野生チンパンジーの薬用的植物利用に関する 化学生態学的研究 : *Vernonia amygdalina* を例に

大 東 肇¹, Michael A. Huffman², 小清水 弘 一^{1,3}

Chemical Ecology of the Medicinal Use of *Vernonia amygdalina* by Chimpanzees.

Hajime Ohigashi¹, Michael A. Huffman² and Koichi Koshimizu^{1,3}

Vernonia amygdalina (Compositae) has been suggested to be a medicinal plant used by wild chimpanzee in the Mahale Mountains National Park, Tanzania. From this plant, the bitter and related constituents were isolated. There were four known sesquiterpene lactones, and seven new steroid glucosides and two aglycones of these glucosides. The sesquiterpene lactones showed high cytotoxic activity against P-388 and L-1210 cells, and antibacterial activities against *Bacillus subtilis* and *Micrococcus lutea*. They also showed significant *in vitro* antischistosomal, plasmodicidal and leishmanicidal activities. Antischistosomal activity was also found in the major steroid glucoside, vernonioside B₁. A trend in the glucosides was observed for significant antischistosomal, plasmodicidal and amoebicidal activities when the sugar moiety was removed. Vernodalinal, the most significant antiparasitic constituent *in vitro*, was tested for *in vivo* antischistosomal effect. However, vernodalinal is highly toxic to the cercaria-infected mouse, and no effect was observed when orally administered at below the lethal dose (2.5 mg/mouse). Chimpanzees have been only rarely observed to ingest anything but the pith of the young stem. The occurrence of vernonioside B₁ and its aglycone vernoniol B₁, the major constituents among the steroid-related constituents, were detected at significant levels in the pith. However, vernodalinal was abundant only in the leaves and bark. Thus, chimpanzees at Mahale were hypothesized to control parasite-related diseases by ingesting the young pith of this tree containing steroid-related constituents.

1 京都大学農学部食品工学科

Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyoto University,

2 京都大学大学院理学研究科

Department of Zoology, Faculty of Science, Kyoto University,

3 現所属 : 近畿大学生物理工学部生物工学科

Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki University,

1. はじめに

近年野生霊長類の採食行動の生態学的解析から、植物の薬的利用に関する多くの情報がもたらされてきている (Huffman et al., 1990; Huffman and Wrangham, 1994; Huffman and Seifu, 1989; 西田, 1993; Phillips-Conroy, 1986; Takasaki and Hunt, 1987; Wrangham and Nishida, 1983)。著者らは京都大学理学部の西田利貞教授のお誘いを受け、1990年頃からタンザニア国のマハレ山塊国立公園に棲息するチンパンジーの薬用植物利用仮説を化学的ならびに生理活性物質的視点から解析する研究に携わってきた。

すでに著者らは、西田らのこれまでの膨大な調査結果 (西田, 1993; Nishida and Uehara, 1983) に基づき、同地のチンパンジーが薬として利用していると考えられる多くの植物を入手し、それらに潜在する生理的活性を広く評価してきた (Koshimizu et al., 1993; Ohigashi et al., 1991b)。これら植物の中で特にキク科, *Vernonia amygdalina* の採食例は、薬としての利用に最も状況証拠に富んだものであった。そこで、チンパンジーによる薬用植物利用仮説に化学的根拠を与えることのできる絶好の例として、これまで主として *V. amygdalina* の生理活性成分について研究を行い、その一部は本誌にも報告してきている (大東ら, 1991)。ここでは以下、その後の展開も含めてマハレチンパンジーの *V. amygdalina* の採食意義についてレビューしてみたい。

2. マハレチンパンジーによる *V. amygdalina* の採食行動

チンパンジーによる薬的植物利用が初めて示唆された種はキク科の *Aspilia* 属植物である

(Wrangham and Nishida, 1983)。1983年、タンザニア国の北西部のタンガニーカ湖に沿った一地域 (ゴンベ) で調査を行っていた Wrangham は、三種の *Aspilia* 属植物 (*A. mossambicensis*, *A. pluriseta*, *A. rudis*) が、通常とは一風変わった様式で食べられることを見いだした。すなわち、

同地のチンパンジーはこれら植物の葉を一枚一枚口で引きちぎり、口の中に入れ、しばらく舌の上で転がすようにし、やがて嚙まずに呑み込むことが観察された。時を同じくして、マハレ (ゴンベからタンガニーカ湖に沿って約150km南下した地点) に棲息するチンパンジーを観察していた西田も、*Aspilia* の特徴ある採食様式を観察していた。西田はそれ以前に、チンパンジーの糞便中にある種の葉が未消化のまま排泄されていることに気づいていたが、その一つが *Aspilia* であることをこの時点で確認した。両者は互いにそれぞれの調査情報を交換し合い、その結果チンパンジーによるこれら植物の採食は非栄養的なものであり、恐らく何らかの生理的効果を狙ったものであろうとの共同報告を行った。その後天然物化学者である Rodriguez ら (1985) の参画により、*Aspilia* の葉中に抗菌、抗線虫、抗ウイルスなど多彩な生物活性を持つ含硫化合物, *thiarubrine A* の存在が見いだし、チンパンジーによる *Aspilia* の薬的 (抗生物的) 利用仮説を支持する化学的根拠が初めて与えられた。しかしながら、*Aspilia* 葉中における *thiarubrine A* の存在 (根には存在する) は最近疑われている (Page et al., 1992)。Page らは葉中に *thiarubrine A* は存在しないが、子宮収縮作用を持つジテルペンカルボン酸の存在を確認し、化学的側面から見る限り *Aspilia* の採食は抗生物的效果より生殖制御に意義があるのではないかと提唱している。

