

Propionibacterium acnes に対する漢方薬の抗リパーゼ ならびに抗菌作用

桧垣 修一

富山医科薬科大学皮膚科学教室

The anti-lipase and anti-bacterial activities of Kampo medicines against *Propionibacterium acnes*

Shuichi HIGAKI

Department of Dermatology, Faculty of Medicine, Toyama Medical and Pharmaceutical University

(Accepted January 14, 1994.)

Abstract

The anti-lipase and anti-bacterial activities of Kampo medicines against *Propionibacterium acnes* were studied.

1. To estimate the lipase activity of *P. acnes*, we devised gas chromatographic method and determined butyric acid which was released in PYG medium containing 0.017 meq./ml amount of tributyrin.
2. We found that Kampo medicines inhibited the growth of *P. acnes*, which resulted in the inhibitory effect on the lipase activity. Combined treatment with Jumi-haidoku-to and minocycline, with Keigai-rengyo-to (KRT) and Sei jo-bofu-to (SBT), or with berberine and palmatine showed more effective anti-lipase activity than each single treatment.
3. *P. acnes* strains were highly susceptible to two medicinal herbs, Coptidis rhizoma (CR) and Phellodendri cortex (PC). The minimal inhibitory concentrations (MICs) of the herbs against *P. acnes* were the same as or less than those of Kanamycin and Gentamycin. It was considered that this was due to berberine contained in CR and PC.
4. No correlation of MIC of *P. acnes* among KRT, SBT and their ingredients was found. The cause of the no correlation of MIC among them might be the existence of mutual interaction or the difference of anti-bacterial mechanism between the two Kampo medicines. Kampo formulations, composed of CR, PC and smaller numbers of Kampo crude drugs, might be shown to be more susceptible to *P. acnes*, such as Oren-gedoku-to.
5. Destruction of microstructures of cells of *P. acnes* strains cultured in a medicum containing 1 MIC amount of CR was observed under transmission electron microscopy, but the mechanism of destruction of *P. acnes* was unknown.

Key words *Propionibacterium acnes*, Kampo crude drugs, Kampo formulations, anti-bacterial activity, anti-lipase activity.

はじめに

尋常性痤瘡は、思春期頃より男女の顔面及び胸背部の脂腺性毛包をおかし、毛包一致性の面皰、紅色丘疹、膿疱、硬結、囊腫及び癰疽が集簇性あるいは散在性に種々の程度に混在してみられる慢性炎症性疾患である。

1986年 Unna によって面皰組織内ではじめて観察された *acne bacillus* は、1946年嫌氣的及びプロピオン酸の産生の性質より Douglas と Gunter¹⁾ により、*Propionibacterium* 属の一種と考えられた。その後、1971年 Johnson と Cummins²⁾ が細菌壁の組成分析等を行った結果、本菌を *Pronibacterium acnes* と命名し現在にいたっている。*P. acnes* は痤瘡の発症機序である面皰形成と炎症惹起の両方に深く関与している。すなわち、毛漏斗の管腔が角質で閉塞され、皮脂の排泄障害を生じ、*P. acnes* 菌数の増加やそのリパーゼ作用により、皮脂中の中性脂肪が分解されて遊離脂肪酸の生成が亢進する。この遊離脂肪酸などが固着性角質増殖をきたし毛包壁に対して、comedogenic な作用を呈する。ついで、*P. acnes* 自身面皰内で増殖し、好中球走化因子や各種酵素を産生し、これらが、面皰から真皮へ漏出すると炎症が惹起される。さらに、*P. acnes* は好中球の加水分解酵素の遊離作用を有し、この酵素による面皰壁の障害や破綻によっても炎症を惹起させている。^{3, 4)}

そのため、現在 *P. acnes* に対し直接性抗リパーゼ作用を有し毛包脂腺系への移行性の優れているテトラサイクリン系抗生物質の内服療法が中等症～重症の痤瘡治療の主流となっている。しかし、投与対象として妊娠年令層が多く、少量でも長期投与になりがちなため、胃腸障害⁵⁾、肝腎障害、光線過敏性及び催奇形性等の副作用の問題が指摘されている。

一方、昭和54年に漢方薬が薬価に収載されて以来、各医療機関あるいは各診療科において漢方薬は西洋薬との併用効果あるいは離脱目的等に積極的に使用されるようになった。皮膚科の場合、湿疹・皮膚炎群や皮膚癢痒症など多くの疾患に漢方薬が使用されている。尋常性痤瘡においても荊芥連翹湯、十味敗毒湯及び清上防風湯などの漢方方剤を中心に多くの症例で投与され一定の臨床効果をあげている。^{6, 7)}

その反面、当科では今までに和漢薬の脂腺の脂質合成に対する抑制効果等⁸⁾ 種々の基礎研究を行ってきているが、皮膚科領域全体での漢方薬の基礎研究は臨床研究に比べ立ち遅れている。又、抗生物質の *P. acnes* あるいは *Staphylococcus epidermidis* に対する抗菌作用、抗リパーゼ作用を中心とした基礎研究は盛んに行われているが、⁹⁾

漢方薬の場合は皆無に等しい状態である。

今回、我々は、本邦で初めて *P. acnes* に対する漢方薬の抗菌ならびに抗リパーゼ作用について検討を行った。

1. *P. acnes* リパーゼ活性測定方法及び漢方薬の抗リパーゼ作用

P. acnes リパーゼ活性の測定法として、薄層クロマトグラフィー法¹⁰⁾ や吸光度法¹¹⁾ 等が報告されている。Rokos ら、¹²⁾ Shalita ら¹³⁾ はテトラサイクリン系薬剤の *P. acnes* リパーゼ阻止作用を、ブタの膀胱リパーゼを用いて検討している。又、西嶋¹⁴⁾ は、*P. acnes* 84株を用い、テトラサイクリンのリパーゼ活性阻止作用は、0.38 µg/ml あるいは 0.2 µg/ml で観察されるとし、エリスロマイシンは直接的に抗リパーゼ活性はみられないとしている。

