

〈一般研究課題〉 プリンティングエレクトロニクス用
金属ナノ粒子の生体毒性の評価
助成研究者 名古屋大学 佐々木 勝寛



プリンティングエレクトロニクス用 金属ナノ粒子の生体毒性の評価

佐々木 勝寛
(名古屋大学)

Cytotoxicity of metallic nanoparticles developed for printing electronics application

Katsuhiro Sasaki
(Nagoya University)

Abstract

The oxidation-resistant Cu and Cu-Sn alloy nanoparticles with a biopolymer nanoskin suitable for printing electronics application have been synthesized using a simple wet-process. Microstructure of the particles has been analyzed using transmission electron microscopy. The Cu nanoparticles showed single crystalline or twinned structure with { 111 } twin boundary. Some particle contained 5-fold multiply twinned particle structure. The electron and X-ray diffraction analysis showed that Cu-Sn alloy particles consist of Cu_6Sn_5 phase. 3-5nm thick gelatin surface layers were observed on both nanoparticles. Cytotoxicity of nanoparticles has been evaluated with the relative viability of HeLa cells exposed upto $100 \mu\text{g/ml}$ of nanoparticles. Cu nanoparticles showed moderate toxicity lower than $30 \mu\text{g/ml}$ and abrupt enhancement of the toxicity in higher concentration. However, Cu_6Sn_5 nanoparticles never showed any toxicity. The results suggest that simple Cu ion release from the particles is not possible to explain the cytotoxicity of gelatin coated nanoparticles.

1. はじめに

Ag、Cuなどの金属を数十nmのサイズの微細粒子にすると、体積効果や表面効果といったサイズ効果により、プラズモン振動による特異な発色、触媒活性作用の増大、融点の降下など、様々な特異

な性質[1]が見られるようになり、それぞれの特徴を活かした応用研究が行われている。中でも特に、電子デバイスの製造に印刷技術を適用するプリンティングエレクトロニクスへの金属ナノ粒子の応用は、プロセスの低コスト化と簡略化が実現できる次世代技術として注目を集めている[2]。

一方でナノサイズの物質の研究開発については、そのプラス面ばかりが強調されている風潮があるが、ナノ・マイクロ微粒子が健康に及ぼす影響も検討する必要がある。ナノ粒子の特徴の一つは、そのナノオーダーのサイズのため人体の最深部(肺胞のう、脳など)にまで達する可能性があり、おそらく細胞への侵入も容易であろうと推定されることである。またその毒性は、同じ化学物質であっても、より大きなサイズの粒子の毒性からは推測できない。微細化によって比表面積が大きくなり、粒子の表面にある、相互の結合力が弱く反応しやすい原子の割合が増加するために、粒子の活性度が高くなる。それにより、他の物質との化学反応性や触媒作用が高まり、その表面でのフリーラジカルの生成や金属・炭化水素などとの結合も容易になる。このような特異な性質が、ナノ粒子の毒性の推測を困難にしている。また、空気中に浮遊しやすいなど、環境中においても大きなサイズの粒子とは異なった挙動を取ると推測される。しかも、作業現場では、長年にわたって多量の粒子を吸引する可能性がある。しかし、どのような問題が生じるかに関して十分な実験的蓄積がないのが現状である。超微小粒子の健康への悪影響の可能性が示され、一部の研究者からは危険視されつつある[3]。

現在、プリンティングエレクトロニクス技術においては、大気中で取り扱いやすく電気的特性の良いAgナノ粒子が、配線材料や接合材料として盛んに検討されている。しかしながら、Agの高い原材料価格や、低いマイグレーション耐性などの問題から、より安価でマイグレーション耐性が高く、Agと同等の高い電気伝導性を有するCuナノ粒子が次世代材料として期待されている。しかし、Agよりもはるかに酸化され易いCuは、数十nmのナノ粒子を合成すること自体が非常に困難であり、Cuナノ粒子の実用的な合成法や応用に関する報告は数例しかない[4,5]。

