

二鎖型ビス（第四級アンモニウム）

化合物の抗菌作用

加 藤 信 行

緒 言

界面活性剤の多くは抗菌作用（微生物の発育阻害ないし殺菌作用）を示し、特に陽イオン界面活性剤の作用力は強い。陽イオン界面活性剤のうち第四級アンモニウム塩の殺菌剤としての実用性が Domagk により最初に報告された。¹⁾ 現在では数種の第四級アンモニウム塩が殺菌剤として使用されているが、塩化ベンザルコニウム（BAC）および塩化ベンゼトニウム（BZC）が主体である。図1にそれらの構造式を示したが、R（アルキル基）はBACではドデシル基（C₁₂H₂₅—）およびテトラデシル基（C₁₄H₂₉—），BZCではオクチル基（C₈H₁₇—）が主成分である。これらの第四級アンモニウム塩はグラム陽性細菌に対して強力な抗菌作用を示し，グラム陰性細菌および真菌に対しても有効である。

本報告は新規化合物である二鎖型ビス（第四級アンモニウム）化合物の抗菌作用について検討した結果を述べる。

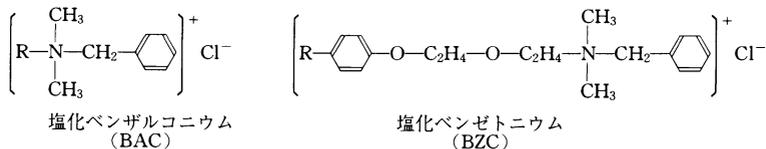


図1 殺菌剤として実用されている主な第四級アンモニウム塩

実験方法

1. 供試薬剤と供試菌

抗菌試験に供した薬剤を表1に示したが、これらの試料は大阪大学工学部
 応用化学科岡原研究室より提供された合成物である。²⁾塩化ベンザルコニウム
 として市販のオスバン液「ダイゴ」(10W/V%)、(アルキル基の組成はドデシル
 基が80～85%、ドデシル基+テトラデシル基が98%以上の製品、日本製薬)を用い
 た。

供試菌としてグラム陽性細菌 (*Bacillus subtilis* var. *niger* OUT 4380, *B. cereus*
 OUT 8361, *Staphylococcus aureus* 209P), グラム陰性細菌 (*Escherichia coli* K-
 12 OUT 8401, *Salmonella typhimurium* DB 21, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC
 27853), かび (*Aspergillus niger* ATCC 1015), 酵母 (*Candida utilis* OUT 6020,

表1 抗菌試験に供した二鎖型ビス（第四級アンモニウム）化合物

$$\begin{array}{c}
 \text{CH}_3 \\
 | \\
 \text{R}_1-\text{N}^+ \\
 | \\
 \text{R}_2
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \text{CH}_2 \\
 \diagup \\
 \text{CH} \\
 \diagdown \\
 \text{HO}
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \text{CH}_2 \\
 \diagdown \\
 \text{CH} \\
 \diagup \\
 \text{HO}
 \end{array}
 \text{—CH}_2\text{—O—Y—O—CH}_2\text{—}
 \begin{array}{c}
 \text{CH}_2 \\
 \diagup \\
 \text{CH} \\
 \diagdown \\
 \text{HO}
 \end{array}
 \begin{array}{c}
 \text{CH}_3 \\
 | \\
 \text{N}^+-\text{R}_1 \\
 | \\
 \text{R}_2
 \end{array}
 \quad 2\text{X}^-$$

試料名	R ₁	R ₂	Y	X
8-C2-I	C ₈ H ₁₇	CH ₃	—(CH ₂) ₂ —	I
10-C2-I	C ₁₀ H ₂₁	〃	〃	〃
12-C2-I	C ₁₂ H ₂₅	〃	〃	〃
8-C4-I	C ₈ H ₁₇	〃	—(CH ₂) ₄ —	〃
10-C4-I	C ₁₀ H ₂₁	〃	〃	〃
12-C4-I	C ₁₂ H ₂₅	〃	〃	〃
8-E3-I	C ₈ H ₁₇	〃	—CH ₂ (CH ₂ OCH ₂) ₂ CH ₂ —	〃
10-E3-I	C ₁₀ H ₂₁	〃	〃	〃
12-E3-I	C ₁₂ H ₂₅	〃	〃	〃
12-C2-S	〃	〃	—(CH ₂) ₂ —	HSO ₄
12-C4-S	〃	〃	—(CH ₂) ₄ —	〃
10-C2-Bz	C ₁₀ H ₂₁	CH ₂ — 	—(CH ₂) ₂ —	C1
8-C4-Bz	C ₈ H ₁₇	〃	—(CH ₂) ₄ —	〃
10-C4-Bz	C ₁₀ H ₂₁	〃	〃	〃
12-C4-Bz	C ₁₂ H ₂₅	〃	〃	〃
10-E3-Bz	C ₁₀ H ₂₁	〃	—CH ₂ (CH ₂ OCH ₂) ₂ CH ₂ —	〃

