

## [序論]

複数の原子が規則的に集合してできるクラスター分子は、化学修飾を施すことで形状、サイズを由来とする特異な物性を引き出すことができる。本研究ではクラスター分子の化学修飾に注目し、表面化学修飾による物性制御と毒性の評価、および形状を利用した標識分子の合成と観察を行った。炭素クラスターであるカーボンナノチューブはそのチューブ状の形状と歪んだ $\pi$ 曲面からなる表面を持ち数多くの研究がなされている一方、分子同士の強い相互作用のため凝集しやすく応用研究の大きな問題となっている。本研究では外側表面を化学修飾する手法を開発し、カーボンナノチューブ同士の強い凝集がとけることを見いだした。その結果詳細な構造決定が可能となり、形状由来の毒性を性格に評価することができた。また、ホウ素クラスターであるカルボランは球状の形状をもち、透過型電子顕微鏡でその形状がよい標識となることを見だし、カーボンナノチューブに内包した単一有機小分子を初めて画像化できた。

## [水溶性カーボンナノチューブの合成、精製、構造決定と細胞毒性]

近年ナノメートル程度の大きさと針状の形状からカーボンナノチューブの持つ毒性が注目されている。すでに、カーボンナノチューブの毒性評価はいくつか報告されているが、有毒とする報告と無毒とする報告の両者がありはっきりとした結論が得られていない。ナノメートルサイズの物質は既存の物質とは異なる観点からの毒性評価が必要であり、最近毒物学を専門とする研究者グループはナノ物質の毒性に関与すると疑われる物性を以下の9項目提示し、すべての物性を決定することが望ましいとしているが、カーボンナノチューブでこれらすべてを決定することはその高い凝集力のために困難であった。

- 1) 粒径            2) 凝集状態        3) 形状            4) 結晶構造        5) 化学組成  
6) 表面積        7) 表面化学        8) 表面電荷        9) 多孔度

本研究ではカーボンナノチューブの会合体であるカーボンナノホーン会合体を用いて毒性評価を行った。カーボンナノホーン会合体は純粋な炭素をレーザー蒸発させることで単層カーボンナノチューブの会合体として得られる。一方、カーボンナノホーン会合体もカーボンナノチューブ同様、凝集力が強く種々の粒径を持つ塊となっている。

本研究ではまずカーボンナノホーン会合体を水へ可溶化させるために新しい化学修飾法を開発した。すなわちカーボンナノホーン会合体を液体アンモニア中分散させナトリウムアミドを作用させることで表面にアミノ基を導入したアミノナノホーン会合体を得た(式1)。カーボンナノホーン会合体は水中へ分散することはないが、アミノナノホーン会合体は純水中へ1 mg/mL と高い濃度で分散した (Figure 1)。

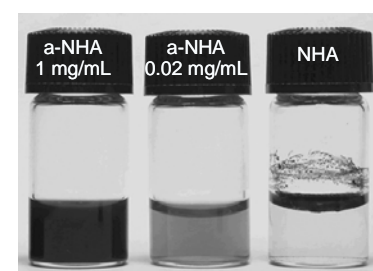
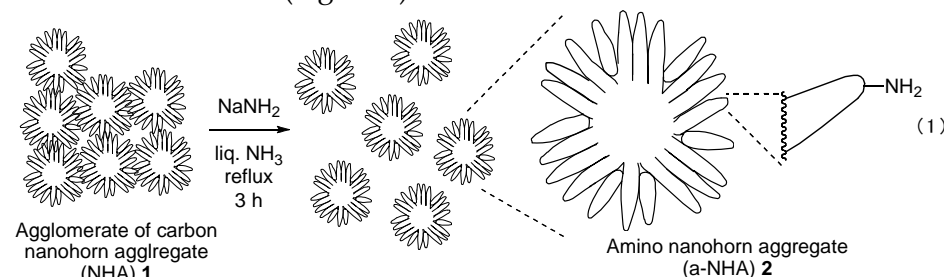
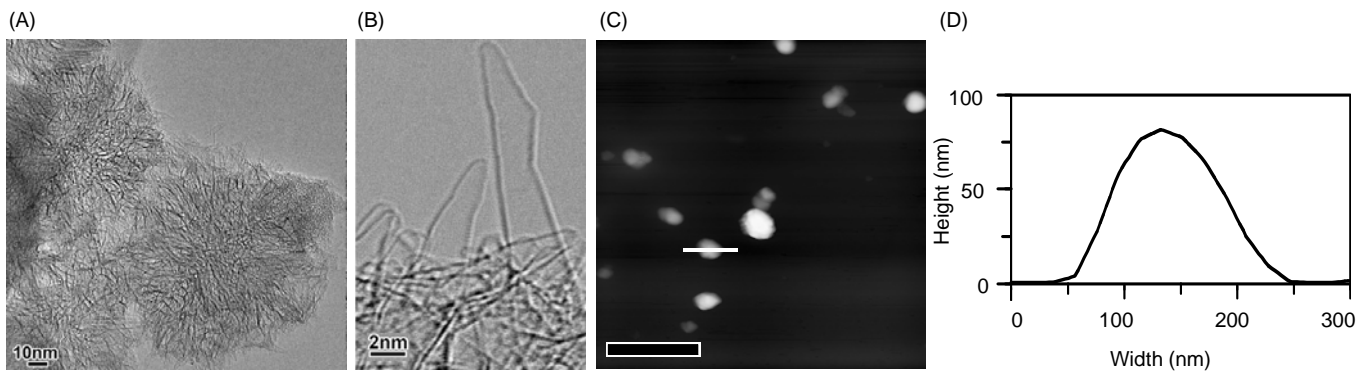


