

Si ナノ結晶の発光と医療分野への応用展開

太田 誠一*・山口由岐夫**

Photoluminescence from Silicon Nanocrystals and Its Application in the Biomedical Area

Seiichi OHTA and Yukio YAMAGUCHI

Semiconductor nanoparticles, often called as quantum dots (QDs), have attracted much attention as biological labels. However, potential toxicity of heavy metals contained in conventional, compound semiconductor-based QDs (e.g., CdSe and CdTe) has hampered their practical application in biomedical area. In this review, we introduce silicon nanocrystals, which are heavy metal-free quantum dots. They are expected to have lower cytotoxicity than conventional QDs, while maintaining their excellent optical properties. We introduce synthesis method, optical properties, and cellular imaging application of silicon quantum dots (Si-QDs). Future application of Si-QDs in the biomedical area is also discussed.

Key words: silicon, quantum dot, nanocrystals, bio-imaging, diagnosis

半導体はナノ粒子化すると、量子サイズ効果（閉じ込め効果）によりバンド構造が変化し、粒径に応じた色の蛍光を示す。この特徴から、半導体ナノ粒子は量子ドットとよばれ、発光素子としての利用が期待されてきた。1998年、Science誌に量子ドットを用いた細胞イメージングが初めて報告されて以来^{1,2)}、バイオ分野においても量子ドットの応用は盛んに検討され、蛍光による外科手術支援や医療診断のマーカーなど、さまざまな応用が期待されている。

量子ドットの特徴は、蛍光波長をサイズによって変えることができる点である。これにより、単一の励起光によって多色の蛍光を実現することも可能である。また、光褪色への安定性も優れていることから、従来用いられてきた有機蛍光分子では褪色してしまい困難だった、長期の細胞観察も可能となる。このような優れた光学特性を有するにもかかわらず、量子ドットのバイオ分野での実用化は未だ限定的であり、イメージング試薬などの実験用途にとどまっている。その原因として、毒性への懸念が挙げられる。従来合成されてきたのはCdSe、CdTeなど化合物半導体の量子ドットであったが、これらは重金属を含むため、重金属

の溶出によって毒性を示すことが報告されている³⁾。溶出量自体は微量であることもあり、実際に人体に使用したときにどの程度の毒性が予測されるかについては現在も議論の続くところではあるが、長期にわたる重金属蓄積のリスクを考えると、他の材料による代替が望ましい。

この課題の解決策として、重金属フリーの半導体であるIV族半導体の量子ドットが近年注目されている。従来、IV族半導体は間接遷移型のバンド構造をもつため、発光素子には適さないとされてきたが、1990年にナノサイズのシリコン（ポーラスシリコン）が可視光領域の蛍光を示すことが報告され⁴⁾、その可能性が開かれた。また、IV族半導体のナノ粒子は、化合物半導体に比べると原料となる前駆体の分解温度が高く、合成が困難であったが、近年の技術の進歩により、現在ではいくつかの合成法が確立されつつある。

本稿では、代表的なIV族半導体の量子ドットであるシリコン量子ドット（Si-QD）の発光とその医療分野への応用について、最新の研究結果を紹介する。

* 東京大学大学院医学系研究科疾患生命工学センター（〒113-0033 東京都文京区本郷7-3-1） E-mail: s-ohita@chemsys.t.u-tokyo.ac.jp

** 東京大学大学院工学系研究科化学システム工学専攻（〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1）

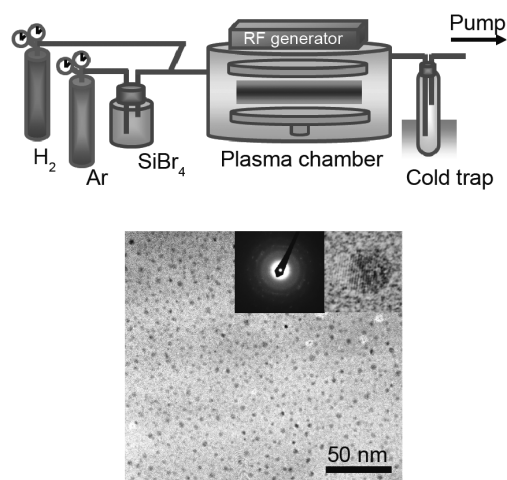


図1 プラズマCVDを用いたSi-QDの合成装置の模式図(上)と、合成された粒子の透過型電子顕微鏡像(下). 写真中の挿入図は、電子線の回折パターン(左)と顕微鏡像の拡大図(右)をそれぞれ表す.

