

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：82108

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390024

研究課題名(和文) 発光色を近赤外でチューニングできる水溶性シリコンナノ粒子の合成

研究課題名(英文) Synthesis of functional NIR-emitting water dispersible silicon nanocrystals

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・准主任研究者

研究者番号：80421428

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、生体透明性の高い近赤外波長域($\lambda = 700 - 1000\text{nm}$)で活用できる2光子励起用の蛍光バイオマーカーを開発した。本マーカーは、コアにシリコンを有するダブルシェル構造から成る。シリコンの特長は、生体毒性が他物質に比べて格段に低い、量子効果に基づいて発光波長を該波長域でチューニングできる、発光ピーク波長を該波長域で連続的にチューニングできる、等である。内殻を構成する炭化水素鎖は、発光量子収率を30%以上へ増強する役割を担う。外殻は、マーカーに水溶性を付与する。さらに外殻の一部官能基を変換することで、特定の分子に対する標的機能付与や蛍光共鳴エネルギー移動も可能となった。

研究成果の概要(英文)：Functional near-IR (NIR) emitting nanoparticles (NPs) adapted for two-photon excitation fluorescence cell imaging were obtained starting from octadecyl-terminated silicon nanocrystals (ncSi-OD) of narrow photoluminescence (PL) spectra having no long emission tails, continuously tunable over the 700-1000 nm window, PL quantum yields exceeding 30%, and PL lifetimes of 300 μs or longer. These NPs, consisting of a Pluronic F127 shell and a core made up of assembled ncSi-OD kept apart by an octadecyl (OD) layer, were readily internalized into the cytosol, but not the nucleus, of NIH3T3 cells and were non-toxic. Asymmetrical field-flow fractionation (AF4) analysis was carried out to determine the size of the NPs in water. HiLyte Fluor 750 amine was linked via an amide link to NPs prepared with Pluronic-F127-COOH, as a first demonstration of functional NIR-emitting water dispersible ncSi-based nanoparticles.

研究分野：ナノ粒子科学

キーワード：バイオイメージング シリコン 量子ドット 近赤外発光 ナノ粒子 In-vivo 蛍光共鳴エネルギー移動 水溶性

1. 研究開始当初の背景

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。もともと in-vivo イメージングは、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モニタリングし、そして解析する「生体分子イメージング」技術の発展とともに急速に広まってきた画像化法である。生体分子の複雑な挙動を可視化するには蛍光を用いるイメージング技術が汎用的であり、とくに、生体透過性の高い 650 - 2000 nm 波長域での近赤外光を利用したイメージング法は、非侵襲性で生体深部の観察が可能のため、疾病研究や薬剤開発における in-vivo 画像化法の中核となりつつある。しかしながら、当該波長域で活用できる蛍光バイオマーカーの種類は極めて少なく、さらに次のような欠点を有する。易退色性である、生体毒性の高い構成元素を含む、生体で分解吸収されてしまう、構成元素に重元素を含む、発光量子収率が低い、発光スペクトルがブロードである、励起源に紫外光や短波長可視光が必要である、等である。

2. 研究の目的

このような現状を背景に、応募申請者は、シリコンのナノ粒子を用いることで、先に示した問題点を全て解決できることを示唆する研究成果を積み重ねてきた。本研究課題では、シリコンをナノ粒子化し、その粒子表面に生体分子修飾を施すことで「波長変調できる近赤外蛍光バイオプローブ」を開発することを目的とする。

3. 研究の方法

1) 発光量子収率を増強する表面構造の解明
バルク結晶と同じくダイヤモンド構造を有するシリコンナノ結晶粒子のサイズを制御することで、フォトルミネッセンス (Photoluminescence, PL) スペクトルのピークを「第 1 の生体窓 ($\lambda = 650 - 950\text{nm}$)」と呼ばれる赤 - 近赤外の波長域で変調するためには、シリコンナノ結晶の粒子サイズを 2 - 8nm の範囲で制御する必要があった。最終的には、合成条件の最適化によって、平均粒子径を ± 1.5 の誤差で制御できることが分かった。このようにして合成されたシリコンナノ粒子の表面は、水素原子で終端された。水素原子でキャッピングされた状態では、量子効果に基づくシリコンナノ粒子からの発光の量子収率は低いので、その表面を炭化水素基で置換することで、発光量子収率を増強させた。この発光効率増強のメカニズムを解明するために、PL スペクトルの温度依存性を 4 - 300K の温度範囲で測定した。また、時間分解 PL 寿命の温度依存性を調べた。ナノ結晶粒子の微細構造は、実動環境対応物理分

