

ホスホニウム塩含有オリゴマーの合成と 抗菌性材料への応用

Synthesis and Application of Oligomers Containing Phosphonium Segments to Antibacterial Materials

稲葉佳子*, 杉矢 正, 沢田英夫

Yoshiko INABA, Masashi SUGIYA and Hideo SAWADA

We synthesized novel oligomers, which included a silanol group containing the phosphonium salt. A PMMA or glass surface treated with these cooligomers was shown to have a good oil repelling properties. More interestingly, these materials were also found to exhibit a high degree of surface antibacterial activity.

1 緒 言

近年、病院内でのメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) による被害が問題となっている。抗生物質の開発と耐性菌の関係はいわゆるいたちごっこであり、現在残された唯一の特効薬であるバンコマイシンにも、既に耐性菌が出現したとの報告がある。病院内では今まで以上に、抗生物質に頼らないこまめな抗菌対策が要求されている。このような現状では、抗菌処理材料は単なるブームだけではなく、真に必要な物である。

ホスホニウム塩は有機系抗菌剤の一種で、手指殺菌消毒剤として長年使用されている塩化ベンザルコニウムと同様、ブドウ球菌等の細菌や、黴の菌糸に殺菌活性を

示す。これらのカチオン系抗菌剤の菌体への作用機構は、カチオンが細胞表面のアニオン部位と結合し、疎水的相互作用により細胞表層構造を物理化学的に破壊し、死滅させると考えられている。

ここで、ホスホニウム塩はアンモニウム塩に比べ耐熱性に優れ、水溶液としての使用だけではなく材料への加工が可能のため、新規な抗菌性材料への展開が期待されている。我々は、現在までに種々の材料への加工を可能にした次の様な化合物を合成してきた。すなわち、スチレン系のビニル基を持つホスホニウム塩¹⁾、アクリル基を持つホスホニウム塩^{2) 3)}、イソフタル酸構造を持ち、ポリエステル等と共重合できる化合物⁴⁾等である (Fig.1)。

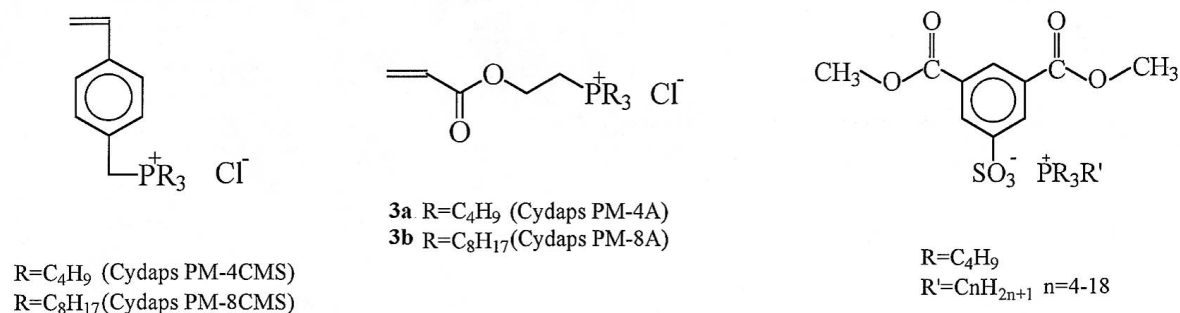


Fig. 1 Some kinds of phosphonium salts.

一方、国立奈良工業高等専門学校 沢田研究室では、分子末端にフルオロアルキル基を導入した化合物の研究⁵⁾、さらにシラノール基を導入したオリゴマーの研究を行っている。

ビニルトリメトキシシランはシラノール基を持ち、ヒドロキシル基を持つ化合物と重縮合により化学結合する。従って、これをオリゴマー中に共重合で導入することにより、種々の材料表面にオリゴマーの処理を行うことが可能である。今回、共同研究を行い、数種類の新規化合物が見出された。これらの一部については、既に報告済みである^{6) 7)}。

これらのうち、2-アクリロキシエチルトリアルキルホスホニウムクロライド-トリメトキシビニルシランコオリゴマーは、以下の特長を持つ。①シラノール基を持ち、種々の材料表面にシランカップリング処理が可能な化合物である。②ホスホニウム塩を持つので、高い抗菌活性能がある。③重合することにより分子サイズが大きくなり、皮膚吸収の抑制や刺激性の低下が期待される。

カチオン性界面活性剤は皮膚内に浸透し、脂質の配列構造を乱すため、皮膚刺激性が高いことが知られている。しかし、これを分子量1万程度に高分子量化することによって、効果を保持したまま刺激性のみ抑えることが可能であることが報告されている⁸⁾。つまり、分子サイズが大きくなることによって人体に吸収されることの少ない、より安全性の高い抗菌剤とすることができる。

