



# 機能性シリコンナノ結晶のバイオ応用に関する研究

井上, 飛鳥

---

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2019-03-25

(Date of Publication)

2020-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7508号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007508>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

機能性シリコンナノ結晶の  
バイオ応用に関する研究

平成 31 年 1 月

神戸大学大学院工学研究科

井上 飛鳥



# 目次

第1章 序論.....	1
1.1 はじめに.....	1
1.2 ナノバイオテクノロジー.....	2
1.3 半導体量子ドットコロイド溶液.....	7
1.4 ホウ素、リン同時ドーピング Si ナノ結晶.....	13
1.5 表面プラズモン共鳴による光学特性改善.....	15
1.6 金属ナノ粒子/半導体ナノ構造の抗菌剤応用.....	19
1.7 本論文の目的・構成.....	21
第2章 Si ナノ結晶の表面修飾.....	25
2.1 はじめに.....	25
2.2 実験方法.....	27
2.2.1 試料作製方法.....	27
2.2.2 分散性評価方法.....	30
2.2.3 発光特性評価方法.....	30
2.3 実験結果.....	32
2.3.1 分散性評価.....	32
2.3.2 発光特性評価.....	34
2.4 考察.....	38
2.5 まとめ.....	38
第3章 Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体.....	41
3.1 はじめに.....	41
3.2 実験方法.....	43
3.2.1 試料作製方法.....	43

3.2.2	構造評価方法	46
3.2.3	発光特性評価方法	46
3.3	実験結果	48
3.3.1	静電気による Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体	49
3.3.2	金-チオール結合による Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体	52
3.3.3	DNA による Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体	54
3.4	考察	56
3.5	まとめ	58
第4章 銀ナノ構造基板による Si ナノ結晶の発光特性変化		59
4.1	はじめに	59
4.2	実験方法	60
4.2.1	試料作製方法	60
4.2.2	構造評価方法	64
4.2.3	消光スペクトル測定方法	65
4.2.4	発光測定方法	65
4.3	実験結果	67
4.3.1	膜厚評価	67
4.3.2	消光スペクトル評価	69
4.3.3	発光特性評価	71
4.4	考察	78
4.5	まとめ	80
第5章 Si ナノ結晶シェルを有する銀ナノ粒子の抗菌作用		81
5.1	はじめに	81
5.2	実験方法	82
5.2.1	試料作製方法	82
5.2.2	構造評価方法	83
5.2.3	安定性評価方法	84

5.2.4	抗菌作用評価方法.....	85
5.3	実験結果.....	88
5.3.1	構造評価.....	88
5.3.2	構造安定性評価.....	92
5.3.3	溶液中での抗菌作用.....	94
5.3.4	フィルムでの抗菌作用.....	96
5.4	考察.....	97
5.5	まとめ.....	100
第6章	Si ナノ粒子による時間分解発光イメージング.....	101
6.1	はじめに.....	101
6.2	実験方法.....	103
6.2.1	試料作製方法.....	103
6.2.2	構造評価方法.....	105
6.2.3	光学特性評価方法.....	106
6.2.4	時間分解イメージング方法.....	109
6.3	実験結果.....	111
6.3.1	構造評価.....	111
6.3.2	光学特性評価.....	117
6.3.3	時間分解バイオイメージング.....	119
6.4	考察.....	121
6.5	まとめ.....	123
第7章	本研究のまとめ.....	125
	参考文献.....	127
	謝辞.....	142
	研究業績.....	143



# 第1章 序論

## 1.1 はじめに

本論文では、水溶媒分散性を有するシリコン(Si)ナノ結晶コロイド溶液のナノバイオテクノロジー応用を目的として、表面修飾プロセス開発、金属ナノ構造との複合体形成による特性向上、及び時間分解バイオイメージングへの応用に関して議論する。直径が数 nm の Si ナノ結晶が溶媒中に分散した溶液は、バイオ分野において現在広く用いられている有機色素や蛍光たんぱく質、化合物半導体の量子ドットに比べて、広い励起波長領域や抗光退色性、生体の窓の波長領域での発光に代表される優れた光学特性や、高い構造安定性、生体親和性、環境親和性という優れた特徴を有していることから、蛍光標識としての期待が高まっている。これまでに、発光体でがん細胞をマークし、生体内でがん細胞を発光により可視化する蛍光バイオイメージングにおける蛍光標識への応用を目的とした研究や、極微量なターゲット分子を生体分子の特異的結合を用いて検出するバイオセンシングへの応用を目的とした基礎研究が精力的になされている<sup>1-9</sup>。その結果、Si ナノ結晶はバイオ応用において非常に有用な新規ナノ材料であることが明らかになりつつある。

これまでに Si ナノ結晶のバイオ応用に関する基礎研究として、有機分子で表面を被覆し、溶媒分散性を付与した Si ナノ結晶が主に用いられてきた<sup>8,10-12</sup>。また、更にその表面をがん細胞と特異的に結合することが可能な生体分子や、特定の物質にのみ結合する生体分子で更に修飾することにより、生体内バイオイメージングを実証したという報告は数多くなされている<sup>2,3,5-8,13</sup>。しかし、Si ナノ結晶に関する基礎研究は 20 年以上にわたって行われているにも関わらず、顕著な進歩は依然として見られておらず、その利用は研究室における細胞や動物レベルの実験に留まっている。その最たる原因として、Si は格子整合する半導体材料が存在しないためコア/シェル構造が形成できず、表面修飾の自由度が著しく小さいことが挙げられる。そのため、バイオ応用において必須となる様々な条件下(広範囲にわたる pH、高イオン濃度など)での表面修飾プロセスにおいて発光の消光や、発光波長が変化するため、生体分子との安定した複合プロセスの実現が困難であった。

これまでの研究で、ホウ素(B)とリン(P)の Si ナノ結晶への同時ドーピングがこれらの課題解決において、有望であることが明らかになりつつある<sup>14-16</sup>。B と P を同時に Si ナノ結晶へ同時にドーピングすることで、ナノ結晶表面に B と P が固溶限界以上の超高濃度でドーピングされた Si シェルが形成され、“ホモ接合コア/シェル構造 Si ナノ結晶”



が作製可能であることが分かっている<sup>17,18</sup>。この Si ナノ結晶は、生体及び環境に無害な軽元素(Si,B,P)のみで構成されているため、非常に生体・環境親和性が高く、これは将来の実用化において大きな意味を持つ<sup>15</sup>。また、溶媒分散性の起源が有機分子修飾による立体障害ではなく、負の表面電位(ζ電位:~40 mV)であるため、極性溶媒中で分散性を示し、幅広い pH 範囲においても安定して分散する<sup>16,19,20</sup>。これは使用する生体分子、特にタンパク質に応じて選択する、幅広い pH 範囲における極性溶媒中での生体分子との結合プロセスにおいて、非常に重要な特性である。更に重要な特性として、サイズを制御することにより、生体の窓の波長領域をカバーする広範囲の発光波長制御が可能であることが挙げられる<sup>19</sup>。また、発光寿命が数十マイクロ秒と非常に長いため、発光寿命がナノ秒オーダーの自家蛍光を、励起時間と発光時間間に遅延を設けることで抑制する時間分解発光イメージングへの、発光体としての応用が期待されている。

上述のように、B と P を同時にドーピングした Si ナノ結晶はバイオ分野において、極めて汎用性・有用性の高い新規ナノ材料であることが分かる。しかしながら、この Si ナノ結晶をバイオ分野における真に実用可能な材料にするためには基礎物性理解に加えて、より実用化を見据えたプロセス開発及び更なる特性改善が必要不可欠である。本研究では、B と P を同時にドーピングした Si ナノ結晶をバイオ分野において実用可能な新規ナノ材料としての応用実現を目的として、表面修飾プロセスの確立、及び金属ナノ構造との融合による高機能化・高性能化を行い、最終的にバイオイメージングにおける応用可能性を時間分解バイオイメージングに応用することで実証する。具体的な実験結果については、第二章以降で詳細に述べる。第一章の第二節では、近年注目されている分野であるナノバイオテクノロジーに関して述べる。第三節では、コロイド状半導体量子ドットの原理及びその応用例に関してまとめる。第四節では、B と P を同時にドーピングした Si ナノ結晶の基礎的な物性に関して述べる。第五節では、プラズモン共鳴に代表されるナノ構造を有する金属にのみ発現する特異な特性に関して述べる。第六節では、抗菌剤応用を目的とした半導体ナノ構造と金属ナノ構造の複合材料に関して述べる。最後に第七節では、本論文の構成と目的に関して述べる。

## 1.2 ナノバイオテクノロジー

近年、"ナノバイオテクノロジー(Nanobiotechnology)"という新しい技術分野が注目を集めている。ナノバイオテクノロジーとは、あらゆる物質を原子・分子単位でコントロールし、新たな物性を発現することを目標としたナノテクノロジー(Nanotechnology)と、生物若しくは生体分子のもつ特異な性質を生産に応用し、新たな技術を創出するバイオテクノロジー(Biotechnology)、及び生物学で蓄積されたデータを情報科学の技術を用いて解析し、新たな知見を得るバイオインフォマティクス(Bioinformatics)、つまり生体情報工学の3つの技術分野の共通領域から生まれた技術分野である(図 1.1)<sup>21</sup>。

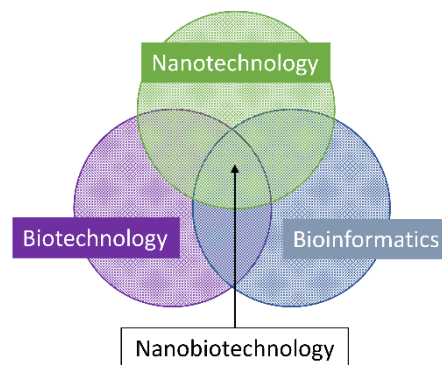


図 1.1 ナノバイオテクノロジーは、ナノテクノロジー、バイオテクノロジー及びバイオインフォマティクスの分野の共通領域から生まれた新規分野である。

ナノバイオテクノロジーにより生みだされた技術の応用の概念は、1959年にカリフォルニア工科大学で行われた、ノーベル物理学賞受賞者のリチャード・ファインマンのナノテクノロジーに関する先見的な講演である、"There's plenty of room at the bottom." で述べられている<sup>22</sup>。講演でファインマンは、ナノテクノロジーがもたらす生命科学への効果的な利用方法の概念について、以下のように述べている。

*"Although it is a very wild idea, it would be interesting in surgery if you could swallow the surgeon. You put the mechanical surgeon inside the blood vessel and it goes into the heart and "looks" around.... It finds out which valve is the faulty one and takes a little knife and slices it out."*

上述の様な、生体内に埋め込み治療を行う小さな外科医であるナノマシンを開発することはナノバイオテクノロジーにおける究極の目標ではあるが、その開発過程に必要な基礎技術は非常に重要である。以下に、ナノバイオテクノロジーにおける重要な開発課題を列挙する。

- ① 生体内における分子挙動の詳細な理解
- ② 生体内の異常部位の高精度な認識および検出技術
- ③ 生体内の異常部位の治療技術

①の生体内の分子挙動の理解に関しては、近年、バイオイメーjingという細胞や組織レベルで、生きたままの生体内での生体分子や薬剤、がん細胞や幹細胞に代表される細胞などの分布や動態を、様々な手法で可視化及び画像化して解析する技術を用いることで、急速に研究が進んでいる<sup>23-28</sup>。バイオイメーjingでは、特定の領域を可視化する際に、発光や核磁気共鳴法(Nuclear Magnetic Resonance: NMR)、光音響効果を利用した Photoacoustic Imaging を用いる手法の研究が進んでいるが、測定系の簡易さ、特定部位

への染色方法が確立されていることなどの理由により、現在では発光を用いるバイオイメーキングに関する研究が最も盛んにおこなわれている。発光を用いるバイオイメーキングでは、ターゲットとなる生体分子や細胞の分布や動態を直接的に可視化できるだけでなく、分子の発現や機能、細胞内環境やストレスを非侵襲的で高感度に、かつ継続的に可視化できる可能性を秘めている。その結果、細胞や臓器の機能を確認、疾患の病変特徴を評価し、治療に貢献できると考えられている。発光を用いるバイオイメーキングでは、生体からの発光である自家蛍光を抑制し、ターゲット部位に結合した発光体の発光と分離して検出することが、高感度化には必須となる。分離方法には、(i)発光波長による分離、(ii)発光寿命による分離の二つがあげられる。(i)発光波長による分離は、生体の自家蛍光は主に 300~600 nm の波長範囲で発光することが知られているため(表 1.1)、より長波長領域(700 nm 以上)、つまり赤~近赤外領域で発光を示す発光体を用いることで実現できる。また、700~1200 nm の波長領域は生体の窓の波長領域と呼ばれ、生体の透過率が非常に高いため、バイオイメーキング分野においては非常に重要な波長領域である。また図 1.2 に示すように、赤~近赤外の波長領域は侵入深さ(penetration depth)が可視領域の光に比べて大きいという利点もある。(ii)発光寿命による分離は、生体の自家蛍光の発光寿命は 10 ナノ秒以下であるため(表 1.1)、100 ナノ秒以上の十分に長い発光寿命を使用し、励起時間と発光時間に遅延を設けることで実現可能である(図 1.2(b))。このイメージング手法は、時間分解発光イメージングと呼ばれ、近年注目を集めている。以上より、(i)及び(ii)両方の分離手法を同時に行うと、より S/N 比が高く、高感度な発光イメージングが可能になると予想される。そのためには、赤~近赤外領域で高効率かつ高輝度発光を示し、十分に長い発光寿命を有する発光体の開発が望まれる。

表 1.1 生体内自家蛍光の原因となる生体内分子の発光特性<sup>29</sup>。

Fluorophore	Excitation (nm)	Emission (nm)	Lifetime (ns)
NAD(P)H	310 - 370	410 - 510	0.3
flavine	380 - 500	500 - 600	5.2
collagen	270 - 370	305 - 450	5.3
elastin	300 - 370	400 - 460	~2.0
lipofuscin	410 - 470	500 - 695	1.3
tryptophan	280 - 340	300 - 400	2.6
tyrosine	273 (max)	303 (max)	3.6
phenylalanine	258 (max)	280 (max)	7.5
melanin	340 - 400	440, 520, 570	0.1/1.9/8.0

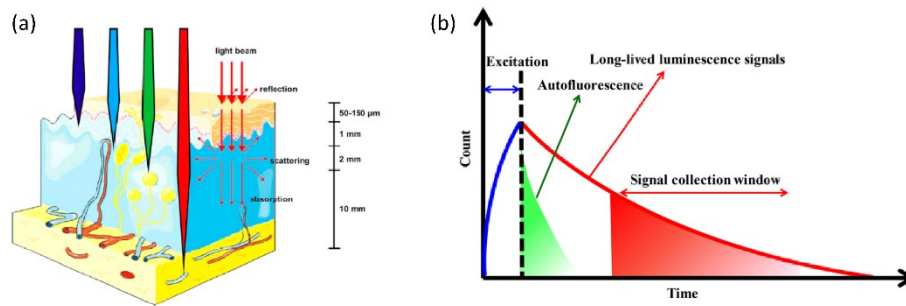


図 1.2 (a) 生体での各波長の光の挙動の模式図<sup>30</sup>、(b)時間分解バイオイメージングにおける発光寿命の違いを利用した自家蛍光抑制原理<sup>29</sup>。

②の生体内異常部位(ウイルスなども含む)の高精度かつ高感度の認識技術として、生体分子の特異的認識機構である酵素基質反応や抗原抗体反応、受容体タンパク質反応や DNA の二重らせん形性反応などを用いた認識技術の研究が進んでおり、これらの技術はバイオセンサーとしての応用が期待されている<sup>23,30-32</sup>。バイオセンサーには以下の3つの構成要素が非常に重要になる(図 1.3)<sup>21</sup>。まず、検出対象(specimen)の存在を認識し、定量評価可能な信号を発するセンサー部分(sensor)が必要となる。この部分には、検出対象の定量分析が可能であり、極微量でも検出可能であることが求められる。また、検出対象に対して非常に選択的かつ高精度な応答を示す必要がある。次に、sensor からの信号を検出器で処理可能な信号に変換するトランデューサー(transducer)部分が必要となる。この部分では、検出器で処理可能な信号に変換し、必要に応じて信号を増幅する必要がある。近年では、バイオセンサーのセンサー及びトランデューサー部分として主に発光、表面プラズモン共鳴及び電流変化などが精力的に研究されている<sup>30,33,34</sup>。最後に、センサーとトランデューサーから出力された信号を、あらかじめ得られていた情報などを基に検出対象の種類や濃度を出力する検出器部分が必要となる。そしてこの検出器部分で得られた情報をセンサー部位にフィードバックし、次の測定に移る。このように、検出対象を定量的に可視化するセンサー技術において、センサー及びトランデューサー部分が高感度化に非常に重要であることから、検出対象のセンシング技術に関する研究が盛んにおこなわれている。中でも、検出対象の有無により変動する発光特性を利用する発光検出型バイオセンサーが、検出系の簡易さや非特異吸着による信号を抑制することで得られる S/N 比の高さから注目を集めている。

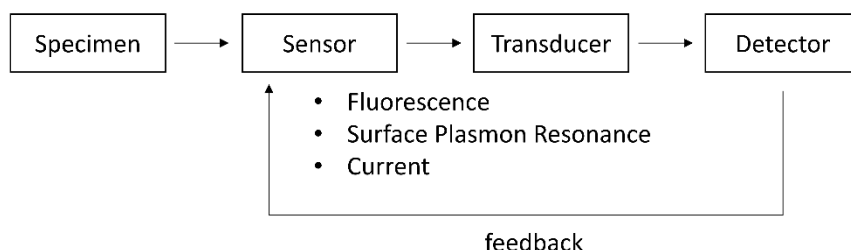


図 1.3 バイオセンサーの構成要素。

③の生体内の異常部位の治療技術として、注目を集めているものにドラッグデリバリーシステム(Drug Delivery System: DDS)が挙げられる<sup>35-40</sup>。多くの薬剤には、活性である細胞内区画(小胞、ゴルジ体、核などの区画のこと)や組織があることはよく知られており、薬剤の効能は運ばれた標的位置での持続力に依存することがわかっている。そのため、薬剤を目的とする領域に効率的にデリバリーする技術開発が薬剤の性能向上には必須となる。近年、ナノテクノロジーにより生みだされたナノ構造は、高い比表面積や検出しやすい物性(発光など)、細胞膜を通過しての輸送が容易であるナノサイズの構造であること、薬剤分子の活性の保護が可能であることなどから DDS の分野で注目を集めている。中でも、発光と薬剤の保護を同時に実現するナノ材料は、薬剤のデリバリーのメカニズム解明及び高効率化に大きく貢献することが可能であるため、早期の開発が望まれている。

上述のように、ナノバイオテクノロジーの分野において重要となる課題の解決には、ナノ材料の発光という特性が非常に重要であるといえる。また、2008年のノーベル化学賞は、オワンクラゲの緑色蛍光タンパク質(Green Fluorescent Protein: GFP)発見が生命科学及び医療工学に大きく貢献したとされ、下村脩博士らが受賞したことからも明らかなように、ナノバイオテクノロジーの発展には高性能な発光体が必要不可欠である<sup>41</sup>。以下に、ナノバイオテクノロジーに応用可能な発光体の理想的な条件に関してまとめる。

- ① 長時間の励起において、光退色が生じない発光を有すること。
- ② 周囲の環境変化(温度、pH、塩濃度など)に影響を受けない、安定した発光を示すこと。
- ③ 表面修飾の自由度が高い、つまり特定の分子との結合が容易であり、それと同時に発光特性を失わないこと。
- ④ 赤~近赤外の生体の窓の領域で励起され、発光を示すこと。
- ⑤ 発光寿命が、生体分子に比べて十分に長いこと。
- ⑥ 輝度が高い発光(量子収率の高い発光)を示すこと。

- ⑦ 大量生産(mass productivity)が可能であること。
- ⑧ 生体及び環境に無害であること。

現在、広く用いられている発光材料として、有機色素及び蛍光タンパク質が挙げられる。しかし、これらは長時間の励起の際に発光が退色してしまうことや、周囲の環境変化により発光強度が減少するという安定性の面での課題があった。そのため、測定中に励起光や周囲の環境変化により発光強度が減衰してしまうため、S/N比の低下や高感度化のための光学系の設計の自由度が低いという課題があった。

これらの既存の色素が有する課題を解決することが可能なナノ材料として、近年半導体のナノ粒子である半導体量子ドットコロイド溶液が注目を集めている<sup>42-44</sup>。

### 1.3 半導体量子ドットコロイド溶液

サイズが数 nm の半導体のナノ結晶である半導体量子ドットは、バルクの物質とも分子とも違った特異な挙動を示すことが知られており、ここ数十年の間精力的に研究が行われている<sup>45</sup>。半導体が0次元系に閉じ込められた半導体量子ドットは、3次元系(バルク)とは異なる光学的性質を有し、最も顕著な変化として電子や正孔の空間的閉じ込めに起因する異なったエネルギーレベルや状態密度の違いが挙げられる。半導体をナノ構造にすると、ナノ構造中に閉じ込められた電子や正孔は、位置がナノ領域に確定されることにより位置の不確定性が減少し、不確定性原理により運動量の不確定性が大きくなることで、電子と正孔の運動エネルギーは有限のエネルギーとなることで量子閉じ込め効果が働く。半径が  $d$  の球状量子井戸のエネルギーギャップは以下の式であらわされる。

$$E_g = E_g(\text{bulk}) + \frac{h^2}{2m^*d^2} - \frac{1.8e^2}{2\pi\epsilon\epsilon_0d}$$

ここで  $m^*$  は励起子の換算質量であり、 $\epsilon$  は半導体の誘電率、 $d$  は量子ドットの直径である。右辺の第二項はキャリアの閉じ込めエネルギーを表し、第三項は電子正孔対のクーロン相互作用エネルギーを表す。尚、この式は第一近似の結果に過ぎないため、より詳細な計算を行う際は、結晶の異方性やスピン-軌道カップリングなどその他の多くの効果を考慮する必要がある。上式より、量子ドットのバンドギャップに対する基本近似の式には、サイズに関する項として、 $\frac{1}{d^2}$  で変化する閉じ込めエネルギーと、 $\frac{1}{d}$  で変化するクーロン引力の二項が含まれていることが分かる。このことから、量子ドットという数 nm の小さいサイズ領域においては、これらの項が非常に主要な項として働くことから、量子ドットのバンドギャップはサイズにより変化することができると考えられる。この特性により、量子ドットのサイズを高精度に制御することで、発光波長を制御することが可能となる(図 1.4)。

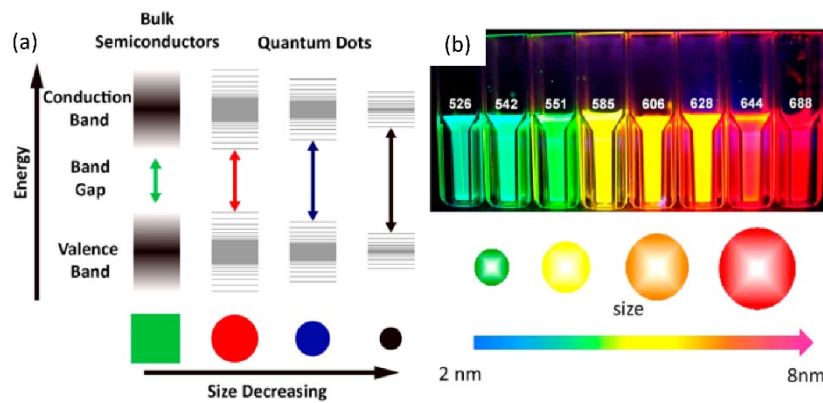


図 1.4 (a)バルクの半導体と量子ドットのエネルギーバンド構造、(b)サイズの異なる CdTe/ZnTe 量子ドットの発光の写真。UV 励起により、高輝度な発光を可視領域(530-690 nm)において示すことが分かる<sup>30</sup>。

1990 年代後半には、Guyot-Sionnest および Bawendi らによってコアシェル構造を有するカドミウムカルコゲナイド( $\text{CdX}=\text{S,Se},\dots$ )系の量子ドットの合成方法が確立され、急速に高品質化が進んだ<sup>46,47</sup>。また、Alivisatos らの研究グループが *Science* 誌に化合物半導体の量子ドットを実際に蛍光プローブとして応用し、細胞のイメージングに成功したことを皮切りに、量子ドットのバイオ分野、特にバイオフォトンクス分野への応用可能性が注目され、急速に研究が発展してきている<sup>30,42,44,48,49</sup>。その理由として、半導体の量子ドットには従来蛍光体として利用されてきた有機蛍光色素や蛍光たんぱく質にはない、高い光安定性やブロードな吸収幅やスペクトル幅の狭い発光といった特性が挙げられる<sup>50</sup>。なかでも、量子ドットのサイズにより制御可能な可視から近赤外の発光は、多色イメージングの実現や生体の透過率が高い波長領域である生体の窓におけるイメージングの実現に利用できる(図 1.5)<sup>51</sup>。特に、近赤外領域での高輝度発光は、既存の蛍光プローブに対して最も優位な点であり、現在高輝度に近赤外領域で安定した発光を示す水溶媒分散性の蛍光プローブはほとんどない。そのため、近赤外領域で高輝度発光を示す半導体量子ドットは生体内部のイメージングにおいて、非常に有用な蛍光プローブ、つまり光造影剤として有用である。

上述のように、ここ二十年余において半導体量子ドットの合成方法の確立や、光学特性の理解、生体分子との複合を念頭に置いた表面修飾プロセスには目覚ましい進展があった。しかし、半導体量子ドットを真に実用可能な新規ナノ材料として応用するにあたり、いくつかの課題が依然として残されている。そのうち、最も大きな課題は量子ドットの生体毒性である<sup>52</sup>。これまでに研究開発が進んできた半導体量子ドットのほとんどは、カドミウムに代表される有害な重金属元素を主成分としており、実際に生体内に注

入しイメージングを行うバイオイメージングにおける蛍光プローブとしての利用や、デバイスに蛍光体として組み込む場合に非常に深刻な課題となっている。そのため、量子ドットの生体毒性という課題を根本的に解決することを目的とした、Si ナノ結晶に代表されるカドミウムフリーの量子ドットの研究が注目を集めている<sup>1,43</sup>。

図 1.6 にその一例を示す<sup>43</sup>。これらの半導体量子ドットは、カドミウムカルコゲナイド系の量子ドットに比べて低毒性であるため、バイオフォトニクスからナノ医療応用に至るまで、幅広い領域での応用が期待されている。カドミウムフリーの量子ドットとしては、InP や Ag<sub>2</sub>S、ZnO の化合物系量子ドットに関する研究が精力的に行われている。中でも Si を主成分とする Si ナノ結晶は、表面処理プロセスがこれまでの半導体産業における技術蓄積により確立されていることや、地球の地殻構成元素の主成分であることにより資源が豊富であること、また生体適合性、生分解性が高いという特徴により、既存の化合物半導体量子ドットに置き換わるあらたな半導体量子ドットとして期待されている<sup>1,2,13,53-56</sup>。

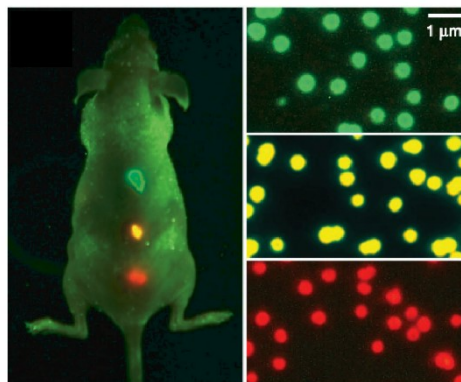


図 1.5 発光波長の異なる 3 種類の化合物半導体量子ドットを有するマイクロビーズによる多色イメージング<sup>51</sup>。

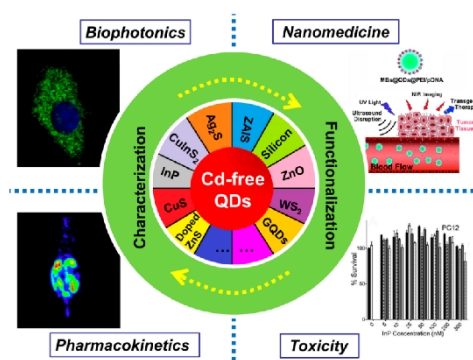


図 1.6 バイオフォトニクスやナノ医療応用が期待されているカドミウムフリーの量子ドットの一つ例<sup>43</sup>。



Si は、エレクトロニクス産業においてこの 50 年余り最も重要な元素としてトランジスタを代表とする素子への応用に関する研究が精力的になされ、その結果スマートフォンやパソコンに代表される電子機器においてなくてはならない元素としての地位を確立してきた。しかし、Si のデバイス応用に関する研究は盛んに行われてきた半面、発光素子としての研究は殆ど進展がなかった。その理由は、バルク Si のバンド構造にある。図 1.7 に擬ポテンシャル法により計算されたバルク Si 結晶のバンド構造を示す<sup>57</sup>。価電子帯のバンド構造では、 $\Gamma$  点( $k=0$ )が価電子帯の頂上であることがわかる。しかし、伝導帯の谷の位置は、X 点から  $\Delta$  点方向に僅かにずれた位置に存在し、価電子帯の頂上である  $\Gamma$  点から離れていることがわかる。このようなバンド構造を有する半導体は間接遷移型半導体とよばれ、Si や Ge が代表例として挙げられる。間接遷移型半導体では、光学遷移の際に運動量保存則を満たすため、フォノンの吸収及び放出といった相互作用が必要となる<sup>58</sup>。そのため、バルク Si は吸収断面積が可視領域において小さく、また発光量子効率が  $10^{-6}$  程度と非常に低いため、発光素子としての応用が期待されていなかった<sup>59</sup>。

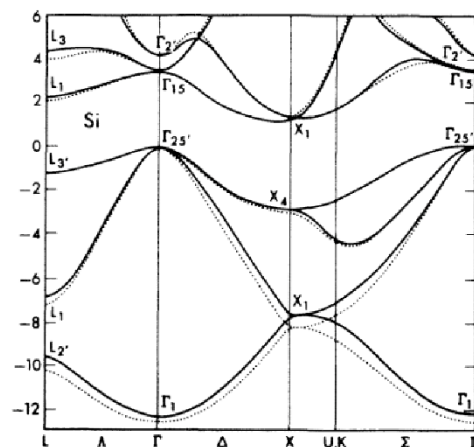


図 1.7 擬ポテンシャル法を用いて計算された Si のバンド構造<sup>57</sup>

上述のように、バルク Si のエネルギーバンド構造が間接遷移型半導体であるため、Si の発光素子としての応用は期待されていなかったが、1990 年に L.T. Canham がナノ構造を有する Si が、量子サイズ効果により発光を示すことが報告されて以来、ナノ構造を有する Si の発光に関する研究が、世界中でこの二十余年精力的に研究が行われてきた<sup>2,5,9,10,12,60-62</sup>。その成果もあり、現在では化合物半導体量子ドットにひけを取らない高品質な Si ナノ結晶が作製可能になっており(図 1.8)、その光学特性への理解も深まっている<sup>63</sup>。Si ナノ結晶は生体に低毒であること、また環境親和性が高いこと、そして表面修飾プロセスが過去の半導体プロセス技術の蓄積により確立されていることなどにより、バイオ応用に関する研究が盛んにおこなわれ、バイオイメージングやドラッグデリバリーを実証している報告が多数ある(図 1.9)。

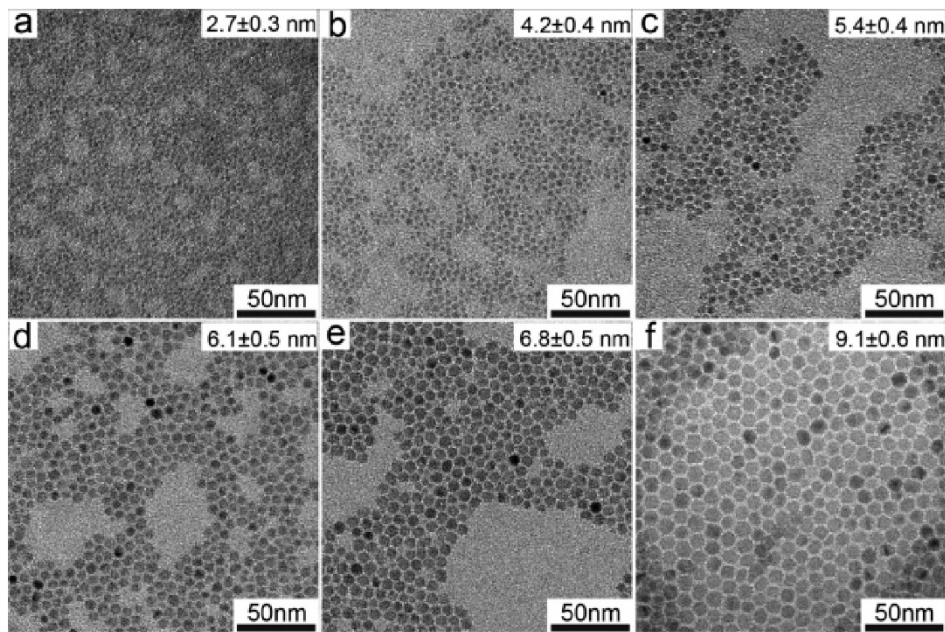


図 1.8 単分散 Si ナノ結晶の透過型電子顕微鏡像。非常にサイズ分布の小さい、均一なナノ結晶が作製できていることがわかる<sup>63</sup>。

しかし、Si ナノ結晶の作製プロセスは殆ど確立され、光学特性評価に関しても理解が深まっているのにも関わらず、バイオ分野における実用化への壁は未だ厚い。この最大の原因として、Si には格子整合する半導体が存在せず、コアシェル構造が形成できないために波動関数を Si ナノ結晶のコア内部に閉じ込めることができず、発光特性が Si ナノ結晶の表面に非常に敏感になっていることが挙げられる。例として、同一サイズを持ち、異なる官能基で修飾された Si ナノ結晶コロイド溶液の発光イメージを図 1.9 に示す<sup>10</sup>。図から明らかなように、Si ナノ結晶は表面修飾分子により異なる発光特性を有することがわかる。このように、発光特性が Si ナノ結晶の表面操作に非常に敏感であるため、他の分子(がん細胞に対するターゲット分子、生体分子など)との複合が必要不可欠となるバイオ分野における実用化には至っていない。そのため、Si ナノ結晶をバイオ分野における既存の材料(有機色素、蛍光たんぱく質など)にとってかわる真に有用なナノ材料にするためには、早急にこの課題を解決する必要がある。

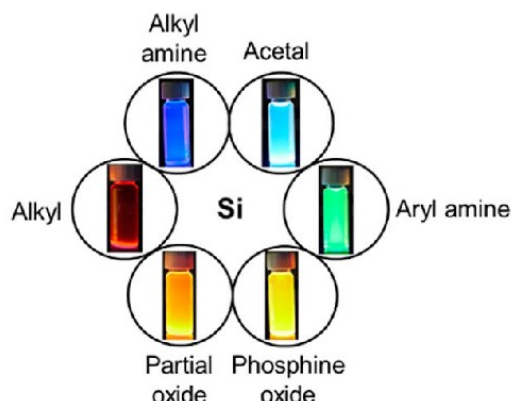


図 1.9 異なる官能基で表面修飾された Si ナノ結晶の発光の写真。表面修飾した分子に依存した発光波長を示していることが分かる<sup>10</sup>。

上述の、表面修飾に敏感な発光特性以外にも、Si ナノ結晶に代表される Si ナノテクノロジー研究において課題は存在する。表 1.2 に Si ナノ結晶に代表される Si ナノテクノロジーの技術における強み(Strength)と弱み(Weakness)、機会及び応用先(Opportunity)と脅威(Threat)を挙げ、各項目の交差しているセルには今後の課題及び対策をまとめた。赤字はナノバイオテクノロジー関連項目を、黒文字はその他の分野への応用における項目を示す。まず、Si 結晶の圧倒的な強みは、生体・環境親和性が高く、赤～近赤外領域に長寿命発光を示す材料であるということが挙げられる。弱みとしては、比較的小さい吸収断面積及び発光量子効率が挙げられる。また、実用上必須となる、大量生産プロセスの欠如も挙げられる。同時に、先にも述べたように周囲の環境変化に特性が非常に敏感であるという課題も存在する。

これらを踏まえたうえで、Si ナノテクノロジーに期待されている応用例としては、バイオセンサーやバイオイメージングにおける蛍光体が挙げられる。この応用例において Si ナノ結晶は、時間分解発光イメージングによる S/N 比の向上への寄与や、発光検出型バイオセンサーデバイスの感度向上に貢献できると考えられる。これらの応用を実現するには、Si ナノ結晶の安定した表面修飾プロセスの開発、及び安定した品質の Si ナノ結晶を実用可能なレベルに大量生産する技術が必要となる。

Si ナノ構造をナノバイオテクノロジー分野において応用可能な技術にまで成長させるにあたり脅威となるものには、Si ナノ構造を実際に応用する際に必要となる政府の認可や、基礎研究を行う大学と応用研究を行う企業との研究方針のギャップなどが予想される。Si ナノ構造を真に実用可能なナノ材料として応用するためには、実際にどの程度の特徴(発光特性、安全性、構造制御性等)のものが実現されれば応用可能なのかを常に考えながら研究を行っていく必要がある。

表 1.2 Si ナノ材料の Strength、Weakness、Opportunities 及び Threats のまとめ。各要素の交差しているセルには、今後の課題を記入している。赤字はナノバイオテクノロジー領域における項目、黒文字はその他の領域における項目を示す。

	Opportunities	Threats
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biomedical (DDS, biosensor)</li> <li>• Bioimaging</li> <li>• Energy (solar, battery, etc.)</li> <li>• Electric devices (conductive films, transistors, etc.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Other materials (depending on App)</li> <li>• Government permission/approval for use and research</li> <li>• Difference in goals between academia (research, innovation) and industry (money)</li> </ul>
Strengths	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Time gated imaging</li> <li>• Increase sensor sensitivity</li> <li>• DDS (small molecule, protein, oligonucleotides)</li> <li>• Long-term DDS/controlled release</li> <li>• Photospectrometer</li> <li>• Battery anode</li> <li>• Solar cell component</li> <li>• Composite material (using surface modification)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Push forward to clinical trials for biomedical</li> <li>• Need more application-based research to entice companies</li> <li>• Need to highlight and prove merits and necessity of silicon devices—get the word out</li> </ul>
Weaknesses	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Biocompatible, non-toxic</li> <li>• Optical (photoluminescence, long life-time, large Stoke shift, stability)</li> <li>• Surface modification</li> <li>• Cheap, abundant</li> <li>• Facile controllability (size, pore, etc.)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Low QY (small absorption cross-section, low emission rate)</li> <li>• Difficult to scale-up</li> <li>• Low stability in harsh condition</li> </ul>

## 1.4 ホウ素、リン同時ドーピング Si ナノ結晶

前節のとおり、Si ナノ結晶に代表される Si ナノテクノロジーは生体・環境親和性やその特異な発光特性により、ナノバイオテクノロジーにおける新規発光ナノ材料として期待されている。しかし、Si ナノ結晶を応用可能なナノ材料とするためには、幾つかの解決すべき課題が存在した。その課題を解決する有効なアプローチとして、ホウ素(B)とリン(P)の同時ドーピングが挙げられる<sup>14,17,19,64-68</sup>。BとPを同時にドーピングすることにより、Si ナノ結晶表面に固溶限界以上の超高濃度でドーピングされた Si シェルを有する、Si ナノ結晶が作製可能であることがわかっている(図 1.10)<sup>68</sup>。この Si ナノ結晶はコアは Si ナノ結晶であり、シェルとして B と P が高濃度で存在する層が存在することで、ホモ接合コアシェル構造 Si ナノ結晶となっている<sup>17,68</sup>。

BとPが同時にドーピングされた Si ナノ結晶は、以下の特徴を有している。

- ① 水やアルコールといった極性溶媒中で、数年にわたり安定して分散性を示す。
- ② 表面の安定化、及び分散性付与のための表面修飾分子を必要とせず、その表面は Si-H や Si-OH で終端されており、表面は負に帯電している(ζ 電位: - 40 mV)。
- ③ 粒子径を高精度に制御可能であり、粒径に依存した発光波長を生体の窓(600-1100 nm)の範囲で示す(図 1.11)。
- ④ 広い pH 範囲で安定した分散性・発光特性を示す。
- ⑤ pH やイオン濃度といった溶媒変化に伴う表面状態変化に鈍感である。

- ⑥ 長時間の励起下でも退色しない、優れた抗光退色性を有する。
- ⑦ 生体・環境に低毒な軽元素(Si、B、P)で構成されている。

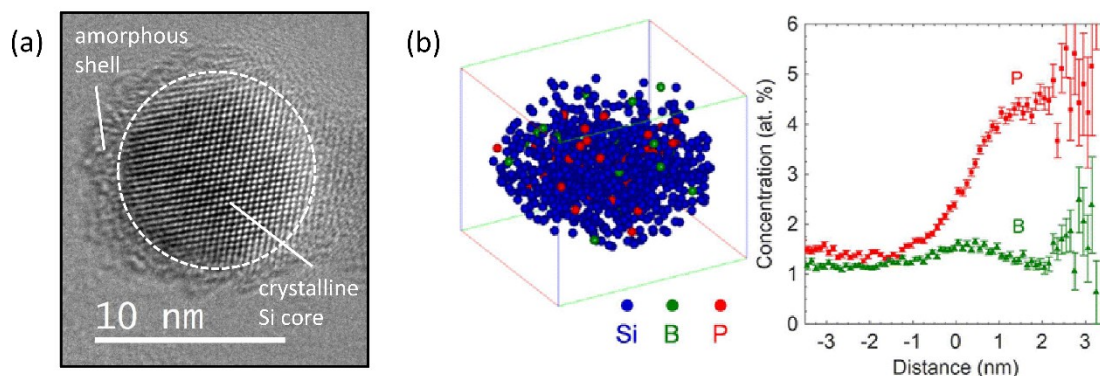


図 1.10 (a)B、P 同時ドーピング Si ナノ結晶の高分解 TEM 像。コアに Si ナノ結晶、シェルにアモルファス Si、B、P 層がみられる<sup>68</sup>。(b)atom probe tomography により得られた Si ナノ結晶中の元素分布。ナノ結晶の表面に B と P が偏在していることが分かる<sup>17</sup>。

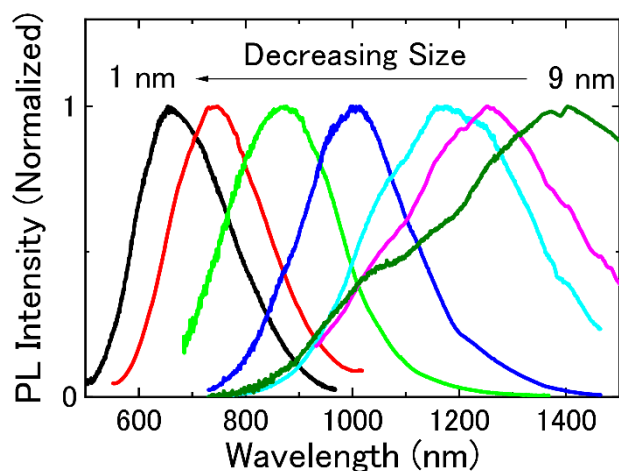


図 1.11 サイズの異なる B、P 同時ドーピング Si ナノ結晶の発光スペクトル。粒径に依存した発光波長が得られ、生体の窓の波長領域においても発光を示すことが分かる<sup>19</sup>。

上記のように、B と P が同時にドーピングされた Si ナノ結晶は従来の Si ナノ結晶の課題を克服しており、カドミウムカルコゲナイドに代表される化合物半導体量子ドットにとってかわる新たな半導体ナノ材料として、バイオ分野での応用が期待されている。B と P が同時にドーピングされた Si ナノ結晶を真に実用可能なナノ材料として、バイオ分野で応用するにあたり、解決すべき課題がいくつか存在する。以下に課題を列挙する。

- ① B と P をドーピングした Si シェルに対する表面修飾プロセスが確立されていない

ため、生体分子との複合が実証されていない。

- ② 間接遷移型半導体のバルク Si のエネルギーバンド構造を継承していることにより、可視領域での吸収断面積及び発光再結合レートが小さい。

①で挙げられた、B と P が同時にドーピングされた Si ナノ結晶の表面修飾プロセスが確立されていないという課題は、特定の分子に対して特異的な結合をする生体分子との結合が必須となるバイオ応用(バイオイメージングやセンシング技術)への実用化に向けて、早急に解決しなければならない。通常、生体分子との複合体を形成する際には、アミノ基やカルボキシル基を介したペプチド結合や、チオール基を介したジスルフィド結合が用いられることが多い。そのため、B と P が同時にドーピングされた Si ナノ結晶の表面を、水素又は酸素終端の状態から生体分子との結合が可能な官能基で表面修飾をするプロセスの開発が望まれている。

②で挙げられた、可視領域での小さい吸収断面積及び小さい発光再結合レートは、生体内バイオイメージングにおいて、深刻な課題である。通常、生体内バイオイメージングは生体の透過率が高い波長領域であり、生体の窓と呼ばれる 700-1100 nm の波長領域で発光体を励起し、得た発光を生体内から検出する必要がある<sup>69,70</sup>。Si ナノ結晶は生体の窓の領域で発光を示すことから、生体内発光プローブとしての利用が期待されているが、可視領域での吸収断面積が小さいため、現状では紫外領域での Si ナノ結晶の励起が行われている。紫外領域での生体内部発光体の励起は、発光体だけではなく生体細胞自体も励起してしまい、生体の自家蛍光が生じることによるイメージングの S/N 比低下が生じる。また、紫外光による生体へのダメージが懸念されるため、好ましくない。そのため Si ナノ結晶を可視領域で励起し、可視領域での高効率発光を目的とした Si ナノ結晶と金属ナノ構造との複合に関する研究が盛んにおこなわれている。

## 1.5 表面プラズモン共鳴による光学特性改善

金のナノ粒子に代表される金属ナノ構造は、金属ナノ構造中の電子と入射する光の相互作用により、特徴的な光学特性を有することが古くから知られている。特定の波長の光が入射すると、局在表面プラズモン共鳴(Localized Surface Plasmon Resonance: LSPR)と呼ばれる、金属微細構造中の電子の集団振動が誘起され、光の吸収及び散乱が生じる。この時の入射光の波長は、プラズモン共鳴波長とよばれ、プラズモン共鳴波長が入射し、LSPR が生じた金属ナノ構造近傍には、著しく増強された電場が存在することが知られている(図 1.12)<sup>71-74</sup>。

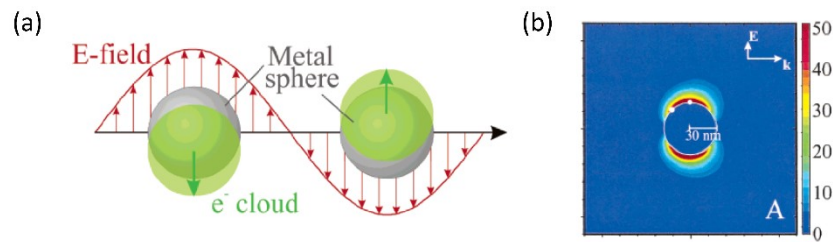


図 1.12 (a)金属ナノ粒子に誘起される局在表面プラズモン共鳴の概念図、(b)直径 30 nm の銀ナノ粒子にプラズモン共鳴波長の入射光が入射した際の電場分布。銀ナノ粒子の周囲に増強された電場が存在することが分かる<sup>71</sup>。

この増強電場中に発光体を配置すると、その光学特性に変化があることが知られており、精力的に研究が行われている。発光増強におけるプラズモンの効果は、以下の式で表される。

$$E.F. = \left(\frac{E}{E_0}\right)^2 \times \frac{\Gamma_r}{\Gamma_r + \Gamma_{nr}}$$

E.F.は発光強度の Enhancement Factor つまり発光増強度を表し、 $E_0$ は金属ナノ構造がない場合の電場を、 $E$ は金属ナノ構造が存在する場合の電場を表している。 $\Gamma_r$ は金属ナノ構造が存在する場合の輻射的遷移割合の増強度を、 $\Gamma_{nr}$ は金属ナノ構造が存在する場合の非輻射的遷移割合の増強度を表している。尚、 $\frac{\Gamma_r}{\Gamma_r + \Gamma_{nr}}$ は antenna efficiency とよばれる<sup>75,76</sup>。第一項は、励起側、つまり吸収断面積増大の効果である。これは、入射光が LSPR 状態にある金属ナノ構造の近傍にある発光体の位置における局所場の入射場に対する増強効果であり、つまり弱い入射光を入射しても、強い入射光を入射した時と同じ効果が得られるという効果である。第二項は、量子効率改善における効果を示している。発光体に光が入射し、発光体内部に励起子が生成された際、輻射確率はフェルミの黄金律で与えられる。この式には、輻射先のフォトンの状態密度が含まれており、その輻射確率は状態密度に比例する。発光体の近傍に金属ナノ構造が存在する場合、プラズモンモードへの輻射確率が加えられる。そのため、発光強度の増強に寄与するか否かは、発光体や金属ナノ構造に依存する。

これまで、発光体の特性改善を目的として、金属ナノ構造との融合に関する研究が行われてきた<sup>77-86</sup>。発光体を金属ナノ構造の近傍に配置することで得られる発光増強度は金属ナノ構造と発光体の距離に大きく依存する。発光体と金属ナノ構造間の距離が小さい場合、励起子のエネルギーが金属内部に散逸してしまい、非輻射的遷移割合が増大、結果として発光の消光、つまりクエンチングが生じてしまう。一方、距離が大きすぎる場合、増強電場による発光増強効果が薄れてしまい、結果として大きな発光増強度は得

