

乳酸菌を使った微生物農薬 “ラクトガード®水和剤”の開発

京都府農林水産技術センター生物資源研究センター(現 京都府立農業大学校)

Meiji Seika ファルマ株式会社生物産業研究所

京都府立大学大学院生命環境科学研究科

つ
津
うめ
梅
つじ
辻

だ
田
むら
村

かず
和
けん
賢
げん
元

ひさ
久
じ
司
と
人

はじめに

2000年代初頭に、雪印集団食中毒事件、BSEや高病原性鳥インフルエンザ等有害微生物などによる食品汚染事件が多発し、食に対する消費者の信頼を揺るがす事態となった。また、輸入冷凍ホウレンソウの残留農薬や無登録農薬の使用等の農薬に関する事件も多発し、農薬に対する消費者の不安が高まった。

農薬は、農薬取締法に基づいて安全性が確保されており、生産者が農薬使用基準を遵守する限り、農薬を使用して栽培された農産物の安全性に何ら問題はない。近年、生産者も農薬の使用履歴を記録し、使用基準を遵守していることを証明して、農産物の安全性を保証する取り組みを進めている。しかしながら、現在においてもなお、多くの消費者が健康への影響に気を付けなければならないと考えるハザードの一つに残留農薬を選択しているのが現状である(食品安全委員会HP)。

一方、化学合成農薬のみに過度に依存せず、様々な防除法を組合せた総合的病害虫・雑草管理(IPM: Integrated Pest Management)の確立が求められている。その技術の一つとして、微生物農薬の利用が世界的にも注目されている。

微生物農薬に利用する微生物は、農作物に直接処理するものであることから、消費者に安全性を保証するだけでなく、安心感を持ってもらうことが重要だと考え、乳酸菌に着目した。乳酸菌は乳製品や漬物などの発酵食品中に存在する微生物であり、近年はプロバイオティクスとしても注目を集めている。プロバイオティクスとは、「腸内細菌叢を改善することによって宿主に有益な作用をもたらす微生物」を指し(上野川, 2003)、乳酸菌による整腸作用、発がんリスク低減作用や免疫賦活作用等のヒトに対する保健機能が注目されている(辨野,

2004)。このように、ヒトに馴染みがあるとともに、有益な機能が期待されている乳酸菌であれば、消費者は安心感を持てると考え、乳酸菌を使った微生物農薬の開発に着手した。

発酵食品などから分離・収集した乳酸菌株をスクリーニングした結果、野菜やバラレシヨの軟腐病に防除効果を示す *Lactobacillus plantarum* BY株を見だし、世界で初めて乳酸菌を使った微生物農薬“ラクトガード®水和剤”を2015年5月に農薬登録した。本稿では、これまでの研究開発の経緯と推定される防除機構について紹介する。

なお、本研究成果は、農林水産省の先端技術を活用した農林水産研究高度化事業「人の健康に有益な乳酸菌を使った世界初の微生物農薬を開発する(2005～07年)」により得られた成果である。

I 有用乳酸菌株の探索

食品から分離される乳酸菌であれば、消費者はより安心感を持てると考え、ヨーグルト、漬物や塩辛等の発酵食品を主な分離源とした。さらに、自然環境中にも乳酸菌は広く分布する(岡田, 1996)ことから、農作物などの植物体からも分離した。乳酸菌の分離には0.5%炭酸カルシウムを含有したMRS寒天培地を用い、30℃で2, 3日培養後、菌体外に分泌された乳酸などによって炭酸カルシウムが溶解し、クリアゾーンを形成したコロニーを乳酸菌株として分離した。

分離した約1,500菌株の乳酸菌を対象に, TAKAHARA et al. (1993)の方法に準じて1次選抜を行った。すなわち、軟腐病菌 *Pectobacterium carotovorum* MAFF302818株と乳酸菌株の混合懸濁液にキャベツ葉ディスクを24℃、1時間浸漬した後、シャーレに並べて28℃、24時間静置後の病徴程度を比較することにより、有望株を選抜した。2次選抜では、1次選抜した乳酸菌株と軟腐病菌株との混合懸濁液を、ポット栽培したハクサイ株の中肋(葉柄)部に穿刺接種して10日間栽培した後、発病程度を調査した。これらのスクリーニングにより、有望な2菌株を選抜した。

Development of Biopesticide “Lactogard®” Using Lactic Acid Bacteria. By Kazuhisa TSUDA, Kenji UMEMURA and Gento TSUJI

