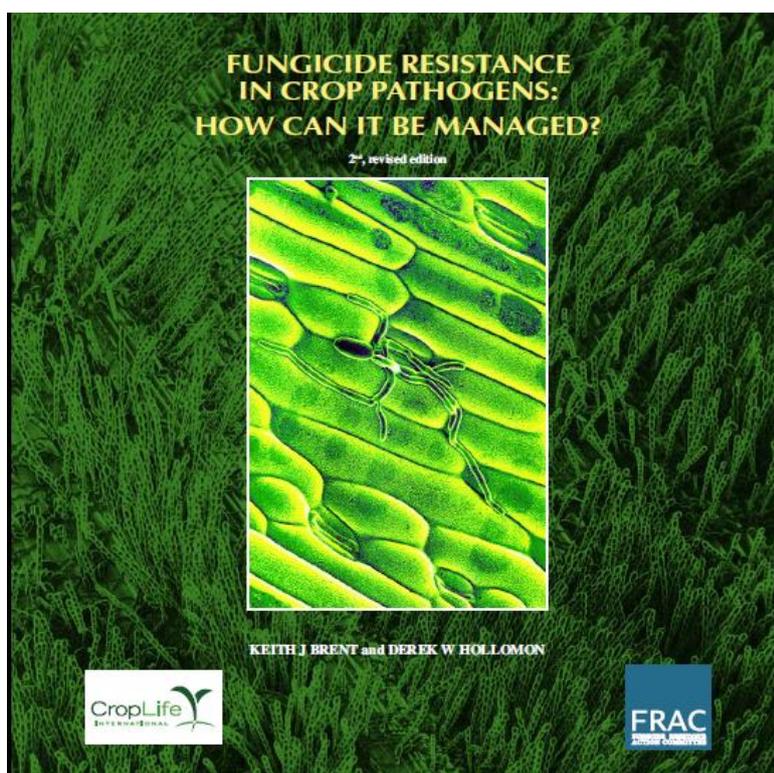


農業用殺菌剤耐性菌： どのように対策するのか？

FRAC モノグラフ No.1 改訂版

著者：KEITH J. BRENT, DEREK W. HOLLOMON



翻訳 農薬工業会 J FRAC

翻訳者

農薬工業会 J FRAC

田辺 憲太郎 日本曹達株式会社

中島 嘉秀 シンジェンタジャパン株式会社

木村 教男 住友化学株式会社

波多野 広幸 バイエル クロップサイエンス株式会社

目次

概要	1
1. 緒言	3
2. 植物病害の化学的防除	3
3. 耐性菌の定義	4
4. 耐性菌の発生	4
5. 耐性の原因	7
6. 耐性機構	8
7. モニタリングによる感受性の現状把握	9
8. リスク評価	12
9. 耐性菌対策	14
10. 今後の課題	18
あとがき	21
付録 殺菌剤の耐性リスク評価方法について	

概要

この論文は、農業用殺菌剤耐性菌に関わる諸問題について、国際的な成果をまとめたものである。主要点は以下のとおりである。

- * 殺菌剤は、現在もまた今後においても、作物の健全な生育、高収量、高品質を維持するために不可欠である。総合的作物管理において重要であり、良好な効果をできるだけ長期間維持しなければならない。
- * 耐性菌は広く分布していて、多くの殺菌剤の防除効果に影響している。
- * 耐性菌問題は悪化する恐れがある。すべての殺菌剤が多くの場合で今もなお有効である。現在の対策は完全ではないが、必要であり有益である。
- * 耐性菌は、元々はごくわずかに存在する突然変異菌株が殺菌剤暴露後に生き残り、拡散することにより顕在化する。発生様式として、一遺伝子変異による一段階耐性および多遺伝子変異による多段階耐性がある。耐性機構はさまざまであるが、病原菌における殺菌剤の作用点変異が原因であることが多い。
- * 新規殺菌剤の耐性リスクはある程度推定することができる。次のような場合は高リスクである可能性がある。
 - 病原菌における作用点が単一である。
 - 既存の殺菌剤と交差耐性がある。
 - 実験室で簡単に耐性の突然変異株を得ることができる。
 - 実使用において、繰り返すまたは長期にわたり防除する。
 - 広範囲に使用する。
 - 防除対象の菌集団が大きく、世代交代が速い。
 - 他の殺菌剤や防除手段がない。
- * 殺菌剤の防除効果が低下した時の原因を耐性菌に帰するため、また耐性菌対策が適切であるかどうかを判断するためには、モニタリングの実施が必要である。新規殺菌剤の実使用が始まる前に、感受性のベースラインデータを得ておく必要がある。結論を間違えないように、注意深く結果を解釈しなければならない。
- * 現在推奨されている主要な耐性菌対策は以下のとおりである。
 - 同じ殺菌剤を繰り返し使用しない。
 - 適切な殺菌剤と混用またはローテーションで組み合わせて使用する。
 - 使用回数や時期を制限する。
 - 発病してからの使用はしない。
 - 処理量を守る。
 - 化学的防除以外の手段も活用する。
 - 可能であれば複数の対策を実施する。一部の対策は理論に基づくものであり、耐性菌の遺伝学的・疫学的動態および異なる対策の効果について、一層の実験データが必要である。処理量を減らすことは耐性菌の発生に悪影響はないようである。
- * 農薬製造企業が運営する FRAC は、複数の企業が保有する同じグループの殺菌剤に関わる耐性菌対策の作成と実施について重要な役割を果たしている。耐性菌に関する教育および情報の普及も重要な活動である。新規殺菌剤は FRAC によって厳密に取り扱われている。

- *企業が耐性菌に関する研究、助言を行っている。公的研究機関やアドバイザーも研究や実防除において耐性菌対策に貢献している。相互の連絡も一般的に良好であり、更なる交流の機会もある。
- *多様な新規化学合成殺菌剤および生物農薬の持続的な供給と注意深い実使用開始は、最も重要な耐性菌対策である。この点については国や国際的な登録審査機関の認識が高くなっている。国によっては、新規殺菌剤の申請者に、耐性菌発生の現状や予測、ベースラインデータ、モニタリング活動案、適切な使用方法などの情報を求めている。

1. 緒言

「変異しやすい危険な種族」 菌に対するこの適切な記述は、スイスの医学者アルブレヒト・フォン・ハラーの 1745 年頃の手紙に書かれている。

長期間にわたって、農業は殺菌剤耐性菌の発生による諸問題に直面してきた。初期の耐性菌の広範囲な発生以降、殺菌剤の製造企業、大学、公的研究機関、アドバイザーは現象の分析と対策の立案に注力している。1994 年に、Fungicide Resistance Action Committee (FRAC) は、耐性菌に関わる国際的な進歩と解決しなければならない問題についての総括を依頼された。

これについて FRAC モノグラフ¹No. 1 が刊行された。これ以降も耐性菌対策の基本は変わっていないが、殺菌剤の創製、耐性菌の事例、耐性機構の知見および耐性菌対策プロジェクトに多くの発展があった。これらはできる限りこの改訂版に取り込まれている。以前と同様にこの論文は、生物学者、化学者、農業技術者、販売者、公的な登録審査機関、大学教員、学生などの植物病害管理に関心がある専門家の役に立つことを目的としている。他に 2 冊の FRAC モノグラフが、耐性菌対策に重要なリスク評価および感受性ベースライン検定を取り扱っている。

2. 病害の化学的防除

殺菌剤は 200 年以上にわたって、作物を病原菌から守るために使用されてきた。初期から主にムギ類の種子やブドウを保護していた。特に第二次世界大戦以降、使用する作物数、防除する病害数、殺菌剤数、防除面積、防除回数、防除効果は、飛躍的に増加してきた。

驚くべきことに、古くから使用されている 2 つの殺菌剤、銅および硫黄は今でも有効であり、広く使用されている。フタルイミド、ジチオカーバメートなどは 50 年間以上安定した防除効果を示している。新規骨格で一部には浸透移行性があるような、初期の製品には無かった特性を持つ、より効果の高い殺菌剤の使用は、1960 年代後半から 1970 年代にかけて始まった。これらの殺菌剤には、MBC 殺菌剤、ジカルボキシイミド、フェニルアミド、DMI 殺菌剤などがある。1980 年代には、既存の殺菌剤の類縁体、特に DMI 殺菌剤について、特性が同程度か改良された化合物の使用が始まった。その後、フェニルピロール、アニリノピリミジン、Qo 阻害剤、SDHI、CAA 殺菌剤などの新規殺菌剤の開発、実使用の開始が続いている。

茎葉散布は殺菌剤の処理法の中で最も多く、一般に加圧式噴霧器が使用されている。散布量の減少、安定で安全な製剤化は、散布技術における重要な進歩である。散布の回数や時期は、浸透移行性の殺菌剤の使用と予察の精密化により多少改善しているが大きくは変わっていない。作物の病害防除の半分程度は、1 作期あたり 1~2 回の殺菌剤処理があるのみである。残りは 1 作期あたり 3 回以上 (20 回に及ぶこともある) の処理が必要である。最小限の化学合成農薬やエネルギーを使用して、補助的な非化学防除対策を使用する総合的作物管理のシステムは広く採用されていて、一部の条件においては散布回数や処理量の低減に寄与している。