Aspilia で確認されたように、採食に際して嚙まずに呑み込まれるタイプの種は薬的利用植物の典型として捉えられている。これまでのアフリカ大型類人猿の調査により、このタイプに属する植物は *Aspilia* 以外に16種報告され、その内マハレで観察されたものが7種含まれている (Huffman et al., 1995a; 1995b)。興味深いことに、呑み込まれる種に共通した特徴として葉の表面に密生した細かい毛状突起があることが指摘されている。この事実から最近、このタイプの植物における抗寄生虫作用から見た薬的利用では、これまで推測されていた生理活性物質説に代わって、物理的効果説が浮上してきている (Huffman et al., 1995b)。

チンパンジーによる薬的利用を伺わせる植物種は上記のタイプ以外にも、数は限られているが報告されている(西田, 1993)。その代表例が *V. amygdalina* である。マハレチンパンジーによる本植物の採食において、観察された特徴は次のようなものである(Huffman and Seifu, 1989)。1987年11月のある日、チャウシク(CH)と名付けられた成熟雌が *V. amygdalina* の茎部髄を噛み砕き、にじみ出る樹液をすすり飲んだ。本植物は樹液も含めて強烈な苦みを呈し、このためマハレチンパンジーにとっては日常食にはならないものと考えられている。事実、1965年から1981年までの長期間に渡る調査記録によると(Nishida and Uehara, 1983)、その葉および樹皮の採食が観察された回数はそれぞれ1回および2回である。ただし、髄部は合計 18回の採食が記録されている。*V. amygdalina* を採食したチンパンジー(CH)は当日、日中の殆どを横臥して過ごしており、また排便、排尿の異常さから病気であると判定された。この間CHは時間を変えて 2 回上記の採食を繰り返したが、付き添っていた数頭の仲間はいずれもこの植物に全く興味を示さず、他の植物を食べていたことが観察されている。翌日CHの体調は除除に回復しているように見え、午後には通常の活動状態に戻ったことが確認されている。

V. amygdalina は熱帯アフリカでは広く知られた民間薬用種であり、マハレ近辺でも整腸、寄生虫症などに利用されている(Huffman and Seifu, 1989)。一方、西アフリカ・カメルーンでは民族料理の素材でもあり、活力の維持・回復に卓効があるものとして重用されている(Koshimizu et al., 1993)。

以上から、チンパンジーによる *V. amygdalina* の採食は栄養的であるより薬的意義があると推測され、著者らは、各種状況証拠に基づき提唱された“薬的利用仮説”に化学的な示唆を加えるための研究を始めた。

3. *V. amygdalina* に含まれる苦味成分

通常、植物などから何らかの生理活性物質を採

索するためには、目的とする活性を反映する *in vitro* 生理活性試験法を確立し、その結果を指標として順次分離・精製が進められる。この研究を始めた当時、*V. amygdalina* を採食したチンパンジーが果してどのような病気であったか定かではなかった。そこで、まず採取した植物のアルコール抽出物について、すでに確立されている多様な *in vitro* 試験を実施し、潜在する生理活性の評価を行った。試みた試験は細胞毒性(抗腫瘍活性)、免疫賦活および抑制、抗菌、各種酵素阻害活性など11種の薬理的活性(Koshimizu et al., 1993; 大東ら, 1991)、ならびに殺虫、抗植物病原菌、除草活性など抗生物活性(大東ら, 1991; Ohigashi et al., 1991b)である。試験の結果、顕著な効果として、マウス白血病細胞に対する細胞毒性、免疫抑制活性ならびに抗菌活性が認められた(Koshimizu et al., 1993)。アルコール粗抽出物を各種溶媒で油に溶ける区分から水に溶ける区分へと順次4画分に分配・分離し、活性を再検討したところ、上記3種の活性は中極性部(どちらかと言えば油に溶け易い区分)にほぼ集中して認められた。また、極性部(どちらかと言えば水に溶け易い区分)には弱いながら細胞毒性と細胞分化誘導の両作用が出現した。このように、*V. amygdalina* 中には多彩な生理活性物質が含まれ、天然生理活性物質を取得する絶好の対象植物であることが示唆された。

上記生理活性スクリーニングにおいて興味あることに、*V. amygdalina* の持つ苦味が、生理活性に富む中極性ならびに極性の両部に分配されてくることが分かった。従来より苦味は幅広い生理活性を反映するものとして天然生理活性物質の探索のための一次的 *in vitro* 試験法として汎用されている(芝, 1976)。著者らはそこで、苦味を担う成分を化学的に明かにすれば、当初の目標であるチンパンジーによる *V. amygdalina* の採食意義の解析に多少ともアプローチできるものと考え、以下苦味成分の研究に取り掛かった。

