

特集：DMI 剤耐性菌に関する最近の話題

D M I 剤 耐 性 菌 を め ぐ っ て

(独)農業環境技術研究所 石井 英夫

I DMI 剤を取り巻く環境と耐性菌

ステロール生合成阻害剤は、多くの病原糸状菌の膜成分として重要な、ステロールの合成を阻害することにより病害を防除する薬剤である。中でもステロール合成経路の脱メチル化反応を阻害する DMI 剤 (sterol demethylation inhibitors) は特に重要で、2005 年の世界における農業用殺菌剤マーケットの 27.7% を占め、ミトコンドリア電子伝達系の複合体 III を阻害する QoI 剤 (19.1%) と合わせて、およそ半分のシェアをもっている (Kuck and Gisi, 2007)。我が国においても、イネの種子消毒剤、ムギ類、野菜、果樹その他の茎葉散布剤として広く使用されている。

DMI 剤が我が国に広く普及した 1980 年代中ごろには、既に海外でムギ類やキュウリのうどんこ病などで DMI 剤耐性菌が出現していた (石井, 1985)。このため普及当初から耐性菌発達のリスクを考慮して、リンゴに見られたように DMI 剤の使用回数制限なども行われ、耐性菌管理において一定の効果を上げてきた。

ベンゾイミダゾール系薬剤や QoI 剤 (ストロビルリン系薬剤) などの場合と異なり、DMI 剤に対する菌の感受性低下は圃場では通常ゆっくり進行するため、DMI 剤の防除効果が 1 年や 2 年の短期間の使用で突然失われることはまずない。しかし、そのことが反面、栽培者をして、薬剤感受性の低下に気付くのを遅らせる。

キュウリうどんこ病菌では、DMI 剤トリアジメホンなどに対する感受性低下が報告された (浅利ら, 1994) もの、すべての DMI 剤が耐性菌出現によって効果を失ったわけではなく、中でもトリフルミゾールはまさにとっておきの特効薬として、最近まで多くの農家の信頼を得てきた。DMI 剤の種類によって交差耐性のパターンが異なることは、テンサイ褐斑病菌 (KARAOLANIDIS and THANASSOULOPOULOS, 2003) やナシ黒星病菌 (20 ページ参照) など、多くの病原菌で観察されている。

以前ならば、新旧取り混ぜた防除薬剤のラインナップも豊富であったが、減農薬に対する社会の要請に応える

ために、また消費者団体との契約栽培などに見られるように、ある種の薬剤をメニューから削除する中で、農家はいきおい特効薬に依存して限度いっぱいまで使用することになる。それがここに来て、本来ならば大切に使うべき各種の薬剤に耐性菌問題が続発するという結果を招いている。

普及開始から既に 20 年以上が過ぎ、その防除スペクトラムの広さ、耐性菌発達の緩慢さなどで、これまで高い評価を得てきた DMI 剤に、最近新たな耐性菌問題が起こっている。その中からこのミニ特集では、ウリ類とイチゴのうどんこ病菌、テンサイ褐斑病菌、それにナシ黒星病菌の DMI 剤耐性菌を各論として取り上げることとした。また、本総論では、耐性菌の諸性質、耐性のメカニズム、海外からの最新情報などを紹介する。

II DMI 剤耐性検定上の問題点

絶対寄生菌で培養のできないうどんこ病菌では、耐性検定のためにその都度植物を用意する必要があり、あまりにも時間や労力が多くかかる。これに対して、培養可能な菌では、PDA (ブドウ糖添加ジャガイモ煎汁寒天) のような通常の培地に DMI 剤を加えて培養すれば、DMI 剤感受性は検定できる。ベースライン感受性との比較も可能である。感受性菌であれば、それで問題はない。

