

# 化粧品の防腐剤低含有率化を目指した除菌材料の開発

九州共立大学工学部<sup>1</sup>、福岡工業大学工学部<sup>2</sup>

栞原 順子<sup>1,2</sup>、甲斐原 梢<sup>1</sup>

Parabens are alkyl ester derivatives of parahydroxybenzoic acid and are widely used as preservatives in cosmetics, foods, toiletries products. These parabens are essential for keeping quality high in the perishable products. However, parabens are known to present a very weak contact allergy to user's skin. We attempted to construct a series of sterilization agents for lowering preservative in cosmetics. These agents have dendritic lysine peptides structure as a spacer on a polystyrene bead. Peptide immobilized beads are also effective in reducing the pollution of wastewater. The surface ionic property of the beads is polycationic due to numerous  $\alpha$ - or  $\epsilon$ -ammonium groups. These polycationic beads were interacted with anionic liposomes, the liposome leakage activities were increased with surface charge density and generation number of oligo lysine dendron groups. We tested antimicrobial activity of novel surfactants containing dendritic oligo lysine groups for confirmation effectiveness of numerous ammonium groups. It was revealed that a series of surfactants were active against Gram-positive bacterium (e. g., *Staphylococcus aureus*) than Gram-negative bacterium (e.g., *Escherichia coli*). These results suggest that the peptidoglycan layer of Gram-positive bacterium cells is interacts specifically with ammonium groups.

## 1. 緒言

我が国における抗菌・防黴技術は20世紀半ば頃より急激な発展を遂げ、現在では天然物系、人工系のものを含めると抗菌剤の種類は百数十種類以上にのぼる。また、食品や化粧品、生活用品等の抗菌・防黴技術は私たちの衣食住を中心とした生活衛生環境の向上に大きく貢献している。

化粧品を含む一般工業製品の除菌法としては、洗浄法、濾過法、吸着法など多様な手法が知られ、数種の除菌法を組み合わせた製品が多い。また、消費者が手にする化粧品のほとんどにパラベン類の防腐剤が添加されているのが現状である。現在、国内では、防腐剤としてパラオキシ安息香酸エチルなど数種が認可されている。パラベンは、食品の防腐剤としても添加が認可されているが、人体への影響が懸念されるため使用制限値が設定されている。一方、医療用として用いられる第四級アンモニウム系の化合物は、特にグラム陽性菌に対して優れた除菌効果を示すことが知られている。しかし、除菌能力は高いが、塩化ベンザルコニウムなどのように界面活性剤系除菌剤は水で洗い流すことが前提で、化粧品のように長時間、直接肌に触れるような場合は皮膚への刺激性が認められる場合もある。抗菌活性を示す界面活性剤としてアンモニウム塩が有名であるが、これらは特に負の電荷を帯びたタイコ酸を有するグラム陽性菌に対して効果が高い。このことは、細菌の最表層と

アンモニウム基との静電相互作用による抗菌効果であり<sup>1)</sup>、第一級や第四級のアンモニウム塩でも同様の効果が期待される。

本研究の目的は、防腐剤の代替物質として、安全性に優れ、かつ環境へ配慮した除菌材料を創製することである。生体親和性の高いアミノ酸、特に側鎖にアンモニウム基を有するリシンからなる除菌材料を開発した。図1で示すように分子構造の異なる3種類①球状 dendリマー型、②半球 dendリマーを親水部にもつ界面活性剤型、③半球 dendリマー固定型ビーズのそれぞれ異なるタイプの抗菌剤を合成し、その抗菌作用効果についてパラベンとの比較検討を行ったので報告する。

## 2. 実験

### 2.1 球状型リシン dendリマーの合成

保護D-アミノ酸<sup>t</sup>Boc-Lys(<sup>t</sup>Boc)-OHおよび1,6-diaminohexaneを使用し、HOBt/HBTUによる活性エステル法でカップリングを行った。得られた粗生成物についてはシリカゲルカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、保護体を得た。さらにHClによる<sup>t</sup>Boc基の除去を行い、第一世代を得た。また、第一世代に<sup>t</sup>Boc-Lys(<sup>t</sup>Boc)-OHを4等量加えてカップリングを行い、精製、脱保護を行い第二世代の dendリマーを得た。

