

## Studies on The Mechanism of Cucumber Downy Mildew and Anthracnose Disease Suppression by Licorice Extract

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): licorice extract, cucumber downy mildew, cucumber anthracnose, disease suppression, glycyrrhetic acid, flavonoids 作成者: 宮川, 久義, 大野, 裕和 メールアドレス: 所属:
URL	<a href="https://doi.org/10.24514/00001763">https://doi.org/10.24514/00001763</a>

# 甘草抽出物のキュウリべと病および炭疽病に対する 発病抑制機作に関する研究

宮川久義・大野裕和<sup>1</sup>

**Key words** : 甘草抽出物, キュウリべと病, キュウリ炭疽病, 発病抑制機作, グリチルレチン酸, フラボノイド類

## 目 次

I 緒 言	71	2 キュウリべと病に対する発病抑制効果	91
II 甘草抽出物 (MZ-1) のキュウリべと病に対する発病抑制効果	73	3 甘草刻の50%エタノール抽出液およびホワイトリカー抽出液に含まれる成分	92
1 MZ-1分画物の発病抑制効果	74	V キュウリ葉上でのフラボノイド類の動態および溶液の物理的安定性	92
2 フラボノイド類の発病抑制効果	76	1 キュウリ葉散布後のフラボノイド量の変化	93
3 グリチルリチン酸類の発病抑制効果	79	2 主要成分の混合溶液の物理的安定性	95
4 MZ-1のキュウリべと病に対する発病抑制機作	81	VI MZ-1のキュウリべと病に対する発病抑制効果 (圃場試験)	96
III MZ-1のキュウリ炭疽病に対する発病抑制効果	83	1 各種展着剤の発病抑制効果におよぼす影響	96
1 MZ-1分画物の発病抑制効果	83	2 グリチルレチン酸および油性甘草抽出物の発病抑制効果	97
2 フラボノイド類の発病抑制効果	84	VII 総合考察	99
3 グリチルリチン酸類の発病抑制効果	85	摘 要	101
4 主要成分の炭疽病菌胞子発芽抑制効果	87	謝 辞	102
5 キュウリ褐斑病に対するグリチルレチン酸の発病抑制効果	88	引用文献	102
IV 乾燥甘草根のエタノール抽出液の発病抑制効果	89	Summary	105
1 キュウリ炭疽病に対する発病抑制効果	89		

## I 緒 言

カンゾウ (甘草, Licorice) とはユーラシア大陸の北緯 40 度周辺の乾燥地帯に野生するマメ科 (Leguminosae) カンゾウ (*Glycyrrhiza*) 属の多年草である。高さ 1 ~ 3 m で茎の下部は木質化し、ス

トロン (根茎) が伸びて茎を出して増殖する。6 月頃レンゲに似た淡紫色の花が咲き、豆果は茶褐色で種子が数個生じる<sup>28, 49)</sup>。その根および根茎 (ストロン) を乾燥したものは、古代から東洋および西洋で生薬として供されている<sup>49)</sup>。わが国においても日本薬局方 (第十六改正)<sup>14)</sup> に掲載されており、漢方指定処方<sup>7)</sup> の 7 割以上に配合される主要な生薬の一つ

である。Glycyrrhiza属植物は約30種知られているが、主として利用されているのは、主要な薬効成分であるグリチルリチン酸を含有する *G. glabra* Linné (ヨウカンゾウ)、*G. inflata* Batalin (チョウカンゾウ)、*G. uralensis* Linné (ウラルカンゾウ) の3種である<sup>49, 54)</sup>。甘草に含まれるサポニンの一種、グリチルリチン酸には、抗炎症作用、鎮咳作用、抗アレルギー作用、抗腫瘍作用などの薬理活性が知られている<sup>49, 54)</sup>。また、グリチルリチン酸は砂糖の約200倍の甘味を有し、食品、特に醤油、味噌、漬け物などに広く使用されている。これらサポニン成分は水溶性であるため、水や熱水で抽出できる<sup>49)</sup>。

一方アルコールなどの有機溶媒で抽出される抽出物(以下油性甘草抽出物)には多くのフラボノイドが含まれている。主要なものはリクイリチン、イソリクイリチンなどである。このリクイリチン、イソリクイリチンおよびそれらのアグリコンであるリクイリチゲニンおよびイソリクイリチゲニンは上記3種類の甘草に共通して含まれるが<sup>49)</sup>、それ以外に種特異的なフラボノイド成分があり、*G. glabra*ではグラブリジン<sup>40)</sup>、*G. inflata*ではリコカルコンA<sup>40)</sup>、*G. uralensis*ではグリシクマリン<sup>1)</sup>などが知られている。甘草フラボノイドには抗酸化作用、抗菌作用、抗変異原作用などの生理活性が知られている<sup>43, 49, 50, 51)</sup>。

上述のグリチルリチン酸を主成分とする抽出物、フラボノイドを主成分とする抽出物はいずれも消費者庁の定める食品添加物リストの中の「既存添加物名簿収載品リスト」<sup>47)</sup>に掲載されている。

2003年度に近畿中国四国農業研究センター(以下当研究センター)と丸善製薬株式会社との間で「甘草抽出物の作物病害に対する防除機作の解明」に関

する共同研究を実施した。本研究では、甘草根およびストロンから工業的にグリチルリチン酸を抽出製造する過程で得られたフラボノイド類を高含量で含む甘草抽出物<sup>37)</sup>を主な研究対象とした。この甘草抽出物は、黄褐色粉末でわずかに柑橘系の芳香を有し、「甘草抽出物MZ-1」と名付けられた(以下MZ-1, 写真1)。研究の端緒になったのは、予備的にこのMZ-1の水溶液を露地のトマト、キュウリに散布したところ、無散布区で枯死葉(病名不詳)が生じた状況でも、散布区では健全であったこと、またキュウリ葉から単離した数種糸状菌(未同定)の培地上での菌糸生育をMZ-1が抑制したことである。そこで、糸状菌に起因する野菜類の茎葉病害防除にMZ-1が有効ではないかと考え、研究を開始した。

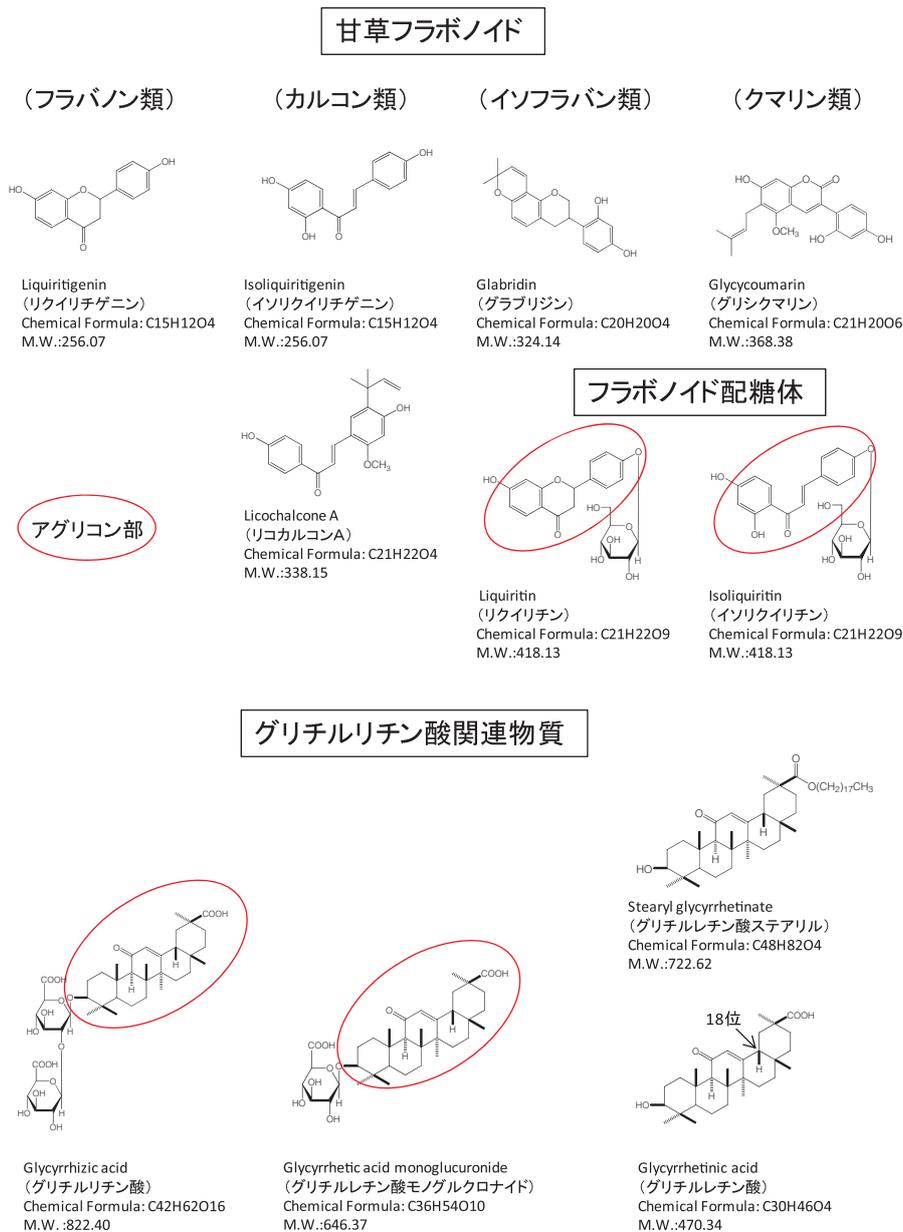
MZ-1が15種類の植物病原糸状菌に100 $\mu$ g/mL~1,000 $\mu$ g/mLの濃度で抗菌性を示し、キュウリ、トマト、ピーマンの数種の茎葉病害に対してポット試験で高い発病抑制効果を有することを確認した<sup>18)</sup>。得られた成果の一部については、論文、学会発表および商業誌などに報告した<sup>16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24)</sup>。さらに、これらの知見にもとづき、特許2件<sup>37, 38)</sup>(共同出願)を取得した。キュウリ、トマト、ピーマンなどの病害に関する研究のほかにも共同研究を実施し、イネばか苗病、いもち病、ごま葉枯病などの水稻種子伝染性病害に対するMZ-1の種子消毒効果、イチゴ炭疽病菌に対する抗菌検定など多岐にわたって研究を行ってきた。

本論文は、キュウリべと病および炭疽病を対象にしてMZ-1に含まれる各フラボノイドおよびグリチルリチン酸などの主要成分の抗菌活性および発病抑制効果、MZ-1を用いた圃場試験、市販生薬の甘草刻からの抽出液の病害発病抑制効果などを中心とした研究結果をとりまとめたものである。

本論文では混乱を避けるため、原植物は「カンゾウ」と記載し、収穫したカンゾウの製品は「甘草」と言葉を使い分けて記述する。甘草抽出物については、日本薬局方<sup>14)</sup>では「カンゾウエキス」、既存添加物リスト<sup>47)</sup>では「カンゾウ抽出物」と表記されているが、本論文では「甘草抽出物」と記述する。また、甘草に含まれる甘味成分についてはグリチルリチンまたはグリチルリチン酸の両方の呼び名があるが、本論文ではグリチルリチン酸を用いる。甘草



写真1 供試した甘草抽出物MZ-1



第1図 本研究で供試した主要物質の構造式、分子量などの一覧

抽出物に含まれるフラボノイド類、グリチルリチン酸関連物質など本論文で使用する主要物質の構造式、分子量などは第1図に示した。

## II 甘草抽出物 (MZ-1) のキュウリべと病に対する発病抑制効果

前報<sup>18)</sup>で報告したように、MZ-1の1,000 $\mu$ g/mL (0.1%)液をキュウリに散布・風乾後にキュウリべと病菌 (*Pseudoperonospora cubensis* (Berk. & M.A. Curtis) Rostowzew) を接種しても、べと病

病斑が発生せず、高い発病抑制効果があることが分かった。MZ-1は甘草根からフラボノイド類が高含量になる製法で精製されているが<sup>37)</sup>、フラボノイド類のほか、グリチルリチン酸なども含有しているため<sup>18)</sup>、疎水性の違いによりMZ-1をカラムクロマトグラフィーで分画し、ポット試験により各分画物の発病抑制効果を検討してMZ-1のどの成分がべと病の発病抑制効果に関与しているか明らかにした。なお、キュウリべと病菌は絶対寄生菌で培地上で人工培養できないため、*in vitro*での菌糸伸長抑制試験は行わなかった。

## 1 MZ-1分画物の発病抑制効果

### 1) 材料および方法

#### (1) 供試植物および処理, 病原菌接種方法

キュウリ品種; 「つや太郎」(タキイ種苗) を供試し, 直径9cmの黒ポリポットに播種し, 本葉1~2枚の幼苗を素焼鉢(直径15cm, 高さ13cm)に移植してガラス温室で栽培した. 培土には市販園芸培土(商品名: タキイ花と野菜の土)を使用した. 播種約1ヶ月後の本葉が5~6枚出葉した時期に供試した.

散布処理するMZ-1などの溶液の調整方法や濃度は個別に記載したが, 病原菌の接種試験では共通して1処理区にキュウリ4鉢を供試し, 供試溶液を株の全葉の表裏に滴り落ちる程度にコンプレッサーとガラス製小型噴霧器を用いて噴霧した. 供試薬液の散布量は原則として4株で200mLとしたが, 植物体が小さい場合は, 150mLあるいは120mLに散布量を減らした. 対照は蒸留水散布とした.

グリチルレチン酸などのトリテルペン類, イソリクイリチゲニンなどのフラボノイド類は水に不溶性なので, 99%エタノール(以下EtOH)に溶解後に, 蒸留水で希釈した. 例えば, 最終濃度が1,000 $\mu$ g/mL(0.1%)の場合では99%EtOHで50倍(w/v)溶液を作製し, 散布直前に蒸留水でさらに20倍希釈した. これは希釈直後は懸濁状態であるが, 時間が経過すると, 凝集・沈殿するためである.

供試薬液を散布して風乾後(散布4~6時間後)にキュウリべと病菌(*P. cubensis*)を接種した. 供試菌は当研究センター内圃場で採取した分離株である. キュウリ苗に継代接種して保存中の菌株を鉢植えキュウリに接種し, 病斑形成させた罹病葉を水洗後, ポリ容器内で25 $^{\circ}$ C湿度100%で1日間保ち新たに生じた分生子(遊走子嚢)を供試した. 絵筆を用いて蒸留水で葉上の分生子を洗い落とし, 4重ガーゼで濾過した. 分生子液は蒸留水で希釈し, 分生子濃度を約1,500個/mLとした. 蒸留水は氷冷したものを用い, 分生子液も接種終了時まで氷冷した. これは, 接種時まで遊走子が放出されることを抑制するためである. この分生子液をキュウリ4株で50mL(試験により40mLの時もある)噴霧し, 直ちに大型透明ポリ袋(90cm $\times$ 120cm)に入れて密閉し, 25 $^{\circ}$ C・照明有りの条件下で2日間保湿した. 以

後ガラス室で栽培し, 接種8~10日後に発病調査した. 調査は各葉位別に全葉の病斑数を目視調査し, 4株の平均値, 標準誤差を算出した. 多発生して病斑が融合したときは, 下記基準で全葉を発病程度別に調査して発病度を算出した.

A(発病程度4): 葉の病斑面積率50%以上

B(発病程度3): 同25%以上50%未満

C(発病程度2): 同5%以上25%未満

(概ね病斑が1葉に20~30個)

D(発病程度1): 同5%未満

(概ね病斑が1葉に10個以下)

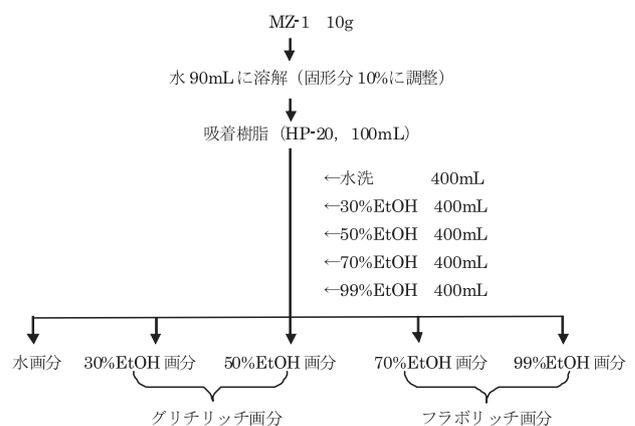
E(発病程度0): 病斑無し

発病度 =  $\sum i P_i / 4n \times 100$  (i: 発病程度数値,  $P_i$ : 発病程度iの葉数, n: 1株の調査全葉数)

反復試験の統計処理にはOMS出版の「エクセル統計Ver.3」のアドインソフトStatcel3を用いた. 病原菌の接種は4株まとめて行ったので, 反復無しの試験では誤差線記載および統計検定を行わなかった.

