

報 文

四級アンモニウムポリマーの TMV 感染阻止効果*

中島 哲男, 織田 雅次, 寺岡 徹, 重松太一郎

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 Quaternary Ammonium Polymers
against TMV Infection*Tetsuo NAKAJIMA, Masatsugu ODA, Toru TERAOKA
and Taichiro SHIGEMATSU*Research Center, Mitsubishi Chemical Industry Ltd.,
Midori-ku, Yokohama 227, Japan*

Cationic quaternary ammonium polymers were tested for their antiviral activities against TMV infection on tobacco plants (*Nicotiana tabacum* L. cvs. Xanthi-nc and Bright Yellow). Chemicals were applied onto leaves of Xanthi-nc prior to TMV inoculation or with TMV inoculum. Among polymethacryloxyalkyl ammonium salts, poly(3-methacryloxy-2-methylpropyl-2-trimethylammonium methylsulfate) (MOBA · TMMS) showed the highest inhibitory activity. Copolymer of dimethyldiallylammonium chloride (MAA) and (3-chloro-2-hydroxy)-propyldiallylammonium hydrochloride (PAA) (MAA/PAA=6, CMPA) was the most effective among polydiallyl ammonium salts. CMPA showed the highest inhibitory activity on Bright Yellow tobacco to TMV infection through the infested soil. It was observed that the degree of flocculation of TMV by CMPA was significantly greater than that by sodium alginate, a known antiviral substance. Furthermore, CMPA was proved to be a stronger antiviral agent than sodium alginate in mixed inoculation method. Whereas, both polymers showed nearly equal antiviral activity in pre-treatment method.

緒 言

前報¹⁾で述べたように、界面活性剤および高分子電解質の TMV 感染阻止効果を比較すると、界面活性剤では α -オレフィンスルホン酸ナトリウムが、アニオンポリマーではアルギン酸ナトリウムやポリアクリル酸ナトリウムが、カチオンポリマーではポリ(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) が高い TMV 感染阻止効果を示した。そのなかでも、カチオン四級アンモニウムポリマーである MOEA · TMC は、最も強い活性を示した。そ

こで、ポリ(メタクリルオキシアルキルアンモニウム)およびポリ(ジアリルアンモニウム)を供試し、TMV 感染阻止効果^{2~6)}とその作用性について検討し、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⁷⁾した試料を用いた。樹脂分 20~40% 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。純度は、仕込みモノマー量から換算した。回転粘度は、ビスメトロン VS 型粘度計(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。

* 抗植物ウイルス剤に関する研究 (第 2 報)
Studies on Antiviral Substances for Plant Virus
(Part 2)

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法^{8,9)} および混合接種法^{8,9)}を, 全身感染阻止効果の検定には土壌接種法を用いた。また TMV と薬剤の直接的な反応を調べるために TMV 凝集力試験を行なった。

1. 前処理法

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)¹⁰⁾。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 μ g/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 (%) = $(1 - x/y) \times 100$ 。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。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^{8,9)}。

2. 混合接種法

Xanthi-nc の葉表面に, あらかじめカーボランダム (600 メッシュ) をふりかけておき, その半葉には 1/15 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で希釈した TMV と供試薬剤の混合液を, 混合 1 ~ 2 時間後に, 対半葉には対照として 0.25 μ g/ml の TMV をなすりつけ接種した¹⁰⁾。その他の点については前処理法の場合と同様である。このよう

Table 1 Inhibitory activity of poly(methacryloxyalkyl ammonium) applied before TMV inoculation to Xanthi-nc^{a)} (Pre-treatment method).

