HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	偏極中性子小角散乱法による急冷糖溶液中に生成するナノ氷結晶の構造解析
Author(s)	熊田, 高之; 中部, 倫太郎; 中川, 洋
Citation	低温科学, 84, 13-17
Issue Date	2026-03-10
DOI	https://doi.org/10.14943/lowtemsci.84.13
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/99013
Type	departmental bulletin paper
File Information	02_p013-017_LT84.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

低温科学 84 （2026） 13-17
doi: 10.14943/lowtemsci. 84. 13

偏極中性子小角散乱法による急冷糖溶液中に生成するナノ氷結晶の構造解析

熊田　高之 [1)]，中部　倫太郎 [1)]，中川　洋 [1)]

2025 年 8 月 29 日受付，2025 年 10 月 1 日受理

スピンコントラスト変調（SCV）小角中性子散乱（SANS）は，水素核偏極度に伴う偏極中性子散乱曲線の変化から複合材料のナノ構造を解析する手法である．本研究では，SCV-SANS法を適用して急速凍結した糖溶液中に生成したナノ氷結晶の構造を検討した．その結果，飽和グルコース溶液中に生成したナノ氷結晶は厚さ2 〜 3 nmの平板状構造を有し，これは過冷却水における氷結晶の臨界核生成サイズとほぼ等しいことが明らかとなった．

Structure analysis of nano-ice crystals in rapidly frozen sugar solutions using polarized small-angle neutron scattering

Takayuki Kumada[1], Rintaro Nakabe[1], Hiroshi Nakagawa[1]

Spin-contrast-variation (SCV) small-angle neutron scattering (SANS) is a technique that determines nanostructures of composite materials from the proton-polarization-dependent polarized neutron scattering curves. We utilized the SCV-SANS technique to determine the structure of nano-ice crystals generated in rapidly frozen sugar solutions. We found that the nanoice crystals generated in saturated glucose solutions have a planar structure with a thickness of 2-3 nm, which was close to the critical nucleation size of ice crystals in supercooled water.

キーワード：凍結保存，ナノ氷結晶，偏極中性子小角散乱，水素核偏極
cryopreservation, nano-ice crystal, polarized small-angle neutron scattering, proton polarization

1．はじめに

精子・卵子などといった生体試料を凍結保存するためには，凍結保護剤を添加して細胞膜や細胞小器官などが破壊されないように氷結晶の形成を食い止める必要がある．そのなかでも，糖は毒性が低い凍結保護剤として注目されており，飽和溶解度に近い高濃度トレハロースやスクロースの添加による氷結晶成長抑制メカニズムの研究が多く進められている．

氷結晶の形成には氷核生成と成長の2段階にわけられる．氷結晶の体積分率は，大雑把に氷核生成の頻度と成長速度の積であらわされるが，同じ体積分率でも小さな氷晶が多い方が生体試料への影響は低く抑えられる．つまり，氷核生成よりも氷晶成長を抑制することが生体組織の保存に対する影響を低く抑える上で重要である（Chang & Zhao, 2021, Zhang *et al*., 2019）．

不凍タンパク質は氷結晶の特定の結晶面に吸着しやすい構造になっており，その吸着した結晶面における氷結晶の

連絡先
熊田　高之
日本原子力研究開発機構
〒 319-1195 茨城県那珂郡東海村白方 2-4
Tel: 029-284-3834
Email: kumada.takayuki@jaea.go.jp

1）日本原子力研究開発機構
Japan Atomic Energy Agency (JAEA), Ibaraki, Japan

成長を強く阻害すると言われている．他の凍結保護剤でも同様の分子レベルの相互作用があるのではないかとも考えられる．その一方で，これまで水溶液中の均一核生成の研究に用いられてきた光学顕微鏡測定では，分解能の高い位相差法（Shimada & Furukawa, 2018）を用いてもサブマイクロメートル以上の氷結晶しか観測できない．X線回折法では，原理上Scherrer則を用いて氷結晶の回折ピークの拡がりから50 nm以下程度の結晶ドメインの大きさを決めることができるが，実際にはアモルファス氷の信号の重なりなどもあって難しい．結晶が成長すればするほど，凍結保護剤と氷結晶面との分子間相互作用以外の，例えば結晶中心と末端部の温度勾配などといったマクロスコピックな要因が結晶のモルフォロジー形成に大きな影響を与えるようになり，議論が凍結保護剤による氷結晶成長の阻害メカニズム解明から遠ざかってしまう．