られない。そのため、発光体の発光増強を金属ナノ構造とのカップリングにより実現するには、発光体を金属ナノ構造から適切な距離を開けて配置することが重要となる。

一例として、金属ナノ構造である銀ナノ粒子配列基板上に、Atomic Layer Deposition(ALD)法により距離を高精度に制御し、発光体層である化合物半導体の量子ドットを配置した系の発光特性に関する報告を挙げる<sup>87</sup>。この系では、金属ナノ構造と発光体層の距離はALDにより高精度に制御され、発光体の発光特性が金属ナノ構造によりどのように変化をし、またどのような距離依存性があるのかを詳細に調べることが可能である(図 1.13 (a-b))。その結果、化合物半導体量子ドットの発光増強度は、距離が5 nmの時に最大となり、発光増強度は最大で約16倍になることがわかった。

図 1.14 に CdSe 量子ドットの発光増強を目的に作製された、Au ナノ粒子と量子ドットの複合体の模式図と透過型電子顕微鏡像を示す。Au ナノ粒子と量子ドットは DNA のハイブリダイゼーションにより結合され、複合体が形成されている。DNA を用いるメリットとしては、金属ナノ構造である Au ナノ粒子との距離が、DNA の塩基対の数により高精度に制御可能なことが挙げられる。また、電気泳動によりナノ粒子表面の DNA の数を制御可能であることを利用して、Au ナノ粒子と、化合物半導体の量子ドットの粒子数比率や構造(サテライト構造、ダイマー構造など)を調整することが可能であり、最終的に5倍の発光増強度を達成した。またこの研究では、生体内に注入可能な Au ナノ粒子コロイド溶液を用いて量子ドットの発光増強を実現するため、将来的にバイオイメージングなどの応用も考えられる。

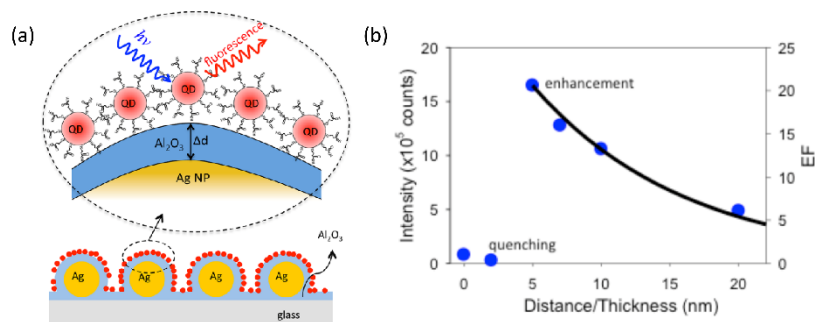


図 1.13 (a)銀ナノ粒子上にALDにより成膜された酸化アルミニウムの薄膜をスペーサーとして配置し、化合物半導体量子ドットが配置されている構造の模式図、(b)発光増強度のスペーサー膜厚依存。銀ナノ粒子に生じる局在表面プラズモン共鳴によって、発光強度が増大されている<sup>87</sup>。



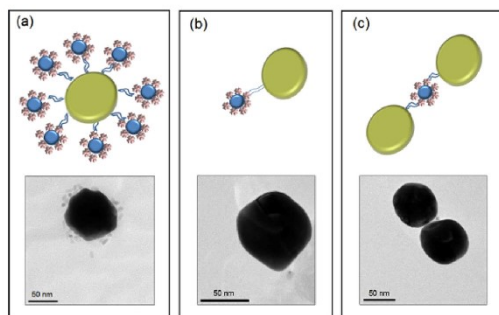


図 1.14 DNA を介した金ナノ粒子と CdSe 量子ドットの複合体の模式図及び TEM 像。DNA の本数を制御することにより、金ナノ粒子と量子ドットの数や構造を制御可能である。(a)金ナノ粒子周囲に量子ドットがサテライト構造に配置された複合体、(b)金ナノ粒子と量子ドットの個数比が 1:1 の複合体、(c)金ナノ粒子のダイマー間に量子ドットを配置した複合体<sup>77</sup>。

上述のとおり、金属ナノ構造により化合物半導体をはじめとする発光体の光学特性を改善することが可能なことが過去の研究から明らかになっている。しかし、これらの報告は原理実証にとどまっており、バイオイメージングで必須となる生体内への発光体の注入が難しい、生体毒性を有する化合物半導体量子ドットを用いて実験が行われている。また、その発光増強度は吸収断面積増大、または輻射的遷移割合増大のどちらか一方のみの寄与であるため最大の発光増強度は依然として低く、金属ナノ基板上の発光増強現象の主な応用先である、発光検出型のバイオセンサーへの応用も厳しい。しかしながら、金属ナノ構造により制御可能な発光体の光学特性変化には、生体内バイオイメージングで利用可能な発光特性を有する発光体や、検出対象の有無を生体分子の特異的な分子認識機構を利用し、発光強度を変化させることで実現可能な発光検出型バイオセンサーへの応用に向けたポテンシャルがあるため、より大きな発光増強度が期待される金属ナノ構造と発光体の複合体の構造を開発する必要がある。

近年では、バイオフォトンクスへの応用が期待されている Si ナノ結晶と金属ナノ構造との複合に関する研究報告が増えつつあるが、構造の制御性、および発光増強度などの値は、化合物半導体や有機色素や蛍光タンパク質といった既存の蛍光体を用いた複合体に比べて劣っているのが現状である<sup>85,88-90</sup>。そこで本研究では、金属ナノ構造を用いた Si ナノ結晶の特性改善を実証し、最終的にバイオフォトンクス分野に応用可能な複合体の構造の開発、及び発光特性の改善を実現し、Si ナノ結晶の性能を、バイオフォトンクス分野における実用可能な発光体のレベルまで引き上げることを目的とする。

## 1.6 金属ナノ粒子/半導体ナノ構造の抗菌剤応用

金属ナノ構造の代表例である、粒径が数十 nm の金属ナノ粒子が近年注目を集めている。この金属ナノ粒子には、バルクの金属とは異なる性質を有することが知られており、その代表例が前節で述べた表面プラズモン共鳴の発現であった<sup>91-96</sup>。金属ナノ粒子はプラズモン共鳴の発現以外にも、高い比表面積を有することにより様々な特性が発現し、その結果金属ナノ粒子には様々な魅力的な応用が存在する。例えば、白金(Pt)ナノ粒子は高い触媒活性を有することが知られており、ナノ粒子を用いることで希少金属である白金の使用量削減及び高効率化に寄与している<sup>97-99</sup>。また、酸化鉄などの磁性ナノ粒子は、その表面を生体分子で修飾し、生体分子の特異的反応を利用し夾雑物の多い混合溶液から目的タンパク質のみを回収するという用途で、バイオ分野において広く用いられている<sup>100-103</sup>。

上述のとおり、金属ナノ粒子にはバルク金属とは異なる性質が存在するため盛んに研究が行われている。中でも銀(Ag)や銅(Cu)のナノ粒子は金属イオンを効率的に徐放することにより発現する抗菌作用を利用した、金属ナノ粒子の抗菌剤応用が注目を集めている<sup>104-113</sup>。金属ナノ粒子の優れた抗菌作用は、微生物の細胞内に金属イオンが取り込まれ、金属イオンがタンパク質等に結合し、その機能を障害、結果として活性酸素種が発生し微生物が死滅に至るというメカニズムによるものであると考えられている(図 1.15)<sup>114</sup>。

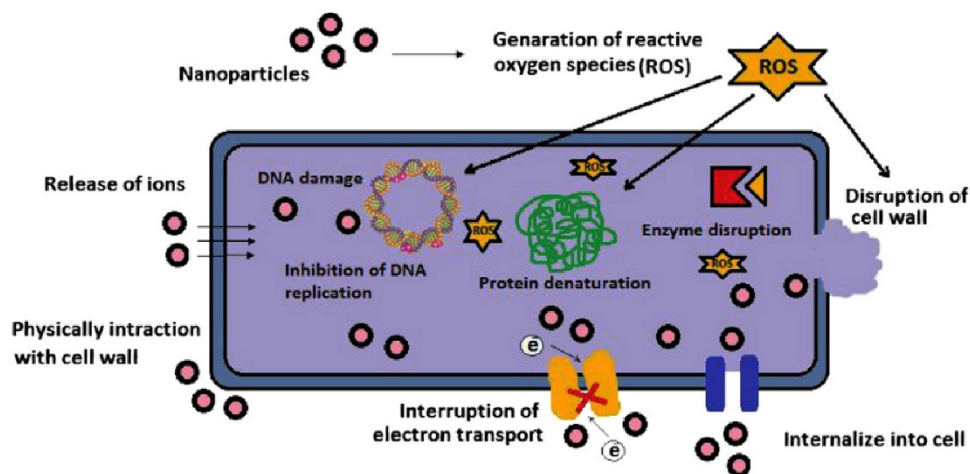


図 1.15 金属ナノ粒子の細菌に対する抗菌作用のメカニズム<sup>114</sup>。

特に Ag ナノ粒子は、Ag イオンが幅広い細菌の種類に対して抗菌作用を有すると同時に、生体への安全性が非常に高いため盛んに研究が行われている<sup>104,105,108,110-113</sup>。その

ため金属ナノ粒子を抗菌剤として応用する際には、効率的かつ安定して金属イオンを溶液中に徐放する必要がある。しかし、抗菌剤応用が期待されている Ag ナノ粒子には、溶液中で凝集や酸化してしまうという安定性の課題が存在していた。その課題の解決のため、Ag ナノ粒子の表面をポリマーや高分子で被覆した構造や、無機材料上に Ag ナノ粒子を担持させ、凝集を抑制するという方法がとられている<sup>115-122</sup>。中でも、有機分子を使用する安定化手法よりもより耐熱性や長期安定性にすぐれる無機材料での Ag ナノ粒子の安定化向上が注目を集めている。無機材料として、ナノワイヤやポーラス構造に代表されるナノ構造を有する半導体ナノ材料を用いて、Ag ナノ粒子の安定性向上を実証したという報告が過去になされている<sup>116,123,124</sup>。過去に行われた無機材料による Ag ナノ粒子の安定性向上及び抗菌作用の実証に関する例として図 1.16 に、Si ナノワイヤ/Ag ナノ粒子複合体の模式図及び電子顕微鏡像を示す<sup>116</sup>。この報告では、Si ナノワイヤ上に Ag ナノ粒子を担持させることで凝集を抑制し、安定性の向上を実証している。安定性が向上した結果、大気中に暴露しても凝集が生じないため、作製した複合体でフィルムを作製し、抗菌フィルムの作製にも成功している。

既述のように、Ag ナノ粒子と半導体ナノ構造の複合体は、安定性の高い抗菌力として優れたポテンシャルを有することが分かる。しかし、半導体ナノ構造と Ag ナノ粒子により作製される複合体の構造(半導体ナノ構造と銀ナノ粒子の比率や、Ag ナノ粒子の被覆率など)が、抗菌力にどういった影響を及ぼすかに関して精査はされておらず、また Ag ナノ粒子の Ag イオンの徐放性を失わず、抗菌力を保持可能な構造の最適化もされていないのが現状である。Ag ナノ粒子をより安定性の高い抗菌剤として応用するにあたり、半導体ナノ構造での安定性向上は優れたアプローチであることは過去の研究から明らかであるため、今後は構造の制御性および構造が抗菌力に与える影響に関して、詳細に調べていく必要がある。

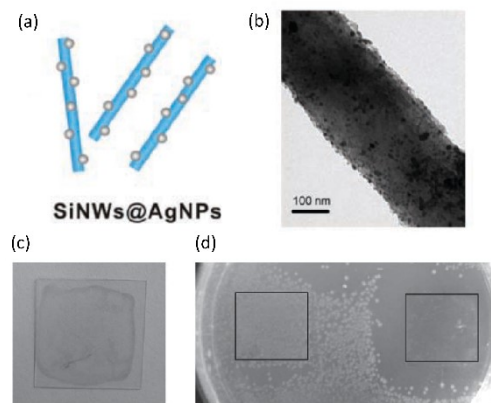


図 1.16 Si ナノワイヤ上に担持させ、安定性を向上させた Ag ナノ粒子の(a)模式図、(b)透過型電子顕微鏡像。作製した複合体をカバーガラス上にドロップコートし、作製された抗菌フィルムの(c)写真、及び(d)大腸菌と培地上で培養した結果(右)。比較対象として、複合体を含まないカバーガラスを配置している(左)<sup>116</sup>。

## 1.7 本論文の目的・構成

本研究の目的は、B と P を同時にドーブし作製した Si ナノ結晶のバイオ応用に向けて、金属ナノ構造との複合体を形成し、その物性を向上させることにある。金属ナノ構造との複合体の形成目的は大きく二つに分けられる。一つ目の目的は、Si ナノ結晶の光学特性改善である。前述のとおり、Si ナノ結晶には構造及び発光特性の面で非常に優れた特性があるが、可視の波長領域において小さい吸収断面積及び低い発光再結合レートを有するといった課題が存在する。これは励起および発光を生体の窓の波長領域(700-1100 nm)において行う必要があるバイオフォトンクス分野において非常に大きな課題である。本研究では、金属ナノ構造に生じる表面プラズモン共鳴を用いて、Si ナノ結晶の発光特性を改善する。二つ目の目的は、金属ナノ構造自体の安定性向上である。金属ナノ構造である銀ナノ構造には発光特性改善以外にも、抗菌作用を有するというバイオ分野において有用な性質がある。しかし、銀ナノ粒子に代表される銀の微細構造には安定性の面で課題があった。そこで、抗菌剤としての性能向上のため、Si ナノ結晶を安定化剤として用いた銀ナノ粒子と Si ナノ結晶の複合体を形成する手法が有効である。本論文の構成は以下の通りである。

第 2 章では、B と P を同時にドーブし作製した Si ナノ結晶の表面修飾について述べる。この Si ナノ結晶は、バイオイメージングやバイオセンシングといったバイオフォトンクス分野において非常に有用な蛍光プローブになり得る可能性を秘めた新規ナノ材料である。しかし、その表面は主に水素、酸素で終端されており、生体分子との結合に不向きであるため、その表面を生体分子と結合が容易な官能基で修飾する技術の開発

が必要であった。本研究では、生体分子との結合が容易なチオール基及びアミノ基での表面修飾プロセス確立を目的として実験を行った。表面修飾プロセスとして、シランカップリング反応を採用した。使用する分子の分子構造及び濃度を最適化することにより、分散性を損なわず、かつ発光特性への影響が最小限となる表面処理条件を見出した。特に、表面修飾前後で発光波長及び発光スペクトル形状に変化のない発光を観測した。以上の結果は、Si ナノ結晶のバイオフォトンクスにおける蛍光プローブとしての応用に非常に重要なステップとなったといえる。

第3章では、Si ナノ結晶の吸収断面積増大を目的とした金ナノ粒子との複合体形成について述べる。Si ナノ結晶は前述のとおり、特に発光特性の面において非常に優れた特性を有することからバイオ分野における蛍光プローブとしての利用が期待されている。しかし Si は間接遷移型半導体であるために、吸収断面積が可視~近赤外領域において著しく低下するということが課題であった。この解決のため、金属ナノ構造に発現する表面プラズモン共鳴を利用する。特に、生体内バイオイメージングへの応用を見据えて、金ナノ粒子のコロイド溶液を金属ナノ構造として用いて、金ナノ粒子と Si ナノ結晶の複合体を形成し、吸収断面積増大を試みる。金属ナノ構造を用いた発光体の発光特性改善には、金属ナノ構造と発光体の距離が非常に重要なパラメーターであるため、本研究では異なる3種類の方法(静電相互作用、金-チオール結合、DNA ハイブリダイゼーション)を用いて複合体を形成しその構造を制御、金属ナノ構造による Si ナノ結晶の吸収断面積増大の最大化を図った。その結果、金ナノ粒子と Si ナノ結晶を二重鎖 DNA を介して結合させ、粒子間距離を 10 nm に保った場合に最大で4倍の発光増強が得られることが分かった。これらの結果は、金属ナノ構造との融合により Si ナノ結晶の吸収断面積増大に成功したことを示している。

第4章では、可視領域に複数の表面プラズモン共鳴に起因するピークを有する金属ナノ構造である銀ナノ構造基板を用いることで、Si ナノ結晶の吸収断面積及び発光再結合レートの同時増強を目的に実験を行った。前述のとおり、Si ナノ結晶は可視~近赤外領域において吸収断面積および発光再結合レートが低いという課題を有していた。その課題の解決のために金属ナノ構造との融合が発光特性に与える影響に関して研究が進められてきたが、そのほとんどが吸収断面積、若しくは発光再結合レートの片方みの増大であったため、最終的に得られる発光増強度が大きくないという課題があった。本研究では、複数の表面プラズモン共鳴を有する銀ナノ構造基板を用いて、銀ナノ構造基板と Si ナノ結晶の距離を高精度に制御し、構造を最適化することで、Si ナノ結晶の吸収断面積及び発光再結合レートの同時増大を実現した。結果として、励起波長と発光波長がプラズモン共鳴波長に存在するとき、最大で約10倍の発光増強が得られた。この現象を用いることで、将来的に検出対象の有無により基板との距離が変化し、結果として変化する Si ナノ結晶の発光特性を利用する発光検出型バイオセンサーへの応用につな

がったと考えられる。

第5章では、抗菌作用を有する金属ナノ構造である Ag ナノ粒子の安定性向上を目的とした Si ナノ結晶シェルで被覆された Ag ナノ粒子の作製及び抗菌作用に関して述べる。Ag ナノ粒子は高い比表面積によって効率的に Ag イオンを徐放できることから、抗菌剤としての応用が期待されている。しかし、高い感光性を有し、凝集しやすいといった安定性の面での課題が存在したために、ポリマーや無機ナノ材料との複合による安定性向上を目的とした研究が盛んになされてきた。本研究では、Ag ナノ粒子の安定剤として Si ナノ結晶を用いて、Si ナノ結晶で被覆された銀ナノ粒子を作製し安定性を向上、その抗菌作用を評価した。Si ナノ結晶シェルと Ag ナノ粒子の構造(シェル膜厚やナノ粒子の直径)を高精度に制御し、抗菌力評価を行うことで、構造の最適化を図った。その結果、シェルの膜厚が薄い構造が高い抗菌作用を有することが明らかになった。また、作製した複合体を用いて抗菌フィルムを作製し、その抗菌力を評価した。結果として、抗菌フィルムが抗菌作用を発揮するメカニズムは、培地上に存在する水中をナノ粒子が拡散することにより抗菌力を発揮するということが明らかになった。これらの知見は、今後 Ag ナノ粒子の抗菌剤としての実用化に大きく貢献できると考えられる。

第6章では、Si ナノ結晶を用いた時間分解バイオイメーキングを実証する。Si ナノ結晶は、生体の自家蛍光の発光寿命(10 ナノ秒以下)に比べて非常に長い発光寿命を有する。そのため、励起光を照射する時間と、発光を検出する時間に遅延を設けて、発光寿命の長い発光のみを検出し、イメーキングを行い、S/N 比を向上させる時間分解バイオイメーキングにおける発光体としての利用が可能である。本研究では、3種類の異なる構造及び発光特性を有する Si ナノ結晶を用いて時間分解バイオイメーキングを行った。Si ナノ結晶としては、ポーラス Si ナノ結晶、ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶、有機分子で表面修飾をした Si ナノ結晶の3種類を用いた。構造評価、光学特性評価を詳細に行うことで、3種類の Si ナノ結晶は、発光スペクトルは 700-800 nm でブロードに発光を示すが、その構造や分散性の起源及び発光寿命などは異なることが明らかになった。3種類の Si ナノ結晶を用いて時間分解バイオイメーキングを、生体に皮下注射をすることで行った。その結果、全ての Si ナノ結晶において時間分解発光イメーキングが実現され、従来のイメーキングと比べて S/N 比が向上されることが分かった。これらの結果は、Si ナノ結晶はその構造やドーピングの有無、分散性の起源に依らず、時間分解発光イメーキングにおける蛍光体として非常に有用であることが明らかになった。

最後に第7章で、本研究のまとめを述べる。



## 第2章 Si ナノ結晶の表面修飾

### 2.1 はじめに

半導体量子ドットは既存の蛍光体(有機色素や蛍光たんぱく質など)に比べて、粒径制御により幅広い範囲で調整可能な発光波長や大きいストークスシフト、蛍光退色が起こりにくいといった優れた特性により、バイオ分野におけるプローブとして理想的な特性を示すことが知られている<sup>48,50,51,125,126</sup>。中でも Si ナノ結晶は生体に対しての毒性が低いこと、また生体内での分解・排出が行われやすい、つまり生分解性が高いといった生体適合性において、他の量子ドット(カドミウムカルコゲナイド系)に比べて、明らかな優位性を示す<sup>2,3,127,128</sup>。そのため、Si ナノ結晶はバイオ分野における新規蛍光材料として注目を集め、その実用化のための研究が盛んに行われている<sup>1,4-9,13,129,130</sup>。

Si ナノ結晶のバイオイメージングやバイオセンシングにおける蛍光プローブとしての本格的な応用には、ターゲットとなる細胞や生体分子と選択的かつ強固に結合する生体分子(抗体、核タンパク質、酵素、受容体等)と結合させる技術が必要不可欠となる<sup>130-133</sup>。一般に、無機系材料と生体分子の結合には物理吸着、静電結合及び化学結合が用いられている。中でも化学結合による生体分子との結合は、生体分子との結合部位の選択制や安定性の面を考慮すると、非常に重要な結合方法である。化学結合による Si ナノ結晶と生体分子の結合には、ナノ材料の表面を生体分子と結合可能な官能基で修飾することが必須プロセスとなる。Si ナノ結晶の表面修飾に関する研究は過去に盛んに行われており、そのプロセスは確立されており、殆どの報告では水素終端された Si ナノ結晶を用いるヒドロシル化反応を用いている<sup>8,10,129,134-140</sup>。しかしながらこの方法では、表面修飾後に発光強度低下や発光波長の短波長シフトといった発光特性が大きく変化してしまうという現象がおきる。これはナノ結晶表面に欠陥準位が形成されることや、修飾分子へのエネルギー移動が原因である<sup>10</sup>。バイオ分野において蛍光体には、安定した赤~近赤外発光が求められているが<sup>141</sup>、現在、この波長領域で安定した発光を示す Si ナノ結晶の表面修飾プロセスの報告は殆どない。そのため、Si ナノ結晶の蛍光プローブとしての応用実現において、表面修飾後も安定して発光を示す Si ナノ結晶の表面修飾プロセスの開発は急務である。

ホウ素(B)とリン(P)を同時にナノ結晶中にドーピングした Si ナノ結晶は、その表面に B と P が固溶限界以上に高濃度でドーピングされた Si シェルを有しており、ホモ接合コア/シェル構造となることが近年の研究から明らかになっている<sup>14,18,68</sup>。この新しいタイプの Si 量子ドットは生体に無害な軽元素(B、P 及び Si)のみから構成されており、ヒトの細胞に対しての毒性が低いことがわかっている<sup>15</sup>。また、その表面には負の表面電位が誘起されるため、広い pH 範囲で水分散性を示すことが分かっている<sup>16</sup>。これらの特徴



は、B と P を同時にドーピングした Si ナノ結晶がバイオ分野における蛍光プローブとして非常に有用な発光体であることを示している。その表面は、試料作製直後には水素終端されており、溶液中で保存するにつれて、徐々に表面酸化が進んで行くことが分かっている(図 2.1)<sup>142,143</sup>。しかしながら、水素終端、及び酸素終端のいずれも生体分子との化学結合は困難であるため、ホウ素リン同時ドーピング Si ナノ結晶のバイオ応用を実現するには、表面を生体分子と反応可能な分子で修飾する技術の開発が必要である。

そこで本研究では、BP 同時ドーピング Si ナノ結晶の表面修飾プロセスの開発を行う。表面修飾プロセスとしては、表面酸化膜を利用するシランカップリング反応を用いる。表面修飾が分散性及び発光特性に与える影響に関して評価し、表面修飾条件(修飾分子の構造や濃度比率など)の最適化を行う。実験では、生体分子とペプチド結合による複合技術が確立されているアミノ(NH<sub>2</sub>)基と、ジチオール結合による複合技術が確立されているチオール(SH)基による表面修飾を行った。実験の結果、シランカップリング反応を用いた表面修飾プロセスでは、発光波長に変化がない、つまり近赤外発光を維持できることがわかった。またプロセスの前後で凝集による分散性の低下がみられなかったことから、分散性を保持可能な表面修飾プロセスであることがわかった。これは、過去の表面修飾に発光特性が非常に敏感である Si ナノ結晶に比べて、安定した近赤外発光が求められる蛍光プローブとして非常に重要な特性である。本章では、表面修飾プロセスの開発、及び分散性・発光特性へ表面修飾分子が与える影響に関して、複数の異なる表面修飾分子を用いて比較検討を行い、修飾条件を最適化する。

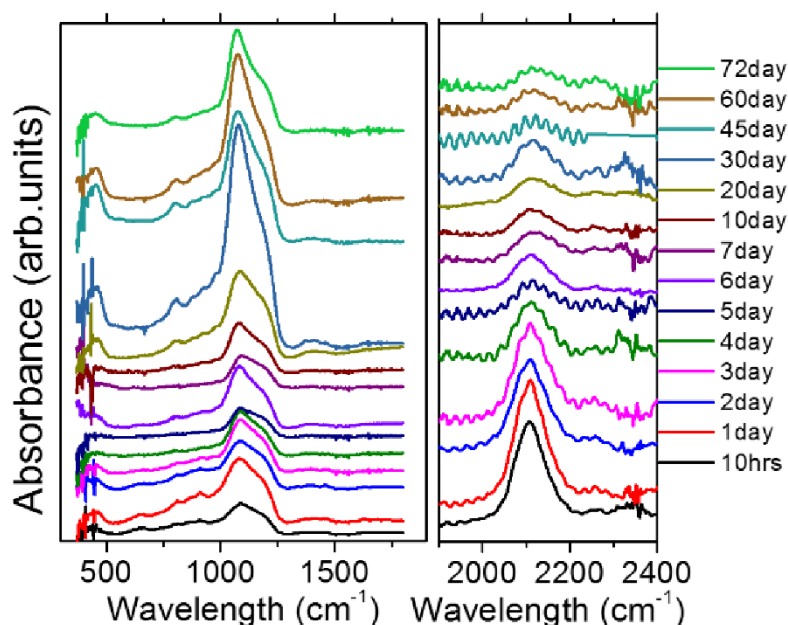


図 2.1 Si ナノ結晶のエッチング後 10 時間~7 日目の赤外吸収スペクトル。メタノール中で穏やかに酸化されていることが分かる<sup>142</sup>。

## 2.2 実験方法

### 2.2.1 試料作製方法

ホウ素とリンを同時にドーブした Si ナノ結晶の作製方法

ホウ素とリンを同時にドーブした Si ナノ結晶は、図 2.2 に示すプロセスにて作製される。作製プロセスは主に①Si ナノ結晶を含む BPSG(borophosphosilicate glass)薄膜作製と、②フッ酸エッチングによる Si ナノ結晶コロイド溶液の作製の 2つのステップから成る。

①Si ナノ結晶を含む BPSG 薄膜は、マグネトロンスパッタリングを用いた複数のターゲットの同時スパッタリング法により作製した。直径が 100 mm の円形の P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> を 5wt.%含む SiO<sub>2</sub> 焼結体のターゲット上に、Si 基板を切り出して作製した Si チップ(150 mm<sup>2</sup>)と、B<sub>2</sub>O<sub>3</sub> タブレットを円周上に配置し、RF マグネトロンスパッタリング装置(SPF-210HS, ANELVA)を用いてスパッタリングを行った。マグネトロンスパッタリングでは、円形に配置されたマグネットを用いて磁場中に電子を囲い込み、濃いプラズマ領域を形成することにより Ar 原子がターゲットに衝突する確率を高めて、スパッタリング効率の上昇を行っている。そのため、ターゲットを円周上かつ対称に配置する必要がある。なお、スパッタで成膜した薄膜は、厚さ 0.1 mm のステンレス円板に堆積し、スパッタリング後に薄膜を折り曲げて剥離することで回収した。全てのスパッタリングプロセスにおいて、基板は加熱せず、循環冷却水を用いて冷却しながら成膜を行った。作製した薄膜は、管状電気炉(SYK-460-MA, Sanyo Rikagaku-kikai Seisakusho)を用いて、酸化を防ぐため窒素雰囲気中(2 L/min)で 30 分間アニールを行うことで、Si ナノ結晶成長を行った。このプロセスでは、アニール温度により結晶成長を制御することで、任意のサイズの Si ナノ結晶が作製可能であり、各実験毎に必要な粒径に応じてアニール温度(1050-1200 °C)を選択した。アニール終了後、-3.3 °C/min で徐冷し、700 °Cまで冷却したとは自然冷却、500°C以下になった時点で電気炉から取り出した。得られた Si ナノ結晶を含む BPSG 薄膜を回収し、試料を乳鉢で粉碎し粉末試料を作製した。

②フッ酸エッチングによる Si ナノ結晶コロイド溶液の作製は、①で作製した試料をフッ酸溶液(48 wt.%)を希釈せずに原液として用いるフッ酸エッチングにより行う。粉末試料 20 mg を超高速遠心式ろ過ユニット(Vivaspin2, sartorius stedim biotech)に入れ、フッ酸水溶液を 1 mL 加え、ろ過ユニットを超音波洗浄機(USD-3R, AS ONE)中で 30 分(1200°C アニールのは 60 分)攪拌する。使用するフィルターの膜は polyethersulfonate(PES 膜)という薬品耐性の高いものを使用している。また、フィルター 1 つにつき 20 mg が適量だが、状況に応じて多めや少なめにしても問題はない。その際は、加えるフッ酸水溶液の量を適宜変更する。粉末試料をフッ酸水溶液に加えた後、フィルター底面に試料が沈殿し、エッチングレートが低下することを防ぐため、開始直後にテフロン製のスパチュ

ラにて優しく攪拌する。この際、強く攪拌すると PES 膜が破けるため、丁寧に行う。30 分の超音波洗浄による攪拌後、メタノール(Wako, 99.7 wt.%)を 1 mL 加え、ろ過ユニットを遠心分離機(H-11N, Kokusan)中で 4000 rpm で 1-2 分遠心分離を行い、フッ酸をメタノールで置換する。遠心分離後、ろ過ユニットの底部にたまった溶液を廃棄し、廃棄した溶液と同量のメタノールを上部に加えて、遠心分離を行う。この作業を、透過液の pH が 4-5 程度になるまで繰り返す。通常、7-10 回程度の遠心分離で終了する。そのあと、パストゥールピペットでフィルター上部の溶液をバブリングにより攪拌し、回収する。この際、数十秒程度ろ過ユニットを超音波洗浄にかけると回収率が向上するが、長期間(10 分以上)超音波洗浄にかけると、ろ過ユニットのフィルターから水がコロイド中に入り込むため注意する。作製したコロイド溶液は、作製 3 日後には凝集物と分散するナノ結晶に分かれるため、この段階で遠心分離(10,000 g, 10 分)を行うことで、完全にコロイド溶液と凝集物に分離が可能になる。また、作製したコロイドは希釈は容易だが、濃縮は手間であるため、なるべく濃い状態で回収することが望ましい。

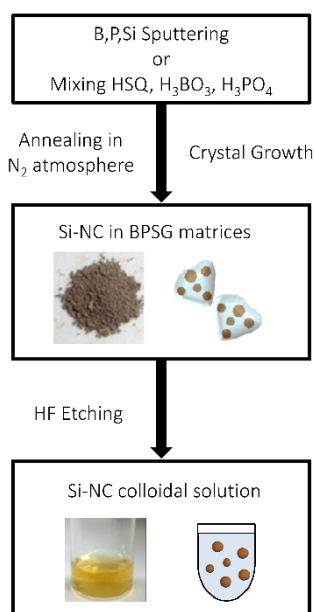


図 2.2 ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶溶液の作製方法の概略図。

### 表面修飾方法

Si ナノ結晶の表面修飾として、主に表面の水素結合を利用するヒドロシリル化反応と、表面酸化膜を利用するシランカップリング反応の二つが主に研究されている。本研究では、表面修飾方法として、試料表面の Si-O-Si を用いるシランカップリング反応を

採用する。尚、ヒドロシリル化反応を用いた表面修飾プロセスについては、2017年の菅野天さんの博士論文に詳細が記載されている<sup>144</sup>。

図 2.3 にシランカップリング反応による Si ナノ結晶の表面修飾プロセスの模式図を示す。シランカップリング剤は水相において加水分解反応( $\text{Si-OCH}_3$  が  $\text{Si-OH}$  に変化)が起こり、結果として生じたシラノール基が Si ナノ結晶表面の水酸( $\text{OH}$ )基に吸着する。その後、脱水縮合反応によってシロキサン結合( $\text{Si-O-Si}$ )が形成され、表面に固定化、Si ナノ結晶の表面修飾プロセスが完了する<sup>79,145-148</sup>。

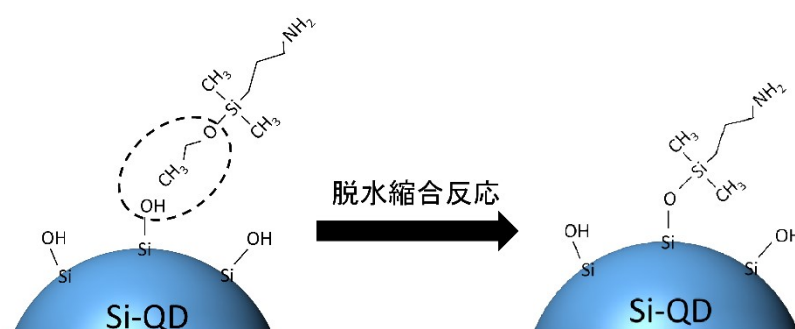


図 2.3 Si ナノ結晶のシランカップリング反応を用いた表面修飾プロセス。

シランカップリング反応において、加水分解後のシラノール基の数が多くほど、無機物質表面への吸着率、つまり反応効率が高くなることが知られている。また、脱水縮合反応を  $\text{Si-OH}$  間で起こして表面への固定化を行う際に、異なる分子間での  $\text{Si-OH}$  間の脱水縮合反応、つまり架橋が起こることも知られている。そのため、本研究ではシラノール基となる官能基である  $\text{Si-OCH}_3$  の数が異なる分子に関してシランカップリング反応を起こし、チオール( $\text{SH}$ )基、及びアミノ( $\text{NH}_2$ )基での表面修飾プロセス条件の確立、及び最適化をすることを目的に実験を行った。使用した分子構造を図 2.4 に示す。 $\text{SH}$  基修飾には(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane (3-MPTS) (Sigma Aldrich)を用いた。 $\text{NH}_2$  基修飾には、(3-Aminopropyl)triethoxysilane (Sigma Aldrich)、及び 3-(Ethoxydimethylsilyl)propylamine (Sigma Aldrich)を用いた。尚、 $\text{SH}$  基修飾を行うシランカップリング剤に関して、 $\text{Si-OCH}_3$  の数が 1 つの分子を使用し、比較検討することを試みたが、そのような分子は一般的でないため、 $\text{SH}$  基修飾に関しては  $\text{Si-OCH}_3$  の数が 1 つの分子のみ実験を行った。

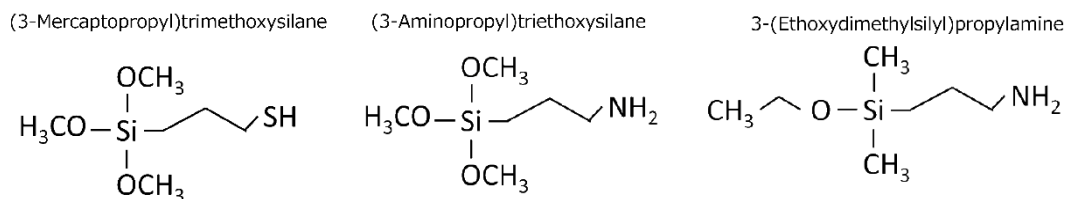


図 2.4 Si ナノ結晶の表面修飾プロセスに用いたシランカップリング剤の分子構造。

Si ナノ結晶の溶液中での表面修飾方法の詳細なプロセスを以下に示す。

1. メタノールに分散した Si ナノ結晶コロイド溶液(0.4 mg/mL)400  $\mu$ L に対して、メタノールで濃度調整を行ったシランカップリング剤 20  $\mu$ L を混合し、純水 20  $\mu$ L を加えることで、溶液中で加水分解反応を起こす。
2. ボルテックスミキサーで 1.の溶液を混合後、超音波洗浄機に 15 分間かけることで、十分に攪拌する。
3. 遠心式フィルター(Amicon Ultra -0.5 mL 遠心式フィルター 3K Da, Merckmillipore)を用いて、未反応のシランカップリング剤を取り除く。遠心条件は、14,000 rcf で 30 分間として、洗浄プロセスは 2 回行った。
4. 溶液を 110°C に熱したホットプレートで 10 分間加熱し、脱水縮合反応を促進させる。

## 2.2.2 分散性評価方法

### 透過スペクトル測定

Si ナノ結晶コロイド溶液の可視～近赤外領域における透過率スペクトルの測定には、紫外可視分光光度計(UV-310PC, Shimadzu)を用いた。測定範囲は 300～1000 nm とし、スリット幅は 3 nm、サンプリングピッチは 1 nm、スキャンニングスピードは中速(200 nm/min)に設定した。測定の際は、微小容量溶液用の石英セル(容量 100  $\mu$ L)を使用した。リファレンスには水を用いた。

## 2.2.3 発光特性評価方法

### 発光スペクトル測定

可視～近赤外領域(500～1300 nm)の検出波長領域における発光スペクトル測定には、モジュール型蛍光分光測定装置(SPEX Fluorolog-3, HORIBA)を用いた。励起光源として、ダブルモノクロメーターで 405 nm に分光された 450 W の Xe ランプからの光を用い、シングルモノクロメーターで分光された発光は光電子増倍管(Photomultiplier: PMT)(500-850 nm)、あるいは液体窒素で冷却された InGaAs 近赤外フォトダイオード(800～1400 nm)で検出される。光電子増倍管を検出器として用いる際は、ロングパス

フィルター(Y44, HOYA)を、InGaAs 近赤外フォトダイオードを用いる際は、ロングパスフィルター(IR75, HOYA)を検出側分光器のスリット直前に配置することで、励起光の散乱光を除去した。励起、及び検出スリット幅は 5 nm とし、Increment は 5 nm に設定した。サンプルは微小容量溶液用の石英セルに溶液を入れたものを使用した。

### 発光減衰スペクトル測定

図 2.5 に発光減衰スペクトル測定の概略図を示す。励起光源には波長 405 nm の半導体レーザー(CUBE 1073840, COHERENT)を用いた。このレーザー光をパルスジェネレーター(PG-230, IWATSU)により、パルス幅 1.0 ms のパルス光にした。レーザー直後には 405 nm のバンドパスフィルター(TECHSPEC Bandpass Filter 65133, Edmund)を配置し、アパーチャーと焦点距離 150 mm のレンズを用いてサンプル上に集光した。この際、サンプルは微小容量溶液用の石英セルに溶液を入れたものを使用した。その後、検出光は励起光と 90° をなす方向の光とし、焦点距離が 150 mm と 250 mm の 2 枚のレンズを用いて、分光器(SpectraPro-300i, Acton Research Corp.)のスリット上に集光した。スリット直前には手前から順番にロングパスフィルター(R64, HOYA)とダイクロイックフィルター(J52529, Edmund)を設置し、レーザーからの散乱光を除去した。検出器には gated intensified CCD (iCCD) (PI-Max, Princeton Instrument)を用いた。時間分解能は 4  $\mu$ s とした。発光寿命は、得られた発光減衰スペクトルを  $I = I_0 \exp\{- (t/\tau)^\beta\}$  を用いてフィッティングし、得られた時定数  $\tau$  と、stretched parameter である  $\beta$  を用いて、平均発光寿命 ( $\tau_{ave}$ ) を計算する。平均発光寿命は、 $\tau_{ave} = \tau \beta^{-1} \Gamma_E(\beta^{-1})$  を用いて計算した<sup>149,150</sup>。

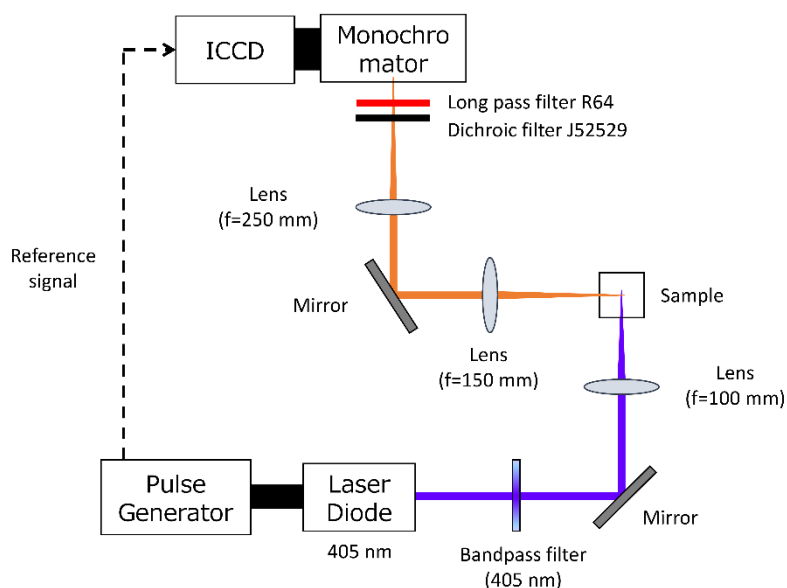


図 2.5 発光減衰スペクトル測定系の概略図。

## 2.3 実験結果

### 2.3.1 分散性評価

Si ナノ結晶の表面修飾が、水溶媒分散性に与える影響に関して、透過率スペクトルを測定することにより議論する。図 2.6 に異なる表面修飾分子(図 2.4)、及び異なる Si ナノ結晶と分子数の比率を用いて表面修飾プロセスを行った溶液の透過率スペクトルを示す。今回、分子数比率としては、Si ナノ結晶に対して表面修飾分子が 1:250, 500, 2500 となるように濃度調整を行った。尚、比較対象として表面修飾分子を加えず、同様の表面修飾プロセスを行った Si ナノ結晶コロイド溶液の透過率を黒線として示す。Si ナノ結晶の吸収が存在しない波長領域(700 nm 以上)において、透過率が 100% であることより、溶液中に巨視的な散乱体、つまり凝集物が存在せず、非常に分散性が高い溶液であることがいえる。

図 2.6(a)に示す、(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane を用いたチオール基での表面修飾では、透過率スペクトル形状は比較対象に比べて変化しておらず、また、表面修飾分子数の比率にスペクトル形状は依存していないことがわかる。つまりこれは、表面修飾プロセスは溶媒分散性に影響を与えておらず、分散性を保持したまま、Si ナノ結晶の表面修飾がなされたことを示している。

図 2.6(b)に、(3-Ethoxydimethylsilyl)propylamine を用いたアミノ基での表面修飾を行った試料の、透過率スペクトルを示す。図 2.6(a)の場合とは異なり、分子数の比率が 1:2500 の場合で透過率スペクトルの変化が生じている。特に、Si ナノ結晶の吸収が存在しない波長領域(700 nm 以上)での透過率の低下及び、Si ナノ結晶の吸収が存在する領域での透過率の上昇がみられた。これは、溶液中に凝集物が存在していることを示している。そのため、この分子を用いる表面修飾には、分子数比率が 1:500 以下が分散性保持の観点から望ましいといえる。

図 2.6(c)に、(3-Aminopropyl)trimethoxysilane を用いたアミノ基での表面修飾を行った試料の透過率スペクトルを示す。全比率において、Si ナノ結晶の凝集に起因する透過率スペクトル形状の変化が見られ、分子数の比率を低下させても改善はみられなかった。このことから、アミノ基での修飾を行う際は、(3-Aminopropyl)trimethoxysilane を用いる方法は、分散性保持の面では望ましくないことが分かった。

以上の結果より、Si ナノ結晶の表面修飾は、使用するシランカップリング剤の分子構造、及び Si ナノ結晶に対する表面修飾分子数の比率が重要であることが分かった。この結果は、ホウ素リン同時ドーピング Si ナノ結晶の極性溶媒中での分散起源が、粒子間に働く静電斥力であることに強く関与していると考えられる。通常、BP 同時ドーピング Si ナノ結晶は、pH7 付近において、-40 mV 程度の負の表面電位を有することが知られている。そのため、負に帯電したチオール基での表面修飾は、Si ナノ結晶の表面電位の低下につながらないため、分散性に影響を与えないと考えられる。しかし、正に帯電したア

ミノ基での修飾を行うと、Si ナノ結晶の表面電位は低下し、凝集につながってしまう。なかでも、図 2.6(c)に示す結果となった(3-Aminopropyl)trimethoxysilane では、Si ナノ結晶と反応する官能基であるシラノール基となる部位が 3 つ存在し、(3-Ethoxydimethylsilyl)propylamine に比べて多いことが分かる。つまり、(3-Aminopropyl)trimethoxysilane を用いた表面修飾では、ナノ結晶表面に過剰にアミノ基が修飾されたことで表面電位が著しく低下し、分散性の低下が生じたと考えられる。

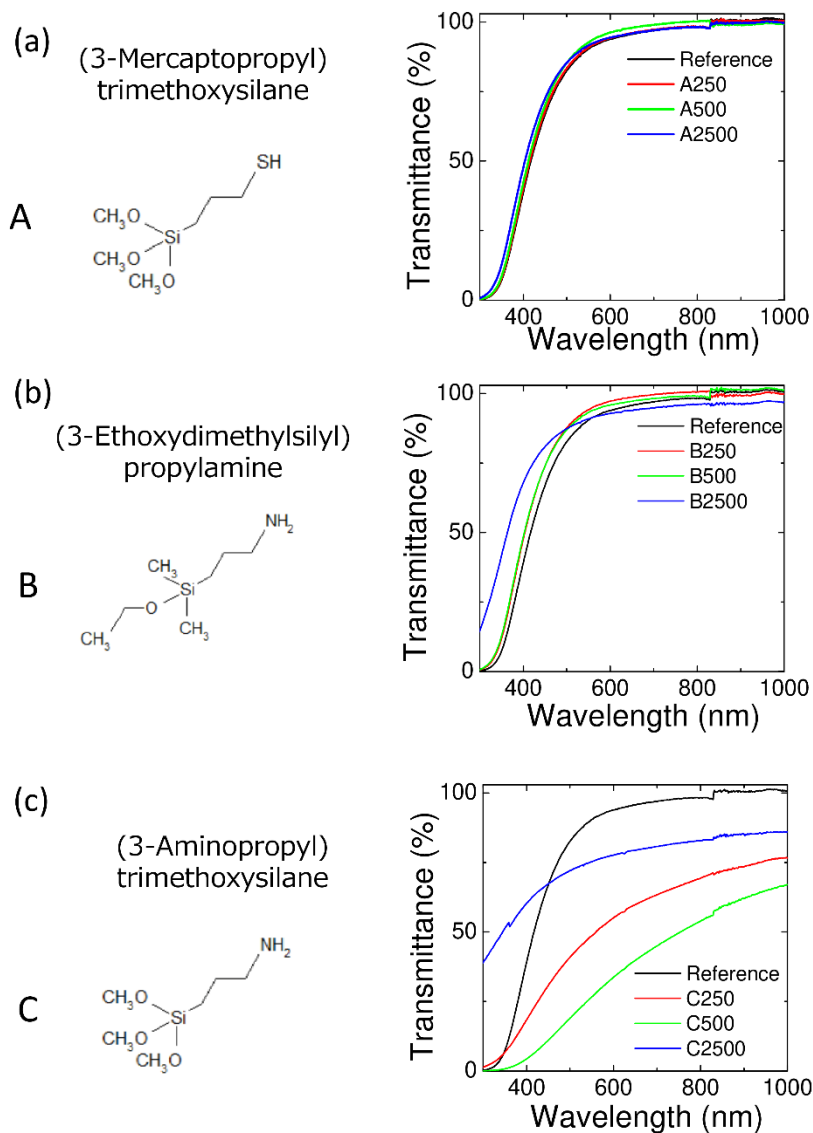


図 2.6 異なる構造、及び濃度の表面修飾分子を用いた、表面修飾プロセス前後での透過率スペクトル。



### 2.3.2 発光特性評価

図 2.7 に、異なる構造を有するシランカップリング剤を用いて表面修飾を行った場合の、発光スペクトルを示す。全試料において、発光スペクトル形状変化は見られなかったが、分子構造、及び分子数比率に依存した発光強度低下がみられた。この結果は、他の不純物をドーブしていない Si ナノ結晶の表面修飾が発光特性に与える影響に関しての報告と比べて、非常に特異であるため、後の考察の部分で詳しく述べる。

図 2.7(a) に示す、(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane を用いたチオール基での表面修飾では、発光強度は減少したものの、減少分は分子数比率に依存していないことが分かる。図 2.6(a) より、Si ナノ結晶の透過率スペクトルに変化がないことを考慮すると、表面修飾プロセスにより、非輻射的遷移割合が増大したことが、発光強度の原因として考えられる。

図 2.7(b) に、(3-Ethoxydimethylsilyl)propylamine を用いたアミノ基での表面修飾を行った試料の、発光スペクトルを示す。表面修飾による発光強度の減少が確認され、また減少分は表面修飾分子の分子数比率に依存することがわかる。図 2.6(b) に示すように、Si ナノ結晶と表面修飾分子の分子数比率が 1:250 及び 1:500 では、透過率スペクトルに変化がないことから、発光強度の減少は、非輻射的遷移割合の増大によるものであると考えられる。分子数比率が 1:2500 まで増大すると、発光強度は著しく低下していることが分かる。図 2.6(b) に示すように、分子数比率が 1:2500 の場合は、凝集が生じているため、非輻射的遷移割合増大に加えて、溶液中の Si ナノ結晶が凝集し、石英セル下部に沈殿したことが発光強度の低下につながったと考えられる。(3-Ethoxydimethylsilyl)propylamine を用いた表面修飾プロセスでは、全濃度比率において、発光増強度の減少分は、(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane を用いた場合よりも大きいことがわかる。これは、表面欠陥の増大につながると予想される Si ナノ結晶表面と直接反応可能なシラノール基の数が異なることや、異なるチャージを有する官能基(負に帯電したチオール基と正に帯電したアミノ基)が原因であると考えられる。

