

防菌防黴学会賞受賞論文

殺菌剤の定量的構造活性相関手法を用いた  
基礎的研究および実用化に関する研究

高麗 寛紀

Fundamental and Applied Research of Biocide using  
Quantitative Structure-Activity Relationship

Hiroki KOURAI

*Department of Biological Science and Technology,  
Faculty of Engineering, The University of Tokushima,  
Minamijosanjima-cho, Tokushima 770-8506, Japan*

ISSN 0385-5201

防菌防黴誌

Bokin Bobai

Shinkousan Bldg., 13-38, Nishi-Hon-machi 1-chome, Nishi-ku, Osaka, 550-0005, JAPAN.

THE SOCIETY FOR ANTIBACTERIAL AND ANTIFUNGAL AGENTS, JAPAN.

防菌防黴学会賞受賞論文

殺菌剤の定量的構造活性相関手法を用いた  
基礎的研究および実用化に関する研究

高麗 寛紀

Fundamental and Applied Research of Biocide using  
Quantitative Structure-Activity Relationship

Hiroki KOURAI

Department of Biological Science and Technology,  
Faculty of Engineering, The University of Tokushima,  
Minamijosanjima-cho, Tokushima 770-8506, Japan

1. はじめに

地球生態系の根幹である微生物は、人類を含めた総ての動植物にとって必要欠くべからざる生き物であることは言うまでもない。しかし、微生物はその増殖場所、増殖速度、最大増殖量および代謝生産物質などにより、人類にとって有益な微生物が容易に有害微生物に変化する場合やその逆も起こる。世界における最近の年間総死亡者数はおよそ5,200万人であり、この死亡原因の約33%が微生物感染症である。その中の主な感染症は肺炎、コレラ、マラリア、結核、肝炎であるとWHOは報告している。総ての人類が健康で快適な長寿社会を維持するためには、抗生物質や殺菌消毒剤などに対して多剤耐性化した環境中の有害微生物を効果的に制御し、感染の危険性を低下させることは非常に重要で意義深いと思われる。次に病原性微生物感染以外の微生物災害についてまとめた。我が国における1954年の自衛隊ジェット練習機の墜落事故、アメリカにおける1990年のスペースシャトル排水系ステンレスパイプの水漏れ事故および火力発電所の冷却系熱交換装置の金属腐食などは嫌気性微生物が直接的に関与した微生物腐食 (Microbial Influenced Corrosion : MIC)

が原因である。さらに衣食住などの工業製品 (金属材料, 無機材料, プラスチック, 石油製品, 電子材料, 接着剤, 塗料, 繊維, ゴム, 香料, 油脂, 医薬品, 化粧品, 木材, 皮革, 食品, 紙製品など), 生鮮農水産物や農水産加工製品の多くが微生物劣化 (腐敗, 変敗, 腐朽, 変色, 変性および腐食など) による多大の被害を被っている。このような微生物被害を防ぐために我々の祖先は誕生と同時に様々な微生物制御方法を開発してきた。現在, 実施されている有害微生物制御方法を大別すると物理的制御 (温度, 圧力, 電磁波, 電子線, 濾過, 遮断など) と化学的制御 (薬剤, Aw, ガス, pH, 醗酵など) に分類される<sup>1)</sup>。著者は主として後者の化学的制御分野の抗菌剤や殺菌剤の開発とそれらを用いた微生物制御に関する研究を行ってきた。本稿では今回学会賞受賞の対象となったモノ型, ビス型 (ジェミニ型, 双子型) の第四アンモニウム塩系薬剤の定量的構造活性相関の手法による最適分子設計 (環境調和・安全性・環境毒性・作用機構・薬剤耐性・製剤・用途・経済性) から得られた高機能性抗菌剤の殺菌メカニズムや殺菌特性および可視光励起型光触媒系抗菌剤 (無機系および有機系) の開発ならびにそれらの作用メカニズムの解明に関して得られた知見を以下に

概説する。

## 2. 光触媒系抗菌剤の開発

光エネルギーを利用して酸素系ラジカルを生成し、抗菌活性を示す無機材料は酸化チタン（アナターゼ型）<sup>2-5)</sup>、および銀担持リン酸ジルコニウム<sup>6-11)</sup>、有機材料は銀担持アクリル繊維等が報告されている<sup>12)</sup>。二酸化チタンについては藤島らによって多数報告されているので詳細な説明は省略するが、ブラックライト領域の紫外線で励起された電子や正孔が表面吸着酸素や水と反応して酸化力の非常に強いヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ , 酸化電位 +2.8V)とスーパーオキシアニオンラジカル( $\text{O}_2^-$ , 酸化電位 +1.7V)を生成する。著者らが開発に関与した銀担持リン酸ジルコニウム（商品名：NOVARON）および銀担持アクリル繊維（NX-85）などは銀が光受容体となっているため可視光線から紫外線までの広い波長領域において励起され、二酸化チタンと同様にヒドロキシルラジカルとスーパーオキシアニオンラジカルを生成し、非常に高い抗菌効果を示す。ここでは銀担持リン酸ジルコニウムと銀担持アクリル繊維を用いた不織布（izi）の抗菌特性や抗菌メカニズムについて以下に述べる。

### 2-1. 銀担持リン酸ジルコニウム抗菌剤

銀担持リン酸ジルコニウムの特徴的な層状結晶

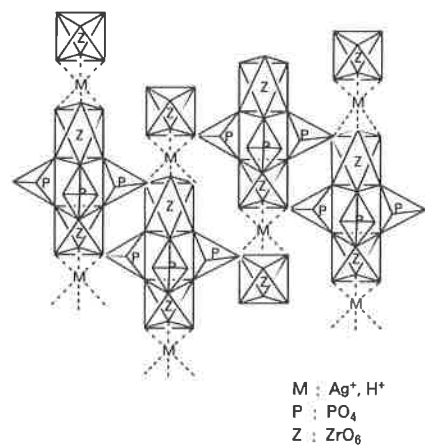


図1. 銀担持リン酸ジルコニウムの層状結晶構造

構造を図1に示す。層間に露出した酸化ジルコニウムの酸素原子をリガンドとして銀を担持させたことにより、通常の水環境条件下ではほとんど銀イオンを溶出することなく光触媒機能を発現して強い殺菌活性を示す。光照射下の銀担持リン酸ジルコニウムの光触媒反応により発生するラジカル種をESRスペクトルにより解析した結果を図2に示す。測定条件はJEOL TE300, X-bandを使用し、スピントラッピング剤としてDMPO (5,5-ジメチル-1-ピロリンN-オキサイド)を用い、紫外線をカットしたキセノンランプ照射下で測定した。スペクトル(A):ヒドロキシルラジカルとDMPOアダクトのスペクトルに帰属されることより、ヒドロキシルラジカル( $\cdot\text{OH}$ )が生成していることを示した。スペクトル(B):ヒドロキシルラジカルスカベンジャーであるI<sup>-</sup>イオ

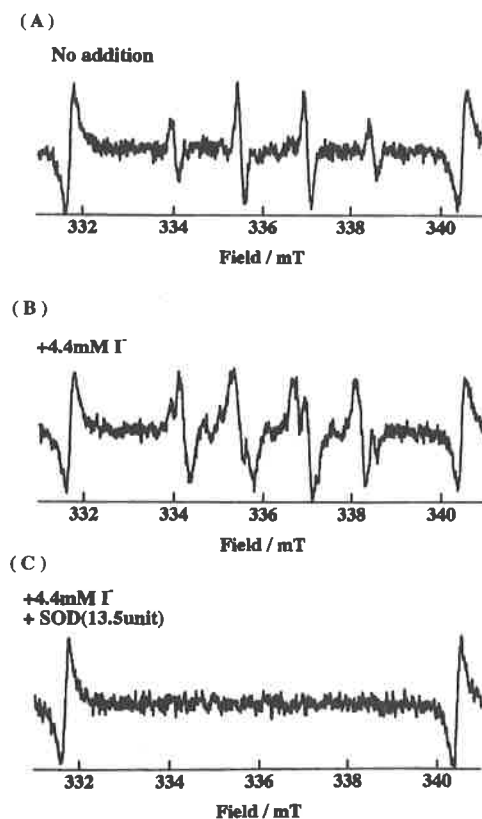


図2. ESRスペクトルを用いた銀担持リン酸ジルコニウムの光触媒反応生成物の解析  
測定装置: JEOL TE 300 X-Band  
可視光線照射: 紫外線カットキセノンランプ

