

生分解性材料としてのキトサンフィルムの 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 Films

Teruo NAKASHIMA

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

Synopsis

Chitin, chitosan and quaternary chitosan films were prepared, and the physical properties and the antibacterial activities of chitosan and quaternary chitosan films were evaluated.

The tensile strength of chitin films was 30~40% lower than that of chitosan films, but the crystallinity of chitin film was much higher than that of chitosan films. The crystallinity and orientation of crystallites were hardly affected by the four kinds of solvent chosen to cast chitosan films, but a detailed analysis revealed that the cast film prepared with acetic acid provided slightly lower crystallinity than others.

The antibacterial activities of quaternary chitosan films against *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 and *Escherichia coli* NBRC 3972 were stronger than those of chitosan films.

The antibacterial activities of neutralized chitosan films may be slightly inferior to those of un-neutralized chitosan films. The improvement in the antibacterial activity of chitosan films against *E. coli* was slightly inferior to that against *S. aureus*. This phenomenon was particularly observed on the neutralized chitosan films.

Though the antibacterial activity of chitosan was slightly inferior to that of the organic antibacterial compounds, we emphasize that chitosan would be a useful and suitable material with regard to its effect on the environmental ecosystem.

Keywords: chitosan and quaternary chitosan films, physical property of chitosan, antibacterial efficacy, Film Adhering Method (JIS Z 2801²⁰⁰²), *Staphylococcus aureus* NBRC 12732, *Escherichia coli* NBRC 3972.

緒 言

新合成高分子を設計する場合、人為的に造られてきた今までの合成高分子材料の開発設計思想は、一般に使用時の強度、軽量および耐腐食性など、その製品が持つ機能性に最重点が置かれて生産販売されてきた。これらの合成高分子材料は現代社会の一端を築いてきた反面、その大部分は、使用後再利用（リユース（reuse、新たに部品などを再使用）、リサイクル（recycle））¹⁾されず、主に放棄されている。その廃棄物量は多量で、20年間以上分解しないで残存する。これらの廃棄物は当時、自然環境に対する負荷の影響を十分考慮せずに関産されたため、汚染の重大さが最近まで明確に認識されていなかった。このため自然環境に対して高負荷を与え、重大な環境問題を引き起こす原因になっている。

具体的には20世紀の初頭以来、我々の日常生活において密接に関与した合成繊維が開産され、我が国の生活環境中に多量に使用されたにもかかわらず、その再利用は考慮に入れていなかった。例えば、合成高分子材料の廃棄物量は、海中およびその周辺に年間10万トン以上も蓄積し、その廃棄物の多くが河川・湖沼や海洋中およびその周辺に放置され、生態系の均衡を乱して多大な被害を与えている。これが原因で各種の公害が発生している^{2,3)}。

近年、地球環境問題は世界中でかなり注目を受け、自然環境で分解可能な高分子材料の研究開発が要望されてきた。微生物の作用によって分解する生分解性高分子や太陽光線によって分解する光分解性高分子の製品化が益々注目され始めてきた。

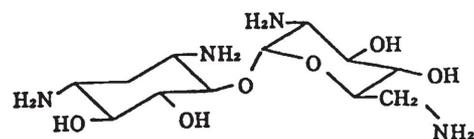
理想的な生分解性高分子材料は、製品の使用期間中においては、優れた機能性を長期間持続的に発揮し、使用済みで破棄後は、速やかに微生物や太陽光線の作用によって分解され、最終的に炭酸ガスと水に戻る物質循環可能な製品の開発が望ましい。

一方、高分子は、1) 動植物、海洋生物由来の天然高分子、2) 微生物が生産する高分子、3) 合成高分子、4) 合成高分子を化学的または物理的

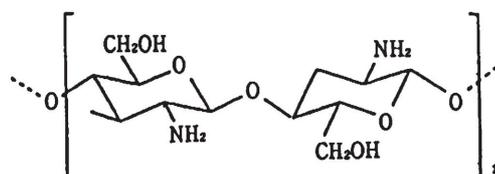
手法で組み合わせた物質に分類することができる^{2,4)}。キチン、キトサンは、カニ、エビおよびロブスターなどの殻から生産された動物由来の天然高分子で、1) に該当するが、現状では、それらの殻は有効に利用されていない。その原材料のカニ、エビの生産量は、セルロースに次いで多く、年間1千億～1万億トンと推定されている^{2,5,6)}。しかし、原材料として使用することができる殆ど全てが現在破棄されている。したがって、これらの廃棄物を再利用し、経済的効果を向上させて未利用天然資源のキチン・キトサンを有効活用することは、廃棄物処理上非常に有意義で大いに興味がある。

また、キトサンは抗菌活性に基づく高分子複合材料としても使用されている。しかし、純粋なキトサン製品は日常生活で大規模に利用されていない。その原因はキトサンの原材料価格がまだ高価で、力学的性質や抗菌活性など総合的な特性に関する研究が殆ど行われていないためと考えられる。

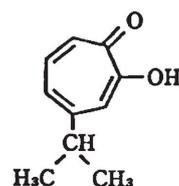
更に、最近の抗菌防臭加工繊維製品は、表1に



Amino glucoside, 1-L-(1,3,5/2,4)-1,5-Diamino-4-O-(2-6-dideoxy- α -D-glucopyranosyl)-2-3-cyclohexanediol



Chitosan, (β -1,4-Polyglucosamine)



Hinokitiol, (4-Isopropyl-2-hydroxy-cyclohepta-2,4,6-triene-1-one)

Fig. 1. Structural formula of typical natural antimicrobial agents.

Table 1. Typical natural antimicrobial agents and antibacterial mechanisms.

