

Hive entrance smearing behavior of *Apis cerana japonica* in response only to *Vespa mandarinia* attacks: First report on the use of diverse organisms by worker bees in emergency situations

Ayumi Fujiwara¹, Yumiko Fujiwara²

^{1,2}General Incorporated Association, The Japanese Native Honey Bee Association, 2nd Floor, Ogasawara Building, 1-11-25 Honcho-dori, Morioka City, Iwate, Japan

Corresponding author: Ayumi Fujiwara

E-mail: fujiwara328@gmail.com

Abstract

Vespa mandarinia is a formidable predator that attacks the hives of *Apis mellifera* and *Apis cerana japonica* in the autumn, sometimes resulting in their complete destruction. *A. c. japonica* is known to defend their hives from *V. mandarinia* by forming a "hot defensive bee ball" to kill the scout hornets and subsequently repelling the devastating mass attacks. Since 2011, the authors' ongoing investigations have revealed that immediately after the attack of *V. mandarinia* scouts at the hive, worker bees of *A. c. japonica* collect and smear leaves, buds, and other parts of several plant species around the hive entrance and perform a unique emergency dance (Fujiwara et al. 2016, 2017, Fujiwara 2020). Furthermore, we demonstrated that these behaviors are exclusively observed in response to *V. mandarinia* and not exhibited towards other hornet species (Fujiwara et al. 2016, 2017).

In this study, from 2011 to 2015, the smearing behavior of worker bees was recorded and verified using video cameras. In the autumn of 2015, smearing materials were observed using a microscope, multiple species of insects and a large number of materials from unknown organisms were found. Additionally, in the autumn of 2016, following a simulated attack by *V. mandarinia*, it was observed through field surveys and marking of individual worker bees that worker bees gnawed mushrooms growing near their hives and subsequently returned to the hive to smear them around the hive entrance.

In the autumn of 2017, it was confirmed that worker bees carried larva of moth and Diptera and pupa of Diptera in their mandibles back to the hive and smeared them around the hive entrance. These insect individuals were all in a fresh state, and individuals with bodily fluids emanating from wounds were also observed. These evidences strongly supported the conclusion that the insects were alive immediately prior to capture. The

behavior of *A. c. japonica* capturing live insects in the field to defend their hives against *V. mandarinia* and bringing them back to smear around the hive entrance was, to the best of the authors' knowledge, reported for the first time in this study.

To comprehensively understand the organisms utilized worker bees for nest defense, smearing materials were collected from six colonies maintained at three survey sites with distinct surrounding environments in the autumn of 2021, and DNA analysis was conducted. In this study, to minimize the risk of contamination from other organisms or their fragments and to prevent DNA degradation when collecting materials from the hive, we collected fresh materials as soon as possible after they were smeared, rather than materials that had accumulated. Furthermore, we collected smearing materials directly from returning worker bee individuals. The DNA analyses were outsourced to Bioengineering Lab Co., Ltd. The analysis revealed 30 families and 39 genera of plants, 25 families and 31 genera of insects, 28 families and 38 genera of fungi (*Agaricomycetes*), 11 families and 15 genera of mammals, and 11 families and 13 genera of birds. In addition to this study, diverse organisms including algae, bryophytes, fish, and crustaceans have been detected through DNA analysis of materials conducted separately since 2015.

In this study, we discovered and demonstrated for the first time—through the use of multiple methods, including behavioral observations of worker bees, examination of smearing materials, and DNA analysis—that *A. c. japonica* utilize a variety of organisms as smearing materials in response to attacks by the predator hornet *V. mandarinia*. Furthermore, we were able to grasp how organisms were collected by worker bees and the process through which they were smeared onto the hive, which cannot be fully understood through DNA analysis alone.

Through comparing materials collected from three different regions, characteristic utilization trends of diverse organisms reflecting variations in natural environments and biota were observed. Furthermore, rare organisms such as *Nisaetus nipalensis*, a nationally scarce species of wild fauna and flora in Japan, were also detected. These findings suggest that the DNA analysis of smeared materials can help understand rare species and wildlife that are challenging to detect visually. Moreover, this approach may serve as a new tool to understand the connection between local biota, natural ecosystems, and the *A. c. japonica*.

Keywords

Japanese Honeybee, Asian Giant Hornet, Smeared Materials, Plants, Mushrooms, Insects, Animals, Defensive Behavior, Hive Entrance Smearing Behavior

天敵オオスズメバチの攻撃に対してのみ行うニホンミツバチの巣の出入口周囲における塗り付け行動：緊急時に塗り付け物質として利用する多様な生物の新発見

藤原 愛弓¹, 藤原 由美子²

^{1,2}一般社団法人日本在来種みつばちの会 岩手県盛岡市本町通 1-11-25 小笠原ビル 2F

連絡著者: 藤原愛弓

E-mail: fujiwara328@gmail.com

要旨

オオスズメバチ *Vespa mandarinia* は、秋季にセイヨウミツバチ *Apis mellifera* やニホンミツバチ *Apis cerana japonica* の巣を集団で攻撃し、時には全滅させる天敵である。ニホンミツバチは、オオスズメバチの斥候個体に対して蜂球を形成して熱殺し、その後の壊滅的な集団攻撃から巣を防衛しようとするのが知られている。著者らの 2011 年からの研究により、オオスズメバチの斥候が巣に飛来した直後に、ニホンミツバチの働き蜂が巣の出入口周囲に複数種の植物の葉や芽を塗りつけ、その際に特有の緊急ダンスを踊ることが明らかになった (Fujiwara et al. 2016, 2017, Fujiwara 2020)。また、これらの行動はオオスズメバチに対してのみ行われ、他のスズメバチ種に対しては行われなかったことが証明された (Fujiwara et al. 2016, 2017)。

本研究では、2011 年から 2015 年にかけて、ビデオカメラで働き蜂の塗り付け行動を記録し検証した。2015 年秋季に、顕微鏡を使用して塗り付け物質を観察したところ、複数種の昆虫と、正体不明の生物に由来する物質を多数見つけた。また、2016 年秋季には、野外調査と働き蜂個体のマーキングにより、オオスズメバチの模擬襲撃後に働き蜂が巣箱近傍に生育するキノコを齧り、その後巣箱に戻り巣の出入口周囲に塗りつける行動が観察された。

2017 年秋季には、働き蜂がガ類の幼虫や双翅目の幼虫や蛹を大顎に啜って巣箱に持ち帰り、巣の出入口周囲に塗りつける行動が確認された。これらの昆虫個体はいずれも新鮮な状態であり、傷口から体液が出ている個体も見られた。これらの証拠は、昆虫が捕獲される直前まで生きていたことを強く支持していた。ニホンミツバチがオオスズメバチから巣を防衛するために野外で生きた昆虫類を捕獲し、巣箱に持ち帰って巣の出入口周囲に塗り付ける行動は、著者らが知る限り本研究が初の報告となる。

ニホンミツバチが巣の防衛のために利用する生物をより包括的に把握するため、2021 年秋季に、周辺環境の異なる 3 つの調査地点で飼育されている、計 6 群から塗り付け物質を採取し DNA 分析を行った。本研究では巣箱から物質を採取する際、他の生物やその断片の混入リスクを最小限に抑え、DNA の劣化を防ぐために、蓄積された物質ではなく、働き蜂が塗り付けた直後の物質を可能な限り早く採取した。また、帰巢する働き蜂から直接物質を採取した。それらの新鮮なサンプルを用いて、アンプリコンシーケンス解析による DNA 分析を実施した。これらの DNA 解析は、株式会社生物技研に委託した。分析の結果、植物類 30 科 39 属、昆虫類 25 科 31 属、菌類 28 科 38 属、哺乳類 11 科 15 属、鳥類 11 科 13 属が検出された。また本研究に加えて、2015 年以降に別途実施した物質の DNA 分析からも、藻類、苔類、魚類、甲殻類等を含む多様な生物が検出された。

本研究では、天敵オオスズメバチの襲撃という緊急時に際して、ニホンミツバチが多様な生物を塗り付け物質として利用していることを、働き蜂の行動調査、塗り付け物質の観察、DNA 分析等の複数の手法を用いて初めて明らかにした。また、DNA 分析のみからでは把握することができない、生物がどのような状態で採集され、どのような過程を経て巣箱に塗り付けられたのかを把握することができた。

3 つの異なる地域で採取された物質の比較により、各地域の自然環境や生息生物相の違いを反映する特徴的な生物の利用傾向がみられた。また、国内希少野生動植物種として指定されているクマタカ *Nisaetus nipalensis* などの希少な生物も検出された。これらの成果は、塗り付け物質の DNA 分析により、目視では確認の難しい希少種や野生生物を把握できる可能性を示すとともに、ニホンミツバチと地域の生物相や自然生態系との繋がりを理解するための新たな手段として利用できると考えられる。

