

# Smearing behavior of *Apis cerana japonica* in response only to attacks by *Vespa mandarinia*: First report on the use of diverse organisms as smeared materials by worker bees in emergency situations

Ayumi Fujiwara<sup>1</sup>, Yumiko Fujiwara<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>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 natural predator known for its collective assaults on the colonies of *Apis cerana japonica*, often leading to their annihilation during the autumn season. It is recognized that *A. c. japonica* form heat balls around scouting hornets that venture close to the hive, effectively killing them with heat and preventing subsequent catastrophic group attacks. Through the authors' research since 2011, it has been demonstrated for the first time that after attacks of scouting hornets, worker bees of *A. c. japonica* actively engage in the behavior of vigorously smearing plant fragments such as leaves and buds from various plant species around the entrance of their hives and it was also observed that they perform “emergency dance” during this behavior. These behaviors not occur with other hornet species (Fujiwara et al. 2016, 2018).

Additionally, during the investigation in the autumn of 2011, numerous smeared materials believed to be of non-plant biological origin were observed, with such observations consistently made during the same period in subsequent years. To verify these behaviors, from 2011 to 2015, the smearing behavior of worker bees was documented using video cameras and other devices, capturing both videos and images. In 2015, the materials smeared were observed under a microscope to verify the contents contained within. During this examination, it was observed that not only plant fragments but also multiple insect species and unidentified materials of biological origin were present.

In the autumn of 2016, field investigations and marking studies of individual worker bees confirmed that worker bees gnaw on individuals of mushroom sp. and used them as materials for smearing after attacks by *V. mandarinia*. In the autumn of 2017, it was discovered for the first time that worker bees were carrying larvae such as moths and *Diptera* back to the hive, clamped in their mandibles, engaging in smearing behavior. Upon observing these insects immediately after they were smeared by the worker bees, it was noted that many of the insect individuals were in a fresh state, suggesting they had been alive just before, with several individuals also found to be oozing body fluids. These evidences strongly suggested that at

least a portion of the insects used as smearing materials were captured in a living state by worker bees and subsequently applied to the hive as a means of *V. mandarinia*.

The authors' continuous behavioral research on worker bees since 2011 has demonstrated the use of smearing materials not only from plants but also from mushrooms and insects. Furthermore, it has been suggested that a broader array of organisms was used in their smearing behavior. On the other hand, until now, there have been no studies conducted that have analyzed the DNA of smearing materials to determine their origins from various organisms. Therefore, to investigate the smearing materials through DNA analysis, in the autumn of 2021, smeared materials were collected from a total of six colonies of *A. c. japonica* reared at three different research sites with varying surrounding environmental conditions. An attempt was made to assess the biotic composition of these materials through amplicon sequencing targeting the plant, fungal, insect, mammalian, and avian (birds) communities. The analysis revealed the detection of 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. Furthermore, preliminary DNA analysis also detected algae, mosses, fish, crustaceans, and other organisms.

In this study, we have for the first time discovered and demonstrated that *A. c. japonica* used a variety of organisms as smearing materials in response to attacks by their natural predator, *V. mandarinia*, through both behavioral investigation of worker bees and DNA analysis. From the smear samples collected in the surveyed areas of biodiverse Satoyama landscapes, rare species such as the mountain hawk-eagle (*Nisaetus nipalensis*), which have been officially designated as nationally rare wild plant and animal species by the Ministry of the Environment, were detected. Additionally, other wild animals inhabiting Satoyama and forests were found in higher abundance compared to other surveyed areas. In this way, distinctive use patterns of specific organisms reflecting the differences in surrounding natural environments and biotic compositions have been identified. Furthermore, this study demonstrated the potential contribution to the identification of the habitat of rare species and wild organisms that are difficult to confirm visually by analyzing the smearing materials of *A. c. japonica*. The understanding of the diverse use of various organisms through the analysis of smeared materials is considered to be intriguing, as it can demonstrate the connection between *A. c. japonica* and the local natural ecosystems, indicating the interplay between them.

