

ミツバチ群における内勤蜂と外勤蜂の識別手法の改良

市原直登, 大石桂輔, 石原 悟

独) 農林水産消費安全技術センター 農薬検査部

大石らはミツバチの内勤蜂と外勤蜂を識別する手法として、ミツバチ一頭を試料とする残留農薬分析の前処理工程で生じる精製塩の彩度を比較する手法を開発した。本手法は識別のために前処理の最終工程まで進める必要があり、一度に多量のサンプルを処理することが困難であった。本研究では作業の簡易化を図るため、残留農薬分析の前処理中の工程において、分光測色計を用いる方法（改良法 1）およびマイクロプレートリーダーを用いる方法（改良法 2）を検討した。

検討の結果、改良法 1 および改良法 2 でそれぞれ精製塩の色調の色度座標 (b^*) または抽出溶液の吸光度 (405 nm) を指標とすることで、既存の方法と同等の精度で内勤蜂と外勤蜂の識別が可能であった。

Keywords : ミツバチの分業, 農薬被害, 殺虫剤, 曝露経路

緒 言

ミツバチの活動範囲は、巣箱を中心に半径 2-6.5km と広く^{1,2)}、農薬が使用される農地とミツバチの活動範囲を明確に区分することはできない。そのため、農薬の使用に当たっては農薬のラベルに記載されたミツバチに関する注意事項の遵守が求められる。

2000 年代より、欧米においてミツバチを含めた花粉媒介者減少の懸念が高まっており、その要因の一つとして農薬が挙げられている^{3,4)}。このため、農林水産省は平成 25 年度から平成 27 年度までの 3 年間にわたり、農薬によるミツバチの被害事例について詳細な調査を行った⁵⁾。その結果、我が国における農薬が要因と考えられるミツバチ被害の多くは、水稻カメムシ防除に用いる殺虫剤にミツバチが直接曝露することにより発生していることが示唆された⁶⁾。しかしながら、現時点においては詳細な曝露経路の解明には至っていない⁷⁾。

真性社会性昆虫であるミツバチは、巣の内外で仕事を分業している⁸⁾。農薬の曝露量は巣の内部で働く内勤蜂と外部で働く外勤蜂とで異なることが考えられることから、曝露経路の解明には、内勤蜂と外勤蜂それぞれについて農薬の曝露量を解析する必要があると考えられる。

大石らは、ミツバチ一頭を試料とした残留農薬分

析（以下一頭分析という。）において生じる精製塩の彩度の違いによって内勤蜂と外勤蜂を識別する手法を開発した^{9,10)}。しかし、本手法は、一頭分析の最終工程まで進めなければ識別ができないこと、彩度の確認を画像解析で行うこと等から、一度に多量の試料を処理することは困難であった。本研究ではより簡易に識別する手法開発を目的に、分光測色計を用いる手法（改良法 1）およびマイクロプレートリーダーを用いる手法（改良法 2）を検討した。

材料および方法

1.改良法の妥当性の確認

1.1. 試料

野外飼育（巣板 5 枚群）の巣箱内部（育児圏の比率が高い巣板）で活動している成虫を内勤蜂、巣箱に隣接する植物に訪花している個体を外勤蜂と仮定し採取した各 33 頭を妥当性の確認に用いた。試料の採取は平成 28 年 5 月 30 日の午前中に行った。

1.2. 方法

一頭分析の工程における既存の識別手法（以下既存手法という。）および今回検討した 2 種類の改良法のフロー図を図 1 に示す。

改良法 1 では既存手法と同様に精製塩を測定試料とし、改良法 2 では抽出溶液を測定試料とした。

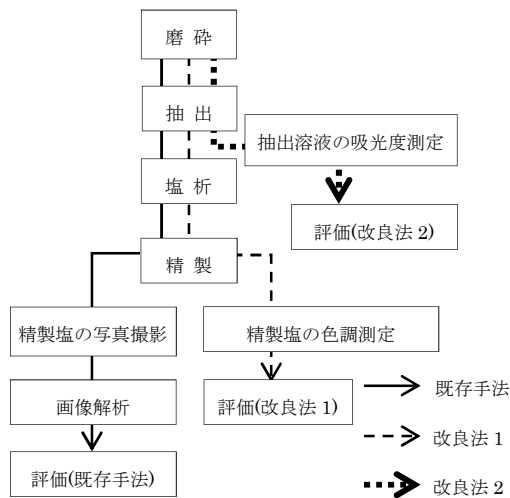


図 1. 既存手法および改良法のフロー図

1.2.1. 分光測色計を用いた方法(改良法 1)

