

1-3 サンプルング理論とリスクレベルの設定

1-3-1 戦略決定のプロセスとサンプルング方法

害虫の薬剤抵抗性発達度合いの現状を把握することは、その後の薬剤防除戦略構築に大変重要である。もし抵抗性をもつ個体が数割も発生しているのであれば、その薬剤ではすでに防除効果を高く保つことが出来ないため、別の薬剤に切り替えるべきであろう。さらに、抵抗性が極めて低頻度であっても発見されてから顕在化するまで10年未満の事例（Georghiou & Saito, 1983）もある。常に抵抗性遺伝子の存在をモニタリングしてリスクレベルを把握し、高薬量・複数剤同時施用やブロックローテーションといった予防的な抵抗性発達抑制戦略を維持することが大切である。

害虫によっては、抵抗性顕在化まで十年以上要するものもあれば、一、二年のうちに広域拡大してしまうものもある。また、全国的に抵抗性が問題になることもあれば、極めて限られた場所で発生することもある。根拠なく設定した調査地点の抵抗性頻度を測定しても、どれぐらい先の時点まで、どの空間範囲まで、その結果が当てはまるかは予想できない。また各地点の検査個体数が少ないと、背後に生息する害虫の特徴を十分に代表する推定値は得られない。少しでも将来の抵抗性発達の予測精度を上げ、有効な防除手段を選定するには、害虫の移動能力などの生活史と加害作物の栽培規模・方法などを考慮したサンプルングと、これに対応するリスクレベルの設定が重要になる。ここではサンプルングとリスクレベル設定の基本的な考え方を整理する。

1-3-2 サンプルングにおける空間スケール

例えば長距離飛翔が可能なチョウ目露地作物害虫が対象であれば、各普及所管轄地域単位で一箇所ずつサンプルングを行えば充分である（図1）。一方で移動性の低い害虫では、県内各地域またはさらに細かく各市町村単位で、5~20地点程度の複数サンプルングが必要になる。施設栽培の場合には、抵抗性害虫が苗の流通経路によって運ばれてくる場合と、施設内の残存害虫である場合とで大きく異なる。苗の流通経路が疑われる場合、種苗を共有すると思われる複数ハウスでサンプルングが必要と考えられる。一方、抵抗性個体が施設内に残存する場合には、代表地点でのサンプルング結果が個々の施設の抵抗性発達状況としばしば一致しないため、施設ごとに分けて調べる必要がある。さらに害虫が単為生殖を行う場合（ワタアブラムシ等）には、コロニー内から複数個体をサンプルングしても遺伝子型が同一なクローンである可能性が高い。なるべく多くのコロニーからサンプルングすることが重要である。

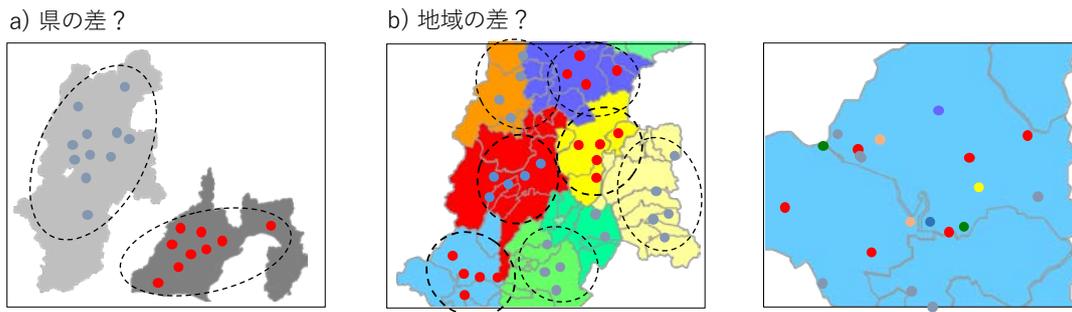


図1 害虫の移動性・対象作物栽培体系により抵抗性の発達スケールが違う。それぞれのケースにあったサンプリングを行うことが抵抗性管理戦略の決定に重要である。

1-3-3 抵抗性遺伝子診断に必要なサンプル数

次に各地点内での抵抗性遺伝子頻度を推定するために必要なサンプル数を考える。ある害虫種に対して5個体を採集し、そのうち3個体が抵抗性個体で生き残った場合、抵抗性頻度は $3 \div 5 = 0.6$ すなわち60%だろうか？60%と推定するには2つの大きな問題がある。1つは推定精度の問題である。サンプル数が少なければ、推定した抵抗性頻度の「不確かさ」が大きくなる。例えば、サンプル数が5でそのうち3サンプルが抵抗性であれば、抵抗性頻度は約15%～95%と推定される（図2左）。一方、サンプル数が50でそのうち30サンプルが抵抗性であれば、約45%～74%と60%の近くにまとまる。2つ目の問題は遺伝様式である。通常、交尾して産卵する生物は、特定の形質に関わる遺伝子を2つペアで持っている。抵抗性を支配する遺伝子が一遺伝子座上の優性形質であるならば、抵抗性遺伝子が単独でも抵抗性を示し、劣性形質であるならば抵抗性遺伝子がペアでなければ抵抗性にはならない。つまり5個体中3個体が抵抗性であると判定されたとき、抵抗性が劣性形質であれば死んだ個体の中に抵抗性遺伝子を半分持つものもあったと思われるので、60%よりも多いはずである。一方優性形質であれば、生き残った3個体の片一方の遺伝子は感受性でもよいので、60%よりも少なくなるだろう。