以上のような特長を持つホスホニウム塩含有オリゴマーを開発したので、報告する。

2 実 験

2.1 試薬

2-クロロエタノールは関東化学株式会社製1級品、アクリル酸クロライドは東京化成工業株式会社製、4-メトキシフェノールは東京化成工業株式会社製、ビニルトリメトキシシランは東京化成工業株式会社製、 α, α' -アゾ

ビス(イソブチロニトリル)は東京化成工業株式会社製、トリブチルホスフィン、トリオクチルホスフィン(当社製のものを)を用いた。

2.2 抗菌活性試験菌体

Escherichia coli (大腸菌、以後*E.coli*と略す)はIFO3806の株を、*Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ状球菌、以後*S.aureus*と略す)はIFO12732の株をそれぞれ財団法人 醗酵研究所より購入し、継代培養したものを使用した。

2.3 2-アクリロキシエチルトリアルキルホスホニウムクロライドの合成

2-アクリロキシエチルトリアルキルホスホニウムクロライドの合成は以下に示す方法で行った (Scheme 1)。

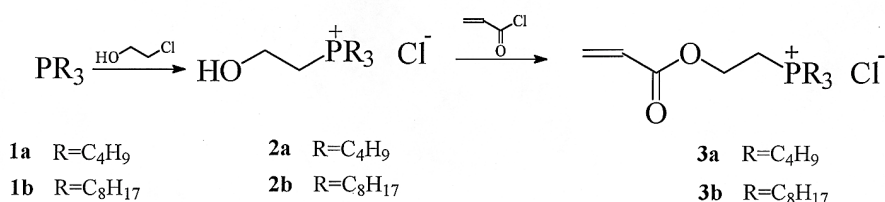
トリブチルホスフィン (1a) 1575.58g (7.79mol) を窒素気流下フラスコに仕込み90°Cに加熱する。ここに、2-クロロエタノール691.38g (8.57mol) を滴下した。その後10時間攪拌し、温度を徐々に120°Cまで上げて反応を行った。アセトニトリルを加えてから濃縮することにより過剰の2-クロロエタノールを追い出し、2-ヒドロキシエチルトリブチルホスホニウムクロライド (2a) 2200.37gを得た (収率99.9%)。

続いて、アセトニトリル500ml中に2aを141.41g (0.5mol) 仕込み窒素を吹き込みながら約80°Cに加熱、アセトニトリルと水を共沸で留出させた。この後、重合禁止剤として4-メトキシフェノール0.51gを仕込み、アクリル酸クロライド54.31g (0.6mol) を滴下し、同様に窒素を吹き込みながら反応を行った。濃縮し、2-アクリロキシエチルトリブチルホスホニウムクロライド (3a) 159.73gを得た (収率94.8%)。生成物確認は¹H-NMRで行った。

同様に、2-アクリロキシエチルトリオクチルホスホニウムクロライド (3b) を合成した (収率94.0%)。得られた化合物のスペクトルデータを以下に示す。

3a ;

¹H-NMR(CDCl₃, σ) 0.99(t,9H), 1.50-1.63(m, 12H),



Scheme 1 Synthesis of 2-acryloyloxyethyl trialkyl phosphonium chloride.

2.38-2.48(m,6H),3.02-3.10(m,2H),4.54-4.65(m,2H),
5.96(dd,J=10.51Hz,J=1.20Hz),
6.11(dd,J=10.51Hz,J=16.82Hz),
6.48(dd,J=16.82Hz,J=1.20Hz)
3b ;

$^1\text{H-NMR}(\text{CDCl}_3, \sigma)$ 0.88(t,9H),1.27-1.59(m,36H),
2.43(t,6H),3.05-3.15(m,2H),4.57-4.65(m,2H),
5.96(dd,J=10.81Hz,J=1.20Hz),
6.11(dd,J=10.81Hz,J=17.42Hz),
6.48(dd,J=17.42Hz,J=1.20Hz)

2.4 2-アクリロキシエチルトリアルキルホスホニウムクロライド-トリメトキシビニルシランコオリゴマーの合成

ビニルトリメトキシシランと2-アクリロキシエチルトリアルキルホスホニウムクロライドとの反応について検討を行った (Scheme 2)。

ビニルトリメトキシシラン14.82g (100mmol) と2-アクリロキシエチルトリオクチルホスホニウムクロライド 50.52g (100mmol) をトルエン溶液中、窒素気流下で反応し、Scheme 2に示すようなコオリゴマー (4b) を得た。重合開始剤としてアゾビスイソブチロニトリル (AIBN) 0.48g (3mmol) を使用、反応は40~80°C/1~5時間で行い、反応時間1, 3, 5時間でサンプリングし、物性測定を行った。得られたスペクトルデータを以下に示す。

