

平成 28 年度

学位論文（博士）

セイヨウミツバチによる
コロニー防衛戦術
熱蜂球による外敵排除の行動学的解析

**Colony defensive tactics of
*Apis mellifera***

Behavioral analysis of heat bee-ball

平成 29 年 1 月 30 日提出

玉川大学大学院農学研究科
資源生物学専攻博士課程後期
細野 翔平

Graduate School of Agriculture,
Tamagawa University
Hosono, Shouhei

(2017)

目次

目次	I
1.緒論	1
2 セイヨウミツバチによる熱蜂球の確認	5
2.1.緒言	5
2.2.材料および方法	7
2.2.1.セイヨウミツバチとスズメバチ	7
2.2.2.蜂球行動とスズメバチ死亡原因の決定	7
2.2.3.統計解析	8
2.3.結果	10
2.3.1.セイヨウミツバチが形成した蜂球と蜂球に捕わ れたスズメバチの体温の測定	10
2.3.2.スズメバチが死亡するタイミングの特定	12
2.3.3.スズメバチの死亡要因の決定	13
2.3.4.熱蜂球に参加した個体数の測定	13
2.4.考察	15
3.スズメバチとの遭遇経験に依存した熱蜂球形成の解析	18
3.1.緒言	18
3.2.材料と方法	20
3.2.1.セイヨウミツバチとキイロスズメバチ	20
3.2.2.スズメバチ提示と行動観察	20
3.2.3.統計解析	21
3.3.結果	22
3.3.1.スズメバチ提示回数と熱蜂球発現	22
3.3.2.提示初回と熱殺初回の蜂球参入個体数	22

3.4. 考察	25
4. 熱蜂球形成を解発させる外敵刺激の解析	28
4.1. 緒言	28
4.2. 材料と方法	29
4.2.1. 供試虫	29
4.2.2. 異なる昆虫種に対する熱蜂球行動の発現	29
4.2.3. 統計解析	30
4.3. 結果	31
4.3.1. 異なる昆虫種に対する熱蜂球行動の発現	31
4.4. 考察	33
5. 総合考察	35
6. 引用文献	41
7. 図と表	47
8. 摘要	62
9. Summary	65
10. 謝辞	68

1. 緒論

昆虫にはさまざまな防衛行動の様式が見られる。防衛行動は長い時間をかけて、個体や集団を外敵や捕食者から守るため獲得維持されてきた。社会性昆虫の中には個体が所属する群れやコロニーを、集団全体で防衛する昆虫種も存在する。社会性昆虫が示す防衛行動には個体が単独で外敵へ攻撃を加える行動様式も見られるが (Aoki & Kurosu 1989; Tian & Zhou 2014), トウヨウミツバチ (*Apis cerana*) による熱蜂球行動は、外敵に対し集団で攻撃を加えるという意味で非常に特徴的である (Ono *et al.* 1987).

熱蜂球行動はトウヨウミツバチでよく知られている集団による防衛行動の一つであり、高度に複雑化した集団的防衛行動である (Ono *et al.* 1987; Sugahara *et al.* 2012). 熱蜂球行動はトウヨウミツバチの天敵スズメバチに対して示される行動であり、いくつかの研究により熱蜂球行動に至るまでの行動機序が明らかになっている (Oldroyd & Wongsiri 2009; Hepburn & Radloff 2011). スズメバチが巣へと飛来したとき、トウヨウミツバチは先ず Abdomen-shaking や Hissing Sound による威嚇行動を行う (Seeley *et al.* 1987; Tan *et al.* 2012). 威嚇行動を示しても、スズメバチがなお巣へと近づこうとすると、トウヨウミツバチは自身の体温を上昇させ攻撃準備を行う (Pre-heating: Tan *et al.* 2010). 場合によっては、巣内へと退却し、スズメバチが巣内へと入ってくるように待ち伏せる行動を示す (Retreating: Ono *et al.* 1995; Koeniger *et al.* 2010). スズメバチが巣内へと入り込むと、一斉に飛びかかり蜂球を形成し一気に体温を上昇させ、蜂球内温度を最高で 47° から 48°C にまで上昇させる (Ono *et al.* 1995; Ken *et al.* 2005). このときの蜂球温度はスズメバチの環境致死温度と考えられている (Ono *et al.* 1987; Sugahara *et al.* 2012). スズメバチが致死となる環境温度はス

ズメバチの種ごとに多少異なるが、おおむね 46°から 48°C である

(Ono *et al.* 1995; Sugahara *et al.* 2012). ミツバチが発熱したときに発生する CO₂ ガスと相対湿度の上昇はスズメバチの熱感受性を上げ、よりスズメバチが熱死しやすくなる効果が報告されている (Sugahara & Sakamoto 2009; Sugahara *et al.* 2012). これら一連の行動はトウヨウミツバチ (Ono *et al.* 1995), キナバルヤマミツバチ (*A. nuluensis*), サバミツバチ (*A. koschevnikovi*) (Koeniger *et al.* 2010), オオミツバチ (*A. dorsata*) (Kastberger & Satchl. 2003) で報告されており、スズメバチに対抗する防衛戦術として獲得維持されてきたと考えられている。

現在、世界的に飼育されているセイヨウミツバチ (*Apis mellifera*) の起源は東南アジア地域とされるが、分布域を西へと広げることで現在のヨーロッパやアフリカまで進出したと考えられている (Crane 1999). セイヨウミツバチが進出したヨーロッパ地域はアジア地域に比べてスズメバチの生息密度が非常に低く (Rortais *et al.* 2010), スズメバチとの競争関係が希薄であるため、従来、セイヨウミツバチは蜂球行動によるコロニーの防衛は行わないと考えられてきた。

しかし, Arca *et al.* (2014) は多くの養蜂場でセイヨウミツバチが蜂球行動を示し外来種であるツマアカスズメバチ (*Vespa velutina*) に対抗したことを報告した。これまで蜂球行動はトウヨウミツバチが長いスズメバチとの競争関係の中で共進化的に獲得されたと考えられてきた。しかし, ツマアカスズメバチが 2004 年にヨーロッパに侵入して以来, 僅か 10 年程度でツマアカスズメバチに対する蜂球行動が観察されたことは, これまでの蜂球行動はスズメバチとの共進的に獲得されたとの解釈に対する疑問を提示している。セイヨウミツバチは, 他にもイタリアで土着のモンズメバチ (*Vespa crabro*) に対し蜂球行動を示し (Baracchi *et al.* 2010), キプロス島で自生しているセイヨウミツバチキプロス亜種 (*A. m. cypria*) ではオリエントスズメバチ (*Vespa*

orientalis) を窒息させる窒息蜂球が観察されている (Papachristoforou *et al.* 2007). これまでの研究により蜂球行動自体はセイヨウミツバチでも共通に観察されているが熱によりスズメバチを熱死させているのか明らかになっていない (Nouvian *et al.* 2016). 熱蜂球行動がトウヨウミツバチ特異的な行動ではなく, セイヨウミツバチでも観察されるならば, これまでの共進化的な蜂球行動の獲得仮説を覆すことになる. セイヨウミツバチで観察された蜂球行動がどのような特徴をもつのか明らかにする必要がある. 先行研究がなされたのはいずれも, セイヨウミツバチとスズメバチ種がともに自然共生している地域であり, 自然選択により熱蜂球行動を示すセイヨウミツバチの亜種が形成されている可能性がある (Papachristoforou *et al.* 2007; Baracchi *et al.* 2010). セイヨウミツバチ種全体で熱蜂球行動が観察されるかを明らかにするためには, 本種が定着していない地域で自然選択や選抜育種など受けていない集団を用いて検証すべきである.

熱蜂球行動をセイヨウミツバチにおいて観察するにあたり, 日本はその条件を満たしていると考えられる. 仮にセイヨウミツバチによる熱蜂球が対スズメバチの有効な防衛行動として機能している場合, 日本においても本種が定着する可能性がある. しかし, 飼育されている養蜂群からの分蜂群や逃去群の報告がある一方で, 日本では一部の地域を除いてセイヨウミツバチは定着していない (Kato *et al.* 1998; 高橋・片田 2002). 日本で飼育されているセイヨウミツバチは重要な養蜂種であり, 明治期以降約 150 年もの間, 海外で生産された女王バチを輸入し繁殖と国内の移動を繰り返している. また, 日本国内では選抜育種が行われていないため, セイヨウミツバチの亜種形成などはほとんど進んでいない. スズメバチからの襲撃に対し人による保護が行われているため, 自然選択をほとんど受けずに飼育が続けられている. これらのことから, 導入種であるセイヨウミツバチが, 在来の捕

食者スズメバチに対しどのような防衛行動を取るのか明らかにすることを調べる上で、日本は適している。

そこで本研究では、セイヨウミツバチが示す蜂球行動の防衛機能や行動特性を明らかにすることを目的とした。この研究により、これまでのトウヨウミツバチとスズメバチ属 (*Vespa*) との共進化的に蜂球行動が獲得されたとする仮説の再検討が可能となる。また、外来種であるセイヨウミツバチが導入された日本において定着しない理由を考察することができる。この考察は導入種による地域への生態学的な相互関係を考慮するためにも必要であり、養蜂におけるセイヨウミツバチの飼育に関して基礎的な知見をもたらすものと期待される。

2. セイヨウミツバチによる熱蜂球の確認

2.1. 緒言

過去にセイヨウミツバチによる蜂球行動は、いくつか報告されている (Ken *et al.* 2005; Papachristoforou *et al.* 2007; Baracchi *et al.* 2010). しかし、いずれの報告においてもスズメバチの死因が熱であることの言及を避けている. Ken *et al.* (2005) では、いち早くセイヨウミツバチの蜂球で発熱していることを報告している. しかし、このときに用いたツマアカスズメバチの死亡は観察されていない. 東ヨーロッパ地域にあるキプロス島に自生するセイヨウミツバチキプロス亜種は同所的に共生するオリエントスズメバチに対し蜂球行動を示す

(Papachristoforou *et al.* 2007). このとき用いられたオリエントスズメバチでは死亡が確認されており、蜂球の温度は 44°C 前後まで上昇したことが報告された. オリエントスズメバチの致死環境温度は 50°C 程度と非常に高く、報告された蜂球内の温度では死なないと考えられたため、Papachristoforou *et al.* (2007) は蜂球の熱以外の要因で死亡している可能性を指摘した. このとき、Papachristoforou *et al.* (2007) はオリエントスズメバチの腹部のクチクラ節間膜間にプラスチック材を入れ呼吸し易い状況を作り出した. その結果オリエントスズメバチが蜂球から生き残ることを証明し、オリエントスズメバチの死亡要因に窒息を提案した. Baracchi *et al.* (2010) は蜂球で殺されたモンズズメバチを回収しガスクロマトグラフによる解析を行ったところ、セイヨウミツバチの毒成分が検出された. この結果から、モンズズメバチの死因を刺殺によるものと考察している.

これら先行研究に共通した認識は、セイヨウミツバチが示す蜂球温度は多くのスズメバチ種の致死環境温度を下回っていることである. さらには、インキュベータ内で蜂球内温度を再現し、その温度にスズ

メバチを暴露させても死に至らないことを報告している。スズメバチは自身の体温を調節することが知られている (Heinrich 1984; Schmolz *et al.* 1993)。高温に暴露されたスズメバチが致死環境温度よりも低い体温を維持していた可能性も否定できない。より直接的にスズメバチ種の環境致死温度を測定するためには、スズメバチの体温を測定する必要がある。

そこで本章ではまず、セイヨウミツバチによる蜂球行動が発熱をともない、その熱によってスズメバチが死亡しているかを明らかにする。日本において、セイヨウミツバチが飼育されている養蜂場に飛来するスズメバチは主にキイロスズメバチとオオスズメバチである (Ono *et al.* 1987; 1995)。この日本産スズメバチ二種を提示し、蜂球行動形成時の行動を観察した。先行研究において、セイヨウミツバチの蜂球形成時の個体数が記録されており、本章でも基礎的な情報として蜂球形成時の個体数を記録した (Tan *et al.* 2012)。

2.2. 材料および方法

2.2.1. セイヨウミツバチとスズメバチ

セイヨウミツバチコロニーは、玉川大学学内（東京都，町田市）の養蜂場で飼育されている 1 群を実験に用いた。コロニーは 10 から 12 枚の巣板で構成され、女王バチ 1 頭と 20,000 頭程度の働きバチを有していた。セイヨウミツバチコロニーはスズメバチが飛来するようになると採餌活動が極端に低下することが知られている。コロニーを維持するために一週間に一度、50% (w/v) スクロース溶液と代用花粉を適宜給餌した。

蜂球を形成するためにキイロスズメバチ (*Vespa simillima xanthoptera*) とオオオスズメバチ (*Vespa mandarinia japonica*) を野外で捕獲し、二酸化炭素ガスで麻酔し毒針を切除した。そのスズメバチをフタ付きのプラスチックカップ（直径 10cm，深さ 8cm）に入れ、50% (w/v) スクロース溶液を給餌した。室温 25°から 30°C で飼育し、スズメバチは捕獲してから 5 日以内に実験に用いた。

2.2.2. 蜂球行動とスズメバチ死亡原因の決定

蜂球行動の再現実験とスズメバチ死亡原因の決定実験を 2014 年 9 月から 10 月にかけて行った。提示実験はすべて晴れた日に行った。セイヨウミツバチのオリエンテーションフライトが行われる昼間 12 時から 15 時までは、スズメバチに対する反応性が評価できないため提示実験は行わなかった。蜂球行動を観察する前にスズメバチを CO₂ ガスで麻酔し、胸部背側後部にまち針で 1mm 程度の穴を開けた。そこに胸部内の温度を記録するための温度センサー（TR-5620, T&D Corporation, Japan, 直径 1mm）を差し込み、溶かしたミツロウで穴を塞いだ（図 1）。スズメバチの胸部と腹部の接合部分を針金でくくり、温度センサーを針金にテープで固定した。蜂球はスズメバチを中心に

形成されるため、スズメバチの胸部側面に蜂球中心部の温度を記録する別の温度センサー（TR-5620, T&D Corporation, Japan）を沿わせ、針金にテープで固定した。温度センサーの取り付け操作を受けた個体について、短くとも二週間生存したことを事前に確認した（データは示さない）。用意したスズメバチが麻酔から完全に覚醒したことを確認した後、蜂球行動の観察もしくは死亡原因の決定実験を行った。セイヨウミツバチコロニーにスズメバチを提示したのち、胸部内温度、蜂球中心部温度と巣門前（TR-5620, T&D Corporation, Japan）の外気温は1秒ごとに記録された。蜂球全体の温度を記録するために、サーモグラフィカメラ（FLIR T335 with FOL18 lens, FLIR Systems Inc.）を用いて毎分蜂球全体の温度を撮影した。また、各実験の行動はビデオカメラ（GZ-V590, JVC, Japan）によって記録された。実験中にセイヨウミツバチの死体が発見された場合、その死体を回収した。回収したミツバチは実体顕微鏡下で観察され、外傷の有無と損傷の程度を記録した。

記録された蜂球内の温度がスズメバチの環境致死温度に達しているかを検証するために、ガラス瓶（容量 1,800mL、直径 110mm、深さ 200mm、開口部 60mm）の内部温度をウォーターバスで 45°C まで温め、そこに温度センサーを取り付けたスズメバチを静置した。ガラス瓶内部温度と相対湿度、胸部内温度（TR-5620, RH: TR-3310, T&D Corporation, Japan）は 1 秒ごとに記録した。また、実験ごとに容器内の空気を入れ替え、CO₂ 濃度が極端に上昇しないようにした。

