

천연물 Polygodial과 Imidazole계 화합물의 병용에 의한 항진균 활성의 증진

이상화 · 이재란 · 김창진*

생명공학연구소

(Received February 5, 1999)

Synergistic Effect of Polygodial with Imidazole Drugs on the Antifungal Activity

Sang-Hwa Lee, Jae-Ran Lee and Chang-Jin Kim*

Korea Research Institute of Bioscience & Biotechnology, Taejon 305-306, Korea

Abstract—The fungistatic and the fungicidal activities of amphotericin B, fluconazole, miconazole, econazole, and 5-fluorocytosine against *Saccharomyces cerevisiae* were estimated in the presence of $\frac{1}{2}$ minimum inhibitory concentration (MIC) and $\frac{1}{2}$ minimum fungicidal concentration (MFC) of polygodial, respectively. Among them, the antifungal activities of miconazole and econazole were greatly (32-128 fold) enhanced by polygodial. The potentiated activity of the imidazoles by polygodial was still shown against several yeast-like fungi including *Candida albicans*, *Candida utilis*, and *Cryptococcus neoformans*, except for *Candida krusei*. The combination of polygodial with imidazole drugs against *Saccharomyces cerevisiae* was further examined using the macrobroth dilution checkerboard method. The fractional inhibitory concentration (FIC) and the fractional fungicidal concentration (FFC) index between polygodial and miconazole were 0.16 and 0.19, while the combination of polygodial with econazole exhibited the FIC index of 0.19 and the FFC of 0.25, respectively. These results suggest that polygodial and the imidazoles on the fungistatic and fungicidal action are highly synergistic.

Keywords □ Polygodial, econazole, miconazole, synergistic.

기회성(opportunistic) 진균 감염증은 broad spectrum antibiotics의 개발과 더불어 그 발생이 증가하였으며 특히 corticosteroid계 약물과 면역억제제의 사용, 그리고 HIV 감염 등으로 인한 면역계 손상 환자들의 수가 급증함에 따라 보건상의 중대한 도전이 되고 있다.¹⁻³⁾ 현재 기회성 진균증에 대한 화학 요법제로서는 amphotericin B로 대표되는 polyene계와 fluconazole 등의 azole계 화합물들이 있다.^{4,5)} 그러나 amphotericin B는 비록 많은 진균감염에 대해 높은 효능을 보이거나 nepratoxicity등의 강한 부작용으로 그 사용이 매우 제한되고 있다.⁶⁾ 또한 azole계 항진균제는

amphotericin B에 비해 상대적으로 독성은 약하나 치료 효과가 낮고⁷⁾ 특히 현재 가장 널리 사용되고 있는 fluconazole에 대한 내성균주의 출현은 실질적인 문제가 되고 있다.^{8,9)} Azole계 화합물들 중 miconazole과 econazole은 1960년대에 개발된 imidazole계 화합물로서 나중에 개발된 fluconazole 등에 비해 강한 독성 등의 문제로 현재 전신성 항진균제로서는 거의 사용되지 않고 있다.⁵⁾

한편 sesquiterpene dialdehyde인 polygodial은 *Polygonum hydropiper*(water-pepper) 식물로부터 insect antifeedant로서 처음 분리된 후 *Warburgia ugandensis*, *Warburgia stuhlmannii*, *Pseudowintera colorata* 등의 여러 식물에서도 확인되고 있다.¹⁰⁻¹²⁾ 또한 polygodial은 일본에서 오랫동안 식품 양념으로 사용되고 있

* 본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 042-860-4332 (팩스) 042-860-4595

는 *Polygonum hydropiper*의 매운 맛 성분으로 알려져 있다.¹³⁾ Polygodial은 병원성 진균에 대한 항균 활성으로 *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* 등의 효모성 진균들과 *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Penicillium marneffeii* 등의 일부 균사성 진균들에 대해 amphotericin B와 비슷한 수준의 살균 활성을 나타내었다.^{14,15)} 또한 polygodial은 actinomycin D와 병용하였을 때 actinomycin D의 항진균 활성을 증진시키는 것으로 알려져 있다.¹⁶⁾

본 연구에서는 기존 항진균 약제들의 활성을 증가시켜 그들의 치료 효과를 높이고 그에 따른 실질 사용량을 줄여 독성 문제를 개선할 목적으로 천연물 polygodial과의 병용 효과를 조사하였다.

