総

説

植物病原菌における薬剤耐性菌の検定法とその疫学

桜 井 寿

農林省農薬検査所

(昭和51年6月7日受理)

Methods of Determinating the Drug-resistant Strains in Phytopathogenic Bacteria and Fungi and its Epidemiology in the Field

Hisashi SAKURAI

*Agricultural Chemicals Inspection Station, Ministry of Agriculture
and Forestry, Kodaira, 187 Tokyo, Japan*

はじめに

近年植物保護における病害防除薬剤として、残留毒性のおそれがなく、選択毒性の高い薬剤が開発実用化されている。これらの化学療法剤は病原菌の生育は阻害するが、寄主に対しては一般的に阻害作用を示さない。また、各種の化学療法剤にはそれぞれ特有の抗菌スペクトルがあって、ある病原菌に対して阻害作用を示すが、他の菌に対しては抗菌力を示さない。このように同じ生きた細胞であり、その基本的機構が同じであるにもかかわらず、細胞の種類によって異なる毒性を示す。この現象が Ehrlich 以来の基礎的理念である「選択毒性」であり、その性質を有する物質が化学療法剤である。植物病害防除においても、化学療法剤の発見は大きな成果をもたらした。

しかしながら植物病原菌も生物の一種である以上、外部環境の変化に対応して変異し、適応しやすいもののみが生存しつづけることから、薬剤の攻撃に対して病原菌も巧妙に変異し、生存・増殖して薬剤防除を困難にすることは当然考えられることであった。

有害生物が薬剤に抵抗性を示す現象の歴史を調べると、医薬領域における化学療法剤の広汎な使用開始後20年にして、細菌類の中に非常に勢いで薬剤耐性菌が出現している。また、害虫およびダニ類の有機合成殺虫剤に対する抵抗性が薬剤使用後数年を経ずして発生し、防除上大きな問題となっている。それに反し植物病原菌にお

ける薬剤耐性菌の出現は懸念されていたが、比較的最近まで病害防除上それほど問題にならなかった。ところが、ここ数年間に各地で選択性の高い抗生物質および有機合成殺菌剤の薬効低下現象が発生し、その原因として耐性菌の出現^{1,2)}が認められ、病害防除上大きな問題となっている。今後も各種の病原菌につぎつぎと耐性菌が出現することが予想され、病害防除の面から、これら耐性菌をいかに絶滅するか重要な問題をかかえているといえよう。

最近植物病原菌の薬剤耐性に関する研究報告ならびに情報は多くなっているが、浅学のためそれらを総括することは不可能に近い。そこで主として、わが国で開発・実用化された農業用抗生物質を中心にした研究結果から、薬剤耐性菌の検定法ならびに疫学的動向をとりあげて、今後の耐性菌の調査・研究の参考にしたいと思うものである。

感 性 と 耐 性

生物が薬剤との接触に対して示す反応として、感受性あるいは感性、抵抗性あるいは耐性という言葉は、農薬科学の基礎研究者はもとより、その使用場面にたずさわっている人々にとって、もはや慣用語である。基礎研究において、病原菌と薬剤を試験管内で取扱っている研究者には、その立場からの見方がある。また病原菌の薬剤耐性は遺伝学と密接な関係があり、その立場からの見方がある。一方は場で病害防除に薬剤を使用する立場か

ら、「薬剤の防除効果が期待できれば感性菌、期待できなければ耐性菌」とすれば問題はない。しかし薬剤の作用性、施用方法および施用量が異なることによって、感性和耐性の境界が研究者の見方によってかなり違ってくる。このようにきわめて不便な現象について、薬剤感受性値の頻度分布曲線から求められる感性和耐性の関係と、ほ場における防除効果の予測の意味を含めた感性和耐性を何らかの形で区別することも必要になる場合もある。

病原菌の薬剤耐性を一つの形質発現という立場から考察すると、ある菌がある薬剤に感性であるか、耐性であるかは、ある薬剤濃度の条件下で菌が生育するかしないかで定めることで、いかなる耐性菌も薬剤濃度を高めれば生育が不可能になる。したがって薬剤に対する病原菌の感受性の程度は概念的には「感受性が高い」とか、「低い」と表現されている。それを定量的に示すために *in vitro* の薬剤感受性値、あるいは植物体上の防除効果を示す値によって具体的に表現することが可能である。病原菌株の示す薬剤感受性値または防除効果は一様ではなく、その程度が「一定程度以上高い」場合を感性とし、「一定程度以下低い」場合を耐性という関係を少なくとも慣習的に広く認めている。しかしながら、現実にはその「一定程度」という重要な限界線が見方によって大きく異なる点に問題の核心がある。そのためには、「ほ場において薬剤の効果が期待できるのが感性菌、できないのが耐性菌」という区別の仕方を可能とする目的として、薬剤感受性値を適正均一な方法で正しく測定し、妥当適切に感性菌と耐性菌を判定しなければならない。しかもその検定法が実験者に実施可能な範囲で、検定能率の点からも許される範囲内に簡易化した試験法を確立するために、今後どのようにすればよいか、あるいはそれに関係した問題点を整理しておく必要もあると考えられる。

なお、言葉の定義として、一般に生物が薬剤との接触に対して示す反応は、質的には感受性という言葉で表現されている。桑原⁹⁾は「感受性」という表現は、Susceptibility あるいは Sensitivity なる語に対応するもので、いうまでもなく化学療法に特有な言葉ではない、つまり、外来の刺激に対する反応性はすべて感受性という言葉に包括されるのである。また「sensitive」なる語に「感受性」をあてることがあるが、感受性は sensitivity に相当する語とし、sensitive には感性なる語をあてべきであると、述べている。病害虫に対する作物の生理的な反応に感受性あるいは抵抗性が慣用語として用いられているが、薬剤に対する病原菌の反応について感性（または感受性）と耐性の語を用いることの適否について検討する

必要があるかもしれない。

薬剤耐性菌の定義

有害生物に対する有効な薬剤の開発目的は、医薬あるいは農業としての応用にある。少ない薬量で有害生物の発育を阻止または殺菌することが目的である。対象生物に有効な薬剤に抵抗性あるいは耐性を示す生物学的集団について、WHO は「殺虫剤に対する抵抗性とは、その正常な集団の大多数の虫を殺すような薬量に耐える能力がその系統に発達したことをいう⁴⁾」と定義している。そして抵抗性は殺虫剤の使用で昆虫集団にひき起こされた発達した特性で、遺伝的なものであるとしている。したがって、ある昆虫集団がある薬剤にもともと耐性を示す現象は「無反応性 (refractoriness)⁴⁾」という語で表現して、抵抗性 (resistance) とは明確に区別している。

