

抗菌性両親媒性分子の溶液物性と  
抗菌作用の相関に関する研究

1998年

木原孝治

名古屋工業大学博士論文

乙第122号(論文申請による)

平成10年3月16日授与

# 目 次

序論 .....	1
第 I 編 抗菌性両親媒性分子の会合体構造 .....	7
第 1 章 臭化セチルトリメチルアンモニウム会合体構造：特に， ニトロキシドラジカルプローブ可溶化会合体構造 — E S R 法による研究 .....	9
2-1 緒言 .....	9
2-2 実験方法 .....	10
2-3 結果および考察 .....	11
2-4 結論 .....	20
参考文献 .....	21
第 2 章 臭化セチルトリメチルアンモニウム会合体動的構造：特に， 可溶化ニトロキシドラジカル誘起核磁気緩和法による研究 .....	23
3-1 緒言 .....	23
3-2 実験方法 .....	25
3-3 結果および考察 .....	26
3-4 結論 .....	47
参考文献 .....	48
第 3 章 N-アシルサルコシナトリウム会合体構造：特に， <sup>1</sup> H-NMR スペクトル法による研究 .....	51
1-1 緒言 .....	51
1-2 実験方法 .....	52
1-3 結果および考察 .....	53
1-4 結論 .....	75
参考文献 .....	76

第Ⅱ編 水溶液中における抗菌性両親媒性分子－金属イオンの相互 作用 .....	79
第1章 抗菌性アニオン界面活性分子－塩化ランタン(Ⅲ)複合体形成	81
1-1 緒言 .....	81
1-2 実験方法 .....	82
1-3 結果 .....	83
1-4 考察 .....	91
1-5 結論 .....	107
参考文献 .....	108
第2章 抗菌性アニオン界面活性分子のモデル膜への吸着とその金属 イオン共存効果 .....	109
2-1 緒言 .....	109
2-2 実験方法 .....	110
2-3 結果 .....	112
2-4 考察 .....	123
2-5 結論 .....	128
参考文献 .....	129
第3章 抗菌性アニオン界面活性分子－多価金属イオン混合水溶液中 における細胞表面特性 .....	131
3-1 緒言 .....	131
3-2 実験方法 .....	133
3-3 結果 .....	136
3-4 考察 .....	161
3-5 結論 .....	165
参考文献 .....	166

第Ⅲ編 抗菌性両親媒性分子の溶液物性－殺菌活性の相関 .....	169
第1章 抗菌性アニオン界面活性分子－金属イオン混合水溶液系の 殺菌活性 .....	171
1－1 緒言 .....	171
1－2 実験方法 .....	172
1－3 結果 .....	173
1－4 考察 .....	183
1－5 結論 .....	192
参考文献 .....	193
第2章 抗菌性カチオン界面活性分子の会合体形成と至適殺菌濃度 ...	195
2－1 緒言 .....	195
2－2 実験方法 .....	196
2－3 結果 .....	198
2－4 考察 .....	207
2－5 結論 .....	212
参考文献 .....	213
第3章 抗菌性カチオン界面活性分子－エモリエント剤混合系の殺菌 活性と疎水性パラメータ .....	215
3－1 緒言 .....	215
3－2 実験方法 .....	217
3－3 結果 .....	225
3－4 考察 .....	251
3－5 結論 .....	257
参考文献 .....	258
総括 .....	261
謝辞 .....	269

## 序論

分子中に親水基と疎水基をもつ化合物を両親媒性化合物と定義すると、広義の意味では、非常に多くの化合物がこの中に含まれる。一般的には界面活性剤といわれるものがその中心になる。界面活性剤は、表面（界面）張力低下能や乳化、分散、可溶化、浸透および湿潤作用などの界面化学的性質以外に、抗菌作用をもつものがあり、分子のイオン性の種類や親水性－疎水性バランスを変えることによって、その発現する性質が異なる。これらの性質を利用して、界面活性剤は洗淨剤をはじめとして、乳化剤、分散剤、帯電防止剤、柔軟剤、抗菌剤など極めて多くの分野で利用されている<sup>1-3)</sup>。

両親媒性化合物は、アニオン系、カチオン系、両性系および非イオン系の大きく4種類に分類される。本研究では、両親媒性化合物の中で、特に、抗菌性を有するアニオンとカチオン界面活性剤、およびビグアニド系化合物を中心に取り上げた。アニオン界面活性剤は洗淨剤の主成分として、また、カチオン界面活性剤（特に、第四級アンモニウム塩）およびビグアニド系化合物（特に、グルコン酸クロルヘキシジン）は食品・医療分野において殺菌消毒剤として広く利用されている。しかし、これら両親媒性化合物の抗菌活性に関して、水溶液中における分子の集合状態などの物理化学的側面から研究されたものはほとんどなく、抗菌活性の作用機構を解明するためにも、溶液物性と抗菌作用の関連性を調べるのが重要視されている。

アニオン界面活性剤はグラム陰性菌に対する抗菌活性が弱いことが知られている<sup>4-7)</sup>。しかし、pHの低下や多価金属イオンの共存によりその活性が著しく増強される<sup>8-11)</sup>。また、アニオン界面活性剤の中には、高濃度においてグラム陰性菌を溶菌したり、細胞膜成分を可溶化する作用がある<sup>12,13)</sup>。このように、特定の条件下において、アニオン界面活性剤はグラム陽性菌だけでなく、グラ

ム陰性菌に対しても優れた殺菌活性を発揮するが、殺菌（抗菌）目的にはほとんど利用されていないのが現状である。

カチオン界面活性剤の多くは強い殺菌活性を有し、古くから逆性石けんの名称で殺菌剤として広く用いられてきた。特に、第四級アンモニウム塩の塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウム、いわゆる塩化ベンザルコニウムは日本薬局方にも収載されており、医療分野も含めて幅広く殺菌消毒剤として使用されている代表的なカチオン界面活性剤の一つである。このタイプの界面活性剤は、抗菌スペクトルが広い、ほとんど無臭である、水に対する溶解度が大きいなどの長所をもっている。しかし、洗浄力がほとんどない、有機物や多価金属イオンが共存すると活性が低下する、皮膚刺激が強いなどの欠点もある。グルコン酸クロルヘキシジンは皮膚刺激性がほとんどないため、近年、塩化ベンザルコニウムに代わって消毒剤として多用されるようになっている。

抗菌剤の抗菌活性は、最小発育阻止濃度（MIC：minimum inhibitory concentration）や最小殺菌濃度（MBC：minimum bactericidal concentration）で評価され、これらの値が小さいほど、微生物に対する抗菌活性が強いことを意味している。両親媒性化合物の抗菌活性も、MIC や MBC の立場で、界面活性をもたない他の抗菌剤と同様に比較されることが多い。また、抗菌剤の作用機構を調べる場合、細菌の呼吸阻害、細胞の表面電荷や表面疎水性変化、酵素阻害、タンパク質の変性あるいは細胞内成分の漏出などの菌体側で起こる変化を中心に議論されてきた。しかし、両親媒性化合物は上述したように種々の界面活性能をもつこと、また、会合体（micelle, ミセル）を形成することなど、他の抗菌性化合物には見られないコロイド化学特有の性質があるため、これら化合物の抗菌活性を検討する場合、ミセル形成やその構造変化などの溶液側で起こる変化も考慮に入れて論ずる必要がある。たとえば、ミセル形成の前後において表面張力などの界面化学的性質が明らかに変化するため、この溶液物性

変化が、当然、抗菌活性にも影響を及ぼすことが予想される。さらに、ミセルの大きさ、rigidity や構造変化の影響も考慮に入れる必要があると考えられる。本論文では、両親媒性化合物溶液と菌体表面の両面から物理化学的アプローチを行い、溶液の物性変化と抗菌活性との関連性を明らかにしようとした。

第 I 編の「抗菌性両親媒性分子の会合体構造」においては、「臭化セチルトリメチルアンモニウム会合体構造：特に、ニトロキシドラジカルプローブ可溶化会合体構造—ESR法による研究」（第 1 章）、「臭化セチルトリメチルアンモニウム会合体動的構造：特に、可溶化ニトロキシドラジカル誘起核磁気緩和法による研究」（第 2 章）および「N-アシルサルコシナトリウム会合体構造：特に、 $^1\text{H-NMR}$  スペクトル法による研究」（第 3 章）をおこない、特にミセル構造に関する基礎的性質について検討した。第 1 章では、ニトロキシドラジカルをプローブとして用いて、臭化セチルトリメチルアンモニウムミセル内におけるプローブの運動状態を ESR スペクトル解析を行ってミセルの構造変化を調べた。第 2 章では、ニトロキシドラジカルによって誘起された臭化セチルトリメチルアンモニウム分子のプロトン NMR 緩和時間を用いてミセル構造を考察した。第 3 章では、N-アシルサルコシナトリウムのミセル形成に伴う分子のコンホメーション変化をプロトン NMR スペクトル法により調べた。

第 II 編の「水溶液中における抗菌性両親媒性分子—金属イオンの相互作用」においては、「抗菌性アニオン界面活性分子—塩化ランタン(III)複合体形成」（第 1 章）、「抗菌性アニオン界面活性分子のモデル膜への吸着とその金属イオン共存効果」（第 2 章）および「抗菌性アニオン界面活性分子—多価金属イオン混合水溶液中における細胞表面特性」（第 3 章）の研究を行った。第 1 章ではオクタンスルホン酸ナトリウム (NaOS) と塩化ランタンの混合水溶液中に形成される複合体組成をプロトン NMR スペクトルの緩和時間を解析することにより検討した。第 2 章では水晶振動子マイクロバランスを用いて、NaOS



—金属イオン混合系における脂質膜への吸着を調べ、複合体生成との関連性について考察した。第3章では、同様の混合系について、おもに菌体側で起こる変化、すなわち、細菌の細胞表面電荷や細胞表面疎水性の変化および細胞内成分の漏出について議論した。

第Ⅲ編の「抗菌性両親媒性分子の溶液物性—殺菌活性の相関」においては、「抗菌性アニオン界面活性分子—金属イオン混合水溶液系の殺菌活性」（第1章）、「抗菌性カチオン界面活性分子の会合体形成と至適殺菌濃度」（第2章）および「抗菌性カチオン界面活性分子—エモリエント剤混合系の殺菌活性と疎水性パラメータ」について研究を行った。第1章では、NaOSと各種カチオン混合系の殺菌活性を調べ、この混合系における両親媒性分子—金属イオンの相互作用との相関について検討した。第2章では、カチオン界面活性分子の殺菌活性には至適濃度が存在することを明らかにし、その至適殺菌濃度とミセル形成との関連性について論じた。第3章では、グルコン酸クロルヘキシジンおよび第四級アンモニウム塩の殺菌活性に及ぼす各種エモリエント剤の影響を調べ、エモリエント剤の疎水性とその殺菌力増強効果の相関について議論した。

## 参考文献

- 1) J. I. DiStasio, "Surfactants, Detergents and Sequestrants", Noyes Data Corporation, Park Ridge, New Jersey (1981).
- 2) 刈米孝夫, "界面活性剤の性質と応用", 幸書房 (1980) .
- 3) 藤本武彦, "新・界面活性剤入門", 三洋化成工業 (1985) .
- 4) P. B. Cowles, *Yale J. Biol. Med.*, **11**, 33 (1938).
- 5) J. M. Birkeland and E. A. Steinhaus, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **40**, 86 (1939).
- 6) Z. Baker, R. W. Harrison and B. F. Miller, *J. Exp. Med.*, **73**, 249 (1941).
- 7) H. N. Glassman, *Bacteriol. Rev.*, **13**, 105 (1948).
- 8) G. R. Dychdala and J. A. Lopes, *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 4th ed., ( by S. S. Block ), Lea and Febiger, Philadelphia (1991), p256.
- 9) J. G. Voss, *J. Bacteriol.*, **86**, 207 (1963).
- 10) R. W. Berg and R. E. Zimmerer, *J. Ind. Microbiol.*, **1**, 377 (1987).
- 11) K. Kihara, N. Kito and T. Furuta, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **24**, 449 (1996).
- 12) M. R. J. Salton, *J. Gen. Physiol.*, **52**, 2275 (1968).
- 13) D. F. H. Wallach and R. J. Winzler, *Evolving Strategies and Tactics in Membrane Research*, Springer-Verlag, New York (1974), p88.



# 第 I 編

## 抗菌性両親媒性分子の会合体構造



# 第 1 章 臭化セチルトリメチルアンモニウム会合体構造： 特に，ニトロキシドラジカルプローブ可溶化会 合体構造 — ESR 法による研究

## 1-1 緒言

ニトロキシドフリーラジカルはプローブとしてミセル構造の研究に利用されており，プローブを可溶化したミセルの第 1 CMC において，回転相関時間が顕著に変化することが知られている<sup>1-4)</sup>。この変化は，プローブとミセルの相互作用の結果，プローブ分子の tumbling 速度が低下することにより生じる。

本研究において，2 種類の長鎖アルキル基を有するニトロキシドラジカルをプローブとして用い，臭化セチルトリメチルアンモニウムミセルの球状から棒状への遷移について ESR 法を用いて調べた。

## 1-2 実験方法

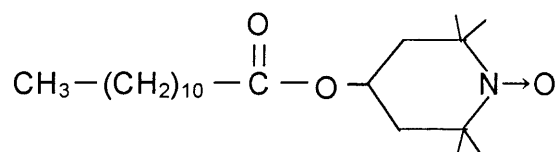
### 1-2-1

臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) および塩化セチルトリメチルアンモニウム (CTAC) (以上, 半井化学製) は, アセトン-エタノールで再結晶して用いた。5-(N-オキシル-4',4'-ジメチルオキサゾリジン)パルミチン酸 (5-PASL) は Hubbell および McConnell<sup>5)</sup>の方法にしたがって合成した。ラウリン酸 2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジノール-1-オキシル (1-LASL) は, Waggoner らの方法<sup>2)</sup>によって合成した。これらのスピンラベル化合物はカラムクロマトグラフィにより分離精製した。

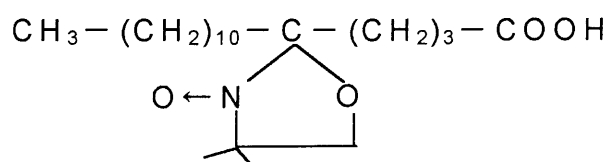
ESR 測定用試料は, 5-PASL (または, 1-LASL) を溶解したベンゼン溶液の一定量を試験管にとり, 減圧下で溶媒を除去後, CTAB 水溶液を加えてプローブを可溶化させた。

ESR 測定の試料管は融点測定用チューブを用いた。ESR スペクトルは JEOL-model JES-ME スペクトロメータを用いて室温 (22±2°C) で測定した。

### 1-LASL



### 5-PASL



### 1-3 結果および考察

一般的に、ニトロキシドラジカルの tumbling 速度は回転相関時間 ( $\tau_c$ ) によって表され、この  $\tau_c$  は ESR スペクトルの線幅に関係する<sup>6)</sup>。ラジカルの線幅の狭い ESR スペクトルにおいては、2つの相関時間は式(1)および(2)で表される<sup>1,6-8)</sup>。

$$\tau_c = 0.65 W_0[(h_0/h_1)^{1/2} + (h_0/h_{-1})^{1/2} - 2] \quad (1)$$

$$\tau_c' = -2211 W_0/H_0[(h_0/h_1)^{1/2} - (h_0/h_{-1})^{1/2}] \quad (2)$$

ここで、 $W_0$ は中心ピークの線幅、 $H_0$ は掃引磁場であり、いずれも Gauss 単位である。 $h_0$ 、 $h_1$  および  $h_{-1}$  は、それぞれ、中、高および低磁場におけるピークの高さである。プローブが等方性運動するときには、 $\tau_c$  は  $\tau_c'$  に等しいが、普通は異なる値をとることが知られている。 $\tau_c$  と  $\tau_c'$  の差 ( $\Delta\tau_c$ ) は分子運動の異方性を表す尺度と考えることができる<sup>4,9)</sup>。

本研究では、CTAB ミセル中に配向した 5-PASL および 1-LASL の回転相関時間を第 2 CMC 付近で測定した。測定に用いたミセル溶液の濃度が非常に高いので、相関時間の計算においては、モノマーとミセル間の化学交換の影響は無視した。さらに、界面活性剤水溶液中におけるニトロキシドプローブの回転運動の減少が ESR スペクトルのブロードニングのおもな要因であるので、極性基と無極性部分の hopping 効果は無視した。

5-PASL の飽和水溶液の ESR スペクトルは、ほとんど強度の等しい 3 本線からなるシグナルを示す (Fig. I-1-1(a))。しかし、5-PASL を CTAB ミセルに可溶化すると、3本の超微細構造線の幅は非等価になる (Fig. I-1-1(b))。

Table I-1-1 は有機溶媒および CTAB ミセル中における 5-PASL および 1-LASL の  $\tau_c$  と  $\tau_c'$  を示している。5-PASL-CTAB ミセル系における  $\tau_c$  は、有機溶媒中のそれよりも大きいことがわかる。この結果は、5-PASL がミセルへ配向することにより、そのプローブの tumbling 運動が低下することを示している。



5-PASL 水溶液中における  $\Delta\tau_c$  は有機溶媒中の値とほとんど差がない。したがって、5-PASL 分子は水溶液中で単分散状態にあり、ほとんど等方性の分子運動をしていると考えられる。CTAB ミセル中における 5-PASL の  $\Delta\tau_c$  は、有機溶媒中よりも大きい。この事実は、CTAB ミセル中では 5-PASL が異方性の分子運動をしていることを示唆している。

Table 1-1. Rotational correlation times for 5-PASL and 1-LASL in organic solvents and in CTAB micelles.

	5-PASL			1-LASL		
	$\tau_c$	$\tau_c'$	$\Delta\tau_c$	$\tau_c$	$\tau_c'$	$\Delta\tau_c$
water	23.6	18.0	5.6	—	—	—
ethyl alcohol	17.8	31.7	13.9	12.3	3.4	8.9
hexyl alcohol	56.0	54.8	1.2	25.1	13.6	11.5
benzene	1.0	9.4	8.4	2.3	3.5	1.2
hexadecane	33.1	31.3	1.8	7.1	10.4	3.3
CTAB solution (120 mg/cm <sup>3</sup> )	290.0	174.0	126.0	87.6	96.1	8.5

1-LASL-CTAB ミセル系の場合、 $\tau_c$  は 5-PASL-CTAB ミセル系の場合と比較して明らかに小さいことがわかる。さらに、CTAB ミセル中における 1-LASL の  $\Delta\tau_c$  は、有機溶媒中のそれに非常に近い。この事実は、CTAB ミセル中においては、1-LASL のラジカル基が 5-PASL のラジカル基ほど束縛されておらず、前者の分子運動の異方性が小さいことを示している。

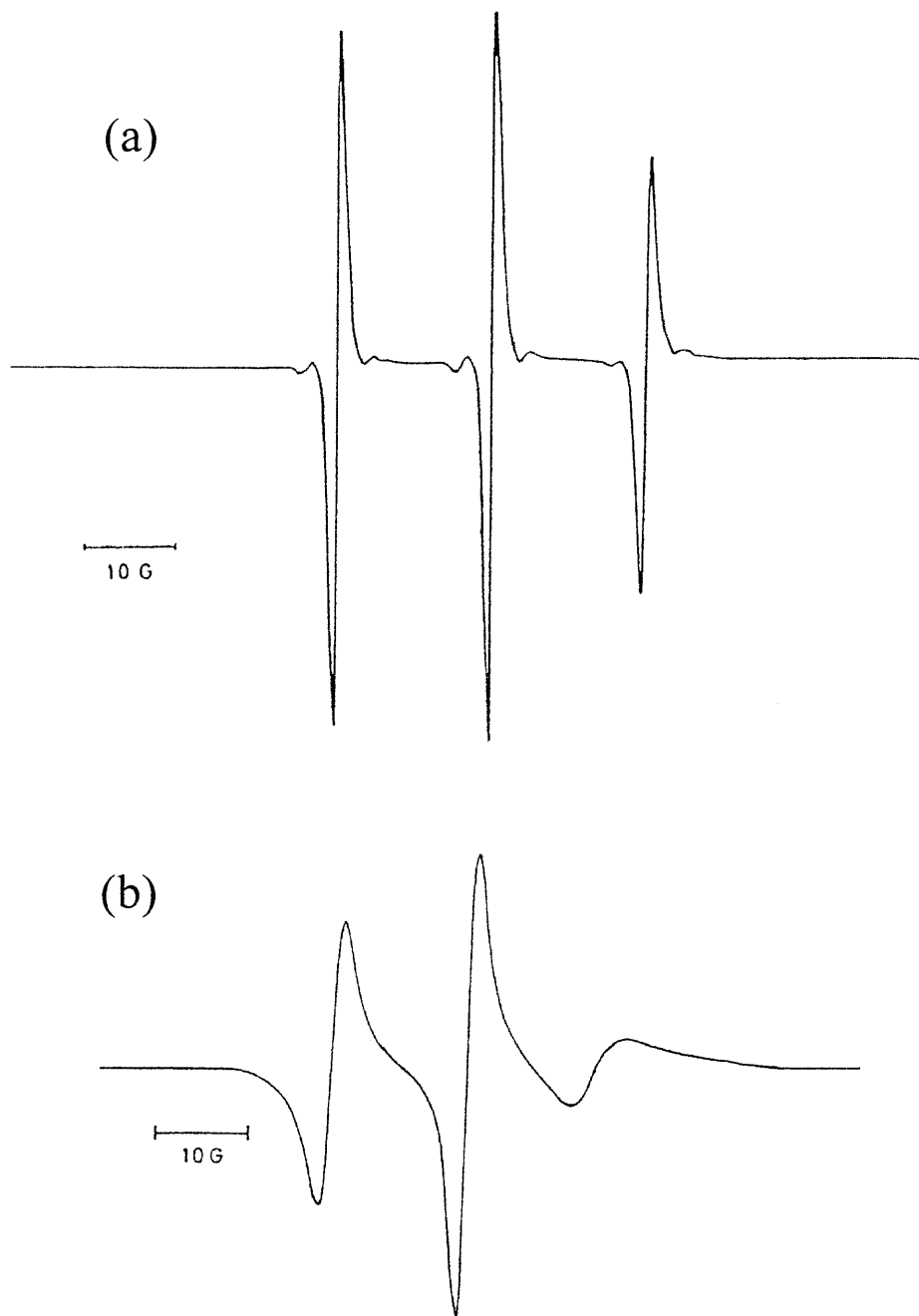


Fig. I-1-1(a) ESR spectrum of 5-PASL (saturated) in water.

Fig. I-1-1(b) ESR spectrum of 5-PASL ( $1.14 \times 10^{-3}$  M) in CTAB micelle ( $175 \text{ mg/cm}^3$ ).



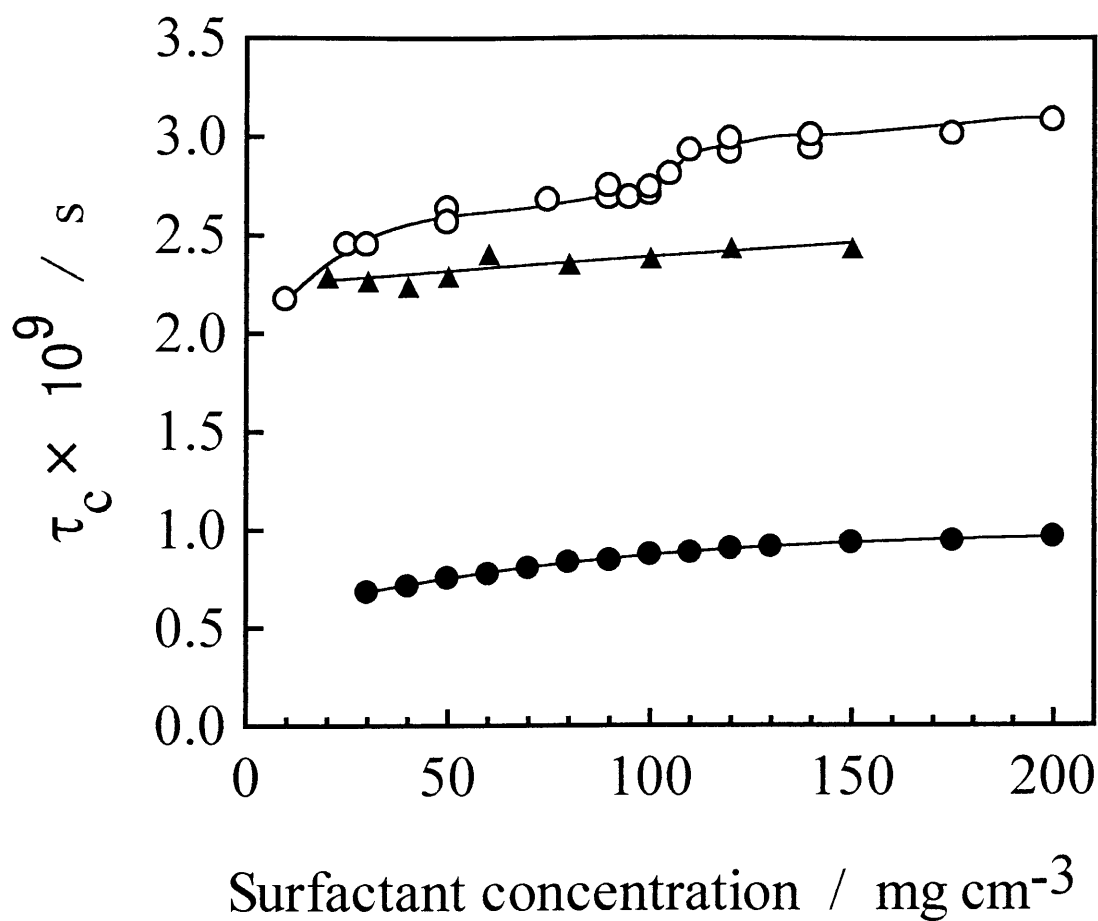


Fig. I-1-2 Rotational correlation times of 5-PASL and 1-LASL in aqueous solutions vs. surfactant concentrations (room temperature,  $22 \pm 2^\circ C$ ). ○, 5-PASL-CTAB ; ●, 1-LASL-CTAB ; ▲, 5-PASL-CTAC.



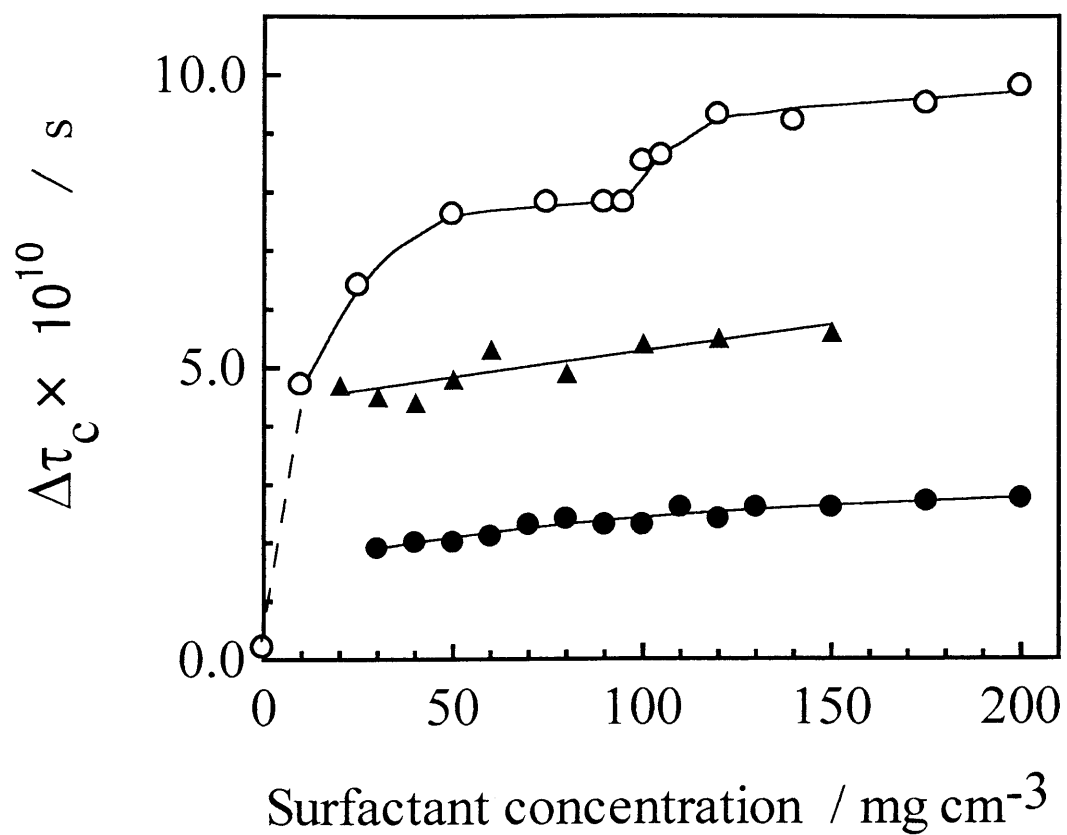


Fig. I-1-3  $\Delta\tau_c$  values of 5-PASL and 1-LASL in aqueous solutions vs. surfactant concentrations. ○, 5-PASL-CTAB ; ●, 1-LASL-CTAB ; ▲, 5-PASL-CTAC.



5-PASL の回転相関時間を CTAB 濃度の関数として Fig. I-1-2 に表した。90–120 mg/cm<sup>3</sup> の濃度範囲で著しい  $\tau_c$  の変化がおこっていることがわかる。この濃度範囲は第 2 CMC に対応している。一方、5-PASL を CTAC ミセルに可溶化したときは、第 2 CMC に相当するような変化は認められなかった。したがって、CTAB ミセルの場合に観測された回転相関時間の変化は、ミセルの形状変化によるものと推察される。

また、1-LASL の  $\tau_c$  についても CTAB 濃度の関数として Fig. I-1-2 に示した。このプローブの  $\tau_c$  は、ほとんど CTAB 濃度に依存しないことがわかった。これらの事実から、CTAB ミセルの極性基部分の rigidity は、ミセルの形状変化の影響を受けにくいと結論できる。

Fig. I-1-3 に 5-PASL および 1-LASL の  $\Delta\tau_c$  値が界面活性剤濃度の関数として示されている。5-PASL-CTAB 水溶液においては、約 100 mg/cm<sup>3</sup> の濃度で  $\Delta\tau_c$  の変化が認められたが、5-PASL-CTAC 系の場合、そのような変化は観測されなかった。この事実は、球-棒状転移によって、5-PASL の分子運動が異方的になったことを示している。一方、CTAB ミセルに 1-LASL を可溶化するとき、 $\Delta\tau_c$  は変化しない。したがって、ミセルの炭化水素部分とは対照的に、CTAB ミセルの極性基部分におけるラジカル基の分子内回転運動は、ミセルの形状変化による束縛を受けにくいと結論される。



## 2-4 結論

$\delta$ -炭素および極性基部分にニトロキシドラジカル基をもつ長鎖アルキル化合物（それぞれ，5-PASL および 1-LASL）をスピンプローブとして臭化セチルトリメチルアンモニウム（CTAB）および塩化セチルトリメチルアンモニウム（CTAC）ミセル中に可溶化し，ESR スペクトル解析により，プローブの回転相関時間を求めた。5-PASL を可溶化した CTAB 水溶液においては，球状から棒状ミセルへの転移と考えられる濃度領域で回転相関時間の変化が認められた。しかし，CTAC ミセルではそのような変化は観察されなかった。また，CTAB に 1-LASL を可溶化した場合も相関時間はほとんど変化しなかった。これらの結果から，CTAB ミセルの形状変化により，ミセルの疎水基部分（5-PASL の  $\delta$ -炭素付近に対応する部分）はより rigid になるが，親水基付近はほとんど束縛を受けないと結論される。

## 参考文献

- 1) A. S. Waggoner, O. H. Griffith and C. R. Christensen, *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, **57**, 1198 (1967).
- 2) A. S. Waggoner, A. D. Keith and O. H. Griffith, *J. Phys. Chem.*, **72**, 4129 (1968).
- 3) S. Ohnishi, T. J. R. Cyr and H. Fukushima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **43**, 673 (1970).
- 4) J. R. Ernandes, S. Schreier and H. Chaimovich, *Chem. Phys. Lipids*, **16**, 19 (1976).
- 5) W. L. Hubbell and M. H. McConnell, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 314 (1971).
- 6) D. Kivelson, *J. Chem. Phys.*, **27**, 1087 (1957).
- 7) M. B. McBride, *J. Phys. Chem.*, **80**, 196 (1976).
- 8) F. Sachs and R. Latorre, *Biophys. J.*, **14**, 316 (1974).
- 9) B. Cannon, C. F. Polnaszek, K. W. Butler, L. E. Goran Eriksson and I. C. P. Smith, *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 505 (1975).
- 10) P. Ekwall, L. Mandell and P. Solyom, *J. Colloid Interface Sci.*, **35**, 519 (1971).



## 第2章 臭化セチルトリメチルアンモニウム会合体動的構造：特に、可溶化ニトロキシドラジカル誘起核磁気緩和法による研究

### 2-1 緒言

核磁気共鳴吸収法は界面活性剤水溶液の物理化学的挙動を調べるための有用な手段である<sup>1-24)</sup>。特に、核四重極吸収は、アルカリイオンと生体膜表面との相互作用のような生体反応に関連して、対イオンとミセル凝集体との間の相互作用機構に関する情報を得るためにしばしば利用されてきた<sup>8, 11-15, 17, 19)</sup>。

すでに多くの研究者によって報告されているように、核磁気緩和測定は界面活性剤の水溶液中における分子運動を研究するために有用である<sup>4, 16, 20)</sup>。Williams, Sears, Allerhand および Cordes<sup>16)</sup> は、ミセル水溶液の<sup>13</sup>C-スピン-格子緩和時間の測定から、界面活性剤の極性基から遠いセグメントほどその運動が増加し、極性基末端では非常に束縛される傾向にあることを示した。また、彼らは臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) ミセルの球から棒状への転移によってもセグメント運動が抑制されることを認めた。Henriksson と Ödberg<sup>20)</sup> は、n-ヘキサン酸ナトリウム水溶液において、そのアルキル炭素の<sup>13</sup>C-スピン-格子緩和時間を各種濃度に対して詳細に調べた。そして、CMC 以下において、その核磁気緩和時間はヘキサン酸塩の分子全体の運動に支配され、一方、ミセル状態では、ブラウン運動の減少により、C-C 結合周りの束縛された内部回転が緩和過程に寄与すると結論した。

常磁性イオンあるいは分子を含む溶液においては、核磁気共鳴吸収スペクトルは非常に強い常磁性効果の影響を受ける。たとえば、常磁性物質は核磁気緩和時間を減少させる<sup>25)</sup>。このような摂動を受けた共鳴スペクトルから、常磁性中

心と核間の距離の計算が可能であるため、核磁気緩和法は酵素の動力学やその活性中心の構造を研究するためにしばしば利用されてきた<sup>26-29)</sup>。Kornberg と McConnell<sup>30)</sup> は、ニトロキシドラジカルでラベル化したホスファチジルコリンを含むベシクル中において、ホスファチジルコリン分子の N-CH<sub>3</sub> 水素の吸収ピークのブロード化を測定し、ベシクルの flip-flop および横方向拡散速度を評価した。

本研究においては、ニトロキシドラジカルプローブを含む CTAB ミセル水溶液の核磁気共鳴吸収スペクトルを測定し、常磁性物質によって生じたスピンースピン緩和時間 ( $T_{2M}$ ) を球-棒状転移にともなう CTAB ミセルの rigidity 変化と関連づけて議論した。

## 2-2 実験方法

臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB), 塩化セチルトリメチルアンモニウム (CTAC), 5-(N-オキシル-4',4'-ジメチルオキサゾリジン)パルミチン酸 (5-PASL) およびラウリン酸 2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジノール-1-オキシル (1-LASL) は, 第 1 章と同じものを用いた。NMR 測定には MERCK 製の重水 (純度 99.75%) を使用した。

NMR スペクトルは Hitachi-Perkin-Elmer R-20B スペクトロメーター (60 MHz) を用い, 掃引幅 60 Hz, 温度  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  で測定した。

## 2-3 結果および考察

### 2-3-1 5-PASL または 1-LASL 可溶化 CTAB ミセルの $N-CH_3$ ピークの線幅

ニトロキシドフリーラジカルをラベル化した分子が CTAB ミセルに可溶化された場合、CTAB 分子中の水素原子の吸収ピークにブロードニングが生じる。この現象はニトロキシドラジカルの常磁性緩和効果として知られている。一定温度の条件で、線幅のブロードニングは (1) 式で与えられる。

$$\Delta\nu = \Delta\nu_{1/2} - \Delta\nu_{1/2}^{\circ} \quad (1)$$

ここで、 $\Delta\nu_{1/2}$  および  $\Delta\nu_{1/2}^{\circ}$  は、それぞれスピンラベルプローブが共存するとき、および共存しないときの NMR ピークの半値幅を表している。式(1)はさらに式(2)として与えられる<sup>30,33</sup>。

$$\Delta\nu = P_M / \{ \pi(\tau_M + T_{2M}) \} \quad (2)$$

ここで、 $\tau_M$  および  $T_{2M}$  は、それぞれ CTAB 分子とスピンラベル分子がもっとも接近しているときの寿命およびスピンスピン緩和時間を示す。 $P_M$  は式(3)によって与えられる。

$$P_M = q [R] / ([S] + [R]) \quad (3)$$

ここで、 $[S]$  および  $[R]$  は、それぞれ、CTAB およびニトロキシドラジカルプローブのモル濃度を表す。 $q$  はスピンラベル分子の近傍に位置する CTAB の分子数で、CTAB ミセルが六方充填構造と仮定すると  $q=6$  である。したがって、式(2)はつぎの形で表すことができる。

$$\Delta\nu = \{ q/100 \pi(\tau_M + T_{2M}) \} \times \{ 100 [R] / ([S] + [R]) \} \quad (4)$$

すなわち、プローブによって生じる線幅のブロードニングは、そのラジカル濃度に直線的に比例する。したがって、スピンスピン緩和時間 ( $1/T_{2M}$ ) は式(4)の傾きから求められ、その傾きは式(5)で与えられる。

$$L = q / \{ 100 \pi(\tau_M + T_{2M}) \} \quad (5)$$

ここで、ミセル-モノマー交換は非常に速い ( $T_{2M} \gg \tau_M$ ) ので、式(5)の傾

きは近似的に式(6)で表される。

$$L = q / (100 \pi \cdot T_{2M}) \quad (6)$$

Fig. I-2-1 は CTAB ミセルの N-CH<sub>3</sub> ピークの線幅におよぼす 5-PASL の影響を示している。

5-PASL-CTAB ミセルにおいては、N-CH<sub>3</sub> ピークのブロードニングは 5-PASL 濃度に依存し、しかも直線的であることがわかる (Fig. I-2-2)。CTAB の種々の濃度におけるスピンスピン緩和時間(T<sub>2M</sub>)は、Fig. I-2-2, I-2-3 および I-2-4 に示された直線の傾きから算出した。N-CH<sub>3</sub> ピークの T<sub>2M</sub> 値は濃度の関数として Fig. I-2-5 に示されている。20-50 mg/cm<sup>3</sup> の濃度範囲においては、T<sub>2M</sub> はほとんど一定であるが、CTAB 濃度がさらに増加するとしだいに減少し、最終的に一定値に近づく傾向を示した。一方、Fig. I-2-5 に見られるように、CTAC の場合、T<sub>2M</sub> 値は試験した濃度範囲において濃度依存性は認められなかった。

T<sub>2M</sub> が著しく減少する 60-110 mg/cm<sup>3</sup> の CTAB 濃度は、第 2 CMC に対応しているから<sup>17,18)</sup>、このような 5-PASL-CTAB 混合水溶液において観測される T<sub>2M</sub> 値の顕著な変化は、CTAB ミセルの形が球状から棒状へと転移すること起因すると考えられる。

常磁性分子によって誘起される核磁気緩和の強さは、界面活性剤分子の水素原子とラジカル中心との距離(r)に関係する。すなわち、NMR の線幅は、1/r<sup>6</sup> に比例して広くなる<sup>35)</sup>。電子の磁気双極子モーメントは大きいので、核磁気スピンの及ぼす不対電子スピンの常磁性緩和効果は、約 40 Å の距離でさえ影響することが知られている。このように、スピンラベルを用いた緩和時間測定から、プローブと CTAB 分子間の平均距離に関する情報を得ることができる。ミセルは球状から棒状への形状変化によりパッキング状態が密になるので、プローブと CTAB 間の平均距離が短くなり、その結果、ミセルの炭素鎖部分の rigidity



が増加する。このことがミセル水溶液における水素核の核磁気共鳴吸収ピークの線幅の広がりのおもな要因と考えられる。すなわち、 $T_{2M}$  の減少は、球状の CTAB ミセルから棒状ミセルへの転移によって生じるミセルの rigidity の増加のためである。このように  $T_{2M}$  値は界面活性剤分子の rigidity に関する尺度と考えられる。

第 2 CMC 以下において、5-PASL-CTAB 水溶液の  $T_{2M}$  値は、5-PASL-CTAC 水溶液のそれと比較して小さい。このことは CTAB の球状ミセルが CTAC より rigid であることを示唆している。

CTAB ミセルに 1-LASL を可溶化するとき、ミセルの親水基近傍にあるニトロキシドラジカルもまた CTAB の水素原子の緩和速度を短縮し、特に、 $N-CH_3$  ピークの緩和速度が 5-PASL の場合より大きくなることがわかった。Fig. I-2-3 は CTAB ミセルの  $N-CH_3$  ピークの線幅に及ぼす 1-LASL 濃度の影響を示している。また、Fig. I-2-5 には  $N-CH_3$  の水素原子の  $T_{2M}$  値を CTAB 濃度の関数として表した。この場合、 $T_{2M}$  の減少は認められたが、第 2 CMC 付近の  $T_{2M}$  変化は 5-PASL の場合ほど顕著ではなかった。そして、1-LASL の場合、 $T_{2M}(\text{球状}) / T_{2M}(\text{棒状})$  の比は 3 : 1 であり、5-PASL の場合は 4.5 であった。

1-LASL-CTAB 水溶液における  $T_{2M}$  値の変化は、球状から棒状ミセルへの形状変化によって起こる親水基領域の rigidity の増加に起因すると考えられる。5-PASL と 1-LASL 間における  $T_{2M}$  値の相対変化の違いは、ミセル内部と親水基部分の rigidity の差を意味している。すなわち、ミセルの親水基部分はその内部と比較して、ミセルの形状変化による束縛を受けにくいと結論される。この事実は、第 1 章のニトロキシドスピンプローブを可溶化した CTAB ミセルの ESR 研究の結果と一致する<sup>36)</sup>。

Debye と Anacker<sup>39)</sup> は、CTAB ミセルが臭化ナトリウムの添加により、大きな棒状ミセルになることを報告した。本研究においても、CTAB 水溶液に電解

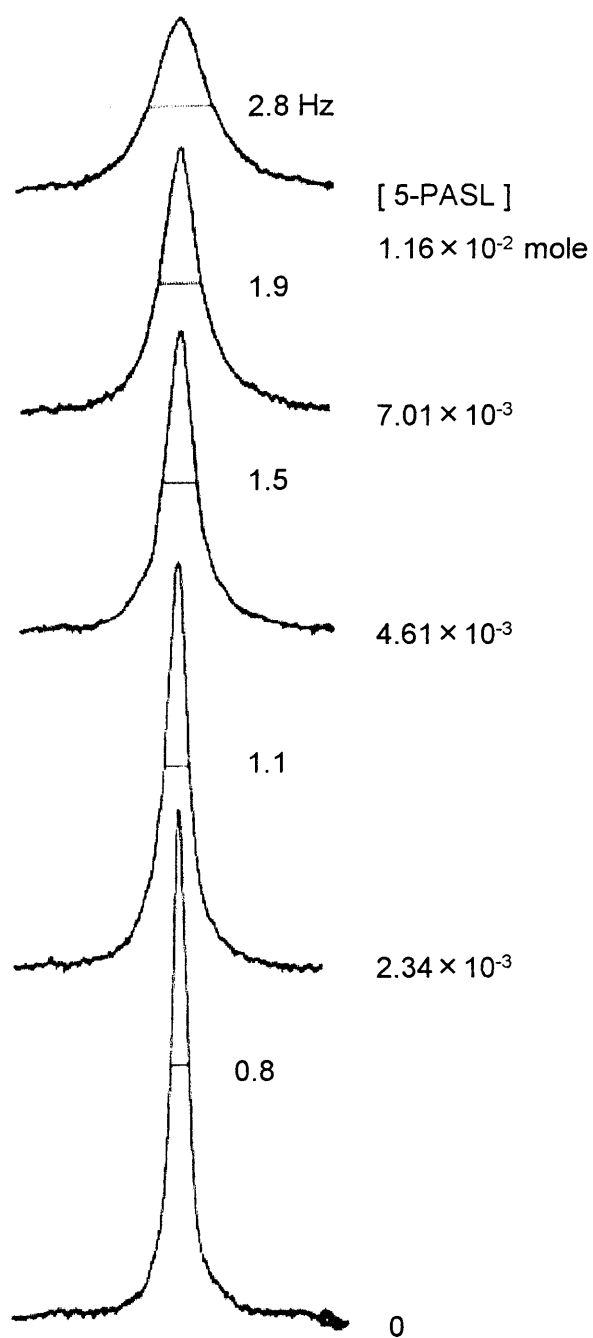


Fig. I-2-1 Broadening of the N-CH<sub>3</sub> hydrogen resonance of CTAB due to the paramagnetic effect of 5-PASL. The concentration of CTAB is 120 mg/cm<sup>3</sup>.



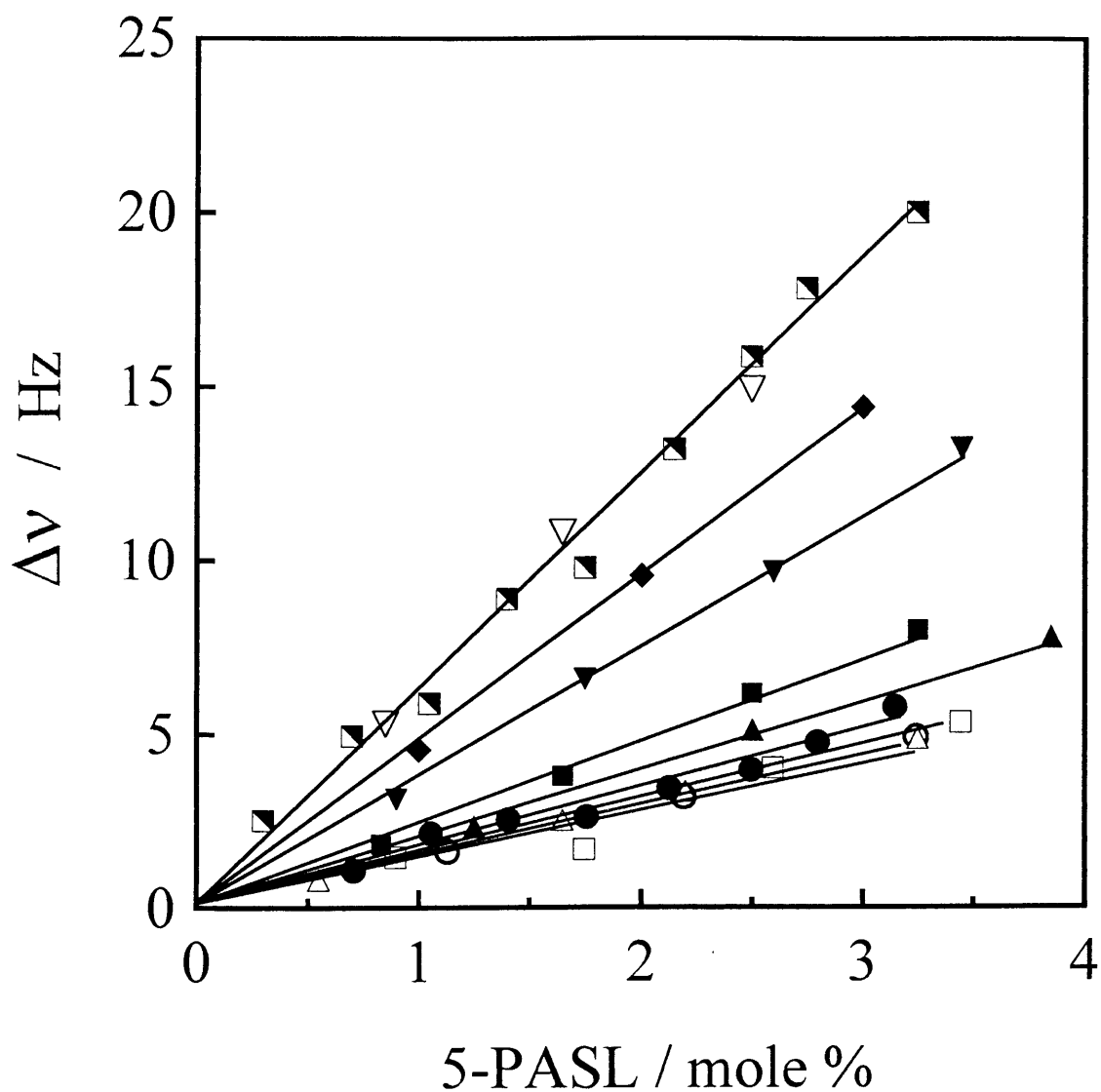


Fig. I-2-2 N-CH<sub>3</sub> Hydrogen resonance line-width ( $\Delta\nu$ ) as a function of 5-PASL concentration at various CTAB concentrations. Mole % represents  $100 \times [R]/([S]+[R])$ , where [S] and [R] are the molar concentrations of CTAB and the radical probe, respectively. CTAB concentration ( $\text{mg}/\text{cm}^3$ ): ○, 20; △, 40; □, 50; ●, 60; ▲, 70; ■, 80; ▼, 100; ◆, 110; ◼, 120; ▽, 130.



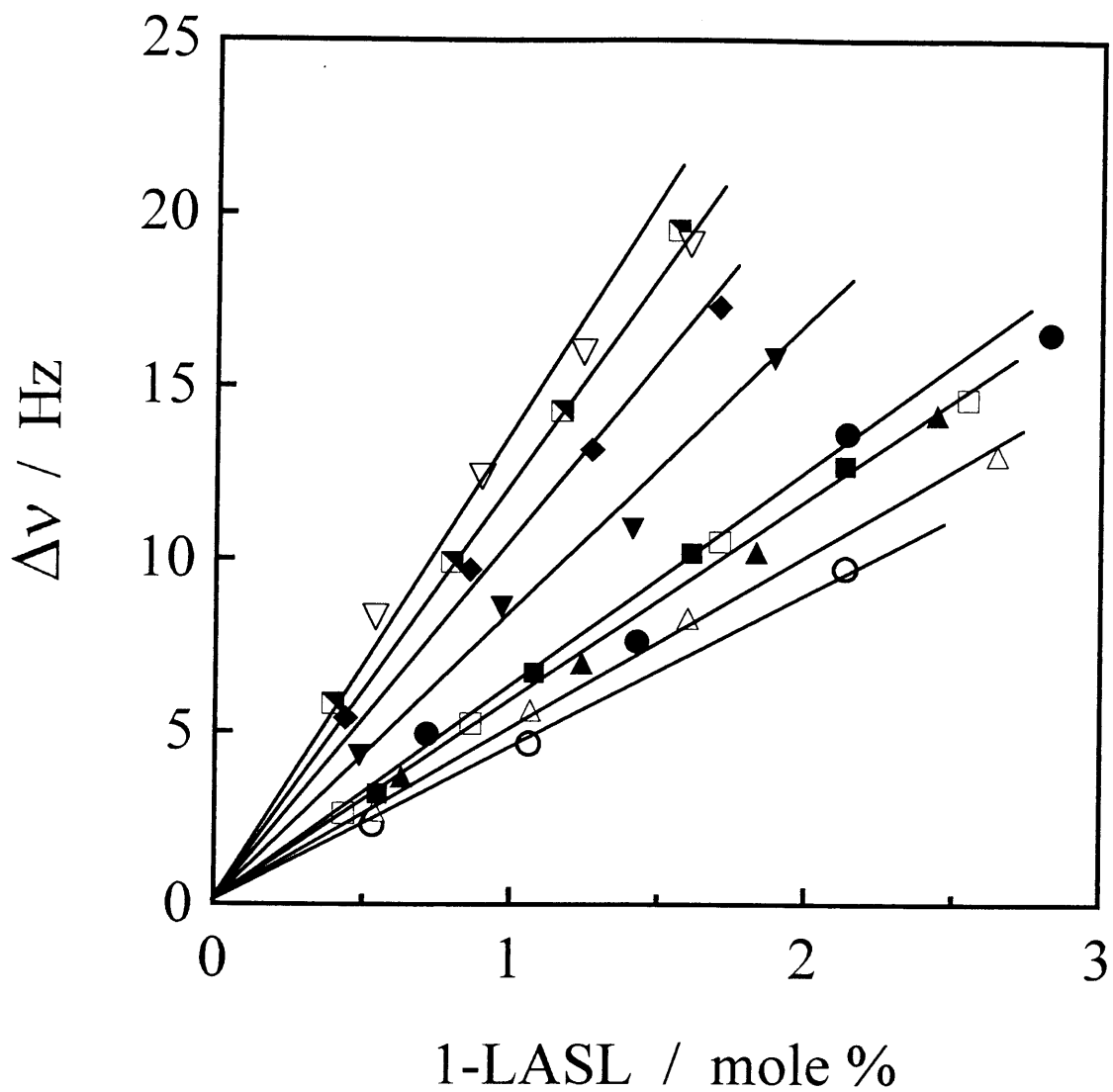


Fig. I-2-3 N-CH<sub>3</sub> Hydrogen resonance line-width as a function of 1-LASL concentration at various CTAB concentrations. Mole % is shown in Fig. I-2-2. CTAB concentration (mg/cm<sup>3</sup>): ○, 20; △, 40; □, 50; ●, 60; ▲, 70; ■, 80; ▼, 90; ◆, 100; ◩, 110; ▽, 120.



