

令和元年5月27日現在

機関番号：33931

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K17366

研究課題名（和文）ゼブラフィッシュを対象とした行動の再出現における嫌悪刺激の抑制効果

研究課題名（英文）Suppressive effects of aversive stimuli on the relapse of behavior in zebrafish

研究代表者

黒田 敏数 (Kuroda, Toshikazu)

愛知文教大学・人文学部・講師

研究者番号：80712968

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、生命科学で注目を集めるゼブラフィッシュを対象に、消去された行動の再出現についての実験を行った。まず、行動の再出現がゼブラフィッシュでも再現できることを確認した。次に、ゼブラフィッシュを対象に、嫌悪刺激として機能する刺激を特定できた。最後に、嫌悪刺激によって行動の再出現を抑制できるかどうかの実験を行った。標的となる行動の獲得時、または消去時に嫌悪刺激を提示したが、いずれのケースでも抑制効果を示唆するような結果は得られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

一度獲得した行動は、それがしばらくの間起こらなくなった後でも、再び出現することがある。これを「行動の再出現」と呼び、犯罪者の刑期後の再犯や、薬物依存といった社会的に望ましくない行動のモデルにもなっている。行動の再出現に対し、抑制効果が期待できるものとして、逮捕など苦い経験がある。しかし、動物を対象とした本研究では、そういった苦い経験に抑制効果はない、あるいは乏しいことを示唆する結果が得られた。これは再犯率の高さにも関係するものと考えられ、別の対策が必要であることを示唆している。

研究成果の概要（英文）：This experiment investigated relapse phenomena of previously reinforced and extinguished behavior using zebrafish (*Danio rerio*), which have been a popular animal model in life science. The relapse phenomena, which have been reported with other species, were replicated with the fish. Next I identified a couple different stimuli that function as an aversive stimulus for zebrafish. Lastly, I examined whether the aversive stimulus would reduce the likelihood of the relapse. The stimulus was presented to a target response during a response-acquisition phase or during an extinction phase. However, the stimulus did not reduce the relapse in either case.

研究分野：行動分析学

キーワード：ゼブラフィッシュ 行動の再出現 嫌悪刺激 弱化 強化 オペラント条件づけ

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) オペラント条件づけの強化により学習した行動は、強化刺激を取り除き消去しても、環境変化によって再出現することがハト、ラット、ヒトなどで報告されている。これは、犯罪や薬物依存といった社会的に望ましくない行動の「再出現」のモデルとなっており、どのように再出現を抑制するかが課題となっている。

(2) 一方、生命科学研究では、ゼブラフィッシュの研究が増えている。ゼブラフィッシュは遺伝子配列が解析済みの動物モデルで、生命科学とオペラント条件づけ研究の橋渡しとなることが期待されている。

### 2. 研究の目的

(1) ゼブラフィッシュを対象に、消去した行動の再出現の再現が可能かどうかを検討する。

(2) ゼブラフィッシュにおける嫌悪刺激を明らかにする。

(3) 嫌悪刺激を用いて、行動の再出現を抑制できるかどうかを調査する。

### 3. 研究の方法

行動の再出現は、その引き金となる環境変化のタイプによって幾つかに分類されるが、いずれの実験手続きも3つのフェーズで構成される。Renewal と呼ばれるタイプでは、フェーズ1で特定の場所(文脈A)で標的行動を強化し、フェーズ2で別の場所(文脈B)で消去する。フェーズ3で文脈Aに戻ることを引き金に、標的反応が再出現する。Resurgence と呼ばれるタイプでは、フェーズ1で標的行動を強化し、フェーズ2で標的行動を消去しながら別の行動(代替行動)を強化する。フェーズ3で代替行動への強化を止めることを引き金に、標的行動の再出現が起こる。

#### <実験1> ゼブラフィッシュを対象とした Renewal の再現

フェーズ1: 水槽の側面を白色のボードで囲み、標的行動(センサーへの接近行動)に対しエビの卵を提示して強化。フェーズ2: ボードの色を黒に変えて、標的行動を消去。フェーズ3: ボードの色を白に戻す。個体間で、ボードの白黒をカウンターバランスした。

#### <実験2> ゼブラフィッシュを対象とした Resurgence の再現

フェーズ1: 標的行動(左センサーへの接近行動)を強化。フェーズ2: 標的行動を消去すると同時に、代替行動(右センサーへの接近行動)を強化。フェーズ3: 代替行動を消去。個体間で、左右のセンサーをカウンターバランスした。

#### <実験3> ゼブラフィッシュにおける嫌悪刺激の調査

標的行動(センサーへの接近行動)を強化した後、それに対して嫌悪刺激と考えられる刺激を時折提示。刺激にはゼブラフィッシュの捕食者である Indian leaf fish (*Nandus nandus*)の動画と、安全が確認された低電圧・低電流の電撃を用いた。

