

化粧品による皮膚かぶれを防ぐ菌類成分の探索

千葉大学 薬学部

藤本 治 宏

In order to protect a person from allergic skin inflammation caused by some cosmetics, survey to discover new fungal immunosuppressive constituents which are helpful to induction of immunotolerance against such allergy, was executed in the use of more than 170 Ascomycetous fungi. On the survey, it was found out that *Gelasinospora multiforis*, *G.heterospora*, *G.longispora*, *G.kobi*, *Diplogelasinospora grovesii*, and *Microascus tardifaciens* produced appreciably immunosuppressive constituents. Solvent partition followed by repeated chromatographic fractionations of crude extracts obtained from the six fungi under the guidance of bioassay to test suppressive activity against proliferation of mouse splenic lymphocytes stimulated with mitogens afforded many immunosuppressive features. Namely, nine new 2-pyrones named multiforins A-I from *G.multiforis*, some of the multiforins together with a known metabolite sordarial from both *G.heterospora* and *G.longispora*, a novel bicyclic sesterterpene named kobiin and three new 2-furanones named kobifuranones A-C from *G.kobi*, two known metabolites macrophin and colletodiol together with a new stereoisomer of colletodiol named 10-epi-colletodiol from *D.grovesii*, and six known metabolites, questin, rubrocristin, cladosporin (asperentin), cladosporin 8-O-methylether, 5,7-dihydroxy-4-methylphthalide and asperflavin, together with two new 2,5-dioxopiperazines named tardioxopiperazines A and B from *M.tardifaciens*, were isolated as immunosuppressive features on this study. It was further examined whether interleukin-2 (IL-2) recovered proliferative suppressions of the lymphocytes caused by eight sample compounds, which were selected from these immunosuppressive constituents isolated this time from fungi, or not. It has been shown up to now that IL-2 has not recovered proliferative suppressions of the lymphocytes due to the eight compounds, indicating that they have not inhibited biosynthesis of IL-2.

1. 緒言

化粧品により皮膚かぶれ（皮膚の炎症）を起こす人が時に見られる。この様な皮膚かぶれは、多くの場合、化粧品中に存在する生体にとって異物の成分（抗原、アレルゲン）に対し、生体が過剰に免疫応答して起きたアレルギーである。化粧品による皮膚かぶれを防ぐ方法の一つとして、化粧品に対し免疫寛容を誘導することが考えられる。もし、化粧品中の特定のアレルゲンに対する免疫寛容を誘導できれば、皮膚かぶれを起こさずに化粧品を安全に使えることになる。免疫寛容の誘導には、免疫抑制剤を緩和に使用してアレルゲン特異的なIgE抗体の生産を低下させておきながら、生体を徐々にアレルゲンへ曝し、長時間かけて生体をアレルゲンへ馴化させて行く方法が考えられる。この際使われる免疫抑制剤には、個々の体質による適不適があるため、色々な体質の人向けに様々なタイプのものが準備されていることが望ましい。化粧品による皮膚かぶれに対する免疫寛容の誘導の様な目的に相応しい免疫抑制剤は、臓器移植や骨髄移植などに際して用いられる cyclosporin A や tacrolimus (FK506) の様な強力なものよりも、作用が比較的緩和なものの方が副作用も少なく長期間の使用も可能と

なって都合が良い。本研究では、この様な目的に合う新しい免疫抑制物質を天然素材から探索することを目指した。

探索対象の天然素材としては、既に、いくつかの免疫抑制成分が得られて実績がある菌類を考えたが、これまで得られたものの多くが不完全菌や放線菌から見出されたものであったため、今回は、新しいタイプのものを見出そうと、従来、比較的的成分研究例が少なかった子囊菌を選んだ。生体がアレルゲンの侵入に対し発動させる細胞性、体液性免疫の一連の免疫応答の開始過程であるアレルゲン刺激によるT、B細胞活性化の*in vitro*モデルとされるマイトゲン刺激によるT、B細胞幼若化（増殖）に対する抑制活性（LT活性）を指標として、これまでに170余種の子囊菌につき検索を行った。その結果、多数の新化合物を含む免疫抑制活性成分を見出した。しかしながら、LT活性には、一般的な細胞増殖抑制活性も含まれることがある。そこで、検体化合物が免疫担当細胞へ特異的な抑制活性を有するか否かを調べる方法の一つとして、今回、活性化T細胞から分泌されてT細胞の増殖、細胞障害性T細胞やB細胞の活性化などを誘導するリンホカインであるinterleukin 2 (IL-2)の存在が、検体によるリンパ細胞増殖抑制を取り止めさせるか否かを*in vitro*で試験する方法を採用し、本研究で得られた免疫抑制活性成分中の主なものへ適用してみた。これらの研究結果について、以前の関連研究における結果も含めて以下に述べる。

