ミニレビュー

乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* を使った微生物農薬の開発[#]

津田 和久^{1,*}, 梅村 賢司², 辻 元人³

¹ 京都府農林水産技術センター

² Meiji Seika ファルマ株式会社

³ 京都府立大学大学院

(2014年12月3日受理)

Development of biopesticide using lactic acid bacteria *Lactobacillus plantarum*

Kazuhisa TSUDA,¹ Kenji UMEMURA² and Gento TSUJI³

¹ Kyoto Prefectural Agriculture Forestry and Fisheries Technology Center,
Kameoka, Kyoto 621-0806, Japan

² Meiji Seika Pharma Co., Ltd., Yokohama, Kanagawa 222-8567, Japan

³ Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University,
Kyoto, Kyoto 606-8522, Japan

Keywords: lactic acid bacteria, *Lactobacillus plantarum*, biopesticide, bacterial soft rot of Chinese cabbage.

はじめに

「食の安全」「食の安心」が、現代日本の社会情勢を現すキーワードの一つではないだろうか。

1990年代後半から2000年代当初にかけて、学校給食に起因する腸管出血性大腸菌O-157による学童集団下痢症事件(1996年)、雪印集団食中毒事件(2000年)、BSE問題(2001年)、高病原性鳥インフルエンザ事件(2004年)など、食品の安全性にかかわる大きな事件が多発した。また、牛肉偽装事件(2002年)などの食品の虚偽表示問題も発覚し、食に対する消費者の信頼を揺るがす事態となった。さらに、2002年に起こった輸入冷凍ホウレンソウの残留農薬問題や無登録農薬問題、その後に発覚した農薬に関する不適切な流

通販売や使用に関する数々の事件により、農薬に対する消費者の不安は一気に高まった。食品安全委員会が実施する食品安全モニターアンケート調査・課題報告によると、2004年には約9割の消費者が農薬に不安を感じると回答していた¹⁾。

農薬は、農薬取締法に基づき、登録の際にその安全性が科学的に証明されている。使用基準も明確に定められており、生産者がその基準を遵守して使用する限り、農薬を使用して栽培された農産物の安全性に何ら問題はない。近年、生産者も農薬散布などの使用履歴を記録し、農薬使用基準を遵守していることを証明して、農産物の安全性を保障する取り組みを進めている。しかしながら、2013年においてもなお、6割を超える消費者が農薬に対する不安を感じており¹⁾、「健康に有害ではないか」という不安を完全には払拭できていない。消費者は、農薬を使用しないで栽培した無農薬農産物、あるいはその使用を抑えた減農薬農産物を望み、農薬を使って栽培された農産物を避けようとする傾向にある。しかしながら、高品質な農産物を安定的に生産するためには、農薬の使用は欠かせないのが生産者側の実状である。

[#] 第39回大会シンポジウムを取りまとめた解説

* 〒621-0806 京都府亀岡市余部町和久成9

E-mail: k-tsuda72@pref.kyoto.lg.jp

© 日本農薬学会

一方、従来の化学合成農薬のみに依存した防除から脱却し、耕種的、生物的、物理的あるいは化学的な防除法を合理的に組み合わせた総合的病害虫・雑草管理（IPM: Integrated Pest Management）の確立が求められている。その技術の1つに、農作物の病害虫を防ぐ有用な微生物を使った微生物農薬の利用があり、これまでに、いくつかの微生物農薬が開発され普及している。それらの微生物農薬についても、化学合成農薬と同様に、農薬登録の際にはその安全性が科学的に証明されている。しかし、農産物に微生物を直接処理する微生物農薬では、消費者に対して、その微生物について安全性を保証するだけでなく、安心感を持ってもらうことも重要である。

そこで、“ヒトの健康に有益な”農薬であれば、消費者は安心と感じて受け入れやすいのではないかと考え、微生物農薬に利用する微生物として、消費者に馴染みがあり、安全性が高い乳酸菌に着目した。

