

論 文

ポリマエレクトレットの重ね合せによる 電荷の安定性と血小板の粘着

高 松 俊 昭*, 井 上 直 史**

(1985年12月25日受理)

Stability of Surface Charge and Adhesion of Platelets on the Piled Polymer Electrets

T. TAKAMATSU* and N. INOUE**

(Received December 25, 1985)

Polypropylene films of 55 μm thickness were polarized by a corona charging at 100°C in air. Two polarized films were piled, so that the surfaces with the same and/or the opposite polarity faced each other. Stability of surface charges after various sterilization tests was investigated on these electrets. The platelet adhesion test was carried out by immersing the piled electret films in the mixture of human platelet rich and poor plasma (PRP+PPP). The initial surface charge density of the electrets after corona charging was $(2-3) \times 10^{-7} \text{ C/cm}^2$. When both surfaces of the electret was short circuited, over 90% of surface charges disappeared and the final charge stabilized was $(1-2) \times 10^{-8} \text{ C/cm}^2$. When the piled electrets of which inner two surfaces were charged with the same polarity was soaked into water, the following decay of surface charges was much smaller. In the case of soaking the piled electrets in which the surfaces with opposite polarity are contacted, over 90% of surface charges decayed after a few second of soaking. The number of platelets in PRP+PPP contacted with electret films decreased with increasing the time of contact. A significant increase in the number of the adhered platelets was observed on positively charged surface of the piled electrets, compared to the number of adhered platelets on negatively charged surface or an unpolarized surface.

1. はじめに

最近、人工心臓、人工血管などの開発研究が盛んであるが、その材料によっては血栓が生じるという問題がある。血栓は生体内で血流、血管壁および血液凝固系の三要素に異常があると起こる。一方、生体の血管壁内面、血小板、赤血球などは負に荷電しているため、互いに接近すると静電的反発力が働き、血管壁には血球成分が粘着しにくく血栓形成が抑制されるという考えもあるが^{1,2)}、これらの説はまだ十分に証明されていない。

負に荷電したポリマエレクトレットを人工血管として動物に移植したとき、その荷電面では血栓形成が抑制され、抗血栓性を示すとの報告があるが^{3,4)}、この研究を追試して同様な結果が得られたという報告は少な

い⁵⁻⁷⁾。

ポリマエレクトレットは両極を開放状態で室内に放置すると、その表面電荷はしだいに減衰する⁸⁾。またポリマエレクトレットを人工血管材料として生体に移植する際には、あらかじめ十分な消毒殺菌処理を行なわなければならない。これまでポリマエレクトレットにオートクレーブ中(132°C, 10分)での殺菌処理、乾熱殺菌(135°C, 3~5時間処理)、熱水中で煮沸、消毒液に浸漬、またはコバルト60からのγ線照射などの殺菌処理を行なうとエレクトレットの表面電荷は著しく減衰するという欠点があることが報告されている。これらの殺菌処理に対して、エチレンオキサイド(EO)によるガス殺菌法を用いた場合、エレクトレットの表面電荷はほとんど消失しないことが認められている⁹⁾。

本研究では2枚のポリマエレクトレットフィルムを同じ極性同士重ね合わせて積層エレクトレットにすると表面電荷の減衰が著しく抑制され、室温に放置する限り電荷減衰が認められないこと、この積層エレクトレットを水やヒビテン消毒液に長時間漬けたり、室温で紫外線

* 理化学研究所 (351-01 和光市広沢 2-1)

The Institute of Physical and Chemical Research,
2-1, Hirosawa, Wako, 351-01 Japan** 三井石油化工业株式会社 (740 山口県玖珂郡和木町)
Mitui Petrochemical Industries Co. Ltd., Kuga-
gun, Yamaguchi, 740 Japan

(UV) を長時間照射して殺菌処理を行なったときでも表面電荷の減衰が抑制されることが見いだされた。

さらに積層エレクトレットフィルムをヒトの多血小板血漿 (PRP) と貧血小板血漿 (PPP) の混合液に接触させたときの血小板の粘着性を調べ、表面電荷の極性と抗血栓性の関係を検討した。

