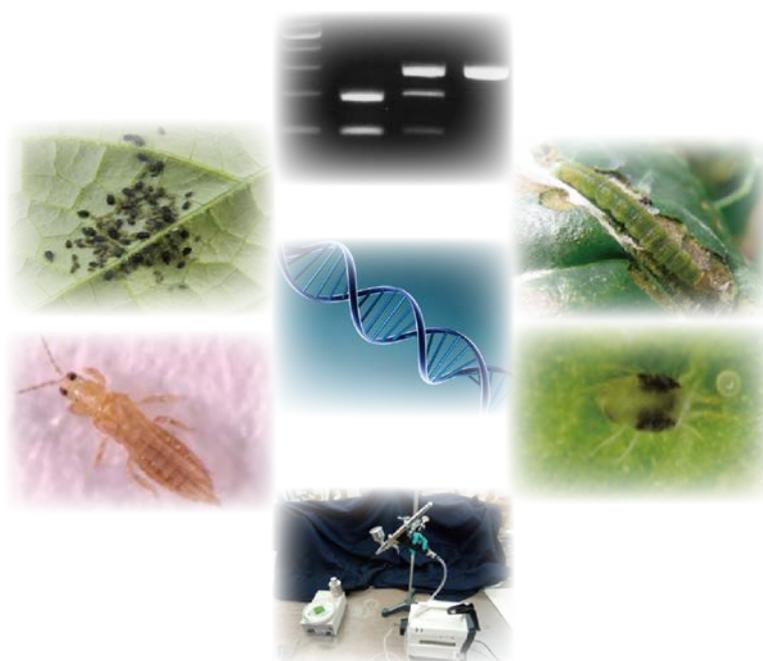


薬剤抵抗性農業害虫管理のための ガイドライン案

(2019年3月)



平成26～30年度 農林水産省委託プロジェクト研究
「ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発」
コンソーシアム編

目次

はじめに

使用の手引き

第1章 総論

1-1 薬剤抵抗性発達の経緯と国内外の現状	1
1-2 薬剤抵抗性管理の考え方	7
1-3 サンプルング理論とリスクレベルの設定	16
1-4 遺伝子診断による抵抗性遺伝子検出の概要	31
1-5 生物検定法の種類と各手法に必要な計算手法の概要	36
1-6 薬剤抵抗性管理における現場指導の留意点	39

第2章 ガイドライン案

2-1 コナガ	45
1) コナガの薬剤抵抗性の現状と対策の考え方	45
2) 薬剤抵抗性管理の具体的手順	45
3) 判断基準	47
4) 代替防除手段について	47
5) 地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント	48
6) 薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報と事例集	53
2-2 チャノコカクモンハマキ	57
1) チャノコカクモンハマキの薬剤抵抗性の現状と対策の考え方	57
2) 薬剤抵抗性管理の具体的手順	57
3) 判断基準	59
4) 代替防除手段について	59
5) 地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント	60
6) 薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報と事例集	61
2-3 ワタアブラムシ	68
1) ワタアブラムシの薬剤抵抗性の現状と対策の考え方	68
2) 薬剤抵抗性管理の具体的手順	68

3)	判断基準	71
4)	代替防除手段について	71
5)	地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント	74
6)	薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報と事例集	74
2-4	ネギアザミウマ	81
1)	ネギアザミウマの薬剤抵抗性の現状と対策の考え方	81
2)	薬剤抵抗性管理の具体的手順	82
3)	判断基準	84
4)	代替防除手段について	84
5)	地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント	85
6)	薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報と事例集	86
2-5	ナミハダニ	92
1)	ナミハダニの薬剤抵抗性の現状と対策の考え方	92
2)	薬剤抵抗性管理の具体的手順	93
3)	判断基準	94
4)	代替防除手段について	95
5)	地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント	96
6)	薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報と事例集	97
2-6	ウンカ類	104
1)	ウンカ類の薬剤抵抗性の現状と対策の考え方	104
2)	薬剤抵抗性管理の具体的手順	105
3)	判断基準	107
4)	代替防除手段について	107
5)	地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント	107
6)	薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報	108
第3章 遺伝子診断供試虫の採取方法		113
3-1	コナガ	114
3-2	チャノコカクモンハマキ	117
3-3	ワタアブラムシ	119
3-4	ネギアザミウマ	122

3-5	ナミハダニ	125
3-6	イネウンカ類	126

第4章 害虫の薬剤抵抗性遺伝子診断法マニュアル

4-1	コナガのジアミド剤抵抗性遺伝子診断法	130
4-2	チャノコカクモンハマキのテブフェノジド剤抵抗性遺伝子診断法	138
4-3	ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断法	144
4-4	ネギアザミウマのピレスロイド剤抵抗性遺伝子診断法	147
4-5	ナミハダニのキチン生合成阻害剤抵抗性遺伝子診断法	152
4-6	トビイロウンカのイミダクロプリド剤抵抗性遺伝子診断法	164

第5章 害虫薬剤抵抗性の生物検定法

5-1	コナガの薬剤抵抗性生物検定法	170
5-2	チャノコカクモンハマキの薬剤抵抗性生物検定法	176
5-3	ワタアブラムシおよびモモアカアブラムシの薬剤抵抗性生物検定法	182
5-4	ネギアザミウマの薬剤抵抗性生物検定法	190
5-5	ナミハダニの薬剤抵抗性生物検定法	203
5-6	ウンカ類の薬剤抵抗性生物検定法	209

IRAC 分類表

・殺虫剤の作用機構分類	212
・サブグループ分類と農薬名の例示	213
・農薬名 50 音順によるサブグループ判別リスト	217

執筆者一覧	231
-------	-----

はじめに

農作物の安定生産には害虫被害の抑制が必須である。近年、化学合成農薬だけに依存しない総合的害虫管理（**Integrated Pest Management, IPM**）の重要性は増しているが、**IPM** 導入下においても化学合成農薬が果たす役割は大きい。これまで卓効を示す化学合成農薬の連用により、薬剤抵抗性を示す害虫個体群が蔓延した事例は、有機リン剤、ピレスロイド剤等、数多い。農薬の開発には、安全性を確保するために膨大な安全性試験が行われ、環境残留性等マイナス面が高い薬剤は使用されていない反面、開発コストは百億円規模にも達するようになった。抵抗性害虫出現のために農薬としての使用寿命を迎えるのは社会にとっても不利益である。

農林水産省は、薬剤抵抗性病害虫の発生状況等調査を行っており、イネウンカ類のイミダクロプリド剤、ナミハダニ類の多剤耐性、チャノコカクモンハマキの **IGR** 剤耐性等が拡大傾向にあることが報告されている。また、この数年で、コナガのジアミド剤抵抗性、ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性、ネギアザミウマのピレスロイド剤・ネオニコチノイド剤抵抗性等が拡大傾向にある。

薬剤抵抗性害虫対策には発生の早期発見と適正な農薬使用が重要である。そこで、平成 26 年度から農林水産省委託プロジェクト研究「ゲノム情報等を活用した薬剤抵抗性管理技術の開発」を 5 年計画で実施し、害虫の薬剤抵抗性獲得原因となる遺伝子変異を同定し、感受性系統と抵抗性系統の塩基配列の違いを検出する手法をマニュアル化した。この成果を骨子に、薬剤抵抗性害虫の発生が拡大する前に早期検出するためのサンプリング手法、簡易な生物検定法、リスク判定の基準、代替防除法の事例等をまとめた。

本書には、プロジェクトに参画した道府県の公設試を中心に行われた代表的な対応例も記載されており、防除指導に携わる方々の参考にしていただければ幸いである。

農研機構 生物機能利用研究部門
昆虫制御研究領域長 中島信彦

本書使用の手引き

第 1 章の総論にはすべての害虫種に共通して、薬剤抵抗性管理を行う上での前提となる知識を得るための記載となっている。国内外の薬剤抵抗性発達の経緯と現状について述べた後、抵抗性の発達を遅延させるためのモデル研究事例について紹介し、信頼度の高い診断結果を得るために必要なサンプリングに関する解説と薬剤抵抗性発達リスクレベルの判断に関する解説、遺伝子診断による抵抗性遺伝子検出方法の概要、遺伝子診断法と生物検定法それぞれの長所と短所についての説明、生物検定法に用いられる統計手法、農薬散布における「薬剤付着」に関する説明の記載がある。

第 2 章が本プロジェクト研究で対象とした害虫－薬剤の抵抗性管理のためのガイドライン案で、対象害虫の薬剤抵抗性の概略とリスクレベル判定や代替防除法等の説明を行っている。第 3 章には対象害虫の遺伝子診断供試虫の採取法、第 4 章に遺伝子診断方法、第 5 章に生物検定方法を記載した。第 3 章以降は実際の薬剤抵抗性検定作業の手引き書としても使用できるように虫種の特徴に応じた記載となっている。

巻末に薬剤選択の指標となる IRAC 分類表を作用機作グループと農薬名の 50 音順でそれぞれ掲載している。

本書の全体版と節単位に区切った各記載を農研機構ホームページ内の下記アドレスに掲載している。必要個所をダウンロードして担当地域の薬剤抵抗性管理に役立てていただければ幸いである。

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/121745.html

第1章 総論

1-1 薬剤抵抗性発達の経緯と国内外の現状

近年、重要な農業害虫に使用される基幹薬剤に対して、薬剤抵抗性を発達させた個体群が出現して防除が困難となっている。この現象は日本国内に留まらず、広く世界各国に共通の重要問題である。

1-1-1 薬剤抵抗性の生理メカニズムの概説

米国の殺虫剤抵抗性対策委員会 (Insecticide Resistance Action Committee; IRAC) は殺虫剤抵抗性のメカニズムとして、i)代謝、ii)作用点変異、iii)体表透過性、iv)行動を挙げている (<http://www.ircac-online.org/about/resistance/mechanisms/>)。

i)代謝に関わるのは主に解毒酵素と呼ばれる酵素群 (シトクロム P450、カルボキシエステラーゼ、グルタチオン S-トランスフェラーゼなど) で、これが発達した害虫では殺虫剤や殺ダニ剤を体内で分解・無毒化して体外に排出してしまう。これらの解毒酵素はもともと植物が持つ様々な防御物質などに対して発達し、たまたま一部の酵素が農薬に対しても分解する能力を持ち、薬剤防除による淘汰を通じてそれらの解毒酵素を持つ子孫が害虫集団中に広がって農薬が効かなくなる。解毒能力が高い個体では、解毒酵素そのものが過去の突然変異によって農薬に対する分解活性をもつようになる場合や例えば解毒酵素を作る遺伝子の数が増えることによって沢山生産するようになってきている場合などが知られている (河野・富田, 1995; 葛西, 2009)。

一方、散布された農薬は害虫の体内に入ってから代謝され (あるいはそのまま)、神経や発育あるいは呼吸などに関係する部位で重要な役割を果たしている酵素などのタンパク質に結合してその機能を阻害することによって、害虫の正常な生命活動ができない状態を作って死に至らしめる。農薬が結合するタンパク質の部位は決まっていて、その部位と農薬 (あるいはその代謝物) は鍵穴と鍵のような関係にある。このとき、DNA がたまたま変化してタンパク質の鍵穴の一部を構成するアミノ酸が別のアミノ酸に置き換わっている個体がいると、鍵穴の形が変化してしまう可能性があり、それによって農薬が結合できなくなる場合がある。これが ii)作用点変異と呼ばれるものであり、結合できない以上、もはや農薬がその効力を発揮することは不可能となる。このような変異はそのタンパク質をコードする DNA のたった一つの塩基が変化する (塩基置換) ことで起こり得る (河野・富田, 1995; 駒形, 2009; Van Leeuwen et al., 2010)。このような塩基置換は必ずしもタンパク質の本来の機能を損なわない場合も多いため、

害虫に限らずいろいろな生物の中に遺伝的な変異として数多く存在している。このような変異を持つ個体が畑に存在する場合、農薬の散布を通じて生き残り、その子孫が害虫集団中に広がることは想像に難くない。農薬と害虫の組み合わせによっては、iii)体表透過性の低下や農薬散布による摂食停止や忌避などのiv)行動が、薬剤の効果を低下させる要因となる場合がある。しかし、深刻な薬剤抵抗性の発達が認められるケースでは多くの場合、その要因として i)か ii)あるいはその両方が認められる。

前述のように、薬剤抵抗性の発達は、農薬散布を通じて害虫個体群の中でこれらの遺伝子を持つ個体が生き残り、その子孫の割合が個体群内で増加することによって、個体群全体の死亡率が低くなる現象である。そのため、害虫管理においては、薬剤と害虫の組み合わせにより、抵抗性を引き起こす i)および ii)の遺伝的な変異を明らかにし、圃場に発生している害虫にそれら抵抗性遺伝子が存在するか否かを把握し、その後の薬剤抵抗性の発達を予測して個体群の拡大を防止することが重要である。

1-1-2 国内外の農薬登録状況

現在使用されている有機リン系（IRAC 分類番号：1B）、カーバメート系（IRAC 分類番号：1A）、ネライストキシン系（IRAC 分類番号：14）などの薬剤は、1950年代後半から1970年代にかけて開発された。続いて、1980年代に合成ピレスロイド系（IRAC 分類番号：3A）やBT剤（IRAC 分類番号：11A）など、1990年代にネオニコチノイド系（IRAC 分類番号：4A）やマクロライド系（IRAC 分類番号：6）など、2000年代にジアミド系（IRAC 分類番号：28）の薬剤が開発されてきた（図1）。

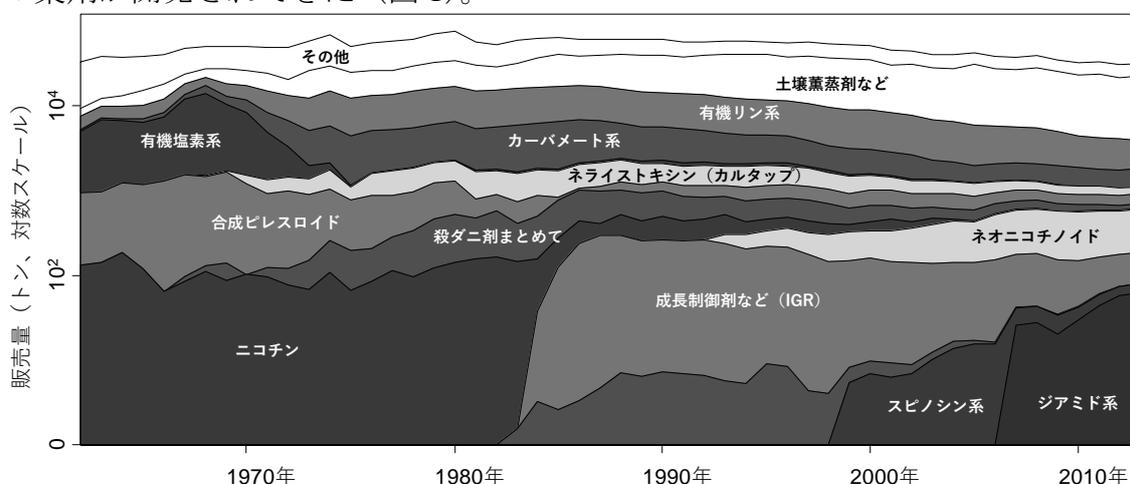


図1 農薬出荷量の推移。土壌薫蒸剤と有機リン系殺虫剤の出荷量が多いため、縦軸を対数変換して表示した。（出典：国立環境研究所 Webkis-plus：www.nies.go.jp/kis-plus/index_3.html, 2017年1月）

近年、農薬に対するリスク評価が厳しくなっており、例えば欧州連合（EU）では1998年から2008年の10年間で約7割の農薬が登録削除となった（図2）。今後も新たな規制（Regulation (EC) No. 1107/2009）により、2割以上の農薬が登録困難になると予想されているが（横田, 2014）、その一方で新規薬剤の登録は十分に進んでいない。日本においても2000年以降、農薬の有効成分数は横ばいである。今後も、新規薬剤の登録数が大幅に増加するとは考えにくく、薬剤の使用寿命を出来るだけ長くするための抵抗性管理は極めて重要である。

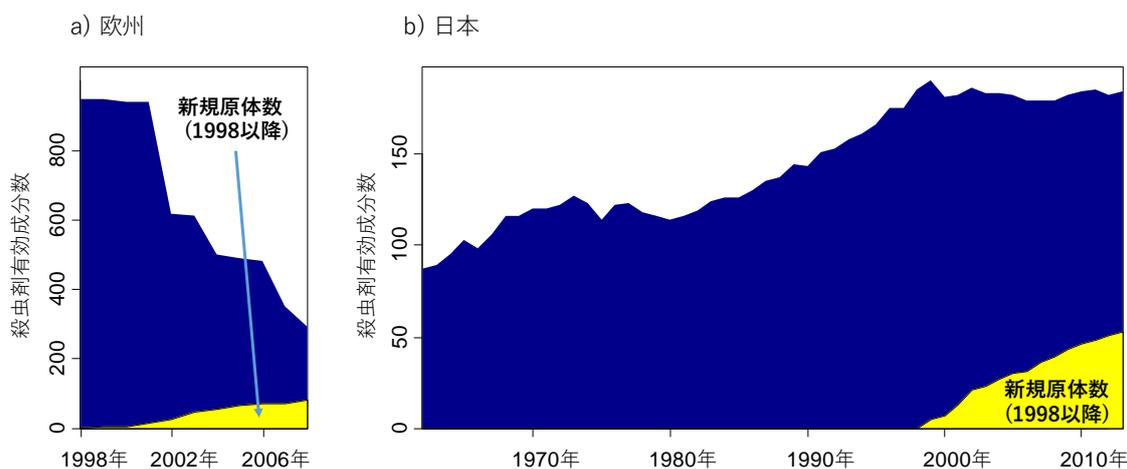


図2 農薬有効成分数変動の日欧比較. (出典: Bielza 他 (2008) Ljubljana 宣言, 国立環境研究所: www.nies.go.jp/kis-plus/index_3.html, 2017年1月).

1-1-3 国内外の薬剤抵抗性発達の状況

節足動物における薬剤抵抗性の最初の報告は1914年、アメリカ合衆国カリフォルニア州のカンキツ害虫、ナシマルカイガラムシの石灰硫黄合剤抵抗性とされている。ただし、薬剤抵抗性の問題が顕在化したのは化学合成農薬が農業生産の現場で広く使用されるようになった戦後のことである。日本における最初の報告は、衛生害虫ではコロモジラミの DDT (IRAC 分類番号: 3B) 抵抗性 (1950年)、農業害虫ではミカンハダニのシュラーダン (IRAC 分類番号: 1A) 抵抗性 (1958年) とされている。

2015年時点において、薬剤に対して何らかの抵抗性を発達させた害虫は全世界で597種に達している。また、336の化合物に対する抵抗性が、累計で14,644件報告されている。抵抗性に関する報告のほとんどは、農業害虫 (68.0%) と衛生害虫 (31.0%) で占められている。

薬剤抵抗性の報告件数が最も多いのはチョウ目とハエ目の害虫でそれぞれ、全報告件数の27.0%、25.1%を占める。以下の内訳は、カメムシ目ヨコバイ亜目 (Homoptera; 15.9%)、ダニ目 (11.0%)、コウチュウ目 (10.9%)、カメムシ目

(Hemiptera; 3.2%)、アザミウマ目 (2.0%)、その他 (4.9%) となっている。

抵抗性の報告件数を害虫種別に見ると、最も多いのは本プロジェクトでも取り上げられているコナガであり、862 件の報告がある。次いで、オオタバコガ (763 件)、ハスモンヨトウ (644 件)、タバココナジラミ (593 件)、シロイチモジヨトウ (525 件)、ナミハダニ (501 件) が続く。その他本プロジェクトに関連する害虫では、トビイロウンカ (410 件)、ワタアブラムシ (268 件) がトップ 20 害虫にランクされている。また、トップ 20 の害虫種に関する抵抗性の報告が最も多い国 (地域) は EU であり 3,520 件、次いでアメリカ合衆国 (2,621 件)、中国 (1,923 件)、パキスタン (1,693 件)、オーストラリア (677 件) と続き、日本は 453 件で 8 番目に多い国となっている。

*以上の数値は常に変化するもので、最新のデータについては IRAC のホームページ (<http://www.irc-online.org/pests/>) や Arthropod Pesticide Resistance Database (<http://www.pesticideresistance.org/search.php>) でご確認ください。

日本における薬剤抵抗性の状況については、農林水産省消費・安全局植物防疫課が 2016 (平成 28) 年度に行った、薬剤抵抗性病害虫・雑草の発生状況調査の結果が公表されている (白石, 2017)。この調査では、薬剤抵抗性の発達度合いを 4 つの指標 (フェーズ 0~フェーズ III) を用いて評価している。

フェーズ 0: 感受性低下は認められていないものの、モニタリング調査などにより薬剤抵抗性の発達を警戒している場合。

フェーズ I: 一部の圃場での現象にとどまっている状況。指導者には周知するが、農家への指導の必要性は低い。

フェーズ II: ある程度の面積規模で薬剤抵抗性の発達が見られており、農家への注意喚起を要する。(その程度の広がり度で注意喚起を行うべきかは、ケースバイケースであり、防除指導機関の判断による。)

フェーズ III: 県下で広域に広がり、対象薬剤の使用については何らかの指導が必要。

薬剤抵抗性が認められるフェーズ I~フェーズ III の報告件数が最も多かったのはナミハダニ (127 件) で、以下ミナミキイロアザミウマ (101 件)、ミカンキイロアザミウマ (27 件)、ネギアザミウマ (22 件)、トビイロウンカ (21 件)、タバココナジラミ (16 件)、イネドロオイムシ (10 件)、ヒラズハナアザミウマ (9 件)、コナガ (6 件)、チャノキイロアザミウマ (5 件) と続く。この調査は単年度の調査であり、世界の薬剤抵抗性害虫の累積報告数と単純に比較する事は危険であるが、それでも日本ではアザミウマ類の報告件数が非常に多い、コナガ以外のチョウ目害虫がトップ 10 に含まれていないなど、特有の状況が浮かび上がる。

(執筆: 刑部正博 園田昌司 山中武彦)

文献

- Alstad, D. N. and D. A. Andow (1995) Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 268: 1894-1896.
- Andow, D. A., D. N. Alstad, Y.-H. Pang, P. C. Bolin and W. D. Hutchinson (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.
- Bourguet, D., A. Genissel and M. Raymond (2000) Insecticide resistance and dominance levels. *J. Econ. Entomol.* 93: 1588-1595.
- Comins, H. N. (1986) Tactics for resistance management using multiple pesticides. *Agric. Ecosyst. Environ.* 16: 129-148.
- Coyne, J. A. (1951) Proper use of insecticides. *BMJ* 2: 911-912.
- Georghiou, G. G. and T. Saito (1983) Pest resistance to pesticides. Plenum Press.
- Gould, F. (1998) Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: Integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.* 43: 701-726.
- Groeters, F. R. and B. E. Tabashnik (2000) Roles of selection intensity, major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 93: 1580-1587.
- Huang, F., D. A. Andow and L. L. Buschman (2011) Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. *Entomol. Exp. Appl.* 140: 1-16.
- 葛西真治 (2009) 代謝酵素による解毒活性の増大. 分子昆虫学, ポストゲノムの昆虫研究 (神村 学, 日本典秀, 葛西真治, 竹内秀明, 畠山正統, 石橋純 編). 共立出版, 東京, pp. 365-370.
- 桐谷圭治 (2004) 「ただの虫」を無視しない農業. 築地書館.
- 駒形 修 (2009) 作用点の感受性低下. 分子昆虫学, ポストゲノムの昆虫研究 (神村 学, 日本典秀, 葛西真治, 竹内秀明, 畠山正統, 石橋 純 編). 共立出版, 東京, pp. 361-365.
- 河野義明・富田隆史 (1995) 殺虫剤抵抗性の分子機構. 応動昆 39: 193-211.
- REX Consortium (2012) Heterogeneity of selection and the evolution of resistance. *Trends Ecol. Evol.* 28: 110-118.
- 白石正美 (2017) 農林水産省における薬剤抵抗性対策に向けた取組状況. 植物防疫 71: 269-277.
- Smith, R. F. and W. W. Allen (1954) Insect control and the balance of nature. *Sci. Am.* 190: 38-42.
- 寒川一成 (2010) 緑の革命を脅かしたイネウンカ. ブイツーソリューション.
- 鈴木芳人 (2012) 殺虫剤抵抗性管理の原理. 植物防疫 66: 380-384.

- Sudo, M., D. Takahashi, D. A. Andow, Y. Suzuki and T. Yamanaka (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.
- Van Leeuwen, T., J. Vontas, A. Tsagkarakou, W. Dermauw and L. Tirry (2010) Acaricide resistance mechanisms in the two-spotted spider mite *Tetranychus urticae* and other important Acari: A review. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 40: 563-572.
- 山中武彦 (2015) 論文の紹介： 選択に異質性を持たせることが薬剤抵抗性の発達を遅らせる。農業と環境 178
(www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/magazine/178/mgzn17805.html).
- 山中武彦・須藤正彬・高橋大輔・鈴木芳人 (2015) 進化生態学的アプローチから薬剤抵抗性管理を考える。第 59 回日本応用動物昆虫学会要旨集：206(W072)
- 横田篤宜 (2014) EU における農薬事情-Regulation (EC) No.1107/2009-. 植物防疫 68:117-121.

1-2 薬剤抵抗性管理の考え方

1-2-1 薬剤抵抗性発達を抑制するための理論

害虫のように世代時間が短く増殖力も高い生物集団に、強烈な人為的な選抜を繰り返すと、必然的に抵抗性を獲得してしまう。仮に抵抗性が顕在化する前に対象害虫を根絶できたとしても、別のマイナー害虫が抵抗性を獲得して、顕在化する可能性がある。また、意図せず天敵類を排除してしまい、抵抗性害虫に有利な状況を作り出してしまいう可能性もある。実際に、害虫防除が殺虫剤頼みだった 1970 年代の日本や東南アジアでは、殺虫剤を散布すればするほど害虫が増えるリサージェンスが顕在化していた（桐谷, 2004; 寒川, 2010）。

抵抗性害虫の出現に対抗する一番わかりやすい方法は、選択圧を緩めること、つまり殺虫剤の使用を大幅に減らすことである。このようなアイデアは北米を中心として徐々に広まり、様々な物理的防除の併用や天敵の活用によって害虫個体数を許容できる範囲に抑えるという戦略がとられた。これは現在の総合的害虫管理（IPM）の考え方と同じであり、実際に IPM は抵抗性管理戦略に端を発している（Smith & Allen, 1954）。過剰な農薬散布を大幅に削減する原動力になった IPM は、現在も日本の栽培体系を考える基本であり続けている。とはいえ日本では見栄えの良い収穫物への嗜好が根強いいため、多くの作物では出荷前に防除を徹底する必要があり、抵抗性が発達しない程度まで化学合成農薬の散布を減少させることは難しい。

化学農薬有効成分の選択圧を緩める別の方法として、作用が異なる複数の薬剤を順番に散布するローテーションがある。ローテーションでは、一世代内もしくは数世代間で一つの剤を使い続けたら、次世代ないしその後の数世代には、交差抵抗性を持たない他の剤で防除を行う。産卵数や交尾活性、生存率等において抵抗性個体が野生型に劣る場合（抵抗性獲得による適応度コストが生じている場合）には、暴露されない期間を作ることで、その間に感受性個体が抵抗性を駆逐して優占することが期待できる（図 1）。周囲から感受性個体が流入する場合には、感受性回復の効果はさらに高まると考えられる。ローテーションは抵抗性管理理論の中でも特に歴史が古く（Coyne, 1951）、今でも殺虫剤抵抗性管理の中心的な理論として、IRAC（主要な農薬メーカーが中心の殺虫剤抵抗性対策委員会）から強力に推奨されている。

複数の剤を順番に組み合わせることで個々の剤の選択圧を弱めるローテーションは、直感的にも受け入れやすく IPM の体系にも組み込みやすい。先行する室内・ほ場試験の結果からも、その効果は認められている。しかし実際には様々な昆虫で、抵抗性獲得が適応度低下につながらない、つまり生存率や産卵

数が大きく低下しないケースが報告されている。このような害虫種では感受性の回復が見込めない可能性が高い。また抵抗性遺伝子は、特に薬剤の作用点に生じる単一の突然変異を原因とするものでは、劣性形質である場合が多い

(Bourguet et al., 2000)。劣性抵抗性遺伝子をヘテロで持つ個体が、適応度コストを負っていない場合には、選抜をやめた後も抵抗性遺伝子は集団中に長く潜在し続けると考えられる。このような状態で、再びもとの薬剤を使用すれば、数世代のうちに集団中に抵抗性が発達してしまうだろう。つまり、抵抗性が一度顕在化してしまった薬剤では、その再使用について慎重な検討を要する。

主として理論研究の立場からは、逆に選択圧を強めるほうが効率的に抵抗性を管理できるとする意見も根強い(鈴木, 2012; Sudo et al., 2018)。これを実現する手段が、高薬量施用および複数剤同時施用である。薬剤による防除(=選抜)が開始される前の野外の害虫集団では、抵抗性遺伝子を1対の染色体両方に持つホモ型はほとんど無く、抵抗性遺伝子を片方の染色体に隠し持つヘテロ型の個体が、抵抗性の運び手になっていると考えられる。高濃度(具体的にはヘテロ型の半数致死量を上回る程度)の薬剤を施用すれば、実質的にヘテロ型を劣性形質に追い込むことができ、その大部分を取り除けるため、抵抗性発達を効率的に遅らせることができるだろう(図2)。たとえ集団中に少数のホモ型個体が生き残ったとしても、圧倒的大多数の野生型と交配することでヘテロ型の子を作り、結局は次の高濃度薬剤による選抜で除去される。さらに複数の薬剤を高濃度で同時に施用すると、指数的に抵抗性発達を遅らせることができる(Comins, 1986)と考えられる。複数薬剤への抵抗性因子をホモで持つ個体は計算上、天文学的に少ないためである。

ただし、選抜された抵抗性ホモ個体が野生集団と十分に混ざらない場合は、高薬量施用・薬剤の複数剤同時施用により、逆に抵抗性選抜を強めてしまう危険性がある。また高濃度での複数薬剤の使用がコストや環境負荷を増加させるため、これまで殺虫剤の管理戦略としては国内の現場で実施されてこなかった。一方、米国など遺伝子組換え作物栽培を推進している国々では、Bt毒素を生産する遺伝子組換え作物(Bt植物)の管理において、感受性個体の供給源を確保するための保護区の併設を義務づけた高薬量/保護区戦略が中心的役割を果たしている。これはBt植物では輪作によるローテーションが難しいこと、植物体全身から高濃度の毒素を発現するため確実な高薬量施用が可能なことが理由である(Gould, 1998)。Bt植物が大規模に栽培されてから15年以上が経過したが、十分な保護区が確保される限り抵抗性が発達していないことが報告されている(Huang et al., 2011)。

この他、圃場や地域ごとに異なる薬剤をまく空間的モザイク戦略も提案されているが、まだその有効性については、十分な科学的データの蓄積がない。

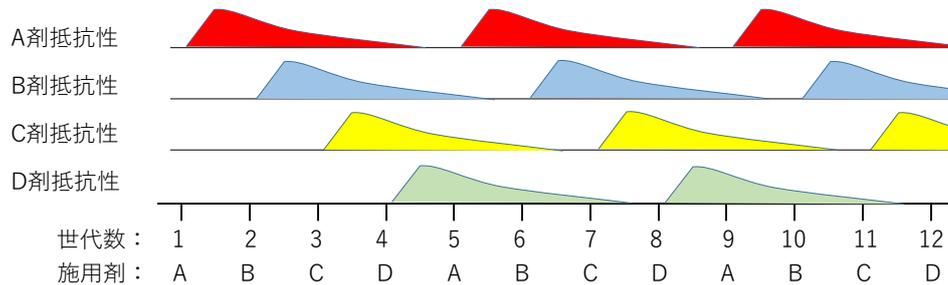


図1 ローテーションによる理想的な抵抗性管理. 山の高さが抵抗性発達度合いを示す. ある剤の使用後に一定の冷却期間を設けると抵抗性個体が感受性個体との競争に負ける、野生型が流入する等の現象により感受性が回復する可能性がある (Georghiou & Saioth, 1983).

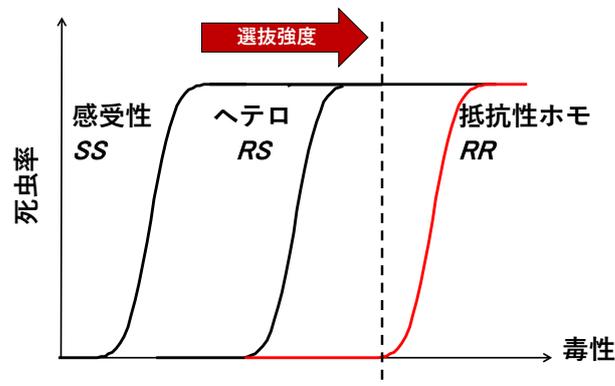


図2 高薬量戦略の概念図. 害虫の死虫率は遺伝子型と薬剤の濃度の双方によって決まる. 選抜強度を強くすることでヘテロ型が実質的に劣性となる状況を生み出し、集団に含まれる抵抗性遺伝子の大部分を除去できる (Alstad & Andow, 1995)

1-2-2 薬剤抵抗性管理戦略間の比較

どの殺虫剤抵抗性管理戦略が最も効果を挙げられるか、古くは1950年代から理論的・実験的なアプローチが数多く行われてきた。個々の知見が蓄積されていく一方で、研究者、殺虫剤メーカー、農家の間で総合的かつ合理的な共通認識には達していない。人工化合物全般の抵抗性を考える団体、REX コンソーシアムは殺虫剤・殺菌剤に対する抵抗性発達に関連する過去の学術論文を網

羅的に精査し、信頼できる理論研究（29件）と実証研究（17件）を選び、i)複数剤同時施用、ii)ローテーション、iii)モザイク、iv)1剤の連続施用による使い捨て、の4種類の施用法間での比較を行った（REX Consortium, 2012；山中, 2015）（表1）。その結果、理論研究では複数剤同時施用が圧倒的に優れており、ローテーションとモザイクがこれに次いだ。一方、実証研究では複数剤同時施用がローテーションよりやや有利だが、はっきりした優劣をつけがたく、どちらも使い捨てよりも効果が高かった。前提条件も実験設定も異なる他人の研究論文を、横並びにカウントして勝敗をつけるこの研究例の議論はやや乱暴であるが、全体的な傾向として複数剤同時施用の効果が一般的に高いことを示したことは重要である。

表1 先行理論・実践研究が結論した戦略の優劣一覧表（REX Consortium 2012）.

戦略比較 (1 vs. 2)		理論研究					実証実験			
1	2	n	1>2	1=2	1<2	?	n	1>2	1=2	1<2
複数剤同時	使い捨て	14	11	0	0	3	10	8	2	0
複数剤同時	ローテーション	16	14	0	1	1	8	2	5	1
複数剤同時	モザイク	7	5	0	1	1	1	1	0	0
ローテーション	使い捨て	7	3	4	0	0	9	7	2	0
ローテーション	モザイク	11	2	3	5	1	3	2	0	1
モザイク	使い捨て	3	2	1	0	0	2	1	0	1

1-2-3 害虫タイプ別モデルによる予測

理論研究の多くで高薬量施用・薬剤の複数剤同時施用の有効性が強調されている一方、IRACを中心とする農薬メーカーからはローテーションが推奨されており、現在まで統一された結論は出ていない。特に、選択圧を強める複数剤同時施用に関しては、農業現場からの同意を得にくく、理論研究と現場の不一致が存在する。この原因として、1.農業現場では様々な生活史を持つ複数の害虫に対応しなくてはならないが、過去の理論研究はおおむね一種類の生活史を対象としてきたこと、2.理論研究では抵抗性発達速度の予測を研究目標にしているが、実際の農業では害虫密度も低く保っていかなくてはならないこと、が挙げられる。

これらを解決する為、山中ら（2015）は抵抗性の遺伝子頻度だけではなく害虫密度を考慮し、さらに昆虫の多様な生活史に対応できる包括的なシミュレーションモデルを構築した。これまでの理論研究の知見をもとに、防除対象でな

い代替寄主（保護区）の有無や、生涯に経験する圃場間移動、交尾および薬剤による選抜など、抵抗性発達に関連する生活史イベントをモジュール化することで、基本構造を共有しながら各々の害虫タイプの特徴を組み込むことが可能になっている（図3）。この一連のモデルを使って、二つの殺虫剤が利用可能な場合の施用戦略、1.使い捨て（各剤を抵抗性が発達するまで連続施用する）、2.ローテーション（害虫世代毎に交互に施用する）、3.複数剤同時施用（害虫の世代期間内に同時に施用する）という3タイプの管理戦略が検討された。さらに地形的な設定として、薬剤散布圃場のみの場合（空間構造なし）、圃場と野外の保護区の二つのパッチを持つ場合（保護区設置）の2つの空間配置を考えた。

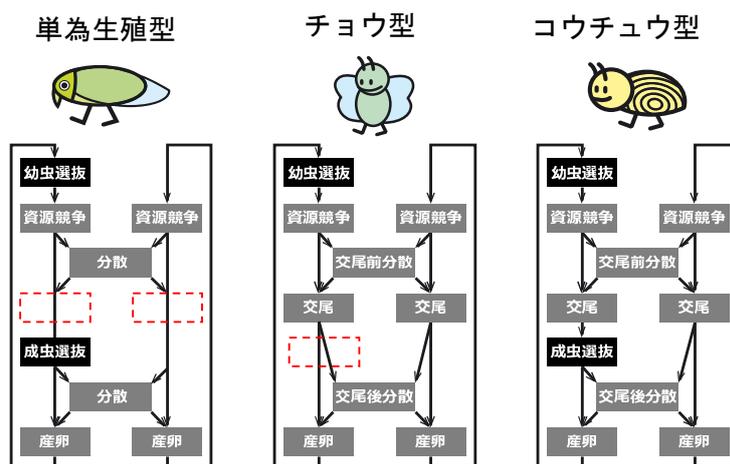


図3 抵抗性発達予測シミュレーションで検討した害虫タイプ（山中ら 2015）。単為生殖型（アブラムシ・アザミウマ等）は交配ステージを持たない、チョウ型（チョウ目）は成虫期に作物を摂食しない為、殺虫剤による成虫選抜がない。コウチュウ型（コウチュウ目・カメムシ目）は、交配し成虫選抜も幼虫選抜も起こる。

生活史によって分類した三つの主要な害虫タイプ、単為生殖型（アブラムシ・アザミウマ等）・チョウ型（チョウ目）・コウチュウ型（コウチュウ目・カメムシ目）についてシミュレーションを行ったところ、空間構造なしでも保護区を設置した場合でも、チョウ型、コウチュウ型など有性生殖する害虫では、複数剤同時施用がはるかに抵抗性発達を遅らせる予測結果となった。一方、ローテーションは、抵抗性発達を遅らせることは出来るものの、使い捨てに比べてちょうど2倍分程度の効果しかないことがわかった（表2）。単為生殖昆虫では何をやっても効果が低く、ローテーションによる引き伸ばし効果が見られるだけという予測となった。

表2 単純なシミュレーションによる害虫タイプ別戦略比較 (山中ら 2015).

	空間構造なし			保全区設置		
	使い捨て	ローテーション	複数剤同時	使い捨て	ローテーション	複数剤同時
単為生殖型	×	○	×	×	○	×
チョウ型	×	○	◎	×	○	◎
コウチュウ型	×	○	◎	×	○	◎

どちらかの薬剤に対する抵抗性遺伝子頻度が50%を超えた世代数を戦略の良否の判断基準とした。×：数世代内にブレイクダウンされる、○：数十世代は効果が持続する、◎：抵抗性発達を長期間遅らせることができる。空間構造がない場合でも、薬剤の掛けムラや打ち漏らしにより少数の感受性個体が生き残ると仮定した。

このシミュレーションは、抵抗性個体が野生型と同等の競争力を持っていると仮定している。一方、従来のローテーション戦略では抵抗性個体が産卵数や交尾活性、生存率で野生型に劣ることを前提にしていた (図1参照)。実際、抵抗性獲得による適応度コスト(寿命が短くなる、産卵数が減少するなどの不利益)は、抵抗性発達に大きな影響を持つと考えられるが、これをシミュレーションモデルに組み込むのは大変難しい。なるべく単純化したモデルで二つの薬剤の遺伝様式を表現しており、さらに適応度コストを取り入れようとする、不確かな仮定が数多く必要になるためである。

ここでは非常に限られた条件ではあるが、適応度コスト (2割の産卵数減少) を組み込んだシミュレーション例を紹介する。コウチュウ型で保護区設置の場合、適応度コストによって、ローテーションでも抵抗性発達がやや遅延する (図4下)。しかし複数剤同時施用がうまく機能する生活史タイプならば適応度コストを与えない場合ですら、適応度コストを与えたローテーションの10倍以上も、抵抗性発達を遅延できる (図4上)。さらに適応度コストが大きくなれば、ローテーションが複数剤同時施用より有効になるケースも出てくることもあるだろうが、多くの主要な害虫で適応度コストを調べた研究では、適応度の減少は多くの場合1割程度、最大でも4割ぐらいだろうと報告されている (Groeters & Tabashnik, 2000)。あまりに大きな適応度コストを持つ抵抗性害虫はそもそも、野外で集団を維持できないのであろう。つまり、多くの害虫における抵抗性問題では複数剤同時施用の優位性は揺らがないものと推察される。

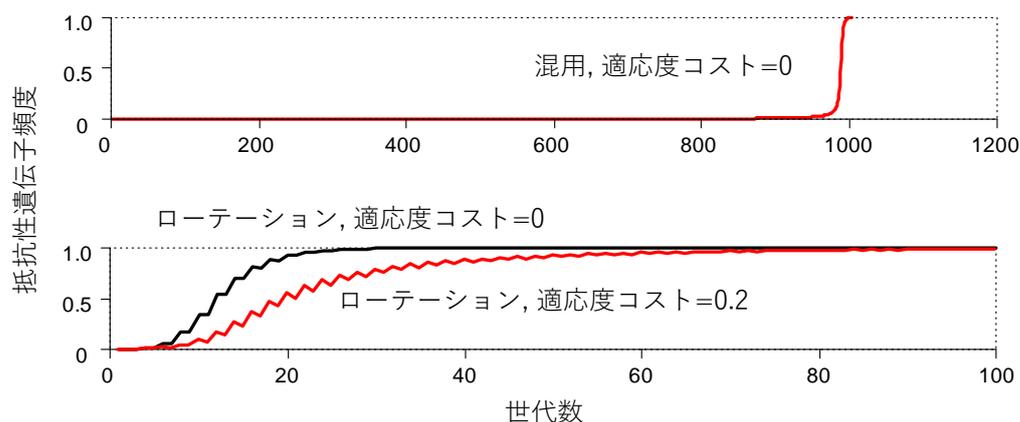


図4 害虫の抵抗性獲得による適応度コストが、複数剤同時施用・ローテーション戦略に与える影響（コウチュウ型、保護区設置の例）。上は混用、適応度コストゼロの場合、下はローテーション、適応度コストがゼロ（黒）と2割（赤）の場合。上下グラフの横軸縮尺が大きく違うことに注意。

1-2-4 まとめ

対象害虫に対してどの戦略を当てはめるのが良いかは、個々の特徴を考慮すべきであるが、ここでは害虫全般に当てはまる傾向をまとめる（表3）。IPMのメニューになっているフェロモン剤や気門封鎖剤などの物理的防除などは、減農薬を志向することで結果的に薬剤による選択の回数を減らす効果があるので、抵抗性管理に概ねプラスに働く。ただし化学殺虫剤の濃度を薄めて施用することは、抵抗性を潜在的に持つ害虫を温存して抵抗性発達を早める可能性があるため、絶対に避けるべきである。定められた処理量を守って散布回数を減らす、害虫の多発が見込まれる特定の部分、ほ場外からの侵入経路である周辺部などに、スポット的に規定の高薬量を散布すると、感受性個体や天敵の保護にもプラスであろう。

複数剤組み合わせ戦略の中では、高薬量・複数剤同時施用の効果が高いと考えられるが、散布剤ではコストや環境負荷の面で実施が難しいケースがあると考えられる。また登録以上の濃度では施用できない制約もある。IRACは、主要なターゲット害虫の世代時間をブロックと定め、隣り合うブロック間で殺虫メカニズムが似かよった剤を使わないようにする、ブロックローテーションの考え方を指導している（www.iraconline.org/content/uploads/DBM_Workshop_Diamide_MOA_Rotation.pdf、2017年1月確認）。もし3剤以上の剤が使用可能であるならばブロック間で剤を共有し

ないのと同時に、ブロック内でも世代内ローテーションを行うと、複数剤同時施用と同じ効果も見込まれるため非常に有効であると考えられる。

このほか初期徹底防除と収穫後の処理も、抵抗性管理に重要な意味を持つ。作期の最初、まだ害虫の密度が増加する前に徹底防除すれば、効果的に個体数を抑制できて全体の殺虫剤散布回数を減らすことができるだろう。また初期徹底防除に気門封鎖剤（須藤ら 2017）、施設栽培においては二酸化炭素（Miyata et al. 2016）や紫外線（Tanaka et al., 2016）などの物理的防除を使うことで、当該剤で同程度の防除効果を確保した場合よりも、抵抗性個体を除去できる確率が高まるため、作期中の化学薬剤による防除効果も上がる可能性がある。そして収穫後のハウスやほ場に残った作物残渣には、作物の生育期間中に撒かれた殺虫剤により、抵抗性を持つ個体が選抜され残っている可能性が高い。収穫後残渣を確実に土壤中にすき込むなどして害虫が生存できないようにする、収穫後の施設を高温処理するなどして施設内に残った害虫を外にださない、といった施設・ほ場管理上の方策も必要である。

表 3 抵抗性管理・害虫防除効果、環境負荷・コストから見た各戦略の甲乙

項目	抵抗性管理	害虫防除	環境負荷・コスト	備考
<i>IPM</i>				
殺虫剤を削減	○	×	○	小発生を許容できるのであれば、撒かないがベスト。濃度を薄めては絶対に×
フェロモン剤・物理防除	△	△	○	化学合成殺虫剤以外でも抵抗性は発達する。効果はマイルドであることが多い
天敵製剤	○	△	△	ややコスト高？タイミングが難しい
<i>複数剤組合戦略</i>				
ローテーション	○	○	△	確実に剤の数だけ寿命は伸びる。単為生殖害虫にも使える
高薬量・複数剤同時施用	◎	◎	×	有性生殖する害虫には非常によく効く。環境負荷とコストが課題。農業関連法令を遵守の上、規定の薬量の範囲内で
モザイク	△	△	△	まだよくわかっていない
<i>その他</i>				
初期徹底防除	○	○	○	個体数が増える前に防除すれば抵抗性個体も除去できるし散布回数も減らせる
収穫後の処理	○	○	×	収穫後残渣や収穫の終わったハウスは適切に処理して翌年の抵抗性の発生源にしない

（執筆：山村光司 須藤正彬 山中武彦）

文献

- Alstad, D. N. and D. A. Andow (1995) Managing the evolution of insect resistance to transgenic plants. *Science* 268: 1894-1896.
- Bourguet, D., A. Genissel, and M. Raymond (2000) Insecticide resistance and dominance levels. *J. Econ. Entomol.* 93: 1588-1595.
- Comins, H. N. (1986) Tactics for resistance management using multiple pesticides. *Agric. Ecosyst. Environ.* 16: 129-148.
- Coyne, J. A. (1951) Proper use of insecticides. *British Medical Journal* 2: 911-912.

- Georghiou, G. G. and T. Saito (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.
- Groeters, F. R. and B. E. Tabashnik (2000) Roles of selection intensity, major genes, and minor genes in evolution of insecticide resistance *J. Econ. Entomol.* 93: 1580-1587.
- Huang, F., Andow, D.A., and Buschman, L.L. (2011) Success of the high-dose/refuge resistance management strategy after 15 years of Bt crop use in North America. *Entomologia Experimentalis et Applicata* 140: 1-16.
- 桐谷圭治 (2004) 「ただの虫」を無視しない農業. 築地書館.
- Miyata, K., Kikuchi, T., Katoh, H., Kagawa, K., Sonoda, S., and T. Murata (2016) Lethal effects of concentrated CO₂ on adult females and eggs of *Frankliniella occidentalis* and *Frankliniella intonsa* (Thysanoptera: Thripidae) at a high temperature. *Appl. Entomol. Zool.* 51: 441-444.
- REX Consortium (2012) Heterogeneity of selection and the evolution of resistance. *TREE* 28: 110-118.
- Smith, R. F. and W. W. Allen (1954) Insect control and the balance of nature. *Scientific America* 190: 38-42.
- 寒川一成 (2010) 緑の革命を脅かしたイネウンカ. ブイツーソリューション.
- 鈴木芳人 (2012) 殺虫剤抵抗性管理の原理. 植物防疫 66: 380-384.
- 須藤正彬・中野亮平・土井誠・今村剛士・國本佳範・刑部正博 (2017) エトキサゾール抵抗性ナミハダニの代替防除手段としての気門封鎖剤：土耕イチゴでの検証. 第26回日本ダニ学会大会：講演番号16
- 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.
- Tanaka, M. et al. (2016) Physical control of spider mites using ultraviolet-B with light reflection sheets in greenhouse strawberries. *Journal of Economic Entomology* 109: 1758-1765.
- 山中武彦 (2015) 論文の紹介：選択に異質性を持たせることが薬剤抵抗性の発達を遅らせる. 農業と環境 178
(www.naro.affrc.go.jp/archive/niaes/magazine/178/mgzn17805.html).
- 山中武彦・須藤正彬・高橋大輔・鈴木芳人 (2015) 進化生態学的アプローチから薬剤抵抗性管理を考える. 第59回日本応用動物昆虫学会要旨集：206(W072)

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。

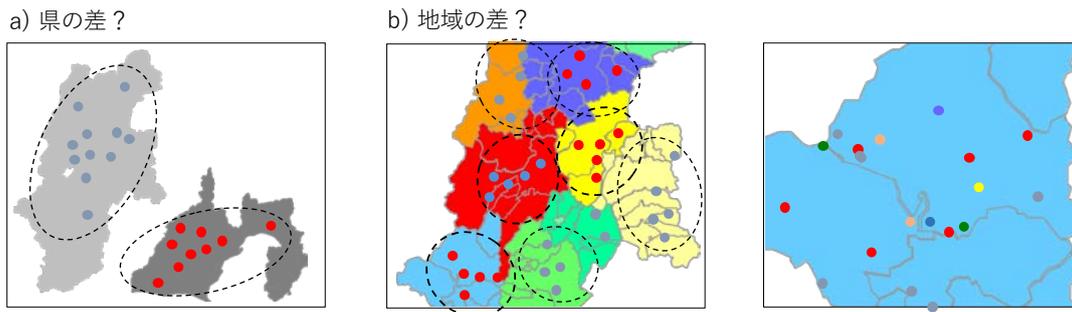


図1 害虫の移動性・対象作物栽培体系により抵抗性の発達スケールが違う。それぞれのケースにあったサンプリングを行うことが抵抗性管理戦略の決定に重要である。

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%と推定するのには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。

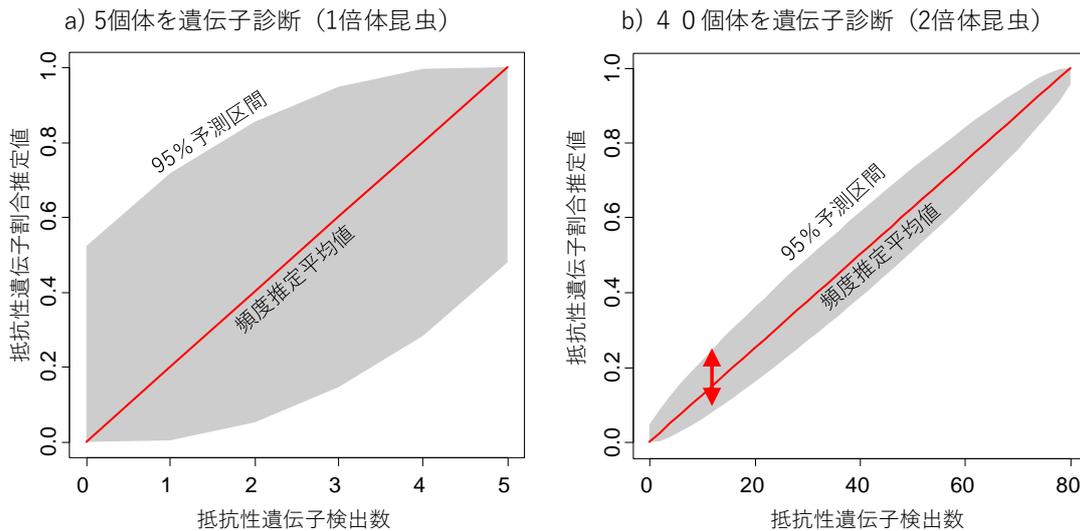


図2 遺伝子診断は見えない野外集団の抵抗性を推定する作業である。極少数、例えば5個体を調べても不確実性が高くはっきりした結論は出ない（左）。2倍体昆虫の遺伝子ペアを認識できる場合、10%の抵抗性遺伝子頻度を5%~20%内の精度で結論したいならば、40個体が必要である（右、赤矢印）。

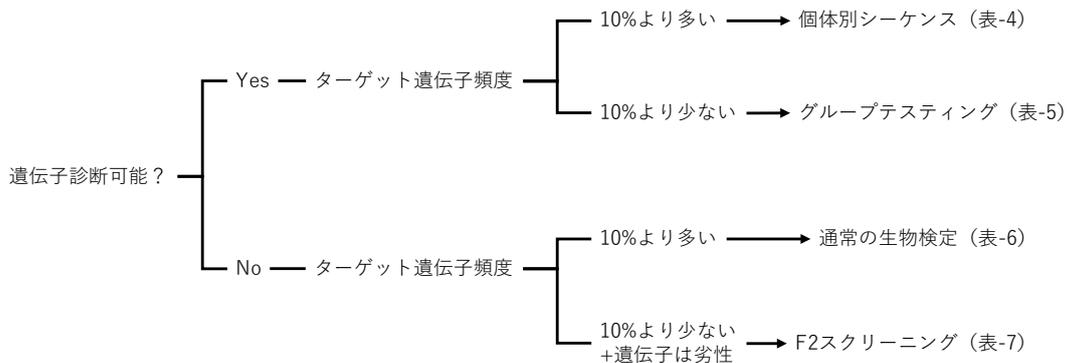


図3 サンプルング・診断手法選択のフローチャート。

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

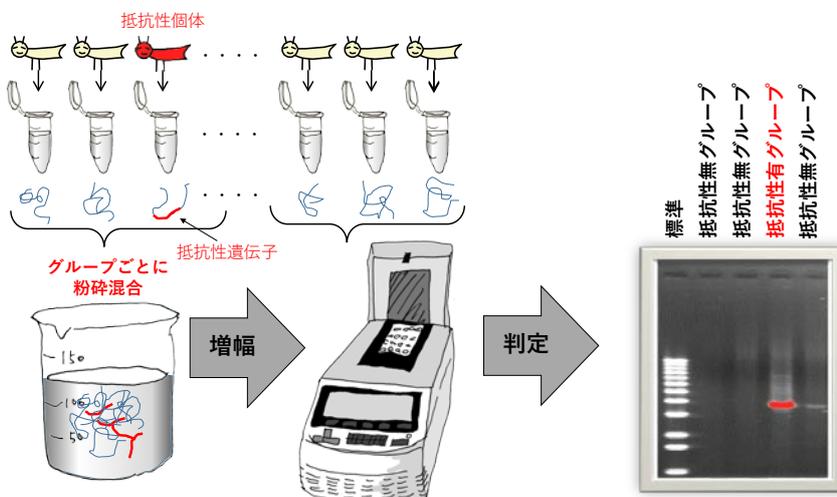


図4 複数のサンプルをまとめてPCRで遺伝子診断を行えば、少ない回数で抵抗性率を推定することができる。

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

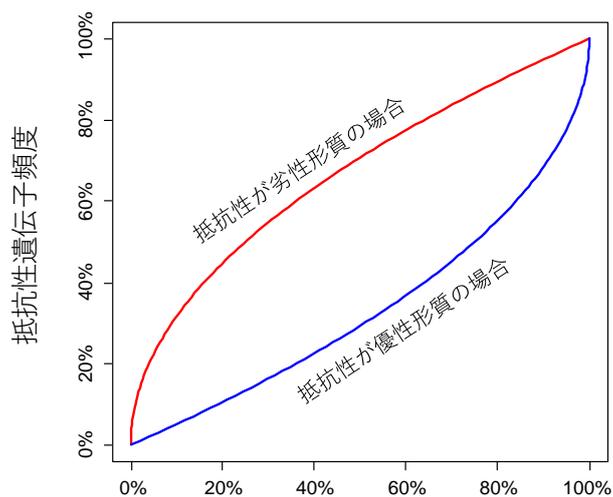


図 5 生物検定における死亡率と抵抗性頻度の関係。抵抗性遺伝子が優性形質なら青線、劣性形質なら赤線となる。抵抗性は多くの場合劣性形質なので(赤線)、死亡率がかなり低くても、抵抗性遺伝子が存在する可能性がある。

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。

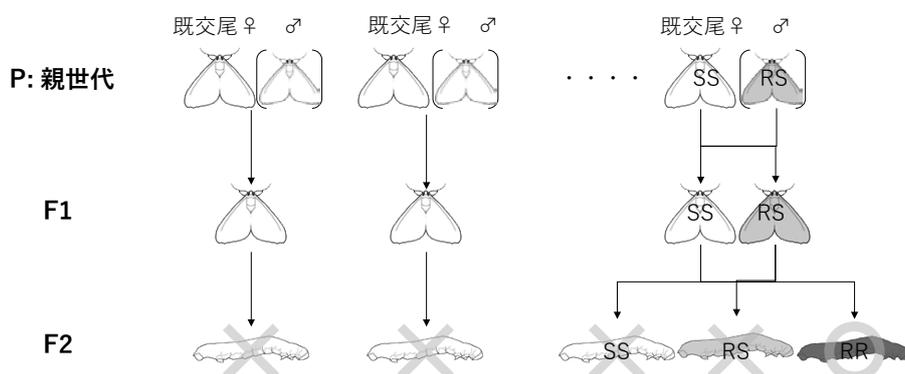


図 7 F2 スクリーニング法の概念図。交尾雌を多数捕獲して、採卵し F1 を飼育して成虫まで育て兄弟交配し F2 を選抜する。低頻度の抵抗性遺伝子はヘテロ (RS) の状態で野外に存在し、その交配相手はほぼ間違いなく野生型である (SS)。抵抗性ヘテロ (RS) と野生型 (SS) の子供 F1 は SS:RS = 1 : 1 の割合となるが、抵抗性ヘテロは薬剤感受性のため選抜できない。F2 まで飼育して初めて抵抗性ホモ (RR) を得ることが出来る。

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%(3.5-2.4%)	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間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。

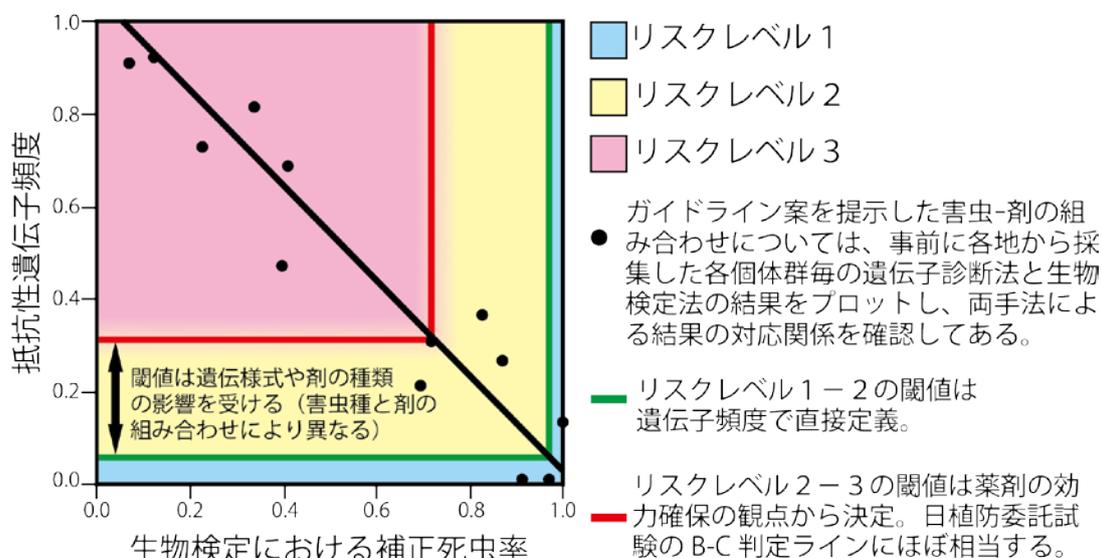


図8 リスクレベルの区分けの概念図。

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)

1-4 遺伝子診断による抵抗性遺伝子検出の概要

はじめに

害虫の殺虫剤感受性検定には、生物検定法が広く用いられているが、近年、新たな手法として遺伝子診断法が注目されている。遺伝子診断法の開発には、抵抗性発達の分子メカニズムの解明が前提となる。主たるメカニズムは生理生化学的要因、とりわけ解毒代謝活性の増大あるいは作用点の薬剤感受性の低下であるとされているが、近年、様々な害虫種において殺虫剤抵抗性の発達要因となる遺伝的変異が突き止められている。遺伝子診断法は、各種殺虫剤の作用点あるいは解毒代謝酵素の遺伝子コード領域で生じた一塩基多型 (SNP) 部位など、感受性系統と抵抗性系統とで遺伝的組成が異なる部位をターゲットとして開発される。ここでは、遺伝子診断における共通技術を示すと共に、遺伝子診断として用いられる手法の実例、およびその長所と短所について述べる。

1-4-1 遺伝子診断における共通技術

1 DNA 抽出・精製法

DNA の抽出・精製法には、溶液からタンパク質を取り除き、核酸 (DNA や RNA) を抽出するフェノール・クロロホルム法など様々な手法がある。また、昆虫類の DNA 抽出に適したキットが様々な製品として市販されており、そのマニュアルに従えば特に熟練した技術を必要とせず、純度の高い DNA を抽出・精製することができる (例えば、DNeasy Blood and Tissue kit (キアゲン社))。

一方、薬剤抵抗性遺伝子診断では、純度は低くなったとしても、コストがかからず、簡便かつ迅速に DNA を抽出する手法が有効である。虫体を溶液中ですり潰して加熱するだけの工程で DNA を粗抽出できる試薬が市販されており、本プロジェクトにおいても活用されている (例えば、Prepman Ultra Reagent (ライフテクノロジー社))。また、より安価な方法として、核酸を用いた生化学実験でよく用いられる TE 緩衝液 (Tris-HCl と EDTA の混合液) のみで DNA を粗抽出することもできる。

2 電気泳動

アガロース (寒天) あるいはアクリルアミドを使用したゲルに PCR 産物を注入、通電し、核酸をその大きさに応じて分離する手法。ゲル中では分子量の小さなものほど流れやすいことから、分子量の差が泳動距離の差となって現れる。次節で述べる対立遺伝子特異的 PCR、PCR-RFLP 法、マルチプレックス PCR 法などで使用する。一方、リアルタイム PCR 法や量的シーケンス法は電気泳動を必要としない技術である。

3 PCR 産物の染色および観察

電気泳動を終えたゲルは、臭化エチジウム溶液あるいは Gel Red (Biotium 社) などの核酸染色試薬を TAE 緩衝液 (TE および酢酸からなる試薬)、または TBE 緩衝液 (TE およびホウ酸からなる試薬) で希釈した溶液中に浸漬し、DNA を染色する。核酸染色試薬をあらかじめゲルや電気泳動槽内のバッファーに添加し、電気泳動と同時に染色することもできる。染色を終えたゲルは、紫外線 (UV) 照射装置で紫外線を照射し、蛍光発色した PCR 産物を観察・撮影する。

1-4-2 遺伝子診断に用いられる手法

1 対立遺伝子特異的 PCR

対立遺伝子特異的 PCR は、PASA 法とも呼ばれ、抵抗性対立遺伝子に特異的な PCR プライマーを設計して、抵抗性、感受性両対立遺伝子に適合する共通プライマーとの PCR により、増幅産物が得られるか否かで診断する手法である。遺伝子診断の基本的な手法であり、開発も比較的容易であるが、この手法を応用したマルチプレックス PCR 法の形で用いられることが多い。

2 PCR-RFLP 法

RFLP は制限酵素断片長多型 (Restriction Fragment Length Polymorphism) の略であり、特定の短い塩基配列を認識して DNA を切断する制限酵素によって切断された DNA の断片長が示す多型、あるいはそれを検出する手法を意味する。PCR-RFLP 法とは、PCR で増幅した DNA 断片を制限酵素で消化し、生じる断片長のパターンから比較対象を分類する手法である。

この手法の長所は、条件設定に手間取ることが無く、再現性に優れることである。また、2 倍体の生物であれば、抵抗性遺伝子をホモ接合体で保有するか、ヘテロ接合体で保有するかを判別することも容易である。一方、短所は検出しようとする多型部位が市販の制限酵素の認識配列に一致することが条件となるため、適当な酵素がなければ適用できないこと、PCR 増幅工程に制限酵素処理工程が加わるため、時間が余計にかかること等である。

この手法は、チャノコカクモンハマキの IGR 剤抵抗性遺伝子診断 (2-2 節)、トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性遺伝子診断 (2-6 節) で用いられている。

3 マルチプレックス PCR 法

マルチプレックス PCR とは、複数の異なる PCR 反応を同一チューブ内で行い、目的とする複数の DNA 断片を特異的に増幅する手法である。通常の PCR が 1 対のプライマーセットで行われるのに対し、マルチプレックス PCR では 2 対以上のプライマーセットが用いられる。

この手法の長所は、一度の PCR で診断結果を得ることができ、PCR-RFLP 法

に比べ、短時間での診断が可能となること、複数の領域を同時に増幅可能であることから、サンプルからの DNA 抽出の成否も同時に検証することも可能であること等である。一方短所は、判別法の開発段階において、目的通りのバンドパターンを得るための PCR 条件の最適化が困難な場合があることである。

この手法は、コナガのジアミド抵抗性遺伝子診断 (2-1 節)、ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断 (2-3 節)、ネギアザミウマの合成ピレスロイド剤抵抗性遺伝子診断 (2-4 節) で用いられている。

4 リアルタイム PCR 法

リアルタイム PCR とは、蛍光物質を利用し、PCR 反応によって増幅された DNA の量を即時的に測定しながら行う PCR のことである。定量的な解析だけでなく、一塩基多型 (SNPs) を検出する定性的な解析もできる。蛍光検出方法には、蛍光標識プローブを用いる方法とインターカレーターを用いる方法の 2 通りがある。蛍光標識プローブを用いる方法には多くの種類があるが、TaqMan プローブ法が最も一般的であり、特異的な 20 塩基対かそれ以下の短い配列の DNA (オリゴヌクレオチド) に蛍光色素を結合させたプローブを用いる。一方、インターカレーター法は 2 本鎖 DNA に結合する色素 (主に SYBR Green I) を PCR 反応液に混ぜ、ポリメラーゼによって合成された 2 本鎖 DNA を検出する方法である。

この手法の長所は、電気泳動を必要としないことから時間の短縮が図れること、コンタミネーションのリスクが低いこと、集団単位での抵抗性対立遺伝子頻度解析が可能なことなどが挙げられる。一方短所として、専用の機器類を必要とすることが挙げられるが、近年その普及は進みつつある。

この手法は、ハダニのエトキサゾール抵抗性遺伝子診断 (2-5 節) で用いられている。

5 量的シーケンス法

量的シーケンシング (Quantitative Sequencing: QS) 法は、一塩基多型部位におけるシーケンスシグナルのピーク比をもとに抵抗性対立遺伝子の割合を求め、抵抗性の程度を推定する方法である。集団単位で抽出した DNA の一塩基多型部位を含む領域を PCR 増幅し、DNA シーケンサーを用いて解析する。

この手法の長所は、集団中に含まれる抵抗性遺伝子の割合を把握することができるため、個体単位ではなく集団単位での解析が可能になることにある。一方短所は、解析に時間を要すること、抵抗性対立遺伝子頻度が低い場合の検出感度が高くないこと等があるが、高頻度の値を閾値に設定した解析には支障はない。

6 次世代シーケンサーによる大規模遺伝子診断法

PCR 法による薬剤抵抗性遺伝子の判別は、実施が容易であるという大きな利点があるが、一度に一つの遺伝子のみが診断可能という制限がある。このため、

複数の薬剤の抵抗性を診断する場合には対象薬剤の数だけ診断を繰り返す必要があり、大量個体の迅速な診断が難しい（薬剤抵抗性が複数の遺伝子変異に起因する場合には変異の数に応じて更に診断回数が増える）。本プロジェクトでは、この問題を解決するための次世代遺伝子診断手法として、次世代シーケンサーを活用した大規模遺伝子診断法の開発に取り組んでいる。この手法の長所は、大量の害虫個体（数百個体以上）を対象に、既知の複数の薬剤抵抗性に関するすべての遺伝子変異の有無を個体単位で診断可能であり、かつ、短期間（数日程度）で実施可能であることにある。これは、次世代シーケンサーにより、大量個体を対象に PCR 法による数千回分以上の遺伝子診断に相当する規模の塩基配列を一度にまとめて解読することで実現される（図 1）。これにより、将来的に、各地の害虫集団における各薬剤の抵抗性診断をより迅速かつ高精度で実施することが可能となる見込みである。一方、短所は、次世代シーケンサーおよびバイオインフォマティクス解析用コンピュータを必要とするため、診断を実施可能な施設が限定されるという点である。このため、この手法は、これらの設備を備えた解析センター等における一箇所集中的な診断の実施といった形での利用形態が想定される。

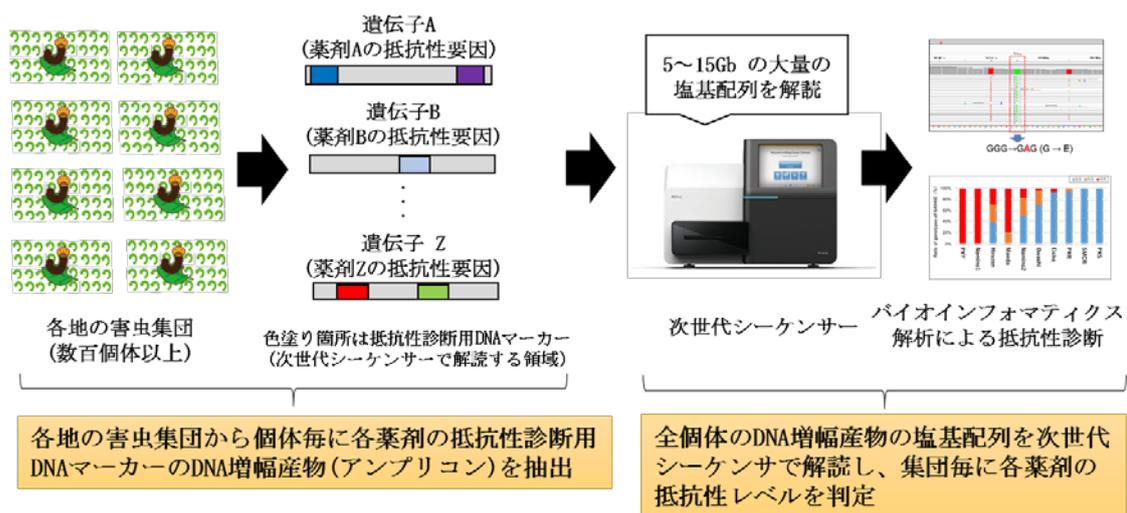


図 1 次世代シーケンサーを用いたマルチプレックスアンプリコンシーケンシング法による大規模遺伝子診断法の概要.

