

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5100291号  
(P5100291)

(45) 発行日 平成24年12月19日(2012.12.19)

(24) 登録日 平成24年10月5日(2012.10.5)

(51) Int.Cl.

F I

C O 1 B 33/021 (2006.01)

C O 1 B 33/021

請求項の数 9 (全 12 頁)

(21) 出願番号	特願2007-260771 (P2007-260771)	(73) 特許権者	507330280 楠見 明弘 京都府京都市左京区岩倉三宅町203-3
(22) 出願日	平成19年10月4日(2007.10.4)	(73) 特許権者	507330291 西村 博仁 京都府京都市中京区清水町390 アヴニール御所南302号
(65) 公開番号	特開2009-91168 (P2009-91168A)	(73) 特許権者	000004112 株式会社ニコン 東京都千代田区有楽町1丁目12番1号
(43) 公開日	平成21年4月30日(2009.4.30)	(74) 代理人	110000198 特許業務法人湘洋内外特許事務所
審査請求日	平成22年10月4日(2010.10.4)	(72) 発明者	楠見 明弘 京都市左京区岩倉三宅町203-3

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光性ナノ粒子、及び、それを用いて生体物質を観察する方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

シリコン基体にフッ化水素酸溶液と硝酸との第1の混合溶液を作用させる工程と、  
前記第1の混合溶液を作用させたシリコン基体に、フッ化水素酸溶液と硝酸と水との第2の混合溶液を作用させる工程と、  
前記第2の混合溶液を作用させたシリコン基体を、さらにフッ化水素酸と水との第3の混合溶液の蒸気にさらす工程と  
を含むことを特徴とする蛍光性シリコンナノ粒子の製造方法。

【請求項2】

シリコン基体にフッ化水素酸溶液と硝酸との第1の混合溶液を作用させる工程と、  
前記第1の混合溶液を作用させたシリコン基体に、フッ化水素酸溶液と硝酸と水との第2の混合溶液を作用させる工程と、  
前記第2の混合溶液を作用させたシリコン基体を、さらにフッ化水素酸溶液と水との第3の混合溶液に浸す工程と  
を含むことを特徴とする蛍光性シリコンナノ粒子の製造方法。

【請求項3】

前記第1の混合溶液の前記フッ化水素酸溶液と前記硝酸との混合比は、体積比で2:1~1:2の範囲であることを特徴とする請求項1または2に記載の蛍光性ナノシリコン粒子の製造方法。

【請求項4】

10

20

前記シリコン基体を前記第 1 の混合溶液に作用させる際、前記第 1 の混合溶液に前記シリコン基体の一部を浸すことを特徴とする請求項 1 から 3 の何れか一項に記載の蛍光性シリコンナノ粒子の製造方法。

【請求項 5】

前記第 2 の混合溶液のフッ化水素酸溶液と硝酸と水の混合比は、体積比でフッ化水素酸溶液：硝酸 = 1 : 1 ~ 1 : 5 の範囲であり、フッ化水素酸溶液：水 = 1 : 3 ~ 1 : 5 の範囲であることを特徴とする請求項 1 から 4 の何れか一項に記載の蛍光性ナノシリコン粒子の製造方法。

【請求項 6】

前記第 3 の混合溶液のフッ化水素酸溶液は、フッ化水素の含有量が 5 ~ 46 %であることを特徴とする請求項 1 から 5 の何れか一項に記載の蛍光性ナノシリコン粒子の製造方法。

10

【請求項 7】

前記第 3 の混合溶液を作用させ、蛍光シリコンナノ粒子が生成したシリコン基体をアリル化剤により表面修飾する工程を含むことを特徴とする請求項 1 から 6 の何れか一項に記載の蛍光性シリコンナノ粒子の製造方法。

【請求項 8】

前記第 3 の混合溶液による作用が終了したシリコン基体を液体中に浸し、さらに前記液体による超音波処理を行うことで前記シリコン基体の表面上からシリコンナノ粒子を分離する工程を有することを特徴とする請求項 1 から 7 の何れか一項に記載の蛍光性ナノシリコン粒子の製造方法。

20

【請求項 9】

分離された前記蛍光性シリコンナノ粒子をアリル化剤により表面修飾する工程を含むことを特徴とする請求項 8 に記載の蛍光性シリコンナノ粒子の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光性ナノ粒子、及び、それを用いて生体物質を観察する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

結晶がナノサイズの径をもつシリコンナノ粒子は、可視領域において、結晶サイズ依存性の蛍光性/発光性を示すことが知られている。この蛍光発光は、従来の蛍光プローブである、有機蛍光色素や蛍光タンパク質等の標識剤と比較すると、光による分解を受けにくく、退色が非常に遅いという特徴をもつ。このような蛍光性シリコンナノ粒子は、電気化学的手法により製造できることが知られている（特許文献 1）。