三橋⁵⁾は薬剤耐性に関する生物学的意義を細菌遺伝学的立場から、次のように説明している。各地からランダムに集めた菌株の薬剤耐性値 (MAC) を表示すると、理論的には図1のようになるはずである。すなわち、bに

図1 細菌の示す薬剤感受性値の分布 (三橋)

頂点をもつ一峰性の山を画く集団はc以上の濃度では菌は発育できない。この菌の集団のもつ薬剤に対する感受性はa～cの濃度範囲内に散在し、この性状は一定で、遺伝的特性である。したがって薬剤濃度cを越えた培地に発育できるようになった菌、すなわち薬剤濃度d以上に分布する菌の集団IIは集団Iに属さず、耐性菌と定義できるとしている。

植物病原細菌および糸状菌において、感性菌群と耐性菌群を区別する境界濃度を設定している事例に、Georgopoulos⁹⁾らのベノミル耐性テンサイ褐斑病菌 (*Cercospora beticola*) をはじめとし、わが国では Kuramoto²⁾のチオファネートメチル耐性カンキツ青かび病菌 (*Penicillium italicum*) および緑かび病菌 (*P. digitatum*) の報告がある。片桐ら⁸⁾、Miura⁹⁾らは阻止円法でカスガ

マイシン耐性イネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) の検定を行ない、阻止円を形成しない菌株を耐性菌としている。筆者ら¹⁰⁻¹²⁾は寒天平板希釈法で、ストレプトマイシンおよびカスガマイシンに対する野菜の軟腐病菌 (*Erwinia carotovora*)、キュウリ斑点細菌病菌 (*Pseudomonas lachrymans*)、ポリオキシンBに対するリンゴ斑点落葉病菌 (*Alternaria mali*)、ナシ黒斑病菌 (*A. kikuchiana*)、カスガマイシンおよびブラストサイジンSに対するイネいもち病菌 (*Pyri. oryzae*)、carbendazim (MBC) および chlorothalonil に対する灰色かび病菌 (*Botrytis* sp.) などの薬剤感受性値の頻度分布曲線を描くことによって、感性菌と耐性菌の境界濃度を判定または推定できることを報告した。

このように *in vitro* の薬剤感受性から感性か耐性かを判定される事例は多いが、フサライドなど *in vitro* の薬剤感受性を測定する方法がみつかっていない薬剤の耐性菌を考慮し、また現在採用されている *in vitro* の検定法が植物体組織と同一の薬剤感受性を示す理想的な試験法でないことから、試験規模や実験誤差から耐性菌を感性菌と判定し、またその逆の事例も少数ではあるが認められる。したがって、ほ場における防除効果の予測を含めた耐性菌の検定を実施する立場から、私見として、「農業において薬剤耐性菌とは、通常の薬剤施用によって防除効果の期待されない病原菌をいう」¹³⁾と定義したいことを提案した。

そのためには、植物体上における防除効果の感性和耐性の境界を定量的に決めておくことが大切である。そこで筆者らは薬剤試験と耐性菌の検定においても、薬剤の有効性の判定基準は同一であることが望ましく、またほ場における病害防除効果の期待値を考慮し、試案として「理論的に求められる完全防除効果の50%未満または感性菌標準株の防除効果の50%未満しか期待されない菌株を耐性菌という」条件を設定し、*in vitro* の検定法から耐性菌と判定または推定された菌株について防除試験を行なった。その結果、同一菌株の *in vitro* と *in vivo* の薬剤感受性は相関することが認められた^{12,14)}。しかしながら供試菌株のすべてが、*in vitro* と *in vivo* の感性和耐性が一致するとは限らなかったことから¹²⁾、より多数の菌株を供試し、試験例を蓄積し検定結果がほ場の防除効果に反映させることができるよう検討すべき事例も認められている。

ほ場における薬効低下(減退)現象の要因

病害防除に施用した薬剤が常に有効であることが望ましい、しかし施用した薬剤が所期の目的を果さず、いわ

ゆる薬効低下(減退)現象が認められた場合、その原因調査に必要な条件として以下の要因が考えられる。

I. 原因が耐性菌による場合

- a. その病原菌がもともと耐性である場合—自然耐性
- b. もともと感性であった病原菌が耐性を獲得した場合—変異あるいは獲得耐性

c. 病原菌が耐性誘導剤に触れて耐性が上昇した場合

II. 病原菌は感性であるが植物組織側に原因がある場合

- a. 薬剤が病原菌にその有効濃度まで達しない場合

a-1) 薬剤の施用方法が不良の場合

a-2) 滲出物、壊死組織に病原菌がとりかこまれている場合

- b. 薬剤が植物組織内で不活化される場合

b-1) 植物組織内の代謝産物による拮抗作用あるいは蛋白質と結合する場合

b-2) 酵素によって不活化される場合

b-3) その他の原因によって不活化される場合

- c. 環境条件の悪化に原因がある場合

c-1) 異常気象によって病原菌の分布密度が異常に高くなった場合

c-2) 気象の悪化と過剰施肥によって病原菌に対する植物体組織の抵抗力が著しく減退した場合

c-3) 施用薬剤の溶脱、流亡あるいは日光等による分解が著しく促進され、病原菌と薬剤の接触時間が著しく短くなった場合

c-4) 植物体上に泥土、塵、煙灰などが異常に蓄積し、施用薬剤が不活化された場合

以上の要因のなかで、薬剤耐性ということは「I」に示された場合のみに限られる。自然耐性およびプラスミドによる薬剤耐性の伝達によって耐性が獲得された場合は明らかである。「Iのc」の事例として、エリスロマイシンが誘導剤となりうるブドウ状球菌のマクロライド抗生物質耐性の例がある。ブドウ状球菌が0.5 µg/ml程度の薄いエリスロマイシンに触れると、1時間以内にマクロライド系抗生物質全部とリンコマイシンに高度耐性が発現される。したがってこの後いかに高濃度の上記抗生物質を投与しても、誘導された耐性が消失するまで、まったく無効な現象が知られているが、農業の場合この事例はまだ認められていない。

