

ポリエチレンイミン吸着繊維の抗菌性

内田恵美子, 岩田博夫*, 筏義人**

(奈良教育大学教育学部, * 京都大学再生医科学研究所, ** 鈴鹿医療科学大学医用工学部)

原稿受付平成 13 年 9 月 20 日; 原稿受理平成 14 年 2 月 4 日

Antibacterial Property of Polyethyleneimine-Adsorbed Fabrics

Emiko UCHIDA, Hiroo IWATA* and Yoshito IKADA**

Faculty of Education, Nara University of Education, Nara 630-8528

* Institute for Frontier Medical Sciences, Kyoto University, Kyoto 606-8687

** Faculty of Medical Engineering, Suzuka University of Medical Science, Suzuka 510-0293

To endow fabrics with an antibacterial property, polyethyleneimine (PEI), which has a strong cationic characteristic, was physically immobilized onto a poly(ethylene terephthalate) (PET) fabric and the antibacterial activity of the modified fabric was tested using two methods. Antibacterial modification of the fabric was easily accomplished by simply immersing it in PEI solution for 1 min and the subsequent post-treatment for 3 h at 60°C. The amount of the immobilized cation increased with the molecular weight and the concentration of PEI. Wettability and lubricity of the PET fabric were slightly improved by this PEI adsorption. The PET treated with PEI of molecular weight of 75,000 at 1 wt% concentration had excellent antibacterial activity for *Staphylococcus aureus*. In addition, an antibacterial effect of the PET fabric was also observed for *Klebsiella pneumoniae* and MRSA. The antibacterial activity of the PEI-treated fabric was maintained even after being washed ten times. Two different antibacterial tests indicated that the antibacterial event occurred upon direct contact of the fabric surface with bacteria without any significant fear of destruction of normal flora. A skin irritation test using a cultured human skin model showed the modified fabric to be negative.

(Received September 20, 2001; Accepted in revised form February 4, 2002)

Keywords: antibacterial activity 抗菌活性, polyethyleneimine ポリエチレンイミン, skin irritation 皮膚刺激性, PET fiber ポリエステル繊維, *Staphylococcus aureus* 黄色ブドウ球菌.

1. 緒言

近年, 腸管出血性大腸菌 (O-157), メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA), 多剤耐性肺炎球菌 (DRSP) などの細菌による感染症がますます増える傾向にあり, 高齢者だけでなく, MRSA による新生児臍炎の増加も指摘されている¹⁾. MRSA などの院内感染発生の3大要因は感染源, 感染経路と易感染受容体である. 感染源や易感染受容体の存在は医療機関では避けられないので, 最も有効な防止手段は感染経路の遮断である. そのため, 病院内の環境整備をはじめとして, さまざまな感染防止策が試みられている. ある調査によると, 入院患者周囲ではシーツ, 枕, 布団, 床にMRSAが100%検出され, 医療従事者からは, 足底が89%, 着衣から28%検出されたとの報告²⁾もあり, 入室前後の手洗いの実践は勿論のこと, 着衣からの感

染を食い止めることも有効な予防対策である. ちなみに, 外来患者から検出される黄色ブドウ球菌の3つに1つがMRSAであるという³⁾. さらに, 今やMRSAは国内では市中にも浸透し, ホームヘルパーを介した感染も新たな問題となっている⁴⁾. 医療従事者の衣類や感染患者の寝具類に対する防止策としては, それらの殺菌消毒とともに抗菌加工繊維の使用が主である. そのため, 多くの抗菌性繊維が開発されている^{5)~10)}.

