

Fig. 1 – Dynamic light scattering size distribution of CNTs in the CNT-based dyestuffs.

this is the first use CNTs for direct dye-printing of continuous multifilament yarns. CNTs, even the multiwalled types, are characterized by extremely large aspect ratios, because of their nanometer sized diameters and their micrometer (~few hundred micrometers) sized length. This one-dimensional morphology of CNTs results in stronger adhesion properties (in comparison with the so-called zero-dimensional materials, such as carbon blacks), suggesting a possible application for directly employing CNTs as dyestuffs for dyeing of fibers, yarns, and textiles. Such application, as demonstrated in this study, was achieved by using CNTs at molecular levels (or tubular levels) for dispersions as dyestuffs. Typical CVD products of multiwalled CNTs (Baytubes® C 150P), received as powders, have been used for preparing the CNT-based dyestuffs. Briefly, 300 g of the CNT powders were introduced into 10 l of an aqueous solution containing 40 g of 3-(*N,N*-dimethylmyristylammonio)-propanesulfonate and 30 g of polyoxyethylene lauryl ether sulfonate, to prepare the raw CNT-suspension. This suspension was then used as the precursor for preparing the CNT-based dyestuffs by dispersing the CNT-aggregates at the molecular level using a continuously operating bead-mill system. Three essential strategies are involved in the preparation of the CNTs-based dyestuffs: (i) Wetting of CNTs: air and moisture were displaced from the surfaces of the CNT-aggregates by replacing them with the disper-

sants. This objective was accomplished in the process of preparing the raw CNT-suspensions and the best wetting efficiencies were obtained by using a combination of 3-(*N,N*-dimethylmyristylammonio)-propanesulfonate, a zwitterionic type of surfactants and polyoxyethylene lauryl ether sulfonate, an anionic type of surfactant, as the dispersants. (ii) Grinding of the “wetted CNT-aggregates”: CNT-aggregates, after being well-wetted by the blended zwitterionic/anionic dispersants, were easily dispersed into individual tubes by very mild mechanical shear forces through the use of a continuously operating bead-mill system. (Hereafter, CNT-aggregates, after being dispersed into individual tubes, will be referred as the “molecular level (or tubular level) of dispersion”). Particle size distributions, as measured using a dynamic light scattering size distribution analyzer (Fig. 1), showed that 95% of the overall particles exhibited mean diameters smaller than 270 nm, suggesting that most of the dispersion of CNTs in the CNT-based dyestuffs occurred at the molecular level. (iii) Addition of a small amount of polymers into the dyestuffs: the electric resistivity of the CNT-dyed yarns can be precisely controlled at certain levels by controlling the ratios of carbon nanotubes to polymers in the dyestuffs. In this study, anionic polyurethanes, received as emulsions, were used as the typical polymers. The CNT-based dyestuffs have a life time (the mean diameter of CNTs monitored using the dynamic light scattering size distribution analyzer was used as the essential indicator) longer than 18 months.

Commercially available polyester multifilament yarns (20 dtex/24 filament) were dyed directly through a dye-printing approach (Fig. 2). Briefly, the polyester multifilament yarns were passed through a dye-bath containing the CNT-based dyestuffs. Temperature of the dye-bath was maintained at 40 °C. A micro-wave vibration system was used to vibrate the polyester multifilament yarns, so that each filament of the multifilament yarns was dyed thoroughly by the CNT-based dyestuffs. The CNT-dyed multifilament yarns were further cured at 170 °C, which was about 100 °C higher than the glass transition temperature (T_g , 69 °C) of the polyester multifilament yarns, for about 30 s, by passing the yarns through a cure oven. The resulting CNT-dyed multifilament yarns were black yet bright (Fig. 3). SEM images of the CNT-dyed multifilament yarns (Fig. 4) revealed a CNT-skin, with the CNTs arranged into continuously interconnected networks over the

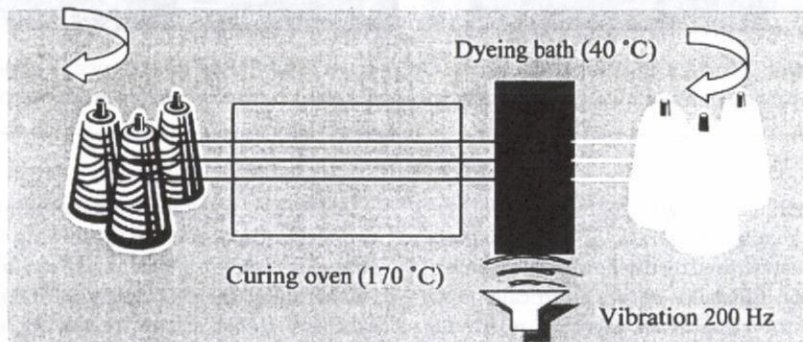


Fig. 2 – Schematic illustration of the dye-printing system for mass production of the CNT-dyed multifilament polyester yarns.

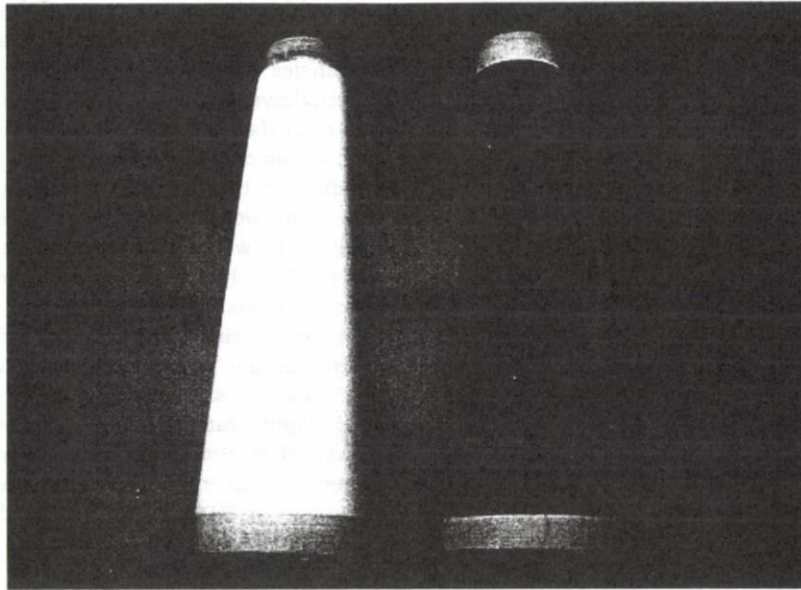


Fig. 3 – Photos of the polyester multifilament yarns before (left-photo) and after (right-photo) being dye-printed with the CNT-based dyestuffs. The yarns were about 10,000 m long.

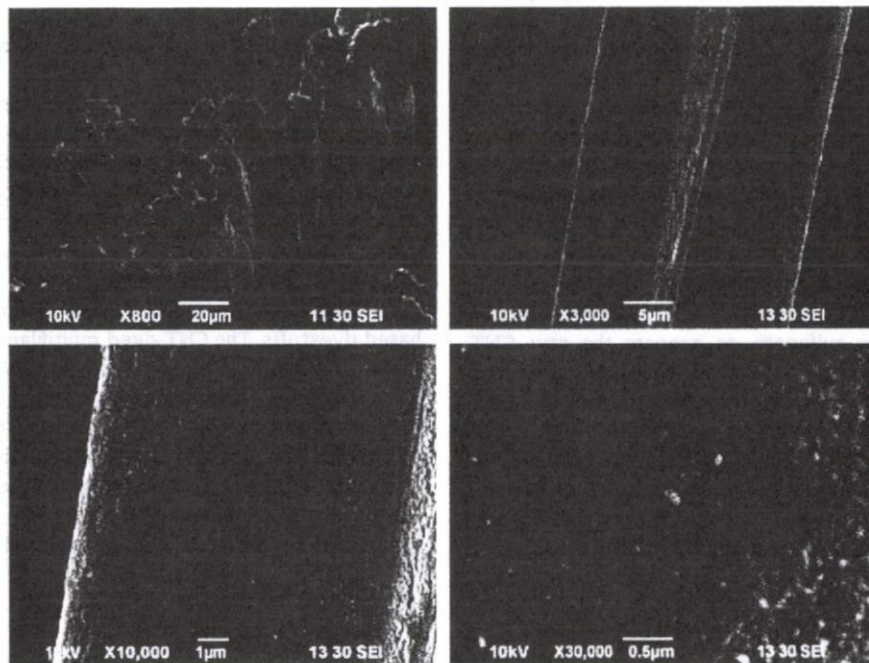


Fig. 4 – SEM images of the CNT-dyed multifilament yarns. CNTs have established an electrically conductive layer with the individual carbon nanotubes arranged as a continuously interconnected network over each filament of the yarns.

surfaces of the yarns. Each filament was coated by a continuous CNT-skin, with a coating thickness of approximately 400 nm. The outer skin, established by the continuously interconnected CNT-networks, functions as an electrically conductive layer (ECL) and the value of its electrical resistivity ranged from 10^3 to 10^9 ohm/cm, as verified by the contents of CNTs in the ECL.

Electrical resistivity measurements, obtained using a two-electrode resistance measuring meter (Table 1), demonstrated a highly uniform resistivity along the yarn direction. Furthermore, the CNT-dyed multifilament yarns have shown excellent stable electric resistivity, even under elongation. The yarns broke at an elongation ratio of approximately 30%.

Table 1 – Data on measuring of electric resistivity (ohm/cm) of twenty randomly chosen samples (10 cm of each sample) of the 10^3 ohm/cm level CNT-dyed multifilament yarns.

Samples	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10
Resistivity $\times (10^3)$	1.76	1.65	1.91	2.01	1.65	1.78	2.03	1.72	1.92	1.76
Samples	#11	#12	#13	#14	#15	#16	#17	#18	#19	#20
Resistivity $\times (10^3)$	2.01	1.78	2.00	2.03	2.01	1.90	1.72	1.70	1.76	1.70

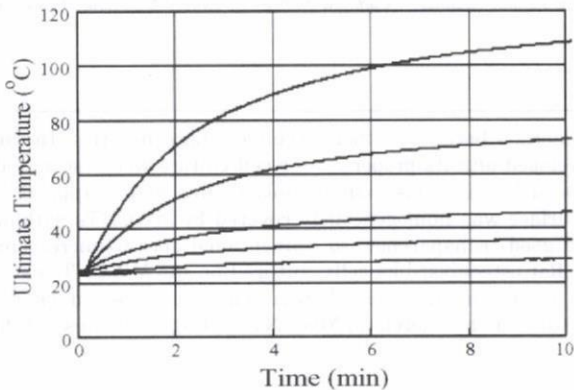


Fig. 5 – Temperature–time dependence observed for the fabric samples obtained using CNT-dyed 10^3 ohm/cm level multifilament yarns as the wefts and regular polyester textured yarn for the warps. The applied voltages were 5, 10, 15, 20, 30, and 40 V, respectively (from the bottom curve to the top curve).

