

生分解材料としてのキトサン/PVAブレンドフィルムの 物性と抗菌活性

中島 照夫

(近畿大学資源再生研究所)

Physical Properties and Antibacterial Efficacy of Biodegradable Chitosan/PVA Blend Films

Teruo NAKASHIMA

*Institute of Resource Recycling, Kinki University, 3327-204 Nakamachi,
Nara 631-8505, Japan*

Synopsis

In this study, fabrication of chitosan/PVA blend films was fabricated, and their mechanical properties and antibacterial efficacy were examined.

The maximum draw ratio of the chitosan/PVA blend films increased with increasing PVA content. Only diffraction from PVA could be observed from a wide angle and X-ray diffraction measured from the through view of drawn films. The diffraction arcs from PVA crystal planes (110) and $(\overline{110})$ for the composite with 22/78 composition ($\lambda = 7$) become spots indicating high orientation of molecular chains of PVA. Furthermore, the value of Young's modulus increased significantly by elongation because of the preferential orientation of PVA and chitosan crystallites with respect to the stretching direction. The E' reached ca. 20GPa at room temperature for the 22/78 composite at draw ratio of 7 times which is higher than the pure PVA film at $\lambda = 8$.

The contact angle increased with increasing of the chitosan content, and the film became more hydrophilic.

The antibacterial activity for the chitosan/PVA blend films was better for *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 (ATCC 6538P) rather than *Escherichia coli* NBRC 3972 (ATCC 8739) but the activity became worse (less effective) with increasing draw ratio. The activity become more effective for the blend films treated by quaternary ammonium chitosan and became hardly affected by the neutralization. This indicates that the drawing of the treated blends provide the possibility to expand the applications as industrial materials became of an increase in Young's modulus and tensile strength.

Keywords: chitosan/PVA blend film, mechanical property, antibacterial efficacy, *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 (ATCC 6538P), *Escherichia coli* NBRC 3972 (ATCC 8739)

緒言

今まで開発されてきた新合成高分子材料の設計思想は、一般に軽量、強度および耐腐食性など、使用時の実用的特性に最重点が置かれていた。しかし、この種の高分子材料は、使用后、破棄した場合の地球環境に対する負荷の影響を検討することが重大であるが、この点に関しては最近まで全く考慮されていなかった。理想的な高分子材料は、廃棄後、自然界において微生物や太陽光線の作用によって速やかに分解し、炭酸ガスと水に戻る物質循環が可能な生分解や光分解を行う分子設計で製品化することが重要である。

こうした観点から、自然界に存在する未利用天然資源の有効活用に着目し、環境保全の一環として、セルロースに次いで多量に生産されている蟹、海老およびロブスターの甲殻類から得たキチン・キトサンを原材料としてフィルムを試作した。前報では新工業材料の開発を検討するため、その試作フィルムの物性、抗菌活性および生分解特性の可能性を追求してきた^{1,2)}。しかし、本試作キトサンフィルムは、型づけ加工には適していたが、延伸性能が欠けるため繊維製品への応用は難しいと考えた。そこで次に、生分解特性と延伸特性の両方を有する機能性ポリマーの導入を計画した。今回は、キトサンに生分解可能なPVAを導入し、延伸性能の向上を試みたキトサン/PVAブレンドフィルムの物性と抗菌活性に関して検討した。

実験方法

1. 原材料

本実験に使用した原材料は、蟹の甲羅100%から調製したキトサン微粉末（アセチル化度85%、粘度5-20 cp）で、Kimika Co., Ltd.から購入した。ポリビニールアルコール（PVA）粉末は、ナカライ株式会社製の重合度2000、ケン化度99～100%の市販製品を使用した。

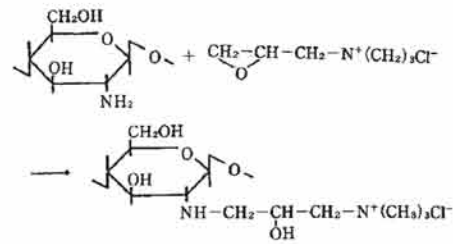


Fig. 1. Reaction of chitosan and glycidyl trimethyl ammonium chloride (GTMAC)⁴⁾.

2. 四級化キトサンの調製方法³⁾

キトサン粉末20gは、80%のisopropyl alcohol水溶液140gを加え、水浴中で60 ± 5℃に到達するまで加熱した。次に、図1⁴⁾に示すようにGlycidyl trimethyl ammonium塩化物20gを攪拌しながら溶液中に滴下して加え、さらに5時間攪拌した。この混合物溶液をガラスフィルターG1で濾過後、80%のisopropyl alcohol水溶液200mlを用い、繰り返し5回洗浄した。その後、室温で風乾して溶媒を蒸発させ、40 ± 2℃で48時間乾燥し、四級化キトサンを作成した。

3. フィルムの成形加工方法

3. 1. 物性測定用のフィルム作成

PVA粉末3gを95℃の蒸留水で40分間攪拌溶解後、室温まで冷却したPVA溶液とキトサン微粉末2gを1%酢酸溶液に溶解⁵⁾したキトサン溶液（溶液調製後、濾過した）を別々に調製した。次に、両溶液2種を所定の割合でブレンドし、室温で3時間攪拌後、できる限りフィルムの厚さを一定に調整するため、注入量を一定量に制御した。このブレンド溶液の溶媒は室温で蒸発させた。キトサン/PVAのブレンド比は、100（キトサン）/0, 61/39, 40/60, 50/50, 30/70, 22/78および0/100（PVA）の7段階に設定した。

上記で調製したキトサン/PVAブレンドフィルムは、長さ30mm、幅10mmの試験片に切断した。この試験片は、手動式延伸装置（前報⁶⁾の図1を参照）を用いて延伸するため、掴み間の試験片長を20mmに設定し、濾紙で掴み試験片を固定して滑りを防止した。この試料は窒素雰囲気下で160℃のオープン中に5分間保持後、必要な延伸倍率（λ）まで手動でゆっくり延伸した。試験片を付けた延伸装置は、瞬間弾性回復を防止するため延伸

Table 1. Preparation of chitosan/ PVAbblend films used for the antibacterial activity test.

Sample code	Composition (Chitosan/PVA)	Quaternary ammonium chitosan	Neutralization status
Untreated film (Polyethylene film)	/	/	/
1a			-
1b	100/0	N	+
1c			-
1d		Y	+
2a	60/40	N	+
2b			-
3a	50/50	N	+
3b			-
4a		N	+
4b	40/60		+
4c		Y	-
4d			+
5a		N	-
5b	22/78		+
5c		Y	-
5d			+
6a			-
6b	0/100	N	+

+ : Neutralized, - : Non- neutralized, N: No, Y: Yes.

