

令和 5 年 4 月 27 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19919

研究課題名（和文）13Cラベルしたナノグラフェンの合成と生分解性評価

研究課題名（英文）Preparation of 13C-labeled nanographenes and their biodegradability

研究代表者

新留 琢郎（Niidome, Takuro）

熊本大学・大学院先端科学研究部（工）・教授

研究者番号：20264210

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：ナノグラフェンを医療材料として用いる場合、その安全性が問題にされる。本研究では、13Cラベルしたナノグラフェンを合成し、13C-NMRで感度良く構造解析し、動物体内での蓄積、排泄、そして、微生物分解を明らかにすることを目的とした。まず、13Cラベルした無水酢酸からナノグラフェンを合成し、非常に強いNMRシグナルを得た。しかし、得られた試料の総量が少なく、生物試料中のナノグラフェンのNMR解析は困難であった。一方で、窒素やホウ素をドーブしたナノグラフェンの合成に成功し、これら異元素は、ナノグラフェンの分解起点になる可能性が大きく、今後、詳細な分解に関する情報を得ることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グラフェンやカーボンナノチューブといった炭素材料は燃料電池などに使われる先端素材として精力的に研究・開発が進められている。また、医用材料としても様々な用途が期待されているが、その安全性が問題にされている。本研究では13Cラベルすることで、ナノグラフェンの生成や分解を追跡するための基礎技術を提供し、学術的意義は大きい。また、ナノグラフェンの体内での蓄積、分解、排泄の有無に関する情報だけではなく、燃料電池といった産業利用においても、そのその廃棄に伴う環境への負荷という観点から生分解性を調べることを可能にし、社会的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：Safety of nanographenes is an important key for their uses as medical materials. In this study, we synthesized 13C-labeled nanographenes and tried to analyze their biodistributions in animal, excretion, and degradation in the animals and bacteria by 13C-NMR. It showed strong signals of the nanographenes. For biodistribution in mice and degradation by bacteria, the total amount of 13C-labelled nanographene was too low to analyze them. On the other hand, we succeeded in synthesizing nitrogen- and boron-doped nanographenes. Such foreign elements in the nanographenes would be starting points of their degradation. It will be an important clue to understand degradation of nanographenes in animals and environments.

研究分野：医用材料学

キーワード：ナノグラフェン 安全性 生分解性 NMR 13C

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はシルクフィブロインのアセチル化を試みていた際に、無水酢酸に少量の硫酸を加え、加熱することで蛍光性のナノグラフェンが生成することを偶然にも見出した。さらに、このナノグラフェンは有機溶媒に分散可能で、疎水性の高いものであった(図1)。有機溶媒に分散可能なナノグラフェンを安価な原料で簡便に合成する方法はこれまで報告はなく、全く新しいカーボン材料およびその製造法であるとして、特許出願した(特願 2020-147069)。この偶然に発見されたナノカーボンを安価かつ簡便に作製する技術は、それから製造される製品のコストを下げるだけではなく、高額な同位元素(^{13}C)を比較的安価にナノカーボンに導入できる画期的な手法でもあり、 ^{13}C -NMR や質量分析を駆使し、その細胞や体内での挙動(排泄、分解、代謝)を解析することが可能になるのではないかと着想したのが本研究である。

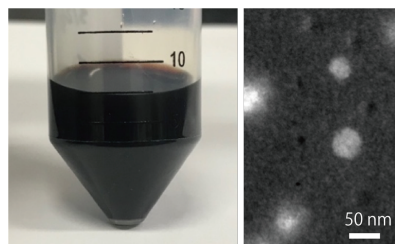


図1、有機溶媒分散ナノカーボン

2. 研究の目的

グラフェンやカーボンナノチューブといった炭素材料は、その特徴的な電気的あるいは力学強特性から燃料電池などの素材として期待されている。中でもグラフェンは、ナノグラフェン、グラフェン量子ドット、酸化グラフェン、還元した酸化グラフェンなど様々なものが報告され、それぞれの特徴を活かした先端材料が開発されている。その応用範囲は電池、センサー、そして、医療材料まで幅広く、特に医療材料として用いる場合はその安全性が問題にされ、臓器への蓄積あるいは排泄の有無、また、体内で分解されるのか、されるのであれば、その速度や分解産物を解析する必要がある。電池やセンサーといった産業利用においても、その廃棄に伴う環境への負荷という観点から生分解性を調べることは非常に重要である。

