

4) 参考情報の取りまとめ

殺菌剤感受性検定の経験が浅い技術者が、業務に取り組みやすいよう関連する情報を以下のように取りまとめた。

(1) 文献・技術情報

web上に公表されている文献、レポート、成果情報等とし、検定法として特に参考になるものが分かるようにExcel上で編纂した。

- ・専門誌に掲載されている文献・レポート・マニュアル(図3、a、b)
- ・都道府県が提供している主要成果情報、病害虫防除所情報(図3、c)

(2) 検定法のノウハウ

- ・薬剤感受性検定の考え方、技術的なノウハウをマニュアルとして作成した(図4)。

以上は、今後、殺菌剤耐性菌研究会と連携し、日本植物防疫協会のHP等で公開するとともに、情報の随時更新を行い、広く活用を図る予定である。

対象	著者	年	題名	巻号	URL
Pyricularia	深谷薫夫	1993	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(2)イネいもち病菌	47(7):324-328	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/47_07_40.pdf
Fusarium	入江和己・井上幸次	1993	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(3)イネばか苗病菌	47(8):376-380	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/47_08_34.pdf
Fusarium	宮島邦之・中澤靖彦	1993	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(4)コムギ赤かび病菌・うどんこ病	47(9):428-432	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/47_09_38.pdf
うどんこ病	宮島邦之・中澤靖彦	1993	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(4)コムギ赤かび病菌・うどんこ病	47(9):428-432	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/47_09_38.pdf
眼斑病	竹内 徹	1993	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(5)ムギ眼斑病	47(10):468-471	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/47_10_36.pdf
Botrytis	木曾 隆	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(6)野菜類灰色かび病	48(1):42-46	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_01_42.pdf
べと病	中澤靖彦・黒沢美保子	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(7)キュウリべと病	48(2):86-89	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_02_36.pdf
疫病	辻本一幸	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(8)ジャガイモ疫病及び各種疫病	48(3):141-144	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_03_141.pdf
炭疽病	楠 幹生・佐古 勇	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(9)野菜類炭そ病・つる枯	48(4):179-184	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_04_179.pdf
つる枯病	楠 幹生・佐古 勇	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(9)野菜類炭そ病・つる枯	48(4):179-184	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_04_179.pdf
Corynespora	狭間 渉・中澤靖彦・大	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(10)野菜類抱卵菌(黒枯病)	48(6):267-272	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_06_267.pdf
うどんこ病	狭間 渉・中澤靖彦・大	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(10)野菜類抱卵菌(黒枯病)	48(6):267-272	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_06_267.pdf
細菌	松嶋正文・林 寛夫	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(11)野菜類細菌病・コンゴ	48(7):310-312	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_07_310.pdf
細菌	尾形 正・小泉銘朗	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(12)モモせん孔細菌病・ナ	48(8):350-353	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_08_350.pdf
Alternaria	石井英夫	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(13)ナン黒斑病・リンゴ	48(9):395-401	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_09_395.pdf
Ventria	石井英夫	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(14)ナン黒斑病	48(10):442-444	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_10_38.pdf
Ventria	石井英夫	1994	植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル(14)ナン黒斑病	48(10):442-444	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_10_38.pdf
Penicillium	外間正之・深谷薫子	1995	植物病原菌	48(12):524-526	https://www.jpfa.or.jp/archive/pdf/48_12_32.pdf

a:「植物防疫アーカイブ」から抽出

対象	著者氏名	年	掲載論文題名	掲載誌名	巻	号	掲載ページ(スタート)	掲載ページ(エンド)	URL, doi
Botrytis	大森 真子ら	2019	栃木県におけるトマト、イチゴの灰色かび病の薬剤感受性	関東農山産物昆虫研究	66	7	11		https://doi.org/10.11377/ktpp.66.7.11
Botrytis	川上 拓ら	2019	トマト栽培圃場における灰色かび病の主要病原菌に対する耐性菌の発生	病害虫防除研究	61	15	22		https://doi.org/10.4165/kappo.61.15
	小島一輝ら	2021	灰色かび病の菌糸の薬剤感受性検定法の改良と栽培圃場内トマト茎	病害虫防除研究	63	109	113		https://doi.org/10.4165/kappo.63.109
	祖田 嘉孝ら	2022	大分県におけるイチゴ灰色かび病の病原菌の検出	病害虫防除研究	68	36	43		https://doi.org/10.4241/kysub.68.36
	Ayumi Notsu et al.	2022	Distribution of benzimidazole-resistant strains of the onion gray-	Journal of General Plant	87	249	253		https://doi.org/10.1007/s10321-021-00928-w
Cercospora	原藤雅明ら	2022	秋田県におけるQoI耐性アシタバカス抱卵菌の発生	病害虫防除研究	73	19	22		https://doi.org/10.11455/kntan.73.19
Cercospora	Miyuki Kayamori et al.	2020	First report of QoI resistance in Cercospora beticola in sugar beet in	Journal of General Plant	86	149	153		https://doi.org/10.1007/s10321-018-0085-1

