

流行盛期のリンゴ斑点落葉病の発病程度に関する コホート内症例対照研究

岩手県農業研究センター ^{ねこ}猫 ^{づか}塚 ^{しゅう}修 ^{いち}一*

はじめに

リンゴ斑点落葉病（病原：*Alternaria mali*）は発生期間が長く、リンゴの主要病害として位置づけられる。岩手県における本病の発生消長は、リンゴの落花期にあたる5月中～下旬に葉上病斑が確認され、しばらく病勢が漸増を続けた後、梅雨期の6月下旬～7月下旬にかけて急激に増加する（平良木，1985）。これまで本県では、本病を対象とした薬剤防除体系として、落花期～落花20日後は黒星病との防除を兼ねて有機硫黄系殺菌剤を、6月下旬以降は輪紋病との同時防除として有機銅水和剤の使用が推奨されてきた。ただし、この防除体系では7月になってから本病が急激に増加してしまうことがあるので、発病が目立ってきて急激な増加が予想される場合には、本病に卓効を示すポリオキシシン剤あるいはイプロジオン剤を斑点落葉病専用剤として追加散布することになっている。専用剤の散布時期は、生産現場では本病の発生状況や天候を勘案しながら個々に決定しているが、梅雨期特有の短期的な気象変動により防除タイミングを逃して7月下旬に多発生させる事例もしばしば認められる。そのため、夏期の散布回数を削減しながら効果的に防除するためには、この急増期の予測による方法とは別の観点から、本病の防除体系を再構築する必要がある。

本研究では、岩手県における本病の流行様相に応じた効率的な防除体系を構築するために、疫学の疫学でしばしば用いられている観察研究の研究デザインの一つである「コホート内症例対照研究」(nested case-control study；上地，2000)を実施し、夏期の多発生要因を解析した。次いで、この結果に基づき防除適期の仮説を立て、薬剤防除試験により防除効果を検証した。なお、本研究の一部は既に報告した（猫塚ら，2009）。

I 伝染源量の影響評価

本病の発生には、主因（伝染源量）、誘因（温度、葉

A Nested Case-Control Study on Disease Severity of *Alternaria Blotch* of Apple at Early and Late Phases of Epidemics. By Syuuichi NEKODUKA

（キーワード：リンゴ斑点落葉病，発生予察，疫学，観察研究，リスク解析）

* 現所属：岩手県農林水産部農業普及技術課

面の濡れ）および素因（感受性の変動）が影響する。このうち伝染源量については、無防除条件下では流行初期の発病程度と流行盛期の発病程度との間には一定の関係が認められている。しかし、定期的な薬剤防除が実施されている一般栽培圃場でもこの関係が認められるだろうか。すなわち、一般栽培圃場では流行初期の発生量は非常に少ないが、これが夏期の発病増加の要因となり得るだろうか。この命題を解くためには、人為的に発病程度が異なる樹を用意した防除試験が考えられるが、本病のように短期間で伝染環が繰り返される病害ではこのような実験研究による解析は困難である。また、一般栽培圃場における発病程度は複数の要因による影響を受けると考えられるため、他病害も含めても流行初期の発病程度がその後の流行様相にどの程度影響しているかについては、知見が乏しい。

II 疫学研究デザインの導入

疫学の疫学では、ある要因（曝露要因）と病気の発生との因果関係を解析するために、「観察研究」という研究手法が発達している。観察研究とは、多数事例の観察のみによって、曝露要因と病気の発生との因果関係を明らかにしようとする研究方法であり（齋藤，2000）、実験をすることが困難な場合の代替的手段として用いられる。例えば、喫煙と肺がんの発生との関係のような、生活習慣と病気の発生との関係について解析が行われている。我々は、研究対象を人間から圃場・事例に置き換えることで、この手法を上記の伝染源量の影響評価に適用できるのではないかと考えた。

1 症例対照研究とは

表-1に疫学研究デザインの種類を示すが、観察研究と介入研究に大別され、さらに前者は記述的研究と分析的研究に分けられる（中村，2006）。分析的研究は、曝露要因と病気の発生との関係を検討するものであり、その調査方法によってコホート研究、症例対照研究、横断研究および生態学的研究に分かれる。コホート研究は、曝露要因を有する集団を将来にわたって追跡し、その後の症状発生を観察するものである。なお、コホートとはラテン語で300～600人の戦闘集団に由来する言葉であり、疫学では「一定期間にわたって追跡される人々」と

