

環境制御型電子顕微鏡法による溶液中での NaCl 結晶成長の観察

箕田 弘喜, 清水 俊樹

東京農工大学工学部

概要

原子や分子の結晶化は科学技術, 生物学, 環境などのさまざまな分野で利用されており, その微細なメカニズムを解明することが重要である。近年, 分子動力学シミュレーションを用いて液体中の結晶核生成を原子レベルで解明する研究が進み, 液体中の結晶核生成と結晶化は, 濃度変動による高濃度領域の生成と, その後の高濃度領域の生成という2段階で構成されることが報告されている。空間的な順序付け。しかし, 液体中での結晶成長をその場で, 高空間分解能で観察することは困難であり, 二段階プロセスでの高濃度領域の直接観察は実現されていない。本研究では, この二段階プロセスを確認することを大きな目標としてまずは, NaCl の結晶成長過程をナノメートルスケールで可視化することを目的として研究を行った。電子顕微鏡内で溶液サンプルを保持するために液体セルを使用した。

観察された数ナノメートルの結晶は, 表面での反応により常に形状を変化させていたが, 約 $4 \times 10^4 \text{ e}^-/\text{nm}^2 \cdot \text{s}$ の電子線量で 150 秒間電子照射を行った後でも, 構造は大きく破壊されることはなかった。これは, NaCl 結晶がこの観察条件下で平衡状態にあることを示している。観察された格子縞は(200)または(220)格子面であった。局所的な構造変動により結晶の成長や消失が観察されたが, 比較的大きな結晶粒の縁では(200)の格子縞が長く成長し, 比較的小きな結晶粒の縁では(200)格子面の層数を増加させる成長が観察された。この結果は, NaCl がステップ成長に比べてキンク成長が容易に起こりやすいことを示唆している。

本研究では画像のコントラストを向上させるため, 6 枚の画像の強度を平均した積層画像を用いて解析を行った。いくつかの視野で重ね合わせた画像の枚数を減らして解析を試みたところ, 結晶領域が変化している可能性があることが分かった。今回の解析では結晶領域の面積や境界位置を手作業で求めたが, ノイズが大きく, より客観的な判断が必要であった。したがって, 結晶領域を自動的に特定する自動解析手法の導入が今後の課題である。

1. 研究目的

原子や分子による結晶化は科学技術, 生物学, 環境などの様々な分野において活用されており, その微視的な機構を解明することは重要である^[1, 2]。最近では, 真空下における原子レベルでの結晶核発生の直接的なその場観察も行われ報告されている^[3]。しかし, 真空下における結晶成長と, 自然界で主に見られる液中での結晶析出における結晶成長ではその微視的な成長過程が異なる可能性があるため, 液中における結晶成長のその場観察が必要である。これまでの液中での結晶成長の観察として,

光学顕微鏡を用いた塩化ナトリウム(以下 NaCl)結晶成長の観察が報告されており, μm オーダーでの結晶成長の様子が観察されている^[4, 5]。

また, 原子レベルでの結晶成長についての研究の1つである分子動力学シミュレーションの報告では, 液中での結晶核発生は密度の高いイオン"パッチ"(以下高濃度領域と呼ぶ)をもたらす濃度変動と, それに続く空間的秩序化という2つの連続的なステップで構成されることが, タンパク質などをはじめとする物質で報告された。これは, それまで液中における結晶成長過程において熱力学の観

点から考えられていた 1 段階成長に対して、まったく新しい報告であった^[6]。この微視的な 2 段階ステップで起きる結晶核生成については、様々なタンパク質結晶や NaCl 結晶についてのシミュレーションにおいても同様の結果が報告されている^[7-10]。さらに、光学顕微鏡を用いたタンパク質における直接的な液中での結晶成長の観察により、2 段階ステップにおける高濃度領域がもたらすものが核発生のみではなく、結晶表面における結晶化と溶解も引き起こすことが報告された^[11]。以上の報告はタンパク質結晶におけるシミュレーションを用いた結果と直接観察の相違を提示したが、液中下での結晶成長に関する 2 段階ステップにおける高濃度領域の発生に関しては nm オーダーでの直接的な観察が実現されていないため、液中での成長を nm オーダーで観察することは重要であると考えられる。

上述したように、液中環境下でおきる結晶成長の詳細な情報を得るためには、試料を原子レベルの分解能で観察することが可能な透過型電子顕微鏡法 (TEM 法) を用いることが考えられる。しかし、試料環境が高真空下である一般的な TEM 法では液体試料の観察を実際に行うことは困難であり、これまで様々な試料作製法が考案されてきた^[12]。我々も非晶質炭素膜を用いた独自の液体セルの作製法を開発し、液体試料の観察を実現している^[13]。これらにより、TEM 法での液中における結晶成長の観察が可能となり、液中下の結晶の様子を観察することが実現されている^[14, 15]。しかし、液中下の結晶化を nm オーダーでその場観察することは時間分解能、空間分解能において依然として難易度が高く、現在も分子動力学シミュレーションを用いることによって得られた情報がほとんどであり、直接的なその場観察の例は少なく、特に 2 段階ステップにおける高濃度領域の直接的な観察は実現されていない。

申請者は、大気圧や液中環境下にある試料観察を行うために、環境制御電子顕微鏡法の開発・改良を進めてきており、その中で、活きたタンパク質の ATP 加水分解による構造変化を、電子顕微鏡内のその場観察法を用いて調べた^[16, 17]。これらの研究で確立された液中試料の電子顕微鏡による観察技法を、溶液環境中での NaCl の結晶成長過程の実験的な研究に使用して、その結晶成長の過程をナノスケールで明らかにすることを目的として研究を行う。NaCl は、人体や食品にも含まれる物質で、ヒトの生存には欠かせない材料である。身近な材料であるにも関