#### <実験4> Renewal 手続きのフェーズ1での嫌悪刺激提示による再出現抑制効果の調査

フェーズ1: 水槽の側面を白色のボードで囲み、標的行動を強化。標的行動に対して時折、電撃を提示。フェーズ2: ボードの色を黒に変えて、標的行動を消去。フェーズ3: ボードの色を白に戻す。

#### <実験5> Renewal 手続きのフェーズ2での嫌悪刺激提示による再出現抑制効果の調査

フェーズ1: 水槽の側面を白色のボードで囲み、標的行動を強化。フェーズ2: ボードの色を黒に変えて、標的行動を消去。標的行動に対して時折、電撃を提示。フェーズ3: ボードの色を白に戻す。

#### <実験6> Resurgence 手続きのフェーズ1での嫌悪刺激提示による再出現抑制効果の調査

フェーズ1: 標的行動(左センサーへの接近行動)を強化。標的行動に対して時折、電撃を

提示。フェーズ2：標的行動を消去しながら、代替行動（右センサーへの接近行動）を強化。  
 フェーズ3：代替行動を消去。

<実験7> Resurgence 手続きのフェーズ1での嫌悪刺激提示による再出現抑制効果の調査  
 フェーズ1：標的行動（左センサーへの接近行動）を強化。フェーズ2：標的行動を消去しながら、代替行動（右センサーへの接近行動）を強化。標的行動に対して時折、電撃を提示。  
 フェーズ3：代替行動を消去。

#### 4. 研究成果

##### (1) 実験1・2

図1が示すように、Renewal（左側）と Resurgence（右側）いずれの手続きでも、フェーズ2の最後のセッションと比べ、フェーズ3での標的反応が高まった。また、標的反応とは別の、強化履歴のない統制反応では、フェーズ2からフェーズ3への移行の際に、顕著な変動は観られなかった。以上の結果から、Renewal と Resurgence をゼブラフィッシュで再現できることを確認した。（下記「5. 主な発表論文等」欄の、 の論文として発表。）

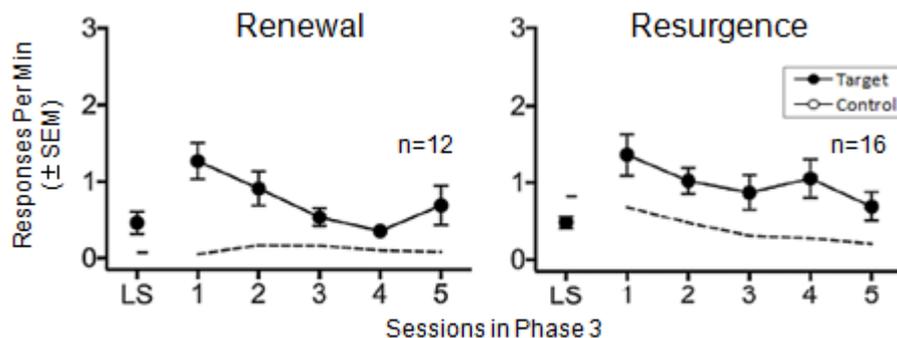


図1 実験1および実験2での、フェーズ2の最終セッション(LS)とフェーズ3の各セッションにおける反応率。実線は標的反応、破線は統制反応を示す。

##### (2) 実験3

捕食者動画を用いた手続きでは、図2（左側）が示すように、動画提示のコンディション（Punishment）で標的行動が低下した。しかし、このコンディションの途中で、標的行動が元に戻り始める個体もいたことから、馴化が起きたと示唆される。電撃を用いた手続きでも、図2（右側）が示すように、電撃提示のコンディションで標的行動が低下した。捕食者動画とは異なり、馴化が起こらず、また電撃提示を停止した後でも、標的行動が低下したままの個体もいた。以上の結果から、捕食者動画と電撃の両方が嫌悪刺激として機能することが明らかになった。電撃は馴化が起きにくいという理由から、これ以降の実験では嫌悪刺激に電撃を使うことにした。（下記「5. 主な発表論文等」欄の の論文として発表。）

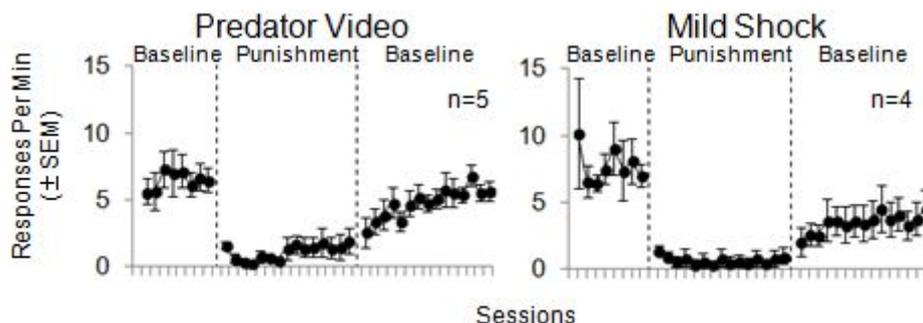


図2 実験3での各セッションにおける反応率。

##### (3) 実験4・5

Renewal における嫌悪刺激の再出現抑制効果を検討した実験では、フェーズ1（図3左側）またはフェーズ2（図3右側）で嫌悪刺激を提示したいずれの場合でも、嫌悪刺激なしの場合と比べ、Renewal の度合いに顕著な差は現在までに確認されていない。