乳酸菌は乳製品や漬物などの発酵食品に利用される微生物である。また、ヒトは発酵食品を食することにより体内に乳酸菌を摂取してきたという長い食経験がある。さらに、近年、乳酸菌はプロバイオティクスとしても注目を集めている。プロバイオティクスとは、「腸内細菌叢を改善することによって宿主に有益な作用をもたらす微生物」をさし²⁾、乳酸菌は整腸作用、発がんリスク低減作用、免疫賦活作用などの機能性を持つプロバイオティクスの代表的な微生物である³⁾。このような乳酸菌であれば消費者は安心感を持てると考え、乳酸菌を使った微生物農薬の開発に取り組んだ。

発酵食品などから分離・収集した多数の乳酸菌株を対象にスクリーニングした結果、各種軟腐病に対し防除効果を示す菌株を見出した。現在、本菌株を有効成分とする乳酸菌製剤を微生物農薬として登録申請中である。これまでの研究開発の経緯とその作用機構解明の取り組みについて紹介する。

なお、本研究成果は、Meiji Seika ファルマ株式会社（前明治製菓株式会社）、京都府立大学大学院および京都府農林水産技術センターが共同で実施した、農林水産省の先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「人の健康に有益な乳酸菌を使った世界初の微生物農薬を開発する（2005～2007年）」により得られた成果である。

1. 有用乳酸菌株の探索

多数の乳酸菌株を収集することから始めた。食品から分離した乳酸菌であればより安心感が高まると考え、まずは、発酵食品を分離源とした。ヨーグルトや乳酸菌飲料などの発酵乳製品、キムチや柴漬けなどの発酵植物製品、鯖の糠漬け（へしこ）や塩辛などの発酵水産食品を集め、そこから乳酸菌株を分離した。さらに、乳酸菌は自然環境中にも広く分布していることから⁴⁾、栽培中の農作物や自生植物などからも分離を行った。

分離にはMRS寒天培地を用い、磨砕・希釈したサンプルを滅菌シャーレに分注し、約50℃に冷ました0.5%炭酸カルシウム含有MRS寒天培地と混和して固化させた後、素寒天培地を重層した。30℃で2, 3日培養後、菌体外に分泌した乳酸によって炭酸カルシウムを溶解し、クリアーゾーンを形成したコロニーを乳酸菌として分離した。分離した乳酸菌株は、以降のスクリーニングに供試するまで超低温フリーザーに保存した。

有用乳酸菌の選抜として、1次選抜は高原らの方法⁵⁾に準じて行った。供試乳酸菌株と軟腐病菌 *Erwinia carotovora* (*Pectobacterium carotovora*) MAFF 302818株を、それぞれ 10^{8-9} cfu/mLと 10^7 cfu/mLになるように調整した混合液に、直径1 cmのキャベツ葉ディスクを24℃、1時間浸漬した。その後、キャベツ葉ディスク表面の水分を拭き取り、滅菌シャーレに並べて28℃、24時間静置した後、軟腐病菌株単独懸濁液 (10^7 cfu/mL) に浸漬したキャベツ葉ディスクと病徴程度を比較することにより有望株を選抜した。2次選抜では、1次選抜された乳酸菌株を対象に、1次選抜と同様に調整した軟腐病菌株との混合懸濁液に10本束ねた針の先端を浸け、ポット栽培したハクサイ株の中肋（葉柄）に株あたり5か所穿刺接種した。温室内で10日間栽培した後に発病程度を調査し、軟腐病菌株単独懸濁液を穿刺接種したハクサイ株の発病程度と比較した。これらのスクリーニングにより、ハクサイ軟腐病の発病を抑制する有望な乳酸菌2菌株を選抜した（図1）。

次に、2次選抜された2菌株の圃場での防除効果を比較するため、2006年、京都府農林水産技術センター生物資源研究センター内の軟腐病菌汚染圃場でハクサイを栽培し、 10^7 cfu/mLに調整した各菌株懸濁液を散布して防除試験を実施した。春作と秋作の2作で試験を行った結果、2作ともに既存の微生物農薬より高い防除効果を示し、かつ、ハクサイの生育や品質に対して悪い影響を示さなかったSOK04株を実用化候補株として選抜した。