30

【0003】

【特許文献 1】米国特許第 6585947 号

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

しかしながら、従来の製造方法では、シリコンナノ粒子の収量は十分では無く、操作も複雑であり、また、保存期間も水溶液中に数日しか保存出来なかった。そこで、本発明の目的は、より簡便な方法で、高い蛍光強度と親水性をもち、水溶液中でも長期保存が可能な蛍光性シリコンナノ粒子を、高収率で製造することにある。製造された蛍光性シリコンナノ粒子を用いて、生体物質を観察する方法を提供する。

40

【課題を解決するための手段】

【0005】

上記課題を解決すべく、蛍光性シリコンナノ粒子の製造方法は、シリコン基体にフッ化水素酸溶液と硝酸との第 1 の混合溶液を作用させる工程と、前記第 1 の混合溶液を作用させたシリコン基体に、フッ化水素酸溶液と硝酸と水との第 2 の混合溶液を作用させる工程

50

と、前記第2の混合溶液を作用させたシリコン基体を、さらにフッ化水素酸と水との第3の混合溶液の蒸気にさらす工程と、を含むことを特徴とする。

【0006】

また、発明の蛍光性シリコンナノ粒子の製造方法は、シリコン基体にフッ化水素酸溶液と硝酸との第1の混合溶液を作用させる工程と、前記第1の混合溶液を作用させたシリコン基体に、フッ化水素酸溶液と硝酸と水との第2の混合溶液を作用させる工程と、前記第2の混合溶液を作用させたシリコン基体を、さらにフッ化水素酸溶液と水との第3の混合溶液に浸す工程と、を含むことを特徴とする。

【発明を実施するための最良の形態】

【0007】

#### 1. ポーラスシリコンの製造

<ステップ1> まず、シリコンウエハ等のシリコン基体10を用意し、適度な大きさ(例えば、約5cm×5cm)にカットする。次に、図1に示すように、容器15中の濃フッ化水素酸溶液(HF、HF含有量46%)と、濃硝酸(HNO<sub>3</sub>、HNO<sub>3</sub>含有量70%)の第1の混合溶液30に、カットしたシリコン基体10の一端11を、1~5mm程度浸ける。

【0008】

ここで用いる混合溶液のHFとHNO<sub>3</sub>との混合比は、体積比において、HF:HNO<sub>3</sub>=2:1~1:2の範囲である。混合溶液中のHNO<sub>3</sub>の割合が少なすぎると、十分にシリコン基体のエッチングが進行せず、多すぎると反応速度が速すぎ、均一なエッチングを行なうことができない。

【0009】

また、この段階で、シリコン基体を完全に混合溶液に浸すと、エッチング速度が過度に速くなり、均一にポーラスシリコンが形成されない。よって、上記の如くシリコン基体の一部を混合溶液に浸すのが好ましい。

【0010】

シリコン基体の一端を混合溶液に浸す時間は、0.5~5秒の範囲である。浸す時間が短いと、エッチングが均一に進行せず、十分なポーラスシリコンが形成されない。一方、浸す時間が長すぎると、形成されたポーラスシリコンが溶出してしまう。この処理は、室温で行なうことができる。

【0011】

<ステップ2> 次に、図2に示すように、上記ステップ1で処理したシリコン基体10を、容器35内のHFとHNO<sub>3</sub>と水との第2の混合溶液40に浸す。ここで用いる混合溶液中のHFとHNO<sub>3</sub>との混合比は、体積比において、HF:HNO<sub>3</sub>=1:1~1:5の範囲である。また、HFと水との混合比は、体積比において、HF:H<sub>2</sub>O=1:3~1:5の範囲である。なお、この混合溶液の組成比を調整することによって、様々な蛍光波長を示すポーラスシリコンを製造することができる。

【0012】

混合溶液に浸す時間は、目的とするポーラスシリコンや、用いる混合溶液の組成により適宜選択できるが、通常2~10分の範囲である。また、この処理は室温で行うことができる。

【0013】

なお、組成比を変えた複数の混合溶液を用いて、シリコン基体を混合溶液に浸す処理を、複数段階で行ってもよい。

【0014】

<ステップ3> その後、ステップ2の処理を経たシリコン基体10を、水、又は、エタノール等の有機溶媒で洗浄し、乾燥させる。本方法によって生成したポーラスシリコンの蛍光スペクトルは、蛍光分光光度計を用いて測定することができる。なお、洗浄用の有機溶媒には、メタノール等の他のアルコール性溶媒を用いても良い。

#### 2. シリコンナノ粒子の分離

10

20

30

40

50

<ステップ1> 図3(a)に、上記の方法でエッチング処理を行なったシリコン基体10を示す。上がシリコン基体10の断面図であり、下が該シリコン基体10の上面図である。シリコン基体10の表面上には、 $\text{HNO}_3$ を使用した表面処理によって、シリコンナノ粒子12と、アモルファスシリコン膜13が形成されている。アモルファスシリコン膜13は、後述の、超音波処理によるシリコンナノ粒子の分離の妨げになるため、まず、これを除去する。なお、ここでいうアモルファスシリコン膜13とは、アモルファス状のものに限定されず、他の形状を有している場合もある。