The 10^3 ohm/cm level CNT-dyed multifilament yarns were woven into fabric (20 m \times 0.6 m) by using the CNT-dyed yarns as the wefts (horizontal yarns) and the regular polyester textured yarn for the warps (vertical yarns). This orthogonally blended fabric was then cut into pieces of smaller size (20 cm \times 30 cm) to evaluate their thermoelectric behaviors by gripping both ends of the CNT-dyed yarns of the fabric samples between two copper plates (electrodes). Typical plots of the time–temperature dependence, over the applied voltage range of 5–40 V (Fig. 5) illustrated that the orthogonally blended fabric functioned as an electrical heater when the applied voltages exceeded 20 V.

The CNT-dyed multifilament yarns showed excellent electrical conductivity even after being water-washed. For example, for the 10^5 ohm/cm level CNT-dyed multifilament yarns, the electrical resistivity was 2.52×10^5 ohm/cm prior to washing and 8.23×10^5 ohm/cm (the average value of twenty mea-

surements) after 20 min of washing in tap-water at 75 °C. This high tolerance for washing indicated that the CNT-dyed multifilament yarns are useful for anti-static uniforms.

CNT-dyed multifilament yarns with an electrical resistivity level of 10^9 ohm/cm have been used for establishing brushes for the photocopying machines; excellent static-control performance was obtained.

In conclusion, polyester multifilament yarns with each filament being suffused with a continuous CNT-skin can be produced in industrial quantities by using CNTs at the molecular level of dispersions as dyestuffs. This thin CNT-skin functions as an electrically conductive layer with excellent adhesion, toughness, and durability. The direct use of CNTs in dyeing opens new applications of nanotechnologies in yarn/textile productions.

REFERENCES

- [1] Li Y-L, Kinloch IA, Windle AH. Direct spinning of carbon nanotubes fibers from chemical vapor deposition synthesis. *Science* 2004;304:276–8.
- [2] Kozio K, Vilatela J, Moissala A, Motta M, Cunniff P, Sennett M, et al. High-performance carbon nanotubes fiber. *Science* 2007;318:1892–6.
- [3] Jiang K, Li Q, Fan S. Spinning continuous carbon nanotubes yarns. *Nature* 2002;419:801.
- [4] Zhang M, Atkinson KR, Baughman RH. Multifunctional carbon nanotubes yarns by downsizing an ancient technology. *Science* 2004;306:1358–61.
- [5] Ericson LM, Fan H, Peng H, Davis VA, Zhou W, Sulpizio J, et al. Macroscopic, neat, single-walled carbon nanotubes fibers. *Science* 2004;305:1447–50.
- [6] Kumar S, Dang TD, Arnold FE, Bhattacharyya AR, Min BG, Zhang X, et al. Synthesis, structure, and properties of PBO/SWCNT composites. *Macromolecules* 2002;35:9039–43.
- [7] Vigolo B, Penicaud A, Coulon G, Sauder C, Pailler R, Journet G, et al. Macroscopic fibers and ribbons of oriented carbon nanotubes. *Science* 2000;290:1331–4.
- [8] Dalton AB, Collins S, Munoz E, Razal JM, Ebron VH, Ferraris JP, et al. Super-tough carbon-nanotube fibers. *Nature* 2003;423:703.

Development of a multiwalled carbon nanotube coated collagen dish

Michiko TERADA¹, Shigeaki ABE², Tsukasa AKASAKA², Motohiro UO², Yoshimasa KITAGAWA¹ and Fumio WATARI²

¹Oral Diagnosis and Oral Medicine, Department of Oral Pathobiological Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University

²Department of Biomedical, Dental Materials and Engineering, Division of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Kita-13, Nishi-7, Kitaku, Sapporo 060-8586, Japan

Corresponding author, Michiko TERADA; E-mail: terada@den.hokudai.ac.jp

Carbon nanotubes (CNTs) are one of the most interesting nanomaterials because of their excellent characteristics. In this study, a transparent CNTs coating for cell culture dishes was developed and its properties for cell culture were estimated. Carboxylated multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) were dispersed in aqueous sodium cholate solution and applied on a collagen type I-coated cell culture dish (cover glass). The dish surface was homogeneously covered by MWCNTs without aggregation. The MWCNT-coated dish was slightly gray and had good transparency, so conventional optical microscopic observation of the cells on the MWCNT-coated dish was possible. Rat osteoblast-like cells cultured on the MWCNT-coated dish showed slightly lower viability and proliferation compared to the collagen-coated dish. The cell adhesion on the MWCNT-coated dish was much higher than that on the collagen-coated dish. Therefore, MWCNT-coating for dishes will be a useful new material for cell culture.

Key words: Multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs), Collagen, Cell culture

Received May 1, 2008; Accepted Jul 25, 2008

INTRODUCTION

Carbon nanotubes (CNTs) and other carbon nanomaterials are of interest for biological and medical applications because of their high chemical durability, mechanical strength and electrical properties. Studies of the application of carbon nanomaterials have been carried for the substrate of cell culture¹⁻⁹, drug delivery systems^{10,11} and medical implant materials^{12,13}.

Cells have high affinity to singlewalled CNTs (SWCNTs)^{5-7,9,14}, multiwalled CNTs (MWCNTs)^{2,4,6-8} and other carbon nanofibers^{1,3}. The bone cell affinity to CNTs^{1,14} and bone formation (osseointegration) on sintered MWCNTs were reported¹². However, those CNT-based substrates were black and had low optical transparency. Therefore, conventional optical microscopic observation of the cultured cells on the CNT-based substrates was quite difficult and the cells needed to be observed by scanning electron microscopy (SEM) after fixation. However, *in situ* microscopic observation of cultured cells on CNTs is important to evaluate the cell affinity to them.

MacDonald *et al.* reported a collagen-SWCNT composite for the cell culture substrate⁵. The SWCNTs were strongly entrapped by collagen and the composite showed high mechanical strength and good cell viability. Then good affinity between collagen and CNTs was expected.

On the other hand, collagen is one of the most biocompatible materials, and then collagen-coated

dish is widely used for cell culture. From the Macdonald's result, CNTs would show high affinity to the collagen-coated dish surface. Then above CNTs remarkable properties would be added to the collagen-coated dish. Concerning to the CNTs, purification and surface treatment was easier carried out for MWCNTs than SWCNTs because of their chemical stability resulted from thick tubular structure. Thus MWCNTs coating on the collagen-coated dish would be possible by the appropriate treatment of MWCNTs.

In this study, MWCNTs were coated onto collagen-coated cell culture, in an attempt to develop coated dishes with optically transparent MWCNTs, and the cell viability, proliferation, and adhesion on the MWCNT-coated dishes were estimated.

MATERIAL AND METHODS

Preparation of MWCNT-coated dishes and surface roughness measurement

MWCNTs (20-30nm in diameter, Cnt, Seoul, Korea) were purified by oxidation at 500°C for 90 minutes and treated in concentrated hydrochloric acid. The purified MWCNTs were carboxylated by the method reported by Peng *et al.*¹⁵ to improve their dispersion in aqueous solutions. The carboxylated MWCNTs were dispersed in sodium cholate (1w/v%) aqueous solution to MWCNT concentrations of 1-1,000ppm under sonication for 90 minutes. Sodium cholate was reported to be one of the most effective surfactants

for carbon nanotube dispersion¹⁶⁾. The obtained MWCNT suspension (2ml/dish) was poured into a collagen type I-coated cell culture dish (35mm ϕ , Iwaki, Tokyo, Japan) and kept at room temperature for 3 hours. Then it was rinsed with deionized water, dried and employed for the following cell culture experiments. For the SEM observations, a collagen type I coated cover glass (25mm ϕ , Iwaki, Tokyo, Japan) with the same treatment was used instead of the culture dish. Hereafter, the dishes and the cover glasses treated with the MWCNT suspension are referred to as "MWCNT-coated dish" and "MWCNT-coated cover glass", respectively.

To estimate the optimum treatment conditions for the MWCNT solution, the collagen-coated dishes were treated with 1-1,000ppm suspensions in 1w/v% sodium cholate aqueous solution for 1-6 hours. The homogeneity of the MWCNT coating on these dishes was estimated by SEM observation (S-4000, Hitachi, Japan) and optimum treatment conditions were determined. The changes in surface roughness of the collagen-coated cover glass before and after MWCNT coating were estimated using a surface roughness meter (Surfcom 130A, Tokyo Seimitsu, Tokyo, Japan).

Cell proliferation, viability and adhesion on MWCNT-coated dishes

Rat osteoblast-like MC3T3-E1 cells were seeded onto

MWCNT-coated dishes and collagen-coated dishes at 1×10^5 cells/2ml/dish. These cells were cultured in α -MEM (Gibco, USA) with 10% FBS (Biowest, USA) and PSN Antibiotic Mixture (Gibco, USA) at 37°C in humidified 5% CO₂ for 24, 48 and 72 hours and used for the following proliferation and viability estimations. Observation and cell counting were done under an optical microscope after fixation and Giemsa staining (Merck, USA). The number of cells per dish was estimated under optical microscopic observation and the cell proliferation was estimated. Cell viability was measured by colorimetry using Alamer blue (Biosource, USA). The cells were cultured in medium containing 10% Alamer blue and the changes in absorbance at 570nm and 600nm were estimated using a spectrophotometer (U-1100, Hitachi, Japan). Cell adhesion was estimated by treatment using diluted Trypsin-EDTA solution (Gibco, USA). The MC3T3-E1 cells that were cultured to confluence on MWCNT-coated dishes and collagen-coated dishes were treated with 0.1% and 0.02% Trypsin-EDTA solution. The decrease of the attached cells with treatment time was evaluated under an optical microscope.

RESULTS

Fig. 1 shows SEM images of MWCNT-coated cover glasses treated with various concentrations of

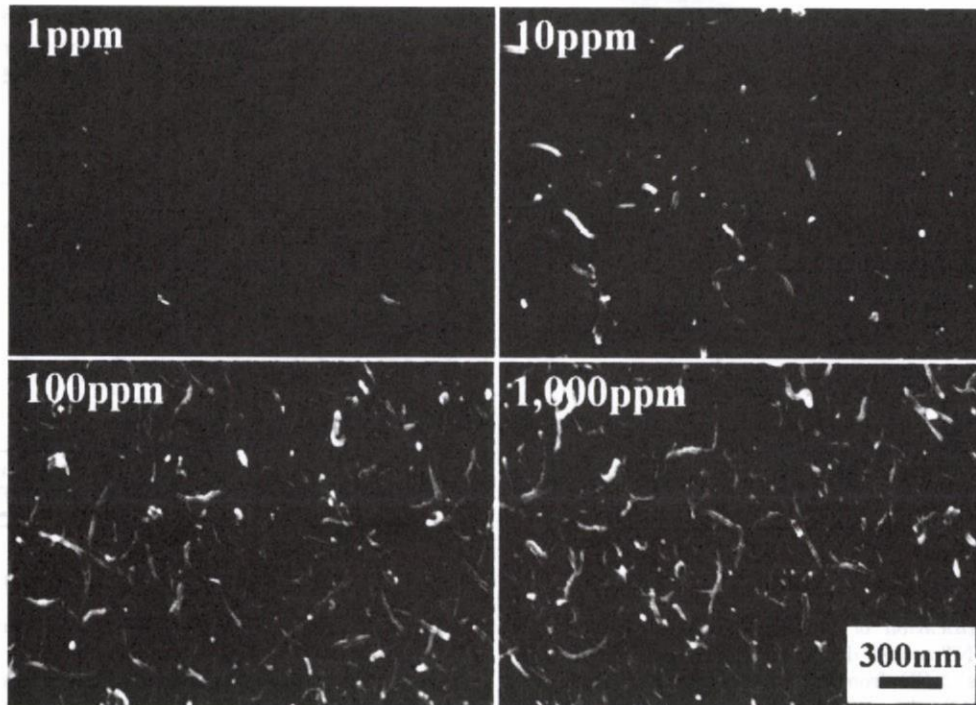


Fig. 1 SEM images of MWCNT adhering to collagen-coated cover glass treated with MWCNT suspensions at the concentrations of 1, 10, 100 and 1,000ppm for 3 hours.

carboxylated MWCNT suspension. The coverage of MWCNTs on the surface was increased with the increase of the MWCNT concentration from 10ppm to 1,000ppm. In contrast, MWCNT aggregation was observed on the dish treated with 1,000ppm MWCNT suspension. Therefore, the optimum concentration of the MWCNT suspension for the coating treatment was estimated to be 100ppm. The effect of the treatment period using 100ppm suspension was also estimated and optimum MWCNT coverage was obtained after 3-hour treatment.