4a ;

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}, \sigma)$ 0.95(t,9H),1.43-1.60(m,12H),2.20-2.47(m,6H),2.73-2.86(m,6H),
3.30(s,9H),3.70-3.76(m,2H),3.86-3.93(m,2H)

4b ;

$^1\text{H-NMR}(\text{CD}_3\text{OD}, \sigma)$ 0.86(t,9H),1.28-1.65(m,36H),2.19-2.27(m,6H),2.38-2.48(m,6H),
3.30(s,9H),3.72-3.77(m,2H),3.86-3.92(m,2H)

2.5 物性の測定

オリゴマーの分子量は、大塚電子株式会社製光散乱光度計 DLS-7000 を用い重量平均分子量を測定することにより算出した。測定溶媒はメタノールを用いた。

熱分解温度はセイコー電子工業株式会社製示差熱重量同時測定装置 TG/DTA-300を用い、窒素気流下、昇温速度10°C/minで測定した。

オリゴマーの表面改質剤としての性能を評価するため、ポリメタクリル酸メチル (PMMA) のフィルムを作成し、接触角の測定を行った。PMMA (分子量Mn=35300) にオリゴマーを1wt%加えてテトラヒドロフラン (THF) により溶解し、溶媒をとばすことにより、キャストフィルムを作成した。この膜表面における水及びドデカンの接触角の測定をERMA製 G-I-1000型ゴニオメーターを用いて行った。

2.6 抗菌効果

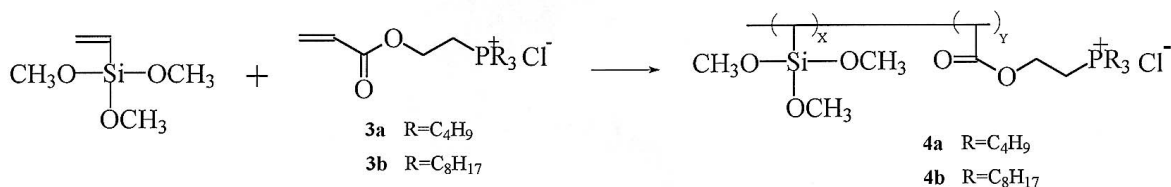
先に作成したオリゴマーをメタノール (5wt%の水を含む) に溶解し、1, 2.5, 5, 10wt%溶液を作成した。ガラス製プレパラートをこの溶液に漬け、引き上げ150°Cで乾燥することによってガラス表面にシランカップリング処理を行った。未反応のオリゴマーをメタノールで洗浄後、抗菌活性試験に供した。このガラス上の抗菌活性を、フィルム密着法⁹⁾ により測定した。

3 結果と考察

3.1 ホスホニウム塩モノマーの合成

Scheme 1における、2a, 2bの合成はほぼ定量的に進行した。トリアルキルホスフィンとアルキルクロライドの反応は、非共有電子対を持つ3価のりん原子がハロゲン化アルキルの炭素を攻撃するS_N-2反応であり、ある程度の温度をかけて、反応を行う。ハロゲン化アルキルのハロゲンの種類による反応性の違いは、R-Br>R-Clである。

続いて、3a, 3bの合成は酸ハロゲン化物とアルコール



Scheme 2 Synthesis of 2-acryloyloxyethyl trialkyl phosphonium chloride vinyltrimethoxysilane cooligomer.

Table 1 Molecular weights of cooligomers determined by laser light-scattering photometer in methanol.

Run	Monomer	Temp. /°C	Molecular weight		
			Reaction Time/h		
			1	3	5
1	3a	40			not reacted
2	3b	40			not reacted
3	3a	60			13,250
4	3a	80	15,650	21,520	21,270

から脱塩酸によりエステルを生成する反応である。本実験では、副生するハロゲン化水素を窒素を吹き込むことにより速やかに、強制的に系外へ追い出すことにより、反応を行った。

3.2 オリゴマーの合成と物性

オリゴマー重合の各実験条件と結果をTable 1に示す。使用したホスホニウム塩モノマー (3a, 3b), 重合温度 (40°C–80°C), 重合時間 (1–5時間) による結果を示す。

