

貪食細胞)を用いて2ヶ月間生体外試験 (*in vitro*) を行っている。細胞毒性は乳酸脱水素酵素放出(培養24時間後)、炎症性は培養6時間後の腫瘍壊死因子(tumor necrosis factor- α ; TNF- α)である腫瘍細胞を壊死させる作用のある物質を測定して評価している。彼らは精製MWCNTsの粉砕物はアスベストやカーボンブラックと同様な濃度依存性を示す毒性があるが、精製MWCNTsにおけるTNF- α 量や炎症は精製MWCNTsの粉砕物のもとと比較すると低く、重大な毒性を示さないと言及している。「精製MWCNTsの粉砕物」は珪藻ボールミルでサンプルを調製しており、珪藻の磨耗物がサンプルに混入している可能性がある。珪藻は微結晶質石英の集合体であり、結晶質シリカは高い発ガン性物質として位置付けられているため²²⁾、粉砕で混入した珪藻の磨耗物の影響が現れている可能性も考えられる。

Koyamaらは²³⁾、4つの異なる精製されたCNTs(SWCNTs、直径の異なるMWCNTs、カップ型MWCNTs)を末梢血中T細胞のCD4⁺とCD8⁺の測定、また皮下細胞に埋入した時の周囲軟組織の炎症反応(3ヶ月間)を病理組織学的に調べているが、アスベストと比較すると格段に低く、急性の細胞毒性は示していない。

3 化学修飾のCNTsの細胞毒性

Sayesらは²⁴⁾、*in vitro*でヒト由来真皮線維芽細胞を使用し、SWCNTsの細胞毒性における官能基の化学修飾度の影響を調べている。SWCNTsはSWCNT-phenyl-SO₃H、SWCNT-phenyl-SO₃Na(SWCNTsに対する-phenyl-SO₃Xの化学修飾度はC/CF = 18, 41, 80。C/CFは化学修飾されているSWCNTsの炭素原子に対するSWCNTsの全炭素原子の割合を示し、数値が低いほど化学修飾度が高い)、SWCNT-phenyl-(COOH)₂(SWCNTsに対する-phenyl-(COOH)₂の修飾度はC/CF = 23)、1.0%ブルニックF108被覆したSWCNTsを使用している。SWCNTsの化学修飾度が増加すると、界面活性剤で被覆したSWCNTsよりも大幅に細胞毒性が低いことを見出している(図2)。化学修飾されたSWCNTsの細胞生存率は50%未満にはならない。

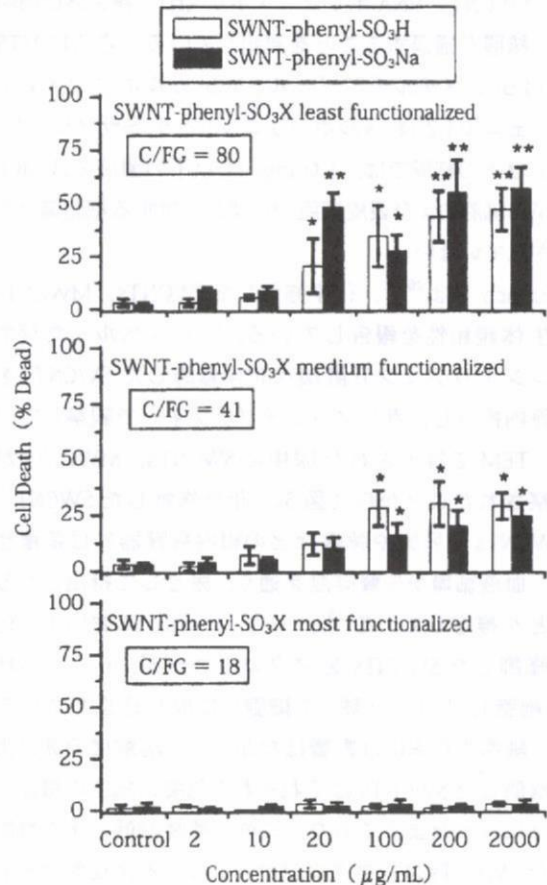


図2 SWCNT-phenyl-SO₃H (□) と SWCNT-phenyl-SO₃Na (■) の濃度に対する細胞活性率。SWCNTs に対する -phenyl-SO₃X の化学修飾度は C/CF = 80 (上段), 41 (中段), 18 (下段) である。C/CF は化学修飾されている SWCNTs の炭素原子に対する SWCNTs の全炭素原子の割合を示し、数値が低いほど化学修飾度が高いことを示している²⁴⁾

CNTs をナノサイズの移動媒体として医工学応用するために、Lu らは²⁵⁾、SWCNTs /RNA ポリマー・ポリ (rU) 複合体 (ポリ (rU) の塩基類は、SWCNTs ベーサル面の炭素環による π - π 積層も形成可能であり、SWCNTs と RNA ポリマー・ポリ (rU) の疎水性窒素性塩基類が SWCNTs のベーサル面との物理的な結合していると推測している) の MCF 乳がん細胞への搬送実験を行なった。SWCNTs /RNA ポリマー・ポリ (rU) 複合体の可視化はヨウ化プロピジウム (PI) を塩基対間に挿入させ、共焦点顕微鏡で観測している。この実験か

ら、SWCNTs /RNA ポリマー・ポリ (rU) 複合体は細胞膜、核膜を通過することを見出している。さらに MTS (3-(4,5-ジメチルチアゾール) 5-(3-カルボキシメトキシフェニル)-2-(4-スルホフェニル)-2-テトラゾリウム) アッセイの結果では、1.0 mg/mL 以下の濃度では MCF 乳がん細胞および表皮細胞のいずれに対する細胞毒性も示されていない。

Bianco らは^{26,27)}、化学修飾した SWCNTs, MWCNTs の生体親和性を報告している。¹¹¹In ラベルしたジエチレントリアミン五酢酸を化学修飾した SWCNTs を静脈内投与し、ガンマシンチグラフィで観察している。TEM で排出された尿中に SWCNTs, MWCNTs が観察されたことから (図 3)、化学修飾した SWCNTs, MWCNTs は肝臓や脾臓などの網内系臓器には蓄積せず、血液循環から腎排泄を通り、尿として排出されることを推定している²⁵⁾。一方、*in vitro* において、化学修飾した SWCNTs をマクロファージ、B リンパ球 (B 細胞)、T リンパ球 (T 細胞) に取り込まれているが、細胞生存率には影響はなかった。溶解度の高い化学修飾した SWCNTs はそれぞれの免疫系細胞の機能は正常に保ったままであり、やや溶解度の低い化学修飾した SWCNTs は、マクロファージによる炎症性サイトカインの分泌を引き起こしてはいるものの、リンパ球の機能が保たれていることを確認している²⁶⁾。さらに、Bianco らは²⁸⁾、様々な種類の分子官能基 (図 4) を修飾した SWCNTs, MWCNTs が繊維芽細胞、接着性細胞、菌細胞、酵母菌、バクテリアに取り込まれることを示した。図 5 は f-SWNT 1 (SWNT-NH₃⁺) と A549 (肺上皮細胞) を 37°C、2 時間培養した後に、核、細胞膜を青、赤で蛍光染色したものを共焦点蛍光顕微鏡で観察したものである。緑は f-SWNT 1 にラベルされている蛍光色素である (a は SWCNTs のないコントロール)。このことから核の近傍に CNTs が取り込まれていることがわかる。エンドサイトーシス (細胞外環境から細胞膜によって形成された小胞を介する物質の内在化) による細胞内への取り込みであるかを調べるために、アジ化ナトリウム (NaN₃) を用いたエンドサイトーシス抑制試験が試みられているが、抑制に無関係に SWCNTs は細胞内に取り込まれた。結局、化学修飾 CNTs は官能基の種

類に関係なく、様々な種類の細胞壁を通り抜けることができるが、その取り込む機構は単純な ATP の加水分解で得られるエネルギーから得られる運動によるものと断定できず、エネルギー以外の機構で取り込まれている可能性を示している。その細胞膜進入機構の 1 つとして、大きな縦横比を持つシリンダー形状が細胞膜を進入、貫通できるのではないかと推測している。

化学修飾された CNTs は生体親和性に優れている結果を示しているが、これは官能基と細胞の親和性が高いためであると推測はできる。一方、未化学修飾の CNTs は現在のところ明快な結論は得られていない。CNTs のベーサル面の π 電子と細胞表面にあるレセプターとの相互作用によるシグナル伝達があるのであれば、何らかの細胞組織反応が現れるはずである。今後ベーサル面の π 電子と細胞表面にあるレセプターとのシグナル伝達の有無は明らかにしなければならない課題の 1 つである。

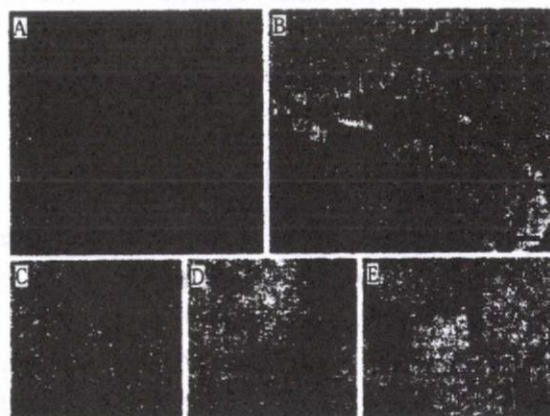


図 3 排出された尿中の ¹¹¹In ラベルしたジエチレントリアミン五酢酸を化学修飾した SWCNTs (A, B スケールバー: 500 nm) と MWCNTs (C, D, E スケールバー: 100 nm) の透過型電子顕微鏡写真²⁶⁾