カーボン材料の体内動態や分解産物を評価する手法として、同位体ラベルし、それを追跡することが考えられる。カーボン材料の場合、放射性同位元素である ^{14}C ラベルが体内動態を追跡するには便利であるが、分解産物の化学構造を解析することはできない。一方、 ^{13}C ラベルすれば、 ^{13}C -NMR や質量分析で構造解析が可能になる。そこで、 ^{13}C ラベルされた無水酢酸を購入し、これを原料にナノグラフェンを合成し、その ^{13}C -NMR による分解プロセスを解析することを目的とした。また、無水酢酸から合成されるナノグラフェンの基本的な特性を調査するために、各種分光分析を進め、さらに、窒素やホウ素といった異元素がナノグラフェンの中に含まれれば、これらが分解起点になりやすいのではないかと着想し、異元素ドーピングしたナノグラフェンの合成を試みた。

3. 研究の方法

3-1. ^{13}C ラベルしたナノグラフェンの合成

^{13}C ラベルした無水酢酸(1,1'- $^{13}\text{C}_2$ 、1,1',2,2'- $^{13}\text{C}_4$: 図2)に、濃硫酸を最終濃度が 50 mM となるように加え、 160°C で加熱した。加熱後、放冷し純水を加え、その後クロロホルムを加え、純水、5% NaHCO_3 水溶液、飽和食塩水、硫酸マグネシウムの順番でクロロホルム相を洗浄し、溶液中の未反応の無水酢酸と硫酸を取り除いた。最後に 200 nm のフィルターを用いてサイズ

の大きな粒子を取り除いた。得られたクロロホルム抽出液をナノグラフェン溶液とした。

3-2. 異元素をドーブしたナノグラフェンの合成

窒素あるいはホウ素をドーブしたナノグラフェンを作製するために、5 % w/w のアセトアミド、あるいは、5 % w/w のフェニルボロン酸を共存させ、50 mM 硫酸存在下、無水酢酸を 160°C で加熱した。

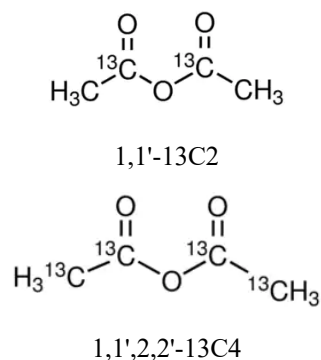


図 2、¹³C ラベルした無水酢酸

4. 研究成果

4-1. ¹³C ラベルしたグラフェン量子ドットの合成

¹³C ラベルされる炭素原子の位置が異なる無水酢酸 (1,1'-¹³C₂、1,1',2,2'-¹³C₄) を原料に、ナノグラフェンを合成した。各原料について、反応時間と共に色が濃くなり、その変化は同位体の数には無関係であった (図 3)。

4-2. NMR 測定

得られたナノグラフェン (無水酢酸 (1,1',2,2'-¹³C₄) を原料) をクロロホルム層に抽出し、精製し、それを濃縮し、NMR 試料管に入れ、¹³C-NMR を測定した (図 4)。その結果、グラフェン材料に特徴的な 90~130 ppm のブロードなピークが得られた。これはグラフェン構造 (sp²/C=C) を構成している炭素からのシグナルである。また、20~40 ppm にも多数のピークが観察され、グラフェン構造の欠陥あるいはエッジ部分の炭素からのシグナルであると考えられる。なお、これらシグナルは通常は無水酢酸 (¹³C はエンリッチされていない) から合成されたナノグラフェンと比べ、はるかに強いものであった。