わらず、その結晶化の過程の詳細はまだ明らかになっていない。この過程の研究は主に計算機シミュレーションにより行われているが、適切な実験研究手法が無かったために、ナノスケールでの実験的な構造研究は、ほとんど行われていない。本研究ではこれにチャレンジする。

2. 研究方法

2.1 液体セル

本研究では溶液中での結晶成長の様子をナノスケールで観察するために、我々のグループで独自に開発した自作の封じ切タイプの液体セルを用いる^[13]。Fig. 1 に液体セルの模式図を示す。

この方法は、2 枚の非晶質の炭素薄膜で、溶液試料を挟み込んで溶液を封止するというものであるが、特別な試料ホルダーを必要としない構造なので、市販されている電子顕微鏡用の試料ホルダーであれば、この方法で液中試料観察が可能である。我々が開発した液体セルの特徴として 2 枚の炭素膜に間のスペーサーとして自作の穴の開いたプラスチック膜を利用していることが挙げられる。このスペーサーは十分に洗浄したガラス板を冷蔵庫に入れて冷やした後に冷蔵庫から取り出した際にできるガラス板表面の結露を利用することでプラスチック膜に数 μm の穴を作製することがポイントである。穴の中に溶液試料を閉じ込めることで、プラスチック膜がスペーサーとして利用可能となる。

プラスチック膜は、酢酸エチル 10 g に対してトリアホール 0.03 g を溶かしたプラスチック溶液を結露したガラス板を傾けて設置した際にその表面上に滴下し、酢酸エチルが蒸発する際に得られる。トリアホールの濃度や滴下するガラス板の傾きを調整することで、100 nm 程度の膜厚のプラスチック膜、すなわちスペーサーを得ることができる。

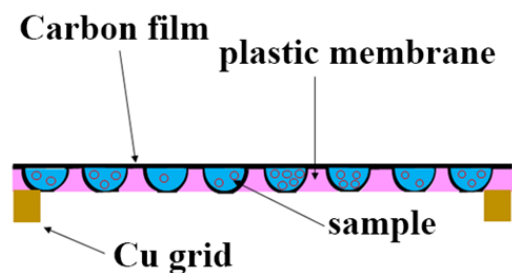


Fig. 1 A schematic drawing of a wetcell

2. 2 NaCl 水溶液のパッキング(封止)

約 2 mm × 2 mm の大きさにカットした下膜用炭素膜を蒸留水の上に浮かべ、親水化処理をした直径 3 mm の穴が多数ある銅グリッドで掬うことでグリッド上に載せて、試料支持用のグリッド(通常下膜と呼ぶ)を準備する。次に、あらかじめ真空蒸着によって作製しておいた平坦な厚さ 10~15 nm の非晶質炭素膜を飽和濃度よりわずかに濃度の薄い NaCl 水溶液の液面に浮かし、プラチナの輪を用いて浮いている炭素膜を NaCl 溶液と共に掬いあげ、下膜を載せた銅グリッド上に落とすことで NaCl 溶液を上下 2 つの膜の間に封入した。上下の膜はいずれも非晶質なので、結晶性の試料の格子縞の観察の大きな妨げになることはない。

3. 研究結果と考察

3. 1 結晶方位

前節で説明したように準備した液体セルを用いて試料を電子顕微鏡内に導入したところ、結晶領域に対応すると思われる格子縞を観察することができた(Fig. 2)。2.2 節でも述べたように、試料溶液は飽和濃度よりわずかに低い濃度で、これを冷却することで、NaCl を結晶化させることを想定して実験を行ったが、冷却前の段階で結晶領域が観察されたのでは、試料溶液をパッキングする過程か、あるいはパッキング後、電子顕微鏡の高真空の鏡筒内に導入した際にわずかな水の蒸発により濃度が高くなって飽和濃度を越えたことによるものと考えている。

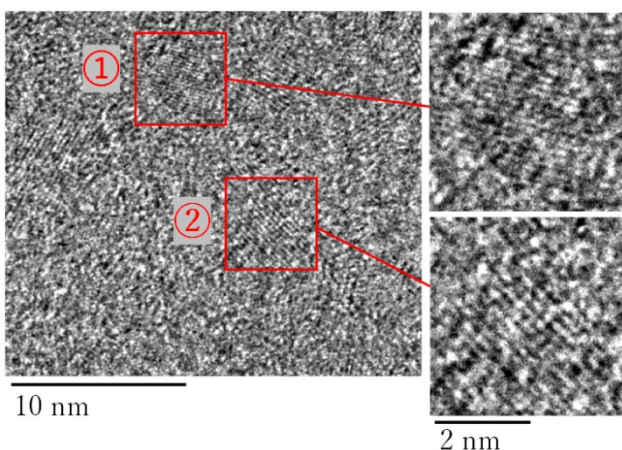


Fig. 2 TEM images of NaCl microcrystals. Lattice fringes derived from NaCl crystals are visible. The spacing between the lattice fringes in regions ① and ② is 1.99 Å and 2.75 Å, respectively, which correspond to the lattice spacing of the (220) and (200) planes of NaCl.

