

分岐型脂肪酸類による水回り環境の微生物防除  
**Microbial control of domestic sanitary environment with  
branched fatty acids**

2020 年 3 月

北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科

環境システム専攻

佐々木 春菜

**Haruna Sasaki**

(指導教員 森田 洋)

## 要旨

近年、住宅において気密性や断熱性が重視されるようになったことから、湿気の停滞などにより室内において微生物が発生しやすい環境を生んでいる。この中でも水回り環境には多くの微生物が生息しており、様々な感染症を引き起こすことが知られている。原生生物である *Acanthamoeba* は汚染された水や手を介してコンタクトレンズ上で繁殖をし、角膜炎を引き起こす。また、赤色酵母である *Rhodotorula* においても日和見感染することが知られている。本研究では分岐型脂肪酸類に着目をして、室内の水回り環境で問題となるこれらの微生物株に対する防除効果が炭素鎖の長さや分岐構造の違いにより与える影響について検討を行い、作用機序について考察を行った。

分岐型中鎖および長鎖脂肪酸類で *Acanthamoeba* に対する抗アメーバ効果と最小殺アメーバ濃度(MAC)を検討した結果、中鎖では 2-エチルヘキサン酸 K(Ac C8K)で 140 mM、3,5,5-トリメチルヘキサン酸(Ac C9)で 710 mM、長鎖ではイソパルミチン酸塩(Ac iso-C16K)が 10 mM、イソステアリン酸塩(Ac iso-C18K)が 9.6 mM でそれぞれ 10 分 4 オーダー(99.99%)の増殖抑制効果が明らかとなった。なお、Ac iso-C16K および Ac iso-C18K では、アメーバが薬剤との接触後にプラスマレンマの破裂が確認された。そこで、ソフトコンタクトレンズを用いた実証実験を行った結果、Ac C8K で 35 mM、Ac C9 で 0.70 mM、Ac iso-C16K で 1.3 mM、Ac iso-C18K で 1.2 mM の抗アメーバ効果が認められた。さらに、コンタクトレンズの洗浄剤であるマルチパーパスソリューション(MPS)への利用を目的とした抗アメーバ効果の検討を行うため、Ac iso-C18K を用いたスタンドアロンテストを行った結果、カビや細菌である対象の 5 菌株に対し、2 ~6 オーダー(99%~99.9999%)の抗菌効果があることが明らかとなった。以上より、Ac iso-C18K は MPS としての利用可能性が示唆された。

## Abstract

*Acanthamoeba* has been regarded as a problem that infects the cornea and causes keratitis when contact lenses are worn with contaminated water or hands. Also, *Rhodotorula* which is widely present in the living environment, is known to be infected opportunistically. In this study, we focused on branched fatty acids, and examined the microbial control effect on these microorganisms due to the difference in carbon chain length and branch structure. The mechanism of action was also discussed.

The anti-amoeba effect against *Acanthamoeba* was examined using each undiluted solution of branched medium-chain and long-chain fatty acids, and then the minimum amoeba concentration (MAC) was examined. As a result, the more effective sample was potassium isostearate (Ac iso-C18K) was 9.6 mM, and the growth inhibitory effect of 4 orders (99.99 %) for 10 minutes was revealed. In addition, Ac iso-C18K was confirmed by a microscope that bursts of amoeba plasmalemma after contact with the samples. From the above, it was suggested that Ac iso-C18K could be used as MPS. Against *Rhodotorula* strain, Ac C8 and Ac C9 showed 97 and 88 mM at the minimum fungicidal concentration (MFC), respectively, and Ac iso-C16K showed 41 mM.

Furthermore, cell membrane damage was examined by flow cytometry (FACS) using PI (propidium iodide). In the highly effective branched fatty acids and fatty acid salts, MFC showed cell membrane damage. From the above results, branched fatty acids had a great influence on the control effect due to the difference in the branched structure. This study revealed that branched fatty acids are highly useful for controlling microorganisms in the water environment.

# 目次

## 第1章 序論

1.1 本論文の背景	8
1.1.1 水回り環境における微生物	8
1.1.2 水回り環境における微生物制御法	10
1.2 本論文の目的	12
1.3 本論文の構成	12

## 第2章 *Acanthamoeba castellanii* に対する分岐型脂肪酸類の抗アメーバ効果

2.1 研究背景と目的	14
2.2 実験方法	14
2.2.1 供試菌株と培養条件	14
2.2.2 分岐型脂肪酸類	16
2.2.3 抗アメーバ試験	18
2.2.4 最小殺アメーバ濃度 (MAC) 試験	18
2.2.5 形態的観察	19
2.3 実験結果	19
2.3.1 分岐型長鎖脂肪酸による抗アメーバ効果	19
2.3.2 分岐型長鎖脂肪酸塩による抗アメーバ効果	20
2.3.3 分岐型長鎖アルコールによる抗アメーバ効果	21
2.3.4 分岐型中鎖脂肪酸による抗アメーバ効果	22

2.3.5 分岐型中鎖脂肪酸塩による抗アメーバ効果	23
2.3.6 最小殺アメーバ濃度 (MAC)	24
2.3.7 分岐型脂肪酸類接触による形態的变化	25
2.4 考察	28
2.5 結論	33

### 第3章 *Rhodotorula mucilaginosa* に対する分岐型脂肪酸類の抗真菌効果

3.1 研究背景と目的	34
3.2 実験方法	35
3.2.1 供試菌株と培養条件	35
3.2.2 分岐型脂肪酸類	36
3.2.3 抗真菌試験	36
3.2.4 最小殺真菌濃度 (MFC) 試験	36
3.2.5 propidium iodide(PI)染色による細胞膜の損傷試験	36
3.3 実験結果	37
3.3.1 分岐型脂肪酸類による抗真菌効果	37
3.3.2 直鎖型脂肪酸類との比較	40
3.3.3 最小殺真菌濃度 (MFC)	43
3.3.4 PI 染色による細胞膜の損傷	44
3.4 考察	47
3.5 結論	51

## 第4章 分岐型脂肪酸類のマルチパーパスソリューション(MPS)への応用

4.1 研究背景と目的	52
4.2 実験方法	53
4.2.1 実証試験	53
4.2.1.1 供試菌株と培養条件	53
4.2.1.2 分岐型脂肪酸類	53
4.2.1.3 汚染コンタクトレンズを使用した実証試験	54
4.2.2 スタンドアローンテスト	54
4.2.2.1 供試菌株と培養条件	54
4.2.2.2 分岐型脂肪酸類	55
4.2.2.3 試験法	55
4.3 実験結果	55
4.3.1 汚染コンタクトレンズを使用した実証試験	55
4.3.1.1 イソパルミチン酸塩 (Ac iso-C16K)	55
4.3.1.2 イソステアリン酸塩 (Ac iso-C18K)	56
4.3.1.3 3,5,5-トリメチルヘキサノ酸 (Ac C9)	57
4.3.1.4 2-エチルヘキサノ酸塩 (Ac C8K)	58
4.3.2 スタンドアローンテスト	59
4.3.2.1 イソステアリン酸塩 (Ac iso-C18K)	59
4.4 考察	63
4.5 結論	67

## 第 5 章 総括と今後の展望

5.1 分岐型脂肪酸類のアカントアメーバに対する防除効果 . . . . . 68

5.2 分岐型脂肪酸類のロドトルラ酵母に対する防除効果 . . . . . 69

参考文献

謝辞

# 第1章 序章

## 1.1 本論文の背景

### 1.1.1 水回り環境における微生物

住宅の室内には、数多くの微生物が生息しているが、その微生物は、住宅環境やヒトと深く関わりながら住宅に分布している<sup>1)</sup>。これらの微生物は、室内の外観を損ない、材質を傷めるだけでなく、健康に影響を与える可能性がある<sup>2,3)</sup>。特に室内において、水回り環境は住宅の中でカビ汚染の最も多いところとされており<sup>4,5)</sup>、細菌やカビの他にアcantアメーバが存在している<sup>6)</sup>。アcantアメーバは、一般に土壌、淡水、海水に含まれる原生生物とされている<sup>7)</sup>。しかし、その一方で水道水等によるコンタクトレンズ保存液の汚染や、風による運搬、さらに室内の塵埃中にもアメーバは普遍的に存在しているとされており<sup>8-10)</sup>、角膜炎の感染要因として問題となっている<sup>8-10)</sup>。その角膜感染症の原因菌は *Acanthamoeba castellanii* であり、アcantアメーバ角膜炎と呼ばれ、1974年に英国で初めて報告された<sup>11)</sup>。日本では1988年に報告され<sup>12)</sup>、現在までに1500万人以上発症していると推定されている<sup>13)</sup>。近年では、特に若者が使用するソフトコンタクトレンズが増加傾向にあることが明らかとなっている<sup>14,15)</sup>。アcantアメーバ角膜炎の症状は、輪状潰瘍、輪状浸潤、円板状角膜炎、放射状角膜炎などである<sup>16,17)</sup>。治療法としては薬物療法と手術療法とがあるが、角膜やコンタクトレンズからアメーバを分離同定することは困難であり、さらに細菌、真菌などの他の角膜感染症の感染と誤診されることも多く、失明に至り摘出された眼球や角膜の病理組織検査で初めてアメーバ感染と診断された症例も報告されている<sup>11)</sup>。また、アメーバ感染と確定診断され、種々の抗生物質や抗真菌剤が使用されても、進行した症例では薬物治療が非常に困難であるとされている<sup>18,19)</sup>。

また、アメーバの他にも水回り環境における汚染菌は様々存在しているが、これまでに *Cladosporium* および *Acremonium*<sup>20)</sup>、*Aureobasidium*<sup>21)</sup>、*Phoma* や *Penicillium* および *Alternaria*<sup>22)</sup>、*Exophiala* および *Rhodotorula*<sup>23)</sup>などの真菌類が浴室環境において多く存在しているとされている。

濱田らの研究では、*Rhodotorula* は夏の浴室において浴室の天井、壁の上部、壁の下部



など最も多く存在することが明らかとなっており、特に天井では、酵母相が多く存在している中でも、*Rhodotorula* は全酵母の 70 %ということが明らかとなっている<sup>23)</sup>。また、その他にも浴室の石鹸入れ、シャンプー入れは酵母では床の約 4~5 倍多い傾向がみられており、加えてシャワーホース、風呂のふた、ドアや窓のパッキンなど濡れた状態が長く続く個所では、床の 2 倍以上、窓のパッキンでは床の 10 倍以上の酵母が存在していることが明らかとなっている<sup>23)</sup>。石鹸入れとシャンプー入れにカビ・酵母汚染がとりわけ多い理由としては、石鹸などからの溶出液がカビの栄養になると考えられている<sup>20)</sup>。神野は、石鹸を栄養にして、*Cladosporium* や *Rhodotorula* などの多くの種類のカビや酵母が多く増殖したことを明らかにしている。*Rhodotorula* は、担子菌型の不完全な酵母であり、その名の通りピンク~紅色のコロニーを形成するため、赤色酵母と呼ばれている<sup>24)</sup>。

1980 年頃から浴室の構造や入浴習慣は大きく変化したことにより、ユニットバスが一般家庭でも増加し、シャワーの使用頻度の増加で壁面の濡れる機会が増えたとされている<sup>25)</sup>。また、浴室外への湿気の排出を窓に頼っていたのに対し、100 %強制換気に依存する窓のない浴室が一般的になってきた。それに伴い、浴室は外壁に面した開放系から、窓のない住宅の内部に作られるようになってきた。菅原は室内汚染物の侵入、または室内で発生した場合の室内の汚染のメカニズムは、次の式で表せられるとしている(式 1)<sup>26)</sup>。

$$\text{室内濃度} = \frac{\text{外から換気により侵入する汚染物} + \text{室内発生量}}{\text{換気量}} \quad (1)$$

式 1 より、室内の汚染濃度を低くするためには屋外から侵入する分子や室内環境で発生する汚染物質を少なくすること、また分母の換気量を大きくして円滑に屋外に汚染物を排出する必要性がある。

また、井原は、特に水が常に伴う環境である浴室以外に、便器、洗面所、台所のシンクなどを *Rhodotorula* の発生源として挙げている<sup>27)</sup>。さらに、*Rhodotorula mucilaginosa* は生活環境中(空中)に広く生息しているとされ<sup>24,28)</sup>、近年では本菌に起因する腹膜炎

が、持続腹膜透析を受けている患者の間においても発生している<sup>24)</sup>。これはカテーテルまたは透析装置の汚染によるもので、汚染源を除去するだけで症状がなくなるとされている。主に、真菌血症、心内膜炎、髄膜炎などの血流感染症の原因菌として報告がされている<sup>24,29)</sup>。

### 1.1.2 水回り環境における微生物制御方法

抗菌・防カビ剤は大きく有機系、無機系の2つに分類できる<sup>30)</sup>。有機系の多くは抗菌だけでなく防カビ効果もあり、即効性があるのが大きな特徴である<sup>31)</sup>。有機系の代表であるホルムアルデヒドは、院内感染が危惧される病院施設で利用されてきた<sup>32,33)</sup>。病院内や医療用具の不十分な殺菌や滅菌は、手術後の二次感染症を引き起こすため重大な問題であるといえる。しかし、殺菌処理後に刺激性のあるパラホルムアルデヒドとして残留するため、近年では使用が敬遠されつつある。また、エタノールは残留性が低く安全性も高いために、インフルエンザウイルスによる接触感染防止のために幅広く普及しているが、残留性の低さは効果の持続性の低さに繋がるため、1日に何度も使用する必要があるとされている<sup>30)</sup>。作用機序としては細菌やカビの細胞壁や細胞膜に結合して、その機能を破壊することによって効果を発揮するものが多く、イミダゾール系のチアベンダゾールは食品添加物にも使用され、水回りなどの住宅環境に防カビ剤としてよく用いられている。しかし一方で、難分解性であるためにその残留性や人体に与える影響が懸念されている<sup>34)</sup>。有機系の消毒・殺菌剤は溶出性が高いために効力も大きい反面、効果の持続時間の短いのが難点である。無機系は、銀や銅などの重金属のものが代表的であり、銀含有物をはじめとする抗菌・防カビ剤は、効果の持続時間が長く、安価かつ簡便であり、人体への安全性が比較的高いとされている<sup>30,35,36)</sup>。抗菌効果は、溶出した銀や銅イオンが細菌の細胞膜に取り込まれて菌体タンパク質を変性することによるものであり<sup>8)</sup>、銀の食器や銅の硬貨の抗菌効果は、我々の生活において古くから認知されてきた。しかし、環境負荷や生態系への影響などについては疑問視されるものもあり、防カビ効果自体は比較的低いものとされている<sup>37)</sup>。

コンタクトレンズの洗浄方法は、煮沸消毒、過酸化水素溶液、ポビオンヨード、多目的溶液であるマルチパーパスソリューション(MPS)の主に4つの方法があり、中でも過酸化

水素溶液および MPS による低温消毒が一般的に使用されている<sup>38-45)</sup>。特に MPS は、すぎ、消毒、保存がすべて同じ液体で機能するため主流となっている<sup>38,39)</sup>。しかし、MPS の消毒効果は他のコンタクトレンズ消毒方法である煮沸法や、過酸化水素やポビドンヨードを用いた処理法と比較すると効果が低いことが明らかとなっている<sup>42-45)</sup>。さらに、抗アメーバ活性においては、2009 年消費者センターの報告により、市販の MPS は非常に低いことが明らかとなっている<sup>45,46)</sup>。アカントアメーバと市販の MPS を接触させ、25 °C で 8 時間培養した研究では、8 株中 4 株で 1/10 以下の細胞しか減少しなかったとの報告がされている<sup>45)</sup>。さらに、MPS は主に細菌と真菌の除去を目的としており、ISO14729 ではアメーバによる抗アメーバ効果の報告義務がないことから、感染症を防ぐことは MPS で考慮されていないとされている。市販の MPS に含まれる消毒剤には塩酸ポリヘキサニド(ポリヘキサメチレンピグアニド：PHMB)および塩化ポリドロニウムの 2 種類があるが<sup>45,47-49)</sup>、これらは過敏症が発生する可能性が示唆されている<sup>39,40)</sup>。抗菌活性に関する先行研究では、真菌<sup>50)</sup>、細菌<sup>51)</sup>に対する抗菌試験を直鎖型脂肪酸およびその塩を使用した抗菌試験<sup>46)</sup>が報告されている。脂肪酸塩は、鎖状炭化水素のカルボン酸塩であり、親水性と疎水性の両方の特性を持つ脂肪酸とアルカリから形成される界面活性剤である。なお、脂肪酸は Shapiro らによって、口腔細菌である *Porphyromonas gingivalis*、*Selenomonas artemidis* および *Streptococcus sobrinus* に対して有効であることを報告している<sup>52)</sup>。

水回り環境における微生物制御方法は、洗浄剤として、合成洗剤の主成分であるポリオキシエチレンアルキルエーテル、アルキルエーテル硫酸エステルナトリウム、脂肪酸アミドプロピルジメチルアミンオキシドや、石鹼の主成分であるオレイン酸ナトリウム、また、漂白剤として次亜塩素酸ナトリウム等が使用されている<sup>53-55)</sup>。しかし、塩酸系の酸性洗浄剤と塩素系カビ取り剤が混ざることによって濃厚な塩素ガスが発生し、塩素ガス中毒となることが知られている。

そこで本研究では、安全性の高い薬剤として分岐型脂肪酸類に着目した。分岐型脂肪酸類は日産化学株式会社が開発した不飽和・多分岐型の液状高級脂肪酸、脂肪酸塩、アルコールの総称である。これらは、無臭、無色透明な粘性液体であり、疎水性、分散性、耐熱性、および耐酸化性をもつ安定した液体であるため、主に化粧品、界面活性剤、洗浄剤、

樹脂用潤滑剤の原料で使用されている。安全性については、マウスの急性経口試験において 200 mg/kg 以上の結果が出ており、Ames 試験で陰性の結果が得られている。そこで、水回り環境において感染症の原因となる *Acanthamoeba castellanii* および、水回りを中心として空中に多く存在している *Rhodotorula mucilaginosa* に対する抗菌試験を試みた。

## 1.2 本論文の目的

前節では、水回り環境における微生物とその制御方法について述べた。そして安全性の高い新規抗菌剤の検討として、分岐型脂肪酸類を挙げた。そこで本論文では分岐型脂肪酸類を用いて、水回り環境における *Acanthamoeba castellanii* および *Rhodotorula mucilaginosa* の 2 菌株の抗菌効果を試みることにした。そしてこれらの微生物に対する防除効果が、炭素鎖の長さや分岐構造の違いにより与える抗菌活性への影響について検討を行い、作用機序について考察を行うことを目的とした。

## 1.3 本論文の構成

本論文の構成を図 1 に示す。第 2 章では、分岐型脂肪酸類による *Acanthamoeba castellanii* に対する抗アメーバ効果を検討する。第 3 章では *Rhodotorula mucilaginosa* に対する分岐型脂肪酸類および直鎖型脂肪酸類の抗真菌効果の検討を行い、さらに細胞膜の形態観察を検討する。そして第 4 章では第 2 章で明らかにした抗アメーバ効果の高い分岐型脂肪酸類を、*Acanthamoeba castellanii* によって汚染されたコンタクトレンズを用いて MPS への応用を検討する。最後に、第 5 章では本論文の統括と今後の展望について述べる。

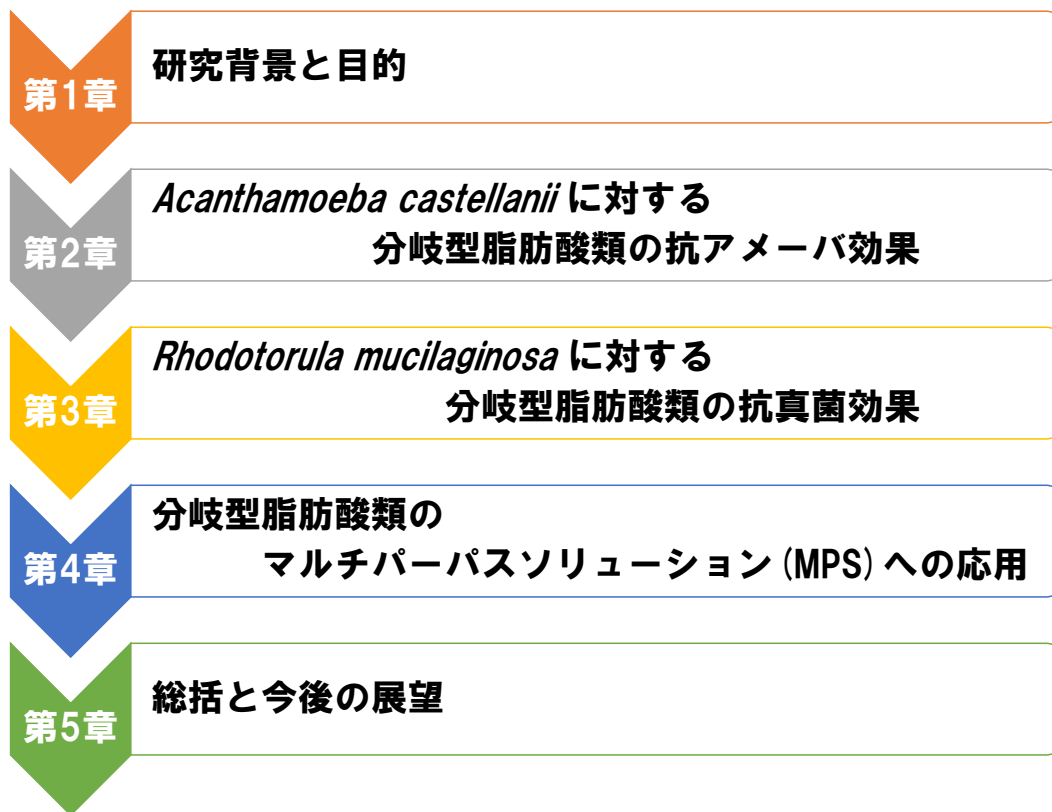


図1 本論文の構成

## 第 2 章 *Acanthamoeba castellanii* に対する

### 分岐型脂肪酸類の抗アメーバ効果

#### 2.1 研究背景と目的

アcantアメーバ角膜炎を抑制する新規 MPS の検討のためには、はじめに MPS に応用するための抗アメーバ効果の検討を行う必要がある。そこでまずは、アcantアメーバに対する、より抗アメーバ効果の高い分岐型脂肪酸類の探索を行った。そして、炭素鎖の長さや分岐構造の違いによるアcantアメーバへの影響について検討を行い、作用機序について考察を行った。

#### 2.2 実験方法

##### 2.2.1 供試菌株と培養条件

*Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30010)は、ATCC(American Type Culture Collection)から入手し、Peptone-yeast-glucose 培地(PYG, ATCC 712)を増殖培地とした<sup>44)</sup>。表 1 に培地組成を示す。なお、基礎培地、無機塩溶液、および 2 M グルコースストック溶液は、10 %HCl および 1 M KOH で pH=6.5 に調整した。

無機塩溶液 5 種類をオートクレーブ後、160 mL の基礎培地を含む 300 mL の三角フラスコに加えた。さらに、10 mL の 2 M グルコースストック溶液(表 1)を 0.25  $\mu\text{m}$  フィルターで濾過することにより滅菌し、三角フラスコに加えた。次に、三角フラスコ内の溶液 45 mL を厚底シャーレ( $\phi$  60 $\times$ 45)に分注し、10 倍希釈した抗生物質 Antibiotic Antimycotic Solution を 5 mL 加えた。最後に、PYG 培地( $3.0\times 10^5$  cells/mL)で 7~30 日間培養した 500  $\mu\text{L}$  の *A. castellanii* を加え、継続的に培養を行った。なお、実験に用いる際にはアメーバを新たな増殖培地に摂取し、30  $^{\circ}\text{C}$ で約 10 日間培養したものを以後の実験に使用した。本実験では *A. castellanii* の栄養型を用いた。

表 1 PYG 培地

---

Basal Medium

Tryptone (Becton Dickinson): 3.56 g

Yeast extract (Becton Dickinson): 0.178 g

Distilled water: 160 mL

---

Inorganic salt solution

a) 0.4 M  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Kanto Chemical Co., Inc.): 2.0 mL

b) 0.05 M  $\text{CaCl}_2$  (Junsei Chemical Co., Ltd.): 1.6 mL

c) 0.005 M  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  (Alfa Aesar): 2.0 mL

d) 0.25 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Kanto Chemical Co., Inc.): 2.0 mL

e) 0.25 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Kanto Chemical Co., Inc.): 2.4 mL

---

2 M Glucose stock solution

a) Glucose (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.): 3.6 g

b) Sodium citrate (Nacalai Tesque Co., Ltd.): 0.2 g

c) Distilled water: 10.0 mL

---

---

## 2.2.2 分岐型脂肪酸類

本研究で検討した分岐型脂肪酸類・アルコール類とその構造式を図 2 に示す。分岐型脂肪酸類は炭素数 16~20 の長鎖と、炭素数 8、9 の中鎖型に分けられる。本章では長鎖として、5 つの脂肪酸であるイソパルミチン酸(Ac iso-C16)、イソステアリン酸(Ac iso-C18)、イソステアリン酸 N(Ac iso-C18N)、イソステアリン酸 T(Ac iso-C18T)、イソアラキン酸(Ac iso-C20)および 2 つの脂肪酸塩であるイソパルミチン酸 K(Ac iso-C16K)、イソステアリン酸 K(Ac iso-C18K)、さらに 5 つのアルコールであるイソパルミチルアルコール(Ac iso-C16OH)、イソステアリルアルコール(Ac iso-C18OH)、イソステアリルアルコール N(Ac iso-C18NOH)、イソステアリルアルコール T(Ac iso-C18TOH)、イソアルキルアルコール(Ac iso-C20OH)の 12 サンプルに加えて、中鎖として、2 つの脂肪酸である 2-エチルヘキサン酸(Ac C8)、3,5,5-トリメチルヘキサン酸(Ac C9)、2 つの脂肪酸塩である 2-エチルヘキサン酸塩(Ac C8K)、3,5,5-トリメチルヘキサン酸塩(Ac C9K)の 4 サンプルの計 16 サンプルの抗アメーバ効果を検討した。なお、分岐型長鎖脂肪酸塩は pH=10.5、分岐型中鎖脂肪酸塩は pH=12.6 であった。