2. 実験

2.1 ポリマエレクトレットの作製

厚さ 55 μm のポリプロピレン (PP) フィルムを図 1 に示すような直径 30 cm の金属円筒の上に巻き、この円筒を 100°C に加熱しながら毎秒 0.2 cm の速さで回転させた。この円筒を接地してフィルム面の垂直上方 10 mm の距離に針状電極を固定し、両極間に 9 kV の直流高電圧を連続的に印加してフィルム表面をコロナ荷電した。円筒が一回転する間に円周に沿った単位長さ (1 cm) 当りのフィルム面は 5 秒間コロナ荷電され、その後コロナ雲囲気から離れて 100°C で熱処理を受けたあと再びコロナ荷電と熱処理を 4 回繰り返しエレクトレットを作製した。これらのエレクトレットフィルムを図 2 に示すように、同極または異極同士重ね合わせて積層化した。

2.2 热処理および水中浸漬処理

積層エレクトレットフィルムを恒温槽中で種々一定温度で 30 分間熱処理を行なった。また、これらの試料を室温で蒸留水に時間を変え浸漬したあと外界に取り出し、フィルム面に付着した液滴を拭き去った。

2.3 紫外線照射処理

2 枚のエレクトレットフィルムを同極または異極同士重ね合わせた表面に紫外線を線量率、約 1.1 J/m²·s の下で時間を使って照射した。これらのエレクトレットの

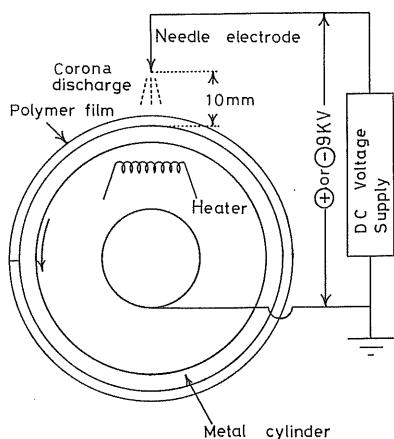


図 1 コロナ分極装置の概略図

Fig. 1 Schematic drawing of a corona poling setup.

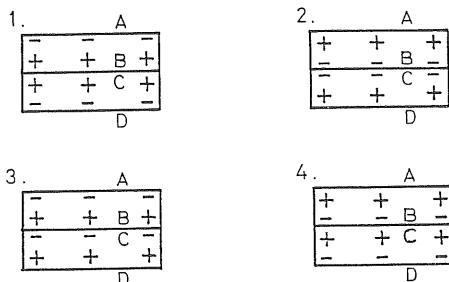


図 2 エレクトレットフィルムの積層法

Fig. 2 Preparation of the piled polymer electret films.

表面電荷は静電誘導法で測定した。積層エレクトレットの場合、互いに剝がして 1 枚ずつ表面電荷を測定した。

2.4 血小板の粘着

健康な青年男子より血液 10 ml を採取し、これに 3.8 % のクエン酸ソーダ水溶液を体積比で血液の 10% 相当量を加え、遠心分離（毎分 700 回転、15 分間処理）して多血小板血漿 (PRP) を採取した。この PRP の量は少なくかつ血小板の濃度は高い。そこで残りの血液を再び遠心分離（毎分 3,000 回転、15 分間処理）して貧血小板血漿 (PPP) を採取し、先の PRP と PPP を体積比にして 2 対 1 の割合に混合して增量し、以下の実験に使用した。

図 3 に示すようなアクリル板に 2 組の積層フィルムをゴムパッキングを介して向かい合わせ、その空間の約 1/2 体積に (PRP+PPP) 混合液を注入し、上面には別のアクリル板をのせ固定した。このような試料を多数作り、毎秒 0.2 回転の速さで回転しエレクトレット表面に万遍なく (PRP+PPP) 混合液を接触させた。種々な時間経過後、(PRP+PPP) 混合液に含まれる血小板数をエルマ光学機器製自動血球計算器 (ACM-403 型) を用いて

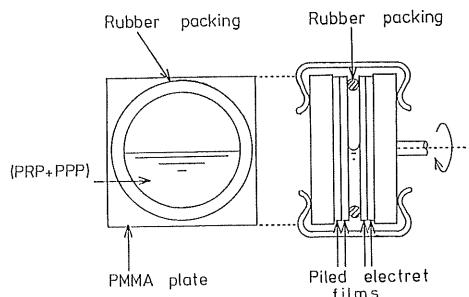


図 3 積層エレクトレットフィルム表面への血小板粘着量測定装置の概略図

Fig. 3 Schematic drawing of apparatus for measuring platelet adhesion on the piled polymer electret films.

