
コセンダングサ (*Bidens pilosa* var. *pilosa*) から分離された抗菌活性をもつポリアセチレンについて

柘植純一

Abstract

Antimicrobial activity of the ethanol extract from aerial parts of a cosmopolitan weed *Bidens pilosa* var. *pilosa* (Asteraceae), collected on Nagoya city was evaluated by the disk diffusion method. The benzene-ethylacetate 6:4 fraction obtained by silica gel column chromatography showed extremely strong activities against all tested microorganisms (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*), and an antimicrobial polyacetylene was isolated from this fraction by bioassay guided fractionation with preparative thin layer chromatography. The molecular structure of the isolated compound was elucidated by IR spectrometry, UV spectrometry, MS spectrometry and NMR spectrometry. The structure of the compound (mw 196, C₁₃H₈O₂) was determined to be 1,2-dihydroxytrideca-3,5,7,9,11-pentayne. This compound showed much stronger activities against fungi than bacteria. The multiplication of *C. albicans* was inhibited at 5 µg/filter paper disc.

Keywords : *Bidens pilosa*, antimicrobial activity, polyacetylene

I. 緒言

発展途上国(特にアフリカおよび南アメリカ諸国)において多くの人々は地元の治療者によって処方される疾病治療に有効であると伝承されている薬用植物を利用している (Adia *et al.* 2014)。一方、先進国では化学合成された抗生物質の多用により、薬剤耐性菌の出現や合成薬剤の副作用が深刻な問題になっていることから、民族薬学の重要性が注目されている (Sasidharan *et al.* 2011)。現代の日本では極端な清潔志向があり、文房具から生活用品にいたるまで抗菌加工された抗菌グッズといわれる製品が広く使用されている。しかしながら、これらの製品に使用されている抗菌物質も多くは合成化合物で、使い方によっては健康被害が懸念されている。特に、玩具など乳幼児が使用する製品の場合、深刻な健康被害をおよぼす危険性があり得る。また抗菌物質、抗生物質を過度に使用することは本来人間と共生関係にある微生物をも封じ込めてしまうことになり決して好ましいことではない(磯部 2001)。

このような問題が背景となり合成化合物に頼る従来の手法ではなく、生物間において繰り広げられている相互作用に注目し、そこで重要な役割を果たしている生理活性物質を新しい薬剤の開発に役立てることに関心が向けられている (Fabricant & Farnsworth 2001)。特にエジプト (Sarg *et al.* 1991)、エチオピア (Desta 1993)、ギニア・ビサウ (Silva *et al.* 1996, 1997, Abreu *et al.* 1999)、ルワンダ (Boily & Puyvelde 1986, Vlietinck *et al.* 1995, Sindambiwe *et al.* 1999)、セネガル (Grand *et al.* 1988)、南アフリカ

(Rabe & Staden 1997, Afolayan & Meyer 1997), ウガンダ(Freiburghaus *et al.* 1996, 1998), ブラジル(Borges *et al.* 2013)などアフリカおよび南アメリカ諸国で伝統的に治療薬として用いられている薬用植物を中心に, その地域で伝統的な治療に用いられている薬用植物から治療効果のある物質をスクリーニングすることを通して, 現地の民間医療に従事する治療者によるその植物の伝統的な処方の方の正しさを検証する研究が行われている(Geissberger & Séquin 1991)。このような研究は新しい薬剤を開発する際の鋳型となるような基本構造の発見にも繋がると考えられている(Wagner 1993)。

伝統的な薬用植物として広く使用されている植物にコセンダングサ(*Bidens pilosa* var. *pilosa*)がある。コセンダングサは熱帯アメリカを起源とし, 現在では南北アメリカ大陸の他, アフリカ, アジアの熱帯から亜熱帯にかけて世界中に広く分布するコスモポリタン種となっているキク科の一年草である。この植物はアフリカや南アメリカ諸国で民間伝承薬として広く知られており, 特にマラリア(Adia *et al.* 2014), 腸炎, 腎炎, 下痢(Chih *et al.* 1995), 消化性潰瘍を含む胃障害(Alvarez *et al.* 1999)などの治療に利用されている。実際にコセンダングサの懸濁物あるいは抽出物を用いた生理活性に関する研究の結果, 抗マラリア活性(Brandão *et al.* 1997, Oliveira *et al.* 2004, Tobinaga *et al.* 2009), 抗炎症, 抗アレルギー, 免疫抑制活性(Pereira *et al.* 1999, Horiuchi & Seyama 2006), 抗菌活性(Ashafa & Afolayan 2009, Dagawal & Ghorpade 2011), 抗白血病活性(Chang *et al.* 2001), 血糖降下作用(Ubillas *et al.* 2000), 肝臓保護効果(Yuan *et al.* 2008), 抗癌作用(Sundararajan *et al.* 2006)等が確認されている。

コセンダングサには, *Bidens pilosa* complex ともいわれるように種内変種が多く, さらにこれらの間では雑種も存在しており形態による正確な同定が煩雑であることから, Grombone-Guaratini *et al.* (2005)はこれらの植物体内に含まれる化学物質に注目し, セスキテルペンおよびポリアセチレンのパターンによるブラジル南東部で採集したセンダングサ属(*Bidens* sp.)の分類を試みている。日本にはコセンダングサ(筒状花のみで舌状花をもたない)が本州中部以西に自生しているほか, その変種で舌状花をもつコシロコセンダングサ(*Bidens pilosa* var. *minor*)が本州中部以西の都会の荒地や川原に, アワユキセンダングサ(*Bidens pilosa* var. *bisetosa*)が南西諸島, 小笠原諸島の路傍に, 日本生態学会により日本の侵略的外来種ワースト 100 に指定されているタチアワユキセンダングサ(*Bidens pilosa* var. *radiata*)が九州南部から沖縄, 小笠原諸島の路傍や畑地に群生している。また, センダングサ属では在来種であるタウコギ(*Bidens tripartita*), エゾノタウコギ(*Bidens radiata* var. *pinnatifida*), ヤナギタウコギ(*Bidens cernua*)のほか, 先史時代に移入したと考えられているセンダングサ(*Bidens biternata*), ホソノバセンダングサ(*Bidens parviflora*), コバノセンダングサ(*Bidens bipinnata*), オトメセンダングサ(*Bidens aristosa*), 20世紀初頭に移入したと考えられている北アメリカ原産のアメリカセンダングサ(*Bidens frondosa*)などが自生している(大橋ほか 1981, 村上・鷲谷 2002, 清水 2003, 梅沢 2007)。

