成績を Table III に示すと、これらのノニル誘導体は比較的グラム陽性菌に有効で、グラム陰性菌にはコレラ菌を除き無効である。唯し第4報にも述べた如くノニルピラゾールは淋菌には10万倍であつた。4位に陰性原子団のニトロ基及びハロゲン原子が導入されると抗菌力は広範となり、逆にアミノ基が置換されるとグラム陽性菌に対する薬効は減ずる代りにグラム陰性菌に或る程度効果を發揮してくることを示している。

以上述べた如くノニルピラゾールを中心としたピラゾール系置換体はその有する抗真菌性は広範なスペクトルを有し、強力な作用を示している点から推定して、今後本系統の誘導体より新しい抗真菌剤の出現が期待し得ると考える。

本研究に終始御指導、御鞭撻を賜つた東大医学部島蘭順雄教授、伊藤四十二教授並びに各種菌株を御分与賜つた秋葉朝一郎教授及び順天堂大学医学部高橋吉定教授に対し謹んで感謝の意を表し、更に本研究の試料を合成下された金沢大薬学部小菅卓夫氏に御礼する。また本研究実施に当たり御鞭撻頂いた日本曹達株式会社大和田悌二社長、大我勝躬取締役並びに日比野工場長に厚く感謝する。

実 験 の 部

抗 菌 試 験 試験方法の要は第2報²⁾に記載の方法に準拠した。*Tr. purpureum*, *Tr. interdigitale*, *Tr. asteroides* 及び *Achorion gypseum* などの真菌の培養は Sabouraud's glucose 液体培地に 23° で行い薬剤阻止濃度の判定は培養7日目の成績を以つてした。*Staph. aureus* その他の細菌の培養はブイヨンで行い、37°, 24時間培養後の最小阻止濃度を以つてその効力を判定した。結核菌はキルヒナー血清加培地に 37°, 5日間培養後の成績を以つて効力を判定した。

東京大学医学部生化学教室
日本曹達株式会社高岡工場研究部

U.D.C. 547.913 : 582.998 *Artemisia*: 615.778

98. 今井統雄, 池田信一, 田中喜一郎, 菅原眞一: カワラヨモギの精油に関する研究 (第1報*) 精油の抗カビ性 その1

Kaneo Imai, Nobukazu Ikeda, Kiichiro Tanaka, and Sin-ichi Sugawara :

Studies on the Essential Oil of *Artemisia capillaris* Thunb. I.

Antifungal Activity of the Essential Oil. (1).

(Takamine Research Laboratory, Sankyo Co., Ltd.**)

Essential oil of *Artemisia capillaris* Thunb. was found to have a specific and powerful growth inhibition and antifungal activity to pathogenic dermatophytes. Examination of the effect of metals, pH, and temperature on its antifungal potency revealed that the potency is reduced by long treatment at higher (over 100°) temperature, while the acid pH was found to effect gradual increase of potency with increasing acidity and decrease of potency on the alkaline side. No effect has been found in metals to the potency.

(Received December 21, 1955)

精油の抗菌性に関しては磯貝¹⁾, 小菅²⁾, 岡崎³⁾らの報告があるが、今回我々はカワラヨモギ *Artemisia capillaris* Thunb. の精油が顕著な抗カビ作用を有することを発見した。

カワラヨモギは河川の附近、砂地および海浜の砂場に多く自生する菊科の多年生草本で、その果実は生薬「茵陳蒿」と称し古来消炎性利胆剤⁴⁾あるいは駆虫剤⁵⁾として用いられて来た。

* 1954年4月日本薬学会第74回年会, 1955年日本薬学会12月第1例会講演。

** Nishi-shinagawa, Shinagawa-ku, Tokyo.

1) 磯貝: Sci. papers Coll. of Gen. Education, Vol. 2, No. 1 (1952).

2) 小菅: 本誌 72, 1227 (1952).

