

農業用殺菌剤耐性菌の概要

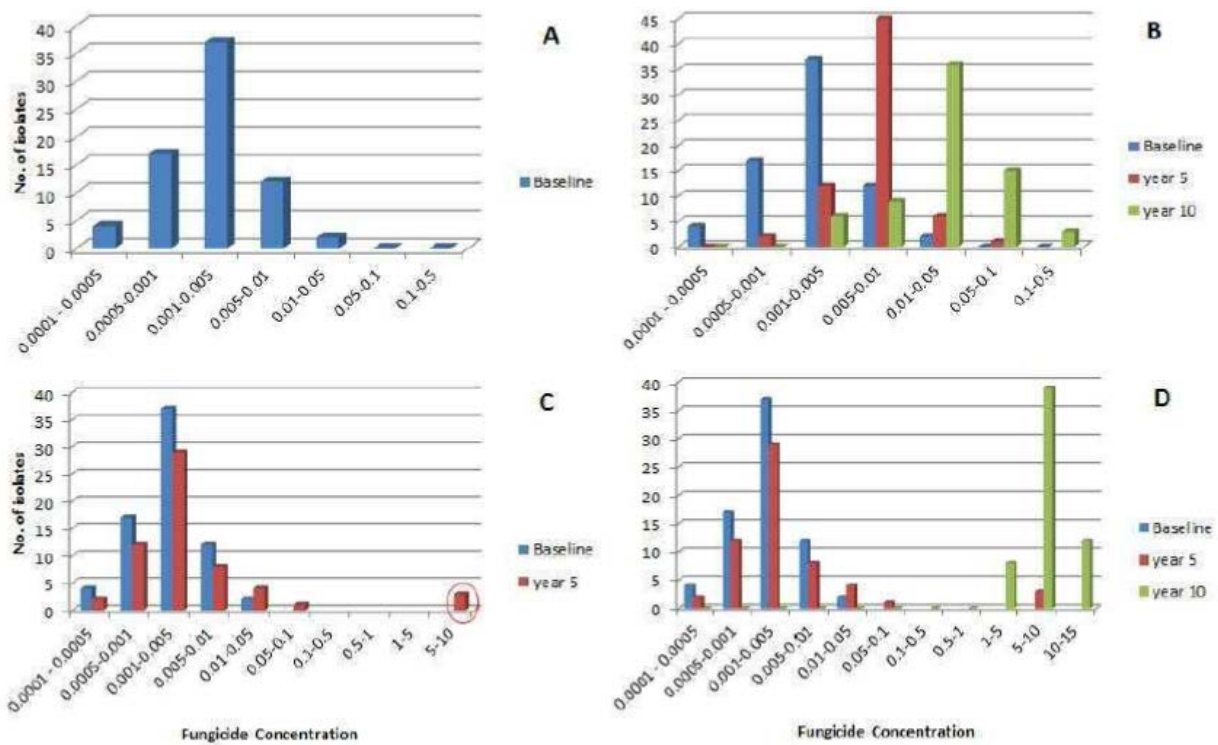


図 殺菌剤の感受性ベースラインとモニタリングの例

A:ベースライン B:多段階耐性 C:一段階耐性の初期 D:耐性菌の選択が進んだ一段階耐性
 カラム 青:ベースライン 赤:5年後 緑:10年後
 横軸は殺菌剤の濃度、縦軸は菌株数を示す。

出典: Resistance Overview (FRAC HP, <https://www.frac.info/resistance-overview>)

翻訳: 農薬工業会 Japan FRAC, 2020年1月

1. 耐性菌の定義

Fungicide Resistance Action Committee (FRAC)*による耐性菌の定義は、「特定の殺菌剤に対して遺伝的に感受性低下を獲得した病原菌」である。病原菌の殺菌剤感受性は、殺菌剤の不適切な使用で生じる選択圧によって低下する（病原菌が、作用点と同じ殺菌剤に、長期間、広範囲に暴露されることによる事例が多い）。この感受性低下は集団または単独の菌株として確認できる。

選択の過程において、耐性菌は殺菌剤を使用していない自然な病原菌集団中にわずかに存在している。自然でランダムな突然変異によって発生して、特定の殺菌剤の処理によって選択される。

FRAC は実験室耐性菌と圃場耐性菌を明確に区別している。

実験室耐性菌は、実験室において種々の方法によって人工的に発生させた耐性菌である。科学的な研究対象として重要である。実験室耐性菌は圃場で発生する耐性菌とは異なるが、圃場でも発生する可能性がある。実験室耐性菌に関する論文は、その旨を明確に記述すべきである。