Saccharomyces cerevisiae OUT 7180) を用いた。

2. 抗菌作用力の検定

抗菌作用力の検定は寒天希釈法による静菌作用力（発育阻害）と無菌水中での殺菌作用力の測定により行った。

寒天希釈法では、細菌については肉エキス・ペプトン寒天培地（NA, pH 7.0）で 37°C, 24時間, かび, 酵母は Czapek-Dox 寒天培地（CDA, pH 5.6）で 30°C, 48時間培養して得た細胞を無菌水に浮遊させ（約 10^8 cells/ml）, この 1 白金耳を試験薬剤を含む培地（細菌は NA 培地, かび, 酵母は CDA 培地）に接種した後, 細菌は 37°C, 24時間, かび, 酵母は 30°C, 48時間後の菌の発育の有無より静菌作用力として最少発育阻止濃度（MIC, $\mu\text{g/ml}$ ）を求めた。

殺菌作用力の測定は 2 種の細菌（*Staph. aureus* および *Sal. typhimurium*）について行った。肉エキス・ペプトン寒天培地で 37°C, 24時間培養して得た細胞を試験薬剤を含む無菌水に浮遊させ（約 10^8 cells/ml）, 30°C, 10分間処理した。この処理液を肉エキス・ペプトン培地（NB, pH 7.0）に 2% となるように植菌し, 37°C, 24時間振盪培養した。培養後の菌の発育の有無より殺菌作用力として最少殺菌濃度（MBC, $\mu\text{g/ml}$ ）を求めた。

実験結果および考察

二鎖型ビス（第四級アンモニウム）化合物のグラム陽性細菌に対する静菌作用力を表 2 に示した。これらの薬剤に対する 3 種の細菌の感受性はほぼ同等であった。N, N-ジメチルタイプ二鎖ビスアンモニウム塩の静菌作用力はアルキル基がオクチル基の化合物（8-C2-I, 8-C4-I, 8-E3-I）では微弱であった。アルキル基がデシル基の化合物（10-C2-I, 10-C4-I, 10-E3-I）およびドデシル基の化合物（12-C2-I, 12-C4-I, 12-E3-I）はいずれも MIC が 2.5~10 $\mu\text{g/ml}$ であり, 強い静菌作用力を示した。連結基の種類による静菌作用力を比較すると, いずれのアルキル基についても $-(\text{CH}_2)_4-$ 型が最も強く,

表2 二鎖型ビス（第四級アンモニウム）化合物のグラム陽性細菌に対する静菌作用力

試料名	最少発育阻止濃度(μg/ml)		
	<i>B. subtilis</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Staph. aureus</i>
8-C2-I	75	>100	75
10-C2-I	5	10	5
12-C2-I	5	7.5	7.5
8-C4-I	50	75	25
10-C4-I	2.5	5	2.5
12-C4-I	5	5	5
8-E3-I	75	>100	50
10-E3-I	5	5	5
12-E3-I	5	5	5
12-C2-S	7.5	7.5	7.5
12-C4-S	5	5	5
10-C2-Bz	5	7.5	5
8-C4-Bz	2.5	5	2.5
10-C4-Bz	5	5	5
12-C4-Bz	25	50	25
10-E3-Bz	2.5	5	2.5
BAC	2.5	5	2.5

—CH₂(CH₂OCH₂)₂CH₂—型がこれにつき、—(CH₂)₂型の作用力がやや弱いことが判る。陰イオンの違いによる静菌作用力の差異はほとんど認められなかった（I⁻イオン型の12-C2-I、12-C4-Iと対応するHSO₄⁻イオン型の12-C2-S、12-C4-SのMICはそれぞれほとんど同等であった）。N—ベンジル—N—メチルタイプ二鎖ビスアンモニウム塩のグラム陽性細菌に対する静菌作用力は、アルキル基がデシル基の化合物については連結基が—CH₂(CH₂OCH₂)₂CH₂—型が—(CH₂)₂—型、—(CH₂)₄—型と比較して強かった。また連結基が—(CH₂)₄—型のアンモニウム塩についてはアルキル基がオクチル基の化合物が強い静菌作用力を示し、デシル基の化合物は作用力がやや低下し、ドデシル基の化合物では大きく低下していた。この様にN、N—ジメチルタイプ二鎖ビスアンモニウム塩とN—ベンジル—N—メチルタイプ二鎖ビスアンモニウム塩では最大の静菌作用力を示すアルキル基の鎖長および連結基に差があることが認められた。この差の原因は細菌の細胞に作用する薬剤の親