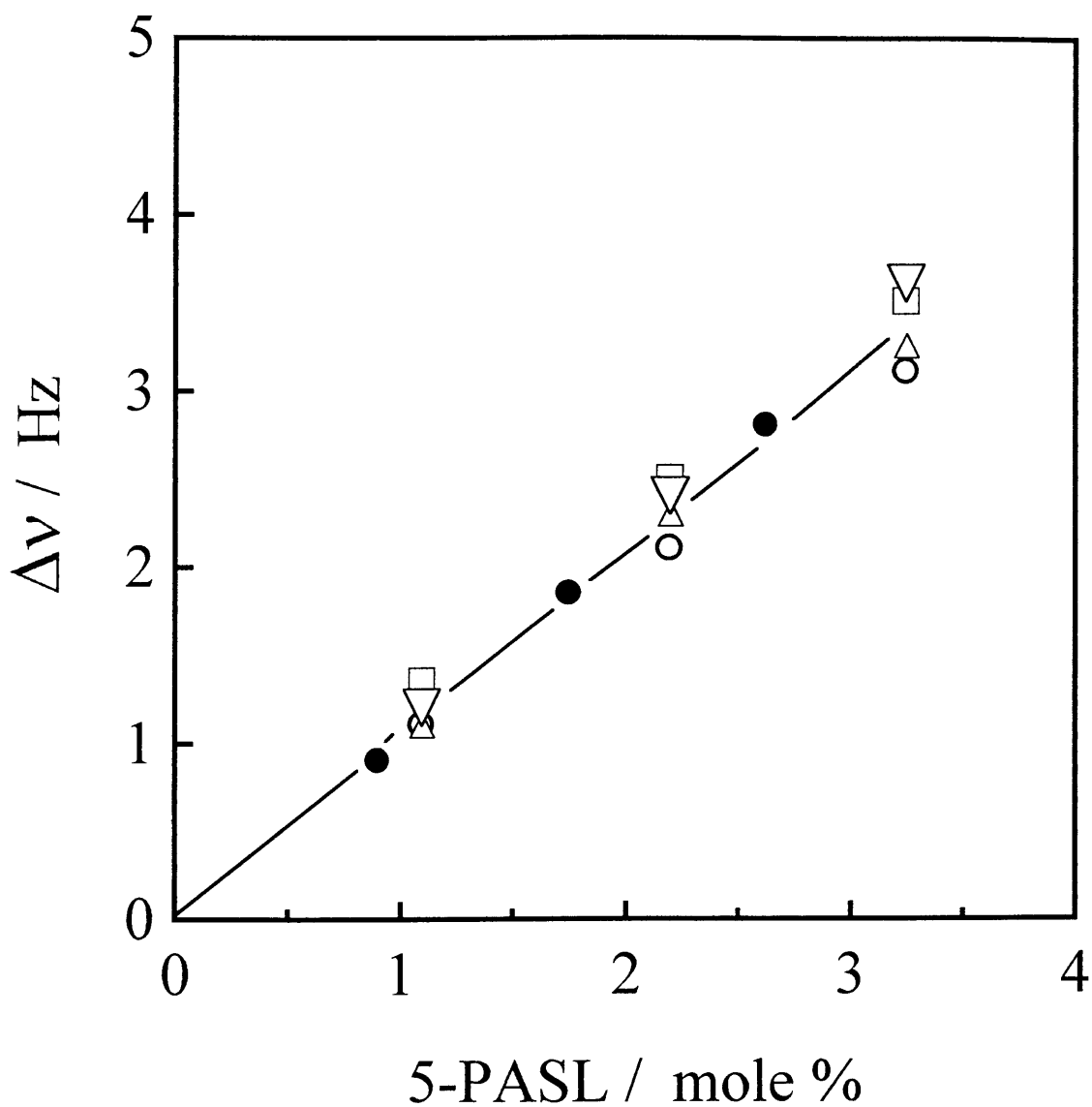


Fig. I-2-4 N-CH<sub>3</sub> Hydrogen resonance line-width as a function of 5-LASL concentration at various CTAC concentrations. Mole % is shown in Fig. I-2-2. CTAC concentration (mg/cm<sup>3</sup>) : O, 20 ; Δ, 60 ; □, 80 ; ▽, 100 ; ●, 120.





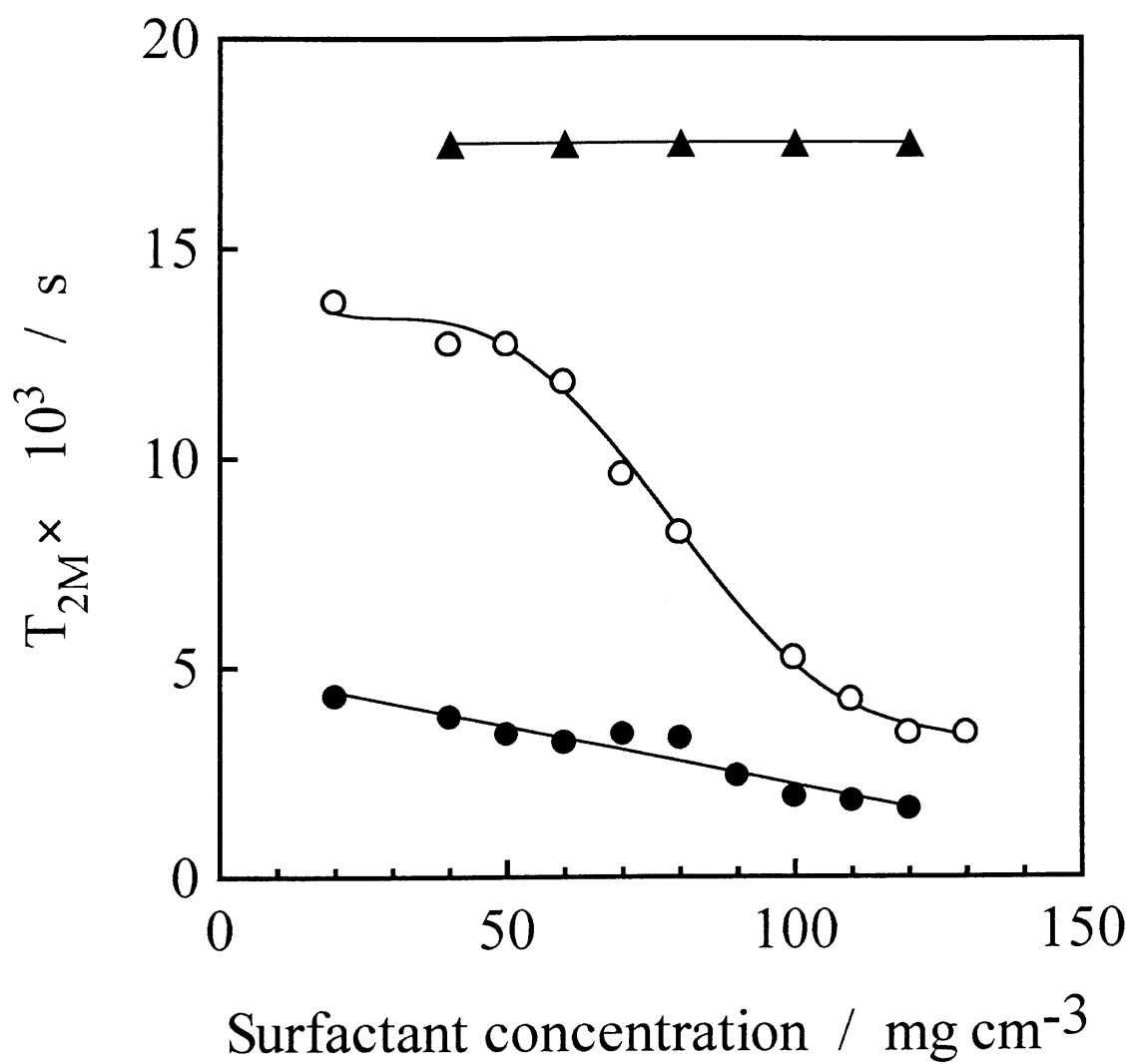


Fig. I-2-5 Nitroxide-radical induced transverse relaxation time ( $T_{2M}$ ) vs. surfactant concentration.  $\circ$ , 5-PASL-CTAB ;  $\bullet$ , 1-LASL-CTAB ;  $\blacktriangle$ , 5-PASL-CTAC.



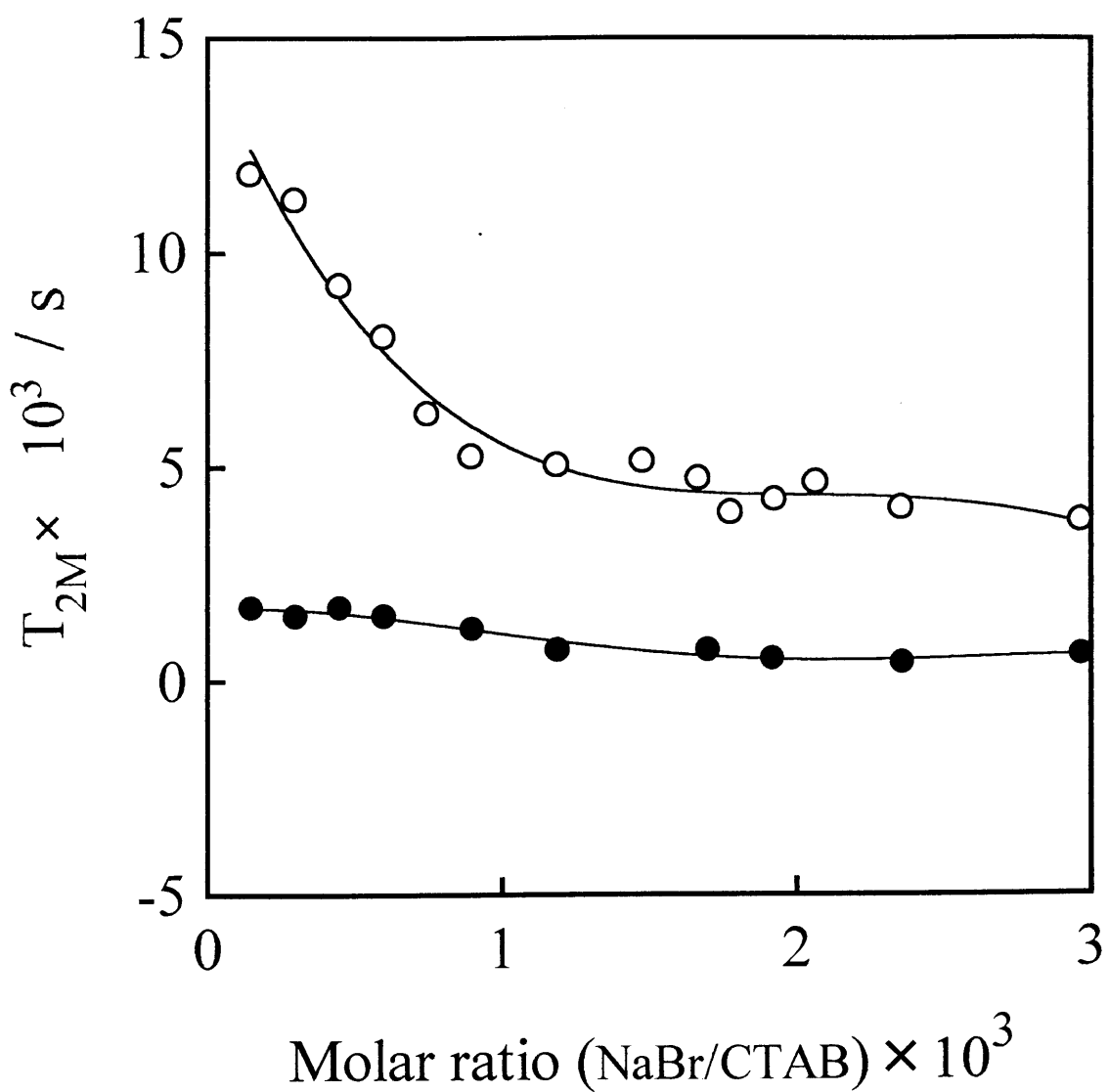


Fig. I-2-6 Effect of NaBr on  $T_{2M}$  of the N-CH<sub>3</sub> peak. The CTAB concentration is 60 mg/cm<sup>3</sup>. O, 5-PASL ; ●, 1-LASL.



質を添加したとき、球-棒状転移のために、N-CH<sub>3</sub> ピークの T<sub>2M</sub> に変化が認められた。

Fig. I-2-6 はニトロキシドプローブを可溶化した CTAB ミセル (CTAB 濃度は 60 mg/cm<sup>3</sup> に固定) において、N-CH<sub>3</sub> ピークの T<sub>2M</sub> 値に及ぼす臭化ナトリウムの影響を示している。臭化ナトリウム濃度の増加とともに T<sub>2M</sub> 値は急速に減少し、 $1.0 \times 10^{-3}$  のモル比でほとんど一定値を示した。この結果は、臭化ナトリウムの添加によって、ミセルの炭化水素コアの rigidity が増加したことを示しており、Shinitzky らの報告と一致する<sup>40)</sup>。

また、1-LASL-CTAB 水溶液への臭化ナトリウムの添加によっても T<sub>2M</sub> 値の若干の減少が認められた。しかし、この T<sub>2M</sub> の相対変化は NaBr-5-PASL-CTAB 系ミセルの場合よりも小さかった。すなわち、1-LASL 系に対する T<sub>2M</sub>(球状)/T<sub>2M</sub>(棒状)の比は 2.3 であり、5-PASL 系のそれは 3.3 であった。これらの結果から、NaBr 添加によって生じたミセル形状変化のために、炭化水素部分はより rigid になるが、親水基部分は内部ほど rigid にならないと結論される。

ミセル系において観測されるスピンスピン緩和時間 T<sub>2M</sub> は、モノマーとミセルの平均であるので、それらの間の速い化学的交換の影響を考慮に入れる必要がある。しかし、本研究においては、この影響は無視することができる。それは、試験した CTAB 溶液においては、界面活性剤分子の 99% がミセル中に存在し、さらに、5-PASL および 1-LASL プローブはほとんど水に溶解しないので、これらのプローブはそのほとんどがミセル中に可溶化されていると考えられるからである。

## 2-3-2 球-棒状転移にともなうラジカル中心と界面活性剤分子の極性基間の平均距離の相対変化

$^1\text{H-NMR}$  スペクトルの  $\text{N-CH}_3$  吸収ピークの  $T_{2M}$  値は、ニトロキシドフリーラジカル中心と CTAB ミセルの  $\text{N-CH}_3$  基間の距離に関する定量的情報を与えてくれる。

Solomon<sup>35)</sup>によれば、誘起スピンスピン緩和時間は、式(7)で表される。

$$1/T_{2M} = (1/15)(\mu_s^2 \gamma_I^2 r^6) f(\tau_c) \quad (7)$$

ここで、 $\tau_c$  は核スピン-電子スピンの磁気双極子相互作用に関する相関時間、 $\mu_s$  は電子双極子モーメント、 $\gamma_I$  は核磁気回転比、そして  $r$  は不対電子と核の間の距離である。

Wien, Morrisett および McConnell<sup>41)</sup>は、スピンラベル化されたインヒビターと酵素の分子複合体に関して、 $\omega_s$  (電子のラーモア周波数)  $\gg \omega_I$  (核のラーモア周波数) および  $\omega_s^2 \tau_c^2 \gg 1$  の条件下において式(8)を誘導した。

$$1/T_{2M} = (1/15)(\mu_s^2 \gamma_I^2 / r^6) \{4\tau_c + 3\tau_c / (1 + \omega_I^2 \tau_c^2)\} \quad (8)$$

この式は不対電子と核間の距離が一定で、等方性のスピン交換相互作用による緩和効果が無視できるという仮定の下で誘導された。ここで、 $T_{2M}$  と  $\tau_c$  が明らかになれば、距離  $r$  が決定できる。また、もし、モノマーとミセル間の化学交換の影響が無視できるとすると、式(8)は常磁性分子-ミセル系に適用できる。すなわち、5-PASL-CTAB ミセルにおいて、可溶化されたラジカルを中心と  $\text{N-CH}_3$  の水素原子核の間の平均距離を決定することができる。

このようなミセル系において、球-棒状転移が起こるとき、プローブ中心と  $\text{N-CH}_3$  水素間の平均距離が変化すると推測される。球状ミセルに対する棒状ミセルの平均距離の違いは式(9)によって与えられる。

$$T_{2M}^\circ / T_{2M} = (r^\circ / r)^6 \{(4\tau_c + 3\tau_c / [1 + \omega_I^2 \tau_c^2]) / (4\tau_c^\circ + 3\tau_c^\circ / [1 + \omega_I^2 \tau_c^{\circ 2}])\} \quad (9)$$

ここで、 $T_{2M}$  および  $r$  は、それぞれ、 $\text{N-CH}_3$  ピークの双極子誘起スピンスピ

ン緩和時間および球状の CTAB ミセルにおけるプローブの対電子と N-CH<sub>3</sub> 水素の原子核間の平均距離であり、 $\tau_c$  は球状ミセルにおけるプローブの相関時間である。添字ゼロは棒状ミセルを表す。 $\omega_I$  は核のラーモア歳差運動周波数 (rad/s) である。

水素の核磁気共鳴周波数  $\omega_I$  が  $3.768 \times 10^8$  rad/s (60 MHz), および  $\tau_c$  と  $\tau_c^\circ$  が, それぞれ  $2.6 \times 10^{-9}$  と  $3.0 \times 10^{-9}$  s であるとき (第 1 章の ESR スペクトルから算出した<sup>36)</sup>), 相対位置 ( $r^\circ/r$ ) は  $T_{2M}$  を用いて式(10)のように表現できる。

$$r^\circ/r = 0.875 (T_{2M}^\circ/T_{2M})^{1/6} \quad (10)$$

球状と棒状ミセル間の相関時間の差が小さいとき, 相対位置は近似的に式(11)で表される。

$$r^\circ/r = (T_{2M}^\circ/T_{2M})^{1/6} \quad (11)$$

$T_{2M}$  および  $T_{2M}^\circ$  の値として, それぞれ, 本実験で得られた  $14 \times 10^{-3}$  および  $4 \times 10^{-3}$  s の値を用いるとき,  $r^\circ/r = 0.83$  が得られる。

また, 式(11)は比の値として 0.81 を与える。したがって, このような小さな相関時間の差によって, 相対位置はほとんど影響を受けないと考えられる。

これらの計算値は, 可溶化されたプローブのラジカル中心と N-CH<sub>3</sub> 基の間の平均距離が, 球状-棒状転移の結果, 17-20%短くなっていることを示している。NaBr による球状-棒状転移の場合, 相対位置はこれらの値とほとんど等しい。

一方, 比  $r^\circ/r$  は球状および棒状ミセルのモデルから数学的に推測できる。CTAB ミセルの 2 つの型に対して, ミセルの分子量, 会合数および極性基の断面積 (計算値) を Table I-2-1 に示した<sup>34,39)</sup>。

球状の CTAB ミセルにおいて, 極性基の断面は直径 9.2 Å の円と見なされ, これは, ある極性基の中心から隣接する極性基中心までの距離に等しい。



Table I-2-1. Micellar molecular weight, aggregation numbers and cross-section areas of a polar head.

	Micellar molecular weight	Aggregation number	Cross section of a polar head (Å)
Sphere (observed)*	$3.5 \times 10^4$	111	66
Rod (observed)**	$1.86 \times 10^6$	5933	34
(calculated)**	$1.44 \times 10^6$	4585	44

\* Ref. 34.

\*\* Ref. 36.

5-PASL プローブに関して、極性基とラジカル中心間の分子内距離は、極性基と  $\delta$ -CH<sub>2</sub> 基の間の距離に近似的に対応していると考えてよい。したがって、極性基中心から隣接する界面活性剤の  $\delta$ -CH<sub>2</sub> 基までの平均距離は約 10.8 Å と計算される (Fig. I-2-7)。

1312 Å の長さをもつ Debye の CTAB 棒状ミセル<sup>39)</sup>において、ミセル分子量として  $1.86 \times 10^6$  を採用するとき、平均距離は 8.7 Å と評価でき、そして  $1.44 \times 10^6$  の理論分子量<sup>39)</sup>の場合、9.3 Å の平均距離が求められる。その結果、0.81 または 0.86 の相対位置が得られる。すなわち、 $r'/r = 8.7/10.8 = 0.81$  および  $r'/r = 9.3/10.8 = 0.86$  である。これらの計算値は本研究の双極子誘起スピンスピン緩和時間から得られた値とよく一致する。

これらの計算においては、極性基と  $\delta$ -CH<sub>2</sub> 基間の炭化水素セグメントがすべてトランス構造であると仮定したが、この仮定は岡林らの他の実験結果<sup>42,43)</sup>から推測して合理的であると考えられる。

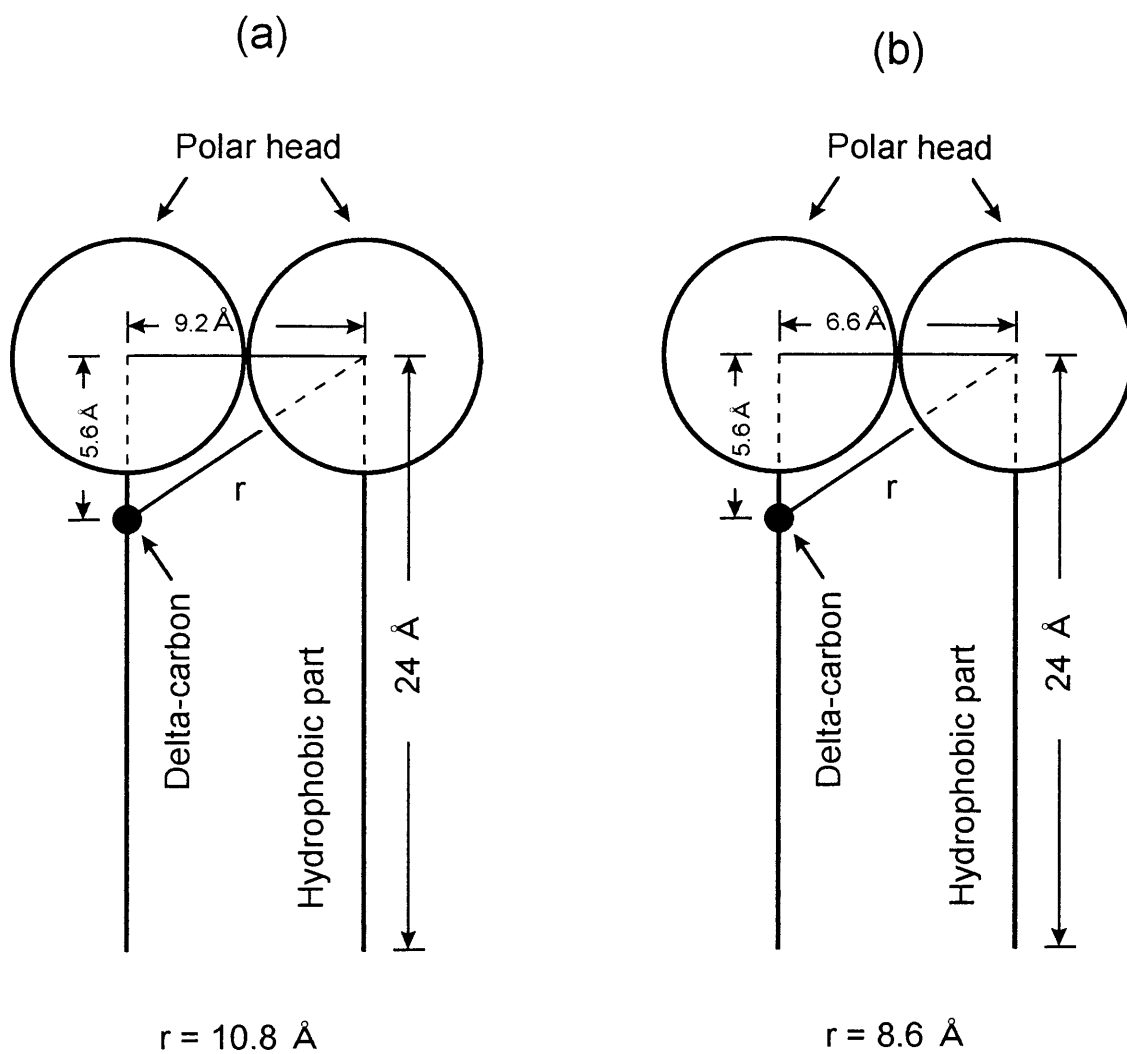


Fig. I-2-7 Schematical models for calculation of average distance between the radical center of the solubilized probe and  $\text{N-CH}_3$  groups of adjacent surfactant molecule. (a), spherical micelle model ; (b), rod-like micelle model.



## 2-4 結論

スピンラベル化されたパルミチン酸 (5-PASL) およびラウリン酸エステル (1-LASL) を可溶化した臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) のミセル水溶液について、N-CH<sub>3</sub> ピークの双極子誘起スピン-スピン緩和時間 (T<sub>2M</sub>) を測定し、このミセル系の動的構造を調べた。CTAB ミセルに 5-PASL を可溶化した場合、60–110 mg/cm<sup>3</sup> の濃度範囲で、T<sub>2M</sub> は急激に減少し、さらに濃度が増加すると一定になる傾向を示した。この濃度領域は CTAB の第 2 CMC に相当するので、T<sub>2M</sub> の著しい変化は球状ミセルから棒状ミセルへの転移のためであると考えられる。1-LASL の場合も T<sub>2M</sub> 値の減少が認められたが、5-PASL ほど顕著ではなかった。これらの結果から、CTAB ミセルの球-棒状転移において、アルキル鎖は強く束縛されるが、極性基部分はそれほど影響を受けないことがわかった。また、プローブ分子のラジカル中心とそれに隣接する CTAB 分子の極性基間の平均距離は、ミセルの形状変化の結果、約 17–20% 減少することが明らかになった。

## 参考文献

- 1) J. C. Eriksson, *Acta Chem. Scand.*, **17**, 1478 (1963).
- 2) T. Nakagawa and K. Tori, *Kolloid-Z. Z. Polym.*, **194**, 143 (1964).
- 3) J. C. Eriksson and G. Gillberg, *Acta Chem. Scand.*, **20**, 2019 (1966).
- 4) J. Clifford and B. A. Pethica, *Trans. Faraday Soc.*, **60**, 1483 (1964) ; *ibid.*, **61**, 182 (1965).
- 5) H. Inoue and T. Nakagawa, *J. Phys. Chem.*, **70**, 1108 (1966).
- 6) N. Müller and R. H. Birkhahn, *J. Phys. Chem.*, **71**, 957 (1967) ; *ibid.*, **72**, 583 (1968).
- 7) N. Müller and T. W. Johnson, *J. Phys. Chem.*, **73**, 2042 (1969).
- 8) B. Lindman and P. Ekwall, *Mol. Cryst.*, **5**, 79 (1968) ; *Kolloid-Z. Z. Polym.*, **246**, 688 (1971).
- 9) F. Tokiwa and K. Aigami, *Kolloid-Z. Z. Polym.*, **246**, 688 (1971).
- 10) N. Müller and F. E. Platko, *J. Phys. Chem.*, **75**, 547 (1971).
- 11) G. Lindblom, H. Wennerstroem and B. Lindman, *Chem. Phys. Lett.*, **8**, 489 (1971).
- 12) G. Lindblom, *Acta Chem. Scand.*, **25**, 2767 (1971).
- 13) K. K. Fox, I. D. Robb and R. Smith, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, **168**, 445 (1972).
- 14) B. Lindman and I. Danielsson, *J. Colloid Interface Sci.*, **39**, 349 (1972).
- 15) H. Gustavsson and B. Lindman, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1973**, 93.
- 16) E. Williams, B. Sears, A. Allerhand and E. H. Cordes, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 4871 (1973).

- 17) G. Lindblom, B. Lindman and L. Mandell, *J. Colloid Interface Sci.*, **42**, 400 (1973).
- 18) C. A. Bunton and M. J. Minch, *J. Phys. Chem.*, **18**, 1490 (1971).
- 19) H. Gustavsson and B. Lindman, *J. Am. Chem. Soc.*, **95**, 3923 (1975).
- 20) U. Henriksson and L. Ödberg, *Colloid & Polymer Sci.*, **254**, 35 (1976).
- 21) B. O. Pensson, T. Drakenberg and B. Lindman, *J. Phys. Chem.*, **80**, 2124 (1976).
- 22) A. A. Ribeiro and E. A. Dennis, *J. Colloid Interface Sci.*, **55**, 94 (1976).
- 23) H. Takahashi, Y. Nakayama, H. Hori, K. Kihara, H. Okabayashi and M. Okuyama, *J. Colloid Interface Sci.*, **54**, 102 (1976).
- 24) H. Okabayashi, K. Kihara and M. Okuyama, *in Colloids and Interface Science*, (Ed. M. Kerker), Vol. II, Academic Press, New York and London, 1976.
- 25) T. J. Swift, *In NMR of Paramagnetic Molecules*, (Ed. G. N. LaMar, W. DeW. Horrocks, Jr., R. H. Holm), Academic Press, New York and London, 1973.
- 26) A. S. Mildvan and H. Weiner, *J. Biol. Chem.*, **244**, 2465 (1969).
- 27) A. S. Mildvan and M. Cohn, *Adv. Enzymol.*, **33**, 1 (1970).
- 28) T. R. Krugh, *Biochemistry*, **10**, 2594 (1971).
- 29) M. Cohn and J. Reuben, *Accounts Chem. Res.*, **4**, 6 (1971) .
- 30) R. D. Kornberg and M. H. McConnell, *Biochemistry*, **10**, 111 (1971) ; *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **68**, 2564 (1971) .
- 31) W. L. Hubbell and M. H. McConnell, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 314 (1971).
- 32) A. S. Waggoner, A. D. Keith and O. H. Griffith, *J. Phys. Chem.*, **72**, 4129 (1968).
- 33) T. J. Swift, and R. E. Connick, *J. Chem. Phys.*, **37**, 307 (1962).

- 34) P. Ekwall, L. Mandell and P. Solyom, *J. Colloid Interface Sci.*, **35**, 519 (1971),.
- 35) I. Solomon, *Phys. Rev.*, **99**, 559 (1955).
- 36) H. Okabayashi, K. Kihara and M. Okuyama, *Z. Naturforsch.*, **32a**, 1571 (1977).
- 37) J. R. Ernandes, S. Schreier and H. Chaimovich, *Chem. Phys. Lipids*, **16**, 19 (1976).
- 38) B. Cannon, C. F. Polnaszek, K. W. Butler, L. E. Goren Ericksson and I. C. P. Smith, *Arch. Biochem. Biophys.*, **167**, 505 (1975).
- 39) P. Debye and E. W. Anacker, *J. Phys. Chem.*, **55**, 644 (1951).
- 40) M. D. Shinitzky, A. C. Dianoux, C. Gitler and G. Weber, *Biochemistry*, **10**, 2106 (1971).
- 41) R. W. Wien, J. D. Morrisett and H. M. McConnell, *Biochemistry*, **11**, 3707 (1972).
- 42) H. Okabayashi, M. Okuyama, T. Kitagawa and T. Miyazawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **47**, 1075 (1974).
- 43) H. Okabayashi, M. Okuyama and T. Kitagawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **48**, 2264 (1975).

## 第3章 N-アシルサルコシンナトリウム会合体の構造： 特に， $^1\text{H}$ -NMR スペクトル法による研究

### 3-1 緒言

NMR 分光法は界面活性剤水溶液のコロイド化学的挙動を知るための有力な手段の一つとして利用されている<sup>1-12)</sup>。Eriksson と Gillberg<sup>1,3)</sup> は、ミセル溶液の可溶化機構に関するプロトン NMR スペクトルを用いた研究から、極性芳香族化合物が臭化セチルトリメチルアンモニウムミセルと水相の界面に吸着し、一方、無極性の芳香族化合物はミセルの炭化水素部分に可溶化されると結論した。Bunton と Minch<sup>9)</sup> は臭化セチルトリメチルアンモニウムミセルへのカルボン酸およびフェノールの配向に関する NMR スペクトルデータから、カルボン酸の解離におよぼすカチオン性ミセルの影響について検討した。

界面活性剤溶液に関して多くの NMR による研究がなされているにもかかわらず、水溶液中における界面活性剤分子のコンホメーションを研究するために本法を適用した例はほとんどない。Okabayashi<sup>13,14)</sup> は、レーザーラマン分光法による界面活性剤のコンホメーション研究において、水溶液中においては界面活性剤分子がミセルを形成するとき、分子の *n*-アルキル鎖のコンホメーションが変化することを明らかにした。

本研究では、重水中において *N*-アシルサルコシン塩の  $^1\text{H}$ -NMR スペクトルを測定し、これらの NMR スペクトルの濃度依存性とミセル形成にともなう界面活性剤分子のコンホメーション変化との関連性を調べた。



## 3-2 実験方法

### 3-2-1 試料

*N*-オクタノイルサルコシナトリウム (SNOS), *N*-デカノイルサルコシナトリウム (SND<sub>e</sub>S) および *N*-ドデカノイルサルコシナトリウム (SNDS) はつぎの方法<sup>15)</sup> で調製した。過剰のサルコシナトリウムを含む水溶液を十分攪拌しながら, 酸クロライドを滴下した。溶液は pH 9–13 および温度 35°C 以下に維持し, 反応を完結した。薄層クロマトグラフィーにより目的化合物を確認後, 6 N HCl を用いて溶液の pH を 4 以下に下げ, エチルエーテルで抽出した。この抽出物をメタノールで再結晶し, 一水和物を得た。サルコシン, 酸クロライド, *n*-デカン酸塩 (Pn-D) および *n*-オクタン酸塩 (Pn-O) (東京化成) は再結晶により精製した。*n*-デシル硫酸ナトリウム (SDeS) および *n*-オクチル硫酸ナトリウム (SOS) は硫酸, *n*-アルコールおよび水酸化ナトリウムから合成した<sup>16)</sup>。

### 3-2-2 プロトン NMR スペクトルの測定

プロトン NMR スペクトルは周波数カウンター (Takeda Riken TR-3824X) を接続した Hitachi-Perkin-Elmer R-20B スペクトロメーター (60 MHz) を用いて, 35°C で測定した。*N*-アシルサルコシナトリウム (SNAS) のすべての吸収ピーク位置は, 内部標準として水のピークを用い, 60 Hz の掃引幅で測定した。ケミカルシフトの精度は ±0.3 Hz であった。

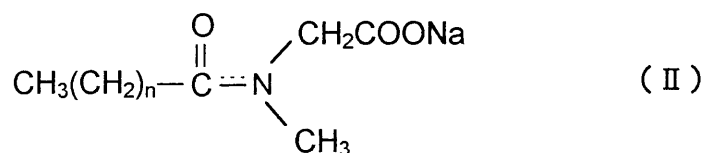
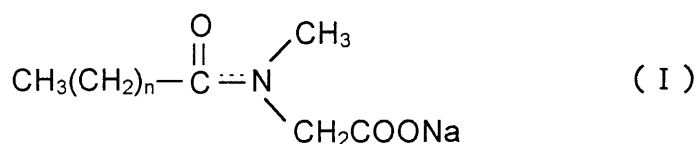
### 3-2-3 CMC 測定

SNOS, SND<sub>e</sub>S および SNDS の CMC は, TOA デジタル伝導度計 (CM-2A) を用いて, 伝導度法により決定した。得られた CMC 値はそれぞれ 47 mg/cm<sup>3</sup>, 14 mg/cm<sup>3</sup> および 4 mg/cm<sup>3</sup> であった。

### 3-3 結果および考察

#### 3-3-1 N-アシルサルコシンナトリウムの NMR スペクトル

N-アシルサルコシンナトリウム分子は、他の単純なアミドと同様に、ペプチド基の C-N 結合に関してシス (I) とトランス (II) の立体配置があり、これらの分子の N-アルキル基は、カルボニル基の炭素-窒素結合のまわりの回転に関する高いエネルギー障壁のために磁氣的に等価ではない。



したがって、N-アシルサルコシンナトリウムのプロトン NMR スペクトルにおいては、N-アルキル基の吸収ピークが分裂することが予測される。Fig. I-3-1 は SNOS (100 mg/cm<sup>3</sup>) の水溶液中におけるプロトン NMR スペクトルを示している。吸収ピークの相対強度および単純なアミドのケミカルシフト<sup>17)</sup>をもとにピークの帰属を行なった。N-CH<sub>3</sub> は水を基準として、1.78 および 1.62 ppm に 2 本のピークが観察された。高磁場側のピークはシス体 (I)、そして低磁場側のそれはトランス体 (II) に帰属される。N-CH<sub>2</sub> のピークに対しても分裂が認められ、0.79 ppm の吸収ピークはトランス体 (II) に、0.75 ppm のそれはシス体 (I) に帰属される。

SNOS の NMR スペクトルにおいては、カルボニル基に隣接したメチレン基

に弱い不規則な 4 本に分裂したピーク (2.38 ppm) が見られ, 5 個の炭素鎖メチレンはブロードなピーク (3.37–3.38 ppm) を示し, そしてアシル基のメチル基に帰因するピークは 3 本に分裂 (3.83 ppm) した。

SNDeS および SNDS の吸収位置は, N-CH<sub>2</sub> を除いて, SNOS の吸収位置とほとんど同様であった。

SNOS, SNDeS および SNDS の N-CH<sub>2</sub> のケミカルシフトは著しい濃度依存性を示した。

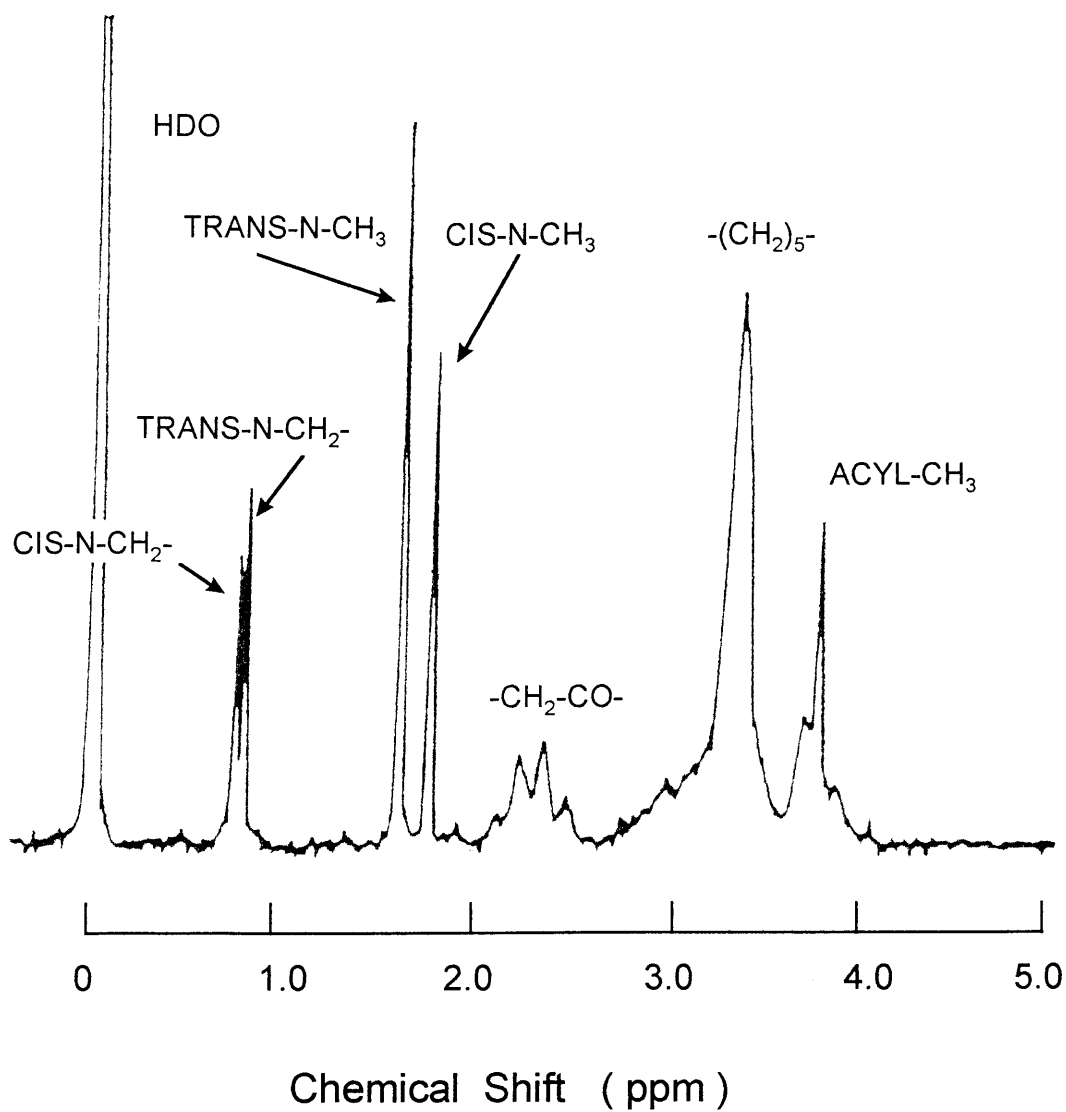


Fig. I-3-1 NMR spectrum of SNOS (100 mg/cm<sup>3</sup>).



### 3-3-2 内部ケミカルシフトの濃度依存性

N-メチルアミドの NMR スペクトルにおいて、トランスとシス N-CH<sub>3</sub> のケミカルシフトの差  $\Delta\nu_{t-c}$  (内部ケミカルシフト) は、溶媒やペプチド基に結合している置換基の影響を受ける<sup>17)</sup>。この内部ケミカルシフトは、平面構造の異なる環境下にある N-メチル基に由来する<sup>18,19)</sup>。すなわち、ジメチルホルムアミドやジメチルアセトアミドのような単純なアミドの R<sub>1</sub>CONR<sub>2</sub>R<sub>3</sub> 骨格が平面であることから、ペプチド基の C=N 結合の回転が制限され、トランスおよびシス N-CH<sub>3</sub> は異なる磁気的環境下に置かれ、その結果、異なる吸収ピークを示す。

本研究において、SNOS, SNDeS および SNDS 水溶液について、N-CH<sub>3</sub> および N-CH<sub>2</sub> の内部ケミカルシフトを各種濃度で測定し、この内部ケミカルシフトを用いて考察した。Fig. I-3-2 に  $\Delta\nu_{t-c}$  を濃度の関数として示した。2 つの N-CH<sub>3</sub> ピークの内部ケミカルシフトは 20–550 mg/cm<sup>3</sup> の範囲で変化しなかった。したがって、SNOS 水溶液において、N-メチルピークの内部ケミカルシフトは、ミセル形成によって、界面活性剤の分子間相互作用による影響を受けないと考えられる。これは N-CH<sub>3</sub> ピークの分裂がカルボニル基の炭素と窒素結合による回転の制限にのみ依存することを示している。

また、Fig. I-3-2 に示したように、SNDeS および SNDS の NMR スペクトルにおいて、N-メチルピークの内部ケミカルシフト (10 Hz) も濃度に依存しないことが明らかになった。

N-CH<sub>2</sub> の内部ケミカルシフトは濃度増加とともに急速に減少し、最終的にゼロになる (Fig. I-3-2)。この著しい変化はミセル形成にともなう N-CH<sub>2</sub> の立体配置変化に起因する。なぜならば、N-CH<sub>2</sub> ピークの分裂は、ペプチド基の C-N 結合の回転制限だけでなく、N-CH<sub>2</sub> 結合の立体配置変化による N-CH<sub>2</sub> プロトンの磁気的非等価のためである。

SNDeS の NMR スペクトルにおいて、45 mg/cm<sup>3</sup> 以下の濃度で N-CH<sub>2</sub> ピーク

の分裂が認められ、濃度増加とともに2つのピークは徐々に接近し、それらは  $45 \text{ mg/cm}^3$  の濃度で重なった。

SNDS の N-CH<sub>2</sub> は  $7 \text{ mg/cm}^3$  以上の濃度でシャープな単一ピークを示し、この濃度以下で2本に分裂した。

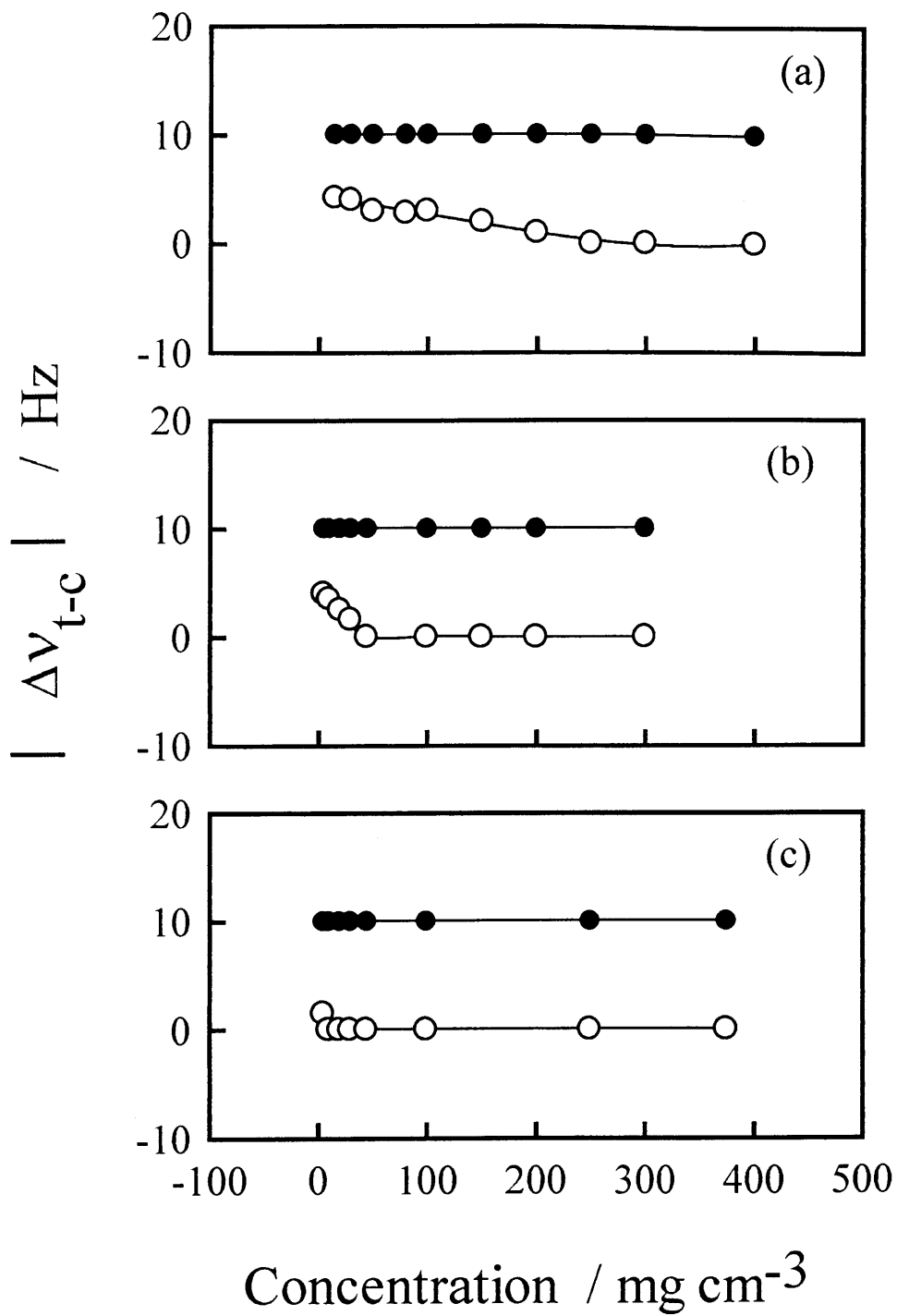


Fig. I-3-2 Internal chemical shifts ( $\Delta v_{t-c}$ ) of  $\text{N-CH}_3$  and  $\text{N-CH}_2$  protons of (a) SNOS, (b) SNDeS, and (c) SNDS as a function of concentration. ●,  $\text{N-CH}_3$ ; ○,  $\text{N-CH}_2$ .





### 3-3-3 異性体の存在割合に対する濃度依存性

重水溶液中における SNOS, SNDeS および SNDS の  $^1\text{H-NMR}$  スペクトルに関して、2つの異性体の割合をそれらの異性体の N-CH<sub>3</sub> ピークの相対強度から決定した。その結果、トランス体の割合 ( $100 P_{\text{trans}} / (P_{\text{trans}} + P_{\text{cis}})$ ) が、濃度に依存することが明らかになった (Fig. I-3-3)。

SNOS の CMC 以下においては、トランスの立体配置をとる異性体の割合 (46%) は、シス体のそれ (56%) よりも小さく、ほとんど一定であった。しかし、CMC よりもさらに濃度が増加するとトランス体の割合が漸近的に増加し、ミセル状態において最終的に一定の割合 (76%) になった (Fig. I-3-3a)。

SNDeS および SNDS の NMR スペクトルにおいても、トランス体の割合は SNOS の場合と同様の変化が観察された (Fig. I-3-3b および I-3-3c)。また、濃度増加に対するトランスおよびシス N-CH<sub>2</sub> ピークの相対強度は、N-CH<sub>3</sub> の場合と同様の変化を示した。

この2つの異性体の存在割合に対する濃度依存性はミセル形成のためであると考えられる。これはミセル中において SNAS のトランス体がシス体よりも安定であることを示唆している。

#### 3-3-4 混合ミセル中における SNOS の NMR スペクトル

CMC 以下においては、SNOS 分子の立体配置は、わずかにシス体が優勢である。しかし、SNOS ( $40 \text{ mg/cm}^3$ ) の重水溶液に SDS を溶解するとき、シス  $\text{N-CH}_3$  ピークと比較してトランス体の相対強度は SDS 濃度の増加とともに漸近的に増加し、最終的に一定割合に達した (76%) (Fig. I-3-4)。

トランス体の割合変化が SNOS と SDS の混合ミセル形成と関係することは明かである。この結果は、SNOS 分子が SDS のアニオン性ミセルに配向するときトランス体の割合が増加し、そして、混合ミセル中ではシス体よりもトランス体が安定であることを示している。

SNOS 水溶液への SDS 添加は、 $\text{N-CH}_3$  ピークの内部ケミカルシフトを徐々に増加させる (最大 1.3 Hz, Fig. I-3-5a)。これは、 $\text{N-CH}_3$  ピークの分裂が混合ミセル中の SNOS と SDS の間の分子間相互作用の影響を受けることを示唆している。また、 $\text{N-CH}_3$  ピークのトランス体割合および内部ケミカルシフトがその他の界面活性剤 (SDeS, SOS, Pn-D および Pn-O) の添加によっても同様に増加することがわかった。

2つの  $\text{N-CH}_2$  ピークの内部ケミカルシフトは、Pn-D 濃度の増加により徐々に減少した (Fig. I-3-5b)。この変化は SNOS 分子の  $\text{N-CH}_2$  に関する立体配置変化、すなわち、 $n$ -アルキルカルボン酸ミセルへの配向によって起こると考えられる。SNOS 水溶液にアルキル硫酸塩を添加するとき、 $\text{N-CH}_2$  ピークの内部ケミカルシフトも減少することが予測されるが、 $n$ -アルキル硫酸塩の  $\text{CH}_2\text{OSO}_3^-$  と  $\text{N-CH}_2$  のピークが重なるため確認できなかった。

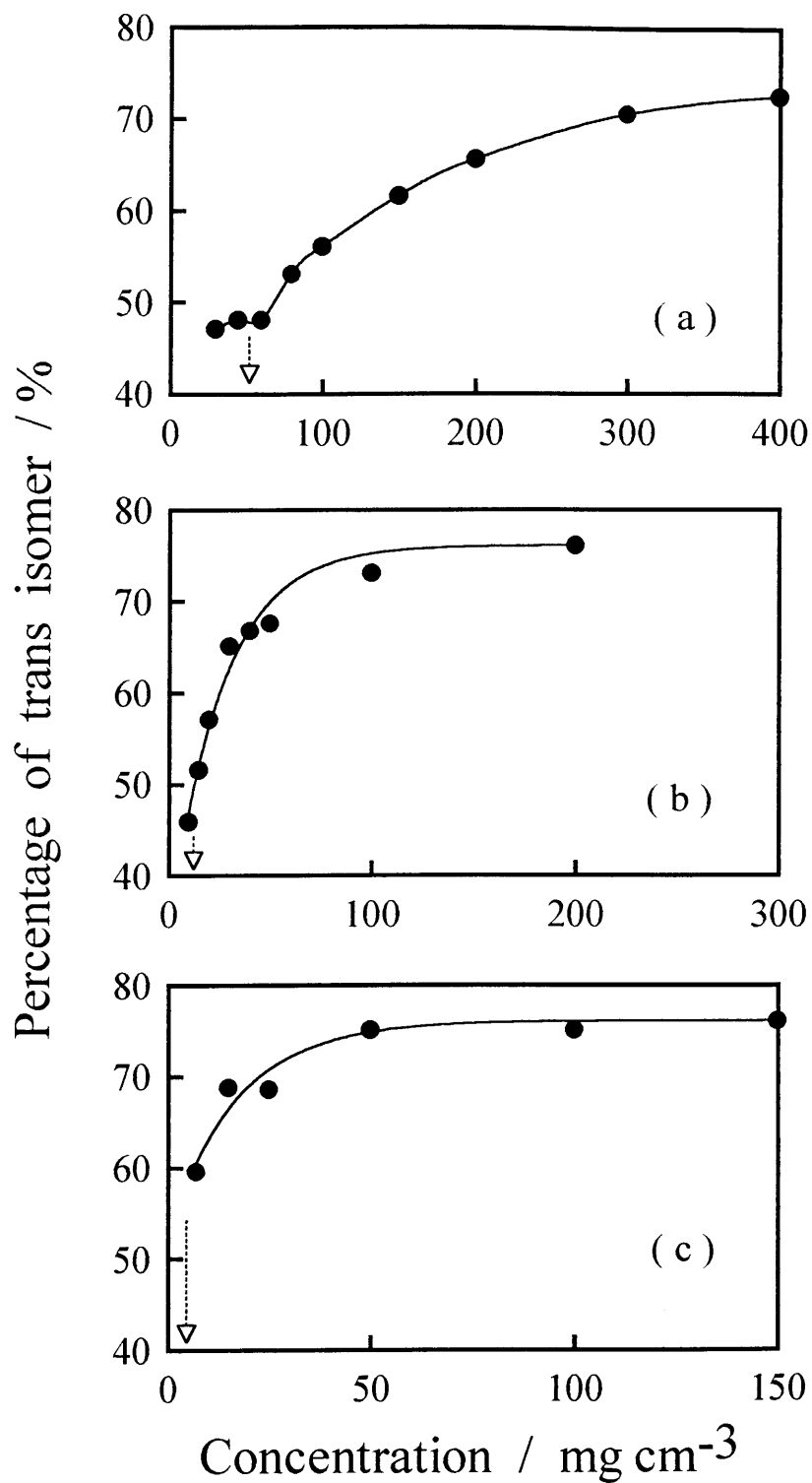


Fig. I-3-3 Concentration dependence of percentage of the *trans* isomer. (a) SNOS ; (b) SNDDeS ; (c) SNDS. The broken arrows show the CMC's of SNOS, SNDDeS, and SNDS.



