Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-16

ニホンミツバチの群れが見せる特有な集団行動の生理・生態学的研究

菅原，道夫

(Degree)
博士（理学）
(Date of Degree)
2013-03-06
(Date of Publication)
2013-08-21
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
乙3210
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003210

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

神戸大学博士論文

ニホンミツバチの群れが見せる
特有な集団行動の生理・生態学的研究

平成 25 年 1 月

菅原　道夫

神戸大学博士論文

ニホンミツバチの群れが見せる
特有な集団行動の生理・生態学的研究

第１編　キンリョウヘンは、3-hydroxyoctanoic Acid と 10-hydroxy-(*E*)-2-decenoic Acid の混合物でニホンミツバチを誘引する。

第２編　窒息でなく、蜂球の環境（高温と共に、高湿度、高 CO_2 濃度）が致死温度の低下を招き、スズメバチの死を引き起こす。

平成 25 年 1 月

菅原　道夫

要旨

ニホンミツバチ（*Apis cerana japonica*）は、トウヨウミツバチ（*Apis cerana*）の1亜種とされる。北海道を除く日本列島に広く分布し、古来伝統的な養蜂に利用されてきた。セイヨウミツバチ（*Apis mellifera*）が導入された明治時代より昭和期まで蜜源が両者で競合するために、その生息が激減し一時はその種の絶滅が危惧された。近年、国外から安価なハチミツが輸入されると共に国内のセイヨウミツバチを使った養蜂が衰退するとそれに伴い、ニホンミツバチの生息数が増加し、加えてニホンミツバチを使用した養蜂が健康志向からか爆発的なブームを引き起こし、その生息数は過去にない数に増大している。

このニホンミツバチには、セイヨウミツバチにみられない特異な現象が知られている。その一つは、キンリョウヘン（*Cymbidium floribundum*）の花が咲くと分蜂群が花に集結してしまう現象である。二つ目は、天敵スズメバチに対する防衛行動—蜂球形成である。この二つの現象の解明を試みた。

1. キンリョウヘンの花に、ニホンミツバチの働きバチだけでなく、オバチも女王もさらには分蜂群や逃亡群までもが誘引される。この誘引物質が、3-hydroxyoctanoic Acid (3-HOAA) と 10-hydroxy-(*E*)-2-decenoic Acid (10-HDA) の混合物であることを明らかにした。

ニホンミツバチは、大ガク腺から 3-HOAA と 10-HDA を分泌し、この混合物は、集合フェロモンとして機能している。これらの物質は、混合物としてはじめて機能し、単独では誘引力がない。キンリョウヘンは、ハチの大ガク腺から分泌されるフェロモンを擬態しニホンミツバチを誘引していた。

これまで、日本では、ニホンミツバチの伝統的な養蜂にキンリョウヘンが利用され、分蜂群の捕獲に用いられてきた。この発見は、分蜂群を捕獲するルアーの作成に道を開き、東南アジアにおけるトウヨウミツバチの伝統的な養蜂の技術革新に貢献できる。さらに、ジャワからのトウヨウミツバチの侵入がセイヨウミツバチによる養蜂の威嚇となっているオーストラリアでのトウヨウミツバチの効果的な捕獲に貢献できる。

2. ニホンミツバチが、捕食者であるスズメバチを蜂球に閉じ込め殺す仕組みを研究した。スズメバチが蜂球に捕捉されると、蜂球内の温度と湿度が急速に上昇する。温度は5分後には46℃に、湿度は90%以上になる。さらに、蜂球内の炭酸ガス濃度は4%に達する。多

くのスズメバチは、蜂球内では10分で死ぬ。この死が蜂球内のどのような環境によるか、条件を変え致死温度を測定することで考察した。

実験に使用した4種のスズメバチでは、いずれも呼気中（CO_2濃度3.7%）では、2℃以上も致死温度が低下した。加えて、相対湿度が90%以上になるとさらに致死温度が低下した。炭酸ガスの増加により減少する酸素を補っても致死温度は変わらない。ニホンミツバチは、スズメバチを窒息（呼吸をできなくする）させるのではなく、高温に加え、高炭酸ガス、高湿度の環境をつくりスズメバチの致死温度を下げることで殺している。

目　次

第 1 編

1. 序論 1
2. 材料と方法 2
　2-1　ハチとランの確保 2
　2-2　生物検定 2
　2-3　活性化合物の精製、化学分析と同定 4
　2-4　統計処理 5
3. 結果 5
　3-1　生物検定 1 による花、花の部分、花抽出物の活性 5
　3-2　活性成分の抽出　(Extraction)、純化 (Purification)、分離　(Isolation) 5
　3-3　3-HOAA の構造解析とその活性 6
　3-4　二番目の活性化合物の同定 6
　3-5　生物検定 2 による群れの捕獲 7
4. 考察 7
5. 写真図版 10

第 2 編

1. 序論 15
2. 材料と方法 16
　2-1　ミツバチコロニーとスズメバチの捕獲 16
　2-2　蜂球の作成と蜂球の温度測定、スズメバチの生死の確認 16
　2-3　蜂球の炭酸ガスの測定 17
　2-4　致死温度の測定 17
　2-5　湿度の設定と測定 17
3. 統計処理 18

4. 結果 18
4-1　蜂球での生死 18
4-2　蜂球の温度測定 19
4-3　蜂球の炭酸ガス濃度の測定 19
4-4　蜂球の湿度測定 19
4-5　致死温度測定 20
5. 考察 20
5-1　スズメバチの蜂球での死の原因 20
5-2　蜂球の最高温度の均一性 21
5-3　4 種のスズメバチの致死温度の差とミツバチの致死温度の均一性 21
5-4　今回の研究成果と他種のスズメバチに対する蜂球研究との比較 22
6. 写真図版 23
謝辞 33
参考文献 34

第１編

キンリョウヘン（*Cymbidium floribundum*）は、3-hydroxyoctanoic Acid と10-hydroxy-(*E*)-2-decenoic Acid の混合物でニホンミツバチ（*Apis cerana japonica*）を誘引する。

1. 序論

ニホンミツバチ（*Apis cerana japonica*）は、4 亜種が知られているトウヨウミツバチ（*A. carana*）の 1 亜種である（Ruttner 1988）。近年、東南アジアの島々に住む種の研究が進み、トウヨウミツバチは、現在 6 morpho-clusters に分類されている。その中でニホンミツバチは、morpho-cluster I 、morpho-subcluster f に分類される (Hepburn and Radloff 2011)。

ニホンミツバチは、セイヨウミツバチ（*A.mellifera*）が導入される以前から日本国内での伝統的な養蜂に利用されてきた。ニホンミツバチには、セイヨウミツバチにない特異な行動特性が知られている。その 1 つは、東洋蘭の 1 種、キンリョウヘン（*Cymbidium floribundum*）の花が咲くと働きバチだけでなくオバチも女王バチも、さらには分蜂群、逃亡群までもが花に誘引され集結してしまう（Fukuda 1988, Sasaki et al. 1992, Sasaki et al. 1995）。その結果、本来何もしないオバチが花粉媒介をすることがみられ、特異な現象として注目された（Sasaki et al. 1991）。興味深いことに、セイヨウミツバチでは、その働きバチはもちろん、群れも全く花に誘引されない（Sasaki et al. 1995）。2 つ目は、天敵のスズメバチに対して蜂球を形成し、スズメバチを殺す行動である（Ono et al. 1987,1995, Sugahara and Sakamoto 2009）。

まず、花に誘引され集結してしまう現象の解明を試みた。キンリョウヘンと同様に Ophrys の花は、送粉者に与える報酬を持たないが、ジガバチのオス（*Andrena* males）を花に誘い、ジガバチに花粉媒介をさせる。花の唇弁がメスの腹部に擬態し、さらに念入りに唇弁からメスの出す性フェロモンが分泌されていることが明らかにされている（Barth 1991, Ayasse et al. 2003）。ところが、これまでミツバチの群れ全体が誘引され、花に集結してしまう現象はキンリョウヘン以外に報告がなく、どのような仕組みによるか、この現象が生態学的にどういう意義を持つのかは、興味が持たれてきた。

キンリョウヘンの花に、トウヨウミツバチの大ガク腺に含まれる 3-HOAA が存在すること（Sasagawa and Matsuyama 1997, Keeling et al. 2001）、ハチを誘う物質が花弁・ガクから分

泌されていること (Sugahara 2000 b) が明らかにされ, キンリョウヘンのエーテル抽出物が、トウヨウミツバチの他の 2 亜種でも誘引効果があることが知られていたが (Sugahara et al. 2005)、誘引物質の同定はできていなかった。今回、ニホンミツバチを誘引する物質を特定したのでここに報告をする。

最近、日本国内では、以前には顧みられなくなっていた在来種のニホンミツバチを使った伝統養蜂が復活し、養蜂家は花を付けたキンリョウヘンを利用して分蜂群を捕獲することを常用している。この誘引物質の同定は、科学的な興味と共に伝統養蜂技術の革新という面でも期待される。さらに、ジャワからのトウヨウミツバチの侵入が、セイヨウミツバチによる養蜂の威嚇となっているオーストラリアでのトウヨウミツバチの効果的な捕獲に貢献できる。

2. 材料と方法

2-1 ハチとランの確保

大阪府枚方市で捕まえた分蜂群を守口市内で、セイヨウミツバチ用の巣箱と伝統的な巣箱で飼育した。このニホンミツバチを生物検定 1、2 の実験材料として使用した。また、自然巣からの群れを京都府綾部市で捕獲し、生物検定 2 に使用した。キンリョウヘンを近畿地方の民家から譲り受け、守口市内で向山 (Mukoyama 2000) によって記述された方法により栽培した。

2-2 生物検定

生物検定 1

生物検定 1 では、働きバチの花と化合物への誘引活性を、[flower equivalent (FE)] とした量で示した。それぞれ、示された回数の繰り返しを、5 花 (5FE)、花弁・ガク (5FE)、唇弁・ずい柱 (5FE)、 酸性分画 (20FE)、中性・塩基性分画 (20FE)、 3HOAA (7FE) と 10-HAD (11FE) の混合物でおこなった。検定条件は、 1) 夏を避け春と秋の天気が良い日か曇りの日、 2) 微風か無風日、 3) 気温は 17℃～25℃を選んでおこなった。さらに、検定は、午前 1 回、午後 1 回、日陰でおこなった。過剰な刺激を避けるため、3 回以上同じ巣箱からハチを取り出すのは避けた。

ハチの巣箱から 5m離れた地面にベニヤ板 (900×900×5 mm) を敷いて検定場所とした。ベニヤ板の上端に 2 枚の黒紙 (200×150 mm) を 5cm 離してピンでとめた。 ベニヤ板の上端から少し離して、扇風機（直径 30 cm , Sanyo EP-30KD）を設置し使用した。 扇風機は、

ハチがぶつからないように網で被い、最低風速 (ca. 1 m/s) にセットして、穏やかな空気の流れが検定場所の上端から下端に流れるようにした。サンプルは、黒紙の中央に置き、他方の黒紙はコントロールとした。テストの前に巣箱の外側の巣板 (図 1-A) を取り出した。外側の巣板は育児圏がなく、女王を取り出すことを避けることができる。この場所のハチの多くは foragers とされている (Sakagami and Akahira 1958)。常に 3 個の巣箱を用意してそれらから順に巣板を取り出した。総数計 6 個の巣箱を実験に使用した。

検定場所の上で巣板を振ることで、2 枚の黒紙から 10cm はなしてミツバチ (約 100～200 匹の働きバチ) を検定場所の中央に落とした（図 1-A)。ハチを落とした後で写真を撮り、落としたハチの数を計測した。検定場所に落とされたハチは約 20sec は動かなかった。その後、動き出し探索行動を示した。もし、試薬に誘引活性があればハチは動き出し、約 2min 後には試薬に集結した。この時、集結したハチの数を記録するためにもう 1 枚の写真を撮った (図 1-B, 1-C, 1-D)。ハチの集結率を 2 枚の写真から求め%で示した (図 2)。 集結時間は、外部条件（温度、風速、時刻、季節）に影響された。二つの紙が同じ誘引活性を示した時、テストされたハチは落とされた地点から移動して 2 枚の黒紙に等分に集まった (Sugahara et al. 2010)。この結果は、ハチの中にリーダーがいないことと、それぞれのハチは匂いに対して独立して行動していることを示す。誘引活性のない成分が与えられたら、すべてのハチは徐々に飛び上がり巣箱に帰り、どの黒紙にも近づかない。これらの観察から、個々の紙上の物と化合物の誘引活性をコントロールと比較した。

生物検定２

次に示す化合物の Swarm-catch 活性を求めた; (a) 酸性分画 (40FE)、(b) racemic 3-HOAA (*R*-isomer として 28FE)、(c) 3-HOAA (*R*-isomer として 14FE) と 10-HAD (22FE) の混合物。