苦味は、乾燥植物体(葉および茎)をアルコールで抽出するよりも、アセトンまたは塩化メチレンで抽出する方がはるかに顕著であった。そこでア

セトン抽出物について、簡便な官能試験 (Jisaka et al., 1992a) により苦味物質を精製・単離した。これまで単離・構造決定できた苦味成分ならびに関連物質の化学構造を図1に示す。中極性部と極性部では、苦味成分はそれぞれ異なった二つのグループに分けられる化合物であった。

中極性部からは、vernodalin(1), vernolide(2), hydroxyvernolide(3)などセスキテルペンラクトンと総称される化合物群が苦味物質として確認できた (Jisaka et al., 1993a)。それぞれの苦味活性は表1に示すようであった。比較的苦味の弱い vernodalol(4)は乾燥植物体をメタノールで抽出した際得られるが、これはvernodalin(1)がメタノール中で分解して生じたものであることが判明した。

一方、極性部の苦味活性物質はステロイド配糖体類であった。また、苦味は呈さないが、構造的に酷似した一連の化合物が同時に得られてきた。これらはいずれも新規物質であったので、苦味性および非苦味性物質をそれぞれ vernonioside A類 (A₁~A₄) およびB類 (B₁~B₃) と命名し、順

次図1に示すように構造決定した (Jisaka et al., 1992a; Jisaka et al., 1993b; Ohigashi et al., 1991a)。なお、上記セスキテルペンラクトン類と同様著者のろ紙法による官能試験 (被検物質を吸収させた1cm², 厚さ0.2mmのろ紙を舌の上に置き、苦味を感じさせる最小量を検定する) によるA₁, A₂, A₃およびA₄の苦味閾値 (最小呈苦味量) はそれぞれ7μg, 5μg, 5μgおよび30μgであり、B群化合物では200μg以下でいずれも苦味を示さなかった。

4. セスキテルペンラクトン類の細胞毒性および抗菌活性

V. amygdalina より得られたセスキテルペン類はいずれも既知化合物であった。これら化合物には、KB細胞に対する毒性 (Kupchan et al., 1969) や昆虫の摂食阻害 (Ganjan et al., 1983) など多様な生理活性が報告されている (大東ら, 1991)。すでに述べたように、当初の生理活性スクリーニングにおいて、これらセスキテルペ

図1 *V. amygdalina* より得られる苦味関連物質, ならびにステロイド関連誘導体の構造

表1 セキステルペンラクトン類および vernodalin 誘導体の生理活性

化合物	苦味 (μg)	細胞毒性		抗 菌	
		IC_{50} ($\mu\text{g}/\text{ml}$)		($\mu\text{g}/\text{disk}$)	
		P-388	L-1210	B.s. ^a	M.l. ^b
Vernodalin	0.8	0.11	0.17	5	5
Vernolide	1.2	0.13	0.11	5	5
Hydroxyvernolide	1.0	0.92	1.25	5	5
Vernodalol	70.0	0.32	0.61	50	50
Vernolepin	1.2	0.12	0.29	5	5
Vernomenin	1.0	0.17	0.32	5	5
4,15-Dihydro-vernodalin	0.8	0.07	0.15	5	5
1,2,2',3'-Tetrahydro-vernodalin	2.5	0.14	0.26	10	10
1,2,11,13,2',3'-Hexahydrovernodalin	2.4	0.52	1.00	50	50
1,2,4,15,11,13,2',3'-octahydrovernodalin	0.4	>50	>50	>50	>50

a B. s: *B. subtilis* に対する活性

b M. l: *M. lutea* に対する活性

クトン類が得られる中極性部にはマウス白血病細胞 (P-388およびL-1210細胞) に対する顕著な毒性活性が認められていた。そこで、セスキテルペンラクトン類1~4や、図2に示す vernodalin から調整された種々の誘導体についてP-388やL-1210細胞に対する細胞毒性を検討した。また同時に、グラム陽性菌 (*Bacillus subtilis* および *Micrococcus lutea*) に対する抗菌活性をも評価

してみた (Jisaka et al., 1993a)。

その結果は、苦味活性の結果と共に、表1に示されている。細胞毒性活性は P-388 とL-1210 細胞でほぼ平行した結果が得られ、vernodalin および vernolide で極めて強いことが示された。Vernodalin の α -メチレン- γ -ラクトンを開環したり (vernodalol), そのメチレン部を飽和 (1,2,11,13,2',3'-hexahydrovernodalin) すると活性は

図2 Vernodalin より調整された誘導体の構造

幾分弱まるが、決定的にはこの α -メチレン- γ -ラクトンおよび α -メチレン- δ -ラクトンの両メチレンの飽和(1,2,4,15,11,13,2',3'-octahydrovernodalin)が活性を消失させることが明らかとなった。Kupchan らは(1970) vernodalin や vernolide のKB細胞に対する毒性活性は、生体分子の求核的反応部位が γ -ラクトンの α -メチレン部と容易に反応することに由来すると指摘している。P-388 や L-1210 細胞を用いた著者らの研究では、 γ -ラクトンのみならず δ -ラクトンに含まれる α -メチレンの重要性が示唆できたが、基本的には Kupchan らの指摘に沿った結果と考えられる。