ンの共存下では、ヒドロキシルラジカル DMPO アダクトのシグナルが消失し、新たにスーパーオキシアニオン DMPO アダクトのスペクトルを示し、スーパーオキシアニオン ( $\text{O}_2^-$ ) の生成が示された。スペクトル (C): I<sup>-</sup>イオンと SOD (スーパーオキシジスムターゼ) 共存下での測定ではシグナルが完全に消失した。これらの結果は銀担持リン酸ジルコニウムがスーパーオキシアニオンラジカルとヒドロキシルラジカルを同時に生成することを明らかとした。また、室内光下でも高い殺菌活性を示すことを見出し、銀担持リン酸ジルコニウムが弱い可視光下でも励起されて光触媒反応を起こすことが明らかになった。次にいずれのラジカルが主たる殺菌化学種であるのかを検索するため光触媒反応以外で調製したヒドロキシルラジカルとスーパーオキシアニオンラジカルを用いて実験を行った。スーパーオキシアニオンラジカルはヒポキサンチンオキシダーゼを用いて酵素化学的に生成させた。一方のヒドロキシルラジカルはフェントン反応より生成させた。これらの殺菌試験結果を図3に示す。本実験結果より、ヒドロキシルラジカルの方がスーパーオキシアニオンラジカルよりも高い殺菌活性を示し、主たる殺菌化学種はヒドロキシルラジカルであることが判明した。このヒドロキシルラジカルは寿

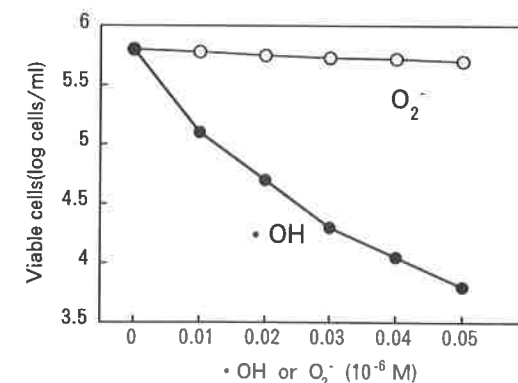


図3. ヒドロキシルラジカルあるいはスーパーオキシアニオンラジカルのいずれが主たる殺菌化学種であるのか? *Escherichia coli* K12 W3110に対するスーパーオキシアニオンラジカル (ヒポキサンチンオキシダーゼ反応より生成) とヒドロキシルラジカル (フェントン反応より生成) の殺菌力の比較  
○; スーパーオキシアニオンラジカル, ●; ヒドロキシルラジカル

命が非常に短く ( $7 \times 10^{-6}$  sec), 平均拡散距離は 100nm 程度である。さらにヒドロキシルラジカルは容易に再結合し、過酸化水素を生成する。しかし生成した過酸化水素は銀担持リン酸ジルコニウム結晶表面のカタラーゼ作用により速やかに分解されることも確認された。したがって銀担持リン酸ジルコニウムの殺菌作用は、結晶表面近傍 (表面から数  $\mu$  程度) でのみ強い殺菌活性を示すなどの特徴を持っていることが明らかとなった。現在この銀担持リン酸ジルコニウムは年間数百トンが生産され、抗菌性プラスチック (まな板, キッチントップ, 人工大理石, 包装材料, トイレタリー, 自動車など), 抗菌性繊維 (レーヨン, ナイロン, ポリエステル, アセテート, 不織布など), 抗菌性塗料および抗菌砂などとして利用されている。

### 2-2. 銀担持アクリル系抗菌剤

光触媒活性を有する有機系繊維としては我々が開発した銀担持アクリル繊維 (NX-85) が世界最初である。このアクリル繊維はアクリロニトリルポリマー中のペンダント型ニトリル基の一部をポリマー反応によりスルホン酸基に置換し、銀イオンをキレートさせたものである (図4)。スルホン基の酸素およびニトリル基の窒素をリガンドとしたことにより、通常の水系において銀をほとんど溶出すること無く強い殺菌活性を示す。この NX-85 (銀担持量 0.46% w/w) とポリエステル繊維を用いて作製した抗菌性混抄紙 (izi) の抗菌特性と殺菌機構を明らかにした<sup>12)</sup>。

セークフラスコ法で抗菌性混抄紙殺菌活性を測

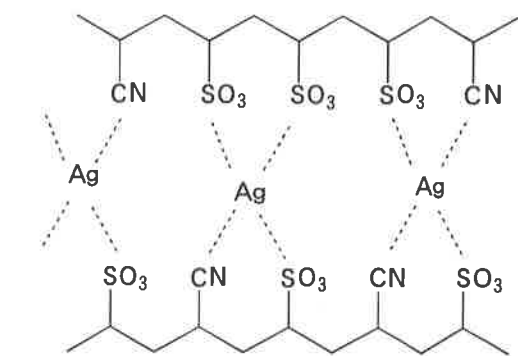


図4. 銀担持アクリル繊維 (NX-85) の化学構造

定した結果、グラム陽性、陰性菌に関わらずほぼ全ての細菌に対し、15分間の接触で200cells/ml未満(定量的測定限界以下)に殺菌し、さらに60分接触後には全細菌を死滅できることを見出した。腸管出血性大腸菌の *Escherichia coli* O-157:H7、レジオネラ菌の *Legionella pneumophila* Sg1 IID 5232、食中毒菌の *Salmonella typhimurium* IFO 3245、MRSA など病原性の高い細菌に対しても非常に強い殺菌活性を示した(表1)。次に混抄紙 izi の殺菌機構解析結果を図5に示す。少し詳しく実験方法を記載する。20ml (10<sup>6</sup>cells/ml) の大腸菌 (*Escherichia coli* K12 W3110) 懸濁液に izi 0.1g の izi を使用した。室内光下において izi と大腸菌懸濁液を15分間振盪接触した後、izi を取り除いた菌液を分取した。この分取菌液を3等分し、無添加菌液、200ppm SOD、200ppm KI を添加したものについて継続して生菌数測定を行った。SOD を添加すると殺菌速度はやや低下し、KI を添加すると殺菌効果は完全に阻害された。すなわち SOD がスーパーオキシドアニオンラジカルを消去し、KI がヒドロキシルラジカルを消去したためと考えられ、殺菌にこれらのラジカルが明らかに関与していることを証明した。加えて SOD 添加の場合には、殺菌効果が持続し、KI 添加において完

全に消滅したことから、主たる殺菌化学種は、スーパーオキシドアニオンラジカルではなくヒドロキシルラジカルであると結論した。また、15分後に izi を取り除いた菌液において、生菌数の顕著な減少が観察され、殺菌効果が持続していることを認めた。さらにラジカル照射を行った大腸菌の ESR 測定結果より、細胞内ヒドロキシルラジカルの存在を確認した。したがって、ヒドロキシルラジカルの高い反応性とその短寿命から考察すると、izi から光触媒作用により生成したヒドロキシルラジカルは、菌体表面への作用、菌体内部へのラジカル転移、連鎖移動型リビングラジカルの生成、細胞内物質のラジカル破壊という継続的かつ特異的な殺菌機構を有していることが判明した。この結果より、izi が水系で非常に強い殺菌活性と広い殺菌スペクトルを有しており、水系殺菌材料あるいは殺菌フィルターとしての有効性を示した。