Antimicrobial agents	Typical processed products	Finishing method	Processing	Antibacterial mechanism
Amino glucoside	Seiketsujiman Fukusuke Co., Ltd.	After-finishing method	Amino glucosidal treated with 2% padding was adhered to the surface of fibers and heat-treated at 130°C for 90s	The action of the cell ribosome subunit for 30s can hamper the biosyntheses of the protein.
Chitosan	Chitogreen Fuji Bo Holdings Inc.	Pre-finishing method	Mixing the viscose rayon with the chitosan derivate corpuscle.	The amino groups of the chitosan molecule adsorb the bacillus and are bonded with the negative ion of the cell wall, thus hampering the biosyntheses of the cell wall and restraining the material transportation between the inside and outside of cell wall
	Chitopoly Fuji Bo Holdings Inc.	Pre-finishing method	Mixing chitosan into polynosic fibers	
	New Tafel Par clean Mitsubishi rayon	Pre-finishing method	Adding chitosan corpuscle to matrix and mixing during the manufacturing of acrylic fiber	
	Chito Silky Daiwabo Inc.	After-finishing method	Chitosan was linkage with liquid collagen by peptide bond to form chitosan-collagen derivate and fixed to the cellulose fibers.	
	Biatoron Komatsu Seiren Co., Ltd.	After-finishing method	Chitosan and collagen derivate obtained from natural protein were bonded polyester by graft polymerization	
Hinokitiol	Riken Resin RMC-HOL Mikiriken Kogyou Inc.	After-finishing method	Treating fibers with the spraying method and the soaking method by using 0.5-3% of hinokitiol microcapsule combined with Riken Sol A-605 (binder)	Principal ingredients are sesquiterpenes and phenol. The former is a smell element, and the latter is antibacterial. Which can destroy the cell and react with the protein and denature.
	Hinokichi Toho Tenax Inc.	After-finishing method	Wrapping the hinokitiol by the microcapsule of silica, and added-on it to the fibers by the resin binder.	

示す代表的な天然物系抗菌剤が利用され始め、安全性面から再認識されてきた。この理由は、加工製品の抗菌効果を殺菌活性域でなく静菌活性域（マイルドな抗菌活性）での効果に重点を置く傾向が強くなったことによる。その代表的な天然物系抗菌加工薬剤の構造式を図1に示した。

上記で指摘したように、天然資源の枯渇が叫ばれているにも拘わらず、近年、高度な社会構造を維持し発展させるため、産業界では新合成高分子材料の生産量を増大させ、生態系の自己制御作用の限界を大きく超えた環境形成能力によって現代社会の構築を維持してきた。その反面、今まで増え続けてきた膨大な産業廃棄物は、現代社会が抱える地球規模での環境汚染物質として多量に放出され、重大な社会問題に発展してきた。

本研究は、上記に提起した各種の問題点を解決するため、地球規模の環境保全を考慮して生態系に最重点を置き、物質循環が可能で、しかも未利用天然資源の有効活用も同時に解決できる甲殻類のカニ、エビから得たキトサンに着目した。そして生活環境中で適切に使用するために数種のキトサンフィ

ルムを調製した。今回はそのフィルムの力学的特性および抗菌活性の向上に関して検討した。

実験方法

1. 四級化キトサンの調製方法⁷⁾

キトサン粉末20gは、80%のisopropyl alcohol水溶液140gに加え、水浴中で60±5℃に到達するまで加熱した。次に、図2⁸⁾に示すようにGlycidyl trimethylammonium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

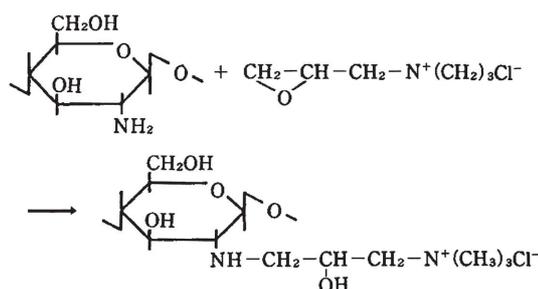


Fig. 2. Reaction of chitosan and glycidyl trimethylammonium chloride (GTMAC)⁸⁾.

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、 $40 \pm 2^\circ\text{C}$ で48時間乾燥し、四級化キトサンを調製した。

2. フィルムの成形加工法

使用したキチン粉末は、キミカ（株）製品で、甲殻類のカニ100%の殻から調製した。キチンフィルムの調製は、キチン粉末1gを *N,N*-dimethyl acetamide 50ml、および *N*-methyl-2-pyrrolidone 50mlの混合溶液中に分散後、その反応混合物に対し、LiCl 5gをゆっくり加えた^{9,10}。この溶液は24時間混合後、ペトリ皿に注入した。次に、これを2時間isopropyl alcoholで処理して凝固させ、キチンフィルムを調製した。このフィルムを蒸留水でよく洗浄した。作成したキチンフィルムは収縮を避けるため、リングにはめて固定し、 80°C の温水中に2時間処理後、循環気流中で溶媒を蒸発させて乾燥した。

一方、粘度5-20cp、アセチル化度85%のキトサン粉末は、キミカ（株）製品で、カニ100%の殻から調製した。キトサンフィルムの調製は、キトサン4gを蒸留水100ml中に加え、よく膨潤させるため30分間攪拌した。蟻酸、酢酸、プロピオン酸、および酪酸の4種を溶媒として使用し

た¹¹。各4mlの溶媒をキトサン水溶液中に加え、24時間攪拌後、その溶液をペトリ皿に注入した。キトサンフィルムの溶媒は、室温の循環気流中で蒸発させた。次に、キトサンフィルムの中和は、4%の水酸化ナトリウム水溶液中に24時間浸漬後、取り出して蒸留水でよく洗浄し、循環気流中で水分を蒸発させて2週間乾燥した。四級化キトサンフィルムは、酢酸溶媒を使用して同じ方法で調製した。また、中和は上記の方法と同様に行った。

こうして調製した乾燥フィルムは、長さ30mm、幅10mmの試験片に切断した。この試験片を手動式の一軸延伸装置（前報¹²）の図1を参照）を用い、延伸するための長さ20mmに固定（前報¹²）の図1のaとb間に固定）した。この試料を蒸気下で2倍まで延伸した。しかし、2倍以上の延伸は残念ながらできなかった。

キチン・キトサンフィルムはできる限り厚さを一定に調製するため、注入溶液量を制御した。調製したフィルムを実測した結果、キチン・キトサンフィルムの厚さは0.18~0.24mmの範囲であった。これらの試験試料を表2に示した。

3. 試料の形態学的観察と力学的性質の測定

キチン・キトサンフィルムの形態学的特徴は、広角X線回折（WAXD）と走査型電子顕微鏡

Table 2. Preparation of chitosan films used for the antibacterial activity test.

