してのち、5枚以上のペーパーを用い同一条件で展開し、そのうち一枚をとり、まず呈色を行い patulin の呈色部位を調べ、これを基礎にして他の展開ペーパーの該当部位を切りとる。切片紙をエーテルで充分溶出し、エーテル留去ののち、一定量の水を加えた patulin 溶液を調製し、上記方法で呈色して patulin 標準液の検量曲線より定量する。本操作による patulin の回収率は約 80% であるが一定にすることは困難である。

カップ法による patulin の微量定量 肉汁 5 g, ペプトン 10 g, 食塩 1 g, 寒天 15~20 g を水 1000 cc に溶解し、120°, 20 分間滅菌する。滅菌ののちの pH 6.5~6.6. この培地をペトリ皿に 20 cc ずつ分注する。あらかじめ寒天斜面からブイオンに植え 37° に 24 時間培養した *Staphylococcus aureus* 209 P を接種菌液とし、接種菌液 2 cc を 48° に保つた上記寒天培地 100 cc に加え、よく混和させる。その 4 cc をあらかじめ水平に置かれた上記ペトリ皿の上に流し一様に拡げる。この二重層の寒天培地の上に 4 個のカップ（ステンレススチール製）を立て、検液ごとにペトリ皿 5 枚を用い、各カップに検液、標準液を 0.1 cc ずつ入れ、37° で 24 時間培養する。円筒周囲の発育阻止円の直径をノギスで 0.5 mm まで正確に測つて検量曲線を作る。

神戸市衛生研究所

U. D. C. 615.779.932:582.282.123

334. 山本丈夫：麦芽根飼料より分離せる有害物質産生糸状菌の研究（第7報）

Penicillium urticae BAINIER の培養時 patulin の消長

Takeo Yamamoto : Studies on the Poison-producing Mold isolated from Dry Malt. VII.
Variation of Patulin during Culture of *Penicillium urticae* BAINIER.

(Kobe Municipal Hygienic Laboratory)

Various conditions affecting the amount of patulin during the culture of *Penicillium urticae* BAINIER were examined. The amount of patulin produced increases with proliferation of the fungus but pH of the medium tends to alkaline side when the consumption of sugar source in the medium depletes beyond 1/4 of the original, and patulin produced in the medium was found to be decomposed. If sugar source is added during the rise of pH, such change of pH in the medium can be prevented and there will be no decrease of patulin. A large amount of ammonia was detected from the medium with increased pH and, considering the fact that patulin is easily decomposed in alkaline reaction and becomes detoxicated, one of the cause of decomposition of patulin in the medium may be taken as a simple chemical reaction of patulin with free ammonia.

(Received September 14, 1956)

Penicillium urticae BAINIER の培養時に patulin の産生量に消長があることは、培養日数が経過し、培地 pH がアルカリ性に移行すると毒力が消滅したり ことから容易に予測される。本研究においてはサブロー培地について *Pen. urticae* の培養時 patulin の消長と関係を持つ諸条件をしらべた。

まず基礎培養過程において日を追うて、糖量の変化、培地 pH の変化、菌の増殖及び産生 patulin 量を測定した。これらの成績と patulin の消長とを比較検討し、更に関連性のあると思われる諸条件について追及した。

実験方法 供試菌株：既報²⁾ の分離菌 *Pen. urticae* を 20% ショ糖加ツアベック寒天培地に植えつぎ、冷蔵庫に保存したものより一白金耳量の分生胞子を取り、あらかじめ用意したバレイショ培地に移植し、22~25° に約 7 日培養した新鮮なる分子胞子を供試する。なおバレイショ培地はバレイショを約 1 cm 四角に切り、試験管の底部より 1 cm の上に支えて挿入し、120°, 10 分滅菌した培地である。

培養：供試菌株の分生胞子を培養液（ブドウ糖 4%, ペプトン 1%）200 cc を入れた内容 300 cc の培養フラスコに一白金耳量ずつ接種し、24~26° 培養を行つた。糖の補給は 80°, 30 分ずつ 3 回滅菌した 60% のブドウ糖溶液で行つた。pH の補正にはザイツワ過器で濾して無菌的とした 0.1 N HCl を使用した。

1) 第5報；山本：本誌 76, 1419(1956).

2) 山本：本誌 74, 797(1954).

