

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2020-2016

(P2020-2016A)

(43) 公開日 令和2年1月9日(2020.1.9)

(51) Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
AO1N	65/48 (2009.01)	AO1N 65/48	2B022
AO1P	1/00 (2006.01)	AO1P 1/00	4H011
AO1N	61/00 (2006.01)	AO1N 61/00	D
AO1G	7/06 (2006.01)	AO1G 7/06	A
AO1P	3/00 (2006.01)	AO1P 3/00	

審査請求 有 請求項の数 10 O L (全 18 頁)

(21) 出願番号 特願2018-120010 (P2018-120010)
 (22) 出願日 平成30年6月25日 (2018. 6. 25)

(出願人による申告) 平成29年度、農林水産省「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業」及び平成30年度、農林水産省「イノベーション創出強化研究推進事業」、産業技術力強化法第19条の適用を受ける特許出願

(71) 出願人 591060980
 岡山県
 岡山県岡山市北区内山下2丁目4番6号
 (74) 代理人 110001047
 特許業務法人セントクレスト国際特許事務所
 (72) 発明者 鳴坂 義弘
 岡山県加賀郡吉備中央町吉川7549-1
 岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所内
 (72) 発明者 畑中 唯史
 岡山県加賀郡吉備中央町吉川7549-1
 岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所内

最終頁に続く

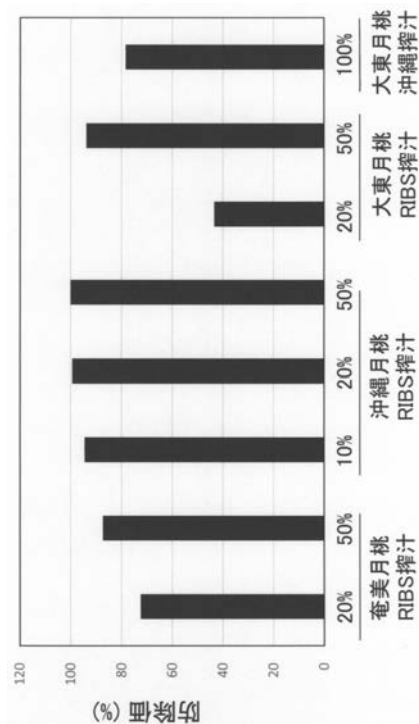
(54) 【発明の名称】 植物病害の防除剤

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】 植物病害に対して優れた防除効果を有する分子を同定し、当該分子を利用した植物病害の防除剤および防除方法を提供する。

【解決手段】 月桃からの特定の抽出画分が、様々な植物病害に対して優れた防除効果を有することを見出した。また、プロアントシアニジンがその活性成分であることが判明した。

【選択図】 図1



- 【特許請求の範囲】
- 【請求項 1】
発酵過程を経ない精製により得られる植物精製物を含む、植物病害の防除剤。
- 【請求項 2】
精製が、エタノールによる抽出またはアセトニトリルによる溶出を含む、請求項 1 に記載の防除剤。
- 【請求項 3】
精製が、少なくとも 3 5 0 0 の分子量での分画を含む、請求項 1 または 2 に記載の防除剤。
- 【請求項 4】 10
プロアントシアニジンを含む有効成分とする、植物病害の防除剤。
- 【請求項 5】
プロアントシアニジンを含む植物精製物を含む、植物病害の防除剤。
- 【請求項 6】
プロアントシアニジンを含む乾燥重量で 1 % 以上含む、請求項 4 または 5 に記載の防除剤。
- 【請求項 7】
植物病害が、植物ウイルス病、植物糸状菌病、または植物細菌病である、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の防除剤。
- 【請求項 8】 20
植物病害が、モザイク病である、請求項 7 に記載の防除剤。
- 【請求項 9】
植物病害が、炭疽病または黒斑細菌病である、請求項 7 に記載の防除剤。
- 【請求項 10】
請求項 1 ~ 9 のいずれかに記載の防除剤を植物に施用することを含む、植物病害の防除方法。
- 【発明の詳細な説明】
- 【技術分野】
- 【0001】 30
本発明は、プロアントシアニジンを含む有効成分とする植物病害の防除剤、および当該防除剤を植物に施用することを含む植物病害の防除方法に関する。
- 【背景技術】
- 【0002】
糸状菌病、細菌病、植物ウイルス病等により引き起こされる植物病害による世界の農業生産量の損失は 15 % にもおよび、そのうち植物ウイルス病による作物生産量の損失額は年間 6 兆円を超えると予想されている。植物ウイルス病は農作物に様々な異常を引き起こし、収量および品質に大きな被害を与えている。
- 【0003】 40
植物ウイルス病の防除剤としては、日本においてレンテミンが農薬登録されているものの、特効薬となる化学農薬は存在しない（レンテミンは、野田食菌工業（株）の登録商標。農薬登録第 15584 号、第 17774 号、第 19439 号、第 19440 号）。そこで、媒介生物の防除や弱毒ウイルスの接種など時間と手間をかけた耕種的防除を行って、植物ウイルス病の被害を軽減させているのが実情である。
- 【0004】
このため、植物ウイルス病に対して優れた効果を示す防除剤の開発が切望されている。
- 【0005】
なお、植物ウイルス病の防除剤に関しては、例えば、アミノ酸発酵副生物、デヒドロアスコルビン酸、アスコルビン酸（ビタミン C）、リグニン抽出物などが有効であるとの報告がある（特許文献 1 ~ 4）。
- 【先行技術文献】
- 【特許文献】 50

【 0 0 0 6 】

【特許文献 1】国際公開第2013/065439号公報

【特許文献 2】特開2014-5232号公報

【特許文献 3】特許第5574266号公報

【特許文献 4】国際公開第2017/125993号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【 0 0 0 7 】

本発明は、このような状況に鑑みてなされたものであり、その目的は、植物病害に対して優れた防除効果を有する分子を同定し、当該分子を利用した植物病害の防除剤および防除方法を提供することにある。

10

【課題を解決するための手段】

【 0 0 0 8 】

本発明者は、上記課題を解決すべく鋭意検討を行った結果、植物からの特定の抽出画分が、様々な植物ウイルスや植物病原菌に対して優れた防除効果を有することを見出した。本発明者は、さらに、当該抽出画分に含まれる活性成分の同定を試みた結果、遂に、プロアントシアニジンが活性成分であることを突き止め、本発明を完成するに至った。

【 0 0 0 9 】

すなわち、本発明は、植物精製物を有効成分とする植物病害の防除剤、および当該防除剤を植物に施用することを含む植物病害の防除方法に関し、より詳しくは、以下の発明を提供するものである。