No significant difference was observed in the arithmetic mean surface roughness (Ra) of the collagen- and MWCNT-coated cover glass because of the detection limit. The maximum roughness (Rmax) of the MWCNT-coated cover glass was estimated to be $0.78 \pm 0.08 \mu\text{m}$ and it was slightly higher than that of the collagen-coated cover glass ($R_{\text{max}}=0.52 \pm 0.05 \mu\text{m}$). Thus the MWCNT-coated surface was

estimated to be as smooth as the collagen-coated surface.

The MWCNT-coated dishes used in the following experiments were treated with 100ppm MWCNT suspension for 3 hours. The MWCNTs were strongly entrapped on the collagen-coated surface and never released by rinsing or cell culture procedures.

Fig. 2 shows a comparison of the color and the transparency of the collagen-coated dish and the MWCNT-coated dish. The MWCNT-coated dish looked slightly gray but had good transparency.

Fig. 3 shows the cell proliferation on an MWCNT-coated dish and collagen-coated dish. The cells on both dishes showed similar tendencies and their difference was not significant until 48 hours (t-test, $p < 0.05$). Fig. 4 shows cell viability on both dishes. The cell viability on the MWCNT-coated dish was slightly lower than that on the collagen-coated dish.

Fig. 5 shows optical microscope images (a) and SEM images (b) of the cultured cells on MWCNT-coated and collagen-coated dishes. The changes in cell morphology on both dishes were similar in the optical images; however, the cells on the MWCNT-coated dish were not widespread as those on the collagen-coated dish. Fig. 6 shows high magnification SEM images of the filopodia of E1 cells. Large numbers of filopodia were observed in the cells on the MWCNT-coated dish and the ends of the filopodia appeared to contact MWCNTs.

Fig. 7 shows the residual cell percentage of the dish surface in the Trypsin-EDTA treatment period (values represent mean detachment of cells \pm SD from $n=4$). Cells on the MWCNT-coated dish were

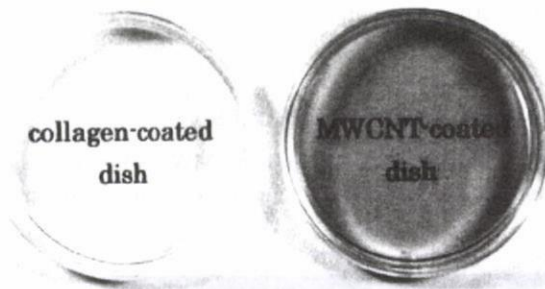


Fig. 2 Transparency of the MWCNT- and collagen-coated dishes

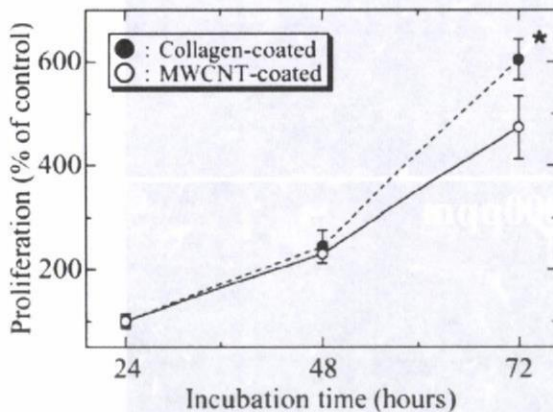


Fig. 3 Quantification of MC3T3-E1 cell growth on an MWCNT-coated dish. Values represent mean cell counts \pm SD from $n=6$ fields of observation per treatment; *, $p < 0.05$ compared with MWCNT-coated dish at 72 hours.

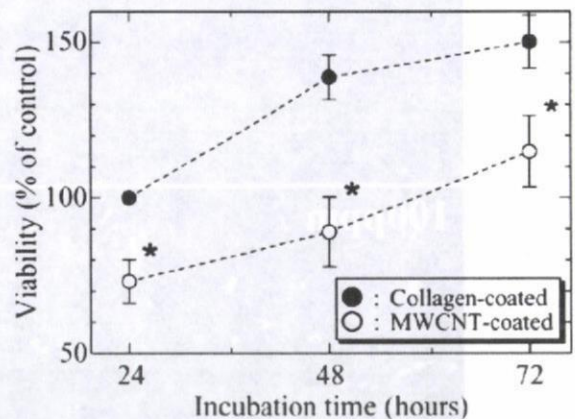


Fig. 4 Viability of MC3T3-E1 cells cultured on the MWCNT- and collagen-coated dishes. Values represent mean cell viability \pm SD from $n=5$; *, $p < 0.05$ compared with collagen-coated dish.

detached from the dish surface within a few minutes with 0.1% Trypsin-EDTA solution. Even with the lower concentration of Trypsin-EDTA (0.02%), all cells on the collagen-coated dish were detached within 10 minutes. In contrast, some of the cells on the MWCNT-coated dish remained on the surfaces of MWCNTs for more than 30 minutes of 0.1% Trypsin-

EDTA treatment. Fig. 8 shows that cells were detached with 0.02% Trypsin-EDTA solution at 2 minutes. Fig. 9 shows SEM images of the cells on an MWCNT-coated dish after 2 minutes of treatment with 0.02% Trypsin-EDTA solution. Mechanical contact between the filopodia and MWCNTs could be observed.

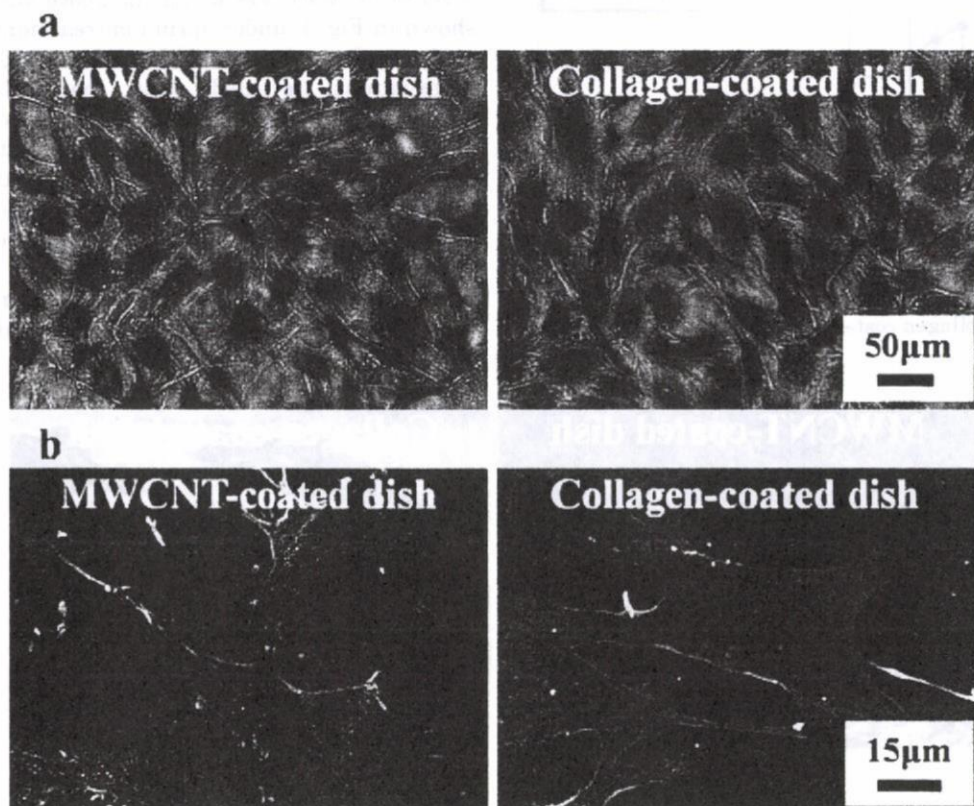


Fig. 5 (a) Optical microscope image of MC3T3-E1 cells on the surface of collagen- and MWCNT-coated dishes.
(b) Low magnification SEM image of MC3T3-E1 cells on the surface of collagen- and MWCNT-coated dishes.

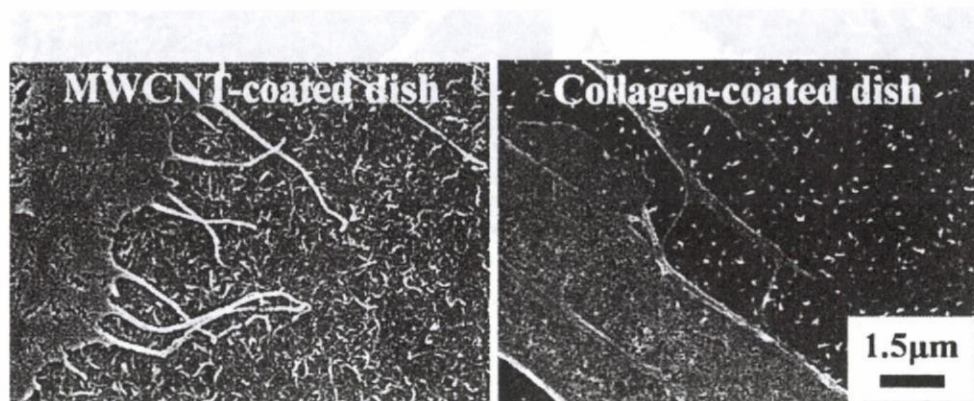


Fig. 6 High magnification SEM images of MC3T3-E1 cells on the surface of the collagen- and MWCNT-coated dishes.