われわれも, ポリエステル (PET) 繊維への光グラフト重合を利用して, 急性経口毒性の低い金属系無機抗菌剤を繊維表面に固定化した抗菌性繊維を開発した¹¹⁾. このグラフト化繊維は, 抗菌剤の溶出も少なく, 高い抗菌性能を保持したが, グラフト重合操作が簡単ではなく, 銅の固定化による青色着色という短所もっているため, 応用範囲が限定されていた. そこで,

今回、抗菌処理が簡単で、着色しない方法を検討した。われわれが着目したのは、高いカチオン性を示すポリエチレンイミン (PEI) である。これを PET 繊維表面に後加工法によって固定化し、その抗菌性と洗濯耐久性および安全性を調べた。PEI はアニオン性物質との親和性が高いが、単量体と比較して毒性が低いため、化粧品とくに毛髪用の分野でヘアコンディショニングやウェーブセット性の向上に、そして食品の包装材としても用いられている。PEI のイヌおよびマウスに対する 1 日あたりの影響のない摂取量は、それぞれ、0.75 g/kg および 3 g/kg である¹²⁾。抗菌の分野においても、PEI 誘導体に抗菌性をもった金属塩を固定し、それを練りこんだ抗菌繊維¹³⁾や、ポリビニルアルコールにポリアミンと抗菌剤を混合した乾式紡糸繊維¹⁴⁾の開発はすでに行われているが、PEI 単独使用による後加工抗菌処理に関する報告は見当たらない。

2. 実験方法

(1) 試料および試験

試験布はポリエステルフィラメント 75 d×75 d の平織 PET 布で、使用前にエタノールで洗浄して実験に供した。PEI は分子量 75,000 (PEI-75) (シグマ社)、25,000 (PEI-25) (和光純薬)、800 (PEI-8) (和光純薬) の市販品をそのまま用いた。

(2) 抗菌加工

PEI がセルロース繊維に強く吸着されることはよく知られている¹⁵⁾¹⁶⁾。しかし、表面極性の低い PET 繊維へ安定した吸着量を得るためには熱処理が必要であることを予備実験により確認した。そこで、所定濃度の PEI エタノール溶液 50 ml の入ったバット中に試験布 (20×15 cm²) を 15 秒ごとに反転させながら、1 分間浸漬した後、60℃で 3 時間熱処理した。その後、繊維から未反応 PEI を取り除くために、熱処理した PET 布を蒸留水中に浸漬し、室温にて 10 分間超音波洗浄した。更に、水を取り替え、同様の操作を繰り返した後、蒸留水中で 10 分間煮洗い後、風乾した。

(3) 表面特性分析

PEI 布へのポリエチレンイミンの導入は X 線光電子分光法 (XPS, ㈱ 島津製作所, 京都) で確認し、導入されたカチオン量は染色法¹⁷⁾を用いて定量した。吸着布の摩擦係数は摩擦感テスター (KES-SE-STP 型 カトーテック ㈱, 京都) により、接触角は接触角計 (CA-X 型 協和界面科学 ㈱, 東京) により測定した。

(4) 抗菌試験

供試菌株は、黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538 P)、肺炎桿菌 (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352)、MRSA (methicillin resistant *Staphylococcus aureus* IID 1677) である。抗菌試験は日本化学繊維検査協会 (繊維製品新機能評価協議会 (JAFET) 認定試験機関) に依頼し、JIS L 1902 による¹⁸⁾定量試験 (統一試験法) と定性試験 (ハローテスト) を行った。さらに、抗菌効果の耐久性評価のために、JIS L 0217 103 号¹⁹⁾に準拠した洗浄を 10 回繰り返した後、抗菌試験を行った。使用洗剤は JAFET 標準配合洗剤である。なお、一部の試料について 80℃でのワッシャー洗濯 50 回後の抗菌試験も行った。これらの用語の定義は JIS L 1902 によった。

(5) 安全性試験

加工布の安全性は皮膚化学刺激試験法 (暫定法) に基づき²⁰⁾、三次元培養皮膚モデル (ゲンゼ ㈱ 提供) を用いて行った。すなわち、三次元培養皮膚モデル上にあらかじめ試料重量の 3 倍の人工汗液 (ISO 105-E 04 に規定される酸性溶液) をしみこませた直径 7.5 mm の試料を載せ、35℃、5% CO₂ の条件下で 24 時間または 48 時間培養した。その後、培養皮膚モデル表面から試料を除去し、細胞に与えられた障害の程度をテトラゾリウム塩 (MTT) を用いた MTT 法によって評価した²¹⁾。