ニホンミツバチの分蜂群 (swarm ; 働きバチ、オバチ、女王バチからなる) は、巣を離れると近くの木の太い枝に集結する。セイヨウミツバチと同様に働きバチたちが最初に集まる。女王は分蜂過程の後半に分蜂群に加わる (Seelley 1985)。分蜂群が集結する枝は表面がざらざらしている特徴がある。さらに、一度分蜂群が集結した場所にはハチの体から分泌されたミツロウが付着しているのが原因で、その後何回も同じ場所に分蜂群は集結する。このような特徴を備えた分蜂群誘導板 (図 3-B) を作成した。450×450×5ｍｍのベニヤ板の表面にステンレス製の網 (1×1 mm のメッシュ) を張り、溶けたミツロウをその上に流し、巣箱から 5～10m離し、高さ 2m、間隔 2m、2 枚の分蜂群誘引板を、表面を下向きに設置した (図 3-C)。一方の分蜂群誘導板の金網付近に試験化合物 (サンプル) をしみ込ま

せた黒紙（200×150mm）を、もう一方には黒紙のみを、コントロールとして押しピンで固定した。飛び立った分蜂群は、サンプルに誘引される場合は、サンプルをしみこませた黒紙側に集結する。捕獲された群れや逃亡群の場合は、あらかじめ群れを段ボール箱（40×30×20 cm）に収容し、ハチの巣箱から離れた場所に同様な間隔、高さに2枚の分蜂群誘引板を設置し、ダンボールからハチの群れを2枚の分蜂群誘導板の間の地上に落として検定した。この検定は、4月から7月の天気のいい日、気温がほぼ20℃かそれ以上の日におこなった。

2-3　活性化合物の精製、化学分析と同定

新鮮な400個の花から、花弁・ガクを採集した。それを20時間300mlのdiethyl etherに浸しエーテル抽出物を得た。固形成分をろ紙でろ過することで取り除いた後、5 % sodium bicarbonate溶液（150 ml×2）で2回洗浄した。飽和NaCl、2N-HClでpHを酸性化した後、水相はdiethyl ether (350 ml) で抽出した。元のエーテル相は、中性・塩基性の化合物から構成される。2次のエーテル相は、酸性の化合物から構成される。Na_2SO_4で水を取り除き、in vacuoで各々40 mlに濃縮し生物検定1でそれらの活性を検定した。不活性である花（400個）の唇弁・ずい柱も上記と同様な方法で抽出した。

Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS分析）は、HP-5MS capillary column (0.25 mm i.d.×29 m, 0.25 μm film thickness ; Agilent Technologis Inc.) を使用し、70 eVで作動させ、mass selective detector (5975 Inert XL; Agilent Technologis Inc.) を備えたNetwork GC System (6890N;Agilent Technologis Inc.) を使用して行なった。10℃/min の割合で60℃ (2 min) から290℃まで変化するようにプログラムしたasplit- less mode で、流速1.00ml/ min、carrier gas として Helium を使用した。GC と GC-MS data は、MS database (Wiley275 library;Hewlett Packard Co.) を用い、Chemstation (Hewlett Packard Co.) から得た。

^{1}H-nuclear magnetic resonance (NMR) spectrum (重アセトン中, 400 MHz, internal standard として TMS) と ^{13}C NMR spectra (重アセトン中, 100 MHz) は Bruker Biospin AC400M spectrometerで記録した。

Chiral GCは、flame ionization detector をもち InertCap CHIRAMIX capillary column (0.25 mm i.d.×30 m, 0.25 μm film thickness; GL Sciences Inc.) を供えた Agilent Technologies 6890N を使って行った。3℃/min の割合で40℃ (2 min) から180℃まで変化するようにプログラムしたasplit- less mode で、流速50ml/ min 、carrier gas として Helium を使用した。温度を15min 間180℃に維持した。

NMR spectrum を得るために、花弁・ガクの部分から活性のある酸性分画 (255mg) を SiO_2 column chromatography (Wako, C-200, 5 g, 径 12.6 mm×高さ 70 mm) をおこない、次の条件 ; diethyl ether, ethyl acetate, acetone (50 ml each) で順に流出した。すべての分画は GC-MS で監視し、大部分の成分は ethyl acetate に収容した。

標準の *R*-3-HOAA (97% ee), *S*-3-HOAA(100% ee) と ラセミ体は報告されている方法 (Kikukawa et al. 1987) により作られ、それを Chemical Soft R. & D. Inc. (三重県) より購入した。10-HDA は Phero Tech Inc.より購入した。

2-4 統計処理

サンプル側と、コントロール側に集結したハチの数を各々観察し、観察された数の違いを goodness-of-fit ([McDonald]) の反復 G-tests にいれ、probabilities (*p*) を算出した。

3. 結果

3-1 生物検定 1 による花、花の部分、花抽出物の活性

図 1-B と 図 2-Aに示されるように、新鮮な5花は巣板から落とされたハチを誘引する。その活性は、51.1 ± 7.4 % (平均±標準偏差 %) であった。花は 4 つの部分からなり、大きく 2 つに区別される ; 花弁・ガク (petal と sepal)、唇弁・ずい柱 (labium と columns) である。花弁・ガク (5 FE) の活性は、49.3 ± 17.2 %で示され、唇弁・ずい柱には、活性がない (図 1-C と 2-B)。

エーテル抽出の酸性分画 (acidic ether fraction) [20 FE, 20 花の花弁・ガクから分画されたサンプル] は、同じ材料からの中性・塩基性分画と比較した。図 2-C に示されるように、酸性分画は強い誘引活性を示し、その活性は 74.2 ± 16.0 %であった。一方、中性・塩基性分画には、ハチは誘引されなかった。この結果は、花の活性成分が酸性化合物であることを示した。

3-2 活性成分の抽出 (Extraction)、純化 (Purification)、分離 (Isolation)

材料と方法で述べたように、誘引活性は、400 個の花から分離した花弁・ガクの酸性分画に観察された (図 2-C, 各々20 FE として検定)。活性のある花弁・ガクの酸性分画(A)と唇弁・ずい柱の不活性な酸性分画(B)を GC-MS の資料として測定した。図 3-A に示したように、花弁・ガクの酸性分画は、4 つの主なピークを示した ; 1(t_R 11.2 min), BHT (2,6-bis(1,1-dimethylethyl)-4-methylphenol) (diethyl ether の安定化剤, t_R 13.5 mm), 2 (t_R 15.5 min), と未知の化合物 (t_R 21-22 min)。一方、図 3-B に示すように、 唇弁・ずい柱の不活

性な酸性分画は2つの共通のピークだけを示した；1(少量, Aの1/19の量)、BHT。ピーク2と未知の化合物 (t_R 21-22 min) は観察されなかった。結果から活性のある化合物は、化合物1 (ピーク 1) と想像された。

3-3 3-HOAAの構造解析とその活性

花（1900 個）由来の酸性分画 (255mg)を精製して得た化合物1 (17mg) の ^{1}H-NMR分析 (重アセトン中) は、次のように水素16個の存在を支持した；δ (ppm) 0.9(3H, t, J=7Hz, -CH3), 1.25-1.43(4H, m, -CH_2-×2), 1.43-1.55(4H, m, -CH_2-×2), 2.41(1H, dd, J=15.4 Hz, 8 Hz, 2-CH_2), 2.50(1H,dd, J=15.4 Hz, 4 Hz, 2-CH_2), 3.86(1H br, OH), 4.01(1H, m, 3-CH), 10.67(1H, br, -COOH)。^{13}C-NMR 分析 (重アセトン中) は、以下のように炭素 8 個の存在を示した；-COOH δ (ppm)・173 [-C(O)-OH]-], δ・67.7 [sp3-C with -O-],δ・41.7, δ・36.9, δ・31.7, δ・25.1, δ・22.4, δ・13.4 [sp3C×6]。質量分析では、分子イオン M+ m/z 160 (検出できず)、基準イオン m/z 89(100%), および以下の開裂イオン; m/z 142(M+-18, 1.8%), 124(2.9%), 101(7.9%), 96(5.8%), 83(22.6%), 71(62.5%), 55(25%), 43(30.3%) を示した。

本化合物は分子イオン M^+ を与えず、M^+ -18 イオンを m/z 142 に最大イオンとして観察できることから、容易に脱水し共役系となって安定できる3-ヒドロキシ-カルボン酸と推測した。さらに、基準イオン m/z 89 は3-ヒドロキシアルカン酸のα-開裂イオンに相当し、二番目に大きい m/z 71 断片は 3-ヒドロキシオクタン酸のアルキル側鎖断片 ($CH_3CH_2CH_2CH_2CH_2$-) に相当した。したがって化合物1の構造は3-ヒドロキシオクタン酸 (3-HOAA) と結論できた。天然3-HOAA の分析結果（^{1}H-と ^{13}C-NMR及び質量分析）がラセミ体3-HOAA評品のそれらと完全に一致する事を確認した。

R-3-HOAA (97% ee)（*R*-体） および *S*-3-HOAA (100% ee)（*S*-体）はキラルカラムによるGC分析で、それぞれ保持時間41.95 min と 41.78 min を示し、天然3-HOAA (71 μg/花) はコクロマトグラフ法で*R*-体と一致した。しかし*R*-体[0.5 mg, 7 FE] は生物試験で、*S*-体(0.5 mg)および ラセミ体 (1.0 mg, *R*-体として7 FE, 図2-D)とともに全く活性を示さなかった (*R*-、*S*-体ともにデータは示さず)。この事実は、抽出物の酸性活性画分にさらに第二成分が存在することを、強く示唆した。

3-4 二番目の活性化合物の同定

図 3 に示されるように、花弁・ガクより得られた酸性分画 (A) と唇弁・ずい柱より得られた不活性な酸性分画 (B) のもっとも顕著な違いは、(A) に見られる t_R 22 min の無名なピークと他の微小なピークとともに、化合物2 (t_R 15.5 min におけるピーク 2) の存在であ

る。この GC-MS spectrum は、m/z 186 (検定不能) における M^+ ion ,そして m/z 55 (100%) における次の diagnostic ions base ion ; m/z 168 (M+-18, 5.3%), 156(4.5%), 150(2.6%), 138(6.7%), 124(22.3%), 108(21.7%), 99(37.0%), 86(48.5%), 81(63.9%), 73(32.7%), 87(58.0%), と 41(61.3%) を示す。そして、構造が 10-hydroxydecanoic acid (一致率; 91%, 10-HDA, 23 μg/花。これはハチが持つ既知の化合物である) であることを示す。真正な 10-HDA の mass spectrum は花から得られた化合物 2 の mass spectrum と一致した。後で述べるように、この 10-HDA と 3-HOAA の混合物はハチの集結活性を示し、強い相乗作用が二つの化合物の間に示された。racemic 3-HOAA と natural *R*-isomer の間には、活性の違いは見られなかった (data を示さず)。図 2 に示すように、3-HOAA (racemate, 1mg, *R*-isomer として 7 FE) と 10-HDA 0.25 mg (11 FE) の混合物は、コントロールとしてのそれぞれ単独の成分と比べ活性が見られた (それぞれ、図 2-D, 56.0 ± 20.2 % と 図 2-E, 54.1 ± 19.8 %)。そして、その値は、5 花の結果 (図 2-A, 51.1 ± 7.4%) と比べられた。その結果から、花の活性成分は *R*-3-HOAA と 10-HDA の混合物であると結論づけることができた。二つの化合物は、活性を引き起こすには、相乗的で不可欠である。それぞれのペアー (図 2-A から 2-E) は、replicated G-tests of goodness-of-fit ([McDonald]) において $p<0.0001$ の値で、有意差が見られた。

3-5 生物検定 2 による群れの捕獲

表 1 に示すように、自然分蜂群 (3 回)、逃亡群 (2 回) の合計 5 回の試行を [racemic 3-HOAA (28FE)] で処理した分蜂群誘導板を使い行ったが、ハチの群れは誘引されなかった。結果は、生物検定 1 で示されたように、3-HOAA 単独では、ハチの群れに対して活性がないことが証明された。ところが、[acidic fraction, 40 FE] は、活性があり、咲いた花と同様に (図 4-A) 自然分蜂群を集結させることができた。[3-HOAA (14 FE) と 10-HDA (22 FE)の混合物] は、4 回の試行 (2 回は分蜂群で、2 回は捕獲した群れで試行) すべてで活性があった。分蜂群誘導板へのハチの集結は、30min 以内に行われた (図 4-C から 4-D)。生物検定 2 の方法は、養蜂家が自然分蜂群や逃亡群を捕獲するための効果的な仕掛けを実用化する方法を示唆することができる。