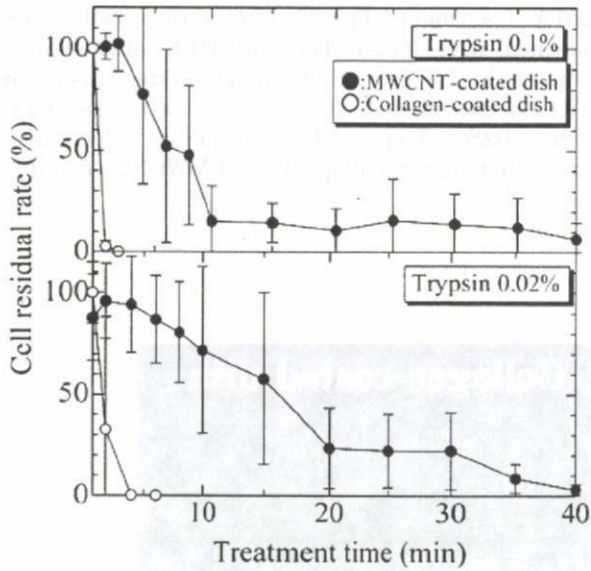


Fig. 7 Cell attachment test
 ○: Collagen-coated dish, ●: MWCNT-coated dish.

DISCUSSION

Usually, CNTs and other carbon nanoparticles have low dispersion in aqueous solutions because of their hydrophobicity. However purification and surface treated methods were well studied for MWCNTs than SWCNTs, and carboxylated MWCNTs¹⁵⁾ can be stably dispersed into sodium cholate aqueous solution¹⁶⁾. The collagen-coated dishes could be homogeneously covered by MWCNTs using the above suspension, as shown in Fig. 1, under optimum treatment conditions (100ppm for 3 hours). SEM and surface roughness observations revealed that the collagen-coated surface was homogeneously and fully covered with MWCNTs without their aggregation. The carboxylation of MWCNTs and sodium cholate addition were effective to obtain homogeneous coverage of MWCNTs on the collagen-coated dish surface.

Concerning to the interaction between CNTs and collagen, MacDonald *et al.*⁵⁾ reported SWCNT-

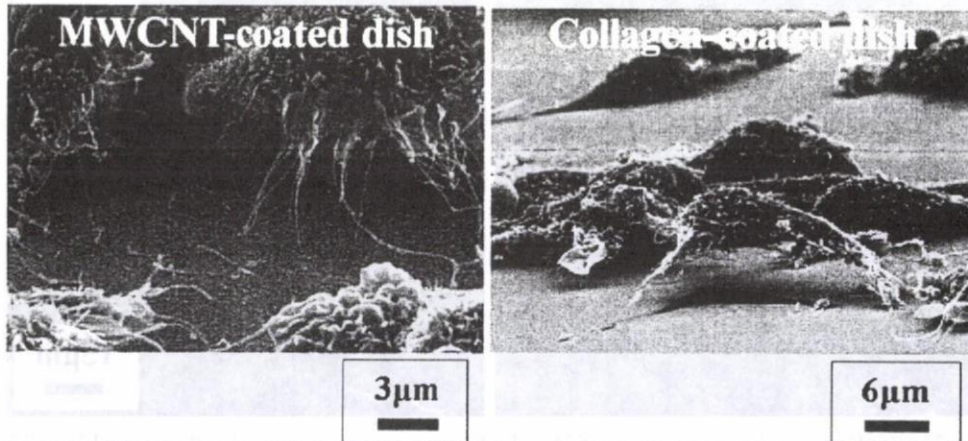


Fig. 8 SEM images of MC3T3-E1 cells treated with 0.02% Trypsin-EDTA for 1 to 2 minutes on the surface of a collagen- and MWCNTs-coated dish.

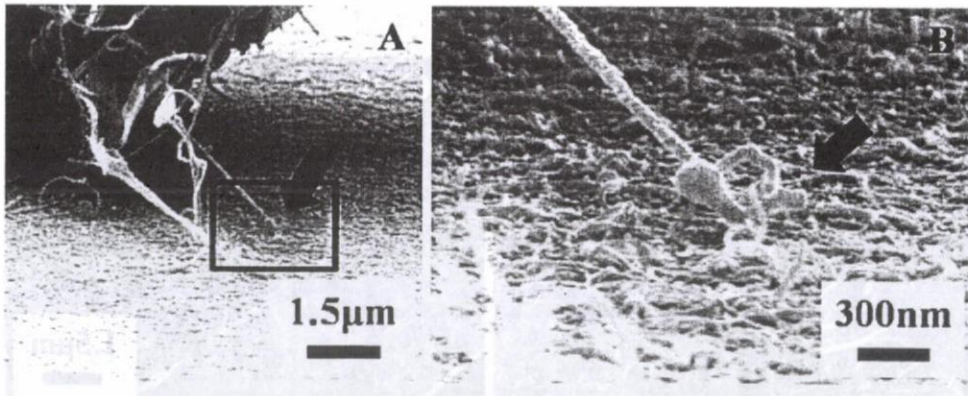


Fig. 9 SEM images of mechanical coupling of filopodia on an MWCNT-coated dish
 A: low magnification view, B: enlargement of the square in A.
 The arrow: mechanical coupling between filopodia and MWCNTs.

reinforced collagen. As the mechanism of SWCNT entrapment in collagen, they suggested the blend and interaction between CNTs and collagen fibrils. In the present study, MWCNTs were homogeneously coated on collagen-coated cell culture dishes and cover glass. The coated MWCNTs were strongly fixed on the collagen-coated surface. Thus, strong entrapment of MWCNTs by collagen would also have occurred via a similar mechanism.

The prepared MWCNT-coated dishes showed good transparency and conventional optical microscopic observation could be easily carried out. Usually, cell culture studies on CNTs were carried out on the CNTs membranes which have no optical transparency. Therefore the observation of cells on CNT membranes should be carried out by SEM. Our MWCNT-coated dishes had a densely packed MWCNT surface with optical transparency, and optical microscopic observation of cells cultured on MWCNTs became possible. Thus, they would be suitable MWCNT substrate for cell culture study on MWCNTs.

The proliferation and viability of the cells on the MWCNT-coated dish were slightly lower than those on the collagen-coated dish as shown in Fig. 3 and Fig. 4. In addition, the cells on the MWCNT-coated dish were widely extended on that dish surface (Fig. 5). The cell adhesion on the MWCNT-coated dish was quite strong as shown in Fig. 7. Aoki *et al.*⁸⁾ reported that the cells on an MWCNT membrane were strongly attached and were not detached by trypsin treatment. That was in good agreement with our results. As shown in Fig. 9, mechanical contact between MWCNTs and pseudopods of the cells was observed. Aoki *et al.*⁸⁾ and Zanella *et al.*¹⁴⁾ also reported the same mechanical contact of bone cells cultured on MWCNTs. This mechanical binding would be one reason for the high adhesion, and the large specific surface area of MWCNTs would also be effective to increase the adhesion.

There were many reports of the interaction between SWCNTs and MWCNTs and variety of cells. Hu *et al.*⁹⁾ reported good neural cell viability on MWCNTs deposited on the polyethyleneimine-coated cover glass. Aoki *et al.*⁸⁾ and Zanella *et al.*¹⁴⁾ reported the comparison of bone cell proliferation on various CNTs. Aoki *et al.*⁷⁾ found the highest cell proliferation and viability on the SWCNT membranes. Those for MWCNTs were lower than for SWCNTs but higher than for graphite particles. Zanella *et al.*¹⁴⁾ also reported higher cell proliferation on SWCNTs than on MWCNTs, but the osteoblasts cultured on MWCNTs showed an osteocyte-like shape. That suggested the differentiation of osteoblasts on MWCNTs. Thus the interaction between various cells and CNTs was strongly interested. However, most of CNTs substrates had no optical transparency, and

then cell observation should be carried with SEM. This means the difficulty of the conventional cell observation *in situ* with optical microscope while cell cultured. Our aim was to prepare the CNTs based cell culture substrate which is applicable for ordinary cell culture and optical microscope observation. The obtained MWCNT-coated dish in this study had densely MWCNT-coated surface with good optical transparency. Then, cell morphology and behavior on MWCNTs while cultivation could be observed with optical microscope *in situ*. The cell proliferation and viability of the cells on those dish was comparable to those of the collagen-coated dish which is known as the one of the best substrate for cell culture. In addition, cell adhesion on the MWCNT-coated dish was extremely stronger than the collagen-coated dish. The preparation of the present MWCNT-coated cell culture materials was quite simple and it would be applicable for other carbon nanomaterials e.g. SWCNTs or carbon nanohornes. Thus, the feasibility of the MWCNT-coated dish for the application of cell culture on the MWCNTs and other carbon nanomaterials was suggested.

The MWCNT-coated dish prepared in the present study would provide cell proliferation and viability of the cells comparable to those of the collagen-coated dish. And cell adhesion on the MWCNT-coated dish was extremely stronger than the collagen-coated dish. The collagen-coated dish is one of the best substrates for cell culture. The preparation of the present MWCNT-coated cell culture materials was quite simple and showed good transparency. Thus, the feasibility of the MWCNT-coated dish for cell culture was suggested.

CONCLUSION

Carboxylated MWCNTs were homogeneously coated on collagen-coated cell culture dishes. The MWCNTs were strongly entrapped on the collagen-coated dish surface and the dishes had good optical transparency. Thus, *in situ* optical microscope observation of cultured cells on the MWCNTs was possible. The viability and proliferation of MC3T3-E1 cells on MWCNT-coated dishes were comparable to those on dishes coated with collagen, which is one of the most appropriate substrates for cell culture. The MWCNT-coated dishes had high cell viability comparable to that on collagen-coated dishes, and the cell adhesion on the MWCNT-coated dishes was quite strong compared to that on the collagen-coated dishes. SEM images suggested that one of the reasons for the strong cell adhesion on MWCNT-coated dishes was the mechanical contact between MWCNTs and pseudopods. Therefore, the coating of carboxylated MWCNTs on collagen-coated dishes will be useful not only for *in situ* cell observation on CNTs but also for

the improvement of cell adhesion.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by Research on Advanced Medical Technology in Health and Labour Sciences Research Grants from the Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan.

