

# ウルトラファインバブルの表面への微粒子付着に関する急速凍結レプリカ法による検討

Adhesion of nanoparticles on surfaces of ultrafine bubbles observed by quick-freezing replica electron microscopy.

川崎一則(AIST), 川崎隆史(AIST), 小林秀彰(IDEA), 前田重雄(IDEA), 西原一寛(IDEA), 藤田俊弘(IDEA),

安井久一(AIST), 綾 信博(AIST)

KAWASAKI Kazunori, KAWASAKI Takashi, NISHIHARA Ikkan, KOBAYASHI Hideaki, MAEDA Shigeo, FUJITA Toshihiro, YASUI Kyuichi, AYA Nobuhiro

**Abstract** To examine adhesion of nanoparticles on fine bubbles, image processing and analysis methods were discussed using quick-freezing-replica electron microscopy. Original grayscale TEM images including both ultra-fine bubbles and nanoparticles were converted to pseudo-color images by mapping each intensity value to a color according to a color-table. The image processing facilitated to discriminated nanoparticles from ultra-fine bubbles in TEM images. A line-plot analysis and a region-of-interest analysis of TEM images were also tested to quantitatively discriminate nanoparticles from ultra-fine bubbles.

**Keywords:** Ultrafine bubbles, Electron microscopy, Freeze fracture

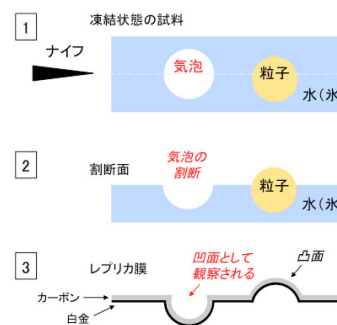
## 1. 急速凍結レプリカ法によるファインバブルと微粒子の電子顕微鏡観察

水中に浮遊するファインバブルの形状を直接的に観察が可能な技術として、凍結技法による電子顕微鏡観察が有望である[1,2]。ファインバブルを含む試料水を凍結してから、凍結水の内部のファインバブルの観察を実施する。例えば、急速凍結レプリカ法の観察で用いられるメタルコンタクト法という凍結方法[3]では、液体ヘリウムで冷却した純銅ブロックに接触されることによって水が3ミリ秒以内に非氷晶条件で凍結し、ファインバブルの形状がそのまま保たれて凍結されると期待される。この凍結試料をフリーゼレプリカ装置の真空チャンバー内にある冷却ステージの上に設置し、冷却ナイフで切断する。次に、切断で露出した氷の面に白金を蒸着することによって、白金薄膜のコートを作製して切断面の形状を型取りし、さらにその上をカーボンの薄膜でコートして補強を行う。ファインバブルは氷の切断面では凹みとして白金レプリカ膜に型取りされ、その様子はレプリカ膜を電子顕微鏡で観察することによって把握することができる (Fig. 1)。

一方、水の中にファインバブルと同程度の大きさの微粒子が存在していた場合、微粒子の形状もレプリカ膜に型取りされ電子顕微鏡で観察される。微粒子が凍結切断の際に面上に残るとすると、レプリカ膜では凸部として表れることになる (Fig. 1)。白金レプリカ膜の凸部では、白金の蒸着の厚さが厚くなるので、周囲の部分より電子顕微鏡での信号強度が強く、画像のコントラストが高くなる。反対に、白金レプリカ膜の凹部では、白金の蒸着が周囲の部分より薄くなり、電子顕微鏡での信号強度は弱く、画像のコントラストが低くなる。つまり、写真の上で「凸部は明るく鮮明」で、「凹部は暗く不鮮明」な見え方になる。

このような基本事項に則っていれば、ファインバブルのレプリカ法電子顕微鏡観察において、ファインバブルに混入した微粒子、あるいはファインバブルに吸着した微粒子をファインバブルと識別して観察することに役立つと考えられる。しかしながら、実際には、レプリカ観察の上で周囲よりも明るく鮮明な画像部分を(凸部と思われる部分を)、ファインバブルであると誤って解釈しているケースに遭遇することがある。目で見た形状が丸いからファインバブル

であろうと、写真の印象に頼った解釈がなされてしまうことがある。その画像の信号強度やコントラストという計測可能な情報から、ファインバブルや微粒子を識別し得るという事実が見過されている。



**Fig. 1** A schematic drawing of concave faces representing fine bubbles and convex faces representing nanoparticles on freeze-fracture replicas.

