

# Mie 共鳴により高輝度な散乱を示すシリコンナノ粒子をコアとする 生体用蛍光センシングナノプローブの開発

足立 将人<sup>A</sup>、杉本 泰<sup>A</sup>、森田 健太<sup>B</sup>、丸山 達生<sup>B</sup>、藤井 稔<sup>A</sup>

神戸大学大学院工学研究科電気電子工学専攻<sup>A</sup>

神戸大学大学院工学研究科応用化学工学専攻<sup>B</sup>

## Development of Fluorescent Nanoprobe Composed of Silicon Nanoparticle Core with Bright Scattering by Mie Resonance

M. Adachi<sup>A</sup>, H. Sugimoto<sup>A</sup>, K. Morita<sup>B</sup>, T. Maruyama<sup>B</sup>, M. Fujii<sup>A</sup>

Department of Electrical and Electronic Engineering, Kobe University<sup>A</sup>

Department of Chemical Science and Engineering, Kobe University<sup>B</sup>

Recently, inorganic nanoparticles with bright scattering and fluorescence have attracted significant attention for applications as multimode nanoprobes in the life science and medical fields. In our previous research, we focused on the highly efficient light scattering by Mie resonance of silicon (Si) nanospheres and demonstrated scattering/fluorescence dual-mode imaging by fluorophore decorated Mie resonant Si nanosphere. In this work, we develop novel nanoprobes with bright scattering that are capable of sensing the cancer cells by fluorescence switching. We develop Si core and manganese oxide (MnO<sub>2</sub>) shell nanoparticles in solution. The nanoparticles are designed so that the MnO<sub>2</sub> shell is dissolved by glutathione (GSH) in the cancer cells. We demonstrate the fluorescence switching by dissolution of MnO<sub>2</sub> shell in the presence of GSH and perform the fluorescence imaging in cancer cells.

### 1. はじめに

近年、散乱や蛍光などの光機能を持つナノ粒子をより迅速で正確なバイオイメージング・バイオセンシングのための標識に応用する研究が盛んに行われている。これまでに、金属ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴(LSPR)による散乱現象と付与した蛍光体の増強蛍光を利用した金属ナノ粒子プローブに関する研究が報告されている[1,2]。これにより、散乱光を利用したドラッグデリバリーシステムの簡易な観測と蛍光を用いた診断技術を融合したナノプローブ開発が期待されている。しかしながら、金属材料には非輻射エネ

ルギー移動による蛍光のクエンチング、光照射下での発熱による蛍光体の劣化などの課題がある。当グループは、金属に代わる新たな共鳴ナノ構造として、光損失が少なく、高い屈折率( $n \sim 4$ )を持つシリコン(Si)ナノ粒子[3]に着目している。先行研究では、直径 100-200 nm のシリコンナノ粒子(Si NS)表面に蛍光分子を修飾したコアシェルナノ粒子の開発を報告した[4]。この粒子は白色光照射下で可視域に Mie 共鳴による強い光散乱を示す高感度な散乱プローブとして機能する。加えて、単色光励起で低損失な Mie 共鳴による粒子近傍の蛍光体の励起増強と発光レート増強

によって蛍光体の発光増強とスペクトル制御が可能であり、高輝度かつ発光波長を選択できる蛍光プローブとして機能する。本研究では、診断技術に応用可能なナノプローブへと展開する。グルタチオン(GSH)はがん細胞内に高濃度で存在する抗酸化物質であり、がんの診断と治療に向けて検出技術が盛んに研究されている[5]。本研究は細胞内部で散乱によるイメージングと、GSHにより蛍光を OFF/ON する診断機能を併せ持つナノ粒子の開発を目的とする。