結晶構造の観察時に電子線照射による試料破壊をなるべく避けるために、試料への電子線照射密度は、 $80 \text{ e}^-/\text{nm}^2/\text{s}$ 以下に設定しており、比較的高倍率での電子顕微鏡観察の条件としては、低照射条件となっている。電子線照射密度が低く、かつ液体セルの試料の上下の炭素膜やセル内の水分子の散乱の影響で試料自身のコントラストは低くなることが予想されるが、格子縞が見えている。Fig. 2 では、これらの格子縞が見やすいように①と②の領域を拡大して右側に示している。①の領域の格子縞の間隔に比べ、②の領域の格子縞の間隔がわずかに大きくなっている。

この条件で観察できた結晶が NaCl の結晶であること、更には NaCl 結晶のどの方位の面を観察しているかを確認するために、格子縞の間隔を測定した。その結果、①の領域の格子縞の間隔は 1.99 Å、②の領域の格子縞の間隔は 2.75 Å であった。NaCl 型結晶の格子定数の文献値 5.64 Å を使うと、①と②で見えた格子縞はそれぞれ (220)、(200)格子面に対応すると考えられる。したがって、これらの格子縞は NaCl 結晶由来の格子縞であることが確認できた。同様に結晶領域の像が他にも多く観察できたが、観察された格子縞は全て(220)か(200)格子面のいずれかであった。NaCl の安定構造は面心立方格子であり、観察された格子縞は、免振立方格子の[001]入射条件において見える格子縞に対応しており、NaCl 結晶は非晶質の下の炭素膜の表面に対し[001]方位になるように形成されると結論された。NaCl は、その構造から(001)面が最も安定な面であり、結晶粒の表面は(001)タイプの面であることはよく知られているので、この結果は NaCl の(001)面の構造安定性とも矛盾しない。

3. 2 動的観察に向けての条件の検討

水溶液中で形成された NaCl の結晶の観察に成功したので、次に液中での結晶成長のその場観察をするための動画撮影条件の検討を行った。先に述べたように、入射電子線は比較的弱いので高いコントラストを得にくく、格子縞が形成されていたとしても十分な信号強度が得られず、格子縞を確認することが難しい。そこで、十分なコントラストで格子縞を観察するために必要な 0.5 s 露光の像の積算(スタック)枚数を確認した。複数枚の像をスタックしてその強度の平均化を行った画像に対して、単一結晶の格子縞が見えている視野を 3 つの時間帯で 0-5 s、60-65 s、

90-95 s, 150-155 s で区切り, それぞれ scene1~4 とした。観察視野内に結晶をとらえた瞬間を 0 s としている。それぞれの場面对してドリフト補正を行った連続的な画像からスタック画像を作成し, 格子縞が見えている領域の面積を手作業で求め, スタックの枚数と観察されている結晶粒の面積の関係を調べた。Fig. 3 は, scene2 に対する面積測定のため格子縞が見えている領域を線で囲ったものを示している。(a)から(f)まで 1 枚ずつスタックの枚数を増やしたもので, (a)はスタック無しの 1 枚画像で(f)が 6 枚スタック画像である。Fig. 4 には scene1~scene4 で各スタック画像での同一の結晶領域の画素数の測定結果をまとめたグラフを示す。

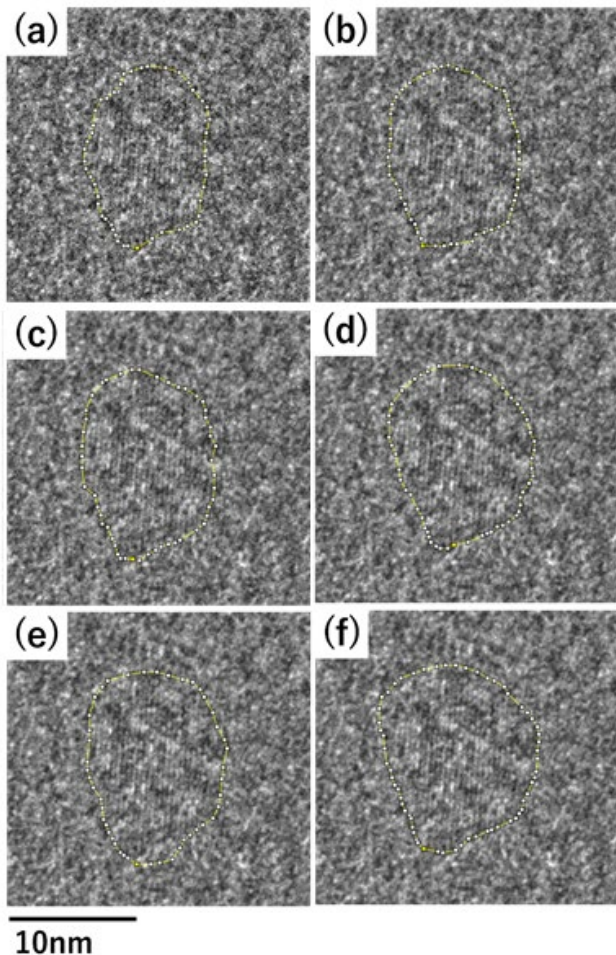


Fig. 3 Manually measured area of NaCl crystal region (a) No stack (b) 2-sheet stack image (c) 3-sheet stack image (d) 4-sheet stack image (e) 5-sheet stack image (f) 6-sheet stack image

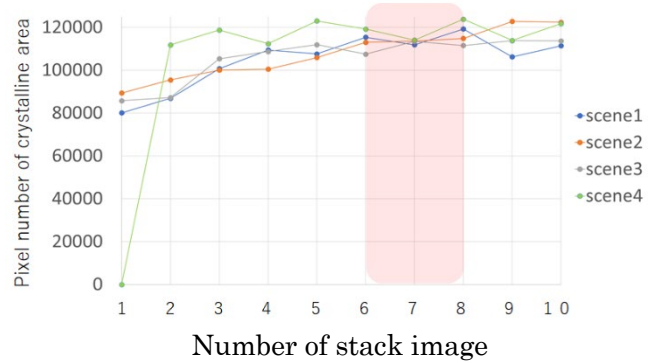


Fig. 4 Relationship between the number of stacked sheets and the number of measured pixels in the NaCl crystal region from scene 1 to scene 4.