2. 実験

2.1 LT活性検索用子囊菌脱脂画分の作製

精白米培地 200gをいれたルー培養瓶を高圧滅菌し、子



Search for Fungal Constituents to Protect a Person from Allergic Skin Inflammation Caused by Cosmetics

Haruhiro Fujimoto

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chiba University

菌を接種して、25℃暗所で、時々振り混ぜながら、静置培養を、各菌の生育状態により10-30days行った。LT活性検索には、各菌当り精白米培地800g(ルー瓶4本)を用いて行ない、培養終了後、かび米へAcOEt 1.2Lを加え、室温振盪抽出5hrを2回繰り返して行ない、抽出液を減圧溶媒留去して、AcOEtエキスを得た。次に、同エキスへn-hexane 5-10mLを加え、超音波処理によりn-hexane可溶成分を溶解させて除去し、n-hexane不溶性の脱脂画分を得て、この脱脂画分をLT活性検索用検体とした。

2.2 LT活性試験

マウス(BALB/C、雄、7-11週齢)の脾臓由来リンパ細胞のマイトゲン刺激増殖に対する検体の抑制活性を試験した。マイトゲンとしては、T細胞にはconcanavalin A(Con A)を、B細胞にはlipopolysaccharide(LPS)を用いた。活性の測定には、リンパ細胞をマイトゲン、検体と共にマイクロタイタープレートのwell内で、37℃、5%CO₂存在下、48hr培養した後、[methyl-³H]thymidineを培地に添加し、更に22hr培養した際にリンパ細胞中に取り込まれる³H放射能から、細胞増殖抑制率を算出する³H標識法(実験の詳細は既報¹⁾参照)か、又は、上記マイクロタイタープレートで培養を72hr行った後、MTT[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide]を培地に添加し、更に4hr培養した際に、リンパ細胞のmitochondria内膜中の呼吸鎖関与酵素によりMTTが還元されて生成するMTT-formazanの量を57nmで比色定量し(対照波長630nm)、細胞増殖抑制率を算出するMTT法(実験の詳細は既報²⁾参照)か、いずれかの方法を用いた(³H標識法での算出値とMTT法での算出値はほとんど同じであった)。171種の子嚢菌の一斉LT活性検索では、各検体は50、10、2.0、0.4μg/mLの濃度においてそれぞれtriplicateで活性を測定した。

2.3 活性成分の単離

LT活性検索で、濃度依存性を示す高い活性を示した菌の中で、活性成分が未解明と考えられた菌については、精白米培地20-60kg(ルー瓶100-300本)を用い、2.1と同様の条件で大量培養を行った。培養終了後、AcOEt 30-90Lを用いて室温振盪抽出5hrを2回繰り返して行ない、抽出液を減圧溶媒留去して、AcOEtエキスを得た。AcOEt抽出エキスをn-hexane-AcOEt(1:1, v/v)を用いてn-hexane可溶部と不溶部に分け、n-hexane不溶部は、更に、AcOEt-H₂O(1:1)を用いてAcOEt可溶部とH₂O可溶部に分けた。n-hexane、AcOEt、H₂O可溶部につき、LT活性を試験したところ、AcOEt可溶部に活性が集約したので、AcOEt可溶部を、更にLT活性を指標にしながら、順相のsilica gelや逆相のoctadecyl silica gel(ODS)を用いたオープンカラム、

中圧カラム、高速液体カラム、薄層などによるクロマトグラフィーを適宜用いて、分画精製を繰り返し行ない、更に再結晶等によって精製して、各菌の活性成分を単離した。

2.4 活性成分の構造解明

単離された各菌の活性成分については、mp、[α]_D、各種呈色反応、溶解性等の物性を測定し、如何なるタイプの化合物であるかを推定し、更に、¹H-NMR、¹³C-NMR、IR、UV、MS(低分解能のEI-MS、FAB-MS、高分解能のEI-MS、FAB-MS)、CDスペクトルを測定して検討した。特にNMRでは、通常測定のほかに、spin-decoupling ¹H-NMR、NOE ¹H-NMR、二次元の¹H-¹Hシフト相関(COSY)、¹H-¹³Cシフト相関(HMQC)、¹H-¹³C遠隔シフト相関(HMBC)スペクトルを測定し検討した。その結果、活性成分が既知化合物と推定された場合は、その文献記載の各種物性やスペクトルデータとの比較を行って、標品が入手可能なら直接比較して同定した。活性成分が新化合物と推定された場合は、各種スペクトルデータの詳細な検討、誘導体の作製、或いは、X線解析(10-*epi*-colletodiolの場合)等を適宜用い、化学構造を解明した。