計測した。エレクトレット表面への血小板粘着率は次式で与えられる。

$$\text{粘着率} = \{(N_0 - N)/N_0\} \times 100\% \quad (1)$$

ここで N_0 は (PRP+PPP) 混合液 $1 \mu\text{l}$ 中に含まれる初期血小板数で約 1.6×10^5 個/ μl であった。 N は種々な時間フィルムと接触した (PRP+PPP) 混合液 $1 \mu\text{l}$ に含まれる血小板数である。

2.5 血小板の粘着状況

積層エレクトレットの小片を (PRP+PPP) 混合液に漬け、 37°C で 2 時間加温した後、外界に取り出し、リン酸緩衝液で洗浄し、グルタールアルデヒド溶液で固定化した。これを再びリン酸緩衝液で洗浄後、濃度を変えたエチルアルコールと水の混合溶液に漬けて脱水処理を行ない、次にイオソコータを用いてフィルム表面に金を蒸着した。これらのフィルム表面上の血小板の粘着状況を走査型電子顕微鏡（日立製 S-430 型）で観察した。

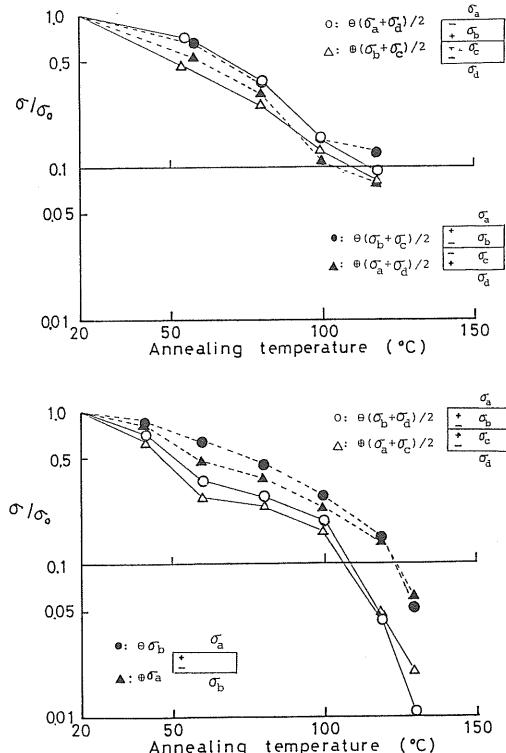
3. 結 果

3.1 表面電荷減衰

ポリプロピレンフィルムのコロナ荷電直後の表面電荷密度 (σ) は $(2 \sim 3) \times 10^{-7} \text{ C/cm}^2$ の値を示すが、両極を導体で短絡すると約 90% 以上の電荷が放電で消失し、あとに $(1 \sim 2) \times 10^{-8} \text{ C/cm}^2$ の電荷が残り安定化した。このように荷電直後の電荷は不安定であるためコロナ荷電したフィルムの両面を短絡処理したあと種々の実験に使用した。この電荷は同極同士重ね合わせた積層エレクトレットの状態で放置する限り、室温ではほとんど減衰が認められない。これに対して単独エレクトレットや異極同士重ねた積層エレクトレットの表面電荷は時間の経過につれてゆっくりと減衰した。

図 4 は積層および単独エレクトレットフィルムの σ/σ_0 と熱処理温度の関係を示す。ここで σ_0 は熱処理前の表面電荷密度 ($= (1 \sim 2) \times 10^{-8} \text{ C/cm}^2$)、 σ は種々な温度で熱処理した後の表面電荷密度を示す。積層エレクトレットの場合、互いに剥がして各表面の電荷密度を測定し、同じ極性をもつ表面上の電荷密度の平均値をプロットした。積層エレクトレットの場合、同極同士の σ の値はほぼ同程度の値を示した。いずれの試料も σ/σ_0 の値は熱処理温度の上昇に伴い単調に減少し、積層と単独エレクトレットの双方において表面電荷の熱安定性に大きな差異が見られなかった。