3. 結 果

(1) PEI の導入と表面特性

Fig. 1 は 1 wt% PEI-75 で処理し、60℃で 3 時間熱処理した PET 布の XPS スペクトルを示したものである。処理布にはアミンに帰属される N 1s のピークが 405 eV に認められ、PEI が表面に吸着固定されていることが確認できた。Fig. 2 はカチオンの固定量に対する PEI の濃度および分子量の影響を示したものである。縦軸は酸性染料 (Acid Orange 7) で染色することにより求めた固定カチオン量であり、布 1 cm²あたりのカチオンのモル濃度で示している。(A) は濃度の異なる PEI-75 で、(B) は分子量の異なる PEI の 1 wt% で処理した結果である。処理濃度が高いほど、そして同じ濃度ならば PEI の分子量が高いほど、繊維表面に固定化されるカチオン量は増加した。0.025 wt% PEI-75、あるいは 1 wt% PEI-8 にて処理した場合には、この定量法では固定化されたカチオン量が低すぎるため算出できなかった。

ポリエチレンイミン吸着繊維の抗菌性

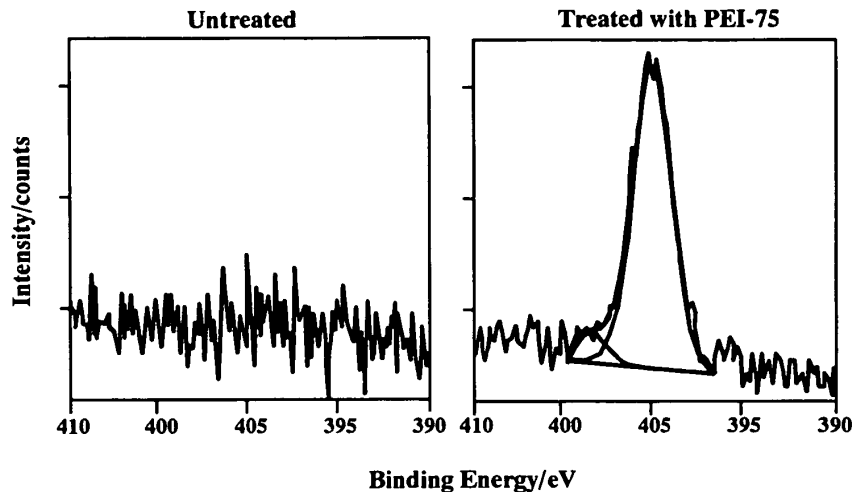
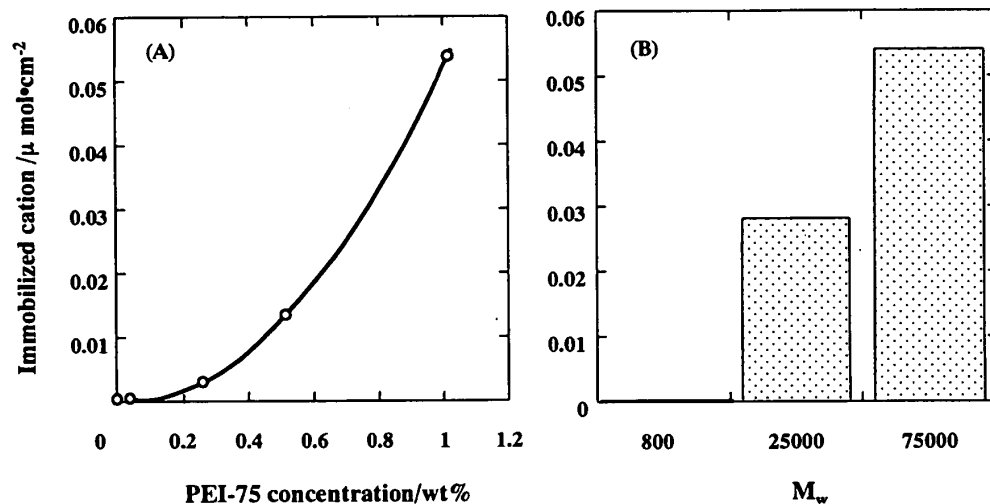


Fig. 1. N1s spectra of the untreated and treated fabrics

Fig. 2. Effects of the PEI concentration (A) and M_w (B) on the amount of immobilized cation