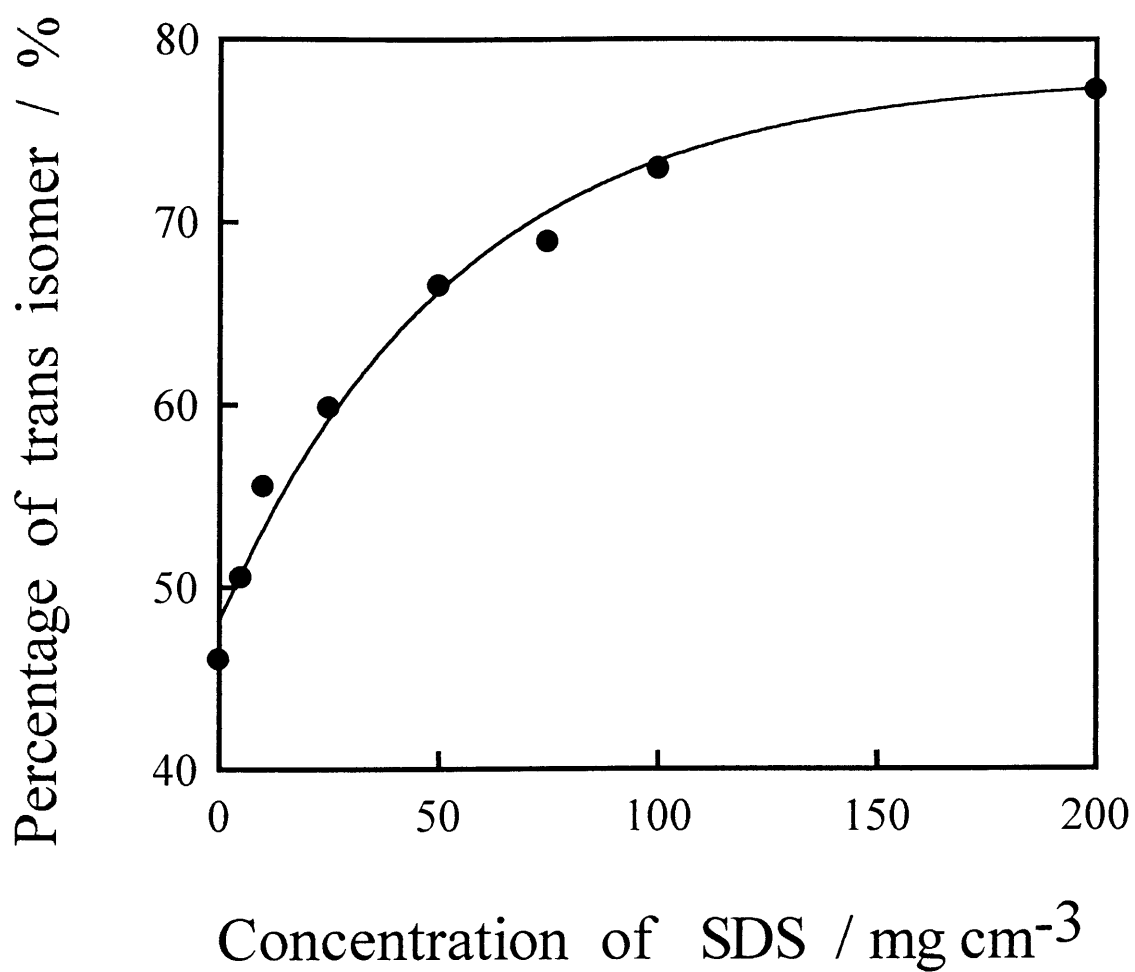


Fig. I-3-4 Effect of SDS on the *trans*-isomer percentage of SNOS.



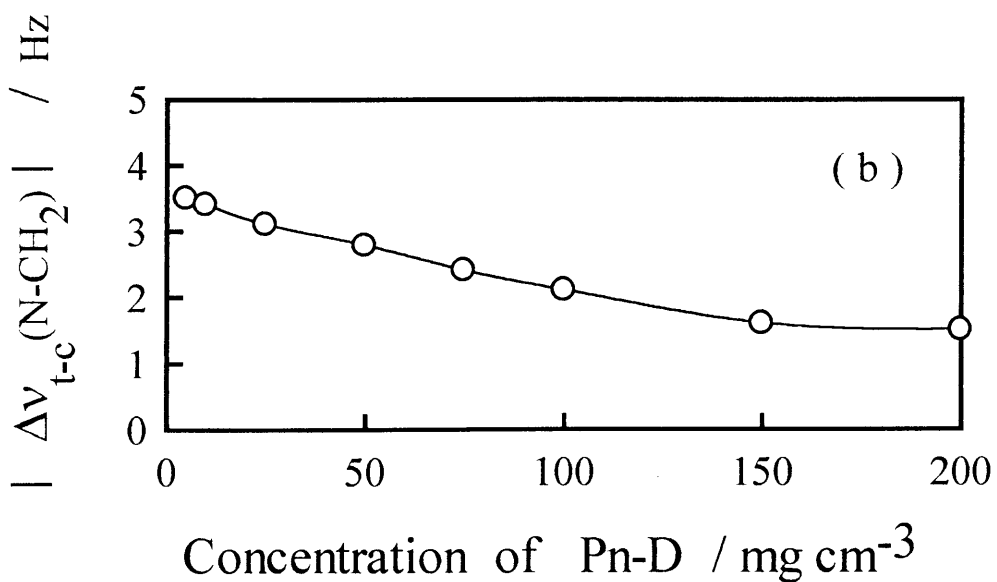
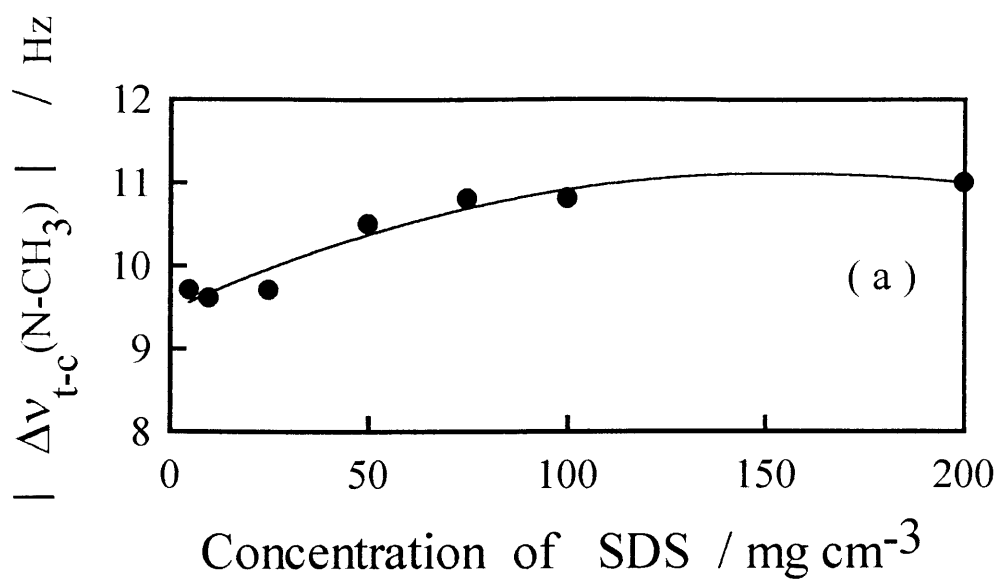


Fig. I-3-5(a) Effect of SDS on the  $\Delta v_{t-c}$  value of the N-CH<sub>3</sub> resonance lines.

Fig. I-3-5(b) Effect of Pn-D on the  $\Delta v_{t-c}$  value of the N-CH<sub>2</sub> resonance lines.





### 3-3-5 N-CH<sub>2</sub>結合の立体配置

N-アシルサルコシンの2つの異性体は、Fig. 3-6に示されているようにN-CH<sub>2</sub>結合に関して6種類の立体配置をとる。トランス異性体の3つの立体配置に対して、トランスI型はトランスIIおよびII'型より安定であるように思われる。これは、末端のCOO<sup>-</sup>基とカルボニル酸素との間の反発が前者よりも後者の2つの型を不安定にさせるからである。また、シス異性体に対してもN-CH<sub>2</sub>結合に関して3つの立体配置がある。シスI型はN-CH<sub>3</sub>基とCOO<sup>-</sup>基との立体障害のために、シスIIおよびII'型より不安定である。

ミセル水溶液においてはトランス異性体が優勢であるので、トランスI型がミセル状態におけるもっとも安定な立体配置と推定される。

### 3-3-6 トランス I 型とシス II 型モデルの比較

トランス I 型とシス II 型のモデルは、ミセル状態におけるトランス異性体の安定化に対する理由を考察するうえで有益である。

Fig. I-3-7 は SNOS のこれら 2 つの立体配置モデルを示している。これらのモデルにおいて、*n*-アルキル鎖のコンホメーションはオールトランス構造であると推定される。Fig. I-3-7 において、トランス I 型の極性基の断面とシス II 型の断面（2 つのモデルの長軸に対して垂直）を比較するとき、トランス I 型の断面はシス II 型のそれよりも明らかに小さいことがわかる。そして、2 つの断面の比は 1 : 1.4 である。したがって、トランス体は、その極性基の断面が小さいためにミセルに配向しやすいと結論される。この結果は、界面活性剤濃度の増加とともにオールトランス型分子の割合が増加するというラマンスペクトルによる研究<sup>14)</sup>の結果とも一致する。

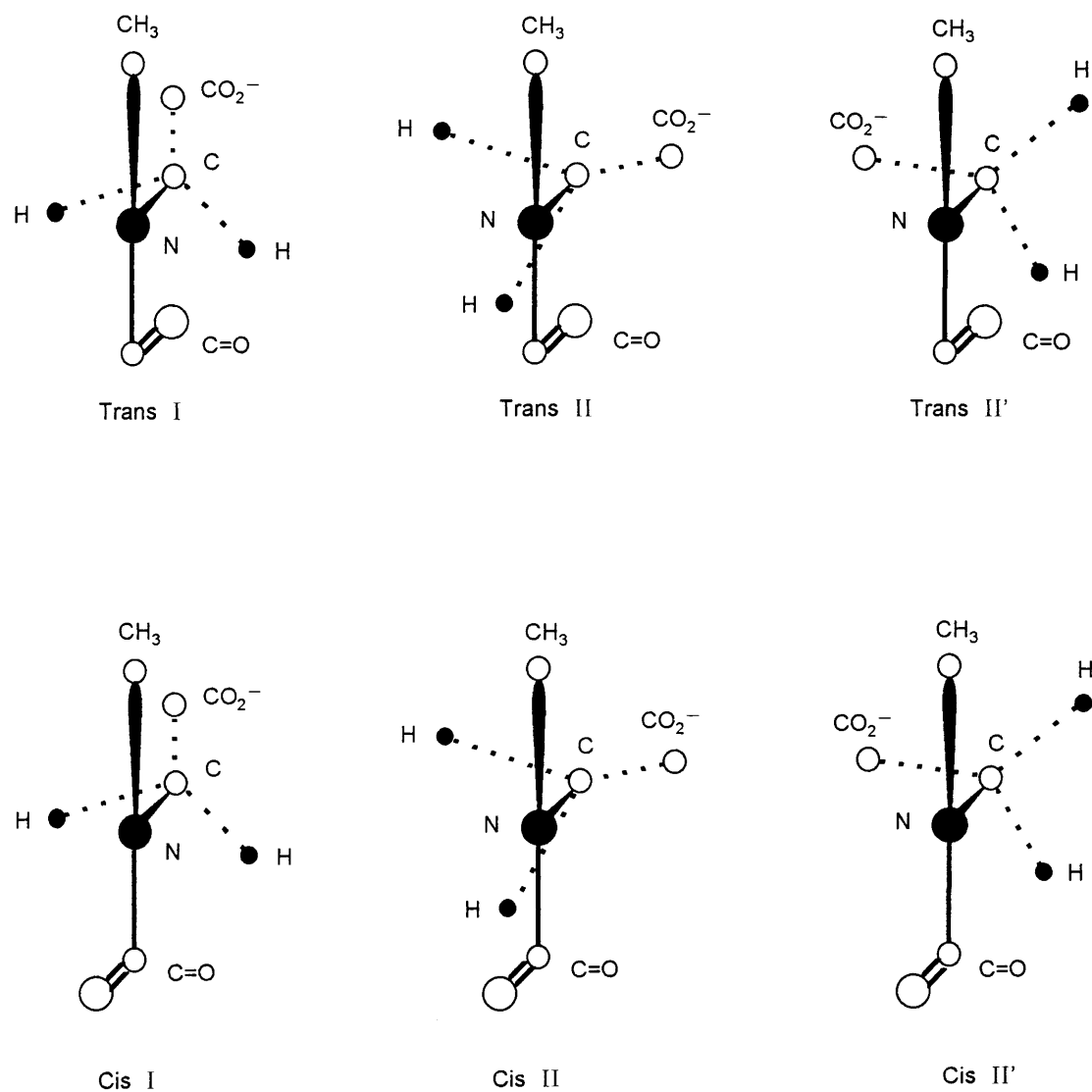


Fig. I-3-6 Possible configurations about the N-CH<sub>2</sub> bond for the *trans* and *cis* isomers of *N*-acyl sarcosinate ion. In these configurations, the two carbon atoms of the N-CH<sub>3</sub> and N-CH<sub>2</sub> groups are coplanar to a peptide-plane.



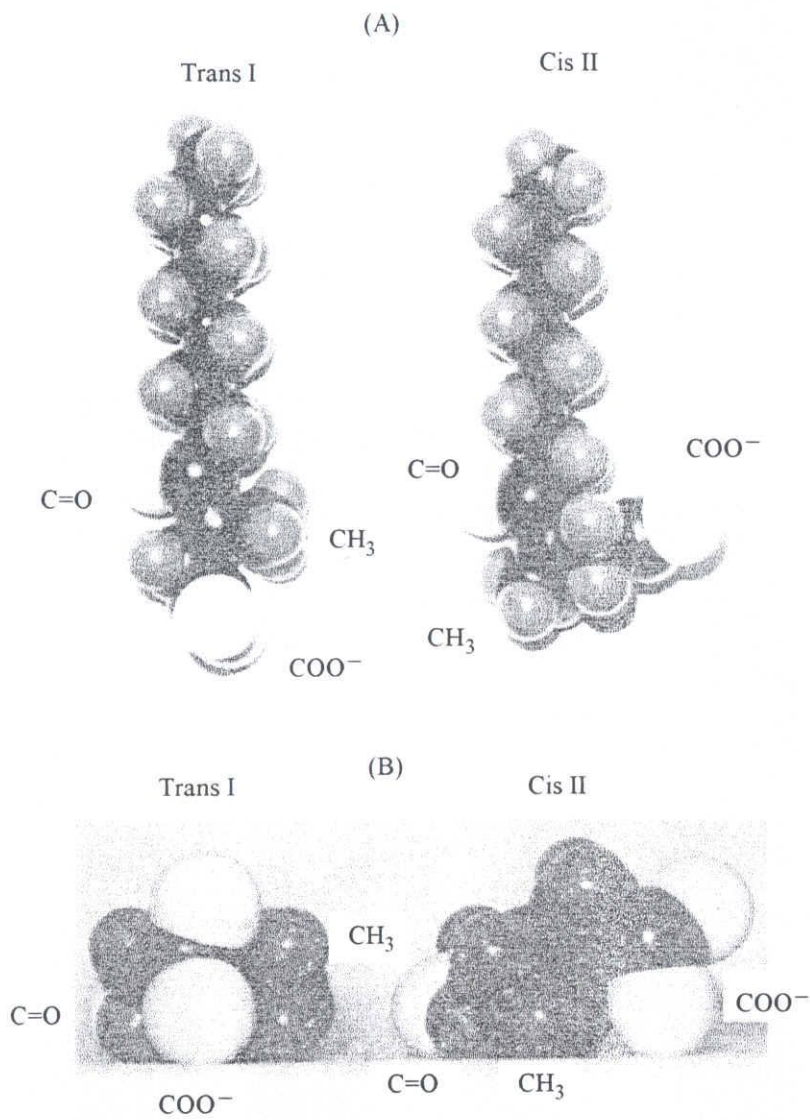


Fig. 3-7 Models for *trans* I and *cis* II forms of *N*-octanoyl sarcosinate ion : (A) plane ; (B) elevation.



### 3-4 結論

N-アシルサルコシンナトリウムの NMR スペクトルを重水溶液中で測定し、この界面活性剤のミセル形成にともなう分子のコンホメーション変化を調べた。その結果、界面活性剤濃度が増加するとき、シス体と比較してトランス体の割合が増加することがわかった。そして、この増加現象は臨界ミセル濃度で顕著であった。したがって、この結果は、N-アシルサルコシンナトリウムのトランス立体配置が、単分子分散状態よりもミセル状態の方が安定であることを示している。



## 参考文献

- 1) J. C. Eriksson, *Acta Chem. Scand.*, **17**, 1478 (1963).
- 2) J. Clifford and B. A. Pethica., *Trans. Faraday Soc.*, **60**, 182, 1276, 1483 (1964).
- 3) J. C. Eriksson and G. Gilberg, *Acta Chem. Scand.*, **20**, 2079 (1966).
- 4) H. Inoue and T. Nakagawa, *J. Phys. Chem.*, **70**, 1108 (1966).
- 5) N. Müller and R. H. Birkhahn, *J. Phys. Chem.*, **71**, 957 (1967) ; **72**, 583 (1968).
- 6) R. Haque, *J. Phys. Chem.*, **72**, 3059 (1968).
- 7) R. E. Baily and G. H. Cady, *J. Phys. Chem.*, **73**, 1612 (1969).
- 8) J. H. Fendler, E. J. Fendler, R. J. Medary and O. A. El Seoud., *J. Chem. Soc. Faraday I*, **69**, 280 (1973).
- 9) C. A. Bunton and M. J. Minch., *J. Phys. Chem.*, **78**, 1490 (1974).
- 10) U. Henrikson and L. Odberg, *J. Colloid Interface Sci.*, **46**, 212 (1974).
- 11) I. D. Robb and R. Smith, *J. Chem. Soc. Faraday I*, **70**, 287 (1974).
- 12) R. E. Atkinson, G. E. Clint and T. Walker, *J. Colloid Interface Sci.*, **46**, 32 (1974).
- 13) H. Okabayashi, M. Okuyama, T. Kitagawa and T. Miyazawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **47**, 1075 (1974).
- 14) H. Okabayashi, M. Okuyama and T. Kitagawa, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **48**, 2264 (1975).
- 15) E. Jungermann, J. F. Gerecht and I. J. Krems, *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 172 (1956).

- 16) R. Goto and T. Sugano, *in* "Jikken Kagaku Koza," (Chem. Soc. of Japan, Ed.) p. 131, 1956.
- 17) L. A. LaPlanche and M. T. Rogers, *J. Am. Chem. Soc.*, **86**, 337.(1964).
- 18) W. D. Phillips, *J. Chem. Phys.*, **23**, 1363 (1955).
- 19) H. S. Gutowsky and C. H. Holm, *J. Chem. Phys.*, **25**, 1228 (1956).



## 第Ⅱ編

# 水溶液中における抗菌性両親媒性 分子－金属イオンの相互作用



# 第1章 抗菌性アニオン界面活性分子—塩化ランタン(Ⅲ) 複合体形成

## 1-1 緒言

アニオン界面活性分子とカチオン，特に多価金属イオンの混合水溶液について，その界面化学的性質や抗菌活性を調べる場合，混合系の複雑さを回避するために，凝集や沈殿を起こさない系を選択する必要がある。そこで，著者は比較的アルキル鎖長の短いオクタンスルホン酸ナトリウムを選び，各種カチオンとの混合系について凝集や沈殿を生じない濃度領域で，殺菌活性を調べた。その結果，1価カチオン<2価カチオン<<3価カチオンの順でその活性が増加することを報告した<sup>1,2)</sup>。そして，この多価金属イオンによる殺菌力増強効果には，アニオン界面活性剤と金属イオンとの間に形成される疎水性の複合体が深く関与していると推察された（第Ⅲ編，第1章）。

そこで，本章では，オクタンスルホン酸ナトリウム—塩化ランタン（Ⅲ）混合水溶液中に形成される複合体の組成を表面張力，電気伝導度およびプロトンスピン—格子緩和時間を解析することにより決定した<sup>3)</sup>。

## 1-2 実験方法

### 1-2-1 試料

アニオン界面活性剤として、オクタンスルホン酸ナトリウム（以下、NaOSと略記する、>98%，東京化成）を用いた。塩化ランタン（Ⅲ）（99.9%，和光純薬）をNaOS水溶液または重水溶液に添加することにより試料液とした。

### 1-2-2 測定

電子天秤（1 mg 感度，FA-200，研精工業）を用いたWilhelmy plate法により，25°Cの恒温槽内で表面張力を測定した。

電気伝導度はコンダクタンス計（CM-40V，東亜電波）により，3 KHz，25°Cで測定した。

プロトンスピン-格子緩和時間 ( $T_1$ ) は，NMR スペクトロメータ（日立 90H）を用い，反転回復法（inverse recovery method）により測定した。そのパルス系列は  $180^\circ - t - 90^\circ - T$  で ( $t = 30, 8, 4, 3, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125$  s) の9種類で， $T$  は 20 s ( $>5T_1$ ) とした。 $T_2$  緩和（スピンスピン緩和）による位相ズレを防ぐために， $180^\circ$  パルスの 5 ms 後に磁気均一損傷パルス（homogeneity spoiling pulse）を照射した。

### 1-3 結果

#### 1-3-1 表面張力の $\text{LaCl}_3$ 濃度依存性

$\text{NaOS-LaCl}_3$  混合水溶液の表面張力は、その混合比に大きく依存し複雑な変化を示すことがわかった。 $\text{NaOS}$  を 6 mM 一定にして、 $\text{LaCl}_3$  を添加した時の表面張力  $\gamma$  を Fig. II-1-1 に示した。モル比 ( $\text{LaCl}_3/\text{NaOS}$ ) が 0.05 以下の低濃度域、0.15 付近および 0.7 付近の 3 領域で  $\ln(\text{LaCl}_3/\text{NaOS})-\gamma$  間に直線関係がみられた。

#### 1-3-2 電気伝導度の $\text{LaCl}_3$ 濃度依存性

$\text{NaOS-LaCl}_3$  混合水溶液の電気伝導度は、各混合成分を別々に溶かした水溶液の電気伝導度の和よりも小さくなった。その電気伝導度の減少量を  $D_c$  と定義して、混合モル比 ( $\text{LaCl}_3/\text{NaOS}$ ) に対してプロットした結果を Fig. II-1-2 に示した。 $D_c$  は混合モル比が小さい領域においては直線的に変化した。

#### 1-3-3 プロトンスピン—格子緩和時間 $T_1$

$\text{NaOS}$  の重水溶液のプロトンピークは、DDS (4,4-ジメチル-4-シリルペンタン硫酸ナトリウム) を基準としてメチル基プロトン( $H_A$ )は 0.742 ppm, メチレン基プロトン( $H_B$ )は 1.173 ppm, 親水基にもっとも近いメチレン基プロトン( $H_C$ )は 2.742 ppm に現れる。 $\text{NaOS}$  重水溶液 (15 mM) に  $\text{LaCl}_3$  を添加したとき、プロトン  $H_C$  のスピン—格子緩和時間はプロトン  $H_A$  および  $H_B$  のそれに比べて顕著な変化を示した (Fig. II-1-3)。これは、 $\text{NaOS}$  の親水基付近と  $\text{La}$  イオンとの相互作用が混合モル比 ( $\text{LaCl}_3/\text{NaOS}$ ) に依存して変化することを示唆している。





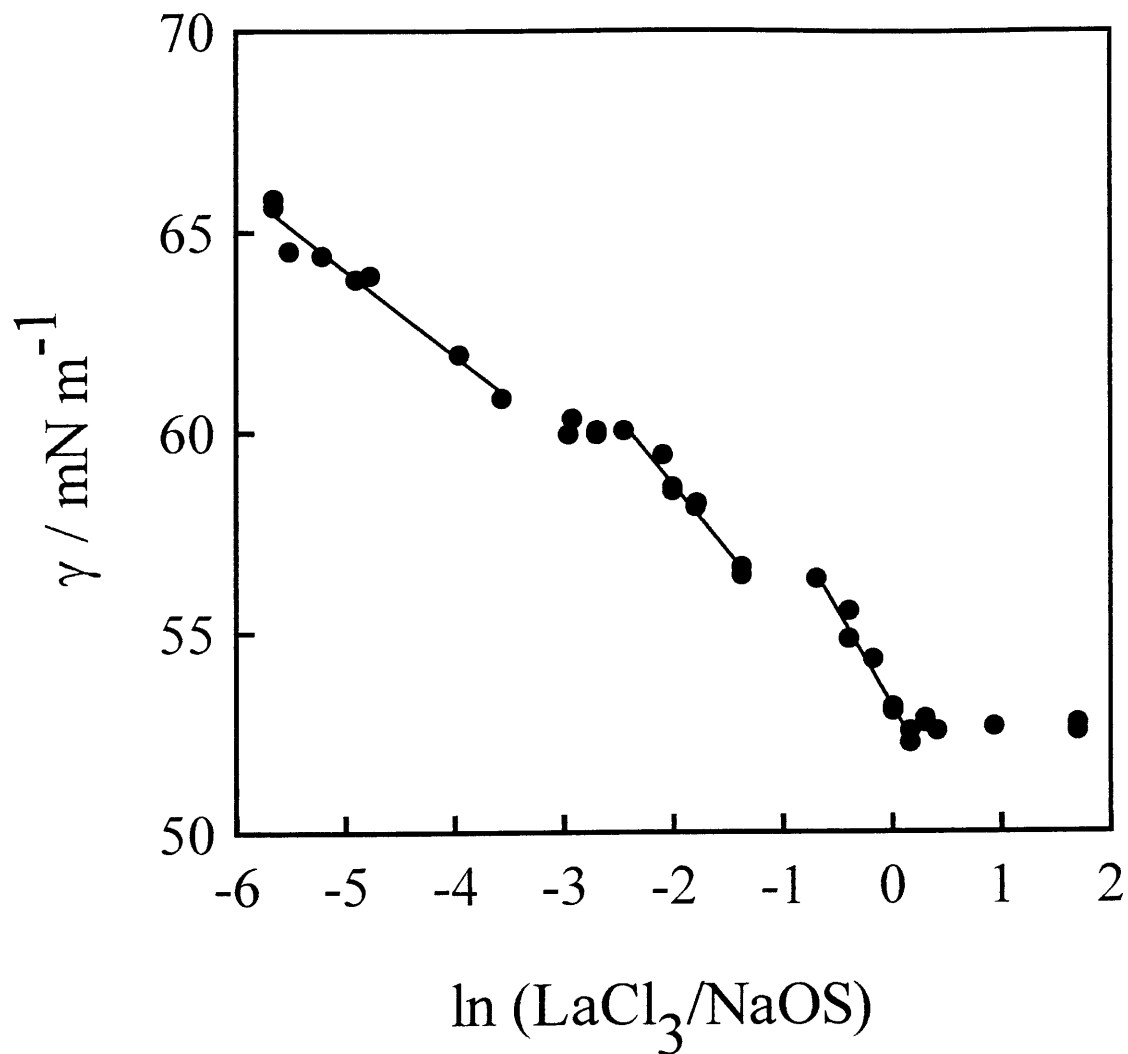


Fig. II-1-1 Relationship between the surface tension ( $\gamma$ ) and the molar ratio ( $\text{LaCl}_3/\text{NaOS}$ ) in the mixed aqueous solution of NaOS and  $\text{LaCl}_3$ . The surface tension was measured by the Wilhelmy plate method. The concentration of NaOS were kept at 6 mM.



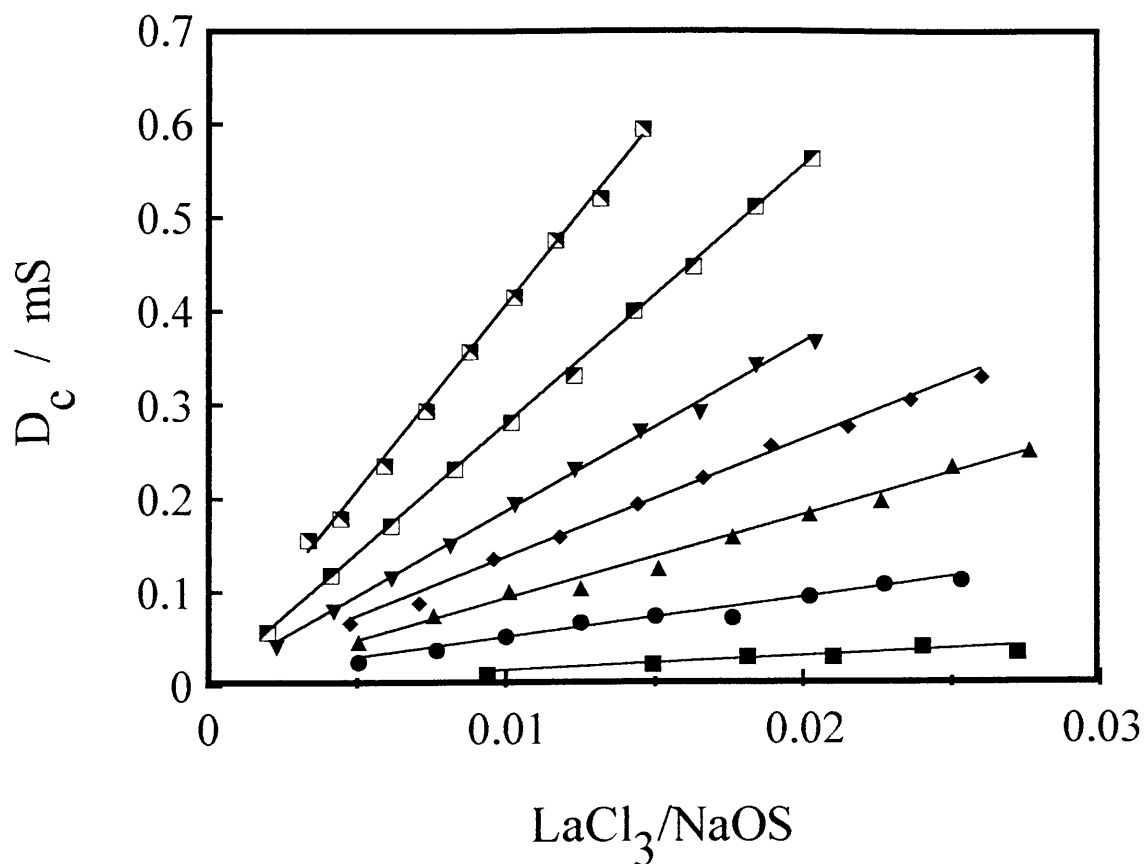


Fig. II-1-2 Relationship between  $D_c$  and the molar ratio (  $\text{LaCl}_3/\text{NaOS}$  ) in the mixed aqueous solution of  $\text{NaOS}$  and  $\text{LaCl}_3$ , where  $D_c$  was defined as the difference between the sum of the frequency changes for individual components and the overall frequency change of their mixed solution.  $\text{NaOS}$  concentration :  $\blacksquare$ , 6 mM;  $\bullet$ , 9 mM;  $\blacktriangle$ , 12 mM;  $\blacklozenge$ , 15 mM;  $\blacktriangledown$ , 18 mM;  $\square$ , 25 mM;  $\blacktriangledown$ , 35 mM.



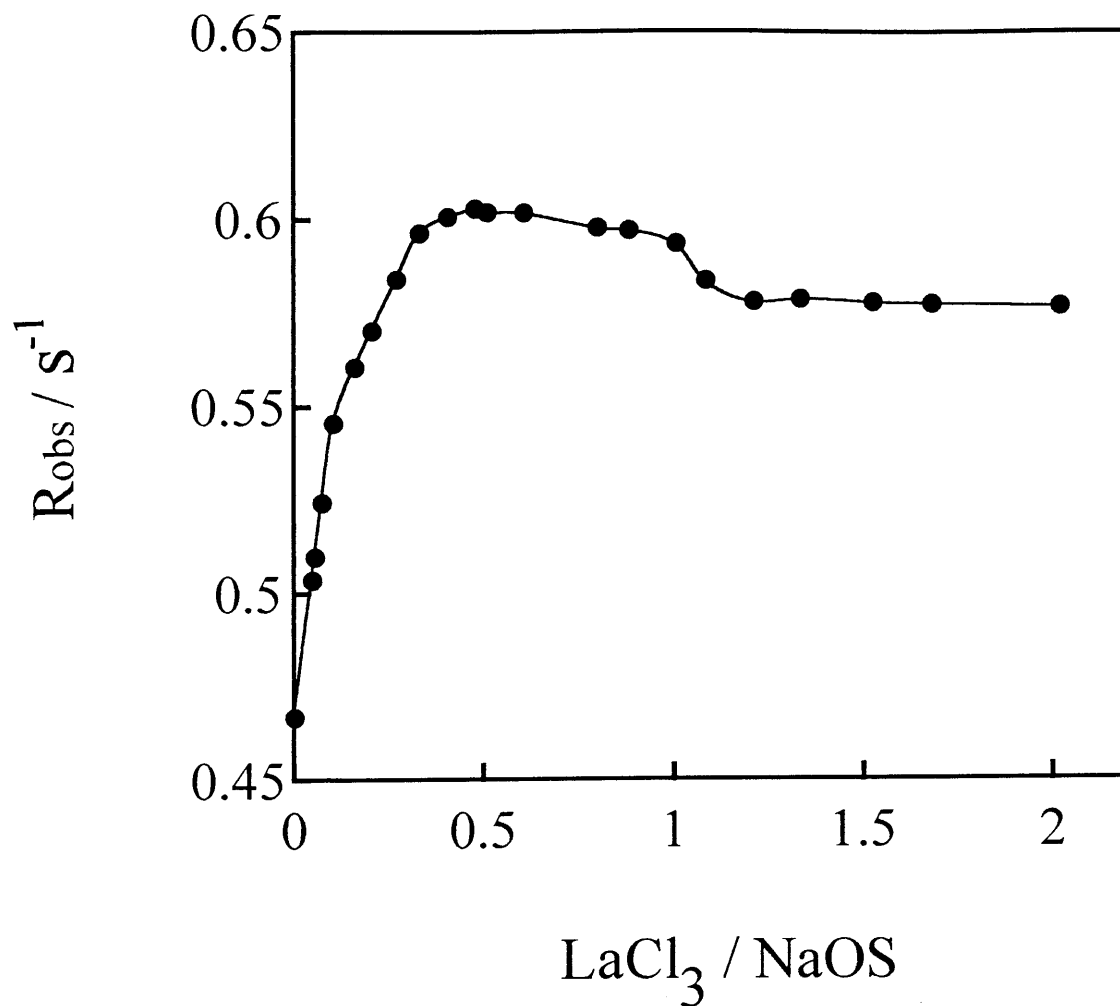


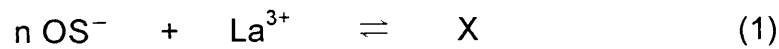
Fig. II-1-3 Relationship between the relaxation rate of  $\alpha$ -proton of NaOS and the molar ratio (  $LaCl_3/NaOS$  ) in the mixed aqueous solution of NaOS and  $LaCl_3$ . The concentration of NaOS was kept at 15 mM.



#### 1-4 考察

LaCl<sub>3</sub> 水溶液 (<20 mM) の表面張力は、純水のそれとほぼ同じで、界面活性を事実上示さない。しかし、NaOS が共存するとき、LaCl<sub>3</sub> 濃度の増加に伴って、表面張力は明らかに低下し、見掛け上、LaCl<sub>3</sub> は界面活性を示す (Fig. II-1-1)。これは NaOS-LaCl<sub>3</sub> 混合水溶液中に複合体が形成され、その表面吸着によって、表面張力の低下が生じるためであると考えられる。

今、n 個の OS<sup>-</sup> イオンと 1 個の La<sup>3+</sup> イオンとの間に複合体 X が形成されたとする。



OS<sup>-</sup> および La<sup>3+</sup> の初濃度を a, b とし、X の平衡濃度を c とするとき、複合体生成定数 K は(2)式で示される。

$$K = \frac{c}{(a - nc)^n (b - c)} \quad (2)$$

a >> b 条件下では a >> nc であるから

$$c = a \left[ \frac{Ka^n}{1 + Ka^n} \right] \left[ \frac{b}{a} \right] \quad (3)$$

となる。NaOS-LaCl<sub>3</sub> 混合水溶液系に対して、Gibbs の吸着等温式<sup>4)</sup> を適用すると(4)式が成立する。

$$-d\gamma = \Gamma_{\text{OS}^-} d\mu_{\text{OS}^-}^s + \Gamma_{\text{Na}^+} d\mu_{\text{Na}^+}^s + \Gamma_{\text{La}^{3+}} d\mu_{\text{La}^{3+}}^s + \Gamma_{\text{Cl}^-} d\mu_{\text{Cl}^-}^s + \Gamma_{\text{comp}} d\mu_{\text{comp}}^s \quad (4)$$

ここで、 $\Gamma$  と  $\mu^s$  は各イオンおよび複合体の表面吸着濃度と化学ポテンシャルである。 $d\mu^s = RT \ln C$  (C は各成分の濃度) であるから

$$-d\gamma = RT ( \Gamma_{\text{OS}^-} d\ln C_{\text{OS}^-} + \Gamma_{\text{Na}^+} d\ln C_{\text{Na}^+} + \Gamma_{\text{La}^{3+}} d\ln C_{\text{La}^{3+}} + \Gamma_{\text{Cl}^-} d\ln C_{\text{Cl}^-} + \Gamma_{\text{comp}} d\ln C_{\text{comp}} ) \quad (5)$$



となる。今、 $C_{OS^-}$  および  $C_{Na^+}$  は一定、また、 $C_{La^{3+}}$  および  $C_{Cl^-}$  が変化しても  $\gamma$  は変化しないので、

$$-d\gamma = \Gamma_{comp} RT \, d \ln C_{comp} \quad (6)$$

と近似される。一方、(3)式において、 $K$  が十分大きいときは  $1 \ll Ka^n$  であるから、 $C_{comp}(=c) = b$  となり、(7)式がえられる。

$$-d\gamma = \Gamma_{comp} RT \, d \ln b \quad (7)$$

また、 $a$  が一定の条件では、(7)式は(8)式と表すことができる。

$$\frac{d\gamma}{d \ln \left[ \frac{b}{a} \right]} = -\Gamma_{comp} RT \quad (8)$$

(8)式を Fig. II-1-1 のモル比( $LaCl_3/NaOS$ ) $<0.05$  の領域に適用すると、 $\Gamma_{comp} = 8.1 \times 10^{-11} \text{ mol} \cdot \text{cm}^{-2}$  が得られた。この  $\Gamma_{comp}$  値は  $a \gg b$  の条件下で形成される複合体の表面での 1 個当たりの占有面積が  $208 \text{ \AA}^2$  であることを示唆している。

一方、複合体形成は正電荷 ( $La^{3+}$  イオン) と負電荷 ( $OS^-$  イオン) との電氣的中和をともなうために、混合水溶液の電気伝導度の減少  $D_c$  (Fig. II-1-2) を生じる。形成される複合体の組成は単一であると仮定すると、 $D_c$  は水中の複合体濃度に比例する。

$$D_c = Bc \quad (9)$$

ここで、 $B$  は比例定数である。

$a \gg b$  の条件下では、 $D_c$  は(3)および(9)式より

$$D_c = aB \left[ \frac{Ka^n}{1 + Ka^n} \right] \left[ \frac{b}{a} \right] \quad (10)$$

となる。(10)式に従って、Fig. II-1-2 の勾配と  $NaOS$  の初濃度  $a$  より、 $B[Ka^n/(1+Ka^n)]$  を算出することができる (Fig. II-1-4)。

$B[Ka^n/(1+Ka^n)]$ は、 $n \geq 1$  のとき  $a$  の増加とともに  $B$  に近づく。したがって、Fig. II-1-4 の曲線より、 $B \doteq 1.2$  と推測できる。この  $B$  値を用いて Fig. II-1-4 より  $Ka^n/(1+Ka^n)$  を算出した。

今、 $Ka^n/(1+Ka^n) = A$  と定義すると、つぎの関係が成立する。

$$\log K + n \log a = \log \left[ \frac{A}{1-A} \right] \quad (11)$$

(11) 式にしたがって、Fig. II-1-5 の勾配から  $n = 3.0$ 、またその切片から  $K = 1.2 \times 10^6$  と決定した。この  $n$  値は、 $a \gg b$  の条件下では  $OS^- : La^{3+} = 3 : 1$  の組成を有する複合体が形成されていることを示唆している。前述のように、表面張力の変化から、この複合体の大きさは  $208 \text{ \AA}^2$  と評価できる。したがって、複合体を形成する  $OS^-$  1 個当たりの占有面積は  $69 \text{ \AA}^2$  で、各々の  $OS$  は水面の法線に対して約  $45^\circ$  傾いていると考えられる。

$NaOS$  と  $LaCl_3$  との間で複合体が形成されるとき、 $NaOS$  の親水基に近い  $\alpha$  プロトンの運動性は束縛される。この運動の束縛は、 $\alpha$  プロトンのプロトンスピン-格子緩和時間  $T_1$  を減少(すなわち、緩和速度を増加)させる (Fig. II-1-3)。

この複合体形成時の  $\alpha$  プロトンの緩和速度を  $R_c$  とし、複合体を形成しないときのそれを  $R_f$  とするならば、観測される緩和速度  $R_{obs}$  は次式で示される<sup>5-7)</sup>。

$$R_{obs} = x_c R_c + x_f R_f \quad (12)$$

ここで  $x_c$  は複合体を形成している  $OS^-$  のモル分率で、 $x_f$  は複合体を形成していない自由な  $OS^-$  のモル分率である。  $x_c + x_f = 1$  が成立するから、

$$R_{obs} - R_f = x_c (R_c - R_f) \quad (13)$$

となる。 $R_f$ は  $\text{LaCl}_3$  を添加しない  $\text{NaOS}$  重水溶液の  $\alpha$  プロトン緩和速度に等しいから、Fig. II-1-3 より  $R_f = 0.466 \text{ s}^{-1}$  である。

$\text{NaOS}$  濃度  $15 \text{ mM}$  を一定にし、 $\text{LaCl}_3$  濃度  $b$  を変化させたときの  $R_{\text{obs}} - R_f$  および  $(R_{\text{obs}} - R_f) / b$  を Fig. II-1-6 に示す。

モル比  $(\text{LaCl}_3 / \text{NaOS}) < 0.1$  の条件では、 $(R_{\text{obs}} - R_f) / b$  はほぼ一定値を保っている。これは、 $\text{LaCl}_3$  希薄領域では同一組成の複合体が、 $\text{LaCl}_3$  濃度に比例して増加すること、すなわち、 $x_c \propto b$  であることを示唆している。前述の電気伝導度の解析から、複合体の安定度定数  $K$  は十分大きいことは明らかであるので、第一近似として、(14)式が成り立つ。

$$x_c = \frac{nb}{a} \quad (14)$$

したがって、

$$n = \left[ \frac{a}{R_c - R_f} \right] \left[ \frac{R_{\text{obs}} - R_f}{b} \right] \quad (15)$$

がえられる。

Fig. II-1-6 よりモル比  $(\text{LaCl}_3 / \text{NaOS}) < 0.1$  では  $(R_{\text{obs}} - R_f) / b \doteq 52 \text{ s}^{-1} \text{M}^{-1}$  である。また、前述のように電気伝導度変化より、 $n = 3$  であることが明らかになっているから、(15)式より  $R_c = 0.726 \text{ s}^{-1}$  と算出することができる。

一方、モル比  $(\text{LaCl}_3 / \text{NaOS}) > 1.2$  では、 $(R_{\text{obs}} - R_f)$  がほぼ一定値の  $0.111 \text{ s}^{-1}$  を保っている。これは(13)式に従えば  $x_c$  と  $R_c$  が同時に一定値を保っていることを示している。 $\text{LaCl}_3$  の増加にもかかわらず、両者がこの条件を満たすのは、 $x_c$  が最大値  $1$  に近く、かつ、その複合体の組成が単一である時のみである。このとき(13)式より  $R_c$  は  $R_{\text{obs}}$  に等しいことが導かれる。したがって、Fig. II-1-6 よりモル比  $(\text{LaCl}_3 / \text{NaOS}) > 1.2$  の領域では、 $R_c = 0.577 \text{ s}^{-1}$  に対応する組成を有

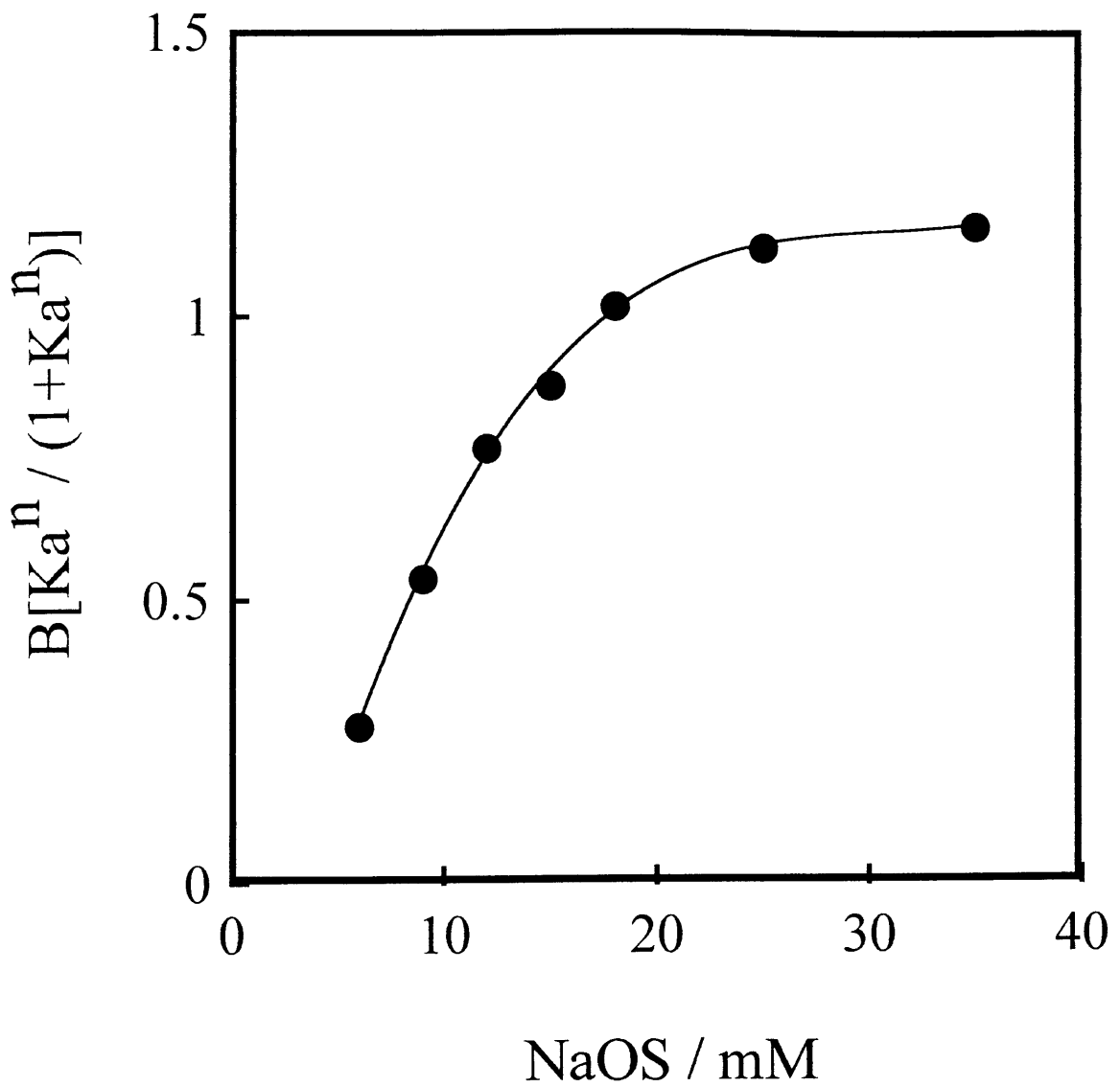


Fig. II-1-4 Relationship between  $B[\text{Ka}^n/(1+\text{Ka}^n)]$  and NaOS concentration, where  $B[\text{Ka}^n/(1+\text{Ka}^n)]$  was calculated from the slope of the straight line in Fig. II-1-2 and NaOS concentration.



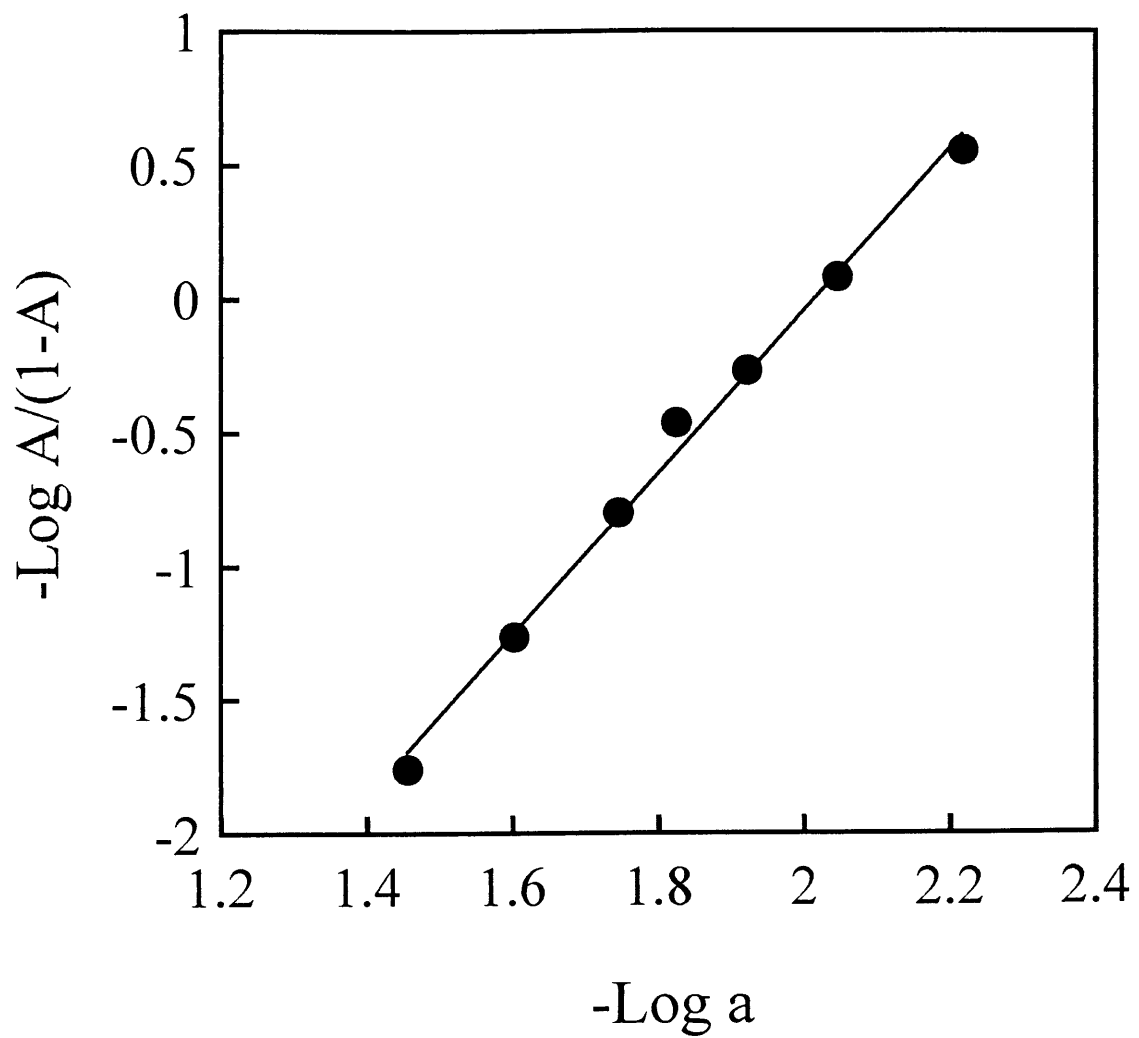


Fig. II-1-5  $\text{Log } A/(1-A)$  vs.  $\text{log } a$  plot according to eq.(11).



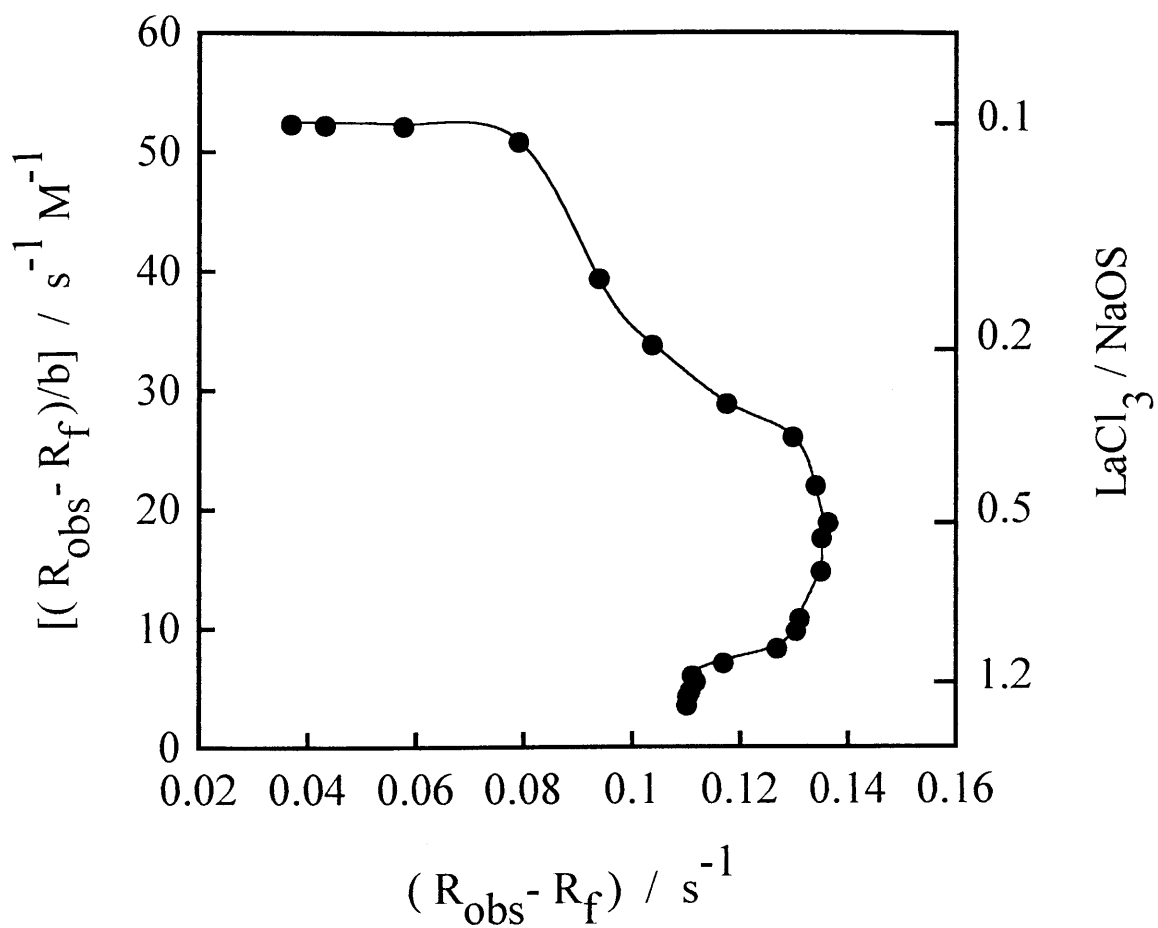


Fig. II-1-6 Relationship among  $(R_{\text{obs}} - R_f)/b$ ,  $R_{\text{obs}}$  and the molar ratio (  $\text{LaCl}_3/\text{NaOS}$  ).





する複合体が形成されていると推測される。

また, モル比(LaCl<sub>3</sub>/NaOS) ≐ 0.5 付近でも, 同様に R<sub>obs</sub> はほぼ一定値 0.602 を示している。したがって, この付近では R<sub>c</sub> (= R<sub>obs</sub>) = 0.602 s<sup>-1</sup> に対応する組成を有する複合体が形成されていると考えられる。

Table II-1-1 The relaxation rates of α-proton and the compositions of complexes formed in aqueous solution consisting of a binary mixture of sodium 1-octanesulfonate and lanthanum (III) chloride.

LaCl <sub>3</sub> /NaOS	Complex	R <sub>c</sub> / S <sup>-1</sup>	n <sup>a)</sup>
< 0.1	III	0.726	3
≐ 0.5	II	0.602	2
> 1.2	I	0.577	1

a) the molar ratio of OS<sup>-</sup> per La in the complex, La(OS)<sub>n</sub>.