### 2.2 半球 dendリマーを親水部にもつ界面活性剤の合成

dendリティックD-リシン導入型界面活性剤については、親水部位が第一世代型を1G DK-C12、第二世代型を2G DK-C12と略記する。原料は<sup>t</sup>Boc-Lys(<sup>t</sup>Boc)-OHおよび*n*-ドデシルアミンを使用し、球状 dendリマー同様に合成と精製を繰り返し、第一世代型、第二世代型、第三世代型を得た。



Study on sterilization agents for lowering preservative in cosmetics

Junko Kuwahara\*, Kozue Kaibara

Faculty of Engineering, Kyushu Kyoritsu University, Fukuoka Institute of Technology

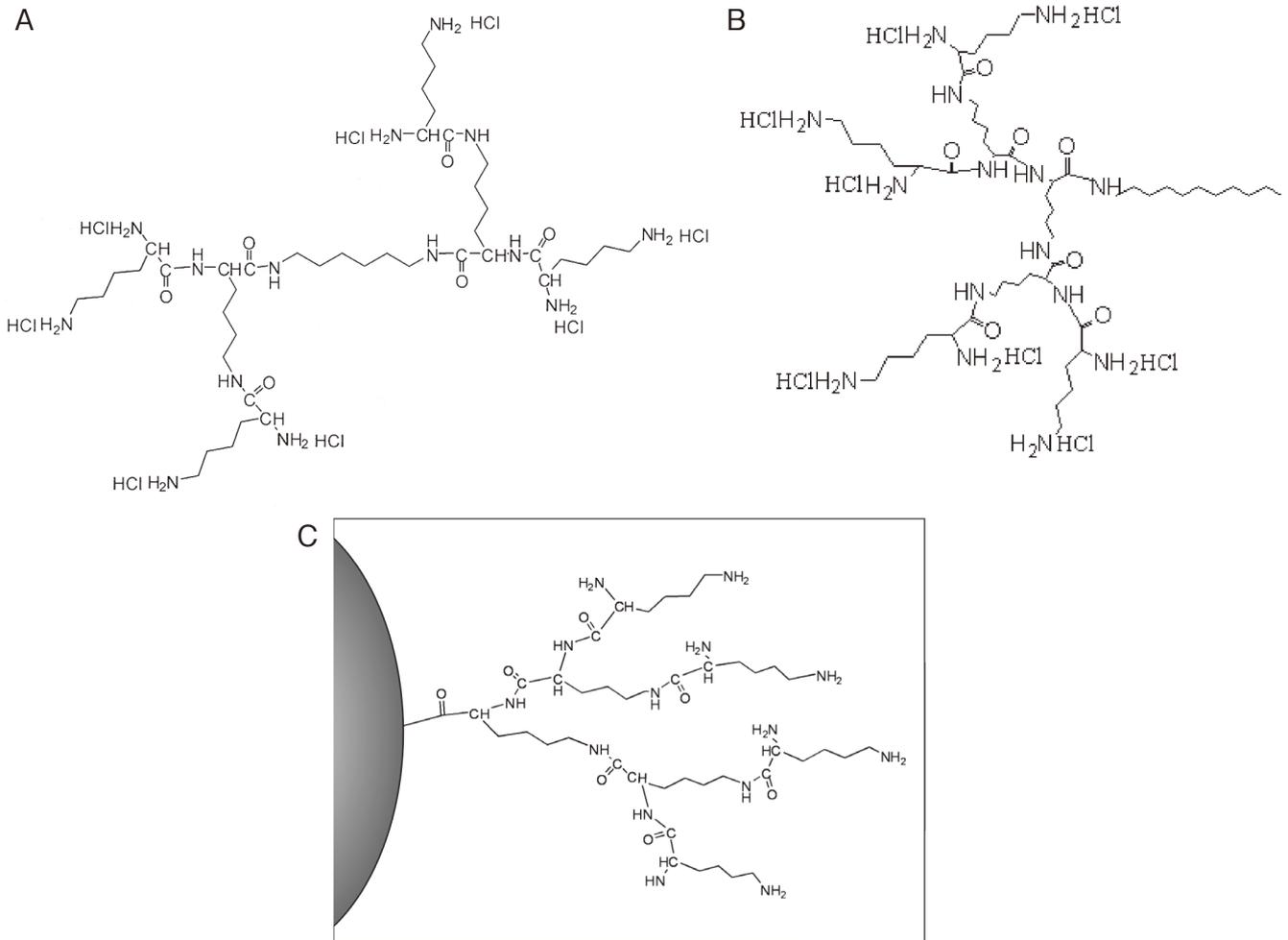


図1 分子構造の異なる3種の除菌材料

(A) 第二世代リシンデンドリマーの分子構造

(B) 親水部に第三世代型半球デンドリマーをもつ界面活性剤 3G DK-C12 の例

(C) 半球リシンデンドリマーを固定化したポリスチレン樹脂の模式図

### 2.3 半球デンドリマー固定型ビーズの合成

粒径75～150  $\mu\text{m}$ のポリスチレン樹脂表面に第四級アンモニウム基を導入するため、樹枝状ペプチド「デンドリティックオリゴD-リシン」を結合した。リシンデンドリマー部位の世代数は1～3までとし、N-末端を第一級アンモニウム型 ( $n\text{G-A}$ ,  $n=1, 2, 3$ )、あるいは第四級アンモニウム型 ( $n\text{G-TMA}$ ,  $n=1, 2, 3$ ) とした。第四級アンモニウム型は、リシンデンドリマーの末端部位に (3-Carboxypropyl)-trimethylammonium chloride を導入した。