選抜したSOK04株の同定を行ったところ、本菌株には2種の乳酸菌株が混在していることが判明し、1つは *Lactobacillus plantarum* BY株であり、他方は“*Lactobacillus kyotoensis*”と名づけた新種のSW株であった。そこで、両株の製剤試作品を作製し、2007年と2008年、6府県内の10圃場において防除試験を実施して、両菌株の防除効果を比較した。その結果、いずれの試験でも、BY株を有効成分とするBY製剤が既存の微生物農薬と同等ないしそれ以上の防除効果を示したことから、BY株を実用化株に決定した（図2, 3）。

2. 乳酸菌製剤の実用性評価と微生物農薬登録申請

2009～2011年に国内延べ6か所の圃場で、ハクサイ軟腐病に対するBY製剤の薬効・薬害試験を実施した。その結果、BY製剤は、対照薬剤とした化学農薬（銅水和剤または

図1. 2次選抜された有望乳酸菌株. 左; 対照区, 右; 有望乳酸菌株処理区. 1次選抜された乳酸菌株と軟腐病菌との混合懸濁液をハクサイ葉の中肋に株あたり5か所穿刺接種した後, 10日間温室内で栽培した. 対照区には, 軟腐病菌懸濁液を同様に刺接種した.

図2. *Lactobacillus plantarum* BY株の透過型電子顕微鏡像.

図3. BY製剤によるハクサイ軟腐病防除効果. 左; 無処理対照区, 右; BY製剤処理区. 2008年, 京都府農林水産技術センター生物資源研究センター内汚染圃場で実施した.

オキシリニック酸水和剤) と比べ, やや劣る～ほぼ同等の効果を示し, 既存の微生物農薬と比べ, ほぼ同等～優る効果を示した. また, 軟腐病は多くの農作物に発生する多犯性病害であることから, トマト, キャベツ, ダイコンやパレシヨ等の軟腐病に対するBY製剤の薬効・薬害試験を実施したところ, 化学農薬とほぼ同等の防除効果が認められた. また, いずれの試験においても, 供試した作物に対する薬害は認められず, BY製剤の実用性が確認された.

さらに, 微生物農薬登録ガイドラインに沿って安全性試験を実施し, BY製剤の安全性が担保されたことから, BY製剤を野菜類軟腐病およびいも類軟腐病に対する防除剤“ラクトガード®水和剤”として微生物農薬に登録申請した. 本剤は, 有効成分 *Lb. plantarum* BY株を 1×10^{10} cfu/g 含有し, 使用希釈倍率は1,000倍, 使用液量は150～300 L/10a, 使用方法は散布, 使用時期は発病前～発病初期であり, 使用回数の制限はない.

表1. 軟腐病菌に対するBY株及びJCM 1149株の抗菌活性

菌株	阻止円直径 (mm)			
	10 ³ cfu/mL ^{a)}	10 ⁴ cfu/mL	10 ⁵ cfu/mL	10 ⁶ cfu/mL
BY株	20.6 ± 1.8	25.2 ± 1.7	28.4 ± 0.7	31.5 ± 0.7
JCM 1149株	19.1 ± 1.9	23.9 ± 2.2	28.1 ± 3.4	31.0 ± 1.9

^{a)} MRS寒天培地ディスク中の乳酸菌密度

3. *Lb. plantarum* BY株の防除機構の解明

2009年, 4種類の *Lactobacillus* 属標準菌株 *Lb. plantarum* JCM 1149株, *Lb. brevis* JCM 1059株, *Lb. acidophilus* JCM 1132株および *Lb. casei* JCM 1134株を対照株とし, 汚染圃場における *Lb. plantarum* BY株の防除効果を比較した. その結果, 春作ではBY株, JCM 1132株とJCM 1134株に防除効果が認められたが, 秋作ではJCM 1132株とJCM 1134株には防除効果は認められなかったことから, BY株だけが安定した防除効果を示すことが明らかになった. そこで, BY株と, BY株と同種の *Lb. plantarum* であるが防除効果を示さないJCM 1149株を用いて, 以下の比較試験を行った.

