



最近の研究と技術

水中に分散化したセルロース・ナノファイバーの 急速凍結ディープエッチ・レプリカ法と HAADF-STEMによる解析

Cellulose Nanofibers in Water Observed by the Quick-Freeze, Deep-Etch Replication and HAADF-STEM

川崎 一則^a, 加藤 智樹^a, 渡邊 愉香^a,
上垣 浩一^a, 原島 謙一^b, 小倉 孝太^b,
林田 稔^b, 石川 一彦^a

Kazunori Kawasaki, Tomoki Kato, Yuka Watanabe, Koichi
Uegaki, Kenichi Harashima, Kota Ogura, Minoru Hayashida
and Kazuhiko Ishikawa

^a産業技術総合研究所セルエンジニアリング研究部門
^b株式会社スギノマシン

要旨 セルロースを産業資源に活用するため、ウォーター
ジェットによる結晶性セルロースの分散化技術を開発し
た。分散状態のセルロースの微細構造を電子顕微鏡によ
り観察、評価した結果、特に、急速凍結ディープエッ
チ・レプリカと高角度環状暗視野走査透過型電子顕微鏡
(HAADF-STEM)、電子線トモグラフィーを組み合わせた
解析から、水中に分散化されたセルロース・ナノファ
イバーのネットワーク形成の様子が明らかになった。

キーワード：セルロース分散化、ウォータージェット、急速凍結
ディープエッチ・レプリカ、HAADF-STEM、電子
線トモグラフィー

1. はじめに

セルロースは地球上のバイオマス（生体高分子）の大部分
を占め、産業資源としての有効利用が期待されている。セル
ロースを分解してそこからグルコースを得ることができれ
ば、エタノール、プロパノール、ブタノール等のアルコール
類やコハク酸等の有機酸を発酵法によって製造する際の原料
として利用することができる。また、バイオマス由来の複
合材料（グリーンコンポジット）の開発においても、ナノレ
ベルで均一に微細化（ナノファイバー化）されたセルロースに
関心が集まっている。しかし、バイオマス中のセルロースは

強固な結晶構造を有するために微細化や酵素分解が困難であ
り、現時点ではまだ利用への技術開発は滞っている。本稿で
はセルロースの微細化のためにウォータージェット技術を応
用した取組みについて紹介し、水中に分散化されたセルロ
ース・ナノファイバーの形状評価において、急速凍結ディ
ープエッチ・レプリカ法を用いた観察用試料作製と HAADF-
STEMによる観察の組み合わせが示す有用性について述べる。

2. ウォータージェットによるセルロースの分散化

ウォータージェットは高圧水を細いノズルから吐出する技
術であり、幅広い産業分野において洗浄や切断の用途のため
に利用されている。株式会社スギノマシンでは最高圧
392 MPa の超高圧水を小径ノズルから噴射し、高速水ジェ
ット（噴流）の運動エネルギーを利用した装置の開発を行って
いる。超高圧ポンプで加圧された超高圧水の噴射スピードは、
音速の3倍にも達し、破壊力のあるジェットが生まれる。こ
のウォータージェットを用いると各種金属、ガラス、セラミッ
ク、樹脂やこれらの複合材料など様々な素材を切断すること
が可能である。切断に用いた場合には高温化を伴うことなく、
また、物体の変形、ひずみ、ひび割れなどの影響が少ないこ
となどがメリットとして評価されている。

また、ウォータージェットは粉体の微細化や分散化の用途
でも注目され、湿式微粒化装置として実用化されている¹⁾。
我々はこの技術をバイオマスの産業資源利用の前処理として
応用するために、その取り組みの一つとしてウォーター
ジェットによるセルロースの微細化技術を開発した。強固な
結晶構造を持つセルロースを工業用原料として活用するた
めには前処理として分解・微細化が必要である。現在は強酸・
超臨界法・メカノケミカル法及びイオン液体を用いた分解・
微細化が行われているが、これらの方法では廃液等による環
境高負荷・高コスト・生産効率の低さなどが課題となる。株
式会社スギノマシンが開発したウォータージェットを用いた
超微細化装置は、水のみを使用して硬質材料を短時間で連続
的に大量に粉砕することが可能な装置である（図1）。酸や
アルカリ等の有害な薬品を一切使用せずに素材を粉砕する
ことが可能であり、これらの特徴はバイオマスの粉砕（前処理）
に非常に適していると考えられる。