この計測の時間経過の範囲で, 結晶領域サイズの変化が無いと仮定すると, グラフから結晶領域の面積(画素数)が一定値とみなせるようになる 6 枚以上のスタックで概ね十分なコントラストで格子縞が見えていると判断することができる。そこで, 可能な限り小さい時間幅での結晶の時間変化を観察するため, 本研究では画像解析に 6 枚スタック画像を用いる。

scene1~scene4 において, それぞれ 0-3 s, 60-63 s, 90-93 s, 150-153 s で得られた像の 6 枚スタック画像に対して, 結晶領域の面積測定を行った結果, scene1 では 117846 ピクセル, scene2 では 115424 ピクセル, scene3 では 112438 ピクセル, そして scene4 では 118457 ピクセルであった。この結果から分かるように, 同一の結晶領域を 153 秒間観察し続けた際に結晶領域の面積は, 多少のゆらぎはあるものの, 一方的な増加や減少は見られなかった。このことは, 設定した電子線量で電子照射し続けても, 照射領域の温度の上昇による結晶の溶解などによる結晶の析出が起きていないことを表している。すなわち, この実験で設定した電子照射条件が, 結晶成長や破壊等に大きな影響を与えていないことを示唆している。

また, 使用している液体セルは, 2 枚の炭素膜による封じ切りタイプのセルであり, 観察中に水や Na^+ や Cl^- のイオンの供給はしていないので, 電子照射による電子と水の相互作用による気体の発生などが生じていないと考えられ, 観察中に観察視野外との間で大きな物質移動はなく, 平衡状態に近い状態に保たれていると考えられる。

一方、短い時間スケールで見た場合には、わずかながら結晶領域の面積の増減はある。後述するが、局所的な結晶領域の生成や消滅は観察されており、 μm オーダーの結晶に対して観察されているように^[4]、平衡状態に近い状態に保たれていても nm スケールのサイズの結晶の表面も絶えず変化していることが分かる。

3.3 動的観察の結果①

時間経過によって観察された結晶領域が変化した視野を示す。Fig. 5の(a)~(c)にはそれぞれ0-3 s, 10-13 s, 20-23 sで得られた6枚スタック画像を示している。

(a)~(c)において青い点線で示した領域は(a)においてはっきりとした縞模様が見えている領域である。観察されている格子縞の面方位は、縞の間隔の解析から(200)面であった。(b)では青い点線内の右上に黄色の点線で境界を示したように、(a)の青で囲んだ領域の一部では格子縞が消失しており、縞の面積が減少していることが分かる。一方で、(c)では境界線を赤い点線で示したように、(a)の青で囲った領域の外側の領域にはっきりとした縞模様が現れ、縞の面積が増加している。結晶領域のピクセル数は、(a), (b), (c)でそれぞれ、167383, 152375, 163748ピクセルとなっており、1度減った面積がまたもとに戻ってきている。Fig. 3で示した観察結果の例と同様に、ここでも長い時間スケールで見ると結晶領域の面積は大きく変化していない。この例では、結晶領域の成長や消失は、格子縞の方向であり、この結果は、結晶成長が観察されている格子面に垂直な(010)面方向、あるいは(110)面方向に起こりやすいということを示唆している。

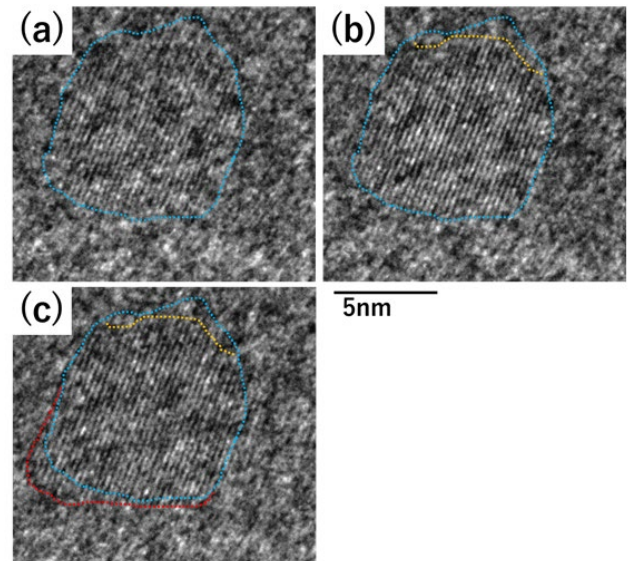


Fig. 5 Time evolution of crystalline region ①.

An example that suggests that crystal growth tends to occur as the length of (020) lattice fringes increases.