【0015】

以下、アモルファスシリコン膜13の除去方法について説明する。上記の方法でエッチング処理を行ったシリコン基体10を適度な大きさ(例えば、約 $1\text{cm} \times 1\text{cm}$ )にカットする。次に、図4に示すように、ホットスターラ21で、HFと $\text{H}_2\text{O}$ の混合溶液(第三の混合溶液)50を入れた容器45を加温する。そして、ピンセット20によって挟持したシリコン基体10を、容器45上でシリコン粒子の形成面を下にして、HF水溶液50の蒸気にさらし、アモルファスシリコン膜13の除去処理を行う。

10

【0016】

ここで用いるHF水溶液の濃度は5~46%の範囲である。HF濃度が薄すぎると、十分にアモルファスシリコン膜13を除去することができない。濃すぎると、処理時間を最適とするのが困難になる。

【0017】

なお、HF水溶液の温度は、30~70の範囲である。水溶液温度が低すぎると、十分にアモルファスシリコン膜13を除去することができず、高すぎると反応が進行しすぎるため、シリコンナノ粒子の回収量が低下する。

20

【0018】

さらに、HF水溶液の蒸気で処理する時間は1~240秒の範囲である。処理時間が短すぎると、十分にアモルファスシリコン膜13を除去することができず、長すぎると反応が進行しすぎるため、シリコンナノ粒子の回収量が低下する。この処理は、室温で行うことができる。

【0019】

なお、図5に示すように、ホットスターラ21により加温した容器45中のHF水溶液50に、カットしたシリコン基体10を浸して処理を行ってもよい。

30

【0020】

ここで用いるHF水溶液の濃度は、蒸気にさらす場合と同様の、5~46%の範囲である。HF濃度が薄すぎると、十分にアモルファスシリコン膜13を除去することができず、高すぎると、処理が進行しすぎるため、シリコンナノ粒子の回収量が低下する。

【0021】

HF水溶液の温度は、20~60の範囲である。これについても、水溶液の温度が低すぎると、十分にアモルファスシリコン膜13を除去することができず、水溶液温度が高すぎると処理が進行しすぎるために、シリコンナノ粒子の回収量が低下するからである。

【0022】

HF水溶液中による処理時間は、1~180秒の範囲である。処理時間が短すぎると、十分にアモルファスシリコン膜13を除去することができず、長すぎると処理が進行しすぎるため、シリコンナノ粒子の回収量が低下する。この処理は、室温で行うことができる。

40

【0023】

図3(b)に、アモルファスシリコン膜13除去処理後の、シリコン基体10を示す。上がシリコン基体10の断面図であり、下が該シリコン基体10の上面図である。以上の処理によって、シリコン基体10の表面からアモルファスシリコン膜13が除去され、後述の超音波処理によって、高収率でシリコンナノ粒子の回収を行うことができる。

【0024】

<ステップ2> 上記ステップ1でアモルファスシリコン膜13を除去したシリコン基

50

体10を、水、又は、エタノール等の有機溶媒でよく洗浄して乾燥させる。このとき、後述の超音波処理の際に用いる溶液60に、洗浄液と同様のものを用いる場合には乾燥させる必要はない。なお、洗浄用の有機溶媒には、メタノール等の他のアルコール性溶媒を用いても良い。

#### 【0025】

<ステップ3> まず、水、又は、エタノール等の有機溶媒よりなる溶液60を満たしたガラス容器55に、上記ステップ2で洗浄処理を行なったシリコン基体10を浸し、ガラス容器55を蓋22により封止する。次に、ガラス容器55を超音波洗浄機23中に載置し、超音波処理を行う(図6参照)。この超音波処理によって、シリコン基体10の表面上から、シリコンナノ粒子が分離される。さらに、シリコン基体10をガラス容器55から取り除き、シリコンナノ粒子の含まれる上澄のみを遠心分離機によって分取し、図7に示すような、シリコンナノ粒子懸濁液70を得ることができる。

10

#### 【0026】

シリコン基体10の超音波処理時間は0.5~20分の範囲である。処理時間が短すぎるとシリコンナノ粒子を十分に回収することができず、長すぎると均一な粒径や粒形の粒子を回収することができない。回収したシリコンナノ粒子懸濁液の吸収と蛍光スペクトルは、吸光分光光度計と蛍光分光光度計で測定することができる。この処理は室温で行うことができる。

#### 【0027】

また、この処理は一度に数枚のシリコン基体を容器に入れて行うことができる。一度に処理できるシリコン基体の枚数は、用いる容器によるため限定するものではない。

20

#### 【0028】

また、異なる複数のシリコン基体を用い、繰り返しステップ3の操作を行うことで、高濃度のシリコンナノ粒子懸濁液を得ることができる。なお、カットされたシリコン基体1枚について、ステップ1~3を数回繰り返すことで、シリコン基体表面上からすべてのシリコンナノ粒子を回収することができる。通常、3~4回の繰り返すことで、シリコン基体上のシリコンナノ粒子を完全に分離、回収することが可能である。

