

Title: Neonics and mites can interfere with extending the bee-colony longevity during wintering ネオニコやダニは冬季中のミツバチの寿命の増加を妨げる可能性がある

Short title: Bee-brood damage causes abnormal seasonal changes in longevity

ミツバチの幼虫の傷害は異常な寿命の季節変化を引き起こす

Authors: Toshiro Yamada^{1,*†} and Yasuhiro Yamada^{2,*‡}

Affiliations:

¹ Graduate School of Natural Science & Technology, Kanazawa University, Kakuma, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan.

² Department of Applied Physics, The University of Tokyo, 7-3-1 Hongo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0033, Japan.

*Corresponding author. Email: yamatohikazu0501@yahoo.co.jp (T.Y.); yyasuhilo@gmail.com (Y.Y.)

Both authors contributed equally to this work.

[†] Present address: 2-10-15, Teraji, Kanazawa, Ishikawa, 921-8178, Japan.

[‡] Present address: NTT Basic Research Laboratories, 3-1, Morinosato Wakamiya Atsugi, Kanagawa, 243-0198, Japan.

Summary: 我々は、成虫の数と蓋をした幼虫（封蓋蜂児）数の両方からミツバチの見かけの寿命を推定できる数理モデルを提案した。野外実験データを用いて推定された見かけ寿命の季節的变化から、以下の興味深い知見が得られました。

ダニや無農薬のミツバチのコロニーの見かけの寿命は、越冬後9月中旬までほぼ一定で、9月下旬から増加し始め、越冬の終わりまで増加し続け、越冬終了直前に最大に達し、越冬終了後に急激に低下します。このような見かけの寿命の通常季節変化は、農薬を添加した砂糖シロップ(SS)と無農薬の花粉末(PF)を摂取したダニのいないコロニーでも確認されました。

以上の結果から、成虫の見かけの寿命が9月下旬から延び始めることや、働き蜂が女王蜂の産卵後21日目に成虫になることから、ミツバチのコロニーの越冬失敗を防ぐ対策として、9月上旬からミツバチの群れによるダニや殺虫剤への曝露を防ぐ必要性が示唆された。

一方、ネオニコチノイド含有PFを摂取したダニのいないコロニーとダニが蔓延したコロニーでは、見かけの寿命は正常な季節変化を示さず、異常な季節変化を示し、9月下旬以降、ミツバチは冬の接近に気づいていないかのように、伸びず、ほぼ一定に保たれるか、あるいは短くなることさえあります。

花粉がミツバチの幼虫や蛹の主食であること、ダニが蜂児に寄生すること、ネオニコチノイド系農薬が長期間毒性を持ち続けること、ミツバチの生命機能や器官が幼虫期や蛹化期に作られていることから、ネオニコチノイド含有PFや寄生ダニは、ミツバチの冬の到来を感知する能力に深刻なダメージを与えていると推測されます。このような幼虫期の機能不全は、冬が近づいても成虫の見かけ上の寿命を延ばすことを妨げている可能性があります。

One Sentence Summary: 幼虫期や蛹期のネオニコチノイド系農薬やダニによる機能やセンサーの損傷は、越冬期のミツバチの寿命の延長を帳消しにする可能性があります。

Key words: seasonal changes in longevity, bee colony, abnormal, overwintering, pollen, neonicotinoid, pesticide, mite, field experiment, larval, pupal, period, damage

Main Text: 動物の個体の寿命は、動物の活動を評価するための重要な指標の 1 つです。ミツバチのようにコロニーを形成する真社会性昆虫では、コロニーはあたかも 1 匹の動物のように振る舞う超個体として扱うことができる。ミツバチのコロニーで最も長生きするミツバチの群れの日齢(寿命)は、ミツバチのコロニーの活動期間を表しているといえます。つまり、ミツバチのコロニーの活動期間は、個々のミツバチの寿命ではなく、コロニー全体の寿命の指標である longevity で評価されると考えられます。著者らは、ミツバチのコロニーの寿命を成虫の数と封蓋蜂児数のみから推定する数理モデル(1)を提案し、数理モデルによって推定される寿命を、直接測定された寿命と区別するために「見かけの寿命」と名付けました。この数理モデルと、長期野外実験で測定した成虫の個体数と蜂児の個体数を用いて、見かけの寿命の季節変化を推定した(1)。

その結果、中西部日本における長期野外実験から推定された対照(無農薬)コロニーの見かけの寿命は、越冬期に急激に増加し、越冬終了直前には、非冬期の 6 倍から 10 倍の寿命に達することがわかった(1)。このような見かけの寿命の急激な変化は、これまで述べてきた採餌作業(3, 4)や授乳作業(5)などの労働負荷(2)だけでは説明できません。

そこで著者らは、ミツバチに遺伝的にあらかじめ組み込まれた生体リズム制御システムが、気温、湿度、日照時間などの環境の季節変化を感知し、その結果、寿命の季節変化を引き起こすという仮説を提唱しました(1)。また、冬が寒くないマウイ島での長期野外実験結果から推定された見かけの寿命は、日本の中西部の推定結果とはかなり異なり、大きく変動したが、季節変化は認められなかった。マウイ島のような季節変化の少ない地域では、見かけの寿命は、女王蜂の不在や産卵量の減少などのミツバチの生理学的現象に大きく影響されることがわかっています(6)。

ミツバチの寿命に影響を与える要因については多くの報告があります。20 世紀末に登場したネオニコチノイド系農薬(ネオニコチノイド系農薬)は、その特性(持続性、殺虫性、全身性、神経毒性)からミツバチの寿命に悪影響を及ぼすことが知られています。例えば、ネオニコチノイド系薬剤自体は、ミツバチの寿命を直接的に短くしたり(7, 8, 9)、あるいは間接的にミツバチの寿命を縮めたりします。

ネオニコチノイドは女王蜂の免疫力に悪影響を及ぼし、病気の再発症を引き起こす可能性があります(10)。それらはミツバチの概日リズムと睡眠を乱し、ミツバチのナビゲーション、時間記憶、社会的コミュニケーションを損なう可能性があります(11)。アセタミプリドはミツバチの記憶関連特性、ホーミング能力、記憶関連遺伝子の発現レベルに悪影響を及ぼします(12)。ネオニコチノイドは女王蜂の交尾頻度を減少させ、働き蜂の遺伝的多様性を減少させ、コロニーの活力に悪影響を及ぼす可能性があります(13)。イミダクロプリドは、ミツバチの幼虫期に嗅覚と視覚の両方に関与する領域の神経系の発達を損傷し、ミツバチの活動を阻害します(14)。

さらに、バロアダニはミツバチの寿命を縮め、バロアダニと変形翼ウイルス(DWV)は冬のミツバチの寿命を縮めます(15)。バロアダニの存在下で封蓋蜂児から出房する成虫のミツバチは、翼の変形を引き起こし、寿命を著しく縮めます(16)。外部寄生ダニ *Tropilaelaps mercedesae* は、ミツバチの寿命と羽化重量を減少させる(17)。バロア・デストラクタ寄生虫病と DWV 感染は、アフリカ化したミツバチの発育中に奇形を引き起こし、細胞性免疫を阻害し、成虫のミツバチの寿命を著しく縮めます(18)。

さらに、全身性農薬(ネオニコチノイドとフィプロニル)への慢性的な曝露と、ダニに深く関与するバロアダニ(19)または微孢子虫寄生虫 *ノセマセラナエ*(20-24)の蔓延の組み合わせは、ミツバチの生存に相乗的かつ悪影響を及ぼし、ミツバチのコロニーの寿命を縮める結果となる。

このように、長期残留性・浸透性農薬(ネオニコチノイド系農薬など)と、それらのダニが媒介する外部寄生ダニ(バロアダニなど)やウイルスがミツバチの寿命を縮めることはわかっているが、ミツバチの寿

命の季節変化に対する浸透性農薬やバロアダニの影響については、我々の研究以外では見つかっていない(6)。そこで、養蜂におけるミツバチのコロニーの寿命の季節変化がどのような影響を与えるのかを知ることが重要であることから、本論文では、日本中西部で実施された長期野外実験(25-28)から得られた成虫とキャップ付きひなの数のみからミツバチの寿命を推定する数理モデル(1)を用いて、以下の点を明らかにする。

(1)バロアダニがほとんどいない対照(無農薬)コロニー(以下、ダニフリーCR コロニー)とバロアダニが蔓延しているコロニー(以下、ダニ寄生 CR コロニー)の見かけ寿命の季節変化の違い。

(2)砂糖シロップを介して農薬を投与するダニフリーコロニー(以下、ダニフリー&有毒 SS コロニー)と花粉ペーストを介して殺虫剤を投与するコロニー(以下、ダニフリー&有毒 PP コロニー)との間の見かけの寿命の季節変化の違い。

(3)ダニがいない殺虫剤を投与したコロニーと、ダニが蔓延して農薬を投与したコロニーの間の見かけの寿命の季節変化の違い。

Mite-free control (pesticide-free) colony

ダニのない CR コロニー(2011/2012 CR-1; 2012/2013 CR-1; 2012/2013 CR-3; 2013/2014 CR-1; 2013/2014 CR-2)(27-29)は、見かけの寿命の季節変化を示しており、9月下旬頃から増加し始め、越冬終了直前に最長になり、越冬直後の春に一気に低レベル近くまで短くなり、その後、小さな変動はあるが、低レベルではほぼ一定に保たれます。(補足図 S7~S9 参照)(1)。このような見かけの寿命の季節変化は、四季のある地域では普通のことです。なお、越冬に失敗したダニフリーCR コロニーの見かけの寿命は、越冬に成功したダニフリーCR コロニーの場合と同様に、コロニーが絶滅するまで変化します(図 1A)。

これらの通常の季節変化は、ミツバチの作業量(3,5,29)や栄養摂取量(30-32)などの学説では説明できません。例えば、ミツバチが活動する9月下旬頃から見かけの寿命が伸び始めるという事実は、仕事量が多いと見かけの寿命が下がるという報告と矛盾しています。また、越冬が終わる前後の見かけの寿命の急激な変化は、ミツバチの作業負荷のそれほど急激ではない変化だけでは説明できません。越冬期は他の時期よりも栄養価が高くなく、女王蜂は2月中旬の越冬時に産卵し始め、この時期にミツバチの作業負荷が増加するはずであるにもかかわらず、見かけの寿命が延びていることを従来の学説では説明できません。

Mite-free & toxic (pesticide-containing) sugar-syrup colony

ダニがいない有毒な SS コロニー(2011/2012 DF 10ppm/シロップ、2012/2013 FT 10ppm/シロップ、2013/2014 DF 0.2ppm/シロップ、2013/2014 CN 0.08ppm/シロップ、2013/2014 FT 1ppm/シロップ、2013/2014 MT 1ppm/シロップ)(25-27)は、9月下旬頃から増加し始め、冬にかけてコロニーが絶滅するまで増加し続けます(図 1A)(補足図 S7~S9 参照)。ダニのない CR コロニーの場合も同様です。

ダニがいない有毒な SS コロニーの見かけ上の寿命におけるこのような季節的变化は、農薬を含む砂糖シロップの摂取が、上記の季節変化を読み取る生来の能力にほとんど悪影響を与えないことを示唆している。しかし、農薬、特にネオニコチノイドを含む砂糖シロップの摂取は、通常の季節変化でコロニーを弱め、コロニーを越冬に失敗させることがよくあります。

これまでの長期野外実験(25-27, 33)では、長期残留性ネオニコチノイドを摂取したミツバチのコロニーは全て越冬に失敗したが、フェニトロチオンなどのはるかに短期分解性の有機リン系農薬を摂取したミ

ツバチのコロニーは、長期持続性ネオニコチノイドを摂取したミツバチのコロニーよりも弱体化する可能性が低く、十分な量の有機リン系農薬(フェニトロチオン)(2012/203 FT 10ppm/シロップ)を摂取したにもかかわらず、越冬に成功することがある(26)参照補足図 S8)。

農薬を含むシュガーシロップが、コロニーが絶滅するまでの見かけの寿命の季節変化にほとんど悪影響を及ぼさないのは、シュガーシロップ(蜂蜜)がエネルギー源だからかもしれません。

蜂蜜(水飴)などのエネルギー源は、主にミツバチの活動に利用され、卵期、幼虫期、蛹期の見かけ寿命の季節変化を検出・読み取るために必要な生物学的機能や器官の形成には不可欠ではないことから、有毒な蜂蜜含有農薬は季節変化感知機能にそれほど影響を与えないと考えられます。つまり、すべての生物学的機能や器官が作られている成虫のミツバチは、主にエネルギー源である砂糖シロップ(蜂蜜)を消費するため、有毒な砂糖シロップ(蜂蜜)は、季節の変化を感知して読み取る生物機能や器官に異常を生じさせないと考えられます。

Mite-free & toxic (neonicotinoid-containing) pollen-paste colony

ダニのない有毒な PP コロニー(2011/2012 DF 0.565ppm/花粉)(25)は、ダニのない CR コロニーとダニのない有毒な SS コロニーによって示される通常のものとは、見かけの寿命の季節変化がかなり異なる。ダニがいない有毒な PP コロニーの見かけの寿命の異常な季節変化とは、見かけの寿命が9月下旬頃から冬にかけて増加し始めず、ほぼ一定に保たれ、さらに越冬中も増加しないため、越冬中にコロニーを崩壊させることである(図 1B)(補足図 S7 参照)。

花粉はミツバチの幼虫の主食(幼虫、蛹)として、女王蜂や若い幼虫が摂取するローヤルゼリーの原料として利用されているため、有毒な農薬を含む花粉は、遺伝子転写、機能分化、器官創造の際にミツバチに悪影響を及ぼすと、様々な障害や機能障害を引き起こすと推測されます。

そのため、機能や器官が作られる際に遺伝子転写エラーを起こしたり、何らかの機能障害(例えば生体リズムの乱れ)を起こしたりして、冬の到来を検知できなくなると推測されます。一方、すでに機能や器官が完成している成虫期には、有毒な蜂蜜や有毒な花粉がミツバチの機能や器官に及ぼす影響は限定的であると考えられます。

Mite-infested colony

Varroa-ダニが蔓延するコロニー(以下、ダニが蔓延するコロニー)(2018 CR-1; 2018 CR-2; 2018 CR-3; 2018 DF-2 0.4ppm/pollen)(28)の見かけの寿命も異常であり、9月下旬頃に増加しないだけでなく、ダニがいない有毒な PP コロニー(補足図 S7~S9 参照)の場合と同様に、冬に向けて一定またはむしろ短くなります(図 1A)(補足図 S10 参照)。2018-Experiment のダニが蔓延したこれらのコロニーは、越冬開始の直前または直後に崩壊しています。

このような異常な季節変化を引き起こす原因を推測します: Varroa ダニの生活環(ライフサイクル)によると、ダニは巣房に蓋をする前に巣房内の幼虫の餌に飛び込み、その後産卵を繰り返す、幼虫と蛹の体液を吸いながら成長します(34)。一方、ダニは、ダニや媒介ウイルスによる傷害により、さまざまな病気や機能障害を引き起こすと考えられています。幼虫期や蛹期はミツバチの様々な機能や器官の形成に重要であり、ダニやウイルスによって体内時計が破壊され、それらによる攻撃によって季節の変化が認識されないと考えられます。

バロアダニによるミツバチの幼虫の被害は、9月下旬頃から冬にかけては寿命が伸びないような見かけの寿命の季節変動を引き起こす可能性があるという学説に基づき、ミツバチのライフサイクルから判断

すると、ミツバチのコロニーが越冬に成功するためには、少なくとも9月上旬から中旬にかけてはバロアダニを駆除する必要があることが示唆されています。

次に、ダニがいない有毒な PP コロニー(2011/2012-Experiment)とダニが蔓延する有毒な PP コロニー(2018-Experiment)の間にわずかな違いを、何が引き起こす可能性があるかについて説明します。ダニがいない有毒な PP コロニーとダニが蔓延するコロニーは、見かけの寿命の季節的变化がほぼ同じであります。以前の論文(25)の観察結果によると、ダニがいない有毒な PP コロニーのダニはコロニーに寄生しなかったと報告されていますが、異常な季節変化がバロアダニによって引き起こされた可能性は否定できません。

そこで、ダニの感染状況を確認するために、2011年から2012年にかけて実施した野外実験で撮影したすべての櫛の写真を用いて、ダニによる被害を受けたミツバチの数(2011/2012 DF 0.565ppm/花粉)を、前回の論文(28)で報告したのと同じ測定方法でカウントしました。

ちなみに、2種類の毒性 PP コロニー(2011/2012-Experiment と 2018-Experiment)のわずかな違いについては、別の視点から検討します。私たちは、見かけの寿命の異常な季節変化は、花粉ペーストを介して投与された農薬と幼虫に寄生するバロアダニによって引き起こされる可能性があるかと推論しました。ダニが蔓延した有毒な PP コロニーは、ダニが寄生した CR コロニーと見かけの寿命において非常によく似た季節変化があるという事実(図 1B)は、バロアダニが蔓延したコロニーに農薬(ジノテフラン)を投与しても、それ以上の悪影響はほとんど見られないことを示唆しています。このことから、以下のことを演繹することができます。

これとよく似た異常な季節変化は、冬の到来を感じて寿命を延ばす器官や機能が、バロアダニによってほぼ完全に破壊されていることが原因と考えられます。この場合、幼虫が殺虫剤ジノテフランを含有する花粉ペーストを摂取したとしても、有毒な花粉ペーストはダニによって破壊された感覚器官の季節変化検出能力や機能に悪影響を及ぼすことはほとんどありません。

以上の事実によれば、農薬を含む有毒な砂糖シロップは、見かけの寿命に異常な季節変化を引き起こすのではなく、コロニーを弱体化させ、コロニーの絶滅を加速させるが、冬に向かって伸びる見かけの寿命の通常の季節変化を引き起こす。しかし、バロアダニも有毒な花粉ペーストも、ミツバチが冬の到来に気づかなかつたかのように、9月下旬から冬にかけての見かけ上の寿命を延ばすことはありません。従来の学説では説明できない見かけの寿命の季節変化は、遺伝子に埋め込まれた情報をもとに、特定の生体リズムなどの季節変化を事前に読み取ることで、ミツバチのコロニー周辺の微妙な環境変化(温度、湿度、天候、日照時間など)に対応する異常や生来の能力の欠如によって引き起こされたのではないかと推測しています。

つまり、ネオニコチノイド含有の花粉ペーストやダニは、ミツバチの重要な機能や器官が作られる幼虫期や蛹期に、機能や器官を傷つけたり、遺伝子の誤写を引き起こしたりすると推定されます。これらの異常は、生物学的リズムの乱れを引き起こし、冬が近づいていることに気づかないために、このような異常な見かけの寿命の変化を引き起こす可能性があります。

前述したように、冬の接近に気づかなければ、2011/2012-Experiment のネオニコチノイド含有花粉ペーストコロニーのように見かけの寿命は延びず、春や夏とほぼ同じ低レベルでほぼ一定に保たれます。しかし、2018年の実験では、ダニが蔓延するコロニーの見かけの寿命は、冬に向けて低レベルで一定ではなく、短くなりました。

ここで、「2011/2012年にネオニコチノイド含有花粉ペーストを投与したミツバチのコロニー(補足図 S7)のように一定ではなく、2018年実験のダニ感染コロニーの見かけの寿命が9月下旬(補足図 S10)か

ら減少するのはなぜか」という疑問が湧いてきます。この減少は、以下の理由によるものと推測されます。2018年の実験では、9月中旬からダニの蔓延が急激に増加したことから(図2)、ミツバチのダニ罹患率の増加に伴い、冬に向けてミツバチの死亡率も増加し、その結果、ミツバチのコロニーの見かけの寿命が短くなったと推定されます。

これまでの結果から、以下のことが推測できます。働き蜂は産卵後約21日で成蜂となり、9月下旬から、ミツバチのコロニーの見かけの寿命は越冬のために延び始めます。そのため、9月上旬以降にダニがコロニーに寄生したり、コロニーがネオニコチノイド含有花粉を摂取したりすると、コロニーの見かけの寿命は例年の9月下旬から延びることができないため、見かけの寿命は20~30日以下となり、越冬中でも春や秋とほぼ同じ長さになります。その結果、ミツバチのコロニーの越冬期間が4~5ヶ月であることから判断すると、コロニーの寿命が20~30日程度であれば、ミツバチのコロニーはうまく越冬できないことが明らかです。本研究により、ミツバチのコロニーの越冬失敗を防ぐためには、9月上旬からミツバチのコロニーへのダニやネオニコチノイド系農薬への曝露を防ぐ必要があることが明らかになりました。

REFERENCES AND NOTES

1. Y. Yamada, T. Yamada, K. Yamada, *Sci. Rep.* 9, 4102 (2019).
2. H. Fukuda, K. Sekiguchi, *Jpn. J. Ecol.* 16, 206–212 (1966).
3. P. Schmid-Hempel, T. Wolf, *J. Anim. Ecol.* 57, 509–521 (1988).
4. T. J. Wolf, P. Schmid-Hempel, *J. Anim. Ecol.* 58, 943–954 (1989).
5. G. V. Amdam, O. Rueppell, M. K. Fondrk, R. E. Page, C. M. Nelson, *Exp. gerontol.* 44, 467–471 (2009).
6. T. Yamada, K. Yamada, *PeerJ* 8, e9505 (2020).
7. H. Tarek, M. M. Hamiduzzaman, N. Morfin, E. Guzman–Novoa, *Genet. Mol. Res.* 17, gmr16039908 (2018).
8. N. L. Anderson, A. N. Harmon-Threatt, *Sci. Rep.* 9, 3724 (2019).
9. D. M. Aljedani, *J. Am. Sci.* 13, 19–31 (2017).
10. A. Brandt *et al.*, *Sci. Rep.* 7, 4673 (2017).
11. M. C. Tackenberg *et al.*, *Sci. Rep.* 10, 17929 (2020).
12. J. Shi, C. Liao, Z. Wang, Z. Zeng, X. Wu, *Apidologie* 50, 553–563 (2019).
13. N. Forfert *et al.*, *PLoS ONE* 12, e0186109 (2017).
14. Y.-C. Peng, E.-C. Yang, *Sci. Rep.* 6, 19298 (2016).
15. B. Dainat, J. D. Evans, Y. P. Chen, L. Gauthier, P. Neumann, *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 981–987 (2012).
16. S. J. Martin, B. V. Ball, N. L. Carreck, *J. Apic. Res.* 52, 251–258 (2013).
17. K. Khongphinitbunjong, P. Neumann, P. Chantawannakul, G. R. Williams, *J. Invertebr. Pathol.* 137, 38–42 (2016).
18. M. Reyes-Quintana *et al.*, *J. Invertebr. Pathol.* 164, 43–48 (2019).
19. L. Straub *et al.*, Neonicotinoids and ectoparasitic mites synergistically impact honeybees. *Sci. Rep.* 9, 8159 (2019).
20. C. Alaux *et al.*, Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* 12, 774e782 (2010).