PEI-75 で処理した布の接触角と摩擦係数を Fig. 3 に示す。液滴法で測定した接触角は PEI 濃度が高いほど低下し、1 wt% 濃度で処理した場合は 70° となり、わずかながら水濡れ性の向上が認められた。また、指紋モデルの摩擦子で摩擦したときの摩擦係数も PEI 濃度の増加とともに減少し、潤滑性がわずかながら向上した。

(2) 抗菌性

Table 1 は、分子量の異なる PEI の 1 wt% 濃度で処理したときの黄色ブドウ球菌に対する抗菌試験結果である。本研究ではナイロン白布を標準布として用いた。接種直後の菌数は 1.7×10^4 であるが、18 時間培養後の菌数は標準布においては 2.4×10^7 まで増殖しているのに対し、分子量 800 の PEI 処理では 7.6×10^2 、

分子量が 25,000 および 75,000 では 20 以下に激減した。洗濯を 10 回繰り返した後では分子量 75,000 以外の処理布上の菌は増加した。Table 2 は異なる濃度の PEI-75 で処理したときの抗菌試験結果である。洗浄前の処理布は、染色法では算出できなかったほどの極めて低濃度 (0.025 wt%) で処理した場合でも培養 18 時間後の菌数は接種直後より減少している。洗濯を 10 回繰り返した後には、濃度が 0.025, 0.25 wt% では、わずかに洗濯前より生菌数は多い。0.5 wt% 以上の濃度では洗濯を繰り返した後も洗濯前と変化なく、洗濯耐久性の高いことを示している。Table 3 は 1 wt% の PEI-75 で処理した布の制菌加工 (特定用途) の試験対象菌種による抗菌試験結果である。いずれの菌に対しても 18 時間後の菌数は接種直後の菌数より減

少している。

Fig. 4 は、同条件の処理布の黄色ブドウ球菌に対するハロー試験結果である。阻止円がまったく認められないことがわかる。

(3) 安全性

衣料用繊維製品として実用に供するためには、その製品の洗濯耐久性のみでなく安全性の検討も欠かせない。安全性の検討法としてヒトに直接貼布する試験法は、個人差が大きく再現性が得にくいなどの問題点をかかえている。そこで、今回は、すでにヒト皮膚貼布試験との高い相関性が認められ、暫定法ながら皮膚化学刺激試験法として検討されている培養皮膚モデルを用いて安全性評価を行った。その結果の一部を Fig. 5 に示す。被検物質で処理した皮膚モデルを所定時間培養後に MTT 溶液で処理したものである。細胞が生きている部分だけ青紫色に染色される。コントロールには綿金巾を用いた。対照として、前報で報告したポリメタクリル酸 (PMAAc) をグラフトした後、抗菌性

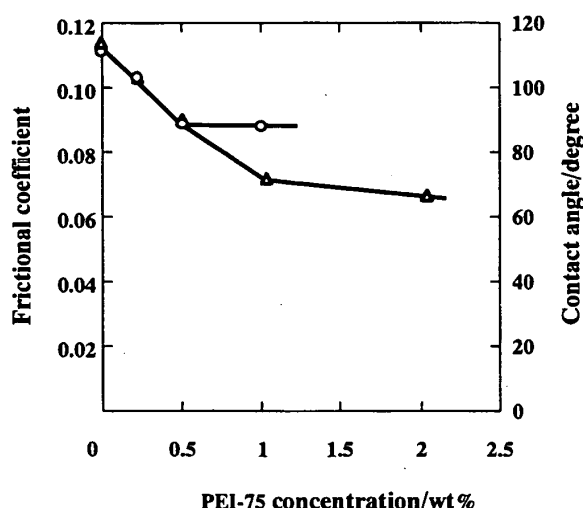


Fig. 3. Frictional coefficient and contact angle of fabrics treated with different PEI concentrations

○: frictional coefficient, △: contact angle.