今回、ガスクロマトグラフィーを利用し、遊離脂肪酸産生量の測定による *P. acnes* リパーゼ活性の新たな検出方法を考案した。材料として、当科外来を受診した痤瘡患者顔面皮膚部からの *P. acnes* 分離株を用いた。*P. acnes* は、特に *P. granulosum* との鑑別のため、グラム染色による形態、API 嫌気システムによる生化学的性状及びグルコース代謝産物の確認により同定を行った。一夜培養後の *P. acnes* 菌液 0.1 ml を PYG 培地 5 ml に接種し、3日間嫌気培養を行なった。培養後の 1 ml を小試験管に取り、これに 50% 硫酸 0.4 ml、塩化ナトリウム 0.4 g ジエチルエーテル 1.0 ml を加え、約 20 回転倒混和、3,000 回転で 5 分間遠心した。その後、エーテル層の除水後試料とした。この際、PYG 培地液量に対し、トリブチリン無添加、0.005 meq/ml、0.010 meq/ml、0.017 meq/ml 及び 0.033 meq/ml トリブチリンを各々添加した。測定時のガスクロマトグラフィーの分析条件は、キャリアガス 2.0 kg/cm²、水素ガス及び空気 0.8 kg/cm²、注入温度 170 °C、カラム温度 140 °C である。充填剤は Chromosorb w (80-100 mesh) に対し、Resoplex 400 を 10% にコートしたものを使い、3 m のガラス製カラムに充填した。このカラムに試料 2 µl を注入し、遊離脂肪酸中の酪酸とプロピオン酸産生量を測定した。

その結果、菌培養時の酪酸の産生量はトリブチリン添加量が 0.005 meq/ml、0.010 meq/ml、0.017 meq/ml 及び 0.033 meq/ml の時、各々平均値 0.019 meq/ml、0.039 meq/ml、0.048 meq/ml 及び 0.054 meq/ml であった (Table I)。トリブチリン無添加及び 0.005 meq/ml、0.010 meq/ml、0.017 meq/ml、0.033 meq/ml トリブチリン添加 PYG 培地でのプロピオン酸の産生量は、各々 0.018 meq/ml、0.019 meq/ml、0.019 meq/ml、0.019 meq/ml、0.018 meq/ml であった (Table II)。*P. acnes* 個々の菌株の発育をプロピオン酸産生量で調べたところ、ここで使

Table I The production of butyric acid in PYG medium at each concentration of tributyrin.

The concentration of tributyrin (meq/ml)	The production of butyric acid (meq/ml)
0.005	0.019±0.004
0.010	0.039±0.016
0.017	0.048±0.017
0.033	0.054±0.023

(average±standard error)

Table II The production of propionic acid in PYG medium at each concentration of tributyrin.

The concentration of tributyrin (meq/ml)	The production of propionic acid (meq/ml)
0	0.018±0.005
0.005	0.019±0.005
0.010	0.019±0.006
0.017	0.019±0.005
0.033	0.018±0.006

(average±standard error)

用したトリブチリン濃度に特に影響されなかった。*P. acnes*, *S. epidermidis*, *Pityrosporum* の3者を抗生物質で殺菌し、その際の菌数と遊離脂肪酸の消長を測定した実験で、*P. acnes* の消長と遊離脂肪酸との間にだけ著明な平行関係があったという成績¹⁵⁾等や面皰内のリパーゼが*P. acnes* リパーゼと同質であるとする考え¹⁶⁾からも、皮膚常在菌である*P. acnes* のリパーゼ活性が痤瘡発生機序の中で特に重要視されている。

今回、漢方薬の*P. acnes* リパーゼ活性の阻止効果を検討する前段階として、PYG培地にて産生される酪酸量及びプロピオン酸量を各々*P. acnes* リパーゼ活性の程度、*P. acnes* の発育量の指標とする*P. acnes* リパーゼ活性の新しい測定方法を考えた。その際、PYG培地に、基質として安定性があるトリブチリンを添加した。これは、*P. acnes* からのリパーゼは、中性脂肪の両末端に同時に作用し加水分解を行うため、*S. epidermidis* とは違い中性脂肪からの中間産物である diglyceride や monoglyceride を生ぜず、一挙に遊離脂肪酸とグリセロールに分解されることを応用したものである。他の基質であるトリアセチンをPYG培地に添加し産生される酢酸量を*P. acnes* のリパーゼ活性とする方法も考えられたが、酢酸産生量自身酪酸のそれよりも低くかつ*P. acnes* 自身が酢酸産生能を有するため、トリブチリンの場合と比較し、測定には不正確と思われた。トリブチリン-PYG培地のpHは7.2±0.2でトリブチリン濃度にかかわらずほ

ぼ一定で、リパーゼ産生能測定に好適であった。

測定の結果、ガスクロマトグラムの波形の高さが酸の量と平行するため、酪酸産生量をもとにリパーゼ活性を定量化した。*P. acnes* による酪酸産生量はPYG培地に添加したトリブチリン濃度が0.017 meq/mlまでは、添加量に伴いほぼ比例的に増加した。使用したトリブチリン濃度では、*P. acnes* の発育量とするプロピオン酸産生量に対する影響は認められなかった。

以上を総合すると、リパーゼ活性測定時の条件として、PYG培地に添加するトリブチリン至適濃度は、0.017 meq/mlと考えられ、0.017 meq/mlトリブチリン添加PYG培地に各種各濃度の抗生物質や漢方薬等を加えることにより、各々薬剤の*P. acnes* リパーゼ活性に対する阻止効果が測定できると考えられる。使用した臨床分離株間において、酪酸産生量すなわちリパーゼ活性の強さにばらつきが認められた。このことは、分離株によっては痤瘡の治療歴あるいは患者の皮疹の状態等の差によりリパーゼ活性の絶対値が異なることを示している。

次に、この測定方法を各漢方薬に応用してみた。*P. acnes* 臨床分離株を用い、痤瘡に頻用されている漢方方剤の清上防風湯、荊芥連翹湯ならびに十味敗毒湯、漢方生薬では黄連、黄柏、甘草、苦参ならびに連翹、抗生物質ではテトラサイクリンさらに黄連の主成分である植物アルカロイドの中からパルマチン及びベルベリンを用い、*P. acnes* に対する抗リパーゼ活性について検討を加えた。尚、いずれの培地とも培地pHはほぼ一定であった。

第一に、黄連各濃度添加PYG培地では、被験5株とも同様の傾向を示したので、代表的な1例をTable IIIに示した。24時間、48時間及び96時間培養とも経時的に各濃度においてプロピオン酸及び酪酸産生量は増加した。その一方、黄連添加濃度が高いほど、*P. acnes* 菌数及びコントロールと比較したプロピオン酸や酪酸産生量の減少傾向は強く、高濃度(300 µg/ml)では特に顕著であった。

第二に、黄連、黄柏、甘草、苦参、黄翹及び清上防風湯各々1%量添加PYG培地においてコントロールと比較したプロピオン酸及び酪酸産生量の減少度を検討した。その結果、いずれの漢方生薬や漢方方剤とも、コントロールと比較してプロピオン酸産生量の減少度が酪酸のそれを約20%~35%上回った。黄連や黄柏ではプロピオン酸、酪酸産生量の減少度が各々6%、25%~27%と強く、逆に甘草が各々25%、62%と一番弱かった。総じて、プロピオン酸産生量の減少度が高い漢方薬ほど酪酸産生量の減少度も高度であった(Table IV)。

第三に、十味敗毒湯、ミノマイシン各々単独あるいは

Table III Inhibitory effects of Coptidis Rhizoma against *P. acnes* cell counts, amounts of propionic and butyric acid in PYG-tributyrim medium at different incubation periods.