「II」に示された要因は薬剤耐性でない事例で、病原菌は感性であるが、植物体組織側に薬剤の効果を減退していることである。医薬領域における同様な現象として、病原菌は感性であるが生体組織側に原因がある場合を生体組織側で薬剤に「不応(nonrefractory)」というべ

きで、耐性の用語を使うことは混乱を生じやすいと、三橋⁹⁾は述べている。

薬剤耐性菌の検定法

植物病害防除において、農業科学の進歩は収穫の増加、品質の向上、あるいは施設栽培を可能にした役割は高く評価される。しかし一方において、広汎な時として不必要にまで連用されたこれら薬剤は耐性菌の出現をうながした。今や各種薬剤に耐性菌が増加していることから、耐性菌の検定は合理的かつ的確な薬剤防除を行なう上に必要不可欠である。

薬剤耐性菌の検定に大切なことは、三橋¹⁰⁾が「ある菌のある薬剤に対する耐性を論ずる場合、最初に必要なのは耐性度分布曲線を描くことである」と述べているように、自然界に分布している病原菌の示す薬剤感受性値の頻度分布を調べることにある。検定の目的はある病原菌がある薬剤に感性的か耐性かを知るため、ある薬剤濃度の下で病原菌が生育するか否かを定量的に示す必要がある。感性和耐性は相対的なものであるが、それを区別する境界濃度が遺伝学的におおしくなく、かつほ場における防除効果が予測できる検定法を確立することが望ましい。一方において耐性菌の検定を実施する立場から、多くの被検菌株の薬剤感受性値を適正均一な方法で測定し、正確に感性的菌と耐性菌を判定することが必要条件であるが、その試験法が実施可能な範囲で、検定能率の点からも許される範囲内で簡易化したものが望ましい。

また、*in vitro* の実験系で薬剤感受性を測定できない薬剤の耐性菌の検定、あるいは薬剤の使用目的が最終的には防除効果であることを考慮すると、基本的にはほ場における防除試験が最も基本的な検定法であろう。しかし、この方法は実験設備および労力の点から、実施可能な被検菌株数が限定される。そして医薬領域における耐性菌の院内感染にみられるように、耐性菌の環境汚染の問題を考えると、可能な限りほ場の防除試験と関連する *in vitro* の検定法を探索し、採用する必要があると考えられる。

以下に現在薬剤耐性菌の検定法として採用されている試験法について述べる。

1. 寒天平板希釈法

多数の被検菌株を同一平板に接種して、葉株間の薬剤感受性値を正確に比較できる。薬剤感受性あるいは薬剤の抗菌力を測定する方法として広く採用されており、その値を定量的に表わす単位として最小発育阻止濃度 (Minimal Inhibitory Concentration 以下 MIC) および最大生育許容濃度 (Maximal Allowable Concentration 以下

MAC) がある。

この方法における実験条件の設定について、日本化学療法学会の MIC 測定法¹⁶⁾の要旨を以下に記す。

1. 感受性測定用培地はいずれの会社の製品でもよいが、製造会社名を明記すること。

2. 抗生物質の濃度段階は 100 $\mu\text{g/ml}$ を基準にした 2 倍希釈を使用する。

3. 接種用菌液は約 $10^8/\text{ml}$ に増殖したものをを用いる。培養後長期間保存してある菌株を試験する場合、少なくとも 1 回以上継代培養し、継代培養後の菌を使用する。 $10^8/\text{ml}$ の菌液で耐性を示す場合、 $10^6/\text{ml}$ 以下の菌液についても MIC を測定することが望ましい。

4. 判定は完全に発育が阻止された最低濃度をもって感受性をあらわす。ただし集落が 1 個でも発育した場合、またはきわめてうすい菌苔が発育した場合も「発育」とみなすが、ストレプトマイシンのようなアミノグリコシッド系抗生物質のように、耐性変異率の高い薬剤では対照 (薬剤を含まない培地) の発育と比べて明らかに発育が抑制された濃度以上の高濃度において、2, 3 の集落が認められることがあるが、これは除外する。たとえば次の場合 MIC は 12.5 $\mu\text{g/ml}$ とする。

薬剤濃度 ($\mu\text{g/ml}$)	3.12	6.25	12.5	25	50	100
菌の発育の程度	+++	+++	+	+	—	—
			(2)	(1)		

() 内は集落数

5. 感受性測定用平板の作り方は培地を溶解し、その温度が 60~50°C になったところに、所定の薬剤希釈液を培地の 1/9 量加えて、よくまぜ合せてペトリ皿に分注して平板とする。

このように実験条件の設定に十分な配慮し、正確な薬剤感受性を測定することが大切である。植物病原菌株においても、培地の種類によって薬剤感受性が異なることは日常経験されることで、培地の組成、pH の調整¹⁷⁾に細心の注意が必要である。

2. 液体培地希釈法

薬剤の作用機構が殺菌的か、静菌的であるかを確かめるために、最小殺菌濃度 (Minimal Bactericidal Concentration 以下 MBC) を測定するには便利な試験法である。ナシ黒斑病菌 (*Alt. kikuchiana*)¹⁸⁾、ナシ黒星病菌 (*Venturia nashicola*)¹⁹⁾ の薬剤耐性の検定で、感性的菌と耐性菌の菌体生育阻害率が他の試験法と一致した薬剤感受性を示した。しかしながら、この試験法は耐性変異率の高い薬剤あるいは、接種菌量が多かったり、培養時間が長過ぎると、mutant が発育してくるため、正確な薬剤感受性を測定することが困難な場合もある。

3. 阻止円法

薬剤耐性菌の検定法として、同一平板内で薬剤間の抗菌力を定量的に比較するには便利な方法である。薬剤耐性細菌²⁰⁾および糸状菌の検定^{8,21,22)}に採用され、通常、阻止円形成の有無、阻止円の直径を測定して、感受性の程度や耐性を判定している。実験条件の設定については寒天平板希釈法に準ずるが、平板の調製時に接種菌株の生育状態が等しく、菌量も等しくとも実験操作の遅速によって菌株間の正確な薬剤感受性を比較することが難しい事例もある。その他実験実施上の注意事項については他の著書を参照されたい。