21. C. Vidau *et al.*, *PLoS ONE* 6, e21550 (2011).
22. J. Aufauvre *et al.*, *Sci. Rep.* 2, 326 (2012).
23. J. Aufauvre *et al.*, *PLoS ONE* 9, e91686 (2014).
24. A. Gregorc *et al.*, *Chemosphere* 147, 328–336 (2016).
25. T. Yamada, K. Yamada, Y. Yamada, *J. Biol. Ser.* 1, 84–107 (2018).
26. T. Yamada, Y. Yamada, K. Yamada, *J. Biol. Ser.* 1, 108–137 (2018).
27. T. Yamada, Y. Yamada, K. Yamada, *J. Biol. Ser.* 1, 187–207 (2018).
28. T. Yamada, *Enliven: J. Diet. Res. Nutr.* 7, 002 (2020).
29. S. W. Omholt, *J. Theor. Biol.* 130, 275–284 (1988).
30. A. S. Alqami, *J Biol Sci.* 6, 734–737 (2006).
31. H. Wang, S.-W. Zhang, Z.-J. Zeng, W.-Y. Yan, *Apidologie.* 45: 618–625 (2014).
32. W. Yang, Y. Tian, M. Han, X. Miao, *PeerJ* 5, e3118 (2017).
33. T. Yamada, K. Yamada, N. Wada, *Jpn. J. Clin. Ecol.* 21,10–23 (2012).
34. D. Sammataro, U. Gerson, G. Needham, *Annu. Rev. Entomol.* 45, 519–548 (2000).
35. E.-C. Yang, H.-C. Chang, W.-Y. Wu, Y.-W. Chen, *PLoS ONE* 7, e49472 (2012).
36. C. Solanki, P. Thapliyal, K. Tomar, *IJCATR.* 3, 533–535 (2014).
37. I. Nagata, T. Yamada, *J. Chem. Eng. Jpn.* 6, 215–219 (1973).
38. D. Flanagan, Y. Matsumoto, *The Ruby Programming Language* (Japanese version translated by Takahiro Nagao under a supervisor of Shohei Urabe), issued the 8th printing of the first edition; O'Reilly Japan Publisher (Selling agency: Ohmsha, Tokyo), Tokyo, July 5, 2016.
39. J.P. Strange, W.S. Sheppard, *J. Econ. Entomol.* 94: 1324–1331 (2001).
40. P.A. Macedo, J. Wu, M.D. Ellis, *J. Apicult. Res.* 41, 3–7 (2002).
41. V.M. Barlow, R.D. Fell, *VCE.* 444–103 (2006).

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to greatly appreciate the hearty cooperation of Mr. Yuhki Nagai (Nanosystem Co., Ltd., Kyoto, Japan) for developing and improving automatic counting software to improve the counting speed and accuracy of the numbers of adult bees, capped brood and damaged mites. We would like to thank for the cooperation of Mr. Kazuo Harada (Platon Co., Ltd., Kakogawa, Japan) when improving the input and output of software with apparent longevity. We would also like to express their deep gratitude to the following people for their devoted cooperation in conducting the field experiments and counting the numbers of adult bees and capped brood whose measurements proved to be highly accurate through the estimation of apparent longevity with a mathematical model; Ms. Kazuko Yamada; Ms. Hiroko Nakamura; the members of YUINOTE (Mr. Tetsuya Kojima, Ms. Yuki Kojima, Dr. Hiroshi Mibayashi, Ms. Kimiko Mimura-Ruth, and Mr. Kenji Mimura) which is a natural farming group in Noto, Japan. We appreciate also Ms. Kazuko Yamada's cooperation in algorithmic design for longevity estimation. Dr. Ken Hashimoto (Okayama, Japan) gave us his warm and appreciate advice, guidance and encouragement when we had some troubles on this research. Thank you deeply. Finally, we would like to thank everyone who gave us this opportunity and/or assisted us for our research.

Funding: This research was funded by a Yamada Research Grant (grant number 253) of Yamada Bee Company, Inc. at <https://www.bee-lab.jp/grant/grant/qa.html>.

Author contributions: Y.Y. and T.Y. conceived and designed the study. Y.Y. proposed and made the mathematical model. Y.Y. made programming to estimate the apparent longevity and performed the calculation. T.Y. and Y.Y. analyzed the data. T.Y. designed and conducted field experiments. T.Y. wrote the manuscript draft. Y.Y. and T.Y. contributed to the final manuscript.

Competing interests: The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results. Incidentally, the authors have absolutely nothing to do with Yamada Bee Company, Inc. though "Yamada" is same name.

Data and materials availability: Data are available in the supplementary materials.

Supplementary Material

Materials and Methods

Figs. S1 to S10

Table S1 to S7

References (35–41)

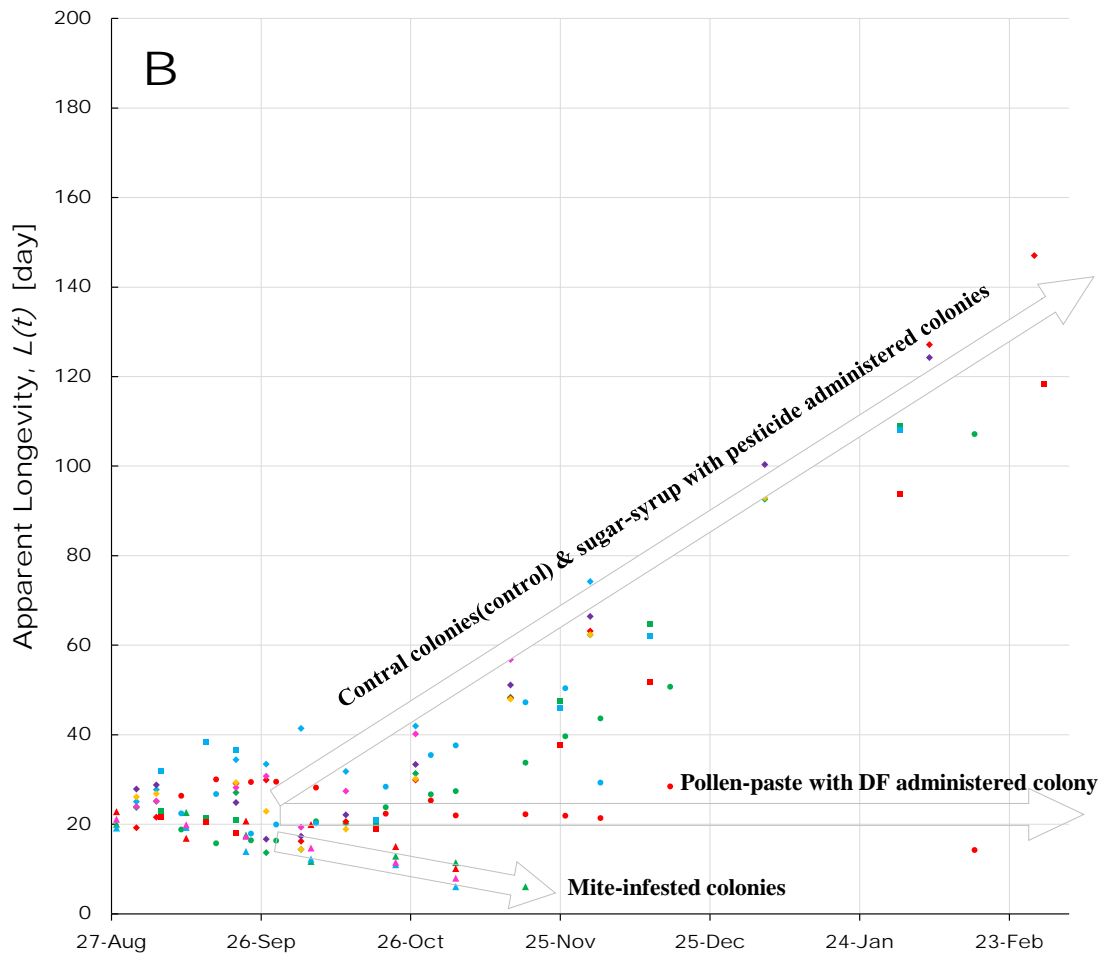
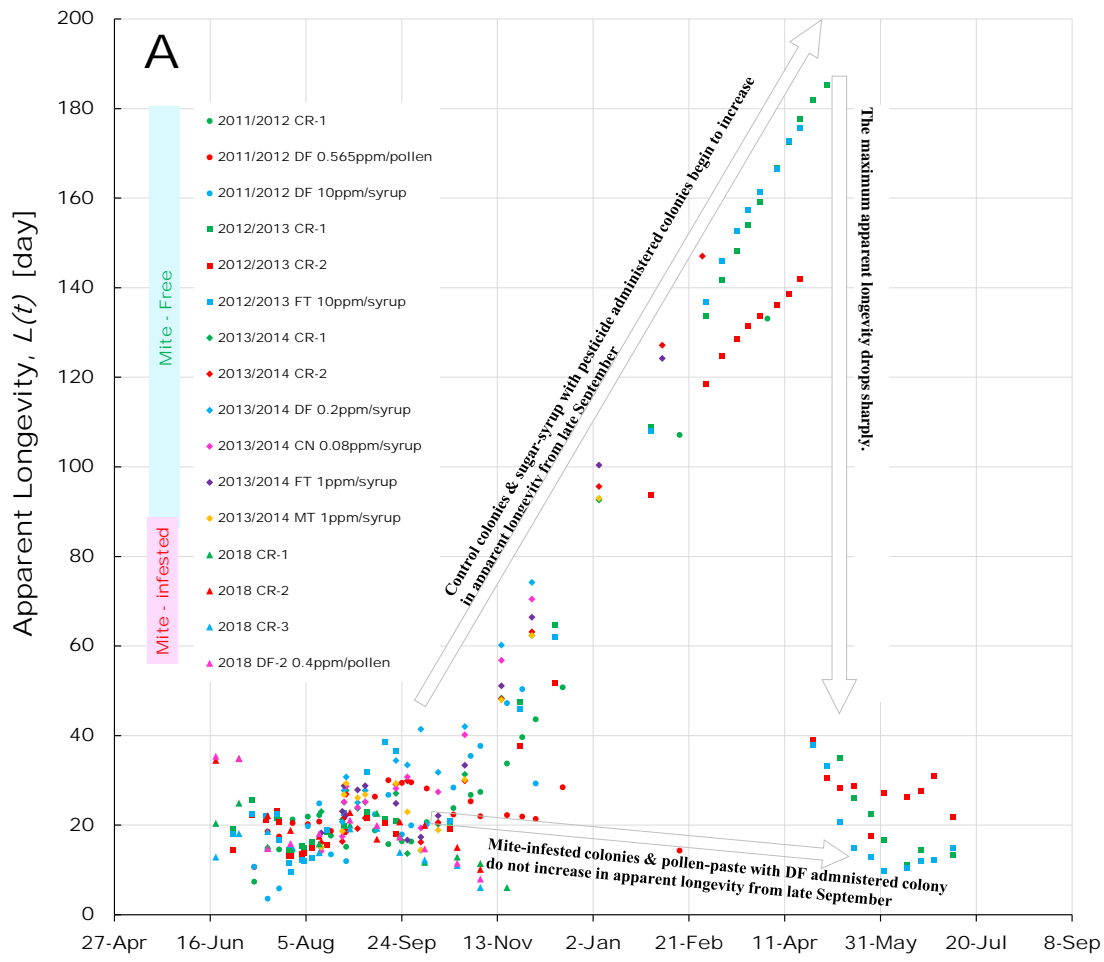


Fig. 1. Seasonal change in apparent longevities of honeybee colonies in four long-term field experiments.

(A): General view. (B): Date-axis enlarged view. Apparent longevities were estimated by using the numbers of adult bees and capped brood obtained from four long-term field experiments conducted in : 2011 to 2012 (25) for the colonies of "2011/2012 CR-1", "2011/2012 DF 0.565ppm/pollen" and "2011/2012 DF 10ppm/syrup"; 2012 to 2013 (26) for the colonies of "2012/2013 CR-1", "2012/2013 CR-2" and "2012/2013 FT 10ppm/syrup"; 2013 to 2014 (27) for the colonies of "2013/2014 CR-1", "2013/2014 CR-2", "2013/2014 DF 0.2ppm/syrup", "2013/2014 CN 0.08ppm/syrup", "2013/2014 FT 1ppm/syrup" and "2013/2014 MT 1ppm/syrup"; 2018 (28) for the colonies of "2018 CR-1", "2018 CR-2", "2018 CR-3" and "2018 DF-2 0.2ppm/pollen". The colonies which had become extinct before wintering (before late November) are eliminated in this study. Where CR, DF, CN, FT and MT denote control (pesticide-free), dinotefuran, clothianidin, fenitrothion and malathion, respectively. "201x/201y" denotes the experimental period from 201x to 201y, "X Yppm" denotes the concentration "Y ppm" of the pesticide "X". "syrup" and "pollen" denote sugar syrup and pollen paste of vehicles through which the pesticide is administered into the honeybee colony, respectively. See Supplementary Tables S3 to S6.

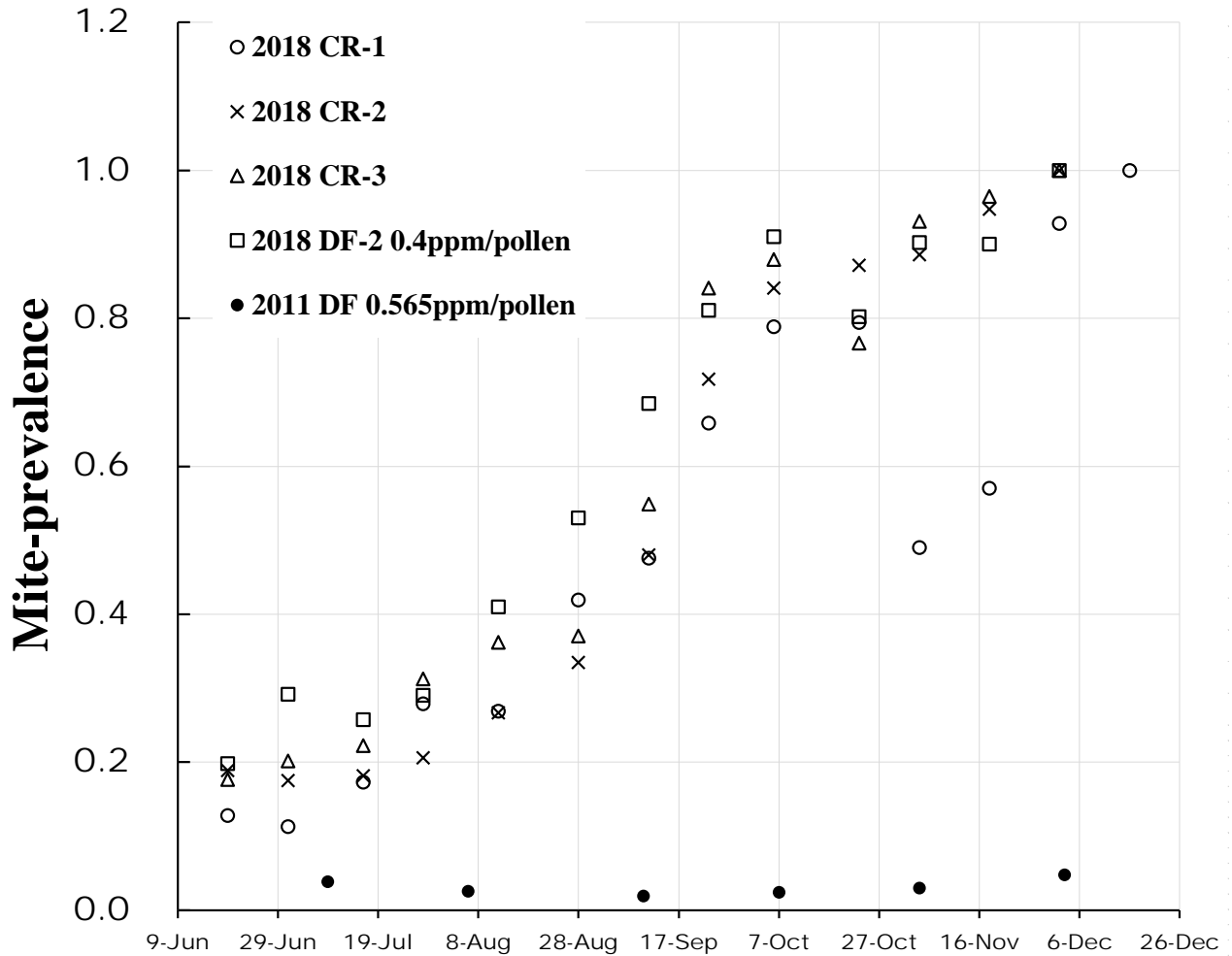


Fig. 2. Comparison of mite-prevalence between the mite-infested colonies and the mite-free & toxic PP colony.

2018 CR-1, 2018 CR-2 & 2018 CR-3: Pesticide-free control colonies in 2018-Experiment (CR-1, CR-2, CR-3); 2018 DF-1, 2018 DF-2 & 2018 DF-3: Experimental colonies where dinotefuran is administered via pollen paste in 2018-Experiment (DF-1, DF-2, DF-3). 2011/2012 DF: Experimental colonies where dinotefuran is administered via pollen paste in 2011/2012-Experiment.

Mite-prevalence denotes the ratio of bees damaged by mites to total bees in each measurement interval. All colonies in this figure could not begin to increase in apparent longevity around late September. Mite prevalence of all colonies (2018 CR-1, 2018 CR-2, 2018 CR-3, 2018 DF-1, 2018 DF-2, 2018 DF-3) in 2018-Experiment, where dinotefuran (neonicotinoid) were administered via pollen paste, are about 50% in mid-September, about 80% in mid-October, and finally more than 90% (called mite-infested colony). On the other hand, the mite-prevalence of experimental colony in 2012-Experiment (2011/2012 DF) where dinotefuran was administered via pollen paste is almost 2~3%, and at most less than 5%. See Supplementary Table S7.

Supplementary Materials for

Neonics and mites can interfere with extending the bee-colony longevity during wintering

Toshiro Yamada* and Yasuhiro Yamada*

*Corresponding author.

Email: yamatoshikazu0501@yahoo.co.jp (T.Y.); yyasuhilo@gmail.com (Y.Y.)

This PDF file includes

Materials and Methods

Figs. S1 to S10

Tables S1 to S7

References

Supplementary Materials for

Neonics and mites can interfere with extending the bee-colony longevity during wintering

Toshiro Yamada* and Yasuhiro Yamada*

*Corresponding author. Email:

yamatoshikazu0501@yahoo.co.jp (T.Y.); yyasuhilo@gmail.com (Y.Y.)

Both authors contributed equally to this work.