Figure 1. Picture of aqueous solution of a-NHA and carbon nanohorn aggregates.

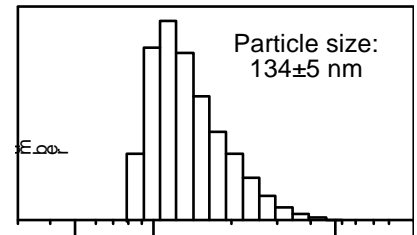
得られたアミノナノホーン会合体の構造決定を行った。まず TEM 観察を行ったところカーボンナノホーン会合体は水溶化の過程で基本的な構造は変化しておらず、単層カーボンナノチューブのチューブ状のグラファイト構造を持っていることが明らかになった (Figure 2A, B)。

次に原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて粒子の形状を観察した。HOPG 上にアミノナノホーン会合体水溶液を滴下し、減圧下乾燥した後観察したところその粒子が楕円球であることを見いだした (Figure 2C, D)。また高さ分布を求めたところ平均が 95 nm であった。

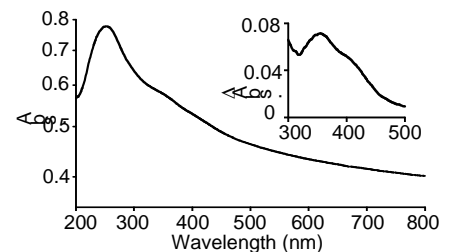
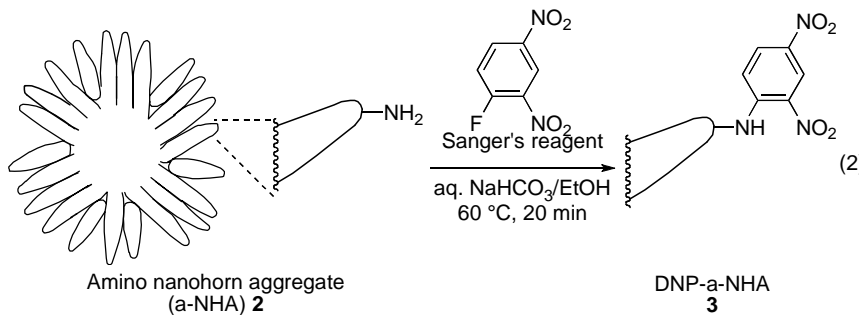


**Figure 2.** (A) Low magnified and (B) high magnified TEM images of a-NHA. (C) AFM image of a-NHA. a-NHA solution at the concentration of 0.02 mg/mL was casted on HOPG and dried *in vacuo*. (D) AFM profile of the line in (C).