水性—親油性の微妙なバランスにあると推定される。小山内, 阿部はエーテル結合を含む陽イオン界面活性剤の合成と抗菌性を検討しているが, 3—ドデコキシプロピルトリメチルアンモニウム塩(一鎖型)がグラム陽性細菌に対して強い静菌作用を示し, その作用力は3—ドデコキシ型より強いことを報告している。³⁾ 俣田らは二鎖型の塩化(2,3—ジヒドロキシ—1—プロピル)ジアルキルアンモニウム(モノアンモニウム塩と略記)および塩化(2—ヒドロキシ—1,3—プロパンジイル)ビス(アルキルジメチルアルモニウム(ジアンモニウム塩と略記))の合成と抗菌特性を検討している。⁴⁾ その報告によると2種のグラム陽性細菌(*Staph. aureus* および *Staph. epidermidis*)に対して最も強い発育阻止力を示したのはモノアンモニウム, ジアンモニウム塩いずれについてもアルキル炭素鎖長10付近の化合物であった。著者らは長鎖アルキル基(一鎖型)を含む化合物(脂肪酸エステル, 1—アルカノール, N—アルキルモノアザクラウンエーテル, アルキルクラウンエーテル)についてアルキル炭素鎖長と抗菌作用力の関係について検討し, グラム陽性細菌に対してはアルキル基がドデシル基の化合物が最も強い静菌作用力を示すことを報告している。⁵⁻⁸⁾ また二鎖型の脂肪酸エステルである蔗糖ジカプリレート(アルキル基としてオクチル基)がグラム陽性細菌に対して蔗糖ジカプレート(デシル基), 蔗糖ジラウレート(ドデシル基)より強い静菌作用力を示すことも報告している。⁵⁾ 本実験で検討した二鎖型ビス(第四級アンモニウム)化合物のグラム陽性細菌に対する静菌作用力は10-C4-I, 8-C4-Bz, 10-E3-Bzが最も強く, 代表的な殺菌剤であるBACの作用力と同等であった。

次に二鎖型ビス(第四級アンモニウム)化合物のグラム陰性細菌に対する静菌作用力を表3に示した。これらの薬剤に対する *E. coli* と *Sal. typhimurium* の感受性は一部の例外を除きほぼ同等であった。*Ps. aeruginosa* は一般に各種薬剤に対し強い抵抗性を示すが, 本実験に供した薬剤もMICが100 μ g/ml以上であり, 静菌作用力はBACと同様に微弱であった。N, N—ジメチルタイプ二鎖ビスアンモニウム塩の *E. coli*, *Sal. typhimurium* に対する静菌作用力はアルキル基がオクチル基の化合物は弱く, デシル基の化合

表3 二鎖型ビス（第四級アンモニウム）化合物のグラム陰性細菌に対する静菌作用力

試料名	最少発育阻止濃度(μg/ml)		
	<i>E. coli</i>	<i>Sal. typhimurium</i>	<i>Ps. aeruginosa</i>
8-C2-I	>100	>100	>100
10-C2-I	7.5	7.5	>100
12-C2-I	75	50	>100
8-C4-I	>100	>100	>100
10-C4-I	5	5	>100
12-C4-I	75	25	>100
8-E3-I	>100	>100	>100
10-E3-I	10	10	>100
12-E3-I	50	10	>100
12-C2-S	100	75	>100
12-C4-S	75	25	>100
10-C2-Bz	75	75	>100
8-C4-Bz	10	25	>100
10-C4-Bz	75	75	>100
12-C4-Bz	>100	>100	>100
10-E3-Bz	25	25	>100
BAC	75	75	>100

