

令和元年6月21日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14969

研究課題名(和文) バイオセンサによる魚類のユーストレス/ディストレスの解明：魚に良いストレスとは？

研究課題名(英文) Exploration of fish eustress / distress using wireless biosensor system

研究代表者

遠藤 英明 (Hideaki, Endo)

東京海洋大学・学術研究院・教授

研究者番号：50242326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：魚類のためのストレス応答測定用バイオセンサを用いて、魚にとって有益なストレス(ユーストレス)と有害なストレス(ディストレス)の関連性を解明することを目的とした。まず、本目的に適したバイオセンサを作製した。次に、供試魚(ナイルティラピア)を異なった波長の光(白、青、赤、緑)で飼育し、それらのストレスからの回復履歴を観察したところ、緑色の波長がその回復に効果がある傾向があった。また、水槽内面壁の色(青、赤、緑)を変化させ、同様に回復履歴を観察したところ、赤色で飼育した個体にやや効果が認められた。これらの結果が魚のユーストレスに結びつく可能性も示唆されたが、各個体における応答差も確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、これまで未知のテーマであった魚類におけるユーストレス/ディストレスの存在について、バイオセンサを用いることによりその解明を試みた。この手法の特色は、従来のバイオリギングや採血を伴う測定法では解明することが困難であった「魚を泳がせながらストレス応答をリアルタイムにモニタリングできる」という点である。本研究の遂行により、魚類のユーストレスの存在に関する学術的解明においての手がかりが得られたものと考えている。これらの成果は、魚類行動学、魚類生理学、水産化学、比較生理生化学等の分野に対して、横断的発展のための新知見を提供できる可能性があり、その意義は極めて大きいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We aimed to clarify the relationship between beneficial stress (eustress) and harmful stress (distress) in fish using a biosensor system to evaluate the stress response. We first developed a biosensor system suitable for our purposes. Next, the test fish (Nile tilapia) were bred with lights of different wavelengths (white, blue, red, or green), and recovery from stress was monitored over time. Breeding under green wavelengths tended to be most effective for recovery. Also, we examined the effect of the color of the inner wall of the fish tank (blue, red, or green) on recovery from stress. The pattern of recovery was also monitored which similar to that under different wavelengths. The red inner wall showed relatively effective for recovery from stress in the test fish compared to the rest color. These findings may be associated with eustress, but differences in the response among individuals were also observed.

研究分野：生物機能利用学

キーワード：バイオセンサ 魚類 ストレス ユーストレス ディストレス グルコース

### 1. 研究開始当初の背景

臨床医学分野におけるヒトのストレスは、これまで精神的疲労の原因として定義づけられてきたが、近年になって身体にポジティブなストレス、すなわちユーストレスの存在があることが注目されている。一般に、ヒトにおいては負荷されたストレスを自身の心の中で、プラスの方向にもマイナスの方向にもとることができ、ストレスに対する反応をポジティブに捉えると有益なユーストレスとなり、ネガティブに捉えると有害なディストレスとなるといわれている。また最近では、ラットなどの動物において、ユーストレスの存在とその効果に関する報告がされている。一方、魚類においてはこのような研究例は皆無であり、そもそも魚に感情や痛みがあるのかということ自体、またその定義も含めて未だに明確な結論が得られていないのが現状である。

一方、我々は、魚を捕獲することなく自由に遊泳させた状態で、魚のストレス応答の指標となる血中グルコースの濃度変化をリアルタイムにモニタリングできるバイオセンサシステムを開発してきた。このシステムは、魚体内に留置可能なグルコース測定用バイオセンサを、微小電極と固定化酵素を用いて構築し、魚を自由に遊泳させた状態で血中グルコース濃度を陸上からリアルタイムにモニタリングできる。バイオセンサは、白金-イリジウム線と銀塩化銀ペーストから構成される微小電極をベースとし、電極検出部には分子識別素子として酵素[グルコースオキシダーゼ(GOx)]が固定化されている。このGOxと基質となるグルコースが酵素反応した際に生じる過酸化水素濃度の変化量を信号変換素子となる電極にて測定することにより、グルコース濃度を求めることができる。