表-1 疫学研究デザインの分類

研究デザイン	研究方法
1. 観察研究	
(1) 記述的研究	症例の発生頻度を記述する（曝露要因には触れない）
(2) 分析的研究	
①コホート研究	曝露を有する集団における症例の発生を将来にわたって追跡する
②症例対照研究	症例群と対照群を設定し、それぞれの群で曝露状況を比較する
③横断研究	ある時点における曝露要因と症例発生の関連性を記述する
④生態学的研究	既存の統計データを利用して、集団間の曝露と症例頻度の関係を比較する
2. 介入研究	人為的に曝露を行った集団における症例の発生を将来にわたって追跡する

表-2 因果関係有無の判断基準^{a)}

1. 関連の時間性	曝露要因が症状発生に先立って生じていること
2. 関連の強固性	曝露量の増加につれてオッズ比が高まるなどの用量・反応関係、オッズ比が高いこと
3. 関連の一致性	関連性が対象者、場所、時を異にする集団でも認められること
4. 関連の特異性	曝露要因と症状発生との関係が必ず認められること
5. 関連の整合性	実験などで得られた事実と符合すること

^{a)} 米国公衆衛生局長諮問委員会（1964）が喫煙と肺がんについて検討を行った際に示した5条件。

いう意味である（中村，2006）。一方，症例対照研究とは，同じ時期に多数の圃場を調査し，ある時点において特定の症状を呈した作物を有する圃場（症例）と有しない圃場（対照）の2群に分け，症状発生に先立って観察される曝露要因の有無と症状の発生頻度を比較する。曝露要因と症状発生との統計学的な関連性は p 値で表されるとともに，関連性の強さはオッズ比（odds ratio）で表される。症例対照研究は，曝露要因の情報を含んだ既存の調査データがあれば解析ができるため，コホート研究や介入研究に比べて経費，労力ともに少なく済むメリットがある（永井，2005）。本研究では，病害虫防除所が発生予察事業で定期的実施している巡回調査結果を用いた。

2 症例対照研究の手順

症例対照研究を実施するうえで注意すべき事項として，情報バイアスと交絡因子が挙げられる（中村，2006）。情報バイアスとは，データの不確実性であり，曝露要因の情報を収集するときに生じる。症例対照研究では，曝露要因の有無をアンケートや聞き取りによって調べるが，曖昧な記憶がバイアスとして存在し得られた結果をゆがめてしまう可能性がある。一方で，コホート研究は，あらかじめ曝露要因が明らかな集団を対象に将来にわたって追跡するので，情報バイアスの影響を受けることがない。コホート内症例対照研究は，コホート研究と症例対照研究のそれぞれ利点を生かした解析方法であり，あらかじめ集団全体について調査を実施し（コホ

ート研究），後に症状が発生した時点で症例対照研究を実施する。本研究で用いた病害虫防除所の調査結果は，同一地点について定期的に発生推移を調査しているため，流行初期と流行盛期の発病程度に関するコホート内症例対照研究を実施するうえで，精度が高いデータであるといえる。

交絡因子とは，曝露要因と症状発生の両者に影響を及ぼす因子として定義される。例えば，老人に発生が多い病気であるのに，もし症例群と対照群において群を構成している人の年齢が大きく異なっているとしたり，その発生率の差が曝露要因によるものなのか，それとも年齢の差によるものか判断がつかない。このような交絡因子を排除するためには，「層別化」によって年齢別に層別して集計したうえで解析する。本研究のように，伝染源量を曝露要因として解析する場合は，誘因（環境要因；地域ごとの気候特性，流行様相，防除圧）や素因（品種，生育ステージ，年次による感受性）が交絡因子として存在する可能性があるため，これらが層別化の対象となり得る。

3 因果関係仮説の構築

症例対照研究によって示された曝露要因と症状発生との関係は，統計学的な関連性であり，原因と結果の関係（因果関係）を示しているわけではないことに注意する必要がある。得られた統計学的な関連性について，通常いくつかの基準をもとに検討したうえで，曝露要因と症状発生に因果関係があるとする仮説（因果関係仮説）を

立てる(横山・田中, 2005; 中村, 2006)。この基準の設け方にはいくつかの指針があるが, 本稿では, 表-2に示す米国公衆衛生局長諮問委員会(1964)の提唱する5基準を紹介する。すなわち, 「関連の時間性」(曝露要因が症状発生に先立って生じていること), 「関連の強固性」(曝露量の増加につれてオッズ比が高まるなどの用量・反応関係が認められること), 「関連の一致性」(異