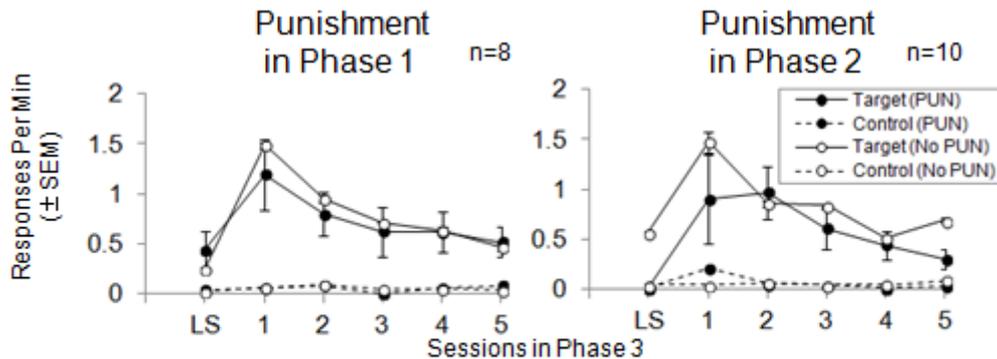


図3 実験4(左側)および実験5(右側)での、フェーズ2の最終セッション(LS)とフェーズ3の各セッションにおける反応率。実線は標的反応、破線は統制反応を示す。黒丸は嫌悪刺激あり、白丸は嫌悪刺激なしを示す。

#### (4) 実験6・7

Resurgence における嫌悪刺激の再出現抑制効果を検討した実験では、フェーズ1（図4左側）またはフェーズ2（図4右側）で、標的反応に対し嫌悪刺激を提示したいずれの場合でも、嫌悪刺激なしの場合と比べ、Resurgence の度合いに顕著な差は現在までに確認されていない。実験6は個体数を増やし、現在も進行中である。

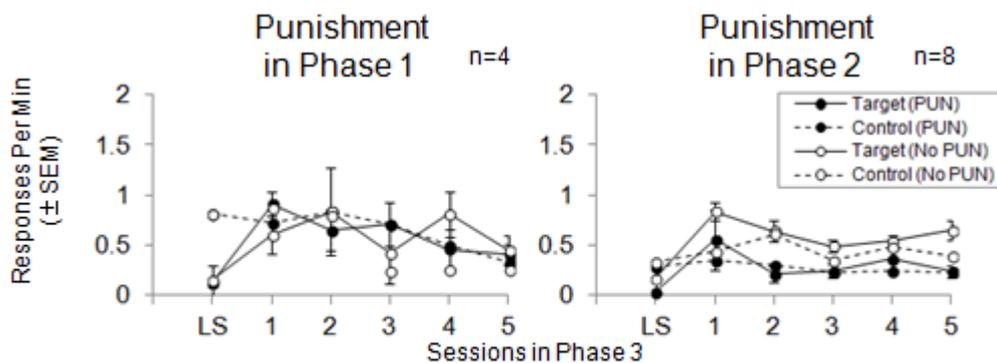


図4 実験6(左側)および実験7(右側)での、フェーズ2の最終セッション(LS)とフェーズ3の各セッションにおける反応率。実線は標的反応、破線は統制反応を示す。黒丸は嫌悪刺激あり、白丸は嫌悪刺激なしを示す。

#### (5) まとめ

以上の実験結果から、Renewal と Resurgence がゼブラフィッシュで起きることを確認した。また、捕食者動画や電撃が嫌悪刺激として機能することも確認した。しかし、嫌悪刺激に再出現抑制効果があるかについて、「ある」ということを示唆する結果は、現在までに得られていない。実際に抑制効果がないのか、それとも実験手続きが最適でなかったのかは不明である。この課題は、嫌悪刺激提示の期間を延ばすなどして明らかにしていきたい。(嫌悪刺激提示期間は、実験4～7いずれも5セッションであった。)