1-4-3 遺伝子診断の利点と問題点

殺虫剤抵抗性の遺伝子診断には以下のような長所がある。

- 1 遺伝子診断では薬液による溺死や虫の栄養状態など、薬剤の殺虫効果以外の死亡要因を考慮する必要がなく、抵抗性個体（遺伝子）の割合を正確に測定

することが可能である。また、生物検定法では一定数の健全な個体を必要とするため、場合により野外採集虫の短期間の飼育、増殖が必要となる。これは個体群の遺伝的構成の変化を導き、感受性程度が変動する可能性がある。これに対し、遺伝子診断では採集時点の感受性程度が反映される。

- 2 遺伝子診断は死亡虫でも解析できるため、採集虫を液浸標本等で輸送・保存することも可能であるなど、サンプリングおよび取り扱いが容易である。また、発消長調査用のフェロモントラップ（粘着板）や黄色水盤等による捕捉虫等でも診断することができる。
- 3 個体ごとに複数の殺虫剤抵抗性を評価することが可能であり、複合抵抗性の発達を個体レベルで把握することも可能である。

一方、遺伝子診断の短所としては、以下のような点が挙げられる。

- 1 作用点抵抗性は、殺虫剤グループごとに抵抗性の分子メカニズムが異なる。したがって、診断法を開発するためには各々の抵抗性メカニズムを解明し、それぞれについて遺伝的変異の存在を明らかにする必要がある。
- 2 一般に、シトクロム P450 などの解毒代謝活性増大に起因する殺虫剤抵抗性の遺伝子診断法の開発は困難である。
- 3 抵抗性の発達が作用点抵抗性と解毒代謝活性の増大等との複合要因により生じている場合、単一の遺伝子診断では野外個体群の感受性程度を正確に診断できない可能性がある。

本プロジェクトにおける薬剤抵抗性管理のためのガイドライン案で使用する遺伝子診断法は、これらの制約を考慮に入れ、状況に応じて最適な診断技術が選択されている。より詳細な技術情報は中山（1996）などの書籍を参照されたい。

（執筆：土田聡 上樂明也）

文献

中山広樹（1996）バイオ実験イラストレイテッド 3 本当にふえる PCR（目で見える実験ノートシリーズ）秀潤社 201p

1-5 生物検定法の種類と各手法に必要な計算手法の概要

1-5-1 生物検定法の種類

害虫やハダニ類の薬剤感受性の生物検定法については、これまで様々な手法が確立されており、それぞれの害虫に対して適している手法が第5章に紹介されている。ここでは、生物検定法のタイプ分けと、それぞれの手法でどのような薬剤感受性の指標となる数値を計算すべきかについての概略を述べる。

生物検定法は、昆虫やハダニ類の虫体に殺虫剤を直接処理する手法と、餌となる寄主植物に殺虫剤を処理し、そこに供試虫を放飼して死虫率や行動阻害を見る手法に大きく分けられる(表1)。前者の直接処理する手法には、薬液を塗布したり(局所施用法)、経口投与あるいは体内に注入する手法、虫体を薬液に浸漬あるいは粉衣、散布する手法がある。後者の間接的に処理する手法には、葉片や葉身、葉しょうなどを薬液に浸漬して風乾し、そこに供試虫を放飼する手法などがある。

多くの殺虫剤は害虫に対して致死作用を及ぼすため、生物検定では通常は殺虫剤の薬量や濃度と死虫率との関係を調査する。しかし、殺虫剤の中には致死作用としての働きは小さいものの、摂食・吸汁行動や産卵行動を阻害する作用を示すものがある。このような殺虫剤については、殺虫剤の薬量や濃度と行動阻害程度、あるいは薬剤を処理した成虫が産んだ卵や幼虫の数との関係を調査する。

これらの生物検定法で調べた薬量や薬液濃度と死虫率あるいは行動阻害程度との関係を示す指標は、死虫率の場合には50%致死薬量(50% lethal dose, LD₅₀値)と50%致死濃度(50% lethal concentration, LC₅₀値)、行動阻害程度の場合には50%効果薬量(50% effective dose, ED₅₀値)と50%効果濃度(50% effective concentration, EC₅₀値)がある。直接処理法のうち、供試虫に施用した薬剤の薬量がわかるもの(薬液塗布、経口投与、注入法など)については、50%致死薬量(LD₅₀値)または50%効果薬量(ED₅₀値)が計算できる(表1)。一方、直接処理法であっても供試虫が摂取した薬量が明らかではないもの(虫体に液浸、粉衣、散布)や間接処理法については、50%致死濃度(LC₅₀値)または50%効果濃度(EC₅₀値)が計算できる(表1)。

表 1 生物検定法の処理法、観察項目の違いと計算指標 (LD₅₀値, LC₅₀値, ED₅₀値, EC₅₀値)^{a)}との関係

薬液処理の手法	具体的な処理法の例	観察項目	
		死虫率	行動阻害程度
直接処理法	薬液塗布 (局所施用法)	LD ₅₀ 値	ED ₅₀ 値
	経口投与	LD ₅₀ 値	ED ₅₀ 値
	注入法	LD ₅₀ 値	ED ₅₀ 値
	虫体に液浸, 粉衣, 散布	LC ₅₀ 値	EC ₅₀ 値
間接処理法	葉片浸漬, 葉しょう浸漬	LC ₅₀ 値	EC ₅₀ 値
	餌や土壤に混ぜる方法	LC ₅₀ 値	EC ₅₀ 値

^{a)} LD₅₀値: 50%致死薬量, LC₅₀値: 50%致死濃度, ED₅₀値: 50%効果薬量, EC₅₀値: 50%効果濃度

1-5-2 計算手法

殺虫剤感受性の生物検定の結果のまとめ方として、殺虫剤の薬量または濃度と死虫率との間に S 字型の反応曲線が書ける場合には LD₅₀ 値、LC₅₀ 値を計算する。この計算には、Bliss(1934)や Finney(1952)が開発したプロビット法 (probit analysis) を用いるのが一般的である。

プロビット法では、死虫率をプロビットに変換した上で、薬量または濃度と死虫率との関係について回帰を行う。その際、無処理区 (対照区) に死虫がある場合には、Abbott (1925)の補正などを行う。回帰式から 50%致死薬量(LD₅₀ 値)あるいは 50%致死濃度 (LC₅₀ 値) が計算できる。また、これらの値の信頼限界値やプロビット回帰直線の傾き (*b*) も計算できる。プロビット法の理論及び具体的な手順についてはここでは省略するが、菅原(1959)、楯谷(1970)、Robertson et al. (2017)を参照されたい。

プロビット回帰については、手計算によっても可能であるが、市販ソフトウェアや SAS、R などのプログラミングツール、あるいはエクセルのマクロ等でも計算できる。市販のソフトウェアについては、PoloPlus Ver. 2 (Leora Soft Company, 2003)が標準的なソフトウェアである。このソフトウェアは Robertson et al. (2017) の筆頭著者が開発したもので、これまで Web サイトを通じて開発者自身が販売していたが、開発者が 2014 年に逝去されたため、現在入手が困難となっている。プログラミングツールやエクセルのマクロを使う場合には、菅原(1959)、楯谷(1970)、Robertson et al. (2017)などの解説に掲載されている計算例を用いて、実際の計算値を検証してから使うのがよい。

ED₅₀ 値や EC₅₀ 値の計算については、行動阻害程度などが死虫率と同じような指標で計算できる場合には、上記のプロビット法を用いるのがよい。しかし、行動阻害程度を次世代幼虫数などで観察する場合には、無処理区の幼虫数に対して 50%の虫数に抑制した薬量あるいは薬液濃度の値を求める必要がある。ウンカ類に対して吸汁阻害作用を示すピメトロジンの ED₅₀ 値の計算手法が、九州沖縄農業研究センター(2016)に掲載されているので参照されたい。

(執筆: 松村正哉)

文献

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265-267.
- Bliss, C. I. (1935) The calculation of the dosage-mortality curve. *Ann. Appl. Biol.* 22: 134-167.
- Finney, D. J. (1971) *Probit Analysis*, 3rd ed., Cambridge University Press, New York.
- 九州沖縄農業研究センター (2016) イネウンカ類の薬剤感受性検定マニュアル.
http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/072957.html
- Robertson, J. L., M. M. Jones, E. Olguin and B. Alberts (2017) *Bioassays With Arthropods*, 3rd edn., CRC Press, Boca Raton, FL.
- LeOra Software Company (2003) *PoloPlus: Probit and logit analysis. User's guide*, Version 2.0. LeOra Software Company, Petaluma, CA.
- 菅原寛夫 (1959) プロビットの計算. 昆虫実験法 (深谷昌次・石井象二郎・山崎輝男 編), 日本植物防疫協会, 東京, pp.700-707.
- 楯谷昭夫 (1970) LD₅₀ の意味とその計算法. 植物防疫 24: 431-435.

1-6 薬剤抵抗性管理における現場指導の留意点

はじめに

薬剤抵抗性の問題は栽培現場で顕在化している問題であり、本ガイドライン案により具体的な抵抗性管理を指導するのは主に普及指導員や営農指導員である。そこで、本ガイドライン案を実践的に活用してもらう上で留意しておくべき点を4つ挙げる。

- ・ 農薬取締法に基づき定められたルールを守る。—濃度、対象作物の遵守—
- ・ 栽培現場の薬剤散布の実情を踏まえる。
- ・ 農薬散布時の薬液付着が確保されている。
- ・ 生産者の防除が結果的に抵抗性管理になるように誘導する。

1-6-1 定められた濃度、対象作物の遵守

食用作物または飼料作物に農薬を使用する場合には、1. 適用作物以外には使用しない、2. 使用量または使用濃度を守る、3. 使用時期を守る、4. 総使用回数を超えて使用しない、の4点が農薬使用者の遵守義務である（農薬取締法第12条の3）。

栽培現場では、その薬剤の効果が低くなってきたと感じると、濃度を高くする誘惑があるかもしれない。しかし、それは定められた使用濃度の範囲内で可能なことである。これを超えた濃度での散布は農薬取締法に違反し、その農作物は流通させることはできない。

また、生産量が少ないマイナー作物では、登録農薬数が少ない。抵抗性管理の面からは特定の農薬の連用は望ましくない。しかし、たとえ効果があることがわかっている異なる作用機構の薬剤でも対象作物に登録がない場合は使用できない。

栽培現場で大きな問題である薬剤抵抗性であるが、その管理手段はあくまでも農薬のラベルに記載された使用法の範囲内で行わねばならない。

1-6-2 栽培現場での薬剤散布の実情

抵抗性管理のためには、薬剤散布による防除の失敗が感受性低下に起因するものか、単に薬液の付着が不十分で効果がなかったのかを区分する必要がある。付着が不十分な状態で散布を継続すると、害虫の個体数回復も早くなり、結果的に薬剤散布回数が増えることになる。しかし、栽培現場では薬剤散布後に薬液の付着状況が確認されることはほとんどない。日本では園芸作物に対する薬剤散布において乳剤や水和剤など液剤が散布される場合が多い。そのほとんどが多量の水に農薬を希釈し、動力噴霧機を用いて散布する多量散布である。このため、

多くの生産者は勢いよくノズルから出る霧状の薬液と、作物の葉表から滴る薬液を見て、対象作物の全ての部位に薬液が付着したと考えてしまいがちである。しかし、ハダニなどが主に寄生する葉裏の付着量は概して少ない。

さらに、防除が分業化されていない日本では、薬剤散布作業も生産者自身が行わなければならない。生産者は日常の肥培管理、整枝、剪定、収穫、調整など様々な作業を行っている。また、集落内での出役作業や自治会活動などの役員になっている場合も多い。これらの日常作業や行事の合間を縫って行われる薬剤散布作業は、その付着精度よりも早く作業を終えることが重視される。

一方、殺虫剤を散布して対象害虫を防除するためには、1. 対象害虫の生活環と生息場所等を理解して散布時期や散布時に狙う場所を把握している、2. 生産者が使用している散布器具・散布条件・散布技量等で確実に生息場所に薬液が到達している、3. 使用している薬剤の効果がある、の3点が必要である。1. は様々な害虫の生態研究の結果がまとめられている。2. は感受性検定により把握が可能である。しかし、上述のように3. は把握されていない場合が多い。このため、まず、生産者の薬剤散布技量で確実に目標部位に付着しているかの確認が必要となる。具体的には感水紙（Water-sensitive paper、スプレーイングシステムジャパン、図1）を目標部位に設置してから散布する方法（國本・井上、1996）などがある。

1-6-3 散布動作の改善による薬液付着の向上

目標部位に十分に薬液が付着していない場合の原因は幾つか考えられる。作物の生育ステージや形状に応じたノズルの選択の誤り、散布圧が高すぎる、散布動作が好ましくない、などである。このうち、散布動作の改善が最も難しいが、付着向上には非常に有効である。

現在、薬剤散布動作を指導する機関はほとんどなく、多くの生産者は独学で薬剤散布動作を習得している。しかも、散布動作を第三者から見られる機会がほとんどない。このため、動きは滑らかだが、合理的な散布動作ではない場合もある。

道具を用いる動作改善はゴルフやテニス等のスポーツにおける技術上達法として古くから研究されてきた（例えば、山崎、1971）。その基本は、以下のよう

- ・習得しようとするフォームやテクニックが頭の中に明確にある。
- ・反復練習を行う。
- ・本人の意識、感覚と実際の動作との間の誤差を正しく修正する。
- ・良い条件で練習を行う。
- ・本人の意欲、心構えが確立されている。

これらを参考に薬剤散布動作を見直すことで、薬液付着の向上を図ることは

可能である（図 2）。具体的には生産者圃場で、生産者の散布器具を用いて、望ましい薬剤散布動作を示し、どのような点に注意しているかを説明する（図 3）。生産者自身に自分の動作とどのような点が違うか気づいてもらい、その動作ができるようになるまで、第三者が観察しながら助言する。抵抗性管理の前に、まず、確実な薬液付着を確保したい。

1-6-4 抵抗性管理への誘導を意識しての指導

生産者の営農目的は作物栽培による収益確保であり、病害虫管理ではない。まして抵抗性管理を主体的に考える栽培者は少ない。防除暦に従って散布をすれば、薬剤の選択で悩むこともなく、とりあえず病害虫管理ができると考えている生産者が多い。現場指導者が生産者に正面から抵抗性管理の重要性を説いても理解が得られるとは限らない。まず、生産者が病害虫管理をどのように考えているのかを聴き、それを認める所から始めなければならない。その上で、

1. 指導対象圃場で使用している各種薬剤の感受性の現状
2. 生産者および生産者が加入する出荷団体等の販売戦略
3. 生産者の栽培面積、性格、年齢や家族構成、防除器具などの情報

これらを踏まえた上で、このままの防除法を継続した場合のリスクの説明と望ましいと思われる防除法の提案という流れになると思われる。

単なる個体数管理としての防除の指導ではなく、抵抗性管理も含めた防除指導であることを指導者側が意識することがこれからの抵抗性管理の成否を左右する重要な視点となる。

さらに、将来的に抵抗性管理は生産者自身に取り組むものだと意識させるためには、生産者に「抵抗性管理は指導者から教えてもらわないとできない」と思わせないようにする指導体制が必要になる。簡易な感受性検定結果さえ示せば、生産者が自分で薬剤の選択をする、防除法の選択をするという状態にしなければならない。そのための効果的な講習会や資料配布、あるいは情報入手方法や入手先提供などの布石を打っておくとよい。

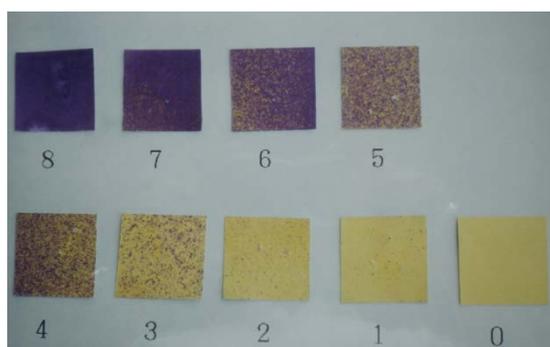


図 1 感水紙と付着指標（0～8）
付着指標 3～5 以上が付着目標の目安

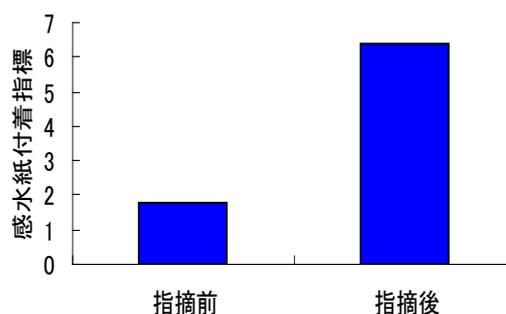


図 2 第三者の指摘による薬液付着程度向上効果（散布経験の浅い被験者がナスに薬剤散布）



図3
イチゴ生産者に対する
薬剤散布動作指導
(講習会での水散布)

(執筆：國本佳範)

文献

國本佳範・井上雅央（1996）動力噴霧機による作業者の液剤散布技量の評価.農
作業研究 31(3) : 175-180.

山崎国昭（1971）スポーツにおける技術上達の方法.中央学院大学論叢 6(1) : 81-
89.

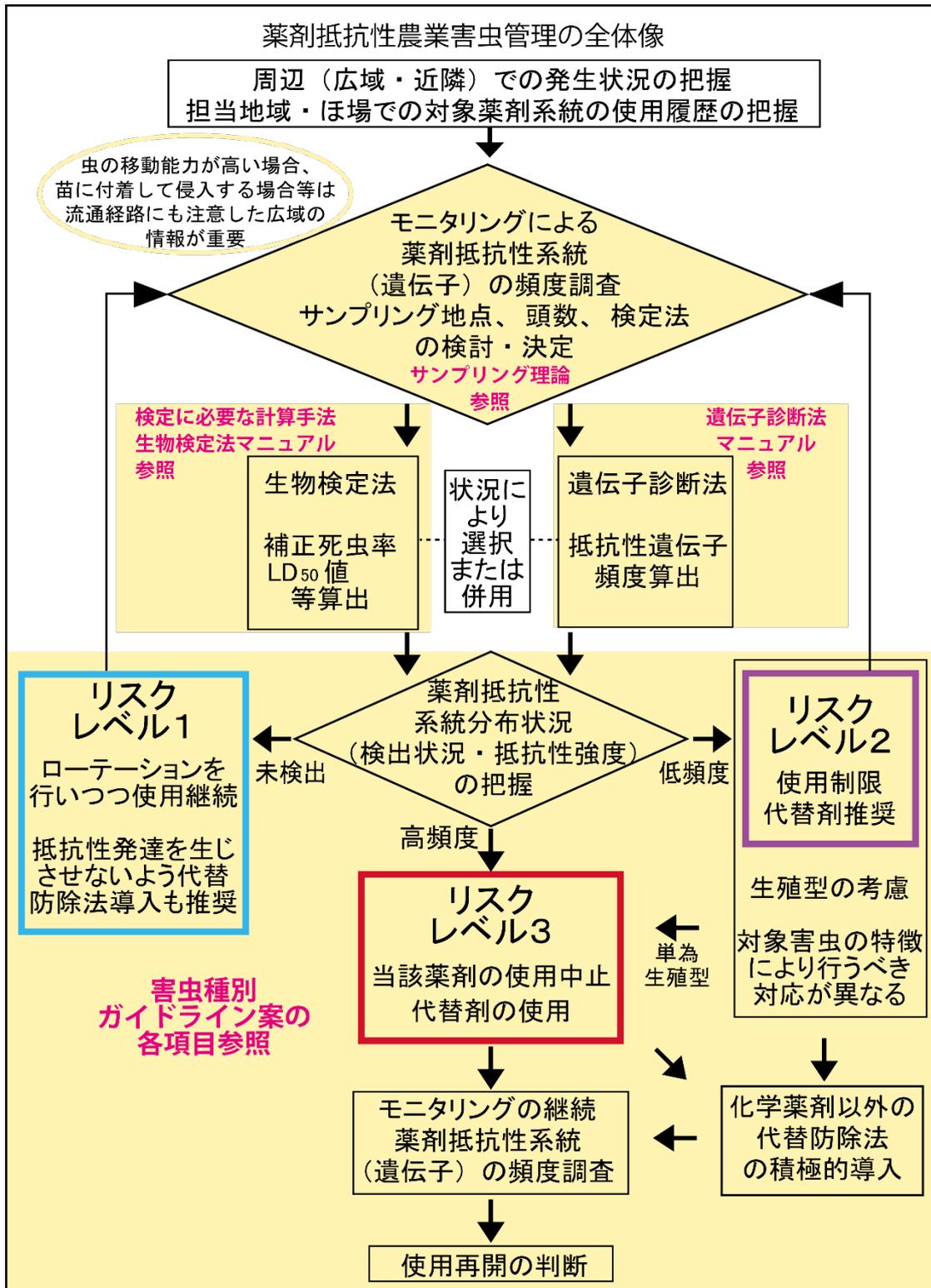
第2章 ガイドライン案

本章ではプロジェクト研究で対象とした害虫種について、遺伝子診断法、生物検定法により薬剤抵抗性系統の発生状況をモニタリングし、抵抗性害虫による被害を拡大させないために行うべき内容をガイドライン案にまとめた。

化学農薬を使用する限り薬剤抵抗性害虫の発生をゼロにする事はできないが、抵抗性系統の発生を早期に把握し、蔓延を防止してそれによる被害を拡大させないことは可能である。いち早く抵抗性系統の発生を把握し、被害が顕在化する前に他の剤、あるいは物理的・生物的代替防除法で抵抗性系統を封じ込めればよいのであるが、害虫の薬剤抵抗性対策管理を行うといっても背景条件、たとえば、どこから移入してくるのか、虫の世代交代時間や繁殖特性（交配か単為生殖か）、飛翔可能距離、施設・露地などの栽培条件、対象薬剤の作用特性、選択可能代替剤の品数等により、考慮すべきポイントは極めて多種多様であり、決して、「この方法ですべて大丈夫」とはならない。そのため、ここに示すのはあくまで「案」としての提示であり、地域実情に合わせたガイドラン、防除体系の構築に役立てていただきたい。

ガイドライン案の骨子は、次ページに示したフローチャートのように、抵抗性害虫の発生状況と担当地区内の薬剤使用履歴の把握にはじまり、担当地区で使用している薬剤への抵抗性を保持した系統が発生していないかモニタリングしつつ、発生を検出した場合は、検出頻度からリスクレベルを判断し、他剤切り替え等の指導を行い、抵抗性系統の頻度が低下すれば使用再開するという手順を繰り返し行い、抵抗性害虫の密度を上げないように管理することになる。リスクレベルは1～3でクラス分けしている。この数字は、薬剤抵抗性害虫の全国発生調査で使用されているフェーズ（1-1-3参照）の数字とは無関係である。県内ごく一部のほ場に発生してフェーズIであっても、発生圃場においてはリスクレベル3に相当することも起こりうるためである。

繰り返しになるが、薬剤抵抗性害虫への対処法は害虫種やその地域の実情に即した対策が必要となる。事例として、委託プロ参画機関で収集したデータも紹介しているので、各地域での薬剤抵抗性管理対策の参考として役立てていただきたい。



2-1 コナガ

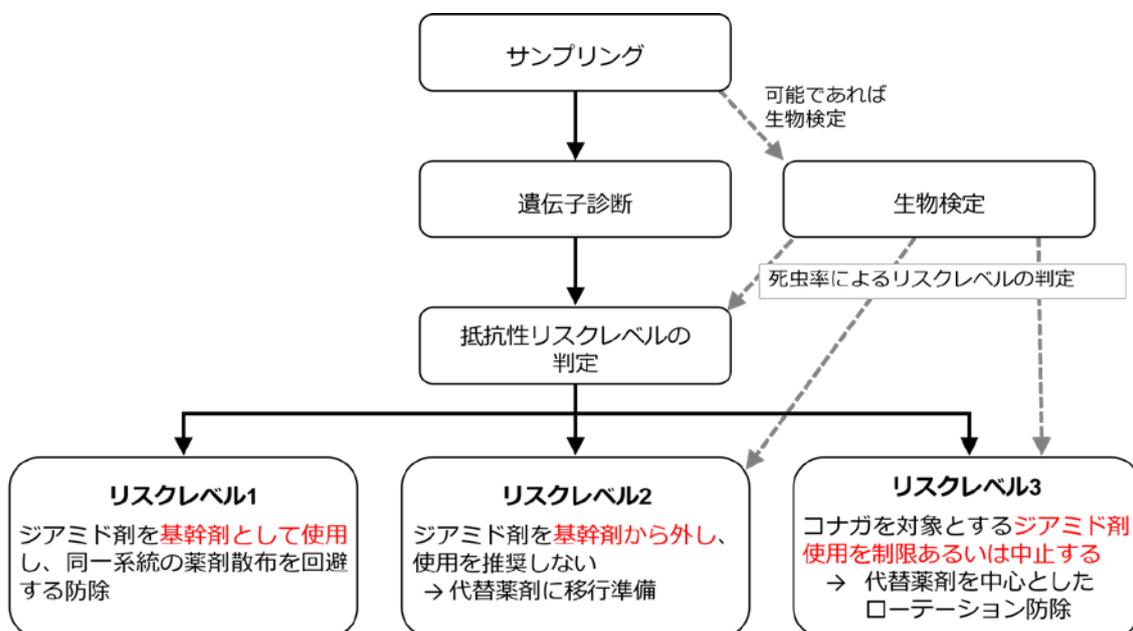
1) コナガの薬剤抵抗性の現状と対策の考え方

アブラナ科作物の最重要チョウ目害虫であるコナガは、インドネシアにおける DDT 抵抗性 (Ankersmit, 1953) を初めとして、ジアミド剤 (28) を含む 95 の化合物に対して抵抗性を発達させており、この数値はナミハダニと並んで最多である。ジアミド剤は 2007 年に上市された、チョウ目を中心とする害虫の筋肉に作用する新しいタイプの殺虫剤であるが、2009 年にタイ国とフィリピンで抵抗性が確認されたのを皮切りに、東南アジアを中心に抵抗性が全世界に蔓延しつつある。わが国においても 2013 年に抵抗性個体群が初めて確認され、全国に分布を拡大させつつある。ジアミド剤に対する抵抗性機構については、作用点変異 (リアノジン受容体のアミノ酸変異: G4946E) が主要因とされている (Troczyka et al., 2012)。しかしながら、国外ではその他のアミノ酸変異が抵抗性に関わっているとの報告もあり (Guo et al., 2014)、今後わが国においても同様の変異を持つ個体群が出現する可能性がある。しかし、先発のジアミド剤 (フルベンジアミドやクロラントラニリプロール) に抵抗性を発達させたコナガに対しても防除効果が高いとされる、いくつかの作用機作の異なる薬剤が存在する。

本ガイドライン案では、近年問題となっているコナガのジアミド剤 (フルベンジアミドやクロラントラニリプロール) 抵抗性への対策として、遺伝子診断や生物検定の結果からジアミド剤抵抗性リスクレベルを判定し、レベルに応じて効果的な薬剤を中心としたコナガ防除体系を構築する手法を解説する。

2) 薬剤抵抗性管理の具体的手順

a) フローチャート



b) サンプルリング

(1) 粘着式トラップ

フェロモンルアー（住友化学、アースバイオケミカル、サンケイ化学）及び粘着式トラップを用いたフェロモントラップ（日本植物防疫協会から購入可能）により雄成虫 16 個体以上を捕獲する。フェロモントラップは各普及所管轄地域等に 1 箇所設置すればよいが、紫外線等による DNA の損傷が比較的少ない 1 週間程度の設置で 16 個体以上の捕獲が難しい場合は、複数箇所に設置して必要個体数を確保する。

(2) 野外サンプルリング

圃場で幼虫（飼育する場合は蛹も含める）を採集する。十分量捕獲できた場合はそのまま生物検定に供試する。個体数が少ない場合は飼育して個体数を増やした上で生物検定に供試する。

c) 薬剤抵抗性検出

c-1) 遺伝子診断法（3-1 参照）

マニュアルに従い、フェロモントラップに捕獲された 16 個体以上の雄成虫を用いて、マルチプレックス PCR によるジアミド剤抵抗性に関わる遺伝子変異（G4946E）のジェノタイピング（遺伝子型判定）を個体ごとに行う。解析した個体群における G4946E の割合から抵抗性リスクレベルの判定を行う。なお一部に、頻度は低い G4946E とは異なる変異による抵抗性も見つかっているため、正確に判断できない場合もあることに留意する。

c-2) 生物検定法（4-1 参照）

マニュアルに従い、ジアミド剤を用いた生物検定を行う。生物検定を行うことにより、遺伝子診断の信頼性がより高まる。また、生物検定はジアミド剤に抵抗性を発達させたコナガ個体群に対する代替剤を選抜する際にも有効である。コナガではひとつの殺虫剤に対する抵抗性についても複数の抵抗性機構が存在し、それらの関与の度合いも国、地域によって大きく異なっている可能性がある。そのため、代替剤の選択は、基本的には各普及所管轄地域に生息する個体群を用いた生物検定の結果を踏まえて行うことが望ましい。

3) 判断基準

遺伝子診断	生物検定	リスク レベル	望ましい対策
抵抗性 遺伝子頻度	補正死虫率		
10%未満	99%以上	1	引き続きジアミド剤を基幹剤として組み入れつつ、同一系統薬剤散布を回避する防除を行う。
40%未満	84%以上	2	ジアミド剤を基幹剤から外し、コナガに対する剤としての使用を推奨しない。
40%以上	84%未満	3	コナガを対象としてのジアミド剤の散布を制限あるいは中止する。生物検定で高い死虫率、摂食停止等が維持されている薬剤を中心としたローテーション防除に切り替える。

野外のコナガ個体群における G4946E の割合は、1) 春から夏にかけて増加し秋に低下すること、2) 晩秋（発生終期）の割合は次年の春先（発生初期）の割合とよく似ていることが示されている。そのため、当該年のリスクレベルの判定は前年のコナガの発生終期、あるいは当該年の発生初期に捕獲された個体を用いて行うのが望ましい。

リスクレベルの判定は、「抵抗性遺伝子頻度」で行う。生物検定による補正死虫率データは、リスクレベル判定の参考とする。

リスクレベル1の判定のためには、40個体（一つのトラップで確保できない場合は8個体×5トラップでも可）のサンプルが必要となる（1-3参照）。十分な虫数を集められずこれ以下の場合、たとえ抵抗性遺伝子頻度が10%未満でもリスクレベル2の可能性のあることを考慮しておく必要がある。

一方、すでに抵抗性遺伝子の存在が明らかで、リスクレベル2か3の判断をする場合は、16個体の診断で良い。遺伝子診断でリスクレベル2と判定された場合は、可能であれば定植前にもう一度サンプリング・遺伝子診断を行い、リスクレベルを再確認する。

4) 代替防除手段について

a) 代替薬剤の使用

後発ジアミド剤（シアントラニリプロール（28））、BT剤（アイザワイ系、クルスターキ系）（11A）、マクロライド系（6）、スピノシン系（5）は

ジアミド剤抵抗性が発達した地域においても防除効果が高いことが示されている。これらの薬剤を組み合わせ、同世代コナガに対して異なるグループの薬剤が適用される防除体系を構築し、抵抗性発達の遅延を目指す。

b) 混合剤の使用

コナガ以外の害虫防除にジアミド剤を使用せざるを得ない場合は、ジュリボフロアブル（クロラントラニリプロール（28）＋チアメトキサム（4A））、ガードナーフロアブル（イミダクロプリド（4A）＋スピノサド（5））、アベイル粒剤（シアントラニリプロール（28）＋アセタミプリド（4A））などの混合剤を使用すると被害が軽減できるとともに抵抗性発達の遅延効果が期待できる。

5) 地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント

コナガのジアミド剤抵抗性は非越冬地と越冬地では抵抗性リスクが異なる（図1）ため、地域ごとの遅延戦略が必要である。その防除体系事例を次に示す。ただし、各普及所管轄地域レベルでは抵抗性リスクの顕著な違いはないと考えられ、必要以上に地域を細分化した戦略は必要ない。なお、非越冬地域の体系は抵抗性遺伝子が冬期死滅により翌年に持ち越されないことが前提のため、越冬可能地域では絶対に用いてはならない。

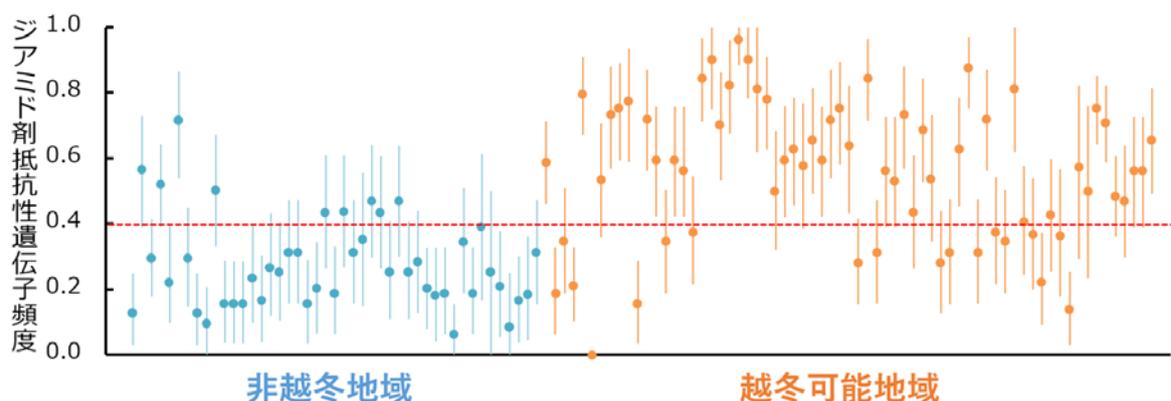


図1 コナガ非越冬地域（青字）と越冬可能地域（橙字）におけるジアミド剤抵抗性遺伝子（G4946E）頻度。越冬可能地域で有意に頻度が高い。

防除体系 例1) 西南暖地におけるキャベツ栽培

- ・西南暖地におけるキャベツの作型は、標高 500 m 以上の高原地域で 4～8 月に定植し 6～11 月に収穫する作型（春～夏まき）と平坦地域で 8～12 月に定植し 10 月～翌年 5 月に収穫する作型（初夏～秋まき）がある。
- ・問題となるチョウ目害虫は、コナガ、ハイマダラノメイガ、大型チョウ目害虫

(ハスモンヨトウ、オオタバコガ等)である。コナガは5～10月、ハイマダラノメイガは8～10月、大型チョウ目害虫は9～11月に発生が多く、防除にあたっては、時期別に問題となるチョウ目害虫に応じた薬剤の選定が重要である。

モデル体系案)

作型	春まき			初夏～秋まき
	4月	5～7月		8月以降
コナガのジアミド剤抵抗性リスクレベル	1～3	1～2	3	1～3
定植前 (灌注処理)	ジノテフラン水溶剤(4A)	チアメトキサム・クロラントリニプロール水和剤(4A+28)	イミダクロプリド・スピノサド水和剤(4A+5)	チアメトキサム・クロラントリニプロール水和剤(4A+28)
定植14日後	—	エマメクチン安息香酸塩乳剤(6)	エマメクチン安息香酸塩乳剤(6)	エマメクチン安息香酸塩・ルフェヌロン水和剤(6+15)
定植25日後	スピネトラム水和剤(5)	スピネトラム水和剤(5)	トルフェンピラド水和剤(21A)	スピネトラム水和剤(5)
定植35日後	インドキサカルブ水和剤(22A)	チオシクラム水和剤(14)	チオシクラム水和剤(14)	ピリダリル水和剤(UN)
定植45日後	ピリダリル水和剤(UN)	ピリダリル水和剤(UN)	ピリダリル水和剤(UN)	インドキサカルブ水和剤(22A)
定植55日後	エマメクチン安息香酸塩乳剤(6)	インドキサカルブ水和剤(22A)	インドキサカルブ水和剤(22A)	レピメクチン乳剤(6)
主な防除対象害虫	コナガ、アブラムシ類	コナガ、アブラムシ類、(大型チョウ目害虫(オオタバコガ等))	コナガ、アブラムシ類、(大型チョウ目害虫(オオタバコガ等))	コナガ、ハイマダラノメイガ、大型チョウ目害虫(ハスモンヨトウ等)
防除の留意点	・アブラムシ類の防除にネオニコチノイド系薬剤を灌注処理する。 ・コナガ対象の薬剤は5月から散布する。 ・適宜、アブラムシ類の防除を行う。	・コナガ及びアブラムシ類の防除にネオニコチノイド系とジアミド系の混合剤を灌注処理する。	・コナガ及びアブラムシ類の防除にネオニコチノイド系とスピノシン系の混合剤を灌注処理する。 ・大型チョウ目の発生が認められる場合は、フルベンジアミド水和剤(28)を散布する。	・チョウ目害虫の防除にネオニコチノイド系とジアミド系の混合剤を灌注処理する。 ・大型チョウ目の発生が認められる場合は、フルベンジアミド水和剤(28)を散布する。

防除体系 例2) 高冷地におけるキャベツ栽培

- ・キャベツの生育適温は 15～20℃と比較的低く、25℃以上では生育が抑制される。高冷地とは、標高による冷涼な気候を活かし栽培を行う地域で、地帯別・標高別の産地形成により初夏～秋にかけて連続した出荷を行う。栽培期間中はコナガの寄主となるアブラナ科植物が途切れることなく、防除による薬剤選抜が進みやすい。
- ・長野県におけるキャベツ産地は、標高 900 m 以上の寒地（年間平均気温 9℃以下）、標高 500～900 m の寒冷地（年間平均気温 9～12℃）、標高 500 m 以下の温暖地（年間平均気温 12～15℃）という様に標高と密接に関係している。コナガの発生は、標高 900 m 以下の準高冷地では 4 月ごろから発生が徐々に増え始め 6 月下旬～7 月ごろに最初のピークを迎えるが、900 m 以上の高冷地では発生は 5 月下旬から始まり、8 月下旬から 9 月上旬にピークを迎えるため、地域の発生に合わせた防除が必要である。

防除の基本コンセプト)

	作 型		
	①前半・②中盤		③後半
高冷地 (寒地)	5～6月定植		7月定植
準高冷地 (寒冷地)	4～5月定植		6月～7月定植
灌注処理剤	早春,コナガ発生前は アブラムシ防除に重点	ジアミド系混合剤防除	スピノサド、シアントラニリプロール 混合剤による防除
定植 14～21日後 ごろ	<低密度の維持> 梅雨時は耐雨性の高いピリダリルを適用 スペクトラムが狭いので、適宜アブラムシ防除 を追加 晴天続けばBT剤も有効 ウワバ類対策注意		<低密度の維持> インドキサカルブ、晴天続けばネライ ストキシシン剤が有効。多用はNG。 秋に向け、アザミウマ発生が多い場合 はIGRなどを防除に加える。
定植 28日後ごろ			
定植 35～45日後 ごろ	<低密度の維持・大型チョウ目対策> ①、② 発生が増える後半に効果の高いマクロライド剤を適用 ③コナガの発生が増加する時期にマクロライド剤を適用 トルフェンピラド、インドキサカルブなどで低密度を維持。薬剤の収穫前日数に注意 発生が多い兆候があれば、効果の高いマクロライド系、スピノシン系薬剤による防除		
定植 55日後 ごろ	若干の発生がある場合はBT剤による防除、マクロライド系、スピノシン系も有効である ので、同系薬剤の多用にならぬよう注意し薬剤選定する		

モデル体系案)

コナガ防除は、効果の高い薬剤選定が基本となる。生産現場における防除の成否は、薬剤自体の殺虫効果のほかに薬剤の残効性・耐雨性、害虫ステージと散布タイミングなどにも大きく影響を受ける。後述の薬剤の残効期間を参考とする。効果の高いマクロライド系、スピノシン系、ネライストキシシン系薬剤は、残効性・耐雨性が比較的強く、多用されがちなので注意する。

近年の薬剤はスペクトラムが狭いものが多く、コナガ防除に偏りすぎると他の害虫の防除を失敗するケースがある。薬剤の特性を見極め、アブラムシ防除、大型チョウ目防除も念頭に防除を組み立てる。フルベンジアミドはコナガへの効果が劣る場合があるが、残効が長く大型チョウ目防除には有効である。

	作 型		
	①前半	②中盤	③後半
高冷地 (寒地)	5月上旬定植	5月下旬～6月定植	7月定植
準高冷地 (寒冷地)	4月定植	5月定植	6月～7月定植
灌注処理剤	ジノテフラン水溶剤 [4A]	チアメトキサム・クロ ラントラニプロール 水和剤 [4A+28]	イミダクロプリド・スピノサド水和剤 [4A+5] 又は シアントラニプロール・チアメトキサ ム粒剤 [4A+28]
定植21日後	ピリダリル水和剤 [UN] + アブラムシ防除		カルタップ水溶剤 [14]
定植28日後	BT剤 [11A] 又は スピノサド水和剤[5]		エマメクチン安息香酸塩・ルフェヌロン 水和剤 [6+15] + アブラムシ防除
定植35日後	エマメクチン安息香酸塩・ルフェヌロン水和剤 [6+15]		ピリダリル水和剤 [UN] + アブラムシ防除
定植45日後	トルフェンピラド水和剤 [21A]		
定植55日後	BT剤 [11A]		

BT剤、カルタップ水溶剤は、散布後の降雨に注意する。

BT剤は晴天であればどのタイミングでも効果が高い。摂食毒なので3齢以前での使用が基本

防除体系 例3) 非越冬地域のキャベツ栽培

- ・コナガの非越冬地域とは、冬期の寒さでコナガが死に絶える地域である。根雪 60 日以上（日本海側豪雪地域）、または冬期 3 カ月（12～2 月）平均気温 0°C 以下（宮城県山間部以北の太平洋側）の地域。
- ・春から初夏にかけて（6 月まで）暖地から飛来するコナガに対してジアミド剤が一定程度有効である。しかし、抵抗性コナガが結球部に残る場合があるので、結球期のジアミド剤連用は避ける。
- ・抵抗性コナガ防除体系では、ウワバ類の問題が顕在化する。外葉部に大きな食害痕が目立つ場合は、葉裏に隠れているウワバ対策に残効性が高いジアミド剤（フルベンジアミド水和剤など）や IGR 剤などを用いる。

モデル体系案 1) 散布ごとに異系統薬剤をローテーションする防除体系

	5月下旬定植	6月下旬定植
灌注処理剤	チアメトキサム・クロラントラニ リプロール水和剤 [4A+28]	イミダクロプリド・スピノサド水 和剤 [4A+5]
定植 14 日後	Bt 剤 [11A]	Bt 剤 [11A]
定植 24 日後	フルベンジアミド水和剤 [28]	トルフェンピラド・メタフルミゾ ン水和剤[21A+22B]
定植 34 日後	スピノサド水和剤 [5]	エマメクチン安息香酸園・ルフェ ヌロン水和剤 [6+15]
定植 44 日後	エマメクチン安息香酸塩・ルフェ ヌロン水和剤 [6+15]	ピリダリル水和剤 [UN]
定植 54 日後	メタフルミゾン水和剤 [22B]	クロルフェナピル水和剤 [13]

モデル体系案 2) 効果の高い系統の薬剤を基幹として 1 ヶ月ごとに系統を変えるブロックローテーション（ウワバ類対策に補完剤としてジアミド系[28]・ベンゾイル尿素系 [15]を組み入れた）

	5月下旬定植	6月下旬定植
灌注処理剤	チアメトキサム・クロラントラニ リプロール水和剤 [4A+28]	イミダクロプリド・スピノサド水 和剤 [4A+5]
定植 14 日後	シアントラニリプロール水和剤 [28]	スピノサド水和剤 [5]
定植 24 日後	シアントラニリプロール水和剤 [28]	スピノサド水和剤 [5]
定植 34 日後	スピノサド水和剤 [5]	エマメクチン安息香酸園・ルフェ ヌロン水和剤 [6+15]

定植 44 日後	エマメクチン安息香酸園・ルフェ ヌロン水和剤 [6+15]	エマメクチン安息香酸園・ルフェ ヌロン水和剤 [6+15]
定植 54 日後	スピノサド水和剤 [5]	エマメクチン安息香酸園・ルフェ ヌロン水和剤 [6+15]

※ ウワバ類対策に補完剤としてジアミド系[28]・ベンゾイル尿素系[15]を組み
入れている。

※ 本防除体系は岩手県農業研究センターによる案を含む。

6) 薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報と事例集

a) コナガに対する各種系統の殺虫剤の殺虫効果順位

2013～18年の22文献（実用濃度での生物検定データ）にもとづき、順位が
高いものほど殺虫効果が高い。ただし、文献の多くはジアミド剤抵抗性の個体
群を対象にしており、ジアミド剤の効果について過小評価している可能性があ
ることに注意。

作用機作分類名	IRAC コード	オッズ比*	有意差	死虫率	95%信頼区間
スピノシン系	5	1.0	a	0.998	(0.996-0.999)
Bt	11A	3.4	b	0.995	(0.990-0.998)
ピリダリル	UN	21	c	0.858	(0.812-0.893)
アベルメクチン系/ミルベマイシン系	6	26	cd	0.934	(0.912-0.951)
オキサジアジン（イトキカルブ）	22A	31	d	0.806	(0.728-0.863)
ネライストキシン類縁体	14	34	d	0.955	(0.927-0.975)
セミカルバゾン	22B	36	e	0.767	(0.679-0.840)
ピロール（クロルフェナピル）	13	48	f	0.702	(0.632-0.759)
フェニルピラゾール系（フィロロル）	2B	67	g	0.641	(0.559-0.715)
METI 剤（トルフェンピラト）	21A	89	h	0.589	(0.503-0.667)
有機リン系	1B	101	gi	0.671	(0.595-0.740)
ベンゾイル尿素系（IGR）	15	117	gi	0.364	(0.308-0.431)
ジアミド系	28	229	h	0.395	(0.353-0.441)
ネオニコチノイド系	4A	242	hij	0.271	(0.208-0.350)
カーバメート系	1A	643	j	0.184	(0.109-0.288)
ピレスロイド系	3A	1805	k	0.128	(0.093-0.170)

*表の順位が高いものほど（オッズ比が低いものほど）殺虫効果が高い。

b) 交差抵抗性

コナガの交差抵抗性については以下のような報告があるが、いずれも感受性系統や非選抜系統との抵抗性比はそれ程高くない（園田 2015）。

- ・ダイアジノン（2A）とペルメトリン、シペルメトリン、デカメトリン、フェンバレレート（3）
- ・デルタメトリン（3）と Cry1Ac（BT 剤（11A））
- ・フィプロニル（2B）とスピノサド（5）、Cry1Ca（BT 剤（11A））
- ・テブフェノジド（18）とアバメクチン（6）・フフェノジド（18）とヘキサフルロン（15）、ジフルベンズロン（15）
- ・スピノサド（5）とインドキサカルブ（22A）、アセタミプリド（4A）

c) 遺伝様式

各種薬剤に対する抵抗性の遺伝様式については以下のような報告がある（園田（2015）参照）。

- ・有機リン系（1B）：常染色体上の複数遺伝子支配、不完全優性
- ・フィプロニル（2B）抵抗性：常染色体の単一もしくは少数の遺伝子支配、不完全劣性
- ・合成ピレスロイド系（3A）：常染色体上の複数遺伝子支配だが、不完全劣性と不完全優性の報告がある
- ・スピノシン系（5）：常染色体上の単一遺伝子支配であるが、不完全劣性と不完全優性の報告がある
- ・アバメクチン（6）：常染色体上の複数遺伝子支配であるが、不完全劣性と不完全優性の報告がある
- ・BT 剤（11A）：常染色体上の単一あるいは少数の遺伝子支配であるが、不完全劣性と不完全優性の報告がある
- ・ベンゾイル尿素系（15 タイプ 0）：常染色体上の単一遺伝子支配、劣性
- ・ジアシル-ヒドラジン系（18）：常染色体上の複数遺伝子支配、不完全劣性
- ・インドキサカルブ（22A）：常染色体上の単一遺伝子支配、不完全劣性
- ・ジアミド系（28）：常染色体上の（恐らく）単一遺伝子支配、不完全劣性もしくは完全劣性

d) 残効期間

系統/IRAC分類	薬剤名/一般名	効果発現速度	効果持続性	スペクトル(登録のある害虫種)
ジアミド系/28	フェニックス/フルベンジアミド	中	長	チョウ目
	プレバゾン/クロラントニリブロール	中	中	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、ハエ目
マクロライド系/6	アフーム/エマメクチン安息香酸	速	短	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、ハエ目
	アニキ/レピメクチン	速	短	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、ハエ目
スピノシン系/5	スピノエース/スピノサド	速	短	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、ハエ目
	ディアナ/スピネトラム	速	短	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、ハエ目
セミカルバゾン系/22B	アクセル/メタフルミゾン	遅	中	チョウ目、コウチュウ目
オキサダイアジン系/22A	トルネードエース/インドキザカルブ	遅	中	チョウ目、コウチュウ目
ピラゾールアミド系	ハチハチ/トルフェンピラド	中	短	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、ハエ目、カメムシ目
ピロール系/13	コテツ/クワロルフェナビル	中	中	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、ハエ目、カメムシ目
	ゼンターリ/BTアイザワイ	遅	短	チョウ目
BT剤/11A	エスマルク/BTクルスターキ	遅	短	チョウ目
	デルフィン/BT	遅	短	チョウ目
	ノーマルト/テフルベンズロン	遅	長	チョウ目、アザミウマ目
IGR(BPU)剤/15	カスケード/フルフェノクスロン	遅	長	チョウ目、アザミウマ目、ダニ目
	マッチ/ルフェスロン	遅	長	チョウ目、アザミウマ目
	ネオニコチノイド系/4A	モスピラン/アセタミプリド	速	中
ネライストキシシン/14	ハダシ/カルタップ	中	短	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、カメムシ目
フェニルピラゾール系/2B	プリンス/フィプロニル	速	長	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、カメムシ目
	マブリック/フルバリネート	速	長	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、カメムシ目、他
ピレスロイド系/3A	トレポン/エトフェンプロックス	速	長	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、カメムシ目、他
	アクテリック/ピリミホスメチル	速	短	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、カメムシ目、他
有機リン系/1B	オルトラン/アセフェート	速	短	チョウ目、コウチュウ目、アザミウマ目、カメムシ目、他
その他/UN	プレオ/ビダリル	中	長	チョウ目、アザミウマ目

e) コナガの移動分散

成虫の翅長は約 16 mm と短く、飛行速度も 1.9 m/sec であり、自力での飛翔（移動）能力は低いと考えられるが、自然条件によっては長距離移動を行い（園田（2015）参照）、薬剤抵抗性個体を全国的に拡散させている。

f) リスク管理に基づく圃場データ事例

キャベツ圃場で実施した試験事例を紹介する。2015 年～2016 年はジアミド剤の連用により G4946E 頻度が 40% 以上でリスクレベル 3 であったため、ジアミド剤の使用を中止しネオニコチノイド剤を中心とした防除体系に切り替えたところ、2017 年は概ねリスクレベル 2 で推移した（図 2）。

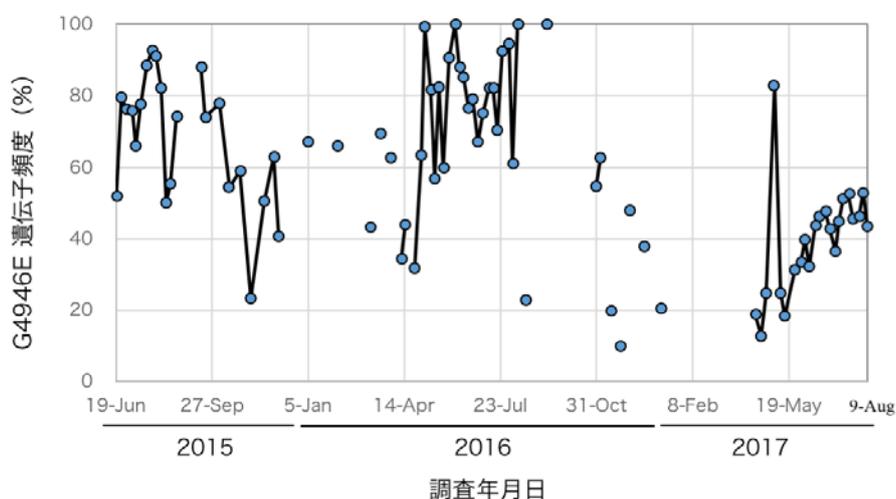


図 2 圃場における抵抗性遺伝子（G4946E）頻度

（執筆代表者：日本典秀 園田昌司）

文献

- Ankersmit, G. W. (1953) DDT-resistance in *Plutella maculipennis* (Curt.) (Lep.) in Java. *Bull. Entomol. Res.* 44(3): 421-425.
- Guo, L., P. Liang, X. Zhou, and X. Gao (2014) Novel mutations and mutation combinations of ryanodine receptor in a chlorantraniliprole resistant population of *Plutella xylostella* (L.). *Sci. Rep.* 4: 6924.
- 園田昌司 (2015) 害虫の殺虫剤抵抗性 アブラナ科作物の害虫コナガの殺虫剤抵抗性 : 海外の事例を中心に. *農業および園芸* 90(4): 446-455.
- Troczka, B., C. T. Zimmer, J. Elias, C. Schorn, C. Bass, T. G. E. Davies, L. M. Field, M. S. Williamson, R. Slater, and R. Nauen (2012) Resistance to diamide insecticides in diamondback moth, *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae) is associated with a mutation in the membrane-spanning domain of the ryanodine receptor. *Insect Biochem. Molec. Biol.* 42(11): 873-880.