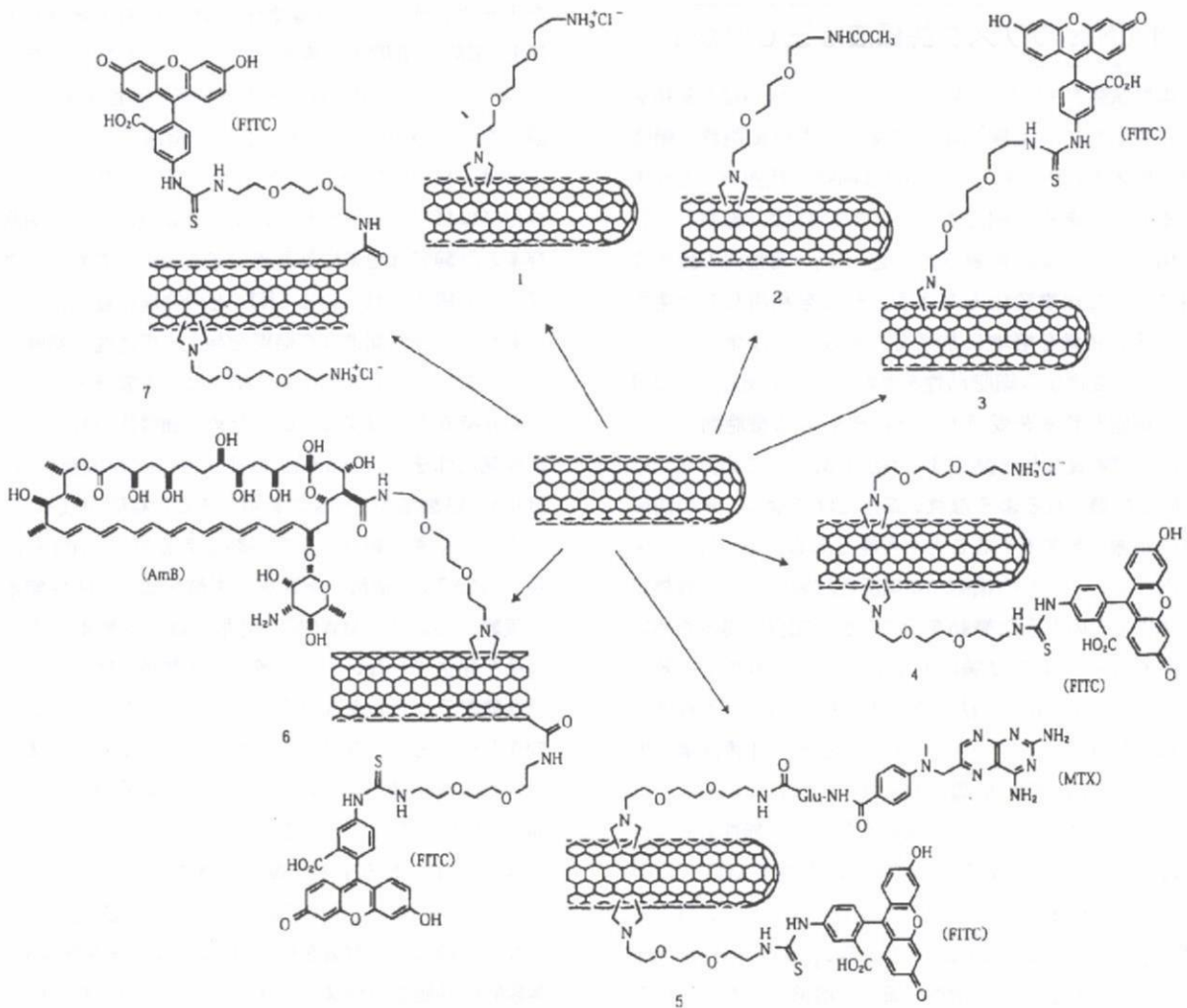


図4 CNTsに共有結合させた様々な種類の分子官能基 (文献28)

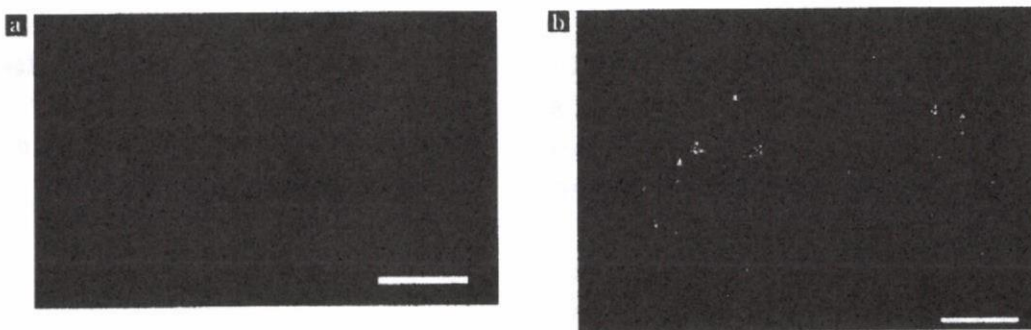


図5 SWNT-NH₃⁺とA549(肺上皮細胞)を37℃, 2時間培養後に、核、細胞膜をそれぞれ青、赤で蛍光染色した共焦点蛍光顕微鏡写真。蛍光色素でラベルされたSWNT-NH₃⁺は緑色の蛍光を発する。(a) SWNT無し(コントロール), (b) SWNT-NH₃⁺あり。スケールバー: 20 μm²⁸⁾

4 CNTs のリスク評価法は正しいか？

毒性試験方法には大きく4つある。1つ目は対象物を加えた状態で所定期間細胞培養し、生存細胞数を顕微鏡で数える方法である。2つ目は細胞の代謝作用を利用するものである。細胞が生存していれば、細胞の代謝作用により外部の物質を取り込んで、細胞内の酵素作用によって化学変化を与える。それを利用して代謝されやすい色素を培地に加えて、吸収（又は蛍光）スペクトルの変化から細胞活性を求める方法である。3つ目は、細胞が刺激を受けたときに放出する細胞間のシグナル伝達物質などを測定する方法であり、この方法では細胞が破壊されるような強い毒性だけでなく、その前段階の刺激性を評価することも可能である。4つ目は、生体内 (*in vivo*) での細胞・組織反応試験であり、異物が生体内でどのような挙動を示すのかの知見を得るためには、*in vivo* による試験は必須である。これまで、多くのCNTsは *in vitro* 方法によりナノ材料のリスク評価が行われてきた。しかし、CNTsになると、比表面積の増大による表面状態の影響が全く無いとは言いきることができず、従来のアッセイが適応できない可能性もある。

Wörle-Knirschらは²⁹⁾、SWCNTsの毒性をMTTアッセイにより評価している。MTTとはテトラゾリウム塩の一種3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromideであるが（水溶性で黄色の溶液）、MTTが細胞内に取り込まれると細胞内のミトコンドリアにある脱水素によってホルマザンに変化する。このホルマザンは青色の非水溶性の結晶で生成後は沈殿するが、ジメチルスルホキシドで溶解させると赤紫色の溶液となるので、570 nmにおける吸光度によって、ホルマザン産生量（＝ミトコンドリア酵素活性×細胞生存率）を測定する。彼らの試験では、SWCNTsがMTTアッセイにあるテトラゾリウム塩と相互作用を示す知見を得ており、細胞生存活性を正しく評価できないことを主張している。

同様なことはIsobeらのカーボンナノホーンで行なった試験においても確認されている³⁰⁾。カーボンナノホーンは、単層のグラフィンシートが角のように円錐状に閉じたものの集合体であり、合成時に触媒を使用しないため、金属を一切含まない。彼らはアミンで化学修飾され

たカーボンナノホーン凝集体に対して3T3細胞およびHeLa細胞の細胞生存率をMTTアッセイで行ったところ、アッセイで使用される芳香族染料の呈色を減少させ、誤ったデータを生じさせることを指摘している。このことは、MTTアッセイ、アラマーブルーアッセイ、ヨウ化プロピジウムアッセイのような染色に基づく細胞生存率の試験では色素に芳香族分子を使用しており、グラフィンで構成されているCNTsとの物理吸着の相互作用があり、一様に間違った結果を与える可能性を意味している。また、これまでもCNTsは芳香族分子以外の分子も非特異性吸着する。このため、通常使われている酵素標識抗体法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay: ELISA）試験法がCNTsに適用できるか疑問が残る。

まったく違う観点からの実験であるが、Funbiらは精製MWCNTsに過酸化水素水やギ酸を加え、活性酸素発生実験において、MWCNTs分散液は活性酸素やラジカル種を発生させないこと、多くの水酸基活性ラジカルや活性酸素ラジカルを補足するという“スキベンジャー効果”があることを見出しており³¹⁾。CNTsが生体内でラジカル種を補足する効果により、免疫系のバランスを崩す可能性が起こりうることを指摘している。

現状では、ある1つの毒性試験を行なうことによりCNTsの安全性を完全に評価できるという決定的な方法はない。幾つかの試験を行い、相補的なデータを集めて、客観的に評価する地味な方法しかない。中でも時間を必要とする*in vivo*試験は細胞・組織反応を評価するにはなくてはならない有効な毒性評価法である。筆者らはカルボキシル基で化学修飾されたMWCNTsのラット軟組織埋入試験を4週間行ったが、急性な炎症は観察されず³²⁾、現在は2年間の長期間の*in vivo*試験を行っている最中である。アスベストのように発症するまでに長期間を必要とする症例を考慮すると、CNTsの長期間の*in vivo*試験の必要性があると考えられる。

5 むすび

CNTsの表面と毒性について最近の論文を紹介した。CNTsの合成方法はたくさんあり、C₆₀のような分子量が決定されているわけでない。それゆえ、CNTsの評価法や標準化は非常に重要となってきた^{33,34}。リスク評価に使用されるCNTsは、未精製CNTs、精製CNTs、化学修飾CNTsなどすべて詳細にキャラクターゼーションされた共通なサンプルであるべきで、様々なリスク評価を行なうことにより、データベースを築き上げていくべきである。最近ではCNTsの標準化も検討されており、近い未来には、リスク評価においても均一なサンプルが提供され、試験が行なわれるのではないかと考える。

参考文献

- 1) 神山 宣彦, セラミックス 29, 111 (1994)
- 2) M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus and P. C. Eklund, *Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes*, (Academic Press, San Diego, CA, 1996)
- 3) M. Uo, F. Watari, A. Yokoyama, H. Matsuno and T. Kawasaki, *Biomaterials* 22, 677 (2001)
- 4) A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, M. Suga, Y. F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki and K. Yamamoto, *Nano Lett.* 4, 2163 (2004)
- 5) E. E. Connor, E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy and M. D. Wyatt, *Small* 1, 325 (2005)
- 6) C. J. Johnston, J. N. Finkelstein, P. Mercer, N. Corson, R. Gelein and G. Oberdörster, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 168, 208 (2000)
- 7) K. Tamura, N. Takashi, R. Kumazawa, F. Watari and Y. Totsuka, *Mater. Trans.* 43, 3052 (2002)
- 8) R. Kumazawa, F. Watari, N. Takashi, Y. Tanimura, M. Uo and Y. Totsuka, *Biomaterials* 23, 3757 (2002)
- 9) M. Tsoli, H. Kuhn, W. Brandau, H. Esche and G. Schmid, *Small* 1, 841 (2005)
- 10) T. Kodama, *J. Stomatol. Soc. Jpn.* 38, 263 (1989)
- 11) J. P. Landsberg, B. McDonald and F. Watt, *Nature* 360, 65 (1992)
- 12) J. L. Bard, J. R. Connor and B. C. Jones, *Nuter. Rev.* 51, 157 (1993)
- 13) M. A. Smith, P. L. R. Harris, L. M. Sayres and G. Perry, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9866 (1997)
- 14) F. Q. Shcafer, S. Y. Qian and G. R. Buettner, *Cell. Mol. Biol.* 46, 657 (2000)
- 15) M. Layard, A. Tegeris, E. Miller, M. May, E. Morgan and A. Smith, *J. Natl. Cancer Inst.* 67, 965 (1981)
- 16) F. Pott, *IARC Sci. Pub.* No. 30, Vol. 1, 286 (1980)
- 17) C. Journet and P. Bernier, *Appl. Phys. A* 67, 1 (1998)
- 18) P. Dubrue, B. Christiaens, M. Rosseneu, J. Vandekerckhove, J. Grooten, V. Goossens and E. Schacht, *Blomacromolecules* 5, 379 (2004)
- 19) A. Aissaoui, N. Oudrhiri, L. Petit, M. Hauchecorne, E. Kan, M. Sainlos, S. Julia, J. Nacarro, J. P. Vigneron, J. M. Lehn and P. Lehn, *Curr. Drug Targets* 3, 1 (2002)
- 20) N. A. Monteiro-Riviere, R. J. Nemanich, A. O. Inman, Y. Y. Wang and J. E. Riviere, *Toxicol. Lett.* 155, 377 (2004)
- 21) J. Muller, F. Huaux, N. Moreau, P. Misson, J. -F. Heilier, M. Delos, M. Arras, A. Fonseca, J. B. Nagy and D. Lison, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 207, 221 (2005)
- 22) IARC, *IARC Sci. Pub.* No. 97 (1990)
- 23) S. Koyama, M. Endo, Y. -A. Kim, T. Hayashi, T. Yanagisawa, K. Osaka, H. Koyama, H. Haniu and N. Kuroiwa, *Carbon* 44, 1079 (2006)
- 24) C. M. Sayes, F. Liang, J. L. Hudson, J. Mendez, W. Guo, J. M. Beach, V. C. Moore, C. D. Doyle, J. L. West, W. E. Billups, K. D. Ausman and V. L. Colvin, *Toxicol. Lett.* 161, 135 (2006)
- 25) Q. Lu, J. M. Moore, G. Huang, A. S. Mount, A. M. Rao, L. L. Larcom and P. C. Ke, *Nano Lett.* 4, 2473 (2004)
- 26) R. Singh, D. Pantarotto, L. Lacerda, G. Pastorin, C. Klumpp, M. Prato, A. Bianco and K. Kostarelos, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103, 3357 (2006)
- 27) H. Dumortier, S. Lacotte, G. Pastorin, R. Marega, W. Wu, D. Bonifazi, J. -P. Briand, M. Prato, S. Muller and A. Bianco, *Nano Lett.* 6, 1522 (2006)
- 28) K. Kostarelos, L. Lacerda, G. Pastorin, W. Wu, S. Wieckowski, J. Luangsvilay, S. Godefroy, D. Pantarotto, J. -P. Briand, S. Muller, M. Prato and A. Bianco, *Nat. Nanotech.* 2, 108 (2007)
- 29) J. M. Wörle-Knirsch, K. Pulskamp and H. F. Krug, *Nano Lett.* 6, 1261 (2006)
- 30) H. Isobe, T. Tanaka, R. Maeda, E. Noiri, N. Solin, M. Yudasaka, S.