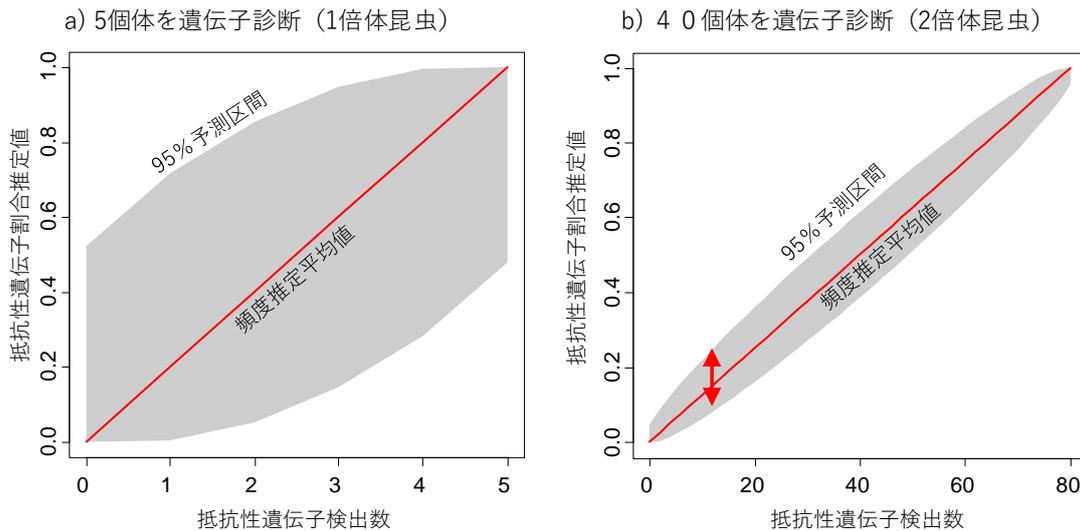


図2 遺伝子診断は見えない野外集団の抵抗性を推定する作業である。極少数、例えば5個体を調べても不確実性が高くはっきりした結論は出ない(左)。2倍体昆虫の遺伝子ペアを認識できる場合、10%の抵抗性遺伝子頻度を5%~20%内の精度で結論したいならば、40個体が必要である(右、赤矢印)。

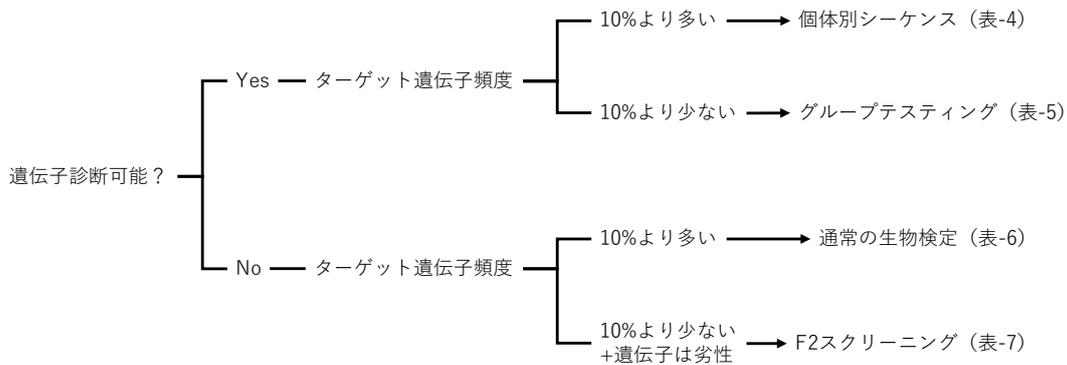


図3 サンプルング・診断手法選択のフローチャート。

図3にサンプルング・診断手法選択のフローチャートを示した。遺伝子診断法が確立されれば、表現型ではなく遺伝子を直接測定するので、少なくとも遺伝様式の違いに起因する問題は解決される(図3一番上のフロー)。では遺伝子診断を使う場合、何個体を遺伝子診断すれば十分な精度が得られるだろうか? 一般に、死亡率や増加率といった掛け算で生成される変量の場合には、その推定値の精度を示す際には「相対精度」すなわち「標準誤差を推定値で割ったもの」が用いられる(久野 1986)。しかし、野外での遺伝子率が変われば、その相対精度を一定に保つために必要なサンプル数は変わってくる。その

ため「必要サンプル数を決めるためには、事前に遺伝子率を知らなければならない」という大きな矛盾が生じる。これまでこのような矛盾に対処するため「2回サンプリング」や「逐次サンプリング」と呼ばれる複雑な手法が開発されてきた。しかし、一回のサンプリングで簡便に済ますために発想を逆転して、限界とする抵抗性遺伝子率を事前に決めてこの矛盾を回避することを考える (Yamamura and Ishimoto 2009)。