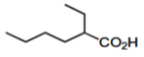
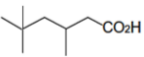
Branched chain fatty acid	Structural formula	Branched chain fatty acid	Structural formula
isopalmitic acid (Ac iso-C16)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-(\text{CH}_2)_2 \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5 \end{array} \text{CH-COOH}$	isopalmityl alcohol (Ac iso-C16OH)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5-(\text{CH}_2)_2 \\ \text{CH}_3-(\text{CH}_2)_5 \end{array} \text{CH-CH}_2\text{-OH}$
isostearic acid (Ac iso-C18)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_2)_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} \text{CH-COOH}$	isostearyl alcohol (Ac iso-C18OH)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_2)_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} \text{CH-CH}_2\text{-OH}$
isostearic acid N (Ac iso-C18N)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2)_2 \\   \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_2)_3 \end{array} \text{CH-COOH}$	isostearyl alcohol N (Ac iso-C18NOH)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\   \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-(\text{CH}_2)_2 \\   \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3-\text{CH}_2-\text{CH}-(\text{CH}_2)_3 \end{array} \text{CH-CH}_2\text{-OH}$
isostearic acid T (Ac iso-C18T)	$\begin{array}{c} n\text{-C}_8\text{H}_{17} \quad n\text{-C}_8\text{H}_{13} \\   \quad   \\ n\text{-C}_8\text{H}_{17} \text{CH-CH}_2\text{-OH} \quad n\text{-C}_{10}\text{H}_{21} \text{CH-COOH} \end{array}$	isostearyl alcohol T (Ac iso-C18TOH)	$\begin{array}{c} n\text{-C}_8\text{H}_{17} \quad n\text{-C}_8\text{H}_{13} \\   \quad   \\ n\text{-C}_8\text{H}_{17} \text{CH-CH}_2\text{-OH} \quad n\text{-C}_{10}\text{H}_{21} \text{CH-CH}_2\text{-OH} \end{array}$
isoarachic acid (Ac iso-C20)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-(\text{CH}_2)_2-\text{CH}-(\text{CH}_2)_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3-\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} \text{CH-COOH}$	isoaralkyl alcohol (Ac iso-C20OH)	$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\   \quad   \\ \text{CH}_3-\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH}-(\text{CH}_2)_2 \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3-\text{CH}-(\text{CH}_2)_3-\text{CH} \\   \quad   \\ \text{CH}_3 \quad \text{CH}_3 \end{array} \text{CH-CH}_2\text{-OH}$
2-ethylhexanoic acid (Ac C8)			
3,5,5-trimethylhexanoic acid (Ac C9)			

図 2 分岐型脂肪酸類とそのアルコールの構造式

### 2.2.3 抗アメーバ試験

2.2.1 節で調製した栄養型のアメーバ懸濁液の細胞数は、プランクトン計数板(松浪硝子工業株式会社)を用いてカウントした。最終的なアメーバ懸濁液の終濃度は約  $5 \times 10^4$  cells/mL に調整した。事前に調製した 1 mL のアメーバ懸濁液を遠心分離させることによってペレット化し、1 mL の 10 % Tween 80 を 1 mL の脂肪酸類またはアルコール類と混合した後、ペレットに再懸濁したものを 30 °C で静置培養した。なお、脂肪酸塩では Tween 80 の代わりに pH 調整水(pH=10.5)を使用し、コントロールとした。

接触時間は、0、10、60、180 分後にサンプリングを行い、Hanks' Balanced Salt Solution (Invitrogen) 100  $\mu$ L、0.4 % Trypan Blue Stain (Invitrogen)400  $\mu$ L が入った 1.5 mL 容エッペンに、サンプリング溶液を 500  $\mu$ L 加え、5 分間染色させた。この溶液を 200  $\mu$ L 取り、800  $\mu$ L の滅菌水にてさらに希釈した後、プランクトン計数板に 300  $\mu$ L 流し込み、5 分放置した。その後、光学顕微鏡(Nikon、ECLIPSE TS100)を用いてアメーバが Trypan Blue によって染色されていないものを生アメーバとし、細胞数を算出した。Trypan Blue は、浸透圧により染色液は死細胞に浸透し、死細胞は青く染まる。なお、算出した値は対数値で平均(n=3)をとり、かつ標準偏差も同様に算出した。

### 2.2.4 最小殺アメーバ濃度(MAC)試験

最小殺アメーバ濃度である MAC (minimum amebacidal concentration)は、微生物の増殖を阻止するために必要な最小薬剤濃度のことで、微生物に対する抗菌力の強さを表し、数値が低いほど抗菌力が強いことを意味する。抗アメーバ試験で高い抗菌力を示した分岐型脂肪酸類の中で、*A. castellanii* に対して最も低濃度で抗アメーバ効果の高いサンプルであるのかを検討した。

2.2.3 節で行った抗アメーバ試験の場合と同様に、脂肪酸およびアルコールの場合は 10 % Tween 80 を希釈液として使用し、脂肪酸塩の場合は pH 調整水(pH=10.5)を使用した。サンプルは 2 倍希釈系列で調製し、サンプルとアメーバ懸濁液(最終濃度 約  $3.0 \times 10^4$  cells/mL)をそれぞれ 400  $\mu$ L ずつ 1.5 mL チューブに入れた。そして 10 分後、Hanks' Balanced Salt

Solution(Invitrogen) 100  $\mu$ L、0.4 % Trypan Blue Stain(Invitrogen)400  $\mu$ Lが入った 1.5 mL 容エッペンに 500  $\mu$ L のサンプリング溶液を取り、5 分間染色した。この溶液を抗アメーバ試験と同様に滅菌水にてさらに 5 倍希釈して、プランクトン計数板に 300  $\mu$ L 流し込み、光学顕微鏡 (Nikon、ECLIPSE TS100) を用いて無染色の生細胞数を算出した。なお、算出した値は対数値で平均(n=3)をとり、かつ標準偏差も同様に算出した。

## 2.2.5 形態的観察

2.2.3 節、2.2.4 節において、本章で検討した分岐型脂肪酸類のアメーバの 3 時間接触後のアメーバの生細胞および死細胞について、光学顕微鏡(Nikon、ECLIPSE TS100)を用いて観察を行った。また、Ac iso-C16K および Ac iso-C18K ではアメーバの生細胞および死細胞が確認できなかったことから、アメーバ懸濁液とサンプルを接触させた後の動画を撮影した。

## 2.3 実験結果

### 2.3.1 分岐型長鎖脂肪酸による抗アメーバ効果

図 3 は、横軸に時間、縦軸に log 対数を取った分岐型長鎖脂肪酸類による抗アメーバ効果の結果である。図 3 では、炭素数 16 の長鎖脂肪酸である Ac iso-C16 (1600 mM)、炭素数 18 である Ac iso-C18 (1200 mM)、Ac iso-C18N (1400 mM)、Ac iso-C18T (1400 mM)、炭素数 20 である Ac iso-C20 (1300 mM)の *A. castellanii* に対する抗アメーバ試験の結果を示す。Ac iso-C16 は 180 分の接触においてもほぼ抗アメーバ効果はなく、Ac iso-C18T、Ac iso-C18N は 60 分接触で 4 オーダー(99.99 %)の増殖抑制効果を示した。そして最も抗アメーバ効果が高い分岐型長鎖脂肪酸は、10 分接触で 4 オーダーの増殖抑制効果を示した Ac iso-C18 であることが明らかとなった。また、コントロールである 10 % Tween 80 はいずれの接触時間においても抗アメーバ効果を示さなかったことから、Ac iso-C18 が抗アメーバ効果を有することが明らかとなった。

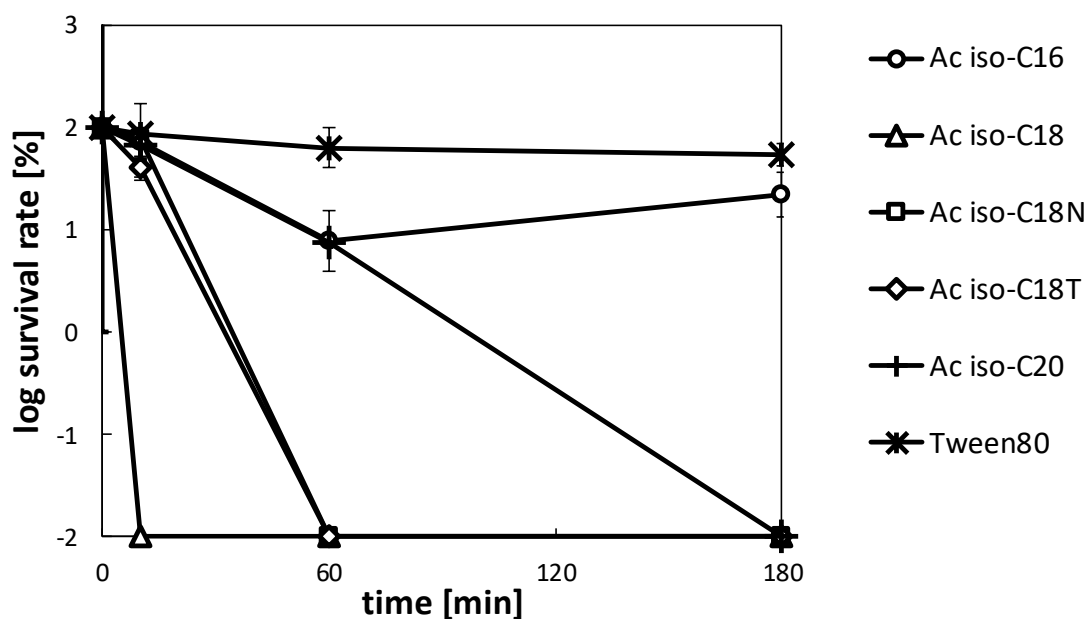


図3 分岐型長鎖脂肪酸による抗アメーバ効果

### 2.3.2 分岐型長鎖脂肪酸塩による抗アメーバ効果

図4に、炭素数16の長鎖脂肪酸塩であるAc iso-C16K (160 mM)、炭素数18のAc iso-C18K (150 mM)の*A. castellanii*に対する抗アメーバ試験の結果を示す。この結果より、Ac iso-C16KおよびAc iso-C18Kの両サンプルにおいて、どちらも10分間接触で4オーダーの増殖抑制効果を示した。また、コントロールであるpH調整水はいずれの接触時間においても抗アメーバ効果を示さなかったことから、Ac iso-C16KおよびAc iso-C18Kが抗アメーバ効果を有することが明らかとなった。

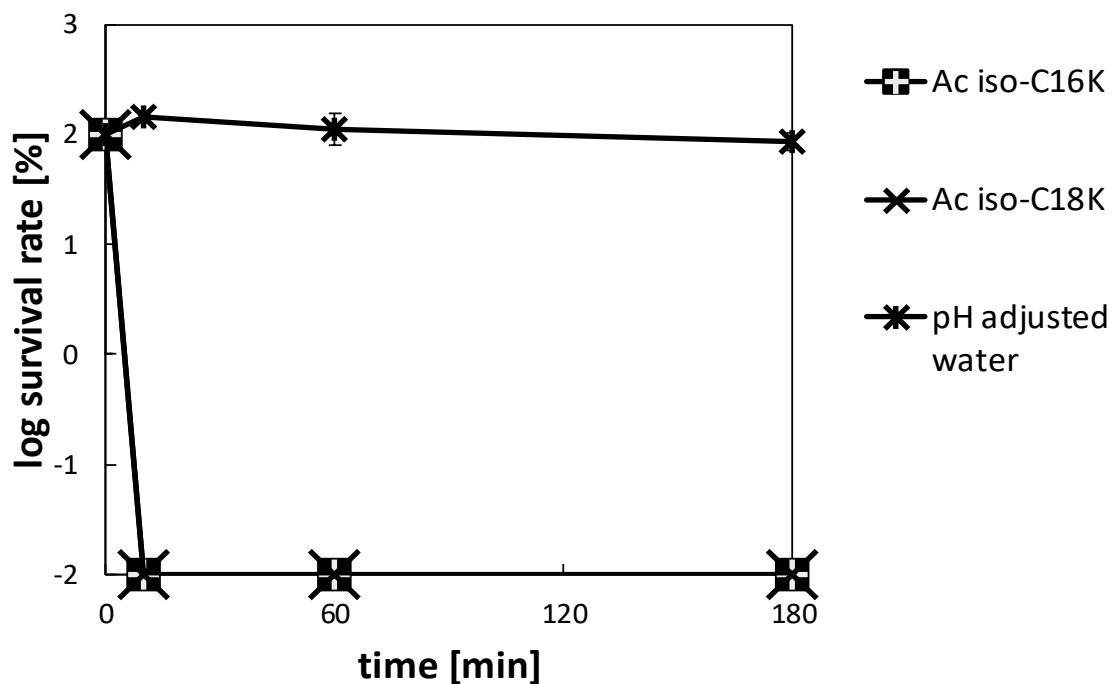


図 4 分岐型長鎖脂肪酸塩による抗アメーバ効果

### 2.3.3 分岐型長鎖アルコールによる抗アメーバ効果

図 5 に、長鎖アルコールである炭素数 16 の Ac iso-C16OH (1700 mM)、炭素数 18 の Ac iso-C18OH (1400 mM)、Ac iso-C18NOH (1400 mM)、Ac iso-C18TOH (1500 mM)、炭素数 20 の Ac iso-C20OH(1200 mM)の *A. castellanii* に対する抗アメーバ試験の結果を示す。この結果より、Ac iso-C18NOH が 10 分間接触で 1 オーダー、Ac iso-C20OH が 180 分で 1 オーダー、Ac iso-C18OH が 180 分で 0.5 オーダーの抗アメーバ効果を示した。そして、最も抗アメーバ効果が高い分岐型長鎖アルコールは、10 分で 4 オーダーの増殖抑制効果を示した Ac iso-C18TOH であることが明らかとなった。Ac iso-C16OH はいずれの接触時間においても抗アメーバ効果を示さなかった。また、コントロールである 10 % Tween 80 もいずれの接触時間においても抗アメーバ効果を示さなかったことから、Ac iso-C18TOH が抗アメーバ効果を有することが明らかとなった。

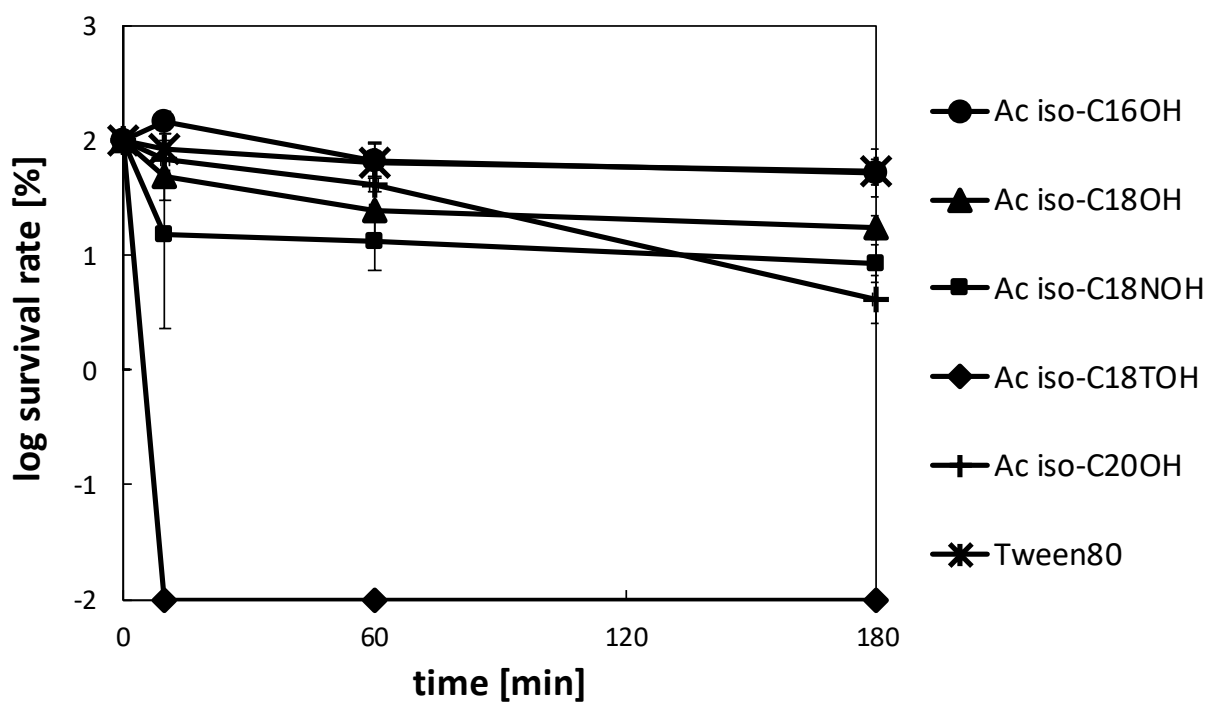


図5 分岐型長鎖アルコールによる抗アメーバ効果

### 2.3.4 分岐型中鎖脂肪酸による抗アメーバ効果

図6に、中鎖脂肪酸である炭素数8のAc C8 (3100 mM)、炭素数9のAc C9 (2800 mM)の*A. castellanii*に対する抗アメーバ試験の結果を示す。この結果より、Ac C8およびAc C9の両サンプルにおいて、どちらも10分間の接触で4オーダーの増殖抑制効果を示した。また、コントロールである10% Tween 80はいずれの接触時間においても抗アメーバ効果を示さなかったことから、Ac C8およびAc C9が抗アメーバ効果を有することが明らかとなった。

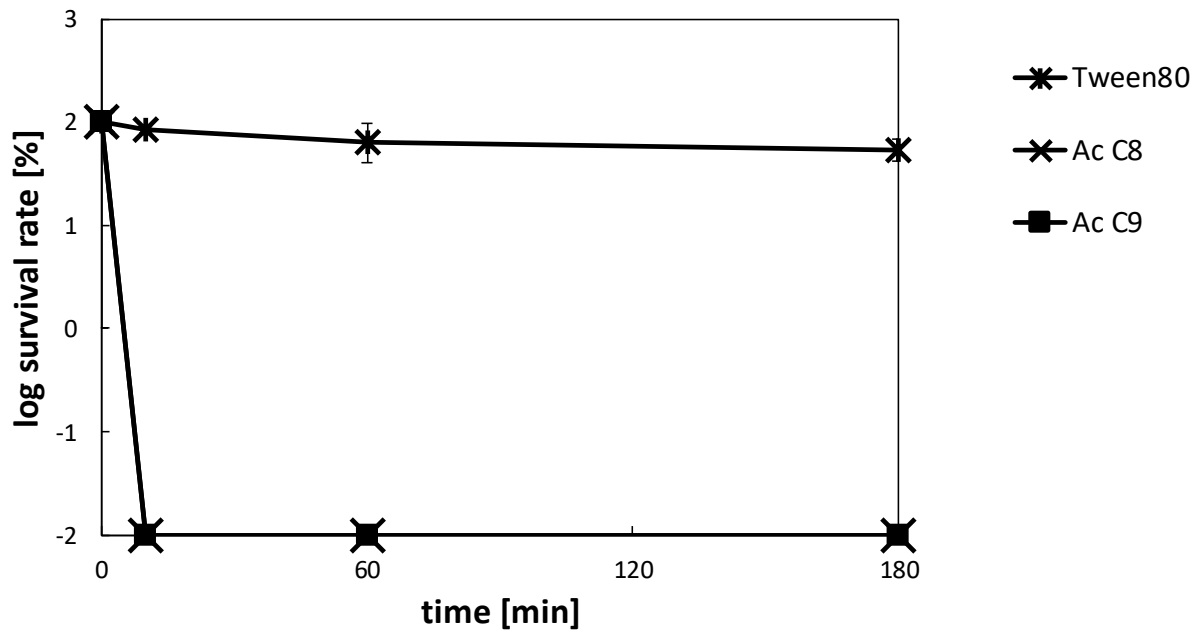


図 6 分岐型中鎖脂肪酸による抗アメーバ効果

### 2.3.5 分岐型中鎖脂肪酸塩による抗アメーバ効果

図 7 に、中鎖脂肪酸塩である炭素数 8 の Ac C8K (280 mM)、炭素数 9 の Ac C9K (260 mM) の *A. castellanii* に対する抗アメーバ試験の結果を示す。この結果より、Ac C9K は 10 分間接触で 1.5 オーダー、180 分で 4 オーダーの増殖抑制効果を示した。そして最も抗アメーバ効果が高い分岐型中鎖脂肪酸塩は、10 分で 4 オーダーの増殖抑制効果を示した Ac C8K であることが明らかとなった。また、コントロールである pH 調整水(pH=12.6)は 180 分で 1 オーダー低下したが、Ac C8K および Ac C9K の挙動よりも低い抗アメーバ活性となったことから、Ac C8K は抗アメーバ効果を有することが明らかとなった。

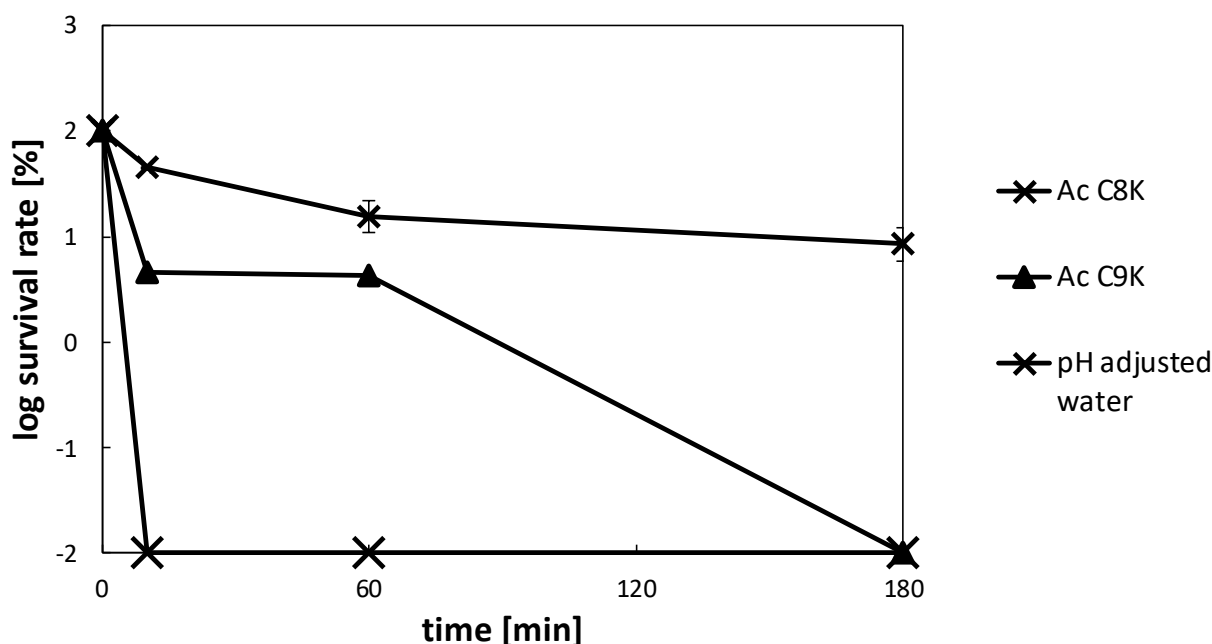


図 7 分岐型中鎖脂肪酸塩による抗アメーバ効果

### 2.3.6 最小殺アメーバ濃度(MAC)試験

2.3.1 節～2.3.5 節より、分岐型脂肪酸類を用いた *A. castellanii* に対する高い抗アメーバ効果を示したサンプルは、10 分 4 オーダーの増殖抑制効果を示した長鎖脂肪酸の Ac iso-C18、長鎖脂肪酸塩の Ac iso-C16K および Ac iso-C18K、長鎖アルコールの Ac iso-C18TOH、中鎖脂肪酸の Ac C8 および Ac C9、中鎖脂肪酸塩の Ac C8K の 7 サンプルであった。各サンプルの MAC の結果を表 2 に示す。抗アメーバ試験より高い抗アメーバ効果を示した 7 サンプルのうち、最も高い抗アメーバ効果を示したサンプルは、順に Ac iso-C18K (9.6 mM)、Ac iso-C16K (10 mM)、Ac C8K (140 mM)、Ac C9 (710 mM)、Ac C8 (780 mM)、Ac iso-C18 (1200 mM)、Ac iso-C18TOH (1500 mM) であった。よって、最も抗アメーバ試験において効果の高いサンプルは、長鎖脂肪酸塩である Ac iso-C18K であることが明らかとなった。なお、本研究では使用したサンプルのモル濃度を計算するために、サンプル 1 mL あたりの重量を 3 回測定し、サンプルの平均値と分子量を考慮し、モル濃度を求めた。



表 2 *A. castellanii* に対する分岐型脂肪酸類の MAC 値

Long chain		Medium chain			
fatty acid	MAC [mM]	fatty acid	MAC [mM]		
Ac iso-C16	> 1600 (45 v/v %)	Ac C8	780 (13 v/v %)		
Ac iso-C18	1200 (42 v/v %)	Ac C9	710 (13 v/v %)		
Ac iso-C18N	> 1400 (46 v/v %)	/			
Ac iso-C18T	> 1400 (45 v/v %)				
Ac iso-C20	> 1300 (45 v/v %)				
fatty acid salt	MAC [mM]			fatty acid salt	MAC [mM]
Ac iso-C16K	10 (0.31 w/v %)			Ac C8K	140 (2.5 w/v %)
Ac iso-C18K	9.6 (0.31 w/v %)	Ac C9K	> 260 (5.0 w/v %)		
alcohol	MAC [mM]	/			
Ac iso-C16OH	> 1700 (45 v/v %)				
Ac iso-C18OH	> 1400 (43 v/v %)				
Ac iso-C18NOH	> 1400 (44 v/v %)				
Ac iso-C18TOH	1500 (45 v/v %)				
Ac iso-C20OH	> 1200 (42 v/v %)				

