(2000年5月8日受付・2000年10月6日受理)

繊維状デオキシアミノセルロースの抗菌性

群馬大学工学部 荒井健一郎・細井俊宏

Antibacterial Activity of Fibrous Deoxyaminocellulose

Kenichiro Arai and Toshihiro Hosoi

Faculty of Engineering, Gunma University, Kiryu, Gunma 376-8515, Japan

Abstract: Fibrous deoxyaminocelluloses (DACs) with degree of substitution by amino group up to 0.11 were prepared by the nucleophilic substitution of deoxybromocellulose (DBC), which had prepared from cotton fiber, with ammonia in dimethylsulfoxide. A certain amount of unsubstituted bromine residue remained in obtained DAC. Antibacterial activity of acetic acid salt of the fibrous DAC was examined on three bacteria. For *Escherichia coli*, DAC showed good antibacterial activity, although the bromine residue in DAC was deduced to contribute to the activity more than amino group. For *Staphylococcus aureus*, DAC showed excellent antibacterial activity, where the amino group in DAC contributed to the activity more than bromine residue. For *Klebsiella pneumoniae*, the antibacterial activity of DAC was rather lower than that for the former two bacteria, but still the activity was enough to pass JIS L 1902-1998 as a antibacterial fiber.

(Received 8 May, 2000; Accepted 6 October, 2000)

1. 緒言

セルロースは地球上に大量に存在する再生可能な有機資源であり、枯渇が心配されている化石資源の代替としてその有効活用が期待されている。我々はこのセルロースを素材として各種機能性材料を調製し、その機能を検討している。その一つがデオキシアミノセルロース (DAC) であり、既に *p*-トルエンスルホン酸セルロースを経由して合成したDACがアルデヒド類などの吸着に優れた効果を発揮することを報告している [1]。DACはキトサンと類似の化

することが予測される。その機能の一つとして、キトサンは抗菌性を示すことが認められ [2,3]、既に実用的応用も検討されている [4,5,6]。しかしキトサンを繊維状で使用することは難しく、そのためキトサンを繊維に練り込むことなどによって抗菌性繊維が作られている。その結果、耐洗濯性などに問題が残っている。DACは繊維状は勿論、粉末や可溶性のものも容易に調製することができ、またそれらの分子量やアミノ基含有量も或る範囲内で制御できる。さらに抗菌性繊維として使用する場合に、アミノ基が繊維に直接結合していることから、洗濯による抗菌性の低下の少ないことが期待できる。

本報告ではこれらの利点に着目して、木綿繊維から繊維状DACを調製し、いくつかのバクテリアに対するこのDACの抗菌性を試験した結果を述べる。

DAC (DS=0.5)

2. 実験

2.1 試料および試験

セルロースとしては市販の脱脂綿をそのまま使用

学構造を持っていて、キトサンと類似の機能を発揮

した。N,N-ジメチルアセタミド (DMAC) およびジメチルスルホキシド (DMSO) は、モレキュラーシーブス3Aを加えて一昼夜脱水し、減圧蒸留して用いた。アンモニアは液化アンモニアからの気化ガスを使用した。臭素および窒素の定量用試薬はそれぞれの標準法 [7,8] に従って調製した。その他の試薬は市販の特級品をそのまま用いた。抗菌性試験に用いた菌株は(財)醗酵研究所より入手した。

2.2 繊維状デオキシプロモセルロース(DBC)

の調製

繊維状DBCは Ziderman [9] および Furuhashi [10] の報告を参考にして、不均一系で調製した。約8.0gのセルロースを18%NaOH水溶液で膨潤させ、水で十分洗浄後、脱水DMACで洗浄して、水分を完全に除去した。この試料を三口フラスコ中でDMAC300mLに分散させ、雰囲気窒素を置換した。別に52.8gのN-プロモスクシンイミドと77.6gのトリフェニルホスフィン [ともにセルロース無水グルコース単位 (AGU) の6倍モル量] をそれぞれDMAC 150mLに溶解させた。これらの溶液をこの順序で三口フラスコに加え、70℃で所定時間反応させた。反応終了後、反応混合物をろ別し、アセトン、水、アセトンの順序で洗浄した後、減圧乾燥した。得られたDBCの収率は約95%、臭素による置換度 [DS(Br)] は0.42までであった。

2.3 繊維状デオキシアミノセルロース (DAC)

の調製

1.0gのDBCおよび予め3時間アンモニアガスをバブリングしたDMSO ($[NH_3] = 1.85 \text{ mol/L}$) 100mLを三角フラスコに入れ、密栓し、50℃で所定時間攪拌した。反応混合物をろ別し、アセトン、水、メタノールの順で洗浄した後、減圧乾燥した。