そこで本システムを用いることにより、各種ストレスに起因する「魚の真のストレス応答」をモニタリングし、得られた結果と魚の評価指標を解析することにより、魚にとって「良い意味での環境ストレス」を明らかにすることができないかと考えた。これまで魚類に各種ストレスを負荷し、その成長に及ぼす影響について調べた研究は散見された。しかしながら従来の研究では、ストレス応答を測定する際に魚の捕獲、採血と血漿分離、そして吸光度分析法による成分の測定など煩雑な操作と時間を必要としていた。水中を生活の場としている魚類にとって、網で捕獲され、空気中に暴露されながら採血されることは既に多くのストレスを受けた状態といえ、加えて実験者のサンプリングのテクニックもストレスの指標物質の分析に影響を与える。このため得られた応答値が、実験目的のために負荷されたストレスのみに由来する値とは言い難かった。一方、我々が開発してきたバイオセンサは、魚体内に留置可能なシステムであり、魚を遊泳させた状態で血中グルコース濃度をリアルタイムモニタリングできる。したがって、そのストレス応答を測定すれば、ストレスから生じる真のストレス応答を知ることができ、「魚類にとってのユーストレス/ディストレスの解明」の手がかりが得られると考えた。

### 2. 研究の目的

本研究は、これまで未知のテーマであった魚類におけるユーストレス/ディストレスの存在の解明を試みることを目的とした。すなわち、魚に各種ストレスを負荷し、それらのストレスが魚にとってユーストレスまたはディストレスの何れに成り得るのかについて、ストレスパラメータの回復履歴に関するモニタリング結果を考察することにより、魚にとってのユーストレスを探求した。

まず、これまで開発してきた魚類のためのストレス応答測定用バイオセンサを、本研究の目的に適した特性になるように更に改良した新規のセンサシステムを製作した。次に、魚に各種ストレス(飼育水塩分濃度、照射光波長、水槽内壁色)を与えてその環境に馴致させた後、魚が死に至らない程度の強いストレスを負荷し、それに対するストレス応答とその回復履歴をバイオセンサでリアルタイムモニタリングすることにより、与えられたストレスがユーストレスになるのかについて考察した。

### 3. 研究の方法

本研究では以下の方法に従って実験を遂行した。試料魚はニルティラピア *Oreochromis niloticus* を用いた。

### 3.1 ストレス応答測定用バイオセンサの製作

これまで我々が開発してきたバイオセンサは、電極への酵素の固定化方法に物理吸着及び架橋反応を用いていたことから、電極表面上に酵素が均一に固定化されにくいと、基質に対する酵素活性が不安定になることがしばしばあり、本研究を遂行してゆく上で解決しなければならない課題であった。そこで、分子が自発的に集合して規則的な配列を形成できる自己組織化単分子膜 (SAM) の性質に着目し、SAM を介して酵素を固定化することにより、センサの応答性を向上させることを試みた。まず、白金イリジウムを作用極、銀塩化銀を対極とする微小電極 ( $\phi 1 \times 4 \text{ mm}$ ) を作製し、作用極に SAM を形成させた後、GOx を固定化することにより、新規バイオセンサ (SAM/GOx 型バイオセンサ) を製作した。次に、このセンサをリン酸緩衝