20

【 0 0 1 0 】

(1) 発酵過程を経ない精製により得られる植物精製物を含む、植物病害の防除剤。

【 0 0 1 1 】

(2) 精製が、エタノールによる抽出またはアセトニトリルによる溶出を含む、(1) に記載の防除剤。

【 0 0 1 2 】

(3) 精製が、少なくとも 3 5 0 0 の分子量での分画を含む、(1) または (2) に記載の防除剤。

【 0 0 1 3 】

(4) プロアントシアニジンを有効成分とする、植物病害の防除剤。

30

【 0 0 1 4 】

(5) プロアントシアニジンを含む植物精製物を含む、(4) に記載の防除剤。

【 0 0 1 5 】

(6) プロアントシアニジンを乾燥重量で 1 % 以上含む、(4) または (5) に記載の防除剤。

【 0 0 1 6 】

(7) 植物病害が、植物ウイルス病、植物糸状菌病、または植物細菌病である、(1) から (6) のいずれかに記載の防除剤。

【 0 0 1 7 】

(8) 植物病害が、モザイク病である、(7) に記載の防除剤。

40

【 0 0 1 8 】

(9) 植物病害が、炭疽病または黒斑細菌病である、(7) に記載の防除剤。

【 0 0 1 9 】

(1 0) (1) ~ (9) のいずれかに記載の防除剤を植物に施用することを含む、植物病害の防除方法。

【発明の効果】

【 0 0 2 0 】

本発明の防除剤を用いれば、植物に含まれる成分によって、葉の萎縮や斑点の発生などの薬害を生じさせることなく、安全に植物病害を防除することが可能である。本発明の防

50

除剤による防除効果は、それを直接散布した葉のみならず、その上位葉にも認められたことから、植物の免疫力（病原に対する抵抗性）の向上を引き起こすことが考えられる。従って、本発明の防除剤によれば、非常に効果的に防除効果をもたらすことが可能である。

【図面の簡単な説明】

【0021】

【図1】月桃垂種抽出物のToMVに対する感染抑制効果を示す図である。なお、図中、「RIBS搾汁」とは、岡山県で搾汁した抽出液であり、「沖縄搾汁」は、沖縄県で搾汁した抽出液である。

【図2】原材料の違う搾汁機の刃を用いて得た月桃抽出物のToMVおよびTMVに対する感染抑制効果を示す図である。

10

【図3】ペンサミアータパコの上位葉における、各資材のToMVに対する感染抑制効果を示す図である。

【図4】トマトの上位葉における、各資材のToMVに対する感染抑制効果を示す図である。

【図5】シロイヌナズナおよびチンゲンサイに施用された月桃抽出物のアブラナ科野菜類炭疽病菌に対する感染抑制効果を示す図である。

【図6】シロイヌナズナに施用された月桃抽出物の黒斑細菌病菌に対する感染抑制効果を示す図である。

【図7】チンゲンサイに施用された月桃抽出物の黒斑細菌病菌に対する感染抑制効果を示す図である。

【図8】ペンサミアータパコに施用された各アセトニトリル画分のToMVに対する感染抑制効果を示す図である。

20

【図9】各アセトニトリル画分の乾燥物重量を示す図である。

【図10】アセトニトリル画分に含まれる成分の分子量分布および吸収スペクトルをゲルパー浸透クロマトグラフィー分析した結果を示す図である。

【図11】アセトニトリル画分に含まれる成分の分子量分布をMALDI-TOF質量分析した結果を示す図である。

【図12】アセトニトリル画分に含まれる成分の部分構造を赤外吸収（IR）分析した結果を示す図である。

【図13】アセトニトリル画分に含まれる成分の部分構造をプロトンNMR分析した結果を示す図である。

30

【図14】アセトニトリル画分に含まれる成分の部分構造を熱分解GC-MS分析した結果を示す図である。

【図15】アセトニトリル画分に含まれる成分の部分構造をカーボンNMR分析した結果を示す図である。

【発明を実施するための形態】

【0022】

本発明は、発酵過程を経ない精製により得られる植物精製物を含む、植物病害の防除剤に関する。

【0023】

国際公開第2017/125993号公報に記載の方法では、活性成分であるリグニン分解物を得るために、精製工程において発酵を行っているが、本発明では精製工程において発酵は必要ない。また、同公報の精製工程においては、リグニン分解物を得るために鉄イオンとの接触（鉄製破砕機の利用）を要するが、本発明においてプロアントシアニジンの精製物を得るためには、鉄イオンとの接触は必要なく、例えば、ステンレス製破砕機を利用してもよい。

40

【0024】

本発明における精製工程は、エタノールによる抽出またはアセトニトリルによる溶出を含むことができる。エタノールによる抽出を行う場合、エタノール濃度は、通常、40%～80%であり、好ましくは、60%～80%である。一方、アセトニトリルによる溶出を行う場合、アセトニトリル濃度は、通常、5%以上、好ましくは5%～30%であり、より好ましく

50

は5%～20%である。40%以上の濃度のアセトニトリルを用いてもよいが、抽出物において非活性成分の割合が高まることが考えられる。

【0025】

また、例えば、3500の分子量での分画（例えば、4000以上、5000以上、6000以上、7000以上、8000以上、9000以上、10000以上の分子量での分画）を含むことができる。これにより植物病害の防除活性に寄与しない低分子量の成分を除去することができる。

【0026】

その他、本発明においては、必要に応じて、他の精製工程を組み合わせてもよい。

【0027】

本発明においては、プロアントシアニジンが活性成分（若しくはその一つ）であることが見出された。従って、本発明は、プロアントシアニジンを有効成分とする、植物病害の防除剤を提供する。

【0028】

本発明において「プロアントシアニジン」とは、カテキンやエピカテキンといったフラバン-3-オール類が複数結合した化合物である。本発明の防除剤に用いるプロアントシアニジンは、植物病害の防除効果を有するものであれば特に制限はなく、天然由来の精製物であっても、人工的に合成された化合物であってもよい。精製物は、完全な精製物であっても、粗精製物であってもよい。

【0029】

本発明におけるプロアントシアニジンの好ましい形態は、植物精製物である。プロアントシアニジンの精製物（抽出液）は、通常、プロアントシアニジンを0.1mg/ml以上、好ましくは0.3mg/ml以上、より好ましくは0.5mg/ml以上（例えば、1mg/ml以上、5mg/ml以上、10mg/ml以上、20mg/ml以上）含む。薬害などの負の影響を生じさせないためには、通常、50mg/ml以下が好ましいと考えられる。また、プロアントシアニジンの精製物は、通常、プロアントシアニジンを、乾燥重量で1%以上、好ましくは5%以上、より好ましくは10%（例えば、20%以上、30%以上、50%以上）含む。従って、本発明は、プロアントシアニジンを上記濃度または割合で含む、植物病害の防除剤を提供する。プロアントシアニジンは、1種単独でまたは2種以上組み合わせて使用することができる。

【0030】

本発明の防除剤においては、植物病害の防除効果が阻害されない限り、他の有効成分を含有していてもよい。例えば、植物病害に対する防除効果をさらに高めるため、あるいは、適用対象とする植物病害の範囲を広げるため、レンテミンなどの既知の薬剤と組み合わせて用いることができる。また、植物ウイルスは、虫媒感染する例もあることから、既知の殺虫剤、殺ダニ剤、抗菌剤などと組み合わせて用いることもできる。

【0031】

本発明の防除剤においては、植物病害の防除効果が阻害されない限り、他の任意成分を含んでもよい。他の任意成分としては、例えば、展着剤、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、滑沢剤、稀釈剤、賦形剤等を挙げることができる。

【0032】

本発明の防除剤の植物への施用方法は特に制限されず、例えば、散布、塗布、浸漬などが挙げられる。また、植物組織培養を行っている場合には、その培地への添加なども考えられる。本発明の防除剤が施用されている領域では非常に高い感染防除効果が認められることから、施用方法としては、散布や塗布などによる植物体の全体や葉への施用、種子や球根などへの浸漬が好ましい。本発明の防除剤は、施用された部位の周辺部位においても、植物病害に対する防除効果を示すことができる点で有利である。

【0033】

本発明の防除剤の剤型は、施用方法などに応じて各種の形態を採ることができる。例えば、乳剤、油剤、エアゾール、フロアブル剤などの液剤の他、水和剤、水溶剤、粉剤、粒剤、錠剤などが挙げられる。散布などにより植物体へ施用する場合には、液剤、または施用時に液状にすることができる剤型が好ましい。