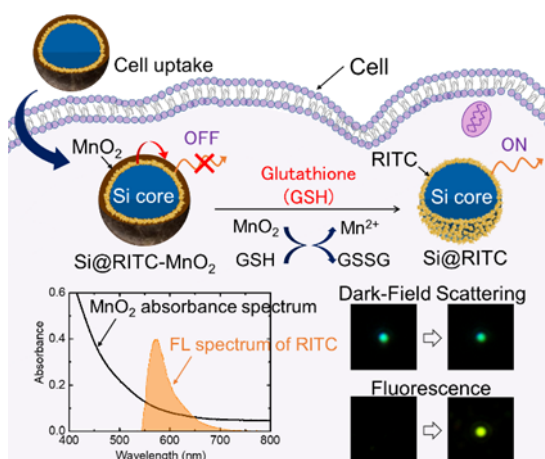


図 1: 蛍光 OFF/ON 機能と細胞イメージングの概要図。

## 2. ナノ粒子プローブの概要と作製方法

図 1 に蛍光 OFF/ON 機能と細胞イメージングの概要図を示す。今回はシリコンナノ粒子表面に蛍光分子を修飾し、 $\text{MnO}_2$  シェルを形成したコアシェル構造を提案する( $\text{Si@RITC-MnO}_2$ )。  $\text{MnO}_2$  は可視域にブロードな吸収を示すため、蛍光分子から  $\text{MnO}_2$  シェルへの非輻射エネルギー移動が生じ、蛍光は消光する。細胞内に GSH が存在する場合は  $\text{MnO}_2$  シェルが酸化還元反応によって溶解し、蛍光が回復するとともにシリコンナノ粒子コアの Mie 共鳴による増強蛍光が観察される。それに

対し、シリコンナノ粒子コアのロバストな Mie 散乱はシェルの有無に影響されることなく観察される。このように、細胞内のナノ粒子の位置を散乱でイメージングし、蛍光の OFF/ON で GSH を検出することができる。図 2(a)に  $\text{Si@RITC-MnO}_2$  ナノ粒子の作製方法を示す。まず、当グループが開発した粒径 100-300 nm の球状シリコンナノ粒子表面にシランカップリング剤 (APTES) を用いて黄色蛍光分子の Rhodamine B isothiocyanate (RITC) を修飾した。その後、 $\text{KMnO}_4$  水溶液を加えて攪拌することで  $\text{MnO}_2$  シェルを形成した。図 2(c)の SEM 像では表面に凹凸が見られ、図 2(b)の TEM 像、図 2(d)の元素マッピングに示すように厚さ 6 nm 程度の  $\text{MnO}_2$  シェルが形成された所望のコアシェル構造が得られている。