圃場耐性菌は、自然の条件で感受性が低下した病原菌であり、定期的実施するモニタリングによってみつけることがある。殺菌剤の防除効果が低い原因は他にもあるので、耐性菌が原因であることを科学的に示す必要がある。病原菌集団の感受性が明確に低下したときに、防除効果が著しく低下する。耐性菌の発生頻度に加えて、異なる機構で耐性菌が発生することがあり、それぞれ感受性差(RF 値**)に違いがある。発生頻度と感受性差の両方が、圃場における殺菌剤の防除効果に影響する。感受性の変動は、病原菌の生存と繁殖力(フィットネス)にも依存する。効果的な耐性菌対策のために、科学者は細胞、生物、圃場集団のような異なるレベルで耐性菌を研究している。圃場における防除効果の低下の原因を耐性菌とするためには、殺菌剤の防除効果に影響する他の要因を排除した条件で、その病原菌を使って実験室で確認する必要がある。

耐性菌の出現は自然な進化の過程である。病原菌の繁殖が速い場合、耐性菌は急速に発達する。殺菌剤の使用により、病原菌集団中の感受性菌が淘汰される一方で、耐性菌は影響を受けないことにより、選択圧が生じる。耐性菌における変異が、殺菌剤の存在しない状態でフィットネスに不利な場合、選択圧が無い状態では集団中の耐性菌の密度は低下する。これをフィットネス・ペナルティ(フィットネス・コスト)という。

(訳注) *: 殺菌剤耐性菌対策を国際的に推進している CropLife International の技術部会。

** : 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

2. モニタリング

殺菌剤の感受性モニタリングは、病原菌集団における感受性の変動を知るのに非常に重要である。新規殺菌剤の使用が始まる前に、感受性のベースラインを確認しておく必要がある。

ベースラインとは、ある殺菌剤の使用前に採取した病原菌株の感受性である。検定法が異なるとベースラインが変わる可能性があるため、感受性検定法を確立しておく必要がある。殺菌剤を加用した簡易な寒天培地で、多くの病原菌の感受性を調べることができる。絶対寄生菌の場合はリーフディスクのような生きた植物を使う必要がある。感受性検定において、EC₅₀(50%生育阻害濃度)を得るために、複数の濃度を使用する。ベースラインを確認するために EC₅₀をグラフ化する(表紙図 A)。正確な感受性検定

のためには、適切な菌株数が必要である。

圃場における病原菌集団のモニタリングにおいては、新しい菌株を採取して感受性をベースラインと比較する。EC₅₀が有意にベースラインよりも高くなった場合は、低感受性にシフトしている（表紙図 B 赤）。その集団に選択圧が継続すると、EC₅₀はさらに低感受性にシフトする（表紙図 B 緑）。このシフト型の低感受性化を多段階耐性（量的、連続耐性）という。概してこれらの菌株は、実験室におけるバイオアッセイでは、やや高濃度の殺菌剤で防除可能である。多段階耐性の初期においては、殺菌剤は防除効果を示す。EC₅₀がより高濃度になったときには、十分な防除効果を得るためにより高濃度の殺菌剤を散布する必要がある。殺菌剤を散布するときには、製品ラベルを遵守する必要がある。

EC₅₀がベースラインよりもはるかに高い菌株が見つかる場合がある（表紙図 C 赤丸）。このような菌株を防除するためには非常に高濃度の殺菌剤が必要となり、実験室における検定でも実用的な効果がない可能性もあるので耐性菌とみなされる。これを一段階耐性（質的、分離耐性）という。このような耐性菌を防除するのに必要な薬量は、圃場において使用できないかもしれない。これらの菌株の集団中の密度が高くなると（表紙図 D 緑）、殺菌剤の防除効果は大幅に低下する。

モニタリングを実施していない場合、耐性菌が最初に認知されるのは、殺菌剤の大幅な防除効果の低下を農家が確認したときになる。罹病部は実験室に持ち込まれて、分離した病原菌の殺菌剤感受性の低下を確認する。殺菌剤の防除効果が低い理由は他にも考えられる（病原菌の密度が高い、散布液の不均一な付着、処理量・濃度の間違い、不適切な防除のタイミング等）ため、感受性の確認は非常に重要である。感受性低下を確認した場合は、防除効果が低かった地域に耐性菌が蔓延している可能性が高い。その周辺の地域でモニタリングすることによって、耐性菌が拡散している範囲がわかり、次の年の耐性菌対策の立案にあたって参考になる。定期的なモニタリングによって、病原菌集団の中で耐性菌が増える前に、耐性菌の存在を確認することができる。適切な耐性菌対策によって耐性菌の密度を低下させることができ、圃場における殺菌剤の防除効果を維持することができる。

3. 作用機構

殺菌剤は、病原菌の重要な細胞機能を阻害することによって生育を抑制する。作用機構とは、特定の殺菌剤が阻害する細胞機能である。FRAC は、コード表に現在 11 の作用機構を掲載している。殺菌剤の中には上市の時点で作用機構が不明なものがある。このような殺菌剤は、十分な知見を得るまでは「作用機構不明」と分類されている。