次に izi の室内環境下(乾燥下)での殺菌活性について繊維製品の抗菌性試験方法・抗菌効果 JIS L 1902:2002 にしたがって殺菌試験を行った。試験方法はメンブランフィルター上に捕集した対数増殖初期の黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus* IFO 12732) 10<sup>6</sup> cells を転写法(Printing method)に従って izi 上に転写し、一定時間室内光下で培養した。SCDLP 液体培地

表1. 室内光下での銀担持アクリル繊維を含む混抄紙(izi)の殺菌活性

細菌	生存菌数 (cells/ml)		
	接触時間 (min)		
	15	30	60
<i>Escherichia coli</i> K12 W3110	<200	<200	<200
<i>Escherichia coli</i> O157:H7 (sakai kabu)	<200	<200	<200
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	<200	<200	<200
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	<200	<200	<200
<i>Legionella pneumophila</i> Sg1 IID 5232	--	--	<200
<i>Salmonella typhimurium</i> IFO 13245	<200	<200	<200
<i>Bacillus subtilis</i> IFO 3134	<200	<200	<200
<i>Bacillus cereus</i> IFO 3001	<200	<200	<200
<i>Bacillus megaterium</i> IFO 3003	<200	<200	<200
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 12708	4×10 <sup>3</sup>	2.8×10 <sup>3</sup>	<200
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732	3.6×10 <sup>4</sup>	3.2×10 <sup>2</sup>	<200
<i>Staphylococcus aureus</i> JC1 (MRSA)	<200	<200	<200

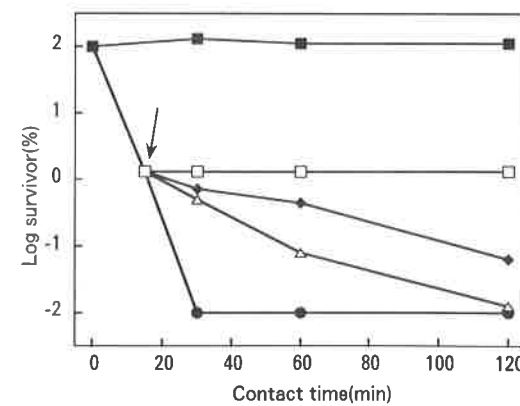


図5. 銀担持アクリル繊維混抄紙(izi)の *Escherichia coli* K12 W3110に対するラジカル殺菌機構  
 ■; 対照, ●; izi 添加, △; 15分後に izi 除去 (矢印), ◆; 15分後に izi 除去, 200ppm SOD 添加 (矢印), □; 15分後に izi 除去, 200ppm KI 添加 (矢印)

を洗い出し液としてストマッカーを用いて izi から菌を洗い出し、生菌数を測定した(図6)。izi 表面上で30分間で99.9%死滅、60分間では99.99%死滅、さらに120分間では検出限界以下にまで殺菌された。この結果より、izi は室内光下では、ほぼ無菌状態が保たれることが判明した。この結果は、izi が医療用不織布(シーツ、枕カバー、手術用クロス、衛生湯上がりマット、その他)として応用できることを示しており、加えて医用分野の製品開発を行った。さらに空気殺菌フィルターに適用するための試験として図7に示す気流殺菌試験装置を開発した。微生物をネブライザーから噴霧するが、試験フィルターまでのパイプ径と長さを調整し、微生物を含む気流が層流となるように設計した。試験フィルターを通過後のサンプルをメンブランフィルターで採取する。試験フィルター通過後の総ての微生物は最終 HEPA フィルター

ターで採取する。二つの流量計の調整により、詳細な実験条件を設定可能とした。また試験フィルター通過流速を0.1~3.0m/秒、最大流量1,200リットル/分であり、大規模な実験を可能とした。加えて気流殺菌試験装置をP2のバイオハザードルーム内に設置したバイオハザード型安全キャビネット内に設置し、安全性の向上を図った。*Staphylococcus aureus* IFO 12732を用いて実験を行った結果(結果は示していない)より izi フィルターを通過した菌および捕集された菌も60分以内に全て死滅した。この結果を基に izi をフィルターとして用いた空気殺菌システムや衛生マスクなどを商品化した。

### 3. 有機系抗菌剤の開発

#### 3-1. モノ型第四アンモニウム塩系抗菌剤の分子設計と作用機構

第四アンモニウム塩は、1935年 Domagk<sup>1,3)</sup>により殺菌活性が発見され、消毒剤として開発された歴史ある薬剤であり、現在においてもなお病院や食品工場で多量に使用されている。1970~1980年頃は新規第四アンモニウム塩の合成研究や応用研究は多数見受けられたが、殺菌機構の解明や分子構造の最適化に関する研究は非常に少なかった。そこで著者はアルキルピリジニウム塩をリード化合物として、定量的構造活性相関の模式図(図8)にしたがって殺菌メカニズムと殺菌特性の解明、最適化パラメーターの選択、さらに、化学合成を通して分子構造の最適化を行った<sup>1,4-2,7)</sup>。ピリジニウム核に電子放出性核置換基

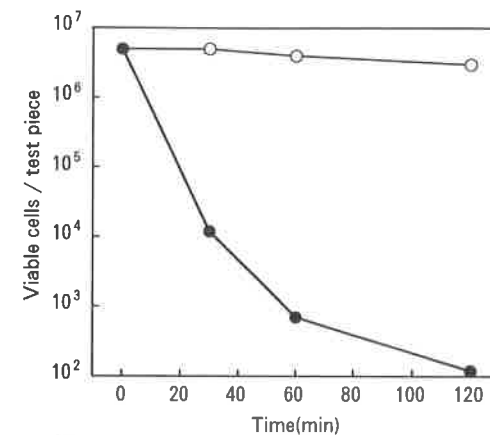


図6. 銀担持アクリル繊維混抄紙(izi)の乾燥下での *Staphylococcus aureus* IFO12732に対する殺菌効果  
 ○; 対照, ●; izi

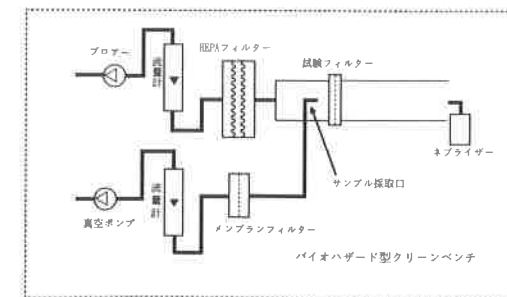


図7. 気流殺菌システムの模式図

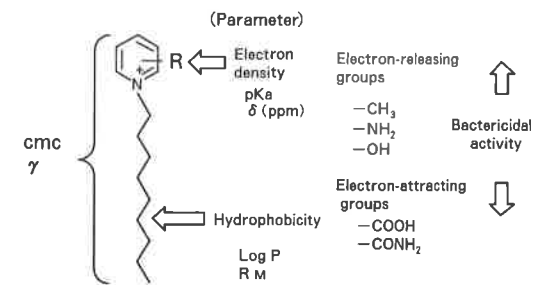


図8. アルキルピリジニウム塩の定量的構造活性相関手法による解析模式図

を導入すると抗菌活性が強化され、酸解離定数 ( $pK_a$ ) やアンモニウム窒素隣接メチレンプロトンおよび  $^{13}C$  のケミカルシフト ( $\delta$ ) に比例することを見出し、殺菌活性にアンモニウム窒素あるいはピリジニウム部位全体の電子密度が関与していることを見出した。さらに薬剤分子の疎水性パラメーター ( $\log P$ ,  $R_M$ ) を用いて最適化を試み、殺菌活性がリード化合物よりも数十倍高いものを得ることに成功した。一方、殺菌/静菌スペクトルに関する薬剤感受性の差異に関する理論的解析報告が全く無いことより、第四アンモニウム塩のような疎水性薬剤の場合には、殺菌および静菌スペクトルは微生物表面の疎水性に依存していると仮定し、研究を進めた。まず、微生物細胞表面の疎水性を精度良く測定し得る方法を開発し、この細胞表面疎水性パラメーター ( $\log HI$ ) を用いて殺菌スペクトルを詳細に解析した。薬剤の疎水性が高いほど細胞表面疎水性に依存することを明らかにし、殺菌スペクトルを細菌細胞表面疎水性から予測することに成功した。しかしながら、理想の最適分子設計には至らず、モノ型第四アンモニウム塩の殺菌活性改善の理論的境界を明らかにした。