2.5 免疫抑制活性がIL-2の存在により拮抗されるか否かを調べる実験

リンパ細胞溶液は2.2の際と同様に作製し、マイトゲンとしては、Con Aの代わりにionomycinとphorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)を用いた。活性の測定は、リンパ細胞をマイトゲン、検体と共にマイクロタイタープレートのwell内でLT試験に類似した方法で培養して進められるが、IL-2生合成阻害の有無を調べるために、培地にIL-2を添加して培養する実験と添加しないで培養する実験を常に平行させて行う。培養は37℃、5%CO₂存在下、48hr培養した後、MTTを培地に添加し、更に4hr培養した後、MTTが還元されて生成するMTT-formazanを比色定量し、IL-2を添加した場合と添加しない場合のリンパ細胞増殖抑制活性を比較し、検体による細胞増殖抑制が、培地へのIL-2添加により拮抗されるか否かを試験した(実験の詳細は既報²⁾参照)。

3. 結果と考察

3.1 子嚢菌のLT活性検索とLT活性子嚢菌からの免疫抑制活性成分の単離

当研究室保存の子嚢菌中、不整子嚢菌綱(Plectomycetes)に属する*Emericella*属13種、*Eupenicillium*属16種、*Eurotium*属16種、*Hemicarpenales*属3種、*Neosartorya*属5種、*Talaromyces*属4種など、並びに核菌綱(Pyrenomycetes)に属する*Chaetomium*属5種、*Gelasinospora*属20種、*Microascus*属3種、*Thielavia*属4種などこれまでに合計171種につき、

リンパ球幼若化抑制活性 (LT 活性) の有無を検索した。その結果、濃度依存性の高い活性を示した菌は 38 種も見出されたが、それらの中で、新しい免疫抑制活性成分の単離を目的として、これまで系統立った成分研究が比較的行なわれていない属に分類される菌からの系統的な活性本体の解明を目指した。今回は、その様な菌の中から、核菌綱の *Gelasinospora multiforis*, *G.heterospora*, *G.longispora*, *G.kobi*, *Diplogelasinospora grovesii* および *Microascus tardifaciens* の 6 種の LT 活性菌について得られた結果につき述べる。

3. 1. 1 *Gelasinospora*, *Diplogelasinospora* 属菌の免疫抑制活性成分

LT 活性を示す菌が多数見出された *Gelasinospora*, *Diplogelasinospora* 属の菌については、従来系統立った成分研究があまり行なわれていなかったため、これらの属に分類される活性菌中、比較的高い活性が示された菌につき活性成分の単離を目指した。

まず、*G.multiforis* について、溶媒分画によって LT 活性の集約した AcOEt 可溶部から、主活性成分として単離された化合物は構造研究の結果、5-formyl-3-hydroxymethyl-4-methoxy-6-(1E-propenyl)-2-pyrone の構造を有する新 2-pyrone (*a*-pyrone) と判明し、multiforisin A (1) (Fig. 1) と命名された。同菌からは、更に同族体 5 種が単離され、それぞれ multiforisin B-F (2-6) と命名された。続いて、同属の *G.heterospora* より単離された活性成分 3 種も multiforisin 類と構造関連の新 2-pyrone であることが分か

り、multiforisin G-I (7-9) (Fig. 1) と命名された。なお、同菌からは、*Sordaria macrospora* から単離されていた sordarial (10) ³⁾ (Fig. 1) も活性成分として得られたが、側鎖の絶対配置が未定であったので、絶対配置を (3'R, 4'S) と決定した。なお、10 に免疫抑制活性が知られたのは今回が初めてである。7-9 については、その後 *G.multiforis* から得られた。*G.longispora* から 1, 7-9 並びに 10 が活性成分として単離された^{2, 4)}。

新しい免疫抑制活性成分として得られた multiforisin 類 1-9 中、活性が高いものは 1, 7, 8 である [リンパ球の Con A 誘導 (T 細胞)、LPS 誘導 (B 細胞) 増殖に対する 1 の IC₅₀ は 0.6, 0.6 μg/mL]。1 に比較し、1 の acetyl 体 [multiforisin B (2) に一致する] では活性は大きく低下し、1 の dihydro 体 (11) では活性はやや低下した。multiforisin 類とその誘導体の活性比較から、multiforisin 類では 3 に hydroxymethyl 基、5 に formyl 基が存在するか、3 と 5 のどちらか一方に hydroxymethyl 基、他方に acetoxymethyl 基が存在すると高い活性を示すが、3, 5 が共に acetoxymethyl 基である 8 の acetyl 体 (12) では活性がやや低下し、共に hydroxymethyl 基の 9 では活性が大きく低下する、2-pyrone 環と共役した 6 位側鎖中の二重結合は活性の増強に寄与することなどが判明した (Fig. 1, Table 1)。一方、10 は 1, 7, 8 等に比べ活性は低かった (Table 1)。Table 1 には、本研究で見出された LT 活性代謝産物についての Con A, LPS 誘導増殖に対する IC₅₀ の値を数種の positive control 化合物のそれと共に示す。