コセンダングサの一群はいずれも在来草本類との競合や畑の雑草として問題になっており駆除が必要な外来植物であるが, 瘦果の先端に刺があり動物の体について分布を拡大するため農作業時に人体について畑に持ち込まれやすく, 駆除が非常に困難である。日本では沖縄諸島でタチアワユキセンダングサを中心に薬用植物として栽培, 利用されているのを除いて本土に自生するコセンダングサに含まれる生理活性物質の検索, 薬用植物としての利用に関する研究はほとんど行われていない。しかしながら外来植物駆除のために刈取った後の利用価値が認められれば未利用資源の有効利用につながると考えられる。本研究では本土に自生するコセンダングサに含まれる抗菌活性物質を分離することを目的とし, 名古屋市で採集した同植物の地上部のエタノール抽出物に含まれる抗菌活性物質を検索した結果, 非常に強い活性を有する物質を単離しその構造を決定することができたので報告する。

II. 材料と方法

1. 植物試料

本研究で使用したコセンダングサ (*Bidens pilosa* var. *pilosa*) は 2000 年 7 月 29 日および 10 月 15 日に名古屋市東区の矢田川河川敷で採集した。使用した試料および採集地の写真を Fig. 1 に示した。採集の際には地上部(葉および茎)を刈り取り、以後の実験に供するまで乾燥させずに新鮮な状態で -35°C の冷凍庫で凍結保存した。



Fig. 1. *Bidens pilosa* var. *pilosa* used in the present study.

Aerial parts (leaves and stems) of *Bidens pilosa* var. *pilosa* used in the present study were collected on Nagoya city.

A; collected place (the dike at the Yada river, Higashi-ku, Nagoya), B; the collected sample.

2. 抽出物の調製

凍結保存試料(湿重 560 g)を 2 L のエタノール中で日本精機製 AM-7 ホノジナイザーによってホモジナイズしエタノールに浸した状態で 24 時間静置後、超音波洗浄装置(Bransonic Ultrasonic Cleaner Model 8210, 220 W)中で 30 分間処理した後、3,500 rpm, 30 分間遠心分離することによりエタノール層と沈殿物とを分離した。沈殿物に同量のエタノールを加えて同様の処理をさらに 2 回繰り返す。得られたエタノール層をまとめて 40°C で減圧濃縮し粗抽出物 (16.07 g) とした。粗抽出物は少量のエタノールに溶解し -35°C の冷凍庫で保存した。

3. 抗菌活性物質の分離精製

(1) ケイ酸カラムクロマトグラフィー

エタノール抽出によって得られた粗抽出物をケイ酸カラムクロマトグラフィー(Wakogel C-200)により分画した。n-ヘキサンで平衡化させたケイ酸カラムに試料を供し、n-ヘキサン、ベンゼン、ベンゼン-酢酸エチル(8:2)、ベンゼン-酢酸エチル(6:4)、ベンゼン-酢酸エチル(4:6)、ベンゼン-酢酸エチル(2:8)、酢酸エチル、酢酸エチル-メタノール(1:1)およびメタノール各 2 L で順次溶出した。溶出された各画分を 40°C で減圧濃縮し少量のクロロホルム-メタノール(2:1)混液に溶解し冷凍庫で保存した。

(2) 薄層クロマトグラフィー(TLC)

ケイ酸カラムクロマトグラフィーにより得られた画分からの抗菌活性物質の分離・精製は UV ランプ

照射および TLC バイオオートグラフィーを指標として用いた薄層クロマトグラフィー(5×20 cm, 20×20 cm, Wakogel B5)によって行われた。展開溶媒にはクロロホルム-エタノール(19:1)および n-ヘキサン-ジエチルエーテル(1:9)を使用した。

(3) TLC バイオオートグラフィー

グルコース・ペプトン(GP)培地(2%グルコース, 0.5%カゼインペプトン, 0.2%酵母エキス, 0.05% MgSO₄, 0.1% KH₂PO₄)で12時間予備培養した *Saccharomyces cerevisiae* の培養液 8 mL を 125°C, 15 分間蒸気圧滅菌後 45°C まで冷却させた 1.5%寒天を含む GP 培地 80 mL に接種し, 滅菌済みシャーレ(7.5×22.5 cm)に移して固めた。この平板培地上に抽出物を展開させた TLC プレート(5×20 cm)をケイ酸側を下にして, 供試菌を混濁培養している寒天培地の上に密着させて置いた状態で 27°C, 48 時培養後, 形成された増殖阻止円の位置から抗菌活性を有する物質のスポットを検出した。

4. 抗菌活性物質の構造解析

単離された抗菌活性物質を以下の機器分析に供しその構造を解析した。IR スペクトルは JASCO FT/IR-420 によって, UV スペクトルは Shimadzu mini1240 によって測定された。質量分析は JEOL JMS-SX102 A によって, NMR 分析は Bruker AMX500 によって行われた。

得られた分析データは以下のとおりである。

UV λ_{max} (EtOH) nm: 202, 237, 249, 263. IR ν_{max} (KBr) cm⁻¹: 3300, 2900, 2845, 2200, 1630, 1450, 1375, 1345, 1235, 1210, 1100. FD-HR-MS m/z (M⁺): Calcd. for C₁₃H₈O₂: 196.0524, Found: 196.0510. ¹H-NMR (500 MHz, CDCl₃): δ 4.51 (1 H, dd, J=6.1, 3.8 Hz, C-CH(OH)-C), 3.76 (1 H, dd, J=11.3, 3.8 Hz, C-CH₂-OH), 3.71 (1 H, dd, J=11.3, 6.1 Hz, C-CH₂-OH), 1.96 (3 H, s, C≡C-CH₃).