REFERENCES

- Price RL, Waid MC, Haberstroh KM, Webster TJ. Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. *Biomaterials* 2003; 24: 1877-1887.
- Hu H, Ni Y, Montana V, Haddon RC, Parpura V. Chemically functionalized carbon nanotubes as substrates for neuronal growth. *Nano Lett.* 2004; 4: 507-511.
- McKenzie JL, Waid MC, Shi R, Webster TJ. Decreased functions of astrocytes on carbon nanofiber materials. *Biomaterials* 2004; 25: 1309-1317.
- Correa-Duarte MA, Wagner N, Rojas-Chapana J, Morszeck C, Thie M, Giersing M. Fabrication and biocompatibility of carbon nanotube-based 3D networks as scaffolds for cell seeding and growth. *Nano Lett.* 2004; 4: 2233-2236.
- MacDonald RA, Laurenzi BF, Viswanathan G, Ajayan PM, Stegemann JP. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res., Part A* 2005; 74A: 489-496.
- Hu H, Ni Y, Mandal SK, Montana V, Zhao B, Haddon RC, Parpura V. Polyethyleneimine functionalized single-walled carbon nanotubes as a substrate for neuronal growth. *J. Phys. Chem. B* 2005; 109: 4285-4289.
- 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.
- Aoki N, Akasaka T, Yokoyama A, Nodasaka Y, Akasaka T, Uo M, Sato Y, Thoji K, Watari F. Cell culture on a carbon nanotube scaffold. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2005; 1: 402-405.
- Jan E, Kotov NA. Successful differentiation of mouse neural stem cells on layer-by-layer assembled single-walled carbon nanotube composite. *Nano Lett.* 2007; 7: 1123-1128.
- Ajima K, Yudasaka M, Maigné A, Miyawaki J, Iijima S. Effect of functional groups at hole edges on cisplatin release from inside single-wall carbon nanohorns. *J. Phys. Chem. B* 2006; 110: 5773-5778.
- Feazell RP, Nakayama-Ratchford N, Dai H, Lippard SJ. Soluble single-walled carbon nanotubes as longboat delivery systems for platinum (IV) anticancer drug design. *J. Am. Chem. Soc.* 2007; 129: 8438-8439.
- Wang W, Watari F, Omori M, Liao S, Zhu Y, Yokoyama A, Uo M, Kimura H, Ohkubo A. Mechanical properties and biological behavior of carbon nanotube/polycarbosilane composites for implant materials. *J. Biomed. Res., Part B* 2007; 82B: 223-230.
- Usui Y, Aoki K, Narita N, Murakami N, Nakamura I, Nakamura K, Ishigaki N, Yamazaki H, Horiuchi H, Kato H, Taruta S, Kim YA, Endo M, Saito N. Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects. *Small* 2008; 4: 240-246.
- Zanello LP, Zhao B, Hu H, Haddon RC. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Lett.* 2006; 6: 562-567.
- Peng H, Alemany LB, Margrave JL, Khabashesku VN. Sidewall carboxylic acid functionalization of single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 15174-15182.
- Ishibashi A, Nakashima N. Individual dissolution of single-walled carbon nanotubes in aqueous solutions of steroid or sugar compounds and their roman and near-ir spectral properties. *Chem. -Eur. J.* 2006; 12: 7595-7602.

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノ微粒子の体内動態可視化法の開発

(課題番号 : H18-化学-一般-006)

平成20年度冬期

第5回研究成果発表会

(平成20年度第5回研究班会議)

日時 : 平成21年2月20日～21日

場所 : 苫小牧市「ホテル ニドム」

平成 20 年度 研究組織

北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 教授
 〔主任研究者〕

巨理 文夫

〔分担研究者〕

北海道大学大学院環境科学研究科 教授
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 教授
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 教授
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 教授
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 教授
 北海道大学大学院地球環境科学研究科 教授
 北海道大学大学院工学研究科 教授
 北海道大学大学院医学研究科 准教授
 九州大学大学院歯学研究科 教授
 広島大学大学院医薬学総合研究科 教授
 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 教授

田路 和幸
 戸塚 朝明
 楳山 敬朗
 北川 善政
 朝倉 清高
 古月 文志
 大貫 惣明
 遠山 晴一
 石川 邦夫
 岡崎 正之
 浅岡 憲三

〔研究協力者(順不同)〕

北海道大学 エネルギー安全科学国際研究センター 研究支援者
 北海道大学大学院工学研究科 教授
 北海道大学 名誉教授
 名古屋工業大学 名誉教授
 北海道大学 名誉教授
 石巻専修大学大学院理工学研究科 教授
 (財) ファイセンセラミックスセンター 主任研究員
 (財) ファイセンセラミックスセンター 副主任研究員
 (独) 理化学研究所
 九州大学大学院歯学研究科 助教
 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授
 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 助教
 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 助教
 徳島大学ヘルスバイオサイエンス研究部 准教授
 東京大学 大学院理学系研究科 准教授
 名古屋工業大学都市循環システム工学専攻 助教
 東北大学大学院環境科学研究科 助教
 フルカー・ダルトニクス株式会社
 名古屋大学大学院工学研究科 教授
 広島大学大学院医薬学総合研究科 助教

大森 守
 橋田 俊之
 矢田 慶治
 奥山 文雄
 久保木 芳徳
 芳賀 信幸
 水野 峰男
 橋本 雅美
 市野瀬 英喜
 竹内 あかり
 植野 哲
 細木 真紀
 日浅 雅博
 山下 菊治
 米澤 直
 林 靖彦
 佐藤 義倫
 重澤 崇
 田中 信夫
 平田伊佐雄

北海道大学エネルギー変換マテリアル研究センター 准教授
 北海道大学大学院医学研究科 運動機能再建医学分科 助教
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 教授
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 准教授
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 教授
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 准教授
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 准教授
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 助教
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 助教
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 助教
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 助教
 北海道大学大学院歯学研究科 中央研究部 助教
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 歯科医師
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 専門研究員
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔健康科学講座 外国人特別研究員
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔病態学講座 大学院生
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 大学院生
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 大学院生
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 大学院生
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 大学院生
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 大学院生
 北海道大学大学院歯学研究科 口腔機能学講座 大学院生
 北海道大学大学院工学研究科 研究員
 北海道大学大学院地球環境科学研究科 大学院生
 北海道大学大学院地球環境科学研究科 大学院生
 北海道大学大学院地球環境科学研究科 大学院生
 北海道大学大学院地球環境科学研究科 大学院生
 韓国 全北大学校 准教授

坂口 紀史
 小野寺 伸
 川浪 雅光
 菅谷 勉
 八若 保孝
 加我 正行
 宇尾 基弘
 赤坂 司
 阿部薫明
 高師 則行
 野田坂佳伸
 大塚 太一
 朱 馮赫
 Xiaoming Li
 寺田 典子
 石川 秋佑
 伊藤 佐智子
 松岡 真琴
 平田 忠理
 北原浩美
 王 永明
 林 春
 藤井 明洋
 譚 曉明
 高廣 充
 Minho Lee

平成 20 年度冬期 第 5 回研究成果発表会プログラム

(平成 20 年度第 5 回研究会議)

平成 21 年 2 月 20 日 (金)

13:00~13:15

研究組織の紹介
研究全般について

「ナノ微粒子体内動態可視化法の開発」

北海道大学大学院歯学研究科生体理工学教室
巨理 文夫

13:15~13:25

「Ni-Ti 合金およびステンレス鋼の腐食生成物の状態分析」

○宇尾基弘、巨理文夫 (北大院歯学研究科)
朝倉清高 (北大触媒科学研究センター)
淺岡憲三 (徳島大ヘルスバイオサイエンス)

13:30~13:40

「ミクロンからナノ・オーダーへの人工細胞外マトリックス幾何学」(3):
「トネル構造」の血管と骨の誘導効果と最適空間論について

北海道大学名誉教授¹、北海道医療大学歯学部²
北海道医科大学客員教授³、(株)バイロットコーポレーション⁴
○久保木芳徳¹、寺田典子²、北川善政³、賀来 亨⁴
部小兵¹、高山満利子¹

13:45~13:55

「カーボンナノチューブの細胞培養担体およびインプラント材料表面改質への応用」

北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔診断内科学教室
○寺田典子、北川善政
北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座生体理工学教室
宇尾基弘、巨理文夫

14:00~14:10

「カーボンナノチューブとアルミナとから生体材料適用可能な複合材料の開発」

○阿部英明、赤坂司、宇尾基弘、巨理文夫
北海道大学大学院工学研究科：大森 守、橋田俊之
東北大学流体科学研究所：山本 剛
東北大学金属材料研究所：大久保昭、木村久道

14:15~14:25

「Effect of carbon nanotubes on cellular functions in vitro」

○Xiaoming Li¹, Hong Gao², Motohiro Uo³, Yoshimori Sato⁴,
Tsukasa Akasaka¹, Shigeaki Abe¹, Qingling Feng⁵, Fu-zhai Cui¹, Fumio Watari¹

¹ Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Japan; ² Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Japan; ³ Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, Japan; ⁴ Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, China

14:30~14:40

「カーボンナノチューブディスプレイ上での細胞培養」

北海道大学大学院歯学研究科
○松岡真琴、赤坂司、戸塚靖明、巨理文夫
株式会社名城ナノカーボン
橋本剛

14:45~15:00 休憩

15:00~15:10

「Surface characteristics of chemically treated Ti-10Ta-10Nb alloy for dental implant」

○Min Ho Lee¹, Fumio Watari²
¹ Department of Dental Biomaterials, Institute of Oral Bioscience and Brain Korea 21, School of Dentistry, Chonbuk National University,
² Biomedical, Dental Materials and Engineering, Department of Oral Health Science, Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University.

15:15~15:25

「カーボンナノチューブによる細菌吸着と細胞培養」

北海道大学大学院歯学研究科
○赤坂 司、横山 敦郎、松岡 真琴、阿部 英明、宇尾 基弘、巨理 文夫
東北大学 大学院環境科学研究科 佐藤 義倫、田路 和幸
株式会社 名城ナノカーボン 橋本 剛

15:30~15:40

ヒップシミュレータ試験により発生したポリエチレン摩耗物の形態解析

(財)フアインセラミックスセンター
材料技術研究所
○橋本雅美、水野峰男、北岡諭

15:45~15:55

「各種マイクロ・ナノ粒子の体内動態の追跡・可視化」

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座
○阿部英明、赤坂司、宇尾基弘、巨理文夫
北海道大学名誉教授、(株)高研バイオサイエンス
久保木芳徳

16:00~16:10

「炭酸アパタイト・コラーゲン複合体の骨再生能に関する材料学的考察」

広島大学大学院医歯薬学総合研究科
○岡崎正之、平田伊佐雄

16:15~16:25

「Ti 合金の腐食と免疫応答」

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 生体材料工学分野
○日浅 雅博 浅岡 憲三

16:30~16:45 休憩

16:45~16:55

「微量金属元素の血管新生への影響について (*in vitro*)」
大阪歯科大学歯科理工学講座, 2 同 麻酔学講座

○今井弘一, 白田義弘, 武田昭二

17:00~17:10

「ナノ起伏/結晶構造を有する骨伝導性酸化チタン層の創製」

九州大学大学院 歯学研究科
○都留寛治・石川邦夫

岡山大学大学院 自然科学研究科
城崎由紀・早川 聡・尾坂明義

17:15~17:25

「コラーゲン内に形成される石炭化微粒子の検出」

徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部
○山下菊治・石川達夫・角田佳折・阿部佳織・二宮雅美・北村清一郎

17:30 終了

平成21年2月21日(土)