### 2.3.7 分岐型脂肪酸類接触による形態的变化

分岐型長鎖脂肪酸類サンプル接触後の *A. castellanii* の様子を図 8、分岐型中鎖脂肪酸類のサンプル接触後の *A. castellanii* の様子を図 9 に示す。すべての写真は接触後 180 分後のアメーバの様子を示す。図 8、9 の Tween 80、図 9 の pH 調整水とともに、長鎖の Ac iso-C16、Ac iso-C18N、Ac iso-C16OH、Ac iso-C18OH、Ac iso-C18NOH、Ac iso-C20OH はアメーバが青く染まらず、アメーバ細胞内の液胞などの構造が観察できる。そして、長鎖の Ac iso-C18、Ac iso-C18T、Ac iso-C20、Ac iso-C18TOH、中鎖の Ac C8、Ac C9、Ac C8K、Ac C9K は濃い青色に染色され、アメーバ細胞内の液胞が観察できなかつたため、死細胞とした。

なお、Ac iso-C16K および Ac iso-C18K においては、アメーバの生細胞および死細胞が観察できなかつたため、アメーバ懸濁液とサンプルを接触させた瞬間の顕微鏡を用いた動画の撮影を行った。図 10 に Ac iso-C16K、Ac iso-C18K 接触時の *A. castellanii* の様子を示す。(A)、(C)では生細胞のアメーバが観察できるが、(B)、(D)ではプラスマレンマの破裂が認め

られ、アメーバ細胞が確認できないことがわかる。本実験では、Ac iso-C16K および Ac iso-C18K の接触時、すべての *A. castellanii* のプラスマレンマが破裂したことが確認された。加えて、その破裂は薬剤接触から約 10 秒前後で起こることも明らかとなった。以上のことから、分岐型長鎖脂肪酸塩である Ac iso-C16K および Ac iso-C18K はアメーバのプラスマレンマを破裂させることで、抗アメーバ効果を発揮することが明らかとなった。

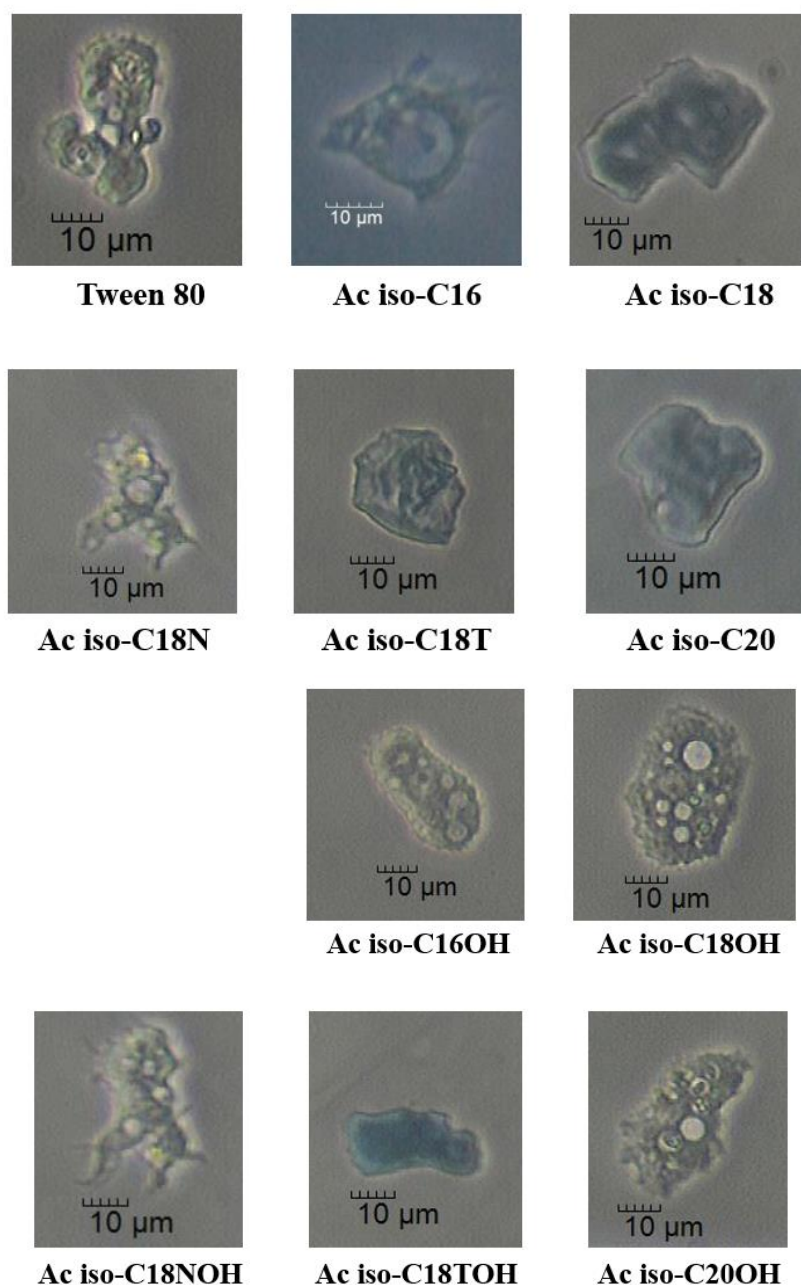


図 8 分岐型長鎖脂肪酸類接触時によるアメーバ形態の様子

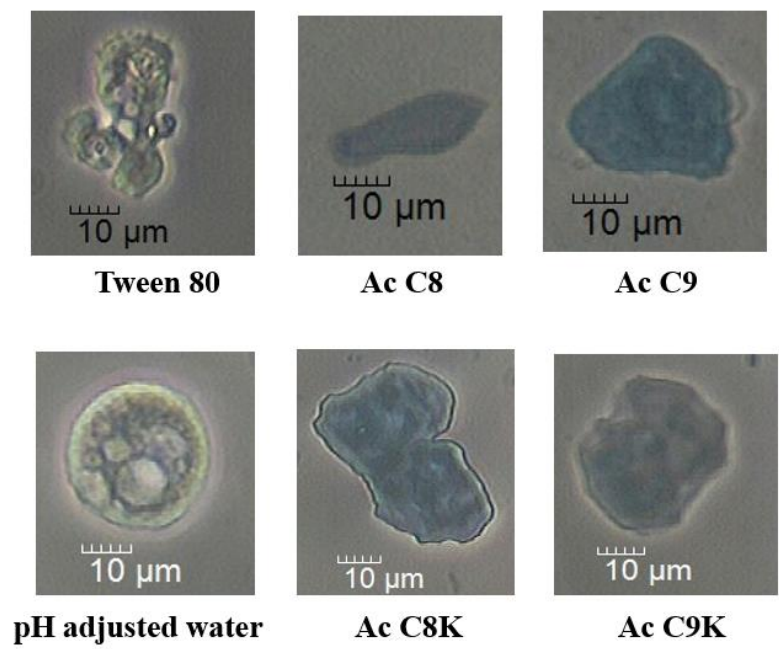


図 9 分岐型中鎖脂肪酸類接触時によるアメーバ形態の様子

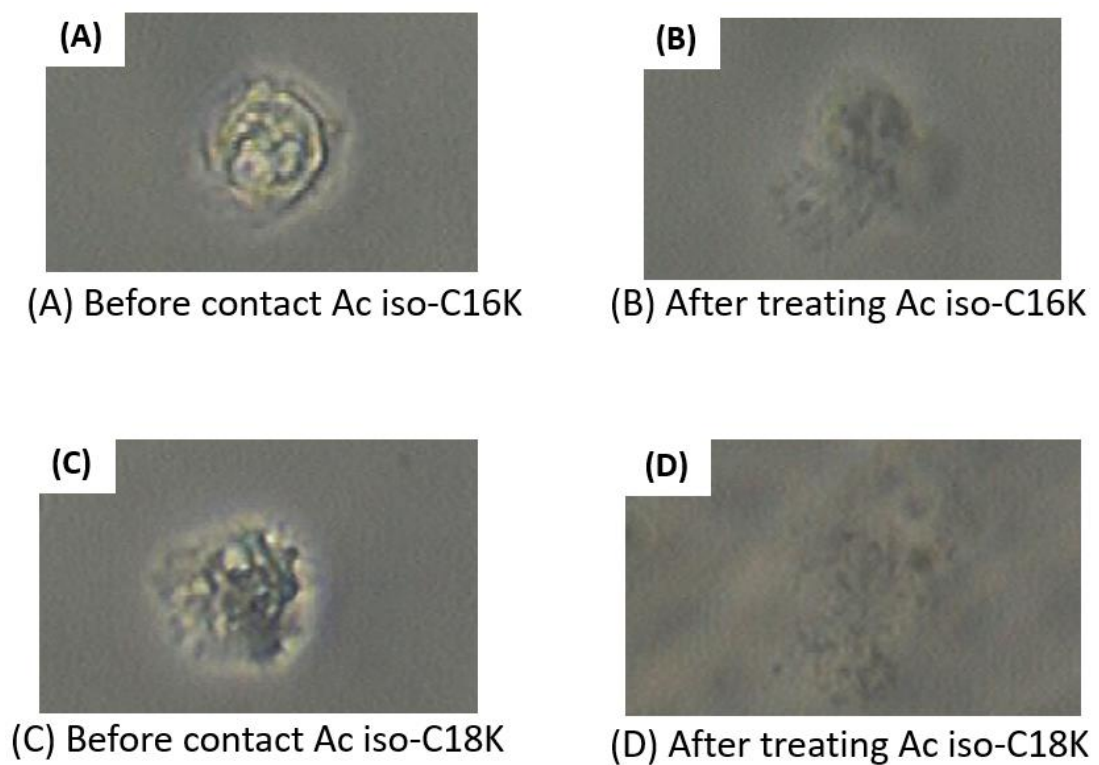


図 10 Ac iso-C16K および Ac iso-C18K 接触時によるアメーバ形態の様子

## 2.4 考察

最も抗アメーバ効果が高い分岐型長鎖脂肪酸は、10分接触で4オーダーの増殖抑制効果を示した Ac iso-C18 であることが明らかとなり、中鎖脂肪酸類においては、Ac C8 および Ac C9 の両サンプルにおいてどちらも10分間の接触で4オーダーの増殖抑制効果を示し、中鎖脂肪酸塩の Ac C8K も同様の結果を得た。分岐型長鎖脂肪酸塩では、Ac iso-C16K および Ac iso-C18K の両サンプルにおいて、どちらも10分間接触で4オーダーの増殖抑制効果を示した。また、分岐型長鎖アルコールは、10分で4オーダーの増殖抑制効果を示した Ac iso-C18TOH が最も抗アメーバ効果が高いことが明らかとなった。さらに、各サンプルの MAC では、抗アメーバ試験より高い抗アメーバ効果を示したサンプルのうち、最も高い抗アメーバ効果を示したサンプルは、長鎖では分岐型脂肪酸塩である Ac iso-C18K 9.6 mM (0.31 w/v%)、Ac iso-C16K 10 mM (0.31 w/v%)が低濃度で抗アメーバ効果を示し、次に効果が高かったものは中鎖脂肪酸塩である Ac C8K 140 mM (2.5 w/v%)、中鎖脂肪酸である Ac C9 710 mM (13 v/v%)であった。これらの結果から、分岐型の長鎖では脂肪酸塩の方が効果が高くなる傾向にあることが分かったが、中鎖においてはこの限りではなかった。

田中らの研究では、*A. castellanii* の抗アメーバ効果を直鎖型脂肪酸および直鎖型脂肪酸塩で検討している<sup>46)</sup>。田中らは 175 mM カプリル酸塩(C8K)、カプリン酸塩(C10K)、およびラウリン酸塩(C12K)で180分間アメーバをサンプルと接触した場合、4オーダーの増殖抑制効果が示されたとしている。さらに、アメーバ懸濁液を C10K または C12K と接触させた結果、プラスマレンマの破壊が観察され、そのときの C10K および C12K の MIC は 2.7 mM であった。図 9 に示すように、本実験においても Ac iso-C16K および Ac iso-C18K でプラスマレンマの破壊が確認された。また、Ac iso-C16K および Ac iso-C18K では、先行研究の C10K および C12K の濃度より約 4 倍の高濃度であるが、抗アメーバ効果を示す時間は 10 分と短時間での抗アメーバ効果を明らかにした。また、本研究ではアメーバのプラスマレンマが破裂しない中鎖脂肪酸である Ac C8、Ac C9 および中鎖脂肪酸塩である Ac C8K の死細胞も確認された。これらも先行研究の濃度より約 50~250 倍の高濃度であるが、10 分間の接触で抗アメーバ効果を示すことが明らかとなった。

このアメーバの細胞死のメカニズムについて、Petschow らは *Helicobacter pylori* に対

する中鎖モノグリセリドと遊離脂肪酸の殺菌特性に対する感受性を明らかにしている<sup>56)</sup>。モノグリセリドは脂肪酸1分子がグリセリン1分子に結合したものである。彼らは、中鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸、および不飽和脂肪酸が外膜を通過する際に電子伝達鎖のキャリアに結合し、細胞への侵入を可能にし、電子伝達の破壊を引き起こすことを示した。そしてこの破壊要因は、Zhengらにより、脂質代謝の一部である FabI タンパク質の阻害によることが考えられている<sup>57)</sup>。また、抗菌界面活性剤に関する渡辺の研究では、陰イオン界面活性剤が細菌の表面に付着することが明らかとなっている<sup>58)</sup>。吸着された界面活性剤は細胞表面に親和性を示し、細胞膜を破壊し、ポリタンパク質膜を透過することによって、抗菌効果をもたらしたと考えられている。Godfrey は、界面活性剤は真菌の表面に吸着されることにより抗菌メカニズムを発揮し、表面脂質膜の破壊とリポタンパク質膜の浸透調節機能の障害を伴うとしている<sup>59)</sup>。さらに、真菌の表面に形成された界面活性剤の膜によって呼吸が妨げられるとしている。さらに、大林は大腸菌をさまざまな界面活性剤 (Ribonox LCR、Ribonox NCI、CTAB、CPC、Ribonol AS、Lipon P-106、Lipomin SA、Lipomin COH) と反応させ、電子顕微鏡で観察を行っている<sup>60)</sup>。その結果、細胞膜の破裂が確認でき、殺菌作用が明らかとなった。渡辺はこの膜破壊の抗菌作用のメカニズムは、抗菌剤が真菌の表面細胞膜に付着した後、作用部位に移動し、半透性などの正常な膜機能を妨げる膜の特性により、薬剤は膜を貫通し、細胞内に入ること、核酸とタンパク質の変性を活性化、もしくは細胞膜の一部を破壊しているとした<sup>58)</sup>。さらに渡辺は、抗菌性が菌の表面に吸着してから作用部位まで移動する際、この間には多くの親油性部分と親水性部分があるため、分配が繰り返されるとしている<sup>58)</sup>。したがって、親油性と親水性のいずれかが偏って大きすぎると、作用部位までの移動が妨げられるとしている。界面活性剤の性質を示す一つの目安として、**Hydrophilic-Lipophilic Balance (HLB)**があり、抗菌剤にも同様に、親油性と親水性との間の適当なバランスが必要であることが考えられている。光井は、**HLB** 値は実際に化粧品薬剤を調合するときの界面活性剤の選定や油性成分を変更する場合の影響の予測などに広く用いられてきたばかりでなく、種々の物理化学的現象を整理する上でもしばしば用いられ、その有用性が立証されてきたと述べている<sup>61)</sup>。さらに、界面活性剤が関与する界面現象が界面活性剤の親水性、親油性のバランスによって支配されないわけがなく、**HLB** 的な考え方が有用であるとしている。このような **HLB** の考え方を定量的なものとし、さらに乳化剤選用法へと確

立したのはGriffinである<sup>62)-64)</sup>。彼は乳化実験より非イオン界面活性剤のHLB値を提唱し、乳化する油相の所要HLBを求めて、最適乳化剤を求める”Atlas HLB System”を発表した。Griffin法の算出方法を式2に表す。

$$\text{HLB 値} = 20 \times \frac{\text{親水部の式量の総和}}{\text{分子量}} \quad (2)$$

前述したとおり、界面活性剤の溶液の溶存状態・機能性は界面活性剤の親水性親油性バランス(HLB)に依存しているため、界面活性剤の選択の際にはHLBの概念が不可欠である<sup>61)-63),65)</sup>。辰巳らは灰色かび病菌である*Botrytis cinerea*に対するショ糖およびグリセリンに炭素数8~18の脂肪酸をエステル結合させた食品用乳化剤を用いて、抗菌効果を試験した結果、抗菌作用は炭素数の少ない脂肪酸のショ糖脂肪酸エステルで大きく、炭素数が大きい脂肪酸ショ糖エステルでは抗菌効果が小さかったことを明らかにしている<sup>66)</sup>。加えて、これらのエステルのHLB値は炭素数8~18でHLB値16、炭素数18:1でHLB値15であった。さらに、炭素数12~18のグリセリン脂肪酸エステルでは、HLB値が7であるカプリル酸モノエステルで抗菌効果が大きく、ここでも脂肪酸の炭素数の少ないエステルで抗菌作用が見られたことを明らかにしている。そこで本研究で検討した分岐型サンプルに加え、先行研究<sup>49)</sup>である直鎖型サンプルのHLB値を式2に従って算出した。表3に、分岐型、直鎖型<sup>46)</sup>の*A. castellanii*に対する各サンプルのMACおよび炭素数と算出したHLB値をまとめたものを示す。表3より、分岐型ではHLB値が5.2~6.2が最適で、直鎖型では7.0~10が最適であることが明らかとなった。さらに分岐型においても直鎖型においてもHLB値が3.1以下のものは抗アメーバ効果が低い傾向、また直鎖型においてはHLB値が11以上のものは抗アメーバ効果が低い傾向にあることが明らかとなった。

表 3 分岐型および直鎖型脂肪酸類<sup>46)</sup>の *A. castellanii* に対する MAC と算出した HLB 値

Branched chain				Straight chain			
fatty acid, salt, alcohol	Carbon number	HLB	MAC [mM]	fatty acid, salt, alcohol	Carbon number	HLB	MAC [mM]
Ac C8	8	6.2	780	C4	4	10	2.7
Ac C9	9	5.7	710	C6	6	7.8	5.5
Ac iso-C16	16	3.5	>1600	C8	8	6.2	10.9
Ac iso-C18	18	3.1	1200	C10	10	5.2	>175
Ac iso-C18N		3.1	>1400	C12	12	4.5	>175
Ac iso-C18T		3.1	>1400	C14	14	3.9	>175
Ac iso-C20	20	2.9	>1300	C18:1	18	3.2	>175
				C18:2		3.2	10.9
				C18:3		3.2	175
Ac C8K	8	9.1	140	C4K	4	13	>175
Ac C9K	9	8.5	>260	C6K	6	11	>175
Ac iso-C16K	16	5.6	10	C8K	8	9.1	175
Ac iso-C18K	18	5.2	9.6	C10K	10	7.9	2.7
				C12K	12	7.0	2.7
				C14K	14	6.2	>175
				C18:1K	18	5.2	>175
				C18:2K		5.2	>175
				C18:3K		5.3	>175
Ac iso-C16OH	16	2.6	>1700				
Ac iso-C18OH	18	2.3	>1400				
Ac iso-C18NOH		2.3	>1400				
Ac iso-C18TOH		2.3	1500				
Ac iso-C20OH	20	2.1	>1200				

また、炭素数の観点においては、分岐型および直鎖型ともに 8 付近が高い抗アメーバ効果を示し、さらに分岐型では長鎖でも脂肪酸塩になると、高い抗アメーバ効果を有することが分かった。徳岡らは、33 菌株の酵母に対する界面活性剤の影響を検討し、9 種類の界面活性剤の生育抑制効果をグルコース濃度別に評価した<sup>67)</sup>。その結果、グルコース濃度によって効果に差が見られたことより、界面活性剤による酵母の生育抑制効果が異なることを明らかにした。また、シヨ糖酸エステルのうち、HLB 値の大きな、すなわち親水性の大きなものが HLB 値の小さなものより生育抑制効果が大きかったことから、界面活性剤の水に対する溶解性も生育抑制効果の重要な要素の 1 つであると結論付けた。よって本研究で検討した分岐型サンプルにおいても、脂肪酸およびアルコールよりも脂肪酸塩に対する水への溶解性が大きかったためではないかと推察した。

加えて、アcantアメーバは、裸アメーバと呼ばれ、擬足によって移動する原生動物であ

る<sup>7)</sup>。殻アメーバ(tested amoebae)とは異なり、裸アメーバは殻(test、skeleton、shell、conch)や甲(theca、case、box)を形成せず、その名前が示すように、繊毛虫のように硬質の被膜ペリクラ(pellicle、cuticle)や発達した皮膚層(cortex)もないとされている。しかし、石井は *Amoeba proteus* の体表を高分解の光学顕微鏡で観察すると、細胞膜に相当する部分に、かろうじて厚みの認められる膜構造が観察されたとしている<sup>7)</sup>。この構造は、厚さからみて、裸の細胞膜と見なすことができないため、アメーバでは細胞膜といわず、昔からプラスマレンマ(plasmalemma)と呼ばれていた<sup>68)</sup>。その後、電子顕微鏡によりプラスマレンマの外部に単位膜に接して糖衣(glycocalyx)に相当する構造があることが判明した<sup>69)</sup>。石井は、これらの外被を整理して、糖衣、糖針、鱗片に3大別した<sup>7)</sup>。そしてほぼ全種のアメーバは、厚さ8~10 nmのプラスマレンマの外側に密接した糖衣をもつという。糖衣の微細構造は、最も単純な無構造のもの以外に、糸状、管状、六角柱あるいはさらに錯綜した複雑なパターンがその内部に認められるものも多い。しかし、これらパターンは各々独立した単位構造と認められるほど鮮明でないのが糖衣の特徴である。一方、糖衣から分化した繊細な構造であるが、電子顕微鏡により糖衣から明瞭に識別できる点で糖衣そのものとは違い、糖衣を構成する素材のひとつを、糖針としている<sup>69)</sup>。さらに石井は鱗片が、糖衣表面に多数配列した硬質の安定した固体構造とした<sup>7)</sup>。Grellらによって最初に発見された鱗片は、*Cochliopodium*、*Dactylamoeba*、および *Paramoeba eilhardi* などの生物に見られるとしている<sup>70)</sup>。園部らは、表面糖衣にはレクチンの一種である concanavalin A が結合するとされており、細胞膜直下にはアクチン繊維およびミオシン繊維からなる層が存在するとしている<sup>71)</sup>。細胞膜を単離するとアクチン繊維もついてくることから、アクチン繊維はプラスマレンマに結合していると考えられる。

石井らは、アメーバ運動中におけるプラスマレンマの局所破壊の研究で、表面活性剤はアメーバのプラスマレンマを溶かすとしており、さらにこの液でガラス毛细管により体表の局所を溶かし、次の結果を発表している<sup>72)</sup>。

- 1) 液が薄い場合、局所は殆ど球形状に外側へ突出する。この時、他のプラスマレンマに付着しているカーボン粒子の不動状態から、局所のプラスマレンマのみの硬さが低下したことによるものと思われる。



- 2) 液が濃い場合、局所のプラスマレンマが溶かされて一部の原形質が外に出るが、直ちに膜が再形成された。
- 3) 体前端部に薬剤をかけた場合、突出球状部に原形質は流れ込むが、その時、体中間部は形を変えず後端部のみ前方に顕著に変形した。
- 4) 濃い薬剤を後端部にかけた場合、後端部の原形質が膨出しているにもかかわらず削端部で偽足形成がみられた。また原形質が膨出した後、閉じたプラスマレンマと透明質のみの偽足が短縮を示した。

## 2.5 結論

アカントアメーバ角膜炎を抑制する新規 MPS の検討のために、アカントアメーバに対するより抗アメーバ効果の高い分岐型脂肪酸類の検討を行った。これまでの実験結果から、最も抗アメーバ効果の高いサンプルは、長鎖では分岐型脂肪酸塩である Ac iso-C18K 9.6 mM (0.31 w/v%)、Ac iso-C16K 10 mM (0.31 w/v%)が低濃度で抗アメーバ効果を示し、次に効果が高かったものは中鎖脂肪酸塩である Ac C8K 140 mM (2.5 w/v%)、順に中鎖脂肪酸である Ac C9 710 mM (13 v/v%)であった。本研究では長鎖脂肪酸塩である Ac iso-C16K および Ac iso-C18K においてプラスマレンマの破壊が観察され、なおその破壊時間は約 10 秒程度であることが明らかとなった。また、アメーバのプラスマレンマが破裂しない中鎖脂肪酸である Ac C8、Ac C9 および中鎖脂肪酸塩である Ac C8K の死細胞も確認された。これらは 10 分間の接触で抗アメーバ効果を示すことが明らかとなったことから、分岐型脂肪酸類の新規抗菌薬剤としての可能性が示唆された。さらに、これらの結果から炭素鎖の長さや分岐パターンによって抗アメーバ効果に違いが出ることが示唆された。

## 第3章 *Rhodotorula mucilaginosa* に対する

### 分岐型脂肪酸類の抗真菌効果

#### 3.1 研究背景と目的

第2章では水回り環境に存在する *Acanthamoeba castellanii* に対する分岐型脂肪酸類の抗アメーバ効果の検討を行った。その結果、長鎖では脂肪酸塩である Ac iso-C16K および Ac iso-C18K、中鎖では Ac C9 が高い抗アメーバ効果を示し、さらに長鎖脂肪酸塩の2サンプルでは、アメーバのプラスマレンマの破裂が確認された。