2.2.3. 統計解析

記録データを一般化線形混合モデルに当てはめて解析した。すべての有意差検定にはカイ二乗近似による尤度比検定を行った。有意水準は $p=0.05$ とした。温度が記録された部位間（蜂球中心部とスズメバチ

胸部内) で、最高温度に違いがあるかを解析するために、応答変数を最高温度とし、説明変数を部位として当てはめ、実験回をランダム効果とした。確率分布にはガンマ分布を仮定した。提示したスズメバチ種間で温度に違いがあるかを解析するために、応答変数を温度とし、説明変数をスズメバチ種として当てはめ、実験回をランダム効果とした。確率分布にはガンマ分布を仮定した。個体数の解析では、応答変数を個体数とし、説明変数を提示したスズメバチ種として当てはめ、実験回をランダム効果とした。確率分布にはポアソン分布を仮定した。

2.3. 結果

2.3.1. セイヨウミツバチが形成した蜂球と蜂球に捕われたスズメバチの体温の測定

すべての実験において、スズメバチを提示する前に Baracchi *et al.* (2010) で報告されている“Bee-carpet”が観察された。また、Bee-carpet を構成する働きバチの中には体温が 35°から 40°C になっていた個体が数頭いた (図 4A)。スズメバチを Bee-carpet に提示すると即座に Bee-carpet を構成する働きバチたちは蜂球を形成した (図 2)。蜂球形成はキイロスズメバチ (4 試行) とオオスズメバチ (4 試行) 両種に対して観察された。蜂球が形成されるのと同時に蜂球内の温度が上昇した (図 3A, 図 5)。蜂球内の温度にすこし遅れてスズメバチの胸部内温度が上昇した (図 3A, 図 5)。蜂球内の温度は最高温度に達したのち、最高温度近辺での定常状態が続いた。キイロスズメバチに対する蜂球の最高温度は $44.0^{\circ} \pm 0.96^{\circ}\text{C}$ (平均 \pm SD, N=4) であった。オオスズメバチに対する蜂球の最高温度は $44.9^{\circ} \pm 0.2^{\circ}\text{C}$ (平均 \pm SD, N=4) であった。提示したスズメバチ種間で蜂球温度に有意性はなかった ($p=0.093$, $\chi^2=2.811$, $df=1$)。蜂球温度が最高温度に達した後にスズメバチの胸部内温度が蜂球内温度を超えて最高温度を記録した。キイロスズメバチの胸部内温度は $45.0^{\circ} \pm 2.3^{\circ}\text{C}$ (N=4) であった。オオスズメバチの胸部内温度は $47.7^{\circ} \pm 1.4^{\circ}\text{C}$ (N=4) であった。提示したスズメバチ種間で胸部内最高温度に有意性はみられなかった ($p=0.188$, $\chi^2=11.7326$, $df=1$)。また、キイロスズメバチを提示した実験において、記録された蜂球内最高温度と胸部内最高温度間に有意性が見られた ($p<0.001$, $\chi^2=26.63$, $df=1$, N=4)。同様に、オオスズメバチを提示した実験において、記録された蜂球内最高温度と胸部内最高温度間に有意性が見られた ($p<0.001$, $\chi^2=25.396$, $df=1$, N=4)。提示されたスズメバチはすべて回収され、死亡が確認された。スズメバ

チは実体顕微鏡下で刺し痕やミツバチの針があるか観察された。その結果スズメバチに刺し傷や針は残っていなかった。

蜂球の温度変動において、はっきりとした3つの相が観察された(図3A)。私はそれぞれの相を次のように定義した。「発熱期(Heating-phase)」蜂球形成開始時点から最高温度に到達するまでの時期、「熱温度維持期(Heat-retaining phase)」最高温度に到達後、40°Cを下回るまでの時期、「解散期(Breaking-up phase)」温度が40°Cから30°Cになるまでとした。キイロスズメバチを提示した蜂球温度における各相の時間は424.3±173.5秒(発熱期)、1365.7±729.8秒(熱温度維持期)、701.3±316.1秒(解散期)であった。また、スズメバチ胸部内の温度では516.5±354.5秒(発熱期)、1404.8±799.1秒(熱温度維持期)、687.9±241.9秒(解散期)であった。オオスズメバチを提示した蜂球温度における各相の時間は541.5±100.9秒(発熱期)、2678.3±1240.6秒(熱温度維持期)、741.8±231.9秒(解散期)であった。スズメバチの胸部内温度では655.5±316.9秒(発熱期)、2833.0±1333.8秒(熱温度維持期)、742.5±308.5秒(解散期)であった。

蜂球形成の行動観察から、これらの温度変動相は蜂球行動の各段階を反映していた(図4)。発熱期において、活動が高い働きバチがスズメバチを捕らえ、即座に包み込んだ。多くのミツバチがスズメバチを包み込み、スズメバチに刺針行動を示していたが失敗していた。数頭のミツバチが発熱期と熱温度維持期に蜂球から離れ、他のミツバチと接触または巣へと戻った。熱温度維持期では、蜂球の表面にいるミツバチの動きは少なく、表面よりも内部にいるミツバチの動きが活発であるように見えた。蜂球表面にいるミツバチは他のミツバチに捕まり、ほとんど動かなかった。解散期には、蜂球に参加したミツバチの活動は前の二相よりも低く、ほとんどのミツバチが巣へと戻った。オ

オスズメバチを提示した実験において、セイヨウミツバチが 27.3 ± 10.0 頭が殺された。実体顕微鏡下で死亡した原因を調査したところ、平均して 21.3 頭に大きな噛み跡が見られた。また平均して 4 頭が肢を欠損していた。

これらの結果から、セイヨウミツバチによる蜂球は高温をとめない日本産スズメバチ二種を殺す機能をもつ熱蜂球であることがわかった。また、スズメバチ二種に対するそれぞれの蜂球温度に有意性が見られなかったことから、セイヨウミツバチがスズメバチ種を見分けて蜂球行動を変化させていることはないと考えた。以降の実験では、オオスズメバチによるミツバチの被害を軽減させるためにキイロスズメバチを主材料として熱蜂球を形成させた。

2.3.2. スズメバチが死亡するタイミングの特定

ここまでの実験で、スズメバチがセイヨウミツバチの高温をとまなう蜂球で死亡すること、セイヨウミツバチの蜂球には温度変動を指標として相が 3 つあることがわかった。しかし、スズメバチがどの相で死亡しているのかわかっていない。これを明らかにするため、スズメバチの体温が特徴的なピークを描く発熱期に注目した。提示したスズメバチの体温が最高温度に達し、蜂球温度と同等になった時点でセイヨウミツバチの熱蜂球を振り、強制的に解散させた (4 試行)。このときの蜂球内最高温度は $44.5 \pm 0.6^\circ\text{C}$ であり、スズメバチ胸部内最高温度は $46.4 \pm 2.0^\circ\text{C}$ であった (図 3B)。蜂球内と胸部内の最高温度間で有意性が見られた ($p < 0.001$, $\chi^2 = 23.64$, $df = 1$, $N = 4$)。提示したすべてのスズメバチが死亡していることを確認した。また、回収されたスズメバチを実体顕微鏡下で観察したところ、刺し痕は観察されなかった。蜂球の発熱期は 420.0 ± 86.5 秒であり、スズメバチ胸部の発熱期は 435.5 ± 43.9 秒であった。

スズメバチは発熱期中に死亡することが明らかとなった。また、スズメバチ体温の特徴的なピークは、スズメバチの死亡したことを判別する指標となることが示唆された。

2.3.3. スズメバチの死亡要因の決定

ここまでの実験で、スズメバチ胸部内温度が示すピークがスズメバチの死亡を判別する指標として用いることができることがわかった。熱蜂球の熱がスズメバチの死亡要因となっていることを明らかにするために、熱蜂球内温度の 45°C をガラス瓶内で再現し、瓶内に生きたスズメバチを静置した。瓶内にスズメバチを入れた直後からスズメバチ胸部内温度が上昇した (図 3C)。スズメバチ胸部内温度が瓶内設定温度の 45°C を超え、最高温度を記録した後、45°C になった時点でガラス瓶からスズメバチを取り出した。このときの胸部内最高温度は $47.9^{\circ}\pm 0.3^{\circ}\text{C}$ であった。同時点でのガラス瓶内温度は $44.4^{\circ}\pm 1.7^{\circ}\text{C}$ であった。記録された相対湿度の範囲は 30-40% であった。胸部内最高温度と瓶内温度間に有意性が見られた ($p < 0.001$, $\chi^2 = 13.06$, $df = 1$, $N = 4$)。スズメバチ胸部内温度の発熱期は 1148.4 ± 751.1 秒だった。すべてのスズメバチで死亡が確認された。すべての実験において、相対湿度は 30% から 40% の範囲に収まっていた。

2.3.4. 熱蜂球に参加した個体数の測定

Tan *et al.* (2012) は、セイヨウミツバチが平均 69.8 個体で蜂球を形成したことを報告した。しかし、この先行研究では熱蜂球形成過程のどのタイミングでの個体数であるかが不明瞭である。スズメバチが死んだタイミングと考えられる発熱期での個体数がもっとも重要な情報である。これを明らかにするためにスズメバチの胸部内温度がピークを迎えた時点での蜂球をプラスチックカップ内に隔離し、CO₂ ガスで

蜂球全体を麻酔した。また、スズメバチ種によって参加する個体数に変動があるかを調査した。キイロスズメバチで蜂球を形成させたとき、蜂球内最高温度は $44.8^{\circ}\pm 0.44^{\circ}\text{C}$ (4 試行)、スズメバチ胸部内の最高温度は $48.3^{\circ}\pm 1.75^{\circ}\text{C}$ (4 試行) だった。蜂球内と胸部内の最高温度の間に有意性がみられた ($p<0.001$, $\chi^2=28.33$, $df=1$, $N=4$)。麻酔されたミツバチをトレイ上に広げ、麻酔から覚める前に写真を撮影し画像から個体数を測定した。発熱期に熱蜂球に参加したミツバチ個体数は 137.5 ± 40.8 頭だった。オオスズメバチで蜂球を形成させたとき、蜂球内最高温度は $44.8^{\circ}\pm 0.44^{\circ}\text{C}$ 、スズメバチ胸部内の最高温度は $48.3^{\circ}\pm 1.75^{\circ}\text{C}$ だった。蜂球内と胸部内の最高温度の間に有意性がみられた ($p<0.001$, $\chi^2=25.37$, $df=1$, $N=5$)。麻酔されたミツバチをトレイ上に広げ、麻酔から覚める前に写真を撮影し画像から個体数を測定した。発熱期に熱蜂球に参加したミツバチ個体数は 296.2 ± 32.2 頭だった。オオスズメバチの実験において 41.4 ± 23.4 頭の死亡個体を回収した。スズメバチ両種間における蜂球参加個体に有意性がみられた ($p<0.001$, $\chi^2=56.67$, $df=1$)。

2.4. 考察

セイヨウミツバチは熱蜂球で捕らえたスズメバチをオーバーヒート状態にさせることで熱死させていることが示唆された (図 3). このスズメバチがオーバーヒート現象はミツバチを除去した制限された環境の中でも再現された (図 3C.). よってオーバーヒートはスズメバチの生理的な効果であり, 多数のミツバチとの接触による効果ではないと考えられる. これらの実験から, スズメバチの死因は熱によるものであると考えられる. 図 3 と図 5 からオーバーヒート状態になるのはキイロスズメバチとオオスズメバチの両種で観察されているため, スズメバチ種に共通した性質であることが示唆される. スズメバチは自身の体温を調節する能力がある (Heinrich 1984; Schmolz *et al.* 1993). しかし, 蜂球に捕らえられたスズメバチは, 熱いミツバチが周囲におり, 自身の体温を下げるのが困難になる. このことによりスズメバチはオーバーヒートしてしまったと考えられる.

興味深かったのは, 熱蜂球が形成される最中であっても蜂球に参加せず, 外側を向いた状態で周辺にとどまった個体がいたことである (図 4B-D). セイヨウミツバチでは, 防衛行動においても一時的な分業構造がある可能性が議論されている (Breed *et al.* 2004; Nouvian *et al.* 2016). 防衛行動においてもどのような攻撃をするのか意思決定がなされていると考えられており (Nouvian *et al.* 2015), 熱蜂球形成時にもミツバチ個体が熱蜂球に参加するか否かの意思決定をしている可能性がある.

熱蜂球は捕らえたスズメバチを中心として形成される. スズメバチの周囲は蜂球の中心となり, 最高で 44°-45°C を記録した. スズメバチの周囲にいるミツバチもこの温度に暴露されているはずである. しかしながら, キイロスズメバチを提示した実験回では死亡したミツバチは観察されなかった. セイヨウミツバチの半致死温度 (LT50) は, 通

常の空气中で約 51°C と報告されており (Sugahara *et al.*, 2012), 今回記録された熱蜂球内の温度には十分に耐えられる. 一方でオオスズメバチを提示した実験回では 30 頭前後のミツバチ個体が死亡した. オオスズメバチとキイロスズメバチに対する熱蜂球温度に有意性はなく, オオスズメバチの実験回で死亡したミツバチのほとんどに外傷が見られたことから, 死亡したミツバチ個体のほとんどはオオスズメバチによって噛み殺されたと考えられる.

トウヨウミツバチでは, 蜂球の熱に加えて高い二酸化炭素濃度と相対湿度によってスズメバチの熱感受性を上げていることが報告されている (Ono *et al.*, 1995; Sugahara *et al.*, 2010). 本研究では, 低い相対湿度でも再現された熱蜂球の温度でスズメバチを熱死させられることを明らかにした (図 3C). 制御されたガラス瓶では発熱期に約 20 分間と広いばらつきがあったが, 熱蜂球では約 10 分間とそれよりも短かった (図 3B). このことから, 高い相対湿度と CO₂ 濃度はよりスズメバチの熱感受性を上げる要因であることが示唆された.

本実験によって得られた熱蜂球に参加したセイヨウミツバチの個体数 (137.5 ± 40.8 頭) は先行研究よりも多い (Tan *et al.*, 2012: 参加個体数 69.8 ± 31.1 頭). キイロスズメバチに対する熱蜂球では死亡ミツバチは回収されなかった. 一方でオオスズメバチに参加個体数は明らかにキイロスズメバチよりも多く, また死亡個体数も多かった. これは, オオスズメバチにより噛み殺された働きバチから警報フェロモンが放出されたことが原因と考えられる. セイヨウミツバチにおいて警報フェロモンは誘導性をもっていることが知られている (Nouvian *et al.* 2016). 熱蜂球形成初期にオオスズメバチへ取り付いたセイヨウミツバチが噛み殺され, 蜂球周辺や巣内にいたセイヨウミツバチ働きバチが誘導され参加する個体数が増加したと考えられる.