3.4 動的観察の結果②

前節で示した結晶領域に比べて小さな結晶領域の揺らぎを観察した視野の様子を示す。Fig. 6(a)~(d)に0-3 s, 10-13 s, 20-23 s, 30-33 sで得られた像の強度を平均化した6枚スタック画像を示す。観察された面の方位は(200)面である。Fig. 6では(a)~(d)において赤、青、黄の点線で示した四角形は各画像上の同じ領域を示している。赤で示した領域では(a)の時点では縞模様は殆ど見えないが、(b)~(d)においてはうっすらと縞模様が見えているのが分かる。青で示した領域では(a), (c)では縞模様が観察されているが、(b), (d)でははっきりとした縞模様が見えなくなっている。黄で示した領域では(a), (c)では縞模様が見えないが、(b), (d)では縞模様が現れていることが分かる。これら3つの領域の間にも格子縞は平行に等間隔で並んで、時間経過によって結晶領域の形状が小さく揺らいでいることが分かる。また、消失や生成は、結晶粒の端(表面)で起こりやすく、内部では起こりにくいこともわかる。また、赤の領域にける成長や消失は、格子縞の数が増減する方向に生じている例で、前節の例とは異なるのに対し、青と黄色の領域における成長や消失は前節と同様に格子面に沿った方向であった。よって、小さい領域の変化においては、縞模様の消失や生成が起こりやすいといえる。このことは、NaClがステップ成長に比べてキンク成長が優先的に起きることを示している。

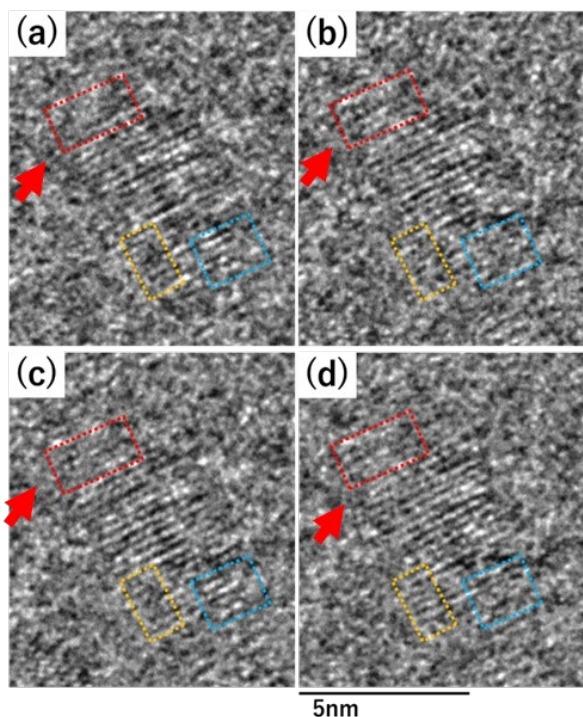


Fig. 6 Time evolution of crystal region ②.

An example showing growth in the direction perpendicular to the lattice planes, such that the number of layers in the lattice planes increases. These changes are in a relatively small area compared to the previous section.

このように縞模様の消失と生成が時間経過とともに繰り返し起こるが、一方的に結晶領域がどんどん減少したり、どんどん増加したりといった状況は観察されなかった。よって、本研究における観察時の条件下では電子線照射による結晶構造の大きな崩壊や成長は起こっていないことが再確認できる。ただし、3.3 節で示した例では結晶領域の一方の縁が成長して面積が増加し、反対側の縁では消失が起こって面積が減少するという変化であったのに対して、**Fig. 6** で示した結晶領域では多方向で増加と減少が見られた。この違いは、結晶サイズの違いによるものであると考えられる。このことから、小さな結晶ほど結晶領域の揺らぎは相対的に小さくなり、揺らぎが起こる時間的頻度は高くなると考えられる。**Fig. 6(a)~(d)**すべてに赤い矢印の先で示したような領域は、縞の見える領域周辺の1 nm ほどが少し暗くなっている部分を示している。この領域は形状が揺らいでいる様子が見られ、移動性の領域であると考えられる。

3.5 動的観察の結果③

3.4 節で示した結晶よりも大きな結晶の周辺についても観察を行った。この視野においても暗いコントラストが確認できた。例を **Fig. 7** に示す。この像は、0-3 s で得られた像の強度を平均した6枚スタック画像の視野全体を示している。この像では、いろいろな場所に格子縞が見えている。この格子縞の面方位は(200)であった。この像の上方に見える比較的大きな結晶の塊(周りを四角い赤枠で囲った)に注目した。

Fig. 8(a), (b)に、それぞれ 0-3 s, 30-33 s で得られた6枚スタック画像は、**Fig. 7** で示した赤い四角で囲んだ部分を拡大したものを示している。観察視野の上端にある結晶領域であり、結晶の下側の1部のみが見えている状態である。**(a)**においてははっきりとした格子縞が見えている領域を**(a), (b)**の両方に青い点線で示した。また、**(b)**には、青い点線に加えて、**(b)**の像ではっきりとした格子縞が現れている領域の境界線を赤い点線で示した。

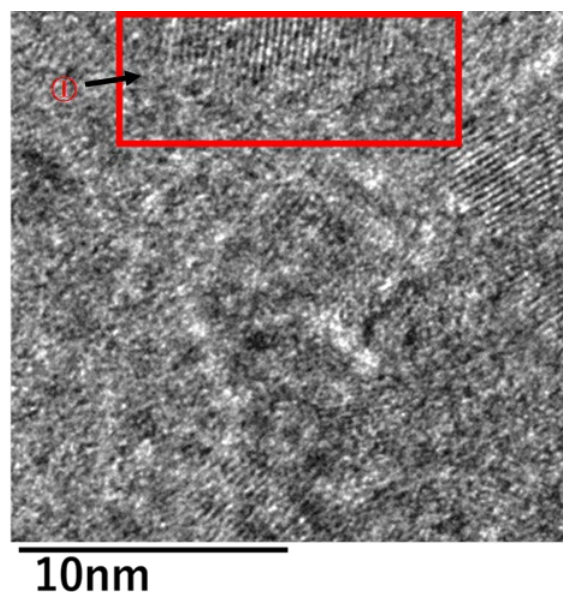


Fig. 7 A field of view where changes in crystalline regions was observed. We investigated the details of structural changes at the left and right edges of the crystalline regions indicated by arrows ①.