### 3. アリル化合物によるシリコンナノ粒子の表面修飾

<ステップ1> 上記の方法で得られたシリコンナノ粒子の表面修飾は、アリル化合物を作用させることにより行うことができる。これによって、シリコンナノ粒子表面上に、該アリル化合物が有する官能基を導入することができる。アリル化合物の有する官能基としては、アミノ基、チオール基、メチル基、エチル基等があるが、中でも、アミノ基、チオール基が好ましい。

30

#### 【0029】

まず、シリコンナノ粒子懸濁液中の溶媒をエバポレータ等で完全に留去して、アリルアミンやアリルメルカプタンをこれに加えて懸濁させ、アミノ化試薬とシリコンナノ粒子の懸濁液80とする。次に、図8に示すように、ガラス容器55中に、アリルアミンやアリルメルカプタン等のアミノ化試薬とシリコンナノ粒子の懸濁液80を移し、白金触媒を加えて攪拌子25とスターラ24を用いて攪拌することで、表面修飾を行う。この処理は室温で行うことができる。

40

#### 【0030】

反応溶液中の白金触媒の濃度は、アリル化合物の種類によるが、通常0.1~100mMの範囲である。濃度が薄いとアリル化合物による修飾が十分に進まず、濃度が濃すぎると後述の後処理操作において、白金触媒を完全に取り除くことができない。白金触媒の種類は、その反応系によって、適宜選択される。

#### 【0031】

反応時間はアリル化合物の種類によるが、通常1~36時間の範囲である。反応時間が短いとアリル化合物による修飾が十分に進行せず、長すぎると非特異的に修飾が行われる。

#### 【0032】

50

アリル化合物は、上記のものに限定されず、アリルアルコール、臭化アリル、塩化アリル、アリルイソチオシアネート、1-ブテン等から、適宜選択される。

【0033】

<ステップ2> 上記ステップ1により得られた反応溶液から、白金触媒と、未反応のアリル化合物とを除去する。反応溶液中の溶媒と共に、未反応のアリル化合物をエバポレータなどで完全に留去し、ヘキサン等の有機溶媒を加えて、超音波処理を行う。これにより、アリル化合物により表面修飾がなされたシリコンナノ粒子と白金触媒とが分離されるため、上澄のシリコンナノ粒子のみを回収することが可能である。

【0034】

この操作を、2~10回程度繰り返して行うことで、完全にアリル化合物と白金触媒とを取り除くことができる。繰り返す回数は、アリル化合物の種類によるため限定するものではないが、繰り返す回数が多くなるにつれ、シリコンナノ粒子の回収量は減少する。回収したシリコンナノ粒子懸濁液の吸収と蛍光スペクトルは、吸光分光光度計と蛍光分光光度計で測定することが可能である。

【0035】

有機溶媒はヘキサンに限定されず、シクロベンゼン、シクロヘキサン、ジクロロメタン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン等を用いても良い。

【0036】

<ステップ3> 上記ステップ2を行った懸濁液中のヘキサンなどの有機溶媒を、水、又は、緩衝液等の水溶液に交換する。有機溶媒をエバポレータ等で完全に留去し、水、又は、緩衝液等の水溶液を加えて、超音波処理を行う。このシリコンナノ粒子の懸濁液の吸収と蛍光スペクトルは、吸光分光光度計と蛍光分光光度計で測定することができる。

4. シリコンナノ粒子の精製

高純度のアリル化合物で修飾されたシリコンナノ粒子が必要な場合は、例えば、ろ過処理等で回収したシリコンナノ粒子を、ゲルろ過高速クロマトフィー（HPLC）によって精製することができる。使用目的によるため限定するものではないが、通常はPBS（phosphate-buffered saline）等のリン酸緩衝液が使用される。

5. シリコンナノ粒子を用いた生体分子標識

アリル化合物で修飾したシリコンナノ粒子は、公知の方法によって生体分子を標識することができる。例えば、アリル化合物で修飾したシリコンナノ粒子の有する官能基と、生体分子の官能基とを、必要に応じて他の化合物の存在下、又は、架橋剤等の化合物を介して共有結合、又は、イオン結合させる。

【0037】

より具体的には、例えば、粒子表面にアミノ基をもつシリコンナノ粒子を、カルボキシル基を持つ蛋白質やペプチドに、架橋試薬EDC（1-ethyl-3-[3-dimethyl-aminopropyl]carbodiimide HCl）を用いて標識することが可能である。

【0038】

また、SPDP（N-succinimidyl 3-[2-pyridyldithio]propionate）や、2-イミノチオラン塩酸塩などを用いて導入した、チオール基とアミノ基を持つ蛋白質やペプチドに、EMCS（N-[3-(3-dimethylaminopropyl)carbodimide]succinimide ester）のような架橋剤でマレイミド基を導入し、そこへ粒子表面にアミノ基をもつシリコンナノ粒子を反応させて、標識しても良い。