重合温度40°Cの場合, 重合時間1–5時間のいずれにおいても, $^1\text{H-NMR}$ にて重合基は未反応のままで観測され, 重合はまったく進行しなかった。重合温度60°Cの場合は, 反応1時間で $^1\text{H-NMR}$ にて約29.0%の未反応重合基が観測された。3時間で同じく約12.4%, 5時間で約5.4%であった。また, 重合温度80°Cの場合, 重合1時間から $^1\text{H-NMR}$ にて未反応重合基は見られず, 重合は速やかに進行していた。この際の, 光散乱光度計による分子量は重合1時間で約15,000, 3時間以降は約20,000であった。ここで, これらの化合物は溶液中で分子集合体を形成しやすいことが知られており, 実際はオリゴマー領域の分子量を示しているものと推定される。また, 光散乱光度計の測定結果より, 分子量に比較して, 慣性二乗半径の値が大きく, 分子形状が延びた形態をしていることが示唆されている。

次に, アクリル基部分がメタクリル基であるホスホニウム塩で同様の合成を試みたが, ゴム状のポリマーが生成し, 操作性が悪く断念した。一般的に, アクリル基を持つ化合物に比べ, メタアクリル基を持つ化合物の方が反応性が高い。このため, オリゴマー領域の重合が不可能であったと考えている。

熱分解温度は, 322°Cであった。従って, 処理温度300°C程度まで使用可能であることがわかった。シランカップリング処理するには150°C程度で充分であるため, 材料表面に処理して使用することができる。

3.3 撥油性等

撥水, 撥油性の指標となる接触角測定の結果をTable 2に示す。

Table 2 Contact angles of dodecane and water on PMMA films treated with silanol-phosphonium cooligomers listed in Scheme 2.

R	Contact Angles	
	Dodecane	Water
	/°	/°
C_4H_9	15	60
non-treated	0	45

Table 2に示す様に, n-ドデカンとの接触角の値は, 無処理 (0°) に比べ15°と高い値を示し, 撥油性のあることがわかった。一方, 水の接触角は無処理 (45°) に比べ60°とやはり高い値を示し, 撥水性も向上することがわかった。従って, 本化合物は撥水, 撥油性とも併せ持つ特徴がある。

3.4 抗菌活性

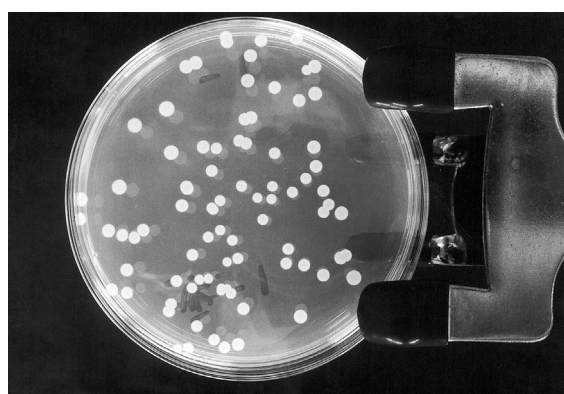
フィルム密着法により抗菌活性試験を行った様子をFig. 2に示す。これは, ガラスの表面に菌液 (*S.aureus*) を接種し, 24時間静置した後のガラス表面に菌体がどの程度生存しているかを培養して調べたものである。左の写真(a)が無処理のガラス表面から培養したもの, 右の写真(b)がオリゴマーを処理したガラスのものである。

無処理のガラス表面には菌が残存しているため, これを培養すると菌が増殖してコロニーを形成する (写真の黄色球状物)。一方, オリゴマー処理したガラス表面では菌が死滅しているため, 培養しても菌はまったく増殖しない。これらをまとめた結果をTable 3に示す。

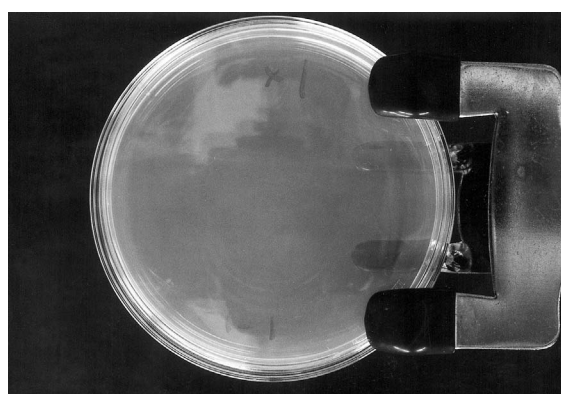
Table 3に示すように、*Saureus*に対しては、濃度1wt%のオリゴマー液で処理したガラス表面でも初期菌数 10^5 オーダーを 10^2 オーダー以下にまで死滅させることができた。また、*E.coli*に対しては、濃度5%のオリゴマー液で処理したガラス表面で同じく菌数を 10^4 オーダーから 10^2 オーダー以下にすることができた。ここで、繊維等に使用されている一般的な後加工抗菌剤である、アンモニウム塩固定化シランカップリング剤 (Fig. 3) を同様にガラス表面に