Concentration of Coptidis Rhizoma ($\mu\text{g/ml}$) in the PYG-tributyrim medium	pH of the medium	Sampling times after inoculation *								
		24 hr			48 hr			96 hr		
		Propionic acid (meq/ml)	Butyric acid (meq/ml)	cell count (CFU/ml)**	Propionic acid (meq/ml)	Butyric acid (meq/ml)	cell count (CFU/ml)	Propionic acid (meq/ml)	Butyric acid (meq/ml)	cell count (CFU/ml)
0	7.4	1.66	5.26	3.2×10^8	3.18	5.51	1.0×10^8	3.48	6.59	4.0×10^7
0.3	7.4	1.30	4.44	6.0×10^7	1.90	4.52	3.0×10^7	2.54	5.68	8.0×10^6
1.5	7.2	0.46	3.14	4.2×10^7	1.71	3.97	1.6×10^7	2.44	4.82	2.0×10^6
15	7.2	0.38	2.10	1.2×10^7	0.76	2.28	5.0×10^6	1.25	3.76	8.0×10^5
300	7.2	0.12	0.47	2.6×10^3	0.16	0.50	1.0×10^2	0.17	0.53	$< 5.0 \times 10^1$

* Strain used : Isolated from facial skin of normal person.

Number of cells inoculated : 6.0×10^7 CFU/ml.

** CFU : Colony forming unit

Table IV Inhibitory effects of 1 % amount of each Kampo crude drug against the production of propionic acid and butyric acid produced by *Propionibacterium acnes*.

	Propionic acid (%)	Butyric acid (%)
Coptidis Rhizoma	$6.2 \pm 2.2^*$	25.5 ± 8.7
Phellodendri cortex	5.8 ± 2.0	27.1 ± 9.5
Glycyrrhizae Radix	25.6 ± 8.2	61.8 ± 13.8
Sophorae Radix	17.1 ± 4.8	37.6 ± 8.5
Forsythiae Fructus	16.5 ± 5.1	52.5 ± 11.1
Seijo-bofu-to**	10.6 ± 6.0	34.4 ± 6.9

* Figures indicate average $\pm$ standard error percent of acids produced in the medium added with each Kampo drug to those in the control medium. pH of each medium : 7.2 to 7.4

** Combination of several Kampo crude drugs

両者添加培地におけるプロピオン酸、酪酸産生量を検討した。代表的 1 例及び 4 株平均ともコントロールと比較して、十味敗毒湯あるいはミノサイクリン添加培地でのプロピオン酸及び酪酸産生量は各々の添加濃度が高いほど低値であり、両者添加培地でさらに低値であった。十味敗毒湯単独の場合は、プロピオン酸産生量の減少度が酪酸のそれよりも高く、一方、ミノサイクリン単独の場合は逆に低かった。濃度比較では、十味敗毒湯 5 mg/ml, 10 mg/ml 加 PYG-トリブチリン培地よりもミノサイクリン各々 0.5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$ 加 PYG-トリブチリン培地の方がコントロールと比較してプロピオン酸、酪酸産生量の減少度がより高度であった (Table V, VI)。

第四に、清上防風湯、荊芥連翹湯単独あるいは混合、パルマチン、ベルベリンの単独あるいは混合各々添加培地における比較では 4 株とも同様の傾向なので代表的 1 例を Table VII, VIII に示した。すべての培地で、コントロールと比較してプロピオン酸産生量の減少度が酪酸の

Table V Inhibitory effects of Jumi-haidoku-to and Minocycline against amounts of propionic and butyric acids produced by *P. acnes* in PYG-tributyrim medium at different incubation periods.

Supplement medium	Incubation time (48 hr)		Incubation time (96 hr)	
	Propionic acid	Butyric acid	Propionic acid	Butyric acid
Control	0.92* (100%)	1.88 (100%)	1.23 (100%)	2.29 (100%)
Jumi-haidoku-to 5 mg/ml	0.58 (63%)**	1.28 (68%)	0.64 (52%)	1.56 (69%)
Jumi-haidoku-to 10 mg/ml	0.41 (45%)	1.17 (62%)	0.50 (40%)	1.38 (60%)
Minomycin 0.5 $\mu\text{g/ml}$	0.51 (55%)	0.98 (52%)	0.59 (48%)	1.03 (45%)
Minomycin 1 $\mu\text{g/ml}$	0.35 (38%)	0.66 (35%)	0.45 (37%)	0.70 (31%)
Jumi-haidoku-to 5 mg/ml, Minomycin 0.5 $\mu\text{g/ml}$	0.16 (17%)	0.63 (34%)	0.19 (15%)	0.70 (31%)
Jumi-haidoku-to 10 mg/ml, Minomycin 1 $\mu\text{g/ml}$	0.09 (10%)	0.40 (21%)	0.10 (8%)	0.46 (20%)

* : Figures indicate the amount of acid (meq/ml) in the media

** : Figures in parentheses indicate percentages of amount of acids in the media to those of control medium

それより高度で、各々一剤より二剤添加培地の方が、プロピオン酸及び酪酸産生量の減少度が高度であった。一方、黄連の主成分であるベルベリン、パルマチンは 1.5 $\mu\text{g/ml}$ において、黄連そのものよりプロピオン酸及び酪酸産生量の抑制度を下回った。

第五に、岸下ら¹⁷⁾のリパーゼ検査培地を用い、黄連及び黄柏の *P. acnes* リパーゼに対する阻止作用を検討し

Table VI Inhibitory effects of Jumi-haidoku-to and Minocycline against amounts of propionic and butyric acids produced by *P. acnes* in PYG-tributyryn medium.

Supplement added to PYG-tributyryn medium	Amount of acid produced	
	Propionic acid	Butyric acid
Control	100	100
Jumi-haidoku-to 5 mg/ml	66.5±9.6*	76.0±8.1
Jumi-haidoku-to 10 mg/ml	41.0±6.2	54.0±5.6
Minomycin 0.5 µg/ml	57.0±7.7	48.0±6.7
Minomycin 1 µg/ml	29.0±4.5	26.2±3.8
Jumi-haidoku-to 5 mg/ml Minomycin 0.5 µg/ml	25.8±7.9	41.0±8.7
Jumi-haidoku-to 10 mg/ml Minomycin 1 µg/ml	9.0±3.6	18.5±5.8

*: Figures indicate % (average±standard error, n=4) of amount of acids in the media to those in control medium

Table VII Inhibitory effects of Keigai-rengyo-to and Seijo-bofu-to against amounts of propionic and butyric acids produced by *P. acnes* in PYG-tributyryn medium.