以上より, NaOS-LaCl<sub>3</sub> 混合水溶液中には少なくとも 3 種の複合体が存在すると推測される (Table II-1-1)。モル比(LaCl<sub>3</sub>/NaOS)が大きくなるにしたがって, R<sub>c</sub> は小さくなる。これは複合体 III > 複合体 II > 複合体 I の順で複合体を形成する OS<sup>-</sup> の α プロトンがより強く束縛されることを示している。表面張力の LaCl<sub>3</sub> 濃度依存性 (Fig. II-1-1) にも, 3 段階の変化が見られ, 3 種の複合体が存在することを支持している。

Table II-1-1 に示したモル比(LaCl<sub>3</sub>/NaOS)以外の中間領域では, 前後の領域で形成される複合体が混在していると仮定して, 混合溶液中に存在する各複合

体のモル分率を求めた。すなわち、モル比(LaCl<sub>3</sub> / NaOS) < 0.4 では複合体Ⅲと複合体Ⅱが混在していると仮定すると(16)–(18)式が第1近似として成立する。

$$b \doteq [\text{complex III}] + [\text{complex II}] \quad (16)$$

$$x_{\text{III}} + x_{\text{II}} + x_{\text{f}} = 1 \quad (17)$$

$$R_{\text{obs}} = x_{\text{III}} R_{\text{III}} + x_{\text{II}} R_{\text{II}} + x_{\text{f}} R_{\text{f}} \quad (18)$$

ここで、[complex III] および [complex II] はそれぞれ複合体Ⅲと複合体Ⅱの濃度、 $x_{\text{III}}$  および  $x_{\text{II}}$  は複合体ⅢおよびⅡを形成する OS<sup>-</sup> のモル分率である。上述した各 R 値を代入して、3式を整理すると、

$$x_{\text{III}} = \frac{3b}{a} - 1.5x_{\text{II}} \quad (19)$$

$$x_{\text{II}} = 204b - 3.9 (R_{\text{obs}} - R_{\text{f}}) \quad (20)$$

となる。

一方、 $0.4 < (\text{LaCl}_3 / \text{NaOS}) < 1$  では、複合体Ⅱと複合体Ⅰが混在すると仮定すると、

$$b \doteq [\text{complex II}] + [\text{complex I}] \quad (21)$$

$$x_{\text{II}} + x_{\text{I}} + x_{\text{f}} = 1 \quad (22)$$

$$R_{\text{obs}} = x_{\text{II}} R_{\text{II}} + x_{\text{I}} R_{\text{I}} + x_{\text{f}} R_{\text{f}} \quad (23)$$

ここで、[complex I] ,  $x_{\text{I}}$  は、それぞれ複合体Ⅰの濃度およびそれを形成する OS<sup>-</sup> のモル分率である。これら3式を連立させて整理すると、(24)および(25)式がえられる。

$$x_{\text{II}} = \frac{2b}{a} - 2x_{\text{I}} \quad (24)$$

$$x_{\text{I}} = 112b - 6.2 (R_{\text{obs}} - R_{\text{f}}) \quad (25)$$

(14)式は、モル比(LaCl<sub>3</sub>/NaOS)<0.1でのx<sub>III</sub>を示していることを考慮して、(14)、(19)、(20)、(24)および(25)式から各複合体の存在割合を算出した結果を Fig. II-1-7 に示した。LaCl<sub>3</sub>の希薄濃度領域では複合体Ⅲが生成し、LaCl<sub>3</sub>濃度の増加とともに、複合体Ⅱ、複合体Ⅰの順にその存在割合が増加することが明らかになった。



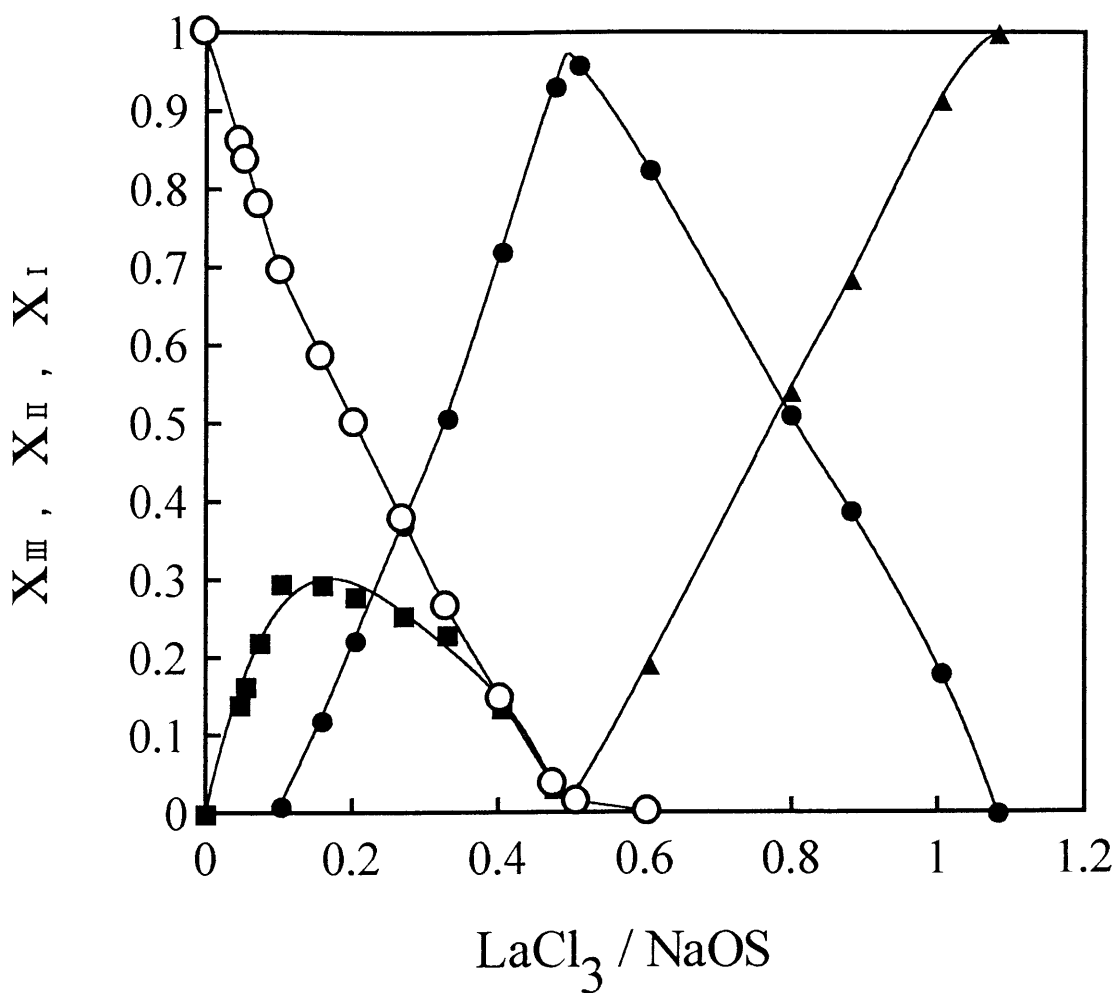


Fig. II-1-7 Species distributions in  $\text{LaCl}_3$ - $\text{NaOS}$  system as a function of the molar ratio ( $\text{LaCl}_3/\text{NaOS}$ ).  $\blacksquare$ ,  $x_{\text{III}}$  (complex III);  $\bullet$ ,  $x_{\text{II}}$  (complex II);  $\blacktriangle$ ,  $x_{\text{I}}$  (complex I);  $\circ$ ,  $\text{OS}^-$  ion.



## 1-5 結論

NaOS と  $\text{LaCl}_3$  の混合水溶液中に形成される複合体の組成を表面張力、電気伝導度およびプロトンスピン-格子緩和時間を解析することにより調べた。その結果、モル比( $\text{LaCl}_3/\text{NaOS}$ )  $< 0.1$  の領域で、OS : La = 3 : 1 の複合体 (3 : 1 複合体) 生成が推定され、この複合体の空気/水界面における分子占有面積は、 $208 \text{ \AA}^2$  であることがわかった。また、モル比( $\text{LaCl}_3/\text{NaOS}$ )  $\approx 0.5$  付近およびモル比( $\text{LaCl}_3/\text{NaOS}$ )  $> 1.2$  の領域では、それぞれ 2 : 1 複合体および 1 : 1 複合体の生成が明らかとなった。これらのモル比の中間領域では、前後の領域で形成される複合体が混在していると考えられる。



## 参考文献

- 1) K. Kihara, N. Kito, and T. Furuta, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **24**, 449 (1996).
- 2) K. Kihara, N. Kito and T. Furuta, *Biocontrol Science*, **2**, 13 (1997).
- 3) 木原孝治, 古田太郎, 日化, **1997**, 323.
- 4) A. W. Adamson, *Physical Chemistry of Surfaces*, 3rd ed, Wiley-Interscience, New York, (1971), p.68.
- 5) B. W. Dubois and A. S. Evers, *Biochemistry*, **31**, 7069 (1992).
- 6) Z. Gao, R. E. Wasylshen and J. T. C. Kwak, *J. Phys. Chem.*, **93**, 2190 (1989).
- 7) R. W. Behling, T. Yamane, G. Navon, M. J. Sammon and L. W. Jelinski, *Biophys. J.*, **53**, 947 (1988).

## 第2章 抗菌性アニオン界面活性分子のモデル膜への吸着とその金属イオン共存効果

### 2-1 緒言

抗菌性アニオン界面活性分子の抗菌作用に対する作用機構として、いくつか提案されているが、細胞膜との相互作用による膜破壊がおもな要因であると考えられている<sup>1)</sup>。したがって、抗菌活性の発現には第一段階としてアニオン界面活性分子の脂質膜への吸着が重要となる。薬物の活性はその疎水性と密接な関係があることはよく知られており、分子の分配係数などの疎水性パラメータを用いて、殺菌活性との関連性が調べられている<sup>2-4)</sup>。最近では、脂質膜のもつ規則的な構造が重要であるとの指摘もあり、より生体系に近い二分子膜ラメラ構造をもつ合成脂質膜を被覆した水晶振動子を用いて、各種の化学物質<sup>5-7)</sup>やカチオン界面活性剤<sup>8)</sup>の脂質膜への吸着挙動が研究されている。

著者はオクタンスルホン酸ナトリウムの殺菌活性が多価金属イオンの共存によって、著しく増強すること、また、その活性の発現にはオクタンスルホン酸アニオンと金属カチオンの複合体が深く関与していることを明らかにした(第Ⅱ編第1章, 第Ⅲ編第1章)<sup>9-11)</sup>。本章では、水晶振動子マイクロバランス(Quartz Crystal Microbalance: QCM)を用いて、各種カチオン共存下において、水晶振動子上のモデル膜へのオクタンスルホン酸ナトリウムの吸着挙動を調べた<sup>12)</sup>。

## 2-2 実験方法

### 2-2-1 試料

アニオン界面活性剤として、1-オクタンスルホン酸ナトリウム (NaOS, 試薬特級, >98%, 東京化成) を用いた。塩化アンモニウム ( $\text{NH}_4^+$ , 片山化学), 塩化テトラメチルアンモニウム ( $\text{Me}_4\text{N}^+$ , 東京化成) および塩化テトラプロピルアンモニウム ( $\text{Pr}_4\text{N}^+$ , 和光純薬) の各アンモニウム塩と金属塩化物 ( $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{La}^{3+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  および  $\text{Na}^+$ ) (片山化学) を添加物として用いた。これらの化合物は市販の試薬 (純度 98%以上) をそのまま使用した。

### 2-2-2 合成脂質膜の調製

臭化ジオクタデシルジメチルアンモニウム (東京化成) とポリスチレンスルホン酸ナトリウム (Aldrich) から調製したポリイオン複合体を合成脂質として用いた<sup>5,8)</sup>。これらの合成脂質の 0.1%クロロホルム溶液を調製し, その 3  $\mu\text{l}$  を水晶振動子の電極部分にキャスト後, 自然乾燥した。この操作を 3 回繰り返し, 合計 9  $\mu\text{l}$  キャストした。つぎにこのキャスト膜を 60°C で 30 分間エージングを行なった後に実験に使用した。本研究において用いた合成脂質のキャスト膜は非常に安定である<sup>6)</sup> ために繰り返し使用することが可能で, 再現性のある周波数変化の測定結果が得られた。また, この合成脂質膜は電極の平面方向と平行に配向した二分子膜ラメラ構造をもっていることが確かめられており<sup>5)</sup>, 生体中の細胞膜に類似した膜構造をもっているという特長がある。

### 2-2-3 脂質膜への吸着量の測定

合成脂質膜への NaOS の吸着は Okahata ら<sup>6)</sup>と同様に QCM を用いて評価した。QCM (SF-105, 相互薬工) は, AT カット (水晶の結晶の電気軸に垂直な面を持つようにカット) された直径 8 mm の水晶振動子 (基本共振周波数 9 MHz) を有していた。水晶振動子の表裏に金電極 (20 mm<sup>2</sup>) が蒸着されていて, 周波数測定システムと接続することにより, 同調周波数変化を計測することができる。

合成脂質膜で被覆した水晶振動子をホルダーに取り付け, 70 ml の蒸留水 (40°C) 中に静かに浸漬した。振動周波数が一定になるのを確認後, 試料水溶液をマイクロシリンジで蒸留水中へ注入し, 再度, 振動周波数が一定になる過程をパーソナルコンピュータ (FMV 466C, 富士通) に記録した。試料水溶液の注入によって, 水相全体の体積が増加するのをさけるために, 高濃度の水溶液を微量添加する必要があった。しかし, NaOS-LaCl<sub>3</sub> 混合水溶液は, 高濃度になると沈殿を生じるので, 両成分をあらかじめ混合した高濃度の試料水溶液を調製することはできなかった。本実験では, 各成分を個別に高濃度水溶液として, 別々に微量を水相へ注入することにより, 沈殿が生じない状況下で周波数変化を測定した。試料添加前後の周波数変化 ( $\Delta F = F_a - F_b$ ;  $F_a$ , 試料添加後の振動周波数;  $F_b$ , 試料添加前の振動周波数) を算出し, 添加物の最終濃度との関係を調べた。

## 2-3 結果

### 2-3-1 試料の添加順序と QCM の周波数変化

NaOS を水中に 0.35 mM または  $\text{LaCl}_3$  を 0.27 mM 添加した場合の QCM の周波数変化  $\Delta F$  を Fig. II-2-1 に示した。いずれを添加したときも直ちに周波数は減少し、時間経過とともに一定値になった。はじめに、NaOS または  $\text{LaCl}_3$  を添加したときは、それぞれ、約 30 および 90Hz の周波数低下が観察された。この NaOS 添加による周波数の経時変化は、Okahata ら<sup>6)</sup> が報告したドデシル硫酸ナトリウムの脂質膜への吸着挙動と同様のパターンであった。無機電解質である  $\text{LaCl}_3$  が脂質膜に吸着することはほとんどないと考えられる。しかし、それにもかかわらず、その周波数の経時変化は NaOS のそれより大きいことがわかった。この点に関しては 2-4 項で考察する。

つぎに、NaOS を添加後続いて  $\text{LaCl}_3$  を添加、またはその順序を変えて試料を添加した場合、添加順序にかかわらず、2 成分添加後の最終の周波数はほとんど同じであることがわかった。この事実は、本実験系の周波数変化が混合溶液の最終平衡濃度によって決定されることを示している。

### 2-3-2 周波数変化の濃度依存性

NaOS, NaCl および  $\text{LaCl}_3$  の添加濃度を変えて周波数変化を調べた。いずれの試料も濃度増加とともに周波数は直線的に減少し (Fig. II-2-2), その減少率は、 $\text{NaOS} < \text{NaCl} < \text{LaCl}_3$  の順に大きくなることがわかった。

### 2-3-3 NaOS と金属イオン混合水溶液系の周波数変化

Fig. II-2-3 は 0.35 mM の NaOS 共存下において、NaCl および  $\text{LaCl}_3$  の添加濃度を増加させたときの周波数変化を示す。1 価の電解質である NaCl の場合、添加濃度に比例して周波数が直線的に減少し、その傾きは NaCl のみ添加した

とき (Fig. II-2-2) とほとんど同じであった。一方,  $\text{LaCl}_3$  添加の場合,  $\text{LaCl}_3$  単独 (Fig. II-2-2) の場合より NaOS 共存下の方が著しく大きい周波数低下を示した。

0.35 mM の NaOS 水溶液に各種カチオンを 0.18 mM 添加した場合の周波数変化 ( $\Delta F$ ) を Fig. II-2-4 に示した。金属イオンの中では, 2 価カチオンの  $\Delta F$  に及ぼす影響は 1 価の  $\text{Na}^+$  よりわずかに大きく, これに対して, 3 価カチオンの  $\text{Al}^{3+}$  は  $\text{La}^{3+}$  (Fig. II-2-3) と同様に  $\Delta F$  を著しく増加させることがわかった。アンモニウム塩の中ではテトラプロピルアンモニウムイオン ( $\text{Pr}_4\text{N}^+$ ) が 2 価の金属イオンと同等の効果を示した。



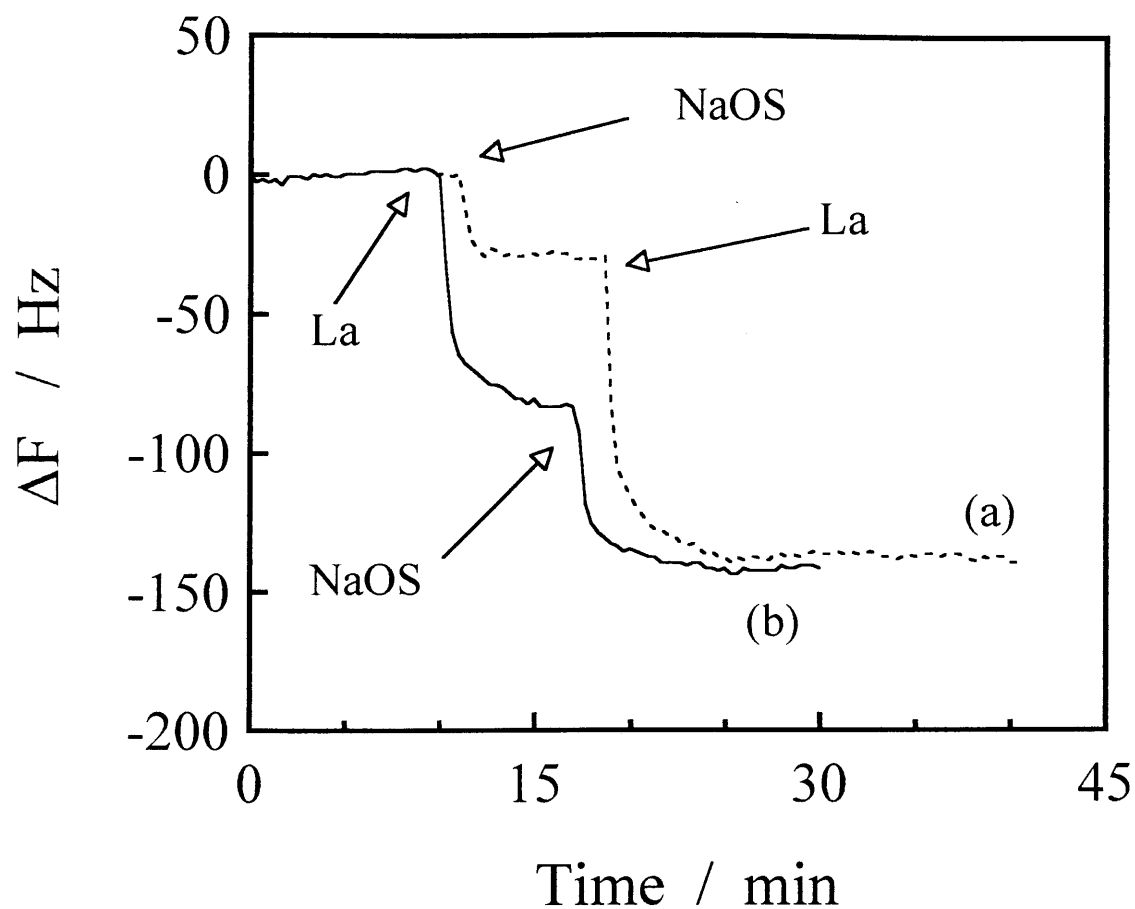


Fig. II-2-1 Typical frequency changes of a synthetic lipid film-coated QCM, responding to the addition of 0.35 mM NaOS and 0.26 mM  $\text{LaCl}_3$  into distilled water at  $40^\circ\text{C}$ . (a)  $\text{LaCl}_3$  was injected after adding NaOS. (b) NaOS was injected after adding  $\text{LaCl}_3$ .





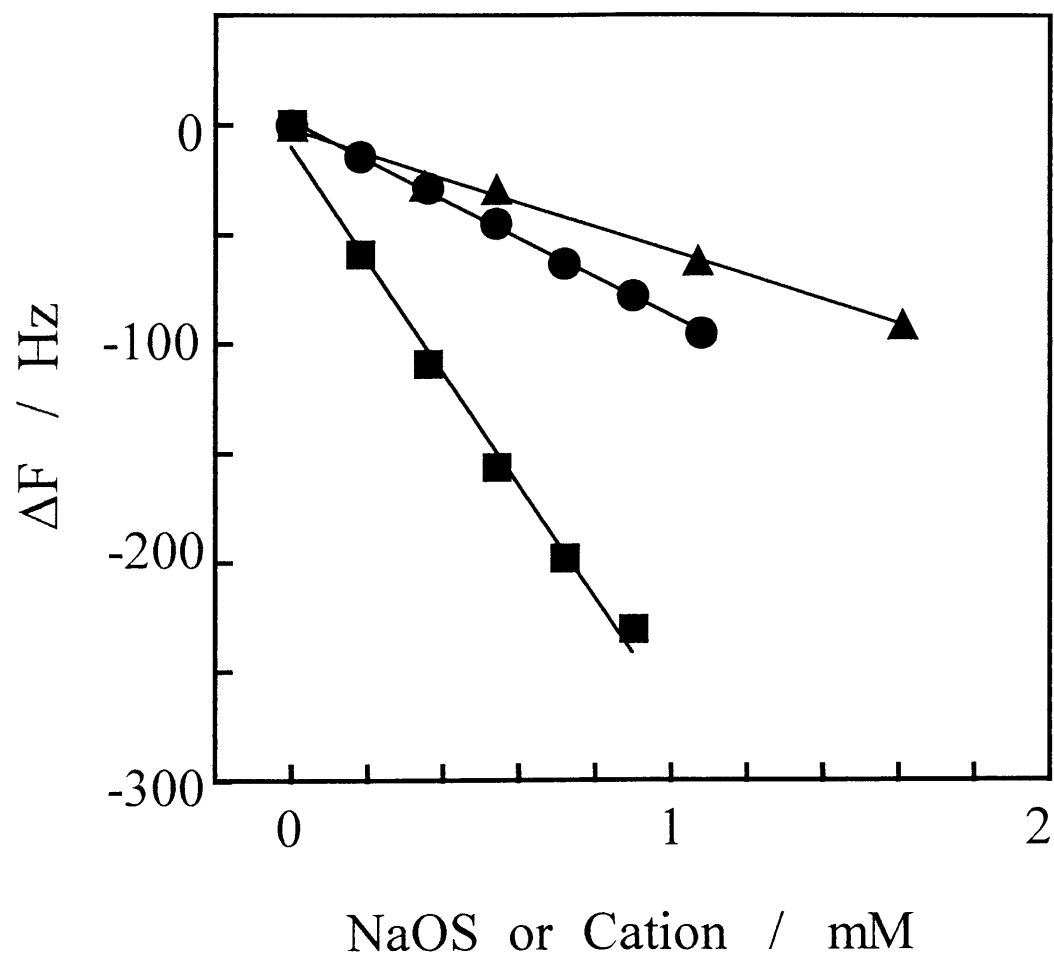


Fig. II-2-2 Effect of concentrations of NaOS or cations on the frequency changes ( $\Delta F$ ) of a lipid film-coated QCM.  $\blacktriangle$ , NaOS;  $\bullet$ , NaCl;  $\blacksquare$ , LaCl<sub>3</sub>



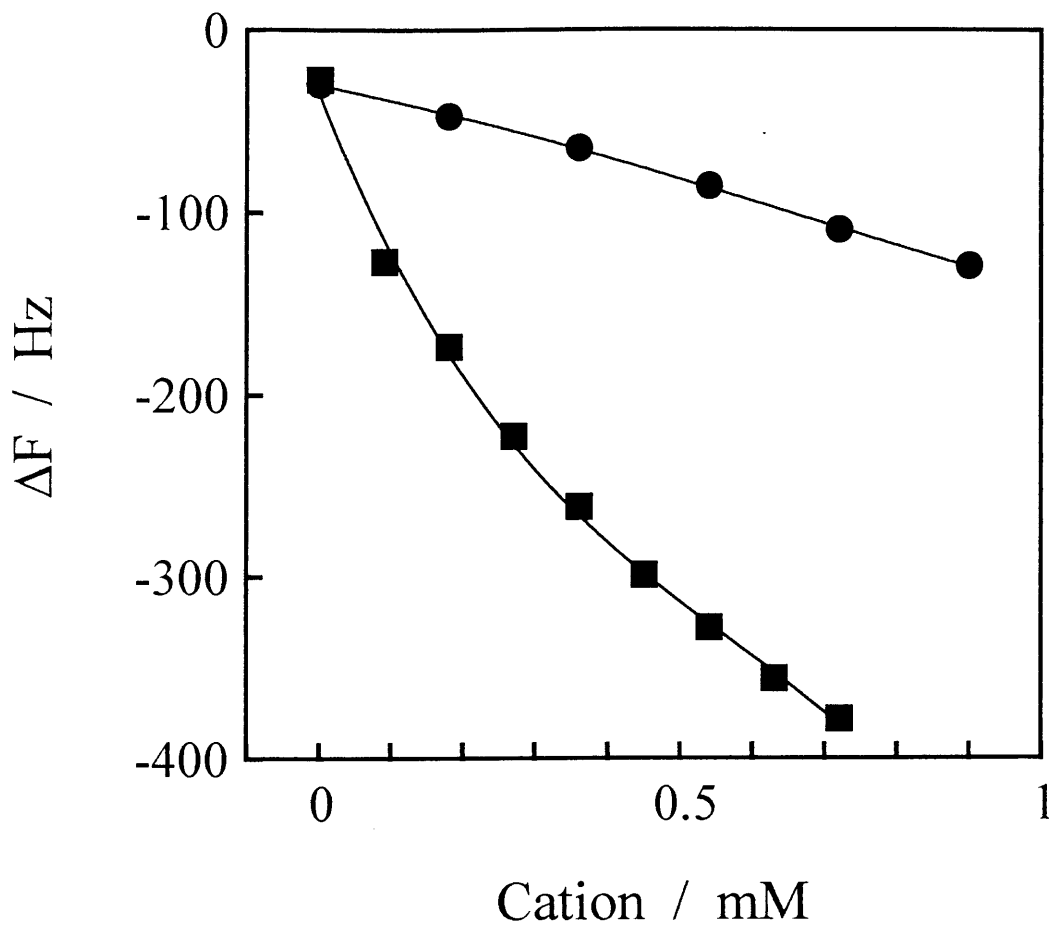


Fig. II-2-3 Effect of concentrations of NaCl (●) and  $\text{LaCl}_3$  (■) on the frequency changes ( $\Delta F$ ) of a lipid film-coated QCM in the presence of 0.35 mM NaOS.



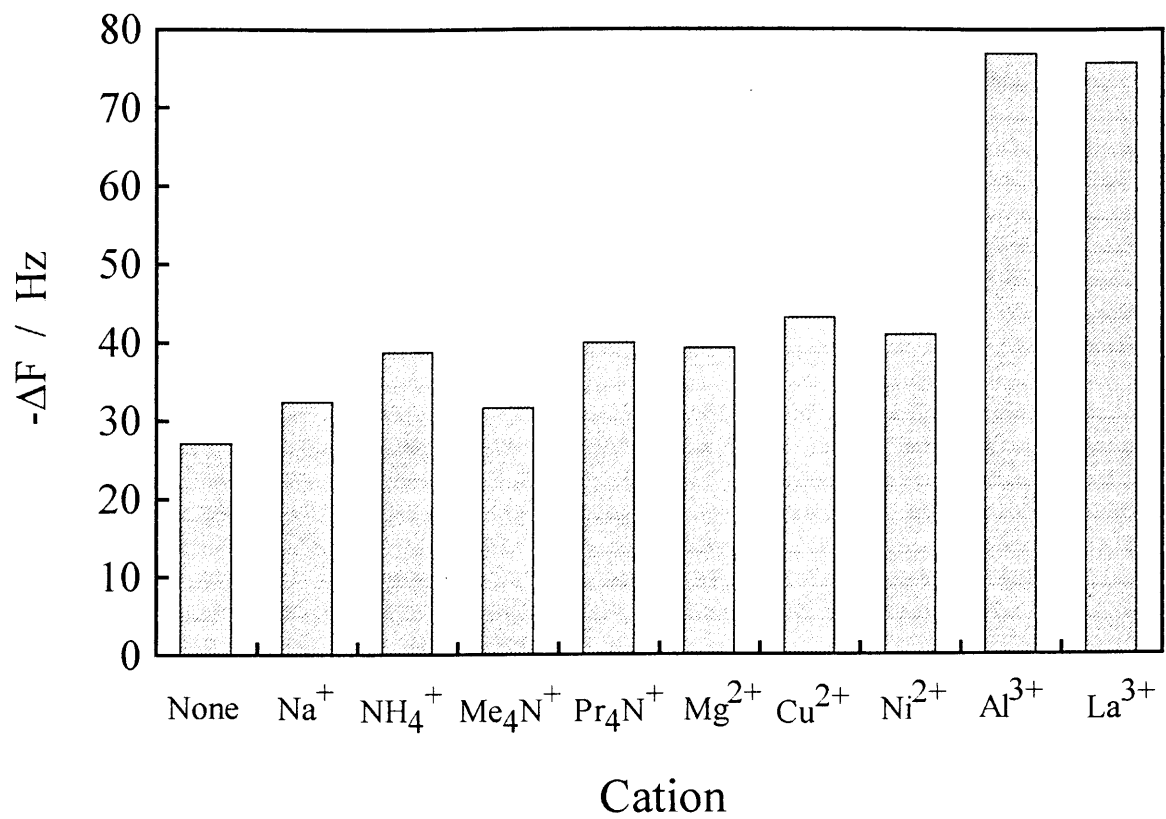


Fig. II-2-4 Frequency changes by adding various cations (0.18 mM) to 0.35 mM NaOS solution.



## 2-4 考察

気相中では、水晶板の電極上における質量増加に比例して、共振周波数変化が減少することが知られている<sup>13)</sup>。すなわち、質量変化 ( $\Delta m$ ) は (1)式で与えられる。

$$\Delta m = - \Delta F(\mu\rho)^{1/2}/(2f_s^2) \quad (1)$$

ここで、 $f_s$ 、 $\mu$  および  $\rho$  は、それぞれ水晶の基本振動数、剛性率および密度を表す。Okahata ら<sup>6)</sup> は、この関係を水溶液中での測定にも適用し、合成脂質膜で被覆した水晶振動子を用いて界面活性剤の脂質膜への吸着量を評価することが可能であることを明らかにした。したがって、Fig. II-2-2 は水晶振動子上の脂質膜表面へ  $\text{NaOS} < \text{NaCl} < \text{LaCl}_3$  の順に多く吸着することを示唆していると考えられる。しかし、 $\text{NaCl}$  や  $\text{LaCl}_3$  のような無機電解質が、疎水基をもつ界面活性剤  $\text{NaOS}$  より脂質膜の界面に吸着しやすいとは考えられない。

一方、液体中での水晶振動子の共振周波数は、液層の影響を受けることが知られており、その周波数変化 ( $\Delta F$ ) は次式で表すことができる<sup>14)</sup>。

$$\Delta F = -f_s^{3/2}(\eta_1\rho_1/\pi\mu\rho)^{1/2} \quad (2)$$

ここで、 $\eta_1$  および  $\rho_1$  はそれぞれ溶液の粘度と密度を表す。 $f_s$ 、 $\mu$ 、 $\rho$  は一定であるので、 $\Delta F$  は溶液の粘度と密度に関係する。したがって、 $\text{NaCl}$  や  $\text{LaCl}_3$  の電解質を添加したときは、それらの脂質膜への吸着によって周波数が増加するのではなく、液性の変化によって生じる可能性があると考えるのが妥当である。事実、脂質膜をキャストしていない、すなわち電解質イオンが吸着しないと考えられる未被覆の水晶振動子を用いたときも、無機電解質添加により同程度の周波数低下が観察された（データは省略）。以上のことより、Fig. II-2-2 の結果から、添加物の種類による脂質膜への吸着量の多少を単純に評価することは困難と考えられる。



NaOS とカチオンの混合系において、両者の間に相互作用がないと仮定すると、各成分単独で測定した周波数変化 ( $\Delta F_D$  および  $\Delta F_C$ ) の代数和とこれらの混合系で測定した周波数変化 ( $\Delta F_M$ ) は一致すると考えられる。しかし、Fig. II-2-2 と Fig. II-2-3 に示した結果から明らかなように、NaOS-LaCl<sub>3</sub> 混合水溶液系 (Fig. II-2-3) では各成分単独のときの周波数変化の代数和以上に周波数の低下が観測された。

これらの現象を説明するために、次のように  $\Delta F_S$  を定義した。

$$\Delta F_S = \Delta F_M - (\Delta F_D + \Delta F_C) \quad (3)$$

したがって、 $\Delta F_S$  は近似的に NaOS とカチオンの相互作用に基づく周波数変化とみることができ、脂質膜への吸着の指標と考えることができる。Fig. II-2-5 は 0.35 mM NaOS 共存下における  $\Delta F_S$  をカチオン濃度に対してプロットした結果である。NaOS-LaCl<sub>3</sub> 混合系の場合、LaCl<sub>3</sub> 濃度の増加とともに  $\Delta F_S$  が著しく減少することがわかった。オクタンスルホン酸アニオンがランタンカチオンとの間で疎水性の複合体を形成することは第 1 章において述べた。したがって、この形成された複合体が NaOS より大きな疎水性をもつため、NaOS に比べて脂質膜に優先的に吸着すると考えられる。一方、NaOS-NaCl 混合水溶液系では、両者の間の相互作用がほとんどないか、または非常に小さいために、その疎水性は NaOS 単独の場合とあまり変わらず、脂質膜面への吸着は極めて小さいと考えられる。このため  $\Delta F_S$  値の変化が小さく観測されたと思われる。

同様に、NaOS-各種カチオン混合水溶液系について、Fig. II-2-4 のデータから(3)式に従って算出した  $\Delta F_S$  値で比較すると、NaOS の脂質膜への吸着が、1 価 < 2 価 << 3 価カチオンの順で促進されることが明らかになった。Pr<sub>4</sub>N<sup>+</sup> は 1 価カチオンであるにもかかわらず、2 価の金属イオンと同等の効果を示した。アニオン界面活性剤はカチオン界面活性剤との間で強い相互作用をし、疎水性の複合体を形成する<sup>15,16)</sup>。Pr<sub>4</sub>N<sup>+</sup> はテトラメチルアンモニウムイオン(Me<sub>4</sub>N<sup>+</sup>)

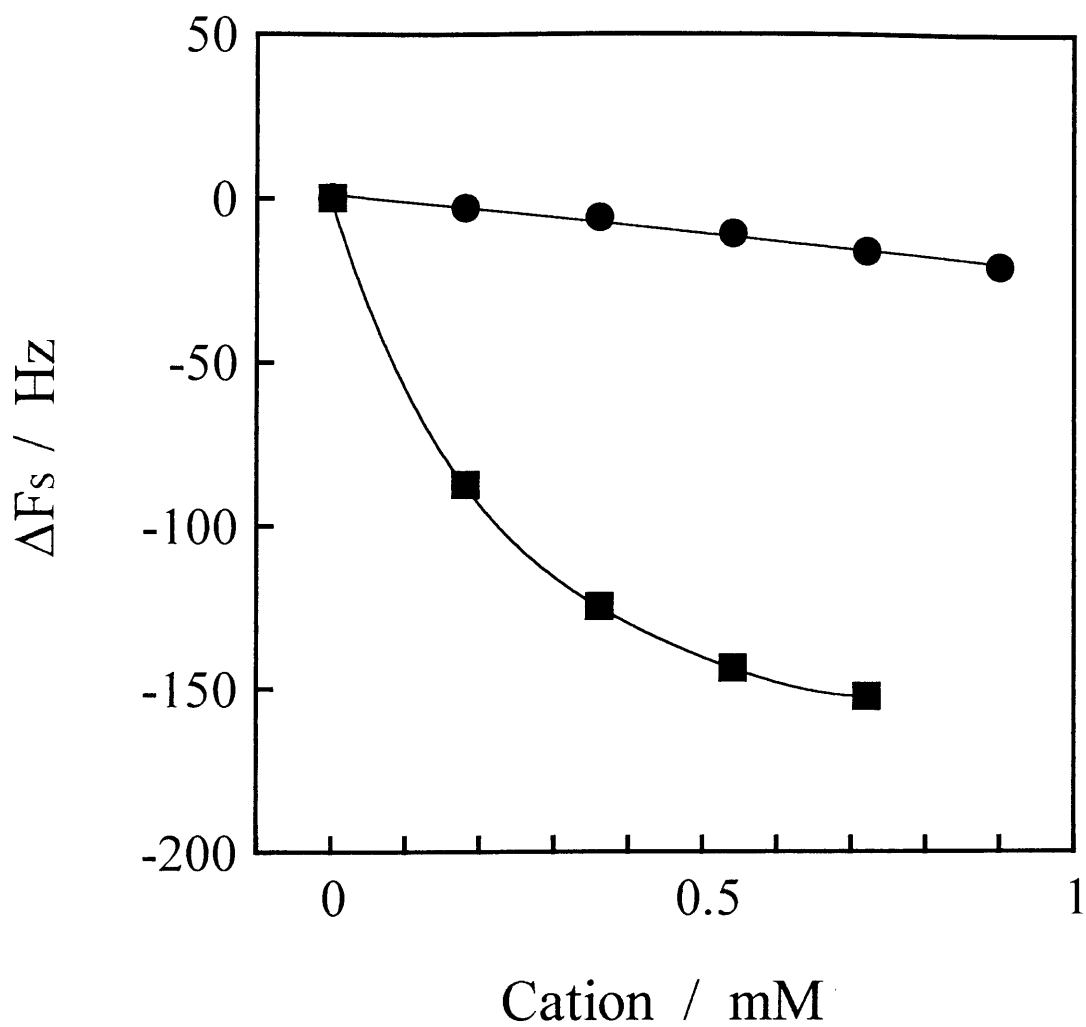


Fig. II-2-5 Specific frequency changes ( $\Delta F_s$ ) depending on concentrations of NaCl (●) and  $\text{LaCl}_3$  (■) in the presence of 0.35 mM NaOS.



に比べて比較的大きな疎水基をもつので、NaOS との間で複合体を形成しやすいと考えられる。3 種のアンモニウム塩では  $\text{NH}_4^+$  は予想外に NaOS の脂質膜への吸着を増加させたが、この理由については、現時点では明らかではない。

## 2-5 結論

0.18 mM の各種金属イオン水溶液に 0.35 mM NaOS を添加したとき、NaOS が合成脂質膜へ吸着する量を QCM 法で評価した。その結果、種々の金属イオンの中で、2 価および 3 価カチオンが NaOS の脂質膜への吸着を促進した。とくに、3 価カチオンの効果が顕著であった。アンモニウム塩の場合、比較的アルキル基の大きな  $\text{Pr}_4\text{N}^+$  が 2 価カチオンと同程度の効果を示した。これらの吸着量の増加は NaOS とカチオンの間に形成された疎水性の複合体によるものと推察される。

## 参考文献

- 1) G. R. Dychdala and J. A. Lopes, *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 4th ed ( by S. S. Block), Lea and Febiger, Philadelphia (1991), p.256.
- 2) N. N. Daoud, N. A. Dickinson and P. Gilbert, *Microbios.*, **37**, 73 (1983).
- 3) H. Korai, M. Takechi and T. Horie, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **13**, 245 (1985).
- 4) T. Furuta and K. Kihara, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**,1309 (1992).
- 5) Y. Okahata, X. Ye, A. Shimizu and H. Ebato, *Thin Solid Films*, **180**, 51 (1989).
- 6) Y. Okahata, and H. Ebato, *Anal. chem.*, **63**, 203 (1991).
- 7) 江波戸 博, 岡畑恵雄, 藤田稔夫, 三芳秀人, 日化, **1993**, 189.
- 8) M. Makino, S. Ohta and H. Zenda, *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 603 (1995).
- 9) K. Kihara, N. Kito, and T. Furuta, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **24**, 449 (1996).
- 10) K. Kihara, N. Kito and T. Furuta, *Biocontrol Science*, **2**, 13 (1997).
- 11) 木原孝治, 古田太郎, 日化, **1997**, 323.
- 12) K. Kihara, K. Sugiya and T. Furuta, *Biocontrol Science*, **2**, 49 (1997).
- 13) G. Sauerbrey, *Z. Physik.*, **155**, 206 (1959).
- 14) K. K. Kanazawa and J. G. Gordon, Jr, *Anal. Chem.*, **57**, 1770 (1985).
- 15) P. M. Holland, *Structure / Performance Relationships in Surfactants*, ( by M. J. Rosen), American Chemical Society, Washington, D.C. (1984), p.141.

- 16) Y. Nakama, F. Harusawa and I. Muratani, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **67**, 717 (1990).

## 第3章 抗菌性アニオン界面活性分子—多価金属イオン混合水溶液中における細胞表面特性

### 3-1 緒言

細菌の細胞表面は外部環境との接触の第一段階であり、細胞と外的環境の界面あるいは細胞表面における変化は、栄養分の取り込みや抗菌剤の作用に著しい影響を及ぼすと考えられる。したがって、外的な環境変化に伴って生じる細胞表面の生化学的性質を把握することは、抗菌剤の作用機構を考察する上で重要であると思われる。生化学的表面パラメータとしては、細胞の表面電荷や表面疎水性が用いられている。

細胞の表面電位から細胞表面における静電的相互作用の情報を得ることができ、細菌それ自身の表面電位またはゼータ電位の正確な測定は非常に困難である。そこで、一般的には、電気泳動度が細胞表面電荷の指標として用いられることが多い<sup>1-7)</sup>。細胞の表面疎水性は、各種有機溶剤への分配<sup>8-11)</sup>、接触角の測定<sup>12,13)</sup>、塩凝集試験 (salting-out aggregation test)<sup>14)</sup> や疎水性相互作用クロマトグラフィ (hydrophobic interaction chromatography)<sup>13, 15)</sup>などの方法によって測定されている。

抗菌性界面活性分子の標的部位は細胞膜であり、膜構造の攪乱によって細胞内成分の漏出が起こることが知られている<sup>16,17)</sup>。そして、この漏出程度はすでにカリウムイオン<sup>18,19)</sup> や 260 nm 電磁波吸収物質 (核酸やアミノ酸)<sup>19-21)</sup> によって評価され、殺菌活性との関係が論じられている。

本章においては、各種の1価、2価および3価カチオン共存下において、アニオン界面活性分子であるオクタンスルホン酸ナトリウムが、細菌の生化学的 surface 特性 (すなわち、細胞表面電荷や細胞表面疎水性) および細胞内成分の漏



出に及ぼす影響について検討を行った<sup>22)</sup>。また、これら混合水溶液の溶液物性として表面張力の測定も併せて行って、これら溶液の界面物性に関する考察を行った。

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 試料

アニオン界面活性剤として、1-オクタンスルホン酸ナトリウム (NaOS, 試薬特級, >98%, 東京化成) を用いた。金属塩は,  $\text{Fe}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  の各塩化物 (片山化学) および第 2 章で記述したと同一のものを用いた。これらの化合物は市販の試薬 (純度 98%以上) をそのまま使用した。

### 3-2-2 表面張力測定

NaOS と多価カチオン混合水溶液の表面張力は, Du Nöuy の表面張力計を用いて, ASTM Standards の Annual Book <sup>23)</sup> に従って, 20°C で測定した。

### 3-2-3 供試菌, 培地および培養条件

供試菌として *Escherichia coli* ATCC 25922 (*E. coli*) を用いた。液体ブイヨン培地 (NB) [乾燥ブイヨン (日水製薬) 30g を水 1L に溶解] またはブイヨン寒天培地 (NA) [NB に寒天末 (試薬一級, 片山化学) を 1.5% 添加] で 37°C, 16~18 時間培養し, 菌体を遠心分離により滅菌蒸留水で 2 回洗浄し, 再度, 滅菌蒸留水に懸濁したものを供試菌液とした。

#### 3-2-4 電気泳動度 ( electrophoretic mobility ) 測定

菌懸濁液 (約  $10^7$  CFU/ml) 10 ml と等量の試験液を混合し, 10 分間静置した。水平シリンダー型ガラスセルの Rank ミクロ電気泳動装置 (モデル Mark II, Rank Brothers, UK) を用いて,  $27^{\circ}\text{C}$  で細胞の電気泳動度を測定した。細胞が一定距離間 ( $60.3\ \mu\text{m}$ ) を通過する時間を測定した。10 個の細胞について同様に測定し平均値を求めた。イオン間の相互作用を排除するために, 緩衝溶液は用いなかった。金属塩は過剰の加水分解を避けるために, 毎回, 測定前に新しく調製したものをを用いた。

#### 3-2-5 細胞表面疎水性 ( cell surface hydrophobicity ) 測定

Rosenberg ら<sup>8)</sup> によって示された方法に準じて行った。すなわち, 菌懸濁液と n-ヘキサデカンを攪拌し, 炭化水素の細胞への付着を水相の濁度測定により決定した。蒸留水で 2 倍希釈したときに, 波長 400 nm における吸光度が 1.0 (10 mm 光路長セル) となるように菌懸濁液を調製した。この懸濁液 2 ml と試験液 2 ml を試験管内で混合し,  $30^{\circ}\text{C}$  の恒温槽中に 10 分間静置した。つぎに, 0.3 ml のヘキサデカン ( $30^{\circ}\text{C}$ ) を加え, vortex mixer で 2 分間激しく攪拌した。恒温槽中に 15 分間静置し, 2 相に分離後, ピペットで水相を静かに吸い取り, 波長 400 nm における吸光度を測定した。細胞表面疎水性は水相の吸光度変化として表し, つぎの式より求めた:

$$\text{細胞表面疎水性(\%)} = (1 - A/A_0) \times 100$$

ここで,  $A_0$  および  $A$  は, それぞれ, ヘキサデカンと混合前後の水相の吸光度である。

### 3-2-6 細胞内成分（260 nm 吸収物質）の漏出

#### 3-2-6-1 菌懸濁液の調製

*E. coli* の NB 培養液の 200ml を NA に塗抹し、37°C で 18 時間培養した。つぎに滅菌蒸留水で集菌後、2 回遠心洗浄し、約 15 mg 菌体乾燥重量/ml となるように滅菌蒸留水に再懸濁した。なお、菌体の乾燥重量は菌懸濁液 1 ml を時計皿にとり、赤外線乾燥式電子水分計（長計量器 IB-30 型）を用いて測定した。

#### 3-2-6-2 細胞内成分の漏出測定

細胞内成分の漏出は Al-Najjar & Quesnel<sup>21)</sup>の方法に準じて 260 nm における吸光度を測定することにより評価した。菌懸濁液（約 15 mg 菌体乾燥重量/ml）の 0.5 ml を 20°C に保った試験液 4.5 ml に加え、一定時間作用後、遠心分離し（3000 rpm, 1 分）、ただちに、その上澄液をメンブランフィルター（0.45 ml）でろ過した（ただし、初留は廃棄した）。このろ液の 260 nm における吸光度（日立 U-3200 型）を測定し、菌懸濁液中の菌体乾燥重量 15 mg 当たりの値に換算して表した。

### 3-3 結果

#### 3-3-1 NaOS—金属イオン混合水溶液の表面張力

NaOS とカチオンの合計濃度を 15 mM 一定にして、それらの混合割合を変えて表面張力を測定した。その結果を Fig. II-3-1 に示した。2 成分混合系の表面張力は、NaOS—NaCl 混合系を除き、各成分単独の表面張力より低くなった。さらに、NaOS—MgCl<sub>2</sub> 混合系および NaOS—3 価カチオン混合系の表面張力は、それぞれ、モル比が 2 : 1 および 3 : 1 付近でもっとも低くなった。また、表面張力に及ぼす影響は、1 価 < 2 価 < 3 価カチオンの順で大きくなることがわかった。

#### 3-3-2 電気泳動度

*E. coli* 細胞の電気泳動度を各種カチオンのイオン強度を変えて測定した。その結果を Fig. II-3-2 および Fig. II-3-3 に示した。2 価および 3 価カチオンのイオン強度が増加すると、細胞表面の負電荷の絶対値が徐々に減少したが、その負電荷は維持された。しかし、Fe<sup>3+</sup> では負から正へ電荷の逆転が観測された。一方、Na<sup>+</sup> や NH<sub>4</sub><sup>+</sup> のような 1 価カチオンは試験した濃度範囲において表面電荷に影響を及ぼさないことがわかった。カチオンが細胞の表面電荷を低下させる順序は、Fe<sup>3+</sup> >> Cr<sup>3+</sup> ≥ La<sup>3+</sup> ≐ Al<sup>3+</sup> ≐ Cu<sup>2+</sup> > Mg<sup>2+</sup> ≐ Ni<sup>2+</sup> ≐ Zn<sup>2+</sup> > Pr<sub>4</sub>N<sup>+</sup> ≐ Me<sub>4</sub>N<sup>+</sup> ≐ NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ≐ Na<sup>+</sup> であった。

Fig. II-3-4 は、10 mM NaOS 共存下において、細胞の電気泳動度に及ぼすカチオン（イオン強度 = 2.75 mM）の影響を調べた結果である。これらの電気泳動度の結果は NaOS の共存しない場合（Fig. II-3-2 および Fig. II-3-3）と同様の傾向を示した。すなわち、有効性の順は 3 価 > 2 価 > 1 価カチオンであった。

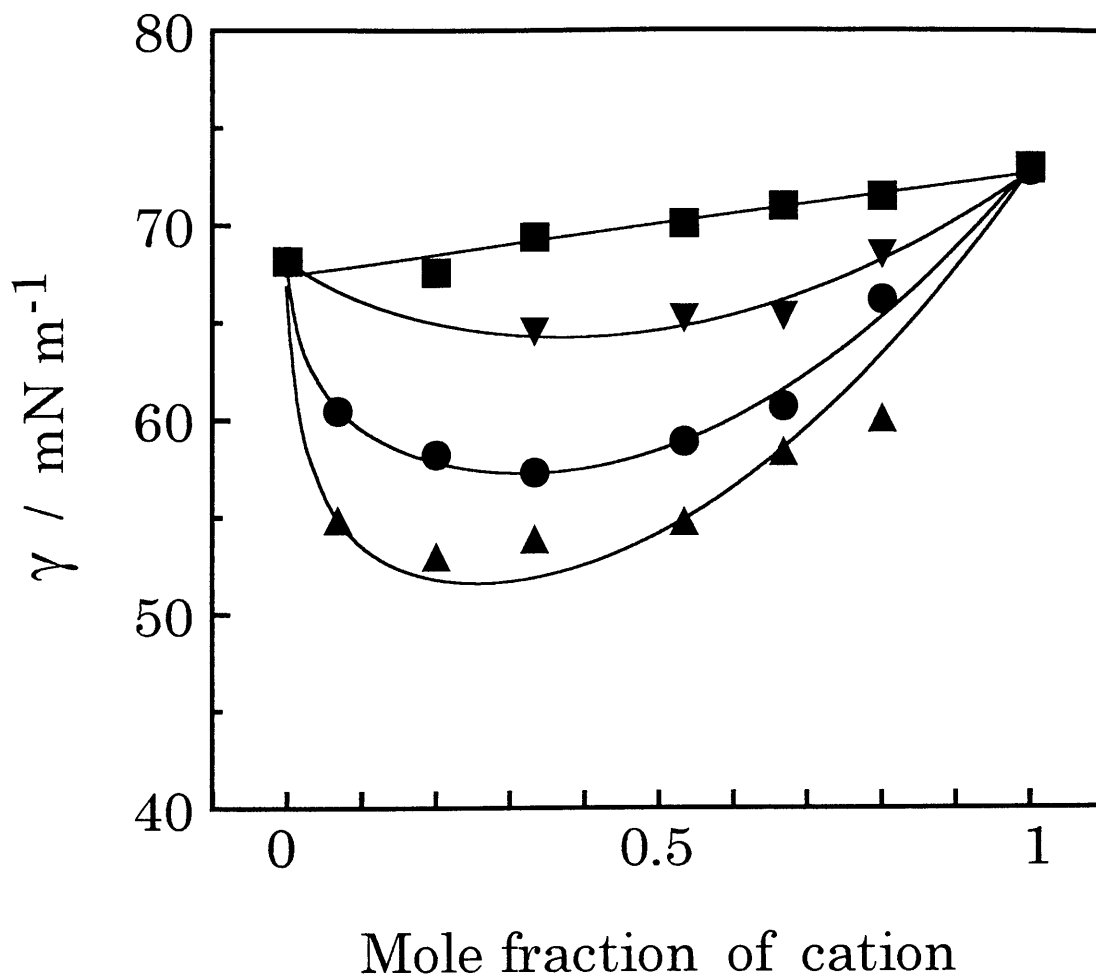


Fig. II-3-1 Surface tension ( $\gamma$ ) of the mixture of NaOS and metal cations (total concentration : 15mM). The surface tension was measured by the Du Nöuy ring method. ■, NaCl; ▼, MgCl<sub>2</sub>; ●, AlCl<sub>3</sub>; ▲, LaCl<sub>3</sub>.