4. 孢子発芽試験法

実験操作が簡便で、試験期間が短く、純粋培養ができないうどんこ病菌などの薬剤感受性も比較できる利点がある。リンゴ斑点落葉病菌 (*Alt. mali*)²³⁾、ナシ黒斑病菌 (*Alt. kikuchiana*)^{24,25)}、リンゴ黒星病菌 (*Venturia inaequalis*)^{26,27)}、イネいもち病菌 (*Pyri. oryzae*)¹⁴⁾、キュウリ・メロンうどんこ病菌 (*Sphaerotheca fuliginea*)²⁸⁾の分生孢子、キク白錆病菌 (*Puccinia horiana*)^{29,30)}の冬孢子、小生子などについて試験が行なわれ、感性和耐性が判定できることは報告されている。しかしながら、感性菌と耐性菌の境界濃度を定量的に表示した研究報告は少ない。たとえば宇田川ら²⁵⁾はポリオキシシンに対するナシ黒斑病菌の耐性菌の検定法として、ポリオキシシン 2, 20, 200 ppm と無添加区の培地上における孢子発芽状態を観察し、薬剤耐性の程度を強, 中, 弱の三群に区別して、ほ場における防除指針に利用していることを報告している。筆者らはカスガイシン耐性イネいもち病菌がブラストサイジン S に交差耐性を示し¹⁴⁾、その孢子発芽阻害濃度を定量的に求め、感性菌と次のようにして比較した。標準菌株 P-2 と耐性菌 4 株のブラストサイジン S の孢子発芽阻害濃度を次式から R・R (Resistant Ratio) を求めると

$$R \cdot R = \frac{\text{被検菌(耐性菌)のED値}}{\text{標準菌株(感性菌)のED値}}$$

ED₅₀ で約 4~10, ED₉₀ で約 10 の値を示すことが認められた。この R・R が 4~8 の値が結核菌に対するストレプトマイシンの感性和耐性を区別する数値³¹⁾と類似しており、孢子発芽試験においても耐性菌と判定する R・R の値、あるいはその薬剤濃度を定量的に表示し、感性和耐性の境界濃度を求めるためには多数の菌株を供試した試験成績の蓄積が必要と考えられる。この他に孢子発芽に対する薬理作用において、異常発芽した孢子が植物に感染力をもつか否かを判定する基準を誤ると、感性菌と耐性菌の境界濃度変動し、検定結果が防除効果に反

映しない可能性も推定されるので注意しなければならない。

5. 防除試験

薬効試験において、*in vitro* の薬剤感受性とほ場における防除効果が一致することもある。それゆえに耐性菌の検定法として、防除試験が最も基本的な検定法であろう。他の検定法に比較し実験結果にバラツキは大きい、最も信頼できる方法であり、*in vitro* の薬剤感受性と植物体上の病害防除作用が相関するか否かを確かめる場合にも実施されている。試験法の種類と規模については多数の研究報告と著書があるので省略する。ただし、防除効果のみを目的とした試験に比較し、耐性菌による環境汚染を避けるために、接種源、罹病植物の管理はきびしくする必要がある。

検定実施上の注意事項

ほ場に分布している病原菌が薬剤に感性的か耐性であるかを判定するために、以下の条件に注意する必要があると考えられる。

- 1) 正しい原因菌の把握
- 2) 同一実験方法による薬剤感受性の測定
- 3) 同一基準による防除効果の判定
- 4) 単独薬剤の施用 (二種以上の薬剤併用の成績は除く)
- 5) 原因菌の薬剤感受性値 (または耐性値) と小規模試験およびほ場の防除効果と相関する検定法が望ましい

原因菌の薬剤感受性値が正確に求められても、ほ場における防除効果が一致しない例は必ずしもまれではない。原因菌の推定で誤っている場合、検定法に難点がある場合を別にすれば、不一致の原因として次のことが推定される。

1) 耐性と判定されながら防除効果が認められた場合、感染・増殖している病原菌の集団の中における耐性菌の占める割合が問題になる。*in vitro* の試験で、多数の集落あるいは菌株を混ぜて検定しても、一個だけ耐性菌であれば、それが選択的に増殖し耐性の成績が出るであろうが、防除効果の場合、耐性菌の割合がきわめて少なれば病状は回復し、少数の耐性菌は植物体の抵抗力に制圧される可能性がある。また接種菌量が多いと *in vitro* および *in vivo* の薬剤感受性が低下し、感性菌を耐性菌と判定するおそれがある。それは個体当たりの薬量が少なくなることにも原因があり、細菌の場合とくに著しい。

- 2) 感性和判定されながら防除効果が低い原因とし

て、薬剤施用後における耐性の誘導現象（農薬ではこの現象はみつかっていない）、あるいは検定時間が短いと一定時間は発育が阻止されているが、その後急激に菌が発育する場合は検定時間を長くしてみる必要がある。それは薬剤によって、MIC と MBC が比較的接近しているものと、両者がかなり離れている場合³²⁾が知られているからである。たとえば MIC を測定するまでの時間を2~3倍にし、細菌では48~72時間、糸状菌では72~120時間培養して、薬剤の作用性を観察している報告^{14), 17)}もある。しかしながら、培養時間が長過ぎると、ストレプトマイシン、リファンピシンなど耐性変異率の高い薬剤の場合、耐性菌に変異した菌の発育を観察することになる。その事例はキュウリ斑点細菌病菌 (*Ps. lachrymans*) および野菜の軟腐病菌 (*Er. carotovora*) に認められているので³³⁾、実験条件の設定には十分な検討を加えておく必要があろう。

3) 検定精度を高める条件に被検菌株のサンプリング方法が問題となる。多数の分離菌株を供試することが検定精度を高める。実施可能な方法として、病害虫の発生予察事業に採用されている、高木³⁴⁾らの平面型任意系統抽出法が望ましいと考えられる。すなわち、一筆ほ場の4~5地点から各1菌株を分離し、40~50筆のほ場から合計200株程度を検定することによって、耐性菌の疫学的動向が把握できるものと推定される¹³⁾。

以上の注意事項の他に検定法の問題とも関係することであるが、薬剤の作用性の差異も十分検討する必要がある。たとえば薬剤が直接植物体上の病原菌に接触する場合は問題がない。しかしポリオキシンのように植物体内および菌体内に浸透移行する薬剤に比較し、chlorothalonilのように植物体内にほとんど浸透移行しない薬剤とでは、罹病組織内の病原菌の防除作用が異なる現象も観察されると推定される。事実、カスガマイシン耐性イネもち病菌はプラストサイジンSに対し、*in vitro*の感受性値と防除試験の予防効果よりも治病効果に交差耐性を示す¹⁴⁾ことが認められている。したがって、薬剤と病原菌の組合せによっては各種の試験結果を検討した後に感性和耐性を判定する必要もあると考えられる。

