[農化 第 40 卷, 第 12 号, p. 437~442, 1966]

感光色素の抗稲白葉枯病菌作用 (第1報)

化学構造と抗菌性の関係

石井 至, 片桐 政子, 坂詰 偕一郎*, 見里 朝正
(農林省農業技術研究所, *小西六写真工業株式会社化学研究所)

昭和 41 年 5 月 13 日 受 理

Antibacterial Effect of Photosensitizing Dyes on *Xanthomonas oryzae*, Leaf Blight Bacteria of Rice Plant

Part I. The Relationship between the Chemical Structure of the Dyes and their Antibacterial Activity

By Itaru ISHII, Masako KATAGIRI, Kaichiro SAKAZUME* and Tomomasa MISATO
National Institute of Agricultural Sciences; *Chemical Research
Laboratories, Konishiroku Shashin Kogyo Co., Ltd.

760 photosensitizing dyes were tested for bactericidal activity in vitro against *Xanthomonas oryzae*, leaf blight bacteria of rice plant. It was found that 205 dyes, which were cyanine- or styryl-type, were effective for inhibiting growth of *X. oryzae*, four dyes of which at a concentration of 0.1 $\mu\text{g/ml}$ completely inhibited the growth of *X. oryzae*. The relationship between the chemical structure of photosensitizing dyes and their antibacterial activity was discussed. In greenhouse, using rice seedlings inoculated artificially with *X. oryzae*, effect of photosensitizing dyes was tested for control of leaf blight, and it was found that several dyes were highly effective. (Received May 13, 1966)

緒 言

感光色素の中には抗細菌作用^(1,2), 抗糸状菌作用⁽³⁾, 駆虫作用⁽⁴⁾, 植物ホルモンの作用⁽⁵⁾等の生物学的作用を現わすものがあり, その医学的応用に関する研究, 化学構造と抗菌作用との関係についての研究が多数報告されているが, 農薬として使用する面についての研究は未だ行なわれていない。著者らは感光色素が稲白葉枯病菌に対して特に強い殺菌力を有することを知ったので, これらを稲白葉枯病防除薬剤として使用することを目的として研究を行なった。760 種類の感光色素について抗菌性を試験し, その中で 205 種類の色素が有効であることを知り, 化学構造と抗菌性との関係を考察した。数種類の色素について温室内稲苗接種試験を行なって, かなりの稲白葉枯病の防除効果を確認した。本報ではこれらの結果について報告する。

実験材料および方法

(1) 微生物: *Xanthomonas oryzae* H 5809 およ

び, その他の供試植物病原細菌は農技研病理科保存菌株を用いた。

(2) 感光色素: 感光色素化合物の 760 種類を合成し, 再結晶を繰り返して純度 100% に精製したものを試験に供した。その中で基本的な構造を有する色素の 42 種類とその融点を第 1 表に示した。

(3) 濾紙円板法による抗菌力の測定法: 培地として向・渡辺培地 (sodium glutamate 0.2%, KH_2PO_4 0.2%, MgCl_2 0.1%, FeSO_4 0.01%, sucrose 2%, 酵母エキス 0.02%, peptone 0.5%, 寒天 1.8%, pH を 6.8 に調節) を用いた。*X. oryzae* を 10ml 試験管斜面に 48 時間培養後, 生育した菌体を 5ml の無菌水に懸濁し, その 1ml を 100ml の融解寒天培地に稀釈し, これを上層として流して固めた平面培養を調製した。感光色素を 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で ethanol に溶解し, 直径 8 mm の濾紙円板にしみこませて風乾した後, 固化直後の上記平面培地上に置き, 27°, 48 時間培養した後, 生じ

第1表 感光色素の *Xanthomonas oryzae* に対する抗菌力色素の 1,000 $\mu\text{g/ml}$ 溶液を塗ませたペーパードイスタにより生じた阻止円の直径.

