

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14512

研究課題名(和文) ストレス環境学習によるストレス耐性訓練の実用化に関する研究

研究課題名(英文) Study of stress training by learning in fish

研究代表者

高橋 宏司 (Takahashi, Kohji)

慶應義塾大学・法学部(日吉)・助教

研究者番号：70723211

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の増養殖過程には様々なストレスが存在し、効率的な増養殖の推進には個体のストレス耐性の向上が求められる。本研究では、軽度の日常的なストレス経験に対する学習によって、魚類のストレス耐性を訓練することができるかどうかを検討した。実験では、キンギョやメダカ、ゼブラフィッシュを対象として、ストレス処理方法およびストレス耐性の機能を調べた。その結果、ゼブラフィッシュにおいて、浅水での飼育処理によって、空中暴露ストレスおよび温度変化ストレスに対する耐性が向上する可能性が示された。一方で、ストレス耐性の訓練効果には、魚種や個体によって効果が大きく異なることも確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

魚類の増養殖現場において、ストレス耐性の獲得は効果的な飼育、輸送などに有用な情報となりうる。本研究では、ゼブラフィッシュを用いて、ストレス環境の学習を利用した訓練によってストレス耐性を向上できる可能性が示された。本研究で採用したストレス訓練の手法は、水深を浅くして飼育するという極めて容易な方法であり、実際の水産現場にも適用できる可能性がある。また、訓練によって、温度変化やハンドリングなど様々なストレスに対する耐性を高められる可能性が示されたことから、実用性が高いと考えられる。学習によるストレス訓練は、効率的な増養殖において画期的な技術となる可能性を秘めており、今後さらなる研究が望まれる。

研究成果の概要(英文)：Fish is suffered from various stress under aquaculture environment, and thus acquirement of stress tolerance is useful for effective aquaculture. The present study investigated the effect of training of stress tolerance by learning for stress environment. I focused on the methods (stress treatment) and the effect of stress training by using goldfish, medaka, and zebrafish. As the result, zebrafish improved the stress tolerance for air exposures and heat-shock stress by shallow feeding stress treatment. However, the training effect was not stabled among species and individuals.

研究分野：水産心理学

キーワード：魚類 学習 ストレス 訓練

1. 研究開始当初の背景

魚類の生活には様々なストレスが存在し、重度なストレスは免疫機能や代謝機能の低下を引き起こし、最悪の場合は死亡にいたる。増養殖の過程においても、飼育環境の水質悪化や輸送過程でのハンドリングなどのストレスが存在し、これらのストレスは成長率の低下や病気の蔓延、疲弊や斃死のリスクへとつながる。そのため、飼育や輸送の過程で生じるストレスの軽減は、効率的な増養殖を推進する上で重要な課題の一つである。

一方で、魚類は日常的に軽度のストレスを与えて飼育することで、ストレス耐性が向上することが報告されている (Schreck et al., Fish Phys 2016)。本研究者が行なった実験では、マダイに1日2試行の追尾ストレスを3週間与えて飼育すると、水槽移送ストレスからの立ち直りが早くなることが明らかにされた (Takahashi & Masuda, Can J Fish Aqua Sci in press)。これは、日常的に追いかけるストレスに対して馴化(非連合学習)が成立し、移動ストレスに対する耐性が高くなったためだと考えられる。

また、本研究者の最近の研究では、学習によって獲得されたストレス耐性は学習時と質的に大きく異なるストレスに対しても機能的であることが示されている。追尾ストレスを3週間与えたキンギョの熱上昇ストレス耐性を検討したところ、追尾処理個体のストレス負荷後の血中グルコース量(ストレス負荷時に増加)は対照区よりも有意に低かった。これは、追尾処理のような物理ストレスの経験によって、温度変化のような環境ストレスに対しても耐性が高くなることを意味しており、ストレス環境学習はストレス全般に対する耐性を高める可能性を示唆している。ストレス環境学習によるストレス訓練は、短期間のごく簡単な処理で様々なストレスに対する耐性を備えさせることができるため、増養殖魚のストレス耐性を向上させる技術として応用できる可能性がある。

2. 研究の目的

魚類の学習に関する研究はこれまでに多くある。一方で、環境に対する学習を明らかにした例は少なく、特に、ストレス環境によってストレス耐性が向上することを示した例はわずかである。そのため、まず魚類におけるストレス耐性が学習によって向上するかどうかの知見の集積が求められる。また、これまでにストレス環境学習によるストレス訓練の効果が示されている魚種は数種であるため、この手法が様々な魚種においても適用できるかどうかは不明である。特に、質的に大きく異なるストレスに対する耐性を検討した例は本研究者が行ったキンギョの例しか見当たらない。そのため、増養殖において想定される様々なストレスに対して耐性が獲得されるか、複数魚種に適用できるかを明らかにする必要がある。