(キーワード: 微生物農薬, 乳酸菌, 軟腐病, *Lactobacillus plantarum*)

2次選抜した2菌株の圃場レベルでの防除効果を比較するため、2006年、京都府農林水産技術センター生物資源研究センター内の汚染圃場において、防除試験を2回実施した。その結果、既存の微生物農薬より高い防除効果を示し、かつ、ハクサイに対して薬害を示さなかったSOK04株を実用化候補株として選抜した。

SOK04株の同定の過程において、2種の乳酸菌株BY株とSW株が混在していることが判明した。そこで、両菌株の製剤試作品を作製し、2007年と08年の2か年にわたり、合計6府県10圃場で軟腐病防除試験を実施して、防除効果を比較した。その結果、いずれの試験においても、BY株を有効成分とするBY製剤が既存の微生物農薬と同等ないしそれ以上の防除効果を示したことから、BY株(図-1, 2, 口絵①)を実用化株に決定した。

II 乳酸菌製剤の実用性評価と微生物農薬登録申請

2009～11年にハクサイ軟腐病に対する薬効・薬害試験を国内6箇所で行ったところ、BY製剤は対照薬剤とした化学合成農薬(銅水和剤またはオキシリニック酸

水和剤)に対してやや劣る～同等、既存の微生物農薬に対しては同等～優る防除効果を示した(図-3)。軟腐病は多くの農作物に発生する多犯性病害であることから、トマト、キャベツやバレイショ等の軟腐病に対する薬効・薬害試験を実施したところ、BY製剤は化学合成農薬とほぼ同等の防除効果が認められた。また、本剤は、いずれの試験においても供試した作物に対する薬害は認められず、微生物農薬登録ガイドラインに沿って実施した各種安全性試験でも安全性が確認された。

これらの結果を基に微生物農薬として登録申請し、2015年5月、野菜類およびいも類軟腐病に対する防除剤“ラクトガード®水和剤”として農薬登録された。本剤は、有効成分 *Lb. plantarum* BY株を 1×10^{10} cfu/g 含有し、使用希釈倍率は1,000倍、使用液量は150～300 l/10 a、使用方法は散布、使用時期は発病前～発病初期であり、使用回数に制限はない。

III *Lb. plantarum* BY株の推定される防除機構

2009年のハクサイの春作と秋作において、*Lb. plantarum* BY株と、*Lactobacillus* 属の4種の標準菌株 *Lb. plantarum* JCM1149株、*Lb. brevis* JCM1059株、*Lb. acidophilus* JCM1132株および *Lb. casei* JCM1134株の防除効果を比較・検討した結果、BY株が安定した防除効果を示した。そこで、BY株と、BY株と同種であるが防除効果を示さなかったJCM1149株を用いて、以下の比較試験を行った。

軟腐病菌に対するBY株とJCM1149株の抗菌活性を培地上で比較した。その結果、BY株、JCM1149株とも抗菌活性を示し、両菌株の菌密度が高いほど抗菌活性は高まったが(表-1)、両菌株の抗菌活性には差が認められなかった。このことから、BY株の抗菌活性は防除機構の一つと考えられるが、BY株に特異的な防除効果を説明するものではないと考えられた。



