

化粧品素材としての生体安定性を有する発色ナノ粒子含有液の開発

東京電機大学工学部電気電子工学科

平 栗 健 二

We have developed photoluminescent stable silicon nanocrystals (nc-Si) which have attracted great interest as quantum dots due to their nontoxic, abundant, and low-cost materials. The nc-Si particles show visible luminescent properties caused by a radiative recombination of electrons and holes in the Si-nc. The emitted colours can be tuned by changing the size of the nc-Si. In order to know the limit concentration for cytotoxicity, we investigated the response of HeLa cells. We detected a toxicity of nc-Si at 1,120 $\mu\text{g/mL}$. We suggested one of the mechanisms that nc-Si can generate oxygen radicals and the radicals were associated with membrane damages.

1. 緒 言

発光性ナノシリコン (nc-Si) は、可視領域において発光する物質であり、最近の研究により、粒子状態で固体状または溶液内へ分散することが可能になっている。そこで、生体内への取り込み、毛細血管内での流動性、さらには生体への安全性に優れた新規の半導体ナノ粒子材料として、シリコンナノ粒子が有望視されている。この材料は、今日の半導体産業を支えてきたバルクシリコン結晶のサイズ(直径)を4.3 [nm] (この値は電子と正孔が静電引力で弱く結合した粒子的状態、すなわち励起子のボーア半径に相当)以下に縮小したもので、粒子を構成する原子数も $10^2 \sim 10^4$ [個] (通常のシリコン結晶の原子数は 10^{23} [個]である)と極小にしたものである。

また、材料自体もシリコン元素のみで構成されているため、資源面、環境面以外に、特に人体に優しい無害性・無毒性の物質であり、しかも材料費や製造費が安価な物質として最大のメリットを有している。さらに、このナノシリコン粒子の物性や機能性に関しても、大変ユニークな材料である。その主な物性は、電子や励起子が3.0 [nm] 以下のナノ空間に閉じ込められることによって起こる量子閉じ込め効果である。この量子閉じ込め効果により、バルクシリコン結晶では見られない可視領域での発光現象が現れる。可視発光は、その材料のもつバンドギャップエネルギーが可視領域まで広がることで得られる。さらに、粒子径によって発光波長が制御できるため、赤色から青色までの広い

可視領域の光学マーカーとして期待されている。発光色とナノシリコンの粒子径の関係は、直径約3 [nm]で赤色、約2.3 [nm]で緑色、約2 [nm]で青色となり、目的の色を自由に制御する応用に適している^{1, 2)}。特に、溶液中での分散状発光性ナノシリコンは、多方面に添加できるので電子工学、光工学、機械工学だけでなく医学、薬学、化学など広範囲への応用が期待されている。また、この発光性ナノシリコンは、励起源として、発光波長よりエネルギーの高い短波長の光によって発光するので、赤色には青色の励起源、青色には紫外線の励起源など、発色の選択に光源を選ぶことも出来る³⁾。

さらに、この材料は、最近の生体への安全やリサイクル等の環境や省エネを考慮した材料である^{4, 5)}。その理由は、①ナノシリコンは、原料がSiであるので地球上に豊富に存在する元素として安定に確保できる。②このSiは、ガラスの主成分として広く利用されており、生体適合性も十分有する材料である。③加えて、Siの形成には半導体工業として培われた幅広い先端技術があり、化粧品への応用に応える十分な要素を持っている。

本研究では、この発光性ナノシリコンを含有する溶液を化粧用材料として利用する可能性について調査するために、生体に対する安定性について評価する。特に、現在、利用が期待されているが生体への影響が大きいと懸念されているCdおよびSeにより構成されている量子ドット (QD) と比較する。比較の試料としては、濃度の異なる溶液を作製し、細胞毒性を検討した。

2. 実 験

図1に作製方法の概要図を示す。スパッタ条件並びにエッチング条件は、通常のパラメータで行った⁵⁾。発光性ナノシリコン分散溶液の作製には、真空中でのスパッタ法と液相エッチング法を併用した。高周波スパッタリング法を用いて、ターゲット材料である比抵抗2-9 [Ωcm]のp形シリコンチップ(面方位(100))を純度99.99 [%]の石英デ