2-2 チャノコカクモンハマキ

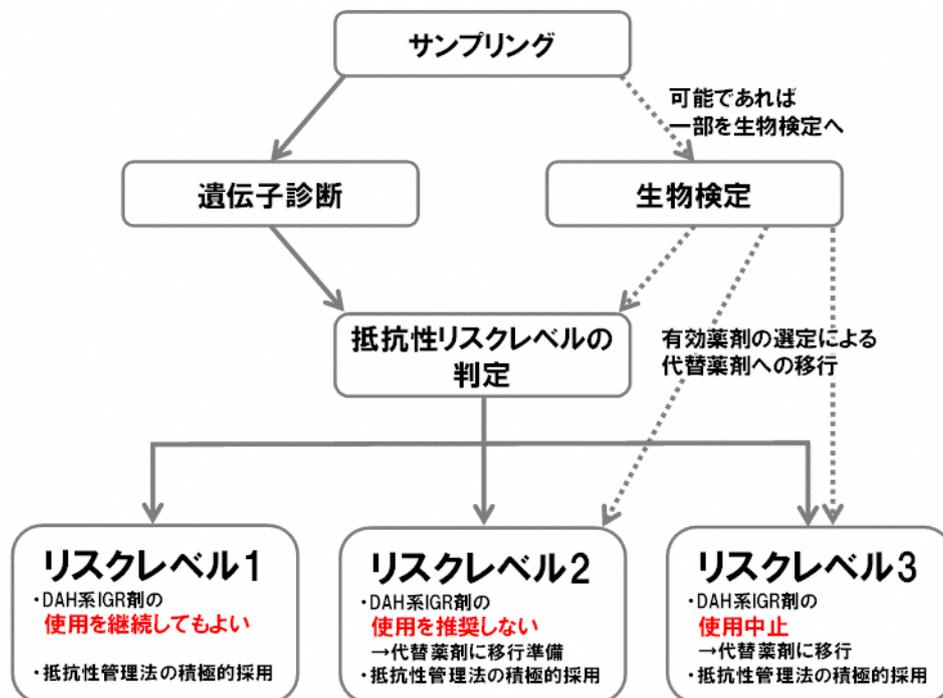
1) チャノコカクモンハマキの薬剤抵抗性の現状と対策の考え方

チャの重要害虫であるチャノコカクモンハマキの薬剤抵抗性は、全国の茶産地で問題となっている。本種の薬剤抵抗性は、これまでに静岡県茶産地で1980年代にカーバメート剤（1A）（白井ら、1988）、1990年代に有機リン剤（1B）およびピレスロイド剤（3A）（小杉、1999）で確認されている。さらに近年では、本種の基幹防除剤としてジアシルヒドラジン（以下、DAH）系IGR剤（18）およびジアミド系殺虫剤（以下、ジアミド剤）（28）が広く使用されているが、これらの薬剤に対する抵抗性も確認されている（内山ら、2013；Uchiyama and Ozawa、2014）。両剤に対する感受性の低下は、2018年までに静岡県をはじめとして三重県、京都府および福岡県でも認められており、今後は全国の茶産地で問題となる可能性がある。

本ガイドライン案では、チャノコカクモンハマキの抵抗性遺伝子診断や生物検定から抵抗性リスクレベルを判定するとともに、レベルに応じた防除体系の構築と抵抗性管理法を解説する。なお、本稿では、抵抗性診断法が開発されているDAH系IGR剤〔テブフェノジド剤（18）〕を対象にガイドライン案を構成している。

2) 薬剤抵抗性管理の具体的手順

a) フローチャート



b) サンプルリング (3-2 参照)

(1) 粘着式トラップ

抵抗性診断を実施するためのサンプルリング法としては、フェロモンルアー（信越化学工業、住友化学）および粘着式トラップ（住友化学、サンケイ化学）を用いたフェロモントラップ（いずれも日本植物防疫協会から購入可能）を利用するのが効率的である。本トラップにより雄成虫を合計 80 個体（リスクレベル 1 か 2 かを判断する場合）または 16 個体（リスクレベル 2 か 3 かを判断する場合）捕獲する（1-3 参照）。なお、半径数百メートル程度の地域内での抵抗性の現状を把握するためには、本トラップを地域内の複数か所（3 か所以上が望ましい）に設置するとともに、各トラップから満遍なく個体を回収して、必要な個体数を抵抗性診断に用いる。

(2) 見取り

抵抗性診断を実施するためには、見取りを行ってサンプルを採集しても良い。成虫発生期にチャ株を叩いて成虫を追い出し、捕虫網や 50ml チューブなどを用いて合計 80 個体（リスクレベル 1 か 2 かを判断する場合）または 16 個体（リスクレベル 2 か 3 かを判断する場合）捕獲する（「1-3 サンプルリング」参照）。また、幼虫または蛹発生期には食害された巻葉を採集し、巻葉内に生息する幼虫または蛹を捕獲しても良い（必要な個体数は成虫と同様）。なお、半径数百メートル程度の地域内での抵抗性の現状を把握するためには、複数圃場（3 か所以上が望ましい）から満遍なく個体を回収して、必要な個体数を抵抗性診断に用いる。

c) 薬剤抵抗性検出

c-1) 遺伝子診断法 (4-2 参照)

マニュアルに従って PCR-RFLP 法または LAMP 法によりテブフェノジド剤 (18) に対する抵抗性を個体別に診断する。

c-2) 生物検定法 (5-2 参照)

生物検定、すなわち殺虫剤感受性検定は、小杉 (1998) の方法に準じて実施する。ただし、幼虫の生死の判定時期については、小杉 (1998) の方法を改変することが望ましい (内山・小澤、2017b)。

c-3) 圃場検定法

圃場における防除試験を新農薬実用化試験・殺虫剤圃場試験法 (日本植物防疫協会、2018) に従って実施する。本試験を実施することにより、遺伝子診断および生物検定の結果と照らし合わせた総合的な判断が可能になる。

3) 判断基準

遺伝子診断	生物検定	リスク レベル	望ましい対策
抵抗性 遺伝子頻度	補正死虫率		
5%未満	100%	1	DAH系IGR剤の使用を継続してもよい。ただし、本剤抵抗性の発達を抑制するためにも、抵抗性管理法を積極的に採用する。
40%未満	70%以上	2	DAH系IGR剤の使用を推奨しない。抵抗性管理法を積極的に採用するとともに、代替薬剤への移行を準備する。
40%以上	70%未満	3	DAH系IGR剤の使用を中止する。抵抗性管理法を積極的に採用するとともに、代替薬剤に移行する。

チャノコカクモンハマキにおけるテブフェノジド剤(18)抵抗性遺伝子頻度は、同一地域内においては年次での変化がほぼないことがわかっている。そのため、当該年のリスクレベルの判定は、前年のいずれかの世代、または当該年の越冬世代に捕獲された個体を用いて行うことが望ましい。

リスクレベルの判定は、「抵抗性遺伝子頻度」で行う。生物検定による補正死虫率データは、リスクレベル判定の参考とする。

リスクレベル1の判定のためには、80個体のグループテストイング(10個体の混合サンプル×8試験グループ)が必要となる(1-3参照)。80個体以下でもリスクレベルの判定は可能だが、たとえ抵抗性遺伝子頻度が5%未満であってもリスクレベル2の可能性のあることを考慮する必要がある。なお、既に抵抗性遺伝子の存在が明らかで、リスクレベル2か3かを判断する場合には、16個体の個体別(グループテストイングではない)の抵抗性診断を実施すれば良い(1-3参照)。

4) 代替防除手段について

「薬剤を使用する限り薬剤抵抗性の発達を防ぐことはできない」ことを念頭に置き、リスクレベルの高低にかかわらず、下記の代替防除手段(=抵抗性管理法)の積極的な採用を推奨する。

a) 抵抗性発達リスクの高い薬剤の使用制限

チャノコカクモンハマキはDAH系IGR剤およびジアミド剤に対する抵抗性の発達速度が他剤よりも速いことが明らかになっている(内山ら、2013；

Uchiyama and Ozawa, 2014)。これらの薬剤は抵抗性発達リスクが高いことを念頭におき、次のような使用制限を推奨する。

- ・DAH系 IGR 剤（テブフェノジド剤（18）、クロマフェノジド剤（18）およびメトキシフェノジド剤（18））のうち1剤のみを年1回までの使用にとどめる。
- ・ジアミド剤（フルベンジアミド剤（28）、クロラントラニリプロール剤（28）およびシアントラニリプロール剤（28）、シクラニリプロール剤（28） ※今後、テトラニリプロール剤（28）も上市予定）のうち1剤のみを年1回までの使用にとどめる。

b) 複数剤同時施用（1-2 参照）

チャノコカクモンハマキに対する登録薬剤のうち系統の異なる薬剤を同時施用することにより、抵抗性発達を抑制できる可能性がある。

c) 選択性薬剤の使用による土着天敵の保護・利用

ピレスロイド剤（3A）、有機リン剤（1B）およびカーバメート剤（1A）などの非選択性薬剤の散布は各種害虫の土着天敵に悪影響を及ぼすため、基本的には防除体系に組み入れることを避ける。IGR 剤（16、18 など）やジアミド剤（28）などの選択性薬剤の使用は土着天敵の保護・利用を可能とするため、防除体系に組み入れることを推奨する。ただし、DAH系 IGR 剤（18）およびジアミド剤（28）は抵抗性発達リスクも高いため、使用制限にも十分注意する。

d) 交信攪乱フェロモン剤（ハマキコンーN）の活用

チャノコカクモンハマキ成虫発生初期に新型のローブ状製剤については 30～50m/10a、従来型のディスペンサー製剤については 150～250 本/10a を設置する。本剤を設置した場合は、薬剤散布によるチャノコカクモンハマキの防除を原則省略できるが、本種の被害が確認された場合は薬剤散布で対応する。

e) ハマキ天敵や BT 剤の活用

ハマキ天敵を 2000～3000 倍希釈で散布することによりチャノコカクモンハマキ幼虫が本製剤に含まれる顆粒病ウイルスに感染し、次世代密度を抑制する効果を示す。また、BT 剤は茶期が進むにつれて効果が不安定になるとも指摘されている（諫山ら、私信）ことから、一番茶摘採後の第一世代幼虫を対象に散布する。

5) 地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント

本ガイドライン案は、チャに寄生するチャノコカクモンハマキを対象としている。本種は果樹類やカンキツ類にも寄生するが、本稿では対象としていないの

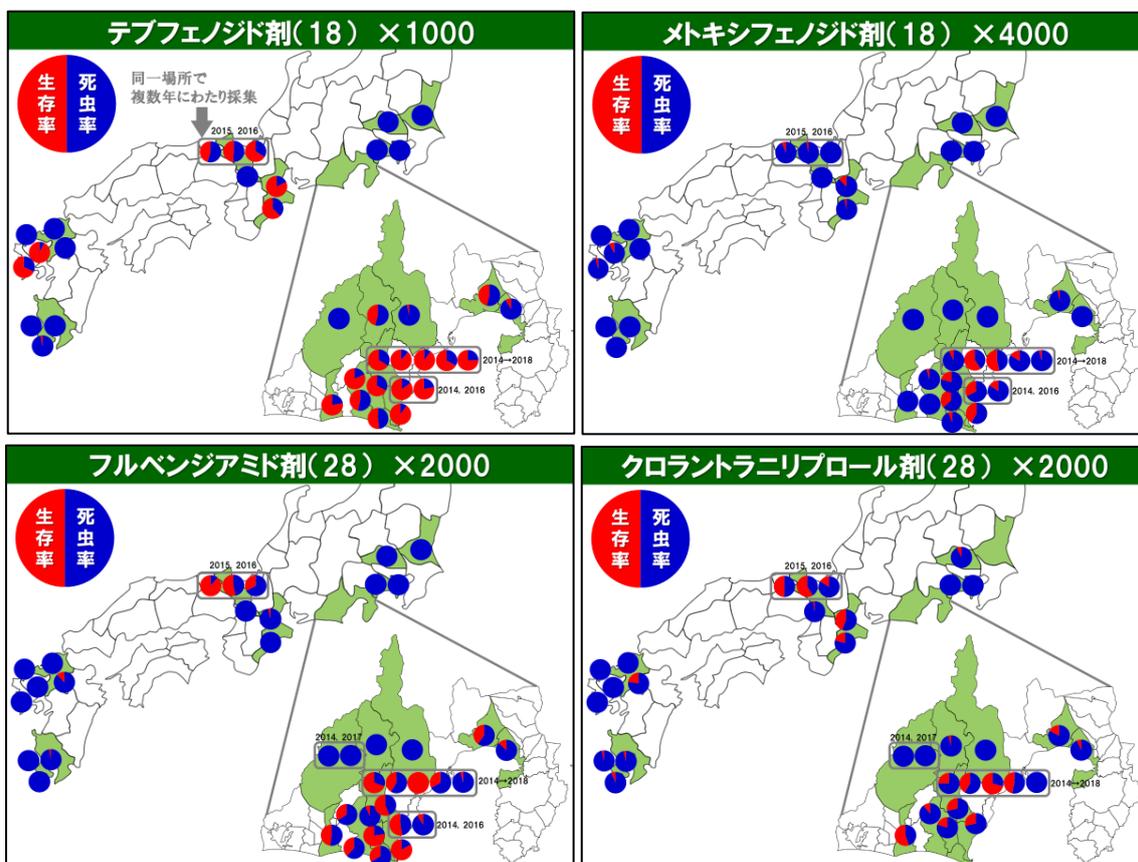
で注意する。

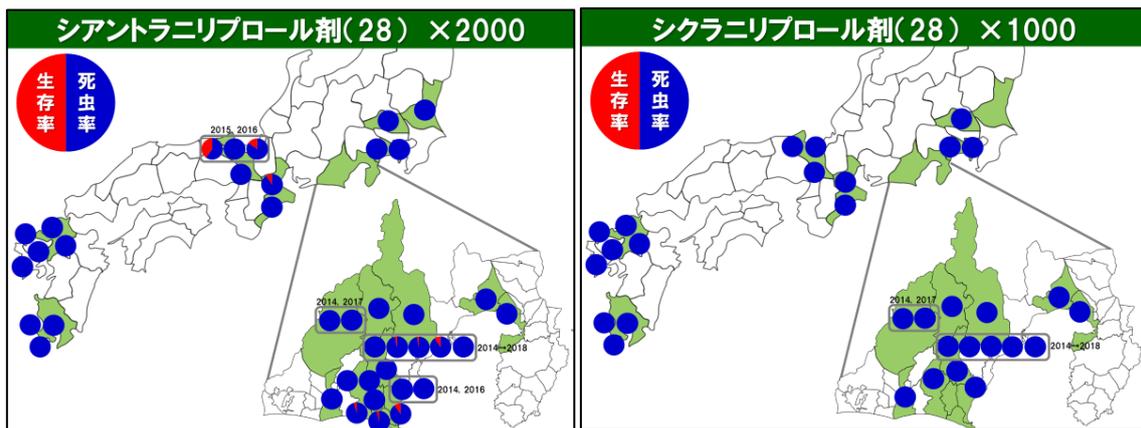
チャノコカクモンハマキの薬剤感受性は、茶産地ごとに異なっている。例えば、静岡県において複数の茶産地から採集したチャノコカクモンハマキの各個体群は、産地ごと、薬剤ごとに感受性が異なっている〔6) a) および b) 参照〕。抵抗性管理の実施にあたっては、地域ごとに抵抗性診断や生物検定を行った上で抵抗性リスクレベルを判定し、レベルに応じて防除体系を構築する必要がある。

6) 薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報と事例集

a) 全国の茶産地における薬剤感受性（補正死虫率）

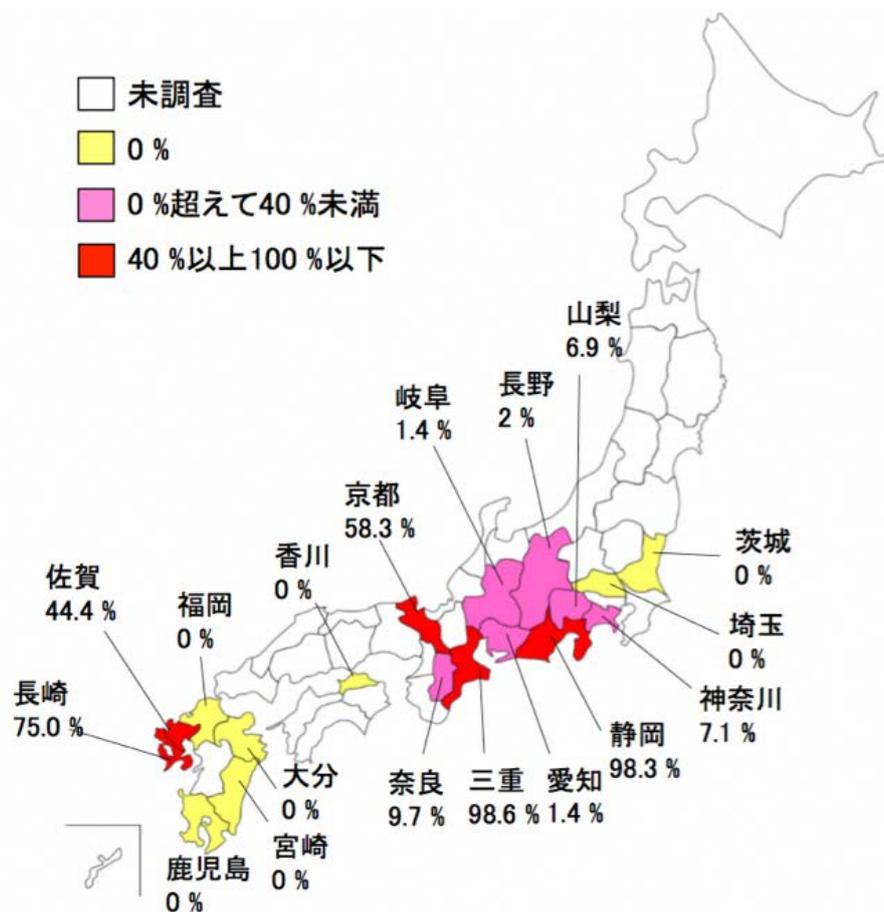
本プロジェクトの研究結果から、チャノコカクモンハマキにおける DAH 系 IGR 剤およびジアミド剤に対する感受性（常用濃度に対する補正死虫率％、2014 年～2018 年調査）は次の図のように明らかにされている。なお、全国各地の個体群に対して総じて感受性の高い殺虫剤（図の剤は除く）は、エマメクチン安息香酸塩剤（6）、スピノサド剤（5）、スピネトラム剤（5）、クロルピリホス剤（1B）、プロフェノホス剤（1B）であった。





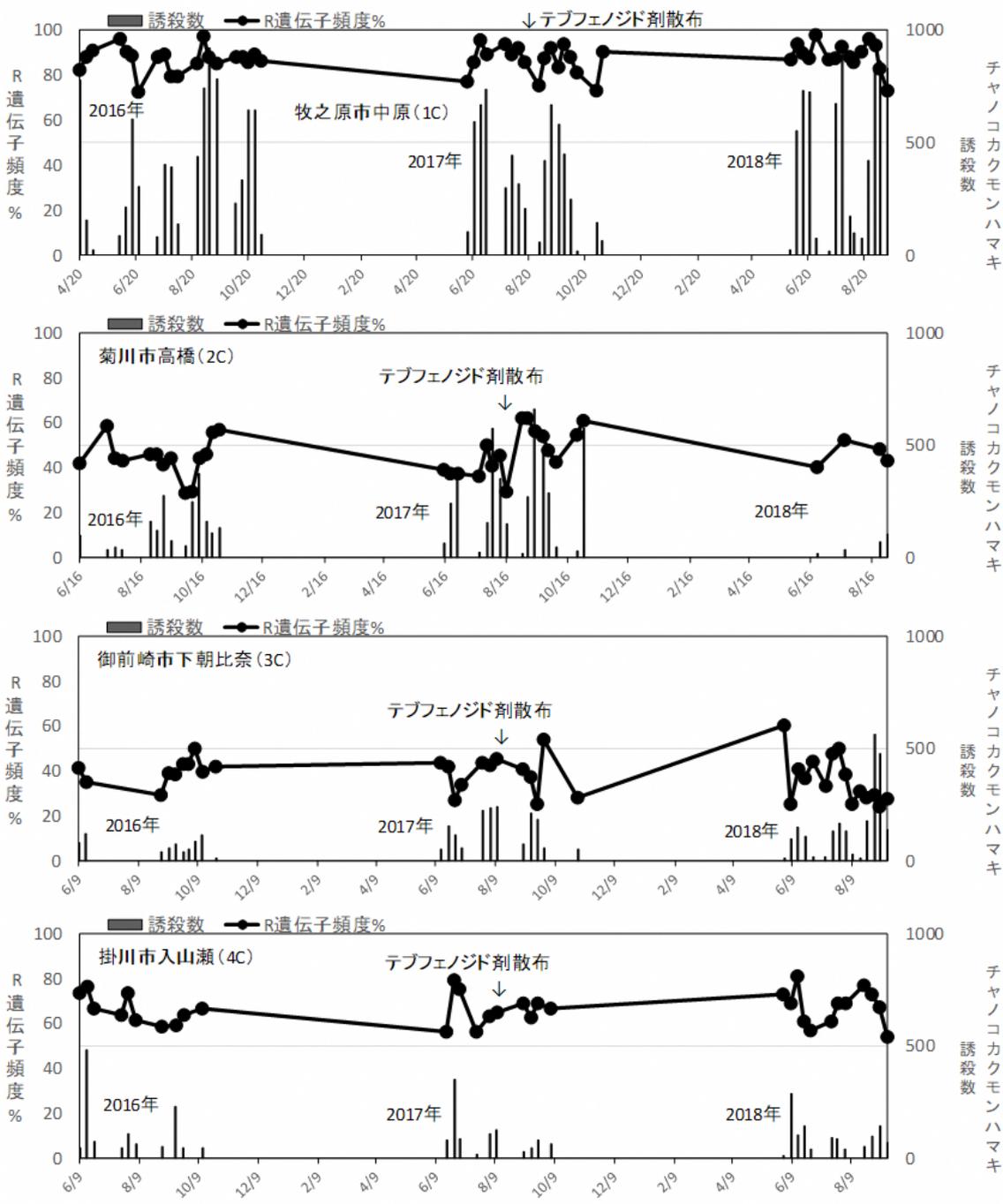
b) 全国の茶産地における DAH 系 IGR 剤 (18) 抵抗性遺伝子頻度

本プロジェクトの研究結果から、各府県の調査地点におけるテブフェノジド剤 (18) 抵抗性遺伝子頻度の最も高い値を示した。なお、抵抗性遺伝子頻度は、フェロモントラップに誘殺された雄成虫 30 個体を供試して抵抗性遺伝子診断を実施していることから、同頻度が低い場合 (14%未満) でも抵抗性リスクレベル 2 の可能性があることを考慮しておく必要がある (1-3 参照)。



c) 同一茶園における DAH 系 IGR 剤（18）抵抗性遺伝子頻度の推移

本プロジェクトの研究結果から、同一茶園におけるチャノコカクモンハマキのテブフェノジド剤（18）抵抗性遺伝子頻度は地域ごとに異なっており、地域内では同頻度が 20%以上の増減を伴うが、年次での変化はばばないことが明らかになった。



d) 交差抵抗性

本プロジェクトの研究結果から、チャノコカクモンハマキのテブフェノジド剤抵抗性には、作用点（エクダイソン受容体）変異および解毒分解酵素の関与が示唆されている。本種の交差抵抗性は次のように明らかにされているが、解毒分解酵素の関与により異系統の薬剤に交差抵抗性が付与されている可能性がある。また、本結果は室内での薬剤選抜による本種抵抗性系統における交差抵抗性の可能性を示したものであり、生産現場においては必ずしも同様の現象が起こるとは限らないため注意する。なお、下記の「A 剤→B 剤」は「A 剤に抵抗性が発達すると B 剤にも抵抗性が発達する」の意味を示し、逆方向の抵抗性発達については未解明のため注意する。

(1) メトキシフェノジド剤（18）との交差抵抗性



- ・メトキシフェノジド剤（18）→テブフェノジド剤（18）
- ・メトキシフェノジド剤（18）→ルフェヌロン剤（15）
- ・メトキシフェノジド剤（18）とフルベンジアミド剤（28）は交差しない。
- ・メトキシフェノジド剤（18）とクロラントラニリプロール剤（28）は交差しない。
- ・メトキシフェノジド剤（18）とエマメクチン安息香酸塩剤（6）は交差しない。

(2) フルベンジアミド剤 (28) との交差抵抗性



- ・フルベンジアミド剤 (28) → クロラントラニプロール剤 (28)
- ・フルベンジアミド剤 (28) → シアントラニプロール剤 (28)
- ・フルベンジアミド剤 (28) → シクラニプロール剤 (28)
- ・フルベンジアミド剤 (28) → テブフェノジド剤 (18)
- ・フルベンジアミド剤 (28) → メトキシフェノジド剤 (18)
- ・フルベンジアミド剤 (28) → フルフェノクスロン剤 (15)
- ・フルベンジアミド剤 (28) → ルフェヌロン剤 (15)

e) 遺伝様式

本プロジェクトの研究結果から、チャノコカクモンハマキにおける殺虫剤抵抗性の遺伝様式は次のとおり明らかにされている。

- ・テブフェノジド剤 (18) 抵抗性は、常染色体性の複数因子 (エクダイソン受容体変異 + 解毒分解酵素) による不完全優性である (内山・小澤、2015)。
- ・フルベンジアミド剤 (28) およびクロラントラニプロール剤 (28) 抵抗性は、いずれも常染色体性の複数因子による不完全優性である (内山・小澤、2017a)。

f) ハマキ剤の残効期間

内山 (2012) によると、チャノコカクモンハマキの薬剤感受性系統 (金谷系統) を用いて、野外におけるハマキ剤の残効期間 (7月散布) を調査した結果は次のとおりである。なお、ハマキ剤の残効期間は散布時期の違いにより異なることも報告されている (内山、2012)。

- ・メトキシフェノジド剤 (18) : 7日程度
- ・ルフェヌロン剤 (15) : 7日程度
- ・フルベンジアミド剤 (28) : 7日程度
- ・クロラントラニプロール剤 (28) : 7日程度
- ・エマメクチン安息香酸塩剤 (6) : 3日程度

- ・スピネトラム剤 (5) : 3 日程度
 - ・クロルピリホス剤 (1B) : 3 日程度
- g) IGR 剤およびジアミド剤に対する抵抗性発達の速度
- チャノコカクモンハマキ島田市湯日個体群における IGR 剤抵抗性 (2004 年～2011 年) およびジアミド剤抵抗性 (2006 年～2011 年) の発達速度は次のように明らかにされている (内山、2017)。
- ・テブフェノジド剤 (18) : 抵抗性比が 1 年経過するごとに 1.48 倍上昇。
 - ・メトキシフェノジド剤 (18) : 同様に 1.49 倍上昇。
 - ・ルフェヌロン剤 (15) : 同様に 1.22 倍上昇。
 - ・フルフェノクスロン剤 (15) : 同様に 0.99 倍となり横ばい。
 - ・フルベンジアミド剤 (28) : 同様に 1.75 倍上昇。
- h) チャノコカクモンハマキの移動分散
- 本プロジェクトにおいて、静岡県菊川市高橋の半径数百メートル程度の地域に、同一時期に複数のフェロモントラップを設置し、各トラップに誘殺されたチャノコカクモンハマキ成虫の遺伝的血縁度を解析した。その結果、本種成虫はそれほど移動分散せずに極小個体群を形成するとともに、その中で近親交配を行っている可能性が考えられた。

(執筆代表者：内山徹)

文献

- 小杉由紀夫 (1998) 農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル(17) 茶害虫：チャノコカクモンハマキ, チャハマキ. 植物防疫 52: 48-50.
- 小杉由紀夫 (1999) 静岡県島田市におけるチャノコカクモンハマキの薬剤感受性低下. 関東病虫研報 46: 123-126.
- 日本植物防疫協会 (2018) 新農薬実用化試験・殺虫剤圃場試験法
- 白井 満・小林久俊・伊藤善文・堀田 柏・竹島節夫 (1988) 静岡県におけるチャハマキに対するランネートの感受性低下について. 関東病虫研報 35:189-190.
- 内山 徹 (2012) 各種薬剤のチャノコカクモンハマキに対する残効期間. 関西病虫研報 54:151-154.
- 内山 徹 (2017) チャノコカクモンハマキの殺虫剤抵抗性に関する研究. 静岡農林技研特別報告 7 : 16-26.
- Uchiyama, T. and A. Ozawa (2014) Rapid development of resistance to diamide insecticides in the smaller tea tortrix, *Adoxophyes honmai* (Lepidoptera: Tortricidae), in the tea fields of Shizuoka Prefecture, Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 49: 529-534.
- 内山 徹・小澤朗人 (2015) チャノコカクモンハマキ (チョウ目：ハマキガ

- 科)におけるテブフェノジド剤抵抗性の遺伝様式. 応動昆 59: 127-131.
- 内山 徹・小澤朗人 (2017a) チャノコカクモンハマキ (チョウ目: ハマキガ科)におけるジアミド系殺虫剤抵抗性の遺伝様式. 応動昆 61: 109-117.
- 内山 徹・小澤朗人 (2017b) チャノコカクモンハマキの殺虫剤感受性比較による移動分散の検討. 関西病虫研報 59: 97-99.
- 内山 徹・小澤朗人・劉 主 (2013) 静岡県のチャ園に生息するチャノコカクモンハマキの薬剤感受性とジアシルヒドラジン系 IGR 剤に対する薬剤抵抗性. 応動昆 57: 85-93.

2-3 ワタアブラムシ

1) ワタアブラムシの薬剤抵抗性の現状と対策の考え方

ワタアブラムシは世界各地に広範に分布し、日本では野菜、畑作物、花卉、庭木、果樹など多くの植物の重要害虫となっている。一般に成虫・幼虫が葉、茎等に寄生し、葉巻き、葉の萎縮及び発育阻害等を引き起こす。高密度発生時には排泄物（甘露）にすす病が発生し、大きな被害が出る。また、キュウリモザイク病をはじめとする多数のウイルス病の媒介者として重要である。

ワタアブラムシの殺虫剤抵抗性は、我が国では1980年以降に問題となり始めた。最初は有機リン剤（1B）およびカーバメート剤（1A）に対する抵抗性が顕在化し始め（浜, 1987）、その後急速に全国に広がった。ピレスロイド剤

（3A）に関しては、1989年に初めて感受性低下が確認され（西東, 1990）、全国に分布が拡大した。その後、イミダクロプリドから始まる一連のネオニコチノイド剤（4A）の登場により、ワタアブラムシの防除も比較的容易なものとなっていた。しかし、使用開始後20年以上を経過した2012年、宮崎県および大分県で栽培されているピーマンやキュウリにおいて、ネオニコチノイド剤の効力が著しく低下したワタアブラムシの発生が確認された（Matsuura and Nakamura, 2014; 岡崎, 2013）。ネオニコチノイド剤抵抗性のワタアブラムシはさらに、和歌山県（岡本ら, 2014）や愛媛県（窪田・武智, 2014）でも発生が確認され、今後も各地で問題となることが懸念されている。一方海外でも、中国（Shi et al., 2012）および韓国（Koo et al., 2014）においてほぼ時期を同じくしてネオニコチノイド剤抵抗性が顕在化しており、世界的な分布拡大も懸念されている。

ワタアブラムシにおけるネオニコチノイド剤抵抗性は、作用点であるニコチン性アセチルコリン受容体 $\beta 1$ サブユニットのタンパク質を構成する81番目のアミノ酸が、アルギニン（R）からスレオニン（T）に変化した作用点変異

（R81T）が主要因であることが明らかとなった（Hirata et al., 2015）。これは、2011年にフランスのモモアカアブラムシで明らかにされたメカニズム（Bass et al., 2011）と同一であった。作用点変異によるネオニコチノイド剤抵抗性が報告されているのは現在までのところ、これら2種アブラムシのみである。

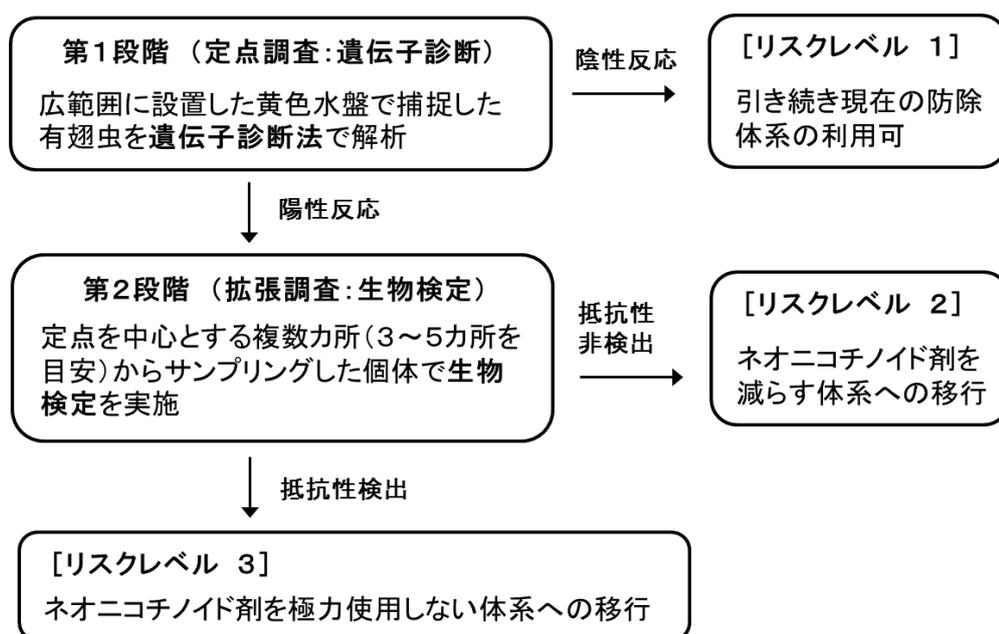
単為生殖により増殖するワタアブラムシでは、作付期間中の交雑による感受性回復が期待できないことから、特に施設栽培においては「入れない、増やさない、出さない」が大原則となる。したがって、これを踏まえた防除システムの構築が必要であり、そのためには高感度なモニタリングの実施が重要となる。また、抵抗性が検出された場合、ガイドライン案に従いネオニコチノイド

剤の使用を制限し、他の防除手段（系統の異なる薬剤、生物的防除法および物理的防除法）を使用する必要がある。

本ガイドライン案では、ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性を対象として、新たに開発された遺伝子診断法（Toda et al., 2017）を改変したもの、および生物検定法（松浦, 2016）を用いた抵抗性リスクレベルの判定のしかた、さらにレベルに応じた防除体系の構築と抵抗性管理法について解説する。

2) 薬剤抵抗性管理の具体的手順

a) フローチャート



b) サンプリング

調査単位は、2段階での調査を基本とする。第1段階は調査単位（普及所、JA、生産組合等）ごとに1カ所（以上）の定点調査ポイントを設定して、黄色水盤（b-1）によりワタアブラムシをサンプリングし、遺伝子診断（集団単位）する。第2段階の調査（陽性反応が得られた場合）は第1段階の定点ポイントを中心とする複数カ所の圃場から、圃場採集（b-2）によりサンプリングし、生物検定法により診断を実施する。

b-1) 黄色水盤

具体的調査法は3-3参照。

調査時期は、ワタアブラムシの発生ピークである春（3～6月）または秋（9～10月）とする。トラップ交換頻度は、DNAの劣化を考慮し、原則3日に一度とする。採集個体数は、1地点あたり累計20個体以上を目

安とする。ただし、ワタアブラムシの選別に不安がある場合は 50 頭以上、アブラムシの選別に不安がある場合は 100 頭以上を目安とする。

サンプルの保存方法は、調査地点ごとにエタノール（99.5%）の入ったサンプルチューブに収容し、遺伝子診断を実施するまでの間、冷蔵もしくは冷凍保存する。

b-2) 圃場採集

第 2 段階の調査における生物検定に供試する。第 1 段階の定点ポイントを中心とする地域内の複数カ所（3～5 カ所を目安）でサンプリングを行う。アブラムシは寄主植物とともに採集し、ティッシュペーパーなどに包み、ビニール袋等に入れて持ち帰る。

c) 薬剤抵抗性検出

c-1) 遺伝子診断法（4-3 参照）

マニュアルに従い、マルチプレックス PCR 法によりネオニコチノイド剤抵抗性に関与する遺伝子変異を識別する。トラップで捕捉された有翅虫を 20～50 頭単位の集団で診断し、抵抗性個体の存在の有無を判定する。

遺伝子診断法によって得られた抵抗性個体の有無に基づいて調査地点の抵抗性リスクレベルを判定する。シミュレーションの結果、単為生殖するアブラムシは、1 個体でも抵抗性が現れれば、その薬剤を使用する限り抵抗性頻度は上昇するため、抵抗性個体がいる／いないで判断する。

c-2) 生物検定法（5-3 参照）

マニュアルに従い、キュウリ葉片浸漬法（松浦, 2016）により実施する。遅効性薬剤については補正密度指数を用いて判定する。

c-3) 圃場検定法

圃場における防除試験を新農薬実用化試験・殺虫剤圃場試験法（日本植物防疫協会, 2016）に従って実施する。本試験を実施することにより、遺伝子診断及び生物検定の結果と照らし合わせた総合的な判断が可能になる。

3) 判断基準

1. 第1段階（遺伝子診断）（定点調査による抵抗性リスクレベルの判定）

遺伝子診断結果	リスクレベル	望ましい対策
抵抗性非検出	1	ネオニコチノイド剤の使用を継続してもよい。ただし、本剤抵抗性の発達を抑制するためにも、抵抗性管理法を積極的に採用する
抵抗性検出		第2段階へ

2. 第2段階（生物検定）（定点周辺調査による抵抗性リスクレベルの判定）

補正死虫率 %	リスクレベル	望ましい対策
95%以上	2	ネオニコチノイド剤の使用回数を減らし、代替薬剤に置き換える。抵抗性管理法を積極的に採用する。
95%未満	3	抵抗性管理法を採用する。ネオニコチノイド剤の使用を極力控える。

4) 代替防除手段について

「薬剤を使用する限り薬剤抵抗性の発達を防ぐことはできない」ことを念頭に置き、リスクレベルの高低にかかわらず、下記の代替防除手段（＝抵抗性管理法）の積極的な採用を推奨する。

a) 化学的防除法

ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシに関しては、ネオニコチノイド剤以外の薬剤は代替薬剤として概ね高い効果があり、フロニカミド（29）、トルフェンピラド（21）などの薬剤は極めて有効である（表1）。有機リン剤（2A）、ピレスロイド剤（3A）など、かつてワタアブラムシが高度に抵抗性を発達させた基幹薬剤も有効であるが、生物的防除法を積極的に取り入れた防除体系では、これら非選択性薬剤は天敵に悪影響を及ぼすため使用を控える必要がある。定植時の粒剤処理等、代替薬剤への置き換えが難しい場合、ネオニコチノイド剤粒剤と定植後の代替薬剤の散布を併用する。

表1 ネオニコチノイド剤抵抗性系統の各種薬剤に対する感受性

供試薬剤	希釈倍率	補正死虫率 (%)	
		宮崎系統 ^{a)}	和歌山系統 ^{b)}
カーバメート (1 A)			
メソミル45DF	1,000	100	100
アラニカルブ水和剤	1,000	100	—
有機リン (1 B)			
アセフェート水和剤	1,000	100	100
ダイアジノン乳剤	1,000	100	—
合成ピレスロイド剤 (3 A)			
アクリナトリン水和剤	1,000	100	—
フェンプロパトリン乳剤	1,000	100	—
エトフェンプロックス乳剤	1,000	—	100
ネオニコチノイド (4 A)			
イミダクロプリド水和剤	1,000		24.4
	2,000	27.0	
ニテンピラム水溶剤	2,000	23.0	46.2
ジノテフラン顆粒水和剤	2,000	26.0	0
クロチアニジン水溶剤	2,000	7.0	40.3
チアメトキサム顆粒水溶剤	2,000	22.0	0
アセタミプリド顆粒水溶剤	2,000	97.0	91.4
チアクロプリド顆粒水和剤	2,000	90.0	—
ピリジン アゾメチン誘導体 (9 B)			
ピメトロジン顆粒水和剤	5,000	100	86.6
ピリフルキナゾン顆粒水和剤	4,000	100	96.6
METI剤 (2 1 A)			
トルフェンピラド乳剤	1,000	100	100
フロニカミド (2 9)			
フロニカミド顆粒水溶剤	2,000	100	96.7

a) 2012年に検定実施

b) 2013年9月、和歌山県広川町のシシトウで採集し、幼苗法により検定実施

b) 生物的防除法

b-1) 生物的防除資材の利用

生物的防除資材の中ではテントウムシ類および寄生蜂類の活用が有効と考えられる。大分県の夏秋ピーマン栽培においてはコレマンアブラムシとヒメカメノコテントウをリレー使用することにより高い防除効果が認められた。

b-2) 土着天敵を生かした栽培体系

栽培が容易なイネ科植物（オオムギ等）を栽培し、そこで土着寄生蜂（ナケルクロアブラバチ等）の餌となるアブラムシ（トウモロコシアブラムシ等）を増殖させることで、ワタアブラムシの基盤防除として土着天敵を活用する（長坂，2016）。

c) 物理的防除法

c-1) 防除資材の利用

防虫ネット等により外部からの侵入防止を図る。アブラムシ類に使用する防虫ネットの目合いのめやすは0.8 mm以下（小松，2005）とされ、ワタアブラムシを通過させない目合いは0.34 mm（Bethke and Paine, 1991）とされている。野外においてワタアブラムシ有翅虫の侵入防止に有効な目合いを調べた結果、1 mmで77～100%、0.8 mmで94～100%、0.6 mmで91～100%、0.4 mmで97～100%の個体の侵入を防止した。したがって、防虫ネットの目合いはできるだけ小さい目合いを選択することが望ましい。

また、光反射シートによるアブラムシ類の飛来抑制技術（木村，1982）や施設栽培では近紫外線除去フィルムによる防除技術（野中・永井，1985）などと併用する。

c-2) 施設密閉高温処理

夏季に栽培するピーマンでは、晴天日にビニルハウスのすべての開口部（側窓、天窓、ドア、吸気口）を閉め、ハウス内の温度を上昇させることにより、ワタアブラムシやアザミウマ類の密度抑制に効果があることが和歌山県で確認されている。地上高150 cmの気温が46～50℃に達したら（または30分経過したら）、すべての開口部を開けて換気し、常温に戻す。天敵類のヒメハナカメムシ類、スワルスキーカブリダニは処理直後に少なくなるが、時間の経過とともに回復する。高温によるピーマンの日焼け等の障害を避け、かつ安定した防除効果を得るためには気温を精度よく観測する必要があり、強制通風筒と応答性がよい温度計は必須である。簡易な強制通風筒は材料費2千円程度で自作できる。外径89mm×長さ250mmの塩ビパイプ（VU75）の一端にACファンモータ

を、空気が筒内から外へ出るように取り付けて通風する。この筒の内部中央に温度計のセンサー部を固定する。温度計はサーミスタ温度計（センサー外付けタイプ）が取り扱い容易で簡便である。ワイヤレス式の温度計はハウス外から気温を確認できて便利であるが、温度表示の更新間隔が長い製品は即時値をモニターできないことに注意する（高温処理中は1分間で0.5℃以上気温が上昇する）（日本農業気象学会関東支部編，1988）。ピーマンへの高温障害を生じないように行う必要があり、詳細については本節執筆代表者に照会いただきたい。

5) 地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント

ワタアブラムシは寄主範囲が広く、野菜、畑作物、花卉、庭木、果樹、さらには雑草など多岐にわたる。地域により本種の寄主植物相は異なることが予想されるため、6-b に示す寄主植物別リスク一覧を参照し、地域全体で抵抗性管理に取り組むことが望ましい。

6) 薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報と事例集

a) 生殖様式

ワタアブラムシの生殖様式は、秋に一度有性生殖を行う完全生活環型、通年単為生殖を行う不完全生活環型、さらに両者の中間型など多様である。完全生活環型では、一次寄主の木本植物上に越冬卵が産み付けられ、翌春ふ化した幼虫は新梢で成虫になる。その後、出現した有翅胎生雌虫が各種作物を含む中間寄主植物上に移住し、世代を繰り返した後、秋に再び一次寄主植物へ移る。この時期にのみ出現する雄虫と産卵雌虫は一次寄主植物で交尾し、産卵する。一方、不完全生活環型は、雑草等の中間寄主植物上で胎生雌虫及び幼虫で越冬する。翌春増殖を開始し、出現した有翅胎生雌虫が農作物等の中間寄主植物に飛来し、増殖・加害する。中間型は両方の生活環型の形質を併せ持つ。

ネオニコチノイド剤抵抗性系統は、低温短日条件に反応して両性型が出現したことから、完全生活環の形質を有することが確認されている。一方、野外の雑草において無翅胎生雌虫の越冬が確認されていることから、不完全生活環の形質も併せ持つ中間型であると推定される。

b) 寄主選好性

寄主範囲は極めて広い広食性であるが、ナス科植物を選好するナス型系統やウリ科植物を選好するウリ型系統といった選好性の異なる系統が存在することも知られている（西東, 1991）。一次寄主植物はムクゲやカンキツなどの一部の木本植物であり、各種野菜類や雑草類は二次寄主植物である。

ピーマンから採集されたネオニコチノイド剤抵抗性系統が選好する（増殖率

が高い) 栽培作物は、カボチャ、キュウリ、ヒョウタン、ヘチマ、ピーマン (パプリカ) などであり、オクラ、シロツメクサ、ウンシュウミカンなどでも増殖する (表 2)。一方、ナス、イチゴなどでは増殖率が低い (表 2)。ただし、イチゴでは葉の状態により増殖率が高くなる可能性がある。また、これまでに越冬が確認されている雑草は、ホトケノザ、オオイヌノフグリ、オランダミミナグサ、オニタビラコ、ハハコグサ、ナズナである。

表 2 ネオニコチノイド剤抵抗性系統の寄主選好性程度の高低

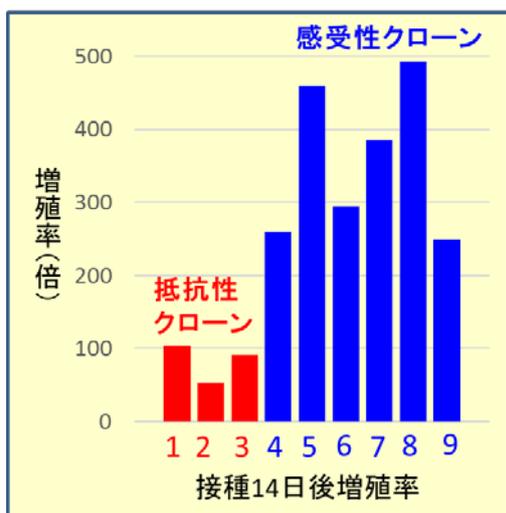
高	中	低
ウリ科 カボチャ、キュウリ、 ヒョウタン、ヘチマ	アオイ科 オクラ	ナス科 ナス、ジャガイモ
ナス科 ピーマン (パプリカ)	キンポウゲ科 トゲミノキツネノボタン	キク科 ゴボウ、ジニア、 ヒメジョオン、 オオバナノセンダングサ
アブラナ科 ナズナ	オオバコ科 オオイヌノフグリ	バラ科 イチゴ
	マメ科 シロツメクサ	マメ科 ダイズ
	シソ科 ホトケノザ	タデ科 イヌタデ
	ムラサキ科 キュウリグサ	ヒルガオ科 サツマイモ、アサガオ
	ミカン科 ウンシュウミカン	フクロソウ科 アメリカフウロ
	キク科 シュンギク、キク、 ヒマワリ、コスモス	キョウチクトウ科 ニチニチソウ
	バラ科 ナシ	
	スミレ科 パンジー	

キュウリ苗を用い 20°C16L8D 条件で累代飼育した無翅成虫を、直径 9 cm のビニールポットで栽培した寄主植物に接種し、15 日後の増殖率を調査した。

高：50 倍以上、中：10～50 倍、低：10 倍未満

c) 薬剤抵抗性系統の適応度

ネオニコチノイド剤抵抗性系統は感受性系統に比べ、増殖率 (産子数) が低い傾向にあった (図 1)。したがって、抵抗性系統の適応度は低く、ネオニコチノイド剤による防除圧の低い条件下では増殖に不利である可能性がある。ただし、増殖率の違いが抵抗性遺伝子によるものであるのかどうかは不明である。



採集年	供試クローン名	ネオニコチノイド感受性
1	2012 宮崎県きゅうり①	抵抗性
2	2013 宮崎県きゅうり②	抵抗性
3	2013 和歌山県ししとう	抵抗性
4	2008 宮崎県きゅうり①	感受性
5	2013 宮崎県きゅうり②	感受性
6	2013 宮崎県メロン	感受性
7	2014 和歌山県スイカ	感受性
8	2014 和歌山県かぼちゃ	感受性
9	2014 宮崎県きゅうり③	感受性

図1 増殖率のクローン間差異

各クローン産子 24 時間以内の幼虫を 5 日間飼育後に、キュウリ幼苗 1 株に 1 頭接種し、14 日後の虫数から算出

d) 遺伝様式

交雑試験の研究結果から、ワタアブラムシにおけるネオニコチノイド剤抵抗性の遺伝様式は次のとおりと推定される。

ネオニコチノイド剤の作用点であるニコチン性アセチルコリン受容体 $\beta 1$ サブユニットにおけるアミノ酸変異 R81T は劣性遺伝する。

R81T 変異をもたない感受性対立遺伝子には、R81T 変異サイトの下流部に数塩基の欠損部位を有するものがある。この欠損は正常な受容体タンパクの合成を妨げると推定される。

その結果、欠損部位を有さない正常な感受性対立遺伝子が R81T 抵抗性対立遺伝子と対になった場合は感受性の表現型を示すが、欠損部位を有する感受性対立遺伝子が R81T 抵抗性対立遺伝子と対になった場合、遺伝子型は抵抗性ヘテロであるものの、表現型は抵抗性となる。

したがって、ネオニコチノイド剤抵抗性の遺伝子診断を行うためには、R81T 抵抗性対立遺伝子および欠損型感受性対立遺伝子それぞれの遺伝子型を明らかにする必要があるが、集団単位での遺伝子診断では個体単位の遺伝子型を知ることができない。そこで、本ガイドラインにおいては R81T 変異の有無の診断のみを行い、抵抗性遺伝子保有個体のスクリーニングを行うこととしている。

e) ネオニコチノイド剤間の感受性差異

ネオニコチノイド剤はこれまでに 7 剤が上市されているが、それらは構造の違いによりシアノ基タイプ (2 剤) とニトロ基タイプ (5 剤) に大別される

(図 2)。ネオニコチノイド剤に対するワタバラムシの効力低下は、薬剤間の差異が認められており、イミダクロプリド、ジノテフランなどのニトロ基タイプの剤で効力低下が大きく、アセタミプリド、チアクロプリドのシアノ基タイプでは比較的高い感受性が維持された (表 1; Hirata et al., 2015; Matsuura and Nakamura, 2014)。これは、薬剤に対する受容体の機能を測定できる電気生理学的手法 (2 電極膜電位固定法) を用いた作用点レベルの測定でも同様の結果であった。作用点変異 (R81T) を持つ抵抗性型 nAChR と感受性型 nAChR を比較したところ、シアノ基タイプのアセタミプリドに比べ、ニトロ基タイプのイミダクロプリドの機能が大幅に低下した (Hirata et al., 2015)。

この理由を計算科学的にコンピューターに発現させた作用点 nAChR を用いて薬剤との相互作用の強弱を解析した。その結果、イミダクロプリドのニトロ基は感受性 nAChR ではアルギニンとの相互作用が強いため、トレオニンに変異した抵抗性型 nAChR (R81T) の影響を受け易かった。一方、シアノ基を持つアセタミプリドは、感受性 nAChR でもアルギニンよりもシステインとの相互作用で機能を発揮しているために、作用点変異の影響を受けにくいと推察された。

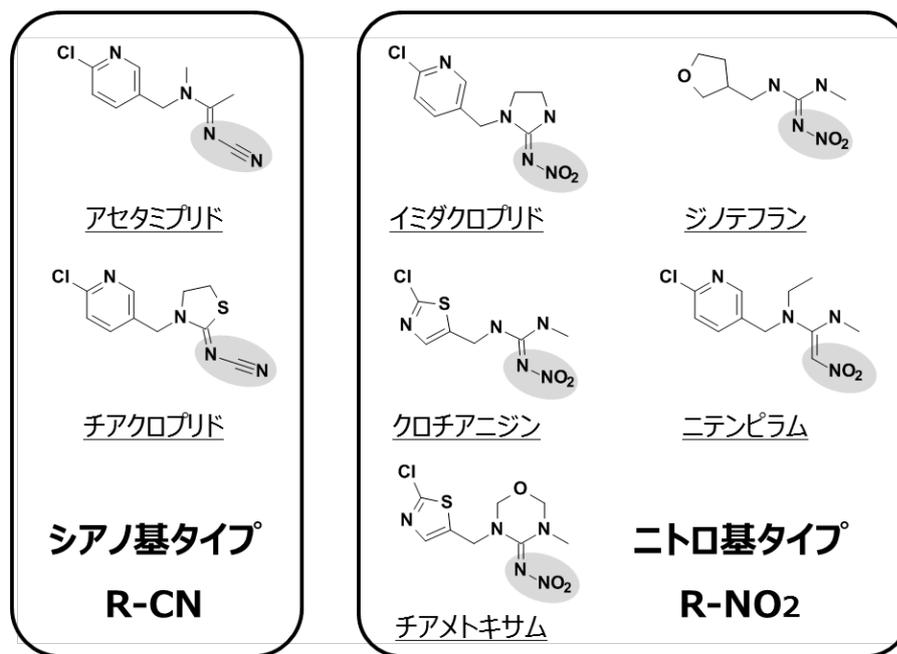


図 2 ネオニコチノイド系殺虫剤の構造

f) 薬剤抵抗性管理を考慮したワタアブラムシの防除体系の事例

防除体系例1) 大分県の夏秋ピーマンにおける防除暦（アブラムシ対象薬剤のみ表示）

ネオニコチノイド剤効力低下前（2011年）		ネオニコチノイド剤効力低下後（2016年）
薬剤名		薬剤名
3月 中旬		ニテンピラム顆粒水和剤（4A）
下旬	ニテンピラム粒剤（4A）	
4月 中旬		スピロテトラマト水和剤（23）
下旬	イミダクロプリド水和剤（4A）	アクリナトリン水和剤（3A）
5月 上旬		
中旬	クロチアニジン水溶液（4A）	ピメトロジン顆粒水和剤（9B）又はフロニカミドDF（29） マラソン乳剤（1B）
6月 上旬		ピリフルキナゾン顆粒水和剤（9B）
7月 中旬	※アブラムシが発生した場合は	ピメトロジン顆粒水和剤（9B）
8月 中旬	ネオニコチノイド剤を散布して抑える	ピリフルキナゾン顆粒水和剤（9B）
下旬		マラソン乳剤（1B）
9月 上旬	ジノテフラン顆粒水溶液（4A）	

黄色マーカーはネオニコチノイド剤であることを示す

防除体系例2)

和歌山県の小玉スイカ早熟トンネル栽培（3月上中旬定植、6月収穫）における防除暦（アブラムシ対象薬剤のみ表示）

ネオニコチノイド剤効力低下前（2013年）		ネオニコチノイド剤効力低下後（2017年）
薬剤名		薬剤名
定植時	アセタミプリド粒剤（4A）	アセタミプリド粒剤（4A） またはスピロテトラマトフロアブル（23）
生育期初期	アセタミプリド顆粒水溶液（4A）	ピリフルキナゾン顆粒水和剤（9B）
交配時以降	アセタミプリド顆粒水溶液（4A）	（ミツバチ受粉）フロニカミドDF（29） （人工授粉）ピリフルキナゾン顆粒水和剤（9B）

黄色マーカーはネオニコチノイド剤であることを示す

（執筆代表者：土田聡）

文献

Bass C, A. M. Puinean, M. C. Andrews, P. Culter, M. Daniels and J. Elias (2011)
Mutation of a nicotinic acetylcholine receptor β subunit is associated with
resistance to neonicotinoid insecticides in the aphid *Myzus persicae*. *BMC*

Neurosci. 12: 51.

Bethke, J. A. and T. D. Paine (1991) Screen hole size and barriers for exclusion of insect pests of glasshouse crops. *J. Entomol. Sci.* 26:169-177.

浜 弘司 (1987) アブラムシの薬剤抵抗性. 植物防疫 41: 159-164.

Hirata K, R. Kiyota, A. Matsuura, S. Toda, A. Yamamoto, T. Iwasa (2015) A R81T mutation in the nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit of *Aphis gossypii* and the differential resistance to acetamiprid and imidacloprid. *J. Pestic. Sci.* 40: 25-31.

木村 裕 (1982) マルチ資材によるアブラムシ類の防除. 植物防疫 36: 469-473.

小松由美 (2005) 耕種的防除法・資材. 防虫ネット (施設栽培). 農業総覧病虫害防除・資材編 10. 防除資材便覧. 農文協, 東京. 993-998

河野 哲 (1992)・田中尚智 (1999) 耕種的防除法・資材. 寒冷紗など (被覆、障壁). 農業総覧病虫害防除・資材編 10. 防除資材便覧. 農文協, 東京. 987-992 の 2.

Koo, H.N., J. J. An, S. K. Park, J. I. Kim and G. H. Kim (2014) Regional susceptibilities to 12 insecticides of melon and cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) and a point mutation associated with imidacloprid resistance. *Crop Prot.* 55: 91-97.

窪田聖一・武智和彦 (2014) ネオニコチノイド系殺虫剤に対して感受性の低下したワタアブラムシの愛媛県における発生. 応動昆大会講要 58: 67.

Matsuura A. and M. Nakamura (2014) Development of neonicotinoid resistance in the cotton aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) in Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 49: 535-540.

松浦 明 (2016) ワタアブラムシに対する薬剤感受性検定法の違いが検定結果に及ぼす影響. 九病虫研会報 62: 77-81.

長坂幸吉 (2016) アブラバチ類. 土着天敵. 野菜・畑作物. 保護と強化で高い効果. アブラムシ類の天敵. 天敵活用大辞典. 農文協, 東京. 土着 38-41

日本植物防疫協会 (2017) 新農薬実用化試験・殺虫剤圃場試験法

日本農業気象学会関東支部編 (1988) 農業気象の測器と測定法. 農業技術協会. 東京. 332pp.

野中耕次・永井清文 (1985) 紫外線除去フィルム利用による害虫防除. 農業および園芸 60 (2) :323-326.

岡本 崇・岩橋良典・森下正彦 (2014) 和歌山県におけるネオニコチノイド系薬剤の殺虫効果が低いワタアブラムシの発生. 関西病虫研報 56: 135-137.

岡崎真一郎 (2013) ネオニコチノイド系薬剤に対して感受性低下したワタアブ

- ラムシの初確認. 応動昆大会講要 59: 108.
- 西東 力 (1990) ワタアブラムシ *Aphis gossypii* Glover の薬剤抵抗性 III. 合成ピレスロイド剤抵抗性個体群の発生. 応動昆 34: 174–176.
- 西東 力 (1991) ワタアブラムシ *Aphis gossypii* Glover の薬剤抵抗性 V. 寄主選好性と有機リン剤抵抗性の関係. 応動昆 35: 145–152.
- Shi, X. G., Y. K. Zhu, X. M. Xia, K. Qiao, H. Y. Wang and K. Y. Wang (2012) The mutation in nicotinic acetylcholine receptor $\beta 1$ subunit may confer resistance to imidacloprid in *Aphis gossypii* (Glover). *J. Food Agric. Environ.* 10: 1227-1230.
- Toda S., K. Hirata, A. Yamamoto and A. Matsuura (2017) Molecular diagnostics of the R81T mutation on the D-loop region of the $\beta 1$ subunit of nicotinic acetylcholine receptor gene conferring resistance to neonicotinoids in the cotton aphid, *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae). *Appl. Entomol. Zool.* 52: 147-151.