ところが耐性菌の場合、継代培養や保存中に耐性程度が低下する、つまり感受性が回復することがよくある。筆者はリンゴやナシの黒星病菌でこれを経験した (表-1) が、最近になってアメリカで DMI 剤の効力低下が問題化しているモモ灰星病菌 *Monilinia fructicola* のような、培地上での生育が速い菌でも見られる (Cox et al., 2007) ことから、感受性の回復は生育スピードとはあまり関係ないらしい。DMI 剤耐性が不安定であるために、せっかく供試菌株を多数用いても、その感受性検定結果に十分な信頼がおけない。

これを端的に示したのが図-1 である。これは、四つのナシ園から黒星病菌をおよそ 50 菌株ずつ単孢子分離し、フェナリモール感受性の園内分布を培地上で調べたものである。図の左上から左下、右上、そして右下に向かうにつれて、EC₅₀ (50% 生育阻害濃度) や MIC (最小

Recent Topics on DMI Fungicide Resistance in Plant Pathogens.
By Hideo Ishii

(キーワード：薬剤耐性菌, DMI 剤耐性, DMI 剤, 耐性機構)

生育阻止濃度) で示した菌の感受性が低下しているのがわかる。ところが、同じ日に同じ圃場より採集した罹病葉から、病斑上の分生子を回収し、これを懸濁液としてあらかじめフェナリモル 12%水和剤 4,000 倍を散布したナシ苗木に接種してみるとどうか? 薬剤感受性の低下が最も進んでいた図右下の圃場からのサンプルに対して、最も高い発病抑制効果が得られた。逆に、薬剤感受性低下が特に見られなかった左上の圃場からのサンプルには、フェナリモルの効果がほとんど得られなかった。

雨媒伝染性で伝搬距離が短いナシ黒星病菌では、耐性

菌が圃場内で不均一に分布することがベンゾイミダゾール系薬剤耐性菌で実証済みであり (Ishii et al., 1985; 石井, 1998), DMI 剤耐性菌も同様である可能性が高い。これが、図-1 における感受性分布曲線と薬剤の発病抑制率との不一致をもたらししているとも考えられる。

III DMI 剤耐性のメカニズム

培地での耐性検定に不安があるとすれば、ほかに方法はないものだろうか? イネいもち病菌の MBI-D 剤 (シタロン脱水酵素阻害型メラニン生合成阻害剤) 耐性菌や各種病原菌のストロビルリン系薬剤耐性菌では、遺伝子診断法が開発され、既に広く利用されている (石井, 2005)。しかし、これらでは、耐性機構の解明が遺伝子診断法を開発する端緒となった。つまり、薬剤作用点タンパク質の遺伝子に耐性変異が見つかり、これをヒントに診断法が生まれた。

それでは、DMI 剤耐性菌の場合はどうか? キュウリうどんこ病菌の DMI 剤耐性菌は、1980 年代の初めオランダでまず問題となり、今日でも汎用されるリーフディスク法は SCHEPERS (1984) により考案されたものである。しかし、この耐性菌の診断法に関してはその後特段の進展はなかった。また、より取り扱いが困難なイチゴうどんこ病菌ともなると、リーフディスク法による耐性

表-1 培地上で検定を繰り返した場合のナシ黒星病菌のフェナリモル感受性の変化 (菌糸生育試験)

菌株	薬剤の EC ₅₀ (ppm)	
	検定 1 回目	検定 2 回目
黒川 4	0.151	0.028
黒川 9	1.067	0.263
黒川 18	1.948	0.973
黒川 20	0.504	0.347
黒川 21	21.300	1.721
黒川 22	5.906	7.879
黒川 26	1.970	0.680
黒川 39	0.166	0.131