【実施例】

【0039】

以下に本発明を実施例により詳細に説明する。ただし、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。

【0040】

<実施例1> ポーラスシリコンの製造

シリコンウエハ（面方位（100）、p-type、ホウ素ドーパ、比抵抗0.1~100Ω・cm）を、縦3.5cm×横4.0cmの大きさにカットした。図1に示したよ

10

20

30

40

50

うに、カットしたシリコンウエハの端を2～3mm程度、HFとHNO<sub>3</sub>の混合液(体積比1:1)に2秒間浸ける。次に、図2に示したように、シリコンウエハ全体をHF、HNO<sub>3</sub>、水の混合液(体積比2:7:8)に5分間浸ける。その後、水でよく洗い乾燥させる。

#### 【0041】

上記処理により得られたシリコンウエハを、約1.0cm×1.0cmにカットする。図4に示したように、カットしたシリコンウエハを、ホットスターラで約40℃に温めた15%HF水溶液の蒸気に40秒間さらし、アモルファスシリコン膜を取り除く。その後、エタノールでよく洗って、シリコンウエハ表面についたエタノールを拭き取る。

#### 【0042】

上記処理を行ったシリコンウエハを、図6に示すように、エタノール2mlの入ったガラス容器に入れ、蓋をして、超音波洗浄機で5分間超音波処理を行い、その後、シリコンウエハの基板を取り除く。また、同じエタノール中で10枚のシリコンウエハを1枚ずつ同様に処理して得られた懸濁液を、遠心分離機(遠心回転数15000rpm)で30分間遠心し、シリコンナノ粒子の含まれる上澄みを分取する。

#### 【0043】

<実施例2> アリルアミンで修飾した蛍光波長437nmのシリコンナノ粒子の製造  
実施例1で得られたシリコンナノ粒子懸濁液から、エバポレータを用いて完全にエタノールを留去する。そこへ、アリルアミン1mlを加えて30分間超音波処理を行い、アリルアミン中にシリコンナノ粒子を加えて懸濁させた。その後、50mM白金触媒20μlを加えて、図8に示したように、スターラを用いて室温で3時間攪拌し、反応液を作成する。ここで使用した白金触媒は、Aldrich Chem.社製の、Cloroplatinic acid hydrate (H<sub>2</sub>PtCl<sub>6</sub>·aq)であり、densityは、2.43g/ml at 25℃である。

#### 【0044】

<実施例3> アリルアミンで修飾したシリコンナノ粒子の分離  
その後、エバポレータを用いて上記の反応液から、完全にアリルアミンを留去する。そこへ、ヘキサン2mlを加えて、30分間超音波処理を行い、アリルアミンで修飾したシリコンナノ粒子をヘキサンの加えて懸濁させ、上澄みを分取する。この操作を3回繰り返し、完全にアリルアミンと白金触媒を取り除いた。その後、エバポレータを用いてヘキサンを完全に留去し、そこへ水1mlを加えて超音波処理することで、水にアリルアミンで修飾したシリコンナノ粒子のみを再懸濁させる。図9に本方法によって生成したアリルアミンで修飾したシリコンナノ粒子の吸収スペクトル・蛍光スペクトルを、図10に本方法によって生成したアリルアミンで修飾したシリコンナノ粒子のFT-IRスペクトルを示した。

#### 【0045】

<実施例4> アリルアミンで修飾したシリコンナノ粒子の精製  
アリルアミンで修飾したシリコンナノ粒子懸濁液を0.22μmフィルターでろ過処理する。より高純度のものを得るため、回収したシリコンナノ粒子をHPLC(高速液体クロマトグラフィー)に付する。ここで使用したカラムは、ゲルろ過カラムSuperdex 75であり、溶媒は50mMリン酸緩衝液(pH7.0)、流速は0.4ml/minで精製を行う。図11に、HPLCにより分離された、アリルアミンで修飾したシリコンナノ粒子のチャートを示す。

<実施例5> アリルアミンで修飾したシリコンナノ粒子による1細胞の標識

マウス由来のマクロファージ系細胞株であるP388D1細胞を、5×10<sup>5</sup>個/2mlになるよう、10%FBS(FETAL BOVINE SERUM)を含むRPMI1640培地中で、37℃、5%CO<sub>2</sub>で培養した。細胞は12時間以上培養した後、アリルアミンで粒子表面を修飾したシリコンナノ粒子を加え、更に2時間培養し細胞にナノ粒子を貪食させた。

#### 【0046】

PBSで3回洗浄し、非特異的に吸着したナノ粒子を取り除いて、細胞懸濁液とした。細胞懸濁液を遠心した後、2%FBSを含むPBSに再懸濁させ、蛍光顕微鏡とフローサ

10

20

30

40

50

イトメータを用いて解析した。図12に蛍光顕微鏡でP388D1細胞を観察した結果を、図13にフローサイトメータによる解析結果を示す。

【0047】

蛍光顕微鏡による観察では、シリコンナノ粒子を貪食した標識細胞(+)は、励起光470/40nmにおいて、535/50nmの蛍光発光が見られた。また、蛍光発光は、3日以上長時間にわたって観察が可能であった。なお、視覚的に見ても、本願発明の蛍光性シリコンナノ粒子は、従来のもよりも10倍以上強い発光強度が観察された。

