

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：82108

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22176

研究課題名（和文）多光子励起場における光熱変換と熱輸送を制御するナノ構造設計と実践

研究課題名（英文）Design of nanostructures to control photothermal effect and phononics under multi-photon excitation conditions

研究代表者

白幡 直人（SHIRAHATA, Naoto）

国立研究開発法人物質・材料研究機構・国際ナノアーキテクトニクス研究拠点・グループリーダー

研究者番号：80421428

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：水溶性シリコン量子ドット(SiQD)バイオマーカーを合成し、当該マーカーに発現するフォトサーマル効果の機能開発を行うことを目的とした。1.SiQDにおけるフォトサーマル効果の検証、2. SiQDと血漿タンパク質の相互作用、等の項目について研究を実施した。1について、QDサイズが大きくなるに伴い発生する熱量は増大した。2について、SiQDに対して血漿タンパク質を作用させたところ、グロブリン以外のタンパク質変性は小さかった。また、カルボキシル基で修飾したQDの細胞取り込みは小さかった。以上、QDが正常細胞へ取り込まれることを防ぎ、逆にがん細胞への取り込みを促進させるQD設計指針が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍等の治療において、セラノティクスの考え方が広く普及し発展が期待されるなか、強い関心は生体内における該腫瘍等をリアルタイムに診察し、同時に、患者への身体的負担を最小限に、該腫瘍等を選択的に死滅/除去させる治療システムの開発にある。がん細胞に特異的に結合する可能性を有し、一方で正常細胞には結合しない特異性を発現する生体に無毒なナノ粒子の合成開発に成功した。さらに当該ナノ粒子はフォトサーマル効果を発現した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was the colloidal synthesis of a water-soluble silicon quantum dot (SiQD) biomarker and develops the function of the photothermal effect expressed in the marker. First, we investigated the photothermal effect in SiQD, and found that the amount of heat generated in SiQD under sequential absorption of photons increases as the QD size increased. Second, when plasma protein was allowed to act on SiQD, we found that protein denaturation other than globulin was small. In addition, the cellular uptake of QD modified with a carboxyl group was small. As described above, the QD design guideline for preventing the uptake of QD into normal cells and conversely promoting the uptake into cancer cells has been clarified.

研究分野：ナノ粒子科学

キーワード：バイオマーカー 蛍光 フォトサーマル効果 量子ドット コロイダルナノ粒子 血漿タンパク質 シリコン

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍等の治療において、セラノティクスの考え方が広く普及し発展が期待されるなか、強い関心は生体内における該腫瘍等をリアルタイムに診察し、同時に、患者への身体的負担を最小限に、該腫瘍等を選択的に死滅/除去させる治療システムの開発にある。

イメージングについては、医療・創薬の最先端研究において細胞や生体内をリアルタイムに観察することは、生命機能を理解するための重要な役割を担っている。遺伝子や蛋白質が生体内のどこで・どのように働いているかを観察し、またモニタリングし、そして解析するために画像化技術の発展が重要である。最もよく知られる画像化法は、コンピューター断面撮影法(CT)、放射性同位元素を用いた陽電子放射断層撮像法(PET)、核磁気共鳴画像法(NMR)等の非侵襲性イメージング技術であり、基礎から臨床医学に至るさまざまな分野で利用されている。蛍光イメージング技術は、空間分解能、時間分解能、フィードバック特性に優れる。そこで広範囲の高速イメージングが行える CT 等と組み合わせて医療診断に使われることが期待されている。

蛍光イメージング法の利用方法は波長域によって異なる。例えば、蛍光ガイド手術に代表されるようなヒトの視覚化が必要なケースでは可視短波長帯における蛍光体が必要であるし、低侵襲条件下でのモニタリングや観察を行うには「生体の窓」と呼ばれる生体透過性の高い近赤外波長域(700 - 2000nm)で発光する蛍光体が必要となる。表皮から数ミリメートルの深さまでの生体内を非侵襲で観察できるからである。各蛍光体に必要なとされる要件の一つに挙げられる低生毒性の量子ドット(Quantum dots, QDs)蛍光体の開発は発展途上である。