- Iijima and E. Nakamura, *Angew. Chem. Int. Edit.* **45**, 6676 (2006)
- 31) I. Fenoglio, M. Tomatis, D. Lison, J. Muller, A. Fonseca, J. B. Nagy and B. Fubini, *Free Radic. Biol. Med.* **40**, 1227 (2006)
- 32) Y. Sato, A. Yokoyama, K. -I. Shibata, Y. Akimoto, Y. Nodasaka, T. Kohgo, K. Tamura, T. Akasaka, M. Uo, K. Motomiya, B. Jeyadevan, M. Ishiguro, R. Hatakeyama, F. Watari and K. Tohji, *Mol. BioSyst.* **1**, 176 (2005)
- 33) http://www.msel.nist.gov/Nanotube2/Carbon_Nanotubes_Presentations.htm
- 34) <http://www.inmetro.gov.br/msin07/program.asp>

カーボンナノチューブの長さ制御

Length Control of Carbon Nanotubes

東北大学大学院 名村 優、佐藤 義倫、田路 和幸
Masaru NAMURA, Yoshinori SATOU & Kazuyuki TOHJI

1. はじめに

カーボンナノチューブ (carbon nanotubes ; CNTs) は、炭素の六員環構造から構成されるグラフィン (グラファイトの一枚のシート) を筒状にした物質である。一枚のグラフィンを筒状にした構造の物質を単層カーボンナノチューブ (Single-Walled Carbon Nanotubes ; SWCNTs)、一方、多層カーボンナノチューブ (Multi-Walled Carbon Nanotubes ; MWCNTs) は、グラフィンが同心円状に幾層にも重なった構造をしており、その直径はグラフィン層の数に依存し、十 nm ~ 数百 nm のものまで存在する。また、CNTs の長さは数十 μm 程度と非常に長く、縦横比 (アスペクト比) が大きいことで知られている^{1),2)}。CNTs は金属触媒を用いることにより、アーク放電法^{3),4)}、レーザー蒸発法⁵⁾、化学蒸着法 (chemical vapor deposition ; CVD)⁶⁾ などによって一度に何本も合成され、「粉体」という立場から CNTs を眺めると、密度 $1.4\text{g}/\text{cm}^3$ の CNTs が凝集した、非常に軽い粉としてみることができる。1本のCNTは電気物性、熱伝導性、機械的強度、吸着特性において優れた特性を示しており^{1),2)}、これらの特性を生かした走査型プローブ顕微鏡の探針⁷⁾、電子源^{8),9)}、Liイオン電池^{10),11)} やキャパシター¹²⁾の電極、センサー¹³⁾、複合強化材料¹⁴⁾、ドラックデリバリーシステムの担体¹⁵⁾ や生体材料^{16),17)} など、広範囲の分野で応用研究が行われている。これらの応用のためにはCNTsが均一な特性を示さなければならないが、上記の特性は、「直径 (カイラリティー)」、「ナノチューブの層数」、「長さ」、「凝集・成形状態」等により決定されるため、これらが制御されることで安定かつ再現性のある特性を示すことができる。例えば、ドラックデリバリーに使用するCNTsは溶媒に分散し易いように短い方が適しているし、分子デ

バイスの応用では適用するパーツにより、CNTsの長さを制御しなければならない。本報告では、CNTsの長さ制御について最近の動向と、著者らの行ったサイズ分離について報告する。

2. カーボンナノチューブの切断

これまでに、数 μm におよぶ長さのCNTsを切断する方法が幾つか報告されている。Venemaらは¹⁸⁾、Au基板に分散させた1本のSWCNT (レーザー蒸発法; 触媒金属: Co/Ni) 上に走査型トンネル顕微鏡 (scanning tunneling microscope ; STM) のティップを配置し、SWCNTとティップ間に-6.5Vのパルス電圧を印加することにより、ティップから放出した電子のエネルギーによって、SWCNTのグラフィンネットワークを崩壊させて切断している (図-1)。炭素-炭素結合の切断エネルギーの観点から考えると、C-C結合の結合エネルギーが3.6eVで、C=C結合の結合エネルギーが6.3eVである。彼らの見積もりでは、最低4.0eVのエネルギーでSWCNTのグラフィンネットワークの炭素-炭素結合を切断できると予測している。これはSWCNTの骨格であるグラフィンの炭素原子は sp^3 軌道が少し混在した sp^2 混成軌道であるためであり、4.0eVのエネルギーは3.6~6.3eVの範囲に収まっており、妥当な値と言える。この方法は切断部分を選べるのが長所であるが、大量に切断するには不向きである。また、1本のSWCNTのI-V曲線は線形性を示すが、30nmにカットしたSWCNTのI-V曲線はステップ状の線形特性を示し、量子サイズ効果が現れ、デバイスなどに使用するCNTsはカイラリティーによる制御だけでなく、長さ制御が電気特性に重要であることを示している。

Stepanekらは¹⁹⁾、アーク放電法により合成さ

れたSWCNT（未精製）に対して、せん断応力を与え、0.1 μm のダイヤモンド微粒子で凹凸を形成しているディスクを2枚合わせ、その合わせ面にSWCNTsが分散したエタノール溶液を入れ、エタノールが乾燥するまで擦り合わせた。その結果、SWCNTは平均450nm \pm 60の長さに切断している。しかし、透過型電子顕微鏡（transmission electron microscope；TEM）観察から、SWCNTの表面は多くのダメージを与えられており、キレイな表面ではない（図-2）。

ボールミリング粉碎によるCNT切断も行われている。Pierardらは²⁰⁾、Co/Fe金属触媒を使用したアセチレンガスによるCVD法により合成された異なる層数のMWCNTs（精製したもの）をボールミリング粉碎による切断効果を調べている。実験は、精製された粉体状のMWCNTsを振動型ボールミル粉碎機（瑪瑙ポット、直径5cmの瑪瑙ボール）に入れ、3,000振動/minの条件でミリングした。外径25nmの層の厚いMWCNTsは、1、4、16、36、120時間と粉碎時間を長くするに従い、平均長さ7.4、4.3、1.6、0.8、0.9 μm と短く切断されていく。36時間以降では、切断される長さはほとんど変わらなかった。一方、外径15nmの

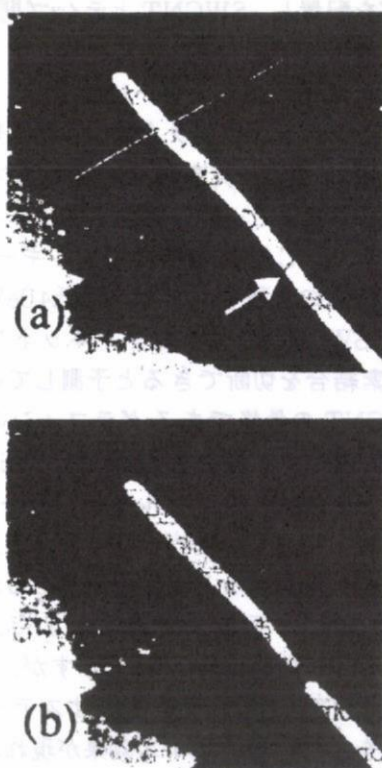


図-1 (a) 1本のSWCNTのSTM像。(b)切断されたSWCNTのSTM像。(a)の矢印の部分にSTMチップを配置し、-65Vのパルス電圧を印加させて切断させた。(参考文献：L. C. Venema et al, Appl. Phys. Lett. 71, 2629-2631 (1997))

層の薄いMWCNTsは、2、4、6、8、10、12時間と粉碎時間を長くするに従い、平均長さ2.8、3.6、4.6、5.7、1.5、0.7 μm となり、10時間以降から切断効果が顕著に現れてきている。ボールミリング粉碎は、ボールの衝突エネルギーにより、CNTsの切断が起こる。彼らのデータからも明らかであるように、長さ制御の最適条件（ボールの大きさ、振動強度や回数、時間）が存在することが示唆されている。この方法は大量の処理が行えるが、ポットやボールから生じる不純物、CNT表面の損傷が問題点として挙げられる。

Guらは²¹⁾、フッ素化SWCNTsの加熱によるフッ化炭素脱離による切断を報告している。高压COガスを使用したCVD法により合成された精製SWCNT（平均直径1.0nm）をヘリウムガス希釈した1%のフッ素ガスと50 $^{\circ}\text{C}$ 、2時間反応させ、フッ化SWCNTsを合成した。このフッ化SWCNTsを常圧下のアルゴンガス雰囲気中で10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ で1,000 $^{\circ}\text{C}$ までアニールを行った。この熱処理により、300~560 $^{\circ}\text{C}$ でフッ素と結合しているSWCNTsを構成している炭素がCF₄ガスとして、560 $^{\circ}\text{C}$ 以上でCOF₂が分解し、その結果SWCNTsが切断された。この処理により、SWCNTsは平均長さ20~50nmに切断されている（図-3）。この方法はフッ素が選択的に化学修飾できるならば、大量に切断できるユニークな方法である。