2.4 臭素およびアミノ基による置換度 [DS(Br)

およびDS(NH₂)] の決定

DS(Br)はフラスコ燃焼法 [6,8] による臭素の定量から、またDS(NH₂)はマイクロケルダール法 [7] による窒素の定量から算出した。

2.5 繊維状DACの脱臭素化と酢酸塩化

DAC中の臭素量を減らすためには、DACを0.2 mol/L NaOH水溶液を用いて室温で窒素雰囲気下、48時間処理し、DS(Br)=0.05のDACを得た。また抗菌性試験のためには、DACを0.1 mol/L 酢酸水溶液で処理して得たDAC酢酸塩を使用した。

2.6 抗菌性試験

抗菌性試験は 繊維製品新機能協議会試験方法 [11] に準じて行った。まず、醗酵研究所より入手した生菌をニュートリエントブロスを用いて前培養し、生菌数が 2.5×10^5 CFU (コロニー生成単位)

/mLの試験用菌懸濁液を調製した。この懸濁液を用いて生菌を繊維試料に接種し、37℃で18時間試験培養した。その後生菌を菌洗い出し液 (0.2%の界面活性剤Tween # 80を含む0.85%食塩水) で洗い出し、これをニュートリエント寒天培地中37℃で48時間培養してコロニー数を計測することにより、菌数を求めた。

抗菌性の指標として生菌の減少指数を次式で算出した。

$$\text{生菌減少指数} = \log \left[\frac{\text{18時間試験培養後の、(未処理繊維中の生菌数)} / (\text{抗菌性試料中の生菌数}) \right]$$

この基準では生菌減少指数が2.2以上であれば抗菌性繊維として合格とされている。

なお、減少指数の測定値は試料の三点についての測定の平均として算出したが、それでも誤差が比較的大きいので、各測定を二度ずつ行い、本報告における値はそれらの測定値の相乗平均で示した。

3. 結果と考察

前述の反応条件下でのDBCの調製ではDS(Br)が0.42までの生成物が得られた。この反応が木綿繊維の不均一系反応であることを考慮すると、この値は可能な最高値に近いと考えられる。

このDS(Br)=0.42のDBCを用いて、NH₃による求核置換反応によるアミノ化を行った。その反応におけ

Fig. 1 Changes in degree of substitution by amino group and bromine residue [DS(NH₂) and DS(Br), ○ and □] of deoxyaminocellulose (DAC) obtained in reaction of deoxybromocellulose (DBC) with NH₃ at 50℃, with reaction time.

る生成物のDS(NH₂)とDS(Br)の経時的変化の一例を図1に示す。DMSO中50℃における反応で、アミノ基は経時的に増加し、48時間でDS(NH₂)=0.11となる。また臭素残基は経時的に減少するが、48時間後でもまだDS(Br)=0.15に留まっている。さらに、反応時間をそれ以上に延長してもDS(NH₂)とDS(Br)の値はともにほとんど変化しないことが認められる。したがって、元の臭素残基の約62% [DS(Br)=0.26に相当] が水酸基に戻ったものと考えられる。40℃以下での求核置換反応およびアンモニア水中での反応も検討したが、これらの場合には得られる生成物のDS(NH₂)値がより小さくなる傾向を認めた。また反応温度を高くすると繊維の損傷の増加することが観察され

た。

そこで、反応温度50℃で調製したいくつかのDACを酢酸塩としてそれらのバクテリアに対する抗菌性を調べた。なお、いくつかのDACについて残留臭素残基の効果を確認するために、アルカリ処理により臭素含有量を低下させた。

表1に *Escherichia coli* (大腸菌) IFO14196, *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ状球菌) IFO12732, および *Klebsiella pneumoniae* (肺炎桿菌) IFO13277に対するいくつかのDBCおよびDACの抗菌性試験の結果を示す。表の第1列は試験用繊維試料であり、未処理の木綿繊維、およびDS(Br)とDS(NH₂)値の異なる2種のDBCと4種のDACである。第2列

Table 1 Antibacterial activity of fibrous DBC and DAC on some bacteria.