4. 考察

ニホンミツバチの養蜂家にとってもっとも重大な仕事は、野外から分蜂時期の間にハチの群れを捕獲することと、その群れを適切な巣箱に入れ設置することにある。あるいは、前もって設置した巣箱に群れを導くことにある。これら二つの方法は、偶然に大きく左右

される。セイヨウミツバチの場合は、Nasonov gland から分泌される化合物が働きバチを誘引する集合フェロモンとして同定され、巣箱に入れて効果的に群れを誘引するルアー“Swarm Catch” が開発されている。

ニホンミツバチの Nasonov gland からの成分は、ハチの定位成分と機能していて、誘引効果があることは知られているが (Sugahara 2005)、その実体は解明されていない。他方、キンリョウヘンの花は、ニホンミツバチだけでなくトウヨウミツバチの他の亜種の群れを誘引することが知られている。キンリョウヘンの花は、伝統的な養蜂技術として、自然の群れの捕獲に実際に用いられてきた (Sugahara 2005)。

キンリョウヘンから作り出された交配種の研究から、誘引活性は、花の色や形、花が分泌する花蜜の存在とは関係せず、花の中に含まれる成分に直接関係すると思われた (Sugahara 2005)。今回の研究は、花に存在する群れの誘引成分が花の花弁・ガクに見つかり、化学分析と生物検定で、3-HOAA と 10-HDA の混合物であることが明らかになった。3-HOAA (2 mg, racemic mixture, 14 FE) と 10-HDA (1mg , 22 FE) の混合物は、活性があり、自然分蜂群だけでなく逃亡群の捕獲も出来た。今後、各々の成分の最適量と最適なデザインの仕掛けを、実際の使用経験に元づき研究されなければならないが、100 個以上の花を付けたキンリョウヘンと等価であると評価できる。

花の酸性抽出物の主な成分 3-HOAA は、ニホンミツバチの大ガク腺の構成成分であると報告されていた。他方、働きバチは、3-HOAA の他に 9-ODA (9-oxo-(*E*)-2-decenoic acid) や 10-HDAA (10-hydroxydecanoic acid) と共に 10-HDA をもつていた。セイヨウミツバチの働きバチには、3-HOAA が欠けている (Matsuyama et al. 1997, Keeling et al. 2001)。さらに、セイヨウミツバチの女王フェロモン(QMP)とされる 9-ODA は、セイヨウミツバチの大ガク腺に存在する。そして、royal jelly の主成分とされる 10-HDA と 10-HDAA は、セイヨウミツバチの働きバチの大ガク腺から分泌される (Winston 1987)。トウヨウミツバチ (*A. cerana*) に存在する 3-HOAA と 10-HDA の二者は、ニホンミツバチを誘引するという相乗作用をもつ活性のある成分としてキンリョウヘンの花弁・ガクから明らかにされた。この一致は、かつて Sasagawa と Matsuyama によって Nasonov gland 成分とキンリョウヘンの花の成分が一致すると観察された時に言われた「ニホンミツバチを誘引する腺成分（今回は大ガク腺であるが）を花が擬態している」(Sasagawa and Matsuyama 1997)という仮説を支持するものである。大ガク腺に存在が知られている他の化合物と 3-HOAA の混合物が生物活性を持つかどうかの検定は早急に確かめられなければならない課題である。

ミツバチとランの間の生態学的な関係は、明らかではない。ハチの群れが集結した花の温度は36℃に保たれ、普通1昼夜群れは移動しない (Sugahara 2005)。もしこの保温が好ましくない気候条件下に生息する花の受粉・受精に効果的ならば、ハチの群れの集結がキンリョウヘンの受粉・受精に効果的に働くと思われる (Du Puy D J and Cribb P 1988)。

最近、日本においてニホンミツバチの伝統的な養蜂がよみがえっている。そして、花を付けたキンリョウヘンが群れの捕獲に使用されている。ハチを誘引する活性成分の同定は、科学的な興味引き起こすと同時に、伝統的な養蜂の技術革新を引き起こすと思われる。

加えて、オーストラリアでは、ジャワから侵入するトウヨウミツバチに高い関心が払われている (Anonymous, 2011)。それはこのミツバチがオーストラリアで飼われているセイヨウミツバチに感染する病気を伝播する可能性があるからである。侵入するトウヨウミツバチの駆除が必須とされるので、ハチを誘引する成分の同定は、ハチの捕獲の有効な手段の開発に大きく貢献するだろう。

5. 写真図版

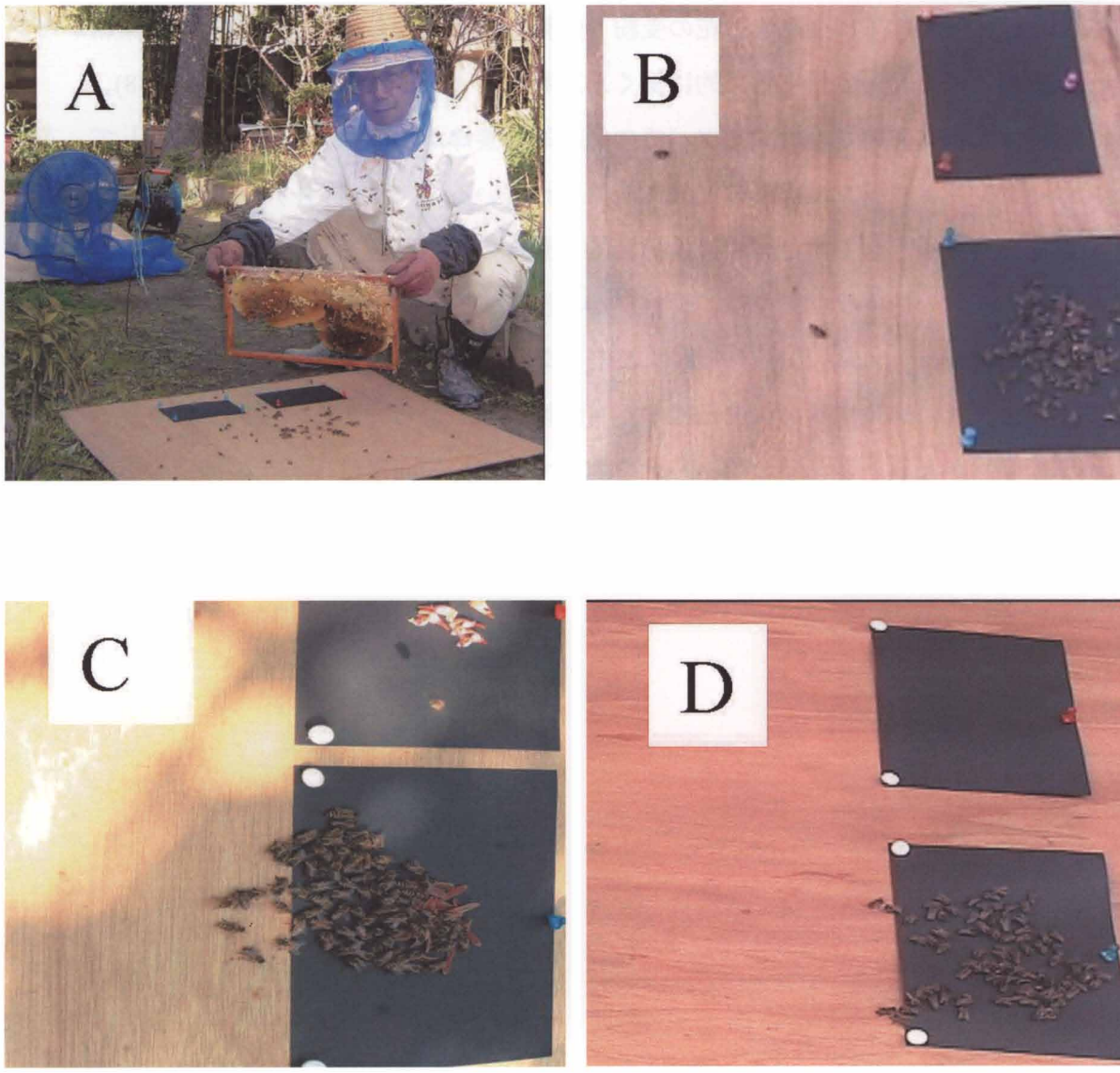


図 1　(A) 生物検定 1 の仕組みを示す写真。(B) キンリョウヘン（control（上）、5 花（下））の花へのハチの誘引の様子を示す。ハチは花の周りに集結する。 (C) 唇弁・ずい柱（上）と花弁・ガク（下）に対する検定の様子。ハチは花弁・ガクに集結する。 (D) 3-HOAA (1.0 mg/ml)（上）と 3-HOAA + 10-HDA (1.0 mg/ml + 0.25 mg/ml)（下）に対する検定の様子。ハチは 3-HOAA + 10-HDA に集結する。

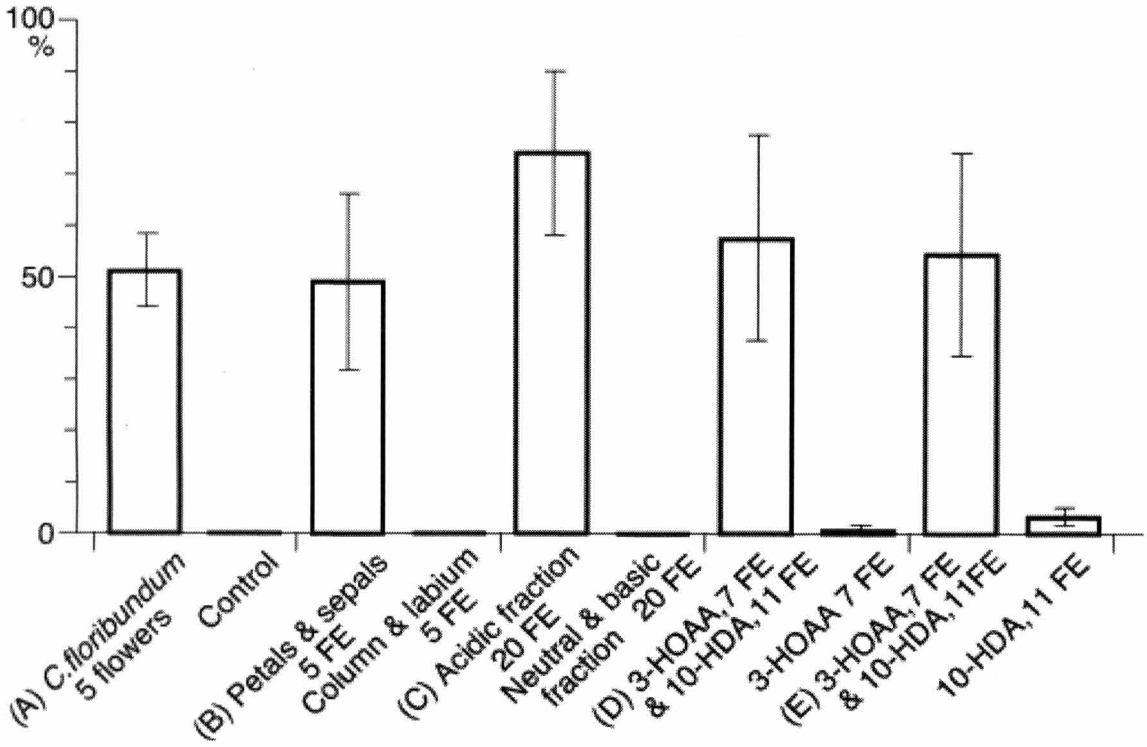
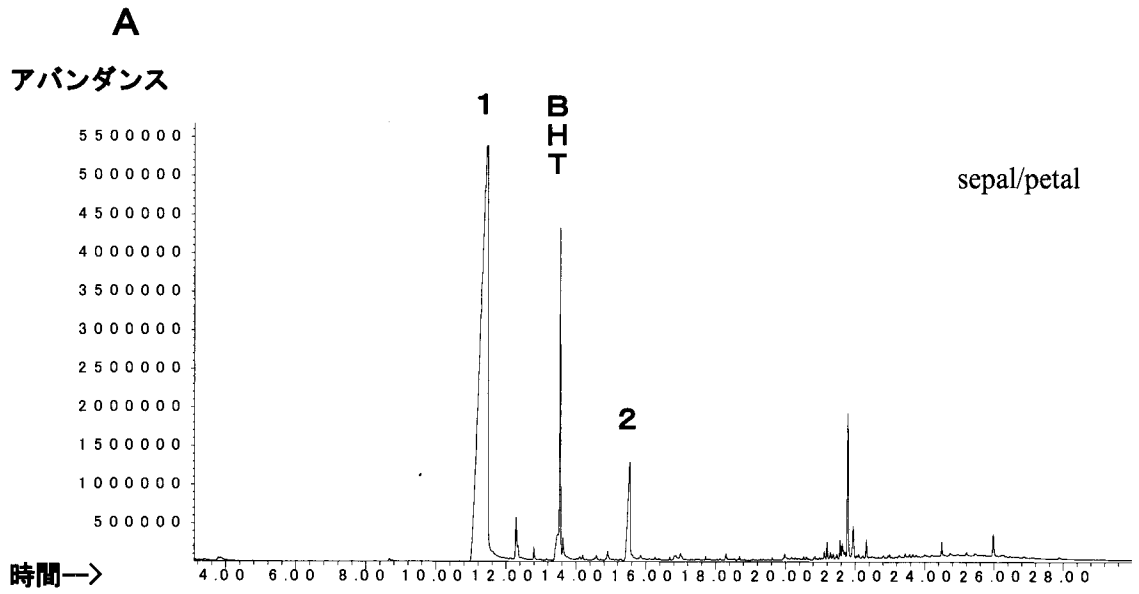