Dye No.	構造式	被 検 感 光 色 素 名 称	m. p.	抗 菌 力	
				阻止円 直径* (mm)	最低生育 阻止濃度 ($\mu\text{g/ml}$)
1	(I)	1'-methyl-1-ethyl-4'-pyrido-2-cyanine iodide ⁽⁶⁾	212°	34	1.3
2	(II)	2 (<i>p</i> -dimethylaminostyryl) pyridine methyl perchlorate ⁽¹²⁾	257°	32	0.6
3	(III)	1,1'-dimethyl-2,2'-cyanine iodide ⁽⁶⁾	245~6°	33	0.3
4	(IV)	1'-methyl-1-ethyl-2,2'-cyanine iodide ^(6,8)	258~9°	31	0.3
5	(V)	1,1'-dimethyl-2'-pyrrolino-2-cyanine iodide ⁽⁶⁾	245~6°	37	1.3
6	(VI)	1'-methyl-1-ethyl-2'-pyrrolino-2-cyanine iodide ^(6,7)	205°	23	1.3
7	(VII)	1,1'-diethyl-5-methyl-2'-pyrrolino-2-cyanine iodide ⁽⁶⁾	195°	20	10
8	(VIII)	1,1',3',3'-tetramethyl-indo-2-cyanine perchlorate ^(6,7)	256°	27	5
9	(IX)	1-methyl-3'-ethyl-thiazolino-2-cyanine iodide ⁽⁶⁾	190~2°	43	0.3
10	(X)	1,3',4'-trimethyl-thiazolo-2-cyanine iodide ⁽⁶⁾	243°	35	0.1
11	(XI)	1,3',4'-trimethyl-thiazolo-2-azamethinecyanine iodide ^(21,22)	232°	44	0.3
12	(XII)	1,3'-dimethyl-4'-phenyl-thiazolo-2-azamethine- cyanine iodide ^(21,23)	274°	46	0.1
13	(XIII)	1-ethyl-3',4'-dimethyl-thiazolo-2-cyanine iodide ^(6,14)	238~9°	34	0.3
14	(XIV)	1-ethyl-3'- <i>n</i> -octyl-4'-methyl-thiazolo-2-cyanine iodide ⁽⁶⁾	166~8°	18	2.5
15	(XV)	1-3'-dimethyl-thia-2-azamethinecyanine iodide ⁽²¹⁾	270°	45	0.3

第1表の構造式 (I)~(XV)

第 1 表つづき

Dye No.	構造式	被 検 感 光 色 素 名 称	m. p.	抗 菌 力	
				阻止円直径* (mm)	最低生育 阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
16	(XVI)	1-methyl-3'-ethyl-thia-2-cyanine iodide ^(6,7)	255~7°	21	0.3
17	(XVII)	1,2',4'-trimethyl-1',3',4'-oxadiazolo-2-cyanine iodide ^(6,7,18)	266~7°	26	5
18	(XVIII)	1,4'-dimethyl-2'-ethyl-1',3',4'-thiadiazolo-2-cyanine iodide ⁽⁶⁾	259~60°	48	0.3
19	(XIX)	4 (<i>p</i> -dimethylaminostyryl) quinoline <i>n</i> -propyl iodide ^(12,17)	195°	30	1.3
20	(XX)	1',3,3',3'-tetramethyl-10-phenoxy-selenoindocarbocyanine iodide ⁽¹⁹⁾	235°	20	1.3
21	(XXI)	2-(<i>p</i> -dimethylaminostyryl)-3,3-dimethyl-indolenine methyl iodide ⁽¹²⁾	238°	33	1.3
22	(XXII)	2-(<i>p</i> -dimethylaminostyryl) oxazoline methyl iodide ^(12,15)	216~8°	27	20
23	(XXIII)	3,3'-dimethyl-oxacyanine iodide ^(6,19)	310°	32	1.3
24	(XXIV)	3,3'-dimethyl-oxacarbocyanine iodide ⁽⁹⁾	278°	27	1.3
25	(XXV)	2-(2-benzopyranylidene methyl) benzoxazole ethyl iodide ⁽¹⁰⁾	250~1°	29	40
26	(XXVI)	1,1'-diisopropyl-3,3'-dimethyl-5,5'-dichloro-benzimidazolcarbocyanine iodide ⁽¹¹⁾	252°	23	5
27	(XXVII)	3,3',10-trimethyl-thiazolino-thiacarbocyanine iodide ^(13,16)	225°	31	0.3
28	(XXVIII)	2-(2-benzopyranylidene methyl)-thiazoline ethyl iodide ⁽¹⁰⁾	229~30°	22	5
29	(XXIX)	3,3',4,4'-tetramethyl-thiazolocyanine iodide ⁽⁶⁾	320°	45	0.3
30	(XXX)	3,3'-diethyl-4,4'-dimethyl-thiazolocyanine iodide ⁽⁶⁾	310°	21	1.3