### 3-2. モノ型第四アンモニウム塩に対する薬剤耐性化機構

モノ型第四アンモニウム塩であるアルキルピリジニウム塩の緑膿菌に対する耐性化機構について分子生物学的に解析した。外膜蛋白質の OprR が第四アンモニウム塩耐性に重要な役割をしていることを見出し、遺伝子ノックアウト法および再導入法を用いて解明した。また、次項で解説するビス型第四アンモニウム塩はモノ型第四アンモニウム塩よりも薬剤耐性化が非常に起こり難いことも見出した<sup>28,29)</sup>。

### 3-3. ビス型第四アンモニウム塩の分子設計と作用機構<sup>30-38)</sup>

モノ型第四アンモニウム塩の抗菌活性の限界を明らかにし、さらに高い活性を付与するためには、分子内に2個のピリジニウムヘッドを有するビス型薬剤 (図9) とすることが最適であることを見

出した。ビス型第四アンモニウム塩の分子設計の基礎となるリード化合物を4,4'-( $\alpha, \omega$ -ポリメチレンジチオ)ビス(1-アルキルピリジニウムアイオダイド)とした。この化合物は2個のピリジニウムヘッドをチオール結合とポリメチレン鎖を介して結合させた非常に簡単な構造を有する。この薬剤の殺菌特性と静菌特性を図10と図11に示した。横軸に薬剤分子の疎水性パラメーター ( $R_M$ )、縦軸に大腸菌に対する殺菌活性 ( $\log 1/MBC$ ) をプロットした。比較のために使用したモノ型第四アンモニウム塩のアルキルピリジニウムアイオダイドの場合には、殺菌活性が薬剤分子疎水性の二次に比例し、グラフがパラボリック (放物線) を示すが、ビス型薬剤では分子疎水性に依存せず一定の高い殺菌活性を示した。この結果は、モノ

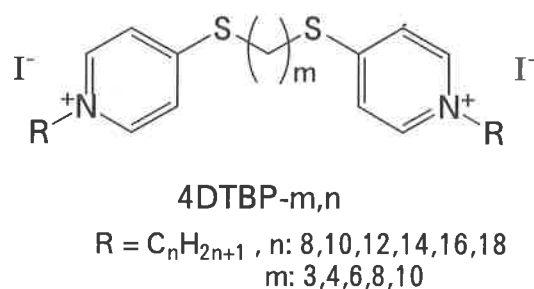


図9. チオエーテル結合で連結されたビス型第四アンモニウム塩系抗菌剤 (4DTBP-m,n) の化学構造

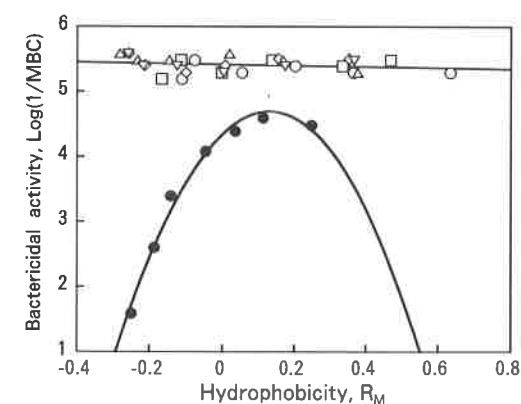


図10. 薬剤分子疎水性 ( $R_M$ ) を用いたビス型第四アンモニウム塩 (4DTBP-m,n) およびモノ型第四アンモニウム塩、アルキルピリジニウムアイオダイド (P-n) の *Escherichia coli* K12 W3110 に対する殺菌特性の解析 ○; 4DTBP-3,n, □; 4DTBP-3,n, ◇; 4DTBP-6,n, △; 4DTBP-8,n, ▽; 4DTBP-10,n, ●; P-n

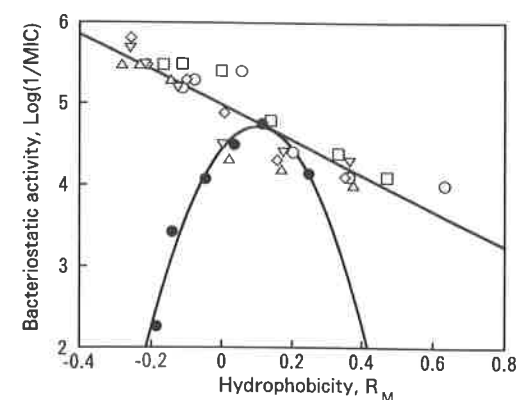


図11. 薬剤分子疎水性 ( $R_M$ ) を用いたビス型第四アンモニウム塩 (4DTBP-m,n) およびモノ型第四アンモニウム塩、アルキルピリジニウムアイオダイド (P-n) の *Escherichia coli* K12 W3110 に対する静菌特性の解析 ○; 4DTBP-3,n, □; 4DTBP-3,n, ◇; 4DTBP-6,n, △; 4DTBP-8,n, ▽; 4DTBP-10,n, ●; P-n

型とビス型では殺菌機構が異なることを強く示唆している。そこで静菌活性 (培地系での増殖抑制効果) をモノ型とビス型を比較した (図11)。モノ型では殺菌活性の場合と同様に疎水性との相関グラフはパラボリックを示したが、ビス型では傾きが大きく変化した直線性を示した。この結果は、親水性薬剤の静菌活性が高く、疎水性の高い薬剤ほど活性が低下することを示唆している。この原因は培地成分のポリペプトンなどの薬剤との会合による有効薬剤濃度の減少であることをペプトン添加法により明らかにした。これらの結果より、ビス型第四アンモニウム塩は微生物細胞の表面疎水性には関係なく高い活性を示すことが明確となった。すなわち種々の表面疎水性を有する多種の細菌に対しても一定の高い活性を示すことが推察された。そこで各種細菌に対する静菌スペクトル測定結果を表2に示す。4DTBP-6,8, 4,4'-( $\alpha, \omega$ -ヘキサメチレンジチオ)ビス(1-オクチルピリジニウムアイオダイド)、塩化ベンザルコニウム (市販品) およびドデシルピリジニウムアイオダイドのMICを比較した。この結果は、予期されたとおりビス型が全ての細菌に対して高いフラットな活性を示し、微生物細胞表面疎水性に依存しないことが裏付けされた。一方、モノ型の塩化ベンザルコニウムやドデシルピリジニウムの静菌活性は微生物の表面疎水性に依存し、様々なMIC