Supplement added to PYG-tributyryn medium	Incubation time (96 hr)	
	Production of propionic acid	Production of butyric acid
Control	1,583* (100%)	2,861 (100%)
Seijo-bofu-to 5 mg/ml	839** (53%)	2,288 (80%)
Keigai-rengyo-to 5 mg/ml	586 (37%)	1,140 (40%)
Seijo-bofu-to 5 mg/ml Keigai-rengyo-to 5 mg/ml	427 (27%)	1,059 (37%)
Seijo-bofu-to 10 mg/ml	507 (32%)	1,090 (38%)
Keigai-rengyo-to 10 mg/ml	158 (10%)	916 (32%)
Seijo-bofu-to 10 mg/ml Keigai-rengyo-to 10 mg/ml	78 (5%)	658 (23%)

*: Figures indicate the amount of acid (µV·sec) in the media

** : Figures in parentheses indicate percentages of amounts of acids in the media to those of control medium

Table VIII Inhibitory effects of berberine and palmatine against amounts of propionic and butyric acids produced by *P. acnes* in PYG-tributyryn medium.

Supplement added to PYG-tributyryn medium	Incubation time (96 hr)	
	Propionic acid	Butyric acid
Control	4,400 (100%)	5,881 (100%)
Berberine 0.15 µg/ml	3,375 (76%)	4,699 (80%)
Berberine 1.5 µg/ml	3,190 (72%)	4,350 (74%)
Palmatine 0.15 µg/ml	3,456 (78%)	4,810 (82%)
Palmatine 1.5 µg/ml	2,698 (61%)	4,455 (76%)
Berberine 0.15 µg/ml Palmatine 0.15 µg/ml	1,945 (44%)	3,042 (52%)
Berberine 1.5 µg/ml Palmatine 1.5 µg/ml	1,423 (32%)	2,359 (40%)

*: Figures indicate the amount of acid (µV·sec) in the media

** : Figures in parentheses indicate percentages of amounts of acids in the media to those of control medium

た。その結果、いずれにおいても、最小発育阻止濃度(以下 MIC と略) の 1/2-1/4 量添加培地でリパーゼ陰性集落即ち集落の周囲に真珠層も沈殿物(脂肪酸のカルシウム塩)も存在しない集落は全く観察されなかった(Table IX, X)。

黄連添加培地では、24 時間、48 時間及び 96 時間培養ともリパーゼ活性の低下は菌の発育量の低下ほどの減少ではなく、*P. acnes* に対する抗リパーゼ活性は抗菌活性を通じての二次的と言えた。Puhvel¹⁸⁾ は、テトラサイクリンの直接性抗リパーゼ作用を、500 µg/ml 以上の場合、約 80 % 程度の抑制率と報告している。今回、検討した 5 株では、2 日後や 4 日後において、300 µg/ml で約 80 % 程度の抑制率がみられ、テトラサイクリンとほぼ同等ではあるが、菌の発育量の減少に起因するものと考えられた。黄連あるいは黄柏添加培地では、テトラサイクリン添加培地にみられるようリパーゼ陰性集落はみられず、リパーゼ陽性集落のみ観察されたのも *P. acnes* に対する二次的抗リパーゼ活性を支持する所見と言える。さらに、我々は、漢方方剤である荊芥連翹湯や清上防風湯についても検討を行い、漢方生薬同様抗リパーゼ活性は二次的との結果を得ている。

1 % 量各漢方生薬、荊芥連翹湯あるいは清上防風湯添加培地で *P. acnes* に対する抗リパーゼ活性は二次的であったが、抗菌力があると言われてきた黄連、黄柏が他

Table IX Appearance of *P. acnes* colonies grown on the lipase agar added with varied concentration of *Coptidis Rhizoma*.

Strain used	Types of Colonies	Number of colonies grown on lipase agar added with concentration of <i>Coptidis Rhizoma</i> ($\mu\text{g/ml}$)					
		15	6	3	1.5	0.3	0.15
<i>P. acnes</i> No.1	Lipase+	0	0	0	<u>0</u> *	320	360
	Lipase-	0	0	0	<u>0</u>	0	0
<i>P. acnes</i> No.2	Lipase+	0	<u>0</u>	240	218	203	223
	Lipase-	0	<u>0</u>	0	0	0	0
<i>P. acnes</i> No.3	Lipase+	0	0	0	<u>0</u>	162	138
	Lipase-	0	0	0	<u>0</u>	0	0

* Underlined values mean MIC of *Coptidis Rhizoma* against the strains

Table X Appearance of *P. acnes* colonies grown on the Lipase Agar added with varied concentration of *Phellodendri Cortex*.

Strains used	Types of colonies	Number of colonies grown on Lipase Agar added with concentration of <i>Phellodendri Cortex</i> ($\mu\text{g/ml}$)				
		60	24	12	6	1.2
<i>P. acnes</i> No.1	Lipase+	0	0	0	<u>0</u> *	160
	Lipase-	0	0	0	<u>0</u>	0
<i>P. acnes</i> No.2	Lipase+	0	0	<u>0</u> *	132	141
	Lipase-	0	0	<u>0</u>	0	0

*: Underlined values mean MIC of *Phellodendri Cortex* against the strains

の漢方薬より優れた抗リパーゼ活性を呈した。リパーゼ活性の抑制が強い漢方薬ほどそれに応じて菌の発育量の低下も強いと言える。ミノサイクリンでは、プロピオン酸産生量の減少度が酪酸のそれよりも少なく、抗リパーゼ活性は漢方薬とは逆に西嶋の報告¹⁴⁾と同じように直接的と思われた。十味敗毒湯ならびにミノサイクリン添加培地では、各々薬剤添加濃度いかににより、*P. acnes* に対する抗リパーゼ活性が直接性あるいは間接性優位かが決まり、プロピオン酸及び酪酸産生量のコントロールと比較した減少度も違ってくると思われる。濃度比較では、ミノサイクリンが十味敗毒湯よりもはるかな低値で十味敗毒湯とはほぼ対等のプロピオン酸及び酪酸産生量の減少率を示している。この数値の差と各々の MIC の差とある程度相関するのではないかと思われた。荆芥連翹湯及び清上防風湯の漢方薬間さらにベルベリン及びパルマチン間では、各々二剤の方が一剤よりも *P. acnes* に対する抗リパーゼ活性が強かった。1.5 $\mu\text{g/ml}$ 濃度におい