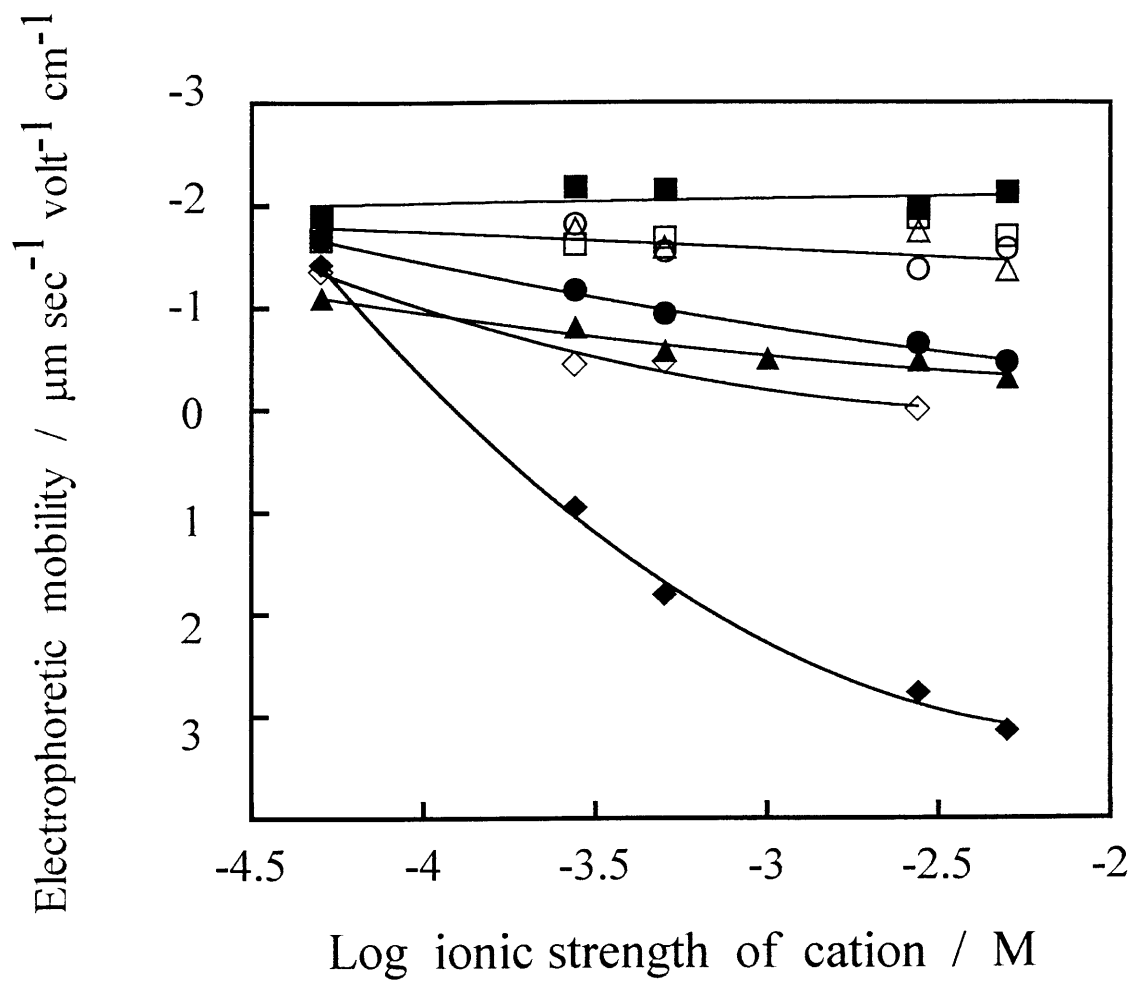


Fig. II-3-2 Effect of mono- and trivalent cations on the electrophoretic mobility of *E.coli*. ■, Na<sup>+</sup> ; ●, Al<sup>3+</sup> ; ▲, La<sup>3+</sup> ; ◆, Fe<sup>3+</sup> ; ◇, Cr<sup>3+</sup> ; □, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ; ●, Me<sub>4</sub>N<sup>+</sup> ; △, Pr<sub>4</sub>N<sup>+</sup>.





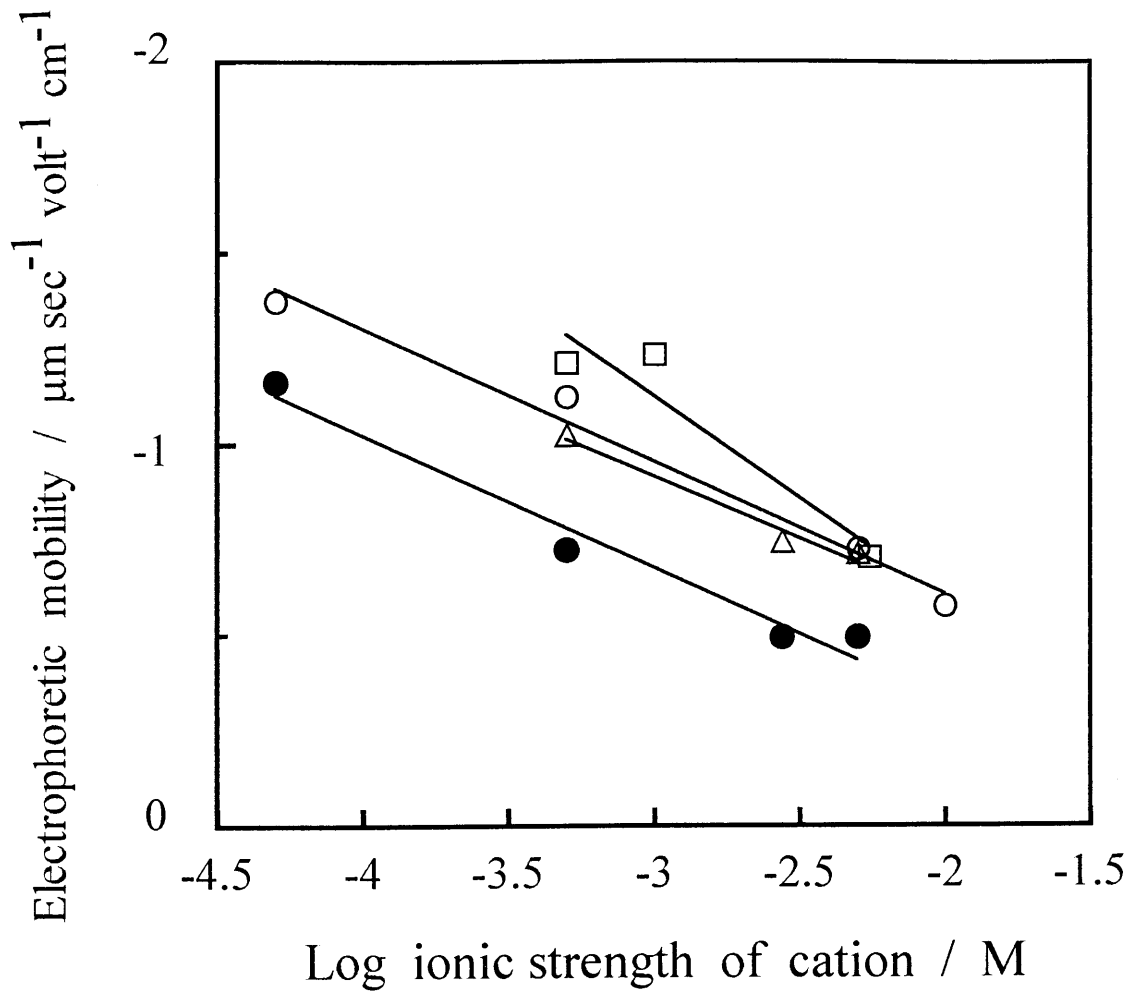


Fig. II-3-3 Effect of divalent cations on the electrophoretic mobility of *E.coli*. O,  $\text{Mg}^{2+}$ ;  $\Delta$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ;  $\square$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ;  $\bullet$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ .



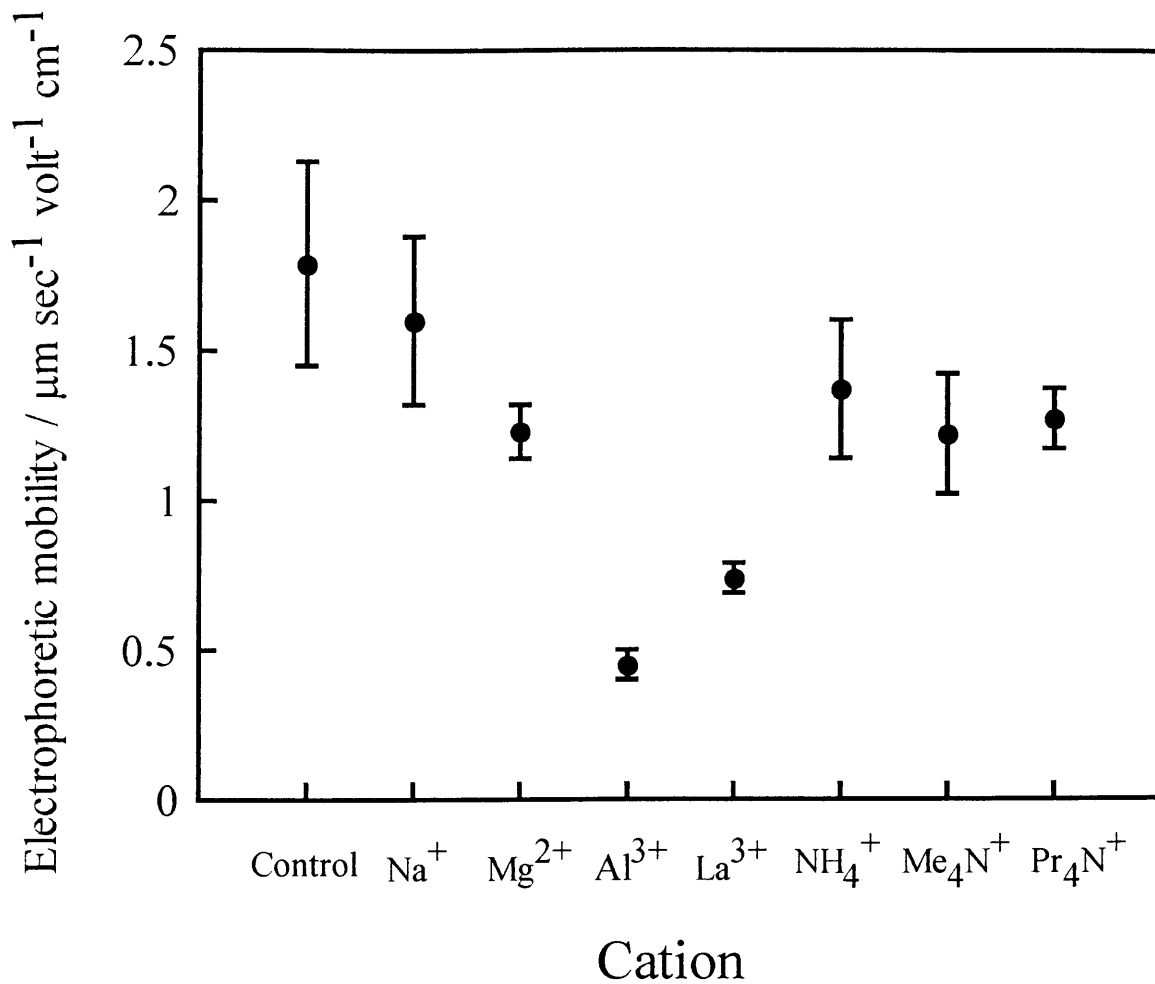


Fig. II-3-4 Effect of cations (ionic strength = 2.75 mM) on the electrophoretic mobility of *E. coli* in the presence of 10 mM NaOS. Bar represents 95% confidence limit.



### 3-3-3 細胞表面疎水性

Fig. II-3-5 は細胞表面疎水性に及ぼす各種カチオンの効果を表している。 $\text{Na}^+$  のイオン強度の増加はヘキサデカンの細胞への付着に影響しないことがわかった。 $\text{Mg}^{2+}$  の共存下において、細菌表面の炭化水素への親和性は、0.01 M のイオン強度以上でわずかに増加したが、それ以下のイオン強度ではほとんど影響しなかった。3 価カチオンの場合、ヘキサデカンへの細菌の親和性は、イオン強度の増加とともに著しく増加した。イオン強度 0.001 M で、各種カチオン共存下におけるヘキサデカンの細胞への吸着を Fig. II-3-6 に示す。細胞表面疎水性の増加は  $\text{Al}^{3+}$  ,  $\text{Fe}^{3+}$  および  $\text{La}^{3+}$  では 70–80% ,  $\text{Cr}^{3+}$  で 30% ,  $\text{Cu}^{2+}$  で 15% , そして  $\text{Ni}^{2+}$  と  $\text{Zn}^{2+}$  の場合 2–4% であった。それに対するカチオンの有効性の順序は、 $\text{Fe}^{3+} \cong \text{La}^{3+} \cong \text{Al}^{3+} \gg \text{Cr}^{3+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+} \cong \text{Ni}^{2+} \cong \text{Mg}^{2+} \cong \text{Na}^+$  であった。

NaOS 共存下における  $\text{LaCl}_3$  の細胞表面疎水性に及ぼす効果を Fig. II-3-7 に示す。 $\text{La}^{3+}$  による細胞表面疎水性の増加は、NaOS の共存しない場合より共存する方が小さいことがわかった。



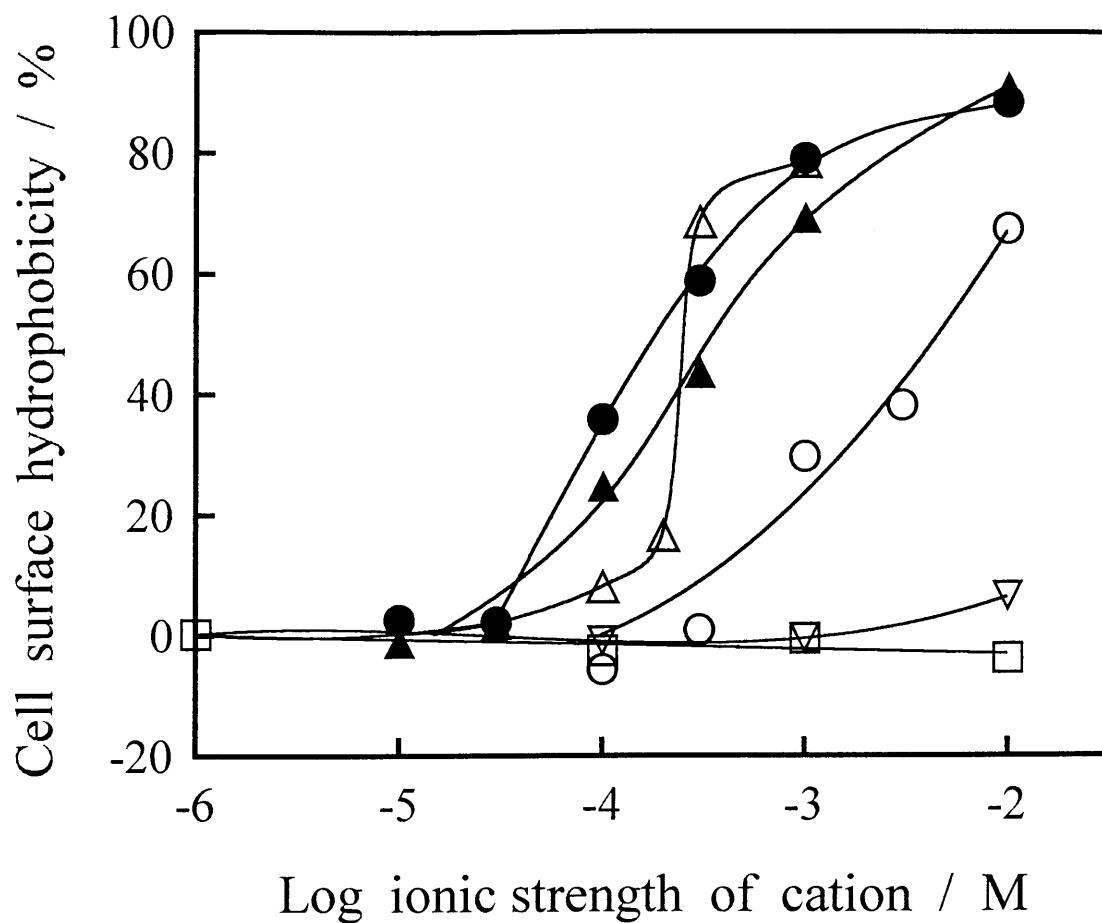


Fig. II-3-5 Effect of cations on the cell surface hydrophobicity . □, Na<sup>+</sup> ; ▽, Mg<sup>2+</sup> ; ▲, Al<sup>3+</sup> ; ●, La<sup>3+</sup> ; △, Fe<sup>3+</sup> ; ○, Cr<sup>3+</sup>





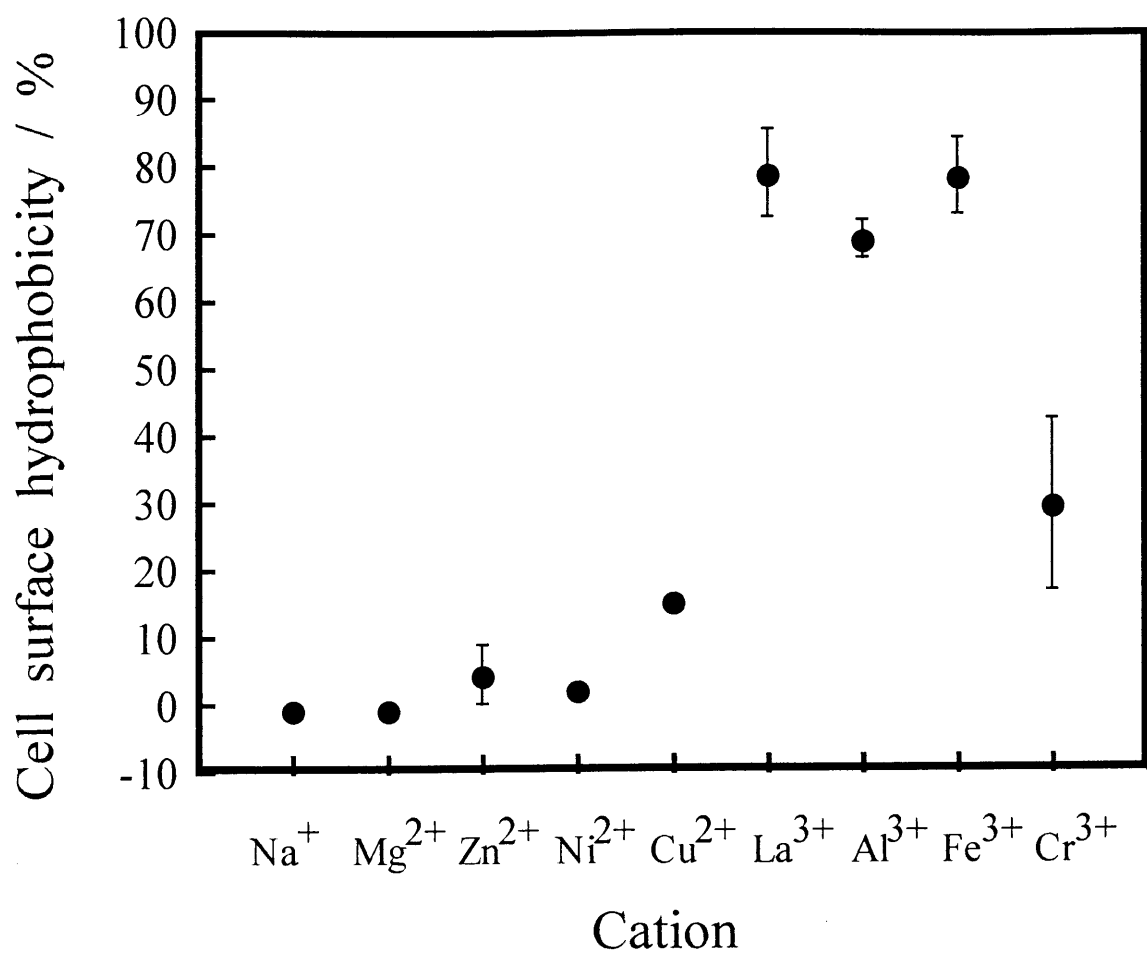


Fig. II-3-6 Effect of cations (ionic strength =  $10^{-3}$  M) on the cell surface hydrophobicity. Bar represents 95% confidence limit.



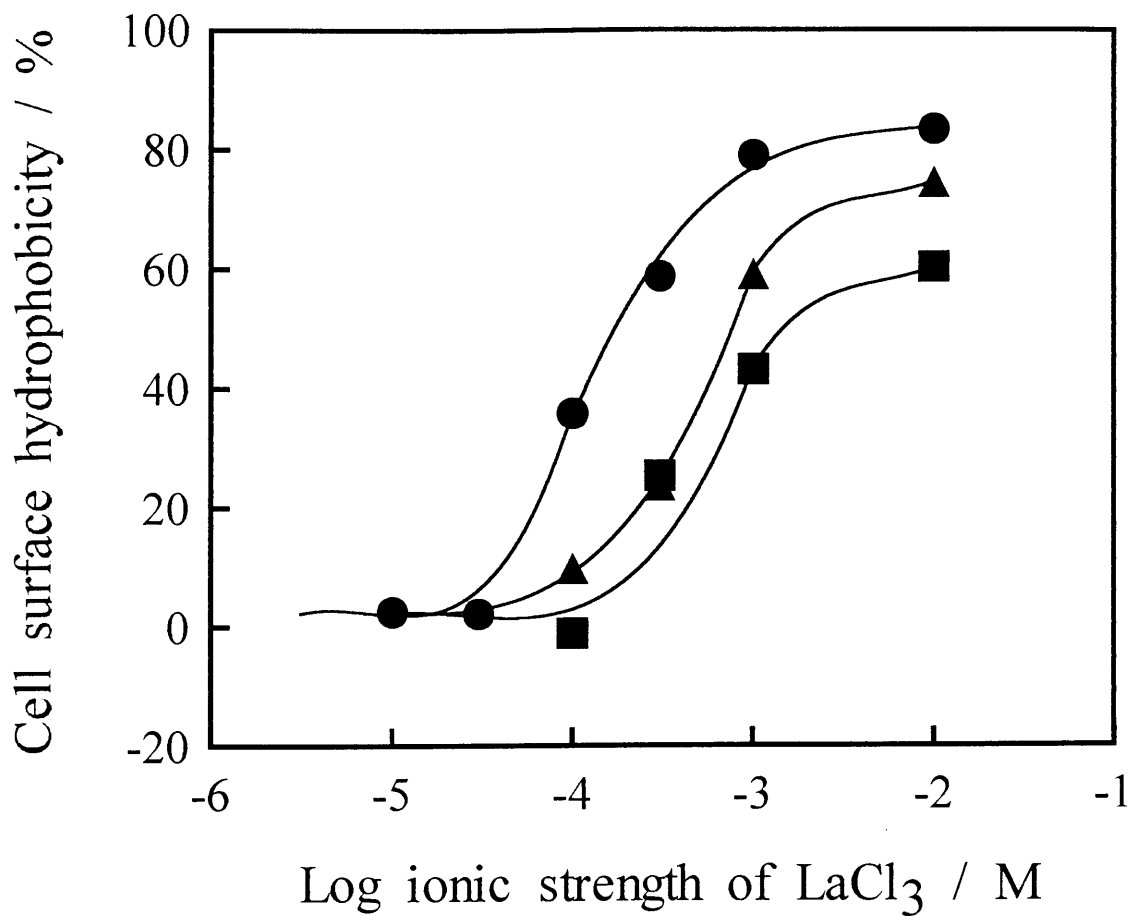


Fig. II-3-7 Effect of LaCl<sub>3</sub> on the cell surface hydrophobicity in the presence of NaOS. NaOS concentrations : ●, 0 mM ; ▲, 5 mM ; ■, 10 mM.



#### 3-3-4 細胞内成分の漏出

20 mM NaOS, 5 mM LaCl<sub>3</sub> およびこれらの混合溶液について, 菌体からの細胞内成分の漏出量を作用時間を変えて測定した結果を Fig. II-3-8 に示した。蒸留水および NaOS 単独では, NaOS の長時間暴露 (3 時間) を除き, 吸光度の変化はほとんどなかった。LaCl<sub>3</sub> では, 作用時間 10 分でわずかに吸光度の増加が認められたが, これ以上増加することはなかった。一方, NaOS と LaCl<sub>3</sub> 混合系の場合, 初期段階で漏出量が急速に増加し, 30 分の作用時間で飽和に達した。そこで, 以後の実験では吸光度が一定となる 1 時間の作用時間を選んで実験を行った。

20 mM の NaOS 共存下において, 金属イオンの添加量を変えて細胞内成分の漏出量を測定した結果を Fig. II-3-9 に示した。1 価および 2 価カチオンの場合 (Fig. II-3-9A), NaCl や MgCl<sub>2</sub> 単独では, 500 mM の比較的高濃度であっても漏出はほとんど起こらないことがわかった。これに対して, NaOS の共存下においては, カチオン濃度の増加とともに 260 nm の吸光度が増加した。そして, その変化は NaCl では直線的であるのに対し, MgCl<sub>2</sub> では 200~300 mM で飽和に達した。一方, 3 価カチオンの場合 (Fig. II-3-9B), AlCl<sub>3</sub> および LaCl<sub>3</sub> のみの場合でも漏出が起こり, その程度は特に AlCl<sub>3</sub> で顕著であった。さらに, NaOS との混合系においては, 1 mM 以下のカチオン濃度で吸光度が著しく増加するが, それ以上では一定となることがわかった。

Fig. II-3-10 は NaOS と LaCl<sub>3</sub> の合計濃度を 15 または 20 mM にして, それらの混合割合を変えて, LaCl<sub>3</sub> のモル分率に対して細胞内成分の漏出量をプロットした結果である。漏出は LaCl<sub>3</sub> のモル分率が 約 0.2 付近で極大となった。そして, この傾向は両成分の合計濃度が変わってもほぼ同じであったが, 合計濃度が高いほど漏出量も多くなった。



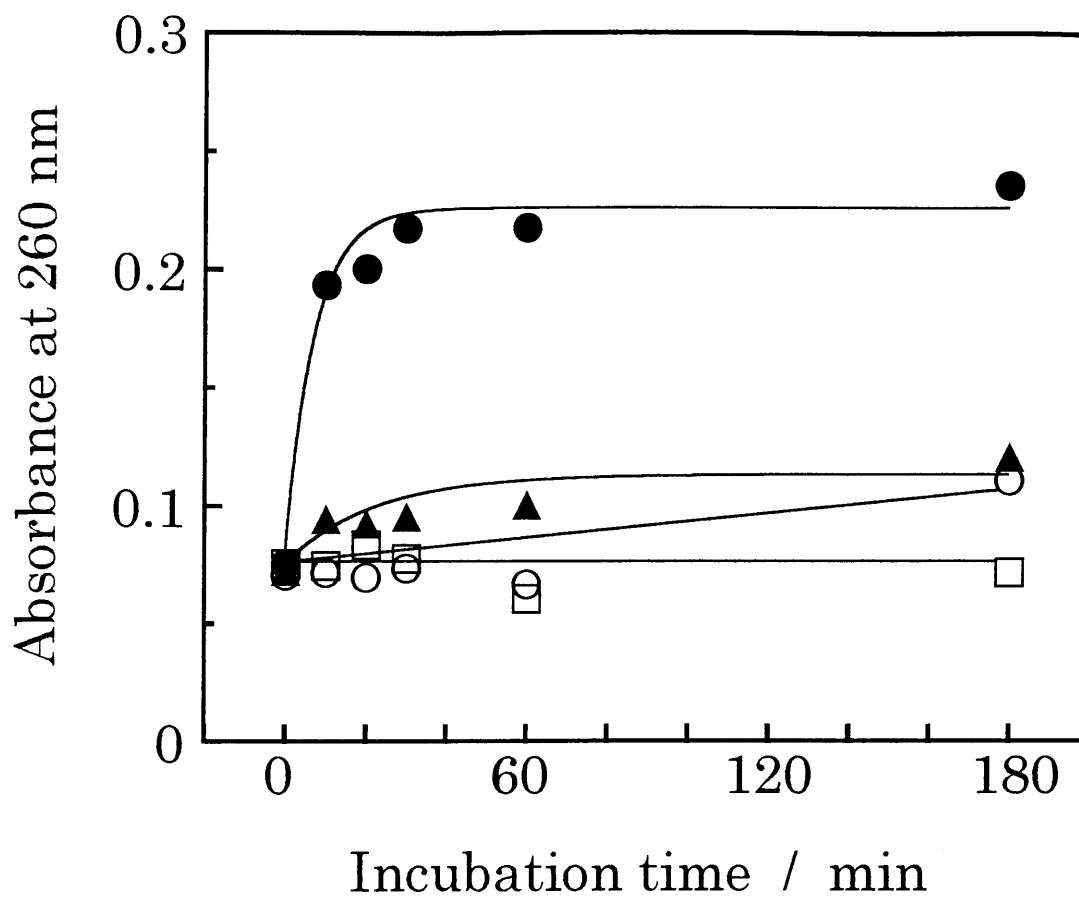


Fig. II-3-8 Time course of the leakage of intracellular materials from *E. coli* cell treated with NaOS, LaCl<sub>3</sub> or their mixture at 20°C.  
 □, water; ○, 20 mM NaOS ; ▲, 5 mM LaCl<sub>3</sub> ; ●, 20 mM NaOS + 5 mM LaCl<sub>3</sub>.





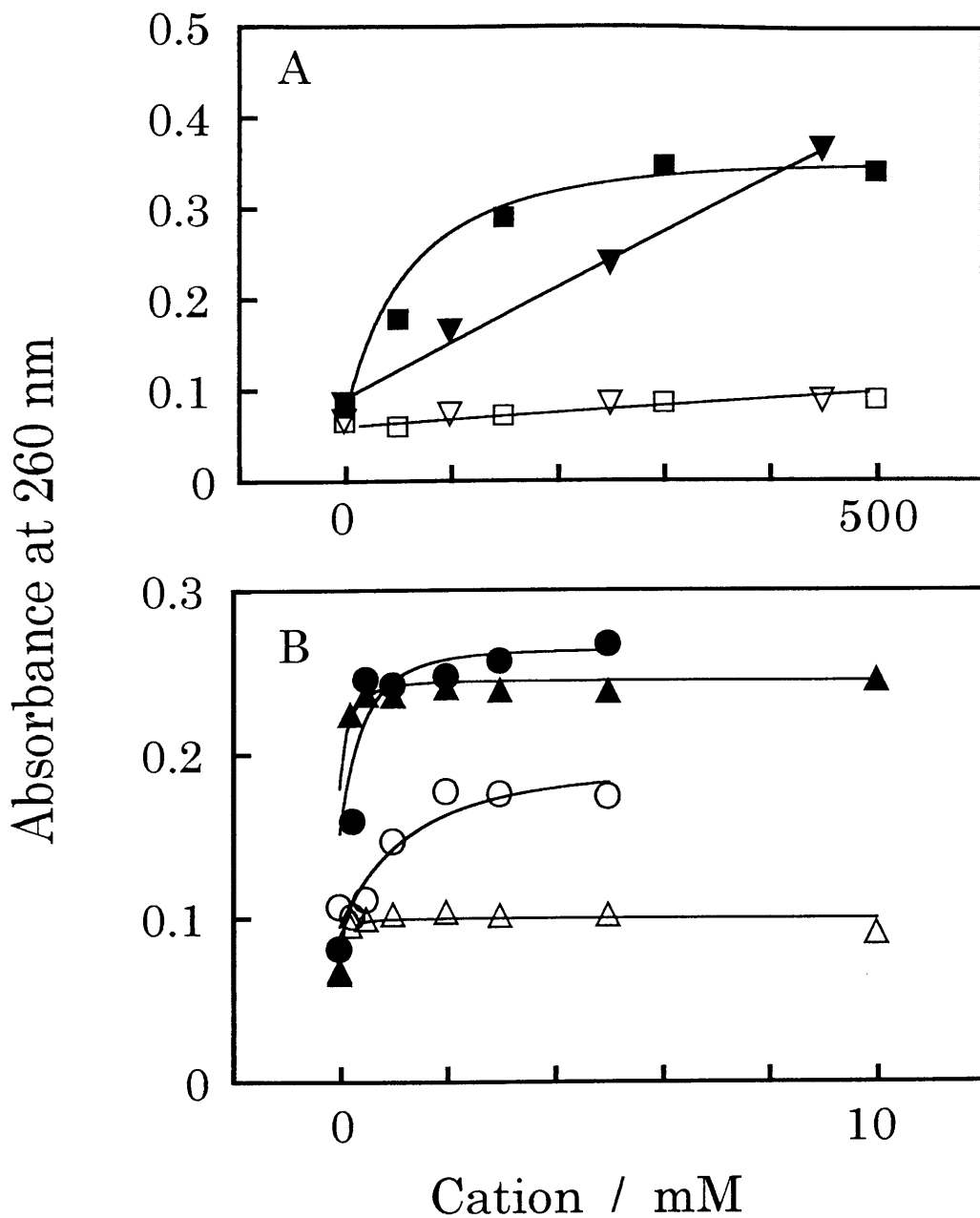


Fig. II-3-9 Effect of various cation concentrations in the absence (open) and the presence (closed) of 20 mM NaOS on the leakage of intracellular materials from *E.coli* cell at 20 °C after 60 min incubation. ▽, ▼, NaCl ; □, ■, MgCl<sub>2</sub> ; ○, ●, AlCl<sub>3</sub> ; △, ▲, LaCl<sub>3</sub>.



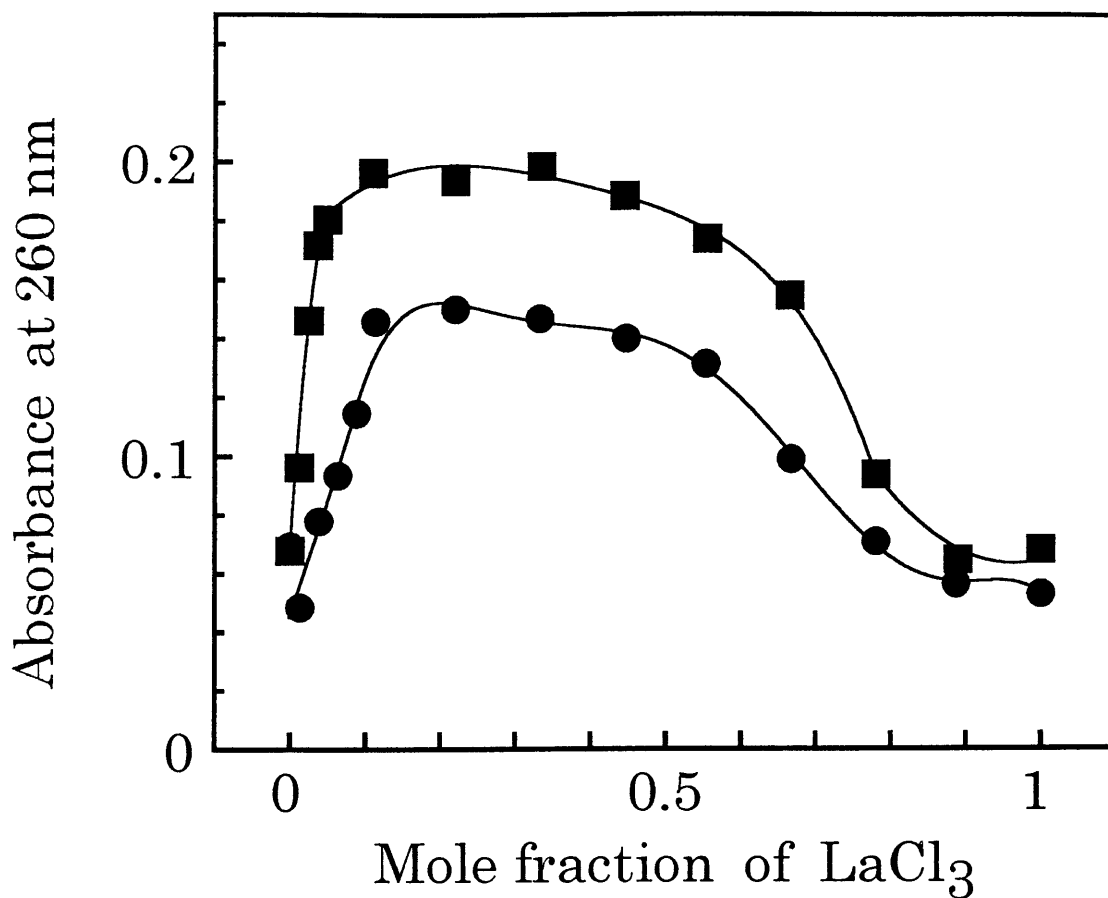


Fig. II-3-10 Leakage of intracellular materials from *E.coli* cell treated with the mixture of NaOS and LaCl<sub>3</sub> at 20°C for 60 min. Total concentration : ■, 20 mM ; ●, 15 mM.



### 3-4 考察

細菌の表面は負に帯電しているので<sup>1,6)</sup>, その細胞の表面は水溶液中において、カチオンと強く相互作用し、そして結合することが期待される。一方、アニオン界面活性剤のアニオンとの間に静電的反発を生じる。電気泳動は細菌の表面電荷を研究する有効な方法である。一般に、電気泳動は緩衝溶液中で測定されるが、著者らは試験しているカチオンと緩衝液のイオンとの相互作用を避けるために緩衝液を使用しなかった。本研究において、電気泳動度をカチオン濃度の代わりにそのイオン強度の関数として表した (Fig. II-3-2 および Fig. II-3-3)。細菌<sup>2,4,5,7)</sup> やその構成成分 (たとえば、細胞質膜や外膜)<sup>3)</sup>, 神経細胞<sup>24)</sup> およびリン脂質リポソームのような人工膜<sup>25,26)</sup> の表面電荷に及ぼす各種金属イオンの影響が電気泳動によって広く研究されている。これらの文献は、溶液の多価カチオン濃度が増加するとき、細胞または粒子表面の負電荷が多価カチオンによって著しく減少することを示しており、著者らの結果と一致する<sup>22)</sup>。

多くの多価金属イオンは加水分解されて水酸化物を生じ、そして、その加水分解の程度は金属種によって異なり、さらに、加水分解物は  $\text{CuOH}^+$ ,  $\text{AlOH}^{2+}$  や  $\text{FeOH}^{2+}$  のような単核種だけでなく、 $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{2+}$ ,  $\text{Al}_2(\text{OH})_2^{4+}$  や  $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$  のような多核種も存在することはよく知られている<sup>13)</sup>。これらの加水分解された金属イオンは、フリーの水和イオン (たとえば、 $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{3+}$ ) と比較して、固体-液体界面に強く吸着されるので<sup>27)</sup>, それらの特異的吸着の結果として細胞表面の負電荷がより一層減少する。さらに、加水分解によって生じた鉄イオンの主なイオン種は  $\text{Fe}_2(\text{OH})_2^{4+}$  である<sup>28)</sup>。したがって、二核のイオン種は、細胞の表面電荷の中和に対して、単核イオン種 (たとえば、 $\text{FeOH}^{2+}$ ) よりも効果的に作用し、このことが Fig. II-3-2 に見られる鉄 (III) イオンの例外的な挙動に対応していると考えられる。

電気泳動度-pH の関係を調べた研究によると、*E. coli* の表面電荷は pH の減

少とともに徐々に減少し、そして、約 3 以下の pH になると、突然、電気泳動度が大きく低下する<sup>29)</sup>。また、同様の結果が *Micrococcus lysodeikticus*<sup>3)</sup> や *Streptococcus faecalis*<sup>28)</sup> で報告されている。さらに、菌懸濁液の pH 低下は細胞表面へのプロトネーションおよび表面電荷の中和をもたらす<sup>25)</sup>。先に述べたように、加水分解した多価カチオン、特に、鉄やアルミニウムイオンを含む水溶液の pH はより低いことから、多価カチオンだけでなく pH もまた表面電荷の中和に重要な役割を果たしているのかもしれない。しかし、これらの金属イオン溶液の pH は試験した濃度範囲で 3 以下ではないので、表面電荷の減少は pH 低下よりもむしろカチオンに起因すると考えられる。

3 価カチオンによる表面ポテンシャルの低下は NaOS の共存下においても認められた ( Fig. II-3-4 )。これは細胞表面とカチオンの間の結合が NaOS とカチオンの結合より強いことを示している。この界面動電測定においては、高濃度 (たとえば、殺菌力試験で用いた 20 mM のような) の NaOS を使用できなかった。なぜならば、そのような濃度は実験に用いた電気泳動装置で採用されているイオン強度の上限を越えるためである。

クロルヘキシジンや塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウムのような有機性カチオンは細胞表面の疎水性を増加させる<sup>9-11)</sup>。また、多価カチオンで *E.coli* を処理すると、細胞の表面疎水性に影響する。Fig. II-3-5 に示したように、3 価カチオン濃度の増加とともに細胞表面疎水性が著しく増加する。しかし、Na<sup>+</sup>のような 1 価カチオンの場合、濃度が増加しても細胞表面疎水性はほぼ一定であった。このようにカチオンの価数が多くなれば、細胞表面疎水性に及ぼす影響も大きくなる。疎水性増加における金属イオンの有効性は、電気泳動度の結果とよく一致している。NaOS—多価カチオン混合系における細胞表面疎水性は、NaOS の共存しない系よりも低く、NaOS 量の増加とともに減少する ( Fig. II-3-7 )。これは、NaOS が多価カチオンの一部と相互作用して

いることを示している。

アニオン界面活性剤の膜への結合が多価カチオンの共存下において増加することが示されている。Voss<sup>31)</sup> はラベル化した ABS (アルキルベンゼンスルホン酸塩) の細菌への吸着を  $\text{CaCl}_2$  の共存下と共存しない場合で測定した。彼は *S. aureus* および *E. coli* への ABS の吸着が  $\text{CaCl}_2$  の増加とともに増えることを認めた。また、アニオン性蛍光プローブである 8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸塩 (他のアニオン界面活性剤と同様に疎水性基と親水性基をもつ) と人工リン脂質膜との相互作用が  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  および  $\text{Ba}^{2+}$  のような 2 価カチオンによって増強されることが報告されている<sup>25)</sup>。

アニオン界面活性剤の作用機構に関して、細胞膜の破壊、特異的な酵素阻害、細胞の代謝阻害および細胞のタンパク変性などが提案されている<sup>32)</sup>。これらの中で、アニオン界面活性剤と細胞膜との相互作用が抗菌活性の主な要因であることが示されている。細胞内成分の漏出は細胞質膜の損傷・破壊により起こり、それは細菌の死と深く関係する。本研究において、NaOS が少量の多価金属イオン共存下において、*E. coli* 細胞から細胞内成分の漏出が確認されたことから、細胞膜の破壊が強く示唆された。

多価金属イオンは、細胞の表面電荷や表面疎水性さらに細胞内成分の漏出などの菌体側で起こる変化だけでなく、水溶液の溶液物性も変化させる。すなわち、NaOS 水溶液の表面張力が多価金属イオンの添加により著しく低下することはすでに述べた (Fig. II-1-1, Fig. II-3-1)。この表面張力低下は NaOS のアニオンが多価金属イオンに配位することにより疎水的になり、空気/水界面への吸着が促進されることを示している。

アルキルスルホン酸ナトリウムは水溶液中でカルシウムイオンによって複分解され、2 分子の界面活性剤と 1 分子のカルシウムイオンからなる沈殿物を生じ、そしてその溶解度はアルキル鎖長に依存することが知られている<sup>33)</sup>。また、



同様の沈殿物の生成がアルキル硫酸ナトリウムと2価カチオンの間で認められている<sup>34)</sup>。Nakamuraら<sup>35)</sup>は、アミノ酸系界面活性剤と2価の銅イオン混合系の表面張力を測定し、それらの混合比が1:1のとき、もっとも表面張力が低下することから、1:1複合体の生成を推定した。また、第1章において、NaOS-LaCl<sub>3</sub>混合水溶液中には、各成分のモル比に対応して、3:1、2:1および1:1の複合体が形成されることを明らかにした。したがって、Fig. II-3-1の結果から、表面張力の極小点において、NaOS-2価カチオンおよびNaOS-3価カチオンの混合水溶液中に、それぞれ、2:1および3:1複合体が形成されていると考えられる。この複合体はNaOSより疎水的であるため、細胞表面との相互作用が促進されると推測される。

### 3-5 結論

NaOS と各種カチオン混合水溶液中において、*E. coli* の細胞表面電荷、細胞表面疎水性および細胞内成分の漏出を調べた。2 価および 3 価カチオンは、細胞の電気泳動度を低下させたが、1 価カチオンの場合、影響しなかった。細胞表面の疎水性は 3 価カチオンの添加により増加したが、1 価および 2 価カチオンでは変化しなかった。NaOS とカチオン混合系におけるこれらの生化学的表  
面パラメータの変化は、カチオン単独の場合と同様の傾向を示した。また、1 価カチオンとして  $\text{Na}^+$ 、2 価カチオンとして  $\text{Mg}^{2+}$  および 3 価カチオンとして  $\text{Al}^{3+}$  と  $\text{La}^{3+}$  を選び、NaOS との混合系について、それらの合計濃度を一定とし、両者の混合割合を変えて表面張力を調べたところ、NaOS と金属イオンのモル比が 2 価カチオンの場合約 2 : 1、3 価カチオンでは約 3 : 1 のときに表面張力がもっとも低下した。また、このとき、細胞内成分の漏出量も増加し、細胞膜の損傷・破壊が示唆された。

## 参考文献

- 1) M. T. Dyar and E. J. Ordal, *J. Bacteriol.*, **51**, 149 (1946).
- 2) D. L. Meggison and W. S. Mueller, *Appl. Microbiol.*, **4**, 119 (1956).
- 3) A. V. Few, A. R. Gilby and G. V. F. Seaman, *Biochim. Biophys. Acta*, **38**, 130 (1960).
- 4) D. A. Haydon, *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 457 (1961).
- 5) H. Schott, and C. Y. Young, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1797 (1973).
- 6) M. C. M. Van Loosdrecht, Jr., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa and A. J. B. Zehnder, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1898 (1987).
- 7) Y. E. Collins and G. Stotzky, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1592 (1992).
- 8) M. Rosenberg, D. Gutnick and E. Rosenberg, *FEMS Microbiol. Lett.*, **9**, 29 (1980).
- 9) T. El Moug, D. T. Dogers, J. R. Furr, B. M. A. El-Falaha and A. D. Russell, *J. Antimicrob. Chemother.*, **16**, 685 (1985).
- 10) B. M. A. El-Falaha, D. T. Rogers, J. R. Furr and A. D. Russell, *Int. J. Pharmaceut.*, **23**, 239 (1985).
- 11) N. Ismaeel, J. R. Furr and A. D. Russell, *J. Appl. Bacteriol.*, **61**, 373 (1986).
- 12) M. C. M. Van Loosdrecht, Jr., J. Lyklema, W. Norde, G. Schraa and A. J. B. Zehnder, *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 1893 (1987).
- 13) H. C. van der Mei, A. H. Weerkamp and H. J. Busscher, *J. Microbiol. Methods*, **6**, 277 (1987).
- 14) M. Lindahl, A. Faris, T. Wadstrom and S. Hjerten, *Biochim. Biophys. Acta*, **677**, 471 (1981).

- 15) P. Jansson and T. Wadstrom, *Curr. Microbiol.*, **8**, 347 (1983).
- 16) G. R. Dychdala and J. A. Lopes, *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 4th ed ( by S. S. Block), Lea and Febiger, Philadelphia (1991), p256.
- 17) W. B. Hugo, *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 2nd ed ( by A. D. Russell, W. B. Hugo, and G. A. J. Ayliffe ), Blackwell Scientific Publications, Oxford, (1992), p.187.
- 18) R. Lannigan and L. E. Bryan, *J. Antimicrob. Chemother.*, **15**, 559 (1985).
- 19) A. Lamikanra and M. C. Allwood, *J. Appl. Bacteriol.*, **42**, 379 (1977).
- 20) M. R. J. Salton, *J. Gen. Microbiol.*, **5**, 391 (1951).
- 21) A. R. Al-Najjar and L. B. Quesne, *J. Appl. Bacteriol.*, **47**, 469 (1979).
- 22) K. Kihara, N. Kito and T. Furuta, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **24**, 449 (1996).
- 23) Annual Book of ASTM Standards, Part 30, pp.208-211, American Society for Testing Materials, Philadelphia.
- 24) M. Miyake and K. Kurihara, *Biochim. Biophys. Acta*, **762**, 256 (1983).
- 25) M. T. Flanagan and T. R. Hesketh, *Biochim. Biophys. Acta*, **298**, 535 (1973).
- 26) K. Furusawa, H. Kakoki and H. Matsumura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **57**, 3413 (1984).
- 27) R. O. James and T. W. Healy, *J. Colloid Interface Sci.*, **40**, 65 (1972).
- 28) C. F. Baes, Jr. and R. E. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*. Krieger Publishing Company, Florida (1986).
- 29) J. J. Marianos, *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 4th ed. ( by S. S. Block ), Lea and Febiger, Philadelphia (1991), p.225.

- 30) H. Schott, and C. Y. Young, *J. Pharm. Sci.*, **61**, 182 (1972).
- 31) J. G. Voss, *J. Bacteriol.*, **86**, 207 (1963).
- 32) R. Dychdala, and J. A. Lopes, *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 4th ed. ( by S. S. Block ), Lea and Febiger, Philadelphia (1991), p.256.
- 33) M. S. Celik and P. Somasundaran, *J. Colloid Interface Sci.*, **122**, 163 (1988).
- 34) K. L. Stellner and J. F. Scamehorn, *Langmuir*, **1989**, 70.
- 35) A. Nakamura and K. Tajima, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **61**, 3807 (1988).

## 第Ⅲ編

# 抗菌性両親媒性分子の溶液 物性－殺菌活性の相関



# 第 1 章 抗菌性アニオン界面活性分子—金属イオン混合水溶液系の殺菌活性

## 1-1 緒言

各種界面活性剤の中でもカチオン界面活性剤，特に第四級アンモニウム塩は強い殺菌作用をもつため，消毒剤として広く利用されている<sup>1)</sup>。一方，アニオン界面活性剤はグラム陽性菌に対してはある程度有効であるが，グラム陰性菌に対する殺菌活性はほとんどない<sup>2)</sup>。また，アニオン界面活性剤は，pH の低下によりその活性が著しく強められることが知られており，海外では食品工業などの製造装置の洗浄・殺菌に酸性サニタイザー<sup>3)</sup>として一部利用されているが，広い分野で汎用的な殺菌剤あるいは消毒剤として用いられている例はほとんどない。さらに，多価金属イオンの共存下において殺菌力が強められることも報告されているが<sup>4-6)</sup>，これらの多価カチオンの影響について系統的に調べた報告はない。

そこで，本章においては，アニオン界面活性剤として 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを用い，各種の 1 価，2 価および 3 価カチオン共存下において，*Escherichia coli* に対するオクタンスルホン酸ナトリウムの殺菌活性を系統的に調べた<sup>7, 8)</sup>。



## 1-2 実験方法

### 1-2-1 試料

アニオン界面活性剤として 1-オクタンスルホン酸ナトリウム（以下，NaOS と略記する，東京化成）を用いた。各種金属塩および第四級アンモニウム塩は，第Ⅱ編の第 2，第 3 章と同じものを使用した。

### 1-2-2 殺菌力試験

試験液 4.5 ml に 0.5 ml の供試菌液（約  $10^7$  CFU/ml，供試菌の調製は第Ⅱ編の第 3 章を参照）を加え，20°C で 10 分間作用させた後，その 0.5 ml を採取し，4.5 ml の中和剤 [ポリソルベート 80（ノニオン OT-221，日本油脂）4 % + 大豆レシチン（試薬一級，片山化学）0.3 % + クエン酸三ナトリウム（試薬特級，片山化学）2.6 %，クエン酸（試薬特級，片山化学）で pH 7 に調整] と混合して，薬剤の作用を停止した。同じ中和剤で段階希釈し，ブイヨン寒天培地（第Ⅱ編第 3 章）に混釈培養（37°C，24 時間）することにより，生残菌数を測定した。各試験はいずれも 3 回繰り返し，それらの平均値で表した。殺菌活性（bactericidal activity）は， $\log(N_0/N)$  として表した。ここで， $N_0$ ， $N$  は，それぞれ供試菌数および試験液で処理後の生残菌数である。

試験液は実験の直前に調製し，必要に応じて塩酸または水酸化ナトリウムで pH を調整した。

### 1-3 結果

#### 1-3-1 NaOS と各種カチオン混合水溶液の殺菌活性

*E. coli* に対する NaOS の殺菌活性に及ぼす 1 価, 2 価および 3 価カチオンの影響を Fig. III-1-1 に示した。カチオン濃度に対して殺菌活性  $[\log(N_0/N)]$  をプロットして得られた 2 直線の交点を 20 mM NaOS 共存下における各カチオンの限界有効濃度(critical effective concentration) とし, カチオンの効果をこの値によって評価した。NaOS の殺菌活性の増強に関して, 限界有効濃度を基にしたカチオンの有効性の順序は,  $Fe^{3+} \cong Cr^{3+} \cong Al^{3+} \gg La^{3+} > Cu^{2+} \gg Pr_4N^+ > Zn^{2+} > Ni^{2+} > Mg^{2+} > NH_4^+ \cong Na \gg Me_4N^+$  であった。

本実験条件下において, NaOS が共存しない場合, 試験したカチオン自身に殺菌作用は認められなかった。ただし,  $Cu^{2+}$ ,  $Cr^{3+}$  および  $Fe^{3+}$  の 3 種のカチオンは高濃度 (10 mM) においてわずかに殺菌力を示した (データは省略)。つぎに, NaOS とカチオン ( $Na^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ ,  $La^{3+}$ ) の 2 成分混合系について, それらの合計濃度を一定にし, カチオンのモル分率を変えて *E. coli* に対する殺菌効果を調べた。その結果を Fig. III-1-2 に示す。NaOS- $Al^{3+}$ , NaOS- $La^{3+}$  および NaOS- $Mg^{2+}$  の 3 種の混合溶液は, 殺菌活性に極大が認められ, その極大点におけるカチオンのモル分率は, それぞれ, 0.27, 0.22 および 0.30 であった。しかし, NaOS と NaCl の場合, これらの合計濃度が 100 mM であっても活性はほとんど認められなかった。

### 1-3-2 NaOS—LaCl<sub>3</sub>混合系の殺菌活性に及ぼす供試菌数の影響

NaOS 濃度を 15 mM 一定にして、LaCl<sub>3</sub> を添加したときの混合水溶液の殺菌活性を供試菌数を変えて測定した (Fig. III-1-3)。少量の LaCl<sub>3</sub> 添加により殺菌活性は著しく増大し、モル比 (LaCl<sub>3</sub>/NaOS) が 1.0 以上で飽和した。この傾向は供試菌数が異なっても同様であった。なお、本試験条件下において、NaOS および LaCl<sub>3</sub> 単独ではほとんど殺菌活性が認められなかった。

### 1-3-3 NaOS の殺菌活性に及ぼす pH の影響

NaOS の殺菌活性に及ぼす pH の影響を Fig. III-1-4 に示した。NaOS の共存しない場合、pH 3—11 (HCl または NaOH で調整) の範囲で殺菌活性は認められなかったが、NaOS 共存下において、その範囲は 5—11 に縮小した。通常、多価金属イオンを含む溶液は酸性のものが多いが、この結果から、pH 5—11 の範囲において pH の影響は無視できると考えられる。

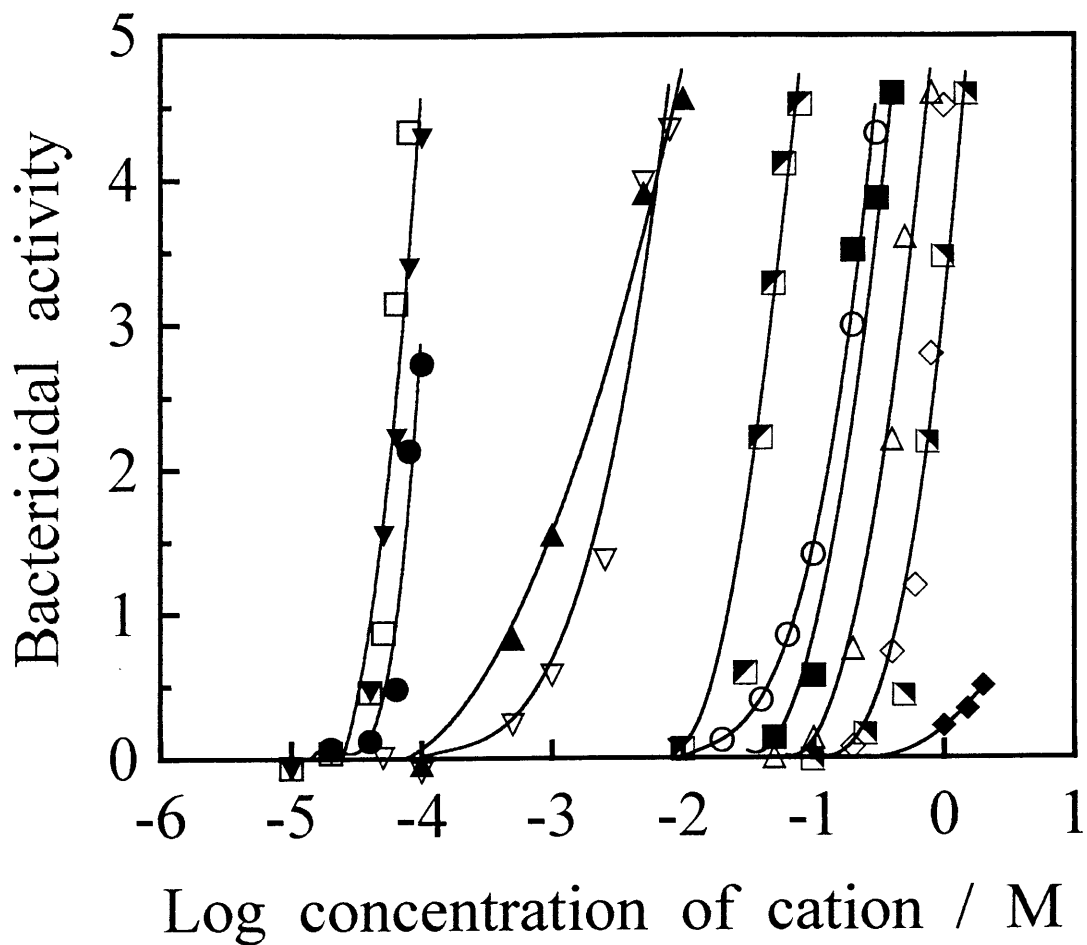


Fig. III-1-1 Effect of cations on the bactericidal activity of 20mM NaOS.  $\blacksquare$ , Na<sup>+</sup>;  $\triangle$ , Mg<sup>2+</sup>;  $\blacksquare$ , Ni<sup>2+</sup>;  $\circ$ , Zn<sup>2+</sup>;  $\nabla$ , Cu<sup>2+</sup>;  $\bullet$ , Al<sup>3+</sup>;  $\blacktriangle$ , La<sup>3+</sup>;  $\blacktriangledown$ , Fe<sup>3+</sup>;  $\square$ , Cr<sup>3+</sup>;  $\diamond$ , NH<sub>4</sub><sup>+</sup>;  $\blacklozenge$ , Me<sub>4</sub>N<sup>+</sup>;  $\blacksquare$ , Pr<sub>4</sub>N<sup>+</sup>



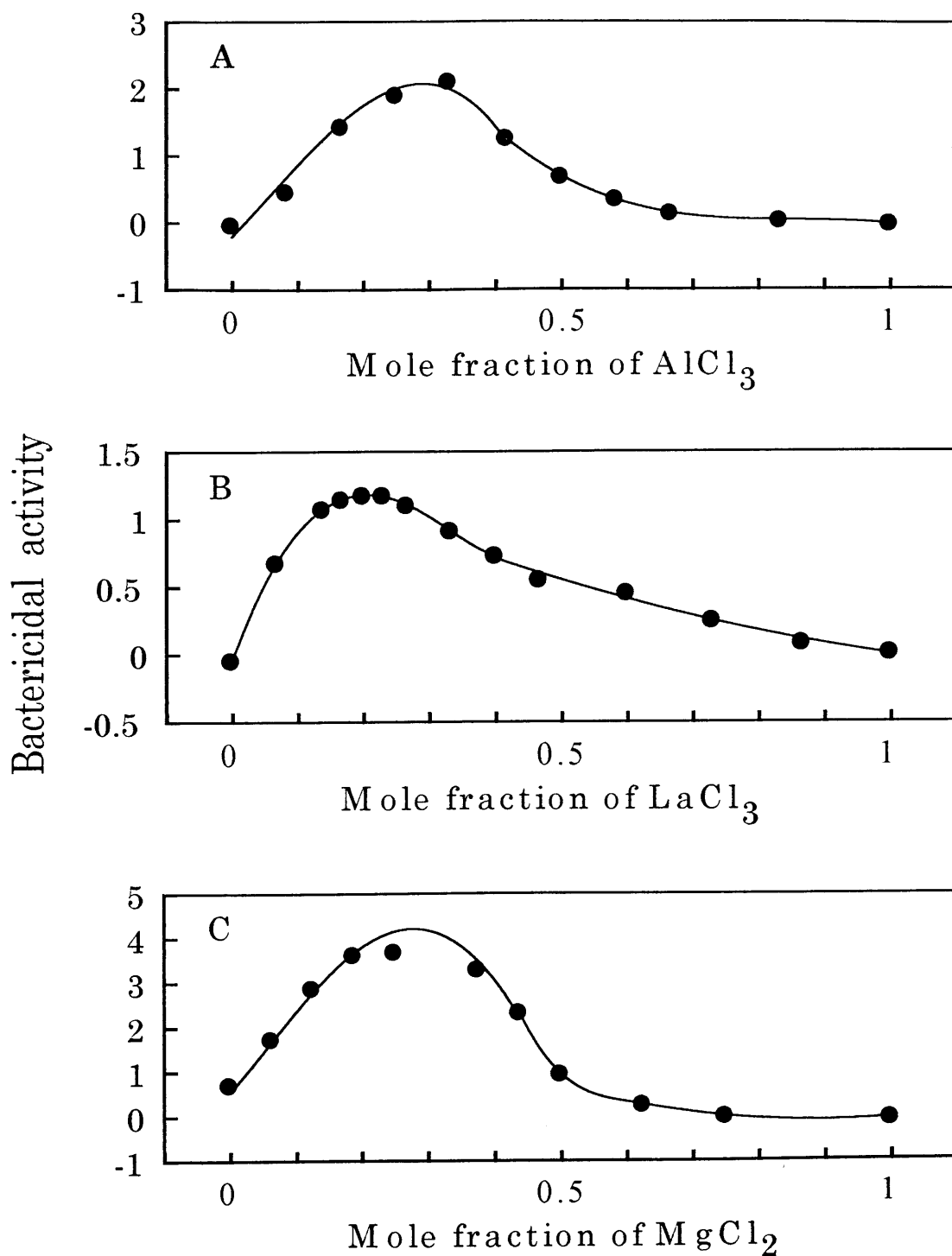


Fig. III-1-2 Bactericidal activity of the mixture of NaOS and polyvalent metal ions against *E.coli* at 20°C after 10 min incubation. Total concentration : A, 3mM ; B, 15mM ; C, 80mM.