この結果を受けて、第3章では水回り環境の中でも特に浴室環境において問題となっている *Rhodotorula mucilaginosa* に対する分岐型脂肪酸類および直鎖型脂肪酸類の抗真菌効果の検討と、2.3.7 節でアメーバのプラスマレンマの破裂が確認されたように、*R. mucilaginosa* でも細胞膜の形態観察を試みた。

Zeng らは真菌の白癬菌である *Trichophyton rubrum* に対する細胞膜の損傷をフローサイトメトリー(FACS)による観察で明らかにしている<sup>73)</sup>。FACS とは、その名の通りフロー(水流)を利用することにより、細胞を1つ1つ解析することである<sup>74)</sup>。蛍光色素を測定対象とした FACS は、当初 DNA 結合性蛍光色素を用いた DNA 量の測定からはじまった。その後、モノクローナル抗体技術および抗体に結合可能な蛍光色素の開発が進んだことにより、その可能性が拡大し生命科学に必要不可欠な実験方法となった。抗体をラベルする蛍光色素はその蛍光波長分布の違いと励起波長の違いの組み合わせで識別される。これによって、10以上のターゲットの分子の細胞あたりの発現量同時測定することが可能となっている。FACS によって検出できる細胞成分は一定量以上の DNA であるが、DNA の検出試薬としては主に propidium iodide(PI)、7-omino-actinomycin D(7-ADD)、Hoechst33342 が用いられ、いずれも DNA の二重らせん構造にインタカレートすることにより蛍光を発し、その強度を調べることで DNA 量を定量できる。これらの蛍光色素のうち PI および 7-ADD は生細胞の細胞膜を透過しないため、染色には膜透過処理が必要となる。7-ADD が GC 塩基対に特異的に結合するのに対し、PI にはそのような塩基配列の選択性はないとされている。そこで本研究では、3.2.4 節で抗真菌効果を示したサンプルに、PI 染色を用いた *R.*

*mucilaginosa* に対する抗菌効果の観察についても併せて試みた。

## 3.2 実験方法

### 3.2.1 供試菌株と培養条件

*Rhodotorula mucilaginosa* NBRC 0001 は NBRC (Nite Biological Resource Center) から入手し、YM 培地を増殖培地とした。表 4 に培地組成を示す。培養条件は、*R. mucilaginosa* を 30 °C で 2~30 日培養したものを、YM スラントで約 2 日間増殖させ、300 mL 三角フラスコに表 1 の YM 液体培地 100 mL を作成した。その後スラントの *R. mucilaginosa* をデイスポループの先で採ったものを添加し、24 °C、70 rpm で約 48 時間培養させることで増殖させた。その後、4 °C、3200 rpm で 20 分間遠心分離を行い、細胞数が  $5 \times 10^6$  cells/mL となるよう懸濁液を作成した。

表 4 YM 培地組成

---

Glucose (Wako Pure Chemical Industries, Ltd): 10 g
Peptone (Becton Dickinson): 5 g
Yeast extract (Becton Dickinson): 3 g
Malt extract (Becton Dickinson): 3 g
Distilled water: 1 L
Agar (Wako Pure Chemical Industries, Ltd): 15 g

---

### 3.2.2 分岐型脂肪酸類

2.2.2 節と同様の長鎖では 5 つの脂肪酸および 2 つの脂肪酸塩を用いた。なお脂肪酸のコントロールとして 20 % Tween 80 を使用し、脂肪酸塩においては pH 調整水を使用した。

### 3.2.3 抗真菌試験

分岐型脂肪酸および脂肪酸塩を 3.2.1 節で調整した懸濁液を 400  $\mu\text{L}$  ずつ接触させた。しかし、脂肪酸およびアルコールは懸濁液と混合した際に分離したため、400  $\mu\text{L}$  の懸濁液を遠心分離でペレット化して水を除き、400  $\mu\text{L}$  の 20 % Tween 80 と 400  $\mu\text{L}$  のサンプルを混合させたものにペレットを溶かし、接触を行った。その後はツインミキサーにて室温で撹拌を行いながら、接触から 10 分、60 分、180 分毎に YM 培地に塗布し、2 日後、コロニーカウント法により生菌数を算出した。

### 3.2.4 最小殺真菌濃度(MFC)試験

最小殺真菌濃度である MFC(minimum fungicidal concentration)は、微生物の増殖を阻止するために必要な最小薬剤濃度のことで、微生物に対する抗菌力の強さを表し、数値が低いほど抗菌力が強いことを意味する。抗真菌試験で高い抗菌力を示した分岐型脂肪酸類の中で、*R. mucilaginosa* に対して最も低濃度で抗アメーバ効果の高いサンプルであるのかを検討した。3.2.3 節で行った抗真菌試験の場合と同様に、脂肪酸の場合は 20 % Tween 80 を希釈液として使用し、脂肪酸塩の場合は pH 調整水を使用した。サンプルは 2 倍希釈系列で調製した。なお、算出した値は対数値で平均( $n=3$ )をとり、かつ標準偏差も同様に算出した。

### 3.2.5 propidium iodide(PI)染色による細胞膜の損傷試験

対象サンプルは 3.2.4 節によって得られた高い抗真菌効果を持つ分岐型長鎖脂肪酸塩である Ac iso-C16K (41 mM)、直鎖型脂肪酸塩である C12K (44 mM)、分岐型中鎖脂肪酸である Ac C9 (48 mM)、直鎖型脂肪酸である C10 (86 mM)とした。

3.2.3 節で調整した真菌懸濁液(約  $5 \times 10^7$  cells/mL)と対象サンプルを 400  $\mu\text{L}$  ずつ 1.5 mL 容エッペンに入れ、ツインミキサーにて室温で撹拌を行いながら、10 分間接触させた。その後 PI(約 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )を添加後、遮光して 5 分間染色させ、フローサイトメトリーを用いて細胞の観察を行った。なお、検討したサンプル濃度は、3.2.4 節より得られた MFC 値を考慮

し、MFC 値および 10 倍の MFC 値での濃度における細胞膜の損傷の観察を試みた。

### 3.3 実験結果

#### 3.3.1 分岐型脂肪酸類およびアルコール類による抗真菌効果

図 11 に長鎖脂肪酸である Ac iso-C16、Ac iso-C18、Ac iso-C18N、Ac iso-C18T、Ac iso-C20、図 12 に長鎖脂肪酸塩である Ac iso-C16K、Ac iso-C18K、図 13 に長鎖アルコールである Ac iso-C16OH、Ac iso-C18OH、Ac iso-C18NOH、Ac iso-C18TOH、Ac iso-C20OH、図 14 に中鎖脂肪酸である Ac C8、Ac C9、図 15 に中鎖脂肪酸塩である Ac C8K、Ac C9K、の *R. mucilaginosa* に対する抗真菌試験の結果を示す。この結果より、最も抗真菌効果が高い分岐型脂肪酸類は、10 分で 4 オーダー(99.99 %)の増殖抑制効果を示した分岐型長鎖脂肪酸塩および中鎖脂肪酸、脂肪酸塩の 6 サンプルであることが明らかとなった。長鎖脂肪酸はいずれのサンプルも抗真菌効果が全く得られなかった。長鎖アルコール類はコントロールである 20 % Tween 80 および pH 調整水はいずれの接触時間においても抗真菌効果を示さなかったことから、これらはサンプル自体の抗菌効果であることが明らかとなった。

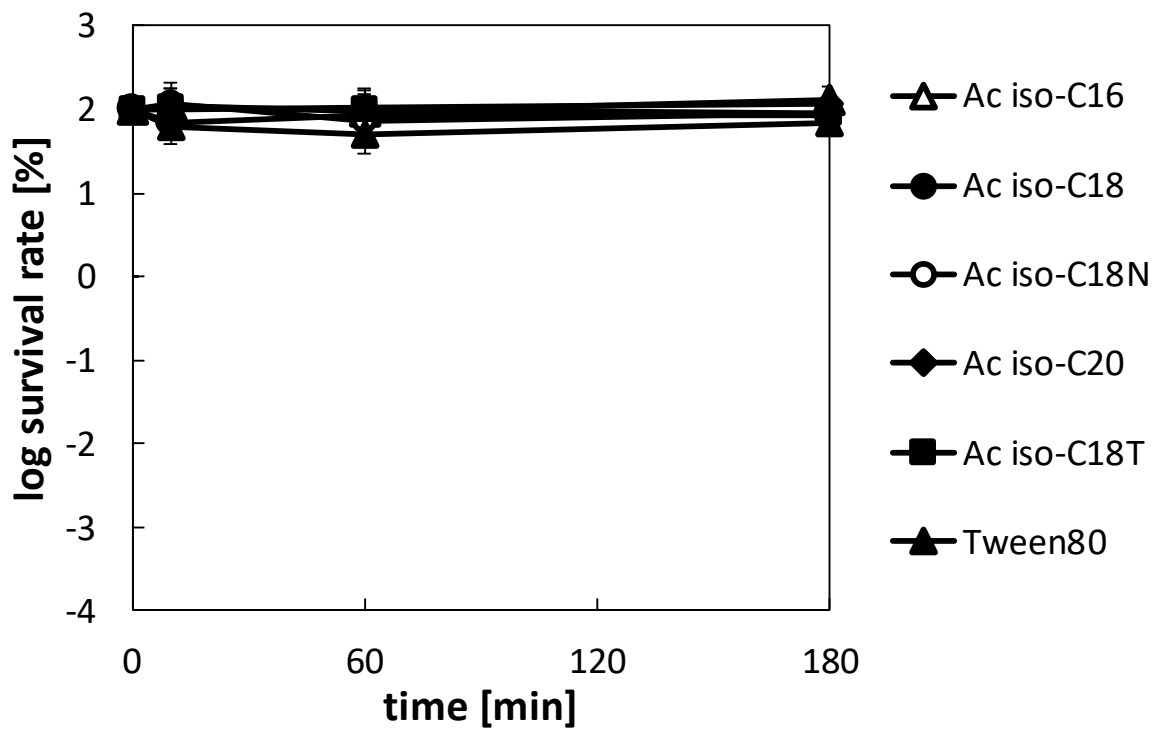


図 11 *R. mucilaginosa* に対する長鎖脂肪酸の抗真菌効果

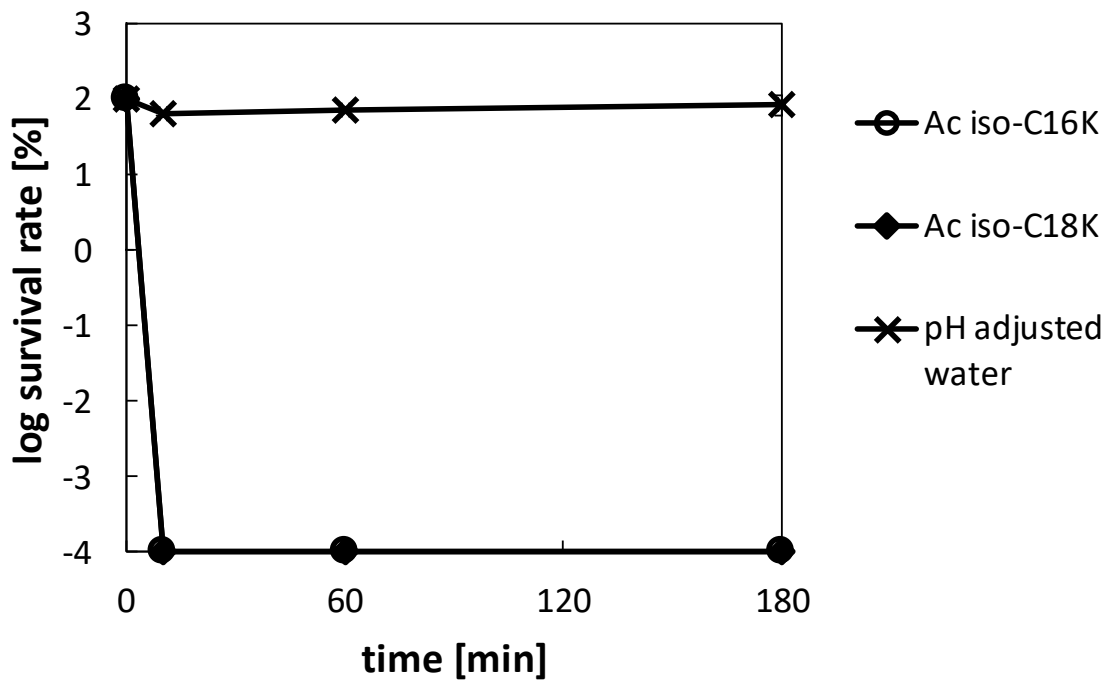


図 12 *R. mucilaginosa* に対する長鎖脂肪酸塩の抗真菌効果

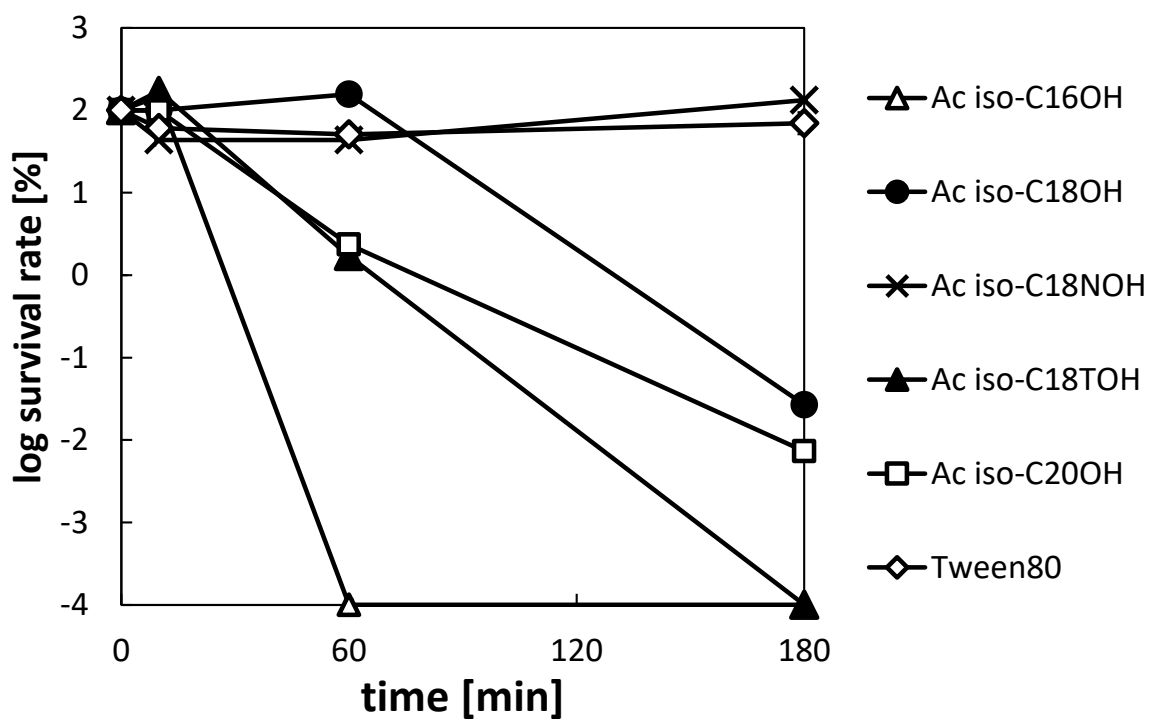


図 13 *R. mucilaginosa* に対する長鎖アルコールの抗真菌効果

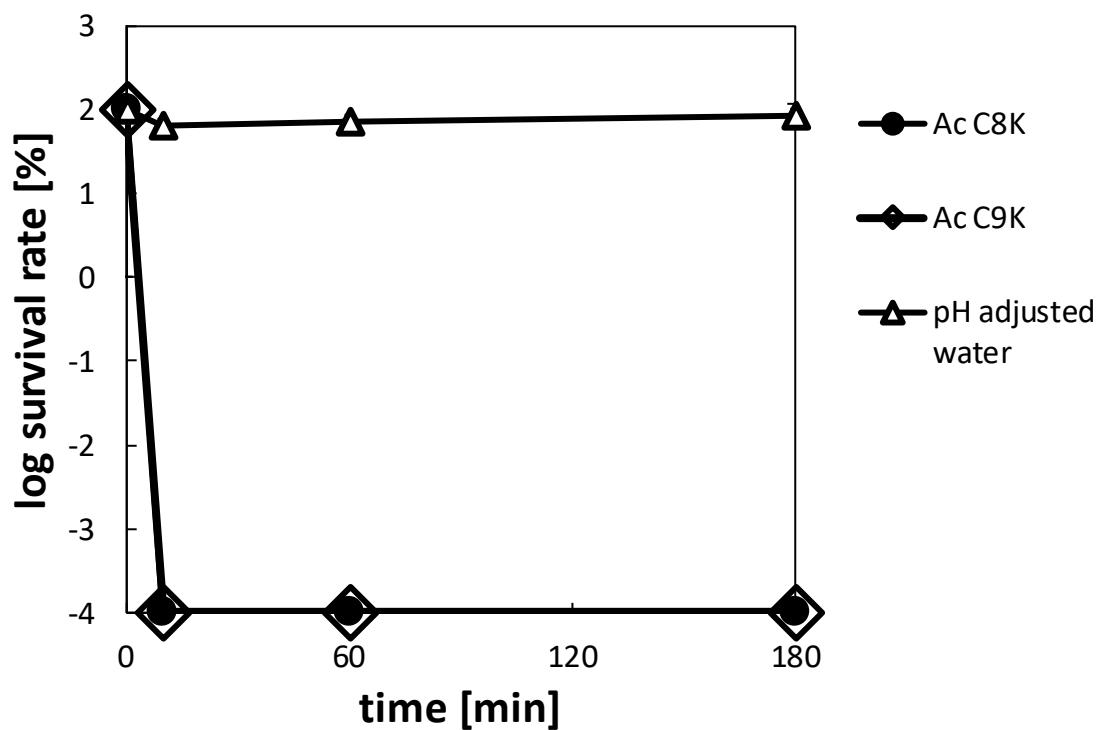


図 14 *R. mucilaginosa* に対する中鎖脂肪酸塩の抗真菌効果

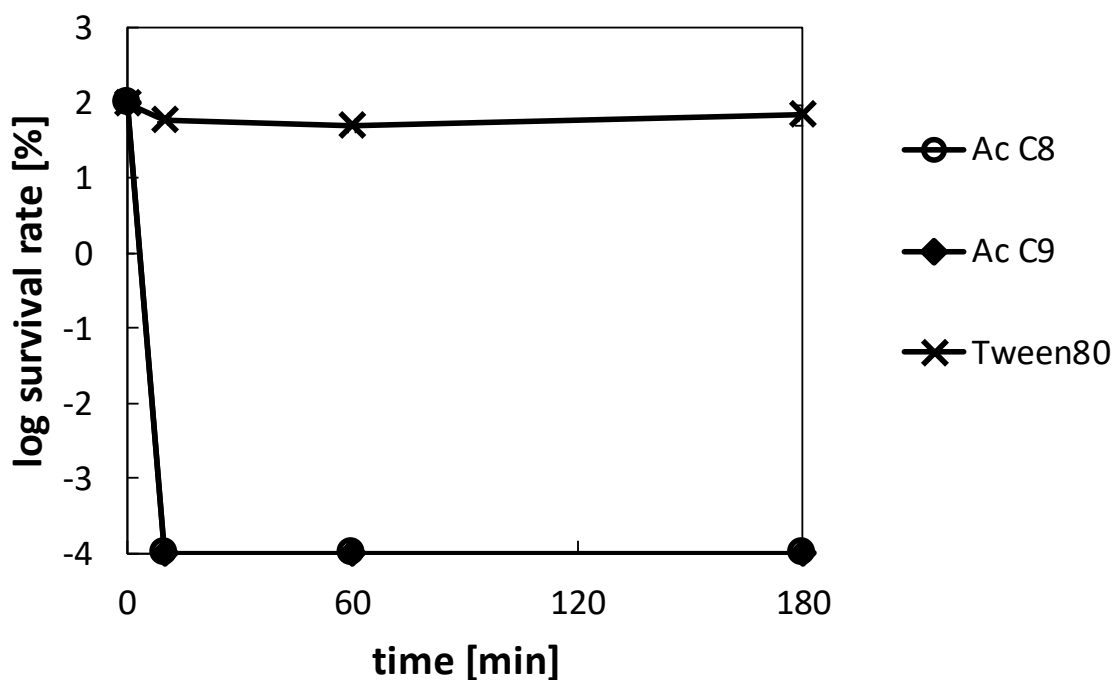


図 15 *R. mucilaginosa* に対する中鎖脂肪酸の抗真菌効果

### 3.3.2 直鎖型脂肪酸類との比較

本研究では分岐型脂肪酸類の抗菌効果を検討している。しかし、直鎖型脂肪酸および脂肪酸塩においても、アメーバ<sup>46)</sup>、カビ<sup>50)</sup>、細菌<sup>51)</sup>に対する抗菌試験において、抗菌効果を有することが明らかとなっている。しかし、*R. mucilaginosa* に対する直鎖型脂肪酸類の抗真菌効果は明らかになっていない。そこで本章では、酵母である *R. mucilaginosa* 分岐型と直鎖型による抗真菌効果の違いの検討を行った。

本章では 9 種の脂肪酸および 9 種の脂肪酸塩を検討した<sup>46,50,51)</sup>。和光純薬工業(株)より酪酸(C4 : 0)、カプロン酸(C6 : 0)、リノール酸(C18 : 2)を得た。そして東京化成工業(株)よりカプリル酸(C8 : 0)、カプリン酸(C10 : 0)、ラウリン酸(C12 : 0)、ミリスチン酸(C14 : 0)、オレイン酸(C18 : 1)およびリノレン酸(C18 : 3)を得た。また、溶媒には Tween 80 を 20 % 攪拌後、試料濃度は 350 mM に設定し、Tween 80 (20 %)をコントロールとして使用した。脂肪酸塩は、脂肪酸および水酸化カリウムペレット(KOH : 和光純薬工業(株))およびイオン交換水を用いて、重量測定により脂肪酸塩の水和混合物を調製した。試料は 350 mM の濃



度で調製し、75 °Cで2時間攪拌した。KOH水溶液を添加し、pH=10.5で脂肪酸塩を中和させた。カプリル酸カリウム(C8K)、カプリン酸カリウム(C10K)、ラウリン酸カリウム(C12K)、ミリスチン酸カリウム(C14K)、オレイン酸カリウム(C18:1K)、リノール酸カリウム(C18:2K)、リノール酸カリウム(C18:3K)およびコントロールはpH調整KOH溶液(pH=10.5)を用いて調整した。すべての脂肪酸塩とpH調整されたKOH溶液は、0.20 µmミリポアフィルター(東洋濾紙(株))を通して低温(4~6 °C)でフィルター殺菌した。

直鎖型脂肪酸および脂肪酸塩と4.2.1節で調整した懸濁液を400 µLずつ接触させ、ツインミキサーにて室温で攪拌を行いながら、接触から10分、60分、180分毎にYM培地に塗布し、2日後、コロニーカウント法により生菌数を算出した。なお、算出した値は対数値で平均(n=3)をとり、かつ標準偏差も同様に算出した。

図16に、*R. mucilaginosa*に対する直鎖型脂肪酸、図17に直鎖型脂肪酸塩の抗真菌試験の結果を示す。直鎖型脂肪酸であるC8およびC10は、*R. mucilaginosa*に対して10分間の接触で6オーダーの抗真菌効果が明らかとなった。しかし、Tween 80においては抗真菌効果が示されなかった。また、脂肪酸塩においては、C10K、C12K、C14K、C18:1K、C18:2K、C18:3Kが10分間の接触で6オーダーの抗真菌効果を示した。しかし、pH調整水の抗菌効果は示されなかった。