我々は、大量合成可能な液相還元法で、高耐酸化性Cuナノ粒子を合成することに成功した[6,7]。本研究では、得られたナノ粒子の微細構造を透過電子顕微鏡を用いて解析するとともに、培養細胞を用いてナノ粒子が細胞に内在化された時の毒性評価を行うin vitro実験を試みた。毒性評価には、純Cu以外に同様の手法を用いて合成した金属材料として一般的なCu合金のナノ粒子も用いた。毒性の評価法として、試料の内在化による細胞の生存率を、条件に依って細胞を染色する色素を用いて、細胞が活着している状態で干渉顕微鏡により細胞像と染色像を同時に得ることで評価した。

2. 実験方法

Cuナノ粒子は、水中に懸濁した酸化銅粒子に錯化剤としてメルカプト酢酸、保護剤としてゼラチン、還元剤としてヒドラジンを添加し、90℃で還元反応を行うことにより合成した[7]。得られたCuナノ粒子は濾過・洗浄を行い、60℃窒素ガス雰囲気中で12時間乾燥させた。ナノ粒子の平均粒径は、メルカプト酢酸の濃度により制御でき、今回使用したCu粒子の平均粒径は46nmであった。Cu合金ナノ粒子としてはCu-Sn合金を用いた。水中に懸濁した塩化第二銅粒と塩化スズ粒子に錯化剤としてクエン酸ナトリウム、保護剤としてゼラチン、還元剤として水素化ホウ酸ナトリウムを添加し、90℃で還元反応を行うことにより合成した。得られたナノ粒子はCuナノ粒子と同様に濾過・洗浄を行い、60℃窒素ガス雰囲気中で12時間乾燥させた。

ナノ粒子の微細構造解析には、透過電子顕微鏡JEM-200CX(日本電子社製)とH-9000NAR(日立製作所製)をそれぞれ加速電圧200kVおよび300kVで用いた。透過電子顕微鏡用試料は、Cuメッシュ上に張られたカーボン膜上に乾燥させた粒子を振りかけることによって作製した。

毒性評価には一般的なヒト細胞のモデルとして多くバイオ系の研究に用いられており、且つ増殖性が高く、培養が容易なヒト子宮頸癌由来HeLa細胞を使用した。まずクライオチューブに細胞保存液と共に凍結保存(液体窒素中)されたものを37°Cの温浴で解凍し、10vol% FBS(牛胎児血清)、抗生物質(100unitml⁻¹ ペニシリンGカリウム, 100 μgml⁻¹ ストレプトマイシン)を添加したDMEM培地(DULBECCO' S MODIFIED EAGLE' S MEDIUM)と共に遠心分離し上澄みを取ったものをDMEM培地5mlに加え、懸濁してからφ60mmのプラスチック製ディッシュに播種し、37°C 5%CO₂雰囲気にて設定したCO₂インキュベーター内にて培養した。光学顕微鏡で観察して細胞がディッシュの底面の70%程を占めているのを確認できたら継代を行った。継代する際は、培地をディッシュからアスピレートし、PBS(リン酸緩衝液)で2回洗浄した後、トリプシンEDTA溶液を加え、3分間程インキュベートして細胞をディッシュ底面から剥離させた後、培地と共に遠心分離し、上澄みを取り除いた後に培地5mlと懸濁し、5mlの培地を入れた新しいディッシュに懸濁液0.5mlを加え、インキュベートした。

ナノ粒子は乾熱滅菌処理をした後、培地1mlが入った1.5mlエッペンドルフチューブに培地中100, 70, 50, 30, 10, 5, 1 μg/mlとなるように加え、超音波処理により培地中に分散させた。