10

20

30

40

50

【0034】

施用量は、植物病害に対して防除効果を有する量であれば特に制限はなく、当業者であれば、適宜調整することができる。

【0035】

本発明の防除剤の植物への施用時期は特に制限されないが、予防的な防除が最も有効である。具体的には、育苗期から収穫前にかけての施用が有効である。また、防除剤の施用回数に、特に制限はない。

【0036】

本発明の防除剤を適用する植物ウイルス病としては、例えば、タバモウイルス属ウイルス、ポテックスウイルス属ウイルス、カルラウイルス属ウイルス、ククモウイルス属ウイルス、カルモウイルス属ウイルス、またはベゴモウイルス属ウイルスの感染により発症する病気が挙げられる。

10

【0037】

タバモウイルス属ウイルスとしては、例えば、タバコモザイクウイルス(TMV)、トマトモザイクウイルス(ToMV)、キュウリ緑斑モザイクウイルス(KGMMV)、トウガラシマイルドモットルウイルス(PMMoV)、スイカ緑斑モザイクウイルス(CGMMV)などが挙げられ、ポテックスウイルス属ウイルスとしては、例えば、オオバコモザイクウイルス(P1AMV)、ジャガイモXウイルス(PVX)などが挙げられ、カルラウイルス属ウイルスとしては、例えば、ジャガイモモザイクウイルス(PVM)が挙げられ、ククモウイルス属ウイルスとしては、例えば、キュウリモザイクウイルス(CMV)などが挙げられ、カルモウイルス属ウイルスとしては、例えば、メロンえそ斑点ウイルス(MNSV)などが挙げられ、ベゴモウイルス属ウイルスとしては、例えば、トマト黄化葉巻ウイルス(TYLCV)などが挙げられるが、これらに制限されない。

20

【0038】

本発明の防除剤の対象とする植物ウイルス病は、好ましくは、各種モザイクウイルスやジャガイモXウイルスなどの感染により発症するモザイク病である。

【0039】

本発明の防除剤を適用する糸状菌としては、例えば、うどんこ病菌(Erysiphe属菌、Sphaerotheca属菌、Leveillula属菌)、ボトリチス(Botrytis)属菌、フルビア(Fulvia fulva)属菌、コリネスポラ(Corynespora)属菌、アルブゴ(Albugo)属菌、べと病菌(ブシウドペロノスポラ(Pseudoperonospora)属菌、Peronospora属菌、Plasmopara属菌、Bremia属菌)、ピリキュラリア(Pyricularia)属菌、いもち病菌(Pyricularia grisea)、ごま葉枯病菌(Cochliobolus miyabeanus)、サーコスボラ類縁菌(Cercospora属菌、Cercosporiella属菌、Pseudocercospora属菌、Paracercospora属菌、Mycovellosiella属菌)、炭疽病菌(コレトトリカム(Colletotrichum)属菌、Glomerella属菌)、さび病菌(Puccinia属菌)、アルタナリア(Alternaria)属菌、スクレロチニア(Sclerotinia)属菌、土壌伝染性糸状菌の根こぶ病菌(Plasmodiophora brassicae)、フィトフィトラ(Phytophthora)属菌、フザリウム(Fusarium)属菌、パーティシリウム(Verticillium)属菌、ピシウム(Pythium)属菌、リゾクトニア(Rhizoctonia)属菌が挙げられる。好ましくは、炭疽病菌である。

30

40

【0040】

本発明の防除剤を適用する細菌としては、例えば、アグロバクテリウム(Agrobacterium)属、クラビバクター(Clavibacter)属、エルウィニア(Erwinia)属、シュードモナス(Pseudomonas)属、ラルストニア(Ralstonia)属、コリネバクテリウム(Corynebacterium)属、クルトバクテリウム(Curtobacterium)属、パークホルデリア(Burkholderia)属、キサントモナス(Xanthomonas)属、リゾバクター(Rhizobacter)属、クロストリジウム(Clostridium)属に属する細菌が挙げられる。好ましくは、黒斑細菌病を引き起こす、シュードモナス属のシュードモナス・シリングゲ・パソパー・マクリコラ(Pseudomonas syringae pv. maulicola)である。

【0041】

50

本発明の防除剤を施用する植物は、上記病原が感染するものであれば特に制限はないが、例えば、タバコ、トマト、トウガラシ、キュウリ、メロン、スイカ、リンゴ、ネギ、タマネギ、ニラ、ピーマン、ジャガイモ、イネ、オオムギ、カボチャ、ハクサイ、キャベツ、チンゲンサイ、レタス、イチゴ、花卉類（キク、バラ、カーネーション、チューリップ、カトレア、シンビジウム、トルコギキョウ、スターチス、ガーベラなど）等が挙げられる。このように本発明の防除剤は、ナス科植物、ウリ科植物、アブラナ科植物、バラ科、イネ科植物など広範囲に適用することができる。植物ウイルスと宿主植物との関係については、日本植物病名データベース（農業生物資源ジーンバンク）を参照のこと。

【実施例】

【0042】

以下、実施例に基づいて本発明をより具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

【0043】

[実施例1] 発酵過程を経ない月桃抽出物の精製

草本系の事例として、ショウガ科ハナミョウガ属の月桃（ゲットウ（サンニン））の茎葉部分を搾汁機に投入し、水を添加することなく、植物から抽出される液を回収し、遠心機（6000rpm、5分間）により夾雑物を除去し、上清を濾紙及び孔径0.22 μmのフィルター（TPP社製）によって濾過した。

【0044】

なお、国際公開第2017/125993号公報に記載の方法では、精製過程において、搾汁液の発酵を行っているが、本実施例による方法は、発酵は行っていないため、得られる抽出物に含まれる成分が異なると考えられる。

【0045】

[実施例2] 月桃垂種抽出物のToMVに対する感染抑制効果

実施例1で調製した植物抽出液を、ToMV-ベンサミアータタバコ評価系を用いて評価した。すなわち、終濃度0.01%のマイリノーを添加した植物抽出液（希釈[10%、20%、50%、無希釈]）を、ベンサミアータタバコの葉に噴霧処理を行い、その3日後に、ToMVウイルスを接種した。ウイルスの接種は、ToMV-GFP（緑色蛍光蛋白質GFPを付加したウイルス）のプラスミド(pTLBN.G3)2 μgについて、AmpliCap-MaxTM T7 High Yield Message Maker Kitsを用いてRNAを転写合成し、RNA転写物を40倍に希釈して、カーボランダムを用いてベンサミアータタバコ葉に10 μlを2ヶ所に塗布することにより行った。ウイルスの接種から3日後に、GFPの蛍光斑点（ToMVの感染、増殖部位に一致する）をカウントし、ウイルスの感染抑制率を検定して植物抽出液の評価を行った。その結果、いずれの希釈率でも強いウイルス感染抑制効果が認められた（図1）。

【0046】

なお、感染抑制率は、以下の式から算出した。

感染抑制率（防除価）% = 100 - {（処理植物の蛍光斑点数の平均） / （未処理植物の蛍光斑点数の平均）} × 100

[実施例3] 原材料の違う搾汁機の刃を用いて得た月桃抽出物のToMVおよびTMVに対する感染抑制効果

草本系植物の事例として、ショウガ科ハナミョウガ属の月桃（ゲットウ（サンニン））の茎葉部分を鉄製またはステンレス製の刃を備えた搾汁機に投入し、水を添加することなく、植物から抽出される液を回収して、遠心機（6000rpm、5分間）により夾雑物を除去し、上清を濾紙及び孔径0.22 μmのフィルター（TPP社製）によって濾過した。