直後、数分間室温中に放置して冷却してから試料を取り外した。延伸倍率は、延伸前の試験片上に1mm間隔で印を付けた位置が、移動した距離を測定する通例の方法で求めた。

3. 2. 抗菌性測定用のフィルム作成

抗菌性測定に用いたフィルムの調製方法は、原材料にキトサンまたは四級化キトサン微粉末を用いた以外は、物性測定用のフィルム形成方法と同様の操作で行った。調製したキトサン（四級化キトサンを含む）/PVAブレンドフィルムは、その後4%カゼイソーダ水溶液中に2時間浸漬処理して中和後、蒸留水でよく洗浄し、室温で風乾した。キトサン（または四級化キトサン）/PVAのブレンド比は、表1に示した6段階（無加工フィルムを含む19種類）に設定した。

4. 試料の形態的および力学的性質の測定法⁷⁻¹²⁾

動的粘弾性は、岩本機械（株）製の粘弾性装置（VES-F）を用い、 $-150 \sim 300^{\circ}\text{C}$ の温度範囲内を昇温速度 $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 、周波数10Hzに調整して繰り返し測定した。掴み間の試験片長は40mm、試料幅を約1.5mmに設定した。動的粘弾性の測定中、フィルムは軸方向に最大変形率が0.0025%の正弦曲線振動を受けるように、試験片に張力を付与し、静的引張張力下に設置した。動的粘弾性は試験片に線

形粘弾性挙動を与えるため、わずかに動的張力を付与しながら測定した。

X線回折の測定は、12 Kwの回転陽極X線装置 Rigaku Electric（株）製のRAD-rAを用い、湾曲黒鉛モノクロメーターでモノクロ化して測定した。広角X線回折（WAXD）図形は、200mA、40kVの条件下で、Cu K α 照射（波長0.154 nm）カメラを用い、点収束法によって測定した。本条件下で付随している電子線は、直径2mmの平衡器を用いて平行に設定し、回折ビームを $0.9\text{mm} \times 0.9\text{mm}$ の隙間に調整後、検出した。小角X線散乱（SAXS）図形は、3ピンホールコリメーター方式によるポイントフォーカス法によって測定した。

DSC (differential scanning calorimetry) は、セイコー（株）製のEXTRA6000を用い、 $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ の昇温速度で $40 \sim 260^{\circ}\text{C}$ の温度範囲内を測定した。表面分析は、島津（株）製のX線光電子分光化学分析装置ESCA-850を用い、30mA、8kVの条件下で、Mg K α 照射（走査速度0.05V/s）カメラで測定した。

接触角は、協和界面科学（株）製のFACE接触角計CA-X型を用いて測定した。

5. 抗菌性試験方法

5. 1. 培地

前培養には普通寒天培地（NA (Nutrient Agar) 培地）、接種菌液用には普通ブイヨン培地（NB (Nutrient Broth) 培地）、菌洗い出し用にはSCDLP (Soybean-Casein Digest Broth with Lecithin & Polysorbate) 培地、生菌数測定用には標準寒天培地（SA (Standard Agar) 培地）をそれぞれ用いた¹³⁻¹⁵⁾。

5. 2. 試験菌

試験菌は、「繊維抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果 JIS Z 2801:2000」通称フィルム密着法に規定されているグラム陽性菌の *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 (ATCC 6538P) とグラム陰性菌の *Escherichia coli* NBRC 3972 (ATCC 8739) を用いた¹³⁻¹⁵⁾。

5. 3. 試験菌の培養と接種菌液の調製

保存菌株をNA (Nutrient Agar) 斜面培地に移植後、35 ~ 37℃で16 ~ 24時間培養した。本培養後の試験菌をNA (Nutrient Agar) 培地に1白金耳移植後、35 ~ 37℃で16 ~ 20時間培養した試験菌を前培養とした。次に、NB (Nutrient broth) 培地を滅菌精製水で500倍に希釈し、pH 7.0 ± 0.2に調製した1/500 NB (Nutrient broth) 培地に、前培養した試験菌を均一に分散させたものを接種用菌液とした。

5. 4. 試験方法

抗菌性試験は、「繊維抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果 JIS Z 2801²⁰⁰⁰」に準じ、抗菌活性値を求めた¹³⁻¹⁵⁾。

本法は、図2に示すように50 ± 2mm (厚さ10mm以内)の正方形に裁断した無加工試験片と加工試験片(各試料は、同一試験片につき、無加工試験片6検体、加工試験片3検体を用いた)を、それぞれ滅菌シャーレ中に入れ、試験片上に接種菌液0.4mlを4から5箇所に分けて接種し、その上に被覆(ポリエチレン製)フィルムを被せてシャーレの蓋をした。これをインキュベーター内の図3¹⁶⁾に示す装置を用い、35 ± 1℃、相対湿度90%以上の条件下で24時間静置培養した。

次に、試験菌接種直後と35 ± 1℃で24時間培養後の無加工試験片と加工試験片上に被覆したフィルムに付着している生菌をSCDLP (Soybean-Casein Digest Broth with Lecithin & Polysorbate) 培地10mlを用いてシャーレ中に十分に洗い出した。この洗い出し液1ml中の生菌を、SA (Standard Agar) 培地を用いて寒天平板法(35 ± 1℃で40 ~ 48時間培養)で生菌数を計測した。

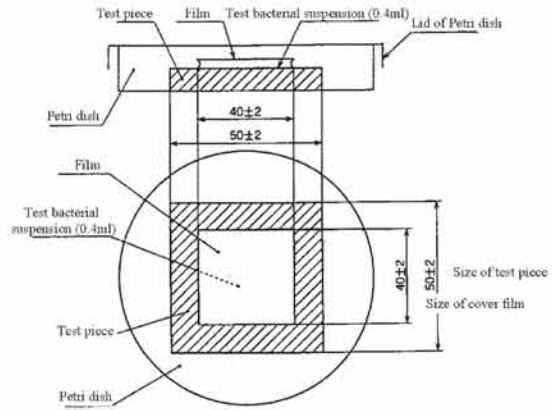


Fig. 2. Dropping test bacterial suspension to test piece and cover of film.

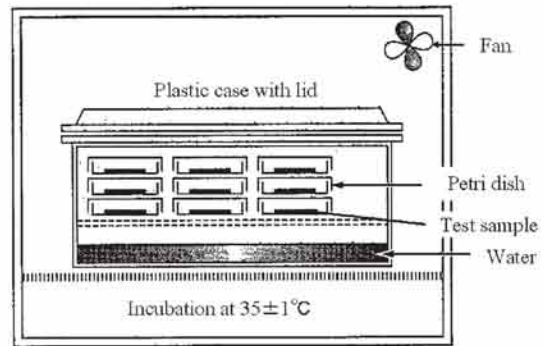


Fig. 3. Device in incubator to control the humidity.