て、*P. acnes* に対する抗リパーゼ活性は、黄連の方が黄連の主成分であるベルベリン、パルマチンよりも強かったが、これは、二者以外に黄連より抗リパーゼ活性の強いものが存在するのか、あるいは二者らの協同効果によるかは今のところ不明である。

痤瘡に対する漢方薬の基礎研究として、*P. acnes* に対する抗リパーゼ活性について述べたが、これと双壁をなすものとして抗菌作用があげられる。黒川ら¹⁹⁾は、*P. acnes* 48 株を用い、各抗生物質の感受性を調べている。その結果、エリスロマイシン、クリンダマイシンが最も感受性が高く MIC₈₀ (10⁶/ml) は 0.05 $\mu\text{g/ml}$ であり、近年全体として耐性株が増加傾向にあるとしている。抗菌力を有する漢方生薬には黄連、黄柏、連翹及び、芍薬等があげられるが、*P. acnes* に対する耐性の問題以前に漢方生薬あるいは漢方方剤の *P. acnes* に対する MIC の測定が全くなされていない。今回、抗生物質と比較検討する観点からも、未解明である漢方薬の *P. acnes* に対する抗菌作用を測定した。

2. 漢方方剤及び漢方生薬の *P. acnes* に対する抗菌作用

今回、痤瘡に頻用される漢方方剤及びその構成生薬の *P. acnes* に対する MIC の測定を行い、さらに両者間の MIC の関係について検討を加えた。

材料として当科外来受診の痤瘡患者由来の *P. acnes* 19 株と標準 2 株の計 21 株を使用し、コントロールとして *Staphylococcus aureus* 7 株、*Staphylococcus epidermidis* 3 株、*Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Proteus vulgaris*, *Klebsiella pneumoniae* 各々 1 株を用いた。MIC の測定は日本化学療法学会による標準法²⁰⁾に準拠した。調整した被検菌種を、各濃度漢方薬添加 GAM 寒天培地に multiple inoculator を用いて接種、37 °C、48 時間嫌気培養し、肉眼的に菌の発育を認めない最小濃度を MIC とした。尚、各寒天培地 pH は、7.2-7.4 であった。

検討薬剤は痤瘡に頻用される清上防風湯、大柴胡湯、三物黄芩湯、荆芥連翹湯、小柴胡湯、十味敗毒湯、当帰芍薬散、加味逍遥散、当帰飲子及び桂枝茯苓丸の合わせて 10 種類の漢方方剤及びそれらを構成するものの中の黄連、黄柏、甘草、連翹、苦参、大枣、当帰、芍薬、人参、枳実、桔梗、白芷、薄荷、乾姜、川芎、山梔子、柴胡、荆芥、黄芩及び防風の合わせて 20 種類の漢方生薬で、コントロールとしてテトラサイクリンを用いた。

さらに、透過電顕を用い黄連及びテトラサイクリンによる *P. acnes* の形態的变化を 2% グルタルアルデヒド、1% オスミウム酸で二重固定後、通常の方法で標本を作成し観察した。

その結果、第一に、*P. acnes* 21 株の各漢方方剤に対す

Table XI Distribution of MIC_s of Kampo formulations to *P. acnes* strains.

Drugs	MIC (mg/ml)	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200	>200
Keigai-rengyo-to		1	<u>10</u>	1	4	4		1			
Seijo-bofu-to		4		3	1		<u>4</u>	5	3	1	
Dai-saiko-to					4	1	3	<u>9</u>	2	2	
Sammotsu-ogon-to					2		<u>10</u>	7	1	1	
Kami-shoyo-san							8	<u>8</u>	3	2	
Keishi-bukuryo-gan							8	1	<u>7</u>	4	1
Sho-saiko-to							7	<u>9</u>	3	2	
Jumi-haidoku-to							4	3	<u>12</u>	2	
Toki-inshi								6	<u>9</u>	6	
Toki-shakuyaku-san								2	<u>10</u>	9	

*: Underlined values mean MIC₅₀Table XII Distribution of MIC_s of Kampo formulations to *S. aureus* strains (mg/ml).

Drugs	MIC(mg/ml)	25	50	100	200
Keigai-rengyo-to			2	<u>5</u>	
Seijo-bofu-to			<u>6</u>		1
Dai-Saiko-to			<u>5</u>	2	
Sammotsu-ogon-to	3		<u>4</u>		
Kami-shoyo-san			2	<u>3</u>	2
Keishi-bukuryo-gan					<u>7</u>
Sho-saiko-to			3	<u>3</u>	1
Jumi-haidoku-to				<u>6</u>	1
Toki-inshi				2	<u>5</u>
Toki-shakuyaku-san				2	<u>5</u>

*: Underlined values mean MIC₅₀

る MIC を, Table XI に示した。荊芥連翹湯が最も感受性が良く, 0.78-50 mg/ml に分布し, MIC₅₀ は 1.56 mg/ml を示し, 清上防風湯では 4 株の MIC が 0.78 mg/ml, 3 株の MIC が 3.12 mg/ml, 大柴胡湯では 4 株の MIC が 6.25 mg/ml を呈したが, 清上防風湯以下 9 種類の漢方方剤の MIC はほぼ同じ分布を示し, MIC₅₀ は 25 mg/ml-100 mg/ml であった。

S. aureus では, MIC₅₀ が 50 mg/ml-200 mg/ml に分布し, 漢方方剤間で顕著な差はなかった (Table XII)。他のコントロール菌では, *S. epidermidis* の一部の菌に対し, 荊芥連翹湯, 清上防風湯の MIC が 25 mg/ml を示した以外, ほとんどが 50 mg/ml-400 mg/ml を示した (Table XIII)。

P. acnes 21 株の各漢方生薬に対する MIC 値を Table XIV に示した。黄連は 1.5-24 µg/ml に分布し, MIC₅₀ は 3.0 µg/ml であり, 次いで, 黄柏が 6.1-390 µg/ml に分布し, MIC₅₀ は 24 µg/ml を示した。荊芥, 甘草及び黄芩

Table XIII Distribution of MIC_s of Kampo formulations to each control strains.

Drugs	MIC (mg/ml)			<i>S. epidermidis</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Keigai-rengyo-to	100	100	25	50	200	200	200	200	50	200
Seijo-bofu-to	200	50	25	50	200	200	200	200	50	200
Dai-saiko-to	100	100	50	50	200	200	200	200	50	200
Sammotsu-ogon-to	50	50	200	200	400	200	400	400	100	400
Kami-shoyo-san	100	100	100	25	200	200	100	100	100	200
Keishi-bukuryo-gan	200	200	200	200	200	200	200	200	200	200
Sho-saiko-to	200	100	50	100	200	200	200	200	50	200
Jumi-haidoku-to	100	100	100	50	200	200	200	200	100	200
Toki-insh	200	200	200	100	200	200	200	200	100	200
Toki-shakuyaku-san	200	200	200	100	200	200	200	200	50	200

Table XIV Distribution of MICs of Kampo crude drugs to *P. acnes* strains.