### 2.4 人工リポソーム崩壊能評価

半球デンドリマー固定型ビーズについては、抗菌活性試験の予備実験として酸性リポソーム崩壊能評価を行った。実験に用いた人工リポソームには蛍光色素5(6)-カルボキシフルオレセイン (CF) 水溶液を内包させる薄膜法<sup>2,3)</sup>で調製した。リポソーム崩壊能測定は、恒温セルホルダ付き蛍光分光光度計 (株式会社日立製作所, F-2500) を使用した。

### 2.5 抗菌活性試験

抗菌活性試験は液体培地希釈法で行い、試験菌株としてグラム陰性菌である大腸菌 (*E. coli*, NBRC14237)、グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌 (*S. aureus*, NBRC12732) を用いた。また、半球デンドリマー固定型ビーズの抗菌活性試験は濁度変化により評価した。

## 3. 結果

### 3.1 半球デンドリマー固定型ビーズのリポソーム崩壊能

図2は、ポリカチオンビーズ重量当たりの官能基モル数に対するリポソーム崩壊能をそれぞれ示したものである。第一級および第四級アンモニウム型はそれぞれ (A) および (B) である。第一級型 ( $n\text{G-A}$ ) は、ビーズ重量当たりのアンモニウム基増加、即ちビーズ表面の表面電荷密度増大に伴いCF-leakage活性が指数関数的に増加した。また、その効果はスパーサー部位であるデンドリティックオリゴリシン鎖の世代数に大きく影響を受けた。一方、第四級型

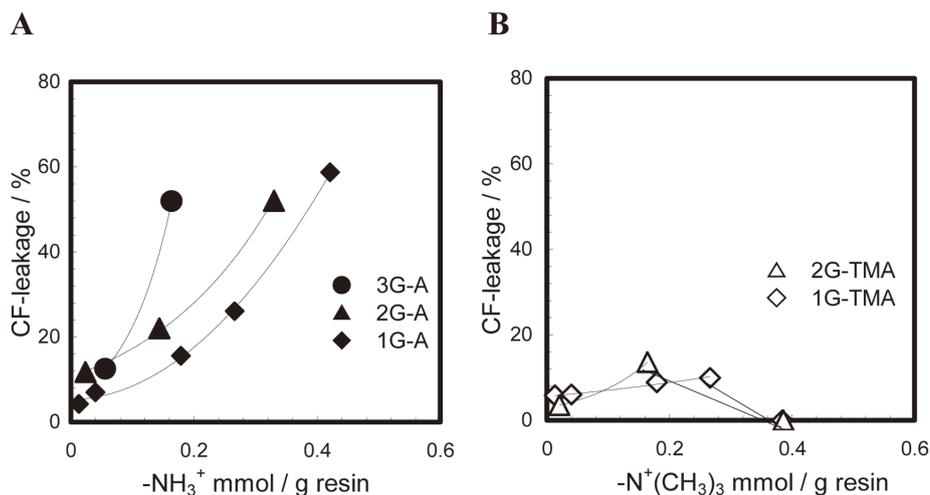


図2 ビーズ重量当たりの官能基モル数に対するリポソーム崩壊能評価  
 リポソーム内水相の漏出率 (CF-leakage (%)) が高いほど崩壊能が優れていることを表す。末端トリメチルアンモニウム型 (B) は 0.4 mmol/g resin 付近で光学セル表面への吸着が起こった。