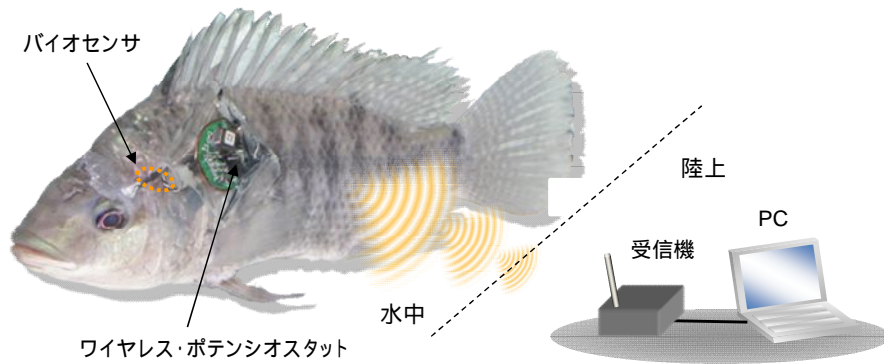


図1 ストレス応答測定用バイオセンサ

液 (0.1 M, pH 7.8) 中に浸漬した後、グルコース標準液を滴下し、センサの出力電流値とグルコース濃度との関係を調べた。さらに、魚 (ティラピア) の眼球外膜近傍の間質液 (EISF) 中にセンサを留置し、そのストレス応答モニタリングを試み、センサの特性を検証した (図 1)。

### 3.2 各種ストレスによるユーストレス/ディストレスの解明

#### 3.2.1 飼育水の塩分濃度の影響

飼育水の塩分濃度を 0%, 0.1%, 0.5% に調製し、これらに供試魚を入れ、環境に順化させるため 3 日間飼育した。また、測定時に供試魚が絶食状態となるように給餌を 48 時間以上停止した。その後、魚体にセンサを装着し、その出力電流値が安定するまで一晩以上静置した。次に、たも網を用いて魚を捕獲し、空気中への曝露を行うことにより、魚に強いストレスを負荷し、その後のストレス応答の回復履歴を経時的にモニタリングした。

#### 3.2.2 光波長の影響

波長の異なる LED ライト (白, 青, 赤, 緑) を水槽に装着し、各々の波長の条件下で供試魚に光を照射 (12 時間 / 日) し、3 日間馴致させた。その際、水面の光量子束密度は  $16 \pm 1.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  に統一した。また、測定時に供試魚が絶食状態となるように給餌を 48 時間以上停止した。その後、魚体にセンサを装着し、その出力電流値が安定するまで一晩以上静置した。次に、たも網を用いて魚を捕獲し、空気中への曝露を行うことにより、魚に強いストレスを負荷し、その後のストレス応答の回復履歴を経時的にモニタリングした。

#### 3.2.3 水槽内壁色の影響

着色されたプラスチック板を用いて異なる内壁の色 (赤, 青, 緑) の水槽を製作した。これらの条件下で供試魚を 2 日間遊泳させて馴致させた。また、測定時に供試魚が絶食状態となるように給餌を 48 時間以上停止した。その後、魚体にセンサを装着し、その出力電流値が安定するまで一晩以上静置した。次に、アンモニア濃度が  $20 \text{ mg L}^{-1}$  の飼育水が含まれる水槽に供試魚を移動し、50 分間遊泳させることにより強いストレスを負荷し、再び元の水槽内に戻してストレス応答の回復履歴を経時的にモニタリングした。

## 4. 研究成果

### 4.1 SAM/GOx センサの特性

リン酸緩衝液 (0.1 M, pH 7.8) 中にバイオセンサを浸漬し、グルコース標準液を一定量添加した際の検量線を図 2 (a)に示す。この図より、センサの出力電流値はグルコース濃度 0 ~ 3500 mg dl<sup>-1</sup> の範囲内において良い相関関係 ( $y = 13.67 + 0.0046x$ ,  $R = 0.9995$ ) が認められる。一方、図 2 (b) は SAM を用いていない従来のバイオセンサにおけるグルコースの検量線を示す。この図から認められるように、本センサはグルコース濃度が 50 mg dl<sup>-1</sup> 付近からセンサの検量線の傾きが減少する傾向があった。これに対して、今回考案した SAM/GOx センサは、0 ~ 3500 mg dl<sup>-1</sup> の範囲で安定した応答を得ることができた。これは、SAM を用いることで GOx を電極面上に均一に固定化することが実現でき、効率的な酵素反応が実現できたためと考えられる。一般に、テラピアの平常時の血糖値は 50 mg dl<sup>-1</sup> 前後、ストレス負荷時の血糖値は 150 mg dl<sup>-1</sup> 前後であることから、本センサは供試魚の血糖値測定に十分対応できると考えられる。実際に、本センサを魚の EISF 中に留置して、遊泳させた状態でグルコース濃度のモニタリングを行ったところ、その測定が十分可能であった。