最もよく使用される方法は、強酸による超音波照射切断法である。Liuらは²²⁾、精製されたSWCNTs（レーザー蒸発法；Co/Ni触媒）を硫酸：硝酸=3：1（体積比）の混合液に入れ、40~70 $^{\circ}\text{C}$ に保ちながら超音波照射を行い、SWCNTsを切断している（図-4）。この切断法は、わずかなエネルギーの高いナノチューブの先端や湾曲しているボディー部分の炭素が硝酸と反応することで、ナノチューブ骨格にケトンやラク톤を生じさせ、そこから徐々にグラフィンネットワークが湿式酸化エッチ

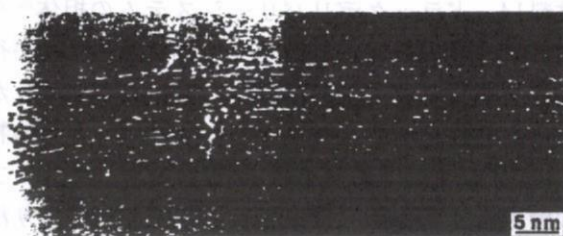


図-2 0.1 μm のダイヤモンド微粒子で凹凸を形成しているディスクで擦り合わせた後のSWCNTのTEM写真。バンドル軸に対して垂直に切断がされている。(参考文献：I. Stepanek et al, Chem. Phys. Lett. 331, 125-131 (2000))

ングされて切断される。SWCNTsの長さ制御は処理温度や時間にも依存するが²³、長さは100nm~1.0 μ mと制御が可能である。しかしながら、CNT表面は水酸基やカルボキシル基が修飾されており、カーボンネットワークはダメージを受けている。

3. カーボンナノチューブのサイズ分離

切断技術と共に重要になるのが、サイズ分離技術である。Duesbergらは²⁴、アーク放電法で合成された10mgのMWCNTs含有堆積物を、1wt%

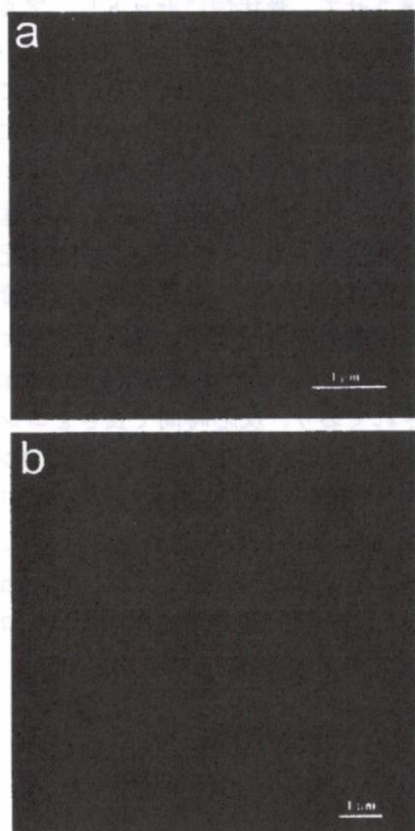


図-3 (a)脱フッ素化されて切断されたSWCNTsのAFM像。(b)フッ素化SWCNTsのAFM像。(参考文献：Z. Gu et al, Nano Lett. 2, 1009-1013(2002))

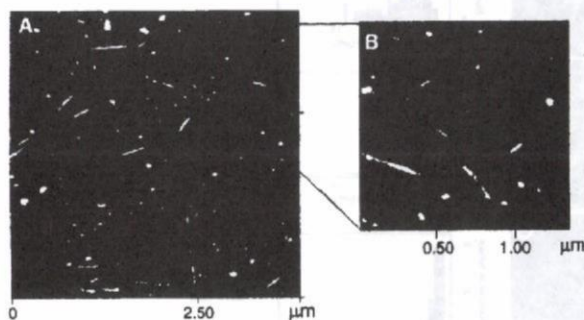


図-4 (a)硫酸・硝酸により切断されたSWCNTsのAFM像。(b)(a)の拡大図。切断されたSWCNTsは100~500nmの真っ直ぐな形状であることがわかる。(参考文献：J. Liu et al, Science280, 1253-1256 (1998))

のSDS溶液2mLに均一分散させ、サイズ排除クロマトグラフィー法を用いてサイズ分離を行った。彼らは連続した2つの繋がったカラムを使用し、最初のカラム(平均ポアサイズ140nmのポアガラス)で0.25wt%のSDS溶液を9mL/hでフローしながら、MWCNT分散液を入れ、ナノグラフィイトカプセルやフラーレンを取り除き、その後、2番目のカラム(平均ポアサイズ300nmのポアガラス)では、0.25wt%のSDS溶液を流量5mL/hにフローしながら、8フラクションに分離抽出し、それぞれを走査型電子顕微鏡(scanning electron microscope;SEM)、TEM、原子間力顕微鏡(atomic force microscopy;AFM)で調べた。フラクション1はMWCNT凝集体が観察され、一方、フラクション8は0.1 μ m以下の球状粒子と短いMWCNTsが抽出されていた。フラクション2~6は凝集していない単独のMWCNTが観察された。フラクション3と6での代表的なナノチューブの長さは、0.8 μ mと0.4 μ mであり、サイズ分離に成功している。同様に、合成直後のSWCNTs(レーザー蒸発法;Y/Ni触媒、またアーク放電法;Y/Ni触媒)1.0mgを1wt%のSDS溶液2mLに分散させて、平均ポアサイズ300nmのポアガラスを詰めたカラムで、分散液を流量5mL/hの0.25wt%のSDS溶液でフローしながら、14フラクションに分離抽出しサイズ分離を行った²⁵。フラクション3と5での平均の長さは、1.0 μ mと0.6 μ mであった。このサイズ排除クロマトグラフィー法では、分散しているすべてのCNTsがカラムから流れてくるのではなく、CNTsの凝集体によりカラムにトラップされることもあり、CNTsの回収率が非常に低く、大量の分離には不向きである。

著者らは、異なるポアサイズによる多段階ろ過により、サイズ制御している²⁶。合成直後のMWCNTs(NanoLab社製、米国)100mgを大気中、773K、90分間燃焼酸化させた後、6M-HCl 1.0Lに入れ、333Kで12時間静置させた。その後、3M-NaOH1.0Lに入れ、アルミナを除去した。ろ液が中性になるまで熱水でろ過して洗い、濾過物を大気中、333Kで24時間乾燥させた。精製したMWCNTs100mgを濃硫酸(95%):濃硝酸(60%)=75mL:25mLの混合液100mLに入れ、5時間超音波照射(200W,39kHz)を行った。その後、切断処理したMWCNTs10mgをエタノール1000mLに分散させ、37 μ mのメッシュフィルターで凝集しているMWCNTsを濾過した。次にポアサイ

ズ2.0、1.2、0.8、0.4 μm のポリカーボネート(PC)メンブランフィルターの順番で濾過を行い、それぞれのフィルター上のろ過堆積物を真空中、313K、48時間以上乾燥させた。この処理を3バッチ行った。図-5にそれぞれのPCフィルター上における残留物のSEM像、MWCNTsの長さ分布、収率を示す。それぞれのSEM像を見ると、1.2 μm 、0.8 μm のフィルター上には、短いナノチューブも観測されるが、ある程度の長さを持ったナノチューブが観察された。0.4 μm のフィルター上では、ほとんどのナノチューブはかなり短く、サイズも揃っているのが観察された。それぞれのフィルターで得た試料において、SEM観察から得られたナノチューブの長さ分布を棒グラフにし、Gauss関数分布による平均長さを見積もると、1.2 μm -PCフィルター上では、フィルターのポアサイズよりも短いナノチューブが多く、平均長さは670nmであった。0.8 μm -PCフィルター上でも同様に、平均長さは545nmで短いナノチューブが多い。0.4 μm -PCフィルター上では、ナノチューブの長さ分布が狭く、平均長さは220nmのサイズの揃ったナノチューブが多いのがわかる。切断ナノチューブのサイズ分離におけるそれぞれの処理での収率は、37 μm のメッシュフィルターでの堆積物が27%を占め、かなりのナノチューブ量がこのフィルターでトラップされていることがわかる。収率が良かったのは、2.0 μm 、0.8 μm フィルター上に残留したものであり、それぞれの収率は16.6、12.7%であっ

た。このことから、強酸下における超音波処理法によるMWCNTsの切断は、切断条件によってナノチューブの長さ制御も可能であることがわかる。

4. CVD法によるカーボンナノチューブの長さ制御合成

CVD法により、基板に堆積した金属触媒からナノチューブを垂直方向に成長させることができる²⁷⁻²⁹⁾。たとえば、Siウェハや石英基板上に、電子ビーム蒸着法^{30)、31)}により触媒金属のFeを5nmほど堆積させて、管状炉にセットし、アルゴンガスで希釈したアセチレンガスを流しながら700~850 $^{\circ}\text{C}$ で反応させると、MWCNTが垂直に配向する。また微量の水分をアセチレンガス中に加えることにより垂直配向SWCNTs³²⁾や、エタノールを炭素源としたCo/Mo金属触媒による垂直配向SWCNTsが合成されている³³⁾。この垂直配向CNTでは、基板に堆積される金属触媒の面密度、触媒のサイズ、金属触媒の種類、反応ガスなどのパラメーターがあるが、成長速度が0.4-50 $\mu\text{m}/\text{min}$ ^{34)、35)}と報告されており、反応時間で長さをコントロールすることが可能である。よって、このコントロールされた垂直配向CNTsを基板から剥がして、均一な長さのCNTsとして使用されることが期待される。著者らが知る限りでは、数百nmから数mmのCNTsが反応条件によりコントロール可能となってきている³⁶⁻⁴¹⁾(図-6)。一方、垂直配

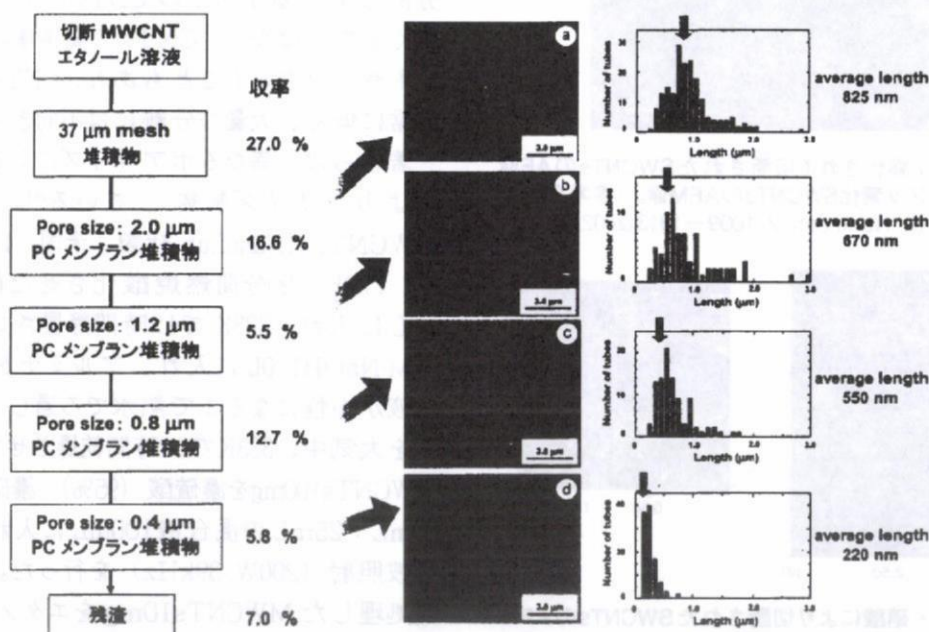


図-5 各PCフィルター上における堆積物のSEM像(左)、そのナノチューブの長さ分布(右)。図中の百分率はスタート物質に対する各フィルターで得られた収率を示す。

向ではなく、基板に水平方向に成長させるユニークなCVD合成方法もある⁴²⁾。吾郷らはサファイアのA面(1120)、R面(1102)上に、Co-Mo触媒を担持し、CH₄/H₂混合ガス(H₂7 vol%)中、750~900℃で反応させた。A面、R面では、サファイアの原子配列の方向に沿って、1本の単独のSWCNTが真っ直ぐと成長している。一方、C面(0001)にはSWCNTがランダムに成長することから、サファイアの原子配列がSWCNTの成長と相関があることを示している。このSWCNTの成長とサファイア原子配列の相関をより詳しく調べることにより、デバイスにおけるCNT配列のためのパターンニングにより、任意の長さのCNTsを配置できる可能性がある。

