

## 酸化マグネシウム共存下における植物由来成分の抗菌性とイネいもち病防除効果

栗田 幸秀 (山形大学 大学院理工学研究科, k.k@wahcom.jp)

野田 博行 (山形大学 大学院理工学研究科, hironoda@yz.yamagata-u.ac.jp)

飯塚 博 (山形大学 大学院理工学研究科, h-iizuka@yz.yamagata-u.ac.jp)

生井 恒雄 (山形大学 農学部, tnamai@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp)

長谷 修 (山形大学 農学部, s.hase@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp)

### Antibacterial activities of plant constituents with magnesium oxide and control efficacy against rice blast disease

Koushu Kurita (Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, Japan)

Hiroyuki Noda (Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, Japan)

Hiroshi Iizuka (Graduate School of Science and Engineering, Yamagata University, Japan)

Tsuneo Namai (Faculty of Agriculture, Yamagata University, Japan)

Shu Hase (Faculty of Agriculture, Yamagata University, Japan)

#### 要約

酸化マグネシウム (MgO) 共存下における、ローズマリー、タイム、セージおよびクローブ等の植物由来成分の抗菌性を細菌の増殖に伴い発生する二酸化炭素およびメルカプタン発生量から評価した。その結果、ローズマリーおよびクローブは72時間経過後でも二酸化炭素 (CO<sub>2</sub>) およびメルカプタン発生を抑えていることが明らかとなった。次に、高いCO<sub>2</sub>およびメルカプタン発生抑制効果が認められたローズマリーおよびクローブをMgO共存下でイネの苗いもち防除効果を調べた結果、化学農薬 (ベンレート T 水和剤) の処理には劣るものの発病率は抑制され、それぞれ蒸留水 (DW) 処理区に対して危険率1%と5%で有意性が認められた。これらの防除効果を、ポリフェノールとMgOが反応して生成する過酸化水素、MgOおよびポリフェノールの相乗効果として議論した。

#### キーワード

いもち病防除, 抗菌性, 酸化マグネシウム, 相乗効果, ハーブ

#### 1. はじめに

農業現場における化学合成農薬の使用は、環境汚染や人的被害、土壌への残留などの社会問題を引き起こしてきた。これらの問題の解決は、安全な農産物生産を行う上で重要である。

植物には、抗菌活性成分を含むものが数多く存在することから、これまで比較的安全性の高い植物を抗菌剤として活用する研究が数多く報告されている (Iwasawa et al., 2009; Kajiya et al., 2004; Kawai et al., 2003; Friedman, 2007; Kusuda et al., 2006; Hatano et al., 2005; Gong et al., 2006)。しかし、植物由来成分を既存の化学合成抗菌剤と比較すると抗菌効果が低く、多量に散布する必要があるという課題がある。また、インフルエンザウイルスやメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、ヘリコバクターピロリ菌などに対して、抗生物質と植物由来成分を混合して投与することで抗ウイルス作用や抗菌効果を相乗的に増幅させる研究も報告されている (Wagner et al., 2009; Haidari et al., 2009; Tanaka et al., 2002; Zhao et al., 2001)。しかし、化学物質と植物由来成分を混合することは、薬剤の毒性に起因する問題が生じることから、有機農業分野での使用は困難である。

そこで著者らは、低コストで毒性の低い植物由来の抗菌資材を探した結果 (Noda et al., 2008; Kurita et al., 2012)、緑茶

やオウバク、ローズマリーと塩基性化合物である酸化マグネシウム (MgO) を水の存在下で酸素と反応させることにより、それぞれを単独で用いた場合に比べて抗菌性を向上させることに成功した。この効果は、溶存酸素の存在下で、植物に含まれるポリフェノールとMgOとの反応により過酸化水素が生成することに起因している。この抗菌剤で用いるMgOとポリフェノールは量も少なく毒性も低いと思われる。また、生成した過酸化水素は、遷移金属イオンや微生物が保有する酵素等により徐々に分解されるため土壌残留は少ないと考えられる。したがって、このような特性を有する本抗菌資材は、有機農業分野においても適用可能であると考えた。そこで、本研究では、さらに効果が高かつ低コストな植物を探するため、ポリフェノールが多く含まれるシソ科ハーブ類や香辛料とMgOからなる資材の抗菌性を検討したので報告する。