多くの殺菌剤の防除価は 90 以上あり、農家における費用便益比は 3:1 である。コムギなまぐさ黒穂病やリンゴ黒星病のような病害については、経済的または生物学的な種々の理

¹ 特定の主題に関わる研究論文。

由により高い防除効果が必要となる。一方で、ムギ類うどんこ病のような病害については、防除効果は高くなくてもよい。一部の殺菌剤は広範囲の病害を防除できるが、一方で防除範囲が限定的な殺菌剤もある。多数の殺菌剤が販売されているが、通常一つの主要病害に対して高い防除効果を示す殺菌剤は 3~4 グループ位しかない。そのため、耐性菌の発生は農家にとって非常に大きな問題である。

3. 耐性菌の定義

新規殺菌剤の候補化合物は、研究室や温室における複数の病原菌に対する試験により見つかって、その後多くの地域や国の圃場で試験される。複数の作期における多数の圃場試験で、重要な作物病害に有効であることが十分に確認された場合、その化合物を殺菌剤として開発・販売するかどうかを検討することになる。殺菌剤が有効な病原菌は感受性菌、効果が無いか非常に低い病原菌は、自然または本質的な耐性菌である。この初めから存在する効果が低い病原菌については、その殺菌剤の抗菌範囲外であるとわかった時点で、実用的な意味はなくなる。自然な耐性の理由についてはほとんど研究の対象とならない。作用機構研究から推測されることがある。

ここで検討している耐性菌は自然な耐性とは現象が異なり、獲得耐性菌ともよばれる。殺菌剤を実使用しているうちに、防除対象となる病原菌の集団内に、適切に防除できなくなる感受性が低下した病原菌が現れる。そのような菌は、一般に殺菌剤の連用、または化学的・生化学的に共通の作用機構である同じグループの殺菌剤の連用によって発生する。以前は有効であった防除対象生物における耐性の出現は、抗細菌剤（サルファ剤、ペニシリン、ストレプトマイシン）、農業および衛生害虫防除剤（DDT）で 60 年以上前から知られている。

企業の研究者は、研究室や実験温室等で発生する感受性の低下、圃場で発生しても防除効果に対する影響が非常に低い場合に、耐性菌という用語を使用することに異議を唱え、感受性の変動により防除効果が低下または無くなるという意味で使用することを推奨している。実際に、実験室で人工的に発生した耐性菌や圃場における低レベルの耐性菌の観察が、その殺菌剤に実用的な防除効果があるにも関わらず、研究者や競合企業によって、事実上の耐性菌であるとか、効果の低下が近いと誤って解釈されることがある。

すでに広く定着している耐性菌という言葉の制限しようとする試みは混乱を招くので、必要なときに制限したほうが良い。圃場耐性菌という言葉が、耐性菌による病害防除の問題がある場合に限って使用されることがある。しかし、圃場における耐性菌発生の徴候があっても、防除効果の低減になるまではまだ程遠い。圃場耐性菌という言葉は、単に圃場に耐性菌が存在する場合（頻度、重度にかかわらず）に使用するのが良いように思う。必要があれば、防除効果の低下を観察した場合に、実用耐性菌という言葉を使用することもできる。実験室耐性菌または人工耐性菌という言葉も有用である。一部の研究者が、実験室において圃場から分離した菌を殺菌剤に暴露した場合に耐性菌として検出できることを報告している。このような例は分類が困難である。

4. 耐性菌の発生

国際的に実使用で発生した耐性菌の事例を表 1 に示す。影響が大きかった事例と重要な文献を引用した。1970 年までは少数の殺菌剤に対する耐性菌が散発的に発生した。発生した時期は、その殺菌剤の使用開始から相当に期間が経過した後であった。浸透移行性の殺

表1 実使用による殺菌剤耐性菌の発生

おおよその初発年	殺菌剤または殺菌剤系統	耐性菌発生までの期間(年)	作物・病害	病原菌
1960	芳香族炭化水素*	20	カンキツ貯蔵病害	<i>Penicillium</i> spp.
1964	有機水銀*	40	ムギ類	<i>Pyrenophora</i> spp.
1969	ドジン*	10	リンゴ黒星病	<i>Venturia inaequalis</i>
1970	MBC殺菌剤	2	多種	多種
1971	2-アミノピリミジン*	2	キュウリうどんこ病 オオムギうどんこ病	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> <i>Blumeria graminis</i>
1971	カスガマイシン	6	イネいもち病	<i>Magnaporthe grisea</i>
1976	有機りん	9	イネいもち病	<i>Magnaporthe grisea</i>
1977	トリフェニル錫*	13	テンサイ褐斑病	<i>Cercospora betae</i>
1980	フェニルアミド	2	ジャガイモ疫病 ブドウべと病	<i>Phytophthora infestans</i> <i>Plasmopara viticola</i>
1982	ジカルボキシイミド	5	ブドウ灰色かび病	<i>Botrytis cinerea</i>
1982	DMI殺菌剤	7	ウリ類うどんこ病 大麦うどんこ病	<i>Sphaerotheca fuliginea</i> <i>Blumeria graminis</i>
1985	カルボキシアニリド*	15	オオムギ裸黒穂病	<i>Ustilago nuda</i>
1998	Q _o 阻害剤	2	多種	多種
2002	MBI-D	2	イネいもち病	<i>Magnaporthe grisea</i>

*: 国内未登録

菌剤の参入とともに、耐性菌の事例は大幅に増加、耐性菌が発生するまでの期間は短くなり、上市 2 年後に発生した事例もある。1960 年後半以降に使用が始まった多くの殺菌剤が非常に影響を受けた。例外としてホセチル、フェニルピロール、イネいもち病防除剤（プロベナゾール、イソプロチオラン、トリシクラゾールなど）については、広範囲な長期間の使用にも関わらず防除効果を維持している。古くから使用されている銅、硫黄、ジチオカーバメート(例:マンゼブ)、フタルイミド(例:キャプタン)、クロロタロニル(TPN)についても、同様に長期間にわたって、場合によっては唯一の殺菌剤として使用されているが、十分な効果を維持している。

耐性菌の発生は、防除効果の大幅な低下と関係付けられることが多い。防除効果の突然で明確な低下について農家が気づくことが、最初の耐性菌の認知となるのが一般的である。もちろん、実験室においてその病原菌の感受性が異常に低いことを確認することにより、耐性菌が本当の原因であることを示す必要がある。時折農家やアドバイザーが、病害防除が困難な原因を耐性菌のせいにしようとすることがある。間違った処理法、病原菌の同定違い、異常に高い病原圧なども原因である可能性がある。しかし、実験室における病原菌の感受性の低下と、防除効果の低下に関係がある事例は多い。

突然の大幅な防除効果の低下があり、感受性菌と耐性菌が明確に区別できるのが特徴の耐性は、一段階、質的、分離、分裂または非連続耐性という(図 1 上図、以降一段階耐性という)。一旦発生すると安定な傾向がある。殺菌剤の使用を中止または大幅に減らしても、長期間耐性菌のままであり続けることもある。この事例として、ギリシャにおける MBC 殺菌剤耐性のテンサイ褐斑病菌がある。フェニルアミドに対するジャガイモ疫病の耐性菌のように、ゆるやかに感受性が回復する場合もある。そのような場合、殺菌剤の再使用が始まると急速に耐性化する傾向があるが、混用または混合剤の使用が有益な事例もある。

DMI 殺菌剤やエチリモールのように、耐性菌の発生が突然でないこともある。防除効果

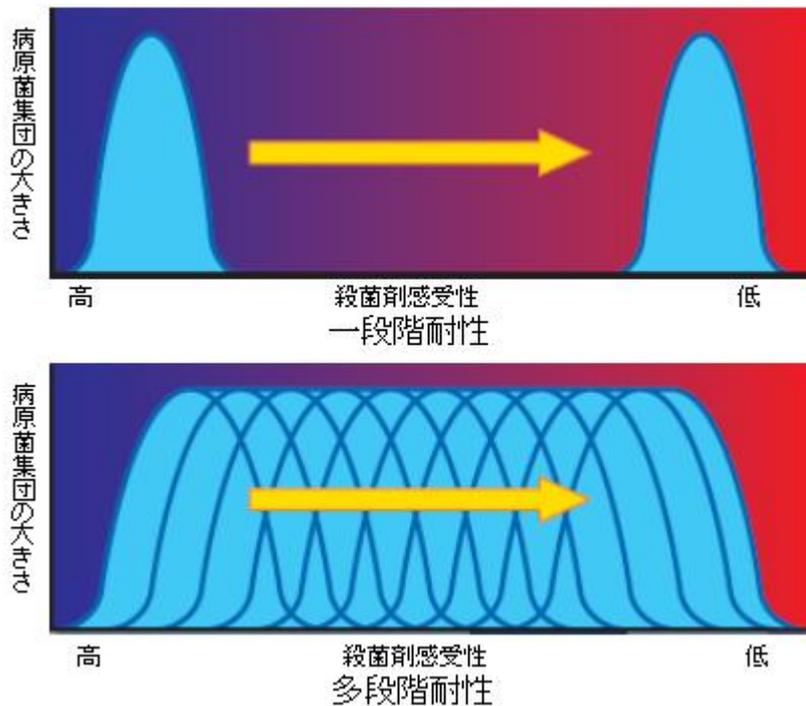


図1 一段階(上図)および多段階(下図)の耐性菌発生様式における2峰性および1峰性の感受性分布。

の低下とモニタリングで判明する病原菌の感受性低下が緩やかで、部分的で、ある程度の変動により現れる。このタイプは、多段階、量的、連続、方向性または前進型耐性菌といわれる(図1下図、以降多段階耐性という)。