ミツバチの影響を排した実験において, 先行研究と本研究結果で異

なる結果が得られている (Sugahara *et al.* 2009; Papachristoforou *et al.* 2007; 図 3C). 先行研究と本研究では手法が異なっている. このことから微環境 (熱源との距離や空気の対流など) の違いによって結果が異なつたと考えられる. 先行研究ではインキュベータ内でセイヨウミツバチによる熱蜂球の温度を再現し, スズメバチをその温度に暴露させている. 本研究ではインキュベータを用いず, ガラス瓶をウォーターバスで温めることで温度を再現した. 重要なことは, 熱蜂球で観測されたスズメバチ体温のオーバーヒートがミツバチの影響を排した環境下でも再現されたことである.

3. スズメバチとの遭遇経験に依存した熱蜂球形成の解析

3.1. 緒言

本研究により、セイヨウミツバチでも熱蜂球が可能であり、スズメバチを熱死させられる機能をもっていることが分かった。過去の観察においてセイヨウミツバチの初期防衛行動である Bee-carpet の有無とスズメバチの飛来頻度は強く相関している (Baracchi *et al.* 2010)。本研究から熱蜂球を形成するためには、多くの個体が巣門前にいることが必要であることがわかった。セイヨウミツバチでは防衛行動は環境ストレスによって攻撃性などが変化することが知られている (Collins *et al.* 1980; Collins & Blum 1983)。一般的な観察として、セイヨウミツバチはスズメバチの飛来が多くなる時期から Bee-carpet を形成するようになる。自然下において熱蜂球は Bee-carpet を中心とした巣外で行われる。これらのことから熱蜂球の形成には Bee-carpet の形成が必要であり、スズメバチの飛来頻度との間に関連性が考えられた。Bee-carpet はセイヨウミツバチ独特のものであり、スズメバチの飛来頻度に合わせた熱蜂球の形成は、セイヨウミツバチの特徴の一つではないかと注目した。

そこで、養蜂場でセイヨウミツバチが実際にスズメバチ種に対しどのような防衛行動を示しているのか事前観察を行った。観察において、ミツバチコロニーの巣門前にスズメバチの死体が多数見られたコロニーと全く見られなかったコロニーがあった。この観察をしたのち、熱蜂球の再現実験を行ったところ、熱蜂球ができるコロニー（スズメバチを熱殺できる）と熱蜂球ができないコロニー（スズメバチを熱殺できない）があった。熱蜂球ができるコロニーの巣門前には多数のスズメバチ死体が散見された。一方の熱蜂球ができないコロニーの巣門前にはスズメバチの死体がまったく見られなかった。経過観察を

行ったところ、熱蜂球ができなかったコロニーの巣門前でもスズメバチの死体が散見されるようになった。このタイミングで蜂球再現実験を行ったところ、熱蜂球ができなかったコロニーでスズメバチを熱死させられる熱蜂球が観察された。この事前観察の結果は、スズメバチと遭遇する経験の累積にともなって熱蜂球形成が可能になることを示唆している。

事前観察の結果に基づき、時間経過をスズメバチの提示回数と置き換えて蜂球再現実験を繰り返し、スズメバチの提示回数と熱蜂球との関係性を調査した。また、提示回数とともに起きた行動の変化を蜂球に参入する個体数を計測し観察した。

3.2. 材料と方法

3.2.1. セイヨウミツバチとキイロスズメバチ

セイヨウミツバチコロニーは、玉川大学学内（東京都，町田市）の養蜂場で飼育されている6群を実験に用いた。コロニーは5から12枚の巣板で構成され、女王バチ1頭と6,000 - 20,000頭程度の働きバチを有していた。コロニーを維持するために一週間に一度、50% (w/v) スクローズ溶液と代用花粉を適宜給餌した。

コロニーに提示するキイロスズメバチ (*Vespa simillima xanthoptera*) の捕獲および飼育は、2.2.1の方法に準じた。

3.2.2. スズメバチ提示と行動観察

2015年の玉川大学（東京都，町田市）において、養蜂場へのキイロスズメバチの飛来は6月下旬から始まった。キイロスズメバチの飛来時期に合わせて、観察を2015年の6月から9月にかけて行った。提示実験はすべて晴れた日に行われた。セイヨウミツバチのオリエンテーションフライトが行われる昼間12時から15時までは、スズメバチに対する反応性が評価できないため提示実験は行わなかった。温度センサー（HYP0-33-1-T-G-60-SMPW-M, OMEGA, USA, 0.2mm diameter）の設置部位と設置手順は、2.2.2の方法に準じた。各部位の温度は1秒ごとに、記録用端末（Graptect, midi LOGGER GL-2200）に記録された。実験の詳細はビデオカメラ（GZ-V590, JVC, Japan）で記録された。スズメバチの提示は1日に1回と定め、繰り返し提示が必要な場合は晴れた別の日に行った。

記録された映像を再生し、蜂球に参入した個体数を測定した。蜂球を形成したのち、スズメバチの胸部内温度がピークに達する時間はおおよそ10分以内であることが結果2.3.2でわかっている。そこでスズメバチ提示初回とスズメバチ提示を繰り返した後の実験回において蜂球

に参入するミツバチ個体数を形成開始から時間経過ごとに記録した。スズメバチ提示直後から1分間、提示直後から5から6分までの1分間、提示直後からの10から11分までの1分間それぞれで蜂球に参入したミツバチ個体数を測定した。

3.2.3. 統計解析

記録データを一般化線形混合モデルに当てはめて解析した。すべての有意差検定にはカイ二乗近似による尤度比検定を行った。有意水準は $p=0.05$ とした。温度が記録された部位間（蜂球中心部とスズメバチ胸部内）で、最高温度に違いがあるかを解析するために、応答変数を最高温度とし、説明変数を部位として当てはめ、実験回をランダム効果とした。確率分布にはガンマ分布を仮定した。スズメバチを提示した回数と蜂球内温度に関連性があるかを解析するために、応答変数を温度とし、説明変数を提示回数として当てはめ、コロニーIDをランダム効果とした。確率分布にはガンマ分布を仮定した。個体数の解析では、応答変数を個体数とし、説明変数を提示した回数を当てはめ、コロニーIDをランダム効果とした。確率分布にはポアソン分布を仮定した。

3.3. 結果

3.3.1. スズメバチ提示回数と熱蜂球発現

2015 年にはじめてスズメバチを実験的に提示されたすべてのコロニーで蜂球形成が観察された。しかしながら、このときの蜂球内最高温度は $36.52^{\circ}\pm 1.57^{\circ}\text{C}$ 、スズメバチの胸部内温度は $35.08^{\circ}\pm 3.28^{\circ}\text{C}$ だった (図 7A, 8A, 9)。蜂球内最高温度とスズメバチ胸部内最高温度間に有意性は見られなかった ($\chi^2=2.28$, $df=1$, $p=0.13$, $N=6$) (図 10)。スズメバチが熱によって死亡するときに観察される胸部内温度の特徴的なピークは観察されなかった (図 7A)。蜂球の形成開始から 30 分後に提示されたスズメバチを回収すると、すべての個体が生存していた。以後、スズメバチの死亡が観察されるまで、スズメバチの提示を繰り返した。スズメバチの死亡が観察されるまでに要したスズメバチ提示回数は、5 コロニー中 2 コロニーにおいて 2 回、残り 3 コロニーで 3 回であった (図 9)。提示回数の増加にともなって蜂球内の最高温度が有意に上昇した ($\chi^2=27.45$, $df=1$, $p=1.616\text{e}^{-7}$, $N=5$)。はじめてスズメバチを熱殺した実験回における蜂球内最高温度は $44.47^{\circ}\pm 0.82^{\circ}\text{C}$ 、スズメバチの胸部内最高温度は $47.98^{\circ}\pm 1.51^{\circ}\text{C}$ だった (図 8, 図 10)。このときの蜂球内最高温度とスズメバチ胸部内最高温度間に有意性が見られた ($p<0.001$, $\chi^2=72.72$, $df=1$, $N=5$)。

この結果から、その年はじめてスズメバチを提示された実験回での蜂球形成と、スズメバチを熱殺した実験回の蜂球形成では明らかな行動の変化が示唆された。以後、はじめてスズメバチを提示された実験回 (初提示) とはじめてスズメバチを熱殺した実験回 (初熱殺) で行動変化の解析を行った。

3.3.2. 提示初回と熱殺初回の蜂球参入個体数

初提示実験回における蜂球参入個体数は、0 から 1 分で 21.0 ± 10.0

頭（平均±SD, N=5), 5 から 6 分で 18.2 ± 6.96 頭, 10 から 11 分で 12.0 ± 3.6 頭であった。初提示実験回において, 蜂球形成からの経過時間とともに蜂球に参入する個体数は低下し有意性が見られた

($\chi^2=14.13$, $df=1$, $p=0.00017$, $N=5$) (図 11)。初熱殺実験回における蜂球参入個体数は 0 から 1 分で 65.2 ± 33.4 頭 (平均±SD), 5 から 6 分で 44.3 ± 24.3 頭, 10 から 11 分で 26.0 ± 12.7 頭であった。初熱殺実験回において, 蜂球形成からの経過時間とともに蜂球に参入する個体数は低下し有意性が見られた ($\chi^2=98.914$, $df=1$, $p<2.2e-16$, $N=5$) (図 11)。

それぞれの計測時点において, 初提示と初熱殺間での参入個体数に有意性が見られた (0-1min ; $\chi^2=122.81$, $df=1$, $p<2.2e-16$, $N=5$; 5-6min ; $\chi^2=61.98$, $df=1$, $p=1.04e^{-14}$, $N=5$; 10-11min ; $\chi^2=29.56$, $df=1$, $p=1.62e^{-7}$, $N=5$) (図 4)。

初提示の実験回における防衛個体は主に二つの行動を示した。スズメバチに対して噛みつきや刺針行動といった一般的な防衛行動とスズメバチの体に取り付きスズメバチの体表を走り回る行動だった。このときの巣門前には Bee-carpet を形成されていたが, Bee-carpet にいたミツバチ個体でもスズメバチに対して反応しない個体が多く見られた。反応を示さない個体の多くがブラッシング行動をしていた。ミツバチ個体はスズメバチに対して刺針行動を示していたが, スズメバチのクチクラを貫いてはいなかった。この行動は 30 分以上続き, スズメバチ提示後の時間経過によって行動が洗練されていくような観察は得られなかった。

初熱殺をした実験回において Bee-carpet を構成していたミツバチ個体のほとんどがスズメバチに反応を示した。一方でブラッシング行動をし続けるミツバチ個体もわずかながらいた。反応を示すミツバチ個体のほとんどが, 前両足一対をもち上げる威嚇行動をしていた (Breed

et al. 2004). スズメバチを Bee-carpet へと提示すると、即座に周辺にいたミツバチ個体がスズメバチを包み込んだ。このときの活動は非常に活発であり、形成された蜂球の表面を走るミツバチ個体が散見された。蜂球の外見は、蜂球参入個体数を計測した蜂球形成開始から 5 から 6 分ころには、結果 2.3.1 で見られた蜂球とほぼ同じような状態となった (図 8)。形成開始から 10 から 11 分ころには蜂球の状態は落ち着き、蜂球の外側のミツバチ個体は他のミツバチ個体につかまり蜂球の形を維持していた。また蜂球のすきまから観察された内側ではミツバチの動きがあった。

3.4. 考察

セイヨウミツバチにおいて、その年にはじめてスズメバチに対し防衛行動を示す場合、熱蜂球にならずスズメバチを熱死させることができなかった（図7から10）。スズメバチに対抗するための熱蜂球の形成には経験回数が必要であることが示唆された。ミツバチ集団が経験依存的に一つの防衛行動を変化させることは報告されておらず、本研究が初めての報告となる。熱蜂球全体の発熱量の変化（図8B, D）から発熱量の変化は、蜂球に参加した個体全体で起きていると考えられる。

セイヨウミツバチ集団において、防衛行動の変化は大きく二通りに分けて起こると考えられる。一つは蜂球に一回以上参加した経験のある個体群が、仕事を変えず防衛行動にとどまることである。セイヨウミツバチの防衛行動は基本的には日齢依存的に決まっている（Moore *et al.* 1987; Breed *et al.* 1990）。防衛行動が必要とされない場合、ほとんどのミツバチは採餌行動へと従事する仕事を変えることはよく知られている。また、セイヨウミツバチは必要とされている仕事に従事するような性質をもっている（Huang & Robinson 1996; Schulz & Robinson 2001）。スズメバチに対し蜂球行動を行った場合、参加した個体が仕事を変えることなく防衛を行う場にとどまったのではないだろうか。スズメバチとの接触が増えたことによって防衛行動の必要性が高まり、防衛行動に従事するように行動を調節するミツバチ個体があらわれた。そして、新たに防衛行動へと参加するような日齢になったミツバチ個体と一回以上は蜂球に参加したことがある個体が一緒に蜂球を形成することで熱蜂球を完成させることができたと考えられる。はじめてスズメバチを提示された実験回にくらべて熱死させた実験回において、蜂球に参加した個体数が増加した結果はこれを支持している（図11）。

もう一つの行動変化が巣門前で展開される Bee-carpet の出現である。スズメバチの飛来が増加し、ミツバチが巣門や巣周辺でスズメバチに襲われると、警報フェロモンがミツバチから放出されミツバチの採餌活動が著しく抑制される (Monceau *et al.* 2013)。この反応は“Stop-signal”として知られている (Srinivasan 2010)。セイヨウミツバチの集団において初期防衛行動でもある Bee-carpet は、その形成の有無とスズメバチの飛来との間に強い相関がある (Baracchi *et al.* 2010)。スズメバチの飛来が高まると、Stop-signal により採餌活動が抑えられ防衛行動の必要性が高まり、防衛行動に従事する個体が増加することが考えられる。防衛行動に従事する個体の増加により、Bee-carpet の出現により蜂球を形成し易い体制が整う。Bee-carpet で蜂球が形成されれば、より多くの個体が導入されやすくなると考えられる。

セイヨウミツバチ個体では環境ストレスによって防衛の攻撃性が変化することが知られている (Collins *et al.* 1980; Collins & Blum 1983)。防衛行動などの分業にはホルモンや生体アミンが関与している

(Huang & Robinson 1996; Schulz & Robinson 2001)。ミツバチ個体が蜂球に参加しスズメバチとの間に物理的もしくは化学的な接触したことで JH などの生理状態を制御する要因に変化が起こり、従事する行動を変化させたのではないだろうか。

Bee-carpet の有無や熱蜂球を“はじめ”からできるか否かにおいて、両種では差異が生じている。トウヨウミツバチにおいて Stop-signal による採餌活動の抑制が発見されている (Tan *et al.* 2016)。しかし、Bee-carpet は観察されていない。トウヨウミツバチにおいて、スズメバチとの巣門前における接触を制限された状態でも、はじめて提示されたスズメバチに対して熱蜂球行動をおこなうことが観察されている (山口未発表データ)。このことから、経験によって熱蜂球による防衛が可能になるという性質は、セイヨウミツバチ特有の性質であると考え

られる。

4. 熱蜂球形成を解発させる外敵刺激の解析

4.1. 緒言

本研究によって、セイヨウミツバチも、キイロスズメバチやオオスズメバチなどスズメバチ種に対して熱殺形成行動を示して反応することが分かった。しかし、熱蜂球を形成するための解発因子が、どの程度スズメバチ特異的であるのか分かっていない。通常、熱蜂球行動は対スズメバチ防衛行動であり、捕食者に対抗するために生得的にもっているものと考えられている (Ono *et al.*, 1987)。もし、セイヨウミツバチによる熱蜂球がスズメバチ特異的に解発されるのであれば、セイヨウミツバチの熱蜂球形成もスズメバチに対し保存された行動であると考えることができる。そこで、スズメバチとは全く異なる昆虫種を提示し、熱蜂球を形成するのか、そのときの反応はスズメバチとどの程度異なるのかを調査した。