## **Keywords**

Japanese honeybee, Asian giant hornet, smeared materials, plants, mushrooms, insects, animals, defensive 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<sup>1</sup>, 藤原 由美子<sup>2</sup>

<sup>1,2</sup>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、秋季にニホンミツバチ *Apis cerana japonica* の群れを集団で攻撃し、時に全滅させる天敵である。ニホンミツバチは、巣に偵察に来る斥候のオオスズメバチ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を防ぐことが知られている。著者らの 2011 年からの研究により、オオスズメバチの斥候の飛来後から、ニホンミツバチの働き蜂が複数の植物種の葉や芽等の植物片を巣箱の入り口周辺へ塗りつける行動を盛んに行うこと、その際に緊急的なダンスを踊ること、この行動は他のスズメバチ種に対しては起こらないことが初めて示された (Fujiwara et al. 2016, 2018)。

また、2011 年秋の調査時に、植物以外の生物由来と考えられる物質の塗り付けが多数確認され、その後毎年同時期に確認された。これらの行動の検証のため、2011 年から 2015 年にかけて、働き蜂の塗り付け行動を、ビデオカメラ等を用いて映像や画像で記録した。2015 年には、顕微鏡を用いて塗り付け物質を観察し、物質に含まれる内容物について検証した。その際、植物片だけでなく、複数種の昆虫類と正体不明な生物由来の物質が確認された。2016 年秋季には、野外調査と働き蜂個体のマーキング調査により、オオスズメバチに襲撃された後、働き蜂がキノコ類の個体を齧り、塗り付け物質として利用することが確認された。2017 年秋季には、働き蜂が大顎にガ類や双翅目の幼虫などを、大顎に咥えて巣箱に持ち帰り塗り付ける行動を初めて発見した。働き蜂により塗り付けられた直後にこれらの昆虫類を観察したところ、昆虫個体の多くは、直前まで生きていたと思われる新鮮な状態であり、体液が出ている昆虫類も複数個体確認された。これらの調査結果から、塗り付け物質として利用される昆虫の少なくとも一部は、働き蜂によって生きた状態で捕獲され、オオスズメバチからの防衛のために巣箱に塗り付けられていると考えられる。

著者らが 2011 年から継続してきた働き蜂の行動面の調査により、植物のみならず、菌類

や昆虫類の塗り付け物質としての利用が示された。さらに他にも多様な生物が塗り付け行動に利用されていると考えられた。一方で、これらがどのような生物に由来するのかを調べるために、塗り付け物質の DNA 分析を行った研究はこれまでになかった。そこで DNA 分析により塗り付け物質を調査するため、2021 年秋に周囲の環境の異なる 3 つの調査地点で飼育している計 6 群のニホンミツバチから塗り付け物質を採集し、植物類、菌類類、昆虫類、哺乳類、鳥類を対象としたアンプリコンシーケンス解析によって、これらの物質に含まれる生物相の把握を試みた。DNA 分析の結果、植物類(陸上植物)は 30 科 39 属、昆虫類は 25 科 31 属、菌類(ハラタケ綱)は 28 科 38 属、哺乳類は 11 科 15 属、鳥類は 11 科 13 属が検出された。また、予備的に実施した DNA 分析からも、藻類、蘚苔類、魚類、甲殻類等が検出された。

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、働き蜂の行動面の調査と DNA 分析の両面から初めて発見し証明した。生物多様性豊かな里山にある調査地で採取した塗り付け物質からは、環境省により国内希少野生動植物種等に指定されているクマタカ *Nisaetus nipalensis* などの希少種や、里山や森林に生息する野生動物が他の調査地と比較して多く検出された。ニホンミツバチの塗り付け物質の分析は、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。本研究から、周囲の自然環境や生息する生物相の違いを反映するような、特徴的な生物の利用傾向が確認された。塗り付け物質の分析による多様な生物の利用の把握は、ニホンミツバチと地域の自然や生態系との結びつきを示していくことができる、興味深いものであると考える。

## 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

## 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、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、蜂球形成(Ono et al. 1995)と二酸化炭素濃度上昇(Sugahara & Sakamoto 2009)の組み合わせにより熱殺することで、その後の壊滅的な集団攻撃を防ぐことが知られている。しかし熱殺以外の防衛行動については、既存の研究では明らかにされてこなかった。

ニホンミツバチは、オオスズメバチの襲撃時期である秋季に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内容物については明らかにされていない。著者らの 2011 年から 2015 年にかけてのニホンミツバチの継続的な研究により、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り取って大顎に咥えて持ち帰り、巣箱の入り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成分を含有し、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、働き蜂による塗り付け物質の採集行動に伴い、巣箱の入り口周囲における特徴的なダンス行動(“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. 2018)。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、同時期の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り取り巣に持ち帰っていた(Fujiwara et al. 2018)。このダンスを用いることで植物片等の巣箱の周囲に塗り付けるための物質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と考えられる(Fujiwara et al. 2018)。