薬剤耐性菌の疫学

自然界には同一病原菌の種でいろいろな形質を発現する菌株が分布していることから、薬剤耐性という遺伝的特性を示す菌株も当然存在するものと推定されていた。ある薬剤が病害防除に使用される前、または未使用地で耐性菌が分離されたという報告もある。たとえばストレプトマイシンに対する耐性菌として、イネ白葉枯病菌

(*Xanthomonas oryzae*)³⁵⁾、クワ縮葉細菌病菌 (*Pseudomonas mori*)³⁶⁾、タバコ野火病菌 (*Ps. tabaci*)³⁰⁾、また糸状菌においてはペノミル耐性菌としてカンキツ青かび病菌 (*Penicillium italicum*) および緑かび病菌 (*Pen. digitatum*)⁷⁾、あるいはポリオキシンに対するナシ黒斑病菌 (*Alt. kikuchiana*)^{18), 37)}において、ポリオキシン使用前に分離されたと推定される菌株に感受性の低いものが存在していた。しかし一般的にはほ場における薬剤低下現象をきっかけとして、その原因が耐性菌の出現によることから確認されている事例が多い。

わが国で1975年に10薬剤に対し13種の病原菌に耐性菌が出現していることが報告¹⁾されている。これら耐性菌が出現している薬剤の作用機構を調べると、従来の薬剤に比較し殺菌作用より静菌作用を有し、生体内組織において Sublethal Concentration (死なない程度の最大薬剤濃度)の持続時間の長い薬剤が多い。一方耐性菌の出現していない従来の重金属を含有する薬剤の場合、その施用濃度が耐性菌の出現可能性以上の高濃度で使用されていることが、ほ場における耐性菌の出現が問題にされなかったことも指摘³⁸⁾される。

薬剤耐性菌の疫学は薬剤を使用する立場から重要な研究テーマである。薬剤防除を必要とするほ場で、分布している菌株の薬剤感受性の疫学的動向を知らないと、所期の防除目的は達せられず、防除費用の損失のみならず残留毒性、微生物相の攪乱などデメリットだけが残る事例を生じている。そこで筆者らは最近全国各地で分離された植物病原菌株について、数種薬剤の感受性値 (MIC) を測定し、病原菌の示す薬剤感受性値が正規分布を示すか、あるいは二・三峰性の頻度分布曲線を示すか調べた。その結果¹²⁾、薬剤との接触の少ない牧草の病原菌 *Pseudomonas coronafaciens* var. *atropurpurea* の示すストレプトマイシンおよびカスガマイシン感受性値の頻度分布は一峰性の正規分布を示し、耐性菌は認められなかった。しかし野菜の軟腐病菌 (*Erwinia carotovora*) およびキュウリ斑点細菌病菌 (*Ps. lachrymans*) の示すストレプトマイシン感受性値、リンゴ斑点落葉病菌 (*Alt. mali*) およびナシ黒斑病菌 (*Alt. kikuchiana*) の示すポリオキシンB感受性値、イネもち病菌 (*Pyri. oryzae*) の示すカスガマイシンおよびプラストサイジンS感受性値の頻度分布曲線は、それぞれ二峰性または三峰性の分布曲線を示し、明らかに耐性菌が分布していることが認められた。

施設栽培の普及に伴って、発生面積と被害が増加している灰色かび病菌 (*Botrytis* sp.) の分離植物として14種類、地域別では1都17県から分離した菌株について調査

図2 Sensitivity distribution of *Botrytis* sp. to polyoxin B and MBC. (Sakurai *et al.*)
PoB: polyoxin B
MBC: carbendazim

した結果¹¹⁾、疫学的にも興味深い事例が認められたので図2および3に示した。これらの図から carbendazim に対する感性和耐性の境界濃度は MIC 値で $0.78 \mu\text{g/ml}$ または $1.56 \mu\text{g/ml}$ と推定される。そして全国的にも耐性菌の分布密度が高率であることを示している。ついで chlorothalonil に対し感受性値の頻度分布曲線は二峰性の分布曲線を示し、耐性菌が分布していることが認められた。ポリオキシシン B に対する感受性値の頻度分布曲線は一峰性を示してはいるが、感受性の低い菌株が増加の傾向にあることが認められた。しかしながら、耐性菌の出現が報告されていない硫酸銅および供試菌株が洗礼を受けていないと推定される薬剤、DDC (S-7131) に対し、この病原菌の示す MIC 値の濃度範囲も狭く、明らかに正規分布を示し、耐性菌が分布していないことが認められた。

薬剤散布の有無と耐性菌の分離頻度は明らかに相関することが、ナシ黒斑病菌の示すポリオキシシン B 感受性値の頻度分布の調査から認められ¹¹⁾、一筆ほ場内において感性菌と耐性菌が混在していることはイネいもち病菌、リンゴ斑点落葉病菌などに認められている。しかしながら、Miura ら⁹⁾は同一罹病部から耐性菌と感性菌が分離されなかったことを報告している。

耐性菌の出現した疫学的背景として、西村³⁷⁾および甲元ら³⁹⁻⁴²⁾はナシ黒斑病菌におけるポリオキシシン耐性菌の場合、二十世紀梨は黒斑病菌に対し高度の罹病性でありながら、その商品価値の高いために栽培が続けられている。このことは病害に対する強力な保護として、過去の栽培経験による耕種の予防法と薬剤防除なしに経営栽培の成り立たない果樹である、そのために薬剤防除は必

図3 Sensitivity distribution of *Botrytis* sp. to TNP, DDC and CuSO_4 . (Sakurai *et al.*)
TPN: chlorothalonil
DDC: N-(3,5-dichlorophenyl)-1,2-dimethylcyclopropanedicarboximide (S-7131)

要であるが、同一薬剤の過度の連用によって耐性菌の出現を促したと述べている。そして耐性菌の地理的分布および年次別推移など疫学的動向を5年間にわたって調査しているが、いったん出現した耐性菌の撲滅は容易でないことを指摘している。三浦、伊藤ら⁴³⁻⁴⁵⁾もイネいもち病菌におけるカスガイシシン耐性病の疫学的調査から、当該薬剤の使用禁止に伴って耐性菌の分布密度は急激に低下するが、完全に絶滅することは困難であることを報告している。