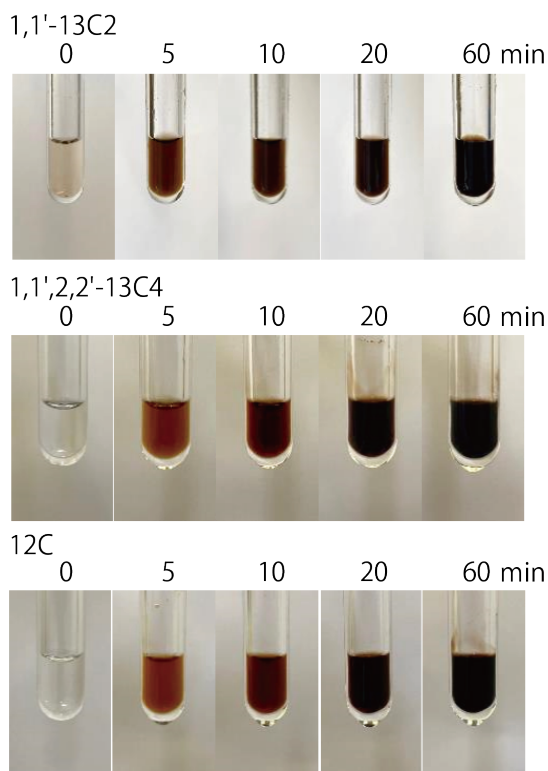


図 3、ナノカーボン生成の様子

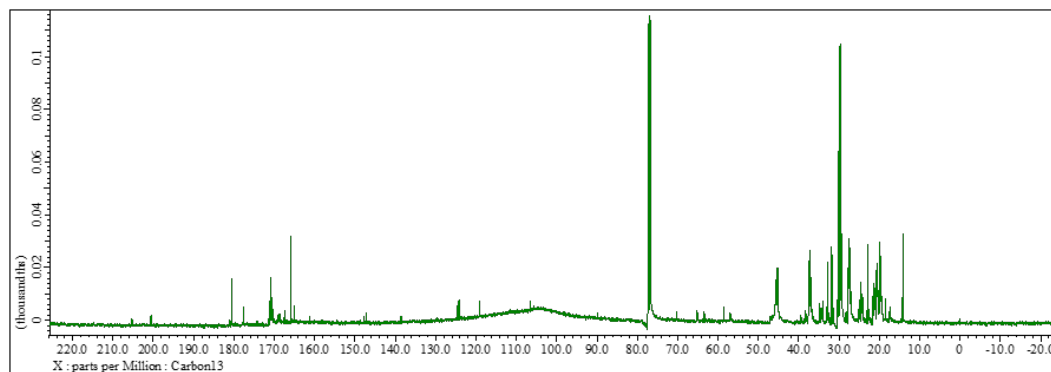


図 4、無水酢酸 (1,1',2,2'-¹³C₄) を原料にした際に得られたナノグラフェンの ¹³C NMR スペクトル

一方、無水酢酸 (1, 1'-13C4) を原料にした場合のナノグラフェンもほぼ同様の NMR スペクトルが得られた。両者の明確な差があれば、無水酢酸のカルボニル炭素あるいはメチルの炭素が、ナノグラフェンの異なる位置に構成されることが証明できるが、この結果からはいずれの炭素も区別なくナノグラフェンの炭素となっていることが示された。

4-3. 各種分光測定

紫外可視光吸収スペクトルを測定した結果、合成したナノグラフェンは 280 nm 付近の光を吸収することが確認され、また、蛍光スペクトルにおいては、420 nm の励起光で、500 nm 付近に最大蛍光波長を持っていた。

ラマンスペクトルを測定した結果、1580 cm^{-1} 付近の G バンド (グラフェンを構成している sp² 結合炭素の平面構造に由来する) と、1360 cm^{-1} 付近の D バンド (欠陥構造における sp³ 結合炭素に由来する) が観察され、これら二つのバンドの強度比 (ID / IG) は 0.64 であった。この比は一般的なグラフェンに見られる比と一致していた。

X 線光電子分光測定の結果、得られたナノグラフェンは C 及び O の二種類の元素から構成され、その割合は、C が 73.2 %、O が 24.6 % であった (図 5)。既報の水分散 GQDs は C : O の割合が約 6 : 4 と報告されており (Ruan ら、