【0048】

フローサイトメータによる解析結果によっても、シリコンナノ粒子を貪食しない未標識細胞(-)と、貪食した標識細胞(+)では、その蛍光強度に明らかな差が生じており、

10

アシルアミンで修飾したシリコンナノ粒子で、すべての細胞を標識することができた。

【0049】

以上、実施例により本願発明を詳細に説明した。

【0050】

本願発明の蛍光性シリコンナノ粒子は、化学的手法によるエッチング、すなわち、HFにおける表面処理と、超音波を使用した回収処理のみという、非常に簡便な操作によって製造可能なことから、収率良く、大量に製造することが可能である。また、表面をアシル化合物で修飾することによって、シリコンナノ粒子は親水性を示し、水溶液中での長期安定保存が可能になると共に、生体分子などにも結合させることができる。

【0051】

20

なお、このようにして製造された量子サイズの蛍光性シリコンナノ粒子によれば、蛋白質などの生体分子において、他の分子とクロスリンクを引き起こさずに、生細胞内あるいは細胞表面における単一分子や、1細胞を標識することが可能であり、非常に微小なスケールでの観察が実現できる。また、その退色の遅さから、個体内での細胞の挙動についても、長時間にわたる観察が可能である。さらに、従来量子ドットのような手法に比べても、生体にとって安全性が高く、分子の機能を解明し、これらの分子の機能異常が原因となるさまざまな病気の探求や、治療法の開発が大いに期待できる。

【0052】

なお、上記実施形態および実験例は、本願発明の技術的思想の範囲内で様々な変形が可能である。

30

【0053】

例えば、上記の方法でポーラスシリコンを生成し、シリコン基体表面をアシル化合物で修飾する。その後、HF水溶液でアモルファスシリコン膜の除去処理を行い、超音波処理によってシリコンナノ粒子を分離(回収)してもよい。こうすれば、より大量のアシルアミンで修飾したシリコンナノ粒子を生成することができる。

【0054】

なお、標識対象は、上記のものに限定されない。本発明の蛍光性シリコンナノ粒子の持つ疎水性と官能基を考慮すれば、核酸、蛋白質、ペプチド、脂質、糖鎖、ビタミン、アゴニスト・アンタゴニストを含む受容体リガンド等の生体分子、生理活性分子、及び、薬剤分子を標識、観察が可能であることは自明である。また、これらを用いることによって、

40

個体、組織、器官、及び、細胞内小器官についても、標識と観察が可能となる。

【図面の簡単な説明】

【0055】

【図1】シリコン基体をHF + HNO<sub>3</sub>の混合溶液に作用させる様子を示す図。

【図2】シリコン基体をHF + HNO<sub>3</sub> + 水の混合溶液に作用させる様子を示す図。

【図3】(a)エッチングしたシリコン基体とその表面を示す図(b)HF水溶液の蒸気により処理したシリコン基体を示す図。

【図4】エッチングしたシリコン基体を、HF水溶液の蒸気に作用させる様子を示す図。

【図5】エッチングしたシリコン基体をHF水溶液に作用させる様子を示す図。

【図6】シリコン基体上から、超音波処理によりシリコンナノ粒子を分離の様子を示し

50

た図。

【図7】シリコンナノ粒子懸濁液を示した図。

【図8】シリコンナノ粒子をアシル化合物で修飾する様子を示した図。

【図9】実施例3における、アシルアミンで修飾したシリコンナノ粒子の吸収スペクトル。

【図10】実施例3における、アシルアミンで修飾したシリコンナノ粒子のFT-IRスペクトル。

【図11】実施例4における、アシルアミンで修飾したシリコンナノ粒子のゲルろ過カラムを用いたHPLCの精製チャート。

【図12】実施例5における、アシルアミンで修飾したシリコンナノ粒子を用いて標識した細胞の蛍光顕微鏡画像。

【図13】実施例5における、アシルアミンで修飾したシリコンナノ粒子を用いて標識した細胞をフローサイトメータで解析した結果。

【符号の説明】

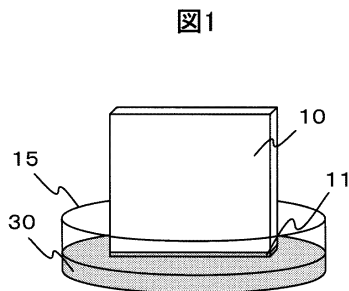
【0056】

10・・・シリコン基体、11・・・シリコン基体の一端、12・・・シリコンナノ粒子、13・・・アモルファスシリコン膜、15・・・容器、20・・・ピンセット、21・・・ホットスターラ、22・・・蓋、23・・・超音波洗浄機、24・・・スターラ、25・・・攪拌子、30・・・HF+HNO<sub>3</sub>の混合溶液、35・・・、40・・・HF+HNO<sub>3</sub>+水の混合溶液、45・・・容器、50・・・HF水溶液、55・・・ガラス容器、60・・・水、又は、エタノール等の有機溶媒、70・・・シリコンナノ粒子懸濁液、80・・・アミノ化試薬とシリコンナノ粒子の懸濁液