2-4 ネギアザミウマ

1) ネギアザミウマの薬剤抵抗性の現状と対策の考え方

ネギアザミウマ *Thrips tabaci* Lindeman は、全世界に広く分布する害虫である。本種は、ネギ、タマネギ、ニラ、ニンニク等のネギ属に加えて、キュウリ、メロン、ナス、トマト、イチゴ、キャベツ、ブロッコリー、コマツナ、アスパラガス、エンドウ、ハウレンソウ、カキ、イチジク、カンキツ、カーネーション、キク、トルコギキョウ、ダリアなど、非常に多くの作物を加害することが知られている。また、アイリス黄斑ウイルス (IYSV) やトマト黄化えそウイルス (TSWV) などの植物病原ウイルスも媒介する。

近年、ネギアザミウマの各種殺虫剤に対する感受性低下が顕在化して問題となっている。武田 (2014) が全都道府県を対象に行ったネギアザミウマに関するアンケート調査によれば、カーベメート系 (1A : IRAC による殺虫剤の作用機構分類、以下同様)、有機リン系 (1B)、ピレスロイド系 (3A)、ネオニコチノイド系 (4A) 等の殺虫剤に対する感受性低下が報告されている。北海道では、全地域でピレスロイド剤 (3A) に対する感受性が低下し、タマネギ、ネギ、キャベツ等でネギアザミウマによる被害が発生している。上記グループ以外の薬剤では、レピメクチン (6) (栃木、千葉)、ピリフルキナゾン (9B) (千葉)、クロルフェナピル (13) (栃木、静岡)、トルフェンピラド (21A) (茨城、大阪)、ピリダリル (UN) (栃木、茨城、大阪) などでも感受性低下が報告されている (大井田ら、2012 ; 柴尾・田中、2012 ; 春山・松本、2013 ; 鹿島ら、2013 ; 土井ら、2014)。

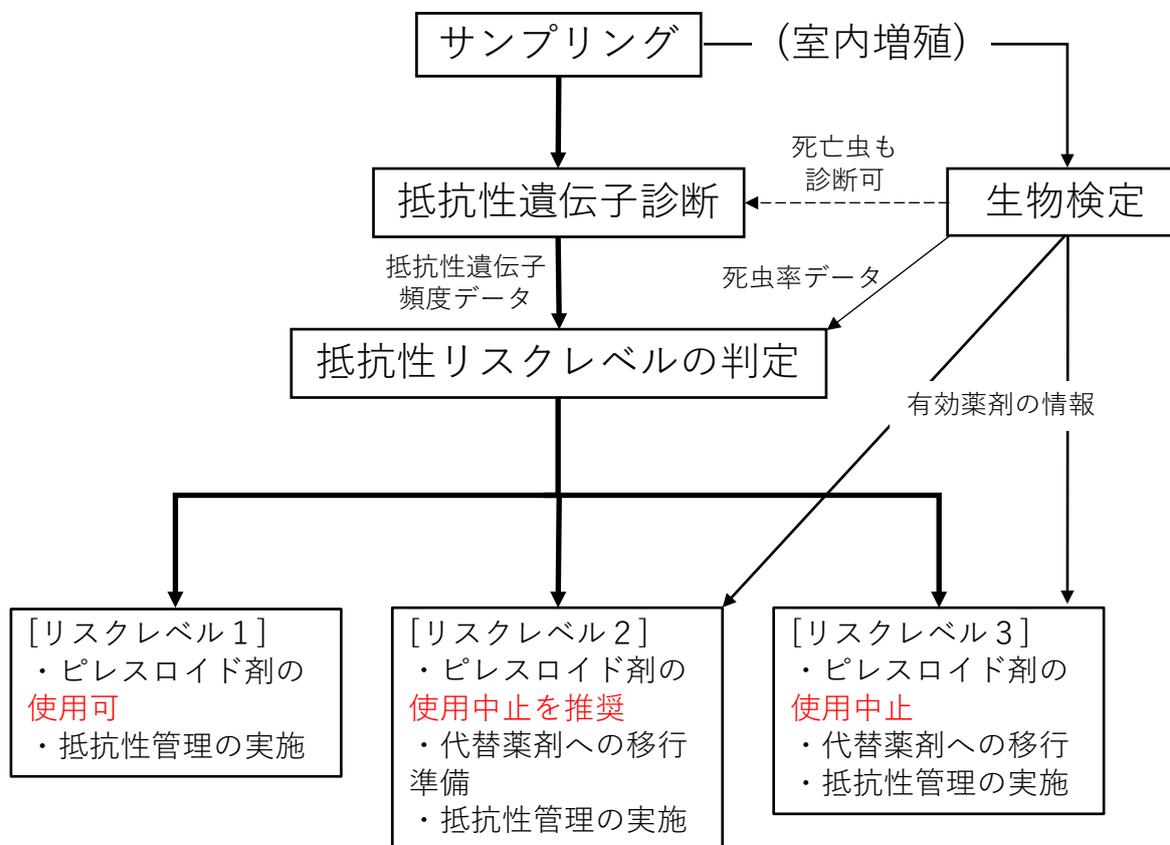
ネギアザミウマには、産雄単為生殖型 (Arrhenotoky) と産雌単為生殖型 (Thelytoky) の2つの生殖型が確認されている。産雄単為生殖型は、雌雄成虫が交尾した後に受精卵 (2倍体) が雌、未受精卵 (単数体) が雄になる生殖様式である。もう一方の産雌単為生殖型では、雄個体は存在せず、雌成虫が雌のみを産む生殖を行う。従来、日本国内では一部の地域を除いて、産雌単為生殖型のみが存在すると考えられてきたが (三浦ら、2013)、近年、15道府県で産雄単為生殖型の発生が確認されており、両生殖型が混在している事例もある (武田、2014)。さらに、産雄単為生殖型のネギアザミウマ個体群では、産雌単為生殖型の個体群と比較して薬剤感受性が低下している事例も報告されている (武澤、2012 ; 十川ら、2013)。

本ガイドライン案では、ピレスロイド剤 (3A) を対象について、ネギアザミウマの抵抗性遺伝子診断や生物検定から抵抗性リスクレベルを判定するとともに、レベルに応じた防除体系の構築と抵抗性管理法を解説する。なお、ネギアザミウマでは2つの生殖型が混在する地域があること、また、生殖型の正確な

判定には手間がかかることを考慮して、本ガイドライン案に示した抵抗性遺伝子診断や生物検定では、生殖型の厳密な識別は求めている。

2) 薬剤抵抗性管理の具体的手順

a) フローチャート



b) サンプリング (3-4 参照)

b-1) 見取り

微小なネギアザミウマを圃場で直接採集することは煩雑であるため、ネギアザミウマ成虫が生息する葉や花ごと採集してチャック付ポリ袋に保存して持ち帰り、実験室で吸虫管などを用いて回収する方法が効率的である。1つの圃場で10か所程度の地点を選定し、後述のリスクレベル1の判定にはネギアザミウマ雌成虫を80個体以上、リスクレベル2か3かの判定には30個体以上を採集する。

b-2) 粘着トラップ

粘着トラップは青色タイプを使用する。黄色タイプも利用できるが、他の昆虫が多数捕獲されると分別に時間を要する。地域における抵抗性の現状を把握するためには、青色粘着トラップを地域内の複数か所に設置する。

また、圃場単位で抵抗性診断を実施する場合には、各圃場にトラップを設置する。捕獲されたネギアザミウマはヘキサンを使用して粘着トラップから引き剥がし、99.5%エタノールを入れた容器に保存する。気温が高い時期は、粘着トラップに捕獲されたネギアザミウマの DNA が損失しやすくなるため、トラップ設置後 1 週間以内に捕獲された個体を使用する。

c) 薬剤抵抗性検出

c-1) 遺伝子診断法 (4-4 参照)

マニュアルに記載したマルチプレックス PCR 法により、ピレスロイド剤 (3A) 抵抗性に関連する 1 つの遺伝子変異を個体別に診断する。抵抗性遺伝子の遺伝子型 (抵抗性ホモ、感受性ホモ、ヘテロ) から抵抗性遺伝子頻度を算出し、リスクレベルを判定する。ここでは、雌個体を診断の対象とする。各個体の生殖型を区別する必要はない。なお、誤って他種のアザミウマ類を PCR 解析した場合、ネギアザミウマのピレスロイド剤 (3A) 抵抗性または感受性遺伝子を示すバンドパターンが検出される可能性があるので留意する (ミナミキイロアザミウマ、ミカンキイロアザミウマ、ヒラズハナアザミウマでは検出されないことを確認している)。

c-2) 生物検定法 (5-4 参照)

マニュアルにしたがって、ピレスロイド剤 (3A) に対する感受性検定を実施する。ただし、リスクレベルの判定は、上述の遺伝子診断法で得られた抵抗性遺伝子頻度に基づいて行うため、生物検定法で得られた補正死虫率データは、リスクレベル判定の参考とする。一方、遺伝子診断法が開発されていないピレスロイド剤 (3A) 以外の薬剤の防除効果の確認には、この生物検定法を使用する。

c-3) 圃場検定法

圃場における防除試験を新農薬実用化試験・殺虫剤圃場試験法 (日本植物防疫協会、2016) に従って実施する。本試験を実施することにより、遺伝子診断及び生物検定の結果と照らし合わせた総合的な判断が可能になる。

c-4) 生殖型診断法

産雄単為生殖型 (Arrhenotoky) と産雌単為生殖型 (Thelytoky) の識別には、ア) 採集した雌成虫を個体飼育して、その子世代と孫世代の性別から判定する方法と、イ) ミトコンドリア DNA の COI 領域の塩基配列に基づいて判定する方法、の 2 つがある。どちらの方法も相澤 (2018) で解説されている。なお、DNA による判定では、一部の個体群で逆の結果が出る事例も報告されているので留意する。

3) 判断基準

遺伝子診断	生物検定	リスク レベル	望ましい対策
抵抗性 遺伝子頻度	補正死虫率		
5%未満	100%	1	ピレスロイド剤（3A）の使用を継続してもよい。ただし、本剤抵抗性の発達を抑制するためにも、抵抗性管理法を積極的に採用する。
30%未満	70%以上	2	ピレスロイド剤（3A）の使用を推奨しない。抵抗性管理法を積極的に採用するとともに、代替薬剤への移行を準備する。
30%以上	70%未満	3	ピレスロイド剤（3A）の使用を中止する。抵抗性管理法を積極的に採用するとともに、代替薬剤に移行する。

リスクレベルの判定は、「抵抗性遺伝子頻度」で行う。生物検定による補正死虫率データは、リスクレベル判定の参考とする。

リスクレベル1の判定のためには、雌成虫80頭を採集し、個体別に遺伝子型を判定してピレスロイド剤抵抗性遺伝子頻度を求める。計算式は「4-4 ネギアザミウマのピレスロイド剤抵抗性遺伝子診断法」に記してある。また、「1-3-4 グループテストイング（group testing）」の方法を用いれば、より少ないPCRの回数でピレスロイド剤抵抗性遺伝子頻度を推定できる。なお、80頭以上の雌成虫が採集できなかった場合は、30頭の雌成虫を個体別に抵抗性遺伝子診断を行い、抵抗性遺伝子が“非検出”の場合をリスクレベル1と判定しても差し支えない（参照「1-3-9 抵抗性リスクレベルの判定」）。

一方、すでに抵抗性遺伝子の存在が明らかで、リスクレベルの2か3かを判定する場合には、雌成虫30個体を採集し、個体別に抵抗性遺伝子診断を行って抵抗性遺伝子頻度を求めれば良い。

4) 代替防除手段について

「薬剤を使用する限り薬剤抵抗性の発達を防ぐことはできない」ことを念頭に置き、リスクレベルの高低にかかわらず、下記の代替防除手段（＝抵抗性管理法）の積極的な採用を推奨する。

- a) 抵抗性発達リスクの高い薬剤の使用制限

抵抗性遺伝診断や生物検定においてピレスロイド剤 (3A) 抵抗性が検出された場合は (リスクレベル 2 以上)、原則、ピレスロイド剤 (3A) の使用を中止すべきであるが、他の害虫に対してピレスロイド剤 (3A) の利用がどうしても必要な場合には、1 作期 1 回を使用回数の上限とする。また、生物検定において感受性の低下 (補正死虫率 70% 未満) が確認された他の薬剤についても、使用を制限することが望ましい。

b) 系統の異なる薬剤の混合散布

ネギアザミウマに対する登録薬剤のうち、ピレスロイド剤 (3A) とは系統の異なる薬剤を利用することにより、ピレスロイド剤 (3A) に対する抵抗性発達を抑制することができる。

c) 選択性薬剤の使用による土着天敵の保護・利用

ピレスロイド剤 (3A) の他、カーバメート剤 (1A)、有機リン剤 (1B) などの非選択性薬剤は、土着天敵類の生存に強い影響を及ぼすため、基本的に防除体系への組み入れは避ける。一方、キチン生合成阻害剤 (15) やジアミド剤 (28) などの選択性薬剤は土着天敵類に対する影響が小さいため、防除体系への組み入れが可能である。ただし、どのような薬剤も連続使用は抵抗性発達リスクを高めるため、使用回数を厳守する。

d) 物理的防除法の活用

ビニールハウスなどの施設圃場では、紫外線カットフィルム、赤色防虫ネット、光反射シート (タイベック) などが、ネギアザミウマに対する侵入抑制効果が確認されている。

e) 天敵、昆虫病原糸状菌の活用

タイリクヒメハナカメムシ、ククメリスカブリダニ、スワルスキーカブリダニ、リモニカスカブリダニなどの天敵が、アザミウマ類の生物農薬として市販されている。また、昆虫病原糸状菌のポーベリア バシアーナ、メタリジウム アニソプリエも製剤化されている。

タバコカスミカメもアザミウマ類の有力な土着天敵であり、バンカー法も含めた利用法が開発されている。

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/laboratory/narc/manual/060741.html

5) 地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント

ネギアザミウマの薬剤感受性は地域によって異なる場合がある。抵抗性管理の実施にあたっては、地域ごとに抵抗性遺伝子診断や生物検定を行った上で抵抗性リスクレベルを判定し、レベルに応じて防除体系を構築する必要がある。

6) 薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報と事例集

a) ネギアザミウマの薬剤感受性の現状

表 1 は、2017 年に茨城県内のネギ圃場で採集したネギアザミウマ雌成虫について、各種薬剤に対する感受性を調査した結果である。ピレスロイド剤 (3A) は、県北地域の一個体群を除いてほとんど効かないレベルまで抵抗性が発達している。また、ネオニコチノイド剤 (4A) やスピノシン剤 (5) も、地域によって感受性が低下している事例も確認される。ネギアザミウマの生殖型については、薬剤抵抗性発達が進んでいる県南、県西地域で産雄型が優占しており、これは、他県の事例と同様に、産雄型優占とピレスロイド剤 (3A) 感受性低下の関連が疑われる現象と考えられる。

表 1 茨城県内のネギから採集したネギアザミウマ雌成虫の各薬剤に対する感受性（補正死虫率）－平成 29 年度のデータ－

供試薬剤 ^{a)}	希釈 倍数	県北地域			県南地域		
		常陸太田市A (10月2日) ^{b)}	常陸太田市B (10月2日)	常陸大宮市A (8月1日)	つくば市A (8月1日)	つくば市B (8月1日)	つくば市C (8月1日)
ピレスロイド系 (3A)							
シベルメトリン乳剤	2,000	0	52.0	94.4	2.4	40.3	24.9
ネオニコチノイド系 (4A)							
アセタミプリド顆粒水溶剤	2,000	94.0	94.0	100	68.0	90.0	90.7
イミダクロプリド顆粒水和剤	5,000	97.0	100	100	76.3	100	97.2
ジノテフラン顆粒水溶剤	2,000	62.0	90.0	98.2	51.5	87.2	66.0
クロチアニジン水溶剤	2,000	94.0	95.0	100	54.5	89.5	79.1
チアメトキサム顆粒水溶剤	1,000	97.0	98.0	100	92.0	98.1	96.4
スピノシン系 (5)							
スピネトラム水和剤	5,000	100	100	100	52.0	84.5	83.8
スピネトラム水和剤	2,500	100	100	98.7	96.6	89.5	91.9
スピノサド顆粒水和剤	5,000	100	100	100	72.8	76.6	46.7
その他							
アバメクチン乳剤(6)	500	—	—	—	91.6	87.1	66.1
クロルフェナビル水和剤(13)	2,000	—	—	—	56.3	52.2	44.6
チオシクラム顆粒水和剤(14)	1,500	—	—	97.8	—	—	—
トルフェンピラド乳剤(21B)	1,000	—	—	—	46.5	58.0	21.8
シアントラニプロール水和剤(28)	2,000	—	—	—	—	—	—
ピリダリル水和剤(UN)	1,000	—	—	—	0.4	0	0.6
ピレスロイド ^{c)} 剤抵抗性遺伝子 (T929I) 頻度% ^{c)}		94.0	72.0	48.0	100	100	100
産雄型の比率% ^{c), d)}		90.6	71.9	50.0	93.3	100	100

供試薬剤 ^{a)}	希釈 倍数	県西地域					
		結城市A (9月25日)	結城市B (9月25日)	結城市C (9月25日)	坂東市A (10月24日)	境町A (7月24日)	境町B (7月24日)
ピレスロイド系 (3A)							
シベルメトリン乳剤	2,000	15.0	13.3	4.0	5.2	1.2	9.7
ネオニコチノイド系 (4A)							
アセタミプリド顆粒水溶剤	2,000	89.9	90.2	93.0	80.3	92.3	79.1
イミダクロプリド顆粒水和剤	5,000	96.7	100	99.0	89.2	88.2	62.0
ジノテフラン顆粒水溶剤	2,000	90.0	90.1	77.0	77.3	80.3	64.8
クロチアニジン水溶剤	2,000	63.0	65.2	75.0	29.8	89.8	66.6
チアメトキサム顆粒水溶剤	1,000	94.6	97.6	88.0	66.7	89.7	60.4
スピノシン系 (5)							
スピネトラム水和剤	5,000	87.0	75.3	57.0	77.8	80.2	81.9
スピネトラム水和剤	2,500	94.2	89.6	90.0	91.7	80.0	93.0
スピノサド顆粒水和剤	5,000	70.8	73.8	28.0	55.2	60.5	25.0
その他							
アバメクチン乳剤(6)	500	80.1	100	73.0	—	91.7	97.9
クロルフェナビル水和剤(13)	2,000	—	—	—	—	—	—
チオシクラム顆粒水和剤(14)	1,500	93.5	94.7	100	100	58.3	73.3
トルフェンピラド乳剤(21B)	1,000	—	—	—	—	50.3	29.3
シアントラニプロール水和剤(28)	2,000	95.5	96.0	71.0	100	78.6	28.9
ピリダリル水和剤(UN)	1,000	—	—	—	—	—	—
ピレスロイド ^{c)} 剤抵抗性遺伝子 (T929I) 頻度% ^{c)}		100	100	100	100	100	100
産雄型の比率% ^{c), d)}		100	96.8	100	100	100	100

^{a)} 括弧内の数字はIRACによる殺虫剤の作用機構分類、^{b)} ネギアザミウマの採集日、^{c)} 32個体を供試、^{d)} 産雄型/(産雄型+産雌型)×100

b) 遺伝様式

ネギアザミウマのピレスロイド剤 (3A) 抵抗性の遺伝様式は明らかとなっていないが、本プロジェクトの研究結果において、野外の抵抗性個体のほとんどで、抵抗性遺伝子 (T929I 変異) の遺伝子型が抵抗性ホモ型であり、また、ヘテロ型

の個体のほとんどが感受性であったことから、完全劣性または不完全劣性であることが予想される。相澤（2018）では、すべての抵抗性系統で抵抗性遺伝子の遺伝子型が抵抗性ホモ型であったことが報告されている。

c) 薬剤抵抗性管理を考慮したネギアザミウマ防除体系の事例

ネギアザミウマのピレスロイド剤（3A）抵抗性個体が優占するネギ栽培圃場において、ピレスロイド剤（3A）を複数回散布する「ピレスロイド剤連用区」と、ピレスロイド剤（3A）以外の代替殺虫剤を散布する「代替剤使用区」を設置して（表 2）、ネギに寄生するネギアザミウマの個体数と食害程度を経時的に調査した。

「ピレスロイド剤連用区」では、ネギアザミウマの個体数が収穫 2 週間前から急増し、収穫直前には食害程度が約 3 のレベルまで達した。一方の「代替剤使用区」では、収穫 2 週間前にはネギ株上でネギアザミウマが見られなくなり、収穫直前の食害程度も 0.5 未満となった（図 1）。これらの結果は、作用機作の異なるピレスロイド剤以外の複数の殺虫剤を散布することでネギアザミウマを抑制できることを示している。

表 2 ネギの「ピレスロイド剤連用区」と「代替剤使用区」における殺虫剤の散布歴

試験区	4/17	5/19	7/21	8/3	8/9	8/17	8/24
ピレスロイド剤連用区	シアントラニリプロール [28] (苗灌注)	シペルメトリン [3A]	トルフェンピラド [21A]	シペルメトリン [3A]	ピリダリル[UN]	シペルメトリン [3A]	フロニカミド[29]
代替剤使用区		スピネトラム[5]	イミダクロプリド [4A]	スピネトラム[5]	チオシクラム[14]	チアメトキサム [4A]	シアントラニリプロール [28]

試験地：茨城県農業総合センター園芸研究内のネギ栽培圃場

耕種概要：夏扇 3 号、2017 年 4 月 20 日定植、9 月 1 日収穫、1 区 9×7m（反復なし）

[]内の数字は IRAC による作用機構分類、ピレスロイド剤は黄色セルで示した。

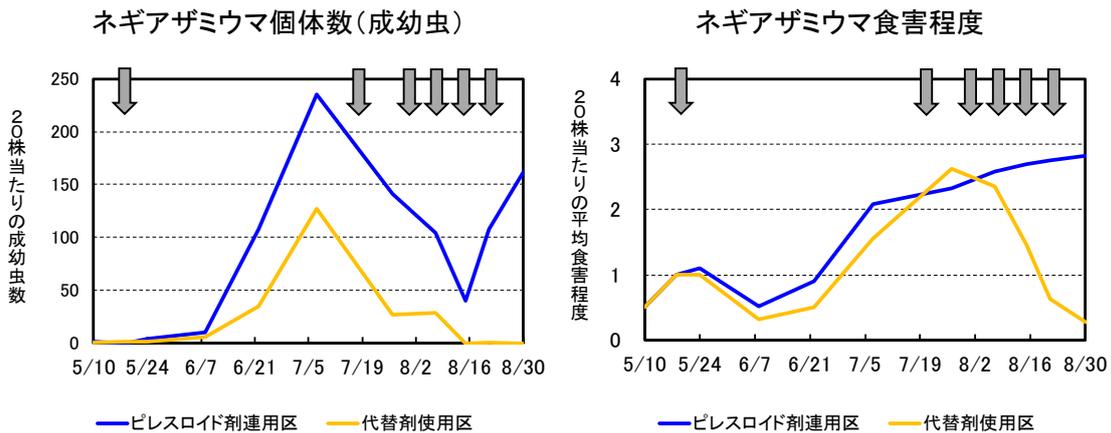


図1 ネギの「ピレスロイド剤連用区」と「代替剤使用区」におけるネギアザミウマ*個体数と被害程度

下向き矢印は殺虫剤の散布日を示す。

被害程度 0：全葉面積に被害なし、被害程度 1：全葉面積の 1～10%の被害、被害程度 2：全葉面積の 11～20%の被害、被害程度 3：全葉面積の 21～30%の被害、被害程度 4：全葉面積の 31%以上の被害とした。

*前年に同試験地で発生していた個体群（2016 年 6 月 24 日採集）のシペルメトリン乳剤（2,000 倍）に対する薬剤感受性は補正死亡率 21.7%であり、“ピレスロイド剤抵抗性個体が優占する圃場”で行われた試験と考えられる。なお、生殖型は、産雌型が 10 個体、産雄型 13 個体の比率で存在していた。

d) 物理的、生物的防除法を活用したネギアザミウマ防除体系の事例

ネギ栽培圃場において、株上に赤色防虫ネット（サンサンネット® e-レッド SLR 2700）を被覆した区、微生物殺虫剤（ボタニガード®ES 1000 倍）を散布した区、防除を行わなかった区の 3 区を設けて、ネギに寄生するネギアザミウマの個体数を調査した。その結果、「赤色防虫ネット被覆区」や「微生物農薬散布区」では、「無処理区」と比較して、ネギアザミウマの個体数は 60%程度になった（図 2）。これは、殺虫剤以外の物理的、生物的防除資材を活用することで、ネギアザミウマをある程度抑制できることを示している。一方、一つの物理的、生物的防除資材でネギアザミウマを完全に抑制することは容易ではなく、殺虫剤も含めた複数の防除手法の組み合わせが実用的である。

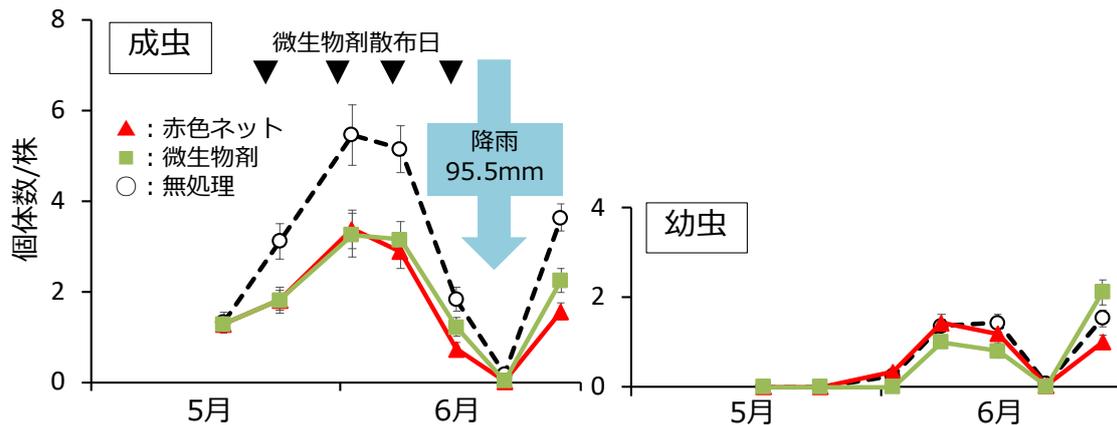


図2 ネギの「赤色防虫ネット被覆区」、「微生物殺虫剤散布区」、「無処理区」におけるネギアザミウマの個体数

(執筆代表者 太田 泉)

文献

- 相澤美里 (2018) ネギアザミウマの異なる生殖系統における合成ピレスロイド剤抵抗性機構と広域的・局所的分布に関する分子生態学的研究. 香川農試研報 69:1-30.
- 土井 誠・土田祐大・片井祐介・多々良明夫 (2014) 静岡県西部地域の露地ネギに発生するネギアザミウマの薬剤殺虫効果. 関西病虫研報 56:111-113.
- 春山直人・松本華苗 (2013) 栃木県の園芸作物に発生したアザミウマ類 6 種に対する各種薬剤の殺虫効果. 関東東海病虫研報 60:121-124.
- 鹿島哲郎・草野尚雄・小西博郷・星野真西・富田恭範 (2013) ネギアザミウマの薬剤感受性およびハウス栽培ニラにおけるネギアザミウマに対する防虫ネットの防除効果. 茨城県農業総合センター園芸研究所報告. 20:35-42.
- 三浦一芸・十川和士・渡邊丈夫・伊藤政雄 (2013) ネギアザミウマのバイオタイプ. 植物防疫 67:662-665.
- 日本植物防疫協会 (2016) <http://www.jppa.or.jp/test/data/tebiki1.pdf> 及び <http://www.jppa.or.jp/test/data/tyousahou-yasai-musi.xlsx>
- 大井田 寛・大谷直樹・中井善太 (2012) アザミウマ類 4 種の千葉県内個体群に対する各種薬剤の殺虫効果. 関東東海病虫研報 59:131-133.
- 武田光能 (2014) ネギアザミウマを巡る諸問題 (寄主植物と被害、生殖型並びに薬剤抵抗性のアンケート調査について). 植物防疫 68:248-254.
- 武澤友二 (2012) 遺伝子診断による北海道空知・上川地方における合成ピレスロイド剤抵抗性ネギアザミウマの発生調査. 北日本病虫研報 63:184-188.

柴尾 学・田中 寛 (2012) 大阪府におけるネギアザミウマ産雄単為生殖系統の薬剤殺虫効果. 関西病虫研報 54:185-186.

十川和士・渡邊丈夫・伊藤政雄・武智和彦・三浦一芸 (2013) 四国におけるネギアザミウマ生殖系統の分布とその薬剤感受性. 植物防疫 67:666-671.

2-5 ナミハダニ

1) ナミハダニの薬剤抵抗性の現状と対策の考え方

ナミハダニは野菜、花卉、果樹など極めて多くの農作物を加害する重要な農業害虫の一つである。さらに薬剤抵抗性の発達が著しく（例えば、今村・國本, 2016）、世界中で大きな問題となっている。静岡県 of イチゴで平成 26 年度の防除基準に掲載された殺ダニ剤は 11 剤ある（物理防除剤を除く）。しかし、これらの内で、他府県も含めた各地のイチゴ圃場において、現在も比較的安定して高い防除効果を示している薬剤は 3~4 剤程度であり、その他の薬剤については効果が低下している圃場が見られ、バラやキク、落葉果樹においても同様の傾向にある（中村・高倉, 2001; 吉川, 2003; 國本, 2010; 大仲・西野, 2013 など参照）。このため、各薬剤の効果の確認とともに抵抗性発達リスクを勘案した適切な防除法の選択が重要である。

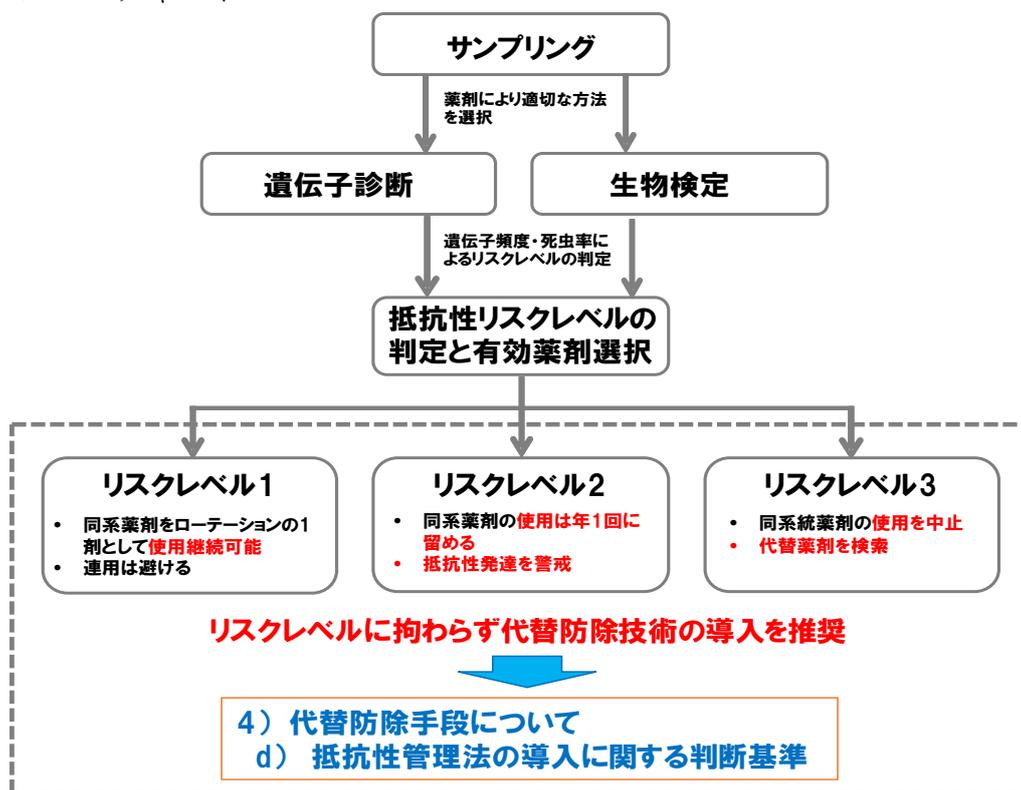
ナミハダニ黄緑型は殺ダニ剤抵抗性が発達しやすいので、殺ダニ剤で防除を行う場合には、感受性検定を実施して抵抗性発達程度のモニタリングを行い、使用薬剤を選択するのが望ましい。これに併せて、抵抗性発達を予防もしくは遅延させるため、可能な限り複数の系統の殺ダニ剤によるローテーション防除を行うとともに、物理的防除、生物的防除等の代替防除技術を活用した抵抗性管理法の積極的な導入に努め、殺ダニ剤使用回数の削減に努める。

また、殺ダニ剤散布を中心とした管理を行う場合には、系統のローテーションが可能な薬剤を多数確保しておく必要がある。効果が高い薬剤であっても、そのみを連用すると、早晚、抵抗性発達を招き、防除体系の崩壊を引き起こす。従って、個別薬剤の効果のみに依拠して薬剤使用の可否を判断するのではなく、系統ローテーションが可能な薬剤数を検討し、効果の高い薬剤数が限られる場合は、むしろその剤を切り札として温存しながら、代替防除技術を中心とした管理体系への積極的な移行を計る必要がある。

本ガイドライン案では、ナミハダニの抵抗性遺伝子診断や生物検定から抵抗性リスクレベルを判定するとともに、レベルに応じた防除体系の構築と抵抗性管理法を解説する。本稿では、遺伝子診断法が開発されたエトキサゾールとその他の薬剤に対する簡易検定法を基にガイドライン案を構成している。

2) 薬剤抵抗性管理の具体的手順

a) フローチャート



b) サンプリング

(1) 遺伝子診断用 (4-5 参照)

ハダニの寄生葉を結露防止のための新聞紙を入れたチャック付きビニル袋に入れて持ち帰り、冷蔵庫 (5~10℃) に保管する。ハダニは移動分散性が低く、同一施設内でも場所によって遺伝的に異なった集団がパッチ状に分布するため、1カ所から大量に採集せず、圃場全体の複数の発生箇所から採集するのが望ましい。小型吸虫管ないしは面相筆などをもちいて、保存した葉から直接ハダニの雌成虫を 1.5 mL チューブに集める。雌成虫は 1 本のチューブに 100 頭以内とする。チューブの数はハダニの発生状況やハウスの規模などによって増やすことが勧められるが、基本的に 1 施設当たり 1 本とする。ハダニを集めた後、チューブを氷などで冷却することでハダニの動きを抑制すると DNA 抽出の際にチューブの底にハダニを集めやすく、取り扱いが楽になる。

(2) 生物検定用 (5-5 参照)

遺伝子診断用と同様にハダニをサンプリングする。通常は 1 薬剤につき雌成虫約 20 頭×3 反復で実施する。これに無処理区を加えた頭数が必要にな

る。必要な採集個体数は、採集した個体を直接使用するか、実験室で増殖して使用するか、また検定に用いる薬剤数などによって異なる。持ち帰る途中の死亡や検定操作時のロスも考慮して、少なくとも必要頭数の2倍以上を採集しておく。

c) 薬剤抵抗性検出

c-1) 遺伝子診断法 (4-5 参照)

マニュアルに従ってチューブごとに DNA を抽出し、制限酵素とリアルタイム PCR を用いた RED- $\Delta\Delta$ Ct 法 (Osakabe et al. 2017) により、サンプル中に含まれているエトキサゾール抵抗性遺伝子の頻度を診断する。なお、リアルタイム PCR の利用が困難な場合は電気泳動による個体ごとの検出を行うことが可能である。

c-2) 生物検定法 (5-5 参照)

マニュアルに従ってインゲンリーフディスク法により実施する。労力をかけられない場合や散布塔の設備がない場合は簡易検定法により実施する。

3) 判断基準

遺伝子診断		生物検定	リスクレベル	望ましい対策
抵抗性遺伝子頻度		補正死虫率		
優性	劣性			
非検出	非検出	100%	1	当該殺ダニ剤及び同系統の殺ダニ剤の使用を継続しても良い。ただし、できる限り他の系統の薬剤とのローテーションで使用し、連用は避ける。
3%未満	22%未満	95%以上	2	当該殺ダニ剤を使用しても良い。ただし、同系統の薬剤も含めて使用回数は年1回に留める。また、感受性検定を実施して抵抗性発達程度のモニタリングに努める。
3%以上	22%以上	95%未満	3	当該殺ダニ剤及び同系統の殺ダニ剤の使用を中止する。また、感受性検定を実施して代替薬剤を検索するとともに、当該薬剤の抵抗性発達程度をモニタリングする。

ナミハダニの抵抗性遺伝子頻度は雌成虫で検定することを基本とする。雌雄混在の場合は性比により遺伝子頻度と死亡率の関係が変化するので、卵での判定には注意が必要である（本節6)-c)参照）。

ハダニは繁殖パッチごとに抵抗性遺伝子頻度が異なり、増殖が速いことからリスクレベル2と3の境界を抵抗性が優性遺伝の場合と劣性遺伝の場合でそれぞれ3%（優性遺伝）および22%（劣性遺伝）とした。また、近接したハウス間であっても抵抗性遺伝子頻度が異なる場合も多いため、ハウスごとに抵抗性の実態を調査することが望まれる。これらの抵抗性遺伝子頻度を推定する場合、制限酵素処理とリアルタイムPCRによる頻度推定法（RED- $\Delta\Delta C_t$ 法）により3%（優性遺伝）と22%（劣性遺伝）の抵抗性遺伝子を検出するために必要な雌成虫数は130頭（優性遺伝）および20頭（劣性遺伝）である。RED- $\Delta\Delta C_t$ 法では50個体程度までを1つのサンプルとしてまとめて処理できるため、実際に処理するサンプル数は優性遺伝で3、劣性遺伝では1となる。リスクレベル1の判定は抵抗性遺伝子頻度が0%であることが基準である。しかし、必要なサンプル数を理論的に決めることはできない。したがって、前述のサンプル数で検出されなかった場合には「未検出（リスクレベル1）」と判断するのが実用的である。発生が少なく必要個体数が確保できない場合は確保できたサンプルでの結果をもってハウス内の抵抗性の状況を判定することになるが、実際のリスクレベルよりも低く見積もってしまう可能性があることに留意する必要がある（1-3参照）。また、発生のごく初期にはPCR産物を制限酵素処理して電気泳動する方法（PCR-RFLP法）で個体ごとに遺伝子型を検出できる。しかし、抵抗性の発達速度は薬剤によっても異なるため、散布後の観察が重要である。

なお、調べたサンプルで抵抗性遺伝子が非検出の場合においても、抵抗性遺伝子を持つ少数個体の侵入により抵抗性が発達する可能性があるため、引き続き薬剤効果に注視が必要である。

4) 代替防除手段について

地域によっては既に使用可能な薬剤が殆どない例も少なくない。このことは新規に開発される薬剤における抵抗性管理においても重要であり、抵抗性発達の兆しの有無にかかわらず、生物的防除や物理的防除など、他の防除法との組み合わせを検討することを推奨する。

a) 土着天敵の保護と天敵製剤の活用

本圃ではカブリダニ製剤を利用した防除が普及しており、公設試等が作成した防除マニュアルが公開されている（例えば、奈良県農業研究開発センター，2018）。また、育苗圃ではハダニアザミウマなどの土着天敵を

活用する方法や、長い育苗期間をカバーするようバンカーシートなどを活用したカブリダニ製剤利用も検討できる。

b) 紫外線による物理的防除法の活用

施設栽培のイチゴをはじめとして、紫外線ランプ（UVB）と反射シートを利用した新たな物理的防除法が開発されつつある（田中 他, 2017）。

c) 気門封鎖剤の活用

化学農薬とは作用機作が異なる気門封鎖剤を活用する。使用に当たっては、ハダニの生息部位である葉裏にしっかりとかかるように散布する。ハダニの移動分散性は高くないため発生初期のスポット散布は有効である。

d) 定植前の苗に対する炭酸ガス（CO₂）処理（村井, 2018）

e) 抵抗性管理法の導入に関する判断基準

リスクレベル1の殺ダニ剤の系統数	望ましい対策
3 系統以上	当面は殺ダニ剤散布を中心とした化学的防除体系を継続して良いが、同系統の薬剤の連用は避けて、異なる系統の薬剤をローテーションで使用するとともに、感受性検定による抵抗性発達のモニタリングに努める。また、使用可能な薬剤数を確保しておくため、抵抗性管理法の導入を検討する。
2 系統	殺ダニ剤のみによる防除は困難なので、気門封鎖剤を積極的に使用するとともに、使用可能な薬剤がこれ以上減少しないようにするため、生物的防除、物理的防除等の代替防除技術の試験導入を行うなど、抵抗性管理法への早期の移行を図る。
1 系統以下	生物的防除、物理的防除等の抵抗性管理法を本格導入する。使用可能な薬剤が残っている場合は、抵抗性管理に失敗した場合の切り札剤として温存する。

5) 地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント

促成栽培イチゴは地域ごとに品種や育苗方法が異なっている。品種特性（立性など）や育苗方法（雨除けハウスで管理するか、露地かなど）により、ハダニ防除のための殺ダニ剤散布回数は異なってくる。栽培品種の特性として、葉柄が短く、匍匐（ほふく）気味で葉の湾曲が大きいなどハダニ寄生部位である葉裏への薬液付着が難しい場合は殺ダニ剤散布回数が増加しやすい。また、炭疽病に弱いため雨除け育苗が必須の場合もハダニが増加しやすいといえる。個々の殺ダニ剤ごとの抵抗性管理手法が確立していない段階

では、全ての殺ダニ剤に共通して散布回数を減らすことで抵抗性の発達を遅延させるようにしたい。

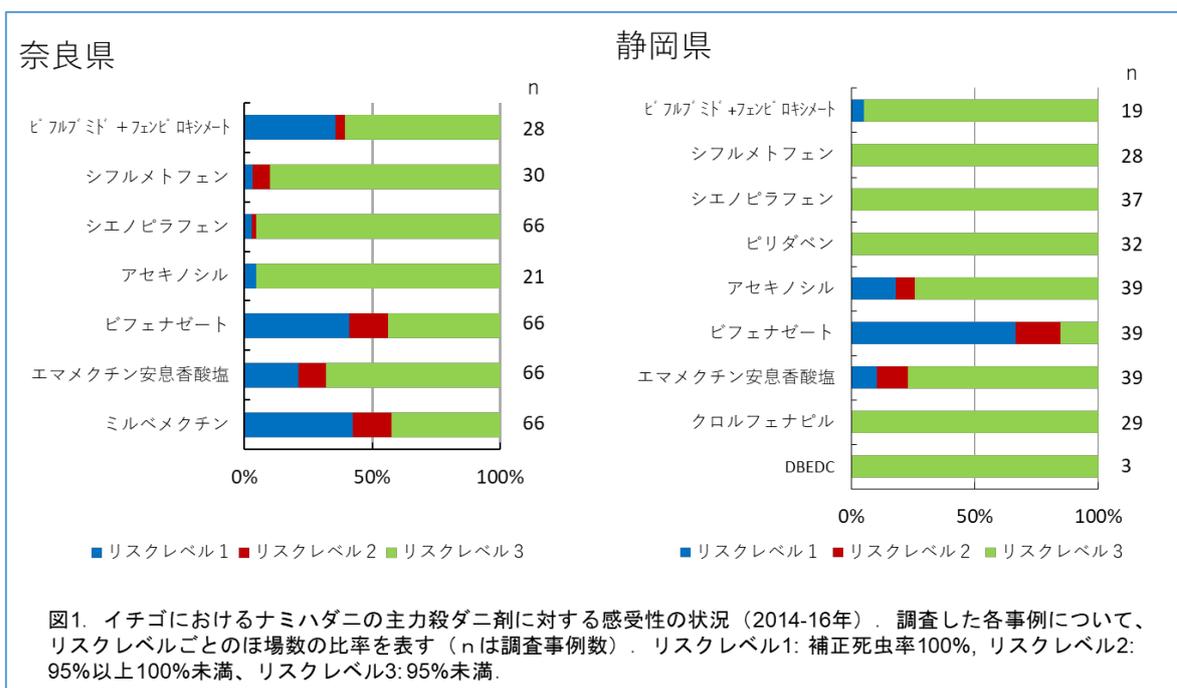
栄養繁殖であるイチゴに寄生するナミハダニは基本的には栽培時にイチゴに寄生して移動する。薬剤による淘汰は栽培者自身によるものである。しかし、例外が幾つかあり、最も重要なのが、育苗期間中の殺ダニ剤散布の影響である。多くの県では増殖事業者等が、生産者団体等に無病苗を配布する取り組みが行われている。育苗がイチゴ生産者とは異なる管理者により行われており、「次に渡すときにはハダニを0にしよう」という意識が働きやすく、ハダニの有無に関わらず殺ダニ剤がスケジュール的に散布されることもある。地域ごとに親株の増殖管理の仕組みは異なると思われるので、一概には言えないが、できるだけ殺ダニ剤散布をしないハダニ管理法に取り組む必要がある。

既に本圃ではカブリダニ製剤による生物的防除が確立しているので、今後育苗での殺ダニ剤使用回数の削減が大きなポイントと言える。将来的には、生物的防除法と共に、現在開発が進められている紫外線を用いた物理的防除法等を組み込んだ総合的害虫管理（IPM）体系が検討可能である。

6) 薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報と事例集

a) イチゴ圃場における薬剤感受性低下の現状

ナミハダニの薬剤感受性低下の状況は地域や圃場によって異なり、感受性が低下した薬剤の種類とその程度は一様ではない。しかし、感受性の高い薬剤の種類数が十分に確保されている圃場であっても、物流が発達している現



在では、苗などとともに抵抗性遺伝子を持った個体が侵入するリスクが常にある。そこで、現在イチゴで使用されている主力剤に対する感受性低下状況について、静岡県と奈良県で実施した（図1）。その結果、全ての殺ダニ剤でリスクレベル3の事例が大半を占めている。つまり、使用を中止すべきリスクレベル（「3 判断基準」の表を参照）まで感受性が低下しているほ場がほとんどであった。

次に、調査した事例において、リスクレベル1を示した薬剤系統数が圃場ごとに幾つあったかを図2に示す。それによると、殆どの圃場においてリスクレベル1は1系統以下であり、ここでも感受性低下が深刻な状況にあるほ場が大半である実態が読み取れる。なお、「4-c)抵抗性管理法の導入に関する基準」の表に従うなら、系統数1以下のほ場は、残された使用可能な薬剤を抵抗性管理に失敗した場合の切り札剤として温存し、生物的防除、物理的防除等の抵抗性管理法を本格導入する必要があるほ場である。

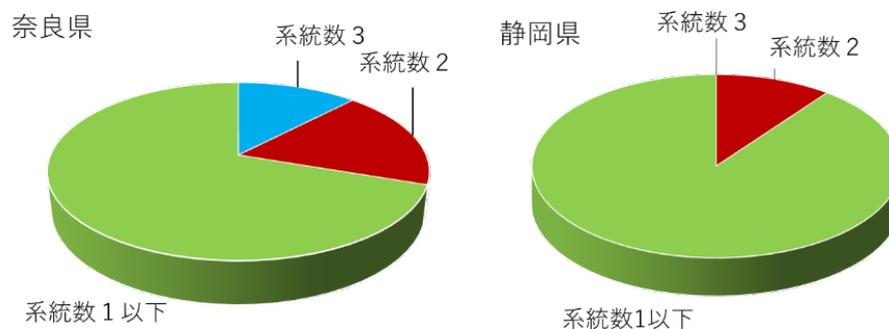
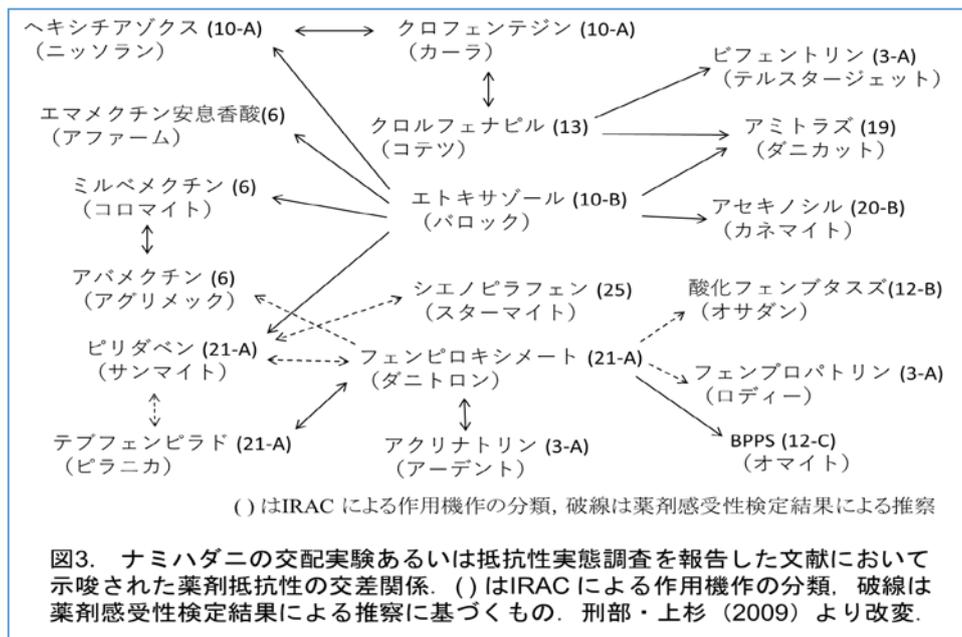


図2. リスクレベル1を示す薬剤系統数ごとのほ場の比率（2014-16年）

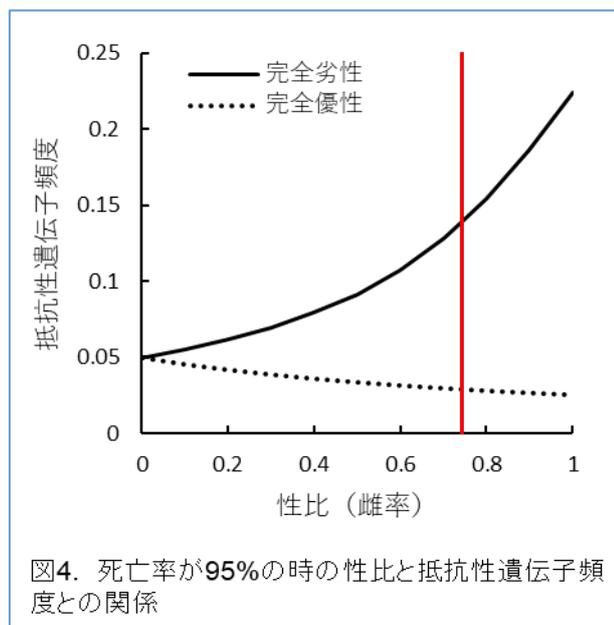
b) 文献に見られるナミハダニの薬剤抵抗性に関する殺ダニ剤間の交差関係

文献中で交差抵抗性が疑われた薬剤間の関係を図3に示す。矢印は、元の薬剤に抵抗性が発達すると矢じり側の薬剤に対する感受性が低下することを意味している。図では、単に薬剤感受性検定結果において共に感受性が見られたというだけのものを破線で示している。特にそれらの薬剤間の交差関係については再検討が必要であるが、警鐘の意味も含め、ここでは敢えてそのような不完全な情報についても含めて表した。全く作用機作が異なる薬剤間でも交差が疑われるデータが得られている点に注意が必要である。



c) 遺伝様式と死亡率との関係

ナミハダニの雌成虫は受精卵と未受精卵を産み、受精卵は二倍体の雌に、未受精卵は半数体の雄になる。半数体の雄では薬剤抵抗性の遺伝が優性・劣性に関わらず、抵抗性遺伝子を持つか持たないかによって死亡率が決定する（図4の横軸0に相当）。一方、雌では抵抗性と感受性のヘテロの個体は、薬剤抵抗性が優性であれば薬剤散布されても生き残り、劣性では死亡することから、抵抗性の遺伝様式によって死亡率が変化する。図4は死亡率が95%の時の性比（雌率）による抵抗性遺伝子頻度の変化を示したものである。雌成虫での薬剤検定は性比1に当たり、同じ死亡率であっても、優性遺伝と劣性遺伝での抵抗性遺伝子頻度がそれぞれ2.5%および22.4%となり、もっとも大きな差が生じる。特に劣性では性比による変化が大きい。そのため、雌雄が混ざった卵での検定結果から抵抗性遺伝子頻度を推定する場合は注意が必要である。グラフの赤線は平均的なナミハダニの性比（0.743; Kondo and Takafuji, 1985）を示している



ので、卵での判定では平均的にこの程度の差になると考えられる。

d) 薬剤抵抗性の遺伝様式

イチゴで登録のある殺ダニ剤について、文献に見られる抵抗性の遺伝様式を整理して表 1 に示した。

表1 イチゴの主要殺ダニ剤の活性化・作用機構と抵抗性の遺伝様式		
薬剤	活性化・作用機構	遺伝様式
ミトコンドリア電子伝達系複合体I阻害剤 (METI ; 21A)		
フェンピロキシメート	結合部位：ミトコンドリア電子伝達系複合体IのPSSTと49kDaサブユニットとのインターフェース (ウシ)	不完全優性
ピリダベン	0	雌成虫では不完全優性だが、卵では母性効果が認められる
ピリミジフェン	0	0
テブフェンピラド	0	0
ミトコンドリア電子伝達系複合体II阻害剤 (25; β -ケトニトリル誘導體)		
シエノピラフェン	エステラーゼ (CCE) による活性化	不完全優性、卵で抵抗性レベルが低い傾向
シフルメトフェン	CCEによる活性化	雌雄間の感受性差
ミトコンドリア電子伝達系複合体III阻害剤 (20B)		
アセキノシル	0	0
ビフェナゼート	ミトコンドリア電子伝達系複合体III cytochrome bのQO阻害、CCEによる活性化	完全母性遺伝
塩素イオンチャネルアクチベーター (6; ミルベマイシン系、アベルメクチン系)		
ミルベメクチン	0	0
エマメクチン安息香酸塩 (アバメクチン)	0	中間
酸化リン酸化脱共役剤 (13)		
クロルフェナピル	0	(不)完全優性
ダニ類成長阻害剤 (10A、10B)		
ヘキシチアゾクス	CHS1膜貫通領域阻害?	(不)完全劣性、複数遺伝子
クロフェンテジン	CHS1膜貫通領域阻害?	(不)完全劣性、単一遺伝子
エトキサゾール	CHS1膜貫通領域阻害?	(不)完全劣性、単一遺伝子
ナトリウムチャネルモジュレーター (3)		
フェンプロパトリン	0	0
ピレスロイド (ビフェントリン)	0	0
アクリナトリン	0	0

優性遺伝するものとしては、フェンピロキシメート、ピリダベン、シエノピラフェン、クロルフェナピルが知られている。しかし、ピリダベンでは卵の時にのみ母性効果が認められている (Sugimoto and Osakabe, 2014)。シエノピラフェンでは雌成虫に比べて卵では感受性の低下が少ないことが報告されて

いる (Sugimoto and Osakabe, 2014) が、静岡県の施設イチゴで見つかった抵抗性系統では、著しい感受性の低下が雌成虫と卵の両方で認められている。シフルメトフェン抵抗性では、雌雄で抵抗性のレベルに差があり、雄の感受性低下は雌に比べて小さいことが明らかになった。ビフェナゼートでは、薬剤抵抗性の要因はミトコンドリア DNA のシトクロム b におけるアミノ酸置換とされており、このため顕著な母性効果が認められる (Van Leeuwen et al., 2006)。

エマメクチン安息香酸塩に対する抵抗性は中間とみられることが明らかになった。エトキサゾールとヘキシチアゾクスに対する抵抗性は劣性遺伝し、いずれの場合もキチン合成酵素 (CHS1) のアミノ酸置換 (I1017F) がこれらの薬剤とさらにクロフェンテジンに対する共通の抵抗性の要因になっている (Demaeght et al., 2014)。しかし、表 1 に 0 で示したものについては、これまでのところ遺伝様式に関する情報が得られていないため、さらなる分析と情報収集が必要である。

e) 抵抗性の発達速度

ナミハダニは受精卵が雌に、未受精卵が雄になる産雄単為生殖を行うため、雌は二倍体であるのに対して雄は半数体である。このような単数倍数性の生物では、通常二倍体生物に比べて、生存に不利な遺伝子は集団から急速に排除され、有利な遺伝子 (例えば、薬剤散布下における薬剤抵抗性遺伝子) はより速く集団内で頻度を上昇させる傾向にある (刑部, 2001)。

完全劣性の場合、理論上、抵抗性遺伝子をホモに持つ個体しか生き残れないため、抵抗性遺伝子頻度は 1 回の薬剤散布で一気に 100% 近くに上昇する可能性がある。しかし、抵抗性遺伝子が低頻度の場合は殆どがヘテロの状態で保持されているため、個体数の低下が著しく、抵抗性遺伝子頻度と個体数の増加を総合的に見た場合、一般的には優性遺伝の方が抵抗性の発達はやいと予測されている (Georghiou and Taylor, 1977)。

f) 圃場内での移動分散と薬剤抵抗性遺伝子の偏在の可能性

ナミハダニは同一の葉の上で発育した雄雌間で交尾することが多く、また雌では有効な交尾は最初の 1 回だけである。つまり、1 頭の雄の子供のみを次世代に残す。また、ハダニの密度が低い時には、それぞれの葉に最初に侵入した 1 ないし数頭の雌が持つ遺伝子によって、遺伝子頻度が大きく変化する。そのため、低密度時にはイチゴの同一株の小葉間であっても、薬剤抵抗性を含む様々な遺伝子の頻度が異なっている可能性が高い (Hinomoto and Takahuji, 1994)。また、施設栽培されている農家圃場のアーチング栽培のバラでも、わ

ずか 2-3 m 離れるだけでナミハダニの遺伝子の移動はごく限られていることが確認されている (Uesugi et al., 2009)。

静岡県の無加温ビニルハウスの土耕栽培イチゴにおいても、12月にナミハダニを放飼して移動分散を調査したところ、畝方向 2 m 程度の移動に 2~3 カ月を要した。また、生産者圃場において圃場内の複数個所からナミハダニを採集して薬剤感受性を調査したところ、採集箇所間で感受性に違いが認められ、薬剤抵抗性遺伝子が圃場内で偏在していることが確認された。遺伝子診断法と生物検定法を問わず、施設栽培圃場のナミハダニの薬剤抵抗性の状態を調査する際には、このような遺伝子の偏在を考慮して、施設内の個所ごとに調査するか、あるいは全体からまんべんなくサンプリングして調査する必要がある。また、全体をまとめて調査した際に検出された抵抗性遺伝子頻度が低かったとしても、部分的にはその頻度が高いパッチが存在する可能性を考慮しておく必要がある。

(執筆代表者：刑部正博)

文献

- Demaeght, P., E. J. Osborne, J. Odman-Naresh, M. Grbić, R. Nauen, H. Merzendorfer, R. M. Clark and T. Van Leeuwen (2014) High resolution genetic mapping uncovers chitin synthase-1 as the target-site of the structurally diverse mite growth inhibitors clofentezine, hexythiazox and etoxazole in *Tetranychus urticae*. *Insect Biochem. Mol. Biol.* 51: 52-61.
- Georghiou, A. P. and C. E. Taylor (1977) Genetic and biological influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70: 319-323.
- Hinomoto, N. and A. Takafuji (1994) Studies on the population structure of the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch, by allozyme variability analysis. *Appl. Entomol. Zool.* 29: 259-266.
- 今村剛士・國本佳範 (2016) 奈良県内のイチゴに寄生するナミハダニ黄緑型の薬剤感受性. 奈良農研セ研報 47 : 34-36.
- Kondo, A. and A. Takafuji (1985) Resource utilization pattern of two species of Tetranychid mites (Acarina: Tetranychidae). *Res. Popul. Ecol.* 27: 145-157.
- 国本佳範 (2010) 奈良県におけるナミハダニ黄緑型の殺ダニ剤感受性の推移. 奈良農総セ研報 41: 23-28.
- 村井保 (2018) 高濃度炭酸ガスによる植物の害虫フリー苗生産 —イチゴ苗の処理—. *JATAFF ジャーナル* 6(9): 37-41.
- 中村 淳・高倉 慎 (2001) 福島県におけるイチゴのナミハダニに対する殺ダニ剤の効果. 北日本病虫研報 52: 198-200.

- 奈良県農業研究開発センター (2018) 促成イチゴにおけるカブリダニ製剤を利用したハダニ防除の指導マニュアル.
<http://www.pref.nara.jp/secure/9176/itigokaburidanimanyuaru.pdf>.
- 大仲桂太・西野 実 (2013) 三重県におけるイチゴのナミハダニの薬剤感受性. 関西病虫研報 55: 113-115.
- 刑部正博 (2001) 遺伝子. ダニの生物学 (青木淳一 編). 東京大学出版会, 東京, pp. 173-193.
- 刑部正博・上杉龍士 (2009) ハダニの薬剤抵抗性. 日本農薬学会誌 34: 207-214.
- Osakabe, M., T. Imamura, R. Nakano, S. Kamikawa, M. Tadatsu, Y. Kunimoto and M. Doi (2017) Combination of restriction endonuclease digestion with the $\Delta\Delta C_t$ method in real-time PCR to monitor etoxazole resistance allele frequency in the two-spotted spider mite. Pestic. Biochem. Physiol. 139: 1-8.
- Sugimoto, N. and M. Osakabe (2014) Cross-resistance between cyenopyrafen and pyridaben in the twospotted spider mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). Pest Manage. Sci. 70: 1090-1096.
- 田中雅也・八瀬順也・神頭武嗣・刑部正博 (2017) UVB ランプと光反射シートによるハダニ物理的防除 (UV 法) について-施設イチゴにおける防除事例を中心に-. 植物防疫 71: 229-234.
- Uesugi, R., Y. Kunimoto and M. Osakabe (2009) The fine-scale genetic structure of the two-spotted spider mite in a commercial greenhouse. Exp. Appl. Acarol. 47: 99-109.
- Van Leeuwen, T., L. Tirry and R. Nauen (2006) Complete maternal inheritance of bifentazate resistance in *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae) and its implications in mode of action considerations. Insect Biochem. Mol Biol. 36: 869-877.
- 吉川 誠 (2003) 栃木県におけるイチゴおよびニホンナシに寄生するナミハダニの薬剤感受性. 関東東山病虫研報 50: 161-163.