5. カーボンナノチューブ調製での注意点

ナノチューブの精製におけるアモルファスカーボンや金属触媒を取り除く処理の間に、グラフィンネットワークはかなりのダメージを与えられている。近年、著者らのグループはSWCNTのグラフィンネットワークの完全性をTEMと極低温水素脱離昇温スペクトル法を用いて評価した⁴³⁾。非常に完全性の高いSWCNTは20Kに水素が脱離する鋭いピークのみが観察される。このピークはSWCNTバンドル形成により作られるグループ(groove)サイトへの吸着と考えられている。一方、表面に少量の欠陥が生じると(TEM観察で確認)、極低温水素脱離昇温スペクトルは20Kのピークはブロードニングし、新たに27Kにピークが現れる。この新たなピークはナノチューブに欠陥が生じ、水素が内部に侵入し、インターstitialチャネル(interstitial channel)サイトへの吸着と考えられ、SWCNTのグラフィンネットワークに欠陥の有無を調べることができる。今回の報告したSWCNTsの長さ制御でも同様に、CNTs

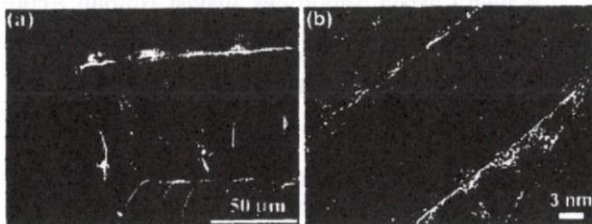


図-6 (a)垂直配向MWCNTsのSEM写真。約80μmの長さのMWCNTsが基板に対して垂直に成長している。(b)垂直配向しているMWCNTのTEM写真。(Z. Zhang et al, Appl. Phys. Lett. 87, 223121 (2005))

の切断のために様々な処理を行わなければならない、ナノチューブ表面にダメージを与えてしまう。また、CVD法による長さを制御したCNTsにおいても、CVD法により合成されたCNTsのグラフィンネットワークに欠陥が多いことが問題になっている。どちらにせよ、CNTsの特性を維持するには、グラフィンネットワークの完全性を高めるために、高真空または不活性ガス中で熱処理(1,200~1,500℃)が必要である。このようなグラフィンネットワークの完全性を持ったサイズ制御されたナノチューブを使用することで、真のカーボンナノチューブの特性が発揮され、今後ますます様々な分野で応用されていくものと信じている。

引用文献

- 1) P. J. F. Harris: "Carbon Nanotubes and Related Structures: New Materials for the Twenty-First Century", Cambridge University Press, p.1-12 (1999)
- 2) 齋藤弥八編著: "カーボンナノチューブの材料科学入門", コロナ社 (2006)
- 3) W. Kratschmer, L. D. Lamb, K. Fostiropoulos and D. R. Huffman: "Solid C60: A New Form of Carbon", *Nature* **347**, 354-358 (1990).
- 4) S. Iijima: "Helical Microtubules of Graphitic Carbon", *Nature* **354**, 56-58 (1991).
- 5) A. Thess, R. Lee, P. Nikolaev, H. Dai, P. Petit, J. Robert, C. Xu, Y. H. Lee, S. G. Kim, A. G. Rinzler, D. T. Colbert, G. E. Scuseria, D. Tomanek, J. E. Fischer and R. E. Smalley: "Crystalline Ropes of Metallic Carbon Nanotubes", *Science* **273**, 483-487 (1996)
- 6) M. Endo, K. Takeuchi, S. Igarashi, K. Kobori, M. Shiraishi and H. W. Kroto: "The Production and Structure of Pyrolytic Carbon Nanotubes (PCNTs)", *J. Phys. Chem. Solids* **54**, 1841-1848 (1993)
- 7) H. Dai, J. H. Hafner, A. G. Rinzler, D. T. Colbert and R. E. Smalley: "Nanotubes as Nanoprobes in Scanning Probe Microscopy", *Nature* **384**, 147-150 (1996)
- 8) A. G. Rinzler, J. H. Hafner, P. Nikolaev, L. Lou, S. G. Kim, D. Tomanek, P. Nordlander, D. T. Colbert and R. E. Smalley, "Unraveling Nanotubes: Field Emission from an Atomic Wire", *Science* **269**, 1550-1553 (1995)

- 9) Y. Saito, K. Hamaguchi, K. Hata, K. Uchida, Y. Tasaka, F. Ikazaki, M. Yumura, A. Kasuya and Y. Nishina : "Conical Beams from Open Nanotubes", *Nature* **389**, 554 – 555 (1997)
- 10) E. Frackowiak, S. Gautier, H. Gaucher, S. Bonnamy and F. Beguin : "Electrochemical Storage of Lithium in Multiwalled Carbon Nanotubes", *Carbon* **37**, 61 – 69 (1999)
- 11) B. Gao, A. Kleinhammes, X. P. Tang, C. Bower, L. Fleming, Y. Wu and O. Zhou : "Electrochemical Intercalation of Single-Walled Carbon Nanotubes with Lithium", *Chem. Phys. Lett.* **307**, 153 – 157 (1999)
- 12) Y. H. Lee, K. H. An, J. Y. Lee and S. C. Lim : "Carbon Nanotube-Based Supercapacitors", *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 1, pp. 625 – 634, Ed. H. S. Nalwa, American Scientific Publishes, USA (2004)
- 13) J. Li and H. T. Ng : "Carbon Nanotube Sensors", *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 1, pp. 591 – 601, Ed. H. S. Nalwa, American Scientific Publishes, USA (2004)
- 14) C. Laurent and A. Peigney : "Carbon Nano-tubes in Composite Materials", *Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology*, Vol. 1, pp. 635 – 653, Ed. H. S. Nalwa, American Scientific Publishes, USA (2004)
- 15) D. Pantarotto, J. -P. Briand, M. Prato and Alberto Bianco : "Translocation of Bioactive Peptides across Cell Membranes by Carbon Nanotubes", *Chem. Comm.* 16 – 17 (2004)
- 16) N. Aoki, A. Yokoyama, Y. Nodasaka, T. Akasaka, M. Uo, Y. Sato, K. Tohji and F. Watari : "Cell Culture on a Carbon Nanotube Scaffold", *J. Biomed. Nanotech.* **1**, 402 – 405 (2005)
- 17) Y. Sato, A. Yokoyama, T. Kasai, S. Hashiguchi, M. Ootsubo, S. Ogino, N. Sashida, M. Namura, K. Motomiya, B. Jeyadevan and K. Tohji : "In Vivo Rat Subcutaneous Tissue Response of Binder-Free Multi-Walled Carbon Nanotube Blocks Cross-Linked by De-Fluorination", *Carbon* **46**, 1927 – 1934 (2008).
- 18) L. C. Venema, J. W. G. Wildoer, H. L. J. Temminck Tuinstra, C. Dekker, A. G. Rinzler and R. E. Smalley : "Length Control of Individual Carbon Nanotubes by Nanostructuring with a Scanning Tunneling Microscope", *Appl. Phys. Lett.* **71**, 2629 – 2631 (1997)
- 19) I. Stepanek, G. Maurin, P. Bernier, J. Gavillet, A. Loiseau, R. Edwards and O. Jaschinski : "Nano-Mechanical Cutting and Opening of Single Wall Carbon Nanotubes", *Chem. Phys. Lett.* **331**, 125 – 131 (2000)
- 20) Z. Konya, I. Vesselenyi, K. Niesz, A. Kukovecz, A. Demortier, A. Fonseca, J. Delhalle, Z. Mekhalif, J. B.Nagy, A. A. Koos, Z. Osvath, A. Kocsonya, L. P. Biro and I. Kiricsi : "Large Scale Production of Short Functionalized Carbon Nanotubes", *Chem. Phys. Lett.* **360**, 429 – 435 (2002)
- 21) Z. Gu, H. Peng, R. H. Hauge, R. E. Smalley and J. L. Margrave : "Cutting Single-Wall Carbon Nanotubes through Fluorination", *Nano Lett.* **2**, 1009 – 1013 (2002)
- 22) J. Liu, A. G. Rinzler, H. Dai, J. H. Hafner, R. K. Bradley, P. J. Boul, A. Lu, T. Iverson, K. Shelimov, C. B. Huffman, F. Rodriguez-Macias, Y. -S. Shon, T. R. Lee, D. T. Colbert and R. E. Smalley : "Fullerene Pipes", *Science* **280**, 1253 – 1256 (1998)
- 23) K. J. Ziegler, Z. Gu, H. Peng, E. L. Flor, R. H. Hauge and R. E. Smalley : "Controlled Oxidative Cutting of Single-Walled Carbon Nanotubes", *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 1541 – 1547 (2005)
- 24) G. S. Duesberg, M. Burghard, J. Muster and G. Philipp : "Separation of Carbon Nanotubes by Size Exclusion Chromatography", *Chem. Comm.* 435 – 436 (1998)
- 25) G. S. Duesberg, J. Muster, V. Krstic, M. Burghard and S. Roth : "Chromatographic Size Separation of Single-Wall Carbon Nanotubes", *Appl. Phys. A* **67**, 117 – 119 (1998)
- 26) Y. Sato, A. Yokoyama, K. -I. Shibata, Y. Akimoto, S. Ogino, Y. Nodasaka, T. Kohgo, K. Tamura, T. Akasaka, M. Uo, K. Motomiya, B. Jeyadevan, M. Ishiguro, R. Hatakeyama, F. Watari and K. Tohji : "Influence of Length on Cytotoxicity of Multi-Walled Carbon Nanotubes against Human Acute Monocytic Leukemia Cell Line THP-1 in Vitro and Subcutaneous Tissue of Rats in Vivo", *Mol. BioSyst.* **1**, 176 – 182 (2005)
- 27) W. Z. Li, S. S. Xie, L. X. Qian, B. H. Chang, B. S. Zou, W. Y. Zhou, R. A. Zhao and G. Wang : "Large-Scale Synthesis of Aligned Carbon Nanotubes", *Science* **274**, 1701 – 1703 (1996)
- 28) Z. F. Ren, Z. P. Huang, J. W. Xu, J. H. Wang, P. Bush, M. P. Siegal and P. N. Provencio : "Synthesis of