図-1 *Lactobacillus plantarum* BY株
0.5%炭酸カルシウム含有MRS寒天培地上のコロニー。

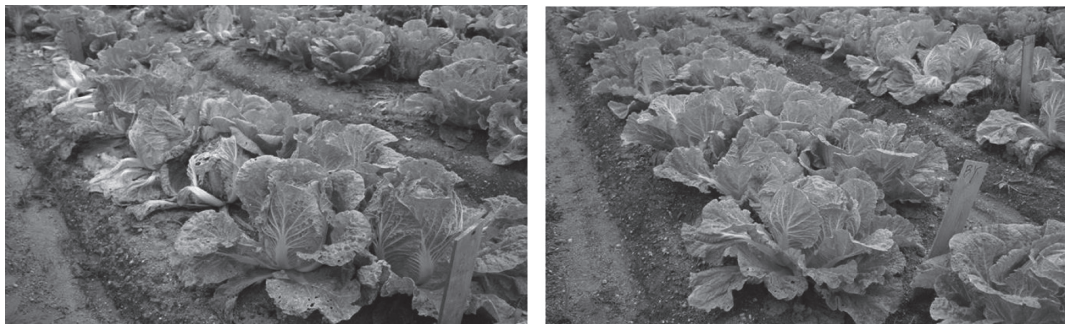


図-2 BY製剤によるハクサイ軟腐病防除効果(2007, 京都)
左: 無処理区, 右: BY製剤処理区。

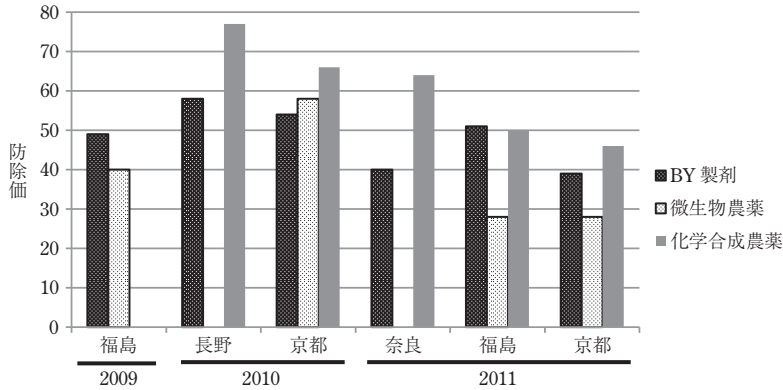


図-3 微生物農薬登録のためのハクサイ軟腐病に対する薬効・薬害試験

表-1 軟腐病菌に対する *Lactobacillus plantarum* BY 株および JCM1149 株の抗菌活性

菌株	阻止円直径 (mm)			
	10 ³ cfu/ml ^{a)}	10 ⁴ cfu/ml	10 ⁵ cfu/ml	10 ⁶ cfu/ml
BY 株	20.6 ± 1.8	25.2 ± 1.7	28.4 ± 0.7	31.5 ± 0.7
JCM1149 株	19.1 ± 1.9	23.9 ± 2.2	28.1 ± 3.4	31.0 ± 1.9

軟腐病菌塗布した PDA 培地に、所定の菌密度の乳酸菌株を含む MRS 寒天培地ディスクを置床して 30℃ で 3 日間培養した後、阻止円直径 (mm) を測定した。

^{a)} MRS 寒天培地ディスク中の乳酸菌密度 (cfu/ml)。

次に BY 株による作物への抵抗性誘導作用の可能性について検討した。ハクサイ葉に BY 株および JCM1149 株の死菌体懸濁液をそれぞれ噴霧処理して 24 時間後、処理葉から RNA を回収し、RT-PCR 法により防御応答マーカー遺伝子の発現を調べた。その結果、蒸留水や JCM1149 株処理した区と比べ、BY 株処理区では PR タンパク質遺伝子である *BrPR-1*, *BrPR-4* および *BrPR-5* やディフェンシン遺伝子である *BrPDF1.2* の発現量が多いことが認められた。このことから、BY 株の防除機構としてハクサイに対する抵抗性誘導作用も関与する可能性が強く示唆された。

さらに、ハクサイ株における BY 株と JCM1149 株の定着性を明らかにするため、温室内でポット栽培したハクサイ株の中肋部に針で傷を付けた有傷部と傷を付けない無傷部に、両菌株の懸濁液をそれぞれ噴霧処理した後、経時的にサンプリングし、両菌株の菌密度の推移を調査した。その結果、有傷部では、両菌株とも処理 1, 2 日後に菌密度が増加していた (図-4)。

一般に、乳酸菌は植物に対して病原性を持たないが、栄養要求性が高く、糖分やアミノ酸等の栄養が豊富な環境でないと生育できない。生鮮野菜を原料とする漬物では、植物に食塩を振りかけ、重石をすることにより、植

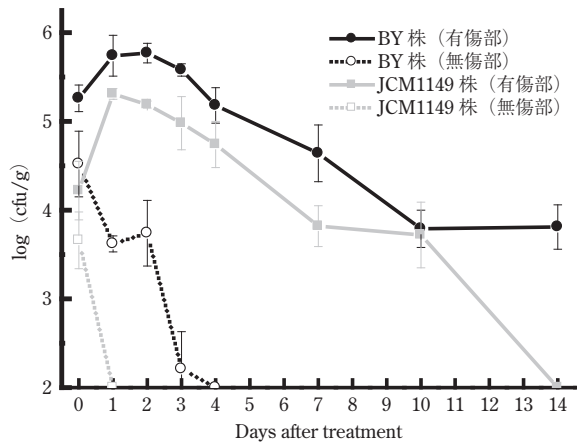


図-4 ハクサイ葉における *Lactobacillus plantarum* BY 株および JCM1149 株の定着性
ポット栽培しているハクサイの中肋の有傷部および無傷部に、 1×10^7 cfu/ml に調整した BY 株および JCM1149 株懸濁液を噴霧処理し、経時的に菌密度を調査した。