2. 研究の目的

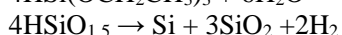
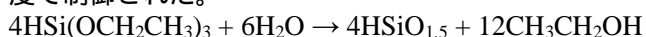
半導体 Si 結晶に光を照射したときに発現する光励起子の閉じ込め効果に着目した。Si のバルクバンドギャップは室温で 1.14eV なので、そのフォトンエネルギーはおおよそ 1080nm に相当する。従来からの報告に従うと光励起子の量子閉じ込め効果に基づき変調できる波長域は 600 - 1030nm であるので生体第 1 の窓をフルに活用できる。

本研究では、1) Si のサイズ制御を精密に行うことで可視短波長域にける蛍光出現の可能性を探索し、また 2) 近赤外発光する水溶性 SiQD の血漿タンパク質との相互作用を明らかにし、さらに 3) 水溶性 SiQD のフォトサーマル効果について初めて明らかにすることで、癌セラノスティクスの開発に資する材料として SiQD の可能性を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

水素終端 SiQD 合成

SiQD は我々が開発した手法で合成した(Adv. Funct. Mater. 2014, 2014, 24, 7151.)。具体的には、式 1 に示すようにテトラエトキシシラン(TEOS)を加水分解して得た水酸化シリセスキオキキオキサンを、式 2 に従い熱的不均化させ、次にフッ酸溶液中でシリカを除去することで得た。この SiQD の表面は水素原子で終端されていた。QD のサイズは加水分解反応の条件と不均化反応の温度で制御された。



プルロニック修飾による水溶性 Si ナノ粒子の合成

SiQD へ水溶性を付与するために 2 つの手法を用いた。第 1 は両親媒性分子であるプルロニック(Pluronic F127)分子である。H-SiQD の表面へ 1-デセンのヒドロシリル化反応を通じてデカン単分子修飾を施す(SiQD-De)。SiQD-De のトルエン溶液とプルロニック分子を分散させた水相のシェイクし数日間静置すると二層分離し、その後トルエンが蒸発し水相にプルロニックの逆ミセル粒子に内包された SiQD-De/F127 を得た。

ウンデカン酸終端による水溶性 SiQD の合成

1-ウンデセン酸のヒドロシリル化反応によりウンデカン酸終端 SiQD を得た。SiQD-De/F127 は、SiQD-De の集合体 (~100nm) をプルロニック逆ミセルでコートしたサブマイクロサイズの大きさの粒子であったが、ウンデカン終端 SiQD は個々の QD 表面へウンデカン酸が結合することで水溶性が付与された。

4. 研究成果

可視短波長で発光する SiQD の合成 (Nano Letters 2020, 20, 1491.)

図 1 に示すように、緑色蛍光を示す SiQD を世界で初めて発表した。可視発光を得るには、QD サイズを 2nm より小さくする必要があるのである。従来、2nm よりも小さなサイズで粒子を分画することが難しかったが、本研究では、1.1 - 2.0nm のサイズ範囲で 5 種類

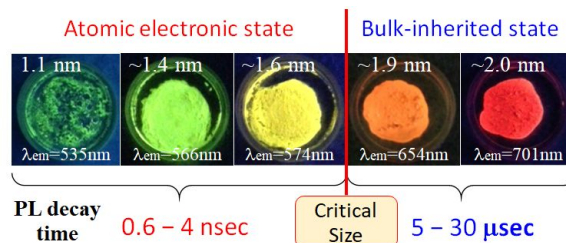


図 1. 粒子のサイズに依存して、蛍光発光波長を連続的に制御できる SiQD

に分画することに成功した。1.7nm よりも大きな粒子では、既知のように、蛍光波長を 600 - 720nm(橙 - 赤色相当)間で制御できた。これらの発光の蛍光寿命は粒子のサイズに依存して、5 - 30 μ sec である。興味深いことに、1.7nm よりも小さなサイズで粒子を合成すると、発光色は 535 - 575nm (緑 - 黄色に相当)の波長域で制御できた。特筆すべきは、1.1nm の粒子における 535nm-蛍光の寿命は 600psec と計測された点にある。この値は、2nm の赤色発光に比べると 5 桁短いスケールである。このようなサイズの変化に基づき蛍光寿命がドラスティック変わる物質系は、Au ナノ粒子でしか報告がない (Science 2019, 364, 279)。

