

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：13601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24655101

研究課題名(和文)透過型電子顕微鏡観察のための新しい染色法の開発とその有用性の実証

研究課題名(英文)Development of new stain method for transmission electron microscope and demonstration of the usefulness

研究代表者

英 謙二 (Hanabusa, Kenji)

信州大学・総合工学系研究科・教授

研究者番号：60126696

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,400,000円、(間接経費) 420,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、透過型電子顕微鏡(TEM)観察のための新しい染色法としてポリシロキサンに着目しその有用性を実証することを目的にした。これまではTEM観察の試料を作るとき高コントラストを出すために高価できわめて毒性の高い酸化オスmium(Ⅷ)が一般的に広く使われてきた。本研究で提案した新しい染色法では、酸化オスmiumの代替品として安価で安全性の高いポリシロキサンが非常に有用であることを実証した。高沸点のシロキサンであれば高分子量のポリシロキサンである必要はなく、低分子量のシロキサンやオリゴシロキサンでも良好な染色が得られた。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to prove the usefulness of polysiloxanes as a new stain for transmission electron microscope. Thus far osmium (VIII) oxide, which is very expensive and extremely harmful, has been used for the stain in transmission electron microscope observation. We proved that polysiloxanes have useful potential as stain instead of osmium (VIII) oxide. Polysiloxanes are characterized by being cheap, commercial available, and innocuous. Polysiloxane having high molecular weight is not necessarily effective for staining. In fact, low molecular weight siloxanes having high boiling point and oligosiloxanes also show effective staining for transmission electron microscope.

研究分野：高分子化学

科研費の分科・細目：非共有結合高分子

キーワード：透過型電子顕微鏡 染色法 ポリシロキサン

1. 研究開始当初の背景

申請者は約20年前から、ゲル化剤の開発を研究テーマとしてきた(申請者のゲル化剤に関する第1報は1993年のChem. Commun.)。ゲル化剤を溶媒中で加熱すると溶けて均一溶液となる。これを冷やすとゲル化する。これがゲル化剤による物理ゲル化の現象である。ゲル化は2次元的な配列で繊維状の会合体が形成されるために惹起され、原動力は共に水素結合やファンデルワールス力などの非共有結合的相互作用である。この繊維状会合体はTEMやSEMにより観察することができる。このような研究背景の下、申請者は次なるテーマとしてポリマー型ゲル化剤の研究を行なった。開発したポリシロキサン型ゲル化剤の集合体をTEM観察したところ、酸化オスミウム(VIII)染色をしなくても良好なコントラストの会合体像が観察されることを偶然見つけた。さらに、これまで酸化オスミウム(VIII)染色ではよいコントラストが得られない会合体に他のポリジメチルシロキサンの希薄溶液を滴下すると明確な像が観察される場合のあることがわかった。すなわち、各種のポリジメチルシロキサンの滴下は酸化オスミウム(VIII)に代わる新しい染色法になる可能性があることを偶然見つけた。

2. 研究の目的

本研究の目的はTEM観察のための新しい染色法の開発である。これまではTEM観察のためには高価できわめて毒性の高い酸化オスミウム(VIII)が広く使われてきたが、本研究で提案する安価で安全性の高い軽金属含有ポリマーを使う染色法が普遍的な方法として認められるようになれば、その学術的意義は大きい。酸化オスミウム(VIII)に代わる染色剤としての各種ポリシロキサンやチタン含有ポリマーの有用性を明らかにする。また、SiやTi含有ポリマーが染色剤として作用する機構を解明する。染色剤としての最適構造を明らかにする。

透過型電子顕微鏡観察では、電子を散乱させる重原子が有効(必要)とされる。以前は酢酸ウラニル水溶液をグリッドに滴下し試料をネガティブ染色した。最近では放射性のある酢酸ウラニルを使う研究者はいない。現在主流の方法は酸化オスミウム(VIII)を使う方法である。酸化オスミウム(VIII)は昇華性があるため、グリッド上の試料に付着し染色する。しかし、酸化オスミウム(VIII)は11,500円/gと高価であり、何よりも毒性が強(毒物扱い)昇華性のため、その使用はドラフト内で厳重な管理の下で行なわないといけない。さらに、原子番号76のオスミウムは重原子であるため原子半径が大きく(1.336Å)、観察する像は付着したオスミウムによって実物の会合体よりかなり大きなものになってしまう。