同様の傾向が抗菌活性においても認められ、本活性が細胞毒性活性と同じ機構で発現されるものと推察された。しかしながら、苦味活性では細胞毒性や抗菌活性とは多少様子を異にしていることが伺えた。Vernodalin の苦味は、その γ -ラクトンの開環で100倍近く弱まるが、細胞毒性や抗菌活性を消失した1,2,4,15,11,13,2',3'-octahydrovernodalin では未だ強く保持されている。従って、苦味活性は飽和、不飽和を問わず γ -ラクトンの存在に基づくものと示唆された。

最近、vernodalin およびその関連成分には免疫抑制効果があることが判明した(未発表データ)。このことは、初期の活性スクリーニング段階における中極性部の免疫抑制活性がこれらセスキテルペンラクトン類で説明できることを示している。

またここで、セスキテルペンラクトン類で示された薬理活性試験結果から、チンパンジーの薬的利用植物は新しい天然生理活性物質を開発する上で絶好の対象資源となることを強調しておきたい。

5. 苦味および関連成分の抗寄生虫活性

各種苦味成分の化学的研究の途上、著者の一人 Huffman は *V. amygdalina* の樹液を摂取したチンパンジー(CH)の病徴や、現地での薬用的民間利用法の調査を進めた。その結果、CHは恐らく寄生虫症であったと推測するに至った。そこで、チンパンジーは本植物を寄生虫コントロールを目的として利用しているとの仮説を立て、これまで

述べてきた苦味ならびに主要な関連成分について各種抗寄生虫活性を *in vitro* 法にて検討することとした。

種々の寄生虫の中で先ず検討したのは、国立予防衛生研究所の川中正憲博士のご協力による抗住血吸虫活性である。住血吸虫にはビルハルツ、マンスンならびに日本住血吸虫の3種がよく知られているが(田中, 1991)、熱帯アフリカで問題となるのは前二者である。しかしながら、いずれの種も生活史はよく似ているので、手に入り易く、しかも疾病の直接の原因である卵の動態がよく判定できる日本住血吸虫を用いて活性の検討を行った(Jisaka et al., 1992b; Ohigashi et al., 1994)。また住血吸虫以外に、熱帯性寄生虫として一般的なマラリアや赤痢アメーバに対する効果を、ロンドン大学の Phillipson 博士らのご協力を得て、検討した(Ohigashi et al., 1994)。さらに、マルセユ大学の Balansard 博士らとは、地中海沿岸で問題となる鞭毛虫リーシュマニアに対する効果を調べた(Ohigashi et al., 1994)。検討したこれら寄生虫の内、住血吸虫、マラリアおよび赤痢アメーバはチンパンジーにも感染することが知られている(Brack, 1987)。マハレチンパンジーがこれら寄生虫に感染しているか否かは定かでないが、上記活性の検討は熱帯性寄生虫に対する効果を一般的に反映するものであると考えられる。

表2に成虫(1対の雌雄抱合体)の運動性(IM)および産卵能(EL)から評価した各種化合物の抗日本住血吸虫活性を示す。セスキテルペンラクトン類はいずれも、既知の抗住血吸虫剤(praziquantel および niridazol)より弱い、200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で成虫の運動および産卵を共に抑制した。Vernodalin や vernolide では運動抑制活性が 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ でも認められた。2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では運動抑制活性は消失するが、vernodalol を除くセスキテルペンラクトン類では産卵を幾分かは抑えているようである(表2において、被検物質とcontrol区の産卵個数を比較せよ)。一方、ステロイド配糖体では、運動性に対する活性には見るべきものはなかったが、主要配糖体 vernonioside

表2 セスキテルペンラクトン類およびステロイド関連化合物の抗住血吸虫活性

化合物	200 μ g/ml		20 μ g/ml		2 μ g/ml	
	IM ^a	EL ^b	IM	EL	IM	EL
セスキテルペンラクトン						
Vernodalin	++	2 $\pm$ 2	++	0	-	297 $\pm$ 194
Vernolide	++	0	+	24 $\pm$ 17	-	69 $\pm$ 6
Hydroxyvernolide	++	34 $\pm$ 47	-	154 $\pm$ 163	-	197 $\pm$ 116
Vernodalol	++	1 $\pm$ 1	-	25 $\pm$ 33	-	617 $\pm$ 24
ステロイド関連物質						
Vernonioside B ₁	+	0	-	0	-	20 $\pm$ 28
Vernoniol B ₁	NT ^c	NT	+	0	+	33 $\pm$ 47
3-Oxovernoniol B ₁	NT	NT	+	0	+	79 $\pm$ 108
Isovernoniol B ₁	NT	NT	+	0	-	2 $\pm$ 2
3-Oxoisovernoniol B ₁	NT	NT	-	0	-	122 $\pm$ 147
Vernonioside A ₁	-	22 $\pm$ 17	NT	NT	NT	NT
Vernonioside A ₂	-	350 $\pm$ 304	NT	NT	NT	NT
Vernonioside A ₃	-	341 $\pm$ 236	NT	NT	NT	NT
A ₃ -Aglycone	NT	NT	-	106 $\pm$ 92	-	184 $\pm$ 24
Vernonioside A ₄	NT	NT	+	61 $\pm$ 74	-	348 $\pm$ 264
Vernoniol A ₄	NT	NT	+	10 $\pm$ 14	-	117 $\pm$ 43
			IM	EL		
Praziquantel (2 μ g/ml)			+	0		
Niridazol (2 μ g/ml)			+	18 $\pm$ 2		
Control (DMSO) ^d			-	662 $\pm$ 193		