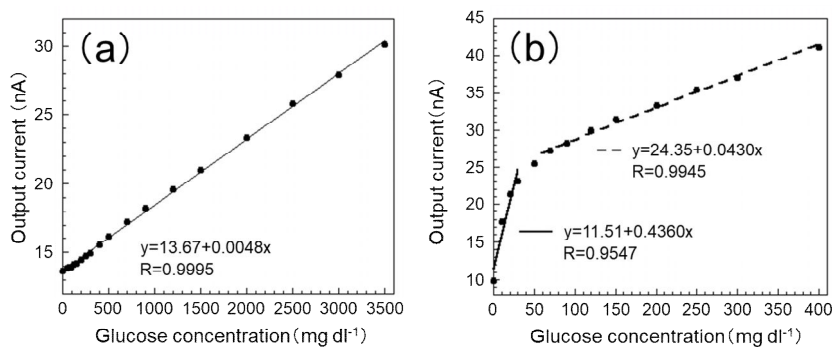


図 2 SAM/GOx センサの検量線

### 4.2 各種ストレスによるユーストレス/ディストレスの解明

#### 4.2.1 塩分濃度の影響

魚類は鰓を介して周囲のイオンや水が受動的に移動するため、陸上の生物とは異なる浸透圧調整能力を持っている。本研究では、魚を異なる塩分濃度 (0.1, 0.5%) で一定時間飼育した後、魚を空气中へ曝露することにより強いストレスを負荷し、これら供試魚におけるストレスからの回復履歴を観察した。

その結果、いずれの条件においてもストレス負荷後に血糖値の上昇は認められたが、淡水飼育 (0%) と比較して 0.1, 0.5 % の飼育条件においても優位なストレス回復は認められなかった。したがって、塩分濃度変化によるストレスは、魚類のストレス回復に対してユーストレスとなる可能性は低いものと推察される。しかしながら、本研究に用いたニルテラピアは広塩性の淡水魚であることが知られており、広塩性を示さないような魚種においては、本実験とは異なる結果を示すことも予測される。

#### 4.2.2 照射光の色の影響

近年、魚類の網膜上にある錐体細胞の分布から、魚類の色に対する認識に関する研究が進んでいる。魚類の視環境については、青、緑、近赤外線の色として認識できることが明らかにされている。それに伴い、環境中の色が魚の成長や生殖、攻撃性、ストレス応答に影響を及ぼすことも明らかにされてきた。したがって、飼育環境の「色」が成長率や繁殖率に影響を及ぼすと考えられる。そこで、魚を異なった波長の光照射下で飼育し、その環境に馴致させた後、魚に強いストレスを負荷し、バイオセンサシステムを用いてストレス応答の回復履歴をモニタリングした。

その結果、白・青・赤・緑の全ての波長の条件下において、いずれの条件においてもストレス負荷後に血糖値の上昇が認められた。次に、各条件下における回復履歴を比較したところ、緑色 LED の照射下で飼育した個体が他の個体に比べて、ストレスからの回復が早い傾向が認

められた。一方、白色 LED 照射下では、ストレス負荷後からの回復が他の色に比べて遅い傾向が見受けられた。通常の水産養殖現場では、白色の光を用いて魚を飼育することが一般的であるが、本研究の結果から、他の波長光を用いた方が魚にとってのユーストレスとなりうる可能性が示唆された。したがって、将来的には飼育環境における光の波長を改善することにより、生産性の向上に資することが期待できる。

#### 4.2.3 水槽内壁の色の影響

近年、トラフグの稚魚において、飼育水槽内壁の色が白色よりも黒色の方が成長に良い影響を与えるという報告や、ナイルティラピアについても、群れの中で大きな個体ほど黄色の環境を好むという研究例が報告されている。そこで本研究では、水槽内壁の色を青、赤、緑に各々設定し、その中で魚を環境に馴致させた後、強いストレスを負荷し、バイオセンを用いてストレス応答の回復履歴をモニタリングした。