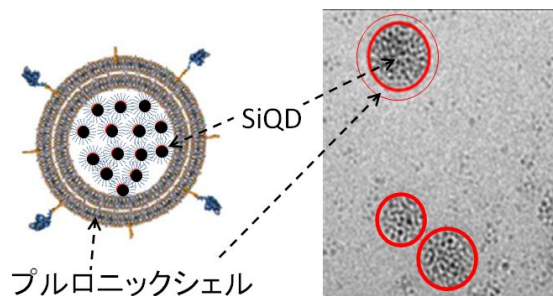


図 2. プロニックシェルコートにより水溶性が付与された SiQD-De/F127 粒子の模式図と透過型電子顕微鏡象

SiQD において、PL の蛍光寿命が短くなるメカニズムを考察するために、PL の温度依存性を調べた。最初にサンプルを 4K にまで冷やし、計測温度を上昇させると PL スペクトルは、温度上昇に伴い、低光子エネルギー側へシフトし、PL 強度は 300K でおおよそ半分となった。PL 強度の減少は一般に無輻射失活チャンネルの熱的活性化で説明することができる。PL 減少挙動における見かけの活性化エネルギーは 66meV 程度と見積もられ、この値は発光が欠陥に起因しないことを示唆している。また、一般に SiQD における PL ピークエネルギーの温度依存性は Varshni の式に従うことが知られているが、1.7nm 以下のナノ粒子からの発光挙動は当該式に従わなかった。PL スペクトルの半価幅の温度依存性から、2nm-QD はバルク結晶と同程度のフォノンエネルギー (70meV) と電子-フォノンカップリング係数 (101meV/K) を示すが、1.1nm-QD のフォノンエネルギーや電子-フォノンカップリング係数は一桁の値であった。1.1nm の SiQD はモデル計算上 37 個の原子で形成される。そのような小さなサイズにおいては電子やフォトンから波の性質がほとんど現れず、電子構造は分子のように HOMO-LUMO 準位を構成すると議論された。

近赤外発光する水溶性 SiQD の血漿タンパク質との相互作用 (Nanomaterials 2020, 10, 2250)

図 2 に、本研究で合成した水溶性バイオマーカー「SiQD-De/F127」の構造を示す。QD のサイズを制御することで「生体の第一窓 (= 650 - 950 nm)」波長域で発光波長可変を達成した。図示されるように、内殻を構成するデセン (De) 鎖が発光量子収率 (PLQY) を増強し、各近赤外波長帯で発光量子収率 30 - 60% を実現した。プルロニック F127 分子は逆ミセルを形成し Si-QD-De 数十個を包み込むので、水溶性が付与される。この水溶性バイオマーカーの粒子径はおおよそ 70-100nm ほどで、粒度分布は 50-120nm の間で広がった。当該バイオマーカーは、蛍光寿命がマイクロ秒と長いので時間分解による蛍光イメージングでは自家蛍光の問題を回避できた。SiQD に特徴的な大きな「吸収 - 発光」ストークスシフトに着眼し、光励起したところ「シグナル - 背景色」比の高い蛍光イメージング像を得た。

当該水溶性ナノ粒子に対して血漿タンパク質であるアルブミン、グロブリン、フィブリノーゲン、トランスフェリンを作用させたところ、アルブミンとトランスフェリンはナノ粒子上へハードコロナを、グロブリンとフェブリノーゲンはナノ粒子上へソフトコロナを形成した。また、タンパク質の構造変化についても研究を進めた。驚くことに、アルブミン、フィブリノーゲン、トランスフェリンはナノ粒子濃度増大に伴いタンパク質変性が当初起こるが、ある閾値を境にリカバリーが起こる現象が観察された。さらにナノ粒子濃度を上げると、リカバリー現象が促進されオリジナル値まで復活する珍しい現象が観察された。グロブリンだけはタンパク質変性が起こることが明らかとなった。プルロニックコートでは最表面は水酸基で修飾されているので表面電荷がニュートラルに近く細胞へ取り込まれないことが明らかとなった。このことはゼータ電位測定からもサポートされた。図 3 では、唯一 SiQD-De/F127 を取り込んだ「マウス胎児から分離した NIH3T3 細胞」の蛍光イメージング像である。細胞質が SiQD の蛍光によりマーキングされることが確認された。粒子は細胞基質には取り込まれるが、核には侵入していないことが中央像より分かる。細胞外および細胞内領域との間の良好なコントラストが見られた。本研究で開発したナノ粒子に対する細胞生存率の計測を行ったところ毒性は、半導体バイオマーカーに比べて、格段に低いことが示された。