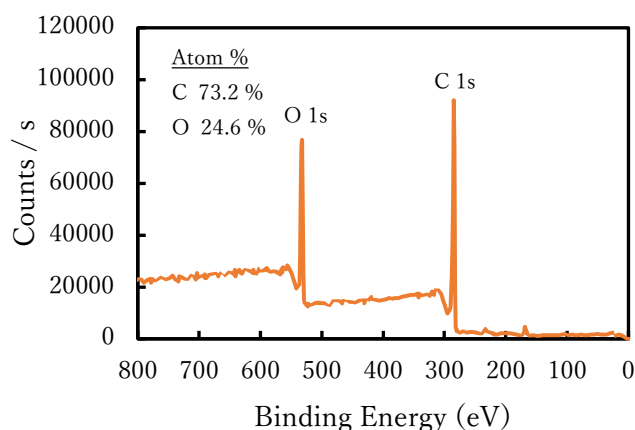


図 5、ナノグラフェンの X 線光電子分光スペクトル

ACS Appl. Mater. Interfaces, 2018, 10, 14342-14355)、水分散ナノグラフェンよりも酸素含有量が少なかった。また、C1s スペクトルの結果から、C=C 結合を多く含みカルボニル基 (C=O) が少ないことが確認された。

赤外吸収スペクトル測定の結果、C-H 伸縮振動 (2923 cm^{-1})、C=O 伸縮振動 (1719 cm^{-1})、C=C 伸縮振動 (1634 cm^{-1})、CH-変角振動 (1365 cm^{-1})、C-O 伸縮振動 (1175 cm^{-1}) を持つことを確認した。しかし、水分散ナノグラフェンに観察される O-H 伸縮振動 (3300 cm^{-1} 付近) のピークは今回得られたナノグラフェンでは現れず、疎水性であることを示していた。

4-4. マウス体内での動態および細菌による分解評価

マウスや細菌をつかった研究を当初計画していたが、予想より得られる ¹³C ラベルナノグラフェンの総量が少なく、これら生物試料中のナノグラフェンの NMR 解析は困難であった。ナノグラフェンの合成課程において、無水酢酸は溶媒としても機能しており、¹³C ラベルした無水酢酸を溶媒として利用するのは非常に効率が悪い。より高収率で合成する手法の開発が必要で、あるいは、後述するが異元素でドーピングし、それをプローブとする方法がこの問題を解決する手段と考える。

4-5. 異元素ドーブ

5 % w/w のアセトアミド、あるいは、5 % w/w のフェニルボロン酸を共存させ、窒素あるいはホウ素をドーブしたナノグラフェンを作製した。その結果、DバンドとGバンドの相対強度 (I_D / I_G) は 0.80 となり、欠陥構造が増加することがわかった。また、X線光電子分光測定や赤外吸収スペクトルにおいて、窒素あるいはホウ素の存在を確認できた(図6)。グラフェン構造内の炭素が窒素やホウ素に置き換わることで、蛍光スペクトルも短波長側にシフトし、共役二重結合のネットワークが壊れ、このような特性変化が現れたものと考えられる。

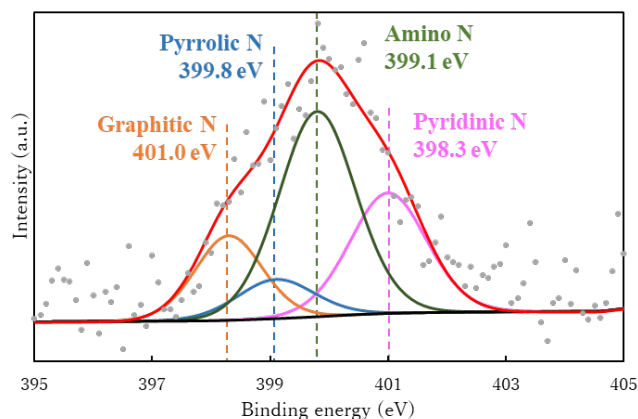


図6、窒素ドーブしたナノグラフェンのX線光電子分光スペクトル (ナローズキャン)