をもつ銅を配位結合により表面に導入した抗菌加工布もあわせて行った。未処理 PET 布および PEI 処理布の染色状態はコントロールとほとんど変わらないが、銅を導入した処理布では大きな変化が見られた。すなわち、24 時間では顕著な細胞死は認められなかったものの、MTT 色素とは異なる青系の色相が観察された。さらに、48 時間後では明らかに細胞死が認められた。

Table 1. Antibacterial test of the fabrics treated with PEI of different molecular weights (M_w) at 1 wt%

M_w of PEI	Number of bacteria after 18 h culture	
	Before laundering	After laundering 10 times
Control (nylon)	2.4×10^7	—
800	7.6×10^2	1.3×10^5
25,000	<20	5.3×10^5
75,000	<20	<20

Initial number of bacteria = 1.7×10^4 .

Table 2. Antibacterial test of the fabrics treated with PEI-75 at different concentrations

[PEI]/wt%	Number of bacteria after 18 h culture	
	Before laundering	After laundering 10 times
Control	1.6×10^7	—
0	2.4×10^6	—
0.025	5.5×10^3	2.6×10^4
0.25	1.4×10^3	5.4×10^3
0.50	1.1×10^3	1.1×10^3
1.00	<20	<20

Initial number of bacteria = 2.4×10^4 .

Table 3. Antibacterial test of the fabric treated with PEI-75 (1 wt%) using various bacteria

Bacteria	Initial number of bacteria	Number of bacteria after 18 h
<i>Staphylococcus aureus</i>	2.6×10^4	1.1×10^3 (2.5×10^7)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	2.5×10^4	1.6×10^3 (2.4×10^7)
MRSA	1.5×10^4	<20 (1.8×10^7)

() ; control nylon.

ポリエチレンイミン吸着繊維の抗菌性

4. 考 察

(1) PEI 吸着量

PEI には、くし型の直鎖状のものと、多くの枝分かれ鎖をもったものがある。後者は親水性で、1 級：2 級：3 級アミンの割合は 1：2：1 になっており、その枝分かれは 3～3.5 窒素原子ごとに生じ、偏球の分子形状をしているという²²⁾。ここで使用した PEI は親水性であり、弱塩基性でカチオン性を示す。上記のこと

を勘案し、分子量 75,000 の PEI 1 wt% 溶液で加工処理した試料の染色法で得た固定化アミン量から PEI の吸着量を推定すると、それは布 1 cm² あたり約 2.36 μg となる。布 1 cm² の表面積をそのまま単純化して 1 cm² として計算すれば、PEI 鎖間隔は 2.3 nm となり、高密度に存在していることになる。したがって、このときの高い洗濯堅牢性は、多くの枝分かれ鎖をもつ高分子量の PEI が高密度に存在し、熱処理過程において繊維表面で互いにかからまり、強固に固着することで達成されたものと推定される。

(2) 抗菌活性

抗菌活性は抗菌試験（統一試験法）で得られた生菌数から静菌活性値（bacteriostatic activity）と殺菌活性値（bactericidal activity）を次式から算出できる。

静菌活性値

$$= \log(\text{標準布の 18 時間培養後に回収した菌数} / \text{加工布の 18 時間培養後の回収菌数}) \quad (1)$$

殺菌活性値

$$= \log(\text{標準布の接種直後に回収した菌数} / \text{加工布の 18 時間培養後の回収菌数}) \quad (2)$$

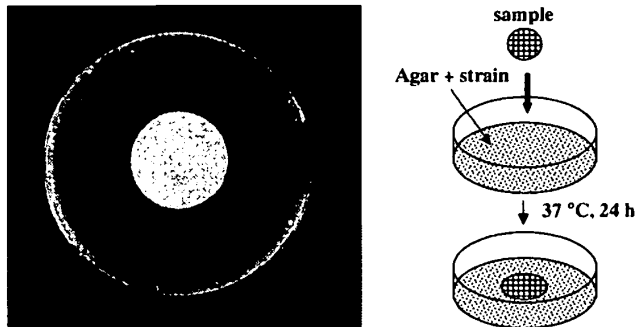


Fig. 4. Antibacterial activity of the fabric treated with PEI-75 (agar plate method, *Staphylococcus aureus*)