실험방법

균주, 배지 및 배양

본 실험에 사용된 효모 균주 *Saccharomyces cerevisiae* 7754, *Candida albicans* 18804, *Candida albicans* 38247, *Candida utilis* 9226, *Candida krusei* 6258, *Cryptococcus neoformans* 32719, *Cryptococcus neoformans* 32264는 American Type Culture Collection(Rockville, MD)로부터 분양받아 10% glycerol을 포함하는 yeast nitrogen broth(Difco Laboratories, Detroit, MI)에 현탁하여 -80°C 에서 보존하였다. 각 균주는 Sabouraud Dextrose Agar(SDA) (Bactopeptone 1%, Dextrose 4%, Bacto-agar 1.8%) 배지를 이용하여 30°C 에서 계대 배양하였다. 항진균 활성 측정을 위한 종균은 Malt Extract(ME) (BBL, Cockeysville, MD) 액체 배지를 이용하여 37°C 에서 24시간 동안 진탕 배양한 다음 새로운 배지에서 5시간 동안 더 배양하여 사용하였다.

항진균 화합물

항진균제 amphotericin B, miconazole, econazole, 5-fluorocytosine은 Sigma Co. (St. Louis, MO)로부터 구입하였으며 fluconazole은 제조사인 Pfizer, Inc. (New York, NY)로부터 제공받았다. 항진균성 phytochemical인 polygodial은 Kubo 등의 방법¹¹⁾에 준하여 *Polygonum hydropiper*로부터 순수 분리하여 사용하였다. 실험에 사용된 화합물들은 dimethylformamide(EM Science, Gibbstown, NJ) 용매를 이용하여 최종 조사 농도의 100배로 조절한 후 순차적으로 2배 희석하

여 ME 액체 배지로 다시 10배 희석하였다.

MIC 및 MFC의 측정

화합물들의 항진균 활성 측정은 기본적으로 macrobroth dilution법¹⁵⁾에 준하였다. 즉, 일정 농도의 화합물 희석액 0.3 ml을 종균(1×10^5 CFU/ml)이 포함된 ME 액체 배지 2.7 ml와 혼합한 다음 30°C 에서 48시간 동안 정지 배양하였다. 이때 육안상 균 생육이 없는 화합물의 최저 농도를 MIC(minimum inhibitory concentration)로 결정하였다. 한편, MFC(minimum fungicidal concentration)는 다음과 같이 조사되었다. MIC를 결정한 후 균 생육이 없는 각 시험관들로부터 30 μl 를 취하여 새로운 YPD(yeast extract 0.5%, polypeptone 0.5%, dextrose 1.0%) 액체 배지 3 ml에 가한 다음 30°C 에서 48시간 동안 정지 배양하였다. 이때 균의 생육이 회복되지 않은 화합물의 최저 농도를 MFC로 결정하였다. 모든 항진균 시험은 3 반복하여 중간 값을 취하였다.

병용 효과 측정

두 화합물의 병용 효과는 한 화합물의 MIC 또는 MFC의 $\frac{1}{2}$ 농도를 다른 화합물의 희석액과 혼합한 다음 MIC 및 MFC를 측정하여 화합물 본래의 MIC 및 MFC와 서로 비교하였다. 또한 화합물들의 병용 효과는 macrobroth dilution checkerboard 법^{17,18)}을 이용하여 여러 농도에서도 조사되었다. 두 화합물들의 순차적 2배 희석액을 checkerboard 형으로 혼합한 다음 MIC 및 MFC를 측정하고 그 결과로부터 FIC(fractional inhibitory concentration) 및 FFC(fractional fungicidal concentration) 지수를 구하여 그들의 병용 효과를 판정하였다.