2011 年秋季に働き蜂の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。それらは 2012 年以降も秋季に毎年確認された(図 2)。Mattila et al. (2020)の研究において、ベトナムに生息するトウヨウミツバチの巣箱が、集団攻撃を行う大型のスズメバチ類の *Vespa soror* に襲撃された際、働き蜂が新鮮な鶏、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。トウヨウミツバチの一亜種であるニホンミツバチも、集団攻撃を行うオオスズメバチに対して、様々な生物由来の原料物質を利用して巣を防衛している可能性が考えられ

る。

しかしこれまで、働き蜂がどのような原料からどのように物質を採集し持ち帰るのか、また異なる群間でも共通した物質を利用するのか、周囲の環境や地域の違いにより、採集する物質が異なるのかについては明らかにされていない。また、塗り付け物質に含まれる生物由来のDNAの分析により、これらの物質の構成内容の把握を行った研究はこれまでにない。そこで本研究では、働き蜂の塗り付け物質の採集行動の調査、顕微鏡による観察、DNA分析等により、これらの物質の採集過程とそれらを構成す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、岩手県と宮城県(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、岩手県一関市で里山の再生活動に取り組む仏教寺院・知勝院の主導により、自然再生推進法に基づく自然再生事業として『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の一角である(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)、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3.9 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、周辺環境の大きく異なる他地域の群れと、一関市の養蜂場の群れにおいて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、2021年に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。

### 塗り付け行動と塗り付け物質に関する調査(2011年～2021年)

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、毎年秋季に行われる塗り付けに関連する働き蜂の行動について、ビデオカメラによる巣箱の連続撮影や、手持ちのビデオカメラにより撮影して映像や画像を記録し、後程それらを検証した。また、2015年秋季に、一関市の養蜂場 A で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で観察しつつデジタルカメラで撮影し、植物以外の生物を由来とする物質が含まれているか否かの検証を行った。また、採集した塗り付け物質は、 $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で保存した。

養蜂場 A において、著者が各巣箱に塗り付けられた物質の匂いを自身の鼻で嗅いで確認したところ、森林に生育するキノコのような独特の芳香があった。そのため働き蜂が、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を考えた。2016年9月に、巣箱を設置している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訪れるニホンミツバチの働き蜂がいるかどうか調査した。

働き蜂が塗り付ける物質の組成について、より詳細な検証を行うため、養蜂場 A において、2017年10月15日と10月16日に、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、巣箱に帰巣した働き蜂を複数個体捕獲して、大顎に咥えている物質ごとデジタルカメラで撮影し、画像や映像を記録した。撮影した画像は、目視や実体顕微鏡による物質の確認に用いた。また、上記以外にも、2011年から2021年まで、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。

### 塗り付け物質の採取と DNA 分析 (2021年)

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集した。塗り付け物質のサンプル採取を行ったニホンミツバチの群れは、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日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。オオスズメバチを Fujiwara et al.(2016)の手法に倣って巣箱に接近させ、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。通常塗り付け物質は、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、時間をかけて徐々に巣箱の入口周囲に堆積していく。巣箱はニホンミツバチの採餌活動等を考慮し、通常屋外や屋外に面する場所に設置されている。そのため、塗り付け物質が堆積していく過程で、野外に生息する生物やその断片等が塗り付け物質に混入する可能性が考えられる。本来働き蜂が利用していない生物やその DNA が混入した場合、塗り付け物質を目視で観察する際や DNA 分析の際に検出される可能性があり、結果に大きな影響を及ぼす可能性も考えられる。そのため著者らは、塗り付け物質の採取の際、巣箱の前で待機し、働き蜂により巣箱に塗り付けられた物質を見つけ次第採集し、すぐにサンプル瓶に保存した。また、巣箱に塗り付け物質を持って帰巣する働き蜂個体の捕獲も行い、それらの個体から直接塗り付け物質の採取を実施した。これらの方法で採取した物質のサンプルは、 $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫で保存した。

2021 年 9 月～10 月に、養蜂場 B で飼育している 4 群から、サンプルの採取を 7 日間実施し、計 0.96g の塗り付け物質を採取した。また、盛岡市のニホンミツバチ 1 群から 2021 年 9 月に 1 日間で計 0.22g を、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 日間で計 0.27g の塗り付け物質を採取し、分析に供した。