提示した昆虫種は2種類用意した。キイロスズメバチとアオドウガネ (*Anomala albopilosa*) である。キイロスズメバチは日本産のスズメバチにおいて、もっとも頻繁にミツバチの巣へと飛来する捕食性のスズメバチである。また、これまで実験で用いてきたスズメバチへの反応として適切である。アオドウガネは日本産のコガネムシであり、スズメバチとは全く異なり日本全土に生息する普通種である。アオドウガネはセイヨウミツバチと生活圏が重ならないため、通常巣門で出会うことがない。また、アオドウガネは捕食性の昆虫種ではなく食植生であるため、通常対捕食者行動であるはずの熱蜂球行動の対象にはならない。アオドウガネにも熱蜂球行動を示す場合、熱蜂球行動の解発因子がスズメバチに特異的ではないと考えることができる。これら2種の昆虫種に対する反応の強さを観察するため、それぞれの死体も提示した。

4.2. 材料と方法

4.2.1. 供試虫

実験に用いたセイヨウミツバチコロニー5群は、玉川大学学内（東京都、町田市）の養蜂場で飼育した。コロニーは5 - 12枚の巣板で構成され、女王バチ1頭と6,000 - 20,000頭程度の働きバチを有していた。コロニーを維持するために一週間に一度、50% (w/v) スクローソス溶液と代用花粉を適量給餌した。

蜂球を形成するためにキイロスズメバチとアオドウガネ (*Anomala albopilosa*) を野外で捕獲した。キイロスズメバチの飼育は2.2.1の方法に準じた。アオドウガネはプラスチックケース（横90mm, 縦100mm, 奥行き150mm）に新鮮な植物の葉をいれ室温25°-30°Cで飼育した。

4.2.2. 異なる昆虫種に対する熱蜂球行動の発現

昆虫種の違いによる熱蜂球への反応性変化の実験を2016年8月から9月にかけて行った。提示実験はすべて晴れた日に行なわれた。セイヨウミツバチのオリエンテーションフライトが行われる昼間12時から15時までは、スズメバチに対する反応性が評価できないため提示実験は行わなかった。スズメバチとアオドウガネの固定方法と昆虫胸部内への熱電対温度センサー（YC300, Yashima Sokki CO., Japan, 0.2mm diameter, 図12）の設置は方法2.2.2に準じた。

蜂球核は生きたキイロスズメバチ (*Living Vespa simillima xanthoptera: L-Vsx*)、提示実験直前に氷殺したキイロスズメバチの死体 (*Dead Vespa simillima xanthoptera: D-Vsx*)、生きたアオドウガネ (*Living Anomala albopilosa: L-Aa*) と提示実験直前に氷殺したアオドウガネの死体 (*Dead Anomala albopilosa: D-Aa*) の4つを用意した。死体を使用するたびに新しい死体へと交換した。

実験期間中、最初に生きたキイロスズメバチ (L-Vsx) を提示し、熱蜂球が観察されたコロニーを実験に用いた。提示順序による影響の交絡を少なくするために提示実験は一日一回だけ行った。熱蜂球が観察されたコロニーに対して、D-Vsx, L-Aa と D-Aa のいずれかをランダムに提示した。

4.2.3. 統計解析

記録データを一般化線形混合モデルに当てはめて解析した。すべての有意差検定にはカイ二乗近似による尤度比検定を行った。有意水準は $p=0.05$ とした。説明変数には、蜂球核がスズメバチであるかどうかと、生きた昆虫を提示されたかどうかの二要因四水準が考えられた。そのため交互作用項を考慮した。また疑似反復を考慮しコロニー番号をランダム効果とした。確率分布にはガウシアン分布を仮定した。蜂球内温度と昆虫内温度の比較解析を行うために、記録された温度を応答変数とし、温度記録部位を説明変数として当てはめた。また疑似反復を考慮しコロニー番号をランダム効果とした。確率分布にはガウシアン分布を仮定した。

4.3. 結果

4.3.1. 異なる昆虫種に対する熱蜂球行動の発現

異なる昆虫種に対する蜂球内の温度に注目し解析を行った。その結果、蜂球核がスズメバチあることと生きた昆虫を提示されたことに有意な効果があった（蜂球核がスズメバチであること： $\chi^2=15.24$, $df=1$, $p=9.46e^{-05}$ ；生きた昆虫を提示されたこと： $\chi^2=10.94$, $df=1$, $p=0.00094$ ）。提示された蜂球核がスズメバチであることと生きていることの交互作用にも有意な効果が認められた（ $\chi^2=8.77$, $df=1$, $p=0.0031$ ）。

それぞれの蜂球核ごとに解析をした。すべてのコロニーで L-Vsx に熱蜂球を示した（図 13A と A'）。蜂球内の最高温度が $43.88^\circ \pm 0.63^\circ\text{C}$ （平均 \pm SD）、胸部内最高温度が $47.38^\circ \pm 1.43^\circ\text{C}$ であった（図 14）。このとき、蜂球内と胸部内の最高温度間に有意性が見られた

（ $\chi^2=26.01$, $df=1$, $p=1.36e^{-6}$, $N=5$ ）。回収されたすべての L-Vsx 個体の死亡が観察された。D-Vsx と L-Aa においても熱蜂球を示した（D-Vsx：図 13B と B'，L-Aa：図 13C と C'）。しかし、このとき昆虫の胸部内温度ではスズメバチで見られる特徴的なピークは観察されなかった。D-Vsx では蜂球内最高温度が $43.38^\circ \pm 0.43^\circ\text{C}$ 、胸部内温度が $43.02^\circ \pm 0.72^\circ\text{C}$ であり有意性が見られなかった（ $\chi^2=3.19$, $df=1$, $p=0.295$, $N=5$ ）（図 14）。L-Aa では蜂球内最高温度が $42.52^\circ \pm 2.88^\circ\text{C}$ 、胸部内温度が $41.42^\circ \pm 2.54^\circ\text{C}$ であり有意性は見られなかった（ $\chi^2=5.42$, $df=1$, $p=0.079$, $N=5$ ）（図 14）。回収されたすべての L-Aa 個体の死亡が観察された。D-Aa においては熱蜂球が一例を除き観察されなかった（図 13D と D'）。蜂球内温度が $33.48^\circ \pm 5.71^\circ\text{C}$ （平均 \pm SD）、胸部内温度が $32.62^\circ \pm 5.50^\circ\text{C}$ であり、有意性は見られなかった（ $\chi^2=5.66$, $df=1$, $p=0.069$, $N=5$ ）（図 14）。D-Aa で唯一熱蜂球が見られたコロニーでは蜂球内温度が 43.6°C であり、胸部内温度が 42.4°C だった。

蜂球核を提示したとき、蜂球核の種類によってミツバチの反応が異なっていた。L-Vsx を提示したときは、これまでに観察されてきたスズメバチに対する蜂球行動とまったく同じ反応を示した。一方で D-Vsx ではミツバチ個体は提示直後から蜂球核を包み込み発熱を示した。しかし、その後蜂球上を走り回るような個体はほとんど観察されなかった。L-Aa を提示したとき、即座に蜂球を形成し発熱が記録された。L-Aa 提示直後に数頭のミツバチ個体は L-Aa の体に組み付き、刺針行動を示した。しかし、蜂球を形成したミツバチ個体の活動は L-Vsx や D-Vsx に比べると低かった。それは記録された温度変動と対応していた。D-Aa の提示に反応するミツバチ個体はほとんどいなかった。D-Aa に反応したミツバチ個体は、D-Aa に取り付くと死体の表面を触覚で探ったのち、防衛行動を示さなくなった。熱蜂球を示した D-Aa 実験回では、提示したときに D-Vsx とほぼ同じ反応を示した。D-Aa 提示において熱蜂球を示した実験回を除き、死体に反応したミツバチ個体は死体に噛みつき巣門から外へと引っ張っていた。

4.4. 考察

本研究によって、セイヨウミツバチによる熱蜂球行動の解発には必ずしもスズメバチ特異的な刺激を必要としないことが明らかになった。これは、スズメバチとは全く異なる L-Aa にも熱蜂球を行い、アオドウガネが熱死したためである (図 13)。L-Aa に対する熱蜂球においては、L-Vsx と D-Vsx に対する蜂球内温度最高温度において有意性がなかった (図 13A, B と C)。しかし、蜂球内最高温度の標準偏差が L-Vsx や D-Vsx よりも大きかったこと、蜂球内温度変動の形状がバラついたことから、L-Vsx や D-Vsx と同じであるとは言い難い。D-Aa に関しては、蜂球の温度がほとんど上昇していない (図 13D)。門番ミツバチの体温は、35°から 40°C である (Stabentheiner *et al.* 2002; 2007)。蜂球の平均温度が 35°C を超えていないことから、D-Aa に対して熱蜂球を行うように自身の体温を上げていないことが考えられる。L-Aa に対し熱蜂球行動を示したことから、熱蜂球の対象となる昆虫が生きていることも熱蜂球行動を解発する刺激となることを示唆している。Baracchi *et al.* (2010) は、セイヨウミツバチの蜂球からミツバチ由来の警報フェロモンが検出されたことを報告している。セイヨウミツバチの場合、防衛行動の解発に警報フェロモンが関与している (Nouvian *et al.* 2016)。また、警報フェロモンにはミツバチを誘導する効果があり、多量のフェロモンに暴露されたミツバチは攻撃性が向上することも知られている (Collins *et al.* 1980)。蜂球に捕らえられたアオドウガネが動くことで、より多くの警報フェロモンが放出され、ミツバチの誘導が促進され熱蜂球に至った可能性が考えられる。

しかしながら本来、熱蜂球行動は対スズメバチ行動として解発される (Ono *et al.* 1987; 1995; Papachristoforou *et al.* 2007; Baracchi *et al.* 2010)。ミツバチにとってスズメバチは強力な捕食者であり、捕食に対抗するために熱蜂球行動をミツバチが獲得維持されてきたと考えら

れる。被食者による捕食者に対抗した防衛行動は、その行動の解発に捕食者から受け取られる刺激と強い関係性があり、熱蜂球行動の解発も例外ではない (Ono *et al.* 1995; Koeniger 1996)。

セイヨウミツバチの熱蜂球行動は、スズメバチの生体と死体の両方に対して行われた (図 13)。D-Vsx に対する熱蜂球は、L-Vsx と非常によく似た温度変動を示した (図 13A と B)。蜂球内最高温度においても有意性がなかったこと、蜂球内温度変動の形状がほぼ同一であったことから、L-Vsx と D-Vsx の反応はほとんど同じであると考えられる。これらの結果は、セイヨウミツバチが示す熱蜂球行動が捕食者であるスズメバチ由来の刺激が、その行動の解発に強く関係していることを示唆している。熱蜂球を解発することに強く関係をもったスズメバチ由来の刺激に加え、蜂球で捕らえた昆虫が動くなどの生きていることで発せられる刺激が L-Vsx にはあったと考えられる。しかし、現時点では死亡したスズメバチのどのような形質が熱蜂球形成行動を解発するのかは不明であるが、セイヨウミツバチにおいてもスズメバチを捕食者として認識し、対防衛行動として熱蜂球を獲得し維持してきたためであると考えられる。

5. 総合考察

熱蜂球によってスズメバチが熱死する理由は、これまで環境致死温度差によるものであると考えられてきた (Ono *et al.* 1987; Sugahara *et al.* 2007). これは、トウヨウミツバチによる熱蜂球の温度 (約 46°から 48°C) がスズメバチの環境致死温度 (約 45°から 47°C) を上回り、トウヨウミツバチの環境致死温度 (約 50.1°C) を熱蜂球温度が下回ることによってスズメバチの熱死を招くとする仮説である。しかし、私の研究から熱蜂球の温度がスズメバチの環境致死温度に達していなくとも、スズメバチのオーバーヒートによる熱死を招くことができることが明らかになった (図 3)。スズメバチのオーバーヒート現象は、ミツバチの影響を排した容器内でも確認されたことから、スズメバチ自身の生理状態によるものであると結論付けられる (図 3C)。例数は少ないが、トウヨウミツバチでも蜂球再現実験を行ったとき、スズメバチのオーバーヒートが観察された (図 6)。このことから、熱蜂球によってスズメバチを熱死させる原理自体はセイヨウミツバチとトウヨウミツバチで共通していることが示唆された。

本研究で観察されたセイヨウミツバチによる熱蜂球行動は、本種の祖先種ですでに獲得されていたと考えられる。現在ミツバチ属

(*Apis*) は 9 種~11 種と考えられており、これらを閉鎖営巣系ミツバチ亜属 (subgenus *Apis*)、解放営巣系オオミツバチ亜属 (subgenus *Megapis*)、解放営巣系コミツバチ亜属 (subgenus *Micrapis*) の 3 つのクレードに分けることができる (Crane, 1999; Han *et al.* 2012)。ミツバチ属の種分化のプロセスにはいくつかの仮説があるが、コミツバチ亜属の祖先とミツバチ亜属とオオミツバチ亜属の共通祖先が分かれば、その後、ミツバチ亜属の祖先とオオミツバチ亜属の祖先が分かれたと考えられている (Raffiudin & Crozier 2007; Han *et al.* 2012)。ミツバチ種

の中で、熱蜂球または熱蜂球に類似した防衛行動が観察されているのは、セイヨウミツバチ（本研究）、トウヨウミツバチ（Ono *et al.* 1987）、キナバルヤマミツバチ（Koeniger, 1996）、サバミツバチ（Koeniger *et al.* 2010）、オオミツバチ（Kastberger & Stachl, 2003）である。前4種がミツバチ種であり、後ろ1種がオオミツバチ種である。また、セイヨウミツバチとトウヨウミツバチは交雑しても次世代を残すことができない（Koeniger & Koeniger 2000）。これらのことから、蜂球による防衛行動はミツバチ亜属とオオミツバチ亜属の共通祖先ですでに獲得されていたと考えられる。セイヨウミツバチ特有の性質、はじめてスズメバチに巣を襲撃されたとき熱蜂球を作れずスズメバチを熱死させられない性質（図7, 図10）は、ミツバチ亜属が種分化していく過程で生まれたと考えられる。

被食者の防衛行動を考える上で、同所性の天敵との相互作用は無視できない。セイヨウミツバチの捕食者として一般的に考えられているスズメバチ種とセイヨウミツバチの生態系での位置づけを考察する。

まず、セイヨウミツバチと熱蜂球がよく研究されているトウヨウミツバチ、捕食性のスズメバチ種6種についての分布域は図15に記述した（Carpenter & Kojima 1997; Crane, 1999より作成）。セイヨウミツバチはヨーロッパをアフリカ地域に分布し、それぞれの地域で亜種形成が進んでいる（Han *et al.* 2012）。トウヨウミツバチは東南アジアを中心として、アジア地域に広く分布している。両種の共通祖先は東南アジアが起源と考えられている（Arias & Sheppard 2005; Raffiudin & Crozier 2007）。セイヨウミツバチと分布が重なるのは、モンズズメバチとオリエントスズメバチである。モンズズメバチとオリエントスズメバチに対してセイヨウミツバチが蜂球行動を示している

