

アニリノピリミジン系殺菌剤の灰色かび病菌に対する感受性検定法

クミアイ化学工業株式会社生物科学研究所 ^{たか}高 ^{がき}垣 ^ま真 ^き喜 ^{いち}一
アベンティス クロップサイエンス ジャパン株式会社
ノバルティスアグロ株式会社

はじめに

メパニピリム (商品名：フルピカフロアブル, クミアイ化学), ピリメタニル (商品名：スカラフロアブル, ヘキスト・シェーリング・アグレボ) およびシプロジニル (商品名：ユニックス顆粒水和剤 47, ノバルティスアグロ) は, 新規のアニリノピリミジン系殺菌剤 (図-1, 以下 AP 剤と略す) であり, 各種作物の灰色かび病, うどんこ病, リンゴ黒星病等に優れた防除効果を示す。また, ベンズイミダゾール系殺菌剤, ジカルボキシイミ

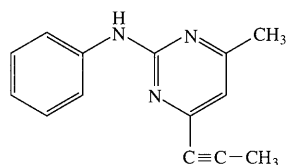
ド系殺菌剤および N-メチルフェニルカーバメート (ジエトフェンカルブ) 殺菌剤耐性灰色かび病菌に対しても, これらの感受性菌と同等に高い防除効果を示す。しかしながら, 灰色かび病防除においては, 新規薬剤が実用化されてもすぐに薬剤耐性菌が出現し, 実防除上問題となることが多く, 本病の防除対策を考えるうえで, 薬剤耐性は避けて通れない問題である。開発メーカーとしても感受性検定方法を確認し, モニタリングによる薬剤感受性分布を把握するなど, 耐性菌出現の回避に向けての取り組みが必要である。

第7回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウムにおいて, 灰色かび病菌のメパニピリム (村松, 1997), ピリメタニル (瀬古, 1997), シプロジニル (杉井, 1997) に対する感受性検定方法をそれぞれ報告した。しかし, 同じ AP 剤であるにもかかわらず, 薬剤によって検定方法が異なっているため, 感受性検定方法の統一化が望まれた。

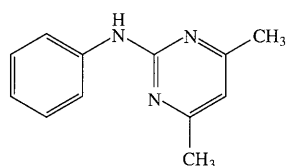
そこで今回, 開発メーカー 3 社が感受性検定方法の統一化に向け種々検討を行い, *in vitro* におけるメパニピリムに対する感受性検定方法である FGA 培地と胞子を付着させたペーパーディスクを用いる方法 (以下, FGA-ペーパーディスク法と称す) を統一検定方法として決定したことから, その手法を紹介する。

I アニリノピリミジン系殺菌剤の作用機構, 作用特性

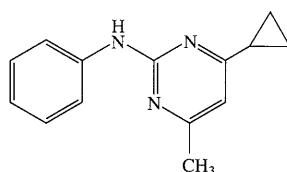
灰色かび病菌に対する AP 剤の作用機構の一つに, 宿



メパニピリム (フルピカ)



ピリメタニル (スカラ)



シプロジニル (ユニックス)

図-1 アニリノピリミジン系殺菌剤の化学構造式

The Method for Testing the Sensitivity of *Botrytis cinerea* to Anilinoypyrimidine Fungicides. By Makiichi TAKAGAKI, AVENTIS and NOVARTIS

(キーワード：アニリノピリミジン, メパニピリム, ピリメタニル, シプロジニル, 灰色かび病菌, 感受性検定法, ペースライン)