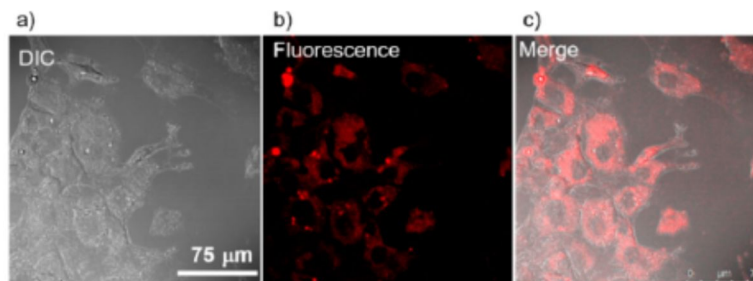


図 3. SiQD-De/F127 を作用させた NIH3T3 細胞の (a) 微分干渉顕微鏡象、(b) 一光子励起蛍光顕微鏡象 (405nm 励起)、および (c) 重ね合わせ画像

水溶性 SiQD におけるフォトサーマル効果の解明 (J. Phys. Chem. C 2021, 125, 3421-3431)
 エレクトロニクスとフォトニクスはナノサイエンスを積極的に使用することで高度に発展したが、熱は長きにわたってマクロに取り扱われてきた。ナノ結晶の格子振動の量子であるフォノンの輸送を制御するフォノンエンジニアリングを深く理解することは、デバイスの微小化に依存して顕著化される放熱の解決策につながると期待され「熱フォノニクス」の学術分野形成が急がれている。本研究では医療の視点から熱フォノニクスに着目した。従来は金、グラファイト、化合物半導体のナノ粒子を対象にして研究が行われてきたが、我々は初めてシリコンの量子ドット (SiQD) を合成対象に選んだ。その理由の一つは、Si は尿素経路で生代謝されると考えられており生体毒性が低いことがこれまでの研究で分かっていたからである。

水溶性 SiQD の合成は、図 4 に示す通りトリエトキシシランの加水分解物を熱的不均酸化させることで得た SiO₂/SiQD 粉末をフッ化水素処理した後に、ウンデカン酸のヒドロシリル化を通じて得た。

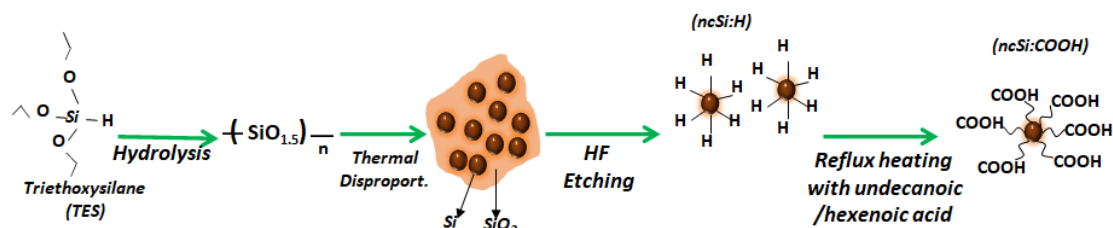


図 4. ウンデカン終端 SiQD の合成スキーム

QD 表面をカルボキシル基終端していることは、赤外吸収スペクトルに加え、ゼータ電位が pH 7 の水溶液中で -35mV であったことから確かめられた。次に、SiQD のフォトサーマル効果を調べた。まずは、Raman 分光法によりストークス/アンチストークスシフトを、弾性散乱光をブロックすることで同時計測し、計測された各々のピークの強度比から、式 (3) を通じて算出した。発生温度の QD サイズ依存性を明らかにするために、Si において光励起子の量子閉込め効果が発現する 5nm 以下で、3 種類の平均粒子径を有するサンプルを合成した。具体的には、4.7、3.7、2.2nm の SiQD を合成して Raman 計測に使用した。