【0047】

ToMVに関しては、0.01%マイリノーを添加した10%溶液を噴霧処理し、3日後に2 μgプラスミドを転写後、40倍希釈したToMV-GFP（緑色蛍光蛋白質GFPを付加したウイルス）を各植物体に10 μlずつ第3葉にカーボランダムを用いて接種し、3日後に接種葉のGFP蛍光のスポットを測定した。コントロールに対する感染抑制率を算出し、その平均値を示した。1処理あたり、ベンサミアータタバコ3個体を用いた。

10

20

30

40

50

【0048】

TMVに関しては、0.01%マイリノーを添加した10%溶液を噴霧処理し、3日後に2 μ gプラスミドを転写後、6倍希釈したTMV-GFP（緑色蛍光蛋白質GFPを付加したウイルス）を各植物体に10 μ lずつ第3葉にカーボランダムを用いて接種し、3日後に接種葉のGFP蛍光のスポットを測定した。コントロールに対する感染抑制率を算出し、その平均値を示した。1処理あたり、ベンサミアーナタバコ3個体を用いた。

【0049】

その結果、鉄製またはステンレス製の刃を備えた搾汁機のいずれで搾汁しても、ToMVおよびTMVに対して、強いウイルス感染抑制効果が認められた（図2）。

【0050】

国際公開第2017/125993号公報に記載の方法では、抗ウイルス効果に鉄および鉄イオンは関係しているとされていたが、本実施例1の精製方法で得た抽出物においては、抗ウイルス効果に鉄および鉄イオンは関係なかった。

【0051】

[実施例4] 月桃のエタノール抽出物のToMVに対する防除効果

ショウガ科ハナミョウガ属の月桃（ゲットウ（サンニン））の茎葉部分をステンレス製の刃を備えたハサミで裁断し、当該裁断物20gに対して40mlの0~100%エタノール溶液につけ込んだ。25℃で一晩往復振盪（180rpm）し、植物から抽出される液を回収した。次いで、遠心機（6000rpm、5分間）により夾雑物を除去し、上清を濾紙で濾過した。

【0052】

0.01%マイリノーを添加した各植物抽出液の20%溶液をベンサミアーナタバコに噴霧処理し3日間静置した。実施例2の方法で2 μ gプラスミドを転写後、40倍希釈したToMV-GFPを10 μ lずつ2ヶ所に第3葉にカーボランダムを用いて接種し、3日後に接種葉のGFP蛍光のスポットを測定した。コントロールに対する感染抑制率を算出し、その平均値を示した。1処理あたり、ベンサミアーナタバコ3個体を用いた。

【0053】

その結果、60-80%エタノール溶液での抽出物に強いウイルス感染抑制効果が認められた（表1）。なお、防除価における括弧内の数値はマイナスを意味する。

【0054】

【表1】

	コントロール (20% EtOH)	抽出物 0% EtOH	抽出物 20% EtOH	抽出物 40% EtOH	抽出物 60% EtOH	抽出物 80% EtOH	抽出物 100% EtOH
	50	50	51	44	18	19	42
	57	68	42	36	17	24	73
平均	53.50	59.00	46.50	40.00	17.50	21.50	57.50
防除価	0.00	(10.28)	13.08	25.23	67.29	59.81	(7.48)

【0055】

[実施例5] 上位葉におけるウイルス感染抑制効果

(1) ベンサミアーナタバコ

ベンサミアーナタバコに対して、実施例1で調製した植物抽出液（0.01%マイリノーを添加した10%溶液と50%溶液）を噴霧処理した。陽性対照として、アスコルビン酸とレンテミンを用いた。各資材処理3日後に2 μ gプラスミドをRNA転写し、20倍希釈したToMV-GFPを各植物体に10 μ lずつ第3葉にカーボランダムを用いて接種した。3日後にリアルタイムPCRを用いて、ToMVの感染量を定量した。1処理あたり、ベンサミアーナタバコ3個体以上を用い、平均値および標準誤差を求めた。その結果、上位葉においても、ToMVに対して、強いウイルス感染抑制効果が認められた（図3）。

【 0 0 5 6 】

(2) トマト

14日齢トマト(品種レジナ)に対して、実施例1で調製した植物抽出液(0.01%マイリノーを添加した50%溶液)を噴霧処理した。陽性対照として、アスコルビン酸とレンテミンを用いた。各資材処理3日後に2 μ gプラスミドをRNA転写して5倍希釈したToMV-GFPを各植物体に10 μ lずつ第1葉にカーボランダムを用いて接種した。6日後にリアルタイムPCRを用いて、接種葉および上位葉のToMVの感染量を定量した。1処理あたり、トマト3個体以上を用い、平均値および標準誤差を求めた。その結果、上位葉においても、ToMVに対して、強いウイルス感染抑制効果が認められた(図4)。

【 0 0 5 7 】

[実施例 6] 病原菌に対する感染抑制効果

(1) 炭疽病菌

実施例1で調製した月桃由来の植物抽出液を用いて、以下の方法によりアブラナ科野菜類炭疽病菌に対する感染抑制効果を評価した。アブラナ科植物のシロイヌナズナに、50%植物抽出液(0.01%マイリノー添加)を茎葉散布した。植物抽出液の散布から2日後、シロイヌナズナにアブラナ科野菜類炭疽病菌(5×10^5 孢子/ml)を噴霧接種した。接種から5日後、接種葉をサンプリングし、qRT-PCR法により、アブラナ科野菜類炭疽病菌のシロイヌナズナへの感染量を定量した。なお、コントロールとして、植物抽出液を含まない展着剤(0.01%マイリノー添加)のみを散布し、同様の定量を行った。

【 0 0 5 8 】

その結果、コントロールと比較して、植物抽出液において有意に感染抑制効果が認められた(図5)。

【 0 0 5 9 】

また、実施例1で調製した月桃由来の植物抽出液を用いて、以下の方法によりイチゴ炭疽病菌(*Colletotrichum gloeosporioides*)に対する感染抑制効果を評価した。バラ科のイチゴに、50%植物抽出液(0.01%マイリノー添加)を茎葉散布した。植物抽出液の散布から3日後、イチゴにイチゴ炭疽病菌(5×10^5 孢子/ml)を噴霧接種した。接種から6日後、病徴の調査によりイチゴ炭疽病菌のイチゴへの感染量を評価した。なお、コントロールとして、植物抽出液を含まない展着剤(0.01%マイリノー添加)のみを散布し、同様の評価を行った。発病度は以下の式で表される。

$$\text{発病度} = \{ (1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4 + 5n_5) / (5 \times \text{調査数}) \} \times 100$$

発病調査は発病程度を以下の5つに区分して調査した。

0: 病徴なし、1: 微小斑点、2: 葉の25%以下の面積に病斑が認められる、3: 葉の25%~50%の面積に病斑が認められる、4: 葉の50%以上の面積に病斑が認められるまたは葉柄が折れる、5: 枯死

n_1 から n_5 は個体数

防除価は以下の図式で表される。

$$\text{防除価} = \{ 1 - \text{処理区の発病度} / \text{無処理区の発病度} \} \times 100$$

その結果、コントロールと比較して、植物抽出液において有意に感染抑制効果が認められた(表2)。

【 0 0 6 0 】

10

20

30

40

【表 2】

	コントロール	植物抽出液
発病度	48	30
防除価	—	37.5

10

【0061】

(2) 黒斑細菌病菌

実施例1で調製した月桃由来の植物抽出液を用いて、以下の方法で、黒斑細菌病菌に対する感染抑制効果を評価した。アブラナ科植物のシロイヌナズナおよびチンゲンサイ(品種:シャパオ)に、50%植物抽出液(0.01%マイリノー添加)を茎葉散布した。植物抽出液の散布から2日後、シロイヌナズナおよびチンゲンサイにそれぞれ黒斑細菌病菌(1×10^8 cfu/ml)を噴霧接種した。接種から3日後、接種葉をサンプリングし、qRT-PCR法により、黒斑細菌病菌のシロイヌナズナおよびチンゲンサイへの感染量を定量した。なお、コントロールとして、植物抽出液を含まない展着剤(0.01%マイリノー添加)のみを散布し、同様の定量を行った。