9:00~9:10

「イメージング質量分析を用いた生体組織観察(5)」

ブルカー・ダルトニクス株式会社
○菅澤 崇

東北大学 大学院環境科学研究所
佐藤 義倫・田路 和幸

9:15~9:25

「肝臓細胞の増殖におよぼすカーボンナノチューブの影響について」

北海道大学大学院歯学研究科
伊藤佐智子, 赤坂 司, ○八若保孝, 巨理文夫

9:30~9:40

「X線化学顕微鏡の開発」

北海道大学触媒化学研究センター
○朝倉清高・宮本剛志・新美大伸・鈴木秀士

9:45~9:55

「カーボンナノチューブコートした3次元培養細胞の作製と評価」

○平田恵理, 宇尾基弘, 巨理文夫, 植山敦郎
1) 北海道大学大学院歯学研究科口腔機能補綴学講座
2) 北海道大学大学院歯学研究科生体理工学講座

10:00~10:10

「ハイドロキシアパタイト含有鼠の異なる

ナノハイドロキシアパタイトコーティング複合体のBMP 担体としての有効性」

北海道大学大学院歯学研究科
○天雲太一・菅谷勉・川浪雅光・巨理文夫

10:15~10:25

「SALDI-MSに適した新規白金ナノ構造体」

東京大学大学院理学系研究科
○米澤 徹

10:30~10:45 休憩

10:45~10:55

「ポリエチレン微粒子により惹起される異物性炎症反応の
バイオイメージングによる可視化に関する研究」

北海道大学大学院医学研究科
運動機能再建医学分野
○小野寺伸, 遠山晴一, 安田和則

11:00~11:10

「環境セルによる化合物分解過程のその場観察と高圧顕微鏡への適用」

北海道大学大学院工学研究科
○大貫惣明, 平澤寛子, 小野晃史
王 沐明, 濱田弘一, 橋本直幸

11:15~11:25

MWCNT induced oxidative stress and vacuolar structure changes to *Arabidopsis* T87 suspension cells」

1) 北海道大学大学院地球環境科学科, 2) 雲南農業大学, 3) 北海道大学大学院歯学研究科
Chun Lin, Bunshi Fugetsu, ○Youbo Su, Fumio Watanabe

11:30~11:40

「イモゴライトスキヤホーランドが骨芽細胞機能へ与える影響」

1) 北海道大学大学院 歯学研究科 口腔機能学講座 小児・障害者歯科学教室
2) 北海道大学大学院 歯学研究科 口腔健康学講座 生体理工学教室
3) 産業技術総合研究所 地圏資源環境研究部門 地上環境機能研究グループ
○石川勉, 赤坂司, 鈴木正哉, 八若保孝, 巨理文夫

11:45~11:55

今後の方針について

北海道大学大学院歯学研究科
巨理 文夫

12:00~12:30

全体討論

12:35 終了

Ni-Ti合金およびステンレス鋼の腐食生成物の状態分析

○宇尾 基弘、瓦理 文夫 (北大院 歯学研究所)
 朝倉 清高 (北大触媒科学センター)
 淺岡 憲三 (徳島大ヘルスサイエンス)

1. 目的

Ni-Ti合金はその超弾性や形状記憶特性を生かして歯科矯正用ワイヤーやカテーテルガイド、ステントなど医療分野に応用されている。一般的には耐食性に優れるとされるNi-Ti合金であるが、生体内で水素吸蔵により腐食し、微粒子状の腐食生成物を生じる可能性が示唆されている¹⁾。そこで本研究では生理食塩水中などでNi-Ti合金を陰極として電気分解を行い、水素発生条件下で腐食させた同合金の腐食生成物の XANES スペクトルを測定し、腐食生成物の状態分析を行った。また比較のため SUS316L を同条件で水素チャージ下で腐食生成物を発生させ、Fe, Ni, Cr の状態を検討した。

2. 方法

研磨した Ni-Ti 線 (0.5mmφ) を陰極として、下記の条件で電気分解し、水素チャージを行い、発生した腐食生成物粒子を乾燥、デンプン中で希釈、成形後に KEK-PF BL-9A において Ti 及び Ni K-edge XANES スペクトルを透過法で測定した。

Fig. 1 Ni-Ti合金の水素チャージ装置図

試料#1 : 0.9% NaCl aq ; 電圧 = 3V ~ 10V まで 0.1V/min で昇圧

試料#2 : 0.9% NaCl aq ; 電圧 = 3V ~ 24時間

試料#3 : 0.9% NaCl aq を HCl 添加により pH2 に調整 ; 電圧 = 2V ~ 24時間

また一部試料については SEM-EDS による元素分析を行った。

3. 結果及び考察

得られた Ti K-edge XANES スペクトルを Fig. 1 に示す。Ti は anatase などの通常の酸化物はやや異なるスペクトルとなり、TiO₂ の Lepidocrocite 様の層状化合物 (Fig. 2, 3) に近いと考えられた。NaCl 溶液中で電気分解を行っていることから、チタン酸ナトリウム形成も考えられ、同化合物が行ったような Lepidocrocite に近い層状構造を持っており、XANES スペクトルも類似していることが知られている。Table 2 は腐食生成物中の Ni 量の分析を SEM-EDS により行った結果であり、Ti に比べて Ni 量が少ないことから、チタン酸ナトリウムの分析の可能性は低く、Ti は Lepidocrocite 型の TiO₂ として存在すると推定された。また腐食生成物中の Ni は主として水酸化物と推定され、一部酸化物の混在が推定された。水素チャージする溶液を食塩水と塩酸性の水溶液に変化した場合でも、XANES スペクトルには大きな変化はなく、Ni と Ti の状態は電気分解する溶液によらず、ほぼ同様であると推定された。また各吸収端における吸光度比は 0.9% NaCl 水溶液中で水素チャージした生成物では Ni/Ti の吸光度比が 0.3~0.8 であったのに対し、HCl を添加して酸性とした場合には Ni/Ti が約 0.03 と極めて Ni が少なく、酸性条件下での Ni-Ti の腐食生成物が TiO₂ 主体であり、Ni は水溶液中に溶解した状態であると推定された。SUS316L では Fe, Ni は水酸化物の状態で見出されたが、Cr は腐食

生成物からは検出されなかった。また生成物量も Ni-Ti 合金と比較して極めて少なく、SUS316L の高い耐食性が確認された。

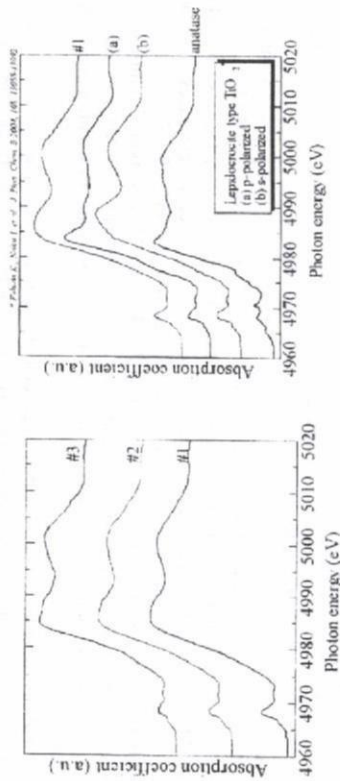


Fig. 2 試料#1~#3のTi K-edge XANESスペクトル(左)とアナターゼおよびレピドクロサイト型TiO₂の XANESスペクトルとの比較(右)

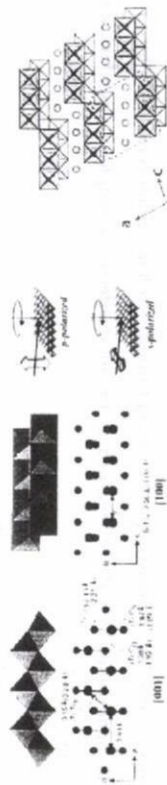


Fig. 3 レピドクロサイト型TiO₂の構造(●:Ti, ○:O) 右はFig. 2中のXANESスペクトル測定時の分極条件³⁾

Fig. 4 Na₂Ti₂O₇(単斜晶)の構造

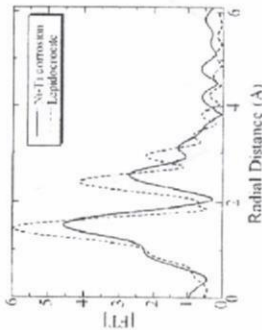


Fig. 5 試料#2のTi K-edge EXAFS スペクトルのフーリエ変換 (波線は Lepidocrocite)

Table 1 SEM-EDSによる試料#2の元素分析 (スタンダードレス ; 酸染は除く)

元素	Na	Ti	Ni
Atom%	1.5	45.7	52.7

ミクロンからナノ・オーダーへの「人工細胞外マトリックス幾何学」(3) ;

「トンネル構造」の血管と骨の誘導効果と最適空間論について

図

Diagram of osteo- and vasculo-genesis in honeycomb β -TCP

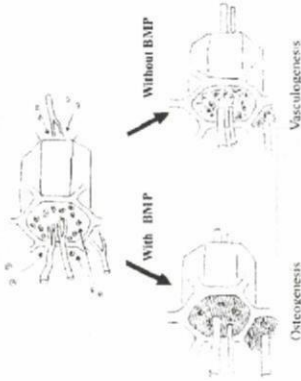


Figure: One of the remarkable phenomena found in this study was the straight capillaries formation without BMP by the mere implantation of cylinder-type honeycomb β -TCP. This study is the first demonstration by straight tunnels in honeycomb ceramics. Thus, tunnels in the honeycomb β -TCP are regarded as the most effective example of vasculature-inducing geometry (1-7).

4. 人工ECM幾何学に関する文献

1. 久保木芳徳, 滝田裕子, 吉本良太, 賀来亨; 人工細胞外マトリックスの幾何学, ティッシュエンジニアリング 2006, 田畑泰彦, 岡野光夫, 編集, 日本医学館, 東京, 24-33.
2. 久保木芳徳, 郁小兵, 滝田裕子, 吉本良太, 賀来亨; 人工細胞外マトリックスの幾何学の統一原理, 再生医療 3: 20-30, 2006
3. 久保木芳徳, 藤澤隆一, 滝田裕子; 人工細胞外マトリックス, ティッシュエンジニアリング 2007, 田畑泰彦, 岡野光夫, 編集, 日本医学館, 東京, 101-108.
4. Kuboki Y, Jin Q, Takita; Geometry of carriers controlling phenotypic expression in BMP-induced osteogenesis and chondrogenesis. J Bone Joint Surg Am. 2001;83-A Suppl 1(Pt 2):S105-15.
5. Kawakami T, Kuboki Y, Tanaka J, Hijikata S, Akazawa T, Murata M, Fujisawa R, Takita H, Arisue M; Regenerative medicine of bone and teeth - with special references to biological principles, problems and indicators. J Hard Tissue Biology 16 (3): (2007) 95-113.
6. Kuboki Y, Iku, S., Yoshimoto, R., Kaku, T. and Takita, H.; Modification of titanium surfaces based on the principles of geometry of the artificial extracellular matrix (ECM). In Tanaka, J. and Itoh, S. (Eds) Modification of the Biomaterials for Clinical Application, Research Signpost, Kerala, India, 2009 in Press.
7. Ichinohe N, Kuboki Y, Tabata Y; Bone regeneration using titanium nonwoven fabrics combined with FGF-2 release from gelatin hydrogel microspheres in rabbit defects. Tissue Eng Part A 2008, Oct; 14 (10): 1663-171

北海道大学名誉教授¹, 北海道医療大学歯学部², 北海道大学歯学研究所³, 新郷医科大学客員教授⁴, (株)パイロットコーポレーション⁵
○久保木芳徳¹, 寺田典子², 北川善政³, 賀来亨³, 郁小兵⁴, 高山満利子⁵