Drugs	MIC ($\mu\text{g/ml}$) (mg/ml)	1.56	3.12	6.25	12.5	24	48	96	190	390	0.39	0.78	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200	400
Coptidis Rhizoma		9	<u>5</u>	6		1															
Phellodendri Cortex				7	3	<u>6</u>		1	3	1											
Schizoneptae Spica										5	1	<u>6</u>	2	5	2						
Glycyrrhizae Radix										2	4	4	<u>6</u>	4		1					
Scutellariae Radix											2	2	3	<u>6</u>	8						
Sophorae Radix												3	<u>9</u>	4	5						
Forsythiae Fructus														4	<u>15</u>	2					
Gardeniae Fructus													1		6	1	<u>6</u>	7			
Angelicae Dahuricae Radix																	8	<u>13</u>			
Abgelicae Radix																3	1	1	<u>10</u>	6	
Menthae Herba																3	<u>10</u>	6	2		
Aurantii Fructus Immaturus													1	1	1	3	1	<u>9</u>	2		
Ledebouriellae Radix															3			4	<u>9</u>	5	
Bupleuri Radix																	3	5	<u>13</u>		
Cnidii Rhizoma															3	1		<u>10</u>	7		
Paeoniae Radix																3		<u>10</u>	7	1	
Platycodi Radix																		2	7	<u>11</u>	1
Zingiberis Siccatum Rhizoma																		<u>16</u>	4	1	
Zizyphi Fructus																		3	<u>13</u>	5	
Ginseng Radix																		1	3	<u>15</u>	2

* : Underlined values mean MIC₅₀Table XV Distribution of MICs of Kampo crude drugs to *S. aureus* strains.

Drugs	MIC ($\mu\text{g/ml}$)	1.56	3.12	6.25	12.5	25	50	100	200	400
Coptidis Rhizoma		2	1	<u>3</u>			1			
Phellodendri Cortex					<u>7</u>					
Schizoneptae Spica				1	<u>6</u>					
Glycyrrhizae Radix			3						<u>4</u>	
Scutellariae Radix				<u>4</u>	3					
Sophorae Radix				1	<u>5</u>				1	
Forsythiae Fructus					<u>5</u>	2				
Gardeniae Fructus							<u>7</u>			
Angelicae Dahuricae Radix							<u>6</u>	1		
Abgelicae Radix									<u>7</u>	
Menthae Herba								<u>7</u>		
Aurantii Fructus Immaturus								<u>7</u>		
Ledebouriellae Radix								<u>6</u>	1	
Bupleuri Radix									<u>7</u>	
Cnidii Rhizoma						3	<u>4</u>			
Paeoniae Radix							2	<u>5</u>		
Platycodi Radix									<u>7</u>	
Zingiberis Siccatum Rhizoma						1	<u>6</u>			
Zizyphi Fructus						1	<u>5</u>	1		
Ginseng Radix									<u>5</u>	2

* : Underlined values mean MIC₅₀

などは黄連、黄柏の次に MIC が低値 (1.56 mg/ml-6.25 mg/ml) であった反面、その他の漢方生薬の MIC₅₀ は概して 25 mg/ml-200 mg/ml であった。ちなみに、同時に行ったテトラサイクリンに対する MIC の分布は 0.39-1.56 $\mu\text{g/ml}$ であった。

S. aureus では、黄連、黄柏、荊芥、黄芩、苦参及び連翹が MIC₅₀ が 6.25-25 mg/ml と低値を示したが、その他の 14 種の漢方薬の MIC₅₀ は、50-200 mg/ml であった (Table XV)。 *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *E. coli*, *P. vulgaris* では黄連、黄柏等一部の漢方生薬で、1.56-12.5 mg/ml の低い MIC を示したが、他の場合の MIC は概して 25-400 mg/ml の範囲であった (Table XVI)。

第三に *P. acnes* に対する荊芥連翹湯及び清上防風湯の MIC により、*P. acnes* 高感受性群 (荊芥連翹湯 MIC : 0.78 mg/ml-3.12 mg/ml, 12 株, 清上防風湯 MIC : 0.78 mg/ml-6.25 mg/ml, 8 株) と低感受性群 (荊芥連翹湯 MIC : 6.25 mg/ml-50 mg/ml, 9 株, 清上防風湯 MIC : 25 mg/ml-200 mg/ml, 13 株) に分け、各々の構成生薬の MIC と比較検討を行った。その結果、荊芥連翹湯 MIC₈₀ より低値を示す構成生薬は 17 種類中黄連、黄柏など 4 種類であった。2 群間比較では、高感受性群の MIC₈₀ が低感受性群のそれより低い生薬が黄連、黄柏など 8 種類みられた。一方、清上防風湯 MIC₈₀ より低値を示す構成生

Table XVI Distribution of MICs of Kampo crude drugs to each control strain.

Drugs MIC (mg/ml)	<i>S. epidermidis</i>			<i>S. pyogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>E. cloacae</i>	<i>S. marcescens</i>	<i>P. vulgaris</i>	<i>K. pneumoniae</i>
Coptidis Rhizoma	1.56	1.56	12.5	50	400	50	100	100	400
Phellodendri Cortex	12.5	12.5	12.5	200	100	100	100	200	200
Schizoneptae Spica	25	25	25	25	25	25	25	25	25
Glycyhizae Radix	200	200	200	3.12	400	400	200	50	400
Scutellariae Radix	6.25	12.5	6.25	12.5	400	100	100	6.25	200
Sophorae Radix	12.5	12.5	12.5	25	100	100	100	100	200
Forsythiae Fructus	25	12.5	12.5	12.5	12.5	25	25	50	50
Gaedeniae Fructus	100	50	100	50	100	50	100	100	100
Angelicae Dahuricae Radix	100	50	100	50	400	200	200	400	50
Abgelicae Radix	200	200	200	50	200	200	200	200	200
Menthae Herba	50	50	50	50	50	50	100	50	100
Aurantii Fructus Immaturus	200	100	100	100	200	100	100	200	200
Ledebouriae Radix	200	100	200	100	200	200	200	200	200
Bupleuri Radix	200	100	200	100	200	200	100	100	200
Chidii Rhizoma	50	100	100	12.5	100	50	100	100	100
Paeoniae Radix	200	200	200	200	400	200	200	200	200
Platycodi Radix	200	200	200	200	400	200	200	200	400
Zingiberis Siccatum Rhizoma	200	200	200	12.5	200	100	200	50	200
Zizyphi Fructus	100	100	100	100	200	200	100	200	200
Ginseng Radix	200	200	200	200	400	200	400	200	200