2. SCV-SANS法

そのような背景の下，我々が開発をすすめてきたスピンコントラスト変調（SCV）中性子小角散乱法（SANS）を用いれば，ナノスケールの氷結晶が観測できるようになるのではないかと考えた（Kumada *et al*., 2023）．SCV-SANS法は，中性子の軽水素核に対する散乱能がスピン方向に依存する性質（図1）を利用した，複合材料の構造解析手法である．試料中の水素核スピン偏極度P_Hに応じて変化する複数の散乱パターンを解析することで，複合材料中における成分ごとの構造とそれらの絡み合い状態を決定することができる（図2）．

SCV-SANS法に用いる波長0.6 nm近傍の冷中性子の偏極技術はすでに確立しており，偏極素子を配置するだけで偏極度98％以上の偏極中性子ビームが得られる．一方，磁気モーメントが電子スピンの1/660しかない水素核スピンの偏極が容易ではなく，1 K, 3 Tの低温強磁場下でも熱平衡条件下で偏極度は0.2%にしかならない．そこで，磁気共鳴技術を用いて試料中に添加した電子スピンから核スピンへの偏極移動により準平衡条件ながら核スピンの偏極度を大きく引き上げる動的核スピン偏極（DNP）法を用いる（図3）（Kumada *et al*., 2009）．

SCV-SANS法は，1989年に西ドイツのStuhrmann（Knop *et al*., 1989）により原理実証されたものの，当時の技術では水素核の偏極が非常に難しくその後の研究展開が限定されていた．そこで我々は，性能をむやみに追求しない代わりに扱いやすい小型のDNP装置を開発して，自身が管理・運営する研究用原子炉（JRR-3）の小角散乱装置（SANS-J），

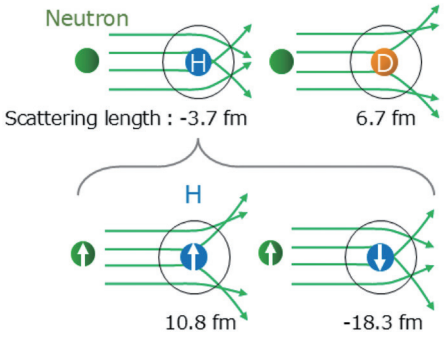

図1：上段：熱冷中性子の無偏極時における軽水素と重水素に対する散乱の違い．数値は干渉性散乱長を示す．下段：中性子と軽水素のスピン方向に応じて散乱が変化する様子を示したもの．

Figure 1: Upper, coherent scattering lengths of unpolarized thermal and cold neutrons against hydrogen and deuterium; Lower, spin-dependent coherent scattering length of thermal and cold neutrons against hydrogen.

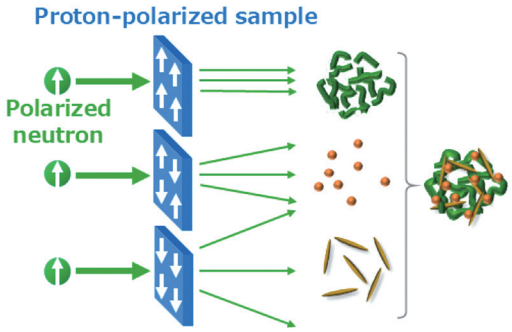

図2：SCV-SANSにおいては，試料の水素核偏極度P_Hに依存して変化する偏極中性子の散乱パターンから複合材料における各成分のナノ構造とそれらの絡み合い状態を決定する．

Figure 2: SCV-SANS reveals nanostructure of each component of composite materials and entangles among the components from the P_H-dependent polarized-neutron scatterings.