図 2.7(c) に、(3-Aminopropyl)trimethoxysilane を用いたアミノ基での表面修飾を行った試料の発光スペクトルを示す。図 2.7(b) と比較すると、より顕著に発光強度の減少がみられ、分子数比率が 1:2500 のサンプルでは、殆ど発光が検出できていないことが分かる。これは、表面修飾プロセスによる非輻射的遷移割合の増大に加え、図 2.6(c) から明らかなように、全試料において凝集が生じたことが原因として考えられる。

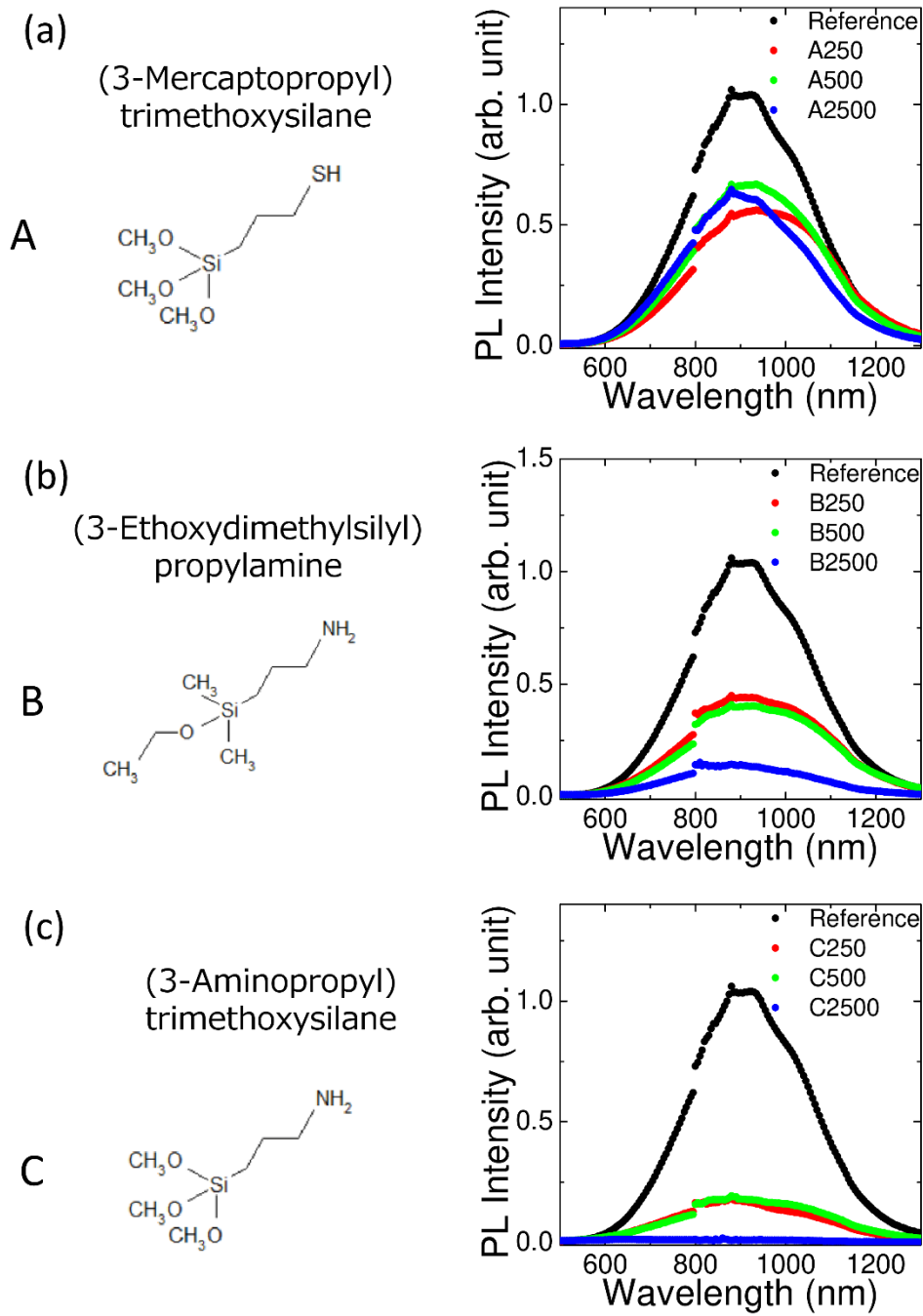


図 2.7 異なる構造、及び濃度の表面修飾分子を用いた、表面修飾プロセス前後での発光スペクトル。

図 2.8(a)に、(3-Mercaptopropyl)trimethoxysilane を用いたチオール基での表面修飾を行った場合の、発光減衰スペクトル、及び発光寿命を示す。表面修飾プロセスにより、発光寿命が減少していることがわかり、減少分は分子数比率と相関があることが分かる。これは非輻射的遷移割合の増大による発光寿命の減少によるものと考えられ、図 2.7(a)で得られた発光強度の減少につながったと考えられる。非輻射的遷移割合の増大及びそれに伴う発光寿命の減少、発光強度の低下は、表面修飾による表面欠陥の発現、表面修飾分子へのエネルギー移動などが原因として考えられるが、詳細は不明である。

図 2.8(b)に、(3-Ethoxydimethylsilyl)propylamine を用いたアミノ基での表面修飾を行った場合の発光減衰スペクトル、及び発光寿命を示す。図 2.7(a)の場合と同様に、表面修飾プロセスにより発光寿命が減少し、減少分は分子数比率と相関があることが分かる。(a)と比べると表面欠陥増大に繋がるシラノール基の数は減っているが、発光寿命はさらに減少していることが分かる。この結果から、(b)で見られた、発光寿命の減少は、表面欠陥準位形成によるものより、アミノ基へのエネルギー移動が支配的であることがいえる。

図 2.8(c)に、(3-Aminopropyl)trimethoxysilane を用いたアミノ基での表面修飾を行った場合の、発光減衰スペクトル、及び発光寿命を示す。尚、分子数比率が 1:2500 の場合は、図 2.6(c)に示すように発光強度が低く、発光寿命が測定できなかったため、載せていない。(3-Aminopropyl)trimethoxysilane を用いたアミノ基での表面修飾では、(3-Ethoxydimethylsilyl)propylamine を用いたアミノ基での表面修飾を行った場合よりもより顕著に発光寿命の減少がみられた。これは、アミノ基へのエネルギー移動による発光寿命の減少に加え、シラノール基の数が増えたことによる、表面欠陥の増大、及びナノ結晶表面に修飾されたアミノ基が増大したことが原因として考えられる。

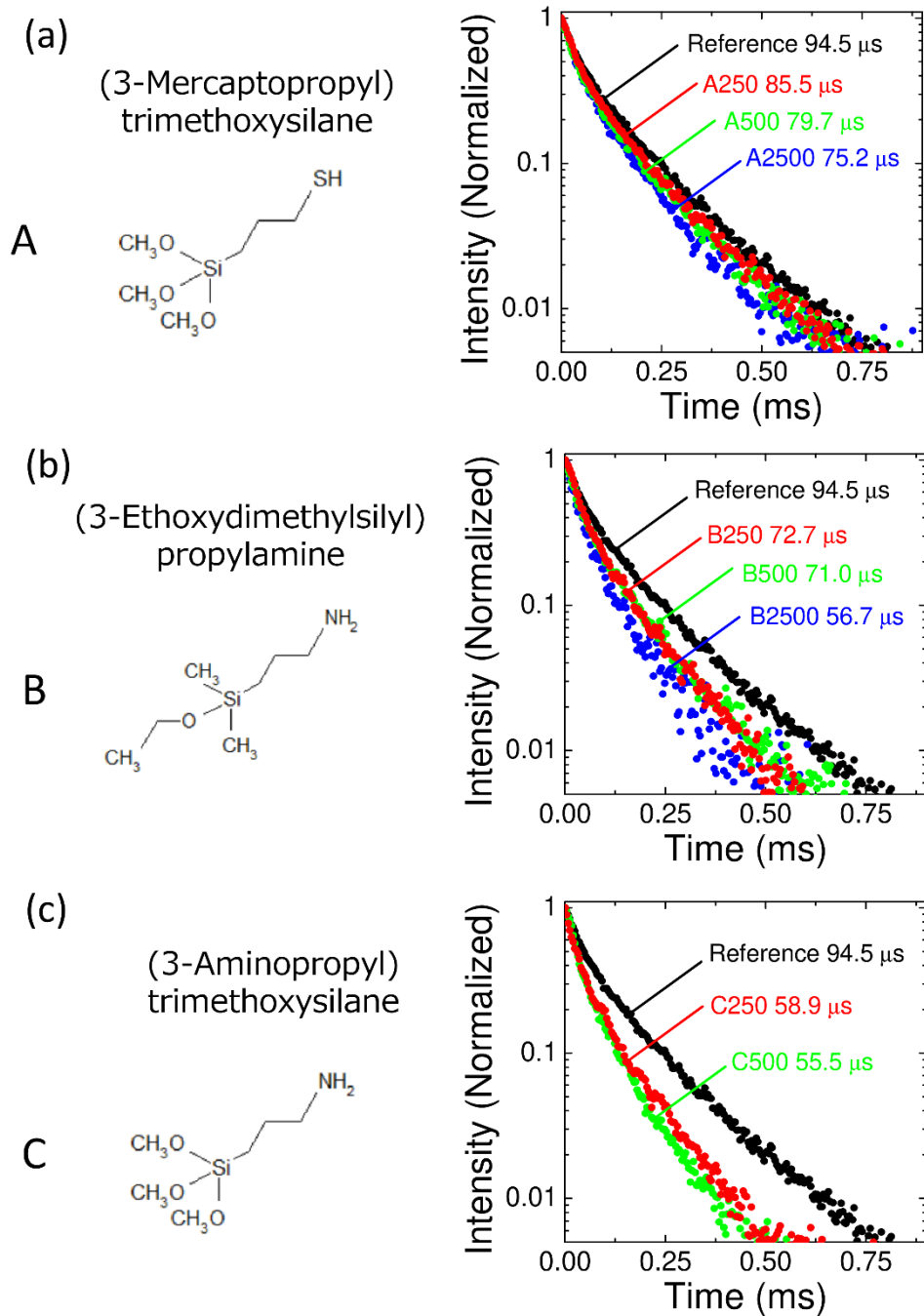


図 2.8 異なる構造、及び濃度の表面修飾分子を用いた、表面修飾プロセス前後での発光減衰スペクトル。

## 2.4 考察

以上の結果より、シランカップリング剤を用いた B と P を同時にドーブした Si ナノ結晶の表面修飾では、表面修飾分子構造及び濃度に依存した分散性及び発光特性を示すことが明らかになった。これは、目的とする官能基で表面修飾を行う際、表面修飾分子及び濃度を適切に選択することで、分散性の保持、及び発光特性への影響を最小限にとどめることができることを示している。

チオール基修飾の場合、高濃度の表面修飾分子を加えても分散性に影響はない、つまり粒子の表面電位低下やシランカップリング剤による架橋が原因となる粒子の凝集が生じないことがわかった。また表面修飾により、発光波長及び発光スペクトル形状に変化がないことが分かった。表面修飾後では発光強度は 50 %程低下するが、発光強度の低下分と表面修飾分子の濃度の相関関係がみられないことからチオール基修飾では、濃度に依存せず一定量の表面修飾分子で表面が修飾されたと考えられる。アミノ基修飾の場合、Si ナノ結晶の分散性は表面修飾分子構造、つまりシラノール基の数および表面修飾分子濃度に依存することがわかった。シラノール基の増大に伴い Si ナノ結晶表面への表面修飾分子数が増大し、表面電位が低下することや、Si ナノ結晶間でシランカップリング剤を介した架橋反応が起こることにより、分散性が低下した。また、分散性は濃度に依存し、シラノール基の数が 1 つである 3-(Ethoxydimethylsilyl)propylamine を用いた場合、低濃度であれば分散性に影響を与えないことが明らかになった。また、表面修飾により発光強度は低下し、その低下分は分子構造及び濃度に依存することがわかった。特に APDMS を高濃度で使用した場合、発光は完全に消光した。

得られた結果をふまえ、チオール基及びアミノ基での表面修飾条件を検討する。まず、チオール基修飾の場合、分散性及び発光強度は表面修飾分子濃度に依存しないことから、分子対ナノ結晶比率を 2500:1 に設定した表面修飾方法を採用する。次に、アミノ基修飾の場合、分散性及び発光特性への影響を最小限に抑えるため、3-(Ethoxydimethylsilyl)propylamine を表面修飾分子として採用し、分子対ナノ結晶比率は 500:1 が最適である。今後、Si ナノ結晶表面を修飾する際は、上記の表面修飾条件で行うことにする。

## 2.5 まとめ

本章では、B と P を同時ドーブした Si ナノ結晶の表面修飾を、シランカップリング剤を用いることで実現した。この表面修飾手法では、使用する分子構造や分子の濃度、つまり分子数と Si ナノ結晶の比率を最適化することにより、分散性を損なわず、発光強度の低下分を最小限にとどめて表面修飾をすることが可能である。また、表面修飾前後において発光波長及び発光スペクトル形状に変化はみられなかった。この発光特性に影響を与えない、つまり表面修飾前後において赤~近赤外発光領域のブロードな発光を

保持可能な Si ナノ結晶の表面修飾プロセスは、Si ナノ結晶を生体内蛍光プローブや発光検出型のバイオセンサー応用の際に必要な、発光特性を保持可能な生体分子との複合の実現に貢献できると考えられる。



## 第3章 Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体

### 3.1 はじめに

シリコン(Si)ナノ結晶コロイドは、サイズにより発光波長が可視~近赤外領域において制御可能であることや、長時間の励起による発光の退色が小さいこと、生体毒性が低いといった優れた特性から、バイオイメージングにおける蛍光プローブや、発光検出型のバイオセンサーといったバイオ分野における新たな発光体としての応用が期待されており、研究開発が盛んに行われている<sup>1,2,151,3-7,9,13,129</sup>。しかし、このSiナノ結晶を発光体として実際に応用するにあたり、解決すべき課題が存在する。それは、Siナノ結晶は間接遷移型半導体であるバルクSiのバンド構造を継承することによる、可視~近赤外領域における小さい吸収断面積及び低い発光再結合レートである。特に、生体内において励起と発光を近赤外領域で行う必要があるバイオイメージング応用においては、可視~近赤外領域における小さい吸収断面積は早急に解決する必要がある。そこで本研究では、ホウ素とリンを同時にドーピングしたSiナノ結晶の吸収断面積増大を目的とする。

発光体の光学特性を改善する手法として、金属微細構造の表面プラズモン共鳴を用いる研究が盛んに行われている<sup>77-86</sup>。発光過程における表面プラズモン共鳴の効果は、励起側の効果と、発光側における効果の二つに分けることができる。励起側の効果とは、入射光が表面プラズモン共鳴状態にある場合の発光体の位置における局所場の入射場に対する増強効果である。つまり、弱い光を入射しても、強い光を入射したときと同じ効果を意味する。もう一つは、表面プラズモン共鳴の発光側における効果である。発光側の効果では、励起された発光側の輻射の確率は、フェルミの黄金律で与えられ、この中には輻射先のフォトンの状態密度が含まれ、輻射確率は状態密度に比例する。発光体が真空中におかれている場合は、真空のモードのみが寄与するが、発光体近傍に金属が存在する場合は、表面プラズモンモードへの輻射確率が加えられ、発光特性に影響を与える。本研究では、励起側の効果、つまりプラズモン共鳴による吸収断面積の増大効果により、Siナノ結晶の吸収断面積の増大を図る。発光側における効果に関する研究は、第4章にて述べる。

これまでの研究では、化合物半導体量子ドットの吸収断面積増大を目的に、金属微細構造として銀ナノ粒子を配列させた基板<sup>87</sup>や金ナノ粒子<sup>77</sup>が用いられ、発光体との距離を高精度に制御し、金属微細構造が発光体の吸収断面積へ与える影響に関して詳細に評価されてきた。その結果、金属微細構造により、発光体の吸収断面積増大による発光特性の改善がみられ、発光増強度は発光体と金属微細構造の距離に依存することが実証され、金属微細構造を用いた発光体の光学特性改善は非常に有用なアプローチであることが明らかになった。特に金属微細構造のなかでも金ナノ粒子コロイド溶液を用いる手



法は、生体内への注入が必須となるバイオイメージング応用において非常に有用である。しかし、金ナノ粒子を代表とする金属ナノ粒子コロイドを用いた発光体の発光特性の改善は化合物量子ドットで先行しており、Si ナノ結晶を用いた報告は依然として限られている<sup>85,90,152-156</sup>。また、金ナノ粒子と Si ナノ結晶の複合体の構造を制御し、得られる発光増強度が最大となる構造の最適化を図った報告はない。

そこで本研究では、Si ナノ結晶の吸収断面積増大を、金ナノ粒子と Si ナノ結晶を溶液中で結合させることにより実証する。過去の化合物半導体を用いた研究から明らかのように、表面プラズモン共鳴による発光特性改善には、金属微細構造、つまり本研究における金ナノ粒子と Si ナノ結晶間の距離が非常に重要な構造パラメーターとなる。そこで金ナノ粒子と Si ナノ結晶の複合体を、粒子間に働く静電気力、化学結合及び DNA ハイブリダイゼーションを用いて作製し、構造の最適化を行う。特に DNA ハイブリダイゼーションを用いる手法は DNA の塩基数により、粒子間の距離を 0.3 nm 単位で制御することができるため、近年ナノテクノロジーにおける試料作製プロセスとして注目を集めている。本研究では、3つの異なる方法により作製された金ナノ粒子と Si ナノ結晶の複合ナノ粒子に関して、構造及び発光特性に関して詳細に評価を行った。その結果、静電気力を用いたものでは 1.3 倍、化学結合したものでは発光の消光(クエンチング)、DNA ハイブリダイゼーションにより粒子間の距離を 10 nm に保った複合体では最大で 4 倍の発光強度を得ることができた。本章では、其々の複合体の構造評価及び発光特性に関して、詳細に議論を行う。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 試料作製方法

Si ナノ結晶と Au ナノ粒子の複合体形成方法の概略図を図 3.1 に示す。本研究では複合体形成方法として、粒子間に働く静電気力を用いるもの、SH 基修飾 Si ナノ結晶を用いて金-チオール結合を用いるもの、そして一本鎖 DNA のハイブリダイゼーションを用いるものの 3 つを採用した。以下、其々に関して試料作製プロセスを詳細に説明する。

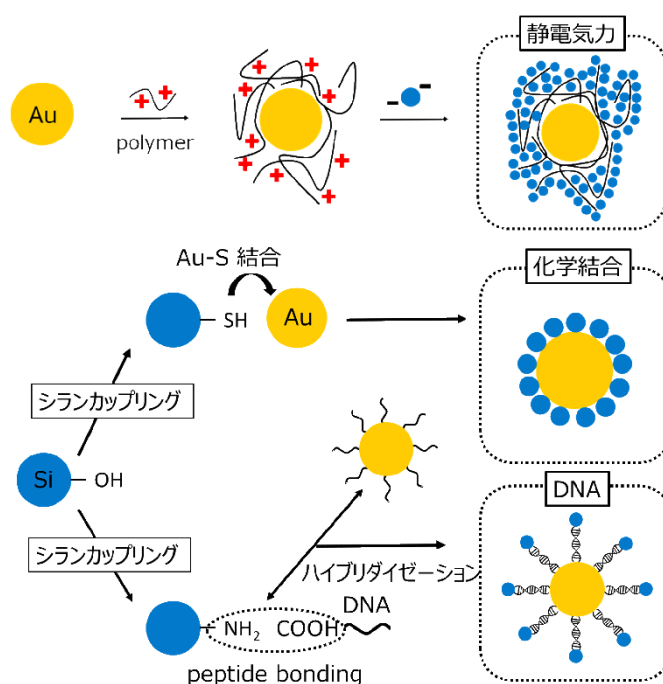


図 3.1 Si ナノ結晶と Au ナノ粒子の複合体形成方法の概略図。Au ナノ粒子及び Si ナノ結晶間に働く静電気力、金-チオール結合及び DNA のハイブリダイゼーションを用いて複合体を形成した。

#### 静電気力による複合体形成方法

この作製方法では、負に帯電した Au ナノ粒子を正に帯電したポリマーで被覆し<sup>157</sup>、その後負に帯電した Si ナノ結晶を溶液中で混合することで、粒子間に働く静電気力を用いて複合体を形成する。Au ナノ粒子として、クエン酸保護された直径 50 nm の金ナノ粒子コロイド溶液(Gold Colloid 50 nm EMGC50, BBI solutions)を用いた。この Au ナノ粒子はクエン酸保護により、表面は負に帯電している。正に帯電したポリマーとして、Poly(allylamine hydrochloride)(PAH)(Sigma Aldrich)を用いた。

1. Au ナノ粒子コロイド溶液は、出荷時の溶媒に含まれている過剰な保護剤を取り除くため、遠心分離により溶媒を純水に置換する。遠心条件としては、1.5 mL のチューブに 1.5 mL の Au ナノ粒子コロイド溶液を加え、遠心分離機(H-11NB, (株)コクサン)を用いて 4,000 rpm で 10 分間遠心分離を行う。沈降したナノ粒子以外の上清部を取り除き、同体積の純水で再分散させる。このプロセスは 2 回繰り返す。
2. ポリマー水溶液の濃度を調整する。50 mg の PAH を 9 mL の純水に溶かし、ボルテックスミキサー、及び超音波洗浄機で 20 分間攪拌を行い、完全に溶解する。
3. 2. で作製した PAH 溶液 1.5 mL に 1. の Au ナノ粒子コロイド溶液を 1.5 mL を少しずつ滴下する。このプロセスはマグネットスターラーで攪拌しながら行う。その後、4 時間室温で攪拌する。
4. 3. の溶液を遠心分離にかけ、溶媒を純水に置換する。遠心条件は 1. と同様の条件とした。
5. 4. で作製した PAH 被覆 Au ナノ粒子溶液 600  $\mu$ L に Si ナノ結晶コロイド溶液(0.026 mg/mL)100  $\mu$ L を徐々に滴下する。このプロセスは、マグネットスターラーで攪拌しながら行う。その後、溶液を 4 時間攪拌し、Au ナノ粒子と Si ナノ結晶を粒子間に働く静電気力により結合させる。

尚、上述の遠心分離のプロセスには Au ナノ粒子の収率向上のため、Eppendorf タンパク質 LoBind マイクロ遠心チューブを用いた。このチューブは表面に低吸着性をもたせるため、表面処理がされている。

#### 化学結合(金-チオール結合)による複合体形成方法

化学結合による複合体形成には、第2章で作製した SH 基修飾 Si ナノ結晶を用いる。金ナノ粒子は塩化金酸を還元することにより作製したものをを用いた。作製プロセスは 2016 年山本薫さんの修士論文に詳細に記載されているため、ここでは省略する。また、Sigma Aldrich で購入する Au ナノ粒子コロイド溶液を用いると、金-チオール結合が形成されないため、複合体形成の際は研究室で作製した Au ナノ粒子コロイドを用いる。Au ナノ粒子は直径が 40 nm のものを使用した。SH 基修飾 Si ナノ結晶コロイド溶液(0.4 mg/mL)と Au ナノ粒子コロイド溶液( $\sim 10^{10}$ /mL)を体積比 9:1 で混合することで、ナノ粒子は金-チオールで結合され、複合体が形成される。

#### DNA ハイブリダイゼーションを利用した複合体形成方法

一本鎖 DNA のハイブリダイゼーションを用いて Si ナノ結晶と Au ナノ粒子を結合させるためには、Si ナノ粒子と Au ナノ粒子の両方に相補的な配列を有する一本鎖 DNA を修飾する必要がある。以下に、今回使用した DNA の塩基配列を示す。Si ナノ結晶に修飾する DNA の塩基配列は、

Sequence (5' to 3'): TGC TGT TCC CAT CTG GTC CAG GTT TCG TCG (30 base pair) であり、修飾は 5'-Carboxy Modifier C5 (5'末端に COOH 基を有し、COOH 基と DNA の塩基対の間に CH<sub>2</sub> が 5 つ存在)である。Au ナノ粒子に修飾する DNA の塩基配列は、Sequence (5' to 3'): GCA CGA AAC CTG GAC CAG ATG GGA ACA GCA (30 base pair) であり、修飾は 5'-Thiol C6(5'末端に SH 基を有し、SH 基と DNA の塩基対の間に CH<sub>2</sub> が 6 つ存在)である。これらの一本鎖 DNA はつくばオリゴサービス(株)のカスタム DNA を用いた。尚、DNA の保存は -20°C で冷凍保存を行う。

以下に、一本鎖 DNA とナノ粒子を結合する方法を詳細に示す。

Si ナノ結晶の一本鎖 DNA 修飾は、NH<sub>2</sub> 基で修飾された Si ナノ結晶と、COOH 基を有する一本鎖 DNA 間で脱水縮合反応を起こし、ペプチド結合を形成することで結合する。ペプチド結合には、トリアジン系縮合剤である、4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium Chloride n-Hydrate (DMT-MM)を用いた<sup>158</sup>。この脱水縮合剤は、溶液中に加えるだけでペプチド結合が誘発されるため、従来の EDC-NHS 反応を用いた脱水縮合プロセスに比べて、非常に簡便であるという特徴がある。NH<sub>2</sub> 基で修飾された Si ナノ結晶(0.3 mg/mL)を、100 μM の Milli-Q に分散させた DNA を体積比 1:1 で混合する。この溶液に DMT-MM 溶液(17.8 mg/mL)を体積比 10 %で加え、室温で 4 時間静置する。その後、遠心式フィルター (Amicon Ultra -0.5 mL 遠心式フィルター 3K Da, Merckmillipore)を用いて、未反応の DNA を取り除く。遠心条件は、14,000 rcf で 30 分間として、洗浄プロセスは 2 回行った。このプロセスにより、一本鎖 DNA で修飾された Si ナノ結晶コロイド溶液が作製される。

Au ナノ粒子の一本鎖 DNA 修飾は、OligoREADY 金ナノ粒子標識キットを用いて行う。このキットは、SH 基を末端にもつ一本鎖 DNA を Au ナノ粒子表面に高効率かつワンステップで標識することができる。OligoREADY に Milli-Q 及び還元された SH 基修飾一本鎖 DNA を加え、室温で 1 時間静置することで結合が完了する。詳しい反応プロセス及び DNA 還元方法などは、OligoREADY のホームページ上のプロトコルに詳細に記載されている。

次に、作製された一本鎖 DNA 修飾 Si ナノ結晶、及び Au ナノ粒子を溶液中でハイブリダイゼーションさせることで、Si ナノ結晶と Au ナノ粒子の複合体を形成する。このプロセスでは、バッファーとして Hybridization Buffer (0.3 M(NaCl), 10 mM Phosphate Buffer)を用いる<sup>159</sup>。このバッファー中に、一本鎖 DNA 修飾された Si ナノ結晶及び Au ナノ粒子を体積比 1:1 で混合し、Thermal Cycler (Gene Atlas G02, (株)アステック)を用いて 80°C で 2 分間、25°C に 30 分かけて降温することで、DNA の二重らせん構造が形成される。

### 3.2.2 構造評価方法

#### 透過スペクトル測定

試料の透過率は透過型分光光度計(UV-3101PC, SHIMADZU)を用いて測定した。測定範囲は 300~1000 nm とし、スリット幅は 3 nm、サンプリングピッチは 1 nm、スキヤニングスピードは中速(200 nm/min)に設定した。溶液試料の測定の際は、石英セル、若しくは微小容量溶液用の石英セルを使用した。リファレンスにはサンプルの溶媒に応じて水、又はメタノールを用いた。

#### 透過型電子顕微鏡観察

作製した Si ナノ結晶と Au ナノ粒子の複合体の構造評価を、透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope:TEM)を用いて行った。本研究では、より詳細な構造評価のため、高分解 TEM(High Resolution TEM: HR-TEM)像、及び元素マッピング像(Scanning Transmission Electron Microscope Energy Dispersive X-ray Spectroscopy: STEM-EDS)を、透過型電子顕微鏡(JEM-2100F, JEOL)を用いて観察した。加速電圧は 200 kV とする。観察対象となるナノ粒子の試料は、銅メッシュにカーボン支持膜を担持した TEM 観察用支持膜(グリッドピッチ 100  $\mu\text{m}$ )上に溶液を 1 滴滴下することで作製した。

### 3.2.3 発光特性評価方法

#### 発光スペクトル測定

図 3.2 に発光スペクトル測定の概略図を示す。励起光源には波長 405 nm の半導体レーザー(CUBE 1073840, COHERENT)を用いた。レーザー直後には 405 nm のバンドパスフィルター(TECHSPEC Bandpass Filter 65133, Edmund)を配置し、アパーチャーと焦点距離 150 mm のレンズを用いてサンプル上に集光した。この際、サンプルは微小容量溶液用の石英セルに溶液を入れたものを使用した。その後、検出光は励起光と 90° をなす方向の光とし、焦点距離が 150 mm と 250 mm の 2 枚のレンズを用いて、分光器(SpectraPro-300i, Acton Research Corp.)のスリット上に集光した。スリット直前には手前から順番にロングパスフィルター(R64, HOYA)とダイクロイックフィルター(J52529, Edmund)を設置し、レーザーからの散乱光を除去した。分光器の中心波長は 1000 nm に設定した。検出器には液体窒素で冷却した InGaAs フォトダイオードアレイ(OMA-V-SE, Roper Scientific)を使用した。測定により得られた発光スペクトルは、タングステン標準ランプを用いて得られた分光感度の補正係数を用いて、補正した。尚、補正係数の詳しい求め方は 2002 年の渡辺啓さんの博士論文の付録に詳細に記載されているのでここでは省略する。

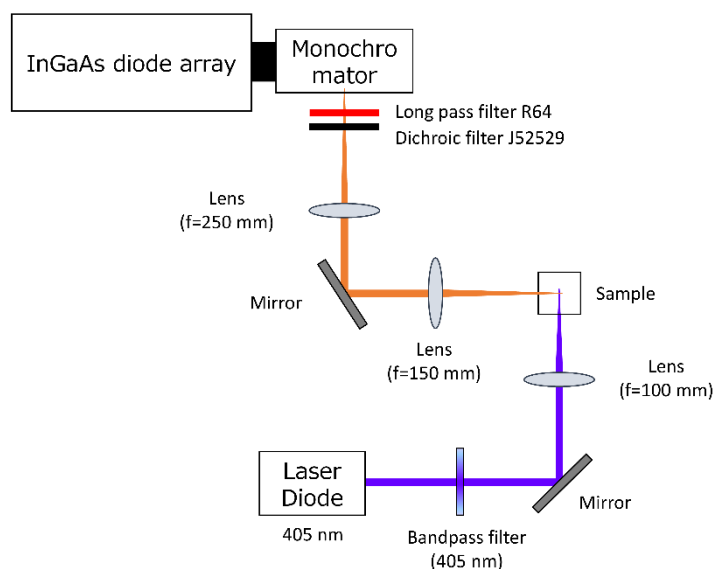


図 3.2 発光スペクトル測定系の概略図。

可視～近赤外領域(500～1300 nm)の検出波長領域における発光スペクトル測定には、モジュール型蛍光分光測定装置(SPEX Fluorolog-3, HORIBA)を用いた。励起光源として、ダブルモノクロメーターで 405 nm に分光された 450 W の Xe ランプからの光を用いた。シングルモノクロメーターで分光された発光は光電子増倍管(Photomultiplier: PMT)(500-850 nm)、あるいは液体窒素で冷却された InGaAs 近赤外フォトダイオード(800～1400 nm)で検出される。光電子増倍管を検出器として用いる際は、ロングパスフィルター(Y44, HOYA)を、InGaAs 近赤外フォトダイオードを用いる際は、ロングパスフィルター(IR75, HOYA)を検出側分光器のスリット直前に配置することで、励起光の散乱光を除去した。励起スリット幅は 5 nm、検出スリット幅は 10 nm とし、Increment は 10 nm に設定した。サンプルは石英セルに溶液を入れたものを使用した。

#### 発光励起スペクトル測定

試料の発光スペクトルの励起波長依存性(発光励起スペクトル)(Photoluminescence Excitation Spectrum: PLE)測定のため、モジュール型蛍光分光測定装置(SPEX Fluorolog-3, HORIBA)を用いた。励起光源として、ダブルモノクロメーターで分光された 450 W の Xe ランプからの光を用いた。励起光の波長範囲は 300 – 600 nm に設定した。シングルモノクロメーターで分光された発光は光電子増倍管(Photomultiplier: PMT)(780 nm)で検出される。ロングパスフィルター(IR75, HOYA)を検出側分光器のスリット直前に配置することで、励起光の散乱光を除去した。励起スリット幅は 10 nm、検出スリット幅は 29.4 nm とし、Increment は 10 nm に設定した。サンプルは石英セルに溶液を入れたものを使用した。

### 発光減衰スペクトル測定

図 3.3 に発光減衰スペクトル測定の概略図を示す。励起光源には波長 405 nm の半導体レーザー(CUBE 1073840, COHERENT)を用いた。このレーザー光をパルスジェネレーター(PG-230, IWATSU)により、パルス幅 1.0 ms のパルス光にした。レーザー直後には 405 nm のバンドパスフィルター(TECHSPEC Bandpass Filter 65133, Edmund)を配置し、アパーチャーと焦点距離 150 mm のレンズを用いてサンプル上に集光した。この際、サンプルは微小容量溶液用の石英セルに溶液を入れたものを使用した。その後、検出光は励起光と 90° をなす方向の光とし、焦点距離が 150 mm と 250 mm の 2 枚のレンズを用いて、分光器(SpectraPro-300i, Acton Research Corp.)のスリット上に集光した。スリット直前には手前から順番にロングパスフィルター(R64, HOYA)とダイクロイックフィルター(J52529, Edmund)を設置し、レーザーからの散乱光を除去した。検出器には gated intensified CCD (iCCD) (PI-Max, Princeton Instrument)を用いた。時間分解能は 0.5  $\mu$ s とした。

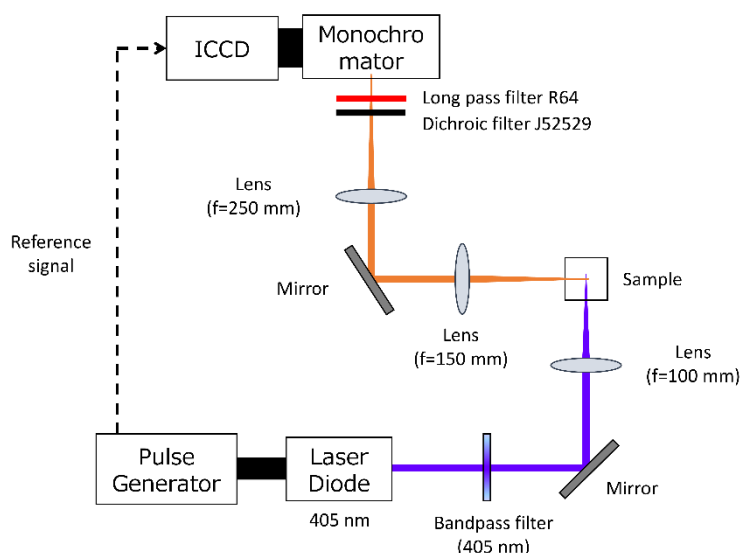


図 3.3 発光減衰寿命測定系の概略図。

### 3.3 実験結果

図 3.4 に BP 同時ドープ Si ナノ結晶の発光スペクトル(黒点線)、発光励起スペクトル(赤実線)を示す。発光スペクトルから、Si ナノ結晶は可視~近赤外領域にブロードな発光を示すことが分かる。また、発光励起スペクトルからは、紫外領域(< 400 nm)における励起では強い発光強度を示すが、可視領域(> 400 nm)での励起において、発光強度が著しく低下していることが分かる。これは、Si ナノ結晶が間接遷移型半導体であるバルク Si のバンド構造を強く継承していることに起因する。本研究の目的は、この可視領域における Si ナノ結晶の吸収断面積増大である。その手段として、Au ナノ粒子の局在

表面プラズモン共鳴に起因する増強電場を用いる。図 3.4 に直径 50 nm の Au ナノ粒子の吸光スペクトル(青点線)を示す。530 nm 付近にピークを有する、局在表面プラズモン共鳴に起因する吸収が見られた。本研究では、この波長領域で励起した際の Si ナノ結晶の吸収断面積増大に伴う発光特性の改善を目的とする。以下、異なる作製方法を用いて作製された複合ナノ粒子の構造評価、及び光学特性に関して議論を行う。

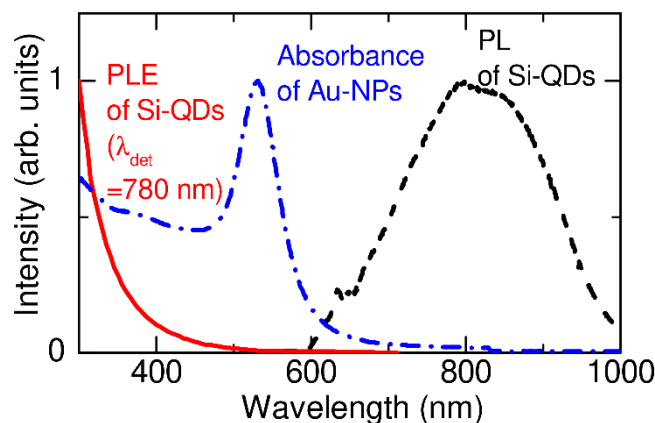


図 3.4 Si 量子ドットの発光スペクトル(黒点線)、発光励起スペクトル(赤実線)、及び Au ナノ粒子の吸収スペクトル(青点線)。

### 3.3.1 静電気による Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体

#### 構造評価

Si ナノ結晶と Au ナノ粒子間に働く静電気力を利用した複合体の構造評価を、TEM 観察により行った。図 3.5 に作製した複合体の TEM 像を示す。コントラストの高い直径 50 nm の粒子が Au ナノ粒子、その周囲に存在するコントラストの低い数 nm の粒子が Si ナノ結晶である。TEM 観察により、Au ナノ粒子の周囲に Si ナノ結晶が存在することがわかった。また、作製された複合ナノ粒子の形状は多種多様であり、主に Au ナノ粒子の周囲を Si ナノ結晶がランダムに取り囲んでいる粒子形状であることがわかった。これは、Au ナノ粒子の周囲を正に帯電したポリマーで被覆し、そのポリマーが Si ナノ結晶をからめとるようにして複合体を形成していることが原因として考えられる。



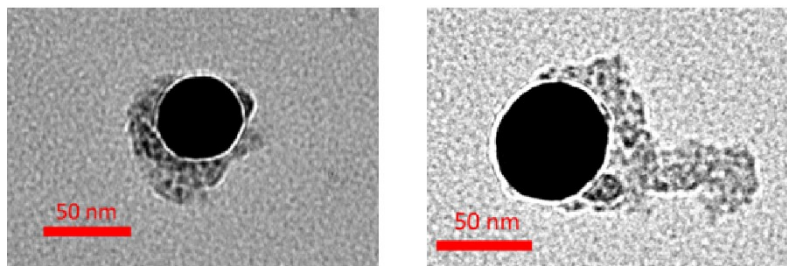


図 3.5 静電気力により作製した Si ナノ結晶/Au ナノ粒子複合体の TEM 像。Au ナノ粒子が、Si ナノ結晶の層に囲まれているのがわかる。

#### 光学特性評価

図 3.6 に、作製した複合ナノ粒子の発光増強度の励起波長依存性を示す。本実験では、Au ナノ粒子と Si ナノ結晶の粒子数比率を  $\text{Au-NP:Si-NC} = 1:1200, 6000, 18000$  に変化させ実験を行った。発光増強度の励起波長依存性を(3.1)式に示す。

$$\text{Enhancement Factor} = \frac{PLE(\text{SiNC} - \text{AuNP})}{PLE(\text{SiNC})} \quad (1)$$

ここで、 $PLE(\text{SiNC})$ は Si ナノ結晶の発光励起スペクトルの発光強度を、 $PLE(\text{SiNC} - \text{AuNP})$ は Si ナノ結晶と Au ナノ粒子の複合体の発光励起スペクトルの発光強度を表す。

粒子数比が  $\text{Au-NP:Si-NC} = 1:1200$  の場合、Au ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴の波長領域での発光強度の低下がみられた( $E.F < 1$ )。これは、溶液中の Au ナノ粒子が Si ナノ結晶に比べて多量に存在したため、励起光を Au ナノ粒子が過剰に吸収し、結果として励起効率の低下が生じたことが原因として考えられる。

粒子数比が  $\text{Au-NP:Si-NC} = 1:6000$  の場合では、状況は変化する。Au ナノ粒子を局在表面プラズモン共鳴の波長領域で励起した場合、発光増強度は 1.3 倍になっており、発光強度の増大が見られた。また、発光増強度のグラフは、Au ナノ粒子の吸収スペクトルと良い一致を示す。これは、Au ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴により Au ナノ粒子表面に増強電場が発生し、その内部に配置された Si ナノ結晶の吸収断面積が増大され、結果として発光強度の増大につながったと考えられる。

粒子数比が  $\text{Au-NP:Si-NC} = 1:18000$  の場合、1:6000 の場合に比べて発光増強度が 1.1 倍と多少減少傾向にある。これは、溶液中に Si ナノ結晶が過剰に存在したため、Au ナノ粒子による吸収断面積増大に伴う発光増強の寄与を受けられることができる Si ナノ結晶量が相対的に増大したことが原因として考えられる。

以上の結果より、Si ナノ結晶は Au ナノ粒子と複合体を形成することにより、発光特性が変化することが分かった。また、発光増強度の最大化のためには、溶液中に存在する Si ナノ結晶と Au ナノ粒子の粒子数比率が非常に重要であることも明らかになった。

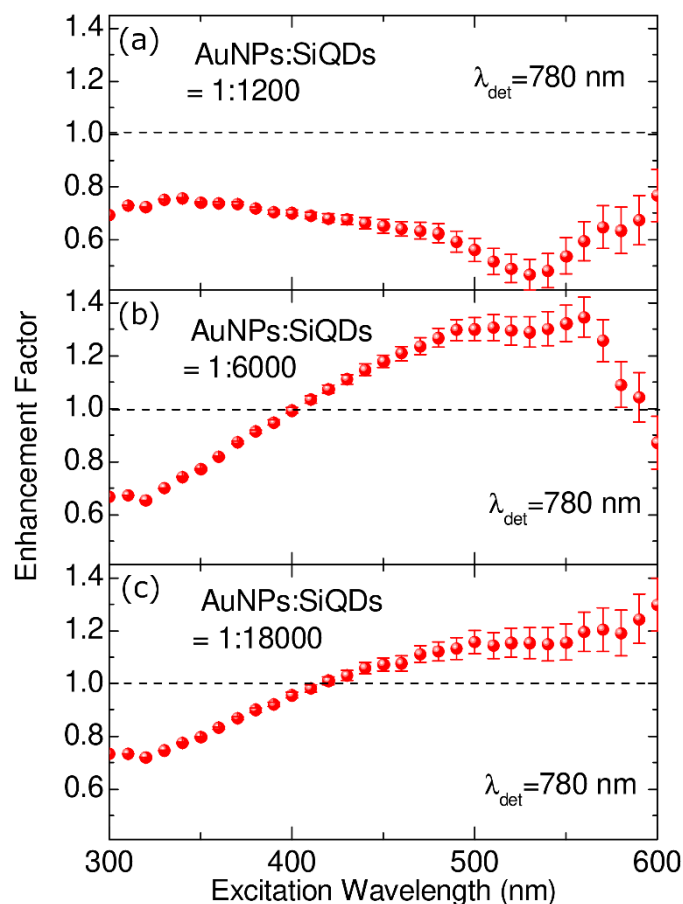


図 3.6 Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体の発光増強度の励起波長依存性。励起波長は 300-600 nm、検出波長は 780 nm に設定し、異なる金ナノ粒子と Si ナノ結晶の比率((a)1:1200, (b)1:6000, (c)1:18000)に関して測定した。

図 3.6 で確認された発光強度の増大が、Si ナノ結晶の Au ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴に起因する吸収断面積増大に伴う発光増大であることを確認するため、発光減衰スペクトル測定を行った。図 3.7 に得られた発光減衰スペクトルを示す。黒色が比較対象である Au ナノ粒子が存在しない Si ナノ結晶の発光減衰スペクトルを、赤色が Au ナノ粒子と複合体を作製した Si ナノ結晶の発光減衰スペクトルを示す。グラフからも明らかのように、複合体を形成することに伴う発光減衰スペクトル形状の変化、つまり発光寿命の変化は見られなかった。このことから、今回得られた Si ナノ結晶の発光増強は、輻射的遷移割合の増大に伴う発光増強、つまり量子効率改善による発光増強ではなく、励起効率改善による発光増強に起因するものであることが明らかになった。

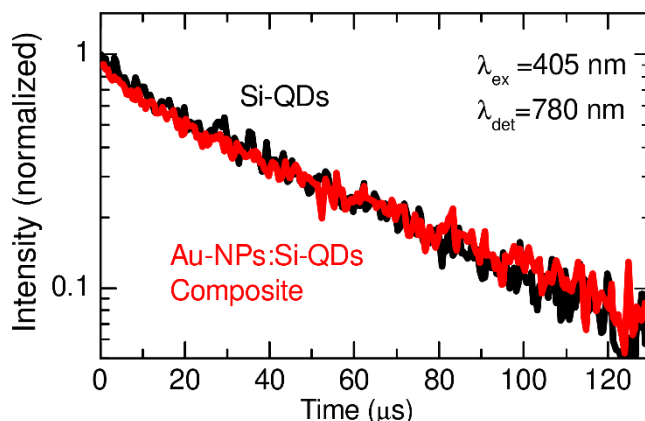


図 3.7 Si ナノ結晶、及び Si ナノ結晶/Au ナノ粒子複合体の発光減衰スペクトル。励起波長は 405 nm、検出波長は 780 nm に設定した。

### 3.3.2 金-チオール結合による Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体

3.3.1 節で得られた Au ナノ粒子と Si ナノ結晶複合体の構造は、正に帯電したポリマーを介した複合体であるがゆえに、その構造の制御性の低さ及びそれに伴う比較的小さな発光増強度(~1.4 倍)という課題が存在した。3.3.2 節及び 3.3.3 節では、構造の制御性の高い複合体形成およびそれに伴う更なる発光増強度の増大に向けて、Si ナノ結晶の表面修飾を用いた複合体形成方法を確立し、複合体を作製、その構造評価及び光学特性を評価した。

#### 構造評価

図 3.8(a)にチオール基で修飾した Si ナノ結晶と Au ナノ粒子を混合することにより作製した複合体の TEM 像を示す。この作製方法では、原理的に Au ナノ粒子の周囲に一層しか Si ナノ結晶は結合することができない。TEM 像から、Au ナノ粒子の周囲に Si ナノ結晶が一層だけ結合していることが分かり、静電気力により作製された複合ナノ粒子に比べて、非常に高い構造制御性を有していることが分かる。このことは、図 3.8(b)に示す高分解 TEM 像からもわかる。点線内部には Si ナノ結晶の(111)面に対応する格子縞が確認された。Au ナノ粒子との距離は 1 nm 以下であり、その粒子間距離は非常に小さいことが分かる。これは今回、複合体形成に金-チオール結合を用いたことにより、Au ナノ粒子と Si ナノ結晶が 1 分子を介して複合したことによるものである。

図 3.9 に複合体の STEM-EDS による元素マッピングを示す。Au 元素の位置は Au ナノ粒子の位置を示している。その周囲に Si 元素が多数存在することから、Au ナノ粒子の周囲に Si ナノ結晶が存在することが確認された。この結果からも、Au ナノ粒子と Si ナノ結晶の複合体が形成されたことが示された。

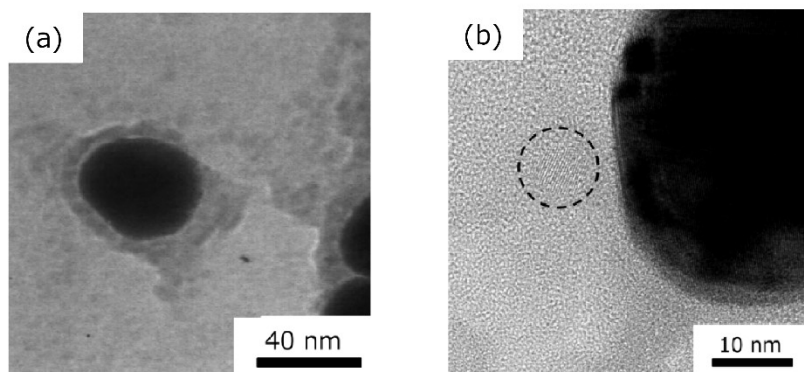


図 3.8 金-チオール結合により作製した Si ナノ結晶/Au ナノ粒子複合体の(a)TEM 像、及び(b)高分解 TEM 像。点線内部に、Si の(111)面に対応する格子縞がみられる。

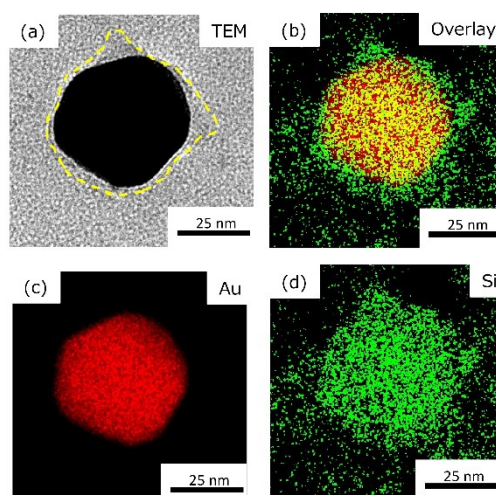


図 3.9 金-チオール結合により作製した Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体の(a)TEM 像、(b)-(d)STEM-EDS 元素マッピング。赤色は金の位置を、緑色は Si の位置を示している。