1. 目的

医療目的で、局所的に骨を効率よく再建するスキヤフォールドの構造を追求してきた結果、私たちは「人工細胞外マトリックスの幾何学」に到達した(1-7)。この理論によれば、組織の再建には、①細胞、②細胞外マトリックス (ECM)、③制御因子、④栄養供給、⑤力学刺激という5大要素の統合が必要である。そのうち人工の細胞外マトリックス (人工ECM) については、最適な3次元幾何構造がとくに重要である。骨と血管の形成に最適空間の一つをハニカム構造のトンネルであるが、我々は既にその最適直径を決定した(厚さ1mmのハニカム型 β TCPの場合、最適直径は、75 μ m)。今回は、長軸方向に伸びた円柱状ハニカムを用いて骨誘導タンパク質 (rhBMP-7) 存在と非存在下での、骨と血管の誘導現象を比較する。

2. 実験方法

縦方向に直径300 μ mの円形トンネルを37本備えた円柱で、外側の直径は3mm、長さは4mmおよび10mm、2種類のハニカム型 β TCPを作製した。これらの人工ECMを、BMP添加及び非添加で、ラットの皮下に埋植し、2週後に摘出して組織学的に観察した。

3. 結果

BMP添加群では、4mm長のハニカムのトンネル内に、骨と血管が、トンネルの長軸に並行して成長している。このような、骨と血管の成長は血管を中心にして、それを取り囲むようにして骨が成長している。従って、毛細血管の10-40 μ mの間隔を置いて骨芽細胞が、新生骨の上に規則的に配列し、骨を形成しているのが明確に観察できる。血管・骨の間隔を置いて骨芽細胞の前駆細胞と、血管の前駆細胞(未確認)が存在した。一方、BMP非添加群では、埋植後2週間に血管のみが顕著に長軸方向に新生することを見出した。

4. 考察と結論

長軸ハニカムのトンネル構造は、BMPがあれば骨を、なくとも血管のみを誘導するという今回の発見は、人工ECM幾何学の新しい顕著な実証であり、このような「トンネル効果」は骨、血管のみならずおそらくは神経の再生にも有用であることが期待される。

カーボンナノチューブの細胞培養担体およびインプラント材料表面改質への応用

北海道大学大学院歯学研究科口腔病態学講座口腔診断内科学教室

○寺田典子・北川善政

北海道大学大学院歯学研究科口腔健康科学講座生体理工学教室

宇尾基弘・亘理文夫

1. 緒言

カーボンナノチューブ(CNTs)は、化学的安定性、機械的強度、電気的特性に優れ、高い生体適合性も推測されており、多方面での応用が期待されている。そこで我々はCNTsをcollagen-coated dish表面にコートさせ、新たな細胞培養担体を開発し、その培養特性を評価した。さらに同dishの作製技術を歯科用インプラントで主に用いられるチタンに応用し、チタンへの細胞付着性を向上させることを目的とした。

2. 多層カーボンナノチューブを用いた細胞培養担体の開発

精製多層CNTs(MWCNTs)に水懸基を付与し、100ppmとなるようコールゲルナトリウム水溶液に均一分散後、collagen-coated dishに3時間作用させ、MWCNTsを凝集体なく均一にコートさせたMWCNT-coated dishを得た(図1)。得られたdishは、高い透光性をもち、従来のCNTsを用いた担体では困難であった光学顕微鏡観察が可能となった。また、良好な細胞増殖、細胞活性を認め、通常では細胞が剥離するtrypsin-EDTAを用いた細胞付着性試験ではMWCNT-coated dish上の細胞が多く残存していた(図2)。

3. 多層カーボンナノチューブのチタンへの付着応用

鏡面研磨チタン板をアミノ化し、アテロコラーゲンを付着させ、MWCNT-coated dishの作製法と同条件でMWCNTs分散液を作用させたところ、MWCNTsは凝集体なく均一にコートされたMWCNT-coated Ti plate(図3)。MWCNTsはコラーゲンを介しチタン表面に強くコートされ、通常培養操作では剥離しなかった。また、このコーティング層の厚みは150-300nmで、MWCNT-coated Ti plateの表面粗さはMWCNTsにより有意に増加した。MWCNT-coated Ti plateにもdish同様、良好な細胞増殖と高い細胞付着性が認められた(図4)。

4. まとめ

適切に処理したMWCNTs分散液を用いることにより、MWCNTsを均一に凝集体なく付着させたMWCNT-coated dishおよびTi plateを作製することが可能であった。両者のコート物は洗浄、培養処置、トリプシン処置で剥離することはなく安定し、高い細胞親和性を示したことから、細胞培養に応用することが可能であると考えられた。MWCNT-coated dishとTi plateの付着性は、細胞とMWCNTsの機械的結合だけでなく、MWCNTsによる比表面積の増大やMWCNTsのカルボキシル化が細胞接

着因子をより多くMWCNTsに吸着させたことによると推測された。

MWCNT-coated dishの高い細胞付着性は、通常の培養担体には付着、培養しにくい細胞も付着させる可能性を示唆するものであった。また、一般にCNTsから成る細胞培養担体は光学的に不透明であるが、本MWCNT-coated dishは、光学顕微鏡観察が可能な新たな細胞培養用担体となりえる可能性が示唆された。MWCNT-coated Ti plateの高い細胞付着能から、細胞接着能を有した表面を持つチタン製インプラントの開発に応用できる可能性が示唆された。

図1 MWCNT-coated dishの透光性と、その基質表面のSEM像

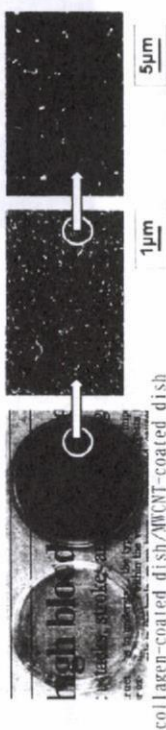


図2 MWCNT-coated dishの細胞付着性

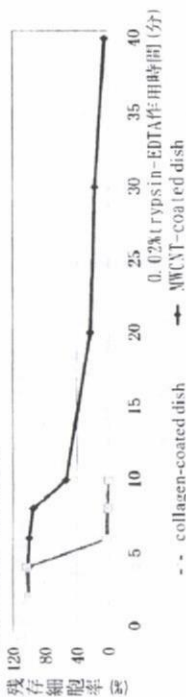


図3 MWCNT-coated Ti plateの表面SEM像



図4 MWCNT-coated Ti plateの細胞付着性 (0.02% trypsin-EDTA作用)

残存細胞 (%)	collagen coated Ti plate	MWCNT coated Ti plate
0 %		
9 %		

カーボンナノチューブとアルミナとから生体材料適用可能な複合材料の開発

東北大学大学院工学研究科：O大森 守、橋田俊之

東北大学流体力学研究所：山本 剛

東北大学金属材料研究所：大久保昭、木村久道

1. 緒言

人口の高齢化への傾斜により、健康的かつ経済的な生活を保障するため、医療技術の一段の進歩が求められている。人口関節に關しては、一年間に日本においては約6万件の手術が行われている。この人工関節の最も重要な部分は滑動部のライナーである。このライナーは超高密度ポリエチレンで作られているが、金属製のヘッドとの摩擦により一年間に約0.3mm消費されるため、平均の耐用年数は15年とされている。この超高密度ポリエチレンに代わるライナーの開発が、アルミナやジルコニアのセラミックスから、さらには金属とセラミックスとの複合材料を使って試みられているが、まだ成功の段階に達していない。これらの材料は耐摩耗性に優れているが、潤滑性に問題を有している。

カーボンナノチューブは炭素で構成され、電気伝導性、潤滑性、熱伝導性、電磁波吸収に優れた材料である。特に潤滑性は他の材料にはほとんど期待できない優れた特質である。アルミナは価格が低い強度特性と耐摩耗性に優れた汎用性のセラミックスである。この二つの物質を組み合わせ複合材料が合成できれば、優れた特性を持つライナーになるかと期待でき、カーボンナノチューブに対しては生体毒性の問題の指摘もあるが、炭素自体には生体毒性はなく熱分解黒鉛の弁への適用例もある。アルミナについてはすでに人口骨として生体材料への応用研究がなされてきている。このカーボンナノチューブ-アルミナ複合材料を生体材料に適用する研究は、日本においても科学技術振興機構のプロジェクトとして、課題名「ナノバイオテクノロジーによる高機能人工関節滑動部材の研究開発」(19年6月～22年3月、日本メテカイルマテリアル(株)他)で進行している。このプロジェクト研究も含めてアルミナの原料にアルミナ粉が使用されている。しかし、本研究ではアルミナ粉に代え、加熱によりこれを生成する水酸化アルミニウムを原料にした。次いで、カーボンナノチューブについても検討し、工業製品に使用できる安価な多層カーボンナノチューブには2種類あることが分かった。すなわち、その一つは中空のシリンドラの直径が小さく、黒鉛シートとの巻き数の少ない肉厚多層カーボンナノチューブである。もう一つは、中空のシリンドラの直径が大きく、黒鉛シートとの巻き数の多い肉厚多層カーボンナノチューブである。水酸化アルミニウムと2種類の多層カーボンナノチューブを使い2種類の複合材料の合成を行い、アルミナ中へのカーボンナノチューブの分散状態の中心的観点から複合材料を評価した。

2. 実験方法

実験に使用した多層カーボンナノチューブの一つはアメリカのナノラボ社の製品の肉厚多層カーボンナノチューブ(直径20-40nm)であり、もう一つは日本のナノカーボンテクノロジーズ社の製品である肉厚多層カーボンナノチューブ(直径40-90nm)である。カーボンナノテクノロジーズ社の製品の純度は99.5%以上であり、金属や非金属質炭素をほとんど含んでいない。ナノラボ社の製品の純度は70%以上であり、非金属炭素と金属(主に鉄)とが含まれている。これらを除くため中空での熱処理と酸処理を行った。焼結中に起るアルミナの粒成長を抑制するために、添加剤としてシリカの前駆体であるシリカゲル(SiO₂nH₂O)(和光純薬製)を使用した。これらと水とからスラリーを作り混合した。このスラリーを乾燥後、放電プラズマ焼結機(SPS シンテックス、SPS-1050)を使って、真空中において20MPaの加圧下のもと、1500℃で焼結して複合材料を得た。比較のためにアルミナ粉(住友化学製、AKP-30、平均粒径0.3μm)を用い、上記と同じ条件で焼結体を作製した。

焼結した複合材料について、水を使ったアルキメデス法にてかさ密度を測定した。直径10mm、厚さ3mmの試料を用い、超音波探傷機(日立建機製、ATS100)とディジタルストレージコープ(岩

崎通信機製、DS6411)を使って、超音波パルス法にてヤング率とポアソン比の測定を行った。2x3x25mm³の試料について、万能試験機(インストロン製、5582)を用い、スパン20mmで3点曲げ試験を行った。複合材料の破壊靭性値は、ノッチドビーム法を用い、スパン12mmにて3点曲げ試験を行い求めた。破断面を走査型電子顕微鏡(SEM)(日本電子製、JFM-6500F)を用いて観察した。