20

【0062】

その結果、コントロールと比較して、植物抽出液において有意に感染抑制効果が認められた(図6、図7)。

【0063】

[実施例7] 月桃のアセトニトリル抽出物のToMVに対する防除効果

沖縄月桃の搾汁液を、逆相担体(Sep-Pak C18)にかけ、水で洗浄した後、5%、10%、15%、20%、40%アセトニトリルで、段階的に溶出した画分を得た。得られた画分に含まれるアセトニトリルを、エバポレーターにて留去したのち、残った溶液を凍結乾燥した。得られた各画分の凍結乾燥物を、水で溶解し、ウイルス感染抑制効果を評価した。

30

【0064】

ウイルス感染抑制効果の評価においては、ベンサミアーナタバコに月桃抽出物を処理して3日後に、ウイルスを接種(すりこみ接種)した。この評価においては、ToMVに、蛍光を発するタンパク質GFP遺伝子を導入し、感染すると蛍光を発するようにしたウイルスを用いた。

【0065】

その結果、5%、10%、15%、20%アセトニトリル溶出画分に、ウイルス感染抑制効果が認められた(図8)。

【0066】

なお、上記アセトニトリル溶出画分の乾燥重量を図9に示した。また、以降の実験におけるウイルス感染抑制効果の評価は、全て、このGFP挿入ToMVとベンサミアーナタバコを用いた系で行った。

40

【0067】

[実施例8] 透析膜による活性画分の分離

沖縄月桃の搾汁液(20ml)を、蒸留水に対して透析して得られた透析内液のウイルス感染抑制効果を評価した。透析膜として分画分子量の異なる3種(100-500、1,000、3,500)を用いた。その結果、3種の透析膜による透析内液のいずれにも、ウイルス感染抑制効果が認められたことから、活性成分は、分子量3,500以上のものと推測された。

【0068】

50

[実施例 9] 限外濾過による活性画分の分離

上記の5%、10%、15%、20%アセトニトリル溶出画分を合わせて、蒸留水に対して透析した。透析膜として分画分子量3,500のものを用いた。得られた透析内液を、凍結乾燥した後、再度水に溶解したものを、遠心限外ろ過（分画分子量：10,000）にかけた。通過したもの（すなわち、分子量10,000以下）と、残存したもの（分子量：10,000以上）の画分を凍結乾燥し、抗ウイルス活性を評価した。

【 0 0 6 9 】

その結果、限外ろ過の残存画分に活性が存在していたことから、活性成分は、分子量10,000以上であると推測された。

【 0 0 7 0 】

[実施例 1 0] アセトニトリル溶出画分における無機金属の分析

実施例9と同様にして、アセトニトリル溶出画分の透析内液の凍結乾燥物を得た。得られた凍結乾燥物に含まれる無機金属をICP発光で、分析した。

【 0 0 7 1 】

その結果、凍結乾燥物1,000mgに対して、マグネシウムが2.6mg、鉄が2.1mg、カルシウムが1.0mg、ナトリウムが1.0mg含量していた。

【 0 0 7 2 】

また、得られた凍結乾燥物の溶媒に対する溶解性を検討したところ、水およびジメチルホルムアミド（DMF）には可溶であったが、テトラヒドロフラン（THF）およびクロロホルムには不溶であった。

【 0 0 7 3 】

[実施例 1 1] ゲル浸透クロマトグラフィーによる分子量分布の分析

実施例9と同様にして、アセトニトリル溶出画分の透析内液の凍結乾燥物を得た。得られた凍結乾燥物の分子量分布および吸収スペクトルを、DMFを溶媒に用いたゲルパー浸透クロマトグラフィーで検討した。

【 0 0 7 4 】

その結果、サンプルは、283nmと263nmに、強い吸収極大をもつことが判明し、その分子量は10,000以上と見積もられた（図10）。

【 0 0 7 5 】

なお、重合度の異なるポリスチレンを検量線に用いて換算した、吸収極大波長における重量平均分子量を図の右上に示した。

【 0 0 7 6 】

[実施例 1 2] 質量分析による分子量分布の分析

実施例9と同様にして、アセトニトリル溶出画分の透析内液の凍結乾燥物を得た。得られた凍結乾燥物の分子量分布を、MALDI-TOF質量分析にて推定した。その結果、サンプルは、分子量288ユニットがいくつか重合したポリマーであることが示唆された（図11）。既報文献（Xiaolan Jiang et al., SCIENTIFIC REPORTS 5:8742, DOI:10.1038/srep08742, Sauro Bianchi et al., Phytochemistry 120(2015)53-61）で、分子量288は、カテキンあるいはエピカテキンであることが報告されている。このことから、活性本体が、そのポリマーであるプロアントシアニジンであることが推測された。

【 0 0 7 7 】

なお、ベンサミアータパコに500ppmのエピカテキンを噴霧処理して2時間後にToMVを接種したところ、若干の感染抑制効果が認められたが、噴霧処理して3日後にToMVを接種した場合は、感染抑制効果が認められなかった。

【 0 0 7 8 】

[実施例 1 3] 部分構造の推定

実施例9と同様にして、アセトニトリル溶出画分の透析内液の凍結乾燥物を得た。得られた凍結乾燥物の部分構造をプロトンNMRおよび赤外吸収スペクトルにて推定した（図12、図13）。その結果、部分構造として、芳香族環や水酸基などが多く含まれることが推測された。さらに、得られた凍結乾燥物の部分構造につき、熱分析GC-MSによる解析を

10

20

30

40

50

行った結果、ポリフェノール類が多く含まれていることが推測された(図14)。以上の結果は、活性本体がプロアントシアニジンであることをさらに裏付けた。

【0079】

実施例9で得られた透析内液の凍結乾燥物を、蒸留水に再溶解し、分画分子量(10,000)の透析膜を用いて、蒸留水に対して透析し、透析内液の凍結乾燥物を得た。これをアセトンに溶解し、C13カーボンNMRにて構造を推定した(図15)。その結果、文献(Thomas L. Eberhardt et al., J. Agric. Food Chem. 42(1994)1704-1708)に報告されているプロアントシアニジンのC13カーボンNMRデータとよく一致した。以上の結果は、活性本体がプロアントシアニジンであることをさらに裏付けた。

【0080】

[実施例14] プロアントシアニジン濃度の測定

実施例9で得られた透析内液(分画分子量3,500)の凍結乾燥物を、蒸留水に再溶解し、分画分子量(10,000)の透析膜を用いて、蒸留水に対して透析し、透析内液の凍結乾燥物を得た。これを蒸留水に溶解し、月桃由来検量線用精製アントシアニジンとした。