FIC 및 FFC 지수의 결정

FIC 지수는 macrobroth dilution checkerboard 법에 의한 MIC 결과들로부터 아래의 공식을 이용하여 계산하였다.^{17,18)}

$$\text{FIC index} = \\ (\text{MICa combined with b/MICa alone}) + \\ (\text{MICb combined with a/MICb alone})$$

이때 a와 b는 사용된 각 화합물이며 FIC 지수 값이 0.5 이하, 0.5초과 4미만, 4이상일 때 각각 상승적, 부가적,

길항적이라고 판정하였다. 또한 FFC 지수는 MFC 결과들을 이용하여 FIC 지수와 같은 방법으로 결정하였다.

항진균 화합물의 세포 사멸 동태

종균과 적정 농도의 화합물을 포함하는 조사 시험관 (3 ml)은 앞서 기술된 바와 같이 준비되었다. 이때 초기 종균 농도는 3×10^6 CFU/ml 였으며 반응 시험관들은 30°C에서 정치 배양되었다. 일정 시간 별로 반응액 0.1 ml을 취하여 멸균 생리 식염수로 희석한 후 YPD 고체 배지에 도말하여 30°C에서 2일간 배양한 다음 출현하는 균의 집락 수(CFU)를 측정하였다.

결과 및 고찰

Polygodial과 병용된 항진균 약제들의 MIC 및 MFC

항진균 약제들에 대한 천연물 polygodial의 병용 효과를 알아보기 위해 먼저 *Saccharomyces cerevisiae*를 대상으로 화합물들의 정균(MIC) 및 살균(MFC) 활성을 조사하였다. 이미 알려진 바와 같이,^{4,7)} amphotericin B는 비슷한 수준의 정균 및 살균 활성을 나타내었으며 fluconazole과 5-fluorocytosine은 정균 활성만 나타내었고 econazole과 miconazole은 정균 활성에 비해 약한 살균 활성을 나타내었다. 또한 polygodial은 이미 알려진 바와 같이¹⁵⁾ 3.13 µg/ml의 MIC와 6.25 µg/ml의 MFC를 갖는 강한 항진균 활성을 나타내었다(미 제시 결과). 이 결과들을 기준으로 하여 polygodial의 준 저해 농도에서 항진균 약제들의 병용 효과를 조사하였다. 그 결과 amphotericin B, fluconazole, 5-fluorocytosine의 병용 활성은 단독으로 사용한 경우에 비해 4배 이상의 차이를 나타내지 않았다. 그러나 econazole과 miconazole의 항진균 활성은 polygodial에 의해 크게 강화되는 것으로 나타났다. 즉 polygodial의 ½ MIC (1.56 µg/ml)와 병용할 때, miconazole과 econazole의 MIC는 6.25 µg/ml로부터 0.10 µg/ml로 감소하였다. 또한 polygodial의 ½ MFC(3.13 µg/ml)와 병용할 때, miconazole과 econazole의 MFC는 각각 50 µg/ml과 25 µg/ml로부터 0.39 µg/ml로 크게 감소하였다(Table I). 따라서 천연물 polygodial은 항진균 약제들 중 imidazole성 항진균제인 miconazole과 econazole에 대해 선택적으로 항진균 활성을 크게 증진시키는 것으로 판단된다. 한편, imidazole성 항진균 약제들의 활성은 비록 고농도에서는 살균적이거나 *in*

Table I—Susceptibilities of *Saccharomyces cerevisiae* to the antifungal drugs in combination with polygodial

Antifungal drugs	Alone		With polygodial	
	MIC ^{a)}	MFC ^{b)}	MIC ^{c)}	MFC ^{d)}
Amphotericin B	1.56	3.13	0.78	1.56
Fluconazole	6.25	>100	3.13	>100
Econazole	6.25	25	0.10	0.39
Miconazole	6.25	50	0.10	0.39
5-Fluorocytosine	3.13	>100	3.13	>100

^{a)} Minimum inhibitory concentration (µg/ml).
^{b)} Minimum fungicidal concentration (µg/ml).
^{c)} MIC of drug in combination with ½ MIC of polygodial.
^{d)} MFC of drug in combination with ½ MFC of polygodial.