害虫による被害率を推定する場面では、被害率が許容水準以上に大きければそれを正確に推定する必要があるが、被害率が許容水準よりもずっと小さい場合には、その率をさほど正確に推定する必要がない。抵抗性遺伝子率の推定に関しても同様のことが考えられる。つまり、推定したい下限の抵抗性遺伝子率を p_c (=ターゲット遺伝子率) とすると、 p_c よりも大きい場合には正確な推定が要求されるが、小さい場合には抵抗性遺伝子は低い頻度でしか存在しないため安全だと判断できるので、さほど正確な推定は必要ない。この場合、ターゲット遺伝子率 p_c を事前に設定した時、これが正確な推定値になるためのサンプル数を計算すれば充分である。

このようなターゲット抵抗性遺伝子率 (p_c) を事前に設定する推定法において、「8の規則」と呼ばれる規則を使うと必要サンプル数を簡単に計算することができる (山村 2013)。一般に、比率を推定する際どの程度の精度を確保すべきかは、場面によってさまざまな考え方ができる。ここでは、多くの人々が合意できる「本当の値から2倍以上も外れるのは良くない」という基準を導入する。ターゲット抵抗性遺伝子率が p_c であるとき、必要サンプル数 (s) は、

$$s = \frac{8}{p_c}$$

で近似的に与えられる。ターゲット抵抗性遺伝子率 (p_c) としてどの程度の値を用いるべきかについてはさまざまな考え方があろう。研究場面では p_c は小さいに越したことはないが、実用的には $p_c = 0.2$ あるいは $p_c = 0.1$ が妥当ではないだろうか。必要サンプル数は、たとえば、 $p_c = 0.2$ を用いる場合には、

$$s = \frac{8}{0.2} = 40$$

であるから40サンプルとなる。このサンプル数を用いれば、推定された抵抗性遺伝子率が p_c 以上の場合には、推定値が真の値と2倍以上外れることはない。(正確に言えば、推定値が真の値と2倍以上に離れる確率は5%以下である。) 一方、 $p_c = 0.1$ を用いる場合には、

$$s = \frac{8}{0.1} = 80$$

であるから80サンプルとなる。ただし、遺伝子診断を用いて抵抗性率を推定

する場合で、2倍体の生物を扱う場合には、1個体に2遺伝子が含まれるので、この場合に必要なサンプル個体数は80の半分の40個体であることに注意する必要がある。

1-3-4 グループテストイング (group testing)

ターゲット抵抗性遺伝子率が $p_c = 0.1$ よりも小さい場合には、必要なサンプル数が多くなって実施が困難になる。しかし、PCR法をはじめ多くの遺伝子診断技術を使えば、大量のサンプルをすりつぶした試験用サンプルから、極少量の抵抗性遺伝子を検出することが出来る。このような場合、グループテストイングの考え方が有効である（たとえば、Yamamura and Hino 2007を参照）。グループテストイングでは、複数のサンプルを混合して（つまり複数のサンプルを1グループにして）これから1試験グループを作成して、これを実験機器にかける。これにより試験回数を減らして検査労力を低減することができる(図4)。いま1グループ内で混合するサンプル数を n とする。そして検査機器にかける試験グループ数を g とする。ここで用いられている総サンプル数は ng である。

「8の規則」を適用すれば、必要な試験グループ数 g は、

$$g = \frac{8}{np_c}$$

で計算できる。たとえば、 $p_c = 0.05$ を用いる場合で、10個体=20遺伝子サンプルを混合してすりつぶして試験グループを作成する場合には、必要な試験グループ数は、

$$g = \frac{8}{20 \times 0.05} = 8$$

であるから8試験グループとなる。いくつかの計算例を表4に示した。

g 個の試験グループのうち r 個で抵抗性遺伝子が検出された場合には、抵抗性遺伝子率 p の推定値 \hat{p} は次式で与えられる。

$$\hat{p} = 1 - \left(1 - \frac{r}{g}\right)^{\frac{1}{n}}$$

たとえば上述の20サンプル（10個体）を混合してすりつぶした試験グループを8個調べたところ、3個の試験グループで抵抗性遺伝子が見つかった場合には、

$$\hat{p} = 1 - \left(1 - \frac{3}{8}\right)^{\frac{1}{20}} = 0.023$$

であるから、抵抗性遺伝子率の推定値は0.023である。このようにグループテストイングでは、ターゲットとなる抵抗性遺伝子率が5%を下回る場合でも、効率的に推定することが出来る。推定値および信頼区間の計算用のエクセルシ