ならびに大強度陽子加速器施設　物質・生命科学実験施設（J-PARC MLF）の小角散乱装置（BL15, TAIKAN）に組み込みSCV-SANS実験を成功させてきた．SCV-SANS実験には，高度な磁気共鳴と散乱双方の知見を必要とすることもあり，現在SCV実験は，我々を含めて世界で3つの中性子施設でしか行うことができない．

SCV-SANS実験を行うためにはDNP法で試料中の水素核を偏極度P_Hで10%程度以上にしなければならない．水素核を偏極するための条件は，

- 試料中に電子スピンの供給源となる2,2,6,6-テトラメチルピペリジン 1-オキシル（TEMPO），4–ヒドロキシTEMPO（TEMPOL）などの安定フリーラジカルが分散していること
- 核スピンの緩和を誘導する電気伝導体やTEMPO誘導体を除く磁性体が入っていないこと

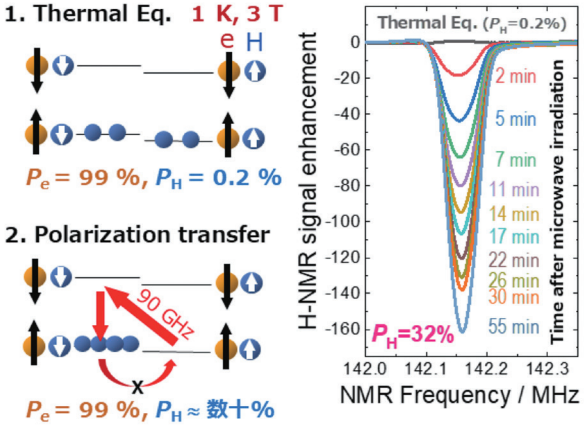

図3：DNPによる水素核偏極の原理．1 K, 3 Tの低温強磁場下において，電子スピンは偏極度（P_e）99%まで偏極するのに対し，磁気モーメントが小さい水素核は0.2%しか偏極しない（左上）．そこに電子スピンと水素核スピンのゼーマンエネルギーの和分のエネルギーを持つマイクロ波を照射すると，電子スピンと水素核スピンは励起される．電子スピンはミリ秒で緩和する一方で水素核スピンの緩和は数分から数時間に及ぶほど遅い．マイクロ波による水素核スピンの励起速度が緩和速度を大きく上回った時，水素核スピン偏極度は電子スピン偏極度と同程度まで超偏極される（左下）．右はマイクロ波照射後のＨ－ＮＭＲ信号の増大を示したものである．

Figure 3: Mechanism of DNP and enhancement of proton polarization. Whereas electron spin polarization (P_e) of 99% is obtained, P_H is only 0.2% at the thermal equilibrium condition at 1 K and 3.3 T (Upper left). However, by irradiating microwave with energy corresponding to the sum of Zeeman energy of electron and proton spins, the electron and proton spins are excited. Whereas the electron spins relax within milliseconds, the relaxation time of proton spin amounts to minutes to hours. When the excitation rate far exceeds the nuclear-spin relaxation rate, proton polarization increases close to P_e(Lower Left). The right shows enhancement of H-NMR signal after irradiation of the microwave.

の2点である．なお，純水は凍結時に添加したTEMPOLが氷結晶から排斥され氷結晶の界面に凝集してしまうことから，代わりに水－グリセロール混合液を用いるのが一般的である．そのような中，我々は結晶化度の低い急冷濃厚糖溶液を用いると，水－グリセロール混合液と同様に高い偏極度が得られることを見出し，SCV-SANS実験のスタートに漕ぎつけた．

3. 実験

試料は45wt%グルコース，72wt%フルクトース，34wt%マルトースのD_2O溶液（*h*-glu/D_2O, *h*-fru/D_2O, *h*-mal/D_2O），および52wt%重水素化グルコースのH_2O溶液（*d*-glu/H_2O）を用いた．溶媒に合わせてそれぞれの糖はあらかじめOH基はD置換，OD基はH置換した．図1に示すように，中性子のHとDに対する干渉性散乱長は大きく異なる．後述するように，糖と溶媒でH体とD体を使い分けたのは，糖を排斥する氷結晶と濃縮するアモルファス相でH/Dの比が異なることを利用して，両者の散乱能の違いを際立たせるためである．各試料にTEMPOLを1 wt%添加，脱気処理を施した後に注射針を通して，液体窒素の減圧冷却によってつくられた固液混合窒素に滴下し，直径3㎜弱のビーズ状固体試料とした（図4）．液体窒素でなく固液混合窒素を用いたのは，滴下した液滴のまわりに沸騰した窒素ガスが膜を作り急冷条件が損なわれるのを防ぐためである．アモルファス氷の熱伝導率から，滴下した試料の冷却速度は数十K/sと見積もられる．試料は低温を維持したままJ-PARC MLF BL15にセットされたDNP装置に挿入した．SCV-SANSでは，1.2 K, 3,33 T下で94 GHzのマイクロ波を印加することで水素核を偏極しながら偏極中性子の小角散乱を測定した．