$$T = \frac{h\vartheta_K}{k \left[-\ln \left(\frac{\sigma[\alpha\vartheta_K]_S}{\sigma[\alpha\vartheta_K]_A} \right) \left(\frac{I_A[\vartheta_K]}{I_S[\vartheta_K]} \right) \left(\frac{\vartheta_0 - \vartheta_K}{\vartheta_0 + \vartheta_K} \right)^4 \right]} \quad (3)$$

Raman cross section
Anti-Stokes to Stokes peak ratio
Frequency ratio

図 5 に、我々のサンプルの発熱温度をプロットし、文献値と比較した。従来の文献では主に Si 粒子サイズがバルクの励起子ボーア半径 5nm よりも遙かに大きな (= 量子サイズ効果を示さない) サイズ領域 (27 - 41nm) において、励起光と発熱温度の関係が調べられている。粒子サイズが小さくなるに従い発熱量は小さくなる傾向が見られる。この傾向は QD でも同様であった。4.7~2.2nm の QD サイズに対して発熱量はサイズ依存性を示した。このメカニズムを明らかにするために、QD それぞれの PL スペクトルの温度依存性を 4.2-300K の範囲で計測したところ、計測温度上昇に伴い、4.7nm-SiQD の PL 強度は最大で 1/440 倍減少した。3.7nm-SiQD では 1/70 倍、2.2nm-SiQD では 1/10 倍であった。PL 強度の連続的な減少は、計測温度増大に伴い無輻射失活チャンネルが活性化することに起因すると考えられたことから、アレニウスにより見積もられた PL 減少の活性化エネルギーは、4.7nm-SiQD で 143 ± 17、3.7nm-SiQD で 51 ± 5、2.2nm-Si-QD で 42 ± 4meV となり、これらの値は PL 強度の温度上昇に伴う減少は、無輻射失活チャンネルの活性化であると熱力学的に結論づけられた。PL スペクトル半値幅の計測温度依存性から見積もられた LO フォノンエネルギーは、4.7nm-SiQD と 3.7nm-SiQD に対しておよそ 60meV とバルク値と良く一致した。このことから電子-フォノン相互作用が強いことが示された。一方、2.2nm-SiQD で見積もられた LO フォノンエネルギーは小さかった。このことは、小さな QD 中では電子と正孔が近い距離にあり閉じ込め効果が強いので互いの波動関数の重なりも大きく、フォノン-電子相互作用が弱くなったと考えられる。以上のことから、シングルナノ-オーダーの微小領域における光熱変換特性は QD サイズに依存することが分光学的にも明らかにされた。このような発熱温度の違いが熱伝搬にどの程度影響するかを調べるために、SiQD-COOH の 2.5mL 水溶液を準備し、532nm レーザー照射下で熱電対で水溶液の温度変化を調べた。粒子サイズ依存性を明らかにするた

めに、2.2nm と 4.7nm の SiQD をサンプルに用いた。QD を含まない水だけの場合、当該レーザー照射条件下では温度上昇は認められなかった。2.2nm-SiQD とは大きく異なり、4.7nm-SiQD では、レーザー照射後、1分ほどで温度が上昇を始め、7分経過後には8ほど上昇した。その後温度上昇曲線は緩やかとなり、最大で 10 の温度上昇が見られた。このような結果から、発熱メカニズムは次のように議論された。レーザー光を吸収することで SiQD 内に生成した光励起キャリアは無輻射失活のチャンネル（主に表面欠陥）にトラップされ、そのエネルギーは熱に変換され QD の結晶格子を振動させ、フォノンとして系外へ散逸する。それゆえ、無輻射チャンネル密度が高く、励起光吸光度が大きい 4.7nm-SiQD で発熱量が多かった。