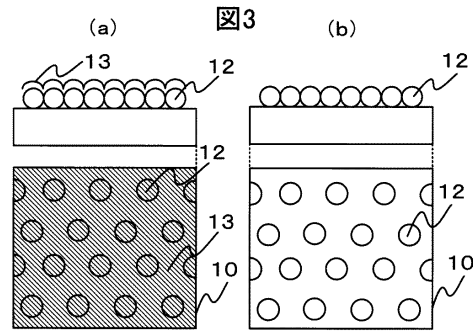
10

20

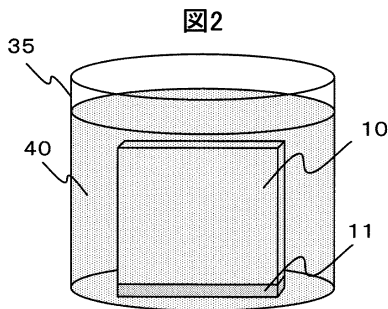
【図1】



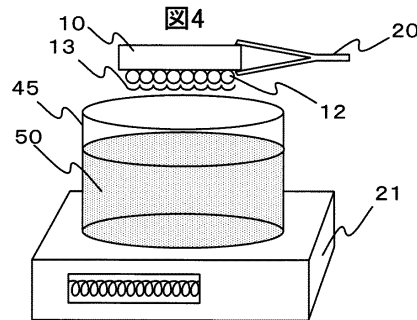
【図3】



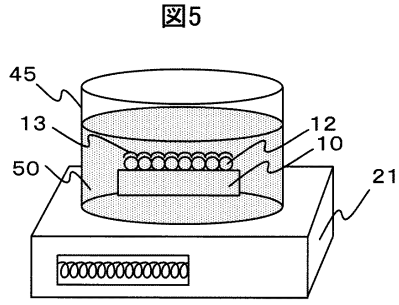
【図2】



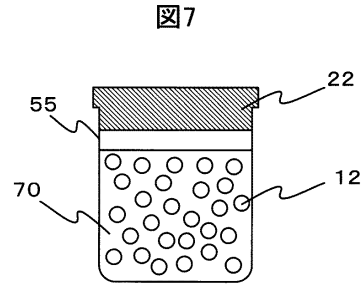
【図4】



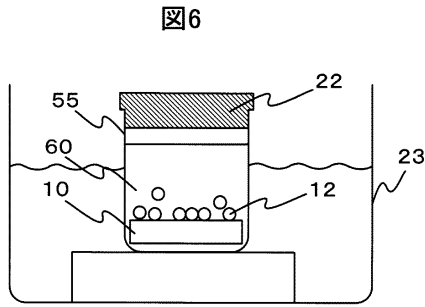
【 図 5 】



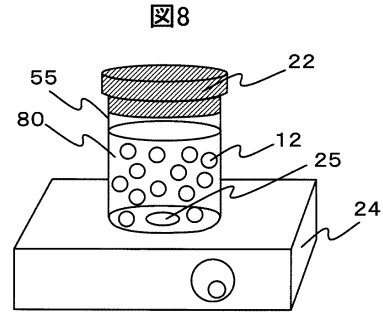
【 図 7 】



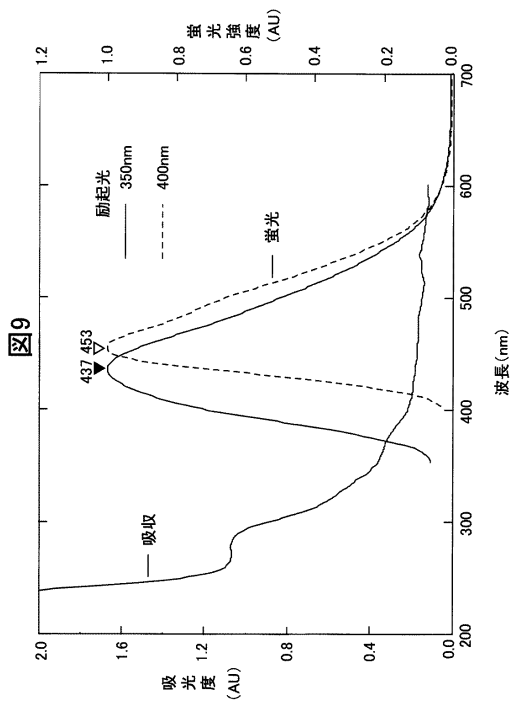
【 図 6 】



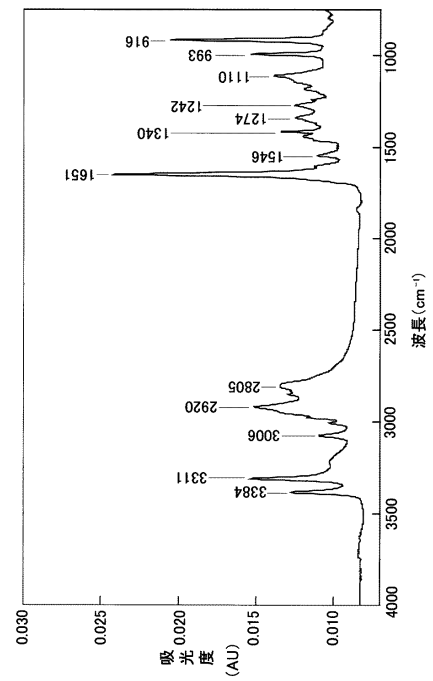
【 図 8 】



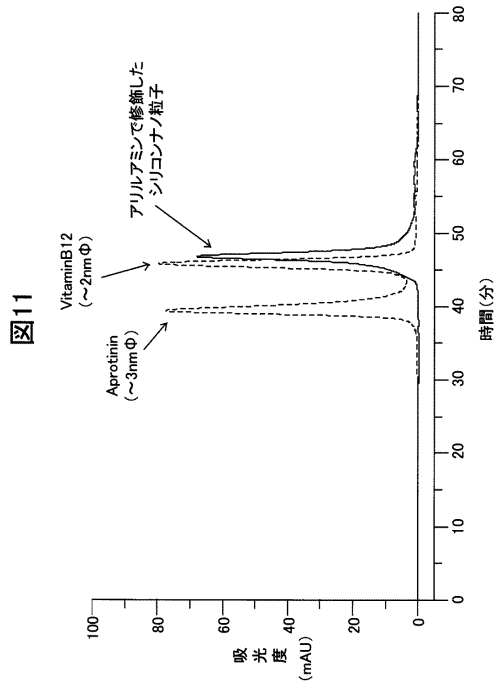
【 図 9 】



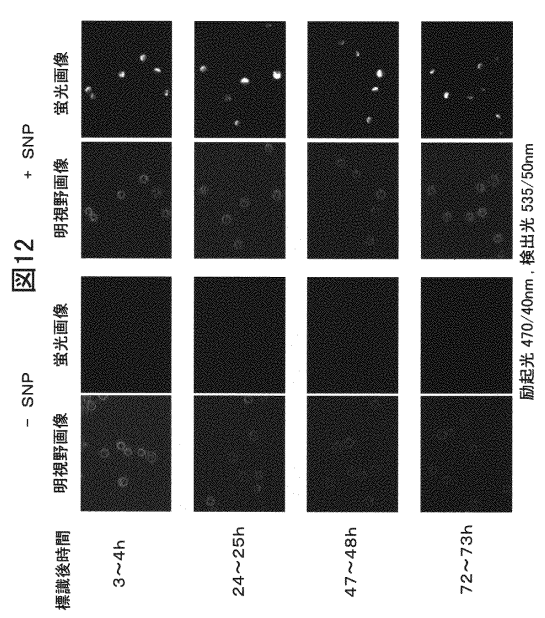