図 5 は積層および単独エレクトレットフィルムを水中に浸漬した時間と σ/σ_0 の関係を示す。ここで $\sigma_0 (= (1 \sim 2) \times 10^{-8} \text{ C/cm}^2)$ および σ は水浸漬前後の表面電荷密度を示す。同極同士重ね合わせた積層エレクトレットの電荷減衰は著しく遅いが、異極同士重ね合わせた積層エレ



$\sigma_a, \sigma_b, \sigma_c$, and σ_d are the surface charge density at a, b, c, and d surfaces. Annealing time: 30 min. $\sigma_0 = (\pm)1.8 \times 10^{-8} \text{ C/cm}^2$.

図 4 積層または単独エレクトレットフィルムの σ/σ_0 と熱処理温度の関係

ここで σ_0 は熱処理前の同じ極性をもった表面電荷密度の平均値、 σ は熱処理後の表面電荷密度の平均値

Fig. 4 Annealing temperature dependence of σ/σ_0 on the piled and single electret films. σ_0 is the initial mean value of surface charge density with the same polarity and σ the mean value of surface charge density after annealing.

クレットや単独エレクトレットの場合、水に数秒間浸漬するのみで著しく電荷減衰が起こっている。

表 1 は各種積層エレクトレット表面に紫外線を照射した後の σ と照射時間の関係を示す。同極同士重ね合わせた積層エレクトレット表面に最大 $1.9 \times 10^4 \text{ J/m}^2$ の紫外線を照射しても電荷減衰が認められず、異極同士重ねた積層エレクトレットの表面電荷は照射時間とともに減衰するのが認められた。

3.2 血小板の粘着

図 6 は両面が正または負荷電の積層エレクトレットまたは無荷電フィルム表面に (PRP+PPP) 混合液を接触させたときの残留混合液に含まれる血小板数の時間変化を示す。接触時間の増加に伴い残留混合液中の血小板数

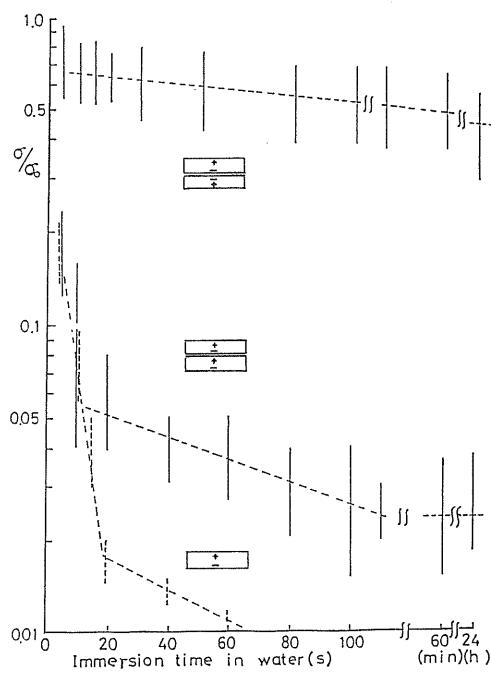


図5 積層または単独エレクトレットを水に浸漬した時間と σ/σ_0 の関係

ここで σ_0 は水浸漬前の正負の表面電荷密度の平均値を、 σ は水浸漬後の正負の表面電荷密度の平均値を示す。

Fig.5 Relationship between σ/σ_0 and immersion time into water for the piled electrets and the single electrets. σ_0 is the initial surface charge density and σ the residual surface charge density after immersion into water.