#### 光学特性評価

金-チオール結合により作製した Si ナノ結晶/Au ナノ粒子の複合体に関して、発光特性評価を行い、Au ナノ粒子が Si ナノ結晶の発光特性へ与える影響に関して議論する。図 3.10 に、複合体形成前後の発光スペクトルを示す。複合体形成に伴った発光スペクトル形状の変化はおこらず、発光強度は複合体形成により減少していることが分かった。これは、溶液中で Au ナノ粒子と複合体を形成した Si ナノ結晶の発光が、Au ナノ粒子へのエネルギー移動にともなう発光消光を示したことが原因として考えられる。

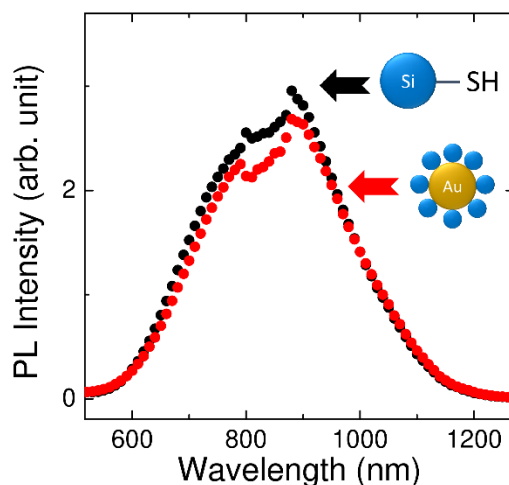


図 3.10 Si ナノ結晶(黒)、及び金-チオール結合により作製した Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体の発光スペクトル(赤)。励起波長は 365 nm に設定した。

### 3.3.3 DNA による Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体

#### 構造評価

図 3.11(a)に DNA ハイブリダイゼーションにより作製した複合体の TEM 像を示す。Au ナノ粒子の周囲に Si ナノ結晶が存在することが確認された。また図 3.5 や図 3.8 に示す複合体に比べると、Au ナノ粒子の周囲には比較的均一に Si ナノ結晶が結合していることが分かる。DNA ハイブリダイゼーションを複合体形成方法として用いる利点の最も大きなものは、粒子間距離の高精度な制御性である。図 3.11(b)に複合体の高分解 TEM 像を示す。今回、DNA として鎖長が 10 nm のものを使用した。そのため、Si ナノ結晶と Au ナノ粒子間の距離は 10 nm に保たれることが予想される。高分解 TEM 像から、Au ナノ粒子の表面から 10 nm 空いた領域に Si ナノ結晶の存在が確認された(点線内部)。このことから、DNA ハイブリダイゼーションを用いて作製された複合体は非常に構造の制御性が高いといえる。

図 3.12 に作製した複合体の TEM 像及び STEM-EDS 元素マッピングによる像を示す。Au ナノ粒子に起因する Au 元素の存在する領域の周囲に Si ナノ結晶に起因する Si 元素のシグナルが確認された。更に、DNA 中に存在する多数の窒素原子に由来するピークも確認されたことから、DNA ハイブリダイゼーションにより複合体が形成されたことが明らかになった。

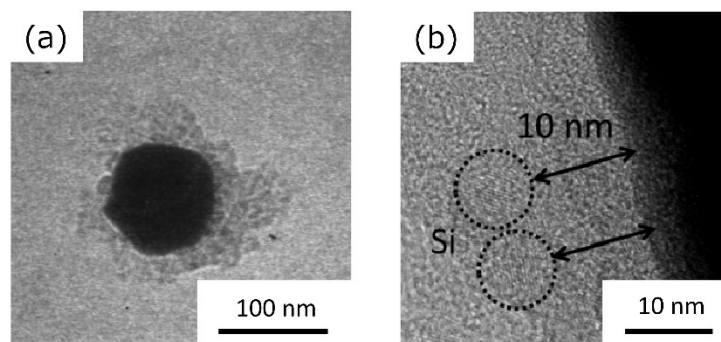


図 3.11 DNA ハイブリダイゼーションを用いて作製した Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体の(a)TEM 像、及び(b)高分解 TEM 像。点線内部に、Si の(111)面に対応する格子縞がみられ、金ナノ粒子の表面からは DNA の鎖長分だけ距離が空いていることがわかる。

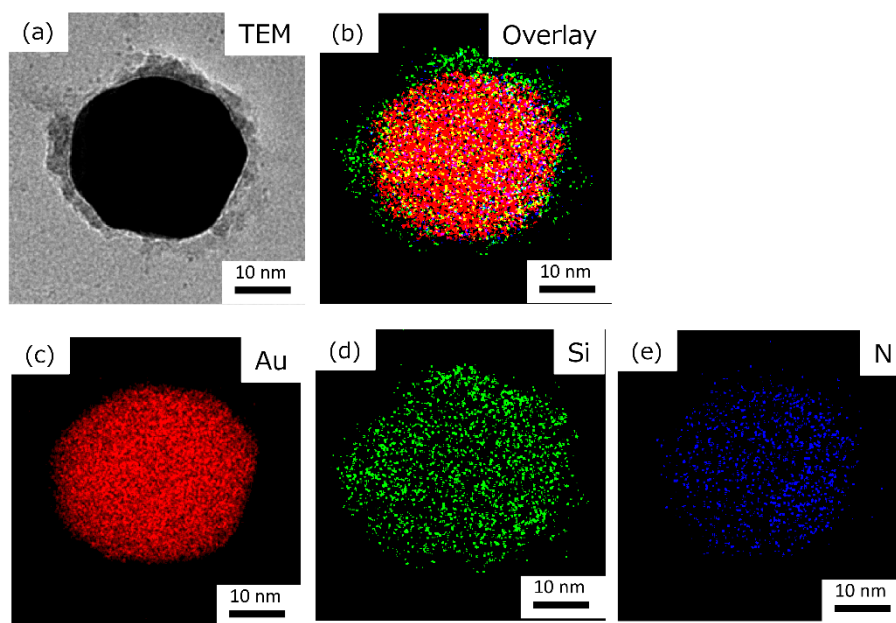


図 3.12 DNA のハイブリダイゼーションにより作製した Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体の(a)TEM 像、(b)-(e)STEM-EDS 元素マッピング。赤色は金の位置を、緑色は Si の位置を、青色は DNA 由来の窒素の位置を示している。

#### 光学特性評価

図 3.13 に比較対象となる複合体を形成していない Si ナノ結晶と Au ナノ粒子の混合溶液の発光スペクトル、及び DNA ハイブリダイゼーションにより複合体を形成した Si ナノ結晶と Au ナノ粒子の発光スペクトルを示す。この測定では、励起波長は Au ナノ

粒子の局在表面プラズモン共鳴波長領域である 532 nm に設定した。発光測定の結果より、複合体を形成した Si ナノ結晶は、発光スペクトル形状は変化していないが、発光強度が増大していることが分かる。これは、Au ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴に起因する増強電場中に Si ナノ結晶が配置されたことで、吸収断面積が増大したことによるものである。また、静電気力を用いて作製された複合体と異なり、構造が高精度に制御されたことで発光強度の更なる改善が得られたことがわかる。

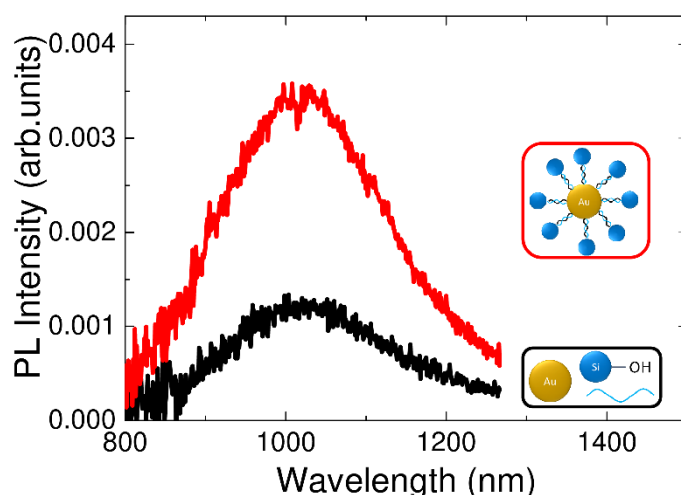


図 3.13 Si ナノ結晶(黒)、及び DNA ハイブリダイゼーションにより作製した Si ナノ結晶/金ナノ粒子複合体の発光スペクトル(赤)。励起波長は 532 nm に設定した。

### 3.4 考察

異なる結合方法を用いて作製した Si ナノ結晶/Au ナノ粒子複合体の特徴を表 3.1 にまとめた。まず、作製プロセスの簡便性に関して議論する。静電気力を用いた作製方法では、正に帯電した Au ナノ粒子と負に帯電した Si ナノ結晶を溶液中で混合するだけで、粒子間に働く静電引力により複合体が自発的に形成された。そのため作製プロセスが非常に簡便であり、数時間で複合体が形成可能である。金-チオール結合による複合体形成も、静電気力を用いたものと同様に、チオール基で修飾された Si ナノ結晶を Au ナノ粒子のコロイド溶液に混合するだけで化学結合が可能である。よって Si ナノ結晶の表面修飾プロセスを含めても、数時間で反応が終了する。対して DNA ハイブリダイゼーションを用いるサンプルでは、Au ナノ粒子と Si ナノ結晶の一本鎖 DNA での修飾プロセス、加えてハイブリダイゼーションのプロセスが存在する。また全プロセスにおいて、生体分子を用いるため溶媒(バッファー)の選択や DNA の還元プロセスなどを、正確に行わなければ Au ナノ粒子が凝集してしまうという煩雑さも存在する。以上をまとめると、プロセスの簡便性のみで Si ナノ結晶/Au ナノ粒子複合体を評価するならば、静電気

力と金-チオール結合を用いるプロセスが優れているといえる。

次に、構造の制御性、及び結果として得られる発光増強度に関して議論する。既述のとおり、表面プラズモン共鳴により発生する金属近傍の増強電場を利用する発光体の発光増強には、金属ナノ構造と発光体の距離が非常に重要なパラメーターである。そのため、複合体の形成による発光増強の最大化には、高い構造制御性を有する作製プロセスが必須である。静電気力を用いた複合体形成では、粒子間に働く静電気力により、ランダムに複合体が形成されるため、Si ナノ結晶と Au ナノ粒子の距離の制御性は殆どない。その結果、得られる発光増強度も 1.4 倍であり、シミュレーションで求められた得られる最大の発光増強度である 3.4 倍に達しない。金-チオール結合を用いる複合体形成では、粒子間の距離は Si ナノ結晶と Au ナノ粒子を架橋する分子の鎖長によって決まる。今回、架橋する分子は Si ナノ結晶表面を修飾するために用いられた鎖長が 1 nm 以下のシランカップリング剤(3-MPTS)である。よって、粒子間距離は 1 nm 以下であり、Au ナノ粒子の周囲に一層だけ Si ナノ結晶が結合した構造を有する。金-チオール結合を用いる方法では、複合体の構造制御性は非常に高いことがいえる。しかし、粒子間距離が 1 nm 以下であるため金属による発光体の発光の消光、つまりクエンチングが生じるため、発光の増強は見られなかった。DNA ハイブリダイゼーションを用いる構造では、粒子間のスペースは二重らせん構造を有する二重鎖 DNA により固定され、その鎖長によって一意に決定される。DNA の鎖長は塩基対の数を変化させることにより、一塩基対の鎖長である 0.3 nm 単位で制御することが可能である。今回用いた DNA の鎖長は、シミュレーションにより高い増強度が得られた 10 nm に設定した。その結果、発光増強度は最大で一本鎖 DNA 修飾 Si ナノ結晶に比べて 4 倍に増大された(修飾されていない Si ナノ結晶と比べると 2 倍程度)。

以上により、Si ナノ結晶の発光増強度の最大化には、粒子間距離に代表される複合体の構造が非常に重要であることが明らかになった。

表 3.1 静電気力、金-チオール結合、DNA ハイブリダイゼーションを用いた Si ナノ結晶/Au ナノ粒子複合体の特徴

結合方法	プロセスの簡便性	構造制御性	発光増強度
静電気力	簡便	低い	1.3 倍
金-チオール結合	簡便	高い (粒子間距離 < 1 nm)	消光
DNA ハイブリダイゼーション	煩雑なプロセス	高い (0.3 nm 毎に制御可能)	4 倍



### 3.5 まとめ

本章では、金属ナノ構造である Au ナノ粒子を用いて、Si ナノ結晶の吸収断面積を増大、結果として発光強度の増大を実現した。3種類の作製プロセスを用いることで、異なる構造を有する複合体を形成、複合体の構造が発光特性に与える影響を評価した。その結果、Si ナノ結晶と Au ナノ粒子の距離が、発光増強度の最大化には重要なパラメータであることを実証し、最終的に構造の最適化により約 4 倍の発光増強を達成した。

溶液中に分散した Au ナノ粒子との複合体の形成により、実現された Si ナノ結晶の吸収断面積の増大及びそれに伴う発光強度の増大は、生体内に発光プローブを注入し、検出対象を可視化する生体内バイオイメーキングにおける蛍光体としての Si ナノ結晶の応用の実現において、非常に重要なステップであると考えられる。

## 第4章 銀ナノ構造基板による Si ナノ結晶の発光特性変化

### 4.1 はじめに

Si ナノ結晶は生体・環境親和性が高く、可視～近赤外領域で光退色が起こらない発光体であることから、バイオ分野での発光プローブとしての応用が期待されている<sup>1,2,151,3-7,9,13,129</sup>。しかしながら、可視～近赤外領域における小さい吸収断面積及び発光量子効率が課題として残されていた。その課題の解決のため、第3章で述べた様な金属ナノ構造に発現するプラズモン共鳴による金属ナノ構造近傍に発現した増強電場中に Si ナノ結晶を配置し、光学特性を改善する試みがなされてきた。Au ナノ粒子を用いた場合、プラズモン共鳴波長が励起光と重なったときに吸収断面積増大により発光強度は最大で4倍に増強されることが明らかになった<sup>160</sup>。また、Au ナノロッドを用いた場合、プラズモン共鳴波長が発光波長と重なることで、輻射的遷移割合増大に伴う発光量子効率改善により、輻射的遷移割合は最大で3.5倍に増強された<sup>161</sup>。これらの結果から、金属ナノ構造によって Si ナノ結晶の吸収断面積、及び発光量子効率が可能であることが明らかになっている。しかし、これまでに報告された発光増強度は依然として数倍程度にとどまっている。最終的に得られる発光増強度は、吸収断面積の増強度と発光量子効率の増強度の積であるため、この二つを同時に増強することができれば、得られる発光増強度は非常に大きくなることが予想される。本研究では、Si ナノ結晶の吸収断面積と発光量子効率の同時増強、及びそれに伴う発光特性の改善を目的とする。

発光体の吸収断面積と発光量子効率の二つを同時に増大する場合、励起波長と発光波長の二つの波長領域に、表面プラズモン共鳴を有する金属微細構造が必要となる。本研究では、直径 350 nm のポリスチレン球を二次元配列させた構造上に、銀薄膜を蒸着し、形成した Ag Film Over Nanosphere (AgFON) 構造を用いる。この構造は、Nanosphere Lithography を用いて作製され、電子線描画 (Electron Beam Lithography: EB) などと比べて、安価にかつ簡易に金属ナノ構造が作製可能である。Metal (Ag, Au etc...) FON 構造は主に表面増強ラマン散乱 (Surface Enhanced Raman Scattering: SERS) に古くから用いられており、非常に大きな増強電場 (ホットサイト) が金属ナノ粒子の半球が並んだ構造の間、つまりギャップ部分に生じることがわかっている<sup>162-165</sup>。また、伝搬型表面プラズモン共鳴と局在型表面プラズモン共鳴の二つを有することで、異なる二波長においてプラズモン共鳴を有することも知られている。そのため、AgFON 構造パラメーターを適切に設定することで、Si ナノ結晶の励起波長と発光波長の二つにプラズモン共鳴波長を有する構造が作製可能であると考えられる。

第3章でも述べたように、金属ナノ構造を用いて発光体の発光特性を改善する場合、金属ナノ構造と発光体の距離は非常に重要な構造パラメーターである。本研究では、金属ナノ構造と Si ナノ結晶の距離を高精度に制御し、発光増強度の距離依存を解明することで、発光増強度の最大化を図る。そのために、距離を高精度に制御することを目的として、Layer by Layer 法により作製されるポリマー層を利用する<sup>166-168</sup>。この方法は、高価な成膜装置や煩雑なプロセスを必要とせずに、高精度に制御された薄膜が形成できるという利点を有する。

本研究では、AgFON 構造上に、Layer by layer 法により作製された異なる膜厚を有するスペーサー層として配置し、その上に Si ナノ結晶の単層膜を形成したサンプルに関して、構造及び光学特性評価を行うことで、Si ナノ結晶の発光特性改善を行った。その結果、AgFON 構造と Si ナノ結晶の距離が 16 nm 空いた際に、最大で 12 倍の発光増強度が得られた。これらの結果は、Si ナノ結晶と金属ナノ構造をカップリングすることで、検出対象の有無により変化する発光を利用する発光検出型バイオセンサーへの応用可能性を示唆している。

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 試料作製方法

本研究では、Si ナノ結晶の単層膜を金属ナノ構造上に、スペーサーによって高精度に単層膜と微細構造の距離を制御し配置することで、光学特性評価を行う。作製した試料の構造を図 4.1 に示す。金属微細構造としては Nanosphere Lithography(NSL)法を用いて作製した銀微細構造を用いた。NSL 法とは、直径が均一なナノメートルサイズの球(ポリスチレンビーズやシリカナノ粒子など)を二次元平面状に単層かつ最密充填にし、それを鋳型として金属微細構造を作製する非常に簡便かつ安価な手法である。スペーサーとしては Layer by Layer (LbL)法により作製したポリマー層を用いた。LbL 法とは、正負の異なるポリマーを交互に静電気力により積層させ、その層数により膜厚が高精度に制御可能なポリマー層の作成手法である<sup>169,170</sup>。安価な設備及び簡便に高精度に制御された薄膜が形成手法であることから、近年、ナノ構造間の距離制御の手法として広く用いられている。Si ナノ結晶単層膜としてはホウ素(B)、リン(P)同時ドーピング Si ナノ結晶コロイド溶液のドロップコートにより作製した膜を用いる。各々の作製方法を以下に示す。

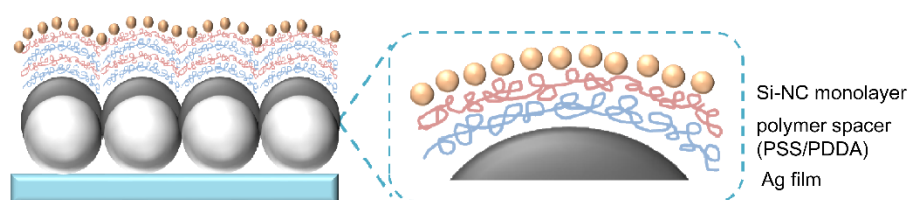


図 4.1 銀微細構造基板上に配置した Si ナノ結晶単層膜。距離はポリマーの膜厚により、高精度に制御が可能である。

### 銀微細構造基板作製方法

本研究では、銀微細構造として Silver Film Over Nanosphere(AgFON)構造を用いる。AgFON 構造の作製プロセスには、土台となるポリスチレン球の 2 次元配列、銀薄膜の形成がある。通常、2 次元配列のポリスチレン球はポリスチレン球分散液を基板上に滴下・乾燥することで作製していたが、この方法では、多層膜形成や配列方向の制御が困難であるといった問題が生じ、かつ最大数十  $\mu\text{m}^2$  の面積でしか最密充填構造が作製できないという課題があった。そこで本研究では 2 次元に配列されたポリスチレン球には、水面上でのポリスチレン球の自己凝集膜を用いる。この方法では、エタノールと水が体積比 1:1 で存在する溶媒中にポリスチレン球を分散させ、その溶液を、時計皿を伝わせて水面上に滴下し、ポリスチレン球を水面上に展開する。その際、水面上にポリスチレン球は自己凝集的に最密充填され、単層の膜のみが浮遊するため、単層かつ方位が一般的なポリスチレン球単層膜を、1  $\text{cm}^2$  以上の大面積で作製可能である。作製した単層の 2 次元配列したポリスチレン球上に、銀薄膜を真空蒸着し、銀微細構造基板を作製した。以下に詳なプロセスを示す。

1. 直径 350 nm、濃度 2.6 % のポリスチレン球分散液(Polybead Polystyrene 0.35 Micron Microspheres, Polyscience, Inc.)400  $\mu\text{L}$  を 1.5 mL のマイクロチューブにとり、遠心分離機(H-11NB, 株コクサン)を用いて 3,000 rpm にて 30 分間遠心分離機を行い、ポリスチレン球をチューブ下部に沈降させる。
2. 1.の上清部分として 300  $\mu\text{L}$  取り除き、エタノールを 100  $\mu\text{L}$  加える。このプロセスにより、溶媒が体積比 1:1 で水とエタノールになる。よって水よりもポリスチレン球分散液の溶媒の比重が小さくなり、最終的に水面上に浮力による自己凝集膜が作製される。(作製した分散液は、凝集しやすいため使用するまでは冷蔵庫にて保存する。また、作製した分散液は、作製したその日中で使いきるようにする。)
3. 2.で作製した分散液を水面上に滴下する際、緩やかに水面上に滴下するため、親水処理された時計皿を用いる。時計皿は、恒温槽を用いて 50°C に温めた 5 M の水酸化ナ

トリウム水溶液に 10 分間浸漬させることで親水処理を行う。その後、水で軽く洗浄し、図 4.1 に示すように配置する。この際、水酸化ナトリウムを洗い流しすぎないように注意する。

4. 2. で作製した分散液を冷蔵庫から取り出し、ボルテックスミキサー、若しくは超音波洗浄にて攪拌した後に 3. で配置した時計皿の上部に 1 滴ずつ滴下していく。この際、なるべくピペットチップの先端を時計皿の上部に近づけ、緩やかに滴下する。水面の大部分にポリスチレン球の自己凝集膜が形成されるまで、この作業を続ける。大体、ポリスチレン球の自己凝集膜形成には 100  $\mu$ L 程度を使用する。

5. 作製した自己凝集膜の強度向上のため、界面活性剤であるドデシル硫酸ナトリウム (0.01~0.1%) を滴下する。その後、2 時間以上、できれば半日以上静置し、多層膜となる粒子の沈降を行うことで、単層膜の収率を向上させる。膜を安定させている間は、必ずカバーをかけて、ほこりなどが水面に付着するのを防ぐ。

6. 表面を親水処理 (UV オゾンアッシャー、若しくは水酸化ナトリウム洗浄) したシリカ基板をもちいて、形成した自己凝集膜を掬いとる。自己凝集膜の位置が把握しづらいときは、デスクランプを用いると見やすくなる。この際、基板の親水化が不十分であると表面に目視可能なしわが形成され単層膜ではなく多層膜が形成されるため、基板の親水化には十分注意を要する。

7. 6. で作製した基板を、シャーレなどを利用し、斜めに立てかけて自然乾燥させる。

8. 2 次元配列ポリスチレン基板上に銀薄膜を真空蒸着により堆積することで、銀微細構造基板を作製する。銀薄膜は、真空蒸着装置 (SVC-700T, サンヨー電子) を用いて 200 nm 堆積した。銀の膜厚は水晶振動式成膜コントローラー (CRTM-6000, ULVAC) を用いて測定した。尚、銀薄膜とポリスチレン球の密着性の向上のため、ポリスチレン球と銀薄膜の間には、チタンによる接着層 (10 nm) を蒸着している。この密着層が無ければ、後のポリマー形成時に銀薄膜が剥離してしまうので、非常に重要である。また、銀薄膜は非常に酸化しやすいため、大気暴露後すぐに (5 分以内)、自己組織化単分子膜形成に使用する 6-AHT の溶液に浸漬させる。

#### Layer by Layer 法によるポリマー層形成

本研究では、金属ナノ構造と Si ナノ結晶単層膜の距離を、Layer by Layer 法により作製したスペーサー層を用いて高精度に制御する。Layer by Layer 法 (交互積層法、又は交互吸着法) は、真空蒸着や分子線エピタキシー (MBE) 等を必要とせず、簡易な設備、常温常圧下で高精度に膜厚が制御できるポリマー層が作製できる手法として、広く用いられており、その成膜可能な範囲は基板からナノ粒子まで幅広い<sup>157,171,172</sup>。Layer by Layer 法は 1992 年に、ドイツの G. Decher らによってはじめて報告された<sup>173</sup>。この手法では正、若しくは負に帯電したポリマーを交互に積層していくことで製膜し、積層数により膜厚

が決定する(図 4.2)。積層毎に基板表面を純水で十分にリンスすることにより、クーロン力で基板に強固に吸着したポリマーのみが残されるため、非常に高精度に成膜が可能となる。ポリマーの組み合わせやポリマー濃度、溶媒中の電解質濃度を制御することで、非常に薄い膜が形成可能となる。吸着時間は一般的に 10-20 分間が多いが、使用する材料によってはより長い時間を必要とすることもある<sup>174</sup>。また膜厚と層数の関係は、一般に層数の増加とともに一層あたりに積まれるポリマーの膜厚が増大していくことが知られている。これは層数を重ねることで表面のラフネスが増大し、表面積が増加、結果的に積層されるポリマーが増大することが原因と考えられている。Layer by Layer 法で薄膜を形成する際は、可能な限り毎実験同じ条件(洗浄プロセス、濃度、浸漬時間、pH 等)で成膜することにより、実験毎の膜質のばらつきが軽減できるため、可能な限り同条件での成膜を行うことが望ましい。

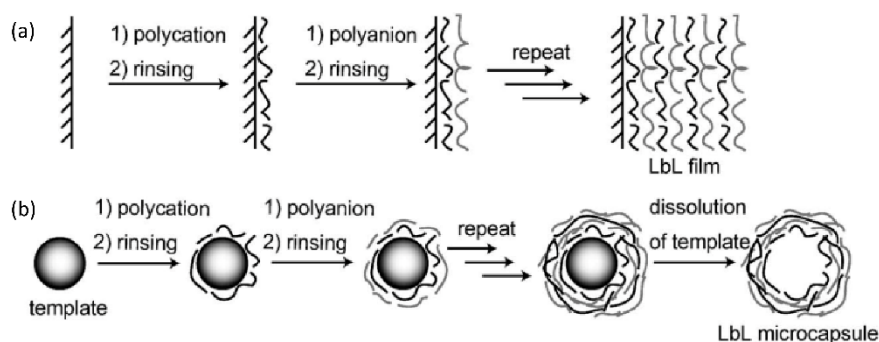


図 4.2 (a)基板上に Layer by Layer 法によりポリマー層を堆積するプロセス、(b)Layer by Layer 法で粒子周囲にポリマー層を形成、粒子を溶解させて作製するポリマーカプセルの作製プロセス<sup>172</sup>。

以下に詳細な手順を示す。

1. 成膜開始前に、銀薄膜を有する基板を 6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride(6-AHT, Dojindo Laboratories)による自己組織化単分子膜(Self-Assembled Monolayer: SAM)にて表面を正に帯電させる。エタノールに溶解した 1 mM の 6-AHT 溶液に基板を暗室中で一晚浸漬させる。その後、エタノールにて洗浄し、窒素ガンを用いて十分に乾燥させる。
2. 正、負それぞれに帯電したポリマーの水溶液を調整する。正に帯電したポリマーとして Poly(diallyldimethylammoniumchloride: PDDA, average molecular weight 100,000–200,000 g/mol, 20 wt% in H<sub>2</sub>O, Sigma Aldrich)を用いる。負に帯電したポリマーとして、Poly(sodium 4-styrenesulfonate: PSS, average molecular weight 70,000 g/mol, powder, Sigma Aldrich)を用いる。50  $\mu$ L の PDDA、若しくは 10 mg の PSS にそれぞれ電解質である塩化ナトリウム(Wako)0.292 g を加え、10 mL の水に溶解させる。尚、PSS は非常に溶解しづらいため、ボルテックスミキサー、及び超音波洗浄機を用いて十分に攪拌する。

2. 作製したポリマー溶液に基板を浸漬させる。基板は 6-AHT による SAM で正に帯電しているため、PSS 溶液から浸漬させる。20 分間浸漬させ、十分な水で洗浄し、窒素ガンにて乾燥させる。その後、PDDA 溶液に浸漬し、同様に洗浄する。
3. このプロセスを必要回数だけ繰り返す。後に Si ナノ結晶単層膜を形成する際は、Si ナノ結晶は負に帯電しているため、必ずポリマーの積層は正に帯電したポリマーである PDDA で終了する。

#### Si ナノ結晶単層膜の作製方法

Si ナノ結晶単層膜は、メタノール分散した B と P を同時にドーブすることで作製した Si ナノ結晶の溶液をドロップコートすることにより作製する。Si ナノ結晶の濃度は、単層膜が形成されるように濃度計算を行い、調整する。本研究では、Si 量子ドットが 2 次元に最密充填されると仮定し、計算した値を濃度に用いた。具体的には、225 mm<sup>2</sup> の面積を有する基板に、4 nm の Si ナノ結晶が 0.173 mg/mL の濃度で分散した溶液を 8 μL 滴下することで、単層膜を形成した。その後、十分にデシケーター中で乾燥させ、溶媒を完全に揮発させた。

### 4.2.2 構造評価方法

#### 可視分光エリプソメトリー

4.2.1 において作製したポリマー層、及び Si ナノ結晶単層膜の膜厚を、可視分光エリプソメーター(自動薄膜装置 Auto SE, HORIBA Scientific)を用いて測定した。光源には、入射角が 70° で固定のハロゲンランプを用いた。測定波長範囲は 450 – 1000 nm、スポットサイズは 250 × 250 μm<sup>2</sup> とした。

エリプソメトリーによる膜厚測定に使用するサンプルは、Si 基板上の銀薄膜(200 nm)上に 6-AHT による SAM 膜を 4.2.1 の手法で作製し、その上にポリマー若しくは Si ナノ結晶薄膜を堆積することで作製した。

薄膜の膜厚の見積もりの際に必要となるモデルを図 4.3 に示す。使用する誘電率は、PDDA は 1.41、PSS は 1.50 とした<sup>175</sup>。ポリマー中での PDDA と PSS の体積比が 1:1 であることを仮定することで、ポリマー層の誘電率は 1.455 に設定した。

また、Si ナノ結晶の誘電率には、以下に示す Bruggeman の有効媒質近似を用いた<sup>176</sup>。

$$f_{Si} \frac{\epsilon_{Si} - \epsilon_{eff}}{\epsilon_{Si} + 2\epsilon_{eff}} + (1 - f_{Si}) \frac{\epsilon_{air} - \epsilon_{eff}}{\epsilon_{air} + 2\epsilon_{eff}} = 0$$

ここで  $\epsilon_{Si}$  はバルク Si の誘電率、 $f_{Si}$  は Si ナノ結晶の充填率、 $\epsilon_{air}$  は空気の誘電率であり、1 である。上記の式を用いることで、ナノ結晶単層膜の有効な誘電率  $\epsilon_{eff}$  を求める。そのためにはナノ結晶の充填率である  $f_{Si}$  が必要となる。今回は過去の実験から予想され

ている 25-35 % を  $f_{Si}$  として用いることで、ナノ結晶の有効な誘電率を求めた<sup>142</sup>。

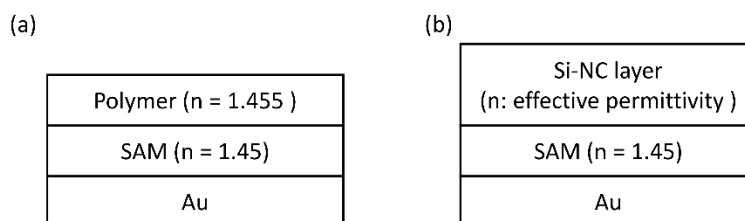


図 4.3 エリプソメトリーのデータ解析に使用したモデル。(a)ポリマー層が堆積された基板、(b)Si ナノ結晶単層膜が堆積された基板。

### 4.2.3 消光スペクトル測定方法

本研究では、消光スペクトル(absorbance: A)をサンプルの透過スペクトル(transmittance: T)、及び反射スペクトル(reflectance: R)を測定することで求めた。消光スペクトルは  $1-T-R$  によって求められる。透過率、及び入射角度が  $5^\circ$  の反射率は分光光度計(UV-3101PC, SHIMADZU)を用いて測定した。反射スペクトルの入射角度依存性はUV-VIS 紫外可視近赤外分光光度計(SolidSpec-3700, SHIMADZU)を用いて測定した。測定波長範囲は 300-800 nm、入射角は  $5, 15, 30, 45, 60^\circ$  の範囲で設定した。

### 4.2.4 発光測定方法

金属ナノ構造基板上の Si ナノ結晶単層膜の発光特性評価として、本研究では発光スペクトル測定、発光減衰スペクトル測定、及び発光励起マトリクス測定を行った。以下に詳細な実験方法を示す。

#### 発光スペクトル測定

図 4.4 に発光スペクトル測定の概略図を示す。励起光源には波長 405 nm の半導体レーザー(CUBE 1073840, COHERENT)を用いた。レーザー直後には 405 nm のバンドパスフィルター(TECHSPEC Bandpass Filter 65133, Edmund)を配置し、アパーチャーと焦点距離 150 mm のレンズを用いて基板上に集光した。尚、入射角は  $45^\circ$  に設定し、励起強度はサンプル上で 3 mW に設定した。スポット径は 1.4 mm であるため、パワー密度は  $20 \text{ W/cm}^2$  である。その後、焦点距離が 150 mm と 250 mm の 2 枚のレンズを用いて、分光器(SpectraPro-300i, Acton Research Corp.)のスリット上に集光した。スリット直前には、425 nm のロングパスフィルター(High Performance OD4 Longpass Filters 425 nm, Edmund)を設置し、レーザーからの散乱光を除去した。分光器の中心波長は 800 nm に設定した。検出器には液体窒素で冷却した Charge Coupled Device (CCD (Roper Scientific))を使用した。測定により得られた発光スペクトルは、タングステン標準ランプを用いて得られた分光



感度の補正係数を用いて、補正した。尚、補正係数の詳しい求め方は 2002 年の渡辺啓さんの博士論文の付録に詳細に記載されているのでここでは省略する。

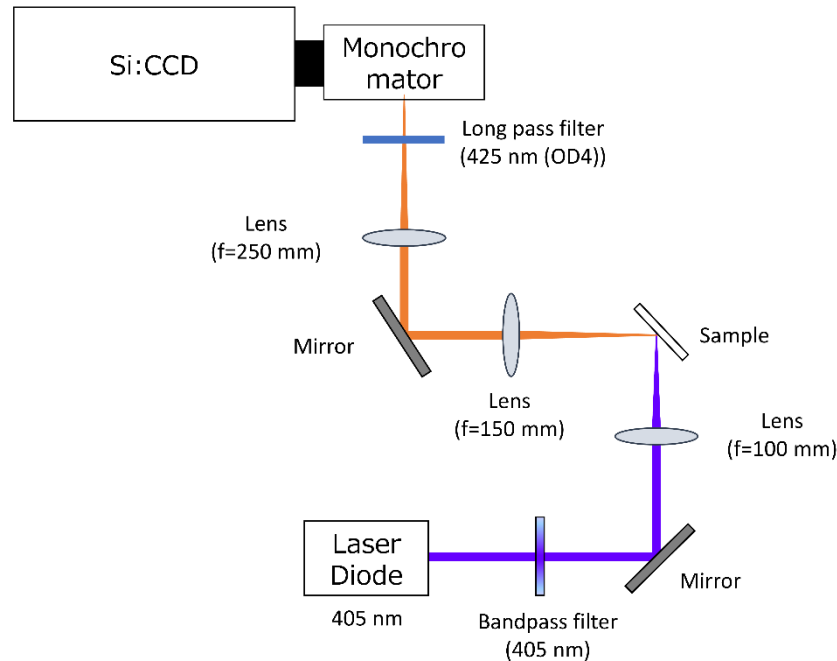


図 4.4 発光スペクトル測定系の概略図

#### 発光減衰スペクトル測定

図 4.5 に発光減衰スペクトル測定の概略図を示す。励起光源には波長 405 nm の半導体レーザー(CUBE 1073840, COHERENT)を用いた。このレーザー光をパルスジェネレーター(PG-230, IWATSU)により、パルス幅 0.6 ms のパルス光にした。レーザー直後には 405 nm のバンドパスフィルター(TECHSPEC Bandpass Filter 65133, Edmund)を配置し、アパーチャーと焦点距離 150 mm のレンズを用いて基板上に集光した。尚、入射角は  $45^\circ$  に設定し、励起強度はサンプル上で 3 mW に設定した。スポット径は 1.4 mm であるため、パワー密度は  $40 \text{ W/cm}^2$  である。その後、焦点距離が 150 mm と 250 mm の 2 枚のレンズを用いて、分光器(SpectraPro-300i, Acton Research Corp.)のスリット上に集光した。スリット直前には、425 nm のロングパスフィルター(High Performance OD4 Longpass Filters 425 nm, Edmund)を設置し、レーザーからの散乱光を除去した。検出器には gated intensified CCD (iCCD) (PI-Max, Princeton Instrument)を用いた。時間分解能は  $1 \mu\text{s}$  とした。

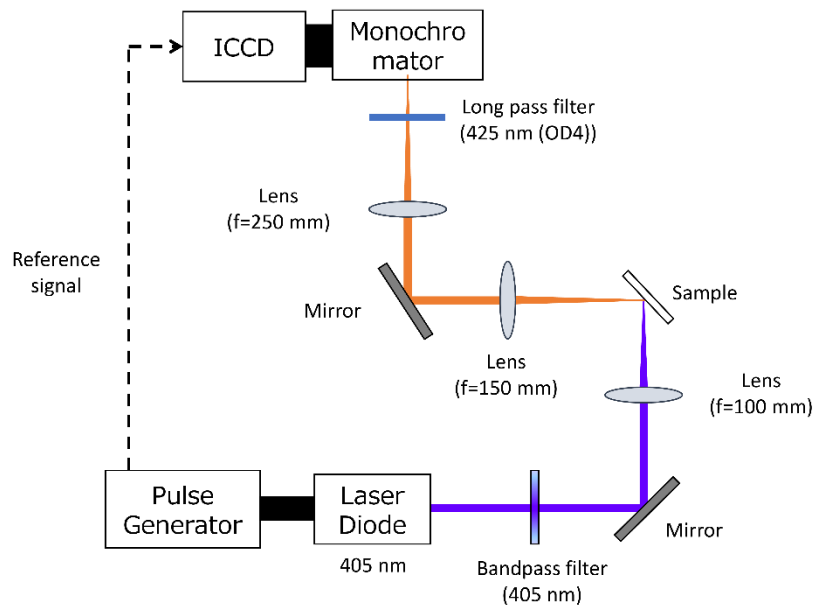


図 4.5 発光減衰スペクトル測定系の概略図

### 励起発光マトリクス測定

発光スペクトルの励起波長依存性を調べるために、モジュール型蛍光分光測定装置 (SPEX Fluorolog-3, HORIBA) を用いて、励起発光マトリクスを測定した。励起発光マトリクスとは、多波長励起した発光スペクトルを X 軸に発光波長、Y 軸に励起波長をとって 3 次元の等高線プロットをしたものである。励起光源には、出力が 450 W のキセノンランプを用いており、ダブルモノクロメーターによって任意の波長に分光し、励起光源として用いる。各励起波長ごとに、励起強度で発光スペクトルの規格化を行っている。サンプルの発光はシングルモノクロメーターで分光され、光電子増倍管 (Photomultiplier: PMT) で検出される。励起光源からの散乱光除去のため、ロングパスフィルター 575 nm (High Performance OD4 Longpass Filters 575 nm, Edmund) を用いた。励起波長範囲は 300 – 550 nm、検出波長範囲は 600 – 850 nm に設定した。励起側のスリット幅は 10 nm、発光側のスリット幅は 15 nm とした。励起側の Increment は 10 nm、発光側の Increment は 15 nm とした。

## 4.3 実験結果

### 4.3.1 膜厚評価

図 4.1 に示すように、本研究では銀微細構造である AgFON 上に、発光体層である Si ナノ結晶の単層膜を形成し、その間の距離を Layer by Layer 法により作製したポリマー層で高精度に制御した。図 4.6 に、作製したポリマー層の膜厚の層数依存のデータを示す。ポリマー層の膜厚は、エリプソメトリーにより測定した。尚、このデータは銀薄膜

上に形成したポリマー層の膜厚を示している。今回の実験では、最終的に正に帯電したポリマー(PDDA)層の上に、負に帯電した Si ナノ結晶の単層膜を形成し、静電相互作用により Si ナノ結晶単層膜を基板上に吸着させる。そのため、ポリマー層は PDDA 層を最表面に配置する必要があるため、層数は全て偶数で終了している。

図 4.6 から層数の増大に伴い、ポリマー層の膜厚が増大していることが分かる。このデータより、Layer by Layer により作製したポリマー層の膜厚は、そのポリマー層の層数で制御可能であることがいえる。また、膜厚の増大は線形ではなく、非線形的に増大している。これは層数が増えるに従い、ポリマー層表面のラフネスが増大し、一度のポリマー層形成において吸着するポリマー量が増えたことが原因として考えられる。

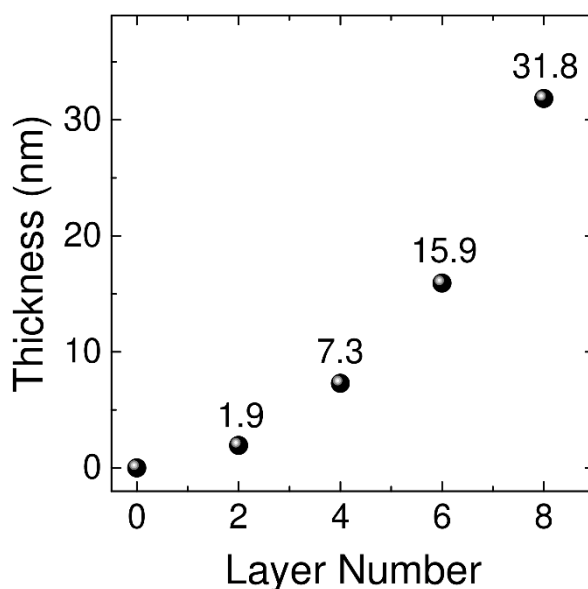


図 4.6 Layer by Layer 法により作製されたポリマー層の膜厚の層数依存性。

次に、発光体層である Si ナノ結晶の単層膜の膜厚評価を行う。単層膜は、Si ナノ結晶をドロップコートすることで作製した。図 4.7 に、作製した Si ナノ結晶層の膜厚の、ドロップコートの回数依存を示す。ドロップコートの回数は、1-5 回の間で変化させた。膜厚はエリプソメトリーにより測定し、異なる Si ナノ結晶層の充填率を用いて求めた膜厚を示している。過去の研究より、Si ナノ結晶層の充填率は 0.3 程度と見積もられている。充填率が 0.3 の場合(緑点線)、ドロップコート一回当たりに作製される Si ナノ結晶層の膜厚は、4 nm であった。これは、今回使用した Si ナノ結晶の直径(4 nm)と非常によく一致することから、一回当たりのドロップコートで、Si ナノ結晶の単層膜が形成されているといえる。以降、作製された銀微細構造(AgFON)/ポリマー層(層数 n)/Si ナノ結晶単層膜のサンプル名を、Si-NC/L(n)/AgFON とする。

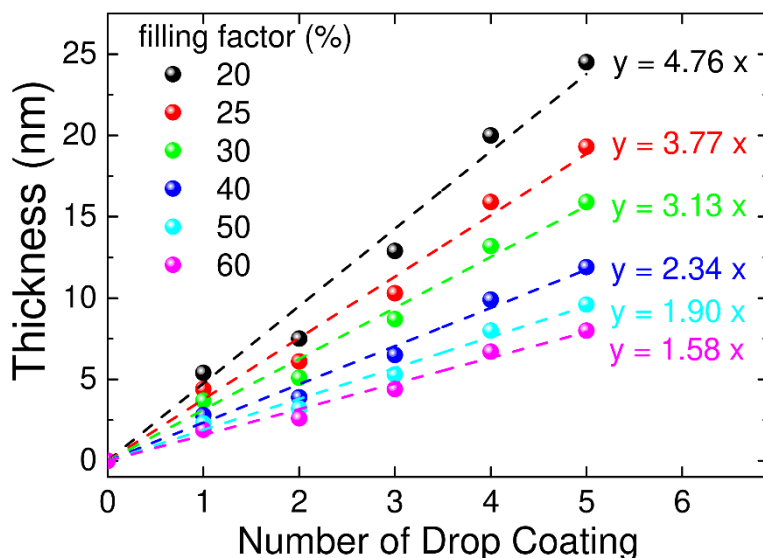


図 4.7 ドロップコートにより作製された Si ナノ結晶の層の膜厚の、ドロップコートの回数依存性。エリプソメトリー法により測定されたデータを、異なる Si ナノ結晶の充填率を用いて計算した誘電率を用いて解析し、其々の充填率に関して膜厚を求めている。

#### 4.3.2 消光スペクトル評価

図 4.8 に、異なるポリマー層数( $n=0-6$ )を有する  $L(n)/AgFON$  のサンプル、及び Si ナノ結晶層を形成した  $Si-NC/L(n)/AgFON$  のサンプルの消光スペクトルを示す。ポリマー層を形成前( $L(0)/AgFON$ )は、400 nm 及び 600 nm の波長領域に、プラズモン共鳴に起因する消光スペクトルのピークがみられた。ポリマー層数を増やすに従い、 $AgFON$  周囲の誘電率が変化し、結果としてピーク波長は長波長にシフトし、最終的に  $L(6)/AgFON$  のサンプルでは、450 nm 及び 700 nm の波長領域にピークがみられた。更に、Si ナノ結晶単層膜形成後には、ピークは更に長波長シフトし、500 nm 及び 720 nm 付近にピークが見られた。この構造では、Si ナノ結晶を励起波長 500 nm 付近に、発光波長が 750 nm 付近になるように設定すると、吸収断面積および発光再結合レートの同時増強が起こることが期待される。

図 4.9 に  $Si-NC/L(6)/AgFON$  のサンプルの消光スペクトルの、入射角度依存性を示す。入射角度は  $5-60^\circ$  の間で変化させた。長波長側のピーク( $\sim 720$  nm)は、入射角度に依らず、一定であることがわかる。このことから、長波長側のピークの起源は、局在表面プラズモン共鳴であるといえる。一方、短波長側のピーク(400-500 nm)は、入射角度が増大するに従い、分裂していることがわかる。これは、短波長側のピークは表面プラズモン共鳴によるものであると考えられる。尚、図 4.8 及び図 4.9 にみられる 350 nm 以下の消光の増大は、銀のバンド間遷移に伴うものである。

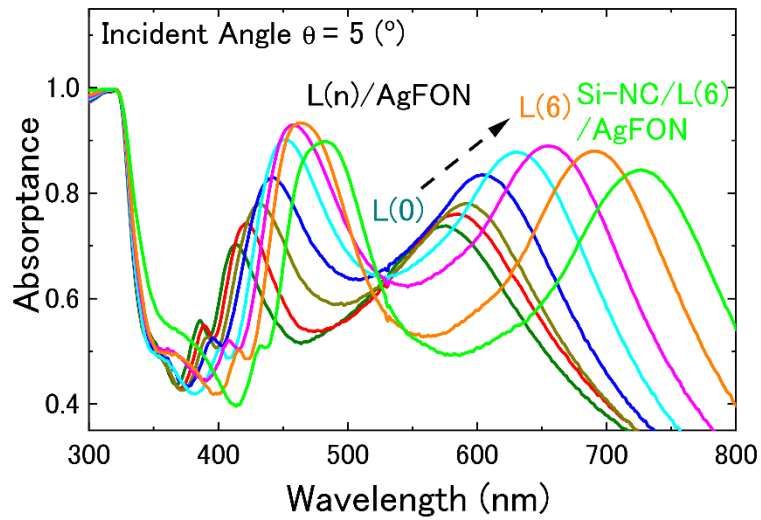


図 4.8 AgFON 構造とポリマー層から成る構造の吸収率スペクトル。異なる層数のポリマー層(0-6 層)、及び 6 層のポリマー層と Si ナノ結晶を有する構造に関して示す。

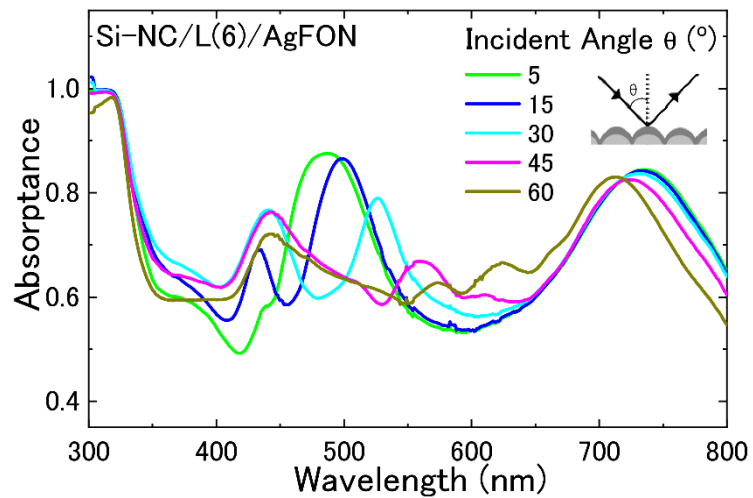


図 4.9 AgFON 構造と 6 層のポリマー層、及び Si ナノ結晶の単層膜を有する構造の吸収率スペクトルの入射角度依存。

### 4.3.3 発光特性評価

図 4.10 に、異なるポリマー層数(n)を有する、Si-NC/L(n)/AgFON の発光スペクトルを示す。励起波長は 405 nm に、励起光の入射角度は 45° に設定した。比較対象として、石英基板上及び、Ag 薄膜上の Si ナノ結晶の発光スペクトルも同時に示す。尚、この二つのサンプルに関しては、発光強度を 5 倍にして表示している。