そこで、ここではウルトラファインバブルのレプリカ法で撮影した電子顕微鏡画像の上で、注目する部分が凹部であるか凸部であるかを、画像の信号強度によってより客観的に識別する方法を考案した。微粒子の像をバブルの像であると誤って解釈してしまうリスクを軽減する指針となり得るものと期待する。

## 2. 氷晶凍結と非氷晶凍結

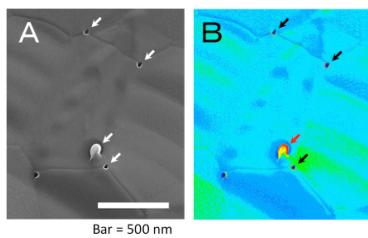
液体ヘリウムと純銅ブロックを用いたメタルコンタクト法による急速凍結法では、試料水の非氷晶凍結が可能である。非氷晶凍結が生じた部分で、レプリカ膜から観察されるウルトラファインバブルは円形である。一方、同じレプリカ膜の上でも部分によっては、氷晶形成を伴って凍結した様子も観察され、ウルトラファインバブルは円形ではなく、氷晶の粒界の影響によって歪んだ形状となって観察される。凍結に伴ってウルトラファインバブルは氷晶から排除されて粒界には集められ、粒界にはより多くのウルトラファインバブルが観察される傾向がある[4]。近接した複数のウルトラファインバブルを1枚の画像の中で示すことができるため、以降では (Fig. 2-4) 粒界線上で観察され

たウルトラファインバブルの像を用いて検討を行う。

### 3. 擬似カラー表示によるファインバブルの識別

Fig. 2A のように、急速凍結レプリカ法電子顕微鏡観察による1枚の画像の中に、ウルトラファインバブルと微粒子が同時に撮影されている場合、ウルトラファインバブルの領域は凹部で周囲より暗く（黒く）、微粒子の領域は凸部で周囲より明るく（白く）見える。しかし、黒白の違いだけから凹と凸の識別をしようとした際には、画像に表れている形状の印象によって、あるいは、見る人ごとの感じ方によって、黒白と凹凸の関係性が不明確になる場合や、あるいは、逆転してしまう場合もあり得る。

画像の領域ごとの輝度をわかりやすく表現する方法として、擬似カラー表示が有用である。画像処理・解析ソフトウェアのImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/index.html>) を用いて、Fig. 2A の画像の輝度分布をカラーコード表示に変換したものが Fig. 2B である。輝度の低い画素を示す紺色から輝度の高い画素を示す黄色/赤色まで、画像上の個々の画素を段階的に異なる色で表示している。この変換によって、Fig. 2B における凹部の領域は紺色に表示され、凸部は黄色/赤色に表示され、両者を色調の違いによって識別が可能となる。紺色に表示された凹部はウルトラファインバブルの存在を示し、黄色/赤色に表示された凸部は試料水中に偶発的に混入した微粒子の存在を示す、という画像の解釈が容易となる。電子顕微鏡画像中において、ファインバブルを識別する方法として利用できる。



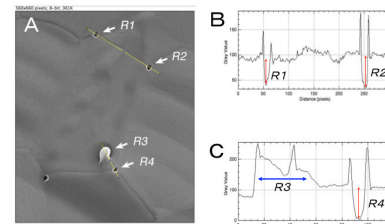
**Fig. 2** A) A representative grayscale TEM image of freeze-fracture-replica of ultra-fine bubbles and a coexisting nanoparticle. B) A pseudo-color image derived from the image in A by mapping each intensity value to a color with a color-table in imageJ software.