以上の結果から、SiQD をバイオマーカーに使用すれば、量子サイズ効果に基づく蛍光発光をガイド光にして特定の細胞を温めることが可能であることが明らかとなった。

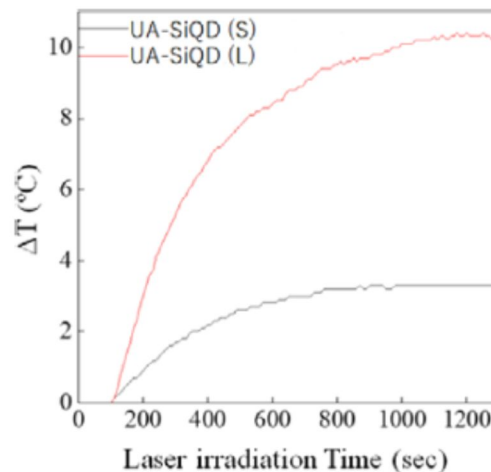


図 5. 532nm レーザー照射下における 2.2nm-SiQD(S)水溶液と 4.7nm-SiQD(L)水溶液の温度変化

ことが可能であることが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Shirahata Naoto, Nakamura Jin, Inoue Jun-ichi, Ghosh Batu, Nemoto Kazuhiro, Nemoto Yoshihiro, Takeguchi Masaki, Masuda Yoshitake, Tanaka Masahiko, Ozin Geoffrey A.	4. 巻 20
2. 論文標題 Emerging Atomic Energy Levels in Zero-Dimensional Silicon Quantum Dots	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nano Letters	6. 最初と最後の頁 1491 ~ 1498
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.nanolett.9b03157	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Ghosh Batu, Shirahata Naoto	4. 巻 9
2. 論文標題 All-Inorganic Red-Light Emitting Diodes Based on Silicon Quantum Dots	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Crystals	6. 最初と最後の頁 385 ~ 385
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cryst9080385	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Ghosh Batu, Shirahata Naoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Influence of Oxidation on Temperature-Dependent Photoluminescence Properties of Hydrogen-Terminated Silicon Nanocrystals	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Crystals	6. 最初と最後の頁 143 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cryst10030143	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shirahata Naoto	4. 巻 none
2. 論文標題 The quest for perfect quantum dot biomarkers	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Asia research news	6. 最初と最後の頁 22 ~ 23
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chinnathambi Shanmugavel, Hanagata Nobutaka, Yamazaki Tomohiko, Shirahata Naoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Nano-Bio Interaction between Blood Plasma Proteins and Water-Soluble Silicon Quantum Dots with Enabled Cellular Uptake and Minimal Cytotoxicity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nanomaterials	6. 最初と最後の頁 2250 ~ 143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/nano10112250	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ozbilgin Irem Nur Gamze, Ghosh Batu, Yamada Hiroyuki, Shirahata Naoto	4. 巻 125
2. 論文標題 Size-Dependent Photothermal Performance of Silicon Quantum Dots	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 3421 ~ 3431
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c10027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Yamada Hiroyuki, Saitoh Noriyuki, Ghosh Batu, Masuda Yoshitake, Yoshizawa Noriko, Shirahata Naoto	4. 巻 124
2. 論文標題 Improved Brightness and Color Tunability of Solution-Processed Silicon Quantum Dot Light-Emitting Diodes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry C	6. 最初と最後の頁 3333 ~ 23342
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.0c06672	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Naoto Shirahata
2. 発表標題 Solution-Processed Silicon Quantum Dots for Optoelectronics and Bio Applications
3. 学会等名 The 13th Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (PACRIM13) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Irem Nur Gamze Ozbilgin, Shanmugavel Chinnathambi, Naoto Shirahata
2. 発表標題 Investigation of Photothermal Effect in Silicon Quantum Dots for Bioapplications
3. 学会等名 The 13th Pacific Rim Conference of Ceramic Societies (PACRIM13) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白幡直人
2. 発表標題 重金属フリーコロイダル量子ドット粉末の湿式調製と光学的応用
3. 学会等名 粉体粉末冶金協会2020年度秋季大会(第126回講演大会) (招待講演)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

https://samurai.nims.go.jp/profiles/shirahata_naoto?locale=ja

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
カナダ	トロント大学			
フィンランド	ヘルシンキ大学			
インド	TDBカレッジ			