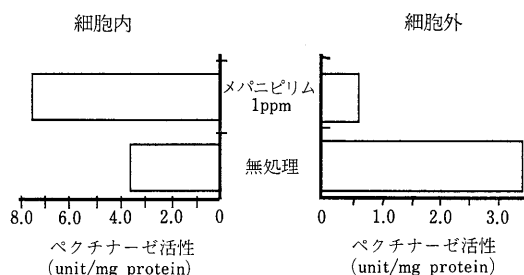


図-2 灰色かび病菌のペクチナーゼ分泌に対するメパニピリムの阻害

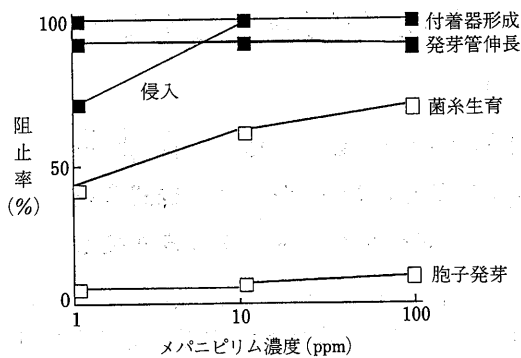


図-3 灰色かび病菌に対するメバニペリムの作用

主細胞壁分解酵素の菌体外への分泌阻害作用 (図-2) が考えられている (MIURA et al., 1994; MILLING et al., 1993)。また、メバニペリムの灰色かび病菌に対する *in vitro* での抗菌活性試験では、胞子発芽阻止力、菌糸生育阻止力は弱く、胞子の発芽管伸長、附着器の形成および附着器からの侵入を強く阻害する (図-3)。しかし、これらの阻害作用も、時間の経過とともに活性が低下することから、生育阻止作用というよりもむしろ生育遅延作用と考えられる (MIURA et al., 1994)。

II FGA-ペーパーディスク法による灰色かび病菌のメバニペリムに対する感受性

FGA-ペーパーディスク法は、メバニペリムの作用機構である宿主細胞壁分解酵素の菌体外への分泌阻害作用に着目し、高分子化合物を含有する合成培地上では分解酵素の分泌により、高分子化合物を低分子化しないと菌糸生育に必要な栄養素を直接摂取できないという仮説に基づいている。つまり、メバニペリムが分解酵素の分泌を阻害することによって、灰色かび病菌が培地中の栄養素をより低分子化して摂取できなければ、その程度が菌糸生育阻害として現れると考えた。この作用は、メバニペリムの抗菌活性力が強い胞子の発芽管伸長期で最も強く発現した (高垣ら, 1997)。

1 試験方法

(1) 検定菌株の分離、培養

灰色かび病罹病葉、果実から常法に従い単孢子分離した菌株を PDA 平板培地に移植し、20°C で 3 日間培養後、さらに同条件下で 3 日間 BLB ランプを照射して分生胞子を形成させる。

(2) 検定培地

・FGA 培地組成

KH_2PO_4 1g, NaNO_3 2g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5g,

Fructose 10g, Gelatin 2g, 寒天 15g, 蒸留水 1,000 ml pH 5.8 に調整後、121°C、20 分間オートクレーブ滅菌する。

(3) 検定薬剤

フルピカプロアブル (メバニペリム 40%) を用い、培地中の最終有効成分濃度が所定濃度になるように滅菌水で希釈し、FGA 培地中に添加する。

(4) 胞子ペーパーディスクの作成

培地上に形成された胞子を滅菌蒸留水に懸濁し、 $10^4 \sim 10^6$ 個/ml になるよう調整後、乾熱滅菌したペーパーディスク (東洋濾紙, 厚手 径 6 mm) を入れる。なお、平板培地の胞子形成部位を、直径 6 mm のコルクボーラーで打ち抜き、胞子ディスクを 1 ml の滅菌蒸留水中に懸濁すると、ほぼ前記胞子濃度に調整できるので、これを目安として行う。

必要ディスク数は、1 検定濃度、1 菌株当たり 1 ディスクである。

(5) 接種および培養

胞子懸濁液に浸漬したペーパーディスクを取り出し、余分な水分を取り除くため滅菌濾紙の上に置いた後、速やかに所定濃度の薬剤を含有する FGA 培地上に置床し、暗黒下 20°C で 4 日間培養する。