さて、イネいもち病はイネの最重要病害であり、本病の第一次伝染源は、前年度のイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) 汚染種子で、育苗中に発生する苗いもちが大きな意味を持つことが知られている。この罹病苗を圃場に移植すると、イネの生育に伴って葉いもち、穂いもちが発生し、特に穂いもちは、不稔もみや未成熟もみを発生し、収量に直接的に影響を及ぼすため甚大な被害をもたらす。そのため、本病の防除には種子消毒が基本となっている (生井, 2011)。

本研究は本抗菌資材の農業への応用の可能性を探ることを目的として、イネのいもち病に対する種子消毒効果を検討したので合わせて報告する。

## 2. 実験方法

### 2.1 酸化マグネシウム共存下における香辛料およびポリフェノールの抗菌性評価

MgO、ローズマリン酸(ROS)、没食子酸(GA)、エピガロカテキンガレート(EGCg)、クロロゲン酸(CGA)およびオイゲノール(EUG)は和光純薬製を用いた。香辛料としてローズマリー葉、セージ粉末、タイム粉末およびクローブ粉末の市販品(GABAN)を用いた。ローズマリー葉は粉碎後、資材として用いた。

既報(Kurita et al., 2012)のとおり、内容量約6Lのデシケーター内のシャーレに1%ポリペプトン溶液100 mLと各抗菌資材を配置し、大気中の微生物の増殖に伴い発生する二酸化炭素(CO<sub>2</sub>、好気性菌)およびメルカプタン(嫌気性菌)濃度をガステックにより測定し、それらの発生量を抗菌性の指標とした。

試験区として、ローズマリー粉末200 mg + MgO 50 mg (ローズマリー/MgO)、セージ粉末200 mg + MgO 50 mg (セージ/MgO)、タイム粉末200 mg + MgO 50 mg (タイム/MgO)、クローブ粉末200 mg + MgO 50 mg (クローブ/MgO)、0.1 mMローズマリン酸+MgO 50 mg、0.1 mMクロロゲン酸+MgO 50 mg、0.1 mM GA + MgO 50 mg、0.1 mM EGCg + MgO 50 mgを設定した。

### 2.2 ポリフェノールの定性分析

香辛料粉末0.1 gに脱イオン水10 mLを加え、振とう機で30分間振とうし、抽出した。抽出液は細孔径0.45 μmのミリポア製ナイロンフィルターでろ過したのち、高速液体クロマトグラフィシステム(HPLC、JASCO製)で分析した(マルチチャンネル検出器)。

HPLC用カラムは野村化学製C30-UG-5(逆相、150×2.0 mm、5 μm)を用いた。分析条件は、溶離液A(水:酢酸、100:1、体積分率)、溶離液B(アセトニトリル:酢酸、100:1、体積分率)、流速0.2 mL/minを用いた。グラジエントは、0 min 15 % B; 0-32 min: linear gradient to 30 % Bを設定した。ピークはリテンションタイムと紫外スペクトル、標準試料により同定した。

### 2.3 酸素消費速度の評価

酸素消費は、内容量約1 mLの測定セルに、1%ポリペプトン溶液700 μLと香辛料の100倍抽出液400 μLを加え、最後に1 mg/mL MgO懸濁液100 μLを添加したのち直ちに、セントラル科学製クラーク型酸素電極(オキシグラフ8型)を用いて測定した。

### 2.4 抗菌資材の浸種処理による苗いもち防除効果

供試植物はイネ(*Oryza sativa*)の栽培品種'はえぬぎ'を使用した。用いたイネの種子は、前年度いもち病菌を噴霧接種して作成したいもち病菌汚染種子である。供試資材は2.1と同様のものと、脱塩水(DW)100 mLにベンレートT水和剤250 mgを加え攪拌し作成した、ベンレートT水和剤溶液である。

試験区は、①DW区を対照として、②ローズマリー400 mg + MgO 50 mg / 100 mL DW区、③クローブ400 mg + MgO 50 mg / 100 mL DW区、④農薬(ベンレートT水和剤)