基板上で孤立粒子が観察されたことから溶液中の粒度分布を測定した。0.02 mg/mL の濃度のアミノナノホーン会合体水溶液の粒度分布を動的光散乱法 (DLS) を用いて測定したところ平均粒径が 134 nm であり、アミノナノホーン会合体の AFM 観察から得られた高さ分布とアスペクト比を考慮するとよい一致を示したため溶液中でも単粒子分散していることを見いだした (Figure 3)。同時に純水中での表面電位を測定し、 $-28$  mV とわかった。

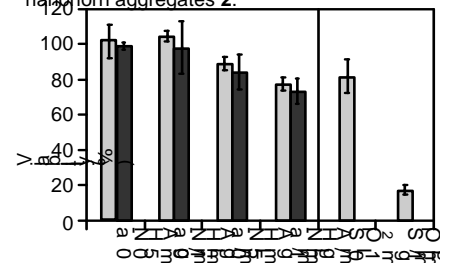


アミノナノホーン会合体の表面にアミノ基が導入されていることは Sanger のアミノ基の定量法を用いて確認した。すなわちアミノナノホーン会合体に 2,4-ジニトロフルオロベンゼンを塩基性条件下作用させることでジニトロフェニル化されたアミノナノホーン会合体 **3** を得た (式 2)。ジニトロフェニルアミノ基の生成は紫外光領域にある 350 nm の特性吸収により確認し、アミノ基の量を 0.22 mmol/g と見積もることができた (Figure 4)。以上の検討とすでに報告されている表面積、多孔度の測定結果を用いると先に述べたナノ物質の毒性に関する疑いのあるすべての物性を決定することができた。このことはアミノナノホーン会合体がカーボンナノチューブの毒性を評価する標準試料であるといえる。アミノナノホーン会合体は遷移金属微粒子を含まず、そろった粒径を持つカーボンナノチューブの会合体であることから毒性を評価するには望ましい物質である。



**Figure 4.** UV-vis spectrum of DNP-a-NHA **3** at the concentration of 0.02 mg/mL in water. Inset shows the differential spectrum of **3** and amino nanohorn aggregates **2**.

引き続きアミノナノホーン会合体を用いて細胞毒性試験を行った。細胞が生産する総タンパク量を指標として細胞活性をはかったところアミノナノホーン会合体は 0.1 mg/mL の投与量までは細胞活性が低下しなかったが、1 mg/mL の投与量で 75%程度まで低下した (Figure 5)。この細胞活性値は有毒な対照粒子として用いられる石英粒子の 10 分の 1 の投与量に対する値とほぼ同等であり、アミノナノホーン会合体の毒性は石英粒子の 10 分の 1 程度といえる。石英粒子は毒性があるものの道路標識など身の回りで広く用いられている材料であるため、遷移金属を含まない単層カーボンナノチューブは利用法を工夫することで安全に使用できると示唆された。

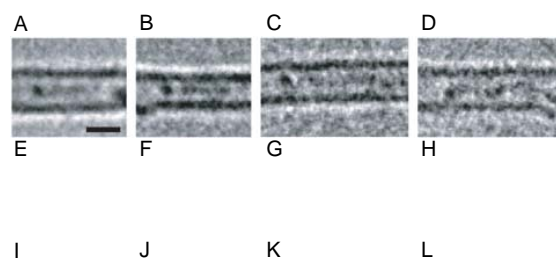
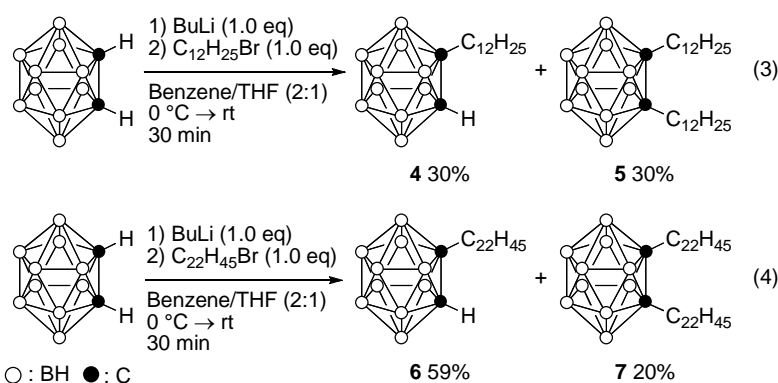


**Figure 5.** Cytotoxicity assessment of a-NHA. Viability of 3T3 (gray) and HeLa (black) cells after incubation with particles for 24 h.