5. 微生物

抗菌活性試験には, グラム陽性菌として *Bacillus subtilis* ATCC 6633 および *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, グラム陰性菌として *Escherichia coli* ATCC 11775, 真菌として *Candida albicans* ATCC 10231 および *S. cerevisiae* を用いた。

6. 抗菌活性試験

抽出物の抗菌活性試験はディスク拡散法によって行われた。使用培地は細菌用にはダイズ・カゼイン・ダイジェスト(SCD)培地(1.7%カゼインペプトン, 0.3%大豆ペプトン, 0.25% K₂HPO₄, 0.25%グルコース, 0.5% NaCl), 真菌用には GP 培地とした。これらの培地に 1.5%となるように寒天を加え, 121°C, 15 分間蒸気圧滅菌後, 滅菌済みの直径 90 mm シャーレに 20 mL ずつ分注して固めた。この平板培地上に供試菌を混濁培養させた培地を重層するために, 0.5%の寒天を含む同じ培地を調製し 121°C, 15 分間蒸気圧滅菌後 45°C まで冷却した後, 同種類の液体培地で 12 時間予備培養した供試菌の培養液を重層用培地の 1/5 量接種してよく混合した後, 平板培地上に均一な薄い層が形成されるように滅菌済みのパスツールピペットで重層した。試料溶液をペーパーディスク(直径 6 mm)に浸み込ませ十分に溶媒を乾燥させた後, 上記の方法で調製した抗菌活性試験用の平板培地上に載せた。陽性対照試験として細菌用にはネオマイシン(0.05 μg/disk), 真菌用にはナイスタチン(2 μg/disk)を用いた。クロロホルム-メタノール(2:1)混液をペーパーディスクに浸み込ませた後十分に乾燥させたものを空試験とした。細菌は 37°C, 24 時間, 真菌は 27°C, 48 時間培養後, 抗菌活性を評価した。全ての試験を 1 試料につきシャーレ

2枚ずつ行い、抗菌活性をペーパーディスクを含む阻止円の直径(mm)で表した。

7. 試薬

ケイ酸カラムクロマトグラフィー用ケイ酸(Wakogel C-200)および薄層クロマトグラフィー用ケイ酸(Wakogel B-5)は和光純薬工業社製、抗菌活性試験用のペーパーディスクは東洋濾紙社製、SCD培地およびGP培地は日本製薬社製、ナイスタチンおよびネオマイシンはSigma-Aldrich社製の製品を用いた。その他の試薬は全て特級試薬を用いた。

III. 結果

1. 抗菌活性物質の分離と精製

コセンダングサのエタノール抽出物をケイ酸カラムクロマトグラフィーによって9画分(Fr1; n-ヘキサン, Fr2; ベンゼン, Fr3; ベンゼン-酢酸エチル 8:2, Fr4; ベンゼン-酢酸エチル 6:4, Fr5; ベンゼン-酢酸エチル 4:6, Fr6; ベンゼン-酢酸エチル 2:8, Fr7; 酢酸エチル, Fr8; 酢酸エチル-メタノール 1:1 および Fr9; メタノール)に分画し、各画分の抗菌活性試験を行った結果、Fr3, Fr4 および Fr5 ですべての供試菌に対して抗菌活性が認められ、これらの中でFr4の活性が最も強かった。Fig. 2に *S. cerevisiae* に対する各画分の抗菌活性試験の結果を示した。また Table 1に Fr4 の *B. subtilis*, *S. aur-*

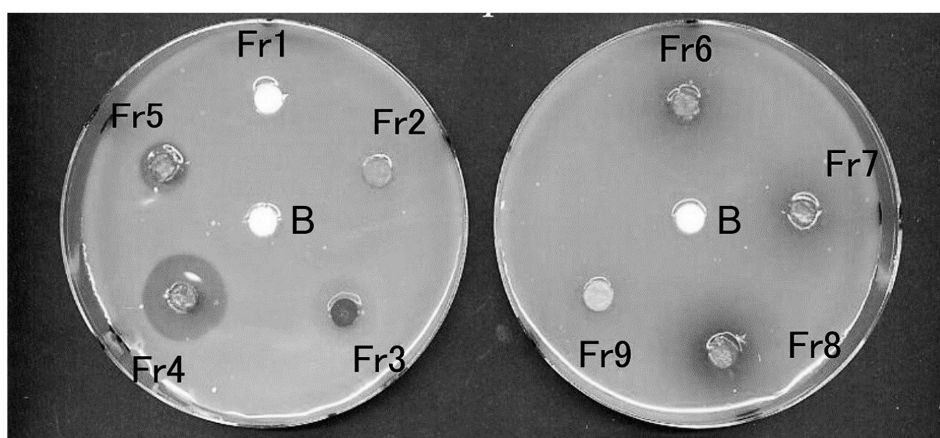


Fig. 2. Inhibition zone of the fractions obtained by silica gel column chromatography of the ethanol extract from *Bidens pilosa* var. *pilosa* against *Saccharomyces cerevisiae*.

Antimicrobial activities of the fractions were determined by the disc diffusion method. Each 100 μ g of the sample dissolved in 12.5 μ g of chloroform-methanol (2:1) was applied to the paper disk.

Fr1, n-hexane; Fr2, benzene; Fr3, benzene-ethylacetate 8:2; Fr4, benzene-ethylacetate 6:4; Fr5, benzene-ethylacetate 4:6; Fr6, benzene-ethylacetate 2:8; Fr7, ethylacetate; Fr8, ethylacetate-methanol 1:1; Fr9, methanol; B, chloroform-methanol 2:1 (negative control).

Table 1. Antimicrobial activity of Fr4 (benzen-ethylacetate 6:4) obtained by silica gel column chromatography of the ethanol extract from *Bidens pilosa* var. *pilosa*.