3) 岡崎等: 本誌 70, 347 (1950) 以降一連の報告。

4) 湯川, 高野, 三善: 実験消化器病学 3, 1349 (1929).

5) 宮崎, 有馬: 特許 96956 (1932).

寺坂⁶⁾, 世良⁷⁾ らはその果実を熱湯抽出して mp 145° のジメチルエスクレチンを得、一方その精油成分については有馬⁸⁾ が数種の新物質を発見し、また最近に至り原田⁹⁾, 杉山¹⁰⁾ らは精油中特に不飽和炭化水素について詳細な報告を行つている。

我々は、原植物の果実あるいは茎葉を水蒸気蒸留して得られる精油の各種微生物に対する作用を調べた所 *Trichophyton* などのいわゆる皮膚病原性糸状菌に対し特異的に強力な発育抑制および殺菌作用のあることを認めた。またこの精油の抗カビ力価に及ぼす温度, pH, 金属等の影響について検討した。

実 験 の 部

I. 精油の取得 市販の「茵陳蒿」を水蒸気蒸留したのち留液をエーテルで処理し、芒硝で乾燥、エーテルを留去して精油を得た (収量: 平均 1%)。

II. 精油の抗菌スペクトラム 被験菌: *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* 209 P, *Escherichia coli*, *Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Candida albicans*, *Epidermophyton inguinale*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton asteroides*, *T. interdigitale*, *T. purpureum*。

希釈系列の作り方: 精油を 95% エタノールで各種濃度に希釈しこれを更に培地で希釈して斜面寒天とする。この時培地中のエタノール濃度は 1.25% である様にこの濃度では被験菌の生育には影響を及ぼさない。

抗菌力検定法: 被験細菌を肉汁中 35°, 24 時間培養の菌液一白金耳量を上記の如くして作つた肉汁寒天斜面上に接種し, 35°, 24 時間培養後菌の発育の有無を以つて判定する。

抗カビ力検定法¹¹⁾: 培地組成 ブドウ糖 2%, ペプトン 1%, 水, 固体培地とする場合は寒天 2% 添加。以後この培地を S 培地と略称する。

前培養: *Aspergillus*, *Candida* は 25°, 3 日, その他は 10 日。

接種菌量: 滅菌生理食塩水を以て 1000 万孢子/cc の孢子浮游液となし, この一白金耳づつを接種。

判定: *Aspergillus*, *Candida* では 25°, 5 日, その他は 2 週間培養後被験菌の発育を完全に阻止する濃度の最大希釈倍数を以つてその力価とした。

殺カビ力検定法¹²⁾: 被験菌を寒天 5% の S 培地平板上に 25°, 10 日前培養して一面に繁殖せしめ, これを内径 8 mm のコルクボーラーで打ち抜きこの円板を 95% エタノールでそれぞれの濃度に希釈した被検液と接触 1 分間 → 1% ペプトン水中振りまぜ洗滌 3 分間 → 25% エタノール中振りまぜ洗滌 5 分間 → 1% ペプトン水中振りまぜ洗滌 2 分間の処理後 S 培地上に菌生育面を下にして接種し 25°, 3 週間培養後判定する。

上記の諸方法に従つてカワラヨモギ精油の抗菌スペクトラムを検討した結果は Table I の如くであつた。

Table I. Antimicrobial Spectrum of the Essential Oil

Test org.	Cult. condition	(-) Growth (+)
	Static activity	× (dilution)
<i>B. subtilis</i>	35°C, 24 hrs.	1,800 3,600
<i>Staph. aureus</i> 209 P		" "
<i>E. coli</i>		" "
<i>A. niger</i>	25°C, 5 days	1,800 3,600
<i>A. oryzae</i>		" "
<i>C. albicans</i>		" "
<i>E. inguinale</i>	25°C, 2 weeks	160,000 320,000
<i>M. gypseum</i>		" "
<i>T. asteroides</i>		" "
<i>T. interdigitale</i>		" "
<i>T. purpureum</i>		" "
	Cidal activity	
<i>T. asteroides</i>	25°C, 3 weeks	80 160
Note: Undecylenic acid, static 30,000 (-) 60,000 (+) (<i>T. purpureum</i>), cidal 40 (-) 80 (+) (<i>T. asteroides</i>).		

