

トビイロウンカ幼虫の齢期内発育に伴う ブプロフェジンに対する感受性変動¹⁾

栗山 研・山口力雄

日本農薬株式会社総合研究所

Changes in Susceptibility to Buprofezin Following Ecdysis in Nymphs of Brown Planthopper, *Nilaparvata lugens*. Ken Kuriyama and Rikio Yamaguchi (Research Center, Nihon Nohyaku Co., Ltd., 345, Oyamada-cho, Kawachinagano, Osaka 586-0094, Japan). *Jpn. J. Appl. Entomol. Zool.* 44: 134-137 (2000)

Abstract: The effect of buprofezin as a molting interferent was investigated in nymphs of *Nilaparvata lugens*. When susceptibility to buprofezin was examined in 4th-instar nymphs by 6 h split-feeding with treated rice plants or topical application, susceptibility varied remarkably with 4th-instar nymphal development. The values for LC₅₀ by feeding test and LD₅₀ by topical application in the 0-6 h after 3rd ecdysis were 570 ppm and 21.2 ng/nymph, respectively. The most susceptible period in 4th-instar nymphs is 40-50 h after the 3rd ecdysis when the LC₅₀ and LD₅₀ values are 0.47 ppm and 0.281 ng/nymph, respectively. The susceptibility to buprofezin decreased again after 54 h (approximately 10 h before the next ecdysis). These changes in susceptibility to buprofezin may be linked to physiological changes following development after ecdysis in nymphs. To avoid an unstable LC₅₀ value, continuous contact and/or feeding is recommended for buprofezin laboratory tests.

Key words: *Nilaparvata lugens*, buprofezin, change of susceptibility

ブプロフェジンは主にトビイロウンカ *Nilaparvata lugens* を含む半翅目昆虫に対して活性を示す昆虫成長制御剤 (IGR) で、その主作用は対象昆虫の幼虫に対する脱皮阻害作用である (Kanno et al., 1981; Asai et al., 1983)。トビイロウンカ幼虫を用いた作用機作研究として、幼虫の脱皮期の外骨格形成を対象とした組織学的研究および放射ラベルをしたキチン前駆体の取り込み実験が行われ、新クチクラ層形成の部分的阻害並びにキチン生合成量の低下が認められており、幼虫の外骨格形成に影響を及ぼすことが明らかとなっている (Uchida et al., 1985)。

一方、内分泌系、特に脱皮ホルモンが幼虫発育の特定の時期に作用して脱皮を制御していることも良く知られた事実である (Loche, 1985; Nijhout, 1994)。脱皮ホルモンの一つである 20-ヒドロキシエクダイソン (20-HE) はブプロフェジンの活性発現に対して拮抗的に作用し、また、ブプロフェジン自身も幼虫の 20-HE 濃度に影響を及ぼすことが報告されており、内分泌系がその作用発現に関与することが示されている (Uchida et al., 1986; Kobayashi et al., 1989)。

そこで、本研究では、トビイロウンカ幼虫を用いてブプロフェ

ジンを齢期間内の種々の限定した時期に処理し、齢期内の発育時期とブプロフェジン感受性との関係を検討した。

材料および方法

1. 供試虫

トビイロウンカは 1983 年に和歌山県有田市で採集した個体群を、温度条件 25°C、明暗サイクル 16L 8D に調節した室内で、イネ実生を飼料に用いて累代飼育した系統を用いた。実験に用いた 4 齢幼虫は、予め脱皮後 3 時間以内の個体を 1 群として集め、供試齢を時間単位で管理した。本飼育条件で無処理区の 4 齢幼虫は脱皮後 63 時間を平均とする 54~72 時間までの間に 5 齢脱皮を完了した (Table 2)。

2. 薬剤感受性試験

トビイロウンカ幼虫の薬剤感受性試験は、水和剤あるいは乳剤を処理したイネ葉鞘に供試虫を放飼する接触試験法と原体の溶媒溶液を塗布する局所施用法により実施した。

接触試験法には、ブプロフェジン水和剤 (商品名、アブロード)、フェノブカルブ乳剤 (商品名、パッサ)、ダイアジノン乳剤 (商品名、ダイアジノン、以上日本農薬)、エトフェンプロックス乳剤 (商品名、トレボン、三井化学) を供試した。約 10 cm に切り揃えたイネ葉鞘を脱イオン水で所定濃度に希釈した薬液に 30 秒間浸漬処理し、風乾後、直径 2 cm、高さ 20 cm の試験管に 1 ml の水道水とともに入れた。接触処理は、脱皮後時間の異なる 4 齢幼虫を、6 時間だけ処理イネ葉鞘と接触させ、他の期間は無処理のイネで飼育した。生死の判定は無処理区が 5 齢脱皮を完了する 4 齢脱皮後 72 時間に行った。なお、脱皮不全で正常歩行のできない個体は死虫と判定した。LC₅₀ 値は Finney (1971) のプロビット法に従って計算した。1 処理時期あたり 4 濃度区以上供試し、1 濃度あたりの供試数は 10 頭とし、試験は 6 回反復した。