は減少し120分以上で一定の値を示した。

図7は図6において減少した血小板がすべて積層フィルム面に粘着したものと仮定して算出した血小板粘着率を接触時間に対してプロットしたものである。150分経過後の粘着率は無荷電面より荷電面のほうが減少している。

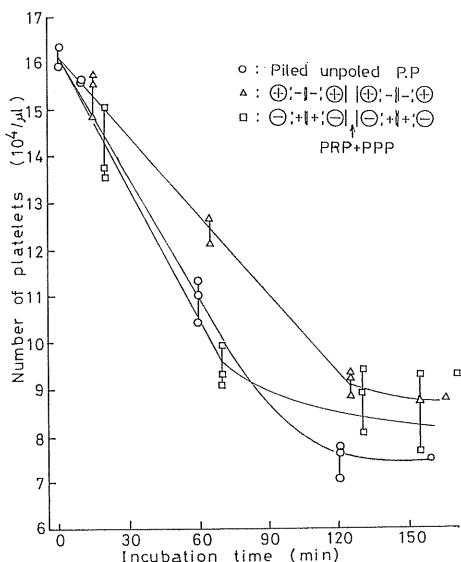
図8(a)および(b)は積層および単独エレクトレット表面に(PRPP+PPP)混合液を120分間接触させたあとの走査電子顕微鏡写真を示す。同極同士重ね合わせ、その両面が負に荷電したフィルム表面への血小板粘着数は両面が正に荷電したフィルム表面や無荷電のフィルム表面の場合に比べて少ない傾向が見られた。

図9は積層または単独エレクトレットフィルム表面に水を滴下し、1分後の接触角(θ)の値を示す。 θ は無荷電表面で最も大きな値を示しているが、同極同士重ね合わせた積層エレクトレット表面の θ 値は無荷電の場合より減少しており、さらに単独エレクトレット表面での θ

表1 紫外線を照射した積層エレクトレットフィルムの表面電荷の安定性

Table 1 Stability of surface charge of the piled electrets exposed to ultraviolet rays.

Sample	Surface	Polarity	Time of exposure (h)			
			0	1	3	5
Surface charge density (10^{-9} C/cm^2)						
1	A	⊖	13.4	13.4	13.4	13.4
	B	⊕	13.5	13.5	13.5	13.5
	C	⊕	13.1	13.4	13.5	13.4
	D	⊖	13.4	13.4	13.4	13.4
2	A	⊕	13.5	13.5	13.5	13.5
	B	⊖	13.4	13.4	13.4	13.4
	C	⊖	13.4	13.4	13.4	13.2
	D	⊕	13.5	13.5	13.5	13.5
3	A	⊖	9.7	6.7	4.1	1.1
	B	⊕	8.6	5.0	4.4	3.1
	C	⊖	11.8	5.0	6.1	3.9
	D	⊕	10.1	5.1	6.3	2.5

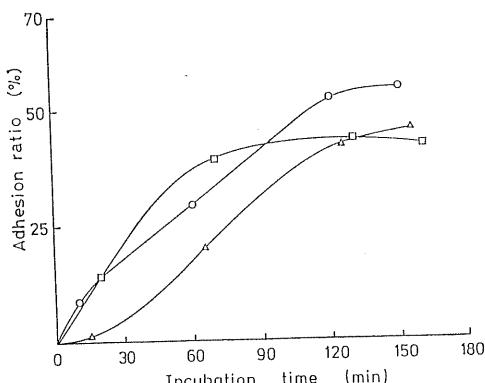


○: Surfaces with the unpoled films, △: Surfaces with the positive polarity. □: Surfaces with the negative polarity.

図6 積層エレクトレットフィルムに(PRPP+PPP)混合液を接触したときの混合液中の血小板数と接触時間の関係

Fig.6 Relationship between the number of platelets in (PRPP+PPP) contacted with the piled electrets and the incubation time.

の値は前二者よりも小さくなっている。



○: Surfaces with the unpoled films. △: Surfaces with the positive polarity. □: Surfaces with the negative polarity.

図7 積層エレクトレットフィルムを(PPR+PPP)液に接触したときの血小板粘着率と接触時間の関係

Fig. 7 Relationship between adhesion ratio of platelet on the piled electret surface and the incubation time at room temperature.