#### (2) MZ-1の成分分析およびその分画物の発病抑制効果

MZ-1などに含まれるグリチルリチン酸およびリクイリチン, イソリクイリチンなどのフラボノイド含量の分析は, 特許公報記載の方法<sup>37)</sup>によりHPLC分析を行った. 比較対照に甘草熱水抽出物および甘草粉末を供試した. 甘草熱水抽出物とは甘草根の熱水抽出液を乾燥させた褐色粉末で食品甘味料



第2図 甘草抽出物MZ-1の分画方法

第1表 MZ-1, 甘草熱水抽出物および甘草粉末に含まれるグリチルリチン酸およびフラボノイド含量

	MZ-1		甘草熱水抽出物	甘草粉末
	10ロットの範囲	Lot.20040605		
グリチルリチン酸	8.0~13.0	9.7	6.0~9.0	2.0~3.0
リクイリチン	4.0~ 8.0	4.1	1.0~3.0	0.2~0.6
イソリクイリチン	1.0~ 3.0	1.6	0.2~0.5	0.0~0.1
リクイリチゲニン	0.5~ 2.0	1.2	0.1~0.3	0.0~0.1
イソリクイリチゲニン	0.5~ 2.0	1.2	0.05~0.2	0.0~0.05
フラボノイド類の合計	6.0~15.0	8.1	1.0~3.0	0.2~0.6

表中の単位は%, 各々10ロットの分析結果を示した。

注) MZ-1は上記フラボノイド類の他, リコカルコンAを0.2~1.0%含有。また, グリチルリチン酸のアグリコンであるグリチルレチン酸を0.9%含有。

として市販されている。また甘草粉末とは甘草の根茎を乾燥後粉碎したもので, 甘味料として漬物などに使用される<sup>48)</sup>。

第2図に示したように, MZ-1 10gを蒸留水90mLに溶解して吸着樹脂(ダイヤイオンHP-20; 三菱化学(株)製)を100mL充填したカラムクロマトを用い, 蒸留水, 30%, 50%, 70%および99% EtOH各400mLで分画した。このうち, 30%および50% EtOH分画物をまとめて乾燥粉末化したものをグリチリッチ画分(グリチルリチン酸が多く含まれる画分), 70%および99% EtOH分画物をまとめて乾燥粉末化したものをフラボリッチ画分(フラボノイドが多く含まれる画分)と略称する。フラボリッチ画分は70% EtOHに溶解したあと, 蒸留水で20倍希釈して1,000 $\mu$ g/mL (0.1%)とした。グリチリッチ画分およびMZ-1は直接蒸留水に溶解し0.1%とした。これらを鉢植えキュウリ4株に噴霧し, 風乾後にべと病菌液を噴霧接種した。試験は4回反復した。なお, 以下のキュウリに対する接種検定では原則としてMZ-1 (Lot. 20040605)を供試した。

## 2) 結果および考察

### (1) MZ-1に含まれる成分について

第1表にMZ-1に含まれるグリチルリチン酸およびリクイリチン, イソリクイリチンなどのフラボノイド含量を示した。MZ-1などの甘草抽出物は天然物由来のため, 成分量に若干の変動があり, 第1表ではLot. 20040605およびそれを含む10ロットの濃度範囲のデータを示した。甘草熱水抽出物および甘草粉末と比較すると, 各フラボノイド含量が高い。なお, 一般に甘草根中ではフラボノイドは配糖体で

第2表 MZ-1の分画物に含まれるグリチルリチン酸およびフラボノイド含量

	MZ-1	グリチリッチ画分	フラボリッチ画分
グリチルリチン酸	11.0	18.0	0
リクイリチン	5.9	8.4	0
イソリクイリチン	1.9	0.5	0.03
リクイリチゲニン	4.3	1.3	15.07
イソリクイリチゲニン	2.2	0	12.47

表中の単位は%。

注) 本実験で用いたMZ-1は製造初期のもので, 第1表に示す品質管理の確立した現在のMZ-1と若干成分量が異なる。

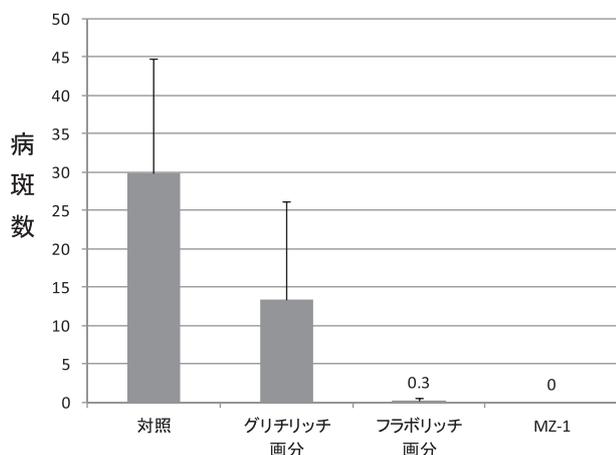
存在するが, 製造過程で加熱などによりアグリコンが生成されると考えられる。また, 本研究で供試したMZ-1は原料カンゾウ種(*G. inflata*)に特異的なフラボノイドであるリコカルコンAを含んでいる。Haraguchi et al.<sup>6)</sup>によると, *G. inflata*にはリコカルコンA, B, CおよびDの4種類が存在し, 糸状菌(*Mucor pusillus* Lindt)に対する抗菌活性はリコカルコンAが最も高かった。

### (2) MZ-1分画物の発病抑制効果

次に, 分画に供試したMZ-1およびMZ-1の各画分に含まれるグリチルリチン酸およびフラボノイド類の含量を第2表に示した。フラボリッチ画分にはグリチルリチン酸が含まれず, リクイリチゲニン, イソリクイリチゲニンが多く含まれ, 配糖体はほとんど含まれていない。一方, グリチリッチ画分はその逆で, グリチルリチン酸が多く, フラボノイド(アグリコン)は少ない。なお供試したMZ-1は製造初期(2002年頃)のもので, 品質管理が確立した第1表に示すMZ-1とはフラボノイド含量が一部異なる。

4回の接種試験のうち1回は激発して, 発病程度別の調査であったため, 病斑数のデータのある3回

の試験の平均を第3図に示した。この試験ではフラボリッチ画分およびMZ-1では3回の試験とも、ごくわずかのべと病しか発生せず、高い発病抑制効果を認めた。なお、対照区の試験間の変動が大きいため、Tukey-Kramer法の検定で有意差は示せなかった。一方、グリチリッチ画分にも程度は低いが対照に比べ発病抑制効果が認められた。写真2にMZ-1散布処理後にべと病菌を接種した時の発病抑制効果を示した。



第3図 MZ-1分画物のキュウリべと病発病抑制効果

各物質供試濃度：1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，エラーバーは標準誤差。反復間の変動が大きいため処理間に有意差はなかった (Tukey-Kramer法)。なお、病斑数が少ない場合は、無発病と区別するためデータを記載した。以下の図でも同じ。

## 2 フラボノイド類の発病抑制効果

### 1) 材料および方法

#### (1) 試験1

前節の試験でフラボリッチ画分に発病抑制効果を認めたため、MZ-1に含まれるフラボノイド類の発病抑制効果について検討した。MZ-1に含まれるリクイリチン、イソリクイリチンおよびそれらのアグリコンであるリクイリチゲニンおよびイソリクイリチゲニンを供試した。MZ-1 (100 g) をHP-20カラムクロマトでEtOH濃度を段階的に上昇させて溶出させ、4分画を得た。このうち50%EtOH + 70%EtOH溶出部をODSカラムクロマト (40%メタノールで溶出、以下MeOH) で3分画した。フラクション1をSiO<sub>2</sub>カラムクロマト (クロロホルム：MeOH = 5：1) で分画して得られた粗分画について再結晶を行い、リクイリチンを得た。フラクション2より同様にイソリクイリチンを得た。99%EtOH溶出部をODSカラムクロマト (60%MeOH) で分画して得られた粗分画から再結晶によりイソリクイリチゲニンを得た。また、ODSカラムクロマト (40%MeOH) で得られた粗分画からリクイリチゲニンを得た。これらのフラボノイドは標品とTLCおよび<sup>13</sup>C-NMRデータの比較により同定した。

試験1としてリクイリチン、イソリクイリチン、リクイリチゲニンおよびイソリクイリチゲニンについて発病抑制効果を検討した。イソリクイリチン、リクイリチゲニンおよびイソリクイリチゲニンについては99%EtOHに溶解したあと、蒸留水で20倍希釈して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。リクイリチンは50%EtOHに溶解したあと、蒸留水で20倍希釈し100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と



写真2 MZ-1のキュウリべと病に対する発病抑制効果

(MZ-1の処理濃度：1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )

した。MZ-1は直接蒸留水に溶解し100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。これらをキュウリ4株に噴霧し、風乾後にべと病菌を接種した。試験は2回反復した。なお、以後の試験では比較対象のMZ-1濃度は、陽性対象として効果が確実に確認できる1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。一部試験で供試フラボノイド濃度が100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合、MZ-1も同濃度に設定した場合もあるが、例外もあり厳密には区別していない。

#### (2) 試験2

試験1で効果の高かったイソリクイリチゲニンおよびリクイリチゲニンにMZ-1に含まれるリコカルコンAを加え、MZ-1を対照にして試験した。リコカルコンAおよびイソリクイリチゲニンはともにカルコン骨格<sup>28)</sup>(第1図)を持つ黄色のフラボノイドである。前述の3種フラボノイドは99%EtOHに溶解後、蒸留水で20倍希釈して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。この試験は2回反復した。

#### (3) 試験3

試験3として*G. glabra*に特異的なフラボノイドであるグラブリジン(丸善製薬精製品、第1図)を加え、上述の5種のフラボノイドと発病抑制効果を比較した。リクイリチン以外のフラボノイドは99%EtOHに溶解後、蒸留水で20倍希釈して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。この試験ではリクイリチンは70%EtOHに溶解後、蒸留水で20倍希釈した。その他は試験1, 2と同様である。ただし、MZ-1のみ濃度を1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。

#### (4) 試験4

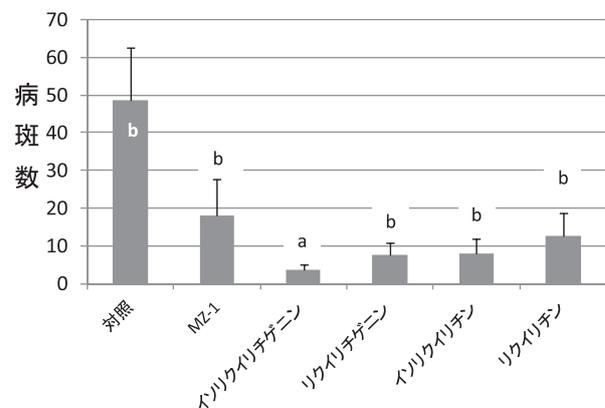
試験4としてカンゾウ以外の植物に含まれるフラボノイドの発病抑制効果を検討した。イソリクイリチゲニンと同じカルコン骨格を持つカーサミン、リクイリチゲニンと同じフラバノン骨格<sup>28)</sup>(第1図)を持つヘスペリジン、ナリンゲニンおよびその配糖体ナリンギンを供試した。これらはいずれも市販試験薬(和光純薬製)を供試した。ナリンゲニンおよびナリンギンは99%EtOHに溶解後、蒸留水で20倍希釈して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。カーサミンは蒸留水に溶解して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ としたが、ヘスペリジンは水、99%EtOHのいずれにも溶解しなかったため、蒸留水懸濁液の状態ですべて供試した。対照のMZ-1のみ濃度は1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。野方<sup>32)</sup>によると、ナリンギンおよびヘスペリジンはカンキツに多く含まれるフ

ラボノイドで、仮にこれらに強い発病抑制効果があれば、通常廃棄されているカンキツ果汁搾汁残渣などが病害防除素材になると考えたためである。

## 2) 結果および考察

### (1) 試験1

2回の試験の平均を第4図に示した。供試したフラボノイドは配糖体およびアグリコンとも発病抑制効果があり、特にイソリクイリチゲニンの効果が大きく、対照とTukey-Kramer法の検定で5%有意差が認められた。また配糖体よりアグリコンの方が効果が高い傾向であった。一般に健全植物ではフラボノイド類はpost-inhibitins<sup>8)</sup>(感染後に化学変化して抗菌活性化するもの)として不活性な配糖体として液胞に貯蔵されており、これが病原菌の侵入やエリシター処理によりグリコシダーゼの酵素作用で抗菌活性を有するアグリコンに変わることがよく知られている<sup>13)</sup>。これは細菌に対するデータであるが、Puupponen-Pimiä *et al.*<sup>42)</sup>はフィンランドベリーから抽出した多数のフェノール物質の抗菌活性を調査した。その中でQuercetinとその配糖体Isoquercitrinの細菌に対する抗菌活性を比較すると、Quercetinの方が抗菌活性が高いことを示した。配糖体の方がアグリコンより分子量が大きく、同じ100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であってもモル濃度が低いことは考慮しなければならないが、本論文の引用文献<sup>1, 6, 7, 12, 27, 40, 42)</sup>では各物質の抗菌活性を $\mu\text{g}/\text{mL}$ で比較しているため、本論文でもそれに従った。



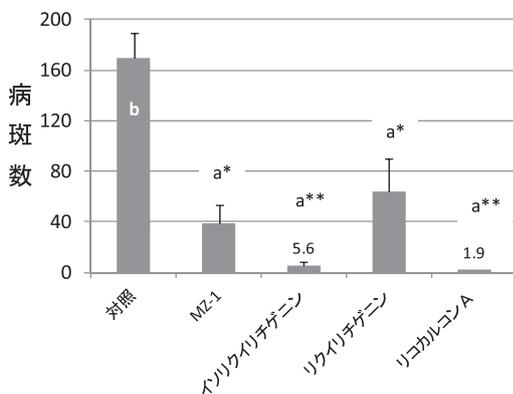
第4図 MZ-1に含まれるフラボノイドのキュウリべと病発病抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，異なる英字間には5%有意差あり(Tukey-Kramer法)。

なお、MZ-1の効果は各フラボノイド単独よりやや劣ったが、これはMZ-1に含まれる4種フラボノイド含量の合計は最も多いもので15%であるため(第1表)、MZ-1と各フラボノイド類とを同一濃度(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ )で供試した場合は発病抑制効果が劣ると考えられた。

## (2) 試験2

2回の反復の平均を第5図に示した。対照とMZ-1、リクイリチゲニンとの間には5%有意差、対照とイソリクイリチゲニン、リコカルコンAとの間にはTukey-Kramer法で1%有意差があったが、リクイリチゲニンの効果はやや劣った。なお、リクイリチ

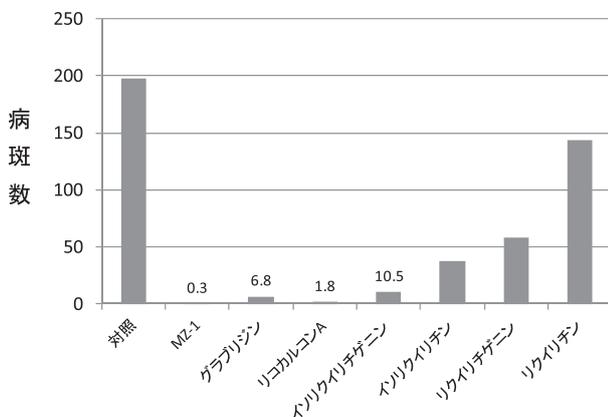


第5図 イソリクイリチゲニン、リクイリチゲニンおよびリコカルコンAのキュウリペと病発病抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，異なる英字間には有意差あり(Tukey-Kramer法)。

a\*：対照とMZ-1，リクイリチゲニン間には5%有意差，

a\*\*：対照とイソリクイリチゲニン，リコカルコンA間には1%有意差あり。



第6図 グラブリジンおよびMZ-1に含まれるフラボノイド類のキュウリペと病発病抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ，ただしMZ-1のみ1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

ゲニンは、マメ科植物のアルファルファ (*Medicago sativa* Linné)，コマツブウマゴヤシ (*M. lupulina* Linné) が病原糸状菌 (*Helminthosporium carbonum* Ullstrup) の感染を受けたときに生成されるファイトアレキシンとして報告があり<sup>9)</sup>，抗菌活性を有すると考えられる。

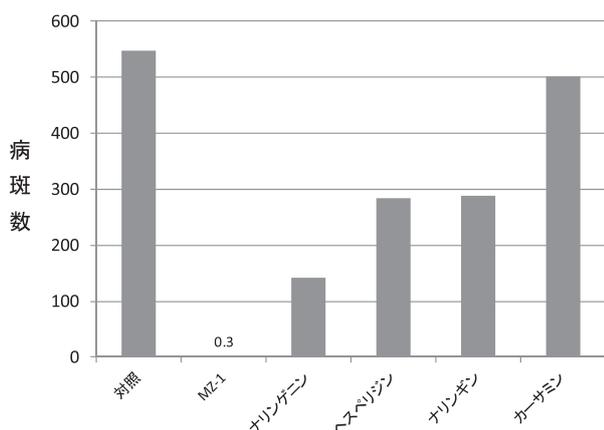
## (3) 試験3

第6図に結果を示した。グラブリジンはリコカルコンA，イソリクイリチゲニンと同様に100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で高い発病抑制効果を示した。Okada *et al.*<sup>40)</sup>によると、リコカルコンAとグラブリジンのグラム陰性細菌(2種)に対する抗菌活性(*in vitro*でのMIC値)は同等であるが、酵母類および糸状菌(各2種)に対しグラブリジンは7.81~31.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のMIC値を示すのに対し、リコカルコンAはいずれも>250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。このことから考えると、植物病原糸状菌に対してもグラブリジンの方が高い抗菌活性を示すことが想定されるが、試験3ではともに同等の高い発病抑制効果を示した。べと病菌は分類学上クロミスタ界(卵菌門)に属し、Okada *et al.*<sup>40)</sup>が供試した糸状菌(*M. pusillus*, *Aspergillus niger* Tiegh)は菌界(接合菌門、子囊菌門)に属するなど両者は分類学的、形態的に大きく異なる<sup>35)</sup>ことが影響していると考えられる。

また試験1と同様、イソリクイリチゲニン、リクイリチゲニンとその配糖体を比較するとアグリコンであるイソリクイリチゲニン、リクイリチゲニンの方が発病抑制効果が高かった。この試験ではMZ-1は1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で試験したため、第4図、第5図に比べ発病抑制効果が高かった。なお、配糖体のリクイリチゲニンの発病抑制効果は試験1に比べるとやや低かったが、この試験では対照区の発病程度が高かったことなどの要因も考えられる。

## (4) 試験4

第7図に結果を示した。ナリンゲニン、ヘスペリジンおよびナリンギンは供試濃度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で試験したが、ナリンゲニンでは病斑数が対照の約1/4、ヘスペリジンおよびナリンギンでは約1/2となり発病抑制効果が見られたが、カーサミンはほとんど効果がなかった。MZ-1は濃度1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で試験したため、ほとんど発病しなかった。アグリコンのナリンゲニンの方が配糖体より効果が高いのは、イソリ



第7図 カンキツなどに含まれるフラボノイド類のキュウリべと病発病抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL，ただしMZ-1のみ1,000 $\mu$ g/mL.

クイリチゲニンおよびリクイリチゲニンの場合と同じであった。

Padmavati *et al.*<sup>41)</sup>によるとナリンゲニンはイネの白葉枯病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Ishiyama) Swings *et al.*) の生育抑制，いもち病菌 (*Pyricularia oryzae* Cavara) の孢子発芽阻害作用があったが，紋枯病菌 (*Rhizoctonia solani* J.G. Kühn) には抗菌活性を認めなかった。なお，直接比較は行っていないが，第6図，第7図のMZ-1の相対比較から考えると，ナリンゲニンのキュウリべと病の発病抑制効果はグラブリジン，リコカルコンAより劣ると考えられる。

### 3 グリチルリチン酸類の発病抑制効果

前節の試験ではMZ-1のグリチルリチン酸を含む画分 (グリチルリッチ画分) にも弱いながら発病抑制効果が認められたため，グリチルリチン酸類の発病抑制効果について試験した。

#### 1) 材料および方法

##### (1) 試験1

供試物質は，グリチルリチン酸，グリチルリチン酸二カリウム (以下グリチルリチン酸K2)，グリチルリチン酸二ナトリウム (以下グリチルリチン酸Na2) およびグリチルレチン酸 (グリチルリチン酸のアグリコン) について発病抑制効果を調査した。これらの物質はいずれも甘草根およびMZ-1に含まれているが，試験には市販試薬 (和光純薬製) を供

試した。

まず，これらの供試濃度を1,000 $\mu$ g/mLとした試験を行った。試験は2回に分けて行い，まずMZ-1，グリチルリチン酸，グリチルリチン酸K2，グリチルリチン酸Na2について試験した。次に，MZ-1，グリチルリチン酸，グリチルレチン酸について試験した。グリチルリチン酸およびグリチルレチン酸は99% EtOHで溶解後，散布直前に蒸留水で20倍希釈して1,000 $\mu$ g/mLとした。なお，グリチルレチン酸は蒸留水で20倍希釈すると白濁した。その他の物質および対照のMZ-1は蒸留水に溶かして1,000 $\mu$ g/mLとした。散布・風乾後にべと病菌を接種した。

##### (2) 試験2

試験1で供試した物質の濃度を100 $\mu$ g/mLに下げた試験を行った。この試験は2回反復した。なお，グリチルレチン酸は99% EtOHに可溶であるが，蒸留水で希釈すると100 $\mu$ g/mLでも薄く白濁した。

また，天然甘草およびMZ-1には含まれないが，グリチルレチン酸の誘導体であるグリチルレチン酸ステアリル (第1図) についても参考のため比較試験を行った (反復無し)。グリチルレチン酸ステアリルはグリチルレチン酸の脂溶性を向上させるためステアリルアルコールをエステル結合した合成品で，化粧品に汎用されている。いずれも99% EtOHに溶解後，100 $\mu$ g/mLに調整した。

