《様式Ｂ》

研究テーマ　**「人体と環境に優しい新規ジェミニ型カチオン界面活性剤の開発」**

研究責任者　所属機関名　鈴鹿工業高等専門学校
官職又は役職　講師
氏　　名　河合　里紗　　メールアドレス kawai-r@cc.nara-wu.ac.jp

共同研究者　所属機関名
官職又は役職
氏　　名

（令和 4 年度募集）第 35 回 助成研究 完了報告書

上記様式記載後

１．実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要（１，０００字程度）

※産業技術として実用化の可能性や特許出願（予定も含む）の有無についてもご記載ください。

近年、新型コロナウイルスの影響で、感染防止対策の一つとして抗菌・抗ウイルス剤の開発が急速に行われているが、実用化されている素材は既存のものが多く、種類も限られているため、より多機能で効果的な抗菌・抗ウイルス剤の開発が必要不可欠である。界面活性剤のなかでもカチオン界面活性剤は、他と比べて毒性があるために人体への影響が懸念されており、地球環境や人体にやさしい界面活性剤が求められる。また、従来の界面活性剤を連結基によって２分子繋いだ構造であるジェミニ型界面活性剤は、従来型と比べて著しく低い濃度で最大の界面活性を示し、次世代型界面活性剤として学術的に注目されている。本研究では、親水基の陽イオンの対イオンにアミノ酸を有するジェミニ型カチオン界面活性剤を新規に分子設計・合成し、これらの水溶液物性と抗菌性を調べ、物性に及ぼすアミノ酸系界面活性剤の構造の影響について検討した。

合成したアミノ酸含有ジェミニ型カチオン界面活性剤は、従来の臭化物塩のカチオン界面活性剤と比べて高い臨界ミセル濃度（CMC）を示したものの、対応する単鎖型界面活性剤と比べて著しく低い濃度でミセルを形成した。アラニンを対イオンに有するカチオン界面活性剤は、気/液および固/液界面において優れた吸着を示し、表皮ブドウ球菌に対して最も低濃度で抗菌性を示したことから界面吸着が抗菌性に大きく寄与することが明らかとなった。

対イオンにハロゲン化物イオンの代わりにアミノ酸を導入することで、毒性の低下や生分解性の向上により人体や環境に優しい界面活性剤が開発できると考えられる。さらに、

ジェミニ化を行うことで、従来品と比べて高い性能や新たな機能性の発現が期待され、微量で最大の効果を発揮できるにもかかわらず人体への細胞毒性は低下することから環境負荷低減にも繋がり、従来の乳化剤、分散剤、表面改質剤などの用途だけでなく、材料表面や皮膚上の新規な抗菌・殺菌剤など医療・衛生・健康分野での応用に向けても大きな期待を持っている。天然由来のアミノ酸構造を用いた本研究のジェミニ型カチオン界面活性剤は、乳化・分散・潤滑性など界面活性剤としての機能を有するだけでなく、抗菌・抗ウイルスといった衛生面での実用化に向けての貢献も期待される。

２．実施内容および成果の説明（Ａ４で、５ページ以内）

２．１　緒言

近年、新型コロナウイルスの影響で、感染防止対策の一つとして抗菌・抗ウイルス剤の開発が急速に行われているが、実用化されている素材は既存のものが多く、種類も限られているため、より多機能で効果的な抗菌・抗ウイルス剤の開発が求められる。界面活性剤のなかでもカチオン界面活性剤は、他と比べて毒性が高いために人体への影響が懸念されており、地球環境や人体にやさしい界面活性剤が求められる。また、従来の界面活性剤を連結基によって２分子繋いだ構造であるジェミニ型界面活性剤は、従来型の 1/10～1/100 以下の濃度で最大の界面活性を示し、次世代型界面活性剤として注目されている。近年、天然由来のアミノ酸構造を親水基に有する界面活性剤が開発され、シャンプー等に用いられているが、それらはアニオンまたは両性タイプであり、カチオン界面活性剤に関する報告はない。本研究では、アミノ酸を対イオンに有する四級アンモニウム塩系ジェミニ型界面活性剤（2C$_n$-2 X、n はアルキル鎖長で n = 12、14、16、X は対イオンで X = Gly、Ala、Pro、Fig. 1）および対応する単鎖型界面活性剤 C$_n$TA X を合成し、これらの水溶液物性を調べ、アルキル鎖の鎖長および鎖数、アミノ酸の構造の影響について検討した。

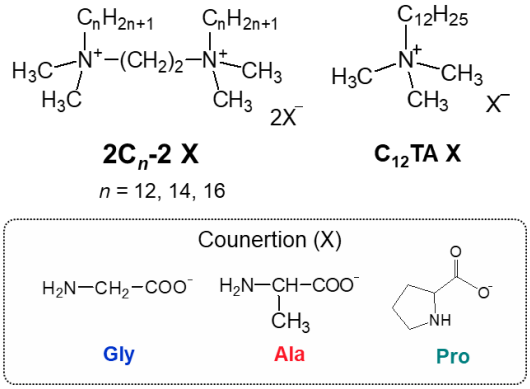

Fig. 1 Structures of quaternary-ammonium-salt-type gemini (left) and monomeric (right) surfactants containing amino acid in counterion.