4. 考 察

4.1 表面電荷の安定性

これまで単独エレクトレットフィルムの表面電荷は

水や消毒液などの接触によって短時間で減衰するため^{9,10}、単独エレクトレットを材料とした人工血管を生体内に移植して、その表面電荷により血小板粘着を抑制することは困難と考えられている。単独エレクトレットに対して同極同士重ね合わせた積層エレクトレットフィルムでは水や消毒液に長時間接触しても表面電荷の減衰は抑制される。このように積層エレクトレットの場合、表面電荷が安定であるため、エレクトレットを保存する場合これまで行なわれていたようにエレクトレットの両極を導体で短絡し内部電界をゼロに近づける必要がなく、かつ消毒処理が容易になるという特長がある。

その上、紫外線照射による殺菌処理でも(表1)、同極同士重ねた積層エレクトレットの表面電荷はほとんど減衰しないことは紫外線による殺菌処理が有効なことを示している。

積層エレクトレットの表面電荷の熱安定性は、単独エレクトレットの場合と同様である(図4)。これはコロナ荷電による電荷トラップの深さが同じであり加熱によって同じ温度域でトラップより電荷が遊離し、移動して再結合や再トラップなどで消失するためと考えられる。

ここで同極同士重ね合わせた積層エレクトレットの表面電荷が安定化される理由を考えてみる。図10(a)およ

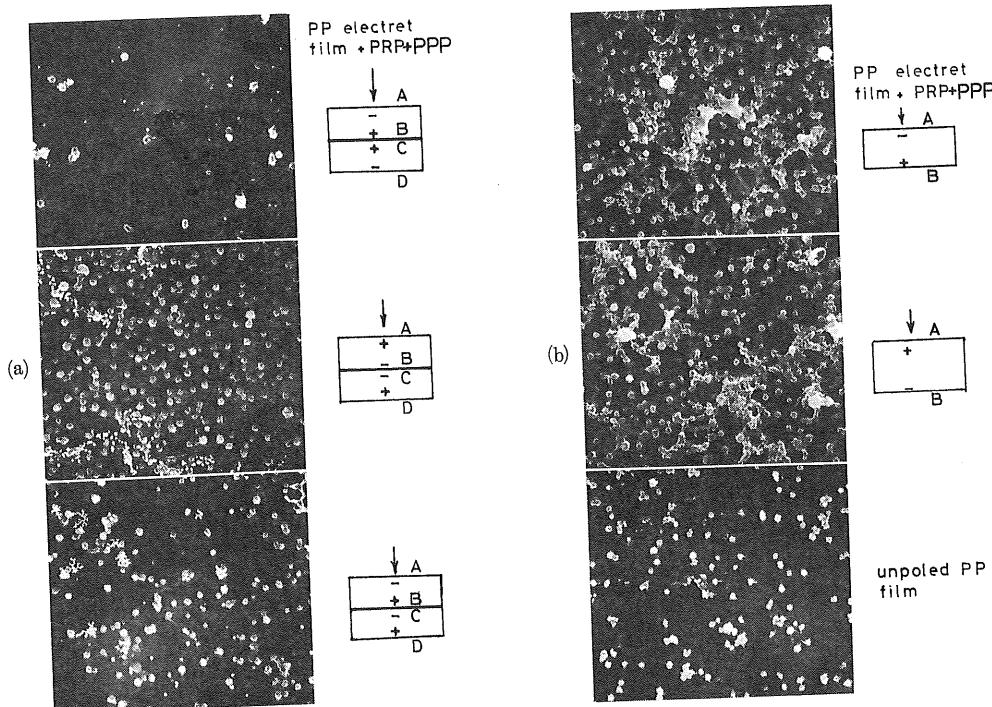


図8 積層または単独エレクトレット表面に粘着した血小板の走査型顕微鏡写真 ($\times 200$)

Fig. 8 Scanning electron microphotographs of platelets adhered on the piled electret surfaces.
Magnification: $\times 200$.

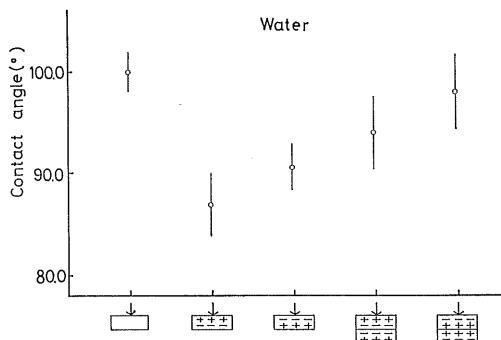
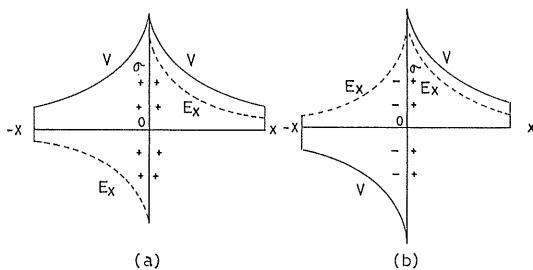


図 9 積層または単独エレクトレット表面における水の接触角 (θ)

Fig. 9 Contact angle of water (θ) on various electret surfaces.