セルロースをウォータージェットによって分散化したとき
の変化は、最も容易には、目視で確認することができる。こ
こでは、結晶性セルロースの粉末（「セオラス PH-102」、旭
化成ケミカルズ）を用いてウォータージェット処理を行った
結果を示す（図2）。セルロースは水に難溶性であるため、
セルロース粉末と水を攪拌することによって粉末をいったん
懸濁させても、攪拌を止めると粉末は直ちに試験管の底に沈
んでしまった（図2左）。セルロースの懸濁液をウォーター
ジェット粉砕装置によって処理（処理通過回数10）すると、
試料は半透明でゲル状態の分散液となって粉末の沈降はみら
れなくなり、この分散状態は数ヶ月経過しても維持された
（図2中央）。

^a 〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31
TEL: 072-751-8334; FAX: 072-751-8370
E-mail: kawasaki.k@aist.go.jp
2009年12月16日受付

ウォータージェットによる分散化には、セルロースの酵素による分解性を向上させる効果があった。結晶性セルロース（「セオラス PH-102」, 旭化成ケミカルズ）のウォータージェット処理後（処理通過回数 10）と未処理の試料を、pH 調整条件下（20 mM 酢酸バッファー pH 5.5）、85°C において、耐熱性酵素^{2,3)}（*Pyrococcus horikoshii* 由来の *endoglucanase* と *Pyrococcus furiosus* 由来の β -Glucosidase の共存）と攪拌しながら 24 時間反応させた。反応後の試料液は透明化し（図 2 右）、セルロース繊維の分解が効率よく進んだことが示唆された。加水分解による糖化効率を単糖の定量（ワコー C II グルコース定量キット）によって比較したところ、ウォータージェットで微細化した試料では未処理と比較して約 5 倍の分解効率が得られることが明らかになった。

3. 電子顕微鏡によるセルロース・ナノファイバーの評価方法

結晶性セルロースの懸濁液を半透明のゲルに変化させ、また酵素による分解性を向上させることができたことから、ウォータージェット処理はセルロースの分散化、微細化に有

効な方法であることが実証された。しかし、分散化の際にセルロースはどのような形状に変化しているのだろうか。ウォータージェットによる前処理技術の評価として、分散化したセルロースの微細構造を把握することが重要と考え、電子顕微鏡による観察を実施した。

まず、走査電子顕微鏡（SEM）によって、セルロースにウォータージェット処理前後の形状比較を行った。結晶性セルロース（「KC フロック W-50GK」, 日本製紙ケミカル）を水中に懸濁しただけのコントロールと、ウォータージェット処理（処理通過回数 20）を行った試料のそれぞれを自然乾燥し、得られた粉末を SEM 試料台に貼付した導電性テープ上に塗布し、真空乾燥させた後にオスミウムコート導電処理（プラズママルチコーター, PMC-5000, メイワフォーシス）を施した。図 3 は電界放出型走査電子顕微鏡（S-5000, Hitachi）による観察結果である。未処理のセルロースは径が 10 ~ 30 μm 程度の繊維であり（図 3a）、これを構成するより微細な繊維は隙間なく詰まっていた（図 3b）。一方、ウォータージェット処理後のセルロースでは形状に劇的な変化が生じており、径が 1 μm より細い、すなわち径がナノメートルスケールの微繊維（ナノファイバー）に分散化されている様子が観察された（図 3c）。