石英基板上の Si ナノ結晶の発光強度に比べると、Ag 薄膜上の Si ナノ結晶の発光強度は、30%程度減少していることがわかる。これは、蛍光分子が金属表面近傍に存在する際、その励起子のエネルギーが輻射に加えて、金属内部へ散逸してしまう、消光(クエンチング)が生じたためである。しかし、Ag 薄膜上には厚さが 1.2 nm ほどの自己組織化単分子膜が形成されているため、消光の影響は最小限に抑えられていると考えられる。

次に、L(n)/AgFON 上にある Si ナノ結晶の発光と、比較対象である石英基板上及び Ag 薄膜上の発光特性を比較する。比較対象と比べると、L(n)/AgFON 上にある Si ナノ結晶の発光強度は増大され、またスペクトル形状に大きな変化があることがわかる。特に L(4)/AgFON 及び L(6)/AgFON 上にある Si ナノ結晶の発光スペクトルでは、新たに狭い線幅を有する発光が 720 nm 付近にみられた。これは、発光再結合過程がこの波長領域において、AgFON 構造により大幅に影響を受けていることを示唆する。局在表面プラズモン共鳴と、発光スペクトル形状の関係に関しては、後で詳しく議論を行う。

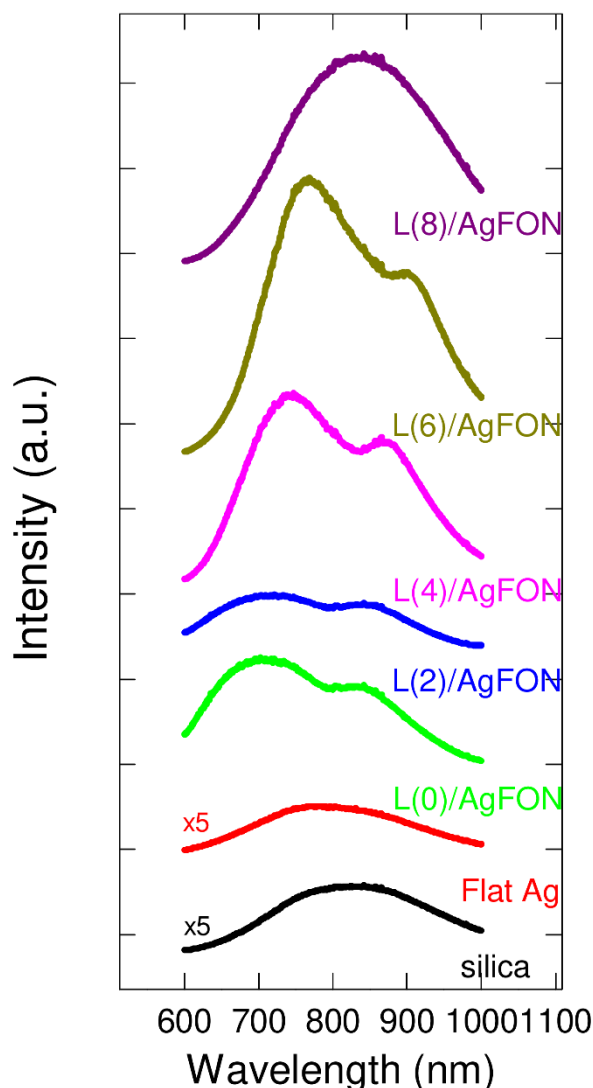


図 4.10 AgFON 構造とポリマー層、及び Si ナノ結晶の単層膜を有する構造の発光スペクトルのポリマー層数依存性。比較対象として、石英基板上、及び銀薄膜上の Si ナノ結晶の単層膜の発光スペクトルを 5 倍に拡大して示している。

図 4.10 と同様のサンプルに対して、発光減衰スペクトル測定を行った。結果を図 4.11 (a)に示す。尚、発光測定系は図 4.10 の場合と同様のものを使用した。検出波長は 775 nm に設定した。図 4.11(b)には、得られた発光減衰スペクトルを用いて算出した、発光寿命の検出波長依存性を示す。発光寿命は、発光減衰スペクトルを  $I = I_0 \exp\left\{-\left(t/\tau\right)^\beta\right\}$  を用いてフィッティングし、得られた時定数  $\tau$  と、stretched parameter である  $\beta$  を用いて、平均発光寿命 ( $\tau_{ave}$ ) を計算する。平均発光寿命は、 $\tau_{ave} = \tau \beta^{-1} \Gamma_E(\beta^{-1})$  を用いて計算した。

まず、石英基板上および Ag 薄膜上の発光寿命に関して比較する。Ag 薄膜上に存在する Si ナノ結晶の発光寿命は、石英基板上の Si ナノ結晶の発光寿命に比べると、短くなっていることがわかる。これは、図 4.10 でも述べた、金属上の発光体の励起子の非輻射的遷移割合の増大に起因する。次に、Ag 薄膜上と L(0)/AgFON 上の発光寿命を比較する。この二つのサンプルでは、ポリマー層数が 0 であるため、Ag からの距離は等しい。AgFON 上に存在することにより、更に発光寿命が減衰していることがわかる。これは、AgFON 上のサンプルでは非輻射的遷移割合の増大に加えて、プラズモン共鳴による増強電場中に発光体、つまり励起子が配置されたことにより輻射的遷移割合が増大したことが原因として考えられる。次に、ポリマー層数を増大させた場合(0-8)を考える。ポリマー層数の増大に伴い、発光寿命が増大し、最終的に石英基板上の発光寿命と同様の値をとることが分かる。これは、AgFON との距離が増大することにより、非輻射的遷移割合、および輻射的遷移割合の増大の影響が減少していくことが原因である。尚、図 4.10 の Si-NC/L(8)/AgFON でみられた発光増強は、発光寿命が変化していなかったことを踏まえると、輻射的遷移割合の増大ではなく、吸収断面積増大によるものであることがわかった。

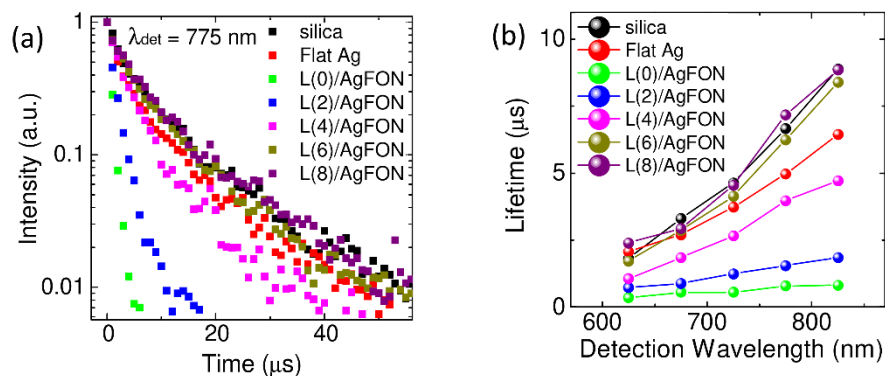


図 4.11 (a)AgFON 構造とポリマー層、及び Si ナノ結晶の単層膜を有する構造の発光減衰スペクトル、及び(b)各検出波長における発光寿命のポリマー層数依存性。

図 4.10 及び図 4.11 で得られた発光特性より、AgFON 上に配置された Si ナノ結晶単層膜は、発光特性が大きく影響をうけることがわかった。そして、その変化は吸収断面積増大及び発光再結合レートの増大の二つの効果が寄与していると予想される。そのため、発光特性の励起波長及び発光波長依存性を明らかにするため、発光励起マトリクス測定を行う。この測定では、異なる励起波長において励起された Si ナノ結晶の発光強度を、異なる検出波長で測定することが可能である。



図 4.12 に比較対象である石英基板上的 Si ナノ結晶と、L(6)/AgFON 上の Si ナノ結晶の発光励起マトリクスを示す。このグラフでは、横軸は発光波長(検出波長)、縦軸は励起波長を表す。励起光の入射角度は  $60^\circ$  である。図 4.12(a)に示す、石英基板上的 Si ナノ結晶では 800 nm 付近に発光強度のピークが存在する発光スペクトルがみられ、その発光強度は、Si ナノ結晶の吸収スペクトルの特性を反映し、励起波長増大に従って減少していることがわかる。図 4.12 (b)に L(6)/AgFON 上の Si ナノ結晶の発光励起マトリクスを示す。励起波長が 330 nm 以上で、著しく発光強度が増大されていることがわかる。特に励起光が 500 nm 以上の領域において、石英基板上的 Si ナノ結晶に比べて発光強度が増大されていることがわかる。また、発光スペクトルのピークもやや短波長シフトしていることが分かる。対して 330 nm 以下の領域では、発光強度の増大がみられなかった。原因としては、銀のバンド間遷移にともなう消光係数の増大が挙げられる。

以上のデータより、AgFON 上の Si ナノ結晶は、吸収断面積と発光再結合レートが同時に影響を受け、発光強度が増大していることが分かった。

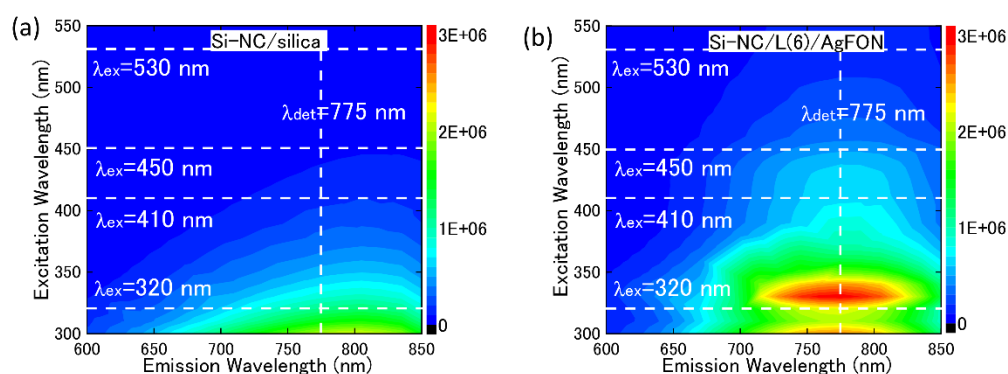


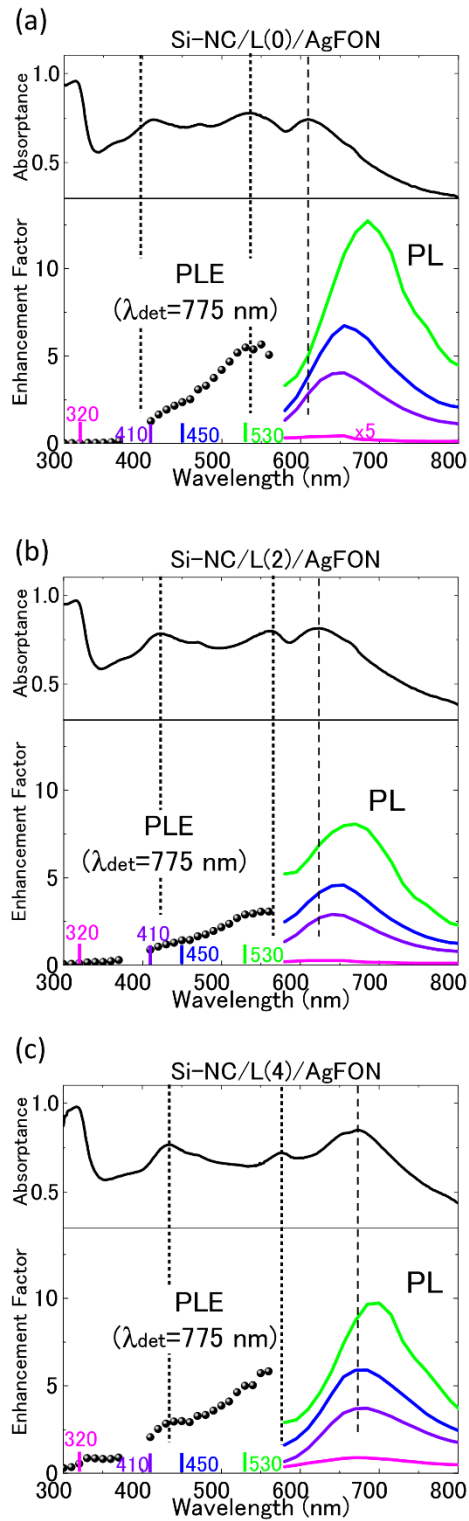
図 4.12 (a)石英基板上的 Si ナノ結晶の単層膜、及び(b) AgFON 構造と 6 層のポリマー層、及び Si ナノ結晶の単層膜を有する構造の発光励起マトリクス。横軸に発光波長(600-850 nm)を、縦軸に励起波長(300-550 nm)を示している。

AgFON による Si ナノ結晶の発光特性への影響について、図 4.12 で得られたデータを基に、更に詳しく解析していく。図 4.13 に Si-NC/L(n)/AgFON ( $n=0-6$ )に関して発光励起マトリクスを測定し、得られた発光励起スペクトルの増強度(下図プロット)、発光スペクトルの増強度(下図実線)を求めた。発光増強度は、AgFON 上の Si ナノ結晶の発光強度を、石英基板上的発光増強度で割ることによりもとめた。発光励起スペクトルは、検出波長を 775 nm に設定し、発光スペクトルは励起波長を 320, 410, 450, 530 nm に設定した。尚、表面プラズモン共鳴と発光増強度の関係性を議論するため、同時

に消光スペクトルも載せた(上図実線)。

図 4.13 (a)に Si-NC/L(0)/AgFON の発光増強度のデータを示す。励起波長が 320 nm では発光が消光、つまり発光増強度が 1 未満になっていることが分かる。しかし、ポリマー層数を増大する(L(2-6))に従い、励起波長 320 nm での消光は見られなくなる(図 4.13 (b-e))。これは、層数が増大するに従い、Ag との距離が離れ、消光が生じなくなったことが原因である。最終的にポリマー層が 6 層( $n=6$ )、つまり Si ナノ結晶と AgFON の距離が 15.9 nm の時、発光増強度は 2 倍になった。これは、320 nm に表面プラズモン共鳴のピーク波長が存在しないことから、発光増強は輻射的遷移割合の増大のみによるものであると考えられる。励起波長が 320 nm の際の発光スペクトルの増強度(下図ピンク実線)を同時にみると、発光増強度のスペクトル形状と、消光スペクトルの形状が一致していることがわかる。このことは、発光増強が輻射的遷移割合の増大、つまり発光再結合レートの増大であることを示している。

次に、励起波長が 400 nm 以上の場合を考える。この場合、Ag との距離が大きくなっても、つまりポリマー層がない状態(L(0))でも、発光増強が得られている。そして、励起波長が増大するに従い、発光増強度も増大していることがわかる。特にポリマー層数が 4 層と 6 層の場合(L(4), L(6)/AgFON)、消光スペクトルと発光励起スペクトルの増強度(下図プロット)が非常に良い一致を示す。これは、励起波長が消光スペクトルの短波長側のピークと一致することによる、吸収断面積増大の影響が加わったことが原因である。Si-NC/L(0)/AgFON のサンプルでは、励起波長を 530 nm に設定すると、吸収断面積増大による発光強度の増大が著しくなり、最大で発光強度が 12 倍になることが分かった。



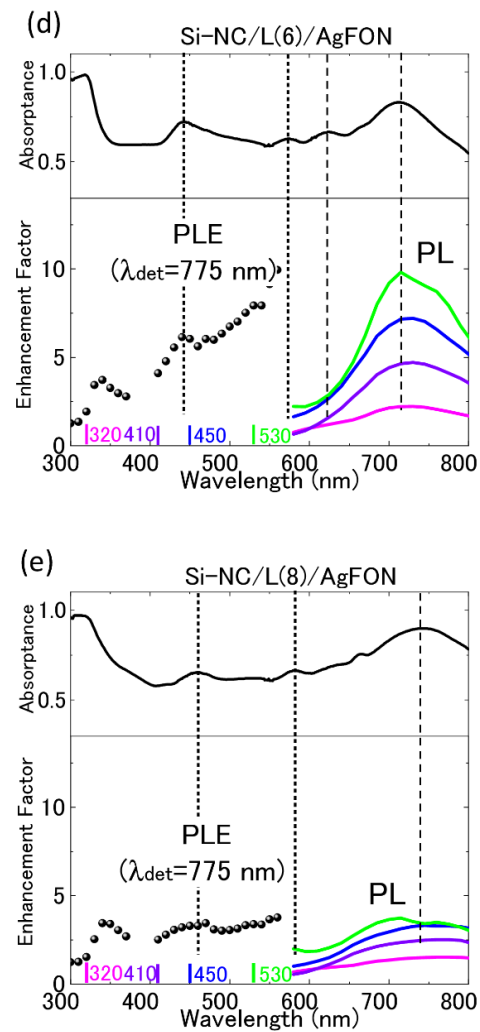


図 4.13 AgFON と各層数のポリマー層((a)0 層、(b)2 層、(c)4 層、(d)6 層、(e)8 層)、及び Si ナノ結晶単層膜を有する構造の吸収スペクトル(黒実線)、発光増強度(検出波長 775 nm)の励起波長依存性(黒点線)、各励起波長(320 nm(ピンク)、410 nm(紫)、450 nm(青)、530 nm(緑))での発光増強度の発光波長依存性。

## 4.4 考察

上述の結果より、AgFON 上の Si ナノ結晶は、ポリマー層数及び励起波長を選択することにより、吸収断面積及び発光再結合レートつまり輻射的遷移割合の2つが同時に増強されることがわかった。その結果として、Si ナノ結晶は金属ナノ構造により、著しく増強された発光強度が得られることが可能であることが実証された。

以上のデータは全て、広い励起面積及び検出範囲(100 mm<sup>2</sup>)に対して得られた。図 4.14 に、集光したレーザーを励起光に用いて、局所的に発光測定を行った場合の発光スペクトルを示す。黒線はリファレンスである石英基板上の Si ナノ結晶の、赤線は L(6)(~16 nm)/AgFON 上の Si ナノ結晶の発光スペクトルを示す。励起波長は 532 nm で、入射角度は 45° である。発光スペクトル形状は大きく変化し、また波長 750 nm では発光強度が約 50 倍になっている。このように、励起面積を局所的にすることで発光増強度がさらに増大することがわかった。

上述のとおり、Si 量子ドットのバイオフォトンクス応用に向けて、金属ナノ構造による Si 量子ドットの発光特性向上を実証した。これらの結果は、Si 量子ドットは、検出対象物質の有無を発光特性の変化により検出する、発光検出型バイオセンサーへの応用に適していることを示唆している。図 4.15 に発光検出型高感度バイオセンサーの模式図を示す。金属ナノ構造に生じるプラズモン共鳴と発光体を利用し開発可能なバイオセンサーは、検出対象の存在により基板に固定化(Bond)された発光体と、固定化されていない(Free)発光体の分離(B/F 分離)が、高感度検出に寄与できると考えられる。これまでの研究から明らかのように、Si 量子ドットは金属微細構造とカップリングした場合と、していない場合の発光強度比が非常に大きい。よって、最適な構造設計により高い B/F 分離を実現し、高感度センシングが可能になると考えられる。最終的に、構造や検出系の更なる最適化を行うことで、最終的に実用可能なセンシング感度である、1 pM の対象物質の検出も可能になると考えられる。

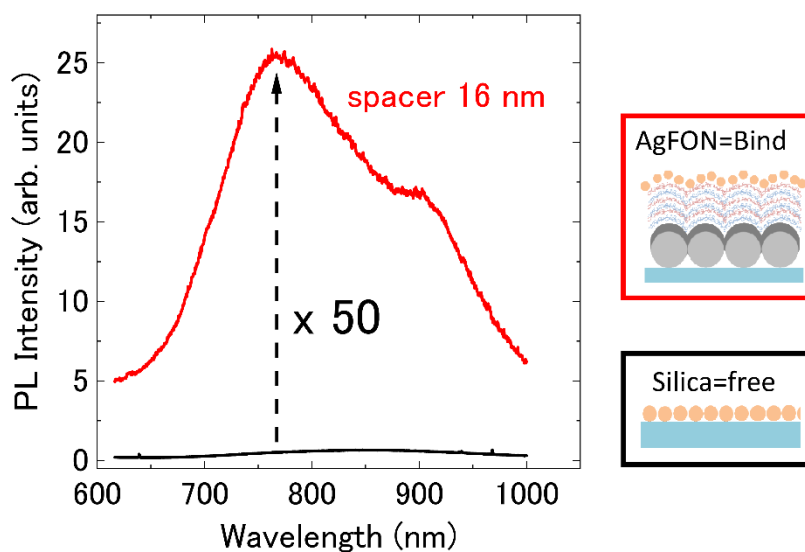


図 4.14 石英基板上(黒線)、及び L(6)/AgFON 上(赤線)の Si ナノ結晶単層膜の発光スペクトル。励起光は 532 nm のレーザー光で、入射角度は  $45^\circ$  に設定している。

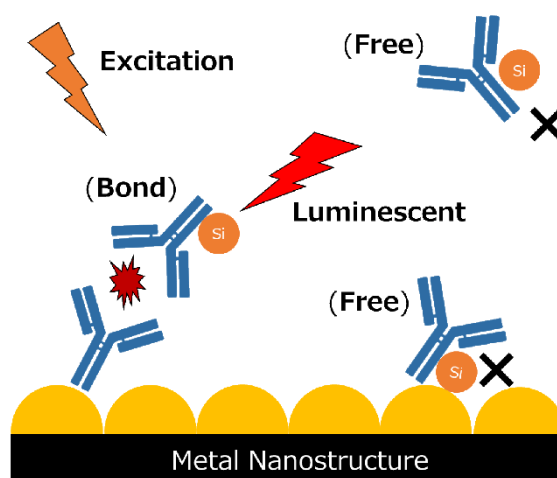


図 4.15 発光検出型のバイオセンサーの模式図。サンドイッチアッセイ法により Si ナノ結晶を基板上に固定、検出対象の有無により変化する発光強度でセンシングを行う。この構造では、B/F 分離により高感度センシングが実現可能である。

## 4.5 まとめ

本章では、金属ナノ構造である AgFON 構造を用いて、Si ナノ結晶の吸収断面積と発光再結合レートを同時に増大することを明らかにした。数 nm 単位で高精度に金属ナノ構造と発光体である Si ナノ結晶層の間の距離を制御し、同時に発光励起マトリクスを測定することで発光特性は、基板との距離及び励起波長、発光波長に強く依存することが分かった。その結果として、構造や励起波長の最適化を行うことで、広範囲の励起面積及び検出面積において、約 10 倍発光強度の増大を実現した。

以上の結果より、金属ナノ構造との距離に影響を受ける Si ナノ結晶の発光特性を用いることで、検出対象の有無により変化する発光特性を利用した発光検出型のバイオセンサーへ、Si ナノ結晶を蛍光プローブとして応用可能であることが示唆された。幅広い pH 範囲及び長時間励起しても発光特性を損なわない安定した Si ナノ結晶をバイオセンシングデバイスに実際に利用することで、従来の光退色性のある有機色素や蛍光たんぱく質に頼っていた発光検出型バイオセンシングデバイスに革新を起こすことができると考えられる。

## 第5章 Siナノ結晶シェルを有する銀 ナノ粒子の抗菌作用

### 5.1 はじめに

古くから銀(Ag)は食べ物や水などの腐敗防止のため、銀食器に代表される食器などに利用されてきた例に代表されるように、銀は抗菌剤として古くから利用されてきた歴史があり、経験的に銀には抗菌作用があることが知られていた<sup>177</sup>。初めて銀に抗菌作用があることが確認されたのは、1896年のRaulinによる、*Aspergillus niger*の発育に対する銀食器が与える影響に関する研究であり、以来、銀の抗菌作用に関する研究は盛んに行われてきた。近年のナノテクノロジー技術の発達に伴って高品質なAgナノ粒子の開発が可能になったこともあり、直径が数nmから数十nmのAgナノ粒子が分散したコロイド溶液の抗菌作用に関する研究が注目を集めている。このAgナノ粒子は、銀食器などのバルクの銀に比べ、高い比表面積を有するため、非常に優れたAgイオンの徐放性を有し、結果として高い抗菌力を発揮する<sup>107-112</sup>。しかしAgナノ粒子には感光性が存在し、また溶液中で容易に酸化され、また凝集しやすいという特性を有し、これらの特性は、Agナノ粒子の抗菌力の低下、すなわちAgイオンの徐放性の低下につながる。そのため、Agナノ粒子の抗菌剤としての応用実現に向けて早急に解決が必要である。この課題を解決する方法として、Agナノ粒子を安定化剤によって保護するという方法がある<sup>115-122,178</sup>。安定化剤としては主にポリマーや無機系ナノ材料が主に研究されている。Lvらは、シリコン(Si)ナノワイヤー上にAgナノ粒子を担持することで、Agナノ粒子の水中での安定性の向上を実現し、またAgナノ粒子/Siナノワイヤーのフィルムを作製することで、抗菌フィルムの作製に成功した<sup>116</sup>。これらの研究に代表されるように、安定剤との複合によって銀ナノ粒子の安定性が向上することが過去の研究からわかっている。

そこで本研究では、Agナノ粒子の安定剤として(Siナノ結晶のシェルを用いることで、Agナノ粒子の安定性を向上させその抗菌能を評価、新たなAgナノ粒子をベースにした抗菌剤を開発する。Siナノ結晶シェルを有するAgナノ粒子は、ホウ素(B)リン(P)同時ドーピングSiナノ結晶をAgイオンに対する還元剤として用いてAgイオンを溶液中で還元することにより作製可能とする。金属イオンをSiナノ結晶で還元し、作製される金属コア/Siナノ結晶シェル複合体の構造は、金属イオンやSiナノ結晶濃度から制御できることが過去の研究からわかっている<sup>143</sup>。本研究では、Agナノ粒子/Siナノ結晶複合体の構造、特にAgコア径とSiシェル膜厚の異なる複数のサンプルを作製し、その抗菌



力を比較することで、構造が抗菌力に与える影響に関して詳細に評価する。Si ナノ結晶により Ag ナノ粒子の表面が被覆されるため、Ag ナノ粒子の安定性が向上、特に酸化と凝集が抑制されると考えられるため、安定性評価を消光スペクトル測定により行った。抗菌力評価は、溶液中及びフィルムに関して行った。その結果、Si ナノ結晶シェルは Ag ナノ粒子表面を保護することにより安定性の向上に寄与するが、Ag イオンの徐放性には影響を与えないことが分かった。最後に、Ag ナノ粒子/Si ナノ結晶複合体のフィルムの抗菌メカニズムを、ナノ粒子の拡散を仮定し、計算を行った。その結果、ナノ粒子が培地上の水中を分散し、Ag イオンを放出、抗菌力を示していることが明らかになった。

## 5.2 実験方法

### 5.2.1 試料作製方法

Si ナノ結晶シェルを有する Ag ナノ粒子の作製方法の概略を図 5.1 に示す。Si ナノ結晶コロイド溶液は B,P を同時ドーピングすることで作製した。詳しい作製方法は過去の文献に記載されているため、ここでは割愛する。Si ナノ結晶の表面状態は、試料作製直後(フッ酸エッチング直後)では大部分が水素終端されており、溶液中で保存することでその表面は酸化され、酸素終端の割合が増大することがわかっている<sup>142</sup>。このプロセスでは、エッチング後 2 日経過し、表面の大部分が水素終端されている Si ナノ結晶を還元剤として用いることで、Ag イオンを溶液中で還元し、Ag/Si ナノ粒子を形成する。

本研究では、Si ナノ結晶濃度を固定し、Ag イオン濃度を変化させることにより、Ag コア及び Si シェル膜厚の高精度制御を行った。以下に詳細な作製プロセスを示す。

1. アニール温度を 1050 °C に設定し、作製したメタノール分散 Si ナノ結晶コロイド溶液(0.1 mg/mL)を 580  $\mu$ L に対して、濃度を調整した硝酸銀水溶液(1.3, 4.0 and 6.7 mM)を 20  $\mu$ L 加える。
2. マグネットスターラーで溶液を 30 分攪拌し、Ag/Si ナノ粒子を形成する。
3. 作製した溶液の溶媒はメタノールであるため、遠心分離により実験に合わせて任意の溶媒に置換する。ナノ粒子溶液を 10,000 rcf にて遠心分離にかけ、ナノ粒子を沈降させる。その後、上清部を取り除き、同量の任意の溶媒(主に水、若しくは LB 溶液)にて置換する(図 5.2)。この際、ナノ粒子がチューブの壁面に吸着してしまう場合は、チューブ内部を負に帯電させ、たんぱく質等の吸着を抑えることが可能な Protein LoBind Tubes (Eppendorf)を用いると、吸着が改善される。

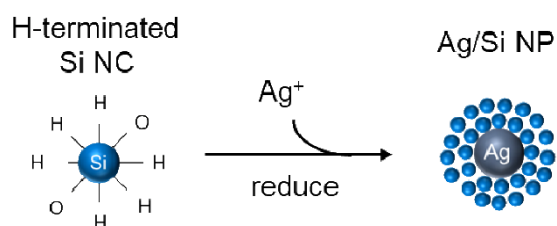


図 5.1 Si ナノ結晶シェルを有する Ag ナノ粒子(Ag/Si ナノ粒子)の作製プロセス。水素終端の Si ナノ結晶を還元剤として利用し、Ag<sup>+</sup>を溶液中で還元することで作製する。6.2.1 のプロセス(1)-(2)に対応。

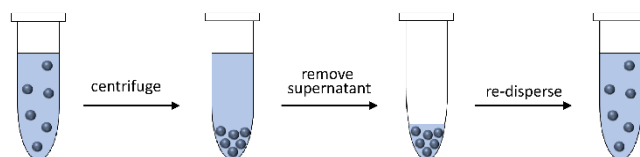


図 5.2 ナノ粒子が分散したコロイド溶液の溶媒置換方法。遠心分離によりナノ粒子を沈降、上清部を取り除き再分散させる。6.2.1 のプロセス(3)に対応。

### 5.2.2 構造評価方法

作製した Ag/Si ナノ粒子に関する構造評価を、透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope:TEM)による観察、及び動的光散乱法(Dynamic Light Scattering:DLS)により行う。以下に詳細を示す。

#### 透過型電子顕微鏡観察

作製した Ag/Si ナノ粒子を TEM(H-7000, HITACHI)で観察することで Ag コア径、Si ナノ結晶シェル膜厚およびナノ粒子の粒径分布等の構造評価を行った。透過型電子顕微鏡加速電圧は 100 kV、拡大倍率は 2-4 万倍とする。尚、結晶性を評価するための高分解 TEM(High Resolution TEM: HR-TEM)像、及び元素マッピング像(Scanning Transmission Electron Microscope Energy Dispersive X-ray Spectroscopy: STEM-EDS)に関しては、透過型電子顕微鏡(JEM-2100F, JEOL)を用いた。加速電圧は 200 kV とする。観察対象となるナノ粒子の試料は、銅メッシュにカーボン支持膜を担持した TEM 観察用支持膜(グリッドピッチ 100  $\mu\text{m}$ )上に溶液を 1 滴滴下することで作製した。

### 動的光散乱法

Ag/Si ナノ粒子の粒径分布を DLS(Zetasizer Nano ZS90, Malvern Instruments)により測定した。レーザーの波長は 644 nm(HeNe)、出力は 4 mW を用いた。観察する試料は散乱強度を確認しながら、適宜水で希釈した。同様に、散乱強度を確認しながら適宜積算回数を決定した。セルには、小容量に対応したディスポセルを用いた。測定した検出信号から粒子の拡散速度に対応する自己相関関数を求め、拡散係数と粒径の関係を表す式(Stoke-Einstein の式)から粒径、及びその分布情報を算出した。

### 5.2.3 安定性評価方法

本研究では、Si シェルによる銀ナノ粒子の安定性向上を実証するため、Ag/Si ナノ粒子の安定性評価を水溶媒中、及び Ag フィルム形成前後で行った。尚、安定性評価を行う際には比較対象として、直径 40 nm のクエン酸保護銀ナノ粒子(Sigma Aldrich)を用いた。安定性の指標として、透過スペクトルを測定することでえられる Ag ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴によるピーク形状変化を用いる。以下に、各々の評価方法に関して述べる。

#### 透過スペクトル測定

試料の透過率は透過型分光光度計(UV-3101PC, SHIMADZU)を用いて測定した。測定範囲は 300~800 nm とし、スリット幅は 3 nm、サンプリングピッチは 1 nm、スキャンニングスピードは中速(200 nm/min)に設定した。溶液試料の測定の際は、石英セルを使用し、リファレンスには水を用いた。フィルム状試料の測定の際には、カバーガラス(直径 12 mm)上のナノ粒子フィルムを用い、リファレンスとしてナノ粒子の存在しないカバーガラスを用いた。

#### 水溶媒中での安定性評価

Ag ナノ粒子、及び Ag/Si ナノ粒子溶液を図 5.2 に示す溶媒置換方法にて、水中に分散させる。水溶媒分散ナノ粒子をインキュベーター(FMU-0541, 福島工業(株))にて 37°C で 15 日間保存した。保存時は Ag ナノ粒子の光劣化を防ぐため、暗幕により光を遮断した。保存前後において透過スペクトルを測定し、比較することで水溶媒中での安定性を評価した。

#### フィルム状態での安定性評価

図 5.3 にフィルムの形成方法を示す。エタノールで洗浄したカバーガラス上に水溶媒分散 Ag ナノ粒子コロイド、及びメタノール溶媒分散 Ag/Si ナノ粒子をドロップコートする。その際、フィルム上から溢れてこぼれ出ることを防ぐため、合計 40  $\mu$ L のコロイドを 4 回に分けてドロップコートする。その後、空気中で 1 時間、デンケータ

一中で2時間乾燥させることで、溶媒を完全に揮発させ、フィルムを形成する。フィルム形成前(コロイド溶液)および形成後(フィルム)に関して透過スペクトルを測定し、比較することでフィルム形成過程における安定性を評価した。

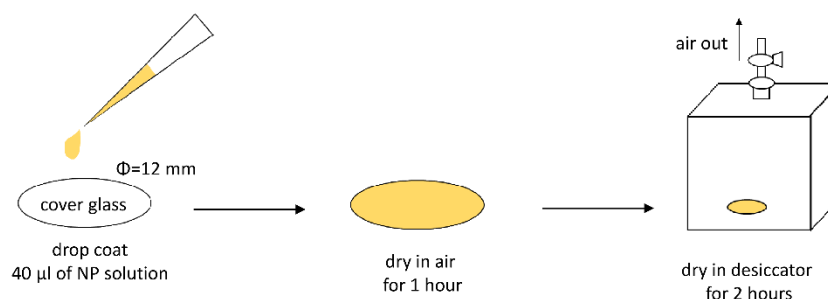


図 5.3 ナノ粒子が分散したコロイド溶液をカバーガラス上にドロップコートする。大気中で1時間、デシケーター中で2時間保管し、溶媒を完全に乾燥させ、フィルムを作製する。

#### 5.2.4 抗菌作用評価方法

作製した Ag/Si ナノ粒子のコロイド溶液、および Ag/Si ナノ粒子により作製されたフィルムに関して、大腸菌(*Escherichia coli*: *E.coli*)に対しての抗菌力評価を行った。まず、大腸菌培養手順に関して述べた後、抗菌力評価の詳細な実験手法を示す。

##### 大腸菌の菌数計数法

溶液中に存在する細菌の菌数は、波長 600 nm での溶液の光学密度(Optical Density: OD)を濁度の指標とし、求める。OD は Absorbance Plate Reader (Spectramax 340Pc384, Molecular Devices)を使用し、測定した。濁度と細菌数には比例関係があり、菌液の生菌濃度数を濁度から推定するこの手法のことを、マクファーランド比濁法(McFarland standards)という。今回実験で使用する大腸菌の場合は OD0.1 は、 $10^8$  CFU/mL に対応する。尚、CFU はコロニー形成単位(Colony Forming Unit: CFU)を意味し、ある量の微生物(本研究においては大腸菌)を、それが発育する固体培地上にて培養した際に生じるコロニーの数を意味し、微生物中に含まれる増殖可能な微生物細胞数を示す。

##### 大腸菌の培養方法

大腸菌を含む細菌類は、培養開始時間に対する菌数として、図 5.4 に示す増殖曲線を有することが知られている<sup>179</sup>。細菌の増殖曲線は(1)誘導期(Lag Phase)、(2)対

数期(Exponential phase)、(3)静止期(Stationary phase)及び(4)死滅期(Death phase)により構成される。誘導期において細菌は、培養開始直後は分裂による増殖は行わず、主に細胞の修復や酵素体制の整備などを行っており、この時期の最近は非常に外界の環境に対して敏感である。対数期に入ると細菌は分裂による増殖を開始し、世代時間(1回の分裂に要する時間)に対して指数関数的に増加するため、爆発的に菌数が増加する。溶液中での抗菌能を評価する際、“誘導期の時間を如何に長くし、対数期に移行させないか”が重要となる。その後、分裂による増殖と、細菌の死滅が平衡に達し、生菌数が一定となる静止期に移行する。更に時間が経過すると生菌数も減少し、分裂が完全に停止する死滅期となる。

通常、細菌類は培養後時間が経過すると溶液中の養分を使い果たし、細菌が死滅する死滅期に入るため、抗菌能評価などを行う際は、必ず実験毎に大腸菌を再び培養し、生菌数がある程度保たれた状態で実験を行う必要がある。大腸菌を培養した際は培養後1週間以内であれば冷蔵庫での保存を行い、1週間以上使用しない場合は、遠心分離機で濃縮し、ペレット状にした状態で冷凍庫にて保管する必要がある。各抗菌力評価を行う際には、その前日に大腸菌を培養し、増殖可能な細菌数を増やした状態で実験を行う。本研究ではペレット状にした大腸菌を数  $\mu\text{L}$  をピペットで測り取り、10 mL の LB 溶液(LB Broth, TEKnova)中にピペットチップごと入れて、18-24 時間、 $37^{\circ}\text{C}$ でインキュベーターにて培養した(LB 溶液とは、大腸菌培養に一般的に用いられる液体培地である)。尚、培養する際にはチューブの蓋を細菌に空気が入る程度にゆるく締め、シェイカーを使って攪拌した。培養した大腸菌溶液は OD を計測することで細菌数を計測し、実験条件に応じて希釈して使用した。

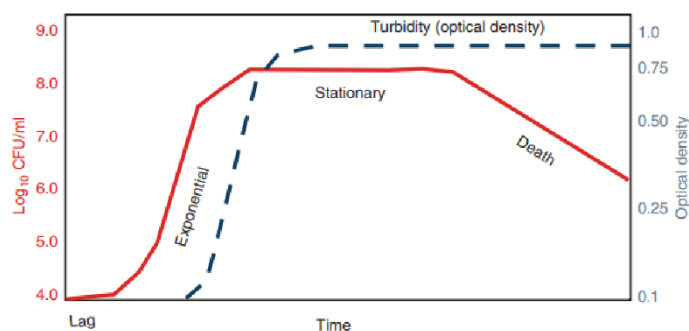


図 5.4 細菌の増殖曲線(赤実線)。横軸に培養時間、縦軸に菌数を示している。細菌の増殖過程は以下の4段階に分かれている。(1)誘導期(Lag phase), (2)対数期(Exponential phase), (3)静止期(Stationary phase), (4)死滅期(Death phase)<sup>179</sup>。各段階における、ODの値は青点線で示している。

### 溶液中での抗菌力評価

作製した Ag/Si ナノ粒子の抗菌力を、LB 溶液中の大腸菌と一定時間培養することで評価した。尚、比較対象としてはナノ粒子が存在しない大腸菌の菌液、Si ナノ結晶のみを有する菌液及びクエン酸保護 Ag ナノ粒子のみを有する菌液を用いた。以下に詳しい評価プロセスを示す。

1. 前日から培養した大腸菌の菌液の菌数を測定、最終的に  $10^6$  CFU/mL となるように、LB 溶液で希釈し、濃度調整を行う。
2. Ag ナノ粒子、及び Ag/Si ナノ粒子は図 6.2 に示す溶媒置換プロセスを用いて、LB 溶液に分散させる。
3. 1.で濃度調整した大腸菌の菌液 900 mL と 2.で濃度調整したナノ粒子のコロイド溶液 100 mL を混ぜる。尚、比較対象となるナノ粒子が存在しない大腸菌の菌液では、LB 溶液 100 mL を、Si ナノ結晶のみを有する菌液では LB 溶液分散の Si ナノ結晶溶液を混合した。LB 溶液分散 Si ナノ結晶は、フィルター(Amicon Ultra-0.5 mL 遠心式フィルター, Millipore)を用いて溶媒置換し、作製した。遠心分離は 13,000 rcf で 30 分で、2 回溶媒置換プロセスを行った。
4. 3.の菌液を 48 時間、 $37^{\circ}\text{C}$ にてシェイカーで攪拌しながら培養する。3.で溶液を混合した時間を 0 時間とし、2 時間おきに生菌数測定を行い、増殖曲線を得た。

### フィルム形状での抗菌力評価

ナノ粒子のフィルムの抗菌力を、フィルムを大腸菌とともに LB 寒天培地上で培養することで評価した。ペーパーディスクやフィルム状の抗菌剤を細菌とともに培地上で培養すると、抗菌剤が培地上に放射状に拡散することで、円形の細菌の発育が抑制される領域(Zone of Inhibition: ZoI)が形成される。この ZoI の面積から、抗菌剤の抗菌力を評価する方法は Disk Diffusion Test や Kirby-Bauer Test と呼ばれ、非常に一般的な手法である。本研究ではこの手法により、フィルムの抗菌力評価を行った。以下に詳細な手順を示す。尚、比較対象として、クエン酸保護された Ag ナノ粒子、および Si ナノ結晶を用いたフィルムを用いる。

1. ナノ粒子のフィルムを図 5.3 に示す手順に従い、作製する。
2. 前日から培養した大腸菌の菌液の菌数を測定、最終的に  $10^5$  CFU/mL となるように、LB 溶液で希釈し、濃度調整を行う。
3. 2.で調整した菌液 100  $\mu\text{L}$  を LB 培地(LB Agar Plates, TEKnova)に広げる。
4. 1.で作製したフィルムの表面を(3)の培地の表面に接するように配置し、インキュベーターで 24 時間培養する。
5. 培養後、ZoI の直径を測定し、抗菌力を評価する。

## 5.3 実験結果

### 5.3.1 構造評価

Si ナノ結晶シェルを有する Ag ナノ粒子(Ag/Si ナノ粒子)の抗菌作用を評価するにあたり、異なる Ag イオンを用いて Ag/Si ナノ粒子を作製することで、コアとなる Ag ナノ粒子の直径、及びシェルとなる Si ナノ結晶の層の膜厚の制御を試みた。

図 5.5(a)に、1.3 mM の Ag イオンを用いて作製した Ag/Si ナノ粒子の TEM 像を示す。中心のコントラストが高い部分が Ag ナノ粒子、その周囲のコントラストが低い部分が、Si ナノ結晶によるシェルである。Ag ナノ粒子が、分厚い Si ナノ結晶によるシェルで被覆されていることが分かる。図 5.5(b)に、40 個の Ag/Si ナノ粒子に対して得られたコアとなる Ag ナノ粒子の直径、Si ナノ結晶シェルの膜厚、及び Ag/Si ナノ粒子全体の直径の分布を示す。Ag ナノ粒子の直径は 18.7 nm であり、Si ナノ結晶シェルの膜厚は 20.4 nm であることがわかる。Si ナノ結晶の直径が約 3 nm であることから、層数が 7 層程度の Si ナノ結晶のシェルが形成されたことがわかる。以上の結果から想定される、Ag/Si ナノ粒子の構造の模式図を図 5.5(c)に示す。Ag ナノ粒子がコアとなり、その周囲を数層の Si ナノ結晶のシェルで被覆されている構造となる。

図 5.6(a) に、4.0 mM の Ag イオンを用いて作製した Ag/Si ナノ粒子の TEM 像を示す。中心のコントラストが高い部分が Ag ナノ粒子、その周囲のコントラストが低い部分が、Si ナノ結晶によるシェルである。Ag ナノ粒子が、分厚い Si ナノ結晶によるシェルで被覆されていることが分かる。図 5.6(b)に、40 個の Ag/Si ナノ粒子に対して得られたコアとなる Ag ナノ粒子の直径、Si ナノ結晶シェルの膜厚、及び Ag/Si ナノ粒子全体の直径の分布を示す。Ag ナノ粒子の直径は 26.4 nm であり、Si ナノ結晶シェルの膜厚は 9.4 nm であることがわかる。Si ナノ結晶の直径が約 3 nm であることから、層数が 3 層程度の Si ナノ結晶のシェルが形成されたことがわかる。以上の結果から想定される、Ag/Si ナノ粒子の構造の模式図を図 5.6(c)に示す。Ag ナノ粒子がコアとなり、その周囲を Si ナノ結晶のシェルで被覆されている構造となる。Ag イオン濃度が 1.3 mM の場合と比較すると、Si ナノ結晶によるシェルの膜厚は薄くなっている。これらの結果より、Ag ナノ粒子の前駆体となる Ag イオン濃度によって Ag/Si ナノ粒子の構造、つまり Ag ナノ粒子径及び Si ナノ結晶シェル膜厚が制御できることがわかった。

図 5.7 に、Ag イオン濃度を 6.7 mM に増加させて作製した Ag/Si ナノ粒子の複合体の TEM 像を示す。直径が 10 nm 程度の小さいナノ粒子と、直径が 100 nm 程度の大きなナノ粒子が存在することから、非常にサイズ分布の大きい Ag/Si ナノ粒子のコロイド溶液が作製されたことが分かる。

図 5.8 に、DLS により測定された、異なる Ag イオン濃度(1.3, 4.0, 6.7 mM)を用いた Ag/Si ナノ粒子のサイズ分布を示す。Ag イオン濃度の増加に伴い、平均粒径とサイズ分布の半値幅が増大していることがわかる。これは、表面の保護の役割を果たす Si ナノ

結晶の濃度が一定であるのに対して、Ag イオン濃度が増大し、Si ナノ結晶の濃度が相対的に減少したことが原因で、コアとなる Ag ナノ粒子の成長が促進されたと考えられる。Ag イオン濃度が 1.3 mM、及び 4.0 mM の場合、TEM で得られたサイズ分布と一致しているが、6.7 mM の場合は一致していないことが分かる。これは、6.7 mM の場合は、溶液中の直径が 10 nm 程度のナノ粒子が凝集し、50 nm 前後の凝集体を作ったことが原因として考えられる。

図 5.9 に、透過率スペクトル測定から得られた、異なる Ag イオン濃度(1.3, 4.0, 6.7 mM)を用いた Ag/Si ナノ粒子の消光スペクトルを示す。Ag ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴に起因するピークが、400 nm 付近に見られた。Ag イオン濃度の増加に伴い、スペクトルの半値幅はブロードになっていることが分かる。これは、図 5.8 で得られたサイズ分布を反映している。特に、6.7 mM の Ag イオンを用いたサンプルでは、スペクトルは非常にブロードになっており、500 nm 以上においても消光係数が大きな値をとっている。これは、溶液中の凝集物の散乱によるものと考えられる。また、ピーク位置が、1.3 mM 及び 4.0 mM のものと大差がないことを考慮すると、図 5.7 でみられた多数の小さな粒子がプラズモンのピーク位置を決定していると考えられる。

今回の研究の目的は、構造制御性の高い Ag/Si ナノ粒子を作製し、その構造と抗菌力を比較することが目的であるため、Ag イオン濃度として、1.3 mM 及び 4.0 mM を採用する。



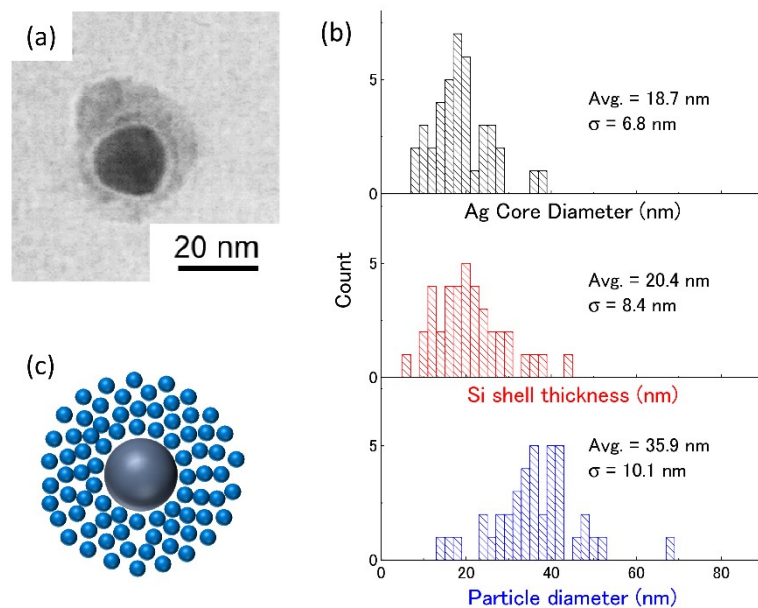


図 5.5 (a)1.3 mM の  $\text{Ag}^+$  を用いて作製した Ag/Si ナノ粒子の TEM 像と、(b)Ag ナノ粒子の直径、Si ナノ結晶シェルの膜厚及び粒子の直径のヒストグラム(N=40)。(c)Ag/Si ナノ粒子の模式図。