(a) Surfaces with the same polarity faced each other.
(b) Surfaces with the opposite polarity faced each other.

図 10 積層エレクトレットにおける電位 (V) および電界 (E_x) 分布曲線

Fig. 10 Distribution of electric potential (V) and electric field (E_x) within the piled electrets.

び(b)に示すように平等に荷電した 2 枚のフィルムを同極または異極同士重ねたとき、その両面における電位 (V) および電界 (E_x) は次のように与えられる¹¹⁾。同極同士の場合は

$$\begin{cases} (E_x)_{+0} - (E_x)_{-0} = \sigma / \epsilon \epsilon_0 \\ V_{+0} = V_{-0} \end{cases} \quad (2)$$

ここで σ は表面電荷密度、 ϵ_0 および ϵ は真空および試料の誘電率である。両面での電位は相等しく、電界は大きさが等しく方向が逆で不連続面を形成し、 $\sigma / \epsilon \epsilon_0$ だけの差がある。両面での電位が等しいため試料に電界が作用せず電荷減衰が抑制されるものと考えられる。

異極同士の場合、接觸面では電気二重層が形成され、その両面における電位と電界は(3)式のように表わされる。

$$\begin{cases} (E_x)_{+0} = (E_x)_{-0} \\ V_{+0} - V_{-0} = \phi / \epsilon \epsilon_0 \end{cases} \quad (3)$$

ここで ϕ は電気二重層の強さで、 $\phi = \lim_{\eta \rightarrow 0} (\sigma \eta)$ で与えられる。 η は重ね合せ面間の距離である。 E_x は両面で等

しいが、電位は $\phi / \epsilon \epsilon_0$ だけの差があり両面間に電位が作用するため電荷減衰が起こるものと考えられる。

また積層エレクトレットの場合、重ね合せ面には面に垂直方向に互いに向きを異なる双極子による四重極が形成される^{12,13)}。この四重極モデルは電荷の集合体として取り扱われ、通常の双極子の場合に比べて電荷や電界による相互作用が弱められ、正味の双極子モーメントはゼロとなるため¹³⁾表面電荷の減衰が抑制されるものと考えられるがまだこの四重極モデルの解析は進んでいない。

4.2 血小板の粘着

これまでに単独ポリマエレクトレット表面に PRP を接觸させたとき、血小板の粘着量は表面電荷の極性にはほとんど依存せず、表面電荷は短時間に消失したとの報告がある¹⁰⁾。われわれの実験では積層エレクトレット表面に (PRP+PPP) 混合液を接觸させたとき、混合液中の残留血小板数が時間とともに減少しているが(図 6)，その減少割合は荷電の有無や表面電荷の極性にはあまり依存性がないという結果が得られた。しかしながら図 8 (a)に示したように、両面が負荷電の場合、血小板の粘着量は正荷電の場合に比べて少なくなっている。なお異極同士重ね合せた積層エレクトレットの負荷電面の血小板粘着量は前二者の中間にある。これらの結果はこれまで負荷電した単独エレクトレット表面で血小板の粘着が抑制され、抗血栓性を示すとの報告^{3,4)}と一致している。それゆえ、本研究における積層エレクトレットで負に荷電した面には血小板の粘着を抑制する作用があり、逆に正の荷電面では血小板を粘着、凝集させる作用があるものと考えられる。これに対して図 8 (b)に見られるように単独エレクトレットの場合には、正および負荷電面における血小板の粘着量はいずれも多くなっている。単独エレクトレットの表面電荷は水や (PRP+PPP) 混合液に浸漬すると短時間に消失するため、単独エレクトレット表面への血小板粘着は表面電荷以外の表面性状が関与しているものと考えられるがまだ詳細な機構は明らかではない。