Sample code	Solvent	Neutralization status	Quaternary ammonium chitosan	Species of chitosan	Deacetylation degree (%)
Control	Untreated film (Polyethylene film)	/	/	/	/
1	Formic acid	+	N	Kimika Co., Ltd., K-03	85.0
2	Acetic acid	+	N	Kimika Co., Ltd., K-03	85.0
2A	Acetic acid	+	Y	Koyo Chemical Co., Ltd., SK-03	86.9
2B	Acetic acid	+	Y	Kimika Co., Ltd., K-03	85.0
2C	Acetic acid	+	Y	Koyo Chemical Co., Ltd., FM-80	94.2
3	Propionic acid	+	N	Kimika Co., Ltd., K-03	85.0
4	Butyric acid	+	N	Kimika Co., Ltd., K-03	85.0
1	Formic acid	-	N	Kimika Co., Ltd., K-03	85.0
2	Acetic acid	-	N	Kimika Co., Ltd., K-03	85.0
2A	Acetic acid	-	Y	Koyo Chemical Co., Ltd., SK-03	86.9
2B	Acetic acid	-	Y	Kimika Co., Ltd., K-03	85.0
2C	Acetic acid	-	Y	Koyo Chemical Co., Ltd., FM-80	94.2
3	Propionic acid	-	N	Kimika Co., Ltd., K-03	85.0
4	Butyric acid	-	N	Kimika Co., Ltd., K-03	85.0

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

(SEM) を用いて観察した。X線回折は、12Kw の回転陽極X線装置 Rigaku Electric (株) 製の RAD-rA を用いて測定した (前報¹³⁾ の図5を参照)。広角X線回折図形は、200mA、40kV の条件下で、CuK α 照射 (波長0.154nm) カメラを用い、点収束法によって測定した。本条件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、回折ビームは0.9mm \times 0.9mmの隙間に調整して検出した。X線回折は湾曲黒鉛モノクロメーターによりモノクロ化した。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。

走査型電子顕微鏡 (SEM) 写真は、日立 (株) 製の S-2100B を用い、白金蒸着した試料を1.5kv の加速電圧下で測定した (前報¹²⁾ の図3を参照)。

応力歪み曲線は、ヤング率と引張強度を得る目的で、Toyo Baldwin (株) 製のインストロン引張試験機 STM-H500BP を用い、最小クロス・ヘッドスピードが10mm/分になるように設定して記録した (前報¹²⁾ の図2を参照)。

動的粘弾性は、岩本機械 (株) 製の粘弾性装置 (VES-F) を用い、 $-150\sim 150$ °C の温度範囲内を周波数10Hzに調整して繰り返し測定した (前報¹³⁾ の図4を参照)。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%のピーク変形を保持させて正弦波長振動を与え、試験片に張力を付与しながら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。応力・歪み曲線と動的粘弾性を測定した掴み間の試料片長 (前報¹²⁾ の図4中のaとb間) は約40mm、試料幅を約1.5mmに設定した。最終的な掴み間は10mm以上の長さに固定した。調製したこれらのキチン・キトサンフィルムの特徴を表3に示した。

4. 培地

前培養には普通寒天培地 (Nutrient Agar (NA) 培地)、接種菌液用には普通ブイヨン培地 (NB 培地)、菌洗い出し用には Soybean-Casein Digest Broth with Lecithin & Polysorbate (SCDLP) 培地、生菌数測定用には標準寒天培地 (SA (Standard agar) 培地) をそれぞれ本実験に用いた¹⁴⁻¹⁶⁾。

5. 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 2801²⁰⁰²⁾」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¹⁴⁻¹⁶⁾。

6. 試験菌の培養と接種菌液の調製

保存機関から入手した分譲菌株1白金耳を Nutrient Agar (NA) 斜面培地に移植し、35 \sim 37°C で16 \sim 24時間培養した。さらに、この培養菌株1白金耳を用いて同様の培地を用い、同一温度で16 \sim 20時間培養した試験菌を前培養とした。

Table 3. Characterization of chitin and chitosan films prepared.

Films	Solvents	pH of solution	Moisture content (%)	Density (g/cm ³)	Tensile strength GPa	Young's modulus GPa
Chitin	—	4.8	18.7	1.400	0.10	1.87
	Formic acid	3.8	9.5	1.422	0.14	2.68
	Acetic acid	4.0	16.2	1.420	0.16	2.39
Chitosan	Propionic acid	4.4	12.8	1.424	0.16	2.53
	Butyric acid	4.3	8.9	1.423	0.14	2.61

Reference data: Moisture content (Standard state; 20°C, 65% RH)

Natural fibers: Cotton 7%, Wool 16%, Silk 11%, Flax 7 \sim 10%,

Synthetic fibers: Polyester 0.4 \sim 0.5%, Acrylic 1.2 \sim 2%, Polyethylene 0%.

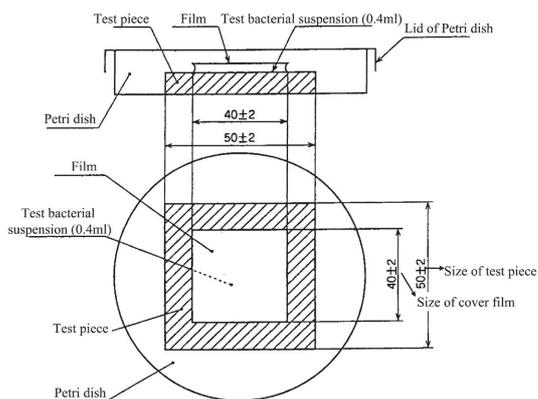


Fig. 3. Dropping method of bacterial suspension to test piece and cover of film.

次に、Nutrient broth (NB) 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 Nutrient broth (NB) 培地に、前培養した試験菌を均一に分散させ、 $2.5 \sim 10 \times 10^5$ cfu (colony forming units、コロニー形成単位)/mlに調整した試験菌を接種用菌液とした。

7. 抗菌力試験法

抗菌力試験は、「繊維抗菌加工製品-抗菌性試験方法・抗菌効果 JIS Z 2801:2002」通称フィルム密着法に準じて行った¹⁴⁻¹⁶⁾。

本法は図3に示すように、平らな部分から 50 ± 2 mm (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)を採取し、試験片の全面を、エタノールを吸収させた局方ガーゼ又は脱脂綿で軽く2~3回拭いた後、十分乾燥した。これらの各試験片をそれぞれ滅菌ペトリ皿に入れ、試験片上に実験方法6で調整した接種用菌液 ($2.5 \sim 10 \times 10^5$ cfu/ml) 0.4mlを接種し、その試験片上に被覆フィルムを被せ、試験菌液がフィルムの端から漏れないように注意してフィルム全体に行き渡るように軽く押さえ、ペトリ皿の蓋をした。これをプラスチック製蓋付き密閉容器内¹⁷⁾に入れ、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度90%以上の条件下で24時間静置培養した。

次に、接種直後と $35 \pm 1^\circ\text{C}$ で24時間培養後の無加工試験片と加工試験片の上に被覆したフィルムに付着している生菌を、被覆フィルムと試験片から菌液がこぼれないように注意し、滅菌