Luminescent nanocrystalline silicon particles with biocompatibility for cosmetic application

Kenji Hirakuri

Department of Electrical and Electronic Engineering, School of Engineering, Tokyo Denki University

イスクを同時にスパッタリングすることにより比抵抗0.01 [Ωcm]のp形シリコン基板(面方位(100))上シリコン原子が混在したアモルファス SiO_x 膜を形成した。

スパッタリング後の試料は、アルゴンガス雰囲気中にて1100 [$^{\circ}\text{C}$]で1[時間]の熱処理を行った。この熱処理において、過剰に含まれたシリコン原子とボロン原子が自在に移動し、Si原子がボロン原子を取り込みながら凝集する。この過程を経て、 SiO_2 層内にボロンドープされたシリコンナノ粒子を形成した。このとき形成されたボロンドープシリコンナノ粒子のサイズは、約3.0 [nm]であった。熱処理後の試料は、HF水溶液の蒸気に暴露し余分な SiO_x 膜を除去した。粒子状になったnc-Siを生理食塩水内に拡散して、nc-Si分散溶液を作製した。本方法にて作製したnc-Si分散溶液の発光写真を図2に示す。

発光性ナノシリコンの細胞毒性を評価するために分散溶液中のナノシリコン濃度を変化させて培養試験を行った。ナノシリコンの含有量は、11.2～1120 [$\mu\text{g/mL}$]とした。評価に使用した細胞は、子宮癌細胞(HeLa細胞)を使用し、培養条件は通常の条件とした。細胞毒性評価試験の条件を表1に示す。

3. 結果

得られたナノシリコン粒子を電子顕微鏡により観察した。その結果、平均粒径6.5 [$\text{nm}\pm 1.5\text{nm}$]の粒子が観察された。

この試料を生理食塩水に分散させた。細胞毒性試験には、ヒト子宮頸癌細胞株HeLa細胞を用いた。この細胞は、マルチウェルプレート内に 5×10^4 [cells/well]を播種し、10 [%]の仔牛血清と抗生物質を添加したMinimum essential medium (MEM)を培養液として、37 [$^{\circ}\text{C}$]、5 [%]の CO_2 湿潤環境条件下において48 [時間]培養した。その後、培養液を取り除き、ウェルに毒性試験評価用材料として2.5 [nm]のサイズをしたシリコンナノ粒子を2.8 [$\mu\text{g/mL}$]から280 [$\mu\text{g/mL}$]までの濃度で培養液とともに添加し、37 [$^{\circ}\text{C}$]、5 [%]の CO_2 湿潤環境条件下において、さらに48 [時間]培養した。48 [時間]の培養期間において、ナノシリコン粒子はHeLa細胞内に容易に貪食されていることを光学顕微鏡観察像より確認している。現在までに、細胞内に貪食される粒子濃度は、1120 [$\mu\text{g/mL}$]まで確認されている。また、毒性試験用材料を添加しないで培養した細胞は、コントロールとして使用した。

ナノシリコン粒子濃度56 [$\mu\text{g/mL}$]の溶液をHeLa細胞内に取り込み、48 [時間]培養し、その後、細胞の安定性を顕微鏡により評価した。ナノシリコン粒子含有HeLa細胞および添加していないHeLa細胞の様子を顕微鏡像ならびに紫外照射時の蛍光像を取得した(図3)。48 [時間]後の細胞は、安定して増殖していることが分かる。さらに、蛍光像からはナノシリコン粒子からの発光が観察され、この時点での細胞毒性および発光特性が良好であることが示唆