区を設定した。処理は、化学薬剤による種子消毒と同一の浸種処理法とした。すなわち、シャーレにイネいもち病菌汚染種子と各資材を加えて、25 °C暗黒条件下で48時間浸種処理後、イネのシードリングケース(15×5×10 cm)に播種し(1,200粒)、ガラス室で育苗した。出芽期に一旦接種箱に移し、24時間保持した後ガラス室に戻し育苗し、4週間目に発病調査を行った。種子消毒効果の調査項目は、種子発芽率と苗いもち発生抑制率である。前者は、用いた汚染種子数をあらかじめ揃えておき、発芽率=(発芽苗数) / (播種種子数)を求めた。また、後者は、発芽苗が黄化、立枯症状を示したものを苗いもちと診断し、発病率=(発病苗数) / (発芽苗数800~900) × 100とした。発芽率および発病率の検定は、エクセル統計2012を用いて行った。

## 3. 結果

### 3.1 CO<sub>2</sub>およびメルカプタン濃度の経時変化

内容量約6Lのデシケーター内のシャーレに1%ポリペプトン溶液100 mLと各抗菌資材を配置し、大気中の微生物の増殖に伴い発生するCO<sub>2</sub>およびメルカプタン濃度をガステックにより測定し、それらの発生量を抗菌性の指標とした。図1に、各種抗菌資材存在下のCO<sub>2</sub>濃度の経時変化を示す。48時間経過後からセージ/MgOとタイム/MgOでCO<sub>2</sub>濃度の上昇が確認された。一方、クローブ/MgOとローズマリー/MgOでは、72時間後でもCO<sub>2</sub>の発生が抑制されていることが確認された。

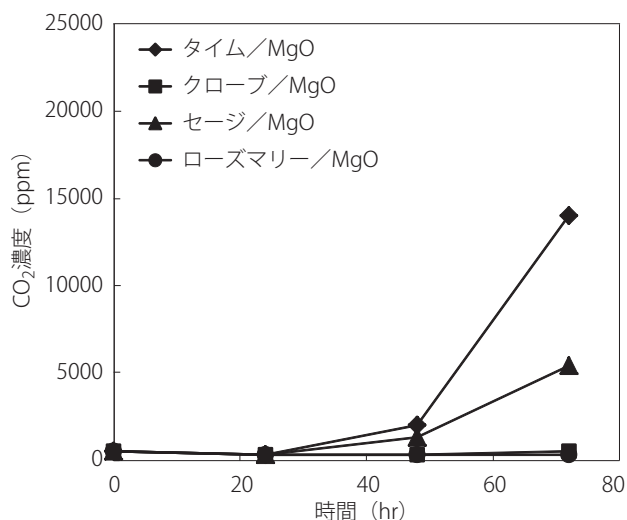


図1: CO<sub>2</sub>発生量の経時変化

図2に、抗菌資材存在下のメルカプタン濃度の経時変化を示す。72時間経過後に、タイム/MgOでメルカプタン濃度の急激な上昇、セージ/MgOでわずかな上昇が確認された。一方、クローブ/MgOとローズマリー/MgOでは、72時間後でもメルカプタンの発生が抑制されていることが確認された。

ローズマリー、タイム、セージは、同じソノ科ハーブ類に属するが、抗菌性に大きな差がみられた。この要因の一つとして、ポリフェノールの種類と含量の違いが考えられる。それぞれの香辛料抽出液のHPLC測定により、ローズマリー中