ピンセットでストマッカー袋内に入れ、SCDLP (Soybean-Casein Digest Broth with Lecithin & Polysorbate) 液体培地10mlを加え、手動又は微生物試験用抽出装置(ストマッカーなど)でよくもみ、接種後培養した試験菌を完全に洗い出した。この洗い出し液1ml中の生菌数を、SA (Standard agar) 培地を用いて寒天平板希釈法 ($35 \pm 1^\circ\text{C}$ で40~48時間培養) で計測した。

8. 評価法

24時間培養後の無加工試験片と加工試験片の生菌数値から、次式を用いて増減値差を算出し、それらの抗菌活性を評価した。

$$\begin{aligned} \text{抗菌活性値} &= \text{Log}(B/A) - \text{Log}(C/A) \\ &= \text{Log}(B/C) \end{aligned}$$

A: 無加工試験片の接種直後(0時間)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

結果及び考察

1. 試作フィルムの物性

表3は未延伸のキチン・キトサンフィルムの特性を整理してまとめた。

フィルム調製時の酸溶液pHは異なった。蟻酸溶液はpH 3.8で酸性が最も強く、他の三種の溶液は4.0~4.4の範囲内のpHで、殆ど同一の酸性値を示した。そのキトサンフィルムの含水率は、8.9~16.2%であった。これらの数値は、標準状態(20°C、65% R.H.(relative humidity 相対湿度))で、天然繊維の水分率(毛16%、綿7%、麻7~10%および絹11%)と殆ど等しく、ポリエチレンやポリエチレンテレフタレートのような合成繊維(ポリエチレン0%、ポリ塩化ビニル0%、ポリエステル0.4~0.5%、アクリル1.2~2.0%およびポリウレタン0.4~1.3%など)よりも遙かに高かった。キチンフィルムに関する密度と引張強度は、キトサンフィルムよりも少し低かった。更に、異

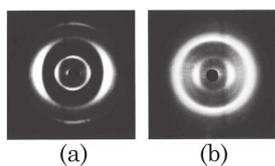


Fig. 4. WAXD patterns (end view) for (a) Chitin film (b) Chitosan film prepared with acetic acid.

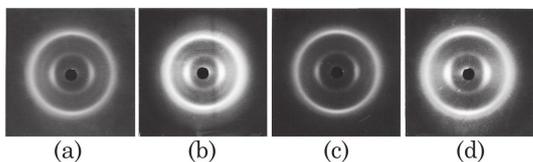


Fig. 5. WAXD patterns (through view) for Chitosan films ($\lambda = 2$) heat treated at 120°C for 2 h after being prepared with different solvents.

(a) formic acid, (b) acetic acid, (c) propionic acid, (d) butyric acid.

種溶媒によって調製したキトサンフィルムに関する密度と引張強度は溶媒間で殆ど違わなかった。これとは対照的に、5つの測定値の平均から入手したヤング率は、キトサンチェーンの分子移動性を示す含水量に非常に敏感であった。

図4は未延伸のキチン・キトサンフィルムの側面から検出した広角X線パターンを示した。

この図は、キチン・キトサンフィルム中の結晶軸が、フィルム表面に対して平行に配向し、ピラノーズ環が同一平面上に配向していることを示

唆している。キチンフィルム図形 (a) の回折弧アークは、キトサンフィルム図形 (b) のそれよりも鮮明で、キチンフィルムの結晶化度と配向性が高いことを示唆している。この結果は、キチンからキトサンを調製する時、脱アセチル化の過程で非結晶領域が増加し、結晶化度が減少したと考えられる。同様の傾向は、異種の溶媒によって調製した4種のキトサンフィルムにおいても同様に確認した。

図5は2倍延伸したキトサンフィルムの広角X線パターンを示した。

結晶の優先配向性を示す図形は、延伸方向に関与していた。4つの図形中において、酢酸溶液によって調製したフィルム (b) の回折強度は、蟻酸、プロピオン酸および酪酸溶液によって調製したキャストフィルム (a)、(c)、および (d) のフィルムよりも観察した回折弧アークが弱かった。これは、キャストフィルムの結晶化度が溶媒の種類に少なからず依存していることを示唆している。

表3に戻って、4種の溶媒で調製したキトサンフィルムの引張強度は、 $0.14\sim 0.16\text{ GPa}$ で、ヤング率は $2.39\sim 2.68\text{ GPa}$ であった。異なった含水率にもかかわらず、引張強度は、大きく違わなかつ

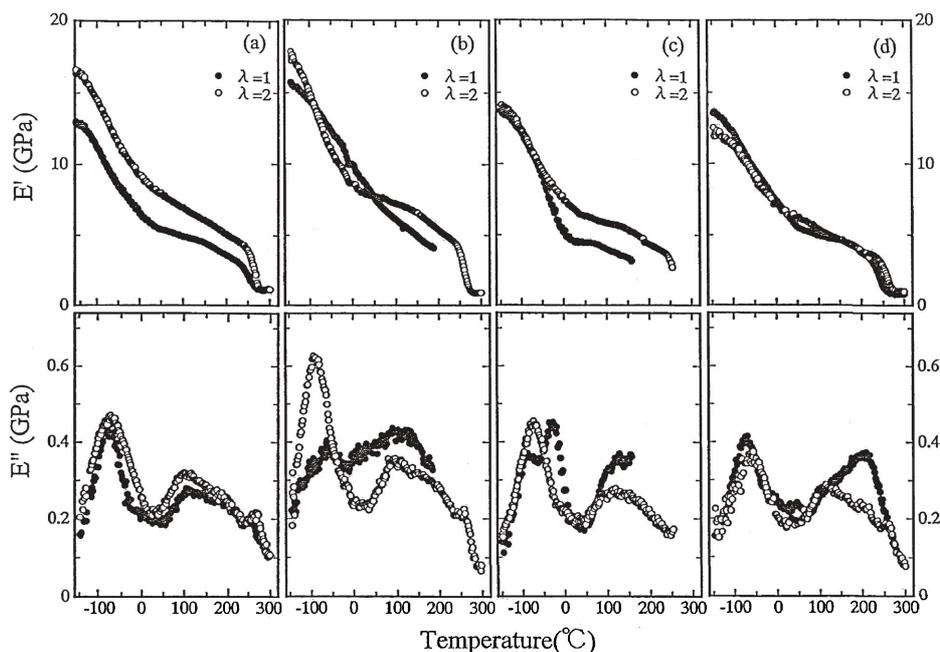


Fig. 6. Temperature dependence of the storage and loss moduli of chitosan films with the indicated draw ratios. The films were heat-treated at 120°C for 2 h. Solvent were (a) formic acid, (b) acetic acid, (c) propionic acid, (d) butyric acid.