G.kobi からは LT 活性を示す成分として、15 員環と 5 員

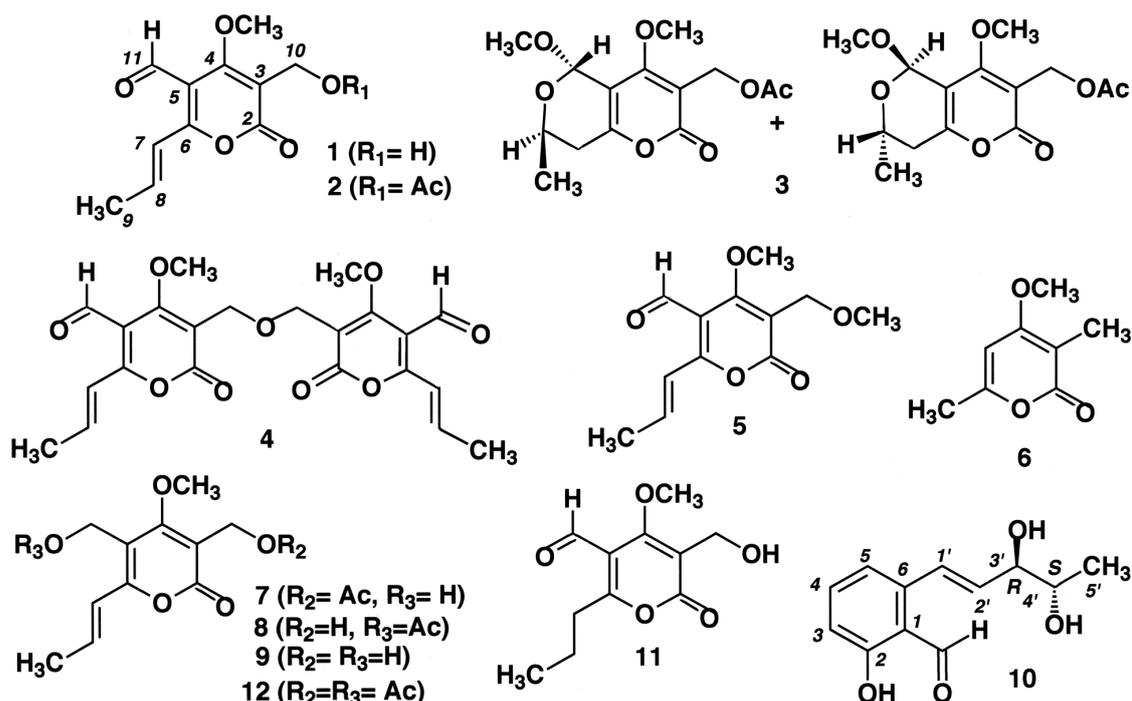


Fig. 1

環から成る新sesterterpenetriolが単離されてkobiin (13)と命名され絶対配置を含めて構造が決定されたほか、新2-furanoneが3種得られてkobifuranone A、B、C (14-16)と名付けられた (Fig. 2)⁵⁾。13の活性は中程度であるが (Table 1)、大環状のユニークな構造を有しており興味深い。14-16の活性は13のそれよりも低かった (Table 1)。

*D. grovesii*からは主活性成分として、*Macrophoma commelinae*から得られていたmacrophin (17)⁶⁾が単離されたほか、*Colletotricum capsici*や*Chaetomium funicola*から得られていた14員環を有する大環状化合物 colletodiol

(18)⁷⁻¹¹⁾及び18の10位立体異性体と判明した新化合物 10-epi-colletodiol (19)¹²⁾が得られた (Fig. 3)¹²⁾。なお、17、18に免疫抑制活性が知られたのは今回が初めてである。*D. grovesii*の主活性成分17がmultiforisin類と構造類似の2-pyrone化合物であったことは構造活性相関の意味から興味深く、その活性もmultiforisin類と同様に高かった (17のCon A、LPS誘導増殖に対するIC₅₀は0.4、0.3μg/mL) (Table 1)。一方、18、19の活性はやや低かった。