【0081】

プロアントシアニジンの定量については、沖らの報告(沖智之ら、Nippon Shkuhin Kagaku Kogaku Kaishi Vol.60, No6, 301-309(2013))に記載された4-ジメチルアミノシンナムアルデヒド(DMAC)を用いる方法におおむね従った。すなわち、検量線用プロアントシアニジン水溶液(10mg/ml)を、アッセイ溶液A(エタノール:メタノール:2-プロパノール=90:5:5)で、20倍希釈したものを、さらにアッセイ溶液B(アッセイ溶液A:水=95:5)で、2倍希釈系列を作成し、検量線用サンプルとした。月桃搾汁液は、アッセイ溶液A(エタノール:メタノール:2-プロパノール=90:5:5)で、20倍希釈したものを、測定用サンプルとした。また、対称サンプルとして、ショウガ搾汁液および実施例9に記載した透析内液(分画分子量3,500)の凍結乾燥物についても、月桃搾汁液と同様に調整した。

【0082】

DMAC溶液は、濃塩酸(3ml)を、上記アッセイ溶液A(27ml)に添加後、氷上で15分冷却した溶液にDMAC(30mg)を添加し、攪拌により溶解し、使用直前まで氷上で保管し、DMAC溶液とした。

【0083】

96穴マイクロプレートのウェルに、検量線用および測定用サンプルを、それぞれ40μlずつ分注し、8連マイクロピペッターを用いて、サンプルを添加したウェルに、DMAC溶液を200μlずつ添加し、プレート上面にプレートシールを貼付し、庫内温度を30℃に設定したプレートリーダー中で、攪拌後、20分間放置後、各ウェルの640nmにおける吸光度を測定した。検量線用サンプルから得られた吸光度値と濃度から検量線を作成し、月桃搾汁液に含まれるプロアントシアニジンを定量した。その結果、月桃搾汁液に含まれるプロアントシアニジンは、5~20mg/mlの範囲であると見積もることができた(表3)。

【0084】

10

20

30

【表 3】

サンプル名	Abs.640nm	Ave.	SD	mg/ml
月桃搾汁液1	1.471	1.542	0.065	9.25
	1.554			
	1.600			
				# 1
月桃搾汁液2	2.918	3.003	0.076	18.59
	3.027			
	3.065			
				# 1
月桃搾汁液3	0.843	0.895	0.045	5.12
	0.916			
	0.925			
				# 1
ショウガ搾汁液	0.074	0.074	0.001	-0.12
	0.073			
	0.075			
				# 1
purif. OG 1mg/ml (c/o=3500)	0.197	0.206	0.009	0.72
	0.214			
	0.208			

【0085】

なお、表 2 に記載した月桃搾汁液2の10mlを凍結乾燥したところ、得られた乾燥物の重量は、431.2mgであった。これから換算すると、プロアントシアニジンの乾燥物に占める割合は、43.0%となる。さらに、搾汁液に含まれるプロアントシアニジンが、5~20mg/mlであるとすると、搾汁液乾燥物に占めるプロアントシアニジンの割合は、10~50%程度と見積もることができる。

【産業上の利用可能性】

【0086】

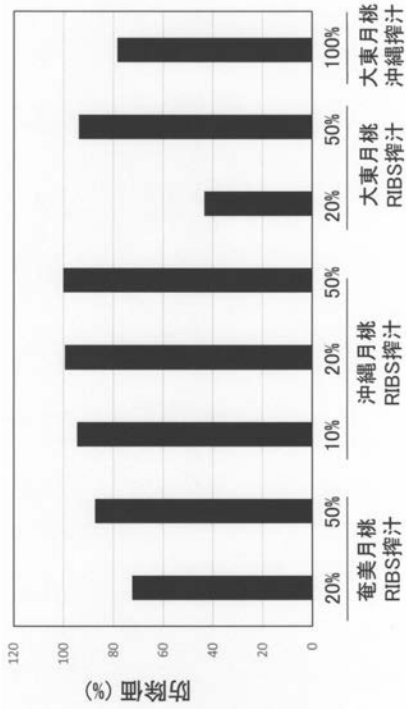
上記の通り、本発明の防除剤は、植物に含まれる成分を利用して、植物病害に対して優れた防除効果を示すことができる。このため、安全性と効果を兼ね備えた農薬として、農業分野において大きく貢献しうるものである。