た。しかし、図6に示すように引張試験機によって測定したヤング率が、室温における貯蔵弾性率 (E') の結果から得られた数値よりも低かった。この原因は、フィルムの水分率が影響したと考えられる。すなわち、引張試験機によって測定したフィルムは、測定中熱処理されていないが、粘弾性の測定フィルムは、測定中120℃で2時間予熱され、フィルム中の水分が蒸発し、水分の影響がなかったからである。延伸フィルムの低温度領域における貯蔵弾性率 (E') 値は、延伸倍率に殆ど依存しなかったが、高温領域では高い値を示した。低温度領域の貯蔵弾性率 (E') 値は、そのような小さい影響がチェーンの方向性に対して優位に働き、キトサンチェーン自体の剛性の抜本的な増加を促進する結果となった。損失弾性率 (E'') は、2あるいは3種の分散ピークを示し、未延伸フィルムの特徴は、キャストフィルムの調製に用いた溶媒の種類に非常に敏感であった。この結果とは対照的に、延伸フィルムの特徴は、殆ど同様の傾向を示した。すなわち、そのピークは、無定形のチェーンセグメントの局部動作に関与し、およそ-100℃で出現した。100℃周辺に出現したピークは、水による可塑性における無定形のチェーンセグメントが大きく移動したと考えられる。

2. キトサンフィルムの抗菌活性

キトサンの抗菌メカニズムは、次のように言われている。1) カチオン性高分子のキトサンが細胞壁を構成するリン脂質やシアル酸などのアニオンとイオンの引き合う結果、細胞の自由度が阻害される¹⁸⁾。2) 分子中のアミノ基が細胞膜や細胞壁を破壊する^{19, 20)}。3) 細胞壁の酸性基とキトサンのアミノ基間の高分子電解質複合体形成とリゾチーム誘導体の作用²¹⁾。

次に、こうした抗菌メカニズムと上記に示した力学的特性を有するキトサンフィルムを用いて *S. aureus* と *E. coli* に対する抗菌活性を「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」で調べた。

表4と図7はキトサンフィルムに *S. aureus* と *E.*

coli を接種し、24時間培養した後の生菌数を示した。

5×5cmに裁断し、中和したキトサンフィルムと中和しなかった(無中和)キトサンフィルム上に、試験菌 *S. aureus* の接種菌数が 2.36×10^5 cfu/mlとなるように調整した1/500ニュートリエントBrothの懸濁試験菌液0.4mlを接種し、35±1℃、R.H. (relative humidity 相对湿度) 90%以上の条件下で24時間培養した。無加工フィルム(ポリエチレンフィルム)に接種した直後に回収(0 time)した生菌数は 2.36×10^5 cfu/plateで

Table 4. Cell counts after 24 h incubation for chitosan films inoculated with *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 or *Escherichia coli* NBRC 3972.

Sample code	Neutralization	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
		Cell counts (cfu/plate)	Cell counts (cfu/plate)
1A	+	7.80×10^1	2.87×10^5
2A	+	<10*	1.83×10^5
3A	+	1.00×10^1	5.60×10^3
4A	+	1.22×10^3	5.50×10^4
1B	-	<10*	1.50×10^1
2B	-	<10*	<10*
3B	-	<10*	<10*
4B	-	<10*	<10*
Untreated film (Polyethylene film)		2.23×10^5	2.69×10^5

Initial cell counts of *S. aureus* on untreated film was 2.36×10^5 cfu/plate.

Initial cell counts of *E. coli* on untreated film was 2.85×10^5 cfu/plate.

+: Neutralization, -: Non-neutralization.

*: N. D.; Not detected (Detection limit: <10)

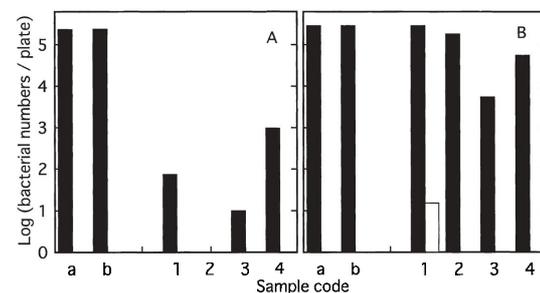


Fig. 7. Bacterial numbers after 24 h incubation for chitosan films inoculated with the test organisms.

A: *S. aureus*, B: *E. coli*. a: Bacterial numbers untreated film just after inoculated, b: Bacterial numbers untreated film after 18 h incubation. ■: Neutralization films, □: Non-neutralization films. Chitosan films were treated with formic acid (Sample code 1), acetic acid (Sample code 2), propionic acid (Sample code 3), butyric acid (Sample code 4).

あった。これを24時間培養した生菌数は 2.40×10^5 cfu/platとなり、接種菌は殆ど増殖しなかった(図7A)。この原因は、「繊維製品の抗菌性試験方法・抗菌効果JIS L 1902^{:2002}」²²⁾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、算出した²³⁾)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。このため接種菌液培地濃度は、「繊維製品の抗菌性試験方法・抗菌効果JIS L 1902^{:2002}」と比較して希薄(1/25培地濃度が薄い)なため、試験菌が増殖するための栄養分が不足しているからである。従って本試験法は、「シェークフラスコ法」²⁴⁾(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²³⁾)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、実際の製品使用条件とは異なり、試験法の改正が望まれる。しかし、Lim, S., H.ら^{25, 26)}もシェークフラスコ法と同様に、0.3mmolの希薄なリン酸緩衝溶液(ASTM E2149-01, American Society for Testing and Materials^{:2001})を用いて抗菌活性を評価している。このように本試験法は栄養分(貧栄養)に問題はあるが、現在フィルムの抗菌力試験は、本JIS法(「繊維抗菌加工製品-抗菌性試験方法・抗菌効果 JIS Z 2801^{:2000}」)で抗菌活性を評価するように規定されている。また、生菌数を計測する定量法でなく、OD(optical density, 光学濃度)評価や阻止帯(Halo)の直径などによる定性法で抗菌活性を評価している報告が多い²⁷⁻³⁵⁾。しかし本実験では、定量法で生菌数を計測する「繊維抗菌加工製品-抗菌性試験方法・抗菌効果 JIS Z 2801^{:2000}」によって抗菌活性を評価した。

同様にキトサンフィルムに対して同数の試験菌を接種し、24時間培養した場合の生菌数は、中和したフィルムが蟻酸溶媒フィルムで 7.40×10^1 cfu/plat、酢酸溶媒フィルムで < 10 cfu/plat、プロピオン酸溶媒フィルムで 1.00×10^1 cfu/plat、酪酸溶媒フィルムが 9.85×10^2 cfu/platの数値を示し、無加工フィルムと比較して接種菌数が1/