図 2　生物検定 1 の集計。それぞれの pair において集結したハチの数は、goodness-of-fit (McDonald) の G-tests で同様にテストして仮説を検証した。 すべての pair は、$p < 0.0001$ のレベルで優位に差が見られた。



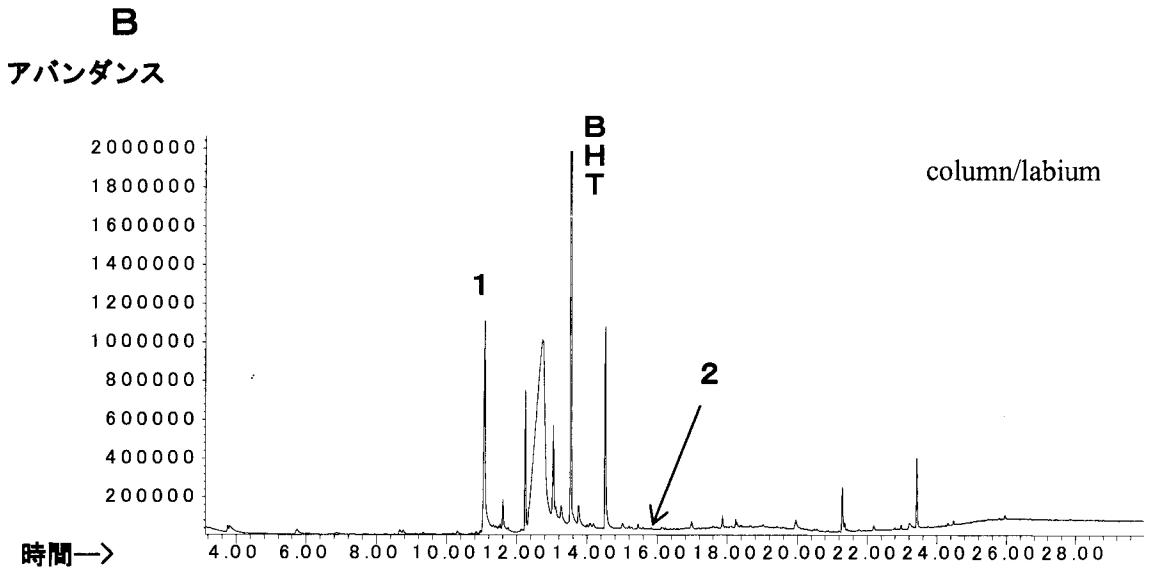


図 3 (A) 花弁・ガク (酸性分画) と(B) 唇弁・ずい柱 (酸性分画) の ether extract の GC-MS 分析。Peaks 1 と 2 は、それぞれ、3-HOAA と 10-HDA を示す。花弁・ガク における 3-HOAA の量は、71 μ g/flower であり、10-HDA の量は、23 μ g/flower であった。量比は、ほぼ 3:1 であった。唇弁・ずい柱 には、10-HDA は存在しなかった。Butylated hydroxytoluene (BHT) は、エーテルの安定化剤である。

A

B

C

Bees released

D

Aggregated

図 4　分蜂群と生物検定 2

(A) 5 花茎を持つキンリョウヘンに集結した分蜂群　(B) 分蜂群誘導板に集結した自然分蜂群　(C) 捕獲した群れ (7/06 2011) を検定場所近くに放した（生物検定 2)。その場所は“Bees released”　と示す　(D) 3-HOAA と 10-HDA を黒紙に滴下し、黒紙を貼り付けた分蜂群誘導板に群れは 20 分後集結した。その場所は“Aggregated”と示す。

Date	Sample	Colony	Number of bees	Sample side	Aggregation	Note
4/27 2007	3-HOAA(1mg/ml, 4ml)	swarm	5000	right	another	landing on another swarm-luring board
4/27 2007	3-HOAA(1mg/ml, 4ml)	absconding	4000	right	another	landing on the lower trunk of a tree
5/03 2007	3-HOAA(1mg/ml, 4ml)	absconding	4000	right	right, left	landing on both sides
5/04 2007	3-HOAA(1mg/ml, 4ml)	swarm	4000	right	another	landing on wall of block
5/09 2007	3-HOAA(1mg/ml, 4ml)	swarm	5000	left	another	landing on another swarm-luring board
4/30 2007	*C.floribundum* extract (acidic 4ml)	swarm	4000	left	left	
5/09 2007	*C.floribundum* extract (acidic 4ml)	swarm	6000	right	right	
6/14 2011	3-HOAA+10-HDA(1mg/ml, 2ml+2ml)	swarm	3000	right	right	
6/14 2011	3-HOAA+10-HDA(1mg/ml, 2ml+2ml)	swarm	3000	left	left	
6/26 2011	3-HOAA+10-HDA(1mg/ml, 2ml+2ml)	captured colony	4000	left	left	
7/06 2011	3-HOAA+10-HDA(1mg/ml, 2ml+2ml)	captured colony	5000	right	right	*

表 1　自然分蜂群 (3 回) 、逃亡群 (2 回) の合計 5 回の試行を[racemic 3-HOAA (28FE)]で処理した分蜂群誘導板を使い行った。ハチの群れは誘引されなかった。 [acidic fraction, 40 FE]は、活性があり、自然分蜂群を集結させることができた(2 回) 。 [3-HOAA (14 FE) と 10-HDA (22 FE)の混合物] は、4 回の試行 (2 回は分蜂群で 2 回は捕獲した群れ) すべてで活性があった。＊は図 4 C,D に示す群れである。

第2編

窒息でなく、蜂球の環境（高温と共に、高湿度、高 CO_2 濃度）が致死温度の低下を招き、スズメバチの死を引き起こす。

1. 序論

古くから、捕食者であるスズメバチに対し、ニホンミツバチが蜂球の中にスズメバチを取り込み、スズメバチを殺すことが報告されてきた（Tokuda 1924）。

蜂球の中でのスズメバチの死は、「ふとんむし」によるとされた。「ふとんむし」とは、布団に人間を包み、人間の体温により蒸す状態を作り出す行為であり、虐めの暴力行為として知られている。スズメバチの死の場合、その死の本当の原因は追求されず、長く言葉だけが使用されてきた。スズメバチの死の原因を最初に明らかにしたのは、Ono らであった。彼らは、ニホンミツバチが作る蜂球の温度が、スズメバチの致死温度を超えることから、ニホンミツバチがスズメバチを蜂球内で熱殺しているとした（Ono et al. 1987,1995）。

しかし、私は、オオスズメバチが蜂球に捕獲されると 10 分で死んでいることを開放巣・閉鎖巣で作られる蜂球で確認した。保持時間が 10 分での致死温度は蜂球の最高温度（47℃）を越え、スズメバチの死が熱殺でないことを示唆した。そこで、大気中と呼気中（CO_2 濃度 3.7%）での致死温度を測定し、呼気中では致死温度が 2℃も低下することを明らかにした。ついで、蜂球内の CO_2 濃度の測定を行い、その濃度が 3.6%であることを示した。オオスズメバチは、高 CO_2 濃度（酸素の減少）と高温の影響を受けて死んでいると結論付け報告した (Sugahara and Sakamoto 2009)。

ミツバチの最大の捕食者は、オオスズメバチ (*Vaspa mandarinia*) である。オオスズメバチは、数頭～数 10 頭の集団でミツバチの巣を攻撃し、数時間～数日で働きバチを全滅させる。また、ミツバチにとっては最強の捕食者であると同時に、日本では毎年 10 数人が刺傷害によって死亡するという危険な昆虫でもある。日本列島には、オオスズメバチの他に、コガタスズメバチ（*V. analis*）、キイロスズメバチ（*V. simillima*）、モンスズメバチ（*V. crabro*）が普通に生息する。これらのスズメバチは、ミツバチの捕食者ではあるが、ミツバチの群れに壊滅的な被害を与える捕食者ではない。彼らは、ミツバチの巣の入口でホバリングして、出入りする働きバチを捕らえる (Matsuura 1995)。そこで、この研究では、新たにオオスズメバチの他にコガタスズメバチ、キイロスズメバチ、モンスズメバチを材料に加え、

蜂球でのスズメバチの死を精査した。

2. 材料と方法

2-1 ミツバチコロニーとスズメバチの捕獲

ニホンミツバチは、京都学園大で飼育するコロニーから働きバチを巣板から容器に振り落とし実験に使用した。蜂球形成のために、1、2 年経過したニホンミツバチの開放空間の開放巣を使用した。開放巣は、次の手順で形成させた。①、分蜂群を枚方市内で捕獲し、②、天板が固定された特別な巣箱に分蜂群をいれ、③、天板に接して巣板が形成され、巣で育児が開始されたことを見極めて、巣箱の側板と底板を取り除いた。

セイヨウミツバチは、業者 (ののがき養蜂場) から購入し京都学園大で飼育するイタリアン種のコロニーから働きバチを巣板から容器に振り落とし実験に使用した。オオスズメバチは、守口市内の淀川の河川敷に形成された巣と、京都府亀岡市の京都学園大で飼育するミツバチの巣箱にミツバチの捕食に現れる個体を捕獲し、実験に使用した。キイロスズメバチは、京都学園大で飼育するミツバチの巣箱に捕食に現れる働きバチとセイタカオオアワダチソウ (*Solidago altissima*) に訪花し昆虫を捕食する働きバチを捕獲し実験に使用した。コガタスズメバチは、京都学園大の近くの民家、淀川の河川敷の樹の間、枚方市内の植え込みにできた巣を駆除し、個体を入手した。モンスズメバチは、淀川の河川敷の樹の洞に作られた巣に出入りする個体を捕獲することで入手した。すべてのスズメバチとミツバチは CO_2 で麻酔し取り扱いしやすくしてから、記述した方法に従いテストした。

2-2 蜂球の作成と蜂球の温度測定、スズメバチの生死の確認

スズメバチは麻酔後、セロテープで温度計のプローブの先端に固定した。麻酔から完全にさめるのに 5 分を要した。麻酔からさめたスズメバチを開放巣に接触させた。すると、蜂球がすぐに形成された。スズメバチを取り囲んで形成された蜂球の温度は、digital thermometer (Yokogawa Model 2455) で測定し、その表示を digital video recorder (SONY DCR, TR V20) で記録した。10 分後、プローブを挿入した蜂球は、プローブごと開放巣から取り外し、プローブに固定されたスズメバチを取り巻くミツバチは、Skin Guard (Johnson Co. LTD) というスプレーを使用することで、効果的に飛散させた。蜂球に取り込まれたスズメバチの生死（survival/death）は、次のような基準で確認した；生存（alive） = 接触刺激に対する反応の存在と 30 分後の動き。死 (dead) =刺針の露出、接触刺激に対する無反応と 30 分後の不動。

2-3 蜂球の炭酸ガスの測定

蜂球の炭酸ガス測定を 2 つの方法でおこなった。最初の方法は、 portable gas detector (COSMOS XP-3140) を使用しておこなった。ガスの引き入れ口が大きい (内径 5 mm) ので、2 匹のスズメバチを引き入れ口の先に固定した (Sugahara and Sakamoto 2009)。そして、引き入れ口の先を開放巣に接触させた。温度測定時に形成された蜂球より少し大きい蜂球が形成された (直径 6 cm)。蜂球の CO_2 濃度 (サンプリングされた空気の量は、250 ml/min であった) は、digital video recorder を使用して記録した。記録された CO_2 レベルから（CO_2 レベルは、蜂球からサンプリングにより減少するため）CO_2 濃度が推測された。2 番目の方法は、GASTEC(GV-100S) によった。検知管は、ガラス製であるため、ハチがすべってしまうのか、蜂球がタイトに形成されない。そこで検知管の先に短いストローをはめ込み (図 2-A)、ストローの先にスズメバチを２匹～４匹セロテープでとめ蜂球を形成させた。5 分後、吸引機を操作して蜂球内の気体を 100ml 吸引し検知管の発色で濃度の測定をおこなった。