表2. ビス型第四アンモニウム塩、BAC および P-12の細菌に対するMICの比較

細菌	MIC (ppm)		
	4DTBP-6,8 <sup>1)</sup>	BAC <sup>2)</sup>	P-12 <sup>3)</sup>
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27583	5.1	53.7	256
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	2.1	64.0	51.2
<i>Proteus rettgeri</i> NIH 96	2.1	53.7	100
<i>Proteus vulgaris</i> ATCC 13315	1.7	16.4	32.8
<i>Escherichia coli</i> K12 W3110	2.1	21.0	64.0
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	0.7	6.6	16.4
<i>Bacillus cereus</i> IFO 3001	0.8	6.6	12.8
<i>Bacillus megaterium</i> IFO 3003	0.7	6.6	16.4
<i>Micrococcus luteus</i> IFO 12708	0.3	6.7	16.0
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732	0.2	5.4	4.2
<i>Staphylococcus aureus</i> JCI (MRSA)	0.3	13.1	50.0

1) 4,4'-( $\alpha, \omega$ -ヘキサメチレンジチオ)ビス(1-オクチルピリジニウムアイオダイド)  
2) 塩化ベンザルコニウム  
3) ドデシルピリジニウムアイオダイド

表3. ビス型第四アンモニウム塩、BAC および P-12の黴に対するMICの比較

黴	MIC (ppm)		
	4DTBP-6,8 <sup>1)</sup>	P-12 <sup>2)</sup>	TBZ <sup>3)</sup>
<i>Aspergillus terreus</i> IFO 6346	1.4	131	156
<i>Penicillium funiculosum</i> IFO 6345	2.2	15.6	9.7
<i>Chaetomium globosum</i> IFO 6347	2.5	27.5	311
<i>Aureobasidium pullulans</i> IFO 6353	1.8	67.1	38.8
<i>Gliocladium virens</i> IFO 6355	3.3	83.9	156
<i>Rhizopus stolonifer</i> IFO 4781	10.0	256	311

1) 4,4'-( $\alpha, \omega$ -ヘキサメチレンジチオ)ビス(1-オクチルピリジニウムアイオダイド)  
2) ドデシルピリジニウムアイオダイド  
3) チアベンダゾール

を示した。次に真菌でも同様の現象が起こるのか検討すべく黴に対する静菌活性を測定した結果を表3に示す。ビス型第四アンモニウム4DTBP-6,8と共に比較対照にモノ型のドデシルピリジニウムや抗黴剤であるTBZを用いた。モノ型やTBZでは菌種の相違により、様々なMIC値を示したが4DTBP-6,8は菌種に依存せずほぼ一定の活性を示した。これらに結果は、ビス型ピリジニウムが細菌および黴に対しても強力かつ広いフラットな抗菌性を発揮できることが明らかとなった。そこでビス型第四アンモニウム塩の特性をさらに明確するため急性経口毒性を他の薬剤と比較した。4DTBP-6,8が4,500mg/kg (マウス)、塩化ベン

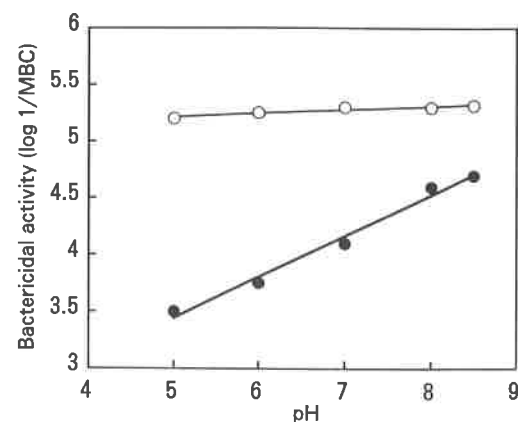


図12. ビス型第四アンモニウム塩 (4DTBP-6,12) とモノ型第四アンモニウム塩 (P-12) の *Escherichia coli* K12 W3110に対する殺菌活性におよぼす環境pHの影響  
●; 4,4'-( $\alpha,\omega$ -ヘキサメチレンジチオ)ビス (1-ドデシルピリジニウムアイオダイド)(4DTBP-6,12), ○; ドデシルピリジニウムアイオダイド (P-12)

ザルコニウムが600mg/kg (ラット), P-12が108 mg/kg (マウス) および TBZ が2,080mg/kg (ラット) である。ビス型第四アンモニウム塩の急性経口毒性が非常に低く、抗菌活性が高い優れた特性である。さらにビス型第四アンモニウム塩分子をさらに親水化するための分子設計、アンモニウムヘッド間の距離の最適化や架橋構造のリジッド性に着目し分子設計を行った結果、架橋構造がフェニレン環およびベンジリデン構造などの回転構造の少ない構造ではメチレン架橋よりもさらに高い抗菌性を示した。また、ピリジン環の架橋結合サイトの検討などにより、水に対する溶解度の改善に加えてさらに高い活性を得ることができるとも明らかにした。次に、ビス型第四アンモニウム塩の一般的な抗菌特性について検討した結果、非常に興味ある結果が得られた。環境の水素イオン濃度の影響をほとんど受けず pH 5~8.5までの広い領域において一定の高い抗菌活性を示すことを見出した (図12)。この結果は、環境の pH 変化は微生物表面の疎水性を変化させることよりモノ型では高い pH 依存性が見受けられる。また、ビス型は 5~40°C の範囲では温度の影響を殆ど受けずに一定の高い殺菌活性を示すことを明らかにした (図13)。ビス型第四アンモニウム塩は温度の低い条件下、寒冷地、冬季および低温下の食

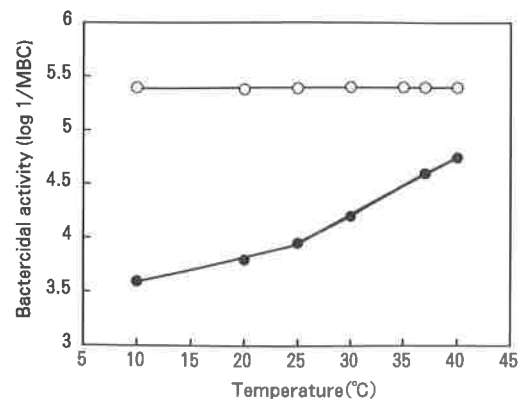


図13. ビス型第四アンモニウム塩 (4DTBP-6,12) とモノ型第四アンモニウム塩 (P-12) の *Escherichia coli* K12 W3110に対する殺菌活性におよぼす環境温度の影響  
●; 4,4'-( $\alpha,\omega$ -ヘキサメチレンジチオ)ビス (1-ドデシルピリジニウムアイオダイド)(4DTBP-6,12), ○; ドデシルピリジニウムアイオダイド (P-12)

品製造装置の殺菌・消毒剤として非常に有効であることを明らかにした。

ビス型第四アンモニウム塩の微生物細胞に対する殺菌メカニズムあるいは殺菌過程について説明する。まず、非常に短時間で細胞表面への静電的な薬剤吸着、Mg の漏洩、OmpE の漏洩、呼吸停止、ATP の漏洩、LPS の漏洩、細胞表面にブレップを形成、ブレップがベシクルに成長して細胞から脱離、細胞表面に孔の形成、この孔から細胞内物質の漏洩へと進行し、完全な死滅に至る<sup>39, 40)</sup>。この過程は SEM (図14) および TEM 観察からも裏付けられた。さらに殺菌反応の律速段階明確にするため殺菌活性化エネルギー測定を行った。モノ型のオクチルピリジニウムアイオダイドでは2つのアーレニウムプロットが得られ、低温領域 (10~30°C) での活性化エネルギーは 99.8kJ/mol, 高温領域 (30~40°C) では40.6kJ/molであった。一方、ビス型第四アンモニウム塩、4DTBP-6,8では10~40°Cの範囲では15.6kJ/molを示し、非常に温度依存性が低く活性化エネルギーが低いことが判明した。この結果は、細胞表面への吸着過程が殺菌反応律速段階であることを強く示唆している。すなわち、モノ型第四アンモニウム塩では表面吸着以降の細胞膜との相互作用が律速段階であるのに対してビス型は非常に