5. 5. 評価法

24時間培養後の無加工試験片と加工試験片上の生菌数値から、次式を用いて増減値差を算出し、それらの抗菌活性値を求め評価した。本評価基準は、抗菌活性値(R)が2.0以上で抗菌効果を有する。

抗菌活性値 (R)

$$= \text{Log} (B / A) - \text{Log} (C / A) = \text{Log} (B / C)$$

A : 無加工試験片の接種直後の1 plate当たりの生菌数の平均値

B : 無加工試験片の24時間培養後の1 plate当たりの生菌数の平均値

C : 加工試験片の24時間培養後の1 plate当たりの生菌数の平均値

結果と考察

1. 試作フィルムの物性

キトサン/PVAブレンドフィルムの最大延伸倍率は、表2に示すようにPVA含有量の増加によって次第に高くなった。特にブレンド比30/70のフィル

Table 2. Density of chitosan/PVA blend films.

Composition (Chitosan/PVA)	Density (g/cm ³)
100/0	1.431
61/39	1.366
50/50	1.357
40/60	1.335
30/70	1.321
22/78	1.316
0/100	1.277

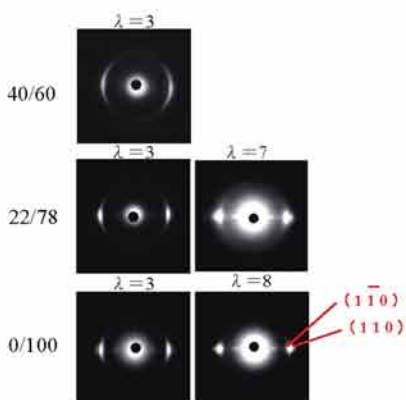


Fig.4. WAXD patterns (through view) for chitosan/PVA blend drawn films.

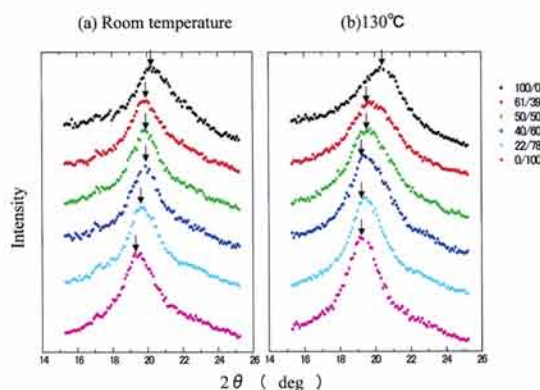


Fig. 7. WAXD intensity distribution of chitosan/PVA blend films.

ムからは、PVA増加に伴って延伸倍率が大きく増加した。ブレンド比22/78のフィルムは、延伸倍率が7倍にも到達した。この結果は、前報¹⁷⁾で試作したキトサンフィルムと比較して延伸特性が3.5倍向上し、本ブレンドフィルムは繊維製品への応用を可能にした。

図4は延伸したキトサン/PVAブレンドフィルム(40/60と22/78)とPVAゲルフィルムの広角X線パターン図形を示した。同一延伸倍率で3倍まで延伸したフィルムは、キトサンの含有量の増加によって、PVA結晶の(110)および(110)面からの回折アーチが大きくなった。この結果は、PVAにキトサンを導入することによってPVA分子鎖の配向度が低下したことを示唆した。また、ブレンド比22/78のフィルムを最高延伸倍率7倍まで延伸した試料においては、PVA結晶の(110)および(110)面からの回折アーチは強いスポット状に変形し、PVAフィルムの8倍まで延伸した試料とほぼ同一の配向度を示した。一方、キトサンからの有意な回折は観察できず、キトサンの結晶化度は低いことが示唆された。

図5はキトサン/PVAブレンドフィルムの貯蔵弾性率(ヤング率)および損失弾性率の温度依存性を示した。

未延伸フィルムの貯蔵弾性率(E')は、キトサン(100/0)フィルムが最も高く、特に室温以上の温度領域では、キトサンフィルムの貯蔵弾性率がPVAブレンドフィルムよりもかなり高いことが明らかになった。また、ブレンドフィルムを延伸することによって、貯蔵弾性率は大きく上昇した。

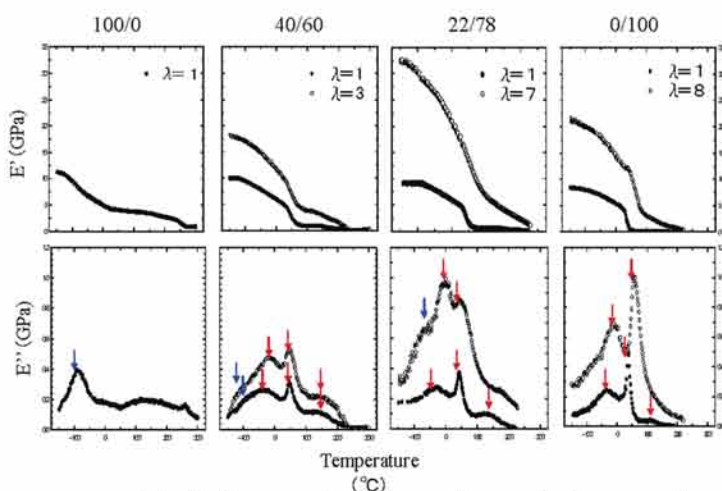


Fig.5. Temperature dependence of storage and loss moduli for chitosan/PVA blend films with indicated draw ratio.

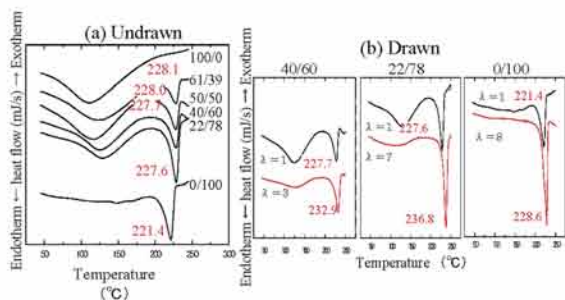


Fig. 6. Differential scanning calorimetry (DSC) curves of chitosan/PVA blend films.