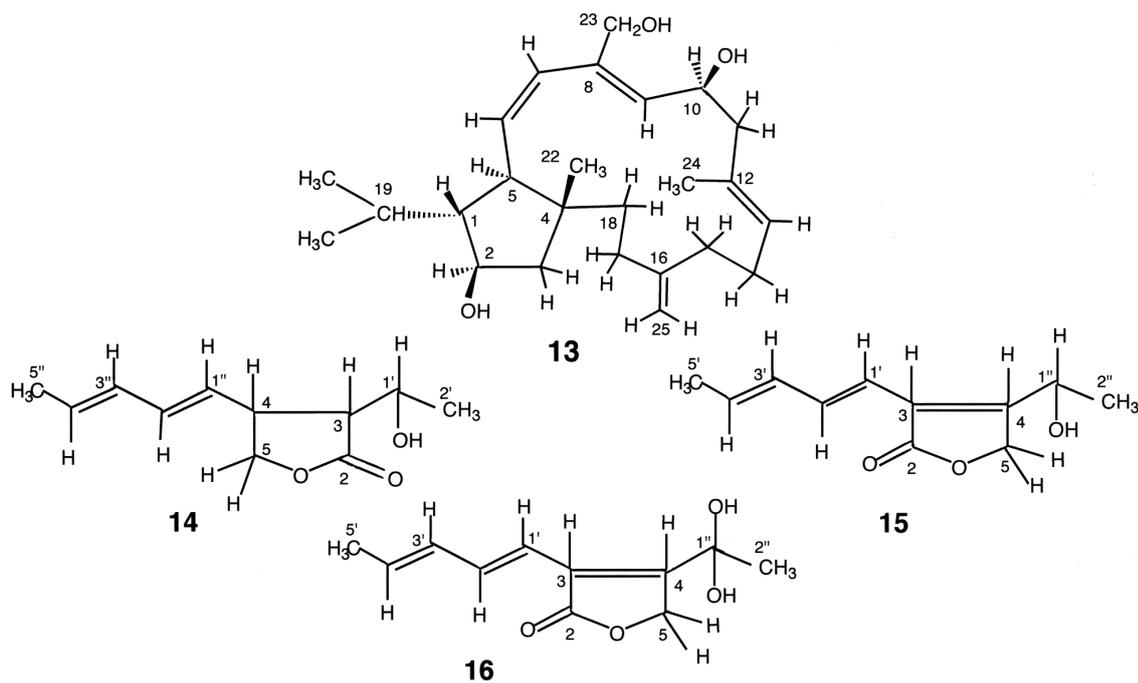


Fig. 2

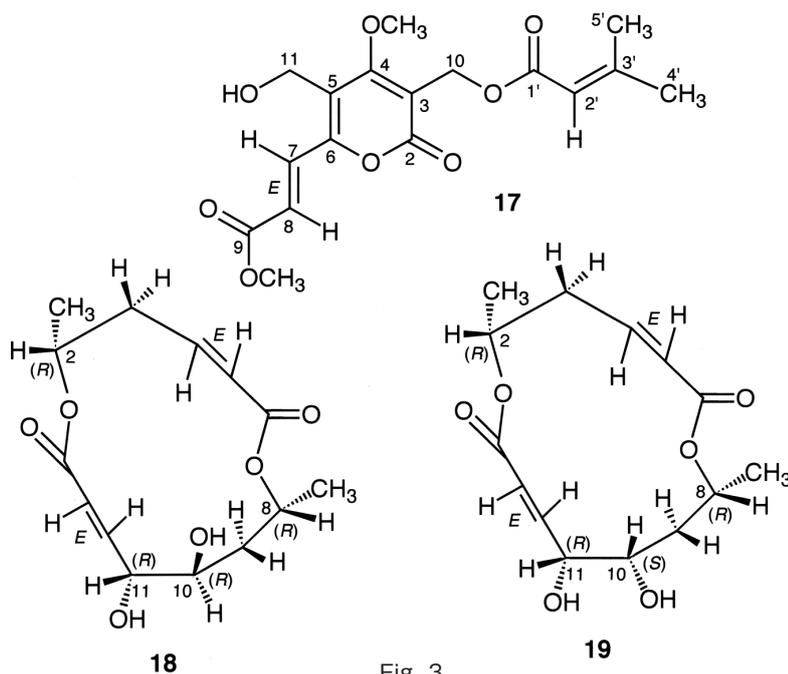


Fig. 3

3.1.2 *M.tardifaciens* の免疫抑制活性成分

*M.tardifaciens*からは、8種の活性成分が得られたが、それらの中の6種は既知菌類代謝産物に一致するものであった。即ち、それらは*Penicillium frequentans*等から得られていたquestin (20)¹³⁾と*Aspergillus cristatus*から得られていたrubrocristin (21)¹⁴⁾、*Cladosporium cladosporioides*や*Aspergillus flavus*から得られていたcladosporin (asperentin) (22)¹⁵⁻¹⁷⁾、*Aspergillus flavus*から得られていたcladosporin 8-O-methylether (23)¹⁶⁾、*Aspergillus flavus*から得られていた5,7-dihydroxy-4-methylphthalide (24)とasperflavin (25)¹⁸⁾であるが、これらのいずれについても免疫抑制活性が知られたのは、今回が初めてである。20-25はいずれも酢酸-マロン酸経路で生合成される代謝