物（10-C2-I, 10-C4-I, 10-E3-I）は BAC の約10倍という強い作用力を示した。アルキル基がドデシル基の化合物は静菌作用力は弱かったが、12-E3-I のみ *Sal. typhimurium* に対し有効であった。連結基の種類による静菌作用力をデシル基の化合物で比較すると 10-C4-I > 10-C2-I > 10-E3-I であったが、その差は少なかった。N—ベンジル—N—メチルタイプ二鎖ビスアンモニウム塩の *E. coli*, *Sal. typhimurium* に対する静菌作用力は、アルキル基がデシル基の化合物についてはグラム陽性細菌の時と同様に連結基が—CH₂(CH₂OCH₂)₂CH₂—型が比較的強い作用力を示した。連結基が—(CH₂)₄—型のアンモニウム塩についてもグラム陽性細菌の時と同様にアルキル基がオクテシル基の化合物が強い静菌作用力を示し、デシル基、ドデシル基の順に作用力は低下していた。一鎖型の長鎖アルキル化合物である 3—アルコキシプロピルトリメチルアンモニウム塩³⁾および N—アルキルモノアザクラウンエーテル⁷⁾についてはアルキル基がドデシル基の化合物が *E. coli*, *Sal. typhi-*

表4 二鎖型ビス(第四級アンモニウム)化合物の真菌に対する
静菌作用力

試料名	最少発育阻止濃度($\mu\text{g/ml}$)		
	<i>Asp. niger</i>	<i>Can. utilis</i>	<i>Sacch. cerevisiae</i>
8-C2-I	>100	>100	>100
10-C2-I	>100	10	75
12-C2-I	>100	100	>100
8-C4-I	>100	100	>100
10-C4-I	>100	5	10
12-C4-I	>100	25	>100
8-E3-I	>100	>100	>100
10-E3-I	>100	7.5	25
12-E3-I	100	7.5	100
12-C2-S	>100	75	>100
12-C4-S	>100	25	>100
10-C2-Bz	>100	75	100
8-C4-Bz	>100	25	50
10-C4-Bz	>100	10	100
12-C4-Bz	>100	>100	>100
10-E3-Bz	>100	5	50
BAC	>100	7.5	50

murium に対し比較的強い静菌作用を示すことが報告されている。また
田らの合成した二鎖型の塩化アンモニウムは *E. coli*, *Sal. typhimurium* に
対して、グラム陽性細菌の時と同様にアルキル炭素鎖長10付近の化合物に強
い静菌作用力が認められている。KOURAI らは N, N'-ジアルキル, γ ,
 γ' -ジピリジニウムジヨウ化物の *E. coli* に対する静菌作用力は、アルキル
基がデシル基の化合物が最強であることを報告している。⁹⁾

二鎖型ビス(第四級アンモニウム)化合物の真菌に対する静菌作用力を表4
に示した。これらの薬剤はかび(*Asp. niger*)に対してはBACと同様に静菌
作用力は微弱であった。2種の酵母については *Can. utilis* が供試薬剤に対
し *Sacch. cerevisiae* より高い感受性を示した。この傾向はBACについて
も同様であった。最も強い静菌作用力を示したのは10-C4-Iであり、その
作用力はBACより優っていた。BACとほぼ同等の強い静菌作用を示した
のは10-C2-I, 10-E3-I, 12-E3-I, 10-C4-Bz, 10-E3-Bzであり、アルキ

表5 二鎖型ビス（第四級アンモニウム）化合物の細菌に対する殺菌作用力

試料名	最少殺菌濃度(μg/ml)	
	<i>Staph. aureus</i>	<i>Sal. typhimurium</i>
8-C2-I	>100	>100
10-C2-I	10	50
12-C2-I	7.5	7.5
8-C4-I	>100	>100
10-C4-I	7.5	25
12-C4-I	7.5	7.5
8-E3-I	>100	>100
10-E3-I	10	25
12-E3-I	7.5	7.5
12-C2-S	7.5	50
12-C4-S	7.5	7.5
10-C2-Bz	7.5	50
8-C4-Bz	7.5	>100
10-C4-Bz	10	25
12-C4-Bz	7.5	10
10-E3-Bz	7.5	25
BAC	7.5	25

ル基の炭素鎖長としては10が適当と言える。著者らはアルキル炭素鎖長が10および12の脂肪酸モノグリセライドがかび (*Asp. niger*, *Penicillium citrinum*), 酵母 (*Can. utilis*, *Sacch. cerevisiae*) に対し強い静菌作用力を示すことを認めている。⁵⁾ また炭素鎖長1から16の1-アルカノールのうち、炭素鎖長11の1-アルカノールが *Asp. niger* に対し、炭素鎖長11と12の1-アルカノールが *Can. utilis*, *Sacch. cerevisiae* に対し最大の作用力を示すことを報告している。⁶⁾ さらに炭素鎖長12のN-アルキルモノアザクラウンエーテルが真菌に対し比較的強い静菌作用を示すこと、⁷⁾ 炭素鎖長8~10のアルキルクラウンエーテルが真菌に対して強い静菌作用を示すことを認めている。⁸⁾

