

課題 4. 「植物防疫事業における効率的な薬剤感受性検定法の調査研究」

(1) (一社) 日本植物防疫協会

担当機関・部署	(一社) 日本植物防疫協会・調査企画部、茨城研究所
担当者	富田恭範、舟木勇樹、北条 広、小林政文、守川俊幸、野田隆志

植物防疫事業実施要綱（令和 5 年 3 月 24 日付け 4 消安第 7238 号農林水産省消費・安全局長通知）第 4 に基づき、植物防疫事業交付金により、各都道府県で地域の実情に応じた薬剤抵抗性の発達の有無のモニタリングを行うこととされており、令和 3 年度には、全国で 757 件の薬剤感受性検定が行われているところ。

しかしながら、当該薬剤感受性検定については、検定手法が示されておらず、各都道府県で異なる手法で検定が実施されていることから、検定結果の比較や集約が困難となっている。

このことから、植物防疫事業における薬剤感受性検定の手法を取りまとめ、各都道府県での薬剤感受性検定の精度を統一し、より適確な薬剤抵抗性管理の実現に繋げるための調査を行う。

以下、「殺菌剤」と「殺虫剤」に分けて報告する。

「殺菌剤」

1. 「殺菌剤」における背景と目的

殺菌剤感受性は、これまで 50%効果濃度 (EC₅₀)、最小発育阻止濃度 (MIC) に基づき、培地検定や生物検定で評価されてきた。また近年では、感受性に係る遺伝子の変異やその発現量から、分離菌株の感受性の低下 (薬剤耐性) を評価される場面が増えてきている。なお、様々な分野で薬剤感受性は EC₅₀ で評価されるのが一般的であるが、国内の農業分野では、MIC などのその他の手法で評価されることが多い。

国内の農業場面では、感受性検定の多くが植物防疫事業のなかで実施されており、地域での迅速な情報提供、指導、誘導に活用されており、なかでも主要品目の防除暦を策定する上での有力な薬剤選定基準となっている。そして、薬剤耐性菌の顕在化を未然に防ぐためには、機能的なモニタリングが必要不可欠である (図1)。

一方では、情報の確かさが前提にあるものの、日常業務の中で多様な農業・病害の感受性の状況を把握し、時に問題となる病害に迅速に対応するため、検定作業の簡便化が図られている。この簡便化は、各実施機関において蓄積された情報を基に、独自の基準で設定することが多いため、様々な検定法が派生している状況にある。一方、その意味が十分に理解されないまま、前例踏襲で実施されているケースもあると予想される。

評価法・基準の統一を求める声もあるが、検定の目的により手法は異なり、その判定基準についても走りながら暫定的に設定しているものも多い。

そこで、ここに検定の状況を取りまとめるとともに、検定法のありようについて考えてみたい。あわせて、これから新たに取り組む技術者にとって有用と思われる情報を整理し、提供する。

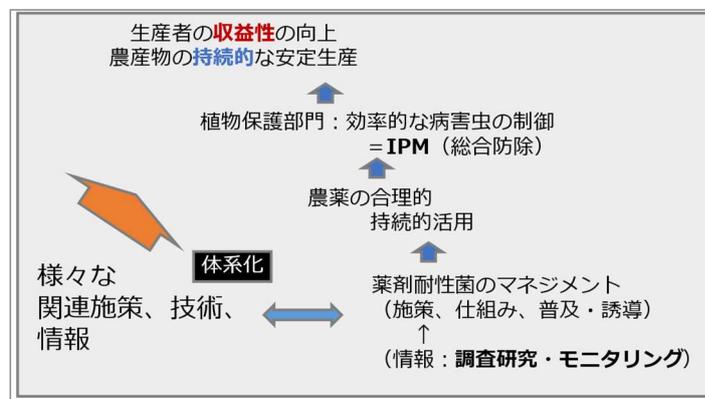


図1 モニタリングの役割

2. 方法

1) 検定状況の調査・分析

薬剤感受性検定の実施状況については、国の毎年度調査 (H22年~R4年) にあるが、検定法についての具体的な情報が不足する報告も多いことから、改めて感受性検定法に注視した内容 (表1) についてアンケート調査を行った。なお、調査対象期間は過去5か年とし、それより以前に特筆すべき検定事例があれば、追記することとした。

関連する文献の調査は、日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会が取りまとめている国内外文献集を参考にしながら、2019~2024年の5年間に国内の主要な専門誌に掲載された関連文献・レポートを主な調査

対象とした。海外の雑誌については、特に関連の深いものを確認し、必要なものは引用した。さらに、今回実施したアンケートで収集した各機関が公表している成果情報、防除所情報等の情報も参考とした。なお、口頭発表の要旨は、調査・引用の対象外とした。

調査は耐性菌発生状況を知ろうとするものではなく、採用されている検定手法とその背景を知ることによって重点を置いた。

なお、取りまとめに際し、①同一病名でも病原菌が異なり、②病原菌が同じでも様々な病名が採用されている事例が多いことから、多くの場合、病名ではなく病原菌の属あるいは近縁種をグループとして取りまとめた。一方、うどんこ病菌、さび病菌（赤星病含む）、べと病菌、炭疽病菌については、特性の近似したいくつかの属を含む病名グループとして整理した（表2、表3）。