なる場所でも認められること), 「関連の特異性」(必ずこの関係が認められること), 「関連の整合性」(実験などで得られた事実と符合すること)である。

上記によって構築した因果関係仮説は, 薬剤散布試験などの介入試験を実施してその妥当性を検証することで, 因果関係の蓋然性(確からしさ; probability)を高めることになる。表-3には, 本研究で実施した, コホート内症例対照研究による発生予察事業の調査データの解析手順を示した。

表-3 発生予察事業の調査データから因果関係を考察するための手順

1. コホート内症例対照研究	
調査データの確認	欠測事例などの排除
↓	
層別化	交絡因子に基づき設定
↓	
症例対照研究	2×2のクロス集計表の作成
↓	
統計学的関連	p値, オッズ比の確認
↓	
因果関係の判断基準	米国公衆衛生局長諮問委員会の5基準との照合
↓	
因果関係仮説の創出	
2. 介入試験	
因果関係仮説のテスト	小規模または大規模な防除試験の実施
↓	
因果関係の蓋然性は高いと考察	

III リンゴ斑点落葉病の多発生要因の解析事例 (猫塚ら, 2009)

1 方法

(1) 調査データ

岩手県病害虫防除所が岩手県内の40~56地点において1993~2005年の5~9月にかけて毎月の上旬と下旬の2回実施したリンゴ品種‘ふじ’における斑点落葉病の発病調査データを用いた。このうち, 6月上旬~7月上旬までは, 各地点で任意に選んだ新梢20本について全葉を, 7月下旬は同様に選んだ徒長枝10本の上位10葉を対象に発病葉割合を算出し, この発病葉割合に基づき発病程度を「無」~「甚」の5段階で評価した。すなわち発病程度無:発病葉割合1%未満, 少:1~5%, 中:6~10%, 多:11~30%, 甚:30%以上とした。なお, 6月上旬~7月上旬の間にデータの欠損がある事例は除外し, 625事例を得た。

表-4 7月上旬の発病程度が7月下旬の発病程度に及ぼす影響に関する症例対照研究

発生状況	地域	7月上旬の発病程度	7月下旬の症例			オッズ比 (95%信頼区間)	p値
			あり	なし	計(割合)		
少発生	県中部	中以上	7	6	13 (3.9)	50.9 (12.5 ~ 207.4)	< 0.001
		少	19	80	99 (29.6)	10.4 (3.7 ~ 28.7)	< 0.001
		無	5	218	223 (66.6)		
	県南部	中以上	7	6	13 (14.0)	3.1 (0.8 ~ 11.2)	0.081
		少	25	15	40 (43.0)	4.4 (1.7 ~ 11.3)	0.002
		無	11	29	40 (43.0)		
	県北部	中以上	13	3	16 (13.0)	9.9 (2.4 ~ 40.3)	< 0.001
		少	31	30	61 (49.6)	2.4 (1.1 ~ 5.3)	0.034
		無	14	32	46 (37.4)		
多発生	沿岸部	中以上	16	2	18 (24.3)	50.0 (8.2 ~ 305.4)	< 0.001
		少	9	18	27 (36.5)	3.1 (0.8 ~ 11.8)	0.084
		無	4	25	29 (39.2)		
計		中以上	36	11	47 (16.2)	9.7 (4.4 ~ 21.5)	< 0.001
		少	65	63	128 (44.1)	3.1 (1.8 ~ 5.3)	< 0.001
		無	29	86	115 (39.7)		

(2) 層別化

各地域の気象条件などによる特徴的な流行様相が本研究で検討しようとする因果関係仮説に対する交絡因子となることを避けるため、625事例を農業改良普及センターの管轄区域により4地域(県中部、県南部、県北部、沿岸部)に層別化した。

(3) コホート内症例対照研究

流行盛期(7月下旬)において発病が急増するリスクが高い発病程度「中」以上(鈴木・平野, 1992)の事例を症例群, 「少」以下の事例を対照群とした。それぞれの群内の各事例について流行初期の6月上旬, 6月下旬あるいは7月上旬の発病程度を曝露要因とし, 発病程度「中」以上(あるいは「少」)を曝露群, 「無」を非曝露群とした。