*vivo*에서 사용 가능한 저농도에서는 거의 정균적이다.⁵⁾ 그런데, 일반적으로 화학요법의 효능은 화합물의 정균 활성과 숙주 면역계에 의한 감염균의 제거능(살균 활성)에 의존한다.¹⁹⁾ 그러나 기회성 진균증은 숙주의 면역계가 크게 손상되었을 때 주로 발생하므로 면역계에 의한 감염균의 제거는 어렵다. 따라서 polygodial에 의한 imidazole성 항진균 약제들의 살균 활성 강화는 기회성 진균증 환자로부터 직접 감염균을 제거(멸균)할 수 있으므로 특히 그 의의가 높다고 생각된다.

Polygodial과 병용된 imidazole계 화합물의 항진균 활성 스펙트럼

여러 효모성 진균들에 대해 polygodial과 병용된 imidazole계 화합물들의 항진균 활성을 알아보기 위하여 먼저 항진균제들의 단독 MIC 및 MFC를 측정하였다(Table II). Miconazole과 econazole은 모두 0.78~6.25 µg/ml 농도 범위에서 정균 활성을 나타내었고 12.5~50 µg/ml 범위에서는 살균 활성을 나타내었다. 그리고 polygodial은 0.78~6.25 µg/ml의 범위에서 정균 활성을 나타내었으며 1.56~6.25 µg/ml 범위에서는 살균 활성을 나타내었다(미 제시 결과).¹⁵⁾ 이 결과들을 근거로 각 균주들에 대한 polygodial의 준 저해 농도에서 miconazole 및 econazole의 항진균 활성을 조사하였다. 그 결과 *Candida krusei*를 제외한 모든 시험 균주들에 대해 polygodial과 병용된 imidazole계 화합물의 활성은 크게 강화되는 것으로 나타났다. 즉, polygodial은 ½ MIC농도에서 miconazole의 MIC들을 0.78~6.25 µg/ml로부터 0.05~0.10 µg/ml로 감소시켰으며 econazole의 MIC들은 0.78~6.25 µg/ml에서 0.05~0.20 µg/ml로 감소하였다. 또한 polygodial은

Table II—Antifungal activities of econazole and miconazole in combination with polygodial against various fungal strains

Fungal strains (ATCC No.)	Miconazole (µg/ml)				Econazole (µg/ml)			
	MIC		MFC		MIC		MFC	
	Alone	With ^{a)}	Alone	With ^{b)}	Alone	With ^{a)}	Alone	With ^{b)}
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 7754	6.25	0.10	50	0.39	6.25	0.10	25	0.39
<i>Candida albicans</i> 18804	1.56	0.05	25	0.39	6.25	0.20	50	0.39
<i>Candida albicans</i> 38247	0.78	0.10	12.5	0.20	1.56	0.10	50	0.39
<i>Candida utilis</i> 9226	1.56	0.10	12.5	0.39	0.78	0.10	12.5	0.20
<i>Candida krusei</i> 6258	6.25	6.25	50	50	6.25	3.13	50	50
<i>Cryptococcus neoformans</i> 32719	1.56	0.05	50	0.39	3.13	0.05	25	0.20
<i>Cryptococcus neoformans</i> 32264	3.13	0.10	25	0.20	1.56	0.05	25	0.10

^{a)} MIC of imidazole in combination with ½ MIC of polygodial.
^{b)} MFC of imidazole in combination with ½ MFC of polygodial.