- Large Arrays of Well-Aligned Carbon Nanotubes on Glass", *Science* **282**, 1105 – 1107 (1998)
- 29) Shoushan Fan, Michael G. Chapline, Nathan R. Franklin, Thomas W. Tombler, Alan M. Cassell and Hongjie Dai : "Self-Oriented Regular Arrays of Carbon Nanotubes and Their Field Emission Properties", *Science* **283**, 512 – 514 (1999)
- 30) M. Zhang, K. R. Atkinson and R. H. Baughman : "Multifunctional Carbon Nanotube Yarns by Downsizing an Ancient Technology", *Science* **306**, 1358 – 1361 (2004)
- 31) X. Zhang, K. Jiang, C. Feng, P. Liu, L. Zhang, J. Kong, T. Zhang, Q. Li and S. Fan : "Spinning and Processing Continuous Yarns from 4-Inch Wafer Scale Super-Aligned Carbon Nanotube Arrays", *Adv. Mater.* **18**, 1505 – 1510 (2006)
- 32) K. Hata, D. N. Futaba, K. Mizuno, T. Namai, M. Yumura and Sumio Iijima : "Water-Assisted Highly Efficient Synthesis of Impurity-Free Single-Walled Carbon Nanotubes", *Science* **306**, 1362 – 1364 (2004)
- 33) S. Maruyama, E. Einarsson, Y. Murakami and Tadao Edamura : "Growth Process of Vertically Aligned Single-Walled Carbon Nanotubes", *Chem. Phys. Lett.* **403**, 320 – 323 (2005)
- 34) X. Zhang, A. Cao, B. Wei, Y. Li, J. Wei, C. Xu and D. Wu : "Rapid Growth of Well-Aligned Carbon Nanotube Arrays", *Chem. Phys. Lett.* **362**, 285 – 290 (2002)
- 35) Y. T. Lee, J. Park, Y. S. Choi, H. Ryu and H. J. Lee : "Temperature-Dependent Growth of Vertically Aligned Carbon Nanotubes in the Range 800 – 1100° C.", *J. Phys. Chem. B* **106**, 7614 – 7618 (2002)
- 36) Z. W. Pan, S. S. Xie, B. H. Chang, C. Y. Wang, L. Lu, W. Liu, W. Y. Zhou, W. Z. Li and L. X. Qian : "Very Long Carbon Nanotubes", *Nature* **394**, 631 – 632 (1998)
- 37) H. Dai : "Carbon Nanotubes: Synthesis, Integration, and Properties", *Acc. Chem. Res.* **35**, 1035 – 1044 (2002)
- 38) R. Andrews, D. Jacques, D. Qian and T. Rantell : "Multiwall Carbon Nanotubes: Synthesis and Application", *Acc. Chem. Res.* **35**, 1008 – 1017 (2002)
- 39) D. B. Geohegan, A. A. Puretzky, I. N. Ivanov, S. Jesse, G. Eres and J. Y. Howe : "In Situ Growth Rate Measurements and Length Control during Chemical Vapor Deposition of Vertically Aligned Multiwall Carbon Nanotubes", *Appl. Phys. Lett.* **83**, 1851 – 1853 (2003)
- 40) Z. Zhang, Y. Zhou and Y. Yue : "Control the Relative Length of Carbon Nanotubes from Site to Site on One Silicon Substrate", *Appl. Phys. Lett.* **87**, 223121 (2005)
- 41) S. Chakrabarti, T. Nagasaka, Y. Yoshikawa, L. Pan and Y. Nakayama : "Growth of Super Long Aligned Brush-Like Carbon Nanotubes", *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**, L720 – L722 (2006)
- 42) N. Ishigami, H. Ago, K. Imamoto, M. Tsuji, K. Iakoubovskii and N. Minami : "Crystal Plane Dependent Growth of Aligned Single-Walled Carbon Nanotubes on Sapphire", *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 9918 – 9924 (2008)
- 43) S. Iwata, Y. Sato, K. Nakai, S. Ogura, T. Okano, M. Namura, A. Kasuya, K. Tohji and K. Fukutani : "Novel Method to Evaluate the Carbon Network of Single-Walled Carbon Nanotubes by Hydrogen Physisorption", *J. Phys. Chem. C* **111**, 14937 – 14941 (2007)



Masaru NAMURA
 東北大学大学院 環境科学研究科
 名村 優
 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-20
 TEL : 022-795-3868 FAX : 022-795-3868
 E-mail : namuram@dowa.co.jp



Yoshinori SATOU
 東北大学大学院 環境科学研究科
 佐藤 義倫
 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-20
 TEL : 022-795-3868 FAX : 022-795-3868
 E-mail : hige@buckyl.kankyo.tohoku.ac.jp



Kazuyuki TOHJI
 東北大学大学院 環境科学研究科
 田路 和幸
 〒980-8579 宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉6-6-20
 TEL : 022-795-3868 FAX : 022-795-3868
 E-mail : tohjik@mail.kankyo.tohoku.ac.jp

Development of a 3D Collagen Scaffold Coated With Multiwalled Carbon Nanotubes

AQ2 Eri Hirata, Motohiro Uo, Hiroko Takita, Tsukasa Akasaka, Fumio Watari, Atsuro Yokoyama

Department of Oral Functional Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Kita-ku, Sapporo 060-8586, Japan

Received 9 July 2008; revised 21 October 2008; accepted 2 December 2008
Published online 00 Month 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com). DOI: 10.1002/jbm.b.31327

Abstract: Carbon nanotubes (CNTs) have attractive biochemical properties such as strong cell adhesion and protein absorption, which are very useful for a cell cultivation scaffold. In this study, we prepared a multiwalled carbon nanotube-coated collagen sponge (MWCNT-coated sponge) to improve the surface properties of the collagen sponge, and its cell culturing properties were examined. The surface of the collagen sponge was homogeneously coated with MWCNTs by dispersion. MC3T3-E1 cells were cultured on and inside the MWCNT-coated sponge. The DNA content on the MWCNT-coated sponge after 1 week of culture was significantly higher than on an uncoated collagen sponge ($p < 0.05$). There was no significant difference between the estimated ALP activity normalized by DNA quantity on the MWCNT-coated sponge and that on the uncoated collagen sponge which is well known as one of the best scaffolds for cell cultivation. In addition, the MWCNT-coated surface shows strong cell adhesion. Therefore, the MWCNT-coated collagen sponge is expected to be a useful 3D scaffold for cell cultivation. © 2009 Wiley Periodicals, Inc. *J Biomed Mater Res Part B: Appl Biomater* 00B: 000–000, 2009

Keywords: carbon nanotubes; coating; collagen sponge honeycomb; 3D scaffolds; cell culture

INTRODUCTION

Carbon nanotubes (CNTs) have high chemical stability, and biochemical properties such as strong cell adhesion,¹ protein absorption² and cell differentiation.³ Favorable biocompatibility *in vivo* was also reported.⁴ Therefore, CNTs have been employed for use as a cell culture scaffold in the form of CNT sheets² and in composite with collagen⁵ or polymers.⁶

On the other hand, for regeneration of more complicated tissues such as bone, a three-dimensional (3D) scaffold is needed. The required properties in addition to the 3D scaffold are biocompatibility, 3D cell proliferation and cell differentiation. Thus, CNTs would be useful as the substrate of a 3D scaffold. Currently, collagen sponges are widely used as 3D scaffolds because of their high biocompatibility. Therefore, CNT coating on the collagen sponge surface could improve its utility as a 3D scaffold.

In this study, multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) were used to coat the surface of a collagen sponge honey-

comb to improve its surface properties, and the cell attachment and proliferation in the early term were estimated.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Preparation of MWCNT-coated Sponge

Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs; 20–50 nm in diameter, CNTs, Korea) were carboxylated by the reported method⁷ and dispersed in 1 w/v % sodium cholate solution to form a 100 ppm MWCNT suspension. A collagen sponge honeycomb (AteloCell[®] 3 × 3 × 2 mm³ in size, pore size 200–400 μm, Koken, Japan) was soaked in the MWCNT suspension for 1 h under gentle shaking and then rinsed with phosphate-buffered saline (PBS; Gibco, USA). The obtained MWCNT-coated collagen sponge (MWCNT-coated sponge) was observed by scanning electron microscopy (SEM; S4000, Hitachi, Japan). The specific resistance of each scaffold was also measured using a digital multimeter (type 175, Fluke, USA).

Cell Culture

Mouse osteoblast MC3T3-E1 cells were suspended at 3.0×10^4 cells/mL in minimum essential medium, alpha modification (α -MEM; Gibco, USA), containing 10% fetal bovine serum (FBS; Biowest, USA) and 1% penicillin/

Correspondence to: E. Hirata (e-mail: erieri@den.hokudai.ac.jp)
Contract grant sponsor: Ministry of Education, Science, Culture and Sport of Japan; contract grant number: 19390488

© 2009 Wiley Periodicals, Inc.

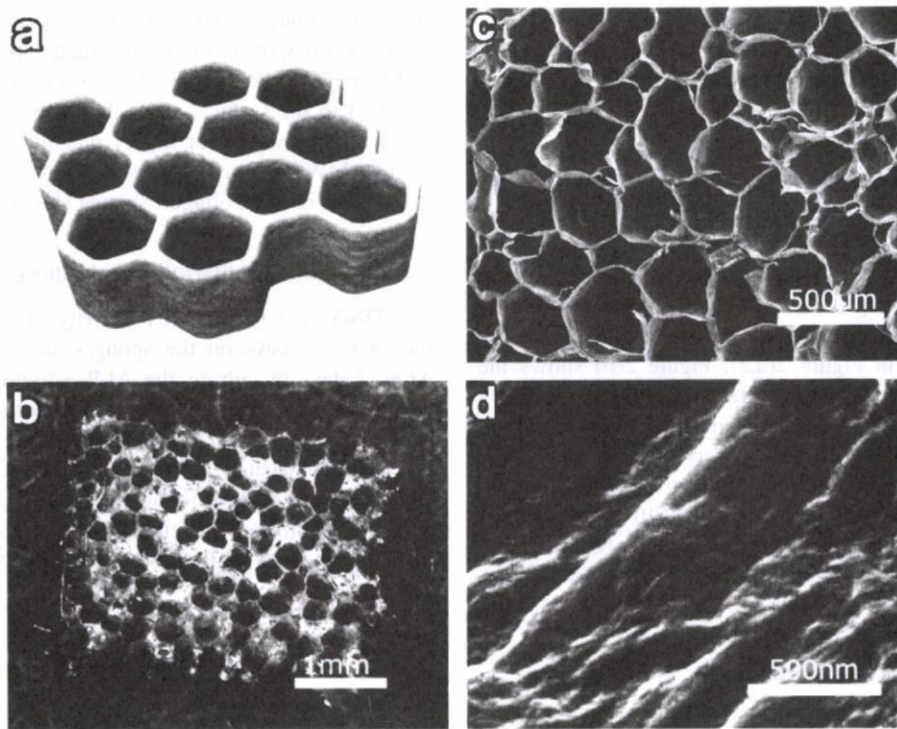


Figure 1. The collagen sponge honeycomb: (a) a schematic model, (b) the whole shape of the collagen sponge, (c)–(d) SEM images of the collagen sponge, (c) at lower magnification, and (d) at higher magnification.

streptomycin. Collagen and MWCNT-coated collagen sponges were placed in the wells of a 96-well plate, and 50 μL of the cell suspension was seeded on scaffold in the wells and then incubated for 7, 14 or 21 days at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere.