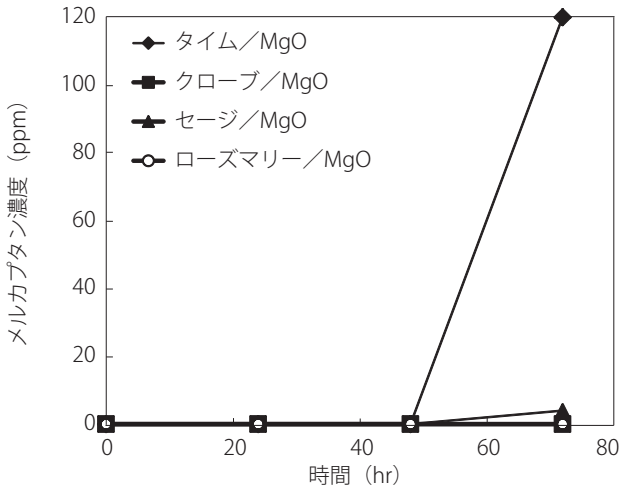


図2：メルカプタン発生量の経時変化

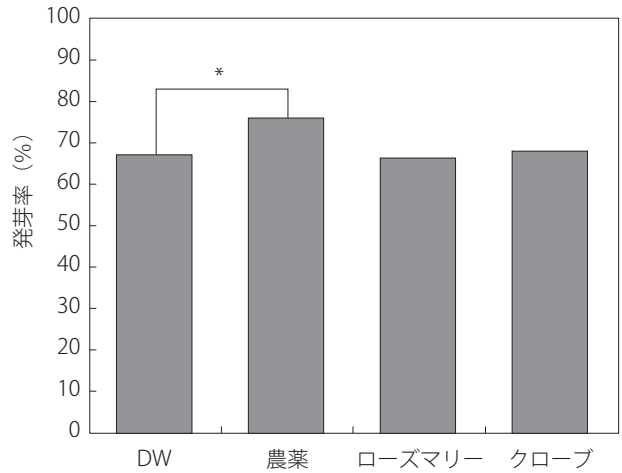


図4：いもち病菌汚染種子の発芽に及ぼす影響  
\*：< 5%

のROSをはじめ多くのポリフェノールの存在が確認された。また、クローブではオイゲノールの存在が確認された。そこで、代表的なポリフェノールのMgO共存下におけるCO<sub>2</sub>発生量を比較した。図3に、ROS、GA、EGCgおよびCGAのMgO存在下におけるCO<sub>2</sub>発生量の経時変化を示す。この結果からROSが最もCO<sub>2</sub>発生を抑えていることが明らかとなった。一方、MgO共存下の0.1 mM EUGにはほとんどCO<sub>2</sub>発生抑制効果がみられなかった。さらに、香辛料とMgOが反応して起こる酸素消費速度を測定した結果、ローズマリーの速度が最も大きく、次いでクローブ、タイム、セージの順であった。

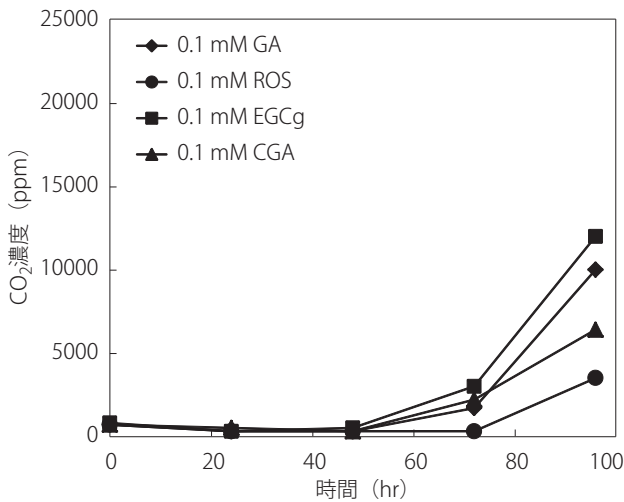


図3：MgO共存下における各種ポリフェノールの二酸化炭素発生量の経時変化

### 3.2 抗菌資材の浸種処理による種子発芽率

図4に、抗菌資材で浸種処理した汚染種子の発芽率を示す。農薬処理区の発芽率がやや高い傾向を示したが、ローズマリー/MgO処理区、クローブ/MgO処理区はDW処理区と同程度であった。化学農薬処理区の発芽率は、DW処理区に対し、5%水準で、有意に高かった。