２．２　実験

親水基の陽イオンの対イオンにアミノ酸を有するジェミニ型カチオン界面活性剤 $2C_n$-2 X は、テトラメチルエチレンジアミンと臭化アルキルとの四級化反応によりアルキル化を行った後、陰イオン交換樹脂を用いて対イオンの臭化物イオンを OH^-、次いでアミノ酸（グリシン、アラニン、プロリン）にイオン交換することにより得た。構造は ^{1}H NMR と元素分析により確認した。これらのアミノ酸含有カチオン界面活性剤の水溶液物性は水溶液物性はクラフト温度、電気伝導率、表面張力およびピレンの蛍光などの測定により評価し、会合体特性は動的光散乱（DLS）、X 線小角散乱（SAXS）および粘度の測定により 25 °C で調べた。カチオン界面活性剤の抗菌性は、表皮ブドウ球菌および大腸菌を用いた寒天平板培養法によりそれぞれ 25、37 °C で評価し、ImageJ で計測したコロニー数から抗菌活性値を算出した。

２．３　結果と考察

電気伝導度法より得られたジェミニ型界面活性剤 $2C_{12}$-2 Gly および $2C_{12}$-2 Ala の CMC（それぞれ 1.46、2.02 mmol dm^{-3}）は、対応する臭化物塩（0.846 mmol dm^{-3}）と比べて大きくなったものの、単鎖型の臭化物塩と比べえると 1/10 以下であり、十分に低い濃度でミセルを形成することがわかった。$2C_n$-2 Gly、$2C_{12}$-2 Ala および C_{12}TA Gly の表面張力と濃度の関係を Fig. 2 に示す。$2C_{16}$-2 Gly の表面張力は濃度の増加とともに低下し、明瞭な屈曲を示して一定となった。一方、$2C_{12}$-2 X（X = Gly、Ala）と $2C_{14}$-2 Gly の表面張力は、濃度の増加とともに大きく低下して極小を示した後に増加して一定となり、特異な挙動を示した。表面張力の極小付近の濃度において、ピレンの蛍光強度比 I_1/I_3 の急激な低下が認められ、散乱強度の増加も見られたことから極小の濃度は CMC に相当すると考えられる。表面張力の直線の傾きと Gibbs の吸着等温式を用いて算出した $2C_{12}$-2 Gly と $2C_{12}$-2 Ala の分子占有面積はそれぞれ 1.64、1.39 nm^2 であり、対応する臭化物塩（1.06 nm^2）および単鎖型 C_{12}TA Gly（1.32 nm^2）と比べて大きくなり、吸着効率は高くなった。これより、ジェミニ型カチオン界面活性剤の対イオンにア

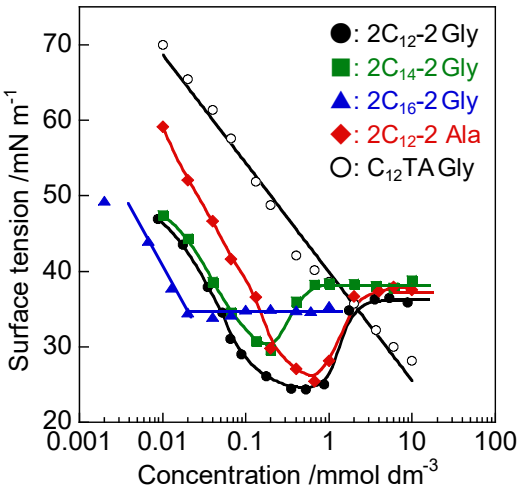

Fig. 2 Variation in surface tension with concentration of $2C_n$-2 Gly, $2C_{12}$-2 Ala and C_{12}TA Gly at 25 °C.