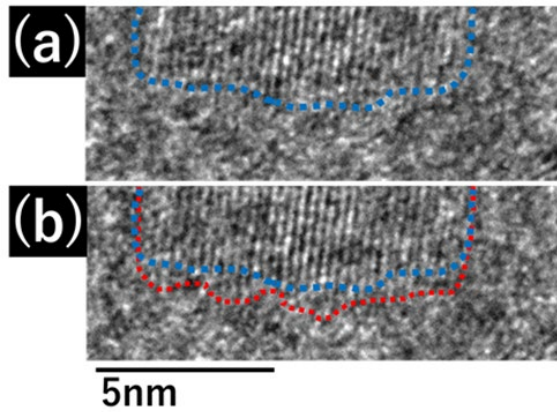


Fig. 8 Time evolution of crystalline region. A slightly dark region is visible near the crystal region.

また、(a)、(b)で注目している結晶領域の左下に①、右下に②の矢印で示したようなコントラストの暗い影が見えている。特に①で示した領域は(a)では見られずに(b)で見えていることや、②ではわずかに領域が変化していることから移動性の領域であり、液体セルの炭素膜由来の構造によるコントラストではない。それ以外に暗いコントラストを与える可能性のあるものとして、視野内に存在し得るものを考えると、この影の部分は周囲に比べて局所的に NaCl の濃度が高くなっている領域であると考えられる。2 段階成長のモデルから、高濃度の領域の一部では結晶化が起きると報告されているが、いずれの例でも NaCl 濃度が高いと考えられる領域では結晶化は行われていない。

6 枚スタック像では観察できなかった(a)から(b)の間のコントラストの暗い領域と結晶領域の変化の関係について、Fig. 8(a)、(b)に①、②の赤い矢印で示した領域付近の結晶表面周辺に時間分解能をあげて解析する。それぞれの矢印で示した領域付近を拡大し、(a)~(b)の間における変化を2枚スタック像において解析した際に見られた視野の変化について解析を行った。結果を Fig. 9 に示す。

Fig. 9(a)~(d)はそれぞれ 0-1 s, 13-14 s, 25-26 s, 32-33 s で得られた像の、①の矢印付近の結晶領域を拡大した2枚スタック画像を示す。コントラストはやや不明瞭になるが、時間分解能は3倍になり、やや早い変化を確認することができる。(a)~(d)に示した赤い点線は結晶領域の左側において、縞模様のうちコントラストが明るい縞3本に沿って引いたものであり、最も左の点線は縞の明るい線が見やすいように少し細く示してある。また、(a)において一

番左の赤い点線で示した部分は、(b)、(c)においては緑色の点線で示している。

(a) では3本ある赤い点線のうちの右の2本で示したように、最も左の明るい格子縞が一行に並んだ様子が見取れる。しかし、(b)、(c)と時間がたつにつれて最も左の格子縞が間隔を広げ、(d)では、赤い矢印で示したコントラストの暗い領域に完全に広がってしまっている。これは時間経過により、格子縞の一行分に対応するイオンが水溶液に溶解し高濃度領域が出現したととらえることができる。

さらに、(a)~(d)を比較すると、黄色の矢印方向に向かって少しずつ格子縞が伸びているのが見える。その先にある黄色い点線で囲んだ領域に注目すると(a)、(b)では周りに比べてコントラストが暗くっており、結晶成長とコントラストの暗い領域に何らかの関係があることが示唆される。

これらのことから、Fig. 8の、①の矢印付近に現れたコントラストの暗い領域は、結晶化していた NaCl 分子が溶液中に溶け込んだことによって生じたものと考えられる。高濃度領域の結晶成長との関係や結晶成長における役割については、今後詳細に調べる予定である。

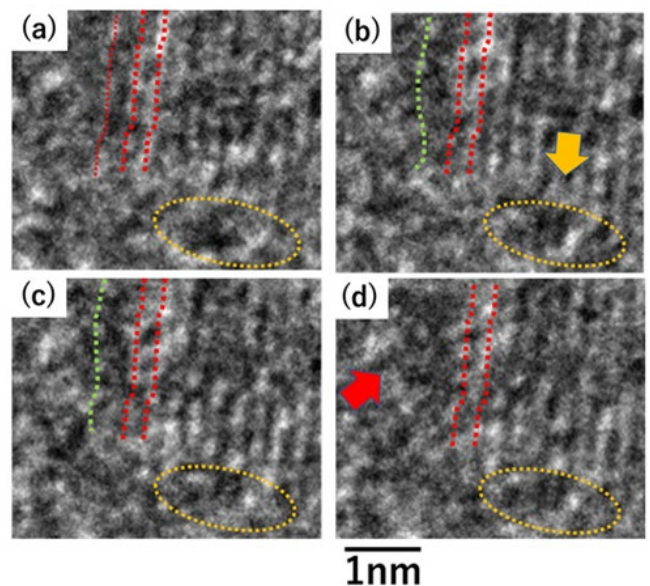


Fig. 9 Time evolution of the crystalline region near the arrow ① in Fig. 7. A slightly dark region is visible near the crystal region.