キーワード

ニホンミツバチ、オオスズメバチ、塗り付け物質、植物、キノコ、昆虫、動物、防衛行動、巣の出入口の塗り付け行動

背景

ニホンミツバチ *Apis cerana japonica* は、アジアに広く分布するトウヨウミツバチの 1 亜種であり、樹洞を本来の営巣場所とする日本の在来種である(佐々木 1999)。その生息域には、主に秋季に幼虫の餌とするために巣を襲撃する世界最大種のスズメバチ、オオスズメバチ *Vespa mandarinia* が生息している。本種は、セイヨウミツバチ *Apis mellifera* やニホンミツバチの群れを集団で攻撃し、時に全滅させる天敵である(松浦・山根 1984)。ニホンミツバチは、オオスズメバチに対する防衛戦略を進化させており、オオスズメバチの斥候個体を、蜂球の形成(Ono et al. 1995)と二酸化炭素濃度上昇(Sugahara & Sakamoto 2009)を組み合わせることで熱殺し、その後の壊滅的な集団攻撃から巣を防衛しようとすることが知られている。

オオスズメバチの襲撃時期である秋季にニホンミツバチが巣門の付近に汚物のような物質を塗りつける行動が報告されており(岡田 1997)、オオスズメバチに対する何らかの防衛手段であることが示唆されてきたが(佐々木 1999)、それらの汚物の具体的な構成内容については明らかにされてこなかった。著者らの 2011 年から 2015 年にかけての働き蜂の行動の継続的な研究により、働き蜂がタニソバ *Persicaria nepalensis* やイヌコウジュ *Mosla scabra* 等、複数の植物種の葉や芽等の植物片を齧って大顎に咥えて持ち帰り、巣の出入口周辺へ繰り返し塗りつける行動を盛んに行うことが初めて証明された(Fujiwara et al. 2016, 藤原 2020)。これらの植物種は、オオスズメバチが忌避する成分、もしくはオオスズメバチの餌場マーキングフェロモンの効果を減じるあるいは被覆する成分等を含有し、働き蜂が周囲に多数生育する植物種の中から選択的に利用している可能性が考えられる(Fujiwara et al. 2016)。

さらに著者らは、働き蜂が巣箱に塗り付ける物質(以下、塗り付け物質)の採集行動に伴い、巣の出入口周囲で、特有の緊急ダンス行動(“Emergency dance”と命名)が行われることを発見し、塗り付け行動とダンス行動は互いに密接な関係があることを証明した(Fujiwara et al. 2017)。働き蜂は、天敵であるオオスズメバチの襲撃という緊急事態に際し、同時期に花粉や花蜜を採集する植物と比較して、より近い場所にある植物を齧って巣に持ち帰っていた(Fujiwara et al. 2017)。このダンスを用いることで、巣の出入口周囲に塗り付けるための植物等の採集を効率的に行うと考えられ、これらの行動は群れの防衛のために重要な行動であることが示唆された(Fujiwara et al. 2017)。また、ニホンミツバチの塗り付け行動とダンスは、オオスズメバチに対してのみ行われ、他のスズメバチ種に対しては行われないことが証明された (Fujiwara et al. 2016, 2017)。

2011 年の秋季にニホンミツバチの働き蜂による塗り付け行動を調査していた際、タニソバやイヌコウジュのような植物 (図 1, Fujiwara et al. 2016, 藤原 2020) 以外の生物由来と考えられる物質の塗り付けが多数発見された。植物以外の生物に由来すると思われる物質は

2012年以降も毎年秋季に確認された(図2)。2015年10月7日に、著者らはニホンミツバチの巣箱に塗り付けられた物質を採取し、同年11月6日と12月7日にそれらを実体顕微鏡(Hirox Co., Ltd., Digital Microscope RH-2000, MXB-2016Z)を用いて観察、撮影した。その際、植物の葉、花卉、種子などの植物片の他、ガ類の幼虫(図3)やアブラムシ類などの複数種の昆虫が、物質中に含まれていることを発見した。物質中に含まれていたガ類の幼虫は、齧られたような形跡があり、中には原形をとどめていないものもあった(図3)。そのため、これらの昆虫は、働き蜂により採集され巣箱に塗り付けられた可能性が考えられた。さらに昆虫以外にも、生物由来と考えられるが、正体が不明な多数の物質が含まれており、働き蜂が、植物以外にも昆虫類やその他の生物を利用している可能性が考えられた。

Mattila et al. (2020)の研究によると、ベトナムに生息するトウヨウミツバチの働き蜂が、集団攻撃を行う大型のスズメバチである *Vespa soror* の襲撃に際し、新鮮な鶏、豚、牛、水牛の糞を採集して巣箱に塗り付けることで、*V. soror* の巣箱への平均滞在時間が減少することが報告されている。また、著者らの野外調査でも、秋季に調査地の道路上でホンダタヌキ *Nyctereutes procyonoides viverrinus* の死骸を齧るニホンミツバチの働き蜂を目視で確認している(藤原ほか 未発表)。既存の研究や著者らのこれまでの調査から、ニホンミツバチも、集団攻撃を行うオオスズメバチに対して、様々な生物に由来する物質を利用して巣を防衛している可能性が考えられた。しかし、これまでニホンミツバチの働き蜂がどのような生物からどのようにして塗り付け物質を採集し持ち帰るのかの過程は明らかになっていない。また、これらの物質に含まれる生物を包括的に把握した研究も存在せず、異なる群間で共通の生物が利用されているのか、または周囲の環境や地域によって採集する生物が異なるのかについても不明である。本研究では、働き蜂による塗り付け物質の採集行動を調査し、その物質の観察およびDNA分析を通じて、これらの物質の採集過程及び含まれる生物を明らかにすることを目的とした。

方法

調査地

本研究は、岩手県内2地点と宮城県内1地点の計3地点において実施した。主な調査地は岩手県一関市に位置し、里山の再生活動に取り組む仏教寺院・知勝院が主導する自然再生推進法に基づく自然再生事業「久保川イーハトーブ自然再生事業」が実施されている地域である(久保川イーハトーブ自然再生協議会2009, 藤原ほか2014)。本地域は、落葉広葉樹林を主体とする森林、畦畔、畑地等の複合的なランドスケープ要素から成り(藤原ほか2014)、朝日新聞社と森林文化協会により制定された「日本の里100選」に選出されている。本事業では、管理放棄された山林や棚田などの植生管理や、溜池の侵略的外来種排除等、里地里山の生物多様性の保全・再生のための様々な活動や研究が進められている(久保川イ

ーハトーブ自然再生協議会 2009)。2023 年には、久保川イーハトーブ自然再生協議会のこれまでの保全活動が評価され、日本自然保護協会の日本自然保護大賞(保護実践部門)を受賞した。

約 1 年の予備調査期間を経て 2011 年 4 月より、著者らは知勝院の宿泊施設(ログハウス)に長期滞在しつつ、ログハウスの 1 階、2 階のベランダで継続的にニホンミツバチを飼育し(養蜂場 A : 38°92'77.14"N, 141°03'31.76"E)、本種に関するさまざまな生態研究を実施した。また、知勝院の職員らの協力を得て、養蜂場 A から直線距離で約 4 km 離れた知勝院の敷地内(周囲の環境は養蜂場 A と類似している)に本種の飼育用の小屋を作り、養蜂場 A と同様に、必要に応じて蜂群を設置、飼育した(養蜂場 B : 38°93'77.22"N, 140°99'00.49"E)。これらの養蜂場で、働き蜂による塗り付け行動や塗り付け物質に関する調査を実施した。

また 2021 年秋季に、周辺環境の大きく異なる他地域の群れと物質の構成内容を比較するため、ニホンミツバチの保護繁殖、生態研究、自然環境保全などを目的に活動する日本在来種みつばちの会(現一般社団法人日本在来種みつばちの会 : <https://nihon-bachi.org/> 2024 年 3 月 1 日確認)の協力を得て、岩手県盛岡市の住宅地と森林域の境にある養蜂場と、宮城県仙台市の住宅地内でニホンミツバチを飼育している場所を調査地とした。

塗り付け物質の採集と塗り付け行動に関する調査

著者らは、働き蜂による塗り付け行動と、塗り付け物質の構成内容を詳細に検討するため、2011 年から 2021 年にかけて、養蜂場 A, B で以下の調査を実施した。2011 年から 2015 年にかけて、適宜ビデオカメラを巣箱の前に設置し、物質の採集と塗り付けに関連する働き蜂の行動について撮影を実施するとともに、働き蜂の行動を個別に記録する際は手持ちのビデオカメラで映像や画像の撮影を行い、後程それらを検証した。