ここで特に注目すべきことは、ブレンド比22/78のフィルムは7倍まで延伸したフィルムでは、室温における貯蔵弾性率が20GPaまで到達した。この結果は、本ブレンドフィルムが高弾性率材料として用途を拡大できる可能性を示唆した。また、その値は -150°C ～ 220°C の全温度領域で、 $\lambda = 8$ (8倍延伸)のPVAフィルムよりも高かった。このことは、優れたブレンド効果が出現し、新工業材料として利用できる可能性も示唆している。

また、損失弾性率の温度依存性においては、キトサンに由来した -100°C 付近の γ 分散が、PVAをブレンドする(キトサン/PVAブレンドフィルム)ことにより見られなくなった。キトサン(100/0)フィルムで見られた γ 分散は、キトサン/PVAブレンドフィルムでは、 -20°C 付近に、また 50°C 付近には β 分散および 150°C 付近に α 分散がそれぞれ見られた。これらの分散ピークは延伸倍率とPVA含有量の増加によって次第に高くなった。延伸フィルムにおいてはPVAの β 分散ピークが大きく抑制され、 γ 分散ピークは $30 \sim 50^{\circ}\text{C}$ 高温側にシフトした。

図6はキトサン/PVAブレンドフィルムのDSC曲線を示した。

未延伸のキトサン(100/0)フィルムのDSC曲線は、 110°C 付近にブロードなピークが見られた(図6(a))。しかし、PVA含有量の増加によってピーク位置は、次第に高温側にシフトし、しかも融点が高くなった。

一方、PVAの融点は 221°C 付近にみられ、キトサンをブレンドすることにより、若干高温側にシフトする傾向が認められたが、ブレンド比には依存しなかった。また、延伸によって、PVAの融点が高温側にシフトし、融解ピークの形状はシャープになり、融解熱が高くなった。キトサン/PVブレンドフィルムは、延伸によりキトサンの融解ピークが小さくなり、ブロードになることが観察された。このDSCの結果と図5の動的粘弾性の結果を総合して推察すると、延伸によってPVAとキトサンが配向結晶化したことを示唆している。

未延伸のキトサン(100/0)フィルムで観察された 110°C 付近のピークがPVA含有量の増加によ

って高温側にシフトした原因を追及するため、常温および 130°C における広角X線回折強度測定を行った。その結果を図7に示した。キトサン(100/0)フィルムは、常温で 20.2° に(020)面からの回折が、またPVA(0/100)フィルムは 19.4° に(110)および $(\bar{1}\bar{1}0)$ 面からの回折がそれぞれ出現した(図7(a))。キトサン/PVAブレンドフィルムは、PVA含有量の増加に伴ってピーク形状が低角度側にシフトした。さらに、 130°C では常温よりも更にピーク形状が低角度側にシフトした(図7(b))。キトサン/PVAブレンドフィルムは、温度処理で面間隔が広くなり、ピーク形状が低角度側にシフトしたものと考えられる。このピーク位置のシフトは、DSC測定で明らかとなった 120°C 付近のブロードなピーク形状(図6の(a)を参照)が高温側にシフトした結果からも裏付けられる。

図8は未延伸のキトサン/PVAブレンドフィルム表面のN1sピークを示した。

PVA(0/100)フィルムは、N1sピークが出現しなかったが、ブレンドフィルムでは、 399.6eV 付近にピークが出現した。このピークはキトサン含有量の増加によって次第に高くなった。

図9は延伸したキトサン/PVAブレンドフィルム表面のN1sピークを示した。

ブレンド比40/60および22/78のフィルムは、延伸によってN1sピークが高くなった。PVAは分子内にN(窒素)が存在しないので、キトサン/PVAブレンドフィルムの表面にキトサンがどの程度分散しているかを相対的に検討するため、未延伸試料のN1s/C1sとキトサン含有量との関係を調べた。その結果を図10に示した。

N1s/C1s値はキトサン含有量の増加によって次第に高くなり、ブレンド比61/39のフィルムではキトサン(100/0)フィルムとほとんど変らなかった。

図11は延伸試料のN1s/C1sとキトサン含有量との関係を調べた。ブレンド比40/60および22/78の両フィルムのN1s/C1s値は、延伸倍率の増加によって上昇した。この結果は、延伸によってフィルム内部のキトサン成分がフィルム表面に出現したことを示唆している。

図12は未延伸試料の接触角を示した。

キトサン/PVAブレンドフィルムの接触角は、キトサン含有量の増加によって次第に高くなり撥水性が増大した。これは前述のESCAの測定結果と同様の傾向を示した。従って、フィルム表面のキトサン成分はフィルム表面の撥水性に影響をおよぼすことが判明した。

図13は延伸フィルムの接触角を示した。全延伸試料における接触角は、キトサン含有量の増加によって次第に大きくなり、より高い撥水性が発現

した。ブレンド比50/50と40/60のフィルムの接触角は、延伸倍率が高くなるに従って高くなり、撥水性が増大した。しかし、キトサン含有量が少ない他のブレンドフィルムでは、逆に延伸倍率の増加によって接触角が低くなり、親水性が増大した。ブレンドフィルムの接触角がPVA含有量の増加によって低下した理由として考えられることは、キトサン含有量が少ないため、フィルム表面に対して均一に分布できず、表面のキトサン量が次第に

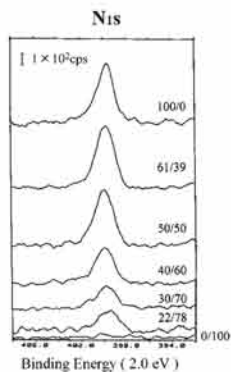


Fig. 8. ESCA spectra of chitosan/PVA blend undrawn film surface.

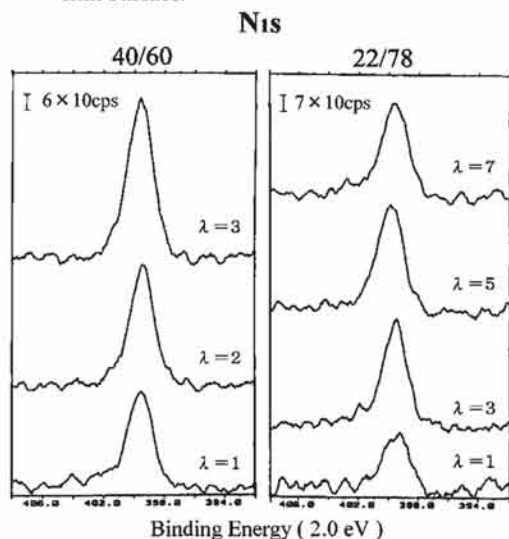


Fig. 9. ESCA spectra of chitosan/PVA blend drawn film surface.