1	Materials and Methods	2
1.1	Determination method of apparent longevity	2
1.1.1	Mathematical model	
1.1.2	Determination procedure	
1.2	Field experiments	6
1.2.1	Precautions for obtaining accurate measurements	
1.2.2	Materials used in the field experiments and their preparation	
1.2.3	Preparation	
1.2.4	Procedure	
1.3	Counting methods of adult bees, capped brood, mite-damaged bees	9
1.3.1.	Software developed to assist in accurately counting the numbers of adult bees, capped brood, and mite-damaged Bees	
1.3.2	Determination procedure of the numbers of adult bees and capped brood	
1.3.3	Counting procedure of the number of mite-damaged bees	
1.3.4	Criteria for determining whether or not it is a mite-damaged bee	
2	Supplementary Figures (Figs.S1 to S10)	15
3	Supplementary Tables (Tables S1 to S7)	36
4	References and Notes	51

1 Materials and Methods

1.1 Determination method of apparent longevity

1.1.1 Mathematical model

著者らは、長期の野外実験で得られたミツバチの成虫数と蜂児の頭数を用いて、とびとびの各測定(観察実験)期間における蜂群の見かけの寿命を推定するための数理モデルを提案しました(1)。ミツバチのグループにはさまざまな日齢グループがあり、理論では、蜂群の中で生存している最古参の日齢を求めています。以下は、数学モデルの概要です。

蜂群の見かけの寿命を推定することができれば、野外実験からより包括的な情報を得ることができます。著者らは、成虫のミツバチと封蓋蜂児(蓋をした巣房に入った幼虫; 蛹)の数から見かけの寿命を推定できる数学的モデルを提案しました。ここでは、式(S1)で定義される「見かけの寿命」 $L(t)$ と呼ばれる動的パラメータが導入され、平均的なミツバチの働き蜂が蜂群から姿を消す「境界」の日齢の特徴が描かれています。

$$a(t) = \int_{T_{pupa}}^{T_{pupa} + L(t)} u(t - s)p(t - s)ds \quad (S1),$$

ここで、 $a(t)$ と $u(t)$ は、それぞれ成虫のミツバチの数と、単位時間 t あたりに新たに封蓋された蜂児の数です。 $p(t)$ は、時間 t における封蓋された蜂児(巣房に密封された蛹)からの脱出(羽化)速度である。蛹は蜂児の封蓋の平均期間であり、ミツバチ *Apis mellifera* の期間は 12 日です。蜂群が定常状態にある場合、働きバチは同じ年齢で死にます。 $L(t)$ は成虫の寿命を表します。死にゆくミツバチの年齢分布は、狭いガウス分布で与えられます。したがって、式(S1)は、正常なミツバチ群における働きバチの寿命の推定値を提供し得ることは注目に値する。

式(S1)の見かけの寿命 $L(t)$ を求めるためには、 $a(t)$ 、 $u(t)$ 、 $p(t)$ を知る必要があります。 $a(t)$ と $u(t)$ の値は、野外実験での測定値から得られます。 $u(t)$ を直接測定することは難しいため、野外実験で測定した $b(t)$ 値を用いて式(S2)から推定します。

$$b(t) = \int_0^{T_{pupa}} u(t - s)[p(t - s)]^{s/T_{pupa}} ds \quad (S2),$$

ここで、 $b(t)$ は、時間 t における封蓋の数である。式(S2)は、蛹が巣房で死ぬとすぐに取り除かれると仮定しています。

式(S1)と式(S2)を組み合わせることで、実験で得やすいミツバチの巨視的量(成虫のミツバチ数と封蓋蜂児の数)を用いて蜂群を特徴づけることができます。式(S1)の $a(t)$ と式(S2)の $b(t)$ は式上は連続(連続関数)ですが、野外実験では連続的に測定することは実際には不可能です。測定日は離散的であるため、式(S1)と式(S2)は、以下の仮定のもとで分離した。

1) 測定日における封蓋蜂児の日齢分布は、巣房に蓋をしている期間(12日間)の間は離散的に均一であり、連続する2つの測定日の間(各測定間隔)は一定であると仮定します。これらの仮定は、1日あたりの新しく封蓋された蜂児の数 $u(t)$ が、2つの連続した測定日間で一定であることと同等です。

- 2) 羽化率は、連続する 2 つの測定日で一定であると仮定します。
- 3) 連続する 2 日間の幼虫 1 匹当たりの農薬摂取量は、ミツバチ 1 匹当たりの農薬摂取量と同じであると仮定します。私たちの実験では、2 日間連続して幼虫 1 匹当たりの農薬摂取量を直接測定することはできません。したがって、測定可能な成虫ミツバチ 1 匹あたりの農薬摂取量は、幼虫の摂取量に置き換えられます。

式(1)と(2)において、 $a(t)$ と $b(t)$ は野外実験で測定された既知の値ですが、 $L(t)$ 、 $u(t)$ 、 $p(t)$ は不明です。2 つの連立方程式では、これらの連立方程式を解く前に、これら 3 個の未知の変数のうちの 1 つがわかっている必要があります。幸いなことに、様々なイミダクロプリド投与量での羽化率 $p(t)$ はすでに報告されている(35)。図 S1 は、イミダクロプリドの投与量と羽化率 (平均値、最小値、最大値) の関係を半対数グラフで示したものである。見かけの寿命を算出するのに必要な羽化率は、図 S1 の平均羽化率曲線を用いて求めることができる。

この実験で用いた農薬はイミダクロプリドではなくジノテフランであるため、図 S1 を用いるためにはジノテフラン濃度をイミダクロプリドの投与量に換算する必要がある。したがって、あるジノテフラン濃度の殺虫能に相当するイミダクロプリド投与量は、以下のように推定される。

著者ら(33)が実施した野外実験では、ミツバチに対するクロチアニジンの殺虫能力は、ジノテフランの約 2.5 倍である(これは、カメムシの駆除に推奨されるジノテフランの殺虫濃度とクロチアニジンの殺虫濃度の比と同じである)。

カメムシの駆除に推奨されるイミダクロプリドの農薬濃度はクロチアニジンとほぼ同じであることから、イミダクロプリドのミツバチ駆除能力はジノテフランの約 2.5 倍と推測できます。2 つの連続した測定日におけるミツバチ 1 匹当たりの農薬摂取量は、著者らが提案した方法を用いて、測定日間の総農薬摂取量と成虫ミツバチの総数から推定することができます(25)。

これまでの野外実験における農薬投与量の範囲(表 S1 参照)では、図 S2 に示すように、農薬投与量の羽化率 $p(t)$ への影響は小さく、 $p(t) = f(\text{農薬投与量})$ で表される 2 日間の連続した測定日数で蜂 1 匹当たりの農薬投与量によって羽化率が変化した場合の見かけの寿命の計算値と、羽化率が対照群の 0.9 の場合の見かけの寿命の計算値にほとんど差がない。

1.1.2 Determination procedure

上記のように提案された数理モデルを用いて見かけの寿命を算出する手順を以下に説明します。各測定(観察実験)における蜂群の見かけの寿命を求めるために、方程式の未知の変数は、見かけの寿命 $L(t)$ と、巣房に新たにキャップされた蜂児の数 $u(t)$ です。これら 2 つの変数のうち、 $u(t)$ は式(S2)から求めることができます。したがって、式(S2)から求められる $u(t)$ の値を式(S1)に代入し、式(S1)の未知変数 $L(t)$ は二分法(36)、シンプレックス法(37)などの反復法で決定する。値 $L(t)$ を変化させながら、式(S1)に一定の値 $L(t)$ を繰り返し代入します。そして、反復法で求めた成虫蜂数 $a(t)$ の計算値と野外実験による成虫蜂数の実測値との差が所定の収束基準値(本論文では 0.0001)以下になるまで、式(S1)と式(S2)の離散化方程式の

計算を繰り返します。

なお、見かけの寿命 $L(t)$ を求める上記の計算では、実測データは各測定日分のみ得ることができる。したがって、見かけの寿命 $L(t)$ は、ミツバチの産卵から羽化までのライフサイクル(卵期 3 日、幼虫期 6 日、蛹(封蓋蜂児)期 12 日)を考慮しながら、諸式の離散化を求めることができる。

本研究では、見かけの寿命 $L(t)$ を二分法で求めています(本研究では $L(t)$ の収束半径は 0.0001)。計算は Ruby プログラミング言語(38)を使用して実行されました。フローチャートを図 S3 及び図 S4 に示す。図 S3 は見かけの寿命 $L(t)$ を求めるための全体フロー図であり、図 S4 は式(S1)の見かけの寿命 $L(t)$ を二等分法で求める手順を示す。これらのフローチャートについては、以下でもう少し詳しく説明します。

ここでは、見かけの寿命を求めるための計算の全体フローを説明します(図 S3)。蜂群の羽化率 p_k は、幼虫 1 匹当たりのイミダクロプリドの投与量と羽化率の関係を用いて計算される(図 S1)(35)。

これまでの実験では、イミダクロプリド以外の農薬を用いていましたが、実験データから推定できるのは、成虫のミツバチによる農薬の摂取量です。幼虫は餌(糖液、花粉ペースト)を直接摂取することができず、成虫(看護蜂)は幼虫に餌を与える必要があるため、1 匹の幼虫の農薬の摂取量は成虫のミツバチと同じであると想定されます。また、成虫ミツバチにおけるミツバチ 1 匹当たりの農薬摂取量は、役割(授乳、形成)によらず同じであると仮定した。すなわち、「幼虫 1 匹当たりのイミダクロプリドの投与量」は、「ミツバチ 1 匹当たりのイミダクロプリド摂取量」に相当する。

ちなみに、イミダクロプリドや他の農薬(ジノテフラン、クロチアニジン、フェニトロチオン、マラチオン)は、ミツバチに対して異なる殺虫能力を持っています。各農薬の殺虫能力を考慮し、各農薬摂取量をイミダクロプリド摂取量に変換し、各農薬が日本で一般的な害虫であるカメムシを駆除する殺虫活性を持つことができるようにしています(6, 26, 27)。

蜂群では、連続する 2 つの測定日の間の各間隔で摂取された農薬の総量と、各間隔での農薬摂取に関与した成虫ミツバチの総数(各間隔で新たに生まれる成虫のミツバチの数と、各間隔で最初から存在する成虫のミツバチの数の合計)は、各間隔で異なります。したがって、間隔ごとにミツバチあたりの農薬の摂取量を決定する必要があります(詳細は以下を参照)。各間隔におけるミツバチ 1 匹当たりの農薬の摂取量がわかれば、各間隔における羽化率 p_k は図 1 から推定することができる。

蜂群において、 $(k-1)$ 回目の測定日から k 番目の測定日までの間に羽化した成虫のミツバチの総数(B_k)と、 $(k-1)$ 回目の測定日に既に存在する成虫のミツバチ(a_{k-1})の総数の合計($N_k=B_k+a_{k-1}$)で、この 2 つの連続する測定日の間に蜂群が摂取した農薬摂取量の総量(TI_k)を除いて、ミツバチ 1 匹あたりの農薬の平均摂取量($I_k=TI_k/N_k$)を決定できます。各測定間隔において、ミツバチ 1 匹当たりの農薬摂取量を、上記の仮定のもと、幼虫 1 匹当たりのイミダクロプリド摂取量に換算し、図 S1 より羽化率 p_k を推定する。農薬摂取量に依存するとして推定された羽化率 p_k を用いて計算した見かけの寿命 $L(t)$ は、野外実験における農薬摂取量に対して、対照コロニーの農薬摂取量に依存しない羽化率 0.9(図 S2)で計算した見かけの寿命とほとんど変わらない。したがって、この論文では、0.9 の羽化率を使用して、見かけの寿命を計算します。

次に、ミツバチのライフサイクル(産卵期 3 日、幼虫期 6 日、蛹(封蓋蜂児)期 12 日)を考慮し、 k 回目の測定日における式 S2 を離散化した連立方程式を解き、新たな封蓋蜂児数 u_k を決定します(STEP1)。

上記のようにして決定された新たにキャップされた蜂児 (封蓋蜂児) の u_k は、式(S1)に代入されます。そして、二分法を用いて、 k 回目の測定日の見かけの寿命 L_k を変化させながら、測定した成虫ミツバチの個体数と計算した個体数の差および旧値と新値の差が共に 0.0001 未満になるまで計算が繰り返されます。これらの収束基準が満たされると、 L_k は決定された値です。上記の計算を繰り返し、すべての実験回数($k=1,2,3, \dots, N$)に対して完了した後 (STEP2)、計算結果を出力します。

二分法で見かけの寿命 L_k を求める場合、まず L_k を大まかなステップサイズ(本研究では 0.5)で増やし、 $Y ((a_k)_{\text{測定値}} - (a_k)_{\text{計算値}})$ の符号が逆転する 2 点(L_k 値)を求めます(図 S4)。符号反転前後の 2 つの L_k 値を挟み込み、さらにステップサイズを小さくし、二等分法で Y がゼロに近づき、 $(L_{k, \text{new}} - L_{k, \text{old}})$ の絶対値が 0.0001 未満になるまで計算を繰り返す。上記の基準が満たされた場合、 L_k の値は決定された見かけの寿命と見なされます。

1.2 Field experiments

1.2.1 Precautions for obtaining accurate measurements

数理モデルを用いて見かけの寿命を得るために非常に重要であり、実験で測定できる成虫ミツバチの数と封蓋蜂児の数は、ミツバチのライフサイクルを通じて互いに深く関わっています。どちらかの数値の測定精度が低いと、これら 2 つの測定値の間に矛盾が生じます。たとえば、成虫のミツバチの一部が採餌に出かけた場合、成虫のミツバチの数は、蜂群に存在する実際の数を過小評価します。この場合、両者の間には不合理な数の差があるため、数理モデルで連立方程式を解くときに見かけの寿命を正確に得られなかったり、連立方程式が解けないために決定すらできなかったりすることがあります。そのため、以下の点に注意しながら実験を行い、正確な数を計測しています。実験は夜明け直後に開始し、巣箱から出る成虫の数を最小限にとどめます。ミツバチの入った巣碑枠は、ミツバチが飛び去らないように、写真を撮るときはできるだけ静かに巣箱から引き出し、フォトスタンドにそっとセットします。実験は、ミツバチが落ち着かなくなるのを防ぐため、天気予報から判断して風や雨の日を避けながら行われます。詳細は、前の論文(28)を参照してください。

1.2.2 Materials used in the field experiments and their preparation

ジノテフラン(ネオニコチノイド系農薬)(DF):スタークルメイト®(10%DF;Mitsui Chemicals Aglo, Inc., Tokyo, Japan)を用いた。クロチアニジン(ネオニコチノイド系農薬)(CN):ダントツ®(16%クロチアニジン;住友商事株式会社(株)(東京、日本)を用いた。フェニトロチオン(有機リン系農薬)(FT):スミチオンエマルジョン(50%フェニトロチオン®;住友商事株式会社(株)を用いた。マラチオン(有機リン系農薬)(MT):マラトン®エマルジョン(50%マラチオン;住友商事株式会社、日本)を用いた。

糖液(SS):グラニュー糖は、日本養蜂協会(<http://www.beekeeping.or.jp/>)から購入し、精製糖(グラニュー糖)99.7988%、塩化ナトリウム(食塩)0.1%以上、L-リジン塩酸塩 0.1%以上、食用色

素(青色 2 号)0.0012%以上で構成されている。50L のプラスチックタンクにグラニュー糖 20kg と約 75°C の熱水 13.33kg を混合し、60%SS のグラニュー糖液を製造した。

花粉ペースト(PP):合計 25kg のスペイン産花粉を神戸の Tawara Apiaries Co., Ltd.から購入しました(<https://tawara88.com/about.html>)。花粉は、名古屋の弘光社(株)製の製粉装置「コナエース A-7」(<http://www.kokkousha.co.jp/>)で軽く粉碎した後に用いた。PP の粘度は、PP 中の SS の比率、花粉の粒径、および PP の温度によって決定されました。PP を充填したトレイをひっくり返しても落ちないように、花粉と SS の比率を予め調整しました。

その結果、花粉重量比 60%、SS 重量 40%が適切な比率であることが確認された。無農薬 PP 及び所望濃度の農薬含有 PP をそれぞれ 10kg で調製した。PP(花粉 6kg、SS4kg)を大型のプラスチックバケツに入れて、高粘度用の攪拌羽根付きドリルドライバーで低速で均一なペースト状になるまで練り上げて調製した。

所望の濃度の農薬を含む SS:所望の濃度の農薬と砂糖を含む 60%SS 溶液を使用して製造した。調製した SS 含有農薬を 10L の容器に入れ、黒色の袋で遮光し、冷蔵庫で保存した。

PP を充填したトレイの準備とメンテナンス: 300g の PP を上皿天秤 (精度±1g)で計量した後、発泡スチロールトレイに詰めました。そして、花粉ペーストを充填した PP トレーを、トレイからの水分の蒸発を防ぐために包み、PP の変質を防ぐために冷蔵庫で保管しました。無農薬の PP トレーは冷蔵室に、農薬の入った PP トレーは冷凍室に保管した。

1.2.3 Preparation

日本中西部のリゾート地(石川県羽咋郡志賀町)で 4 回の実証実験を実施。3 つの野外実験(25-27)は同じ場所で行われ、残りの 1 つの野外実験(28)は近くの別の場所で行われました。これら 4 つの野外実験の環境、方法、および公開の概要をまとめた(表 S2)。高さ約 20cm の台の上に、各巣箱の入り口が南向きに 80cm 間隔で配置され、巣箱とスタンドの間に水が溜まらないように直径 3mm のミシン目孔が多数ある大きな塩ビトレイを置き、死んだミツバチの数を測定しました。

写真画像の観察結果を解析することを念頭に置きながら、野外実験のミスやミスを防止するために、様々な対策を講じました。例えば、巣箱内の蜂群の実験内容を推測できるようにするために、各巣箱の前面の上部に大きな表示タグを取り付けました。巣箱の底や 4 つの壁にラベルが貼られ、巣箱のどの部分であるかが示されていました。また、巣碑枠の橋脚には、各巣碑枠の巣箱内の位置や巣碑枠の表裏が判るように表示されたラベルが数枚取り付けられました。また、投与する巣箱が見つけれられるように、糖液(SS)容器と花粉ペースト(PP)トレイに投与する巣箱の名称をあらかじめ書き込みました。

1.2.4 Procedure

蜂群の野外実験で最も重要なデータは、成虫のミツバチの数と封蓋蜂児の数の両方です。これらのデータをできるだけ正確に取得するために、以下の手順で野外実験を行いました。

STEP-1) 蜂に刺されないように、しっかりと保護対策を講じて服を着て実験を行う。

STEP-2) 実験器具は、記録紙、SS、PP 付きトレイ、カメラ、空の巣箱等を準備する。

STEP-3) 実験前に実験場所(巣箱全体)を撮影します(異常が発生していないか確認する)。

STEP-4) 巣箱の下に置かれた大きなトレーに、ピンセットで拾い上げながら死んだミツバチの数を数える（巣箱外の死蜂数）。数え終わったものはトレーから捨てます。なお、巣箱内の死蜂数は、巣箱の内部検査中にカウントされます。巣箱の内外の死蜂数を合計して、その測定日の死蜂数として記録する。

STEP-5) 巣箱内部の検査前に巣箱の正面を撮影します(撮影の実験対象が間違っていないか記録します)。

STEP-6) 巣箱を開け、巣箱の巣碑枠の上部を覆っていた布を取り除き、巣箱の上部の丸ごと写真を撮ります。さらに、巣箱の布に付着したミツバチをそっと戻します。

STEP-7) 巣箱に入れておいた PP の入ったトレーと SS の入った容器(トレー、給餌枠)を巣箱から取り出し、上皿天秤で PP と SS の残量を計測します。なお、巣箱から容器を取り出すときは、容器に付着したミツバチを巣箱にそっと戻します。

STEP-8) ミツバチの付いた巣碑枠を番号順に(巣箱の正面に向かって左から右に)そっと取り出し、各巣碑枠の両面を撮影します。写真を撮るとき、女王蜂を見つけたら、女王蜂の写真を撮った後、女王蜂をケージに入れて一旦隔離します。巣碑枠の撮影が終わったら、あらかじめ用意しておいた予備の巣箱に巣碑枠を入れ、巣箱の蓋を閉めます。女王ケージの女王蜂は、予備の巣箱の巣碑枠の上部に置きます。

STEP-9) ミツバチが付いている巣碑枠の両面を撮影した後、巣箱の 4 面と底面を撮影し、巣箱に残っている成虫の蜂（成蜂）の数を把握する。巣碑枠の撮影時に女王蜂が見つからない場合は、女王蜂の有無をよく確認し、いる場合は写真を撮ります。成蜂が巣箱の外側と巣箱の内側にいる場合(熱帯夜では巣箱の入り口付近にいることもあります)、写真を撮って数を数えます。

STEP-10) どうしても女王蜂が見つからない場合は、次の作業である封蓋蜂児の写真を撮る前に、すべての巣碑枠上の女王蜂を注意深く捜してください。

STEP-11) 予備の巣箱に入れていたミツバチの付いた巣碑枠を番号順に取り出し、巣箱の巣碑枠からミツバチをそっと振り落とし、巣碑枠に付着していたすべてのミツバチを元の巣箱に戻します。ミツバチのいない巣碑枠の両面の写真を撮った後、ミツバチのいない巣碑枠を元の巣箱に戻します。すべての巣碑枠について、上記のプロセスを繰り返します。ところで、予備の巣箱の巣碑枠上に置かれている女王蜂の入ったケージを、数枚の巣碑枠が元の巣箱に戻された時、一旦、元の巣箱の巣碑枠上に置く。全ての巣碑枠の写真を撮り終えた後、ケージ入り女王蜂を元の巣箱に戻す。女王蜂をケージから出させ、元の巣箱内に戻す。

STEP-12) 蜂のいない巣碑枠を撮影すると、王台、バロアダニ、スムシなどの異常を発見することがあります。この場合、それらの写真を撮り続けてください。これらの異常は、この状況に限ったことではなく、発見された場合は、証拠として写真に記録します。

STEP-13) どうしても女王蜂が見つからなかった場合は、次の実験で確認する。次回見つからなかった場合は、女王蜂の有無や産卵状況などを詳細に観察することで、女王蜂の有無を判定する。

