報 文

界面活性剤および高分子電解質の TMV 感染阻止効果*

中 島 哲 男, 寺 岡 徹, 重松太一郎, 春日井啓之

三菱化成工業株式会社総合研究所

(昭和 58 年 5 月 6 日受理)

Inhibitory Activity of Surfactants and Polyelectrolytes against TMV Infection*

Tetsuo NAKAJIMA, Toru TERAOKA, Taichiro SHIGEMATSU
and Hiroshi KASUGAI

Research Center, Mitsubishi Chemical Industry Ltd.,
Midori-ku, Yokohama 227, Japan

Various kinds of surfactants, polyanions and polycations were tested for their inhibitory activities against TMV infection on tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cvs. Xanthi-nc and Bright Yellow). Chemicals were applied on Xanthi-nc before TMV inoculation. Among surfactants tested, α -olefine sulfonate (AOS) showed high activity without causing phytotoxicity. Polyanions other than sodium alginate and sodium polyacrylate (SPA) were less effective. Among polycations tested, poly(2-methacryloxyethyl trimethylammonium chloride) (MEOA · TMC) showed the highest activity without causing phytotoxicity. MEOA · TMC showed higher inhibitory activity against TMV infection on Bright Yellow through infested soil. It was suggested that cationic quaternary ammonium polymers had excellent properties as antiviral substances.

緒 言

抗植物ウイルス剤、とくに感染阻止剤の研究は、1940 年代から本格的に始められ、1948 年には Kassanis ら¹⁾によりヨウシュヤマゴボウから阻害物質として糖タンパク質が分離された。さらに Ragetli ら²⁾によりカーネーションから、Wyatt ら³⁾によりヨウシュヤマゴボウから、Smookler⁴⁾によりアカザから、それぞれタンパク質が分離された。このような植物由来物質のほかに、酵母抽出物から分離された多糖⁵⁾や、海藻から得られる多糖の一種であるアルギン酸ナトリウム⁶⁾、高分子電解質であるポリアクリル酸ナトリウム^{7,8)}、界面活性剤⁹⁻¹¹⁾にも抗ウイルス活性が報告されている。そこで各種高分子電解質や界面活性剤を供試して、TMV 感染阻止効果を

検討したところ、興味ある結果を得たので報告する。

実験材料および方法

供試物質：市販品あるいは著者らが合成¹²⁾した試料を用いた。界面活性剤は、有効成分 25~85% の製剤か純度 95% 以上の原体を、蒸留水で希釈して使用した。高分子電解質は、樹脂分 20~40% の製剤を、蒸留水で希釈して使用した。高分子電解質の純度は、仕込みモノマー量から換算した。また高分子電解質の回転粘度は、ビスメトロン VS 形粘度計（芝浦システム社製）で、No. 1 ローターを用い、20°C で測定した。

供試ウイルス：TMV 普通系 (TMV-OM) の純化したものを使用した。

検定植物：局部感染タバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Xanthi-nc) と全身感染タバコ (*Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow) を用いた。

試験方法：局部病斑形成阻止効果の検定には前処理

* 抗植物ウイルス剤に関する研究 (第 1 報)
Studies on Antiviral Substances for Plant Virus
(Part 1)

Table 1 Inhibitory activity of nonionic and cationic surfactants against local lesion formation of TMV on Xanthi-nc.^{a)}

Chemicals	Conc. (ppm)	Inhibition (%)	Phyto-toxicity ^{b)}
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{C}_{12}\text{H}_{25}-\text{N}^+-\text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{Cl}^-$	5,000 1,250	— 62	+++ +
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{R}-\text{N}^+-\text{CH}_2-\text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \text{Cl}^-$ R = C ₆ H ₁₇ ~ C ₁₈ H ₃₇	5,000 1,250	— 83	+++ +
$\begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{N}^+ \\ \\ \text{C}_{12}\text{H}_{25} \end{array} \text{Cl}^-$	5,000 1,250	— 75	+++ +
RO(CH ₂ CH ₂ O) _n H	5,000 1,250	— 77	+++ +
R = C ₁₁ H ₂₃ ~ C ₁₅ H ₃₁	5,000 1,250	86 36	++ ±
C ₉ H ₁₉ O(CH ₂ CH ₂ O) _n H	5,000 1,250	86 36	++ ±

^{a)} Chemicals were applied around 3 hr before TMV inoculation.