表1 アンケートの調査項目

	項目	補足事項
基本項目	過去5年に実施 ○ー	直近5年と、それ以前に実施された手法を比較するため
	作物名	
	病名	
	病原菌学名	https://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php
	対象薬剤名（成分名）	
	FRACコード	https://www.jcpa.or.jp/labo/mechanism.html
	検定の目的（a-e）	a:多発要因解析、b:実態把握（広域）、c:定期調査・変動解析、d:対策の検証、e:論文化、他に目的があれば内容を入力
培地・生物検定	供試薬剤名（商品名）	試薬（標準品）、製品名などを記入
	分散媒（溶媒）	供試薬剤の分散媒
	検定培地（植物）	
	市販・自作	
	容器	検定に用いた容器（丸形、角型シャーレ、培養プレート）のサイズ
	前培養培地	
	接種濃度・素材	検定培地、植物に置床・塗布した接種源
	検定濃度	具体的に記載
	単位	検定濃度の単位
	検定温度	培養（栽培）温度
	判定日数	検定培地での培養日数
	検定基準	MIC、EC ₅₀ 、菌叢生育阻止率ほか
	判定濃度 耐性	判定の基準としている薬剤濃度
	中等度耐性	
遺伝子診断	方法	
	対象遺伝子	
サンプリング	おおよその単位	検定する標本の目安
	留意点	
検定法	参考にしたテキストほか	資料名またはURL/DOI入力
検定結果	公表可能な資料・成績書・論文・成果情報	URL/DOI入力 、無ければpdfの添付
その他	コメント	・判定が紛らわしい時の、見分け方 ・検定のノウハウ など

2) 検定法の考え方と標準的手法の提案

薬剤感受性検定法の基本とその簡便化について、考え方を整理するとともに、5つの主要な病原菌群について、近年採用されておる標準的な検定法として提示した。また、検定法の簡素化が図られている事例と、それぞれの利点と注意すべき点について取りまとめた。

3. 専門有識者による中間検討

とりまとめた内容について、以下の要領で開催した中間検討会にて、検定基準の見直しなど、内容の修正を行った。また、標準的手法を示すには、多くの病害で情報が不足しており、目的に応じた検定手法の例

示や、そのための調査研究と実証試験の必要性などが指摘された。

開催日時 2024年12月25日(水) 13時~16時

開催場所 一般社団法人日本植物防疫協会 本部会議室(オンライン併用)

参加者 事業代表:農研機構植物防疫研究部門 須崎浩一*、検討委員:北海道立総合研究機構上川農業試験場 栢森美如*、秋田県果樹試験場 佐藤 裕*、有識者:農研機構植物防疫研究部門 窪田昌春、三重県農林水産部 鈴木啓史、(一社)日本植物防疫協会 門田育生、受託者:(一社)日本植物防疫協会 富田恭範、舟木勇樹、沼田慎一、秋山空隆、守川俊幸

*はオンラインにて参加

4. 結果

1) 検定状況の調査・分析

回答のあった34都道府県で実施された感受性検定の対象薬剤は、FRACコードで30種の作用機構の薬剤を対象に実施されており、灰色かび病菌 (*Botrytis*) をはじめ多くの病害を対象に検定されており、その構成は、先に岡田・井田 (2022) が報告した内容とほぼ同様の傾向が認められた (表2、3)。ただし、当時に比べてイネいもち病菌 (*Pyricularia*) の検定が減少しており、代替剤の普及などにより検定する病害や薬剤の種類は変遷していくものと考えられた。一方では、温暖化の影響とも推定される病害の発生様相の変化や、リンゴ黒星病のDMI耐性菌の発生などの勃発的なイベントにより対象とする病害・薬剤は変化している。いずれにせよ、耐性菌発生リスクが中～高に分類される薬剤 (JapanFRACリスト) を中心に、定期的、継続的あるいは重点的に調査されている。