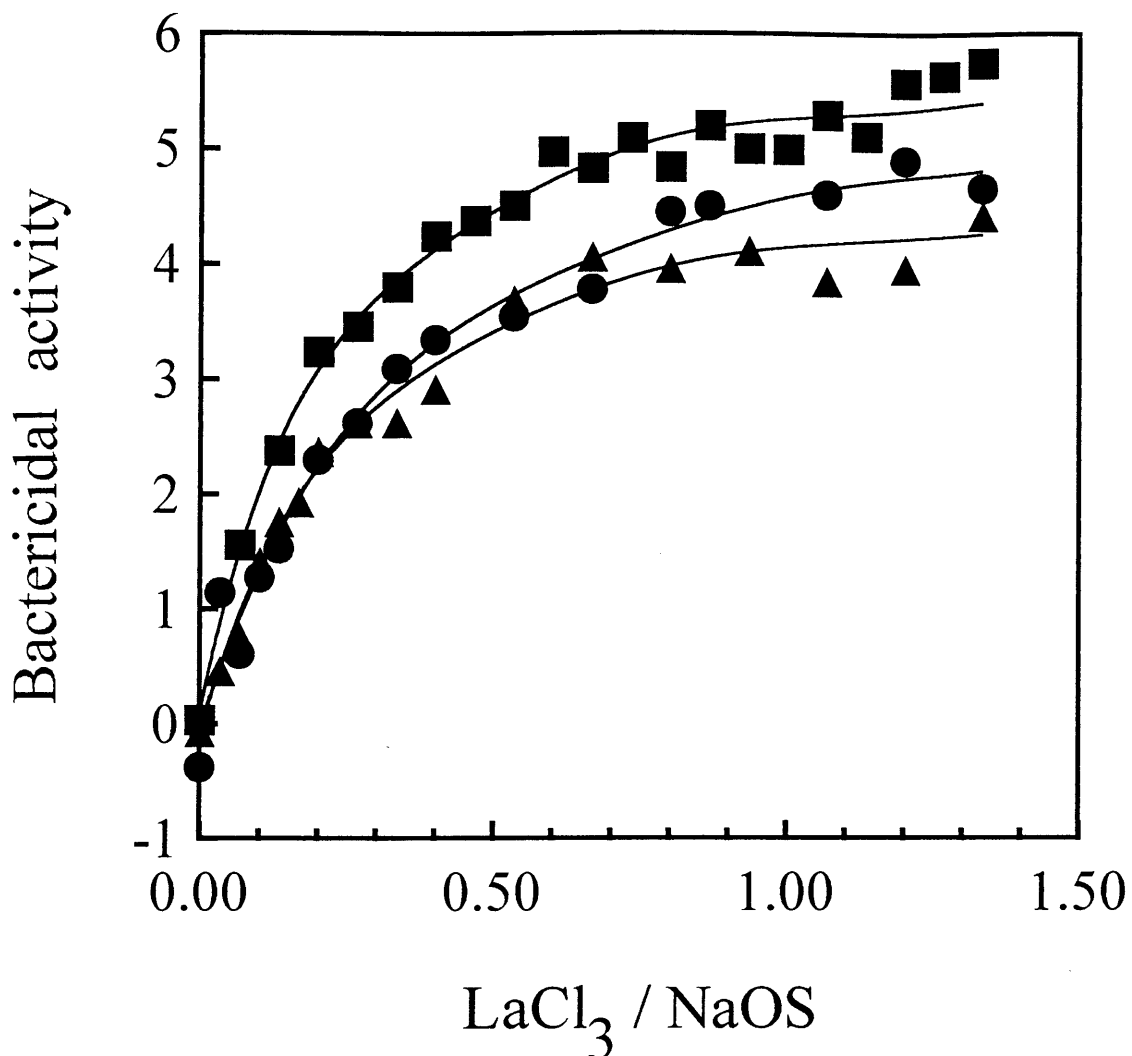


Fig. III-1-3 Relationship between bactericidal activity against *E.coli* and the molar ratio (  $\text{LaCl}_3/\text{NaOS}$  ) in the mixed aqueous solution of NaOS and  $\text{LaCl}_3$ . The concentration of NaOS was kept at 15 mM. Inoculum ( $N_0$ ) :  $\blacktriangle$ , ca.  $10^6$  CFU/ml;  $\bullet$ , ca.  $10^7$  CFU/ml;  $\blacksquare$ , ca.  $10^8$  CFU/ml.





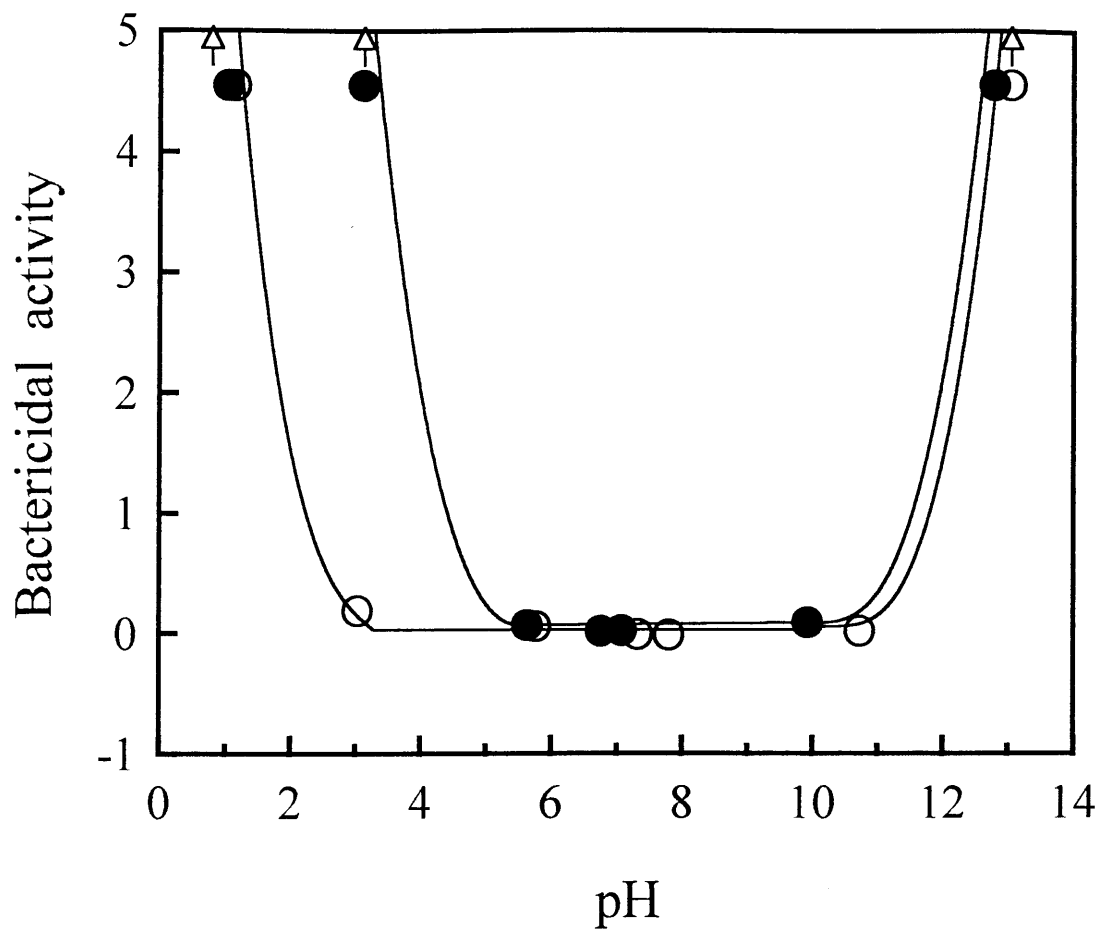


Fig. III-1-4 Effect of pH on the bactericidal activity in the absence and presence of NaOS. NaOS concentration : ○, 0 mM ; ●, 20 mM.



#### 1-4 考察

殺菌力試験において、クエン酸ナトリウムを含むポリソルベート 80/レシチン (P/L) を不活化剤として用いた。一般的に、P/L 混合物はカチオン系殺菌剤の不活化剤として用いられている<sup>9)</sup>。しかし、それは NaOS の不活化には有効であるが、NaOS-多価カチオン混合系に対しては効果がなかった。P/L にクエン酸ナトリウムを添加するとき、NaOS-多価カチオン混合系を有効に不活化し、また、*E. coli* に対する毒性も認められなかった（データは省略）。

金属イオン共存下におけるアニオン界面活性剤の殺菌活性に関する報告は少ない。2 価カチオンの添加は、分岐鎖型アルキルベンゼンスルホン酸ナトリウムの *Staphylococcus aureus* に対する抗菌力を高めたが、*E. coli* に対して効果がなかった<sup>5)</sup>。Berg と Zimmerer<sup>6)</sup> は、 $Mg^{2+}$  や希土類元素の  $La^{3+}$  がグラム陽性菌およびグラム陰性菌に対するアニオン界面活性剤の抗菌効果を強めることを認めた。同様の殺菌活性の増加が、多価カチオン共存下において NaOS 処理された *E. coli* 細胞に関する著者らの研究においても確認された<sup>7)</sup>。言い換えれば、NaOS 共存下におけるカチオンの限界有効濃度は、3 価  $\ll$  2 価  $<$  1 価カチオンの順に増加することがわかった (Fig. III-1-1)。  $La^{3+}$  による NaOS 活性の増強は、同じ 3 価カチオンである  $Fe^{3+}$ 、 $Cr^{3+}$  や  $Al^{3+}$  よりも低かった。アニオン界面活性剤は低 pH で抗菌活性を示すことが知られている<sup>3)</sup>。また、 $Fe^{3+}$ 、 $Cr^{3+}$  および  $Al^{3+}$  は、水溶液中において、強く加水分解され、 $La^{3+}$  より pH が低くなる<sup>10)</sup>。20 mM NaOS 共存下における限界有効濃度での  $Fe^{3+}$ 、 $Cr^{3+}$  および  $Al^{3+}$  の水溶液の pH は、約 4 であるが、 $La^{3+}$  の pH は約 6 であった。Fig. III-1-4 に見られるように、4 以下の pH の水溶液は NaOS 共存下において *E. coli* に対して殺菌的であったが、NaOS が共存しないときにはそうではなかった。したがって、 $La^{3+}$  と他の 3 価カチオンとの間における限界有効濃度の差は、それらの溶液の pH の差に起因すると考えられる。試験した 2 価カチオンの中で、 $Cu^{2+}$

は NaOS の殺菌活性を強めるうえでもっとも有効であった。この有効性は  $\text{Cu}^{2+}$  自身の毒性と関係していると考えられる<sup>11)</sup>。

殺菌活性の発現には、NaOS の細胞膜への吸着が第一段階となる。そこで、殺菌活性と脂質膜への吸着の関係を調べた。20 mM NaOS 共存下において *E. coli* を 99% 死滅させるのに必要なカチオン濃度 ( $C_{99}$ ) を Fig. III-1-1 から求め、これを殺菌活性とした。また、脂質膜への吸着は Fig. II-2-4 から算出した値をその指標とした (第 II 編第 2 章)。Fig. III-1-5 に  $\text{Log}(1/C_{99})$  と  $\Delta F_s$  の関係をプロットした。 $\text{Cu}^{2+}$  および  $\text{Al}^{3+}$  を除いて、NaOS の殺菌活性に及ぼす各種カチオンの効果は、1 価 < 2 価 << 3 価カチオンの順に強くなり、殺菌活性と脂質膜への吸着量の間には良い相関が認められた。 $\text{Cu}^{2+}$  および  $\text{Al}^{3+}$  による NaOS の著しい殺菌活性の増加は、それぞれ、上述した銅イオン自身の毒性および  $\text{AlCl}_3$  の加水分解による pH の低下が寄与していると考えられる。

つぎに NaOS と多価金属イオンの合計濃度を一定にして、それらの混合割合を変えて殺菌活性を調べたところ、その活性に極大が認められた (Fig. III-1-2)。この極大点におけるオクタンスルホン酸アニオンと金属イオンとのモル比は、第 II 編第 3 章において述べた表面張力の極小点 (Fig. II-3-1) および細胞内成分の漏出量の極大点 (Fig. II-3-10) におけるモル比と非常によく一致すること、また、NaOS の脂質膜への吸着が多価金属イオンの共存により増加すること (第 II 編第 2 章) から、NaOS と多価金属イオンによって生成した複合体による細胞膜の破壊が殺菌活性発現に深く関与していると考えられる。

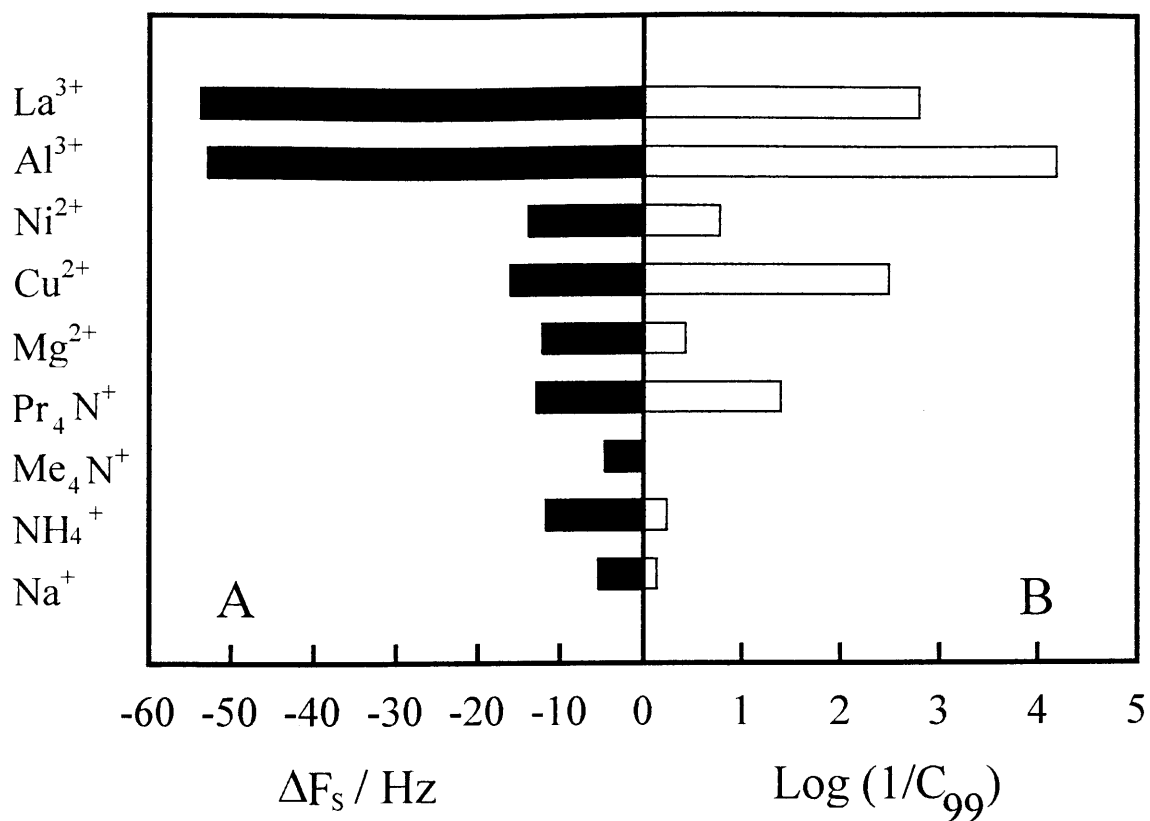


Fig. III-1-5 Relation between (A) specific frequency changes  $\Delta F_s$  or (B) bactericidal activity  $\log(1/C_{99})$  against *E. coli* and various cations. The various cations (0.18 mM) were injected into the 0.35 mM NaOS aqueous solution in (A).  $C_{99}$  in (B) is the minimum concentration of cations at which 99% *E. coli* die in the presence of 20 mM NaOS.



NaOS-LaCl<sub>3</sub>混合系において、それらの混合比に対応して、3:1, 2:1 および 1:1 複合体が形成することを明らかにした(第II編第1章)。これらの複合体形成はつぎのように表すことができる。

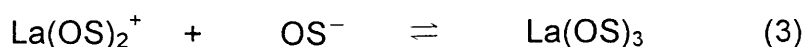
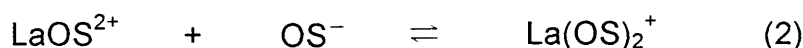
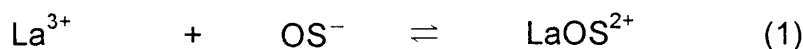


Fig. II-1-7 に示したように、LaCl<sub>3</sub>濃度が低いとき、3:1 複合体 [ La(OS)<sub>3</sub> ] が生成し、LaCl<sub>3</sub>濃度の増加に伴って、2:1 複合体 [ La(OS)<sub>2</sub><sup>+</sup> ], つぎに 1:1 複合体 [ La(OS)<sup>2+</sup> ] の順に増加する。しかし、これらの複合体の分布曲線 ( Fig. II-1-7 の x<sub>I</sub>, x<sub>II</sub> および x<sub>III</sub> ) は、いずれも、*E. coli* に対する NaOS-LaCl<sub>3</sub> 混合水溶液の殺菌活性曲線 ( Fig. III-1-4 ) と相似的でないことがわかる。これは3種の複合体のうち1種のみが殺菌活性をもっているのではないことを示唆している。

そこで、今、NaOS-LaCl<sub>3</sub> 混合水溶液中に存在する複合体が、それぞれ異なった殺菌活性をもっていて、全体としての殺菌活性は、それらの和であると仮定すると、全殺菌活性曲線は ( f x<sub>I</sub> + g x<sub>II</sub> + h x<sub>III</sub> ) に比例すると考えられる。ここで、f, g および h は、それぞれ、1:1, 2:1 および 3:1 複合体のモル当たりの殺菌活性である。f:g:h を種々仮定して全殺菌活性曲線を計算し、Fig. III-1-4 と比較した。f:g:h = 2/3:2/3:1 のとき殺菌活性曲線 ( Fig. III-1-6 ) は、Fig. III-1-3 の実験曲線に相似적であった。これらのことより、3:1 複合体がもっとも強い殺菌活性をもっていて、1:1 複合体と 2:1 複合体のそれは同程度であると推測される。

薬物の抗菌活性はその疎水性と密接な関係があることが指摘されており、消毒剤に関しても分配係数などの疎水性パラメータを用いて、殺菌活性との関連性が調べられている<sup>12-14)</sup>。NaOS-LaCl<sub>3</sub> 混合水溶液中に形成される複合体の





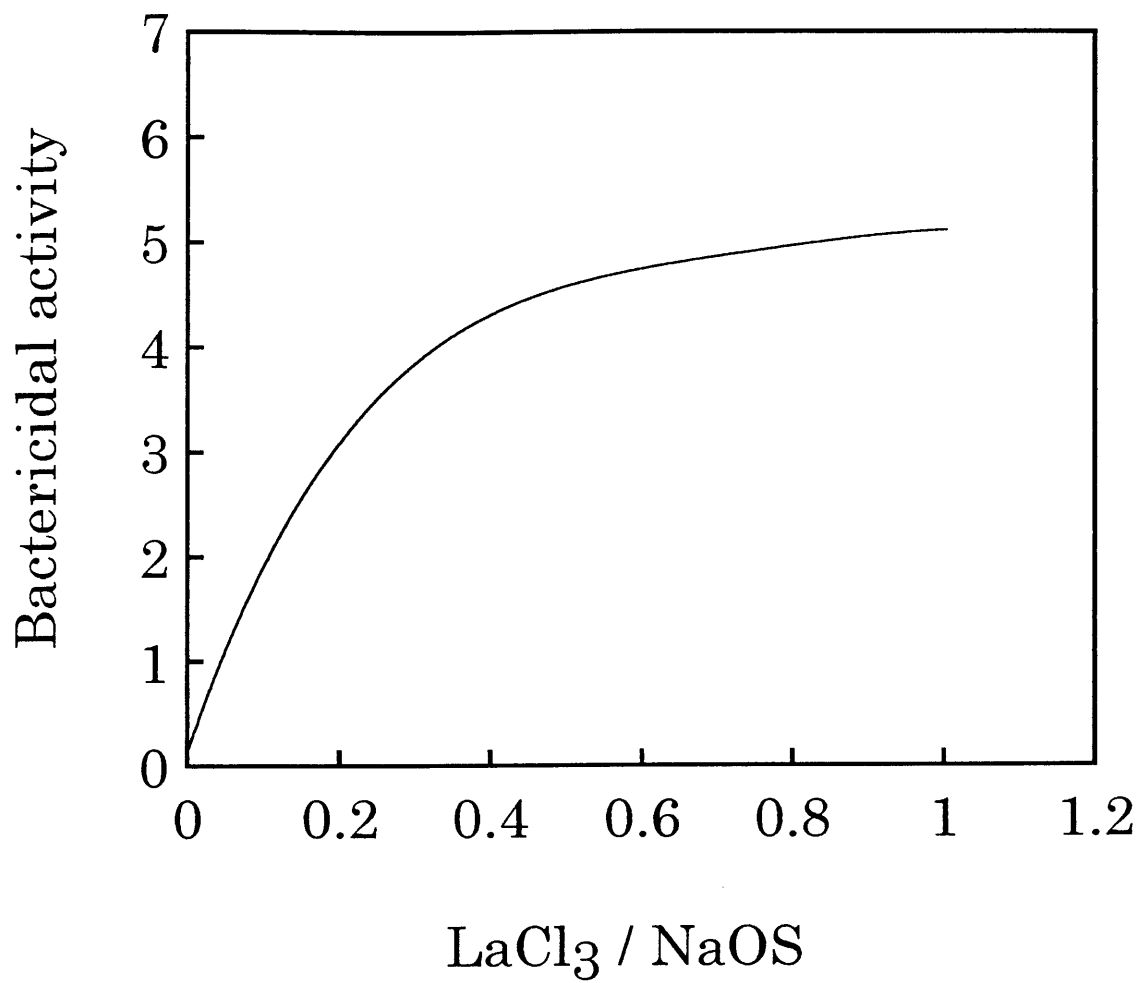


Fig. III-1-6 Calculated curve of bactericidal activity in Fig. III-1-3 (Inoculum : ca.  $10^8$  CFU/ml).



組成から、その疎水性を推測すると、3:1複合体 > 2:1複合体 > 1:1複合体の順である。複合体の疎水性が大きいほど、細胞膜への吸着が容易になり、結果的に大きい殺菌力をもつと考えられる。3:1複合体と2:1複合体との間にみられる殺菌活性の相違は、この疎水性の順序と一致している。しかし、1:1複合体と2:1複合体との間には、疎水性から予測されるような殺菌活性の差がみられなかった。この事実は、殺菌活性が単に複合体の疎水性のみで決まるのではないことを示唆している。複合体の正電荷と *E.coli* 表面の負電荷との間に働く静電引力も複合体の吸着を促進するように作用していると考えられる。この静電引力は複合体のもつ電荷の大きさに従って、3:1複合体 < 2:1複合体 < 1:1複合体の順に増加すると考えられ、上述の疎水性の順とは逆である。複合体の細胞膜への作用機構においては、複合体の疎水性と静電引力の両者の作用が同時に働いていると考えられる。それらの和が1:1複合体と2:1複合体では、ほぼ同じであるために殺菌活性に差が生じないものと推測される。 $\text{La}^{3+}$ 単独では殺菌活性を示さないことから、単に負電荷の細胞膜への吸着が重要ではなく、吸着に伴って疎水性の炭化水素鎖部が細胞膜内部へ侵入し、膜構造の秩序性を破壊することが、殺菌活性を引き起こすために必要な機作と考えられる。したがって、細胞膜表面へ吸着した複合体数と複合体の炭化水素鎖部（疎水部）がもつ破壊力との積が、殺菌活性の大きさに比例すると推測される。他方、疎水性の増大および電荷の減少は複合体同士の凝集力を増して、水溶液中にポリ複合体として沈殿させる傾向を増し、結果的に殺菌力を低下させると考えられる。したがって、複合体を構成する陰イオン界面活性剤の分子構造を選択することにより、凝集力を調節することが要求される。この観点からも、陰イオン界面活性剤の分子構造と殺菌力との関連を系統的にさらに研究することが望まれる。

## 1-5 結論

各種カチオン共存下において、*E. coli* に対する NaOS の殺菌活性を調べた。試験したカチオンの中で、 $\text{Al}^{3+}$  や  $\text{La}^{3+}$  のような 3 価カチオンは、非常に低濃度（0.1~1 mM）で NaOS の殺菌活性を増強した。2 価カチオンは 3 価カチオンと同等の活性を得るためには高濃度（>100 mM）であることが必要であった。1 価カチオンには NaOS の殺菌活性を強める作用はなかった。また、1 価カチオンとして  $\text{Na}^+$ 、2 価カチオンとして  $\text{Mg}^{2+}$  および 3 価カチオンとして  $\text{Al}^{3+}$  と  $\text{La}^{3+}$  を選び、NaOS との混合系について、それらの合計濃度を一定とし、両者の混合割合を変えて *E. coli* に対する殺菌効果を調べたところ、NaOS と金属イオンのモル比が、2 価カチオンの場合約 2 : 1、3 価カチオンでは約 3 : 1 のときに殺菌活性が強く発現した。

## 参考文献

- 1) J. J. Marianos, *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 4th ed ( by S. S. Block ), Lea and Febiger, Philadelphia (1991), p.225.
- 2) Z. Baker, R. W. Harrison and B. F. Miller, *J. Exp. Med.*, **74**, 611 (1941).
- 3) G. R. Dychdala and J. A. Lopes, *Disinfection, Sterilization and Preservation*, 4th ed. ( by S. S. Block ), Lea and Febiger, Philadelphia (1991), p256.
- 4) H. Schott, and C. Y. Young, *J. Pharm. Sci.*, **62**, 1797 (1973).
- 5) J. G. Voss, *J. Bacteriol.*, **86**, 207 (1963).
- 6) R. W. Berg and R. E. Zimmerer, *J. Ind. Microbiol.*, **1**, 377 (1987).
- 7) K. Kihara, N. Kito, and T. Furuta, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **24**, 449 (1996).
- 8) K. Kihara, N. Kito and T. Furuta, *Biocontrol Science*, **2**, 13 (1997).
- 9) A. D. Russel, *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization* ( by A. D. Russell, W. B. Hugo and G. A. J. Ayliffe ), Blackwell Scientific Publications, London (1982), p107.
- 10) C. F. Baes, Jr. and R. E. Mesmer, *The Hydrolysis of Cations*, Krieger Publishing Company, Florida (1986).
- 11) W. B. Hugo and A. D. Russell, *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilisation* ( by A. D. Russell, W. B. Hugo and G. A. J. Ayliffe), Blackwell Scientific Publications, London (1982), p.8.
- 12) H.Kourai, M.Takechi and T.Horie, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **13**, 245 (1985)
- 13) T.Furuta and K.Kihara, *Chem.Pharm.Bull.*, **40**, 1309 (1992).

- 14) Y.Okahata, X.Ye, A.Shimizu and H.Ebato, *Thin Solid Films*, **180**, 51 (1989).

## 第2章 抗菌性カチオン界面活性分子の会合体形成と至適殺菌濃度

### 2-1 緒言

古田ら<sup>1)</sup>は、汚染された10%塩化ベンザルコニウム(BAC)製剤から分離した菌株の生存性に関する研究において、その菌が低濃度は言うまでもなく、高濃度においても生存すること、すなわち、殺菌活性に至適濃度が存在することを報告した。

この事実から、著者は他の第四級アンモニウム塩(QAC)と細菌の間に存在する濃度と殺菌活性の関係(たとえば、濃度増加とともに殺菌活性が増大するという関係)に疑問を抱いた。そして、消毒剤に対する細菌の抵抗性メカニズムを検討するうえで、細菌の細胞特性と同様に消毒剤自身の性質も考慮する必要があると考え、高濃度のQAC中における細菌の生存性に興味をもった。また、実用上の観点から、最適濃度範囲の設定が重要であると思われた。

多くの研究者<sup>2-9)</sup>は、QACのコロイド的性質、あるいは疎水性と抗菌活性との関連性を検討したが、ほとんどが低濃度領域における報告であり、高濃度領域を含む広い濃度範囲で系統的に調べたものはない。

本研究において、異なるタイプのQACおよび臭化アルキルトリメチルアンモニウムの同族体( $\text{RN}(\text{CH}_3)_3\text{Br}$ )を用いて、QACの殺菌活性と濃度との関係を調べ、QACの殺菌活性の濃度依存性をそのコロイド化学的性質と関連づけた<sup>10)</sup>。



## 2-2 実験方法

### 2-2-1 試料

試薬級 (>98 %) の QAC として、ヘキシル、オクチル、デシル、ドデシル、テトラデシルおよびヘキサデシル基を有する臭化アルキルトリメチルアンモニウム ( $C_n$ TAB), 臭化ジデシルジメチルアンモニウム (DDAB), 塩化ドデシルピリジニウム ( $C_{12}$ PC) (以上, 東京化成) および塩化ヘキサデシルピリジニウム ( $C_{16}$ PC, 和光純薬) を, 工業品級の QAC として, 塩化ベンザルコニウム (BAC, カチオン F2-50, 50 %, 日本油脂), 塩化ベンゼトニウム (BEC, ハイアミン 1622, >99 %, ロームアンドハース) および塩化ジデシルジメチルアンモニウム (DDAC, 50 %, 10 % エタノール含有, 三洋化成) を用いた。

### 2-2-2 試験菌と培養条件

*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028 および *Alcaligenes xylosoxidans* No.9<sup>1)</sup> (汚染された市販の 10 % 塩化ベンザルコニウム製剤から分離) を供試菌として用いた。各細菌は液体ブイヨンの標準濃度の 1/20 濃度 (1.5 g/L, 日水製薬) で, 25°C, 48 時間, 振盪培養したものを, そのまま供試菌液として用いた。通常の培養条件と比較して, 貧栄養および低温の培養条件は, 薬剤に対する感受性を低下させることが知られている<sup>11,12)</sup>。

### 2-2-3 殺菌力試験

QAC の殺菌活性は、定性的および定量的懸濁法<sup>13)</sup> の 2 種類の方法によって調べた。

定性的懸濁法では、滅菌蒸留水に溶かした各濃度の QAC 水溶液 4.5 ml に供試菌液 0.5 ml を加え、0, 20 または 25°C の恒温槽中で保持した。一定時間作用後、各混合液から無菌的に 0.025 ml を取り出し、ただちに、中和剤（4% ポリソルベート 80 + 0.3% レシチン）を含むブイヨン液体培地と混合した。30°C、48 時間培養後、細菌の生存を培地の濁りから目視判定により決定した。

定量的懸濁法では、試験液 4.5 ml と供試菌液 0.5 ml の混合液を、*A. xylosoxidans* に対して 25°C で 10 分 または 他の細菌に対して 0 °C で 30 秒作用させ、混合溶液の 0.5 ml を中和剤（6% ポリソルベート 80 + 2% レシチン）4.5 ml と混合した。その後、ただちに、他の中和剤（4% ポリソルベート 80 + 0.3% レシチン）で段階希釈した。各希釈液の 0.5 ml を 4% ポリソルベート 80 と 0.3% レシチンを含むブイヨン寒天培地で混釈培養（25 °C、48 時間）し、生残菌数を求めた。

殺菌活性は対数減少値  $\log (N_0/N)$  として表した。ここで、 $N_0$  および  $N$  は、それぞれ、蒸留水および QAC 溶液に作用後の生残菌数である。

## 2-3 結果

QAC の濃度と殺菌活性の関係において、極大値の存在を明らかにするために、試験菌を各種濃度の QAC 溶液に作用させた。作用時間と温度を変えて試験したところ、QAC に対する感受性は各試験菌によって異なった。

定性的懸濁法による結果を Table III-2-1, III-2-2 および III-2-3 に示した。Table III-2-1 は *A. xylosoxidans* No.9 (BAC に強い抵抗性のある菌株) に対する DDAC の 20 および 25°C における殺菌活性を表している。20°C では、0.001 ~ 10 % (w/v) の全濃度範囲で細菌の生存が確認されたが、25°C では、温度効果のために 0.05 ~ 0.1 % (w/v) の濃度範囲で死滅した。Table III-2-2 および III-2-3 は、*E. coli* および *S. typhimurium* に対する 3 種の QAC (DDAC, BAC, BEC) についての 0°C における結果である。一般的に、これらの細菌は QAC に対する感受性が高く、室温において急速に死滅するが、低温において BEC の高濃度領域で生存した。しかし、BAC および DDAC では死滅した。

Table III-2-1 Effect of concentration and exposure time on bactericidal activity of didecyldimethylammonium chloride against *A. xylosoxidans* at 20 and 25° C.

Temperature (°C)	Exposure time (min)	Concentration % (w/v)								
		0.001	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10
20	1	+ <sup>1)</sup>	+	+	+	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25	1	+	+	+	- <sup>1)</sup>	+	+	+	+	+
	5	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	10	+	+	+	-	-	+	+	+	+
	20	+	+	+	-	-	+	-	+	-

1) +, growth ; -, no growth

QAC の殺菌活性の濃度依存性を供試菌として *P. aeruginosa* および *A. xylosoxidans* を用いて定量的懸濁法によって詳細に調べた。Fig. III-2-1 は 比較的 QAC に抵抗性の *P. aeruginosa* に対する DDAC, BAC および BEC の殺菌活性を温度 0°C, 作用時間 30 秒で試験した結果である。濃度に対する殺菌活性の関係において, 各 QAC で極大が観察された。他の 4 種の QAC について, *A. xylosoxidans* に対する 25°C における濃度依存性の結果を Fig. III-2-2 に示す。DDAB, C<sub>16</sub>PC および C<sub>16</sub>TAB の 3 種の QAC は, 0.1% 付近で明確に最大活性が認められた。しかし, C<sub>12</sub>PC の場合, この化合物の高濃度における殺菌活性

Table III-2-2 Effect of concentration and exposure time on bactericidal activity of quaternary ammonium compounds against *E. coli* at 0°C.

Quaternary ammonium compounds	Exposure time (s)	Concentration %(w/v)								
		0.001	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10
DDAC	15	+ <sup>1)</sup>	+	- <sup>1)</sup>	-	-	-	-	-	-
	30	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	60	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	300	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BAC	15	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	30	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	60	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	300	+	+	+	-	-	-	-	-	-
BEC	15	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	30	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	60	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	300	+	+	+	-	-	-	-	-	-

1) +, growth ; -, no growth

の中和が不十分であるため、極大の存在が明瞭ではなかった。この C<sub>12</sub>PC と C<sub>16</sub>PC の殺菌活性の違いは、極大が QAC のアルキル鎖長に依存することを示唆している。それゆえ、C<sub>n</sub>TAB の同族体を用いて、同様に殺菌活性の濃度依存性を調べた (Fig. III-2-3)。期待されるように、極大が存在し、その殺菌濃度は QAC のアルキル鎖長に依存した。極大は長いアルキル鎖長の C<sub>16</sub>TAB, C<sub>14</sub>TAB および C<sub>12</sub>TAB で認められたが、より短い C<sub>10</sub>, C<sub>8</sub> および C<sub>6</sub> のアルキル鎖をもつ C<sub>n</sub>TAB では観察されなかった。殺菌活性の極大点における濃度は、アルキル鎖長が長くなるほど、低濃度側へシフトした。

Table III-2-3 Effect of concentration and exposure time on bactericidal activity of quaternary ammonium compounds against *S. typhimurium* at 0°C.

Quaternary ammonium compounds	Exposure time (s)	Concentration % (w/v)								
		0.001	0.005	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10
DDAC	15	+ <sup>1)</sup>	+	+ <sup>1)</sup>	-	-	-	-	-	-
	30	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	60	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	300	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BAC	15	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	30	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	60	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	300	+	+	+	-	-	-	-	-	-
BEC	15	+	+	+	+	+	-	-	+	+
	30	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	60	+	+	+	-	-	-	-	+	+
	300	+	+	+	-	-	-	-	-	-

+, growth ; -, no growth

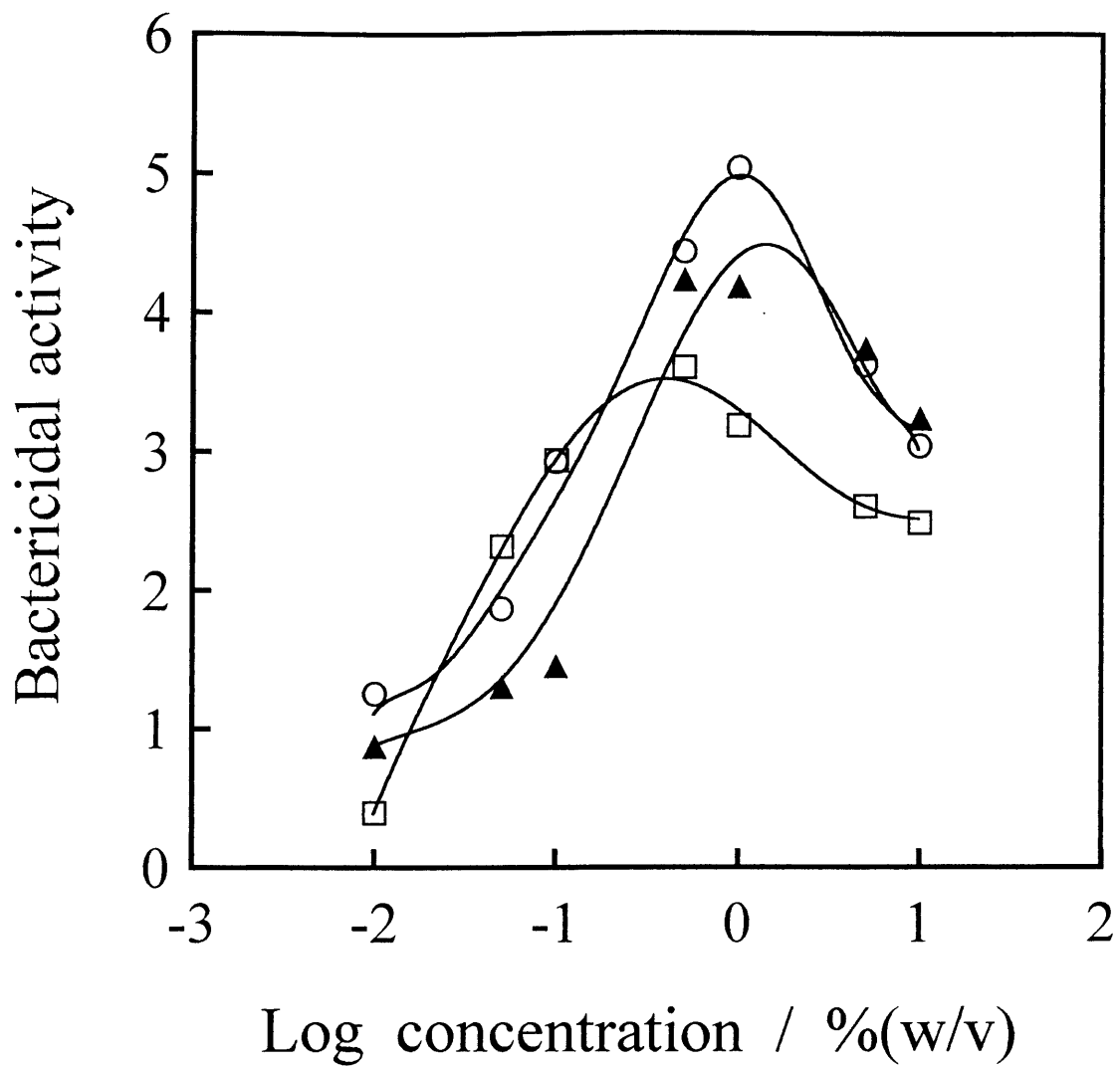


Fig. III-2-1 Concentration dependence of bactericidal activity of quaternary ammonium compounds against *P. aeruginosa* at 0°C after 30-s exposure. O, DDAC ; ▲, BAC ; □, BEC.



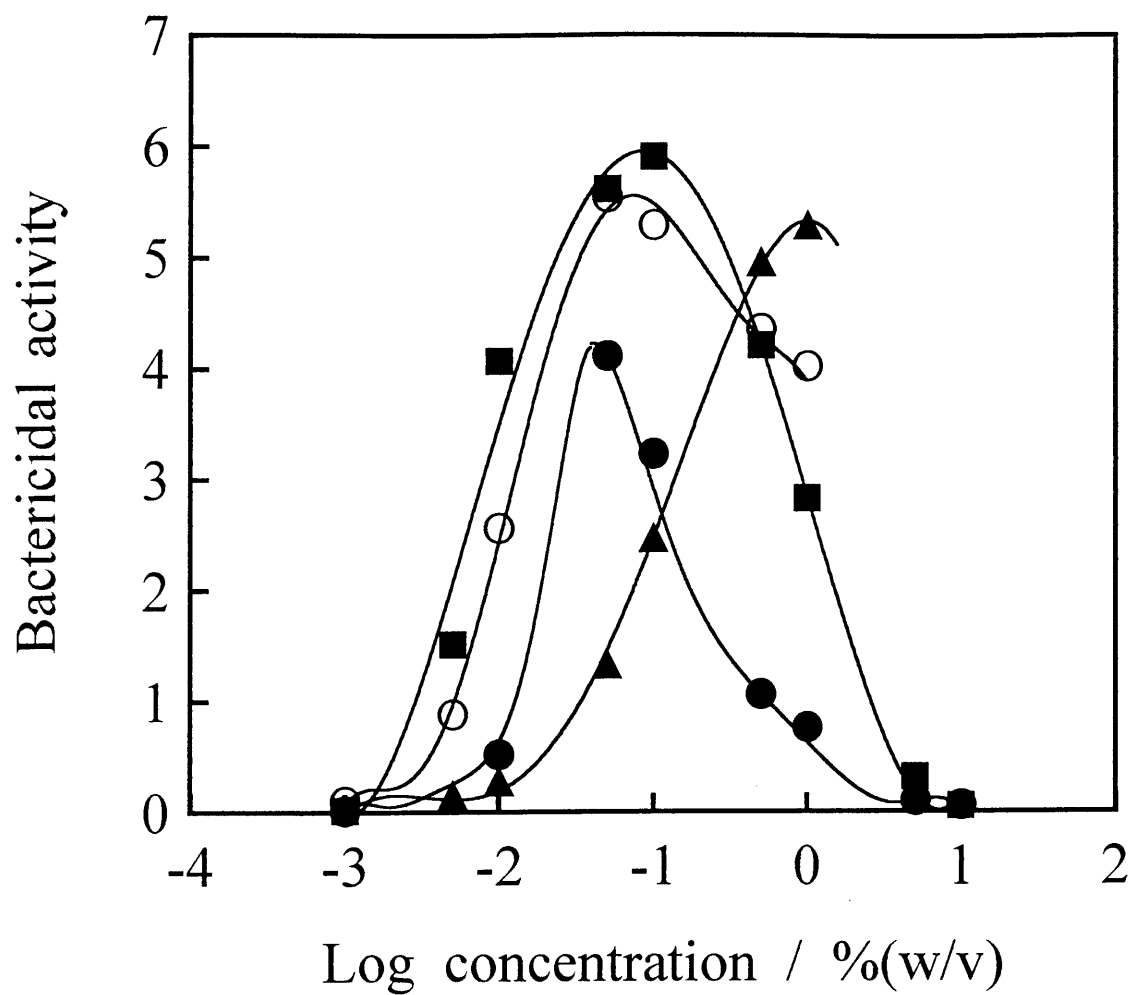


Fig. III-2-2 Concentration dependence of bactericidal activity of quaternary ammonium compounds against *A. xylosoxidans* at 25°C after 10-min exposure. ■, C<sub>16</sub>PC ; ▲, C<sub>12</sub>PC ; ○, DDAB ; ●, C<sub>16</sub>TAB.





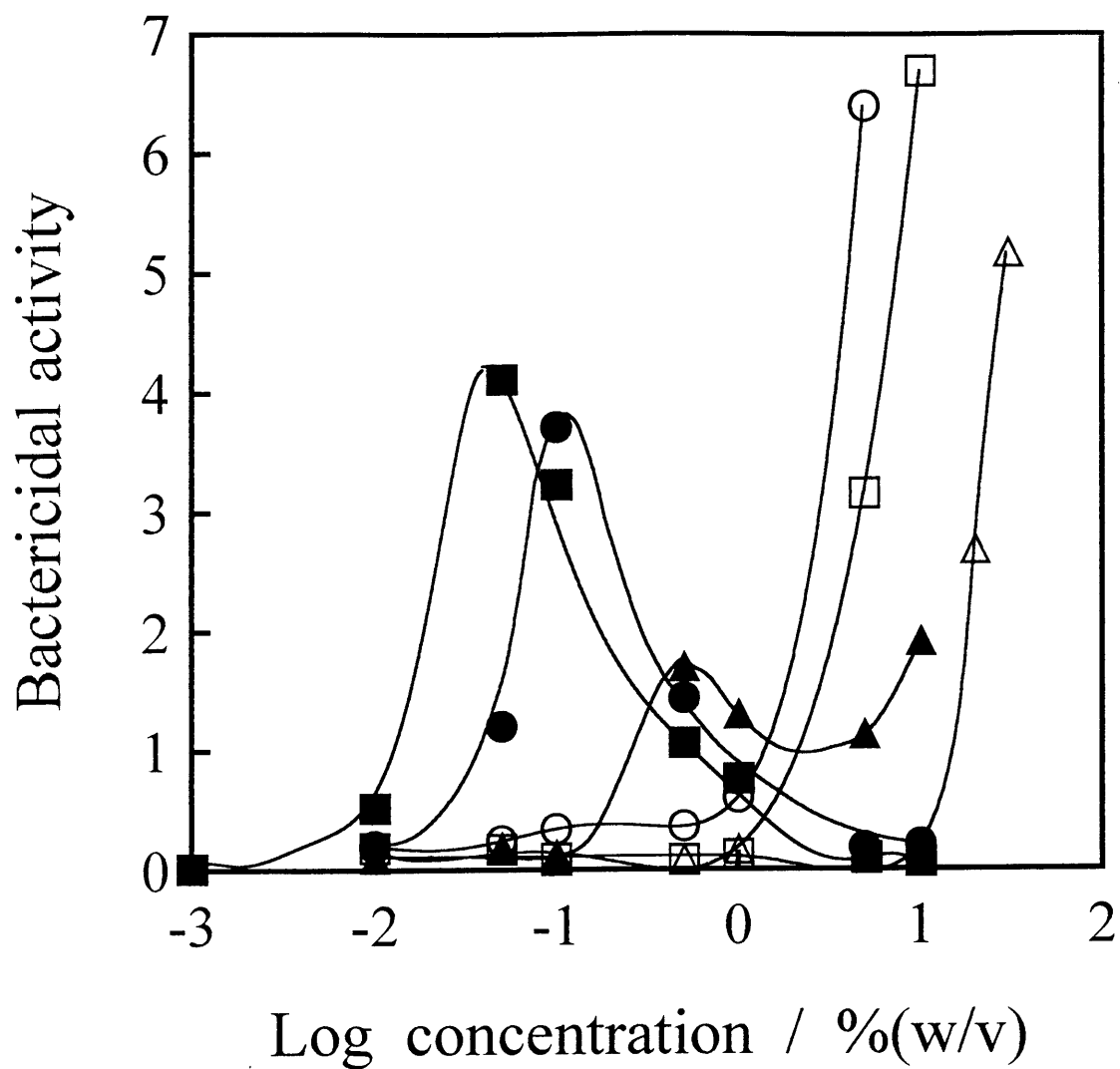


Fig. III-2-3 Concentration dependence of bactericidal activity of alkyltrimethyl ammonium salts against *A. xylosoxidans* at 25° C after 10-min exposure.

■, C<sub>16</sub>TAB : ●, C<sub>14</sub>TAB : ▲, C<sub>12</sub>TAB : ○, C<sub>10</sub>TAB : □, C<sub>8</sub>TAB : △, C<sub>6</sub>TAB.