2-6 ウンカ類

1) ウンカ類の薬剤抵抗性の現状と対策の考え方

ウンカ類にはトビイロウンカ、セジロウンカ、ヒメトビウンカの3種がいる。このうちトビイロウンカとセジロウンカは寄主植物がほぼイネに限られるため、冬季にイネがない日本や中国（最南端の海南島や広東省南部を除く）などでは越冬ができない。これら2種の越冬北限はベトナム北部や中国の海南島や広東省南部であり、そこで越冬したウンカ類がまず中国の華南地域に一次移動して数世代増殖し、6~7月の梅雨時期に南西からの季節風に乗って日本に飛来する。一方、ヒメトビウンカはイネがなくなる秋以降もイネ以外にも越年性のイネ科作物（小麦、大麦、イタリアンライグラスなど）やイネ科雑草で越冬可能である。ヒメトビウンカは、これまでは長距離移動しないといわれていたものの、近年、中国東部の江蘇省などから6月上旬の麦刈りの時期に九州などの西日本や韓国西部に大量に飛来する事例が知られている。

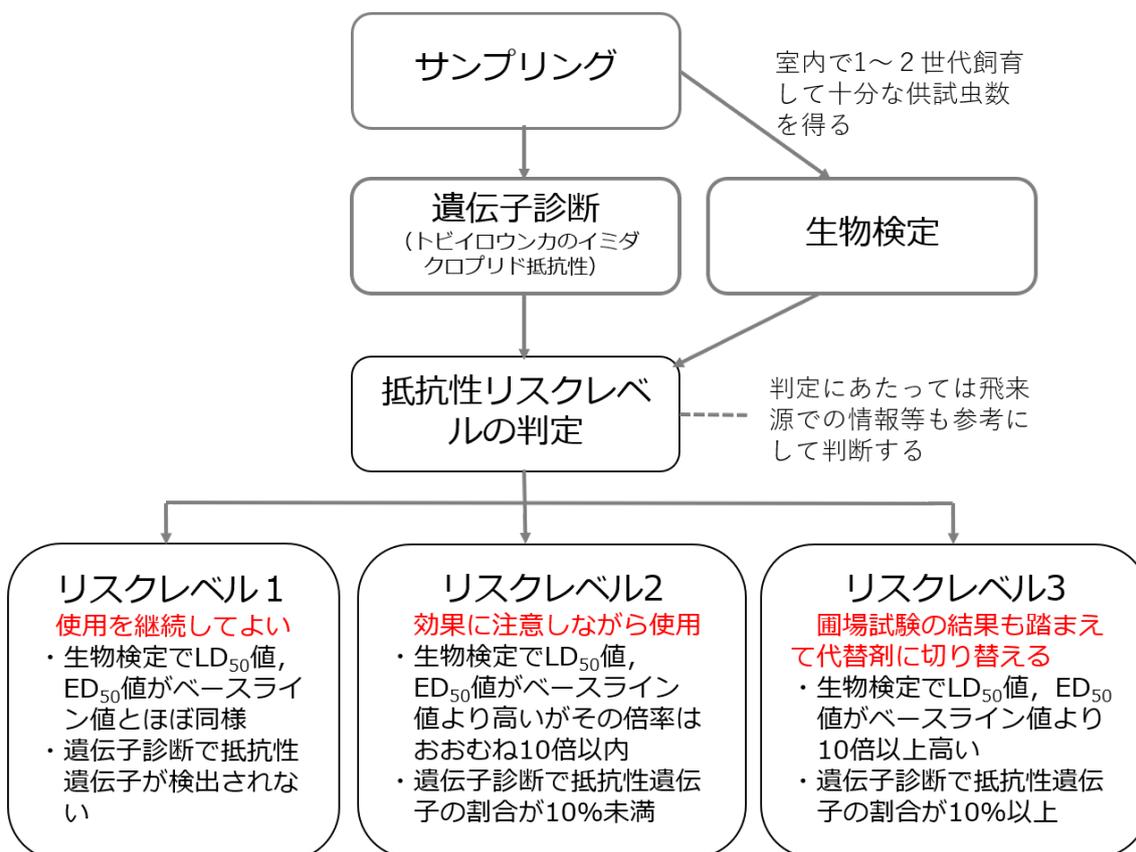
一般的に、害虫に対する薬剤抵抗性は、ある場所で同じ薬剤を使い続けることによって発達する。しかし、ウンカ類のような長距離移動性害虫では、飛来源（ベトナム北部・中国）で薬剤を多用することによって抵抗性が発達し、それが日本に飛来するという特徴がある。このため、他の害虫のように、日本国内で薬剤抵抗性を管理することによって抵抗性の発達を防ぐことはできない。

海外飛来性イネウンカ類の薬剤抵抗性管理においては、日本に飛来した虫の薬剤感受性を迅速に検定して、飛来後の国内での防除対策の構築（当年の本田散布剤の選択や次年度以降の箱施用剤の選択）に資することが、現状におけるイネウンカ類の薬剤抵抗性管理対策の基本的な考え方となる。

将来的には、ベトナムなどの飛来源において薬剤抵抗性のモニタリングを行う体制を構築し、あわせて殺虫剤の使用状況やウンカの発生状況などに関する情報を迅速に入手するシステムを構築することが、飛来源を含めたウンカ類の薬剤抵抗性対策のゴールとなる。

2) 薬剤抵抗性管理の具体的手順

a) フローチャート



b) サンプリング (3-6 参照)

海外から飛来するウンカ類については、可能な限り飛来個体群を採集する。飛来個体群が採集できない場合には、殺虫剤を使用していない水田（試験水田の無防除区などでもよい）で次世代以降の成虫を採集する。

採集した虫は、芽出しイネ苗を入れた容器などに入れて持ち帰り、遺伝子診断を行うまでは冷凍して保存する。水銀灯等のトラップで誘殺された個体や払い落としなどで採集された個体についても冷凍保存すれば遺伝子診断は可能である。遺伝子診断が目的であれば採集個体は幼虫・成虫のどちらでも良い。

採集後、実験室内で増殖してから遺伝子診断を行う必要がある場合には、室内でウンカを飼育する。ウンカ類の飼育方法については、薬剤感受性検定マニュアル（和文及び英文）（九州沖縄農業研究センター、2017a、2017b）を参照する。

c) 薬剤抵抗性検出

c-1) 遺伝子診断法 (4-6 参照)

マニュアルに基づいて、捕獲したトビイロウンカ（出来れば40個体以上）について各個体毎にPCR-RFLP法もしくはマルチプレックスPCR法による

イミダクロプリド剤抵抗性遺伝子診断を行う。

c-2) 生物検定法

ウンカ類の薬剤感受性の生物検定手法については、半数致死薬量(LD₅₀値)や半数効果薬量(ED₅₀値)を求める方法と、半数致死濃度(LC₅₀値)や半数効果濃度(EC₅₀値)を求める方法がある。LD₅₀値やED₅₀値を用いることによって、異なる年代や場所で得られた感受性データを直接比較することができる。これに対して、LC₅₀値やEC₅₀値については同時に試験した感受性系統の値との比較しかできない。このため、実用濃度での効果試験等ではなく感受性の変動を調べることを目的とする薬剤感受性検定においては、LD₅₀値やED₅₀値を求める手法が確立されている薬剤では、極力その手法で感受性検定を行うべきである。

LD₅₀値を算出できる標準的な手法には、微量局所施用法がある。現在イネウンカ類の防除に使用されている薬剤のうち、微量局所施用法を適用できる薬剤は、カーバメート剤(BPMCなど)、ピレスロイド剤(エトフェンプロックスなど)、ネオニコチノイド剤(イミダクロプリド、ジノテフラン、クロチアニジン、チアメトキサム、ニテンピラムなど)、フェニルピラゾール剤(フィプロニルなど)である。

昆虫成長調節剤(IGR剤)のうち、ブプロフェジンについては、局所施用による一回の薬剤塗布では死亡率が上がらないため、LC₅₀値を算出できる葉しょう浸漬法が標準的な手法として使われている。

昆虫に対して吸汁阻害作用を示す薬剤(例えばピメトロジンなど)については、これまでIRAC(Insecticide Resistance Action Committee、薬剤抵抗性対策委員会)では、葉しょう浸漬法によって成虫に薬剤を施用したのちにイネ苗に産卵させて次世代孵化幼虫数を数える手法が提唱されている(No.005)。しかし、この方法では半数効果濃度(EC₅₀値)は算出できるものの半数効果薬量(ED₅₀値)が算出できない。ピメトロジンの感受性検定については、九州沖縄農業研究センターで新たに開発した、微量局所施用法と次世代幼虫数の抑制効果とを組み合わせる半数効果薬量(ED₅₀値)を算出する、ピメトロジンの感受性検定法(Tsujimoto et al., 2016)を推奨する。

これら3つの感受性検定法の手順については、薬剤感受性検定マニュアル(和文及び英文)(九州沖縄農業研究センター、2017a、2017b)を参照する。

c-3) 圃場検定法

圃場における防除試験を新農薬実用化試験・殺虫剤圃場試験法(日本植

物防疫協会、2016) に従って実施する。本試験を実施することにより、遺伝子診断及び生物検定の結果と照らし合わせた総合的な判断が可能になる。

3) 判断基準

薬剤感受性検定によって求められた LD₅₀ 値や LC₅₀ 値などが、どの数値以上になると抵抗性が発達するという厳密な基準はない。これは、現場における薬剤の分量や投入量、苗箱施用薬剤については移植後日数の違いなどによって、実際に害虫に暴露する薬量が異なるからである。しかし、同一薬剤に対する LD₅₀ 値の年次変化を調査することによって、前年までに比べて LD₅₀ 値や LC₅₀ 値などが 10 倍以上増加するような場合には、防除効果が低下する可能性がある。また、微量局所施用法によって求めた LD₅₀ 値については、LD₅₀ 値が 1 µg/g 以下であれば現場における防除効果に問題はないが、LD₅₀ 値が 10 µg/g を超えるような場合については、現場においても防除効果が低下することが多い。これが大まかな基準となる。

トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性の遺伝子診断法によって検出された抵抗性遺伝子頻度については未検出でリスクレベル 1、<10%でリスクレベル 2、≥10%でリスクレベル 3 とする。ただし、海外飛来性であるトビイロウンカの抵抗性管理は日本国内では不可能なため、現場での有効な防除（補正死虫率 90%程度）の観点から、リスクレベル 2 と 3 の判定のみ行うこととする。その際に、リスクレベル 2 と 3 の判別には 16 頭の個体別遺伝子診断を行う必要がある。

4) 代替防除手段について

殺虫剤に代わるウンカ類の防除手段としては、抵抗性品種の利用がある。現在、日本においてはトビイロウンカに対して吸汁阻害を示す抵抗性遺伝子を導入した良食味品種や新規需要米品種の育成が進められている。また、セジロウンカについては殺卵作用遺伝子を導入した品種育成も進められている。ヒメトビウンカについては、媒介するイネ縞葉枯病抵抗性遺伝子を導入した品種育成が進められている。近い将来、これらの品種が実用化されれば、抵抗性品種を利用することによって、薬剤の使用が軽減される可能性がある。

5) 地域特性に合わせた抵抗性管理のポイント

トビイロウンカとセジロウンカは毎年海外から飛来する。毎年飛来源は必ずしも同一ではないが、これまでの感受性検定の結果から、同一年の飛来であれば感受性の程度は大きくは変わらない (Nagata, 1982)。このため、各県などで独自に感受性モニタリングをする必要性は少なく、代表地点における検定結果（現在、九州沖縄農業研究センターで継続的にモニタリングを行っている）

を参照することで感受性レベルが把握可能である。しかし、ヒメトビウンカについては、海外飛来の影響の有無や、現地での薬剤使用状況によって感受性が異なる可能性があるため、それぞれの県で感受性のモニタリングをすることが望ましい。

6) 薬剤抵抗性管理に役立つ生物学的情報

a) 日本に飛来したトビイロウンカとセジロウンカの薬剤感受性 (LD₅₀ 値) の長期的推移

日本に飛来したトビイロウンカとセジロウンカの主要殺虫剤 5 剤 [BPMC(カーバメート系、商品名：バッサ)、エトフェンプロックス (ピレスロイド系、商品名：トレボン)、イミダクロプリド (ネオニコチノイド系、商品名：アドマイヤー)、ジノテフラン (ネオニコチノイド系、商品名：スタークル)、およびフィプロニル (フェニルピラゾール系、商品名：プリンス)] に対する半数致死薬量 (LD₅₀ 値) の 2012 年までの長期的推移を図 1 に示した。すべてのデータは微量局所施用法によって調べられた値である。

トビイロウンカのイミダクロプリドに対する LD₅₀ 値は、1992 年には 0.16 µg/g であったが、2000 年以降には LD₅₀ 値が約 10 倍に増加し、2005 年以降にはさらに抵抗性倍率が増加し、2012 年には 616 倍 (LD₅₀ 値は 98.5 µg/g) に増加した。2012 年以降 2017 年まで、LD₅₀ 値は 100 µg/g 以上で推移しており、感受性が低下した状態が続いている (松村ら、未発表)。一方、トビイロウンカのジノテフランおよびフィプロニルに対する LD₅₀ 値については、2005 年から 2012 年までの変動幅はほぼ 10 倍以内であり、感受性の低下は起こっていない。2012 年以降についても、感受性の大きな変化は起こっていない (松村ら、未発表)。

セジロウンカについては、トビイロウンカと対照的に、ネオニコチノイド系のイミダクロプリドとジノテフランに対する LD₅₀ 値には大きな年次変化はなく、低い値を保っていることから、感受性の低下は起こっていない。しかし、フィプロニルに対する LD₅₀ 値は、トビイロウンカと対照的に、年次によって変動するものの 2009 年のピーク時には 77.2 µg/g と大きな値となっており、感受性が低下した状態が続いている。2012 年以降も同様の傾向が続いている (松村ら、未発表)。

トビイロウンカ、セジロウンカともに、BPMC に対しては 1980 年代から LD₅₀ 値は大きな値を示しており、感受性が低下した状態が続いている。一方、エトフェンプロックスに対しては、1980 年代後半から 2012 年まで LD₅₀ 値の変動幅は他の薬剤に比べて小さく、また LD₅₀ 値についても小さい値を維持していることから、感受性の変化は起こっていない。

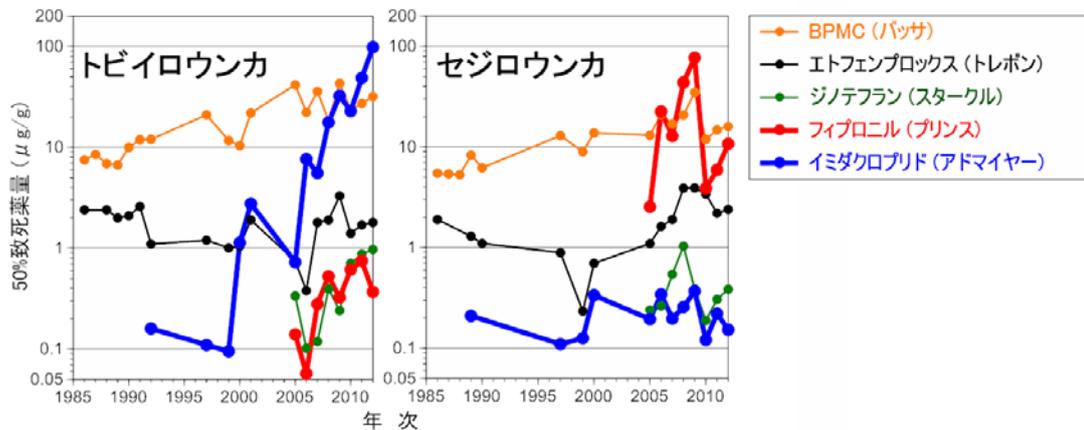


図 1 トビイロウンカ(左)とセジロウンカ(右)の各殺虫剤に対する 50%致死薬量の推移

(2005～2012 年のデータは Matsumura et al. (2014)より。それ以前のデータは既報論文から引用。すべてのデータは微量局所施用法によって調べられた値。フィプロニルとジノテフランは 2005 年以前のデータなし。)

b) トビイロウンカのネオニコチノイド剤 5 剤の交差抵抗性

本研究では、薬剤選抜によりイミダクロプリド抵抗性を強く発達させたトビイロウンカの系統 (図 2) を作出し、トビイロウンカにおけるイミダクロプリド感受性低下に伴うネオニコチノイド剤 5 剤に対する交差抵抗性発達の有無を確認した。その結果、薬剤選抜系統のトビイロウンカにおけるチアメトキサムとクロチアニジンに対する LD₅₀ 値は、対照系統の LD₅₀ 値よりも大きく増加したが、一方で、ジノテフランとニテンピラムに対する LD₅₀ 値には薬剤選抜と対照系統間に明瞭な差が見られなかった。これらの結果から、イミダクロプリドに対する感受性低下によりチアメトキサムとクロチアニジンに対する交差抵抗性が強く発達することがわかった。日本に飛来するトビイロウンカのチアメトキサムとクロチアニジンに対する LD₅₀ 値は 2010 年以降に増加し、トビイロウンカに対するこれら 2 剤の感受性が徐々に低下してきたが、トビイロウンカのジノテフランとニテンピラムに対する LD₅₀ 値については変動幅が小さく感受性の低下が起きていない。薬剤選抜系統を利用した室内試験の結果と、トビイロウンカの野外個体群におけるチアメトキサムとクロチアニジンに対する感受性の長期的推移はよく合致しており、2 剤の感受性低下にはイミダクロプリド抵抗性発達による影響が大きいと考えられる。しかし、トビイロウンカのジノテフランとニテンピラムに対する感受性は薬剤選抜系統と対照系統間での LD₅₀ 値に大きな差が見られなかったことより、イミダクロプリド抵抗性発達の影響が小さいと考えら

れる。トビイロウンカの防除において、ジノテフランとニテンピラムを利用したローテーション散布が有効と考えられ、2剤に対する抵抗性発達を遅延させるように配慮した薬剤管理が推奨される。

c) トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性の遺伝様式

ネオニコチノイド系薬剤イミダクロプリドの抵抗性遺伝様式は、本プロジェクトの研究結果 (Sanada-Morimura et al., 2019) から、「常染色体上にある単一 (主動) 遺伝子によるもので、ほぼ完全優性である」ことが明らかとなった。ここで“ほぼ完全優性”としたのは、優性の程度を示す優性度 (完全劣勢=-1, $-1 <$ 不完全優性 <0 , $0 <$ 不完全優性 <1 , 完全優性=1) は0.9前後で、完全優性の優性度=1と同程度のため、完全優性とほぼ同じ遺伝様式を示すと考えられるためである。後述の「4-6 トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性遺伝子診断法」にあるように、イミダクロプリド抵抗性の主要因は解毒分解酵素 *CYP6ER1* の高発現である。したがって、抵抗性個体にみられる解毒分解酵素 *CYP6ER1* の高発現は、常染色体上にあり、ほぼ完全優性する単一遺伝子によるものと考えられる。

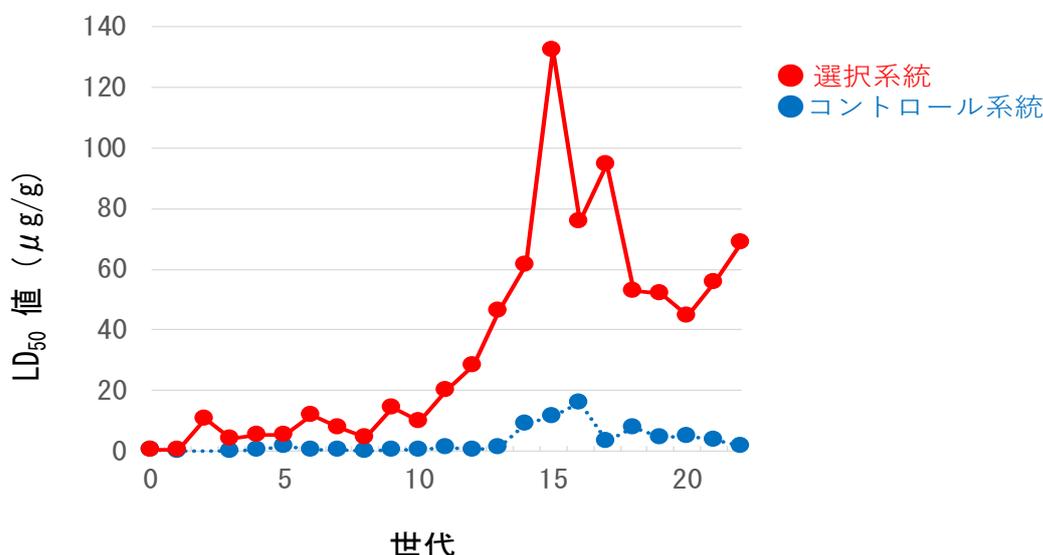


図2 イミダクロプリド選択系統のLD₅₀値

各世代での半数致死薬量 (LD₅₀ 値) のイミダクロプリドで選択した。コントロール系統はアセトン (薬剤溶液の溶媒) のみで選択している。

交雑実験の具体的データで説明すると、イミダクロプリド選抜系統と感受性系統との正逆交雑 F₁, F₁'の薬量に対する回帰線は両者とも、選択系統の回帰線とほぼ一致していることから (図 3)、伴性遺伝はなく (つまり常染色体上にある)、ほぼ完全優性遺伝であることが示された。さらに、F₂と戻し交雑の回帰線 (図 4) は、完全優性である単一遺伝子の予測値とほぼ一致した。

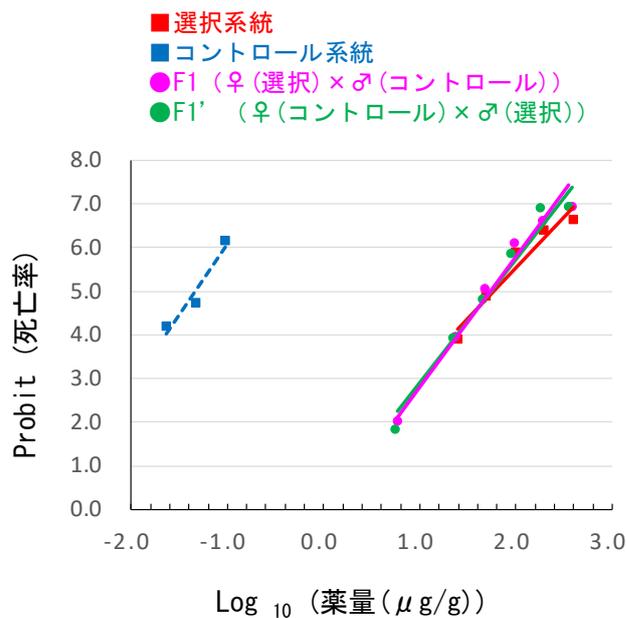


図3 イミダクロプリド選択系統と感受性系統の正逆交雑F₁の死亡率回帰線
25世代の選択系統を使用。F₁は選択系統の雌×感受性系統の雄、F₁'は感受性系統の雌×選択系統の雄の交雑を示す。

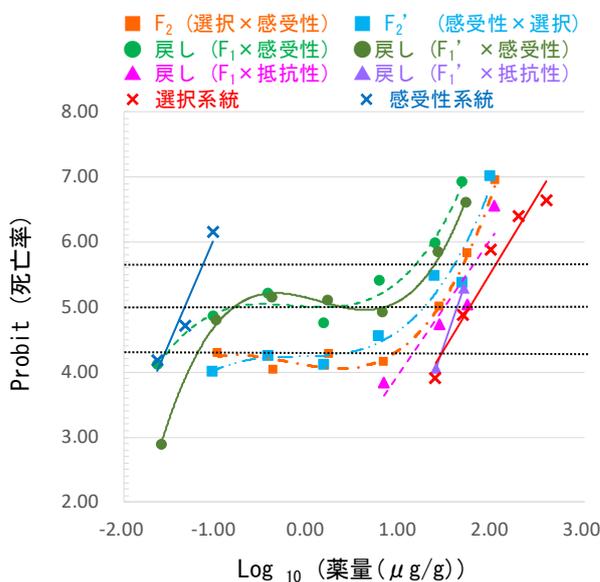


図4 イミダクロプリド選択系統と感受性系統のF₂と戻し交雑の回帰線
上段の破線は死亡率75%、中断は50%、下段は25Cのプロビット変換値を示す。完全優性単一遺伝子である場合の予測値では、F₂、F₂'が下段の破線でプラトー（平衡状態）を示し、F₁、F₁'と選択系統との戻し交雑は選択系統と一致する。F₁、F₁'と感受性系統との戻し交雑は中段の破線でプラトーを示す。

以上の結果から、トビイロウンカのイミダクロプリドにおける抵抗性管理において、生物検定に必要なサンプル数（参照：1-3-5）などは、単一遺伝子による完全優性のモデルを適用する必要がある。

（執筆：松村正哉 眞田幸代 藤井智久）

文献

九州沖縄農業研究センター (2017a) イネウンカ類の薬剤感受性検定マニュアル.
http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-

pamph/072957.html

九州沖縄農業研究センター (2017b) イネウンカ類の薬剤感受性検定マニュアル (英語版).

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/075959.html

Matsumura, M., S. Sanada-Morimura, A. Otuka, R. Ohtsu, S. Sakumoto, H. Takeuchi and M. Satoh (2014) Insecticide susceptibilities in populations of two rice planthoppers, *Nilaparvata lugens* and *Sogatella furcifera*, immigrating into Japan in the period 2005-2012. *Pest Manag. Sci.* 70: 615-622.

Nagata, T. (1982) Insecticide resistance and chemical control of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Bull. Kyushu Nat. Agric. Exp. Stn.* 22: 49-164.

Sanada-Morimura, S., Fujii, T., Chien, H. V., Cuong, L. Q., Estoy, G. F. Jr. and M. Matsumura. (2019) Selection for imidacloprid resistance and mode of inheritance in the brown planthopper, *Nilaparvata lugens*. *Pest. Manag. Sci.* doi: 10.1002/ps.5364.

Tsujimoto, K., S. Sugii, S. Sanada-Morimura and M. Matsumura (2016) A new method for monitoring the susceptibility of the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (Hemiptera: Delphacidae), to pymetrozine by combining topical application and measurement of offspring number. *Appl. Entomol. Zool.* 51: 155-160.

第3章 遺伝子診断用供試虫の採取方法

害虫の薬剤抵抗性を調べるために遺伝子診断法を用いることの長所の一つに、適切な状態で保存した（腐敗していない）死虫からでも診断できる点がある。フェロモントラップ等、目的害虫を効率よく捕獲する手段がある場合は、抵抗性モニタリングの為に供試虫を集める際の労力軽減効果が大きい。しかし、採取した後に遺伝子診断に用いるため、核酸が分解されない適切な状態を保つ必要があり、採集時期の狙いどころなども含め害虫種別に説明する。

3-1 コナガ

3-1-1 採集時期について

地域や年によって採集数の違いはあるが、春から秋にかけて圃場近辺に設置した粘着式フェロモントラップに捕獲される成虫個体を用いる。ただし抵抗性遺伝子診断の性格上、対象作物の作期前に採集を行うことを推奨する（夏秋どり作物なら春期にコナガ成虫を採集する）。

3-1-2 準備するもの

- (1) 日本植物防疫協会などで発生予察用資材として販売しているコナガ用フェロモンルアーおよび粘着式トラップ（粘着板・屋根）を利用する。供試虫を剥離する労力を減らすために、粘着物質が少ないタイプの粘着板が好ましい。
- (2) 粘着式トラップ設置のための資材（コンクリートブロックや園芸用ポールなど）。

3-1-3 粘着式フェロモントラップの設置

- (1) 粘着式トラップの下面が、地面から 30～50 cm の高さになるように設置する（図 1）。
- (2) 粘着板にフェロモンルアーを設置し、トラップの屋根に挿入する。
- (3) 粘着板の回収（図 2）は、挿入後 7 日以内に行う。
- (4) 日光の紫外線による捕殺コナガの核酸劣化に注意する。直射日光下においたトラップにおいても遺伝子診断に利用可能であるが、トラップを日陰に設置する、またはトラップ屋根に日よけを設置するなど措置が好ましい。
- (5) 回収した粘着板ごと冷蔵庫（冷暗乾燥条件）で保管する。遺伝子診断に利用するまでの保管期間は半年以内のものが好ましいが、それより長期間保管しても利用可能である。



図 1 粘着式フェロモントラップの様々な設置例

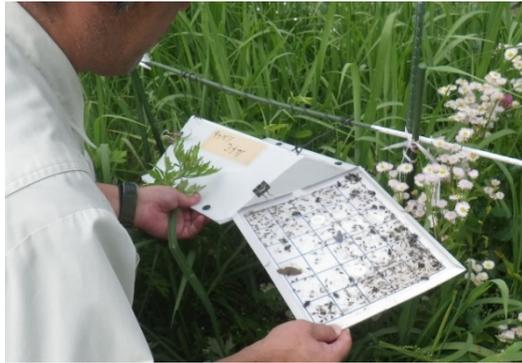


図2 粘着板の回収

3-1-4 コナガサンプルの剥離

- (1) ドラフト内で粘着板に付着したコナガ成虫にノルマルヘキサン (0.5~2mL) を滴下し、粘着物質を溶解する (図3)。コナガに類似したコガ類等との混同に注意する (図4)。
- (2) 爪楊枝 (サンプルごとに使い捨て) を使ってコナガを剥離する。
- (3) 剥離したコナガサンプルを DNA 抽出用マイクロチューブに移す。虫体は多少崩れても問題ないが、なるべくチューブの底に押し込める。
- (4) コナガサンプルが入ったチューブは冷凍庫 (-20℃) で保管する。



図3 コナガ成虫剥離のためのヘキサンの滴下



図4-1 粘着板に付着したコナガ (上) およびネギコガ (下)



図4-2 粘着板に付着したコナガ

3-1-5 その他

圃場から生きた成幼虫を直接採集したものを利用したい場合、採集した成幼虫をバイアル瓶などにまとめて99.5%エタノール溶液に浸漬し、冷暗所で保管する方法もある。この場合、上記トラップによる捕殺成虫よりも核酸の保存状態が良いものが採集できるという利点があるが、サンプリングの時空間的偏りが生じる場合がある。圃場から広く満遍なく、また複数日に分けて採集を行うとよい。

(執筆：上杉龍士)

文献

上杉龍士 (2017) 粘着トラップから回収したコナガ成虫を用いた薬剤抵抗性遺伝子診断の可能性. 植物防疫 71(3): 148-153.

3-2 チャノコカクモンハマキ

3-2-1 採集時期について

わが国において本種成虫は年4~5回発生するが(図1)、地域や年次により発生時期や発生量に違いがある。チャの生産府県では、本種の薬剤防除適期を判断するために、病害虫防除所や農協などがフェロモントラップを設置していることが多い。こうした情報をもとに、本種を採集する地域の発生時期を把握するとともに、適切な時期にフェロモントラップを設置して成虫を採集する。ただし、本種の薬剤防除を実施する前に成虫の採集を行って抵抗性遺伝子診断を実施することが望ましい。

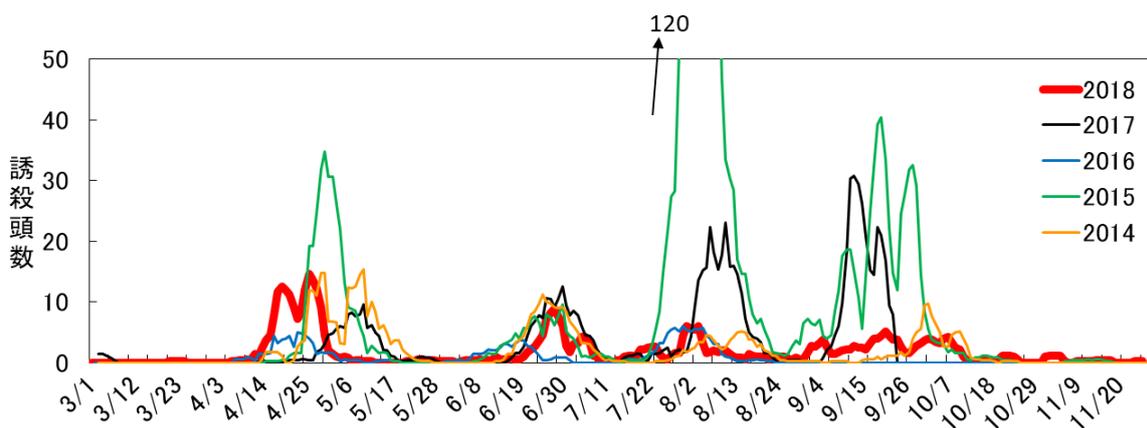


図1 チャノコカクモンハマキ成虫の誘殺状況
(5日移動平均、静岡県茶業研究センター内予察灯)

3-2-2 準備するもの

- (1) チャノコカクモンハマキ用フェロモンルアーおよび粘着式トラップ(いずれも日本植物防疫協会などから購入可能)。
- (2) (1)のフェロモントラップをチャ園に設置するために、粘着式トラップに付属する針金と、必要に応じて園芸用支柱(長さ1.5~2m程度)などを準備する。

3-2-3 フェロモントラップの設置

- (1) 園芸用支柱などに針金でフェロモントラップを固定し、トラップの下面がチャ摘採面と同程度の高さになるように設置する(図2)。なお、この設置方法は一例であり、本トラップが風で飛ばされないように設置すれば良い。ただし、フェロモンは空気より重いことから、チャ株内の雄成虫がトラップに確実に誘引されるよう摘採面と同程度の高さに設置する(図2、3)。
- (2) 粘着板にフェロモンルアーを固定し、トラップの屋根に挿入する。



図 2 フェロモントラップ設置例 1



図 3 フェロモントラップ設置例 2

3-2-4 粘着板の回収と保存

- (1) 成虫の発生量によるが、抵抗性遺伝子診断に必要となるサンプル数（リスクレベル 1 か 2 かを判断する場合は 80 個体、リスクレベル 2 か 3 かを判断する場合は 16 個体（1-3 参照）が粘着板に誘殺され次第、速やかに回収する（図 4）。なお、粘着板を 1 週間以上設置した場合でもチャノコカクモンハマキ成虫からの DNA 抽出は可能であるが、ナメクジによる捕食被害やカビの発生による DNA 劣化も確認されていることから注意が必要である。
- (2) 抵抗性遺伝子診断を実施するまでの間、回収した粘着板は冷凍庫（-20℃）または冷蔵庫（4℃）で保存する。なお、数ヶ月程度の冷凍保存または 1 ヶ月程度の冷蔵保存であれば、抵抗性遺伝子診断は可能である。

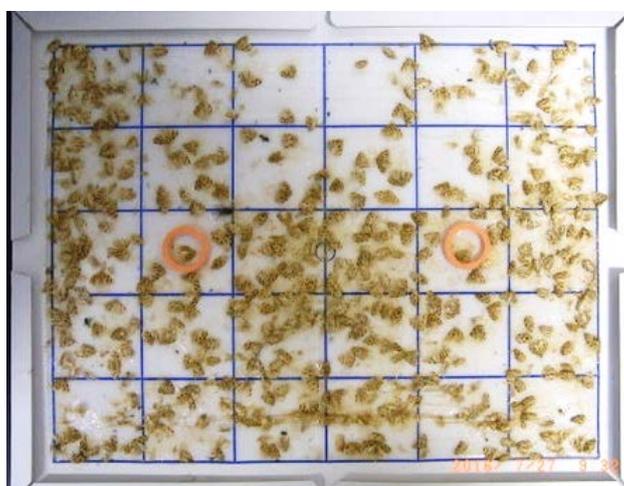


図 4 粘着板に誘殺されたチャノコカクモンハマキ成虫

（執筆：内山徹）

3-3 ワタアブラムシ

3-3-1 採集時期について

寄主植物あるいは作物の栽培形態により差はあるが、ワタアブラムシの発生ピークは春季および秋季にある。したがって、有翅虫の発生・分散ピークも同時期となることから、トラップによるサンプリングもこの時期に行うと効率的に有翅虫を得ることができる。地域により気象条件も異なるが、春季は5～6月、秋季は9～10月に採集を行う。トラップには、黄色水盤あるいは黄色粘着板を用いる。ここでは、黄色コンテナを用いた水盤トラップによるワタアブラムシ有翅虫採集方法について解説する。

3-3-2 準備するもの

- ・黄色コンテナ（三菱樹脂製 S-4-Y、273 mm×176 mm×133 mm、容量 3.8 L）を必要数準備し、底から 7 cm（2 L）の位置にマジックで線を引いておく。
- ・ママレモン（ライオン（株）製：店頭に置いていない場合は注文）。
- ・蛇口付ポリタンクに入れた水道水（20 L 程度で 10 か所分）。
- ・コンクリートブロック（基本ブロック）。
- ・50ml 遠沈管（プラスチック製）。
- ・目の細かい小型あく取り網（百元ショップで売っているものが便利）。
- ・深さ 2 cm 程度の直径 8 cm プラスチック容器（直径 9 cm では操作しにくい）。
- ・エタノール 99.5%（希釈すると比重が増して虫が沈殿しにくい）。
- ・ふるい（網目 2 mm）。
- ・面相筆（2 号）。
- ・マイクロチューブ（1.5ml）。

3-3-3 黄色水盤の設置

- (1) 3 日間降雨がないと予想される日を選ぶ。
- (2) 対象圃場の端で見晴らしの良い場所を選ぶ。
- (3) コンクリートブロックを置き、その上に水盤を設置する（図 1）。
- (4) 遠沈管の目盛でママレモンを 10 ml 測り、水盤に入れる。
- (5) ポリタンクから水道水を、水盤にあらかじめ引いた線まで入れる。
- (6) このまま、3 日間置いておく。



図 1 黄色水盤の設置



図 2 虫の回収-1

3-3-4 虫の回収手順

- (1) あく取り網に、水盤から直接流し込み捕獲虫を漉しとる (図 2)。
- (2) プラスチック容器にエタノールを 35 ml 入れ、そこに捕獲虫を移す (図 3)。
- (3) プラスチック容器から、遠沈管にエタノールごと捕獲虫を移す (図 4)。
- (4) 移りきらなかった捕獲虫は、エタノールの上澄みを戻し再度移す。



図 3 虫の回収-2



図 4 虫の回収-3

- (5) 持ち帰った試料から、ふるい (網目 2 mm) で大きな雑害虫を除去する。
- (6) エタノールを 0.5 ml 入れたマイクロチューブに面相筆でアブラムシ類を移す。
- (7) 遺伝子診断を行うまで冷凍して保存する。

3-3-5 ワタアブラムシの選別

黄色水盤では多種多様な昆虫類が捕捉される。また、アブラムシ有翅虫もワタアブラムシ以外に数多くの種が誘引・捕捉される。したがって、黄色水盤から回収するサンプルからワタアブラムシを選別する必要がある。

宗林 (2008) によると、ワタアブラムシ有翅虫 (胎生雌虫) の特徴は、触覚第 3 節に 4~7 個の二次感覚器をそなえ、腹部背面第 7・8 節に帯状紋があり、腹部側面には 4 個の大型斑紋があるとされている。しかし、ワタアブラムシを含む *Aphis* 属は外観的な特徴に乏しく、体色が濃緑色のワタアブラムシでは腹部の斑紋の有無が確認しづらい場合がある (杉本, 2008)。また、個体の大きさにより斑紋の発達程度に差が生じ、一般的に小型の個体ほど斑紋が消失する傾向にある (杉本, 2008)。したがって、実態顕微鏡下での観察ではある程度の誤判定は避けられず、正確な種判別にはプレパラートを作成して観察する必要があることから、短時間の観察でワタアブラムシのみを選別することは極めて困難である。

一方、近縁種を含む他種アブラムシおよび他種昆虫類から抽出した DNA を用い、ネオニコチノイド抵抗性遺伝子診断を行った結果、擬陽性反応を示す事例は確認されていない。そこで、作業の効率性という観点から、本ガイドライン案では厳密なワタアブラムシの同定は断念し、以下の形態的特徴による大まかな選別を行って遺伝子診断に供することとし、類似種の混入も可とすることとする。

- (1) 触覚の長さ：体長を超えない。
- (2) 角状管の色、形状：黒色～暗褐色、円筒形か先端に向いやや細くなる。
- (3) 尾片の色：黒色ではない（灰は可）。
- (4) 胸部の色：黒色。
- (5) 翅脈に沿った部分は透明。

しかしながら、個体数の絞り込みにより遺伝子診断の検体数を減らすことができ、より少数の個体による解析で診断の精度を高めることができることから、もし労力的に可能であれば、杉本（2008）を参照して形態を精査し、可能な限り他種アブラムシを排除することを推奨する。



図5 ワタアブラムシの形態

（執筆：岡本崇）

文献

宗林正人(2008)果樹のアブラムシ類. アブラムシ類の見分け方. 日本植物防疫協会, 東京. pp.21-37

杉本俊一郎(2008)主要アブラムシの有翅虫による見分け方. アブラムシ類の見分け方. 日本植物防疫協会, 東京. pp. 68-80

3-4 ネギアザミウマ

3-4-1 採集時期について

- (1) 植物の葉や花にネギアザミウマが生息している時期に採集する。

3-4-2 準備するもの

- (1) サンプルング用のチャック付ポリ袋 (例: ユニパック®0.04 タイプ J-4 (340 mm×240 mm×0.04 mm)、(株) 生産日本社) など (図 1)。
- (2) ペーパータオルまたはキムワイブ® (S-200 または M-150、(株) 日本製紙クレシア)。
- (3) クーラーボックス。
- (4) 小型吸引ポンプ (Linicon LV-125、メドー産業 (株)) (図 2)。
- (5) 吸虫管 (先端を切断したマイクロピペット用チップ (1 ml 用) (図 3 の a)、ビニールチューブホース (長さ 1 m 程度、黒色ゴム管 (外径 10 mm) (図 3 の b)、ビニール管 (外径 8 mm) (図 3 の c)、マイクロピペット用チップ (1 ml 用) 中央部 3 cm に切断した先にナイロンメッシュシート (N-305、目合 48 μm、(株) サンプラテック) を貼り付けたもの (図 3 の d) を使って製作したもの)。
- (6) ルーペ (20 倍程度)。
- (7) 実体顕微鏡。
- (8) エタノール 99.5%。
- (9) 面相筆 (極細 1 号)。
- (10) マイクロチューブ (1.5 ml)。



図 1 チャック付ポリ袋



図 2 小型吸引ポンプ

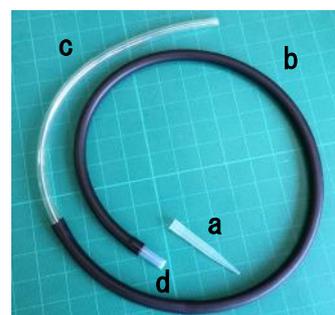


図 3 吸虫管

3-4-3 虫の採集手順

- (1) 圃場内で 10 か所程度の地点を選定する。
- (2) 各地点でネギアザミウマ成虫が生息する植物の葉または花ごと採集する。
なお、ネギアザミウマと他のアザミウマ類を肉眼で識別することは容易ではないので、混発している場合はアザミウマ類成虫をまとめて採集する。
- (3) チャック付ポリ袋 (J-4) に入れ、ペーパータオルまたはキムワイブ®を袋に入れて加湿や結露を防ぐ (図 4)。

- (4) チャック付ポリ袋を閉じてクーラーボックスに入れ、実験室に持ち帰る。



図4 植物の葉・花の採集

3-4-4 虫の種判別手順

- (1) 採集した成虫の一部を 20 倍程度のルーペで確認する。
- (2) 成虫をエタノールに浸漬した後、腹部末端を観察して雌雄を区別する（図 5）。
- (3) 雌成虫の体長、体色、翅の色を観察（表 1）して種を判別する。
- (4) 正確に識別するためには、実体顕微鏡（60～120 倍程度）で確認する。千脇ら（1994）の簡易同定診断法（図 6）を参考にする。



図5 ネギアザミウマの腹部末端（腹面）

左：雄成虫 右：雌成虫

表1 アザミウマ類雌成虫の特徴

	ネギアザミウマ	ミナミキイロ アザミウマ	ミカンキイロ アザミウマ	ヒラズハナ アザミウマ	チャノキイロ アザミウマ
体長	1.1～1.5 mm	1.2～1.4 mm	1.3～1.7 mm	1.3～1.7 mm	0.7～1.0 mm
体色	淡黄色～褐色	黄色	黄土～茶褐色	褐色～黒褐色	黄色
翅の色	透明	翅の毛が黒色	透明	透明	全体が黒色

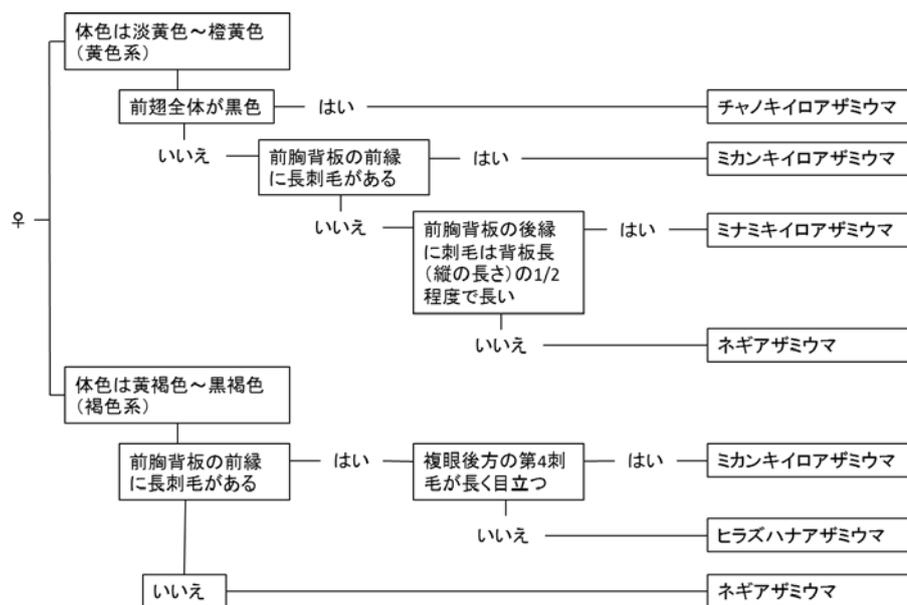


図6 アザミウマ類雌成虫の簡易同定診断法 (千脇ら, 1994 改変)

3-4-5 虫の回収手順

- (1) 吸虫管を小型吸引ポンプに接続する (図7)。
- (2) チャック付ポリ袋から植物の葉や花を取り出し、生息するアザミウマ類成虫を吸引する (図8)。
- (3) エタノールを 0.5 ml 入れたマイクロチューブに回収したアザミウマ類成虫を移す。
- (4) 極細の面相筆を用いて葉や花からアザミウマ類成虫を直接移してもよい。
- (5) 遺伝子診断を行うまで -20°C ~ -30°C の冷凍庫に保存する。



図7 吸虫管と吸引ポンプの接続



図8 アザミウマ類成虫の吸引回収

(執筆：柴尾学)

3-5 ナミハダニ

3-5-1 準備するもの

チャック付きビニール袋（丸めた新聞紙等とハダニ寄生葉が入る大きさ）。

- (1) 新聞紙。
- (2) 小型吸虫管ないしは面相筆、加工パストールピペットを利用した小型吸虫管（生物検定法を参照）などハダニを集める道具。
- (3) 1.5 mL チューブ。

3-5-2 サンプルング方法

- (1) チャック付きビニール袋に、結露防止のための丸めた新聞紙を入れる。
- (2) ハダニが寄生した葉をその袋に入れ、持ち帰る。
- (3) 試験するまでの間、袋に入れたまま室温、もしくは冷蔵庫（5～10℃）で保管する。葉が痛まなければ、ハダニは生きたまま保存可能である。



図1 保管中のハダニ寄生イチゴ

- (4) 小型吸虫管または面相筆などを用いて、保存した葉からハダニの雌成虫を1.5 mL チューブに集める。雌成虫は1本のチューブに100頭以内とすることが望ましい。ハダニを集めた後、チューブを氷などで冷却することでハダニの動きを抑制するとDNA抽出の際にチューブの底にハダニを集めやすく、取り扱いが楽になる。小型吸虫管については刑部（2016）を参照する。

3-5-3 注意点

- (1) ハダニ寄生葉は、吸汁痕だけでなく必ずハダニの寄生を確認してから採集する。被害が著しく褐変・劣化した葉や、ハダニの吐糸が張った葉は、餌質が低下して大部分のハダニ個体が既に離脱していることが多い。周囲の比較的健全な葉に多くのハダニが寄生していることが多い。
- (2) ハダニは移動分散性が低く、同一施設内でも場所によって遺伝的に異なった集団がパッチ状に分布する。そのため、1カ所から大量に採集せず、圃場全体の複数の発生箇所から採集するのが望ましい。
- (3) ハダニ寄生葉を入れたビニール袋は、高温や直射日光を避けて持ち帰る。これらの条件下に置くと、結露が多くなりハダニが水死しやすくなる。そのうえ、葉の劣化が早まることにより、ハダニが葉上から脱出し、ハダニの採集が困難になる。

（執筆：井村岳男）

文献

刑部正博（2016）フィールド&ラボ～知って得する豆知識③～簡単、便利～ハダニ採集用小型吸虫管．植物防疫 70：126-128.

3-6 イネウンカ類

3-6-1 採集時期について

トビイロウンカやセジロウンカのような長距離移動性イネウンカの場合には、可能な限り日本に飛来した直後の飛来個体群の成虫を採集するのが望ましい。飛来個体群が採集できない場合には、殺虫剤を使用していない水田（試験水田の無防除区などでもよい）で次世代以降の成虫を採集する。次世代以降の成虫の場合には、水田内の広い範囲から偏りなく採集するように心がける。

ヒメトビウンカの場合には、特に採集時期にこだわらなくてよいが、越冬後成虫の時期に採集して感受性検定を行うことで、検定結果を当年の水稻作における薬剤防除に生かすことができる。

3-6-2 準備するものと採集方法

一般的な捕虫網、白色のトレイ、吸虫管などを準備する。採集法は捕虫網を用いたすくい取り法や、白色トレイに払い落としのあとに吸虫管を用いて虫を吸い取って集める。野外から採集したウンカには、寄生蜂などの天敵に寄生されている個体があるため、採集後にこれらの天敵に寄生されている個体は完全に除去することが望ましい。

採集した虫は、芽出しイネ苗を入れた容器などに入れて持ち帰り、遺伝子診断を行うまでは冷凍して保存する。

採集後、実験室内で増殖してから遺伝子診断を行う必要がある場合には、室内でウンカを飼育する。飼育方法については、薬剤感受性検定マニュアル（九州沖縄農業研究センター, 2017）の中に詳細が記載されているので、それを参照する。

（執筆：松村正哉）

文献

九州沖縄農業研究センター（2017）イネウンカ類の薬剤感受性検定マニュアル。

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/072957.html

第4章 害虫の薬剤抵抗性遺伝子診断法マニュアル

薬剤感受性系統と比較した場合の薬剤抵抗性原因遺伝子配列の変異が同定され、適切な判別プライマー配列が設計できている場合については、PCR法とアガロース電気泳動法により、対象害虫が薬剤抵抗性遺伝子を保有しているかどうかを半日程度で診断可能である。

PCR増幅反応を終えた液をアガロースゲルで電気泳動し、増幅断片長によりゲル内に分離された感受性/抵抗性遺伝子に由来するDNA断片を核酸検出液で染色して目的のDNA断片を検出し診断する。

害虫種により診断に用いる試料溶液の調整方法が異なることに加え、対象とする薬剤の有効成分と害虫種の組み合わせにより、抵抗性に関わる遺伝子の塩基配列が異なるため、使用するプライマーもそれぞれ異なる。

本プロジェクト研究で対象としたコナガ（ジアミド）、チャノコカクモンハマキ（DAH系IGR剤）、ワタアブラムシ（ネオニコチノイド）、ネギアザミウマ（ピレスロイド剤）、トビイロウンカ（ネオニコチノイド）の遺伝子診断法について個別に記載しているが、共通する事項・注意点について以下にまとめて記載する。

尚、ナミハダニ（エトキサゾール、ピリダベン）については、定量PCR法を用いた診断法も記載する。

プライマーの入手

プライマー（DNAオリゴ）の受託合成サービスを行っている会社が多数ある。PCR増幅に使用するプライマーは20塩基当たり3千円～5千円で入手できる。一般的なPCR増幅反応に用いる場合は脱塩処理（ゲル濾過）したもので良い。チューブ内で凍結乾燥させた状態で納品される場合が多いので、所定濃度になるようにTE緩衝液で溶解して使用する。一度合成すれば数百回分の増幅反応を行うことができる。

DNA試料調製

虫のサイズにより、対象害虫種に応じた調製方法を各項目で記載している。将来、このマニュアルに記載していない害虫種や抵抗性遺伝子の診断プライマーが開発された場合にも転用可能であるが、ゲノム中の対象遺伝子コピー数に応じてPCR増幅反応に使用する量の調整が必要になるかもしれない。

PCR増幅反応

PCR反応液の調製では、サンプル虫から調製した鋳型DNA溶液、プライマー

溶液^{注意}、dNTP 溶液、緩衝液、DNA 増幅酵素溶液を 0.2 mL チューブや 96 穴プレートに分注し、フタをしてサーマルサイクラーで増幅反応を行う。試薬類の分注ではマイクロリッター単位の微量液を扱うので、調製誤差を減じるためにプレミックス液を作成してからチューブに分注する。市販されている PCR 増幅酵素には、あらかじめ必要な緩衝液や dNTP を添加してキット化されたものもあり、各項に記載の試薬で反応液を調合する。増幅反応時の温度設定は場合により様々であるが、約 2 時間程度で終了するので、サーマルサイクラーで増幅反応を始めたならアガロースゲルを作成する。

注意) プライマー溶液は室温放置しない。また、凍結融解の回数はなるべく少なくする。PCR 反応時の濃度の 10 倍濃度液と 100 倍濃度液を数本ずつ作成しておき、1 本の保存チューブの凍結融解 (=フタの開閉回数) は 10 回程度にとどめる。ふたの開閉で混入してくる DNA 分解酵素には、判別に重要なプライマーの末端から分解するものが含まれているため。

PCR-RFLP 法

PCR 増幅産物を、2 本鎖 DNA を塩基配列特異的な部位で切断する制限酵素で処理した後にアガロース電気泳動を行う場合には、各項の説明に従って制限酵素処理を行う。

アガロースゲルの調製

所定のアガロース濃度になるように、核酸電気泳動用アガロース粉末を緩衝液に懸濁し、加熱して溶解させる^{注意}。50°C程度まで冷まして、枠型に流し込み、コームをセットし、室内放置して冷ましてゲル化させる。コームをセットしたままラップで包んで水分の蒸発をしっかりと防げば冷蔵庫で 1 ヶ月程度は保存可能である。

注意) 加熱してアガロース粉末を溶解する際には、密栓できるメジュームビン等を使用すると突沸等による熱傷事故や、容器栓をゆるめ忘れた状態での加熱による爆発事故を起こしやすく危険である。広口のビーカーを使用する。

電気泳動と DNA 断片 (バンド) の検出

アガロースゲルを電気泳動装置にセットしたら、緩衝液を泳動装置に注ぎ、コームを抜き、試料 (5 µL) に視認性の向上のためにローディングバッファーを 1 µL 加えて混合後、ゲル端のウェルにいれ、所定の時間電気泳動を行う。電気泳動が終了したら、ゲルを染色液^{注意}に浸したのちに撮影する。

注意) 核酸の染色液には変異原性を有するものが多く、保護手袋を着用し

て廃液は実験廃液として回収する。あらかじめ、核酸染色試薬をローディングバッファーに懸濁しておくでゲルの染色操作を省くこともできる。

これら一連の実験の所要時間は約 5 時間程度であるが、DNA 鋳型溶液調整後、PCR 増幅反応終了後の段階で試料液の冷蔵・冷凍保存は可能なので、他業務の状況に応じて進めることも可能である。

4-1 コナガのジアミド剤抵抗性遺伝子診断法

はじめに

ジアミド系農薬の有効成分が作用するリアノジン受容体タンパク質の遺伝子変異を検出するプライマーを使用して診断する。

遺伝子型	受容体のアミノ酸	受容体遺伝子上の塩基配列
感受性 (S)	4946 番目がグリシン (G)	GGG
抵抗性 (R)	4946 番目がグルタミン酸 (E)	GAG または GAA

診断は、上記の感受性型および抵抗性型の有無を一回の PCR で同時に判定する手順と感受性型と抵抗性型の判定を二回の PCR に分けてそれぞれ判定する手順がある。実施環境によっては、前者の手順では、電気泳動結果における各遺伝子型のバンドの有無の判定が難しい場合がある。そのような場合には、後者の手順で診断を実施することを推奨する。

1 DNA 抽出法

<準備するもの>

- DNA 抽出用バッファ ((1)、(2)のいずれかを用意)
 - (1) TE-T バッファ(以下の試薬を用いて調整する)
 - 1 M Tris-HCl (pH 9.0) (ニッポンジーン/品番 314-90381)
 - 0.5 M EDTA (pH 8.0) (ニッポンジーン/品番 311-90075)
 - 20% Triton X-100 (ケイマンケミカル/品番 600217)
 - 滅菌蒸留水 UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (サーモフィッシャー/品番 10977015)TE-T バッファの組成は次の通りとする。
10 mM Tris HCl (pH 9.0), 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100
TE-T バッファは室温で保存可能。
 - (2) PrepMan® Ultra Sample Preparation Reagent (サーモフィッシャー/品番 4318930)
- PCR チューブおよびキャップ

<抽出用バッファの調整> (PrepMan® を用いる場合は不要)

50 mL の TE-T バッファを用意する場合は、次の通りに希釈する。

1 M Tris-HCl (pH 9.0)	0.5 mL
0.5 M EDTA (pH 8.0)	0.1 mL
20% Trion X-100	0.25 mL
滅菌蒸留水	49.15 mL
合計	50.0 mL

<手順>

(個体単位で実施)

- 1) チューブにコナガ成虫個体と抽出用バッファ 100 μ L を入れる。虫体をすり潰す必要はない。PrepMan 使用時に空気の層ができる場合にはボルテックスを繰り返し、空気の層が無いことを確認する。
- 2) サーマルサイクラーで 95°C 、15 分間加熱する。
- 3) 室温に戻したサンプルは遺伝子解析までの間、-20°C 以下で保存する。



PCR チューブの抽出バッファ
に浸したコナガ成虫個体

2 マルチプレックス PCR

<準備するもの>

- ・前項のコナガ DNA 抽出液
- ・次のいずれかの PCR 酵素（ホットスタート対応の(1)を推奨する）
 - (1)「EmeraldAmp PCR Master Mix」（タカラバイオ／品番 RR300A）
 - (2)「EmeraldAmp MAX PCR Master Mix」（タカラバイオ／品番 RR320A）
 - (3)「Quick Taq HS DyeMix」（東洋紡/品番 DTM-101）いずれの製品も、プライマー、鋳型 DNA を加えるだけで PCR が実施可能
- ・プライマー5種
 - px_ryr_G4946E_F :5'-AGACTGGCGCTACCAAGTGT-3'
 - px_ryr_G4946E_R :5'-CCCGTTATGCGTGACAGACT-3'
 - px_ryr_G4946E_MR_F :5'-TGTTGGACGTGGCWGTAGA-3'
 - px_ryr_G4946E_MS_R :5'-ATAGTCCTCANNGTCTTGACCC-3'
 - px_ryr_G4946E_MS_F :5'-TGTTGGACGTGGCWGTAGG-3'(px_ryr_G4946E_MS_R は 1 回の PCR で判定する手順でのみ使用し、px_ryr_G4946E_MS_F は 2 回の PCR で判定する手順でのみ使用する。その他のプライマーは各手順で共通して使用する)
- ・滅菌蒸留水 UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (サーモフィッシャー/品番 10977015)
- ・0.5x TBE 緩衝液 (44.5 mM Tris、44.5 mM ホウ酸、1 mM EDTA) (ニッポンジーン/品番 318-90041) (10 倍希釈して用いる)

本診断法では低分子の DNA 断片(65 bp)が含まれるため、アガロース粉末の溶解には前述の TAE 緩衝液ではなく、TBE 緩衝液を用いることを推奨する。
- ・アガロースゲル
- ・DNA 染色試薬 (エチジウムブロマイド、GelRed 等)
- ・実験器具類 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、マイクロチップ等)

<手順>

(抵抗性型と感受性型の判定を一回の PCR で同時に行う場合)

1) 以下の組成になるように各試薬を解析個体数分混合し、PCR チューブに分注する。

	1 本分	20 本分の場合
プライマーミックス	1.8 μL	37.8 μL
PCR 酵素	3.0 μL	63.0 μL
合計	4.8 μL	合計 100.8 μL を 20 本に分注

(複数本分については、必要数+1 の本数分で調整する)

各プライマーについて 100 μM に溶解したものを用意した場合、次のように希釈してプライマーミックスを調整する。

(プライマーミックスは 100 μL ずつ等に小分けして -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下で保存する)

		プライマー濃度
px_ryr_G4946E_F	2.5 μL	0.5 μM
px_ryr_G4946E_R	2.5 μL	0.5 μM
px_ryr_G4946E_MR_F	25.0 μL	5.0 μM
px_ryr_G4946E_MS_R	50.0 μL	10.0 μM
Tris または滅菌蒸留水	420.0 μL	
合計	500.0 μL	

(Tris は 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) または 10 mM Tris-HCl (pH 8.0))

希釈は Tris の使用を推奨する。

- 2) DNA 抽出により得られた各コナガ DNA(10 倍希釈)を 1.2 μL ずつ分注する。
3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、以下の温度・時間設定で PCR 反応を行う。

95 $^{\circ}\text{C}$	2 分	} 35 サイクル
95 $^{\circ}\text{C}$	15 秒	
55 $^{\circ}\text{C}$	15 秒	
68 $^{\circ}\text{C}$	10 秒	
68 $^{\circ}\text{C}$	5 分	

(抵抗性型と感受性型の判定を二回の PCR に分けて行う場合)

1) 以下の組成になるように各試薬を解析個体数分混合し、PCR チューブに分注する。これを2セット分用意する(抵抗性型判定用と感受性型判定用)。

	1 本分	20 本分の場合
プライマーミックス	1.2 μL	25.2 μL
PCR 酵素	3.0 μL	63.0 μL
合計	4.2 μL	合計 88.2 μL を 20 本に分注 (複数本分については、必要数+1 の本数分で調整する)

各プライマーについて 100 μM に溶解したものを用意した場合、次のように希釈してプライマーミックスを調整する。

(プライマーミックスは 100 μL ずつ等に小分けして -20 $^{\circ}\text{C}$ 以下で保存)

(抵抗性型の判定実施分) 以下の 3 プライマーを利用

	液量	プライマー濃度
px_ryr_G4946E_F	2.5 μL	0.5 μM
px_ryr_G4946E_R	5.0 μL	1.0 μM
px_ryr_G4946E_MR_F	25.0 μL	5.0 μM
Tris または滅菌蒸留水	467.5 μL	
合計	500.0 μL	

(感受性型の判定実施分) 以下の 3 プライマーを利用

	液量	プライマー濃度
px_ryr_G4946E_F	2.5 μL	0.5 μM
px_ryr_G4946E_R	5.0 μL	1.0 μM
px_ryr_G4946E_MS_F	5.0 μL	1.0 μM
Tris または滅菌蒸留水	487.5 μL	
合計	500.0 μL	

(Tris は 10 mM Tris-HCl (pH 9.0) または 10 mM Tris-HCl (pH 8.0))

希釈は Tris の使用を推奨する。

2) DNA 抽出により得られた各コナガ DNA(20 倍希釈)を 1.8 μL ずつ分注する。

DNA の希釈は Tris-HCl (10 mM Tris-HCl (pH 9.0) または 10 mM Tris-HCl (pH 8.0)) または滅菌蒸留水を用いる。Tris の使用を推奨する。

- 3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、以下の温度・時間設定で PCR 反応を行う。

(抵抗性型判定用と感受性型判定用についてそれぞれ実施する)

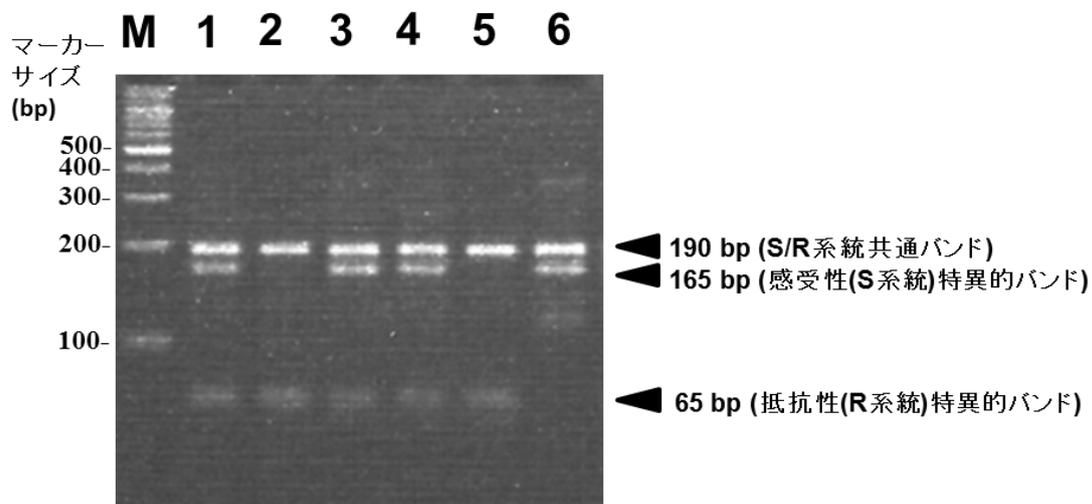
95 °C	2 分	} 35 サイクル
95 °C	15 秒	
58 °C	5 秒	
68 °C	10 秒	
68 °C	5 分	

3 電気泳動・染色・撮影

- 1) PCR 反応液を 3% アガロースゲルで 20~30 分間 100 V で電気泳動する。
- 2) エチジウムブロマイド (EtBr) あるいは GelRed (Biotium / 品番 41003) 等で染色する。
- 3) UV を照射し、バンドパターンを撮影する。

4 結果

(抵抗性型と感受性型の判定を一回の PCR で同時に行う場合)



レーン No.2,5 : ジアミド剤抵抗性ホモ(R ホモ型)

レーン No.1,3,4 : ジアミド剤抵抗性感受性ヘテロ(ヘテロ型)

レーン No.6 : ジアミド剤感受性ホモ(S ホモ型)

M : サイズマーカー (100 bp ラダー)

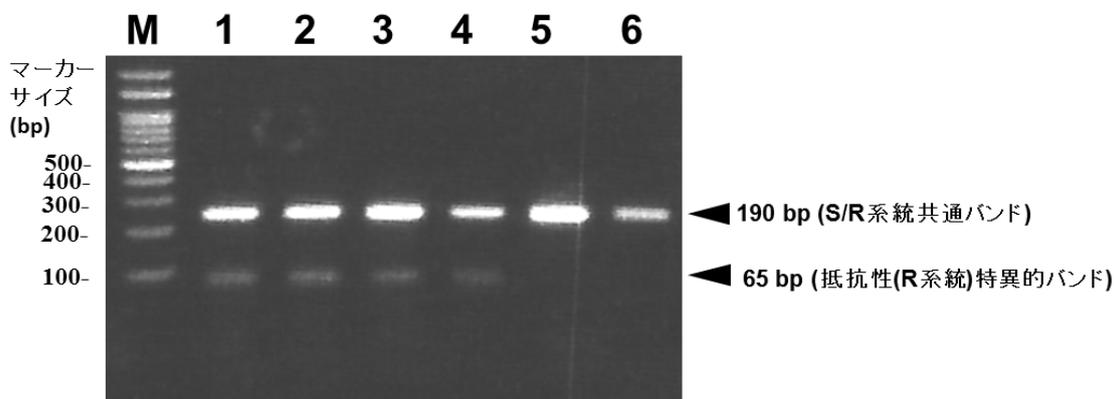
以下の数式により、ジアミド剤抵抗性遺伝子(G4946E)頻度を算出する。

$$\text{G4946E 遺伝子頻度} = \frac{\text{R ホモ型の個体数} \times 2 + \text{ヘテロ型の個体数}}{\text{全個体数} \times 2} \times 100$$