特定の組み合わせの殺菌剤と病原菌について耐性菌が発生すると、同じような頻度でその殺菌剤を使用している他の地域でも、同時期または少し遅れて耐性菌が発生する。他の病原菌についても耐性菌が発生するかどうかについては、事例により異なる。一般的には、他の病原菌が同様に増殖して、同様な頻度でその殺菌剤を使用している場合には、耐性菌が発生する。ムギ類さび病菌は多量に孢子形成して急速に伝搬するにも関わらず、耐性リスクは低いようで耐性菌の事例はほとんどない。

ある殺菌剤に対する耐性菌は、同時に他の殺菌剤の耐性菌になることがある。一般に、この現象は化学的に類縁か、同じ作用機構をもつ殺菌剤のグループ内で認められる。この現象を交差耐性という。たとえば、ベノミル耐性菌は他のMBC殺菌剤であるカルベンダジム、チオフアネートメチル、チアベンダゾールに対しても耐性である。同じグループの殺菌剤間において、抗菌活性に大きな差がある場合は、交差耐性が限定的となる場合がある²。

逆に、ある殺菌剤に対する耐性菌が、他の殺菌剤の感受性菌となる負相関交差耐性という現象がある。例数は少ないが、ジェットフェンカルブとMBC殺菌剤について詳しい研究がある。

関連のない複数の殺菌剤に対して耐性菌となる場合もある。これは、それぞれの殺菌剤に対する独立した突然変異から生じる。この原因は交差耐性とは全く異なり、多剤耐性と

² たとえば、DMI殺菌剤において、ある有効成分の効果がほとんど無い低感受性菌に対して、他の有効成分が実用的な効果を示す事例がある。

呼ばれる。例として、MBC 殺菌剤とジカルボキシイミドの両方に耐性の灰色かび病菌がある。

5. 耐性の原因

一旦発生すると耐性は遺伝する。これは、病原菌の遺伝子における 1 カ所または複数の変異による。特定の耐性機構の原因となる突然変異遺伝子が、ごくわずかに病原菌集団の中にあるという数多くの状況証拠がある。殺菌剤が圃場で使用される前は、そのような突然変異は病原菌の成長や生残に有用ではなく、不利益をもたらす可能性がある。したがって、非常に低率で存在し続け、死滅と再生を自然に繰り返す。

自然突然変異はすべての生物に連続的に起こっている。突然変異株の発生率は、実験室における紫外線照射、突然変異原処理によって高くなり、人工的に得ることができる。しかし、人工的突然変異は、耐性機構や他の点において、圃場において出現するものとは同一ではない。

一般に、耐性菌の初期の比率は 10 億分の 1 くらいである。殺菌剤処理で生き残った菌の中で、耐性菌の割合は著しく増加する。耐性菌の存在が 1% から 10% 程度になったとき、病害の防除が困難になり耐性菌を容易に分離できるようになる。耐性菌の出現は突然であることが多いが、検出できないレベルで増殖している。もし殺菌剤の防除価が 80 であったとしても、1 回の処理で耐性菌はおよそ 5 倍に濃縮されるに過ぎないため、発達はゆるやかである。

リスク評価と耐性菌対策の作成に影響する重要な推論は、この単純な突然変異と選択の過程を考慮することにより導き出される。より有効な処理方法または濃度による殺菌剤の処理回数の増加、処理前の大きな病原菌集団の存在、多量の孢子形成および病原菌の世代が短いことが、耐性菌の選択を促進するであろう。

上述した耐性菌の選択の過程は、多くの感受性菌および耐性菌の遺伝子分析、圃場実験の結果を基にしている。しかし、これは主遺伝子耐性ともいわれる一段階型耐性についてのものである。殺菌剤の標的蛋白質のアミノ酸置換を引き起こす一塩基の点突然変異が、高レベルの耐性菌の原因となり、感受性菌と耐性菌が明確に分離する。このタイプの耐性菌は、MBC 殺菌剤、フェニルアミド、ジカルボキシイミド、Qo 阻害剤などに対して発生する。標的蛋白質における別の突然変異は、低レベルの耐性菌を誘発する。たとえば Qo 阻害剤の標的であるシトクロム b における F129L 突然変異株は低レベルの耐性菌であるため、高レベルの耐性菌である G143A 突然変異株に比べると実用的な被害は少ない。

遺伝子変異のやや異なる多遺伝子プロセスは、多段階耐性の根底にあると考えられる。一段階耐性と同様に、耐性菌は突然変異株の選択の結果であるが、この場合は低感受性化に寄与する限定的な効果の多くの遺伝子が関与している。耐性に関わる突然変異が多いほど、耐性の程度は高くなる。このことが、耐性菌の発達は緩やかであり、感受性の変動が連続的になる原因であると思われる(図 1)。多遺伝子耐性の理論は広く受け入れられているが、圃場分離菌についての遺伝的な実証は少ない。多段階耐性の例はムギ類うどんこ病について多くあるが、遺伝学的研究が困難で、一部のデータは矛盾している。DMI 殺菌剤に対する多遺伝子耐性についての生化学的研究は、少なくとも 4 つの耐性機構が関与していることを示す。しかしヒトの病原菌である *Candida albicans* の研究において、同じ標的遺伝子に異なる突然変異が蓄積し、それら個々の変異は相加的または相乗的であることが明らかとなっている。このように複数の対立遺伝子変異も多段階耐性の原因と成り得る。

Qo 阻害剤は、ミトコンドリア遺伝子にあるシトクロム bc-1 複合体を標的とする初めての殺菌剤である。ミトコンドリア DNA は核 DNA に比べると修復しにくいいため、より突然変異しやすい。呼吸で発生する活性酸素に近いため、ミトコンドリア DNA 塩基置換の頻度はさらに高くなる。殺菌剤の標的部位がミトコンドリア遺伝子にある場合は、適応度に対するこれらの突然変異の影響に応じて、耐性菌が速やかに発達するようである。Qo 阻害剤の耐性菌は多くの病原菌で速やかに発生したが、核遺伝子変異による MBC 殺菌剤耐性菌も速やかに発生したことに注意が必要である。

6. 耐性機構

この分野においては、特に大学において多数の研究がなされている。近年の研究結果を表 2 にまとめた。一部の研究は、圃場から分離した菌ではなく、実験室で得た人工耐性菌を使用している。MBC 殺菌剤、カルボキシアニリド、ホスホロチオレート、ジカルボキシイミド、Qo 阻害剤の耐性機構は十分に分かっている。DMI 殺菌剤については、4 つの主要な耐性機構が関与しているという多くの研究結果がある。しかし、既存の殺菌剤グループだけでなく、新規殺菌剤についても耐性機構に不明な点が多い。

現在、次の耐性機構が判明している。

- * 標的蛋白質のアミノ酸変異
- * 標的蛋白質の増産
- * 標的部位の代替代謝経路の発達
- * 殺菌剤の代謝分解
- * ABC トランスポーターによる殺菌剤の菌体外への排出

表2 殺菌剤の耐性機構

殺菌剤または殺菌剤系統	耐性機構
芳香族炭化水素*	不明 ジカルボキシイミドとフェニルピロールと交差
有機水銀*	結合物質による解毒?
ドジン*	不明
MBC殺菌剤	作用点の変異(β -チューブリン)
2-アミノピリミジン*	不明
カスガマイシン	作用点の変異(リボゾーム)
有機りん	代謝解毒
フェニルアミド	作用点の変異(RNAポリメラーゼ)?
フェニルピロール	作用点の変異(浸透圧制御に関わる蛋白質キナーゼ)
ジカルボキシイミド	
DMI殺菌剤	薬剤流出の増加 作用点の変異 作用点物質に対する需要減 作用点の過剰生産
カルボキシアニリド*	作用点の変異(コハク酸-ユビキノン酸化還元酵素)
Qo阻害剤	作用点の変異(ユビキノール-シトクロム還元酵素)
MBI-D	作用点の変異(シタロン脱水酵素)