1. シリコン量子ドットの合成

Si-QDの合成法の代表的なものとして、シリコンウェハーのエッチングが挙げられる⁵⁾. フッ化水素酸(HF)を用いた電解エッチングによりバルクのシリコンを微細化することで、ナノ粒子を得ることができる. このとき、得られる粒子の粒径は、エッチング時間などで制御することが可能である. しかし一方で、エッチングの過程で大半のシリコンが消失してしまうため、粒子の生成量が非常に少ないという課題も存在する. 比較的多い量の粒子を生成できるボトムアップ的な合成法としては、シラン(SiH₄)の熱分解による粒子合成が報告されている⁶⁾. シランの熱分解によってSi原子が生成され、これが過飽和となり、核発生・成長することで粒子が生成される. このとき生成される粒子はサイズが比較的大きいため、その後フッ化水素酸(HF)/硝酸(HNO₃)の混合液によって粒子をエッチングすることで、量子サイズ効果が現れる領域まで粒径を小さくする必要がある.

このようなエッチングの過程を経ずに一段階でシングルナノメートルの粒子を合成する方法として、筆者らは、プラズマCVD法を用いた合成を行っている⁷⁾. 前駆体である四臭化ケイ素(SiBr₄)をRFプラズマ場で分解してSi原子を生成し、これを反応器内で核発生・成長させることで、ナノ粒子を生成させることができる(図1上). 合成された粒子はシリコンのナノ結晶であり、透過電子顕微鏡では、結晶由来の回折パターンが観察される(図1下). また、粒子のサイズは、反応ガスの反応器内での圧力や滞留時間によって制御が可能である. この合成法では、生成する粒子がシングルナノメートルであるためエッチングがい

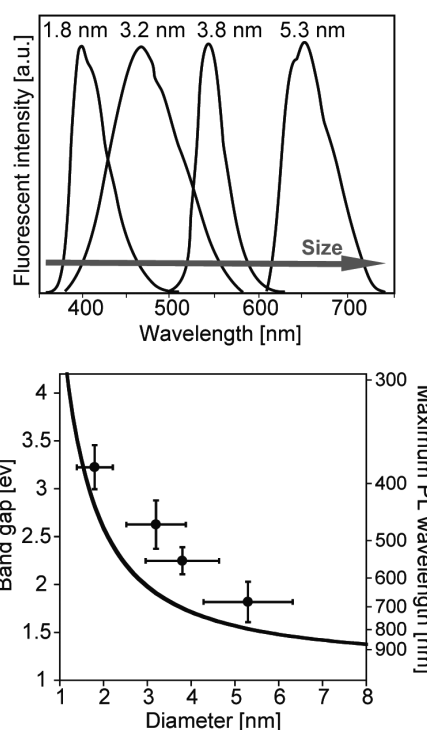


図2 (上) Si-QDの蛍光スペクトルの、粒子サイズによる変化. 粒径の異なるSi-QD(1.8~5.3 nm)の蛍光スペクトルを、360 nmの励起光を用いて測定した. (下) Si-QDの蛍光ピークエネルギーの、粒子サイズ依存性. プロットは実験結果、実線は理論式(1)による計算結果をそれぞれ表す.

らず、連続的な合成も可能であるため、高い粒子収量を得ることができる. また、前駆体として反応性の高いシランを用いなくてもよいため、安全性の面でも従来の合成法よりも望ましいといえる.

2. シリコン量子ドットの光学特性

合成されたSi-QDは、従来の量子ドットと同様、励起光の照射により蛍光を発する. このときの蛍光波長は粒子サイズによって変化し、図2に示すようにサイズが大きいほど蛍光波長が長くなる. 量子サイズ効果の理論では、シリコンナノ結晶の粒径 D [nm]と蛍光エネルギー E_{PL} [eV]との関係は、以下の関係式で表されることが報告されている⁸⁾.

$$E_{PL} = E_0 + 3.73/D^{1.39} \quad (1)$$

ここで、 E_0 [eV]はバルクのシリコンのバンドギャップ(=1.17 eV)である. 合成されたSi-QDの蛍光波長の粒径依存性を理論式(1)と比較すると、両者がおおむね一致することが確認された(図2下). 表面酸化膜や欠陥準位など、シリコンナノ材料の発光機序についてはさまざまな説が提案され議論されているが、筆者らが合成したSi-QDの場合については、従来の化合物半導体量子ドットと同様に量子サイズ効果によって発光していることが、この結果