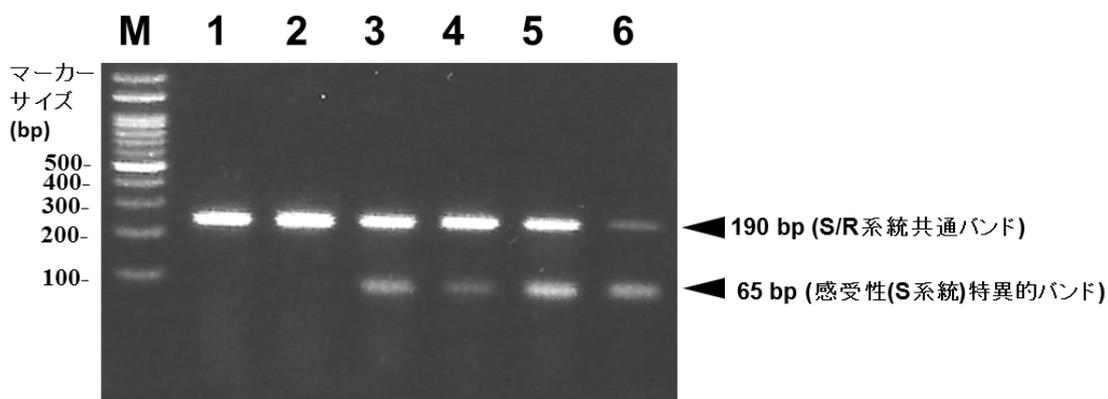
上記の 6 個体の内訳は、R ホモ型が 2 個体、ヘテロ型が 3 個体、S ホモ型が 1 個体であるため、G4946E 遺伝子頻度は $((2 \times 2 + 3) / 6 \times 2) \times 100 = 58.3\%$ となる。
なお、共通バンドが未検出の個体については判定対象外として除外する。

(抵抗性型と感受性型の判定を二回の PCR に分けて行う場合)

(1) 抵抗性型の判定



(2) 感受性型の判定



(EmeraldAmp PCR Master Mix 使用時には、上図のように、バンドの位置が陰極側(上方向)に若干ずれる傾向がある)

レーン No.1,2: ジアミド剤抵抗性ホモ(R ホモ型)

レーン No.3,4: ジアミド剤抵抗性感受性ヘテロ(ヘテロ型)

レーン No.5,6: ジアミド剤感受性ホモ(S ホモ型)

M: サイズマーカー (100 bp ラダー)

上記の 6 個体の内訳は、R ホモ型が 2 個体、ヘテロ型が 2 個体、S ホモ型が 2 個体であるため、G4946E 遺伝子頻度は $((2 \times 2 + 2) / 6 \times 2) \times 100 = 50\%$ となる。

なお、共通バンドが未検出の個体については判定対象外として除外する。

(執筆: 上樂明也)

4-2 チャノコカクモンハマキのテブフェノジド剤抵抗性遺伝子診断法

断法

はじめに

DAH 系 IGR 剤の一つであるテブフェノジドはエクダイソン受容体に作用する。抵抗性系統ではエクダイソン受容体の 415 番目のアミノ酸がアラニンからバリンに変わり、テブフェノジドとの結合親和性が低下することにより感受性が低下する。そこで、415 番目のアミノ酸をコードする受容体遺伝子上の塩基配列(感受性では GCGC、抵抗性では GTGC)を標的として、遺伝子型を判別する。

まず PCR-RFLP 法では、受容体遺伝子上の塩基配列を含むエクダイソン受容体の部分配列を PCR 増幅し、感受性型の塩基配列 GCGC を特異的に切断する制限酵素を用いて診断する。この手法では、抵抗性ホモ、感受性ホモ、抵抗性感受性ヘテロを明瞭に判別し、抵抗性遺伝子頻度算出を行うことが可能である。

次に LAMP 法では、抵抗性型の受容体遺伝子上の塩基配列を特異的に増幅するプライマーを用いて診断する。この手法では、サーマルサイクラーや電気泳動装置などの特殊な機器が不要であるため、抵抗性遺伝子を持つ個体を簡便に検出することが可能である。

遺伝子型	受容体のアミノ酸	受容体遺伝子上の塩基配列
感受性 (S)	415 番目がアラニン (A)	GCGC
抵抗性 (R)	415 番目がバリン (V)	GTGC

I. DNA 抽出法

<準備するもの>

- ・溶解バッファー (50 mM NaOH, 200 μM EDTA)
- ・中和バッファー (200 mM Tris-HCl, pH 8.0)
- ・PCR チューブおよびキャップ
- ・ビーカー(500 mL-1000 mL)
- ・カッターナイフ
- ・ピンセット

<手順>

(幼虫の場合)

- 1) 幼虫は DNA 抽出するまで、冷凍庫(-20°C)で凍らせておく。1.5 mL チューブ

に1頭ずつ入れて冷凍すると、作業効率が良い。

- 2) 溶解バッファー 100 µL を PCR チューブに入れる。
- 3) 幼虫の頭部から約 2 mm をカッターナイフで切り、2) に入れる。
- 4) 使用したカッターナイフやピンセットは、サンプルのコンタミネーションを避けるため、毎回蒸留水で洗い水分を拭き取る。
- 5) サーマルサイクラーを用いて 95°C で 10 分間加熱する。
- 6) 中和バッファー 50 µL を新しい PCR チューブに入れ、5) の上清を 30 µL 入れる。この抽出液は冷蔵庫(4°C)で保存し、1 週間以内に解析を行う。

(成虫の場合)

- 1) 成虫は DNA 抽出するまでトラップごと、冷凍庫(-20°C)で凍らせておく。成虫の腹部をトラップからピンセットで外し、1 頭ずつチャック付きポリ袋に入れて冷凍すると作業効率が良い。
- 2) 溶解バッファー 100 µL を PCR チューブに入れる。
- 3) 成虫の腹部をピンセットあるいは爪楊枝の柄を用いて、2) に入れる。
- 4) 使用したカッターナイフやピンセットは、サンプルのコンタミネーションを避けるため、毎回蒸留水で洗い水分を拭き取る。
- 5) サーマルサイクラーを用いて 95°C で 10 分間加熱する。
- 6) 中和バッファー 50 µL を新しい PCR チューブに入れ、4) の上清を 30 µL 入れる。この抽出液は冷蔵庫(4°C)で保存し、1 週間以内に解析を行う。

II. PCR-RFLP

<準備するもの>

- ・前項のチャノコカクモンハマキ DNA 抽出液
- ・PCR 酵素「Emerald Amp MAX PCR Master Mix」(タカラバイオ/品番 RR320A)
- ・プライマー2種
RFLP-1F : 5'-TGACGCTATTGTATTGTGGTTTC-3'
RFLP-1R : 5'-CTCAATGACGTAGGCCATG-3'
- ・制限酵素「Hha I」(ニューイングランドバイオラボ/品番 R0139S または R0139L)
- ・滅菌蒸留水
- ・アガロースゲル
- ・DNA 染色試薬 (エチジウムブロマイド、Gel Red 等)
- ・実験器具類 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、マイクロチップ等)

<手順>

- 1) 以下の組成になるように各試薬を解析本数分混合し、PCR チューブに分注す

る。

	1 本分	20 本分の場合
Emerald MAX PCR Master Mix	2.5 μ L	50.0 μ L
滅菌蒸留水	1.3 μ L	26.0 μ L
各プライマー(各 10 μ M)	0.26 μ L	5.2 μ L
合計	4.06 μ L	合計 81.2 μ L を 20 本に分注

- 2) DNA 粗抽出により得られたチャノコカクモンハマキ DNA を 1 μ L ずつ分注する。
- 3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、以下の温度・時間設定で PCR 反応を行う。

94°C	30 秒	} 40 サイクル
98°C	10 秒	
65°C	30 秒	
72°C	30 秒	

III. 制限酵素反応

- 1) 以下の組成になるように各試薬を解析本数分混合し、PCR チューブに分注する。

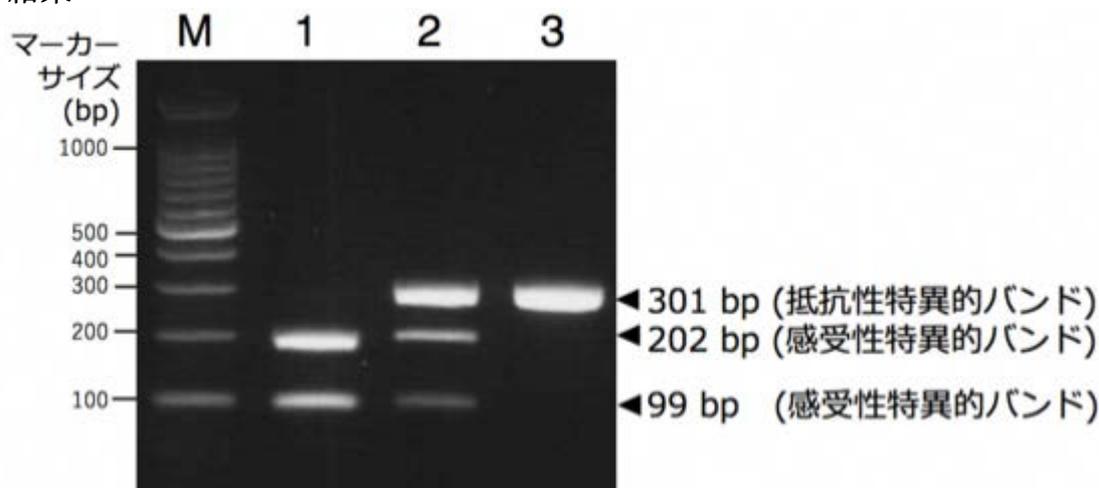
	1 本分	20 本分の場合
HhaI	0.2 μ L	4 μ L
滅菌蒸留水	4.8 μ L	96 μ L
合計	5.0 μ L	合計 100 μ L を 20 本に分注

- 2) チャノコカクモンハマキ PCR 産物を 5 μ L ずつ分注する。
- 3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、37°C、1 時間反応を行う。

IV. 電気泳動・染色・撮影

- 1) HhaI 処理液にローディングバッファーを加え、2%アガロースゲルで 20~30 分間 100 V で電気泳動する。
- 2) エチジウムブロマイド (EtBr) あるいは Gel Red (Biotium/品番 41003) 等で染色する。
- 3) UV を照射し、バンドパターンを撮影する。

V. 結果



レーン No.1 : テブフェノジド剤感受性ホモ S/S
レーン No.2 : テブフェノジド剤抵抗性感感受性ヘテロ R/S
レーン No.3 : テブフェノジド剤抵抗性ホモ R/R
M : サイズマーカー (100 bp ラダー)

PCR 増幅により、エクダイソン受容体の部分配列である 301 bp が増幅される。制限酵素 HhaI は感受性個体の持つ受容体遺伝子上の塩基配列 (GCGC) を特異的に認識して切断する。

感受性ホモ S/S は、制限酵素による切断により 2 本のバンド (99 bp、202 bp) が検出される。抵抗性ホモ R/R は、制限酵素により切断されないため 1 本のバンド (301 bp) が検出される。抵抗性感感受性ヘテロ R/S は、3 本のバンド (99 bp、202 bp、301 bp) が検出される。

VI. 結果の解析

上述の抵抗性ホモ個体、抵抗性感感受性ヘテロ個体の頻度をもとに、DAH 系 IGR 剤抵抗性遺伝子(A415V)頻度を次式により求める。

$$\text{抵抗性遺伝子頻度(\%)} = \frac{\text{R ホモ型の個体数} \times 2 + \text{ヘテロ型の個体数}}{\text{全個体数} \times 2} \times 100$$

* PCR-RFLP 法でバンドが検出されない個体は除く

VII. LAMP

<準備するもの>

- ・前項のチャノコカクモンハマキ DNA 抽出液
- ・LoopampDNA 増幅試薬キット (栄研化学/品番 LMP204)
- ・Loopamp 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学/品番 LMP221)
- ・プライマー4種 (HPLC 精製グレードの使用が望ましい)

F3 : 5'-GCTGCTGTAATCTAGATATCTCA-3'

B3 : 5'-CCTTGCGGTAGTTGTCG-3'

F1P R : 5'-ACTACTCGGAGCATCATTACCTATCAGCTCTCACATCACATT-3'

B1P R : 5'-TGCGGCGGTACGACGAGCCTGGTTGTTCGCG-3'

- ・滅菌蒸留水
- ・実験器具類 (マイクロピペット、マイクロチップ等)
- ・サーマルサイクラー (恒温水槽・魔法瓶でも代用可)

<手順>

- 1) 以下の組成になるようにプライマーミックスを調製する。

プライマー名 (濃度)	液量
F3 (50 μ M)	2 μ L
B3 (50 μ M)	2 μ L
F1P (50 μ M)	16 μ L
B1P (50 μ M)	16 μ L

- 2) 以下の各試薬を解析本数分混合し、PCR チューブに分注する。

	1 本分	20 本分の場合
2 x Reaction mix	12.5 μ L	250 μ L
プライマーミックス	1.8 μ L	36 μ L
Bst DNA polymerase	1.0 μ L	20 μ L
滅菌蒸留水	6.7 μ L	134 μ L
Fluorescent Detection Reagent	1.0 μ L	20 μ L
	合計 23.0 μ L	合計 460 μ L

- 3) DNA 粗抽出により得られたチャノコカクモンハマキ DNA を滅菌蒸留水で 100 倍希釈し、2 μ L ずつ分注する。

- 4) サーマルサイクラー等で以下の通り反応する。

65°C、90 分

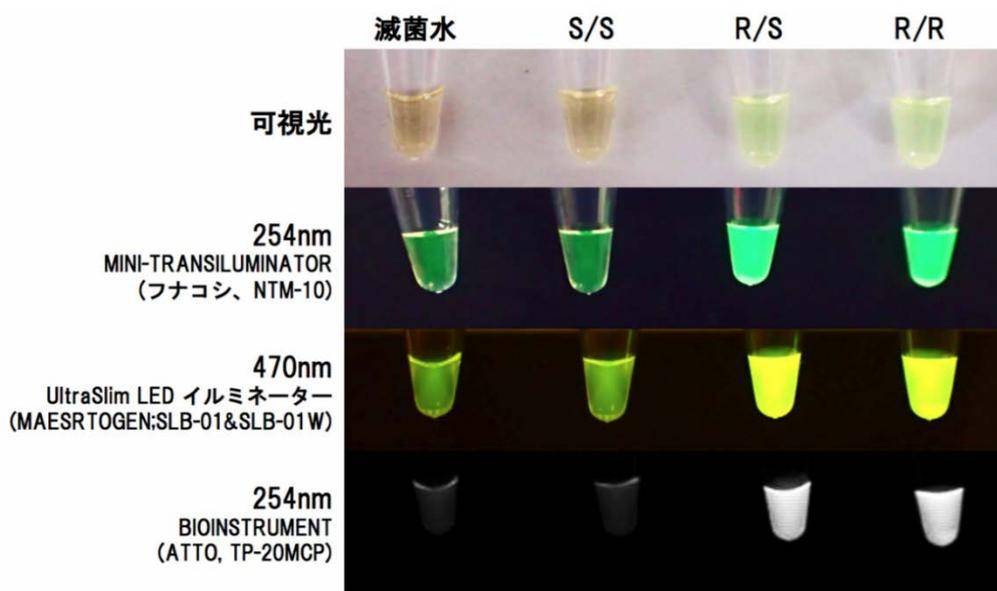
95°C、2 分

VIII. 観察

紫外線を通さない眼鏡や防護面を必ずかけて、短波長(240-260 nm)あるいは長波長(350-370 nm)の紫外線を励起光として反応液の蛍光を観察する。

なお、470 nm の励起光でも R/S、R/R の蛍光は滅菌水、S/S と比較して強く検出された。紫外線照射出力の高い装置では、陰性コントロールも蛍光を発して見えるため、チューブの距離を紫外線照射装置から離し、ネガティブコントロールとの差が見やすい位置に調整する。

IX. 結果



LAMP により、抵抗性型のエクダイソン受容体遺伝子上の塩基配列が特異的に増幅される。Fluorescent Detection Reagent 中に含まれるカルセインは、はじめマンガンイオンと結合して消光しているが、増幅反応の過程において生成するピロリン酸イオンにマンガンイオンを奪われ蛍光を発し、さらに反応液中のマグネシウムイオンと結合することで蛍光が増強される。

すなわち、蛍光が検出されると抵抗性遺伝子が含まれている R/S か R/R であることが示唆される。

X. 結果の解析

本手法では、抵抗性ホモ R/R と抵抗性感受性ヘテロ R/S は判別できないため、DAH 系 IGR 剤抵抗性遺伝子(A415V)頻度は必要に応じて次式で推定する。

$$\text{抵抗性遺伝子頻度(\%)} = \left(1 - \sqrt{\frac{S \text{ ホモ型の個体数}}{\text{全個体数}}} \right) \times 100$$

(執筆：浅野美和)

4-3 ワタアブラムシのネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断法

はじめに

ネオニコチノイド系農薬の有効成分が作用するニコチン性アセチルコリン受容体タンパク質の遺伝子変異を検出するプライマーを使用して診断する。

遺伝子型	受容体のアミノ酸	受容体遺伝子上の塩基配列
感受性 (S)	81 番目がアルギニン (R)	AGA
抵抗性 (R)	81 番目がスレオニン (T)	ACA

I. DNA 抽出法

<準備するもの>

- PrepMan[®] Ultra Sample Preparation Reagent
(アプライドバイオシステムズ/品番 4318930)
- PCR チューブおよびキャップ
- ホモジナイザー
 個体単位：マイクロチップ等
 集団単位：ディスポーザブルホモジナイザー
 「バイオマッシャー II」(株) ニッピ/品番 320103)
- 恒温器 (サーマルサイクラー等)



図1 マイクロチップの先端加工



図2 バイオマッシャー II (ニッピ社 HP より)

<手順>

(個体単位の場合)

- 1) チューブにアブラムシと PrepManUltra 20~30 μ L を入れ、マイクロチップ等の先端で虫体をすり潰す。マイクロチップの先端を火で炙り、図1のように球状に丸めておくと潰しやすい。
- 2) 100 $^{\circ}$ C (サーマルサイクラーを使用する場合は 99.9 $^{\circ}$ C) で 10 分間加熱。
- 3) 室温に戻したサンプルは遺伝子解析までの間、-20 $^{\circ}$ C以下で保存する

(集団単位の場合)。

- 1) バイオマッシャー II (図 2) のチューブ内にアブラムシ (~50 個体) と PrepMan Ultra 100 μL を入れ、付属の攪拌棒を用いて虫体をすり潰す。
- 2) 100°C (サーマルサイクラーを使用する場合は 99.9°C) で 10 分間加熱。
- 3) 室温に戻したサンプルは遺伝子解析までの間、-20°C 以下で保存する。

II マルチプレックス PCR

<準備するもの>

- ・前項のアブラムシ DNA 抽出液
- ・「EmeraldAmp PCR Master Mix」(タカラバイオ/品番 RR300A)
- ・プライマー3種
Agb1MarkerF103 : 5'-TGTGTTTTACTTGTTACAGAACGAA-3'
Agb1MarkerR103 : 5'-GTTTCCTCCCTTTTAAGCGATA-3'
Agb1MF15 : 5'-AAATCGAAGGTTTGGTTGAC-3'
- ・滅菌蒸留水
- ・TAE 緩衝液
- ・アガロースゲル
- ・DNA 染色試薬 (エチジウムブロマイド、Gel Red 等)
- ・実験器具類 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、マイクロチップ等)

<手順>

- 1) 以下の組成になるように各試薬を解析本数分混合し、PCR チューブに分注する。

	1 本分	20 本分の場合
EmeraldAmp PCR Master Mix	10.0 μL	200 μL
滅菌蒸留水	6.0 μL	120 μL
Agb1MarkerF103 (20 μM)	1.0 μL	20 μL
Agb1MarkerR103 (20 μM)	1.0 μL	20 μL
Agb1MF15 (20 μM)	1.0 μL	20 μL
合計	19.0 μL	合計 380 μL を 20 本に分注

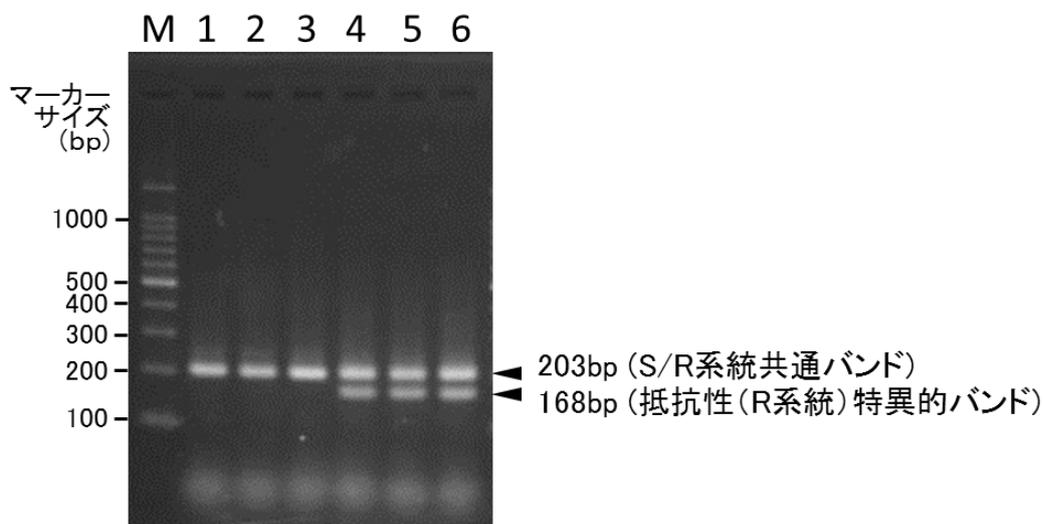
- 2) DNA 粗抽出により得られたアブラムシ DNA を 1.0 μL ずつ分注する。
- 3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、以下の温度・時間設定で PCR 反応を行う。

94°C	3分	} 35 サイクル
94°C	30秒	
52°C	30秒	
72°C	1分	
72°C	7分	

III 電気泳動・染色・撮影

- 1) PCR 反応液を 3% アガロースゲルで 25~30 分間 100 V で電気泳動する。
- 2) エチジウムブロマイド (EtBr) あるいは Gel Red (Biotium/品番 41003) 等で染色する。
- 3) UV を照射し、バンドパターンを撮影する。

IV 結果



レーン No.1-3 : ネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断陰性
 レーン No.4-6 : ネオニコチノイド剤抵抗性遺伝子診断陽性
 M : サイズマーカー (100-bp ラダー)

サンプリング方法の項で示したとおり、トラップで捕捉された有翅虫ではワタアブラムシの正確な同定が極めて困難であることから、遺伝子診断においては他種の混入もやむなしとする。したがって、個体群における抵抗性遺伝子頻度の算出は行わず、168 bp の抵抗性 (R 系統) 特異的バンドの出現の有無により、個体群内に抵抗性個体が存在するか否かの診断を行う。

タンポポアブラムシ *Aphis taraxacicola* などの近縁種でも 203 bp の S/R 系統共通バンドは出現しうるが、168 bp のバンドが出現することはない。アブラムシ有翅虫に類似するハエ目、ハチ目などの他の昆虫類においても 168 bp のバンドの出現は認められていない。
 (執筆：土田聡)

4-4 ネギアザミウマのピレスロイド剤抵抗性遺伝子診断法

はじめに

ピレスロイド系農薬の有効成分が作用するナトリウムチャンネルタンパク質の遺伝子変異を検出するプライマーを使用して診断する。

ナトリウムチャンネルタンパク質における抵抗性関連のアミノ酸変異は、T929I と K1774N というアミノ酸変異ペアが国内の産雄単為生殖型の個体群で広く確認されている（産雌単為生殖型ではごくわずかにしか確認されていない）。一方、国内の産雌単為生殖型の個体群では M918T と L1014F というアミノ酸変異ペアが過去に報告されているが（Toda and Morishita, 2009 ; 武澤, 2012）、近年では報告例がない（相澤, 2018）。そこで、本遺伝子診断法では、国内で広く確認されている T929I と K1774N の変異ペアにおける T929I 変異の有無を調査することにより、抵抗性の診断を行う。なお、M918T と L1014F の変異ペアを対象とした診断については土田ら（2010）の遺伝子診断法が利用可能である。

T929I と K1774N の変異ペア

遺伝子型	ナトリウムチャンネルのアミノ酸	ナトリウムチャンネル遺伝子上の塩基配列
感受性 (S)	929 番目がトレオニン (T) 1774 番目がリシン (K)	ACC AAG
抵抗性 (R)	929 番目がイソロイシン (I) 1774 番目が アスパラギン (N)	ATC AAC

I. DNA 抽出法

<準備するもの>

・DNA 抽出用バッファ

TE-T バッファ(以下の試薬を用いて調整する)

- ・ 1 M Tris-HCl (pH 9.0) (ニッポンジーン/品番 314-90381)
- ・ 0.5 M EDTA (pH 8.0) (ニッポンジーン/品番 311-90075)
- ・ 20% Triton X-100 (ケイマンケミカル/品番 600217)
- ・ 滅菌蒸留水 UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water (サーモフィッシャー/品番 10977015)

TE-T バッファの組成は次の通りとする。

10 mM Tris HCl (pH 9.0) , 1 mM EDTA, 0.1% Triton X-100

TE-T バッファは室温で保存可能。

- ・ PCR チューブおよびキャップ

<抽出用バッファの調整>

50mL の TE-T バッファを用意する場合は、次の通りに調合する。

1M Tris-Hcl (pH 9.0)	0.5 mL
0.5M EDTA (pH 8.0)	0.1 mL
20% Trion X-100	0.25 mL
滅菌蒸留水	49.15 mL
合計	50.0 mL

<手順>

(個体単位で実施)

- 1) チューブにネギアザミウマ雌成虫個体と抽出用バッファ 30 μ L を入れる。虫体をすり潰す必要はない。
- 2) サーマルサイクラーで 95°C 15 分間加熱する。
- 3) 室温に戻したサンプルは遺伝子解析までの間、-20°C以下で保存する。



PCR チューブの抽出バッファに浸したネギアザミウマ成虫

II マルチプレックス PCR

<準備するもの>

- ・ 前項のネギアザミウマ DNA 抽出液
- ・ PCR 酵素
「EmeraldAmp MAX PCR Master Mix」(タカラバイオ/品番 RR300A)
プライマー、鋳型 DNA を加えるだけで PCR が実施可能。
- ・ プライマー4 種

TtkdrF3 :5'-CATCTTCGATTTTCATTATAGTGGCG-3'

TtkdrR1 :5'-TTGGACAGGAGCAAGGCAAGGAA-3'

TtT929I_F1 :5'-GGTGCCTTGGGTAAC TTTAT-3'

TtT929I_MSR:5'-AGATAATGATGCACAACACAAAGG-3'

- ・滅菌蒸留水 UltraPure DNase/RNase-Free Distilled Water
(サーモフィッシャー/品番 10977015)
- ・0.5x TBE 緩衝液 (44.5 mM Tris、44.5 mM ホウ酸、1 mM EDTA)
(ニッポンジーン/品番 318-90041) (10 倍希釈して用いる)
アガロース粉末の溶解には前述の TAE 緩衝液ではなく、TBE 緩衝液を用いることを推奨する。
- ・アガロースゲル
- ・DNA 染色試薬 (エチジウムブロマイド、GelRed 等)
- ・実験器具類 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、マイクロチップ等)

<手順>

- 1) 以下の組成になるように各試薬を解析個体数分混合し、PCR チューブに分注する。

	1 本分	20 本分の場合
プライマーミックス	1.8 μ L	37.8 μ L
PCR 酵素	3.0 μ L	63.0 μ L
合計	4.8 μ L	合計 100.8 μ L を 20 本に分注 (複数本分については、必要数+1 の本数分で調製する)

各プライマーについて 100 μ M に溶解したものを用意した場合、次のように希釈してプライマーミックスを調整後、100 μ L ずつ等に小分けして-20°C以下で保存する。

	プライマー濃度	
TtkdrF3	5 μ L	1 μ M
TtkdrR1	5 μ L	1 μ M
TtT929I_F1	10 μ L	2 μ M
TtT929I_MSR	5 μ L	1 μ M
10mM Tris-HCl (pH 8.0)	425 μ L	
合計	450 μ L	

- 2) DNA 抽出により得られた各ネギアザミウマ DNA (2 倍希釈) を 1.2 μ L ずつ分注する。
- 3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、以下の温度・時間設定で

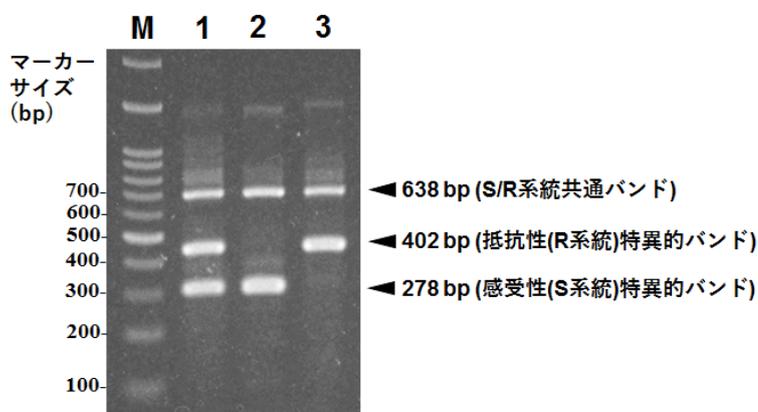
PCR 反応を行う。

95°C 2分
95°C 15秒 } 35 サイクル
58°C 30秒 }
68°C 15秒 }
68°C 5分

III 電気泳動・染色・撮影

- 1) PCR 反応液を 2% アガロースゲルで 20~30 分間 100 V で電気泳動する。
- 2) エチジウムブロマイド (EtBr) あるいは GelRed (Biotium/品番 41003) 等で染色する。
- 3) UV を照射し、バンドパターンを撮影する。

IV 結果



レーン No.1 : 「ヘテロ型」 (3 種のバンドがすべて検出される)
レーン No.2 : 「S ホモ型」 (共通バンドと S 系統特異的バンドが検出される)
レーン No.3 : 「R ホモ型」 (共通バンドと R 系統特異的バンドが検出される)
M : サイズマーカー (100 bp ラダー)

なお、共通バンドが未検出の個体については判定対象外として除外する。
以下の数式により、ピレスロイド剤抵抗性遺伝子頻度を算出する。

$$\text{抵抗性遺伝子頻度} = \frac{\text{R ホモ型の個体数} \times 2 + \text{ヘテロ型の個体数}}{\text{全個体数} \times 2} \times 100$$

(執筆：上樂明也)

文献

- Toda S. and Morishita M. (2009) Identification of three point mutations on the sodium channel gene in pyrethroid-resistant *Thrips tabaci* (Thysanoptera: Thripidae). *J. Econ. Entomol.* 102: 2296-2300.
- 武澤友二 (2012) 遺伝子診断による北海道空知・上川地方における合成ピレスロイド剤抵抗性ネギアザミウマの発生調査. 北日本病虫研報 63:184-188.
- 相澤美里 (2018) ネギアザミウマの異なる生殖系統における合成ピレスロイド剤抵抗性機構と広域的・局所的分布に関する分子生態学的研究. 香川農試研報 69:1-30.
- 土田 聡、森下正彦、望月雅俊 (2010) 合成ピレスロイド抵抗性ネギアザミウマを識別する遺伝子診断法. 農研機構普及成果情報
<http://www.naro.affrc.go.jp/project/results/laboratory/fruit/2010/fruit10-08.html>

4-5 ナミハダニのキチン生合成阻害剤抵抗性遺伝子診断法

はじめに

発育阻害剤エトキサゾール、ヘキシチアゾクスおよびクロフェンテジンの有効成分が作用するキチン合成酵素（CHS1）の遺伝子変異を検出するプライマーを用いたリアルタイム PCR と制限酵素を使用して診断する（RED- $\Delta\Delta$ Ct 法、Osakabe *et al.*, 2017）。

エトキサゾールにおける抵抗性関連のアミノ酸変異は、I1017F というアミノ酸変異が国内外の個体群で広く確認されている。また、この変異はエトキサゾールのみならずヘキシチアゾクスおよびクロフェンテジン抵抗性にも関連していることが報告されている。一方、I1017F の隣にアミノ酸置換を伴わない同義置換の DNA 変異が存在することも知られている。そこで本遺伝子診断法では、同義置換変異の両タイプに対応する方法で I1017F の変異を判定する。

ハダニは体が小さく、個体ごとの取り扱いには一定の慣れを要する。また、施設栽培では発生しているパッチごとに抵抗性のレベルが異なるため、圃場内から満遍なく採集して抵抗性遺伝子の頻度を推定する方法が望まれる。そこで、A にしたがって、多くのハダニからまとめて抽出した DNA について、リアルタイム PCR を用いて抵抗性遺伝子頻度を推定する (A)。リアルタイム PCR が使用できない場合は、後述の PCR-RFLP 法 (B) により、個体ごとに判定する。

遺伝子型	受容体のアミノ酸	受容体遺伝子上の塩基配列
感受性 (S)	1016 番目がセリン (S)	TCG ATT
	1017 番目がイソロイシン (I)	TCA ATT
抵抗性 (R)	1016 番目がセリン (S)	TCG TTT
	1017 番目がフェニルアラニン(F)	TCA TTT

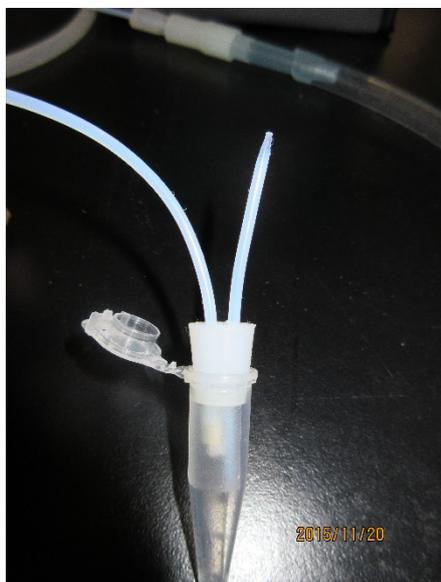
A. RED- $\Delta\Delta$ Ct 法による遺伝子頻度の推定

I. DNA 抽出法

<準備するもの>

- ・ DNA 抽出用キット
 - ・ DNeasy Blood & Tissue kit (キアゲン/品番 69504)
 - ・ RNase A (キアゲン/品番 19101)
- ・ DNA 精製用キット
 - ・ NucleoSpin gDNA Clean-up XS (タカラ/品番 U0904B)
- ・ TE バッファー (pH 8.0)
- ・ 1.5 ml および 2.2 ml サンプルチューブ

- ペレットミキサー1.5 ml 用 (トーホー/品番 0310000)
- マイクロ吸虫管 (コスモ理研/品番 CR-1410)
- エアーポンプ (ミニポンプ MP Σ 300 (柴田科学) など流量が調節できるものが便利)



※ 購入直後は吸虫管の先端部 (吸い口) が太いため、ライターの火で少し炙って柔らかくなったところを引き延ばして、適当な太さ (内径 0.5 mm 程度) のところでカットする。

<手順>

- 1) ナミハダニ 50 ♀♀をマイクロ吸虫管で1.5 ml サンプリングチューブに集め、氷の上に置く (ハダニの動きが抑制され、後で処理し易くなる)。
- 2) DNeasy Blood & Tissue kit により DNA を抽出する。
 1. Buffer ATL 180 μ L を加え、ペレットミキサーにより摩砕。
 2. Proteinase K 20 μ L を加えて混合。
 3. 56°Cの恒温振とう器で一晩保温。
 4. RNase A (100 mg/ml) を 4 μ L 加え、ボルテックスミキサーで 15 秒間攪拌した後、室温で 2 分間置く。
 5. Buffer AL 200 μ L を加え、ボルテックスミキサーで攪拌。
 6. エタノール 200 μ L を加え、ボルテックスミキサーで攪拌。
 7. サンプルを DNeasy Mini Spin Column に移し、8,000 rpm で 1 min 遠心。
 8. カラムを新しいコレクションチューブに移し、AW1 を 500 μ L 加え、8,000 rpm で 1 min 遠心。
 9. カラムを新しいコレクションチューブに移し、AW2 を 500 μ L 加え、14,000 rpm で 3 min 遠心
 10. カラムを 2.2 ml サンプルチューブに移し、AE 200 μ L を加え、室温で 1 分間置いた後、8,000 rpm で 1 分間遠心して DNA を溶出する。

11. カラムに AE 200 μL を追加し、室温で 1 分間置いた後、8,000 rpm で 1 min 遠心してカラムに残った DNA をさらに溶出する。
 12. 得られた DNA サンプルは冷蔵庫や冷凍庫で保存可能。
- 3) NucleoSpin gDNA Clean-up XS により、得られた DNA を精製・濃縮する。
1. 2) で得られた DNA サンプル (約 400 μL) に TE 400 μL を加える。
 2. NT 200 μL を加え、ボルテックスミキサーで攪拌。
 3. コレクションチューブにセットしたカラムに①で希釈した DNA 溶液 500 μL を加え、11,000 g で 1 分間遠心。
※ 遠心機の設定が rpm ではなく、g であることに注意。
 4. 溶出液を捨て、残りの DNA 溶液をカラムに加え、11,000 g で 1 分間遠心。
 5. カラムを新しいコレクションチューブに移し、B5 100 μL を加え、11,000 g で 3 分間遠心。
 6. カラムを 1.5 ml サンプルチューブに移し、BE 10 μL を加え、11,000g で 2 分間遠心して DNA を溶出する。
 7. カラムに BE 10 μL を追加し、11,000 g で 2 分間遠心して DNA をさらに溶出する。
 8. サンプルチューブの蓋を開けたまま 90°C のブロックヒーターで 8 分間保温してエタノールを完全に除去する (これによってサンプルの容量は 8~10 μL 程度に減少)。
 9. 得られた DNA サンプルは冷蔵庫や冷凍庫で保存可能。
- 4) DNA サンプルの濃度調整
1. BE をブランクとして、精製した DNA サンプルの濃度を測定する。
 2. Nuclease-free water 等で濃度を 1 ng/ μL に調整する。

II. 制限酵素反応とバッファー交換

<準備するもの>

・制限酵素

・ *Taq*[®]I (New England BioLabs/品番 R0149S)

・ *Mlu*CI (New England BioLabs/品番 R0538S)

※ 制限酵素用のバッファー成分はメーカーによって異なり、それが次のリアルタイム PCR に影響する可能性がある。

・バッファー交換用カラム

・ Micro Spin S-200 HR Columns

(GE ヘルスケアバイオサイエンス/品番 27512001)

<手順>

- 1) 以下のように各試薬を解析本数分混合し、PCR チューブに分注する。

	1 本	10 本分の場合
<i>Taq</i> ^α I	1 μL	10 μL
<i>Mlu</i> C I	1 μL	10 μL
10×CutSmart	2 μL	20 μL
滅菌蒸留水	1 μL	10 μL
合計	5 μL	50 μL

- 2) 1 ng/μL に調整した DNA サンプルを 15 μL ずつ PCR チューブに加える。
- 3) サーマルサイクラーにセットし、次の温度反応を行う。

37°C 3 時間 (*Mlu*C I による消化)

65°C 3 時間 (*Taq*^α I による消化)

80°C 20 分 (制限酵素の失活)

- 4) Micro Spin S-200 HR Columns によりバッファーを交換する。
 1. カラム内のゲルろ過担体をボルテックスミキサーで十分攪拌する。
 2. カラムのスクリーキャップを 1/4 開け、下のチップを折り取って付属のチューブにセットし、800 g で 1 分間遠心。
 3. カラムを 2.2 ml サンプルチューブに移し、制限酵素処理後の DNA 溶液を全量加え、800 g で 2 分間遠心。
 4. 溶出した DNA 溶液 (>16μL) を定量 PCR (qPCR) に用いる。

III. インターカレーター法による qPCR

<準備するもの>

- ・リアルタイム PCR 用反応試薬
 - ・ SYBR Fast qPCR Mix (タカラバイオ/ 品番 RR430S)
- ・ CHS1 用プライマー (10 μM)
 - ・ tu03CHS1 cyber 1F: 5'-GGCACTGCTTCATCCACAAG-3'
 - ・ tu03CHS1 cyber 1R: 5'-GTGTTCCCAAGTAACAACGTTC-3'
- ・内部標準 (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 用プライマー (10 μM)
 - ・ GAPDH-2F: 5'-GCACCAAGTGCTAAAGCATGGAG -3'
 - ・ GAPDH-2R: 5'-GAACTGGAACACGGAAAGCCATAC -3'

<手順>

- 1) 制限酵素処理した各サンプル (tester) と制限酵素無処理の各サンプル (calibrator) のそれぞれについて、CHS1 および GAPDH 増幅用に以下のよ

うに各試薬を解析本数分混合し、PCR チューブまたは PCR 用プレートに分注する。

	1 本	10 本分の場合
SYBR Fast qPCR Mix (2×)	10.0 μL	100 μL
プライマーF (10 μM)	0.8 μL	8 μL
プライマーR (10 μM)	0.8 μL	8 μL
滅菌蒸留水	0.4 μL	4 μL
合計	12.0 μL	120 μL

- 2) 制限酵素処理した各サンプルと制限酵素無処理の各サンプル (1 ng/μL) を 8 μL ずつ PCR チューブまたは PCR プレートに加える。
- 3) リアルタイムサーマルサイクラーにセットし、次の温度反応を行う。

95°C	30 秒	(プレヒート)	
95°C	10 秒	←	45 サイクル (PCR 増幅)
62°C	10 秒		
72°C	15 秒		
95°C	10 秒	}	(融解温度解析)
60°C	60 秒		
97°C	1 秒		

- ※ 上記の条件はロシュ社製の LightCycler Nano Software ver. 1.1.0 による事例であるが、PCR 増幅時の各温度の保持時間と融解温度解析の条件は使用するリアルタイム PCR 装置で推奨される時間を使用する。
- ※ データは Ct 値 (機種によっては Cq 値) として得られるため、PCR 後の電気泳動などの作業は不要である。

4) $\Delta\Delta Ct$ 法による抵抗性遺伝子頻度の算出

$$\Delta Ct_{(tester)} = Ct_{(CHS1-tester)} - Ct_{(GAPDH-tester)}$$

$$\Delta Ct_{(calibrator)} = Ct_{(CHS1-calibrator)} - Ct_{(GAPDH-calibrator)}$$

$$\Delta\Delta Ct = Ct_{(tester)} - Ct_{(calibrator)}$$

$$\text{抵抗性遺伝子頻度} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

$Ct_{(CHS1-tester)}$, $Ct_{(GAPDH-tester)}$: 制限酵素処理した DNA の CHS1 および GAPDH の Ct 値
 $Ct_{(CHS1-calibrator)}$, $Ct_{(GAPDH-calibrator)}$: 制限酵素無処理の DNA の CHS1 および GAPDH の Ct 値

IV. 結果

1) 野外採集個体群におけるエトキサゾール抵抗性遺伝子頻度の推定

下の表は圃場で採集されたナミハダニの 2 つの個体群 (A と B) の雌成虫各 100 個体からそれぞれ DNA を抽出し、制限酵素処理後にリアルタイム PCR (Applied Biosystems 7500 Real-Time PCR System ; Thermo Fisher Scientific) を用いて抵抗性遺伝子頻度を推定したものの事例である。A 個体群におけるエトキサゾール抵抗性遺伝子頻度 ($2^{-\Delta\Delta CT}$) は 80.7%、B 個体群では 16.3% と推定された。A および B 個体群での生物検定では、補正死亡率がそれぞれ 11.5% および 58.6% となり、大まかに遺伝子診断結果と同様の傾向を示した。

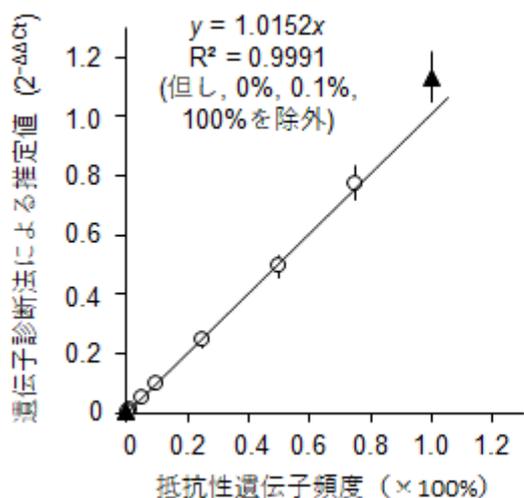
表中の「技術反復」は、ピペティングなどの手作業による誤差を補正する目的で、同じ DNA サンプルを使って各 2 本ずつ反応液を作成し、同じ操作を行ったものである。

個体群	制限酵素 処理	遺伝子	技術 反復	Ct	平均 Ct 値	ΔCT	$\Delta\Delta CT$	$2^{-\Delta\Delta CT}$
A (100 ♀♀)	有り (tester)	CHS1	1	21.97	21.835	0.125 (e = a - b)	0.31 (g = e - f)	0.807 (h = 2 ^{-g})
			2	21.7				
		GAPDH	1	21.75	21.71			
			2	21.67				
	無し (calibrator)	CHS1	1	20.24	20.225	-0.185 (f = c - d)		
			2	20.21				
		GAPDH	1	20.39	20.41			
			2	20.43				
B (100 ♀♀)	有り (tester)	CHS1	1	25	24.935	2.475	2.62	0.163
			2	24.87				
		GAPDH	1	22.48	22.46			
			2	22.44				
	無し (calibrator)	CHS1	1	21.09	21.09	-0.145		
			2	21.09				
		GAPDH	1	21.21	21.235			
			2	21.26				

2) 抵抗性遺伝子頻度検出精度の検証

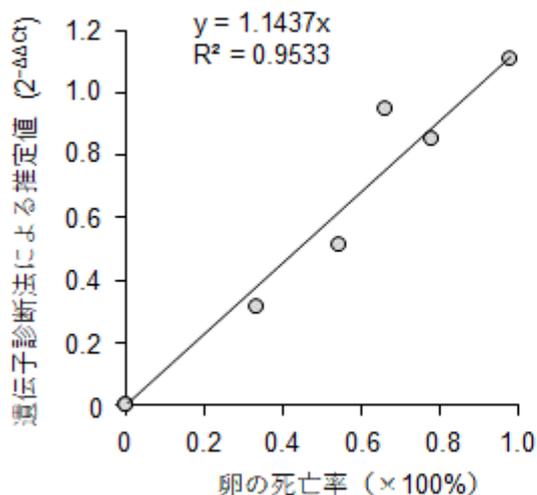
RED- $\Delta\Delta Ct$ 法による抵抗性遺伝子頻度の検出精度を確認するため、エトキサゾール抵抗性と感受性の DNA 配列をそれぞれホモに持つ系統を作成した。それぞ

れの系統から DNA を抽出し、濃度調整後にこれらの DNA を混合して診断法を実施し、実際の抵抗性遺伝子頻度 (0%, 0.1%, 0.5%, 1%, 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 100%) と診断法による推定値の相関を調べた。その結果、0%, 0.1% および 100% では回帰直線から僅かに外れる傾向が認められた。一方、0.5~75%の間では推定値が実際の抵抗性遺伝子頻度とほぼ一致し ($R^2 = 0.9991$)、回帰直線の傾きもほぼ 1 となった。



Osakabe et al. (2017) Pestic. Biochem. Physiol. (in press) doi: 10.1016/j.pestbp.2017.04.003 より、改変

エトキサゾール抵抗性の遺伝様式は完全劣性である。そこで次に、処女雌に半数体の雄卵を産卵させて、常用濃度に (50 ppm) よる雄卵の死亡率と親の処女雌における抵抗性遺伝子頻度を比較した。その結果、極めて高い相関が得られたことから、本診断法による推定値は実際の抵抗性遺伝子頻度とほぼ一致すると考えられる。



Osakabe et al. (2017) Pestic. Biochem. Physiol. (in press) doi: 10.1016/j.pestbp.2017.04.003 より、改変

3) 実験条件の適合性の確認方法

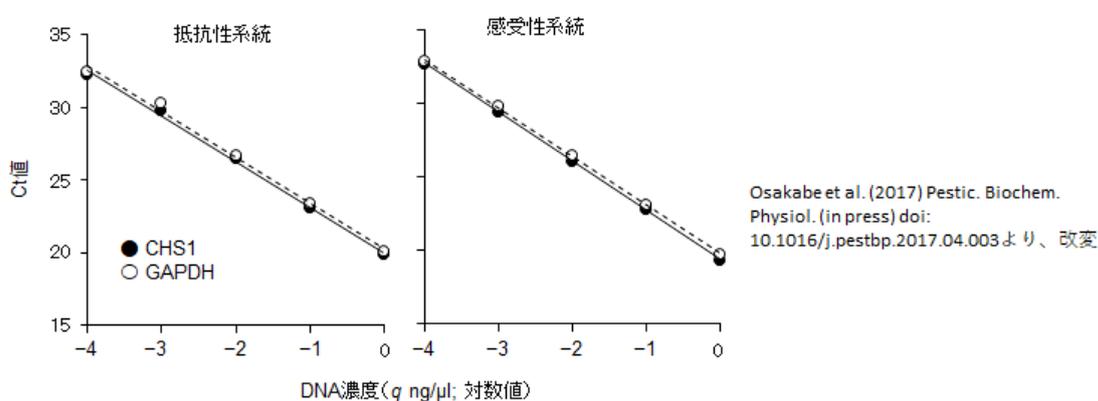
RED- $\Delta\Delta Ct$ 法では検量線は不要であり、CHS1 と GAPDH の増幅の比率が濃度に関わらず一定であることを前提としている。これはプライマーの設計によるところが大きいため、本書と同じ試薬を使用する場合はほぼ問題ないと思われる。しかし、他社製のキットなどを用いる場合には妥当な結果が得られるかどうか、増幅効率の確認をしておくことが望まれる。

ナミハダニ（系統は何でもよい）から抽出した DNA を 1 ng/ μ L に調整し、それを 10 倍ずつ希釈して 0.1~0.0001 ng/ μ L のサンプルを作成する。これらを使ってそれぞれ CHS1 および GAPDH を増幅し、Ct 値を得る。多くのリアルタイム PCR 用の解析ソフトでは検量線を引く機能が付属しているため、マニュアルに従ってそれらを利用すると、下の例のような増幅効率 (e) を自動的に求めることができる。増幅効率は

$$e \times 100 = (E - 1) \times 100(\%)$$

で求めることができ、下の事例では 99.7~107.5% と計算される。増幅効率が 100% のとき、PCR 温度サイクル 1 回につき標的の DNA が 2 倍 ($E=2$) となる。この事例では増幅効率は CHS1 と GAPDH のいずれのプライマーにおいてもほぼ 100% と考えられる。増幅効率が遺伝子間で異なっても回帰直線が互いに平行であれば問題はない。ここでは直線の傾きも遺伝子間でほぼ同等である。

また、ここでは抵抗性系統と感受性系統の両方を示したが、これらでほぼ同じ結果が得られていることから分かるように、抵抗性レベルが不明なサンプルを用いてこの解析を行っても全く問題はない。



Osakabe et al. (2017) Pestic. Biochem. Physiol. (in press) doi: 10.1016/j.pestbp.2017.04.003より、改変

抵抗性系統	CHS1: Ct = 3.15log ₁₀ (q)+19.98, E = 2.075, R ² = 0.997	※ E = 1+e (e: 増幅効率)
	GAPDH: Ct = 3.16log ₁₀ (q)+20.27, E = 2.073, R ² = 0.9938	
感受性系統	CHS1: Ct = 3.33log ₁₀ (q)+19.37, E = 1.997, R ² = 1	
	GAPDH: Ct = 3.28log ₁₀ (q)+19.82, E = 2.019, R ² = 0.9996	

文献

Osakabe et al. (2017) Combination of restriction endonuclease digestion with the $\Delta\Delta Ct$

method in real-time PCR to monitor etoxazole resistance allele frequency in the two-spotted spider mite. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 139, 1–8. doi: 10.1016/j.pestbp.2017.04.003

B. PCR-RFLP 法によるハダニの遺伝子型 (RR, RS, SS) 検出

I. DNA 粗抽出法

<準備するもの>

- 1M トリス塩酸緩衝液 (pH 8.0)
- 0.5M EDTA (pH 8.0)
- IGEPAL CA-630 (シグマアルドリッチ/品番 I8896)
- 4M 塩化ナトリウム
- Proteinase K (タカラバイオ/品番 9034)
- 0.2 ml PCR チューブ
- ペレットミキサー0.5 ml 用 (トーホー/品番 0310010)

<手順>

- 1). DNA 粗抽出用緩衝液を以下の要領で準備する。

1M Tris-HCl buffer (pH 8.0)	0.4 mL
0.5M EDTA (pH 8.0)	8.0 ml
IGEPAL CA-630	0.2 mL
4M NaCl	0.1 mL
滅菌蒸留水	31.3 ml
合計	40.0 ml

- 2). DNA 粗抽出用緩衝液 18 μ L に滅菌蒸留水で 2 倍希釈した Proteinase K 2 μ L を加えて混合し、抽出液とする。抽出液は 1 個体あたり 20 μ L を使用するため、抽出する個体数に合わせて混合する量を調整する。
- 3). 小筆等を用いてナミハダニ雌成虫を 0.2 ml の PCR チューブに入れる。チューブを氷上に置くことにより、ハダニの活動が低下するため、後にホモジネートする際に扱い易い。
- 4). ハダニを入れた PCR チューブに抽出液 20 μ L を加え、ペレットミキサーにより摩砕する。
- 5). 摩砕液が入った PCR チューブをサーマルサイクラーにセットし、65°C で 20 分間保温する。その後、Proteinase K を失活させるため、95°C で 10 分間処理した後、次に使用するまで 4°C に保つ。
- 6). 温度反応を終了した摩砕液を滅菌蒸留水で 20 倍に希釈する。希釈したサン

プルは-20°Cで数か月保存が可能である。この方法でのPCR用DNA調整は卵（産卵後1日以上経過）から雌雄成虫までに適用可能である（Arimoto *et al.* 2012）。

文献

Arimoto *et al.* (2012) DNA preparation method in eggs, immature stages, and diapausing females of *Tetranychus* spider mites (Acari: Tetranychidae) for diagnostic PCR-RFLP. *Applied Entomology and Zoology* 47, 295–300. doi: 10.1007/s13355-012-0119-5

II. PCR-RFLP

<準備するもの>

- KoD Fx Neo（東洋紡/品番 KFX-201）
- CHS1 用プライマー（10 μM）
 - TuCHS1-rna3223F: 5'-CAAATAATGTCCGCTTGTTATGCAC-3'
 - TuCHS1-rna3885R: 5'-TTGTGATTCTGAGCCAATTGAATCC-3'
- 制限酵素
 - *Taq*^αI（New England BioLabs/品番 R0149S）
 - *Mlu*CI（New England BioLabs/品番 R0538S）
- 電気泳動用アガロース及びバッファー
- 0.2 ml PCR チューブ

<手順>

1). サンプル当たりのPCR反応液を以下の要領で準備する。

	1 サンプル当たり	20 サンプル分
KoD Fx Neo 2×buffer	10 μL	200 μL
dNTP (2 mM each)	4 μL	80 μL
Forward primer (10 μM)	0.5 μL	10 μL
Reverse primer (10 μM)	0.5 μL	10 μL
KoD FxNeo	0.4 μL	8 μL
滅菌蒸留水	3.6 μL	72 μL
合計	19 μL	19 μL ずつ分注

2). PCR チューブに 19 μL ずつ分注した反応液に DNA 粗抽出液を 1 μL 加え、ボルテックス等で十分攪拌した後、サーマルサイクラーにセットし、以下の条件で増幅反応を行う。

94°C	2分 (プレヒート)	
98°C	10秒	← 40 サイクル (PCR 増幅)
60°C	30秒	
68°C	77秒	
68°C	7分	
4°C	次のステップまで保持	

- 3). 制限酵素処理のため、以下のように各試薬を解析本数分混合して制限酵素混合液を作成する。

	1本	20本分の場合
<i>Taq</i> ^α I	0.1 μL	2 μL
<i>MluC</i> I	0.1 μL	2 μL
10×CutSmart	2 μL	40 μL
滅菌蒸留水	2.8 μL	56 μL
合計	5 μL	100 μL

- 4). PCR 反応が終わったサンプル液 (各 20 μL) に制限酵素混合液を 5 μL ずつ加えて混合する。
- 5). サーマルサイクラーにセットし、次の温度反応を行う

37°C	3時間 (<i>MluC</i> Iによる消化)
65°C	3時間 (<i>Taq</i> ^α Iによる消化)
80°C	20分 (制限酵素の失活)
4°C	次のステップまで保持

- 6). 2%アガロースゲルを用いて 30~50 分間程度電気泳動を行い、エチジウムブロマイド等で染色して観察する。

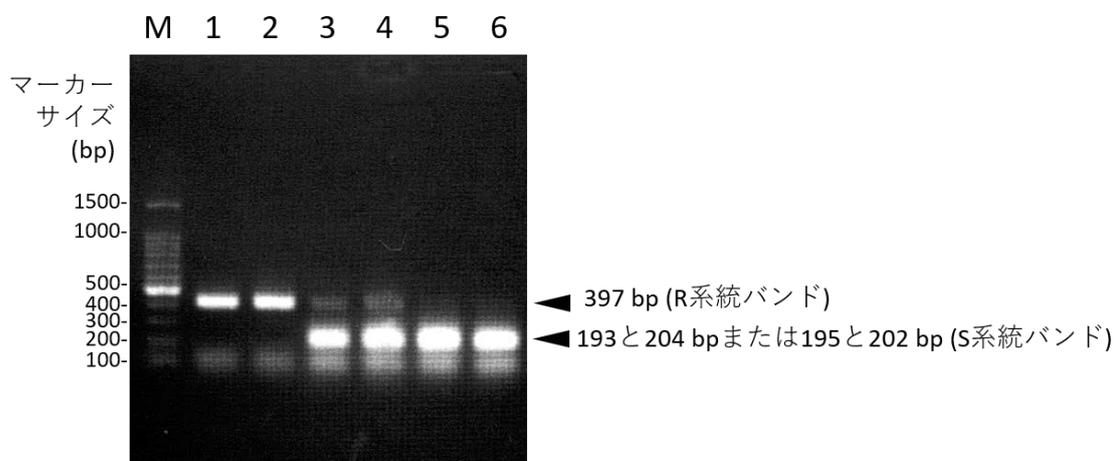
IV. 結果

ここで用いているプライマーによって増幅されるフラグメントのサイズは 653 bp である。Forward primer を含めて、抵抗性と感受性を見分ける *Taq* I もしくは *MluC* I による切断部位までの長さはそれぞれ 193 および 195 bp である。この間には識別部位以外にこれらの制限酵素による認識部位は存在しない。一方、*Taq* I および *MluC* I による切断部位から下流へ 204 および 202 bp の位置に抵抗性と感受性で共通の *MluC* I 切断部位が存在する。さらにそこから reverse

primer の位置までに複数の認識部位が存在し、19~121 bp のフラグメントが発生する。しかし、極めて短いフラグメントは電気泳動で検出されない。

このため、結果的に抵抗性系統では識別部位を含む 397 bp のフラグメントが検出され、一方で感受性系統ではこの 397 bp が切断されて 193 と 204 bp ないしは 195 と 202 bp のフラグメントが検出される。また、ヘテロ個体ではこれらがすべて検出され、遺伝子型の識別が可能である。

図は抵抗性ホモの雌成虫 2 個体と感受性ホモの雌成虫 2 個体ならびにこれら系統間の交配によって得られて F1 雌成虫 (ヘテロ) 2 個体について、個体ごとに電気泳動を行った結果である。ヘテロ個体では 193 と 204 bp ないし 195 と 205 bp のフラグメントが重なった濃いバンドの上に 397 bp のバンドが検出されている。



レーンNo. 1, 2 抵抗性ホモ
レーンNo. 3, 4 ヘテロ
レーンNo. 5, 6 感受性ホモ

(執筆：刑部正博)

4-6 トビイロウンカのイミダクロプリド剤抵抗性遺伝子診断法

はじめに

トビイロウンカのイミダクロプリド抵抗性の主要因として解毒分解酵素 CYP6ER1 遺伝子の高発現が原因であることが明らかになり、高発現型 CYP6ER1 遺伝子は通常発現型 CYP6ER1 遺伝子と配列が異なることが明らかになった。

両者の遺伝子配列は複数箇所では異なっているが、特に高発現型遺伝子では通常発現型遺伝子の開始コドンから 1124-1127 塩基の領域に通常発現型と比較して 3 塩基欠失 ($\Delta 3$) が存在し、この結果高発現型遺伝子 (以下 $\Delta 3$ 型遺伝子) ではこの部位に新たに制限酵素 Sma I 配列が形成される。このことから $\Delta 3$ 周辺の配列を PCR で増幅し Sma I で切断することによって、通常型 (Sma I で切断されない) と $\Delta 3$ 型 (Sma I で切断される) の電気泳動のバンドパターンの違いで、 $\Delta 3$ 型遺伝子の検出が可能である。

N 型配列 : **AAATATCCCGCTGCGCCAGT**
 $\Delta 3$ 型配列 : **AAATATCCCG--G-GCCAGT**
網掛け部分の塩基が欠失で生じた Sma I 認識配列(CCCGGG)

また、 $\Delta 3$ 周辺の DNA 配列の違いに着目し、 $\Delta 3$ 型の配列のみを増幅するプライマーを追加して $\Delta 3$ 型を特異的に検出することが可能なマルチプレックス PCR によっても $\Delta 3$ 型遺伝子の検出が可能である。

I. DNA 抽出法

<準備するもの>

- ・ TE (pH 8.0) (ニッポンジーン / 品番 314-90021 もしくは同等品)
- ・ Triton-X (ナカライテスク / 品番 35501-02 もしくは同等品)
- ・ PCR チューブおよびキャップ

<手順>

(個体単位の場合)

- 1) TE に 0.1% 濃度になるように Triton-X を加え、これを DNA 抽出用バッファーとする。
- 2) 遺伝子診断に供試する個体数に応じて 0.2 mL 8 連 PCR チューブもしくは PCR 用 96 ウェルプレートの各チューブ・ウェル毎に 1 個体ずつ虫を入れる。8 連

チューブではキャップを、96 ウェルプレートでは各ウェルにキャップもしくはプレート全体をシールで密閉し、遺伝子診断に供試するまで-30°Cにて凍結する。

- 3) ゲノム抽出はウンカ個体を凍結した後に行う。8 連 PCR チューブ各チューブもしくは 96 well プレート各ウェルにウンカ 1 個体と DNA 抽出用 buffer を 100 μ L 入れてサーマルサイクラーで 95°C 15 分間加熱する。加熱後 4°C に冷却する。ゲノム抽出したサンプルを長期保存する際には-30°Cで凍結する。

II PCR-RFLP

II-1.PCR 反応

<準備するもの>

- ・ I 項のトビイロウンカ DNA 抽出液
- ・ PCR 酵素「*TaKaRa Ex Taq*[®]」(TaKaRa/品番 RR001A)
本製品には 10X *Ex Taq* バッファー (20 mM Mg²⁺ plus)、dNTP Mixture (各 2.5 mM) が標準添付
- ・ プライマー 2 種
N, delta3_dF1 : 5'-GTCGTCTGCAAACAATGTCTTTCAGATC-3'
N, delta3_dR1 : 5'-ACCAATACAATATCGAGGTCCCTCAC-3'
- ・ 滅菌蒸留水
- ・ TAE 緩衝液
- ・ アガロースゲル
- ・ DNA 染色試薬 (エチジウムブロマイド、Gel Red 等)
- ・ 実験器具類 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、マイクロチップ等)