耐性菌の出現とその分布密度に関与する要因として、薬剤の作用性⁴⁶⁻⁵³⁾、使用歴と施用方法^{25, 29, 45, 54-64)}、他剤との輪用ならびに混用などがあげられる。一方病原菌自体の要因として、生活史、増殖速度、世代交替期間および薬剤耐性の遺伝学的背景が関係してくる。病害の発生が栽培様式における環境条件によって大きく影響を受けることから、同一植物の同一病害でも栽培法によって薬剤の使用回数と使用量が異なるために、病原菌が薬剤耐性化する出現頻度も当然異なってくることが考えられる。したがって、各種の薬剤耐性菌の発生様相が薬剤の輪用よりも連用、露地栽培よりも施設栽培、輪作地帯よりも連作地帯に早く出現し⁶⁵⁾、その分布密度も高い事例が多くなっている。そこで病害防除に農薬を使用する立場から、耐性菌出現の技術予測、耐性菌が増加する状態の防止、あるいは病原菌が薬剤耐性化する変異率を低下させる研究のために、疫学の果たす役割は高いものと考えられる。

薬剤耐性パターン

病原菌の示す薬剤耐性の形質発現が一剤耐性か、多剤

耐性であるかは病害防除上重要な問題である。ある薬剤に耐性を示す病原菌がその薬剤と同じような作用機構をもつ薬剤に交差耐性を示す場合と、腸内細菌の薬剤耐性菌にみられるストレプトマイシン、クロラムフェニコール、第二塩化水銀など化学構造とその作用機構がまったく異なる薬剤に同時に耐性を獲得する事例がある。

植物病原菌の場合、化学構造と作用機構が類似しているポリオキシン各成分に対して、ポリオキシン耐性ナシ黒斑病菌 (*Alt. kikuchiana*) は交差耐性を示す²¹⁾ことが認められている。またベノミルおよびその関連物質であるベンズイミダゾール誘導体およびチオファネートメチルの間において、各薬剤はいずれも変換をうけて共通の生成物である carbendazim を生じ、病原菌の生育を阻害することから多くの菌に交差耐性の事例が認められている。すなわち、*Aspergillus*⁶⁶⁾, *Botrytis*⁶⁷⁻⁷³⁾, *Cercospora*^{74,75)}, *Colletotrichum*⁷⁶⁾, *Erysiphe*⁷⁷⁾, *Sphaerotheca*¹⁾, *Fusarium*⁷⁸⁾, *Penicillium*⁷⁹⁻⁸¹⁾, *Sclerotinia*^{82,83)}, *Venturia*^{26,27,84,85)} などその病原菌の種類は多い。また化学構造とその作用機構が異なるが交差耐性が認められるものに、イネいもち病菌におけるカスガマイシン耐性菌の事例がある。この耐性菌はカスガマイシンの他にブラストサイジンSに交差耐性を示す¹⁴⁾。この他に向ら^{86,87)}はキュウリ斑点細菌病菌に三剤および四剤耐性菌が存在していることを報告している。上杉ら^{88,89)}は実験室内で有機リン剤耐性イネいもち病菌に負相関交差耐性の現象を報告している。このように病原菌にはいろいろな薬剤耐性の形質発現を示す菌株が存在することも推定される。事実、灰色かび病菌 (*Botrytis* sp.) の示す薬剤感受性値 (MIC) を測定し、その結果を図4に示したように

carbendazim 耐性菌のなかで chlorothalonil に耐性を示す菌株もあり、多剤耐性化の傾向が認められている。

薬剤耐性の遺伝的背景と疫学

感性菌群および耐性菌群の集団に属するそれぞれの菌株が示す薬剤に対する性状は一定で、その子孫細胞に伝わる遺伝的特性をもっている。薬剤耐性の形質発現における遺伝的背景が耐性菌の伝播および疫学的動向に及ぼす影響は大きい。薬剤耐性の形質発現が突然変異 (遺伝子突然変異および染色体異常) による場合は、その変異率も低く約 10^{-8} 程度で耐性菌の伝播は菌の増殖に比列する。しかしながら、耐性の形質導入が感染的に伝達するものにプラスミド (細胞質性遺伝因子) がある。プラスミド (Plasmid) は物理的に細菌細胞の染色体とは分離して細胞内に存在し、その状態で細胞に維持される遺伝単位で、正常の細菌細胞の増殖・生長に不可欠なものではなく、多くの場合これが細胞から喪失し、また新しく獲得されても細胞自体の生存には影響がないものである。このプラスミドのなかで薬剤耐性の形質導入の役割を果たしている因子が、R因子と呼ばれ、耐性の形質を菌と菌の接合によって伝達し、細菌細胞内で増殖し $10^{-2} \sim 10^{-6}$ の頻度で感染的に伝達していく。R因子の寄主域が広いことは医学・農学を問わず有害微生物の疫学上重要な問題である。

植物病原菌株間で、菌と菌の接合によって薬剤耐性の形質が伝達することは報告されていない。しかしながら、腸内細菌由来のR因子が植物病原菌に伝達することは報告されている⁹⁰⁾。わが国で蓮田ら⁹¹⁾はキュウリ斑点細菌病菌 (*Ps. lachrymans*) が緑膿菌 (*Ps. aeruginosa*) 由来のR因子の受容菌ならびに供与菌となりうることを報告している。その実験結果の一部を表1に示した。今後植物病原菌における薬剤耐性の遺伝的背景の研究において、薬剤耐性の遺伝因子、形質発現、形質導入および伝達に関する分野の進歩、発展が期待されるところである。

ほ場分離耐性菌と実験室内耐性菌

試験管内で薬剤との接触によって、実験室内耐性菌は比較的容易にえられる。薬剤耐性の形質獲得前と獲得後の性質について、同一菌株で相互に比較できることから実験材料としては便利である。しかし薬剤が多量に施用された後に、自然界に現われた耐性菌と実験室内耐性菌の耐性機構、耐性形質の遺伝的背景が本質的に異なる場合が多いようである。植物病原菌の実験室内耐性菌はその母株に比較し、薬剤耐性以外の性状が異なったり、薬剤耐性度 (MAC) が異常に高いことが認められている¹⁸⁾。

図4 灰色かび病菌のMBCおよびTPNのMIC値の相関図 (桜井ら)

表 1 緑膿菌 (*Ps. aeruginosa*) 由来 R 因子のキュウリ斑点細菌病菌 (*Ps. lachrymans*) への伝達頻度 (蓮田ら)