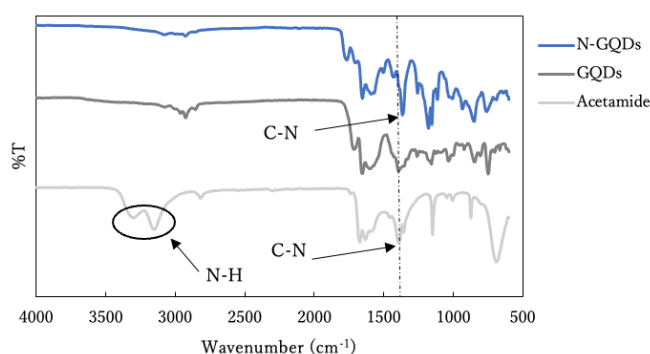


図7、窒素ドーブしたナノグラフェンの赤外吸収スペクトル

5. まとめ

^{13}C ラベルした無水酢酸を原料に、 ^{13}C をもつナノグラフェンの合成に成功した。そして、 ^{13}C NMR 測定において、強いシグナルを得ることができた。一方、 ^{13}C ラベルの位置が異なる無水酢酸から合成されたナノグラフェンの NMR シグナルはほぼ同様で、無水酢酸のどの炭素がナノグラフェンのどの炭素として構成されているかを明らかにすることは難しかった。また、当初計画していたマウス体内における分布や細菌による分解挙動については、 ^{13}C をもつナノグラフェンの総量が少なく、このような生物を対象にした解析は難しかった。一方で、当初の研究計画にはなかった異元素のドーブに成功した。窒素やホウ素といった異元素は、ナノグラフェンの分解起点になる可能性が大きく、 ^{13}C ラベル無水酢酸のみから合成されたナノグラフェンと比較することで、詳細な分解に関する情報を得ることが期待される。特に、窒素ドーブナノグラフェンの場合、 ^{15}N をもつアセトアミドを利用すれば、 ^{15}N をドーブしたナノグラフェンを合成することが可能になり、 ^{13}C と組み合わせることでより詳細な構造解析が期待され、本研究ではその足がかりを得ることができた。

トル

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takeda Emi, Xu Wei, Terakawa Mitsuhiro, Niidome Takuro	4. 巻 7
2. 論文標題 Tailored Structure and Antibacterial Properties of Silica-Coated Silver Nanoplates by Pulsed Laser Irradiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 7251 ~ 7256
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c07058	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Shinohara Mai, Ashikaga Yuya, Xu Wei, Kim Sunnam, Fukaminato Tuyoshi, Niidome Takuro, Kurihara Seiji	4. 巻 7
2. 論文標題 Photochemical OFF/ON Cytotoxicity Switching by Using a Photochromic Surfactant with Visible Light Irradiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 6093 ~ 6098
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.1c06473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Mai Shinohara, Wei Xu, Sunnum Kim, Tsuyoshi Fukaminato, Takuro Niidome, Seiji Kurihara	4. 巻 in press
2. 論文標題 Photo-control of cellular uptake by the selective adsorption of spiropyran derivatives on albumin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1246/cl.220082	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Xu Wei, Sasaki Makoto, Niidome Takuro	4. 巻 14
2. 論文標題 Sirolimus Release from Biodegradable Polymers for Coronary Stent Application: A Review	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pharmaceutics	6. 最初と最後の頁 492 ~ 492
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/pharmaceutics14030492	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Takuro Niidome, Emi Takeda, Mitsuhiro Terakawa
2. 発表標題 Control of Antibacterial Activity of Silica-Coated Silver Nanoplates by Light
3. 学会等名 8th Asian Biomaterial Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Wei Xu, Anna Kawano, Tatsuya Baba, Takuro Niidome
2. 発表標題 Antibacterial and Antiviral Activity of Graphene Quantum Dots
3. 学会等名 8th Asian Biomaterial Conference (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野杏奈, 馬場達也, 徐 薇, 新留琢郎
2. 発表標題 グラフェン量子ドットを混合した生分解性ポリマーの抗菌活性
3. 学会等名 第43回日本バイオマテリアル学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新留琢郎
2. 発表標題 医療材料としてのシルクフィブロイン
3. 学会等名 つくば医工連携フォーラム2022 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許	発明者 新留琢郎、徐 薇	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-128289	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

新留研究室研究紹介 http://www.chem.kumamoto-u.ac.jp/~niidome/
--

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	森村 茂 (Morimura Shigeru) (20230146)	熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・准教授 (17401)	
研究 分担者	徐 薇 (Xu Wei) (40898813)	熊本大学・大学院先端科学研究部(工)・助教 (17401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------