Microorganisms tested	Inhibition Diameters (mm)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	8.0
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	9.5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 11775	8.0
<i>Candida albicans</i> ATCC 10231	10.5

500 μ g/paper disk

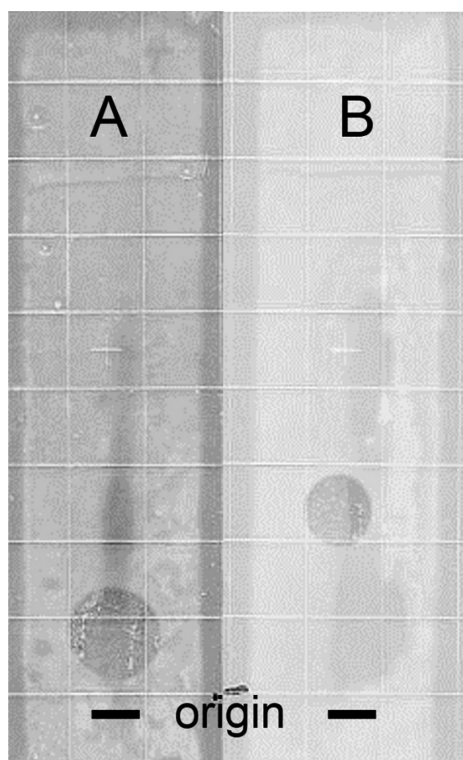


Fig.3. Thin layer chromatography (TLC) bioautography against *Saccharomyces cerevisiae* of Fr4 (benzene-ethylacetate 6:4) obtained by silica gel column chromatography of the ethanol extract.
Solvent systems: A, chloroform-ethanol 19:1; B, n-hexane-diethylether 1:9.

eus, *E. coli* および *C. albicans* に対する抗菌活性試験の結果を示した。真菌である *C. albicans* に対して最も強い活性が観察された。Fr4 から 254 nm の UV 照射によるスポットの検出および *S. cerevisiae* に対する抗菌活性を指標にして TLC により活性物質の分離・精製を行った。Fig. 3 に TLC バイオオートグラフィーの結果を示した。まずクロロホルム-エタノール 19:1 で展開したところ $R_f=0.15$ 付近に UV 照射により暗青色に見え、バイオオートグラフィーの結果大きな増殖阻止円が形成されるスポットが現れることが確認されたため、この部分を分取用 TLC によって同溶媒系で展開し分取した。この展開溶媒では黄緑色の色素を有する物質と目的物質とが重なり分離することができなかったので一緒に分取した。次に n-ヘキサン-ジエチルエーテル 1:9 で展開したところ $R_f=0.36$ 付近に UV 照射により暗青色に見えバイオオートグラフィーの結果大きな増殖阻止円を形成するスポットが観察され、黄緑色の色素を有する物質は原点付近に残り完全に分離したため、分取用 TLC によって同溶媒系で 3 回展開を繰り返して分取し、62.2 mg の精製物が得られた。単離されたこの物質は溶媒を濃縮乾固させると短時間で黒色の炭状に変化し、溶媒に溶解しなくなった。そのため実験操作は窒素ガス下で行い、溶媒乾固後は直ちにクロロホルム-メタノール(2:1)混液に溶解させて、さらに窒素ガスを封入した上で冷凍保存した。溶媒中で保存後に TLC に供すると原点に分解産物と考えられる黄色い蛍光をもつ物質が検出されるため、構造解析のための機器分析に供する直前に分解産物を取り除くために再度 TLC による分離精製を行った。

2. 精製物の構造解析

高分解能質量分析装置(FD-Hr-MS)による分析結果から分子量 196 であるこの精製物の分子式を $C_{13}H_8O_2$ と決定した。また赤外線(IR)吸収スペクトルの結果、三重結合に起因する 2200 cm^{-1} における吸収および水酸基に起因する 3300 cm^{-1} における吸収が観察された。

$^1\text{H-NMR}$ のスペクトルを Fig. 4 に示した。前述したようにこの化合物は非常に化学的に不安定である

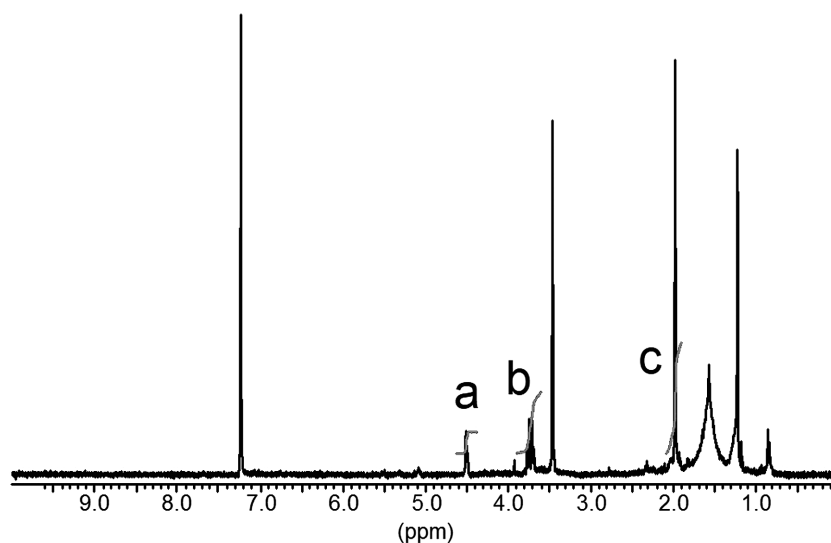


Fig. 4. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the compound isolated from *Bidens pilosa* var. *pilosa*.
 a: one proton derived from a hydroxyl group connected methine.
 b: two protons derived from none equivalent methylene adjacent to the methane (a).
 c: three protons derived from methyl connected to the acetylene terminal.