2015 年 10 月、養蜂場 A において、各巣箱に塗り付けられた物質の匂いを自身の鼻で嗅ぎ確認したところ、森林に生育するキノコのような独特の芳香があった。このことから、働き蜂がオオスズメバチの襲撃の際に、キノコ類も塗り付け物質として利用している可能性が示唆された。そこで 2016 年 9 月に養蜂場 A で、Fujiwara et al. (2016)と同様の方法でオオスズメバチの模擬襲撃を実施した後、巣箱が設置されたログハウス周囲の落葉広葉樹林(自然再生事業地内)の林道を中心に歩き、林内に生育するキノコ類を齧る働き蜂の存在を調査した。またその調査中、オオスズメバチの模擬襲撃を行った巣箱をビデオカメラで連続的に撮影した。キノコ類を訪れて齧る働き蜂が見つかった場合、その一部にマーキングを行うとともに、後程、撮影した映像を検証し、マーキング個体が巣箱に戻ったかを確認した。

また、働き蜂が持ち帰る物質中に昆虫類が含まれるかどうかの検証を行うため、2017 年 10 月に養蜂場 A で、オオスズメバチの模擬襲撃を実施した。その後、巣箱に帰巢した働き蜂を複数個体捕獲して、大顎に啜えている物質の画像や映像を記録するとともに、昆虫類

が含まれるか調査した。上記以外にも、2011年の秋季以降、養蜂場 A, B において、塗り付け行動や塗り付け物質の構成内容等を明らかにするために必要な調査を適宜実施した。なお、これらの調査の映像と画像の記録には、長時間撮影が可能なデジタルビデオ（SONY Co., Ltd. HDR-CX630V）やデジタルカメラ（OLYMPUS Co., Ltd. Tough TG-5）を主に用いた。

塗り付け物質の採取と DNA 分析

塗り付け物質の詳細な構成内容を明らかにするとともに、異なる群間や地域間で構成内容を比較するため、2021年9月～12月に、岩手県2地点と宮城県1地点において塗り付け物質を採取した。塗り付け物質のサンプル採取を行うニホンミツバチの群れの準備は、以下のように行った。2021年5月29日に、岩手県一関市内の古蔵に営巣していた野生のニホンミツバチ1群(古蔵の持ち主から営巣している群れの保護・移動の依頼を受けた)を、日本ミツバチ用現代式縦型巣箱(藤原ほか 2014)に著者らで保護した後、一関市内の里山地域にある、養蜂場 B に設置した。また、2021年6月26月に知人の養蜂家から入手したニホンミツバチ3群を、同様に養蜂場 B に設置し、その後秋季に調査を開始するまで、継続的にこれら4群を飼育した。

ニホンミツバチの群れからのサンプル採取は以下のように実施した。働き蜂が塗り付け行動を行う主な場所である巣箱の出入口周囲に、白い片面粘着テープを広く覆うように貼りつけ、働き蜂により塗り付けられる物質を目視で判別し易いようにした。Fujiwara et al. (2016)と同様の方法でオオスズメバチの模擬襲撃を実施し、働き蜂の塗り付け行動を誘発し、働き蜂が巣箱に持ち帰った塗り付け物質を採集した。通常これらの物質は、オオスズメバチの襲撃に際し、働き蜂により繰り返し塗り付けられることで、何日もかけて徐々に巣箱の出入口周囲に蓄積し、図2のような状態になる。物質が蓄積する過程で、野外に生息する生物やその断片等が巣箱に付着したり、風等により運ばれることで塗り付け物質に混入するリスクが考えられる。また、塗り付け物質が巣箱上に蓄積するまで何日にもわたり採取せず放置することで、諸々の環境因子により塗り付け物質のDNAが劣化し、検出種が減少する可能性が考えられる。そのため著者らは巣箱の前で待機し、働き蜂が塗り付けた直後の物質を目視で確認しつつ可能な限り早く採取した。また、巣箱に帰巣する働き蜂個体から直接塗り付け物質の採取を実施した。なお、働き蜂に塗り付けられる過程で巣箱から落下する物質もあったが、それらについても巣箱の下部にプラスチック製の箱型の容器を設置し採取した。これらの方法で採取した物質は、 -20°C の冷凍庫で保存した。

2021年に養蜂場 B で飼育している4群から、サンプルの採取を7日間(9月23日、10月3日、10月4日、10月6日、10月9日、10月10日、10月11日)実施し、計0.96gの塗り付け物質を採取した。また、盛岡市の養蜂場で飼育している1群から2021年9月20日に計0.22g、仙台市の住宅街で飼育されている1群から2021年11月～12月に8日間(11月19

日、11月20日、11月21日、11月22日、11月30日、12月1日、12月3日、12月4日)計 0.27g の塗り付け物質を採取した。本研究の DNA 分析では、塗り付けられた物質を目視で確認しつつ採取したものと、働き蜂から直接採取したサンプルを分析に供した。

採取した塗り付け物質の DNA 解析は、株式会社生物技研 (神奈川県相模原市) に委託した。既存の研究で著者らが塗り付け物質として利用することを明らかにした植物類 (Fujiwara et al. 2016)、これまでの調査で利用が確認された菌類、昆虫類に加え、一関の調査地で秋季にホンダタヌキ *Nyctereutes procyonoides viverrinus* の死骸を齧るニホンミツバチの働き蜂を確認したこと (藤原ほか 未発表) から、哺乳類を対象遺伝子領域として設定し、計 6 群のサンプルについてアンプリコンシーケンス解析を実施した。なお、具体的な手順は以下である。

VD250 R Freeze Dryer (TAITEC)を用いて、サンプルを凍結乾燥した。そのサンプルをマルチビーズショッカー(安井器械)で1,500rpm、2分間粉碎した。破碎されたサンプルに Lysis Solution F(ニッポンジーン)を添加し、65°Cで10分間静置した。その後、12,000xgで2分間遠心分離を行い、上清を分取した。分取した溶液に Purification Solution(ニッポンジーン)とクロロホルムを添加し、よく攪拌した。攪拌後、12,000xgで15分間遠心分離を行い、上清を分取した。MPure-12 システムと MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Bio)を用いて、分取した溶液から DNA を精製した。さらに精製溶液に 10% PVPP 溶液を添加した。破碎されたサンプルに Lysis Solution F(ニッポンジーン)を添加し、65°Cで10分間静置した。その後、12,000xgで2分間遠心分離し、上清を分取した。MPure-12 システムと MPure Bacterial DNA Extraction Kit (MP Bio)を用いて、分取した溶液から DNA を精製した。

Synergy LX (Bio Tek)と QuantiFluor dsDNA System(Promega)を用いて、DNA 溶液の濃度測定を行い、2-step tailed PCR 法を用いてライブラリーを作製した。SynergyH 1 (Bio Tek)と QuantiFluor dsDNA System を用いて、作製されたライブラリーの濃度測定を行った。ライブラリーの品質確認は、Fragment Analyzer と dsDNA 915 Reagent Kit (Advanced Analytical Technologies)を用いて行った。シーケンシング解析は、MiSeq システムと MiSeq Reagent Kit v 3(Illumina)を用いて、2x300bp の条件で行った。

データ解析にあたり、FASTX-Toolkit(ver.0.0.14)の fastx_barcode_splitter tool を用いて得られたリード配列の読み始めが使用したプライマー配列と完全に一致するリード配列のみを抽出した。植物類 (陸上植物)・哺乳類の解析では、抽出したリードからプライマー配列を FASTX-Toolkit の fastx_trimer で削除、昆虫類の解析では、抽出したリードからプライマー配列と 3'端の 50 塩基を FASTX-Toolkit の fastx_trimer で削除、菌類の解析では、プライマー配列に N-mix を含む場合、N の数(フォワード側 6 種類 x リーバース側 6 種類 = 36 種類)を考慮して、この操作を繰り返し、抽出したリードからプライマー配列を FASTX-Toolkit の fastx_trimer で削除した。その後、すべての対象に対して sickle(ver.1.33)を用いて品質値が 20 未満の配列を取り除き、40 塩基以下の長さとなった配列とそのペア配列を破棄した。リードの結合は、昆虫類・植物類・哺乳類では、ペアエンドリード結合スクリプト