b:学術雑誌から選定

対象	作物名	病名	自治体	c:技術情報	URL, doi
Botrytis cinerea	キュウリ、トマト	灰色かび病	宮城県	c	05sankou23.pdf (pref.miyagi.jp)
Botrytis cinerea	トマト、イチゴ	灰色かび病	栃木県	c	https://www.pref.tochigi.lg.jp/q59/boujo/documents/2018-vasai-haiirokab2.pdf
Botrytis cinerea	果菜類(トマト、イチゴ)	灰色かび病	三重県	c	https://www.pref.mie.lg.jp/common/content/000672274.pdf
Botrytis cinerea	果菜類(トマト、イチゴ)	灰色かび病	三重県	c	https://www.pref.mie.lg.jp/common/content/000871044.pdf
Botrytis cinerea	果菜類(トマト、イチゴ)	灰色かび病	三重県	c	https://www.pref.mie.lg.jp/common/content/001123798.pdf
Botrytis cinerea	トマト	灰色かび病	岡山県	c	https://www.pref.okayama.jp/uploaded/life/623117_5201276_misc.pdf
Cercospora asparagi	アスパラガス	抱卵病	秋田県	c	https://www.pref.akita.lg.jp/uploads/public/archive_0000063669_00/R03_%E5%AE%9F%E7%94
Cercospora asparagi	アスパラガス	抱卵病	岡山県	c	https://www.pref.okayama.jp/uploaded/life/864045_8209294_misc.pdf
Cercospora kikuchii	ダイズ	葉斑病	秋田県	c	https://www.pref.akita.lg.jp/uploads/public/archive_1400063669_00/R03_%E5%AE%9F%E7%94
Colletotrichum	イチゴ	炭疽病	宮城県	c	https://www.pref.miyagi.jp/documents/2020/256498.pdf
Colletotrichum fructicola	イチゴ	炭疽病	栃木県	c	http://www.pref.tochigi.lg.jp/q59/boujo/documents/2019-ichigo-tanso.pdf
Colletotrichum zingimii	ブドウ	炭疽病	長崎県	c	https://www.pref.nagasaki.lg.jp/e-nourin/nousi/IPP/pdf/kentse/26budoubanpukentse.pdf
Colletotrichum fructicola	イチゴ	炭疽病	岡山県	c	https://www.pref.okayama.jp/uploaded/life/726333_6598887_misc.pdf
Colletotrichum gloeosporioides	ナン	炭疽病	栃木県	c	http://www.pref.tochigi.lg.jp/q59/boujo/documents/2022-nashi-tanso-hyo.pdf
Colletotrichum gloeosporioides	イチゴ	炭疽病	佐賀県	c	https://www.pref.saga.lg.jp/kiji/00385836/3_85836_240875_up_acsipuen.pdf
Colletotrichum spp.	ブドウ	炭疽病	佐賀県	c	https://www.pref.saga.lg.jp/kiji/00380591/3_80591_205655_up_206e1m53.pdf
Corynespora cassicola	キュウリ	抱卵病	秋田県	c	https://www.pref.akita.lg.jp/uploads/public/archive_0000009422_00/H26-

c:都道府県の公開情報

図3 薬剤感受性検定に関する情報をリスト化(一部抜粋)

殺菌剤感受性検定の基礎とノウハウ

ver. 0.5

本資料は、日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会の協力を得て作成しました。

基礎とノウハウ ～自次～

・解析であるから、実施後のアウトプットを想定
適切な作業のため
 ① 目的設計
 ② 計画設計
 ③ 実施計画
 ④ 評価計画

① 目的設計
 ・ 目的・目的の明確化
 ・ 目的達成のための作業計画
 ・ 目的達成のための評価計画

② 計画設計
 ・ 目的達成のための作業計画
 ・ 目的達成のための評価計画

③ 実施計画
 ・ 目的達成のための作業計画
 ・ 目的達成のための評価計画

④ 評価計画
 ・ 目的達成のための作業計画
 ・ 目的達成のための評価計画

A 感受性検定を行うにあたり

1 目的の明確化
 ① 多変数因子の解析
 ② 状況の把握 (サーベイランス)
 ③ その他 (対策の検証、論文化ほか)

2 情報収集と検定計画の策定
 ① 情報収集 (目的達成のため)
 ② 検定計画 (目的に応じた設計)