ため、精製後に生じた分解産物のものと考えられるシグナルも複数検出された。そのため、すでに決定している分子式とシグナルの積分値から考えて、積分曲線を表示した 4.5 ppm 付近、3.7 ppm 付近および 2 ppm 付近の 3 つのシグナルをこの化合物由来のシグナルと推定した。また DOSY スペクトルを測定した結果これらの拡散係数が一致し、同じ分子由来のシグナルであることが確認された。これら 3 つのシグナルの積分値は低磁場側から 1 : 2 : 3 となっており 4.5 ppm 付近にみられるシグナルはメチン 1 個分によるものと考えられるが、一般的なアルカン基よりも低いケミカルシフトから判断して水酸基が結合したメチンであると推定できる。3.7 ppm 付近のメチレンと考えられるシグナルは細かくに分裂しており、このメチンに隣接する非等価メチレンであると推定できる。また 2 ppm 付近の鋭いシグナルは、文献値との比較からアセチレンの末端に結合したメチルと推定できる。

これら 3 つのシグナルの解析結果を Fig. 5 にまとめた。低磁場側から a, b, c および d で表したプロトンのうち、a はケミカルシフトが 4.51 ppm でカップリング定数が 6.1 Hz, 3.8 Hz のダブルダブレット、b はケミカルシフトが 3.76 ppm でカップリング定数が 11.3 Hz, 3.8 Hz のダブルダブレット、c はケミカルシフトが 3.71 ppm でカップリング定数が 11.3 Hz, 6.1 Hz のダブルダブレット、d はケミカルシフトが 1.98 ppm のシングレットである。このことは b および c は光学活性である a のメチンに隣接する非等価メチレンであり、11.3 Hz は非等価メチレン同士のジェミナルカップリングであることを示している。これらの結果から単離された化合物の構造を 1,2-dihydroxytrideca-3,5,7,9,11-pentayne と決定した (Fig. 6)。

3. 精製物の抗菌活性

単離された 1,2-dihydroxytrideca-3,5,7,9,11-pentayne の *S. aureus* および *C. albicans* に対する抗菌活性試験の結果を Fig. 7 に示した。いずれの供試菌に対しても強い抗菌活性が認められたが、細菌よりも真菌に対してより強い抗菌活性を示していることが特徴的であり、5 μg /ペーパーディスクで *C. albicans* の増殖を強く阻害した。

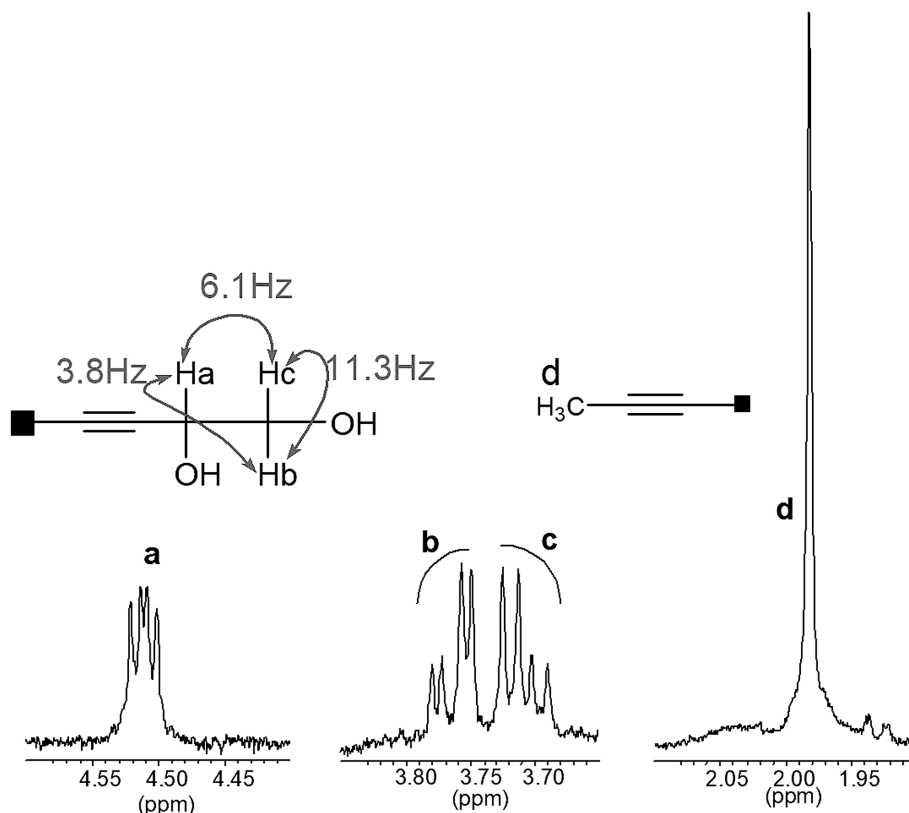


Fig. 5. Analyses of $^1\text{H-NMR}$ spectrum of the compound isolated from *Bidens pilosa* var. *pilosa*.
 a: chemical shift, 4.51 ppm; spin-spin coupling constant, 6.1 Hz, 3.8 Hz; coupling, double doublet.
 b: chemical shift, 3.76 ppm; spin-spin coupling constant, 11.3 Hz, 3.8 Hz; coupling, double doublet.
 c: chemical shift, 3.71 ppm; spin-spin coupling constant, 11.3 Hz, 6.1 Hz; coupling, double doublet.
 d: chemical shift, 1.98 ppm; coupling, singlet.

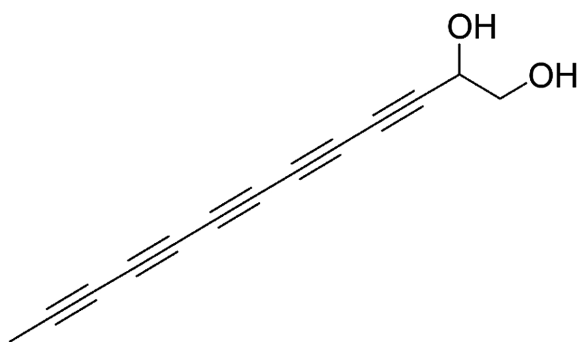


Fig. 6. Molecular structure of the compound isolated from *Bidens pilosa* var. *pilosa*.

The structure of the antimicrobial compound isolated from *Bidens pilosa* var. *pilosa* was determined to be 1,2-dihydroxytrideca-3,5,7,9,11-pentayne.