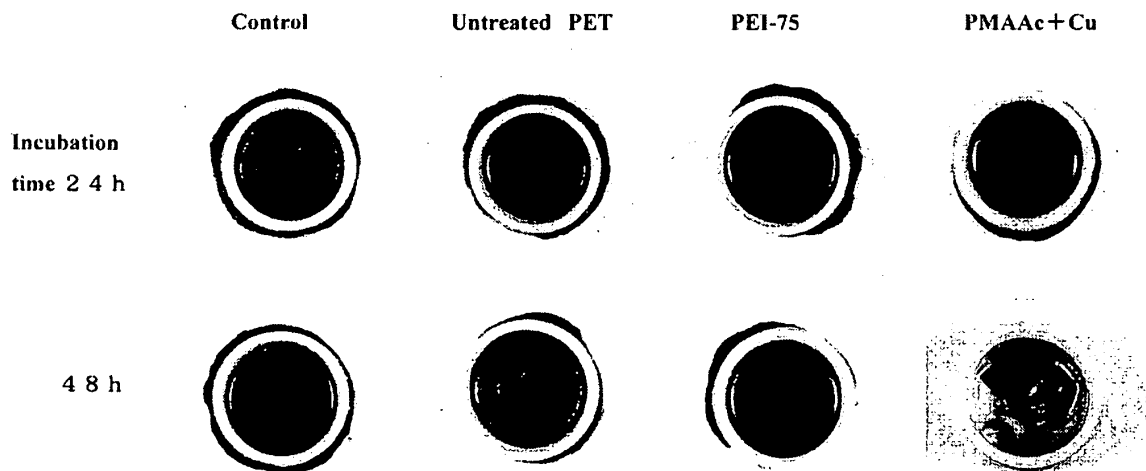


Fig. 5. Dyeing of living cells using the MTT method

Table 4. Antibacterial activity of the fabrics treated with PEI of different molecular weights (M_w)

M_w of PEI	Bacteriostatic activity	Bactericidal activity
800	4.5 (2.3)	1.4 (-0.9)
25,000	>6.0 (1.7)	>2.9 (-1.5)
75,000	>6.0 (>6.0)	>2.9 (>2.9)

() ; after laundering 10 times.

JAFET の抗菌防臭基準は、静菌活性値が2.2 以上と定められている。また、制菌基準は、殺菌活性値が0 以上である²³⁾。

Table 4 は、PEI の分子量の違いによる黄色ブドウ球菌に対する抗菌性を示したものである。抗菌活性は、PEI の分子量が大きいほど高く、導入されたアミン量と正の相関をもつ。洗濯堅牢性と考え合わせると、分子量 75,000 が最も抗菌効率が高い。

Fig. 6 は、PEI-75 の処理濃度と抗菌活性との関係を示したものである。染色法では算出できなかったほどの極めて低濃度 (0.025 wt%) で処理した場合でも、洗浄試験前では優れた静菌活性値を示した。1 wt% で処理した場合は、静菌活性値が6 以上、殺菌活性値が2.9 以上と、最高値を示した。洗濯を10 回繰り返した後は、濃度が0.25 wt% 以下では、静菌活性値も殺菌活性値も低下した。0.5 wt% 以上では洗濯を繰り返しても抗菌活性に変化は認められず、洗濯耐久性の高いことが確認できた。したがって、分子量 75,000

で1 wt%以上の濃度で処理すると洗濯堅牢性も高く、抗菌活性の優れた加工が期待できる。

Table 5 は同様に、1 wt%の PEI-75 で処理した布の制菌加工 (特定用途) の試験対象菌種に対する抗菌活性を示したものである。いずれの菌に対しても高い活性値が認められ、この処理法は制菌加工 (特定用途) にも有望なことがわかる。さらに、ハロー試験結果からこの PEI 加工布の抗菌性は抗菌剤の溶出によるのではなく、菌と加工布との直接接触によるものであり、常在菌叢のバランスを極度に崩す恐れは少ない加工法といえる。Fig. 7 は MTT 法を用いて求めた細胞生存率を示している。この試験では、生存率が24 時間培養で50 から80%以上、かつ48 時間培養で50%以上を陰性とし、24 時間培養で50 から80%以上、かつ48 時間培養で50%以下を弱陽性、24 時間培養で50%以下を陽性とする基準で判定されている。この基準に基づくと、PEI 処理布はいずれも陰性であり、皮膚刺激が極めて少ないといえる。なお、ここには示していないが、直接1 wt% PEI 水溶液を培養皮膚モデルに