½ MFC농도에서 miconazole의 MFC들을 12.5~50 µg/ml로부터 0.20~0.39 µg/ml로 낮추었으며 econazole의 MFC들은 12.5~50 µg/ml에서 0.10~0.39 µg/ml로 감소하였다. 따라서 polygodial에 의한 imidazole계 화합물의 항진균 활성 증진은 효모성 진균들에 대해 상당히 일반적인 것으로 판단된다.

Polygodial과 imidazole계 화합물의 농도에 따른 병용 효과

Imidazole계 각 화합물들과 polygodial의 농도에 따른 병용 효과를 알아보기 위해 *Saccharomyces cerevisiae*를 대상으로 macrobroth dilution checkerboard 법을 이용하여 항진균 활성을 조사하였다. Miconazole과 polygodial을 병용하였을 때(Fig. 1), 정균적 항진균 작용에서 0.16의 FIC 지수를 나타내었으며 살균적 항진균 작용에서는 0.19의 FFC 지수를 나타내었다. 즉, polygodial은 그 MIC의 ½ 농도인 0.39 µg/ml에서 miconazole의 MIC를 6.25 µg/ml로부터 0.20 µg/ml로 낮추었으며 그 MFC의 ½ 농도인 0.78 µg/ml에서는 miconazole의 MFC를 50 µg/ml로부터 0.78 µg/ml로 낮추었다. 또한 econazole과 polygodial을 병용하였을 때 (Fig. 2), 그들은 정균적 항진균 작용에서 0.19의 FIC 지수를 나타내었으며, 살균적 작용에서는 0.25의 FFC 지수를 나타내었다. 즉, polygodial은 그 MIC의 ½ 농도인 0.39 µg/ml에서 econazole의 MIC를 6.25 µg/ml로부터 0.39 µg/ml로 낮추었으며 그 MFC의 1/16 농도인 0.39 µg/ml에서 econazole의 MFC를 25 µg/ml로부터 3.13 µg/ml로 낮추었다. 따라서 imidazole계 각 화합물들과 polygodial은 정균적, 살균적 항진균 작용에서, 그리고 여러 병용 농도에서 상호 상승적인 것으로 판단된다.

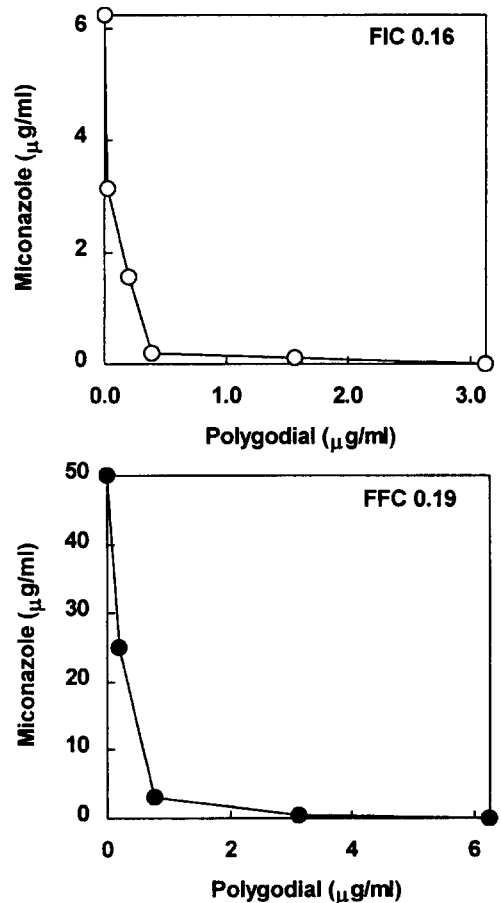


Fig. 1—Resulting isobolograms of the MICs (○) and MFCs (●) obtained with checkerboard combinations of miconazole and polygodial against *Saccharomyces cerevisiae*. The fractional inhibitory concentration (FIC) and fractional fungicidal concentration (FFC) index were calculated with the MICs and MFCs of the combined compounds which exhibited the best antifungal effect, respectively.