^{b)} Symbols correspond with the following degree of damage.

(+++): considerable, (++) : moderate, (+) : slight, (±) : very slight, (—) : none.

法^{6,13)}を，全身感染阻止効果の検定には土壤接種法を用いた。

1. 前処理法 (局部病斑法)

本葉4～5枚が完全展開した Xanthi-nc 苗を用い，その半葉を無処理対照とし，対半葉に薬液を絵筆で塗布した (半葉法)¹⁴⁾。風乾後，カーボランダム (600 メッシュ) を葉の表面全体にふりかけ，1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈した 0.25 μg/ml の TMV をなすりつけ接種した。接種後，葉を水洗し，3～4日間温室に置いた後，形成された局部病斑数を測定し，無処理区に対する感染阻止率を算出した。感染阻止率 (%) = (1 - x/y) × 100。ただし，x および y はそれぞれ処理区および無処理区の病斑数とする。1回の試験には2ポット (8葉) を供試し，2回のくり返しの平均値を結果とした。無処理半葉の病斑数は 95～151 であった。高濃度 TMV 接種試験では，各区2ポットを供試し，処理区では供試葉全体に薬液を塗布した。その後の試験法は半葉法の場合と同様であり，処理区，無処理区各ポットごとの1葉あたりの病斑数を測定し，感染阻止率を算出した。このような，薬剤を TMV 接種の前に処理する試験法は，前処理法と呼ばれている^{6,13)}。

Table 2 Inhibitory activity of anionic surfactants against local lesion formation of TMV on Xanthi-nc.^{b)}

Chemicals	Conc. (ppm)	Inhibition (%)	Phyto-toxicity
C ₁₂ H ₂₅ O(CH ₂ CH ₂ O) _n SO ₃ Na	5,000	91	+
AOS ^{a)}	5,000	97	—
C ₁₂ H ₂₅ -SO ₃ Na (SAS)	5,000	99	+
NaO ₃ S-CH-COOC ₈ H ₁₇ CH ₂ -COOC ₈ H ₁₇ (OSS)	5,000	98	+
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{RCON}-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na} \end{array}$ R = C ₁₆ H ₃₃ - C ₁₈ H ₃₇	5,000	87	—
5,000	63	—

^{a)} AOS: C₁₅H₃₁-CH₂-CH=CHSO₃Na +
C₁₅H₃₁-CH=CH-CH₂SO₃Na +
C₁₅H₃₁-CH₂-CH-CH₂SO₃Na +
|
OH
C₁₅H₃₁-CH-CH₂CH₂SO₃Na
|
OH

^{b)} Chemicals were applied as in Table 1.

2. 土壤接種法 (全身感染法)

TMV 罹病タバコ葉 (Bright Yellow) の乾燥粉末を 0.5 g 混合した感染土壌 1 l に，薬液 (2,500 ppm) を 50 ml 処理してから，圃場の植穴に入れた。そこへ，薬液 (2,500 ppm) をあらかじめ 50 ml 散布した Bright Yellow 苗を移植した。各株の間隔は約 50 cm とった。約2週間後から発病が始まり，1カ月後に発病株率の調査を行ない，無処理区に対する感染阻止率を算出した。感染阻止率 (%) = (1 - x/y) × 100。ただし，x および y はそれぞれ処理区および無処理区の発病株率とする。試験は5月から8月にかけて2回，無被覆栽培で行ない，移植約10日後に除草を行ない，晴天日には毎夕灌水を行なった。1回の試験には各区16株を供試したが，移植直後に土壌害虫の被害に会い，各区の供試苗数にばらつきを生じた。2回の試験の合計を結果とした。

実験結果

1. 界面活性剤の TMV 感染阻止効果

アニオン，カチオン，ノニオンの各種界面活性剤について，5,000 ppm の薬液を供試して，前処理法によって TMV 感染阻止効果を検定した (Table 1, 2)。供試した

化合物のうち、半数以上のものが薬害を示し、なかでも、カチオン、ノニオン系は強い薬害を示した。これらの化合物については、1,250 ppm における試験を行なった。その結果、薬害の軽減はみられたが、TMV 感染阻止効果も低かった。アニオン系の中で TMV 感染阻止効果の高かったものは、以下に示すとおりである。