### 3.3 抗菌資材の浸種処理による苗いもちの発病抑制効果

図5に抗菌資材で浸種処理した種子の苗いもち発病率を示す。化学農薬処理区が最も苗いもちの発生を抑制し、次いでクローブ/MgO処理区、ローズマリー/MgO処理区の順となった。クローブ/MgO処理区とローズマリー/MgO処理区の苗いもちの発生率は、化学農薬処理区よりは低いものの、DW処理区に対して、それぞれ、1%、5%水準で有意差があった。

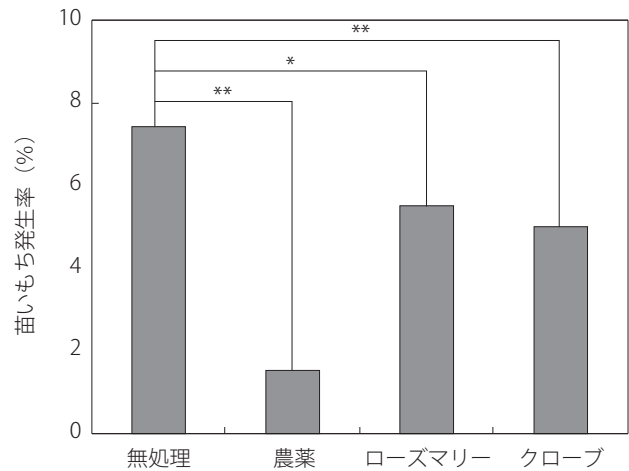


図5：イネの苗いもちの発生に及ぼす影響  
\*\*：< 1%, \*：< 5%

## 4. 考察

香辛料のローズマリー、タイム、セージおよびクローブとMgOからなる資材を、CO<sub>2</sub>濃度とメルカプタン濃度の経時変化から比較したところ、ローズマリーとクローブで高いCO<sub>2</sub>およびメルカプタン発生抑制効果が確認された(図1、2)。ローズマリー、タイムおよびセージは同じシソ科ハーブ類に属するが、CO<sub>2</sub>およびメルカプタン発生抑制効果には大きな差がみられた。この要因の1つとして、これらに含まれるポリフェノールの種類と含有量の違いが考えられる。HPLC測定によ

リタイム、セージと比べてローズマリーではロズマリン酸が高濃度で検出された。そこで、MgO 共存下の0.1 mM ROSのCO<sub>2</sub>発生量を測定した結果、同濃度のCGAやGA、EGCgと比べCO<sub>2</sub>発生を抑制していることが確認された(図3)。したがって、ローズマリーの高いCO<sub>2</sub>およびメルカプタン発生抑制効果には、高濃度に含まれるロズマリン酸が関係していると考えられる。一方、クローブでは、HPLCにより主成分としてEUGが検出されたが、MgO共存下の0.1 mMオイゲノールにはCO<sub>2</sub>発生を抑制する効果がみられなかった。また、HPLC測定によりクローブにはEUG以外に複数のポフェノールが含まれ、MgO共存下では酸素消費反応が起こることが確認された。したがって、クローブのCO<sub>2</sub>発生抑制効果は、MgO共存下でポリフェノール類と反応して生成する過酸化水素とオイゲノールが相乗的に作用していることが考えられる。

次に、高いCO<sub>2</sub>およびメルカプタン発生抑制効果が確認されたローズマリーとクローブについて、イネいもち病に対する種子消毒効果を明らかにするための試験を実施した。本試験では植物粉末400 mgとMgO 50 mgを合わせた濃度で実施した。今回用いたいもち病菌汚染種子は、人工的に接種したものであるため、汚染程度が高く、相対的に発芽率が低かったが、農薬区でやや高い値を示した(図4)。しかし、DW区とローズマリー区、クローブ区を比較すると大きな差は認められなかった。このことは、本資材はこの濃度では化学農薬のような殺菌効果はほとんどないものと思われる。しかし、苗いもちに対する防除試験を実施した結果、化学農薬区には若干劣るものの、ローズマリー区、クローブ区共にDW区に比べ優位に防除効果を示した(図5)。これは、本資材が発芽直後の種子へのいもち病菌の伸展や侵入を抑制する、いわゆる静菌効果をもつものと解釈され、この効果は、植物に含まれるポリフェノール(Kodama et al., 1992)とMgO、過酸化水素の3つの相乗的作用によるものであると考えられる。以上のことから、本資材がいもち病に対して発病抑制活性を有することが証明された。

本研究で用いた資材は、比較的毒性の少ない植物粉末をMgOと反応させるだけで化学農薬には及ばないものの、統計的にも有意差がみられる程度の防除効果を有することから、現在、我が国で政策的に推奨されている化学農薬を用いない有機農業や化学農薬を削減する特別栽培用の抗菌資材としての応用が期待される。

## 引用文献

Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoids and teas. *Molecular Nutrition & Food Research*, Vol. 51, No. 1, 116-134.