処理したものを用意し、同じくフィルム密着法で*Saureus*に対する抗菌活性試験を行った。

Table 4に示すように、本研究のオリゴマーはアンモニウム塩固定化シランカップリング剤とほぼ同程度の抗菌活性を示すことがわかった。このことから、簡単な操作でオリゴマーをガラス表面に処理し、十分に実用的な抗菌活性を付与することができることがわかった。



(a) Non-treated glass



(b) Oligomer treated glass

Fig. 2 Results of antibacterial activity against *Saureus* by the film contact method.

Table 3 Surface antibacterial activity of the modified glass treated with cooligomer (4b) listed in Scheme 2 against *Saureus* and *E.coli* by the film contact method.

Content /%	Viable cells(<i>S.aureus</i>) /cfu ^{a)} /ml	
	<i>E.coli</i> ^{b)}	<i>S.aures</i> ^{c)}
initial	7.1×10^4	1.2×10^5
10	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
5	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
2.5	1.2×10^4	$<1.0 \times 10^2$
1	2.7×10^4	$<1.0 \times 10^2$
None	7.6×10^3	1.5×10^4

a)cfu indicate colony forming units.

b)*E.coli* used IFO 3806.

c)*S.aureus* used IFO 12732.

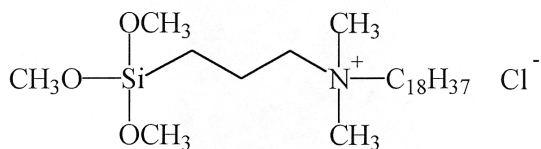


Fig. 3 Structure of ammonium-type silane coupling agents.

Table 4 Surface antibacterial activity of phosphonium- and ammonium-type silane coupling agents against *S.aureus* by the film contact method.

Content /%	Viable cells(<i>S.aureus</i>) /cfu/ml	
	Phosphonium-type	Ammonium-type
initial	7.1×10^4	9.4×10^4
10	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
5	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
2.5	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
1	$<1.0 \times 10^2$	$<1.0 \times 10^2$
None	1.5×10^4	7.6×10^6

4 結 論

本研究では、ホスホニウム塩を含有した種々のオリゴマーを合成し、その重合条件を探索した。また、得られ

たオリゴマーを材料に処理してその表面特性、抗菌活性を調べた。この結果、シラノール基に由来する撥水撥油性と、ホスホニウム塩に由来する抗菌活性を示すことがわかった。従って、本研究で得られたオリゴマー類は、撥水撥油性と高い抗菌活性を併せ持ち、さらに材料表面に簡単な操作で処理することができることがわかった。これらを汎用樹脂であるPMMAやガラスに処理することにより、撥水撥油性・抗菌活性を併せ持つ機能性材料への展開が期待される。

文 献

- 1) 金澤 昭彦, 奈部川 修吉, 日特開 平5-156103 (1993).
- 2) 橋本 一吉, 稲葉 佳子, 志村 征爾, 日特開 平7-025714 (1995).
- 3) 杉矢 正, 渡辺 努, 日特開 平9-255694 (1997).
- 4) 金澤 昭彦, 遠藤 剛, 池田 富樹, 日特開 平5-310820 (1993).
- 5) 沢田 英夫, 川瀬 徳三, 有機合成化学協会誌, 57, 291 (1999).
- 6) 沢田 英夫, 池末 由香, 川瀬 徳三, 早川 由夫, 杉矢 正, 渡辺 努, 材料技術, 16, 257 (1998).
- 7) 沢田 英夫, 河井 義和, 杉矢 正, 渡辺 努, 川瀬 徳三, 色材, 71, 686 (1998).
- 8) 中林 宣男 監修, “医療用高分子材料の開発と応用”, 技術情報センター (1998), p.202.
- 9) 西村 民男 他, “抗菌・防黴剤の使用技術と抗菌力試験・評価”, 技術情報センター (1993), p.226.



著 者
氏名 稲葉 佳子*
Yoshiko INABA
所属 研究開発本部
有機開発部
有機材料第2グループ



著 者
氏名 杉矢 正
Masashi SUGIYA
所属 研究開発本部
有機開発部
有機材料第2グループ



著 者
氏名 沢田 英夫
Hideo SAWADA
国立奈良工業高等専門学校
化学工学科 有機化学研究室
助教授