IV. 考察

キク科植物からは細胞毒性、神経毒性、抗菌、抗炎症、植物毒性等の生物活性を有する 1100 を超える多様なポリアセチレン化合物が分離されているが (Konovalov 2014), コセンダングサからも多くのポリアセチレン化合物が分離されており (Wang *et al.* 2010), これらの抗菌 (Tobinaga *et al.* 2009), 抗マラリア (Tobinaga *et al.* 2009, Oliveira *et al.* 2004), ヒト培養細胞に対する過成長作用 (Alvarez *et al.* 1996), 免疫抑制・抗炎症 (Pereira *et al.* 1999), ヒト臍静脈内皮細胞に対する抗細胞増殖および抗血管形成活性 (Wu *et al.* 2004), 抗酸化活性 (Lee *et al.* 2013), 血糖降下活性 (Ubillas *et al.* 2000) 等についての報告があり、非

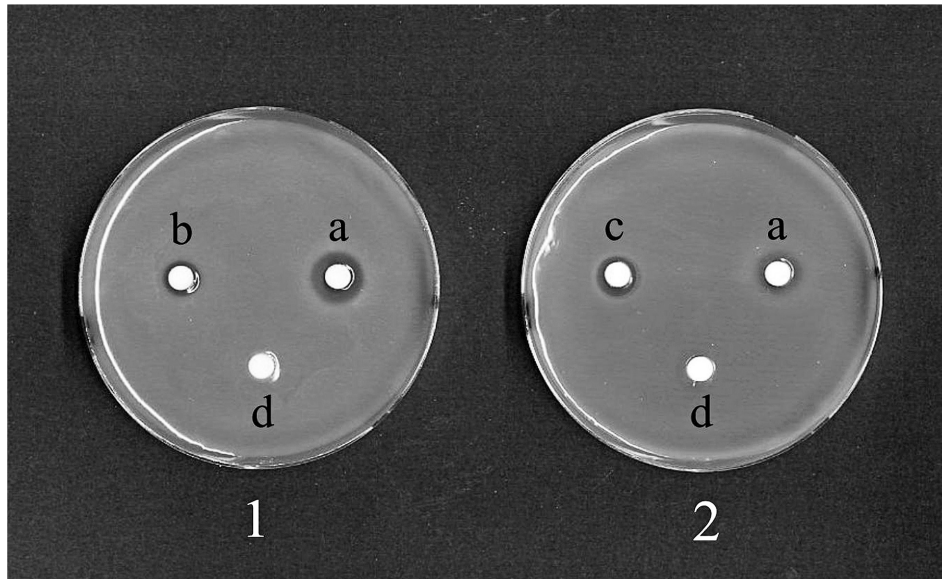


Fig. 7. Inhibition zone of 1,2-dihydroxytrideca-3,5,7,9,11-pentayne isolated from *Bidens pilosa* var. *pilosa* against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus*.

Antimicrobial activities of 1,2-dihydroxy-trideca-3,5,7,9,11-pentayne were determined by the disc diffusion method.

1, *Candida albicans* ATCC 10231; 2, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

a, 5 μ g of 1,2-dihydroxytrideca-3,5,7,9,11-pentayne; b, 2 μ g of nystatin (positive control); c, 0.05 μ g of neomycin (positive control); d, chloroform-methanol 2:1 (negative control).

常に興味深い生理活性物質を含む植物として知られている。

本研究でもコセンダングサのエタノール抽出物から非常に強い抗菌活性をもつポリアセチレン化合物が分離され、その構造はスペクトル分析により 1,2-dihydroxytrideca-3,5,7,9,11-pentayne と決定された。この物質はコセンダングサからは 2009 年にフィジー産のものから初めて発見され、抗菌活性およびマラリア原虫 (*Plasmodium falciparum*) に対する成長阻害活性が報告されている (Tobinaga *et al.* 2009)。このポリアセチレンは本研究では供した植物試料 560 g (湿重) から 62.2 mg 分離されていることから、決して微量成分ではなく、かなり多く産生・蓄積される物質であると考えられる。しかし薬用植物として注目され生物活性物質の検索が広く行われているコセンダングサで 2009 年までこの物質が発見されなかったのは、多くの研究者が扱いやすさから抽出前の植物試料を乾燥処理しているため、非常に不飽和度が高く化学的に不安定であるこの物質が抽出前に分解し消失した可能性が高いと考えられる。本研究でも TLC による分離過程で少しでも空気に触れると黒く炭状に変化し、単離後も精製物を再度 TLC に供すると原点から移動しない分解産物と考えられる黄色い蛍光物質が生じたため、実験操作中の消失も多かったことが示唆される。Nakajima & Kawazu (1977) もオオオナモミ (*Xanthium canadense*) から分離された trideca-1-ene-3,5,7,9,11-pentayne のハエ卵孵化阻害活性に関する研究の中で溶媒を減圧濃縮中に黒く変化しあらゆる溶媒に不溶となることを報告している。試料を新鮮な状態のままアセトン抽出を行った Tobinaga *et al.* (2009) もそれ以前の研究者が操作および保存の容易さから乾燥させた植物を試料として用いたことによる違いを指摘している。これらのことから植物中に含まれるポリアセチレン化合物を検索する際には採集した植物試料を乾燥させずに新鮮な状態で凍結保存し、目的物質の分離精製過程では空気に触れさせず窒素ガス下に置き、精製物を保存する際には溶媒に溶解させ窒素ガスで封印することが重要であると考えられる。Borges *et al.* (2013) はブラジル南部におけるコセンダングサの治療的使用方法についての正しい知識を持つ 4 人の情報提供者から聞き取った 15 例の処

理方法すべてにおいて、植物体を乾燥させず新鮮な状態で使用していることを報告している。このことは植物体を乾燥させずに生で取り扱うことが、コセンダングサに含まれる化学的に不安定なポリアセチレン化合物のもつ生理活性を有効に利用するための伝統的な手法である可能性が示唆される。

本研究で分離された 1,2-dihydroxytrideca-3,5,7,9,11-pentayne には非常に強い抗菌活性が観察され、この活性は細菌よりも真菌に対して強かった。これはポリアセチレン化合物の特徴であり、コセンダングサ以外の植物由来ポリアセチレン化合物の抗真菌活性に関する研究でベニバナ (Allen & Thomas 1971), ニンジン (Garrod *et al.* 1978), ノアザミ (Yoon *et al.* 2011), ピレオギク (Rahman *et al.* 2007) 等でも報告されている。ポリアセチレン化合物は前述のように細胞毒性、抗マラリア原虫活性、ヒト培養細胞に対する過成長作用等、真核生物に対する生物活性をもつことが知られており、ポリアセチレンが細胞膜の機能に何らかの影響を与えると推測されている (Garrod *et al.* 1979)。コセンダングサは現在のところ北海道には侵入していないが、北海道の外来種リストである北海道ブルーリスト (北海道ブルーリスト 2010) のカテゴリー A3 (北海道に定着しており、生態系等への影響が報告または懸念されている外来種) に指定されているアメリカセンダングサは札幌市周辺にも広く自生している。コセンダングサと比較してアメリカセンダングサに含まれる生理活性物質に関する詳細な研究は行われていないため、駆除後の有効利用につながる研究が期待される。