^a IM: 成虫の運動性、++ (完全抑制)、+ (不完全抑制)、- (抑制せず)

^b EL: 成虫の産卵、平均産卵数 $\pm$ 標準偏差

^c NT: 試験せず

^d DMSO (20 μ l) のみ

B₁(9)に評価できる産卵抑制活性が確認できた。配糖体の糖部を除去した各種アグリコン (7a, 8a, 9a, 9b,) や、その一部の 3-オキソ体 (9c, 9d) (いずれも図1の構造を参照) では配糖体よりも活性が強まる傾向にあり、産卵抑制に加えて運動性の抑制をも引き起こすようになることが示された。側鎖部に α , β -不飽和- γ -ラクトンを有する vernonioside A₄(8)にも運動抑制活性が認められた。ステロイド関連物質ではこのように、側鎖部 γ -ラクトンの β 位 (C-22位) に酸素官能基を持つか、 α , β -不飽和体になっていることが抗住血吸虫活性発現に重要であろうと考えられた。また、糖部を除去した遊離型ステロイドの方が配糖体より活性が高いものと期待された。

表3は殺マラリア (PM), 殺赤痢アメーバー (AM) ならびに殺リーシュマニア活性の結果をまとめたものである。Vernodalin などセスキテルペンラクトン類は、既知薬剤 Chloroquine diphosphate に比し20倍程度弱い、天然物としては評価できる殺マラリア活性を示した。一方、vernonioside類では、主要配糖体 B₁に最も強い殺マラリア活性が見いだされたが、セスキテルペンラクトン類に比し弱かった。しかしながらアグリコンでは、特に A₄-Aglyconeで顕著のように、配糖体より全体的に活性が高まることが示された。この傾向は、抗住血吸虫活性で得られたそれと同様で、さらに赤痢アメーバーに対する活性においても認められた。すなわち、配糖体では50 μ g/

表3 セスキテルペンラクトン類およびステロイド関連化合物の抗寄生虫活性

化合物	PH ^a	AM ^b	LM ^c
	IC ₅₀ (μg/ml)	IC ₅₀ (μg/ml)	MIC (μg/ml)
Vernodalin	4.0	- ^d	10
Vernolide	8.4	-	<50
Hydroxyvernolide	11.4	-	- ^e
Vernodalol	4.2	-	-
Vernonioside A ₁	139.7 [62.6]	- [<12.5]	NT ^f
A ₂	94.1 [248.0]	- [<12.5]	NT
A ₃	245.1 [55.1]	- [-]	NT
A ₄	81.8 [15.3] ^g	- [<12.5] ^g	NT
B ₁	46.1 [45.0] ^h	- [<12.5] ^h	NT
3-Oxovernoniol B ₁	50.7	<12.5	NT
Isovernoniol B ₁	156.4	<12.5	NT
Chloroquine diphosphate	0.2	NT	NT
Pentamidine	NT	NT	5

^a PH: 殺マラリア原虫活性 ([] 内の値は真性アグリコンのIC₅₀)

^b AM: 殺赤痢アメーバ活性 ([] 内の値は PH の場合と同じ)

^c LM: 殺リーシュマニア活性

^d -: AM においては 50 μg/ml 以下で不活性

^e -: LM においては 50 μg/ml 以下で不活性

^f NT: 試験せず

^g vernonioside A₄ のIC₅₀

^h vernonioside B₁ のIC₅₀

ml以下で不活性であったに対し、A₃のそれを除く各アグリコンではそのIC₅₀値は12.5 μg/mlであった。また、セスキテルペンラクトン類の中で主要成分として存在する vernodalin には顕著な殺リーシュマニア活性が見いだされた。この活性の強さ (MIC:最小生育阻害濃度) は10 μg/mlと既知薬剤 pentamidine のそれに比し1/2程度であった。以前の報告で (Ohigashi et al., 1994) vernodalin の活性が pentamidine のそれよりも10倍も強いとしていたが、その後数回に渡り確かめたところ、1/2程度であることが判明したので、表3には新しいデータ (vernolide についても修正データ) を記載させていただく。

以上の抗寄生虫活性の試験結果より次のような結論が導かれた。セスキテルペンラクトン類には広範な抗寄生虫活性があり、なかでも主要成分である vernodalin (1) の活性は強いものと期待できた。また、ステロイド配糖体の一部 (特に主要成

分 B₁) にも *in vitro* 活性が認められたが、糖部を除去すると一般的に抗寄生虫活性は上昇する傾向があった。この事実、摂取された配糖体が体内で化学的もしくは酵素的に脱糖を受け、より活性の強い化合物に変化し、抗寄生虫成分として効果を発現している可能性を示唆しているかもしれない。またチンパンジーの *V. amygdalina* の採食意義を解析するためには、苦味とは離れて (苦味性配糖体は脱糖すると苦味を失う)、本植物中に存在する遊離ステロイド類の分析を行う必要があることが指摘できた。

6. チンパンジーによる *V. amygdalina* の採食意義解析へのアプローチ

種々の抗寄生虫活性の検討から vernodalin (1) が最も抗寄生虫活性物質として貢献していることが推測されたので、次に感染マウスによる *in vivo*