第 1 表の構造式 (XVI)~(XXX)

第 1 表つづき

被 検 感 光 色 素				抗 菌 力		
Dye No.	構造式	名	称	m. p.	阻止円直径* (mm)	最低生育阻止濃度 (μg/ml)
31	(XXXI)	3, 3'-di- <i>n</i> -butyl-4, 4'-dimethyl-thiazolocyanine iodide ^(6,24)		248~9°	25	1.3
32	(XXXII)	3, 3'-di- <i>n</i> -hexyl-4, 4'-dimethyl-thiazolocyanine iodide ⁽⁶⁾		235~6°	22	2.5
33	(XXXIII)	3, 3'-di- <i>n</i> -heptyl-4, 4'-dimethyl-thiazolocyanine iodide ⁽⁶⁾		223°	12	2.5
34	(XXXIV)	3, 3'-di- <i>n</i> -octyl-4, 4'-dimethyl-thiazolocyanine iodide ⁽⁶⁾		226~7°	10	2.5
35	(XXXV)	3, 3'-di- <i>n</i> -nonyl-4, 4'-dimethyl-thiazolocyanine iodide ⁽⁶⁾		242~3°	10	2.5
36	(XXXVI)	3, 3'-di- <i>n</i> -dodecyl-4, 4'-dimethyl-thiazolocyanine iodide ⁽⁶⁾		229~30°	0	20
37	(XXXVII)	3, 3'-dimethyl-4-phenyl-thiazolo-azamethine-thiacyanine iodide ⁽²¹⁾		272°	45	0.1
38	(XXXVIII)	2, 3, 4, 4'-tetramethyl-thiazolo-1', 3', 4'-thiadiazolocyanine perchlorate ⁽⁶⁾		230~2°	42	0.6
39	(XXXIX)	2-ethyl-3', 4-dimethyl-1, 3, 4-thiadiazolo-thiacyanine iodide ⁽⁶⁾		281~2°	48	0.1
40	(XL)	2-(2-benzopyranylidene methyl)-benzothiazole ethyl iodide ⁽¹⁰⁾		320° 以上	25	0.3
41	(XLI)	2, 2', 4, 4'-tetramethyl-1, 3, 4-thiadiazolocyanine perchlorate ^(6,20)		223~5°	41	1.3
42	(XLII)	2-(2-benzopyranylidene methyl)-benzoselenazole ethyl iodide ⁽¹⁰⁾		300° 以上	24	0.3
対 照		streptomycin		—	29	10

第 1 表の構造式 (XXXI)~(XLII)

た阻止円を測定した。

(4) 最低生育阻止濃度の測定法：向・渡辺培地の 10ml 試験管液体培地に感光色素の所定濃度を溶解させ *X. oryzae* の斜面培養の 1 白金耳を接種し、48 時間振盪培養した後、生育の有無を調べた。

(5) 抗菌スペクトラムの測定法：寒天稀釈塗抹法

によって測定を行なった。*X. oryzae* 以外の細菌の場合は、グイヨン寒天培地を用いた。細菌の斜面培養から 1 白金耳をとり、3ml の無菌蒸留水に懸濁させ、その 1 白金耳をとり、色素の所定濃度を溶解させて固めた培地上

に塗抹し, 24 時間または 48 時間培養を行ない, その生育の有無を調べた。

(6) 温室稲苗接種試験法: 稲の品種は十石を用い, 20 茎/3 寸鉢の本葉 4~5 葉の苗を用い, 試験管斜面で 27°, 3 日間培養した *X. oryzae* H 5809 の懸濁液を上位 2 葉に単針接種し, 接種翌日にターンテーブル上でスプレーガンを使用して展着剤を加用した感光色素の水溶液を散布 (40 ml/3 鉢) し, 風乾後ガラス温室内に置いた。1 処理は 3 鉢とし, 接種 21 日後に葉位別に病斑長を測定し, 防除価を算出した。