## 2-4 考察

一般に、化学薬剤の抗菌活性は、外部環境や細菌自身の性質および培養条件に依存することが知られている<sup>14,15)</sup>。殺菌力試験において、著者は細菌の薬剤に対する感受性を低下させるために、試験液温度を下げるとともに、作用時間を短縮した。予想されるように、濃度を変えて 0°C, 30 秒の試験条件で、*E. coli*, *S. typhimurium* および *P. aeruginosa* のような一般的な感受性細菌に対して殺菌活性に極大が観察された (Table III-2-2, Table III-2-3, Fig. III-2-1)。このように、温度と作用時間のような条件を注意深く制御することにより殺菌活性の極大の存在を検出できる。これらの結果は極大の存在が菌種ではなく、QAC 自身もつ固有の性質に関係することを示している。

そこで、供試菌として *A. xylosoxidans* を用いて、殺菌活性の濃度依存性におよぼす QAC の分子構造、とくにアルキル鎖長の影響について詳細に検討した。殺菌活性の極大点における  $C_n$ TAB 濃度 ( $C_{max}$ )、または  $C_{max}$  における殺菌活性の強さ ( $RF_{max}$ ) とアルキル基の炭素数との関係を Fig. III-2-4 に示した。

$C_n$ TAB の  $C_{max}$  は炭素数の増加とともに低濃度側にシフトした。本実験で用いた中和剤は、1.0 % (w/v) 以上の  $C_{12}$ PC 濃度で、この薬剤の殺菌活性を中和できなかったが、もし、適切な中和が実施できるならば、同様に極大の存在を明らかにできるものと考えられる。また、 $RF_{max}$  もアルキル鎖の増加とともに大きくなった。この結果は、他の研究者<sup>7,8,16)</sup> によって報告された希薄水溶液中 (CMC 以下の濃度) における抗菌活性におよぼすアルキル鎖の影響に類似している。一方、 $C_{12}$ PC および  $C_{16}$ PC の  $RF_{max}$  値はほぼ同じであった。この理由は明らかではないが、アルキル鎖長以外の要因 (たとえば、親水基) が  $RF_{max}$  に関与している可能性がある。

長鎖アルキル基を有する QAC のような界面活性剤は、CMC で会合する。言い換えれば、モノマー (非会合分子) 濃度は CMC 以上で一定であると考えら

れる。また、薬物による殺菌過程において、細菌表面への吸着は、第1段階として、もっとも重要な因子の1つであり、さらにそれはモノマー濃度に依存すると考えられる。

Tomlinson ら<sup>7)</sup> は、塩化アルキルジメチルベンジルアンモニウムの殺菌活性におよぼすコロイド会合の影響を研究し、ミセル形成の重要性を明らかにした。

CMC 以下において、水溶液中および細胞表面に存在するモノマーの間には、

$$[\text{monomer}]_{\text{solution}} = [\text{monomer}]_{\text{cell}}$$

の平衡が成り立つ。ここで、 $[\text{monomer}]_{\text{solution}}$  および  $[\text{monomer}]_{\text{cell}}$  は、それぞれ、水溶液中および細胞表面に存在するモノマー濃度を表す。このモノマーの化学種が殺菌活性に寄与すると考えられる。水溶液中のモノマー濃度は QAC 濃度の増加とともに増加し、その結果、細胞への吸着が増加する。

一方、CMC 以上で、モノマーは細胞とミセルの間で競争吸着がおこる。

$$[\text{micelle}] = [\text{monomer}]_{\text{solution}} = [\text{monomer}]_{\text{cell}}$$

したがって、ミセル形成により水溶液中のモノマー濃度が抑制される結果、水溶液と細胞間平衡が変化し、殺菌活性に寄与するモノマー量が減少する。

Sexsmith と White<sup>17,18)</sup> は、QAC のミセル水溶液に質量作用の法則を適用することにより、非会合の QAC 濃度を見積もった。そして、水溶液中の全 QAC 濃度が増加するとき、モノマー濃度に極大が存在し、この極大が CMC 付近で起こることを報告した。

Deluca と Kostenbauder<sup>3)</sup> は、メチルセルロースやポリソルベート 80 のような非イオン性基質への C<sub>16</sub>PC の結合が C<sub>16</sub>PC 濃度に強く依存し、結合量が CMC 領域で極大を示すことを明らかにした。

カチオン界面活性剤水溶液の CMC 付近において、モノマー濃度に極大が存在するという事は、殺菌力に関する著者らの実験結果を説明するうえで非常に有用である。そこで、カチオン界面活性剤の CMC と C<sub>max</sub> の関係を調べた結

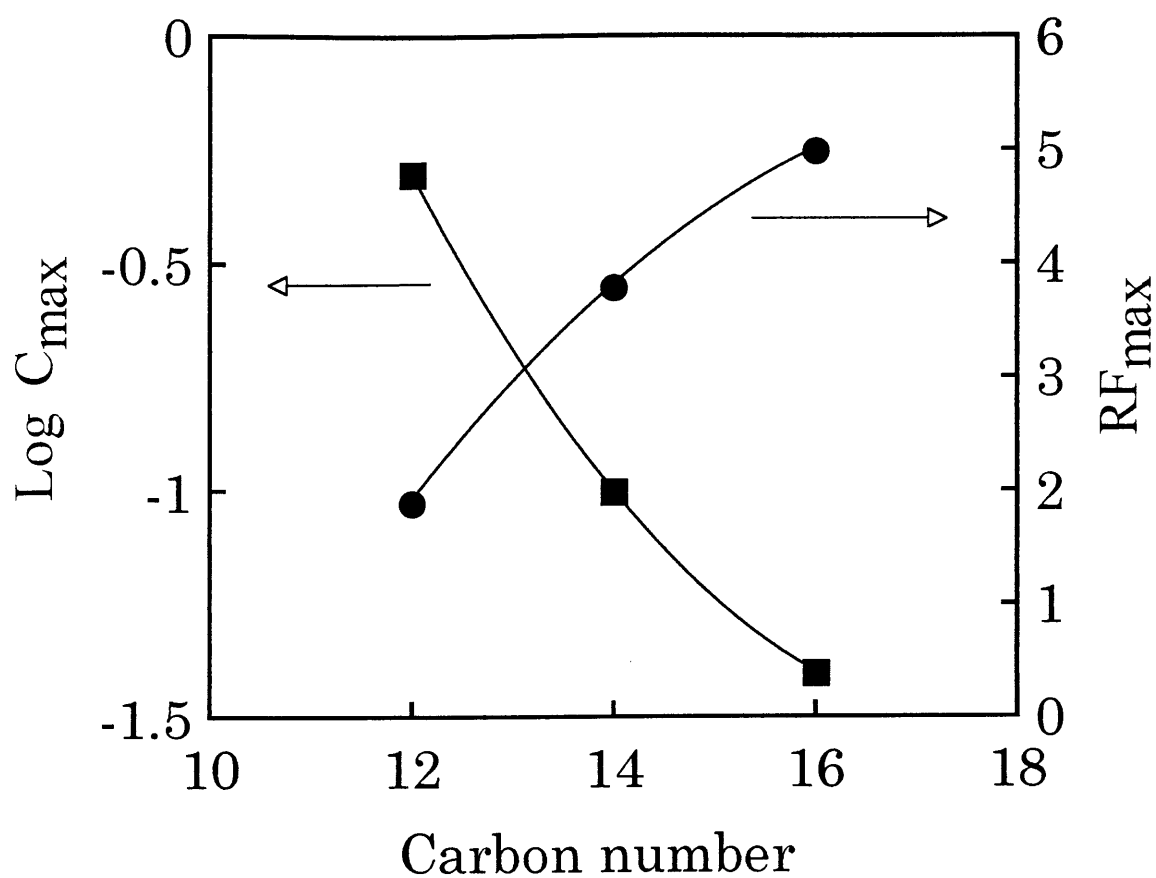


Fig. III-2-4 Relationship between  $C_{\max}$  or  $RF_{\max}$  and carbon numbers of alkyl chain of  $C_n$ TAB. ■,  $C_{\max}$ ; ●,  $RF_{\max}$ .



果( Table III-2-4 ), CMC が小さいほど  $C_{\max}$  も小さくなる傾向があった。これは  $C_{\max}$  が CMC に強く依存することを示している。そこで, 極大点における殺菌活性を  $C_{\max}$  よりもむしろ  $C_{\max}$  と CMC の比を用いて評価した。各 QAC の  $C_{\max} / \text{CMC}$  の差は  $C_{\max}$  のそれと比べて非常に小さく,  $C_{\max} / \text{CMC}$  比は同族体ではほとんど一定であった。しかし, アルキルピリジニウム塩の  $C_{\max} / \text{CMC}$  は, アルキルトリメチルアンモニウム塩の約 2 倍であった。これは分子中の極性基の違い, あるいは殺菌メカニズムの違いによるものと考えられる。

また, 著者は界面活性分子の分子運動が, ミセル形成により著しく束縛され, 特定のコンホマーの安定化が起こることを見出した (第 I 編 1 章, 第 2 章)<sup>19,20</sup>。この事実も高濃度領域における殺菌活性の低下と密接な関係があると推測される。つまりミセル構造と殺菌活性の間に明かな相関があると考えられる。

Table III-2-4 Concentration of quaternary ammonium compounds passing through a maximum in bactericidal activity (  $C_{\max}$  ), CMC and thermodynamic activity necessary for maximal activity (  $C_{\max} / \text{CMC}$  ).

QAC	$C_{\max}$ <sup>1)</sup> (mM)	CMC <sup>2)</sup> (mM)	$C_{\max} / \text{CMC}$
C <sub>12</sub> PC	44.3	17.5	2.5
C <sub>16</sub> PC	2.4	0.9	2.7
C <sub>12</sub> TAB	15.9	16.0	0.99
C <sub>14</sub> TAB	3.6	3.6	1.0
C <sub>16</sub> TAB	1.1	0.92	1.2
DDAB	1.6	1.85	0.83

1) The total concentration of quaternary ammonium salts passing through maximum in bactericidal activity in Figs. III-2-2 and III-2-3.

2) The CMC values at 25 °C from reference 21.



## 2-5 結論

異なるタイプの第四級アンモニウム化合物 (QAC) および臭化アルキルトリメチルアンモニウム  $\text{RN}^+(\text{CH}_3)_3\text{Br}^-$  ( $\text{R} = \text{C}_6 \sim \text{C}_{16}$ ) 同族体の殺菌活性を, 0, 20 および 25°Cにおいて, 0.001 から 25%(w/v)の濃度範囲で調べた結果, 殺菌活性に極大が認められた。この極大点は CMC 付近にあり, CMC 以上の濃度では, QAC の殺菌活性が著しく低下した。また, QAC の各同族体において, 殺菌活性の極大点での QAC 濃度 ( $C_{\text{max}}$ )と CMC の比はほとんど一定であることから,  $C_{\text{max}}$  以上の高濃度領域における QAC の殺菌活性低下は, QAC のミセル形成が深く関与しているものと考えられる。このように, 濃度によって水溶液中での溶存状態が異なる薬剤を取り扱う場合, その殺菌活性におよぼす重要な因子として, 溶液のミセル構造変化も考慮する必要があると考えられる。

## 参考文献

- 1) T. Furuta, A. Ueda, R. Endo and M. Mishima, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **20**, 577 (1992)
- 2) J. A. Cella, D. N. Eggenberger, D. R. Noel, L. A. Harriman, and H. J. Harwood, *J. Am. Chem. Soc.*, **74**, 2061 (1952)
- 3) P. P. Deluca and H. B. Kostenbauder, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **49**, 430 (1960).
- 4) B. Ecanow and F. P. Siegel, *J. Pharm. Sci.*, **52**, 812 (1963).
- 5) N. D. Weiner, F. Hart and Z. Zografi, *J. Pharm. Pharmacol.*, **17**, 350 (1965).
- 6) H. H. Laycock and B. A. Mulley, *J. Pharm. Pharmacol.*, **22**, Suppl., 157 S (1970).
- 7) E. Tomlinson, M. R. Brown and S. S. Davis, *J. Med. Chem.*, **20**, 1277 (1977).
- 8) N. N. Daoud, N. A. Dickinson and P. Gilbert, *Microbios.*, **37**, 73 (1983).
- 9) J. Pernak, A. Skrzypczak and M. B. Bogacki, *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, 2019 (1995).
- 10) K. Kihara, S. Yoshikawa, Y. Nishio and T. Furuta, *Biocontrol Science*, **2**, 61 (1997), 印刷中
- 11) M. R. W. Brown and P. Williams, *J. Antimicrob. Chemother.*, **15**, Suppl. A, 7 (1985).
- 12) 城野久美子, 東出栄治, 防菌防黴, **14**, 541 (1986).
- 13) G. Reybrouck, *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 2nd ed ( by A. D. Russell, W. B. Hugo and G. A. J. Ayliffe ),

- Blackwell Scientific Publications., Oxford, (1992), p.114.
- 14) A. D. Russell, *Principles and Practice of Disinfection, Preservation and Sterilization*, 2nd ed.( by A. D. Russell, W. B. Hugo and G. A. J. Ayliffe ), Blackwell Scientific Publications., Oxford, (1992), p.89.
  - 15) H. B. Kostenbauder, *Disinfection, Sterilization, and Preservation*, 4th ed. ( by S. S. Block ), Lea & Febiger, Philadelphia, London, (1991), p.59.
  - 16) H. Kourai, F. Machikawa, K. Tateishi, T. Horie, K. Takeichi and I. Shibasaki, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **11**, 553 (1983).
  - 17) F. H. Sexsmith and H. J. White, Jr., *J. Colloid Sci.*, **14**, 598 (1959).
  - 18) F. H. Sexsmith and H. J. White, Jr., *J. Colloid Sci.*, **14**, 630 (1959).
  - 19) H. Okabayashi, K. Kihara and M. Okuyama, *Z. Naturforsch.*, **32a**, 1571 (1977).
  - 20) H. Okabayashi and K. Kihara, *Chemica Scripta.*, **12**, 27 (1977).
  - 21) M. J. Rosen, *Surfactants and Interfacial Phenomina*, 2th ed., John Wiley & Sons, Inc., New York, (1989).

## 第3章 抗菌性カチオン界面活性分子－エモリエント剤混合系の殺菌活性と疎水性パラメータ

### 3-1 緒言

クロルヘキシジン化合物の高濃度エタノール溶液には、強い消毒効果のあることが、以前から認められており<sup>1-5)</sup>、手術分野の皮膚消毒や医療器具の消毒に使用されている。しかし、皮膚刺激性、経済性などの見地から、広範に使用する消毒剤として推奨するのはむしろ不適當であるとの指摘もあり<sup>6)</sup>、一般的な手指消毒にはそれほど利用されていないのが現状である。この問題の刺激性を最小限に抑えることができれば、その確実な消毒効果（即効性）と作業性の良さ（即乾性）から、経済面での欠点を、十分に補うことができるものと考えられる。

高濃度エタノールによる手荒れの防止には、古くからグリセリンやセタノールなどの添加が行われているように<sup>7)</sup>、なんらかのエモリエント剤を配合することが必要であり、また、有効な手段となる。しかし、エタノール蒸発後、皮膚上に共存するエモリエント剤が殺菌剤の抗菌力を低下させることがあつては、効果の持続性の点で、本来の消毒剤としての価値が半減するといえる。クロルヘキシジン化合物などのカチオン系化合物の抗菌力は、共存物質によって影響を受けることはよく知られており<sup>8-13)</sup>、各種エモリエント剤がカチオン系化合物の抗菌力におよぼす影響を調べ、明らかにすることは、有効な手指消毒剤を開発、製剤化するうえで基本的かつきわめて重要な課題であると考えられた。

本章において、まず、化粧品分野において汎用されているエモリエント剤およびカチオン系化合物としてグルコン酸クロルヘキシジン（CH）を選び、CHの殺菌活性に及ぼすエモリエント剤の影響を調べた<sup>14)</sup>。さらに、これらのエモ

リエント剤の中で、特に、CH の殺菌活性を著しく増強した二塩基酸ジエステルについては、その疎水性パラメータと殺菌力増強効果との関連性について詳細に検討した<sup>15)</sup>。

## 3-2 実験方法

### 3-2-1 カチオン系化合物

試験したカチオン系化合物（殺菌剤）を Table III-3-1 に示した。

Table III-3-1 Type and source of disinfectants tested

Disinfectant and source	Active ingredient	Abbr.
Hibitane (Sumitomo Seiyaku,Ltd)	Chlorhexidine digluconate, 20 %(w/v)	CH
Cation F2-50 (Nippon Yushi,Ltd)	Benzalkonium chloride, 50 %(w/w)	BAC
Hyamine 1622 (Rohm & Haas,Ltd)	Benzethonium chloride, 99 %(w/w)	BEC
Cation DDC-50 (Sanyo Kasei Kogyo,Ltd)	Didecyl dimethyl ammonium chloride, 50 %(w/w)	DDAC
Vantocil IB (Zeneca,Ltd)	Hydrochloride of polyhexa-methylene biguanide, 20 %(w/w)	PHMB
Levon 15 (Sanyo Kasei Kogyo,Ltd)	Sodium alkyl diaminoethyl glycinate, 30 %(w/w)	AG
Hexadecyl pyridinium chloride , >99 %(w/w) (Tokyo Kasei Kogyo, Ltd)		HDPC

### 3-2-2 エモリエント剤

実験に使用した化粧品級のエモリエント剤を Table III-3-2 に示した。油性のエモリエント剤は，アルコール性ローションとしての使用感（SFI; Skin Feel Index）<sup>16)</sup> が良好で，しかも，80 % (v/v) エタノールに 0.2 % (w/v) 添加したとき，可溶かつ−5°Cまで安定であることを選択の基準にした。また，水溶性のものとして，ポリグリセリンおよびヤシ油脂肪酸ポリオキシエチレングリセリルを選んだ。これらのエモリエント剤は精製を行わず，そのまま実験に用いた。また，試験した二塩基酸ジエステル同族体を Table III-3-3 に示した。これらの純度はガスクロマトグラフィー(GC)または高速液体クロマトグラフィー(HPLC)により，いずれも 98%以上であることを確認した。

Table III-3-2 Test emollients

Emollient	Trade name	Supplier	Symbol
Hexyl laurate	Cetiol A	Henkel Hokusui	HL
Polyoxyethylene glyceryl monococoate	Cetiol HE	Henkel Hokusui	GC
Propylene glycol dicaprylate	Edenol 302	Henkel Hokusui	DC
Caprylic capric acid triglyceride	Mirytol 318	Henkel Hokusui	CCTG
2-Octyldodecanol	Eutanol G	Henkel Hokusui	OD
Diisobutyl adipate	Vyncizer 40	Kao	DIBA
Glyceryl tri(2-ethylhexanoate)	Exceparl TGO	Kao	GTEH
Isopropyl myristate	IPM	Henkel Hokusui	IPM
Isopropyl palmitate	Nikkol IPP	Nikko Chemical	IPP
Isopropyl isostearate	Nikkol IPIS	Nikko Chemical	IPIS
Cetyl lactate		Nikko Chemical	CL
Diisopropyl adipate	Nikkol DID	Nikko Chemical	DIPA
Polyglycerol	Polyglycerin #5	Sakamoto Yakuhin Kogyo	PG

Table III-3-3 Dibasic acid diesters tested, their capacity factors, and their potentiating effects on CH and BC

	Dibasic acid diester	Source <sup>a)</sup>	Capacity <sup>b)</sup> factor (k')	log(N <sub>0</sub> /N) <sup>c)</sup>	
				CH	BC
1	Di-n-butyl oxalate	R	0.478	-0.100	0.230
2	Di-n-butyl malonate	R	0.371	0.100	0.230
3	Di-n-butyl succinate	R	0.476	0.170	0.677
4	Di-n-butyl glutarate	S	0.627	0.403	1.303
5	Di-n-butyl adipate	R	0.908	0.490	1.602
6	Di-n-butyl suberate	S	1.337	0.393	1.227
7	Di-n-butyl sebacate	R	2.621	0.347	0.747
8	Dimethyl adipate	R	0.047	0.053	-0.009
9	Diethyl adipate	R	0.171	0.097	0.007
10	Di-n-propyl adipate	R	0.356	0.093	0.222
11	Diisopropyl adipate	R	0.290	-0.043	0.433
12	Diisobutyl adipate	R	0.844	0.507	1.643
13	Di-tert-butyl adipate	S	0.600	0.330	1.337
14	Diisoamyl adipate	S	1.290	0.383	1.707
15	Di-n-hexyl adipate	S	2.609	0.407	1.043
16	Di-(ethylbutyl) adipate	S	3.509	0.433	1.180
17	Di-(ethylhexyl) adipate	R	7.009	0.060	0.160
18	Diisodecyl adipate	R	16.198	0.003	0.097
19	Dimethyl phthalate	R	0.053	0.103	-0.097
20	Diethyl phthalate	R	0.175	0.147	0.113
21	Di-n-butyl phthalate	R	0.821	0.577	1.377
22	Diisobutyl phthalate	R	0.747	0.603	1.417
23	Di-(2-ethylhexyl) phthalate	R	6.982	0.053	-0.160
24	Diisodecyl phthalate	R	17.493	0.077	-0.247

a) R, reagent ( Tokyo Kasei Kogyo, Ltd ); S, the gift of and synthesis by the late Prof. M. Okahara of Osaka University. b) Determined by HPLC (Table III-3-4). c) Potentiating effect = log(N<sub>0</sub>/N) : N<sub>0</sub>= average counts after exposure to the disinfectant alone ; N=average counts after exposure to the disinfectant and the dibasic acid diesters.



### 3-2-3 試験液

カチオン系化合物およびエモリエント剤を添加した 80 %(v/v)エタノール水溶液を原液のまま、試験液として用いた。

### 3-2-4 試験菌

試験菌として、下記のグラム陰性菌 7 種、グラム陽性菌 3 種の計 10 種を用いた。

- 1) *Enterobacter cloacae* ATCC 23355
- 2) *Escherichia coli* ATCC 25922
- 3) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883
- 4) *Proteus vulgaris* ATCC 13315
- 5) *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853
- 6) *Salmonella typhimurium* ATCC 25923
- 7) *Serratia marcescens* ATCC 8100
- 8) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923
- 9) *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228
- 10) *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615

### 3-2-5 培地および培養条件

試験菌の培養は乾燥ブイヨン（日水製薬）30 g を蒸留水 1000 ml に溶解し、加熱滅菌した液体培地を使用した。37 °C で 16 時間試験管内で静置培養し、ミキサーで攪拌混合し、供試菌液とした。生菌数の測定は、上記の液体培地に寒天末（片山化学工業、試薬一級）を 1.5 % 添加した寒天培地（NA）を使用し、*P. aeruginosa* および *S. pyogenes* については 37°C で 40 時間、その他の菌については 37°C で 16 時間培養した。

### 3-2-6 菌回収液およびその希釈液

CHを中和するために、ココアミドエーテルサルフェート（サンアミドCF-3, 有効成分30%, 日本油脂）を有効成分として0.3%添加<sup>17)</sup>した蒸留水を加熱滅菌し、菌回収液とした。菌回収液の段階希釈液も同じ液を使用した。

### 3-2-7 殺菌力試験法

ろ紙上で試験溶液のエタノールを蒸発させたあとの残留物の殺菌活性を測定するために Fig. III-3-1 に示すような装置を用いた。ガラスビーカー(内径52mm, 深さ70mm)の中心部に固定したガラス管(内径25mm, 長さ65mm)の上にもろ紙(東洋ろ紙, No.50, 20x25mm)を置いた。試験液50 $\mu$ lをろ紙の中心に滴下し、ペトリ皿で覆い、2時間乾燥させた。つぎに、Table III-3-2 に示したエモリエント剤を含む試験液の場合、このろ紙の中心に供試菌液20 $\mu$ lを滴下し、蓋をして10分間作用させた。一方、Table III-3-3 のエモリエント剤を含む試験液に対しては、供試菌液10 $\mu$ lをろ紙の中心に滴下後、1分間乾燥させ、この菌液の接種と乾燥の操作を5回繰り返す。最後の菌接種後5分間作用させた。一定時間作用後、直ちに、ろ紙を50mlの菌回収液およびガラスビーズ(直径約3mm)を含む栓付きのガラス容器(容量225ml)に入れ、上下に45秒間(約3回/秒)振り混ぜ、生菌を回収した。この菌回収液を段階希釈し、NAに混釈培養することにより、生残菌数を測定した。菌数(CFU: colony forming unit)は菌回収液0.5ml当たりの菌数の対数值(log CFU)で表した。log CFUの試験溶液間の有意差を検定するために、分散分析を行なった。

また、それぞれの殺菌剤の殺菌活性に対する二塩基酸ジエステルの増強効果はlog No/Nとして表した。ここで、Noは殺菌剤のみを含む試験溶液による処理後の生残菌数、Nは殺菌剤および二塩基酸ジエステルを含む試験溶液で処理後の生残菌数である。

### 3-2-8 二塩基酸ジエステルの疎水性パラメーターの測定

二塩基酸ジエステルの疎水性パラメーターとして、HPLC によって決定されるキャパシティブァクター( $k'$ )を用いた。HPLC による測定条件を Table III-3-4 に示す。 $k'$  は試験物質の保持時間 ( $t_R$ ) および指標物質 (ヨウ化カリウム) のそれ ( $t_0$ ) から次式により求めた<sup>18)</sup>。

$$k' = (t_R - t_0) / t_0$$

Table III-3-4 Experimental conditions of HPLC

Instrument	LC-6A ( Shimadzu Seisakusho, Ltd. )
Column	Nucleosil 100-5C <sub>18</sub> ( Macherey-Nagel / D-5160 Duren )
Column temperature	40°C ( CTO-6A, Shimadzu Seisakusho, Ltd. )
Detector	UV215 ( SPD6A, Shimadzu Seisakusho, Ltd )
Mobile Phase	0.05 M HClO <sub>4</sub> : CH <sub>3</sub> OH = 25 : 75
Flow rate	1.0 ml/min

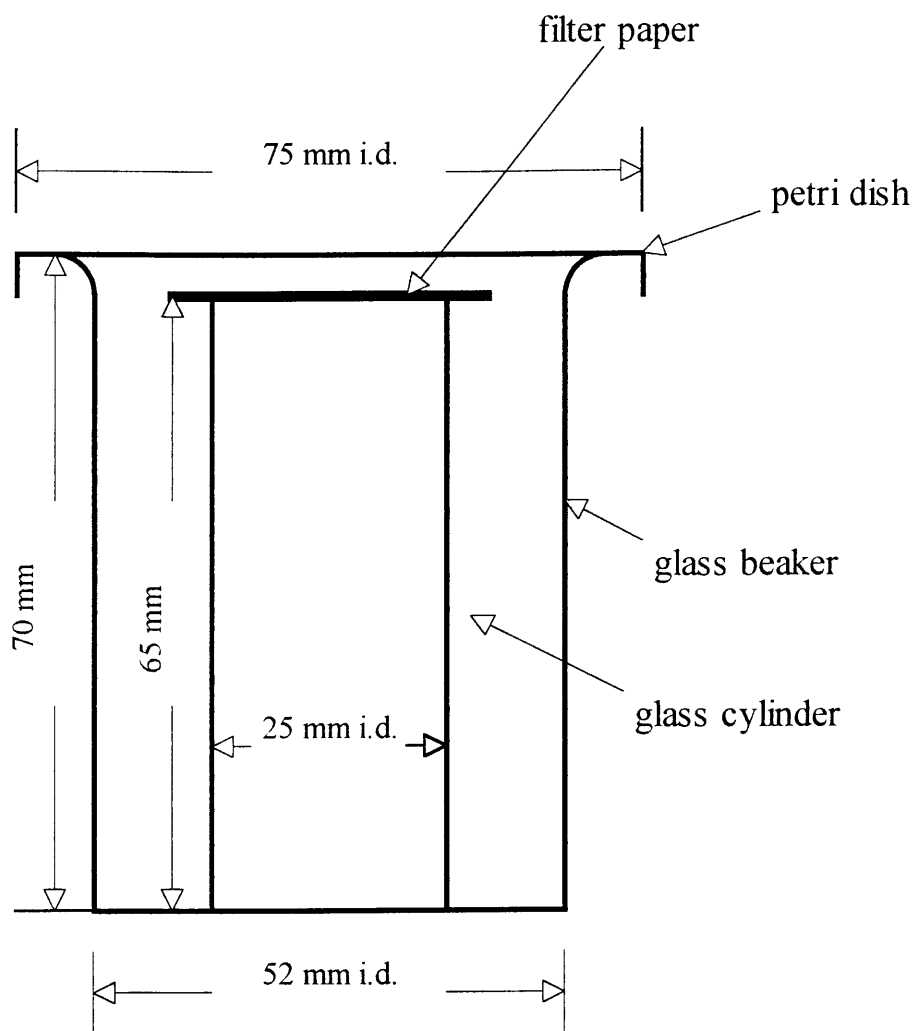


Fig. III-3-1 Apparatus for bactericidal test



### 3-3 結果

#### 3-3-1 菌回収率

本報で用いた殺菌力試験方法による菌の回収率を調べた。Table III-3-5 は薬剤処理していないろ紙に各種菌液を滴下し、10分放置後の菌回収率を求めた結果である。*E. coli* および *S. aureus* を除く菌種では、ほぼ 100 % の回収率が得られた。菌種によって回収率は異なるが、回収菌数には再現性が認められたので、薬剤処理後の回収菌数を生残菌数とし、これにより殺菌活性を評価した。

Table III-3-5 Recovery of bacteria from inoculated filter paper

	CFU		Recovery
	Before*	After**	%***
<i>S. aureus</i>	64 X 10 <sup>5</sup>	122 X 10 <sup>5</sup>	191
		119 X 10 <sup>5</sup>	186
		132 X 10 <sup>5</sup>	206
<i>P. aeruginosa</i>	127 X 10 <sup>5</sup>	125 X 10 <sup>5</sup>	98
		141 X 10 <sup>5</sup>	111
		131 X 10 <sup>5</sup>	103
<i>E. cloacae</i>	136 X 10 <sup>5</sup>	124 X 10 <sup>5</sup>	91
<i>E. coli</i>	64 X 10 <sup>5</sup>	99 X 10 <sup>5</sup>	60
<i>K. pneumoniae</i>	111 X 10 <sup>5</sup>	102 X 10 <sup>5</sup>	92
<i>P. vulgaris</i>	80 X 10 <sup>5</sup>	97 X 10 <sup>5</sup>	121
<i>S. typhimurium</i>	180 X 10 <sup>5</sup>	172 X 10 <sup>5</sup>	96
<i>S. marcescens</i>	172 X 10 <sup>5</sup>	212 X 10 <sup>5</sup>	123
<i>S. epidermidis</i>	52 X 10 <sup>5</sup>	40 X 10 <sup>5</sup>	77
<i>S. pyogenes</i>	57 X 10 <sup>5</sup>	73 X 10 <sup>5</sup>	128

\* CFU/20 ml bacterial suspension

\*\* CFU/50 ml recovery solution

\*\*\* Exposure time : 10min

### 3-3-2 グルコン酸クロルヘキシジンの殺菌活性に及ぼす各種エモリエント剤の影響

*S. aureus* および *P. aeruginosa* を供試菌とし、0.2%(w/v)の各種エモリエント剤および0.2%(w/v)のCHを含む80%(v/v)エタノール溶液について、前述の方法により殺菌活性を調べた。

Fig. III-3-2に *S. aureus* に対する結果を示した。CHを含み、エモリエント剤を含まない場合(R)に比べ、処理後の生菌数が少なかったのは、ヤシ油脂肪酸ポリオキシエチレングリセリル(GC)およびアジピン酸ジイソブチル(DIBA) ( $p < 0.01$ )、ならびにアジピン酸ジイソプロピル(DIPA)およびポリグリセリン(PG) ( $0.05 < p < 0.01$ )を添加した場合であり、これらのエモリエント剤がCHの殺菌力を増強していることが認められた。他のエモリエント剤を添加した系ではRとの有意差は見られなかった。

*P. aeruginosa* に対しては、DIBAのみが殺菌力増強効果を示した( $p < 0.01$ ) (Fig. III-3-3)。

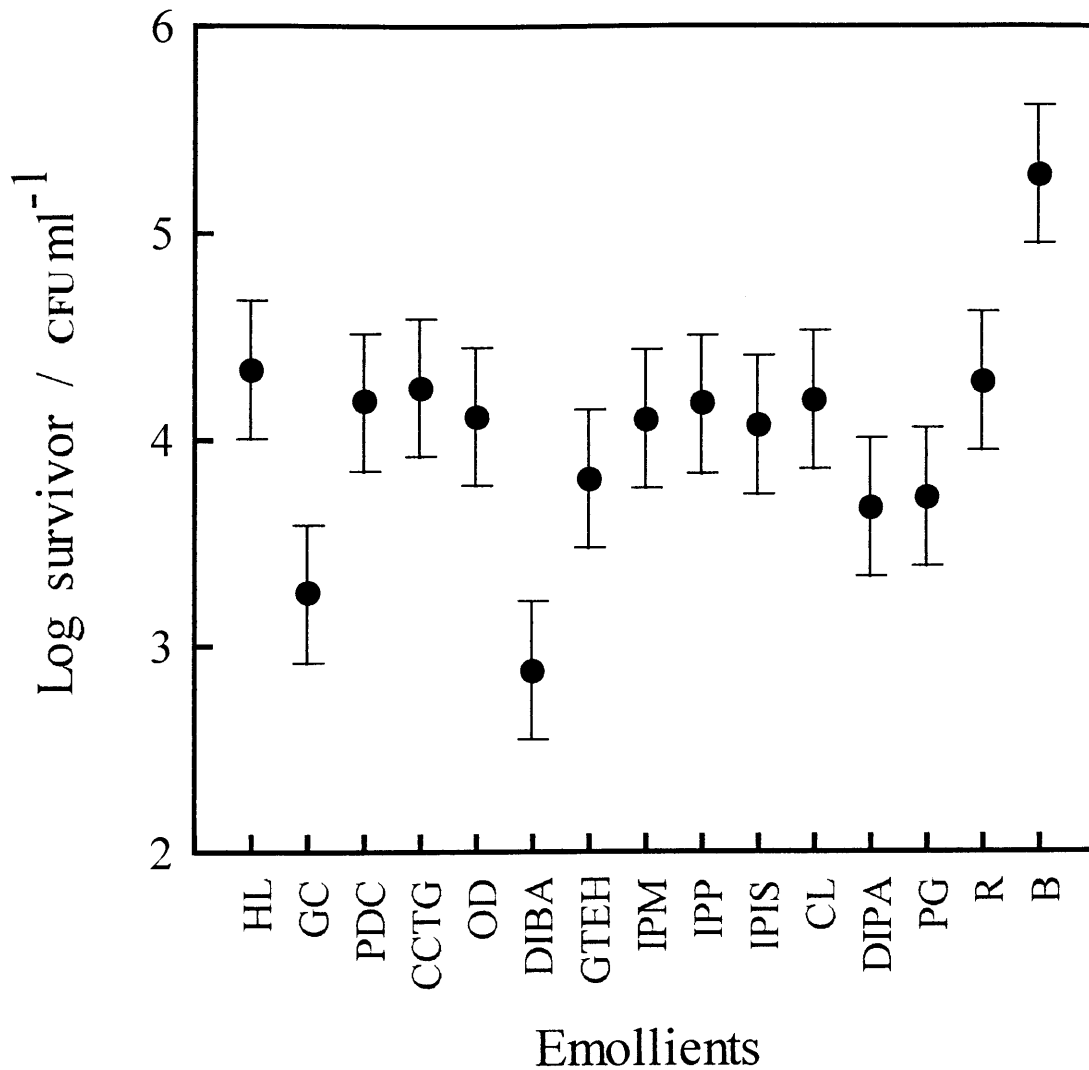


Fig. III-3-2 Bactericidal activity of the residue of test solution against *S. aureus*. Test solution : 80 %(v/v) ethanol + 0.2 %(w/v) CH + 0.2 %(w/v) emollient ; R, 80 %(v/v) ethanol + 0.2 %(w/v) CH ; B, 80 %(v/v) ethanol. Bar represents 95% confidence limit.





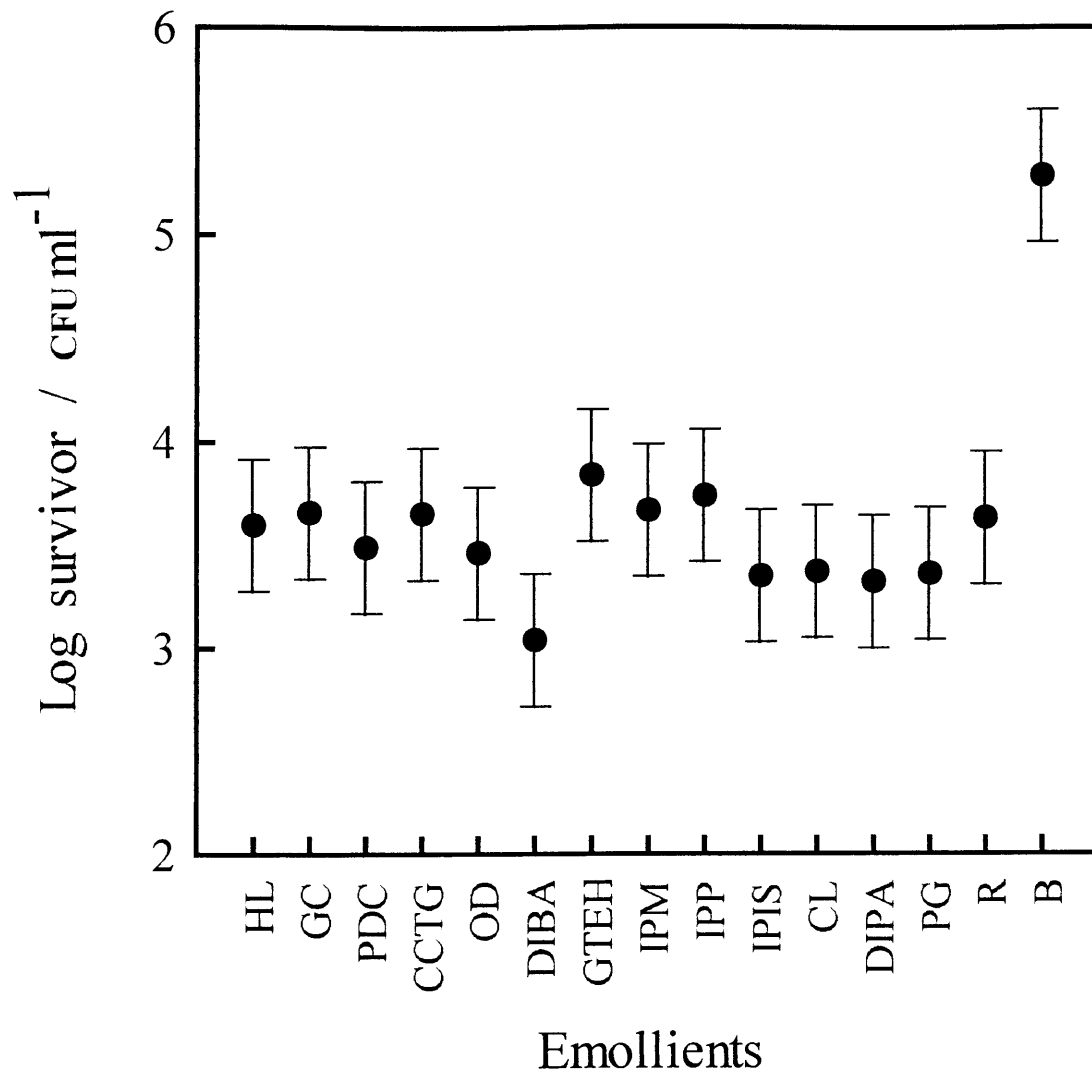


Fig. III-3-3 Bactericidal activity of the residue of test solution against *P. aeruginosa*. Test solution : 80 %(v/v) ethanol + 0.2 %(w/v) CH + 0.2 %(w/v) emollient ; R, 80 %(v/v) ethanol + 0.2 %(w/v) CH ; B, 80 %(v/v) ethanol. Bar represents 95% confidence limit.



### 3-3-3 グルコン酸クロルヘキシジンの殺菌活性に及ぼすエモリエント剤濃度の影響

殺菌力増強効果を示した GC, DIBA および DIPA について, 0.2 %(w/v) CH エタノール溶液への添加量を変えて, 同様の試験を行い, CH の殺菌力に及ぼす影響を調べた。

Fig. III-3-4 に *S. aureus* を供試菌とした DIPA の結果を示した。DIPA 濃度の増加とともに生菌数は直線的に減少した。比較のため, エモリエント剤を含まないエタノール溶液に CH を, 濃度を変えて添加した場合の結果も示した。この 2 つの関係から, 0.2 %(w/v) の DIPA および 0.2 %(w/v) の CH を含むエタノール溶液の殺菌力は, DIPA を含まない 0.4 %(w/v) の CH エタノール溶液のそれに相当することがわかった。*S. aureus* を供試菌とする GC の濃度の影響についても, DIPA とほぼ同様の結果が得られた。

DIBA の濃度を変化させた場合の *S. aureus* および *P. aeruginosa* の生菌数に及ぼす影響について, それぞれ Fig. III-3-5 および Fig. III-3-6 に示した。DIBA の場合, GC や DIPA の場合と異なり, その添加量の増加に伴う生菌数の直線的減少がみられなかった。DIBA の殺菌力増強効果は 0.1 %(w/v) 添加で顕著であり, それ以上濃度を増しても殺菌力はほぼ一定であった。CH 単独の場合と比較すると, DIBA を 0.1 %(w/v) 以上含む 0.2 %(w/v) CH エタノールの殺菌力は, 0.4 %(w/v) CH エタノールのそれに匹敵することがわかった。



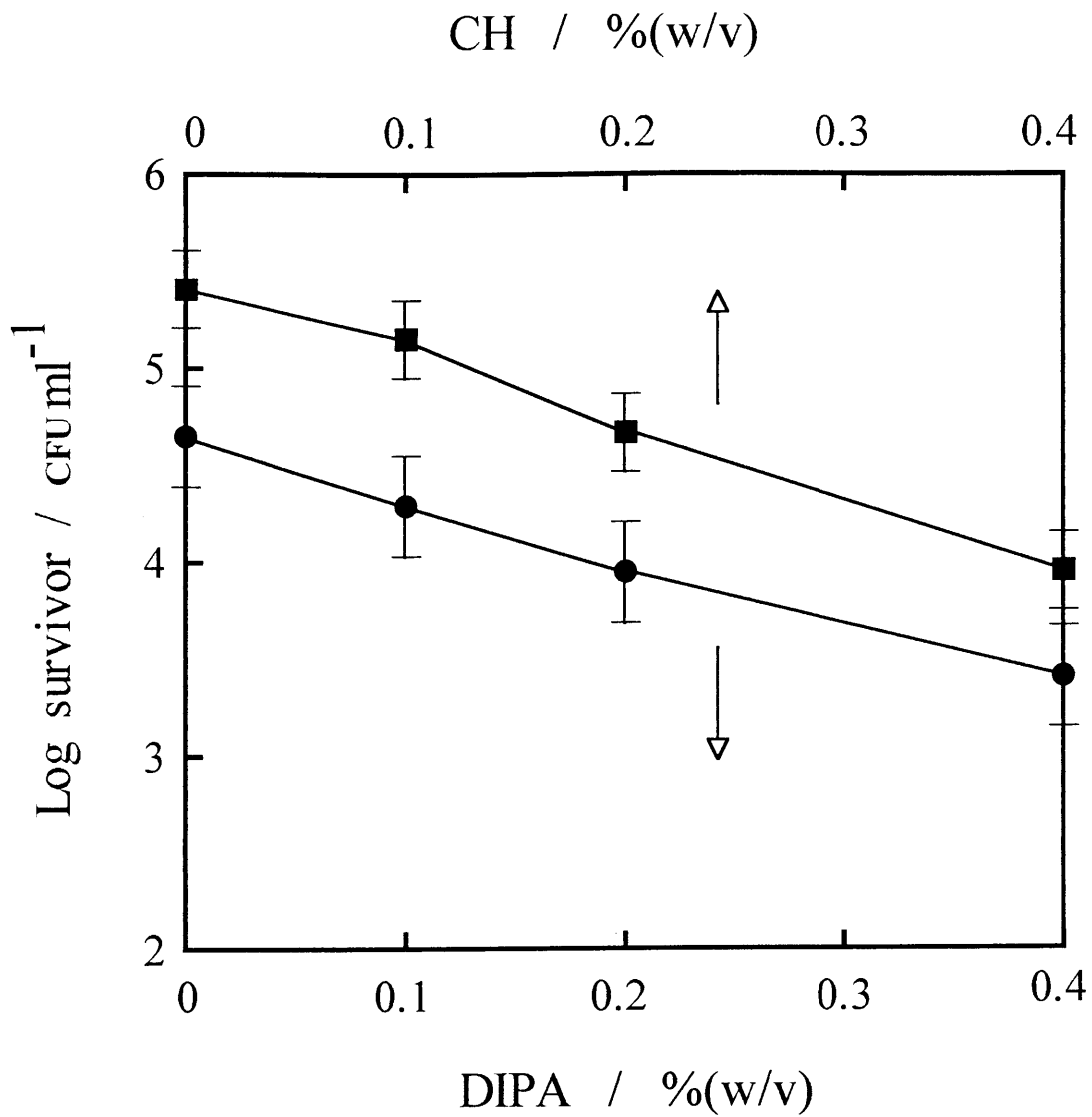


Fig. III-3-4 Relation between survivors of *S.aureus* and concentration of DIPA or CH. ●, 80 %(v/v) ethanol solution with DIPA and 0.2 %(w/v) CH; ■, 80 %(v/v) ethanol solution with CH and without DIPA. Bar represents 95% confidence limit.



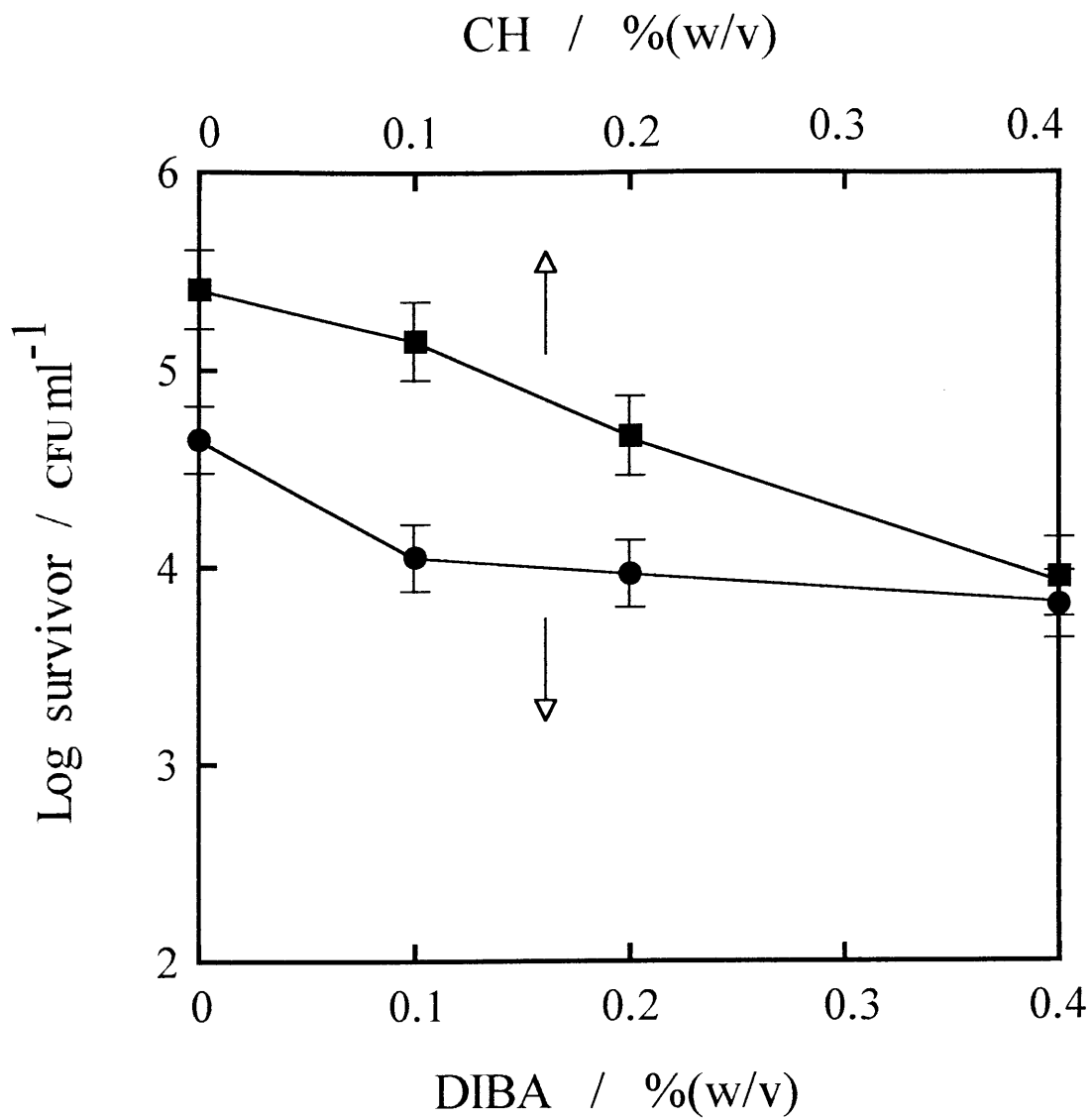


Fig. III-3-5 Relation between survivors of *S.aureus* and concentration of DIBA or CH. ●, 80 %(v/v) ethanol solution with DIBA and 0.2 %(w/v) CH; ■, 80 %(v/v) ethanol solution with CH and without DIBA. Bars represent 95% confidence interval.





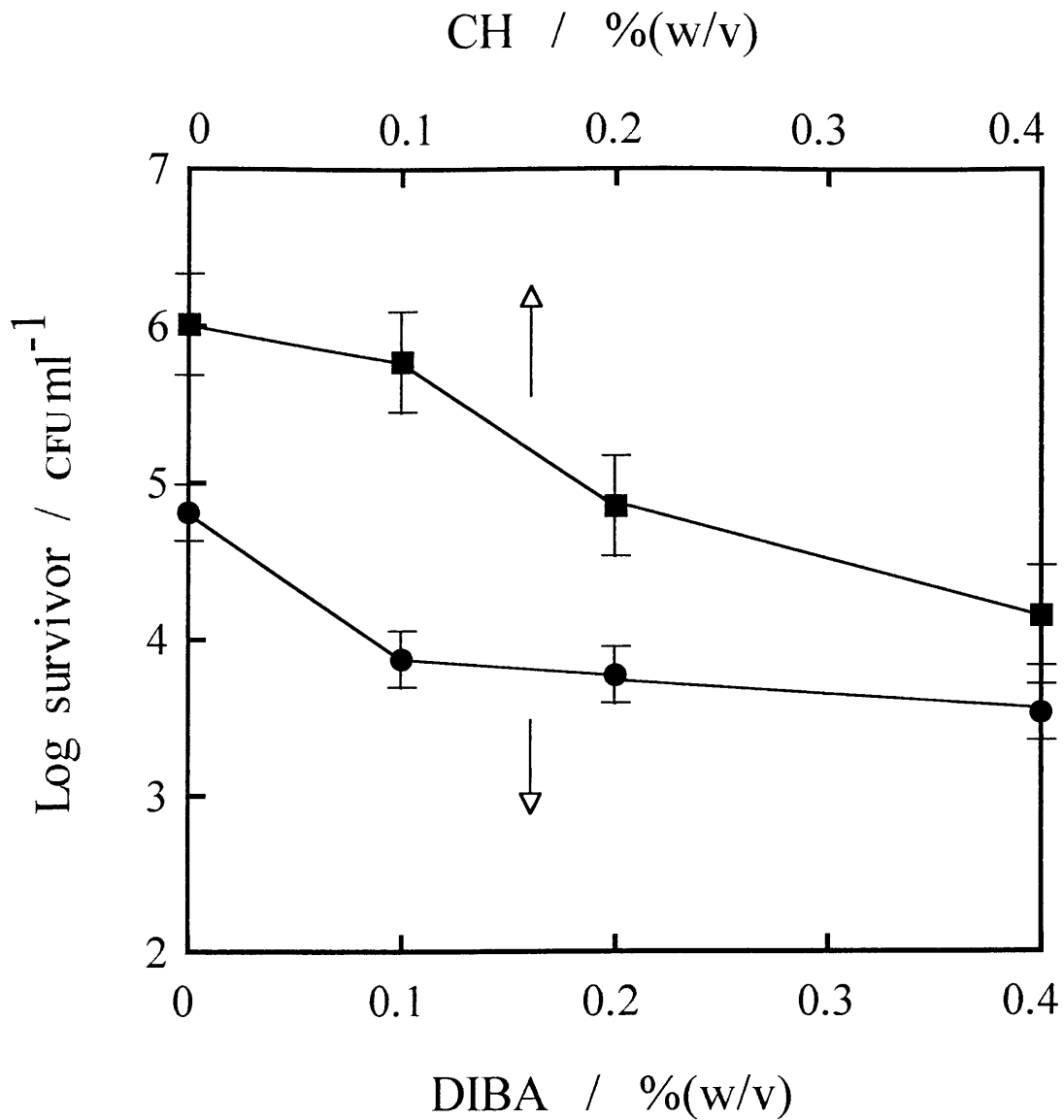


Fig. III-3-6 Relation between survivors of *P.aeruginosa* and concentration of DIBA or CH. ●, 80 %(v/v) ethanol solution with DIBA and 0.2 %(w/v) CH; ■, 80 %(v/v) ethanol solution with CH and without DIBA. Bars represent 95% confidence interval.



#### 3-3-4 各種細菌に対するエモリエント剤配合試料の効果

4種類の試験液(A-D)のエタノール蒸発後の殺菌力を10種の細菌を用いて、同様に測定した。その結果および試験液の組成をTable III-3-6に示した。*S. aureus*に対しては、エモリエント剤を添加した両試験液(C,D)とも、CH単独(B)に比べ、明らかに殺菌力増強効果が認められたが、両溶液の効果には有意差はなかった。*P. aeruginosa*に対しては、DIBAを含む試験液(D)においてのみ、殺菌力増強効果が認められた。*S. aureus*および*P. aeruginosa*に対する結果は、前述の結果と同様であり、これらエモリエント剤の効果を再確認したものである。

実験に供した他の8菌種のなかでは、*S. marcescens*について、*S. aureus*とほぼ同様の傾向が観察された。*E. cloacae*, *P. vulgaris*および*S. typhimurium*については、エモリエント剤の種類およびその添加の有無による効果の差は認められなかった。また、*E. coli*, *K. pneumoniae*, *S. epidermidis*および*S. pyogenes*の場合には、菌回収液中の生菌数が非常に少なく、エモリエント剤の添加効果を評価することができなかった。

#### 3-3-5 二塩基酸ジエステルの疎水性パラメータ

二塩基酸ジエステルの疎水性パラメータとして、HPLC測定によるキャパシティファクター( $k'$ )を用いた。結果をTable III-3-3に示した。各同族体(二塩基酸ジ n-ブチル, アジピン酸ジエステルおよびフタル酸ジエステル)における $k'$ の値は、シュウ酸ジ n-ブチルとマロン酸ジ n-ブチルで逆転が見られた点を除けば、二塩基酸およびアルキル基の長さの順序と一致していた。

### 3-3-6 グルコン酸クロルヘキシジンおよび塩化ベンザルコニウムの殺菌活性に及ぼす二塩基酸ジエステルの影響

CHおよびBACの殺菌活性に及ぼす二塩基酸ジエステルの影響は、 $\log(N_0/N)$ としてTable III-3-3にまとめて示した。CHおよびBACの活性は二塩基酸ジエステルの種類によって影響を受けた。二塩基酸ジ n-ブチル、アジピン酸ジエステルおよびフタル酸ジエステルの各同族体において、最も有効な化合物が存在した。CHおよびBACの活性を有意に増強させた二塩基酸ジエステルは、シュウ酸ジ n-ブチルとマロン酸ジ n-ブチルの例外を除くと、共通していた。シュウ酸ジ n-ブチルとマロン酸ジ n-ブチルはBACの活性を増強させたが、CHに対しては効果がなかった。

### 3-3-7 各種消毒剤の殺菌力に及ぼすアジピン酸ジイソブチルの影響

塩化ベンゼトニウム(BEC)、塩化ジデシルジメチルアンモニウム(DDAC)、ポリヘキサメチレンビグアニド(PHMB)、アルキルジアミノエチルグリシン(AG)、および塩化ヘキサデシルピリジニウム(HDPC)を用い、増強効果が最も優れていた二塩基酸ジエステルの一つである、アジピン酸ジイソブチルのこれら殺菌剤の殺菌活性に及ぼす影響を同様に調べた。Fig. III-3-7に示したように、第四級アンモニウム化合物のすべてに対して、アジピン酸ジイソブチルは増強効果を示したが、PHMBおよびAGに対しては添加効果は認められなかった。本実験条件下では、DDACの殺菌力が最も強いことがわかった。

Table III-3-6. Residual bactericidal activity of 4 test solutions against various microorganisms.