ートの例は以下のサイトにある。このエクセルファイルには、以下に述べる別の推定法の場合の計算シートも別シートとして含まれている。

http://cse.naro.affrc.go.jp/yamamura/Estimation_of_proportion_of_resistance.html

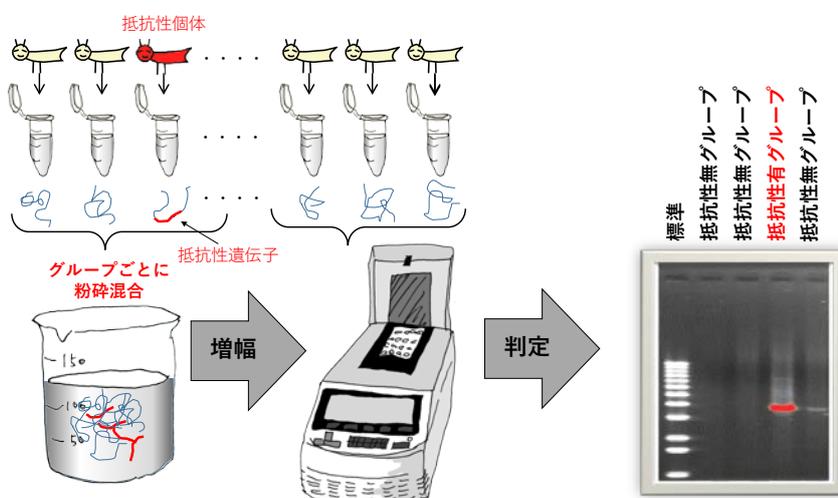


図4 複数のサンプルをまとめてPCRで遺伝子診断を行えば、少ない回数で抵抗性率を推定することができる。

表1「8の規則」をグループテストに応用した場合の必要グループ数と必要グループ内サンプル数の組み合わせ例。2倍体生物で遺伝子検査を行う場合には1頭が2サンプルを占めることになるため表中のグループ内サンプル数を半分にしたものがグループ内の個体数となる。グループ内サンプル数が1のケースは個別検査の場合の「8の規則」に相当する。

ターゲット抵抗性率 (p_c)	グループ内サンプル数 (n)	必要グループ数 (g)
0.20	1	40
0.20	2	20
0.20	4	10
0.10	1	80
0.10	2	40
0.10	4	20
0.10	10	8
0.05	1	160
0.05	2	80
0.05	4	40
0.05	10	16
0.05	20	8
0.02	1	400
0.02	2	200
0.02	4	100
0.02	10	40
0.02	20	20
0.02	40	10
0.01	1	800
0.01	2	400
0.01	4	200
0.01	10	80
0.01	20	40
0.01	40	20
0.01	80	10

1-3-5 生物検定に必要なサンプル数

遺伝子診断法が開発されていない薬剤と害虫の組み合わせに対して、正確な抵抗性遺伝子頻度を推定するのは困難である。結局、直接死亡率を測定する生物検定に頼らざるを得ない（図3下から2番目のフロー）。そのためには、数多くの野外個体を生きたまま捕獲するか、産卵させて飼育を行う必要がある。

また前述のように、抵抗性形質が点突然変異なのか、代謝促進などの量的なものなのか、優性なのか劣性なのかによっても死亡率が大きく変わってしまふ。例えば、最も単純に1遺伝子座—2対立遺伝子で抵抗性が支配されている時でも、生物検定における死亡率と抵抗性遺伝子頻度と一致しない(図5)。抵抗性遺伝子は劣性であるケースが多いので、死亡率と抵抗性遺伝子頻度の関係は多くの場合、図の赤線上(実は $y = \sqrt{x}$)にあると考えられる。これを使って単純に、死亡率を抵抗性遺伝子頻度に変換すれば良いように思われるかもしれないが、低頻度の抵抗性遺伝子を検出する場合には、表現型レベルにおける抵抗性個体率はそれを2乗した率になるため、実際にはかなり面倒である。たとえば、ターゲット抵抗性遺伝子率を $p_c = 0.1$ として生物検定を行う場合には、表現型レベルでのターゲット抵抗性個体率は $0.1 \times 0.1 = 0.01$ と極めて小さくなる。この場合にターゲット抵抗性遺伝子率の信頼区間を $0.5p_c \sim 2p_c$ にするためには、ターゲット抵抗性個体率の信頼区間をその2乗の $0.25p_c^2 \sim 4p_c^2$ にする必要がある。その際に必要なサンプル数 s を計算する際には「8の規則」の代わりに次式を用いる。

$$s = \frac{16}{9p_c^2}$$

たとえばターゲット抵抗性遺伝子率を $p_c = 0.1$ とした場合には必要サンプル数 s は次式で与えられる。

$$s = \frac{16}{9 \times 0.1^2} = 178$$

抵抗性遺伝子率の推定値および信頼区間は、抵抗性個体率の推定値および信頼区間の平方根で与えられる。必要サンプル数の例を表-2に示した。実際の抵抗性遺伝子率を推定するためのシートは先述のエクセルファイルに含まれている。

一般に、ヘテロ個体が確率 d で生存する場合には、表現型レベルでのターゲット抵抗性個体率は $p_c^2 + 2dp_c(1 - p_c)$ である。不完全優性($0 < d < 1$)の場合に必要なサンプル数を計算するのは面倒であるが、完全優性($d = 1$)の場合で p_c が比較的小さい場合にはターゲット抵抗性個体率は約 $2p_c$ であるから、この場合にターゲット抵抗性遺伝子率の信頼区間を $0.5p_c \sim 2p_c$ にするためには、ターゲット抵抗性個体率の信頼区間を $p_c \sim 4p_c$ にすればよい。したがって、完全優性の場合には「8の規則」の p_c を $2p_c$ で置き換えた次式を用いてサンプル数を計算することができる。

$$s = \frac{4}{p_c}$$

たとえばターゲット抵抗性遺伝子率を $p_c = 0.1$ とした場合には必要サンプル数

は次式で与えられる。

$$s = \frac{4}{0.1} = 40$$

抵抗性遺伝子率の推定値および信頼区間は、抵抗性個体率の推定値および信頼区間の1/2で与えられる。必要サンプル数の例を表-2に示した。抵抗性遺伝子率を推定するためのシートは先述のエクセルファイルに含まれている。

表 2 生物検定で抵抗性遺伝子率を推定する際に必要なサンプル数.