産物であり、20、21はanthraquinone、22、23はoctaketideに属する。*M.tardifaciens*から新化合物として得られた2種のは、いずれも2,5-dioxopiperazineであることが判明し、tardioxopiperazine A (26)、B (27)と命名された (Fig. 4)¹⁹⁾。anthraquinone類の免疫抑制については、既にemodinでの例が知られているが²⁰⁾、今回、20、21にも活性が見出され、いずれも高い活性を示した (Con A、LPS誘導増殖に対するIC₅₀は20は0.3、0.3、21は0.8、0.1 μg/mL) (Table 1)。多数の関連するanthraquinone化合物との活性の比較から、β位に遊離のOH基を有するものが活性を示すものと考えられた。新化合物2種中では、26がやや高い活性を示した (Table 1)。その他の化合物の活性は低かった。

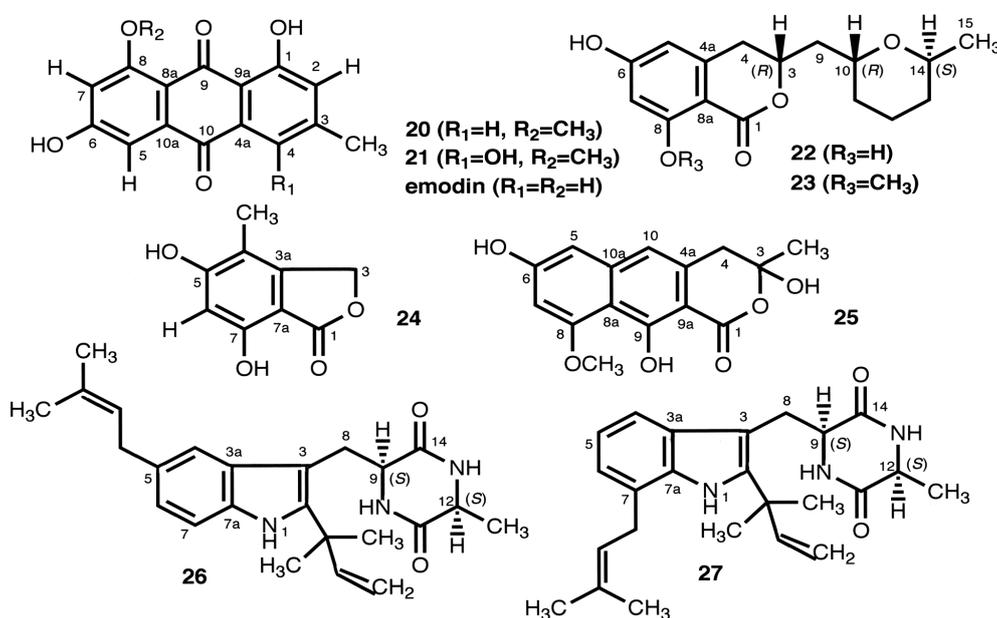


Fig. 4

Table 1 Suppressive Effects of Compounds 1 – 27, and Emodin, Azathioprine, CyclosporinA, and FK506 on ConA and LPS-Induced Proliferations of Mouse Splenic Lymphocytes [IC₅₀(μg/mL)]

Compound	Con A-induced	LPS-induced	Compound	Con A-induced	LPS-induced
1	0.6	0.6	17	0.4	0.3
2	24	22	18	12	5
3	44	27	19	5	3.8
4	>50	37	20	0.3	0.3
5	5	4	21	0.8	0.1
6	22	28	22	13	7.5
7	0.9	1.2	23	2.3	13
8	1.8	0.9	24	17	3
9	>25	19	25	16	3.6
10	6.5	5.1	26	4.5	0.7
11	13	9	27	>25	15
12	4.7	4.5	emodin	0.2	0.2
13	7	3.5	azathioprine	2.7	2.7
14	39	8	cyclosporin A	0.04	0.07
15	17.5	9	FK506	1.5x10 ⁻⁵	1.6x10 ⁻³
16	13	6			

The IC₅₀ value of each sample was calculated from the correlation curve between the sample concentration (horizontal axis) and the cell proliferation (vertical axis). The curve of each sample was drawn with 6 points, each of which represented the mean of 3 experiments on each correlation between 6 different concentrations and cell proliferations.