3.6 多数の結晶粒が存在する領域の観察

最後に、比較的結晶が多く生成されているような視野の例を Fig.10 に示す。赤い四角で囲んだ領域内では縞模様の角度が異なる結晶が二つ隣り合っていることが分かる。これは液中に存在する結晶同士が衝突したことによるものである可能性が高く、液中での核成長における主な要因が2次核発生であることが確認できる。

Fig. 11(a)~(c)では2種類の縞の方向をそれぞれ赤と青い点線で示している。異なる方向の縞模様の領域2つが重なっている領域を黄色の点線で囲んでいる。縞模様が重なっている領域は時間経過により揺らいでいるように見えており、結晶の境界は定まっておらず2つの結晶が入り組んで接合されているように見える。そこで、2種類の縞模様がどのような向きで隣り合っているかを調べるため、縞の間隔と向きを調べた。赤線、青線で向きを示した格子縞は2種類とも(200)面であり、これらは37.2°の角度で隣接していた。通常の双晶が形成されている場合、隣り合う結晶の境界は直線的に決定することが可能である。NaCl結晶と同様の構造を持つKCl結晶で形成される貫入双晶において、(100)面を軸として2種の単結晶が接合した際に最も高い確率で面同士が成す角度36.9°とおおむね一致している^[8]。このことから、2つの結晶が衝突したことで貫入双晶の核となる領域が形成され、この隣り合った単結晶が互いに角度を変えずに包み込むような成長を遂げた場合には報告されているような正八面体の結晶構造を持つ貫入双晶が形成されうると考えられる。

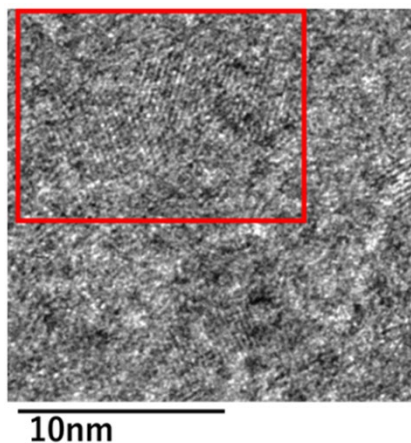


Fig.10 TEM image of a field of view where many crystal grains can be seen.

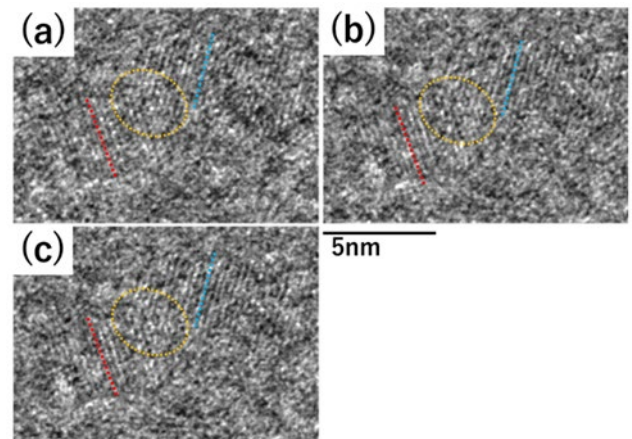


Fig.11 Example showing the time evolution of crystals in different orientation

4. 結論と今後の課題

原子や分子による結晶化は科学技術、生物学、環境などの様々な分野において活用されており、その微視的な機構を解明することは重要であると考えられる。近年、分子動力学シミュレーションによる原子レベルでの液中下における結晶核発生の解明が進められ、液中での核発生や結晶化は溶質分子密度の高い高濃度領域をもたらす濃度変動と、それに続く空間的秩序化という2段階ステップで構成されることが新たに報告された。さらに、光学顕微鏡を用いたタンパク質の結晶成長の液中下におけるその場観察から、溶質分子濃度の高い高濃度領域中に存在する分子が、結晶表面において結晶化と溶解を繰り返すことも報告された。しかし、液中における高分解能での結晶成長のその場観察は試料の環境が制限されることから難易度が高く、2段階ステップにおける高濃度領域の直接的な観察は実現されていない。本研究では、本研究室で開発された wet-cell を用いて NaCl 水溶液を封じ込めることで、透過型電子顕微鏡法を用いた nm オーダーでの液中における結晶成長のその場観察を行った。液中での格子縞の可視化に成功した。これにより、この方法で NaCl の結晶成長についての nm スケールの情報が得られることを確認できた。観察された数 nm の大きさの結晶は、表面での反応によりその形状を常に変化させていたが、電子線量 $3.95 \times 10^4 \text{ e}^-/\text{nm}^2 \cdot \text{s}$ 条件下での 150 s による電子照射でも、その構造の大きな破壊や拡大は起きな

かった。このことから、今回の条件での電子線照射下での観察環境では NaCl 結晶は平衡状態にあると考えられる。結晶表面から周囲 1 nm ほどに、相対的に暗い領域が存在する例がいくつか観察され、その後、その暗いコントラスト領域内で結晶が成長する様子も観察された。この観察結果は、上述した 2 段階ステップ成長を実験的にとらえた観察例であると考えている。しかし、この点については慎重な検討が必要であり、更なる確認が必要である。また、比較的多数の結晶が観察された視野では、巨視的な結晶成長の観察によって報告されていた貫入双晶の核も見ることが出来た。

