

透過電顕試料作製法・シャドウイングを利用した 糖-酸化鉄複合ナノ粒子の形態観察

三重大学工学部・工学研究科技術部

中村昇二

shoji@mach.mie-u.ac.jp

1. はじめに

現在、著者が所属する研究室においてドラッグデリバリーといわれる人体内での薬物分布を目的とした糖-酸化鉄複合ナノ微粒子（以下、試料という）の研究を行っている。作製された試料の材料特性は原子吸光・VSM（振動試料型磁力計）及び物理的サイズはDLS（動的光散乱高度計）を用いて粒子径・粒子径分布の測定を行っている。試料の形態観察に関しては、コア部分（磁性体）のみは透過電子顕微鏡（以下、TEM という）で行っていたが、糖皮膜の部位は電子線が透過してしまうことから TEM 観察は不可と諦めていた。そこで、本報告では TEM 試料作製法であるシャドウイング法（ヒト細胞・ウイルス等の形態観察用試料作製等）に着目し、本試料にも応用可能と考え試行することとした。

2. 糖-酸化鉄複合ナノ粒子

ドラッグデリバリーを目的とした本試料は、マグネタイト (Fe_3O_4) をコア材としてその表面を各種の高分子多糖（本報告では、Sample-P・Sample-C・Sample-H と表示する）で皮膜したものである。図 1 に試料のイメージ図を示す。試料はそれぞれ個々の磁性を有しており、DLS での計測から予想される試料の径は被膜高分子多糖および作製工程によっても違うが、約 100 ~ 400 nm と想像されている。DLS から計測された径は、あくまで動的光散乱理論から導きだされた値であり実際の糖皮膜磁性微粒子の形状を報告された例は学会・研究会等を含め事例が無い。これらをふまえ、本試料の研究をより進めるために実像・形態を捉えることは大いに有意義である。図 2 に DLS による粒径分布結果を示す。

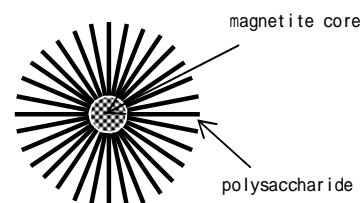


Fig.1 The mode of Magnetic Fluid

3. シャドウイング法とは

シャドウイング法は、広い意味での真空蒸着法の一つであり電子顕微鏡試料作製技術として完成されている。例えば、ウイルスや細胞小器官及び DNA 分子などの微細な粒状試料の軽元素から構成されているものを観察するための方法である⁽¹⁾。通常、これらの試料に入射した電子線の散乱は微弱であるため、TEM の分解能は十分であっても観察に必要な像コントラストが得られないことがある。そこで、単に試料へ電子線散乱を増幅させ形態を観る方法がシャドウイング法である。

実際の方法としては、真空中で試料の上から重金属を蒸発させ、金属蒸気の粒子が直進するという特性を生かして試料表面に堆積させるものである⁽²⁾。

4. シャドウイング法の応用

図 3 にサンプル管瓶に入った試料を示す。本試料は蒸留水中にコロイド粒子として分散している状態で保管されている。シャドウイングを行うまでの試料準備であるが通常、銅製の TEM 用グリッドメッシュ（以下、メッシュという）上に試料を固定する必要がある。試料をスポイトでホルムバル膜貼付け

Sample name	DLS [nm]
Sample P	300 400
Sample C	100
Sample - H	200 - 300

Fig.2 The particle size list of the sample by DLS(dynamic light scattering)

メッシュ(手作り)上に適量を滴下し、自然乾燥させる。従来までは、コロジオン膜貼付けメッシュを主に用いていたが、ホルムバル膜は厚みがあり丈夫でメッシュ作製も簡単であることから使用に至った。比較のために、この軽元素からなる糖皮膜という特性(電子線透過散乱で透過)から観察された本試料のコア部分である Fe_3O_4 のみの TEM 写真を図 4 に示す。



Fig.3 The sample-C in the sample pot

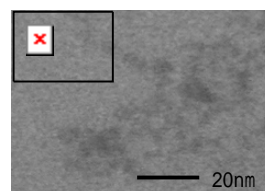


Fig.4 The distribution of core particles

前記の要領でメッシュ上に試料を固定し、以下の手順でシャドウイングを行う。図 5 に今回用いた蒸着装置(日本電子製 JSS-SS)を示す。最終的に、試料表面に堆積させる金属は Pt-Pd (80 : 20) を用いたが、当初は粒状性に優れているということからカーボンで試行を行った。しかし、二次電子発生効率の低さから思い通りの結果(像コントラスト)は得ることが出来なかった。