また、新しい技術を現場に適用する上では、実用的なストレス訓練手法を確立する必要がある。これまでに本研究者が行ってきた追尾ストレス処理は、大規模な飼育現場では適用しにくい可能性があるため、簡便に実施できる訓練手法の開発が必須である。また、増養殖現場では新技術の適用に投資できるコストに限りがあるため、少ない訓練コストで効果が長期にわたって持続する訓練手法の開発が求められる。

上記のことを鑑みて、本研究はストレス訓練の効果の検証として、多様な環境ストレスに対する訓練効果の検証および、多様な魚種での訓練効果の検証を行い、実用的なストレス訓練手法の確立として、簡便な訓練手法の開発を行った。

3. 研究の方法

(1) キンギョを用いた多様なストレス処理によるストレス耐性獲得効果の検証

本研究では、飼育が容易であり、先行研究でストレス訓練の効果が確かめられているキンギョを用いて、増養殖過程で生じる環境ストレスに対するストレス訓練の効果を検討した。

はじめに、これまでにマダイなどでストレス訓練の効果が確認されている手網追尾処理に注目して、実験を開始した。訓練におけるストレス処理として、先行研究と同様に2分間の手網追尾処理(2試行/日)を与えて、3週間継続して飼育した。処理最終日の翌日に、急性ストレスを与えて行動を観察するテストを実施した。ストレステストでは、水槽移動ストレス(網で取り上げて60秒空中暴露後に水槽に戻す)、温度負荷ストレス(ヒーターによって水温20から35に15分であるように急加温)、次亜塩素酸ナトリウムストレス(次亜塩素酸ナトリウム濃度が1%となるように導入)および輸送ストレス(車での長距離輸送)負荷を与えて、負荷の30分後に行動をビデオカメラによって記録した。ビデオ映像からは、水槽内での遊泳行動を観察し、遊泳の停止(freezing)を通常飼育の対照区と比較した。

また、より容易に実施できる訓練方法の開発をおこなうために、キンギョでは追尾処理以外のストレス訓練の効果を検討した。ストレス処理として、浅水飼育処理とコルチゾール添加飼料飼育処理をおこなった。浅水飼育では、水槽上部に網カゴを水深2cmになるように設置して、カゴ

内に魚を導入して3週間飼育した。コルチゾール添加飼料飼育では、配合飼料にコルチゾール溶解液をスプレー照射して乾燥させたものを餌として与えて、10日間飼育した。各ストレス処理の後、追尾処理と同様に水槽移動ストレス、温度負荷ストレス、次亜塩素酸ナトリウムストレス負荷を行い行動テストを実施した。

(2) ゼブラフィッシュでのストレス訓練の効果の検証

ストレス訓練効果が複数の魚種で確認されるかどうかを検証するために、飼育および入手が容易なゼブラフィッシュを用いて訓練効果の検討を実施した。ゼブラフィッシュでの実験では、訓練におけるストレス処理として、浅水飼育処理(水深1cmとなるように設置した網かごで飼育)を用いた。本実験でのストレス処理期間は、4週間与えて飼育した。処理の後に、温度負荷ストレス(ヒーターによって水温20から35に15分であるように急加温)、空中暴露ストレス(網で取り上げて5分空中暴露)と輸送ストレス(不透明な袋に複数尾を導入して60分間徒歩で輸送)する負荷を与えた。本実験では、ストレスの評価として血中グルコース濃度を測定した。ストレス負荷の後に空中暴露ストレス、温度負荷ストレステストでは、負荷の15分、30分、45分、90分、150分、300分後に採血し、グルコース濃度を測定した。輸送ストレステストでは、輸送の30分、60分後に行動をビデオカメラによって記録した。

(3) メダカでの稚魚期のストレス経験による成長後のストレス耐性の獲得効果の検討

多くの動物では、生活史初期に成立した学習が長期におよぶことがある。ストレス耐性の学習についても、初期の学習が長期にわたれば、非常に効果的な訓練として適用できる可能性がある。そこで、稚魚の入手が容易なメダカを対象に、稚魚期のストレス訓練効果について検討した。実験では、水槽から採取された受精卵を孵化させた人工孵化稚魚を用いた。孵化後7日の稚魚を対象に、ストレス処理として空中暴露(網ですくって空中に30秒暴露)を3週間継続して行った。最終処理をおこなった1ヶ月後に、ストレス耐性テストとして、水槽移動ストレス孵化後の行動を、処理をおこなわない対照区と比較した。

