中 野 栄 次

Antimicrobial activity of Imidazolidinyl urea

Eiji Nakano

Antimicrobial activity of Imidazolidinyl urea (IU) is tested in M/10 phosphate buffer solutions against two strains; *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. The influences of pH, gelatin and collagen hydrolysate on its activity are also tested respectively; the following results are obtained.

Antimicrobial activity of Imidazolidinyl urea (IU) has a tendency to be more effective in alkaline pH range.

Imidazolidinyl urea (IU) is slightly inactivated in the presence of gelatin.

But its activity is more effectively decreased in collagen hydrolysate solution, especially in the case of *Pseudomonas aeruginosa*. In this collagen hydrolysate solution, the growth of two microbes is less inhibited in alkaline pH range than in acid one.

Weak phototoxicity of Imidazolidinyl urea (IU) against *Escherichia coli* is recognized by irradiation of 290-350nm ray.

1 結 言

イミダゾリジニルウレア (IU) は、かなり広い抗菌スペクトルをもつ抗菌剤として欧米では化粧品に使用されているが、わが国での使用はまだ許可されていない。著者は、本抗菌剤の化学構造が、従来化粧品に用いられてきた抗菌剤とかなり異なっているうえに、1. 無味無臭であり、微生物の増殖する水相への溶解度が大きいこと、2. ラット等の実験動物に対する毒性が小さいこと、等の報告がなされている¹⁾。そこで本品の抗菌剤としての有用性が期待されるので、その抗菌性について若干の試験を行なった。

一般に抗菌剤の抗菌力は、1. 微生物の種類 2. pH 3. 共存物質、等により変動し、3. については特に蛋白質の共存で抗菌力が低下することが知られている。そこでIU に対するこれらの影響を調べるために、試験菌株としては化粧品の代表的な汚染菌である *E. coli* ならび

に *Ps. aeruginosa* の 2 菌株、pH は 4.0~10.0、共存物質としてゼラチンおよびコラーゲン加水分解物を使用し、各組み合わせによる抗菌力試験を行なった。また *E. coli* に対する光毒性試験も行なったので併せて報告する。

イミダゾリジニルウレア (IU)

構 造 式

 $C_{11}H_{16}O_8N_8 \cdot H_2O : 406.37$

2 実験材料及び方法

2・1 抗菌力試験

試験菌株の *E. coli*, *Ps. aeruginosa* は、tryptic soy

株式会社ピラス研究所
大阪市大淀区豊崎町西通 1—18
Research Laboratory of Pias Co., Ltd.
18, Toyosaki Nishidori 1-chome, Oyodo-ku, Osaka

broth 中で 30°C, 24 時間培養したものを用いた。

pH は M/10 リン酸緩衝液で, pH 4.0, 5.5, 7.0, 8.5, 10.0 の 5 段階に調整した。ゼラチンはバクトゼラチン (Difco) を用い添加濃度は 2%, コラーゲン加水分解物 (注1) は抗菌剤を含まないものを用い添加濃度は 5% とした。

注1) コラーゲン蛋白質を加水分解して得られるポリペプチドとアミノ酸混合物のナトリウム塩 40~44% 及び NaCl 8% を含む水溶液 (成和化成)

試験液の調製: 各試料の滅菌は次のように行なった。リン酸緩衝液及びゼラチン, コラーゲン加水分解物は水溶液として, それぞれ別々に, 120°C, 10 分間, オートクレーブで滅菌した。

IU は水溶液とし, 汙過除菌を行なった。

試験液は, ① M/10 リン酸緩衝液 (pH 4.0, 5.5, 7.0, 8.5, 10.0) に IU を 0.025% 及び 0.1% 含むもの, ② ゼラチン 2% を含む M/10 リン酸緩衝液 (pH 4.0, 5.5, 7.0, 8.5, 10.0) に IU を 0.025% 及び 0.1% 含むもの, ③ コラーゲン加水分解物 5% を含む M/10 リン酸緩衝液 (pH 4.0, 5.5, 7.0, 8.5, 10.0) に IU を 0.025% 及び 0.1% 含むもの, であり, 上記の滅菌試料を適宜混合して調製した。

これらの試験液に, 試験菌株の培養液を希釈して初発菌数が約 $10^5/\text{ml}$ になるように加え, 直径 30mm の試験管に入れ, 30°C で静置培養した。5 時間, 24 時間, 3 日, 8 日後に試料を採取し, 普通寒天培地による混釈法で 30°C, 48 時間後に形成されるコロニー数より生菌数を算出した。