*: 国内未登録

これまでのところ、標的蛋白質のアミノ酸変異による耐性菌が最も多い。これは古くから使用されている殺菌剤に耐性菌があまり発生しない理由でもある。これらの殺菌剤は一度病原菌の細胞に取り込まれると、非特異的な酵素阻害剤のように機能するので、多くの蛋白質に対して影響する（このため、多作用点接触活性化化合物ともよばれる）。また、病原菌に速やかに取り込まれて蓄積するために、植物や動物よりも病原菌に対して選択的に作用する。殺菌作用がなくなるためには、病原菌の多くの作用点が同時に変異しなければならない。必要となる多くの遺伝的変異が起こることはありえないし、変異が多い菌は病原性を失うか、生き残ることができないであろう。時折発生する多作用点接触活性化化合物に対する耐性の原因は、作用点の変異ではなく、別の理由によるものと思われる。

これに対して、単一の標的部位に作用する近代的な殺菌剤は、特異作用点または単作用点阻害剤とよばれる。たった一つの遺伝子変異が作用点を変異させて、殺菌剤に対する感受性が大幅に低下する。近年の耐性の原因となる点突然変異の特定に対する PCR 診断技術の発展により、作用点変異に関わる耐性機構の解明が進展した。耐性に関わる遺伝子が複数同定されて、研究されてきた。いずれも、遺伝子上の一塩基変異による標的蛋白質のアミノ酸置換が生じることで、殺菌剤が標的蛋白質に緊密に結合できなくなる。標的蛋白質におけるアミノ酸置換が異なると、異なったレベルの耐性菌となる。たとえば、Qo 阻害剤においては、ミトコンドリアの複合体Ⅲのシトクロム b 遺伝子における 143 番目のアミノ酸がグリシンからアラニンに置換する G143A 突然変異株は、129 番目のアミノ酸がフェニルアラニンからロイシンに置換する F129L 突然変異株よりも高レベルの耐性菌となる。

多段階耐性において、耐性の程度が異なる理由はよくわかっていない。それぞれの遺伝子によって起こる低いレベルの耐性機構は、特に同定が困難である。DMI 殺菌剤の場合、異なる遺伝子の突然変異によって、表 2 に示す異なる耐性機構を引き起こす。これらは関連はないが、同時にまた恐らく相乗的に作用する。

植物の抵抗反応の誘導によって病害を防除するプロベナゾールのような直接的な抗菌作用のない殺菌剤に対する耐性菌が発生しないのは興味深い。この理由は不明である。

7. モニタリングによる感受性の現状把握

モニタリングとは、圃場から分離した病原菌について、殺菌剤に対する感受性の程度を調べることを意味する。モニタリングは耐性菌研究において非常に重要である。なぜならば、耐性菌の分布、発達および影響についての全ての知見は、モニタリングから得ることができるためである。モニタリングは、コムギとエンバクの種子伝染性病害、柑橘の貯蔵病害における耐性菌調査について、1960 年代に初めて実施された。現在、非常に多くのモニタリングが日常的また国際的に行われている。

モニタリングによって、耐性菌の発生に対する事前警告を受けることができる。しかし、上述したように、一段階耐性菌は、耐性菌率が 1% 以上になってようやく検出可能となる。このような状況では、次またはその次の殺菌剤処理で通常の防除効果が得られなくなるかもしれない。そのため、実施できそうもない大規模の感受性検定をしない限り、有用な事前警告は得られそうもない（1% の発生率を 95% の確率で検出するためには 300 のサンプルが必要となる）。多段階耐性菌の場合、防除効果が実用レベルで低下する前に、不完全な耐性菌が高頻度で存在する。この場合耐性菌の検出は比較的容易であるので、モニタリングによって、より重大な耐性菌の出現や防除効果の低減のリスクを推定することができる。

もし他の地域で耐性菌問題が発生して、耐性機構が判明した場合は、分子生物学的方法が開発されている場合には、一段階耐性菌をより低頻度で検出できるため、耐性菌対策を早期に実施することができる。

モニタリングを実施する重要な理由の一つは、耐性菌対策の有効性の確認である。モニタリングは、殺菌剤が使用されている広い地域で実施されるため費用がかかるので、経済リスクが高い場合に実施される。分子診断技術は、コムギうどんこ病菌や葉枯病菌における Qo 阻害剤の耐性菌対策において有効に活用されてきた。農家からの防除効果の低下についてのクレームに関わる調査、将来処理すべき殺菌剤の選択についての助言のためにもモニタリングが実施された。

モニタリングには重要な二つのステップがある。過去、いずれかのステップを省略したため、明瞭な結果を得ることができなかったモニタリングがあった。一つ目として、早期にモニタリング方法を開発して、新規殺菌剤が使用される前の病原菌集団について感受性のベースラインを把握することである。この自然な範囲の感受性は、その後に実施したモニタリング結果における感受性の変動を解釈するのに極めて有用である。適切なサンプリングと検定方法が考案され、試験されることにもなる。残念ながら最近までベースラインデータはあまりなかった。しかし、農薬登録上の必要項目³となったため、製造企業は商品化の前に実施している。FRACモノグラフNo.3:「殺菌剤耐性菌研究および対策における感受性ベースライン」が、ベースライン作成における方法の詳細を扱っている。

二つ目としては、実際の防除効果を調査することである。圃場における防除効果についてはあいまいで記録が少ないが、それでも実使用における耐性菌の発生についての重要な指標となる。高リスクの殺菌剤で処理されている作物、処理されていない作物における病害の発生および実施された圃場試験のすべての試験区について、毎年系統的に観察すべきである。実使用における耐性菌の発生を確認するために、耐性菌の発生と防除効果の低下について、時と地域を関連させる必要がある。防除効果の低下については、話題とするだけでなく記録して照合しなければならない。

モニタリングの信頼性、準備・方法、費用、必要性等について多くの知見が積み上げられてきた。適切な時期に代表的なサンプルを採集することが重要である。もし十分な感染があるのであれば、なるべく生育の早い時期に一部のサンプルを得ておくことが重要である。殺菌剤処理後に耐性菌が高頻度に存在することは、防除が成功して、病原菌の生き残りが小さな集団になったことの証でもある。もちろん、もし耐性菌の集団が持続して、次の年の伝染源となる場合には、実使用における問題が発生するかもしれない。しかし、必ずこうなるとは限らない。耐性菌の発生リスクは、地域によって異なるという知見がある。病害が多発して殺菌剤の使用が多い地域と、病害の発生がほとんどない地域、または殺菌剤をほとんど使用しない地域との間には、リスクに大差がある。たとえば、北ヨーロッパにおいては主要なムギ類病害に対して多数の殺菌剤に対する耐性菌が発生するのに対して、南ヨーロッパでは感受性菌のままであり、モニタリングを実施する必要性は低い。

感受性検定法は、現実的、量的で、再現性があり、結果がわかりやすい方法でなければならない。ヨーロッパ地中海地域植物防疫機関(EPPO)⁴やFRACを含む多くの機関が方法の標準化を進めている。標準化することにより、特にそれぞれの研究機関で感受性菌の試験が実施されている場合には、異なる研究機関の結果を直接比較することができる。一方

³ 日本国登録においては必要項目ではない。

⁴ ヨーロッパにおいて効果的な植物保護を国際的に推進している政府間組織。

で、異なる方法が同様な結果を示すのであれば、結果の信頼性が高くなる。また、異なる方法の利点・欠点の判断は、数年間使用した後でなければできない。条件が異なる場合には、異なる方法または改良した方法が最も適しているかもしれない。

モニタリングの基本は生物検定である。そのため感受性の低下は耐性機構にかかわらず同定できる。近年試験方法は、可能な限り小型化されてきた。孢子発芽試験には、多くのサンプルを評価できるマイクロプレートを使用する。分光光度計で菌の生育を直接測定するか、蛍光試薬を加えて呼吸活性を測定することで、液体培地における殺菌剤の生育阻害率を測定できる。しかし、べと病菌やうどんこ病菌のような絶対寄生菌の場合は、より多くの作業が必要になる。耐性の分子機構と点突然変異部位が判明している場合は、PCRを使用することができる。Qo阻害剤の標的であるシトクロムbにおけるG143Aアミノ酸変異の早期の発見が、アリル特異的リアルタイムPCRを用いる大規模なQo阻害剤耐性菌のモニタリングのきっかけとなった。現在のリアルタイムPCR診断技術によって、1億分の1の頻度の突然変異を圃場における病原菌の集団に検出することができる。

ある病原菌において耐性の原因となる点突然変異が判明した場合、同じ変異点を他の病原菌にも同定できるため、実使用による耐性菌が発生する前にPCR診断技術を準備しておくことができる。PCRを使用するモニタリングは点突然変異が耐性の原因となるMBC殺菌剤、ジカルボキシイミド、MBI-Dにも適用可能である。



図2 ヨーロッパにおけるトリアジメノールに対するコムギうどんこ病耐性菌の分布についての大規模なモニタリングの結果。数値は、1993年（スペインは1992年）におけるRF値⁵を示す。地域によって大差があり、DMI殺菌剤の使用が最も多かった北西部において、高度耐性菌が発生した。