STEP-14) コームフレームの上部に布を被せた後、対応する巣箱に新しい SS と PP を入れ、巣箱を蓋して測定を終了します。

STEP-15) 実験終了後、試験内容を確認し、研究ノートに記載する。

1.3 Counting methods of adult bees, capped brood, mite-damaged bees

上記のようにして撮影した写真を用いて、成虫のミツバチの数、封蓋蜂児の数、ダニ被害を受けたミツバチの数を決定することができました。これらの数字を写真から数えるのは、非常に難しい作業です。そこで筆者は、画像処理ソフトウェアを開発する株式会社ナノシステム(<http://nanosystem.jp/firm.htm>)の永井芳樹氏の協力を得て、2012年に写真画像から該当数を自動カウントするコンピュータソフトウェアを開発し、その後、ソフトウェアの改良を重ねてきました。カウントの精度と操作が大幅に改善されました。このソフトウェアを使用したカウント時間とカウント精度は、元の写真から直接手でカウントするために必要な作業量と比較して大幅に向上します。

ただし、これらのカウントは、ミツバチの重なり、焦点の合っていない画像、画像の極端なコントラストの違い、カウントターゲットの誤判断などにより、依然として不正確です。このソフトでは、自動計数後に手動で修正することも可能です。そのため、自動カウント後、自動化によるカウントミス、画像を拡大しながら手動操作で修正し、修正した数値が最終データとしました。このように、このソフトウェアを使用すると、自動化でエラーが発生しますが、手動操作を使用することで、カウントエラーを修正することができます。このソフトウェアによる計数精度と速度の向上は、フィールド実験におけるデータ解析精度と速度の向上に大きく貢献しました。この自動計数システムの概要を以下に示します。

1.3.1. Software developed to assist in accurately counting the numbers of adult bees, capped brood, and mite-damaged bees

このソフトウェアは、成虫のミツバチと封蓋蜂児の数を正確に数えるために開発されました。以下では、巣碑枠の画像に写っている成虫の蜂の数を数える方法と、読み取った画像を使って封蓋蜂児の数を数える方法を説明します。これらの数値は、コンピューターにインポートされた写真の画像を使用してソフトウェアでカウントされます。コロニー内の成蜂の数は、すべての巣碑枠の両面の成蜂の数と、巣碑枠のない巣箱に残っている成蜂の数を合計することによって得られます。コロニー内の封蓋蜂児の数は、ミツバチがいないすべての巣碑枠の両面の封蓋蜂児の数を合計することによって取得できます。バロアダニによって被害を受けた成虫のミツバチの数は、成虫のミツバチを数えるのに使用したのと同じ写真から得ることができます。バロアダニによって被害を受けたミツバチを数える方法は、別のセクションで説明されています。この方法で得られた測定結果は、画像が残る限り、いつでも誰でも検証することができます。ここでは、成虫のミツバチと封蓋蜂児の数と、ダニ被害を受けたミツバチの数の決定手順とを別々に説明する。以下に、分けて記載します。

1.3.2 Determination procedure of the numbers of adult bees and capped brood

STEP-1) 巣碑の画像を2値化し、巣碑画像上の成虫の蜂と蜂のいない場所、封蓋蜂児と封蓋蜂児のいない場所の明るさの差、成虫の蜂と封蓋蜂児の特徴を利用して、成蜂あるいは

封蓋蜂児の識別を行います。識別された成虫のミツバチの数、または識別された封蓋蜂児の数がカウントされます。

STEP-2) できるだけ正確にカウントするために、画像の2値化処理の前に、画像全体を、以下のように各領域で同じしきい値を持つと思われるいくつかの領域(最大4つの領域)に分割します。そして、分割領域ごとに最適な閾値を入力する(分割領域の最大数は4、分割形状は任意である)。分割の例: (1)蓋をした蜂蜜の面積と蓋をした蜂児の面積を区別します。(2)ミツバチが少ないエリアとミツバチが密集しているエリアを区別する。(3)コントラストや明るさの異なる領域(光が当たる部分と影の部分など)を区別します。

STEP-3) カウントした成虫と封蓋蜂児を1匹ずつマークするキーの種類(+、*、数字など)とキーの色とサイズを入力します(カウント終了後に変更できます)。

STEP-4) カウントが行われると、カウントされたミツバチや封蓋蜂児を画像に自動的にマークしながら、カウントを続け、その時点でのカウント数が画像の下部に表示される。画像内の成虫の数や封蓋蜂児の数を短時間で数えた後、画像の下部に画像内の合計数が表示されます。カウント状態は視覚的に判断され、不満がある場合は、しきい値を変更し、再カウントします。数回の試行で、閾値を変更しても、カウント状況に改善が見られない場合は、コンピュータでの自動計測によるおおよその数のカウントが完了したものとみなします。

STEP-5) パソコンで自動計数後、同じソフトで手動計数操作に切り替え、自動計数時の計数誤差を修正します。そこで、大画面モニターを用いて、さらに画像を拡大しながら、自動カウント時の成虫や封蓋蜂児のマークミス(重複カウント、対象物ではないものをカウント)やマーキングし忘れ(ミツバチの重なり、画像のぼやけ、明暗の極端な違いなど)を目視で確認しながら修正し、そして、成虫のミツバチの数や封蓋蜂児の数をできるだけ正確に把握するために、あらゆる努力が払われます(最も重要で重大な仕事)。ソフトウェアが手動カウントの場合でも、マークの除去と付与により、ミツバチまたは封蓋蜂児の数が自動的に変更されることに注意してください。この修正はいつでも再開できます。補正が完了したと判断されると、次の新しい画像の測定に移ります。

STEP-6) 測定した成虫や蜂児の個体数を別表に掲示する場合は、実測画像を呼び出し、拡大画像で再度確認し、カウントに誤りがないか確認(間違いを見つけた場合は訂正)した後、別表に数を掲示します。すべての巣碑上の成蜂の数と巣箱の4つの壁と底の成蜂の数の合計やすべての巣碑上の封蓋蜂児の数の合計が、それぞれ、ある測定日における蜂群の成虫のミツバチの数または封蓋蜂児の数です。

1.3.3 Counting procedure of the number of mite-damaged bees

蜂群におけるバロアダニのサンプリング法は、粘着板法、ロール法、粉砂糖振糊法など、さまざまな方法が報告されている(39-41)。これらの方法では、蜂群内のバロアダニの総数を決定することは不可能です。バロアダニの蜂群への影響は、ダニによる被害を伴う成虫のミツバチに直接現れると推定されます。このセクションは、蜂群内のダニの総数ではなく、ダニによって被害を受けたミツバチの総数を測定することを目的としています。ダニ被害を受けたミツバチの数をできるだけ正確に数えるために、成虫のミツバチの数を数えるために使用した画像とソフトウェアを再度使用しました。成虫のミツバチの数を数え

るこの手法を使用すると、成虫のミツバチのバロアダニを数えるのは比較的簡単です。一方、巣房内の封蓋蜂児に損傷を与えるバロアダニを数えることは非常に困難です。幼虫の段階でバロアダニから被害を受けた場合、幼虫が成虫になったとしても被害の痕跡があるはずですが、幼虫期の痕跡がある成虫の蜂は、ダニの被害を受けた蜂と見なされます。また、成虫の発育中にダニが脱落した可能性も考えられます。このとき、成虫の蜂にダニの痕跡が残っているかどうかを確認しました。したがって、ダニが落ちた痕跡がある成虫の蜂もダニ被害蜂と見なされます。

このような痕跡の判定基準は、後述するように画像を拡大して得られた情報に基づいて作成した。ダニ被害を受けたミツバチと認定された例を図 S5 (28) に示します。この基準によれば、成虫の数の測定のために撮影した写真画像を用いて、蜂群内のほぼ全成虫のバロアダニ被害の状況を評価することができます。そこで、バロアダニの成虫とバロアダニの被害の痕跡があるミツバチの総数を、成虫のミツバチ数の測定画像を拡大しながら、成虫のミツバチ数を測定するソフトウェアを用いて手動で求めました。ダニ被害を受けたミツバチの数の測定は非常に困難な作業であり、かなりの時間 (約 6 ヶ月) を要しました。オペレーター間の誤差をなくすために、この測定は 1 人だけで行いました。図 S6 は、ダニ被害を受けたミツバチの季節変化を以下の基準で測定したものです。

1.3.4 Criteria for determining whether or not it is a mite-damaged bee

本研究では、蜂群内のバロアダニの数を直接数える方法ではなく、ダニによる被害を受けたミツバチの数がダニによる蜂群の被害の程度と同等である、と仮定しています。ダニ被害を受けたミツバチの数を、前述した成虫のミツバチと封蓋蜂児の数を数えるために開発したソフトウェアを用いて、成虫のミツバチ数を測定するために撮影したミツバチの巣碑の拡大写真画像上のダニ被害を受けたミツバチの数を、以下に記述した基準に従って、図 S5 を参照しながら、手動でカウントする。

この方法では、蜂群内のダニの絶対数を直接評価することはできませんが、ダニによる蜂群への被害を間接的に推定することは可能です。また、野外実験で成虫の蜂数を測定するための写真画像を用いて、バロアダニによる蜂群への被害を評価するため、必要なときにいつでも何度も確認しながら、ダニ被害を受けたミツバチの数を再測定することができ、測定精度の向上を図ることができます。更に、過去の成虫数測定用の写真画像を用いて、過去の実験時のダニ被害を受けたミツバチの数を測定することも可能である。

撮影した画像を用いて、バロアダニによる被害を受けたミツバチの有無を判断するための注意点と基準を以下に示す。

雌のバロアダニは、幼虫が巣房に蓋をする直前に巣房に入り、卵を産み (すべて雄ダニ)、蓋をした巣房でダニの数が増加します。幼虫だけでなく、成虫のミツバチにも被害を与え続けているといわれています。しかし、キャップされた巣碑巣房内のダニの数を数えることは不可能です。したがって、間接的ではあるが、ダニ被害の痕跡(ダニの存在が確認できる、ミツバチがダニに噛まれたと思われる腫れや炎症の痕跡がある、ミツバチの羽が変形または脱落している、ミツバチにダニの欠損痕がある)をここではダニと見なします。すなわち、上記の痕跡を有する成虫の個体数は、蜂群のダニ被害の程度を推定する指標とみなすことができます。具体的な判断基準は、以下の通りです。

蜂に付着した小さくて丸い(楕円を含む)立体的なものは、赤褐色系(楕円形を含む)と赤褐色系(半透明を含む)の色のダニではないかと疑われています。ダニが疑われる場合は、拡大画像を用いて様々な角度から検討しながら、以下の基準と図 S5 に基づいてダニであるか否かを判定します。ダニの疑いが強いが特定できない場合でも、ダニまたはダニの痕跡と見なします。

- 1) ミツバチの首付近が立体的ではなく平面的に見えるのは、ハチが首を曲げた際に現れる生来のパターンや、他のミツバチの羽の影などと考え、ダニによる被害とは見なされません。
- 2) 赤褐色と黒色以外の色の小さなもの(特に白っぽい色)は花粉とみなします。
- 3) 翅が変形した皺のように立体的に見えるものは、翅の収縮による影とみなす。しかし、翅が収縮する原因は、バロアダニが媒介する翅の奇形ウイルスである可能性が高い。翅の収縮状態を画像上で精査し、縮みがダニによるものかどうかを判断します。
- 4) 羽が縮んだり欠けたりした蜂がダニに噛まれた痕跡がある場合、それはダニと見なします。
- 5) ダニと花粉やゴミの区別がつかない場合は、ダニと見なす必要があります。ただし、花粉やゴミなどダニ以外であることが明らかな場合は除外してください。
- 6) 平面のものは、通常、ダニではないと判断されます。しかし、精査の結果、例外的に、ダニ被害を受けた蜂と見なされる場合があります。
- 7) 筋肉の隆起と思われるもの等を除きます。
- 8) ダニとゴミの違いは、形や色、周囲の状況などで判断し、ダニのような不自然なものを数える(主観ですが、ダニのように見えるものでも数えなさい)
- 9) ダニに噛まれた痕跡(噛まれて膨らむ)もミツバチの被害と考えらる。
- 10) ダニに噛まれた痕跡の数に関係なく、ダニのように見えるものは、ダニに被害を受けた 1 匹の蜂として扱われます。
- 11) ミツバチから落ちたダニの痕跡は、ダニ被害を受けたミツバチとして扱われます。幼虫の巣房に蓋をする直前に、ダニは巣房内の餌に卵を産み付けますが、蓋をした巣房で孵化した幼虫の体液を吸いながら卵が成長するため、蓋をしていない巣房でもダニを見つけることはほとんど不可能です。したがって、巣房内のダニを評価しないことにした。

ダニは巣箱内の様々な場所に存在し、形状もゴミや花粉等と間違えやすく、目に見えない場所(特に巣房内)にも存在し、ダニの絶対数は不明であるが、ダニ被害を受けた成虫のミツバチの数で評価する方法は、ダニの生息数の定性的な指標であると考えられる。巣房内のダニの数はわかりませんが、蜂群のダニの蔓延状態は、成虫のミツバチに付着するダニの数に反映されます。

この方法は、不確定要素を含むが、上記基準の下で、同一人物で測定することにより、各蜂群間のダニ数の相対比較と、各ミツバチ群の経時変化をある程度表すものと考えられる。ところで、疑問が生じたときは、再度、撮影した成虫の蜂数測定用の画像を用いて、数え直します。

2 Supplementary Figures (Figs.S1 to S10)

Fig. S1. Change in eclosion rate of honeybees with imidacloprid dosage.

Fig. S2. Comparison of apparent longevity between a variable eclosion rate, $p(t) = f(\text{dinotefuran-intake per bee})$, and a constant one, $p(t) = 0.9$.

Fig. S3. Flowchart to find the apparent longevity, $L(t)$: Mainstream scheme.

Fig. S4. Flowchart to find the apparent longevity, $L(t)$: Bisection method.

Fig. S5. Images of mite-damaged bees.

Fig. S6. Number of mite-damaged bees and mite-prevalence.

Fig. S7. Apparent longevity of 2011/2012-Experiment.

Fig. S8. Apparent longevity of 2012/2013-Experiment.

Fig. S9. Apparent longevity of 2013/2014-Experiment.

Fig. S10. Apparent longevity of 2018-Experiment.

Fig. S1. Change in eclosion rate of honeybees with imidacloprid dosage.

イミダクロプリドの投与量とミツバチの羽化率との関係に関するソースデータは以下の通りである(35)。対照群では 89.82 ± 10.10 および $89.17 \pm 7.26\%$ ；イミダクロプリド濃度 0.4ng/幼虫 で $89.20 \pm 4.90\%$ ； 24ng/幼虫 で $3.54 \pm 4.92\%$ ； 200ng/幼虫 で $77.29 \pm 6.64\%$ ； 2000ng/幼虫 で $51.04 \pm 6.78\%$ ； 4000ng/幼虫 で $30.63 \pm 12.31\%$ ； 6000ng/幼虫 で $25.21 \pm 6.47\%$ ； 8000ng/幼虫 で $8.54 \pm 1.72\%$ 。それぞれ。セミロググラフではゼロ値を扱うことができないため、便宜上、対照群の農薬濃度を 0.001ng/幼虫 とした。

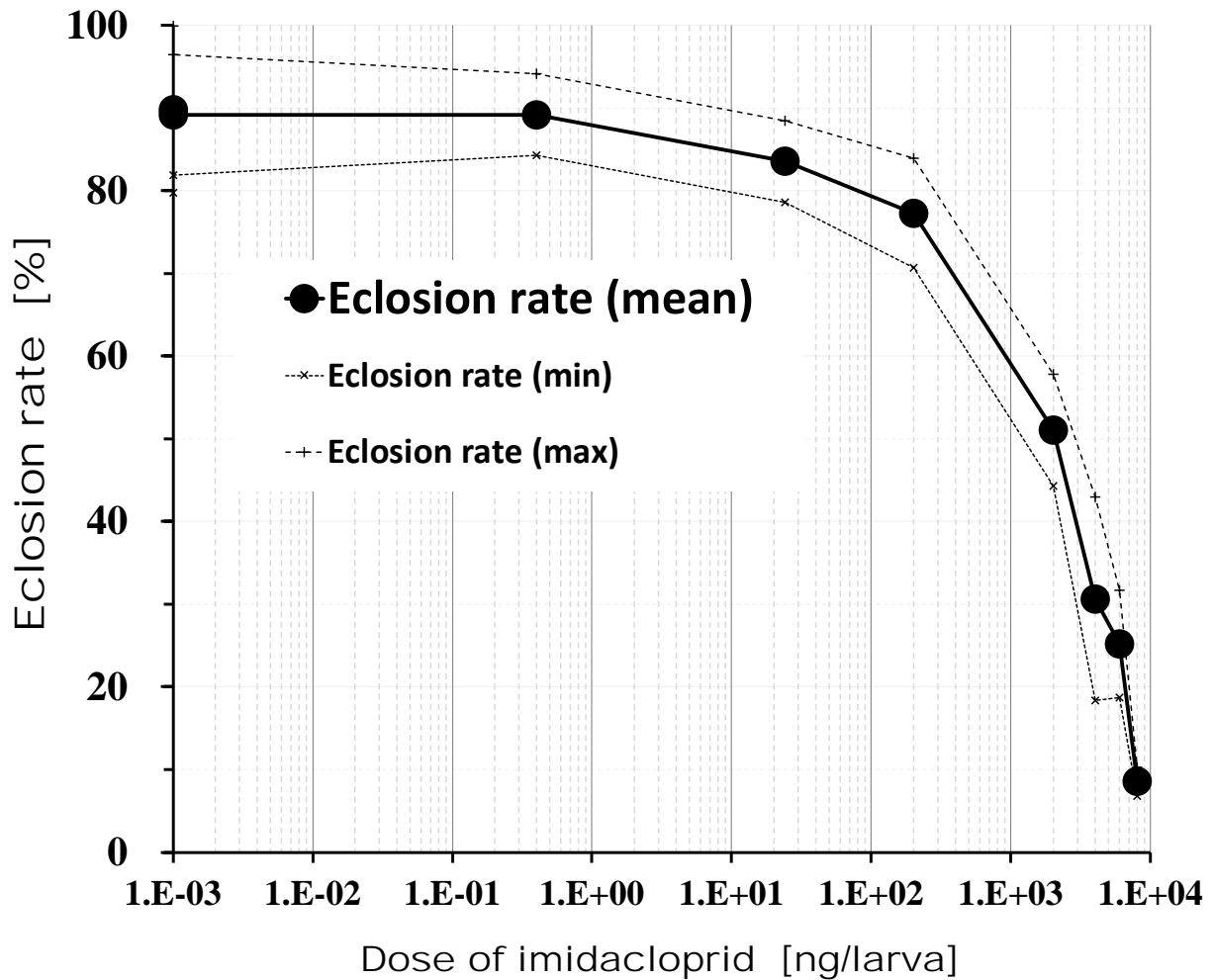


Fig. S2. Comparison of apparent longevity between a variable eclosion rate, $p(t)=f(\text{dinotefuran-intake per bee})$, and a constant one, $p(t)=0.9$.

蜂群の見かけの寿命を推定するために、2011年から2012年に実施された野外実験で測定された成虫のミツバチと封蓋蜂児の数が用いられた(25)。 $L(t)_{p(t)=p(t)}$ は、2つの連続した測定日の間の期間に、ミツバチあたりの農薬摂取量によって変化する変数 $p(t)$ を使用して計算された見かけの寿命を示しています。ここで、 $p(t)$ の範囲は、「2011/2012 DF 1ppm/syrup $L(t)_{p(t)=p(t)}$ 」コロニーでは0.79~0.9です。「2011/2012 DF 0.565ppm/pollen $L(t)_{p(t)=p(t)}$ 」コロニーでは0.84~0.9、「2011/2012 DF 10ppm/syrup $L(t)_{p(t)=p(t)}$ 」コロニーでは0.8-0.9、「2011/2012 DF 5.65ppm/pollen $L(t)_{p(t)=p(t)}$ 」コロニーでは0.835~0.9。

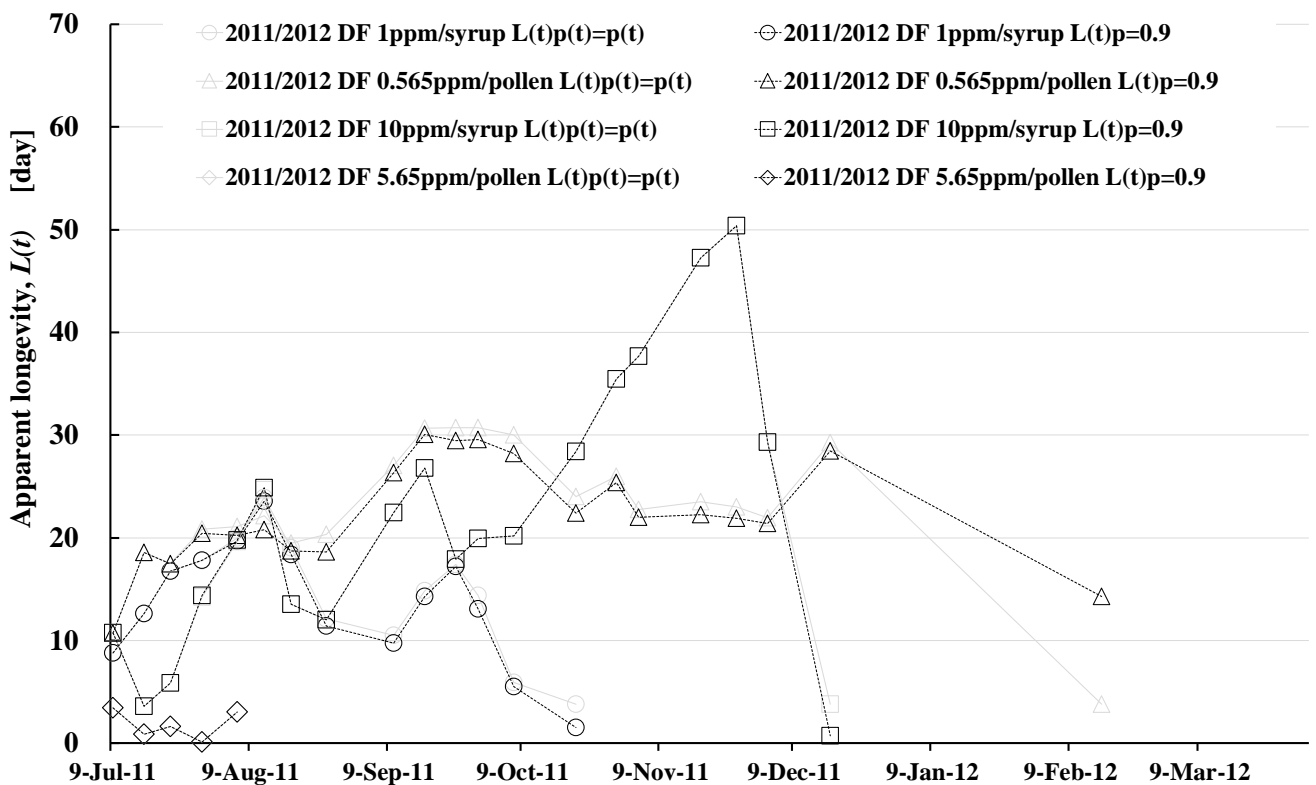


Fig. S3. Flowchart to find the apparent longevity, $L(t)$: Mainstream scheme.