6) 寺坂: 1930 年薬学総会講演。

7) 世良, 渡江: 農化 6, 600 (1930)。

8) 有馬, 岡本: 日化 51, 780 (1930)。

9) 原田: 日化 75, 727 (1954)。

10) 杉山, 原田, 本間: 日本化学会第 7 回年会講演 (1954)。

11) J. F. Schamberg, J. A. Kolmer: Arch. Dermatol. Syphilol. 6, 746 (1922)。

12) M. J. Golden, K. A. Oster: J. Am. Pharm. Assoc., Sci. Ed. 36, 359 (1947)。

III. 抗カビ力価の安定性 A. 温度及び金属の影響 カワラヨモギ精油大量製造時の蒸留器の材質検討の目的で行った実験で, Cu, Fe, Pb, Sn, Zn の各細切金属粒と精油の各 2 g に少量の水を加え (対照: 金属粒の代りに水 2 cc) 還流冷却器をつけ油浴中 95°, 100°, 110° の各温度で 5 時間作用させて後精油をエーテルで抽出しエーテル留去後希釈法 (II-抗カビ力検定法参照, 但し培養 27°) によりそれぞれの力価を検定し Table II の結果を得た.

Table II. Effect of Metals and Temperature on Potency of the Essential Oil

Diln. $\times 10^4$		6	8	12	16	24	32
95°C, 5 hrs. Control	—	—	—	—	—	+++	+++
	Cu	—	—	—	—	+	+++
	Fe	—	—	—	—	++	+++
	Pb	—	—	—	—	++	+++
	Sn	—	—	—	—	++	+++
	Zn	—	—	—	—	++	+++
100°C, 5 hrs. Control	—	—	—	—	—	+++	+++
	Cu	—	—	—	—	+	+++
	Fe	—	—	—	—	++	+++
	Pb	—	—	—	±	+++	+++
	Sn	—	—	—	—	+++	+++
	Zn	—	—	—	—	+++	+++
110°C, 5 hrs. Control	—	—	—	—	+++	+++	+++
	Cu	—	—	—	—	++	+++
	Fe	—	—	—	+	+++	+++
	Pb	—	—	—	++	+++	+++
	Sn	—	—	—	+	+++	+++
	Zn	—	—	—	++	+++	+++

Test org.: *T. purpureum* after 2 weeks' incubation at 27°C

B. pH の影響 S 培地を HCl, NaOH で pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 に予め調整しこれにそれぞれの pH の McIlvaine 緩衝液 0.5% を添加し, おのおのを液体培地と固体培地とし液体培地の場合は含薬物培地液 5 cc に対し被験菌 (*T. purpureum*, S 培地斜面上 27°, 10 日前培養) の孢子浮游液 500 万孢子/cc, 0.5 cc づつを, また固体培地の場合は同じく 1000 万孢子/cc, 一白金耳づつを接種し 27°, 2 週間培養後の発育完全阻止最大希釈倍数を以てその力価とした. 実験結果は Table III の如くであった.