析電子顕微鏡 (JEM-ARM200F-G) を使って詳細に調べた。

2) 2 光子励起に好適なバイオマーカーの開発
シリコンナノ結晶のサイズを 2 - 8nm の範囲で制御すれば、「第 1 の生体窓 ($\lambda = 650 - 950\text{nm}$)」と呼ばれる赤 - 近赤外の波長域で、PL 発光ピークを連続的に制御できる。さらに、該コアを炭化水素膜で終端することで、発光量子収率を増強することが可能となる。バイオマーカーへの応用を考えると、現状メチル基終端故に疎水的であるナノ粒子表面を水溶性に変性する必要がある。

本研究では、表面の濡れ性を変えるために、両親媒性分子の中でも特に生体親和性が高いプルロニック 127 でナノ粒子表面を保護した。具体的には、水層に分散させた該両親媒性分子へナノ粒子を含んだトルエン溶液を混合させ静置することで、両親媒性分子に保護されたシリコンナノ粒子を得た。このようにして合成された水溶性シリコンナノ粒子について、発光特性、pH 安定性、血清アルブミン中での安定性を評価した。また、CCK-8 アッセイキットを用いて、該水溶性ナノ粒子の細胞毒性試験を行った。2 光子励起法に基づくバイオイメージングは、In-vitro の環境下で、NIH3T3 cell サスペンション (105 cells per mL) を用いて行った。

3) ナノ結晶への不純物ドーピング法開発

シリコンナノ結晶中へ、遷移金属イオンを不純物ドーピングさせる合成方法はこれまでに報告された例がない。本研究では、置換型の不純物ドーピング法を新規に開発するために、熱的不均化反応を利用した。具体的には、トリエトキシシランと遷移金属の塩化物を加水分解することで得たアモルファス状の Silsesquioxane を真空中、1100 °C、2hrs 熱処理することで、 Si^{3+} を Si^0 と Si^{4+} に不均化させた。遷移金属種として、ニッケル(Ni)、マンガン(Mn)、コバルト(Co)の塩化物を使った。合成物の結晶相同定は XRD、酸化数の変化は XPS を用いて行った。粒子径は、XRD パターンより Scherrer の式から見積もった。これらの値は、透過型電子顕微鏡より見積もった平均粒子径と比較された。各合成物の光学特性の評価は、紫外可視分光法、PL 分光法を用いて行った。

4. 研究成果

1) 発光量子収率を増強する表面構造の解明
ダイヤモンド構造を有するシリコンナノ結晶粒子は、蛍光寿命の測定から間接遷移型バンド構造を有していると考えられている。シリコン結晶のナノサイズ化によって発現すると考えられる量子効果に基づき、発光量子収率は、バルク結晶に比べて増大するが、水素終端シリコンナノ結晶では、数パーセント以下である。赤色発光で 5%程度、近赤外発光で、0.1 ~ 1%ほどである。面白いことに、

これらのナノ結晶表面において、水素原子を炭化水素鎖へ置き換えることで、発光量子率は革新的に増強される。この置換は、通常、アルケンのヒドロシリル化によって完了する。増大する発光量子率は、ケースバイケースであるが、一般的に 30%以上、最高値で、70%を超える研究例もある。一方で、増強メカニズムは報告されていない。本研究では、水素終端化シリコンナノ構造において、発光量子率を減じる無輻射失活のチャンネル構造を明らかにするために、PL スペクトルの温度依存性を調べた。PL スペクトルは、3K から温度を室温へ上げていくと、レッドシフトした。これは、測定温度が上昇するに伴い膨張する格子（バンドギャップは小さくなる）及び、励起キャリアとフォノンの相互作用に基づくと考えられた。興味深いことに、表面終端分子の差異が、PL スペクトル強度の温度依存性には強く影響を及ぼした。代表的な比較例を図 1 に示す。水素終端構造（ncSi:H）と炭化水素終端構造（ncSi-OD）を比べると、測定温度増大に伴い水素終端構造では、PL 強度比は大きく減少する。これに対して、炭化水素で被覆したナノ粒子では、強度比の減少度が極めて小さい。この違いは、水素終端ナノ粒子内に無輻射失活のチャンネルが数多く存在していることを示唆している。