本研究は、原子番号14のSiや原子番号22のTiのような軽原子でも多数集まれば電

子を散乱するという斬新なアイデアに基づくものである。高価で毒性の高い酸化オスミウム(VIII)に替えて安価で安全なポリシロキサンを染色剤に使うというこの新しい染色法の提案は筆者のゲル化剤の研究で偶然に見つけたものであり、独創性がある。本研究で提案する染色法が様々な試料に適用できるような普遍的なものであれば、酸化オスミウム(VIII)に代わる新規な染色法になる。また、ポリシロキサンは多種多様で様々な構造のものが安価に入手可能である

3. 研究の方法

本研究の染色剤として扱うポリシロキサンはいずれも安価に市販されているものを対象とする。TEM観察の対象となる会合体として、ゲル化剤、増粘剤、ベシクル、二分子膜、ミセル、逆ミセルである。ゲル化剤と増粘剤については筆者が長年研究してきた物質であり、多数の化合物を所有している。ベシクルや二分子膜を形成する物質は市販されている代表的なものを使う。ミセルや逆ミセルについても代表的なものを研究対象とする。官能基の異なる市販のポリシロキサンを使用し、様々な溶媒中で染色を行う。これら試料のTEM観察を行い、染色効果の違いを比較することで、最適なポリシロキサンと溶媒の組み合わせについて検討する。さらにポリシロキサン及び溶媒の誘電率を測定し、これらの極性と染色効果についても検討する。また分子量や構造の異なるポリシロキサン(ケイ素化合物)によって染色を行い、これら試料のTEM観察を行う。そして分子量、構造の違いによる染色効果の比較を行う。Si化合物によって染色した試料について走査型顕微鏡観察(SEM)、原子間力顕微鏡(AFM)、共焦点走査型レーザー顕微鏡(CLSM)を用いて観察を行う。この形態観察から染色機構を検討する。またSEM観察やTEM観察を行う際、エネルギー分散型蛍光X線分光法(EDX)を用いて、元素分析または元素マッピングを行ってSiやTi原子の濃縮位置を特定し染色機構を明白にする。

4. 研究成果

ゲル化剤の溶液にポリシロキサンを混合することでポリシロキサンによる染色を行った。そのサンプルと酸化オスミウム(VIII)によって染色したサンプルのTEM観察を行い、染色効果を比較した。また、ゲル化剤やシロキサンを変化させたサンプルのTEM観察やSEM観察を行い、シロキサンによる染色の効果の違いを比較した。実験に使用したゲル化剤G1、G2およびシロキサンS1、S2の構造をFig. 1に示す。

ポリシロキサンS1によって染色を行ったゲル化剤G1(G1-stained-S1)のTEM写真をFig. 2(a)に示す。比較として四酸化オスミウムによって染色したゲル化剤G1(G1-stained-OsO₄)のTEM写真をFig. 2(b)

に示す。Fig. 2 (a)から、幅約 10nm の繊維が無数に集まり束になった繊維状会合体(幅約 40-200 nm)が観察された。また、Fig. 2 (b)からは幅 10-200 nm の繊維状会合体が観察された。Fig. 2 (a)では束状の繊維状会合体中に無数の細い繊維が観察されたが、Fig. 2 (b)からは観察されなかったことから、ポリシロキサンによる染色の方がより細部の構造まで観察できると考えられる。また、ポリシロキサン染色を行ったサンプルでは周りが黒く、中心が白い像が観察された。これはポリシロキサンを染色剤に使った時にみられる特徴である。ポリシロキサンによる染色では、細部構造が観察でき、安全性も高い。これよりこの染色法が有用であると示唆される。