$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{-(CH}_2\text{-C)}_n \\ \\ \text{COOR}_1\text{-N}^+\text{-R}_2 \\ \\ \text{R}_3 \end{array} \quad \text{X}^-$					Inhibition (%)		
R ₁	R ₂	R ₃	X	Code	2,000 ppm	1,000 ppm	500 ppm
CH ₂ CH ₂	CH ₃	H	Cl	MOEA·DMC	57		
"	"	"	1/2 SO ₄	MOEA·DMS	73	71	31
"	"	CH ₃	CH ₃ SO ₄	MOEA·TMMS	70	57	59
"	"	"	Cl	MOEA·TMC	75	55	56
"	C ₂ H ₅	H	Cl	MOEA·DEC	56	53	45
"	"	"	1/2 SO ₄	MOEA·DES	75	74	35
"	"	CH ₃	CH ₃ SO ₄	MOEA·DEMS	79	61	62
"	"	"	Br	MOEA·DEMB	67	60	44
"	"	"	Cl	MOEA·DEMC	72		
CH ₂ CH ₂ CH ₂	CH ₃	H	Cl	MOPA·DMC	68	52	36
"	"	"	1/2 SO ₄	MOPA·DMS	62		
"	"	CH ₃	CH ₃ SO ₄	MOPA·TMMS	63	62	66
"	"	"	Br	MOPA·TMB	62	63	59
"	"	"	Cl	MOPA·TMC	66		
$\begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_2\text{-C} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	"	H	Cl	MOBA·DMC	79	61	46
"	"	"	1/2 SO ₄	MOBA·DMS	78	75	56
"	"	CH ₃	CH ₃ SO ₄	MOBA·TMMS	74	77	78
"	"	"	Cl	MOBA·TMC	80	66	63

^{a)} Chemicals were applied approximately 3 hr prior to TMV inoculation.

^{b)} Apparent viscosity at 2,000 ppm was between 5 and 20 mPa·sec.

な、薬剤と TMV をあらかじめ混合してから接種する試験法は、混合接種法^{8,9)}と呼ばれている。

3. 土壌接種法

TMV 罹病タバコ葉 (Bright Yellow) の乾燥粉末を 0.5 g 混合した汚染土壌 1 l に、薬液 (2,000 ppm) を 50 ml 処理してから、圃場の植穴に入れた。そこへ、薬液 (2,000 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 とした。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 (%) = $(1 - x/y) \times 100$ 。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。

4. TMV 凝集力試験

蒸留水に懸濁した TMV (200 μ g/ml) と薬液を 3 ml ずつ混合し、1 分間激しく攪拌した。その後、12,500 $\times$ g で 30 分間遠心分離し、上清の 260 nm における UV 吸収を測定し、沈殿率を算出した。沈殿率 (%) = $1 - (T - B_i/B_o) \times 100$ 。ただし、 T および B_i , B_o はそれぞれ TMV と薬剤の混合液および薬液、TMV 液の上清の 260 nm における吸光度とする。

実験結果

1. ポリ(メタクリルオキシアルキルアンモニウム)の TMV 感染阻止効果

ポリ(メタクリルオキシアルキルアンモニウム)を合成し、TMV 感染阻止効果の検定を行なった。前処理法における結果は、Table 1 に示した。2,000 ppm から 500 ppm までのすべての濃度についてみると、ポリ(3-メタクリルオキシ-2-メチルプロピル-2-アンモニウム) (以下 MOBA と略す) が高い活性を示した。とくに、トリメチルアンモニウムメチルサルフェート (以下 MOBA・TMMS と略す) は、500 ppm でも高い活性を示した。混合接種法における結果は、Table 2 に示した。本試験の場合には、ポリ(3-メタクリルオキシプロピルアンモニウム) (以下 MOPA と略す) のなかで、トリメチルアンモニウム塩が若干高い活性を示した。他の化合物においても、トリアルキルアンモニウム塩のほうが、ジアルキルアンモニウム塩よりも高い活性を示す傾向であった。

Table 2 Inhibitory activity of poly(methacryloxyalkyl ammonium) applied to Xanthi-nc with TMV inoculum (Mixture method).