10

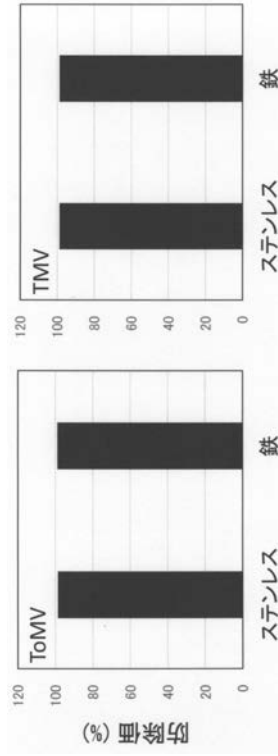
20

30

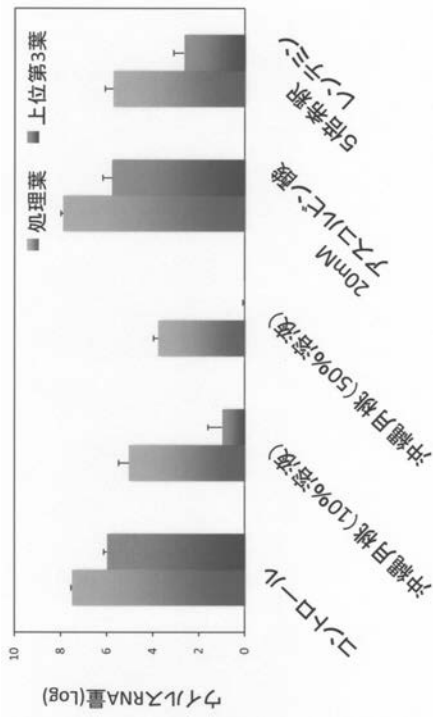
【 図 1 】



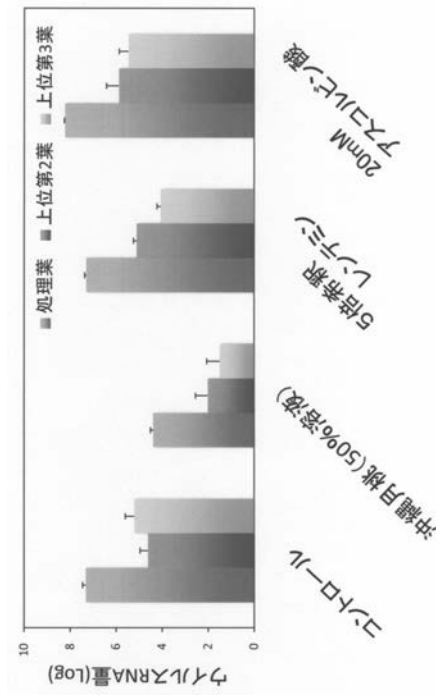
【 図 2 】



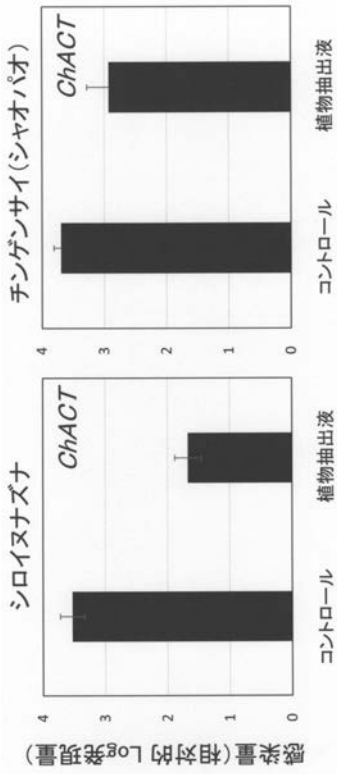
【 図 3 】



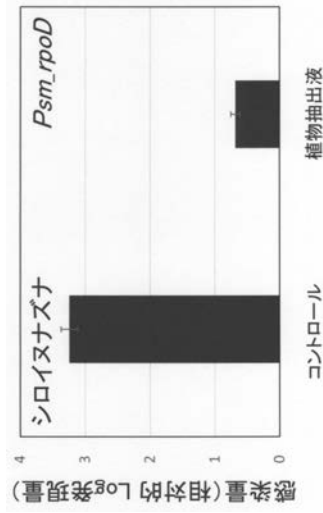
【 図 4 】



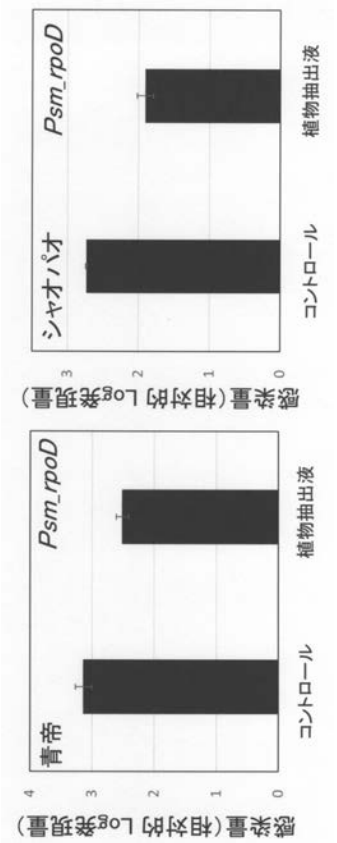
【 図 5 】



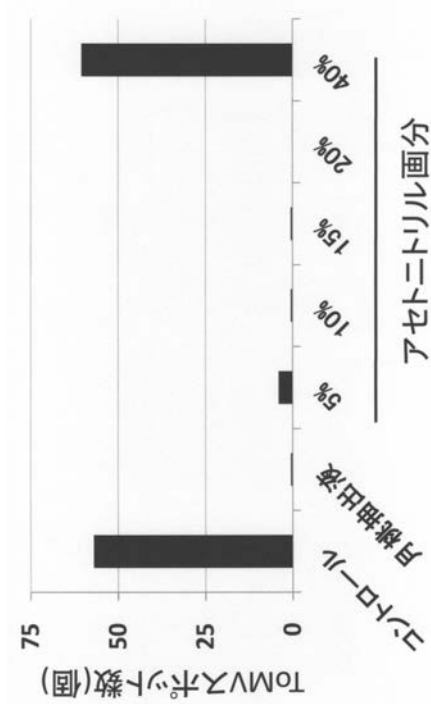
【 図 6 】



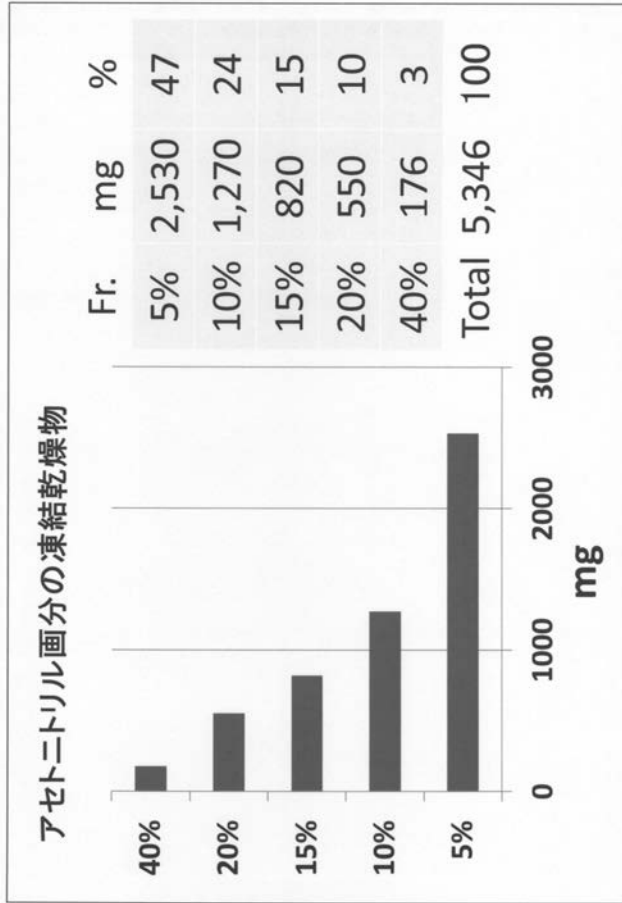
【 図 7 】



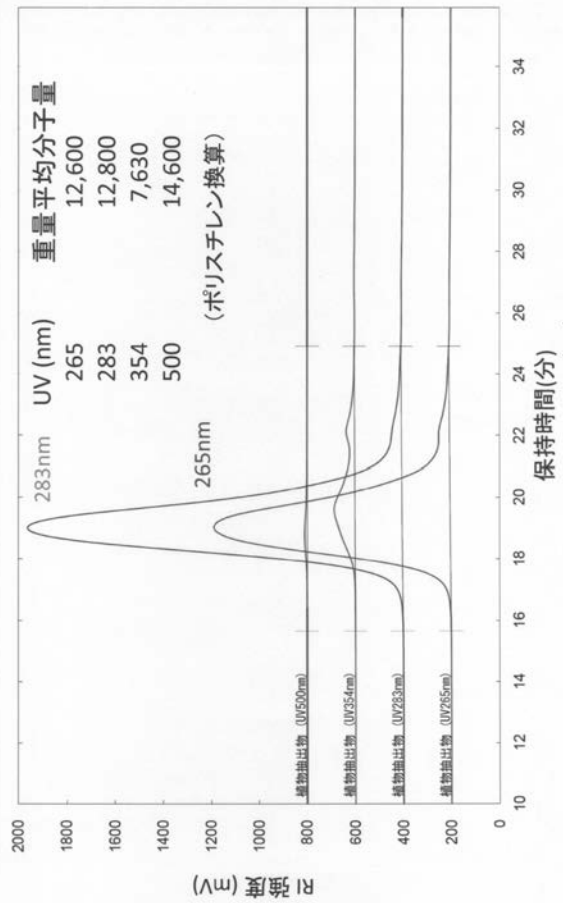
【 図 8 】



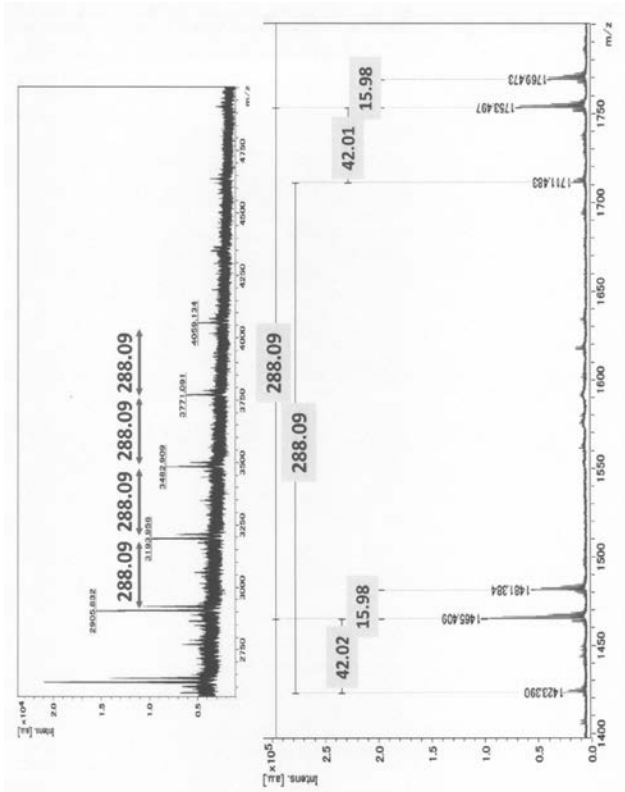
【 図 9 】