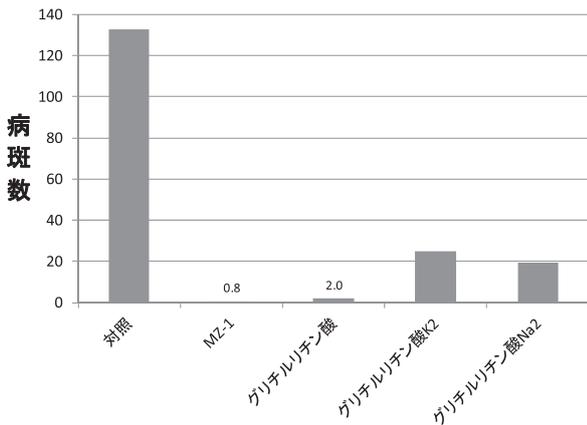
##### (3) 試験3

グリチルレチン酸はテルペン類の中でも5環性トリテルペンに分類されるが，グリチルレチン酸以外の5環性トリテルペンも発病抑制効果を有するか試験した。供試した物質は，オレアノール酸，ヘテラゲニン，ウルソール酸およびヘコゲニンである。これらは丸善製薬精製品を供試した。いずれも99% EtOHに溶解後，散布直前に蒸留水で20倍希釈して100 $\mu$ g/mLとした。

#### 2) 結果および考察

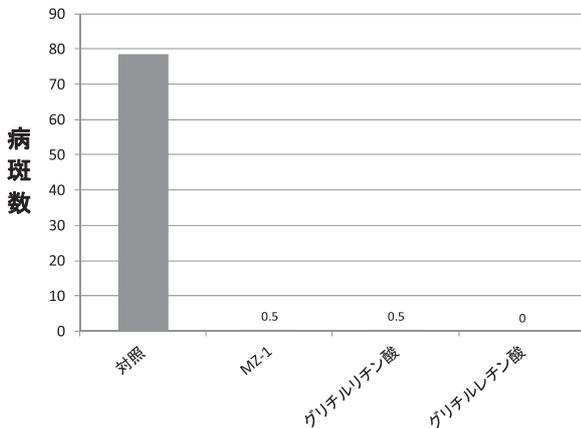
##### (1) 試験1

第8図，第9図に結果を示した。MZ-1およびグリチルリチン酸は1,000 $\mu$ g/mLで高い発病抑制効果を認め，ほとんど病斑が発生しなかった。グリチルリチン酸のK塩，Na塩はやや劣ったが，発病抑制効果が認められた。また，グリチルレチン酸はグリチル



第8図 グリチルリチン酸およびそれらの塩類のキュウリベと病発病抑制効果

各物質供試濃度：1,000 $\mu$ g/mL



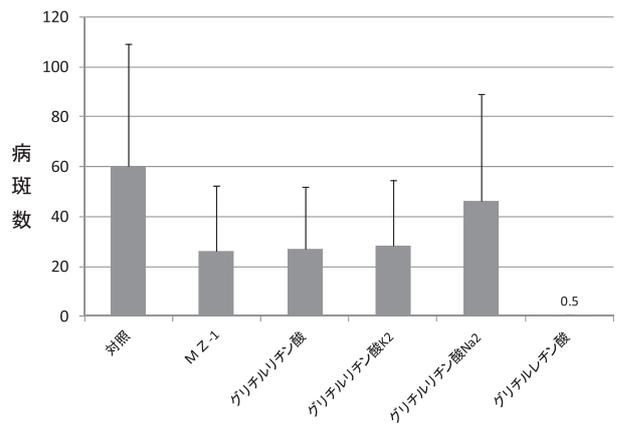
第9図 グリチルリチン酸およびグリチルレチン酸のキュウリベと病発病抑制効果

各物質供試濃度：1,000 $\mu$ g/mL

リチン酸と同等の高い発病抑制効果を示した。グリチルリチン酸はMZ-1のグリチリッチ画分に約18%含まれているが(第2表), 第3図に示したように, 当画分によるべと病の発病抑制効果が低い。しかし, 第3図では当画分の1,000倍希釈液であるため, グリチルリチン酸濃度は約180 $\mu$ g/mLとなり, 第8図の1,000 $\mu$ g/mLより低いことが原因と考えられる。

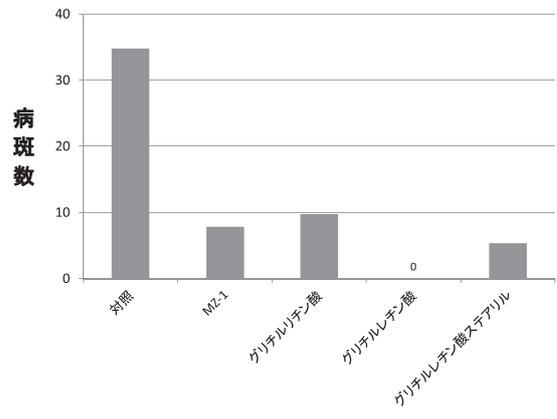
(2) 試験2

供試濃度を100 $\mu$ g/mLとした試験について, 2回の試験の平均を第10図に示した。2回の試験で同じ傾向であったが, グリチルレチン酸を除き変動が大きいため, Tukey-Kramer法の検定で有意差は認められなかった。試験1に比べ供試濃度が1/10のため, MZ-1, グリチルリチン酸およびそのK塩,



第10図 グリチルリチン酸とその塩類およびグリチルレチン酸のキュウリベと病発病抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL. 反復間で同じ傾向であるが, 反復間の変動が大きいため, 有意差なし (Tukey-Kramer法)。

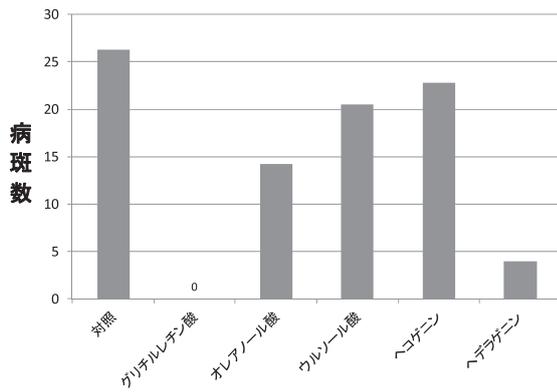


第11図 グリチルレチン酸およびグリチルレチン酸ステアarylのキュウリベと病発病抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL

Na塩は発病抑制効果が低かったが, グリチルレチン酸は100 $\mu$ g/mLでも非常に高い発病抑制効果を示した。グリチルレチン酸はMZ-1に約0.9%含まれており(第1表), MZ-1の発病抑制効果に寄与していると考えられる。

第11図にグリチルレチン酸ステアarylを供試した結果(反復無し)を示した。この試験では, 対照区の発病程度がやや低かったが, グリチルレチン酸は全く病斑が生じなかったのに対し, グリチルレチン酸ステアarylはグリチルリチン酸と同程度の病斑が生じ, グリチルレチン酸ステアarylの防除活性はグリチルレチン酸に劣ると考えられた。なお, グリチルレチン酸ステアarylの分子量は722.6でグリチルリチン酸(同822.4)より小さいが, グリチルレ



第12図 グリチルレチン酸および各種5環性トリテルペンのキュウリべと病発病抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL

チン酸（同470.3）よりは大きい。グリチルレチン酸の効果が高いのは、単にモル濃度の違いなのか、抗菌性に関与する官能基が保護されているのかについては検討を要する。以上、第10図、第11図の結果から、グリチルレチン酸は100 $\mu$ g/mLの濃度で高い発病抑制効果を示すと考えられた。

### (3) 試験3

結果を第12図に示した。本試験でもグリチルレチン酸は全く病斑が生じず、ヘデラゲニンはオレアノール酸、ウルソール酸、ヘコゲニンに比べると発病抑制効果が高かった。しかし、グリチルレチン酸に比べるとこれらの物質の発病抑制効果は劣った。このようにグリチルレチン酸は供試した5環性トリテルペンの中では発病抑制効果が高い物質と考えられる。なお、オレアノール酸はテンサイ、オリーブ葉、リンゴ皮、チョウジの芽、ウルソール酸はリンゴ、サクランボの果実および葉、ヘデラゲニンはウコギ科のセイヨウキズタ (*Hedera helix* Linné) およびムクロジ属植物 (*Sapindus* sp.)、ヘコゲニンはリュウゼツラン科の *Agave deserti* Engelman に含まれる物質である<sup>11)</sup>。

## 4 MZ-1のキュウリべと病に対する発病抑制機作

### 1) 材料および方法

#### (1) 遊走子接種に対するMZ-1の発病抑制効果

上述の接種試験では、べと病菌の分生子液を供試してきた。しかし、キュウリべと病菌は分生子が発芽して放出された遊走子が泳動後、キュウリ葉上で被囊胞子となり、ここから発芽管を出して気孔侵入

する<sup>53)</sup>。このためMZ-1は遊走子接種に対しても効果があるのか明らかにするため、MZ-1 (1,000 $\mu$ g/mL) を噴霧・風乾後に病斑より採取直後の分生子液と採取後常温で約90分静置して遊走子が泳動状態となった遊走子液を接種して発病抑制効果を比較した。

#### (2) MZ-1のべと病菌の遊走子放出への影響

MZ-1が分生子接種で発病抑制効果を示す機作として、分生子から遊走子の放出過程を抑制するか否か検討した。まず、MZ-1の最終濃度が1,000 $\mu$ g/mLとなるように、べと病菌分生子液（約500個/mL）とMZ-1水溶液（2,000 $\mu$ g/mL）を等量混合した胞子液1 mLを小型試験管に入れ、20 $^{\circ}$ C 24時間後に分生子の状態を顕微鏡観察した。なお、MZ-1の2,000 $\mu$ g/mL水溶液では、含有物の微結晶が生じて顕微鏡観察に支障を来すことがあったため、孔径0.45 $\mu$ mのメンブランフィルターで濾過したMZ-1溶液も同時に供試した。対照は蒸留水と胞子液の等量混合とした。次に、同様の試験をMZ-1の最終濃度が10,000 $\mu$ g/mL（1%）、1,000 $\mu$ g/mL（0.1%）および100 $\mu$ g/mL（0.01%）となるようにして実施した。この試験ではフィルター濾過は行わなかった。

#### (3) MZ-1のべと病菌遊走子におよぼす影響

MZ-1が泳動しているべと病菌遊走子の動きに影響をおよぼすか調査した。病斑より採取したべと病菌分生子胞子液を室温で約90分静置して分生子より放出された遊走子が活発に動いている遊走子液を供試した。この遊走子液とMZ-1を各々50、250、500および2,500倍に希釈した液とを等量混合し、MZ-1の最終濃度を各々10,000、2,000、1,000、200 $\mu$ g/mLとした。この混合液を50 $\mu$ lずつ窪み付きスライドグラスに滴下して、遊走子の運動状況に変化が生じるか観察した。

#### (4) べと病菌感染後のMZ-1の発病抑制効果

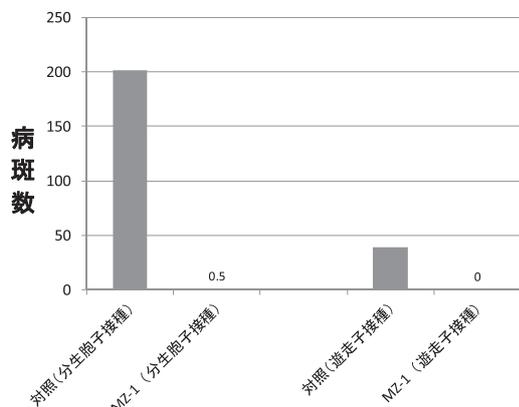
これまでは、MZ-1散布・風乾後にべと病菌を接種する方法で検定したが、順序を逆にして、べと病菌感染後の発病抑制効果について検討した。まず、キュウリにべと病菌分生子液を噴霧接種し、全体をポリ袋で覆って保湿し25 $^{\circ}$ Cの部屋に置いた。接種6時間後、12時間後および24時間後にポリ袋を開けてMZ-1の1,000 $\mu$ g/mL液を噴霧し再度ポリ袋を閉じて保湿した。接種後2日間保湿した。

## 2) 結果および考察

### (1) 遊走子接種に対するMZ-1の発病抑制効果

供試した採取直後の分生子液は分生子濃度が約550個/mLであったが、氷冷しても接種時には少数の遊走子が放出され、約55個/mLの遊走子が観察された。原<sup>5)</sup>によると、分生子1個からは6～8個遊走子が放出されるので、推定では約550個/mLの分生子のうち、約8個/mLの分生子から遊走子が放出されたことになる。

一方、常温静置後の孢子液ではほとんどすべての分生子から遊走子が放出され、分生子は空の状態、多数の遊走子が盛んに泳動していた。それらを接種した試験結果を第13図に示したが、MZ-1は分生子のほか、遊走子接種でも発病を抑制した。なお、第13図では対照区で遊走子接種の病斑数が分生子接種に比べ少なかった。本試験以外に遊走子接種した際も対照区でほとんど病斑が生じないこともあった(データ省略)。キュウリべと病菌の遊走子が分生子



第13図 分生子および遊走子接種に対するMZ-1の発病抑制効果

MZ-1濃度：1,000 $\mu$ g/mL

の乳頭突起部分の孔から放出される際には柔軟に変形すること<sup>53)</sup>から、遊走子は柔らかいと考えられ、ガラス製噴霧器で加圧噴霧することで遊走子が損傷し結果として病斑形成が少なくなった可能性もある。

### (2) MZ-1のべと病菌の遊走子放出への影響

MZ-1の最終濃度を1,000 $\mu$ g/mL (0.1%)とした試験では、対照区では観察したすべての分生子(50～60個)で分生子が発芽して遊走子が放出され、空になった分生子のみであったが、MZ-1の1,000 $\mu$ g/mL区では分生子に細胞質が詰まった未発芽分生子のみであった。またフィルター濾過したMZ-1の1,000 $\mu$ g/mL区でも同様に未発芽の分生子のみであった。

次に最終濃度を10,000 $\mu$ g/mL, 1,000 $\mu$ g/mLおよび100 $\mu$ g/mLとした試験でも各濃度とも、発芽した空の分生子は見あらず、未発芽孢子のみであった(写真3, 10,000 $\mu$ g/mLについては写真省略)。一方、対照区ではほぼすべての分生子が発芽して、細胞質が空になっていた。このことから、MZ-1は分生子から遊走子が放出される過程を阻害すると考えられた。

### (3) MZ-1のべと病菌遊走子におよぼす影響

MZ-1濃度が1,000 $\mu$ g/mLおよび200 $\mu$ g/mLの溶液中では、数分以内に遊走子は運動を停止した。通常、鞭毛は泳動中は激しく動くため顕微鏡観察できないが、運動を停止すると長さの異なる2本の鞭毛が明確に観察できるようになった。さらに数分経つと、遊走子自体が崩壊して形態が不明になった。一方、対照のMZ-1無添加区では遊走子の動きに変化はなく、活発に運動していた。なお、MZ-1が低濃度の1,000 $\mu$ g/mLおよび200 $\mu$ g/mLで運動停止したため、高濃度の10,000 $\mu$ g/mLおよび2,000 $\mu$ g/mLでの変化

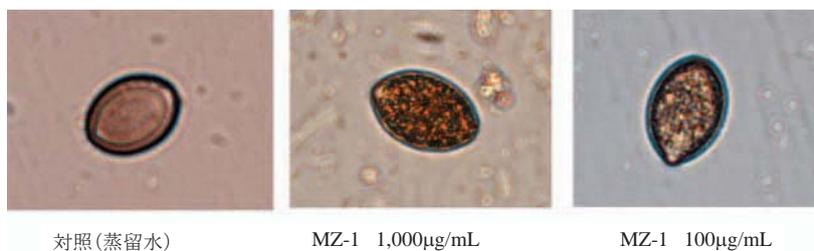


写真3 MZ-1の1,000 $\mu$ g/mL, 100 $\mu$ g/mL液中でのべと病菌分生子発芽阻害効果

20 $^{\circ}$ C 24時間後の状態、対照：分生子から遊走子が放出され細胞質が空になっている。  
MZ-1処理：細胞質が詰まっており未発芽であることを示す。

については観察を省略した。

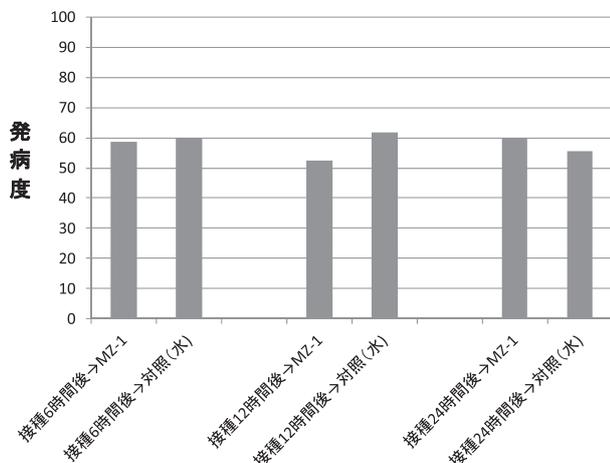
#### (4) べと病菌感染後のMZ-1の発病抑制効果

この試験では発病程度が高かったため、各葉を発病程度別に調査し、発病度を算出した。

べと病菌接種後にMZ-1を噴霧した場合、接種6時間後で既にMZ-1の発病抑制効果はほとんど認められなかった(第14図)。

反復無しの試験であるが、接種6時間後ではMZ-1と対照がほぼ同等、接種12時間後ではMZ-1がやや低く、接種24時間後ではMZ-1がやや多い結果となり、一定の傾向は認められなかった。接種6時間後にはMZ-1と対照がほぼ同等だったことから、接種6時間以降のMZ-1処理には発病抑制効果がないと判断した。

キュウリべと病の伝染環は以下のとおりである。米山<sup>53)</sup>によるとキュウリべと病菌の耐久器官である卵胞子については1933年以降日本国内で確認されておらず、キュウリが栽培されていない期間の生存場所については不明な点が多いが、第一次伝染により葉裏に形成された分生子は、成熟すると空気中に飛散してキュウリの葉に付着する。そこに水滴があると発芽して遊走子を放出する。また原<sup>5)</sup>によると、キュウリべと病菌分生子は適温の水の中では30～60分で2本の鞭毛を有する6～8個の遊走子を放出する。この遊走子は30～60分で鞭毛を失い、球形の被囊胞子となる。被囊胞子は約1時間後に発芽・伸長し、キュウリ葉の気孔から侵入感染する。



第14図 分生子接種後にMZ-1を処理した場合のキュウリべと病の発病抑制効果

MZ-1濃度：1,000 $\mu$ g/mL

MZ-1は分生子から遊走子の放出過程の阻害、遊走子の運動停止と崩壊を引き起こし、キュウリ葉への感染を防止すると考えられる。しかし、接種6時間以降の感染後には発病抑制効果が認められなくなる。

### Ⅲ MZ-1のキュウリ炭疽病に対する発病抑制効果

前報<sup>18)</sup>では以下のように報告した。まず、PDA培地上でのウリ類炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare* (Berk.) Arx) の菌糸伸長抑制率はMZ-1濃度1,000 $\mu$ g/mLで71%、100 $\mu$ g/mLで11%であった。MZ-1が1,000 $\mu$ g/mLの場合、炭疽病菌の孢子発芽率は0.3% (対照98.8%) に抑制された。鉢植えキュウリにMZ-1の10,000 $\mu$ g/mL (1%) 液散布・風乾後に炭疽病菌を接種した場合、病斑数は対照区の3%に抑制された。このようにキュウリ炭疽病に対してもMZ-1は効果が高かった。そこで、キュウリべと病と同様にMZ-1の主要成分の発病抑制効果を調査した。