- ポリオキシエチレンドデシルエーテル硫酸ナトリウム
- C₁₈ の α -オレフィンスルホン酸ナトリウム (以下 AOS と略す)
- ドデシルスルホン酸ナトリウム (以下 SAS と略す)
- ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム (以下 OSS と略す)

これらのうちで、AOS のみが Xanthi-nc に対して薬害を示さなかった。

2. アニオンポリマーの TMV 感染阻止効果

各種アニオンポリマーについて、5,000 ppm の薬液を

Table 3 Inhibitory activity of polyanions against local lesion formation of TMV on Xanthi-nc.^{a)}

Chemicals	Conc. (ppm)	Inhibition (%)	Phyto-toxicity
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{COONa (SPA)}}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_n$	5,000	78	—
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_n$	5,000	59	—
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{CONH} - \underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{C}}} - \text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_n$	5,000	58	—
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{CONH} - \underset{\text{CH}_3}{\underset{ }{\text{C}}} - \text{CH}_2\text{SO}_3\text{Na}}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_n$ n:m=3:7	5,000	25	—
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{SO}_3\text{Na}}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_n$	5,000	63	—
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{SO}_3\text{Na}}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_n$ $\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{CONH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_m$ n:m=1:1	5,000	54	—
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{SO}_3\text{Na}}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_n$ $\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{CONH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_m$ n:m=1:1	5,000	35	—
Sodium alginate	5,000	90	—

^{a)} Chemicals were applied as in Table 1. Apparent viscosity at 5,000 ppm was between 5 and 50 mPa·sec.

供試して、前処理法によって TMV 感染阻止効果を検定した (Table 3)。供試したどの化合物も Xanthi-nc に対して薬害を示さず、アルギン酸ナトリウムとポリアクリル酸ナトリウム (以下 SPA と略す) が高い活性を示した。

3. カチオンポリマーの TMV 感染阻止効果

各種カチオンポリマーについて、5,000 ppm の薬液を供試して、前処理法によって TMV 感染阻止効果を検定した (Table 4)。ポリ(2-メタクリルオキシエチルトリメチルアンモニウムクロライド) (以下 MOEA・TMC と略す) とポリビニールイミダゾリンが高い活性を示したが、ポリビニールイミダゾリンは、Xanthi-nc に対して薬害を示したので、1,250 ppm における試験を行なったところ、薬害の軽減はみられたが、TMV 感染阻止効果も低くなった。

4. 低薬液濃度における TMV 感染阻止効果

5,000 ppm における試験で、高い TMV 感染阻止効果を示した界面活性剤には、AOS, SAS, OSS があり、

Table 4 Inhibitory activity of polycations against local lesion formation of TMV on Xanthi-nc.^{a)}

Chemicals	Conc. (ppm)	Inhibition (%)	Phyto-toxicity
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{CONHCH}_2\text{N} \begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_n$	5,000	60	—
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{NH}_2}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_n$ HCl	5,000	29	—
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{N} \begin{smallmatrix} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{N} \end{smallmatrix}}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_n$ HCl	5,000	49	—
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{HN} \begin{smallmatrix} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{N} \end{smallmatrix}}{\underset{ }{\text{CH}}} \right\}_n$	5,000 1,250	90 68	+
$\left\{ \text{CH}_2 - \underset{\text{COOCH}_2 - \text{N}^+ \begin{smallmatrix} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{smallmatrix}}{\underset{ }{\text{C}}} \right\}_n$ (MOEA・TMC) Cl ⁻	5,000	96	—
$\left\{ \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{NH} \right\}_n$	5,000	79	—

^{a)} Chemicals were applied as in Table 1. Apparent viscosity at 5,000 ppm was between 5 and 50 mPa·sec.