表2 収集したアンケートで対象にしている病害と薬剤

実施自治体数	検定件数	作物	病害名	病原菌	薬剤 (FRACコード)
2	13	リンゴ、モモ	斑点落葉病、黒斑病	<i>Alternaria</i>	2,3,7,11,29,M3,M5,M7
2	8	タマネギ、ネギ	白斑萎枯病ほか	<i>Botrytis (Cinereaを除く)</i>	1,2,11
17	210	野菜、花き、果樹	灰色かび病	<i>Botrytis cinerea</i>	1,2,3,7,9,10,11,12,17,152,M7
1	4	チャ	網もち病	<i>Exobasidium</i>	M1
8	51	テンサイ、ダイズ、アスパラガス、ピーマン	褐斑病、紫斑病、斑点病	<i>Cercospora</i>	1,2,3,7,11,12,24,50,52,M1,M5,M7,U6
16	117	イチゴ、キウイ、スイカ、ナシ、ブドウ、カキ、マンゴー、茶ほか	炭疽病、晩腐病	<i>Colletotrichum, Glomerella, Discula</i>	1,3,7,9,10,11,12,27,52,M1,M3,M5,M7,M9
8	40	キウイ、トマト、ピーマン	褐斑病、褐色輪紋病、黒枯病	<i>Conyospora</i>	1,2,3,7,10,11,12,50,52,M1,M5,U6
3	7	リンゴ	褐斑病	<i>Diplocarpon</i>	1,9,11
8	44	トマト	葉かび病	<i>Passalora (=Fulvia)</i>	1,3,7,11
9	40	イネ、ムギ類、サツマイモ	ほか苗病、赤かび病、つる割病	<i>Fusarium, Gibberella</i>	1,3,11,M7
2	8	ナス	すすかび病	<i>Mycovellosiella</i>	3,7,11
1	1	リンドウ	褐斑病	<i>Mycochaetophora</i>	11
2	5	カンキツ	緑かび病、書かび病	<i>Penicillium</i>	1,M7
2	8	サツマイモ、アスパラガス	萎縮病、萎枯病	<i>Phomopsis, Diaporthe</i>	1,3,11,19,29,Mi,U16
4	14	トマト、ブドウ	すすかび病、褐斑病	<i>Pseudocercospora</i>	1,3,7,11
5	16	イチゴ、コムギ	うどんこ病	<i>Podosphaera, Blumeria</i>	3,7,9,11
1	3	コムギ	黄斑病	<i>Pyrenophora</i>	3,7,11
17	34	イネ	いもち病	<i>Pyricularia</i>	1,11,16,2
1	2	レタス、ブロッコリー	菌核病	<i>Sclerotinia</i>	1
1	1	アスパラガス	斑点病	<i>Stemphylium</i>	11
9	50	ナシ、リンゴ	黒星病	<i>Venturia</i>	1,3,7,9,11
1	4	ナシ	赤星病	<i>Gymnosporangium</i>	3,7,M3
2	2	コムギ、キク	さび病、白さび病	<i>Puccinia</i>	11
8	23	キウイ、タマネギ、ブドウ	へと病	<i>Pseudoperonospora, Peronospora, Plasmopara</i>	4,11,21,27,40,49
1	3	ジャガイモ	疫病	<i>Phytophthora</i>	40
1	3	イネ	褐条病	<i>Acidovorax</i>	24,31,M1
2	12	イネ、タマネギ	もち枯細菌病、苗立枯細菌病、腐敗病	<i>Burkholderia</i>	24,25,31,M1,U18
3	12	モモ	せん孔細菌病	<i>Xanthomonas</i>	24,25,31,41,M1

基本は、属レベルで集計

ただし、以下については病名あるいは近縁群ごとに集計

- ・うどんこ病、へと病、炭疽病

性低下菌として評価しようとするものであり、簡便な手法として採用されている。また、MICの結果に基づいて設定した濃度ではなく、農地における常用濃度での生育の有無で評価する事例もある。薬剤の種類によっては有効濃度でも生育する場合があります、植物体内で変化して活性化するものもあることから (Furuta et al., 2024; 佐野, 2019)、その判断には検討する余地がある (対象病害・薬剤の感受性に関する情報に乏しい場合に、暫定的に採用する基準として理解できる)。

表4 実施されている薬剤感受性検定の評価法 (基準)

評価法	検定数	同率(%)	基準	率(%)
EC ₅₀	23	3.1	特定濃度での生育の率	19.9
菌叢生育阻止率	123	16.8		
MIC	281	38.3	特定濃度での生育の有無	55.7
菌叢生育の有無	120	16.4		
胞子の発芽の有無	7	1.0	色素産生の有無	
培養性状	1	0.1		
生物検定	108	14.7	発病抑制効果	
遺伝子診断	70	9.5	変異の有無	

733

次に、培地における特定濃度における菌叢生育阻止濃度は、過去に MIC や EC₅₀ を計測した際のデータを基に設定されている場合、薬剤耐性菌の発生程度を推定できるが、再現性が高いという報告はない。また、代表的な薬剤について数段階の濃度で検定し、これをセットとして定期的に検定して経年的な感受性の変動を知ろうとするケースもある (栃木県資料)。薬剤感受性検定の情報の少ない薬剤においては、耐性菌発生の兆候をとらえる手段として有効であると考えられる。この場合、培地や培養温度、日数などを一定に保ちながら継続する必要がある。また、常用濃度での菌叢生育抑制率から、耐性、感受性を機械的に判定しようとするケースがあるが、対照に耐性菌を加えると理解しやすい。さらに、耐性菌と断定する場合は、生物検定における (防除) 効果の確認が必要であると判断される。

生物検定は、人工培養できない病原菌 (うどんこ病、さび病、べと病) では、中心となる検定手段であり、その他、培地検定のみでは判断しづらい薬剤では、培地検定の結果を補足するために用いられる。ナシ黒星病菌の DMI 剤感受性は、培地検定、遺伝子診断ともにこれを評価することができない状況にあり、もっぱら生物検定で薬剤の感受性が評価されている。また、薬剤の防除効果の低下をもって耐性菌とすることから、新たな耐性菌が発生した場合において、生物検定での効果減退を証明することが必要であり、収集したアンケートの中にもそれが含まれる。そもそも、防除効果の低下 (耐性菌であること) は生物検定を用いないと明確には証明できず、培地検定や遺伝子診断はその手間を省くための間接的な代替手段といえる。