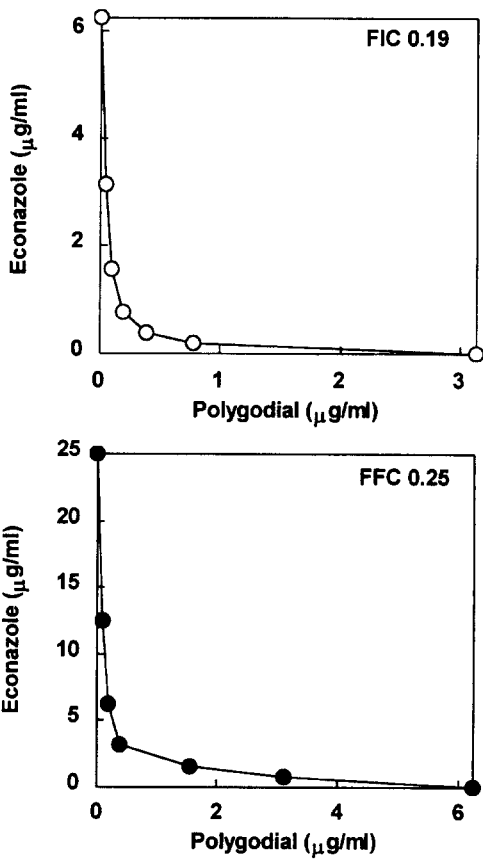


Fig. 2—Resulting isobolograms of the MICs (○) and MFCs (●) obtained with checkerboard combinations of econazole and polygodial against *Saccharomyces cerevisiae*. The fractional inhibitory concentration (FIC) and fractional fungicidal concentration (FFC) index were calculated with the MICs and MFCs of the combined compounds which exhibited the best antifungal effect, respectively.

Imidazole계 화합물의 세포 사멸 활성에 대한 polygodial의 병용 효과

Polygodial에 의한 miconazole과 econazole의 살균적 항진균 활성 강화는 세포 사멸 동태 연구를 통하여 더 조사되었다. 항진균제를 처리하지 않았을 때, *Saccharomyces cerevisiae*의 초기 종균 농도 3×10^6 CFU/ml는 시간에 따라 증가하여 48시간 후 9×10^7 CFU/ml 수준에 도달하였다. 또한 3.13 μg/ml의 polygodial을 처리하였을 때, 조사균의 초기 농도는 48시간 동안 큰 변화 없이 유지되었다(Fig. 3 & 4). Miconazole과 econazole의 경우, 25 μg/ml 이하의 농도

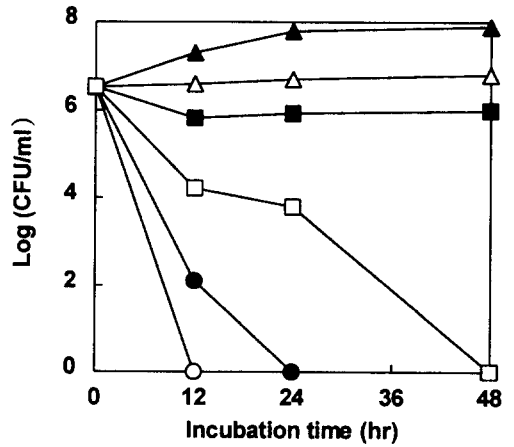


Fig. 3—Killing kinetics of miconazole in combination with polygodial against *Saccharomyces cerevisiae*. Symbols indicate the concentration of miconazole and polygodial: Drug free (▲); polygodial 3.13 μg/ml (△); miconazole 25 μg/ml (■); polygodial (3.13 μg/ml)+miconazole of 3.13 μg/ml (○), 1.56 μg/ml (●), 0.78 μg/ml (□).