Cell Morphology

After 7 days of cell culture, the samples were examined biochemically and observed by SEM and optical microscopy. The samples were washed twice with PBS and fixed with 2% glutaraldehyde. After dehydration through a graded series of water-ethanol, half of the samples were freeze-dried and sputter-coated with palladium-platinum for SEM observation. The others were embedded in paraffin and HE-stained for optical microscopic observation. The cell surface morphology was observed by SEM. The cell proliferation on the internal part of the scaffold was observed by optical microscopy.

DNA Quantification and ALP Activity

After 14 or 21 days of cell culture, the amounts of DNA and ALP activities of the samples were measured. The samples were washed twice with PBS. One hundred microliters of the cell suspension containing 0.2% IGEPAL CA-630 (Sigma-Aldrich), 10 mM Tris-HCl and 1 mM MgCl_2 ,

pH 7.4 was added to each sample. The samples were frozen, thawed and homogenized. The sample solution was then shaken for 30 min and centrifuged.

Picogreen (Molecular Probes, Leiden, The Netherlands) was used to measure DNA content. Thirty microliters of the supernatant fluid in the sample gathered with 70 μL of TE buffer was added to 100 μL of picogreen working solution and incubated for 10 min at room temperature in the dark. After incubation, DNA was measured using a fluorometer (F-3000, Hitachi, Japan) with the excitation filter set at 365 nm and the emission filter at 450 nm. A DNA standard curve was made with Lambda DNA.

Alkaline phosphatase (ALP) activity was measured with LabAssay (Wako, Japan). Twenty microliters of the supernatant fluid in the sample was added to 100 μL of *p*-nitrophenol phosphate in carbonate buffer and incubated for 15 min at 37°C. After 80 μL of NaOH was added, absorbance was measured at 405 nm using a plate analyzer (ETY-300, TOYO, Japan) and enzyme activity was determined from the calibration curve of the *p*-nitrophenol standard. ALP activity was normalized by DNA content.

DNA content and ALP activity were determined in four samples and expressed as means \pm standard deviations. Data for these measurements were analyzed with Student's two-tailed *t*-test, assuming equal variance, using Microsoft Excel. Statistically significant values were defined as $p < 0.05$.

RESULTS

Scaffold Morphology

F1 Figure 1 shows the shape and the upper surface of a collagen sponge honeycomb. The pore size of the scaffold was 100–400 μm and the pores were longitudinally connected from the top to the bottom surfaces. The surface structure was smooth.

F2 Figure 2 shows the shape and the surface of an MWCNT-coated sponge. The whole shape and honeycomb structure of the collagen sponge were stable after MWCNT coating, as shown in Figure 2(a,c). Figure 2(b) shows the raw MWCNTs. The sponge surface was homogeneously covered by MWCNTs as shown in Figure 2(d) and no aggregation of MWCNTs was observed. The MWCNT-coated sponge showed electron conductivity and the specific resistance was estimated to be $8 \times 10^3 \Omega\text{m}$, but the resistance of the collagen sponge could not be measured because it was over the detection limit (40 MΩ) of the digital multimeter.

Cell Morphology

F3 Figure 3 shows optical microscope images after 1-week incubation. The HE-stained paraffin-embedded specimens were sliced as shown in 3a. The cells covered and spread on the internal sidewall of the CNT-coated sponge as

shown in Figure 3(c,d), whereas few cells were observed in the collagen sponge shown in Figure 3(b). Figure 4 shows SEM images of the cells after 1-week incubation. The cells attached to the surfaces of both scaffolds as shown in Figure 4(a,c). However, at higher magnification, the filopodia on the MWCNT net shown in Figure 4(d) were distinct from those on the collagen sponge shown in Figure 4(b).

Cell Proliferation and Differentiation

F5 The DNA content and ALP activity of the cells cultivated for 14 or 21 days on the sponges are shown in Figure 5. After 7 days of culture the ALP activities of the cells on both scaffolds were lower than the detection limit of the assay kit used. The DNA content in the cells attached to the MWCNT-coated sponges was significantly higher than that on the uncoated collagen sponges ($p < 0.05$). There was no significant difference between the scaffolds for ALP activity and ALP activity normalized by DNA content at $p > 0.1$.

DISCUSSION

In this study, a surface-modified collagen sponge using MWCNTs was prepared. The surface of the MWCNT-coated sponge was homogeneously covered with MWCNTs using carboxylated MWCNT dispersion with a surfactant.

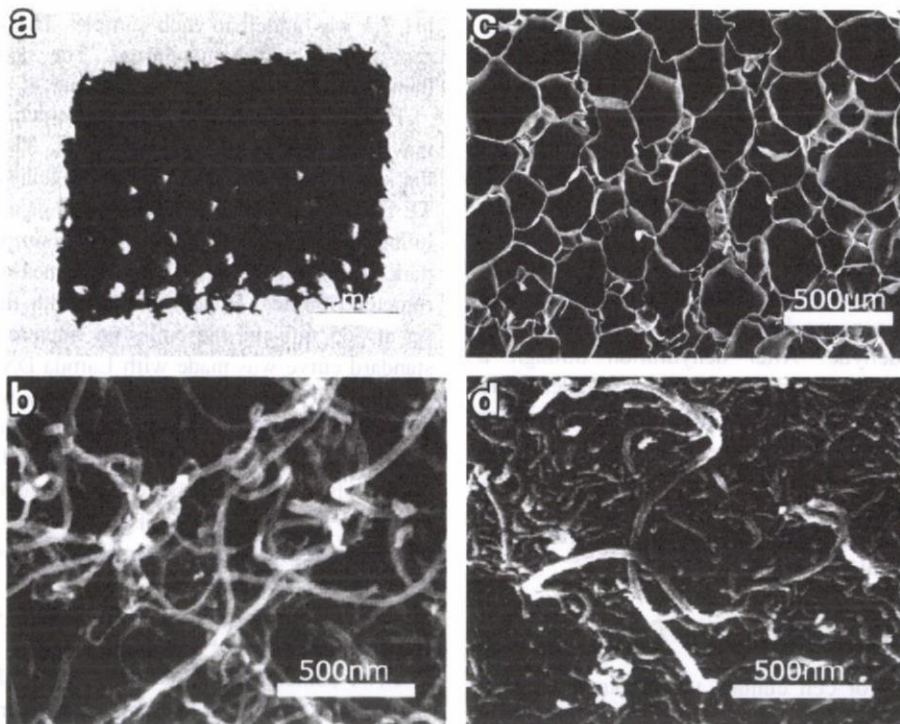


Figure 2. The MWCNT-coated sponge: (a) the whole shape of the MWCNT-coated sponge, (b) SEM image of untreated MWCNTs, (c)–(d) SEM images of the MWCNT-coated sponge, (c) at lower magnification, and (d) at higher magnification.

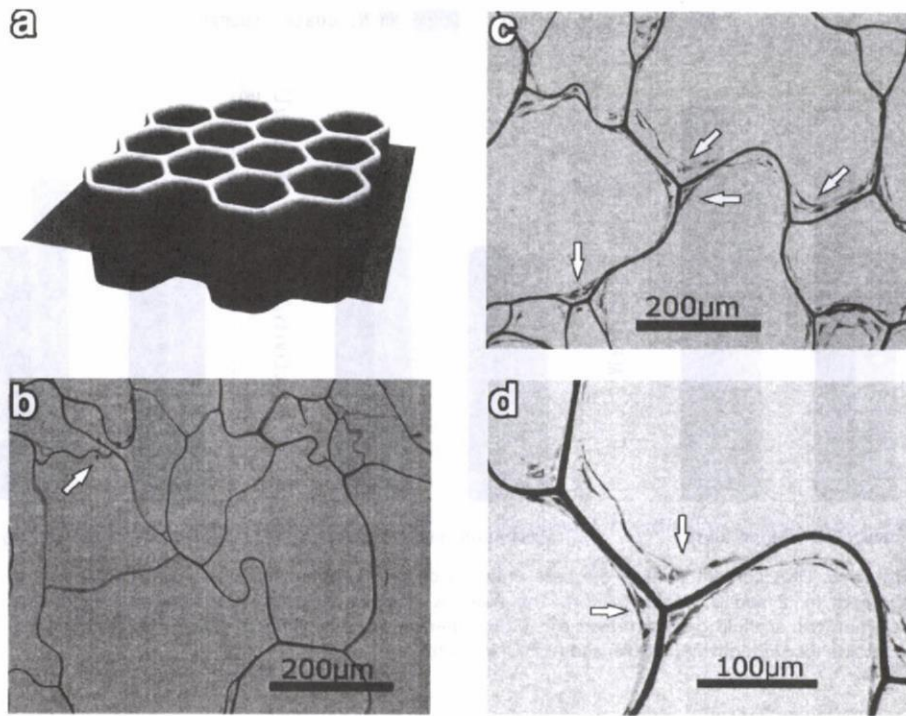


Figure 3. Optical microscopic observation after 1 week of culture: (a) paraffin-embedded specimens were sliced as in the schematic model (b) Few cells are observed in the collagen sponge. (c) Many cells are observed in the MWCNT-coated sponge at low magnification. (d) The cells spread on the sidewall of the MWCNT-coated sponge. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at www.interscience.wiley.com.]

AQ3

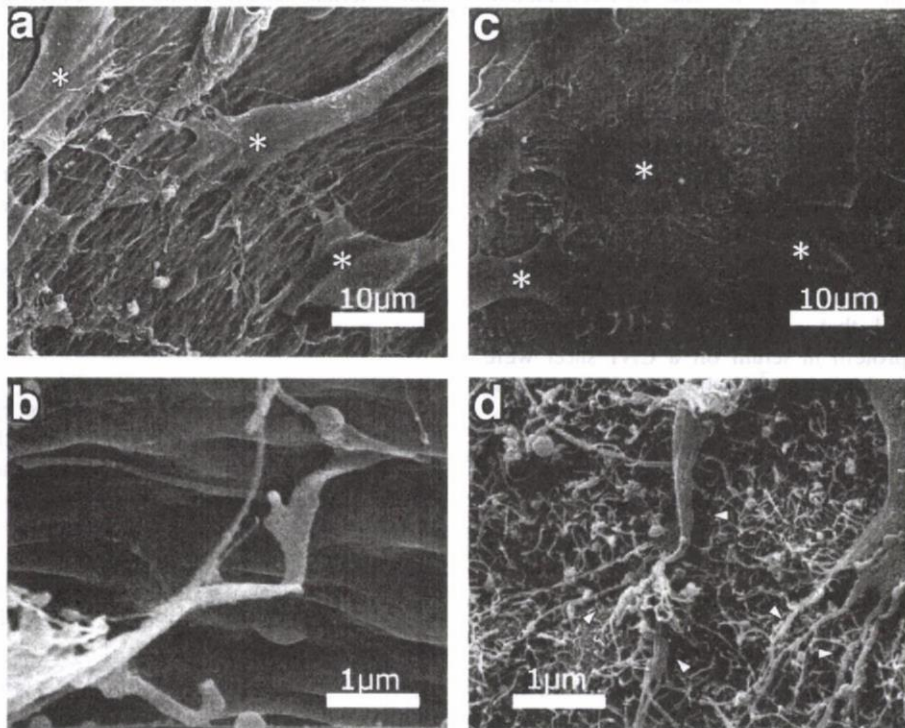


Figure 4. SEM observation after 1-week incubation: cells (asterisk) grown on the (a) collagen sponge and (c) MWCNT-coated sponge. SEM images at higher magnification: (b) collagen sponge, (d) cytoplasmic elongations (arrowhead) intertwined with MWCNTs on the surface of the MWCNT-coated sponge.