#### 1 MZ-1分画物の発病抑制効果

##### 1) 材料および方法

##### (1) 供試植物および処理、病原菌接種方法

キュウリ炭疽病についてもべと病と同様の方法でMZ-1の主要成分の発病抑制効果を検討した。供試品種、栽培条件、供試作物ステージ、供試株数、MZ-1、フラボノイド、グリチルリチン酸などの散布量、接種する炭疽病菌孢子液の量などもキュウリべと病の試験と同じである。

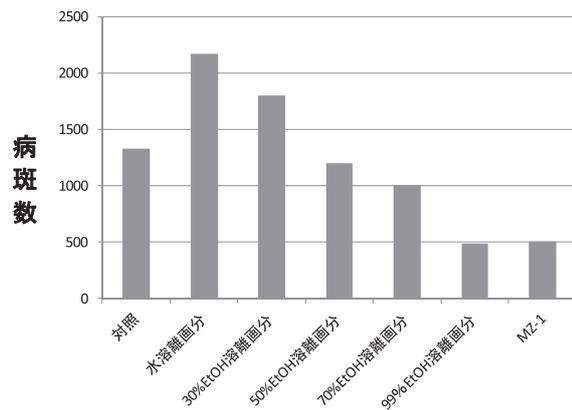
供試したウリ類炭疽病菌 (*C. orbiculare*) は京都大学大学院農学研究科植物病理学研究室分譲の菌株(104-T株)で、PDA培地(ニッスイ製)での培養菌そうを約5mm角に切り、滅菌した50%グリセリン溶液中で-80℃で冷凍保存した。この保存菌株をPDA培地に移植して25℃5～6日培養し、生じたオレンジ色の孢子塊を滅菌ニクロムループを使って水冷蒸留水で洗い出し、4重ガーゼで濾過した。水冷蒸留水で希釈し、孢子濃度を約1,000個/mLに調整し、孢子発芽を抑制するため接種終了時まで孢子液は水冷した。

##### (2) MZ-1分画物の発病抑制効果

第1図に準じて、MZ-1 10gを水90mLに溶解し、

第3表 MZ-1のEtOH溶離画分に含まれるフラボノイドおよびグリチルリチン酸の含量

	固形物重量 (g)	リクイリチン (%)	イソリクイリチン (%)	リクイリチゲニン (%)	イソリクイリチゲニン (%)	リコカルコンA (%)	グリチルリチン酸 (%)
水溶離画分	3.23	1.43	0.04	0	0	0	29.22
30%EtOH溶離画分	2.69	8.02	0.98	0	0	0	6.37
50%EtOH溶離画分	1.92	10.99	8.44	1.50	0.06	0	0
70%EtOH溶離画分	0.99	0	0.10	3.95	5.38	2.04	0
99%EtOH溶離画分	0.65	0	0	0	1.21	5.75	0



第15図 MZ-1の各溶離画分のキュウリ炭疽病発病抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL，ただしMZ-1のみ1,000 $\mu$ g/mL。

吸着樹脂（ダイヤイオンHP-20，100mL）に通し，水および30%～99%EtOH各300mLで疎水性の違いにより分画した．第1図と異なる点は，溶離EtOHの量である．各溶離画分を凍結乾燥後，各画分の固形量およびグリチルリチン酸含量，フラボノイド類含量をHPLCで分析した．HPLC条件は特許公報記載<sup>37)</sup>の方法によった．水抽出および30%～99%EtOH抽出物（各20mg）をそれぞれ蒸留水，30%～99%EtOH 10mLに溶解したあと，キュウリに散布直前に蒸留水190mLを加えて濃度100 $\mu$ g/mLとした．キュウリに散布し，風乾後に炭疽病菌を接種した．比較対照のMZ-1は1,000 $\mu$ g/mL水溶液を噴霧した．

## 2) 結果および考察

### (1) MZ-1分画物の発病抑制効果

各画分に含まれるグリチルリチン酸およびフラボノイド類の含量を第3表に示した．溶離EtOH濃度が高くなると，グリチルリチン酸およびフラボノイド配糖体が減少し，またフラボノイドアグリコンの

含量が高まった．特に99%EtOH溶離画分ではリコカルコンAの濃度が高くなった．

発病抑制効果との関係は第15図に示した．溶離EtOH濃度の上昇とともに発病抑制効果が高まる傾向であった．水溶離および30%～70%EtOH溶離画分では100 $\mu$ g/mLの濃度では，ほとんど発病抑制効果が見られないか，逆に促進した．99%EtOH溶離画分（100 $\mu$ g/mL）およびMZ-1（1,000 $\mu$ g/mL）はともに対照の1/2以下に病斑が減少し，発病抑制効果が認められた．

## 2 フラボノイド類の発病抑制効果

### 1) 材料および方法

#### (1) 試験1

前節の試験で，フラボノイド含量の高い画分ほど発病抑制効果が高くなったため，MZ-1に含まれる各フラボノイドおよび*G. glabra*に含まれるグラブリジンを生供試して炭疽病発病抑制効果を検定した．使用したフラボノイド類はキュウリべと病の試験に用いたものと同じである．各フラボノイド類の供試濃度は100 $\mu$ g/mLとした．試験は2回反復した．MZ-1のみ1,000 $\mu$ g/mLとした．

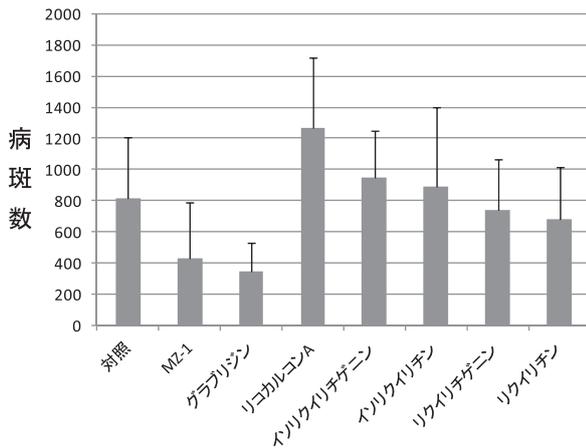
#### (2) 試験2

さらにべと病の試験同様，カンゾウ以外の植物に含まれるフラボノイドの発病抑制効果を検討した．ヘスペリジン，ナリンゲニン，その配糖体のナリンギンおよびカーサミンを生供試した．各フラボノイドの溶解および希釈方法はべと病の試験と同じで，濃度100 $\mu$ g/mLとした．MZ-1のみ1,000 $\mu$ g/mLとした．

## 2) 結果および考察

### (1) 試験1

結果を第16図に示した．2反復間で同じ傾向であったが，反復間の変動が大きいので，Tukey-Kramer



第16図 グラブリジンおよびMZ-1に含まれるフラボノイド類のキュウリ炭疽病発病抑制効果

反復間で同じ傾向であるが、反復間の変動が大きいため有意差なし (Tukey-Kramer法)。

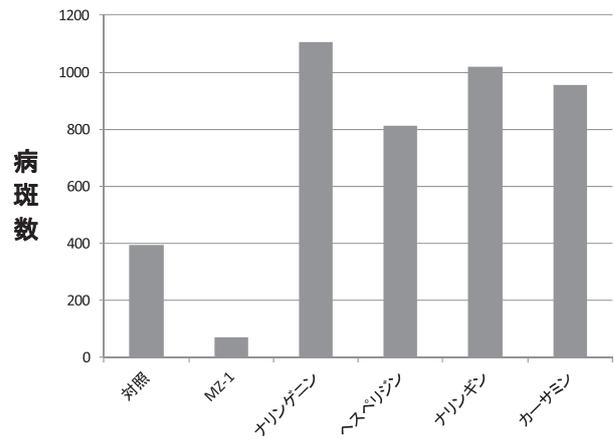
各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL，ただしMZ-1のみ1,000 $\mu$ g/mL。

法の検定で有意差が認められなかった。

グラブリジンでは病斑数が対照の約1/2となり発病抑制効果を示したが、リコカルコンA、イソクイリチゲニン、リクイリチゲニンなどのフラボノイド類には発病抑制効果が認められなかった。このようにグラブリジンには発病抑制効果が認められるが、リコカルコンAなどのフラボノイド類には100 $\mu$ g/mLの濃度では、発病抑制効果が認められなかった点は2回の反復とも同じであった。Okada *et al.*<sup>40)</sup>によると、グラブリジンは糸状菌 (*A. niger*) に対し31.3 $\mu$ g/mLのMIC値を示すのに対し、リコカルコンAは>250 $\mu$ g/mLとなっている。ウリ類炭疽病菌も *A. niger* もともに、子囊菌門に属する糸状菌であるため、リコカルコンAを100 $\mu$ g/mLで処理しても、発病抑制効果が認められなかったと考えられる。

#### (2) 試験2

第17図に結果を示したが、供試したヘスペリジンなどの各フラボノイドは100 $\mu$ g/mLの濃度では、炭疽病に対し全く発病抑制効果がなかった。前述の試験1と合わせて考えると、グラブリジンは別として、リコカルコンA、イソクイリチゲニン、リクイリチゲニンなどのフラボノイド類あるいはカンキツに含まれるフラボノイド類を100 $\mu$ g/mL濃度でキュウリ葉に散布しても、炭疽病発病抑制効果が望めないと考えられた。



第17図 MZ-1およびカンキツなどに含まれるフラボノイド類のキュウリ炭疽病発病抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL，ただしMZ-1のみ1,000 $\mu$ g/mL。

### 3 グリチルリチン酸類の発病抑制効果

べと病の試験と同様に、グリチルリチン酸類の炭疽病発病抑制効果を検定した。

#### 1) 材料および方法

##### (1) 試験1

べと病の試験と同様に、MZ-1に含まれるグリチルリチン酸およびグリチルレチン酸ならびに参考としてグリチルリチン酸の関連物質について検討した。供試物質はグリチルリチン酸、グリチルレチン酸のほか、グリチルレチン酸モノグルクロナイド (第1図)、グリチルレチン酸ステアシル (後者の2種は丸善製薬精製品) を供試した。グリチルレチン酸はグリチルリチン酸に結合している2分子のグルクロン酸がすべて除かれたアグリコンであるが、グリチルレチン酸モノグルクロナイドとは2分子のグルクロン酸から1分子のみを加水分解で除いたもので、MGGRと略称する。非常に甘味が強く、グリチルリチン酸の約5倍、蔗糖の約940倍の甘味を有する物質である<sup>26)</sup>。グリチルレチン酸ステアシルはキュウリべと病の試験で用いたものと同じである。いずれも天然の甘草根やMZ-1には含まれていない。各物質は99% EtOHに溶解後、散布直前に蒸留水で20倍に希釈して100 $\mu$ g/mLとした。MZ-1は蒸留水に溶かして100 $\mu$ g/mLとした。キュウリに散布・風乾後に炭疽病菌を接種した。この試験は2回反復した。

##### (2) 試験2

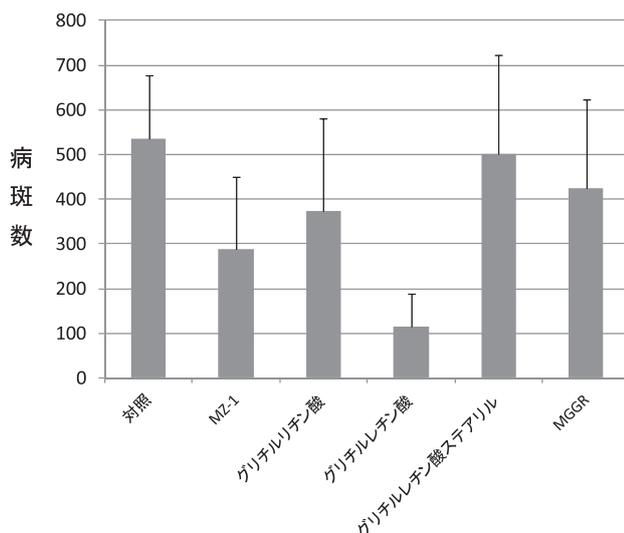
べと病の試験と同様にグリチルレチン酸以外の5

環性トリテルペンの発病抑制効果について試験した。べと病の試験で供試したオレアノール酸、ウルソール酸、ヘコゲニンのほか、参考として18- $\alpha$ グリチルレチン酸（シグマアルドリッチ製）も供試した。グリチルレチン酸には環系骨格の18位の炭素-水素結合（第1図）の向きが異なる $\alpha$ 、 $\beta$ の立体異性体がある。これまで供試してきたグリチルレチン酸は18- $\beta$ グリチルレチン酸のことで、甘草に含まれるグリチルリチン酸のアグリコンである。本論文では特に断らない限り“グリチルレチン酸”とは18- $\beta$ グリチルレチン酸を意味する。一方、18- $\alpha$ グリチルレチン酸は天然甘草根には含まれず、アルカリ処理によって合成される<sup>54</sup>。これはMZ-1には含まれていないが、主に化粧品に使用される物質である。各物質は99% EtOHに溶解後、散布直前に蒸留水で20倍に希釈して100 $\mu$ g/mLとした。なお、この試験ではべと病の試験で供試したヘデラゲニンは供試しなかった。

## 2) 結果および考察

### (1) 試験1

試験結果を第18図に示した。グリチルレチン酸が最も発病抑制効果が高く、同じ100 $\mu$ g/mLのMZ-1



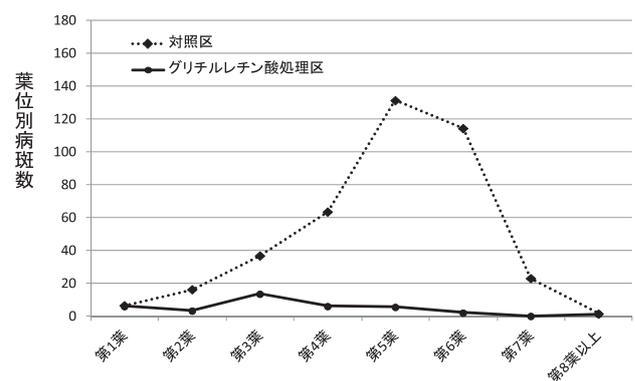
第18図 グリチルリチン酸およびグリチルレチン酸などのキュウリ炭疽病発病抑制効果

反復間で同じ傾向であるが、反復間の変動が大きいため、有意差なし (Tukey-Kramer法)。

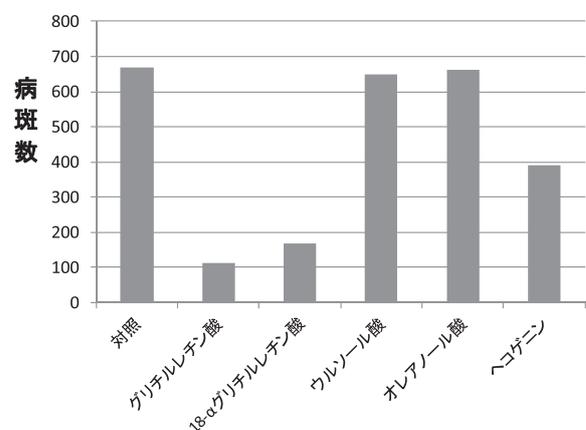
各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL, MGGR：グリチルレチン酸モノグルクロナイド。

に優る傾向であった。グリチルリチン酸およびその誘導体には発病抑制効果はみられるものの、グリチルレチン酸に比べるとその程度は低かった。Naidu et al.<sup>27</sup> はワタの病原糸状菌 (10種類) に対するグリチルレチン酸およびグリチルリチン酸の *in vitro* の抗菌検定 (濃度1,000 $\mu$ g/mL) を行い、供試した10種糸状菌ともグリチルレチン酸の方が阻止円が大きかった。また、細菌 (*Staphylococcus epidermidis* Winslow & Winslow) に対するデータであるが<sup>12</sup>、MIC値はグリチルリチン酸が400 $\mu$ g/mLであるのに対し、グリチルレチン酸は12.5 $\mu$ g/mLと大幅に低く、抗菌性が高かった。

この試験で、グリチルレチン酸散布処理区での葉位別病斑数を第19図に示したが、第1葉から最上葉まで対照区に比べ常に病斑数を低く抑制していた。特に、接種時に頂葉であった第5葉、第6葉で



第19図 グリチルレチン酸処理キュウリにおける葉位別の炭疽病病斑数



第20図 グリチルレチン酸および5環性トリテルペンのキュウリ炭疽病発病抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL

は対照区で1枚あたり病斑数が100個以上発生したが、グリチルレチン酸散布区ではほとんど病斑が生じなかった。

## (2) 試験2

試験結果を第20図に示した。反復無しの試験であるが、グリチルレチン酸およびその立体異性体の18- $\alpha$ グリチルレチン酸にもグリチルレチン酸と同程度の発病抑制効果が認められた。その他のトリテルペン類の発病抑制効果は概して低くウルソール酸、オレアノール酸には発病抑制効果が認められなかった。

## 4 主要成分の炭疽病菌孢子発芽抑制効果

これまではフラボノイド類、グリチルリチン酸類の発病抑制効果について鉢植えキュウリを用いたポット試験で検定してきた。一方、*in vitro*での抗菌検定法として、孢子発芽試験法<sup>52)</sup>がある。そこで、本法でフラボノイド類、グリチルリチン酸類の孢子発芽阻害による抗菌検定を行った。

### 1) 材料および方法

#### (1) 試験1

リコカルコンA、イソリクイリチゲニン、リクイリチゲニン、イソリクイリチン、リクイリチン、グリチルレチン酸、グリチルリチン酸Na2のキュウリ炭疽病菌孢子発芽阻害効果を検定した。検定濃度は100 $\mu$ g/mLとした。グリチルリチン酸Na2以外の各物質は、99%EtOHに溶解して10,000 $\mu$ g/mL(1%)の原液を作製した。グリチルリチン酸Na2は50%EtOHに溶解して1%原液を作製した。

次にPDA培地で形成させた炭疽病菌孢子を蒸留水に懸濁した孢子液4.95mLと上記各物質の原液0.05mLを混合して、各物質の最終濃度を100 $\mu$ g/mLとした。

検定液に含まれるEtOHが孢子発芽に影響をおよぼす可能性があるため、対照①として溶媒の99%EtOH、対照②として50%EtOH、対照③として蒸留水を各々0.05mLと孢子液4.95mLと混合した区を設定した。各対照区のEtOH濃度は順に1%、0.5%および0%である。

この孢子液をスライドガラスに20 $\mu$ Lずつ3カ所滴下し、100%湿度を保って25 $^{\circ}$ C 24時間後に発芽率

調査を行った。1カ所につき100~120個の孢子を調査した。本菌孢子は発芽直後に付着器を形成するため、付着器形成孢子を発芽孢子とした。

## (2) 試験2

次に、試験1で孢子発芽阻止効果の高かったリコカルコンA、イソリクイリチゲニンおよびグリチルレチン酸について、濃度を50 $\mu$ g/mLおよび10 $\mu$ g/mLに下げて試験した。試験方法などは試験1と同じであるが、対照には試験1の③蒸留水を供試した。