モニタリング結果の解釈は難しく、耐性菌の発生を過大に予測したことがある。圃場分

⁵ Resistance factorの略。耐性の程度を示す。RF値＝耐性菌のEC₅₀／感受性菌のEC₅₀

離菌株間のわずかな感受性の違いや、極わずかに存在していた耐性菌および人工耐性菌の検出について、実用的な問題であると過大に解釈してきた。正確な報告や詳細な科学的論文よりも、口頭発表や短報により公表する場合において、このような事例がありがちである。良好なベースラインデータと圃場における防除効果を関連づけた正確なモニタリングによって、科学的小および実用的価値がある多くの知見を得てきたし、今後も継続するであろう。

これまで、大規模な殺菌剤のモニタリングは、長期間にわたってムギ類およびブドウ病害についてなされている。企業が費用負担した初期の研究にミュンヘン大学における図2の研究があり、最近では民間研究機関の受託企業も実施している。ある国に限定した調査が、企業または農協によって資金提供されて、製造企業自身または公的・民間研究機関で実施されている。

8. リスク評価

耐性菌の発生に関わるリスク評価は、新規殺菌剤を開発しようとしている企業にとって、非常に重要な課題である。耐性リスクについての知識は、その製品が開発・販売されるべきかどうか、もし開発・販売されるのであれば、どのような、またどの程度の耐性菌対策やモニタリングを実施すべきかを決定する手助けとなる。

既存の殺菌剤に対する耐性菌が、新規殺菌剤に対しても交差耐性を示すかどうかについては容易に推定できる。新規殺菌剤の化学構造もしくは作用機構が、既存の殺菌剤と類似しているのであれば、交差耐性の可能性がある。より直接的には、新規殺菌剤を他の殺菌剤の耐性菌に有効かどうか試験することにより、交差するかどうか分かる。現在これは日常的に実施されている。実験室において交差耐性が見つからず、圃場試験において高い防除効果があったとしても、実使用によって元々はわずかに存在している耐性菌が選択されて、高密度になる可能性がある。このリスクを正確に評価することはできないが、低、中、高リスクというような、大まかではあるが有用なリスク評価の手がかりを得ることはできる。FRACモノグラフNo. 2「殺菌剤耐性菌：リスク評価」は、これについてより詳細に取り扱っている。

殺菌剤の作用機構についての知見は有用である。例えば、MBC殺菌剤に類似する β -チューブリン重合阻害剤は高リスク、多作用点接触活性化化合物は比較的 low リスクと推定することが可能である。

耐性突然変異の潜在力について、病原菌を突然変異原で処理したり、紫外線照射しながら新規殺菌剤を処理して、人工耐性菌を得る研究が多い。実験室において、適応度に障害のない人工耐性菌を得ることができない場合は、圃場における防除効果は安定していると推定されてきた。その一例として多作用点接触活性化化合物がある。反対に、MBC殺菌剤、フェニルアミドおよびQo阻害剤のように、人工耐性菌を簡単に得ることができる場合は、実使用においても耐性菌が発生しやすいと推定されてきた。

しかし、人工耐性菌を簡単に得ることができるかどうかは、信頼性のある指標ではない。モルフォリンに対する人工耐性菌は容易に得ることができるが、実使用における重大な耐性菌問題は長期間発生していない。DMI殺菌剤に対する人工耐性菌は、多くの病原菌で容易に得られているが、それらは生育が遅く、孢子形成量が少なく、耐性度と病原性が反比例している。このような適応度の低下がある場合は、実使用における耐性菌問題が発生しにくく、耐性菌が発生したとしても発達は比較的緩やかである。フルジオキシニルについ

てのリスク評価において、灰色かび病菌の人工耐性菌が得られ、ジカルボキシイミドと交差することがわかった。しかし、ジカルボキシイミド耐性の圃場分離菌はフルジオキソニル感受性であり、圃場試験においてフルジオキソニルはジカルボキシイミド耐性菌を選択しなかった。

このように遺伝的な実験結果により耐性リスクを推定するのは議論の残るところであり、現状においては他の知見とともに検討することは有用と思われる。人工耐性菌が容易に得られるかどうかということと、その交差耐性、適応度と病原性、実使用における耐性菌の発生との関連は、重要な話題であり、今後の研究課題である。

低濃度の殺菌剤を複数世代の病原菌に繰り返し処理する淘汰試験は、実使用における耐性リスクを示す可能性がある。この手法は、フェニルアミドに対するジャガイモ疫病菌の耐性菌発生研究に用いられた。複数の人工耐性菌を実験室内で選抜することはできたが、これらは病原性が無いか、フェニルアミドを散布した植物に感染できなかった。ジャガイモにおいて11世代選択された疫病菌において、耐性菌は発生しなかった。一方で、同属の他の病原菌を突然変異原であるニトロソグアニジンで処理した場合に、フェニルアミドを処理した植物に感染する高度のフェニルアミド耐性菌を得た。これらの結果の違いは、耐性リスク研究において、物理的または化学的に誘発する突然変異は、淘汰試験よりもより高リスクを示すことを示唆している。淘汰試験における初期の病原菌集団は、圃場における集団の自然発生的な突然変異株を含むには小さすぎるためと思われる。突然変異原を使用する場合は、耐性菌を外部に放出しないような対策が必要である。実使用における一段階および多段階耐性菌発生の両方に関連して、突然変異原と淘汰を予測因子とするより多くの研究が望まれる。

耐性菌を選択する可能性があるかどうかについては、病原菌の感染に好適な条件で、殺菌剤を繰り返し散布する圃場実験でたびたび検討されている。しかし、そのような実験が、将来耐性菌問題が発生するかどうかについては、有益な予測をしたかどうかについては記録が無いようである。もしそのような圃場における集中的な処理によって発生した耐性菌が初めての事例である場合は、拡大して最初の耐性菌問題となる可能性があるため、適切な予防措置が必要である。

既に述べたように、殺菌剤のグループによって、耐性菌の発生しやすさは大きく異なる。それぞれの殺菌剤リスクが低、中、高のどれに該当するかについては、突然変異原の処理、淘汰試験、またはより信頼性のある方法として（実使用開始後となるが）防除効果の確認、実使用初期のモニタリング、交差耐性試験から明らかにできる。

病原菌によっても耐性菌になりやすさに違いがある。病原菌リスクには、多くの生物的要因が関与している。高い病原菌リスクには、短い世代、多量の胞子生産、急速で長距離の胞子の拡散が関与している。たとえば、MBC殺菌剤耐性菌は、世代が短く、多量の胞子形成があり、広範囲に伝搬して、多数の殺菌剤散布を必要とするキュウリうどんこ病よりも、胞子形成量と伝搬が少なく、1年に1世代しかなく、年1回の防除しかない麦類眼紋病菌における発達は非常に遅かった。病原菌リスクの程度には複数の要因が関与している。詳細は不明であるが病原菌に特異的なゲノムの性質が関与している場合もあろう。たとえば、多量の胞子を形成して、世代が短いにもかかわらず、ムギ類さび病菌には大きな耐性菌問題がない理由は不明である。殺菌剤リスクと病原菌リスクをあわせた耐性リスクを図3に示す。



図3 殺菌剤と病原菌の組み合わせによる耐性リスクの差異を示すマトリックス図。評価はおおよそであり、過去の知見に基づく。青色部分は低リスク、赤色部分は高リスクを表す（日本における状況を加味して改変）。

耐性菌発生の全体のリスクは、殺菌剤と病原菌リスクのみによるのではなく、殺菌剤の使用条件も関与する⁶。殺菌剤の使用条件は地域や圃場によって大きく異なる。使用条件には、発病程度や病害の伝染に影響する気象、地域条件からなる環境要因および農家が採用している栽培技術がある。栽培技術の例として、使用する殺菌剤、処理回数と濃度、温室またはハウス栽培（病原菌集団を隔離して、感受性菌が入ることを阻害する傾向がある）、輪作のパターン、品種の選択と感受性の程度、耕種の防除を使用する程度がある。もし地域の環境要因や栽培技術が病害の発生や電線に不都合であれば、これによって殺菌剤の使用が減り、高リスク殺菌剤の使用が少ないか無いのであれば、全体のリスクは低くなる。

特定の地域における耐性菌発達のリスク程度の評価には、影響するすべての要因をできる限り考慮して統合しなければならない。要因としては、殺菌剤と病原菌の組み合わせによる固有リスク、発病程度に影響する環境要因、製造企業から推奨される殺菌剤の使用法を含む栽培技術がある。このようなリスク評価は、多くの要因が関与するためおおよその低、中、高レベルの評価であり、現在の知見ではそれを正確に測定することはできない。

9. 耐性菌対策

理論的な議論、研究結果および実使用における事例はすべて、耐性菌の発生の主な原因が特定のグループの殺菌剤を連続的に使用することであることを示している。反対に、低頻度で使用したり、他のグループの殺菌剤とあわせて使用すれば、耐性菌は発生しにくい。実用的な耐性菌対策は、農家の要求を満足させたいうえで、企業に対して適切に利益還元す