採取した塗り付け物質中に含まれる生物由来の DNA 分析は、株式会社生物技研に委託した。著者らが利用を明らかにした植物類 (Fujiwara et al. 2016) の他、これまでの観察等から、物質中に含まれる可能性が考えられる菌類、昆虫類、哺乳類を対象遺伝子領域とし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、 $65^{\circ}\text{C}$ 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、 $65^{\circ}\text{C}$ 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 v3(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検出された鳥類についても、結果を示した。

## 結果

### 塗り付け行動と塗り付け物質に関する調査

2015 年秋季に養蜂場 A で採集した塗り付け物質を、実体顕微鏡により観察した結果、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。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いた。そのため働き蜂が、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を考えた。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、働き蜂により採集され塗り付けられた可能性が高いと考えられた。

2016年9月11日、キノコ類を訪れる働き蜂を探すため、養蜂場 A の周囲の落葉広葉樹林内の林道を中心に探索した。その結果、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のを発見した(図 4-1, 図 4-2)。そこで、齧り行動が確認されたキノコ類のパッチの前にビデオカメラを設置し、継続的に撮影し記録した。それらの映像解析の結果、同じキノコ類のパッチに繰り返し複数個体の働き蜂が訪れることを確認した。これらの個体が、オオスズメバチの模擬襲撃を実施した巣箱から飛んで来ているか否かを確認するため、この巣箱の前面を、同じくビデオカメラで継続的に撮影しつつ、キノコ類を齧った複数の働き蜂個体にマーキングを行い追跡した。その結果、これらの個体は、オオスズメバチの模擬襲撃を行った巣箱に帰巢したことを確認した(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、働き蜂により巣箱の入口周囲に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)。なお、株式会社生物技研に生物種同定を委託した結果、双翅目の蛹(図 5-1)はチョウバエ科 *Psychodidae* sp. と 100% の同一性を示した。働き蜂の行動の詳細な観察・記録と DNA 分析により、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、これまで考えられてきた植物(Fujiwara et al. 2016)にとどまらず、菌類や昆虫類等、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

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で検出された。

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* などは、巣箱の設置場所周囲に落葉広葉樹林が多く存在する一関市の 2 群でのみ検出された。人家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、例えば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、他の群れからは本種は検出されなかった。

菌類類(ハラタケ綱)の分析結果、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* は一関市で1群から検出され、ヌメリイグチ *Suillus luteus* は一関市で2群から検出された。その一方で、一般的に不食に該当すると考えられるフサタケ *Pterula subulata* が一関市の3群から検出され、毒キノコとされているスギヒラタケ *Pleurocybella porrigens*(今関ほか 2011, 表3)は、一関市の全ての群れから検出されたが、盛岡市、仙台市では検出されなかった。

哺乳類の分析結果、哺乳類11科15属、鳥類11科13属が検出された。ホンドタヌキ *Nyctereutes procyonoides* は全ての群れと地点で共通して検出された(表4)。イヌ *Canis lupus* やネコ *Felis silvestris* 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*、ホンドテン *Martes 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。また同地域において、環境省により絶滅危惧IB類(EN)と国内希少野生動植物種に指定されているクマタカ *Nisaetus nipalensis* が1群から検出された(表4)。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ニホンカワネズミ *Chimarrogale platycephalus* が3群から検出された(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、働き蜂が植物類、菌類、昆虫類、哺乳類、鳥類等を塗り付け物質の原料として利用することが明らかになった。また、本研究とは別に、これまで著者らが複数の地域で採取した塗り付け物質のDNAの分析調査からは、上記の分類群の他、コケ類、藻類、菌類(子囊菌門など)、魚類、甲殻類等が検出されている(藤原ほか 未発表)。ニホンミツバチが、天敵オオスズメバチの襲撃という緊急時に