FLASH(ver.1.2.11)を用いて、最小の重なりを 10 塩基の条件で結合した。菌類では、ペアエンドリード結合スクリプト FLASH(ver.1.2.11)を用いて、結合後の配列長 320 塩基、リードの結合長 280 塩基、最低の重なりを 10 塩基の条件でリードを結合した。結合できなかったリードを抽出し、両鎖とも 3'側 50 塩基を除去し、再度結合を行った。同様の作業をさらに 2 回行った。計 4 回の結合の作業で得られた配列を統合し、以降の解析を行った。

Qiime2(ver.2021.11)の dada2 プラグインでキメラ配列とノイズ配列を除去した後、代表配列と ASV 表を出力した。昆虫類・植物類・哺乳類では、取得した代表配列を NCBI の nt に対し、BLASTN(ver.2.11.0)を行い、系統推定した。その他のパラメーターは標準の条件で行った。菌類では、feature-classifier プラグインを用いて、取得した代表配列と UNITE(ver.8.2)の 97% OUT を比較し、系統推定した。系統樹の作成には、Alignment と phylogeny プラグインを使用した。Qiime2 の tools export プラグインで qzv 形式のデータを閲覧可能なデータに変換した。得られた解析結果については、データの信頼度を考慮して、リード数が 100 以上のものを採用した(上村 et al. 2018)。なお、菌類については、担子菌門ハラタケ綱について得られた結果を示した。また、哺乳類の解析の際に同時に検出された鳥類についても、結果を示した。

結果

働き蜂によるキノコと昆虫の採集と塗り付け行動

2016 年 9 月にキノコ類を訪れる働き蜂を林道で探索していたところ、9 月 11 日に、巣箱の設置場所から約 30m 離れた林道上に生育している萎れ始めのキノコ類を、働き蜂が盛んに齧る行動を確認した(図 4-1, 図 4-2)。ビデオカメラで撮影したキノコ類における働き蜂の行動の映像解析の結果、同じキノコ類のバッチに繰り返し複数個体の働き蜂が訪れたことが確認された。また、マーキングを行った 2 個体は、オオスズメバチの模擬襲撃を行った巣箱に帰巢し、塗り付け行動を行った(図 4-3)。

2017 年 10 月 15 日に、養蜂場 A において、双翅目(ハエ類)と考えられる 2 個体(蛹、幼虫)が、働き蜂により塗り付けられたため、直後にそれらを採取し撮影した(蛹：図 5-1、幼虫：図 5-2)。また 2017 年 10 月 16 日に、大顎にガ類の幼虫を啜って持ち帰った働き蜂個体を捕獲し、デジタルカメラで撮影を行った(図 5-3)。働き蜂により巣箱に持ち帰られた昆虫類を採取直後に観察したところ、直前まで生きていたと考えられる新鮮な状態であり、大顎で齧られたためか体液が出ている昆虫個体も確認された(図 5-2)。

働き蜂の行動の観察と一部 DNA 分析(図 5-1)により、植物類と同様に昆虫類を採集し、塗り付け物質として利用することが明らかとなった。2011 年から実施してきた様々な角度からのニホンミツバチの継続的な調査により、塗り付け物質は、これまでに明らかになっている植物(Fujiwara et al. 2016)にとどまらず、菌類や昆虫类等、多様な生物が利用されてい

ると考えられた。

塗り付け物質の DNA 分析により検出された多様な生物

3 地点計 6 群から採取した塗り付け物質の DNA 分析の結果、植物類(陸上植物)は 30 科 39 属が検出された(表 1)。キク科 *Asteraceae* は、全ての地点と群れから検出された(表 1)。またタデ科 *Polygonaceae* も、仙台市以外の全ての群れから検出された。タデ科には、2011 年に養蜂場 A でニホンミツバチによる齧り行動が観察されたタニソバ *Persicaria nepalensis* も含まれており(Fujiwara et al. 2016, 表 1)、本種は仙台市を除く全ての群れから検出された。

林縁などで生育がみられるキツリフネ *Impatiens noli-tangere* やヤブマメ *Amphicarpaea edgeworthii* は、周囲に森林が多い一関市の 2 群から検出された。人家等で育てられていると考えられるニガウリ(ゴーヤ)*Momordica charantia* は、住宅地と森林域の境に位置する盛岡市の群れでのみ検出された。キク科のコウオウソウ属(マリーゴールド) *Tagetes* とカミツレ(カモミール)*Matricaria chamomilla* は、住宅地に囲まれた仙台市でのみ検出された。

昆虫類の分析の結果、25 科 31 属が検出され(表 2)、アブラムシ科 *Aphididae* は、盛岡市を除く全ての群れから検出された。ショウジョウバエ科 *Drosophilidae* は、仙台市を除くすべての群れから検出された。腐植質やキノコ類から発生するショウジョウバエ科 *Psychodidae* は一関市の全ての群れから検出された(表 2)。キノコを採餌するフタオビショウジョウバエ *Drosophila bizonata* (岡部 2006)は、一関市の 3 つの群れと盛岡市の群れから検出された。一方、盛岡市の群れからは、オオヒラタシデムシ *Eusilpha japonica* が多く検出されたが、他の地域からは本種は検出されなかった。

菌類(ハラタケ綱)の分析の結果、28 科 38 属が検出された。スッポンタケ属 *Phallus* は全ての地点と群れで共通して検出されたが、盛岡市のみで検出されたオオオシロイタケ属 *Postia* のように、特定の地点で検出されたものもあった(表 3)。可食のキノコであるマイタケ *Grifola frondosa* は一関市の 1 群から検出され、ヌメリイグチ *Suillus luteus* は一関市の 2 群から検出された。一般的に不食に該当すると考えられるフサタケ *Pterula subulata* は一関市の 3 群から検出された。また、以前は食用として利用されていたものの、現在は毒性があるとされるスギヒラタケ *Pleurocybella porrigens* は、周囲にスギ等の針葉樹が密集して生育する一関市の全ての群れから検出された(今関ほか 2011、表 3)。一方、住宅地に面している盛岡市や、住宅地内に位置する仙台市の群れではスギヒラタケは検出されなかった。

哺乳類の分析の結果、哺乳類 11 科 15 属、鳥類 11 科 13 属が検出された。哺乳類では、ホンドタヌキが全ての群れと地点で共通して検出された(表 4)。イヌ *Canis lupus familiaris* やネコ *Felis silvestris catus* は仙台市の群れから多く検出され、ウシ *Bos taurus* は盛岡市の群れからのみ検出された(表 4)。一方、一関市の群れからのみ、ニホンアナグマ *Meles anakuma*、ニホンイタチ *Mustela itatsi*、ニホンノウサギ *Lepus brachyurus*、ヒメネズミ *Apodemus argenteus*、ホンドアカネズミ *Apodemus speciosus speciosus*、ホンドテン *Martes melampus*

melampus、キクガシラコウモリ科 *Rhinolophinae* などの、森林域や里山環境を中心に生息する野生動物が複数種検出された。また、岩手県版のレッドリストで D ランクに分類されているカワネズミ *Chimarrogale platycephalus* が一関市の 3 群から検出された(表 4)。鳥類は、ヒヨドリ *Hypsipetes amaurotis* やカケス *Garrulus glandarius* が、一関市と盛岡市の各 1 群から検出された。また、一関市の 1 群から、環境省により絶滅危惧IB 類(EN)と国内希少野生動物種に指定されているクマタカ *Nisaetus nipalensis* が検出された(表 4)。

考察

本研究で実施した塗り付け物質の DNA 分析により、植物類、菌類、昆虫類、哺乳類、鳥類などの多様な生物が、働き蜂が採集した塗り付け物質中に含まれていることが明らかになった。また、本研究とは別に、2015 年以降各地で実施してきた物質の DNA 分析からも、上記の分類群の他、コケ類、藻類、菌類(子囊菌門など)、魚類、甲殻類などを含む多数の生物が検出されている(藤原 2023, 藤原ほか 未発表)。これらの結果は、天敵オオスズメバチの襲撃という緊急時に際し、ニホンミツバチが営巣場所周囲に生息する多様な生物を、塗り付け物質として利用していることを示している。

さらに本研究では、ニホンミツバチが多様な生物を塗り付け物質として利用していることを、働き蜂の行動調査、塗り付け物質の観察、DNA 分析等の複数の手法を用いて初めて発見し証明した。また、長期にわたる調査と観察により、DNA 分析のみからは把握することができない、実際に生物がどのような状態で採集され、どのような過程を経て巣箱に塗り付けられたのかを把握することができた。調査結果から、塗り付け物質に含まれる昆虫類の少なくとも一部については、働き蜂が直前まで生きていた昆虫個体を捕獲して大顎に啜え持ち帰り、塗り付けたものであると考えられた。ニホンミツバチがオオスズメバチから巣を防衛するために野外で生きた昆虫類を捕獲し、巣箱に持ち帰って塗り付ける行動はこれまで報告されておらず、著者らが知る限り本研究が初の報告となる。また、キノコ類や植物類についても、それらの個体の一部を齧り取って直接利用していることが、野外調査や観察により明らかとなった。