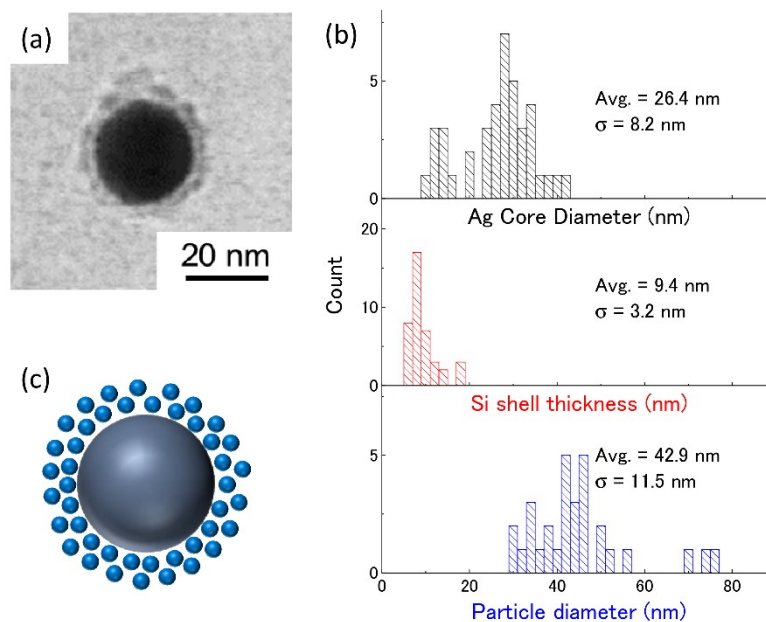


図 5.6 (a)4.0 mM の  $\text{Ag}^+$  を用いて作製した Ag/Si ナノ粒子の TEM 像と、(b)Ag ナノ粒子の直径、Si ナノ結晶シェルの膜厚及び粒子の直径のヒストグラム(N=40)。(c)Ag/Si ナノ粒子の模式図。

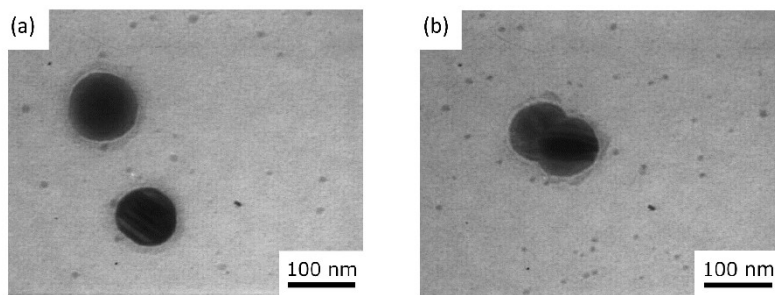


図 5.7 (a,b)6.7 mM の Ag<sup>+</sup>を用いて作製した Ag/Si ナノ粒子の TEM 像。

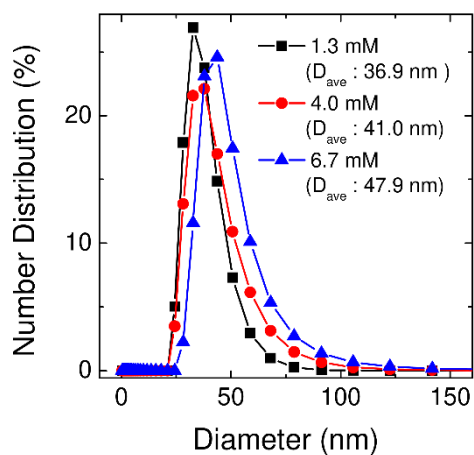


図 5.8 異なる Ag<sup>+</sup>濃度(1.3, 4.0, 6.7 mM)を用いて作製された Ag/Si ナノ粒子の粒度分布。動的光散乱法により測定した。

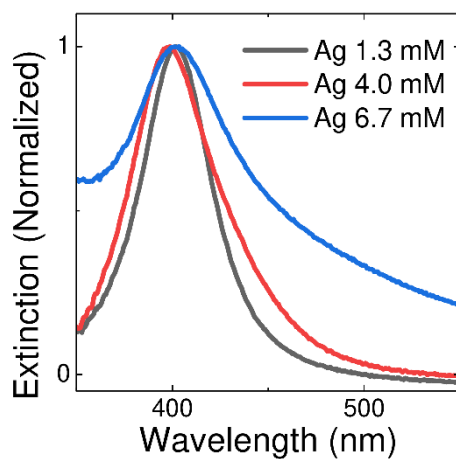


図 5.9 異なる Ag<sup>+</sup>濃度(1.3, 4.0, 6.7 mM)を用いて作製された Ag/Si ナノ粒子の消光スペクトル。

### 5.3.2 構造安定性評価

Si ナノ結晶によるシェルで Ag ナノ粒子を被覆した理由の一つとして、安定性の向上が挙げられる。特にクエン酸保護された Ag ナノ粒子は高い感光性を有し、水中保存下において凝集に起因する安定性の低下が課題である。そこで本研究では、クエン酸保護された Ag ナノ粒子を比較対象として、Si ナノ結晶シェルを有する Ag ナノ粒子の安定性を、水中及び大気中において評価した。尚、安定性の指標として、透過率スペクトル測定から得られる消光スペクトルを用いる。

図 5.10(a)にクエン酸保護された Ag ナノ粒子の水中で保存前(黒線)、及び 15 日間保存後(赤線)の消光スペクトルを示す。局在表面プラズモン共鳴による 400 nm のピークはブロードになり、凝集に起因するピークが 500 nm 付近に表れている。このことは、水中で保存することにより、溶液中で Ag ナノ粒子が凝集したことを示している。この傾向は、Ag ナノ粒子のフィルムを作製し、大気中で乾燥させた場合により顕著に表れる(図 5.10(a)青線)。右側に示す溶液、及びフィルムの写真からも明らかのように、局在表面プラズモン共鳴に起因する 400 nm のピークは消失、長波長側の消光が増大している。これは、Ag ナノ粒子が凝集・酸化されたことが原因である。Ag ナノ粒子による抗菌フィルムでは、効率よくフィルムから Ag イオンを放出することが必要不可欠となるが、ナノ粒子の凝集は、Ag イオンの放出レートの減少につながると考えられるため、好ましくない。

図 5.10(b)に、Ag/Si ナノ粒子の水中で保存前(黒線)、及び 15 日間保存後(赤線)の消光スペクトルを示す。局在表面プラズモン共鳴による 400 nm のピークに変化はなく、長波長領域においても変化がないことが分かる。これはクエン酸保護された Ag ナノ粒子と対照的に、水中で凝集が起こらず、安定して存在していることによる。クエン酸保護された Ag ナノ粒子と最も対照的な結果が得られたのは、ナノ粒子のフィルムを作製した場合である。図 5.10(b)の青線にフィルムを大気中で作製した場合の消光スペクトルを示す。ナノ粒子周辺の誘電率変化に起因する、ピークのわずかな長波長シフトは見られたが、スペクトル形状に大きな変化はない。また写真からも、プラズモン共鳴による黄色が保持されたフィルムの形成がみられ、大気中においても凝集や酸化といった安定性の低下につながる現象が起きていないことがわかった。これは Ag ナノ粒子の周囲を、Si ナノ結晶のシェルで被覆することにより、安定性が向上したことを示しており、Ag ナノ粒子をベースとしたナノ材料の抗菌剤応用において非常に重要な特性となる。

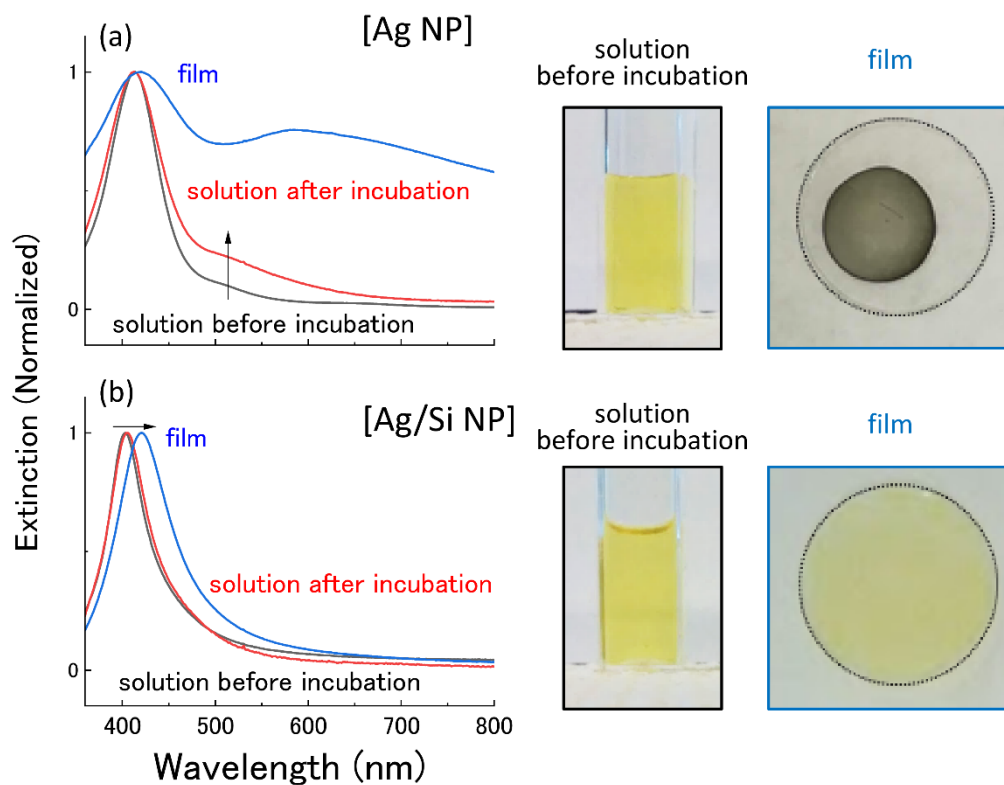


図 5.10 (a)クエン酸保護された Ag ナノ粒子(Ag NP)、及び(b)Si ナノ結晶シェル を有する Ag ナノ粒子(Ag/Si NP)の消光スペクトル。黒色の線は比較対象となる水中分散したナノ粒子のコロイド溶液(右図黒枠の写真(左))、赤色の線は 15 日間 37°Cで保管後、青色はフィルムを形成後(右図青枠の写真(右))の消光スペクトルを示している。

### 5.3.3 溶液中での抗菌作用

Si ナノ結晶シェルが Ag ナノ粒子を被覆することにより、抗菌作用の要となる Ag ナノ粒子からの Ag イオンの放出に影響を与えているかを評価するため、溶液中で大腸菌と共に 48 時間培養し、増殖曲線を測定した。図 5.11(a)に、大腸菌のみ(黒)、比較対象となるクエン酸保護された、濃度が 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の Ag ナノ粒子を加えた大腸菌(赤)、Si ナノ結晶シェルを有する濃度が 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の Ag ナノ粒子(緑)、及び Si ナノ結晶シェルを有する濃度が 14  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の Ag ナノ粒子(青)の増殖曲線を示す。Ag 濃度は 1.3 mM で作製した。大腸菌のみのサンプルの増殖曲線から、培養開始 2 時間後から分裂が始まり、対数期に移行していることが分かる。対して、クエン酸保護された Ag ナノ粒子が入っている大腸菌のサンプルでは、対数期に移行するまでに約 8 時間要していることから、Ag イオンを溶液中に放出することによる抗菌作用があるといえる。同濃度の Ag を有する、Si シェルで被覆された Ag ナノ粒子においても、対数期に移行するまでに約 10 時間かかっており、クエン酸保護された Ag ナノ粒子と同程度の抗菌力を有しているといえる。このことから、Si シェルは Ag イオンの放出レートを保持しながら、Ag ナノ粒子の保護剤として寄与しているといえる。更に、Si シェルを有する Ag ナノ粒子の濃度を 14  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に増加することにより、大腸菌の発育、つまり対数期への移行を 48 時間にわたり防いでいることが分かる。同様の実験を、Ag イオン濃度を 1.3 mM から 4.0 mM に変更して作製したナノ粒子に関するデータを図 5.11 (b)に示す。1.3 mM のナノ粒子と同様に、低濃度(5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )においては対数期に移行するまでの時間が約 10 時間程度に増加し、濃度を 43  $\mu\text{g}/\text{mL}$  まで上げることにより、48 時間にわたり大腸菌の発育を抑制していることがわかる。このことから、Si ナノ結晶シェルの膜厚によらず、Ag イオンを放出することが可能であることが分かった。

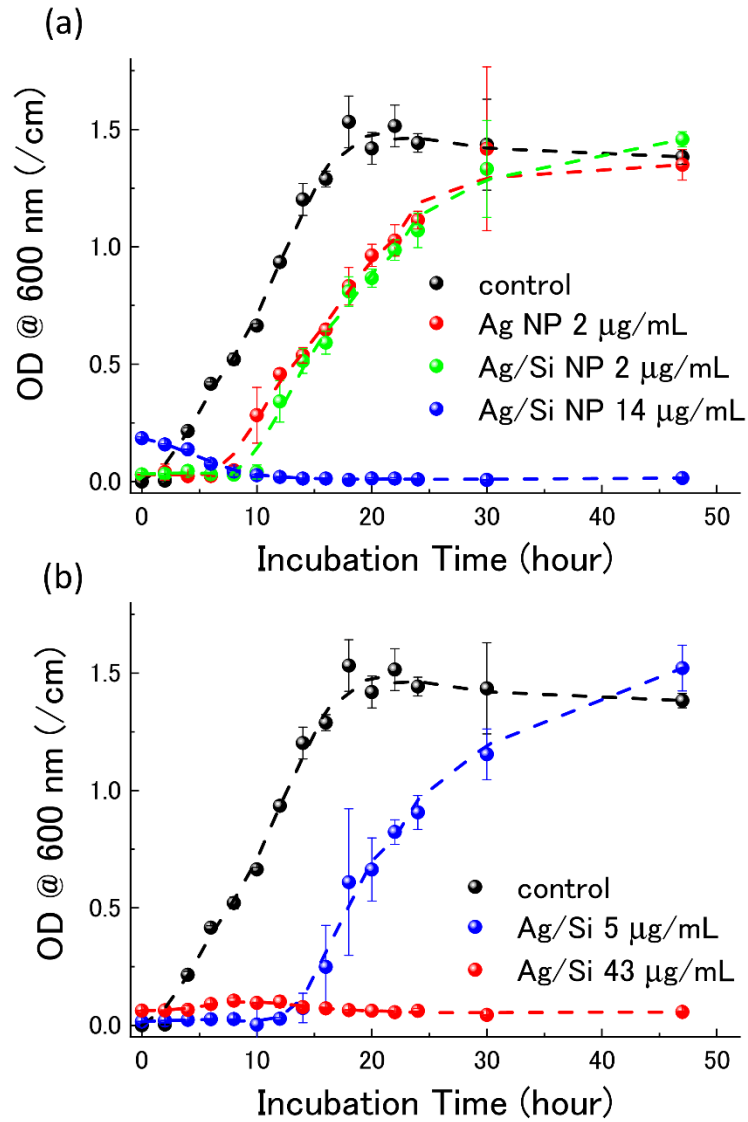


図 5.11 大腸菌の増殖曲線。大腸菌のみ(黒色)、クエン酸保護の Ag ナノ粒子(赤色)、Si ナノ結晶シェルを有する Ag ナノ粒子(緑色、青色)を有する場合を示す。Si ナノ結晶シェルを有する Ag ナノ粒子は(a) 1.3 mM、及び(b) 4.0 mM の  $\text{Ag}^+$  を用いて作製した。

### 5.3.4 フィルムでの抗菌作用

これまでの結果から、Si ナノ結晶シェルは Ag イオンの放出レートに影響を与えず、大気中にてフィルムの形成が可能といった安定性向上のみに寄与することが分かった。次のステップとして、実際に作製されたナノ粒子のフィルムの抗菌剤としての応用に関しての評価を agar diffusion assay により行う。今回は、LB 寒天培地上に大腸菌を広げ、フィルム表面を寒天に接するように配置し 24 時間培養、細胞の発育が抑制された領域 (zone of inhibition: ZoI) の面積を測定することで、フィルムの抗菌力を定量評価した。尚、ZoI として、フィルムのエッジから細胞の発育が抑制された領域までの距離を測定した。

図 5.12(a)にクエン酸保護された Ag ナノ粒子で作製されたフィルムを用いて、LB 培地上で大腸菌を培養した結果を示す。カバーガラスのエッジ付近からコロニーが形成されていることから、フィルムには抗菌作用がないことが分かった。図 5.12(b)に、1.3 mM の Ag イオンを用いて作製された Si ナノ結晶シェルを有する Ag ナノ粒子のフィルムを用いた結果を示す。カバーガラスから 2.3 mm 離れた領域において、大腸菌の発育が抑制されていることが分かる。その結果は、1.3 mM の Ag イオンを用いて作製された Si ナノ結晶シェルを有する Ag ナノ粒子のフィルムを用いた場合により顕著にみられる (図 5.13(c))。このことから、Si ナノ結晶シェルを有する Ag ナノ粒子のフィルムは、抗菌作用を有し、その抗菌作用はナノ粒子の構造(Si ナノ結晶シェル膜厚やナノ粒子の直径)に依存することが予想される。

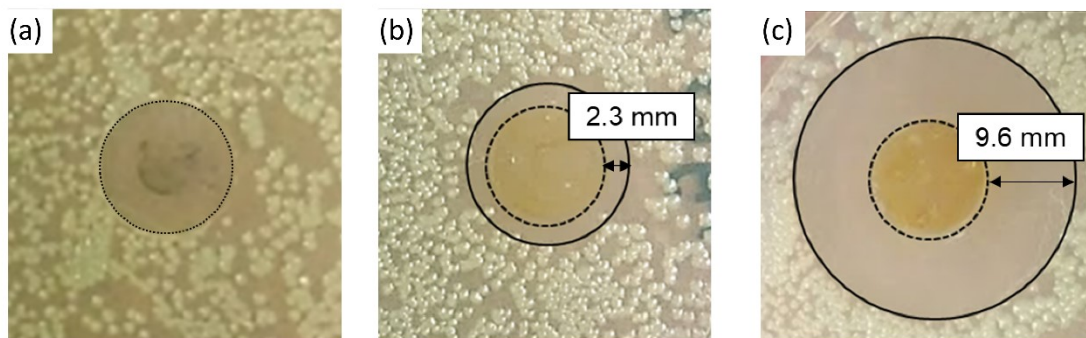


図 5.12 (a)クエン酸保護 Ag ナノ粒子、(b)1.3 mM、及び(c)4.0 mM の Ag イオンを用いて作製した Si ナノ結晶シェルを有する Ag ナノ粒子のフィルムを用いた、Agar Diffusion Assay 法による抗菌力評価。

## 5.4 考察

図 5.12 で得られた結果は、Si ナノ結晶によるシェルを有する Ag ナノ粒子により作製されたフィルムは大腸菌に対して抗菌力を有し、その抗菌力は Si ナノ結晶のシェルや全体の粒径に依存することが分かった。更に抗菌力と構造の関係を明らかにするため、抗菌面積の銀ナノ粒子の濃度依存に関しての実験を行った。図 5.13 に、滴下したナノ粒子の銀濃度を  $x$  軸に、縦軸に抗菌面積の指標としてカバーガラスのエッジからコロニーの抑制が行われた部分までの距離の関係を示す。Si ナノ結晶シェルを有する Ag ナノ粒子の抗菌作用とその構造の関係、つまり抗菌メカニズムを解明するため、absorptive diffusion model を用いて得られたデータを分析していく。今回、ナノ粒子がフィルムから拡散していくモデルを考え、拡散していく過程の間に培地との相互作用や、抗菌の失活といった減衰項も考慮に入れる。以下に用いたモデルの式を示す。

$$D \frac{\partial^2 c(x, t)}{\partial x^2} + V \frac{\partial c(x, t)}{\partial x} - \frac{\partial c(x, t)}{\partial t} = 0 \quad (2)$$

尚、 $c(x, t)$  は、位置  $x$  における時間  $t$  での抗菌剤の濃度を、 $D$  は拡散係数(diffusion coefficient)を、 $V$  は減衰係数(coefficient characterizing the dissipation rate)を表す。

(1)式を、変数分離により解くことで、以下の式が得られる。

$$\ln(MIC) = \ln(c) - \frac{V \pm \sqrt{V^2 - 4D}}{2D} x \quad (3)$$

式(2)を得るにあたり、銀ナノ粒子の初期濃度( $c$ )、及び抗菌面積( $x$ )を初期条件として用いた。図 5.13 で得られた実験結果を、 $MIC$ 、 $V$ 及び $D$ をフィッティングパラメーターとしてフィッティングを行った。ここで  $MIC$  は、細菌の発育を抑制可能な最小濃度を示す。(1)式、及び(2)式で仮定する、ナノ粒子が拡散し、抗菌力を発揮する抗菌メカニズムにおいては、より小さな  $MIC$ 、つまりナノ粒子自体の強い抗菌作用、大きな拡散係数  $D$  と小さな減衰係数  $V$ 、つまりより遠くまで拡散できる拡散条件が望ましい。



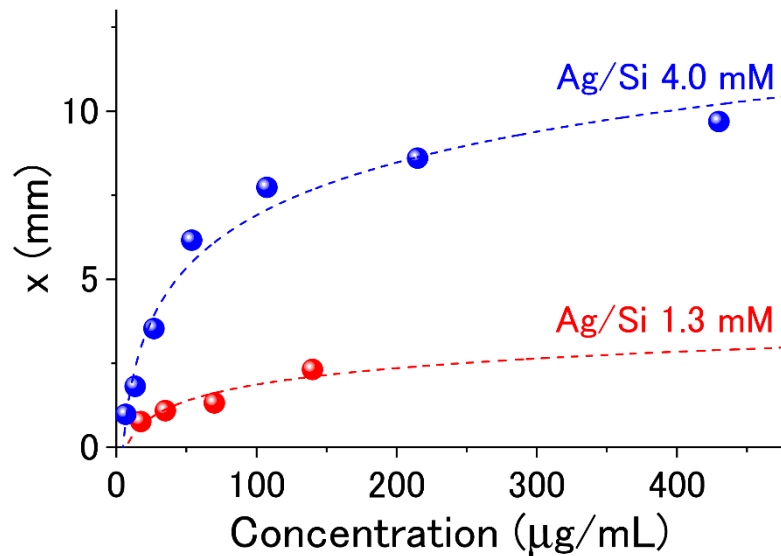


図 5.13 大腸菌の発育が抑制された面積の、Ag/Si ナノ結晶濃度依存。Ag<sup>+</sup>濃度はそれぞれ、1.3 mM(赤色)と 4.0 mM(青色)を用いた。

表 5.1 Ag/Si ナノ結晶フィルムの抗菌面積のナノ粒子の濃度依存から得られたフィッティングパラメーターの値。

Ag ion (mM)	1.3	4.0
Diameter (nm)	36.9	41.0
MIC (μg/mL)	7.06	4.72
$D$ (m <sup>2</sup> /s)	$6.82 \cdot 10^{-12}$	$3.45 \cdot 10^{-12}$
$V$ (m/s)	$3.09 \cdot 10^{-8}$	$1.95 \cdot 10^{-8}$
$R^2$	0.888	0.977
Viscosity (mPa*s)	0.91	1.59

得られた曲線を図 5.13 の点線として、パラメーターを表 5.1 に示す。フィッティングは回帰分析により行ったため、同時に決定係数( $R^2$ )も同時に示す。Ag イオン濃度が 1.3 mM では、決定係数は 0.88、Ag イオン濃度が 4.0 mM では、決定係数は 0.97 である。これらの決定係数は、1 に十分近いことから、このフィッティングの式と実験値は強い相関を有しているといえる<sup>180</sup>。

得られた MIC の値は、Ag イオン濃度が 1.3 mM の時は 7.1 μg/mL で、4.0 mM の時は 4.7 μg/mL であった。つまり、より薄い Si ナノ結晶シェルを有する構造となる Ag イオ

ン濃度が 4.0 mM の条件で作製されたナノ粒子の抗菌作用が、分厚い Si ナノ結晶シェルを有する構造となる Ag イオン濃度が 1.3 mM の条件で作製されたナノ粒子の抗菌作用より強いことがわかった。これは、より薄い Si ナノ結晶シェルのほうが、効率的に Ag イオンが徐放されたことが原因として考えられる。

次に、得られた拡散係数(D)を用いて、拡散メカニズムを解明する。拡散係数は、以下の式で与えられる。

$$D = \frac{RT}{6\pi\eta N_A r} \quad (4)$$

ここで、 $R$ は気体定数、 $\eta$ は溶媒の粘度、 $N_A$ はアボガドロ定数、 $r$ は拡散物質の大きさである。今回、 $D$ として、表 5.1 の値を用い、 $r$ として DLS により測定した値を用いると、式(3)における未知数である溶媒の粘度( $\eta$ )を求めることが可能である。求められた粘度( $\eta$ )を表 5.1 に示す。Ag イオン濃度が 1.3 mM では 0.91 mPa、Ag イオン濃度が 4.0 mM では 1.59 mPa となった。これらの値は、水の粘度(~ 1.00 mPa)に非常に近いことから今回の実験では、ナノ粒子は寒天培地中ではなく、寒天培地上の結露した水の部分を拡散しているモデルが考えられる(図 5.14)。

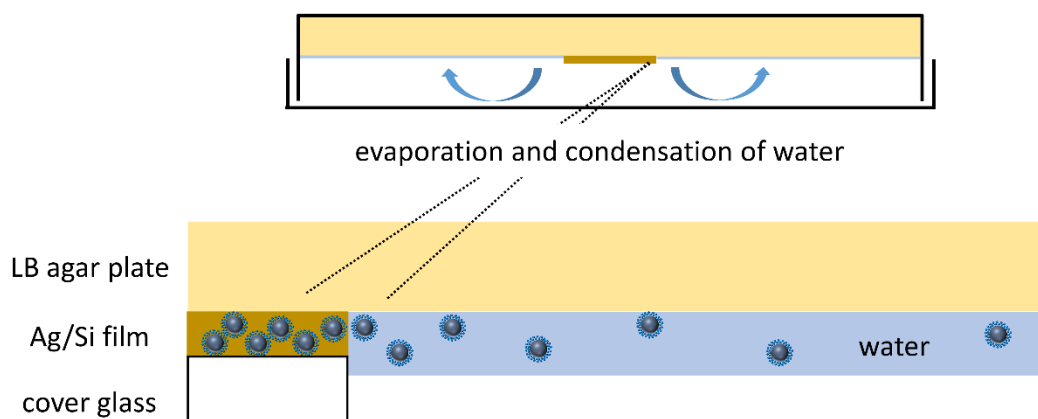


図 5.14

Ag/Si ナノ粒子により作製されたフィルムの抗菌メカニズム。ナノ粒子がアガー上に結露した水中を拡散し、Ag イオンを放出することで抗菌力を保持していると考えられる。

## 5.5 まとめ

本章では、金属ナノ構造の一種である銀ナノ粒子を Si ナノ結晶で被覆し安定性を向上、作製した Si ナノ結晶シェルで被覆した Ag ナノ粒子の抗菌剤としての応用を実証した。Si ナノ結晶シェルにより安定性が向上した結果、大気中に取り出しても凝集が生じないため、作製した複合ナノ粒子溶液をドロップコートすることにより、Ag ナノ粒子をベースとした抗菌フィルムが作製可能になった。作製したフィルムに関して抗菌力評価を行った結果、大腸菌に対して優れた抗菌作用を有することが分かった。抗菌メカニズムを解析したところ、フィルム中のナノ粒子が、アガー上に結露した水溶媒中を拡散することにより抗菌力を発揮することが明らかになった。

本研究で明らかになった Si ナノ結晶で被覆された Ag ナノ粒子の、高安定性かつ高効率な抗菌作用により、半導体ナノ構造と金属ナノ粒子の複合体の新たなバイオ応用につながったと考えられる。

## 第6章 Siナノ粒子による時間分解発 光イメージング

### 6.1 はじめに

バイオイメージングは、生きたままの生体内における生体分子や薬剤、がん細胞や幹細胞などの分布や局在、挙動といった情報を様々な手法で可視化・画像化する技術のことをであり<sup>23</sup>、イメージング手法には主に核種イメージングや磁気共鳴イメージング(MRI)、発光イメージングがある。中でも、発光イメージングは装置コストが低く、細胞の損傷及び毒性が少なく、蛍光体にプローブをつけることにより特定の部位のみを検出可能な特異性を有するといった特徴を有することから、注目を集めている。発光を用いるバイオイメージングにおける高感度化・高分解能化において非常に重要となるのは、生体からの発光、つまり自家蛍光を如何にして抑制するかという点にある。発光体を含む生体に励起光を照射すると、発光体からの発光だけではなく、300–600 nmの波長領域においてブロードに生体内分子が発光することが知られている<sup>29</sup>。このバックグラウンドの信号により、発光体の発光が相対的に小さくなることで、S/N比が悪くなるという問題があった。この課題の解決のためには、生体からの発光の発光波長や発光寿命(10ナノ秒以下)と異なる発光波長(600 nm以上)を有する蛍光体を用いて、波長及び寿命で生体の自家蛍光との分離を図ればよい。中でも、自家蛍光よりも十分に発光寿命の長い蛍光体を用いて、励起時間と発光時間に遅延を設けることで自家蛍光を抑制する、時間分解バイオイメージングはバイオイメージングの高感度化に期待されている<sup>181–187</sup>。時間分解バイオイメージングで主に用いられている蛍光体としては、量子ドットや希土類イオンが挙げられる。中でも、Siナノ結晶は間接遷移型半導体であるバルクSiのエネルギーバンド構造を継承していることにより、発光寿命が数十マイクロ秒と生体の自家蛍光に比べて $10^4$ 倍ほど長いこと、可視~近赤外領域において発光を示すこと、生体・環境親和性が高いことから、時間分解バイオイメージングでの蛍光体として注目を集めている<sup>181,182,187</sup>。

発光材料としてのSiナノ結晶の研究は、1990年にL.T.CanhamのポーラスSiからの発光の報告を皮切りに、研究が精力的に進められ、その結果、化合物半導体量子ドットにひけをとらない高品質なSiナノ結晶が作製可能になった。中でも、水溶媒分散性を示すSiナノ結晶は、生体内発光材料としての応用が期待されている。水分散性Siナノ結晶の構造は大きく以下の3つに分けることができる。まず一つ目は、多孔質構造を有するポーラスSiナノ粒子である。ポーラスSiの発光起源は、部分的にSiのポーア半径(~5 nm程度)以下のサイズの結晶性Siが作製過程で形成され、その部分が量子サイズ効

果により発光を示していると考えられている。二つ目は、ホウ素(B)とリン(P)をドーピングした Si ナノ結晶である。ナノ結晶表面に、高濃度の不純物層が形成されることにより、表面が負に帯電(ゼータ電位:  $-40\text{ mV}$  程度)し、水中で溶媒分散性を保持している。また、試料作製条件(アニーリング温度)を変化させ粒径を制御することで、可視～近赤外領域で発光波長を制御することができる。三つ目は、直径が数ナノメートルの結晶性 Si の微小球である Si ナノ結晶(Si 量子ドット)である。通常、試料作製直後は表面は水素終端されている。この表面を有機分子(polyethyleneglycol)で置換することにより、Si ナノ結晶の水への溶解を防ぎ、同時に水溶媒分散性を付与している。

上述の様に、Si ナノ結晶は長寿命発光、可視～近赤外発光を有するために時間分解バイオイメージングへの応用が期待されているが、その構造や特性を比較し、それらを時間分解バイオイメージングへ応用し、構造や特性が与える影響に関して報告した例は過去にない。そこで本研究では、図 6.1 に示す異なる 3 種類の Si ナノ結晶(ポーラス Si、ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶、有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶)にかんして構造・光学特性評価を行い、実際に時間分解バイオイメージングへ応用し、性能を評価する。

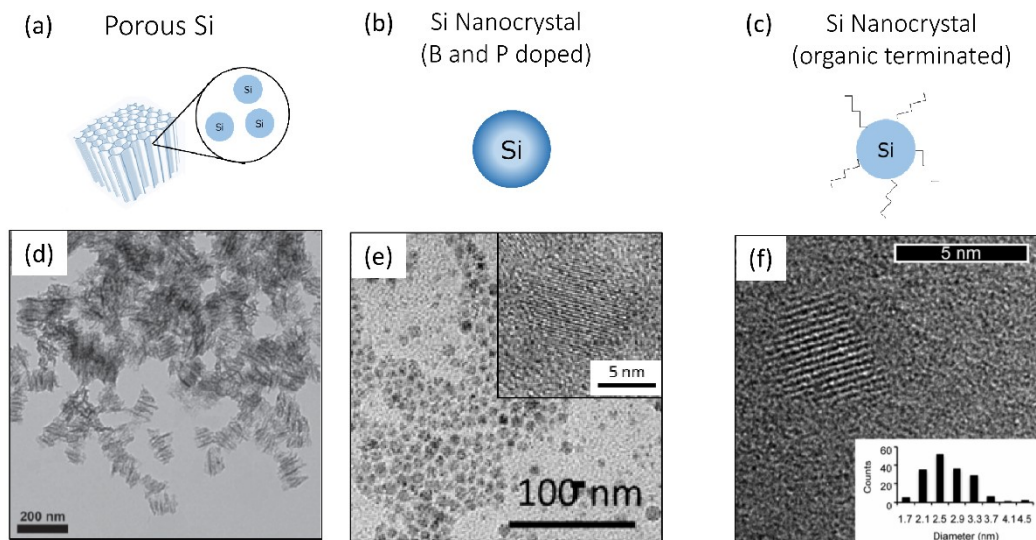


図 6.1 異なる構造を有する 3 種類の Si ナノ粒子。(a,d)ポーラス Si ナノ粒子、(b,e)ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶、(c,f)有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶の模式図、及び TEM 像。

## 6.2 実験方法

### 6.2.1 試料作製方法

本章では、異なる構造を有する3種類のSiナノ粒子に関して構造、光学特性評価を行い、時間分解イメージングへ応用し、異なる構造及び光学特性が時間分解イメージングへ与える影響に関して議論する。3種類の異なる構造として、多孔質SiであるポーラスSiナノ粒子、BとPを同時にドーピングし作製したSiナノ結晶、及び有機分子で表面修飾したSiナノ結晶を用いる。以下に、各構造の作製方法に関して簡潔にまとめる。

#### ポーラスSiナノ粒子

ポーラスSiは、Siウェファをフッ化水素酸中で陽極酸化することによって作製可能である。本章で用いるポーラスSiナノ粒子の作製方法を図6.2(a)に示す。以下に作製手順を示す。また、ポーラスSiナノ粒子作製に関する各プロセスの条件の最適化や、ドラッグデリバリー、バイオイメージング応用などに関する詳細情報は、Michael J. Sailor 教授のグループの論文に詳しく記載されている<sup>188-191</sup>。また、今回実験に用いたポーラスSiナノ粒子は、Michael J. Sailor 教授のグループの博士課程の学生である Geoff Hollet が作製を行った。

#### 1. 陽極酸化プロセス

p<sup>+</sup>タイプの単結晶Siウェファを体積比3:1のフッ酸(48% in water)とエタノールの混合溶液を用いて、陽極酸化を行い作製した。エッチングに用いた電流として、50 mA/cm<sup>2</sup>の電流を1.8秒間印加し、そのあと400 mA/cm<sup>2</sup>の電流を0.36秒印加する電流波形を用いた。この電流波形を合計で140サイクル繰り返し、高い空孔率を有する層と低い空孔率を有する層をもつポーラスSiを作製した。異なる2つの空孔率を有するポーラスSiを作製することにより、後の超音波洗浄におけるプロセスで、空孔率の高い領域でポーラスSiが砕かれ、ポーラスSiナノ粒子が形成される。

#### 2. リフトオフ

作製したポーラスSi基板を体積比1:29のフッ酸(48% in water)とエタノールの混合溶液を用いてリフトオフする。3.7 mA/cm<sup>2</sup>の電流を250秒間印加すると、ポーラスSiの層がSi基板から剥離され、回収される。

#### 3. 超音波洗浄によるナノ粒子の作製

リフトオフし得られたポーラスSiを超音波洗浄機(50T, VWR International)を用いて、一晩超音波洗浄にかける。このプロセスにより、1で作製された高空孔領域(高電流が印加された層)が破壊され、ナノ粒子が作製される。

#### 4. 酸化プロセス

作製されたポーラスSiナノ粒子をホウ砂溶液(borax, sodium tetraborate)中に分散させ、緩やかに表面酸化を行うことで、発光性ポーラスSiナノ粒子を作製する。この際、目

的とする発光強度及び発光波長になるまで酸化を進行させる。

#### ホウ素とリンを同時にドーブした Si ナノ結晶

ホウ素とリンを同時にドーブし、作製される Si ナノ結晶の作製プロセスの模式図を図 6.2(b)に示す。B、P、Si を RF スパッタリング装置により同時にスパッタリングすることで、borophosphosilicate glass(BPSG)を作製、窒素雰囲気中でアニーリングすることで、BPSG 膜中で Si ナノ結晶を結晶成長させる。そのあと、フッ酸を用いて SiO<sub>2</sub> 部分を除去し、溶媒を水に置換することで水分散のコロイド溶液が作製可能となる。詳しい作製プロセスは、第二章の試料作製方法に記載している。

#### 有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶

不純物をドーピングしない Si ナノ結晶は、hydrogen silsesquioxane (HSQ) (Dow Corning) をアニーリングすることで作製される。その後、テフロンビーカーに水、エタノール及びフッ酸の混合溶液を入れ、作製した Si ナノ結晶を含むマトリクスを混合溶液中に入れることでエッチングを行う。エッチングプロセス後、ナノ結晶はトルエン溶液中に分散させる。エッチング直後の Si ナノ結晶の表面は、Si-H で終端されているため、ヒドロシリル化反応により表面を修飾することが可能である。ヒドロシリル化反応により、表面を polyethylene glycol で修飾することで、水溶媒分散性を付与する。本章で使用した、有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶は、University of Alberta の Jonathan Veinot 教授のグループのポストドクである Muhammad Amirul Islam が作製した。詳しい作製方法は、参考文献中に記載されている<sup>11</sup>。

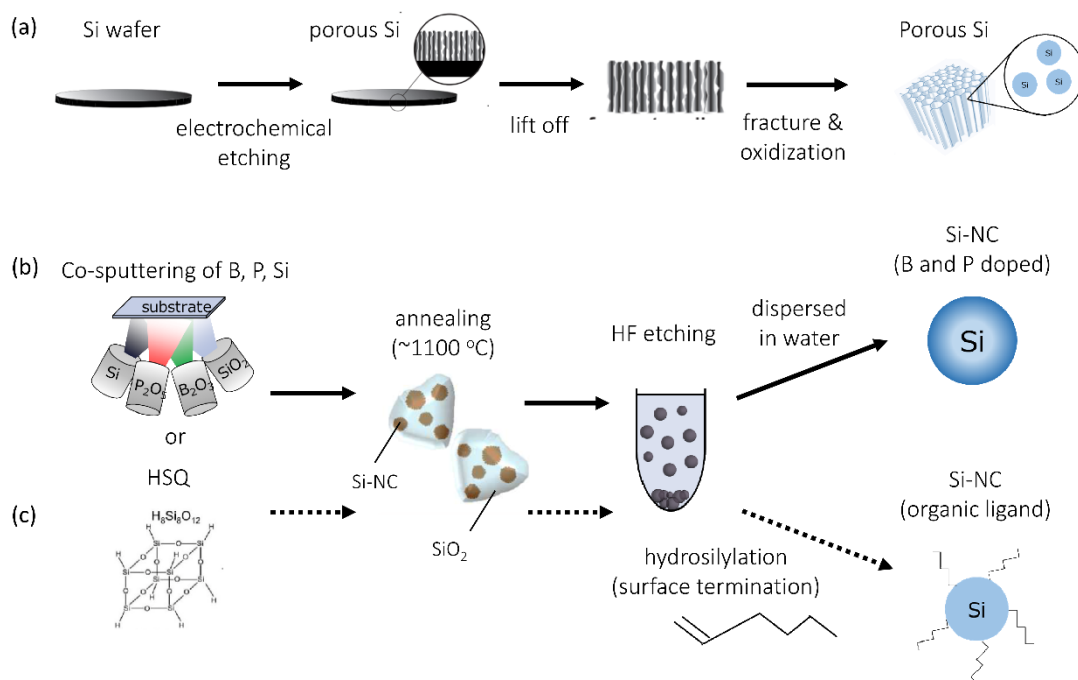


図 6.2 (a)ポラス Si ナノ粒子、(b)ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶、(c)有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶の作製方法の模式図。

## 6.2.2 構造評価方法

### 動的光散乱法

Si ナノ結晶の粒径評価は、動的光散乱法(dynamic light scattering: DLS)を用いて行った。DLS 測定装置(zetasizer nanoZS90; Malvern Panalytical)に、微小容量用ディスポセルをセットし、測定を行う。この際ディスポセル中には、十分量(100-200 $\mu$ L 程度)の溶液を入れる。測定温度は 25 $^{\circ}$ C に設定し、ディスポセルセット後から測定開始まで 2 分間温度を一定に保ってから測定を行った。積算回数やサンプル濃度などは、随時 scattering intensity や expert advice などを見ながら適宜決定した。測定終了後、散乱強度、体積比率及び粒子数比率の 3 つに関するデータを取得し、測定したサンプルに応じて、使用するデータの種類を決定した。

動的光散乱法により測定される粒子径は、粒子の実際の直径ではなく、アインシュタイン-ストークスの式を用いて計算される流体力学的径(hydrodynamic diameter)であることに注意する。

### ゼータ電位測定

Si ナノ結晶のゼータ電位は、ゼータ電位測定装置(zetasizer nanoZS90; Malvern Panalytical)を用いて行った。測定には、ゼータ電位測定用ディスポセルを用いた。測定



する溶液の体積は 1 mL 必要であるため、適宜溶液を希釈して実験を行った。この際、expert advice、散乱強度及び積算回数を確認しながら、溶液濃度を決定する。測定する際に、微小な泡などがセル中に入ると正しく測定できないため、泡が入らないように丁寧に溶液をディスポセル中に入れる。

#### 赤外吸収スペクトル測定

Si ナノ結晶の表面状態解析は、赤外吸収スペクトルを測定することで行った。測定には、ATR 法(Attenuated Total Reflection: 全反射測定法)を採用したフーリエ変換赤外分光光度計(Fourier Transform Infrared Spectrometer: FTIR)(Nicolet 6700 with Smart-iTR diamond ATR crystal)を用いた。尚、検出器は液体窒素で冷却した MCT-A 検出器を用いた。測定の積算回数は 64 回に設定し、バックグラウンドは大気中で測定することにより得た。測定するサンプルは、Si ナノ結晶コロイド溶液 2  $\mu$ L を 5 回、超音波洗浄した Si 基板にドロップコートし、デシケーターで 1 日乾かすことで完全に溶媒を揮発させ、作製した。

### 6.2.3 光学特性評価方法

#### 発光スペクトル測定

図 6.3 に発光スペクトル測定の概略図を示す。励起光源には波長 385 nm の LED(Ocean Optics)を用いた。レーザー光は、紫外から可視領域(300-800 nm)の波長領域で最も効率的に光を伝搬する光ファイバ(Premium-grade Optical Fiber Assemblies, Ocean Optics)を用いて、ディスポセル中の溶液サンプルに照射した。その後、サンプルからの発光は、可視から近赤外領域(400-2100 nm)の波長領域で最も効率的に光を伝搬する光ファイバ(Premium-grade Optical Fiber Assemblies, Ocean Optics)を用いて、伝搬させる。スリット直前には、550 nm のロングパスフィルターを設置し、励起光の散乱光を除去した。サンプルからの発光は、分光器で分光され、検出器を用いて測定される。本章の発光スペクトル測定では、分光器と検出器として Ocean Optics の QEPro を用いた。

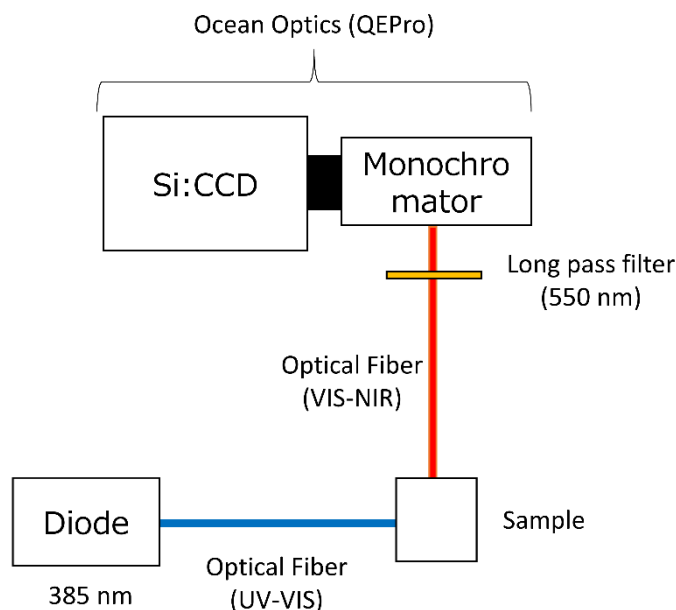


図 6.3 発光スペクトル測定系の概略図。

### 発光量子効率測定

Si ナノ結晶の発光量子効率測定は、相対法を用いて行った<sup>192-194</sup>。相対法では、発光量子効率は発光量子効率が既知である標準溶液との比較を行うことで、以下の式から求めることが可能である。

$$\Phi_x = \Phi_{st} \frac{F_x A_{st} n_x^2}{F_{st} F_x n_{st}^2}$$

ここで、 $\Phi$ は発光量子効率、 $F$ は発光強度の積分値、 $A$ は励起波長における吸光度、 $n$ は溶媒の屈折率を表し、添え字の $x$ は測定試料の溶液を、 $st$ は標準溶液を表す。ここで、屈折率の補正項である $\frac{n_x^2}{n_{st}^2}$ は、発光を点光源であると仮定し、それを非常に小さい立体角で検出した際にのみ成り立つ近似である。つまり、より正確に発光量子効率を求めたい場合は、測定試料の溶液と、標準溶液の溶媒を、同様の屈折率を有する同一の溶媒にすることが望ましい。

また、測定を行う際には、以下のことに注意する必要がある。①測定試料の溶液と、標準溶液の吸光度は可能な限り一致させ、励起波長や励起光強度、励起光照射時間などの測定条件を同一にして発光スペクトル測定を行う。②自己吸収効果、及び濃度消光の影響を避けるため、溶液の吸光度を 0.1 以下となるように濃度を調整する。③正確な発光スペクトル測定が、正確な発光量子効率測定につながるため、測定装置の分光感度補正を厳密に行う。具体的には、検出器の感度が波長に対して一定でない

ため、各検出波長において補正係数をかける必要がある。それに伴い、装置の分光感度補正に起因する誤差を最小限にするため、発光波長領域が測定試料になるべく近い標準溶液を選択する。また、その標準溶液は発光量子効率について信頼性の高い値を有するものを選定する。他の発光量子効率測定法としては、積分球を用いた絶対法が挙げられる<sup>195</sup>。

本研究では、発光量子収率の標準溶液として、ローダミン 6G(Rhodamin6G)を用いた。発光スペクトル測定には可視~近赤外 spectrofluorometer(Fluorolog-3, Horiba Jovin Yvon)を用いた。検出器は 500-850 nm の領域では PMT を、800-1500 nm の領域では InGaAs フォトダイオードを用いた。其々の検出器で得られた発光スペクトル強度の絶対値補正は、タングステンランプ強度を 2 つの異なる検出器で測定し、つなぎ合わせるにより求めた。今回、試料と標準溶液を同様の測定系で測定するため、励起光及び検出光のスリット幅、積算時間は統一する。また、試料と標準溶液の吸光度は 0.1 未満になるように濃度調整を行った。

#### 発光減衰スペクトル測定

図 6.4 に発光寿命測定系の概略図を示す。励起光源には波長 375 nm のレーザーダイオード(DeltaDiode, HORIBA Scientific)を用いた。このレーザー光をパルスジェネレーターにより、周期 100 ms(ON 0.5%)のパルス光にした(図 6.5)。レーザー光は、紫外から可視領域(300-800 nm)の波長領域で最も効率的に光を伝搬する光ファイバ(Premium-grade Optical Fiber Assemblies, Ocean Optics)を用いて、ディスプレイ中の溶液サンプルに照射した。その後、サンプルからの発光は、可視から近赤外領域(400-2100 nm)の波長領域で最も効率的に光を伝搬する光ファイバ(Premium-grade Optical Fiber Assemblies, Ocean Optics)を用いて、伝搬させる。スリット直前には、550 nm のロングパスフィルターを設置し、励起光の散乱光を除去した。サンプルからの発光は、分光器で分光され、検出器を用いて測定される。検出器には thermoelectrically cooled gated intensified CCD (iCCD) (iStar, ANDOR)を用いた。この際、パルスジェネレーターから TTL 信号を iCCD に入力することにより、シャッターのタイミングを制御した。図 6.5 に示すように、gate width 及び gate delay を制御することで、発光減衰スペクトルを測定した。発光寿命は、得られた発光減衰スペクトルを  $I = I_0 \exp\left\{-\left(t/\tau\right)^\beta\right\}$  を用いてフィッティングし、得られた時定数  $\tau$  と、stretched parameter である  $\beta$  を用いて、平均発光寿命( $\tau_{ave}$ )を計算する。平均発光寿命は、 $\tau_{ave} = \tau\beta^{-1}\Gamma_E(\beta^{-1})$  を用いて計算した<sup>149,150</sup>。