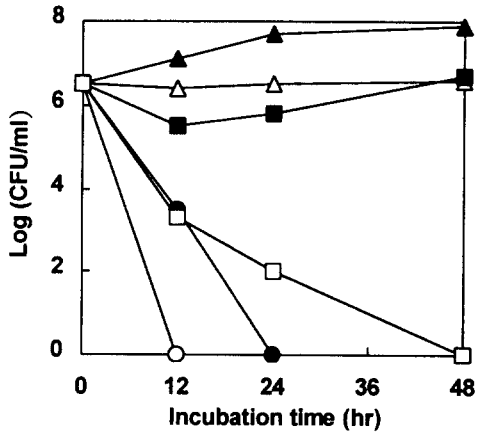


Fig. 4—Killing kinetics of econazole in combination with polygodial against *Saccharomyces cerevisiae*. Symbols indicate the concentration of econazole and polygodial: Drug free (▲); polygodial 3.13 μg/ml (△); econazole 25 μg/ml (■); polygodial (3.13 μg/ml)+econazole of 3.13 μg/ml (○), 0.78 μg/ml (●), 0.39 μg/ml (□).

에서는 살균 활성을 거의 나타내지 못하였다. 그러나 polygodial의 준 살균 농도 (3.13 μg/ml)와 병용하였을 때, 12, 24, 48시간 내 대량균을 완전히 사멸시키는 miconazole의 최저 농도는 각각 0.78 μg/ml, 1.56 μg/ml, 3.13 μg/ml로 나타났다(Fig. 3). 또한 3.13 μg/ml의 polygodial과 econazole을 함께 처리하였을

때, 12, 24, 48시간 내 조사균을 완전히 사멸시키는 econazole의 최저 농도는 각각 0.39 $\mu\text{g/ml}$, 0.78 $\mu\text{g/ml}$, 3.13 $\mu\text{g/ml}$ 로 나타났다(Fig. 4). 따라서 imidazole계 항진균 약제인 miconazole과 econazole은 polygodial과 병용시 그들의 정균 농도 이하에서도 살균 활성을 나타낼 수 있는 것으로 생각된다.

한편 polygodial의 항진균 활성은 세포막 파괴와 관련이 있으며 그 작용은 또한 병용된 화합물의 막 투과성을 높여 항진균 활성을 증진시킬 수 있다고 하였다.¹⁶⁾ 그러나 이러한 가정은 imidazole들에 대한 polygodial의 선택적 병용 효과를 기꺼이 설명할 수 없는 것으로 보인다. 지금까지 규명된 imidazole계 화합물들의 항진균 작용 기구는 ergosterol의 생합성을 저해하여 ergosterol의 세포막 고갈을 야기하고 그에 따른 세포막의 투과성 변형으로 설명되고 있다.^{4,5,20)} 이러한 imidazole의 항진균 작용 기구도 polygodial에 대한 그들의 현저한 항진균 활성 강화를 논리적으로 만족시킬 수 없는 것으로 생각된다. 따라서 polygodial과 imidazole들의 항진균 작용 기구는 그들의 병용 효과를 설명하기 위해서는 앞으로 많은 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

결 론

*Saccharomyces cerevisiae*에 대한 amphotericin B, fluconazole, miconazole, econazole, 5-fluorocytosine의 정균적(MIC), 살균적(MFC) 항진균 활성을 각각 polygodial의 $\frac{1}{2}$ MIC 및 $\frac{1}{2}$ MFC와 병용하여 조사한 결과 miconazole과 econazole의 항진균 활성은 다른 항진균제들과 달리 polygodial에 의해 크게(32~128배) 증진되는 것으로 나타났다. Polygodial에 의한 imidazole계 화합물의 항진균 활성 강화는 *Candida krusei*를 제외한 *Candida albicans*, *Candida utilis*, *Cryptococcus neoformans*을 포함하는 여러 효모성 진균들에 대해서도 유효하였다. 또한 polygodial과 imidazole계 화합물의 병용 효과를 *Saccharomyces cerevisiae*를 대상으로 macrobroth dilution checkerboard 법을 이용하여 조사한 결과, polygodial과 miconazole의 병용에서 FIC 및 FFC 지수는 각각 0.16과 0.19 이었으며 polygodial과 econazole의 병용에서는 0.19의 FIC와 0.25의 FFC 지수를 나타내었다. 따라서 imidazole계 각 화합물들과 polygodial은 정균적, 살

균적 항진균 작용에서 상호 상승적인 것으로 판단된다.