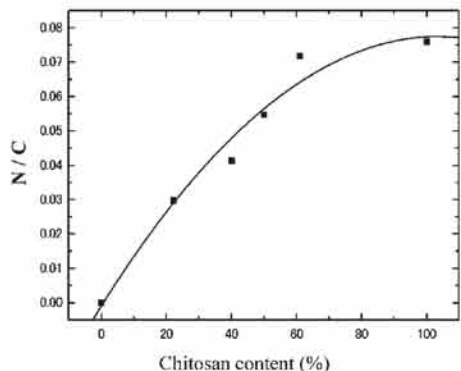


Fig.10. Ratio of nitrogen to carbon (N/C) of chitosan/PVA blend undrawn films measured by ESCA as a function of chitosan content.

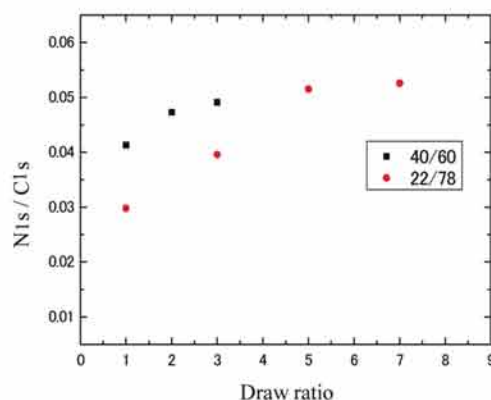


Fig. 11. Ratio of nitrogen to carbon (N1s/C1s) measured by ESCA as a function of draw ratio.

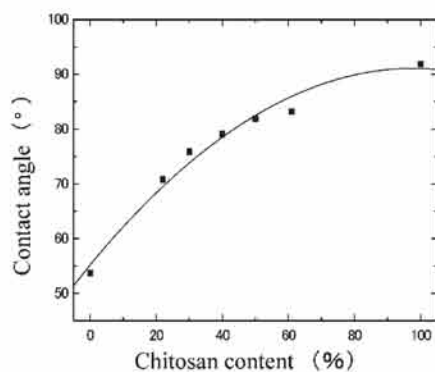


Fig.12. Contact angle of chitosan/PVA blend undrawn films measured as a function of chitosan content.

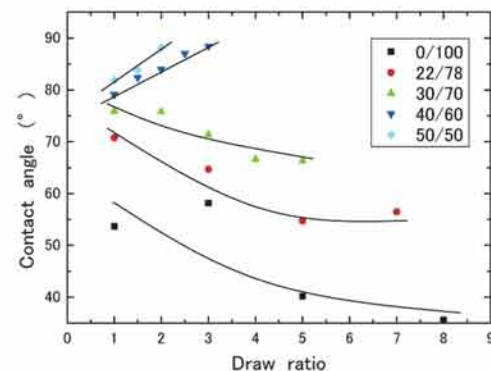


Fig.13. Contact angle of chitosan/PVA blend drawn films measured as a function of draw ratio.

少なくなったと思われる。この結果は、前述の結果と相反するが、その詳細な原因に関しては、残念ながら現段階では不明であり、今後の研究課題としたい。

2. キトサン/PVAブレンドフィルムの抗菌活性

表3はキトサン/PVAブレンドフィルムに *Staphylococcus aureus* NBRC 12732と *Escherichia coli* NBRC 3972を接種し、24時間培養した後の生菌数と抗菌活性値 (R) を示した。

5 × 5cmに裁断し、中和したキトサン/PVAブレンドフィルムと中和しなかったキトサン/PVAブレンドフィルム上に、試験菌 *S. aureus*の接種菌数が 2.4×10^5 cfu/mlとなるように調整した1/500ニュートリエントBurouthの懸濁菌液0.4mlを4～5箇所に分けて接種した。これをインキュベーター内の図3⁶⁾に示した装置を用い、35 ± 1℃、相対湿度90%以上の条件下に設定して24時間培養した。無加工フィルム (ポリエチレンフィルム) 上

に接種した直後に回収した生菌数 (0タイム) は 2.5×10^5 cfu/plateであった。これを24時間培養した後の生菌数は 8.6×10^5 cfu/plateとなり、接種菌は殆ど増殖しなかった。この原因は、前報¹⁷⁾でも指摘したように「繊維製品の抗菌性試験方法・抗菌効果JIS L 1902²⁰⁰²」¹⁸⁾の接種菌液培地の濃度1/20ニュートリエントBroth (着用実験から付着汚れ量を測定して算出した¹⁹⁾)とは異なり、本試験法の接種菌液培地濃度が1/500ニュートリエントBrothであった。このため接種菌液の培地濃度は、「繊維製品の抗菌性試験方法・抗菌効果JIS L 1902²⁰⁰²」と比較して1/25希薄ため、細菌が増殖するために必要な栄養分が不足していた (貧栄養化培養条件) からである。従って本試験法は、「シェークフラスコ法」²⁰⁾ (800倍に希釈したリン酸緩衝溶液)と同様に、接種した試験菌が増殖できない系 (汚れが付着していない系¹⁹⁾)で抗菌活性を評価している。実際には、製品を使用すると各種の汚れが付着する。このため本試験法は、実際の

Table 3. Antibacterial activity value and bacterial numbers after 24 h incubation on chitosan/PVA blend films inoculated with *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 or *Escherichia coli* NBRC 3972.

Sample code	Composition (Chitosan/PVA)	Neutralization status	Staphylococcus aureus			Escherichia coli		
			Bacterial numbers (cfu/plate)	Antibacterial activity value (R) ¹⁾	Evaluation results	Bacterial numbers (cfu/plate)	Antibacterial activity value (R) ¹⁾	Evaluation results ²⁾
Untreated film (Polyethylene film)	/	/	8.6×10^5	/	/	5.2×10^5	/	/
1a	100/0	—	< 10*	5.93	○	< 10*	5.72	○
1b		+	1.7×10^4	1.40	(×)	1.4×10^5	1.11	×
2a	60/40	—	< 10*	5.93	○	6.0×10^1	3.21	○
2b		+	5.0×10^4	1.26	(×)	2.1×10^5	1.07	×
3a	50/50	—	2.7×10^1	4.15	○	8.6×10^1	2.96	○
3b		+	2.9×10^5	1.04	×	2.5×10^5	1.06	×
4a	40/60	—	5.3×10^1	3.44	○	1.1×10^2	2.80	○
4b		+	3.4×10^5	1.07	×	3.1×10^5	1.04	×
5a	22/78	—	4.6×10^2	2.23	○	9.3×10^3	1.44	(×)
5b		+	5.5×10^5	1.03	×	3.2×10^5	1.04	×
6a	0/100	—	8.4×10^5	1.00	×	5.0×10^5	1.00	×
6b		+	8.5×10^5	1.00	×	5.1×10^5	1.00	×

+ : Neutralized, — : Non-neutralized, N: No, Y: Yes. *: Not detected (Detection limit: < 10*). + : Neutralized, — : Non-neutralized, N: No, Y: Yes.