Haidari, M., Ali, M., Casscells III, S. W. and Madjid, M. (2009). Pomegranate (*Punica granatum*) purified polyphenol extract inhibits influenza virus and has a synergistic effect with oseltamivir. *Phytomedicine*, Vol. 16, No. 12, 1127-1136.

Hatano, T., Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T., Shiota, S., Tsuchiya, T. and Yoshida, T. (2005). Effects of tannins and related polyphenols on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Phytochemistry*, Vol. 66, No. 17, 2047-2055.

Iwasawa, A., Niwano, Y., Mokudai, T. and Kohno, M. (2009). Antiviral activity of proanthocyanidin against feline calicivirus used as a surrogate for noroviruses, and coxsackievirus used as a representative enteric virus. *Biocontrol Science*, Vol. 14, No. 3, 107-111.

Kajiya, K., Hojo, H., Suzuki, M., Nanjo, F., Kumazawa, S. and Nakayama T. (2004). Relationship between Antibacterial Activity of (+)-Catechin Derivatives and Their Interaction with a Model Membrane. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Vol. 52, No. 6, 1514-1519.

Kawai, K., Tsuno, N. H., Kitayama, J., Okaji, Y., Yazawa, K., Asakage, M., Hori, N., Watanabe, T., Takahashi, K. and Nagawa, H. (2003). Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, Vol. 112, No. 5, 951-957.

Kodama, O., Miyakawa, J., Akatsuka, T. and Kiyosawa, S. (1992). Sakuranetin, a flavanone phytoalexin from ultraviolet-irradiated rice leaves. *Phytochemistry*, Vol. 31, No. 11, 3807-3809.

Kusuda, M., Inada, K., Ogawa, T., Yoshida, T., Shiota, S., Tsuchiya, T. and Hatano, T. (2006). Polyphenolic constituent structures of *Zanthoxylum piperitum* fruit and the antibacterial effects of its polymeric procyanidin on methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, Vol. 70, No. 6, 1423-1431.

Kurita, K., Noda, H. and Iizuka, H. (2012). Antibacterial Activities of Plant Powders with Magnesium Oxide. *Transaction of the Material Research Society of Japan*, Vol. 37, No. 4, 597-600.

生井恒雄 (2011). イネいもち病菌レースの分化およびいもち病の環境保全型防除に関する研究. 日本植物病理学会報, Vol. 77, No. 3, 129-132.

Noda, H. and Miyamoto, Y., Koukinzai, Patent No. 4202493, Japan, 17/10/ 2008.

Gong, W., Si, J., Tsao, R., Kalab, M., Yang, R. and Yin, Y. (2006). Bioassay-guided purification and identification of antimicrobial components in Chinese green tea extract. *Journal of Chromatography A*, Vol. 1125, No. 1, 204-210.

Tanaka, M., Isogai, E., Isogai, H., Hayashi, S., Hirose, K., Kimura, K., Sugiyama, T. and Sato, K. (2002). Synergic effect of quinolone antibacterial agents and proton pump inhibitors on *Helicobacter pylori*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, Vol. 49, No. 6, 1039-1046.

Zhao, W.-H., Hu, Z.-Q., Okubo, A., Hara, Y. and Shimamura, T. (2001). Mechanism of Synergy between Epigallocatechin Gallate and b-Lactams against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Vol. 45, No. 6, 1737-1742.

Wagner, H. and Ulrich-Merzenich, G. (2009). Synergy research: Approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine*, Vol. 16, No. 2-3, 97-110.

(受稿：2013年5月10日 受理：2013年5月23日)