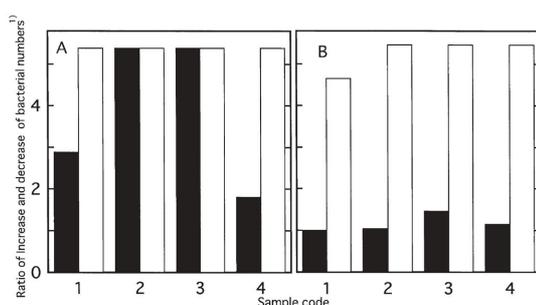


Fig. 8. Antibacterial activity test of chitosan films against *S. aureus* or *E. coli* using Film-adhering method. A: *S. aureus*, B: *E. coli*. □: Neutralized films, ■: Non-neutralized films. Chitosan films were treated with formic acid (Sample code 1), acetic acid (Sample code 2), propionic acid (Sample code 3), butyric acid (Sample code 4), respectively. 1): Log (C/D), C: Bacterial numbers after 24 h incubation for untreated film inoculated with test bacteria, D: Bacterial numbers after 24 h incubation for chitosan films inoculated with test bacteria.

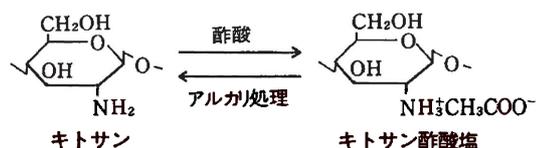


Fig. 9. Reaction of chitosan and organic acid⁸⁾.

1,000~1/1万減少した(表4と図7A)。この場合の抗菌活性値は、実験方法8の式を用いて算出すると、図8Aに示すように1.80~<5.38の数値になった。

一方、無中和キトサンフィルムの生菌数は、いずれの溶媒フィルムでも < 10 cfu/platの値を示し、1/1万減少した。この場合の抗菌活性値は、同じく実験方法8の式を用いて算出すると、図8Aに示すように < 5.35 の数値になった。

無中和キトサンフィルムよりも、中和したキトサンフィルムは抗菌力の低下が顕著であった。これは図9に示したように四級塩化したキトサンは中和処理、水洗いの操作によって造塩結合して形成したキトサン塩から酸が離脱し、遊離型キトサン(遊離アミノ基)に変化し、抗菌活性値が低下したと考えられる^{7, 34, 35)}。

Tsurugai et al.^{8, 36)} および細川ら³⁷⁾は、有機酸でキトサンを処理して得た四級塩化キトサンが抗菌作用を示すと報告している。しかし、幾つかの四級塩化キトサンは、水酸化ナトリウム水溶液を

使用して中和反応させると遊離アミノ基を形成し、抗菌活性が低下する原因になる。

表4と図7Bに示すように *S. aureus* の場合と同様に、5×5cmに裁断し、中和したキトサンフィルムと無中和キトサンフィルム上に、試験菌 *E. coli* の接種菌数が 2.85×10^5 cfu/plat となるように調整した1/500ニュートリエント Broth の懸濁菌液 0.4 ml を接種し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、R. H. 90 % 以上の条件下で24時間培養した。無加工フィルムに接種した直後に回収した生菌数は 2.85×10^5 cfu/plate であった。これを24時間培養後の生菌数は 2.91×10^5 cfu/plat となり殆ど増殖しなかった。同様にキトサンフィルムに対して同数の試験菌を接種し、24時間培養した場合の生菌数は、中和フィルムで蟻酸溶媒フィルムが 2.87×10^5 cfu/plate、酢酸溶媒フィルムが 1.83×10^5 cfu/plate、プロピオン酸溶媒フィルムが 5.55×10^3 cfu/plate、酪酸溶媒フィルムが 5.50×10^4 cfu/plate の数値を示し、無加工フィルムと比べて接種菌が1～1/100減少した(表4と図7B)。この場合の抗菌活性値は、実験方法8の式を用いて算出すると、図8Bに示すように1.00～1.46の数値になった。

一方、無中和キトサンフィルムの生菌数は、蟻酸溶媒フィルムが 1.50×10^1 cfu/plate、その他の溶媒フィルムはいずれも<10の値を示し、1/1万減少した。この場合の抗菌活性値は、実験方法8の式を用いて算出すると、図8Bに示すよう4.65～<5.46の数値になった。以上のように *E. coli* に対するキトサンフィルムの抗菌活性の向上は、*S. aureus* に対するよりも低い。この傾向は、中和したキトサンフィルムで顕著に現れた。これはキトサンの抗菌活性が、*S. aureus* の場合はアミノ基酢酸塩などによる四級塩化の効果以外に、キトサンフィルムから直接遊離した酢酸などの有機酸の抗菌作用も加わる。しかし、*E. coli* の場合は前者の効果しか期待できないと考えられる。こうした傾向は、加工薬剤や効力評価法が異なっても同様に認められた³⁷⁻⁴³⁾。

無中和キトサンフィルムは、接種懸濁菌液0.4

mlを接種すると、酪酸とプロピオン酸溶媒フィルムが膨潤し、蟻酸と酢酸溶媒フィルムが一部溶解した。この接種時と同一条件下(50±2mmの正方形で接種菌液0.4ml)でpHを測定することは、溶液量が非常に少ないため残念ながら再現できなかった。しかし、条件は異なるが、予備実験において、蒸留水30ml中にキトサンフィルム3gを入れ、24時間放置した条件下で調べた溶液のpHは、蟻酸溶液フィルム、酢酸溶液フィルム、プロピオン酸溶液フィルムおよび酪酸溶液フィルムが、それぞれ5.1、5.7、6.0および5.9であった。キトサンフィルムの抗菌性測定時のpHは、フィルム作成時のpH(表3を参照)よりも高く、その格差も小さい。このことは、懸濁菌溶液の接種時に遊離した酸やキトサンフィルムの非結晶領域におけるアミノ基が酸と造塩結合して四級化したこと²⁶⁾や、キトサンのアンモニウムイオンがイオン化した影響⁴⁵⁾が抗菌活性に関与したと推察される。

次に四級化キトサンフィルムの細菌に対する抗菌活性を表5と図10に示した。

四級化していないフィルムと同様に、5×5cmに裁断したフィルム(中和フィルムと無中和フィルム)上に、試験菌 *S. aureus* の接種菌数が 4.75×10^5 cfu/mlとなるように調整した1/500ニュート

Table 5. Bacterial numbers after 24 h incubation on quaternary ammonium chitosan films inoculated with *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 or *Escherichia coli* NBRC 3972.