Initial bacterial numbers of *S. aureus* on untreated film were 2.4×10^5 cfu/plate. Initial bacterial numbers of *E. coli* on untreated film were 1.9×10^5 cfu/plate.

¹⁾ R (Ratio of increase and decrease of bacterial numbers) = $\log(B/A) - \log(C/A) = \log(B/C)$, A: Average bacterial number per plate in the untreated film at 0 h, B: Average bacterial number per plate in the untreated film after 24 h incubation, C: Average bacterial number per plate in the chitosan/PVA blend film after 24 h incubation. ²⁾ Antibacterial activity value has an antibacterial efficacy in the value of above 2.0. ○: Antibacterial activity value was above 2.0, ×: Antibacterial activity value was below 2.0.

以上の値を示し、○印の評価を得た。例えばブレンド比40/60のフィルムで、四級化していないキトサンをブレンドし、中和しなかった場合のブレンドフィルム（試料4a）の抗菌活性値（R）は3.44、中和したフィルム（試料4b）では1.07となり、抗菌活性値（R）が1/3.2低下した。しかし、四級化キトサンをブレンドした場合は、中和してもしなくてもブレンドフィルム（試料4cと4d）の抗菌活性値（R）が5.93を示し、前述の四級化していないキトサンをブレンドしたフィルム（試料4a）の抗菌活性値（R）の3.44と比較して、むしろ高い値を示した。また、キトサン/PVAブレンドフィルムの抗菌活性は、*S. aureus*に対するよりも*E. coli*が低く、表4に示すようにPVAのブレンド比が高くなるに従って次第に低下する傾向が確認された。

これらの結果を、中国の抗菌性評価法（中国人民共和国軽工業標準QB/T 2591²⁰⁰³）³⁴⁾と比較すると、表3と4中で（ ）で示した箇所の評価結果が異なる。すなわち、中国は、抗菌率（%）=(B-C)/Bで計算し、I：99%以上（強い抗菌作用あり）、

II：90%以上（抗菌作用あり）、89%以下は抗菌作用なし、で評価している。ここで、B:ブランクの平均回収菌数、C:抗菌加工製品の平均回収菌数を示す。中国の抗菌性評価法は、わが国の抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果JIS Z 2801²⁰⁰⁰を参照しているため殆ど似ている。

（ ）で示した評価結果の×印の箇所は、中国の抗菌性評価法、抗菌率（%）で評価すると、表3に示した*S. aureus*の項目で、試料1bと2bがそれぞれ98.0と%94.2%、*E. coli*の項目で試料5aが100.0%となり、II：90%以上（抗菌作用あり）の評価結果を得、抗菌効果を有することになる。すなわちこの相違は、わが国のJIS Z 2801:2000の試験評価方法が中国のQB/T 2591²⁰⁰³よりも厳しい評価規格なことを意味し、日本製品の品質・安全性の高さを示唆している。なお、我が国と中国の抗菌加工プラスチック製品の評価法の詳細な比較に関しては、文献35)を参照願いたい。

キトサンフィルムにおいても*E. coli*に対する抗菌活性が*S. aureus*よりも低かった²⁾。特にこの傾

Table 4. Antibacterial activity value and bacterial numbers after 24 h incubation on chitosan or quaternary ammonium chitosan/PVA blend films against *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 or *Escherichia coli* NBRC 3972 using JIS Z 2801:2000 (Film Adhering Method).

Sample code	Composition (Chitosan/PVA)	Quaternary ammonium chitosan	Neutralization status	Staphylococcus aureus			Escherichia coli		
				Bacterial numbers (cfu/plate)	Antibacterial activity value (R) ¹⁾	Evaluation results	Bacterial numbers (cfu/plate)	Antibacterial Activity ¹⁾	Evaluation results ²⁾
Untreated (Polyethylene film)	/	/	/	8.6 x 10 ⁵	/	/	5.2 x 10 ⁵	/	/
1a	100/0	N	-	< 10*	5.93	○	< 10*	5.72	○
1b			+	1.7 x 10 ⁴	1.40	(×)	1.4 x 10 ⁵	1.11	×
1c	40/60	Y	-	< 10*	5.93	○	< 10*	5.72	○
1d			+	< 10*	5.93	○	< 10*	5.72	○
4a	22/78	N	-	5.3 x 10 ¹	3.44	○	1.1 x 10 ²	2.801	○
4b			+	3.4 x 10 ⁵	1.07	×	3.1 x 10 ⁵	1.041	×
4c	5d	Y	-	< 10*	5.93	○	< 10*	5.72	○
4d			+	< 10*	5.93	○	1.8 x 10 ¹	4.56	○
5a	5d	N	-	4.6 x 10 ²	2.23	○	9.3 x 10 ³	1.441	(×)
5b			+	5.5 x 10 ⁵	1.03	×	3.2 x 10 ⁵	1.04	×
5c	5d	Y	-	< 10*	5.93	○	< 10*	5.72	○
5d			+	< 10*	5.93	○	2.0 x 10 ¹	4.39	○

+ : Neutralized, - : Non- neutralized, N: No, Y: Yes. *:Not detected (Detection limit: < 10*) . + : Neutralized, - : Non- neutralized, N: No, Y: Yes.

Initial bacterial numbers of *S. aureus* on untreated film were 2.4 x 10⁵ cfu/plate. Initial bacterial numbers of *E. coli* on untreated film were 1.9 x 10⁵ cfu/plate.

¹⁾ R (Ratio of increase and decrease of bacterial numbers) =log (B/A) – log (C/A) = log (B/C) , A: Average bacterial number per plate in the untreated film

at 0 h. B: Average bacterial number per plate in the untreated film after 24 h incubation. C: Average bacterial number per plate in the chitosan or quaternary

ammonium chitosan/PVA blend film after 24 h incubation. ²⁾ Antibacterial activity value has an antibacterial efficacy in the value of above 2.0. ○: Antibacterial

activity value was above 2.0, × : Antibacterial activity value was below 2.0.