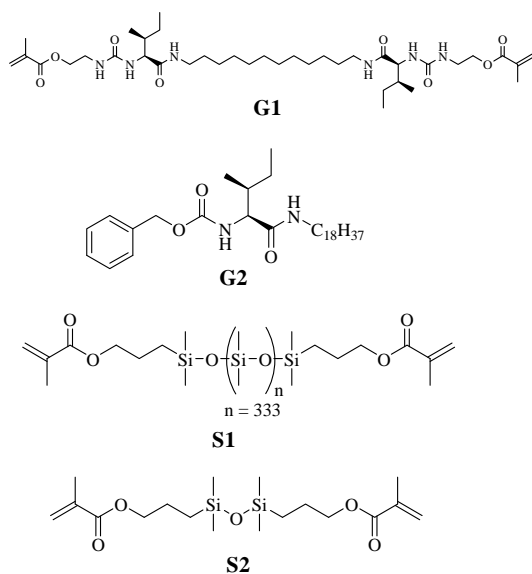


Fig. 1 Chemical structures of gelators G1, G2 and siloxanes S1, S2

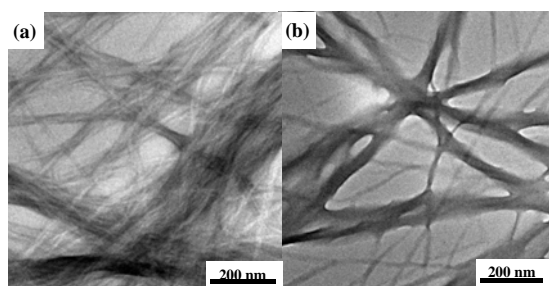


Fig. 2 TEM images of (a) G1-stained-S1 and (b) G1-stained-OsO₄

シロキサン S2 によって染色したゲル化剤 G1 (G1-stained-S2)の TEM 写真を Fig. 3 (a) に示す。この写真から、シロキサン染色特有の周りが黒く、中心が白い繊維の像が観察されなかった。S1 に比べて S2 は、分子量が低いシロキサンである。分子量の低いシロキサンはサンプル調製中に揮発してしまうと考えられる。そのため、分子量の低いシロキサ

ンでは染色効果が観られないと考えられる。

また、ポリシロキサン S1 によって染色したゲル化剤 G2 (G2-stained-S1)の TEM 写真を Fig. 3 (b)に示す。この写真から、ポリシロキサン染色による特有の TEM 像が観察された。異なるゲル化剤を使用したサンプルからもポリシロキサン染色の効果が観られたことから、種々のゲル化剤に対してこの染色法が有用であると考えられる。

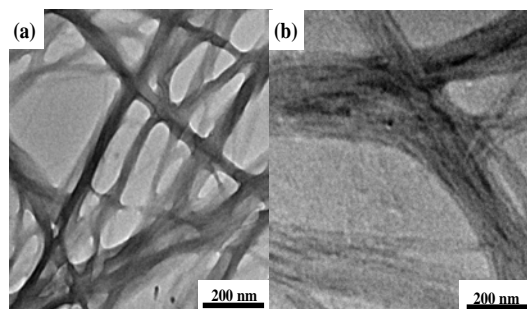


Fig.3 . TEM images of (a) G1-stained-S2 and (b) G1-stained-S2

ゲル化剤 G2 によるシクロヘキサゲルから調製したキセロゲル (Xerogel-G2)の SEM 写真を Fig. 4 (a)に示す。またポリシロキサン S1 を含んだ G2 によるシクロヘキサゲルのキセロゲル (Xerogel-G2 and S1)の SEM 写真を Fig. 4 (b)に示す。Fig. 4 (a)から幅 60-110 nm の繊維が観察され、また Fig. 4 (b)から幅 160-260 nm の繊維が観察された。繊維の太さを比較すると、ポリシロキサン S1 を含んだキセロゲルの方が太い。これは繊維状会合体の周りにシロキサンが付着したため繊維が太くなったためと考えられる。

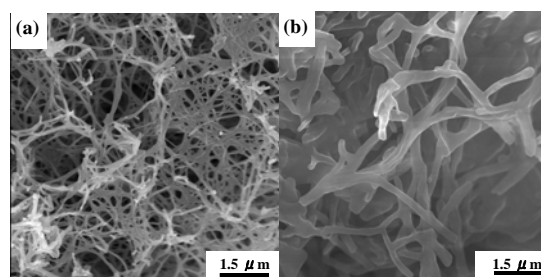


Fig. 4. SEM images of (a) Xerogel-G2 and (b) Xerogel-G2 and S1

また、ポリシロキサン S1 を含んだ G2 によるシクロヘキサゲルのキセロゲル (Xerogel-G2 and S1) について EDS 測定及び元素マッピングを行った。その結果を Fig. 5 に示す。EDS 測定の結果 (Figure (a))から、ケイ素のピークが観測された。また元素マッピングの結果 (Figure (c))から、繊維状会合体上にケイ素が存在することがわかった。これらの結果から、ポリシロキサンが繊維状会