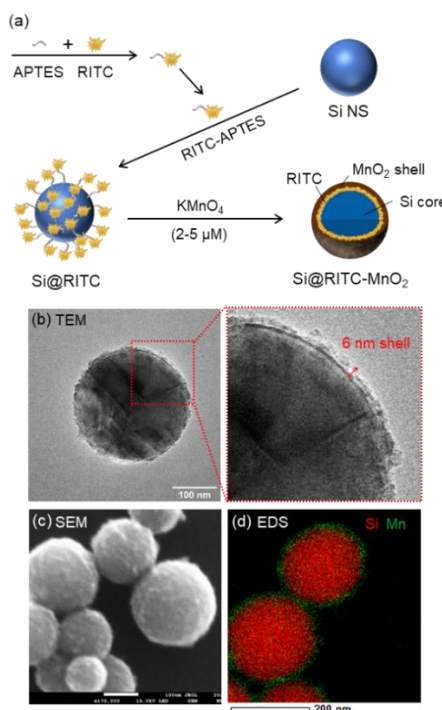


図 2:  $\text{Si@RITC-MnO}_2$  ナノ粒子の(a)作製方法の概要図、(b)TEM 像、(c)SEM 像、(d)EDS 元素マッピング。

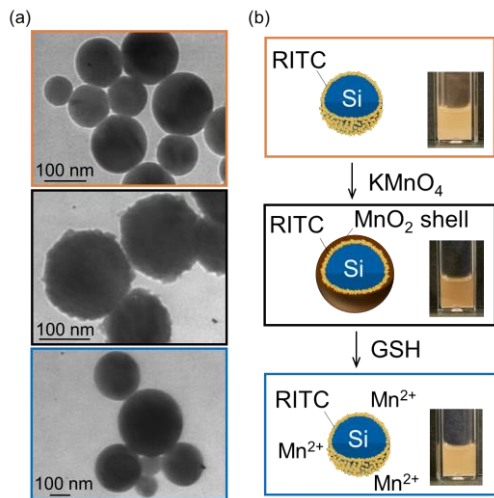


図 3: MnO<sub>2</sub> シェルを付ける前後と GSH を加える前後の(a)TEM 像、(b)ナノ粒子の概形と溶液の写真。

### 3. 実験結果

図 3 に MnO<sub>2</sub> シェルを付ける前後と GSH を加える前後の TEM 像と溶液の写真を示す。まず、Si@RITC ナノ粒子に KMnO<sub>4</sub> 水溶液を加えることで滑らかな表面から凹凸のある表面に変化し、溶液の色が黒くなっている。次に、GSH を加えた後のナノ粒子では表面の凹凸が無くなり、溶液の色も MnO<sub>2</sub> シェルが無い状態に戻っている。したがって、作製したナノ粒子の MnO<sub>2</sub> シェルが GSH によって溶けることが確かめられた。

図 4(a)に GSH 添加前後の Si@RITC-MnO<sub>2</sub> ナノ粒子分散液の蛍光スペクトルを示す。GSH を加える前(黒実線)と比較して加えた後(青実線)では蛍光強度が約 8 倍強くなり、消光していた蛍光が回復している。図 4(b)にナノ粒子分散液を SiO<sub>2</sub> 基板上に垂らして顕微鏡で観察した、単一 Si@RITC-MnO<sub>2</sub> ナノ粒子の暗視野散乱(DF)イメージと蛍光(FL)イメージを示

す。白色光照射下では GSH の添加に関わらず、シリコンナノ粒子コアによる高輝度な散乱が確認できる。散乱色は粒子のサイズに依存し、粒径~180 nm では赤みがかかった色を示す。蛍光イメージでは、GSH 添加前は蛍光が観察されないが、添加後は RITC の黄色蛍光がみられる。図 4(c)に顕微分光により測定した GSH 添加前(黒実線)と添加後(青実線)の単一 Si@RITC-MnO<sub>2</sub> ナノ粒子の散乱スペクトルと蛍光スペクトルを示す。散乱スペクトルでは、MD、MQ などの Mie 共鳴モードが見られ、GSH 添加前後でスペクトル形状に大きな変化は無い。それに対して、蛍光スペクトルではいずれのサイズの粒子においても蛍光強度が 10 倍弱大きく

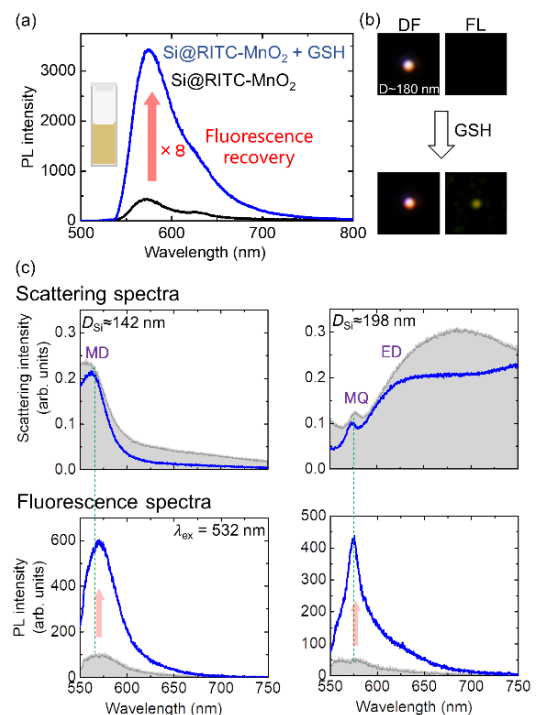


図 4:(a)GSH 添加前後の Si@RITC-MnO<sub>2</sub> ナノ粒子分散液の発光スペクトル。(b)GSH 添加前後の単一 Si@RITC-MnO<sub>2</sub> ナノ粒子の暗視野散乱(DF)イメージと蛍光(FL)イメージ。(c) GSH 添加前後の単一 Si@RITC-MnO<sub>2</sub> ナノ粒子の散乱スペクトルと蛍光スペクトル。