<手順>

- 1) 以下の組成になるように各試薬を解析本数分混合し、PCR チューブに分注する。

	1 本分	20 本分の場合
10x ExTaq buffer	2.0 μ L	40 μ L
滅菌蒸留水	13.2 μ L	264 μ L
dNTP (2.5 mM each)	1.6 μ L	32 μ L
プライマー		
N, delta3_dF1(10 μ M)	1.0 μ L	20 μ L
N, delta3_dR1(10 μ M)	1.0 μ L	20 μ L
ExTaq	0.2 μ L	4 μ L
合計	19.0 μ L	合計 380 μ L を 20 本に分注

- 2) DNA粗抽出により得られたトビイロウンカDNAを1.0 μLずつ分注する。
 3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、以下の温度・時間設定でPCR反応を行う。

94°C	2分	}	40 サイクル
94°C	30秒		
68°C	1分		
68°C	3分		

II-2. 制限酵素反応

- 1) 各試薬を解析本数分混合し、PCRチューブに分注する。

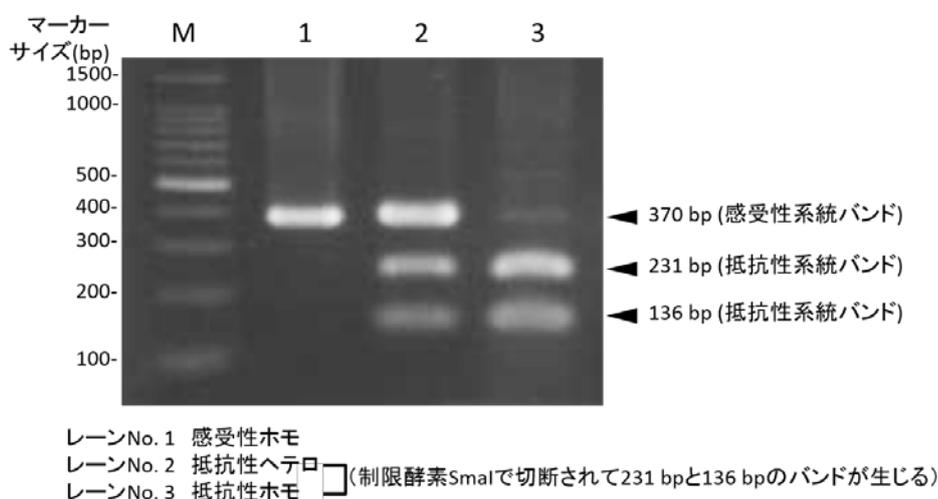
	1本分	20本分の場合
10xT buffer	2.0 μL	40 μL
滅菌蒸留水	5.6 μL	112 μL
0.1% BSA	2.0 μL	40 μL
制限酵素 <i>Sma</i> I	0.4 μL	8 μL
合計	10.0 μL	合計 200 μL を 20 本に分注

- 2) PCR反応液を10.0 μL分注し、キャップを閉め、30°Cで1時間反応する。

II-3. 電気泳動・染色・撮影

- 1) 制限酵素反応液8 μLを2.5%アガロースゲルで20~30分間100 Vで電気泳動し、エチジウムブロマイド(EtBr)あるいはGel Red (Biotium/品番41003)等で染色後、バンドパターンを撮影する。

II-4. 結果



以下の数式により、抵抗性遺伝子頻度を算出する。

$$\text{抵抗性遺伝子頻度} = \frac{\text{抵抗性ホモの個体数} \times 2 + \text{抵抗性ヘテロの個体数}}{\text{全個体数} \times 2} \times 100$$

III マルチプレックス PCR

III-1. PCR 反応

<準備するもの>

- ・ I 項のトビイロウンカ DNA 抽出液
- ・ PCR 酵素「*TaKaRa Ex Taq*[®]」(TaKaRa/品番 RR001A)
本製品には 10X *Ex Taq* バッファー (20 mM Mg²⁺ plus)、dNTP Mixture (各 2.5 mM) が標準添付
- ・ プライマー 3 種
N, delta3_dF1-2 : 5'-GTCGTCTGCAAACAATGTCTTTCAGAAC -3'
N, delta3_dR1 : 5'-ACCAATACAATATCGAGGTCCCTCAC-3'
delta3_dR1 : 5'-CGAAATGTTGAGGAAATATCCCGGG-3' (Δ3 型遺伝子
検出用)
- ・ 滅菌蒸留水
- ・ TAE 緩衝液
- ・ アガロースゲル
- ・ DNA 染色試薬 (エチジウムブロマイド、Gel Red 等)
- ・ 実験器具類 (サーマルサイクラー、マイクロピペット、マイクロチップ等)

<手順>

- 1) 以下の組成になるように各試薬を解析本数分混合し、PCR チューブに分注する。

	1 本分	20 本分の場合
10x ExTaq buffer	2.0 μL	40 μL
滅菌蒸留水	12.2 μL	244 μL
dNTP (2.5 mM each)	1.6 μL	32 μL
プライマー		
N, delta3_dF1-2 (10 μM)	0.2 μL	4 μL
N, delta3_dR1 (10 μM)	0.8 μL	16 μL
delta3_dR1 (10 μM)	2.0 μL	40 μL
ExTaq	0.2 μL	4 μL
合計	19.0 μL	合計 380 μL を 20 本に分注

- 2) DNA 粗抽出により得られたトビイロウンカ DNA を 1.0 μL ずつ分注する。

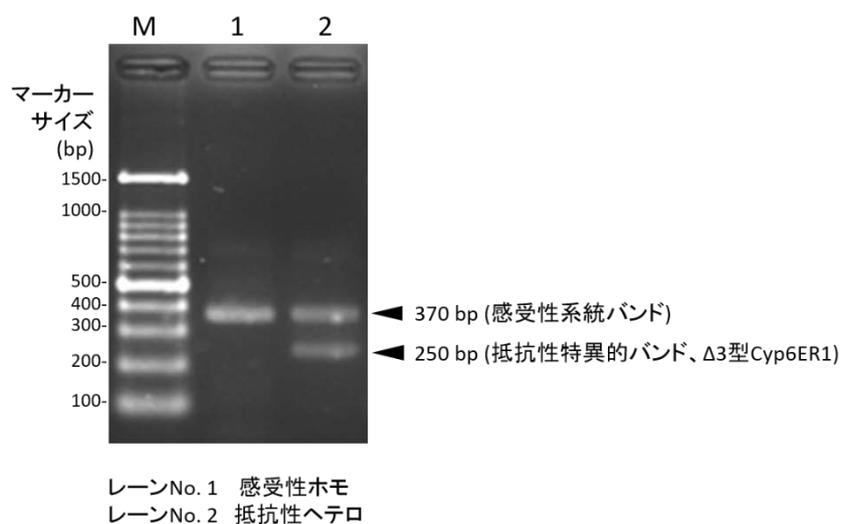
3) キャップを閉め、サーマルサイクラーにセットし、以下の温度・時間設定で PCR 反応を行う。

94°C	2分	} 33 サイクル
94°C	30秒	
68°C	1分	
68°C	3分	

III-2. 電気泳動・染色・撮影

- 1) 制限酵素反応液 8 μ L を 2.5%アガロースゲルで 20~30 分間 100V で電気泳動する。
- 2) エチジウムブロマイド (EtBr) あるいは Gel Red (Biotium/品番 41003) 等で染色する。
- 3) UV を照射し、バンドパターンを撮影する。

III-3. 結果



(執筆：秋月岳)

第5章 害虫薬剤抵抗性の生物検定法

薬剤の「効果」を確実に知るためには虫に薬剤処理を行い、処理濃度と死虫率の関係を調べる生物検定を行う。生物検定法では、数百頭の発育ステージを揃えた供試虫が必要になるため、採取した虫を飼育する必要がある。虫を飼育する技術は重要で、状態の悪い餌や飼育容器の結露などが結果に誤差を生じる原因になり、ひどい場合には結果を得られない事態も生じる。虫の採取・飼育から薬剤処理・生死判定・統計解析まで労力と時間を要するが、対象虫種（群）別に、簡易で正確な結果が得られる方法を記載する。

早急に「効き具合」を知る必要がある場合には、圃場での検定や採集した植物体、あるいはその一部に付いている虫に直接薬剤処理するなど臨機応変な対応を求められる場合も想定されるが、そのような場合にも生物検定法の基礎として参考にしていただきたい。

尚、ウンカ類については薬剤感受性検定マニュアルを既に公開している（九州沖縄農業研究センター, 2017）。

文献

九州沖縄農業研究センター (2017) イネウンカ類の薬剤感受性検定マニュアル.
http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/072957.html

5-1 コナガの薬剤抵抗性生物検定法

5-1-1 はじめに

コナガでは、基幹防除剤であるジアミド剤に対して抵抗性を発達させた個体群が出現して、防除が困難となりつつある。コナガのジアミド剤に対する抵抗性を早期に把握できる遺伝子診断法が開発され検定が容易になったが、当該個体群・地域で抵抗性レベルが高い場合は、代替薬剤の使用が必要になる。それら代替薬剤に対する抵抗性の検定は、依然として生物検定に頼らざるをえない。生物検定においては、方法により結果が異なることがあるため、統一された方法で検定を行う必要がある。本稿では、標準的な生物検定法について紹介する。

5-1-2 供試虫の入手と飼育

(1) 供試虫の入手方法

コナガ *Plutella xylostella* Linnaeus はアブラナ科圃場より採集する。成虫を採集すれば寄生蜂に寄生されている心配はないが、採集効率が低く採集後の移送や取り扱いにも注意が必要であることから、通常は幼虫、蛹を採集する。ただし、寄生されている場合が多いため、可能な限り多くの個体数を採集する。幼虫であれば3~4齢が扱い易いが、若齢の場合は寄生葉ごとサンプリングする

(1齢幼虫は潜葉している)。いずれの場合も次世代を得、齢期を揃えて検定に供するが、個体群の感受性レベルを適正に捉えるためにも、圃場内の複数個所から可能な限り多くを採集する。少数しか採集できなかった場合はF-2以降の世代を検定に供試することになるが、個体群としての感受性を必ずしも反映しない可能性があることを考慮しておく。

(2) 種の識別方法

幼虫で採集する際、アオムシ、ヨトウムシ類、ウワバ類と混発している場合が多いが、これらとは形態および刺激に対する反応の違いにより容易に区別できる。近縁にヒロバコナガ *Leuroperna sera* Meyrick があるが、薬剤で防除されている圃場での発生頻度は極めて低い。成虫の上翅の幅と斑紋が異なるので、雑草地や無農薬栽培圃等で採集した個体群では、念のため羽化時に確認しておく。「野菜害虫発生予察用フェロモントラップに混入する非標的チョウ目昆虫識別の手引」(農研機構, 2017) も適宜参照すると良い。

(3) 供試虫の累代飼育法

通常は根本（1991）に記載されているカイワレダイコンを用いた方法で累代飼育が可能である。しかし、野外採集の場合、個体群によってはカイワレダイコン実生が餌として適さず、累代飼育が難しいことがある。このような場合、パクチョイ葉を与えることで飼育・維持が良好となる事例がある。

5-1-3 幼虫に対する飼料（葉片）浸漬法

(1) 検定の準備

1) パクチョイ葉片の準備：温室内ポットや露地で5-6葉期以上にまで生育させたパクチョイ（品種：白茎優愛菜）から十分に展開した葉を切り取る。調査期間が長期になることがあるので、葉肉が厚く緑色の濃い日持ちする葉を選ぶ。直径7 cmの金型により葉をくり抜き、円形の葉片を試験に必要な枚数用意する。均一な大きさへの調整と浸漬処理作業が煩雑でないこと、食害程度を調査し易いことを充たしていれば、円形の葉片に固執する必要はない。また、作物種も他のアブラナ科で代用可能であるが、個体群によっては硬化したキャベツ葉での生存率が低い場合があり、ここではパクチョイを選択した。なお、足立（1997）の方法では5×5 cmのキャベツ葉片が採用されている。



図1 葉片をくり抜く

2) 薬液と検定容器の準備：薬剤は市販の製剤を用い、展着剤（マイリノー10000倍など）を加用した水道水を用いて所定濃度に段階希釈し、検定用薬液を調製する。併せて、葉片を浸漬するためのガラスビーカー（またはプラスチック製ディスポーサブルビーカー）を検定する薬剤ごとに準備しておく。検定容器はシャーレ（直径9 cm）を用いるが、葉片の乾燥を防ぐため水1 mlで湿らせた露紙（直径7 cm）を入れ、蓋をして試験区No.を記載しておく。

(2) 検定の手順

1) 浸漬処理：浸漬用の容器に薬液と葉片を投入して約 20 秒間浸漬処理する。処理中は容器を振って、葉片の両面に薬液が均一に付着させる。コントロール区の葉片は、展着剤を加用した水道水に同じ手法で浸漬する。処理後、容器から葉片をピンセットで取り出し、ペーパータオル（新聞紙等でも代用可）上に置いて風乾する。異なる薬剤を同時に検定する場合は、薬剤数分のピンセットを用意するか、1 薬剤の処理が終わるごとにピンセットを洗浄する。葉片の片面（上面）が乾いたら裏返して両面ともに風乾する。濡れた状態のまま試験に供試すると、供試虫の歩留まり低下（水滴での溺れ等）や、作物の劣化が早まる等の影響が出るので注意する。葉片が乾いたら湿らせた露紙を敷いたシャーレに 1 枚ずつ入れる。

2) 供試虫の接種と保管：検定には採集次世代の極力 3 令脱皮後 1 日以内の幼虫を供試する。飼育容器から幼虫をバット等に広げ、3 令脱皮後摂食の進んでいない幼虫を選び、面相筆を用いてシャーレ当たり 10 頭ずつ接種する。3 令後期の幼虫を供試するとベンゾイル尿素系 IGR 剤に対する感受性を正しく評価できない場合があるので注意する。接種を終えた容器はひとまとめにして、個体群名（採集地と採集日）が分かるように記載し、一定の温湿度・日長条件（25℃、60～70% RH、16L8D が望ましい）の恒温室または恒温器内に静置する。

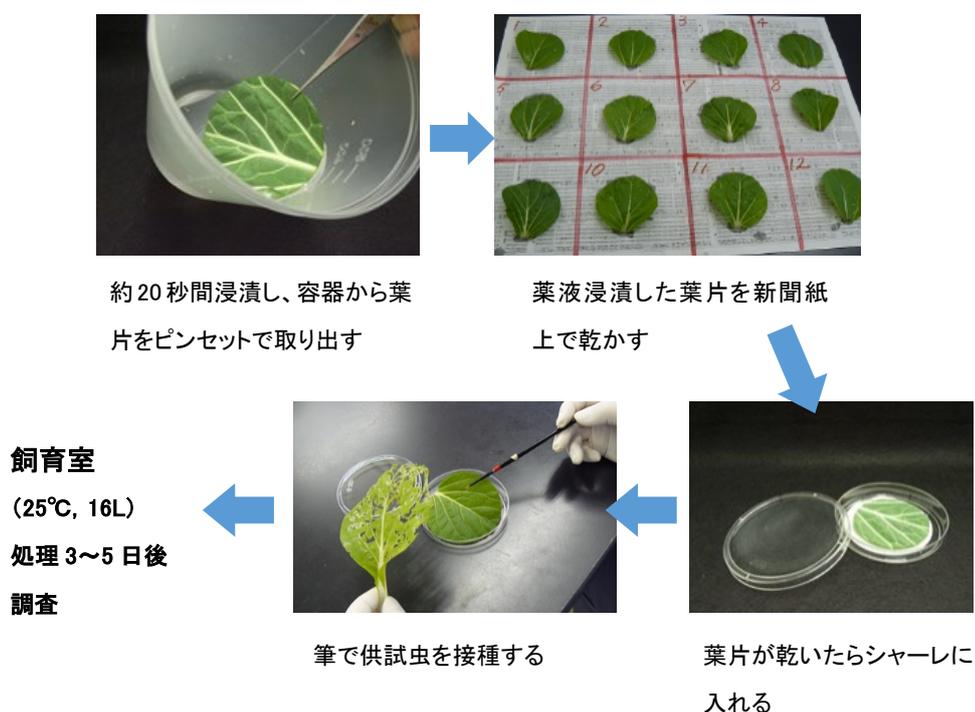


図 2 幼虫に対する葉片浸漬法

3) 調査と結果の解析：処理 3～5 日後に生存虫、異常虫、死亡虫を計数し、コントロール区の死亡率から Abbott (1925) の補正式を用いて各区の補正死亡率を算出し、各薬剤の殺虫活性を数値化する（薬剤の作用特性に応じて、予め観察期間や異常虫の判定基準を設定しておく）。供試虫が十分に確保できた場合には、各薬剤について殺虫活性が認められなくなる低濃度まで供試濃度を増やし、Bliss (1935) のプロビット法により半数致死濃度 (LC₅₀ 値) を算出する。虫数調査に併せ、食害程度を食害面積率のグレード評価（例えば、- : 0%, ± : 1-5%, + : 6-10%, ++ : 11-25%, +++ : 26-50%, ++++ : 51-75%, +++++ : 75-100% の 7 段階）で調査しておく。薬剤の作用性によっては死亡率と食害抑制効果が相関しない場合があるため、接触毒の強い薬剤や忌避剤等の場合は死亡率のみを注視せず食害程度も十分考慮の上考察する。

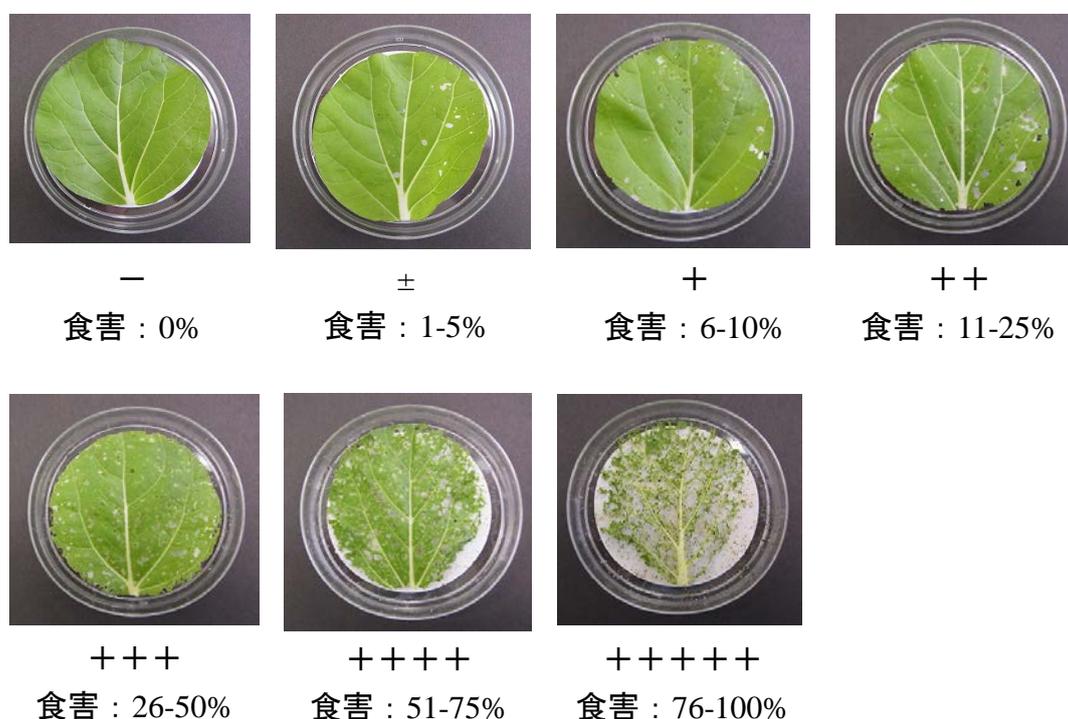


図 3 食害程度を食害面積率のグレード評価

生存虫、異常虫、死亡虫の数および食害程度を調査する

(3) 検定手法の特徴と問題点

本検定法の特徴として簡便性が挙げられる。特別な器具・機器を必要とせず、作物さえ準備しておけば、短期間で対象個体群の薬剤感受性を把握することができる。一方で、葉片への有効成分の付着量や供試虫の摂食・接触による取り込み量は一定に制御できないため、別途実施された試験結果との絶対的な比較には注意が必要となる。この点、局所施用法は供試虫の体重当たりの処理薬量が定量的であるため、異なる試験機関、異なる年次で実施された検定結果を直接比較することが可能である。ただし、マイクロアプリーターを用いた処理が必要となり、防除現場に速やかにフィードバックするには技術的な習熟が必要となる。また、溶媒を用いた経皮的な活性のみを評価するため、実製剤での防除効果を必ずしも反映しない場合がある。特に、近年開発された殺虫剤は経皮よりも経口活性の強いものが多く、このような剤の実圃場での防除効果を予測することを目的とする場合には、実製剤を用いて経口活性も評価できる葉片浸漬法が適していると考えられる。標準的な感受性系統を併行して検定に供試することを習慣づけておくと、別途実施された検定結果との差についても考察が可能になる。

5-1-4 結果の解析

コントロール区の死亡率に基づき Abbott (1925) の補正式を用いて各処理区の補正死亡率を算出し、各薬剤の殺虫活性を数値化する。供試虫が十分に確保できた場合には、供試濃度を増やし、Bliss (1935) のプロビット法により半数致死濃度 (LC50 値) を算出する。求めた値から抵抗性比を算出し、定点での感受性の季節的・年次的変動等の解析に用いる。また、感受性系統との正逆交雑や戻し交雑試験にも本検定法を活用すれば、抵抗性の遺伝様式を解析することが可能となる。

(執筆：藤岡伸祐)

文献

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18(2) :265-267.
- 足立年一. 1997. 植物貿易基礎講座 農業害虫および天敵昆虫等の薬剤感受性検定マニュアル(13) 野菜・花き害虫：コナガ. 植物防疫 51(9): 440-444.
- Bliss, C. I. (1935) The calculation of the dosage–mortality curve. *Ann. Appl. Biol.* 22(1): 134-167.
- 根本久 (1991) 昆虫の飼育法 (湯嶋健ら編) 日本植物防疫協会、東京、pp.113-115.

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構（2017）野菜害虫発生予察
用フェロモントラップに混入する非標的チョウ目昆虫識別の手引.

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/078755.html

5-2 チャノコカクモンハマキの薬剤抵抗性生物検定法

5-2-1 はじめに

チャの重要害虫であるチャノコカクモンハマキの殺虫剤感受性は、府県により異なっているだけでなく、同一県内でも地域ごとに異なることが明らかになっている（内山, 2017）。本種の効率的な防除には、地域ごとに異なる殺虫剤感受性を把握して有効な殺虫剤を選抜する必要がある。ここでは、チャノコカクモンハマキの殺虫剤感受性を把握するための生物検定、すなわち殺虫剤感受性検定に必要な種々の方法について解説する。

5-2-2 供試虫の入手と飼育

(1) 供試虫の採集

供試虫は殺虫剤感受性を把握したいチャ園とその周辺ほ場から採集する。本種個体群の効率的な採集に適する時期は成虫発生期である。この時期に、チャ株を棒などで軽く叩いて成虫を追い出した後、捕虫網や 50 ml チューブなどを用いてアイスクリームカップなどの容器に雌成虫を捕獲する（図 1、図 2）。当該地域の個体群としての遺伝的多様性を保持するためには雌成虫を 20 頭以上捕獲して採卵することが望ましいが、20 頭未満の捕獲数でも累代飼育により個体数を増殖させることにより殺虫剤感受性検定は可能である。



図 1 成虫の追い出し



図 2 成虫の捕獲

成虫発生時期に供試虫を採集できない場合には、幼虫または蛹を捕獲しても良い。ただし、幼虫には寄生蜂などの天敵類が寄生していることがあるため、成虫での採集に比べて効率性は劣ることが多い。幼虫または蛹の発生時期には、食害された巻葉を採集し、巻葉内に生息する幼虫または蛹を 100 頭以上捕

獲する。天敵類による幼虫の死亡を考慮して 100 頭以上を確保しておくことが望ましい。また、幼虫または蛹で採集する場合には、圃場内で場所の偏りのないように満遍なく採集する。なお、本種の卵塊はチャの葉裏に産みつけられることから非常に見つけにくく、圃場での採集は困難である。

(2) 供試虫の累代飼育法

雌成虫 (P) から採卵後、野口 (1991) の方法に従って累代飼育する。この方法では、人工飼料の調整法が詳しく述べられているが、日本農産工業株式会社製の市販品 (シルクメイト 2S やインセクタ LFS など) でも代用できる。また、飼育容器あたりの接種卵塊数は 3~4 となっているが、検定当代の卵塊を接種する場合は、容器あたり 20 程度の卵塊を投入しても差し支えない。

殺虫剤感受性検定には、累代飼育を経て増殖させた後代 (F_2 または F_3) の幼虫を供試すると良い。ただし、数世代累代飼育を行うと薬剤感受性が回復する事例も確認されていることから、検定に必要な供試虫数が得られ次第、速やかに検定を実施する。なお、検定に必要な供試虫数が少ない場合には、 F_1 の幼虫でも検定は可能である。

5-2-3 種の識別方法

我が国におけるチャのハマキガ類としては、チャノコカクモンハマキとチャハマキの 2 種が重要種として挙げられる。地域により優占種は異なるものの、近年では全国の茶産地においてチャノコカクモンハマキが優占する傾向にある。また、京都府などのようにチャハマキの発生がほとんど見られない地域もある。

両種の成虫は、形態が大きく異なるため容易に識別が可能である（図3）。幼虫は、チャノコカクモンハマキの頭が黄褐色で体色はやや緑がかっていることが多いのに対して、チャハマキの頭は黒褐色で体色は白っぽいことが多い（図3）。ただし、体色については食性により個体差があるため頭色での識別が確実である。



図3 チャノコカクモンハマキおよびチャハマキ

両種の寄生部位もやや異なっており、チャノコカクモンハマキが比較的柔らかい新葉を好むのに対して、チャハマキは主に成熟した成葉や古葉を好んで寄生する。卵塊の産卵部位も異なり、チャノコカクモンハマキが葉裏に産卵するのに対して、チャハマキは葉表に産卵する。

5-2-4 検定法

殺虫剤感受性検定は、小杉（1998）の方法に準じて実施する。ただし、幼虫の生死の判定時期については、小杉（1998）の方法を改変することが望ましい（内山・小澤, 2017）。ここでは、チャ葉浸漬法（小杉, 1998）を一部改変した検定法（内山・小澤, 2017）について詳細に解説する。なお、チャ葉が入手困難な場合は人工飼料（インセクタ LFS、日本農産工業）を用いた浸漬法により検定可能だが、本種の殺虫剤感受性検定は一般的にチャ葉浸漬法により行われていることから、こうした過去の検定データと比較する場合にはチャ葉浸漬法が適している。

(1) チャ葉の準備

薬剤無散布チャ園から採集した新鮮なチャの成葉を用いる。殺虫剤感受性検定には大量のチャ葉を必要とすることから、農薬無散布チャ園などを確保しておく都合が良い。検定に用いるチャ葉は、チャノコカクモンハマキの餌となることから、食害に耐えうる大きめの葉が適している。こうした葉を確保するためには、一番茶芽を伸ばしたまま翌春まで摘採や整せん枝を実施せずに放任しておくが良い。

(2) 薬液の調整

市販の薬剤を水道水により所定濃度に希釈して、展着剤を加用（0.01%程度の Tween 20）した薬液を調整する。試験濃度は常用濃度とし、必要に応じて水道水を用いて薬液を段階希釈して所定濃度の薬液を作成する。対照としては、水道水に展着剤を加用したものを用いる。半数致死濃度 LC_{50} 値を算出する場合には、常用濃度を含めた 5～6 段階の濃度を設定する。なお、この濃度設定に際しては、予備試験を実施しておく失敗が少ない。

(3) 薬液処理チャ葉の準備

チャ成葉を所定の薬液に 10 秒間以上浸漬した後、ピンセットや割り箸を用いて処理葉を取り出す。カゴ内に敷いたペーパータオル上に処理葉を重ねないように広げて風乾する（図 4）。殺虫剤感受性検定は各処理 3 反復とし、各処理 18 枚の処理葉（6 枚×3 反復）を準備する。



図 4 薬液処理葉の風乾

(4) 検定容器の準備

検定容器には、フタで密閉できる丸型スチロール製容器（内径 78 mm、深さ 44 mm）などを用いる（図 5）。フタで密閉できる容器であれば代用可能だが、上述の検定容器より大きいと多量の検定を行う際に保管スペース等の問題が生じやすい。検定容器にろ紙を敷き、1つの容器ごとに風乾させた処理葉 6 枚を揃えて投入する（図 5）。検定容器は各処理 3 反復のため 3 つ用意し、シールなどでラベリングしておく（図 5）。なお、フタで密閉しない場合（ゴース張りで通気性のある容器など）、チャ葉が乾燥して検定が困難となるため注意する。



図 5 検定容器の準備

(5) 供試虫の投入

上述の手順で準備した検定容器に、1 カップあたり 10 頭の 2~3 齢幼虫を面相筆により静かに投入する。これを各処理 3 反復（合計 30 頭）実施する。なお、幼虫の頭部を面相筆で軽く刺激し、糸を吐いたところを筆でつり上げると、幼虫を傷つけずにカップ内に投入できる。幼虫の投入後は検定容器にフタをし、25°C、16L : 8D の恒温室内で静置する。

(6) 幼虫の生死判定

幼虫の生死の判定時期については、小杉（1998）の方法を改変することが望ましい（内山・小澤, 2017）。すなわち、殺虫効果が遅効的な IGR 系殺虫剤およびジアミド系殺虫剤については処理 10 日後に、その他の殺虫剤については処理 7 日後に最終的な生死を判定する。IGR 系殺虫剤およびジアミド系殺虫剤については処理 3~6 日後のいずれか 1 日と 10 日後の計 2 回、その他の殺虫剤については処理 2 日後および 7 日後に生死を調査する。なお、苦悶虫（幼虫を裏返した際に自力で元に戻れない）は死虫として扱う。

5-2-5 結果の解析

(1) 補正死虫率の算出

上述の最終調査日の生死をもとに死虫率を算出し、Abbott (1925) の次式により補正する。

$$\text{補正死虫率}\% = [(\text{対照区の生存率} - \text{処理区の生存率}) / \text{対照区の生存率}] \times 100$$

(2) 半数致死濃度 LC₅₀ 値の算出

LC₅₀ 値は Bliss (1935) のプロビット法により算出する。殺虫剤感受性系統の LC₅₀ 値が既にわかっている場合には、抵抗性比 (R/S 比 = 各 LC₅₀ 値/感受性系統の LC₅₀ 値) を算出して、抵抗性の発達程度を判断する。

(執筆：内山徹)

文献

Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J.*

Econ. Entomol. 18: 265-267.

Bliss, C. I. (1935) The calculation of the dosage-mortality curve. *Ann. Appl. Biol.*

22 : 134-167.

小杉由紀夫 (1998) 農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル(17) 茶害虫：チャノコカクモンハマキ，チャハマキ. 植物防疫 52: 48-50.

野口 浩 (1991) 鱗翅目 26 チャノコカクモンハマキ，リンゴコカクモンハマキ，チャハマキ. 昆虫の飼育法 (湯嶋 健ら 編). 日本植物防疫協会，東京. pp. 91-96.

内山 徹 (2017) チャノコカクモンハマキの殺虫剤抵抗性に関する研究. 静岡農林技研特別報告 7 : 3-15.

内山 徹・小澤朗人 (2017) チャノコカクモンハマキの殺虫剤感受性比較による移動分散の検討. 関西病虫研報 59 : 97-99.

5-3 ワタアブラムシおよびモモアカアブラムシの薬剤抵抗性生物

検定法

5-3-1 はじめに

果樹、野菜および花き等の重要害虫であるワタアブラムシ *Aphis gossypii* Glover およびモモアカアブラムシ *Myzus persicae* (Sulzer)の薬剤抵抗性の実態は、これまで各種生物検定によって明らかにされてきた。1980～1990年代後半までは、局所施用法（西東ら, 1995; 西東, 2013）や虫体浸漬法（浜, 1987）が多く用いられてきたが、ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシの発生以降は、簡易な植物体浸漬法による Mungler cell 法（岡崎, 2013）や幼苗処理法（熊本県, 2000 ; Matsuura and Nakamura, 2014 ; 岡本ら, 2014）および簡易検定法（松浦・日高, 2016）が用いられている。

簡易検定法は市販の器材を利用し、かつ手順が簡便に実施できることから、アブラムシ類の薬剤抵抗性モニタリングに向いている。

本稿ではワタアブラムシとモモアカアブラムシに対する簡易検定法の手法について紹介する。



図1 ワタアブラムシ
(成虫と幼虫)



図2 モモアカアブラムシ
(成虫と幼虫)

5-3-2 供試虫の入手と飼育

(1) 供試虫の入手

アブラムシは寄主植物とともに採集し、過湿防止のため、ティッシュなどに包みビニル袋に入れて持ち帰る。ほ場内の数カ所から数十頭ずつ採集し、まとめて検定に供試する。野外で採集した個体群は、農薬の暴露による影響や寄生蜂および寄生菌に侵されている場合があるので、可能な限り直接検定に用いず、数世代を飼育後に供試する。

(2) 種の識別方法

有翅虫による識別は困難であるため、寄主植物、無翅雌成虫の体色および形状で識別する。

1) ワタアブラムシ

体色は濃緑色で、更に濃色の個体は黒色に見える。黄色や茶色の個体も混在する可能性がある。体長は約 1.1~1.7 mm。額瘤は発達しない。角状管は黒色であるが、尾片は体色と同じ。

農作物ではウリ科（キュウリ、メロン、スイカなど）、ナス科（ナス、ピーマン、ジャガイモなど）、オクラ、サトイモ、カンキツ、ナシ、イチゴなどに寄生する。



図3 ワタアブラムシ



図4 モモアカアブラムシ

2) モモアカアブラムシ

体色は黄緑色や淡黄色変化が多く、光沢がある。無翅胎生雌虫は体長約 1.8~2 mm。額瘤は発達し、内側に突出する。角状管は体と同色であるが、中央部から先端にかけてわずかに膨らみ、先端部は暗色。

農作物ではナス科（ナス、ピーマン、ジャガイモなど）、アブラナ科（ダイコン、ハクサイなど）、ゴマ、モモ、ナシ、ウメなどに寄生する。

※形態情報は、「アブラムシ類の見分け方, 2008」より引用

(3) 供試虫の累代飼育法

ワタアブラムシには同一種でも寄主植物が異なるバイオタイプが存在するため、採集作物と同じもしくは近縁の植物で飼育するのが望ましい^(注1)。ソラマメの芽だし（村井, 1991）を用いれば、ほとんどのバイオタイプを飼育維持可能である。ただし、ソラマメで飼育した個体は小型化するので、発育良好な寄主植物に移し、数世代増殖した後に検定を行う。

モモアカアブラムシは概ねアブラナ科やトマトを除くナス科植物で飼育が可能であるが、ダイコンの葉であれば、どのバイオタイプでも飼育が可能である（高田，1991）。

注1) ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシは感受性個体群に比べ、増殖率が低いため（松浦ら，2016）、混在した場合は感受性個体群が優占する恐れがある。また、その他の薬剤抵抗性個体も感受性個体に比べ、増殖率が低い可能性があるため、採集1ヶ月後位までに検定を実施することが望ましい。

すぐに検定が困難な場合は、15～20℃の低温条件下での飼育やクローンによる個体維持を行う。なお20℃以下で飼育する場合は、長日条件で飼育すること。低温短日条件では有性世代が出現し、感受性が変化する恐れがある。

5-3-3 簡易検定法による検定手順

(1) 検定の事前準備

1) 検定用アブラムシの準備

ワタアブラムシは数世代高密度の状態では飼育すると、体サイズが小型化し、扱いにくいので、検定日の2週間位前から新しい植物を用い増殖する。

きゅうりやピーマンに寄生するワタアブラムシは、きゅうり（本葉6～8枚）やピーマン（本葉12枚）の各4～6株に対して、成幼虫を株当たり200～400頭程度接種する。接種後は20～25℃前後の室温で管理する。ただし一部抵抗性個体群やバイオタイプによる寄主植物の不適合の場合は、増殖率が低い場合があるので、飼育中の増殖状況を観察し、適宜、接種量や飼育期間を調整する。

モモアカアブラムシはワタアブラムシに比べ、高密度による小型化は顕著ではない。抵抗性の有無により増殖率が異なるかどうかは不明であるが、寄主植物であっても、生育初期のトマトやハウレンソウでは、飼育が困難な事例が見られる。

2) 検定植物および検定葉片

- ・ 検定植物には、採集または飼育植物と同じ植物を供試する。
- ・ 本稿ではキュウリおよびピーマンを用いた手順を記載する。
- ・ 供試葉は健全な厚めのものを用いる。目安としてキュウリは播種20日後、

ピーマンは播種 30 日後以降の株を供試する^(注2)。

- ・ 検定葉片は葉片浸漬の 2 時間位前までに直径約 5 cm の円形に打ち抜き、十分に湿らせたペーパータオル上に葉裏を上にして置く^(注3)。
- ・ 打ち抜きには市販の打ち抜き用のベルトポンチ（販売：トラスコ中山株式会社）やお菓子作り用の円形の型（100 円ショップ等で販売）などを利用する。
- ・ 葉片の鮮度維持のため、葉片の直径は 4 cm 以上を確保する。

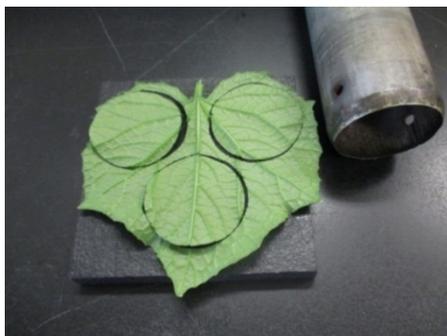


図 5 供試葉片の打ち抜き

注 2) キュウリは成長点を除去すると残りの葉が大きくなり、多数の葉片を確保しやすくなるので、本葉 5 ないし 6 葉目を除去後、しばらく栽培すると良い。また肥料は多めに施用する。

注 3) 打ち抜いた葉は浸漬まで乾燥しないように、湿らせたペーパータオル上に置き、ハンドスプレーで水道水を噴霧後、ラップをかけておく。

(2) 検定容器

1) 検定容器および検定器材

- ・ プラスチックシャーレ（直径 6.0×深さ 1.5 cm、西部株式会社製、未滅菌）
- ・ ペーパータオル（商品名リードクッキングペーパー、約 8×5 cm にカットし、2 枚重ねで使用する）
- ・ ガラス製もしくは耐薬品性プラスチックビーカー（500 ml）
- ・ 葉さじ
- ・ 浸漬用ピンセット

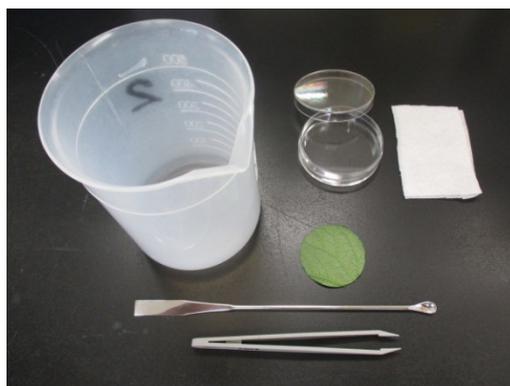


図 6 検定に使用する器材

2) 検定容器の作成

2枚のペーパータオル（約8×5 cm）を半分に折り、シャーレ内に敷いた後、水道水を1.0～1.5 ml 滴下する（入れすぎに注意すること）。

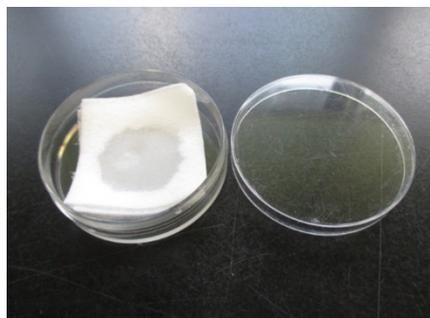


図7 シャーレ内にペーパータオルを敷き、水を滴下する。

3) 薬液の準備と浸漬

- ・各供試薬剤は展着剤トリトン X-100（2,000倍0.05%）を添加した水道水で希釈する（注4）。
- ・供試薬液は1薬剤につき最低200～300 ml以上作成する。各葉片を薬液に10秒間浸漬後、軽く湿らせたスポンジまたはペーパータオル上に葉裏を上向きに置き、風乾後シャーレ内に移動する（注5）。

注4) トリトン X-100 添加水道水は、20倍の高濃度液（要冷蔵）を作成しておき、検定前に100倍希釈で使用する。希釈は水道水を9割以上入れた後、20倍液を所定量添加する（泡立ち防止のため）。

- ・冷蔵中の20倍液にかびが発生した場合は作り直す。

注5) 浸漬後の葉片は、葉片上の水分の9割以上が乾けば、シャーレに移動してよい。1時間程度で残った水分は検定容器内で蒸発する。

- ・また葉片はペーパータオルに押しつけず、軽く置くだけにする。



図8 薬液浸漬後の葉片

各薬液の混同防止に、各検定容器を同じ並びに置き、目印とする。

(4) 供試虫の接種

成虫の移動は、実体顕微鏡下で無翅雌成虫（尾片の形状により判断する（田中，1977）^{注6)}。幼虫は丸みを帯び、突起状ではない。）であることを確認しながら、面相筆を用い10頭／シャーレを接種する^{注7)}。

注6) 成虫より大きい4齢幼虫が存在するため、大きさだけでは成虫を識別できない。

注7) アブラムシは小筆の先をあごの下付近に差し込むような感じですくい取ると効率よく接種できる。この採取法で死亡率が上昇することはないため、アブラムシが口針を抜くまで待つ必要は無い。

ワタアブラムシは、同一植物体でも、寄生部位によって体サイズにバラツキが認められることから、供試薬剤ごとの虫体サイズが平均的になるように配慮しながら接種する。また元気な個体を選んで移動させる。



図9 ワタアブラムシ無翅成虫
モモアカアブラムシ成虫の区別も同じく尾片で行う。



図10 接種後の様子

(5) 検定容器の保管と死亡虫調査

23～25℃の16L8Dの定温器内に重ねずに静置する。

72時間後に実体顕微鏡下で生死を判定し、Abbot (1925) の補正式によって各補正死虫率を算出する。なお、葉片以外の場所で生存している個体も生存虫として計数する^{注8)}。

注8) 試験の目的にもよるが、無処理の死亡率が30%以上の場合は再度検定を行う。浜 (2013) は20%以上で再検定を推奨している。

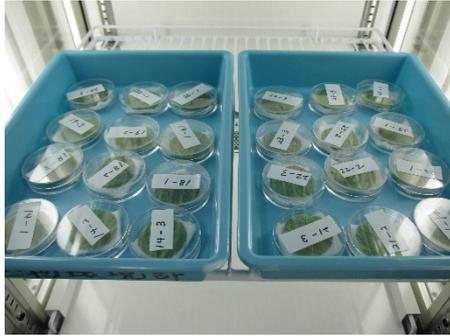


図 11 定温器内に平積みで置く。

(6) 簡易検定法の問題点

シャーレ内に結露が生じると、死虫率が上がる場合がある。対策として、①シャーレ内の水道水の滴下量を 1.5～2.0 ml とする、②シャーレ上に新聞紙やティッシュなどを被せて遮光をしない、③フタの内側に付着した結露が多い時は、検定 2 日目頃に拭き取る。などが有効である。

(7) 遅効性薬剤の評価

遅効性薬剤であるピメトロジン、ピリフルキナゾン、フロニカミドの簡易検定法による無翅雌成虫を用いた評価は、同一個体群でも検定日ごとに結果のバラツキが大きい事例が認められ、困難である（松浦・日高, 2016）。

そのため、産子幼虫数を含めた密度指数を用いて評価する。基本的な手順はこれまでと同様であるが、処理 96 時間後に全生存成幼虫数を調査し、無処理の生存幼虫数と比した密度指数*を算出することにより評価する。

*密度指数＝処理区の生存成幼虫数／無処理区の生存成幼虫数×100

（執筆：松浦明）

文献

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.* 18: 265–267.
- 浜 弘司 (2013) 農業害虫：薬剤感受性検定法の基礎（農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル編集委員会編）. 日本植物防疫協会, 東京. pp. 4–6.
- 熊本県農業研究センター (2000) 九州農業研究成果情報 15: 455–456.
- 松浦 明・日高春美・土田聡 (2016) ネオニコチノイド剤抵抗性ワタアブラムシのきゅうりにおける増殖率. 第 60 回応動昆大会講演要旨集 19.
- 松浦 明・日高春美 (2016) アブラムシ類の殺虫剤感受性検定のための簡易

- 検定法. 九病虫研究会報 62: 82-88
- Matsuura A. and M. Nakamura (2014) Development of neonicotinoid resistance in the cotton aphid *Aphis gossypii* (Hemiptera: Aphididae) in Japan. *Appl. Entomol. Zool.* 49: 535-540.
- 村井 保 (1991) 昆虫の飼育法 (湯嶋 健ら編)、日本植物防疫協会, 東京. pp. 75-77.
- 岡本 崇・岩橋良典・森下正彦 (2014) 和歌山県におけるネオニコチノイド系薬剤の殺虫効果が低いワタアブラムシの発生. 関西病虫研報 56: 135-137.
- 岡崎真一郎 (2013) 近年大分県の夏秋ピーマンで多発生するワタアブラムシに対する各種薬剤の殺虫効果. 九病虫研究会報 59: 108 (講要)
- 西東 力 (2013) 野菜・花き害虫: アブラムシ類. 農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル (農業害虫の薬剤感受性検定マニュアル編集委員会編). 日本植物防疫協会, 東京. pp.79-82.
- 西東 力・浜 弘司・鈴木 健 (1995) ワタアブラムシ *Aphis gossypii* (GLOVER)の薬剤抵抗性クローンの各種薬剤に対する感受性と協力剤の影響. 応動昆 39: 151-158.
- 高田 肇 (1991) 昆虫の飼育法 (湯嶋 健ら編). 日本植物防疫協会, 東京. pp. 71-74.
- 田中 正 (1977) 野菜のアブラムシ. 日本植物防疫協会, 東京. pp. 25-26.

5-4 ネギアザミウマの薬剤抵抗性生物検定法

5-4-1 はじめに

日本において農作物を加害するアザミウマは3科44種が知られている（日本応用動物昆虫学会, 2006）。アザミウマ類を効果的に防除するためには、殺虫剤抵抗性の現状を把握し、有効な殺虫剤を選択する必要がある。これまでもアザミウマ類の殺虫剤感受性検定については、雑誌「植物防疫」においてミナミキイロアザミウマ *Thrips palmi* Karny（森下, 1997）（図1）、ミカンキイロアザミウマ *Frankliniella occidentalis*（Pergande）（片山, 1997）（図2）、チャノキイロアザミウマ *Scirtothrips dorsalis* Hood（河合, 1997）（図3）の検定法が詳しく紹介されている。森下（1997）が紹介しているミナミキイロアザミウマに対する葉片・虫体散布法では、薬液の散布に回転式薬剤散布塔を使用するが、現在、この製品は製造中止となっていることに加え、農業現場ではネギアザミウマ *Thrips tabaci* Lindeman（図4）やヒラズハナアザミウマ *Frankliniella intonsa*（Trybom）（図5）なども発生して被害を及ぼすようになってきている。



図1 ミナミキイロアザミウマ雌成虫



図2 ミカンキイロアザミウマ雌成虫



図3 チャノキイロアザミウマ雌成虫



図4 ネギアザミウマ雌成虫



図5 ヒラズハナアザミウマ雌成虫

アザミウマ類の防除に使用される主な殺虫剤には、カーバメート系（1A：IRACによる殺虫剤の作用機構分類、以下同様）、有機リン系（1B）、ピレスロイド系（3A）、ネオニコチノイド系（4A）、スピノシン系（5）、アベルメクチン系（6）、ネライストキシシン系（14）、ベンゾイル尿素系（15）など多くの系統がある。ほとんどは、成虫および幼虫の両ステージに対して殺虫効果をもつが、なかにはベンゾイル尿素系のクロルフルアズロン乳剤（15）、フルフェノクスロン乳剤（15）、ルフエヌロン乳剤（15）、テトロン酸およびテトラミン酸誘導体のスピロテトラマト水和剤（23）など幼虫にのみ殺虫効果を発揮し、効果の発現が遅効的な薬剤もある。

本稿ではソラマメで飼育できないチャノキイロアザミウマを除く上記アザミウマ類 4 種の成虫と幼虫に対する簡易な生物検定法について記載する（柴尾, 2013 ; 浜崎ら, 2015)。なお、前述のように、成虫および幼虫の両ステージに対して殺虫効果があり、速効的に効果を発現する薬剤は成虫に対する葉片浸漬法、ベンゾイル尿素系 (15) やスピロテトラマト水和剤 (23) など幼虫のみに殺虫効果を示し、効果の発現が遅効的な薬剤は幼虫に対する葉片浸漬法または虫体・葉片散布法を基本的に用いる。

5-4-2 供試虫の入手と飼育

(1) 供試虫の入手方法

ネギアザミウマの成虫は主に作物の葉に生息することから、圃場内の 10 か所程度から成虫を葉ごと採集し、チャック付ポリ袋に入れて持ち帰る。その際、袋内が過湿にならないようにペーパータオルなどを入れておく。

(2) 種の識別方法

アザミウマ類成虫を採集した場合、まずは 20 倍程度のルーペか拡大鏡で確認する。成虫の性を区別するため、腹部の先の部分を観察する。雌には産卵管があり、腹部全体が太く、腹部末端が尖っているのに対し、雄には産卵管がなく、腹部全体が細長い。雌成虫ではルーペを観察により種をある程度見分けることができる。①体長を比較する。ミカンキイロアザミウマやヒラズハナアザミウマは 1.3~1.7 mm で大きく、チャノキイロアザミウマは 0.7~1.0 mm で小さい。②体色を比較する。ミナミキイロアザミウマやチャノキイロアザミウマは強い黄色であるが、ヒラズハナアザミウマは褐色~黒褐色である。③翅の色を比較する。チャノキイロアザミウマは翅全体、ミナミキイロアザミウマは翅の毛が黒いため、翅をたたんだ時に合わせ目が背中の黒筋として見える。

ルーペや拡大鏡による観察では種をある程度見分けることができるが、正確な診断は難しい。そこで、実体顕微鏡 (60~120 倍程度) を用いた簡易同定診断法により種を診断する (千脇ら, 1994)。主要 5 種の雌成虫の形態に基づく同定診断フローチャートは図 6 のとおりである。ただし、主要 5 種以外にダイズウスイロアザミウマ、ハナアザミウマ、ダイズアザミウマ、ビワハナアザミウマ、クロゲハナアザミウマ、キイロハナアザミウマ、クサキイロアザミウマ、マメハナアザミウマ、イネアザミウマ、コスモスアザミウマなどが発生している場合には種の診断ができない。この場合は必要に応じてプレパラート標本作製して前述の簡易同定法により診断し、触角の配色なども確認する。なお、幼虫は実体顕微鏡でも種の診断が困難である。

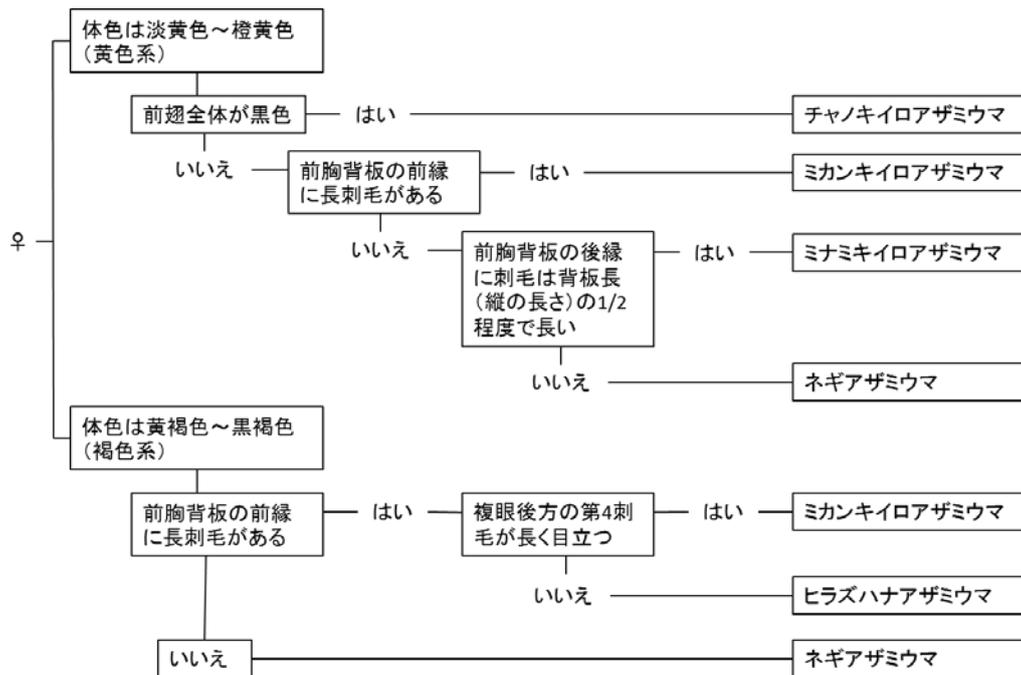


図6 アザミウマ類雌成虫の同定診断フローチャート (千脇ら、1994 を改変)

(3) 供試虫の累代飼育法

生物検定には、1 薬剤について 30～50 個体が必要となる。感受性検定を効率的に実施するためにはアザミウマ類を飼育して増殖させる。アザミウマ類の飼育は村井 (2002) の方法で行う。餌はレース鳩用のソラマメを用いる (図7、コクサイペットフード (株))。ソラマメは流水中で発芽・発根させて皮を剥き、芽と根を除去したものを使用する。



図7 アザミウマ類飼育用のソラマメ催芽種子の準備

飼育容器（タイトタッパー（12×8.5×4.5 cm）、ふた中央部に直径約 5 mm の穴を開けてナイロンメッシュシート N-305（目合 48 μm、（株）サン普拉テック）を貼付けたもの）に剥皮したソラマメ種子をキムワイプ等で包んで入れる（図 8）。この飼育容器にアザミウマ類の成虫を 100 個体ほど入れ、25°C の恒温室内に入れる。成虫はソラマメ催芽種子に産卵し、孵化幼虫はソラマメ催芽種子を餌として発育する。幼虫はキムワイプ等の隙間などで蛹化し、3 週間後には次世代成虫が得られる。なお、飼育容器は蛍光灯の光が直接当たらないようにしないとソラマメの水分が蒸発して容器内面に水滴が付着し、アザミウマ類幼虫が溺死することがある。なお、この方法でほとんどのアザミウマ類は飼育できるが、チャノキイロアザミウマは飼育できない。また、累代飼育を長期間行くとその間に薬剤感受性が変動する可能性があり、採集 2 世代後くらいまでに実施する。

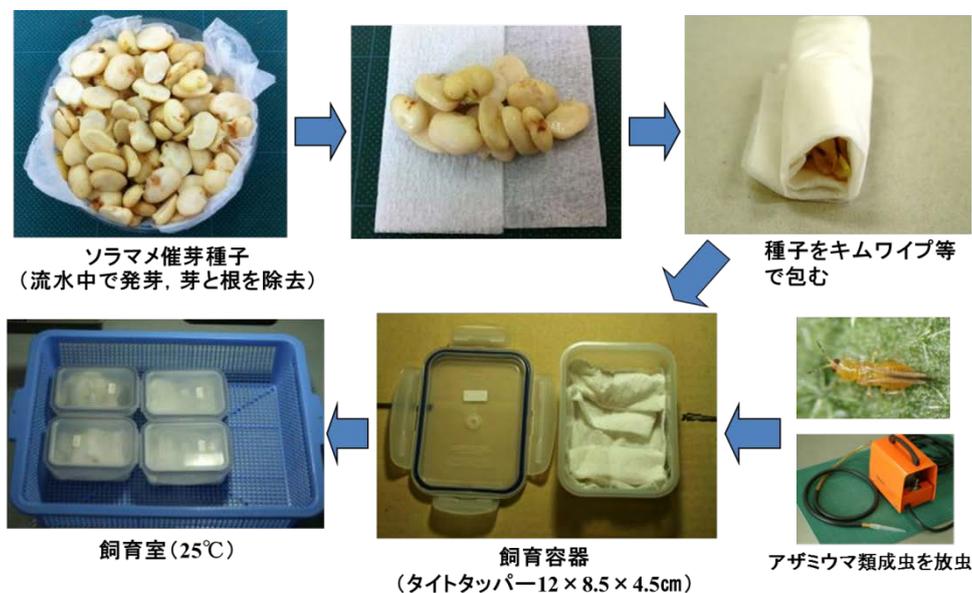


図 8 アザミウマ類の累代飼育法

5-4-3 成虫に対する葉片浸漬法

(1) 検定の準備

1) インゲンマメ葉片の準備：9 cm ポットにインゲンマメ種子（品種：ナガウズラマメ）を 1～2 粒播種し、25°C、16L8D 条件の人工気象器内で 2～3 週間栽培する（図 9 左）。芽が成長してくるので、初生葉を残し摘み取る。検定直前に苗から初生葉を切り取り、葉片（1.2 cm 四方）を作成しておく。インゲンマメがない場合は、アザミウマ類の累代飼育に用いるソラマメを用いてもよい。プランターに育苗用培土を入れ、前述のソラマメ種子を播種する。これを人工気象器内に置き、適宜灌水して 2～3 週間で草丈 20 cm 程度にする

(図9右)。検定直前に苗から葉を切り取り、葉片(1.2 cm 四方)を作成する。



図9 インゲンマメ苗(左)とソラマメ苗(右)

2) 薬液と検定容器の準備：薬剤は市販の製剤を用い、水道水を用いて所定の濃度に希釈し、薬液を調製する。水和剤、フロアブル剤、水溶剤などには展着剤(5,000倍)を加用する。検定容器として内径2.5 cm、高さ5.0 cmの透明の円筒型スチロール棒瓶(アズワン(株)、容量15 ml、蓋は使用しない)を用いる。検定容器の開口部を密封するための薄膜フィルム(ラボピタ(ニプロ(株))やパラフィルム(Bemis company)など)と検定容器内の湿度を調節するためのろ紙片(1.2×4 cm)を準備しておく。小型のラベルシールに供試虫の採集場所、供試薬剤名などの情報を記入し、スチロール棒瓶に貼り付けておく。

(2) 供試虫の確保

検定には雌成虫を供試する。累代飼育により得られた雌成虫を供試する場合には羽化後7日以内の雌成虫を用いる。供試虫の移し替えにはマイクロピペット用チップ、ビニールチューブホース、ナイロンメッシュシート(前述)を使って製作した吸虫管を用いる(図10)。小型吸引ポンプ(Linicon LV-125、メド一産業(株))をビニールチューブホースに接続して使用すると効率的に供試虫を吸引することができ、スムーズに移し替えできる。幼虫を検定に用いることは可能であるが、供試虫の移し替えなどの操作は雌成虫の方が扱いやすい。



図10 吸虫管と小型吸引ポンプ

(3) 検定の手順

- 1) 検定容器にラベルシールを貼り付ける。
- 2) 薬液を検定容器に十分量注入した後に薬液を除去し、ペーパータオル上で開口部を下にして検定容器を置き、内面に付着した薬液を乾かす（図 11）。薬液が乾いたら、開口部を上にして置き、ろ紙片を 1~2 枚入れる。なお、展着剤を加用した水道水のみ注入し、同様に検定容器内面を乾かした無処理の検定容器も用意する。



図 11 検定容器の薬液処理

- 3) 用意しておいたインゲンマメ葉片（1.2 cm 四方）を薬液に 30 秒間浸漬し、割りばしを用いてよく攪拌した後、ペーパータオル上に取り出して風乾させる（図 12）。風乾後、インゲンマメ葉片を検定容器に入れる。なお、インゲンマメ葉片を展着剤を加用した水道水に浸漬した無処理のインゲンマメ葉片も同様に用意する。
- 4) 吸虫管と小型吸引ポンプを用いて 10~15 個体の供試虫を吸い取り、検定容器内でマイクロピペット用チップを軽く叩きながら供試虫を移し替える。直後に検定容器の開口部を薄膜フィルム（ラボピタやパラフィルムなど）で覆って密封する。各薬剤および無処理の反復数は 3~5 とする。
- 5) 検定容器は 25℃の恒温室に 24~72 時間静置する。その際、蛍光灯の光が検定容器に直接当たらないようにするとともに、恒温室内の湿度条件が極端

な高湿度および低湿度にならないように調整する。所定時間経過後、検定容器内の供試虫を生存虫（面相筆の先でつついて動くもの）と死亡虫（動かないもの）の別に計数し、死亡率を算出する。無処理についても同様に調査し、無処理の死亡率から各薬剤の補正死亡率（Abbott, 1925）を算出する。

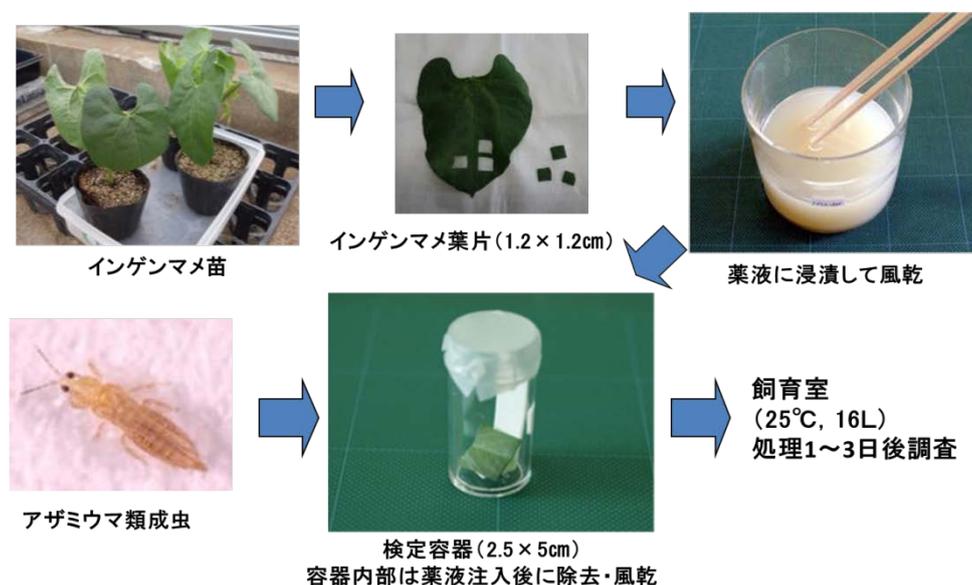


図 12 成虫に対する葉片浸漬法

(4) 検定手法の特徴と問題点

検定法の特徴として、インゲンマメ葉片の準備に要する期間は2~3週間程度であり、供試虫の入手または累代飼育虫の準備ができ次第に検定が実施できる。また、森下（1997）の葉片・虫体散布法で用いられる回転式薬剤散布塔などの機器を事前に準備する必要がない。一方、問題点としては、検定には雌成虫を供試するため、脱皮阻害剤など幼虫に作用する薬剤、効果の発現が遅効的な薬剤、薬液の直接的な接触により殺虫効果が発現する薬剤の検定は難しい。