糖の定量：Fig. 1 のブドウ糖の定量はベルトラン法³⁾によつたが、Fig. 2, 3 の糖の定量は迅速に行うため、Folin-Wu 氏法⁴⁾により、光電管比色計で測定した。

pH の測定：島津 GU 型硝子電極 pH 測定器を使用した。

アンモニア性窒素の定量：水道協会飲料水、汚水試験法⁵⁾に準じた。検液にマグネシア乳液を加えて蒸留し、留液を硼酸溶液にとり、これにメチルオレンジ溶液を指示薬として 0.1 N H₂SO₄ で滴定し、常法により算出した。

発育量の測定：全培養物をガラス濾過器で濾過し、水洗して得た菌蓋を 80° で 24 時間乾燥し、デシケータ中で恒量に達するまで乾燥し秤量した。

培地中の patulin の定量：Fig. 2, 3 の patulin の定量は培養液をザイツ濾過器で濾し、その 0.1 cc をとり前報に述べたカップ法による微量定量法を応用した。

培地のマウスに対する毒力測定：Fig. 1 の毒性試験は次の如く行つた。培養液をザイツ濾過器で濾し、その 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 cc を体重 12~15 g のマウス 1 群 3 匹にそれぞれ腹腔内注射して 72 時間以内の斃死状況により判定した。

patulin の発育阻害作用の測定：径 3 分の試験管に培地 2 cc ずつを注入し、これに patulin を添加して所要濃度となし、次いで供試菌株の分生孢子を一白金耳量ずつ接種し、24~26° で培養し 3 日、7 日目に発育状況を観察した。

実験結果

I. サブロー液体培地での patulin の消長 *Pen. urticae* の分生孢子をサブロー液体培地に接種し、25° で培養しつつ、その間の糖量の変化、培地の pH の変化、菌の増殖、patulin 量（マウスに対する毒性として）を 2 日ずつの間隔で測定し、Fig. 1 の如き成績を得た。

Fig. 1.

サブロー液体培養時における糖量の変化、pH の変化、菌の増殖、及び毒性との関係

糖源の消費が初濃度の約 50% に及ぶまで、培地の pH はかなり急速に酸性に移行して、この間に菌量も急激に増加しつつある。この間においては patulin の産生量は菌の増殖に比例し、増殖の極大点と patulin の最大蓄積時期はほぼ一致する。

更に糖源の消費が進行するに従つて、培地の pH は徐々に中性に移行し、菌の発育は弱くなる。糖源の消費が初濃度の 3/4 以上に達すると培地の pH は中性となり、菌の発育は低下する。

II. 糖源の補給及び培地 pH の修正が patulin の消長に及ぼす影響 I の成績から patulin の消長は培地の糖源量と pH に関連が深いことが示された。従つて考察の項で詳述するように、糖源の追加補給を行いつつ *Pen. urticae* を培養すれば patulin の分解はふせげると考えた。実際に試みたこれら一連の実験成績を Fig. 2 に示す。

対照培地である Fig. 2 I の (A) 実線に示されるものの糖量が 50% 消費された時期に菌の発育は極大 (IIIA) に近づき、このとき patulin の蓄積量も上昇期 (IVA) の状態で恐らく菌の活性度が最大に近いと思われる。またこの時期における培地の pH は約 4 (IIA) で、この時期を境として pH 値は急に上昇する。このときブドウ糖を加えて培養初期の糖量と同値の 4% に近づけるように補正した。

糖量補正以後の培養成績は Fig. 2 のうち I~IV の (B) 鎖線に示される。対照 (A) に比して培地 pH は酸性を維持し (IIB)、菌量は更に増すが (IIIB)、培地の patulin の蓄積量は 3 mg/cc と同じ値を保つ (IVB)。その後

3) 大岡：“食品分析一般試験法”（南山堂）42(1949)。

4) 斎藤：“光電比色計による臨床化学検査”（南山堂）第 5 版 144(1954)。

5) 水道協会：“飲料水の判定標準とその試験法” 48(1955)。

培養を継続して観察すると再び対照 (A) と同傾向を示すようになる。そこで菌の活性度が著しく低下してきたときに、即ち培地の糖源の消費がすすみ、培地 pH がアルカリ側に移行し、菌の発育も停頓し、patulin の蓄積量も減少し始めたときに再び糖源を補給し糖量を約 4% に補正した。その後の培養成績は Fig. 2 のうち I~IV の

Fig. 2.

サブロー液体培養時における糖源の補給及び pH の修正が patulin の消長に及ぼす影響

Fig. 3.

サブロー液体培養時の糖源を恒量に維持させた場合の pH, 菌の増殖, NH₃-N 及び patulin の消長に及ぼす影響

(C) 線に示した如くである。即ち菌の発育は復活し、patulin は再び生産されるが、その最大蓄積量はこの場合も 3 mg/cc である。なお考察の項で詳しく述べるように、pH 値の上昇と patulin の消滅とが直接の関係にあることを確かめるために、培地 pH が酸性期を経て中性に移り、patulin 量も減少しつつあるとき、3 日目毎に塩酸で培地の pH を約 4 に修正しつつ観察をつづけた。修正後の培養成績は Fig. 2 のうち I~IV の (D) 線に示した。即ちこの場合 patulin の減少は防止しえていたが、力源の補給は行われていないので、培地中の patulin の増量はみられない。