なっている。また、コア粒径 198 nm の粒子では MQ モードとのカップリングにより、半値幅が減少するスペクトル形状変化が生じている。蛍光回復に加えたこれらの蛍光増強とスペクトル形状変化は Mie 共鳴の Purcell 効果によるものである。以上の結果から、作製したナノ粒子は GSH の有無により散乱は変化せずに、蛍光が OFF から ON に変化する機能をもつことが示された。

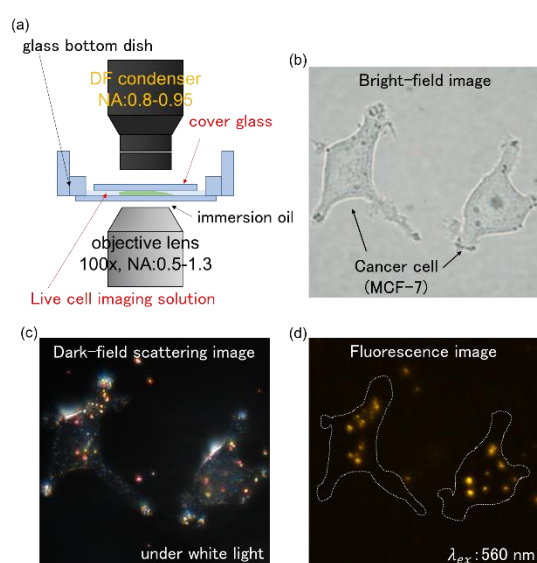


図 5:(a)細胞イメージングの観察セットアップ。ヒト乳がん細胞(MCF-7)とインキュベートした後の Si@RITC-MnO<sub>2</sub> ナノ粒子の(b)明視野イメージ、(c)暗視野散乱イメージ、(d)蛍光イメージ。

作製したナノ粒子によるがん細胞の暗視野散乱・蛍光イメージングを行った。観察は共焦点レーザー顕微鏡を用いて図 5(a)に示すセットアップで行った。Si@RITC-MnO<sub>2</sub> ナノ粒子を加えて 24 時間インキュベートした後のヒト乳がん細胞(MCF-7)の図 5(b)明視野、(c)暗視野散乱、(d)蛍光イメージを示す。暗視野イメージでは細胞内の個々のナノ粒子の散乱がみられる。蛍光イメージでは、散乱と同一箇所 RITC の黄色蛍光がみられる。したが

って、がん細胞内の Si@RITC-MnO<sub>2</sub> ナノ粒子の高輝度な散乱と、回復蛍光が観察できることが示された。

#### 4. まとめ

本研究では、診断技術に応用可能なナノプローブへの展開として細胞内で暗視野散乱によるイメージング機能と、GSH により蛍光を OFF/ON する機能をもつナノ粒子を開発した。また、がん細胞内で作製したナノ粒子の暗視野散乱と回復蛍光が観察できることを示した。今後、診断・治療用ナノプローブとして、正常細胞との蛍光強度比較によるがんの診断や、ドラッグデリバリーシステム等への応用が期待される。

#### 参考文献

- [1] S. Tu, D. Rioux, J. Perreault, D. Brouard, and M. Meunier, *J. Phys. Chem. C* **121**, 8944 (2017).
- [2] J. Wang, Y.X. Liu, X.L. Li, H.Y. Chen, and J.J. Xu, *Anal. Chem.* **93**, 10317 (2021).
- [3] H. Sugimoto, T. Okazaki, and M. Fujii, *Adv. Opt. Mater.* **8**, 2000033 (2020).
- [4] M. Adachi, H. Sugimoto, Y. Nishimura, K. Morita, C. Ogino, and M. Fujii, *Small* **19**, (2023).
- [5] N. Sohal, B. Maity, N. Shetti, P. Basu, *ACS Appl. Nano Mater.* **4**, 3, 2285–2302, (2021).