これまで生体材料の表面特性と抗血栓性の間で重要な指標として材料表面の水に対する濡れ性があげられている¹⁴⁾。図 9 に示すように無荷電フィルム面で θ の値は最も大きく疎水性を示す。これに対して単独エレクトレット表面の θ の値は小さく、より親水性であることを示している。これは荷電による静電気力で水分子が分極し、荷電表面に引きつけられるためと考えられる。積層エレクトレットで両面が正荷電面での θ の値はマイナス荷電面の場合より小さい。実験結果が示すように荷電の有無、安定性、極性の違い、単独または積層などの差によ

ってポリマ表面の水に対する濡れ性が多少異なるが、濡れ性の違いと血小板の粘着挙動との関係は明確には得られなかった。この点については今後の詳細な研究が必要である。

5. 結び

以上の結果をまとめると次のようになる。

(1) ポリプロピレンフィルム表面にコロナ荷電したエレクトレットを同極同土重ね合わせた積層状態での表面電荷減衰は単独エレクトレットの場合に比べて著しく遅い。

(2) 積層エレクトレットの熱安定性は単独エレクトレットの場合と同程度である。

(3) 同極同土重ねた積層エレクトレットを水に長時間浸漬しても表面電荷の減衰は遅く、消毒液による殺菌処理が容易に行なえる。これに対して単独エレクトレットの表面電荷は水に浸漬すると短時間で減衰した。

(4) 同極同土重ねた積層エレクトレットの表面電荷は紫外線の照射によってほとんど減衰せず、紫外線による殺菌処理が可能である。異極同土重ねた積層エレクトレットの表面電荷は紫外線の照射によって速く減衰した。

(5) 同極同土重ねた積層エレクトレット表面に (PRP + PPP) 混合液を接触させたときの血小板の粘着量は正荷電面のほうが負荷電面より多くなっている。

(6) 単独のエレクトレットまたは積層エレクトレット表面への水の接触角は単独エレクトレットの正荷電 < 単独エレクトレットの負荷電 < 積層エレクトレットの正荷電 < 積層エレクトレットの負荷電 < 無荷電表面の順に増加した。これらポリマ表面の濡れ性が血小板の粘着に多少関与するのかもしれない。

終りに臨み本研究にご助言を賜わった理化学研究所主任研究員雀部博之博士に感謝申し上げる。なお、本研究経費の一部はライフサイエンスプロジェクト研究「循環系および代謝系人工臓器に関する研究」によるものである。

参考文献

- 1) P.N. Sawyer and J.W. Pate : Am. J. Physiol., 175 (1953) 118
- 2) 高久史麿、水上茂樹編：血液の病態生化学、p. 355、朝倉書店 (1979)
- 3) P.V. Murphy, A. Lacroix and S. Merchant : J. Macromol. Sci., —Chem., A4(3) (1970) 561
- 4) P.V. Murphy and F.J. Holly : Electret, L.M. Baxt, ed., p. 109, University Microfilms A Xerox Co., Michigan (1971)
- 5) R.E. Baier : Ann. N.Y. Acad. Sci., 283 (1971) 17
- 6) J.L. Brash : Ann. N.Y. Acad. Sci., 283 (1971) 356
- 7) S. Srinivasan and P.N. Sawyer : J. Macromol. Sci., —Chem., A4(3) (1970) 545.
- 8) V.M. Fridkin and I.S. Zheludev, ed. : Photo-electrets and the Electrophotographic Process, p. 28, D. Van Nostrand Comp. Inc., Princeton (1966)
- 9) 高松俊昭、香山聰、深田栄一：静電気学会誌, 2(1978) 268
- 10) 医用高分子材料編集委員会編：医用高分子材料、p. 176, 学会出版センター (1981)
- 11) 竹山説三：電磁気学現象理論、p. 58, 丸善 (1951)
- 12) L.L. Hench and E.C. Ethridge, ed. : Biomaterials. An Interfacial Approach, p. 9, Academic Press, New York (1982)
- 13) Raymond Gabler, ed. : Electrical Interactions in Molecular Biophysics, p. 77, Academic Press, New York (1978)
- 14) 今西幸男、桜井靖久、妹尾学、竹本喜一編：医用材料と生体、p. 86, 講談社サイエンティフィク (1982)