抗住血吸虫活性を検討した。しかしながら、その細胞毒性からも推測されたように vernodalin のマウスに対する毒性は強く、5mg/マウスの注射や経口投与で致死する。そこで、2.5mg/マウスの経口投与で vernodalin の効果を検定したが、無効であった (Jisaka et al., 1992b)。このように、もしチンパンジーが寄生虫コントロールのために *V. amygdalica* を採食したとすれば、vernodalin を初めとして *in vitro* 活性の強いセスキテルペンラクトン類は狙いの化合物ではないものと推察された。

ところで、すでに述べたようにマハレでは、*V. amygdalica* のチンパンジーによる採食はまれにしか記録されていない。また、採食部位は殆どが髓部である。また、Huffmanが観察した病気のチンパンジーが選択した部位も髓であった。著者らはそこで、セスキテルペンラクトン類ならびにステロイド配糖体類のそれぞれの主要成分である vernodalin(1) および vernonioside B₁(9) につき、植物各部位での存在レベルを調べた (Ohigashi et al., 1994)。両化合物の HPLC による定量分析法を確立し、1991年10月~12月にかけて入手した、季節的に異なった3種の試料 (I~III) につき分析した結果、表4のような結果を得た。毒性の強

い vernodalin は、例えば試料-Iの結果のように、葉 (Lv) には2.18mg/g 生葉と高レベルで含まれているが、樹皮 (Bk) では0.32mg/g 生樹皮と約 1/7 に低下していた。さらに興味深いことに、チンパンジーの採食部位である髓 (Pth) では 0.03mg/g 生髓と、極めて少量しか含まれていないことが分かった。一方、vernonioside B₁ は樹皮部で最大であるが、葉や髓部にも評価できるレベルで分布することが示された。

マハレでは10月に雨期が始まり、12月はその真中である。この両季節間で vernodalin と vernonioside B₁ の存在レベルを比較すると、試料-IIおよび試料-IIIの結果から示されるように、vernodalin は葉、茎部 (St:樹皮および髓部を含む) のいずれの部位においても雨期が進行すると減少し、これとは反対に B₁ は増加する傾向にあることが明らかとなった。雨期が深まるとチンパンジーの寄生虫に感染する度が増し (Kawabata et al., 1991; Huffman et al., 1990)、またチンパンジーの *V. amygdalica* の採食頻度も高まることが記録されている (Huffman et al., 1990)。

1991年の調査で、Huffman は再度病気のチンパンジーが *V. amygdalica* を採食する場面に遭遇している。その個体の糞便より感染寄生虫の種

表4 Vernodalin および vernonioside B₁ の植物部位別存在レベル

試料/化合物	若い地上部			古い地上部			根	
	Lv ^b	Bk ^c	Pth ^d	Lv	Bk	Pth	Bk	Pth
試料-I (10月28日) /								
Vernodalin	2.18	0.32	0.03	2.28	0.02	0	0	0
Vernonioside B ₁	0.61	1.64	0.75	1.26	1.28	0.08	0.26	0
試料-II ^e (10月27日) /								
Vernodalin	Lv St ^f			Lv	St		Bk	Pth
Vernodalin	2.17 ± 0.47	0.28 ± 0.20		NM ^g	NM		NM	NM
Vernonioside B ₁	0.55 ± 0.07	0.50 ± 0.12		NM	NM		NM	NM
試料-III ^e (12月22日) /								
Vernodalin	Lv St			Lv	St		Bk	Pth
Vernodalin	1.66 ± 0.27	0.13 ± 0.07		NM	NM		NM	NM
Vernonioside B ₁	1.83 ± 0.68	0.88 ± 0.38		NM	NM		NM	NM

a 生試料各 1 g. b Lv: 葉. c Bk: 樹皮. d Pth: 髓. e 3種の異なる個体の平均値 ± 標準偏差. f 樹皮 + 髓 g NM: 測定せず.

を検索し、腸内感染寄生虫として *Ternidens* sp. と *Troglodytella abressarti* を同定した (Huffman et al., 1993)。また興味深いことに、*V. amygdalina* の採食1時間後および23時間後の糞中の *Ternidens* sp. の卵数を測定すると、23時間後には極度にその数が減少していることが確認されている (Huffman et al., 1993)。

先にステロイド関連化合物では一般に、配糖体より遊離型により強い抗寄生虫活性が期待できることを示した。著者らはこれまで、*vernonioside B₁* および *A₄* のそれぞれのアグリコンである *vernoniol B₁* (9a) および *vernoniol A₄* (8a) の存在を見いだしている (Ohigashi et al., 1994)。特に *vernoniol B₁* の存在レベルは高く、チンパンジーの採食部位である若い髄部には、その配糖体である *vernonioside B₁* のその1/3程度に達することを確かめている。また、*vernoniol B₁* より強い抗住血吸虫活性を持つ新規ステロイド類を数種単離し (未発表)、現在構造決定中である。