局所施用法には、ブプロフェジン原体 (日本農薬) をアセトン/ジメチルホルムアミド (容量比 5/1) に溶解し、同溶媒で希釈して用いた。ガラスキャピラリー (Narishige Sci. Inst. Lab., Type G-1) をパラフィンをういて装着したマイクロシリンジに薬液を充填し、マイクロアプリーケーター (Arnold, Type LV-65) を用いて、脱皮後の時間が異なる 4 齢幼虫に、炭酸ガス麻酔をして腹部腹面に 0.05 μl ずつ処理した。処理虫は 1 ml の水道水とイネ葉鞘を入れた試験管に 10 頭ずつ入れ、25°C の室内に置いた。生死の判定は接触試験法と同様溶媒対照区が 5 齢脱皮を完了する 4 齢脱皮後 72 時間に行った。1 処理時期あたり 4 濃度区以上供試し、1 濃度あたりの供試数は 30~40 頭とし、試験は 2 回反復した。LD₅₀ 値はプロビット法に従って計算した。なお、LD₅₀ 値の表示には齢期内で幼虫の体重が増加し処理時期と死亡時期に時間差があるため個体あたりの投与量の ng/nymph で示した (Table 2)。

¹⁾ 本報告の一部は、第 31 回日本応用動物昆虫学会大会 (1987 年 9 月、筑波) で発表した。

日本応用動物昆虫学会誌 (応動昆) 第 44 巻 第 2 号: 134-137 (2000)

1999 年 10 月 25 日受領 (Received 25 October 1999)

2000 年 1 月 12 日登載決定 (Accepted 12 January 2000)

結 果

1. 接触法による4齢幼虫期内のLC₅₀値の変動

トビイロウンカ4齢幼虫にイネ葉鞘経由でブプロフェジンに6時間だけ接触させると、齢期内の時間帯によってLC₅₀値は大きく変動した (Table 1). 対照薬剤のフェノブカルブ、ダイアジノンおよびエトフェンプロックスでは齢期内でほとんど変動はなく、齢期を通して接触させた場合と比較しても接触時間を積算した数倍程度の差が認められただけであった。ブプロフェジンに対するLC₅₀値は、4齢脱皮直後の0~6時間に接触させると570 ppmであったがその後齢期間が経過するに従って低下し、4齢脱皮後42~48時間および48~54時間の時間帯で感受性は高まってLC₅₀値でそれぞれ0.47 ppm および0.71 ppm に達した。脱皮直後と感受性の最も高まる42~48時間とのLC₅₀値の差は1,000倍以上であった。この時期以後の感受性は、54時間以後、即ち、

5齢脱皮の約10時間前に急激に低下した。また、感受性の最も高まった42~48時間のLC₅₀値と4齢期間を通して接触させたLC₅₀値はそれぞれ0.47 ppm と0.46 ppm とほぼ一致した。

2. 局所施用法によるLD₅₀値の変動

接触法では製剤中の有効成分がイネから経口的にトビイロウンカに食下される等の変動要因の影響の可能性も考えられたので、局所施用法でも検討した。トビイロウンカ4齢の任意の時点でブプロフェジンを経皮投与すると、そのLD₅₀値は接触法でのLC₅₀値の変動とはほぼ同様のパターンで変動した (Table 2)。4齢脱皮直後の時点では21.2 ng/nymphであったLD₅₀値が4齢期の経過とともに感受性が高まり、40~53時間後には0.2~0.4 ng/nymphと感受性は最大値を示した。以後5齢脱皮約10時間前にLD₅₀値は急速に増大し、感受性は減退した。薬剤の処理法を変えた局所施用法でも接触法と同様4齢脱皮後40~50時間後付近に感受性の極大時期があり、5齢脱皮約10時間前に感受性が低下する

Table 1. LC₅₀ values for 4th-instar nymphs of *N. lugens* to buprofezin, fenobucarb, diazinon and ethofenprox in 6-h feeding test

| Treatment period (h after ecdysis) | LC ₅₀ in ppm (95% confidence limits) | | | |
|---------------------------------------|---|--------------|----------------|--------------|
| | Buprofezin | Fenobucarb | Diazinon | Ethofenprox |
| 0-6 | 570 (260-1,370) | 11 (1.5-83) | 8.5 (4.8-14) | 14 (6.5-17) |
| 6-12 | 130 (86-190) | | | |
| 12-18 | 210 (110-360) | | | |
| 18-24 | 66 (34-100) | | | |
| 24-30 | 85 (50-140) | 16 (3.5-29) | 8.8 (5.3-13) | 17 (11-25) |
| 30-36 | 29 (11-86) | | | |
| 36-42 | 2.5 (1.3-4.7) | | | |
| 42-48 | 0.47 (0.37-3.4) | | | |
| 48-54 | 0.71 (0.42-1.2) | 20 (9.5-87) | 12 (8.9-17) | 13 (5.8-21) |
| 54-60 | 120 (79-182) | | | |
| continuous (0-72) | 0.46 (0.30-0.74) | 7.8 (4.9-13) | 2.0 (0.24-3.0) | 5.7 (1.7-19) |