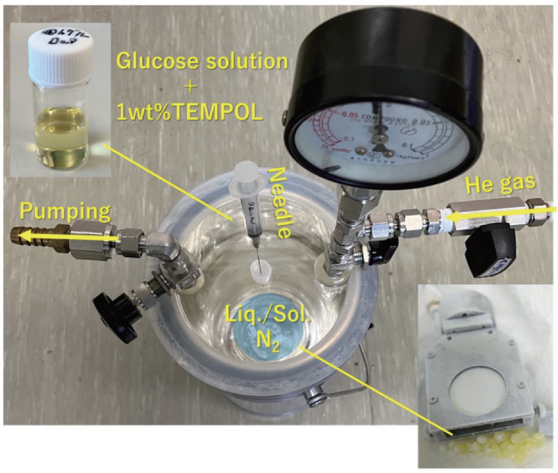

図4：糖溶液の急速凍結装置．デュワー内の液体窒素を1時間程度ポンピングして固化させたのち，ヘリウムガスで常圧までパージしてから1 wt%TEMPOLを添加した糖溶液を注射針から滴下する．滴下した液滴は固体窒素表面で瞬時に凍結して直径3㎜のビーズとなる．ビーズは液体窒素下で試料セルに詰めた後，極低温を維持したままDNP装置に取り付ける．

Figure 4: Rapid-freezing apparatus for sugar solutions. After solidifying liquid nitrogen in the Dewar by pumping, we parged with helium gas and dropped the 1 wt%TEMPOL-doped sugar solution samples through the needle to prepare 3-mm-diameter frozen beads. These beads were filled in the sample cell and set to the DNP apparatus while maintaining cryogenic temperature.

4. 結果と考察

図5(a)-(d)は，各糖溶液のSCV-SANS曲線を示す．運動量移行$Q \leq 1$ nm^{-1}における散乱強度の立ち上がりは干渉性散乱であり，ここから構造情報が取り出せる．一方，$Q > 1$ nm^{-1}の平坦部は構造情報を持たない水素原子の非干渉性散乱であり本稿では論じない．

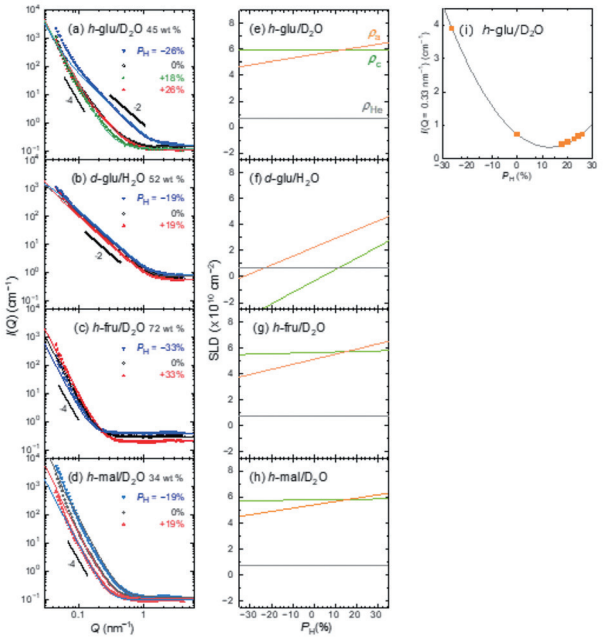

図5： (a)–(d) SCV-SANS曲線；(e)–(h) ρ_a，ρ_c，およびρ_{He}の計算値；(i) *h*-glu/D_2OにおけるQ = 0.33 nm^{-1}での散乱強度のP_H依存変化．(a)-(d)における細実線はフィッティング曲線を示す（Kumada *et al*., 2023）．

Figure 5: (a)–(d) SCV-SANS curves; (e)–(h) calculated values of ρ_a, ρ_c, and ρ_{He}; (i) variation of scattering intensity at Q = 0.33 nm^{-1} with P_H for h-glu/D_2O. The narrow solid lines in (a)-(d) show the fitting curves (Kumada *et al*., 2023).