その結果、いずれの色の水槽においても、アンモニア曝露によるストレス応答の上昇が確認された。なかでも赤色の内壁の水槽では、他の色と比較してその上昇が大きいことが観察された。また、赤色内壁の個体の回復については、他の色に比べてやや速い傾向が観察された。

以上のように、色による環境の変化が、魚にとってのユーストレスに関係する可能性が示唆された。今後は同様の実験を繰り返し行い、測定データを蓄積することにより、それらを詳細に解析する必要があると考えている。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計 3 件)

H. Wu, Y. Fujii, T. Nakano, T. Arimoto, M. Murata, H. Matsumoto, Y. Yoshiura, H. Ohnuki, H. Endo: Development of novel enhanced biosensor system for real-time monitoring of fish stress using a self-assembled monolayer. *Sensors* 19(7), in press (2019) 査読有 DOI: 10.3390/s19071518

H. Endo and H. Wu: Biosensors for the assessment of fish health: a review. *Fisheries Science*, in press (2019) 査読有 DOI: 10.1007/s12562-019-01318-y

T. Nakano, H. Wu, T. Arimoto, H. Endo, T. Yamaguchi, Y. Ochiai: Some artificially applied stressors have a positive effect on fish fitness, *Proceedings of The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium (ID 06010)* (2017)

### 〔学会発表〕(計 6 件)

山本航大・呉 海雲・有元貴文・中野俊樹・村田政隆・松本陽斗・遠藤英明：バイオセンサを用いた魚類のユーストレスの探求～水槽内面の色が及ぼす影響～：平成 31 年度日本水産学会春季大会 東京海洋大学 2019 年 3 月

H. Takahashi, M. Nakayama, H. Wu, T. Arimoto, T. Nakano, H. Endo: Exploration of fish eustress using wireless biosensor system. *International Symposium "Fisheries Science for Future Generations"*, Tokyo, Japan, September 22-24, 2017 (Best Student Presentation Awards を受賞)

T. Nakano, H. Wu, T. Arimoto, H. Endo, T. Yamaguchi, Y. Ochiai: Some artificially applied stressors have a positive effect on fish fitness. *The JSFS 85th Anniversary-Commemorative International Symposium*, Tokyo University of Marine Science and Technology, Tokyo, September 22-24, 2017

Y. Fujii, K. Yamada, H. Wu, H. Ohnuki, M. Murata, K. Hibi, H. Endo: Development of novel glucose biosensor for fish using self-assembled monolayer. *International Symposium "Fisheries Science for Future Generations"*, Tokyo, Japan, September 22-24, 2017

H. Wu, Y. Fujii, H. Ohnuki, M. Murata, H. Endo: Development of novel biosensor system for fish stress monitoring using self-assembled monolayer. *BBMEC 12*, Rome, Italy, September 25-29, 2017

自己組織化単分子膜を用いた魚類のためのグルコース測定用バイオセンサの試作に関する研究：藤井柚，山田和輝，呉海雲，大貫等，日比香子，遠藤英明：平成 29 年度日本水産学会春季大会 東京海洋大学 2017 年 3 月 27 日

〔その他〕

ホームページ等

■遠藤英明研究室（東京海洋大学）

<http://www2.kaiyodai.ac.jp/~endo/endo/index.html>

■researchmap

<https://researchmap.jp/read0008605>

■Web of Science ResearcherID

<https://publons.com/researcher/2465419/hideaki-endo/>

■東京海洋大学研究者総覧データベース

<http://olcr.kaiyodai.ac.jp/kenkyusha-db/>

## 6 . 研究組織

研究協力者氏名：有元貴文

ローマ字氏名：Takafumi Arimoto

所属研究機関名：東京海洋大学

部局名：学術研究院

職名：名誉教授

研究者番号：20106751

研究協力者氏名：中野俊樹

ローマ字氏名：Toshiki Nakano

所属研究機関名：東北大学大学院

部局名：農学研究科

職名：助教

研究者番号：10217797