から示唆される。われわれは、反応条件によって粒子サイズを制御することで、青から赤までフルカラーで Si-QD の蛍光を制御することに成功している。

一方で、Si-QD からの発光の強さは、CdSe などの化合物半導体量子ドットと比較するとまだ劣るのが現状である。CdSe/ZnS 系の量子ドットでは 50% を超える量子効率が達成されているのに対し⁹⁾、われわれの合成した Si-QD の量子効率は、最大で 20% 程度である。間接遷移型のバンド構造をもつシリコンはバルク体では発光を示さないが、ナノサイズになることでバンド構造が擬似直接遷移型に変化し、発光を示すようになる。しかしながらその発光効率は、直接遷移型である化合物半導体の量子ドットには劣るのであろう。また Si-QD には、空気に触れると表面が速やかに酸化し、量子効率が低下してしまうという課題も存在する。このため、Si-QD を長期に保存するためには、不活性ガス中に密閉したり、化学的修飾により粒子表面を安定化させたりするなどの工夫が必要となっている。今後、バンド構造や表面状態の最適化によってこれらの点を改善し、Si-QD の発光を高輝度で安定したものにしていく必要があるといえる。

3. シリコン量子ドットの表面修飾

Si-QD をバイオ分野で蛍光ラベルとして使用するためには、粒子を水系の環境下で使用する必要がある。しかし、Si-QD の表面は Si-H で構成されるため疎水性であり、水中では容易に凝集、沈殿してしまう。そのため、粒子の表面を適切な化学種で修飾し、粒子を親水化させる必要がある。CdSe などの化合物半導体量子ドットでは、チオール分子による配位子交換を用いた表面修飾法が確立されており、チオール基をもつメルカプト酢酸やシステインなどの親水性分子の修飾によって、粒子が水分散化されてきた。これに対し、シリコンをはじめとする IV 族半導体ではチオール分子による配位などが起こらないため、新たな水分散化手法の開発が必要となる。

筆者らはこれまでに、いくつかの方法を用いて、この Si-QD の水分散化を行ってきた。まず 1 つ目は、ヒドロシリル化反応を用いた共有結合による、水溶性分子の修飾である。アルケン分子は、触媒の存在下で Si-H 表面とヒドロシリル化反応を起こし、Si 表面に固定される。この反応は有機ケイ素化合物の合成で広く用いられる反応で、半導体分野でのシリコン基板の表面修飾にも使用されている。この反応をナノ粒子にも適用し、塩化白金酸の存在下で末端アルケンを有する水溶性分子を反応させることで、Si-QD 表面を親水化し、水に分散させることができる (図

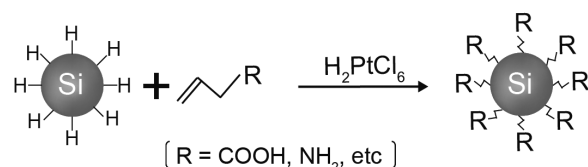


図3 ヒドロシリル化反応を用いた Si-QD の表面修飾。

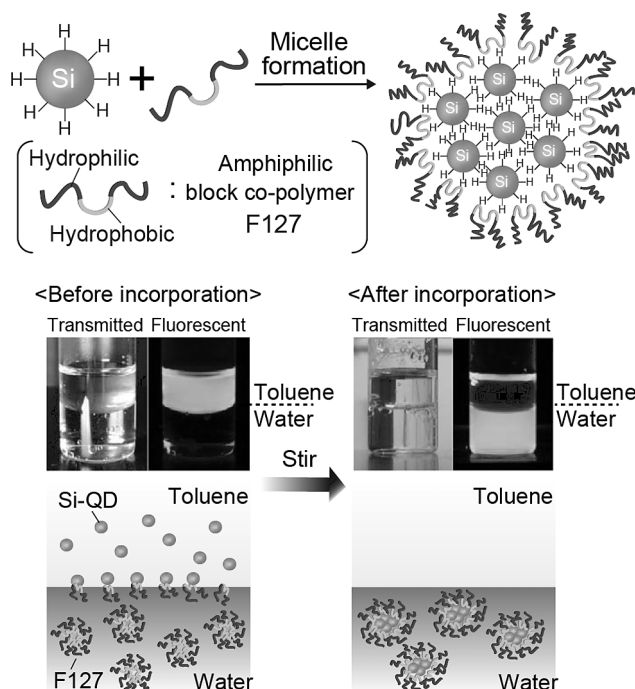


図4 両親媒性ブロックコポリマー F127 を用いたミセルへの Si-QD の内包化。ミセルに内包化されることによって、Si-QD 由来の蛍光がトルエン相から水相に移行していることが確認される。