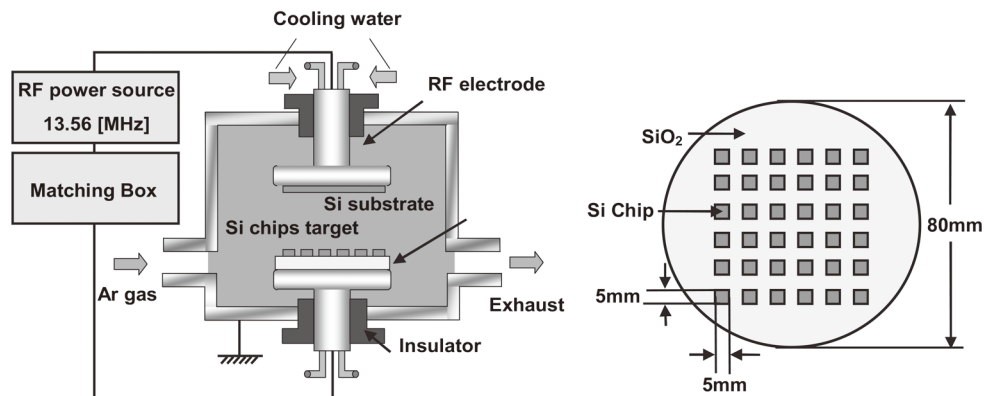


図1 スパッタ装置図ならびにターゲット条件

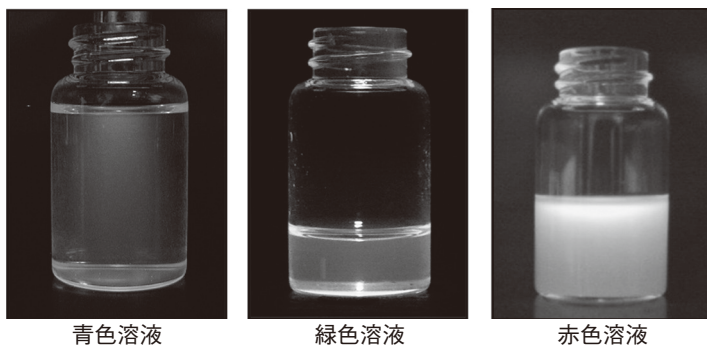


図2 各色に発光したnc-Si分散溶液

表1 細胞培養条件

細胞	子宮癌細胞 (HeLa細胞)
培養液	Minimal essential medical alpha (MEM- α)
培養条件	暗室 (37 $^{\circ}\text{C}$, CO_2 : 5%)
細胞数	12,500 [cells/well]
培養時間	48 [h]
評価試料	CdSe (QD), nc-Si
溶液添加量	11.2, 112, 1120 [$\mu\text{g/mL}$]