ターゲット抵抗性遺伝子率 (p_c)	必要サンプル数 (s)
➤ 完全劣性の場合	
0.20	45
0.10	178
0.05	712
➤ 完全優性の場合	
0.20	20
0.10	40
0.05	80

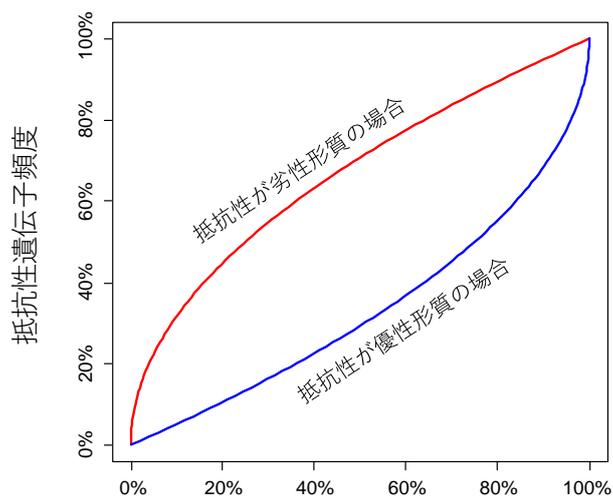


図 5 生物検定における死亡率と抵抗性頻度の関係。抵抗性遺伝子が優性形質なら青線、劣性形質なら赤線となる。抵抗性は多くの場合劣性形質なので(赤線)、死亡率がかなり低くても、抵抗性遺伝子が存在する可能性がある。

1-3-6 生物検定における Abbott 補正

寿命が短くデリケートな昆虫は通常の飼育条件下でも死亡するので、死亡率の推定の際にはバックグラウンド死亡率を考慮して推定を行う必要がある。こうした場面で昔から頻繁に用いられてきた補正法は「Abbott 補正」であり、この補正法では抵抗性個体率を $(1 - \text{殺虫剤による死亡率}) / (1 - \text{バックグラウンド死亡率})$ として推定する(Abbott 1925; 1-5-2 節も参照)。その推定精度については、バックグラウンド死亡率が高くなければ「8 の規則」などの規則が成立する。しかし、バックグラウンド死亡率が高くなると精度が低下し、「8 の規則」などの規則が成立せずに信頼区間が広がる場合がある。抵抗性個体率の推定値および信頼区間を正しく計算するためには、たとえば図 6 のような R の関数を用いることができる。先述のように、抵抗性遺伝子が劣性の場合には、これらの推定値と信頼区間の平方根を計算することにより抵抗性遺伝子率の推定値と信頼区間が推定される。また、抵抗性遺伝子が優性の場合には、これらの推定値と信頼区間を1/2倍することにより抵抗性遺伝子率の推定値と信頼区間が推定される。

```
# 関数の定義
ResistEst <- function(n,s){
  Treatment <- c("Control","Resistant")
  results <- summary(glm(cbind(s,n-s) ~
  Treatment,family=binomial(link=log))
  Estimate <- results$coefficients[,1]
  SE <- results$coefficients[,2]
  bgm.est <- c(1-exp(Estimate[1]),max(1-exp(Estimate[1]+1.96*SE[1]),0),1-
  exp(Estimate[1]-1.96*SE[1]))
  p.est <- c(exp(Estimate[2]),exp(Estimate[2]-
  1.96*SE[2]),min(exp(Estimate[2]+1.96*SE[2]),1))
  table <- rbind(Background=bgm.est,p=p.est)
  colnames(table) <- c("Estimate","Lower","Upper")
  table
}

# 計算例：無処理区で 100 頭中 70 頭が生存し、薬剤処理区で 178 頭中 2 頭が生存した場合
n <- c(100,178)
s <- c(70,2)
ResistEst(n,s)

# 計算結果
#           Estimate      Lower      Upper
# Background 0.30000000 0.20416454 0.38429484
# p           0.01605136 0.00402173 0.06406354
# 完全劣性の場合には抵抗性個体率 p の平方根を計算すれば抵抗性遺伝子率の推定値となる。
sqrt(ResistEst(n,s))
#           Estimate      Lower      Upper
# Background 0.5477226 0.45184571 0.6199152
# p           0.1266940 0.06341711 0.2531078
```

図 6 バックグラウンド死亡率を考慮した推定のための R 関数の例.