3 検定のサンプリングと検定計画
 ① 検定のサンプリングと検定計画
 ② 検定のサンプリングと検定計画

4 薬剤感受性検定と用いる資材、調整法

1) 主な評価法
 a 最小発育阻止濃度 (MIC)
 b 50%生育阻止濃度 (EC50)
 c 菌数生育阻止濃度
 d 遺伝子診断

2) 検定計画の留意点
 ① 検定計画の留意点
 ② 検定計画の留意点

5 検定計画の準備作業

① オートクレーブ後の培養を、固まる前に5℃程度のオータバスで恒温培養
 ② オートクレーブ後の培養を、固まる前に5℃程度のオータバスで恒温培養
 ③ オートクレーブ後の培養を、固まる前に5℃程度のオータバスで恒温培養

6 検定計画の留意点

① 検定計画の留意点
 ② 検定計画の留意点
 ③ 検定計画の留意点

7 検定計画の留意点

① 検定計画の留意点
 ② 検定計画の留意点
 ③ 検定計画の留意点

8 計画、判定

MIC: ① 移植した寒天ディスクからの発育の有無を判定
 EC50、菌数生育阻止率: ① 生育した菌の径と径を測定し、その平均値から菌数生育阻止率を算出

9 検定計画の留意点

① 検定計画の留意点
 ② 検定計画の留意点
 ③ 検定計画の留意点

10 検定計画の留意点

① 検定計画の留意点
 ② 検定計画の留意点
 ③ 検定計画の留意点

図4 検定の基礎とノウハウ (一部抜粋)

5. 考察

既往の薬剤感受性検定マニュアルは、1990年代に策定されたものから現代に至るまで実施した時代、作物、研究者によって少しずつ手法、条件、考え方は異なってきている。また、最初に耐性菌が顕在化した薬剤・病害・品目において、地域別の研究者が集中的に研究した成果をまとめたものであり、個々の分離株が耐性菌であるか否かを証明することに重点がおかれ、地域における発生状況を広く知ることを目的とした

ものではない。このため、実際に調査を運用する際には、これを参考にしつつ、それぞれの判断で必要に応じた簡素化が図られている。

また、耐性菌の発生が未確認の場合、研究蓄積が少ない場合など、手法や判定基準を独自に設定せざるを得ない。このため、「可能な限り適切であろう方法」を設定して、実施されている状況が伺えた。論文情報を収集する限りにおいては、多様な薬剤に応じた検定法を取り入れながら、学術性を担保するため、従前の解析法に加えて遺伝子解析も行い、結果を補強する作業が行われていた。多様化、高度化する方向にあるように思えたが、アンケートの結果からは、工夫を重ねてそれぞれの機関が簡素化を図っている状況が明らかになった。検定濃度も1濃度ないし2濃度で実施している例が多く(表13)、すでに多くの場合、簡易法で検定されていると言える。

ただし、その一部には検定法の見直しを要するものもあり、それぞれの工夫ではなく、関係者が協議して「確からしい」手法に収斂していくことが必要であると考えられた。

本稿では、標準的手法として示したが、手法の比較検証を行っていないため、十分な信頼性が確保されているとは言えないし、まだまだ検証や簡略化が足りないとの意見が予想される。大幅な改変は可能だが、従来の継続性が無ければ過去と今を知ることができない。残された課題は多いが、その議論の題材となれば良いと考える。

植物防疫事業を行うなかで、本課題に費やせる資源(人と時間、資金)は限られており、その限られた資源でそれぞれの役割を果たすための資料として、本稿が活用されることを期待したい。

6. 今後の課題

- ・対照とする菌株(感受性菌、耐性菌)の一元的な保存・供給体制の整備が必要である。
- ・暫定的に基準を設置しているケースがあり、実施機関によってその基準が異なるため、目安となる数値を明らかにする必要がある。
- ・培養温度、培地の種類、その銘柄、接種源が検定結果に及ぼす影響を明らかにする必要がある。
- ・菌叢生育阻止率で評価できる基準を薬剤ごとに設定する必要がある。
- ・SDHI剤など、薬剤によっては検定法そのものの再検討が必要である。
- ・以上の課題について、調査研究する事業を行う必要がある。

7. 要約

検定手法は、論文やマニュアル等を参考にしながらも、各機関が過去に得た知見と照らし合わせながら、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が明らかになった。一部には、その意味が十分に理解されないまま、実施されているケースもあると予想される。実施されている検定法は、工夫して簡便化が図られているが、多様な基準で判定されていることから、これを比較検討する機会が必要であると判断された。いずれにせよ、耐性菌かどうかは生物検定でない判断できず、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であること念頭におき、判定を行う。検定の基本的な検定法を改めて示すとともに、関連情報を利用しやすいスタイルで取りまとめた。主要な病害の標準的な検定法を取りまとめるとともに、その課題を示した。

8. 謝辞

今回の報告書をまとめるにあたって、アンケート調査にご協力いただいた都道府県関係者、文献情報並びに終始有益なご助言を下された日本植物病理学会殺菌剤耐性菌研究会の皆様に厚くお礼申し上げます。