3. 結果および考察

3-1. 肉厚多層カーボンナノチューブ-アルミナ複合材料

水酸化アルミニウムから生成する複合材料では、アルミナの結晶が異常に成長して強度が低下するたため、これを抑制する目的でシリカが酸化マグネシウムを1mass%添加した。肉厚多層カーボンナノチューブと、アルミナに1mass%のシリカを添加した原料から得られた複合材料では、肉厚多層カーボンナノチューブが凝集したままアルミナマトリックス中に分散している。このため、この凝集した肉厚多層カーボンナノチューブにより強度と靭性が低下することになり、複合材料は工業製品として使えないことが分かった。比較的合成の容易と思われ肉厚多層カーボンナノチューブと高分子との複合材料において、凝集を解いて分散するためには大きな困難のあることが報告されている。これまでは世界中の複合材料はこの肉厚多層カーボンナノチューブを使って合成されてきた。

3-2. 肉厚多層カーボンナノチューブ-アルミナ複合材料

肉厚多層カーボンナノチューブとアルミナとから焼結によって得られた複合材料のかさ密度は、肉厚多層カーボンナノチューブのそれに比べて、5mass%添加でも3.55Mg/m³で(肉厚多層カーボンナノチューブ、3.54Mg/m³)と大きく、ヤング率は5mass%の添加でも202GPaと肉厚多層カーボンナノチューブの約2倍となっている。

図1には破壊強度と破壊靭性とを肉厚多層カーボンナノチューブの添加量に対してプロットした。1mass%の添加で強度はアルミナのそれに比べ約30%大きくなり、添加量に対する減少も小さく、5mass%の添加でも、一般的に構造材料の実用化のために必要とされる400MPaの強度を維持している。靭性は0.3mass%添加でアルミナのそれより30%大きくなくなっている。5mass%添加でもアルミナのそれより大きく、肉厚多層カーボンナノチューブを多く添加しても強度と靭性の低下は小さい。

肉厚多層カーボンナノチューブを5mass%添加した複合材料の破断面の透過電子顕微鏡写真を図2に示す。肉厚多層カーボンナノチューブは一本ずつ分散した状態と、長さ10nm以下の細長い塊となつて分散している様子が観察される。ほとんどの肉厚多層カーボンナノチューブは引き抜かれた状態である。この引抜は、複合材料の強度と靭性の向上に寄与している。しかし、その添加量が多くなると塊が多くなり、図1で示されるように機械的性能は低下すると考えられる。今後の課題として、この塊をなくするの大きさを小さくする必要がある。高強度・高靭性で破壊できる複合材料の製造に成功したので、余剰の摩滅係数、磨耗量の測定などを行い、ライナーに適合できる材料の開発を行っていく。

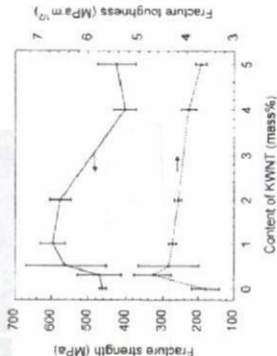


図1 複合材料の肉厚多層カーボンナノチューブと添加量に対する強度と靭性の変化



図2 肉厚多層カーボンナノチューブを5mass%添加した複合材料の破断面の透過電子顕微鏡写真

Effect of carbon nanotubes on cellular functions in vitro

Xiaoming Li¹, Hong Gao², Motohiro Uo¹, Yoshinori Sato³, Tsukasa Akasaka¹,
Shigeaki Abe¹, Qingling Feng⁴, Fu-zhai Cui⁴, Fumio Watari¹

¹ Graduate School of Dental Medicine, Hokkaido University, Japan; ² Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Japan; ³ Graduate School of Environmental Studies, Tohoku University, Japan; ⁴ Department of Materials Science and Engineering, Tsinghua University, China

Introduction

Carbon nanotubes have been shown to affect cell behaviour [1, 2]. But how and why the carbon nanotubes affect potential differentiation of the attached cells have not been largely known. In this study, myoblastic mouse cells (C2C12) were cultured on multi-walled CNTs (MWNTs) compacts, comparing on graphite compacts, with and without the adsorption of FBS in advance. Cell differentiation was examined and compared, as well as cell attachment and proliferation. Meanwhile, we used cell culture on the culture plate as a control.

Materials and Methods

Fabrication of compacts: MWNTs (about 90 nm in diameter) and GP (about 4.5µm in diameter) with the same weight were separately compacted serially in a steel-tool die via a uniaxial pressing cycle.

Cell culture: C2C12 cells were respectively seeded on the samples, with and without adsorbing FBS in advance, with a cell density of 2.0×10^4 per sample in culture plates. Dulbecco's modified Eagle's medium with 10% fetal bovine serum and 1% penicillin/streptomycin was used as culture medium. After 1, 4 and 7 days, the DNA, alkaline phosphatase (ALP) and proteins and of the cells were analyzed. The morphology of the cells on the compacts was examined by scanning electron microscopy.

Results

During the conventional culture, significantly better cell attachment, proliferation and differentiation of cells on the MWNTs were found. To confirm the hypothesis that the larger amount of protein adsorbed on the carbon nanotubes was crucial for this, we made the compacts adsorb more proteins in culture medium with 50% fetal bovine serum (FBS) before cell culture. With the adsorption of the proteins in advance, the increments of the total-protein/ DNA and alkaline phosphatase (ALP)/DNA for the MWNTs was respectively as about 11 times and 18 times as the increments of those for GP and the control at both day 4 and day 7 (Figure 1).

Discussion and Conclusion

Carbon nanotubes might improve the not only cell attachment and proliferation but also differentiation by adsorbing more specific proteins due to their larger surface area, unique electronic, catalytic and chemical properties, which provided new information for the understanding of the biocompatibility and bioactivity of carbon nanotubes and indicated that carbon nanotubes may be a candidate for scaffold material for tissue engineering.

References

1. Li XM, Gao H, Uo M, Sato Y, Akasaka T, Feng QL, Cui FZ, Liu XH, Watari F. Effect of carbon nanotubes on cellular functions in vitro. *J Biomed Mater Res A* 2008; DOI: 10.1002/jbm.a.32203.
2. Li XM, Gao H, Uo M, Sato Y, Akasaka T, Abe S, Feng QL, Cui FZ, Watari F. Maturation of osteoblast-like Sca2 induced by carbon nanotubes. *Biomedical Materials* 2009; 4, article number: 013005.

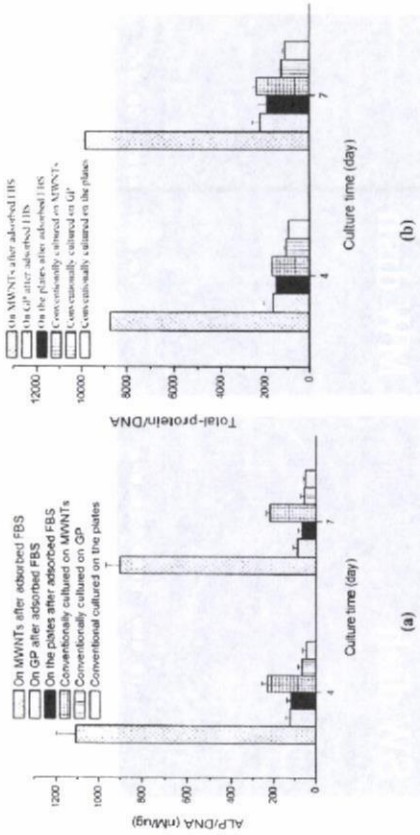


Figure 1 ALP/DNA (a) and Total-protein/DNA (b) of C2C12 cells conventionally cultured on samples with and without the adsorption of FBS in advance (n=4)

カーボンナノチューブディッシュ上での細胞培養

北海道大学大学院歯学研究科

○松岡貞琴・赤坂司・戸塚靖則・亘理文夫

株式会社名城ナノカーボン

橋本剛

1. 目的

カーボンナノチューブ (CNT) はその機械的、電気的特性から様々な分野での応用が期待されており、バイオ分野ではCNTを用いたスキャポールド上での培養などの研究が行われている。

われわれの研究グループでは、CNTスキャポールド上でヒト骨肉腫由来骨芽細胞株細胞 (Saos2) の培養を行い、良好な増殖を認めている。

本研究では、単層 (SW) および、多層 (MW) のカーボンナノチューブ (CNT) の培養細胞に及ぼす影響について検討するため、CNTを表面にコートした培養dish上での細胞接着性や増殖性を評価した。さらにCNT dish上で長期的に細胞を継代・培養することが細胞の形態や機能に及ぼす影響についても検討を行った。

2. 実験方法

単層カーボンナノチューブ (名城ナノカーボン社製、純95%以上) および、多層カーボンナノチューブ (NanoLab社製、純度99%以上) を分散液に加え超音波処理を行い、それぞれポリスチレンディッシュに薄層コートした。

細胞培養は骨芽細胞用細胞 (Saos2) を用い、DMEMに10%FBSを添加した培地で37℃5%CO₂環境下で行った。CNTコートディッシュ (SW dish、および MW dish) に対する初期接着・増殖の評価として、播種後1時間後、6時間後の細胞接着数、および3日後、6日後の細胞数を計測し、Cell culture dish (Corning) と比較した。次いで、長期的にCNT上で培養を行うことによる細胞への影響を評価するため、各ディッシュ上でSaos2の継代・培養を行った。約1カ月の継代・培養後、各ディッシュ上の細胞を走査型電子顕微鏡で観察した (図)。また、それぞれのディッシュ上で培養した細胞のALP活性の評価も行った。さらに、CNTディッシュ上で継代・培養を行うための基本的性能の評価として、それぞれのディッシュ上でトリプシン処理 (0.5%、0.1%、0.01%) を行った際の細胞回収率を比較した。

3. 結果と考察

1時間後と6時間後の細胞接着数を比較したところ、1時間後の接着数は Cell culture dishで最も多

く、ついで MW dish、SW dish の順であったが、6時間後の接着数はほぼ同程度であった。3日後の増殖数はSW dish、MW dish と culture dish に比べやや少ない傾向があるものの、ほぼ同程度の増殖を認めた。長期継代後の細胞の評価では形態・機能的に明らかな変化は認められなかった。

それぞれの培養ディッシュでの細胞回収率は、トリプシン濃度が0.5%ではそれほど差がなかったものの、濃度0.01%では、culture dish では回収率が80%程度、SW dish での回収率は93%以上であったのに対し、MW dishでは60%以下であった。

これらの結果より、カーボンナノチューブ上で細胞が良好に増殖することが示された。また、カーボンナノチューブ上で長期的に継代・培養することによっても形態や機能に大きな影響は及ぼさないものと推測される。これらのことから、カーボンナノチューブを応用した生体材料の開発においても、周囲の細胞がカーボンナノチューブから受ける影響は低いことが推測される。



図 各dish上で継代・培養した骨芽細胞株細胞 (Saos2) の走査型電子顕微鏡写真