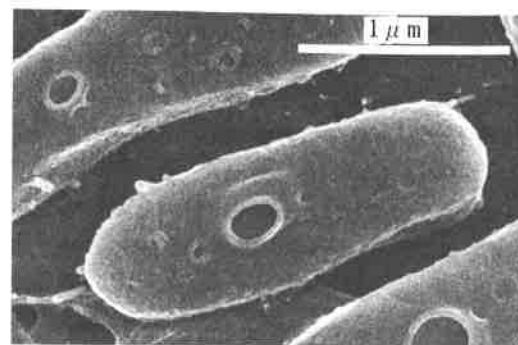


図14. *Escherichia coli* K12 W3110に4,4'-( $\alpha,\omega$ -ヘキサメチレンジチオ)ビス (1-オクチルピリジニウムアイオダイド) (4DTBP-6,8) を0.5ppm 濃度で20秒間作用させた後の走査型電子顕微鏡写真

早い吸着段階で死滅が開始することが明確になった。

### 3-4. ビス型第四アンモニウム塩の細菌芽胞に対する作用機構

モノ型第四アンモニウム塩は細菌芽胞に対してほとんど殺菌作用を示さないが、ビス型第四アンモニウム塩は芽胞表面への薬剤吸着後に起こる物理的な強い細胞破壊作用が殺菌の主要因であることを明らかにした<sup>41)</sup>。細菌芽胞に対する発芽ならびに破壊作用について図15に結果を示す。

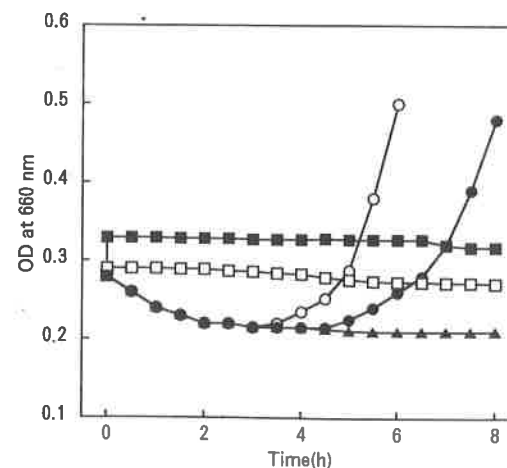


図15. *Bacillus subtilis* ATCC 6633の芽胞に対する、4,4'-( $\alpha,\omega$ -ヘキサメチレンジチオ)ビス (1-オクチルピリジニウムアイオダイド) (4DTBP-6,8) の発芽阻害作用と細胞破壊作用  
○; 対照, ●; 0.2ppm, ▲; 1.0ppm, □; 5.0ppm, ■; 25ppm

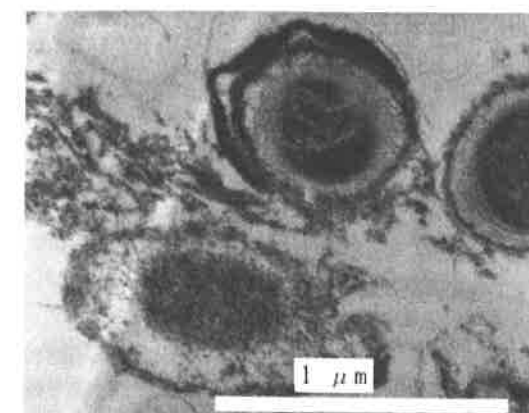
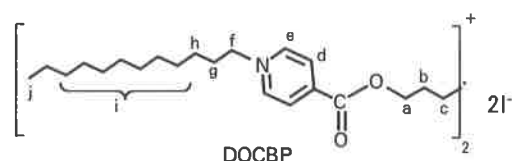


図16. *Bacillus brevis* IFO 1378芽胞に100ppmの4,4'-( $\alpha,\omega$ -ヘキサメチレンジチオ)ビス (1-オクチルピリジニウムアイオダイド) (4DTBP-6,8) を2分間作用させた後のTEM写真

4DTBP-6,8が低濃度 (0.2ppm) の場合には発芽を阻止しないが濃度 (1.0ppm) がやや上昇するとアウトグロースを阻害し始め、さらに濃度 (10, 25ppm) が高くなると瞬間的に濁度が上昇し、芽胞破壊が開始したことが示唆された。そこで *Bacillus brevis* IFO 1378に2分間作用させた後の芽胞をTEMにより観察した (図16)。予期されたごとく芽胞内部まで破壊が進行していることが判明した。これらの結果は、モノ型第四アンモニウム塩では細菌芽胞に殺菌的に作用しないが、ビス型構造とすることにより、芽胞を短時間で殺滅できることが明らかとなった。

### 4. 環境調和型抗菌剤

チオエーテル結合とポリメチレン鎖により架橋されたビス型第四アンモニウム塩は通常環境条件下では、非常に安定であり通常環境条件下では分解しない。殺菌活性が高いだけに使用後の大量廃棄する場合には大きな問題点がある。すなわち、工場や都市下水処理場の活性汚泥を殺滅する可能性や、環境生態系に悪影響をおよぼす可能性がある。そこで高い殺菌活性を保持した状態で環境毒性を低下させる分子設計を試みた。ビス型のチオール架橋構造をエステル結合に変換した薬剤 (DOBP) を開発した (図17)。本薬剤を各種 pH (5~8.5) 0.05M リン酸緩衝液に溶解し、所定時



Found (Calcd.)	
H: 7.42 (7.66)	Ha (3.54, 4H, t), Hb (1.52, 4H, m)
C: 54.55 (54.78)	Hc (1.38, 4H, m), Hd (8.54, 4H, d)
N: 2.93 (3.04)	He (9.25, 4H, d), Hf (4.74, 4H, t)
	Hg (2.07, 4H, m), Hh (1.40, 4H, m)
	Hi (1.28, 32H, m), Hj (0.89, 6H, t)
mp: 165-167 °C	
Acute oral toxicity to mouse	
LD <sub>50</sub> : >5,000mg/Kg	

図17. 加水分解性(エステル結合)を付与したビス型抗菌剤(DOCBP)の化学構造式, NMR, CHN分析, 融点および急性経口毒性

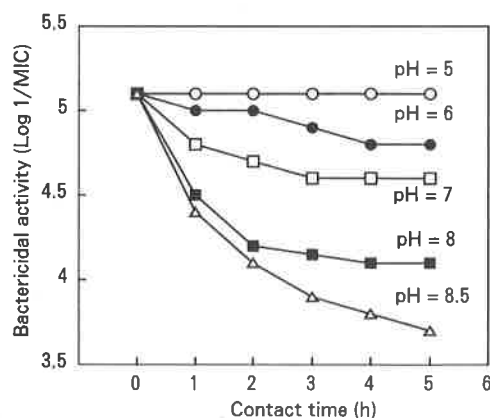


図18. エステル架橋ビス第四アンモニウム塩(DOB)の加水分解と残存殺菌活性

間毎にサンプリングし, 残存殺菌活性を測定した結果を図18に示す。中性領域では安定であるが, 弱アルカリ性領域で速やかに加水分解し, ヘキサメチレングリコールと4-カルボキシピリジニウム塩を生成する。これらの加水分解生成物は殺菌活性が原体の1/50にまで低下し, 活性汚泥により容易に易に生分解を受ける。殺菌剤でありながら加水分解することにより生分解性化合物に変化する優れた性質を持っている。さらに, スペーサーとピリジニウムの結合様式を変換することにより, 加水分解速度調節の可能性を示唆し, 殺菌剤の活性にタイマー機能を付与することも可能となった。以上の結果, ビス型構造とすることにより殺菌活性を著しく高め, これまでの欠点であった共存物質や水素イオンの影響および温度依存性を解決し,