⁶ 栽培リスクという。現在 FRAC が推奨する耐性リスク評価において、殺菌剤リスク・病原菌リスクとともに複合リスク算出に使用する。付録図1参照。

る使用量と使用方法によって、殺菌剤の防除効果を持続させなければならない。バランスのとれた使用方法を設計するのは容易ではない。

十分な成果を得るためには、耐性菌対策は均一にかつ広範囲に適用されなければならない。短期的な不利益と長期的な利益は、同じグループの殺菌剤を保有するすべての企業によって共有されなければならない。耐性菌対策の成功には、関係するすべての企業が実施について同意して、責任を持たなければならない。また、農家にとって理解しやすく、実施できる対策でなければならない。限られたデータと現象の理解を基礎としてこのすべてを達成することは困難ではあるが、重要なFRACの役割である。ここには実施可能な対策を述べる。複数の対策をあわせて使用することが可能であり、有用であり、また実施されている。

1) 同じグループの殺菌剤のみを使用しない

異なるグループの殺菌剤を混用する、または異なるグループの殺菌剤とローテーション散布する。

混用（混合剤を含む）またはローテーション散布で組み合わせる相手剤は、高リスク殺菌剤による耐性菌の選択圧を低下させ、また発生する耐性菌の生育を阻害する。混用する殺菌剤の候補として、耐性菌の発生リスクが低い多作用点接触活性化化合物がある。交差耐性がない特異作用点阻害剤を使用することもできる。特異作用点阻害剤を2剤混用して使用すると、二重耐性菌の選択リスクが一定程度ある。しかし、2つの突然変異が同時に起こる確率は、単一の突然変異よりも極めて低い。二重耐性菌が連続して発生する可能性は有るが、その2成分が別々に繰り返して使用されるよりは極めて低いとみられる。

この対策は企業やアドバイザーが広く推奨している。異なるグループの殺菌剤からなる混合剤も製造されている。もし高リスク殺菌剤の単剤が無く、農家が混合剤しか使用できない場合は、より確実な耐性菌対策となる。病害の防除が年間1回または2回しか必要ない場合は、ローテーション散布は適用できない。混合剤は、防除スペクトルの拡大、残効性の改善など別の目的でも販売されている。各々の成分の適切な濃度設定は困難であり、何度も議論されている。防除コストを低減するために、有効成分濃度を低くする事例は多い。これにより、高リスク殺菌剤による耐性菌の選択圧が低くなるが、混合相手剤が防除対象の病原菌に対して防除効果があることが非常に重要である。

耐性菌発生速度の予測に関わる多数の数学モデルが公開され、議論されている。それによると、耐性菌対策には2つの基本的な原則がある。感受性菌および耐性菌の両方の増加率の低下および感受性菌に対する耐性菌の増加率の低下である。多くの研究は、このうちのどちらか、または両方を採用している。すべてのモデルは、混用およびローテーション散布が耐性菌の発生を遅延化させるが、顕在化を阻害しないことを示している。この2つの原則に、種々の仮説を取り込む試みもある。混用とローテーション散布の耐性菌発生に対する効果に関わる実験データは少ない。人工気象室とビニールトンネルを使用したジャガイモ疫病の実験において、フェニルアミドとマンゼブ、マンゼブ・シモキサニルとの混用は、フェニルアミド単剤よりもフェニルアミド耐性菌の増加率が低下した。ブドウベと病におけるQo阻害剤耐性菌の選択は、ホルペット、ホセチルまたはマンゼブとの混用により遅延した。これらの制御された環境における小規模の接種試験の結果は明確で再現性があるが、圃場で起こりうるより大きく多様な病原菌集団に対する試験法が必要である。

圃場内での使用方法以外に、地域における一段階耐性菌の拡散は、殺菌剤が散布された作物の面積比率によるという予測をするモデル研究がある。耐性突然変異による適応度の低下、感受性の野生病原菌株に対する殺菌剤の効果も、耐性菌の拡散する速度に影響する。一定の面積の圃場を無処理にするか、交差しない殺菌剤で処理することを提案している。このパッチワーク的な耐性菌対策の検証と組織的な商業化は、実施が困難である。

耐性菌対策における圃場研究は、広い反復試験区、複数年にわたる連作、処理および調査を必要とする困難な仕事である。感染条件と病原圧の年による変動、病原菌のサンプル採集の不安定性、試験区間での接種源の移動、試験圃場への接種源以外の病原菌の混入などの要因が、結論を不明確にしてしまう。テンサイ褐斑病に対する初期の圃場研究において、ベノミルと錫のローテーション散布によって、ベノミル耐性菌の発生が遅延した。麦類うどんこ病における複数の研究において、トリアゾール系殺菌剤とモルフォリン系殺菌剤またはアミノピリミジン系殺菌剤の混用散布は、単剤の連続散布に比べて耐性菌の発生を抑制することが明らかになった。ある研究においては、殺菌剤のローテーション散布の効果は一定でなく、同等かそれ以下でしかない。

トンネル栽培のイチゴにおける灰色かび病菌のジカルボキシイミド耐性菌、ジャガイモスキンスポット病菌および銀かび病菌のチアベンダゾール耐性菌の発生は混用により遅延した。ブドウうどんこ病菌における研究において、登録濃度の50%のトリアジメノールと硫黄またはジノカップの混用はトリアジメノール耐性菌の発生を遅延させないが、登録濃度でのローテーション散布は耐性菌の発生を遅延させた。コムギ葉枯病のQo阻害剤耐性菌の圃場における耐性菌の顕在化は、アゾキシストロビン単剤散布よりもアゾキシストロビンとエポキシコナゾール混用散布のほうがはるかに遅かった。全体として、混用またはローテーション散布は耐性菌対策に有用であるようであるが、矛盾する結果があったり、病原菌と作物数が限定的であるため、一層の知見が必要である。

実使用における知見も、混用やローテーション散布によって耐性菌の発生が遅延することを示している。しかし、比較のための耐性菌対策をしない地域がほとんどないため、実使用規模での実証は困難である。

2) 1作期あたりの使用回数を制限する、また必要性が低い場合は使用しない。直前、直後に他系統の殺菌剤を使用する

ローテーション散布に似たこの手法は、高リスク殺菌剤の使用回数を制限することによって耐性菌の選択の機会をある程度遅延する。適応度の低い耐性菌の減少にも寄与する。しかし、殺菌剤は一般的に選択圧が最も高い感染の最盛期と同じ時期に連続的に使用される。

耐性菌発生の遅延化と散布回数の制限は必ずしも比例しないかもしれない。一方で、病原菌の増殖期における使用を制限することによって、感受性が回復した事例がある。

3) 製造企業が推奨する処理量を守る

病原圧が低かったり、防除効果が低くても経済的にあまり影響がない場合に、防除コストを省くために、殺菌剤の処理量を減らす農家がいる。また、条件によって、経済的および環境保護的な目的で低処理量を推奨するアドバイザーがいる。一方FRACの見解においては、多様な条件における防除効果の保持だけでなく、低薬量処理が耐性菌の発生を促進するため、推奨する処理量は遵守すべきである。

しかし殺菌剤の耐性リスクと処理量の関係はまだ十分に確認されていないし、殺菌剤によっても違うようである。上述したモデルの一部において、散布間隔を保ちながら高リスク殺菌剤の処理量を減らすと、防除効果の低下および生残する感受性菌の増加によって一段階耐性菌の密度が低下して、登録の処理量よりも耐性菌の選択が遅延することを示している。多段階耐性において、処理量の減少は登録量では有効な低レベルの耐性菌の生残に好都合であるため、耐性菌の発生を促進するという議論もある。低レベルの耐性菌は、さらに突然変異したり、より高レベルの耐性菌と交配する可能性がある。実使用においては、種々の条件によって、病原菌に到達する薬量は場所と時期によって異なる。従って処理量の減少は、低濃度が最高レベルの耐性への踏み台とならないため、多段階耐性菌の発生を妨げるという可能性についても同様に検討しなければならない。さらに、処理が全くない場合には、耐性菌の選択はない。

処理量の違いが耐性菌発生に影響するかどうかについての実験データは少なく、矛盾がある。人工気象室において、オオムギうどんこ病菌におけるトリアゾール系殺菌剤耐性菌の選択は、低濃度のほうが遅かった。作期間や作期内で防除効果が大きく変動するため、圃場で検討するのは困難である。低濃度になるとトリアジメホン耐性のオオムギうどんこ病菌の発生が遅延した。一方でイチゴ灰色かび病菌やコムギ眼紋病菌においては、処理量は耐性菌の顕在化にほとんど影響しなかった。リンゴ黒星病にベノミルとマンゼブを混用散布した場合、ベノミルの濃度を低くしてマンゼブ濃度を高くすると、ベノミル耐性菌の発生が遅延した。フランスにおいてトリアジメノールの処理濃度を半分にするとブドウうどんこ病耐性菌の発生を促進した。低処理量で散布回数を増やすと、フェンプロモモルフ、フェンプロモモルフとプロピコナゾールの混用は、コムギうどんこ病のフェンプロモモルフ耐性菌の発生を著しく促進する事例がドイツとオランダである。一方で、フェンプロモモルフの処理量を減らしても、オオムギうどんこ病菌の感受性には影響しない事例が英国で報告されている。DMI殺菌剤の処理量を登録量の4分の1から8分の1に減らすと、ムギ類葉枯病の耐性菌発生が減少した事例もある。