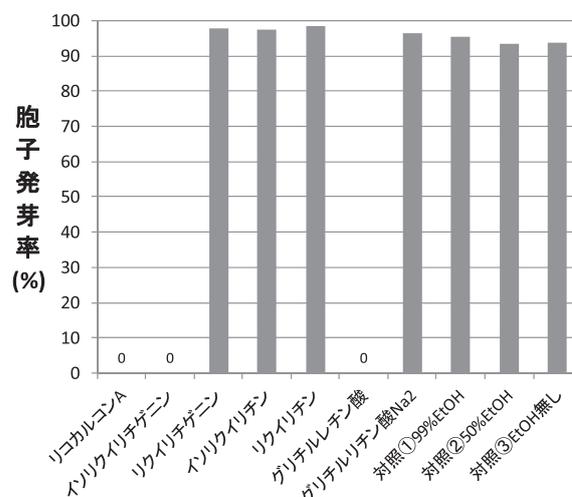
## 2) 結果および考察

### (1) 試験1

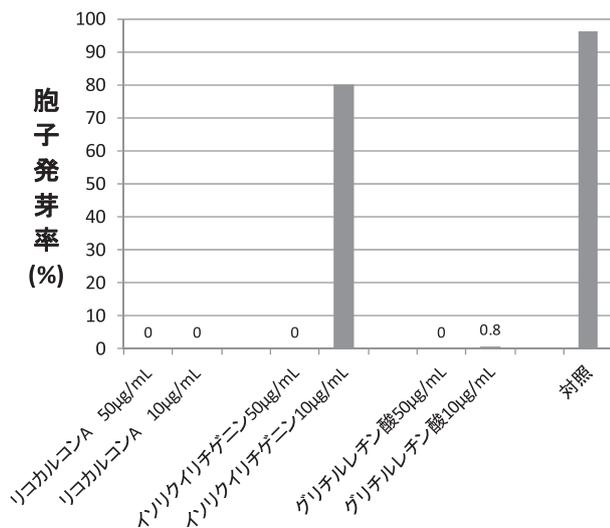
検定濃度を100 $\mu$ g/mLとした場合、リコカルコンA、イソリクイリチゲニンおよびグリチルレチン酸では孢子発芽を完全に阻止した(第21図)。一方、それ以外のフラボノイド、グリチルリチン酸、グリチルリチン酸Na2では対照区と発芽率がほぼ同じで、発芽阻止効果はなかった。また①、②、③の対照区間には発芽率の差が無く、溶媒のEtOHが0%~1%の濃度では孢子発芽に影響はないと判断した。

### (2) 試験2

検定濃度50 $\mu$ g/mLではリコカルコンA、イソリクイリチゲニンおよびグリチルレチン酸とも孢子発芽を完全に阻止した(第22図)。しかし、検定濃度10 $\mu$ g/mLではリコカルコンAおよびグリチルレチ



第21図 MZ-1に含まれるフラボノイド類およびグリチルリチン酸類のウリ類炭疽病菌孢子発芽阻害効果  
各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL



第22図 リコカルコンA, イソリクイリチゲニンおよびグリチルレチン酸のウリ類炭疽病菌孢子発芽阻害効果

ン酸はほぼ完全に発芽阻害したが、イソリクイリチゲニンでは阻止効果が低かった。このことから、キュウリ炭疽病菌孢子発芽阻害効果が特に高いものはリコカルコンAおよびグリチルレチン酸と考えられる。

前述したように、リコカルコンAの100µg/mL溶液をキュウリ葉に散布・風乾後に炭疽病菌を接種した場合は全く発病抑制効果がなかった。リコカルコンAはほとんど水に溶けないが、散布・風乾後に葉面に水滴（菌液）が付着してその中にリコカルコンAが溶け込む場合と *in vitro* でEtOH溶解後に水希釈した液の場合とでは状況が異なると考えられる。さらに *in vitro* での10µg/mL以下の濃度での発芽阻害試験などを行って、べと病菌の方がより低濃度のリコカルコンAに対して感受性が高いのかなどを調べる必要がある。

## 5 キュウリ褐斑病に対するグリチルレチン酸の発病抑制効果

前節の試験で明らかにしたように、キュウリべと病およびキュウリ炭疽病に対し、グリチルレチン酸の100µg/mL液散布は高い発病抑制効果を示したため、グリチルレチン酸のキュウリ褐斑病に対する発病抑制効果および抗菌活性を検討した。

## 1) 材料および方法

### (1) 発病抑制効果

グリチルレチン酸を99%EtOHに溶解し、蒸留水で20倍希釈して100µg/mLとした溶液をキュウリに散布した。対照は蒸留水散布とした。風乾後、キュウリ炭疽病菌およびキュウリ褐斑病菌 (*Corynespora cassiicola* (Berkeley & M.A. Curtis) C.T. Wei, MAFF 237272) 孢子液を噴霧し、25℃2日間保湿した。接種8日後に病斑数を調査した。

なお、キュウリ褐斑病菌は炭疽病菌と同様にPDA培地で25℃培養して得られた孢子懸濁液の孢子濃度を約300個/mLに調整して供試した。

### (2) 菌糸伸長抑制効果

寒天培地上でのキュウリ炭疽病菌、キュウリ褐斑病菌に対するグリチルレチン酸、グリチルレチン酸および参考としてグリチルレチン酸ステアリルを供試して菌糸伸長抑制効果を調査した。各物質20mgを2mLの99%EtOHに溶解し、加熱融解後約50℃まで冷却したPDA培地200mLに添加し（最終濃度100µg/mL）、シャーレに20mLずつ分注した。対照には2mLの99%EtOHをPDA培地に添加した。中央に各菌の菌そうディスク（径5mm）を置き、25℃で培養した。培養5日後および8日後に、菌そう直径を測定しディスク径を差し引いて、菌糸伸長量（mm）を算出し、対照区に対する伸長量の比率（%）を算出した。各試験区シャーレ5枚を供試した。

## 2) 結果および考察

### (1) 発病抑制効果

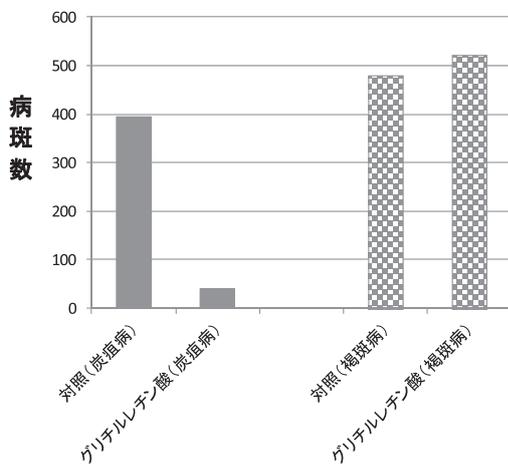
結果を第23図に示した。キュウリ炭疽病では、第18図と同様にグリチルレチン酸は高い発病抑制効果を示したが、キュウリ褐斑病に対しては100µg/mLの濃度では発病抑制効果が認められなかった。

### (2) 菌糸伸長抑制効果

培養8日後に調査した結果を第24図に示した。キュウリ褐斑病に対しては、グリチルレチン酸は菌糸伸長を約1/2に抑制し、グリチルレチン酸も同等の抑制効果があった。一方、キュウリ炭疽病に対しては、グリチルレチン酸の抑制率は約20%にとどまり、グリチルレチン酸には効果がなかった。これは前述の発病抑制効果と逆の結果になった。なお、

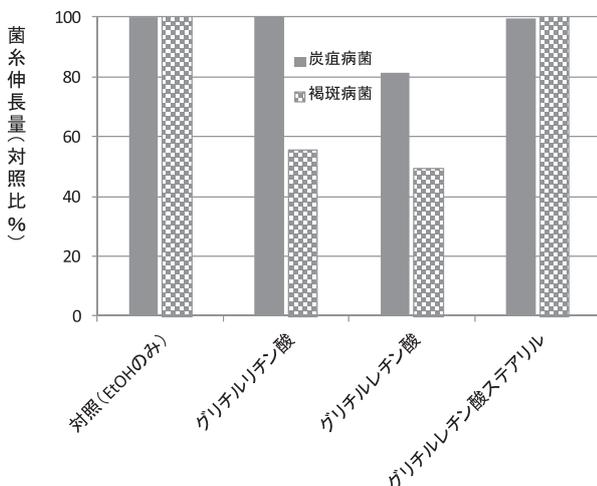
いずれの菌に対しても、グリチルレチン酸ステアリルは抗菌活性がなかった。このようにポット試験と *in vitro* の試験結果に違いがあるが、今後前節の試験と同様に炭疽病菌のほかに褐斑病菌の孢子発芽阻害効果を調べて検討する必要がある。

グリチルレチン酸 100 $\mu$ g/mL の炭疽病菌孢子発芽阻害（第21図）と菌糸伸長抑制効果（第24図）を比較すると、孢子発芽は100%抑制しているのに、菌糸伸長は約20%しか抑制していない。一般に寒天培地で抗菌検定を行う場合、抗菌力に影響する因子として、薬剤の溶解度、培地組成および培地への生体成分添加の影響が指摘されている<sup>52)</sup>。グリチル



第23図 グリチルレチン酸のキュウリ炭疽病および褐斑病に対する発病抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL



第24図 グリチルレチン酸のウリ類炭疽病菌およびキュウリ褐斑病菌に対する菌糸伸長抑制効果

各物質供試濃度：100 $\mu$ g/mL

レチン酸のように水で希釈した場合、白濁するものは、細かい粉体のような状態で培地上に存在するのでグリチルレチン酸分子と菌体の接触の点から見ると接触効率が低い。また、培地の pH あるいは PDA 培地に含まれるジャガイモ煎汁のような生体成分も影響を与える可能性が指摘されている<sup>52)</sup>。これらのことから炭疽病菌孢子発芽阻害と菌糸伸長抑制効果が一致しなかったと考えている。

#### Ⅳ 乾燥甘草根のエタノール抽出液の発病抑制効果

Ⅱ、Ⅲの各章では甘草根から工業的に抽出した甘草抽出物 MZ-1 について試験した。一方、甘草の根および根茎の乾燥品を数 mm に裁断したもの（以下甘草刻；写真 4）は日本薬局方の生薬として市販されている。一般には、甘草刻を水で煮詰めて滓を濾した煎汁を服用する。効果・効能は激しい咳、咽喉痛の緩解である<sup>28)</sup>。この甘草刻の EtOH などによる抽出液のキュウリ炭疽病およびべと病に対する発病抑制効果を試験し、あわせて抽出成分を MZ-1 と比較して、甘草刻抽出液の病害防除剤として利用の可否を検討した。

##### 1 キュウリ炭疽病に対する発病抑制効果

###### 1) 材料および方法

###### (1) 試験 1

以下の試験では市販の甘草刻（小林漢方製造）を供試した。甘草刻（Lot. 602010）25 g に対し、99% EtOH、50% EtOH および蒸留水 100 mL を加え



写真 4 甘草刻の外観

て室温で2日間浸漬後に4重ガーゼで濾過した液を抽出液とした。ここで、99%EtOHは主にフラボノイドのような油溶性成分抽出を目的とし、50%EtOHは油溶性および水溶性の両方の成分の抽出を目的とした。また、甘草刻25gに蒸留水100mLを加えて1時間沸騰水中で湯煎した熱水抽出液も作製した。抽出後は99%EtOHおよび50%EtOH抽出液は4℃保存、蒸留水抽出液および熱水抽出液は冷凍保存した。

これらの抽出液を蒸留水で10倍あるいは100倍希釈後、鉢植えキュウリに散布し、風乾後炭疽病菌を接種した。試験1、2および3では供試キュウリ数は各処理区3株とし、3株あたり希釈液150mLを散布し、炭疽病菌胞子懸濁液を50mL噴霧接種した。なお、100倍希釈液散布の試験は2回反復した。

### (2) 試験2

試験1で4重ガーゼで濾過した抽出液は保存中にタンパク質あるいは多糖類と考えられる沈殿物が生じたが、キュウリへの散布試験の際はこの沈殿物も攪拌して散布した。しかし、後述するように特に常温水抽出液の10倍希釈液散布では対照より発病が促進されるなど不自然な結果であった。そこで、この沈殿物が発病抑制効果を阻害していることが考えられたため、各抽出液をさらに濾紙(アドバンテックNo.2)で濾過した液について試験した。99%EtOH、50%EtOHおよび常温水抽出液について、濾紙濾過液の10倍希釈液を供試した。

### (3) 試験3

一般農家で甘草刻からEtOHで自家抽出して使用することを想定すると、99%EtOHは入手が難しいため、梅酒用ホワイトリカー(アルコール度数35)に浸漬して抽出することを試みた。甘草刻50gを市販の梅酒用ホワイトリカー200mLに20日間浸漬後、濾紙で濾過した。この試験ではLot. 602010およびLot. 902002の2種の甘草刻を供試した。なお、アルコール度数が低いため浸漬日数を20日とした。各抽出液の100倍希釈液を散布・風乾後に炭疽病菌を接種した。

## 2) 結果および考察

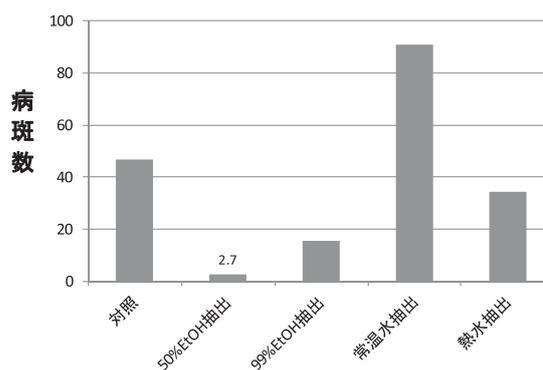
### (1) 試験1

#### a. 甘草刻抽出液の10倍希釈液の発病抑制効果

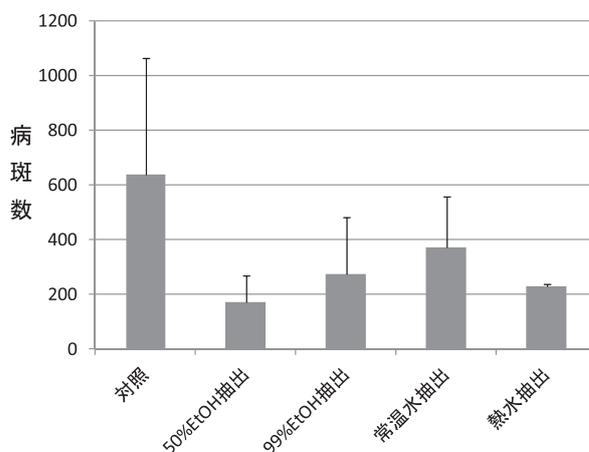
結果を第25図に示した。50%EtOH抽出液の発病抑制効果が最も高く99%EtOH抽出液の效果に優った。一方、常温水抽出および熱水抽出では効果が劣り、特に常温水抽出では逆に発病が促進された。

#### b. 甘草刻抽出液の100倍希釈液の発病抑制効果

結果を第26図に示した。100倍希釈液散布でも、50%EtOH抽出液、99%EtOH抽出液および熱水抽出液では病斑数が対照の半分以下となり発病抑制効果が認められたが、常温水抽出液の效果は劣った。希釈率が100倍になっているので、各抽出液とも10倍希釈時より発病抑制効果が劣ると考えられるが、第25図のように常温水抽出液で発病が促進される



第25図 甘草刻抽出液のキュウリ炭疽病発病抑制効果  
この試験では4重ガーゼで濾過した抽出液の10倍希釈液を供試。



第26図 甘草刻抽出液のキュウリ炭疽病発病抑制効果  
反復間で同じ傾向であるが、反復間の変動が大きいので、有意差なし (Tukey-Kramer法)。  
この試験では4重ガーゼで濾過した抽出液の100倍希釈液を供試。

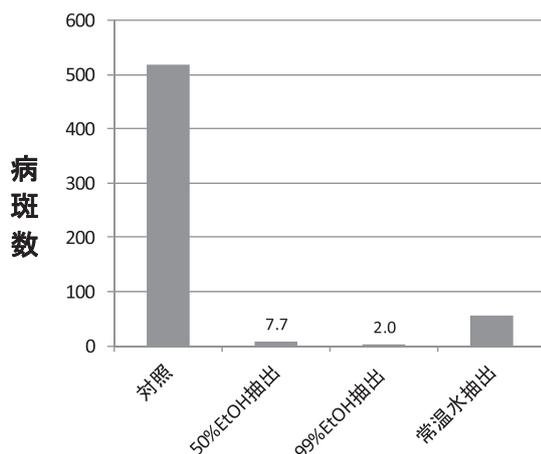
ことはなかった。

## (2) 試験 2

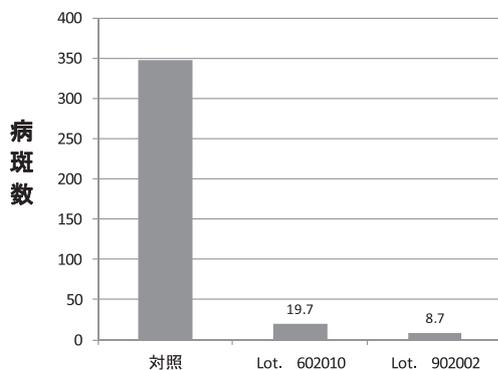
濾紙で再濾過した抽出液 (10倍希釈) のキュウリ炭疽病発病抑制効果を第27図に示した。濾紙濾過液の方が、試験1での4重ガーゼ濾過液 (10倍希釈) に比べ発病抑制効果が高まった。99%EtOH抽出液および常温水抽出液はともに効果が高くなり、特に常温水抽出液でガーゼ濾過液との差が大きかった。濾過後の濾紙には不溶性の残渣が残っていたので、それが発病抑制効果を阻害していると考えられるが、残渣については分析していない。なお、この結果を踏まえ以後の試験では濾紙濾過した抽出液を供試した。

## (3) 試験 3

結果を第28図に示した。ホワイトトリカーで抽出



第27図 甘草刻抽出液のキュウリ炭疽病発病抑制効果  
この試験では濾紙濾過した抽出液の10倍希釈液を供試。



第28図 甘草刻のホワイトトリカー抽出液のキュウリ炭疽病病抑制効果

この試験では濾紙濾過した抽出液の100倍希釈液を供試、甘草刻は2種のロットを使用。

した2種のロット抽出液の100倍希釈液はいずれも対照に比べ高い発病抑制効果を示した。

## 2 キュウリべと病に対する発病抑制効果

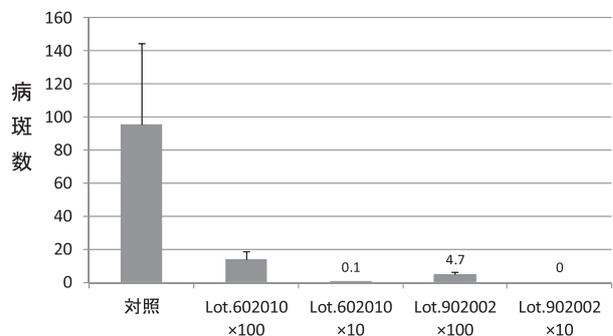
### 1) 材料および方法

上述のキュウリ炭疽病の試験に供試したホワイトトリカー抽出液とは別に、甘草刻 (Lot. 602010およびLot. 902002) 50 gをホワイトトリカー200mLに20日間浸漬後に濾紙濾過して得られた抽出液のキュウリべと病に対する発病抑制効果を検定した。各抽出液とも10倍および100倍希釈液を供試した。べと病の試験では各区ともキュウリ4株を供試し、試験は3回反復した。3回の試験のうち、1回では比較対照にMZ-1 (1,000 $\mu$ g/mL)の散布区を追加した。

### 2) 結果および考察

3回の試験の平均を第29図に示した。なお、第29図には示していないが、MZ-1 (1,000 $\mu$ g/mL)を追加供試した試験では、MZ-1の病斑数0個に対し対照は193.5個であった。

各ロットのホワイトトリカー抽出液の10倍希釈液およびMZ-1 (1,000 $\mu$ g/mL)ではほとんどべと病の病斑が生じなかった。各ロットのホワイトトリカー抽出液の100倍希釈液では、病斑が生じたが、対照に比べると明らかに減少した。このように、甘草刻のホワイトトリカー抽出液のキュウリべと病に対する発病抑制効果を確認した。



第29図 甘草刻のホワイトトリカー抽出液のキュウリべと病発病抑制効果

この試験では濾紙濾過した抽出液を供試、希釈倍率は図中に記載した。反復間の変動が大きいため処理間に有意差なし (Tukey-Kramer法)。甘草刻は2種のロットを使用。

### 3 甘草刻の50%エタノール抽出液およびホワイトトリカー抽出液に含まれる成分

#### 1) 材料および方法

上述の甘草刻 (Lot. 602010) の50%EtOH抽出液および甘草刻 (Lot. 902002) のホワイトトリカー抽出液に含まれるグリチルリチン酸およびリクイリチゲニン, イソリクイリチゲニンなど4種のフラボノイド類の成分量を分析した. 濾紙 (アドバンテックNo. 2) による濾過液を減圧濃縮後, 真空凍結乾燥した固形物を分析した. 抽出液の分析は特許公報記載の方法<sup>37)</sup>で行った. 比較対照にMZ-1 (Lot. 050902) を供試した.