最後に二鎖型ビス（第四級アンモニウム）化合物のグラム陽性細菌 (*Staph. aureus*) およびグラム陰性細菌 (*Sal. typhimurium*) に対する殺菌作用力を表5に示した。*Staph. aureus* に対してはアルキル基がオクチル基のN, N-ジメチルタイプ二鎖ビスアンモニウム塩の殺菌作用力は微弱であった

(MBC 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上)。それ以外の供試薬剤はアルキル基、連結基の種類に関係なく強い殺菌作用力を示し (MBC 7.5~10 $\mu\text{g/ml}$)、BAC の作用力と同等であった。一方、*Sal. typhimurium* に対する二鎖型ビス (第四級アンモニウム) 化合物の殺菌作用力は、ほとんどアルキル基の種類に支配されていた。すなわちアルキル基がオクチル基の化合物の作用力は弱く (MBC 100 $\mu\text{g/ml}$ 以上)、デシル基の化合物は MBC が 25~50 $\mu\text{g/ml}$ であり比較的強い殺菌作用力を示した (BAC とほぼ同等の作用力)。アルキル基がドデシル基の化合物は連結基の種類に関係なく MBC 7.5~10 $\mu\text{g/ml}$ という強い殺菌作用力を示した (12-C2-S のみ例外的に作用力微弱であった)。*Staph. aureus* に対する二鎖型ビス (第四級アンモニウム) 化合物の静菌作用力 (MIC) と殺菌作用力 (MBC) を比較してみると MBC は MIC の 2~3 倍の濃度を必要とし、一部の例外を除きアルキル基がデシル基、ドデシル基の化合物が強い抗菌作用 (静菌および殺菌作用) を示し、BAC のそれとほぼ同等であった。また *Sal. typhimurium* に対する二鎖型ビス (第四級アンモニウム) 化合物の抗菌作用はアルキル基がデシル基の化合物は静菌作用力が強く、アルキル基がドデシル基の化合物は殺菌作用力が強いという明確な差が認められた。仮田らの合成した二鎖型の塩化アンモニウム塩はグラム陰性細菌に対しアルキル炭素鎖長が10の化合物が、グラム陽性細菌に対しては炭素鎖長10~12の化合物が最大の殺菌作用力を示すことが報告されている⁴⁾。本実験の結果と仮田らの報告では最大殺菌作用力を示すアルキル基の炭素鎖長に微妙なずれがあるが、これは連結基の種類の違いを含め薬剤の親水性—親油性のバランスが殺菌作用力を決める重要な因子として関係してくるものと考えられる。

要 約

親規合成物である二鎖型ビス (第四級アンモニウム) 化合物の抗菌作用について塩化ベンザルコニウムを対照にして検討した。

グラム陽性細菌に対してはアルキル基としてデシルおよびドデシル基を含

む化合物が強い静菌作用および殺菌作用を示し、その作用力は塩化ベンザルコニウムとほぼ同等であった。グラム陰性細菌に対してはデシル基を含む化合物が強い静菌作用を、ドデシル基を含む化合物は強い殺菌作用を示し、その作用力は塩化ベンザルコニウムより優っていた。デシル基を含む化合物は酵母に対しても強い静菌作用を示した。

文 献

- 1) Domagk, G.: *Deut. Med. Wochsch.*, **61**, 829 (1935).
- 2) Zhu, Y-P., Ishihara, K., Masuyama, A., Nakatsuji, Y., Okahara, M.: *J. Jpn. Oil Chem. Soc. (YUKAGAKU)*, **42**, 161 (1993).
- 3) 小山内, 阿部: *防菌防黴誌*, **10**, 377 (1982)。
- 4) 俣田, 田上, 星野, 齋藤, 吉村: *防菌防黴誌*, **17**, 319 (1989)。
- 5) 加藤, 芝崎: *醸工*, **53**, 793 (1975)。
- 6) 加藤, 芝崎: *防菌防黴誌*, **8**, 325 (1980)。
- 7) 加藤, 池田, 岡原, 芝崎: *防菌防黴誌*, **8**, 415 (1980)。
- 8) 加藤, 池田, 岡原, 芝崎: *防菌防黴誌*, **8**, 532 (1980)。
- 9) Kourai, H., Takechi, H., Kume, M., Takeichi, K., Shibasaki, I.: *J. Antibact. Antifung. Agents*, **14**, 55 (1986).