The calculations were carried out using a software written in the Ruby programming language.

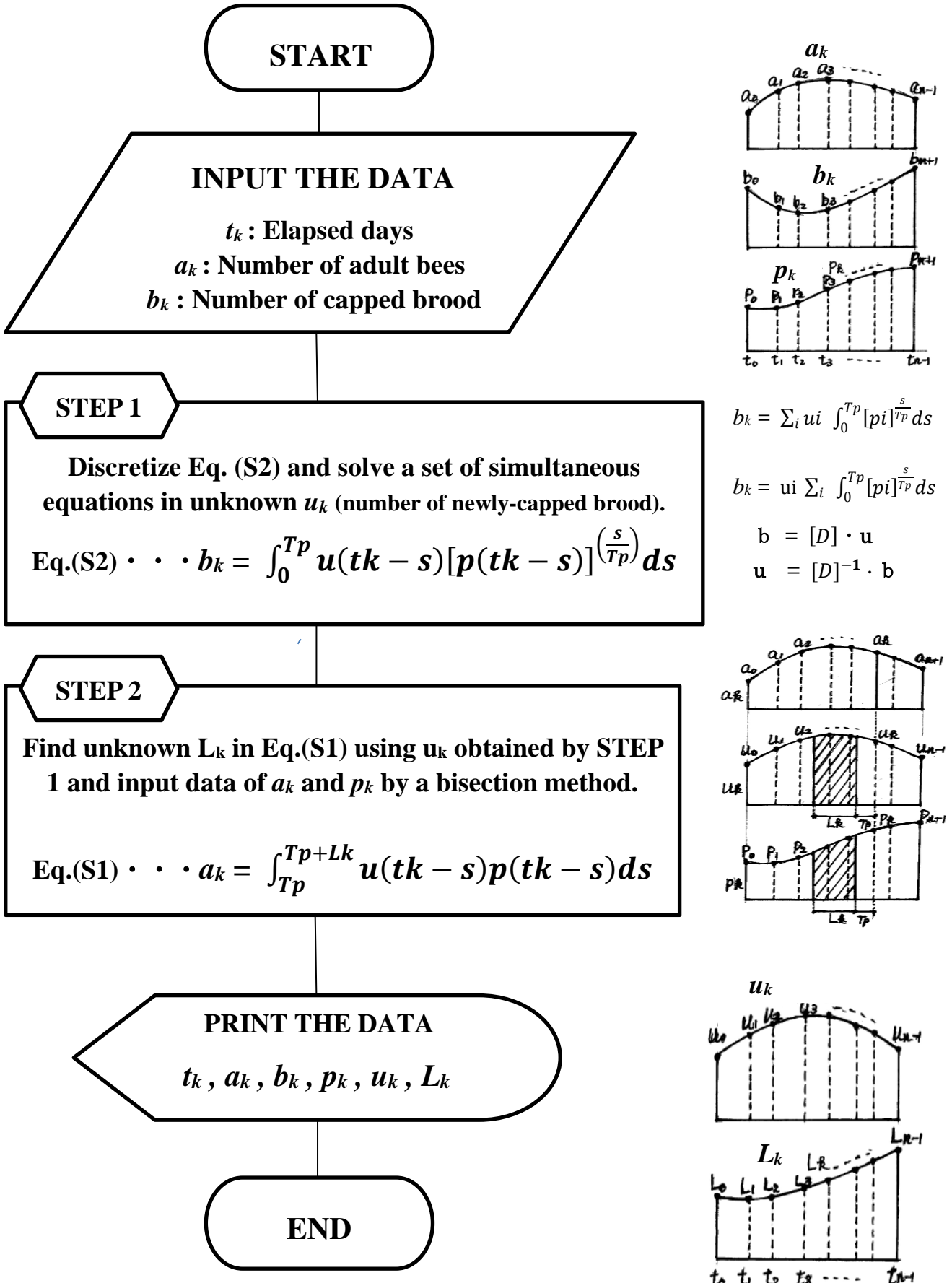


Fig. S4. Flowchart to find the apparent longevity, $L(t)$: Bisection method.

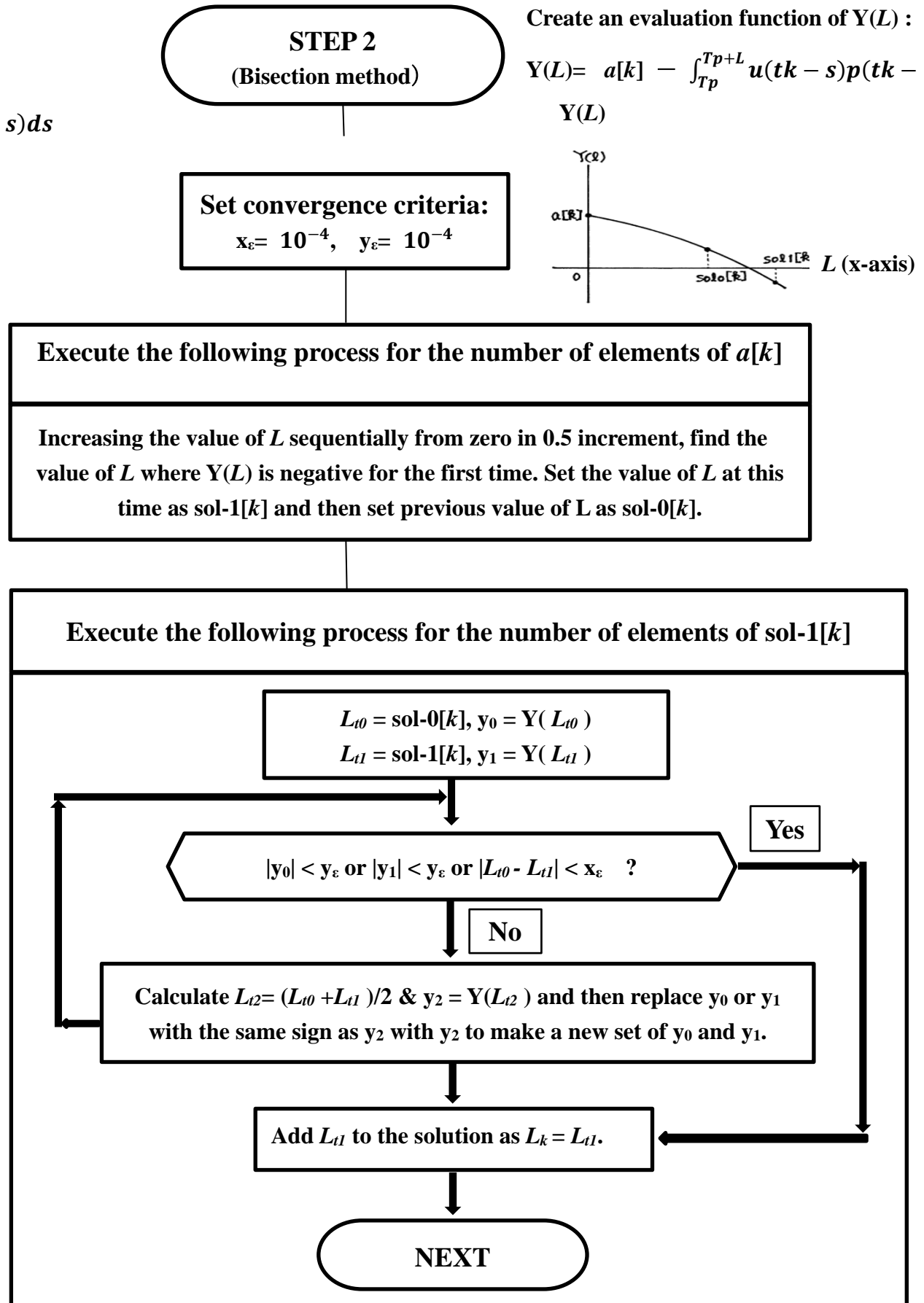
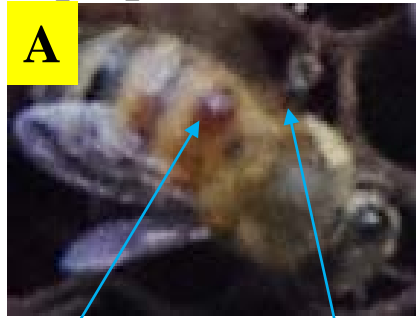


Fig. S5. Images of mite-damaged bees.

上記の画像は、野外実験で撮影した巣碑枠上の成虫のミツバチの写真から得られたものです。上記を参考に、成蜂がダニ被害を受けたかどうか、画像を拡大しながら判断しました。バロアダニの被害を受けたと思われる成虫の代表的な画像がいくつか示されている。各画像は、ダニ被害を受けたミツバチの例です。**A:**羽を取り除いた成虫(働き蜂)の背中のだニ。**B:**ミツバチの足と背中にダニ。**C:**雄蜂の頭部についたダニ。**D:**蜂の背中から落ちたダニの痕跡。**E:**落ちたダニと羽のない蜂の痕跡。**F:**ミツバチの背中から落ちたダニの痕跡と、羽のないミツバチ。**G:**落ちたダニの痕跡と、ダニに噛まれたと思われる蜂。

Mite on the bee's back

DF1_B-2F_20180923



Mite

No wing

Mite on the bee's leg & back

DF2_B-2F_20180923



Mite

Mite on the head

DF2_B-2B_20180923



Mite

Traces of mites

DF2_B-2B_20180923



Traces of falling out

Traces of mites

DF2_B-4B_20180923

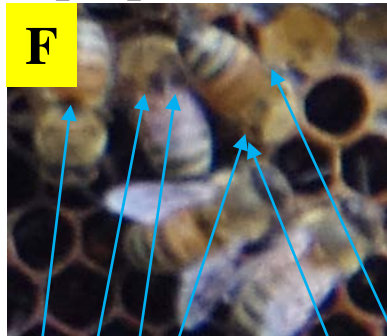


Traces of falling out

No wing

Traces of mites

DF1_B-2B_20180923



Traces of falling out

No wing

Traces of mites

DF2_B-2B_20180923a



Traces of falling out

Traces bitten by mites

Fig. S6. Number of mite-damaged bees and mite-prevalence.

2018年に実施した野外実験におけるこれらのデータの詳細は、前回報告(28)で報告されている。ダニの罹患率は、各測定間隔の間の期間におけるバロアダニ(ダニ被害を受けたミツバチ)による被害を受けたミツバチの数と、成虫のミツバチの総数との比率を示します。ダニ/成虫は、ダニ被害を受けたミツバチ/ミツバチの総数(ダニの罹患率)を示します。**2018 CR-1、2018 CR-2、2018 CR-3**は、バロアダニが蔓延している対照コロニーを示します。**2018 DF-1、2018 DF-2、2018 DF-3**は、バロアダニが寄生し、花粉ペーストを介してジノテフランが投与されるコロニーを示します。

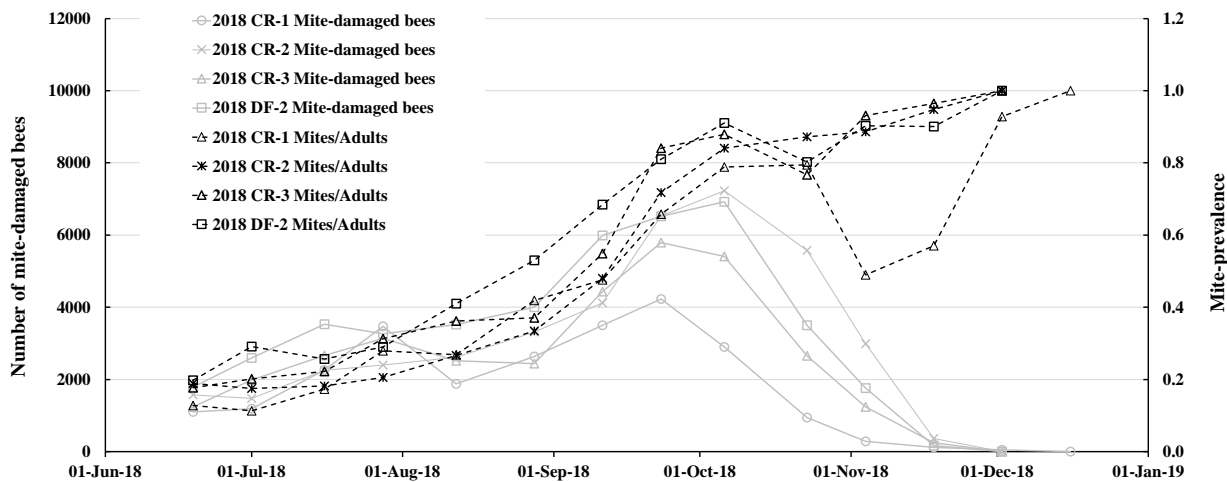


Fig. S7. Apparent longevity of 2011/2012-Experiment.

CR-1 (pesticide-free) L(t): 農薬を投与しない対照コロニー(**DF-1**)の見かけの寿命。**DF-1 (1ppmDF/syrup) L(t):** 1 ppm のジノテフラン(ネオニコチノイドの1種)を、糖液を介して投与した実験コロニー(**DF-1**)の見かけの寿命。**DF-2 (0.565ppmDF/pollen) L(t):** ジノテフラン 0.565 ppm を、花粉ペーストを介して投与した実験コロニー (**DF-2**) の見かけの寿命。**DF-3 (10ppmDF/syrup) L(t):** 10 ppm のジノテフランを、糖液を介して投与した実験コロニー (**DF-3**) の見かけの寿命。**DF-4 (5.65ppm/pollen) L(t):** ジノテフラン 5.65 ppm を花粉ペーストを介して投与した実験コロニー (**DF-4**) の見かけの寿命。すべてのコロニーにはダニがほとんどいません。

対照コロニー**CR-1** と実験コロニー**DF-3** は、冬が近づいていることをすでに知っていたかのように、9月下旬から見かけの寿命を延ばし始めます。**CR-1** は越冬中も増え続けますが、**DF-3** は越冬後すぐに絶滅してしまいました。**DF-3** の絶滅は、他の実験コロニーである**DF-1** と**DF-4** が越冬前に絶滅したことからもわかるように、越冬前にジノテフランによってコロニーが弱体化していたことが原因と考えられます。**DF-1** と**DF-3** はいずれも、糖液を介して、ジノテフランを投与された蜂コロニーであるが、ジノテフランの投与濃度の低い**DF-1** の方が、ジノテフランの投与濃度の高い**DF-3** よりも早く滅亡したのは、農薬の投与期間の違いに因るものと考えられる(詳しくは前の論文(25)を参考のこと)。一方、別の実験コロニーである**DF-2** は、冬が近づいていることに気づかないかのように、9月下旬以降、見かけの寿命が伸び始めることはなく、冬になっても寿命はほぼ一定です。蜂群の年間を通してほぼ一定の寿命の変化は、一般的な季節的な寿命の変化とはまったく異なります。この異常な変化は、ミツバチの通常の生理機能では説明できません。上記のような**DF-2** の見かけの寿命の四季変化と**DF-3** の見かけの寿命の四季変化の違いは、ジノテフランを投与する媒介の食料 (vehicles) の違いによると考えられる。この違いの発生メカニズムはこの論文で議論されている。

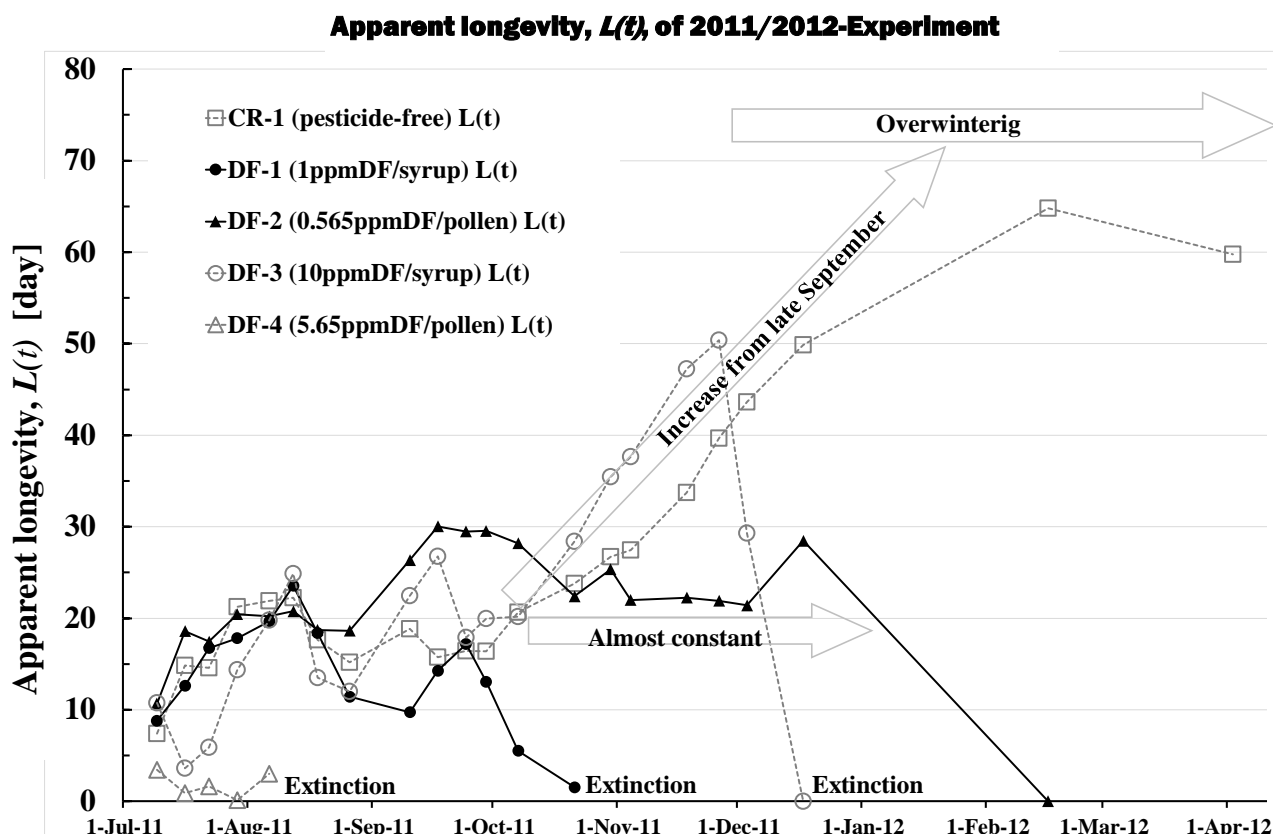


Fig. S8. Apparent longevity of 2012/2013-Experiment.