5-4-4 幼虫に対する葉片浸漬法

(1) 検定の準備

1) 検定容器の準備：検定容器には、内径 8.5 cm、高さ 1.5 cm のプラスチックシャーレを用いる。インゲンマメ葉片の乾燥防止に使用するキムワイブ（M-150）（1枚を四つ折りにしたもの）（図 13 左）と、葉片上からの幼虫の逃亡防止に使用するろ紙（ADVANTEC、直径 7 cm、No.2、中央に直径 21 mm の穴を開ける）（図 13 右）を準備しておく。ろ紙の穴開けには、ハトメ抜き（70号、内径 21 mm）を用いる。



図 13
試験に使用するキム
ワイプ（左）とろ紙と
ハトメ抜き（右）

2) インゲンマメ葉片の準備：成虫に対する葉片浸漬法に準じて準備する。検定の直前に苗から初生葉を切り取り、葉片（3～4 cm 四方）を作成しておく。

3) ソラマメ発芽種子断片の準備：ソラマメ発芽種子断片は、アザミウマ類の1 齢幼虫を確保するための産卵基質として使用する。湿らせたキムワイプ（M-150）（1 枚を四つ折りにしたもの）を敷いたクリーンカップ（直径 10 cm、深さ 4.5 cm）にソラマメ種子を 10～15 粒ずつ並べてふたをし、25℃、16L8D 条件の人工気象器に入れて栽培する（図 14 左）。発芽して芽と根が 3～5cm に成長したら、基部から 5～7 mm ほどを残して芽と根を切り取り、子葉の片方を取り除く。残りの子葉は芽と根の基部を 6～8 mm ほど残して取り除き、11～15 mm 四方の断片にする（図 14 右）。



図 14
ソラマメ発芽種子（左）と
その断片（右、赤丸で示し
た部分を使用）

(2) 供試虫の確保

約 100 個体のアザミウマ類成虫を導入した飼育容器（タイトタッパー（12×8.5×4.5 cm）、前述）にソラマメ発芽種子断片をそれぞれ 6 個ずつ入れ、25℃、16L8D 条件下で 2 日間産卵させる（図 15 左）。プラスチックシャーレ（内径 8.5 cm）に水を含ませたキムワイプ（M-150）（1 枚を四つ折りにしたもの）を敷き、その上にインゲンマメの初生葉片（3～4 cm 四方）を葉表を上にして載せて産卵させたソラマメ発芽種子断片を置き、ふたを被せる（図 15 右）。これを 25℃、16L8D 条件下に約 5 日間置き、幼虫が孵化直後の状態になった断片を試験に用いる。

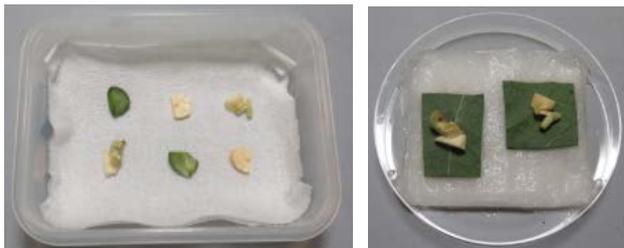


図 15
アザミウマ類の飼育容器（左）
産卵させたソラマメ発芽種子断片を置いたインゲン葉片（右）

(3) 検定の手順

- 1) 内径 8.5 cm のプラスチックシャーレにキムワイプ（M-150）（1 枚を四つ折りにしたもの）を敷き、逆さにしても水が垂れない程度に湿らせておく。
- 2) 用意しておいたインゲンマメ葉片（3～4 cm 四方）を薬液に 30 秒間浸漬し、ペーパータオル上に取り出して風乾させる。風乾した葉片は、葉表を上にして湿らせた脱脂綿上に置き、直径 21 mm の穴をあけたろ紙（直径 7 cm）で覆って保水する（図 16）。
- 3) 穴枠内の葉上に、アザミウマ類幼虫が孵化直後の状態にあるソラマメ発芽種子断片を 1 個載せて 18～20 時間静置し、1 齢幼虫を放虫する。放虫後、ソラマメ発芽種子断片は取り除く。供試個体数は 1 区（1 穴枠）当たり 10～14 個体とする。幼虫数が少ない場合は予備のソラマメ発芽種子断片から孵化した個体を面相筆で加え、多い場合はピンセットで取り除き、供試個体数を調整する。

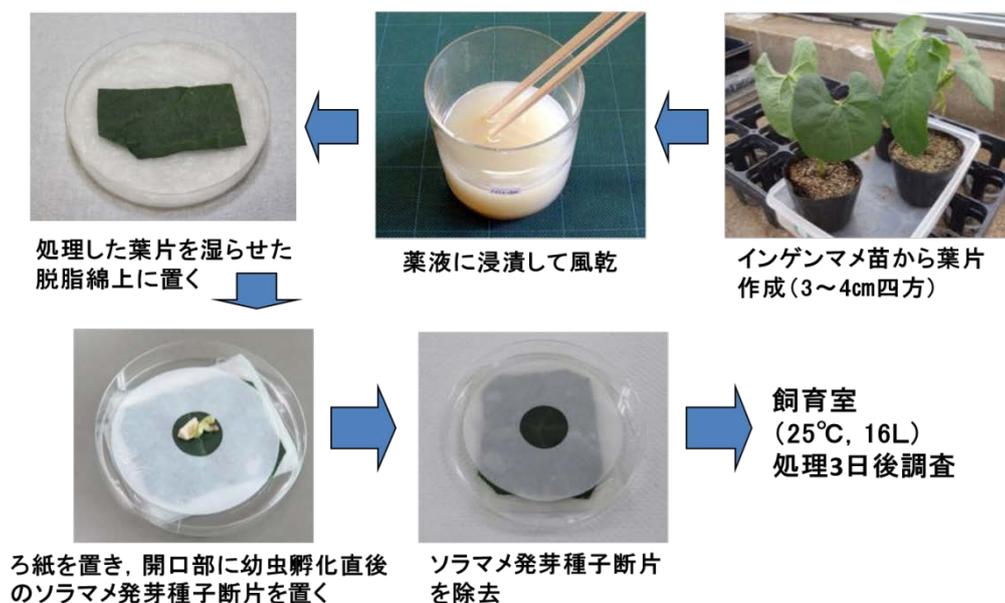


図 16 幼虫に対する葉片浸漬法

4) 検定容器は 25°Cの恒温室に静置する。乾燥によりろ紙の水分が減ると、幼虫がろ紙を這い上がって脱出してしまうので、試験期間中はろ紙が乾燥しないよう適宜水を補充する。72 時間後（3 日後）に実体顕微鏡下で観察し、正常に活動する個体を生存虫、動かない個体や苦悶する個体を死亡虫として計数し、死亡率を算出する。無処理についても同様に調査し、無処理の死亡率から各薬剤の補正死亡率（Abbott, 1925）を算出する。なお、効果の発現が遅効的な薬剤は処理 5 日後または 7 日後に同様に調査する。

(4) 検定手法の特徴と問題点

検定法の特徴として、幼虫が孵化直後の状態にあるソラマメ発芽種子断片を穴枠内の葉上に載せると、1 齢幼虫が自ら葉片上に移動するので、面相筆を用いて 1 個体ずつ移動させる労力を軽減できることが挙げられる。一方、問題点としては、放虫した 1 齢幼虫が 2 齢や蛹に成長すると、ろ紙を這い上がって穴枠から脱出する個体が増えるため、注意する。

5-4-5 幼虫に対する虫体・葉片散布法

(1) 検定の準備

検定法は基本的に幼虫に対する葉片浸漬法の準備に従うが、以下の点が異なる。

1) 散布機器の準備：薬液散布には、エアブラシとコンプレッサー

（TAMIYA、スプレーワーク HG）を用いる（図 17）。穴枠への散布量を均一にするため、ターンテーブル（アズワン（株）、T-Au）を用い、散布した薬液の付着を防ぐためターンテーブルを除く本体部分は加工したアクリル板などで覆い、その上にキムタオルを敷く（図 18 左）。ターンテーブルには、ターンテーブルよりも大きなプラスチックシャーレ等を被せておく（図 18 右）。



図 17 エアブラシとコンプレッサー



図 18 ターンテーブルへの薬液飛散対策

薬液を散布するエアブラシは、ノズルの先端がターンテーブルの中心から 15 cm の距離で、検定容器の底面から高さ 15 cm、水平方向から 45°下向きの位置に固定する（図 19）。ノズルの固定にはカメラ用の三脚を用いる。薬液散布の際は、散布した薬液が周囲に飛散しないよう、ターンテーブルをポリプロピレン製容器（20×30×40 cm、ノズルの先端が当たる部分に穴を開けたもの）で覆っておく。ターンテーブルは 2 秒で 1 回転とし、オプションのフットスイッチで操作する。エアブラシのタンクに入れる薬液量は、穴枠当たりの散布量が約 20 μl になるよう 320~350 μl の範囲内で調整する。セッティングの際、エアブラシのノズルの高さや角度が微妙に異なると、穴枠への散布量が変わるので、タンクに入れる量と穴枠内の散布量を事前に確認しておく。



図 19 虫体・葉片散布法で使用する薬液散布システム

2) 散布量の確認：以下の手順で行う。i) プラスチックシャーレ（内径 85 mm）の中央に、2 mm 四方に切った両面テープを 3 つ貼り付ける（図 20 左）。ii) ハトメ抜きで打ち抜いた直径 21 mm の円形のろ紙片を両面テープにのせて固定する（図 20 右）。ろ紙片は、あらかじめ、重さを測定しておく。iii) ターンテーブルの中央に置き、エアブラシを用いて水道水を散布し、すぐにろ紙片の重さを測定する。iv) 散布前後のろ紙片の重さの変化から、散布量を算出する。



図 20 薬液散布量の測定に使用するシャーレ

(3) 検定の手順

幼虫に対する葉片浸漬法の手順に従うが、インゲンマメ葉片を薬液に浸漬せずに検定容器に置き、幼虫の放虫後に、エアブラシを用いて薬液を散布する(図 21)。まず、幼虫を放虫した検定容器をターンテーブルに載せ、薬液飛散防止用の容器を被せる。次に、エアブラシのタンクに 320~350 μl の薬液を入れ、ターンテーブルを動かしながら薬液を散布する。散布した検定容器は薬液が付着しているので、ピンセットを用いて内径 90 mm のプラスチックシャーレに入れ、持ち運びしやすくする。薬液散布後は、幼虫に対する葉片浸漬法の 5) 以降の手順に従う。

(4) 検定手法の特徴と問題点

検定法の特徴として、エアブラシはハンドスプレーよりも細密に薬剤を散布することができ、再現性も高いことが挙げられる。一方、問題点としては、検定容器に薬剤が付着するため、散布後の取り扱いが面倒になること、複数の薬剤を検定する場合、効率的に作業を進めるためには複数のエアブラシが必要になる。

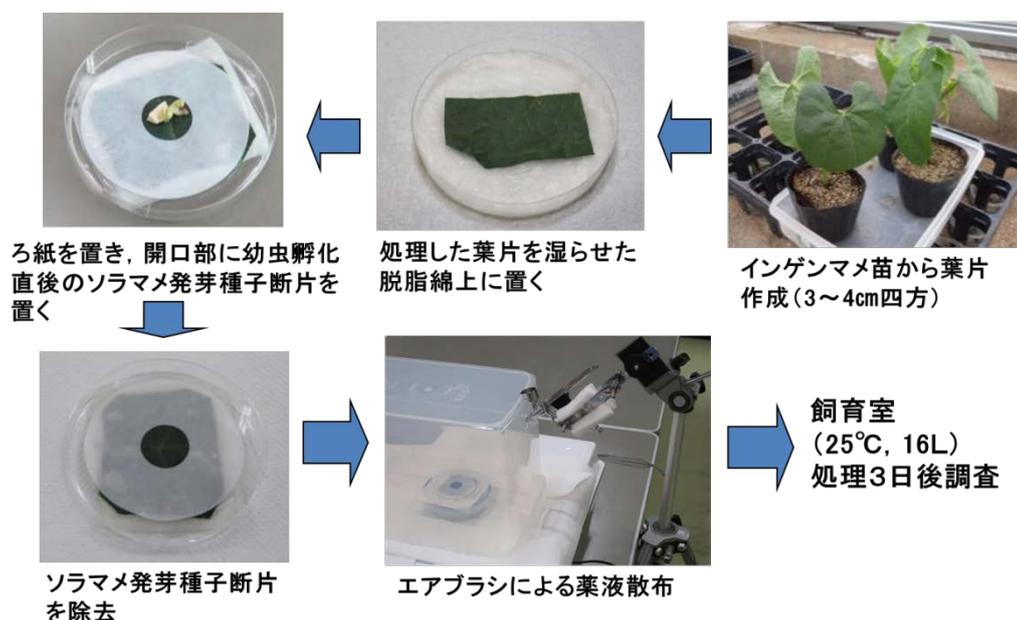


図 21 幼虫に対する虫体・葉片散布法

5-4-6 結果の解析

(1) 殺虫効果の判断方法

一定時間経過後の処理区および無処理区の死亡率から下記の Abbott (1925) の補正式により補正死亡率を求める。なお、無処理区の死亡率は 10% 以下が望ましく、20% 以上の場合には原則として一連の試験結果は破棄する。薬剤の殺

虫効果は補正死亡率により判断し、90%以上で殺虫効果は高い、70%以上 90%未満で殺虫効果は認められる、50%以上 70%未満で殺虫効果は認められるがその程度は低い、50%未満で殺虫効果は低いとする。

補正死亡率 (%) = $100 \times (\text{無処理区の生存率} - \text{処理区の生存率}) / \text{無処理区の生存率}$

(2) プロビット法による半数致死濃度の算出

累代飼育により供試個体数が十分にある場合は、同一個体群を各段階の濃度に希釈した薬液で薬剤感受性検定を実施し、Bliss (1935) のプロビット法により薬剤の半数致死濃度 (LC₅₀ 値) を算出する。この値を感受性系統の値と比較し、薬剤抵抗性の発達の度合い (抵抗性比) を求める。

(執筆：柴尾学)

文献

- Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entmol.* 18: 265-267.
- Bliss, C. I. (1935) The calculation of the dosage-mortality curve. *Ann. Appl. Biol.* 22: 134-167.
- 千脇健司・佐野敏広・近藤 章・田中福三郎 (1994) 粘着トラップに誘殺されたアザミウマ類の簡易同定法. *植物防疫* 48: 521-523.
- 浜崎健児・城塚可奈子・柴尾 学 (2015) ミナミキイロアザミウマ 1 齢幼虫に対する簡易な薬剤検定手法. *関西病虫研報* 57: 129-130.
- 片山晴喜 (1997) 農業害虫および天敵昆虫等の薬剤感受性検定マニュアル (9) 野菜・花き害虫：ミカンキイロアザミウマ. *植物防疫* 51: 235-238.
- 河合 章 (1997) 農業害虫および天敵昆虫等の薬剤感受性検定マニュアル (16) 茶害虫：チャノキイロアザミウマ、チャノミドリヒメヨコバイ. *植物防疫* 51: 587-589.
- 森下正彦 (1997) 農業害虫および天敵昆虫等の薬剤感受性検定マニュアル (9) 野菜・花き害虫：ミナミキイロアザミウマ. *植物防疫* 51: 232-234.
- 村井 保 (2002) ソラマメ催芽種子による汎用的害虫飼育法. *植物防疫* 56: 305-309.
- 日本応用動物昆虫学会 (2006) 農林有害動物・昆虫名鑑増補改訂版. 日本植物防疫協会、東京、387pp.
- 柴尾 学 (2013) 植物防疫基礎講座：殺虫剤感受性検定マニュアル (4) アザミウマ類. *植物防疫* 67: 248-251.

5-5 ナミハダニの薬剤抵抗性生物検定法

5-5-1 はじめに

ナミハダニには黄緑型と赤色型が存在し、野菜類、花き類、果樹類など様々な農作物を加害する。中でも、ナミハダニ黄緑型は薬剤抵抗性の発達が著しく、既に使用可能な薬剤がほとんどない事例も少なくない。ハダニ類の防除を目的として市販されている殺ダニ剤の、作用機作に基づく系統は多岐に渡るが、ナミハダニ黄緑型はその多くに対して感受性を低下させており（例えば、今村・國本, 2016）、現在、実用的に使用されている主な系統は、アベルメクチン系、ミルベマイシン系、ミトコンドリア電子伝達系複合体III阻害剤、テトロン酸及びテトラミン酸誘導体など、そのごく一部である。

したがって、ナミハダニ黄緑型の管理を行う際は、既存の登録薬剤の中で効果のあるものを選定し、生物的防除法や物理的防除法との組み合わせなど、抵抗性の発達を抑制する管理法に基づいた防除の実践が重要である。このことは、新規に開発される薬剤における抵抗性管理においても極めて重要であり、抵抗性発達の兆し（抵抗性パッチの存在あるいはごく低頻度の抵抗性遺伝子を近隣で検出など）が確認されれば、早いタイミングで薬剤を変更するか、他の防除法との組み合わせを検討し、新規薬剤の防除効果の維持に努める必要がある。

抵抗性レベルの把握には対象とする殺ダニ剤ごとの遺伝子診断が望ましいが、殺ダニ剤が市販されてから感受性が低下しはじめるまでの期間が短く、遺伝子診断手法の開発が追いついていない殺ダニ剤もある。そこで、遺伝子診断手法が開発されるまでの間、生物検定法（薬剤感受性検定）で対応する必要がある。そこで、本稿では、ナミハダニ黄緑型に対する簡易な生物検定法について記載する。



図1 イチゴ葉上でのナミハダニ黄緑型多発の様子

5-5-2 供試虫の入手と飼育

(1) 供試虫の入手方法

大きなビニル袋に丸めた新聞紙等を入れたものを準備する。これにハダニが発生している葉を切除して入れる。新聞紙等の紙は、採集した葉から蒸散した水分の結露を防止し、ハダニが袋内で死亡するのを防ぐ目的で入れるものである。葉の鮮度維持のために入れる訳ではないので、新聞紙をあらかじめ水で湿らせないように注意する。

ハダニは圃場内では集中分布する事が多く、発生圃場では、所々にハダニが多発して吐糸に覆われた、いわゆる‘つぼ’が観察されるため、このような場所を手がかりにすると比較的容易に採集できる。ただし、ハダニの多発によって褐変・劣化した葉には、既にハダニが寄生していない場合が多い。従って、葉を集める際には、‘つぼ’の部分の褐変・劣化した葉は避けて、その周囲の比較的新鮮な葉の葉裏を観察し、寄生の有無を確認して採集する。また、施設内ではハダニの移動分散が抑制されるので、同じ圃場内でも場所によって薬剤感受性が異なる集団がパッチ状に分布する。そのため、1カ所から大量に採集せず、圃場全体の複数の発生箇所から採集する。

感受性検定において殺成虫効果を見る場合は、通常は1薬剤につき雌成虫約20頭×3反復で実施する。これに無処理区を加えた頭数が必要になる。必要な採集個体数は、採集した個体を直接使用するか、実験室で増殖して使用するか、また検定に用いる薬剤数などによって異なる。採集した日のうちに雌成虫に対して薬剤処理を行う場合は、持ち帰る途中の死亡や検定操作時のロスも考慮して、少なくとも必要頭数の2倍以上を採集しておくのが無難であり、採集個体数が多いほど、採集葉から検定葉にハダニを移し替える際の手間は削減される。

採集したビニル袋は、直射日光を避けて日陰などに置き、採集後はなるべく早く検定を行う実験室内などに持ち込む。現地圃場で集めたサンプルを車等で持ち帰る場合、特に夏期には温度上昇に注意し、トランクなどに長時間入れておかないようにする。適度に保冷剤を入れたクーラーボックスがあれば安全である。



図2 ナミハダニ黄緑型寄生葉の採集

5-5-3 種の識別方法

ハダニ類の正確な種同定は専門知識・技能を要し、極めて困難である。ただ、ハダニ類の多くは、いわゆる‘赤ダニ’と称される赤い体色の種類であり、農作物を加害するハダニ類の中で、白い体色のいわゆる‘白ダニ’は、ほぼナミハダニ黄緑型のみである。柑橘類のミヤケハダニなどの例外もあるが、こういった種類は殺ダニ剤等を使用している圃場で発生することは稀である。従って、薬剤感受性検定による殺ダニ剤の選択を要するような慣



図3 ナミハダニ黄緑型の雌成虫

行防除圃場で発生する白ダニは、ナミハダニ黄緑型と見なすことができる。PCR-RFLP による *Tetranychus* 属ハダニ類の分類方法については有本ら（2014）が紹介している。

5-5-4 供試虫の累代飼育法

圃場から持ち帰ったハダニが少なかった場合や、時間の関係上、その日のうちに検定を実施出来ない場合は、採集したハダニを飼育によって維持、あるいは増殖させる必要がある。

ナミハダニ黄緑型は、次項の検定法で後述するように、感受性検定に使用するインゲンマメ（以下インゲン）の初生葉で累代飼育できるので、飼育・検定用に常にインゲンを増殖させておくと良い。

15 cm ポットにインゲンマメ種子（品種：長鶉菜豆）を 20 粒程度播種する。コンタミ防止のために人工気象器内で栽培する場合は、25°C、16L8D 程度が適切だが、20°C以上の温度と 12 時間以上の日長があれば、問題なく生育する。また、使用するのは初生葉なので、新芽が伸びてきたら適宜摘み取る。



図 4 インゲンの栽培

飼育の際は、ポットのインゲン上、もしくは地際で切除したインゲンを 200 mL 程度の三角フラスコに水差したものに、ハダニが寄生した葉を直接載せる。インゲンの本数はハダニの頭数や維持する期間に応じて適宜調整し、葉の劣化が進むと新鮮なインゲンに交換する。

なお、インゲンで飼育中に、ハダニの一部が周囲に分散するので、複数系統を維持する場合は異なる部屋に置くなどの工夫が必要である。

5-5-5 検定法

(1) インゲンリーフディスク法

1) リーフディスクの準備

直径 9 cm のプラスチックシャーレに濾紙を 2 枚敷き、水で十分に湿らせる。その上に、切除したインゲンマメの初生葉を、葉表を上にして置く。短冊状に切ったキッチンペーパーを 2 枚重ねて、インゲン葉上に井型に置き、水で十分に湿らせる（図 5）。



図 5 インゲンリーフディスク

2) 検定虫の接種

リーフディスク上の井型の内側に、ハダニを接種する。殺成虫効果を見る場合は、雌成虫約 20 頭を接種して試験に供する。殺卵効果を見る場合は、雌成虫 10 頭を接種して産卵させ、24 時間後に雌成虫を取り除いて試験に供する。

接種は通常、先端を湿らせた面相筆で行い、個体の後方からすくい上げるように採集する。ただしこの作業を効率的に行うには、ある程度慣れを要する。より簡易な方法として、加工したガラス製パスツールピペットを利用する方法を紹介する（國本・今村、2017）。

- ・ガラス製のパスツールピペット（7595D-5X；Corning Co. Ltd.）の先端部分を基部で切断し、アルコールランプで先端を丸く加工する。
- ・上の加工を施したパスツールピペット末端（エアーポンプの接続部分）にはビニルチューブにナイロンメッシュ（20XX-75、Sefar NYTAL）を貼り付けたものを装着する（図 6）。
- ・実体顕微鏡下でこの吸虫管を用いてハダニ雌成虫を吸引し、ビニルチューブを外してナイロンメッシュに溜まったハダニをインゲン葉上へ落とす。



図 6 パスツールピペットの加工

ここで用いた吸虫装置は香川県と徳島県が共同で特許出願中の「虫の保持装置及び虫の薬剤感受性検定方法（特願 2016-062863）」の吸虫方式である。

3) 薬液の準備

薬剤は市販の製剤を用い、水道水を用いて所定の濃度に希釈し、薬液を調製する。展着剤は加用しない。対照区は水道水処理とする。

4) 薬剤処理と飼育

回転式散布塔で、リーフディスクに $2 \mu\text{L}/\text{cm}^2$ 相当量の供試剤を散布する。ただし、回転式散布塔を所有していない場合は、エアブラシとコンプレッサー（タミヤスプレーワーク HG、株式会社タミヤ）を用いる。散布量を均一にするため、ターンテーブル（アズワン（株）、T-Au）を用いる（國本ら、2017）（図 7）。処理後容器の上に新聞紙等を被せて飼育する（図 8）。



図 7 簡易散布装置



図 8 処理後の飼育管理

5) 効果の判定

薬剤処理 48 時間後に生存虫数と死亡虫数を実体顕微鏡下で計数し、死亡率を算出する。この際、対照区の正常な個体と比較して、歩行異常を示す個体や苦悶している個体は死亡虫に含める。また、キッチンペーパー上などで溺死している個体は計数しない。

対照区についても同様に調査し、対照区の生存率から各薬剤の補正死亡率 (Abbott, 1925) を以下の式により算出する。

$$y = \frac{x_{cont} - x_{test}}{x_{cont}} \times 100 (\%)$$

y : 補正死亡率、 x_{cont} : 対照区の生存率、 x_{test} : 薬剤処理区の生存率

(2) 簡易検定法

労力をかけられない場合や散布塔の設備がない場合は特別な器具を必要としない簡易検定法でもよい。具体的な手順は以下のとおりである。

- ・ 初生葉が展開したインゲンをプラスチック製の管瓶 (図 9) に水差しし、切れ込みを入れたスポンジ栓に茎を挟んでふたをする。
- ・ これを発泡スチロール製の箱に穴をあけた部分に差し込み、管瓶の上部と発泡スチロール面が一致するように設置する。
- ・ この茎元にハダニが寄生する葉を置き、室温で一晩放置する (図 10)。
- ・ 翌朝にはインゲン葉裏にハダニが移動しているので、雌成虫数を計数する。
- ・ 所定濃度に希釈した殺ダニ剤を入れたビーカーにインゲン葉ごと 5 秒間浸漬し、再び水差しする。
- ・ 24~48 時間後に生死を判定する。



図 9 プラスチック管瓶



図 10 水差しインゲンを用いた簡易接種法

(執筆：井村岳男)

文献

Abbott, W. S. (1925) A method of computing the effectiveness of an insecticide. J. Econ. Entmol. 18 : 265-267.

- 有本 誠・佐藤 雅・上杉龍士・刑部正博（2014）輸入検疫で発見される *Tetranychus* 属ハダニ類の PCR-RFLP による識別法. 植物防疫 68: 66-70.
- 今村剛士・國本佳範（2016）奈良県内のイチゴに寄生するナミハダニ黄緑型の薬剤感受性. 奈良農研セ研報 47 : 34-36.
- 刑部正博（2016）フィールド&ラボ～知って得する豆知識③～簡単、便利～ハダニ採集用小型吸虫管. 植物防疫 70 : 126-128.
- 國本佳範・今村剛士（2017）ナミハダニの薬剤感受性検定における簡易な接種法の開発. 植物防疫 71 : 154-158.
- 國本佳範・今村剛士・土井 誠・中野亮平・刑部正博（2017）回転式散布塔に代わる散布装置の構築. 応動昆 61 : 192-194.

5-6 ウンカ類の薬剤抵抗性生物検定法

農研機構 九州沖縄農業研究センターのホームページ

(http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/pub2016_or_later/pamphlet/tech-pamph/072957.html)

にイネウンカ類の薬剤感受性検定マニュアルとして2016年12月に公開済みのため記載省略。

IRAC 分類表

IRAC とは Insecticide Resistance Action Committee の頭文字を採った略称で、国際団体 Crop Life International の殺虫剤抵抗性対策委員会のことである。委員会がまとめた殺虫剤の分類表は、作用機構に基づいて記載され、薬剤抵抗性管理のための使用剤選択に役立つため、見やすいように一部改変して次頁以降に転載した。市販農薬の商品名には多彩な名称が使用され、有効成分の化合物名との関連性が低く、異なる商品名でも有効成分が同一で、意図せずして同一剤の連用に陥る場合がある。連用を避けるには有効成分名からサブグループの分類番号(1A, 1B, 2B, 3A, 4A 等、掲載表の黄色表示欄に記載)を確認し、異なる系統の薬剤を使用しなければならない。

また、サブグループの分類番号は、平成 30 年現在のものである。今後、農薬の作用機構研究が進展して、同一サブグループ内に置かれているものが、詳細な作用機構の新しい知見によりさらに細分化されることも起こりうる。さらに、解毒分解酵素の活性上昇や透過性阻害により抵抗性を獲得している場合には、サブグループが異なる剤に対して同時に抵抗性を発達させることも可能性としては起こりうるので、注意が必要である。

・殺虫剤の作用機構分類

IRAC 殺虫剤作用機構分類 (ver.9.1, 2018 年 12 月) を引用・和訳。抵抗性管理のための薬剤ローテーションは次ページ以降のサブグループ (1A、1B 等) に基づいて行うべきである。

主要グループ

主要グループ番号	主要グループ名	作用
1	アセチルコリンエステラーゼ (AChE) 阻害剤	神経作用
2	GABA 作動性塩素イオンチャンネルブロッカー	神経作用
3	ナトリウムチャンネルモジュレーター	
4	ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR) 競合的モジュレーター	神経作用
5	nAChR アロステリックモジュレーター	
6	グルタミン酸作動性塩素イオンチャンネル(GluCl) アロステリックモジュレーター	神経および筋肉作用
7	幼若ホルモン類似剤	成長調節
8	その他の非特異的阻害剤	
9	弦音器官 TRPV チャンネルモジュレーター	神経作用
10	ダニ類成長阻害剤	成長調節
11	微生物由来昆虫中腸内膜破壊剤	
12	ミトコンドリア ATP 合成酵素阻害剤	エネルギー代謝
13	プロトン勾配を攪乱する酸化的リン酸化脱共役剤	エネルギー代謝
14	nAChR チャンネルブロッカー	神経作用
15	キチン生合成阻害剤、タイプ 0	成長調節
16	キチン生合成阻害剤、タイプ 1	成長調節
17	脱皮阻害剤 ハエ目昆虫	成長調節
18	脱皮ホルモン (エクダイソン) 受容体アゴニスト	成長調節
19	オクトパミン受容体アゴニスト	神経作用
20	ミトコンドリア電子伝達系複合体 III 阻害剤	エネルギー代謝
21	ミトコンドリア電子伝達系複合体 I 阻害剤 (METI)	エネルギー代謝
22	電位依存性ナトリウムチャンネルブロッカー	神経作用
23	アセチル CoA カルボキシラーゼ阻害剤	脂質合成 成長調節
24	ミトコンドリア電子伝達系複合体 IV 阻害剤	エネルギー代謝
25	ミトコンドリア電子伝達系複合体 II 阻害剤	エネルギー代謝
26	-	
27	-	
28	リアノジン受容体モジュレーター	神経および筋肉作用
29	弦音器官モジュレーター 標的部位未決定	神経作用
30	GABA 作動性塩素イオンチャンネルアロステリックモジュレーター	神経作用
31	バキュロウイルス	昆虫病原ウイルス
32	ニコチン性アセチルコリン受容体(nAChR) アロステリックモジュレーター	神経作用
UN	作用機構が不明あるいは不明確な剤	

・サブグループ分類と農薬名の例示
 (JCP 訳版 2018 年 10 月 Ver.8.4 を参考に作成した。)

サブグループ	代表的有効成分	有効成分	農薬名の例示 (剤型省略)
1A	カーバメート系	アラニカルブ	オリオン
		ベンフラカルブ	オンコル
		NAC (カルバリル)	デナボン
		カルボスファン	アドバンテージ
			ガゼット
		BPMC (フェノブカルブ)	バッサ
		メソミル	ランネート
		オキサミル	バイデート L
チオジカルブ	ラービン		
1B	有機リン系	アセフェート	オルトラン
			ジェイエース
			ジェネレート
			スミフェート
		カズサホス	ラグビー
		クロルピリホス	ダーズバン
		CYAP (シアノホス)	サイアノックス
		ダイアジノン	ダイアジノン
		ジメトエート	ジメトエート
		エチルチオメトン (ジスルホトン)	エチメトンの成分
		EPN	EPN
		MEP (フェニトロチオン)	スミチオン
		MPP (フェンチオン)	バイジット
		ホスチアゼート	ネマトリン
			ガードホープ
		イミシアホス	ネマキック
		イソキサチオン	カルホス
			カルモック
			ネキリエース K
		マラソン (マラチオン)	マラソン
		DMTP (メチダチオン)	スプラサイド
PAP (フェントエート)	エルサン		
ピリミホスメチル	アクテリック		
プロフェノホス	エンセダン		
プロチオホス	トクチオン		
2A	環状ジエン有機塩素系	-	-
2B	フェニルピラゾール系 (フィプロール系)	エチプロール	キラップ
		フィプロニル	プリンス

サブグループ	代表的有効成分	有効成分	農薬名の例示 (剤型省略)
3A	ピレスロイド系 ピレトリン系	アクリナトリン	アーデント
		ビフェントリン	テルスター
		シクロプロトリン	シクロサール
		シフルトリン	バイスロイド
		シハロトリン	サイハロン
		シペルメトリン	アグロスリン ゲットアウト
		エトフェンプロックス	トレボン
		フェンプロパトリン	ロディー
		フェンバレレート	ハクサップ
			パーマチオン
			ベジホン等
		フルシトリネート	ペイオフ
		フルバリネート	マブリック
		ペルメトリン	アディオン
		シラフルオフェン	MR.ジョーカー
テフルトリン	フォース		
トラロメトリン	スカウト		
ピレトリン	防虫菊		
3B	DDT メトキシクロル	-	-
4A	ネオニコチノイド系	アセタミプリド	モスピラン
		クロチアニジン	ダントツ
			ワンリード
			スタークル
		アルバリン	
		イミダクロプリド	アドマイヤー
		ニテンピラム	ベストガード
		チアクロプリド	バリアード
チアメトキサム	アクタラ クルーザー		
4B	ニコチン	-	-
4C	スルホキシミン系	スルホキサフロル	エクシード
			トランスフォーム
4D	ブテノライド系	フルピラジフロン	シバント
4E	メソイオン系	トリフルメゾピリム	ゼクサロン
5	スピノシン系	スピネトラム	ディアナ
		スピノサド	スピノエース
6	アベルメクチン系	アバメクチン	アグリメック
	ミルベマイシン系	エマメクチン安息香酸塩	アフアーム
		レピメクチン	アニキ
		ミルベメクチン	ミルベノック コロマイト
7A	幼若ホルモン類縁体		-
7B	フェノキシカルブ		-

サブグループ	代表的有効成分	有効成分	農薬名の例示 (剤型省略)
7C	ピリプロキシフェン	ピリプロキシフェン	ラノー ブルート
8A	ハロゲン化アルキル	-	-
8B	クロルピクリン	クロルピクリン	クロルピクリン ドロクロール クロピク ドジョウピクリン クロピクフロー
8C	フルオライド系	-	-
8D	ホウ砂	-	-
8E	吐酒石	-	-
8F	メチルイソチオシア ネートジェネレーター	ダゾメット カーバム	バスアミド ガスタード NCS キルパー
9B	ピリジン アゾメチン誘導体	ピメトロジン ピリフルキナゾン	チェス コルト
9D	ピロペン系	アフィドピロペン	2018年10月現在未登録
10A	クロフェンテジン ヘキシチアゾクス ジフロビダジン	クロフェンテジン ヘキシチアゾクス	カーラ ニッソラン
10B	エトキサゾール	エトキサゾール	バロック
11A	<i>Bacillus thuringiensis</i> と 殺虫タンパク質生産物	subsp. <i>aizawai</i> subsp. <i>kurstaki</i> Subsp. <i>aizawai</i> + <i>kurstaki</i>	フローバック ゼンターリー クオーク サブリーナ エコマスター ジャックポット チューレックス トアローCT チューリサイド チューンアップ エスマルク デルフィン ファイブスター バイオマックス バシレックス
11B	<i>Bacillus sphaericus</i>	-	-
12A	ジアフェンチウロン	ジアフェンチウロン	ガンバ
12B	有機スズ系殺ダニ剤	酸化フェンブタスズ	オサダン
12C	プロパルギット	BPPS (プロパルギット)	オマイト
12D	テトラジホン	テトラジホン	テデオ
13	ピロール	クロルフェナピル	コテツ
	ジニトロフェノール		-

サブグループ	代表的有効成分	有効成分	農薬名の例示 (剤型省略)
	スルフルラミド		-
14	ネライストキシシン類縁体	ベンスルタップ	ルーバン
		カルタップ	パダン
		チオシクラム	エビセクト
			リーフガード
			スクミハンター
15B	ベンゾイル尿素系	クロルフルアズロン	アタブロン
		ジフルベンズロン	デミリン
		フルフェノクスロン	カスケード
		ルフェヌロン	マッチ
		ノバルロン	カウンター
		テフルベンズロン	ノーモルト
16	ブプロフェジン	ブプロフェジン	アブロード
17	シロマジン	シロマジン	トリガード
18	ジアシル-ヒドラジン系	クロマフェノジド	マトリック
		メトキシフェノジド	ファルコン
			ランナー
		テブフェノジド	ロムダン
19	アミトラズ	アミトラズ	ダニカット
20A	ヒドラメチルノン	-	-
20B	アセキノシル	アセキノシル	カネマイト
20C	フルアクリピリム	フルアクリピリム	タイタロン
20D	ビフェナゼート	ビフェナゼート	マイトコーネ
21A	METI 剤	フェンピロキシメート	ダニトロン
		ピリミジフェン	マイトクリーン
		ピリダベン	サンマイト
		テブフェンピラド	ピラニカ
		トルフェンピラド	ハチハチ
21B	ロテノン	-	-
22A	オキサジアジン	インドキサカルブ	トルネードエース
22B	セミカルバゾン	メタフルミゾン	アクセル
23	テトロン酸および テトラミン酸誘導体	スピロジクロフェン	ダニエモン
		スピロメシフェン	ダニゲッター
			クリアザール
		スピロテトラマト	モベント
24A	ホスフィン系	-	-
24B	シアニド系	-	-
25A	β-ケトニトリル誘導体	シエノピラフェン	スターマイト
		シフルメトフェン	ダニサラバ
25B	カルボキサニリド系	ピフルブミド	ダニコング
28	ジアミド系	クロラントラニリプロール	プレバソン
			サムコル
			フェルテラ
		シアントラニリプロール	ベネビア

サブグループ	代表的有効成分	有効成分	農薬名の例示 (剤型省略)
			ベリマーク
			エクシレル
			パディート
			プリロツソ
		フルベンジアミド	フェニックス
29	フロニカミド	フロニカミド	ウララ
UN	アザジラクチン		-
	ベンゾキシメート		-
	ブロモプロピレート		-
	キノメチオナート	キノキサリン系 (キノメチオナート)	モレスタン
	ジコホル	-	-
	ピリダリル	ピリダリル	プレオ
	硫黄	硫黄	硫黄
	石灰硫黄合剤	石灰硫黄合剤	石灰硫黄合剤

・農薬名 50 音順によるサブグループ判別リスト

(平成 30 年 7 月の FAMIC 登録剤リストを基に作成した。)

1 種類の有効成分による殺虫剤

	農薬名の例示 (剤型省略)	サブ グループ	有効成分名
A- Z	ACCノーモルト	15	テフルベンズロン
	DC	8A	D-D
	D-D	8A	D-D
	EPN	1B	EPN
	NCS	8F	カーバム
	TDエース	1B	イソキサチオン
あ	アークリン	3A	エトフェンプロックス
	アースガーデンC	4A	イミダクロプリド
	アースガーデンT	3A	エトフェンプロックス
	アードント	3A	アクリナトリン
	アクセル	22B	メタフルミゾン
	アクセルベイト	22B	メタフルミゾン
	アクタラ	4A	チアメトキサム
	アクテリック	1B	ピリミホスメチル
	アグリメック	6	アバメクチン
	アグロスダイアジノン	1B	ダイアジノン
	アグロスリン	3A	シペルメトリン
	アストロ	1A	BPMC
	アセルプリン	28	クロラントラニリプロール
	アタブロン	15	クロルフルアズロン
	アディオン	3A	ペルメトリン
	アドバンテージ	1A	カルボスルファン
	アドマイヤー	4A	イミダクロプリド
	アトラクトン	4A	ジノテフラン
	アトラック	4A	チアメトキサム
	アニキ	6	レピメクチン
	アフアーム	6	エマメクチン安息香酸塩
	アプロード	16	ブプロフェジン

	農薬名の例示 (剤型省略)	サブ グループ	有効成分名
	アルバリン	4A	ジノテフラン
	アントム	4A	ジノテフラン
	イールダー	4A	アセタミプリド
	イカズチ	3A	シペルメトリン
	イマージ	4A	アセタミプリド
	イモゾウベイト	1B	ME P
	打ち込み上手	1B	アセフェート
	ウッドスター	4A	ジノテフラン
	ウッドセーバー	4A	ジノテフラン
	ウララ	29	フロニカミド
	エイビッド	6	アバメクチン
	エクシード	4C	スルホキサフロル
	エクシレル	28	シアントラニリプロール
	エコヒューム	8F	メチルイソチオシアネート
	エコファイター	4A	チアクロプリド
	エコマイト	23	スピロジクロフェン
	エコマスターBT	11A	BT (生菌)
	エコワン	4A	チアクロプリド
	エスペランサ	28	シアントラニリプロール
	エスマルク	11A	BT (生菌)
	エビセクト	14	チオシクラム
	エピヒューム	24A	リン化アルミニウム
	エルサン	1B	PAP
	園芸用キンチョールE	3A	ペルメトリン
	エンセダン	1B	プロフェノホス
	エンバー	3A	ペルメトリン
	オールスタースプレー	4A	ジノテフラン
	オマイト	12C	BPPS
	オリオン	1A	アラニカルブ
	オンコル	1A	ベンフラカルブ
か	ガーデンアース	3A	ペルメトリン
	ガーデンアシスト	4A	クロチアニジン
	ガーデントップ	3A	ピレトリン

	農薬名の例示 (剤型省略)	サブ グループ	有効成分名
	ガーデンホスピタル	1A	ベンフラカルブ
	ガードベイト	3A	ペルメトリン
	ガードホープ	1B	ホスチアゼート
	ガードワン	18	テブフェノジド
	カーラ	10A	クロフェンテジン
	ガウチョ	4A	イミダクロプリド
	カウンター	15	ノバルロン
	カスケード	15	フルフェノクスロン
	ガゼット	1A	カルボスルファン
	カダンA	3A	アレスリン
	カダンAP	3A	ペルメトリン
	カダンV	3A	ペルメトリン
	カダンスプレーEX	4A	チアメトキサム
	ガットキラー	1B	MEP
	ガットサイドS	1B	MEP
	カネマイト	20B	アセキノシル
	カリブスター	5	スピノサド
	カルホス	1B	イソキサチオン
	カルモック	1B	イソキサチオン
	ガンバ	12A	ジアフェンチウロン
	キックパール	3A	ペルメトリン
	キルパー	8F	カーバムナトリウム塩
	クオーク	11A	BT (生菌)
	グランドオンコル	1A	ベンフラカルブ
	クリアザール	23	スピロメシフェン
	グリーンカルホス	1B	イソキサチオン
	くり専用ヨーカヒューム	8A	ヨウ化メチル
	クルーザー	4A	チアメトキサム
	グレモ	18	メトキシフェノジド
	ゲットアウト	3A	シペルメトリン
	コテツ	13	クロルフェナピル
	コルト	9B	ピリフルキナゾン

	農薬名の例示 (剤型省略)	サブ グループ	有効成分名
	コロマイト	6	ミルベメクチン
さ	サービスエース	5	スピノサド
	サイアノックス	1B	CYAP
	サイハロン	3A	シハロトリン
	サッチューコートS	1B	MEP
	サッチューコートSセ ット	1B	MEP
	サニーフィールド	3A	エトフェンプロックス
	サブリナ	11A	BT (生菌)
	サムコル	28	クロラントラニリプロール
	サンマイト	21A	ピリダベン
	ジェイエース	1B	アセフェート
	ジェネレート	1B	アセフェート
	シクロサール	3A	シクロプロトリン
	シクロパック	3A	シクロプロトリン
	シバマル	UN	ピリダリル
	シバント	4D	フルピラジフロン
	ジメトエート	1B	ジメトエート
	ジャックポット	11A	BT (生菌)
	除虫菊	3A	ピレトリン
	ジョーカー	3A	シラフルオフエン
	ショットイン	15	テフルベンズロン
	ショットガン	1B	ダイアジノン
	ショットワン・ツー	6	エマメクチン安息香酸塩
	ショットワン	6	エマメクチン安息香酸塩
	シラトップ	3A	シラフルオフエン
	スカウト	3A	トラロメトリン
	スケルカット	4A	ジノテフラン
	スケルノック	4A	ジノテフラン
	スターガード	4A	ジノテフラン
	スタークル	4A	ジノテフラン
	スターダム	4A	ジノテフラン
	スターマイト	25A	シエノピラフェン

	農薬名の例示 (剤型省略)	サブ グループ	有効成分名
	スティンガー	28	フルベンジアミド
	スピネアタック	5	スピネトラム
	スピノエース	5	スピノサド
	スピノエースベイト	5	スピノサド
	スプラサイド	1B	DMT P
	スミアルファ	3A	エスフェンバレレート
	スミチオン	1B	ME P
	スミパイン	1B	ME P
	スミフェート	1B	アセフェート
	ゼロカウント	5	スピノサド
	ゼンターリ	11A	B T (生菌)
た	ダズバン	1B	クロルピリホス
	ダイアジノン	1B	ダイアジノン
	タイタロン	20C	フルアクリピリム
	ダイリーグ	4A	アセタミプリド
	ダニエモン	23	スピロジクロフェン
	ダニカット	19	アミトラズ
	ダニゲッター	23	スピロメシフェン
	ダニコング	25B	ピフルブミド
	ダニサラバ	25A	シフルメトフェン
	ダニダウン	6	ミルベメクチン
	ダニトロン	21A	フェンピロキシメート
	ダニボーイ	6	ミルベメクチン
	ダニレンジャー	25A	シフルメトフェン
	ダニ太郎	20D	ビフェナゼート
	ダントツ	4A	クロチアニジン
	チェス	9B	ピメトロジン
	チューリサイド	11A	B T (生菌)
	チューレックス	11A	B T (生菌)
	チューンアップ	11A	B T (生菌)
	ディアナ	5	スピネトラム
	ディプテレックス	1B	DE P
	ティベック	24A	リン化アルミニウム

	農薬名の例示 (剤型省略)	サブ グループ	有効成分名
	テッパン	28	シクラニリプロール
	テデオン	12D	テトラジホン
	テナポン	1A	NAC
	デミリン	15	ジフルベンズロン
	テルスター	3A	ビフェントリン
	デルフィン	11A	BT (生菌)
	テロン	8A	D-D
	トアロー	11A	BT (死菌)
	トクチオン	1B	プロチオホス
	トップチョイス	2B	フィプロニル
	トラベックサイド	8	メチルイソチオシアネート
	トランスフォーム	4C	スルホキサフロル
	トリガード	17	シロマジン
	トルネードエース	22A	インドキサカルブ
	トルネード	22A	インドキサカルブMP
	トレボン	3A	エトフェンプロックス
	トレボンL	3A	エトフェンプロックス
	トレボンエアー	3A	エトフェンプロックス
	トレボンサーフ	3A	エトフェンプロックス
	トレボンスカイ	3A	エトフェンプロックス
な	ナイスイーグル	15	クロルフルアズロン
	ナイスパートナー	4A	クロチアニジン
	ニッソラン	10A	ヘキシチアゾクス
	ニワエース	1B	ホスチアゼート
	ネキリエース	1B	イソキサチオン
	ネキリベイト	3A	ペルメトリン
	ノーカウント	5	スピノサド
	ノーモルト	15	テフルベンズロン
は	バークサイド	1B	MEP
	バイオマックス	11A	BT (生菌)
	バイジット	1B	MP P
	バイスロイド	3A	シフルトリン
	バイデート	1A	オキサミル

	農薬名の例示 (剤型省略)	サブ グループ	有効成分名
	パイベニカVスプレー	3A	ピレトリン
	バシレックス	11A	B T (生菌)
	バズ	28	シアントラニリプロール
	パダン	14	カルタップ
	ハチハチ	21A	トルフェンピラド
	バッサ	1A	B PMC
	パディート	28	シアントラニリプロール
	パナヒューム	24A	リン化アルミニウム
	パノコン	1A	フェノチオカルブ
	バリアード	4A	チアクロプリド
	バロック	10B	エトキサゾール
	パンチショット	3A	ビフェントリン
	ビートルコップ	4A	チアメトキサム
	ビーラム	FRAC 7	フルオピラム
	ピラニカ	21A	テブフェンピラド
	ファームスター	4A	ジノテフラン
	ファイブスター	11A	B T (生菌)
	ファインセーブ	UN	フロメトキン
	ファルコン	18	メトキシフェノジド
	風神X	22A	インドキサカルブ
	フェニックスジェット	28	フルベンジアミド
	フェニックス	28	フルベンジアミド
	フェルテラ	28	クロラントラニリプロール
	フォース	3A	テフルトリン
	フミトキシシ	24A	リン化アルミニウム
	プリロッソ	28	シアントラニリプロール
	プリンスアクティブ	2B	フィプロニル
	プリンス	2B	フィプロニル
	プリンスベイト	2B	フィプロニル
	プルート	7C	ピリプロキシフェン
	ブルースカイ	4A	イミダクロプリド
	フルスウィング	4A	クロチアニジン
	ブレイクショット	28	シアントラニリプロール

	農薬名の例示 (剤型省略)	サブ グループ	有効成分名
	プレオ	UN	ピリダリル
	プレバソン	28	クロラントラニリプロール
	ブロードハンター	1B	DMT P
	フローバック	11A	B T (生菌)
	ペイオフ	3A	フルシトリネート
	ペガサス	28	フルベンジアミド
	ベジタメート	3A	ペルメトリン
	ベストガード	4A	ニテンピラム
	ベニカR	3A	フェンプロパトリン
	ベニカ	3A	ペルメトリン
	ベニカカミキリムシエ アゾール	3A	フェンプロパトリン
	ベニカベジフルスプレ ー	4A	クロチアニジン
	ベニカベジフル乳剤	3A	ペルメトリン
	ベニカマツケア	4A	クロチアニジン
	ベネビア	28	シアントラニリプロール
	ベリマーク	28	シアントラニリプロール
	ペンタック	2A	ジエノクロル
	ホストキシシ	24A	リン化アルミニウム
ま	マイトクリーン	21A	ピリミジフェン
	マイトコーネ	20D	ビフェナゼート
	マイヒューム	8A	ヨウ化メチル
	マガンカウンター	15	ノバルロン
	マザック	UN	ピリダリル
	マツガード	6	ミルベメクチン
	マツグリーン	4A	アセタミプリド
	マッチ	15	ルフェヌロン
	マトリック	18	クロマフェノジド
	マブリック	3A	フルバリネート
	マラソン	1B	マラソン
	ミミダス	1A	B P M C
	みみんず	1A	M I P C

	農薬名の例示 (剤型省略)	サブ グループ	有効成分名
	ミルベノック	6	ミルベメクチン
	モスピラン	4A	アセタミプリド
	モベント	23	スピロテトラマト
	モリエート	4A	クロチアニジン
や	野菜ひろばN	3A	ペルメトリン
	ヨウ化メチル	8A	ヨウ化メチル
ら	ラービン	1A	チオジカルブ
	ラグビー	1B	カズサホス
	ラノー	7C	ピリプロキシフェン
	ランナー	18	メトキシフェノジド
	ランネート	1A	メソミル
	ランブリン	1A	アラニカルブ
	リードック	4A	イミダクロプリド
	リーフガード	14	チオシクラム
	リバイブ	6	エマメクチン安息香酸塩
	リラーク	1A	チオジカルブ
	緑風	4A	ジノテフラン
	ルーバン	14	ベンスルタップ
	レターデン	15	ジフルベンズロン
	レピクリーン	11A	B T (生菌)
	ロックオン	28	フルベンジアミド
	ロディー	3A	フェンプロパトリン
	ロビンフッド	3A	フェンプロパトリン
	ロムダン	18	テブフェノジド

混合剤

	農薬名の例示 (剤型省略)	有効成分 1 のサブ グループ	有効成分 2 のサブ グループ	有効成分名 (1・2)
あ	アクセルキング	21A	22B	トルフェンピラド・メタフルミゾン
	アクタラフォース	4A	3A	チアメトキサム・テフルトリン

	農薬名の例示 (剤型省略)	有効成分 1 のサブ グループ	有効成分 2 のサブ グループ	有効成分名 (1・2)
	アフームエクセラ	6	15	エマメクチン安息香酸 塩・ルフェヌロン
	アプロードエース	21A	16	フェンピロキシメート・ ブプロフェジン
	アプロードスター クル	4A	16	ジノテフラン・ブプロフ ェジン
	アプロードパダン	14	16	カルタップ・ブプロフェ ジン
	アプロードバッサ	16	1A	ブプロフェジン・B PM C
	アプロードロムダ ン	18	16	テブフェノジド・ブプロ フェジン
	アベイル	4A	28	アセタミプリド・シアン トラニリプロール
	エチメトン	1B	1B	エチルチオメトン・ダイ アジノン
	エビセクトトレボ ン	3A	14	エトフェンプロックス・ チオシクラム
	エルサンバッサ	1A	1B	B PMC・P AP
	オーベスト	28	1A	クロラントラニリプロー ル・ベンフラカルブ
	オルチオン	1B	1B	アセフェート・ME P
	オルトランDX粒 剤	1B	4A	アセフェート・クロチア ニジン
	オンコルスターク ル	4A	1A	ジノテフラン・ベンフラ カルブ
	オンダイアエース	1B	1A	ダイアジノン・ベンフラ カルブ
か	ガードナー	4A	5	イミダクロプリド・スピ ノサド
	カイガラムシエア ゾール	4A	3A	クロチアニジン・フェン プロパトリン

	農薬名の例示 (剤型省略)	有効成分 1 のサブ グループ	有効成分 2 のサブ グループ	有効成分名 (1・2)
	カダンK	3A	-	アレスリン・マシン油
	キックオフ	28	4A	クロラントラニリプロール・ジノテフラン
	ギャング	1A	2B	カルボスルファン・フィプロニル
	キラップJ水和剤	2B	3A	エチプロール・シラフルオフエン
	キラップジョーカー	2B	3A	エチプロール・シラフルオフエン
	キラップバリアード	2B	4A	エチプロール・チアクロプリド
	クリアオール	3A	23	アクリナトリン・スピロメシフェン
	グリーンペイト	8	1A	メタアルデヒド・NAC
さ	シーマージェット	21A	1A	テブフェンピラド・BPMC
	シバラック	1A	1B	BPMC・MEP
	ジュリボ	28	4A	クロラントラニリプロール・チアメトキサム
	スタークルトレボン	3A	4A	エトフェンプロックス・ジノテフラン
	スターマイト	25A	21A	シエノピラフェン・ピリダベン
	スミソン	1B	1B	マラソン・MEP
	スミチオントレボン	3A	1B	エトフェンプロックス・MEP
	スミバッサ	1A	1B	BPMC・MEP
	スミロディー	3A	1B	フェンプロパトリン・MEP
	セルオー	4A	28	イミダクロプリド・フルベンジアミド

	農薬名の例示 (剤型省略)	有効成分 1 のサブ グループ	有効成分 2 のサブ グループ	有効成分名 (1・2)
	ソウヘキ	28	29	シクラニリプロール・フ ロニカミド
た	タイクーン	19	16	アミトラズ・ブプロフェ ジン
	ダニトップ	10B	21A	エトキサゾール・ピリミ ジフェン
	ダニハチ	25A	21A	シフルメトフェン・トル フェンピラド
	ダニメツ	10B	-	エトキサゾール・オレイ ン酸ナトリウム
	タフスティンガー	4A	28	イミダクロプリド・フル ベンジアミド
	タフバリアDXフ ロアブル	4A	28	イミダクロプリド・フル ベンジアミド
	ダブルシューター	-	5	脂肪酸グリセリド・スピ ノサド
	ダブルフェース	25B	21A	ピフルブミド・フェンピ ロキシメート
	ダントツパダン	14	4A	カルタップ・クロチアニ ジン
	茶ちゃっと	10B	21A	エトキサゾール・ピリミ ジフェン
	ツインアタック	28	4A	シアントラニリプロー ル・チアメトキサム
	デニムフィット	6	15	エマメクチン安息香酸 塩・ルフェヌロン
	トラサイドA	1B	1B	マラソン・ME P
	トレボンスター	3A	4A	エトフェンプロックス・ ジノテフラン
は	パーマチオン	3A	1B	フェンバレレート・ME P
	ハクサップ	3A	1B	フェンバレレート・マラ ソン

	農薬名の例示 (剤型省略)	有効成分 1 のサブ グループ	有効成分 2 のサブ グループ	有効成分名 (1・2)
	パダントレボン	3A	14	エトフェンプロックス・カルタップ
	パダンバッサ	14	1A	カルタップ・B PMC
	パダンベスト	14	4A	カルタップ・ニテンピラム
	ビリーブ	3A	15	シハロトリン・ジフルベンズロン
	ビルク	10B	3A	エトキサゾール・フェンプロパトリン
	ファルコンエース	5	18	スピノサド・メトキシフェノジド
	フェルテラスタークル	28	4A	クロラントラニリプロール・ジノテフラン
	フェルテラチェス	28	9B	クロラントラニリプロール・ピメトロジン
	プリンススピノ	5	2B	スピノサド・フィプロニル
	ベジホン	1B	3A	ジメトエート・フェンバレレート
	ベジリード	4A	5	クロチアニジン・スピネトラム
	ベニカ J	4A	3A	クロチアニジン・フェンプロパトリン
	ベニカケムシエアゾール	4A	3A	クロチアニジン・フェンプロパトリン
	ボクシー	4A	5	クロチアニジン・スピネトラム (イソチアニル)
	ボリアムガンダム	6	28	エマメクチン安息香酸塩・クロラントラニリプロール
ま	マトリックジョーカー	18	3A	クロマフェノジド・シラフルオフエン
	マラバッサ	1B	1A	マラソン・B PMC

	農薬名の例示 (剤型省略)	有効成分 1 のサブ グループ	有効成分 2 のサブ グループ	有効成分名 (1・2)
	ミネクトスター	28	9B	シアントラニリプロール・ピメトロジン
	ミネクトデュオ	28	4A	シアントラニリプロール・チアメトキサム
	メインスプリング フローラ	28	9B	シアントラニリプロール・ピメトロジン
	メビウス	6	10B	アバメクチン・エトキサゾール
ら	ラビキラー	1B	1B	ME P・P A P
	ランダイヤ	1B	1A	ダイアジノン・メソミル
	リーズン	4A	15	チアメトキサム・ルフエヌロン
わ	ワークワイド	4A	5	イミダクロプリド・スピノサド
	ワンリード	4A	5	クロチアニジン・スピネトラム

執筆者一覧

農研機構（国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構）

農業情報研究センター 山中武彦

東北農業研究センター 上杉龍士

中央農業研究センター 日本典秀

九州沖縄農業研究センター 松村正哉

九州沖縄農業研究センター 眞田幸代

九州沖縄農業研究センター 藤井智久

九州沖縄農業研究センター 秋月岳

果樹茶業研究部門 土田聡

果樹茶業研究部門 須藤正彬

野菜花き研究部門 太田泉

野菜花き研究部門 飯田博之

生物機能利用研究部門 中島信彦

生物機能利用研究部門 上樂明也

生物機能利用研究部門 浅野美和

農業環境変動研究センター 山村光司

大阪府環境農林水産総合研究所 柴尾学

静岡県農林技術研究所 土井誠

静岡県農林技術研究所茶業研究センター 内山徹

長野県野菜花き試験場 北林聡

奈良県農業研究開発センター 井村岳男

奈良県農業研究開発センター 國本佳範

和歌山県農業試験場 岡本崇

和歌山県農業試験場 井口雅裕

熊本県農業研究センター 古家忠

大分県農林水産研究指導センター 竹内実

宮崎県総合農業試験場 松浦明

京都大学大学院 刑部正博

宇都宮大学 園田昌司

日本農薬株式会社 藤岡伸祐

日本曹達株式会社 山本敦司

担当者・協力者一覧：秋月岳、浅野美和、有本誠、飯田博之、上杉龍士、太田泉、神村学、北村登史雄、後藤千枝、眞田幸代、篠田徹郎、上樂明也、末次克行、須藤正彬、瀬筒秀樹、大門高明、武田光能、土田聡、中島信彦、野田隆志、野田博明、日本典秀、藤井智久、松倉啓一郎、松村正哉、三代浩二、宮本和久、山本公子、山村光司、山中武彦、横井翔、和田早苗（以上農研機構）、武澤友二（北海道中央農試）、岩崎暁生（北海道中央農試）、荻野瑠衣（北海道中央農試）、橋本直樹（北海道中央農試）、横山朋也（茨城園研）、高木素紀（茨城園研）、草野尚雄（茨城園研）、窪田直也（茨城園研）、鹿島哲郎（茨城園研）、小河原孝司（茨城園研）、桑澤久仁厚（長野野花試）、増澤高亨（長野野花試）、杉山薫（長野野花試）、吉沢栄治（長野野花試）、野口忠久（長野野花試）、北林聡（長野野花試）、金子政夫（長野野花試）、内山徹（静岡茶研セ）、小澤朗人（静岡茶研セ）、吉田達也（静岡茶研セ）、土井誠（静岡農林技研）、中野亮平（静岡農林技研）、石川隆輔（静岡農技研）、片山晴喜（静岡農技研）、斎藤千温（静岡農技研）、柴尾学（大阪環農水研）、城塚可奈子（大阪環農水研）、濱崎健児（大阪環農水研）、金子修治（大阪環農水研）、國本佳範（奈良農研セ）、竹中勲（奈良農研セ）、今村剛士（奈良農研セ）、神川諭（奈良農研セ）、井村岳男（奈良農研セ）、木矢博之（奈良農研セ）、山口貴大（奈良農研セ）、岡本崇（和歌山農試）、井口雅裕（和歌山農試）、林恭弘（和歌山農試）、岩橋良典（和歌山農試）、薮野佳寿郎（和歌山農試）、古家忠（熊本農研セ）、樋口聡志（熊本農研セ）、本田裕貴（熊本農研セ）、岡崎真一郎（大分農林水産研）、姫野和洋（大分農林水産研）、井上美樹（大分農林水産研）、野村雄太（大分農林水産研）、山崎真居（大分農林水産研）、山村駿太郎（大分農林水産研）、竹内実（大分農林水産研）、松浦明（宮崎総農試）、日高春美（宮崎総農試）、寺本敏（宮崎総農試）、竹原剛史（宮崎総農試）、下大園佳由（宮崎総農試）、園田昌司（元岡山大／宇都宮大）、黒川竜紀（京都大）、森泰生（京都大）、森誠之（京都大）、刑部正博（京都大）、松田一彦（近畿大）、伊原誠（近畿大）、坂田和之（日本農薬(株)）、西松哲義（日本農薬(株)）、犬飼佳代（日本農薬(株)）、藤岡伸祐（日本農薬(株)）、山本敦司（日本曹達(株)）、平田晃一（日本曹達(株)）、清田隆太郎（日本曹達(株)）、金澤潤（日本曹達(株)）、岩佐孝男（日本曹達(株)）

本資料掲載ホームページアドレス

http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/publication/pamphlet/tech-pamph/121745.html

内容に関する問い合わせ窓口

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

prmq@ml.affrc.go.jp

生物機能利用研究部門 029-838-7419 (代表)

029-838-6071 (昆虫制御研究領域長)