R factor	Selection ($\mu\text{g/ml}$)	Transfer freq.	Resistance to	No.
Rms159 (I)	TC (6.2)	1.0×10^{-4}	TC.CM.SM.Hg	5/5
	SM (1.6)	1.0×10^{-4}	TC.CM.SM.Hg	5/5
	Hg (10.0)	1.0×10^{-4}	TC.CM.SM.Hg	5/5
Rms164 (I)	SM (1.6)	3.0×10^{-6}	SM.SA.GM.Hg	5/5
	Hg (10.0)	1.0×10^{-6}	SM.SA.GM.Hg	5/5
Rms163 (II)	TC (6.2)	$<10^{-8}$		
Rms149 (III)	SM (1.6)	$<10^{-8}$		
Rms148 (IV)	SM (1.6)	$<10^{-8}$		
RP4 (V)	TC (6.2)	1.0×10^{-4}	TC.CPC.KM	5/5
	CPC (50)	3.0×10^{-5}	TC.CPC.KM	5/5
FP2 (VI)	Hg (10.0)	$<10^{-8}$		
R151 (VII)	SM (1.6)	3.0×10^{-6}	SM.SA.GM.CPC	5/5

TC : テトラサイクリン

CM : クロラムフェニコール

GM : ゲンタマイシン

SA : スルホオンアミド

Recipient; *Ps. lachrymans* 160 rif^r

CPC : カーベニシリン

Hg : 塩化第二水銀

KM : カナマイシン

SM : ストレプトマイシン

したがって自然界に現われた耐性菌を供試した研究でないと、耐性の生化学的機構および遺伝的背景などを予測することは危険なことも考えられる。このことは医薬領域における腸内細菌の薬剤耐性で指摘⁹²⁾されていることである。

お わ り に

植物病害防除において、選択毒性の高い化学療法剤の使用によって所期の目的は成功し、その被害も軽減した。しかし農作物の栽培様式の複雑化と生産性の向上などに伴って、伝染性病害の感染頻度は増加している。薬剤の伝染性病害に対する防除効果が優れていることから、多くの病害防除に薬剤を使用することが常識のようになってきた。一方において、そのような薬剤の普及は総じて、過剰にまたは不注意に散布される傾向にあったことが、耐性菌の出現をもたらした主因と考えられる。植物病害は環境条件によって病勢の進展が左右され、薬剤を施用した病害のなかには、軽症で自然治癒と変わらなかった事例もあったと予想される。治癒したという時点で、どの薬剤も病状の悪化しない限りは有効ということになる。しかしながら、自然治療の傾向にあるときに薬剤を施用した場合、それよりもはるかに有意であったか、どうかということを判定しない限り、薬剤防除は成功したとはいえないのではないかとする場合も推定される。

薬剤耐性菌の疫学的調査において、その薬剤感受性値の頻度分布から、高率の頻度で耐性菌が検出され、薬剤が期待されないほ場で、その薬剤は有効であったと反論されることもあるかもしれない。しかし、それはほ場で耐性菌が分布し、植物に感染していても病勢が必ず進展するとは限らないし、植物組織における薬剤濃度が病原菌自体の薬剤感受性値を越えたり、ポリオキシシン耐性ナシ黒斑病菌¹⁸⁾でみられたように、菌と薬剤が長時間接触するような場合は予想以上の防除効果を示し、また「ほ場の感性」¹³⁾の現象もあり、収穫の経済的損失を受けない場合もあるのではなからうか。したがって薬剤が優れているからといって、無批判に連用、乱用することをつつしみ、現在残っている数少ない薬剤に再び耐性菌を出現させたり、あるいは増加させることは絶対に避けなければならない。

病害防除に薬剤があることは必要条件である。耐性菌が出現したり、増加する状態を防止するために、疫学的調査研究にもとづいた使用規制が必要であり、また耐性菌の疫学的動向を熟知した上で、薬剤の選択と使用法を決定する必要がある。

今後の耐性菌対策として、新しい防除薬剤の開発と既知薬剤の改良などの研究があげられよう。しかしながら、光合成を行なう能力もない病原菌類が、その旺盛な生命力と環境に適応するすぐれた能力を具えている事実を考慮するならば、ほ場で病害防除に農薬を使用する立場から、最初に必要なのは病原菌の薬剤耐性の検定法とその疫学的調査研究ではなからうか。それらの研究成果がほ場における防除効果に反映し、あるいは耐性菌出現の技術予測に役立つものと考えられる。

最後に耐性菌が出現している薬剤も、その耐性菌が分布していない地域において、優れた防除効果を示している。したがって耐性菌の出現頻度を抑えるためには、薬剤の施用回数をできる限り少なくすることが必要である。そのために耕種的防除法の確立と、病原菌の分布密度を低下させるために、感染源となる罹病個体の除去、埋没などによってほ場衛生に注意を配ること。また病原菌が薬剤耐性化する変異率を低下させるための研究として、各種薬剤の混合施用および輪用について検討する必要があるものと思われる。