1-3-7 F2 スクリーニング法

表-2 に示したように、抵抗性遺伝子が劣性の場合の生物検定に必要なサンプル数は膨大で、しかも極低頻度の抵抗検出が必須なケースでは生物検定ではもはや対応できない。しかし、このような場合でも、当該昆虫の飼育が容易な場合には、米国やオーストラリアで実施されている F2 スクリーニングを使えば 1～5% 程度の抵抗性を何とか検出できるかもしれない (Andow et al., 1998) (図 3 一番下のフロー; 図 7)。F2 スクリーニング法は次の 3 つのステップで構成される。①野外から交尾済み雌成虫を採集・採卵する。②次世代 (F1) を飼育・羽化させて兄弟交配させてさらに採卵する。③その次の世代 (F2) について薬剤検定を行い、抵抗性頻度を計算する。F2 スクリーニングは 2 世代にわたって飼育が必要なため、時間がかかりとても困難に思えるが、例え抵抗性が劣性形質であっても理論的には個体別遺伝子診断と同等の精度を持つ。

F2 スクリーニング法の場合、すべての抵抗性遺伝子がヘテロの状態にあるとして近似すれば、抵抗性遺伝子率は抵抗性遺伝子をもつ雌率の半分になる。そのため必要サンプル数の計算では、ターゲット抵抗性遺伝子率を形式的に 2 倍にして計算を行うことに注意する必要がある。 $p_c = 0.1$ とする場合には計算上は $p_c = 0.2$ として計算を行い、 $p_c = 0.05$ とする場合には計算上は $p_c = 0.1$ として計算を行う。たとえば、ターゲット抵抗性遺伝子率を $p_c = 0.1$ とする場合には必要な雌数は 40 個体であり、 $p_c = 0.05$ とする場合には、必要な雌数は 80 個体である (表 1)。抵抗性遺伝子率を推定するためのシートは先述のエクセルファイルに含まれている。参考までに推定値の早見表の一部を表 3 に掲載した。

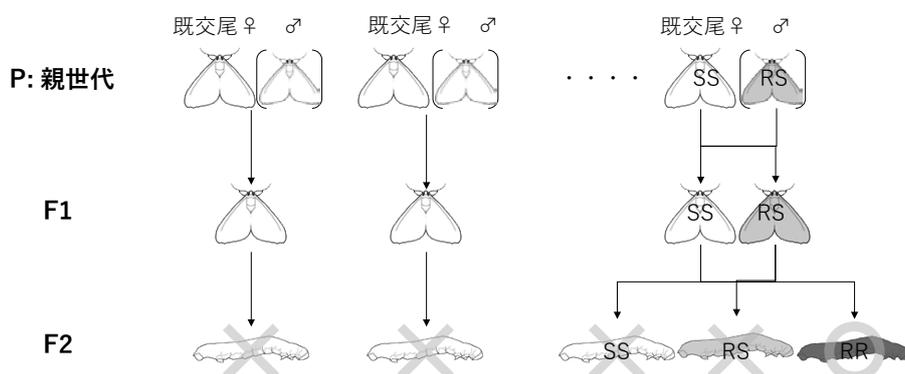


図 7 F2 スクリーニング法の概念図。交尾雌を多数捕獲して、採卵し F1 を飼育して成虫まで育て兄弟交配し F2 を選抜する。低頻度の抵抗性遺伝子はヘテロ (RS) の状態で野外に存在し、その交配相手はほぼ間違いなく野生型である (SS)。抵抗性ヘテロ (RS) と野生型 (SS) の子供 F1 は SS:RS = 1 : 1 の割合となるが、抵抗性ヘテロは薬剤感受性のため選抜できない。F2 まで飼育して初めて抵抗性ホモ (RR) を得ることが出来る。

表3 F2スクリーニングにおける、ターゲット抵抗性遺伝子頻度と必要交尾♀数。表中の数字は推定される抵抗性遺伝子頻度（95%信頼区間）。個別別遺伝子診断と同等の検出精度を見込める。

ターゲット	1%	5%	10%	
必要交尾♀数	400交尾♀	80交尾♀	40交尾♀	
F2世代に生存個体が出現した家族数	0	0.0%(0.0-0.5%)	0.0%(0.0-2.3%)	0.0%(0.0-4.5%)
	1	0.1%(0.0-0.7%)	0.6%(0.0-3.4%)	1.3%(0.0-6.8%)
	2	0.2%(0.0-0.9%)	1.3%(0.2-4.4%)	2.5%(0.3-8.7%)
	3	0.4%(0.0-1.1%)	1.9%(0.4-5.4%)	3.8%(0.8-11%)
	4	0.5%(0.1-1.3%)	2.5%(0.7-6.3%)	5.0%(1.4-12%)
	5	0.6%(0.1-1.5%)	3.1%(1.0-7.1%)	6.3%(2.1-14%)
	6	0.7%(0.2-1.6%)	3.8%(1.4-8.0%)	7.5%(2.8-16%)
	7	0.9%(0.3-1.8%)	4.4%(1.8-8.8%)	8.8%(3.6-17%)
	8	1.0%(0.4-2.0%)	5.0%(2.2-10%)	10%(4.4-19%)
	9	1.1%(0.5-2.1%)	5.6%(2.6-11%)	11%(5.3-20%)
	10	1.3%(0.6-2.3%)	6.3%(3.0-12%)	13%(6.2-22%)
	11	1.4%(0.7-2.4%)	6.9%(3.5-12%)	14%(7.1-23%)
	12	1.5%(0.8-2.6%)	7.5%(3.9-13%)	15%(8.0-25%)
	⋮	⋮	⋮	⋮
⋮	⋮	⋮	⋮	