実験結果および考察

760 種類の感光色素について濾紙円板法を用いて, *X. oryzae* に対する阻止円の直径を測定し, その中で抗菌力の高い色素については, さらに最低生育阻止濃度を測定した。その結果 205 種類の色素が抗菌性を有し 35 種類の色素が streptomycin 以上の抗菌力を有することが確かめられた。第 1 表に, 抗菌力の高い色素の中で代表的な基本構造を有する色素とその抗菌力を示した。抗菌性を有する色素は cyanine 色素, styryl 色素の系統であり, 構造の中に carbonyl を含む色素, 4 級窒素を含まない色素は全く抗菌性を示さなかった。結果を総括して述べると以下のとおりである。

4 級窒素を含む複素複核と 3 級窒素を含む複素環核, aminostyryl 構造, benzopyran 核とをそれぞれ methine 鎖で連結した型の色素が有効であった。有効な複素環の種類は, pyridine, quinoline, pyrroline, indolenine, oxazoline, benzoxazole, benzimidazole, thiazoline, thiazole, benzothiazole, benzoselenazole, oxadiazole,

thiadiazole であった。第 1 表に示した色素の各種の基本構造について種々の改変を行なうと抗菌力に影響をおよぼした。

Methine 鎖については methine と azamethine では差は無く, また monomethine と trimethine では差は無いが, pentamethine 色素は概して抗菌力が小で, heptamethine 色素は全く無効であった。抗菌力については複素環窒素結合 alkyl が重要な因子であり, 一般に $N-CH_3$ は $N-C_2H_5$ より抗菌力が大で, No. 29~No. 36 の色素で見られるように alkyl 炭素数の多い色素はやや抗菌力が落ちる傾向があった。また alkyl 基を $-COOH$, $-SO_3H$, $-OH$, $-CN$ で置換すると抗菌力を減少するか, または失った。色素の酸根は halogen が良く, dimethylsulfate, diethylsulfate, toluenesulfonate は抗菌性を低下させた。複素環の種類, aminostyryl の組合せと抗菌性の関係については, 明らかな傾向は認められなかった。

X. oryzae 以外の細菌に対する抗菌力を数種類の感光色素について試験した結果を第 2 表に示した。これらの色素がいずれも *X. oryzae* に対して特異的な効力を有するのは興味深いことである。

数種類の感光色素について温室内で稲白葉枯病の防除試験を行なった結果を第 3 表に示した。いずれの色素も防除効果を示したが, No. 14, No. 29, No. 33, No. 34, No. 35, No. 36 は効果が高く, cellocidin 製剤の効果に匹敵した。また防除効果は in vitro の抗菌力とは逆に alkyl 基の炭素数の多い方が高い傾向を示した。

第 2 表 感光色素の各種細菌に対する抗菌力

	色素の最低生育阻止濃度					
	No. 29	No. 21	No. 24	No. 25	No. 40	No. 42
<i>Agrobact. tumefaciens</i>	100					
<i>Erwinia aroidae</i>	100					
<i>Pseudomonas eriobotryae</i>	100					
<i>P. fluorescens</i>	>100					
<i>P. solanacearum</i>	>100					
<i>P. tabaci</i>	10	100	100	>100	>100	100
<i>Xanthomonas citri</i>		100	100	100	100	100
<i>X. oryzae</i>	>1	10	10	100	<1	<1
<i>X. pruni</i>	100	>100	>100	>100	>100	>100
<i>Bacillus subtilis</i>	100					
<i>Escherichia coli</i>	>100					
<i>Staphylococcus aureus</i>	100					

培地: *X. oryzae* は向・渡辺培地, その他はブイヨン寒天培地を用いた。

第 3 表 感光色素による稲白葉枯病防除効果

薬 剤	散布濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	葉位別病斑長 (mm)			防除価 (%)
		4 葉	5 葉	平均	
No. 14	200	15	25	20	75
No. 14	400	9	16	13	84
No. 31	200	24	43	34	57
No. 31	400	23	27	25	68
No. 32	200	27	31	29	63
No. 32	400	34	37	35	54
No. 33	200	21	24	23	71
No. 33	400	7	23	15	81
No. 34	200	20	30	25	68
No. 34	400	11	18	15	81
No. 35	200	12	24	18	77
No. 35	400	10	12	11	86
No. 36	200	13	20	17	78
No. 36	400	11	15	13	84
セロサイ 水和剤	150	13	13	13	84
無 処 理	—	84	73	79	—