Table 2. Changes in LD₅₀ values for 4th-instar nymphs of *N. lugens* following topical application of buprofezin

| Treatment time (h after ecdysis) | LD ₅₀ in ng/nymph (95% confidence limits) | Body weight (mg) | Percentage of next ecdysis |
|-------------------------------------|---|---------------------|-------------------------------|
| 0 | 21.2 (15.5-26.9) | 0.38 | 0 |
| 6 | 15.4 (14.0-17.0) | 0.42 | |
| 22 | 4.22 (1.24-6.26) | 0.46 | |
| 29 | 2.07 (1.07-2.94) | 0.52 | 0 |
| 32 | 2.48 (1.73-3.45) | 0.56 | |
| 36 | 1.38 (1.01-1.89) | 0.59 | |
| 40 | 0.344 (0.225-0.551) | 0.65 | |
| 44 | 0.281 (0.201-0.386) | 0.69 | 0 |
| 46 | 0.396 (0.240-0.666) | 0.71 | 0 |
| 53 | 0.411 (0.189-0.713) | 0.74 | 3 |
| 57 | 120 (87.7-152) | 0.76 | 5 |
| 59 | | | 10 |
| 62 | | | 40 |
| 63 | | | 55 |
| 65 | | | 85 |
| 72 | | | 100 |

現象が認められた。

考 察

昆虫に対して致死以外の作用を含めた生理作用を及ぼす薬剤の中で、神経系に作用する有機リン剤や合成ピレスロイド剤化合物では、対象昆虫の発育時期によって感受性の変動する例はいくつか報告されているが、いずれの報告例でも数倍～数十倍までの変化で、その要因としても幼虫期発育における体重増や齢期の経過に伴う薬物解毒代謝酵素の活性増大等で説明されている (Gast, 1959; Ahmad and Forgash, 1975; Mullins and Pieters, 1982)。本報告のプロフェジンに対するトビロウシカカガの感受性変動のような1,000倍以上の変化の報告例はない。

対象昆虫の発育時期によってその感受性の変動する例として幼若ホルモン (JH) 様化合物が知られている。この活性が変化する理由としては、JH 濃度が減少する時期の存在があり、この時期の前後だけ JH 様化合物が有効であるためとされている (Schooneveld et al., 1977; Kono et al., 1997)。

一方、脱皮に関連した作用を示す化合物としてエクダイソンアゴニスト様薬剤のテブフェノジドおよびその類縁化合物が知られている (Aller and Ramsay, 1988; Dhadialla et al., 1998) が、これら薬剤においても齢期内での感受性変動の報告例はない。

プロフェジンのような脱皮阻害作用を示す薬剤としてベンゾイルフェニルウレア化合物が知られているが、対象昆虫の齢期内において感受性の極大期が存在する報告例はない。幼虫ではなく蛹を用いてジフルベンズロンに対する感受性をチャイロコメノゴミムシダマシを用い局所施用法で試験した例では、脱皮直後の感受性が最も高く齢期が進むにつれて低下する (Soltani et al., 1983)。これは、齢期が進むと皮膚の硬化が進み薬剤透過性が低下するため、硬化が進んだ羽化前でも薬剤を注射すれば活性を維持しており、基本的に齢期のどの時期でも薬剤が虫体内に入れは有効とされている。また、オオモンシロチョウ幼虫において、組織学的観察によればジフルベンズロンの影響は脱皮直後の幼虫においても皮膚組織やクチクラ構造の異常として確認され、個体としての致死作用は次の脱皮期に観察されるという報告もある (Mauchamp and Perrineau, 1987)。

本報告で見出されたプロフェジンに対するトビロウシカカの齢期内感受性の大きな変動は、プロフェジンが脱皮ホルモンから誘起される次齢への脱皮に関連した種々の生理的变化 (Loche, 1985; Nijhout, 1994) のいずれかを阻害している可能性を示唆すると考えられた。体液中濃度ではなく虫体中濃度を測定した実験ではあるが、20-HE の濃度のピークがトビロウシカカ幼虫において4齢脱皮後24時間と33時間にあり、42時間後にはほぼ消失すること、また、この時光学顕微鏡による観察からアポリシス以後の旧クチクラ層の消化と新クチクラ層形成が強く阻害されていること (Kobayashi et al., 1989) が知られている。これらの知見を併せて考察すると、トビロウシカカ4齢幼虫脱皮後40～50時間にプロフェジンに対する感受性の極大期が存在することは、プロフェジンの作用点が20-HEによる脱皮期誘起以後のホルモン濃度の減衰期に起こる生理現象、例えば、一般的に支持されて