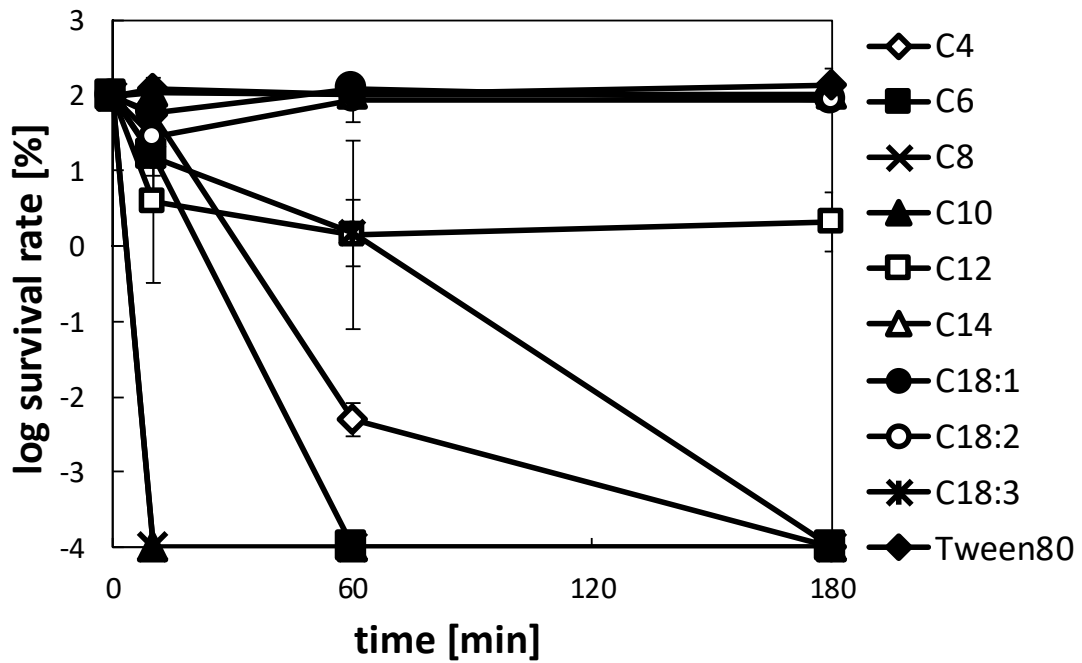


図 16 *R. mucilaginosa* に対する直鎖型脂肪酸の抗真菌効果

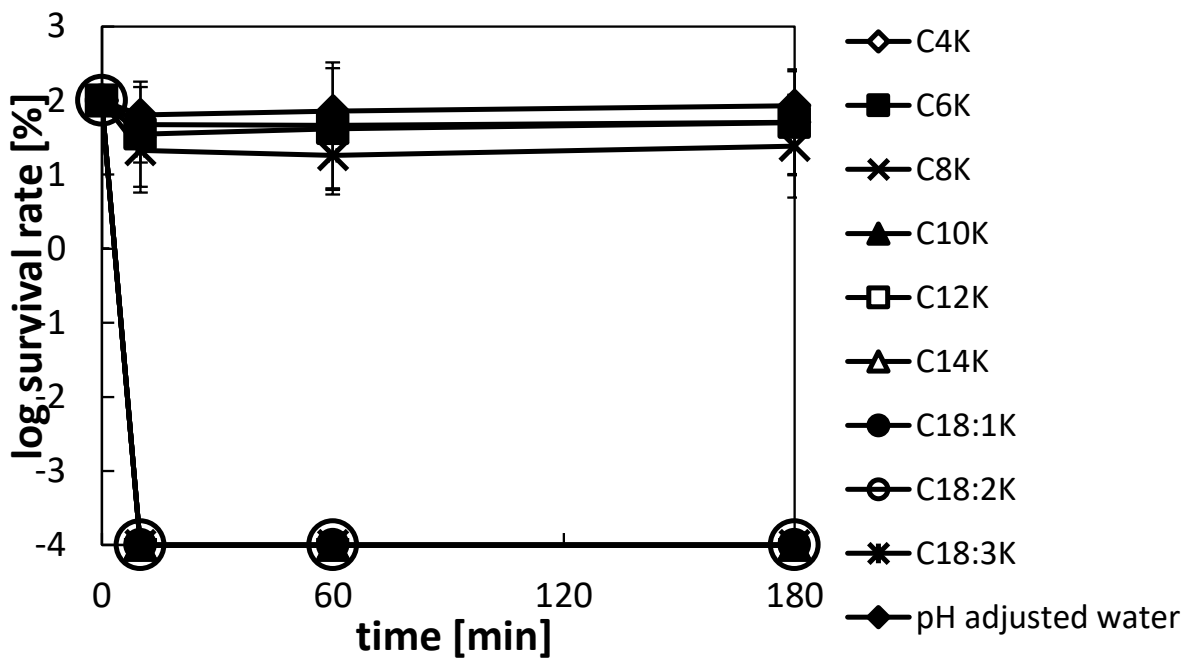


図 17 *R. mucilaginosa* に対する直鎖型脂肪酸塩の抗真菌効果

### 3.3.3 最小殺真菌濃度 (MFC)

3.3.1 節、3.3.2 節より、分岐型脂肪酸類および直鎖型脂肪酸類を用いた *R. mucilaginosa* に対する抗真菌効果が明らかとなったサンプルは、10 分で 6 オーダーの増殖抑制効果を示した分岐型長鎖脂肪酸塩の Ac iso-C16K、Ac iso-C18K、分岐型中鎖脂肪酸の Ac C8、Ac C9、分岐型中鎖脂肪酸塩の Ac C8K、Ac C9K、直鎖型脂肪酸の C8、C10、直鎖型脂肪酸塩の C10K、C12K、C14K、C18:1K、C18:2K、C18:3K であった。MFC の結果を表 5 に示す。表 5 より、最も効果の高かったものは、分岐型長鎖脂肪酸の Ac iso-C16K であった。順に、直鎖型脂肪酸塩の C10K、C12K、続いて中鎖脂肪酸である Ac C8、Ac C9、長鎖脂肪酸塩の Ac iso-C18K、次に直鎖型脂肪酸の C10、直鎖型脂肪酸塩の C14K であった。

表 5 *R. mucilaginosa* に対する分岐型および直鎖型脂肪酸類の MFC 値

branched chain		straight chain	
fatty acid	MAC [mM]	fatty acid	MAC [mM]
Ac C8	48	C4	> 350
Ac C9	48	C6	> 350
Ac iso-C16	> 3200	C8	175
Ac iso-C18	> 2500	C10	86
Ac iso-C18N	> 2900	C12	> 350
Ac iso-C18T	> 2900	C14	> 350
Ac iso-C20	> 2600	C18:1	> 350
		C18:2	> 350
		C18:3	> 350
fatty acid salt	MAC [mM]	fatty acid salt	MAC [mM]
Ac C8K	280	C4K	> 350
Ac C9K	260	C6K	> 350
Ac iso-C16K	41	C8K	> 350
Ac iso-C18K	76	C10K	44
		C12K	44
		C14K	88
		C18:1K	350
		C18:2K	350
		C18:3K	350

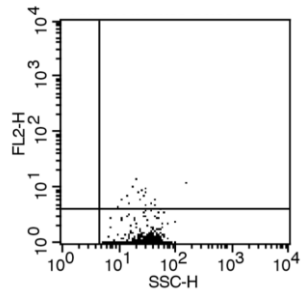
### 3.3.4 PI 染色による細胞膜の損傷

3.3.3 節より、抗菌効果を示した分岐型長鎖脂肪酸である Ac iso-C16K (41 mM)、直鎖型脂肪酸塩である C12K (44 mM)、分岐型中鎖脂肪酸である、Ac C9 (48mM)、直鎖型脂肪酸である C10 (86 mM)の観察をフローサイトメトリーを用いて行った。

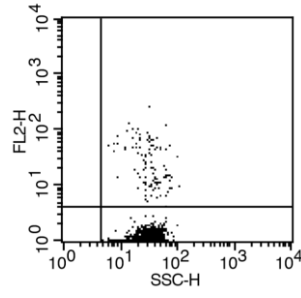
まず、図 18~20 に比較対象として *R. mucilaginosa* と接触させた(A1) 20 % Tween 80 PI 未添加、(A2) 20 % Tween 80 PI 添加、(B1) pH 調整水(pH=10.5) PI 未添加、(B2) pH 調整水(pH=10.5) PI 添加、(C1) チアベンダゾール(TBZ) 500 ppm PI 未添加、(C2) チアベンダゾール(TBZ) 500 ppm PI 添加、(D1) イマザリル(IMZ) 500 ppm PI 未添加、(D2) イマザリル(IMZ) 500 ppm PI 添加、(E1) 50 % エタノール PI 未添加、(E2) 50 % エタノール PI 添加、の結果を示す。これらの PI で染まった菌数の割合は、(A1) 0.90 %、(A2) 5.35 %、(B1) 0.00 %、(B2) 1.95 %、(C1) 0.00 %、(C2) 25.50 %、(D1) 0.05 %、(D2) 6.20 %、(E1) 0.10 %、(E2) 99.65 % であった。(A1)、(A2)~(E1)、(E2)より、(A2)、(B2)では *R. mucilaginosa* に対する細胞膜の損傷はほぼ見られなかった。そして水回りなどの住宅環境に防カビ剤として使用されている(C2)および(D2)は、(A2)、(B2)よりも高い *R. mucilaginosa* に対する細胞膜の損傷が見られた。さらに、インフルエンザウイルスによる接触感染防止として使用されている(E2)では、ほぼすべての *R. mucilaginosa* に対する細胞膜の損傷を確認できた。

図 21、22 に *R. mucilaginosa* と接触させた(F1) Ac iso-C16K (41 mM) MFC 値、(F2) Ac iso-C16K (410 mM) 10 倍 MFC 値、(G1) C12K (44 mM) MFC 値、(G2) C12K (440 mM) 10 倍 MFC 値、(H1) Ac C9 (48 mM) MFC 値、(H2) Ac C9 (480 mM) 10 倍 MFC 値、(I1) C10 (86 mM) MFC 値、(I2) C10 (860 mM) 10 倍 MFC 値の結果を示す。なお、PI はすべて添加した状態である。これらの PI で染まった菌数の割合は、(F1) 99.70 %、(F2) 99.00 %、(G1) 3.75 %、(G2) 99.40 %、(H1) 98.20 %、(H2) 99.15 %、(I1) 24.00 %、(I2) 79.80 %であった。(F1)、(F2)~(I1)、(I2)よりすべてのサンプルで MFC および 10 倍の MFC において細胞膜の損傷が確認できた。しかし、(G2)においては、10 倍の MFC 値のみ細胞膜損傷が確認でき、(I1)の MFC 値ではわずかな細胞膜損傷が確認でき、(I2)である 10 倍の MFC 値においては十分な細胞膜の損傷が確認できた。

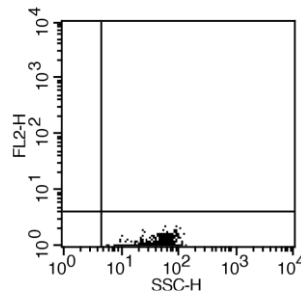
(A1) 20 % Tween80 PI not addition



(A2) 20 % Tween80 PI addition



(B1) pH adjusted water PI not addition



(B2) pH adjusted water PI addition

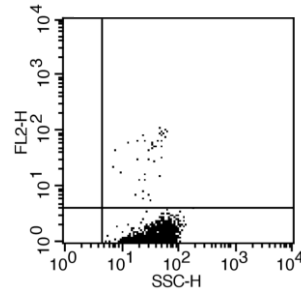
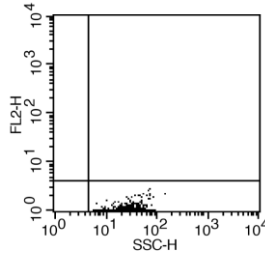
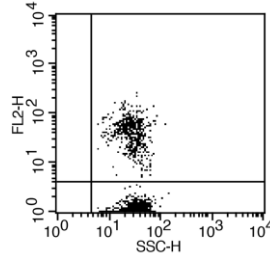


図 18 *R. mucilaginosa* に対する(A)20 % Tween 80、(B)pH 調整水のフローサイトメトリー

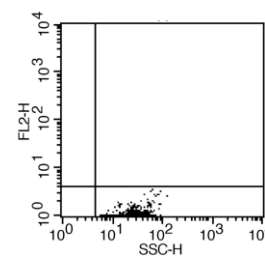
(C1) TBZ 500 ppm PI not addition



(C2) TBZ 500 ppm PI addition



(D1) IMZ 500 ppm PI not addition



(D2) IMZ 500 ppm PI addition

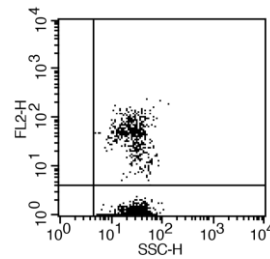
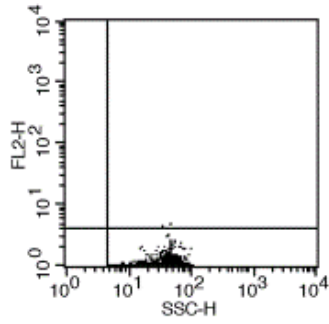


図 19 *R. mucilaginosa* に対する(C)TBZ、(D)IMZ のフローサイトメトリー

(E1) 50% EtOH PI not addition



(E2) 50% EtOH PI addition

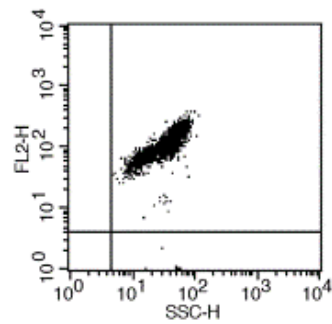
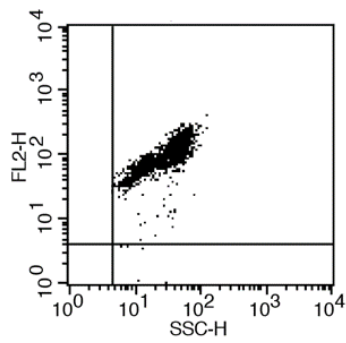
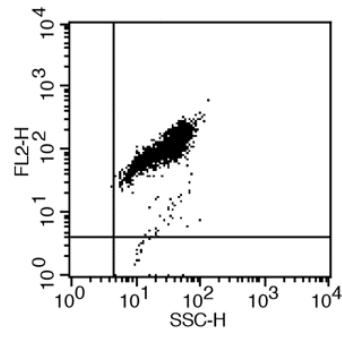


図 20 *R. mucilaginosa* に対する(E)エタノールのフローサイトメトリー

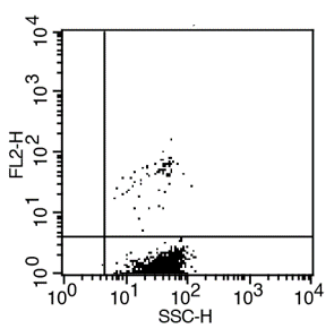
(F1) Ac iso-C16K MFC concentration



(F2) Ac iso-C16K 10MFC concentration



(G1) C12K MFC concentration



(G2) C12K 10MFC concentration

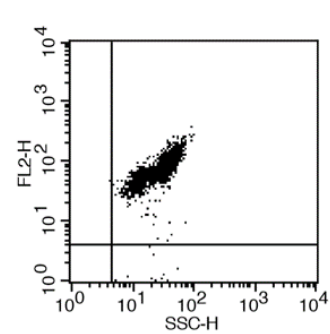


図 21 *R. mucilaginosa* に対する(F)Ac iso-C16K、(G)C12K、フローサイトメトリー

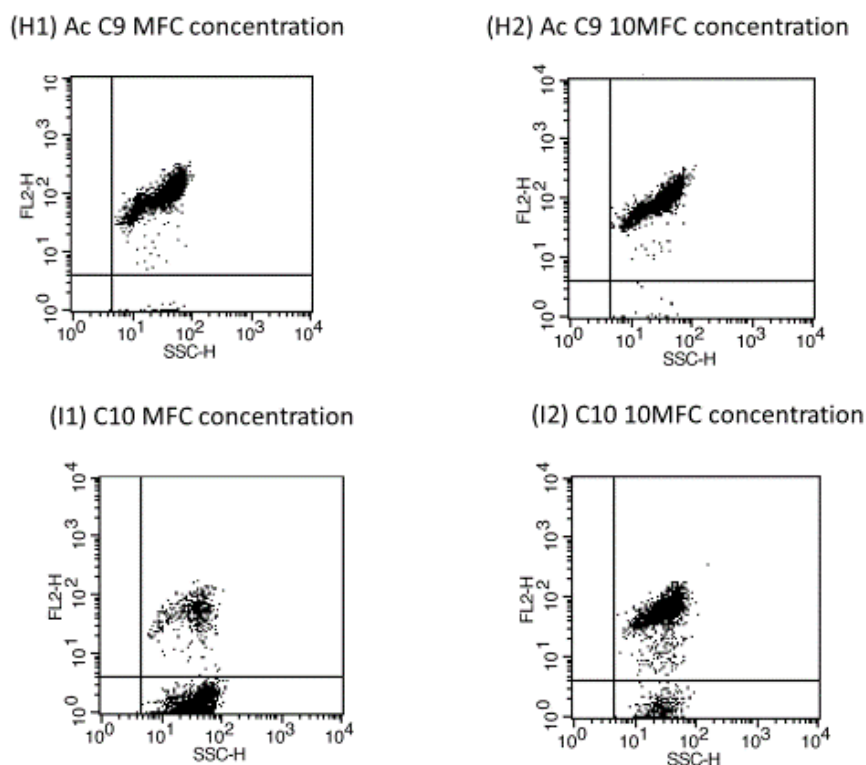


図 22 *R. mucilaginosa* に対する(H)Ac C9、(I)C10 のフローサイトメトリー

### 3.4 考察

本章で最も効果の高かったものは、分岐型長鎖脂肪酸塩の Ac iso-C16K であった。順に、直鎖型脂肪酸塩の C10K、C12K、続いて分岐型中鎖脂肪酸である Ac C8、Ac C9、分岐型長鎖脂肪酸塩の Ac iso-C18K、次に直鎖型脂肪酸の C10、直鎖型脂肪酸塩の C14K であった。直鎖型脂肪酸および脂肪酸塩においては、炭素数が短すぎても長すぎても抗真菌効果が得られないことが示唆された。また、分岐型脂肪酸塩においては、炭素鎖の長いものは塩にすることで抗真菌効果が高まることが明らかとなった。FACS を用いた PI 染色による細胞膜の観察では、Ac iso-C16K (41 mM) では MFC および 10 倍の MFC において細胞膜の損傷が確認でき、Ac C9 (48 mM) においても、十分な細胞膜の損傷が確認できた。

田中らは、直鎖脂肪酸塩である C10K および C12K による処理において、アメーバが破裂することを明らかにしている<sup>46)</sup>。この破裂は、脂肪酸塩による細胞膜収縮に起因する可

能性が示唆されることから、*Acanthamoeba* のように、*R. mucilaginosa* においても、脂肪酸塩によって細胞膜が変性、細胞膜の破壊によって抗真菌効果を発揮した可能性があることが考えられた。しかし、(G1) C12K の MFC や (I1) C10 の MFC、(I2) C10 の 10 倍の MFC のように細胞膜の関与が無さそうなものでも、抗菌効果を示したことや、MFC 濃度であっても薬剤によって PI の染まり方が異なった。これらは膜への作用に加え、他の作用機序が関与している可能性が考えられた。Zheng らはリノール酸が FabI を選択的に阻害する不飽和脂肪酸のモデルであることを示すために、大腸菌および黄色ブドウ球菌のゲノム DNA から増幅された完全長 FabI(アシル輸送タンパク質 ACP 還元酵素)遺伝子を使用した<sup>57)</sup>。その結果、不飽和脂肪酸の抗菌効果は、脂肪酸合成の阻害によるものであることを示唆した。よって、本章で用いた不飽和脂肪酸である分岐型の AcC8、Ac C9、直鎖型の C10 が抗アメーバ活性を示す理由は、不飽和および飽和脂肪酸の合成と FabI の選択的阻害に起因することが考えられる。Lahsen らは、*Clostridium botulinum*、*Clostridium sporogenes*、*Bacillus cereus spores* の孢子に対する 11 の脂肪酸とその塩の抗菌活性を実証し<sup>75)</sup>、Desbois らは直鎖型脂肪酸とシス二重結合からの遊離脂肪酸が黄色ブドウ球菌の成長を阻害することを示した<sup>76)</sup>。これらの研究では、細胞死の根底にあるメカニズムは、細胞溶解、電子輸送システムの阻害、酸化的リン酸化の脱共役、栄養摂取の阻害、および酵素活性の阻害であることを明らかにしている。さらにこれらの研究で検討された脂肪酸および脂肪酸塩は、中鎖および長鎖で高い抗菌効果を示している。加えて、Gina らは、脂肪酸が溶解性と親油性に寄与する吸着性のバランスが重要であるとしている<sup>77)</sup>。それは、細菌の環状ヌクレオチド調節チャンネルの膜貫通領域の構造に関する研究により、疎水性基の炭素鎖の長さによって溶解性が低下し、親油性が改善されることが示されたためである。つまり、炭素鎖が短い場合、溶解性が向上し、親油性は低下する。そこで本節でも 2.4 節と同様に本章で検討した分岐型および直鎖型のサンプルの HLB 値を式 2 に従って算出した。表 6 に、分岐型および直鎖型脂肪酸類の *R. mucilaginosa* に対する MAC と算出した HLB 値をまとめたものを示す。表 6 より、分岐型では HLB 値が 5.6~6.2 が最適で、直鎖型では 7.0~7.9 が最適であることが明らかとなった。さらに分岐型においても直鎖型においても HLB 値が 4.5 以下のものは抗真菌効果が低い傾向、HLB 値が 10 以上のものは抗真菌効果が低い傾向にあることが明らかとなった。また、炭素数の観点においては、分岐型および直鎖型ともに 8~10 付近が高い



抗真菌効果を示し、さらに 2.4 節と同様に分岐型では長鎖でも脂肪酸塩になると、高い抗真菌効果を有することが分かった。

表 6 分岐型および直鎖型脂肪酸類の *R. mucilaginosa* に対する MAC と算出した HLB 値

Branched chain				Straight chain			
fatty acid, salt, alcohol	Carbon number	HLB	MFC [mM]	fatty acid, salt, alcohol	Carbon number	HLB	MFC [mM]
Ac C8	8	6.2	48	C4	4	10	>350
Ac C9	9	5.7	48	C6	6	7.8	>350
Ac iso-C16	16	3.5	>3200	C8	8	6.2	175
Ac iso-C18	18	3.1	>2500	C10	10	5.2	86
Ac iso-C18N		3.1	>2900	C12	12	4.5	>350
Ac iso-C18T		3.1	>2900	C14	14	3.9	>350
Ac iso-C20	20	2.9	>2600	C18:1	18	3.2	>350
				C18:2		3.2	>350
				C18:3		3.2	>350
				C4K	4	13	>350
Ac C8K	8	9.1	280	C6K	6	11	>350
Ac C9K	9	8.5	260	C8K	8	9.1	>350
Ac iso-C16K	16	5.6	41	C10K	10	7.9	44
Ac iso-C18K	18	5.2	76	C12K	12	7.0	44
				C14K	14	6.2	88
				C18:1K	18	5.2	350
				C18:2K		5.2	350
				C18:3K		5.3	350

Petschow らは、中鎖モノグリセリドと遊離脂肪酸の殺菌特性に対する *Helicobacter pylori* の感受性を示した<sup>78)</sup>。彼らは、内膜の内側にプロトン配置し、脱共役剤として濃度勾配を下げることにより、脂肪酸が最初に反応を阻害することを示した。さらに井原は、*Rhodotorula* は紫外線、酸化環境、その他のストレスに耐性があることを示している<sup>27)</sup>。したがって *Rhodotorula* は、脂質成分とカロテノイドに吸着された長鎖脂肪酸塩の疎水性は、細胞膜構造に損傷を引き起こす可能性がある。*Rhodotorula* は、主にスピリロキサニンとカロテンで構成されているとしている<sup>27)</sup>。これらは、さまざまなストレスに反応して細胞内で生成される活性酸素に対する抗酸化機能を示すユニークな成分である。カロテノイドおよび類似化合物と細菌細胞膜に関する研究では、カロテノイドは脂質成分として働き、細胞膜構造を維持し、代謝を調節する<sup>79)</sup>。さらに、ロドトルラの細胞内脂質産生は、*Candida albicans* などの真菌の細胞内脂質産生の約 2 倍であることが知られている<sup>79)</sup>。したがって、*Rhodotorula* の場合、長鎖脂肪酸塩の疎水性が脂質成分のカロテノイドへの吸着を可能に

し、細胞膜構造を損傷すると考えられる。さらに、徳岡らは 33 菌株の酵母に対する界面活性剤の影響を検討し、界面活性剤存在下で培養した酵母細胞の形態観察を行った<sup>67)</sup>。その結果、*Tillandsia glubosa* をグルコース濃度が異なる培地中で培養した結果、やや形がいびつな細胞や、壊れかけた細胞がいくつか固まっているのが観察された。そしてこの菌株を界面活性剤であるシヨ糖脂肪酸エステルおよび Polyoxyethylene、コール酸ナトリウムをそれぞれ添加した培地で培養した結果、すべての界面活性剤において完全に壊れた細胞のかたまりが観察されたことから、界面活性剤が細胞表層に作用してその構造を弱めることを裏付けた。加えて、抗菌界面活性剤に関する渡辺の研究では、陰イオン界面活性剤が細菌の表面に付着することを明らかにしている<sup>58)</sup>。吸着された界面活性剤は細胞表面に親和性を示し、細胞膜を破壊し、ポリタンパク質膜を透過することで、抗菌効果をもたらしたと考えられる。加えて Lahsen らは、多価不飽和脂肪酸の有効性の理由は、自動酸化による過酸化物の形成であるとしている<sup>75)</sup>。さらに、Zheng らによるシス不飽和脂肪酸の抗菌効果に関する研究において、黄色ブドウ球菌および大腸菌に対しては、膜の流動性が不安定になり、シス型のねじれ構造のために流動性が増加することが示唆された<sup>75)</sup>。加えて、中鎖脂肪酸、長鎖脂肪酸、および不飽和脂肪酸は、外膜を通過するとき電子輸送鎖のキャリアに結合し、細胞に侵入すると考えられている。

また、本章では *R. mucilaginosa* に対して分岐型の長鎖において、脂肪酸よりもアルコールの方が抗菌効果の高い結果となった。富樫は、炭素数 8~18 のアルコールを用いて *S. aureus* に作用したときの細菌細胞からのカリウムイオンの流出挙動を検討した結果、細胞膜の流動性変化を電子スピン共鳴にて測定したところ、脂質二重膜の安定性が損なわれる結果を明らかにした<sup>80)</sup>。さらにこのとき活性酵素の発生は認められず、カリウムチャンネルが標的になっていないこと、細胞膜を安定させる化合物の添加によってセスキテルペンアルコールである farnesol による抗菌作用が減弱することを確認した。これらのことから、farnesol は細胞膜の脂質二重膜に非特異的に入り込み、細胞膜の流動性を向上させ、膜構造の損傷を引き起こしていることを強く指摘した。さらに、2.4 節でも述べたように徳岡らは 33 菌株の酵母に対する界面活性剤の影響を 9 種類の界面活性剤の生育抑制効果をグルコース濃度別に評価した結果より、シヨ糖酸エステルのうち HLB 値の大きな、すなわち親水性の大きなものが HLB 値の小さなものより生育抑制効果が大きかったことから、界面活性剤