#### (6) 補足実験

申請した上記の実験の他に、それを補足する実験も実施したことから、これも併せて報告する。

< 遅延強化による反応獲得の実験 >

標的反応が起きてから、餌（強化刺激）を提示するまでに必ず遅延が発生する。どの程度の遅延まで強化が起こるかを実験的に検討したところ、3秒程度の遅延ならば強化が起きることを確認した。（下記「5. 主な発表論文等」欄の論文として発表。）

< 実験装置のIoT化 >

オペラント条件づけ研究では、個体の行動を長期に渡り測定する必要があることから、実験者の負担を軽減する目的で、スマートフォンなどの端末からインターネット経由で実験装置を操作できる安価なシステムを構築した。（下記「5. 主な発表論文等」欄の論文として発表。）

< 3Dトラッキングシステムの構築 >

一般的にオペラント条件づけ研究では、標的反応といった予め指定した行動以外を測定することはない。しかし、行動の再出現に関する理論では、予め指定していない行動についても言及することがある。そこで、個体の動きをリアルタイムで追跡し、それをオペラント条件づけの対象にできる、3Dトラッキングシステムを構築した。（下記「5. 主な発表論文等」欄の論文として発表。）

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Toshikazu Kuroda, Yuto Mizutani, Carlos R. X. Cançado, Christopher A. Podlesnik, Predator videos and electric shock function as punishers for zebrafish (*Danio rerio*), *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 査読有、Vol. 111、2019、116-129  
doi: 10.1002/jeab.494.

Toshikazu Kuroda, A system for the real-time tracking of operant behavior as an application of 3D camera. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 査読有、Vol. 110、2018、522-544  
doi: 10.1002/jeab.471

Toshikazu Kuroda, Yuto Mizutani. Response acquisition by zebrafish (*Danio rerio*) with delayed reinforcement. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 査読有、Vol. 109、2018、520-532  
doi: 10.1002/jeab.324

Toshikazu Kuroda, A combination of Raspberry Pi and SoftEther VPN for remotely controlling contingencies. *Journal of the Experimental Analysis of Behavior*, 査読有、Vol. 108、2017、468-484  
doi: 10.1002/jeab.289

Toshikazu Kuroda, Yuto Mizutani, Carlos R. X. Cançado, Christopher A. Podlesnik, Operant models of relapse in zebrafish (*Danio rerio*): Resurgence, renewal, and reinstatement. *Behavioural Brain Research*, 査読有、Vol. 335、2017、215-222  
doi: 10.1016/j.bbr.2017.08.023

Toshikazu Kuroda, Yuto Mizutani, Carlos R. X. Cançado, Christopher A. Podlesnik, Reversal learning and resurgence of operant behavior in zebrafish (*Danio rerio*). *Behavioural Processes*, 査読有、Vol. 142、2017、79-83  
doi: 10.1016/j.beproc.2017.06.004

〔学会発表〕(計 10 件)

黒田 敏数、水谷優斗、Carlos R. X. Cançado、Christopher A. Podlesnik、Punishment effects of mild electric shock on zebrafish (*Danio rerio*) behavior、日本行動分析学会、2018

Toshikazu Kuroda, Yuto Mizutani, Carlos R. X. Cançado, Christopher A. Podlesnik、Baseline reinforcement rate increases both resistance to extinction and resurgence of operant behavior in zebrafish、Association for Behavior Analysis International、2018

Toshikazu Kuroda, Yuto Mizutani, Carlos R. X. Cançado, Christopher A. Podlesnik、Punishment of zebrafish (*Danio rerio*) approach behavior with the motion picture of their predator、Association for Behavior Analysis International、2018

Toshikazu Kuroda、A system for real-time 3D tracking of operant behavior、Society for Quantitative Analyses of Behavior、2018

黒田 敏数、実験制御機器の IoT 化、日本行動分析学会春の学校、2018

水谷優斗、黒田 敏数、ゼブラフィッシュにおける強化率と変化抵抗の関係、日本行動分析学会、2017

黒田 敏数、水谷優斗、ゼブラフィッシュにおける捕食者の動画をを用いた罰 予備実験の報告、日本行動分析学会、2017

Toshikazu Kuroda, Yuto Mizutani, Carlos R. X. Cançado, Christopher A. Podlesnik、Resurgence, renewal, and reinstatement of operant responding in zebrafish (*Danio rerio*)、Association for Behavior Analysis International、2017

Toshikazu Kuroda、Raspberry Pi and SoftEther VPN for the remote control of contingencies、Society for Quantitative Analyses of Behavior、2017

黒田 敏数、水谷優斗、遅延強化によるゼブラフィッシュの反応獲得、日本行動分析学会、2016

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

とくになし

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者

(2)研究協力者

研究協力者氏名：クリストファー A. ポドレズニック、カルロス R. X. カンサド、水谷優斗、眞邊一近

ローマ字氏名：

Christopher A. Podlesnik, Carlos R. X. Cançado, Yuto Mizutani, Kazuchika Manabe

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。