培養した細胞を培地2mlのφ35mmのディッシュに播種し、播種した細胞がディッシュ底面の約40%程度にまで増殖していることが確認できたら、ディッシュの培地を上記分散液を1vol%(20 μl)になるように加えたものに交換し、よく攪拌して24, 48時間インキュベートしたところで培地を除き、細胞をhemocytometer上に移した後、死細胞を青色に染色するTrypan blue 0.4%試薬を加えた。染色された細胞を、干渉光学顕微鏡下で観察し、微分干渉顕微鏡像下で数えられる細胞数に対する、青く染色された細胞数をカウントし生存率を計数した。

3. 結果と考察

3.1 ナノ粒子の微細構造

図1にCuナノ粒子の透過電子顕微鏡像を示す。粒子の形状はあまり明確な晶癖面を示さない楕円状を示し60%は図1(a)に示すような内部に結晶欠陥を含まない粒子であり、挿図の電子線回折パターンに示すようにCuの単結晶であった。また、そのほかのほとんどの粒子は、図1(b)に示すように粒子中央に面状の欠陥が観察された。図1(c)には図1(b)の粒子より得られた電子線回折パターンを示すが、双晶関係を示す<110>軸入射のパターンが得られている。図中の{111}スポットと200₁と200₂によって示された二つの{200}スポット、および図1(a)中の面欠陥の方位関係より{111}双晶が存在することがわかる。

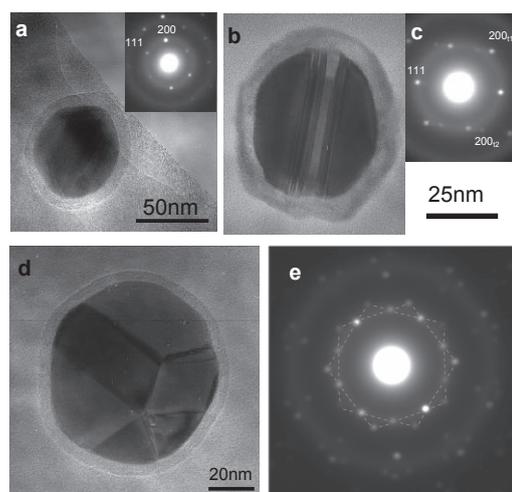


図1 Cuナノ粒子の透過電子顕微鏡像。(a)単結晶粒子と電子線回折パターン。(b)双晶を含む粒子。(c) <110>入射で{111}双晶を示す(b)の粒子の電子線回折パターン。(d)多重双晶構造を示す粒子。(e)多重双晶5MTP構造を示す(d)の電子線回折パターン。

また、観察した100例中の2粒子において図1(d)に示すような多重双晶の存在が観察された。図1(d)の粒子から得られた電子線回折パターン(図1(e))は典型的な十面体状多重双晶粒子(5MTP)構造[8,9]に典型的なパターンを示した。多重双晶の形態と電子線回折パターンの対応より、図1(e)の粒子の下部に見られる欠陥構造が5MTP構造を反映していると考えられる。また、この結果はナノ粒子の一部はかなりの過飽和度を持った溶液中から析出していることを示唆している。さらに、図1(a), (b), (d)より粒子表面を3~5nmの膜が覆っており、試料より得られたフーリエ変換赤外分光スペクトルが残留ゼラチンの存在を示していることより、ゼラチンの被覆層であると考えられる。

図2(a)にCu-Sn合金ナノ粒子の透過電子顕微鏡像を示す。粒子径は平均33nmであり、表面をCuナノ粒子と同様に3~5nmのゼラチン層が覆っていた。挿図に示す電子線回折パターンと図2(b)に示す粉末X線回折チャートより