3.2 免疫抑制活性が IL-2 生合成阻害によるものか否かの検定

上述の 3.1 で得られた免疫抑制活性成分中、活性が比較的高く、量的にも実験が可能であった化合物につき、その免疫抑制活性が IL-2 の存在によって拮抗されるか否かを調べることによって、その免疫抑制活性が活性化 T 細胞における IL-2 生合成の阻害により起きているか否かを検定した。この検定に用いた検体は、2-pyrone 3 種 [multiforisin G (7), dihydromultiforisin A (11), macrophin (17)]、hexaketide と octaketide 各 1 種 [sordarial (10), cladospurin (22)]、大環状化合物 2 種 [kobiin (13), colletodiol (18)]、及び anthraquinone 1 種 [questin (20)] の合計 8 種の化合物である。これらのほかに positive control として、既にその作用発現機構が IL-2 生合成の阻害にあることが判明している FK506 を用いた。その結果、Fig. 5 に示す様に、FK506 では、IL-2 が培地中に存在しない場合はリンパ細胞増殖は強く抑制されるが、IL-2 が培地中に存在するとリンパ細胞増殖抑制は IL-2 により拮抗されるためわずかとなつて、IL-2 が存在しない場合のリンパ細胞増殖抑制と、存在する場合のそれとの間に大きな差異が見られた。一方、検体である 8 種の化合物では、いずれにおいても、Fig. 5 に示す 7 と同様に、IL-2 が存在しない場合のリンパ細胞増殖抑制と、存在する場合のそれとの間に差異は見られなかった。それ故、これら 8 種の化合物による免疫抑制活性は IL-2 生合成阻害によるものではないと考えられた。免疫発現の機構は多数の段階から成る複雑なものであり、いずれかの段階が阻害されても、総体としての免疫阻害が起こる。今後、本研究で見出された多数の LT 活性天然成分が如何なる機構で活性を発現しているのかを解明し、化

粧品による皮膚かぶれを防ぐ目的を始め、色々な目的のために有効に利用できる道を探って行きたい。

(引用文献)

- 1) Fujimoto H., Nakayama Y., Yamazaki M.: Identification of immunosuppressive components of a mushroom, *Lactarius flavidulus*, *Chem.Pharm.Bull.*, 41, 654-658 (1993) .
- 2) Fujimoto H., Sumino M., Nagano J., Natori H., Okuyama E., Yamazaki M.: Immunomodulatory constituents from three ascomycetes, *Gelasinospora heterospora*, *G. multiforis*, and *G. longispora*, *Chem. Pharm.Bull.*, 47, 71-76 (1999) .
- 3) Bouillant M.L., Bernillon J., Favre-Bonvin J., Salin N.: New hexaketides related to sordariol in *Sordaria macrospora*, *Naturforsch.*, 44c, 719-723 (1989) .
- 4) Fujimoto H., Satoh Y., Nakayama M., Takayama T., Yamazaki M.: Isolation of some immunosuppressive components from an ascomycete, *Gelasinospora multiforis*, *Chem.Pharm.Bull.*, 43, 547-552 (1995) .
- 5) Fujimoto H., Satoh Y., Yamazaki M.: Four new immunosuppressive components, *kobiin* and *kobifuranones A, B, and C*, from an ascomycete, *Gelasinospora kobei*, *Chem.Pharm.Bull.*, 46, 211-216 (1998) .
- 6) Sakurai I., Shimizu S., Yamamoto Y.: Studies on metabolites of *Macrophoma commelinae*. III. isolation of new metabolites and biosynthesis of *macommelin* group, *Chem.Pharm.Bull.*, 36, 1328-1335 (1988) .