いるものとして旧クチクラ層消化やエクソクチクラ層形成等 (Riddiford, 1985) があり、これらに關与する何らかの代謝系を阻害することを強く示唆する。

接触法での感受性変動幅が約1,000倍で、局所施用法では約100倍の変動幅と処理方法によって変動幅に差が認められた。これは、接触法では6時間にわたってトビロウシカカがイネ葉鞘上のプロフェジンと接触し、虫体への取り込みが継続したのに比べ、局所施用法は1時点の投与であり、その作用発現に要する時間内に代謝分解等の影響を受けたためと考えられる。

本報告で認められたトビロウシカカ4齢幼虫における感受性変動は、3齢および5齢幼虫においても、さらに、ツマグヨコバイ等においても同様に発現している (著者ら、未発表)。従って、プロフェジンが脱皮阻害活性を示す対象昆虫において、脱皮前の特定の時期に感受性の極大期が存在することは共通した現象であると考えられる。

本報告のように齢期内の感受性に変動現象が認められる場合、薬剤感受性検定を行うに際してその検定法を考慮する必要がある。一般に殺虫剤の感受性検定法として多くの場合局所施用法が用いられているが、トビロウシカカのプロフェジンに対する感受性検定に用いる場合、供試虫の感受性の極大期を使用個体群で確認し、その時期に限定した処理を行う必要が生じ、煩雑となる。簡便かつ安定した検定結果を得るためには、本報告でも実施したように飼料植物にプロフェジンを処理し、対象昆虫の齢期を通して薬剤と接触あるいは食下させる方法が適している。

引用文献

- Ahmad, S. and A. J. Forgash (1975) *J. Econ. Entomol.* 68: 803-806.
- Aller, J. A. and J. R. Ramsay (1988) In *Proceeding of 1988 Brit. Crop Protect. Conf. Pests Diseases, Vol. 2*. The British Crop Protection Council, Brighton, UK, pp. 511-518.
- Asai, T., M. Fukada, S. Maekawa, K. Ikeda and H. Kanno (1983) *Appl. Entomol. Zool.* 18: 550-554.
- Dhadialla, T. S., G. R. Carlson and D. P. Le (1998) *Ann. Rev. Entomol.* 43: 545-569.
- Finney, D. J. (1971) *Probit Analysis*. 3rd ed. Cambridge University Press, London. 383 pp.
- Gast, R. T. (1959) *J. Econ. Entomol.* 52: 1115-1117.
- Kanno, H., K. Ikeida, T. Asai and S. Maekawa (1981) In *Proceeding of 1981 Brit. Crop Protect. Conf. Pests Diseases, Vol. 1*. The British Crop Protection Council, Brighton, UK, pp. 59-66.
- Kobayashi, M., M. Uchida and K. Kuriyama (1989) *Pestic. Biochem. Physiol.* 34: 9-16.
- Kono, Y., K. Omata-Iwabuchi and M. Takahashi (1997) *Med. Entomol. Zool.* 48: 85-89.
- Loche, M. (1985) In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert eds.), Vol. 2. Pergamon, New York, pp. 87-149.
- Mauchamp, B. and O. Perrineau (1987) In *Chitin and Benzoyl-phenyl Ureas* (J. E. Wright and A. Retnakaran eds.). Dr. W.

- Junk Publishers, AD Dordrecht, The Netherlands, pp. 101-109.
- Mullins, W. and E. P. Pieters (1982) *J. Econ. Entomol.* 75: 40-42.
- Nijhout, H. J. (1994) In *Insect Hormones*. Princeton University Press, Princeton, New Jersey, pp. 89-141.
- Riddiford, L. M. (1985) In *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology* (G. A. Kerkut and L. I. Gilbert eds.), Vol. 8. Pergamon, New York, pp. 37-84.
- Schooneveld, H., A. O. Sanchez and J. De Wilde (1977) *J. Insect Physiol.* 23: 689-696.
- Soltani, N., J-P. Delbecque and J. Delachambre (1983) *Pestic. Sci.* 14: 615-622.
- Uchida, M., T. Asai and T. Sugimoto (1985) *Agric. Biol. Chem.* 49: 1233-1234.
- Uchida, M., Y. Izawa and T. Sugimoto (1986) *Agric. Biol. Chem.* 50: 1913-1915.
-