理論的に、また限定的な実験データおよび実使用において、処理量を減らしても一段階耐性菌の発生リスクは高くなる結果が多く、むしろ低下するようである。多段階耐性菌の場合は明瞭でなく、多くの研究データが必要である。処理量を減らして散布回数を増やすと、作期をとおしての処理量が同じ場合よりも、耐性菌の発生リスクが高くなる結果がある。通常の散布回数で処理量を減らすことと、作期あたりの処理量を減らすことと区別する必要がある。低処理量で散布回数を増やすのは、耐性リスクを高めるようなので、避けるべきである。

4) 発病してからの使用を避ける

浸透移行性殺菌剤の利点の一つは、発病していたり、感染が成立していても有効なことである。この特性により、経済的で、発病が進展していて、感染の一層の拡大を防ぐ目的での使用を招く。しかし、このような条件での浸透移行性殺菌剤の使用は、次の2つの理由で避けることが推奨されている。

FRACは発病してからのフェニルアミドの使用を避けるように推奨している。フェニルアミドは多作用点接触化合物との混用で使用されているが、多作用点接触活性化化合物は発病してからでは良好な効果を期待できないので、フェニルアミドのみが有効であることになってしまうためである。

発病してからの使用の回避は、より受け入れられている別の理由により耐性菌の発生を遅らせるようである。病原菌密度が高い時期に殺菌剤を散布すると、多数の胞子が殺菌剤に暴露されることになる。予防的に散布するのに比べると、耐性菌の選択の機会がはるかに多くなる。この理由により、FRACは一部の果樹において、発病してからのDMI殺菌剤の使用を回避するように推奨している。現時点において、予防散布と発病してからの散布における耐性リスクの比較をした研究はないようである。

5) 総合的病害管理

これは総合的病害虫管理(IPM)の一部である。病害防除のすべての手段を総合使用することは、経済的および環境保護的であるだけでなく、耐性菌の発生を遅らせることにも有用である。抵抗性品種、生物農薬、輪作や多年性作物における罹病部位の除去などの適切な耕種的防除の利用は、発病と殺菌剤の使用回数を減らすことにより、耐性菌の選択の機会を減らす。もちろん殺菌剤の使用は、病原性の変異した菌株の高密度化を遅らせることにより、病害抵抗性品種の感受性を遅らせる。

残念ながら、生物農薬の防除効果は一般に低いか利用できないので、化学合成殺菌剤が有力または唯一の手段であることが多い。

6) 作用機構の多様性

病害の防除において、異なるグループの殺菌剤が利用できることは、環境的にも耐性菌問題を解決するにも有利である。数少ない殺菌剤を長期間連続して使用すると、副次的な問題もあり、耐性菌発生にも好都合である。そのため新規殺菌剤の創生と開発が継続することがきわめて重要である。幸いにも、登録審査機関は安全性を担保する限り新規骨格と作用機構の多様性が必要であることを理解している。新規殺菌剤が、既存の殺菌剤よりも優れている必要はないが、既存殺菌剤の耐性菌に対して有効でなければならない。新規の作用機構剤、理想的には複数の作用機構剤によって、新規殺菌剤の耐性菌の発生リスクを低減すべきである。

既存の殺菌剤と同じグループのより防除効果の高い薬剤を開発することも耐性菌対策に有用である。この例として、防除効果が高くRF値が低いDMI殺菌剤であるプロチオコナゾールがある。これにより麦類うどんこ病菌におけるトリアゾール系殺菌剤の耐性菌問題が一定程度低減した。

カプタホールや有機錫のような殺菌剤の失効は、安全性の点においては必要であるが、耐性菌対策の手段を狭める。今後、失効する殺菌剤が増加する懸念がある。

10. 今後の課題

十分に成功したとは言えないが、これまで実施された耐性菌対策は殺菌剤の防除効果の低下を防止または遅延化してきた。現在は、実使用において耐性菌が発生すると迅速に認知され、対策されて、防除効果の低い殺菌剤の無用な使用を抑制している。FRACと公的研究機関は、耐性菌対策に重要な役割を果たしてきたし、今後も継続するであろう。

農薬製造企業による新規殺菌剤の開発は継続しており、これは非常に重要である。新規作用機構の研究を支援する手段が可能となっていて、耐性菌対策の基礎となるであろう。遺伝子工学、生化学および疫学における基礎研究によってリスクに影響する知見が増えるにつれて、耐性リスクを低減する代謝阻害に関わる新規作用機構の研究を可能にするに違

いない。

ベースライン研究、評価や対策を作る活動が、現在はそれぞれの企業において殺菌剤の評価・開発と強く連動している。2社以上が関わる新規殺菌剤のFRAC作業部会が、早期に設置されることは極めて重要である。アニリノピリミジンおよびカルボン酸アミドの作業部会が、実使用による耐性菌問題が発生する前に設置されたのは、模範となる事例である。

ヨーロッパにおいては、多くの登録審査機関が、感受性試験方法、使用前のベースラインデータ、耐性リスク評価や耐性菌対策に関わる文書を登録申請時に提出することを求めている。このような情報は収集すべきであり、防除効果試験成績は既に登録要件となっているため、合理的な要求である。EU指令はデータ要件を提示していて、FRACはEPPOと連携してデータの収集と解析に関わるガイドラインを作成した。また、耐性菌対策に関わる試験方法の提出は、企業にとって対策の実施と耐性菌発生の回避、登録審査機関の理解の向上に有用である。

しかし、硬直した登録要件により柔軟性を失うおそれがある。新製品の使用による知見が増えるにしたがって、実施してきた対策を迅速に変更しなければならない可能性があり、それが行政手続きによって遅れるようなことがあってはならない。耐性菌の発生予知と対策の有効性について不明な点が多く、地域によって耐性菌の発生に違いがあることがわかっている現状においては、殺菌剤の使用について、低リスク、高リスクという分類を公的にすべきではない。新規の作用機構を有する殺菌剤について、登録機関のより迅速で肯定的な対応は非常に大きな助けとなる。混合剤の登録についての登録審査機関の前向きな対応も耐性菌対策の一助となる。

企業は、殺菌剤耐性菌に関わる研究プロジェクトを随時支援している。FRAC、公的研究者、アドバイザーの協力による持続的な機会や企業による研究プロジェクトの財政支援もある。研究プロジェクトとしての難点は、他社の殺菌剤についての共同研究に、別の企業が参加を望まないことである。また、好ましくない結果を得る場合があるので、企業は自社製品を研究の対象とすることに消極的である。これらの難点を克服できない場合があるだろう。

農協による耐性菌研究の財政支援があり、それは適切で国際的に奨励すべきである。しかしその全国組織は、他国における農業生産をも援助するような研究を支援することに懸念を持つ可能性がある。適切な提案ができるのであれば、国際的な支援機関から発展途上国の耐性菌対策プロジェクトに関わる財政支援を受けることも可能と思われる。

耐性菌の圃場動態または疫学、耐性菌の生化学的および遺伝学的基礎、異なる使用方法でのそれらの相互の影響について、より一層の研究が必要である。これは、未だに種々の意見がある耐性菌対策について、信頼性の高い基礎を提供するであろう。特に、処理量や散布間隔の変動の効果について、一段階および多段階耐性について多くの研究が必要である。主遺伝子と多遺伝子の重要な概念に対する遺伝的知見は、主に人工耐性菌についての研究結果であり、圃場で採集した菌株についての研究が必要である。

過去、多くのモニタリング研究が、特に企業によって実施された場合に公開が十分でなかった。ベースラインデータを含むそのような情報は長期間価値があり、最近では科学雑誌に掲載されたり、要約が現状報告や使用ガイドラインと共にFRACのホームページに公開されている。結果と使用ガイドラインについての情報交換と議論が、耐性菌とその対策に関わるシンポジウム、研究会、研修会において継続されるべきである。これについての

FRACの役割は大きく、今後も継続することを望んでいる。国際的に情報が急速に拡散するインターネットの利用は、農家や使用者が最新の耐性菌対策を知る重要な手段となっている。

耐病性を改良した作物品種や生物農薬の開発が進んで、IPMを強化するであろう。IPMにおける生物農薬の効果の維持には、化学農薬と同様に注意が必要である。病原菌が抵抗性品種を征服する能力はよく知られているし、生物農薬に対する耐性菌発生の報告がある。