(4) メダカでのストレス経験および被ストレス個体の観察による訓練効果の検証

多様な魚種において、学習は自身の経験による学習だけでなく、他個体の観察による社会学習によっても成立することが報告されている。社会学習は自身の経験を必要としないことから、非常に効果的な学習手段であることから、ストレス耐性学習で成立すれば効果的な訓練手法として利用できる可能性がある。そこで、メダカを対象に、ストレス環境学習が社会学習によっても成立するかどうかを検討した。

実験では、ストレス処理として手網追尾(2分間)を3週間与えた。実験条件には、自身がストレスを経験する経験区と、経験区がストレスを受ける様子を観察する観察区、魚なしで追尾処理の様子のみを観察する対照区を設けた。ストレス処理の3日後に、テスト水槽での行動観察を実施し、ストレス反応を処理間で比較した。

(5) ゼブラフィッシュにおけるストレス認知刺激の検討

ヒトにおいては、ストレスとなる刺激は多様なものが存在する。魚類についても、ストレスを誘発する刺激の存在は多数確認されているが、まだまだ不明な点も多い。そこで、ゼブラフィッシュを対象として、魚類のストレスを誘発する刺激について検討した。実験では、集団行動を主とする本種が孤独になることでストレスを感じるかどうか、および警報物質(鱗から放出される警報ホルモン)に関するストレス反応について検討した。

孤独ストレスの検討では、複数尾と単独でいるときに手網追尾ストレスを受けた時に生じるストレス反応について調べた。実験では、単独区および3尾区に2分の追尾処理を行い、30分後に血中グルコース濃度を測定した。

警報物質に対するストレス反応については、これまでも同種他個体の警報物質に行動学的なストレス反応を示すことが明らかにされている。一方で、自身の鱗から抽出した警報物質に対する反応は不明であった。そこで、実験魚から採取した自己警報物質に対してもストレス反応を示すかどうかを検討した。実験では、水槽内に自己、他者および他種(メダカ)から採取した警報物質を添加してストレス行動を示すかどうかによって、自己警報物質が他者由来のものと同様にストレス誘引物質となるかどうかを検討した。

4. 研究成果

(1) キンギョを用いた多様なストレス処理によるストレス耐性獲得効果の検証

本実験では、ストレス環境学習によるストレス耐性の訓練が、多様なストレス処理(学習プロセス)およびストレス負荷テスト(学習機能)で確認されるかどうかを明らかにすることを目的としていた。先行研究のマダイでは、少なくとも追尾処理・水槽移動ストレス負荷の実験系では、ストレス処理区は対照区よりもストレス耐性が高くなるような行動の違いはみられていた。しかし、本実験において、いずれのストレス処理・ストレス負荷テストにおいても、ストレス処理

区と対照区の間には顕著な行動の違いは確認されなかった。この要因として、本実験で用いたキンギョでは、対照区においても顕著なストレス反応がみられなかったことが挙げられる。つまり、実験に用いた個体が本質的にストレスに強かったといえる。そのため、テストにおけるストレス負荷のレベルを高めて予備実験を実施したが、処理区・対照区のどちらにおいても、極めて高いストレス反応（全く動かなくなる）を示し、中には死亡してしまう個体も多数みられた。このことは、強すぎるストレス負荷に対しては、ストレス訓練の効果は発揮されないことを示唆している。本実験の結果から、ストレス訓練は、魚種によってはそもそも必要とならず、また強すぎるストレスには効果がみられない可能性が示された。

一方で、別の予備実験として、キンギョよりもストレスに弱いギンブナを用いて、追尾処理によるストレス訓練効果を検討した。21日間の処理後に、移動ストレス負荷を与えて行動観察をしたところ、ストレス処理個体は対照個体よりも通常行動に戻る時間が早かった。また、ストレス負荷を与えた4時間後に血中グルコース濃度を測定したところ、処理区のグルコース濃度は対照的よりも顕著に低く、ストレス耐性の向上効果が生理的にも示された。残念ながら、ギンブナを用いた実験は、十分なサンプルの入手ができなかったため、本種での実験は予備実験で終わってしまったが、本質的にストレスに弱い魚種であれば、ストレス訓練は実施できる可能性が示された。