アニオンポリマーでは、アルギン酸ナトリウム、SPA が、カチオンポリマーでは、MOEA・TMC があった。それらの化合物の低濃度における TMV 感染阻止効果を検定した (Table 5)。界面活性剤では、供試した化合物の間に活性の差はほとんどみられなかった。カチオンポリマーの MOEA・TMC は、界面活性剤とほぼ同等の TMV 感染阻止効果を示したが、アニオンポリマーの SPA とアルギン酸ナトリウムは、低濃度における活性

がやや弱かった。葉害はどの化合物にも認められなかった。

5. 高濃度 TMV 接種時の TMV 感染阻止効果

低濃度試験に供試した界面活性剤の間に、活性の差がみられなかったことから、葉害面で安全性の高い AOS を界面活性剤の代表として取り上げ、MOEA・TMC、SPA、アルギン酸ナトリウムとともに供試して (葉液濃度: 5,000 ppm)、接種 TMV の濃度を高くしたときの Xanthi-nc 上に現われてくる局部病斑数を測定した (Table 6)。AOS、SPA、アルギン酸ナトリウムでは、5 $\mu\text{g/ml}$ の TMV を接種したときには、0.5 $\mu\text{g/ml}$ の TMV を接種したときに比べて、局部病斑数が 5~10 倍に増えたが、MOEA・TMC では、0.5 $\mu\text{g/ml}$ のときと 5 $\mu\text{g/ml}$ のときとで局部病斑数に変化がなかった。

6. 全身感染タバコに対する TMV 感染阻止効果

AOS、MOEA・TMC、SPA の土壌接種法での TMV 感染阻止効果を検定した (Table 7)。MOEA・TMC が最も活性が高く、AOS がそれに次ぐ活性を示した。しかし、SPA は活性が弱かった。

考 察

界面活性剤の TMV 感染阻止効果については、Triton

Table 5 Inhibitory activity of several chemicals applied at lower concentrations prior to TMV inoculation.^{a)}

Chemicals	Inhibition (%)		
	2,500 ppm	1,250 ppm	625 ppm
SAS	96	94	84
AOS	92	90	81
OSS	98	94	88
MOEA・TMC	94	87	78
SPA	76	72	15
Sodium alginate	87	78	66

^{a)} Assayed on Xanthi-nc as in Table 1.

Table 6 Comparison of inhibitory activities of chemicals against TMV infection on Xanthi-nc inoculated at different concentrations.^{a)}

Chemicals	Conc.	TMV 0.5 $\mu\text{g/ml}$		TMV 5 $\mu\text{g/ml}$	
		No. of lesions per leaf	Inhibition (%)	No. of lesions per leaf	Inhibition (%)
AOS	5,000	7	97	79	85
MOEA・TMC	5,000	8	96	5	99
SPA	5,000	21	91	135	74
Sodium alginate	5,000	23	90	109	79
Untreated		237		528	

^{a)} Assayed as in Table 1.

Table 7 Inhibitory activity of several chemicals against TMV infection on the systemic host (Bright Yellow).^{a)}

Chemicals	No. of plants inoculated (A)	No. of plants exhibited symptoms (B)	(B/A) $\times$ 100 (%)	Inhibition (%)
AOS	24	12	50	45
MOEA・TMC	24	10	41	55
SPA	27	18	66	28
Untreated	28	26	92	

^{a)} Tobacco seedlings sprayed with chemicals (2,500 ppm) were transplanted to artificially infested soil, where the chemicals had been predrenched.

X-100 や SDS についての谷口の報告⁹⁾, ABS についての黄らの報告¹⁰⁾, 数種界面活性剤についての著者らの報告¹⁵⁻¹⁷⁾等があるが, 広く界面活性剤全体について, TMV 感染阻止効果の評価がなされた例はみられない。界面活性剤は, タバコ (Xanthi-nc) に対して薬害を示すものが多く, とくに, カチオン, ノニオン系では, 供試したすべてのもので強い薬害がみられた。アニオン系は, カチオン, ノニオン系に比べると, 薬害の程度は軽かった。そのなかで, AOS は, Xanthi-nc に対して高い TMV 感染阻止効果を示し, なおかつ 5,000 ppm においても薬害を示さず, TMV 感染阻止剤としてすぐれた性質を有していることが明らかになった。

アニオンポリマーでは, 従来から TMV 感染阻止効果があるといわれているアルギン酸ナトリウムや SPA と比べて, Xanthi-nc に対する TMV 感染阻止効果ですぐれているものは見いだせなかった。SPA を Xanthi-nc に処理すると, 2~3 日後に TMV に対する抵抗性が誘導されることが報告されているが^{8,18)}, 薬液を処理してから約 3 時間後に接種した本実験条件下では, SPA は抵抗性誘導とは別の機構で感染阻止効果を示したものと思われる。