CR-1 (pesticide-free) L(t) および **CR-2 (pesticide-free) L(t)**: 農薬を投与しない対照コロニー (CR-1、CR-2) の見かけの寿命 ; **DF-1 (2ppmDF/syrup) L(t)**: 糖液を介して、2 ppm のジノテフランを投与した実験コロニー(DF-1)の見かけの寿命 ; **FT-1 (10ppm/syrup) L(t)**: 糖液を介して、10ppm のフェントロチオンを投与した実験コロニー(FT-1)の見かけの寿命。すべてのコロニーにはダニがほとんどいません。

実験コロニー**DF-1** は、早期に絶滅した。無農薬対照コロニー**CR-1** & **CR-2** およびフェントロチオン(有機リン系農薬)を含むコロニー**FT-1** は、一般的な季節的な寿命の変化を示します。寿命は短く、越冬終わりから9月末まではほぼ一定で、その後9月下旬から延び始め、越冬終了直前まで延び続け、越冬が終わると急に短いレベルまで下がり、その後安定します。

特筆すべきは、2ppm のジノテフランと同等の急性殺虫活性を有する量のフェントロチオンを投与した FT が、対照群(**CR-1**、**CR-2**)と同様に越冬に成功したことである。**DF-1** の早期絶滅と **FT-1** の越冬成功の違いは、残存効果期間の長さの違いによるものと考えられます。詳しくは、既報 (26) を参照のこと。

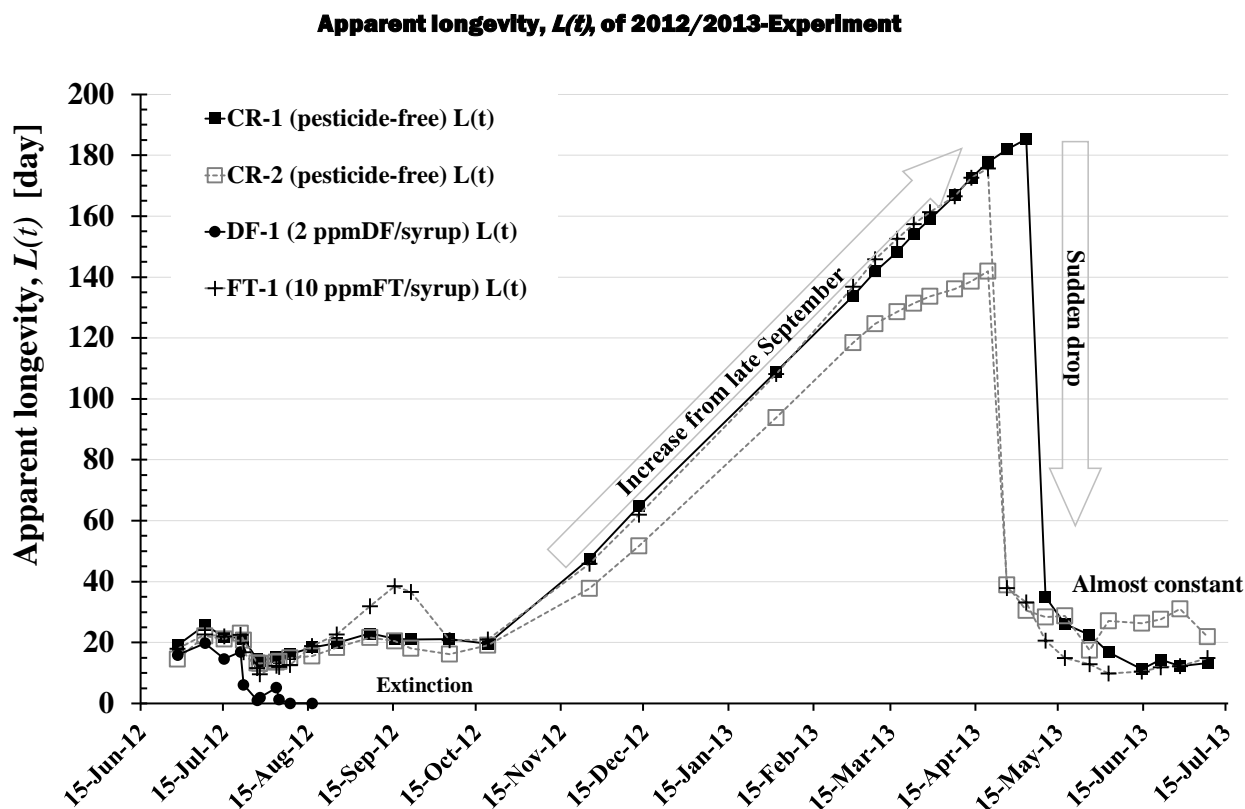


Fig. S9. Apparent longevity of 2013/2014-Experiment.

CR-1 (pesticide-free) L(t)および **CR-2 (pesticide-free) L(t)**: 農薬を投与しない対照コロニー (**CR-1**、**CR-2**)の見かけの寿命。**DF-1 (0.2 ppm/syrup L(t))**: 0.2 ppm のジノテフランを、糖液を介して投与した実験コロニー (**DF-1**) の見かけの寿命。**FT-1 (1 ppmFT/syrup) L(t)**: 糖液を介して、1 ppm のフェニトロチオンを投与した実験コロニー(**FT-1**)の見かけの寿命。**MT-1 (1 ppmMT/syrup) L(t)**: 糖液を介して、1 ppm のマラチオンを投与した実験コロニー (**MT-1**) の見かけの寿命。**CN-1 (1 ppmCN/syrup) L(t)**: 0.08 ppm のクロチアニジンを、糖液を介して投与した実験コロニー (**CN-1**) の見かけの寿命。すべてのコロニーにはダニがほとんどいません。

すべてのコロニー(**CR-1**、**CR-2**、**DF-1**、**FT-1**、**MT-1**、**CN-1**)の見かけの寿命も同様に変化しました。実験開始から9月下旬までは短期間でほぼ一定に保たれ、その後冬に向けて伸び始め、越冬中も伸び続けたが、**CR-2** 以外のコロニーは越冬中に絶滅した。

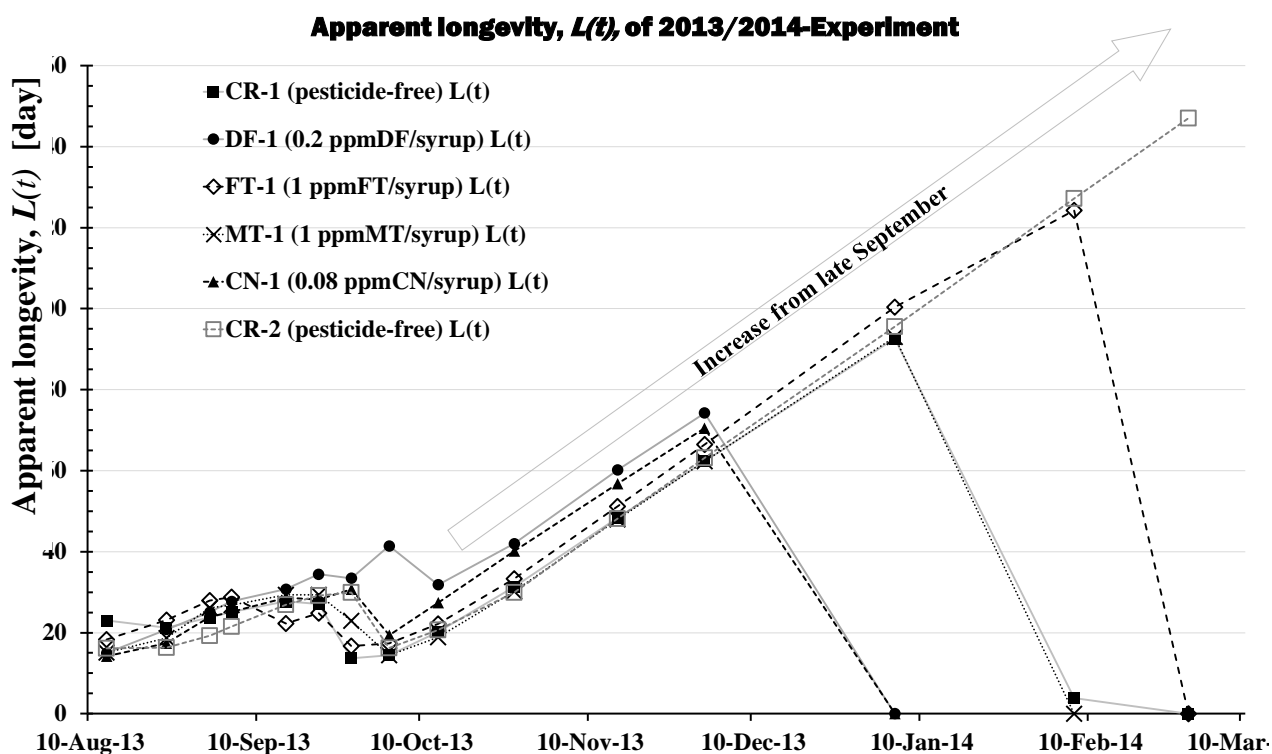
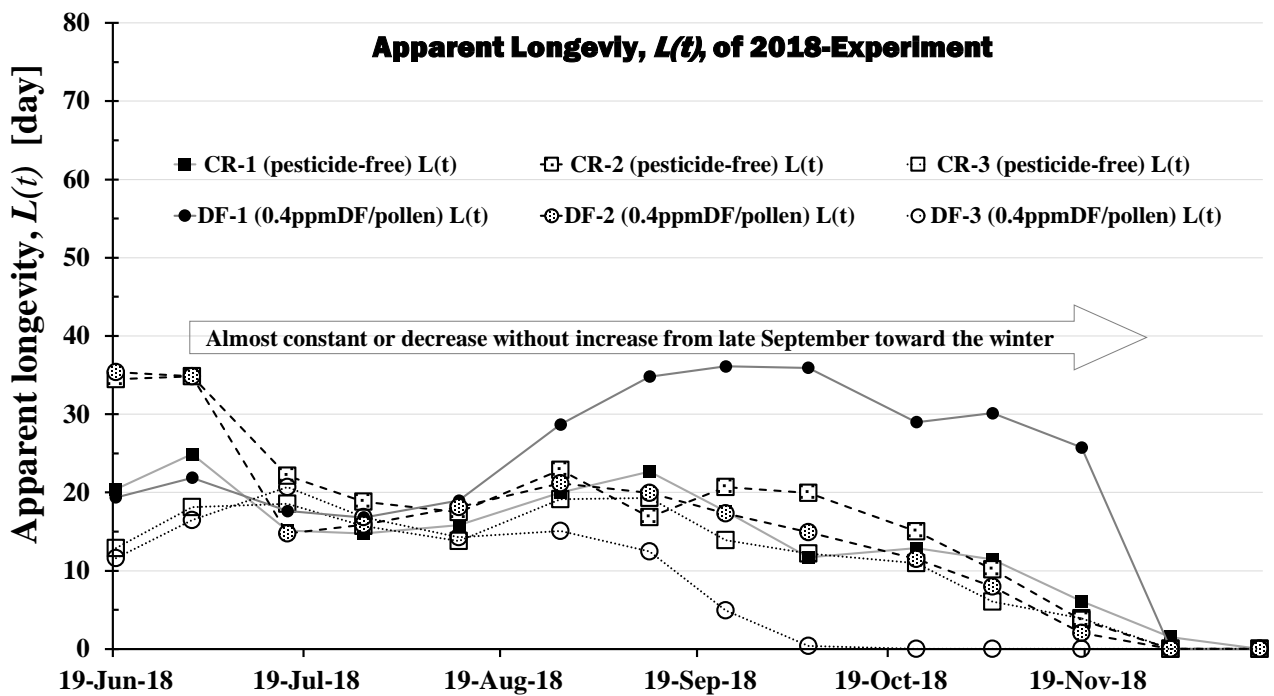


Fig. S10. Apparent longevity of 2018-Experiment.

CR-1 (pesticide-free) L(t), **CR-2 (pesticide-free) L(t)**および**CR-3 (pesticide-free) L(t)**: 農薬を投与しない対照コロニー(**CR-1**, **CR-2**, **CR-3**)の見かけの寿命。**DF-1 (0.4 ppmDF/pollen) L(t)**, **DF-2 (0.4 ppmDF/pollen) L(t)** および **DF-3 (0.4 ppmDF/pollen) L(t)**: 0.4 ppm のジノテフランを、花粉ペーストを介して投与した実験コロニー (**DF-1**, **DF-2**, **DF-3**) の見かけの寿命。すべてのコロニーにダニがはびこっていた(28)。

この野外実験でのすべてのコロニーの見かけの寿命は、9月下旬から延び始め、越冬の終わりまで延び続ける典型的な季節変化ではなく、冬に向かってほぼ一定またはわずかに短くなる異常な季節変化をします。

興味深いことに、本実験すべてのコロニーの見かけの寿命は、大まかに言えば、年間を通じてほぼ一定であり、見かけの寿命の季節的な変化はほとんどありません。これは、花粉ペーストを介してジノテフラン(ネオニコチノイド系農薬)を与えられた蜂群の見かけの寿命の季節的な変化に似ています(25)。



3 Supplementary Tables (Tables.S1 to S7)

Table S1. Outline of pesticide intake in three field experiments.

Table S2. The essentials of experimental conditions and results for four long-term field experiments conducted in Shika, Japan.

Table S3. Apparent longevity of a honeybee colony in the 2011/2012 experiment at the eclosion rate of 0.9.

Table S4. Apparent longevity of a honeybee colony in the 2012/2013 experiment at the eclosion rate of 0.9.

Table S5. Apparent longevity of a honeybee colony in the 2013/2014 experiment at the eclosion rate of 0.9.

Table S6. Apparent longevity, $L(t)$, of a honeybee colony in the 2018 experiment at the eclosion rate of 0.9.

Table S7. Number of mite-damaged bees and mite-prevalence in 2018 and 2011/2012 experiments.

Table S1. Outline of pesticide intake in three field experiments.

Location of experimental site: mid-west Japan (Shika-machi) (Latitude 37°1'9"N; Longitude 136°46'14"N).

	Initial number of adult bees	Initial number of capped brood	Administration period of pesticide	Total intake of pesticide per colony during administration [mg/colony]	Total number of adult bees during administration	Total intake of pesticide per bee during administration [ng/bee]	Extinction or survival
2011/2012 CR-1 (pesticide-free) ²⁵⁾				0		0	Survival
2011/2012 DF 1ppm/syrup ²⁵⁾	2965	4263	9-Jul-11 to 21-Oct-11	4.208	13543	310.7	Extinction
2011/2012 DF-0.565ppm/pollen ²⁵⁾	2158	2556	9-Jul-11 to 3-Dec-11	1.8692	30779	60.7	Extinction
2011/2012 DF 10ppm/syrup ²⁵⁾	3296	3880	9-Jul-11 to 16-Jul-11	1.9	6344	290.3	Extinction
2011/2012 DF 5.65 ppm/pollen ²⁵⁾	1659	6993	9-Jul-11 to 16-Jul-11	0.5257	3078	65.1	Extinction
2012/2013 CR-1 (pesticide-free) ²⁶⁾				0		0	Survival
2012/2013 CR-2 (pesticide-free) ²⁶⁾				0		0	Survival
2012/2013 DF 2ppm/syrup ²⁶⁾	9173	9442	21-Jul-12 to 16-Aug-12	1.55	16524	93.8	Extinction
2012/2013 FT 10ppm/syrup ²⁶⁾	8943	8732	21-Jul-12 to 16-Aug-12	17.97	19792	862.5	Survival
2013/2014 CR-1 (pesticide-free) ²⁷⁾			0	0		0	Extinction
2013/2014 CR-2 (pesticide-free) ²⁷⁾			0	0		0	Survival
2013/2014 DF 0.2ppm/syrup ²⁷⁾	6017	2214	5-Sep-13 to 1-Dec-13	0.514	8612	56.7	Extinction
2013/2014 CN 0.08ppm/syrup ²⁷⁾	7293	1506	5-Sep-13 to 1-Dec-13	0.4016	10130	39.6	Extinction
2013/2014 FT 1ppm/syrup ²⁷⁾	10296	3232	5-Sep-13 to 28-Feb-14	3.86	19585	197.1	Extinction
2013/2014 MT 1ppm/syrup ²⁷⁾	7676	1396	5-Sep-13 to 7-Feb-14	6.75	15724	429.3	Extinction

Table S2. The essentials of experimental conditions and results for four long-term field experiments conducted in Shika, Japan.