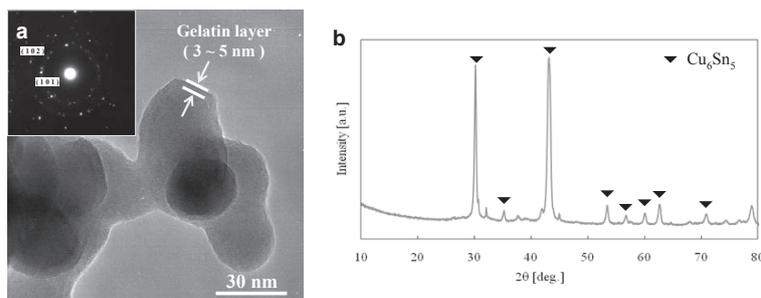


図2 Cu-Sn合金ナノ粒子の (a) 透過電子顕微鏡像と (b) 粉末X線回折チャート。

得られたCu-Sn合金はCu₆Sn₅相であることがわかった。図2(a)では複数の粒子が凝集している様子が示されているが、強い回折を示す粒子が強いコントラストで示されている。中央右に示すように粒子の形状が均一のコントラストで示されていることより、Cu粒子と同じくほとんどの粒子が単結晶であることがわかる。また、図中央左に示される粒子のように明確な晶癖面が観察されるものもあり、Cu粒子比べて小さいサイズの粒子でありながら比較的過飽和度の低い溶液から成長したことが伺える。

3.2 ナノ粒子の毒性評価

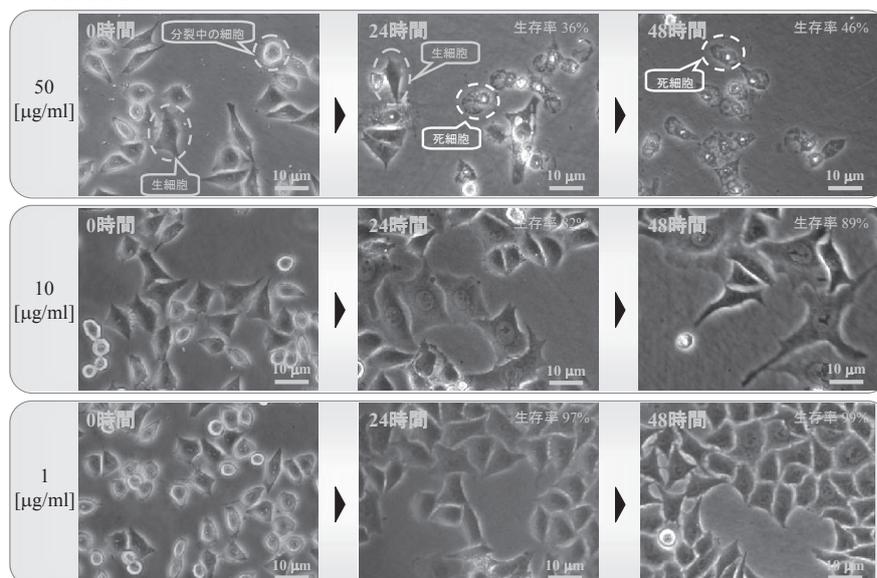


図3 粒子分散量が50, 10, 1μg/mlのCuナノ粒子を加えた直後、24時間および48時間後の微分干渉顕微鏡像

図3に、粒子分散量が50, 10, 1 μg/mlのCuナノ粒子を加えた直後、24時間および48時間後の微分干渉顕微鏡像を示す。図中で球形に観察されるのが死細胞である。ナノ粒子を加えた直後の試料でも、一定数の死細胞は存在することがわかる。50 μg/mlの場合は時間とともに死細胞