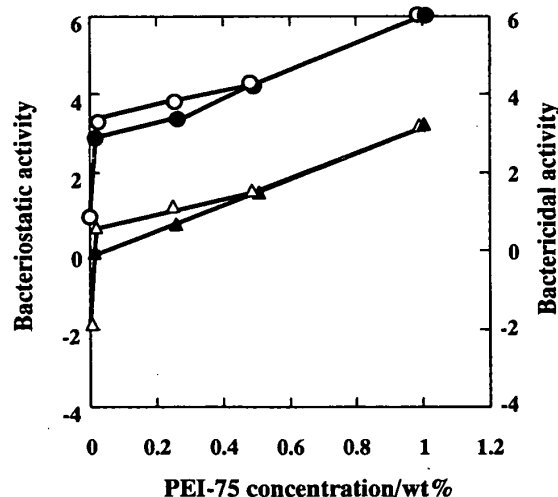


Fig. 6. Antibacterial activity of the fabrics treated with PEI at different concentrations

(○, ●) bacteriostatic activity, (△, ▲) bactericidal activity. Open marks: before laundering, closed marks: after laundering ten times.

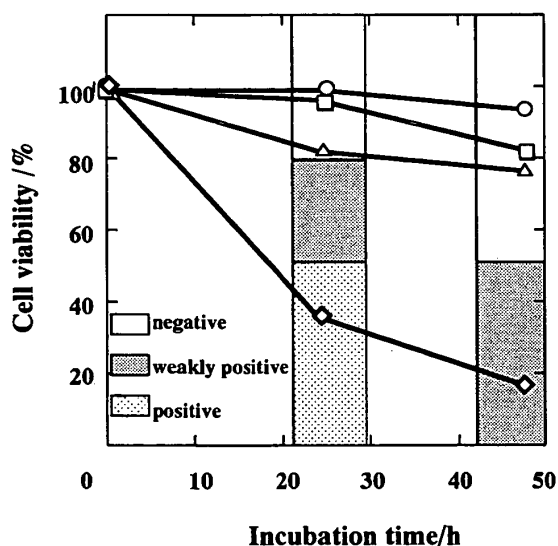


Fig. 7. Cell viability measure with the MTT assay
○, untreated fabric; △, fabric treated with PEI-8; □, fabric treated with PEI-75; ◇, fabric treated with MAAc+Cu.

Table 5. Antibacterial activity of the fabric treated with PEI-75 (1 wt%) using various bacteria

Bacteria	Bacteriostatic activity	Bactericidal activity
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.3	1.4
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	4.2	1.2
MRSA	>6.0	>2.9

滴下しても細胞死は認められなかったことから、PEI 自体、極めて皮膚刺激性が少ないことを裏付けている。

5. 結 論

後加工法で繊維表面に容易に洗濯耐久性のある抗菌性能を付与するための方法を検討した。すなわち、分子量の異なる PEI 溶液に繊維を浸漬したのち、熱処理を行った。その結果、処理時における PEI の濃度と分子量が高いほど、PEI の固定化量は増加し、黄色ブドウ球菌に対する優れた抗菌効果が得られた。さらに、肺炎桿菌と MRSA に対しても高い抗菌活性が認められ、JAFET で定めている制菌加工（特定用途）として有望であることが示唆された。洗濯耐久性を示す JAFET 評価基準である 10 回の洗濯後でも、高い抗菌活性を保持していた。しかし、80℃でのワッシャー洗濯 50 回後では、抗菌活性は認められなかった。したがって、今後、更なる抗菌剤の固定性を検討する必要がある。2 種の抗菌試験法から、この抗菌成分は非溶出型で、菌と処理布との接触によってのみ抗菌活性が得られ、常在菌叢のバランスを極度に崩す恐れは少ないと推定される。安全性に関しては、ヒト細胞によるヒト皮膚に近い構造をもつ三次元培養皮膚モデルを使った皮膚刺激性テストを行い、吸着剤、加工布ともに陰性であり、皮膚刺激性の低いことが確認された。なお、この処理により布の接触角と摩擦係数はわずかに低下し、水濡れ性と潤滑性に向上が認められた。