（Papachristoforou *et al.* 2007; Baracchi *et al.* 2010）。一方のトウヨウミツバチはすべてのスズメバチ種と分布が重なっている。これまで、セイ

ヨウミツバチがヨーロッパやアフリカ地域に分布を広げている一方でアジア地域に生息していない理由は熱蜂球をもたず、スズメバチに有効な防衛行動を行えなかったからと考えられてきた (Abrol 2010). 本研究からセイヨウミツバチがアジア地域に生息していない理由は、熱蜂球を含めた一連の防衛行動をセイヨウミツバチがもたないために、スズメバチ種の特定の攻撃方法に対抗できないからであると考えた。

一連の防衛行動とは、熱蜂球に至るまでに行われる行動である。トウヨウミツバチにおける熱蜂球に至るまでの行動を再び記述すると、Abdomen-shaking や Hissing Sound などの威嚇行動 (Seely *et al.*, 1987; Tan *et al.*, 2012), 自身の体温を上昇させる Pre-heating (Tan *et al.*, 2010), 巣内で待ち伏せる Retreating (Ono *et al.*, 1995; Koeniger *et al.*, 2010), そして Balling (Ono *et al.*, 1995; Ken *et al.*, 2005) を行う。一連の防衛行動のうち威嚇行動と攻撃準備行動はセイヨウミツバチでは観察されていない。観察されていないこれらの行動は、セイヨウミツバチでは欠如した行動であると考えられている (Tan *et al.* 2005; Abrol 2013). 欠如したこれらの行動が、熱蜂球を効率よく運用するための機能をもっている可能性がある。

スズメバチ種の攻撃方法は、単独で攻撃するタイプ (Solitary-attacking) と集団で攻撃するタイプ (Mass-attacking) が観察されている。ほとんどのスズメバチ種は単独攻撃タイプであり、モンズズメバチやツマアカスズメバチ、オリエントスズメバチなどはこのタイプである (Tan *et al.* 2007; Monceau *et al.* 2013). 一方、オオスズメバチは集団で攻撃をするタイプである (Matsuura & Sakagami 1973; Ono *et al.* 1995). 熱蜂球による防衛行動は、スズメバチが単独でいる場合に有効な防衛行動である。しかし、熱蜂球は集団で攻撃を受けた場合、有効な防衛行動として機能しない。セイヨウミツバチにおいて、オオスズメバチに対し熱蜂球行動を行った場合、オオスズメバチが固定され

た状態であっても平均して 40 個体程度の被害があった。自然状態であれば、オオスズメバチ一個体だけであってもより多くの被害がミツバチ側で発生すると考えられる。また、熱蜂球行動がよく調べられているニホンミツバチにおいてもオオスズメバチによる集団攻撃を受けた場合、コロニーを防衛できず全滅してしまう。このことから熱蜂球だけではなく、熱蜂球を含めた一連の防衛行動が集団攻撃をするスズメバチ種に対して効果的に防衛を行うためには必要であると考えられる。

集団で攻撃することが知られているオオスズメバチは、スズメバチ種の中でも後期に分岐した種と考えられている (Carpenter *et al.* 2013)。オオスズメバチのような集団攻撃をするスズメバチ種が誕生する前に、セイヨウミツバチの祖先種がヨーロッパやアフリカ地域に分布を広げていたとすると、セイヨウミツバチの祖先種は効果的にスズメバチに対抗するための行動をもっていないことになる。そのため、セイヨウミツバチの祖先種が種として固定された時期には、東南アジア地域ではすでに生息できない状態であったと考えられる。日本において、小笠原諸島や南西諸島にセイヨウミツバチは定着している (Kato *et al.* 1999; 高橋・片田 2002)。小笠原諸島にはスズメバチが生息していない。一方の南西諸島には、オオスズメバチは生息していないがツマグロスズメバチ (*Vespa affinis*) は生息している。このことから、オオスズメバチによる捕食が存在しない地域であれば、セイヨウミツバチも生息が可能であり、オオスズメバチによる捕食に対応できないことが東南アジアでセイヨウミツバチが生息できない理由と考えられる。

ヨーロッパやアフリカ地域に分布を移したセイヨウミツバチの祖先種は、オリエントスズメバチなどヨーロッパ地域に生息するスズメバチ種の捕食を受け続けていた。オリエントスズメバチの捕食圧はモン

スズメバチに比べて高く (Morece, 1997; Islam *et al.*, 2015), セイヨウミツバチの祖先種はスズメバチに対抗する必要があった。そのため、熱蜂球による防衛行動は維持されたと考えられる。しかしながら、スズメバチの生息数や密度はアジア地域に比べて明らかに低い。本研究から熱蜂球の形成には約 140 頭程度が必要であることがわかった。実際には 140 頭よりも多数の個体が必要になることが考えられる。スズメバチの襲撃が増える初秋から晩秋にかけては、越冬に必要な貯蜜を増やさなくてはならない。予測不能なスズメバチの襲撃に対し、働きバチを確保するよりも採餌を活発に行ったほうがコロニーとしては有益である。単独攻撃型のスズメバチであれば、一度にコロニーが壊滅することは起こらない。そのため、スズメバチの経験回数に依存して防衛行動を発現する性質の獲得に至ったのではないだろうか (図 7-10)。

一方のトウヨウミツバチなどの祖先種は、効果的にスズメバチに対抗するための行動を維持しており、集団攻撃をするスズメバチに対抗することができたため、東南アジア地域に残ることができたと考えられる。トウヨウミツバチの祖先種がその過程で、オオスズメバチのフェロモンを特異的に嗅ぎ取る性質を獲得していったのではないだろうか (Ono *et al.* 1995)。

本研究を応用学的な見地から考察する。現在、世界的に養蜂種として用いられているのは、圧倒的にセイヨウミツバチである。2016 年現在の養蜂産物輸出量をみると、中国やロシアを中心としたアジア地域がもっとも輸出量が多い (FAOSTAT)。ヨーロッパやアフリカ地域に生息していたセイヨウミツバチがスズメバチの生息数が多い地域へと導入されているのが現状である。防衛行動などの進化的な背景を含めると、本研究はセイヨウミツバチがスズメバチ種に対し効果的な防衛を行えないことを示唆している。とくに、*V. mandarinia* などの組織的

な集団攻撃を仕掛けるスズメバチ種が生息する地域では、大きな被害を避けることができない。導入された地域に生息するスズメバチに対し、適切な対処が必要である。

6. 引用文献

- Abrol DP (2006). Defensive behaviour of *Apis cerana* F. against predatory wasps. *Journal of Apiculture Science*, **50**, 39.
- Aoki S and Kurosu U (1989). Soldiers of *Astegopteryx styraci* (Homoptera, Aphidoidea) clean their gall. *Kontyu*, **57**(2), 407-416.
- Arca M, Papachristoforou A, Mougél F, Rortais A, Monceau K, Bonnard O, Tardy P, Thiéry D, Silvain JF, Arnold G (2014). Defensive behaviour of *Apis mellifera* against *Vespa velutina* in France: Testing whether European honeybees can develop an effective collective defence against a new predator. *Behavioural processes*, **106**, 122–129.
- Baracchi D, Cusseau G, Pradella D, Turillazzi S (2010). Defence reactions of *Apis mellifera ligustica* against attacks from the European hornet *Vespa crabro*. *Ethology Ecology & Evolution*, **22**, 281–294.
- Butler CG, Free JB (1951). The behaviour of worker honeybees at the hive entrance. *Behaviour*, **4**, 262–291.
- Breed MD, Guzmán-Novoa E, Hunt GJ (2004). Defensive behavior of honey bees: organization, genetics, and comparisons with other bees. *Annual Reviews in Entomology*, **49**, 271–298.
- Breed MD, Robinson GE, and Page Jr RE (1990). Division of labor during honey bee colony defense. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **27**(6), 395-401.
- Carpenter JM, Kojima JI (1997). Checklist of the species in the subfamily *Vespinæ* (Insecta: Hymenoptera: Vespidae). *Natural history bulletin of Ibaraki University*, **1**, 51-92.
- Carpenter J, Kojima JI, Villemant C (2013). Phylogeny of hornets: a total

- evidence approach (Hymenoptera, Vespidae, Vespinae, Vespa). *Journal of Hymenoptera Research*, **32**, 1.
- Collins AM, Blum MS (1983). Alarm responses caused by newly identified compounds derived from the honeybee sting. *Journal of chemical ecology*, **9**(1), 57-65.
- Collins AM, Rinderer TE, Tucker KW, Sylvester HA, Lockett JJ (1980). A model of honeybee defensive behaviour. *Journal of Apicultural Research*, **19**(4), 224-231.
- Crane EE (1999). The world history of beekeeping and honey hunting. *Routledge*, pp 12-14.
- Han F, Andreas W, Matthew TW (2012) From where did the Western honeybee (*Apis mellifera*) originate? *Ecology and Evolution*; **2**(8), 1949–1957
- Heinrich B (1979). Thermoregulation of African and European honeybees during foraging, attack, and hive exits and returns. *Journal of Experimental Biology*, **80**, 217–229.
- Heinrich B (1984). Strategies of thermoregulation and foraging in two vespid wasps, *Dolichovespula maculata* and *Vespula vulgaris*. *Journal of Comparative Physiology B*, **154**(2), 175-180.
- Heinrich B, Heinrich MJE (1983). Size and caste in temperature regulation by bumblebees. *Physiological Zoology*, **56**, 552–562
- Hepburn HR, Radloff SE (Eds.) (2011). Honeybees of Asia. *Springer Science & Business Media*.
- Huang ZY, Robinson GE (1996). Regulation of honey bee division of labor by colony age demography. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **39**(3), 147-158.
- Islam N, Iftikhar F, Mahmood R (2015). Seasonal Variations in Hornet's Spp.

- and Efficiency of Different Traps as a Tool for Control. *American Journal of Agricultural Science*, **2**(6), 223-230.
- Kastberger G, Stachl R (2003). Infrared imaging technology and biological applications. *Behavior Research Methods, Instruments, & Computers*, **35**(3), 429–439.
- Kato M, Shibata A, Yasui T, Nagamasu H (1999). Impact of introduced honeybees, *Apis mellifera*, upon native bee communities in the Bonin (Ogasawara) Islands. *Researches on Population Ecology*, **41**(2), 217-228.
- Ken T, Hepburn HR, Radloff SE, Yusheng Y, Yiqiu L, Danyin Z, Neumann P. (2005). Heat-balling wasps by honeybees. *Naturwissenschaften*, **92**, 492–495.
- Koeniger N (1996) Observations on colony defense of *Apis nuluensis* Tingek, Koeniger and Koeniger, 1996 and predatory behavior of the hornet, *Vespa multimaclulata* Perez 1910. *Apidologie*, **27**, 341-352.
- Koeniger N, Koeniger G (2000) Reproductive isolation among species of the genus *Apis*. *Apidologie* **31**, 313–339.
- Koeniger N, Koeniger G, Tingek S (2010). Honeybees of Borneo: Exploring the Centre of *Apis* Diversity. *Natural History, Borneo*. pp 150–152
- Matsuura M and Sakagami S (1973). A bionomic sketch of the giant hornet, *Vespa mandrinia*, a serious pest for Japanese apiculture. *J. Fac. Sci. Hokkaido Univ. Ser. V*, **19**, 125-162.
- Monceau K, Arca M, Leprêtre L. (2013). Native prey and invasive predator patterns of foraging activity: the case of the yellow-legged hornet predation at European honeybee hives. *PloS one*. Published online: 18 June, 2013; DOI: 10.1371/ e66492.
- Monceau K, Bonnard O, and Thiéry D (2014). *Vespa velutina*: a new invasive predator of honeybees in Europe. *Journal of pest science*, **87**(1), 1-16.

- Moore AJ, Breed MD. and Moor MJ. (1987). The guard honey bee: ontogeny and behavioural variability of workers performing a specialized task. *Animal Behaviour*, **35**(4), 1159-1167.
- Nieh JC, (1993). The stop signal of honey bees: reconsidering its message. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **33**(1), 51-56.
- Nouvian M, Hotier L, Claudianos C, Giurfa M and Reinhard J (2015). Appetitive floral odours prevent aggression in honeybees. *Nature communications*, **6**.
- Nouvian M Reinhard J and Giurfa M (2016). The defensive response of the honeybee *Apis mellifera*. *Journal of Experimental Biology*, **219**(22), 3505-3517.
- Ono M, Igarashi T, Ohno E and Sasaki M (1995). Unusual thermal defense by a honeybee against mass attack by hornets. *Nature*, **377**, 334–336.
- Ono M, Okada I and 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**, 1031–1034.
- Oldroyd BP and Wongsiri S (2009). Asian honey bees: biology, conservation, and human interactions. *Harvard University Press*, pp.
- Papachristoforou A, Rortais A, Zafeiridou G, Theophilidis G, Garnery L, Thrasyvoulou A, and Arnold G (2007). Smothered to death: hornets asphyxiated by honeybees. *Current Biology*, **17**, R795–R796.
- Papachristoforou A. Sueur J. Rortais A. Angelopoulos S. Thrasyvoulou A. and Arnold G. (2008). High frequency sounds produced by Cyprian honeybees *Apis mellifera cypria* when confronting their predator, the Oriental hornet *Vespa orientalis*. *Apidologie*, **39**(4), 468-474.
- Raffiudin R. and Crozier RH. (2007). Phylogenetic analysis of honey bee

- behavioral evolution. *Molecular phylogenetics and evolution*, **43**(2), 543-552.
- Rortais A, Villemant C, Gargominy O, Rome Q, Haxaire J, Papachristoforou A and Arnold G (2010). A new enemy of honeybees in Europe: The Asian hornet *Vespa velutina*. *Atlas of Biodiversity Risks—from Europe to globe, from stories to maps*. Sofia & Moscow: Pensoft, 11.
- Schmolz E, Lamprecht I and Schrickler B (1993). Calorimetric investigations on social thermogenesis in the hornet *Vespa crabro* L. (Hymenoptera: Vespinae). *Thermochimica acta*, **229**, 173-180.
- Schulz DJ and Robinson GE (2001). Octopamine influences division of labor in honey bee colonies. *Journal of Comparative Physiology A*, **187**(1), 53-61.
- Seeley TD, Seeley RH and Akrotanakul P (1982). Colony defense strategies of the honeybees in Thailand. *Ecological monographs*, **52**(1), 43-63.
- Srinivasan MV (2010). Honeybee communication: a signal for danger. *Current Biology*, **20**(8), R366-R368.
- Sugahara M and Sakamoto F (2009). Heat and carbon dioxide generated by honeybees jointly act to kill hornets. *Naturwissenschaften*, **96**, 1133–1136.
- Sugahara M, Nishimura Y and Sakamoto F (2012). Differences in heat sensitivity between Japanese honeybees and hornets under high carbon dioxide and humidity conditions inside bee balls. *Zoological science*, **29**, 30–36.
- Stabentheiner A, Kovac H, and Schmaranzer S (2002). Honeybee nestmate recognition: the thermal behaviour of guards and their examinees. *Journal of Experimental Biology*, **205**, 2637–2642.
- Stabentheiner A, Kovac H and Schmaranzer S (2007). Thermal behaviour of honeybees during aggressive interactions. *Ethology*, **113**(10), 995-1006.