2・2 E. coli に対する光毒性試験

tryptic soy broth 中で 30°C, 24 時間培養した E. coli を, 5000 r. p. m. で 5 分間遠心分離し, pH 7.2 の PBS 溶液で 2 度洗浄, 同液に約 $10^5/\text{ml}$ になるように懸濁する。この懸濁液に, 汙過除菌した IU の PBS 溶液を加えて所定の濃度 (0.01%, 0.1%) に調整し, 10 分間室温に保持する。内径 6 cm のシャーレにこの試験液 5 ml を分注し, 20W 東芝 FL20SE (波長分布 290~350 nm. ピーク波長 320nm 付近) 及び東芝 FL20S-BLB (300~400nm. ピーク波長 350nm 付近) を 14cm の距離から直接照射する。照射時間を変えて試料を採取し普通寒天培地による混釈法で 30°C, 48 時間後に形成されるコロニー数より生菌数を算出し, 照射線量-生存率曲線を求めた。

3 結 果

3・1 抗菌力試験

3・1・1 リン酸緩衝液における IU の抗菌力

IU 無添加のリン酸緩衝液中での試験菌株の生育曲線を Fig. 1, 2 に示す。これらの図において初発菌数約 $10^5/\text{ml}$ を 1 とし, 生菌数の増減を比率で示した。以下の図についても同様である。E. coli の生育至適 pH は Fig. 1 に示す通り 5.5~7.0 であり, pH 4.0 及び 10.0 では生育が不可能である。一方 Ps. aeruginosa の生育至適 pH は Fig. 2 に示す通り 5.5~8.5 であり, pH 4.0 では生育が不可能である。

Fig. 1 Growth curves of E. coli in M/10 phosphate buffer solutions

このリン酸緩衝液中での IU の両菌株に対する抗菌力は, 0.025% で Fig. 3 に示す通り E. coli に対して, pH 7.0~8.5, Ps. aeruginosa に対して pH 7.0~10.0, でかなり大きい。しかし pH 5.5 では, 両菌株に対する抗菌力は小さい。IU の 0.1% 濃度では Fig. 4 に示す通り, すべての pH 域で十分な抗菌力を示した。

すなわち IU の両菌株に対する抗菌力は, pH 5.5 で小さく pH 7.0 以上では大きい。

3・1・2 ゼラチン 2% 添加リン酸緩衝液における IU の抗菌力

ゼラチン添加リン酸緩衝液中での試験菌株の生育至適

Fig. 2 Growth curves of *Ps. aeruginosa* in $M/10$ phosphate buffer solutions

Fig. 3 Growth curves of *E. coli* and *Ps. aeruginosa* in $M/10$ phosphate buffer solutions containing 0.025% of IU

Fig. 4 Growth curves of *E. coli* and *Ps. aeruginosa* in $M/10$ phosphate buffer solutions containing 0.1% of IU

pH は、Fig. 5 に示す通り *E. coli* で 5.5~8.5 であり、ゼラチン無添加の場合よりも広がる。*Ps. aeruginosa* も Fig. 6 に示す通り生育至適 pH が *E. coli* の場合と同範囲にあり、pH 10.0 でもかなり増殖する。

Fig. 5 Growth curves of *E. coli* in $M/10$ phosphate buffer solutions containing 2% of gelatin

Fig. 6 Growth curves of *Ps. aeruginosa* in M/10 phosphate buffer solutions containing 2% of gelatin

に示す。0.025% 濃度ではわずかな抗菌力を示す程度であるが、0.1% 濃度では十分な抗菌力を示した。ただ pH 5.5 に比較して pH 7.0 以上のアルカリ側での抗菌力が大きい傾向がみられる。

Fig. 8 Growth curves of *E. coli* and *Ps. aeruginosa* in M/10 phosphate buffer solutions containing 0.1% of IU and 2% of gelatin

Fig. 7 Growth curves of *E. coli* and *Ps. aeruginosa* in M/10 phosphate buffer solutions containing 0.025% of IU and 2% of gelatin

この試験液に IU を添加した場合の結果を Fig. 7, 8

Fig. 9 Growth curves of *E. coli* in M/10 phosphate buffer solutions containing 5% of collagen hydrolysate

3・1・3 コラーゲン加水分解物 5% 添加リン酸緩衝液における IU の抗菌力

コラーゲン加水分解物添加リン酸緩衝液中での生育曲線を Fig. 9, 10 に示す。E. coli の生育至適 pH は Fig. 9 に示すように 5.5~7.0 でありコラーゲン加水分解物無添加の場合と変わらない。一方 Ps. aeruginosa の生育至適 pH は、Fig. 10 に示すように 7.0~10.0 であり、コラーゲン加水分解物無添加の場合に比較してアルカリ側に拡がり pH 5.5 では増殖はみられない。

Fig. 10 Growth curves of *Ps. aeruginosa* in M/10 phosphate buffer solutions containing 5% of collagen hydrolysate