薬は11種類中黄連など5種類であった。2群間比較では、高感受性群のMIC₈₀が低感受性のそれより低い生薬が甘草など5種類であった。黄連と荊芥連翹湯、黄連と清上防風湯、黄柏と清上防風湯さらに荊芥連翹湯と清上防風湯間の *P. acnes* 21株のMICの分布には特に相関関係は認められなかった。

第四に *P. acnes* のコントロール像では、細胞膜の外側には厚いペプチドグリカンからなる細胞壁がみられ、細

胞質にはリボゾームが充満している。菌体中央には電子密度の低い核が、核膜なしに直接細胞質に接し、DNA線維が縦横に走行してみられる (Fig. 1)。細胞膜が細胞質内に反転湾入して形成されたメソソームも観察される。一方、黄連1MIC量処理の *P. acnes* 電顕像では細胞壁の溶解、菲薄化、細胞膜の破壊及び細胞質の著明な浮腫等 (Fig. 2)、テトラサイクリン1MIC量処理では細胞質の浮腫性変化、細胞膜と細胞壁との間の裂隙等著明



Fig. 1 Electron micrograph of normal *P. acnes* which consists of cell wall, cell membrane, ribosomes and nuclei. ($\times 70,000$)

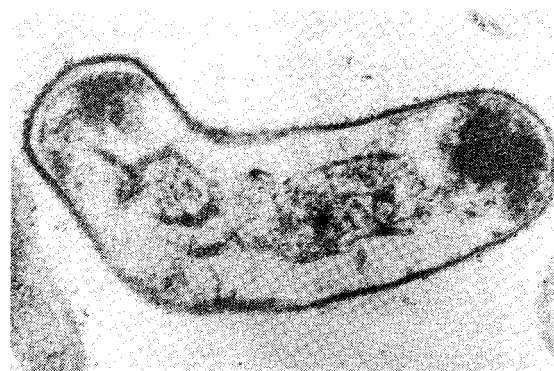


Fig. 2 Electron micrograph of *P. acnes* treated by 1 MIC amount of CR. Degeneration of cell membrane, and edematous changes of cytoplasm were seen. ($\times 70,000$)



Fig. 3 Electron micrograph of *P. acnes* treated by 1 MIC amount of TC.
Cytoplasmic edematous degenerated changes with fissure between cell membrane and cell wall.

($\times 70,000$)

な変性所見が観察された (Fig. 3)。

10 種類の漢方方剤あるいは 20 種類の漢方生薬間では、*P. acnes* が他のコントロール菌よりも MIC の分布に大きな開きがあった。その中で、テトラサイクリンの *P. acnes* 47 株の MIC が $1.25 \mu\text{g/ml}$ 以下とする朝田の報告²¹⁾には劣るものの、10 種類の漢方方剤及び 20 種類の漢方生薬中、黄連及び黄柏が、カナマイシンやゲンタマイシン等一部の抗生剤に劣らない程の *P. acnes* に対する MIC を呈した。10 種類の漢方方剤中、*P. acnes* に対し著しく低い MIC を呈したものはなかったが、その中ではより低い MIC を呈した荊芥連翹湯には黄連及び黄柏、清上防風湯には黄連が含まれている。黄連は、互変異性をもつイソキノリン系四級塩基であるアルカロイドを主成分として、ベルベリンを 4-7% を含有している。ベルベリンは、各種の微生物に対し、試験管内試験で強力な殺菌、抗菌作用を示すことは以前より明らかである²²⁾。黄柏も黄連同様ベルベリンを主成分として、抗菌抗炎症作用を有する生薬である。ベルベリンが黄連及び黄柏の優れた MIC の一因と思われるが、ベルベリンと他の構成成分との協同効果も否定できず今後の検討が必要である。

S. epidermidis, *S. aureus* において他のコントロール菌と比較して黄連及び黄柏は他の漢方生薬より MIC は低かった。しかし、*P. acnes* に対する MIC より約 10^3 倍よりも高い値であり、他の漢方生薬より黄連及び黄柏の場合ははるかに高い差と言える。黄連あるいは黄柏が選択的に *P. acnes* に対し高感受性を示しているのは構造由来等によるかは今のところ不明である。

荊芥連翹湯あるいは清上防風湯とその構成生薬の *P. acnes* に対する MIC の比較検討では、漢方方剤そのもの

の MIC₈₀ より優れた値を示す構成生薬数は半数以下であった。又、高感受性と低感受性群間比較でも同様のことが言えた。このことは、漢方方剤の MIC は、低感受性の漢方生薬のみから構成される漢方方剤はもちろん、黄連や黄柏のような一部の高感受性生薬を含んでいても他の低感受性の漢方生薬の多寡により MIC が左右されやすいと言える。逆に言えば、漢方方剤の *P. acnes* に対する MIC の低値を保つためには、黄連や黄柏を含有し、かつ残りの構成生薬数が少ないことが条件と言える。黄連解毒湯はこの条件に合致し *P. acnes* に対し MIC のかなりの低値が期待され、今後測定する予定である。

抗生物質長期使用により *P. acnes* 耐性菌の出現の報告¹⁹⁾が散見されるが漢方薬にいたっては未解明である。研究の初期段階ではあるが、荊芥連翹湯を 6 ヶ月内服した 2 名の痤疮患者の顔面面皰より複数採集した *P. acnes* の MIC は内服前と特に変化はみられなかった。内服期間や耐性菌の MIC の設定の問題なども指摘されるだろうが、長期間観察により MIC の上昇がなければ、これだけでも臨床的に使用しやすい一つの理由になると言える。電顕的には、1/10 MIC 量テトラサイクリンの *P. acnes* の溶菌像が得られたとする朝田の報告²²⁾がある。今回述べた 1 MIC 量黄連さらには最近の実験で 1/10 MIC 量十味敗毒湯で同様の溶菌所見を得ている。但し、十味敗毒湯の溶菌の機序やそれによるリパーゼ産生の阻害等の程度はこれからの研究課題である。

今回の実験では、漢方薬の *P. acnes* に対する MIC の程度や優れた抗菌性を有する漢方生薬の存在さらには漢方方剤と構成生薬間の MIC の関係など初めて解明された。これらの研究成果は、未知の分野である *P. acnes* に対する漢方薬の皮膚内濃度等体内濃度の解明につながる第一歩と期待される。