際に行う塗り付け行動の際に、多様な生物を利用することが初めて示された。

さらに本研究では、DNA 分析では把握することができない、働き蜂の行動面にも注目し、継続的に調査、観察を実施してきた。例えば、働き蜂により巣箱に持ち帰られた昆虫類を、塗り付けられた直後に観察、採取したところ、直前まで生きていたと思われる新鮮な個体が多く認められ、大顎で齧られたためか体液が出ている昆虫類も複数個体確認された(例：図 5-2)。得られたこれらの調査結果から、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、働き蜂が生きた昆虫個体を積極的に捕獲していると考えられた。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することが、野外調査や観察により明らかとなった。一方で、今回 DNA 分析により利用が判明した哺乳類や鳥類等の生物について、どのような経緯で採集されたのか、本研究では明らかになっていない。トウヨウミツバチで既に示されているように糞(Mattila et al. 2020)や、あるいは死骸、毛や羽毛等の生物の断片を利用している可能性も考えられるが、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ナメクジ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、キノコ類のパッチに訪れる働き蜂を撮影した映像の解析や直接観察から、働き蜂が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おり(藤原ら 未発表)、体に胞子が付着しその後散布されることで、繁殖に寄与している可能性も考えられる。ニホンミツバチに関す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. 2017)。Takahashi et al. (2017) 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キノコやレタスからの物質の採取 (Yokoi 2015, Takahashi et al. 2017) 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希少猛禽類であるクマタカが検出された。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)。本研究では DNA 分析により、クマタカや、カワネズミなどの希少種や、ノウサギ、ヒメネズミ、ホンドアカネズミ、ホンドテン、キクガシ

ラコウモリ科などの野生生物が、一関市の群れのみで検出された。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の生息の把握にも貢献できる可能性が示された。本研究で分析に供したのは、これまでに採集してきた塗り付け物質のごくわずかな部分であるため、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、働き蜂が塗り付け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. 2018)、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. 2018)。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、塗り付け物質を採取するために出巣してから帰巣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. 2018)。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する(Fujiwara et al. 2016, 藤原ら 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。また、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取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り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、オオスズメバチに巣の入り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、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* が巣の出入り口を噛む時間は 94%減ったと報告されている。

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減じる成分が含まれる可能性を考えてきた (Fujiwara et al.

2016)。

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る。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、多様な生物群が、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、行動面の調査とDNA分析の両面から初めて発見し、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、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、これまでにない新たな形で、ニホンミツバチと地域の自然や生態系との結びつきを示していくことができる、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、明らかにしていきたいと考えている。

## 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鷺谷いづみ先生には、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様からは、一関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様には、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)の藤原誠太様、同会理事の長谷川清様、同会理事の齋藤高晴様とご家族の齋藤美知様にご協力いただいた。本研究は、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 回学術研究助成を得て実施された。ここに記して心から御礼を申し上げます。

## 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 (2018) 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.
- 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  
一名鑑日本のきのこ. 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 feses 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.



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



図 3. 2015 年 10 月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(左側が頭部). 齧られたような痕跡がみられる個体や、体が千切れている個体も確認されたが、約 12 個体が写っている. 黒光りして見えるのは幼虫の頭部であり、写真下部の定規のメモリは 1 mm.



図 4-1. 2016 年 9 月 11 日に撮影した、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. 発見時に既にならかなり劣化が進んでおり、種の特定はできなかった.



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(ビデオカメラ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.

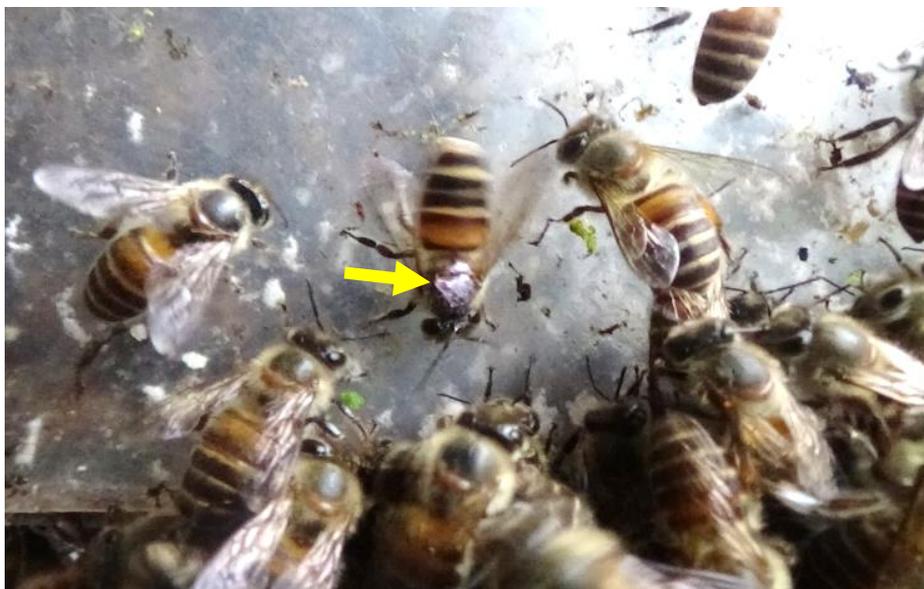


図 4-3. 2016 年 9 月 11 日に撮影した、キノコのパッチを訪れた後、帰巢した働き蜂(写真中央部黄色矢印、マーキングあり)、その周囲には塗り付け物質を多数確認.