遺伝子診断については、いくつかの作用機構の薬剤 (MBC, QoI, SDHI, DMI, CAA, OSBPI ほか) において、関与する変異が明らかになってきている。QoI 剤については関与するチトクローム b 遺伝子上の変異が限定されており、各種病原菌で共通することから、培養できない絶対寄生菌 (べと病、うどんこ病、さび病など) を中心に多くの菌で活用されている。MBC 剤においても同様にβ-チューブリン遺伝子の変異は比較的限定されており、一部の *Fusarium* 属菌で利用されているが、コストの面から培地での検定 (MIC)

が優先されることが多い。

DMI 剤については、CYP51 遺伝子における様々な変異や本遺伝子の過剰発現の例が報告されており、これらが相互に作用するため、特定の変異のみで説明のつかないケースが多く、汎用的な手段となっていない。遺伝子診断法については、様々な薬剤で薬剤感受性低下に関与する遺伝的変異と相互作用の理解が進むとともに、複数の作用機構の変異を同時に検出する技術が開発されれば、活用場面は広がるものと推察される。ただし、同時に生物の変異は常に多様化する方向にあり、継続的な調査研究が必要な分野だと考える。

(2) 培地検定の条件

・ 培地の種類

かつて、MBC 剤などが薬剤感受性検定の主要な検定対象であったころは、自作の PDA や PSA で検定するのが一般的であったが、薬剤の種類によってはこれらの培地での検定が難しいことが明らかになり、薬剤の種類によっては用いる培地を選ぶ必要が生じている。SDHI 剤は YBA、AP 剤や KRI 剤は FGA を使用するケースが増えている（表 5）。その他、細菌病の場合は NA、PDA、PSA、PPGA、Ayer's 培地などが用いられており、どれを選ぶかは定まっていないが、NA、PDA ほか利用できる市販品の培地は数多い。

それでも、PDA の汎用性は高く（全体の 71%）、このうち 65%が市販品の PDA であった。培地の種類によって、EC₅₀、MIC 値が異なることことが知られており、可能な限り、同じ成分の培地を供試する必要がある。特に低濃度での感受性を評価しようとする場合や培地の条件が検定結果に影響する薬剤においては、試験の精度（再現性）を確保する上でも、既製の市販製品あるいは合成培地の使用が推奨される。ただし、使用頻度の高い Difco、ニッスイ、栄研の各社 PDA の間で同じ応答が得られるか比較した例はない。

なお、QoI 剤の検定の際に添加される AOX 剤については、PG（没食子酸 n-プロピル）よりも SHAM（サリチルヒドロキシサム酸）を使用する場合がやや多いが（表 6）、選定基準は特にはなく、ただ前例に従ったものが多いと判断された。なお、AOX 剤は、菌の生育に影響することが知られており、新たな病原菌や薬剤の組合せでは、その種類と濃度について検討する必要がある。

表 5 培地検定に用いられている培地と対象薬剤

培地の種類	採用数	内市販品	同左率%	対象薬剤（グループ）
PDA	407	265	65.1	MBC(1)ほか計22グループ
PSA	23			MBC(1)ほか計11グループ
YBA	89			SDHI(7)
FGA	25			AP(9),KRI(17),ポリオキシシン(19)
NA(普通寒天培地)	12	9	75.0	細菌を対象にした薬剤
その他	15			
	571			

表 6 QoI剤を検定する際に培地に添加する AOX阻害剤

	n=	比率%
SHAM	65	60.2
PG	43	39.8

・培養温度と培養日数

培養日数が、EC₅₀やMICなどの検定結果に影響することが知られており（入江・井上, 1993）、培養温度も生物代謝や抗菌活性に少なからず影響する（農業分野では種子消毒剤、食酢の効果など）。このため、薬剤の種類によっては、培養日数と温度を厳密に設定する必要がある。

培養日数については、生育が早い菌では短く、生育の遅い *Passalora*、*Diplocarpon*、*Venturia* で長く、生育の阻害率を見ようとする際も長くなる。アンケートの結果、おおよそその傾向にあったが（表7）、同じ菌でも培養日数が異なるケースが認められる。培養日数が影響しない薬剤との組合せもあるが、寒天ディスクからの生育の有無を判定に迷うような組み合わせなどでは、条件を整えないと再現性のある結果が得られないと予想される。