の水に対する溶解性も生育抑制効果の重要な要素のひとつであることを示唆した<sup>67)</sup>。以上より、本章で検討した長鎖アルコールサンプルにおいても、アルコールによる細胞膜の流動性の向上および、アルコールの水への溶解性の高さが要因ではないかと考えた。

### 3.5 結論

3.3.1 節、4.3.2 節より、分岐型脂肪酸類および直鎖型脂肪酸類を用いた *R. mucilaginosa* に対する抗真菌効果が明らかとなったサンプルは、10 分 6 オーダーの増殖抑制効果を示した分岐型長鎖脂肪酸塩の Ac iso-C16K、Ac iso-C18K、分岐型中鎖脂肪酸の Ac C8、Ac C9、分岐型中鎖脂肪酸塩の Ac C8K、Ac C9K、直鎖型脂肪酸の C8、C10、直鎖型脂肪酸塩の C10K、C12K、C14K、C18 : 1K、C18 : 2K、C18 : 3K であった。さらに MFC 試験において、最も効果の高かったものは、分岐型長鎖脂肪酸の Ac iso-C16K であった。順に、直鎖型脂肪酸塩の C10K、C12K、続いて分岐型中鎖脂肪酸である Ac C8、Ac C9、分岐型長鎖脂肪酸塩の Ac iso-C18K、次に直鎖型脂肪酸の C10、直鎖型脂肪酸塩の C14K であった。さらに、*R. mucilaginosa* を Ac iso-C16K (41 mM)、C12K (44 mM)、Ac C9 (48 mM)、C10 (86 mM) と接触させ、PI を用いてフローサイトメトリーによる膜損傷の観察を行った。その結果、すべてのサンプルで MFC および 10 倍の MFC において細胞膜の損傷が確認できた。以上のことから、第 2 章で示したアメーバの細胞膜破壊が *R. mucilaginosa* でも起こっている可能性が考えられた。

## 第 4 章 分岐型脂肪酸類の マルチパーパスソリューション(MPS)への応用

### 4.1 研究背景と目的

第 2 章では、アcantアメーバに対して、抗アメーバ効果の高い分岐型脂肪酸類の検討を行った。その結果、長鎖では分岐型脂肪酸塩である Ac iso-C18K 9.6 mM (0.31 w/v%)、Ac iso-C16K 10 mM (0.31 w/v%)が低濃度で抗アメーバ効果を示し、さらに数秒ほどの接触時間でプラスマレンマの破裂が起こることも明らかとなった。また、中鎖では脂肪酸塩である Ac C8K 140 mM (2.5 w/v%)、順に中鎖脂肪酸である Ac C9 710 mM (13 v/v%)の抗アメーバ効果が明らかとなった。これらは、アメーバのプラスマレンマが破裂せず、死細胞が確認できた。

これを受けて第 4 章では、アcantアメーバ角膜炎を抑制する新規 MPS の検討のためにコンタクトレンズに汚染されたアメーバをサンプルに接触させ、MPS での分岐型脂肪酸類の有効性を評価するために、コンタクトレンズを使用した実証試験を検証した。さらに、MPS は有効性を評価するために、国際基準である ISO 14729 の規格に準拠しなければならない。ISO 14729 はコンタクトレンズ消毒剤の評価を行うためにスタンドアローンテストという基準がある。この規格に合格すれば、消毒剤として有効とみなすことができる。スタンドアローンテストでは黄色ブドウ球菌、緑膿菌、セラチア菌の 3 つの細菌およびカンジダ、フザリウムの 2 つの真菌に対する消毒効果を評価する必要がある<sup>81)</sup>。スタンドアローンテストは、消毒剤の液自体の消毒効果を評価するもので 2 つの基準がある。第 1 基準に適合するには、試験菌として定められている細菌 3 種を 1/1000、真菌 2 種を 1/10 に減少させる消毒効果が求められる。第 1 基準に不適合の場合は、第 2 基準に適合し、且つレジメン試験という用法用量に従った試験に適合することが求められる。概要を図 23 に示す。そこで、第 2 章で高い抗アメーバ効果を示した Ac iso-C18K、Ac iso-C16K、Ac C8K、Ac C9 の 4 サンプルを用いて、スタンドアローンテストを行い、試験菌 5 種類の微生物に対する抗菌効果を明らかにした。

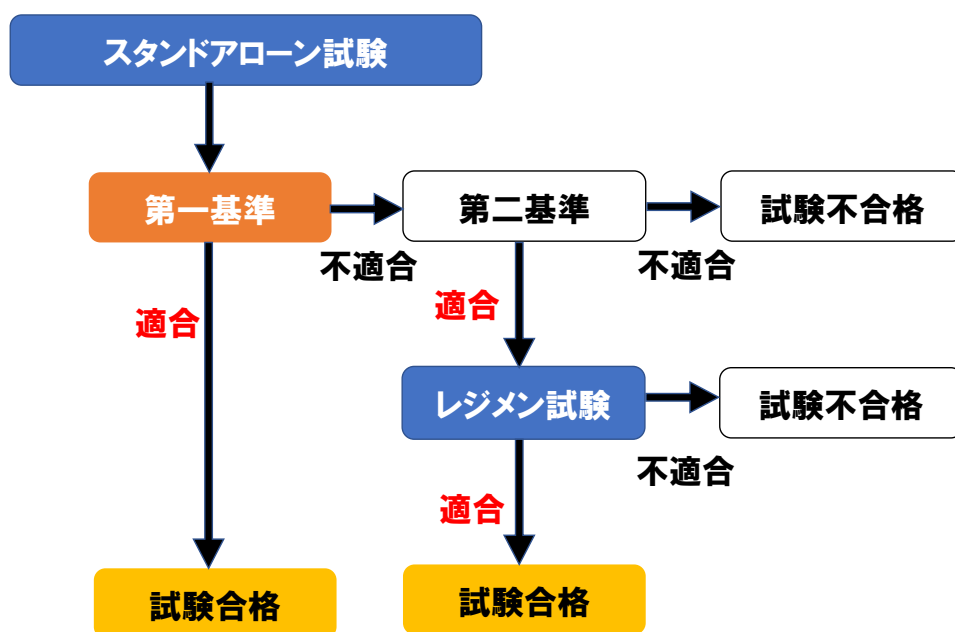


図 23 MPS の有効性試験<sup>47,82)</sup>

## 4.2 実験方法

### 4.2.1 実証試験

#### 4.2.1.1 供試菌株と培養条件

供試菌株には、2.2.1 節で使用した *Acanthamoeba castellanii* (ATCC 30010) を 7～14 日間培養した栄養型を用いた。

#### 4.2.1.2 分岐型脂肪酸類

第 2 章で抗アメーバ効果が低濃度で明らかとなった長鎖の Ac iso-C18K 9.6 mM (0.31 w/v%)、Ac iso-C16K 10 mM (0.31 w/v%) の 2 サンプル、中鎖の Ac C8K 140 mM (2.5 w/v%)、Ac C9 710 mM (13 v/v%) の 2 サンプル、合計 4 サンプルを検討することとした。検証濃度においては、2.3.6 節の表 8 より得られた各 MAC 値を目安とし、その値から 2 倍希釈を行い、

試験を行った。

#### 4.2.1.3 汚染コンタクトレンズを使用した実証試験

操作方法は、Borazjani ら<sup>82)</sup>および Kilvington ら<sup>83)</sup>、田中ら<sup>46)</sup>の試験方法を参考にした。まず 3.2.1 節で  $3.0 \times 10^3$  cells/mL に調整したアメーバ懸濁液 1 mL を 12 ウェルプレートに加え、ソフトコンタクトレンズ(”Seed 2 week pure” (株式会社 Seed)、”One Day Tears” (株式会社ユーロビジョン))を浸漬し、2 時間静置した。次に、3.2.2 節の分岐型脂肪酸類をそれぞれ 1 mL ずつ別のウェルに加え、ソフトコンタクトレンズをこれらのサンプルに移し、6 時間消毒を行った。なお、対象として Ac C9 のコントロールは 10 % Tween 80 とし、Ac C8K、Ac iso-C16K、Ac iso-C18K のコントロールは pH 調整水とした。次に、コンタクトレンズを 1 mL の 2.2.1 節の表 1 である PYG 培地を含む他のウェルに移し、ウェル内のレンズに付着したアメーバを剥がした。そして、30 °C で 7 日間培養後に生存細胞数を計測し、生細胞数が 10 cells/mL であれば、抗アメーバ効果が十分であるとした。なお、算出した値は対数値で平均(n=3)をとり、かつ標準偏差も同様に算出した。

#### 4.2.2 スタンドアローンテスト

##### 4.2.2.1 供試菌株と培養条件

検定菌は細菌 3 種類 : *Staphylococcus aureus* NBRC 12732、*Pseudomonas aeruginosa* NBRC 13275、*Serratia marcescens* NBRC 102204 および真菌 2 種類: *Candida albicans* NBRC 1594、*Fusarium oxysporum* NBRC 31631 を用いた。*S. aureus* の培養培地には NB 培地(Becton Dickinson)、*P. aeruginosa* および *S. marcescens* の培養培地には NBRC 802 培地(Polypepton 10 g: 和光純薬工業株式会社、Yeast extract 2 g、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  1 g、Distilled water 1 L、pH=7.0)を選択した。また、*F. oxysporum* の培養培地にはポテトデキストロース寒天培地: PDA(日水製薬株式会社製)、*C. albicans* の培養培地には YM 培地(Glucose 10 g、Peptone 5 g: Becton Dickinson、Yeast extract 3 g、Malt extract 3 g: Becton Dickinson、Distilled water 1 L)を用いた。培養期間は *S. aureus*、*P. aeruginosa* および *S.*

*marcescens*, *F. oxysporum*, *C. albicans* は約 3~14 日間 30 °C で培養した。

#### 4.2.2.2 分岐型脂肪酸類

4.2.1.3 節で得られた抗アメーバ効果の高い、長鎖の Ac iso-C18K 1.2 mM (0.039 w/v%)、中鎖の Ac C9 0.69 mM (0.012 v/v%) 分岐型脂肪酸類を候補とした。松原らは MPS を用いたソフトコンタクトレンズ使用者の間違ったケア状況について、コンタクトレンズの規定時間以上を超える装着や、コンタクトレンズのこすり洗いの不実施、コンタクトレンズケース洗浄の不実施、コンタクトレンズケースの定期交換の不実施などを挙げていることから<sup>84)</sup>、より短時間での抗アメーバ効果が MPS では必要であるといえる。そこで本研究では、2.3.7 節で約 10 秒のサンプル接触により、アメーバの破裂が確認できた Ac iso-C18K をスタンダードアローンテストの検定サンプルとした。

#### 4.2.2.3 試験法

抗菌試験における初発濃度は細菌で約  $5 \times 10^7$  cells/mL、真菌で約  $5 \times 10^4$  spores/mL とした。なお、培地は 4.2.2.1 節と同様のそれぞれの適した培地を用いた。4.2.2.2 節の対象サンプルと初発濃度を調整した菌懸濁液を 400  $\mu$ L ずつ接触させた。その後はツインミキサーにて室温で攪拌を行いながら、接触から 10 分、60 分、180 分毎に培地に塗布し、2~4 日後、コロニーカウント法により生菌数を算出した。算出した値は対数値で平均 ( $n=3$ ) をとり、かつ標準偏差も同様に算出した。

### 4.3 実験結果

#### 4.3.1 汚染コンタクトレンズを使用した実証試験

##### 4.3.1.1 イソパルミチン酸塩 (Ac iso-C16K)

長鎖脂肪酸塩である炭素数 16 の Ac iso-C16K の実証試験結果を図 24 に示す。抗菌試験での MAC 値 10 mM (0.31 w/v%) を考慮し、その濃度から 2 倍希釈系列で濃度を希釈した。

その結果、抗アメーバ試験結果の約 1/8 の濃度である 1.3 mM (0.039 w/v%)まで抗アメーバ効果を示すことが明らかとなった。なお、0.64 mM 以降は初濃度およびコントロールである pH 調整水と同程度のアメーバが確認され、さらに 0.32 mM では初濃度および pH 調整水を約 2 オーダー上回るアメーバが確認された。

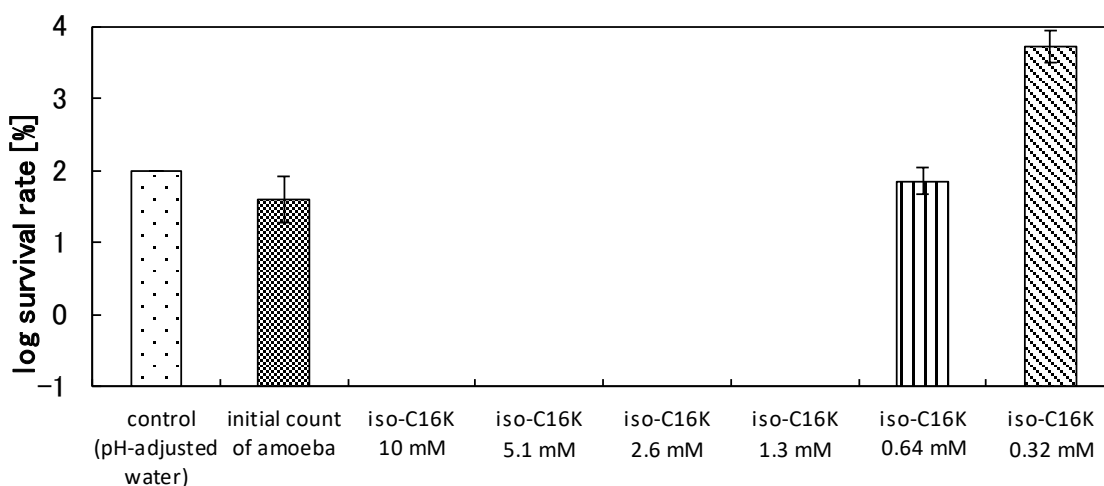


図 24 Ac iso-C16K を用いた実証試験の結果

#### 4.3.1.2 イソステアリン酸塩 (Ac iso-C18K)

長鎖脂肪酸塩である炭素数 18 の Ac iso-C18K の実証試験の結果を図 25 に示す。抗菌試験での MAC 値 9.6 mM (0.31 w/v%)を考慮し、その濃度から 2 倍希釈系列で濃度を希釈した。その結果、抗アメーバ試験結果の約 1/8 の濃度である 1.2 mM (0.039 w/v%)まで抗アメーバ効果を示すことが明らかとなった。なお、0.60 mM 以降は初濃度と同程度のアメーバが確認され、さらに 0.30 mM では初濃度およびコントロールである pH 調整水と同程度のアメーバが確認された。



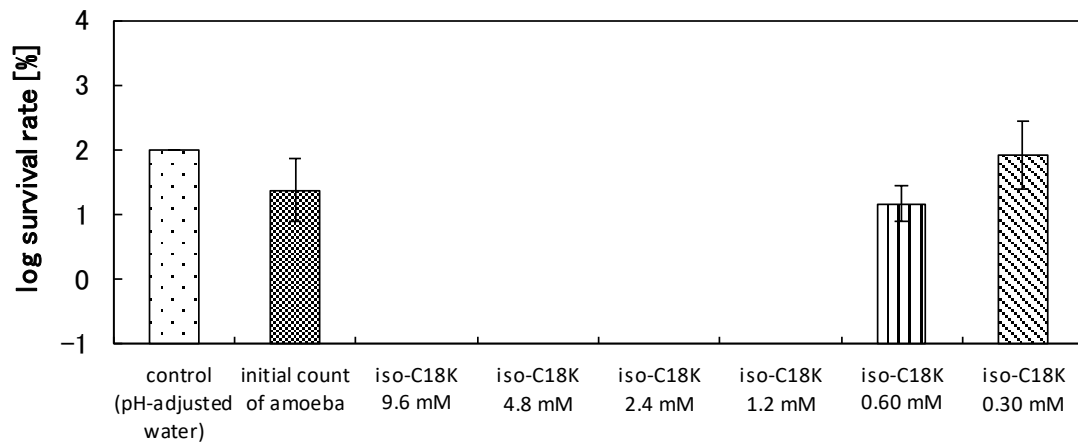


図 25 Ac iso-C18K を用いた実証試験の結果

#### 4.3.1.3 3,5,5-トリメチルヘキサン酸 (Ac C9)

中鎖脂肪酸である炭素数 9 の Ac C9 の実証試験の結果を図 26 に示す。抗菌試験での MAC 値 710 mM (13 v/v%) を考慮し、その濃度から 2 倍希釈系列で濃度を希釈した。その結果、抗アメーバ試験結果の約 1/1000 の濃度である 0.70 mM (0.012 v/v%) まで抗アメーバ効果を示すことが明らかとなった。なお、0.34 mM 以降は初濃度と同程度のアメーバが確認された。

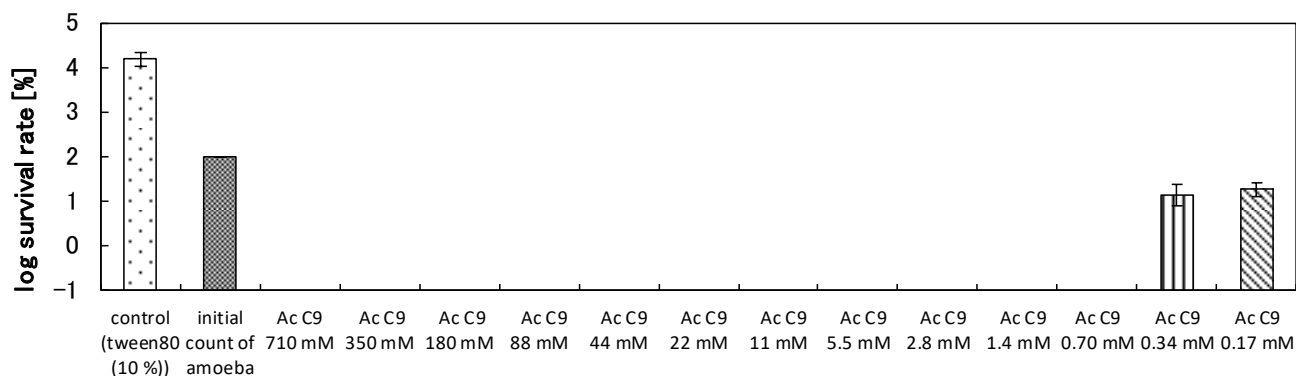


図 26 Ac C9 を用いた実証試験の結果

#### 4.3.1.4 2-エチルヘキサン酸塩 (Ac C8K)

中鎖脂肪酸である炭素数 8 の Ac C8K の実証試験の結果を図 27 に示す。抗菌試験での MAC 値 140 mM (2.5 w/v%) を考慮し、その濃度から 2 倍希釈系列で濃度を希釈した。その結果、抗アメーバ試験結果の約 1/4 の濃度である 35 mM (0.63 w/v%) まで抗アメーバ効果を示すことが明らかとなった。なお、17 mM 以降は初濃度を約 1 オーダー上回るアメーバが確認された。なお、ここでのコントロールである pH 調整水 (pH=12.6) は、アメーバの生菌数は確認できなかった。

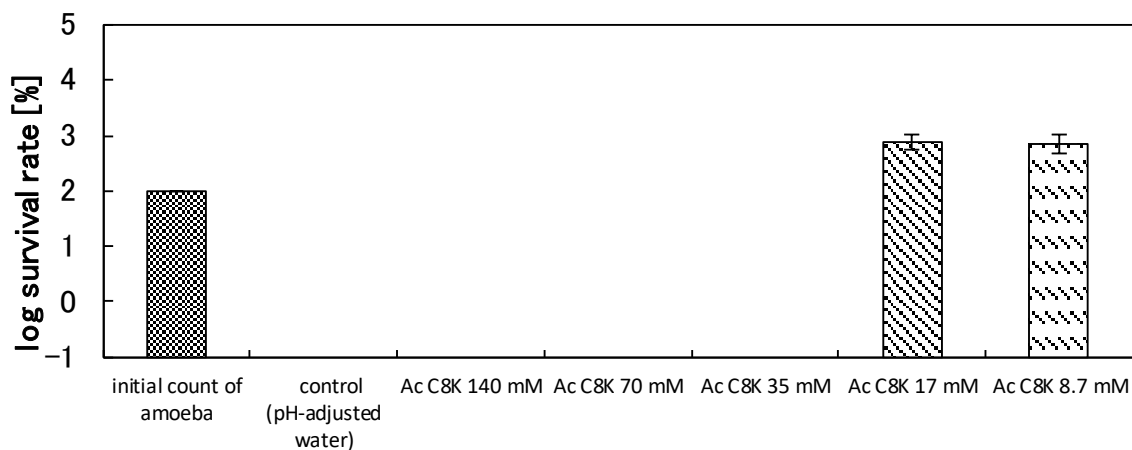


図 27 Ac C8K を用いた実証試験の結果

### 4.3.2 スタンドアローンテスト

#### 4.3.2.1 イソステアリン酸塩 (Ac iso-C18K)

Ac iso-C18K の原液 300 mM (160 w/v%) から 2 倍希釈系列の濃度で 5 菌株の抗菌効果を試験した。図 28 に *S. aureus*、図 29 に *P. aeruginosa*、図 30 に *S. marcescens*、図 31 に *C. albicans*、図 32 に *F. oxysporum* を示す。実験は少なくとも 3 回繰り返した。

図 28 の黄色ブドウ球菌である *S. aureus* では、9.6 mM (0.31 w/v%) の 10 分間接触で 7 オーダーの減少が確認できた。そして、4.8 mM (0.16 w/v%) では、180 分間の接触後で抗菌効果は約 6 オーダーに低下、さらに 2.4 mM (0.078 w/v%) 以下の濃度では、抗菌効果が不十分であった。さらに、図 29 の緑膿菌である *P. aeruginosa* では、4.8 mM (0.16 w/v%) の 10 分間接触で、7 オーダーの減少が確認されたが、2.4 mM (0.078 w/v%) では抗菌効果は不十分であった。図 30 の *S. marcescens* では、310 mM (10 w/v%) の 10 分間接触で 7 オーダーの減少が確認できたが、9.6 mM (0.31 w/v%) では、180 分間の接触でも抗菌効果は得られなかった。図 31 の *C. albicans* は 60 分間で 38 mM (1.3 w/v%) まで約 1.5 オーダーの減少を示した。しかし、9.6 mM (0.31 w/v%) 以下の濃度では、高い抗菌効果は確認できなかった。図 32 の *F. oxysporum* では、310 mM (10 w/v%) の濃度では、180 分間で 4 オーダーの減少

を示した。しかし、180 分後、抗菌効果は濃度の低下とともに減少し、4.8 mM (0.16 w/v%) では抗菌効果は確認できなかった。

スタンドアロンテスト基準に合格するために必要な増殖抑制の目安は、細菌で 3 オーダー、真菌で 1 オーダーとされている<sup>47)</sup>。表 7 に Ac iso-C18K のスタンドアロンテスト結果のまとめを示す。以上より、5 菌株すべての有効濃度は最低濃度、最短時間で 60 分接触の 38 mM (1.3 w/v%) であった。