(6) 検定

培養 4 日後に、検定菌株の最小生育阻止濃度 (MIC 値) を測定する。

2 メバニペリム感受性菌とシプロジニル低感受性菌の検定結果

メバニペリム感受性灰色かび病菌 (クミアイ化学標準菌) と、スイスのブドウから分離されたシプロジニル低感受性灰色かび病菌 3 菌株 (ノバルティスより分譲) を供試し、メバニペリム 0.1, 0.3, 1, 3, 10 および 30 ppm の濃度で検定を行った。

メバニペリム感受性菌の MIC 値は 1 ppm であったのに対して、シプロジニル低感受性菌の MIC 値は 3 菌株ともに 30 ppm 以上であった (図-4)。

以上の結果から、FGA-ペーパーディスク法において、シプロジニル低感受性菌はメバニペリムにも低感受性を示すことが確認された。また、感受性菌と低感受性菌の MIC 値の差は 30 倍以上であり、再現性も高いことから、FGA-ペーパーディスク法は、メバニペリムに対する感受性検定方法として適当であると判断した。

3 国内モニタリング結果

国内 31 か所、7 作物から、メバニペリムの散布歴がない灰色かび病菌 420 菌株を単孢子分離し、検定に供試した。検定薬剤には、メバニペリムを 0.1, 0.3, 1, 3, 10 ppm の濃度で使用した。

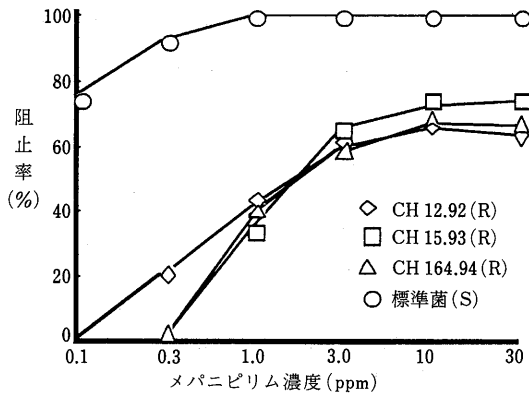


図-4 FGA 検定法におけるメバニピリムの菌糸生育阻止作用

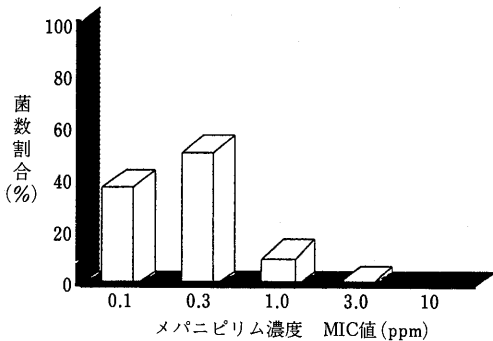


図-5 国内モニタリング菌の FGA 検定法におけるメバニピリムに対する感受性

MIC 値の分布は、0.1 ppm を示した菌株が全体の 37.6%、0.3 ppm の菌株が 51.1%、1 ppm の菌株が 10.6%、3 ppm の菌株が 0.7% であり、いずれの菌株も MIC 値 3 ppm 以下であった (図-5)。

以上の結果から、FGA-ペーパーディスク法による国内灰色かび病菌のメバニピリムに対する感受性ベースラインは、現時点では MIC 値 3 ppm であると考えられた。

III FGA-ペーパーディスク法による灰色かび病菌のピリメタニルおよびシプロジニルに対する感受性

フルピカフロアブル (メバニピリム) の散布歴がない国内分離灰色かび病菌 10 菌株と、スイスのブドウから分離されたシプロジニル低感受性灰色かび病菌 3 菌株 (ノバルティスより分譲) を供試し、検定薬剤にメバニピリム、ピリメタニルおよびシプロジニルを用い、0.1、0.3、1、3、10 および 30 ppm の濃度で検定を行った。