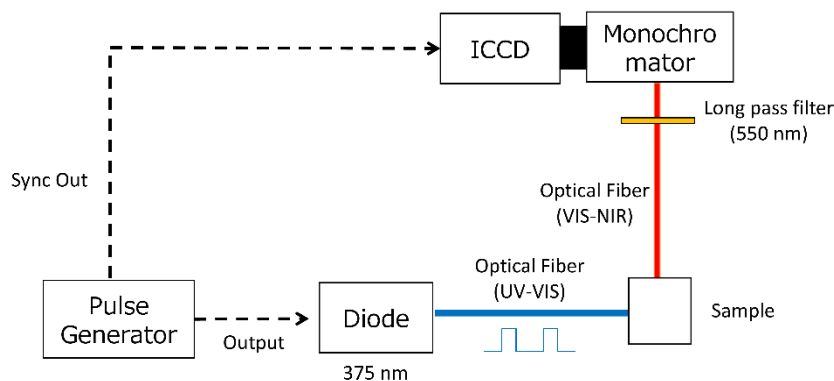


図 6.4 発光減衰スペクトル測定系の概略図。

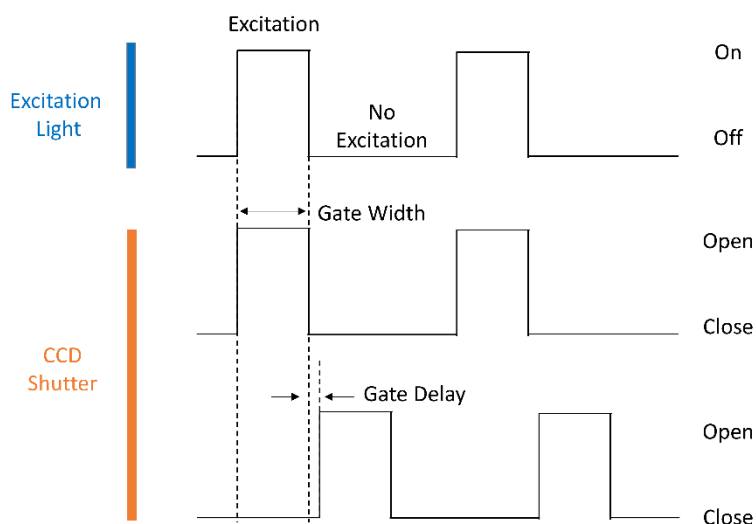


図 6.5 励起光及び CCD に入力される波形。Gate Width、及び Gate Delay を制御することにより、発光寿命測定、及び時間分解イメージング測定が可能になる。

### 6.2.4 時間分解イメージング方法

図 6.6 に時間分解イメージング測定系の概略図を示す。励起光源には波長 375 nm のレーザーダイオード (DeltaDiode, HORIBA Scientific) を用いた。このレーザー光をパルスジェネレーターにより、周期 100 ms (ON 0.5 %) のパルス光にした (図 6.5)。レーザー光は、紫外から可視領域 (300-800 nm) の波長領域で最も効率的に光を伝搬する光ファイバ (Premium-grade Optical Fiber Assemblies, Ocean Optics) を用いて、サンプルに照射した。この際、励起光を広げてサンプルに均一に照射するため、シリンダーレンズを用いた。

その後、サンプルからの発光は 435 nm のロングパスフィルターを通った後に、レンズを用いて検出器上に集光され、検出される。検出器には thermoelectrically cooled gated intensified CCD (iCCD) (iStar, ANDOR) を用いた。この際、パルスジェネレーターから TTL 信号を iCCD に入力することにより、シャッターのタイミングを制御した。図 6.5 に示すように、gate width 及び gate delay を制御することで、時間分解イメージングが得られる。今回は、時間分解イメージングを行う際、gate delay の値として  $1\mu\text{s}$  を用いた。

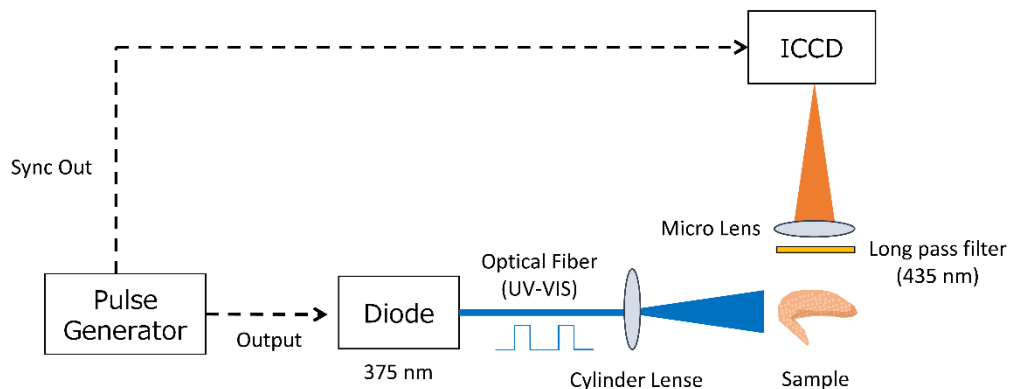


図 6.6 時間分解イメージング測定系の概略図。

図 6.7 に時間分解イメージングに使用したサンプルの作製方法を示す。Si ナノ結晶コロイド溶液を、ニワトリの手羽先、若しくは骨付きもも肉の皮と鶏肉の間に皮下注入した(図 6.7 (a-b))。注入量は  $200\ \mu\text{L}$  とし、Si ナノ結晶濃度は励起波長である  $375\ \text{nm}$  において OD0.1 に統一した。尚、手羽先の部位を使用する場合は注入量が  $200\ \mu\text{L}$  で問題はないが、もも肉の足の部分に注入する際は、 $200\ \mu\text{L}$  だと溶液量が多すぎてしまい、下側に垂れて焦点距離が合わせにくくなることがあるため、注入には気を付ける。作製したサンプルを、検出器直下に設置し、励起光を均一に当てて測定を行った。レンズの焦点距離は、iCCD から取得可能な発光イメージの発光強度が最大となるように調節した。

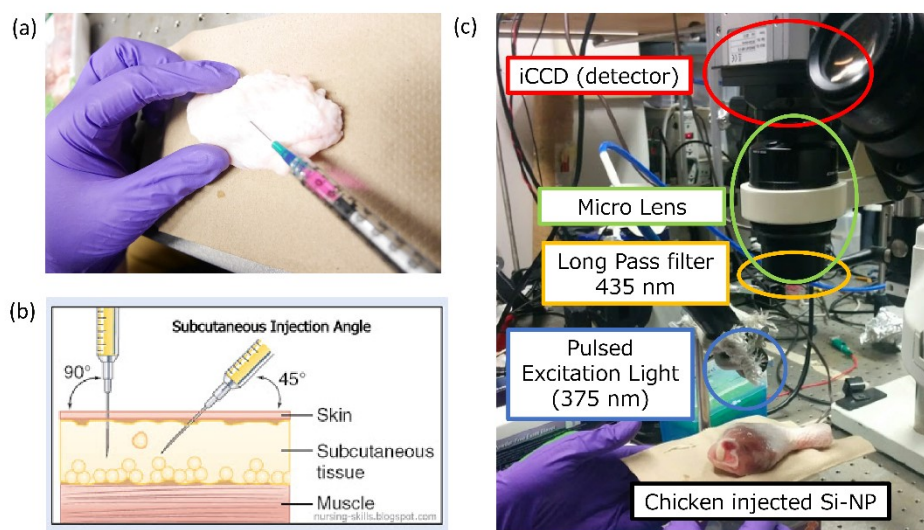


図 6.7 時間分解イメージング測定系。

## 6.3 実験結果

### 6.3.1 構造評価

3種類の異なる構造を有する Si ナノ結晶の構造評価を、動的光散乱法を用いて流体力学的径を測定することで行った。

図 6.8(a)に動的光散乱法を用いて測定された、ポーラス Si ナノ粒子(図 6.8(a))の散乱強度を示す。ポーラス Si のように、ある程度サイズが大きいと予想される粒子に関しては、散乱強度を用いて平均粒径を求めた。測定の結果、作製したポーラス Si ナノ粒子は流体力学的径が 177.4 nm であること、そしてサイズ分布が大きいことがわかった。しかし、得られたポーラス Si の発光特性より、Si ナノ結晶の直径は 4-10 nm 程度と予想される。そのため、今回作製したポーラス Si は、多数のナノ結晶が集まって作製された巨大な Si ナノ結晶の凝集物の様な構造であると考えられる(図 6.8(c))。

次に、B と P を同時にドーブし作製した Si ナノ結晶の粒子数比率を測定した結果を図 6.8(b)赤線に示す。流体力学的径は 7.5 nm であり、サイズ分布が狭いことが分かる。また、この値は透過型電子顕微鏡により測定された Si ナノ結晶のコア径(4-10 nm)に非常に良い一致を示す。このことから、ホウ素とリンを同時にドーブした Si ナノ結晶は、表面が修飾されていない状態であり、かつ水溶媒中で非常に良い分散性を保っている、つまり凝集物を生成していないことが分かる。

最後に、有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶の粒子数比率を図 6.8(b)青線に示す。流体力学的径は 15.7 nm であり、同時にサイズ分布が大きいことが分かる。しかし、発光特性および透過型電子顕微鏡の測定結果を考慮すると、表面修飾した Si ナノ結晶の直

径は 2-4 nm と予想される。流体力学的径と、実際の Si ナノ結晶の直径の差分は、有機分子修飾により、流体力学的径が大きくなったこと、若しくは水溶媒中で分散性が低下し、複数個の Si ナノ結晶が集まって凝集してしまったことが予想される。

図 6.8(c)に、得られた流体力学的径を用いて作製した、Si ナノ結晶の直径を比較する図を示す。図から明らかな様に、ポーラス Si は他の 2 つの Si ナノ結晶に比べて、非常に粒径が大きいことが分かる。また、このポーラス Si は、複数個の Si ナノ結晶の凝集物や、部分的に細くなった Si の枝の部分が発光していると考えられる。ホウ素とリンを同時にドーブした Si ナノ結晶は、流体力学的径の分布が狭いことから、凝集していない分散性の高い構造であると予想される。有機分子で表面修飾したサンプルは、流体力学系の分布が広いこと、また平均粒径が大きいことから、溶液中で複数個の Si ナノ結晶が凝集して存在していることが予想される。

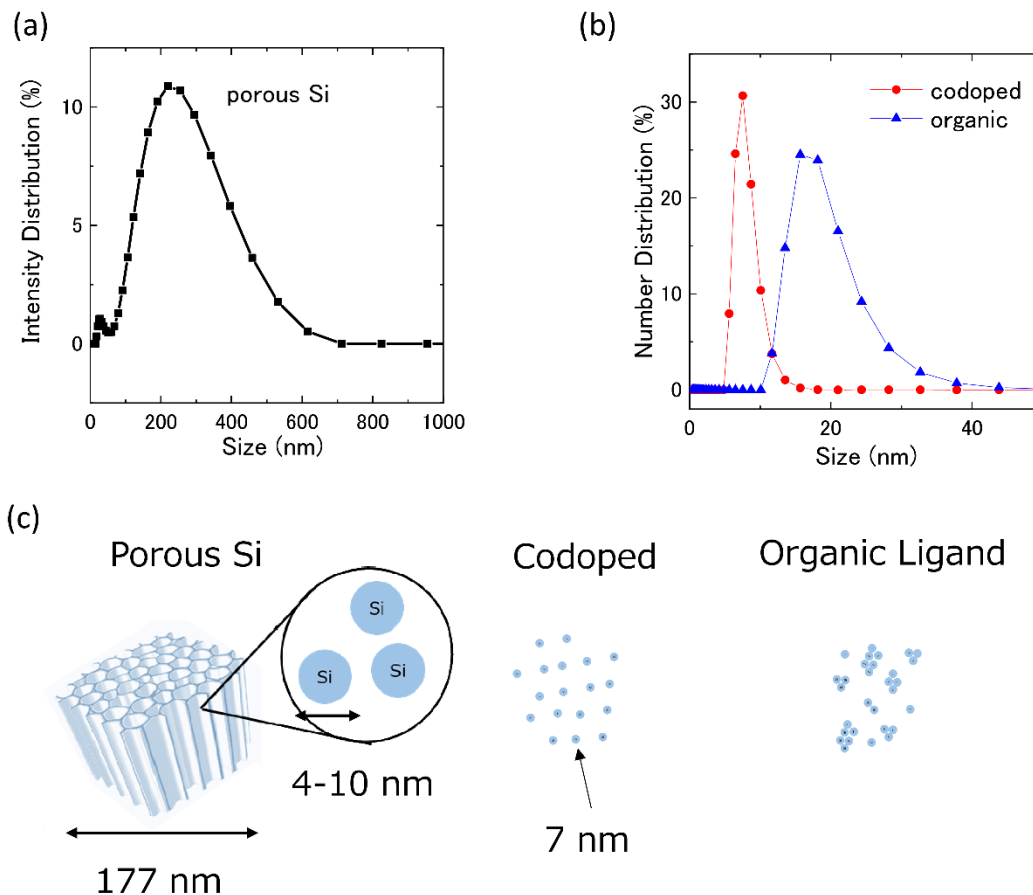


図 6.8 動的散乱法の測定結果。(a)ポーラス Si の散乱強度分布、(b)B と P を同時にドーブした Si ナノ結晶(赤線)、及び有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶(青線)の粒子数分布、(c)ナノ粒子の大きさの模式図。

図 6.9(a)に 3 種類の異なる Si ナノ結晶の表面電位(ゼータ電位)の測定結果を示す。測定の結果、表面電位はポーラス Si ナノ粒子では $-28.8$  mV、ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶では $-27.7$  mV、有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶では $-3.3$  mV であることが分かった。このことから予想される、水溶媒分散性の起源の模式図を図 6.9(b)に示す。ポーラス Si ナノ粒子、及び B と P を同時にドーピングした Si ナノ結晶の表面は負に帯電しているため、水溶媒中での分散性の起源は、静電斥力によるものだと予想される。一方、有機分子で表面を修飾されている Si ナノ結晶は、表面は帯電していないが水分散性を示すため、水分散性の起源は、有機分子による立体障害(steric barrier)であると考えられる。これらの結果より、3 種類の異なる Si ナノ結晶は異なる構造だけではなく、異なる水分散性の起源を有することが明らかになった。

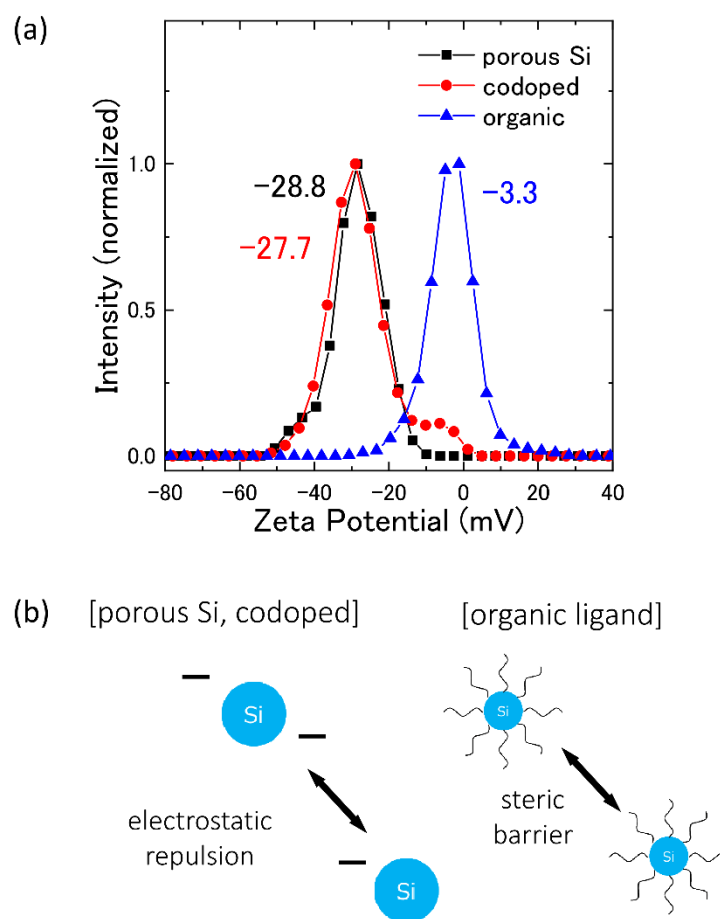


図 6.9 (a)ポーラス Si ナノ粒子(黒線)、B と P を同時にドーピングした Si ナノ結晶(赤線)、及び有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶(青線)のゼータ電位、(b)水分散性の起源の模式図。



図 6.10(a)に 3 種類の異なる Si ナノ結晶の赤外吸収スペクトル測定結果を示す。また、表 6.1 に Si-X の近赤外領域における吸収バンドをまとめた表を示す。

ポーラス Si ナノ粒子、及び B と P を同時にドーブした Si ナノ結晶の測定結果より、 $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$  に Si-O-Si の antisymmetric stretching mode がみられることから、表面には酸化された Si が存在することが分かることから、表面は酸化された状態であることがわかる(図 6.10(a))。その結果表面の親水性が向上し、水分散性を保持していると考えられる。また、 $1500 - 1700 \text{ cm}^{-1}$  に水分子由来の deformation mode 及び  $3000 - 3500 \text{ cm}^{-1}$  に水分子由来の stretching mode がみられた。尚、これらのサンプルは溶液を Si 基板にドロップコートした後に、デシケーター中で 1 日脱気して測定しているため、今回検出された水分子由来のバンドは、Si ナノ結晶表面に吸着した水分子であると考えられる。このことから、この 2 つのサンプルの表面は非常に浸水性が高いことが予想される。尚、ホウ素とリンを同時にドーブした Si ナノ結晶表面の吸着水に関する詳しい議論は、2015 年卒業の佐々木誠仁さんの修士論文などに記載されている<sup>196,197</sup>。また、Si-H の vending mode が存在する波数領域である  $2000 - 2100 \text{ cm}^{-1}$  の領域を見てみると、吸収ピークは見られないことが分かる。このことから、表面にはエッチングにより生じる水素終端の結合はなく、表面は完全に酸化されていることが分かった(図 6.10(b))。

一方、有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶は全く違った表面状態を示すことが赤外吸収スペクトルからわかった。まず、他の 2 種類の Si ナノ結晶と同様に、 $1000 - 1200 \text{ cm}^{-1}$  の波数領域に Si-O-Si の antisymmetric stretching mode がみられた。このことから、Si ナノ結晶の表面の少なくとも一部分は酸化されていることが予想される。ほかの 2 種類の Si ナノ結晶と決定的に違うのは、有機分子由来の(炭素元素由来の)ピークが多数生じている点である。 $1400 \text{ cm}^{-1}$  には Si-CH<sub>3</sub> 中の CH<sub>3</sub> 由来の symmetric deformation mode が、 $2898 \text{ cm}^{-1}$  には Si-CH<sub>3</sub> 中の C-H 由来の symmetric stretching mode が見られた。このことから、Si ナノ結晶の表面には多数の有機分子が存在することがわかる(図 6.10(b))。また、他の Si ナノ結晶にみられた水分子由来の吸収バンドが見られないことから、他の 2 種類に比べて空気中の水分子との吸着が弱い、つまり親水性が比較的低いことが分かる。これらの結果から、有機分子により表面修飾をした Si ナノ結晶の水分散性の起源は、Si ナノ結晶の表面の親水性より、表面修飾分子による立体障害や表面修飾分子の親水性によるものであることが予想される。

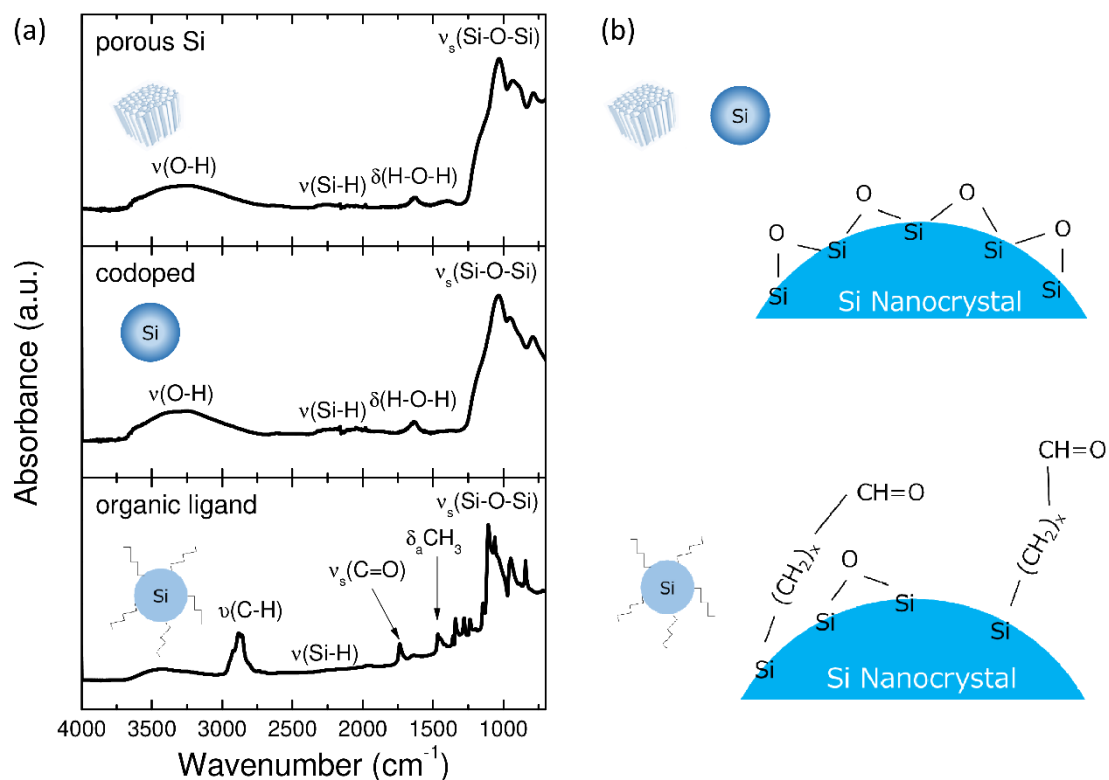


図 6.10 (a)ポラス Si ナノ粒子(黒線)、ホウ素とリンを同時にドーブした Si ナノ結晶(赤線)、有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶(青線)の赤外吸収スペクトル、及び(b)表面状態の模式図。

Species	Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Mode assignment	Species	Frequency ( $\text{cm}^{-1}$ )	Mode assignment
Si-CH <sub>3</sub>	2965	$\nu_s$ C-H	SiH <sub>2</sub>	913	$\delta_s$ Si-H <sub>2</sub>
Si-CH <sub>3</sub>	2898	$\nu_s$ C-H	O <sub>3</sub> Si-H	857	$\delta$ Si-H
O <sub>3</sub> SiH	2268	$\nu$ Si-H	O <sub>2</sub> Si-H	820	$\delta$ Si-H
O <sub>2</sub> SiH <sub>2</sub>	2200	$\nu$ Si-H	Si-F	812	$\nu$ Si-F
SiH <sub>3</sub>	2140	$\nu$ Si-H	OSi-H	775	$\delta$ Si-H
OSiH <sub>3</sub>	2160	$\nu$ Si-H	Si-CH <sub>3</sub>	766	$\rho$ Si-CH <sub>3</sub>
SiH <sub>2</sub>	2108	$\nu$ Si-H	Si-CH <sub>3</sub>	681	$\nu$ Si-C
Si-H	2087	$\nu$ Si-H	Si-Hx	665	$\delta$ Si-H <sub>2</sub>
Si-CH <sub>3</sub>	1400	$\delta_a$ CH <sub>3</sub>	Si-Hx	628	$\delta$ Si-H
Si-CH <sub>3</sub>	1252	$\delta_s$ CH <sub>3</sub>	Si-Si	610	$\nu$ Si-Si
Si-O-Si	1150 - 1240	$\nu_s$ Si-O-Si	All values $\pm 5 \text{ cm}^{-1}$		
Si-O-Si	980 - 1050	$\nu_a$ Si-O-Si	$\nu$ = stretching mode, $\delta$ = deformation mode		
			$\rho$ = rocking mode, a = antisymmetric mode		
			s = symmetric mode		

表 6.1 Si-X の近赤外吸収バンド<sup>198</sup>。

表 6.2 に動的光散乱法から得られた粒径、ゼータ電位測定から得られた表面電位、近赤外吸収スペクトルから得られた表面状態をまとめた。同時に、過去の TEM 観察及び発光波長から予想される Si ナノ結晶のコアサイズ、及び予想される Si ナノ結晶のコアサイズ間の距離も記載している。

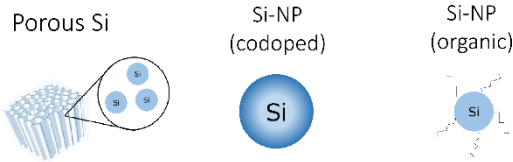
これらの結果をまとめると、異なる 3 種類の Si ナノ結晶は、粒径及び表面状態が全く異なることがわかる。まず、ポーラス Si では粒径が他のナノ結晶に比べて非常に大きいことが分かる。しかし、赤~近赤外領域に発光を示すことを考慮すると、ポーラス Si は、複数個の Si ナノ結晶の凝集物や、部分的に細くエッチングされた Si の部分が発光を示している Si ナノ構造であることが考えられる。また、その表面は酸化されており、表面の親水性は高いことが予想される。そして -27 mV 程度の表面電位を示し、静電斥力によって水溶媒分散性を保持していると考えられる。

次に B と P を同時にドーピングした Si ナノ結晶では、サイズは 7 nm 付近で非常に分布のそろった粒径であることが言える。また、表面の親水性は高く、その表面電位はポーラス Si と同様、負に帯電しているため静電斥力により分散性を保持していると考えられる。またこの Si ナノ結晶は、他の 2 種類に比べ、ナノ粒子が単体で存在している(凝集していない)ことや、表面に有機分子による修飾などが施されていないことから、最も組成及び構造がシンプルな Si ナノ結晶であることがいえる。

最後に、有機分子により表面修飾を行った Si ナノ結晶では、発光及び TEM から予想される Si ナノ結晶のコアサイズよりも大きな平均粒径が検出されていることから、複数個の有機分子で修飾されたナノ結晶が溶液中で凝集していることが予想される。また、溶液中で分散しているため、Si ナノ結晶のコア同士の距離は、ポーラス Si に比べて比較的大きいと考えられる。また、表面電位の絶対値が小さいこと、そして表面に多量の炭素に起因する吸収バンドがみられることから、水溶媒分散性の起源は有機分子による立体障害であるため、他の 2 種類のものとは大きく異なることが予想される。

上述したように、今回使用する Si ナノ結晶は、発光起源は Si の量子サイズ効果に因るものではあるが、構造及び溶媒分散性の起源が全く異なるということが分かった。

表 6.2 3種類の異なる構造を有する Si ナノ粒子の構造パラメーター。



	porous Si	codoped	organic
Size (nm) (DLS)	177.4	7.5	15.7
Estimated Si Core Size (nm)	4-10	4-10	2-4
Core to Core Distance	Small	Large	Large
Zeta Potential (mV)	-28.8	-27.7	-3.3
Surface Termination	Si-OH	Si-OH	Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>x</sub> -CH <sub>3</sub>

### 6.3.2 光学特性評価

図 6.11(a)に異なる 3 種類の Si ナノ結晶の発光スペクトルを示す。図中には、gaussian fitting により得られた半値幅(full width half maximum: FWHM)も加えている。測定結果より、3 種類の Si ナノ結晶すべてにおいて赤～近赤外領域におけるブロードな発光が確認された。また、発光波長のピークは、表面修飾した Si ナノ結晶のものが最も短波長で 700 nm、ホウ素とリンを同時にドーピングしたものでは 750 nm、ポーラス Si のサンプルが最も長波長で 820 nm であることが分かった。不純物をドーピングしていない有機分子で修飾された Si ナノ結晶及びポーラス Si では、Si ナノ結晶のコアサイズが最も寄与するため、今回の結果よりポーラス Si は比較的大きなコアサイズを有することが予想される。また、ポーラス Si は水中で酸化が進むことにより、短波長シフトすることが知られているため、より短波長に発光波長をもっていきたい場合は、溶液中での酸化を進行させればよい<sup>188</sup>。対して、ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶の発光起源は、D-A ペア発光であるため、有機分子で修飾された Si ナノ結晶と同等のコア径を有していても、図 6.11 に示すように長波長(低エネルギー)で発光していることがわかる<sup>19,66</sup>。

図 6.11(b)に、相対法を用いて測定した 3 種類の Si ナノ結晶の発光量子効率を示す。有機分子で修飾された Si ナノ結晶が最も大きな発光量子効率(32.6%)を有し、その次にホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶(11.6%)、そしてポーラス Si が最も小さい発光量子効率(7.3%)であることが分かる。有機分子で修飾された Si ナノ結晶の発光量子効率が大きい理由としては、試料作製直後に表面をヒドロシリル化反応により有機分子で完全に修飾することで、表面欠陥の生成が抑制され、非輻射的遷移割合が燃焼したことが原因として考えられる。

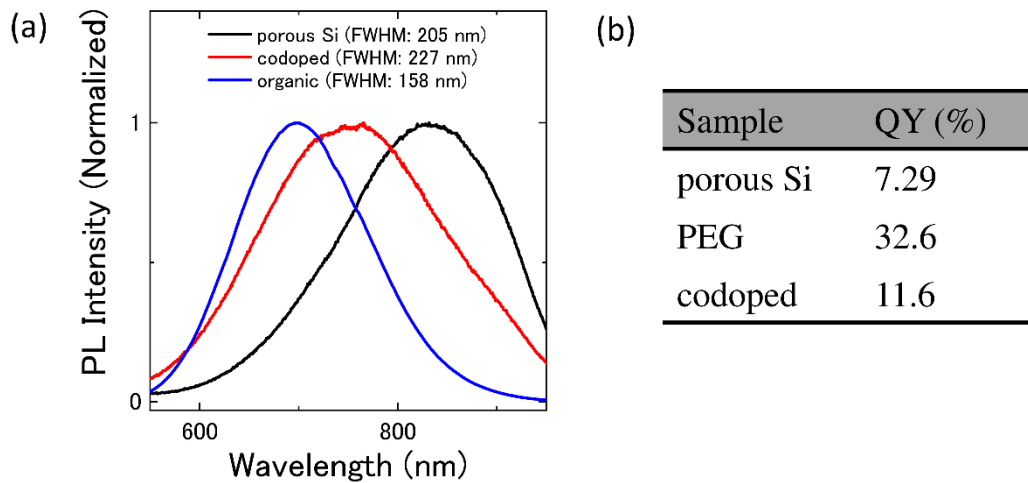


図 6.11 ポーラス Si ナノ粒子(黒線)、ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶(赤線)、有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶(青線)の発光スペクトル。励起光は 375 nm。

図 6.12 に、異なる 3 種類の Si ナノ結晶の発光寿命の発光波長依存性を示す。同時に、一般的な自家蛍光の発光寿命(< 10 ns)も紫点線として表示している<sup>199,200</sup>。3 種類の Si ナノ結晶すべてにおいて、生体の自家蛍光よりも 3 桁程度長い発光寿命を有することが分かる。この発光寿命の違いを利用し、励起時間と発光検出時間に遅延を設けることで、発光寿命の短い自家蛍光を軽減し、自家蛍光抑制によるバックグラウンドの低下、S/N 比の向上を実現する時間分解イメージングが可能になると考えられる。

有機分子で修飾された Si ナノ結晶は、他の Si ナノ結晶に比べて発光寿命が長いことが分かる。これは、非輻射的遷移割合が表面を有機分子で修飾することで抑制され、結果として発光寿命が長くなったと考えられる。この結果は、発光量子効率が他の Si ナノ結晶に比べて高いこととも整合性がとれる。

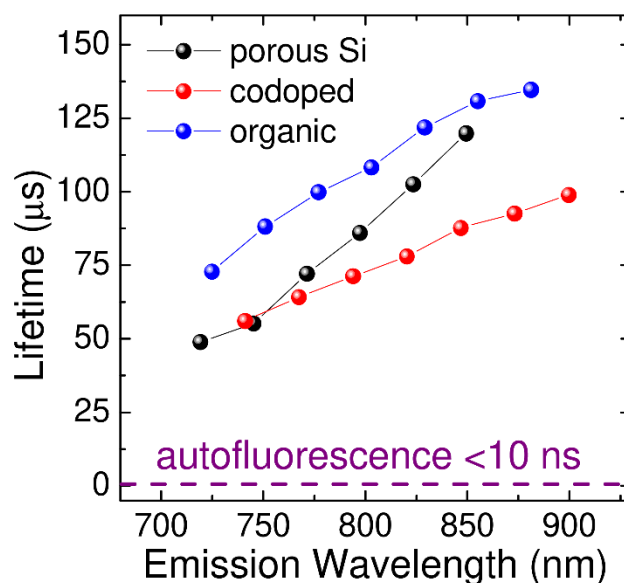


図 6.12 ポーラス Si ナノ粒子(黒線)、ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶(赤線)、有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶(青線)の発光寿命の発光波長依存性。生体の自家蛍光の発光寿命(<10 ns)は紫点線で示している。励起光は 375 nm。

### 6.3.3 時間分解バイオイメーキング

図 6.13 に、(a)リファレンスとなる有機色素であるローダミン B、(b)ポーラス Si、(c)ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶、(d)有機分子で表面修飾された Si ナノ結晶の室内光でのイメージ(左列)、通常のイメージングである励起光が連続光(continuous wave: CW)のイメージ(中列)、及び励起光と発光の検出に 1μs の遅延を設けた時間分解(time gated: TG)イメージング(右列)の図を示す。尚、リファレンスであるローダミン B の発光波長は 560-630 nm 程度、発光寿命は、水溶液中では 1.74 ns である<sup>201</sup>。

図 6.13(a)のローダミン B を用いた CW イメージングでは、非常に強い生体の自家蛍光がみられ、ローダミン B による発光と生体の自家蛍光の区別がつかないことが分かる。特に、鶏皮上の羽を抜いた後に存在する凹凸の部分が明確にわかる程に自家蛍光が強く存在している。自家蛍光を抑制するために行った TG イメージングでは、生体の自家蛍光が除去されているが、同時に蛍光寿命の短いローダミン B の蛍光も除去されてしまい、ローダミン B の存在領域が不明であることが分かる。このことから、ローダミン B に代表される、発光寿命の短い有機色素は TG イメージングに不向きであることが言える。

図 6.13(b)にポーラス Si を用いた結果を示す。CW イメージングでは、実際に注入した部分よりもやや下の部分に蛍光が存在していることから、自家蛍光も同時に検出し

ていることが分かる。対して TG イメージングでは、自家蛍光が抑制され、実際に注入した領域のみで、発光が検出された。TG イメージングで得られた画像の S/N 比の向上があまり顕著でない原因としては、実験中に使用した porous Si の発光量子効率が溶液中での保存で低下してしまったこと、周囲の自家蛍光の強度が大きくなかったことなどが考えられる。

図 6.13(c)に、B と P を同時にドーピングして作製した Si ナノ結晶の結果を示す。CW イメージングでは、骨の血の部分や鶏皮の羽があった部分などから非常に強い自家蛍光がみられ、Si ナノ結晶の位置が発光からは分からない。しかし、TG イメージングを用いた場合、生体の自家蛍光が抑制され、Si ナノ結晶の存在領域で発光が得られていることが分かる。CW イメージングと TG イメージングを比べると、自家蛍光抑制によるバックグラウンドの減少に伴い、非常に大きな S/N 比の向上が実証されたことが分かる。

図 6.13(d)に有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶のイメージング結果を示す。CW イメージングでは、生体の自家蛍光が強いため、Si ナノ結晶の存在領域が不明瞭になっている。一方、TG イメージングでは、生体の自家蛍光が抑制され S/N 比が向上、Si ナノ結晶の存在領域が明確になっていることが分かる。尚、このサンプルでは注入の際に溶液が皮下に広がっていることが TG イメージングからわかった。

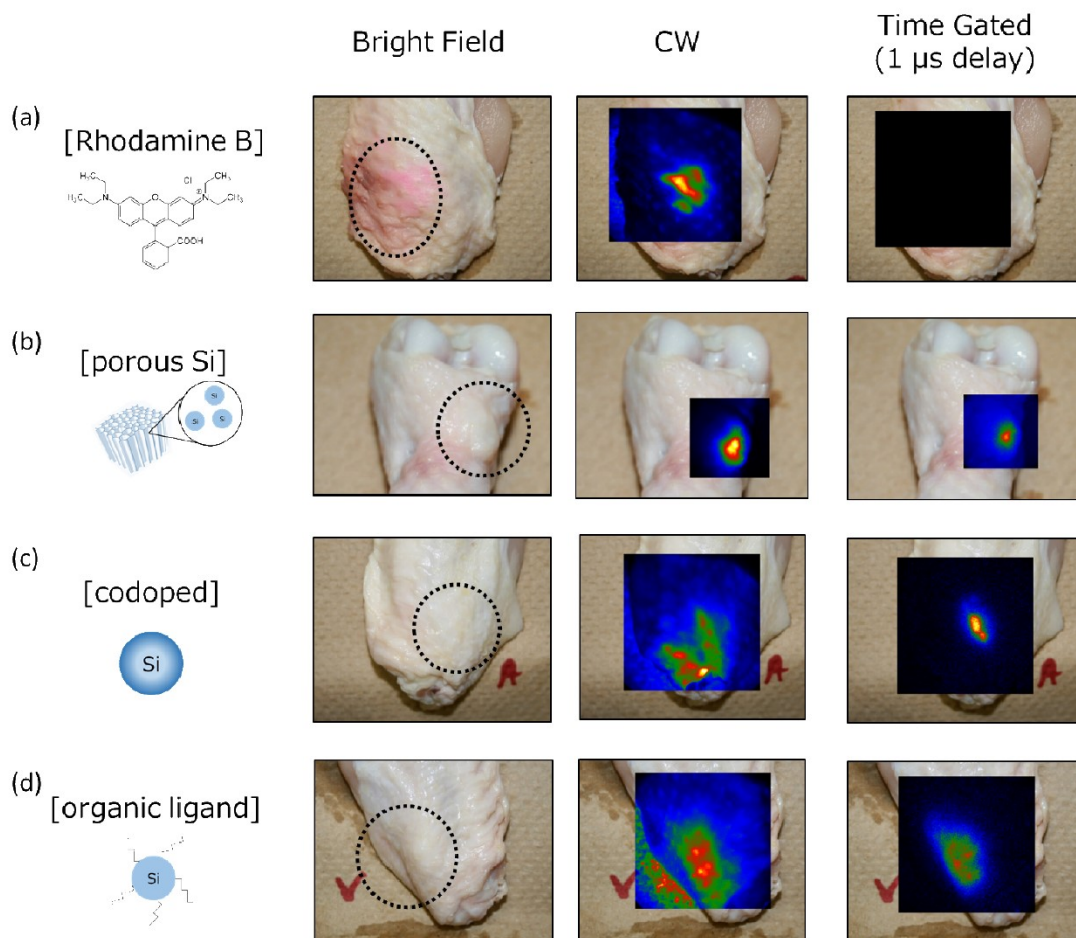


図 6.13 (a)ローダミン B、(b)ポーラス Si、(c) ホウ素とリンを同時にドーブした Si ナノ結晶、(d)有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶の室内光イメージ(Bright Field)、発光イメージ(CW)、及び時間分解イメージング(Time Gated)。

## 6.4 考察

上述の様に、ポーラス Si ナノ粒子、ホウ素とリンを同時にドーブした Si ナノ結晶及び有機分子で表面修飾をした Si ナノ結晶の全てにおいて、長寿命発光を利用した時間分解発光イメージングへの応用が可能であることが分かった。これらの結果は、Si ナノ結晶に発光起源を有する発光体は、その構造や表面修飾状態、水溶媒分散性の起源に依らず、時間分解発光イメージングへの応用が可能であることを示している。しかし、これらの異なる構造を有する Si ナノ結晶は、其々に対してその作製プロセスや構造に起因する利点・欠点が存在する。そのため、イメージングの目的に応じた Si ナノ結晶の選択が必要となる。表 6.3 に利点、欠点及び応用例をまとめた。

ポーラス Si ナノ粒子の利点は、大量生産が可能なこと、また内部に薬剤が内包可能



であることが挙げられる。6.2.1 の試料作製方法で記したように、トップダウンで試料作製を行う。そのため、他の2つのボトムアッププロセスに比べて、短時間で大量に試料を作製することが可能である。また、図 1.1 に示すように、非常に表面積の多い多孔質構造を有するため、薬剤を内部に内包することが可能であるため、ドラッグデリバリーにおける薬剤のキャリアとしての応用も可能である<sup>124,202-205</sup>。欠点としては、表面は Si-OH であるため、水溶媒中で酸化が進行し、最終的に全てが酸化 Si となってしまうため発光を示さなくなるといった安定性の問題が挙げられる<sup>188</sup>。また、表面修飾をしていないため、表面欠陥準位が形成され、試料作製直後に有機分子で表面修飾を行う Si ナノ結晶などに比べて、量子効率が比較的低いという課題も存在する。以上の特性をまとめると、ドラッグデリバリーとバイオイメージングを同時に行い、薬剤の体内での挙動などをリアルタイムでモニターしたい場合、Si ナノ結晶ベースの生体内発光材料としてポーラス Si が適しているといえる。

B と P を同時にドーピングした Si ナノ結晶の利点は、水溶媒中で非常に安定した分散性・発光特性を示すことが挙げられる。図 6.14 に示すように、水溶媒中で数週間保管後も発光スペクトルの変化が見られないことから、非常に溶液中で安定して分散していることが分かる。また発光波長が粒子サイズにより 700 – 1400 nm の範囲で制御可能な発光波長などが挙げられる<sup>16,19</sup>。欠点としては不純物濃度を制御しても最大で発光量子効率が 20%程度<sup>206</sup> という、他の不純物をドーピングせずに表面修飾をした Si ナノ結晶に比べて、比較的低い発光量子効率が挙げられる。以上の特性をまとめると、長時間の励起および発光を行うバイオイメージングや、第二生体窓(NIR-II, 1000-1700 nm)領域を利用するバイオイメージングを行う場合、ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶が適しているといえる。

有機分子で表面修飾された Si ナノ結晶の利点は、水溶媒中で非常に高い量子効率(~30%)を示すことが挙げられる。これは、試料作製直後(HF エッチング直後)に、Si ナノ結晶表面を完全に有機分子で修飾することにより、表面欠陥の形成を防ぎ、非輻射的遷移割合を抑制していることに因るものである。欠点としては、水溶媒中での安定性の低さが挙げられる。図 6.14(b)に、水溶媒中で数カ月間保存した有機分子で修飾された Si ナノ結晶の溶液の写真を示す。溶液中で凝集しているため、非常に濁った溶液になっていることが分かる。また数十分後には、凝集物が下に沈殿していることが分かる。また、この Si ナノ結晶は、表面修飾プロセスに発光特性が非常に敏感であるという問題もある<sup>10</sup>。生体分子と結合する際には表面修飾プロセスは必須だが、表面修飾により発光波長や発光強度が大きく変化するということが報告されている。以上の特性をまとめると、高輝度の Si ナノ結晶が必要で、尚且つ長期間のイメージングを行わず、煩雑な表面修飾プロセスが不必要の際は、有機分子で表面修飾された Si ナノ結晶が適しているといえる。

表 6.3 3種類の Si ナノ結晶の利点、欠点及びその応用例

Siナノ結晶の種類	利点	欠点	応用例
ポーラスSiナノ粒子	<ul style="list-style-type: none"> <li>大量生産が容易</li> <li>内部に薬剤を内包可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>安定性が低い(表面酸化)</li> <li>比較的低い量子効率</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ドラッグデリバリーとイメージングの併用</li> </ul>
B,P同時ドーピングSiナノ結晶	<ul style="list-style-type: none"> <li>水溶液中で非常に安定</li> <li>発光波長が制御可能(700-1400 nm)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>比較的低い量子効率</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>長時間イメージング</li> <li>第二生体窓でのイメージング</li> </ul>
有機分子修飾Siナノ結晶	<ul style="list-style-type: none"> <li>高い量子効率 (~30%)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>安定性が低い(凝集)</li> <li>表面修飾プロセスに敏感</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>高感度イメージング</li> </ul>

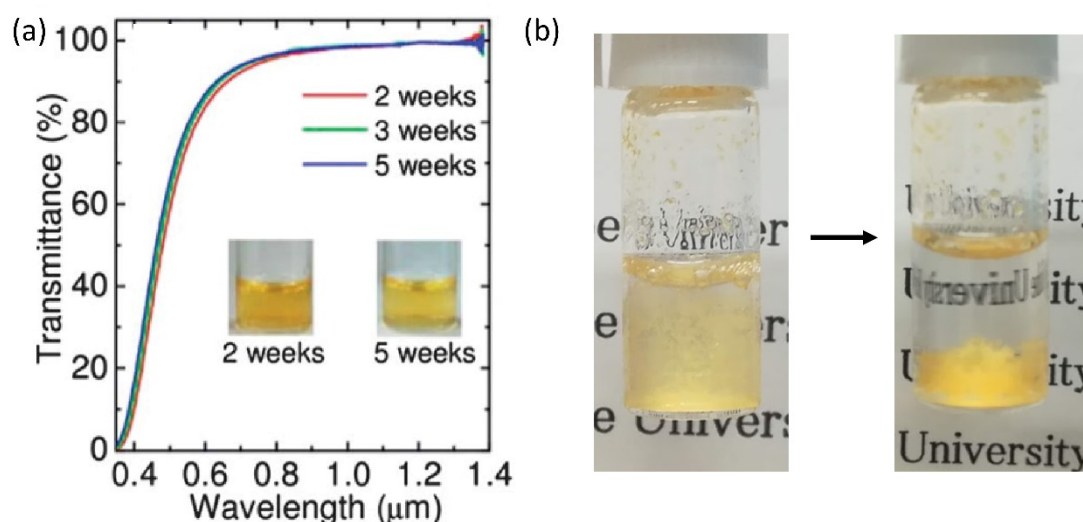


図 6.14 (a)水溶液中で保管したホウ素とリンを同時ドーピングした、Si ナノ結晶コロイドの透過スペクトルと写真<sup>16</sup>、(b)水溶液中で数カ月間保管した、有機分子修飾 Si ナノ結晶コロイド

## 6.5 まとめ

本研究では、ポーラス Si、B と P を同時ドーピングした Si ナノ結晶、及び有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶という異なる 3 種類の Si ナノ結晶の構造・光学特性を評価し、実際に時間分解バイオイメージングへ応用した。構造特性の比較の結果、これらの Si ナノ結晶は異なる粒径、表面状態及び水溶液分散性の起源を有することが分かった。光学特性の比較の結果、全ての Si ナノ結晶は、可視～近赤外領域においてブロードな発光を示し、生体の自家蛍光に比べて十分に長い発光寿命を有することが分かった。これらの Si ナノ結晶は、全てにおいて従来のバイオイメージングに比べて、時間分解バイオイメージングによる感度向上を実現した。これらの結果は、Si ナノ結晶はその構造やドーピングの有無、発光の起源や表面状態に依らず、時間分解バイオイメージングにおける有用な発光体であることを示唆している。



## 第7章 本研究のまとめ

本研究では、B と P を同時にドーブし作製した Si ナノ結晶のバイオ応用に向けて、金属ナノ構造との複合体を形成し、その物性を向上させることを目的に研究を行った。その結果、シランカップリングプロセスにより、ナノ結晶表面を生体分子との適合性が高い官能基で表面修飾するプロセスの開発に成功した。また、金ナノ粒子や銀ナノ構造基板といった金属ナノ構造を用いることで、Si ナノ結晶の課題であった小さい吸収断面積及び低い発光再結合レートといった課題の解決を行った。更に、Si ナノ結晶を保護剤として用いることで金属ナノ構造である銀ナノ粒子の安定性の向上に成功し、結果として安定性の高い抗菌剤として、Si ナノ結晶被覆された銀ナノ粒子の応用価値を示した。これらの結果は、Si ナノ結晶はバイオ分野において実用可能な無機ナノ材料であることを示唆しており、Si ナノ結晶の今後のバイオ分野において非常に重要な意味をもつ。以下に、本研究で得られた成果と今後の展望をまとめる。

第二章では、B と P を同時にドーブし作製した Si ナノ結晶の表面修飾プロセスの開発について述べた。本研究では、生体分子との結合プロセスが確立されているチオール基及びアミノ基での表面修飾方法として、シランカップリング反応を採用した。使用する分子の分子構造、及び濃度を最適化することにより、分散性を損なわず、かつ発光特性への影響が最小限となる表面処理条件を見出した。表面修飾プロセス開発に成功したことで、検出対象に対して特異的な認識機構を有する生体分子との複合が可能になった。これらの結果は、Si ナノ結晶のバイオフォトンクスにおける蛍光プローブとしての応用において、非常に大きな一歩である。

第三章では、Si ナノ結晶の吸収断面積増大を目的とした金ナノ粒子との複合体形成について述べた。生体内バイオイメージングへの応用を見据えて、金ナノ粒子のコロイド溶液を金属ナノ構造として用いて、金ナノ粒子と Si ナノ結晶の複合体を形成し、吸収断面積増大を試みた。異なる三種類の構造を有する複合体を形成しその構造を制御、金属ナノ構造による Si ナノ結晶の吸収断面積増大の最大化を図った。その結果、金ナノ粒子と Si ナノ結晶を二重鎖 DNA を介して結合させ、粒子間距離を 10 nm に保った場合に最大で 4 倍の発光増強が得られることが明らかになった。これらの結果は、金属ナノ構造との融合により、Si ナノ結晶の吸収断面積増大に成功したことを示しており、今後の Si ナノ結晶の生体内蛍光プローブとしての応用につながったと考えられる。

第四章では、可視領域に複数の表面プラズモン共鳴に起因するピークを有する金属ナノ構造である銀ナノ構造基板を用いることで、Si ナノ結晶の吸収断面積及び発光再結合レートの同時増強を目的に実験を行った。本研究では、複数の表面プラズモン共鳴を有する銀ナノ構造基板を用いて、銀ナノ構造基板と Si ナノ結晶の距離を高精度に制御し、

構造を最適化することで、Si ナノ結晶の吸収断面積及び発光再結合レートの同時増大を実現した。結果として、励起波長と発光波長がプラズモン共鳴波長に存在するとき、最大で約 10 倍の発光増強が得られた。この現象は、将来的に検出対象の有無により基板との距離が変化することで影響をうける Si ナノ結晶の発光特性を利用する発光検出型バイオセンサーの実現可能性を示唆している。