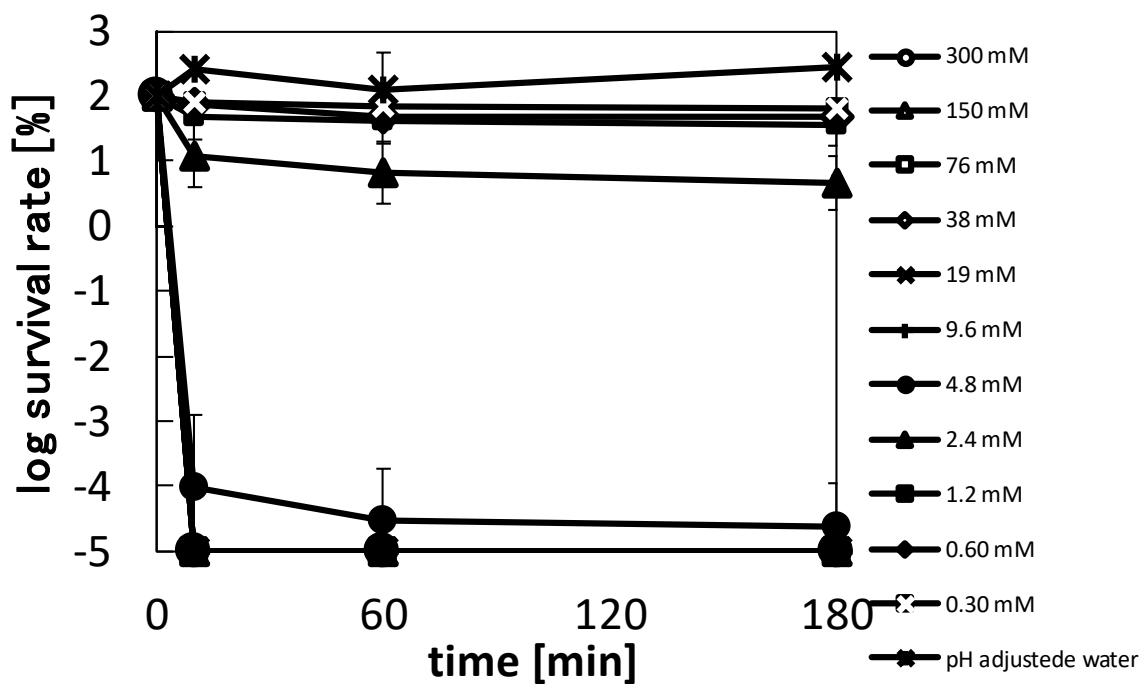


図 28 *S. aureus* に対する Ac iso-C18K の抗アメーバ効果

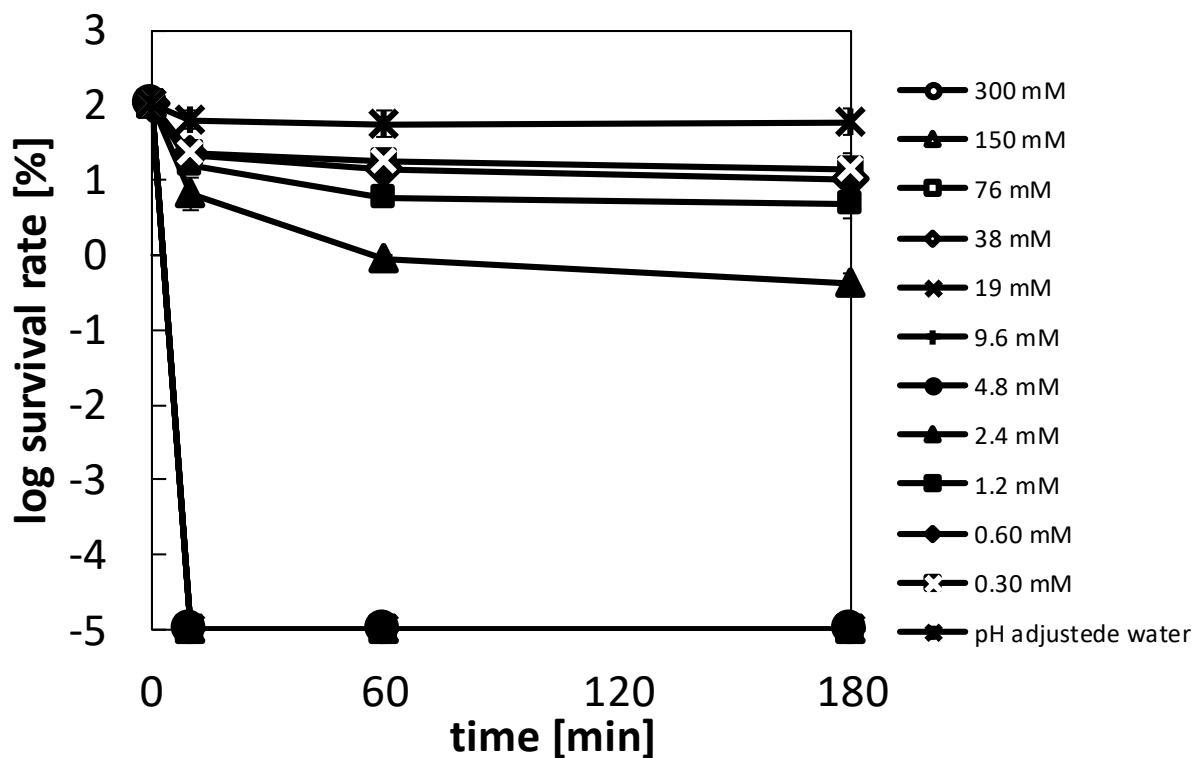


図 29 *P. aenuginosa* に対する Ac iso-C18K の抗アメーバ効果

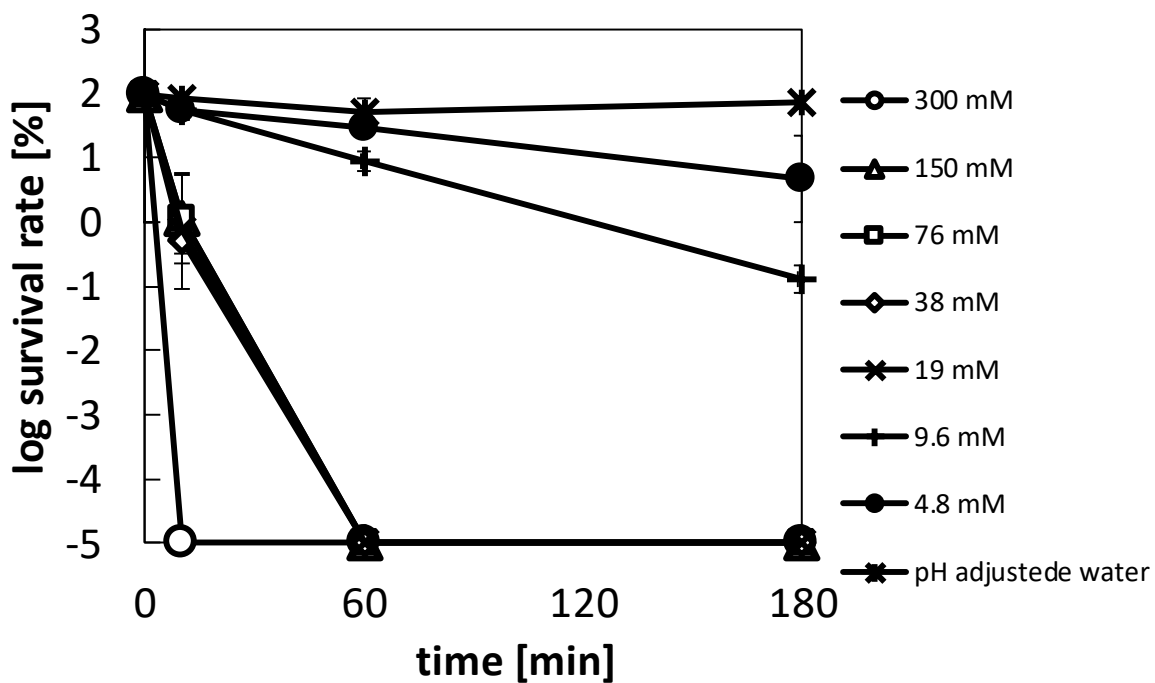


図 30 *S. marcescens* に対する Ac iso-C18K の抗アメーバ効果

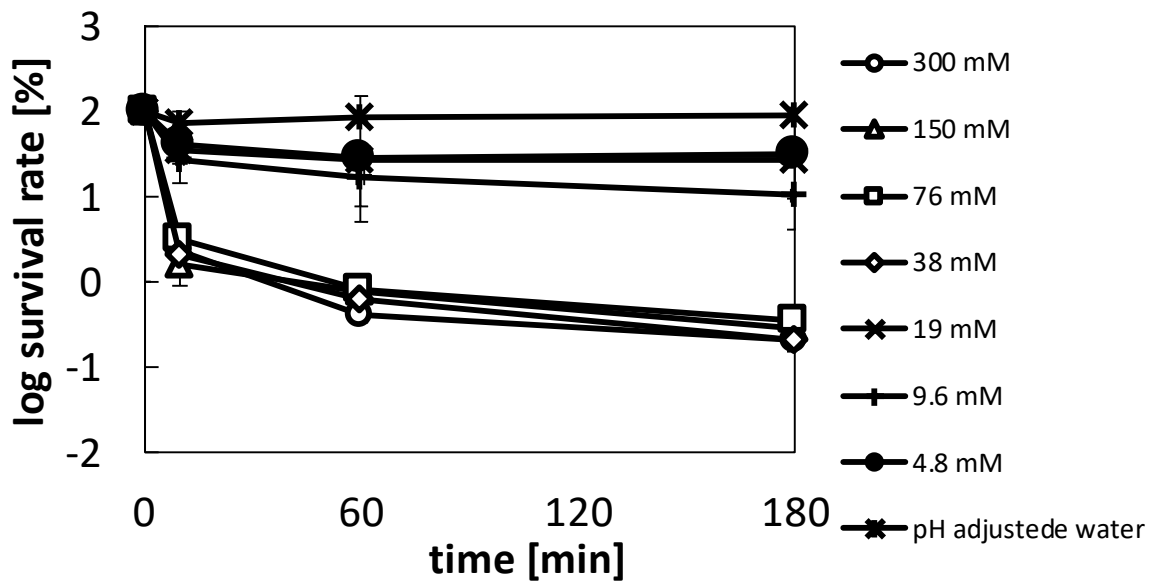


図 31 *C. albicans* に対する Ac iso-C18K の抗アメーバ効果

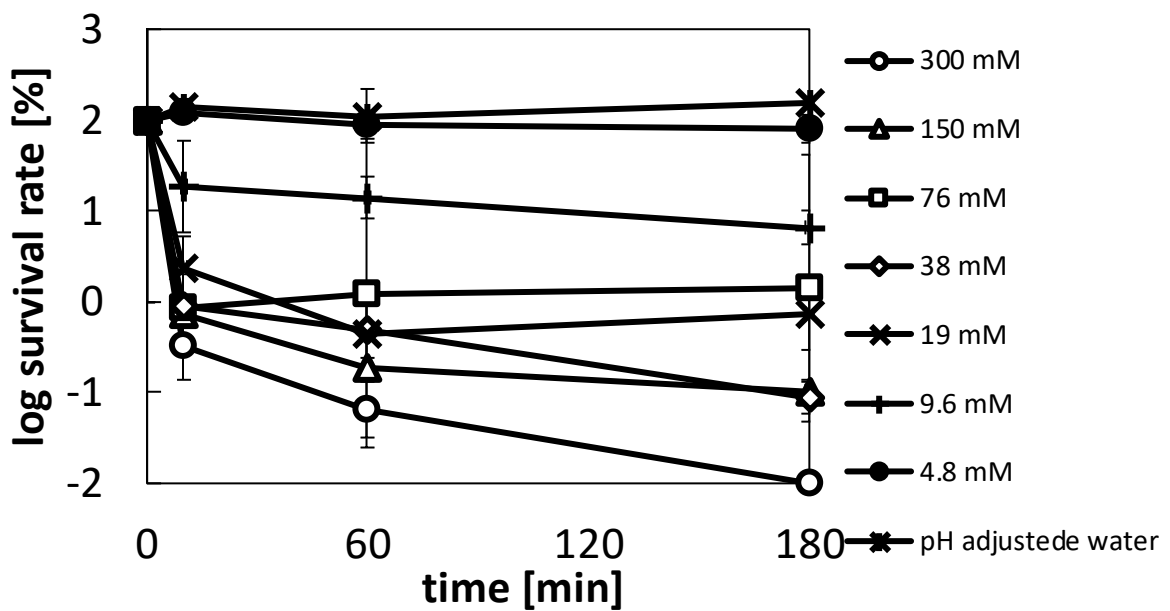


図 32 *F. oxysporum* に対する Ac iso-C18K の抗アメーバ効果

表 7 Ac iso-C18K のスタンドアローンテスト結果のまとめ

	concentration (mM)	time (min)	initial count of amoeba
<i>S. aureus</i>	4.8	10	$3 \times 10^7$ (cells/ml)
<i>P. aeruginosa</i>	4.8	10	
<i>S. marcescens</i>	19	60	
<i>C. albicans</i>	38	60	$3 \times 10^4$ (spores/ml)
<i>F. oxysporum</i>	19	60	

#### 4.4 考察

本章では、アcantアメーバに対するより抗アメーバ効果の高い分岐型脂肪酸類である分岐型長鎖脂肪酸塩である Ac iso-C18K 9.6 mM (0.31 w/v%)、Ac iso-C16K 10 mM (0.31 w/v%)、中鎖脂肪酸塩である Ac C8K 140 mM (2.5 w/v%)、中鎖脂肪酸である Ac C9 710 mM (13 v/v%)の汚染されたコンタクトレンズを用いた実証試験を行った。その結果、長鎖の Ac iso-C18K 1.2 mM (0.039 w/v%)、中鎖の Ac C9 0.69 mM (0.012 v/v%)が高い抗アメーバ効果を示した。なお、図 27 で、Ac C8K のコントロールである pH 調整水のアメーバの生菌数が確認できなかった理由としては、Ac C8K の抗菌試験の際に 60 分間の接触で約 1 オーダーアメーバの生菌数が減少していることが原因ではないかと考える。*Acanthamoeba castellanii* に対する pH 耐性結果を図 33 に示す。実験方法は抗アメーバ試験と同様、10 分、60 分、180 分で経時的にアメーバの生菌数をカウントした。図 33 より、pH が 13 に近くなるとアメーバが生育できないことが分かる。ここで、Ac iso-C16K、および Ac iso-C18K の際の pH 調整水(pH=10.5)と比較すると、Ac C8K の pH は約 2.0 高い pH=12.6 である。この高い pH の値が、7 日間培養したアメーバの生菌数を計測できなかった原因ではないかと考えた。

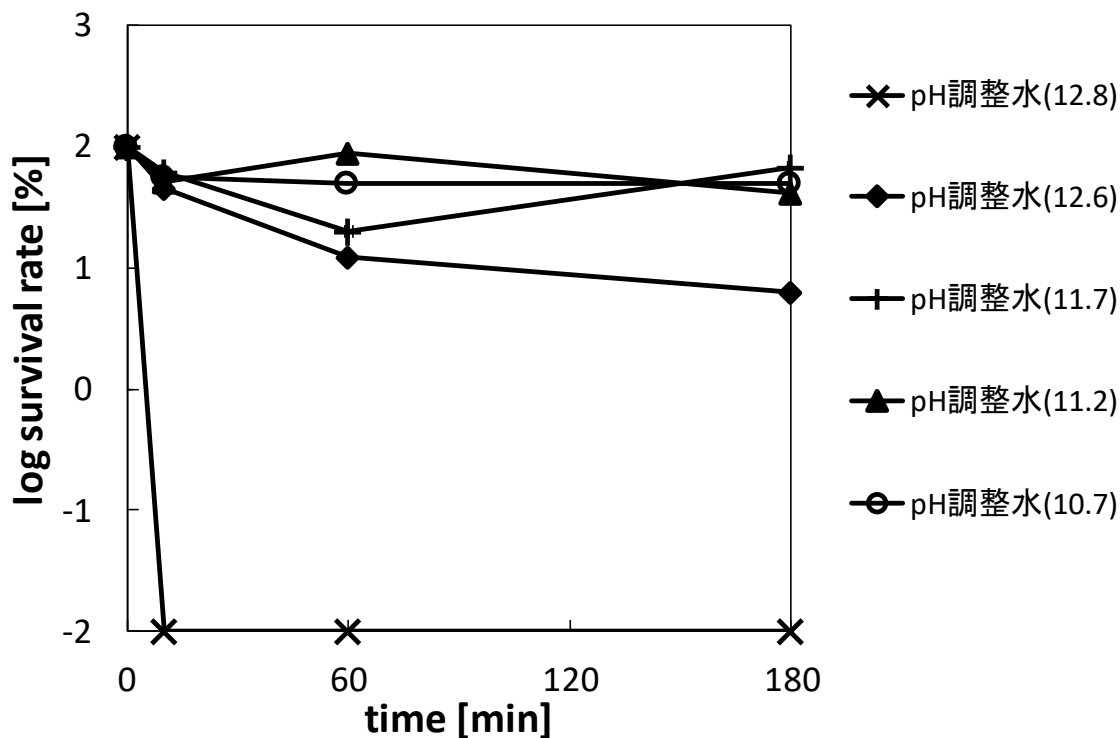


図 33 *Acanthamoeba castellanii* に対する pH 耐性結果

直鎖型脂肪酸塩を用いた *Acanthamoeba castellanii* に対する田中らの抗菌試験に関する研究では、実証試験において 175 mM のカプリン酸カリウム (C10K) およびラウリン酸カリウム (C12K) で 5.5 mM の濃度で抗アメーバ効果を示した<sup>46)</sup>。実証試験において、本研究では Ac C8K を除き、C10K および C12K の約 1/4~1/8 の濃度で抗アメーバ効果を示すことが明らかとなった。さらに、C10K および C12K での接触時間は 180 分だったのに対し、本研究ではわずか 10 分で抗アメーバ効果を示すことができた。これらの結果から、Ac iso-C16K、Ac iso-C18K、Ac C9 の MPS としての応用が示唆された。

さらに、MPS の有効性を明らかにするために、スタンドアロンテストを約 10 秒でアメーバのバーストが確認できた Ac iso-C18K で行った。その結果、Ac iso-C18K は検証菌株である 5 菌株に対して、最低濃度、最短時間で 60 分接触の 38 mM (1.3 w/v%) であった。なお、直鎖型脂肪酸塩で最も効果の高かった C10K および C12K の 5 菌株に対する有効濃度



は 180 分で 175 mM であった<sup>46)</sup>。両者の有効濃度を比較すると、分岐型脂肪酸類は直鎖型脂肪酸類よりも効果が高いことが明らかとなった。

Mori らが行った 6 種類のソフトコンタクトレンズ用多目的用剤であるエピカコールド®、MPS-A®、MPS-B® (日本未発売)、MPS-C® (日本未発売)、MPS-D®、および MPS-E® (日本未発売) の細胞毒性と消毒効力を評価した研究では、細胞毒性については、エピカコールドと MPS-A® は実験した濃度ではいずれも毒性は認められなかったとしている<sup>85)</sup>。他の MPS の細胞毒性の順位は、MPS-B® = MPS-C® < MPS-D® < MPS-E® であり、全ての MPS が細菌に対する消毒効力においてスタンドアロンテストの第一評価基準を満たしたが、エピカコールド® と同じく細胞毒性が認められなかった MPS-A® はフザリウム菌において評価基準を満たさず、細胞毒性の弱かった MPS-E® は消毒効力において基準を満たしたものの、ボーダーラインの値となったとしている。以上の結果より、エピカコールド® は有効な消毒効力と最小限で低い細胞毒性を兼ね備えていることを明らかにした。このエピカコールド® の主成分は、塩酸ポリヘキサニド(0.001 mg /1 mL 含有)、界面活性剤、等張化剤、金属封鎖剤であり、表示指定成分としてエデト酸ナトリウム、プロピレングリコールを提示している<sup>86)</sup>。

MPS へのコンタクトレンズの浸漬時間については、一般的に最低 4~6 時間である<sup>45)</sup>。国民生活センターでは MPS 8 銘柄を表示された最短消毒時間で、*Acanthamoeba* に対する実証試験を行ったところ、過酸化水素タイプおよびポビドンヨードタイプと同程度の消毒効果が得られたものは 1 銘柄のみであったとしている<sup>45)</sup>。夜間消毒して起床後に再装用するサイクルを考えると、8 時間程度静置する使用者が多いと考えられるが、MPS 8 銘柄中 4 銘柄は 8 時間静置後もアメーバが 1/10 以下しか減少せず、8 時間静置後に過酸化水素タイプやポビドンヨードタイプと同程度の効果を示したのは 2 銘柄のみであり、MPS 8 銘柄のうち、同じ成分 (塩酸ポリヘキサニド) が消毒成分として配合されていた銘柄間においても消毒効果に顕著な差が認められたことを明らかにした。これは、MPS 内に含有されている界面活性剤や保湿剤などの他成分が影響を及ぼしているのではないかと考察している。以上のことから、本研究での浸漬時間の抗アメーバ効果は、MPS において十分な時間で抗アメーバ効果があることが示唆された。

また、コンタクトレンズの MPS は、消毒剤でありながらレンズとともに眼に直接入るため、できるだけ刺激性が低く、眼障害やアレルギーを引き起こしてはならない製剤であるとされている<sup>47)</sup>。そのため、使用される消毒剤の濃度は 1 ppm から 10 ppm 程度であり、その消毒効果にも限界がある。こうした消毒効果の弱さを補うために、MPS ではレンズをこすり洗いすることで付着した微生物を物理的に除去し、消毒前の微生物汚染レベルを下げようという取り扱い方法が規定されている。実際に、レンズのこすり洗いで微生物汚染は 1/10 から 1/100 程度減少し、さらにすすぎ洗いにより 1/1000 から 1/10000 程度減少すると報告されている<sup>85)</sup>。国民生活センターによるソフトコンタクトレンズの正しいケア方法を図 33 に示す<sup>45)</sup>。図 34 より、ソフトコンタクトレンズは水道水を介さずに MPS のみでケアを行うことが分かる。ソフトコンタクトレンズは一種のゲル膜で、含水率が高く酸素透過性も高い<sup>87)</sup>。そのため、水道水に介してしまうとレンズ自体が変形してしまうとされている。

本章で MPS の新規薬剤として検討した Ac iso-C18K のアメーバおよびスタンドアローンテストにおける 5 菌株における有効濃度の 60 分間接触の 38 mM (1.3 w/v%)は、1 ppm から 10 ppm の間ではないが、こすり洗いの操作を行っていないため、この操作を行った試

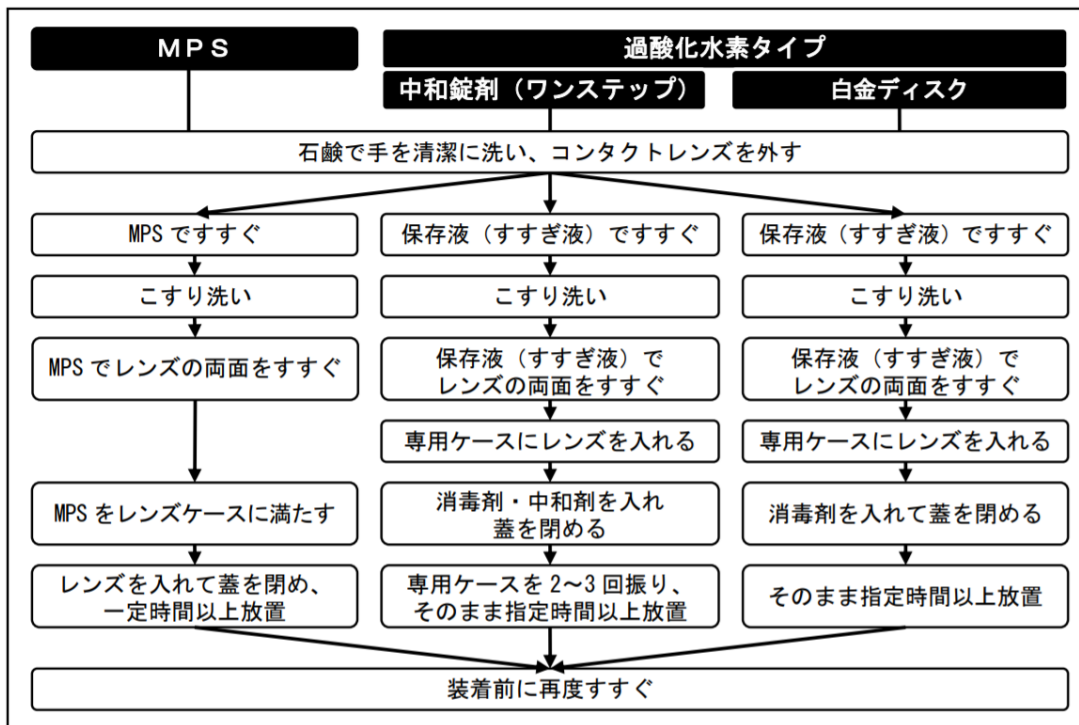


図 34 ソフトコンタクトレンズの正しいケア方法<sup>45)</sup>

験では、より低濃度での抗菌効果が期待できることが示唆された。

#### 4.5 結論

第 2 章では、アカントアメーバに対するより抗アメーバ効果の高い分岐型脂肪酸類の検討を行った結果、長鎖は Ac iso-C18K 9.6 mM (0.31 w/v%)、Ac iso-C16K 10 mM (0.31 w/v%)、中鎖は Ac C8K 140 mM (2.5 w/v%)、Ac C9 710 mM (13 v/v%)の抗アメーバ効果が明らかとなった。そこで本章では、アカントアメーバ角膜炎を抑制する新規 MPS の検討のためにコンタクトレンズに汚染されたアメーバをサンプルに接触させる実証試験を検証した。さらに、MPS の有効性を評価するために、国際基準である ISO 14729 の規格に基づいて、黄色ブドウ球菌、緑膿菌、セラチア菌の 3 つの細菌およびカンジダ、フザリウム の 2 つの真菌に対する抗菌試験であるスタンドアローンテストを行った。その結果、5 菌株すべての有効濃度は最低濃度で 60 分接触の 38 mM (1.3 w/v%)であった。この結果より、Ac iso-C18K の MPS としての利用可能性が示唆された。

## 第 5 章 総括と今後の展望

### 5.1 分岐型脂肪酸類のアカントアメーバに対する防除効果

第 2 章において、分岐型脂肪酸類を用いた *A. castellanii* に対する抗アメーバ効果を検討した結果、Ac iso-C18K 9.6 mM (0.31 w/v%)、Ac iso-C16K 10 mM (0.31 w/v%)が低濃度で抗アメーバ効果を示し、次に効果が高かったものは中鎖脂肪酸塩である Ac C8K 140 mM (2.5 w/v%)、順に中鎖脂肪酸である Ac C9 710 mM (13 v/v%)であった。さらに Ac iso-C16K および Ac iso-C18K においてはプラスマレンマの破壊が観察され、なおその破壊時間は約 10 秒程度であることが明らかとなった。そして第 3 章において、アカントアメーバ角膜炎を抑制する新規 MPS の検討のためにコンタクトレンズに汚染されたアメーバをサンプルに接触させる実証試験を検証した。さらに、MPS の有効性を評価するために、国際基準である ISO 14729 の規格に基づいてスタンドアローンテストを行った。その結果、Ac iso-C18K において、5 菌株すべての有効濃度は最低濃度、最短時間で 60 分接触の 38 mM であった。これまでに直鎖型脂肪酸類を用いた抗アメーバ試験およびスタンドアローンテストを行っている研究はあるが<sup>46)</sup>、分岐型脂肪酸類を用いた研究は行われていなかった。

Mori らが行った 6 種類のソフトコンタクトレンズ用多目的用剤における細胞毒性と消毒効力を評価した研究では、主成分が塩酸ポリヘキサニド(0.001 mg /1 mL 含有)、界面活性剤、等張化剤、金属封鎖剤であり、表示指定成分としてエデト酸ナトリウム、プロピレングリコールであるものが最も有効な消毒効力と最小限で低い細胞毒性を兼ね備えていることを明らかにした<sup>85)</sup>。さらに、MPS へのコンタクトレンズの浸漬時間については、一般的に最低 4~6 時間との表示が多いが<sup>45)</sup>、国民生活センターでは MPS 8 銘柄を表示された最短消毒時間で、*Acanthamoeba* に対する実証試験を行ったところ、過酸化水素タイプおよびポビドンヨードタイプと同程度の消毒効果が得られたものは 1 銘柄のみであったとしている。以上のことから、本研究での浸漬時間の抗アメーバ効果は、MPS において十分な時間で抗アメーバ効果があることが示唆された。