문 헌

- 1) American Thoracic Society : Fungal infection in HIV-infected persons. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **152**, 816 (1995).
- 2) Dixon, D. M., McNeil, M. M., Cohen, M. L., Gellin, B. G. and La Montagne, J. R. : Emerging fungal infections. *Public Health Rep.* **111**, 226 (1996).
- 3) Sternberg, S. : The emerging fungal threat. *Science* **266**, 1632 (1994).
- 4) Cartwright, R. Y. : Antifungal drugs. *J. Antimicrob. Chemother.* **1**, 141 (1975).
- 5) Fromtling, R. A. : Overview of medically important antifungal azole derivatives. *Clin. Microbiol. Rev.* **1**, 187 (1988).
- 6) Warnock, D. W. : Amphotericin B: an introduction. *J. Antimicrob. Chemother.* **28**, 27 (1991).
- 7) Como, J. A., Pharm, D. and Dismukes, W. E. : Oral azole drugs as systemic antifungal therapy. *N. Engl. J. Med.* **330**, 263 (1994).
- 8) Denning, D. W. : Can we prevent azole resistance in fungi? *The Lancet* **346**, 454 (1995).
- 9) Rex, J. H., Rinaldi, M. G. and Pfaller, M. A. : Resistance of *Candida* species to fluconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **39**, 1 (1995).
- 10) Asakawa, Y., Dawson, G. W., Griffiths, D. C., Lallemand, J. Y., Ley, S. V., Mori, K., Mudd, A., Pezechk-Leclaire, M., Pickett, J. A., Watanabe, H., Woodstock, C. M. and Zhong-Ning, Z. : Activity of drimane antifeedants and related compounds against aphids and comparative biological effects and chemical reactivity of (-) and (+)-polygodial. *J. Chem. Ecol.* **14**, 1845 (1988).
- 11) Kubo, I., Lee, Y. W., Pettei, M., Pilkwicz, F. and Nakanishi, K. : Potent army worm antifeedants from the East African Warburgia plants. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1013 (1976).
- 12) Nakanishi, K. and Kubo, I. : Studies on warburganal, muzigadial and related compounds. *Isr. J. Chem.* **16**, 28 (1981).
- 13) Kubo, I. and Ganjian, I. : Insect antifeedant terpenes, hot-tasting to humans. *Experientia* **37**, 1063

- (1981).
- 14) Kubo, I., Miura, I., Pettei, M., Lee, Y. W., Pilekewicz, F. and Nakanishi, K. : Muzigadial and warburganal, potent antifungal antiyeast, and African army worm antifeedant agents. *Tetrahedron Lett.* **52**, 4553 (1977).
 - 15) Lee, S. H. : Antifungal activity and action of polygodial, a new antifungal agent. *Proc. KSAM Spring Meeting*, Seoul, Korea. **32**, 158 (1998).
 - 16) Kubo, I. and Taniguchi, M. : Polygodial, an antifungal potentiator. *J. Nat. Prod.* **51**, 22 (1988).
 - 17) Hallander, H., Dornbusch, K., Gezelius, L., Jacobson, K. and Karlsson, I. : Synergism between aminoglycosides and cephalosporins with antipseudomonal activity: Interaction index and killing curve method. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**, 743 (1982).
 - 18) Neu, H. C. and Chin, N. : *In vitro* activity of fleroxacin in combination with other antimicrobial agents. *Am. J. Med.* **94**, 9 (1993).
 - 19) Tanaka, Y. : Antifungal agents, "The search for bioactive compounds from microorganisms", Omura S. Springer-Verlag, p. 30 (1992).
 - 20) Georgopapadakou, N. H. and Walsh, T. J. : Human mycoses: drugs and targets for emerging pathogens. *Science* **264**, 371 (1994).