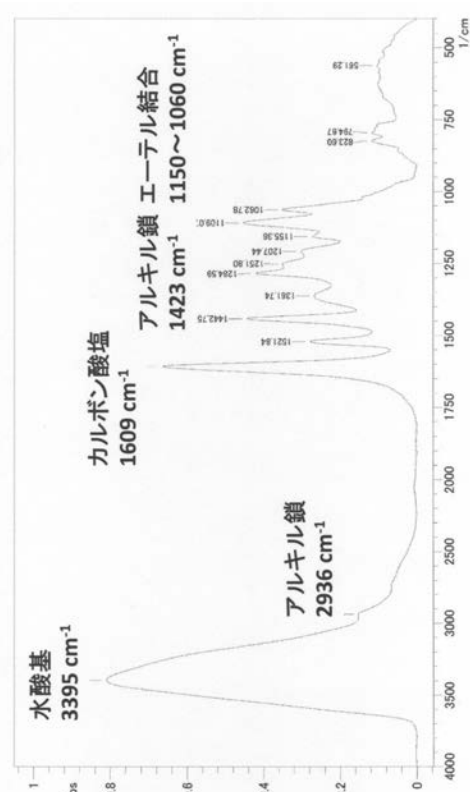
【 図 10 】



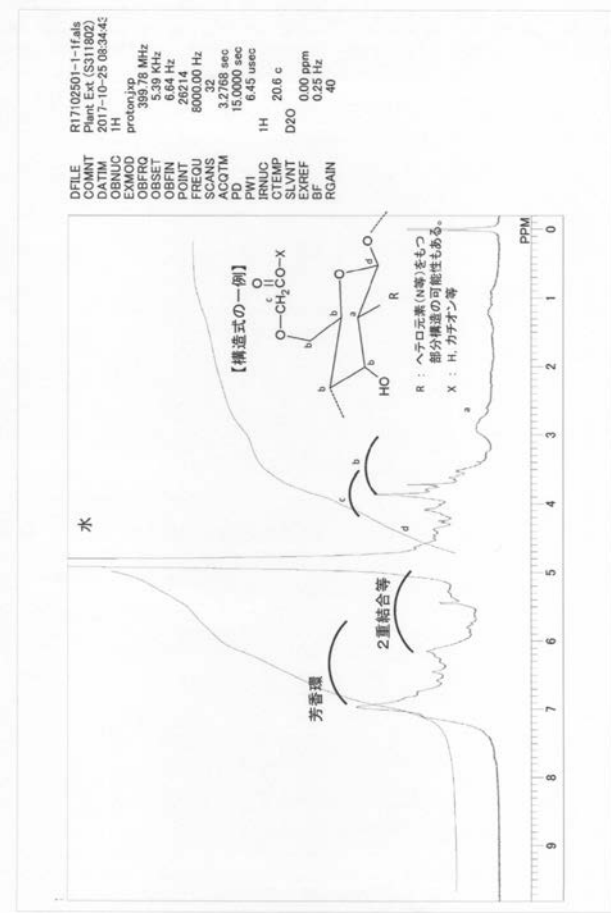
【 図 11 】



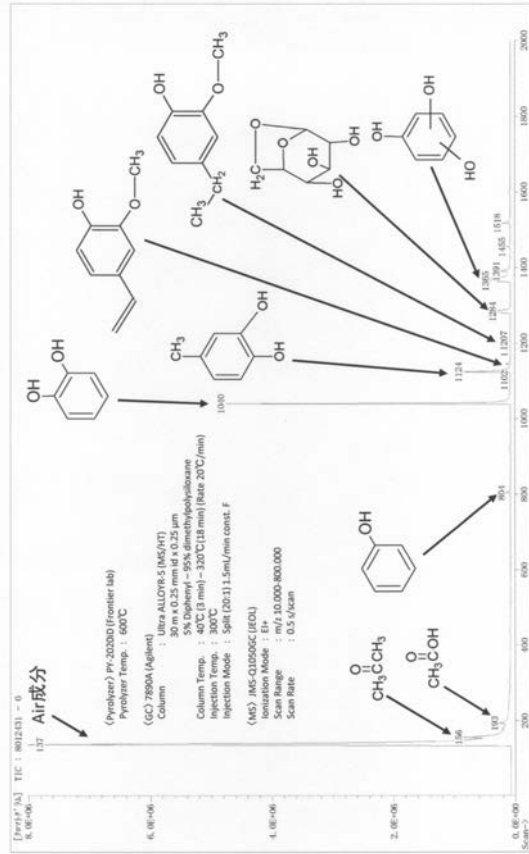
【 図 12 】



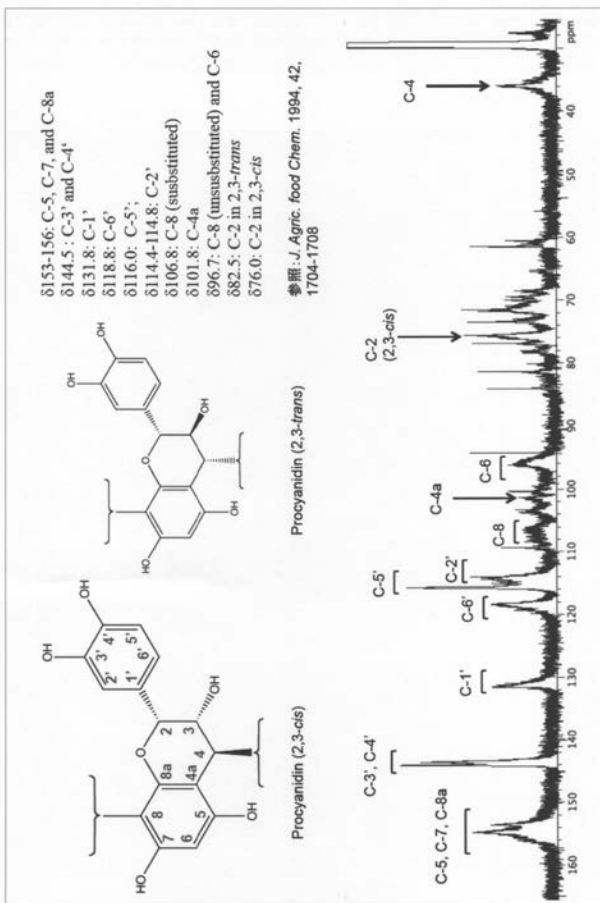
【 図 1 3 】



【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



フロントページの続き

(72)発明者 鳴坂 真理

岡山県加賀郡吉備中央町吉川7549-1 岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所内

(72)発明者 裏地 美杉

岡山県加賀郡吉備中央町吉川7549-1 岡山県農林水産総合センター 生物科学研究所内

Fターム(参考) 2B022 AB13 AB15 AB20 EA10 EB06

4H011 AA01 AA04 BB19 BB22 DD03 DH15