ミノ酸を導入することで、気/液界面において広がるものの効率よく吸着・配向することがわかった。ポリエチレンテレフタラート（PET）表面における $2C_{12}$-2 Gly 水溶液の滴下後 180 秒間の接触角の濃度変化を Fig. 3 に示す。これより、$2C_{12}$-2 Gly の濃度が増加すると CMC 付近の濃度で水の接触角から急激に低下し濡れ性が向上した。接触角が大きく低下する濃度付近ではわずかに接触角が増加した。これより、低濃度ではカチオン間の反発により界面吸着が濡れ性に大きく影響しないものの、気/液および固/液界面が飽和状態に近くなると固体表面が疎水化することで撥水性が生じてわずかに接触角が増加したと考えられる。さらに濃度が増加すると、固/液界面で 2 重層が形成されて PET 表面が親水的になることで急激な接触角の低下が認められたと考えられる。CMC 以上の濃度では飽和な界面により接触角はほぼ一定となった。アラニンを対イオンに有するカチオン界面活性剤は、グリシンよりも気/液界面に効率よく吸着し、疎水的な PET 表面においても優れた濡れ性を示した。これは、アミノ酸構造のメチル基によるものと考えられ、メチル基が表面自由エネルギーを効率よく低下させることが示唆される。PET 表面における濡れ性は、アルキル鎖長が 14 で最大となり、これは鎖長 16 では長鎖のために配向しにくいことが考えられる。

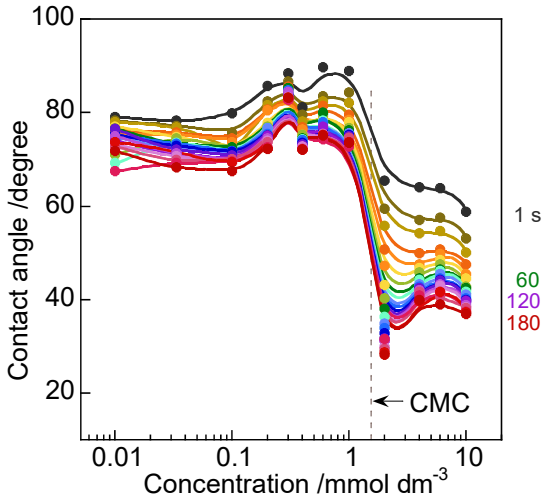

Fig. 3 Variation in contact angle with concentration of $2C_{12}$-2 Gly on PET surface at 25 ˚C.

アミノ酸含有ジェミニ型カチオン界面活性剤 $2C_{12}$-2 X は、いずれのアミノ酸構造の場合も 10～750 mmol dm^{-3} の濃度において数 nm サイズの粒径分布を示し、臭化物塩のような特異な粘度の増加は認められなかった。これより、これらは嵩高い対イオンの構造により臭化物塩と比べて大きな会合体を作りにくく、水溶液中において広い濃度領域で小さなミセルを形成するために高濃度まで低粘度を示すことがわかった。

表皮ブドウ球菌に対する抗菌活性値と界面活性剤濃度の関係を Fig. 4 に示す。アミノ酸含有ジェミニ型カチオン界面活性剤の最小発育阻止濃度（MIC）は、対応する単鎖型よりも低く、鎖長 14 よりも 12 のときに低いことがわかった。一方、大腸菌に対する抗菌性はいずれも表皮ブドウ球菌に対する MIC の 10 倍程度の濃度で発現した。これは、グラム陰性菌である大腸菌は細胞壁に強固な外膜を有するために細胞の組織を破壊して増殖機能を

失わせるのに多くの界面活性剤分子が必要になるためと考えられる。アラニンを有する界面活性剤は表皮ブドウ球菌に対して最も低濃度で抗菌性を示したことから界面吸着が抗菌性に大きく寄与することが明らかとなり、アラニンの構造がカチオン分子の吸着を促進することが示唆された。

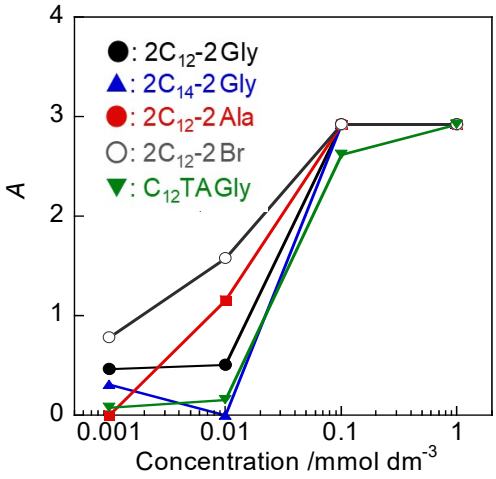

Fig. 4 Relationship between the values of antibacterial activity against *S. epidermidis* and concentration of cationic surfactants.