向は中和フィルムで顕著であった。*E. coli* に対する抗菌活性が *S. aureus* よりも低い傾向は、これまでの実験結果から加工薬剤や効力評価法が異なっても認められた³⁶⁻⁴²⁾。

抗菌活性は、上述のように四級化キトサンのブレンドで向上し、中和してもしていない試料と比較して極端に低下しなかった。このように四級化キトサンのブレンドは、抗菌活性の向上に寄与し(表4を参照)、従来の有機系抗菌剤のように速効性でなく、抗菌効果がマイルドで弱く、安全性が確保でき、しかも不要になって破棄した場合容易に生分解し、地球環境に負荷を与えない優しい抗菌剤と言える。また、キトサンフィルムは、PVAをブレンドすることによって延伸特性が向上し、新複合材料としての市場性の拡大が期待される。なお、こうした特性を有するキトサン/PVAブレンドフィルムの生分解特性に関しては、引き続き次報で詳細に報告する。

結 論

本研究は、キトサンの延伸能力を向上させるため、PVAを導入したブレンドフィルムを試作し、そのブレンドフィルムの力学的性質と抗菌活性に関して検討し、以下の結果を得た。

キトサン/PVAブレンドフィルムの最高延伸倍率は、PVA含有量の増加によって高くなり、ブレンド比22/78のフィルムで7倍にまで到達した。広角X線回折よりその試料はPVAフィルムの8倍まで延伸した試料とほぼ同じ配向度を示唆している。一方、キトサンからの有意な回折は観察できず、キトサンの結晶化度は低いことが示唆された。

未延伸試料の貯蔵弾性率(E')は、キトサン(100/0)フィルムが最も高く、PVA含有量の増加によって低下したが、ブレンド比22/78の試料を7倍まで延伸したフィルムにおいて、室温での貯蔵弾性率は20GPaにまで到達し、高弾性率材料としての用途が示唆された。また、その値は-150℃~220℃の全温度領域では、 $\lambda = 8$ のPVAフィルムよりも高かった。

接触角はキトサン含有量の増加に従って大きく

なり、撥水性が増大した。

キトサン/PVAブレンドフィルムの抗菌活性は、*Staphylococcus aureus*に対するよりも*Escherichia coli*が低く、PVAのブレンド比が高くなるに従って低下した。特にこの傾向は中和フィルムで顕著であった。四級化キトサンのブレンドで抗菌活性は向上し、両試験菌に対する四級化キトサン/PVAブレンドフィルムの抗菌活性値は高く、中和しても抗菌活性が極端に低下しなかった。

本報告は、平成16年度~平成17年度科学研究費補助金(基盤研究B、課題番号16300234)「未利用天然資源の有効活用による地球環境に優しいアパレル加工製品の開発」基金により研究した報告書の一部である。

引用文献

- 1) Nakashima, T., Nakano, T., Bin, Y., and Matsuo, M.: Biodegradation Characteristics of Chitin and Chitosan Films, *J. Home Econ. Jpn.*, **56**, 12, 889 – 897, 2005.
- 2) Nakashima, T., Matsuo, M., Bin, Y., Nakano, Y., Kobayashi, T., Komemushi, S., and Sakagami, Y.: Mechanical Properties and Antibacterial Efficacy of Chitosan Films, *Biocontrol Sci.*, **11**, 1, 27 – 36, 2006.
- 3) ライオン株式会社:特開昭61 – 60701、カチオン性キトサン誘導体の製造方法、1 – 4, 1986.
- 4) Tsurugai, K., and Akaba, T.: 四級塩化キトサンによる繊維の抗菌加工、加工技術、**31**, 2, 125 – 127, 1996.
- 5) Sakurai, K., Takagi, M., and Takahashi, T.: Crystal Structure of Chitosan. 1. Unit Cell Parametets, *Sen-I gakkaiishi (J. Soc. Fiber Sci. Technol. Jpn)*, **40**, 7, 246 – 253, 1984.
- 6) 中島照夫:未延伸並びに一軸延伸した超高分子量ポリエチレン-澱粉複合フィルムの力学的性質と生分解特性、近畿大学資源再生研究所報告、**5**, 1 – 19, 2007.
- 7) Nakashima, T., and Matsuo, M.: Develop-

- ment of High-Strength and High-Modulus Polyethylene-Starch Composite Films and Biodegradation of the Composite Films, *J. Macromol. Sci.-Physics*, **B35**, 3 & 4, 659 – 679, 1996.
- 8) Nakashima, T., Xu, C., Bin, Y., and Matsuo, M.: Young's Modulus Estimated from Orientation Distribution Functions of Crystal and Amorphous Phases for Simultaneous Biaxially Stretching Ultra-High Molecular Weight Polyethylene Films Prepared by Gelation/Crystallization from Solutions, *International J. Polymeric Materials*, **51**, 1 & 2, 77 – 102, 2002.
- 9) Nakashima, T., Xu, C., Bin, Y., and Matsuo, M.: Morphology and Orientation of Crystallites of Simultaneous Biaxially Stretching Ultra-High Molecular Weight Polyethylene Films Prepared by Gelation/Crystallization from Solutions, *Polymer Journal*, **33**, 1, 54 – 68, 2001.
- 10) Nakashima, T., Xu, C., Bin, Y., and Matsuo, M.: Morphology and Mechanical Properties of Poly (vinyl alcohol) and Starch Blends Prepared by Gelation/Crystallization from Solutions, *Colloid Polym. Sci.*, **279**, 7, 646 – 654, 2001.
- 11) Nakashima, T., Ito, H., and Matsuo, M.: Biodegradation of High-Strength and High-Modulus PE-Starch Composite Films Buried in Several Kinds of Soils, *J. Macromol. Sci.-Physics*, **B41**, 1, 85 – 98, 2002.
- 12) Nakashima, T., Nagasaki, S., Ito, H., Xu, C., Bin, Y., and Matsuo, M.: Biodegradation of Biaxially Stretched Polyethylene-Starch Composite Films, *Polymer Journal*, **34**, 3, 234 – 241, 2002.
- 13) 通商産業省生活産業局編:抗菌加工製品ガイドライン、大蔵省印刷局、73 – 75, 1999.
- 14) 鈴木昌二:プラスチック製品等の抗菌性試験方法(フィルム密着法)、織消誌、**41**, 5, 472 – 477, 2000.
- 15) 日本規格協会:繊維抗菌加工製品—抗菌性試験方法・抗菌効果 JIS Z 2801:2000、1 – 19, 2000.
- 16) 高麗寛紀:国際規格 ISO 20743「抗菌加工繊維製品の抗菌性試験方法」の概要その3:転写法(Transfer method)、加工技術、**43**, 2, 139 – 142, 2008.
- 17) 中島照夫:生分解材料としてのキトサンフィルムの物性と抗菌活性、近畿大学資源再生研究所報告、7, 1 – 15, 2009.
- 18) 日本規格協会:繊維製品の抗菌性試験方法・抗菌効果 JIS L1902²⁰⁰²、1 – 30, 2002.
- 19) 中島照夫:繊維製品の抗菌防臭加工の効力評価法、防菌防黴誌、**16**, 5, 249 – 260, 1988.
- 20) 繊維製品衛生加工議会:Shake Flask法、1 – 5, 1985.
- 21) Lim, S., H., and Hudson, S., M.: Application of a Fiber-reactive Chitosan Derivative to Cotton Fabric as an Antimicrobial Textile Finish, *Carbohydrate Polym.*, **56**, 2, 227 – 234, 2004.
- 22) Lim, S., H., and Hudson, S., M.: Synthesis and Antimicrobial activity of a Water-soluble Chitosan Derivative with a Fiber-reactive Group, *Carbohydrate Res.*, **339**, 2, 313 – 319, 2004.
- 23) Liu, N., Chen, X., G., Park, H., J., Liu, C., G., Liu, C., S., Meng, X., H., and Tu, L., L.: Effect of MW and Concentration of Chitosan on Antibacterial Activity of *Escherichia coli*, *Carbohydrate Polym.*, **64**, 1, 60 – 65, 2006.
- 24) Je, J., Y., Park, P., J., and Kim, S., K.: Prolyl Endopeptidase Inhibitory Activity of Chitosan Sulfates with Different Degree of Deacetylation, *Carbohydrate Polym.*, **60**, 4, 553 – 556, 2005.
- 25) Liu, X., F., Guan, Y., L., Yang, D., Z., Li, Z., and Yao, K., D.: Antibacterial Action of Chitosan and Carboxymethylated Chitosan, *J. Appl. Polym. Sci.*, **79**, 9, 1324 – 1335, 2001.
- 26) Zhai, M., Zhao, L., Yoshii, F., and Kume,