これまで述べてきたことから著者らは、マハレチンパンジーによる *V. amygdalina* の採食意義について次のような仮説を提出している。マハレチンパンジーは恐らく寄生虫コントロールのために *V. amygdalina* を利用しているであろう。その際、毒性の強いセスキテルペンラクトン類を含む葉や樹皮の摂取を避け、茎部髄を選択採食する。髄部に存在するステロイド配糖体や遊離ステロイドが寄生虫コントロールに寄与しているであろう。髄部にわずかに含まれるセスキテルペンラクトン類も幾分かは活性に関与しているであろうが、それよりむしろこれら化合物は利用部位の選択に寄与していると考えている。すなわち、ステロイドより強烈な苦味を持つセスキテルペンラクトン類は、その苦味を信号としてチンパンジーに毒物であるとの情報を与え、葉部の摂取を避けさせているのではないだろうか。セスキテルペンラクトン類とステロイドでは苦味の質においても異なっているのかもしれない。今後抗寄生虫活性に関与するさらに幅広い化合物を検索し、また、例えば腸内感染寄生虫などより広範な寄生虫を対象に研究を進展させる必要がある。

7. おわりに

ここまで、野生チンパンジーによる植物の薬的利用仮説を化学的に解析する一例として *V. amygdalina* を取り上げ、研究の一旦を紹介してきた。この仮説をより一般化するため、さらに広範な植物についての研究が望まれる。著者らは現在、西田らのグループと共同して、*V. amygdalina* 以外の植物にも研究の目を向けつつある。これまでの結果で興味深いことは、チンパンジーの薬的利用の可能性があるとの情報に基に採取した植物では、他に比し、抗寄生虫活性が確認される頻度が高いことである。今後この種の研究の一層の進展を計るために、霊長類学、動物行動学、寄生虫学、薬学、生薬学など関連する多彩な分野の研究者の御協力をお願いする次第である。

謝 辞

1990年に開始した本研究は、文部省科学研究費—国際学術研究、一般研究 (C)、総合研究 (A)—の援助により進展させてきたものである。この間、チンパンジーの採食行動生態については京都大学理学部西田利貞教授に、寄生虫に関連する事項ならびに抗住血吸虫活性検定については国立予防衛生研究所寄生動物部の川中正憲博士に、熱帯および地中海域寄生虫に対する活性検定ではロンドン大学薬学部 D. Phillipson 博士のグループおよびマルセユ大学薬学部の G. Balansard 博士のグループに御協力いただいた。厚く御礼を申し上げます。また植物調査にあたってお世話になった東京大学農学部秩父演習林の梶 幹男博士、さらに各種実験を担当していただいた高垣輝嘉、地阪光生、武川一紀、井筒大介氏に深謝いたします。

文 献

- Brack, M., 1987. *Agents transmissible from simians to man*. Springer-Verlag, Berlin.
Ganjan, I., Kubo, I., and Fludzinski, P., 1983. Insect antifeedant elemanolides from *Vernonia amygdalina*. *Phytochemistry*, 22(11):2525–2526.
Huffman, M.A., Gotoh, S., Izutsu, D., Koshimizu, K., and