図 5-1. 2017 年 10 月 15 日に撮影した、働き蜂により巣箱に持ち帰られ塗り付けられた双翅目のものと思われる蛹. 左写真は巣箱に塗り付けられた直後の蛹、黒矢印は蛹を拡大して撮影したもの(約 2 mm).



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

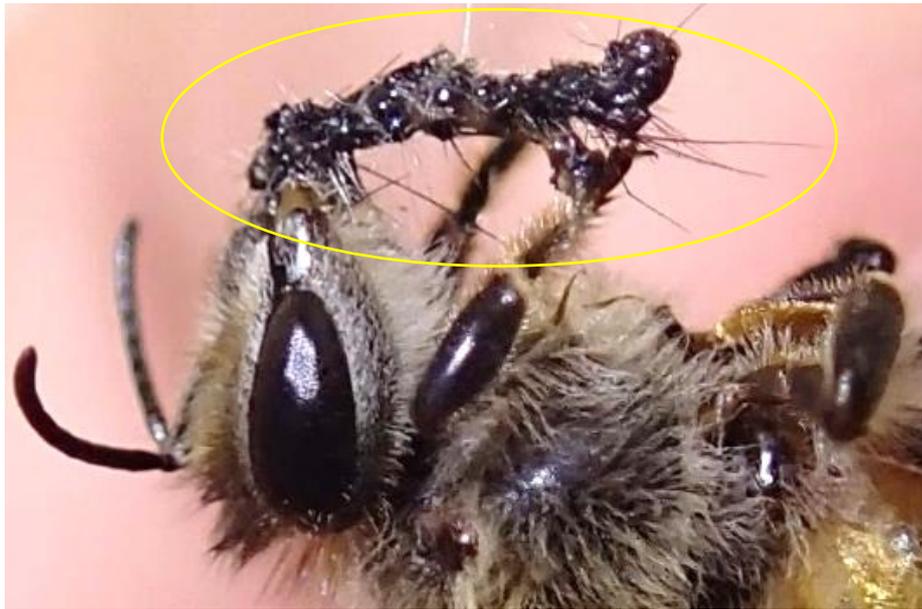


図 5-3. 2017 年 10 月 16 日に採取し撮影した、ガ類の幼虫(黄色丸)を啜えて巣箱に戻ってきた働き蜂、幼虫の尾端を啜えている、幼虫は齧られた痕跡があった。



図 6. 2013 年秋季における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みオオスズメバチが去った後、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.

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.

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>Canacomyrca</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>Symphyotrichum</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.

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>	260	6349		6702			100	318
<i>Drosophila bizonata</i>			133				99.1	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.	263						99.1	317
<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>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.			2281				97.7	218
<i>Psychodidae</i> sp.			2707				97.2	218
<i>Psychomora</i> sp.			108				98.2	218
<i>Psychomora</i> sp.					153		98.2	217
<i>Psychomora</i> sp.		1540					97.3	219
<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 sinensis</i>	1421					327	100	317
<i>Tenodera sinensis</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).

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.

Scientific name	Morioka	Itinoseki1	Itinoseki2	Itinoseki3	Itinoseki4	Sendai	Identity	Alignment length
<i>Apodemus argenteus</i>			265				100	172
<i>Apodemus speciosus</i>		413	386	752			100	171
<i>Bos taurus</i>	2642						100	170
<i>Canis lupus</i>	2170					60328	100	171
<i>Canis lupus</i>						732	100	170
<i>Canis lupus</i>						919	100	198
<i>Canis lupus</i>						1040	100	170
<i>Canis lupus</i>						550	100	169
<i>Canis lupus</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</i>			1628	7153		10126	100	173
<i>Felis silvestris</i>						4433	100	172
<i>Felis silvestris</i>				268		400	99.4	173
<i>Felis silvestris</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</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</i>				6437	10925		100	171
<i>Nyctereutes procyonoides</i>	15709	322	1617	2814	3567	1829	100	169
<i>Nyctereutes procyonoides</i>				271	499		99.4	171
<i>Nyctereutes procyonoides</i>	284				138		99.4	169
<i>Nyctereutes procyonoides</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 ferrumequinum</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.

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