## [カルボランを標識とした有機小分子の画像化]

前節でカーボンナノチューブの外表面の化学修飾により新たな物性が見いだされたことを述べたが、その内部空孔も一次元の特有な形状から修飾による有用な物性の発現が期待でき、検討を行った。TEMはオングストローム程度の分解能を有することから、単一の有機小分子を観察する試みがなされていたが、以下の3つの理由によって達成されなかった。1) 有機分子を固定する入れ物がなかった。2) 有機分子は電子線照射下で分解すると信じられていた。3) 観察した分子が目的とする分子であるかどうかの判断が困難であった。本研究では球状の形状を持つホウ素クラスターであるカルボランが標識分子となりうると考えカルボラン分子の分子設計を行った。さらに単層カーボンナノチューブが炭素原子一層からなる薄い膜であり、かつ内部に空孔を持つことから、カルボラン分子を内包させることで標的分子の固定化ができると考えた。

まず観察を行うにあたり目的とする分子を設計、合成した。カルボランを脱プロトンした後、臭化アルキルで補足し、アルキル鎖の長さ、数の異なる4つのアルキルカルボラン4-7を合成した(式3,4)。これらのアルキルカルボランは酸化開口処理したカーボンナノチューブ内に気相で導入し、TEM観察することで顕微鏡像を得た。その結果、顕微鏡像から球状のカルボランとアルキル鎖を見ることができシミュレーションとよく一致した(Figure 6)。さらにアルキル鎖の数によるコントラストの違い、およびエネルギー損失分光分析によるホウ素原子のピークの検出を見ることでアルキルカルボランの観察が支持された。分子は1分程度分解することなく観察されたことから、カーボンナノチューブ内に孤立した有機分子は安定であるとわかった。

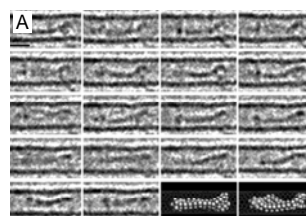


**Figure 6.** (A–D) Experimental TEM images of alkylcarboranes 4–7, respectively. The scale bar shows 1 nm. (E–H) The corresponding molecular models. (I–L) Simulated images for the models in E–F.

さらにこの観察の中でアルキル鎖の構造変化を観察することができた。カーボンナノチューブは直径の異なるチューブの混合物であるため太いチューブの中に存在するアルキルカルボランは運動することができる。単一分子を連続して観察することで図7に示すようにアルキル鎖が上下に変位した二つの状態を交互にとる様子を捕らえることができた。この結果から分子は連続的に構造変化するのではなく状態から状態へと離散的に変化していることがわかった。さらに別の分子を観察することでチューブ内を並進運動する様子や、アルキル鎖がカーボンナノチューブと相互作用している様子を観察することができた。

## [まとめ]

本研究ではカーボンナノホーン会合体の新しい外表面の化学修飾法を開発することで水溶性カーボンナノホーン会合体を合成し詳細な構造決定を行った。得られた水溶性カーボンナノホーン会合体は標準試料ということができ、細胞毒性試験の結果カーボンナノチューブの針状の形状は強い毒性を示さないことを明らかとした。また、カルボランの球状の形状を標識に、カーボンナノチューブのチューブ状の空孔を利用することで単一有機小分子が画像化できることを初めて見いだした。以上の結果から化学修飾を行うことでクラスター分子の物性評価、標識化合物としての応用を達成した。



**Figure 7.** (A) TEM images of conformational change of double C<sub>22</sub>H<sub>45</sub> carborane 7. The numbers at the bottom of each image show the time of the observation in seconds. The scale bar is 1 nm. (B and C) Moieils of the molecule in a CNT at times 4.2 s and 6.3 sec.

### [報文目録]

1. "Preparation, Purification, Characterization, and Cytotoxicity Assessment of Water-Soluble, Transition-Metal-Free Carbon Nanotube Aggregates", Isobe, H.; Tanaka, T.; Maeda, R.; Noiri, E.; Solin, N.; Yudasaka, M.; Iijima, S.; Nakamura, E. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 6676–6680.
2. "Regioselective Oxygenative Tetraamination of [60]Fullerene. Fullerene-mediated Reduction of Molecular Oxygen by Amine via Ground State Single Electron Transfer in Dimethyl Sulfoxide", Isobe, H.; Tanaka, T.; Nakanishi, W.; Lemiègre, L.; Nakamura, E. *J. Org. Chem.* **2005**, *70*, 4826–4832.
3. "Organic and Organometallic Derivatives of Dihydrogen-Encapsulated [60]Fullerene", Matsuo, Y.; Isobe, H.; Tanaka, T.; Murata, Y.; Murata, M.; Komatsu, K.; Nakamura, E. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, *127*, 17148–17149.
4. "Synthesis of Oxy Aminated [60] and [70] Fullerenes with Cumene Hydroperoxide as Oxidant", Lemiègre, L.; Tanaka, T.; Nanao, T.; Isobe, H.; Nakamura, E. *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 20–21.
5. "Imaging of Single Organic Molecules in Motion", Koshino, M.; Tanaka, T.; Solin, N.; Suenaga, K.; Isobe, H.; Nakamura, E. *Science* **2007**, *316*, 853.
6. "Imaging of Aromatic Amide Molecules in Motion", Solin, N.; Koshino, M.; Tanaka, T.; Takenaga, S.; Kataura, H.; Isobe, H.; Nakamura, E. *Chem. Lett.* **2007**, *36*, 1208–1209.