謝辞

本研究を行うにあたり質量分析を北海道大学農学部 GC-MS & NMR 室の渡部賢二氏に、NMR スペクトルを同室の富士江里博士に測定して頂いたことを深く感謝申し上げます。

参考文献

- Abreu, P. M., Martins, E. S., Kayser, O., Bindseil, K. U., Siems, K., Seemann, A. & Frevert, J. (1999) Antimicrobial, antitumor and antileishmania screening of medicinal plants from Guinea-Bissau. *Phytochemistry* 6, 187-195.
- Adia, M. M., Anywar, G., Byamukama, R., Kamatenesi-Mugisha, M., Sekagya, Y., Kakudidi, E. K. & Kiremire, B. T. (2014) Medicinal plants used in malaria treatment by Prometra herbalists in Uganda. *Journal of Ethnopharmacology* 155, 580-588.
- Afolayan, A. J. & Meyer, J. J. M. (1997) The antimicrobial activity of 3,5,7-trihydroxyflavone isolated from the shoots of *Helichrysum aureonitens*. *Journal of Ethnopharmacology* 57, 177-181.
- Allen, E. H. & Thomas, C. A. (1971) Trans-trans-3,11-tridecadiene-5,7,9-triyn-1,2-diol, an antifungal polyacetylene from diseased safflower (*Carthamus tinctorius*). *Phytochemistry* 10, 1579-1582.
- Alvarez, L., Marquina, S., Villarreal, M. L., Alonso, D., Aranda, E. & Delgado, G. (1996) Bioactive polyacetylenes from *Bidens pilosa*. *Planta Medica* 62, 355-357.
- Alvarez, A., Pomar, F., Sevilla, M. A. & Montero, M. J. (1999) Gastric antisecretory and antiulcer activities of an ethanolic extract of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Schult. Bip. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 333-340.
- Ashafa, A. O. T. & Afolayan, A. J. (2009) Screening the root extracts from *Bidens pilosa* L. var. *radiata* (Asteraceae) for antimicrobial potentials. *Journal of Medicinal Plant Research* 3, 568-572.
- Boily, Y. & Puyvelde, L. (1986) Screening of medicinal plants of Rwanda (central Africa) for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology* 16, 1-13.
- Borges, C. C., Matos, T. F., Moreira, J., Rossato, A. E., Zanette, V. C. & Amaral, P. A. (2013) *Bidens pilosa* L. (Asteraceae): traditional use in a community of south Brazil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 15, 34-40.
- Brandão, M. G. L., Kretti, A. U., Soares, L. S. R., Nery, C. G. C. & Marinuzzi, H. C. (1997) Antimalarial activity of extracts and fractions from *Bidens pilosa* and other *Bidens* species (Asteraceae) correlated with the presence of acetylene and

- flavonoid compounds. *Journal of Ethnopharmacology* 57, 131-138.
- Chang, J. S., Chiang, L. C., Chen, C. C., Liu, L. T., Wang, K. C. & Lin, C. C. (2001) Antileukemic activity of *Bidens pilosa* L. var. *minor* (Blume) Sherff and *Houttuynia cordata* Thunb. *The American Journal of Chinese Medicine* 29, 303-312.
- Chih, H. W., Lin, C. C. & Tang, K. S. (1995) Anti-inflammatory activity of Taiwan folk medicine "ham-hong-chho" in rats. *American Journal of Chinese Medicine* 23, 273-278.
- Dagawal, M. J. & Ghorpade, D. S. (2011) Antimicrobial activity of an ethnomedicinal plant *Bidens pilosa* L. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research* 2, 2237-2238.
- Desta, B. (1993) Ethiopian traditional herbal drugs. Part II: Antimicrobial activity of 63 medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology* 39, 129-139.
- Fabricant, D. S. & Farnsworth, N. R. (2001) The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environmental Health Perspectives* 109, 69-75.
- Freiburghaus, F., Ogwal, E. N., Nkunya, M. H. H., Kaminsky, R. & Brun, R. (1996) *In vitro* antitrypanosomal activity of African plants used in traditional medicine in Uganda to treat sleeping sickness. *Tropical Medicine & International Health* 1, 765-771.
- Freiburghaus, F., Steck, A., Pfander, H. & Brun, R. (1998) Bioassay-guided isolation of diastereoisomer of kolavenol from *Entada abyssinica* active on *Trypanosoma brucei rhodesiense*. *Journal of Ethnopharmacology* 61, 179-183.
- Garrod, B., Lewis, B. G. & Coxon, D. T. (1978) Cis-heptadeca-1,9-diene-4,6-diyne-3,8-diol, an antifungal polyacetylene from carrot root tissue. *Physiological Plant Pathology* 13, 241-246.
- Garrod, B., Lea, E. J. A. & Lewis, B. G. (1979) Studies on the mechanism of action of the antifungal compound falcarindiol. *New Phytologist* 83, 463-471.
- Geissberger, P. & Séquin, U. (1991) Constituents of *Bidens pilosa* L.: Do the components found so far explain the use of this plant in traditional medicine? *Acta Tropica* 48, 251-261.
- Grand, A., Wondergem, P. A., Verpoorte, R. & Pousset, J. L. (1988) Anti-infectious phytotherapies of the tree-savannah of Senegal (West-Africa) II. Antimicrobial activity of 33 species. *Journal of Ethnopharmacology* 25, 23-31.
- Grombone-Guaratini, M. T., Silva-Brandão, K. L., Solferini, V. N., Semir, J. & Trigo, J. R. (2005) Sesquiterpene and polyacetylene profile of the *Bidens pilosa* complex (Asteraceae: Heliantheae) from Southeast of Brazil. *Biochemical Systematics and Ecology* 33, 479-486.
- 北海道ブルーリスト 2010 <http://bluelist.pref.hokkaido.lg.jp/>.
- Horiuchi, M. & Seyama, Y. (2006) Anti-inflammatory and anti-allergic activity of *Bidens pilosa* L. var. *radiata* Scherff. *Journal of Health Science* 52, 711-717.
- 磯部賢治 (2001) 微生物の生存戦略—固体表面への付着. *表面科学* 22, 652-662.
- Konovalov, D. A. (2014) Polyacetylene compounds of plants of the Asteraceae family (review). *Pharmaceutical Chemistry Journal* 48, 613-631.
- Lee, W. C., Peng, C. C., Chang, C. H., Huang, S. H. & Chyau, C. C. (2013) Extraction of antioxidant components from *Bidens pilosa* flowers and their uptake by human intestinal caco-2 cells. *Molecules* 18, 1582-1601.
- 村上興正・鷺谷いづみ監修, 日本生態学会編 (2002) 外来種ハンドブック. 地人書館.
- Nakajima, S. & Kawazu, K. (1977) Trideca-1-ene-3,5,7,9,11-pentayne, an ovicidal substance from *Xanthium canadens*. *Agricultural and Biological Chemistry* 41, 1801-1802.
- 大橋広好・門田裕一・邑田仁・米倉浩司・木原浩編 (1981) 日本の野生植物Ⅲ. 平凡社.
- Oliveira, F. Q., Andrade-Neto, V., Krettli, A. U. & Brandão, M. G. (2004) New evidences of antimalarial activity of *Bidens pilosa* roots extract correlated with polyacetylene and flavonoids. *Journal of Ethnopharmacology* 93, 39-42.
- Pereira, R. L., Ibrahim, T., Lucchetti, L., Silva, A. J. R. & Moraes, V. L. G. (1999) Immunosuppressive and anti-inflammatory effects of methanolic extract and the polyacetylene isolated from *Bidens pilosa* L. *Immunopharmacology*, 43, 31-37.
- Rabe, T. & Staden, J. (1997) Antibacterial activity of South Africa plants used for medicinal purpose. *Journal of Ethnopharmacology* 56, 81-87.
- Rahman, M. A., Cho, S. C., Song, J., Mun, H. T. & Moon, S. S. (2007) Dendrazawaynes A and B, antifungal polyacetylenes from *Dendranthema zawadskii* (Asteraceae). *Planta Medica* 73, 1089-1094.