### 4. 画像領域における輝度のラインプロット解析によるファインバブルの識別

画像上でファインバブルをより客観的に識別する方法として、画像の黒白の度合いを数値化することも考えられる。電子顕微鏡画像の中で暗い（黒い）画素は輝度の値が小さく、明るい（白い）画素は輝度の値が大きい。ソフトウェア ImageJ を用いて、Fig. 3A に示したように関心を持つ領域 R1、R2、R3、R4 を設定し、それぞれの領域を横断するライン上の輝度を計測した。各関心領域は、ソフトウェアの円形ツールによって、凹部あるいは凸部の輪郭帯より内側に入る直径を用いて設定した。R1 と R2 を横断するライン上の輝度分布を Fig. 3B に示し、R3 と R4 を横断するライン上の輝度分布を Fig. 3C に示す。R1、R2、R4 の3領域については、中央部の輝度が周囲の輝度レベルよりも低い値まで低下しており、凹部のプロファイルを示していることが定量的に示された。

一方、R3 の領域では、中央部の輝度が周囲の輝度レベルよりも常に高く、凸部のプロファイルを示していることが示された。凹部のプロファイルが求められた R1、R2、

R4 はウルトラファインバブルの存在を示し、凸部のプロファイルが求められた R3 は試料に偶発的に混入した微粒子の存在を示す、という画像解釈ができる。画像領域における輝度のラインプロット解析は、電子顕微鏡画像におい

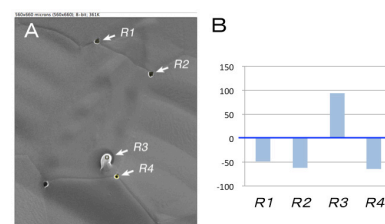


てファインバブルの識別を行う方法として利用できる。

**Fig. 3** A) The identical freeze-fracture-replica image with Fig. 2A. B, C) Line plot analysis of regions R1, R2, R3, and R4 in A.

### 5. 画像領域の平均輝度の解析によるファインバブルの識別

画像上でファインバブルをより客観的に識別するもう一つの方法として、画像領域の平均輝度を計測して利用することを考案した。ソフトウェア ImageJ を用いて、Fig. 4A に示したように関心を持つ領域 R1、R2、R3、R4 を設定し、それぞれの領域内部の平均輝度を計測した。各関心領域は、ソフトウェアの円形ツールによって、凹部あるいは凸部の輪郭帯より内側に入る直径を用いて設定した。



**Fig. 4** A) The identical freeze-fracture-replica image with Fig. 2A. B, C) Analysis of averaged intensity within regions R1, R2, R3, and R4.

R1 から R4 までの関心領域の平均輝度を Fig. 4B に示す。画像全体の平均輝度を差し引いた値で示したため、画像全体平均より輝度の小さな領域はマイナスの値となり、画像全体平均より輝度の大きな領域はプラスの値となる。R1、R2、R4 の3領域については、それぞれの平均輝度が画像全体の平均輝度より小さく（マイナス）、これらの領域が凹部であることが判る。一方、R3 の領域での平均輝度は、画像全体の平均輝度より大きく（プラス）、この領域が凸部であることが判る。マイナスの値が算出された凹部はウルトラファインバブルの存在を示し、プラスの値が算出された凸部は試料に混入した微粒子の存在を示す、という画像解釈ができる。ファインバブルの識別を、電子顕微鏡画像に含まれる数値データに基づいて行う方法として、利用できる。

### 参考文献

- [1] Uchida, T. et al., *Nanoscale Res. Lett.* Vol. 6, 295 (2011).
- [2] Uchida, T. et al., *Nanomaterials* Vol. 6, 31 (2016).
- [3] Heuser, J.E. *J. Mol. Biol.* Vol. 169, 155-195 (1983).
- [4] 川崎一則ほか, 混相流シンポジウム 2015 講演論文集, E114 (2015).