#### 2) 結果および考察

分析結果を第4表に示した. なお, 第4表には示していないが, 50%EtOH抽出液に含まれる固形物の重量は抽出液重量の10.1%, ホワイトトリカー抽出液では6.98%で, 50%EtOH抽出液の方がより多くの固形物成分が抽出された.

次に固形物に含まれるグリチルリチン酸は各々10.92%, 11.40%で比較対照のMZ-1の12.2%と比較すると同程度であった (第4表). なお, 甘草刻抽出液にはMZ-1に含まれているグリチルレチン酸は含まれていなかった. 表中の数値から計算すると, フラボノイド類 (4種類) のグリチルリチン酸に対する比率は, 甘草刻の50%EtOH抽出液, ホワイトトリカー抽出液とも約40%であったが, MZ-1では約

67%であり, MZ-1の方がフラボノイド類を高含量で含むことが確認された. なお, 供試した甘草刻の抽出液の分析では *G. uralensis* に特異的に含まれるフラボノイドのグリシクマリニン (第1図) が検出されたため, カンゾウ種は *G. uralensis* と特定された.

さらに各抽出液の固形物含量から10倍希釈時のグリチルリチン酸およびフラボノイド濃度 (ppm) を算出し, MZ-1の100, 500, 1,000倍液と比較した (第4表). 10倍希釈時のグリチルリチン酸およびフラボノイド (4種) については50%EtOH抽出液の方が, ホワイトトリカー抽出液より濃度が高かった. したがって, ホワイトトリカー抽出液より50%EtOH抽出液の方が発病抑制効果は高いと考えられる.

キュウリべと病に対する試験ではMZ-1の1,000倍液と甘草刻のホワイトトリカー抽出液の10倍液がほぼ同程度に高い効果を示したが, グリチルリチン酸および4種のフラボノイド含量はMZ-1の方が1/5~1/3程度低い. しかし, MZ-1にはグリチルレチン酸およびリコカルコンAが含まれており, II章の結果を考えると, これらの物質が発病抑制効果を示したため, MZ-1の1,000倍液の効果が高かったと考えられる.

### V キュウリ葉上でのフラボノイド類の動態および溶液の物理的安定性

II, IIIの各章ではMZ-1をキュウリ葉に散布・風

第4表 甘草刻の50%EtOH抽出液およびホワイトトリカー抽出液とMZ-1の成分比較

試料	甘草刻		MZ-1	甘草刻		MZ-1		
	50%EtOH抽出物	ホワイトトリカー抽出物	Lot. 050902	50%EtOH抽出液10倍希釈	ホワイトトリカー抽出液10倍希釈	100倍希釈	500倍希釈	1,000倍希釈
単位	%	%	%	ppm	ppm	ppm	ppm	ppm
グリチルリチン酸	10.92	11.40	12.20	1102.9	795.7	1220.0	244.0	122.0
グリチルレチン酸	0	0	0.79	0	0	79.0	15.8	7.9
フラボノイド類 (4種類合計)	4.30	4.57	8.15	434.3	318.1	818.0	163.6	81.8
リクイリチン	3.10	1.96	4.82	313.1	136.5	482.0	96.4	48.2
イソリクイリチン	0.59	0.33	1.97	59.6	23.1	197.0	39.4	19.7
リクイリチゲニン	0.45	1.86	0.70	45.5	129.5	70.0	14.0	7.0
イソリクイリチゲニン	0.16	0.42	0.66	16.2	29.0	66.0	13.2	6.6
リコカルコンA	0	0	0.86	0	0	86.0	17.2	8.6

注) %とは, 乾燥固形物中における重量%で示す.

乾燥後（4～6時間後）に病原菌を接種して検定してきた。しかし、MZ-1散布後の日数の経過とともに、フラボノイドなどの成分が分解するなどして減少することが考えられるので、MZ-1散布後の葉面におけるフラボノイド類の残存量、および散布されたMZ-1の成分が上位葉に移行するか否かを調査した。

一方、Ⅱ、Ⅲの各章では各フラボノイドやグリチルレチン酸などは各物質単独でキュウリ葉に散布して防除効果を検定してきたが、MZ-1はこれらの物質が混在した状態である。各物質単独と混合状態では、水溶液の物理的安定性が異なるかについて試験した。

## 1 キュウリ葉散布後のフラボノイド量の変化

### 1) 材料および方法

MZ-1の10,000 $\mu$ g/mL（1%）水溶液を鉢植えキュウリ（品種：つや太郎、播種1ヶ月後）20鉢に1.5 L 散布した。キュウリは本葉が第4葉まで完全展葉し、第5葉が第4葉の半分程度の大きさで、第6葉が3～4 cm 出葉した状態であった。風乾後（約4時間後）、MZ-1散布および無散布のキュウリから第3葉を任意に各5枚ずつ採取した。さらに散布3日後および7日後にMZ-1散布キュウリの第3葉を任意に5枚採取した。いずれも採取後-80℃のフリーザーで保存した。

次に、MZ-1散布後に散布葉から上位の葉にMZ-1の成分が移行するか否かを調査した。鉢植えキュウリの第5葉以上の上位葉をポリ袋で覆い、MZ-1が付着しないようにした。また、根からの吸収移行を防ぐため、キュウリ茎の地際部周囲にラップをかぶせて、土壌に散布されないようにした。このように処置したキュウリ7鉢の第1葉から第4葉までにMZ-1の1%液500mLを散布した。風乾後、ポリ袋などは除去した。散布2日後に、MZ-1散布、無散布のキュウリの第5葉を任意に5枚採取し、-80℃で保存した。

-80℃で保存したキュウリ葉は液体窒素で凍結後、真空凍結乾燥を行った。凍結乾燥葉に50% EtOHを加え、2時間加熱還流を行い、抽出を行った。得られた抽出物は100mLの蒸留水に懸濁させた後、予め調整したSep-Pakに通導させ、MeOHで溶出させてフラボノイド画分を得た。フラボノイド画分を50% MeOH溶液（2 mL）に溶解させたもの

をHPLC分析用サンプルとした。

（HPLC条件） HPLC装置：HP-1100 series HPLC system（Agilent Technologies）

カラム：YMC Pack ODS-A（4.6 mm $\times$ 150 mm, YMC）温度：40℃, 流速：1.0 mL/min

移動相：A（1%トリフルオロ酢酸（TFA）水溶液）、B（アセトニトリル（MeCN）） A：B 90：10 $\rightarrow$ 40：60 40minのリニアグラジエント、検出：ダイオードアレイ検出器（DAD：280, 350nm）、注入量20 $\mu$ L

以下6種類の試験試料および対照のMZ-1の7種類を用意した。

#### a. MZ-1散布後の経時変化をみる試験

- A：対照葉（MZ-1無散布）
- B：MZ-1散布当日採取葉
- C：MZ-1散布3日後採取葉
- D：MZ-1散布7日後採取葉

#### b. MZ-1の上部移行をみる試験

- E：対照（MZ-1無散布）の上位葉
- F：MZ-1散布2日後の上位葉

対照サンプル：MZ-1の1%（w/v）液、葉と同様にSep-pak処理を行いHPLCサンプルとした。

## 2) 結果および考察

分析に供試した各試料の生重量、乾燥重量、抽出物重量、フラボノイド画分重量などを第5表に示した。

次に、DAD（350nm）分析のHPLCチャートの一部を第30図に示した。対照サンプル（MZ-1）との比較で、B～Dサンプル中にMZ-1に含まれるリクイリチゲニン、イソリクイリチゲニンおよびリコカ

第5表 分析に供試した各試料の乾燥重量、抽出物重量およびフラボノイド画分重量

試料区分	生重量	凍結乾燥重量	抽出に使用した重量	抽出物重量	フラボノイド画分重量
A	29.73	3.17	1.01	0.24	0.01
B	30.01	3.27	1.00	0.29	0.01
C	32.65	3.82	1.00	0.28	0.02
D	33.57	6.14	1.01	0.17	0.01
E	25.23	4.21	1.00	0.24	0.01
F	27.39	3.73	1.00	0.22	0.03

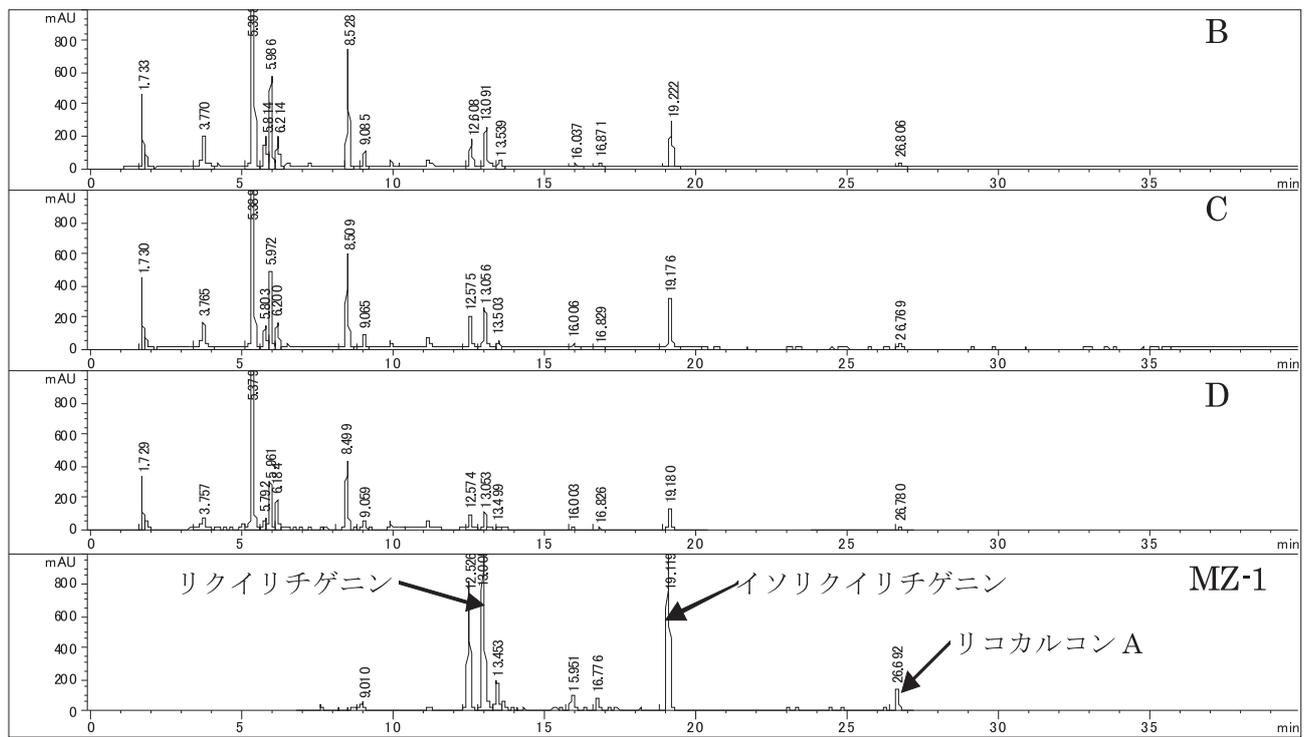
注) 表中の単位はg、A～Fについては本文参照。

ルコンAのピークが確認できた。このようにして、A～Fサンプルのキュウリ葉に含まれているリクイリチゲニン、イソリクイリチゲニンおよびリコカルコンAの保持時間およびピーク面積を第6表に示した。

MZ-1にはリクイリチゲニン、イソリクイリチゲニンおよびリコカルコンAなどのフラボノイド類が含まれている。MZ-1無散布葉 (A, E) にはこれらの化合物と同じ保持時間にはピークが検出されず (図は省略)、MZ-1 散布葉 (B, C, D) でこれら

のピークが検出された。このことより、MZ-1は散布後7日目までは、キュウリ葉表面もしくは内部に存在していることが確認された。ピーク面積は散布3日後までは散布当日と変わらないが、7日後になると半分以下に減少した。

上部移行を見る試験ではMZ-1散布2日後の上位葉 (第5葉) にはリクイリチゲニン、イソリクイリチゲニンおよびリコカルコンAのピークは検出されなかった。このことからMZ-1のフラボノイドが直接上位葉に移行することはないと考えられる。



第30図 HPLCによるMZ-1散布当日 (B)、散布3日後 (C)、散布7日後 (D) のキュウリ葉からのフラボノイドの検出

最下段は対照サンプルのMZ-1、縦軸単位：mAU、横軸単位：分。

第6表 MZ-1を散布処理したキュウリ葉サンプルのHPLC分析結果

試料区分	リクイリチゲニン		イソリクイリチゲニン		リコカルコンA	
	保持時間 (分)	ピーク面積	保持時間 (分)	ピーク面積	保持時間 (分)	ピーク面積
A	-	-	-	-	-	-
B	13.091	1821.1	19.222	2029.2	26.806	254.1
C	13.056	1962.4	19.176	2265.6	26.769	229.5
D	13.053	842.0	19.180	924.3	26.780	72.0
E	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-

注) ピーク面積はピークの高さを時間軸方向に積分した値で、単位を持たない相対値。  
- : 検出せず、A～Fについては本文参照。

## 2 主要成分の混合溶液の物理的安定性

Ⅱ, Ⅲの各章では各フラボノイドおよびグリチルレチン酸などは水に不溶性のため, 99% EtOH 溶液を水で希釈して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ として供試してきた. しかし, 水で希釈すると薄い白濁状態 (黄色フラボノイドでは黄濁) になり, 10分以上経過すると凝集・沈殿した. 一方, MZ-1にはこれらフラボノイドおよびグリチルレチン酸が含まれている. MZ-1は50% EtOHには完全に溶解するが, 水溶液にしても完全に透明にはならないものの, 凝集・沈殿することなく安定している. そこで, フラボノイドおよびグリチルレチン酸などを混合することで溶液の物理的安定性が変化するか試験した.

### 1) 材料および方法

#### (1) 試験1

イソリクイリチゲニンおよびグリチルレチン酸を99% EtOHに溶解して, 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液を作製した. この溶液各1 mLに蒸留水19mLを加え, 各物質単独で100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした. 一方, 各溶液を1 mLずつ混合し, 蒸留水18mLを加えて両物質の100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 混合液を作製した. これらの溶液を静置して物理的安定性を目視で調査した.

#### (2) 試験2

まず, グリチルレチン酸の2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (99% EtOH 溶液) を蒸留水で20倍希釈して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした (①). 次に, グリチルレチン酸の20,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$

(99% EtOH 溶液) を蒸留水で200倍希釈して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした (②). さらにグリチルレチン酸の20,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (99% EtOH 溶液) とグリチルレチン酸の20,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (99% EtOH 溶液) を等量混合し蒸留水で200倍希釈して各々が100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした (③). この, ①, ②, ③の溶液の物理的安定性を目視で調査した. ここで, ②, ③で20,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  (99% EtOH 溶液) を200倍希釈したのは, 希釈液中に含まれるEtOH濃度を下げるためである. すなわち, ①では希釈液中に含まれる溶媒のEtOH濃度は5%であるが, ②, ③では0.5%となる.

## 2) 結果および考察

### (1) 試験1

写真5に示したように, 蒸留水で希釈したイソリクイリチゲニンおよびグリチルレチン酸の100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液は10分以内に凝集・沈殿した. 一方, 両者の混合希釈液は希釈直後には薄い黄濁状態になるが, 5~6時間経過しても, 凝集して沈殿を生ずることはなかった. イソリクイリチゲニンとグリチルレチン酸が混合された微粒子では表面電荷が強まって粒子間の反発力が増して凝集しにくくなったことも考えられるが, ゼータ電位の測定など詳細な解析が必要と考えられる.

### (2) 試験2

写真6に示したように, 蒸留水で希釈したグリチルレチン酸の100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 溶液 (①) は試験1と同様

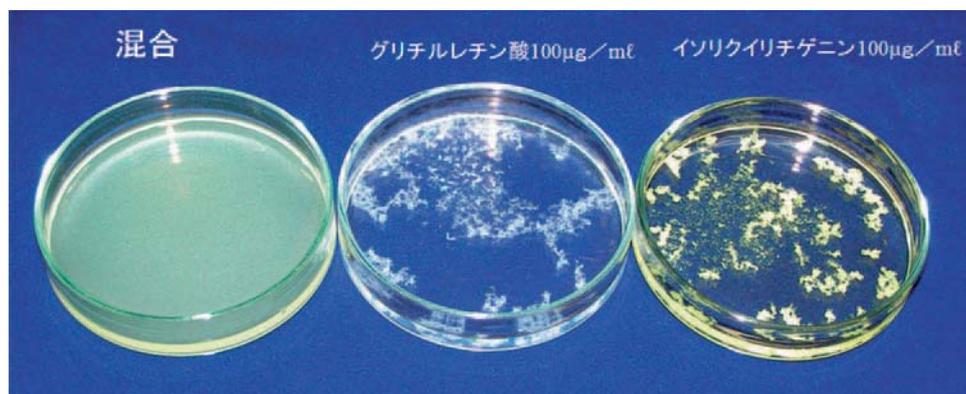


写真5 グリチルレチン酸とイソリクイリチゲニンを混合した場合の溶液の物理的安定性

左端: グリチルレチン酸 (2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 99% EtOH) 1 mLとイソリクイリチゲニン (2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 99% EtOH) 1 mLの混合液に蒸留水18mLを加えた.

中央: グリチルレチン酸 (2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 99% EtOH) 1 mLに蒸留水19mLを加えた.

右端: イソリクイリチゲニン (2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$  in 99% EtOH) 1 mLに蒸留水19mLを加えた.