1-3-8 サンプルング計画立案の重要性

本節冒頭で図3にまとめたように、遺伝子診断の実行可能性および、ターゲットとする抵抗性遺伝子頻度によってサンプルング・診断法が変わってくる。遺伝子診断が可能であれば、抵抗性遺伝子頻度推定のための労力は大幅に軽減される。遺伝子診断が出来ない場合、生物検定かさらにF2スクリーニングが必要である。とくに、10%を下回る精度で抵抗性判別が必要で、抵抗性が劣性であると見込まれる場合には、F2スクリーニング法に頼らざるを得ず、多大な労力が必要になり実施するのは相当困難と思われる。より簡便な遺伝子診断が現場で直ぐに使えるように、新規殺虫成分を含む殺虫剤が上市される度に、抵抗性遺伝子の探索とその遺伝子診断技術の開発が同時並行で進められることが望ましい。

モニタリングは野外での多数の個体の採集が必要で多くの労力が必要となる。遺伝子診断が出来ない場合には、大量採集や飼育をとまなう生物検定やさらにはF2スクリーニングが必要になり、膨大な労力と時間がかかる。だからといって必要な手順や必要な地点数・サンプル数を省略しては、正確な抵抗性の発達を測定することが出来ない。事前に充分にどの情報をどの程度の精度で欲しいのか、サンプルング計画を練っておくことが必要である。

1-3-9 抵抗性リスクレベルの設定

次章の各害虫-剤の組み合わせ別ガイドライン案では、サンプリングした害虫の薬剤抵抗性モニタリングの結果に基づいてリスクレベル判定を導入している。サンプリングによって実際の抵抗性発達状況を把握し、これに対するリスクレベルの設定があってはじめて、有効な抵抗性管理が可能になる。

理論的には、遺伝様式の違いにより生物検定による死亡率と抵抗性遺伝子頻度の中に様々な関係が成り立つと想定されるが（例えば図5）、実運用上、遺伝様式による違いがはっきりと判るほど精度が高い結果が得られることはまれである。そこでもっとも単純な直線関係を仮定して、抵抗性遺伝子の頻度に応じた区分けを行った。

リスクレベル 1 抵抗性は未発達：地域個体群における抵抗性遺伝子頻度が、その薬剤の使用開始以前の個体群並みに低頻度であり、かつ頻度上昇までに十分な時間が見込まれる。剤の通常使用が可能であり、抵抗性管理に適した使用方法に準拠しつつ、防除体系への剤の組み込みを行う。

リスクレベル 2 抵抗性が発達中：地域個体群における抵抗性遺伝子頻度が、使用開始以前の害虫個体群よりも上昇しているものの、薬剤の効力低下には至らない。当該剤を推奨から外し、代替薬剤への移行を準備する。

リスクレベル 3 既に抵抗性が発達：地域個体群における抵抗性遺伝子頻度が十分に高く、かつ薬剤の効力が低下しているか、1~2世代以内の確実な低下が予想される。当該剤の使用を中止し、代替薬剤へ速やかに移行する。