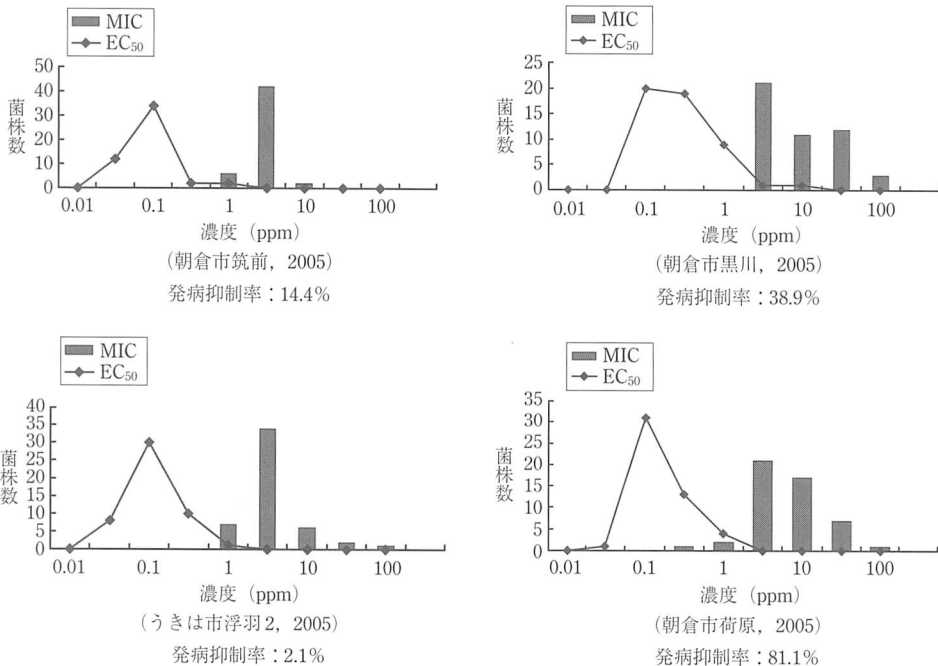


図-1 ナシ黒星病菌のフェナリモル感受性 (菌糸生育試験) と薬剤の発病抑制との関係 (作図: JA 全農営農・技術センター農薬研究室協力)

検定はさらに厄介である。これが、2004年度から3年間、『先端技術を活用した農林水産研究高度化事業』の中で「遺伝子診断法による殺菌剤耐性菌簡易検出技術の開発」に取り組んだ、そもその動機である。

各論で紹介されるように、ウリ類うどんこ病菌やイチゴうどんこ病菌のDMI剤耐性については、そのメカニズムが次第に明らかになってきた。また、これに基づいた耐性菌の遺伝子診断法も、一部問題は残されているものの開発された。それでは、他の病原菌では、DMI剤耐性機構に関する研究はどの程度進展しているのだろうか？

DMI剤耐性機構は大まかにいって3種類、すなわち①DMI剤の作用点タンパク質であるステロール脱メチル化酵素遺伝子 *CYP51* の点突然変異によるアミノ酸置換（薬剤の結合親和性低下が予想される）、② *CYP51* 遺伝子上流域における挿入配列の存在と、これによる *CYP51* 遺伝子およびステロール脱メチル化酵素の過剰発現、そして③膜に局在するABC（ATP Binding Cassette）トランスポーターの活性化による、DMI剤の細胞外排出（efflux）である。アメリカでは、アウトウ leaf spot 病の防除にフェンブコナゾールが8年間使用され、効果の低下が起こったが、*CYP51* 遺伝子上流域における挿入配列を特異的にPCR増幅することで、耐性菌の検出が可能となっている（PROFFER et al., 2006）。

ところが厄介なことに、同種の病原菌でも複数の耐性機構を備えている場合がある。かつてのうどんこ病菌に代わって、最近ヨーロッパのコムギで最も重要とされる葉枯病菌（*Mycosphaerella graminicola* = *Septoria tritici*）がそれである（FRAAJE et al., 2007）。そして、本病原菌にストロビリン系薬剤耐性菌が極めて高率に分布する状況で、テブコナゾールやエポキシコナゾールなどのDMI剤に使用が偏る結果、これらのDMI剤に対する菌の感受性にも耐性側へのシフトが観察されている。また、耐性菌は *CYP51* 遺伝子の変異パターンから多数のグループに分けられ、これが各種DMI剤に対する感受性の違いをもたらしているらしい。状況は実に複雑である。