Chemicals	Inhibition (%)		
	0.1 ppm	0.05 ppm	0.02 ppm
MOEA・DMC	89	66	50
MOEA・DMS	97	77	0
MOEA・TMMS	95	56	6
MOEA・TMC	97	98	29
MOEA・DEC	89	42	0
MOEA・DES	92	72	3
MOEA・DEMS	97	89	0
MOEA・DEMB	98	92	10
MOEA・DEMC	97	95	58
MOPA・DMC	91	54	46
MOPA・DMS	97	39	35
MOPA・TMMS	97	94	53
MOPA・TMB	98	91	74
MOPA・TMC	95	94	80
MOBA・DMC	90	38	53
MOBA・DMS	98	86	4
MOBA・TMMS	98	82	27
MOBA・TMC	97	93	44

2. ポリ(ジアリルアンモニウム)の TMV 感染阻止効果

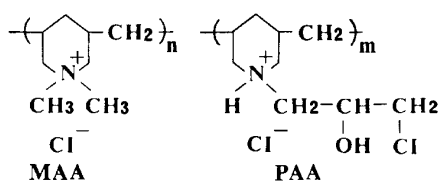
ポリ(ジアリルアンモニウム)の TMV 感染阻止効果を検定した (Table 3)。前処理法による効果をみると、ジメチルジアリルアンモニウムクロライド (以下 MAA と略す) と (3-クロロ-2-ヒドロキシ)プロピルジアリルアミノ塩酸塩 (以下 PAA と略す) との環化重合物 (仕込みモル比 6 : 1, 以下 CMPA と略す) およびポリ(*N*, *N*-ジメチル-3,5-メチレンピペリジニウムクロライド) が高い活性を示した。混合接種法による効果をみると、0.1 ppm, 0.05 ppm 両濃度において、CMPA とポリ(*N*, *N*-ジメチル-3,5-メチルスルホニルピペリジニウムクロライド) が高い活性を示した。

3. MAA と PAA の仕込みモル比と TMV 感染阻止効果の関係

前処理法、混合接種法の両試験で高い活性を示した CMPA は、MAA と PAA の仕込みモル比が 6 : 1 であるが、その比を変えたポリマーを調製し、前処理法により TMV 感染阻止効果を検定した (Table 4)。仕込みモル比が 6 : 1 の場合には、低濃度においても高い活性を示した。MAA と PAA のホモポリマーは、コーポリ

Table 3 Inhibitory activity of poly(diallyl ammonium) against TMV infection on Xanthi-nc.^{a)}

Chemicals	Inhibition (%)				
	Pre-treatment			Mixture	
	2,000 ppm	1,000 ppm	500 ppm	0.1 ppm	0.05 ppm
$\left(\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-SO}_2 \\ \\ \text{N}^+ \\ \text{CH}_3 \text{ CH}_3 \\ \text{Cl}^- \end{array} \right)_n$	49			94	87
$\left(\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-SO}_2 \\ \\ \text{N}^+ \\ \text{H} \text{ CH}_3 \\ \text{Cl}^- \end{array} \right)_n$	51			74	13
$\left(\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-SO}_2 \\ \\ \text{N}^+ \\ \text{CH}_3 \text{ CH}_2\text{CHOH} \\ \text{Cl}^- \end{array} \right)_n$	72			36	0
$\left(\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{N}^+ \\ \text{CH}_3 \text{ CH}_3 \\ \text{Cl}^- \end{array} \right)_n \left(\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{N}^+ \\ \text{H} \text{ CH}_2\text{-CH-CH}_2 \\ \quad \quad \\ \text{Cl}^- \text{ OH Cl} \end{array} \right)_m$ n:m = 6:1 (CMPA)	86	82	73	94	80
$\left(\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{-SO}_2 \\ \\ \text{N}^+ \\ \text{H} \text{ CH CH=CH} \\ \text{Cl}^- \end{array} \right)_n$	73			73	35
$\left(\begin{array}{c} \text{CH}_2 \\ \\ \text{N}^+ \\ \text{CH}_3 \text{ CH}_3 \\ \text{Cl}^- \end{array} \right)_n$	83	79	57	0	11

^{a)} Apparent viscosity at 2,000 ppm was between 3 and 10 mPa·sec.Table 4 Inhibitory activity of several polymers changing in the ratio of MAA to PAA on TMV infection.^{a)}