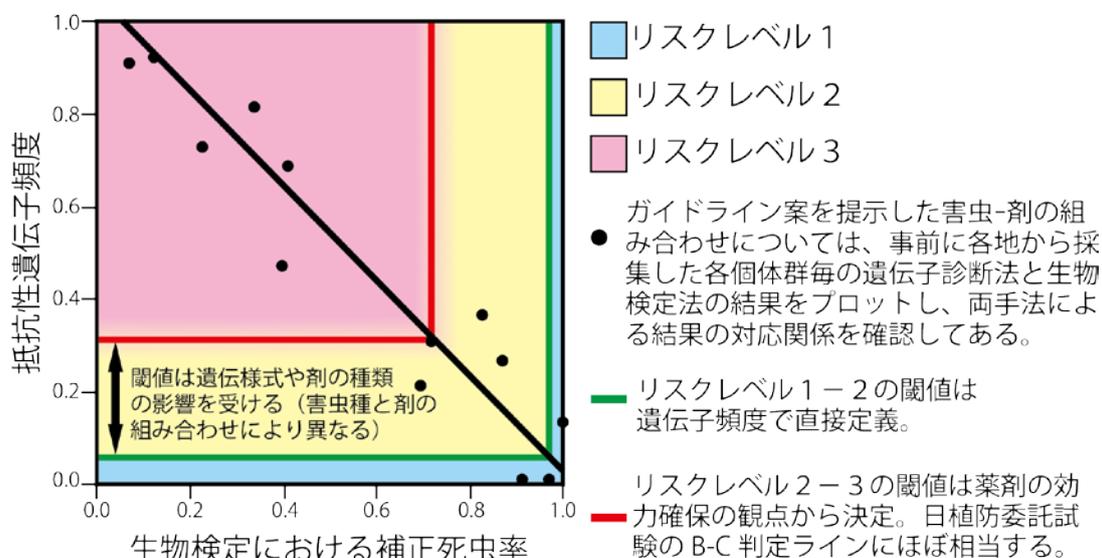


図 8 リスクレベルの区分けの概念図。

リスクレベルは抵抗性遺伝子頻度の上昇と、ほ場での当該薬剤への感受性低下により複合的に判断される指標である。リスクレベル判定に用いる抵抗性遺伝子頻度の閾値は、2章で各害虫の節に示すように、害虫と薬剤の組み合わせ毎に異なる。これらは害虫種の増殖速度や、ほ場内外を移動分散する時期、移動距離といった生活史形質を総合的に勘案して決定している。

リスクレベル1と2の閾値を設定する目安としては、進化動態モデルおよび過去の抵抗性発達事例に基づく先行研究から、ほ場内部で抵抗性個体同士が出会って同系交配が頻繁に起きる時の抵抗性遺伝子頻度、すなわち1%から10%の間に設定するのがよいと考えられる (Gould 1998; Takahashi et al. 2017; Sudo et al. 2018)。一方、リスクレベル2と3の閾値は、生物検定で測定される殺虫剤の効力が、当該剤の農薬登録時に満たすべき基準 (たとえば日本植物防疫協会による新農薬実用化試験の判定ライン) を、明らかに下回る抵抗性頻度として定義される。この閾値を遺伝子頻度ベースで設定するためには、害虫/薬剤の組み合わせ毎に遺伝子診断で直接推定された頻度の値と、その集団における生物検定の死亡率との対応関係を、予め複数の野外集団について測定しておく

(図8)。理論上この対応関係は曲線(図5)になるが、しばしば実測データの分散が大きく、曲線の当てはめが困難となるため、直線回帰した推定式を用いればよい。

上記の方針に基づいてリスクレベルの閾値が決まれば、判定に必要なサンプル数は、実質的により厳しいターゲット抵抗性遺伝子率を要するであろうリスクレベル1と2の閾値を用いて計算される。たとえばリスクレベル1と2の閾値が10%であれば、 $p_c = 0.1$ を採用して8の規則を適用すると染色体80本(40個体)、5%であれば、 $p_c = 0.05$ を採用して160本(80個体)となる。

なお実際には、サンプリングが必要な時期に虫が増殖していない等の理由で、上記の値よりもはるかに少数の個体しか集められない場合もあり得る。このような場合には、品質管理の現場で広く用いられる「3の規則」(Hanley & Lippman-Hand 1983)が有用である。すなわち、染色体 n 本($n/2$ 個体)のサンプルが得られ、その中に抵抗性遺伝子が1本も発見されなかったとき、集団における抵抗性遺伝子頻度の95%信頼区間は0以上、 $3/n$ 以下と近似できる。たとえば染色体60本(30個体)を調べて全て感受性であれば、95%信頼区間の上限は $3/60 = 0.05$ である(正確にはRで `binom.test(0, 60)` として計算され、0.0596となる)から、リスクレベル1と2の閾値が5%以上に設定されているならば、この集団をリスクレベル1と判定しても実用上の支障はない。

(執筆：山村光司 須藤正彬 山中武彦)

文献

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Andow, D. A. et al. (1998) Using an F₂ screen to search for resistance alleles to *Bacillus thuringiensis* toxin in European corn borer (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 91: 579-584.
- Georghiou, G. G. and T. Saioth (1983) Pest resistance to pesticides. Plenum Press.
- Gould, F. (1998) Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. *Ann. Rev. Entomol.* 43: 701-726.
- 久野 英二 (1986) 動物の個体群動態研究法I-個体数推定法-. 共立出版, 東京
- Hanley, J. A. and A. Lippman-Hand (1983). If nothing goes wrong—is everything alright?. *JAMA* 249: 1743-1745.
- Sudo, M. et al. (2018) Optimal management strategy of insecticide resistance under various insect life histories: Heterogeneous timing of selection and inter-patch dispersal. *Evol. Appl.* 11: 271-283.
- Takahashi, D., Yamanaka, T., Sudo, M., and Andow, D. A. (2017). Is a larger refuge always better? Dispersal and dose in pesticide resistance evolution. *Evolution* 71: 1494-1503.
- Yamamura K. and A. Hino (2007) Estimation of the proportion of defective units by using group testing under the existence of a threshold of detection. *Comm. Stat. Sim. Comp.* 36:949-957.
- Yamamura, K. and M. Ishimoto (2009) Optimal sample size for composite sampling with subsampling, when estimating the proportion of pecky rice grains in a field. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* 14:135-153.
- 山村光司 (2011) 農学と統計学. 計量生物学 32: S19-S34.
- 山村光司 (2013) 小さな割合を推定する際に必要なサンプル数の簡易計算法 : 「8 の規則」 の提案。 第 57 回日本応用動物昆虫学会大会要旨集 (G302)