DEVELOPMENT OF A 3D COLLAGEN SCAFFOLD WITH MWCNT

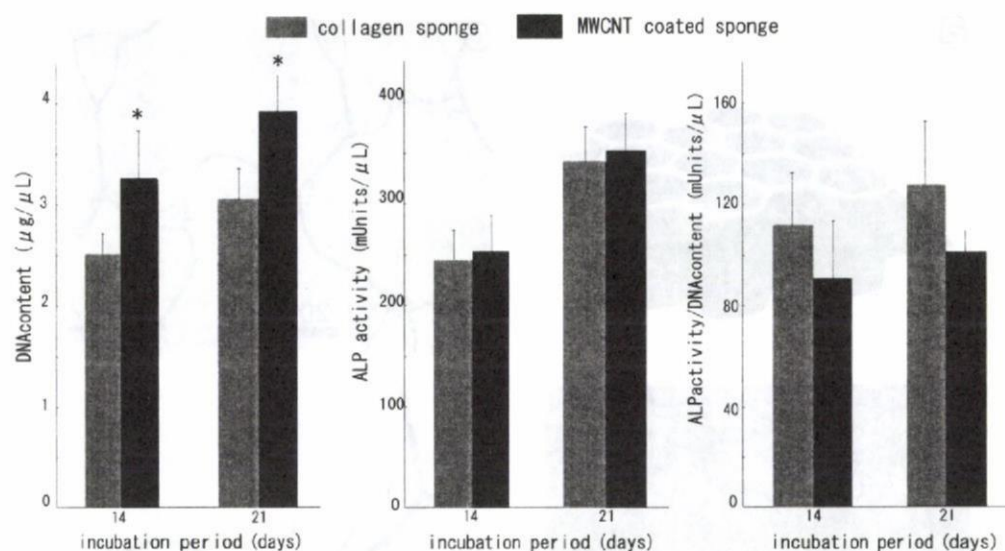


Figure 5. DNA content (left) of the cells cultured on the collagen sponges and MWCNT-coated sponges for 2 and 3 weeks; $n = 4$. The asterisk indicates a statistically significant difference between two scaffold groups (t-test: $p < 0.05$). There were no significant differences between the scaffolds for ALP activity (middle) and ALP/DNA (right).

In Figure 3(c), it can be seen that a large number of cells attached to the internal sidewall of the collagen sponge. The sidewall of the collagen sponge is vertical; thus, it is normally difficult for cells to attach to it. However, MWCNT coating increased the initial cell attachment to the sidewall. One of the reasons for the high cell attachment was suggested to be the mechanical contact between cells and MWCNTs, as can be seen in Figure 4(d), which shows the filopodia of a cell that appear to be twisted around the MWCNTs.

The DNA content of the cells attached to the CNT-coated sponge was significantly higher than that on the uncoated sponge. Usually, DNA content is in proportion to the cell population. Thus, MWCNT coating improved the initial cell attachment to the collagen sponge and assisted proliferation during culture. In a previous study, one of the authors demonstrated that cell growth, proliferation and absorption of the protein in serum on a CNT sheet were higher than on a graphite sheet.² Higher protein adsorption on carboxylated MWCNTs than on non-treated MWCNTs⁸ were also reported. In addition, the surface roughness of the sponge was increased with MWCNTs as shown in Figures 1 and 2. Therefore, the increase in the surface roughness and the adsorption property of the MWCNT coated surface would be effective for the initial cell attachment.

In this study, the collagen sponge honeycomb, which has many straight macropores ($\sim 500 \mu\text{m}$) and good mechanical strength,⁹ was coated with MWCNTs and good osteoblast cell attachment and proliferation were obtained. Shi et al. developed a CNT-based porous scaffold with pore sizes of 80–100 μm from a composite of SWCNTs and a polymer, and good cell attachment and proliferation were demonstrated.⁶ However, to employ the 3D scaffold,

interconnecting macropores are required to obtain cell proliferation toward the internal pores. The MWCNT-coating on the collagen sponge honeycomb improved the cell attachment on the internal pore surface as shown in Figure 3, then, the homogeneous cell proliferation on both internal and external surface of the MWCNT coated sponge was achieved. In our previous study, new bone formation on the MWCNTs sintered monolith was reported.¹⁰ Furthermore, the MWCNT-coated sponge exhibited electrical conductivity, whereas collagen is nonconductive; thus, MWCNT coating could make possible culture under electrical stimulation. It has already been reported that the stimulation of osteoblasts by electric pulses can accelerate the multistep process of biomineralization *in vitro*.¹¹ Therefore, the MWCNT-coated sponge would suggest the feasibility of its use as a scaffold for bone regeneration.

CONCLUSIONS

A 3D cell culture scaffold was obtained by homogeneously coating a collagen sponge honeycomb with MWCNTs. The cell attachment to the internal pore surface was improved by the MWCNT coating. Thereby, homogeneous cell proliferation was achieved not only on the sponge face but also on the internal pore surface.

Therefore, the MWCNT-coated collagen sponge is advantageous as a 3D scaffold for cell cultivation and tissue engineering.

REFERENCES

1. Aoki N, Yokoyama A, Nodasaka Y, Akasaka T, Uo M, Sato Y, Tohji K, Watari F. Strikingly extended morphology of

- cells grown on carbon nanotubes. *Chem Lett* 2006;35:508–509.
- Aoki N, Akasaka T, Watari F, Yokoyama A. Carbon nanotubes as scaffolds for cell culture and effect on cellular functions. *Dent Mater J* 2007;26:178–185.
 - Zanello LP, Zhao B, Hu H, Haddon RC. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Lett* 2006;6:562–567.
 - Yokoyama A, Sato Y, Nodasaka Y, Yamamoto S, Kawasaki T, Shindoh M, Kohgo T, Akasaka T, Uo M, Watari F, Tohji K. Biological behavior of hat-stacked carbon nanofibers in the subcutaneous tissue in rats. *Nano Lett* 2005;5:157–161.
 - MacDonald RA, Laurenzi F, Viswanathan G, Ajayan PM, Stegemann JP. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *J Biomed Mater Res A* 2005;74A:489–496.
 - Shi X, Sitharaman B, Pham QP, Liang F, Wu K, Billup WE, Wilson LJ, Mikos AG. Fabrication of porous ultra-short single-walled carbon nanotube nanocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2007;28:4078–4090.
 - Peng H, Alemany LB, Margrave JL, Khabashesku VN. Side-wall carboxylic acid functionalization of single-walled carbon nanotubes. *J Am Chem Soc* 2003;125:15174–15181.
 - Xaojun L, Wei C, Qiwen Z, Liming D. Direct measurement of interactions between polypeptides and carbon nanotubes. *J Phys Chem B* 2006;110:12621–12625.
 - Kakudo N, Shimotsuma A, Miyake S, Kushida S, Kusumoto K. Bone Tissue engineering using human adipose-derived stem cells and honeycomb collagen scaffold. *J Biomed Mater Res A* 2008;84A:191–197.
 - Wang W, Omori M, Watari F, Yokoyama A. Novel bulk carbon nanotube materials for implant by spark plasma sintering. *Dent Mater J* 2005;24:478–486.
 - Wiesmann H, Hartig M, Stratmann U, Meyer U, Joos U. Electrical stimulation influences of osteoblast-like cells in vitro. *Biochimica et Biophysica Acta* 2001;1538:28–37.



ELSEVIER

available at www.sciencedirect.comjournal homepage: www.elsevier.com/locate/carbon

Letters to the Editor

The production of soft, durable, and electrically conductive polyester multifilament yarns by dye-printing them with carbon nanotubes

Bunshi Fugetsu^{a,*}, Eiji Akiba^b, Masaaki Hachiya^c, Morinobu Endo^d

^aGraduate School of Environmental Science, Hokkaido University, Sapporo 060 0810, Japan

^bKurarayliving Co., Ltd., Umeda kita-ku, Osaka 530 8611, Japan

^cChakyu Dyeing Co., Ltd., Ichinomiya-City, Aichi 494 0001, Japan

^dFaculty of Engineering, Shinshu University, 4-17-1, Wakasato, Nagano-shi, 380-8553, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 2 September 2008

Accepted 10 November 2008

Available online 20 November 2008

ABSTRACT

Carbon nanotube based dyestuffs were prepared by dispersing aggregates of multiwalled carbon nanotubes in water using a blend of zwitterionic surfactants with anionic surfactants. Using a dye-printing approach, the carbon nanotubes were directly applied to polyester multifilament yarns to form an electrically conductive layer over each filament of the multifilament yarn. Yarns having electrical resistivity ranging from 10^3 to 10^9 ohm/cm were obtained. Yarn with a resistivity of 10^3 ohm/cm could be used to form flat, soft, and portable electrical heaters by vertically weaving the yarns into fabrics. The 10^5 ohm/cm yarns could be used for anti-static clothing, and the 10^9 ohm/cm level yarns for brushes for photocopying machines.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Continuous yarns and/or fibers composed of carbon nanotubes (CNTs) are highly attractive due to their intrinsic ability to form a variety of macroscopic objects by simply knitting and/or weaving of the yarns/fibers. The production of continuous yarns of pure CNTs has been accomplished by “dry-spinning”, the mechanical process of spinning either the single-walled CNTs directly from a CVD (chemical vapor deposition) gaseous reaction zone [1,2] or with the multiwalled CNTs previously grown as a vertically oriented CNT forest [3,4]. In contrast, “wet-spinning”, the spinning of a “super-acid (100 + %sulfuric acid) suspension” [5] of the single-walled CNTs, produced purely CNT-based continuous fibers. The pure CNT-based yarns and/or fibers retained the advantageous properties of the individual nanotubes, such as the high electrical and thermal conductivities. However,

the preparation of industrial quantities of the single-walled CNTs or the multiwalled CNT forests, the precursors for making the CNT-based yarns/fibers, is presently impractical.

Continuous fibers containing a few wt.% of CNTs, obtained, for example, by incorporating the single-walled CNTs into PVA polymers [6,7], have shown excellent fiber properties, but electrical and thermal conductivities were low because of limitations on the contents of CNTs. Despite the production of continuous fibers with up to 60 wt.% CNT content [8], the development of the CNT-based continuous yarns/fibers having high industrial applicability remains a challenging issue.

In this study, we used CNTs as “dyestuffs” for producing CNT-based continuous yarns by directly dye-printing of polyester multifilament continuous yarns. To our best knowledge,

* Corresponding author. Fax: +81 11 706 2272.

E-mail address: hu@ees.hokudai.ac.jp (B. Fugetsu).

0008-6223/\$ - see front matter © 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

doi:10.1016/j.carbon.2008.11.013