今後DMI剤が長期にわたって使用され、薬剤によって異なる強さの選択圧が病原菌に働けば、我が国の耐性菌でも様々な耐性変異が蓄積するなど、そのメカニズムがより複雑化する可能性がある。そうなれば、いったん開発された耐性菌の遺伝子診断法にも、見直しが迫られるかも知れない。なお、リンゴ黒星病菌のDMI剤耐性菌でも、*CYP51* 遺伝子の点突然変異や過剰発現などが知られる（SCHNABEL and JONES, 2001）が、今回福岡県で問題となったナシ黒星病菌のDMI剤耐性菌には今のところ、*CYP51* 遺伝子の点突然変異を確認していない。

また、この菌のDMI剤耐性は最近韓国でも問題化しており、共同で研究を進めている。

IV 耐性菌リスクの削減に向けて

欧州連合（EU）では、1993年時点で登録のあった農薬852種類のうち、半分以上が再登録されていない。再評価に多大の費用がかかる、ジェネリック農薬の台頭、農薬企業の合併・買収による販売品目の整理、環境規制強化などが要因とされる（今月の農業、2006）。一方、新規骨格をもつ農薬の開発は今日ますます困難になっている。その結果、DMIやストロビリン系などの適用範囲の広い薬剤に使用が集中し、耐性菌の発達リスクをさらに押し上げている。

施設栽培の野菜を中心に進められている、微生物殺菌剤の使用や無機硫黄剤のくん煙処理、果樹で見られる雨よけ栽培などをさらに進めて、問題点を整理、克服しながら防除を体系化する。これに可能ならば耐病性品種を組み合わせて圃場における発病圧を下げながら、有効薬剤を本当に大切に使用して行かない限り、耐性菌問題は深刻になりこそすれ、将来ともなくならない。

耐性菌は農薬メーカーにとって最も関心ある事柄の一つであり、混合剤開発もその重要な対策の一つである。しかし、新規骨格をもつ薬剤のほとんどは、開発から普及初期の段階で耐性菌の発達リスクを予測することが困難である。このため、どの薬剤と混合するかは、開発後の将来を大きく左右する。耐性菌対策として、当初から混合剤として上市されたシフルフェナミド・トリフルミゾール剤が、不幸にしてキュウリうどんこ病菌の耐性菌出現を招いていることは、誠に残念である。また、混合相手となる薬剤の中にも、将来登録失効などが予想されるものもあり、これを見すえた対応も必要である。

引用文献

- 1) 浅利 覚ら (1994): 関東東山病虫研報 41: 69 ~ 75.
- 2) COX, K. D. et al. (2007): *Phytopathology* 97: 448 ~ 453.
- 3) FRAAJE, B. A. et al. (2007): *Mol. Plant Pathol.* 8: 245 ~ 254.
- 4) 石井英夫 (1985): 第2回農薬生物活性研究会シンポ講要集: 27 ~ 33.
- 5) ——— (1998): 植物病原菌の薬剤感受性検定マニュアル, 日植防, 東京, p. 67 ~ 73.
- 6) ——— (2005): 化学と生物 43: 358 ~ 365.
- 7) ISHII, H. et al. (1985): *Plant Pathol.* 34: 363 ~ 368.
- 8) KARAAGLANIDIS, G. S. and C. C. THANASSOULOPOULOS (2003): *Eur. J. Plant Pathol.* 109: 929 ~ 934.
- 9) 化学工業日報社 (2006): 今月の農業 50(12): 83.
- 10) KUCK, K. H. and U. GISI (2007): *Modern Crop Protection Compounds*: 415 ~ 432.
- 11) PROFFER, T. J. et al. (2006): *Phytopathology* 96: 709 ~ 717.
- 12) SCHEPERS, H. T. A. M. (1984): *Neth. J. Pl. Path.* 90: 165 ~ 171.
- 13) SCHNABEL, G. and A. L. JONES (2001): *Phytopathology* 91: 102 ~ 110.