【 図 10 】



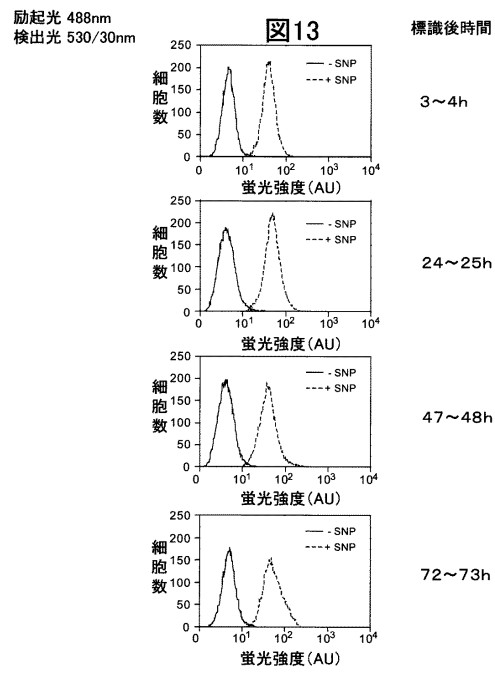
【 図 1 1 】



【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



---

フロントページの続き

- (72)発明者 西村 博仁  
京都市中京区清水町390 アヴニール御所南302号
- (72)発明者 中野 義太郎  
東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株式会社ニコン内
- (72)発明者 佐瀬 一郎  
東京都千代田区丸の内3丁目2番3号 株式会社ニコン内

審査官 廣野 知子

- (56)参考文献 特開2007-137700(JP,A)  
特開2005-170749(JP,A)  
特開平06-144822(JP,A)  
特開昭58-099113(JP,A)  
特開2006-327838(JP,A)  
特開平08-067511(JP,A)  
特開2006-315923(JP,A)

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
C01B 33/00 - 33/193