が増加していることがわかるが、1, 10 $\mu\text{g/ml}$ の場合、顕著な増加が見られないことがわかる。10 $\mu\text{g/ml}$ の場合、24, 48時間でそれぞれ細胞体が拡張しているように見られるものが観察されるが、いずれも細胞核はひとつしか観察されず、細胞融合は確認されなかった。今回の実験の範囲内では遺伝子への影響は明らかに出来なかった。図4(a), (b)にそれぞれ、48時間培養後の分散粒子濃度と生存率の変化および培養時間による生存率の変化を示す。分散粒子濃度が30 $\mu\text{g/ml}$ を超えると急激に生存率が下がり、100 $\mu\text{g/ml}$ でほぼ全数の細胞死が確認された。この結果より、深刻な短期毒性が発現する臨界濃度が確定できた。以前の研究[10]において被覆のないCu粒子を100 $\mu\text{g/ml}$ 加えた実験では、非常に短い時間で全数死が確認されたことと比べると、ゼラチン被覆に一定の毒性抑制の効果が認められた。我々とは異なった方法で作製されたC被覆Cuナノ粒子の毒性評価研究[11]においても27 $\mu\text{g/ml}$ に相当する濃度までは顕著な毒性が見られていないことと、我々の結果はよく一致する。また、図4(b)に示されるように時間による生存率の変化が見られなかった。Cuイオンを培養液中に添加する実験では生存率の経時低下[11]が報告されており、無被覆粒子からCuイオンが徐々に溶出することによりより毒性を発揮するという[10]われわれの以前の考え方が支持されて来たが、今回の結果は説明できない。むしろ粒子が比較的初期に細胞内に取り込まれた結果、定常的に何らかのメカニズムで毒性を発揮し続けるのではないかと考えられる。

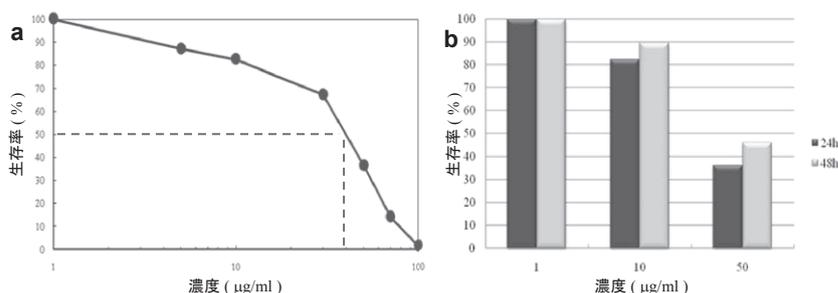


図4 Cuナノ粒子を分散させた後 (a) 48時間培養後の分散粒子濃度と生存率の変化および (b) 培養時間による生存率の変化。

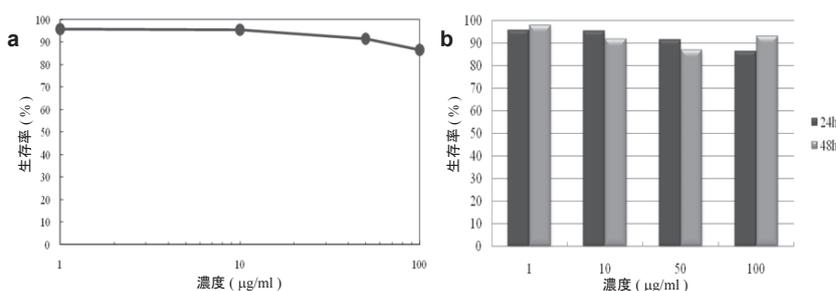


図5 Cu_6Sn_5 ナノ粒子を分散させた後 (a) 48時間培養後の分散粒子濃度と生存率の変化および (b) 培養時間による生存率の変化。

Cu_6Sn_5 ナノ粒子に関しても同様の毒性評価を行った結果を図5に示す。 Cu_6Sn_5 ナノ粒子ではCu粒子と大きく結果が異なり、いずれの濃度、培養時間でも顕著な毒性を示さなかった。もし、毒性が従来の方のように溶出した金属イオンに由来しているならば、 Cu_6Sn_5 も十分な量のCuイオンを生成すると考えられるので、なんらかの毒性を発揮すると考えられる。しかし、まったく毒性を示さないということは、ゼラチン被覆ナノ粒子の毒性発現メカニズムは、これまでと異なったものであると考えなければならない。ナノ粒子が細胞内に取り込まれた後に、細胞内でどのような挙動をするかを今後明らかにしてゆく必要があると考えられる。