2-4 致死温度の測定

10 分間での 50% 致死温度 (LT_{50}) の測定には、インキュベーター (Takasaki Scientific Instruments CORP, TXY-9R-3F と EYELA LTI-601SD）を使用した。大気中の場合は、スズメバチを穴の空いた plastic container (容量 100 ml) に入れ、呼気の場合と混合気体 (Japan AIR GASES) の場合は、小さな電池を備えた fan (OSOTODE 200) を装備し、アルミでシールされたプラスックの袋（340×240mm、容量 4l、SEINITI K.K.）にスズメバチを入れ、一定温度に設定されたインキュベーターに入れ測定した。混合気体 A は、CO_2 5%、O_2 15%、N_2 80%含み（呼気を模擬してある）、混合気体 B は CO_2 5%、O_2 20%、N_2 75%含む（混合気体 A で減少した酸素量を補充）。10 分後にスズメバチの生死 (alive/dead) を確認した。ミツバチの場合は、大気中では小さい plastic container (容量 20 ml) にハチを入れた。呼気中ではハチを直接、小さい電池を備えた fan を持つ plastic bag に入れインキュベーターに投入した。ミツバチの生死 (alive/dead) は、スズメバチと同様な基準で判定した。

2-5 湿度の設定と測定

大気中での致死温度測定では、インキュベーターに小型水槽をいれ相対湿度を確保した。致死温度測定内でのインキュベーター内の湿度は簡易湿度計（HYGROMETER Sinwa）で測定した。その相対湿度は、30%~45%の範囲であった。呼気を入れた容器の湿度と蜂球の湿度は GASTEC No.6 (水蒸気検知管) とデジタル湿度計 (SK-110TRHⅡ,TYOE3 SATO) で

測定した。GASTEC では、蜂球形成 5 分後、吸引機を操作して蜂球内から 100ml（高湿度の場合は 50ml）の気体を吸引し検知管の変色値を読み、付属の換算表から測定温度での水蒸気量得た。GASTEC No.6 (水蒸気検知管) での呼気を入れた容器内の水蒸気量測定では、その量が 35mg/l であった。この結果は、インキュベーター内の温度が 46℃の時、容器内の相対温度が 52%であることを示す。混合気体の相対湿度は、46℃の時 13%であった。混合気体 A,B を入れた袋に濡れたティッシュペーパーをいれ、46℃で相対湿度 90%以上の状態を作りオオスズメバチの致死温度の測定に用いた。デジタル湿度計（SK-110TRH Ⅱ、TYOE3 SATO、99.9%を越えると Hi と表示、精度±5%）のプローブの先にスズメバチ 3 匹を縛り付け、蜂球を形成させ、蜂球の直接の湿度測定もおこなった。

3. 統計処理

2 種類の統計解析を行い、その一方の結果は 図 1 -B に、他方の結果は、表 2 に示した。最初の統計解析は 4 種のスズメバチの時間-温度曲線の比較に関するものである。結果の解釈のために、曲線を特徴付ける 3 つの意味の明解なパラメータを選んだ。その 3 つのパラメータとは、最高温度、最高温度に最初に到達した時間、最終時間の温度である。これらの 3 つのパラメータのそれぞれについて 4 種のスズメバチの各々に対して標本平均値と標準偏差を計算した。3 つのパラメータのそれぞれに対して、平均値の多重比較の一種の対比較 t 検定法を用いて、4 つの平均値を比較した。第 2 の統計解析は、2 種類の大気条件の間の死亡率の比較に関するものである。2 種類の大気条件の比較を、異なる 2 通りの仕方で行った。一方は普通の大気と人間の呼気の比較で、他方は混合気体 A と混合気体 B の比較である。1 共変量 (温度) と 1 因子 (2 種の大気条件) の 2 項 (生か死) ロジステイック回帰分析を用いた。この解析によって、LT_{50} を算出し 2 つの大気条件の間のオッズ比を推定した (表 2)。統計解析パッケージは R ver 2.9.2 (R Development Core Team, 2009,R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.) を使用し、p 値が 0.05 となったときに統計的に有意とした。

4. 結果

4-1 蜂球での生死

蜂球に捕獲されたスズメバチの 10 分後の生死を表 1 に示す。オオスズメバチ、コガタスズメバチとモンスズメバチの worker は、いずれも蜂球の中で 10 分間捕捉されると死亡

していた。キイロスズメバチの worker では、瀕死の状態ながら、8 匹中 5 匹が生きていた。しかし、蜂球は、普通 20 分以上持続する (Ono M et al. 1987, Ono et al. 1995) ため、このキイロスズメバチも蜂球の中に捕捉されると死亡することになる。Queen を捕獲できた 3 種で Queen は、worker と同じく 10 分で死亡した。蜂球に捕獲されたすべてのスズメバチには、ミツバチの針は確認できなかった。

4-2 蜂球の温度測定

蜂球の温度測定結果（10 分間）を、図 1 に示す。4 種のスズメバチがミツバチに作られる蜂球の最高温度の平均は、オオスズメバチが 45.9℃、コガタスズメバチが 46.2℃、キイロスズメバチが 45.9℃、モンスズメバチが 46.1℃であった。この温度は、スズメバチ（働きバチ）の体長（最大 4cm、2.7cm、2.4cm、2.8cm（Matsuura 1995））が大きく異なるのに、ほぼ 46℃とほとんど変わらない。グラフの形も 4 種のスズメバチについてほとんど変わらない。蜂球の温度は、5 分後には最高温度に達し、以後その温度が維持されるという 2 相性を示した。作られる蜂球の大きさは、スズメバチの体長が大きいほど大きくなる（蜂球形成に参加するミツバチは多くなる)。

4-3 蜂球の炭酸ガス濃度の測定

ガス検知器での測定と GASTEC（GV-100S、NO.2H）での測定を試みた。ガス検知器による測定結果は、以前に報告（Sugahara and Sakamoto 2009）したとおり 3.6±0.2%である。この値は、検知器が毎分 250ml のガスを吸引して測定する仕組みなので、実際の濃度はもう少し高いのではないかと予想された。直接検知管（ガラス製）にスズメバチを貼り付けて GASTEC(GV-100S, NO.2H) による測定をすると、測定値が 3%を越えなかった。これは、ガラスの部分では蜂球がタイトに形成されないためと思われた。そこで、表面が多少ガラス管よりざらざらするストローを検知管の先に付けて測定した。その結果、開放巣、閉鎖巣共に 図 2 に示すように検知管 (NO.2H) の数値が 4%と表示された。

4-4 蜂球の湿度測定

GASTEC (GV-100S, No.6（水蒸気検知管）) を使用して蜂球の水蒸気量を測定した。50ml の気体の吸引（高濃度水蒸気量測定）で検知管の変色は、測定値が極大値の 18 を超えた。蜂球の中心部は、温度の測定結果から 46℃であり、蜂球内の気体がガラス製の検知管に吸引される 30 秒の間にほぼ 40℃なるであろうと予想すると（検知管に付随する補正表から）測定値 18 の水蒸気量は、40mg/ l となる。蜂球の水蒸気量はこの値よりも高い。直接湿度計のプローブに蜂球を形成させ相対湿度を測定してみると（図 3)、相対湿度は誤差を顧慮

に入れても 90%を越えた。ミツバチは飛翔筋の運動により、蜂球の温度を 46℃に上げ、蜂球内の CO_2 濃度を 4%、相対湿度を 90%以上の状態を作り出している。

4-5 致死温度測定

4 種のスズメバチと 2 種のミツバチについて、保持時間 10 分での致死温度（LT_{50}）を大気中、呼気中、混合気体中で測定した。スズメバチの捕獲に制限があるため、すべての種ですべての条件での測定ではない。オオスズメバチでは、呼気中での以前の報告 (Sugahara and Sakamoto 2009) に加え測定個体数を増やした (図 4- A)。結果は報告と同様、大気中では LT_{50} が 47.5℃であり、それが呼気中では 2℃低い 45.4℃になった。相対湿度が 46℃で 90%以上になる混合気体中では、さらに 1℃ LT_{50} が低下した。ニホンミツバチとセイヨウミツバチでは、たいへん興味あることに、呼気中、大気中、2 種の混合気体（相対湿度 13%）中の LT_{50} は、ほとんど変わらず、50-51℃の間であった (図 5-A, B)。コガタスズメバチでは、大気と呼気の LT_{50} が 2℃以上も差がある。2 種の混合気体では、低湿度の影響を受けて呼気中より LT_{50} が高くなる。また、2 種の混合気体の差（5%の酸素量の増減）は LT_{50} に影響を与えない (図 4-B)。キイロスズメバチ (図 4-C)とモンスズメバチ (図 4-D) では、大気の LT_{50} がさらに前 2 者より高くなる。モンスズメバチの大気中での結果は、温度と死亡率の値が逆転している箇所があるがその原因は明らかでない。呼気中の LT_{50} は、4 種の中で一番低い。LT_{50} は、4 種のスズメバチの間で種差が見られ同一ではない。

5. 考察

5-1 スズメバチの蜂球での死の原因

Ono らは、スズメバチをニホンミツバチが蜂球内で熱殺しているとした（Ono et al. 1987,1995）。われわれは、大気中と呼気中（CO_2 濃度 3.7%）での致死温度を測定し、呼気中では致死温度が 2℃も低下することを明らかにした。その結果を踏まえ、熱に加えて CO_2 濃度の増加（酸素濃度の減少）がスズメバチの死の原因だと報告した (Sugahara and Sakamoto 2009)。今回の表 2 に示される混合気体 A,B による、コガタスズメバチやミツバチの致死温度の測定結果は、酸素濃度が大気中から 5%減少することが、致死に影響を与えないことをしめす。ところが、オオスズメバチの結果が示すように、混合気体の相対湿度を 90%以上にすると（蜂球での湿度条件を模擬）、LT_{50} が呼気のそれよりもさらに低下することが明らかになった。多くの昆虫では、evaporative cooling によって高温に耐えていることが知られている（Wigglesworth 1972, Prange 1996)。スズメバチの高温での生存も、

この機構によっていたが、高湿度でこの機構が働かなくなると、体温が下がらず死につながり、致死温度が低下すると考えられる。

さらに、われわれ哺乳類とは異なり、昆虫は炭酸ガスで麻酔される。麻酔の仕組みは明らかでないが、高濃度の炭酸ガスがキイロショウジョウバエ (*Dorosophila melanogaster*) の生理、行動に影響することが知られている (Badre et al. 2005)。呼気に含まれる高濃度の炭酸ガスが原因で致死温度が下がり、蜂球内の炭酸ガスの増加が、直接的にスズメバチの死を招く可能性が示唆される。スズメバチの死は、窒息（呼吸の遮断、酸素不足）ではないと思われる。

蜂球でミツバチは、われわれが運動時におこなうように、エネルギーを大量に使い、発熱し、高体温の体内から相対湿度 90%以上、4%の炭酸ガスを含む呼気を排出しスズメバチを殺している。

5-2 蜂球の最高温度の均一性

Heinrich は Hot-Blooded Insects のなかで、セイヨウミツバチの生活場面での体温を記述している（Heinrich 1979,Heinrich 1993）。それによると、出巣のときの体温は 36℃、帰巣時は 30℃、訪花時は 31℃とされる。さらに、分蜂群が新たな巣作りの場所を求めて飛び立つ時、群れ全員の蜂の体温が 36℃になる（Heinrich 1981）。同様な生活場面でのニホンミツバチの体温は、出巣時 41℃、帰巣時 40℃、訪花時 34℃である（Sugahara 2005）。また、分蜂群が飛び立つときの全員の体温は、41℃になる（Sugahara 2003）。セイヨウミツバチがニホンミツバチに比較してどの場面でも、体温が 3-10℃低い。セイヨウの作る蜂球の最高温度は、42.8℃（Ono at el. 1987）、44.1℃（Ken et al. 2005）と報告されている。今回測定した 4 種のスズメバチに対して作られるニホンミツバチの蜂球の最高温度はたいへん均一で 46℃である。この温度は、セイヨウミツバチより 2-3℃高い。この事実は、セイヨウミツバチが作る蜂球の温度は、43-44℃に、ニホンミツバチミツバチの作る蜂球の温度は 46℃に設定されていることを示すのかもしれない。