考 察 カワラヨモギ精油の抗菌スペクトラム検討の結果皮膚病原性糸状菌に対し特異的に強力な発育抑制及び殺菌作用を有することを発見した (Table I). その抗カビ力価に及ぼす金属, pH, 温度等の影響を検討した所, 現在適用している生物学的力価検定法によつては各種金属間に有意差を認めることは困難でありむしろ

Table III. Effect of Medium pH on Potency of the Essential Oil

Diln. $\times 10^4$		1	2	4	8	16	32	64	128	Control
pH	3.0	—	—	—	—	—	—	±	+	+
	4.0	—	—	—	—	—	+	+	+	+
	5.0	—	—	—	—	—	+	++	++	+++
	6.0	—	—	—	+	++	++	++	++	+++
	7.0	—	—	++	++	++	++	++	++	+++
	8.0	—	+	++	++	++	++	++	++	+++
Solid media	3.0	—	—	—	—	—	—	—	+	++
	4.0	—	—	—	—	—	—	+	++	+++
	5.0	—	—	—	—	—	—	+	++	+++
	6.0	—	—	—	—	—	+	++	++	+++
	7.0	—	—	—	+	++	++	++	++	+++
	8.0	—	±	++	++	++	++	++	++	+++

Test org.: *T. purpureum* after 2 weeks' incubation at 27°C

理温度による影響がかなり大きく認められた. 即ち 100° を超える温度での長時間処理は精油の力価をかなり減ずる傾向がみられた (Table II). また概してカワラヨモギ精油の力価は酸性側に於いて酸性に傾くにつれ漸増しアルカリ側ではかなり低下する. 同一 pH 時の液体培地と固体培地による力価のずれは培養条件の相違 (菌の環境, 接種量等) に起因するものと考えられるが上述の酸性, アルカリ性に於ける力価の傾向は何れの場合も同様であった (Table III). この原因の究明は精油が多成分複合体であるので一時止め, 精油中の有効成分の分離に

全力を傾注することにした。

終りに臨み、菌株を御分与頂いた 東大医学部谷奥助教授、植村博士、西山学士、東大農学部酒井学士、順天堂医大高橋教授に謹謝し、終始御鞭撻を賜わった当社福地研究部長、松居同部次長に深謝する。

三共株式会社高峰研究所

U.D.C. 547.913 : 58 .998 *Artemisia*: 615.778

99. 今井統雄, 池田信一, 田中喜一郎, 菅原眞一: カワラヨモギの精油に関する研究 (第2報*)
精油の抗カビ性 その2 有効成分の分離

Kaneo Imai, Nobukazu Ikeda, Kiichiro Tanaka, and Shin-ichi Sugawara: Studies on the Essential Oil of *Artemisia capillaris* Thunb. II. Antifungal Activity of the Essential Oil. (2). Isolation of Antifungal Principle.

(Takamine Research Laboratory, Sankyo Co., Ltd.)

In order to isolate the antifungal substance contained in the essential oil of *Artemisia capillaris*, various procedures were carried out and a new component was separated as colorless hexagonal plates, m.p. 81°. This substance was able to completely inhibit the growth of *Trichophyton purpureum* in 4,000,000 dilution (0.25 γ/cc.), which is the highest potency among the known antifungal substances. Analytical results gave the formula of $C_{12}H_{18}O$, assumed to be a ketone or an aldehyde.

In order to find the rational method of isolating this substance, adsorption chromatography was carried out with alumina of various activation degree and with various developing solvents. It was thereby found that the combination of Brockmann alumina of activation degree III and hexane as the developer gave the best result, giving an yield of 1.8% of this substance from the essential oil.

(Received December 21, 1955)

前報ではカワラヨモギ精油が各種の微生物、なかんずく *Trichophyton* などの皮膚病源性糸状菌に対して顕著な抗カビ作用を有することを報告した。

今回は精油を減圧下に蒸留し、その各分画の中最も抗カビ力価の高いものにつき向流分配抽出を行つて有効成分の特性を知ると共に、更に乾燥シリカゲルを保持剤とする分配クロマトグラフィーを実施してその分離を試みた結果、有効物質として mp 81° の未知成分を無色六角板状晶に得ることが出来た。

Table I.

* 1955 年日本薬学会 12 月第 1 例会講演, 第 1 報: 本誌 76, 397 (1956).

1) 有馬, 岡本: 日化 51, 780 (1930).

2) 原田: 日化 75, 727 (1954).