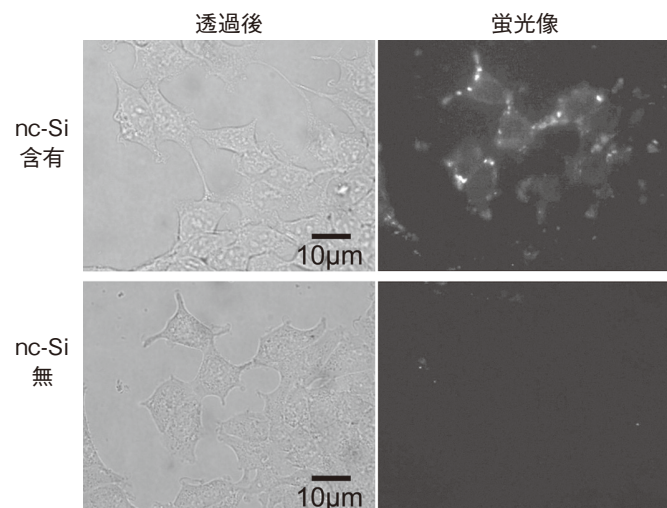


図3 nc-Si 粒子の透過および蛍光像

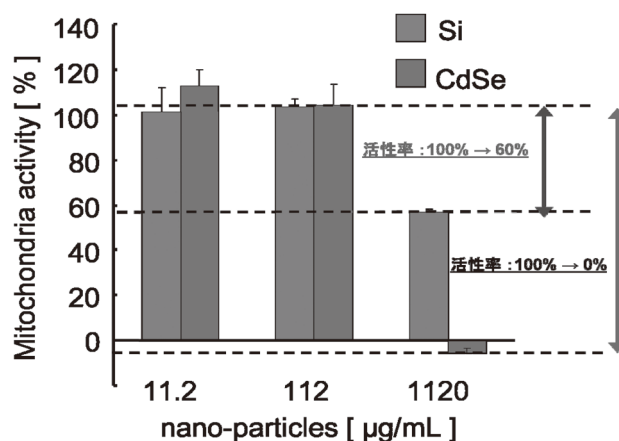


図4 細胞毒性評価試験結果

された。

ナノシリコン粒子の比較対象としてナノシリコン粒子と同条件で細胞と共培養したセレン化カドミウム (CdSe) 粒子を用い、比較・評価を行った。比較的低濃度では、nc-SiおよびCdSe試料ともに、ほぼ100 [%]の安定性を示したが、1000 [µg/mL]を超える濃度では顕著な違いが現れた。nc-Si粒子では、活性率が60 [%]程度あるのに対して、CdSeでは極端な低値を示した (図4)。この結果より、nc-Si粒子は毒性が低く、細胞に対する安定性を持つことが示唆された。

次に、毒性試験用材料を含んだ状態で培養された細胞は、MTTアッセイ試薬と培養液を1:1の比率で混合した溶液を各ウェルに20 [µL]ずつ添加し、37 [°C]、5 [%]のCO₂恒温装置で発色させた。各ウェルにおいて、プレートリーダーで450 [nm]の吸光度値から算出した細胞生存率を毒性評価の指標とした。細胞生存率は、すべての粒子濃度に対してコントロールと同様であり、比較的安定した傾向を示している。また、ナノ粒子が貪食された細胞に、UV光を照射することで、サイズ (この実験で使用した粒子サイズは2.3 [nm]である。) に依存した緑色の発光を確認することができている。この発光輝度は貪食濃度に依存しており、5.6 [µg/mL]以上の濃度において室内照明下でも肉眼で鮮明に確認できている。

4. 考 察

ここまでの研究結果からは、発光性ナノシリコンの細胞毒性は極めて低いことが判明した。これは、nc-SiがSi元素より構成されており、素材の安定性や不活性な表面で覆われていることが要因と考えられる。CdSe系の発光性ナノ粒子材料では、光励起によって粒子が活性化し、細胞に影響を与えることが報告されている。このため、励起粒子

の細胞安定性を検討する必要がある。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、経費を援助いただきました財団法人コスメトロジー研究振興財団に深謝いたします。細胞毒性試験評価に対する知見をいただきました国立国際医療センター研究所山本先生に感謝いたします。

(参考文献)

- 1) Sato, K., Hirakuri, K.: Influence of paramagnetic defects on multicolored luminescence from nanocrystalline silicon, J. Appl. Phys. 100, p.114303 (2006).
- 2) Sato, K., Hirakuri, K., Iwase, M., Izumi, T.: Fabrication of highly efficient full-color electroluminescent device composed of nanocrystalline silicon, J. Nanosci. Nanotechnol. 5, pp.271-276 (2005).
- 3) Barreto, J., Perálvarez, M., Rodríguez, J. A., Morales, A., Riera, M., López, M., Garrido, B., Lechuga, L., Dominguez, C.: Pulsed electroluminescence in silicon nanocrystals-based devices fabricated by PECVD, Physica E 38, pp.193-196 (2007).
- 4) Sato, K., Kishimoto, N., Hirakuri, K.: Enhancement of electroluminescent properties in ethanol dispersible nanocrystalline silicon particles, J. Nanosci. Nanotechnol. 8 pp.374-378 (2008).
- 5) Sato, K., Hirakuri, K.: Influence of oxidized layer on operating voltage and luminance of nanocrystalline silicon electroluminescent device, J. Nanosci. Nanotechnol. 6 pp.200-204 (2006).