この試験液に IU を添加した場合、Fig. 11, 12 に示すように E. coli に対しては pH 5.5 での抗菌力が大きく、pH 7.0 ではかなり小さい。また *Ps. aeruginosa* に対しては各 pH とも抗菌力はかなり小さかった。

3・2 E. coli に対する光毒性試験

結果を Fig. 13 に示す。E. coli を懸濁した 0.1% IU 水溶液に 300~400nm (20W 東芝 FL20S-BLB 使用) の紫外線照射を行なっても生存率低下はみられない。一方 290~350nm (20W 東芝 FL20SE 使用) の紫外線照射を行なうと IU の濃度が増すに従って菌の照射生存率は低

下する。

Fig. 11 Growth curves of *E. coli* and *Ps. aeruginosa* in M/10 phosphate buffer solutions containing 0.025% of IU and 5% of collagen hydrolysate

一方 IU を含まない状態での 290~350nm の紫外線照射でもこの波長紫外線の細胞毒効果により照射生存率が低下する。この両曲線の比較から IU 添加の場合の方が無添加に比較して照射生存率の低下が大きく、290~350nm の紫外線照射ではみかけ上の光毒性効果が認められる。

4 考 察

一般に抗菌剤は血液、蛋白質²⁾、界面活性剤（特に非イオン界面活性剤³⁾、高分子物質⁴⁾、等によりその抗菌力が低下する。

IU に関する報告は現在のところ少ないが血液、蛋白質、ミルク等の存在下でもその抗菌力の低下が比較的小さく、また広い範囲の pH に於て有効であるとの報告がある¹⁾。

本実験ではゼラチン溶液中における試験菌の生育は、コラーゲン加水分解物溶液中における生育より優れている。しかるにこれらの系に IU を添加した場合、抗菌力は

Fig. 12 Growth curves of *E. coli* and *Ps. aeruginosa* in M/10 phosphate buffer solutions containing 0.1% of IU and 5% of collagen hydrolysate

Fig. 13 Phototoxicity of IU against *E. coli*

ゼラチン溶液中における方がコラーゲン溶液中におけるよりも大きい。

これは IU がゼラチンよりもコラーゲン加水分解物に対して、より結合しやすいためであると考えられる。すなわち平均分子量はゼラチンが 61000~670000, コラーゲ

ン加水分解物が 350~400 であり、従って他物質との結合に關する末端基の数は、ゼラチンの方がコラーゲン加水分解物よりも少ないことからこのことが推察される。なお構成アミノ酸組成についてはゼラチン, コラーゲン加水分解物ともに大きな差はないと考えられる⁵⁾。ただ著者はこの結合に關する実験は行っていない。

IU はリン酸緩衝液, ゼラチン添加リン酸緩衝液中での抗菌力試験でみられるようにアルカリ側での抗菌力が大きい。

ただコラーゲン加水分解物 5% 添加リン酸緩衝液中での生育至適 pH の範囲がやや狭くなり、また IU の抗菌力が酸性剤でやや大きい。これはコラーゲン加水分解物の添加が試験菌に対して幾分阻害的に作用し、それが酸性側で IU の抗菌性との相加作用としてあらわれたものと考えている。

IU の動物に対する光毒性試験は行っていないが、*E. coli* を IU の PBS 溶液中で 290~350nm の紫外線照射を行ない、みかけ上の光毒性が認められた。

5 総 括

IU の抗菌力について *E. coli*, *Ps. aeruginosa* を使用し、pH 及びゼラチン, コラーゲン加水分解の影響を試験した。併せて *E. coli* に対する光毒性試験も行なった。

その結果、IU はアルカリ側での抗菌力が大きい傾向がみられた。

またゼラチンとの共存でわずかながら抗菌力の低下がみられた。コラーゲン加水分解との共存ではかなり抗菌力が低下し、特に *Ps. aeruginosa* に対する抗菌力はかなり低下した。ただこのコラーゲン加水分解物溶液中での抗菌力はアルカリ側よりも酸性側でやや大きかった。

E. coli に対するみかけ上の光毒性は弱いながら認められた。

文 献

- 1) P. A. Berke and W. E. Rosen, American Perfumer and Cosmetics, 85, 55 (1970)
- 2) 加藤洋次, 高橋明, 田宮久彰, 河野通治, 霜三雄, 食衛誌, 7, 60 (1966)
- 3) M. G. DeNavarre and H. E. Bailey, J. Soc. Cosm. Chem., 7, 427 (1956)
- 4) M. D. Ray, K. E. Avis and C. C. Flarigan, Jr, J. Pharm. Sci., 57 [4] 609 (1968)
- 5) 野田春彦, 蛋白質化学④, P. 101 (1956)

(昭和49年10月22日受理)