一頭分析に用いる精製塩の色調について分光測色計(コニカミノルタ製, CR-20)を用い測定した。色調の評価は La^*b^* 色空間で表現した際の色度座標 b^* (黄色と青の間の座標の値) を指標として行った。

1.2.2. マイクロプレートリーダーを用いた手法(改良法 2)

一頭分析における抽出溶液を 96 穴マイクロプレートに 200 μ L 分注し, マイクロプレートリーダー(Thermo 製, multiskan jx)を用いて吸光度(測定波長 405 nm)を測定した。

結果および考察

1. 識別手法改良の検討

1.1. 分光測色計を用いた方法(改良法 1)

外勤蜂の b^* は内勤蜂に比べ有意に低い値を示した (t 検定, $p < 0.01$) (図 2)。

既存手法における彩度 (S) と改良法 1 における b^* の相関性を調べた結果, 高い正の相関 ($R^2=0.93$) が認められた (図 3)。本手法は既存手法と同等の精度で, より簡易に内勤蜂と外勤蜂を識別できることが示唆された。

個別別の b^* について解析した結果, 内勤蜂は $b^*=16\sim 26$ の間に分布し, 外勤蜂については $b^*=1\sim 6$ の間に分布していた (図 4)。本結果より, 内勤蜂

と外勤蜂を識別する際の目安として b^* が 10 以下のものを外勤蜂と識別することとした。

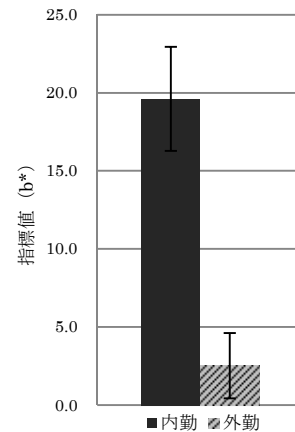


図 2. 内勤蜂および外勤蜂の指標値 (b^*) の平均値の比較

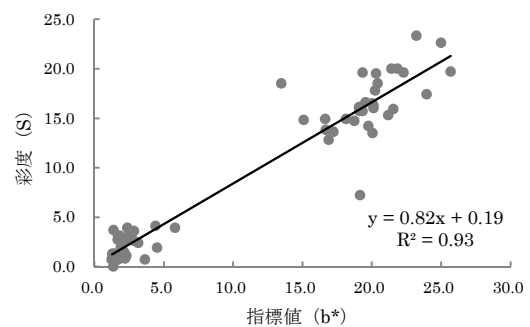


図 3. 彩度 (S) と指標値 b^* の相関

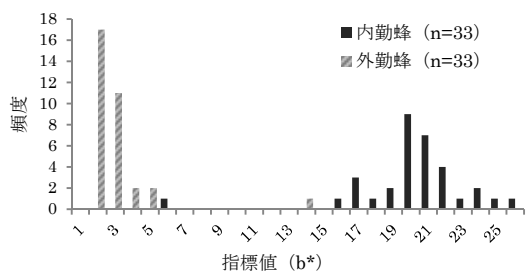


図 4. 指標値 b^* のヒストグラム

1.2. マイクロプレートリーダーを用いた手法(改良法 2)