Bacteria	<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	
	Bacteria number ^{a)}	Decrease index ^{b)}	Bacteria number ^{a)}	Decrease index ^{b)}	Bacteria number ^{a)}	Decrease index ^{b)}
Untreated cotton	6.0×10^7	—	9.4×10^7	—	9.0×10^7	—
DBC	DS(Br)=0.42	8.4×10^1 5.8	1.6×10^4 3.8		3.0×10^6 1.5	
	DS(Br)=0.08	4.1×10^6 1.2	9.2×10^5 2.0		5.4×10^6 1.2	
DAC	DS(NH ₂)=0.05 DS(Br)=0.20	3.0×10^3 4.2	1.7×10^4 3.7		6.1×10^5 2.2	
	DS(NH ₂)=0.05 DS(Br)=0.05	8.1×10^4 1.9	1.9×10^5 2.7		1.1×10^6 1.9	
	DS(NH ₂)=0.11 DS(Br)=0.15	3.8×10^3 4.2	2.0×10^3 4.4		1.1×10^5 2.9	
	DS(NH ₂)=0.11 DS(Br)=0.05	7.8×10^4 2.9	2.3×10^4 3.6		7.7×10^5 2.1	

a) Bacteria number after 18h cultivation, (colony forming unit)/mL.

b) Decrease index = $\log [(bacteria\ number\ in\ untreated\ cotton\ after\ 18h\ cultivation)/(that\ in\ DBC\ or\ DAC)]$.

以降はそれぞれのバクテリアについての18時間培養後の生菌数およびこれらの値から算出した生菌減少指数を示している。

表において、*Escherichia coli* についてはDS(Br)値の大きいDBCが最も高い生菌減少指数値を示し、臭素残基が抗菌性に大きく寄与することを示している。臭素含有量が低下すると生菌減少値が低下するが、アミノ基が増えると生菌減少値がやや増加する。これらの結果から、*E. coli* に対しては繊維試料中の臭素残基およびアミノ基がともに抗菌性に寄与するが、

その効果は臭素残基の方が大きいと判断できる。

Staphylococcus aureus の場合には臭素残基も抗菌性を示すが、アミノ基の方が効果が大きく、DS(NH₂)=0.11, DS(Br)=0.15のDACが生菌減少値4.4と最高の抗菌性を示している。

Klebsiella pneumoniae に対する抗菌性試験では前二者の菌に比べて、DACの抗菌性は相対的に低いが、それでもDACがDBCより高い抗菌性を示し、DS(NH₂)=0.11, DS(Br)=0.15のDACはJIS規格における抗菌性繊維として十分に合格する抗菌性を示している。

なお、本研究で用いた生菌に対する試料の抗菌性の相違は従来の報告と定性的に一致している[12]。

これらの結果から、繊維状DACは、菌の種類によってその効果の大きさは異なるものの、抗菌性繊維として十分に実用化の可能性を持っていると判断できる。

4. 結 論

木綿繊維から、DBCを経由して、繊維状DACを調製し、いくつかのバクテリアに対する抗菌性を調べた。その結果、菌の種類によってその効果の程度は異なるものの、このDACが抗菌性繊維として十分な抗菌性を持つことを見出した。これらの試料は、キトサンと異なって、繊維状であるためにそのまま織布などとして使用することができ、また菌の種類や用途に応じて、材料の性質、形状、分子量、置換度などを調節できるという長所を持っており、広い用途で実用化できる可能性を持っていると考えられる。

最後に、抗菌性の測定に御指導を頂いた群馬大学工学部生物化学工学科篠沢隆雄教授に深甚の謝意を表します。

文 献

1. K. Arai and Y. Kanou, *Sen-i Gakkaishi*, **55**, 356 (1999).
2. 富岡敏一, 荒川正澄, 「抗菌剤の科学, Part 2」, 工業調査会, p. 98 (1997).
3. キチン, キトサン研究会, 「キチン, キトサンの応用」, 技報堂出版, p. 71 (1990).
4. 繊維学会, 繊維学誌, **52**, P-184 (1996).
5. 三崎陽子, 世喜克彦, 特開平 8-74131 (1996).
6. 小泉博史, 特開平 8-74177 (1996).
7. 穂積啓一, 「基礎分析化学講座 11, 有機定量分析」, 共立出版, p.38 (1965).
8. 有機微量分析研究懇談会, 「有機微量定量分析」, 南江堂, p. 259, 383 (1969).
9. I. Zideman, *Text. Res. J.*, **51**, 777 (1981).
10. K. Furuhashi, K. Koganei, H. Chang, N. Aoki, and M. Sakamoto, *Carbohydr. Res.*, **230**, 165 (1992).
11. 繊維製品新機能協議会基準 (繊維製品の定量的抗菌性試験方法)。
12. 瀬尾寛, 繊維科学, **35**, 37 (1993).