MAA/PAA	Inhibition (%)		
	2,000 ppm	1,000 ppm	500 ppm
1/0	64	52	53
7/1	86	65	59
6/1	81	79	71
4/1	77	68	62
1/1	75	66	56
3/7	71	68	58
0/1	65	55	44

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

マーに比べて活性が弱かった。

4. 全身感染タバコに対する TMV 感染阻止効果

ポリ(メタクリルオキシアルキルアンモニウム)のなかで、前処理法および混合接種法で高い活性を示した8化合物と CMPA を、土壌接種法を用いて TMV 感染阻止効果を検定した (Table 5)。CMPA が最も高い活性を示し、MOBA・TMMS がそれに次ぐ活性を示した。

5. CMPA と TMV との凝集反応

CMPA と TMV を試験管内で混合し、前述した TMV 凝集試験法により、凝集のおこり方について、アニオンポリマーのアルギン酸ナトリウムと比較した (Fig. 1)。共存塩類の影響を少なくするため、緩衝液による pH の調整は行なわなかったが、薬液の pH の影響により、いずれの反応液の pH も 6.0~7.0 の間であった。薬液と TMV を混合すると、ただちに白濁がおこり、1分間激しく攪拌するとフロックが観察された。そして、薬液濃度が 2.5 ppm をピークとして、それ以上の濃度になると、沈殿率は急激に低下した。一方、アルギン酸ナトリウムと TMV を混合した場合には、1,000 ppm という

Table 5 Inhibitory activity of quaternary ammonium polymers 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 (%)
MOEA·TMMS	29	12	41	55
MOEA·TMC	32	15	48	48
MOEA·DEMS	32	15	48	48
MOPA·TMMS	28	10	35	62
MOBA·DMC	30	18	60	35
MOBA·TMMS	30	8	26	72
MOBA·TMC	30	12	40	56
MOBA·DMS	30	16	53	43
CPMA	30	6	20	78
Untreated	32	30	93	

^{a)} Tobacco seedlings sprayed with chemicals (2,000 ppm) were transplanted to artificially infested soil, where the chemicals had been predrenched.

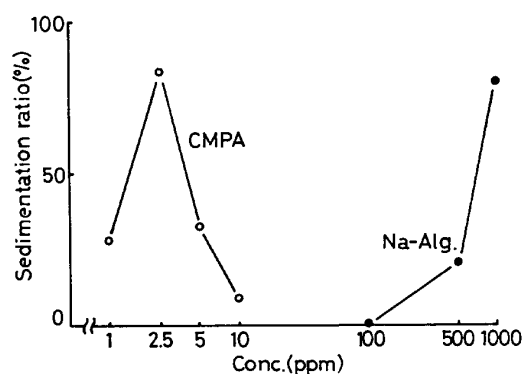


Fig. 1 Sedimentation of TMV from the mixture with the chemicals by low speed centrifugation.^{a)}

^{a)} Sedimentation ratio was assayed by measuring the optical density of the supernatant after the centrifugation at 260 nm (12,500 × g, 30 min).

^{b)} Na-Alg: sodium alginate.

高い薬液濃度でしか同等の沈殿率を示さなかった。

TMV の濃度を変えた場合の結果を Fig. 2 に示したが, TMV 濃度が変化すると, 凝集のピークもそれに伴って移動する傾向であった。

6. CMPA の混合接種法による TMV 感染阻止効果

CPMA の混合接種法による TMV 感染阻止効果を, 種々の薬液濃度で, アルギン酸ナトリウムと比較した (Fig. 3). CMPA は, 0.05 ppm で 80%, 0.1 ppm 以上では 90% 以上の阻止率を示した。一方, アルギン酸ナトリウムは, 100 ppm という高い薬液濃度でも 70% 程度の効果しか示さなかった。

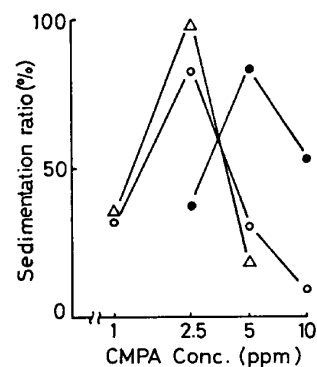


Fig. 2 Sedimentation of TMV from the mixture with CMPA by low speed centrifugation.^{a)}

^{a)} Sedimentation ratio was assayed as in Fig. 1. TMV Conc. (final); Δ : 50 $\mu\text{g/ml}$, $\circ$: 100 $\mu\text{g/ml}$, $\bullet$: 200 $\mu\text{g/ml}$.