表7 培地検定における培養日数

	1日		2日		3日		4日		5日		6日		7日		10日		7-14日		10-14日		14日		21日		28,30日		
	有無	率	有無	率	有無	率	有無	率	有無	率	有無	率	有無	率	有無	率	有無	率									
細菌			6		11		2		4	1																	
<i>Alternaria</i>						3																					
<i>Botrytis</i>			48	12	30	16	28	5			4	2	37	5													
<i>Cercospora</i>					5	2		12	2	11	3		7	7													
炭疽病菌					14	1	34	1	6	9			19	12													
<i>Corynespora</i>					7	3	6	12	1				4	7													
<i>Diplocarpon</i>																			1		2		2				
<i>Fusarium</i>			4	4	5	3			12						1												
<i>Mycochaetophora</i>													1														
<i>Mycovellosiella</i>											3		5														
<i>Passalora</i>							3								30		6									1	
<i>Penicillium</i>					5																						
<i>Phomopsis</i>							1																				
<i>Pseudocercospora</i>									2				4		2												
<i>Pyrenophora</i>						2							1														
<i>Pyricularia</i>					14	2	2		1	1					1												
<i>Sclerotinia</i>																											
<i>Stemphylium</i>							1																				
<i>Venturia</i>	1																							1	16	2	5
有無：	1	58	91	77	26	10	78	33	6	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3			
率：	0	16	32	30	24	2	32	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	16	5			

有無：MIC、特定濃度での生育の有無
率：EC₅₀、生育阻止率、特定濃度での生育率

培養温度（表8）は18~34℃の範囲で行われており、25℃での検定数が最も多かった(63%)、次に20℃の32%でその多くが *Botrytis* を対象としたもので、中低温での生育適温の菌がこの温度で検定されている。今回の調査には無いが麦類の紅色雪腐病菌でも同様である。一方、細菌病は28℃あるいは25℃で検定するケースが多い。この分野では病原菌の生育適温で検定されることが多いが、動物の病原菌の場合は、体温（37℃付近）で検定されている点で、大きく異なる。植物は栽培環境によって、温度（気温）が大きく異なることから、防除を考えるなら、異なる温度域での薬剤の活性や菌の感受性の評価が必要と考えられる。

いずれにせよ、検定結果を比較しようとする場合、生物にとって5℃の温度差はあまりにも大きいことから、菌の種類に応じて検定温度を統一するべきものと考えられた。

表8 培地検定における培養温度

	培養温度℃								
	18	2020~25		23	25	25,28	28	34	室温
細菌					8		14	1	
<i>Alternaria</i>					3				
<i>Botrytis</i>	3	144			40				
<i>Cercospora</i>			2		48				
炭疽病菌					96				
<i>Corynespora</i>					39				
<i>Diplocarpon</i>				4	1				
<i>Fusarium</i>		5			25				
<i>Mycovellosiella</i>		1			8				
<i>Passalora</i>					44				
<i>Penicillium</i>						3	2		
<i>Phomopsis</i>					1				
<i>Pseudocercospora</i>					13				
<i>Pyrenophora</i>					3				
<i>Pyricularia</i>					18		1		1
<i>Sclerotinia</i>	1	1							
<i>Stemphylium</i>					1				
<i>Venturia</i>		24							
計(検定数)	4	175	2	4	348	3	17	1	1
割合(%)	0.7	31.5	0.4	0.7	62.7	0.5	3.1	0.2	0.2

以上、培地の種類も含め、培養条件が異なるケースが多いことが明らかになった。後述する判定基準については、検定の目的によって異なるため、柔軟な判断が必要であるが、年次変動や地域差を議論するには、上記の条件を整える必要がある。なお、特に注意が必要だと想定される菌と薬剤は下記の通りである。

表9 培養条件(培地、温度、日数)が特に強く影響すると推察される薬剤や病原菌

薬剤	DMI剤(3)、SDHI剤(7)、PA剤(4)、その他
病原菌	細菌全般、 <i>Venturia</i> 、 <i>Colletotrichum</i> 、その他

・添加する薬剤と分散媒、培養容器

添加する薬剤は市販の水和剤などの製剤を使うケースが最も多く、原体や試薬を使用する事例は少なかった。オキシリニック酸など試薬として入手しやすいものを除き、分析用の試薬は高価なため、市販の製剤を用いるのが一般的となっている。ただし、市販の製剤は安定性を保つための副資材が加えられており、それが検定結果に影響しないか事前にメーカーを確認するとともに、場合によっては原体の提供を依頼する必要があると考えられる。

また、薬剤の分散媒としてDMSOなどを用いる例も少なかった(表10)。薬剤の種類によっては、水溶解度が低いことから、高濃度での検定には注意が必要である。農薬原体の水溶解度やオクタノール/水分分配係数(Log Pow)については、薬剤の性質を理解する上で重要な情報である。

検定培地はガラス製から使い捨てのプラシャーレが主流になり、グリット線が入った角型シャーレの使用が増加している（表 11）。

表10 培地に加える薬剤の分散媒

分散媒	
DMSO	27
メタノール	2
水	517
0.1N NaOH	6

表11 培地検定に用いた培養容器

	使用数
径9cmシャーレ	196
角型シャーレ 96X96mm	58
140X100	63
230X75mm	39
角型計	160

・ **培地検定における接種源**

糸状菌の場合、PDA 平板培地で前培養し、これから切り出した寒天を含む菌叢ディスクを置床する方法が採用されてきたが、現在でも扱いやすい接種源として広く用いられている（表 12）。一方、MIC など、生育の有無を知ろうとする場合、薬剤の種類によっては、完全に生育を阻止しないため、判定しづらいケースがある。また、生育の遅い菌でも、判定に悩むケースがあった。そこで、菌叢ディスクに代わりに胞子が付着したペーパーディスクを置床する方法や菌叢破碎液を培地上に滴下し、菌叢形成の有無を調査する方法が考案され、普及されている。ただし、破碎等の作業に手間を要することから、前培養を素寒天（WA）で行い、上記課題を解決しようとする試みも認められた。