	Number of bacteria recovered after contact with test solutions			
	< A > 80%(v/v)EtOH	< B > 0.2 %(w/v)CH 80 %(v/v)EtOH	< C > 0.2 %(w/v) CH 0.2 %(w/v)GC 80 %(v/v)EtOH	< D > 0.2 %(w/v) CH 0.2 %(w/v)DIBA 80 %(v/v)EtOH
<i>E. cloacae</i>	198 X 10 <sup>3</sup>	50	50	220
	232 X 10 <sup>3</sup>	180	4	4
	234 X 10 <sup>3</sup>	62	30	54
<i>E. coli</i>	320 X 10 <sup>3</sup>	12	0	2
	282 X 10 <sup>3</sup>	124	0	4
	300 X 10 <sup>3</sup>	6	0	24
<i>K. pneumoniae</i>	148 X 10 <sup>3</sup>	8	20	76
	168 X 10 <sup>3</sup>	0	3	0
	170 X 10 <sup>3</sup>	0	9	6
<i>P. vulgaris</i>	110 X 10 <sup>3</sup>	106 X 10	166 X10	78 X10
	81 X 10 <sup>3</sup>	42 X 10	40 X10	90 X10
	132 X 10 <sup>3</sup>	136 X 10	30 X10	70 X10
<i>P. aeruginosa</i>	46 X 10 <sup>4</sup>	55 X 10 <sup>2</sup>	63 X10 <sup>2</sup>	256 X10
	43 X 10 <sup>4</sup>	195 X 10 <sup>2</sup>	32 X10 <sup>2</sup>	27 X10 <sup>2</sup>
	42 X 10 <sup>4</sup>	83 X 10 <sup>2</sup>	91 X10 <sup>2</sup>	93 X10
<i>S. typhimurium</i>	298 X 10 <sup>3</sup>	44	136	258
	300 X 10 <sup>3</sup>	50	20	22
	300 X 10 <sup>3</sup>	36	60	70
<i>S. marcescens</i>	204 X 10 <sup>3</sup>	64 X 10 <sup>2</sup>	36 X10 <sup>2</sup>	184 X10
	218 X 10 <sup>3</sup>	48 X 10 <sup>2</sup>	34 X10 <sup>2</sup>	260 X10
	228 X 10 <sup>3</sup>	52 X 10 <sup>2</sup>	20 X10 <sup>2</sup>	174 X10
<i>S. aureus</i>	163 X 10 <sup>3</sup>	183 X 10 <sup>2</sup>	110 X10 <sup>2</sup>	81 X10 <sup>2</sup>
	141 X 10 <sup>3</sup>	252 X 10 <sup>2</sup>	87 X10 <sup>2</sup>	51 X10 <sup>2</sup>
	150 X 10 <sup>3</sup>	175 X 10 <sup>2</sup>	143 X10	36 X10 <sup>2</sup>
<i>S. epidermidis</i>	78 X 10 <sup>3</sup>	0	0	0
	81 X 10 <sup>3</sup>	0	0	0
	80 X 10 <sup>3</sup>	0	2	0
<i>S. pyogenes</i>	174 X 10 <sup>2</sup>	0	0	0
	92 X 10 <sup>2</sup>	0	4	0
	173 X 10 <sup>2</sup>	0	1	0



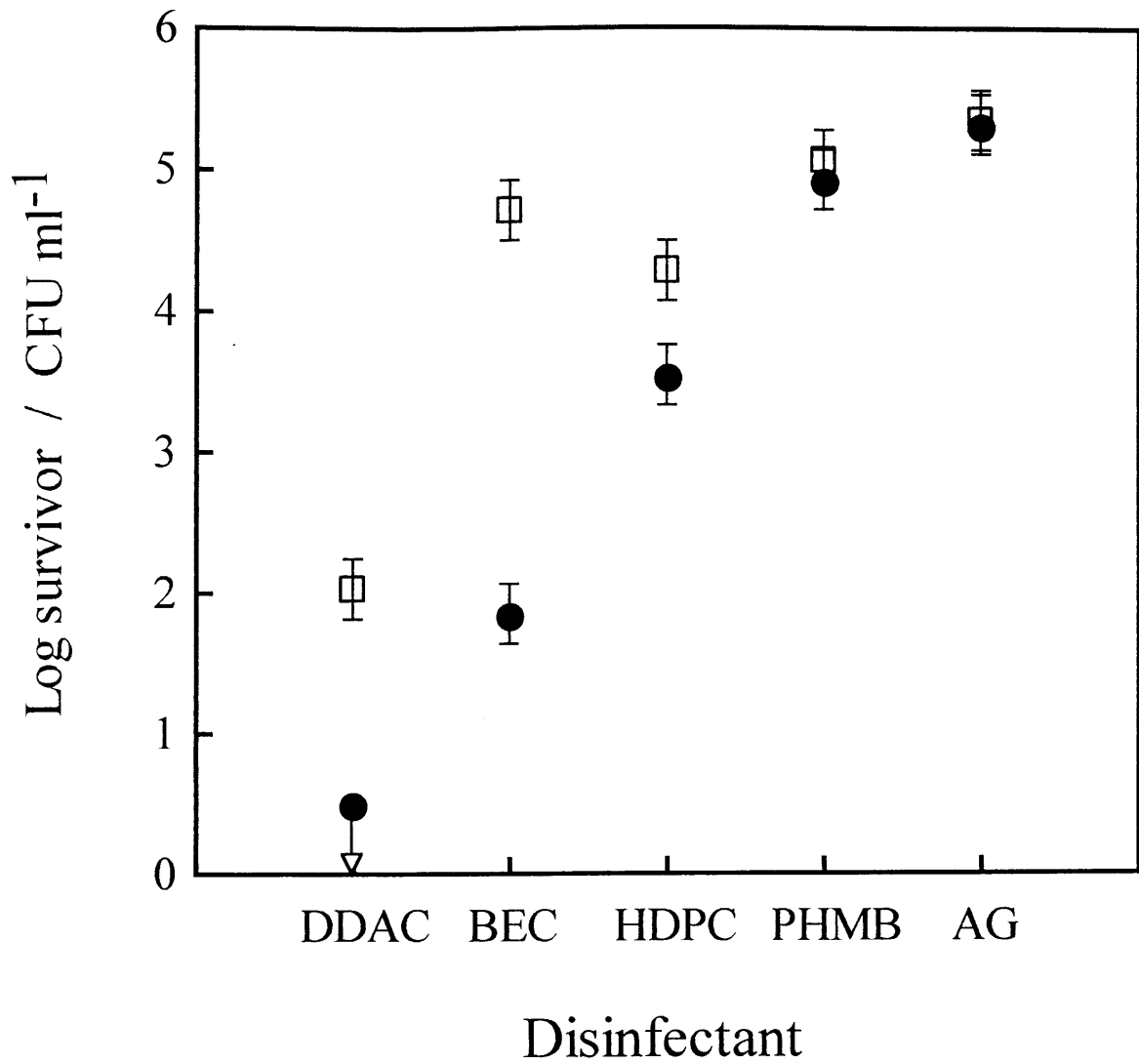


Fig. III-3-7 Effect of diisobutyl adipate on the bactericidal activities of five disinfectants against *S.aureus* on filter-paper. □, disinfectant alone; ●, disinfectant with diisobutyl adipate. Bar represents 95% confidence limit.





### 3-3-8 CH および BAC の殺菌活性に対する二塩基酸ジエステルの増強効果とその疎水性との関係

上述したように、二塩基酸ジエステルの3つの同族体のそれぞれにおいて、増強効果を示すいくつかの有効な化合物が存在していることが認められた。したがって、二塩基酸ジエステルの殺菌力増強効果はその疎水性と密接な関係にあると考えられた。CH および BAC に対する増強効果 ( $\log N_0/N$ ) と疎水性パラメータであるキヤパシティファクターの対数值 ( $\log k'$ ) との関係プロットすると、 $\log k'$  が  $-0.55$  以下、または  $0.85$  以上の場合には、増強効果が認められないことがわかった。 $\log k'$  が  $-0.55 \sim 0.83$  の範囲に入る二塩基酸ジエステルは19種類であった。

1例を除くと、各同族体で得られた  $k'$  の値は化合物の予想される疎水性の順序に従っていた。シュウ酸ジ *n*-ブチルの  $k'$  値は、メチレン基が一つ多いマロン酸ジ *n*-ブチルのそれよりも高く、それゆえ、疎水的性質以外の要因がシュウ酸ジ *n*-ブチルの  $k'$  の測定に関与していると思われたので、以下の解析では、シュウ酸ジ *n*-ブチルを除外した。

多重解析から得られた CH および BAC に対する増強効果は、それぞれ、(1)式および(2)式で表される。

(1) CH :

$$\log(N_0/N) = -1.063 \pm 0.267(\log k')^2 + 0.365 \pm 0.141(\log k') + 0.483 \pm 0.060$$

(  $n=18$ ,  $r=0.910$ ,  $s=0.088$ ,  $F=35.93$ ,  $-0.55 < \log k' < 0.85$  )

(2) BAC :

$$\log(N_0/N) = -2.907 \pm 0.753(\log k')^2 + 0.630 \pm 0.399(\log k') + 1.472 \pm 0.170$$

(  $n=18$ ,  $r=0.911$ ,  $s=0.249$ ,  $F=36.76$ ,  $-0.55 < \log k' < 0.85$  )

ここで,  $n$ ,  $r$ ,  $s$ ,  $F$ , および  $\pm$  はそれぞれ, 化合物の数, 相関係数, 標準偏差, 分散比および各係数の 95%信頼限界を示す。

(1)式および(2)式を Fig. III-3-8 および III-3-9 に図示した。

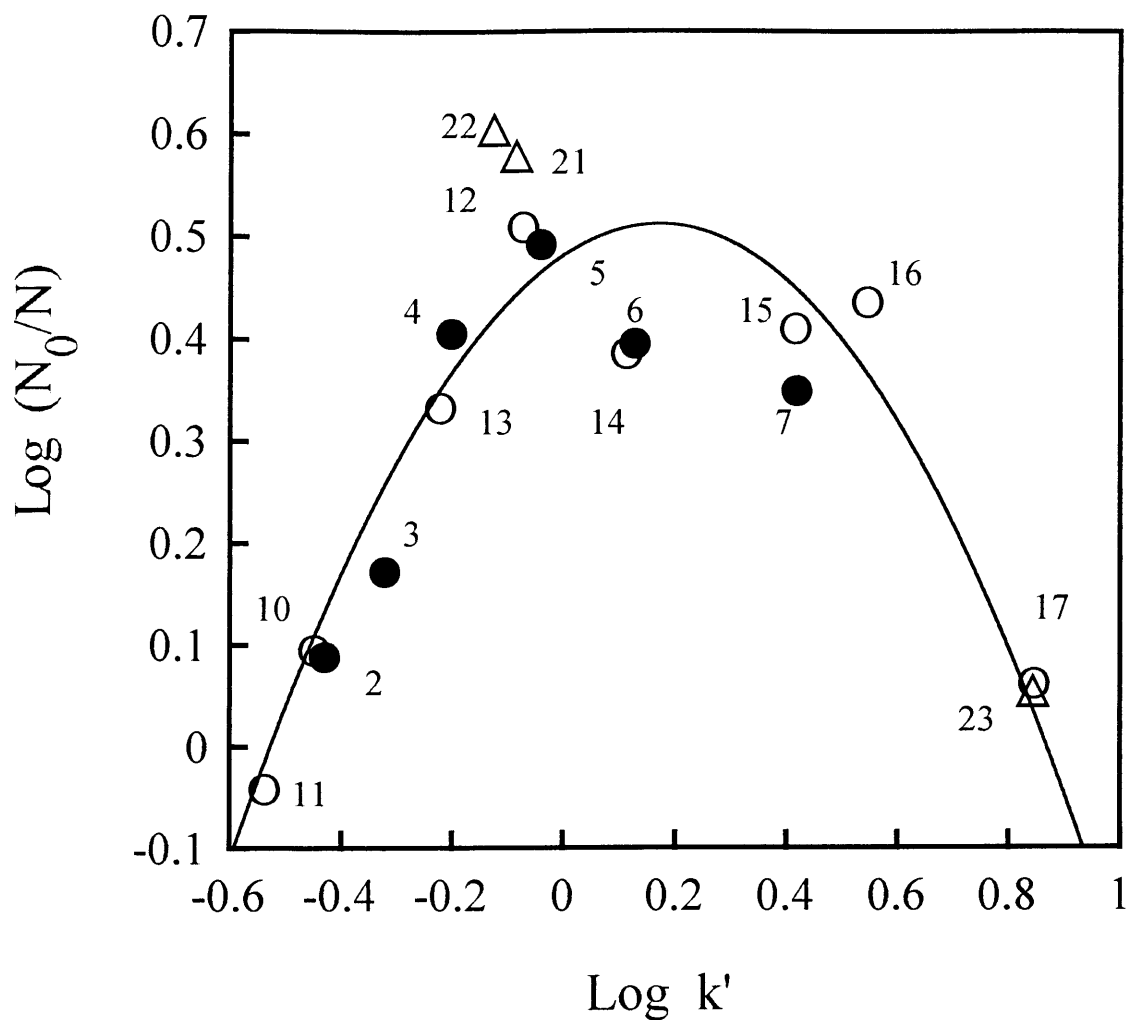


Fig. III-3-8 Relationship between  $\log N_0/N$  for CH and  $\log k'$  of dibasic acid diesters. ●, di-n-butyl esters of aliphatic dibasic acids ; ○, dialkyl esters of adipic acid ; △, dialkyl esters of phthalic acid. Number indicates compound shown in Table III-3-3.



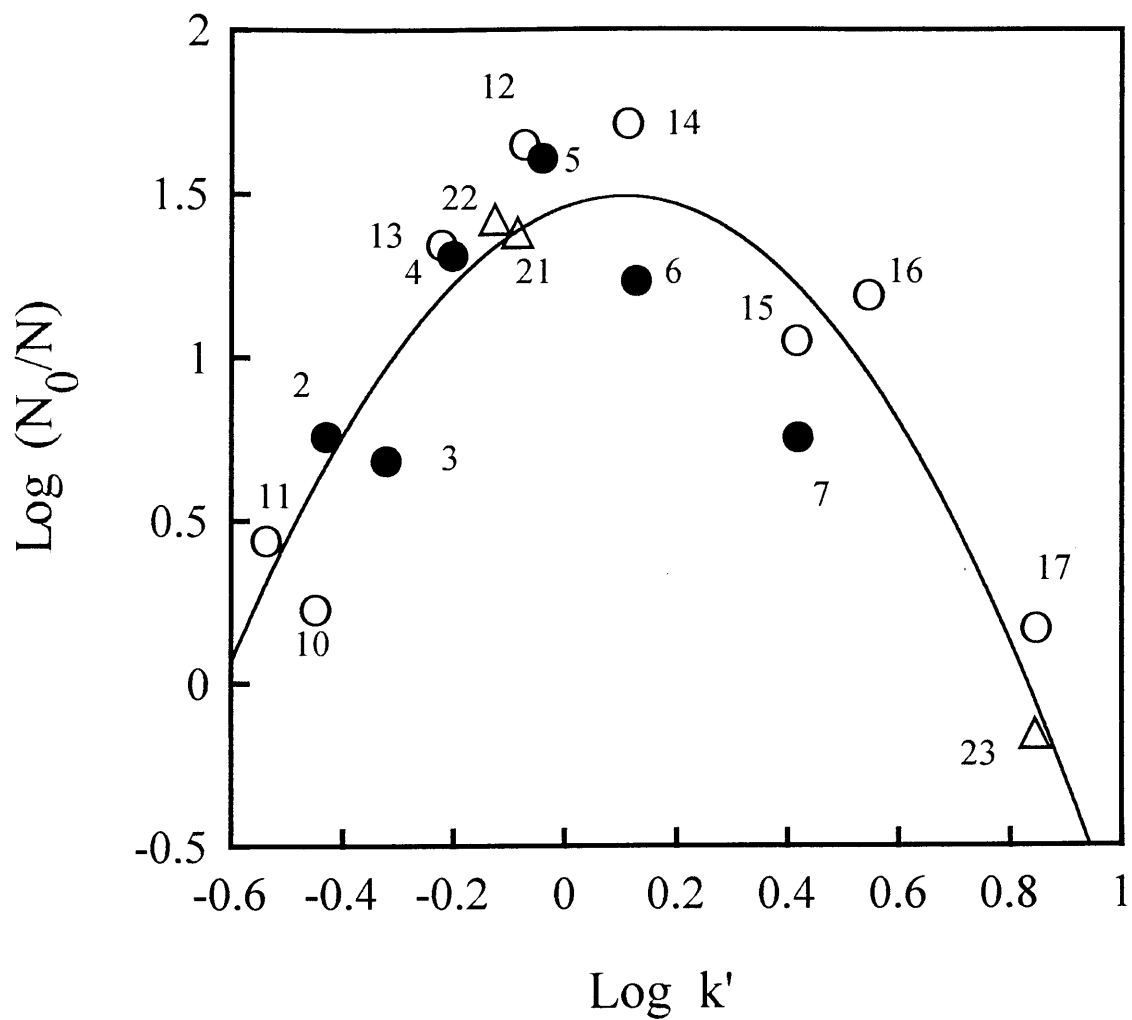


Fig. III-3-9 Relationship between  $\log N_0/N$  for BAC and  $\log k'$  of dibasic acid diesters. Symbol is the same as that in Fig. III-3-8.



### 3-4 考察

いうまでもなく、手指消毒剤の効果の評価は、in vivo，すなわち、実際の手指消毒によっておこなうことが望ましいが、配合基剤の選定、適正濃度範囲の検討など、製剤化の前段階でそれを実施することは、被験者の確保や労力など各種制約を伴い、煩雑でもある。また、多くの配合化合物相互間の殺菌効果の比較などにおいては、むしろ、in vitro の場合のほうが再現性のよい結果が得られることが多い。殺菌剤の抗菌力の測定方法として、最小発育阻止濃度やフェノール係数法、拡散法など各種の方法が周知されているが、これらの方法は皮膚消毒効果との相関性が明確でない。また、CH エタノール溶液のように、エタノールの蒸発の前後で作用する薬剤が異なる場合には、これらの方法は適用できない。すなわち、CH エタノールを手指消毒剤として用いる場合、適量を手にとり、擦り込む方法が一般に行われているが、消毒直後の効果はエタノールおよび CH の作用の合計であり、一方、消毒効果の持続性の面では、エタノール蒸発後手指に残存する CH の単独の作用に、ほとんど依存するものと考えられる。エモリエント剤を CH エタノールに配合し、消毒効果に及ぼす影響を調べる場合にも、以上の点に関して、厳密に2つに分けて議論する必要がある。本報告で記述した殺菌力試験法は、CH エタノールのエタノールを完全に蒸発、除去した後、残存する CH およびエモリエント剤の殺菌力を測定し、CH 単独の場合と比較検討することにより、エモリエント剤自身の CH の殺菌力に与える影響を調べようとしたものである。特に、皮膚消毒後の皮膚上に残存する殺菌剤による resident flora の増加の抑制および transient flora の定着防止といった、消毒後の皮膚上での抗菌効果の持続性に的を絞って、本試験法を考案した。

基本的な特性として、CH は皮膚やセルロースに吸着されやすい<sup>8,9)</sup>、とされているので、基質としてセルロース製のろ紙を選択した。また、ろ紙上での乾



燥による菌の死滅を防止するために、菌液滴下後、ただちに蓋をした。菌回収率は菌種によって異なったが、回収菌数には再現性が認められたので、作用後の回収菌数を生残菌数とみなし、これを殺菌活性の指標とした。

化粧品原料として使用されるエモリエント剤の種類は数多くあるが、ここで試験したエモリエント剤はすべて 80 % (v/v) エタノールに可溶なものばかりで、不溶なものや低温で析出するものは除外した。S. aureus および P. aeruginosa を供試菌として、CH 単独および CH とエモリエント剤との併用系の殺菌力を測定した結果、いくつかのエモリエント剤が CH の殺菌活性を強めることがわかった。殺菌力増強効果を示したのは、S. aureus に対して、DIPA, GC, DIBA および PG の 4 種であり、P. aeruginosa に対しては DIBA のみであった。これら 4 種のエモリエント剤のうち、GC および DIBA については、他の菌種でも試験したが、増強効果が認められたのは S. marcescens だけであり、それ以外の菌種では、増強効果がみられないか、または、菌回収液中の生残菌数が少なく、判定不能であった。

本来、CH の抗菌力は各種物質の共存によって影響を受ける。抗菌力を低下させるものとして、血清<sup>10)</sup>、多糖類<sup>11)</sup>、各種有機物（粉末ミルク、乾燥ウシ血液、魚粉）<sup>12)</sup>などが知られており、また、綿<sup>8)</sup>のような繊維や皮膚<sup>9)</sup>に吸着することによっても抗菌性は低下する。Barnes<sup>13)</sup>は 0.1 %CH の非イオン界面活性剤存在下での有効量を阻止帯から調べており、ポリオキシエチレンモノアルキルエーテル等が存在すると、CH の有効濃度が 30 %減少すること、また、セトステアリルアルコールとポリオキシエチレンモノアルキルエーテルを含むパラフィン-水系エマルジョンにおいて、乳化助剤が 1 %のとき、90 %以上の活性を失うことを明らかにしている。今回試験したエモリエント剤には非イオン界面活性剤や高級アルコールが含まれており、エタノールを蒸発させ、ろ紙上に CH とエモリエント剤を共存させれば、CH 単独の場合よりも抗菌力が低

下することが予想された。しかし、実際は、本実験結果に示したように、試験した 13 種のエモリエント剤はいずれも CH 単独に比べて殺菌力の劣るものはなく、逆に増強するものがいくつか認められた。

皮膚に吸着された CH 量と抗菌力との関係については詳細な検討例もあり<sup>9)</sup>、その吸着量と持続効果時間とは、一応、比例的であることが明らかにされている。この持続効果は殺菌活性の関数とみることができ、ろ紙上でも同様に考えてよいと思われる。CH 単独の場合、Fig. III-3-4 に示したように、CH 濃度が 0.1~0.4 % (w/v) の範囲で、濃度と生残菌数の対数值とは直線関係にあり、ろ紙上に存在する CH 濃度の増加とともに、その有効量が増加したものと考えられる。しかし、エモリエント剤と CH が共存した形で、殺菌力増強効果を示した理由については、CH の有効量以外の因子が寄与していることを想定しなければならない。すなわち、増強効果は試験したすべての菌種については認められていないこと、また、菌種によっては増強効果を示すエモリエント剤の種類が異なることも明らかである。

エモリエント剤の極性（水溶性・油溶性）や供試菌のタイプ（グラム陰性菌・グラム陽性菌）といったことも CH の抗菌力に影響していると考えられる。

この増強効果を示した 4 種のエモリエント剤は、それぞれ、単独では殺菌力はまったく認められず、エタノール蒸発後、ろ紙上で CH と共存するときのみにおいて、CH 単独の場合よりもはるかに強い殺菌活性を発揮した。

CH の殺菌活性を高めることが見出された DIPA および DIBA 以外の二塩基酸ジエステルも CH に対して同様の効果があるのか、また、もしそうなら他の殺菌剤に対しても増強効果を示すのか、非常に興味ある問題であった。ここでは、二塩基酸ジエステルの 3 つの同族体について、ろ紙上で菌と接触させることにより殺菌力増強効果の有無を調べた。

本実験では菌液の接種を 5 回繰り返したが、これは 1 回の処理では増強効果

として検出できないことがあるが、繰り返すことにより、検出可能となる<sup>19)</sup>。

二塩基酸ジ-n-ブチル、アジピン酸ジエステルおよびフタル酸ジエステルの各同族体には、それぞれ CH および BAC の殺菌活性を増強する化合物が存在し、各同族体の疎水性の順序(たとえば、二塩基酸やアルキル基の鎖長)に従って、その増強効果をプロットしてみると、ある鎖長のところに最適値が存在することがわかった。したがって、増強効果はジエステル類の疎水的性質と密接に関連していることが予想された。定量的構造活性相関 (QSAR) の検討には水／オクタノール系の分配係数 (log P) が用いられることが多いが<sup>20-23)</sup>、ここでは、log P と直線関係にあることが知られる<sup>24)</sup> log k' を二塩基酸ジエステルの疎水性を表すパラメータとして用いた。

増強効果を示す二塩基酸ジエステルの log k' の範囲は-0.55~0.85 であり、19 化合物がこの範囲に入った。k' の測定において、疎水性以外の要因が関与していると思われるシュウ酸ジ n-ブチルを除く 18 化合物の増強効果と疎水性との関係について、線形多重回帰分析を行なったところ、CH および BAC に関し、それぞれ、相関係数が 0.910 および 0.911 である、2つの二次式が得られ、増強効果は疎水性と密接に関係していることは明らかであった。計算上、最適な効果をもたらす log k' は CH および BAC において、それぞれ、0.175 および 0.108 であるが、この差はそれほど重要でない。というのも、最も有効な化合物は両殺菌剤において共通しているからである。

二次式で表される抗菌活性の QSAR はいくつか報告されているが<sup>20,23-25)</sup>、いずれも、それ自身が抗菌活性を示す薬剤に関するものであり、ここで示した二塩基酸ジエステルのように、活性のない化合物の他の殺菌剤に対する増強効果が疎水性パラメータの二次式で表されることは、これまでまったく知られていない。

最も増強効果が大きい二塩基酸ジエステルの 1 つであるアジピン酸ジイソブ

チルを用いて、その他のいくつかの殺菌剤について同様に、増強効果の有無を測定した。Fig. III-3-7 に示したように、第四級アンモニウム化合物に対する増強効果は認められたが、PHMB および AG に対する増強効果はほとんど認められなかった。本実験条件下では、この2つの殺菌剤は単独でほとんど殺菌効果がなく、増強効果の発現には、殺菌剤単独である程度の殺菌活性が存在することが必要と思われた。

二塩基酸ジエステルの CH や BAC に対する増強効果がエステル自身の疎水性に依存していることは、上述のように、明らかである。

疎水性化合物の役割について考察すると、疎水性化合物は、アルコール類や麻酔剤で例示されているように、生体膜と相互作用し、膜を攪乱し、その機能に影響を及ぼすと考えられる<sup>26-28)</sup>。さらに、これらの疎水性化合物の生物活性はその疎水性(たとえば、分配係数)と密接に関連していることが明らかにされている<sup>29-33)</sup>。二塩基酸ジエステルも疎水性化合物に属し、それ自身は殺菌活性はないが、同様に生物膜と相互作用すると推察される。したがって、最適な疎水性を有する二塩基酸ジエステルは殺菌剤の殺菌活性をある程度高めることができるものと思われた。

二塩基酸ジエステルと細胞膜との相互作用は、別の観点、すなわち、溶解度パラメータ(SP)からの解釈も可能と思われる。Vaughan と Wright<sup>34)</sup>は Rehn ら<sup>35)</sup>の1,3-ジヒドロキシブタン誘導体の抗菌性についての論文を再評価し、SP と抗菌活性に重要な関係があり、その関係はそれぞれの菌種に特有のもの、すなわち、各菌種に対して最適な活性を示す溶解度パラメータが存在することを示した。SP は本来液体間の混合性の尺度となる液体の特性値であるが、高分子に対する溶剤や可塑剤の選択にも利用されているように、相溶性を示すかどうかの指標ともなる。SP は分子量、沸点および密度から、次の Hildebrand の式<sup>36)</sup>を用いて導くことができる。

$$SP = [(23.7 T_B + 0.02 T_B - 2950 - 1.986 T_D)/(MW/D)]^{1/2}$$

ここで、 $T_B$ は760 mmHgにおける沸点(K)、 $T_D$ は密度測定の温度 (K)、MWは分子量、Dは密度である。たとえば、最も有効な化合物の1つであるアジピン酸ジ-n-ブチルについての物性値<sup>37)</sup> [ $T_B = 578$  K (7 mmHgにおける沸点158.7°Cの沸点換算図表からの換算値)、 $T_D = 293$  K、MW=258、D=0.9615]を代入し、エステルに対する補正值0.6を加えると約8.5となる。この値はVaughanとWright<sup>34)</sup>が例示した*S. aureus*に対する抗菌活性がピークとなるSPの値(約8.3)に極めて近いといえる。したがって、1つの考え方として、アジピン酸ジ-n-ブチルは*S. aureus*と相溶性があり、細胞内に可溶化され、膜を攪乱し、殺菌剤の標的部位への透過を促進しているものと思われる。

### 3-5 結論

0.2%(w/v) CH を含む 80%(v/v) エタノール溶液に各種エモリエント剤を添加し、エタノール蒸発後の殺菌力を測定し、CH 単独の場合と比較することにより、CH の殺菌力に及ぼすエモリエント剤の影響を調べた。*S. aureus* および *P. aeruginosa* を供試菌とし、13 種のエモリエント剤を試験した結果、*S. aureus* に対して GC, DIPA, DIBA および PG の 4 種が、*P. aeruginosa* に対しては DIBA 1 種が CH の殺菌力を増強することがわかった。

つぎに、CH の殺菌力を顕著に増強した DIBA と類似の化学構造をもつ二塩基酸ジエステル同族体について、さらに詳細に検討した結果、二塩基酸ジエステルの CH および BAC の殺菌力に対する増強効果は、二塩基酸ジエステルの疎水性に依存し、疎水性パラメータとして用いた  $k'$  の対数値の二次関数として表すことができた。また、この増強効果は、試験した第四級アンモニウム化合物のすべて(BAC, DDAC, BEC, HDPC)で認められ、その発現には、殺菌剤単独である程度の殺菌活性を必要とすることが示唆された。

このように、最適な疎水性を有する化合物（エモリエント剤）を併用することは、手荒れ防止の目的だけでなく、殺菌剤の活性を高める、1 つの手段として、実用上、非常に有用と考えられる。

## 参考文献

- 1) E. J. L. Lowbury, H. A. Lilly and J. P. Bull, *Brit. Med. J.*, **1**, 1445 (1990).
- 2) E. J. L. Lowbury, H. A. Lilly and J. P. Bull, *Brit. Med. J.*, **2**, 531 (1990).
- 3) E. J. L. Lowbury, H. A. Lilly and G. A. J. Ayliffe, *Brit. Med. J.*, **4**, 369 (1990).
- 4) D. Raahave, *Acta Chir. Scand.*, **140**, 595 (1974).
- 5) R. Hall, *Problem in the Control of Hospital Infection*, (1980), Royal Society of Medicine. [ 小林寛伊訳, 院内感染防止対策, 現状と問題点, p23-33, 永井書店, 大阪 (1983) ].
- 6) 尾家重治, 神代 昭, 薬学雑誌, **104**, 780 (1984).
- 7) I. H. Blank, M. H. Coolidge, L. Soutter and G. V. Rodkey, *Surg. Gynecol. Obstet.*, **91**, 577 (1950).
- 8) 細淵和成, 佐藤健二, 防菌防黴, **5**, 163 (1977).
- 9) 細淵和成, 佐藤健二, 小林寛伊, 高橋泰子, 都築正和, 防菌防黴, **9**, 515 (1981).
- 10) 辻 明良, 関口金雄, 金子康子, 川崎賢二, 小川正俊, 五島瑳智子, 感染症学会誌, **53**, 292 (1979).
- 11) T. D. Hennessey, *J. Periodont. Res.*, **8**, Suppl. 12, 61 (1973).
- 12) P. Gelinias and J. Goulet, *J. Appl. Bacteriol.*, **54**, 243 (1983).
- 13) M. Barnes, Unpublished work, cited in *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **24**, 259 (1973).
- 14) 木原孝治, 古田太郎, 防菌防黴, **14**, 597 (1986).
- 15) T. Furuta and K. Kihara, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1309 (1992).
- 16) R. Goldenberg and C. de La Rosa, *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **22**, 635 (1971).

- 17) 古田太郎, 防菌防黴, **21**, 189 (1993).
- 18) K. Miyake and H. Terada, *J. Chromatogr.*, **157**, 386 (1978).
- 19) 古田太郎, 木原孝治, 武智 誠, 大々瀬浩史, 永井 勲, 防菌防黴, **15**, 505 (1987).
- 20) E. J. Lien, C. Hansch and S. M. Anderson, *J. Med. Chem.*, **11**, 430 (1968).
- 21) A. Leo, C. Hansch and D. Elkins, *Chem. Rev.*, **71**, 525 (1971).
- 22) Y. Yasuda-Tasaki, S. Namiki-Kanie and Y. Hachisuka, *J. Bacteriol.*, **136**, 484 (1978).
- 23) 高麗寛紀, 町川房市, 堀江徳愛, 武市一孝, 芝崎 勲, 防菌防黴, **11**, 401, 553 (1983).
- 24) S. H. Unger and G. H. Chiang, *J. Med. Chem.*, **24**, 262 (1981).
- 25) D. Hemry, J. H. Block, J. L. Anderson and G. R. Carlson, *J. Med. Chem.*, **19**, 619 (1986).
- 26) H. Schneider, *Biochim. Biophys. Acta*, **163**, 451 (1968).
- 27) C. M. Grisham and R. E. Barnet, *Biochim. Biophys. Acta*, **311**, 417 (1973).
- 28) L. O. Ingram and N. S. Vreelaod, *J. Bacteriol.*, **144**, 481(1980).
- 29) S. J. Paterson, K. W. Buttler, P, Huang, J. Labelle, I. C. P. Smith and H. Schneider, *Biochim. Biophys. Acta*, **226**, 597 (1972).
- 30) S. Roth and P. Seeman, *Biochim. Biophys. Acta*, **255**, 207 (1972).
- 31) A. G. MacDonald, *Biochim. Biophys. Acta*, **507**, 26 (1978).
- 32) P. Seeman, *Pharmacol. Rev.*, **24**, 583 (1972).
- 33) M. K. Jain and N. M. Wu, *J. Membr. Biol.*, **34**, 157 (1977).
- 34) C. D. Vaughan and F. J. Wright, *Pharm. Acta Helv.*, **61**, 95 (1986).



- 35) D. Rehen, W. Stiegert and H. Nottle, *Pharm. Acta Helv.*, **59**, 162, 339 (1984).
- 36) C. D. Vaughan, *J. Cosmet. Chem. Soc.*, **36**, 319 (1985).
- 37) 日本化学会編, 化学便覧 基礎編 I, 丸善 (1966).

## 総括

本論文は両親媒性化合物の中で抗菌性を有するアニオン系とカチオン系の化合物に的を絞り、第Ⅰ編では、主として、ミセル構造について、第Ⅱ編では、水溶液中における抗菌性両親媒性分子と金属イオンの相互作用、そして、第Ⅲ編は応用編として抗菌性両親媒性分子の溶液物性と殺菌活性との相関について検討したものである。アニオン界面活性剤としては、*N*-アシルサルコシナトリウムおよびオクタンスルホン酸ナトリウムを選択した。*N*-アシルサルコシン塩は分子中に *N*-メチルアミド基 (-CONCH<sub>3</sub>-) を有するため、シスおよびトランス異性体が存在し、ミセル形成によりこの立体配置の変化が予想される。オクタンスルホン酸ナトリウムは少量の多価金属イオン共存下において凝集や沈殿を生じることがないため、これら混合系の物理化学的測定や殺菌活性を調べるうえで、実験系の複雑さを回避できる利点がある。カチオン系の化合物としては、グルコン酸クロロヘキシジンおよび第四級アンモニウム塩を取り上げた。これらはいずれも医療や食品などの高度な衛生管理を必要とする分野において殺菌消毒剤として汎用されている化合物である。

第Ⅰ編第1章では、 $\delta$ -炭素および極性基部分にニトロキシドラジカル基をもつ長鎖アルキル化合物（それぞれ、5-(*N*-オキシル-4',4'-ジメチルオキサゾリジン)パルミチン酸 [5-PASL] およびラウリン酸 2,2,6,6-テトラメチル-4-ピペリジノール-1-オキシル [1-LASL]）をスピンプローブとして臭化セチルトリメチルアンモニウム (CTAB) および塩化セチルトリメチルアンモニウム (CTAC) ミセル中に可溶化し、ESR スペクトルからプローブの回転相関時間を求め、ミセル中におけるプローブ分子の束縛状態を調べた。5-PASL を可溶化した CTAB 水溶液において、球状から棒状ミセルへの転移と考えられる濃度領域、すなわち、第2 CMC 付近で回転相関時間の増加が認められた。し

かし、対イオンが異なる CTAC ミセルではその変化が観察されなかった。一方、1-LASL の場合、CTAB ミセル中においても相関時間の変化はほとんど見られなかった。これらの結果から、CTAB は、そのミセル形状変化により、ミセルの疎水基部分(5-PASL の  $\delta$ -炭素付近に対応する部分)は、強い束縛を受けて rigid になるが、親水基付近はほとんど束縛を受けないことが明らかになった。

第 I 編第 2 章は、第 1 章と同じニトロキシドラジカル (5-PASL および 1-LASL) を用い、これらのスピンラベルプローブを含む CTAB 水溶液のプロトン NMR スペクトルを測定し、ニトロキシドラジカルによって生じた N-CH<sub>3</sub> ピークの双極子誘起横緩和時間 ( $T_{2M}$ ) を測定し、ミセルの球-棒状転移にともなうミセルの rigidity 変化を調べた。CTAB ミセルに 5-PASL を可溶化するとき、60–110 mg/cm<sup>3</sup> の濃度範囲で、 $T_{2M}$  は急激に減少し、さらに濃度が増加すると一定になった。この濃度領域は CTAB の第 2 CMC に相当するので、 $T_{2M}$  の著しい変化は球状ミセルから棒状ミセルへの転移のためであると考えられる。1-LASL の場合も  $T_{2M}$  の減少が認められたが、5-PASL ほど顕著ではなかった。これらの結果から、ミセルの球-棒状転移において、アルキル鎖は強く束縛されるが、極性基部分はあまり大きな影響を受けないことがわかった。また、プローブ分子のラジカル中心とそれに隣接する CTAB 分子の極性基間の平均距離は、ミセルの形状変化の結果、約 17–20% 減少することが明らかになった。

第 I 編第 3 章では、*N*-アシルサルコシン塩の濃度を変えて、<sup>1</sup>H-NMR スペクトルを測定し、ミセル形成にともなう分子のコンホメーション変化を調べた。*N*-アシルサルコシンナトリウム分子は、アミド基の C-N 結合に関してシス体とトランス体の立体配置がある。界面活性剤の濃度が増加するとき、シス体に比べてトランス体の割合が増加し、そして、この変化は CMC 付近でもっとも顕著であった。この結果から、*N*-アシルサルコシンナトリウム分子は、ミセル形成により強い束縛を受けるため、ミセル中ではトランス体の立体配置が

単分散状態のそれよりも安定であることが明らかになった。

第Ⅱ編第1章では、NaOSとLaCl<sub>3</sub>の混合水溶液中に形成される複合体の組成を表面張力、電気伝導度およびプロトンスピン-格子緩和時間を解析することにより決定した。モル比(LaCl<sub>3</sub>/NaOS)<0.1の領域で、OS<sup>-</sup>:La<sup>3+</sup>=3:1の複合体(3:1複合体)生成が明らかとなり、この複合体の空気/水界面における分子占有面積は、208Å<sup>2</sup>であることがわかった。また、モル比(LaCl<sub>3</sub>/NaOS)≒0.5付近およびモル比(LaCl<sub>3</sub>/NaOS)>1.2の領域では、それぞれ2:1複合体および1:1複合体の生成が推定された。さらに、これらのモル比の中間領域では、複合体が混在していると仮定して、水溶液中に存在する各複合体の分布曲線を算出した。

第Ⅱ編第2章では、水晶振動子マイクロバランス(Quartz Crystal Microbalance: QCM)を用い、各種カチオン共存下において、水晶振動子上にキャストした合成脂質膜へのNaOSの吸着量を評価した。その結果、NaOSは2価および3価カチオンによって脂質膜への吸着が促進された。特に、3価カチオンの効果が顕著であり、1価カチオンは影響しなかった。アンモニウム塩の場合、比較的アルキル基の大きなテトラプロピルアンモニウム塩が2価カチオンと同程度の効果を示した。これらの吸着増加はNaOSとカチオンの間に形成された疎水性の複合体によるものと推測される。

第Ⅱ編第3章では、NaOSと各種カチオン混合水溶液中において、*E. coli*の細胞表面電荷、細胞表面疎水性および細胞内成分の漏出を調べた。細胞表面電荷は2価および3価カチオンによって著しく変化したが、1価カチオンは影響しなかった。細胞表面疎水性は3価カチオンの添加により増加したが、1価および2価カチオンではほとんど変化しなかった。また、1価(Na<sup>+</sup>)、2価(Mg<sup>2+</sup>)または3価カチオン(Al<sup>3+</sup>、La<sup>3+</sup>)とNaOSの合計濃度を一定にして、両者の混合割合を変えて表面張力を調べたところ、それらのモル比が、2価カチオン

の場合約 2 : 1, 3 価カチオンでは約 3 : 1 のときに表面張力がもっとも低下した。この表面張力低下は, NaOS-カチオンの複合体形成に起因すると考えられる。また, このとき, 細胞内成分の漏出量も増加し, 細胞膜の損傷・破壊が示唆された。

第Ⅲ編第 1 章では, *E. coli* に対する NaOS の殺菌活性に及ぼす 1 価, 2 価および 3 価カチオンの影響を調べた。カチオン共存下における NaOS の殺菌活性は, 1 価 < 2 価 << 3 価カチオンの順で増強されたが, 1 価カチオンはほとんど効果はなかった。NaOS とカチオンの混合比を変えて, 殺菌活性を調べた結果, 表面張力の場合と同様に, NaOS と 2 価および 3 価の金属イオンの比が, それぞれ, 2 : 1 および 3 : 1 付近で最大の殺菌効果が得られた。NaOS-LaCl<sub>3</sub> 混合水溶液について求めた殺菌活性曲線と各複合体の分布曲線(第Ⅱ編第 1 章)から, 各複合体の殺菌活性の強さを算出した結果, 3 : 1 複合体がもっとも強い殺菌活性をもち, 1 : 1 と 2 : 1 複合体の活性は同程度であると推測された。また, NaOS を脂質膜へ吸着させる作用の強いカチオンほど *E. coli* に対する殺菌活性に及ぼす影響も大きいことが明らかになった。

第Ⅲ編第 2 章では, 塩化ベンザルコニウム, 塩化ベンゼトニウム, ジデシルジメチルアンモニウム塩およびアルキルトリメチルアンモニウム塩同族体 (C<sub>6</sub>~C<sub>16</sub>) の殺菌活性を 0.001~25 % (w/v) の濃度範囲で調べ, そのコロイド化学的性質, 特に, CMC との関連性について考察した。一般に, *E. coli*, *S. typhimurium* や *P. aeruginosa* などの普通の感受性菌は, これらのカチオン界面活性剤に対する感受性は高く, 室温において急速に死滅することが知られている。しかし, 本研究結果から, 低温においては高濃度で生存するものがあり, 殺菌活性に至適濃度が存在することが明らかになった。塩化ベンザルコニウムに強い抵抗性のある菌株 *A. xylosoxidans* は上記のすべてのカチオン界面活性剤に対して室温で殺菌活性に極大が観察された。この極大点は CMC 付近にあ

り、CMC以上の濃度では殺菌活性が著しく低下した。アルキルトリメチルアンモニウム塩同族体の殺菌活性の極大点は、アルキル鎖長の増加とともに低濃度側へシフトした。カチオン界面活性剤の各同族体において、殺菌活性の極大点における界面活性剤濃度とCMCの比はほとんど一定であることから、高濃度領域における殺菌活性低下は界面活性剤のミセル形成が深く関与しているものと考えられる。また、界面活性剤は、ミセル形成により、その分子運動が著しく束縛される（第I編第1章～第3章）。このことも高濃度領域における殺菌活性の低下と密接な関係があると考えられる。このように、濃度によって水溶液中での溶存状態が変化する薬剤を取り扱う場合、溶液中の分子集合状態もその殺菌活性におよぼす重要な因子として考慮する必要があると判断される。

第III編第3章では、カチオン系化合物の中でも、特に医療分野において消毒剤として広く利用されているビグアニジン系のグルコン酸クロルヘキシジンを取り上げた。このグルコン酸クロルヘキシジンに手荒れ防止の目的で化粧品に用いられているエモリエント剤を添加したアルコールローション型手指消毒剤を調製し、アルコールを蒸発させた後、菌液を接種し、一定時間後の生菌数を測定することにより、エモリエント剤を含まない試料と比較、検討し、グルコン酸クロルヘキシジンの殺菌活性におよぼすエモリエント剤の影響を調べた。*S. aureus* および *P. aeruginosa* を供試菌とし、13種のエモリエント剤を試験した結果、*S. aureus* に対して、ヤシ油脂肪酸ポリオキシエチレングリセリル、アジピン酸ジイソプロピル、アジピン酸ジイソブチルおよびポリグリセリンの4種が、*P. aeruginosa* に対してはアジピン酸ジイソブチルの1種がグルコン酸クロルヘキシジンの殺菌活性を増強した。つぎに、もっとも増強効果が顕著であったアジピン酸ジイソブチルと同族体の各種二塩基酸ジエステルを用い、グルコン酸クロルヘキシジンおよび塩化ベンザルコニウムの殺菌活性におよぼす効果を、特に、二塩基酸ジエステルの疎水性と関連づけて系統的に調べた。

二塩基酸ジエステルのグルコン酸クロルヘキシジンおよび塩化ベンザルコニウムの殺菌活性に対する増強効果は、二塩基酸ジエステルの疎水性に強く依存し、疎水性パラメータとして用いたキャパシティブァクターの対数値の二次関数として表すことができた。また、この増強効果は、他のカチオン界面活性剤に対しても認められた。

以上のように、本論文は抗菌性を有する両親媒性化合物の殺菌活性に関してミセル構造や界面化学的変化などの物理化学的側面から、これら化合物の殺菌機構の解明のための基礎的データを得ようと試みたものである。化合物の殺菌活性と各種物理化学的パラメータの関連性を明らかにすることは、その化合物の活性を最大限引き出すためにも重要であると考えられる。また、殺菌活性の測定は多大な労力、時間や費用を必要とするため、物理化学的パラメータから薬剤の活性を予測できれば、実用上新しい商品を開発するうえで非常に有益である。

第 I 編第 3 章において述べた *N*-アシルサルコシンナトリウム分子のように、特定のコンホーマーがミセル化に伴って安定化する事実とこのサルコシン塩のもつ抗菌性との関連の究明が今後の課題となる。

アニオン界面活性剤の抗菌力は弱いとされているが、本研究で示したように多価金属イオン共存下のような特定の条件下において非常に強い殺菌活性を示す。従来からのアニオン界面活性剤を主体とする液体洗剤、たとえば、食器洗剤は起泡力や洗剤力に優れているが、洗剤自身にはまったく殺菌作用はない。一方、塩化ベンザルコニウムのようなカチオン界面活性剤は、それ自身、強い殺菌活性をもっているが、多価金属イオンなどの電解質が共存すると著しくその活性が低下する。また、洗剤力もほとんど期待できない。この点を改良する方法として、カチオン-非イオン界面活性剤混合系の洗剤が開発されて

いる。しかし、この洗淨剤はカチオン界面活性剤の単独使用に比べて、起泡力や洗淨力について若干の改善はみられるが、アニオン界面活性剤を主成分とした洗淨剤の性能には及ばない。また、殺菌活性が著しく低下するという欠点があった。そこで、本研究結果（第Ⅱ編第1～3章および第Ⅲ編第1章）をもとに、アニオン界面活性剤の分子構造と適当な多価金属イオンを選択することにより、起泡力および洗淨力に優れ、且つ、強い殺菌活性をもつ液体洗淨剤の開発が可能となった（特開平 7-292397 (1995)）。一方、洗淨剤の多くにアニオン界面活性剤が使用されていること、自然界には多価金属イオンが多く存在することを考え合わせると、本来、抗菌性のない洗淨剤であっても、自然界に放出され、多価金属イオンとの相互作用により殺菌性を獲得し、生態系に重大な影響を及ぼしていることもあることを、本研究は示唆している。

抗菌作用のある化合物は数えきれないほど多いが、実用化されているものは限られる。さらに、医療分野の消毒剤や食品・化粧品などの防腐剤として使用できる抗菌剤の数は極めて少ないといえる。そのような分野において、新規の抗菌性物質の開発は、安全性評価等に莫大な費用を必要とすることを考慮すると、現存する抗菌剤をいかに有効かつ効果的に利用していくかということも重要な課題であると考えられる。手荒れの防止目的で配合した殺菌活性のないエモリエント剤がカチオン系殺菌剤の殺菌活性を増強したことは、殺菌消毒剤を開発するうえで、有用な指針与えたものと考えられる。このアルコールローション型手指消毒剤に関する成果は、日本およびアメリカ特許 [ U. S. Patent 5017617 (1991), 特公平 4-33226 (1992), 特公平 5-63446 (1993) ] の取得につながり、現在、病院など医療機関において、著者の所属会社が開発した自動手指消毒器と共に院内感染防止に役立っているものと確信する。





## 謝辞

本論文をまとめるにあたり，終始ご懇切なご教示，ご指導をいただいた名古屋工業大学 岡林博文教授に心から厚く御礼申し上げます。また、有益なご指導・ご助力をいただきました名古屋工業大学 永長久彦教授に感謝申し上げます。

さらに，本研究を遂行するにあたり，有益な議論やご指導，ご協力をいただきました名古屋工業大学 吉田忠義教授および増田秀樹教授，大阪大学工学部 岡原光男教授（故人），関西大学工学部 土戸哲明教授，大阪市立工業研究所 武田徳司先生に感謝いたします

本研究はサラヤ株式会社バイオケミカル研究所において行われたものであり，研究の実施および発表の機会を与えて下さいました更家章太社長に深く感謝申し上げます。

最後に，本研究の遂行にあたり，大きな理解のもとに，ご指導とご助言を頂き，いつも激励して下さいました，サラヤ株式会社 下村国夫常務および古田太郎 研究所長，ならびに，実験にご協力頂いた研究所の関係各位に深く謝意を表します。



## 論文目録

本博士論文は、つぎの学術雑誌に掲載された論文よりなる。

- 1) The proton magnetic resonance spectra and molecular conformations of sodium *N*-acyl sarcosinates in aqueous solution, H. Takahashi, Y. Nakayama, H. Hori, K. Kihara, H. Okabayashi and M. Okuyama, *J. Colloid Interface Sci.*, **54**, 102-107 (1976) [ 第 I 編第 3 章 ].
- 2) The ESR studies of solubilised nitroxide spin probes in cetyltrimethylammonium bromides micelles., H. Okabayashi, K. Kihara and M. Okuyama, *Z. Naturforsch.*, **32a**, 1571-1573 (1977) [ 第 I 編第 1 章 ].
- 3) Nitroxide-radical-induced nuclear magnetic relaxation studies of cetyltrimethylammonium bromide micelles, H. Okabayashi and K. Kihara, *Chemica Scripta.*, **12**, 27-31 (1977) [ 第 I 編第 2 章 ].
- 4) グルコン酸クロルヘキシジンの殺菌力に及ぼす各種エモリエント剤の影響, 木原孝治, 古田太郎, 防菌防黴, **14**, 597-604 (1986) [ 第 III 編第 3 章 ].
- 5) Relationship between the effects on bactericidal activity of selected disinfectants and the hydrophobic characters of dibasic acid diesters, T. Furuta and K. Kihara, *Chem. Pharm. Bull.*, **40**, 1309-1312 (1992) [ 第 III 編第 3 章 ].

- 6) Enhancement of sodium 1-octanesulfonate activity against *Escherichia coli* by cations, K. Kihara, N. Kito and T. Furuta, *J. Antibact. Antifung. Agents*, **24**, 449-456 (1996) [ 第Ⅱ編第3章, 第Ⅲ編第1章 ].
- 7) Synergistic bactericidal activity in binary mixtures of an anionic surfactant and polyvalent metal ions, K. Kihara, N. Kito and T. Furuta, *Biocontrol Sci.*, **2**, 13-17 (1997) [ 第Ⅱ編第3章, 第Ⅲ編第1章 ].
- 8) オクタンスルホン酸ナトリウム-塩化ランタン混合水溶液中に形成される複合体の組成とその殺菌作用との関連性, 木原孝治, 古田太郎, 日化, 1997, 323-328 [ 第Ⅱ編第1章 ].
- 9) Relationship between adsorption of an anionic surfactant onto synthetic lipid membrane and its bactericidal activity in the presence of metal ions, K. Kihara, K. Sugiya and T. Furuta, *Biocontrol Sci.*, **2**, 49-53 (1997) [ 第Ⅱ編第2章 ].
- 10) Existence of an optimal concentration for bactericidal activity of quaternary ammonium compound, K. Kihara, S. Yoshikawa, Y. Nishio, T. Furuta, *Biocontrol Sci.*, **2**, 61-66 (1997) [ 第Ⅲ編第2章 ].

## その他の著者関連論文および特許

### 論文

- 1) グルコン酸クロルヘキシジンを含む 2 種のアルコール製剤の手指細菌および手指汚染菌に対する抗菌効果の比較研究, 古田太郎, 木原孝治, 武智 誠, 大ヶ瀬浩史, 永井 勲, 防菌防黴, **15**, 505-510 (1987).
- 2) 第四アンモニウム塩およびグルコン酸クロルヘキシジンの抗菌活性に及ぼす培地成分の影響, 古田太郎, 上田明宏, 高本一夫, 村田雄司, 木原孝治, 防菌防黴, **21**, 117-124 (1993).
- 3) 被膜性皮膚保護剤プライムコート of 耐油性および皮膚安全性の検討, 東 禹彦, 古田太郎, 木原孝治, 皮膚, **35**, 105-108 (1993).
- 4) 角層水分量に及ぼす各種アルコールローション型手指消毒剤の影響, 木原孝治, 村田雄司, 古田太郎, 皮膚, **36**, 349-353 (1994).

### 特許

- 1) Disinfectant composition for medical use, U.S. Patent 5017617 (1991).
- 2) 手指消毒用組成物, 特公平 4-33226 (1992).
- 3) 手指消毒用組成物, 特公平 5-63446 (1993).
- 4) 皮膚保護膜形成液, 特公平 6-78222 (1994).
- 5) 殺菌性液体洗淨剤組成物, 特開平 7-292397 (1995).