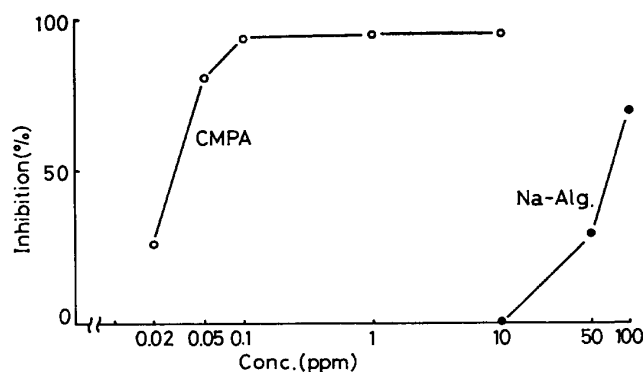


Fig. 3 Inhibitory activity of CMPA applied to Xanthi-nc with TMV inoculum.

7. CMPA の前処理法による TMV 感染阻止効果

CPMA の前処理法による TMV 感染阻止効果を, 種々

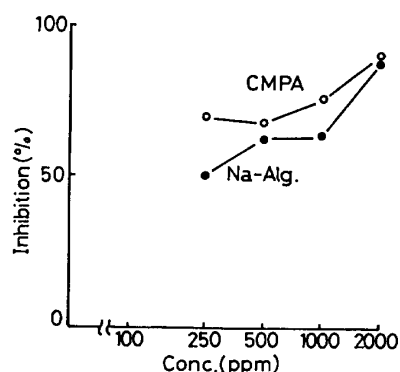


Fig. 4 Inhibitory activity of CMPA applied to Xanthi-nc before TMV inoculation.

の薬液濃度で、アルギン酸ナトリウムと比較した (Fig. 4). 2,000 ppm における効果をみると、CMPA, アルギン酸ナトリウムともに 90% 近い阻止率を示しており, 1,000 ppm から 250 ppm までの濃度においても, 効果に大きな差はみられなかった。

考 察

本実験に供試したポリ(メタクリルオキシアルキルアンモニウム)の前処理法, 混合接種法, 土壌接種法の結果では, アルキル (R_1) 部分の炭素数が多いほど活性が高い傾向であった。またトリアルキルアンモニウム塩とジアルキルアンモニウム塩を比較すると, トリアルキルアンモニウム塩のほうが高い活性を示した。このような結果から, 本系統化合物のなかで最もすぐれた TMV 感染阻止効果を示すのは, MOBA・TMMS であると考えられる。ポリ(ジアルルアンモニウム)の前処理法, 混合接種法の結果では, MAA と PAA の環化重合物の活性が高く, そのなかでも仕込みモル比 6:1 (CMPA) が最も高い活性を示した。CMPA の全身感染タバコに対する効果は, MOBA・TMMS よりも高く, 感染阻止剤としてすぐれた性質を有していると考えられる。

そこで, CMPA の TMV 感染阻止作用を, アニオンポリマーであるアルギン酸ナトリウムと比較しながら検討した。アルギン酸ナトリウムは, CMPA と比べて, 凝集力試験においては弱い凝集作用しか示さず, 混合接種法においてもその活性は低かった。しかし, 前処理法の結果をみるとほぼ同等の活性を示した。このことから, 両ポリマーの TMV 感染阻止の機構は異なっていると考えられる。