(nG-TMA) は、重量当たりの官能基モル数が 0.2 mmol/g resin 付近までは官能基モル数に対して増加傾向を示したが、0.4 mmol/g resin 付近になるとビーズが石英ガラス表面へ吸着し、測定不能となった。

### 3.2 抗菌活性試験結果

#### 3.2.1 球状型リシンデンドリマーの抗菌活性

デンドリマーは対称性のある球状高分子であり、デンドリマー末端に種々の官能基を導入することによって多様な機能性をもたせることが可能である。しかしながら、世代数の増加とともに水への溶解度は減少するため、抗菌活性試験で使用するためにはイオン性アミノ酸からなるデンドリマーである必要がある。水に対する溶解度を考慮して第二世代型のリシンデンドリマーの抗菌活性試験を行った。

第二世代リシンデンドリマー HCl 塩の場合、大腸菌には 2 mg/mL 以上、黄色ブドウ球菌には 0.025 mg/mL 以上で抗菌活性を示し、特にグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌に強い効果が観測された。さらに、対照物質である p-ヒドロキシ安息香酸プロピル (パラベン) より抗菌効果が高いことが明らかとなった。

#### 3.2.2 半球デンドリマーを親水部にもつ界面活性剤の抗菌活性

親水部の世代数と抗菌効果の関係を明らかにするために半球デンドリマー部位を第一世代 (1G DK-C12)、第二世代 (2G DK-C12)、第三世代 (3G DK-C12) それぞれについて調べた。まず、大腸菌に対する抗菌試験の結果、1G DK-C12 は 2 mg/mL、2G DK-C12 および 3G DK-C12 は 0.25 mg/mL 以上で抗菌作用効果があった。また、黄色ブドウ

球菌に対しては 1G DK-C12 は 0.25 mg/mL、2G DK-C12 は 0.125 mg/mL 以上、3G DK-C12 は 0.063 mg/mL 以上となり世代数の増加とともに抗菌作用も高くなることが明らかとなった。球状型デンドリマー分子と同様にグラム陽性菌である黄色ブドウ球菌に対して高い抗菌活性を示した。従って球状型と半球型のような構造上の違いによるものではなく、1 分子内に含まれるアンモニウム基の総数が抗菌活性の強さに関係していると考えられる。

#### 3.2.3 半球デンドリマー固定型樹脂の抗菌活性

第三世代型の末端アンモニウム型樹脂の大腸菌および黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性試験の結果を図 3 に示す。大腸菌の実験系ではほとんど顕著な差が見られなかったが、液体培地に樹脂を 50 mg/mL 投与した系では黄色ブドウ球菌の増殖を 15% 以下に抑えることに成功した。

## 4. 考察

本研究では、化粧品の防腐剤として使用されているパラベンの代替物質あるいは低減化を目指した除菌材料の開発を試みた。抗菌活性試験の予備実験として行ったリポソーム崩壊能測定では、ポリスチレンビーズに結合するリシン側鎖のアンモニウム基密度が高まると酸性リポソームと強く相互作用し、崩壊能が増強されることが明らかとなった。また、同じ電荷密度でも世代数が高い方が有意であった。このことは、リシン側鎖のアンモニウム基が高密度で、かつアンモニウム基が樹脂中心から遠い、つまりアンモニウム基がある程度自由に動ける空間が必要であることを示唆している。また、半球デンドリマーを親水部にもつ界面活性剤は黄色ブドウ球菌に対する抗菌活性はパラベンより優