本研究では、分岐型脂肪酸類が *A. castellanii* に対する抗アメーバ効果を検討したが、実

際のソフトコンタクトレンズのケア方法に基づいた実験は行っておらず、さらにその際に効果的な濃度の検討も行っていない。コンタクトレンズの MPS は、消毒剤でありながらレンズとともに眼に直接入るため、できるだけ刺激性が低く、眼障害やアレルギーを引き起こしてはならない製剤であるとされている<sup>47)</sup>。そのため、使用される消毒剤の濃度は 1 ppm から 10 ppm 程度である。MPS のコンタクトレンズのケア方法では、実際レンズのこすり洗いで微生物汚染は 1/10 から 1/100 程度減少し、さらにすすぎ洗いにより 1/1000 から 1/10000 程度減少すると報告されている<sup>85)</sup>。今後の課題として、MPS のコンタクトレンズのケア方法に基づいて、さらなる薬剤の正しい有効濃度の解明が挙げられる。

さらに、本研究ではアメーバのプラスマレンマの破壊が約 10 秒程度であることが明らかとなったが、その具体的な作用機序の解明までには至っていない。今後の課題として、アメーバのプラスマレンマである外被に対する作用機構の解明が挙げられる。これまでに石井らにより、アメーバ運動中におけるプラスマレンマの局所破壊の研究で、表面活性剤はアメーバのプラスマレンマを溶かすとしており、さらにこの液でガラス毛细管により体表の局所を溶かすことを明らかにしている<sup>65)</sup>。

アメーバのヒトへの健康影響に関しては、コンタクトレンズにおける感染症だけでなく、近年レジオネラ感染症における宿主としての関わりが注目されている<sup>88)</sup>。病原細菌であるレジオネラ属菌による感染症、すなわちレジオネラ症は、さまざまな水系を感染源として人々に甚大な健康影響を与える感染症である。わが国でもこれまでに数件の大規模な集団感染、また多数の散発事例が報告されている。その感染源となる冷却塔水や浴槽水において、アメーバがレジオネラ属菌の宿主としてその汚染に大きく関与していることが近年明らかとなっている。このような背景から、アメーバの細胞膜（プラスマレンマ）である外被に対する作用機構が解明されれば、コンタクトレンズにおける感染症の防止、治療だけでなく、水回り環境におけるアメーバ全般の感染症予防、治療への応用に寄与できる可能性に繋がると考える。

## 5.2 分岐型脂肪酸類のロドトルラ酵母に対する防除効果

第 4 章において、分岐型脂肪酸類および直鎖型脂肪酸類を用いた *R. mucilaginosa* に対

する抗真菌効果が明らかとなったサンプルは、10分6オーダーの増殖抑制効果を示した Ac iso-C16K、Ac iso-C18K、Ac C8、Ac C9、Ac C8K、Ac C9K、C8、C10、C10K、C12K、C14K、C18:1K、C18:2K、C18:3K であった。さらに MFC 試験において、最も効果の高かったものは順に、Ac iso-C16K、C10K、C12K、Ac C8、Ac C9、Ac iso-C18K、C10、C14K であった。さらに、*R. mucilaginosa* を Ac iso-C16K (41 mM)、C12K (44 mM)、Ac C9 (48 mM)、C10 (86 mM) と接触させ、PI を用いてフローサイトメトリーによる膜損傷の観察を行った結果、すべてのサンプルで MFC および 10 倍の MFC において細胞膜の損傷が確認できた。以上のことから、膜の構成成分は異なるものの、第 2 章で示したアメーバのプラスマレンマの破壊が *R. mucilaginosa* でも起こっている可能性が考えられた。

*Rhodotorula* は、主にスピリロキサンチンとカロテンで構成されているとしており<sup>27)</sup>、これらは、さまざまなストレスに反応して細胞内で生成される活性酸素に対する抗酸化機能を示すユニークな成分である。カロテノイドおよび類似化合物と細菌細胞膜に関する研究では、カロテノイドは脂質成分として働き、細胞膜構造を維持し、代謝を調節する<sup>73)</sup>。さらに、ロドトルラの細胞内脂質産生は、*Candida albicans* などの真菌の細胞内脂質産生の約 2 倍であることが知られている。したがって、*Rhodotorula* の場合、長鎖脂肪酸塩の疎水性が脂質成分のカロテノイドへの吸着を可能にし、細胞膜構造を損傷すると考えられる。

現在、抗菌・防カビ剤として主流となっているのは、ホルムアルデヒド<sup>32,33)</sup>、エタノール<sup>30)</sup>、チアベンダゾール<sup>34)</sup>等が挙げられる。しかし、殺菌処理後に刺激性のある残留物や、効果の持続性の低さ、難分解性であるためにその残留性や人体に与える影響が懸念されている<sup>32-34)</sup>。本研究では、水回り環境に存在する *R. mucilaginosa* に対する分岐型脂肪酸類の抗真菌効果の検討を行い、細胞膜における膜損傷の確認の検討を行った。今後の課題としては、*R. mucilaginosa* におけるより詳細な抗菌メカニズムの解明が挙げられる。Tyler らは、細菌である *Escherichia coli* に対し脂肪酸が真菌類の細胞膜の中に入り込むことで、膜透過性を変化させることで、細胞内物質の電解質やタンパク質の流出を引き起こすとして、マグネシウムの流出を確認している<sup>89)</sup>。

また、*R. mucilaginosa* だけでなく、水回り環境における *Cladosporium* および *Acremonium*<sup>20)</sup>、*Aureobasidium*<sup>21)</sup>、*Phoma* や *Penicillium*、*Alternaria*<sup>22)</sup>、*Exophiala*

<sup>23)</sup>等へのあらゆる微生物の抗菌効果の検討も挙げられる。このような微生物を全般的に防除すること、および抗菌スペクトルの解明を行うことは、今後防菌防除分野、食品分野、医薬品分野、化粧品分野等の発展に寄与することを期待する。

## 参考文献

- 1) 秋山一男、田中辰明、阪口雅弘、長谷川真紀、遠藤繁、高鳥浩介、三根博史、山下義仁、前田裕二、工藤誠、「住宅内環境のアレルゲン量と気管支喘息発作出現、重症化との関連の研究—喘息症状改善のための屋内環境整備をめざして」、住宅総合研究所財団研究年報 **24**、pp257-266、1997
- 2) 小渕真弓、澤島智明、「洗濯物の室内干しに関する調査研究」、佐賀大学教育学部研究論文集 **20(1)**、pp111-121、2015
- 3) 小峯裕己、小座野貴弘、末永義明、長谷川永、「住宅室内のカビ汚染と防止に関する研究 その1 人工的な汚れのある建材上へ湿性カビ4種類が発生しにくい温湿度範囲の特定」、日本建築学会計画系論文集 **484**、pp33-41、1996
- 4) 濱田信夫、藤田藤樹夫「浴室の真菌汚染—菌層の特徴—」、防菌防黴 **27(6)**、pp351-358、1999
- 5) 小島みゆき、「住環境での衛生対策を科学する—真菌分布および生活者と浴室環境の変化からみたカビ対策—」、防菌防黴 **27**、pp351-358、1991
- 6) 鈴木崇、白石敦、宇野敏彦、江口秀一郎、勝海修、望月清文、井上康、岡宮史武、宮田和典、大橋裕一、「洗面所における微生物汚染調査」、あたらしい眼科 **26(10)**、pp1387-1391、2009
- 7) 石井圭一、「アメーバ図鑑」、第一版、金原出版、pp41-43、216、1992
- 8) A. B. Zimmerman, K. Richdale, G. L. Mitchell, B. T. Kinoshita, D. Y. Lam, H. Wagner, L. Sorbara, R. L. Chalmers, S. A. Collier, J. R. Cope, M. M. Rao, M. J. Beach, J. S. Yoder、「Water Exposure is a Common Risk Behavior Among Soft and Gas-Permeable Contact Lens Wearers」、*Cornea* **36**、pp995-1001、2017
- 9) 山浦常、白坂龍曠、松本克彦、中井呈子、堀上英紀、石井圭一、「室内塵からのアカントアメーバ検出」、寄生虫学 **42(2)**、pp130-133、1993
- 10) T. Miyazaki, K. Yagita, T. Yanagi, H. Uemura, H. Kanbara、「Seasonal fluctuation



- of *Acanthamoeba* spp. contamination in water containers placed indoors and outdoors」, *Acta Med Nagasak* **52**, pp13-18, 2007
- 11) J. Naginton, P. G. Watson, T. J. Playfair, J. McGill, B. R. Jones, A. D. McG. Steele, 「Amoebic infection of the eye」, *The LANCET* **2**, pp1537-1540, 1974
- 12) 石橋康久、松本雄二郎、渡辺亮子、本村幸子、安羅岡一男、石井圭一、小山力、遠藤拓郎、八木田健司、「*Acanthamoeba* keratitis の一例」, *日本眼科* **92**(6), pp963-972, 1988
- 13) 所正治、山口智博、田中身和、小林顕、及川陽三郎、「病原性寄生原虫における分子分類の現状」 *金沢大学十全医学会* **117**(2), pp53-57, 2008
- 14) 篠田和男、小林顕、三輪さおり、前田有、桜井真由美、白尾裕、内山佳代、及川陽三郎、「アcantアメーバ感染が否定された角膜炎で放射状角膜炎が認められた 1 例」, *日本眼科紀要* **53**(11), pp894-897, 2002
- 15) 感染症角膜炎全国サーベイランス・スタディグループ、「感染症角膜炎全国サーベイランス—分離菌・患者背景・治療の現状—」, *日本眼科* **110**(12), pp961-971, 2006
- 16) F. H. Theodore, F. A. Jakobiec, K. B. Jvechter, M. Pearl, R. C. Troutman, P. M. Pang, T. Iwamoto, 「The diagnostic value of a ring infiltrate in acanthamoebic keratitis」, *Ophthalmology* **92**, pp1471-1479, 1985
- 17) M. B. Moore, J. P. McCulley, H. E. Kaufman, J. B. Robin, 「Radial keratoneuritis as a presenting sign in *Acanthamoeba* keratitis」, *Ophthalmology* **93**, pp1310-1315, 1986
- 18) D. B. Jones, G. S. Visvesvara, N. M. Robinson, 「*Acanthamoeba* polyphaga keratitis and *Acanthamoeba* uveitis associated with fatal meningoencephalitis」, *Trans. Ophthalmol. Soc. UK* **95**, pp221-232, 1975
- 19) M. B. Moore, J. P. McCulley, M. Luckenbach, H. Gelender, C. Newton, M. B. McDonald, G. S. Visvesvara, 「*Acanthamoeba* keratitis associated with soft contact lenses」, *Ophthalmol* **10**, pp396-403, 1985

- 20) 神野節子、「建築内装材に発生するカビと防止法」、木材工学 **32**、pp192-197、1977
- 21) 松田良夫「住環境における菌類」、環境管理技術 **3**、pp521-526、1985
- 22) Y. Moriyama、N. Nawata、T. Tsuda、M. Nitta、「Occurrence of mold in Japanese bathrooms」、*International Biodeterioration and Biogrdiation* **30**、pp47-55、1992
- 23) 濱田信夫、「浴室のカビ汚染の現状とその対策」、生活衛生 **43(3)**、pp89-96、1999
- 24) 山口英世、「病原真菌と真菌症」、第4版、株式会社南山堂、pp204、2007
- 25) 濱田信夫、「最近の浴室のカビ汚染の傾向」、生活衛生 **53(4)**、pp247-256、2009
- 26) 菅原文子、「住環境における微生物汚染」、家政学 **37(9)**、pp809-812、1986
- 27) 井原望、「住宅内水周りに発生するピンクスライム形成菌の特性と精油による抑制効果」、関西大学審査学位論文、pp15、2015
- 28) 大隈良典、「酵母のすべて—系統、細胞から分子まで—」、第一版、シュプリンガー・ジャパン株式会社、pp19-21、2007
- 29) 平井由児、「*Rhodotorula mucilaginosa* によるカテーテル関連血流感染症」、感染症学雑誌 **87(5)**、pp1-9、2013
- 30) 井原望、濱田信夫、「天然系抗菌・防カビの利用の現状と将来」、生活衛生 **54(4)**、pp304-311、2010
- 31) 松田廉治郎、「抗菌製品を創る 3 —抗菌剤の種類、特徴とその動向(3)—有機系抗菌剤」防菌防黴 **36**、pp395-401、2008
- 32) 高田勲、門脇武博、「病院（医療現場）における作業環境管理」、安全工学 **29(1)**、pp2-12、1990
- 33) 澤井淳、「天然無機系抗菌剤の現状と課題」、防菌防黴 **36(11)**、pp757-764、2008
- 34) 柏倉桐子、花井義道、加藤龍夫、「輸入柑橘系果実に残留するイマザリルの調査」、横浜国立大環境研究紀要 **19**、pp11-14、1993
- 35) 内田真志、「抗菌製品を創る 1—抗菌剤の種類、特徴とその動向(1) 無機抗菌剤—」、防

菌防衛 **36**、pp273-280、2008

- 36) 高麗寛紀、「わかりやすい抗菌剤の基礎 2 抗菌剤の種類と特性」、防菌防衛、**37**、pp883-891、2009
- 37) 佐藤嘉洋、「金属材料の抗菌性」、高温学会誌 **35**(3)、pp121-125、2009
- 38) K. Hiti、J. Walochnik、E. M. Haller-Schober、C. Faschinger、H. Aspöck、「Viability of Acanthamoeba after exposure to a multipurpose disinfecting contact lens solution and two hydrogen peroxide systems」、*British Journal of Ophthalmology* **86**、pp144-146、2002
- 39) N. Atkins、「Developments in lens care solution」、*The Optician* **6037**(231)、pp32-38、2006
- 40) 守重比路美、眞野容子、笹岡秀之、中村悌一、富田守、芝紀代子、古谷信彦、「微酸性電解水によるコンタクトレンズケース及びコンタクトレンズ保存液の消毒効果」、環境感染 **27**(1)、pp13-19、2011
- 41) 植田喜一、「コンタクトレンズケアの実態」、あたらしい眼科 **17**、pp935-944、2000
- 42) 柳井亮二、植田喜一、田尻大治、「アカントアメーバおよびウイルスに対するポビドンヨード製剤の有効性」、日本コンタクトレンズ学会誌 **17**(1)、pp37-41、2007
- 43) 中川尚、「アカントアメーバ角膜炎とコンタクトレンズ」、日本コンタクトレンズ **49**(2)、pp76-79、2007
- 44) 岡田忍、玉木由子、中川朋子、西尾淳子、「2 週間頻度交換型ソフトコンタクトレンズの細菌学的汚染と管理方法との関連について—ケースを乾燥させることの重要性—」、千葉大学看護学部紀要 **32**、pp9-16、2010
- 45) 独立行政法人国民生活センター、「ソフトコンタクトレンズ用消毒剤のアカントアメーバに対する消毒性能—使用実態調査も踏まえて—」、報道発表資料、pp1-32、2009
- 46) A. Tanaka、M. Era、Y. Obata、M. Masuda、T. Kawahara、T. Kanyama、H. Morita、「Role of fatty acid salts as anti-Acanthamoeba agents for disinfecting contact lens、

- Biocontrol Science* **22**(3)、pp153-161、2017
- 47) 森理、「マルチパーパスソリューション(MPS)の消毒効果」、*あたらしい眼科* **26**(9)、pp1173-1177、2009
- 48) J. Santodomingo-Rubido、O. Mori、S. Kawaminami、「Cytotoxicity and antimicrobial activity of six multipurpose soft contact lens disinfecting solutions」、*Ophthalmic Physiol Opt* **26**、pp476-482、2006
- 49) C. K. Choy、P. Cho、M. V. Boost、「Cytotoxicity and effects on metabolism of contact lens care solutions on human corneal epithelium cells」、*Clinical and Experimental Optometry* **95**、pp198-206、2012
- 50) M. Era、S. Sakai、A. Tanaka、T. Kawahara、T. Kanyama、H. Morita、「Antifungal activity of fatty acid salts against *Penicillium pinophilum*」、*Japan Journal of Food Engineering* **16**(2)、pp99-108、2015
- 51) M. Masuda、M. Era、T. Kawahara、T. Kanyama、H. Morita、「Antibacterial effect of fatty acid salts on oral bacteria」、*Biocontrol Science* **20**(3)、pp209-213、2015
- 52) S. Shapiro、「The inhibitory action of fatty acids on oral bacteria」、*Oral Microbiol. Immunol* **5**、pp350-355、1996
- 53) 濱田信夫、「洗濯内部に生育するカビと洗剤成分の関係」、*生活衛生* **49**(3)、pp161-167、2005
- 54) 橋本博行、吉光真人、清田恭平、「給食用食器の卵アレルギーの残留性比較」、*日本化成学会* **65**(12)、pp681-687、2014
- 55) 掛川貞夫、「塩素系製品による家庭内事故と今後の課題」、*織消* **31**(7)、pp318-324、1990
- 56) B. W. Petschow、R. P. Batema、L. L. Ford、「Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids」、*Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**(2)、pp302-306、1996

- 57) C. J. Zheng, J. S. Yoo, T. G. Lee, H. Y. Cho, Y. H. Kim, W. G. Kim, 「Fatty acid synthesis is a target for antibacterial activity of unsaturated fatty acids」、*FEBS Lett* **579**, pp5157-5162, 2005
- 58) 渡辺昭一郎、「抗菌界面活性剤の現状と動向」、油化学**29**(8)、pp536-542、1980
- 59) K. M. Godfrey、「Cationic emulsifiers in cosmetics」、*J. Soc. Cosmetic Chemists* **17**, pp17-27、1966
- 60) 大林晃、「微生物に対する表面活性剤の作用 殺菌作用と透過性に及ぼす影響」、農芸化学**35**、pp61-66、1961
- 61) 光井武夫、「HLB値の利用」、日本化粧品技術者連合会会誌**8**(2)、pp12-16、1973
- 62) W.C. Griffin、「Classification of surface-active agents by "HLB"」、*J. Soc. Cosmet. Chem***1**、pp311-326、1949
- 63) W.C. Griffin、「Calculation of HLB values of non-ionic surfactants」、*J. Soc. Cosmet. Chem***5**、pp249-256、1954
- 64) 氷室寿、「乳化剤選択における"HLB"の利用について」、日本化粧品技術者連合会会誌**8**(2)、pp17-21、1973
- 65) 山口茂宏、百武昌夫、「親水性イオン性界面活性剤と親油性非イオン界面活性剤による乳化系の転相」、油化学**39**(3)、pp48-51、1990
- 66) 辰巳保夫、羽立智美、松尾聡子、津野和宜、「灰色かび病(*Botrytis cinerea* PEAS.)に対するショ糖脂肪酸エステル、グリセリンおよびポリグリセリン脂肪酸エステルの抗菌効果について」、日本食品保蔵科学会誌**28**(5)、pp227-234、2002
- 67) 徳岡敬子、石谷孝佑、「酵母の生育に及ぼす界面活性剤の影響」、日本食品工業学会誌**38**(12)、pp1103-1110、1991
- 68) S. O. Mast、「Mechanics of locomotion in amoeba」、*Proc. Natl. Acad. Sci USA* **9**、pp258-261、1923
- 69) G. D. Pappas、「Electron microscope studies on amoebae」、*Ann. N. Y. Acad. Sci USA*,

- 78、pp448-473、1959
- 70) K. G. Grell、G. Benwitz、「Die Zellhiille von Paramoeba eilhardi Schaudinn」、*Z. Naturforschg* **21b**、pp600-601、1966
- 71) 園部誠司、西原絵里、「Amoeba proteus の細胞生物学」、*J. Protozool* **37**、pp159-167、2004
- 72) 石井圭一、菅野文和、「アメーバ運動中におけるプラスマレンマの局所破壊」、*動物学* **78**(1・2)、pp7-8、1969
- 73) H. Zeng、X. Chen、J. Liang、「In vitro antifungal activity and mechanism of essential oil from fennel (*Foeniculum vulgare* L.) on dermatophyte species」、*Journal of Medical Microbiology* **64**、pp93-103、2015
- 74) 中内啓光、「直伝！フローサイトメトリー 面白いほど使いこなせる！」、第一版、羊土社、pp10-11、pp46-47、2014
- 75) A. Lahsen、C. Ahmed、F. B. Francis、「Inhibition of bacterial spore growth by fatty acids and their sodium salts」、*Journal of Food Protection* **55**(12)、pp980-984、1992
- 76) A. P. Desbois、V. J. Smith、「Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential」、*Applied Microbiology and Biotechnology* **85**(6)、pp1629-1642、2010
- 77) M. C. Gina、A. Steve、H. Lise、M. U. Vinzenz、H. João、C. Morais、「Structure of the transmembrane regions of a bacterial cyclic nucleotide-regulated channel」、*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(5)、pp1511-1515、2008
- 78) B. W. Petschow、R. P. Batema、L. L. Ford、「Susceptibility of *Helicobacter pylori* to bactericidal properties of medium-chain monoglycerides and free fatty acids」、*Antimicrobial agents and chemotherapy* **40**(2)、pp302-306、1996
- 79) 中谷陽一、A. Milon、G. Ourisson、「カノチノイドおよび類緑化合物とバクテリア細胞

- 膜」、化学と生物 **28**(9)、pp568-576、1990
- 80) 富樫直子、「鎖状テルペンアルコールの抗ブドウ球菌作用と作用機構に関する研究」、昭和薬科大学博士論文、pp13、2013
- 81) R. A. Rosenthal、S. V. Sutton、B. A. Schlech、「Review of standard for evaluating the effectiveness of contact lens disinfectants」、*PDA Journal of Pharmaceutical Science and Technology* **56**(1)、pp37-52、2002
- 82) R. N. Borazjani、S. Kilvington、「Efficacy of multipurpose solutions against *Acanthamoeba* species」、*Cont. Lens Anterior Eye* **28**、pp169-175、2005
- 83) S. Kilvington、D. F. P. Larkin、「*Acanthamoeba* adherence to contact lenses and removal by cleaning agents」、*Eye* **4**、pp589-593、1990
- 84) 松原倫子、小出良平、鬼頭昌大、廣澤槇子、小渕律子、油井一敬、高橋春男、「コンタクトレンズ装用を発症誘因とする感染性角膜潰瘍の検討」、日本職業・災害医**60**(3)、pp182-187、2011
- 85) J. Santodomingo-Rubido、O. Mori、S. Kawaminami、「Cytotoxicity and antimicrobial activity of six multipurpose soft contact lens disinfecting solutions」、*Ophthal Physiol Opt* **26**、pp476-482、2006
- 86) メニコン、製品一覧、ケア用品、[https://www.menicon.co.jp/products/care/e\\_cold/](https://www.menicon.co.jp/products/care/e_cold/)
- 87) 中尾真一、「安全・安心社会を支える膜技術」、膜(Membrane)**31**(1)、pp2-6、2006
- 88) 八木田健司、泉山信司、「生活用水の病原アメーバ汚染とその健康影響 —水系環境のアメーバ汚染—」、モダンメディア **52**(8)、pp252-259、2006
- 89) J. A. Tyler、Richard. R. B、「Specificity and Mode of Action of the Antifungal Fatty Acid cis-9-Heptadecenoic Acid Produced by *Pseudozyma flocculosa*」、*Applied and environmental microbiology*、**67**(2)、pp956-960、2001

本論文の成果は以下の国際学術誌及び国際会議論文に、すでに公表済みである。

- (a) Haruna Sasaki, Toshinari Koda, Hiroshi Morita, “Anti-Acanthamoeba effect of potassium isostearate for use as a multipurpose solution”, *Biocontrol science*, Vol. 25, No.2, 2020 in press
- (b) Haruna Sasaki, Toshinari Koda, Hiroshi Morita, “Anti-amoeba effect of branched medium chain fatty acids and their salts on *Acanthamoeba castellanii*“, *International Journal of Chemical Engineering and Applications*, Vol. 10, No.4, pp: 96-100, 2019
- (c) Haruna Sasaki, Toshinari Koda, Hiroshi Morita, “Antifungal effects of straight chain and branched chain fatty acids against *Rhodotorula mucilaginosa*” *International Research Conference on Engineering and Technology*, Taipei, Taiwan, 2019



## 謝辞

本研究は、著者が北九州市立大学大学院 国際環境工学研究科に在籍中に行ったものであり、本研究の遂行のみならず3年間の研究生活においてこれまで多くのご指導、ご助言を厚く賜り、私生活においても多くの悩みを聴いてくださった指導教授の北九州市立大学 国際環境工学部 環境生命工学科の森田 洋 教授に心より感謝し、深く御礼申し上げます。

また、本論文の審査にあたり、副査をして頂き、多くのご指導、ご助言を頂きました北九州市立大学 国際環境工学部 環境生命工学科の原口 昭 教授、同 中澤 浩二 教授、同 建築デザイン学科 デワンカー・バート教授に心から感謝致します。

さらに本研究を行うにあたり、研究技術を丁寧に教えて頂き、ご助言を厚く賜りました北九州市立大学 国際環境工学部 環境生命工学科 柳川 勝紀 准教授に心より感謝し、深く御礼申し上げます。ならびに、本研究の軸となった分岐型構造のサンプルを提供していただき、何度も一緒に議論をしてくださった日産化学工業株式会社 好田 年成 様、大野 正 司 様に心から感謝致します。

加えて、研究のイロハや実験操作のコツを指導して頂き、研究を円滑に進めることができるように書類作成から研究室管理に至るまでの研究生活を支え、多大なサポートをしてくださった恵良 真理子 様に深く御礼申し上げます。そして研究生活において共に議論をしてくださった森田研究室の先輩、後輩の皆様方に心より感謝致します。

最後に、博士課程の今日まで、生活面、精神面、健康面を支え、見守ってくれました家族に心より深く感謝いたします。博士課程に進学し、研究を続けることが出来たのは、家族の支えのおかげです。本当にありがとうございました。

2020 年 3 月 佐々木 春菜