表12 培地検定における接種源の種類

接種源	径	検定数	同左率	備考
菌叢ディスク	3mm	2	286	68.6
	4mm	212		
	5mm	20		
	5.5mm	5		
	6mm	47		
菌叢破碎液		64	15.3	<i>Passalora</i> 、炭疽病菌等で利用
胞子（ペーパーディスク）		67	16.1	主に <i>Botrytis</i> でSDHI(7), AP(9)で活用
計		417		

・ **検定濃度と判定基準**

まずは単位であるが、多くの機関が ppm を採用し、 $\mu\text{g/ml}$ を採用している個所数は非常に少なかった。厳密には後者を採用すべきケースが多いと推察される。本稿では 単位を mg/L と表記し、統一を図りたい。

培地検定の際に設定する薬剤濃度（段階）は、*Botrytis* の場合のように簡素化が図られており、1 濃度のみで検定できるようにシステム化されつつある。このように、既往の研究例を参考に 1 濃度での検定が実施されているのは全体の 57.3%と多い（図 13）。この場合、過去の報告や、各機関の研究蓄積を基に濃度が設定されていると推察される。ただし、率（菌叢生育阻止率）で評価されている事例では、感受性の判定基準が実施機関により、阻止率 40~80%と大きな幅があり、薬剤の種類を問わず同一の基準で判断している事例も認められた。

3 濃度以上も 27%程度あり、耐性の程度が評価されている。MIC や EC_{50} を求める場合、少なくとも 5

段階ほど必要となる。感受性の変化をとらえる場合、新たな薬剤耐性を評価する場合などは、さらに多段階の濃度での検定が必要である。

表13 培地検定における薬剤濃度の段階

検定濃度の段階（無添加を除く）	菌叢の生育		計%
	有無	率	
1濃度	36.6	10.5	
1濃度（常用濃度）	3.4	6.8	57.3
2濃度	13.3	1.6	
2濃度（常用濃度と1/10）	0.2	0.5	15.7
3濃度以上	21.8	5.2	27.0

また、判定の基準は知見の蓄積が十分な場合、MIC、EC₅₀ 値、菌叢生育阻止率などで評価されるが、知見が少ない場合は、便宜的に判定基準が設定されている。耐性菌リスクを早い段階で検知しようとする姿勢の現れだと考えられるが、判定基準に常用濃度を設置する事例も増えてきており、このことについては後に考察する。

(4) サンプルングの数

サンプルングの圃場数・標本数は、何が知りたいかで適切な規模がある。また、病原菌の飛散が狭い場合、圃場内で多様な性状の個体群が偏在あるいは混在しており、採るべき試料の数（圃場数、圃場内の地点数）は病害によって異なるものと推察される。一方、適切な数とは一般に多大なものとなるため、限られた時間と人員で調査できる範囲に制限されているのが現実である。また、サンプルングを普及組織など地域の協力を求める場合、関係者との協議・情報共有が不十分だと想定した試料の収集が困難となる。いずれにせよ、様々な制限の中で可能な範囲で収集し、分離培養されたものを検定しているのが実態であると想定される。

また、圃場あたりのサンプルング数は、1～10程度で、苗木で生物検定する黒星病菌などでは1～2点/圃場と供試料数は少ない、その他の培地検定を行う病害では、検定可能数 $\geq a$ （菌株数） $\times b$ （圃場数） $\times c$ （検定薬剤数等の手間）に制限されており、abcのどれを重視して必要な情報を得ようとするかで、サンプルング数は決定されている。

標本のサンプルングの考え方（目的に応じたサンプルング）

- ア. 地域、圃場における耐性菌比率を知りたい場合
 - ※ 耐性菌比率 \neq 伝染源量
 - ※ 比率は使用薬剤で左右される
 - 比率を示すのに必要な菌株数
- イ. 地域における新たな耐性菌発生の兆候を知りたい場合
 - ※ 耐性菌検出後の戦略があつてこそ
 - 偏りなく多地点 $>$ 菌株数
- ウ. 地域の薬剤感受性の実態を知りたい場合
 - ※ 現場誘導、防除暦策定の参考資料となる
 - ※ 未然に防ぐための取り組みも必要
 - 過去の調査との対比性を考慮
- エ. 多発生が耐性菌の惹起によると考えられる場合
 - ※ まずはエビデンスを取得、同時に代替対策提案
 - 限定・対比調査 \rightarrow 広域調査
 - 段階的、2つの局面を説明