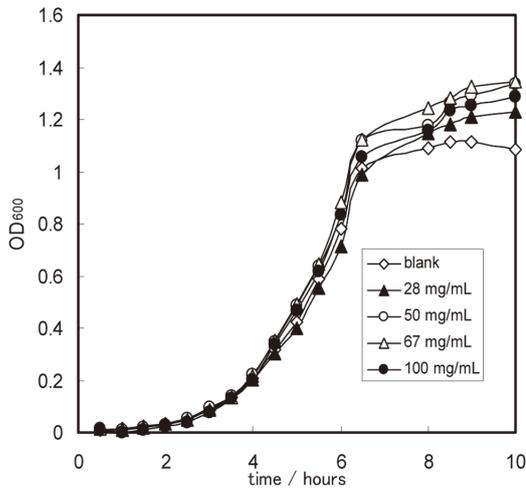
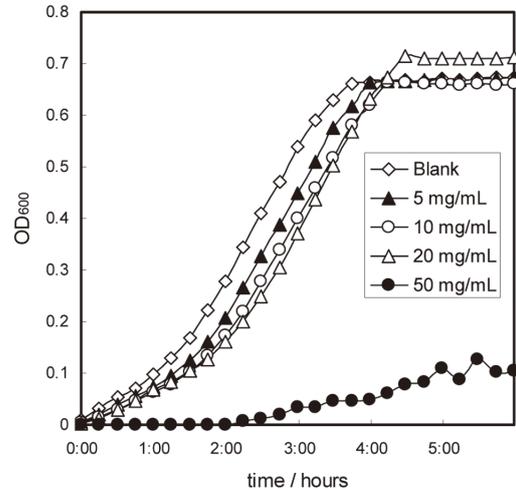
A 3G-A vs *E. coli*B 3G-A vs *S. aureus*

図3 液体培地中での抗菌活性樹脂各濃度における大腸菌 (A) および黄色ブドウ球菌 (B) の増殖曲線

れていることが明らかとなった。パラベンでは黄色ブドウ球菌に対する最小生育阻止濃度は1 mg/mLであったのに対して3G DK-C12では0.063 mg/mLであった。一方、大腸菌に対する抗菌効果は認められなかった。半球 dendリマー固定型樹脂でも同様に黄色ブドウ球菌に対して高活性が認められた。このことは、細胞膜構造の違いに由来すると考えられている。グラム陽性菌である黄色ブドウ球菌はグラム陰性菌である大腸菌と比べて細胞膜を構成するペプチドグリカン層がより厚く、頑丈である。また、多糖も多く含まれている。今回の結果は、ペプチドグリカン層、あるいはアンモニウム基同士の特異的な相互作用によるものと予想される。これまでに報告者は、糖結合型界面活性剤MEGA-10に対して一級アンモニウム塩が強く相互作用しているという研究結果について既に報告しており<sup>4)</sup>、今回の実験からもアンモニウム基はグラム陽性菌に対してより抗菌作用効果の高い官能基であることが確認された。

## 5. 総括

本研究で合成した除菌材料 ①球状 dendリマー型、②半球 dendリマーを親水部にもつ界面活性剤型について抗菌活性試験の結果、どちらも大腸菌より黄色ブドウ球菌に対して高い抗菌活性を示し、高世代型のものほどパラベンより強い活性を示すことが明らかとなった。また、③半球 dendリマー固定型ビーズを50 mg/mL投与した系では黄色ブドウ球菌の増殖を15%以下に抑えることに成功した。今後は、カビ・酵母などに範囲を広げて抗菌活性を示す除菌材料の検討を行っていきたいと考えている。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご支援いただきました財団法人化粧品研究振興財団に深く御礼申し上げます。また、本研究にご協力いただきました九州共立大学大学院秋貞英雄教授、九州工業大学大学院西野憲和教授、同大学院前田憲成助教に深謝申し上げます。

## (引用文献)

- 1) Adair FW, Geftic SG, Gelzer J: Resistance of *Pseudomonas* to quaternary ammonium compounds: II. cross-resistance characteristics of a mutant of *Pseudomonas aeruginosa*, Appl. Microbiol., 21: 1058-1063, 1971.
- 2) Kuwahara J, Akisada H, Kato T, et al.: Effects of hydrophobic and electrostatic interactions on change in decapeptide conformation in micelle and liposome solution, J. Oleo Sci., 53, 619-626, 2004.
- 3) Kuwahara J, Akisada H, Wakayama N, et al.: Amyloid fibril formation of a simple decapeptide in a micellar environment, J. Oleo Sci., 54, 225-231, 2005.
- 4) Akisada H, Kuwahara J, Kunisaki M, et al.: A circular dichroism study of the interaction between *n*-decanoyl-*N*-methylglucamide and surface active agents in mixed micelles, Colloid Polymer Sci., 283, 169-173, 2004.