2 結果および考察

層別化を行うにあたって, 県内4地域における流行様相を検討した。流行初期の6月上旬~7月上旬の発生傾向は県内4地域で異なり, 7月上旬においては県中部が少なかった。流行盛期(7月下旬)の発病程度は, 県中部が少発生, 他の3地域が多発生であった。そこで, 流行様相の違いが交絡因子になることが考えられたので, 4地域に層別化するとともに, さらにこの4地域を少発生地域(県中部)と多発生地域(県南部・県北部・沿岸部)として層別化して解析した。

コホート内症例対照研究において, 7月下旬の症例群の発生頻度と統計学的に関連性が認められたのは, 6月下旬の発病程度「少」, 7月上旬の発病程度「少」および「中以上」であった。このうち, 7月上旬の発病程度「中以上」は「少」に比べてオッズ比が高く, この時期の発病程度が高いほど症例群となりやすい傾向が認められた。さらに, 7月上旬の発病程度「少」または「中以上」

と7月下旬の症例群の発生頻度との関連性は, 県内4地域において認められた(表-4)。

この統計的な関連性について, 表-2で示した因果関係の判断基準に基づき考察すると, 関連の時間性, 関連の強固性, 関連の一致性が認められ, さらに本病の発生生態から見ても関連の整合性は満たされた。したがって, 7月上旬の発病程度と7月下旬の発病程度の間因果関係があるとする仮説の蓋然性は高いと推察され, 7月上旬の発病程度「少」がリスク要因として見いだされた。

IV 介入試験によるリスク要因の検証

コホート内症例対照研究の結果から, 流行盛期において発病が急増するリスクが高い発病程度「中」以上(発病率6%以上)とならない程度の発生を抑えるために

表-5 ピラクロストロピン・ボスカリド水和剤の散布時期と防除効果

供試薬剤 a) / 処理時期		発病率 (%)			
		2005年		2006年	
6月下旬	7月上旬	7月15日	8月1日	7月10日	7月26日
P・B	Ca・C	4.9 b ^{b)}	4.5 b	3.3 b	5.3 b
Ca・C	P・B	16.2 a	16.3 a	9.2 ab	14.5 ab
Ca・C	Ca・C	18.9 a	21.2 a	17.2 a	29.5 a

a) P・B:ピラクロストロピン・ボスカリド水和剤(2,000倍), Ca・C:キャプタン・有機銅水和剤(500倍). 薬剤の処理は, 2005年では6月23日と7月8日に, 2006年では6月22日と7月3日に実施. 最終散布15日後に有機銅水和剤(1,200倍)を散布.

b) 同一英小文字を付した数値間にはTukeyの多重比較検定法により有意差(5%)がないことを示す.

表-6 各種薬剤の6月下旬処理による防除効果

供試薬剤 a)	希釈倍数	調査日/発病率 (%)			
		2005年		2006年	
		7月15日	8月1日	7月12日	7月28日
シプロジニル・ジラム水和剤	500倍	4.7 b ^{b)}	3.0 b	2.4 b	2.9 c
ピラクロストロピン・ボスカリド水和剤	2,000倍	4.9 b	4.5 b	4.1 b	5.9 c
イプロジオン・有機銅水和剤	600倍	nt ^{c)}		4.0 b	7.3 c
ポリオキシシン・有機銅水和剤	1,000倍	nt ^{c)}		2.2 b	2.8 c
キャプタン・有機銅水和剤	500倍	18.9 a	21.2 a	19.1 a	17.4 b

a) 薬剤の処理は2005, 06年ともに6月23日に実施した. 7月は15日間隔の定期散布とし, 2005年は有機銅水和剤を2回, 06年は有機銅水和剤とイミノクタジン酢酸塩液剤をそれぞれ散布した.

b) 同一英小文字を付した数値間にはTukeyの多重比較検定法により有意差(5%)がないことを示す.

c) nt: 試験を実施しなかった.

は、岩手県では7月上旬までの発病程度を「無」に相当する発病葉割合1%未満となるように抑制しておけばよいとする仮説を設けることは妥当であると考えられる。そこで、介入試験として、7月上旬までの発生を防止することを目的として6月下旬の発生が認められない時期に効果の高い薬剤を散布する防除体系を検討した。ピラクロストロピン・ボスカリド水和剤の処理時期は、いずれの試験年次も7月上旬処理と比べて6月下旬処理で高い防除効果が認められた(表-5)。また、6月下旬において本病に卓効を示す各種薬剤を散布する防除体系は、対照のキャプタン・有機銅水和剤と比べて優れ、7月下旬まで発生を抑えた(表-6)。これらから、落花期以降の定期的な薬剤散布において、6月下旬に効果の高い薬剤を選択することで、7月下旬まで高い防除効果が得られることが明らかになった。そして、本防除試験から7月上旬の発病程度「少」が以降に発病増加するリスク要因となり得ることが検証された。