CMPA の結果をみると, 非常に低い薬液濃度で TMV に対して凝集作用を示し, TMV 100 $\mu\text{g/ml}$ に対して 2.5~5 ppm でほぼ完全に TMV を凝集させた。しかし, 薬液濃度を高くすると凝集はみられなくなった。薬

剤が過剰に存在すると, ウイルス粒子表面にある吸着活性点は, すべて薬剤粒子によって占められてしまい, しかも, 薬剤自身は高分子電解質であり, 親水性が強いので保護コロイドの機能をあらわしてウイルス粒子を取り囲み, これを安定化し, ウイルス粒子は分散状態を示すと考えられる¹¹⁾。また, あらかじめ薬剤と混合した TMV (0.25 $\mu\text{g/ml}$) を Xanthi-nc に接種すると, 0.1 ppm の薬液濃度で TMV の感染能力をほぼ完全に喪失させた。そして, 薬液濃度を 10 ppm まで上げて活性の低下はみられなかった。TMV の凝集がおこらないような高濃度の薬液の処理によっても, ウイルスの感染はほぼ完全に阻止される事実から判断すると, 個々のウイルス粒子表面への薬剤粒子の吸着が, 抗 TMV 活性発現の重要な要素である可能性がきわめて高いと考えられる。アニオンポリマーは植物のレセプターサイトと結合してウイルスの感染を阻害するという報告¹²⁾, 葉表面に吸着したウイルスは感染につながる行動を示さないという報告¹³⁾と本実験の結果をあわせて考察すると, カチオン四級アンモニウムポリマーは, 葉の表面上で個々のウイルス粒子の負帯電を中和し, 葉面にとどめてしまうことにより, 抗 TMV 活性を発現させていると考えられる。

要 約

カチオン四級アンモニウムポリマーのポリ(メタクリルオキシアルキルアンモニウム)およびポリ(ジアルルアンモニウム)の TMV 感染阻止効果を, 前処理法, 混合接種法, 土壌接種法により検討した。

ポリ(メタクリルオキシアルキルアンモニウム)のなかではポリ(3-メタクリルオキシ-2-メチルプロピル-2-トリメチルアンモニウムメチルサルフェート) (MOBA・TMMS) が, ポリ(ジアルルアンモニウム)のなかではジメチルジアルルアンモニウムクロライド (MAA) と (3-クロロ-2-ヒドロキシ) プロピルジアルルアミノ塩酸塩 (PAA) との仕込みモル比 6:1 の環化重合物 (CMPA) が, 最も高い活性を示した。それらの全身感染タバコに対する効果では, CMPA が最も活性が高く, MOBA・TMMS がそれに次いだ。

CMPA とアルギン酸ナトリウムを供試して, TMV 感染阻止作用の比較を行なった。TMV 粒子に対する凝集力や混合接種法による試験では, CMPA がすぐれた効果を示したが, 前処理法による試験では, 両ポリマーともほぼ同等の効果を示した。これらのことから, カチオン四級アンモニウムポリマーは, アニオンポリマーと TMV 感染阻止の機構が異なり, ウイルス粒子表面へ吸

着することにより、抗 TMV 活性を発現させていると考えられる。

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) 中島哲男・寺岡 徹・重松太一郎・春日井啓之：
農薬誌 **8**, 499 (1983)
- 2) 特開昭 54-32624
- 3) 特開昭 54-145212
- 4) 特開昭 54-151126
- 5) 特開昭 54-157826
- 6) 特開昭 55-111406
- 7) 大森英三： 高分子凝集剤，高分子刊行会，東京，
pp. 38-59, 75-83, 1973
- 8) 都丸敬一・大河喜彦： 日植病報 **41**, 155 (1975)
- 9) 高木康至： 日植病報 **44**, 262 (1978)
- 10) 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
- 11) 大森英三： 高分子加工 **21**, 572 (1972)
- 12) M. A. Stahmann & S. S. Gothoskar: *Phyto-*
pathology **48**, 362 (1958)
- 13) W. S. W. Merkens, G. A. de Zoeten & G. Gaard:
J. Ultrastruct. Res. **41**, 397 (1972)