h-glu/D_2Oでは，0.1 nm^{-1} ≤ Q ≤ 1 nm^{-1}の領域で信号強度$I(Q)$は$I(Q)\propto Q^{-2}$に従い，Q < 0.1 nm^{-1}では$I(Q)\propto Q^{-4}$に従って変化した．前者の散乱強度はP_Hに対してP_H = 13%に極小を持つ顕著な二次関数的な変化（図5(i)）を示したのに対し，後者はP_Hとともにわずかに増加するのみあった．*d*-glu/H_2Oでは，$I(Q)\propto Q^{-2}$の散乱のみが確認されその強度は*h*-glu/D_2Oに比べ10倍程度高く，P_H上昇にともないわずかに減少する傾向を示した．一方*h*-fru/D_2Oでは，$I(Q)\propto Q^{-4}$の散乱のみが確認され，その強度はP_Hの上昇とともに増加した．*h*-mal/D_2Oでも，*h*-fru/D_2Oと同様に$I(Q)\propto Q^{-4}$の散乱のみが確認されたが，その強度は逆にP_Hの増加とともに減少していた．

図5(e)-(h) は，氷結晶とアモルファス氷の体積当たりの偏極中性子干渉性散乱長の和（散乱長密度，SLD）のP_Hに対する変化を計算したものである（ρ_c，ρ_a）．ここでの，SLDはいわば中性子に対する屈折率（もっと正確には屈折率1からの減少量）のようなものである．界面における光の反射強度が界面を挟む二つの物質の屈折率差の自乗に比例するように，中性子の散乱強度もSLD差の自乗に比例する．(e)(g)(h)において，ρ_cがP_Hに対して変化しないのは，氷結晶は糖を排除してHを含まない純粋なD_2O結晶を生成していることに対応する．反対に，ρ_aはH体を多く含む糖の濃縮によりP_Hに対する傾きが強くなる．

氷結晶の散乱強度$I_c(Q)$は，数密度n_c，体積V_c，形状因子$F_c(Q)$を用いて

$$I_c(Q) = n_c V_c^2 |\rho_c - \rho_a|^2 F_c(Q) \quad (1)$$

とあらわされる．一方，アモルファス氷は熱収縮により内部に無数のひび割れを作ると考えられており（Yamamuro, 2004）．ひびが数十nmより厚いとき，今回の測定Q領域における散乱強度$I_a(Q)$は，試料が浸かっている液体Heの SLDρ_{He}と定数Kを用いて

$$I_a(Q) = K|\rho_s - \rho_{He}|^2 Q^{-4}, \quad (2)$$

と表される．非干渉散乱成分を除くと$I(Q)$は両者の和となる（Hashimoto *et al*., 2007）．

図5(e)と(i)にに示すように，*h*-glu/D_2Oにおいては，P_H = 13%付近で$\rho_c = \rho_a$となり$I(Q)\propto Q^{-2}$の散乱は極小値をとることから，同散乱は$I_c(Q)$つまり氷由来の散乱と考えられる．一方，P_Hに対する強度変化が小さい$I(Q)\propto Q^{-4}$の散乱は$I_a(Q)$由来のものであると考えられる．*d*-glu/H_2Oでは，$I(Q)\propto Q^{-2}$に比例した散乱が強く観測された．これは図5(f) に示すように，*h*-glu/D_2Oに比べ$|\rho_c - \rho_a|$が大きいためである．一方，P_Hの上昇とともに強度が僅かしか減少しないのは，$|\rho_c - \rho_a|$のP_Hに対する変化割合が小さいことに対応している．$I(Q)\propto Q^{-2}$であることは氷結晶が板状であることを示しており（Hashimoto, 2017），おおよそ板厚は2-3 nm，面拡がりは数十nm程度になっていることがわかった．

一方，*h*-fru/D_2Oでは糖濃度が高すぎて氷結晶が生成していないことがX線回折実験からわかっている．観測された$I(Q)\propto Q^{-4}$の散乱はひび割れ由来のものであり，図5(g)から読み取れる$|\rho_s - \rho_{He}|$と同様にP_Hとともに強度が増大している．

h-mal/D_2Oにおける$I(Q)\propto Q^{-4}$の散乱は，P_Hの増加とともに減少していることから，ひび割れではなくあくまで氷結晶由来の散乱である．本結果から，生成した氷結晶が数十nm以上の厚さを持った平板かバルクを形成していることを示す．