V 解析結果の活用場面

1 新たな防除体系の構築

本研究では、従来の急増期(6月下旬～7月下旬)に合わせた防除法(平良木, 1985; 鈴木・平野, 1992)に替わる新たな防除法として、6月下旬に効果の高い薬剤を散布し7月上旬までの発生を抑えることで梅雨期の発生増加を抑える防除法を構築することができた。その後、スピードプレーヤーを用いた防除試験においても極めて高い防除効果を認めている。

2 発生予察法への発展

本病の流行は短期的な気象変動の影響を受けるため、従来の予察法では向こう1か月間の発生動向を予測することは困難とされている(平良木, 1985)。しかし、今回実施したコホート内症例対照研究から、遅くとも7月上旬における本病の流行状況を把握することにより、7月下旬に多発生するリスクを予測する新たな予察法の可能性が見いだされた。つまり、7月上旬の発病程度が

「少」以上であれば、夏期に多発生するリスクを予測して、病害虫防除所では注意報を発令する根拠とすることができる。一方で、生産者は事前のリスク評価に基づき専用剤使用の意思決定をすることが可能となり、従来までの天候や発病程度に応じた防除体系に比べてフレキシブルに対応することができる。

おわりに

都道府県病害虫防除所がこれまでの発生予察事業の中で得た膨大な調査データは、各地域における病害の流行様相を的確に現しており、新たな病害管理技術を構築するためのヒントが埋もれている。今回紹介したコホート内症例対照研究は、リンゴ斑点落葉病だけでなく他作物でも活用できる解析手法であり、最近ではイネ稲こうじ病(笹原ら, 2009)やいもち病(岩館・猫塚, 2010)でも解析が行われ、流行様相を解明するための重要な知見が見いだされつつある。本手法を用いて各地域・病害における流行様相が解明されることで、発生予察情報の的確な提供や新たな防除体系の構築に反映されると考えられる。

最後に、中央農業総合研究センター石黒潔博士には、共同研究者として疫学研究手法について多大なるご助言を賜った。記してお礼申し上げます。

引用文献

- 1) 平良木武 (1985): 農業および園芸 60(7): 59 ~ 64.
- 2) 岩館康哉・猫塚修一 (2010): 日植病報 76: 44 ~ 45.
- 3) 永井正規 (2005): 今日の疫学, 医学書院, 東京, p. 84 ~ 96.
- 4) 中村好一 (2006): 基礎から学ぶ楽しい疫学, 医学書院, 東京, 248 pp.
- 5) 猫塚修一ら (2009): 日植病報 75: 314 ~ 322.
- 6) 齋藤具子 (2000): 疫学概論, 朝倉書店, 東京, p. 34 ~ 37.
- 7) 笹原剛志ら (2008): 北日本病虫研報 59: 14 ~ 17.
- 8) 鈴木 茂・平野 稔 (1992): 同上 43: 199.
- 9) 高橋秀人 (2000): 疫学概論, 朝倉書店, 東京, p. 93 ~ 97.
- 10) 上地 勝 (2000): 同上, p. 23 ~ 33.
- 11) U.S. Department of Health, Education and Welfare (1964): Public Health Service Publication No. 1103, U.S. government Printing Office, p. 387.
- 12) 横山徹爾・田中平三 (2005): 今日の疫学, 医学書院, 東京, p. 22 ~ 49.

発生予察情報・特殊報 (22.6.1 ~ 6.30)

各都道府県から発表された病害虫発生予察情報のうち、特殊報のみ紹介。発生作物：発生病害虫(発表都道府県)発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病害虫。

※詳しくは各県病害虫防除所のホームページまたはJPP-NET (<http://www.jpnp.net/jp/>)でご確認下さい。

- キク：茎えそ病(三重県：初) 6/2
- レタス：レタスヒゲナガアブラムシ(香川県：初) 6/15
- ウメ：プラムボックスウイルスによる病害(滋賀県：初) 6/16
- レタス：レタスヒゲナガアブラムシ(福岡県：初) 6/16
- 水耕栽培ネギ：ネギ根腐病(病原追加) *Pythium* sp. (広島県：初) 6/14
- キク：茎えそ病(宮城県：初) 6/21