本研究では、画像のコントラストを向上させるために、6 枚の像強度の平均をとったスタック像を用いた解析を行っている。いくつかの視野においてスタック枚数を減らして解析を試みたところ、結晶領域が揺らいでいる可能性が浮上した。今回の解析では、結晶領域の面積や境界位置の決定を手作業で行ったが、ノイズが大きく、より客観的な判断が必要である。そこで、今後結晶領域を自動的に同定する自動解析手法を導入することが課題である。

5. 文献

1. J. Yao, L. Sun, Y. Xiao, J. Liu, J. Jie, X. Liu, F. Yang, Y. Sun, Rongjin and Wenping Hu, *SCIENCE CHINA Materials*, 2022, 50, 442–475.
2. T. Bartels-Rausch, et al., *Atmos. Chem. Phys. Discuss.*, 2012, 12, 30409–30541.
3. T. Nakamuro, M. Sakakibara, H. Nada, K. Harano, and E. Nakamura, *J. Am. Chemical Society*, 2021, 143, 1763-1767.
4. N. KUBOTA, *Gypsum & Lime No.242*, 1993, 242, 50-58.
5. K.shimizu, *The Society of Sea Water Science, Japan*, 1996, 51-57.
6. M.Kahlweit, H.Eyring, *Journal of Crystal Growth*, 2001, 63–76.
7. J. Alejandre, and H.Jean-Pierre, *PHYS, REV*, 2007, 76, 061505.
8. C. P. Lamas, J. R. Espinosa, M. M. Conde, J. Ramı rez, P. Montero de Hijes, E. G. Noya, C. Vegaa and E. Sanz, *Phys. Chem. Chem. Phys*, 2021, 23, 26843.
9. Aaron R. Finney and Matteo Salvalaglio, *Faraday Discuss*, 2022, 56, 235.
10. E. Nils R. Zimmermann, B. Vorselaars, D. Quigley and B. Peters, *J. Am. Chem. Soc*, 2015, 137, 13352-13361.
11. Peter G.Vekilov, *Journal of Crystal Growth*, 2005, 11, 65–76.
12. L. Hong-Gang and H. Zheng, *Annu. Rev. Phys. Chem*, 2016, 719–747.
13. Y. Inayoshi, H. Minoda, *Microscopy*, 2013, 62, 623–628.
14. B. Lim, H. Kobayashi, H. Pedro, C. Camargo, F. Lawrence Allard, J. Liu and Y. Xia, *Nano Res*, 2010, 180–188.
15. Maria Luisa Perrotta, Francesca Macedonio, Elena Tocci, Lidietta Giorno, Enrico Drioliab and Annarosa Gugliuzza, *Environ. Sci : Water Res. Technol*, 2020, 1723-1736.
16. H. Sugi, H. Minoda, Y. Inayoshi, F. Yumoto, T. Miyakawa, Y. Miyauchi, M. Tanokura, T. Akimoto, T. Kobayashi, S. Chaen, and S. Sugiura, *PNAS* 105 (2008) 17396-17401.
17. H. Minoda, T. Okabe, Y. Inayoshi, T. Miyakawa, Y. Miyauchi, M. Tanokura, E. Katayama, T. Wakabayashi, T. Akimoto and H. Sugi, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 405 (2011) 651-656.
18. Yoshikazu Aoki, *journal of mineralogy, petrology and economic geology*, 1982, 123-128

Observations of NaCl Crystal Growth in Solution Using Environmental Transmission Electron Microscopy

Hiroki Minoda, Toshiki Shimizu

Department of Applied Physics and Chemical engineering, Tokyo University of Agriculture and Technology

Summary

Crystallization of atoms and/or molecules is utilized in various fields such as science and technology, biology, and the environment and it is important to elucidate its microscopic mechanism. In recent years, progress has been made in elucidating crystal nucleation in liquids at the atomic level using molecular dynamics simulations and it was reported that nucleation and crystallization in liquid consists of two steps: concentration fluctuation leading to a creation of high concentration region, followed by spatial ordering. However, in-situ observation of crystal growth in liquid with high spatial resolution is difficult and direct observation of high concentration regions in the two-step process has not been realized. In this study, we performed in-situ observation of NaCl crystal growth in liquid at nanometer scale using transmission electron microscopy. A liquid cell was used to hold solution samples in the electron microscope.

The observed crystals of several nanometers were constantly changing their shape due to reactions on the surface, but even after 150 seconds of electron irradiation at an electron dose of approximately $4 \times 10^4 \text{ e}^-/\text{nm}^2 \cdot \text{s}$, the structure remained unchanged. It was not significantly destroyed. This indicates that the NaCl crystals are in equilibrium under the current observed conditions. The observed lattice fringes were (200) or (220) lattice planes. Local crystal growth or disappearance was observed due to local structural fluctuations, but there were cases where the lattice fringes grew to lengthen at the edges of relatively large grains, and at the edges relatively small grains, growth was observed that increased the number of layers.

In this study, analysis was performed using stacked images that averages the intensity of six images to improve the image contrast. When we attempted analysis by reducing the number of stacked images in several fields of view, we discovered the possibility that the crystalline region was changing. In this analysis, the areas and boundary positions of crystalline regions were determined manually, but the noise was large and a more objective judgment was needed. Therefore, a future challenge is to introduce an automatic analysis method that automatically identifies crystal regions.