5-3 4 種のスズメバチの致死温度の差とミツバチの致死温度の均一性

大気中での LT_{50} は、高い順にモンスズメバチ＞キイロスズメバチ＞コガタスズメバチ＞オオスズメバチになる。モンスズメバチは、樹洞などに閉鎖空間の巣を作る。直射日光が当たると巣内が高温になる可能性がある。キイロスズメバチは、軒先などの日陰に露出した巣を作る。西日が当たると巣が高温になると思われる。コガタスズメバチは植え込みの間に巣を作る。この巣は、終始日陰である。オオスズメバチは、日陰の地中に巣を作る。

巣の温度は上がらない（Matsuura 1995)。LT_{50}は、これらのスズメバチが巣を作る場所の温度環境と対応していると思われる。

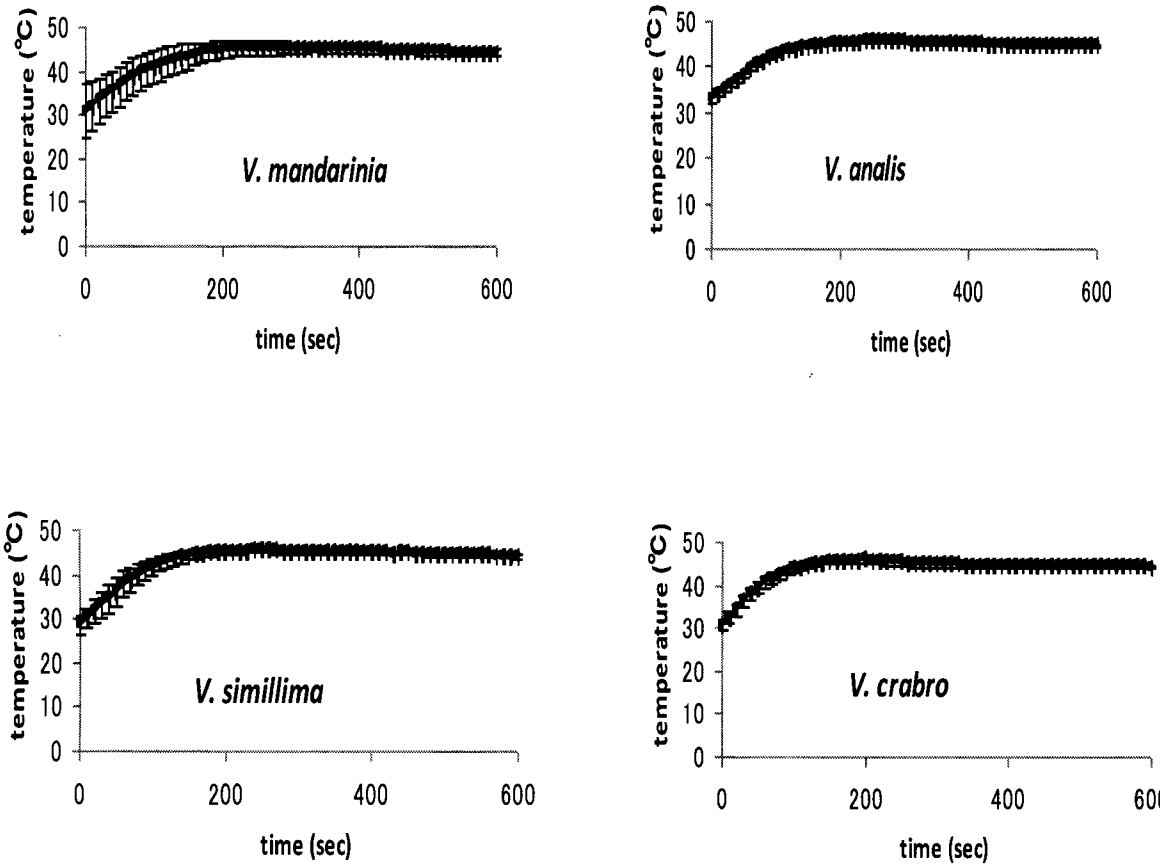
ミツバチの巣内の炭酸ガス濃度は、6%に達することがあり（Buhler at el. 1983)、しかもミツバチは、炭酸ガス濃度に敏感に反応し巣内の炭酸ガス濃度を調節する能力があることが知られている。興味あることに、この調節時には酸素濃度の減少が調節をおこなう行動をひき起こさないという（Seeley 1974, Dietlein 1985, Nicolas and Sillans 1989)。ミツバチにおいても、高温時の死は、相対湿度が高い場合にもたらされる（Free 1962)。今回の呼気中での相対湿度は、50℃で50%を越えず、ミツバチの致死に影響を与えるほどの高湿度ではない。蜂球中 (46℃) でミツバチは、死なないので、ミツバチの LT_{50}が測定した条件で変わらないことは当然の結果といえるが、スズメバチとの大きな違いには驚嘆される。

5-4　今回の研究成果と他種のスズメバチに対する蜂球研究との比較

これまで、*V.velutina* (Ken et al. 2005, Abrol 2006)、*V.magnifica* (Abrol 2006) が *A.cerana* によって熱殺されるとされた。さらに、*V.multimaculata* は、*A.nuluensis* に熱殺されると報告されている (Koeniger et al. 1996)。しかし、スズメバチが蜂球内に捕獲されて死ぬまでの時間測定とその時間内での致死温度の測定（保持時間が短いと致死温度は上昇する（Schmidt-Nielsen 1997)）から、スズメバチの死が熱だけによるのか再考されるべきであると考える。

6. 写真図版

A



B

Species	n	Maximum temperature, °C	Maximum time, sec	Final temperature, °C
V. mandarinia	15	45.9 ± 0.9	292 ± 72	44.4 ± 0.8
V. analis	4	46.1 ± 0.4	275 ± 13	44.7 ± 0.4
V. simillima	4	45.9 ± 0.4	255 ± 74	44.1 ± 0.4
V. crabro	5	46.1 ± 0.7	184 ± 32	44.3 ± 0.4

図 1　蜂球内部の温度の測定。最高温度の平均値は以下のようになった。オオスズメバチ (*Vespa mandarinia)* が 45.9℃、コガタスズメバチ (*V. analis*) が 46.1℃、キイロスズメバチ (*V. simillima*) が 45.9℃、モンスズメバチ (*V.crabro*) が 46.1℃。温度は 5 分後に最大に達して、その後は 10 分後まで維持された (2 相の温度)。A の時間-温度曲線から曲線を特徴付けるために 3 つのパラメータを選び、パラメータを数値として求めた (B)。統計パッケージ R の「pairwise t-test」関数を用いて、3 つのパラメータのそれぞれに対して 4 つの平均値を比較した。この関数は 2 つより多い多群からのすべての 2 群対に対して 2 標本 t 検定を行うものであるが、多重比較検定のためにホルム補正法による p 値の調整がなされる。最高温度到達時間については、オオスズメバチとモンスズメバチの間に差が認められたが (p=0.015)、その他のどの 2 種間にも差はなかった。最高温度と最終時間の温度については、4 種から選んだどの 2 種間にも差が無かった。

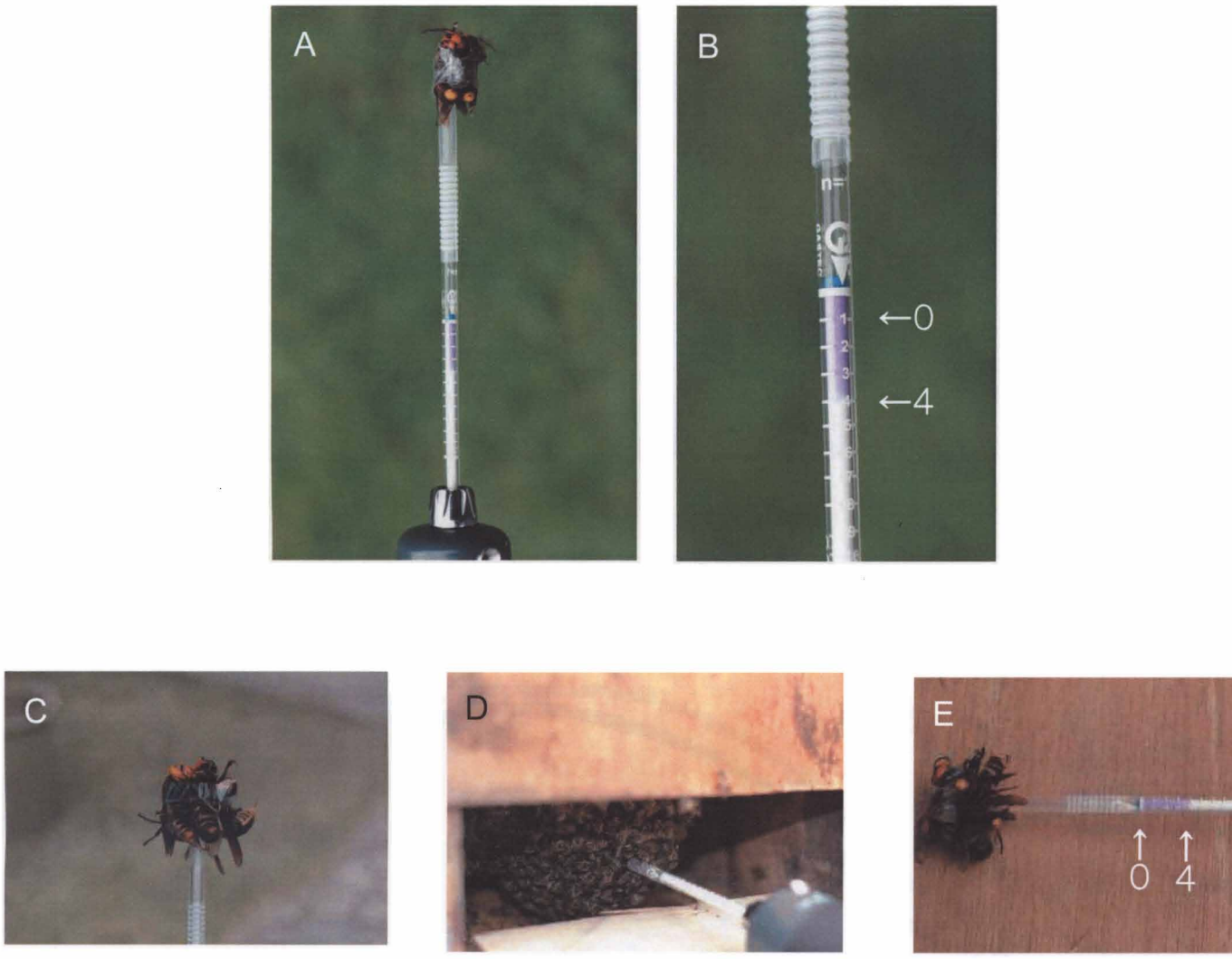
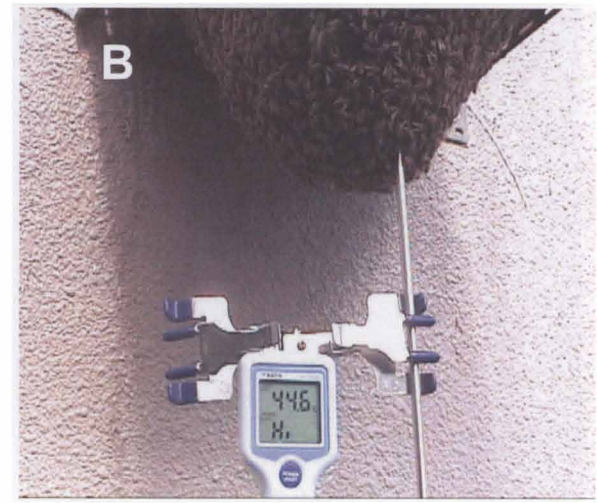


図 2　開放巣と閉鎖巣で形成された蜂球内の炭酸ガス (CO_2) の測定。GASTEC で得られた測定を示す。検知管の先にストローを付け、2 匹のオオスズメバチ (*V. mandarinia*) をその先にセロテープでとめた (A)。開放巣で蜂球が形成されてから 5 分後に、蜂球から 100 ml の気体を吸引した。検知管の色の変化が、4% CO_2 の存在を示した (B)。4 匹のオオスズメバチを固定して閉鎖巣での蜂球形成を試みた (C)。5 分後、100 ml のガスの吸引により、検知管の色の変化は 4% CO_2 の存在を示した (D)。