3)¹⁰⁻¹¹⁾。またこれにより、Si-QD の表面が安定化し、酸化による量子効率の低下が防止される。さらに、このヒドロシリル化反応を用いた修飾では、カルボキシ基やアミノ基など、反応性の高い官能基を粒子表面に導入することができる。そのため、この先にさらに他の分子を結合させて、粒子を機能化することも可能となる。例えば、Si-QD 表面に導入したカルボキシ基を *N*-hydroxysuccinimide (NHS) で活性化エステルとすれば、タンパク質のラベリング剤として使用することができる。また、同様の手法で、粒子表面への抗体の固定化なども可能となる。

共有結合を使用しない Si-QD の水分散化の方法としては、ミセルへの内包化が挙げられる。筆者らは、両親媒性ブロックコポリマーを用いて、この水分散化を行ってきた¹²⁾。例えば、疎水性ブロックにポリプロピレンオキサライド (PPO)、親水性ブロックにポリエチレンオキサライド (PEO) をもつ両親媒性ブロックコポリマーである F127 (PEO-PPO-PEO) は、常温の水の中では 0.025 wt% 以上でミ

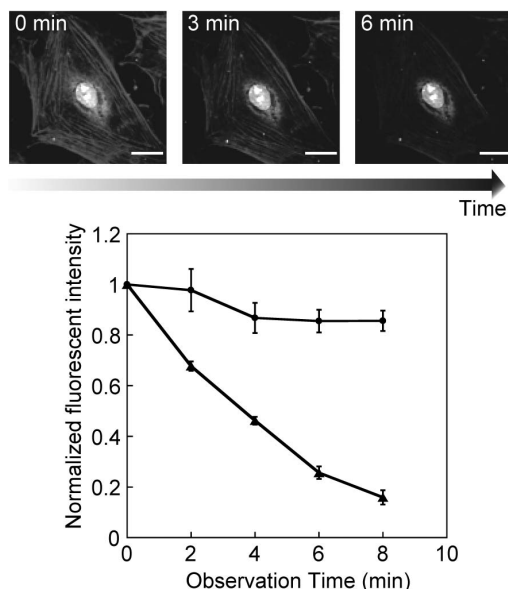


図5 共焦点レーザー顕微鏡を用いた連続観察による、Si-QDと有機蛍光分子(Texas Red)との光褪色への安定性の比較。写真中央の細胞核をSi-QDで、繊維状のアクチンフィラメントをTexas Redでそれぞれ標識し、連続観察を行うことで褪色への安定性を比較した。下のグラフは蛍光強度の時間変化を画像解析から定量化したものであり、●はSi-QD由来の蛍光、▲はTexas Red由来の蛍光をそれぞれ表す。

セルを形成する。このF127の水溶液にSi-QDの有機溶媒分散液を加えると、有機溶媒/水の界面で粒子がミセルの疎水性コアに取り込まれ、水分散化する(図4)。この方法では、粒子は疎水性相互作用によってミセルコアに集積するため、粒子とポリマーとの間に化学結合は形成されない。そのため、水分散化後も粒子表面の化学構造は変わらない。修飾によって粒子の電子状態を変化させたくない場合などに適した水分散方法であるといえる。

4. *In vitro* での特性評価と細胞イメージングへの応用

上記のように水分散化したSi-QDは、細胞のイメージングラベルとして使うことができる。このとき、Si-QDは有機蛍光分子に比べて、非常に高い光褪色への安定性を示す。図5は、Si-QDと有機蛍光分子(Texas Red)でヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)を二重標識し、共焦点レーザー顕微鏡で連続観察することでその光褪色への安定性を比較したものである。観察開始直後(0 min)の画像では、Texas Redで標識された繊維状のアクチンフィラメントと、Si-QDで標識された細胞核が、ともに明確に観察される。これに対し、レーザーを照射し続けて観察を続けた後(3 min, 6 min)では、Texas Red由来の蛍光(アクチンフィラメント)が時間の経過とともに褪色していくのに対し、Si-QD由来の蛍光(細胞核)は高い輝度を保ち続け