第五章では、抗菌作用を有する金属ナノ構造である銀ナノ粒子の安定性向上を目的とした Si ナノ結晶シェルで被覆された銀ナノ粒子の作製及び抗菌作用に関して述べた。銀ナノ粒子は高い比表面積によって効率的に Ag イオンを徐放できることから、抗菌剤としての利用が期待されている。本研究では、銀ナノ粒子の安定剤として Si ナノ結晶を用いて、Si ナノ結晶で被覆された銀ナノ粒子を作製し安定性を向上、その抗菌作用を評価した。Si ナノ結晶シェルと Ag ナノ粒子の構造(シェル膜厚やナノ粒子の直径)を高精度に制御し、抗菌力評価を行うことで、構造の最適化を図った結果、シェルの膜厚が薄い構造が高い抗菌作用を有することが明らかになった。また、作製した複合体を用いて抗菌フィルムを作製し、その抗菌力を評価した。その結果、抗菌フィルムが抗菌作用を発揮するメカニズムは、培地上に存在する水中をナノ粒子が拡散することにより抗菌力を発揮するということが明らかになった。これらの知見は、今後銀ナノ粒子の抗菌剤としての実用化に大きく貢献できると考えられる。

第六章では、実際に Si ナノ結晶を時間分解発光イメージングにおける蛍光体として用いることで、生体内イメージングにおける発光体への応用可能性を実証した。3種類の異なる構造を有する Si ナノ結晶を用いて構造、及び発光特性を評価した。本研究では、ポーラス Si ナノ粒子、ホウ素とリンを同時にドーピングした Si ナノ結晶及び有機分子で表面修飾した Si ナノ結晶の3種に関して性能評価を行った。その結果、これらの Si ナノ結晶は異なる表面状態、水溶媒分散性の起源及び発光寿命を有することが分かった。また、時間分解発光イメージングを行った結果、その構造やドーピングの有無に依存せず、従来のイメージングに比べて S/N 比が向上することが分かった。その結果、Si ナノ結晶は時間分解発光イメージングにおける非常に有用な蛍光体であるといえる。これらの結果は、Si ナノ結晶を将来的に実用可能なバイオフォトンクス分野における蛍光体として用いる際に、他の蛍光体に比べてアドバンテージを証明できるため非常に重要である。

## 参考文献

1. Montalti, M., Cantelli, a. & Battistelli, G. Nanodiamonds and silicon quantum dots: ultrastable and biocompatible luminescent nanoprobe for long-term bioimaging. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 4853–4921 (2015).
2. Erogbogbo, F. *et al.* In Vivo Targeted Cancer Imaging , Sentinel Lymph Node Mapping and Biocompatible Silicon Nanocrystals. *ACS Nano* **5**, 413–423 (2011).
3. Fujioka, K. *et al.* Luminescent passive-oxidized silicon quantum dots as biological staining labels and their cytotoxicity effects at high concentration. *Nanotechnology* **19**, (2008).
4. Zhong, Y. *et al.* Microwave-assisted synthesis of biofunctional and fluorescent silicon nanoparticles using proteins as hydrophilic ligands. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **51**, 8485–8489 (2012).
5. Erogbogbo, F. *et al.* Biocompatible Luminescent Silicon Quantum Dots for Imaging of Cancer Cells. *ACS Nano* **2**, 873–878 (2008).
6. Zhong, Y. *et al.* Large-scale aqueous synthesis of fluorescent and biocompatible silicon nanoparticles and their use as highly photostable biological probes. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 8350–8356 (2013).
7. Erogbogbo, F. *et al.* Bioconjugation of luminescent silicon quantum dots for selective uptake by cancer cells. *Bioconjug. Chem.* **22**, 1081–1088 (2011).
8. Li, Z. F. & Ruckenstein, E. Water-soluble poly(acrylic acid) grafted luminescent silicon nanoparticles and their use as fluorescent biological staining labels. *Nano Lett.* **4**, 1463–1467 (2004).
9. Cheng, X., Lowe, S. B., Reece, P. J. & Gooding, J. J. Colloidal silicon quantum dots: From preparation to the modification of self-assembled monolayers (SAMs) for bio-applications. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 2680–2700 (2014).
10. Dasog, M., De Los Reyes, G. B., Titova, L. V., Hegmann, F. A. & Veinot, J. G. C. Size vs Surface: Tuning the Photoluminescence of Freestanding Silicon Nanocrystals Across the Visible Spectrum via Surface Groups. *ACS Nano* **8**, 9636–9648 (2014).
11. Clark, R. J., Dang, M. K. M. & Veinot, J. G. C. Exploration of organic acid chain length on water-soluble silicon quantum dot surfaces. *Langmuir* **26**, 15657–15664 (2010).
12. Hua, F., Swihart, M. T. & Ruckenstein, E. Efficient Surface Grafting of Luminescent Silicon Quantum Dots by Photoinitiated Hydrosilylation. 6054–6062 (2005). doi:10.1021/la0509394
13. Mcvey, B. F. P. & Tilley, R. D. Solution Synthesis, Optical Properties, and Bioimaging Applications of Silicon Nanocrystals. *Acc. Chem. Res.* **47**, 3045–

- 3051 (2014).
14. Fujii, M., Sugimoto, H. & Kano, S. Silicon quantum dots with heavily boron and phosphorus codoped shell. *Chem. Commun.* **54**, 4375–4389 (2018).
  15. Ostrovska, L. *et al.* The impact of doped silicon quantum dots on human osteoblasts. *RSC Adv.* **6**, 63403–63413 (2016).
  16. Sugimoto, H., Fujii, M., Fukuda, Y., Imakita, K. & Akamatsu, K. All-inorganic water-dispersible silicon quantum dots: highly efficient near-infrared luminescence in a wide pH range. *Nanoscale* **6**, 122–126 (2014).
  17. Nomoto, K. *et al.* Atom Probe Tomography Analysis of Boron and/or Phosphorus Distribution in Doped Silicon Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* **120**, 17845–17852 (2016).
  18. Minami, A., Sugimoto, H., Crowe, I. F. & Fujii, M. Growth of Core–Shell Silicon Quantum Dots in Borophosphosilicate Glass Matrix: Raman and Transmission Electron Microscopic Studies. *J. Phys. Chem. C* **122**, 21069–21075 (2018).
  19. Sugimoto, H., Fujii, M., Imakita, K., Hayashi, S. & Akamatsu, K. Codoping n- and p-type impurities in colloidal silicon nanocrystals: Controlling luminescence energy from below bulk band gap to visible range. *J. Phys. Chem. C* **117**, 11850–11857 (2013).
  20. Sugimoto, H., Fujii, M., Imakita, K., Hayashi, S. & Akamatsu, K. All-inorganic near-infrared luminescent colloidal silicon nanocrystals: High dispersibility in polar liquid by phosphorus and boron codoping. *J. Phys. Chem. C* **116**, 17969–17974 (2012).
  21. Pradeep, T. *Nano: the essentials*. (Tata McGraw-Hill Education, 2007).
  22. Richard P, F. There’s plenty of room at the bottom. (1959).
  23. 日本化学会. *ここまで進んだバイオセンシング・イメージング: 1分子から細胞,脳まで*. (化学同人, 2012).
  24. Femino, A. M., Fay, F. S., Fogarty, K. & Singer, R. H. Visualization of Single RNA Transcripts in Situ. **280**, (1998).
  25. Hama, H. *et al.* Scale: a chemical approach for fluorescence imaging and reconstruction of transparent mouse brain. *Nat. Neurosci.* **14**, 1481–1488 (2011).
  26. Sakakibara, D. *et al.* Protein structure determination in living cells by in-cell NMR spectroscopy. **458**, (2009).
  27. Wang, L. V & Hu, S. Photoacoustic Tomography: In Vivo Imaging from Organelles to Organs. 1458–1463 (2012).
  28. Miller, M. J., Wei, S. H., Parker, I. & Cahalan, M. D. Two-Photon Imaging of

- Lymphocyte Motility and Antigen Response in Intact Lymph Node. **296**, 1869–1874 (2002).
29. Zhang, K. Y. *et al.* Long-Lived Emissive Probes for Time-Resolved Photoluminescence Bioimaging and Biosensing. *Chem. Rev.* **acs.chemrev.7b00425** (2018). doi:10.1021/acs.chemrev.7b00425
  30. Chen, G., Roy, I., Yang, C. & Prasad, P. N. Nanochemistry and Nanomedicine for Nanoparticle-based Diagnostics and Therapy. *Chem. Rev.* **116**, 2826–2885 (2016).
  31. Farka, Z., Juřík, T., Kovář, D., Trnková, L. & Skládal, P. Nanoparticle-Based Immunochemical Biosensors and Assays: Recent Advances and Challenges. *Chem. Rev.* **acs.chemrev.7b00037** (2017). doi:10.1021/acs.chemrev.7b00037
  32. Lei, Y., Chen, W. & Mulchandani, A. Microbial biosensors. *Anal. Chim. Acta* **568**, 200–210 (2006).
  33. Cao, S.-H. *et al.* Turning on fluorescence by plasmonic assembly with large tunable spacing: a new observation and its biosensing application. *Chem. Commun.* **50**, 518–520 (2014).
  34. Hildebrandt, N. *et al.* Energy Transfer with Semiconductor Quantum Dot Bioconjugates: A Versatile Platform for Biosensing, Energy Harvesting, and Other Developing Applications. *Chem. Rev.* **acs.chemrev.6b00030** (2016). doi:10.1021/acs.chemrev.6b00030
  35. Gohla, S., Ma, K. & Mu, R. H. Solid lipid nanoparticles ( SLN ) for controlled drug delivery ± a review of the state of the art. **50**, (2000).
  36. Kanamala, M., Wilson, W. R., Yang, M., Palmer, B. D. & Wu, Z. Biomaterials Mechanisms and biomaterials in pH-responsive tumour targeted drug delivery : A review. *Biomaterials* **85**, 152–167 (2016).
  37. Neuberger, T., Scho, B., Hofmann, M. & Rechenberg, B. Von. Superparamagnetic nanoparticles for biomedical applications : Possibilities and limitations of a new drug delivery system. **293**, 483–496 (2005).
  38. Challa, R., Ahuja, A., Ali, J. & Khar, R. K. Cyclodextrins in Drug Delivery : An Updated Review. **6**, 329–357 (2005).
  39. Ra, A., Real, R. P. & Pe, J. A New Property of MCM-41 : Drug Delivery System. 308–311 (2001). doi:10.1021/cm0011559
  40. Chen, W. *et al.* Black Phosphorus Nanosheet-Based Drug Delivery System for Synergistic Photodynamic / Photothermal / Chemotherapy of Cancer. 1–7 (2017). doi:10.1002/adma.201603864
  41. Shimomura, O., Frank H., J. & Yo, S. Extraction , Purification and Properties of Aequorin , a Bioluminescent Protein from the Luminous. **1353**, 223–239 (1887).
  42. Smith, B. R. & Gambhir, S. S. Nanomaterials for In Vivo Imaging. **117**, 901



- (2017).
43. Xu, G. *et al.* New Generation Cadmium-Free Quantum Dots for Biophotonics and Nanomedicine. *Chem. Rev.* **116**, 12234–12327 (2016).
  44. Kova, D. & Skla, P. Nanoparticle-Based Immunochemical Biosensors and Assays : Recent Advances and Challenges *Zdene k.* **117**, 9973 (2017).
  45. Schmid, G. & others. *Nanoparticles.* (Wiley VCH, 2005).
  46. Hines, M. A. & Guyot-Sionnest, P. Synthesis and characterization of strongly luminescing ZnS- Capped CdSe nanocrystals. *J. Phys. Chem.* **100**, 468–471 (1996).
  47. Dabbousi, B. O. *et al.* (CdSe)ZnS Core–Shell Quantum Dots: Synthesis and Characterization of a Size Series of Highly Luminescent Nanocrystallites. *J. Phys. Chem. B* **101**, 9463–9475 (1997).
  48. Bruchez Jr., M., Mario, M., Peter, G., Shimon, W. & Alivisatos, A. P. Semiconductor Nanocrystals as Fluorescent Biological Labels. *Science (80- )*. **281**, 2013–2016 (1998).
  49. Zhang, S., Geryak, R., Geldmeier, J., Kim, S. & Tsukruk, V. V. Synthesis, Assembly, and Applications of Hybrid Nanostructures for Biosensing. **117**, 12942–13038 (2017).
  50. Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R. & Nann, T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods* **5**, 763–775 (2008).
  51. Gao, X., Cui, Y., Levenson, R. M., Chung, L. W. K. & Nie, S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **22**, 969–976 (2004).
  52. Kim M. Tsoi, Qin Dai, Benjamin A. Alman, W. C. W. C. Are Quantum Dots Toxic? Exploring the Discrepancy Between Cell Culture and Animal Studies. *Acc. Chem. Res.* **46**, 662–671 (2013).
  53. Dasog, M., Kehrle, J., Rieger, B. & Veinot, J. G. C. Silicon Nanocrystals and Silicon-Polymer Hybrids : Synthesis , Surface Engineering , and Applications *Angewandte.* 2322–2339 (2016). doi:10.1002/anie.201506065
  54. Farrell, N. O. Silicon nanoparticles : applications in cell biology and medicine. *Int. J. Nanomedecine* **1**, 451–472 (2006).
  55. Peng, F. *et al.* Silicon nanomaterials platform for bioimaging, biosensing, and cancer therapy. *Acc. Chem. Res.* **47**, 612–623 (2014).
  56. Osminkina, L. a. *et al.* Photoluminescent biocompatible silicon nanoparticles for cancer theranostic applications. *J. Biophotonics* **5**, 529–535 (2012).
  57. Chelikowky, J. R. & Cohen, M. L. Nonlocal pseudopotential calculations for the

- electronic structure of eleven diamond and zinc-blende semiconductors. *Phys. Rev. B* **14**, (1976).
58. Kittel, C. & others. *Introduction to solid state physics*. **8**, (Wiley New York, 1976).
  59. Kovalev, D., Heckler, H., Polisski, G. & Koch, F. Optical Properties of Si Nanocrystals. *Phys. Status Solidi* **215**, 871–932 (1999).
  60. L. T. Canham. Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers. *Appl. Phys. Lett.* **57**, 1046 (1990).
  61. Kovalev, D., Heckler, H., Polisski, G. & Koch, F. Optical Properties of Si Nanocrystals. *Phys. Status Solidi* **215**, 871–932 (1999).
  62. Takeoka, S., Fujii, M. & Hayashi, S. Size-dependent photoluminescence from surface-oxidized Si nanocrystals in a weak confinement regime. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **62**, 16820–16825 (2000).
  63. Yu, Y. *et al.* Size-Dependent Photoluminescence Efficiency of Silicon Nanocrystal Quantum Dots. *J. Phys. Chem. C* acs.jpcc.7b08054 (2017). doi:10.1021/acs.jpcc.7b08054
  64. Sugimoto, H., Fujii, M., Imakita, K., Hayashi, S. & Akamatsu, K. Phosphorus and boron codoped colloidal silicon nanocrystals with inorganic atomic ligands. *J. Phys. Chem. C* **117**, 6807–6813 (2013).
  65. Sugimoto, H., Fujii, M. & Imakita, K. Synthesis of boron and phosphorus codoped all-inorganic colloidal silicon nanocrystals from hydrogen silsesquioxane. *Nanoscale* **6**, 12354–9 (2014).
  66. Hori, Y., Kano, S., Sugimoto, H., Imakita, K. & Fujii, M. Size-Dependence of Acceptor and Donor Levels of Boron and Phosphorus Codoped Colloidal Silicon Nanocrystals. *Nano Lett.* **16**, 2615–2620 (2016).
  67. Fujii, M., Sugimoto, H. & Imakita, K. All-inorganic colloidal silicon nanocrystals—surface modification by boron and phosphorus co-doping. *Nanotechnology* **27**, 262001 (2016).
  68. Sugimoto, H., Yamamura, M., Sakiyama, M. & Fujii, M. Visualizing a core-shell structure of heavily doped silicon quantum dots by electron microscopy using an atomically thin support film. *Nanoscale* **10**, 7357–7362 (2018).
  69. Li, C. & Wang, Q. Challenges and Opportunities for Intravital Near-Infrared Fluorescence Imaging Technology in the Second Transparency Window. *ACS Nano* **12**, 9654–9659 (2018).
  70. Welsher, K., Sherlock, S. P. & Dai, H. Deep-tissue anatomical imaging of mice using carbon nanotube fluorophores in the second near-infrared window. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 8943–8948 (2011).
  71. Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. The Optical Properties of

- Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 668–677 (2003).
72. 梶川浩太郎, 岡本隆之, 高原淳一 & 岡本晃一. アクティブ・プラズモニクス. (Koronasha, 2013).
  73. 岡本隆之 & 梶川浩太郎. プラズモニクス: 基礎と応用. (講談社, 2010).
  74. プラズモンナノ材料の開発と応用. (シーエムシー出版, 2011).
  75. Novotny, L. & van Hulst, N. Antennas for light. *Nat. Photonics* **5**, 83–90 (2011).
  76. Wang, W. *et al.* Modulated photoluminescence of graphene quantum dots in the vicinity of an individual silver nano-octahedron. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 4504–9 (2014).
  77. Cohen-Hoshen, E., Bryant, G. W., Pinkas, I., Sperling, J. & Bar-Joseph, I. Exciton Plasmon Interactions in Quantum Dot Gold Nanoparticle Structures. *Nano Lett.* **12**, 4260–4264 (2012).
  78. Gueroui, Z. & Libchaber, A. Single-molecule measurements of gold-quenched quantum dots. *Phys. Rev. Lett.* **93**, 1–4 (2004).
  79. Naiki, H. *et al.* Modulated exciton-plasmon interactions in Au-SiO<sub>2</sub>-CdTe composite nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **117**, 2455–2459 (2013).
  80. Schneider, G. *et al.* Distance-dependent fluorescence quenching on gold nanoparticles ensheathed with layer-by-layer assembled polyelectrolytes. *Nano Lett.* **6**, 530–536 (2006).
  81. Drummy, L. F. *et al.* Large Scale Solution Assembly of Quantum Dot À Gold Nanorod Architectures with Plasmon Enhanced Fluorescence. 9064–9074 (2013).
  82. Focsan, M., Gabudean, A. M., Vulpoi, A. & Astilean, S. Controlling the luminescence of carboxyl-functionalized CdSe/ZnS core-shell quantum dots in solution by binding with gold nanorods. *J. Phys. Chem. C* **118**, 25190–25199 (2014).
  83. Naiki, H. *et al.* Highly controlled plasmonic emission enhancement from metal-semiconductor quantum dot complex nanostructures. *J. Phys. Chem. C* **117**, 2455–2459 (2013).
  84. Lee, J., Govorov, A. O., Dulka, J. & Kotov, N. a. Bioconjugates of CdTe nanowires and Au nanoparticles: Plasmon-exciton interactions, luminescence enhancement, and collective effects. *Nano Lett.* **4**, 2323–2330 (2004).
  85. Harun, N. A., Benning, M. J., Horrocks, B. R. & Fulton, D. a. Gold nanoparticle-enhanced luminescence of silicon quantum dots co-encapsulated in polymer nanoparticles. *Nanoscale* **5**, 3817–27 (2013).
  86. Ma, X. *et al.* Photoluminescence of Individual Au/CdSe Nanocrystal Complexes

- with Variable Interparticle Distances. *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 2466–2471 (2011).
87. Jin, S. *et al.* Distance-engineered plasmon-enhanced light harvesting in CdSe quantum dots. *J. Phys. Chem. Lett.* **4**, 3527–3533 (2013).
  88. Biteen, J. S. *et al.* Plasmon-Enhanced Photoluminescence of Silicon Quantum Dots : Simulation and Experiment Plasmon-Enhanced Photoluminescence of Silicon Quantum Dots : Simulation and Experiment. *J. Phys. Chem. C* **111**, 13372–13377 (2007).
  89. Biteen, J. S., Lewis, N. S., Atwater, H. A., Mertens, H. & Polman, A. Spectral tuning of plasmon-enhanced silicon quantum dot luminescence. *Appl. Phys. Lett.* **88**, 133–136 (2006).
  90. Erogbogbo, F. *et al.* Plasmonic gold and luminescent silicon nanoplatforms for multimode imaging of cancer cells. *Integr. Biol.* 144–150 (2012). doi:10.1039/c2ib20100c
  91. Fedlheim, D. L. & Foss, C. A. *Metal nanoparticles: synthesis, characterization, and applications*. (CRC press, 2001).
  92. Eustis, S. & El-Sayed, M. A. Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: Noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes. *Chem. Soc. Rev.* **35**, 209–217 (2006).
  93. Doria, G. *et al.* Noble metal nanoparticles for biosensing applications. *Sensors* **12**, 1657–1687 (2012).
  94. Sau, T. K., Rogach, A. L., Jäckel, F., Klar, T. A. & Feldmann, J. Properties and applications of colloidal nonspherical noble metal nanoparticles. *Adv. Mater.* **22**, 1805–1825 (2010).
  95. Kamat, P. V. Photophysical, photochemical and photocatalytic aspects of metal nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **106**, 7729–7744 (2002).
  96. Jain, P. K., Huang, X., El-Sayed, I. H. & El-Sayed, M. A. Review of some interesting surface plasmon resonance-enhanced properties of noble metal nanoparticles and their applications to biosystems. *Plasmonics* **2**, 107–118 (2007).
  97. Narayanan, R. & El-Sayed, M. A. Shape-dependent catalytic activity of platinum nanoparticles in colloidal solution. *Nano Lett.* **4**, 1343–1348 (2004).
  98. Zhao, Y., Fan, L., Zhong, H., Li, Y. & Yang, S. Platinum nanoparticle clusters immobilized on multiwalled carbon nanotubes: Electrodeposition and enhanced electrocatalytic activity for methanol oxidation. *Adv. Funct. Mater.* **17**, 1537–1541 (2007).
  99. Wang, C., Daimon, H., Onodera, T., Koda, T. & Sun, S. A general approach to the size- and shape-controlled synthesis of platinum nanoparticles and their catalytic reduction of oxygen. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **47**, 3588–3591 (2008).

100. Pankhurst, Q. A., Connolly, J., Jones, S. K. & Dobson, J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **36**, 167 (2003).
101. Q A, P., N T K, T., S K, J. & J, D. Progress in applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **42**, 224001 (2009).
102. Berry, C. C. & Curtis, A. S. G. Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **36**, 198 (2003).
103. Gao, J., Gu, H. & Xu, B. Multifunctional Magnetic Nanoparticles : Design , Synthesis , and Biomedical Applications. **42**, (2009).
104. Chen, G. *et al.* A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on Escherichia coli and Staphylococcus aureus. *J. Biomed. Mater. Res.* **52**, 662–668 (2000).
105. Dakal, T. C., Kumar, A., Majumdar, R. S. & Yadav, V. Mechanistic basis of antimicrobial actions of silver nanoparticles. *Front. Microbiol.* **7**, 1–17 (2016).
106. Prabhu, S. & Poulose, E. K. Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. *Int. Nano Lett.* **2**, 32 (2012).
107. Rai, M., Yadav, A. & Gade, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. *Biotechnol. Adv.* **27**, 76–83 (2009).
108. Morones, J. R. & Elechiguerra, J. L. The bactericidal effect of silver nanoparticles. *Nanotechnology* **16**, 2346–53 (2005).
109. Rai, M. K., Deshmukh, S. D., Ingle, A. P. & Gade, A. K. Silver nanoparticles: The powerful nanoweapon against multidrug-resistant bacteria. *J. Appl. Microbiol.* **112**, 841–852 (2012).
110. Sondi, I. & Salopek-Sondi, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: A case study on E. coli as a model for Gram-negative bacteria. *J. Colloid Interface Sci.* **275**, 177–182 (2004).
111. Chernousova, S. & Epple, M. Silver as antibacterial agent: Ion, nanoparticle, and metal. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **52**, 1636–1653 (2013).
112. Pal, S., Tak, Y. K. & Song, J. M. Does the antibacterial activity of silver nanoparticles depend on the shape of the nanoparticle? A study of the gram-negative bacterium Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **290**, 1712–1720 (2015).
113. Durán, N. *et al.* Silver nanoparticles: A new view on mechanistic aspects on antimicrobial activity. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **12**, 789–799 (2016).
114. Dizaj, S. M., Lotfipour, F., Barzegar-Jalali, M., Zarrintan, M. H. & Adibkia, K. Antimicrobial activity of the metals and metal oxide nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **44**, 278–284 (2014).

115. Jain, P. & Pradeep, T. Potential of silver nanoparticle-coated polyurethane foam as an antibacterial water filter. *Biotechnol. Bioeng.* **90**, 59–63 (2005).
116. Lv, M. *et al.* Long-term antimicrobial effect of silicon nanowires decorated with silver nanoparticles. *Adv. Mater.* **22**, 5463–5467 (2010).
117. Kumar, A., Vemula, P. K., Ajayan, P. M. & John, G. Silver-nanoparticle-embedded antimicrobial paints based on vegetable oil. *Nat. Mater.* **7**, 236–241 (2008).
118. Maneerung, T., Tokura, S. & Rujiravanit, R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. *Carbohydr. Polym.* **72**, 43–51 (2008).
119. Dubas, S. T., Kumlangdudsana, P. & Potiyaraj, P. Layer-by-layer deposition of antimicrobial silver nanoparticles on textile fibers. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **289**, 105–109 (2006).
120. Zhao, S., Yao, J., Fei, X., Shao, Z. & Chen, X. An antimicrobial film by embedding in situ synthesized silver nanoparticles in soy protein isolate. *Mater. Lett.* **95**, 142–144 (2013).
121. Song, J., Kang, H., Lee, C., Hwang, S. H. & Jang, J. Aqueous synthesis of silver nanoparticle embedded cationic polymer nanofibers and their antibacterial activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 460–465 (2012).
122. Zhao, R. *et al.* Stable Nanocomposite Based on PEGylated and Silver Nanoparticles Loaded Graphene Oxide for Long-Term Antibacterial Activity. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 15328–15341 (2017).
123. Fellahi, O. *et al.* The antimicrobial effect of silicon nanowires decorated with silver and copper nanoparticles. *Nanotechnology* **24**, 495101 (2013).
124. Kim, T. *et al.* Composite Porous Silicon-Silver Nanoparticles as Theranostic Antibacterial Agents. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 30449–30457 (2016).
125. Chan, W. C. W. *et al.* Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 40–46 (2002).
126. Michalet, X. Quantum Dots for Live Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics. *Science (80-. )*. **307**, 538–544 (2005).
127. Bhattacharjee, S. *et al.* Cytotoxicity of surface-functionalized silicon and germanium nanoparticles: the dominant role of surface charges. *Nanoscale* **5**, 4870–4883 (2013).
128. Ruizendaal, L. *et al.* Synthesis and cytotoxicity of silicon nanoparticles with covalently attached organic monolayers. *Nanotoxicology* **3**, 339–347 (2009).
129. Rosso-Vasic, M. *et al.* Amine-terminated silicon nanoparticles: synthesis, optical properties and their use in bioimaging. *J. Mater. Chem.* **19**, 5926–5933 (2009).

130. Choi, J., Sun Wang, N. & Reipa, V. Conjugation of the photoluminescent silicon nanoparticles to streptavidin. *Bioconjug. Chem.* **19**, 680–685 (2008).
131. Wang, L., Reipa, V. & Blasic, J. Silicon Nanoparticles as a Luminescent Label to DNA. *Bioconjug. Chem.* **15**, 409–412 (2004).
132. Ruizendaal, L., Pujari, S. P., Gevaerts, V., Paulusse, J. M. J. & Zuilhof, H. Biofunctional silicon nanoparticles by means of thiol-ene click chemistry. *Chem. - An Asian J.* **6**, 2776–2786 (2011).
133. Intartaglia, R. *et al.* Bioconjugated silicon quantum dots from one-step green synthesis. *Nanoscale* **4**, 1271–1274 (2012).
134. Chatterjee, S. & Mukherjee, T. K. Spectroscopic investigation of interaction between bovine serum albumin and amine-functionalized silicon quantum dots. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 8400–8 (2014).
135. Ahire, J. H. *et al.* Highly luminescent and nontoxic amine-capped nanoparticles from porous silicon: Synthesis and their use in biomedical imaging. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **4**, 3285–3292 (2012).
136. Shiohara, A. *et al.* Sized controlled synthesis, purification and cell studies with silicon quantum dots. *Nanoscale* **3**, 3364–3370 (2011).
137. Sato, S. & Swihart, M. T. Propionic-acid-terminated silicon nanoparticles: Synthesis and optical characterization. *Chem. Mater.* **18**, 4083–4088 (2006).
138. He, Y. *et al.* One-pot microwave synthesis of water-dispersible, ultraphoto- and pH-stable, and highly fluorescent silicon quantum dots. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14192–14195 (2011).
139. Yu, Y. *et al.* Room temperature hydrosilylation of silicon nanocrystals with bifunctional terminal alkenes. *Langmuir* **29**, 1533–1540 (2013).
140. He, Y. *et al.* Ultrastable, highly fluorescent, and water-dispersed silicon-based nanospheres as cellular probes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **48**, 128–132 (2009).
141. Frangioni, J. V. In vivo near-infrared fluorescence imaging. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **7**, 626–634 (2003).
142. 古田 健太. 修士論文 シリコンナノ結晶間の共鳴エネルギー移動に関する研究. (2015).
143. Sugimoto, H., Fujii, M. & Imakita, K. Silicon nanocrystal-noble metal hybrid nanoparticles. *Nanoscale* **8**, 10956–10962 (2016).
144. 菅野天. シリコンベースコロイド状半導体量子ドットの開発と単一ドット分光に関する研究. 博士論文 (2017).
145. Liu, N., Prall, B. S. & Klimov, V. I. Hybrid gold/silica/nanocrystal-quantum-dot superstructures: Synthesis and analysis of semiconductor-metal interactions. *J.*

- Am. Chem. Soc.* **128**, 15362–15363 (2006).
146. Park, S. E., Park, M. Y., Han, P. K. & Lee, S. W. The effect of pH-adjusted gold colloids on the formation of gold clusters over APTMS-coated silica cores. *Bull. Korean Chem. Soc.* **27**, 1341–1345 (2006).
  147. Quang, D. V., Kim, J. K., Sarawade, P. B., Tuan, D. H. & Kim, H. T. Preparation of amino-functionalized silica for copper removal from an aqueous solution. *J. Ind. Eng. Chem.* **18**, 83–87 (2012).
  148. Kulkarni, S. A., Ogale, S. B. & Vijayamohanan, K. P. Tuning the hydrophobic properties of silica particles by surface silanization using mixed self-assembled monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* **318**, 372–379 (2008).
  149. Lindsey, C. P. & Patterson, G. D. Detailed comparison of the Williams–Watts and Cole–Davidson functions. *J. Chem. Phys.* **73**, 3348 (1980).
  150. Linnros, J., Lalic, N., Galeckas, A. & Grivickas, V. Analysis of the stretched exponential photoluminescence decay from nanometer-sized silicon crystals in SiO<sub>2</sub>. *J. Appl. Phys.* **86**, 6128 (1999).
  151. Li, Q., Kuo, C. W., Yang, Z., Chen, P. & Chou, K. C. Surface-enhanced IR-visible sum frequency generation vibrational spectroscopy. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 3436–3442 (2009).
  152. Mertens, H., Biteen, J. S., Atwater, H. a & Polman, A. Polarization-selective plasmon-enhanced silicon quantum-dot luminescence. *Nano Lett.* **6**, 2622–2625 (2006).
  153. Biteen, J. S., Pacifici, D., Lewis, N. S. & Atwater, H. a. Enhanced radiative emission rate and quantum efficiency in coupled silicon nanocrystal-nanostructured gold emitters. *Nano Lett.* **5**, 1768–1773 (2005).
  154. Mochizuki, Y., Fujii, M., Hayashi, S., Tsuruoka, T. & Akamatsu, K. Enhancement of photoluminescence from silicon nanocrystals by metal nanostructures made by nanosphere lithography. *J. Appl. Phys.* **106**, 1–5 (2009).
  155. Sugimoto, H. *et al.* Enhanced photoluminescence of Si nanocrystals-doped cellulose nanofibers by plasmonic light scattering. *Appl. Phys. Lett.* **107**, 041111 (2015).
  156. Sugimoto, H. *et al.* Plasmon-Enhanced Emission Rate of Silicon Nanocrystals in Gold Nanorod Composites. *ACS Photonics* **2**, 1298–1305 (2015).
  157. Schneider, G. & Decher, G. From functional core/shell nanoparticles prepared via layer-by-layer deposition to empty nanospheres. *Nano Lett.* **4**, 1833–1839 (2004).
  158. Kunishima, M., Kawachi, C., Hioki, K., Terao, K. & Tani, S. Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol- and water-soluble condensing agent: DMT-MM. *Tetrahedron* **57**, 1551–1558 (2001).



159. Jin, R., Wu, G., Li, Z., Mirkin, C. A. & Schatz, G. C. What controls the melting properties of DNA-linked gold nanoparticle assemblies? *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 1643–1654 (2003).
160. Inoue, A., Sugimoto, H., Yaku, H. & Fujii, M. DNA assembly of silicon quantum dots/gold nanoparticle nanocomposites. *RSC Adv.* **6**, 63933–63939 (2016).
161. Sugimoto, H. *et al.* Plasmon-Enhanced Emission Rate of Silicon Nanocrystals in Gold Nanorod Composites. *ACS Photonics* **2**, 1298–1305 (2015).
162. Lin, W. C. *et al.* Size Dependence of Nanoparticle-SERS Enhancement from Silver Film over Nanosphere (AgFON) Substrate. *Plasmonics* **6**, 201–206 (2011).
163. Zhang, X. & Van Duyne, R. P. Optimized silver film over nanosphere surfaces for the biowarfare agent detection based on surface-enhanced Raman spectroscopy. *Mater. Res. Soc. Symp. Proc.* **876**, R8.54.1–R8.54.6 (2005).
164. Farcău, C. & Aștilean, S. Silver half-shell arrays with controlled plasmonic response for fluorescence enhancement optimization. *Appl. Phys. Lett.* **95**, 1–4 (2009).
165. Sugawa, K. *et al.* Metal-enhanced fluorescence platforms based on plasmonic ordered copper arrays: Wavelength dependence of quenching and enhancement effects. *ACS Nano* **7**, 9997–10010 (2013).
166. Kulakovich, O. *et al.* Enhanced Luminescence of CdSe Quantum Dots on Gold Colloids. *Nano Lett.* **2**, 1449–1452 (2002).
167. Chan, Y. H. *et al.* Using patterned arrays of metal nanoparticles to probe plasmon enhanced luminescence of CdSe quantum dots. *ACS Nano* **3**, 1735–1744 (2009).
168. Cui, Q., He, F., Li, L. & Mohwald, H. Controllable metal-enhanced fluorescence in organized films and colloidal system. *Adv. Colloid Interface Sci.* **207**, 164–177 (2014).
169. Lvov, Y., Ariga, K., Kunitake, T. & Ichinose, I. Assembly of Multicomponent Protein Films by Means of Electrostatic Layer-by-Layer Adsorption. *J. Am. Chem. Soc.* **117**, 6117–6123 (1995).
170. Lvov, Y., Decher, G. & Mohwald, M. Assembly, Structural Characterization, and Thermal Behavior of Layer-by-Layer Deposited Ultrathin Films of Poly(vinyl sulfate) and Poly(allylamine). *Langmuir* **9**, 481–486 (1993).
171. Gittins, D. I. & Caruso, F. Tailoring the polyelectrolyte coating of metal nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **105**, 6846–6852 (2001).
172. Yoshida, K. Development of Functional Thin Polymer Films Using a Layer-by-Layer Deposition Technique. *Yakugaku Zasshi* **137**, 1215–1221 (2017).
173. Decher, G. & Schmitt, J. Buildup of ultrathin multilayer films by a self-assembly process III. 831–835 (1992). doi:10.1016/0040-6090(92)90417-A

- 
174. Drexler, C. I., Moore, K. B., Causey, C. P. & Mullen, T. J. Atomic force microscopy characterization and lithography of cu-ligated mercaptoalkanoic acid 'molecular ruler' multilayers. *Langmuir* **30**, 7447–7455 (2014).
  175. Ma, C. *et al.* Supported lipid bilayers lifted from the substrate by layer-by-layer polyion cushions on self-assembled monolayers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **28**, 319–329 (2003).
  176. Bruggeman, D. A. G. The calculation of various physical constants of heterogeneous substances. I. The dielectric constants and conductivities of mixtures composed of isotropic substances. *Ann. Phys. (N. Y.)* **416**, 636–791 (1935).
  177. Yoshinobu, M. 銀イオンや銅イオンの抗菌性-作用メカニズムと微生物適応戦略. *化学と教育* **53**, 288 (2005).
  178. Kong, H. & Jang, J. Antibacterial properties of novel poly(methyl methacrylate) nanofiber containing silver nanoparticles. *Langmuir* **24**, 2051–2056 (2008).
  179. Pepper, I. L., Gerba, C. P. & Gentry, T. J. *Environmental Microbiology*. (Academic Press, 2014).
  180. Richard, T. Interpretation of the Correlation Coefficient: A Basic Review.
  181. Gu, L. *et al.* In Vivo Time-gated Fluorescence Imaging with Biodegradable Luminescent Porous Silicon Nanoparticles. *Nat. Commun.* **4**, (2013).
  182. Tu, C. *et al.* Time-gated Imaging on Live Cancer Cells Using Silicon Quantum Dot Nanoparticles with Long-lived Fluorescence. **4**, 1306–1315 (2017).
  183. Dahan, M. *et al.* Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots. *Opt. Lett.* **26**, 825 (2001).
  184. Online, V. A., Mandal, G., Darragh, M., Wang, Y. A. & Heyes, C. D. Cadmium-free quantum dots as time-gated bioimaging probes in highly-autofluorescent human breast cancer cells †. 624–626 (2013). doi:10.1039/c2cc37529j
  185. Deng, W., Jin, D., Drozdowicz-tomsia, K., Yuan, J. & Goldys, E. M. Europium Chelate ( BHHCT-Eu 3 þ ) and Its Metal Nanostructure Enhanced Luminescence Applied to Bioassays and Time-Gated Bioimaging. **26**, 10036–10043 (2010).
  186. Links, D. A. ChemComm COMMUNICATION A europium ( III ) chelate as an efficient time-gated luminescent probe for nitric oxide w. 6266–6268 (2011). doi:10.1039/c0cc05658h
  187. Joo, J. *et al.* Gated Luminescence Imaging of Silicon Nanoparticles. *ACS Nano* **9**, 6233–6241 (2015).
  188. Joo, J., Cruz, J. F., Vijayakumar, S., Grondek, J. & Sailor, M. J. Photoluminescent porous Si/SiO<sub>2</sub> core/shell nanoparticles prepared by borate oxidation. *Adv. Funct. Mater.* 5688–5694 (2014). doi:10.1002/adfm.201400587

189. Secret, E. *et al.* Two-photon excitation of porphyrin-functionalized porous silicon nanoparticles for photodynamic therapy. *Adv. Mater.* **26**, 7643–7648 (2014).
190. Roberts, D. S. *et al.* Preparation of Photoluminescent Porous Silicon Nanoparticles by High-Pressure Microfluidization. *Part. Part. Syst. Charact.* 1600326 (2017). doi:10.1002/ppsc.201600326
191. Kim, D. *et al.* Two-Photon In Vivo Imaging with Porous Silicon Nanoparticles. *Adv. Mater.* **29**, 1–8 (2017).
192. Crosby, G. A. & Demas, J. N. Measurement of photoluminescence quantum yields. Review. *J. Phys. Chem.* **75**, 991–1024 (1971).
193. Eaton, D. F. International Union of Pure Commission on Photochemistry \* Reference Materials for. *Pure Appl. Chem.*, **60**, 1107–1114 (1988).
194. 発光の事典: 基礎からイメージングまで,. (朝倉書店, 2015).
195. Suzuki, K. *et al.* Reevaluation of absolute luminescence quantum yields of standard solutions using a spectrometer with an integrating sphere and a back-thinned CCD detector. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11**, 9850–9860 (2009).
196. 佐々木誠仁. シリコンナノ結晶塗布薄膜の電気伝導特性評価. (2015).
197. Sasaki, M., Kano, S., Sugimoto, H., Imakita, K. & Fujii, M. Surface Structure and Current Transport Property of Boron and Phosphorous Co-doped Silicon Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* acs.jpcc.5b05604 (2015). doi:10.1021/acs.jpcc.5b05604
198. Sailor, M. J. *Porous silicon in practice: preparation, characterization and applications.* (John Wiley & Sons, 2012).
199. Tadrous, P. J. *et al.* Fluorescence lifetime imaging of unstained tissues: Early results in human breast cancer. *J. Pathol.* **199**, 309–317 (2003).
200. Andersson-Engels, S., Johansson, J., Svanberg, K. & Svanberg, S. Fluorescence Imaging and Point Measurements of Tissue: Applications To the Demarcation of Malignant Tumors and Atherosclerotic Lesions From Normal Tissue. *Photochem. Photobiol.* **53**, 807–814 (1991).
201. Boens, N. *et al.* Fluorescence lifetime standards for time and frequency domain fluorescence spectroscopy. *Anal. Chem.* **79**, 2137–2149 (2007).
202. Anglin, E. J., Cheng, L., Freeman, W. R. & Sailor, M. J. Porous silicon in drug delivery devices and materials. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**, 1266–1277 (2008).
203. Zuidema, J. M. *et al.* Oriented Nanofibrous Polymer Scaffolds Containing Protein-Loaded Porous Silicon Generated by Spray Nebulization. *Adv. Mater.* **1706785**, 1–8 (2018).
204. Kang, J. *et al.* Self-Sealing Porous Silicon-Calcium Silicate Core???Shell

- Nanoparticles for Targeted siRNA Delivery to the Injured Brain. *Adv. Mater.* **28**, 7962–7969 (2016).
205. Kim, B. *et al.* modulates macrophage response to Staphylococcus. *Nat. Commun.* **9**, (2018).
206. Sakiyama, M., Sugimoto, H. & Fujii, M. Long-lived luminescence of colloidal silicon quantum dots for time-gated fluorescence imaging in the second near infrared window in biological tissue. *Nanoscale* **10**, 13902–13907 (2018).

## 謝辞

本研究の指導教官として、学部3年前期の早期配属の頃から博士課程までの5年半にわたり、研究の方針から実験指導、データの解釈やプレゼンテーション方法等、多岐にわたり御指導を下さいました、藤井稔教授に厚く御礼申し上げます。

本研究に関して、貴重なご助言から研究に対する取り組み方、心構え等を御指導を下さいました加納伸也助教に厚く御礼申し上げます。

本研究において、実験方法からデータの解釈、論文の執筆方法等、直属の先輩として丁寧に御指導を下さいました杉本泰助教に厚く御礼申し上げます。

本研究を進めるにあたり、バイオ分野における貴重なご助言、ご意見を下さいましたパナソニック株式会社センサ・デバイス研究所の研究員の方々に厚く御礼申し上げます。同じ研究室での博士課程の学生として色々のご助言、ご協力を頂いた、塩井正彦様、柳川博人様に、深く感謝致します。

本研究におけるバイオ応用に関する実験を進めるにあたり、共同研究者としてご協力頂いた Prof. Michael J. Sailor (University of California, San Diego)、及び Sailor Group のメンバーに深く感謝致します。

5年半の期間に、共に研究活動を行った藤井研究室の卒業生、在学生の方々には深く感謝致します。

最後に、これまでの学生生活を温かく見守ってくれた家族に深く感謝致します。

## 研究業績

### PUBLICATION

---

- [1] **A. Inoue**, M. Fujii, H. Sugimoto, and K. Imakita, "Surface Plasmon-Enhanced Luminescence of Silicon Quantum Dots in Gold Nanoparticle Composites", *The Journal of Physical Chemistry C*, American Chemical Society Publications, Vol.119, No.44, pp.25108-25113, 2015
- [2] H. Sugimoto, S. Yashima, K. Furuta, **A. Inoue**, and M. Fujii, "Probing Purcell enhancement in plasmonic nanoantennas by broadband luminescent Si quantum dots", *Applied Physics Letters*, America Institute of Physics Publishing, Vol.108, No.24, pp.241103, 2016
- [3] **A. Inoue**, H. Sugimoto, and M. Fujii, "DNA assembly of silicon quantum dots/gold nanoparticle nanocomposites", *RSC Advances*, Royal Society of Chemistry, Vol.6, No.68, pp.63933-63939, 2016
- [4] **A. Inoue**, H. Sugimoto, and M. Fujii, "Photoluminescence Enhancement of Silicon Quantum Dot Monolayer by Double Resonance Plasmonic Substrate", *The Journal of Physical Chemistry C*, American Chemical Society Publications, Vol.121, pp.11609-11615, 2017
- [5] H. Yanagawa, **A. Inoue**, H. Sugimoto, M. Shioi and M. Fujii, "Photoluminescence Enhancement of Silicon Quantum Dot Monolayer by Plasmonic Substrate Fabricated by Nano-Imprint Lithography", *Journal of Applied Physics*, America Institute of Physics Publishing, Vol 122, 223101, 2017

### INTERNATIONAL CONFERENCE (with peer review)

---

- [1] (poster) **A. Inoue**, H. Sugimoto, K. Imakita and M. Fujii, "Surface Plasmon Enhanced Absorption Cross-Section of Silicon Quantum Dots in Gold Nanoparticle Composites", 2016 Materials Research Society Spring Meeting & Exhibit, Phoenix, Arizona, USA (April 2016)
- [2] (oral) **A. Inoue**, H. Sugimoto, K. Imakita and M. Fujii, "Surface Plasmon Enhanced Photoluminescence from Silicon Quantum Dots Monolayer", 2017 European Materials Research Society Spring Meeting & Exhibit, Strasbourg, France (May 2017)
- [3] (poster) **A. Inoue**, H. Sugimoto, B. Kim, M.J. Sailor and M. Fujii, "Silver Core/Silicon Nanocrystal Shell Hybrid Nanoparticle as Antimicrobial Agent", 2018 Materials Research Society Fall Meeting & Exhibit, Boston, Massachusetts, USA (November 2018)

## INTERNATIONAL CONFERENCE (without peer review)

[1] (poster) A. Inoue, H. Sugimoto, K. Imakita and M. Fujii, "Surface Plasmon Enhanced Luminescence of Silicon Quantum Dots in Gold Nanoparticle Composites", Asian CORE Student Meeting 2015, Osaka, Japan (December 2015)

## DOMESTIC CONFERENCE

[1] (口頭) 井上 飛鳥、杉本 泰、今北 健二、藤井 稔、「金ナノ粒子-シリコンナノ結晶複合体の発光特性 (I)」『第62回応用物理学会春季学術講演会』13a-A12-11、神奈川、2015年3月

[2] (ポスター) 井上 飛鳥、杉本 泰、今北 健二、藤井 稔「金ナノ粒子シリコンナノ結晶複合体の発光特性評価」『若手フロンティア研究会 2015』2015年12月

[3] (口頭) 井上 飛鳥、杉本 泰、今北 健二、藤井 稔、「金ナノ粒子-シリコン量子ドットバイオコンジュゲートの発光特性評価」『第63回応用物理学会春季学術講演会』19p-S622-3、東京、2016年3月

[4] (口頭) 井上 飛鳥、杉本 泰、藤井 稔、「シランカップリング反応によるシリコン量子ドットの表面修飾」『第77回応用物理学会秋季学術講演会』14a-D62-1、新潟、2016年9月

[5] (ポスター) 井上 飛鳥、杉本 泰、今北 健二、藤井 稔「金属ナノ構造/シリコン量子ドット複合体の発光特性評価」『若手フロンティア研究会 2016』2016年12月

[6] (口頭) 井上 飛鳥、杉本 泰、今北 健二、藤井 稔、「Metal Film Over Nanosphere 構造におけるシリコン量子ドット単層膜の吸収断面積および発光再結合レートの同時増強」『第64回応用物理学会春季学術講演会』15a-F202-7、神奈川、2016年3月

[7] (口頭) 井上 飛鳥、杉本 泰、Byungji Kim、Michael J. Sailor、藤井 稔「シリコンナノ結晶シェルを有する銀ナノ粒子の抗菌作用」『第79回応用物理学会秋季学術講演会』19a-222-5、名古屋、2018年9月

[8] (ポスター) 井上 飛鳥、杉本 泰、崎山 真、藤井 稔「水分散性シリコン量子ドットの近赤外時間ゲートバイオイメーキング応用に関する研究」『第79回応用物理学会秋季学術講演会』20p-PA3-12、名古屋、2018年9月

[8] (口頭) 井上 飛鳥、杉本 洋蔵、杉本 泰、藤井 稔「水分散性シリコン量子ドット-タンパク質間相互作用によるプロテインコロナ形成」『第66回応用物理学会春季学術講演会』10a-W242-6、東京、2019年3月

## AWARD

[1] 若手フロンティア研究会 2015 「部門賞」受賞、神戸大学、2015年12月

[2] 平成28年度竹水会優秀論文賞 受賞、神戸大学、2017年3月（副賞として図書カード2万円分）

[3] 2017 European Materials Research Society Spring Meeting & Exhibit, Young Scientist Award (May 2017) (450 Euro)

[4] Best Presentation Award, Summer School for Silicon Nanotechnology – 2017, University of California, San Diego (August 2017)

[5] 神戸大学学生表彰 (2018年3月)

## FUNDING

日本学術振興会特別研究員(DC2)

採用期間：2018年4月から2019年3月まで

交付金額：月額20万円

平成30年度文部科学省科学研究費補助金

領域：総合

研究課題名：『水分散性シリコン量子ドットのバイオフォトニクス応用に関する研究』

交付：2018年4月から2019年3月まで

交付金額：年間100万円

平成28年度国際交流助成(20万円)、一般財団法人丸文財団、2016年4月

2017年度前期国際会議論文発表者助成(25万円)、公益財団法人 NEC C&財団、2017年4月





神戸大学博士論文「機能性シリコンナノ結晶のバイオ応用に関する研究」全 145 頁

提出日 2019 年 1 月 22 日

本博士論文が神戸大学機関リポジトリ Kernel にて掲載される場合、掲載登録日（公開日）はリポジトリの該当 ページ上に掲載されます。

© 井上 飛鳥

本論文の内容の一部あるいは全部を無断で複製・転載・翻訳することを禁じます。