国内分離菌の AP 剤に対する感受性分布は、シプロジ

表-1 FGA 検定法における灰色かび病菌の AP 剤に対する感受性

供試菌株	検定薬剤と MIC 値 (ppm)		
	シプロジニル	ピリメタニル	メバニピリム
1	0.1	0.1	0.3
2	0.1	0.1	0.3
3	0.1	0.1	0.1
4	0.1	0.1	0.1
5	0.1	0.1	0.1
6	0.1	0.3	0.3
7	0.1	0.1	0.3
8	0.1	0.3	0.3
9	0.1	0.1	0.1
10	0.1	0.1	0.3
*CH 12.92	30	30<	30<
*CH 15.93	30	30<	30<
*CH 164.94	30	30<	30<

*: シプロジニル低感受性菌。

ニルが MIC 値 0.1 ppm、メバニピリム、ピリメタニルが MIC 値 0.1~0.3 ppm であったが、シプロジニル低感受性菌では、シプロジニルが MIC 値 30 ppm、メバニピリム、ピリメタニルが MIC 値 30 ppm 以上であった (表-1)。

以上の結果から、FGA-ペーパーディスク法において、シプロジニル低感受性菌は AP 剤 3 剤すべてに低感受性を示すことが確認され、感受性菌と低感受性菌の MIC 値差も幅広いことから、FGA-ペーパーディスク法は AP 剤 3 剤すべてに適用可能であると判断した。

IV 灰色かび病菌のアニリノピリミジン系殺菌剤に対する統一感受性検定法

FGA-ペーパーディスク法は、AP 剤感受性菌と低感受性菌を明確に判別でき、再現性も高いことから、AP 剤 3 剤に対する感受性検定法として適当であると考えられた。本法におけるモニタリング結果およびメバニピリム、ピリメタニル、シプロジニルの本法における抗菌活性から、感受性ベースラインは、現時点ではメバニピリム MIC 値 3 ppm であることが示唆された。検定薬剤にはメバニピリムを選抜したが、これは AP 剤低感受性菌は 3 剤に交差耐性を示したことから、本法における感受性ベースラインがメバニピリムのみ判明していることなどの理由による。今後は、ピリメタニルおよびシプロジニルに対する感受性ベースラインも把握する必要がある。

先に述べたように、AP 剤の *in vitro* 抗菌活性は不安定な部分があり、さらに、宿主細胞壁分解酵素の菌体外への分泌阻害作用が作用機構の一つであることから、本来、自然感染に近い *in vivo* 系での感受性検定法が適し

ていることはいうまでもない。しかし、*in vivo*系での検定法は供試植物を常時供給するのに難点があることから、AP剤の統一検定法として *in vitro* 系での FGA-ペーパーディスク法を確立した。しかし、以上の理由から、FGA-ペーパーディスク法はあくまでも一次スクリーニング的な意味あいにとらえ、現時点のメパニピリム感受性ベースライン MIC 値 3 ppm 以上の菌株が存在した場合には必ず、次に記載する各社提案の *in vivo* 検定法で再検定 (二次スクリーニング) を行い、薬剤感受性を判別する必要がある。

V 灰色かび病菌のメパニピリムに対する *in vivo* 感受性検定法

本法は、灰色かび病菌のメパニピリムに対する感受性をイチゴ果実を用いて検定する方法 (以下、イチゴ果実法) で、同時に病原性の有無を確認できる長所がある。

1 試験方法

(1) 供試菌の培養

FGA-ペーパーディスク法で低感受性菌と判断された菌株について、前記の FGA-ペーパーディスク法と同様の方法で培養する。

(2) 供試果実

イチゴ果実 (品種: 女峰, 章姫→他の品種でも試験可能と思われるが事前の検討が必要) を水道水で洗浄後、果軸に沿って半切し、70%エタノールで1分間、0.1%次亜塩素酸 Na で2分間浸漬処理後、滅菌水で水洗し、さらにクリーンベンチ内で紫外線を5分間照射し表面殺菌する。検定にはクリーンベンチ内で風乾した果実を1区当たり10片供試する。

(3) 薬剤処理

フルピカプロアブル (メパニピリム 40%) を滅菌水で2,000倍 (メパニピリム 200 ppm: 実用濃度) に希釈し、ハンドスプレーを用いてイチゴ果実に十分量 (約 3 ml/1 果実片) 散布する。なお、対照に無散布区を必ず設定する。