試験方法: 単針接種, 翌日散布 調査時期: 接種 21 日後
 稲 品 種: 十石

$$\text{防除価} = \frac{\text{無処理区病斑長} - \text{処理区病斑長}}{\text{無処理区病斑長}} \times 100$$

要 約

760 種類の感光色素について稲白葉枯病菌に対する in vitro の抗菌力を試験した結果, 205 種類の色素が有効であった。その中で 4 種類の色素は $0.1 \mu\text{g/ml}$ の濃度で *Xanthomonas oryzae* の生育を完全に阻止した。有効であった感光色素は, 4 級窒素を含む複素環核と 3 級窒素を含む複素環核, benzopyran 核, aminostyryl 構造とをそれぞれ methine 鎖で連結した型の色素であった。これらの試験結果から, 供試感光色素の化学構造と抗菌性の関係について考察を行なった。また温室内で稲白葉枯病防除試験を行なった結果, 数種類の感光色素が高い防除効果を示した。

本報告の要旨は昭和 41 年度日本農芸化学会大会にお

いて講演した。

- (1) C. H. Browning, J. B. Cohen, F. R. S., S. Ellingworth, R. Gulbransen : *Proc. Roy. Soc.*, **B 96**, 317 (1924).
- (2) C. H. Browning, J. B. Cohen, F. R. S., S. Ellingworth, R. Gulbransen : *ibid.*, **B 100**, 293 (1926).
- (3) M. Pianka, J. C. Hall : *J. Sci. Food. Agric.*, **8**, 432 (1957).
- (4) E. Bueding : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **50**, 115 (1948).
- (5) T. Ogata, M. Shingu : *Proc. Japan Acad.*, **25**, 22 (1950).
- (6) I. G.: B. P. 423,792 (1932); O. Fischer : *Ber.*, **35**, 3677 (1902); S. Gabriel, C. F. V. Hirsch : *Ber.*, **29**, 2610 (1896).
- (7) O. Doebner : *Ber.*, **25**, 2072 (1892); A. Hofmann : *Ber.*, **B 21**, 1236, 1238 (1880).
- (8) F. M. Hammer : *J. Chem. Soc.*, **1928**, 206.
- (9) M. A. Phillips : *ibid.*, **1930**, 2685; 尾形輝太郎: 理化学研究所彙報, **13**, 6 (1934).
- (10) H. Meerwein : *Ann.*, **641**, 1 (1961); H. Meerwein et al : *Ber.*, **89**, 2060 (1956).
- (11) E. K.: U. S. P. 2,739,149 (1956); F. E. King, J. W. Clark-Lewis : *J. Chem. Soc.*, **1953**, 172.
- (12) J. L. B. Smith : *ibid.*, **123**, 2288 (1923); E. Fischer : *Ann.*, **236**, 116 (1886).
- (13) L. G. S. Brooker : U. S. P. 2,478,366 (1949).
- (14) A. Hantzsch : *Ann.*, **250**, 262 (1889).
- (15) M. Bergmann, E. Brand : *Ber.*, **56**, 1280 (1923).
- (16) L. M. Clark : *J. Chem. Soc.*, **1928**, 2319.
- (17) K. N. Campbell, I. J. Schaffner : *J. Am. Chem. Soc.*, **67**, 86 (1945).
- (18) R. Stollé : *Ber.*, **32**, 797 (1899).
- (19) N. Fischer : *J. Chem. Soc.*, **1930**, 2502.
- (20) C. T. S. Hofman : *J. Prakt. Chem.*, [2] 53 (1835).
- (21) T. D. Keudoll : B. P. 447,038 (1934), B. P. 447,109 (1934).
- (22) J. R. Byers : *Org. Synth.*, **19**, 10 (1939).
- (23) 田鹿義雄: 薬学雑誌, **71**, 709 (1951).
- (24) E. R. Buchmann : *J. Org. Chem.*, **6**, 764 (1941).