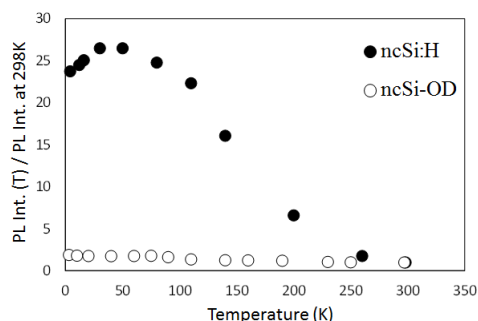


図 1. 表面修飾基の違いに基づき発現する異なる PL 強度温度依存性. Y 軸は、室温での PL 強度に対する各測定温度での PL 強度を示している。

無輻射失活チャンネルを具象化するために、ラマン分光測定及び透過型電子顕微鏡測定を行った。図 2 に代表的な HAASF-STEM 像を示す。ナノ粒子の中心では、Si-Si 結合で構成されるチャンネル構造が周期的に並び、バルク結晶と同じ d 値で、ダイヤモンド結晶を形成している。これに対し表面では、チャンネル構造がもはや周期的ではなくアモルファス化している様子が分かる。表面から中心に向かっては、格子歪みによる構造緩和層が形成している。アモルファス相および構造緩和を支持する格子歪みの領域においては、Si-Si 結合が切断され多くの欠陥が生じている。これらの欠陥は、光励起キャリアのトラップサイトとして働くので、発光量子収率を減少させる。大変興味深いことに、表面を炭

化水素鎖で被覆することで、ナノ粒子表面近傍まで、アモルファス相が形成しないことが明らかとなった。それゆえ、表面欠陥数が、水素終端表面に比べ圧倒的に少なく、結果として、発光量子収率が高くなったと考えられる。ラマン分光の結果もこれを支持した。

以上の結果から、炭化水素鎖は、Si 表面原子の移動を妨げるリンカーのような役割を担っていると考察された。

2) 2 光子励起に好適なバイオマーカーの開発

本研究では、シリコン系バイオマーカーを使った「生体の窓」の波長域における 2 光子励起蛍光イメージングに世界で初めて成功した。シリコンはこれまでも 1 光子励起によるバイオイメージング用の蛍光体として利用が検討されてきたが、発光量子効率が高い等といった問題に悩まされてきた。本研究では、コアである結晶シリコンを炭化水素基と両親媒性分子で覆う、新しいコア・ダブルシェル構造を考案した（図 2A）。コアのサイズを制御することで「生体の窓」波長域で発光波長可変を達成した（図 2B）。内殻を構成する炭化水素鎖が発光量子収率を増強するメカニズムを解明し、全ての波長帯で発光量子収率 30 - 48%を実現した。そして、内殻を両親媒性分子で覆うことで水溶性を付与した。当該バイオマーカーは、蛍光寿命がマイ