塗り付け物質の DNA 分析のみでは、検出された生物が実際にどのような状態で採集され、どのような過程を経て巣箱に塗り付けられたのかを把握することはできない。今回検出された哺乳類や鳥類については、著者らの現地調査でも一部観察されたように、死骸や毛や羽毛等の生物の断片(藤原ほか 未発表)や糞(Mattila et al. 2020)を、持ち帰って利用している可能性も考えられる。

また、昆虫類についての DNA 分析の結果、オオカマキリ *Tenodera aridifolia* やカブトムシ *Trypoxylus dichotomus* などが検出されたが、これらの生きた個体から直接働き蜂が物質を齧り取ってきたとは考えにくい。そのため、昆虫個体の捕獲による直接利用の他に、糞や

死骸等を通じた間接的な利用が含まれる可能性も考えられ、今後詳細な検討が必要である。

キノコ類(ハラタケ綱)の分析結果、28科38属が検出された。全ての群れから検出されたスッポンタケ属は、グレバと呼ばれる粘液状の胞子を持ち、ハエ類などの昆虫を引き寄せて運ばせるために、非常に強い臭気を放つ(今関ほか 2011)。キノコ類は胞子で繁殖するため、時にキノコ食のフタオビショウジョウバエなどの昆虫類やヤマナメクジ *Meghimatium fruhstorferi* に胞子を付着させて、新たな生育場所を得ることが報告されている(岡部 2006, Kitabayashi et al. 2022)。また、キノコ類のパッチを訪れる働き蜂を撮影した映像の解析や現場における観察から、働き蜂が主に胞子を放出するひだの部分も含め、キノコの様々な部位を齧る行動が確認されている(藤原ほか 未発表)。そのため、働き蜂に胞子が付着しその後散布されることで、キノコ類の繁殖に寄与している可能性も考えられる。既存の研究からも、働き蜂が秋季に2種のキノコを齧る行動が報告されている(Takahashi et al. 2019)。Takahashi et al. (2019) では、キノコの中には抗ウイルス作用を持つものがあり、ニホンミツバチもそれを利用しているのではないかと考察されている。また、菌類ではないが同じく秋季にニホンミツバチがキク科のレタス *Lactuca sativa* を齧る行動が報告されており(Yokoi 2015)、働き蜂が越冬のために必要な物質を摂取している可能性を示唆している。これらの論文で報告されたレタスやキノコからの物質の採集(Yokoi 2015, Takahashi et al. 2019)は、いずれも秋季に確認されているため、オオスズメバチに対する防衛行動にも使われている可能性が考えられる。

本研究では、一関市の群れからのみ、クマタカやカワネズミなどの希少種や、ニホンノウサギ、ヒメネズミ、ホンドアカネズミ、キクガシラコウモリ科、ホンドテンなどが検出された。本地域では、自然再生推進法に基づく自然再生事業が2009年から継続して行われており、里山とそこに生息する多様な生物を、次世代に引き継ぐための活動が継続して実施されている(久保川イーハトーブ自然再生協議会 2009)。これらのことから本地域は、知勝院主導で長年実施されてきた里山の保全活動の結果、野生生物が生息可能な良好な里山環境が維持されていると考えられる。本研究により、ニホンミツバチの塗り付け物質の分析により、目視で生息確認が難しい希少種や野生生物の生息の把握にも貢献できる可能性が示された。今回分析に供したのは、これまでに採取してきた塗り付け物質のうちごく一部分であるため、今後、塗り付け物質の解析を進めていくことで、より多様な生物や希少種が検出される可能性がある。

働き蜂が、塗り付けるための生物、あるいは生物由来の物質を採集するために行動する範囲は、花資源の採集と比較して狭いと考えられる。著者らは、働き蜂が物質を採集する際に踊る”緊急ダンス”の解析を行い(Fujiwara et al. 2017)、ダンスの尻振り時間を巣箱から採餌場所までの距離に換算し、約5m~約180mと推定した(Fujiwara et al. 2017)。ニホンミツバチの花資源(花蜜・花粉)の採餌距離は、半径約1km~2kmとされている(佐々木ほか 1993)。実際に、著者らの研究から、塗り付け物質の採集のために働き蜂が出巣してから帰巢するまでの時間を複数のマーキング個体で計測したところ、最大で317秒と非常に短いことが

示されている(Fujiwara et al. 2017)。これは、巣箱からごく近距離にあるタニソバやキノコ類を急いで齧り巣箱に戻るため、採集にかかる時間が短いという著者らの観察結果とも一致した(Fujiwara et al. 2016, 藤原ほか 未発表)。そのため、花資源の採集と比較すると、働き蜂はより近距離かつ狭い範囲内で、大急ぎで塗り付け物質の採集を行っていると考えられる。

本研究により、群れや地域が異なっても、共通して利用される生物が確認された。そのため、働き蜂は巣箱の周囲から無作為に生物を採集してくるのではなく、天敵オオスズメバチの襲来という緊急時に際し、可能な限り巣箱から近距離に生息、生育し、且つオオスズメバチやそのフェロモンに対して効果を発揮する生物由来の物質を、優先的に利用している可能性が考えられる。

今後の展望

オオスズメバチがニホンミツバチの巣箱に飛来すると、働き蜂たちはいったん巣の中に逃げ込み、オオスズメバチが去った後、大急ぎで巣箱の出入口周辺で塗り付け行動を始める(図 6)。これは、群れの全滅という最悪の結果を防ぐための最初の緊急的な行動であり、ニホンミツバチがオオスズメバチに巣の出入口を突破されないための手段と考えられる。Mattila et al. (2020) の論文では、トウヨウミツバチにより巣門周辺に中～高程度の多さで糞の塗り付けがされている場合、*V. soror* が巣の出入口を噛む時間は 94%減ったと報告されている。また、Mattila et al. (2020) は糞には *V. soror* が忌避する成分が含まれている可能性があると考えている。著者らも先行研究でオオスズメバチが忌避する成分、もしくはオオスズメバチの餌場マーキングフェロモンの効果を被覆するまたは減じる成分が含まれる可能性を指摘してきた。

現在までに、オオスズメバチを含むスズメバチや、ミツバチが嫌う匂い成分が、2-フェニルエタノールや同族のフェニルメタノールであることが解明されており(株式会社 KINP, <http://kinp-chem.co.jp/evolutionary-waspa-repellent/> 2024 年 3 月 2 日確認)、この成分をもとに商品が開発され、養蜂等の現場で使用されている。著者らの研究で発見された多様な生物にこれらの成分が含まれているかどうかは、今後検証が必要である。また、猛禽類のハチクマ *Pernis apivorus* は、スズメバチの巣を襲い幼虫や蛹を餌としているが、その際襲われたスズメバチは反撃せず逃げ惑う行動が観察されており、ハチクマが何らかの忌避成分を有していることが示唆されている(小野 1997)。

塗り付け物質には粘着性があるものも確認されており、経時的に次々と上塗りされ蓄積されていく。推測ではあるが、オオスズメバチは、塗り付け物質に粘着性がある場合、その上を歩いたり齧ったりするのを避ける可能性が考えられる。オオスズメバチを含むハチ類の肢先には爪や接着器官、感覚子等があり、それらは歩行時の基質との接着や獲物の捕獲など、様々な場面で使用される重要な器官である(市川 2015)。化学的な成分による忌避

だけではなく、オオスズメバチを物理的に忌避する効果も塗り付け物質にあるとすれば興味深い。

本研究では、多様な生物が、塗り付け物質としてニホンミツバチに利用されていることを、働き蜂の行動面の調査、塗り付け物質の観察、DNA 分析などの複数の調査を組み合わせることにより初めて発見し、証明した。これらの物質の採集過程や成分等については明らかになっていない部分もあり、今後さらなる検証が必要である。著者らは、2011 年から撮影し蓄積してきた映像・画像、これまでに採取し保管している塗り付け物質のサンプル、他関連する様々なデータを保有しており、今後も引き続きそれらの解析を進めていくことで、さらに多様な生物の利用や、塗り付け行動の詳細を明らかにしていくことが可能であると考えている。著者らの調査では、ニホンミツバチの塗り付け行動は、日本各地の様々な場所で確認されている。そのため今後、例えば、全国に多くのニホンミツバチ飼育者の会員を有する、一般社団法人日本在来種みつばちの会の人脈を活用して全国的な調査を実施し、検証していくことも検討している。塗り付け物質の分析による多種の生物の利用の把握は、これまでになかった新たな形で、ニホンミツバチと地域の生物相や自然生態系との繋がりを理解するための手段として、興味深いものであると考えている。