セルロースのナノファイバーはウラン染色法と透過電子顕微鏡（TEM）を用いることによって、より高い分解能で観察することができる。図 4 に示したのは、ウォータージェット処理で分散化した結晶性セルロース（「KC フロック W-50GK」, 日本製紙ケミカル）の観察例である。ウォータージェット装置で処理（処理通過回数 10）したセルロース分散液の濃度を水で 0.1 mg/ml 程度に希釈し、コロジオン膜を張った電子顕微鏡グリッド（銅, 400 mesh）に滴下した後、1% 酢酸ウラン水溶液の数滴を試料液の載ったグリッド上に滴下して染色した。グリッド上の液をろ紙で吸い取り自然乾燥させた後、カーボン蒸着して TEM 観察を行った（TecnaiG2F20, FEI, 加速電圧 120 kV）。つまり、ネガティ

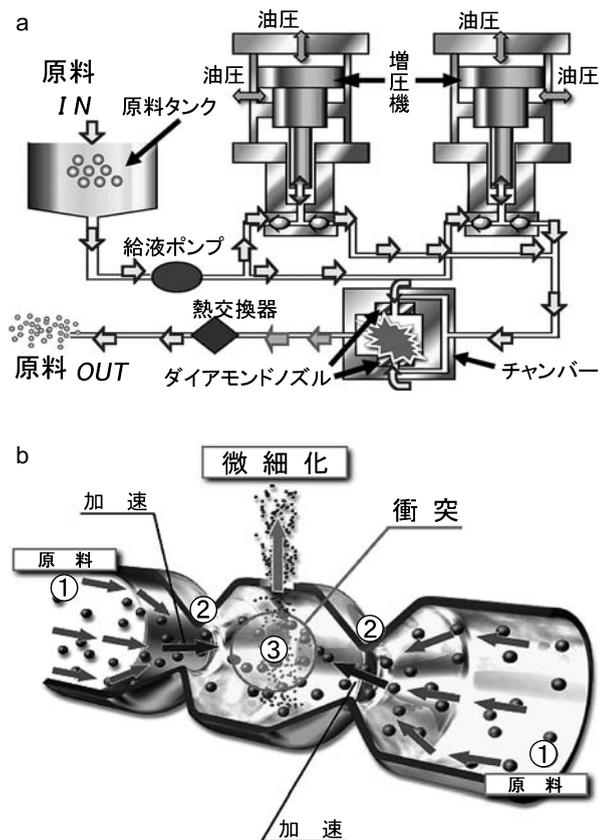


図 1 ウォータージェットによる微細化のメカニズム
a) バイオマス前処理のシステム図. b) ウォータージェット粉碎チャンパーの概念図. 超高圧 (245 MPa) で加圧した原料 (①) を細いノズルから噴出させ (②), チャンパー内で材料どうしを衝突させ微細化を行う (③). 本研究では、この微細化メカニズムを発展させバイオマスの微細化に特化して開発したチャンパーを用いている。

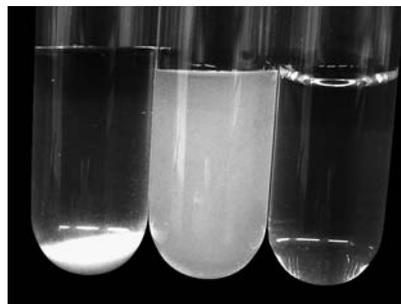


図 2 水中のセルロース
左：未処理のセルロース粉末（「セオラス PH-102」, 旭化成ケミカルズ）は水に加えて混合しても、直ちに試験管の底に沈降した。中央：ウォータージェット処理（処理通過回数 10）した試料は半透明ゲル状態の分散液となり、数ヶ月経過してもセルロースの沈降は生じなかった。右：ウォータージェット処理後のセルロース分散液を酵素（セルラーゼ）によって処理すると、セルロースの分解によって試料液は透明化した。