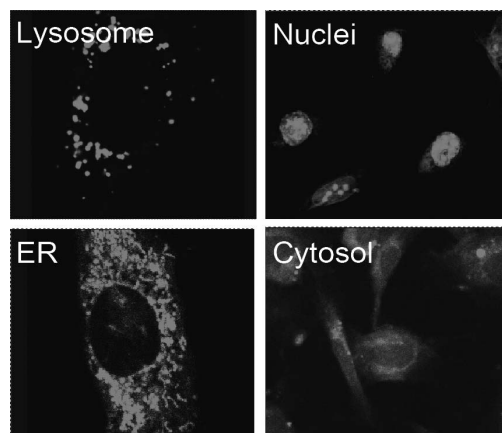


図6 Si-QDを用いた細胞内小器官の選択的なイメージング。HUVECのさまざまな細胞内小器官がSi-QDで標識され、共焦点レーザー顕微鏡によって可視化されている。

ることが確認された。この結果は、Si-QDの光褪色への安定性が有機蛍光分子に比べてきわめて高いことを示している。光褪色への安定性が高いのは量子ドットの特徴であり、Si-QDも従来の化合物半導体量子ドットと同様にこの特徴を有しているといえる。

また、MTTアッセイによる細胞生存率試験を行った結果、Si-QDの細胞毒性が低いことも確認されている¹⁰⁾。細胞のラベリングに使う際よりもさらに多い1.0 mg/mlの濃度でも、Si-QDのHUVECに対する細胞毒性は観察されなかった。これは、Si-QDの生体毒性が十分に低いことを示している。CdSeなどの化合物半導体でも、シリカ粒子の中に包埋することなどによって毒性を下げる検討が行われてはいるが¹³⁾、前述のような重金属の長期にわたる蓄積のリスクがない分、Si-QDの安全性は従来の化合物半導体量子ドットよりも優れているといえる。

さらに、水分散化の際に用いる表面修飾種を変えることで、Si-QDによって細胞内のさまざまな部位を選択的に標識することが可能である。現在までに筆者らは、細胞核(cell nuclei)、小胞体(ER)、細胞質(cytosol)、リソソーム(lysosome)の選択的なイメージングに成功している(図6)^{10,14)}。これらの標識部位の違いは、粒子が細胞内に取り込まれる際の経路や、細胞内での各器官との相互作用によって決まる。例えば表面にアミンが修飾されたSi-QDはクラスリン介在性エンドサイトーシスという経路で取り込まれてリソソームに集積するのに対し、F127のミセル内に包まれたSi-QDはカベオラ介在性エンドサイトーシスという別の経路で取り込まれるため、カベオソームを経てERへと集積することがわかっている。今後、粒子の表面化学種を適切に制御することで、Si-QDの細胞内での動態をより幅広くコントロールできると期待される。

5. 医療分野への応用に向けた今後の展望

上述のように、Si-QD は優れた蛍光特性と、従来の化合物半導体よりも高い安全性とを兼ね揃えた材料である。この特徴を生かし、最終的には医療分野で活用されることが期待される。

医療分野への応用でまず期待されるのは、がんなどの疾患の画像診断である。Si-QD を抗体修飾などによって疾患部位に選択的に集積させ、励起光を照射することで、疾患部位のみを光らせることができる。これにより、レントゲンやPET、内視鏡など従来の診断法では識別困難であったミリメートル以下のがんでも、診断が可能になる。また外科手術と併用することで、腫瘍のみを最小限の切除で摘出することもできる。このような技術は有機蛍光分子を用いて先行的に検討されているが¹⁵⁾、Si-QD でこれが実現できれば、その高い光安定性から、長期にわたる手術や診断でも正確に疾患部位を標識し続けることができると期待される。これを目指し、いくつかのグループがSi-QD を使った *in vivo* でのイメージングを行っているが¹⁶⁾、まだ実用化のレベルまでは達していない。筆者らも現在、マウス腹膜播種モデルを用いて、検討を進めている。

また、体外での診断でも、Si-QD の活用が期待される。Si-QD の表面はさまざまに修飾が可能であるため、特定の生体分子への結合能を付与することができる。これを利用し、疾患に関連したタンパク質や病原体を、高感度で検出することが可能になると期待される。また、生体分子の細胞内での動態を観察する一分子イメージングでも、Si-QD の高い光安定性が生かされると考えられる。疾患に関連した分子の動態を詳細にイメージングすることで、発症メカニズムの解明に寄与することが期待される。

医療分野での使用においては、材料の生体毒性の低さが最重要に求められる。この点において、重金属を含まないSi-QD は、従来の化合物半導体量子ドットに比べて大きなアドバンテージがある。さらに、化合物半導体と比較すると劣る発光効率についても、医療分野での使用においては、エネルギーデバイスや発光素子ほどは問題にならない。これらの点から、医療をはじめとしたバイオ分野は、Si-QD の応用先として適した領域といえるのではないかと筆者らは考えている。今後さらに開発が進み、Si-QD をベースとした新規医療技術が実現されることが期待される。