- Tan K, Dong S, Li X, Liu X, Wang C, Li J and Nieh JC (2016). Honey Bee Inhibitory Signaling Is Tuned to Threat Severity and Can Act as a Colony Alarm Signal. *PLoS Biol*, **14**(3), e1002423.
- Tan K, Li H, Yang MX, Hepburn HR and Radloff SE (2010). Wasp hawking induces endothermic heat production in guard bees. *Journal of Insect Science*, **10**(1), 142.
- Tan K, Radloff SE, Li JJ, Hepburn HR, Yang MX, Zhang LJ and Neumann P (2007). Bee-hawking by the wasp, *Vespa velutina*, on the honeybees *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *Naturwissenschaften*, **94**(6), 469-472.
- Tan K, Wang Z, Li H, Yang S, Hu Z, Kastberger G and Oldroyd BP (2012). An 'I see you' prey-predator signal between the Asian honeybee, *Apis cerana*, and the hornet, *Vespa velutina*. *Animal Behaviour*, **83**(4), 879-882.
- Tan K, Yang MX, Wang ZW, Li H, Zhang ZY, Radloff SE and Hepburn R (2012). Cooperative wasp-killing by mixed-species colonies of honeybees, *Apis cerana* and *Apis mellifera*. *Apidologie*, **43**(2), 195-200.
- Tian L and Zhou X (2014). The soldiers in societies: defense, regulation, and evolution. *International journal of biological sciences*, **10**(3), 296.
- 高橋純一，片田真一（2002）西表島での養蜂とセイヨウミツバチの帰化状況，*ミツバチ科学*，**23**，71-74.

7. 図と表

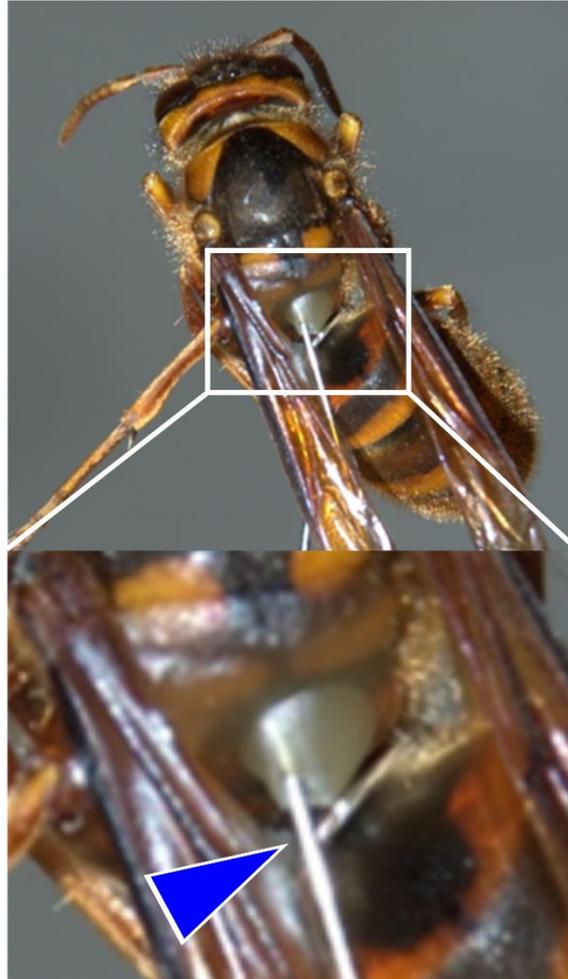


図1. キイロスズメバチに埋め込んだ温度センサーの固定。
キイロスズメバチ胸部背側の後ろから温度センサー（青三角）刺入した。刺入口を溶かした蜜蝋によって塞いだ。



図2. キイロスズメバチに対するセイヨウミツバチによる熱蜂球

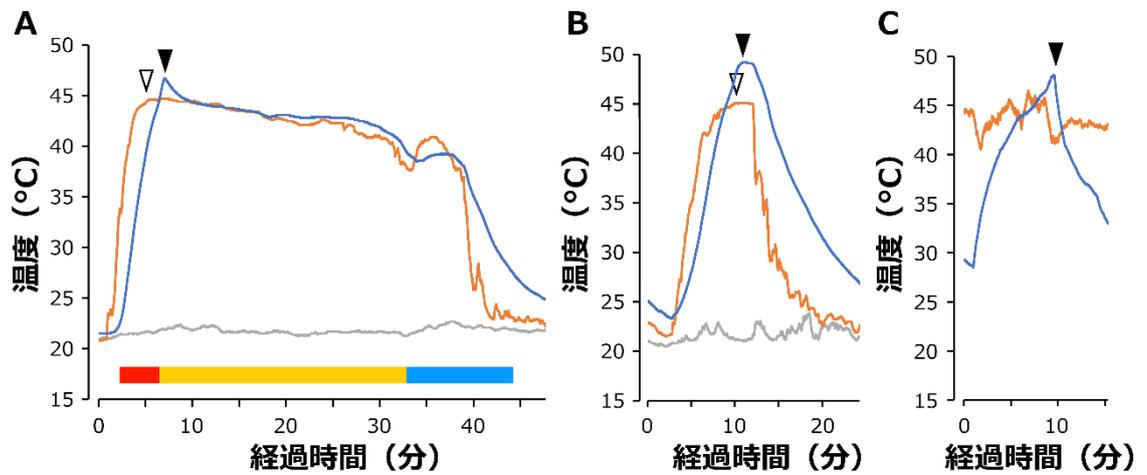


図3. 各実験における温度変動の例.

A: キイロスズメバチに対するセイヨウミツバチによる熱蜂球再現実験. 蜂球内温度 (オレンジ), スズメバチ胸部温度 (青), 巣門前 (灰色). ▼最高胸部内温度, ▽最高蜂球内温度. 各相を発熱期 (赤), 熱温度維持期 (黄色), 解散期 (青) として図中に記載. **B**: キイロスズメバチに対するセイヨウミツバチによる熱蜂球を強制的に解散させた実験. 蜂球内温度 (オレンジ), スズメバチ胸部温度 (青), 巣門前 (灰色). ▼最高胸部内温度, ▽最高蜂球内温度. **C**: ミツバチの影響を排除した容器内での温度変動. 容器内温度 (オレンジ), スズメバチ胸部温度 (青). ▼最高胸部内温度.

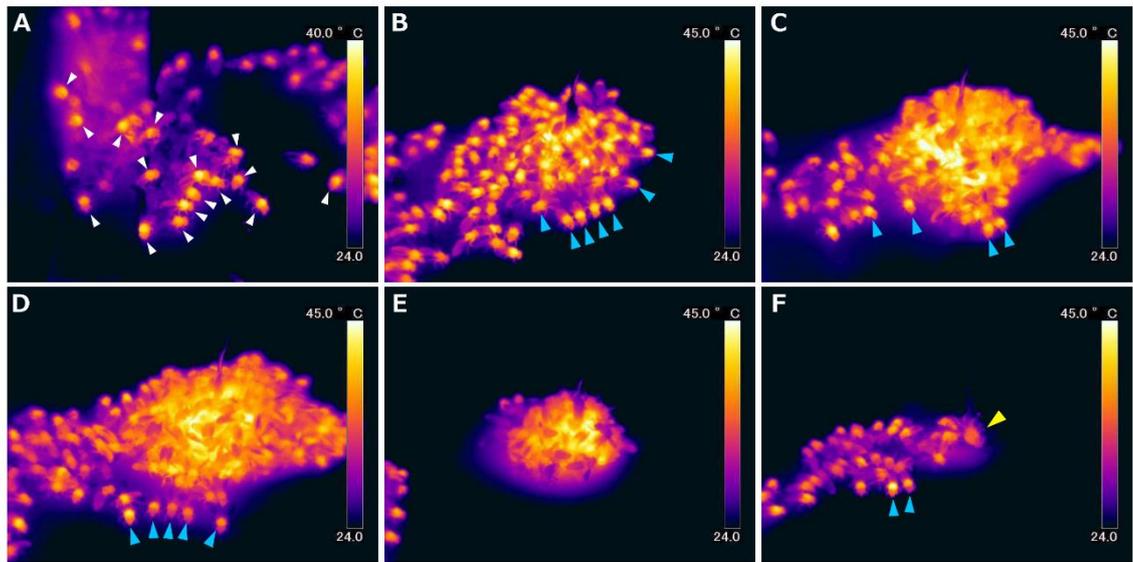


図4. キイロスズメバチに対するセイヨウミツバチによる熱蜂球熱蜂球のサーモグラフィー画像

A：巣門前にいたミツバチ。▽胸部温度が 35°C を超えている個体。 **B-F**：蜂球形成時の各相のサーモグラフィー画像。 **B**：発熱期。 **C**：蜂球内最高温度記録時。 **D**：熱温度維持期。 **E**：解散初期。 **F**：解散後期。蜂球に参加せず外側を向いていた個体（青三角）。死亡したスズメバチ（黄色三角）

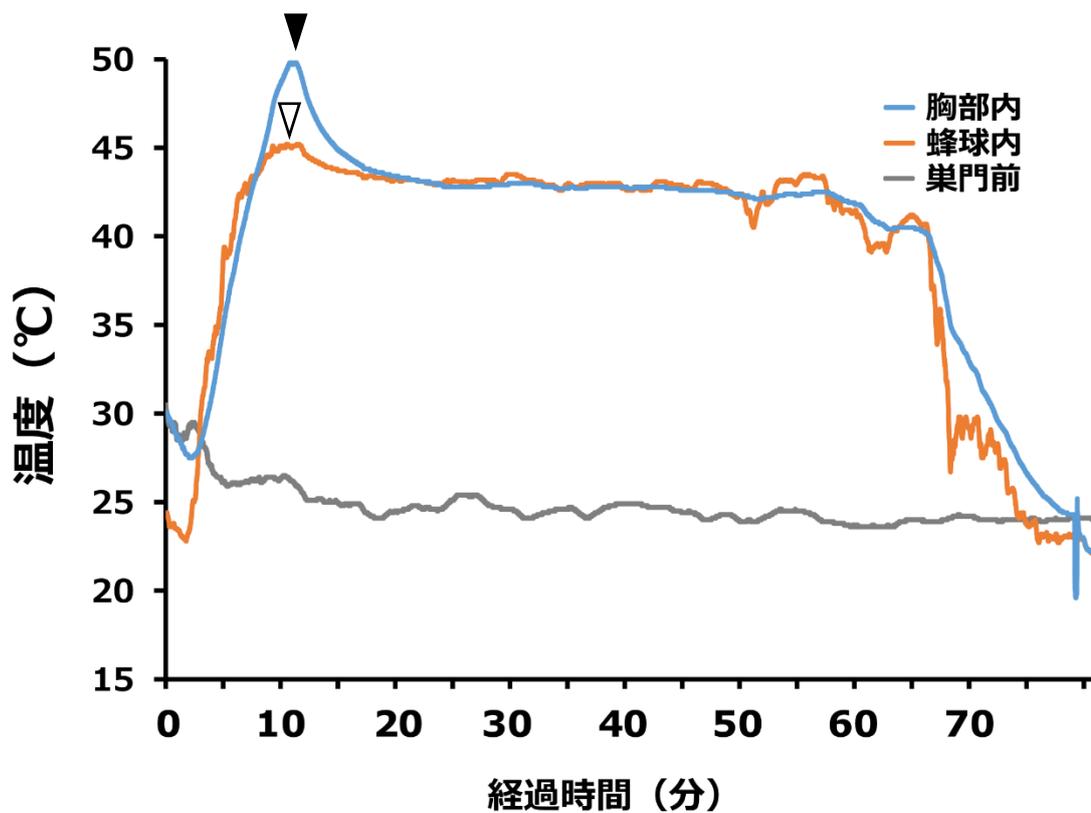


図5. セイヨウミツバチによるオオスズメバチに対する熱蜂球の温度変動

A: 蜂球再現実験時の全体の温度変動。蜂球内温度（オレンジ）、スズメバチ胸部温度（青）、巢門前（灰色）。▼最高胸部内温度、▽最高蜂球内温度。

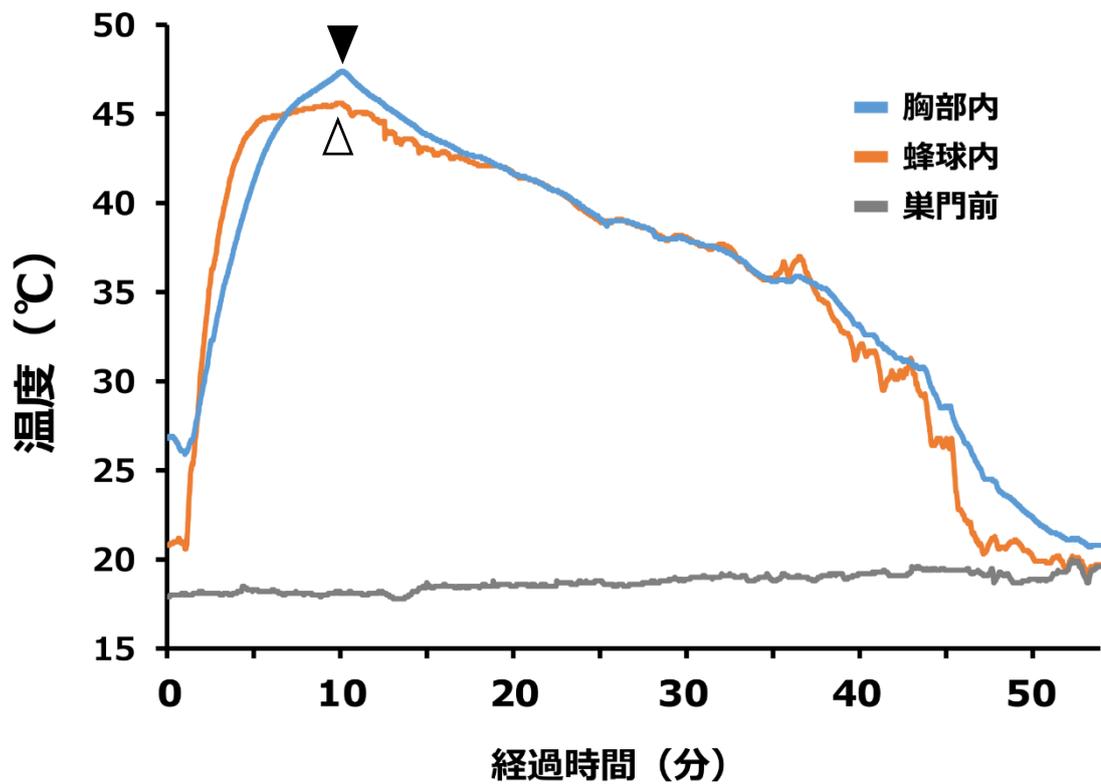


図6. ニホンミツバチによるオオスズメバチに対する熱蜂球の温度変動

蜂球再現実験時の全体の温度変動。蜂球内温度（オレンジ）、スズメバチ胸部温度（青）、巢門前（灰色）。▼最高胸部内温度、▽最高蜂球内温度。

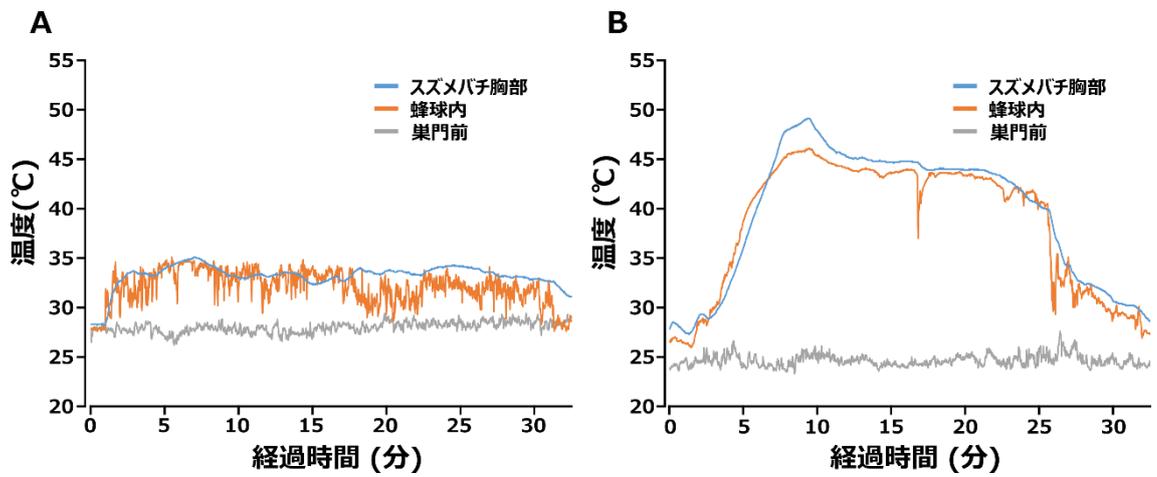


図7. キイロスズメバチに対するセイヨウミツバチによる熱蜂球の再現実験の同一コロニーにおける提示初回と熱殺初回の温度変動
蜂球内温度 (オレンジ), スズメバチ胸部温度 (青), 巣門前 (灰色). **A**: スズメバチ提示初回時の温度変動. **B**: 熱殺初回時の温度変動.