- kalunde M.S., 1993. Further observations on the use of the medicinal plant, *Vernonia amygdalina* (Del.), by a wild chimpanzee, its possible effect on parasite load, and its phytochemistry. *African Study Monographs*, 14(4): 227–240.
- Huffman, M.A., Nishida, T., and Uehara, S., 1990. Intestinal parasites and medicinal plant use in wild chimpanzees: possible behavioral adaptation for the control of parasites. *Mahale Mountains Chimpanzees Research Project. Ecological Report No. 72.*, Kyoto University, Kyoto.
- Huffman, M.A., Page, J., Sukhdeo, M.V.K., Gotoh, S., Kalunde, M.S., Chandrasiri, T., 1995a. Leaf-swallowing by chimpanzees, a behavioral adaptation for the control of nematode infections. Submitted to *International Journal of Primatology*.
- Huffman, M.A., Page, J.E., Sukhdeo, W.V.K., Gotoh, S., Kalunde, M.S., Chandrasiri, T., and Towers, G.H.N., 1995b. チンパンジーの葉呑み込み行動と寄生虫感染症 — Leaf-swallowing behavior by chimpanzee-A behavioral adaptation for the control of nematode infections. 第32回日本アフリカ学会学術大会 (半田), 研究発表要旨, p.50.
- Huffman, M.A., and Seifu, M., 1989. Observations on the illness and consumption of a possibly medicinal plant *Vernonia amygdalina* (Del.), by a wild chimpanzee in the Mahale Mountains National Park, Tanzania. *Primates*, 30(1):51–63.
- Huffman, M.A., and Wrangham, R.W., 1994. Diversity of medicinal plant use in wild chimpanzees. In Wrangham, R.W., McGrew, W.C., de Waal, F.B.M. and Heltre, P.G., (eds.), *Chimpanzee Cultures*, Harvard University Press, Cambridge, pp.129–148.
- Jisaka, M., Kawanaka, M., Sugiyama, K., Takegawa, K., Huffman, M.A., Ohigashi, H., and Koshimizu, K., (1992b). Antischistosomal activities of sesquiterpene lactones and steroid glucosides from *Vernonia amygdalina*, possibly used by wild chimpanzees against parasite-related diseases. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 56(5):845–846.
- Jisaka, M., Ohigashi, H., Takegawa, K., Huffman, M.A., and Koshimizu, K., 1993a. Antitumoral and antimicrobial activities of bitter sesquiterpene lactones of *Vernonia amygdalina*, a possible medicinal plant used by wild chimpanzees. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 57(5):833–834.
- Jisaka, M., Ohigashi, H., Takegawa, K., Hirota, M., Irie, R., Huffman, M.A., and Koshimizu, K., 1993b. Steroid glucosides from *Vernonia amygdalina*, a possible chimpanzee medicinal plant. *Phytochemistry*, 34(2): 409–413.
- Jisaka, M., Ohigashi, H., Takagaki, T., Nozaki, H., Tada, T., Hirota, M., Irie, R., Huffman, M.A., Nishida, T., Kaji, M., and Koshimizu, K., 1992a. Bitter steroid glucosides, vernonioside A1, A2 and A3, and a related B1 from a possible medicinal plant used by wild chimpanzees, *Vernonia amygdalina*. *Tetrahedron*, 48(4): 625–632.
- Kawabata, M., Nishida, T., and Uehara, S., 1991. A preliminary note on the intestinal parasites of wild chimpanzees of the Mahale Mountains, Tanzania. *Primates*, 32(2):275–278.
- Koshimizu, K., Ohigashi, H., Huffman, M.A., Nishida, T., and Takasaki, H., 1993. Physiological activities and the active constituents of potentially medicinal plants used by wild chimpanzees of the Mahale Mountains, Tanzania. *International Journal of Primatology*, 14(2): 345–356.
- Kupchan, S.M., Fessler, D.C., Eakin, T.J., and Giacobbe, T.J., 1970. Reactions of alpha methylene lactone tumor inhibitors with model biological nucleophiles. *Science*, 168:376–380.
- Kupchan, S.M., Hemingway, R.J., Karim, A., and Werner, D. (1969). Tumor inhibitors. XLVII. Vernodalin and vernomygdin, two new cytotoxic sesquiterpene lactones from *Vernonia amygdalina* Del. *Journal of Organic Chemistry*, 34:3908–3911.
- 西田利貞, 1993. 野生チンパンジーの採食行動と薬用植物のスクリーニング. 第29回植物化学シンポジウム (京都), 講演要旨集, pp.12–22.
- Nishida, T., and Uehara, S., 1983. Natural diet of chimpanzees (*Pan troglodytes schweinfurthii*): Long term record from the Mahale Mountains, Tanzania. *African Study Monographs*, 3:109–130.
- Ohigashi, H., Huffman, M.A., Izutsu, D., Koshimizu, K., Kawanaka, M., Sugiyama, H., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., Allen, D., Delmas, F., Elias, R., Balansard, G., 1994. Toward the chemical ecology of medicinal plant-use in chimpanzees: the case of *Vernonia amygdalina*, a plant used by wild chimpanzees possibly for parasite-related diseases. *Journal of Chemical Ecology*, 20(3):541–553.
- 大東肇, 地阪光生, 高垣輝嘉, 小清水弘一, Huffman, M.A., 西田利貞, 高崎浩幸, 梶幹男, 1991. 野生チンパンジーの薬用植物と生理活性成分. *アフリカ研究*, 39: 15–27.
- Ohigashi, H., Jisaka, M., Takagaki, T., Nozaki, T., Tada, T., Huffman, M.A., Nishida, T., Kaji, M., and Koshimizu, K., 1991a. Bitter principles and a related steroid glucoside from *Vernonia amygdalina*, a possible medicinal plant for wild chimpanzees. *Agricultural Biological Chemistry*, 55(4):1201–1203.
- Ohigashi, H., Takagaki, T., Koshimizu, K., Watanabe, K., Kaji, M., Hoshino, J., Nishida, T., Huffman, M.A., Takasaki, H., Jato, J., and Muanza, D.N., 1991b. Biological activities of plant extracts from tropical Africa. *African Study Monographs*, 12(4):201–210.
- Page, J.E., Balza, F., Nishida, T., and Towers, G.H.N., 1992. Biologically active diterpene from *Aspilota mossambicensis*, a chimpanzee medicinal plant. *Phytochemistry*, 31(10):3437–3439.
- Phillips-Conroy, J.E., 1986. Baboons, diet, and disease: Food selection and schistosomiasis. In Taub, D.M., and King, F.A. (eds), *Current Perspectives on Primate*

- Social Dynamics*, Van Nostrand Reinhold, New York, pp.287–304.
- Rodriguez, M., Aregullin, M., Nishida, T., Uehara, S., Wrangham, R., Abramowski, Z., Finlayson, A., and Towers, G.H.N., 1985. Thiarubrine A, a bioactive constituent of *Aspilia* (Asteraceae) consumed by wild chimpanzees. *Experientia*, 41:419–420.
- 芝哲夫, 1976. 苦味と辛味の化学. 化学総説, 14 (味と臭いの化学) : 129–156.
- Takasaki, H., and Hunt, K., 1987. Further medicinal plant consumption in wild chimpanzee? *African Study Monographs*, 8(2):125–128.
- 田中寛, 1991. 住血吸虫症の症状. 化学療法の領域, 7(5) : 876–882.
- Wrangham, R.W., and Nishida, T., 1983. *Aspilia* spp. leaves: a puzzle in the feeding behavior of wild chimpanzees. *Primates*, 24(2):276–182.