総 括

未解明であった漢方薬の *P. acnes* に対する抗リパーゼ及び抗菌作用の基礎研究を行った。ガスクロマトグラフィーを用い、代謝遊離脂肪酸産生量による *P. acnes* リパーゼの新測定方法は治療歴の差異等によるリパーゼ活性の変動さらに漢方薬単独あるいは他剤との併用における *P. acnes* リパーゼ活性の阻止効果について応用検討できるものである。

さらに本方法にて、漢方薬による *P. acnes* リパーゼ活性の減少は、抗菌作用を介する二次的なものであることが解明された。又、漢方薬間、漢方薬と抗生物質間さらに植物アルカロイド間において、*P. acnes* に対する抗リパーゼ作用の協同効果が認められた。

一方、*P. acnes* に対する漢方方剤、漢方生薬の抗菌作用では、黄連及び黄柏が他の漢方方剤及び漢方生薬よりも低くかつカナマイシン、ゲンタマイシンに劣らないほどの MIC を呈した。*S. aureus*, *S. epidermidis* においても同様の傾向がみられた。この一因として、黄連及び黄柏に含まれているペルペリンの存在が示唆された。清上防風湯、荊芥連翹湯の MIC の分布とその構成生薬である黄連や黄柏のそれとは特に相関はなかった。*P. acnes* に対し低い MIC を示す漢方方剤の条件として、黄連、黄柏を含み他の漢方生薬の数が少ないことが必要と思われた。

透過電顕で黄連や十味敗毒湯による *P. acnes* の強い溶菌像が観察された。しかながら、漢方薬の溶菌の作用機序それに伴うリパーゼ産生能の阻害程度の詳細は不明である。

以上、我々は *P. acnes* に対する漢方方剤及び漢方生薬の抗菌及び抗リパーゼ作用について初めて検討し、その活性の有無を明らかにした。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、懇切な御指導を賜りました富山医科薬科大学皮膚科諸橋正昭教授ならびに金沢大学医療技術短期大学部衛生技術科山岸高由教授に深謝いたします。又、本論文に関する研究費は、その一部を平成元年度・2年度文部省科学研究費補助金、第10回田村科学技術振興財団研究助成金によっており、関係各位に謝意を表します。

References

- 1) Douglas, H.C., Gunter, S.E.: The taxonomic position of *Corynebacterium acnes*. *J. Bact.* **52**, 15-23, 1946.
- 2) Johnson, I.L., Cummins, C.S.: Cell wall composition and deoxyribonucleic acid similarities among the anaerobic coryneforms, Classical *propionibacteria*, and strains of *arachnia propionica*. *J. Bacteriol.* **109**, 1047-1066, 1972.
- 3) 諸橋正昭：痤瘡の病因と治療，マルホ皮膚科セミナー放送内容集，**64**，14-18, 1987.
- 4) 諸橋正昭，豊本貴嗣：脂腺の発生学，微細構造，皮膚科 Mook 19巻（今村貞夫，小川秀興編），金原出版，東京，pp. 112-124, 1993.
- 5) アクネ研究班：尋常性痤瘡に対するテトラサイクリン長期連用法の臨床的検討，西日皮膚 **41**，722-729, 1979.
- 6) 諸橋正昭：皮膚疾患と漢方薬，日小皮会誌，**10**，1-7, 1991.
- 7) Leyden, J.J.: Antibiotics and topical antimicrobial agents in acne. *Acta Derm Venereol., Suppl.* **89**, 75-82, 1980.
- 8) 関 大輔，諸橋正昭，皮脂腺の脂質合成におよぼす和漢生薬の影響，“皮膚科における漢方治療の現状”皮膚科東洋医学研究会編，医学書院，東京，pp. 135-142, 1990.
- 9) Leyden, J.J., Kligman, A.M., Mills, O.T.: Acne vulgaris, Treating the difficult-to-treat patient. A scientific exhibit, Univ. of Pennsylvania. 10-12, 1979.
- 10) Reisner, R.M., Silver, D.Z., Puhvel, M., Sternberg, T.H.: Lipolytic activity of *Corynebacterium acnes*. *J. Invest. Derm.* **51**, 190-196, 1969.
- 11) Whiteside, J.A., Voss, J.G.: Incidence and lipolytic activity of *Propionibacterium acnes* (*Corynebacterium acnes* group 1) and *Propionibacterium granulosum* (*Corynebacterium acnes* group 2) in acne and normal skin. *J. Invest. Derm.* **60**, 94-97, 1973.
- 12) Rokos, J., Burger, M., Prochazka, P.: The effect of Chlortetracycline on pancreatic lipase. *Folia Biologica* **4**, 334-336, 1958.
- 13) Shalita, A.R., Wheatley, V.: Inhibition of pancreatic lipase by tetracyclines. *J. Invest. Dermatol.* **54**, 413-415, 1970.
- 14) 西嶋攝子：尋常性痤瘡病巣より分離した *Propionibacterium acnes* に関する研究（第II報）—生物型別抗生物質感受性とテトラサイクリン系薬剤による *Propionibacterium acnes* Lipase 活性阻止作用について，皮膚 **24**(1)，27-37, 1982.
- 15) Plewig, G., Kligman, A. M.: Acne, Springer, Berlin, 1975.
- 16) Asada, Y.: Lipolytic activity of resident flora of the skin: Some observations on lipase activity of *Corynebacterium acnes* and *Staphylococcus epidermidis*. *Skin research*, **10**, 585-593, 1968.
- 17) 岸下雅通，牛島 強，尾崎良克：平板法による *Propionibacterium* のリパーゼ検査の最適条件，医学と生物 **97**，209-213, 1978.
- 18) Puhvel, S. M., Reisner, R. M.: Effect of antibiotics on the lipase of *Corynebacterium acnes* in vitro. *Arch. Dermatol.* **106**, 45-49, 1972.
- 19) Kurokawa, I., Nishijima, S., Asada, Y.: The antibiotics susceptibility of *Propionibacterium acnes*: A 15-year bacteriological study and retrospective evaluation. *J. Dermatol.* **15**, 149-154, 1988.
- 20) 日本化学療法学会：最小発育阻止濃度 (MIC) 測定法再改訂について（1968年制定，1974年改訂），*Chemotherapy* **29**，76-79, 1981.
- 21) 朝田康夫：にきび（尋常性痤瘡），新臨床文庫 307，金原出版，東京，p. 71, 1983. より引用.
- 22) 桑野重昭：ペルペリン—漢薬「黄連，黄柏」の薬効成分—の生化学，生薬誌 **24**，1-7, 1970.
- 23) 朝田康夫：皮脂と微生物—特に痤瘡との関連において—，臨皮臨皮 **29**，437-448, 1975.