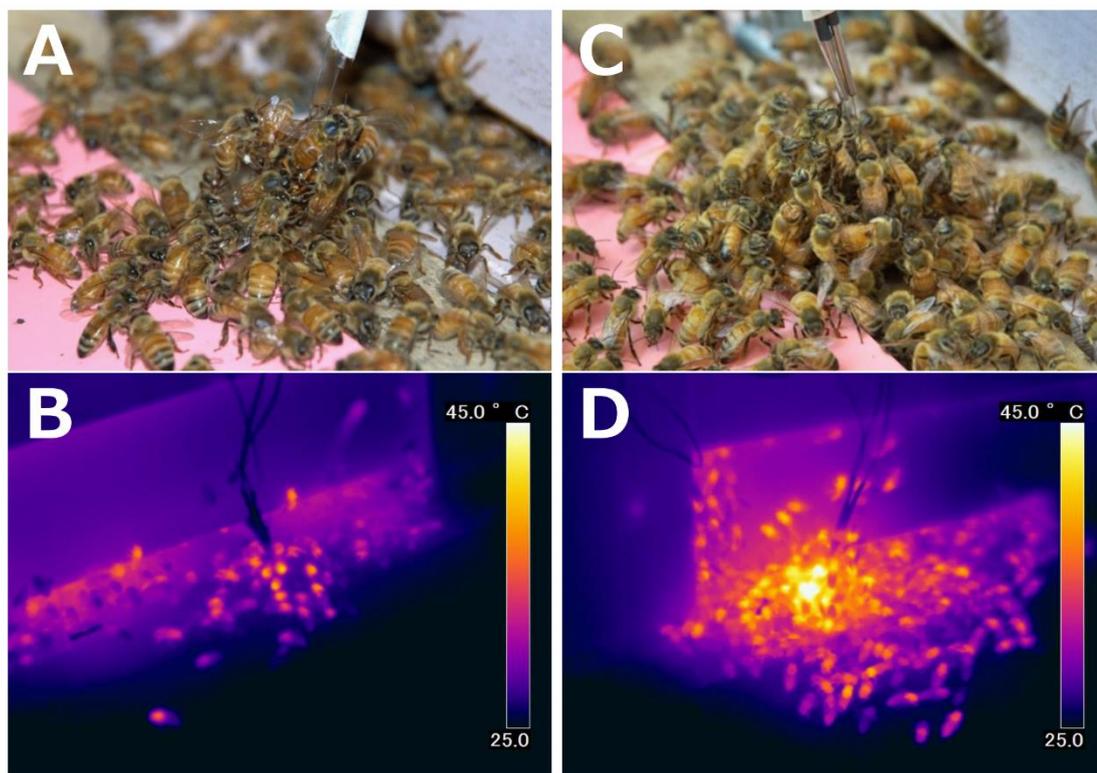


図8. キイロスズメバチに対するセイヨウミツバチによる熱蜂球再現実験の同一コロニーにおける提示初回と熱殺初回の写真とサーモグラフィー画像

A：スズメバチ提示初回時の蜂球形成の様子。 **B**：熱殺初回時の蜂球形成の様子。 **C**：スズメバチ提示初回時のサーモグラフィー画像。 **D**：熱殺初回時のサーモグラフィー画像。

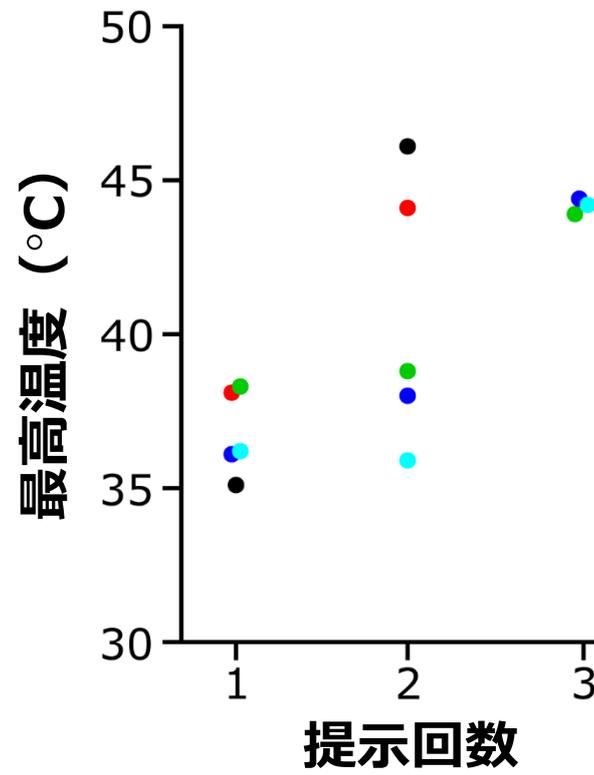


図9. キイロスズメバチを提示した回数に応じたセイヨウミツバチ熱蜂球内の最高温度

5コロニーにおける提示回数に応じた蜂球内最高温度. コロニーごとに色分けをした.

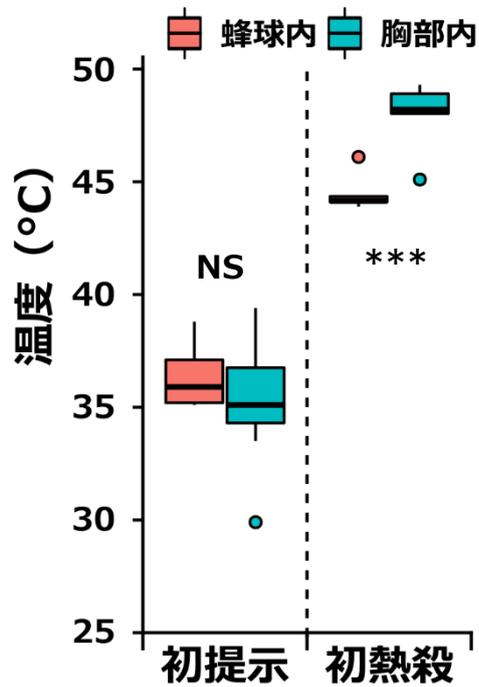


図10. 提示初回と熱殺初回時における最高温度の比較
 蜂球内温度 (赤), スズメバチ胸部内温度 (青) として描画. 初提示: スズメバチ提示初回時の最高温度の比較. 蜂球内と胸部内の温度に有意性はなかった. 初熱殺: 熱殺初回時の最高温度の比較. NS: $p > 0.05$, ***: $p < 0.05$.

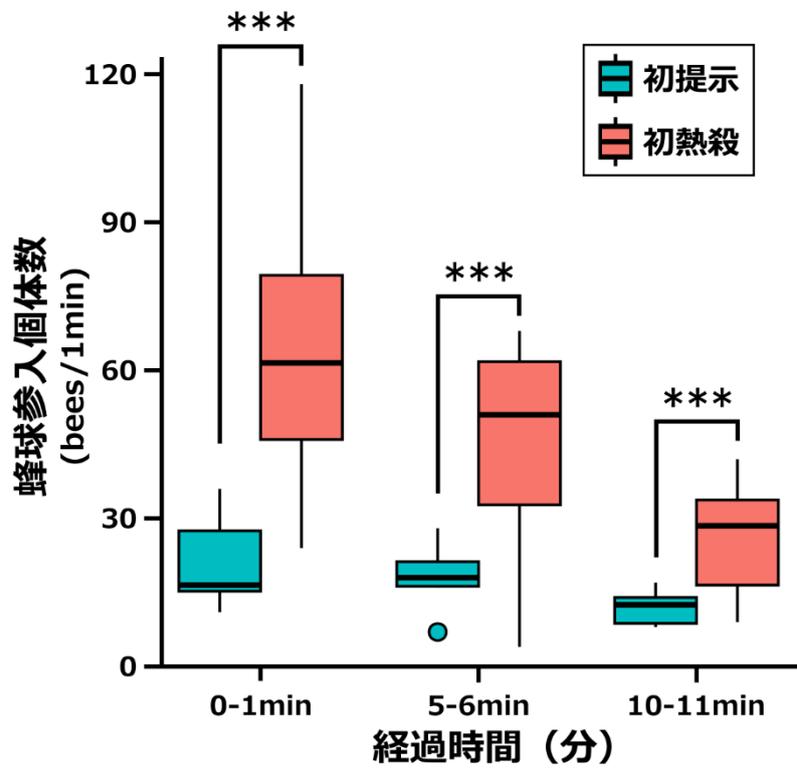


図11. 蜂球への参入個体数の比較

スズメバチ提示直後から1分まで，提示5分後から6分まで，提示10分後から11分までの蜂球へ参加した個体数．初提示（青），初熱殺（赤）として描画．***： $p < 0.05$

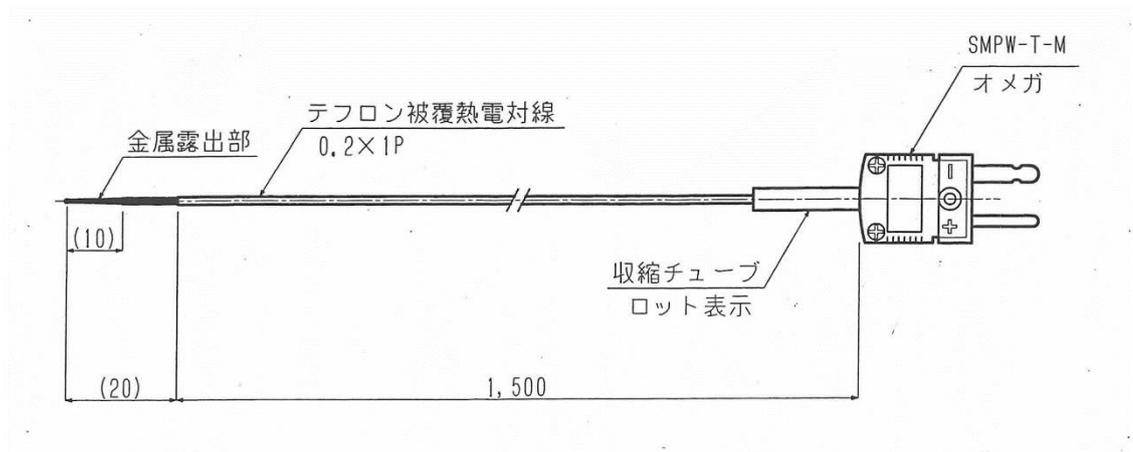


図12. キイロスズメバチの胸部内に刺入するために特注した温度センサーの設計 (YC300, Yashima Sokki CO., Japan)

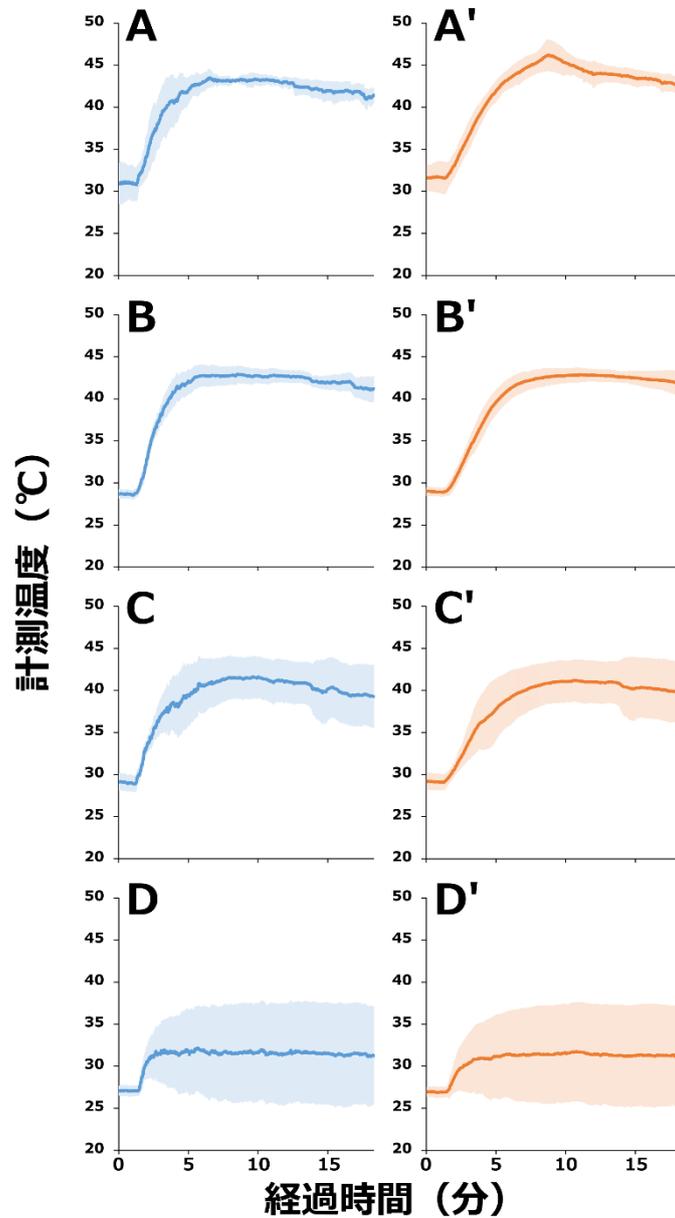


図13. 異なる蜂球核に対する蜂球内と昆虫胸部内の温度変動

A-D：蜂球内の温度変動。 **A'-D'**：昆虫胸部内の温度変動。 **A** と **A'**：キイロスズメバチ生体に対する温度変動。 **B** と **B'**：キイロスズメバチ死体に対する温度変動。 **C** と **C'**：アオドウガネ生体に対する温度変動。 **D** と **D'**：アオドウガネに対する温度変動。 5コロニー分の平均値（実線）と標準偏差（薄い色の塗りつぶし）