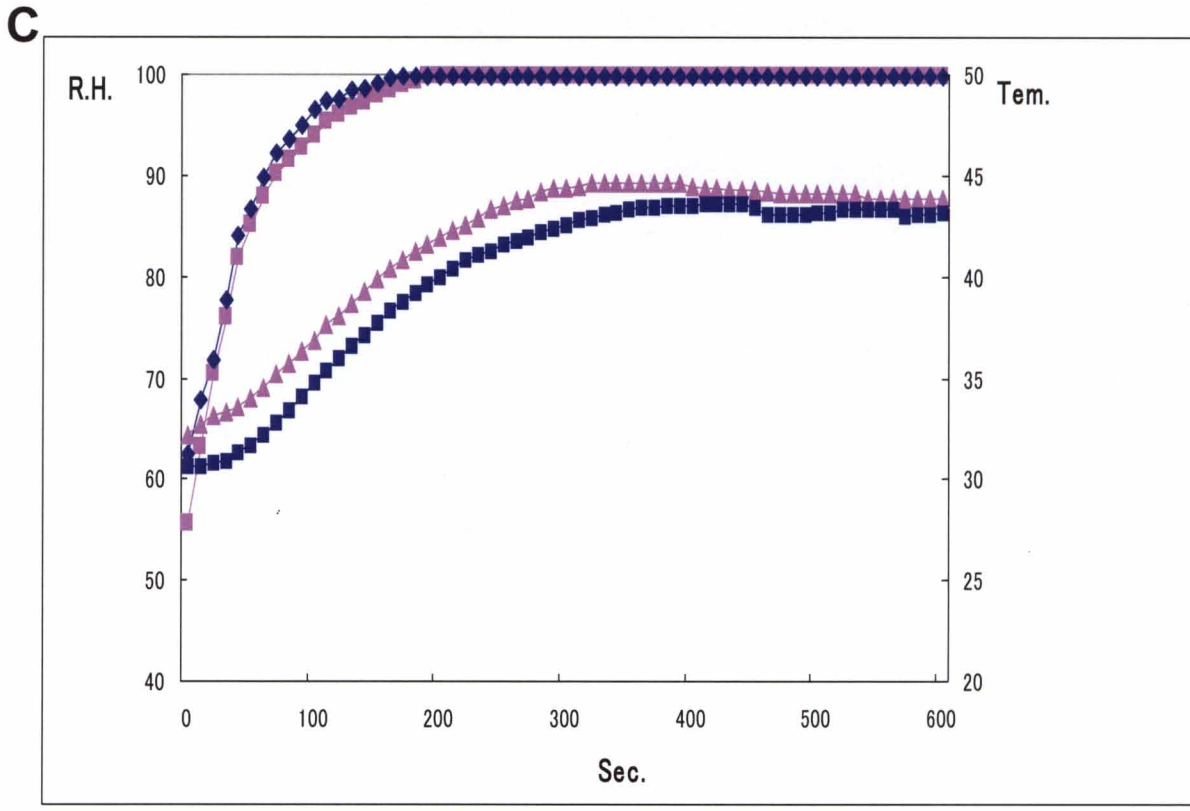
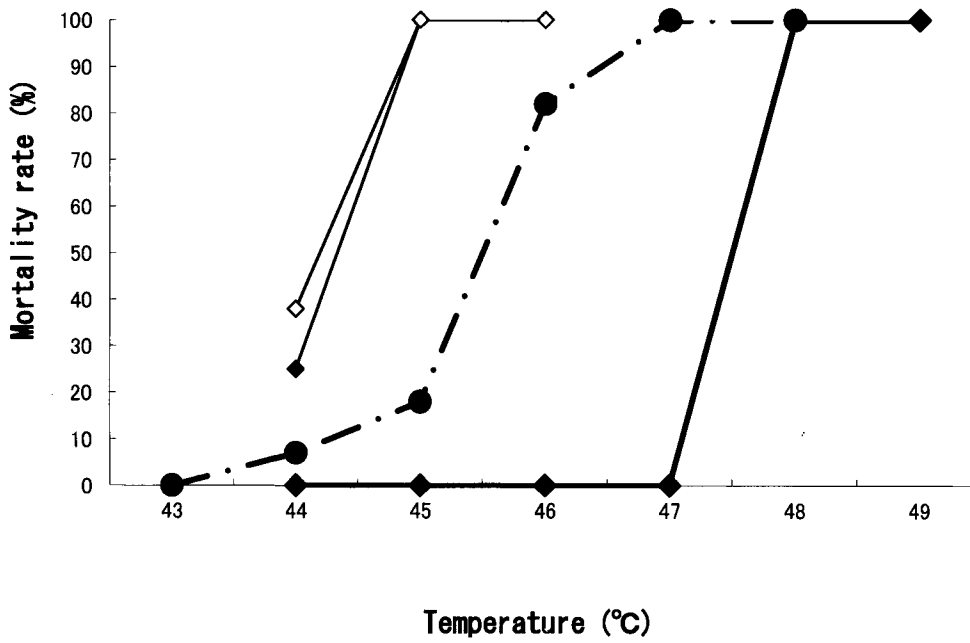


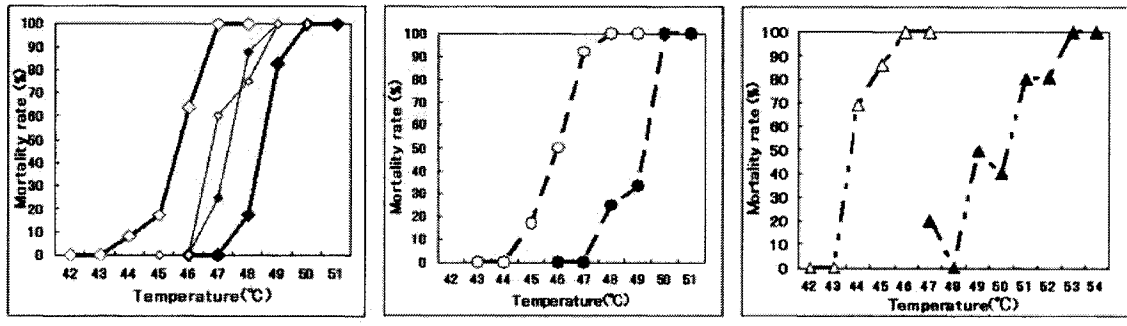
図 3　蜂球内の相対湿度 (relative humidity) と温度 (temperature) の同時測定。検知管の先に輪ゴムで 3 匹のオオスズメバチ（*V. mandarinia*）をとめ (A)、開放巣のミツバチの群れの表面に接触させると、瘤状の蜂球が形成される(B)。相対湿度と温度の時間経過による曲線を 2 例示した (C) 。湿度と温度は、それぞれ 3 分後と 5 分後に最高値に達した。

A



		LT50		℃	43	44	45	46	47	48	49
V. mandarinia	normal air	47.5	—◆—	n		4	4	5	6	6	6
	human expiratory air	45.4	—●-	n	4	14	17	17	5	5	
	gas mixture A (R.H.> 90% at 46℃)	44.1	—◆—	n		8	8	8			
	gas mixture B (R.H.> 90% at 46℃)	44	—◇—	n		8	8	8			

B　　C　　D

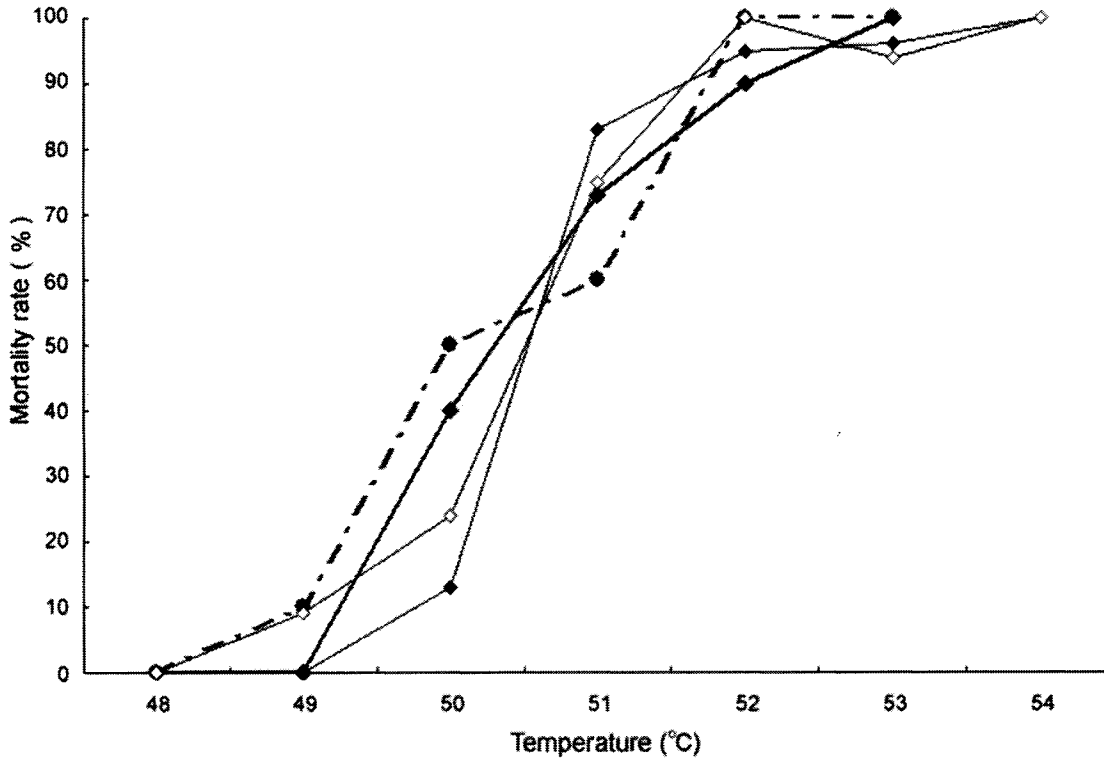


V.analis　　*V.similima*　　*V.crabro*

		LT50		℃	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54
V. analis	normal air	48.5	—◆—	n				4	4	12	12	8	4				
	human expiratory air	45.6	—◇—	n	4	4	12	12	11	4	4						
	gas mixture A (R.H. 13% at 46℃)	47.4	—◆—	n					4	8	8	4	4				
	gas mixture B (R.H. 13% at 46℃)	47.1	—◇—	n				4	6	10	8	4	4				
V. simillima	normal air	49	—●—	n					5	8	8	12	8	4			
	human expiratory air	45.9	—○—	n		4	4	12	12	12	4	4					
V. crabro	normal air	49.8	—▲-	n						10	11	20	15	15	16	3	4
	human expiratory air	43.8	—△-	n	7	10	13	14	11	4							

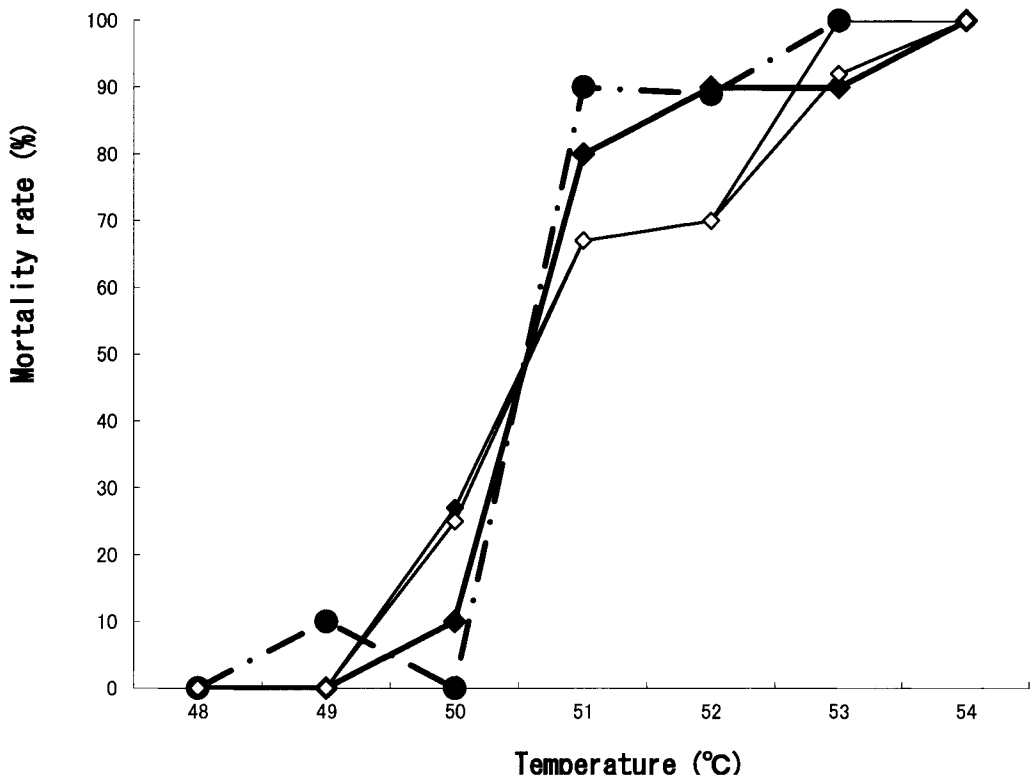
図 4　スズメバチの致死温度 (LT_{50})。オオスズメバチ（*V. mandarinia*）の結果を (A) に示す。normal air を太い実線, human expiratory air を点線,　gas mixture A と B を細い実線。コガタスズメバチ（*V. analis*）を (B) に示す。normal air と human expiratory air を太い実線, gas mixture A と B を細い実線で示す。キイロスズメバチ（*V. simillima*）の結果を (C) に示す。 normal air と human expiratory air を点線で示す。モンスズメバチ（*V. crabro*）を (D) に示す。 normal air と human expiratory air を２点点線で示す。計算した LT_{50} と試験個体数を図の下に表として示す。