カチオンポリマーでは, MOEA・TMC, ポリビニールイミダゾリンが, Xanthi-nc に対して高い TMV 感染阻止効果を示した^{19,20)}。カチオンポリマーは, カチオン活性剤と異なり, ほとんど薬害がみられなかった。これは, 植物体への浸透性の差に起因していると考えられる。

界面活性剤, カチオンポリマー, アニオンポリマーの間の活性の比較をすると, 薬剤の濃度を低くした場合には, 界面活性剤と MOEA・TMC は, ほとんど同等の活性を示したが, アニオンポリマーは, やや活性が弱かった。AOS やアニオンポリマーでは, 接種 TMV 濃度が高い場合には病斑数が増加したが, MOEA・TMC では, 病斑数の変化はほとんどみられなかった。

従来, TMV 感染阻止効果の検定には, 局部感染タバコが多く用いられてきたが, さらに全身感染タバコを用いて TMV 感染阻止効果を検定したところ, MOEA・TMC が最も高い活性を示し, AOS がそれに次いだ。これらのことから, カチオンポリマーとくに四級アンモニウムポリマーが, 界面活性剤やアニオンポリマーと比較して, すぐれた TMV 感染阻止効果を有し, 新しい抗植物ウイルス剤としての可能性をもっていることが示唆された。

そこで, カチオン四級アンモニウムポリマーの TMV 感染阻止効果および作用性について詳細な検討を行なう必要があると考える。

要 約

界面活性剤, カチオンポリマー, アニオンポリマーの TMV 感染阻止効果を前処理法により Xanthi-nc 上で検討した。界面活性剤のなかでは, AOS が阻止効果が高く薬害を示さずに, TMV 感染阻止剤としてすぐれた性質を示した。アニオンポリマーのなかでは, アルギン酸ナトリウムよりも高い活性を示す化合物はなかった。カチオンポリマーのなかでは, MOEA・TMC が, 薬害がなく, 活性も高く, TMV 感染阻止剤としてすぐれ, 土壌接種法による Bright Yellow での TMV 感染阻止効果も高かった。これらのことから, カチオン四級アンモニウムポリマーの抗植物ウイルス剤としての可能性が示唆された。

本実験を行なうにあたり, 種々ご指導いただいた日本専売公社中央研究所久保進博士, および本報告を稿するにあたりご助言いただいた理化学研究所本間保男博士に深謝いたします。

引 用 文 献

- 1) B. Kassanis & A. Kleczkowski: *J. Gen. Microbiral.* **2**, 143 (1948)
- 2) H. W. J. Ragetli & M. Weintraub: *Virology* **18**, 232 (1962)
- 3) S. D. Wyatt & R. J. Shepherd: *Phytopathology* **59**, 1787 (1969)
- 4) M. M. Smookler: *Ann. Appl. Biol.* **69**, 157 (1971)
- 5) 久保 進・都丸敬一・大岳 望・安田隆昌・米原弘: *日植病報* **37**, 208 (1971)
- 6) 都丸敬一・大河喜彦: *日植病報* **41**, 155 (1975)
- 7) M. A. Stahmann & S. S. Gothoskar: *Phytopathology* **48**, 362 (1958)
- 8) A. Stein & G. Loebenstein: *Phytopathology* **62**, 1461 (1972)
- 9) T. Taniguchi: *Phytopathol. Z.* **86**, 246 (1976)
- 10) K. Ko, Y. Matsuzawa & T. Watanabe: *J. Pesticide Sci.* **5**, 481 (1980)
- 11) 高木康至・小川括郎: *日植病報* **44**, 282 (1978)
- 12) 大森英三: 高分子凝集剤, 高分子刊行会, 東京, pp. 38-59, 75-83, 1973
- 13) 高木康至: *日植病報* **44**, 262 (1978)
- 14) 都丸敬一・日高 醇: 植物ウイルス病—実験法と種類, 朝倉書店, 東京, pp. 153-159, 1960
- 15) 特開昭 53-113019
- 16) 特開昭 53-113021
- 17) 特開昭 53-118520
- 18) S. Giannaggi & B. Kassanis: *J. Gen. Virol.* **23**, 1 (1974)
- 19) 特開昭 54-32624
- 20) 特開昭 54-59332