ブ染色の常法にしたがって試料作製を行ったのだが、結果の像を見るとセルロースがポジティブに染色されている（繊維の部分背景よりも高い電子密度に染まっている）場面が多かったので、ここではネガティブ染色法とはせず、ウラン染色法として記載する。この観察から、セルロースが分散化されてきたナノファイバーは10～30 nm程度の径の細さになっていることが明らかになった。

4. 水中ナノ構造体の評価技術としての急速凍結ディープエッチ・レプリカ法

上のSEM観察およびウラン染色TEM観察において、セルロース・ナノファイバーは互いに絡み合っネットワークを形成しているように見える（図3cおよび図4）。また、SEM像ではナノファイバーの凝集塊も観察される。これらナノファイバー間の相互作用は半透明ゲルの中における状態

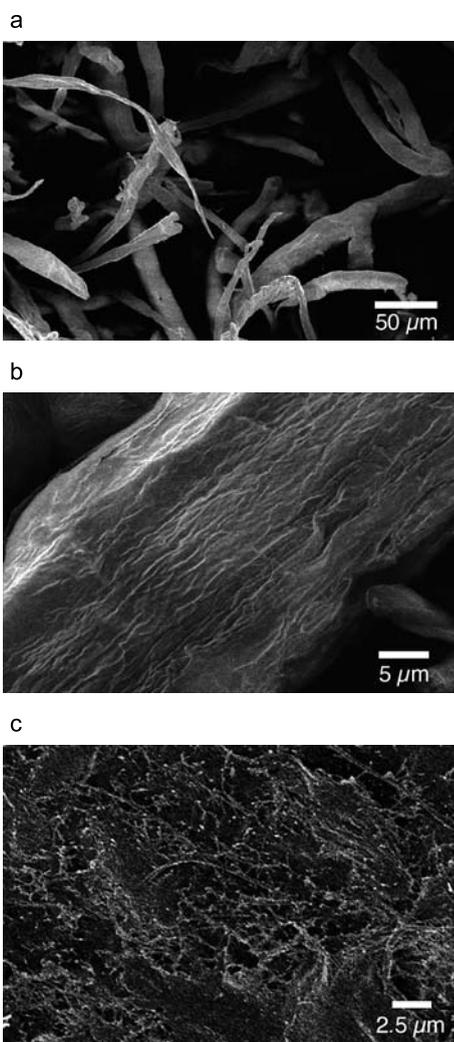


図3 ウォータージェット処理の前後におけるセルロースの走査電子顕微鏡像の比較
a, b) 未処理のセルロース粉末（「KC フロック W-50GK」, 日本製紙ケミカル）。c) ウォータージェット処理（処理通過回数20）したセルロースでは径がナノスケールの微繊維に分散化されていることが確認できた。（a-c:いずれも加速電圧は1.0 kV）。

を反映しているのかもしれないが、しかし、試料作製の際の乾燥によるアーティファクトの可能性もある。そこで我々は、水中のナノファイバーを電子顕微鏡で観察するために、急速凍結ディープエッチ・レプリカ法⁴⁾による試料作製を応用することにした。

まず、結晶性セルロースの懸濁液/分散液を液体ヘリウム冷却によるメタルコンタクト法で急速凍結した。ミリ秒レベルの凍結によって、水中のナノファイバー間相互作用の状態もそのまま無氷晶の氷の中に固定化することができる。次に、凍結試料をフリーズフラクチャー装置（BAF400D, Balzers）の真空チャンバー内（約 -10^{-5} Pa）の冷却試料台に設置して、温度 -90 度にて試料をナイフで切断し、そのまま10分間静置することによって試料を切断面から部分的に凍結乾燥させた。氷の昇華で氷表面が切断時のレベルより低下するので（エッチング）、氷の中に固定化されていたセルロース・ナノファイバーの一部分を氷表面上に露出させることができる。試料を水平面内に回転させながら斜め25度の角度から白金/カーボンを約6.5 nmの厚さで蒸着してレプリカ膜を作製し（ロータリーシャドウイング）、続いて90度の角度からカーボンを約25 nmの厚さで蒸着することで補強を行った。フリーズフラクチャー装置から取り出した試料をリン酸に約1時間浸すことによって、レプリカに付着しているセルロースを除去した後に、コロジオンを張った電子顕微鏡用グリッド（銅、150 mesh）の上にレプリカ膜を回収した。