物細胞から栄養分を漏出させる。その栄養分を消費することで乳酸菌は増殖し、増殖に伴って産生する乳酸をはじめとする各種有機酸によって pH を低下させること

で、雑菌の増殖を抑制する(岡田, 2004)。

定着性調査における有傷部での両菌株の菌密度の増加は、付傷により漏出した細胞成分を資化することでBY株やJCM1149株が増殖し、その増殖に伴って菌体外に乳酸などを分泌していることを示唆している。一方、軟腐病菌にとって、植物体上の傷口は主な感染経路である。軟腐病菌が傷口から侵入する際に、あらかじめあるいは侵入直後にBY株やJCM1149株を噴霧処理すると、軟腐病菌に対して養分や場所の競合が起こるとともに、産生された乳酸などによる抗菌作用も働くことで、軟腐病菌の感染が抑制されることが推測される。つまり、漬物における乳酸発酵の原理が、軟腐病菌の感染部位である植物体上の傷口でも起こっているのではないかと推測している。その有傷部でのBY株の菌密度がJCM1149株より明らかに高かったことは、BY株はJCM1149株よりも競合や抗菌作用が強く働くことを示唆するものである。また、無傷部でもBY株はJCM1149株より菌密度が高く推移したことから、BY株はハクサイへの定着性が高いと考えられる。

以上のことから、BY株の作用機構には、乳酸などによる抗菌活性、抵抗性誘導作用、競合が強く関与しており、BY株の植物体上での高い定着性がこれらの作用を発揮するうえで重要であると推定される。

おわりに

本剤は、野菜類およびイモ類軟腐病に対する微生物農薬として開発された。その防除効果は、各種細菌性病害に対する化学合成農薬と同様に、完全であるとは言い難い。抵抗性品種利用、排水改善や圃場衛生管理の徹底等の耕種的防除と併せて、総合的に防除することが重要で

ある。

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

乳酸菌は、発酵食品に含まれる微生物、腸管内に常在する微生物として知られている。これまで、数種の乳酸菌株が寒天培地上や共培養条件において植物病原性細菌の増殖を抑制する報告(VISSER et al., 1986)はあったが、実際の栽培条件で防除効果を示す乳酸菌製剤を開発したのは本研究が初めてである。

本剤の有効成分であるBY株が属する*Lb. plantarum*は、植物性乳酸菌の一種であり、漬物からしばしば分離される乳酸菌である(岡田, 2004)ことから、本剤は消費者が安心感を持てる農薬と成り得ると考えている。本剤が、生産者のみならず消費者にも安心な農薬として受け入れられ、安定した作物生産に寄与することを願っている。

引用文献

- 1) 辨野義巳(2004):乳酸菌の新しい系譜, 中央法規, 東京, p.286 ~ 313.
- 2) 上野川修一(2003):免疫と腸内細菌, 平凡社, 東京, p.142 ~ 144.
- 3) 岡田早苗(1996):乳酸菌の科学と技術, 学会出版センター, 東京, p.12 ~ 13.
- 4) ———(2004):乳酸菌の新しい系譜, 中央法規, 東京, p.25 ~ 58.
- 5) 食品安全委員会 HP, 食品安全モニターからの報告, https://www.fsc.go.jp/monitor/monitor_report.html
- 6) TAKAHARA, Y. et al. (1993): Ann. Phytopath. Soc. Japan 59: 581 ~ 586.
- 7) VISSER, R. et al. (1986): Appl. Environ. Microbiol. 52: 552 ~ 555.

農林水産省プレスリリース (28.1.16 ~ 2.15)

農林水産省プレスリリースから、病害虫関連の情報を紹介します。

<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan> の後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧下さい。

◆「平成27年度病害虫発生予報第5号(水稻特集)」の発表について
(7/28) /syokubo/150728.html

◆「平成27年度病害虫発生予報第6号」の発表について
(8/18) /syokubo/150818.html