(4) 接種および培養

薬液を風乾後、イチゴ果実を密閉できるプラスチック製容器に切り口をふせて置き、滅菌蒸留水中で $10^4 \sim 10^6$ 個/ml に調整した孢子懸濁液をハンドスプレーを用いて十分量 (約 3 ml/1 果実片) 接種する。湿度を保つためプラスチック製容器内に湿らせたガーゼを入れ、密閉後、20°C暗黒下で5日間培養する。

(5) 検定

培養5日後に、イチゴ果実の発病の有無を調査し、発病が確認された菌株については低感受性菌とみなす。

表-2 イチゴ果実法におけるメパニピリムに対する感受性

供試菌株	メパニピリム濃度 (ppm) と発病果率 (%)			
	0	50	100	200
*CH 12.92	100	100	100	100
*CH 15.93	100	100	100	100
*CH 164.94	100	100	100	100
標準菌	100	0	0	0

*: シプロジニル低感受性菌。

2 アニリノピリミジン系殺菌剤感受性菌と低感受性菌の検定結果

メパニピリム感受性灰色かび病菌 (クミアイ化学標準菌) と、スイスのブドウから分離されたシプロジニル低感受性灰色かび病菌3菌株 (ノバルティスより分譲) を供試し、メパニピリム 50, 100, 200 ppm で検定を行った。

メパニピリム感受性菌はメパニピリム 50 ppm で発病果率 0% であったのに対して、シプロジニル低感受性菌はメパニピリム 200 ppm (実用濃度) でも発病果率 100% であった (表-2)。よって本法は、メパニピリム感受性菌と低感受性菌を明確に判別可能であり、検定法として適当であると判断した。

3 国内モニタリング結果

国内モニタリング菌の FGA-ペーパーディスク法での結果において、それぞれの MIC 値 0.1, 0.3, 1 および 3 ppm を示した菌株から任意に 100 菌株選抜し、イチゴ果実法で検定を行った。

供試した 100 菌株は、すべてメパニピリム 200 ppm での発病果率が 0% であり、FGA-ペーパーディスク法と同様に感受性菌と判断された。

VI 灰色かび病菌のシプロジニル、ピリメタニルに対する *in vivo* 感受性検定法

本法は、灰色かび病菌のシプロジニル、ピリメタニルに対する感受性をリング果実を用いて検定する手法 (以下、リング果実法) で、SCHUEPP and KUNG (1978) の方法に準じている。本検定法の長所は、同時に病原性の有無も確認できる点にある。

1 試験方法

(1) 供試菌の調整

FGA-ペーパーディスク法で低感受性菌と判断された菌株について、前記の FGA-ペーパーディスク法と同様の方法で培養する。培地上に形成された孢子を滅菌水に懸濁し、 $4.0 \sim 4.5 \times 10^6$ 個/ml になるように調整する。なお、懸濁液調整時に、菌体を除去するために、滅菌し

たガラスワールで沓過する。

(2) 供試果実

リング果実(品種:ゴールデンデリシャス→他の品種でも試験可能と思われるが事前の検討が必要)を水道水で洗浄後,果軸に沿って半切する。コルクボーラーで果皮上に直径10mm,深さ6mmの穴を開け,密閉したプラスチック製容器内に切り口をふせて置く。

(3) 薬剤処理

ユニックス顆粒水和剤47(シプロジニル47%),スカラフロアブル(ピリメタニル40%)を供試する。EC₅₀値を得るためには,0,0.3,1,3,10,30および100ppmの希釈濃度を設定するが,低感受性菌の検出のみを目的とする場合には,0(対照)および100ppmの2処理区でよい。試験製剤は,超音波処理を施して,滅菌水中に均一に懸濁する。薬液は50μl/穴を,リング果実上の穴に滴下処理する。検定は3反復で実施する。