(5) 検定目的

表 14 に示すとおり薬剤感受性検定の目的として最も多いのは、①地域で発生する病害の薬剤感受性の実態を広く知ろうとするものであり、次の②実態調査・変動解析とともに多く、地域への情報提供あるいは防除指針（暦）策定の資料にするなど、短期あるいは中長期的な視点で行う行政サービスとして機能しているものと推察される。この場合、簡易な検定法で数をこなすことが優先されるとともに、変動解析では検定条件の継続性、薬剤の感受性変動は MIC、EC₅₀ などの調査の継続も必要になる。次の③多発要因の解析については、耐性菌の発生がその要因の一つと考えられるケースが日々生じており、これを検証するための即応的な作業とみられる。この場合、根拠を得るための様々な調査はもとより、地域の実態調査、対策のための防除試験も同時に実施する必要がある。さらに、以上により防除体系等を変更した後の④対策の検証についても、追跡調査されている実態が伺えた。なお、学術的な情報を収集して⑤論文化し、広く知見を周知することを目的とするケースでは精細な研究が要求される。

表14 感受性検定の目的

検定の目的	回答数	備考
実態把握（広域）	499	地域全体の耐性菌発生状況の把握
定期調査・変動解析	258	毎年あるいは数年おきの変化を把握
多発要因解析	150	突発あるいは多発した病害の発生要因の解析
対策の検証	44	対策（防除体系の変更）の検証
論文化	8	学術的に必要な情報の収集
その他	1	
未回答	17	
計	977	（重複回答を含む）

(4) 検定法の参考とした資料

実施されている感受性検定は、日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会が編集した「植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル」を参考にした事例が最も多く、次いで学術雑誌あるいは専門雑誌（植物防疫）の論文・資料であった（表 15）。また、各機関の過去の成績（研究蓄積）や他県の情報を参考に実施している例も多く認められた。なお、未回答も多かったが、継続的実施されている検定の中にも根拠が不明なケースも少なからずあろう。

表15 培地検定の際に参考とした資料

検定の参考とした資料	該当数	回答に占める割合
学術雑誌	89	15.7
日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会編 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル	147	26.0
同研究会シンポジウム講演要旨集	10	1.8
月刊「植物防疫」（上記、マニュアルを除く）	24	4.2
機関誌	6	1.1
過去の試験成績（未公開含む）等	102	18.0
他県の手法	13	2.3
独自に設定	21	3.7
その他	154	27.2
未回答	258	

2) 検定法の考え方と標準的手法の確認

(1) 検定法の方向性（手法の簡素化）

既往の検定法に関する報告あるいはマニュアルの多くは、新発生の耐性菌の発生報告の過程で得た情報を示すものが多く、薬剤耐性であることを証明するための論拠、基準を示すことに重点が置かれ、多数の検体を調査すること、さらに、異なる種類の薬剤を同時に調べることを前提として組み立てられていない。このため、実際に薬剤感受性検定の事業を運用する際には、マニュアルも含めた既往の知見を基にしなが、可能な限り作業を選択し、最大限の情報を得る方向に検定作業の全体構成が調整される。

特に、検定すべき薬剤の多い灰色かび病菌においては、既往の研究蓄積に独自の研究結果を加えた検定システムが構築され（鈴木ら、2016）、運用例が報告されている（川上ら、2020）。同様に、生育が遅く、感受性検定が難しいとされるトマト葉かび病菌においては、精度の高い検定法が開発され（渡辺、2017）、今回のアンケートにおいても、これらの方法が全国で活用されている実態を知ることができた。

そして、EC₅₀ や MIC での評価ではなく、特定濃度での生育の「有無」や「程度（率）」で評価しようとする方向性があると判断される（図4）。また、既往の研究蓄積からその特定濃度が明らかでない薬剤も多いため、常用濃度で統一して検定している事例が散見される（表13）。先にも述べたが、培地検定や遺伝子診断は間接的に防除効果の低下（耐性菌の発生）を知ろうとするものであり、むしろ「生物検定における常用濃度」での検定は直接的に評価する手段であるが、「培地検定での常用濃度」で、正確な判定が下せるかの検証が必要である。常用濃度で生育が認められない場合に感受性と判定することは理解できるが、生育した場合に耐性菌とする場合には追加の検証が必要に思える。

情報が少ない薬剤・病原菌においては暫定的に判定する目安を設けて、リスク管理や適時の情報提供を行う必要があり、生産現場からもそれを求められている。このため、走りながらも検定の的確性を高めてゆく立ち位置と理解される。

なお、簡易検定法として、過去には薬剤含有培地に病斑上の孢子を塗布する方法、薬剤を染み込ませた楊枝を病果に突き刺す方法等々、現地でもできる簡易検定法が提案されているが、応用できる薬剤の種類が限定され、判定に苦慮するケースがあること、検定資材を自作することの煩雑さなどから、汎用的な技術にはなっていない。

その菌が耐性菌かどうかを重視するのではなく、地域あるいは園地の耐性菌の発生状況を知り、指導に活用するのが目的であれば、MIC や EC₅₀ という評価基準は必ずしも必要とはならない。