タングステンフィラメントを作製し、蒸着金属 Pt-Pd 線を巻き付ける
メッシュを試料台に両面テープで固定し、角度を与えベルジャー内に入れる
蒸着装置を可動させ、適切な真空・電圧値に設定し約 20 秒間を 5 回印加する

5 . TEM 透過電顕像と考察

4 においてシャドウイング法により処理された試料の TEM 観察(加速電圧 70 kV、20nA)を行った。処理直後の大気中では、メッシュ上がうっすらと黒くなる程度であるが、TEM 内に挿入し電子線を照射すると普段見慣れているコア部分ではない高分子皮膜らしきものの形態が見事に確認できた。図 6 に観察に用いた本研究室の TEM (日立製 H-500) を示し、図 7 a-f に sample(P)・sample(C)・sample(H)の各皮膜の形態写真を示す。尚、粒子径の測定に関しては、TEM 標準試料 230nm ポリスチレンラテックスパーティクル(応研製)を用いた。

写真から、粒径を計測すると約 80 ~ 200 nm となった。中でも、図 7 b に示される sample(C)に皮膜された超微粒子は、中心付近に黒く点として観られる Fe_3O_4 のコア部分(未蒸着での TEM 写真と同じ)が確認できた。また、図 7 d に粘性が高いとされる高分子皮膜試料の凝集例が観察され、図 7 e には連鎖と言われる高分子皮膜試料がつながった状態と思われる写真を偶然にもとらえることができた。

6 . おわりに

当初、通常の電顕観察では Fe_3O_4 からなるコア部分しかみえないものを最終的に糖皮膜された形態(外径)を観察することができた。TEM のビノクラーを覗きながら皮膜部分を観た瞬間は筆舌にし難い程の感動と興奮を覚え、技術職員冥利に尽きる瞬間であった。元来、ウイルス等の為の生物試料観察技術がこれ程見事に本試料に適合するとは、正直考えもしなかった。しかし、この投影された像の信憑性を何らかの方法で裏付けることは当然のことと考える。また、DLS での試料径との差異を論理付けし真の粒径を求める必要も課題として残されている。

今後、本報告の第 2 弾としてタングステン(シャドウイング)角度を考えた 3 次元(立体)で蒸着を行い、試料の高さ方向の情報を得ることにより材料特性の新たな評価に結びつけば



Fig.5 The vapor deposition device JEE-SS by JEOL



Fig.6 The transmission electron microscope H-500 by hitachi

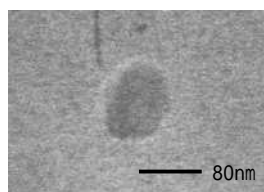


Fig.7a The sample(P) that it was worked to evaporate

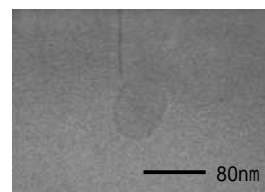


Fig.7b The sample(C) that it was worked to evaporate

と考えている。最後に、本試料作製に用いた日本電子製・真空蒸着装置であるが、本学共同利用センターから廃棄されたものを全てオーバーホールして再利用したものであることを付け加えておく。これもまた技術職員の業務の一つと思っている。

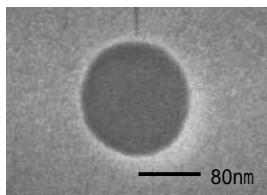


Fig.7c The sample(H) that it was worked to evaporate

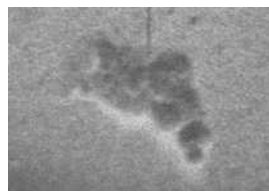


Fig.7d The vapor deposition cohesion example of a treated sample(H)



Fig.7e The chain of a sample(P) worked to evaporate

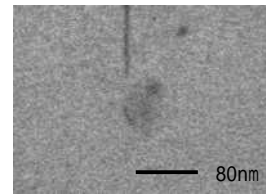


Fig.7f The uneven distribution of the sample(C) core

参考文献

- 1) シャドウイング法とレプリカ法の基礎 松本明著 (株)学会出版センター (1981)
- 2) よくわかる電子顕微鏡技術 平野寛他 朝倉書店 (1993)