また、塗り付け行動は、トウヨウミツバチの天敵となりうる集団攻撃を行うスズメバチが生息する韓国やベトナムでも確認されている(Fujiwara et al. 2016, Mattila et al. 2020)。そのため、それらの地域でも、日本と同様に各地に生息する多様な生物が、スズメバチに対する塗り付け物質として、トウヨウミツバチに広く用いられていると考えられる。これらを調査していくことで、トウヨウミツバチと同所的に生息する多様な生物との生物学的、生態学的な繋がりを、明らかにしていくことができると考えられる。

謝辞

本研究にあたり、玉川大学名誉教授の佐々木正己先生、中央大学名誉教授の鷲谷いづみ先生には、貴重なご意見をいただいた。また、久保川イーハトーブ自然再生協議会会長の千坂げんぼう氏からは、一関市の里山地域において長期滞在が可能な研究環境、ニホンミツバチの飼育環境をご提供いただいたことに加え、現地調査中にも様々なご配慮をいただいた。同会副会長の須田真一氏には、昆虫類の同定にご協力をいただいた。知勝院の職員の方々には、ニホンミツバチ巣箱の観察施設の設置と維持にご助力をいただいた。また、DNA 分析のためのニホンミツバチの提供とサンプル採取等について、一般社団法人日本在来種みつばちの会会長(代表理事)の藤原誠太氏、同会理事の長谷川清氏、同会理事の齋藤高晴氏とご家族の齋藤美知様にご協力いただいた。本研究は JSPS 科研費 JP26292181、特別研究員奨励費 15J07621、公益財団法人 藤原ナチュラルヒストリー振興財団の第 29 回学術研究助成を受けたものである。ここに記して心から御礼を申し上げる。

利益相反に関する開示

本稿について利益相反はありません。

参考文献

- Fujiwara A, Sasaki M & Washitani I (2016) A scientific note on hive entrance smearing in Japanese *Apis cerana* induced by pre-mass attack scouting by the Asian giant hornet *Vespa mandarinia*. *Apidologie* 47: 789–791.
- Fujiwara A, Sasaki M & Washitani I (2017) First report on the emergency dance of *Apis cerana japonica*, which induces odorous plant material collection in response to *Vespa mandarinia japonica* scouting. *Entomological science* 21: 93–6.
- 藤原愛弓, 西廣 淳, 鷺谷いづみ (2014) さとやま自然再生事業地におけるニホンミツバチの生態系サービス評価：花資源利用およびコロニーの発達. *保全生態学研究* 19 巻 1 号: 39-51.
- 藤原愛弓 (2020) 新たに見つかったニホンミツバチの対オオスズメバチ防衛戦略 第 1 回 ニホンミツバチが天敵オオスズメバチに対して行う植物の採集と塗り付け行動. 養蜂産業振興会報 No.3 一般社団法人養蜂産業振興会.
- 藤原愛弓 (2023) ニホンミツバチがオオスズメバチの襲撃後に巣の周囲に塗り付ける物質に関する研究：植物等を用いたミツバチの防衛行動の解明に向けて. 公益財団法人 藤原 ナチュラルヒストリー振興財団 研究成果報告書（第 29 回学術研究助成）.
- 市川敏夫 (2015) 昆虫の肢の接着器官の動作を監視するセンサーシステムの設計：共通性と多様性. *比較生理生化学* 32 (1) : 10-23.
- 今関六也, 大谷吉雄, 本郷次雄, 保坂健太郎, 細矢 剛, 長澤栄史 (2011) 増補改訂新版山溪カラー名鑑日本のきのこ. 山と溪谷社.
- Kitabayashi K, Kitamura S, Tuno N (2022) Fungal spore transport by omnivorous mycophagous slug in temperate forest. *Ecology and Evolution* 12 (2) : e8565.
- 久保川イーハトーブ自然再生事業 全体構想 (2009) 久保川イーハトーブ自然再生協議会.
- 松浦 誠, 山根正気 (1984) スズメバチ類の比較行動学. 北海道大学図書刊行会.
- Mattila HR, Otis GW, Nguyen LTP, Pham HD, Knight OM & Phan NT (2020) Honey bees (*Apis cerana*) use animal feces as a tool to defend colonies against group attack by giant hornets (*Vespa soror*). *Plos One* 15(12): e0242668.
- 岡部貴美子 (2006) 日本における食用きのこの害虫. *森林総合研究所研究報告* 5 巻 2 号 119-

133.

岡田一次 (1997) ニホンミツバチ誌. 玉川大学出版部.

Ono M, Igarashi T, Ohno E, Sasaki M (1995) Unusual thermal defence by a honeybee against mass attack by hornets. *Nature* 377: 334-336.

小野正人 (1997) スズメバチの科学. 海游舎.

佐々木正己, 高橋羽夕, 佐藤至洋 (1993) ニホンミツバチとセイヨウミツバチの収穫ダンスの解析とそれに基づく採餌圏の比較. *ミツバチ科学* 14:49-54.

佐々木正己 (1999) ニホンミツバチ 北限の *Apis cerana*. 海游舎.

Sugahara M & Sakamoto F (2009) Heat and carbon dioxide generated by honeybees jointly act to kill hornets. *Naturwissenschaften* 96: 1133-1136.

Takahashi J, Hosaka K, Martin SJ, Kawabe A (2019) Asian Honey Bee *Apis cerana* Foraging on Mushrooms. *Bee World* 96(1):10-11.

上村了美, 上月康則, 大谷壮介, 平川 倫, 岩見和樹, 竹山佳奈, 山中亮一 (2018) 環境 DNA メタバーコーディングによる運河・港湾に生息する魚類の種多様性検出に関する研究. *海洋開発論文集* Vol.34 74 巻 2 号 p. I_474-I_479.

Yokoi T (2015) Visitation and gnawing behaviour of Japanese honeybee *Apis cerana japonica* to lettuce. *Apidologie* 46: 489-494.



図 1. 2015 年 9 月 6 日に一関市の養蜂場 A の近隣で撮影した、働き蜂によるイヌコウジュの齧り行動.

Fig 1. The gnawing behavior of worker bees on *Mosla scabra* captured near apiary A in Ichinoseki City on September 6, 2015.



図 2. 2018 年 10 月 7 日に一関市の養蜂場 A で撮影した、巣箱の出入口周囲に付着している大量の塗り付け物質.

Fig 2. The substantial materials smearing around the hive entrance captured on October 7, 2018, at the apiary A in Ichinoseki City.



図 3. 2015 年 10 月 7 日に採取した塗り付け物質中で発見された、ガ類の幼虫の一例。齧られたような痕跡がみられる個体も確認された。黒光りして見えるのは幼虫の頭部。写真下部の定規のメモリは 1 mm.

Fig 3. An example of *Lepidoptera* larvae found in the smearing material collected in October 7, 2015. Some individuals with gnawing-like marks were also observed. The shiny black part visible is the head of the larva. The scale at the bottom of the photograph represents 1 mm.



図 4-1. 2016 年 9 月 11 日に確認した、働き蜂が繰り返し訪れて齧ったキノコ類。既に萎れかけており、変色し、柄が横倒しになっていたものもあった。発見時に既にかなり劣化が進んでおり、種の特定はできなかった。

Fig 4-1. Mushrooms repeatedly visited and gnawed by worker bees confirmed on September 11, 2016. Some were already wilting, discolored, and had their stems overturned. At the time of discovery, they were considerably degraded, making species identification impossible.



図 4-2. 2016 年 9 月 11 日に撮影した、萎れかけのキノコ類のパッチを訪れて盛んに齧る働き蜂(撮影した動画からの切り出した画像). この後すぐに、大顎にキノコの破片を啜えて飛び立った.

Fig 4-2. Worker bees vigorously gnawing on a patch of withering mushrooms on September 11, 2016 (image extracted from recorded footage). Immediately afterward, they flew away with mushroom fragments held in their mandibles.



図 4-3. 2016 年 9 月 11 日に撮影した、キノコのパッチを訪れた後、帰巢し塗り付け行動を行った働き蜂(写真中央部黄色矢印、マーキングあり)、その周囲には塗り付け物質を多数確認.

Fig 4-3. Worker bees returning to the hive after visiting a patch of mushrooms on September 11, 2016, performing smearing behavior (yellow arrow and marking in the center of the photo), with substantial smearing materials observed around them.