BY株とJCM 1149株の抗菌活性を比較した. 1×10^6 cfu/mLに調整した軟腐病菌MAFF 302818株をポテトデキストロース寒天培地の培地表面に塗布して乾燥した後, BY株またはJCM 1149株をそれぞれ 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 または 1×10^6 cfu/mL含有するMRS寒天培地ディスクを置床して30°C, 3日間培養した後, MAFF 302818株の生育に対するBY株およびJCM 1149株の阻止円直径を測定した. その結果, BY株やJCM 1149株の菌密度が高いほど阻止円直径は拡大し, 抗菌活性が高まることが認められたが, BY株とJCM 1149株の抗菌活性に差がないことが明らかになった (表1). このことから, BY株には抗菌活性があるものの, その活性は防除効果のない菌株と同程度であり, BY株の抗菌活性そのものが防除機構の主因ではないと考えられた.

次にBY株による抵抗性誘導の可能性について検討した. ハクサイ葉にBY株およびJCM 1149株の死菌体懸濁液をそれぞれ噴霧処理し, 24時間後に処理葉からRNAを回収して逆転写PCRにより防除応答マーカー遺伝子の発現を調べた. その結果, 滅菌蒸留水を処理したMockやJCM 1149株処理区と比較して, BY株処理区においてPRタンパク質遺伝子 *BrPR-1*, *BrPR-4* および *BrPR-5* やディフェンシン遺伝子 *BrPDF1.2* の高い発現が認められた. このことから, BY株の防除機構としてハクサイへの抵抗性誘導が関与することが強く示唆された.

さらに, ハクサイ株におけるBY株とJCM 1149株の定着性を明らかにするため, 温室内でポット栽培しているハクサイ株の中肋に10本束ねた針で深さ1mmの傷をつけた有傷部と傷をつけない無傷部に, 1×10^7 cfu/mLに調整した両菌

図4. ハクサイ株上におけるBY株とJCM 1149株の定着性. 温室内でポット栽培しているハクサイ株の中肋に穿刺した有傷部と無傷部を設け, 1×10^7 cfu/mLに調整した両菌株の懸濁液を噴霧処理した後に経時的にサンプリングし, 両菌株の菌密度の推移を調査した.

株の懸濁液を噴霧処理した後に経時的にサンプリングし, 両菌株の菌密度の推移を調査した. その結果, 有傷部では, 両菌株とも処理1, 2日後に菌密度が増加していることが認められた (図4).

一般に, 乳酸菌は植物細胞を傷つける能力 (植物病原性) をもっており, また, 栄養要求性が高く, 糖分やアミノ酸等の栄養が豊富な環境でないと生育できない. 生鮮野菜を原料とする漬物では, 植物に食塩を振りかけ, 重石をすることにより, 植物細胞から栄養分を漏出させる. その栄養分を消費して乳酸菌は増殖し, 増殖に伴って産生する乳酸によりpHが低下することで, 雑菌の増殖を抑制する⁶⁾.

定着性調査における有傷部での両菌株の菌密度の増加は, 付傷により漏出した細胞成分を資化してBY株やJCM 1149株が増殖していることを示唆している. また, その増殖の際には, 両菌株は菌体外に乳酸を分泌していることが推察される. 一方, 軟腐病菌にとって植物体上の傷口は主要な感染経路の一つである. 軟腐病菌が傷口から侵入する前, あるいは侵入直後にBY株やJCM 1149株を噴霧処理すると, 軟腐病菌に対して養分や場の競合が起こるとともに, 産生された乳酸による抗菌作用も働くことで, 軟腐病菌の増殖が抑制されることが推測される. つまり, 漬物における乳酸発酵の原理が, 軟腐病菌の感染部位である植物体上の傷口で起こっているのではないかと考えている.