III. 培養日数の増加にともなう遊離アンモニアの増加 実験 I, II の成績から考察を加え、その結果から糖源消費にともなう pH 値が上昇するのは、糖源欠乏時においてはアミノ酸が力源として代謝され、そのためアンモニアが放出されることに原因があると考えた。そこで培地中のアンモニア性窒素量の培養中における変化をしらべた。その成績は Fig. 3 に示した如く、糖源量を一定に保ち、pH が酸性を持続し、発育が徐々に上昇しているときは、アンモニア性窒素は蓄積されず、またこの際 patulin は最大蓄積量 3 mg/cc を維持する。

Fig. 3 (I) の点線は培養中の糖源の消費の状況を示しているが、糖源の消費にともなう pH の上昇は (II) の点線で、その際のアンモニア性窒素の上昇は (IV) の点線で示した。即ちこの 3 つの図を対照すれば、糖源の約 3/4 が消費された培養 13 日目頃から pH の上昇は著明でまたこの項を境として培地中のアンモニア性窒素も急激に増すことがわかる。

アンモニア性窒素の増加と pH 値の上昇並びに patulin の分解が直接的な関連にあることは、Fig. 3 のうち (II), (IV), (V) の点線で示された曲線を対照すればよくわかり、また菌体の実際の秤量値は、培養日数 15 日目より、やや低下の傾向すらみられる (III)。

Fig. 3 のうち I~V 中の実線は培養 4 日目より 2 日目に 1 回ずつ糖量を補正し、3~4 g/100 cc (medium) に保つたときの曲線であり、pH の上昇はふせがれ、アンモニア性窒素の増加はみられず patulin も分解されないことがわかる。なおアンモニア性窒素は培養当初は 50 ppm 程度であるが、培養 26 日後には 413 ppm に上昇する (IV 点線)。然し培養中に糖を補給しつつあったものにあつては (IV 実線)、29 日培養後においてもアンモニア性窒素は 61 ppm で、その増加は僅少である。

IV. Patulin の *Penicillium urticae* BAINIER に対する発育抑制作用 上述の I~III の培養成績の何れの場合も、その培地中に最大約 3 mg/cc の patulin を蓄積するのみであつたので、patulin の *Pen. urticae* に対する発育抑制作用を調べた。その成績は Table I に示す如くで、patulin 量 3 mg/cc~4 mg/cc を境として菌の発育は抑制される。この値は培地中の patulin の最大蓄積量にはほぼ等しい。この点興味がある。

Table I. Patulin の *Penicillium urticae* BAINIER に対する発育抑制試験

成績	培養日数	対照	0.5 mg/cc	1 mg/cc	2 mg/cc	3 mg/cc	4 mg/cc	5 mg/cc	6 mg/cc
供試培地									
ツアベック液体培地	3	++	++	+	±	—	—	—	—
	7	++	++	+	±	±	—	—	—
サブロー液体培地	3	++	++	++	±	—	—	—	—
	7	++	++	++	+	±	—	—	—

備考: (++) 全面に発育する。(+) 発育する。(±) 僅かに発芽を認める。

総括並びに考察 実験結果 I より patulin は菌の発育過程に培地中に代謝産生されるが、ついで菌の発育が停止すると patulin は分解され始め、patulin が急激に減少する頃は培地の pH は中性またはアルカリ性であることを知った。即ち patulin の消長は培地の糖源量と pH に関連が深いことが示された。従つて糖源の追加補給を行いつつ *Pen. urticae* を培養すれば patulin の分解はふせげると考えたので実験 II を試みた。

培地中に糖量が半量以上残存する場合は、培地は酸性で patulin も安定であり、かつ増量されつつあるが、糖量が 3/4 以上消費されると例外なく pH の上昇を来し、時間の経過と共に patulin は消滅する。この pH 値の上昇と patulin の消滅とが直接の関係にあることを確かめるために、培地 pH が酸性期を経て中性に移り、patulin 量も減少しつつあるとき、塩酸で培地 pH を約 4 に保持しつつ置くと、patulin の減少は防止しえたが力源の糖の補給を行わないので patulin の増量はみられない。以上の事柄から培地中の糖源量と patulin の生成、分解とは関連性があり、かつ patulin の分解は培地の pH と直接の関係があることを認めた。著者は糖源消費にともなう pH 値が上昇するのは、糖源欠乏時においてはアミノ酸が力源として代謝され、そのためアンモニアが放出されることに原因があると考えた。実験 III より、培地中に糖源を常に恒量に補給しつつ置くとアンモニアの増加はみられない。従つて pH 値は酸性に保たれ、patulin は最大蓄積量である 3 mg/cc を維持する。糖源を追加補給しない培地はすべて pH 値が酸性期を経て中性、アルカリ性に移行し、遊離アンモニアの蓄積量が增大して来る。この状態の培地中には patulin の存在はみとめられず、さきりに報告したように、patulin の水溶液にアンモニア水を加えて得た patulin の分解物と同一物質を分離確認することが出来た。これらの事実から培地中における patulin の分解は単なる化学的反應で説明し得るものと考えられる。