- T.: Study on Antibacterial Starch/Chitosan Blend Film Formed Under the Action of Irradiation, *Carbohydrate Polym.*, **57**, 1, 83 – 88, 2004.
- 27) Zhao, L., Mitomo, H., Zhai, M., Yoshii, F., Nagasawa, N., and Kume, T.: Synthesis of Antibacterial PVA/CM-Chitosan Blend Hydrogels with Electron Beam Irradiation, *Carbohydrate Polymers*, **53**, 4, 439 – 446, 2003.
- 28) Vartiainen, J., Motion, R., Kulonen, H., Ratto, M., Skytta, E., and Ahvenainen, R.: Chitosan-Coated Paper: Effects of Nisin and Different Acids on the Antimicrobial Activity, *J. Appl. Polym. Sci.*, **94**, 3, 986 – 993, 2004.
- 29) Xie, W., Xu, P., Wang, W., and Liu, Q.: Preparation and Antibacterial Activity of a Water-soluble Chitosan Derivative, *Carbohydrate Polym.*, **50**, 1, 35 – 40, 2002.
- 30) Kulkarni, A., R., Kulkarni, V., H., Kesha-vayya, J., Hukkeri, V., J., and Sung, H., W.: Anti-Microbial Activity and Film Characterization of Thiazolidinone Derivatives of Chitosan, *Macromol. Biosci.*, **5**, 6, 490 – 493, 2005.
- 31) Yu, S., H., Mi, F., L., Wu, Y., B., Peng, C., K., Shyu, S., S., and Huang, R., N.: Antibacterial Activity of Chitosan-Alginate Sponges Incorporating Silver Sulfadiazine: Effect of Ladder-Loop Transition of Interpolyelectrolyte Complex and Ionic Crosslinking on the Antibiotic Release, *J. Appl. Polym. Sci.*, **98**, 2, 538 – 549, 2005.
- 32) Tsurugai, T., Yoshikawa, A., Tajima, J., and Ishii, Y.: Preparation and antibacterial activities of crosslinked chitosan films (in Japanese), *Sen-i gakkaiishi (J. Soc. Fiber Sci. Technol. Jpn)*, **47**, 4, 190 – 197, 1991.
- 33) Hosokawa, J., Tsunashima, H., Yoshihara, K., Nishiyama, M., and Morimoto, S.: Properties of Cellophane Films Coated with Chitosan (in Japanese), *Sen-i gakkaiishi (J. Soc. Fiber Sci. Technol. Jpn)*, **48**, 5, 228 – 233, 1992.
- 34) Anonymous: 中華人民共和国軽工業標準QB/T 2591-2003、抗菌塑料 抗菌性能試験方法の抗菌効果 (Antimicrobial plastics – Test for antimicrobial activity and efficacy) – (in Chinese)、中華人民共和国国家發展改革委員会、1 – 8, 2003.
- 35) 中島照夫: 我が国と中国の抗菌加工製品と抗菌力試験 (その3) 抗菌加工プラスチック製品の評価法、加工技術、**44**, 6, 405 – 411, 2009.
- 36) Nakashima, T., and Mitsuischi, Y.: Effects of surface active agents and builders on fastness to washing of antibacterial agents in the latest commercial antimicrobial treatment products (in Japanese). *J. Text. Mach. Soc. Jap.*, **39**, 8, 281 – 291, 1986.
- 37) Nakashima, T., Yaida, O., and Takeuchi, Y.: The effects of the soils on the antibacterial activity of the commercial antimicrobial treatment socks (in Japanese). *J. Text. Mach. Soc. Jap.*, **40**, 2, 57 – 65, 1987.
- 38) Nakashima, T., and Fuse, G.: Studies on the antibacterial and deodorant finishing treatment of fibers (Part 1) – On the fastness to washing and light fastness of the treated commercial antibacterial agents – (in Japanese), *J. Environmental control Technique*, **7**, 16 – 25, 1989.
- 39) Nakashima, T.: Studies on the sanitizing treatment of clothing materials (Part 4) – The effects of washing and light exposing on the antibacterial activity – (in Japanese), *Bulletin Kinki University Toyooka Women's Junior College*, **13**, 15 – 35, 1985.
- 40) Nakashima, T.: Studies on the sanitizing treatment of clothing materials (Part 6) – The origination of drug-resistant microorganisms in textiles treated with antibacterial agents – (in Japanese) , *Bulletin Kinki*

University Toyooka Women's Junior College,
15, 31 – 43, 1987.

- 41) Nakashima, T.,: Studies on the sanitizing treatment of clothing materials (Part 7) – The effects of bleaching agents on the antibacterial activity – (in Japanese), *Bulletin Kinki University Toyooka Women's Junior College*, 16, 41 – 56, 1988.
- 42) Nakashima, T.,: Studies on the sanitizing treatment of clothing materials (Part 8) – A comparison of the antibacterial activity of the cloths treated with commercial antibacterial agents with the antibacterial activity of antimicrobial and deodorant commercial socks – (in Japanese), *Bulletin Kinki University Toyooka Junior College*, 17, 25 – 39, 1989.