レプリカの観察は高角度環状暗視野走査透過型電子顕微鏡（HAADF-STEM）によって行った。明視野のTEM観察での結像には散乱吸収コントラスト、回折コントラスト、位相コントラストが含まれるのに対して、HAADF-STEMでは円環状検出器によって高角度の散乱電子を捉えて結像するため回折コントラスト、位相コントラストの影響が少なく、強度が原子番号（Z）の二乗に比例する Z^2 コントラスト（実際には Z^1 と Z^2 の間に比例するコントラスト）による像が得られる⁵⁾。

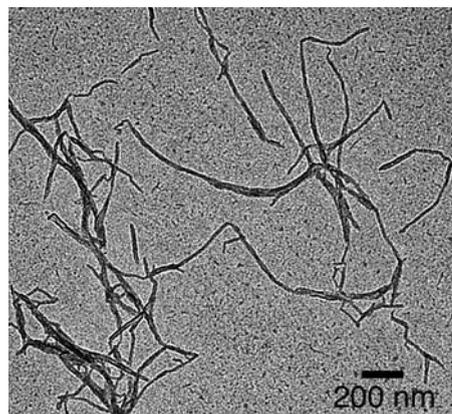


図4 セルロース・ナノファイバーのウラン染色透過電子顕微鏡像
結晶性セルロース（「KC フロック W-50GK」, 日本製紙ケミカル）をウォータージェット処理することによって得られたセルロース・ナノファイバー。

HAADF-STEM をレプリカ観察に用いた際には、レプリカ試料に含まれる白金とカーボンの間の比較において、原子番号の大きな白金からの電子散乱強度がより強く検出されるのに対してカーボンからの画像への寄与はより軽減させることができるので、白金層についてのコントラストの高い画像が取得可能となる。また、STEM ではレンズによる結像を用いず色収差の影響を受けないため、レプリカ膜の白金が厚い部分において非弾性散乱電子が増えてきた状況でも像質の悪化が少ないことが利点となる。

図 5 は、結晶性セルロース（「セオラス PH-102」, 旭化成ケミカルズ）を水中に懸濁した状態のコントロールと、ウォータージェット処理（処理通過回数 10）を行った試料について、急速凍結ディープエッチ・レプリカ像の比較を HAADF-STEM（FEI, TecnaiG2F20, 加速電圧 200 kV, カメラ長 120 mm）によって行った結果である。未処理のコントロールの場合は、周囲の氷の部分だけでなくセルロース粉末も切断され内部の様子を観察することができた。図 5a は径が数十 μm のセルロース粉末に生じた切断面の一部を観察した画像であるが、ナノファイバーが隙間なく充填されている様子が確認できた。一方、ウォータージェット処理による分散液を観察した図 5b では、径が 20 ~ 40 nm 程度のナノファイバーが互いに絡み合ってネットワークを形成している様子が観察されたが、数 μm に及ぶような凝集塊は見いだされなかった。この観察から、セルロースはウォータージェット処理を受けることによって、水中でナノファイバーの緩いネットワークの状態まで微細化、分散化されていることが明らかになった。