4. まとめ

液相還元法により合成したCuおよびCu-Sn合金ナノ粒子の構造を透過電子顕微鏡により評価した。Cuナノ粒子は、楕円状の外形をし60%が単結晶で、そのほかは双晶を含んでいた。一部に5MTP構造を示す粒子があり、比較的高い過飽和度で析出したことがわかった。一方、Cu-Snナノ合金粒子はCu₆Sn₅相であり、明確な晶癖を示す粒子が見られたことから、比較的過飽和度の低い条件で析出したことがわかった。Cuナノ粒子は30 μg/ml以上の濃度で顕著な毒性を示したが、Cu-Snナノ合金粒子はまったく毒性を示さなかった。このことより、ゼラチン被覆金属ナノ粒子の毒性発現は粒子よりの金属イオンの溶出では説明できないことがわかった。今後、粒子が細胞内へ取り込まれた後の挙動を明らかにする必要性が示唆された。

5. 謝辞

本研究は、日比科学技術研究助成金の支援によって実施されたことを、謝意をもって記します。高価な装置を貸与いただき、細かい実験指導をいただいた名古屋大学の臼倉教授に感謝いたします。試料合成に関して御指導いただいた石原産業の井田氏に感謝いたします。困難な実験を短期間で成し遂げた大学院生の中條君に感謝いたします。

参考文献

- [1] D.A. Buffet and J.P. Boel, *Size effect on the melting temperature of gold particles*, Phys. Rev., A13 (1976) 2287-2298.
- [2] H. Sirringhaus, T. Kawase, R.H. Friend, T. Shimoda, M. Inbasekarn, W. Wu, and E.P. Woo *High-Resolution Inkjet Printing of All-Polymer Transistor Circuits*. Science 290 (2000) 2123-2126.
- [3] J. M. Wörle-Knirsch, K. Pulskamp, and H. F. Krug, *Oops They Did It Again! Carbon Nanotubes Hoax Scientists in Viability Assays*, Nano Letters 6 (2006) 1261-1268.
- [4] B. Park, D. Kim, S. Jeong, J. Moon, and J. Kim, *Direct writing of copper conductive patterns by ink-jet printing*, Thin Solid Films 515 (2007) 7706-7711.
- [5] Y. Kumashiro, H. Nakako, M. Inada, K. Yamamoto, A. Izumi, and M. Ishihara, *Novel materials for electronic device fabrication using ink-jet printing technology*, Applied Surface Sci. 256 (2009) 1019-1022.
- [6] K. Ida, Y. Sugiyama, Y. Chujyo, M. Tomonari, T. Tokunaga, K. Sasaki, and K. Kuroda, *In-Situ TEM Studies on Sintering Behavior of Copper Nanoparticles Covered by Biopolymer Nanoskin*, Journal of Electron Microscopy 2010 59: S75-S80.
- [7] M. Tomonari, K. Ida, H. Yamashita, and T. Yonezawa, *Size-controlled oxidation-resistant copper fine particles covered by biopolymer nanoskin*. Nanoscience and nano technology. 8 (2008) 2468-2471.
- [8] K. Kimoto and I. Nishida, *Multiply-twined Particles of F. C. C. Metals Produced by Condensation in Argon at Low Pressure*, J. Phys. Soc. Japan 22(1967) 940.
- [9] S. Ino, *Stability of Multiply Twined Particles*, J. Phys. Soc. Japan 27 (1969) 941-953.

- [10] 加賀正樹 名古屋大学 大学院 工学研究科博士課程(前期課程) 修士学位論文「培養細胞を用いたナノ物質の毒性評価」平成20年3月 量子工学専攻
- [11] A. Studer, L. Linbach, L. Duc, F. Krumeich, E. Athanassiou, L. Gerber, H. Moch, and W. Stark, *Nanoparticle cytotoxicity depends on intercellular solubility: Comparison of stabilized copper metal and degradable copper oxide nanoparticles*, *Toxicology Letters*, 197 (2010) 169-174.