参考となるのは、5、10年おきに主要な薬剤の感受性を継続調査している栃木県の例で、各濃度での生育抑制率の経年的変化から、感受性のおおまかな変化を知ろうとするものである。病害や薬剤の種類を問わない万能の手法ではないが、基礎的な情報として集積する価値のある情報であると考えられる。

耐性菌と感受性菌の比率を重視した議論があるが、比率よりも耐性菌による被害やその伝染源密度が問題である。それを知るにはサンプリングの考え方の方が重要で、これに関する検討や議論は少ない。いずれにせよ、培地検定での感受性検定が難しい薬剤が増えてきており、煩雑な培地検定が要求される方向にある。このため、最も確からしい情報が得られる生物検定で評価しようとする取り組みも目立ち始めている。

(2) 基本の確認

糸状菌病の基本的な培地検定の条件を表16に示す。これを基本とし、病原菌や薬剤の種類に応じて、最

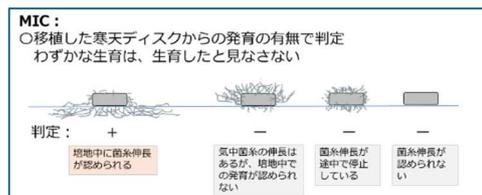
適化（簡易化）を図るものとして。また、検定を行うにあたり、実施後のアウトプットを想定し、必要とされる情報が得られるようデザインすること、中長期的な視点も持ちながら検定計画を立案することが求められる。

表16 糸状菌病の基本的な培地検定の条件

薬剤濃度 mg/L	案1 : 0, 0.01, (0.03), 0.1, (0.3), 1, 3, 10, 30, (100), (300) 又は 案2 : 0, 0.01, (0.05), 0.1, (0.5), 1, 5, 10, 50, (100), (500)	() 内の濃度は必要に応じて設置
検定培地	PDA (基本) YBA・YBG(SDHI), FGA(AP, KRI)	全般 (QoIにはPGまたはSHAM添加) SDHI, AP, KRI剤など
前培養培地	PDA, PDB, WA	
接種源	菌叢ディスク (PDA) 菌叢破砕液、菌叢ディスク (WA) 胞子 (ペーパーディスク法)	MICでの判定が容易な薬剤、EC ₅₀ を調査する場合 MICでの判定が難しい薬剤(SDHI剤ほか)、生育の遅い菌(葉かび病) 胞子形成が容易な菌 (<i>Botrytis</i>)
培養温度	20℃ (暗黒下) 25℃ (暗黒下) 28℃ (暗黒下)	灰色かび病、黒星病ほか その他の多くの菌 一部の中高温性の菌
判定基準	MIC (または生育の有無) EC ₅₀ (または生育阻止率、RG)	・過去の情報と比較し、感受性の低下を考察して判定 (暫定的な判定) MIC値が常用濃度より低ければ感受性菌 ・過去の情報と比較し、感受性の低下を考察して判定 (暫定的な判定) 常用濃度の生育阻止率が80~90%以上であれば感受性菌

※： 耐性菌であると判断するには、当該要件が過去も含めて生物検定で効果が減退していることが示されていること

- 注1) ベースラインより感受性が低下している場合→ 感受性低下菌
さらに、防除効果が低下が認められるものを→ 耐性菌
- 注2) 判定基準は薬剤および菌によって異なる
- 注3) 常用濃度で生育した場合の判定は薬剤によって異なる



A 感受性検定を行うにあたり

1 まずは目的の理解

① 多発要因の解析

気象、伝染源密度、耕種的要因、不適期防除、薬剤感受性の低下
その検討項目の一つとして、薬剤感受性の低下の有無を調査し、
対策の資料とする

② 状況の把握 (サーベイランス)

(定期的な状況調査)

感受性低下のリスクの高い病害と薬剤、あるいは、
かねてより薬剤感受性の低下事例がある病害について、
耐性菌の発生状況 (構成割合) を明らかにする

(継続的な兆候調査)

薬剤感受性低下が想定される病害について、
広域的な調査を継続的に行い、被害の顕在化を防止する

③ その他 (対策の検証、論文文化ほか)

○対策のための調査・解析であるから、実施後のアウトプットを想定

2 情報収集と検定計画の策定

① 情報収集 (背景の理解、適切な作業のため)

- ・現地での耕種概要、薬剤の使用実態、防除暦の内容
- ・農業者、指導者の見解
- ・既往の耐性菌発生状況、適切な検定方法
- ・代替剤の有無、他県での対応など

② 検定計画 (目的に応じた設計)

- ・サンプリングの規模 (精度、検定数、迅速性の何を優先)
- ・検定法の選定 (薬剤の作用特性等に応じる)
 - ▶ 少ない頻度の検出、比率を知る→数を優先
 - ▶ 初知見→精度、確かさを優先
 - ▶ まずは対応→迅速性を優先
- ・検定薬剤の選定 (疑義剤、基幹剤、代替剤)
- ・作業の時期 (情報発出の時期に応じる)
- ・薬効試験 (耐性菌未報告病害では、必須)
(ケースによっては、代替防除の試験を同時並行で行う必要がある)