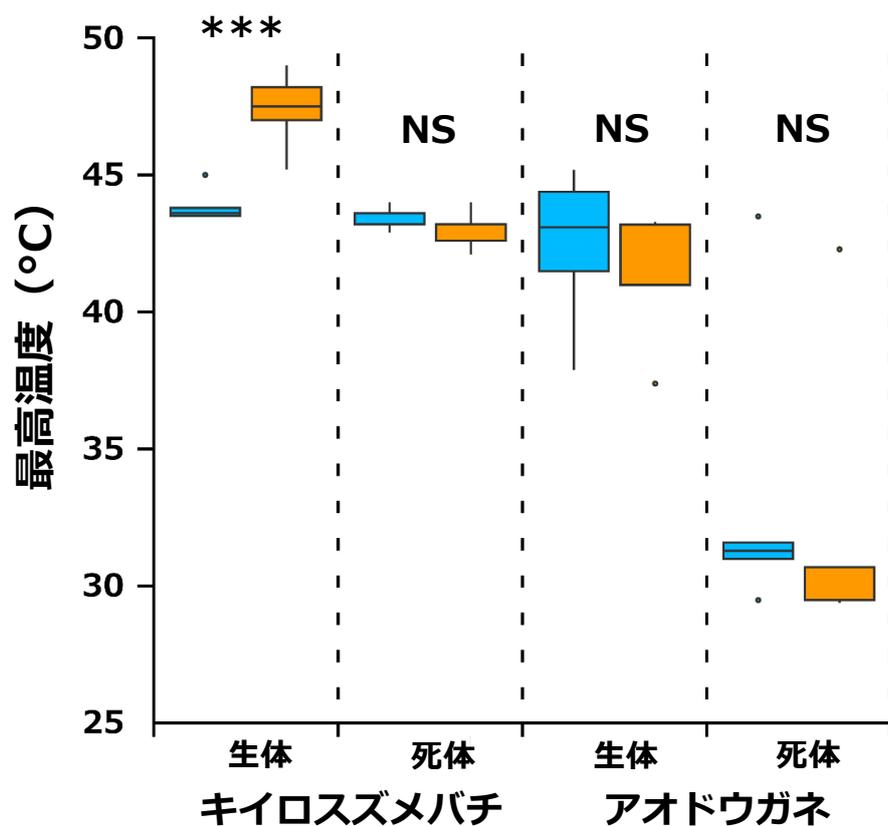


図14. 異なる蜂球核に対する最高温度の比較

生体：生体で蜂球を形成させたときの胸部内（オレンジ）と蜂球内（青）の最高温度。**死体**：死体で蜂球を形成させたときの胸部内（オレンジ）と蜂球内（青）の最高温度。***： $p < 0.05$ ，NS： $p > 0.05$

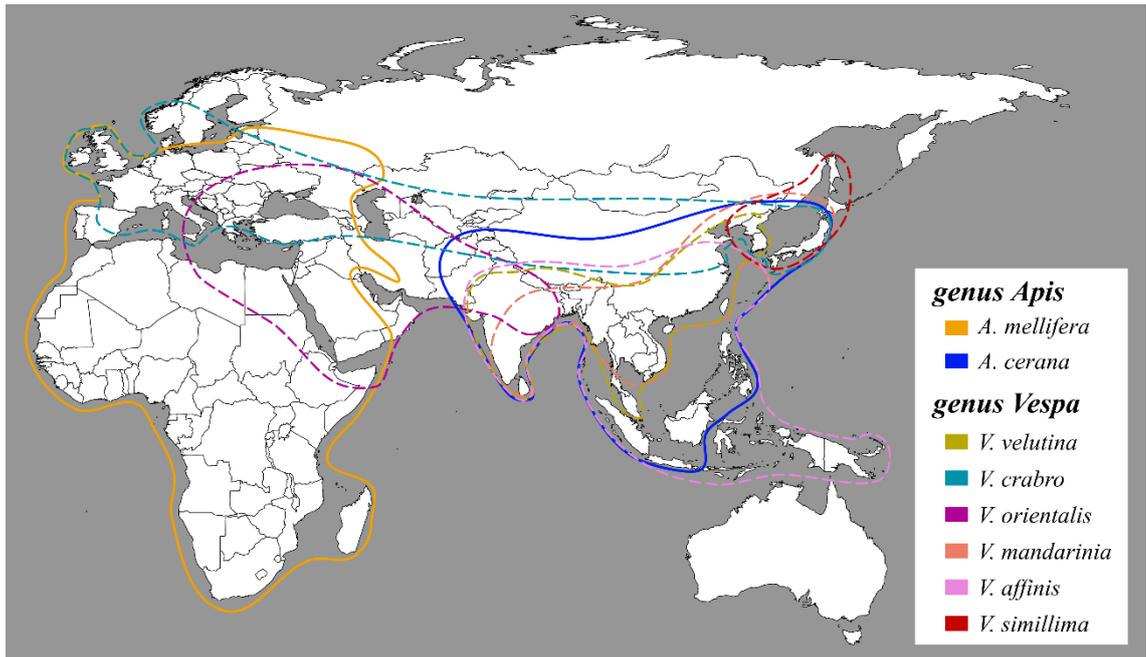


図15. ミツバチ種とスズメバチ種の分布域

実線：ミツバチ種 (Crane 1999). 点線：スズメバチ種 (Carpenter & Kojima 1997). 線で囲われた範囲が分布域.

8. 摘要

社会性昆虫は彼らの巣や幼虫, 蛹, 貯蔵されている食料を捕食者や外敵から守っている. トウヨウミツバチ (*Apis cerana*) は捕食性のスズメバチに熱蜂球行動により対抗する. 熱蜂球行動は長い時間をかけ, 捕食性スズメバチとトウヨウミツバチとの競争関係により獲得されたと考えられてきた. Arca *et al.* (2014) はセイヨウミツバチ (*A. mellifera*) により, 外来種スズメバチであるツマアカスズメバチ (*Vespa velutina*) に対し蜂球行動を示したことを報告した. もし, セイヨウミツバチでもトウヨウミツバチで見られる熱蜂球行動が観察される場合, セイヨウミツバチは日本に定着する可能性がある. しかし, 実際には小笠原諸島などのスズメバチのいない地域を除いた日本には定着していない. セイヨウミツバチ特有の性質が熱蜂球にあり, それが定着しない理由と考えられた. 本研究はセイヨウミツバチによる熱蜂球の特性を解析し, 3つのパートに分かれている.

1. 本研究では, はじめにセイヨウミツバチがキイロスズメバチ (*V. simillima xanthoptera*) とオオスズメバチ (*V. mandarinia japonica*) を熱蜂球によって熱殺するかを調査した. スズメバチの生理状態をモニターするために, その体温を測定した. ミツバチはスズメバチ両種を熱蜂球によって殺した. 熱蜂球の温度は 44°C に達したが, スズメバチの致死温度よりもわずかに下回った. 興味深かったことは, 蜂球に捕らえられたスズメバチの体温が 46°C よりも高くなったことである. 巣門前にいる防衛ミツバチ個体“Bee-carpet”にスズメバチを提示した直後から, スズメバチはミツバチに捕らえられ, 10分程度で死亡した. ミツバチが刺針行動を示した一方で, 死亡したスズメバチには刺し傷は観察されなかった. オオスズメバチは熱蜂球に

包まれていた間、強力な大アゴで多数のミツバチを噛み殺した。スズメバチの死亡原因からミツバチの影響を排除するために、スズメバチ個体を温められた容器内に入れ、熱によって死亡したことを観察した。これらのことから、セイヨウミツバチはスズメバチを捉えることができれば、熱蜂球によってスズメバチを殺すことができると結論づけた。しかしながら、依然として集団で襲撃してくるオオスズメバチはミツバチコロニーにとって強い脅威である。

2. セイヨウミツバチは防衛行動を環境ストレスに依存して調節することが知られている。そこで、本研究はミツバチの熱蜂球による防衛の開始とスズメバチの飛来頻度との関係性に注目した。5つのミツバチコロニーを用い、コロニーに対しはじめてスズメバチを提示したとき、すべてのコロニーは熱蜂球による防衛を行わずスズメバチを殺すことができなかった。5つすべてのコロニーは、2から3回のスズメバチ提示を受けたのち熱蜂球による防衛行動を開始した。また、熱蜂球に参加したミツバチ個体数はスズメバチ提示とともに増加した。これらのことから、セイヨウミツバチの熱蜂球を引き起こすためにはスズメバチ飛来経験が必要であると結論づけた。
3. セイヨウミツバチによる熱蜂球行動はいくつかの刺激によって解発される。針金で固定されたキイロスズメバチの生体と死体(L-VsxとD-Vsx)、アオドウガネ(*Anomala albopilosa*)の生体と死体(L-AaとD-Aa)をミツバチに提示し蜂球行動が開発されるのかを調査した。D-Aaを除いたすべての提示においてミツバチは熱蜂球を形成した。これは熱蜂球を解発する刺激がスズメバチ特異的ではないことを示唆している。ミツバチはD-VsxとD-Aaを区別していることから、熱蜂球を解発するために重要な役割がある刺激がD-Vsxから

放たれていると考えられる。

この研究は蜂球行動がミツバチ属に広く共通していることを示唆している。おそらく、セイヨウミツバチとトウヨウミツバチの共通祖先は熱蜂球を獲得していたと考えられる。モンスズメバチ (*V. crabro*) やオリエントスズメバチ (*V. orientalis*) のような単独で狩りをするスズメバチが分布するヨーロッパやアフリカ地域に広がったグループがセイヨウミツバチとなり、フェロモンを用いた集団で狩りをするオオスズメバチなどが分布する地域にとどまったグループがトウヨウミツバチになったと考えられる。オオスズメバチが用いる餌場フェロモンをセイヨウミツバチは感知することができないため、セイヨウミツバチはオオスズメバチに対し効果的な防衛を行えない。本研究で報告した熱蜂球による防衛行動は単独で狩りをするキイロスズメバチのようなスズメバチには対抗することができる。おそらく、セイヨウミツバチがヨーロッパやアフリカ地域に分布を広げたのちも、モンスズメバチやオリエントスズメバチのような単独で狩りをするスズメバチ種からの捕食圧を受け続けてきた。そのため、熱蜂球による防衛行動は維持されてきたのではないだろうか。

9. Summary

Social insects defend their nests, larvae, pupae, and food stores from predators or other enemies. *Apis cerana* defends against predatory hornets by heat bee-balling behavior, which has been believed to be a specific behavior of *A. cerana* acquired by long-term competition between predatory hornets and Asian honeybees. Arca *et al.* (2014) reported that European honeybees, *A. mellifera*, defend hives against the non-native predatory hornet, *Vespa velutina*, using bee-balling behavior. If *A. mellifera* has developed heat bee-balling like *A. cerana*, *A. mellifera* could be naturalized in Japan, but *A. mellifera* has never naturalized in Japan except in hornet-free regions, such as the Ogasawara islands. This suggests that bee-balling of *A. mellifera* is inadequate to defend against Japanese hornets. This study analyzes the characteristics of bee-balling by *A. mellifera* and consists of three parts:

1. I investigated whether *A. mellifera* kills hornets, *V. simillima xanthoptera* and *V. mandarinia japonica* by heat bee-balling. The body temperature of the hornet was recorded to monitor its physical state. The honeybees were found to kill these two hornet species by heat bee-balling. The bee-ball temperature reached 44°C or slightly below the lethal temperature for the hornets. Notably, the body temperature of hornets engulfed by bees reached more than 46°C, which is lethal to the hornets. When hornets were exposed to the "bee-carpet" (defender bees at hive entrance), they were immediately engulfed in a bee-ball and died within about 10 minutes. No stings were found in the bodies of dead hornets although the bees exhibited stinging behavior toward

the hornets during bee-balling. *V. mandarinia japonica* used its powerful mandibles to kill many honeybees while the bee-ball was being formed. To exclude other bee-influenced causes of hornet death, individual hornets were put in heated containers without bees where they died simply by exposure to heat. I concluded that *A. mellifera* can kill hornets by heat bee-balling if they can successfully capture and engulf the hornet. However, the mass-attack foraging behavior of *V. mandarinia japonica* is still a grave threat to *A. mellifera* colonies.

2. *A. mellifera* is known to adjust defensive behavior, depending on environmental stresses. I focused this study on the relationship between the hornet arrival and the start of *A. mellifera* heat bee-balling. When each of five test honeybee colonies was presented with a hornet for the first time, none defended using heat bee-balling and the presented hornet was not killed. All five colonies start using heat bee-balling behavior after a hornet has been presented two or three times. The number of honeybees joining the heat bee-ball increased with number of hornet presentations. I concluded that experience of hornet attack is required to induce heat bee-balling by *A. mellifera*.

3. The heat bee-balling behavior of *A. mellifera* is released by several stimuli. Both live and dead *V. simillima xanthoptera* (L-Vsx and D-Vsx) and live and dead beetles, *Anomala albopilosa* (L-Aa and D-Aa) tethered individually on a wire were presented to the bee carpet of a colony of *A. mellifera*. With the exception of the

presented D-Aa, all other L-Vsx, D-Vsx, and L-Aa were engulfed in a heat bee-ball, suggesting that the stimulus(i) releasing the heat bee-balling behavior is not hornet specific. Since *A. mellifera* can discriminate between D-Vsx and D-Aa, some signal(s) emitted from D-Vsx may play an important role in releasing the bee heat-balling behavior.

This work suggests that bee-balling behavior is widespread in the genus *Apis*. Perhaps it was acquired when the common ancestor of *A. mellifera* and *A. cerana* spread to Europe and Africa where solitary hunting hornets like *V. crabro* or *V. orientalis* are distributed but where there are no pheromone-regulated mass-attack hornets like *V. mandarinia*. Since *A. mellifera* introduced to Japan cannot detect the foraging-site pheromone used by *V. mandarinia* to regulate its mass attacks, *A. mellifera* has no effective defense. The bee heat-balling defense reported here is only effective against solitary attackers, such as *V. simillima xanthoptera*. Perhaps the heat bee-balling defense of *A. mellifera* against solitary hunting hornets like *V. crabro* and *V. orientalis* remains conserved because *A. mellifera* in Europe and Africa are still exposed to pressure from these predators.

10. 謝辞

本研究を進めるにあたり、多くの方々からご助言をいただいた。この場を借りてお礼申し上げます。本学大学院農学研究科 小野正人教授、ミツバチ科学研究センター 中村純教授両氏は、研究テーマに対する指導や研究姿勢について多くのご助言をいただいた。東京大学大学院理学系研究科 久保健雄教授、本学大学院農学研究科 佐々木謙准教授には、論文原稿をお読みいただき、貴重なコメントを頂戴した。大学院ゼミでは、佐々木哲彦教授、原野健一准教授、宮崎智史助教、宇賀神篤日本学術振興会特別研究員の皆様には研究内容に関する貴重なご助言をいただいた。大学院生活をともにした修士課程学生の皆様にも、日々の生活を支えていただいた。