耐性菌の発生が特異的なDNA変異によるものである場合、PCR診断技術がモニタリングに利用できる。Qo阻害剤の耐性菌対策はPCR診断に依存しているし、MBC殺菌剤、ジカルボキシイミド、DMI殺菌剤、MBI-Dにも利用できる。研究者がリアルタイムPCRとアレイ技術の進歩に追従すること、またこの進歩によって可能となるサンプル数の著しい増大、迅速な結果報告のような便益を得るために、最新の研究機器を備えることは重要である。しかし生物検定も改良してモニタリング手法の一つとして残しておく必要がある。耐性菌は別の作用点における選択または完全に異なる機構で発生するかもしれないからである。

化学合成殺菌剤による病害の防除は、高品質作物の収量確保に常に必要であることは疑いない。既存殺菌剤および新規殺菌剤の防除効果を担保するために、耐性菌対策に注視して改善し続けなければならない。研究の増加、企業、公的研究機関、アドバイザーと登録審査機関との情報交換の増加、公開情報の増加が非常に有用である。しかし耐性菌対策への投資には節度が必要である。限りある研究開発予算の多くは、新規剤の開発研究に割り当てられるべきである。

以上

あとがき

この冊子の原著である’Fungicide resistance in crop pathogens: how can it be managed?’は、農業用殺菌剤耐性菌に関わる数多くの知見をまとめた名著である。日本においても広く読まれるべき内容であり翻訳の必要性があると考えていたが、日々の業務に流されて着手できずにいた。このたび農薬工業会からの勧めにより、Japan FRACのメンバー4名で分担して翻訳、出版できたことで肩の荷が降りた思いである。耐性菌研究に関心のある皆様にご一読頂けると幸いである。

文中に日本国登録のない殺菌剤が多く取り上げられているので、農薬工業会のホームページ(<http://www.jcpa.or.jp/lab/mechanism.html>)に掲載されている国際版の「殺菌剤の作用機構分類」を適宜ご参照頂きたい。図3については、薬剤・病原菌のリスクを現状にあわせた上で、日本で発生する病害と国内登録のあるグループの組み合わせに改訂した。また、現在FRACが推奨している栽培リスクを勘案した「殺菌剤の耐性リスク評価方法について」を付録とした。原著には、殺菌剤のグループ別に推奨使用方法をまとめた’Implementation of management strategies’という章があるが、現状と異なる点が多いため割愛した。この部分に該当する内容は、FRACのホームページ(<http://www.frac.info/>)の’Working group’に詳細が述べられており、日本向けに改訂したものがJFRACのホームページ(<http://www.jcpa.or.jp/lab/jfrac/>)に掲載されている。なお本文中の脚注はすべて翻訳者によるものである。

農薬工業会の廣岡卓氏、小川安則氏には未定稿の初期の段階で読んで頂き、数多くの修正、示唆を頂いた。また日本曹達株式会社の佐藤元亮氏には特に遺伝学的な部分において助言を頂いた。他にも多くの皆様のご援助を賜ったことで翻訳を完了することができた。厚く感謝申し上げます。

翻訳者一同

殺菌剤の耐性リスク評価方法について

1. はじめに

Fungicide Resistance Action Committee (FRAC)は、殺菌剤の耐性リスク評価を過去の事例に基づいて、殺菌剤、病原菌および栽培の3要素から推定する複合リスクにより、耐性菌の発生しやすさを推定している。複合リスクによって、新規に開発する有効成分について、耐性菌対策の必要性を判断することができる。

2. 殺菌剤リスク

殺菌剤の系統によって耐性菌の発生程度は大きく異なるので、殺菌剤リスクを高～低に分類している。殺菌剤の耐性リスクについては、FRACコード表に記載がある。

表1 殺菌剤リスク

リスク	定義	作用機構・グループ例
高	使用開始後数年で耐性菌が広範囲に発生、防除効果が大幅に低下した事例がある。	MBC殺菌剤 フェニルアミド QoI殺菌剤
中～高		コハク酸脱水素酵素阻害剤
中	条件によって防除効果が低下、または限定的に防除効果が低下した。	AP-殺菌剤 DMI-殺菌剤 MBI-D
低	長期間の使用において、耐性菌が無発生、または極めてまれにしか発生しない。	宿主植物の抵抗性誘導剤 多作用点接触活性化化合物 MBI-R

FRAC Monograph 2より抜粋・改変

3. 病原菌リスク

特定の病原菌について耐性菌が出現するかどうかを科学的に推定する手法はないので、FRACは過去45年間の耐性菌の発生状況に基づいて病原菌リスクを高～低に分類している。

表2 病原菌リスク

リスク	定義	病原菌例
高	短期間に耐性菌が発生して殺菌剤の防除効果が大幅に低下した事例がある。	イネいもち病、ウリ類うどんこ病、ウリ類つる枯病、ウリ類べと病、キュウリ褐斑病、ナシ黒斑病、ブドウべと病、麦類うどんこ病、リンゴ黒星病、リンゴ斑点落葉病、灰色かび病
中	高リスク病原菌と比較して、耐性菌の発生が大きな問題になっていない、または発生までに長期間を要する。	アスパラガス斑点病、イチゴうどんこ病、イネ馬鹿苗病、オオムギ網斑病、核果類黒星病、ジャガイモ疫病・夏疫病、ダイズ紫斑病、チャ輪斑病、テンサイ褐斑病、トウモロコシすす紋病、ナシ黒星病、ナスすすかび病、ピーマンうどんこ病、ブドウうどんこ病、麦類眼紋病・紅色雪腐病、青かび病、緑かび病、炭疽病、灰星病、べと病（一部作物）
低	耐性菌が殺菌剤の1系統のみに発生している、または実際の防除において問題となっていない。	イネごま葉枯病・紋枯病、麦類裸黒穂病・なまぐさ黒穂病・さび病、モモ縮葉病、リンゴうどんこ病、菌核病、白絹病、つる割病、苗立枯病、土壌病害、Fusarium病害、Rhizoctonia病害

FRAC Pathogen risk listより抜粋・改変

4. 栽培リスク

気象条件、栽培品種、栽培方法等の違いによる栽培地域の発病程度の差により、殺菌剤の散布回数

大きく異なる。これにより、耐性菌の発生速度に地域による差が生じる。各地域の発病程度に基づいて、栽培リスクを高～低に分類する。

5. 複合リスクの推定

殺菌剤、病原菌および栽培リスクの3要素から構成する複合リスクが図1である。殺菌剤リスクと病原菌リスクの数値を乗じた値に、さらに栽培リスクの数値を乗じて複合リスクを計算する。最大リスクである高殺菌剤と高病原菌リスクの組み合わせにおいて、栽培リスクが高い場合が最も高い複合リスクとなる。

図1 殺菌剤、病原菌および栽培リスクに基づく複合リスク表

殺菌剤の系統例	殺菌剤リスク	複合リスク			栽培リスク
		6	12	18	
ベンゾイミダゾール フェニルアミド Qo阻害剤	高=6	6	12	18	高=1
		3	6	9	中=0.5
		1.5	3	4.5	低=0.25
コハク酸脱水素酵素阻害剤 アニリノピリミジン DMI殺菌剤 MBI-D	中=4	4	8	12	高=1
		2	4	6	中=0.5
		1	2	3	低=0.25
多作用点接触活性化剤 MBI-R 抵抗性誘導剤	低=1	1	2	3	高=1
		0.5	1	1.5	中=0.5
		0.25	0.5	0.75	低=0.25
病原菌リスク→		低=1	中=2	高=3	
病原菌グループ→		イネごま葉枯病 イネ紋枯病 麦類裸黒穂病 麦類なまぐさ黒穂病 麦類さび病 モモ縮葉病 リンゴうどんこ病 菌核病 白絹病 つる割病 苗立枯病 土壌病害 <i>Fusarium</i> 病害 <i>Rhizoctonia</i> 病害	アスパラガス斑点病 イチゴうどんこ病 イネ馬鹿苗病 オオムギ網斑病 核果類黒星病 ジャガイモ疫病、夏疫病 ダイズ紫斑病 チャ輪斑病 テンサイ褐斑病 トウモロコシすす紋病 ナシ黒星病 ナスすすかび病 ピーマンうどんこ病 ブドウうどんこ病 麦類眼紋病 麦類紅色雪腐病 青かび病、緑かび病 炭疽病、灰星病 べと病 (一部作物)	イネいもち病 ウリ類等うどんこ病 ウリ類つる枯病 ウリ類べと病 キュウリ褐斑病 ブドウべと病 麦類うどんこ病 リンゴ黒星病 <i>Alternaria alternata</i> (リンゴ斑点落葉病、 ナシ黒斑病等) 灰色かび病	

6. おわりに

複合リスクが高い場合には以下の対応をとる。

- 1) 散布回数(1年あたり、または1作期あたり)を制限する。
- 2) 使用時期を制限する(例: 予防的に使用する)。
- 3) 防除対象病害に対して有効な殺菌剤との混合剤の開発を検討する。
- 4) ローテーション散布を推奨する。
- 5) 感受性モニタリングを実施して、耐性菌の発生状況を把握する。

引用文献

- FRAC code list
FRAC monograph 1, 2
FRAC Pathogen Risk List 2014