外勤蜂の抽出溶液の吸光度 (405 nm) は内勤蜂に比べ有意に低い値を示した (t 検定, $p < 0.01$) (図 5)。

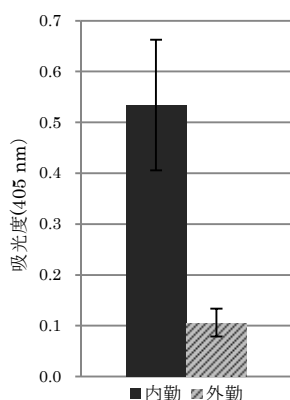


図 5. 内勤蜂および外勤蜂の吸光度(405 nm)の平均値の比較

既存手法における彩度 (S) と改良法 2 における吸光度 (405 nm) の相関性を調べた結果、高い正の相関 ($R^2=0.87$) が認められた (図 6)。本手法も改良法 1 と同様に既存手法と同等の精度で、より迅速に内勤蜂と外勤蜂を識別できることが示唆された。

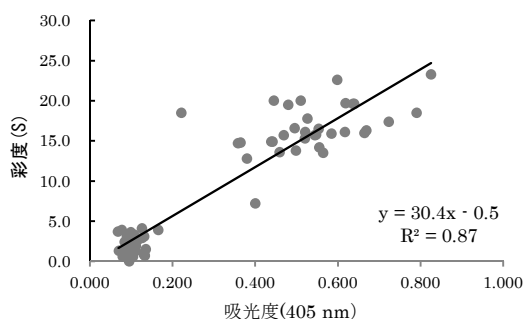


図 6. 彩度(S)と吸光度(405 nm)の相関

個体別の吸光度 (405 nm) について解析した結果、内勤蜂は 0.40~0.85 の間に分布し、外勤蜂は 0.05~0.15 に分布していた (図 7)。本結果より、内勤蜂と外勤蜂を識別する際の目安として吸光度が 0.30 以下のものを外勤蜂と識別することとした。

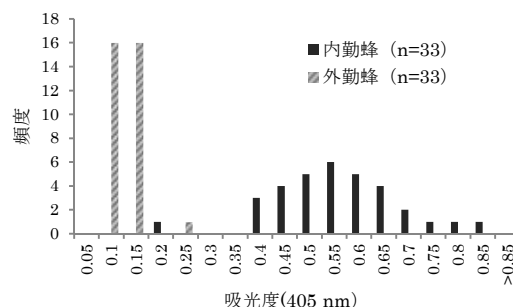


図 7. 吸光度(405 nm)のヒストグラム

おわりに

本検討では、大石らが開発した手法に改良を加え、ミツバチ群における内勤蜂と外勤蜂の識別法について簡易化を試みた。改良法 1 においては、一頭分析における精製塩の色度座標 (b^*) を測定することで、写真撮影および画像解析の工程を省略することができ省力化につながった。また、改良法 2 においては、抽出溶液の段階で識別できることから、既存手法および改良法 1 と比較し、さらに早い段階での識別が可能であった。ただし、改良法 2 については、夾雑物を多く含む抽出溶液を測定することから、試料の状態によっては外勤蜂の吸光度が増加し、識別が困難になる可能性があることに留意が必要である。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、ミツバチ試料の採取にご協力いただくとともにご提供いただいた (株) エスコ、古川雅也氏にこの場を借りて深く感謝の意を表します。

引用文献

(全 URL のリンクについての確認は、2017 年 7 月 21 日に実施。)

- 1) 坂上昭一:ミツバチの世界, 岩波新書, p.221, 1983.
- 2) 佐々木正己:養蜂の科学, サイエンスハウス, p.159, 2003.
- 3) <https://ojs.openagrar.de/index.php/JKA/article/viewArticle/140>
- 4) Johnson, R. M. et al. : Apidologie, 41, 312-331
- 5) http://www.maff.go.jp/j/nouyaku/n_mitubati/pdf/130530_mitubati.pdf

- 6) <http://www.maff.go.jp/j/press/syouan/nouyaku/pdf/160707-02.pdf>
- 7) http://www.naro.affrc.go.jp/publicity_report/press/laboratory/nilgs/053347.html
- 8) 渡辺 寛, 渡辺 孝: 近代養蜂, 日本養蜂振興会, p726, 1974.
- 9) 大石桂輔, 石原 悟: 農薬環境科学研究会要旨集, 23, 139-141 (2015)
- 10) 大石桂輔, 石原 悟: 植物防疫, 70, 63-66 (2016)