加工布の安全性試験に協力いただいたグンゼ株式会社開発研究部に厚くお礼を申し上げます。なお、本研究は文部省科学研究費補助金基盤（A）（2）09308001 によるものである。

引 用 文 献

- 金子光延：MRSA による新生児臍炎の病態と治療法，*Medical Tribune*, **34** (2), 49-51 (2001)
- 石井良章：術後感染の最近の動向，*整・災外*, **43**, 103-110 (2000)
- 菊地 賢：MRSA への新たな取り組み，*Medical Tribune*, 2001 年 2 月 22 日, 17
- 藤ヶ谷明子：くらしを応援，たしかな目，**9**, 20-23 (2001)
- Klueh, U., Wagner, V., Kelly, S., Johnson, A., and Bryers, J. D.: Efficacy of Silver-Coated Fabric to Prevent Bacterial Colonization and Subsequent Device-Based Biofilm Formation, *J. Biomed. Mater. Res.*, **53**, 621-631 (2000)
- 石坂 昇：抗菌防臭加工「東洋紡バイオシル」，*染色工業*, **35**, 171-177 (1987)
- 山口俊朗：光触媒型消臭・抗菌繊維「シャインアップ」について，*染色工業*, **48**, 28-35 (2000)
- Infante, M. R., Diz, M., Manresa, A., Pinazo, A., and Erra, P.: Microbial Resistance of Wool Fabric Treated with bis-Quats Compounds, *J. Appl. Bacteriol.*, **81**, 212-216 (1996)
- Tweden, K. S., Cameron, J. D., Razzouk, A. J., Bianco, R. W., Holmberg, W. R., Bricault, R. J., Barry, J. E., and Tobin, E.: Silver Modification of Polyethylene Terephthalate Textiles for Antimicrobial Protection, *ASAI/O J.*, **43**, M475-M481 (1997)
- 瀬尾 寛：キトサンを応用した抗菌防臭繊維，*染色工業*, **41**, 177-183 (1993)
- 内田恵美子，筏 義人：グラフト重合によるポリエステル布への抗菌性付与，*家政誌*, **51**, 287-239 (2000)
- Encyclopedia of Polymer Science and Technology*, **1**, 25-52 (1976)
- 抗菌剤，抗菌性樹脂及び抗菌性塗料，特開平 9-12717
- ポリビニルアルコール系抗菌繊維およびその製造方法，特開平 11-124723
- Kindler, Jr., W. A., and Swanson, J. W.: Adsorption Kinetics in the Polyethylenimine-Cellulose Fiber System, *J. Polymer Sci.*, **9**, 853-865 (1971)
- Alinec, B.: Polyethyleneimine Adsorption on Cellulose, *Cellulose Chem. Technol.*, **8**, 573-590 (1974)
- Uchida, E., Uyama, Y., and Ikada, Y.: Sorption of Low-Molecular-Weight Anions onto Thin Polycation Layers Grafted onto a Film, *Langmuir*, **9**, 1121-1124 (1993)
- 繊維製品の抗菌性試験方法，日本規格協会，JIS L 1902, 1-18 (1998)
- 繊維製品の取り扱いに関する表示記号及びその表示方法，日本規格協会，JIS L 0217, 8 (1995)
- 平成 11 年度新エネルギー・産業技術総合開発機構研究受託成果報告書，繊維評価技術協議会，50 (2000)
- Morota, K., Morikawa, N., Morita, S., Kojima, H., and Konishi, H.: Development and Evaluation of the Cultured Skin Model, *Tiss. Cult. Res. Commun.*, **17**, 87-93 (1998)
- Encyclopedia of Polymer Science and Engineering*, 2nd ed., **1**, 680-739 (1985)
- 「制菌加工」と「抗菌防臭加工」の相違点は，JAFET 通信，**3**, 2 (1998)