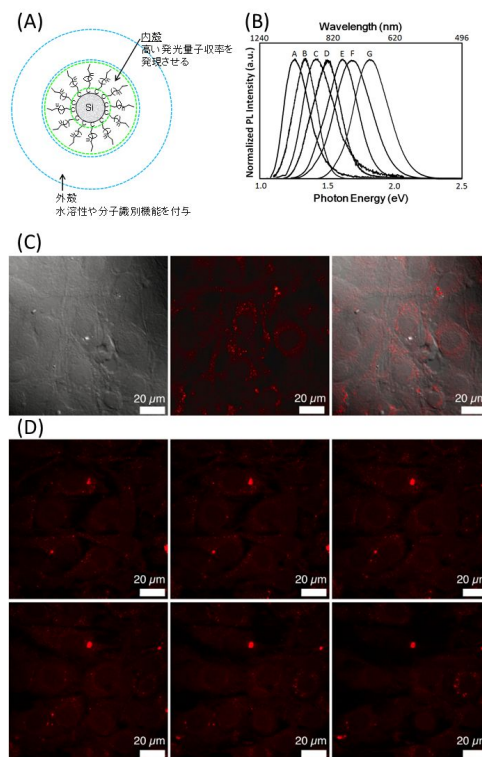


図 2. (A) ダブルシェル構造を有する生体毒性の低い水溶性シリコンナノ粒子、(B) 近赤外波長域での PL スペクトルチューニング、(C) NIH3T3 細胞の微分干渉顕微鏡像(左)、共焦点蛍光顕微鏡像(中央)、両顕微鏡像を重ね合わせた像(右)、(D) 共焦点 Z-スタックイメージ (0.6 μm 間隔, 6 枚)

クロ秒と長く自家蛍光の問題を回避できる。シリコンナノ結晶に特徴的な大きな「吸収 - 発光」ストークスシフトに着眼し、2光子励起したところ「シグナル - 背景色」比の高い蛍光イメージング像が得られた。図 2C では、マウス胎児から分離した NIH3T3 細胞が蛍光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った。図 1D に示す Z-スタック像から、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。本研究開発のナノ粒子に対する細胞生存率の計測を行ったところ細胞への毒性は、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。

3) Si ナノ結晶への不純物ドーピング法開発
本研究では、遷移金属イオンを Si ナノ結晶へ置換固溶させる汎用的な合成法を確立した。図 3 に示すように、遷移金属前駆体を含む Silsesquioxane を高温で不均化させることで、ドーピングが可能なが分かった。

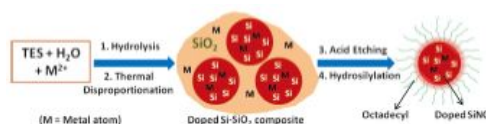


図 3. Silsesquioxane の熱的不均化反応に基づく不純物イオンドーピング方法のプロセス

ドーパントイオンがない Silsesquioxane はアモルファス状のゲルであるため、図 4 に示すとおり無色透明であるが、ドーパントが存在すると、無色ではなくなる。例えば、Co イオン前駆体がドーパントである場合は水色を呈し、Ni イオン前駆体を含む場合は、茶褐色であった。



図 4. 各種ドーパント前駆体を含む Silsesquioxane のデジタルカメラ写真

これらのゲルを熱的に不均化させた後に、フッ化水素酸で、酸化シリコンを除去、続いてアルケンのヒドロシリル化することで、水素

末端されていない副次生成物を除去した。これら不純物ドーパントの存在は、結晶粒子径を増大させるよう働いた。不純物イオンの存在は、XPS で分析された。Co イオンのケースでは、778.5eV に金属コバルト、つまり Co(0) の存在を示す小さなピークが観察された。このとき見積もられた量と ICP-OES 分析から見積もられた Co 量はほぼ一致した。以上より、Co イオンが Si ナノ結晶中へ置換固溶していると結論づけた。これら不純物ドーピングにより PL スペクトルが 1 μ m の発光波長域へレッドシフトすることが確認された。さらに、1 μ m に相当する光子エネルギー放射の量子収率も 30% を超えることが明らかとなった。950nm よりも長波長は、生体第二の窓と呼ばれる波長域に相当し、これまで、シリコンナノ粒子が足を踏み入れたことのない新しい光の領域であるので、今後の研究の発展が興味深い。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 6 件)