さらに細菌および真菌を含めた殺菌スペクトルを拡大し, 加えて殺菌活性と相反する生分解性をも付与した。

以上の結果を併せて考察すると用水・廃水, 塗料・接着剤, スライムコントロール剤やプラスチック, 皮革, 石油製品および電子材料などの微生物制御剤として多岐にわたって利用可能であると思われる。

## 5. おわりに

21世紀の地球環境を守るために必要な環境調和型殺菌剤と考えられる共有結合を利用した固定化殺菌剤, 無機結晶物質に銀担持した固体殺菌剤および殺菌剤の分子が速やかに化学変化を起こし, 生分解性を示す構造に変化するビス型第四アンモニウム塩に関する研究開発状況を概説した。今後は分解物質および代謝物質についても環境毒性あるいは環境ホルモン性についてさらに検討する必要があると思われる。

## 6. 謝辞

このたび, 日本防菌防霉学会から名誉ある学会賞をいただきましたことは, 著者にとって身に余る光栄なことと感じております。本学会の歴代会長をはじめ多くの役員の方, 歴代事務局長や事務局員の皆様方に深く感謝申し上げます。また, 本研究は故武市一孝徳島大学名誉教授, 芝崎勲大阪大学名誉教授に長年にわたる多大のご指導を賜りましたことに対して心より御礼申し上げます。加えて防菌防霉学会の多くの会員の方々のご指導, ご協力に感謝申し上げます。共同研究ならびにご指導, ご援助を賜った徳島大学および徳島大学の研究機関の諸先生, ご協力を頂いた多くの財団や企業の方々に厚く御礼申し上げます。また, 抗菌剤を製品化して頂いた東亜合成(株), イヌイ(株), 東洋紡績(株), 日本エクスラン工業(株), 阿波製紙(株), 日本フネン(株), アクアス(株)の関係者に皆様に厚く御礼申し上げます。最後に研究に関わって頂いた徳島大学の諸先生, 研究を実施していただいた学生および卒業生諸氏に心より深く御礼申し上げま

す。

## 文 献

- 1) 土戸哲明, 高麗寛紀, 松岡英明, 小泉淳一: 微生物制御-科学と工学, 講談社サイエンティフィック (2002).
- 2) 高麗寛紀, 内堀 毅, 檜山圭一郎, 江川 均著, 光触媒の応用と抗菌ビジネス全容, (株)大阪ケミカルマーケティングセンター (1999).
- 3) 藤島 昭, 橋本和仁, 渡部俊也著, 光触媒のしくみ, 日本実業出版者 (2000).
- 4) 田中浩雄, 市浦英明, 深堀秀史, 井口佑美, 北岡卓也, 機能紙研究会誌, 41, 7-15 (2002).
- 5) 林 幸男, 澤村淳二, 田村愛理, 森澤 純, 佐々木麻矢, 機能紙研究会誌, 41, 33-40 (2002).
- 6) 高麗寛紀, 中河貴世, 山田幸生: 結晶中に銀イオンを担持したリン酸ジルコニウムセラミックスの抗菌特性, 防菌防霉誌, 21, No.2, pp.77-84 (1993).
- 7) Kourai Hiroki, Manabe Yuki, Yamada Yukio: Mode of Bactericidal Action of Zirconium Phosphate Ceramics Containing Silver Ions in the Crystal Structure, *J. Antibact. Antifung. Agents*, Vol.22, No.10, pp.595-601 (1994).
- 8) Hirokazu Miyoshi, Takuya Maeda and Hiroki Kourai: Light-induced Formation of 2,5-Dihydroxy-p-benzoquinone from Hydroquinone in Photoirradiated Silver-loaded Zirconium Phosphate Suspension, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, Vol.94, No.2, 283-287 (1998).
- 9) Hirokazu Miyoshi, Masamitsu Ieyasu, Tomio Yoshino and Hiroki Kourai: Photochemical property and surface characterization of silver-loaded zirconium phosphate, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.* 112, No.2-3, 239-244 (1998).
- 10) Miyoshi Hirokazu, Kourai Hiroki, Maeda Takuya, Tomio Yoshino: Role of Cl<sup>-</sup> adsorbed on silver-loaded zirconium phosphate for the photooxidation of OH<sup>-</sup> to OH<sup>•</sup> zirconium phosphate suspension, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 113, No.3, 243-250 (1998).
- 11) Miyoshi Hirokazu, Tanabe Asaka, Maeda Takuya, Kourai Hiroki: Visible Light-Induced Bactericidal Species Generated From Silver-Loaded Hydrogen Zirconium Phosphate Active Against *Escherichia coli* K12, *Biocontrol Science*, Vol.6, No.2, pp.69-74 (2001).
- 12) 白井昭博, 佐久間貴子, 青木美保, 三好弘一, 前田拓也, 高麗寛紀: 銀担持アクリル繊維を含む抗菌紙の殺菌作用機構, 防菌防霉誌, 31, No.4, pp.173-181 (2003).
- 13) Domagk, G.: Eine neue klasse von Desinfektionsmitteln (in German). *Deutsch. Med. Wochenschr.*, Vol.24, 829-832 (1935).
- 14) Hiroki Kourai, Fusaichi Machikawa, Tokunaru Horie, Kazutaka Takeichi and Isao Shibasaki: The Antimicrobial Characteristics of Quaternary Ammonium Salts Part VII, Quantitative Relation between Antimicrobial Activity and Absorbability of N-Octylpyridinium Iodide on *Escherichia coli* K12, *J. Antibact. Antifung. Agents*, Vol.11, No.2, pp.51-54 (1983).
- 15) Hiroki Kourai, Fusaichi Machikawa, Kyoko Tateishi, Tokunaru Horie, Kazutaka Takeichi and Isao Shibasaki: The antimicrobial Characteristics of Quaternary Ammonium Salts Part IX, Quantitative Structure-Activity Correlation Antimicrobial Activity and Hydrophobicity of N-Alkylpyridinium Iodide Derivatives, *J. Antibact. Antifung. Agents*, Vol.11, No.10, pp.553-562 (1983).
- 16) Hiroki Kourai, Hironori Takechi, Tokunaru Horie, Nobuichi Uchiwa, Kazutaka Takeichi and Isao Shibasaki, The Antimicrobial Characteristics of Quaternary Ammonium Salts Part X, Antimicrobial Characteristics and a Mode of Action of N-Alkylpyridinium Iodides against *Escherichia coli* K12, *J. Antibact. Antifung. Agents*, Vol.13, No.1, pp.3-10 (1985).
- 17) Hiroki Kourai, Hironori Takechi, Tokunaru Horie, Kazutaka Takeichi and Isao Shibasaki, The Antimicrobial Characteristics of Quaternary Ammonium Salts Part XI Quantitative structure-activity Relation of