- Sarg, T. M., Ateya, A. M., Farrag, N. M. & Abbas, F. A. (1991) Constituents and biological activity of *Bidens pilosa* L. grown in Egypt. *Acta Pharmaceutica Hungarica* 61, 317-323.
- Sasidharan, S., Chen, Y., Saravanan, D., Sundram, K. M. & Latha, L. Y. (2011) Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 8, 1-10.
- 清水建美編(2003)日本の帰化植物. 平凡社.
- Silva, O., Duarte, A., Cabrita, J., Pimentel, M., Diniz, A. & Gomes, E. (1996) Antimicrobial activity of Guinea-Bissau traditional remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 50, 55-59.
- Silva, O., Duarte, A., Pimentel, M., Viegas, S., Barroso, H., Machado, J., Pires, I., Cabrita, J. & Gomes, E. (1997) Antimicrobial activity of *Terminalia macroptera* root. *Journal of Ethnopharmacology* 57, 203-207.
- Sindambiwe, J. B., Calomme, M., Cos, P., Totté, J., Pieters, L., Vlietinck, A. & Berghe, D. V. (1999) Screening of seven selected Rwandan medicinal plants for antimicrobial and antiviral activities. *Journal of Ethnopharmacology* 65, 71-77.
- Sundararajan, P., Dey, A., Smith, A., Doss, A. G., Rajappan, M. & Natarajan, S. (2006) Studies of anticancer and antipyretic activity of *Bidens pilosa* whole plant. *African Health Sciences* 6, 27-30.
- Tobinaga, S., Sharma, M. K., Aalbersberg, W. G., Watanabe, K., Iguchi, K., Narui, K., Sasatsu, M. & Waki, S. (2009) Isolation and identification of a potent antimalarial and antibacterial polyacetylene from *Bidens pilosa*. *Planta Medica* 75, 624-628.
- Ubillas, R. P., Mendez, C. D., Jolad, S. D., Luo, J., King, S. R., Carlson, T. J. & Fort, D. M. (2000) Antihyperglycemic acetylenic glucosides from *Bidens pilosa*. *Planta Medica* 66, 82-83.
- 梅沢俊著(2007)新北海道の花. 北海道大学出版会.
- Vlietinck, A. J., Hoof, L., Totté, J., Lasure, A., Berghe, D. V., Rwangabo, P. C. & Mvukiyumwami, J. (1995) Screening of hundred Rwandese medicinal plants for antimicrobial and antiviral properties. *Journal of Ethnopharmacology* 46, 31-47.
- Wagner, H. (1993) Leading structures of plant origin for drug development. *Journal of Ethnopharmacol* 38, 105-112.
- Wang, R., Wu, Q. X. & Shi, Y. P. (2010) Polyacetylenes and flavonoids from the aerial parts of *Bidens pilosa*. *Planta Medica* 76, 893-896.
- Wu, L. W., Chiang, Y. M., Chuang, H. C., Wang, S. Y., Yang, G. W., Chen, Y. H., Lai, L. Y. & Shyur, L. F. (2004) Polyacetylenes function as anti-angiogenic agents. *Pharmaceutical Research* 21, 2112-2119.
- Yoon, M. Y., Choi, G. J., Choi, Y. H., Jang, K. S., Cha, B. & Kim, J.-C. (2011) Antifungal activity of polyacetylenes isolated from *Cirsium japonicum* roots against various phytopathogenic fungi. *Industrial Crops and Products* 34, 882-887.
- Yuan, L. P., Chen, F. H., Ling, L., Dou, P., Bo, H., Zhong, M. M. & Xia, L. J. (2008) Protective effects of total flavonoids of *Bidens pilosa* L. (TFB) on animal liver injury and liver fibrosis. *Journal of Ethnopharmacology* 116, 539-546.