Sample code	Neutralize status	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
		Bacterial numbers (cfu/plate)	Bacterial numbers (cfu/plate)
2 A	+	<10*	2.94×10^5
2 B	+	<10*	1.55×10^4
2 C	+	2.86×10^2	1.02×10^5
2 A	-	<10*	8.43×10^2
2 B	-	<10*	<10*
2 C	-	2.33×10^2	1.95×10^3
Untreated film (Polyethylene film)		5.60×10^5	5.68×10^5

Initial bacterial numbers of *S. aureus* on untreated film (control) was 4.75×10^5 cfu/plate. Initial bacterial numbers of *E. coli* on untreated film (control) was 4.80×10^5 cfu/plate.

+: Neutralize, -: Un-neutralize.

*: N. D. ; Not detected (Detection limit: <10)

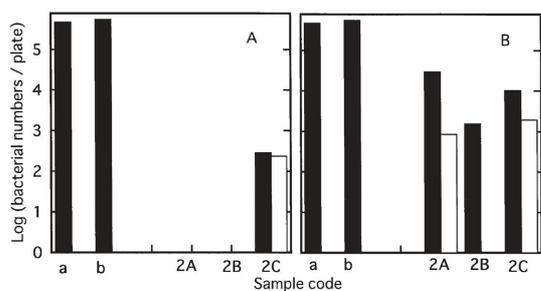


Fig. 10. Bacterial numbers after 24 h incubation for quaternary ammonium chitosan films inoculated with the test organisms. A: *S. aureus*, B: *E. coli*. a: Bacterial numbers for untreated film just after being inoculated, b: Bacterial numbers for untreated film after 18 h incubation. ■: Neutralized films, □: Non-neutralized films.

リエント Broth の接種懸濁菌液 0.4ml を接種し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 90% 以上の条件下で 24 時間培養した。無加工フィルムに接種した直後に回収した生菌数は 4.75×10^5 cfu/plate であった。これを 24 時間培養した後の生菌数は 5.60×10^5 cfu/plate となった。同様に四級化キトサンフィルムに対して同数の試験菌を接種し、24 時間培養した場合の生菌数は、中和フィルムでは試料 2A と 2B が < 10 cfu/plate、試料 2C が 2.86×10^2 cfu/plate の数値を示し、無加工フィルムと比べて接種菌数が 1/1,000 ~ 1/1 万減少した。この場合の抗菌活性値は、図 10A に示すように実験方法 8 の式を用いて算出すると 2.34 ~ < 5.75 の数値になった。

一方、無中和四級化キトサンフィルムの生菌数は、試料 2A と 2B が < 10 cfu/plate、試料 2C が 2.33×10^2 cfu/plate の数値を示し、無加工フィルムと比べて接種菌数が 1/1,000 ~ 1/1 万減少した。この場合の抗菌活性値は、図 10A に示すように実験

方法 8 の式を用いて算出すると 2.43 ~ < 5.75 の数値になった。四級化した試料は、四級化の効力が出現し、中和してもしなくても同様の結果を得た。

表 5 と図 10B に示すように *S. aureus* の場合と同様に、 $5 \times 5\text{cm}$ に裁断し、中和四級化キトサンフィルムと無中和キトサンフィルム上に、試験菌 *E. coli* の接種菌数が 4.80×10^5 cfu/plate となるように調整した 1/500 ニュートリエント Broth の接種懸濁菌液 0.4ml を接種し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、相対湿度 90% 以上の条件下で 24 時間培養した。無加工フィルムに接種した直後に回収した生菌数は 4.80×10^5 cfu/plate であった。これを 24 時間培養した後の生菌数は 5.68×10^5 cfu/plate となった。同様に四級化キトサンフィルムに対して同数の試験菌を同様に接種し、24 時間培養した後の生菌数は、中和フィルムでは試料 2A が 2.94×10^4 cfu/plate、試料 2B が 1.55×10^3 cfu/plate、試料 2C が 1.02×10^4 cfu/plate の数値を示し、無加工フィルムと比較して接種菌数が 1/10 ~ 1/100 減少した。この場合の抗菌活性値は、実験方法 8 の式を用いて算出すると図 10B に示すように 1.29 ~ 1.80 の数値になった。

一方、無中和キトサンフィルムの生菌数は、試料 2A が 8.43×10^2 cfu/plate、試料 2B が < 10 cfu/plate、試料 2C が 1.95×10^3 cfu/plate の数値を示し、無加工フィルムと比べて接種菌数が 1/100 ~ 1/1 万減少した。この場合の抗菌活性値は、実験方法 8 の式を用いて算出すると図 10B に示すように 1.75 ~ < 5.75 の数値になった。*E. coli* の場合は中和すると四級化していない試料と同様の傾向を示

Table 6. Antibacterial activity test of chitosan films against *Staphylococcus aureus* NBRC 12732 or *Escherichia coli* NBRC 3972 using Film Adhering Method.

Sample no.	Neutralized films		Non-neutralized films	
	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
2 ^a	5.38	1.04	5.38	5.46
2 ^b	5.75	1.80	5.75	5.75

^a: Chitosan film, ^b: Quaternary ammonium chitosan film.

^c: Log (C/D), C: Bacterial numbers after 24 h incubation for untreated film (polyethylene film) inoculated with test bacteria, D: Bacterial numbers after 24 h incubation for chitosan film inoculated with test bacteria.

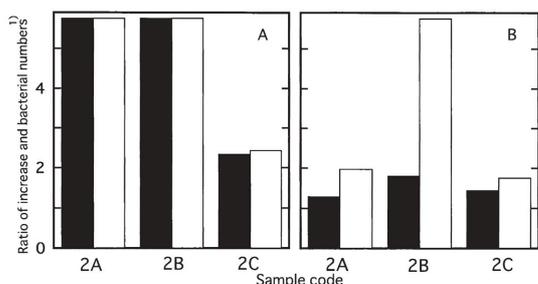


Fig. 11. Antibacterial activity test of quaternary ammonium chitosan films against *S. aureus* or *E. coli* using Film-adhering method.

A: *S. aureus*, B: *E. coli*. ■: Neutralized films, □: Non-neutralized films.