図 5-1. 2017 年 10 月 15 日に撮影した、働き蜂により塗り付けられた双翅目のものと思われる蛹. 黒矢印は蛹を拡大して撮影したもの(約 2 mm). 株式会社生物技研に生物種同定を委託した結果、チョウバエ科 *Psychodidae* sp.と 100%の相同性を示した.

Fig 5-1. The image, taken on October 15, 2017, shows a pupa likely from the order Diptera, smeared onto the hive by worker bees. The black arrow points to a magnified view of the pupa (approximately 2 mm in size). Species identification was outsourced to Bioengineering Lab. Co., Ltd. and the result showed a 100% match with the family *Psychodidae*.



図 5-2. 2017 年 10 月 15 日に撮影した、働き蜂により巣箱に塗り付けられた双翅目とみられる幼虫. 塗り付けられた際に体液が出ていた.

Fig 5-2. The image, taken on October 15, 2017, shows a larva likely from the order Diptera, smeared onto the hive by worker bees. Body fluids were released during the smearing process.



図 5-3. 2017 年 10 月 16 日に採取し撮影した、ガ類の幼虫(黄色丸)を啜えて巣箱に戻ってきた働き蜂、幼虫の尾端を啜えている、幼虫は齧られた痕跡があった。

Fig 5-3. The image, taken on October 16, 2017, shows a worker bee returning to the hive while holding a moth larva (circled in yellow) in its mandibles. The larva appears to have bite marks, indicating it had been gnawed.



図 6. 2013 年秋季、巣箱の連続撮影中に、突如襲来したオオスズメバチの働き蜂. ニホンミツバチの働き蜂は慌てて逃げまどい、一旦巣の中に逃げ込んだ。オオスズメバチが去ってから、塗り付け行動を開始した。黒い点状のものが塗り付け物質。

Fig 6. During continuous shooting in the autumn of 2013, *V. mandarinia* suddenly attacked the hive. Worker bees panicked and fled, retreating into the hive. After the hornet departed, the worker bees began the smearing behavior. The black spots represent the smeared materials.

表 1. 植物類（陸上植物）の分析結果と各群で検出されたリード数(100 リード以上のものを示す). Identity は ASV 配列とデータベース配列の一致した塩基の割合(%)を示し、Alignment length は比較した塩基長(bp)を示す.

Table 1. Results of plant (terrestrial plant) analysis and the number of reads detected in each group (only those with 100 or more reads are shown). 'Identity' indicates the percentage of bases that match between the ASV sequence and the database sequence, and 'Alignment length' indicates the length of bases compared (in base pairs).

Scientific name	Morioka	Itinoseki1	Itinoseki2	Itinoseki3	Itinoseki4	Sendai	Identity	Alignment length	
<i>Actinidiaceae</i> sp.	224	1318		317	274		100	334	
<i>Ampelopsis</i> sp.	1147						100	334	
<i>Amphicarpaea edgeworthii</i>						116	100	334	
<i>Anemone</i> sp.		170					100	334	
<i>Araliaceae</i> sp.						2822	100	334	
<i>Asparagus officinalis</i>						306	100	334	
<i>Asteraceae</i> sp.	27551	2582	22582	26408	33941	885	100	334	
<i>Asteraceae</i> sp.					124		97.3	332	
<i>Brassica</i> sp.	653						100	334	
<i>Brassicaceae</i> sp.	915						100	334	
<i>Canacomyrica</i> sp.						472	97.3	334	
<i>Centipeda minima</i>	284		298				100	334	
<i>Chenopodium</i> sp.	688						100	334	
<i>Chrysanthemum</i> sp.	224	1609	646	187	124	6558	100	334	
<i>Clematis</i> sp.		161					100	334	
<i>Commelina communis</i>	209						100	334	
<i>Commelina communis</i>		974					99.7	334	
<i>Cucurbitaceae</i> sp.	566						100	334	
<i>Dahlia</i> sp.			229	340		289	100	334	
<i>Diospyros</i> sp.						125	100	334	
<i>Fatsia japonica</i>						1040	100	334	
<i>Galium</i> sp.						885	100	334	
<i>Glechoma hederacea</i>						849	100	334	
<i>Glechoma</i> sp.	436		135	262	375	8448	100	334	
<i>Humulus</i> sp.		174					100	334	
<i>Ilex</i> sp.		103					100	334	
<i>Impatiens noli-tangere</i>				399			100	334	
<i>Impatiens textorii</i>	129						100	334	
<i>Juglandaceae</i> sp.	128						100	334	
<i>Lamiaceae</i> sp.	101	1348					100	334	
<i>Matricaria chamomilla</i>						4083	100	334	
<i>Momordica charantia</i>	3426						100	334	
<i>Musa</i> sp.						22223	100	334	
<i>Musa x paradisiaca</i>						223	100	360	
<i>Muscari</i> sp.	244						100	334	
<i>Onagraceae</i> sp.	125						100	334	
<i>Oryza</i> sp.						1413	100	334	
<i>Oxalis</i> sp.	332					160	3122	100	334
<i>Persicaria lapathifolia</i>	179	134					99.7	334	
<i>Persicaria nepalensis</i>	1333	408	188	713	146		100	334	
<i>Persicaria nepalensis</i>	625	129		110			99.1	333	
<i>Prunus</i> sp.						151	100	334	
<i>Quercus</i> sp.		261					100	334	
<i>Raphanus</i> sp.						267	100	334	
<i>Rhododendron</i> sp.						375	100	334	
<i>Rosa</i> sp.	226						100	334	
<i>Rosaceae</i> sp.						618	100	334	
<i>Sicyos</i> sp.						225	100	334	
<i>Symphotrichum</i> sp.		113					100	334	
<i>Tagetes</i> sp.						1074	100	334	
<i>Taxus</i> sp.	1045						100	334	
<i>Theaceae</i> sp.						167	100	334	
<i>Zingiberaceae</i> sp.	195						100	334	

表 2. 昆虫類の分析結果と各群で検出されたリード数(100 リード以上のものを示す). Identity は ASV 配列とデータベース配列の一致した塩基の割合(%)を示し、Alignment length は比較した塩基長(bp)を示す.

Table 2. Results of insect analysis and the number of reads detected in each group (only those with 100 or more reads are shown). 'Identity' indicates the percentage of bases that match between the ASV sequence and the database sequence, and 'Alignment length' indicates the length of bases compared (in base pairs).

Scientific name	Morioka	Itinoseki1	Itinoseki2	Itinoseki3	Itinoseki4	Sendai	Identity	Alignment length
<i>Allantus luctifer</i>						2179	97.4	313
<i>Aphis gossypii</i>						3256	100	318
<i>Aphis</i> sp.					364	1678	100	318
<i>Atractomorpha</i> sp.			102				99.4	316
<i>Atractomorpha</i> sp.				1552			99.1	316
<i>Cloeon dipterum</i>		355					97.5	317
<i>Delphacidae</i> sp.						2262	99.1	322
<i>Drosophila (Sophophora) auraria</i>	919						100	318
<i>Drosophila bizonata</i>			133				99.1	318
<i>Drosophila bizonata</i>	260	6349			6702		100	318
<i>Drosophila bizonata</i>		102					98.7	318
<i>Drosophila</i> sp.					283		99.1	318
<i>Drosophila suzukii</i>	136						100	318
<i>Eusilpha japonica</i>	54269						99.4	313
<i>Galleria mellonella</i>						49488	97.5	324
<i>Harmonia axyridis</i>			233				100	315
<i>Limnephilus</i> sp.						258	97.9	329
<i>Loxoblemmus</i> sp.	19162						98.7	317
<i>Loxoblemmus</i> sp.	353						97.8	317
<i>Loxoblemmus</i> sp.	280						97.8	317
<i>Loxoblemmus</i> sp.	263						99.1	317
<i>Lucilia</i> sp.			2926	1198			99.7	318
<i>Myzus persicae</i>		150					98.4	318
<i>Myzus persicae</i>		3605					98.7	318
<i>Myzus persicae</i>		1661					98.1	319
<i>Ostrinia scapularis</i>					468		100	322
<i>Oxya</i> sp.		271			2888		99.1	316
<i>Psychodidae</i> sp.					1198	503	98.2	217
<i>Psychodidae</i> sp.			2707				97.2	218
<i>Psychodidae</i> sp.			2281				97.7	218
<i>Psychomora</i> sp.			108				98.2	218
<i>Psychomora</i> sp.		1540					97.3	219
<i>Psychomora</i> sp.						153	98.2	217
<i>Pteronemobius ohmachi</i>					122		99.7	294
<i>Sastragala esakii</i>		524					100	297
<i>Scaptomyza</i> sp.						243	98.7	318
<i>Scatopse notata</i>						296	100	216
<i>Schizaphis graminum</i>		1403					99.1	318
<i>Scirtothrips dorsalis</i>	152						99.6	270
<i>Sepsidae</i> sp.		104	921				97.2	317
<i>Stegobium paniceum</i>						205	100	298
<i>Sympetrum frequens</i>		213					99.7	315
<i>Tachycines</i> sp.					626		97.5	317
<i>Teleogryllus emma</i>	1465			1923			99.1	316
<i>Tenodera aridifolia</i>	1421					327	100	317
<i>Tenodera aridifolia</i>	294						98.4	317
<i>Toxoptera odinae</i>			5607				100	289
<i>Tribolium castaneum</i>				23340	2243		100	318
<i>Trypoxylus dichotomus</i>			368				100	294

表 3. 菌類（ハラタケ綱）の分析結果と各群で検出されたリード数(100 リード以上のものを示す).