A



		LT50		℃	48	49	50	51	52	53	54
A.c. japonica	normal air	50.5	◆	n	10	10	10	15	10	10	
	human expiratory air	50.4	●	n	11	10	10	15	10	10	
	gas mixture A (R.H. 13% at 46℃)	50.6	◆	n	8	10	15	18	24	23	5
	gas mixture B (R.H. 13% at 46℃)	50.5	◇	n	8	11	17	16	24	17	6

B



		LT_{50}		℃	48	49	50	51	52	53	54
A.mellifera	normal air	50.8	—◆—	n	10	10	10	10	10	10	10
	human expiratory air	50.6	—●-	n	10	10	10	10	9	11	
	gas mixture A (R.H. 13% at 46℃)	50.8	—◆—	n	12	12	15	33	30	12	6
	gas mixture B (R.H. 13% at 46℃)	50.9	—◇—	n	12	12	24	24	23	12	6

図 5　ミツバチ 2 種の致死温度(LT_{50})

ニホンミツバチ (*A. cerana japonica*) の結果を (A) に示す。 normal air を太い実線、human expiratory air を点線、gas mixture A and B を細い実線で示す。計算した LT_{50} と試験個体数を図の下に表として示す。 セイヨウミツバチ (*A. mellifera)* の結果を(B)に示す normal air を太い実線、human expiratory air を点線、gas mixture A と B を細い実線で示す。計算した LT_{50} と試験個体数を図の下に表として示す。

表 1　蜂球に捕獲されて 10 分後の 4 種のスズメバチの致死率。

スズメバチにミツバチの針はみつからなかった。蜂球の大きさはスズメバチの大きさに伴い大きくなる。オオスズメバチ (*V. mandarinia*) の結果は、開放巣で 24 例、閉鎖巣で 7 例得られた。他のスズメバチの結果はすべて開放巣での結果である。

Species	Caste	MR	n	Notes
V.mandarinia	worker	100%	31	Died with the sting protruded
	queen	100%	3	Died with the sting protruded
V.analis	worker	100%	11	Died with the sting protruded
	queen	100%	1	Died with the sting protruded
V.simillima	worker	38%	8	Dying and died with time
V.crabro	worker	100%	5	Died with the sting protruded
	queen	100%	3	Died with the sting protruded

表 2　ロジスティック回帰分析。

スズメバチのそれぞれの種に対して、1 共変量 (温度) と 1 因子 (2 種の大気条件) の 2 項 (生か死) ロジスティック回帰分析を行った。表 2-1 は普通の大気に対する人間の呼気のオッズ比を示している。オオスズメバチ (*V. mandarinia*)、コガタスズメバチ (*V. analis*)、キイロスズメバチ (*V. simillima*)、モンスズメバチ (*V. crabro*) について、大気と呼気の間には有意差があった。しかし、ニホンミツバチ (*A. cerana japonica*) やセイヨウミツバチ (*A. mellifera*) については、2 種の条件で差はなかった。表 2-2 は混合気体 B に対する混合気体 A のオッズ比を示している。扱ったどの種についても、この 2 つ条件の間には有意な差は見られなかった。

1

Species	p-values	Odds ratio	95 % CI of odds ratio	
			Lower	Upper
V. mandarinia	<0.0001	598	24.8	14400
V. analis	<0.0001	1040	38.4	28000
V. simillima	<0.0001	687	38	12400
V. crabro	<0.0001	578	71.6	4660
A. cerana japonica	0.786	1.16	0.394	3.42
A. mellifera	0.537	1.49	0.419	5.31

2

Species	p-values	Odds ratio	95 % CI of odds ratio	
			Lower	Upper
V. mandarinia	0.592	1.8	0.21	15.4
V. analis	0.414	1.93	0.4	9.26
A. cerana japonica	0.646	1.26	0.473	3.34
A. mellifera	0.778	0.907	0.458	1.8

謝辞

本研究の終わりにあたり、終始ご懇篤なるご指導とご鞭撻を賜った、神戸大学大学院理学研究科教授 尾崎まみこ先生に深く感謝の意を表します。

また、本論文をまとめるにあたり、有益な助言をいただき、校閲の労をお取りいただいた神戸大学大学院理学研究科教授 坂本 博先生、神戸大学大学院理学研究科教授 前川昌平先生に厚くお礼申し上げます。

また、本研究をおこなうにあたり、研究設備の使用、研究の実施に当たる論議に有効なアドバイスをいただいた京都学園大学の坂本文夫教授に感謝します。

また、大阪医科大学の西村保一郎教授には統計処理に多大な協力をいただきました。京都大学名誉教授、桑原保正博士には研究の進め方や論文の作成で有益な助言をいただきました。志賀生実、脇谷英征氏には、自然巣からのハチの群れの捕獲に便宜をいただきました。キンリョウヘンからの成分の抽出には、京都学園大学大学院生の井筒一成氏に、致死温度の測定には、京都学園大学の学生の井上雅人、黒崎一史、天野吉彦氏に協力していただきました。ここに、あらためて感謝の意を示します。

参考文献

Abrol D P (2006) Defensive behaviour of *Apis cerana* F. against predatory wasps. J Apicul Science 50(2):39-46

Anonymous (2011) Asian bee campaign update – 23rd May 2011. The Australian Beekeeper 113: 15-16

Ayasse M, Schiestl F P, Paulus H F, Ibarra F, Francke W (2003) Pollinator attraction in a sexually deceptive orchid by means of unconventional chemicals. Proc R Soc Lond(B) 270:517-522

Badre N H, Martin M E, Cooper R L (2005) The physiological and behavioral effects of cabon dioxide on *Drosophila melanogaster* larvae. Comp Biochem Physiol Part A 140:363-376

Barth F G (1991) The Biology of a Partnership. Princeton University Press, Princeton, New Jersey.

Buhler A, Lanzrein B, Wille H (1983) Influence of temperature and carbon dioxide concentration on juvenile hormone titre and dependent parameters adult worker honey bees (*Apis mellifera*) . J Insect Physiol 29:885-893

Dietlein D G (1985) Measurement of cabon dioxide levels in honey bee colonies using a thermistor bridge.Am Bee J.125:773-774

Du Puy D and Cribb P (1988) The genus Cymbidium. Christopher Helm, London.

Free J B, Spencer-Booth Y (1962) The upper lethal temperatures of honeybees. Ent exp & appl 5:249-254

Fukuda M (1988) The Japanese honeybee and an eastern orchid. Honeybee Science 9:127-130

Heinrich B (1979) Thermoregulation of African and European honeybees during foraging, attack, and hive exits and returns. J Exp Biol 80:217-229

Heinrich B (1981) The regulation of temperature in the honeybee swarm. Scientific American 11 117-125

Heinrich B (1993) Hot-Blooded Insects. Harvard Univ. Press, Cambridge.

Hepburn H R and Radloff S E (2011) Biogeography. In: "Honeybees of Asia" ed by H R Hepburn and S E Radloff, Heidelberg, Springer, pp51-67

Keeling C I, Otis G W, Hadisoesilo S, Slessor K N (2001) Mandibular gland component analysis in the head extracts of *Apis cerana* and *Apis nigrocincta*. Apidologie 32:243-252

Ken T, Hepburn H R, Radloff S E, Yusheng Y, Yiqiu L, Danyin Z, Neumann P (2005) Heat-balling wasps by honeybees. Naturwissenschaften 92:492-495

Kikukawa T, Iizuka Y, Sugimura T, Harada T, Tai A (1987) The preparation of Optically Pure 3-Hydroxybutanoic Acid and Its Homologues as the Dibenzylammonium Salt. Chemistry Letters 16:1267-1270

Koeniger N, Koeniger G, Gries M, Tingek S, Kelitu A (1996) Observations on colony defense of *Apis nuluensis* Tingek, Koeniger and Koeniger, 1996 and predatory behavior of the hornet, *Vespa multimaculata* Perez,1910. Apidologie 27: 341-352

Matsuura M (1995) Social wasps of Japan in color. Hokkaidou Univ.Press, Saporo.

Matsuyama S, Suzuki T, Sasagawa H (1997) Semiochemicals in the Japanese honeybee, *Apis cerana japonica* Rad. Zool Sci 14(Suppl.):49

Mukoyama T (2000) Cymbidium. In: "Orchid Species and Hybrid" ed by K Hashimoto, Dohosya, Tokyo, pp138-139

Nicolas G, Sillans D (1989) Immediate and latent effects of carbon dioxide on insects. Ann Rev Entomol 34:97-116

Ono M, Okada I, Sasaki M (1987) Heat production by balling in the Japanese honeybee *Apis cerana japonica* as a defensive behavior against the hornet *Vespa simillima xanthoptera* (Hymenoptera: *Vespidae*). Experientia 43:1031-1032

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

Papachristoforou A, Rortais A, Zafeiridou G, Theophilidis G, Garnery L, Thrasyvoulou A, Arnold G (2007) Smothered to death: Hornets asphyxiated by honeybees. Current Biology 17(18):795-796

Prange H (1996) Evaporative cooling in insect. J Insect Physiol 42:493-499

Ruttner F(1988) Biogeography and Taxonomy of Honeybees. Springer-Verlag, Berlin.

Sakagami S and Akahira Y (1958) Comparison of ovarian size and number of ovarioles between the worker of Japanese and European honeybees. Kontyu 26:103-109

Sasagawa H, Matuyama S (1997) Co-evolution of the plant and the insect? The oriental orchid(*Cymbidium floribundum* Lindl.) control of the social behavior on the Japanese honeybee and recognition of the Japanese and European honeybee. Zool Sci 14(Suppl.):49

Sasaki M, Ono M, Asada S , Yoshida T (1991) Oriental orchid (*Cymbidium pumilum*) attracts drones of the Japanese honeybee (*Apis cerana japonica*)as pollinator. Experientia 47 :1229-1231

Sasaki M, Ono M, Fukuda M (1992) Pollination ecology of the Japanese honey bee, *Apis cerana japonica* and the oriental orchid, *Cymbidium pumilum*. Proc.Int.Conf.Asian Honey Bee and Bee Mites, Wicwas Press, Connecticut, pp391-397

Sasaki M, Ono M, Asada S, Yoshida T (1995) Some biological aspects of the north-adapted eastern honeybee, *Apis cerana japonica*. The Asiatic Hive Bee, Edited by G.Kevan, Enviroquest, Ltd. pp59-78

Schmidt-Nielsen K (1997) Animal Physiology. Fifth Edition, Chapter 6, Cambridge University Press, Cambridge.

Seeley T D (1974) Atmospheric carbon dioxide regulation in honey-bee(*Apis mellifera*)colonies. J Insect Physiol 20:2301-2305

Seeley T D (1985) Honeybee Ecology. Princeton Univ. Press, New Jersey, U.S.A.

Sugahara M (2000 a) Feral colonies of Japanese honeybee, *Apis cerana japonica* and their life history 2. Natural nests and swarming. Honeybee Science 21(1):35-39

Sugahara M (2000 b) Petals and Sepals of Orchid (*Cymbidium floribundum*) attract colony of Japanese honeybee (*Apis cerana japonica*). Zool Sci 17:53

Sugahara M (2003) The regulation of temperature in the Japanese honeybee swarm. Honeybee Science 24(1):41-43

Sugahara M (2005) Study of the Japanese honeybee. Tokai Univ. Press, Kanagawa.

Sugahara M, Park I H, Chen Y, Kongpitak P (2005) Aggregation activity of *Apis cerana* subspecies on *Cymbidium floribundum*. Honeybee Science 26(4):159-162.

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

Sugahara M, Minamoto T, Fuchikawa T, Michinomae M, Shimizu I (2010) *Apis cerana japonica* discriminates between floral color phases of the oriental orchid, *Cymbidium floribundum*. Zool Sci 27(12):901-906.

Tokuda Y (1924) Studies on the honey bee, with special reference to the Japanese honey bee. Sapporo Natural History Soc 11:1-27

Wigglesworth V B (1972) The Principles of Insect Physiology. Seventh edition, Chapter 14,

Chapman and Hall, London.

Winston M L (1987) The Biology of the Honey Bee. Harvard University Press, London.