グルコースとマルトースの水溶液中で氷結晶の形状がなぜこうも違うのか？原著論文（Kumada *et al*., 2023）では糖の種類に依存した氷結晶成長抑制効果の違いではないかと推察したが，後日行った追加実験の結果は，どうやら糖の種類よりも糖濃度がナノ氷結晶の形状を決定する大きな因

子になっていることを示唆している．こちらについてはまとまり次第報告する予定である．

5. 展望

現状は，SCV-SANS法を用いてとにかくnm厚板状氷結晶が見えたことを報告している状態である．今後は，添加濃度を揃えた複数種類・濃度の糖溶液で測定を行うなど，系統的に凍結保護剤による氷結晶の成長に与える影響の違いを議論したい．

また，今後は圧力による氷結晶の成長抑制効果の研究に展開したいと考えている．糖添加と同様に，水に圧力をかけると氷結晶の前駆体である低密度水が減少するため氷結晶が生成しづらくなることがわかっている（Suzuki & Takeya, 2022）．，凍結保存により大きな影響を及ぼす氷結晶の成長に対し，圧力はどのように働くのか，今後SCV-SANS法を用いて明らかにしていきたいと考えている．

謝辞

本研究を共に進めていただいた共著者の皆様，氷の結晶成長に関し議論いただいた物質材料研究機構の鈴木芳治氏，東海大学の佐々木海渡氏に深く感謝申し上げます．本研究はJ-PARC MLFプロジェクト課題（2021P0502, 2022P0502）において，JSPS科研費21H03741の支援を受けて実施されました．

参考文献

Chang, T. and Zhao, G. (2021) Ice Inhibition for Cryopreservation: Materials, Strategies, and Challenges. *Adv Sci (Weinh)* **8**, 2002425.

Hashimoto, T., Tanaka, H., Koizumi, S., Naka, K. and Chujo, Y. (2007) A combined small-angle scattering study of a chemical reaction at specific sites and reaction-induced self-assembly as a problem in open non-equilibrium phenomena. *J. Appl. Crystallogr*. **40**, s73-s77.

Hashimoto, T. (2017) X線・光・中性子散乱の原理と応用. 講談社．東京.

Knop, W., Schink, H.-J., Stuhrmann, H. B., Wagner, R., Wenkow-Es-Souni, M., Scharpf, O., Krumpolc, M., Niinikoski, T. O., Rieubland, M. and Rijllart, A. (1989) Polarized neutron scattering by polarized protons of bovine serum albumin in deuterated solvent. *J. Appl. Crystallogr*. **22**, 352-362.

Kumada, T., Nakagawa, H., Miura, D., Sekine, Y., Motokawa, R., Hiroi, K., Inamura, Y., Oku, T., Ohishi, K., Morikawa, T., Kawamura, Y. and Kawai, K. (2023) Polarized Neutrons Observed Nanometer-Thick Crystalline Ice Plates in Frozen Glucose Solution. *J Phys Chem Lett* **14**, 7638-7643.

Kumada, T., Noda, Y., Hashimoto, T. and Koizumi, S. (2009) Dynamic nuclear polarization system for the SANS-J-II spectrometer at JAEA. *Physica B: Condensed Matter* **404**, 2637-2639.

Shimada, W. and Furukawa, S. (2018) Rapid growth of ice crystal dendrite tips in dilute solution of trehalose. *J. Cryst. Growth* **493**, 25-29.

Suzuki, Y. & Takeya, S. (2022) Transformation process of ice crystallized from a glassy dilute trehalose aqueous solution. *Phys Chem Chem Phys* **24**, 26659-26667.

Yamamuro, O. (2004) Structural Relaxation and Low-energy Excitation in Amorphous Ice and Related Glasses. AIP Conf. Proc., 627-630.

Zhang, M., Gao, C., Ye, B., Tang, J. and Jiang, B. (2019) Effects of four disaccharides on nucleation and growth of ice crystals in concentrated glycerol aqueous solution. *Cryobiology* **86**, 47-51.