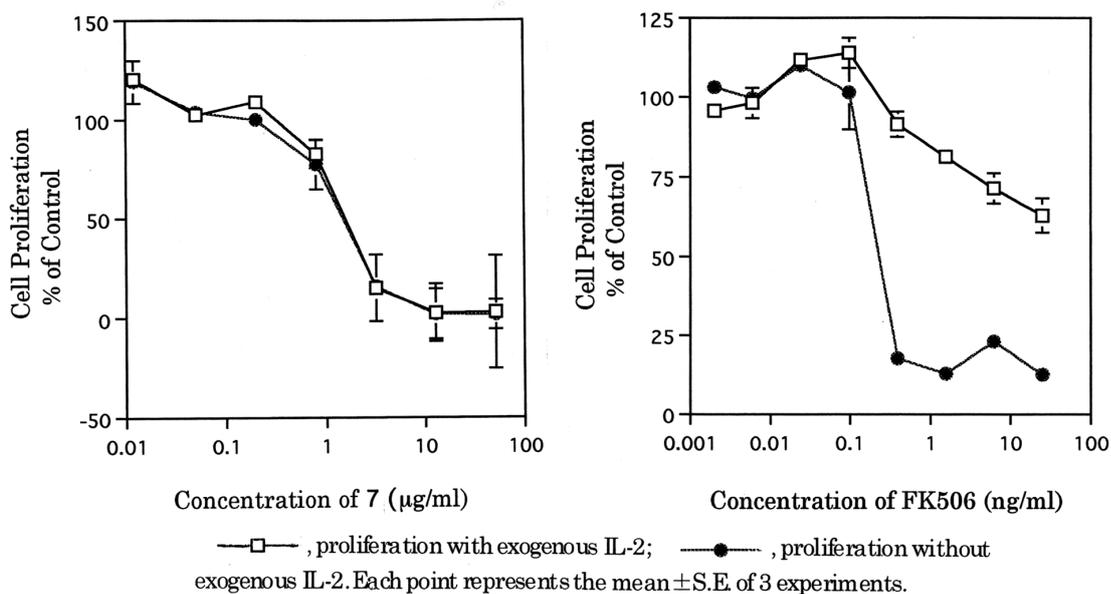


Fig 5 Effects of Multiforisin G(7) and FK506 (a Positive Control) on the Proliferation of Mouse Splenic Lymphocytes Stimulated with Ionomycin and PMA in Cultivation with and without Exogenous IL-2

- 7) Grove J.F., Speake R.N., Ward G.: Metabolic products of *Colletotrichum capsici*: isolation and characterisation of acetylcolletotrichin and colletodiol, *J.Chem.Soc. (C)*, 1966, 230-234.
- 8) Powell J.W., Whalley W.B.: The chemistry of fungi. part LVIII. structure of colletodiol, a metabolite of *Chaetomium funicola*, *J.Chem. Soc. (C)*, 1969, 911-912.
- 9) MacMillan J., Simpson T.J.: Fungal products. part V. the absolute stereochemistry of colletodiol and the structures of related metabolites of *Colletotrichum capsici*, *J.C.S.Perkin Trans. I*, 1973, 1487-1493.
- 10) MacMillan J., Pryce R.J.: The structure of colletodiol, a macrocyclic dilactone from *Colletotrichum capsici*, *Tetrahedron Lett.*, 1968, 5497-5500.
- 11) Amstutz R., Hungerbühler E., Seebach D.: Revidierte struktur des makrodiolids colletodiol, *Helv.Chim.Acta*, 64, 1796-1799 (1981).
- 12) Fujimoto H., Nagano J., Yamaguchi K., Yamazaki M.: Immunosuppressive components from an ascomycete, *Diplogelasinospora grovesii*, *Chem.Pharm. Bull.*, 46, 423-429 (1998).
- 13) Mahmoodian A., Stickings C.E.: Studies in the biochemistry of microorganisms. 115. metabolites of *Penicillium frequentans* Westling: isolation of sulochrin, asteric acid, (+)-bisdechlorogeodin and two new substituted anthraquinones, questin and questinol, *Biochem.J.*, 92, 369-378 (1964).
- 14) Anke H., Kolthoum I., Zahner H., Laatsch H.: Metabolic products of microorganisms. 185. the anthraquinones of the *Aspergillus glaucus* group. I. occurrence, isolation, identification and antimicrobial activity, *Arch.Microbiol.*, 126, 223-230 (1980).
- 15) Scott P.M., Walbeek W.V., MacLean W.M.: Cladosporin, a new antifungal metabolite from *Cladosporium cladosporioides*, *J. Antibiotics*, 24, 747-755 (1971).
- 16) Grove J.F.: New metabolic products of *Aspergillus flavus*. part I. asperentin, its methyl ethers, and 5¹-hydroxyasperentin, *J.C.S.Perkin Trans. I*, 1972, 2400-2406.
- 17) Springer J.P., Cutler H.G., Crumley F.G., Cox R.H., Davis E.E., Thean J.E.: Plant growth regulatory effects and stereochemistry of cladosporin, *J.Agric. Food Chem.*, 29, 853-855 (1981).
- 18) Grove J.F.: New metabolic products of *Aspergillus flavus*. part II. asperflavin, anhydroasperflavin, and 5,7-dihydroxy-4-methylphthalide, *J.C.S.Perkin Trans. I*, 1972, 2406-2411.
- 19) Fujimoto H., Fujimaki T., Okuyama E., Yamazaki M.: Immunomodulatory constituents from an ascomycete, *Microascus tardifaciens*, *Chem.Pharm. Bull.*, 47, 1426-1432 (1999).
- 20) Huang H.-C., Chang J.-H., Tung S.-F., Wu R.-T., Foegh M.L., Chu S.-H.: Immunosuppressive effect of emodin, a free radical generator, *European J. Pharmacol.*, 211, 359-364 (1992).