(いずれも試験開始約6時間後)



写真6 グリチルレチン酸とグリチルリチン酸を混合した場合の溶液の物理的安定性

- ①グリチルレチン酸 (2 mg/mL in 99% EtOH) を蒸留水で20倍希釈。  
 ②グリチルレチン酸 (20mg/mL in 99% EtOH) を蒸留水で200倍希釈。  
 ③グリチルレチン酸 (20mg/mL in 99% EtOH) とグリチルリチン酸 (20mg/mL in 99% EtOH) を混合後に蒸留水で200倍希釈。(いずれも試験開始約18時間後)

10分以内に凝集・沈殿した。また、溶媒のEtOH濃度を①の1/10の0.5%とした②でも、グリチルレチン酸溶液は薄く白濁し、①のように急速ではないが次第に凝集し、1時間ほどで容器の底に沈殿した。一方、グリチルリチン酸と混合した③では希釈直後の懸濁状態を保持し、試験開始18時間後でもその状態を保持した。なお、ここには示していないが、グリチルリチン酸は99%EtOHに溶解した後、蒸留水で希釈して100 $\mu$ g/mLとしても、全く白濁しないため、③で白濁したのはグリチルレチン酸に起因するものと考えている。グリチルレチン酸とグリチルリチン酸の混合液における懸濁状態の安定化にはグリチルリチン酸のサポニンとしての機能が関わっていることが想定される。

このことから、MZ-1はグリチルリチン酸、グリチルレチン酸、フラボノイド類の混合物のため、水溶液中で各成分が凝集・沈殿することなく安定した状態を保つと考えられる。したがって散布液の安定性を考えると各物質単独で使用するより、MZ-1のような混合物であることが有利と考えられる。

## VI MZ-1のキュウリべと病に対する発病抑制効果 (圃場試験)

II章ではポット試験でMZ-1のキュウリべと病に対する発病抑制効果を明らかにしたが、露地圃場における発病抑制効果および展着剤の影響について試験した。

## 1 各種展着剤の発病抑制効果におよぼす影響

### 1) 材料および方法

試験地場所は広島県福山市西深津町6-12-1, 当研究センターのC-2圃場で、露地栽培とした。元肥として2006年4月19日、有機肥料(福山野菜有機189号; N:P:K=10:8:9, 130kg/10a), 苦土重焼燐(P:Mg=35:4.5, 20kg/10a)を施肥し、追肥は行わなかった。キュウリ品種は「つや太郎」(タキイ種苗)を用い、3月28日に播種、4月26日に定植した。定植時、殺虫剤(アセフェート粒剤)を株元に散布した。株間75cm, 畝間3m, 4畝のマルチ栽培とし、約200株定植した。本試験では散布時の隣接畝へのドリフト防止のため、畝間を広く取った。

試験は1区10株の3反復とした。5月15日, 22日, 29日および6月6日の4回MZ-1の100倍液(10g/L)を肩掛け噴霧器で散布した。散布量はキュウリの生育とともに増量し、初回散布で1区10株あたり1L, 最終散布で2.3Lであった。いずれも十分な量であった。

MZ-1の100倍液単独散布のほか、展着剤としてペタンV(展着剤には一般名がないので商品名で表記する, 以下同じ: 1,000倍), アプローチBI(1,000倍), 新グラミン(10,000倍)を添加した区を設定した。なお、ペタンVはパラフィン系固着剤, アプローチBIおよび新グラミンは非イオン系界面活性剤である。

第1回散布後の5月18日にキュウリべと病の初発を確認した。最終散布7日後の6月13, 14日に各区キュウリの全株全葉(約60枚/株)について日

本植物防疫協会編集の「野菜等殺菌剤圃場試験法(2004年3月)」<sup>29)</sup>の方法により発病調査を行い、発病葉率および発病度を算出した。発病葉率および発病度はアークサイン変換後 Tukey-Kramer の多重検定を行った。散布後目視で毎日茎葉観察を行い葉害の有無を調査した。

## 2) 結果および考察

結果を第7表に示した。本試験では露地試験のためキュウリべと病が自然発生し、最終的には中発生となった。散布当日の降雨はなかったが、5月15日から6月14日までの間の総雨量は66.5mmで1日に10mm以上の降雨があった日は計3日であった。発病葉率、発病度とも、MZ-1単独区は展着剤加用区および無処理区と Tukey-Kramer 法で5%有意差がみられた。したがって、甘草抽出物(MZ-1)に展着剤を加用することで防除価が低下すると考えられた。なお、発病度の多重比較検定の手法は研究者によって異なるが、本論文では中島ら<sup>39)</sup>に従い Tukey-Kramer 法で検定した。

MZ-1にはグリチルリチン酸などのサポニン類が含まれていて、それ自身展着剤的作用がある。サポニンの効果はキュウリ葉表面にまんべんなく被膜を作ってMZ-1を付着させ、発病抑制効果を高めると考えられる。本試験で展着剤を添加してかえって防除価が下がった原因として、MZ-1にさらにアプローチBIあるいは新グラミンを加えることにより展

着効果が増大し、被膜層が薄くなり発病抑制効果を下げるものと考えられる。一方、ペタンVはパラフィン系固着剤であり、一般に耐雨性を向上させるが、パラフィンを懸濁するため高濃度の界面活性剤が含まれており、上記と同様の理由により防除価が下がったと考えられる。いずれにせよ、MZ-1への展着剤添加は不要と考えられる。

なお、いずれの試験区でも葉害の発生は認められなかった。

## 2 グリチルレチン酸および油性甘草抽出物の発病抑制効果

II章の試験で、MZ-1に含まれるグリチルレチン酸およびフラボノイド類の発病抑制効果をポット試験で明らかにした。そこで、これら物質の効果を圃場試験で検証した。

### 1) 材料および方法

試験地場所は前節の試験と同じ圃場である。元肥として2007年7月10日、定植する畝跡(長さ45m×巾1m、4本)のみに有機肥料(福山野菜有機189号)および乾燥牛糞堆肥各1袋(20kg)を施用した。キュウリ品種：北進の市販種苗を供試した。マルチ栽培とし、7月12日に、株間70cm、畝間3mで約200株定植した。前節の試験と同様アセフェート粒剤を株元散布した。1区10株の3反復とし、8月2日、9日、17日および23日の4回、下記溶

第7表 MZ-1に各種展着剤を混用した場合のキュウリべと病発病抑制効果

	反復	発病葉率 (%)	平均	発病度	平均	防除価	
						(発病葉率)	(発病度)
MZ-1(100倍)	I	21.1	16.0	5.5	4.1	73	86
	II	13.9		3.5			
	III	12.9		3.2			
MZ-1(100倍) +ペタンV(1000倍)	I	7.1	21.2	2.2	6.2	65	79
	II	37.8		11.7			
	III	18.6		4.7			
MZ-1(100倍) +アプローチBI(1000倍)	I	27.1	29.6	7.3	9.2	51	68
	II	48.8		17.0			
	III	13.0		3.2			
MZ-1(100倍) +新グラミン(1000倍)	I	34.7	23.7	10.2	6.7	60	77
	II	15.8		4.4			
	III	20.5		5.4			
無処理	I	61.3	59.8	25.9	29.1		
	II	77.4		50.3			
	III	40.6		11.2			

注) 発病葉率、発病度ともアークサイン変換後 Tukey-Kramer 法で多重比較検定した。異なる英字間には5%有意差あり。

液を散布した。散布量はキュウリの生育に応じて散布日ごとに0.5 Lずつ増量し、1区10株あたり初回は2.5 L、最終回は4 L散布した。前節の結果を受けて展着剤は使用しなかった。

(散布溶液)

- ①油性甘草抽出物製剤 500倍 (V/V)  
 ②MZ-1 500倍 (W/V)  
 ③グリチルレチン酸 5,000倍 (W/V)  
 ④(対照薬剤) TPN水和剤(商品名:ダコニール1000フロアブル) 1,000倍 (V/V)

この試験ではMZ-1の濃度を500倍としたが、これはMZ-1のコストを考慮して、使用量の少ない散布で効果があるか試験したためである。また、油性甘草抽出物とは、*G. glabra*よりアルコール系の溶媒で抽出したもので、グラブリジンが高含量に含まれるが、リクイリチゲニンとイソリクイリチゲニンの含量はグラブリジンの約1/100である(丸善製薬社内データ)。リコカルコンAはカンゾウ種が異なるため含まれていない。グリチルレチン酸は製造過程で除かれており、グリチルレチン酸も含有しない。したがって主要抗菌成分はグラブリジンのみである<sup>38)</sup>。油性甘草抽出物製剤とはこの油性甘草抽出物を乳化剤を用いて製剤化したもので、製剤中に油性甘草を約9%、抗菌成分としてグラブリジンを約1%含む

製剤<sup>38)</sup>で、食品の日持ち向上剤として市販されている<sup>10)</sup>。

一方、グリチルレチン酸の5,000倍液散布では和光純薬製の試薬を50倍量(w/v)の99% EtOHで溶解後、散布直前に水道水で100倍希釈した。

最終散布7日後の8月30、31日に各区キュウリの全株全葉(約60枚/株)について前節の方法<sup>29)</sup>により発病調査を行い、発病葉率および発病度を算出した。散布後目視で毎日茎葉観察を行い葉害の有無を調査した。統計検定の方法は前節と同じである。

## 2) 結果および考察

第8表に結果を示した。第1回散布前には発病を認めなかったが、第2回散布時にはTPN水和剤以外の処理区では一部の株でべと病が発生していた。最終的に無処理区の発病葉率が54.5%、発病度が20.1となり中発生であった。多重比較検定の結果、発病葉率、発病度とも、油性甘草抽出物製剤、MZ-1、グリチルレチン酸の間には有意差が無かったが、無処理間とはTukey-Kramer法で有意差があった。MZ-1、グリチルレチン酸は無処理区と1%有意差、油性甘草抽出物製剤は無処理と5%有意差であった。なお、対照のTPN水和剤は防除値97と高い発病抑制効果を示した。散布当日の降雨はなかったが、

第8表 MZ-1、油性甘草抽出物製剤およびグリチルレチン酸のキュウリべと病発病抑制効果

	反復	発病葉率 (%)	平均	発病度	平均	防除値	
						(発病葉率)	(発病度)
油性甘草抽出物製剤	I	24.8	32.2	11.7	12.3	41	39
	500倍 II	42.7		16.4			
	III	29.0		8.9			
MZ-1	I	22.6	25.6	10.3	9.5	53	53
	500倍 II	26.8		9.3			
	III	27.4		9.0			
グリチルレチン酸	I	13.4	23.4	4.4	7.8	57	61
	5,000倍 II	26.9		8.7			
	III	29.8		10.4			
TPN水和剤	I	2.0	1.9	0.5	0.5	97	97
	1,000倍 II	1.4		0.4			
	III	2.2		0.7			
無処理	I	57.8	54.5	21.5	20.1		
	II	51.9		17.6			
	III	53.7		21.2			

注) 発病葉率、発病度ともアークサイン変換後Tukey-Kramer法で多重比較検定した。異なる英字間にはTukey-Kramer法で1%有意差あり。ただし、油性甘草と無処理間のみ5%有意差。

8月1日から8月30日までの間の総雨量は18.0mmと少雨であった。

MZ-1の500倍散布では、発病度から算出した防除価が53であった。前節の試験ではMZ-1の100倍液を供試したため防除価が86と高かったが、本試験では500倍液散布のため、防除価が低くなったと考えられる。グリチルレチン酸散布では防除価61でMZ-1よりやや効果が優った。一方、油性甘草抽出物製剤では防除価39と効果が劣った。いずれの試験区でも薬害の発生はなかった。

II章のポット試験ではグリチルレチン酸、グラブリジンとも100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の散布濃度でべと病の発生をほぼ完全に抑制できた。グリチルレチン酸の5,000倍液は200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に相当し、ポット試験の濃度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ より高い。一方、また油性甘草抽出物製剤500倍液中のグラブリジン濃度は約20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とポット試験の濃度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ より低いため、グリチルレチン酸の5,000倍液の方が油性甘草抽出物製剤500倍液より防除価が高くなったと考えられる。第1表より推定すると、MZ-1の500倍液中のグリチルレチン酸含量は約18 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であるが、その他イソリクイリチゲニン、リクイリチゲニン、リコカルコンAなどのフラボノイドも含むため、それらの複合効果で、油性甘草抽出物製剤より効果が優ったと考えられる。

## VII 総合考察

前報<sup>18)</sup>の結果では、MZ-1の1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 散布でもキュウリべと病は全く病斑が生じなかったのに対し、炭疽病ではMZ-1の10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 散布でも病斑数は0にならず対照区の3%の病斑が生じた。また褐斑病ではMZ-1の10,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 散布でも病斑が対照区の約20%生じた。このことから、MZ-1の発病抑制効果はべと病>炭疽病>褐斑病の順と考えられた。このことをMZ-1に含まれるフラボノイド類、グリチルレチン酸などの個別の発病抑制効果から考察する。まず、べと病に対しフラボノイドのリコカルコンA、イソリクイリチゲニン、リクイリチゲニンは100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 液のキュウリ葉散布で高い発病抑制効果を示したのに対し(第5図)、炭疽病ではこれらのフラボノイドには発病抑制効果が認められな

った(第16図)。次にグリチルリチン酸、グリチルレチン酸にはべと病に対する発病抑制効果があり、特にグリチルレチン酸は100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ でも高い発病抑制効果が認められた(第9, 10, 11図)。一方、炭疽病に対してもグリチルレチン酸は100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で発病抑制効果を認めたが、べと病ほど完全に抑制できるものではなかった(第18図)。また、褐斑病に対するフラボノイド類の発病抑制効果は検討していないが、グリチルレチン酸100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 液の散布による発病抑制効果は認められなかった(第23図)。このようにMZ-1の発病抑制効果はフラボノイド類およびグリチルレチン酸の発病抑制効果により説明できると考えられる。

甘草根にはグリチルリチン酸およびフラボノイド類が含まれるが、とりわけフラボノイド類の臨床系、食品系の微生物に対する抗菌活性については多くの報告があり、グラブリジン、リコカルコンAなどの抗菌活性が高いことは広く知られている<sup>1, 6, 40, 51, 54)</sup>。グリチルレチン酸については抗炎症作用、抗アレルギー作用といった薬効作用が高く<sup>28, 49)</sup>、多くの医薬品、医薬部外品に使われている。一方、抗菌作用については、Kim *et al.*<sup>12)</sup>は臨床系の微生物(細菌3種、酵母類3種)に対するグリチルレチン酸の抗菌活性を*in vitro*で検定した結果、細菌2種に抗菌性を認め、グリチルレチン酸はDNA合成阻害作用が大きいと報告した。しかし、臨床系、食品系でのグリチルレチン酸の抗菌作用の利用は体臭抑制効果のある制汗剤など一部にとどまっている<sup>4)</sup>。

一方、植物病原菌に関してはNaidu *et al.*<sup>27)</sup>はワタ(*Gossypium* sp.)の病原菌(細菌3種、糸状菌10種)に対するグリチルリチン酸、グリチルレチン酸およびグラブリジンの抗菌活性を*in vitro*で濃度1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で検定した。阻止帯の大きさ(mm)は供試菌すべてでグリチルリチン酸が小さかった。グリチルレチン酸とグラブリジンの比較では、糸状菌10種中8種、細菌3種中3種でグラブリジンが大きかったと報告した。

これらはいずれも*in vitro*での結果であるが、本研究ではキュウリべと病および炭疽病に対し、ポット試験でグリチルレチン酸は濃度100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で発病抑制効果を示した。これまでも各種薬用植物の抽出液の植物病原糸状菌に対する*in vitro*の抗菌活性

を検定した報告はあるが<sup>3, 46)</sup>, 宮川・大野<sup>24)</sup>は *in vitro* の抗菌活性とポット試験による生物検定の結果は必ずしも相関しないことを明らかにしており, 実用化を考えるとポット試験で効果を判定することが望ましい. 本研究でポット試験でグリチルレチン酸がキュウリべと病および炭疽病に高い発病抑制効果を持つことを確認した意義は大きいと考える.

本研究ではイソリクイリチゲニン, リクイリチゲニン, グリチルレチン酸といったアグリコンの方がそれぞれの配糖体より発病抑制効果が高かった. これらの物質はカンゾウの植物体の中では大部分が配糖体で存在しているが, MZ-1の製造過程で加熱などによりこれらのアグリコンが生成されることが考えられる. 一般に植物自身の病原菌に対する感染防御機構の一つに, post-inhibitins<sup>8)</sup>と定義される抗菌性物質群がある. これは配糖体として存在する抗菌性物質のように, 官能基をグリコシドなどで保護しそれ自体が植物組織を損傷しないような形で蓄えられていて, 感染後に加水分解酵素により糖が遊離するなどの単純な変化で抗菌活性化し感染防御に役立てるものである<sup>8, 13)</sup>. MZ-1では製造過程においてアグリコンが生成され, 病害発病抑制効果が高まったと考えられる.

Schuster *et al.*<sup>45)</sup>はカンゾウ (*G. glabra*) の葉, 小枝の乾燥粉末 200 g を 96% EtOH で抽出し, 400mL に濃縮した液 (成分含量不明) を希釈して散布し, トマトおよびジャガイモの疫病 (病原: *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary), キュウリべと病 (病原: *P. cubensis*), キュウリうどんこ病 (病原: *Podosphaera xanthii* (Castagne) Braun & Shishkoff), コムギうどんこ病 (病原: *Blumeria graminis* (D.C.) Speer f. sp. *tritici* Marchal), インゲンマメさび病 (病原: *Uromyces appendiculatus* (Per.) Link), トマト灰色かび病 (病原: *Botrytis cinerea* Per.) に対する発病抑制効果を調べた. その結果, キュウリべと病およびインゲンマメさび病, トマトおよびジャガイモの疫病で高い発病抑制効果を示したが, キュウリうどんこ病, トマト灰色かび病では全く効果がなかったと報告した. さらに, Scherf *et al.*<sup>44)</sup>は上記のカンゾウの抽出液をガラス温室内で栽培したキュウリに7日間隔で散布した結果, 対照区で発病が急増した7週目以降でもべと病に対する高

い発病抑制効果を確認した.

一方, Mbega *et al.*<sup>15)</sup>は84種類の植物の熱水抽出液をトマト種子に処理してトマト斑点細菌病 (病原: *Xanthomonas perforans* Jones *et al.*) に対する細菌増殖抑制および発病抑制を調べた結果, カンゾウ (*G. uralensis*) を含む13種類の植物抽出液で細菌増殖を完全に抑制し, 発病を100%抑制したと報告している. このようにカンゾウの抽出液は植物病害防除素材として有望と考えられる.

なお, 一般にキュウリ栽培ではべと病, 炭疽病以外にうどんこ病が問題になる. 本研究の過程で, べと病などの試験目的でMZ-1を散布したキュウリに無散布区と同様にうどんこ病が発生することがあった (目視観察のみ). また, 上述のSchuster *et al.*<sup>45)</sup>の結果を考えると, MZ-1はキュウリうどんこ病に対しては発病抑制効果が低いと考えられる.