- antimicrobial N-Laurylpyridinium Iodides, *J. Antibact. Antifung. Agents*, Vol.13, No.6, pp.245–253 (1985).
- 18) Hiroki Kourai, Hironori Takechi, Masayoshi Kume, Kazutaka Takeichi and Isao Shibasaki: The Antimicrobial Characteristics of Quaternary Ammonium Salts Part XII Antimicrobial Characteristics of N,N'-Dialkyl- $\gamma, \gamma'$ -dipyridinium Diiodides, *J. Antibact. Antifung. Agents*, Vol.14, No.2, pp.55–63 (1986).
- 19) Hiroki KOURAI, Hironori TAKECHI, Kaori MURAMATSU and Isao SHIBASAKI : The Antimicrobial Characteristics of Quaternary Ammonium Salts Parts XIV, *J. Antibact. Antifung. Agents*, Vol.17, No.3, pp.119–128 (1989).
- 20) Kourai Hiroki, Hasegawa Yuichi, Goto Seiko, Nakagawa Kiyo: Bacteriostatic Action of Dodecylpyridinium Iodide against *Escherichia coli* K12 W3110, *J. Antibact. Antifung. Agents*, Vol.22, No.8, pp.461–468 (1994).
- 21) Kourai Hiroki, Hasegawa Yuichi, Wada Kaori : Bactericidal Characteristics of N-Alkyl-4-butenylpyridinium Bromide, *J. Antibact. Antifung. Agents*, Vol.22, No.11, pp.653–661 (1994).
- 22) Kourai Hiroki, Oda Kazumi, Takechi Hironori, Nakagawa Kiyo : The Antimicrobial Characteristics of Poly[dimethyliminio(polymethylene)chloride]s, *J. Antibact. Antifung. Agents*, Vol.22, No.9, pp.519–530 (1994).
- 23) Kourai Hiroki, Manabe Yuki, Matsutani Emiko, Hasegawa Yuichi, Nakagawa Kiyo: Antimicrobial Activities of Alkylallyl-dimethyl ammonium Iodides and Alkylallyl-diethylammonium Iodides, *J. Antibact. Antifung. Agents*, Vol.23, No.5, pp. 271–280 (1995).
- 24) Maeda Takuya, Goto Seiko, Manabe Yuki, Okazaki Kiyo, Nagamune Hideaki, Kourai Hiroki : Bactericidal Action of N-Alkylcyanopyridinium Bromides against *Escherichia coli* K12 W3110, *Biocontrol Science*, Vol.1, No.1, pp.41–49 (1996).
- 25) Okazaki Kiyo, Manabe Yuki, Maeda Takuya, Nagamune Hideaki, Kourai Hiroki : Quantitative Structure-Activity Relationship of Antibacterial Dodecylpyridinium Iodide Derivatives, *Biocontrol Science*, Vol.1, No.1, pp.51–59 (1996).
- 26) Okazaki Kiyo, Maeda Takuya, Nagamune Hideaki, Kourai Hiroki : Synthesis and Antimicrobial Characteristics of N-Alkyl-4-Allylthiopyridinium Bromides, *Biocontrol Science*, Vol.2, No.1, pp.39–42 (1997).
- 27) Okazaki Kiyo, Maeda Takuya, Nagamune Hideaki, Kourai Hiroki : Antibacterial Characteristics of N-Alkyl-2-alkylthiopyridinium and N-Alkyl-4-alkylthiopyridinium Salts, *Japanese Journal of Toxicology and Environmental Health*, Vol.43, No.5, pp.251–260 (1997).
- 28) Tabata Atsushi, Maeda Takuya, Nagamune Hideaki, Kourai Hiroki : Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Resistant to a Quaternary Ammonium Compound, *Biocontrol Science*, Vol.7, No.3, pp.147–153 (2002).
- 29) Tabata Atsushi, Hideki Nagamune, Takuya Maeda, Keiji Murakami, Yoichiro Miyake and Hiroki Kourai : Correlation between resistance of *Pseudomonas aeruginosa* to quaternary ammonium compounds and expression of outer membrane protein OprR, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol.47, No.7, pp.2093–2099 (2003).
- 30) Okazaki Kiyo, Maeda Takuya, Nagamune Hideaki, Manabe Yuki, Kourai Hiroki : Synthesis and Antimicrobial Characteristics of 4,4'-( $\alpha, \omega$ -Polymethylenedithio)bis(1-alkylpyridinium iodide)s, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, Vol.45, No.12, pp.1970–1974 (1997).
- 31) Maeda Takuya, Okazaki Kiyo, Nagamune Hideaki, Manabe Yuki, Kourai Hiroki : Bactericidal Action of 4,4'-( $\alpha, \omega$ -Polymethylenedithio)bis(1-alkylpyridinium iodide)s, *Biological Pharmaceutical Bulletin*, Vol.21, No.10, pp.1057–1061 (1998).

- 32) Maeda Takuya, Manabe Yuki, Yamamoto Masashi, Yoshida Munehiro, Okazaki Kiyo, Nagamune Hideaki, Kourai Hiroki : Synthesis and Antimicrobial Characteristics of Novel Biocides, 4,4'-(1,6-Hexamethylenedioxydicarbonyl)bis(1-alkylpyridinium iodide)s, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, Vol.47, No.7, pp.1020–1023 (1999).
- 33) Maeda Takuya, Yoshida Munehiro, Manabe Yuki, Okazaki Kiyo, Nagamune Hideaki, Kourai Hiroki : Synthesis and Antimicrobial Characteristics of 5,5'-[2,2'-(Tetramethylenedicarbonyldioxy) diethyl] bis (3-alkyl-4-methylthiazolium iodide)s, *Biocontrol Science*, Vol.4, No.2, pp.75–81 (1999).
- 34) Nagamune Hideaki, Maeda Takuya, Ohkura Kazuto, Yamamoto, Keiko, Kourai Hiroki : Evaluation of the Cytotoxic Effects of Bis-quaternary Ammonium Antimicrobial Reagents on Human Cells, *Toxicology in Vitro*, Vol.14, No.2, pp.139–147 (2000).
- 35) Yoshida Munehiro, Maeda Takuya, Okazaki Kiyo, Nagamune Hideaki, Kunikata Kensei, Tsuchiya Hiroshi, Nanba Tetsuto, Kourai Hiroki : Synthesis and Antimicrobial Characteristics of N,N'-Hexamethylenebis(4-carbamoyl-1-decylpyridinium bromide), *Biocontrol Science*, Vol.5, No.2, pp.65–71 (2000).
- 36) Shirai Akihiro, Maeda Takuya, Ito Masayo, Kawano Genji, Kourai Hiroki : Control of *Legionella* Species and Host Amoeba by Bis-quaternary Ammonium Compounds, *Biocontrol Science*, Vol.5, No.2, pp. 97–102 (2000).
- 37) Yoshida Munehiro, Maeda Takuya, Okazaki Kiyo, Nagamune Hideaki, Kunikata Kensei, Tsuchiya Hiroshi, Nanba Tetsuto, Kourai Hiroki : Synthesis of 4,4'-(Tetramethylenedicarbonyldiamino) bis (1-decylpyridinium bromide) and Its Antimicrobial and Deodorant Characteristics, *Biocontrol Science*, Vol.6, No.2, pp.75–80 (2001).
- 38) Shirai Akihiro, Maeda Takuya, Hara Ichiro, Nagamune Hideaki and Kourai Hiroki : Synthesis and Antimicrobial Characteristics of 4,4',4''-(1,2,3-Propylenetriethio)tris(1-alkylpyridinium iodide)s, *Biocontrol Science*, Vol.7, No.2, pp.55–61 (2002).
- 39) Tomoko Sumitomo, Takuya Maeda, Hideki Nagamune and Hiroki Kourai : Kinetic Analysis of the Bactericidal Action of a Bis-quaternary Ammonium Compound against *Escherichia coli*, *Biocontrol Science*, Vol.8, No.4, pp.145–149 (2003).
- 40) Tomoko Sumitomo, Takuya Maeda, Hideki Nagamune and Hiroki Kourai : Bacteriostatic Action of a Bis-quaternary Ammonium Compound against *Escherichia coli*, *Biocontrol Science*, Vol.9, No.1,2, pp.1–8 (2004).
- 41) Daxin Zhang, Takuya Maeda, Hideki Nagamune and Hiroki Kourai : Bactericidal Action of a Bis-quaternary Ammonium Compound against Vegetative Cells and Spores of *Bacillus subtilis*, *Biocontrol Science*, Vol.8, No.3, pp.101–110 (2003).