5. HAADF-STEM トモグラフィーによるレプリカの三次元像の再構築

ここで作製したレプリカはディープエッチングの深さだけ試料の高さ方向の情報を含んでいるはずなので、レプリカの立体構造が把握できればセルロース・ナノファイバー・ネットワークの三次元構造についての知見が得られると期待される。近年、生物系の研究においても TEM や STEM で電子線トモグラフィーの活用が進んでいる^{6~9)}。そこで我々は、図 5b で観察した水中分散化セルロース・ナノファイバーのレプリカを用いて、HAADF-STEM トモグラフィーによる三次元像の再構築を行った（FEI, TecnaiG2F20, 加速電圧 200 kV, カメラ長 120 mm）。観察倍率 28,000 倍にて試料を ± 70 度内で 1 度ずつ回転させながら連続画像を取得した後、ソフトウェア Inspect3D（FEI）および Avizo5（MCS）を用いて三次元再構築計算と可視化処理を行うことにより取得した（図 6）。図 6a は再構成三次元像を斜め上方から見た像として表示したものである。ナノファイバーのネットワークが xy 平面内だけでなく z 方向にも広がっている様子をうかがい知ることができた。ナノファイバーの間の黒く表示された空間は氷、すなわち水が占めていた空間である。水溶性の酵素分子が効率よくセルロースにアクセスできる状態にあるこ

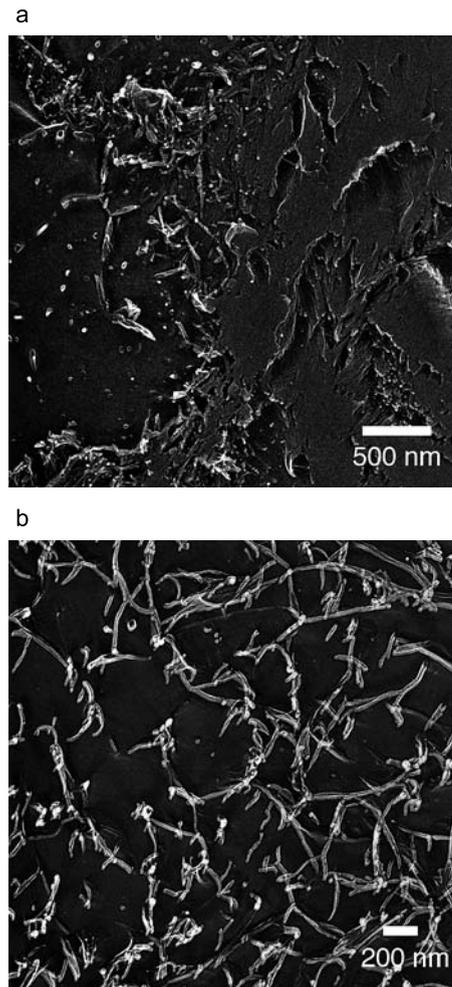


図 5 水中のセルロースの急速凍結ディープエッチ・レプリカ像 HAADF-STEM による観察。a) 未処理の結晶性セルロース粉末（「セオラス PH-102」, 旭化成ケミカルズ）の水への懸濁液。セルロース粉末の切断面が観察できる。b) ウォータージェット処理（処理通過回数 10）したセルロースではナノファイバーのネットワークが観察された。

とが、この三次元像から理解することができる。

レプリカの三次元再構築像は、ナノファイバー・ネットワークについての三次元情報を与えただけでなく、ディープエッチ・レプリカの技術論の上でも有意義な示唆をもたらした。図 6b は再構成三次元像を真横から見た像として表示したものである。ナノファイバーの z 方向の伸展を部分的に観察できることに加えて、ディープエッチングのおおよその深さがこの場合には 180 nm 程度となっていることを観察できたことは興味深い。さらに、一本のナノファイバー（図 6a の矢印）に着目して、xy 方向のスライス像を作成した。図 6c から f はナノファイバーの上方から下方に（白金の蒸着源に近い方から遠い方に）z 方向の高さを下げながら 4 枚のスライス像を表示したものである。上方（図 6c）ではナノファイバーが一本線として見えており、その部分の輝度が大きいことから蒸着された白金の多いことが示唆される。中程の高さ（図 6d, e）ではファイバーの中央の輝度が低く、平行な細