作用機構の中には特異的な作用点がある。この作用点は、細胞機能において殺菌剤が結合する特異的な酵素である。たとえば SDHI 殺菌剤や QoI 殺菌剤の作用機構（呼吸阻害）は同じであるが、電子伝達系における作用点は異なり、SDHI 殺菌剤は複合体 II、QoI 殺菌剤は複合体 III に結合する。FRAC はそれぞれの作用点に対して番号 (FRAC コード) を指定している (例: SDHI 殺菌剤には FRAC コード 7)。

殺菌剤と特異的な作用点の生化学的な相互作用は、鍵と鍵穴の関係に似ている。鍵が酵素に結合する基質、鍵穴が酵素の作用点である。殺菌剤は、鍵穴に差し込むことができる人工的な鍵のようなものである。この人工的な鍵が鍵穴にあると通常の鍵(基質)が結合できなくなり、病原菌の細胞機能が阻害される。細胞内においては、殺菌剤と基質が鍵穴である作用点で競合している。殺菌剤が細胞内に蓄積すると、基質は作用点で競合できなくなり、細胞機能は低レベルまたは完全に阻害されて、有害な影響が現れる。殺菌剤の三次元構造は病原菌の基質に近いが同一ではない。

鍵穴（作用点）が、元々の鍵である病原菌の基質は結合でき細胞機能は正常に働くが、鍵に似た殺菌

剤は作用点に結合できないように変化することがある。この耐性機構のことを作用点変異という。

同じ作用点に活性がある殺菌剤（FRAC コードが同じ殺菌剤）は、一般的には相互に交差耐性があるとみなされている。交差耐性とは、ある殺菌剤に耐性となると他の殺菌剤にも耐性となる現象である。作用点異なる殺菌剤の間で交差耐性が起こることもある（以下の多剤耐性菌を参照）。一部の殺菌剤については作用点が完全に解明されていないので例外もある。たとえば、アザナフタレンの作用点はシグナル伝達である。アザナフタレンに属する 2 有効成分、キノキシフェンとプロキナジットは、ブドウうどんこ病に対して交差するので同じグループである。興味深いことに、コムギうどんこ病に対しては、この 2 剤は交差しない（Genet and Jaworska, 2009）。ある殺菌剤に対して感受性が低くなる一方で、他の殺菌剤に対する感受性が高くなる負相関交差耐性という現象もある。たとえば、MBC 殺菌剤（FRAC コード 1）に耐性の灰色かび病菌は、N-フェニルカーバメート（FRAC コード 10）に対する感受性が高くなる（Leroux et al. 1989）。

4. 耐性機構

1) 作用点変異

これまでのところ最も多い殺菌剤の耐性機構は作用点変異である。病原菌は新しい細胞を作るときに DNA を複製するが、不完全だったり誤りがあったりすることがある。これを突然変異という。DNA は細胞において酵素を作る暗号であるため、一部の突然変異によって作用点のアミノ酸配列が変わって作用点（鍵穴）の形が変異する。これによって殺菌剤（鍵）が作用点に不完全に結合するか、完全に結合できなくなる。これによる感受性の変動は、小さいものから非常に大きいものまで広範囲にある。

2) 解毒

病原菌の細胞は、通常の細胞機能において多くの代謝機構を含んでいる。代謝機構の中には、殺菌剤を細胞に毒性がないように変えるものがある。殺菌剤の中には、活性のない状態で処理されて、病原菌の代謝を受けて活性のある構造に変化するものがある。もし病原菌の代謝におけるその活性化段階が変異したら、活性のある殺菌剤ができなくなる。

3) 標的の過剰発現

上述のとおり、殺菌剤は作用点において基質と競合する。細胞内の殺菌剤が増えるほど天然の基質を打ち負かし、その結果として細胞機能が停止する。より多くの作用点酵素を生産することにより病原菌基質が十分に結合して、細胞機能が働く。実験室においては、高濃度の殺菌剤が活性を回復させるかもしれないが、圃場においては、高濃度は必ずしも実用的とは言えない。

4) 作用点からの排除

細胞には、外部からの物質や細胞内物質を排出するポンプがある。ABC および MFS トランスポーターが一般的である。これらのポンプがあるにもかかわらず、有効な量の殺菌剤が細胞内に入って、細胞機能を阻害する。トランスポーターが、病原菌の感受性を低下させる状態まで殺菌剤を排出することがある。トランスポーターが排出する殺菌剤は、作用点と同じである場合と異なる場合、すなわち特定のトランスポーターとその殺菌剤の作用点に直接的な関係がない場合がある。多剤耐性菌（MDR）のトランスポーターは、作用点異なる殺菌剤を排出する。灰色かび病菌の事例（Kretschmer et al. 2009）のように、不適切な殺菌剤の使用は、殺菌剤を排出するトランスポーターを有する菌株が集団内で優占となるのに十分な選択圧になりうる。

以上