### [参考報文]

1. "Thermal and Palladium-Catalyzed [3 + 2] Synthesis of Cyclopentadienone Acetals from Cyclopropanone Acetals and Acetylenes", Isobe, H.; Sato, S.; Tanaka, T.; Tokuyama, H.; Nakamura, E. *Org. Lett.* **2004**, *6*, 3569–3571.
2. "Three-component synthesis of polysubstituted benzene derivatives via Diels-Alder reaction of cyclopentadienone acetal with alkyne Sato, S.; Isobe, H.; Tanaka, T.; Ushijima, T.; Nakamura, E. *Tetrahedron*, **2005**, *61*, 11449–11455.
3. "Synthetic Pores with Reactive Signal Amplification as Artificial Tongues", Litvinchuk, S.; Tanaka, H.; Miyatake, T.; Pasini, D.; Tanaka, T.; Bollot, G.; Mareda, J.; Matile, S. *Nature Mat.* **2007**, *6*, 576–580.

### [講演目録]

1. "Palladium-Catalyzed [3 + 2] Synthesis of Cyclopentadienone Acetals from Cyclopropanone Acetals and Acetylenes", Takatsugu Tanaka, Eiichi Nakamura, Hiroyuki Isobe, Sota Sato, Hidetoshi Tokuyama, 13th IUPAC International Symposium on Organometallic Chemistry Directed Towards Organic Synthesis, July 2005, Geneva.
2. 「テトラアミノフラレンエポキシドの合成」, 田中隆嗣, 中西和嘉, Loïc Lemiègre, 磯部寛之, 中村栄一, 第30回フラレン・ナノチューブ総合シンポジウム (2006年1月, 名古屋)
3. 「遷移金属を含まない水溶性カーボンナノチューブ会合体の合成, 精製, 構造決定および細胞毒性」, 田中隆嗣・磯部寛之・前田るい・野入英世・湯田坂雅子・飯島澄男・中村栄一, 第31回フラレン・ナノチューブ総合シンポジウム (2006年7月, 津)
4. "Preparation, Purification, Characterization, and Cytotoxicity of Water-soluble, Transition-metal Free Carbon Nanohorn Aggregate", Takatsugu Tanaka, Hiroyuki Isobe, Rui Maeda, Eisei Noiri, Niclas Solin, Masako Yudasaka, Sumio Iijima, Eiichi Nakamura, Tokyo Summer School on Frontier Chemistry 2006, August 2006, Kanagawa.
5. "Preparation, Purification, Characterization, and Cytotoxicity of Water-soluble, Transition-metal Free Carbon Nanohorn Aggregate", Takatsugu Tanaka, Hiroyuki Isobe, Rui Maeda, Eisei Noiri, Niclas Solin, Masako Yudasaka, Sumio Iijima, Eiichi Nakamura, International COE Symposium for Young Scientists on Frontiers of Molecular Science, August 2006, Tokyo.
6. 「単一有機分子の回転・並進分子運動の実時間電子顕微鏡観察」, 田中隆嗣, 越野雅至, Solin Niclas, 末永和知, 磯部寛之, 中村栄一, 日本化学会第87春季年会 (2007年3月, 大阪)
7. 「単一有機分子の回転・並進分子運動の実時間電子顕微鏡観察」, 田中隆嗣, 越野雅至, Solin Niclas, 末永和知, 磯部寛之, 中村栄一, 日本化学会第1回関東支部大会 (2007年9月, 東京)

### [謝辞]

本研究は21世紀COEプログラム「フロンティア基礎化学」, 日本学術振興会の支援のもと行われた。