2002年の農薬取締法改正で, 農薬の製造・使用などの規制が強化されたことを受けて, 「原材料に照らし農作物など, 人畜および水産動植物に害をおよぼすおそれがないことが明らかなもの」として農林水産大臣および環境大臣が特定農薬 (以下, 通称である「特定防除資材」とする) に指定したものは農薬登録を不要とする制度が新設された<sup>34)</sup>. 2011年2月には特定防除資材の指定の検討対象となる資材が35資材に絞り込まれ, 甘草抽出物は「甘草 (マメ科カンゾウ)」として含まれている<sup>34)</sup>. 特定防除資材 (特定農薬) 指定のための評価に関する指針<sup>33)</sup>には「防除価などが無処理区と比較して半分を超える効果を示す2例以上の試験結果が認められ, 具体的な防除価などの数値の目安は以下のとおりであること. ア. 防除価が50以上であること」と定められている. 本研究で行った圃場試験では, キュウリべと病に対し, MZ-1の防除価50以上の試験例を2例示すことができた. さらにMZ-1は公的機関での発病抑制効果を判定するため2008年度より一般社団法人日本植物防疫協会の新農薬実用化試験で試験された<sup>30, 31)</sup>. イチゴ炭疽病では2008年, 2009年に3例, オウトウ灰星病では2009年に1例, 公立農業試験場において試験を実施した. いずれも化学農薬に比べると効果はやや低い実用性有りの判定を受けている. MZ-1などの甘草抽出物は今後, 農水省・環境省合同の審議会で審議され, これらの試験

例も評価の対象になると考えられる。しかし、2003年に3種類（食酢、重曹、地場天敵）の特定防除資材が指定されて以降10年が経過した2013年6月現在も新たな追加指定が行われていないのが現状である。

MZ-1は農業以外にも、水産分野でも利用されている。MZ-1に含まれるグリチルリチン酸はブリ稚魚の連鎖球菌症に対する抵抗性を増強し<sup>2)</sup>、また養殖ヒラメにMZ-1を投与することで、ヒラメ血清の溶血活性、白血球の貪食活性で評価した非特異的生態防御能が増加することが認められ、さらに細菌による感染症であるエドワジラエ病に対する抗病性が向上したと報告されたことから<sup>25)</sup>、MZ-1は養殖魚用の混合飼料として2007年より販売されている<sup>36)</sup>。このようにMZ-1は水産分野で先行して実用化されている。

今後原料調達の関係でMZ-1のような甘草抽出物の製造に*G. glabra*を使用することも考えられ、その場合はリコカルコンAが含まれなくなる。しかし、波多野ら<sup>7)</sup>によれば、リクイリチン、イソリクイリチン、リクイリチゲニンおよびイソリクイリチゲニンは*G. inflata*、*G. glabra*および*G. uralensis*の根茎に広く含まれており、その含量にも大きな差異がないため、原料が*G. glabra*に変わっても同じ製法であれば甘草抽出物中のこれらフラボノイド含量に大きな変化がないと考えられる。同様にグリチルレチン酸はグリチルリチン酸のアグリコンであるが、これは製造過程で配糖体のグリチルリチン酸から生成されたものであり、同じ製法であればカンゾウ種が変わってもその含量に大きな変化がないと考えられる。

## 摘 要

本研究は甘草根よりフラボノイド類が高含量となるように抽出・精製した抽出物（MZ-1）の数種野菜類の茎葉病害に対する発病抑制機作を明らかにするため実施した。キュウリべと病および炭疽病を対象としてMZ-1に含まれる各フラボノイドおよびグリチルレチン酸などの各種成分のポット試験による発病抑制効果および*in vitro*での抗菌活性の調査、市販の乾燥生薬（甘草刻）からの抽出液およびMZ-

1の発病抑制効果と成分含量の比較、キュウリにMZ-1散布した後の植物体上でのフラボノイド成分の変化、圃場試験による発病抑制効果の確認などを通じて、発病抑制機作に関するいくつかの知見を得た。それらを要約すると以下のとおりである。

1. MZ-1を疎水性の違いから分画すると、70%ないし99% EtOH溶離画分（油性画分）にべと病、炭疽病に対する発病抑制効果が認められた。油性画分に含まれる主要成分のうち、べと病に対し発病抑制効果の高いフラボノイドはイソリクイリチゲニンおよびリコカルコンAであった。一方、炭疽病に対しては試験した濃度ではこれらフラボノイドの発病抑制効果は低かったが、イソリクイリチゲニンおよびリコカルコンAは炭疽病菌胞子発芽を強く阻害した。
2. 油性画分に含まれるトリテルペンのグリチルレチン酸にはべと病および炭疽病に高い発病抑制効果が認められた。また、グリチルレチン酸は炭疽病菌の胞子発芽を強く阻害した。なお、グリチルレチン酸の配糖体のグリチルリチン酸の効果は低かった。
3. MZ-1はべと病菌分生子から遊走子の放出過程を阻害し、遊走子の運動停止および崩壊を引き起こすためべと病の発病抑制効果を示すと考えられるが、べと病菌がキュウリに感染した後では発病抑制効果が認められなかった。
4. 甘草生薬の甘草刻の50% EtOHおよびホワイトリカー抽出液などにもべと病、炭疽病に対する発病抑制効果が認められた。MZ-1と比較すると、MZ-1にはグリチルレチン酸、リコカルコンAおよびイソリクイリチゲニンがより高濃度で含まれていた。
5. MZ-1をキュウリ葉に散布後3日後まではイソリクイリチゲニン、リクイリチゲニンおよびリコカルコンAの付着量は変わらなかった。また、MZ-1散布葉から上位葉へのこれらフラボノイドの移行は認められなかった。
6. イソリクイリチゲニンとグリチルレチン酸を混合した場合、あるいはグリチルレチン酸とグリチルリチン酸を混合した場合は、水で希釈しても凝集・沈殿が生じず物理的に安定していた。
7. MZ-1のべと病防除効果を圃場試験で調査した

結果, 100倍液散布で防除価86であった。散布の際には展着剤は防除効果を阻害するため不要である。

8. 本研究で供試した甘草抽出物MZ-1はカンゾウ種 *G. inflata* を原料にしたものである。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり, 当研究センター水田作研究領域病虫害研究グループリーダー竹原利明氏, 元主任研究員井上博喜氏(現:九州沖縄農業研究センター)ならびに当研究センター業務第1科職員の方々には研究の実施および圃場試験で協力と支援をいただいた。当研究センター契約職員松岡礼子氏および中井とし江氏にはキュウリなどの検定植物の栽培管理, 各種寒天培地の調整などを担当していただいた。また, 丸善製薬株式会社甘草研究所所長田村幸吉氏, 商品開発部部长山本正次氏および企画・知財部チーフ小西正敏氏には協力と助言をいただくとともにHPLC分析を行っていただいた。ここに各位に対して深甚なる感謝の意を表する。なお, 本研究の一部はJSTシーズ発掘試験の支援を受けて実施した。

## 引用文献

- Demizu, S., K. Kajiyama, K. Takahashi, Y. Hiraga, S. Yamamoto, Y. Tamura, K. Okada and T. Kinoshita 1988. Antioxidant and antimicrobial constituents of licorice: isolation and structure elucidation of a new benzofuran derivative. *Chem. Pharm. Bull.* 36 (9): 3474 - 3479.
- 枝広知新・浜口雅巳・楠田理一 1990. ブリ稚魚の連鎖球菌症に対するグリチルリチン投与の影響. *水産増殖* 38 (3): 239 - 243.
- 藤井義晴・古河 衛・早川嘉彦・菅原和夫・渋谷知子・浅川征男 1989. 薬用植物からの他感作用候補物質の検索. *雑草研究* 34 (別): 89 - 90.
- 後藤佳子・伴 和佳・井上和郎 2011.  $\beta$ -グリチルレチン酸の *Corynebacterium xerosis* に対する抗菌作用とその応用. *日本薬学会年会要旨集*. 131st (3): 210.
- 原 摂祐 1932. 実験作物病理学(養賢堂, 東京) 瓜類の病害(べと病). 790 - 791.
- Haraguchi, H., K. Tanimoto, Y. Tamura, K. Mizutani and T. Kinoshita 1998. Mode of antibacterial action of retrochalcones from *Glycyrrhiza inflata*. *Phytochemistry*. 48 (1): 125 - 129.
- 波多野力・福田寿之・劉 延澤・野呂忠敬・奥田拓男 1991. 甘草のフェノール性成分(第4報)甘草のフェノール成分と基原植物の関係, 並びに各種甘草エキスのXanthine Oxidase及びMonoamine Oxidaseに対する阻害効果. *薬学雑誌* 111 (6): 311 - 321.
- Ingham, J. L. 1973. Disease resistance in higher plants The concept of pre-infectious and post-infectious resistance. *Phytopath. Zeit.* 78: 314 - 355.
- Jeffery, B. H. and B. Herbert Eds. 1993. *Phytochemical Dictionary*. Taylor & Francis. London UK. 379.
- 北條 寛 2003. 甘草油性抽出物製剤「サンリコリスA」の抗菌活性. *月刊フードケミカル* 2003 (6): 116 - 122.
- 化学大辞典編集委員会編 1963. *化学大事典*, 共立出版社, 東京. 1: 809, 2: 204 - 205, 8: 336 - 337.
- Kim, H. K., Y. Park, H. N. Kim, B. H. Choi, Y. G. Jeong, D. G. Lee and K. Hahm 2002. Antimicrobial mechanism of  $\beta$ -glycyrrhetic acid isolated from licorice, *Glycyrrhiza glabra*. *Biotechnology Letters*. 24: 1899 - 1902.
- 小林昭雄 1997. オリゴ糖によって誘導される罹病抵抗反応. 市原耿民・上野民夫編, *植物病害の化学*. 学会出版センター, 東京. 124 - 133.
- 厚生労働省 2011. 第十六改正日本薬局方(日本薬局方電子版), <http://jpdbs.nihs.go.jp/jp16/>
- Mbega, E. R., C. N. Mortensen, R. B. Mabagala and E.G. Wulff 2012. The effect of plant extracts as seed treatments to control bacterial leaf spot

- of tomato in Tanzania. J. Gen. Plant Pathol. 78: 277 - 286.
- 16) 宮川久義・山本正次・大野裕和 2005 a. 甘草抽出精製物の数種野菜類茎葉病害に対する発病抑制効果について (講要). 日植病報 71 : 60.
- 17) ———・————— 2005 b. 油性甘草抽出物の数種野菜類茎葉病害に対する発病抑制効果について (講要). 日植病報 71 : 245.
- 18) ———・大野裕和 2007. 甘草抽出物を用いた野菜類茎葉病害の防除に関する研究. 近中四農研報 6 : 55 - 69.
- 19) ——— 2007. 甘草抽出物による糸状菌病害の抑制. 農業技術大系 (土壤施肥編, 第5 - 1巻, 追録18号). 畑+216の65 : 27 - 31.
- 20) ———・大野裕和 2007. 甘草抽出精製物のキュウリべと病に対する発病抑制効果について (講要). 日植病報 73 : 64.
- 21) ———・————— 2008. 各種薬草類抽出液の抗菌活性とキュウリ炭疽病に対する発病抑制効果について (講要). 日植病報 74 : 185.
- 22) ——— 2009. 農作物病害防除への新たな甘草抽出物 (甘草抽出物 MZ-1) の利用. フードリサーチ 2009 (11) : 36 - 39.
- 23) ——— 2011. カンゾウ, 植物病原菌に抗菌性有り. 現代農業2011 (6) : 138 - 139.
- 24) ———・大野裕和 2011. 野菜病害に対する生薬抽出液の抗菌活性と生物検定による評価. 九病虫研会報 57 : 38 - 44.
- 25) 三吉泰之・河原栄二郎・福田 穰 2009. ヒラメの非特異的生態防御能に及ぼす甘草抽出物経口投与の影響. 大分県水試調研報 2 : 1 - 4.
- 26) 水谷健二・田村幸吉 1995. 高甘味物質グリチルレチン酸モノグルクロナイド (MGGR) の開発とその癌予防効果. バイオインダストリー 12 (4) : 40 - 49.
- 27) Naidu, K. C., R. Lalam and V. Bobbarala 2009. Antimicrobial agents from *Rubia cordifolia* and *Glycyrrhiza glabra* against phytopathogens of *Gossypium*. International Journal of Pharm Tech Research. 1 (4): 1512 - 1518.
- 28) 日本薬学会編 2004. 薬学生・薬剤師のための知っておきたい生薬100. 東京化学同人, 東京. 18 - 19, 136 - 140.
- 29) 日本植物防疫協会 2004. 野菜等殺菌剤圃場試験法, <http://www.jpapa.or.jp/test/data/yasaikin.pdf>
- 30) 日本植物防疫協会 2009. 平成20年度新農薬実用化試験成績CD版 (平成21年3月).
- 31) 日本植物防疫協会 2010. 平成21年度新農薬実用化試験成績CD版 (平成22年3月).
- 32) 野方洋一 2005. カンキツ果実の機能性成分の検索とその有効利用に関する研究. 近中四農研報 5 : 19 - 84.
- 33) 農林水産省 2003. 特定防除資材 (特定農薬) 指定のための評価に関する指針 (PDF版), [http://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n\\_tokutei/pdf/sisin\\_bessi.pdf](http://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_tokutei/pdf/sisin_bessi.pdf)
- 34) 農林水産省農薬対策室 2011. 特定農薬 (特定防除資材) の検討の現状について. 植物防疫 65 : 37 - 39.
- 35) 大木 理 2007. 植物病理学. 東京化学同人, 東京. 43 - 59.
- 36) 大野裕和 2009. 魚類の免疫学的診断マニュアルの作成と活用. 福山大学社会連携研究推進事業公開講座資料, <http://www.fukuyama-u.ac.jp/rcosr/suishin/report/09/pj2/pj2theme3.pdf>
- 37) ———・宮川久義 2010. 特許4621867号 (平22. 11. 12), 植物病害防除剤及びその製造方法並びに農薬及び肥料, (丸善製薬株式会社, (独) 農業・食品産業技術総合研究機構).
- 38) ———・山本正次・宮川久義 2011. 特許4769921号 (平23. 7. 1), 植物病害防除剤及び農薬, (丸善製薬株式会社・(独) 農業・食品産業技術総合研究機構).
- 39) 中島 隆・富村健太・吉田めぐみ 2006. コムギ赤かび病防除薬剤の耐雨性の評価. 九病虫研会報 52 : 33 - 37.
- 40) Okada, K., Y. Tamura, M. Tamamoto, Y. Inoue, R. Takagaki, K. Takahashi, S. Demizu, K. Kajiyama and T. Kinoshita 1989. Identification of antimicrobial and antioxidant constituents from licorice of Russian and Xinjiang origin. Chem. Pharm. Bull. 37 (9): 2528 - 2530.
- 41) Padmavati, M., N. Sakthivel, K. V. Thara and

- A. R. Reddy 1977. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry*. 46 (3): 499 – 502.
- 42) Puupponen-Pimiä, R., L. Nohynek, C. Meier, M. Kähkönen, M. Heinonen, A. Hopia and K. Oksman-Caldentey 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J. Applied Microbiology*. 90: 494 – 507.
- 43) Sato, J., S. Kawai, W. Hashimoto, K. Murata, K. Goto and F. Nanjo 2001. Identification of an antifungal substance derived from the oil-based extract of licorice. *Biocontrol Science*. 6 (2): 113 – 118.
- 44) Scherf, A., C. Schuster, P. Marx, U. Gärber, S. Konstantinidou-Doltsinis and A. Schmitt 2010. Control of downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*) of greenhouse grown cucumbers with alternative biological agents. *Comm. Appl. Biol. Scxi. Ghent University*. 75 (4) 540 – 554.
- 45) Schuster, C., S. Konstantinidou-Doltsinis and A. Schmitt 2010. *Glycyrrhiza glabra* extract protects against phytopathogenic fungi. *Comm. Appl. Biol. Scxi. Ghent University*. 75 (4) 513 – 540.
- 46) 関崎春男 1995. 薬用植物の植物病原菌に対する抗菌活性. *Natural Medicines*. 49 (1): 97 – 103.
- 47) 消費者庁 2010. 既存添加物名簿収載品リスト, 平成22年10月20日, 消食表第377号 消費者庁次長通知, 別添1.
- 48) 食品と科学社 2003. 天然物便覧 (15版). 食品と科学社, 東京. 408.
- 49) 田村幸吉 2005. カンゾウの新しい用途. *防菌防黴* 33 (3): 127 – 136.
- 50) ——— 2008. 植物エキスの利用による食品の日持ち向上. *防菌防黴* 36 (3): 183 – 191.
- 51) 築山良一・桂 晴美・古林万木夫 2002. カンゾウ油性抽出物に含まれるリコカルコンAの抗菌活性と日持ち向上剤への利用. *食品と開発* 37 (6): 59 – 61.
- 52) 上杉康彦 1981. 抗菌活性測定法, 農薬実験法 No.2 殺菌剤編. 深見順一, 上杉康彦, 石塚皓造, 富沢長次郎編, ソフトサイエンス社, 東京. 37 – 62.
- 53) 米山伸吾 2005. ベと病, 図説 野菜の病気と害虫. 米山伸吾・根本 久・上田康郎・都築司幸著, 農文協, 東京. 102 – 112.
- 54) 吉川展司・伊藤 眞 2012. 甘草およびその成分 (グリチルリチン酸等) について. *FFIジャーナル* 217: 38 – 46.

## Studies on The Mechanism of Cucumber Downy Mildew and Anthracnose Disease Suppression by Licorice Extract

Hisayoshi MIYAGAWA and Hirokazu OHNO<sup>1</sup>

**Key words:** licorice extract, cucumber downy mildew, cucumber anthracnose, disease suppression, glycyrrhetic acid, flavonoids

### Summary

Licorice is widely used as a raw material of pharmaceutical, cosmetic, and food additives. It is known that the constituents of licorice have both antioxidant and antimicrobial activities. In our previous study, we reported the disease control effect of some foliar fungal diseases of vegetables through the application of the purified licorice extract, previously called fravolicorice. In this study, we aimed to elucidate the control mechanism of the licorice extract against cucumber downy mildew and anthracnose disease.

The extract, commercially named MZ-1, is a yellowish powder manufactured by including a large amount of flavonoids during the extraction process of glycyrrhizic acid from the licorice root.

1. MZ-1 was fractionated using column chromatography (stepwise elution with ethanol [EtOH]) into 5 fractions. The 99% EtOH-soluble fractions showed high disease suppressive effects against cucumber downy mildew and anthracnose, as assessed using a potted cucumber plant. Among the major flavonoids included in the 99% EtOH-soluble fraction, isoliquiritigenin and licochalcone A mediated the high disease suppression effect against cucumber downy mildew. Conversely, these flavonoids showed no inhibitory effect against anthracnose at the same test concentrations, but strongly inhibited the fungal spore germination.
2. Glycyrrhetic acid included in the above-mentioned fraction showed high control effect against downy mildew and anthracnose and also strongly inhibited fungal spore germination in anthracnose. However, the control effect of glycyrrhizic acid, which is a glycoside of glycyrrhetic acid, was low.
3. MZ-1 inhibited zoospore release from the conidia of downy mildew, stopped zoospore movements, and caused the collapse of zoospores. However, MZ-1 showed no disease suppressive effect when used after 6 h since the conidia of the downy fungus was inoculated into the cucumber plant.
4. The 50% EtOH-soluble extract of herbal licorice showed suppressive effects against downy mildew and anthracnose. MZ-1 contained a high concentration of licochalcone A, isoliquiritigenin and glycyrrhetic acid compared with the above extracts.
5. Up to 3 days after the spraying of MZ-1, no change in the level of flavonoids was observed in the cucumber leaves. Moreover, the flavonoids were not detected in the leaves above the treated leaves 2

---

Lowland Crops Research Division, NARO Western Region Agricultural Research

<sup>1</sup> Maruzen Pharmaceuticals Co., Ltd.

days after the treatment.

6. An ethanol mixture of isoliquiritigenin and glycyrrhetic acid diluted with water was physically stable, showing no coagulation and precipitation. Similarly, an ethanol mixture of glycyrrhizic acid and glycyrrhetic acid was physically stable after dilution with water.
7. The preventive value of MZ-1 against downy mildew was 86 when cucumber plants in a field were sprayed using a 100-fold dilution of MZ-1. A spreading agent slightly inhibited the effect of MZ-1.
8. The results were obtained using MZ-1 extracted from *Glycyrrhiza inflata*. When the raw material was changed from *G. inflata* to *G. glabra*, the extracted made by the same process as MZ-1 did not include licochalcone A. However, such extracts include glycyrrhetic acid and other flavonoids such as isoliquiritigenin. Therefore, the control effect would not be less.