Experiment name (Experimental period)	2011/2012 experiment ²⁵⁾ From July 9, 2011 to April 2, 2012 (268 days)	2012/2013 experiment ²⁶⁾ From June 28, 2012 to July 26, 2013 (393 days)	2013/2014 experiment ²⁷⁾ From Aug. 13, 2013 to Feb. 28, 2014 (199 days)	2018 experiment ²⁸⁾ From Jul. 19, 2018 to Dec. 16, 2018 (180 days)
Object of Study	To investigate the difference in the long-term impact on a bee colony between toxic sugar syrup (honey) as an energy source and toxic pollen paste (bee bread) as a protein source which are exposed to a neonicotinoid	To investigate the difference in the long-term impact on a bee colony between a neonicotinoid and an organophosphate which are administered through sugar syrup	To investigate the difference in the long-term impact on a bee colony between a neonicotinoid and an organophosphate which are administered through sugar syrup under lower concentrations than in the previous work	To investigate the seasonal changes in colony size and mite-prevalence in a honeybee colony exposed to dinotefuran via pollen paste and infested with <i>Varrou</i> mites
Circumstances around Experimental Site				
Experimental site (latitude and longitude)	Shika (mid-west Japan) (37°19' N, 136°46'14" E, 43m above sea level)	Same as the left	Same as the left	Shika (mid-west Japan) (37°2'35" N, 136°45'38" E, 70m above sea level)
Limitation of honeybee activities	Honeybees can freely forage about for food in a hive or in fields	Same as the left	Same as the left	Same as the left
Environmental effects of pesticides other than administered pesticides	A pesticide-free watering place & a pesticide-free field of flowers in the apiary	Same as the left	Same as the left	Same as the left
Aerial-crop-dusting farmland near experimental site	Nothing	Nothing	Nothing	Nothing
Seasonal changes	Distinct	Distinct	Distinct	Distinct
Experimental Conditions				
Materials	Vehicle : sugar syrup, pollen paste. Pesticide: dinotefuran	Vehicle: sugar syrup; pollen paste. Pesticide: dinotefuran/fenitrothion	Vehicle: sugar syrup; pollen paste. Pesticide: dinotefuran; clothianidin; fenitrothion; malathion	Vehicle: sugar syrup; pollen paste. Pesticide: dinotefuran
Initial numbers of apiaries, colonies and combs (frames)	One apiary (private), five colonies per apiary, three combs per colony (one colony for each same conditions)	One apiary (private), four colonies per apiary, three combs per colony (one colony for each same conditions except 2 controls)	One apiary (private), six colonies per apiary, three combs per colony (one colony for each same conditions except 2 controls)	One apiary (private), six colonies per apiary, three combs per colony (3 control colonies & 3 dinotefuran-exposed colonies)
Concentration of pesticide	Dinotefuran: 1 & 10 ppm in sugar syrup, 0.565 & 5.65 in pollen paste	Dinotefuran: 2 ppm in sugar syrup; Fenitrothion: 10 ppm in sugar syrup	Dinotefuran: 0.2 ppm in sugar syrup; Clothianidin: 0.08 ppm in sugar syrup; Fenitrothion & Malathion: 1 ppm in sugar syrup	Dinotefuran: 0.4 ppm in pollen paste
Initial number of bees per colony	1700 to 3400 bees (accurately counted from photos)	5600 to 7100 bees (accurately counted from photos)	5400 to 7800 bees (accurately counted from photos)	7000 to 9000 bees (accurately counted from photos)
Initial number of capped brood per colony	2600 to 6100 capped brood (accurately counted from photos)	4000 to 5700 capped brood (accurately counted from photos)	4200 to 7600 capped brood (accurately counted from photos)	3100 to 6900 capped brood (accurately counted from photos)
Origin of a queen	Unknown in detail (<i>Apis mellifera</i>) Bee colonies purchased from a bee farm	Same as the left	Same as the left	Queen bees in sister relationship
Experimental Methods				
Interval of experiment	About one-week interval	About one-week or two-weeks interval	Same as left	About two-weeks inter
Administration period of pesticide	From July 9, 2011 to the colony extinction, or to December 3 (147 days)	From July 21, 2012 to the colony extinction, or to August 16 (26 days)	From September 5, 2013 to the colony extinction, or to December 1 (87 days)	From July 1, 2018 to the colony extinction
Starting time of each observation	Just after dawn if possible (before bees go out to forage)	Same as the left	Same as the left	Same as the left
Vehicle to administer a pesticide	Either sugar syrup or pollen paste	Sugar syrup	Sugar syrup	pollen paste
Administration method of pesticide	A pesticide was dissolved in sugar syrup or pollen was kneaded with toxic sugar syrup containing the pesticide. Either toxic sugar syrup or toxic pollen paste was fed into a hive	A pesticide was dissolved in sugar syrup with toxic sugar syrup containing the pesticide. Only toxic sugar syrup was fed into a hive.	A pesticide was dissolved in sugar syrup with toxic sugar syrup containing the pesticide. Only toxic sugar syrup was continuously fed into a hive with an auto-feeding system composed of 10 L (14 kg-syrup) container	Pollen paste was made while pollen was being kneaded with toxic sugar syrup containing the pesticide. Toxic pollen paste was fed into a hive.
Counting method of the number of adult bees	Directly counted with accuracy from photos of combs with bees and bees left in a hive after every comb was removed from it with the help of a automatic counting software	Same as the left (auxiliary automatic counting software has been improved)	Same as the left (auxiliary automatic counting software has been improved)	Same as the left (auxiliary automatic counting software has been improved)
Counting method of the number of capped brood	Accurately counted from photos of combs without bees after shaking the bees off each comb with the help of a automatic counting software	Same as the left (auxiliary automatic counting software has been improved)	Same as the left (auxiliary automatic counting software has been improved)	Same as the left (auxiliary automatic counting software has been improved)
Total intake of pesticide per colony	Calculated from the sugar syrup or pollen paste with pesticide consumed by honeybees.	Calculated from the sugar syrup with pesticide consumed by honeybees.	Same as the left	Same as the left
Estimation of the intake of pesticide per bee	Estimated from dividing the total intake of pesticide per colony by the total number of initial & newly-emerged honeybees.	Same as the left	Same as the left	Same as the left
Counting method of number of dead bees	Dead bees were accurately counted one by one inside and outside a hive which was placed on a large tray	Same as the left	Same as the left	Same as the left
Confirmation and record methods of a queen	A photographic record of the existence of a queen in each colony	Same as the left	Same as the left	Same as the left
Publications of Research Results (Title, Journal, Short Abstract)				
Experimental Results	A clear difference in the impact on honeybee (<i>Apis mellifera</i>) colony between the two vehicles of sugar syrup and pollen paste	Difference between the impact of the neonicotinoid dinotefuran and organophosphate fenitrothion on a bee colony in a long-term field experiment: An evidence	Comparison of the influence of a pesticide at an environmentally realistic concentration level in Japan on a honeybee colony between neonicotinoids (dinotefuran, clothianidin) and organophosphates (fenitrothion, malathion)	Seasonal changes in the size and mite-prevalence of a bee colony exposed to dinotefuran via pollen paste and damaged by <i>Varrou</i> mites
	T. Yamada et al. (2018). <i>J. Biol. Ser.</i> 1(3): 084-107.	Yamada et al. (2018). <i>J. Biol. Ser.</i> 1(3): 108-137	T. Yamada et al. (2018). <i>J. Biol. Ser.</i> 1(4): 187-207.	Yamada T. (2020). <i>J. Diet. Res. Nutr.</i> 7(1): 002.
	This study investigates the difference in the impact of the neonicotinoid pesticide dinotefuran on honeybee colony between the two vehicles of sugar syrup and pollen paste. A distinct difference was observed between the two vehicles. The per-bee intake of dinotefuran administered through pollen paste as a vehicle until colony extinction was roughly one-fifth of the per-bee intake administered through sugar syrup, independently of dinotefuran concentrations. This difference can be attributed to the dissimilarity in strength of the impact on honeybee colony between worker bees which preferentially take sugar syrup (honey) to pollen paste and a queen bee and brood (larvae) which take pollen paste (bee bread) in preference to sugar syrup as a result of the long-lasting toxicity of dinotefuran. This suggests that pollen as a protein source contaminated by neonicotinoid pesticides can cause deeper adverse effect on a honeybee colony than honey as an energy source.	We conducted a long-term field experiment and found different impacts on honeybee colonies in an apiary between the neonicotinoid dinotefuran and the organophosphate fenitrothion. The colony where dinotefuran was administered (dinotefuran colony) became extinct in the administration period of 26 days, while the colony where fenitrothion was administered (fenitrothion colony) survived long after the same administration period. The fenitrothion colony succeeded in overwintering and staying alive for more than 293 days after administration. We speculate that colonies exposed to dinotefuran hardly recover from the damage because dinotefuran has a much longer persistent ability than fenitrothion and toxic foods stored in cells over a prolonged period of time can affect a colony.	In this paper the differences are investigated between neonicotinoids (dinotefuran, clothianidin) and organophosphates (fenitrothion, malathion) on a realistic pesticide-concentration level in the natural environment surrounding an apiary in Japan. It has been shown that neonicotinoids can much more rapidly weaken the colony where it was administered than organophosphates and organophosphates can be rapidly degraded in honey stored because of their high degradability. These results roughly reproduced the findings in our previous experiment. Neonicotinoid-concentration in residual honey in comb-cells were lower than those in sugar syrup fed to each colony were detected but organophosphates were hardly detected. We inferred that obscure massive colony losses in winter can be probably caused by toxic food with a long-term persistent pesticide such as a neonicotinoid stored in combs during overwintering after the weakening of the colony due to the ingestion of toxic nectar, pollen and water under the natural circumstances contaminated by long-persistent pesticides such as neonicotinoids just before.	In this study, the impact of dinotefuran (DF) administered via pollen paste to a bee colony damaged by <i>Varrou</i> mites was investigated. Seasonal changes in the number of adult bees (those capped brood) and the mite-prevalence among adult bees were measured through a field experiment over 180 days. It was found that the bee colony collapsed under the intake of a smaller amount of DF due to the synergistic effect of DF and mite-damage. Because the daily pesticide-free sugar-syrup intake per bee in the DF-exposed colony administered via pollen paste was greater than that of the control colony, DF may have an appetite-promoting effect. Since the consumption of DF-containing pollen paste per bee per day showed almost no difference between all colonies, DF seems to have no repellent effect. Mite-prevalence continued to rise and became almost 100% near the time of colony extinction. The inter-temperature-fluctuation-range of the hive-box (Ti) was smaller than that of the ambient temperature (Ta). The inter-temperature-fluctuation-range of the DF-exposed colony's hive-box was lower
Estimated results of apparent longevity	A mathematical model to estimate the seasonal change in apparent longevity of bee colony			
	Y. Yamada et al. (2019). <i>Scientific Reports</i> , volume 9, Article number: 4102 (2019)			
	We have proposed a new mathematical model to estimate the apparent longevity defined in the upper limit of an integral equation. The apparent longevity can be determined only from the numbers of adult bees and capped brood. By applying the mathematical model to a honeybee colony in Japan, seasonal changes in apparent longevity were estimated in three long-term field experiments. Three apparent longevities showed very similar seasonal changes to one another, increasing from early autumn, reaching a maximum at the end of overwintering and falling approximately plumb down after overwintering. (This study was performed using only the control colonies.)			
Damage to larvae causes seasonal changes in honeybee longevity to go crazy				
T. Yamada and Y. Yamada, preparing paper submission (this work)				
The followings were clarified from the honeybee longevity estimated by the mathematical model using the numbers of adult bees and capped brood obtained from three long-term field experiments. The longevities of the mite-free control colony and the mite-free colony where a pesticide is administered via sugar syrup show common seasonal changes, which continue to increase from the end of September to the end of overwintering and drop rapidly just after overwintering, though the ingestion of a pesticide via sugar syrup shortens the honeybee longevity. However, the longevity of the mite-infested colony and that of the mite-free colony where a pesticide is administered via pollen paste show abnormal seasonal changes in longevity that cannot increase since late September. Such abnormal seasonal changes may be caused by biological rhythm disorders due to damages by toxic pollen paste and parasitic mites during the brood stage when seasonal sensory functions and organs are created. We infer that such damages to larvae and pupae can disrupt bees' internal clocks and make honeybees undetectable of the arrival of winter, and make the colony fail in overwintering because the longevity does not extend due to abnormal seasonal changes in longevity. (This study was performed using all the colonies other than those that collapsed before mid-November)				

Table S3. Apparent longevity of a honeybee colony in the 2011/2012 experiment at the eclosion rate of 0.9.

この表は、2011年から2012年にかけて実施した野外実験結果を用いて推定した図S7の見かけの寿命のデータソースを示しています。 $a(t)$ と $b(t)$ は、それぞれ2011年から2012年にかけて実施された野外実験で得られた成虫の数と、封蓋蜂児の数を示す(25)。 $L(t)$ は、以前に提案した数理モデル(1)によって $a(t)$ と $b(t)$ を使用して推定された見かけの寿命です。「CR-1」は、ダニがほとんど存在せず、農薬を投与しない対照コロニーを示す。

「DF 1ppm/syrup」および「DF 10ppm/syrup」は、それぞれ1 ppmおよび10 ppmのネオニコチノイド系農薬であるジノテフランを、糖液を介して投与したコロニーを示す。

「DF 0.565ppm/pollen」および「DF 5.65ppm/pollen」は、それぞれ0.565 ppmおよび5.65のネオニコチノイドジノテフランを、花粉ペーストを介して投与したコロニーを示す。

注: 農薬投与期間は、2011年7月9日の朝からコロニーが絶滅するまで、コロニーが冬まで生き残る12月3日の朝までです(25)。

Date	Elapsed days	CR-1			DF 1ppm/syrup			DF 0.565ppm/pollen			DF 10ppm/syrup			DF 5.65ppm/pollen		
		$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$
9-Jul-11	0	3392	5819	7.38	2965	4263	8.80	2158	2556	10.68	3295	3880	10.75	1659	6093	3.45
16-Jul-11	7	6827	3644	14.85	4257	1287	12.64	3755	2377	18.59	1102	986	3.59	430	2865	0.89
22-Jul-11	13	6399	4692	14.59	5233	1655	16.75	3493	3207	17.45	1407	232	5.88	330	1165	1.62
29-Jul-11	20	7737	4861	21.27	3131	1034	17.82	4025	2743	20.45	1451	939	14.38	17	790	0.12
6-Aug-11	28	7893	7179	21.89	2393	1591	19.66	4372	3480	20.21	1384	2370	19.78	1	729	3.02
12-Aug-11	34	7675	8390	22.26	1762	2288	23.55	4513	3217	20.77	1752	3217	24.85			
18-Aug-11	40	8873	6125	17.63	2298	1137	18.38	4829	1933	18.72	2257	946	13.50			
26-Aug-11	48	9327	5797	15.17	1623	1757	11.42	4276	2099	18.63	2271	913	11.99			
10-Sep-11	63	9249	8803	18.82	1253	318	9.73	4620	1343	26.35	2096	545	22.46			
17-Sep-11	70	9762	8327	15.75	997	341	14.26	4241	1546	30.04	1760	707	26.76			
24-Sep-11	77	11252	7034	16.44	462	453	17.18	3862	2693	29.47	908	772	17.90			
29-Sep-11	82	10736	5810	16.37	342	230	13.06	3792	2445	29.54	996	505	19.94			
7-Oct-11	90	12015	6100	20.65	169	109	5.51	4232	2082	28.18	1076	12	20.19			
21-Oct-11	104	11253	4100	23.79	0	45	1.53	4225	1935	22.40	860	220	28.40			
30-Oct-11	113	10958	4300	26.73				4044	2105	25.35	895	147	35.46			
4-Nov-11	118	10654	3900	27.44				3675	2665	21.99	790	245	37.66			
18-Nov-11	132	11303	3430	33.75				4022	1720	22.25	779	160	47.23			
26-Nov-11	140	12390	1750	39.66				3806	1034	21.91	630	48	50.39			
3-Dec-11	148	12109	2038	43.64				2992	840	21.41	393	21	29.30			
17-Dec-11	162	11811	2038	49.87				2433	157	28.47	0	0	0.00			
16-Feb-12	223	10514	2038	64.81				0	0	0.00						
2-Apr-12	269	9622	2038	59.75												

Table S4. Apparent longevity of a honeybee colony in the 2012/2013 experiment at the eclosion rate of 0.9.

この表は、2012年から2013年にかけて実施した野外実験結果を用いて推定した図S8の見かけの寿命のデータソースを示しています。 $a(t)$ と $b(t)$ は、それぞれ2012年から2013年にかけて実施された野外実験で得られた成虫の数と、キャップ付きのひなの数を示す(26)。 $L(t)$ は、以前に提案した数理モデル(1)によって、 $a(t)$ と $b(t)$ を使用して推定された見かけの寿命です。「CR-1」および「CR-2」は農薬を投与しない対照コロニーを示す。「DF 2ppm/syrup」は、2ppmのネオニコチノイドジノテフランを、糖液を介して投与するコロニーを示す。「FT 10ppm/syrup」は、10ppmの有機リン系農薬のフェントロチオンを、糖液を介して投与するコロニーを示す。ダニはすべてのコロニーにほとんど存在しなかった。※農薬散布期間は、2012年7月21日朝から8月16日までです。

Date	Elapsed days	CR-1			CR-2			DF 2ppm/syrup			FT 10ppm/syrup		
		$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$
28-Jun-12	0	7136	4746	19.03	5832	5094	14.49	7119	5679	15.86	5690	4012	17.95
8-Jul-12	10	9621	5806	25.65	8917	4710	22.15	8877	6446	19.78	7157	5286	22.58
15-Jul-12	17	8695	10215	21.94	8265	11143	21.07	6878	13267	14.61	7565	9619	22.06
21-Jul-12	23	9647	10254	21.53	9665	11301	23.06	9173	9442	16.91	8943	8732	22.56
22-Jul-12	24	10136	10210	21.12	9558	10967	20.76	4885	8834	6.11	7750	8694	16.76
27-Jul-12	29	10633	10617	14.51	10770	10329	13.24	1434	4548	1.03	8721	6563	11.57
28-Jul-12	30	10391	10858	13.79	10901	10581	13.15	1313	3891	1.90	7786	6389	9.52
3-Aug-12	36	12083	10000	15.41	11939	10025	13.52	1049	1131	5.15	8289	3390	12.31
4-Aug-12	37	12389	9687	14.88	12041	10269	13.70	771	840	1.22	7559	2901	11.96
8-Aug-12	41	14065	7154	16.23	12978	8472	14.86	33	208	0.05	6625	1352	12.62
16-Aug-12	49	13371	6111	18.39	12207	5977	15.60	0	0	0.00	5961	607	18.86
25-Aug-12	58	11961	6014	19.88	10997	6684	18.37				4467	918	22.64
6-Sep-12	70	11165	8783	23.00	11582	8126	21.68				3534	3406	31.86
15-Sep-12	79	11980	5531	21.31	11825	7135	20.47				4576	4187	38.45
21-Sep-12	85	12166	6086	21.00	11025	9202	18.04				5859	4119	36.60
5-Oct-12	99	10715	7615	21.14	10510	5679	16.13				6593	4648	20.80
19-Oct-12	113	11726	7280	19.59	10038	6628	19.03				7326	4713	20.95
25-Nov-12	150	13255	36	47.53	12477	2937	37.74				7755	10	45.86
13-Dec-12	168	12858	0	64.81	13316	305	51.75				7080	0	62.00
1-Feb-13	218	9306	0	108.91	9421	0	93.76				5652	0	108.11
1-Mar-13	246	7464	17	133.75	8426	0	118.44				5957	26	136.85
9-Mar-13	254	7512	497	141.82	8017	660	124.67				6358	619	145.90
17-Mar-13	262	6862	1691	148.28	7372	2419	128.57				6152	2329	152.54
23-Mar-13	268	7312	2431	154.08	7416	3624	131.34				6470	3217	157.36
29-Mar-13	274	7720	4097	159.04	8018	5165	133.66				7143	4994	161.37
7-Apr-13	283	9518	7326	166.80	9833	8414	136.13				8797	7053	166.52
13-Apr-13	289	12523	10166	172.59	12594	11211	138.63				12038	8670	172.62
19-Apr-13	295	15677	11324	177.64	16221	12975	141.88				14275	10320	175.61
26-Apr-13	302	20574	9725	181.88	20412	14287	38.93				17132	10803	37.89
3-May-13	309	23935	5808	185.32	24100	14521	30.47				20413	9631	33.22
10-May-13	316	23629	4551	34.93	27670	13380	28.37				16477	9020	20.60
17-May-13	323	16210	6036	26.01	30325	12864	28.76				11103	8732	14.91
26-May-13	332	9981	9778	22.57	17904	10157	17.50				8817	6867	12.86
2-Jun-13	339	9289	7396	16.76	26814	3454	27.14				5763	5069	9.89
14-Jun-13	351	6135	4875	11.18	16284	1600	26.34				3936	2720	10.49
21-Jun-13	358	5590	3089	14.36	11501	7725	27.64				3058	1706	11.92
28-Jun-13	365	4210	1522	12.24	10454	10165	31.03				2336	1477	12.21
8-Jul-13	375	1962	978	13.31	11162	7534	21.93				1839	796	14.87
26-Jul-13	393				4817	4498	10.72						

Table S5. Apparent longevity of a honeybee colony in the 2013/2014 experiment at the eclosion rate of 0.9.

この表は、2013年から2014年にかけて実施した野外実験結果を用いて推定した図S9の見かけ寿命のデータソースを示しています。 $a(t)$ と $b(t)$ は、それぞれ2012年から2013年にかけて実施された野外実験で得られた成虫の数と、封蓋蜂児の数を示している(27)。 $L(t)$ は、以前に提案した数理モデル(1)によって $a(t)$ と $b(t)$ を使用して推定された見かけの寿命です。「CR-1」および「CR-2」は、農薬が投与されないダニのない対照コロニーを示します。「DF 0.2ppm/syrup」は、0.2ppmのネオニコチノイド系農薬のジノテフランを、糖液を介して投与するダニフリーコロニーを示す。「CN 0.08ppm/syrup」は、0.08ppmのネオニコチノイド系農薬のクロチアニジン、糖液を介して投与したダニフリーコロニーを示す。「FT 1ppm/syrup」は、1ppmの有機リン系農薬のフェニトロチオンを、糖液を介して投与するダニフリーコロニーを示します。「MT 1ppm/シロップ」は、1ppmの有機リン系農薬のマラチオンを、糖液を介して投与するダニフリーコロニーを示します。(注)農薬投与期間は、2013年9月5日の朝から12月1日(27)までです。

Date	Elapsed days	CR-1			DF 0.2 ppm/syrup			FT 1 ppm/syrup			MT 1 ppm/syrup			CN 0.08 ppm/syrup			CR-2		
		$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$
13-Aug-13	0	7579	4167	23.01	5447	4605	14.97	7360	5094	18.28	5500	4616	15.08	5628	5022	14.18	5953	4683	16.09
24-Aug-13	11	7000	3363	21.26	7556	323	20.76	9290	3758	23.08	6803	2414	18.65	6915	2208	17.43	6041	2146	16.32
1-Sep-13	19	7324	1825	23.77	6529	1219	25.07	10402	2671	27.90	8177	1054	26.11	7790	1025	23.95	5565	558	19.22
5-Sep-13	23	7487	2261	25.14	6017	2214	27.74	10296	3232	28.81	7676	1396	26.84	7293	1506	25.17	5549	578	21.56
15-Sep-13	33	6415	5462	27.73	5072	1743	30.73	5795	6040	22.27	5716	4992	29.32	5574	1825	28.67	4027	2665	26.86
21-Sep-13	39	6697	4683	27.08	5154	90	34.44	7431	3015	24.86	5698	3943	29.32	4001	843	28.20	3829	3198	29.13
27-Sep-13	45	5711	2538	13.68	3317	0	33.45	6920	1655	16.68	5617	2456	22.93	3885	208	30.74	3889	2882	29.88
4-Oct-13	52	5048	649	14.39	3145	0	41.41	5124	1456	17.33	4445	984	14.47	1882	160	19.35	3824	2142	16.20
13-Oct-13	61	4210	151	20.18	2029	0	31.82	4478	11	22.14	3459	0	18.90	1762	7	27.41	4322	113	20.63
27-Oct-13	75	3152	314	31.34	1325	0	41.98	3147	0	33.36	2328	0	30.19	1449	0	40.19	3371	0	29.89
15-Nov-13	94	2714	50	48.37	1146	0	60.17	2554	0	51.13	2050	0	47.95	1143	0	56.81	3181	0	48.19
1-Dec-13	110	2189	3	62.34	795	0	74.23	2213	0	66.43	1745	0	62.35	867	0	70.46	2904	0	63.18
5-Jan-14	145	1100	0	92.61	0	0	0.00	1714	0	100.39	916	0	92.97	0	0	0.00	2218	0	95.60
7-Feb-14	178	0	314	3.81				878	0	124.23	0	0	0.00				1799	0	127.15
28-Feb-14	199	0		0.00				0	0	0.00							1594	0	147.03

Table S6. Apparent longevity, $L(t)$, of a honeybee colony in the 2018 experiment at the eclosion rate of 0.9.