した。

同一原材料から得た四級化キトサンフィルムとキトサンフィルムの細菌に対する抗菌性を比較した結果を表6と図11に示した。

*S. aureus*の場合は中和してもしなくても抗菌力が非常に強く、これ以上の抗菌活性値の向上が望めなかった。しかし、*E. coli*の抗菌活性は、図11Bに示すように無中和フィルムでは*S. aureus*と同様の傾向を示した。しかし、中和フィルムの抗菌活性はキトサンの四級化によって効力が約1.7倍向上した(表6)。これは四級化キトサンが中和作用によって酸が離脱し、非結晶領域におけるアミノ基の酢酸塩が殆ど遊離の形態に変化しなかったためと考えられる⁴⁶⁾。

酢酸溶液で調製したキトサンフィルムは、素晴らしい抗菌活性値を示した。この調製したフィルムは、高い含水率(16.2%、毛に相当)にも関わらず、ヤング率と引張強度が他の3種の酸溶液で調製したフィルムと同等であった。従って、この特殊な性能を持つ保水性は吸湿性や吸水性を必要とする場所で使用する製品(例えば紙おむつや水中で使用するフィルターなど)の用途に役立つと考えられる。そしてキトサンの抗菌活性は、有機抗菌剤のように速効性でなく、マイルドで弱く、しかも不要になって破棄した場合、容易に生分解し、地球環境に優しい抗菌剤と言える。なお、こうした特性を有するキトサン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

キトサンフィルムの成形加工を行い、そのフィルムの力学的特性および抗菌活性の向上に関して検討し、以下の結果を得た。

引っ張り強度は、4種の溶媒間で大差がなかった。

貯蔵弾性率(E')の値は、フィルム中の水分が大きく影響し、フィルムに水分が含まれると0℃付近で急激に低下し、再び水分の蒸発によって上昇した。しかし、粘弾性の結果から、熱処理を施した同一溶媒のフィルムに比べ、貯蔵弾性率(E')は低かった。延伸試料は常温から高温域にかけて未延伸試料と比べ、貯蔵弾性率(E')が高くなる傾向が認められた。

キトサンフィルムの抗菌活性は、中和フィルムよりも中和をしていない(無中和)フィルムの方が接種した菌数が少なく、優れていた。これは、中和フィルムは、フィルム表面のキトサンしか作用しないが、無中和フィルムは、フィルムのpHとイオン化したキトサンのアンモニウムイオンの相互作用が抗菌力に関与したと推察される。

キトサンフィルムの抗菌活性は、*Escherichia coli*の方が*Staphylococcus aureus*よりも低かった。この傾向は中和フィルムで顕著であった。

四級化キトサンフィルムの細菌に対する抗菌活性は、*S. aureus*の場合には殆ど変化がなかった。しかし、*E. coli*の場合の抗菌活性は、中和した場合に効力が約1.7倍向上した。

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、筆者が*Biocontrol Science*(2006)において発表した内容をもとに、和訳し未発表データを加筆・修正した原稿を整理してまとめ、一括掲載したものである。

引用文献

- 1) 中島照夫：介護から見た高機能繊維と抗菌防臭・制菌・消臭加工、その4：介護用繊維製品の廃棄物対策、加工技術、**38**, 11, 746-749, 2003.
- 2) 土肥義治監修：分解プラスチック、(株)シーエムシー、東京、1-2, 107-117, 1990
- 3) 斉藤光實：生分解性高分子、防菌防黴**20**, 2, 95-101, 1992.
- 4) 土肥義治：生分解性ポリマー分野、高分子、**54**, 4, 256, 2005.
- 5) 財団法人高分子素材センター：平成4年度高分子系新素材の試験・評価等補助事業報告書、一分解性プラスチック一、3-4, 1993.
- 6) 土肥義治編者：生分解高分子材料、工業調査会、東京、177-197, 1990.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) Aiba, S., Izume, M., Minoura, N., and Fujiwara, Y.: Studies on chitin. 2. Preparation and properties of chitin membranes, *Carbohydr. Polym.*, **5**, 4, 285-295, 1985.
- 10) Uragami, T., Ohsumi, Y., and Sugihara, M.: Studies on syntheses and permeabilities of special polymer membranes: 35. Preparation and permeation characteristics of chitin membranes, *Polymer*, **22**, 9, 1155-1156, 1981.
- 11) Sakurai, K., Takagi, M., and Takahashi, T.: Crystal structure of chitosan. 1. Unit cell parameters, *Sen-i gakkai shi (J. Soc. Fiber Sci. Technol. Jpn)*, **40**, 7, 246-253, 1984.
- 12) 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.
- 13) 中島照夫：二軸延伸した超高分子量ポリエチレンと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、4, 1-18, 2006.
- 14) 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.
- 15) 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.
- 16) 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 2801²⁰⁰²、1-19, 200.
- 17) 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.
- 18) キチン・キトサン研究会：キチン・キトサンハンドブック、技報堂出版、1995.
- 19) Morimoto, M., and Shigemasa, Y.: Applications of chitin and chitosan as biomass (in Japanese), *Kobunshi (High polymers)* **50**, 4, 236-239, 2001.
- 20) M. Shimojoh, M., Masaki, K., and Kurita, K.: Bactericidal effects of chitosan from squid pens on oral streptococci (in Japanese), *Nippon Nogekagaku Kaishi*, **70**, 7, 787-792, 1996.
- 21) Ohtakara, A., and Mitsutomi, M.: Enzymatic preparation of oligosaccharides from chitin and chitosan (in Japanese), *Foods Food Ingredients J. Jpn.*, No.159, 65-71, 1994.
- 22) 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.
- 23) 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.
- 24) 繊維製品衛生加工議会：Shake Flask法、1-5, 1985.
- 25) 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.

- 26) 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.
- 27) 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.
- 28) 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.
- 29) 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.
- 30) 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.
- 31) 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.
- 32) 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.
- 33) 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.
- 34) Kulkarni, A., R., Kulkarni, V., H., Keshavayya, 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.
- 35) 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.
- 36) 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.
- 37) 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.
- 38) 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. Jpn.*, **39**, 8, 281–291, 1986.
- 39) 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. Jpn.*, **40**, 2, 57–65, 1987.
- 40) 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**, 6, 16–25, 1989.
- 41) 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.
- 42) 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.
- 43) 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.
- 44) 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.
- 45) Amiya, S., Mochizuki, K., and Yamashita,
S.: The permselectivity of chitosan salt
membrane and its solid state structure (in
Japanese), *Sen-i gakkaiishi (J. Soc. Fiber
Sci. Technol. Jpn)*, 46, 12, 570–575, 1990.
- 46) Tsurugai, K., and Hiraide, T.: Preparation and
antibacterial activities of N-trimethylammonium
salts of chitosan (in Japanese), *Sen-i
gakkaiishi (J. Soc. Fiber Sci. Technol. Jpn)*,
50, 5, 215–220, 1994.