合体の周りに付着していることがわかった。以上の結果から、ポリシロキサンが繊維状会合体に付着し、ケイ素によって電子線が反射されるため、明瞭な TEM 像が観察されると考えられる。

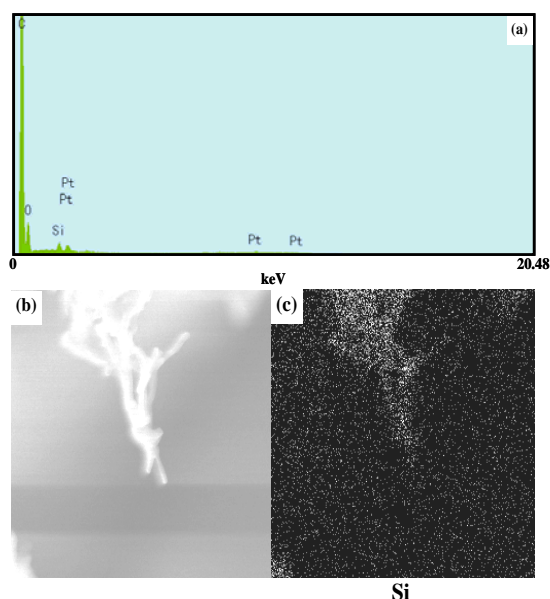


Fig. 5. (a) EDS profile, (b) SEM image, and (c) element mapping of Xerogel-G2 and S1

本研究で得られた知見を以下に示す。

(1)ポリシロキサンによって染色したゲルのサンプルから、ゲルファイバーの中心が白く、周りが黒い特有の像が観察された。この方法で調製したサンプルは像が明瞭であり、四酸化オスミウムなどの酸化剤に比べて人体に影響が少なく、またサンプル作製時間も短い。よってポリシロキサンによる染色法は安全性、利便性が高く有用な方法であることがわかった。

(2)ポリシロキサンによる染色で、様々な低分子ゲル化剤の像を観察することができた。これよりこの染色法が多くゲル化剤に使用できると考えられる。またこの染色法では繊維状会合体の細部構造も観察することができた。

(3)このシロキサンによる染色法では、シロキサンの分子量が 1000 以上は必要であることがわかった。シロキサンの分子量が低い場合、揮発が高く、減圧乾燥中に蒸発してしまうためシロキサンによる染色効果が得られないと考えられる。また揮発性の高い試薬を使用すると、TEM 鏡内の汚染が問題となるため、揮発性の低いポリシロキサンを染色剤として使用するべきであると考えられる。

(4)ポリシロキサンを染色剤として使用したサンプルでは、ゲルのファイバー付近に多くのシロキサンが存在することがわかった。また、シロキサンはゲルファイバーの内部ではなく、周りに付着するように存在すると示唆される。

(5)FT-IR の結果から、ポリシロキサンが会

合体形成に影響を及ぼさないことがわかった。四酸化オスミウムや四酸化ルテニウムは酸化剤であり、それぞれ被染色体の二重結合や非晶質の部分を染色することが知られている。FT-IR の結果から、ポリシロキサンは他の染色剤に見られるような化学的反応は起こらないと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

- 1) 英謙二、 “オイルゲル化剤に関する最近の動向” 高分子、査読無、63 巻、2014、180-184
- 2) H. Hoshizawa, Y. Minemura, K. Yoshikawa, M. Suzuki, K. Hanabusa: Thixotropic Hydrogelators Based on a Cyclo(dipeptide) Derivative: *Langumir* 査読有、29, 2013, 14666-14673
DOI: 10.1021/la40233h
- 3) 英謙二、 “オイルゲル化剤の最近の展望と応用” オレオサイエンス、査読無、13 巻、2013、67-72

[学会発表] (計 2 件)

(1) 英謙二・中島正志・池田義隆・鈴木正浩、“ポリシロキサンを用いた新規染色法によるゲルの TEM 観察” 平成 25 年度繊維学会年次大会予稿集、2F10、2013

(2) 英謙二、“低分子化合物によるゲル化機構の解明とゲル化剤の開発に関する研究” 日本学会中部地区会議学術講演会 (信州大学理学部)、2013 年 7 月 17 日

[その他]

ホームページ等

<http://fiber.shinshu-u.ac.jp/hanabusasuzuki/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

英謙二 (HANABUSA Kenji)

信州大学・総合工学系研究科・教授

研究者番号：60126696