結 論 *Penicillium urticae* BAINIER の培養時における patulin の消長に関連性のある諸条件について調べた結果、菌の増殖にともなう patulin の産生量も増すが、培地中の糖源の消費が 3/4 以上に及ぶ頃から培地中の pH が速かにアルカリ側に傾きつつ、一度産生された patulin も分解されることを知った。またこの pH 上

昇期に培地中に糖源を添加すれば, 培地の pH 値の上昇はふせがれ, patulin の減少もみない. なお pH の上昇した培地から多量の遊離アンモニアを検出したが, 一方 patulin とアルカリの反応で patulin が容易に分解され, 無毒化する事実を考え合えると, 培地中の patulin の分解の一面は遊離アンモニアとの単なる化学的反應で, 説明し得るものと考ええる.

終りに臨み終始御指導を賜わった京都大学薬学科鈴木友二教授に深謝します.

神戸市衛生研究所

U. D. C. 547.659.6

335. 岩井一成, 大木英二, 神崎敬治: セスキテルペノイドの研究 (第7報*)

Desoxytetrahydrosantonin の誘導体

Issei Iwai, Eiji Ohki, and Keiji Kanzaki: Studies on Sesquiterpenoids. VII.
Derivatives of Desoxytetrahydrosantonin.

(Pharmaceutical Institute, Medical Faculty, University of Kyushu**)

The diol compound (VI), m.p. 152~153°, obtained by the reduction of desoxytetrahydrosantonin with lithium aluminium hydride, was oxidized through its monobenzoate (VII) to a ketol compound (IX), in which the ketone group is in C₅. Reduction of (IX) with either sodium and propanol or with sodium borohydride gave the same diol compound (XI), m.p. 99~100°, which is an isomer of (VI).

A keto acid (XV) was prepared from tetrahydroalantolactone (XIV) and the reduction of unsaturated lactone (XVI) derived from (XV) with sodium amalgam afforded an isomer of (XIV). On the other hand, catalytic reduction of (XV) or its reduction with sodium borohydride followed by cyclization reverted the keto acid to the original tetrahydroalantolactone.

(Received September 26, 1956)

著者等は第3報 Alantolacton の誘導体と, Santonin の還元物より誘導せられる各種化合物を比較検討し両者の間にはなほだしい差異のある事を指摘した.

最近田原²⁾は Tetrahydrosantonin (II) より得られる Diketo 酸 (III) の還元について考究し, 更に Keto-lacton (II) を還元して種々の論議を行つている.

著者等は C₃ 位の >C=O 基は C₅ 位に少なからざる影響を与える事を考慮³⁾し, Desoxytetrahydrosantonin の C₅ 位の >C=O の還元について検討した結果二, 三の知見を得た.

Santonin を酢酸中 Pd 炭にて接触還元して得られる α-Tetrahydrosantonin (II) を第3報¹⁾では Clemmensen 法により Desoxytetrahydrosantonin (IV) に誘導したが, 反応条件が苛酷に過ぎ, 反応中に配位に変化の起る事を考慮して今回はエチレンチオグリコールで, チオケタール (V) となし Raney Ni 触媒にて脱硫, Desoxy 体に誘導したが, 本品は前報の Clemmensen 法にて得た Desoxy 体 (IV) と同一なる事を確認した. (IV) は酸に対して安定な化合物なる事を知つた.

著者等は更に第5報³⁾に準じ Desoxytetrahydrosantonin (IV) を LiAlH₄ で還元 Diol 体 (VI) となし, 本品を p-ニトロベンゾイルクロリドと処理, 第一級アルコールのみをエステル (VII) として保護後, 酢酸中クロム酸酸化を行い, C₅-Ketobenzoat (VIII) に導き, 更に (VIII) を鹼化して Kp. 135~138° の油状物 Ketol (IX) を得た. 本品をクロム酸にて酸化すれば Keto 酸 (X) を与えるが, これは Desoxytetrahydrosantonin より, クロム酸ピリジン酸化で得られる Keto 酸¹⁾と一致した.

田原の報告²⁾によれば C₅ 位の >C=O 基はケトン誘導体を与えず, 且つ接触還元抵抗する故, かなりの立

* 第6報: 本誌 75, 1043(1955).

** Katakasu, Fukuoka.

1) 本誌 74, 1206(1954).

2) A. Tahara: J. Org. Chem. 21, 442(1956).

3) 本誌 75, 689(1955).