(4) 接種および培養

薬液滴下2時間後,胞子懸濁液50μlを同じリング表皮上の穴に滴下接種する。接種果実を密閉したプラスチック製容器に入れ,21~22°C暗黒下で5日間培養する。

(5) 検定

リング果皮上に形成された病斑の直径を計測し,無処理との対比から,EC₅₀値を決定する。感受性の判別に関しては,100ppm処理区の防除価が50%以下の場合には低感受性菌とみなす。

2 アニリノピリミジン系殺菌剤感受性菌と低感受性菌の検定結果

シプロジニル感受性灰色かび病菌(ノバルティス標準菌)と,スイスのブドウから分離されたシプロジニル低感受性灰色かび病菌3菌株(ノバルティスより分譲)を供試し,シプロジニル100ppmの濃度で検定を行った。

シプロジニル感受性菌は,シプロジニル100ppmで防除価100%であったのに対して,シプロジニル低感受性菌の防除価は0~33%であった(表-3)。よって本法は,シプロジニル感受性菌と低感受性菌を明確に判別可能であり,検定法として適当であると判断した。また,ピリメタニルについても,本法で検定可能であることを確認している。

3 国内モニタリング結果

国内からシプロジニルの散布歴がない灰色かび病菌80菌株を単胞子分離し,シプロジニル100ppmの濃度で検定を行った。なお,供試菌は,HILBERらの*in vitro*検定法(HILBER and SCHUEPP, 1996)で感受性菌と判断された菌株である。

供試した80菌株は,すべてシプロジニル100ppmでの防除価が80~100%であり感受性菌と判断された。

表-3 リング果実法におけるシプロジニルに対する感受性

供試菌株	無処理病斑直径 (mm)	シプロジニル	
		100 ppm 病斑直径(mm)	防除価(%)
*CH 12.92	18.9	12.7	32.8
*CH 15.93	35.4	30.4	14.1
*CH 164.94	23.9	25.8	0
標準菌	26.8	0	100

*:シプロジニル低感受性菌。

おわりに

灰色かび病防除においては,いずれの作物にも抵抗性品種が存在しないため,耕種の防除と薬剤防除が中心となっている。しかし,ベンズイミダゾール系薬剤をはじめとする有用な薬剤も既に耐性菌がまん延しており,灰色かび病防除薬剤の耐性菌問題は避けて通れない状況にある。開発メーカーとしても,多額の投資と長年の労力をかけて農業登録した新規薬剤の有効性を失わせることなく,長期間にわたって使用していただくことが望ましいのはいうまでもない。したがって,耐性菌発達のリスクアセスメントの必要性を常に認識し,検定方法,感受性ベースラインを公表することは非常に有用なことを考える。

今後も,灰色かび病菌のアニリノピリミジン系殺菌剤に対する感受性分布,推移を公的機関の協力を得て,広範囲にモニタリングしていく予定であるが,このことが総合的な灰色かび病防除対策を推進する上での一助になればと願っている。

最後になったが,感受性ベースライン作成に当たり,貴重な菌株を分譲していただいた各研究機関の方々,並びに本研究をまとめるに当たり,終始ご指導,ご助言を賜った農環研石井英夫博士に,感謝の意を表する。

引用文献

- 1) HILBER, U. W. and H. SCHUEPP, (1996): Pestic. Sci. 47: 241~247.
- 2) MILLING, R. J. et al. (1993): 6th International Congress of Plant Pathology, Montreal, abstract 3. 7. 15.
- 3) MIURA, I. et al. (1994): J. Pestic. Sci. 19: 103~109.
- 4) ——— et al. (1994): Pestic. Biochem. Physiol. 48: 222~228.
- 5) 村松憲通 (1997): 第7回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集: 1~9.
- 6) SCHUEPP, H. and KUNG, M. (1978): Berichte der Schweizerischen Botanischen Gesellschaft 88: 63~71 (in German).
- 7) 瀬古隆司 (1997): 第7回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集: 19~27.
- 8) 杉井信次 (1997): 第7回殺菌剤耐性菌研究会シンポジウム講演要旨集: 10~18.
- 9) 高垣真喜一ら (1997): 日植病報 63: 224 (講要).