この表は、2018年に実施した野外実験結果を用いて推定した図 S10 の見かけ寿命のデータソースを示しています。 $a(t)$ と $b(t)$ は、それぞれ2012年から2013年にかけて実施された野外実験で得られた成虫の数と、封蓋蜂児の数を示している(28)。 $L(t)$ は、以前に提案した数理モデル(1)によって $a(t)$ と $b(t)$ を使用して推定された見かけの寿命です。「CR-1」、「CR-2」および「CR-3」は、殺虫剤が投与されていないダニが蔓延する対照コロニーを示します。「DF-1 0.4ppm/syrup」、「DF-2 0.4ppm/syrup」および「DF-3 0.4ppm/syrup」は、0.4 ppmのネオニコチノイド系農薬であるジノテフランを、花粉ペーストを介して投与するダニ寄生コロニーを示します。注：農薬投与期間は、2018年7月1日の朝からコロニーが絶滅するまでです(28)。

Date	Elapsed days	CR-1			CR-2			CR-3			DF-1 0.4ppm/pollen			DF-2 0.4ppm/pollen			DF-3 0.4ppm/pollen		
		$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$	$a(t)$	$b(t)$	$L(t)$
19-Jun-18	0	8613	5341	20.41	8343	3065	34.45	6987	6861	12.89	9010	5891	19.36	9067	3241	35.40	7079	7726	678.30
1-Jul-18	12	10507	11056	24.90	8439	9401	34.84	9830	8621	18.13	10188	9341	21.89	8926	12549	34.85	10071	5374	471.80
16-Jul-18	27	13064	10657	15.13	12402	7447	22.11	12016	8060	18.56	12070	8360	17.64	13726	8755	14.75	10491	8032	705.20
28-Jul-18	39	12439	5688	14.77	11658	7640	18.81	10037	7006	15.71	11239	5443	16.80	11252	5769	15.88	10301	9052	794.80
12-Aug-18	54	6977	3817	15.81	9812	4619	17.50	6965	4078	13.83	8437	2777	18.96	8588	4030	18.13	9213	4840	425.00
28-Aug-18	70	6284	4125	20.01	9902	6629	22.86	6583	5277	19.15	7609	466	28.70	7558	5690	21.16	5662	4504	395.50
11-Sep-18	84	7369	4755	22.65	8589	5050	16.87	8081	6262	19.30	4716	395	34.80	8742	5928	19.92	4204	2978	261.50
23-Sep-18	96	6427	4201	17.58	9102	5636	20.71	6891	6487	13.93	2370	200	36.12	8046	6559	17.31	1158	1266	111.20
6-Oct-18	109	3680	1490	11.73	8593	5982	19.96	6150	5015	12.22	964	105	35.94	7599	6091	14.92	41	1228	107.80
23-Oct-18	126	1187	658	12.87	6395	4200	15.02	3461	2773	10.97	309	70	28.98	4366	3113	11.52	0	1234	108.30
4-Nov-18	138	596	440	11.46	3373	1747	10.16	1332	1043	6.08	204	43	30.13	1957	1646	7.96	0	0	0.10
18-Nov-18	152	207	411	6.09	383	913	3.73	254	607	3.92	112	39	25.76	191	1147	2.07	0	0	0.00
2-Dec-18	166	56	460	1.54	0	989	0.00	0	691	0.00	0	72	0.00	0	1291	0.00	0	0	0.00
16-Dec-18	180	0	463	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00	0	0	0.00

Table S7. Number of mite-damaged bees and mite-prevalence in 2018 and 2011/2012 experiments

2018年(28)と2011/2012年(25)は、それぞれ野外実験を実施した年数です。**CR-1、CR-2、CR-3**は、それぞれ2018年の実験で農薬を投与しなかった対照コロニーを示す(28)。**DF-1、DF-2、DF-3**は、それぞれ2018年の実験で花粉ペーストを介して、0.4ppmのジノテフランを投与したコロニーを示す(28)。**DF**は、2011/2012年の実験で0.565ppmのジノテフランを、花粉ペーストを介して投与したコロニーを示す(25)。**Mites**と**Adults**は、それぞれダニの被害を受けたミツバチの数と成虫のミツバチの数を示します。**Mite-prev.**は、ダニの被害を受けたミツバチの数(**Mites**)を成虫のミツバチの数(**Adults**)で割って得られるダニの罹患率を示します。

なお、2018年の実験(28)のダニ被害を受けたミツバチの数(**Mites**)と成虫のミツバチの数(**Adults**)とダニの罹患率(**Mite-prev.**)と、2011/2012年の実験(25)の成虫の数(**Adults**)は既に報告されています。本研究では、2011/2012年の実験におけるダニ被害を受けたミツバチの数(**Mites**)とダニの有病率(**Mite-prev.**)を、約1ヶ月間隔で選択した観察日に撮影した写真画像(25)を用いて新たに測定した。

Date of observation	2018																		2011/2012		
	CR-1			CR-2			CR-3			DF-1			DF-2			DF-3			DF		
	Mites	Adults	Mite-prev.	Mites	Adults	Mite-prev.	Mites	Adults	Mite-prev.	Mites	Adults	Mite-prev.	Mites	Adults	Mite-prev.	Mites	Adults	Mite-prev.	Mites	Adults	Mite-prev.
19-Jun	1103	8613	0.1281	1577	8343	0.1890	1237	6987	0.1770	1281	9010	0.1422	1795	9067	0.1980	1940	7079	0.2741			
1-Jul	1190	10507	0.1133	1482	8439	0.1756	1986	9830	0.2020	1739	10188	0.1707	2603	8926	0.2916	2457	10071	0.2440			
9-Jul																			84	2158	0.0389
16-Jul	2263	13064	0.1732	2255	12402	0.1818	2670	12016	0.2222	2380	12070	0.1972	3532	13726	0.2573	3488	10491	0.3325			
28-Jul	3475	12439	0.2794	2401	11658	0.2060	3142	10037	0.3130	3351	11239	0.2982	3269	11252	0.2905	3881	10301	0.3768			
6-Aug																			112	4372	0.0256
12-Aug	1876	6977	0.2689	2620	9812	0.2670	2523	6965	0.3622	2689	8437	0.3187	3519	8588	0.4098	3819	9213	0.4145			
28-Aug	2636	6284	0.4195	3313	9902	0.3346	2442	6583	0.3710	2643	7609	0.3474	4008	7558	0.5303	2378	5662	0.4200			
10-Sep																			90	4620	0.0195
11-Sep	3507	7369	0.4759	4125	8589	0.4803	4438	8081	0.5492	3229	4716	0.6847	5988	8742	0.6850	3072	4204	0.7307			
23-Sep	4230	6427	0.6582	6531	9102	0.7175	5793	6891	0.8407	1985	2370	0.8376	6523	8046	0.8107	1002	1158	0.8653			
6-Oct	2903	3680	0.7889	7227	8593	0.8410	5408	6150	0.8793	815	964	0.8454	6919	7599	0.9105	39	41	0.9512			
7-Oct																			104	4232	0.0246
23-Oct	943	1187	0.7944	5575	6395	0.8718	2654	3461	0.7668	247	309	0.7994	3502	4366	0.8021	1	0	1.0000			
4-Nov	292	596	0.4899	2989	3373	0.8862	1240	1332	0.9309	198	204	0.9706	1766	1957	0.9024	0	0		111	3675	0.0302
18-Nov	118	207	0.5700	363	383	0.9478	245	254	0.9646	100	112	0.8929	172	191	0.9005	0	0				
2-Dec	52	56	0.9286	1	0	1.0000	1	0	1.0000	3	0	1.0000	1	0	1.0000	0	0				
3-Dec																			144	2992	0.0481
16-Dec	0	0	1.0000													0	0				

4 References and Notes

1. Y. Yamada, T. Yamada, K. Yamada, A mathematical model to estimate the seasonal change in apparent longevity of bee colony. *Sci. Rep.* **9**, 4102 (2019). [PubMed: 30858492]. DOI: 10.1038/s41598-019-40725-0. <https://www.nature.com/articles/s41598-019-40725-0>.
2. H. Fukuda, K. Sekiguchi, Seasonal change of the honeybee worker longevity in Sapporo, north japan, with notes on some factors affecting the life-span. *Jpn. J. Ecol.* **16**(5), 206–212 (1966). DOI https://doi.org/10.18960/seitai.16.5_206.
3. P. Schmid-Hempel, T. Wolf, Foraging Effort and Life Span of Workers in a Social Insect. *J. Anim. Ecol.* **57**(2), 509–521 (1988). DOI: 10.2307/4921. <https://doi.org/10.2307/4921>.
4. T. J. Wolf, P. Schmid-Hempel, Extra Loads and Foraging Life Span in Honeybee Workers. *J. Anim. Ecol.* **58**(3), 943–954 (1989). DOI: 10.2307/5134. <https://www.jstor.org/stable/5134>.
5. G. V. Amdam, O. Rueppell, M. K. Fondrk, R. E. Page, C. M. Nelson, The nurse's load: Early-life exposure to brood-rearing affects behavior and lifespan in honey bees (*Apis mellifera*). *Exp. gerontol.* **44**(6–7), 467–471 (2009). [PubMed: 19264121]. DOI: 10.1016/j.exger.2009.02.013. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2009.02.013>.
6. T. Yamada, K. Yamada, Comparison of long-term changes in size and longevity of bee colonies in mid-west-Japan and Maui with and without exposure to pesticide, cold winters, and mites. *PeerJ* **8**, e9505 (2020). [PubMed: 33194324]. DOI 10.7717/peerj.9505. <https://peerj.com/articles/9505/>.
7. H. Tarek, M. M. Hamiduzzaman, N. Morfin, E. Guzman-Novoa, Sub-lethal doses of neonicotinoid and carbamate insecticides reduce the lifespan and alter the expression of immune health and detoxification related genes of honey bees (*Apis mellifera*). *Genet. Mol. Res.* **17**(2), gmr16039908 (2018). DOI: 10.4238/gmr16039908. <https://www.geneticsmr.org/articles/sublethal-doses-of-neonicotinoid-and-carbamate-insecticides-reduce-the-lifespan-and-alter-the-expression-of-immune-health-and-deto-7583.html>.
8. N. L. Anderson, A. N. Harmon-Threatt, Chronic contact with realistic soil concentrations of imidacloprid affects the mass, immature development speed, and adult longevity of solitary bees. *Sci. Rep.* **9**, 3724 (2019). [PubMed: 30842465] DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40031-9>.
9. D. M. Aljedani, Detection of toxicity and effects of some insecticides to local honey bee race (*Apis mellifera jemenatica*). *J. Am. Sci.* **13**(3), 19–31 (2017). DOI:10.7537/marsjas130317.04. <http://www.jofamericanscience.org/>.
10. A. Brandt, K. Grikscheit, R. Siede, R., Grosse, M. D. Meixner, R. Büchler, Immunosuppression in Honeybee Queens by the Neonicotinoids Thiacloprid and Clothianidin. *Sci. Rep.* **7**, 4673 (2017). [PubMed: 28680118]. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-017-04734-1>.

11. M. C. Tackenberg, M. A. Giannoni-Guzmán, E. Sanchez-Perez, C. A., Doll, J. L. Agosto-Rivera, K. Broadie, D. Moore, D. G. McMahon, Neonicotinoids disrupt circadian rhythms and sleep in honey bees. *Sci. Rep.* **10**, 17929 (2020). [PubMed: 33087835]. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-72041-3>.
12. J. Shi, C. Liao, Z. Wang, Z. Zeng, X. Wu, Effects of sublethal acetamiprid doses on the lifespan and memory-related characteristics of honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie* **50**, 553–563 (2019).
DOI: <https://doi.org/10.1007/s13592-019-00669-w>.
13. N. Forfert, A. Troxler, G. Retschnig, L. Gauthier, L. Straub, R. F. A. Moritz, P. Neumann, G. R. Williams, Neonicotinoid pesticides can reduce honeybee colony genetic diversity. *PLoS ONE* **12**(10), e0186109 (2017). [PubMed: 29059234]. DOI: 10.1371/journal.pone.0186109. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0186109>.
14. Y.-C. Peng, E.-C. Yang, Sublethal Dosage of Imidacloprid Reduces the Microglomerular Density of Honey Bee Mushroom Bodies. *Sci. Rep.* **6**, 19298 (2016). [PubMed: 26757950]. DOI <https://doi.org/10.1038/srep19298>.
15. B. Dainat, J. D. Evans, Y. P. Chen, L. Gauthier, P. Neumann, Dead or Alive: Deformed Wing Virus and *Varroa destructor* Reduce the Life Span of Winter Honeybees. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**(4), 981–987 (2012). [PubMed: 22179240]. DOI: 10.1128/AEM.06537-11. <https://aem.asm.org/content/78/4/981>.
16. S. J. Martin, B. V. Ball, N. L. Carreck, The role of deformed wing virus in the initial collapse of varroa infested honey bee colonies in the UK. *J. Apic. Res.* **52**(5), 251–258 (2013). DOI: 10.3896/IBRA.1.52.5.12.
<https://doi.org/10.3896/IBRA.1.52.5.12>.
17. K. Khongphinitbunjong, P. Neumann, P. Chantawannakul, G. R. Williams, The ectoparasitic mite *Tropilaelaps mercedesae* reduces western honey bee, *Apis mellifera*, longevity and emergence weight, and promotes Deformed wing virus infections. *J. Invertebr. Pathol.* **137**, 38–42 (2016). [PubMed: 27126517]. DOI: 10.1016/j.jip.2016.04.006.
<https://doi.org/10.1016/j.jip.2016.04.006>.
18. M. Reyes-Quintana, L. G. Espinosa-Montaño, D. Prieto-Merlos, G. Koleoglu, T. Petukhova, A. Correa-Benítez, E. Guzman-Novo, Impact of *Varroa destructor* and deformed wing virus on emergence, cellular immunity, wing integrity and survivorship of Africanized honey bees in Mexico. *J. Invertebr. Pathol.* **164**, 43–48 (2019). [PubMed: 31034843]. DOI: 10.1016/j.jip.2019.04.009. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022201118303781>.
19. L. Straub, G. R. Williams, B. Vidondo, K. Khongphinitbunjong, G. Retschnig, A. Schneeberger, P. Chantawannakul, V. Dietemann, P. Neumann, Neonicotinoids and ectoparasitic mites synergistically impact honeybees. *Sci. Rep.* **9**, 8159 (2019). [PubMed: 31164662]. DOI: 10.1038/s41598-019-44207-1. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44207-1>.
20. C. Alaux, J. L. Brunet, C. Dussaubat, F. Mondet, S. Tchamitchan, M. Cousin, J. Brillard, A. Baldy, L. P. Belzunces, & Y. Le Conte, Interactions between *Nosema* microspores and a neonicotinoid weaken honeybees (*Apis mellifera*). *Environ. Microbiol.* **12**, 774e782 (2010). [PubMed: 20050872]. [http://refhub.elsevier.com/S0045-6535\(15\)30484-7/sref1](http://refhub.elsevier.com/S0045-6535(15)30484-7/sref1).

21. C. Vidau, M. Diogon, J. Aufauvre, R. Fontbonne, B. Viguès, J.-L. Brunet, C. Texier, D. G., Biron, N. Blot, H. E. Alaoui, L. P. Belzunces, F. Delbac, Exposure to Sublethal Doses of Fipronil and Thiacloprid Highly Increases Mortality of Honeybees Previously Infected by *Nosema ceranae*. *PLoS ONE* **6**(6), e21550 (2011). [PubMed: 21738706]. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021550>.
22. J. Aufauvre, D. G. Biron, C. Vidau, R. Fontbonne, M. Roudel, M. Diogon, B. Viguès, L. P. Belzunces, F. Delbac, N. Blot, Parasite-insecticide interactions: a case study of *Nosema ceranae* and fipronil synergy on honeybee. *Sci. Rep.* **2**, 326 (2012). [PubMed: 22442753]. DOI: 10.1038/srep00326. <https://doi.org/10.1038/srep00326>.
23. J. Aufauvre, B. Misme-Aucouturier, B. Vignes, C. Texier, F. Delbac, N. Blot, Transcriptome analyses of the honeybee response to *Nosema ceranae* and insecticides. *PLoS ONE* **9**(3), e91686 (2014). [PubMed: 24646894]. DOI: 10.1371/journal.pone.0091686. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0091686>.
24. A. Gregorc, E. C. M. Silva-Zacarin, S. M. Carvalho, D. Kramberger, E. W. Teixeira, O. Malaspina, Effects of *Nosema ceranae* and thiametoxam in *Apis mellifera*: A comparative study in Africanized and Carniolan honey bees. *Chemosphere* **147**, 328–336 (2016). [PubMed: 26774296]. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2015.12.030. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26774296/>.
25. T. Yamada, K. Yamada, Y. Yamada, A clear difference in the impact on honeybee (*Apis mellifera*) colony between the two vehicles of sugar syrup and pollen paste. *J. Biol. Ser.* **1**(5), 84–107 (2018). DOI 10.15413/jbs.2018.0400. <https://www.academiapublishing.org/journals/jbs/abstract/2018/Jul/Toshiro%20et%20al.htm>.
26. T. Yamada, Y. Yamada, K. Yamada, Difference between the impact of the neonicotinoid dinotefuran and organophosphate fenitrothion on a bee colony in a long-term field experiment: an evidence. *J. Biol. Ser.* **1**(3), 108–137 (2018). DOI 10.15413/jbs.2018.0401. <https://www.academiapublishing.org/journals/jbs/abstract/2018/Jul/Yamada%20et%20al.htm>.
27. T. Yamada, Y. Yamada, K. Yamada, Comparison of the influence of a pesticide at an environmentally realistic concentration level in Japan on a honeybee colony between neonicotinoids (dinotefuran, clothianidin) and organophosphates (fenitrothion, malathion). *J. Biol. Ser.* **1**(4), 187–207 (2018). DOI 10.15413/jbs.2018.0402. <https://www.academiapublishing.org/journals/jbs/abstract/2018/Oct/Yamada%20et%20al.htm>.
28. T. Yamada, Seasonal Changes in the Size and Mite-Prevalence of A Bee Colony Exposed to Dinotefuran via Pollen Paste and Damaged by *Varroa* Mites. *Enliven: J. Diet. Res. Nutr.* **7**(1), 002 (2020). <http://www.enlivenarchive.org/data/seasonal-changes-in-the-size-and-miteprevalence-of-a-bee-colony-exposed-to-dinotefuran-via-pollen-paste-and-damaged-by-varroa-mites-0.html>.
29. S. W. Omholt, Relationships between worker longevity and the intracolony population dynamics of the honeybee. *J. Theor. Biol.* **130**(3,7), 275–284 (1988). <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0022519388800304>.

30. A. S. Alqami, Influence of Some Protein Diets on the Longevity and Some Physiological Conditions of Honeybee *Apis mellifera* L. Workers. *J Biol Sci.* **6**(4), 734–737 (2006). DOI: 10.3923/jbs.2006.734.737.
<https://scialert.net/fulltext/?doi=jbs.2006.734.737>.
31. H. Wang, S.-W. Zhang, Z.-J. Zeng, W.-Y. Yan, Nutrition affects longevity and gene expression in honey bee (*Apis mellifera*) workers. *Apidologie.* **45**, 618–625 (2014). <https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs13592-014-0276-3>.
32. W. Yang, Y. Tian, M. Han, X. Miao, Longevity extension of worker honey bees (*Apis mellifera*) by royal jelly: optimal dose and active ingredient. *PeerJ* **5**, e3118 (2017). [PubMed: 28367370]. DOI <https://doi.org/10.7717/peerj.3118>.
33. T. Yamada, K. Yamada, N. Wada, Influence of dinotefuran & clothianidin on a bee colony. *Jpn. J. Clin. Ecol.* **21**(1), 10–23 (2012).
[http://www.bijensterfte.nl/sites/default/files/Influence%20of%20dinotefuran%20&%20clothianidin%20on%20a%20bee%20colony_Jpn%20J%20clin%20Ecol%20Vol21,%20No1,%2010-23\(2012\).pdf#search=%27Influence+of+dinotefuran+and+clothianidin+on+a+bee+colony.%27](http://www.bijensterfte.nl/sites/default/files/Influence%20of%20dinotefuran%20&%20clothianidin%20on%20a%20bee%20colony_Jpn%20J%20clin%20Ecol%20Vol21,%20No1,%2010-23(2012).pdf#search=%27Influence+of+dinotefuran+and+clothianidin+on+a+bee+colony.%27)
34. D. Sammataro, U. Gerson, G. Needham, Parasitic Mites of Honey Bees: Life History, Implications, and Impact. *Annu. Rev. Entomol.* **45**, 519–548 (2000). [PubMed: 10761588]. DOI: 10.1146/annurev.ento.45.1.519.
<https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.519>.
35. E.-C. Yang, H.-C. Chang, W.-Y. Wu, Y.-W. Chen, Impaired Olfactory Associative Behavior of Honeybee Workers Due to Contamination of Imidacloprid in the Larval Stage. *PLoS ONE* **7**(11), e49472 (2012). [PubMed: 23166680]. doi:10.1371/journal.pone.0049472. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049472>.
- .
36. C. Solanki, P. Thapliyal, K. Tomar, Role of Bisection Method. *IJCATR.* **3**(8), 533–535 (2014).
<http://ijcat.com/archives/volume3/issue8/ijcatr03081009.pdf#search=%27NUMERICAL+METHODS+WITH+APPLICATIONS+bisection%27>. *IJCATR: International Journal of Computer Applications Technology and Research*.
37. I. Nagata, T. Yamada, On the parameter-seeking method of local composition equations. *J. Chem. Eng. Jpn.* **6**(3), 215–219 (1973). https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcej1968/6/3/6_3_215/article/-char/ja/.
38. D. Flanagan, Y. Matsumoto, The Ruby Programming Language (Japanese version translated by Takahiro Nagao under a supervisor of Shohei Urabe), issued the 8th printing of the first edition; O'Reilly Japan Publisher (Selling agency: Ohmsha, Tokyo), Tokyo, July 5, 2016.
https://books.google.co.jp/books?hl=ja&lr=lang_ja&lang_en&id=jcUbTcr5XWwC&oi=fnd&pg=PR5&dq=Ruby+Programming+Language&ots=fLBht9bucG&sig=fJuPX7bnJv5MoBDzwAtH2JLpV-A#v=onepage&q=Ruby%20Programming%20Language&f=false.

39. J.P. Strange, W.S. Sheppard, Optimum Timing of Miticide Applications for Control of *Varroa destructor* (Acari:Varroidae) in *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) in Washington State, USA. *J. Econ. Entomol.* **94**(6): 1324–1331 (2001). [PubMed: 11777032]. doi: 10.1603/0022-0493-94.6.1324. <https://doi.org/10.1603/0022-0493-94.6.1324>.
40. P.A. Macedo, J. Wu, M.D. Ellis, Using inert dusts to detect and assess varroa infestations in honey bee colonies. *J. Apicult. Res.* **41**(1–2), 3–7 (2002). <https://doi.org/10.1080/00218839.2002.11101062>.
41. V.M. Barlow, R.D. Fell, Sampling Methods for *Varroa* Mites on the Domesticated Honeybee. *Virginia Cooperative Extension (VCE)*. 444–103 (2006). <https://vtechworks.lib.vt.edu/handle/10919/50392>.