- 1) S. Chandra, Y. Masuda, N. Shirahata, F. M. Winnik, "Transition Metal Doped NIR Emitting Silicon Nanocrystals", *Angew. Chem. Int. Ed.* (査読有) 56 (2017) 6157-6160 DOI: 10.1002/anie.201700436
- 2) S. Chandra, G. Beaune, N. Shirahata, F. M. Winnik, "A One-Pot Synthesis of Water Soluble Highly Fluorescent Silica Nanoparticles", *J. Mater. Chem. B* (査読有) 5 (2017) 1363-1370 DOI: 10.1039/c6tb02813f
- 3) B. Ghosh, M. Takeguchi, J. Nakamura, Y. Nemoto, T. Hamaoka, S. Chandra, N. Shirahata, "Origin of the Photoluminescence Quantum Yields Enhanced by Alkane-Termination of Freestanding Silicon Nanocrystals: Temperature-Dependence of Optical Properties", *Scientific Reports* (査読有) 6 (2016) 36951 DOI: 10.1038/srep36951
- 4) S. Chandra, B. Ghosh, G. Beaune, U. Nagarajan, T. Yasui, J. Nakamura, T. Tsuruoka, Y. Baba, N. Shirahata, F. M. Winnik, "Functional Double-Shell Silicon Nanocrystals for Two-Photon Fluorescence Cell Imaging: Spectral Evolution and Tuning", *Nanoscale* (査読有) 8 (2016) 9009-9019 DOI: 10.1039/C6NR01437B
- 5) B. Ghosh, Y. Masuda, Y. Wakayama, Y. Imanaka, J. Inoue, K. Hashi, K. Deguchi, H. Yamada, Y. Sakka, S. Ohki, T. Shimizu, N. Shirahata, "Hybrid White Light Emitting Diode Based on Silicon Nanocrystals", *Adv. Funct. Mater.* (査読

有) 24 (2014) 7151-7160 DOI:
10.1002/adfm.201401795

6) B. Ghosh, N. Shirahata, " Colloidal Silicon Quantum Dots: Synthesis and Tuning the Emission in the Ranging from near-UV through Visible to near-IR ", Sci. Technol. Adv. Mater. (査読有) 15 (2014) 014207 DOI: 10.1088/1468-6996/15/1/014207

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 白幡直人、「ケイ素 炭素接合系ナノ粒子が導く発光物性と応用 (招待講演)」第 29 回日本セラミックス協会秋季シンポジウム、2016 年 9 月 7 日、広島大学 (広島県・東広島市)

2) S. Chandra, B. Ghosh, G. Beaune, U. Nagarajan, N. Shirahata, F. M. Winnik, " Functional Double-Shelled Silicon Nanocrystals for Two-Photon Fluorescence Cell Imaging: Spectral Evolution and Tuning " (Invited Talk), 分子・物質合成プラットフォームシンポジウム、2016 年 6 月 17 日、大阪大学 (大阪府・吹田市)

3) N. Shirahata, " Energy-gap Engineering of Nanosilicon toward Efficient Light Emitters (Invited Talk) ", PacifiChem 2015, Dec. 15-20, 2015 (Honolulu, Hawaii, USA)

4) N. Shirahata, " Organically-Terminated Silicon Nanoparticles: Synthesis, Separation by Emission and Applications (Invited Talk) ", Workshop on Advancement of Group IV Nanostructures, Nanophotonics and Nanoelectronics, 2014 年 11 月 18 日、神戸大学 (兵庫県・神戸市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：水溶性近赤外発光ナノ粒子及び蛍光標識材

発明者：チャンドラ ソロブ、白幡直人、ウィニック フランソワズ

権利者：物質・材料研究機構

種類：特許

番号：特許願 2015-059049 号

出願年月日：平成 27 年 3 月 23 日

国内外の別：国内

名称：発光性シリコンナノ粒子及び電流注入型発光素子

発明者：白幡直人、バトゥゴッシュ

権利者：物質・材料研究機構

種類：特許

番号：特許願 2014-250651 号

出願年月日：平成 26 年 12 月 11 日

国内外の別：国内

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

http://samurai.nims.go.jp/SHIRAHATA_Naoto-j.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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・准主任研究者

白幡 直人 (SHIRAHATA, Naoto)

研究者番号：80421428

(4) 研究協力者

ウィニック フランソワ

(WINNIK, Françoise)

チャンドラ ソロブ (CHANDRA, Sourov)

馬場 嘉信 (BABA, Yoshinobu)

安井 隆雄 (YASUI, Takao)

ゴシュ バトゥ (GHOSH, Batu)

竹口 雅樹 (TAKEGUCHI, Masaki)

増田 佳丈 (MASUDA, Yoshitake)

中村 仁 (NAKAMURA, Jin)