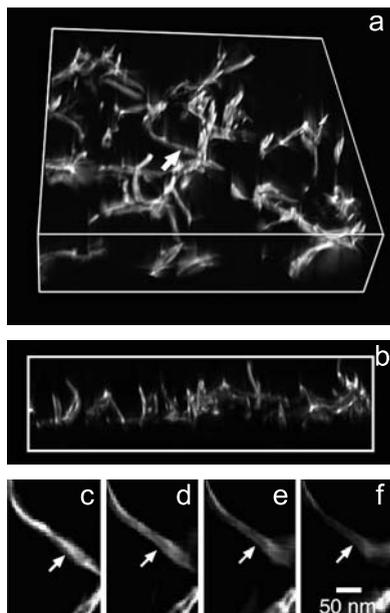


図6 水中のセルロース・ナノファイバーの HAADF-STEM トモグラフィーによる三次元再構築像

図5bのレプリカ試料を用いて HAADF-STEM トモグラフィーによる三次元像の再構築を行った。a) レプリカの斜め上方からの投影図。1,350×1,350×360 nmの空間を再構築した。b) レプリカの真横からの投影図。1,800×450×450 nmの空間を再構築し、真横から見た1,800×450 nmの画像を表示した。縦方向はエッチングの深さ方向にあたる。c-f) 図6aの矢印のナノファイバーの部分を水平面方向(xy方向)のスライス像として表示した。cはレプリカの上部、fはレプリカの下部の再構成スライス画像である。1枚の再構築スライス像の厚さは約1.4 nmで、各スライス像の間隔はc-d間17.3 nm, d-e間10.1 nm, e-f間11.5 nmである。上下方向で白金の蒸着量に勾配のあることがわかる。

い二本線の像として観察され、白金レプリカに空洞があることが示唆される。下方では上方に比べて輝度が小さく白金の存在量が少なくなっていることが示唆される。図6d, eに見られる暗い空洞はセルロース・ナノファイバーそのものが存在していた空間であり、その周囲の輝度は白金レプリカの

形状を表していると考えられる。上方から下方に向かってしだいに白金の散乱強度が低下していることは、レプリカ作製時に白金の蒸着が上方では厚く、下方では薄くなっていることを示唆する。ロータリーシャドウイングでは斜め上方から白金を蒸着しているという前提からすればこれは当然のことではあるが、白金の蒸着が一樣な厚さで起こるわけではないことを今回の HAADF-STEM トモグラフィーの実験結果によって確認することができた。

6. 最後に

急速凍結ディープエッチ・レプリカ法と HAADF-STEM を組み合わせ、さらに電子線トモグラフィーを導入することによって、水中に分散化したセルロースがナノファイバーの三次元的なネットワークを形成していることを明らかにすることができた。ウォータージェットで分散化されたセルロースを「ゲル状態」と表現することの妥当性が、今回の観察によって裏打ちされたことになる。この手法は今後も様々な水中のナノ構造体の形状評価に有力な方法として活用が期待される。

文 献

- 1) 中谷正雄：製剤機械技術研究会誌, 6(1), 26-31 (2007)
- 2) Ando, S., Ishida, H., Kosugi, Y. and Ishikawa, K.: *Appl. Environ. Microbiol.*, 68(1), 430-433 (2002)
- 3) Kim, H. and Ishikawa, K.: *Proteins*, 78(2), 496-500 (2009)
- 4) Heuser, J.: *Methods Cell Biol.*, 22, 97-122 (1981)
- 5) 田中信夫：電子線ナノイメージング 高分解能 TEM と STEM による可視化, 内田老鶴圃 (2009)
- 6) Yakushevskaya, A.E. and Lebbink, M.N.: *J. Struct. Biol.*, 159(3), 381-391 (2007)
- 7) Aoyama, K., Takagi, T., Hirase, A. and Miyazawa, A.: *Ultramicroscopy*, 109(1), 70-80 (2008)
- 8) Morone, N., Nakada, C., Umemura, Y., Usukura, J. and Kusumi, A.: *Methods Cell Biol.*, 88, 207-236 (2008)
- 9) 青山一弘ら：顕微鏡, 特集：STEM の生物応用, 44(4), 240-261 (2009)