引用文献

- 1) 飯田 格: 植物防疫 **29**, 163 (1975)
- 2) 上杉康彦: 同上 **29**, 167 (1975)
- 3) 桑原章吾: 第15回日本化学療法学会東日本支部総会, シンポジウム“感性と耐性”資料, 1968
- 4) 山崎輝男ら: 現代農業講座 **I**, 朝倉書店, p. 135 (1971)
- 5) 三橋 進: 第15回日本化学療法学会東日本支部総会, シンポジウム“感性と耐性”資料, 1968
- 6) S. G. Georgopoulos *et al.*: *Plant Dis. Repr.* **57**, 321 (1973)
- 7) T. Kuramoto: *ibid.* **60**, 168 (1976)
- 8) 片桐政子ら: 日植病報 **40**, 106 (1974)
- 9) H. Miura *et al.*: 同上 **42**, 117 (1976)
- 10) 桜井 寿ら: 同上 **42**, 107 (1976)
- 11) 桜井 寿ら: 日本植物防疫協会, 薬剤耐性菌に関するシンポジウム講演要旨, 41 (1976)
- 12) H. Sakurai *et al.*: *J. Antibiotics* **29**, 1230 (1976)
- 13) 桜井 寿: 植物防疫 **29**, 206 (1975)
- 14) 桜井 寿ら: 農薬検査所報告 **15**, 82 (1975)
- 15) 三橋 進: 薬剤と耐性菌, 南江堂, p. 43, 1970
- 16) 日本化学療法学会: *Chemotherapy* **23**, No. 8, 1-2 (1975)
- 17) 山村宏志ら: 日植病報 **41**, 303 (1975)
- 18) 桜井 寿ら: 農薬検査所報告 **14**, 54 (1974)
- 19) 山口 昭ら: 日本植物防疫協会, 薬剤耐性菌に関するシンポジウム講演要旨, 10 (1976)
- 20) 前田 進ら: 秦野たばこ試報 **70**, 91 (1971)
- 21) 島田徳治ら: 農薬検査所報告 **12**, 96 (1972)
- 22) 馬場洋子: 日植病報 **42**, 373 (1976)
- 23) 大沼幸男ら: 北日本病害虫研究会報 **24**, 70 (1973)
- 24) 島田徳治ら: 農薬検査所報告 **13**, 37 (1973)
- 25) 宇田川英雄: 植物防疫 **29**, 189 (1975)
- 26) 西田 勉ら: 日植病報 **41**, 127 (1975)
- 27) 沢村健三: 植物防疫 **29**, 187 (1975)
- 28) 平根誠一: 同上 **29**, 377 (1975)
- 29) 我孫子和雄: 同上 **29**, 197 (1975)
- 30) 我孫子和雄ら: 日植病報 **41**, 100 (1975)
- 31) 青柳昭雄: 第15回日本化学療法学会東日本支部総会, シンポジウム“感性と耐性”資料, 1968
- 32) 小酒井望: 最新医学 **19**, 743 (1964)
- 33) 桜井 寿: (未発表)
- 34) 高木信一ら: 病害虫発生予察特別報告 **9**, 1 (1962)
- 35) 脇本 哲ら: 日植病報 **28**, 153 (1963)
- 36) 高橋幸吉: 植物防疫 **29**, 199 (1975)
- 37) 西村正暲ら: 植物防疫 **26**, 157 (1972)
- 38) D. R. Mackenzie *et al.*: *Phytopathology* **61**, 458 (1971)
- 39) 甲元啓介ら: 日植病報 **40**, 220
- 40) 三宅英夫ら: 同上 **41**, 100
- 41) 甲元啓介: 日本植物病理学会「植物病理化学談話会」資料 p. 51, 1975
- 42) 甲元啓介: 農薬 **23**, 54 (1976)
- 43) 三浦春夫ら: 日植病報 **40**, 220 (1974)
- 44) 伊藤 弘ら: 日植病報 **40**, 220 (1974)
- 45) 三浦春夫: 植物防疫 **29**, 183 (1975)
- 46) 中村広明ら: 農薬検査所報告 **8**, 21 (1968)
- 47) K. Ohmori: *J. Antibiotics* **A20**, 109 (1967)
- 48) 上杉康彦ら: 農技研報告 **C23**, 93 (1969)
- 49) 我孫子和雄ら: 日植病報 **39**, 173 (1973)
- 50) 薬師寺国人ら: 同上 **37**, 191 (1971)
- 51) 小泉銘冊ら: 園試興津年報 **7**, 23 (1971)
- 52) 小泉銘冊ら: 同上 **8**, 28 (1972)
- 53) 小泉銘冊ら: 園試報告 **B12**, 245 (1972)
- 54) 三浦春夫ら: 日植病報 **41**, 302 (1975)
- 55) 上杉康彦ら: 同上 **41**, 303 (1975)
- 56) 大沼幸男ら: 同上 **41**, 304 (1975)
- 57) 三浦春夫ら: 同上 **41**, 415 (1975)
- 58) 木曾 皓: 日本植物防疫協会, 薬剤耐性菌に関するシンポジウム講演要旨, 1 (1975)
- 59) 伊藤征男ら: 日植病報 **42**, 372 (1976)
- 60) 三浦春夫ら: 同上 **42**, 372 (1976)
- 61) 牛山欽司: 同上 **42**, 374 (1976)
- 62) 山口武夫ら: 同上 **42**, 372 (1976)
- 63) 杉本利哉ら: 日本植物防疫協会, 薬剤耐性菌に関するシンポジウム講演要旨, 1 (1976)
- 64) 山本 磐: 同上, 同上, 17 (1976)
- 65) 菅原寿一; 私信
- 66) A. Hastie *et al.*: *J. Gen. Microbiol.* **67**, 371 (1971)
- 67) G. J. Bollen *et al.*: *Neth. J. Pl. Path.* **77**, 83 (1971)
- 68) 山本 磐: 植物防疫 **29**, 194 (1975)
- 69) 高梨和雄: 日植病報 **42**, 65 (1976)
- 70) 竹内好子ら: 同上 **42**, 65 (1976)
- 71) 手塚信夫ら: 同上 **42**, 98 (1976)
- 72) 手塚信夫ら: 同上 **42**, 373 (1976)
- 73) G. J. Bollen *et al.*: *Neth. J. Pl. Path.* **78**, 55 (1972)
- 74) E. M. Clark *et al.*: *Phytopath.* **64**, 1476 (1974)
- 75) R. H. Littrell: *Phytopath.* **64**, 1377, 49 (1974)
- 76) P. J. Griffie: *Trans. Br. mycol. Soc.* **60**, 433 (1973)
- 77) M. Vargas: *Phytopath.* **63**, 1366 (1973)
- 78) J. B. Schooley *et al.*: *Phytopath.* **61**, 816 (1971)
- 79) G. J. Bollen: *Neth. J. Pl. Path.* **77**, 187 (1971)
- 80) P. R. Harding: *Pl. Dis. Repr.* **56**, 256 (1972)
- 81) J. J. Smoot *et al.*: *Pl. Dis. Repr.* **58**, 933 (1974)
- 82) C. W. Goldenberg *et al.*: *Phytopath.* **63**, 201 (1973)
- 83) C. G. Warren *et al.*: *ibid.* **64**, 1139 (1974)
- 84) 沢村健三ら: 日植病報 **42**, 70 (1976)
- 85) 石井英夫ら: 同上 **42**, 373 (1976)
- 86) 向 秀夫ら: 同上 **42**, 61 (1976)
- 87) 向 秀夫ら: 同上 **42**, 113 (1976)
- 88) Y. Uesugi *et al.*: *Agric. Biol. Chem.* **38**, 907 (1974)
- 89) 上杉康彦ら: 日植病報 **40**, 255 (1974)
- 90) W. V. Panopoulos *et al.*: *Phytopath.* **65**, 380 (1976)
- 91) 蓮田勝美ら: 日植病報 **42**, 107 (1976)
- 92) 三橋 進: 薬剤と耐性菌, 南江堂, p. 175, 1970