Table 3. Results of fungal analysis (*Agaricomycetes*) and the number of reads detected in each group (showing only those with 100 or more reads).

Scientific name	Morioka	Itinoseki1	Itinoseki2	Itinoseki3	Itinoseki4	Sendai
<i>Agaricus parasubrutilescens</i>	838					
<i>Agaricus</i> sp.						661
<i>Albatrellus flettii</i>				125		
<i>Amanita citrina</i>						119
<i>Amanita fulva</i>			890			
<i>Armillaria borealis</i>	6373	536	497	406		276
<i>Armillaria mellea</i>			158			
<i>Clavariaceae</i> sp.					163	
<i>Clavulinopsis</i> sp.		154		748		
<i>Clitocybe nebularis</i>					105	
<i>Collybia cirrhata</i>			140			
<i>Coniophora puteana</i>	792					
<i>Coprinellus verrucispermus</i>		16859				
<i>Coprinellus xanthothrix</i>						580
<i>Coprinopsis cinerea</i>			447			2497
<i>Coprinopsis insignis</i>		120		762		319
<i>Cortinarius</i> sp.			436	141		402
<i>Cortinarius vibratilis</i>			250			
<i>Entoloma sericeum</i>						312
<i>Gerhardtia highlandensis</i>				143		
<i>Gliophorus</i> sp.				168		852
<i>Gloiothele citrina</i>		772		409		
<i>Grifola frondosa</i>						565
<i>Gymnopus austrosemihirtipes</i>			205			
<i>Hygrocybe</i> sp.		139				
<i>Inocybaceae</i> sp.		632				212
<i>Inocybe</i> sp.			101			
<i>Lacrymaria lacrymabunda</i>			571			
<i>Leifia</i> sp.		249				
<i>Melanophyllum haematospermum</i>			101			
<i>Mycena maculata</i>		117				
<i>Mycena pura</i>				458		117
<i>Mycena</i> sp.		766	4167	2213		2373
<i>Mycoacia fuscoatra</i>			783			
<i>Phallus</i> sp.	2867	602	955	7252	14011	20326
<i>Phellodon</i> sp.		381				
<i>Pholiota astragalina</i>				151		
<i>Pleurocybella porrigens</i>		1529	3987	2988	1660	
<i>Postia</i> sp.	3450					
<i>Postia stiptica</i>	1151					
<i>Pterula subulata</i>		262	142	281		
<i>Ramaria rubella</i>		1218				
<i>Ramaria</i> sp.		3396	8539	6451	4764	
<i>Rhizopogon luteolus</i>				235		
<i>Rhodocollybia</i> sp.			725			
<i>Russula</i> sp.		105	141			
<i>Sistotrema coroniferum</i>		134	615	942	3098	
<i>Sistotrema</i> sp.						684
<i>Suillus luteus</i>			302		196	
<i>Thanatephorus cucumeris</i>	254	1518	100	177		
<i>Tricholoma</i> sp.					136	
<i>Tricholoma ustale</i>			415			

表 4. 哺乳類の分析結果と各群で検出されたリード数(100 リード以上のものを示す). Identity は ASV 配列とデータベース配列の一致した塩基の割合(%)を示し、Alignment length は比較した塩基長(bp)を示す.

Table 4. Results of mammal analysis and the number of reads detected in each group (only those with 100 or more reads are shown). 'Identity' indicates the percentage of bases that match between the ASV sequence and the database sequence, and 'Alignment length' indicates the length of bases compared (in base pairs).

Scientific name	Morioka	Itinoseki1	Itinoseki2	Itinoseki3	Itinoseki4	Sendai	Identity	Alignment length
<i>Apodemus argenteus</i>			265				100	172
<i>Apodemus speciosus speciosus</i>		413	386	752			100	171
<i>Bos taurus</i>	2642						100	170
<i>Canis lupus familiaris</i>						919	100	198
<i>Canis lupus familiaris</i>	2170					60328	100	171
<i>Canis lupus familiaris</i>						1040	100	170
<i>Canis lupus familiaris</i>						732	100	170
<i>Canis lupus familiaris</i>						550	100	169
<i>Canis lupus familiaris</i>						610	99.4	171
<i>Chimarroale platycephalus</i>		568					98.3	172
<i>Chimarroale platycephalus</i>		269		156	902		97.1	175
<i>Felis silvestris catus</i>			1628	7153		10126	100	173
<i>Felis silvestris catus</i>						4433	100	172
<i>Felis silvestris catus</i>				268		400	99.4	173
<i>Felis silvestris catus</i>						232	98.3	173
<i>Homo sapiens</i>	8800	4410	1570	8217	3492	1117	100	173
<i>Homo sapiens</i>		416				906	100	168
<i>Homo sapiens</i>				386			99.4	177
<i>Homo sapiens</i>				687			99.4	173
<i>Homo sapiens</i>					447		99.4	168
<i>Lepus brachyurus</i>		308					100	174
<i>Martes melampus</i>		32002	4623	568			99.4	170
<i>Martes melampus melampus</i>			106				98.8	170
<i>Meles anakuma</i>			228				100	171
<i>Mustela itatsi</i>		17667	51394	3096	12364		100	170
<i>Mustela itatsi</i>				253			99.4	170
<i>Nyctereutes procyonoides viverrinus</i>				6437	10925		100	171
<i>Nyctereutes procyonoides viverrinus</i>	15709	322	1617	2814	3567	1829	100	169
<i>Nyctereutes procyonoides viverrinus</i>				271	499		99.4	171
<i>Nyctereutes procyonoides viverrinus</i>	284				138		99.4	169
<i>Nyctereutes procyonoides viverrinus</i>	124						98.8	169
<i>Paguma larvata</i>	716		196	29440	17009		100	173
<i>Paguma larvata</i>				774			99.4	173
<i>Rhinolophus sp.</i>						421	100	172
<i>Sus scrofa</i>						203	100	172
<i>Vulpes vulpes japonica</i>				8014	2878	17755	100	171
<i>Vulpes vulpes japonica</i>				246			99.4	171
<i>Vulpes vulpes japonica</i>				442			98.8	171

表 5. 鳥類の分析結果と各群で検出されたリード数(100 リード以上のものを示す). Identity は ASV 配列とデータベース配列の一致した塩基の割合(%)を示し、Alignment length は比較した塩基長(bp)を示す.

Table 5. Results of bird analysis and the number of reads detected in each group (only those with 100 or more reads are shown). 'Identity' indicates the percentage of bases that match between the ASV sequence and the database sequence, and 'Alignment length' indicates the length of bases compared (in base pairs).

Scientific name	Morioka	Itinoseki1	Itinoseki2	Itinoseki3	Itinoseki4	Sendai	Identity	Alignment length
<i>Ardea alba</i>			229				99.4	181
<i>Ardea alba</i>			922				100	181
<i>Butorides striatus</i>		1030					100	181
<i>Butorides striatus</i>		222					99.4	181
<i>Corvus</i> sp.	191						100	183
<i>Dendrocopos major</i>					249		100	175
<i>Emberiza cioides</i>					1051		99.5	184
<i>Ficedula narcissina</i>					2715		100	185
<i>Ficedula narcissina</i>					122		99.5	185
<i>Gallus gallus</i>	2221						100	182
<i>Gallus gallus</i>	262						99.5	182
<i>Garrulus glandarius</i>			194	791			100	183
<i>Horornis</i> sp.		276					97.3	183
<i>Hypsipetes amaurotis</i>	2487	2998					100	183
<i>Hypsipetes amaurotis</i>	448	185					99.5	183
<i>Nisaetus nipalensis</i>					682		100	182
<i>Passer montanus</i>						151	99.5	184
<i>Streptopelia orientalis</i>				587			99.5	182