文 献

- 1) W. C. W. Chan and S. Nie: "Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection," *Science*, **281** (1998) 2016-

- 2018.
- 2) M. Bruchez Jr, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss and A. P. Alivisatos: "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels," *Science*, **281** (1998) 2013-2016.
- 3) A. M. Derfus, W. C. W. Chan and S. N. Bhatia: "Probing the cytotoxicity of semiconductor quantum dots," *Nano Lett.*, **4** (2004) 11-18.
- 4) L. T. Canham: "Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers," *Appl. Phys. Lett.*, **57** (1990) 1046-1048.
- 5) M. H. Nayfeh, N. Barry, J. Therrien, O. Akcakir, E. Gratton and G. Belomoin: "Stimulated blue emission in reconstituted films of ultrasmall silicon nanoparticles," *Appl. Phys. Lett.*, **78** (2001) 1131-1133.
- 6) X. G. Li, Y. Q. He, S. S. Talukdar and M. T. Swihart: "Process for preparing macroscopic quantities of brightly photoluminescent silicon nanoparticles with emission spanning the visible spectrum," *Langmuir*, **19** (2003) 8490-8496.
- 7) P. Shen, N. Uesawa, S. Inasawa and Y. Yamaguchi: "Stable and color-tunable fluorescence from silicon nanoparticles formed by single-step plasma assisted decomposition of SiBr₄," *J. Mater. Chem.*, **20** (2010) 1669-1675.
- 8) G. Ledoux, D. Porterat, C. Reynaud, F. Huisken, B. Kohn and V. Paillard: "Photoluminescence properties of silicon nanocrystals as a function of their size," *Phys. Rev. B*, **62** (2000) 15942-15951.
- 9) B. O. Dabbousi, J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen and M. G. Bawendi: "(CdSe)ZnS core-shell quantum dots: Synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites," *J. Phys. Chem. B*, **101** (1997) 9463-9475.
- 10) S. Ohta, P. Shen, S. Inasawa and Y. Yamaguchi: "Size- and surface chemistry-dependent intracellular localization of luminescent silicon quantum dot aggregates," *J. Mater. Chem.*, **22** (2012) 10631-10638.
- 11) A. Shiohara, S. Hanada, S. Prabakar, K. Fujioka, T. H. Lim, K. Yamamoto, P. T. Northcote and R. D. Tilley: "Chemical reactions on surface molecules attached to silicon quantum dots," *J. Am. Chem. Soc.*, **132** (2010) 248-253.
- 12) P. Shen, S. Ohta, S. Inasawa and Y. Yamaguchi: "Selective labeling of the endoplasmic reticulum in live cells with silicon quantum dots," *Chem. Commun.*, **47** (2011) 8409-8411.
- 13) B.-H. Jun, D. W. Hwang, H. S. Jung, J. Jang, H. Kim, H. Kang, T. Kang, S. Kyeong, H. Lee, D. H. Jeong, K. W. Kang, H. Youn, D. S. Lee and Y.-S. Lee: "Ultrasensitive, biocompatible, quantum-dot-embedded silica nanoparticles for bioimaging," *Adv. Funct. Mater.*, **22** (2012) 1843-1849.
- 14) S. Ohta, S. Inasawa and Y. Yamaguchi: "Real time observation and kinetic modeling of the cellular uptake and removal of silicon quantum dots," *Biomaterials*, **33** (2012) 4639-4645.
- 15) Y. Urano, M. Sakabe, N. Kosaka, M. Ogawa, M. Mitsunaga, D. Asanuma, M. Kamiya, M. R. Young, T. Nagano, P. L. Choyke and H. Kobayashi: "Rapid cancer detection by topically spraying a γ -glutamyltranspeptidase-activated fluorescent probe," *Sci. Transl. Med.*, **3** (2011) 110ra119.
- 16) F. Erogbogbo, K.-T. Yong, I. Roy, R. Hu, W.-C. Law, W. Zhao, H. Ding, F. Wu, R. Kumar, M. T. Swihart and P. N. Prasad: "*In vivo* targeted cancer imaging, sentinel lymph node mapping and biocompatible silicon nanocrystals," *ACS Nano*, **5** (2011) 413-423.

(2014年3月18日受理)