その有傷部でのBY株の菌密度がJCM 1149株より明らかに高かったことは (図4), BY株はJCM 1149株よりも競合や抗菌作用が強く働くことを示唆するものである. また, 無傷部でもBY株はJCM 1149株より菌密度が高く推移したことから (図4), ハクサイ株に対するBY株の親和性が高いことが考えられる.

以上のことから, BY株の作用機構には, 乳酸による抗菌

活性，抵抗性誘導，競合が強く関与しており，BY株の高い定着性がこれらの作用を発揮するうえで重要であることが考えられた。

おわりに

BY製剤は，野菜類軟腐病およびいも類軟腐病に対する微生物農薬として開発した。その防除効果は，化学合成農薬と同様に，完全であるとはいえない。抵抗性品種利用，排水改善や圃場衛生管理の徹底などの耕種的防除と併せて，総合的に防除することが重要である。化学合成農薬との併用には一部制限があるが，乳酸菌はグラム陽性細菌であることから，本剤はオキシロニック酸水和剤との併用が可能である。

現在，軟腐病に対する防除剤として登録を進めているが，推定される本剤の防除機構からは，軟腐病以外の病害に対する防除効果も期待できる。これまでにいくつかの病害に対する防除試験も実施している。今後，軟腐病以外の病害に対する防除効果を明らかにすることで，本剤の適用拡大を図っていく予定である。

乳酸菌は，発酵食品に含まれる微生物，腸管内に常在する微生物として知られている。これまで，数種の乳酸菌株が寒天培地上や共培養条件において植物病原性細菌の増殖を抑制する報告⁷⁾はあったが，実際の栽培条件で防除効果を示す乳酸菌製剤を開発したのは本研究が初めてである。本製剤の有効成分であるBY株が属する *Lb. plantarum* は，植物性乳酸菌の一種であり，漬物からしばしば分離される乳酸菌であることから⁴⁾，本剤は消費者が安心感をもつ農薬と成り得ると考えている。

「食の安全」「食の安心」が，現代日本において重要な課題である中，本剤が生産者のみならず消費者にも安心な農薬として受け入れられ，安定した作物生産に寄与することを願っている。

引用文献

- 1) http://www.fsc.go.jp/monitor/monitor_report.html (2014年10月30日閲覧)
- 2) 上野川修一：免疫と腸内細菌，平凡社，pp. 142-144, 2003.
- 3) 辨野義巳：乳酸菌の新しい系譜，小崎道雄，佐藤英一編，中央法規，pp. 286-313, 2004.
- 4) 岡田早苗：乳酸菌の科学と技術，乳酸菌研究集談会編，学会出版センター，pp. 12-13, 1996.
- 5) 高原吉幸，岩淵哲哉，塩田正幸，木村俊夫，菊本敏雄：日植病報 **59**, 581-586 (1993).
- 6) 岡田早苗：乳酸菌の新しい系譜，小崎道雄，佐藤英一編，中央法規，pp. 25-58, 2004.
- 7) R. Visser, W. H. Holzapfel, J. J. Bezuidenhout and J. M. Kotze: *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 552-555 (1986).

略歴

津田和久（つだ かずひさ）

最終学歴：京都府立大学大学院農学研究科博士課程，博士（農学）

研究テーマ：有用微生物を利用した植物病害防除
趣味：卓球

梅村賢司（うめむら けんじ）

最終学歴：名古屋大学大学院農学研究科修士課程，博士（農学）

研究テーマ：環境調和型農業資材の開発，イネの病害防御機構解析
趣味：ゴルフ

辻 元人（つじ げんと）

最終学歴：京都府立大学大学院農学研究科博士課程，博士（農学）

研究テーマ：植物病原菌の感染機構，作物病害の生物的防除
趣味：釣り，アクアリウム