(2) ゼブラフィッシュでのストレス訓練の効果の検証

キンギョでの実験が困難であったため、ゼブラフィッシュでのストレス訓練効果について検討した。本実験では、ストレス処理として、手網追尾処理よりも容易な浅水飼育処理を採用した。その結果、浅水飼育処理個体は、空中暴露ストレス、高温ストレス負荷を与えた際に対照区よりも、血中グルコース濃度が上昇しにくくなる傾向が示された（図1aおよび図1b）。一方で、輸送ストレスでは処理区間で顕著なグルコース濃度の違いはみとめられなかった。このことは、浅水での生活という軽度の慢性ストレスを与えて飼育することで、ゼブラフィッシュのストレス耐性が向上する可能性が示された。また、このストレスに対する耐性は、飼育時に経験していない、空中暴露や急激な温度変化に対してもみられたため、ストレス耐性の訓練は未経験のストレスに対しても効果的である可能性がある。一方で、本実験では、複数の飼育集団での実験を実施していたが、訓練の効果は反復によって大きく異なる様子がみられた。つまり、ストレス訓練の効果がある個体群と効果がみられない個体群があり、全体としてみると、訓練効果は顕著に現れなくなってしまうということである。この要因については定かではないが、ストレス訓練が、実験魚の性質や飼育環境の微妙な差が影響していた可能性がある。効果的なストレス訓練手法を確立するためにも、再現性のとれる訓練方法を明らかにする必要があるだろう。

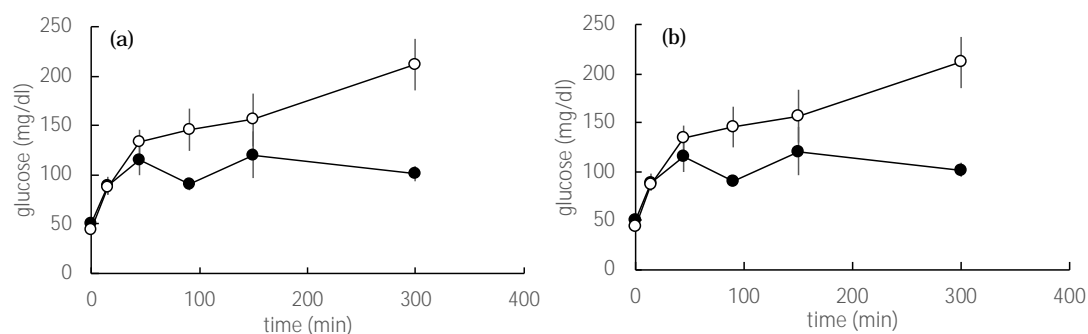


図1 ストレス負荷後の血中グルコース濃度：(a)空中暴露ストレステスト、(b)高温ストレステスト。○は訓練区、●は対照区の時間ごとの値。

(3) メダカでの稚魚期のストレス経験による成長後のストレス耐性の獲得効果の検討

効果的なストレス訓練方法を開発するために、稚魚期のメダカにストレス処理を行う実験をおこなった。本実験では、ストレス処理（空中暴露処理を3週間）を与えた一月後に、移動ストレスに対する反応を検討したが、ストレス処理区と対照区の間で行動（freezingや遊泳水深）に目立った違いは確認されなかった。本実験において、期待される成果が得られなかった要因にはいくつかの可能性が考えられる。当初に予想していた初期学習の長期保持効果がストレス学習にはそもそも成立しないという可能性の他に、訓練の開始タイミングが適切でなかった可能性がある。初期の学習が成立するには、学習臨界期や感受期があり、本実験の開始時期とずれていたのかもしれない。また、もう一つの可能性として、本実験ではストレステストを単独で実施していたため、単独での実験によるストレス負荷が大きく、効果が検出できなかった可能性がある。実際に、飼育時の観察では、処理区と対照区で怯えやすさなどに違いがみられていたためその可能性は棄てきれない。生活史初期の学習によるストレス耐性訓練については、今後処理条件やテストの方法を改良した実験をおこない、さらなる検討が求められる。

(4) メダカでのストレス経験および被ストレス個体の観察による訓練効果の検証

ストレス訓練に対する社会学習効果を明らかにするために、メダカを用いて他個体を受ける追尾処理の観察によって観察者の行動特性が変わるかどうかの検討をおこなった。行動テストでは、freezing 行動（警戒反応）と freezing からの立ち直り（ストレス耐性）を測定し、実験条件間で比較した。自身が追尾ストレス処理を経験した魚では、水槽に導入した時点では、警戒反応がみられたが（図 2a）、その後の立ち直りも早い傾向がみられた（図 2b）。一方で、ストレス経験を受ける個体を観察していた魚では、同様に警戒反応が現れたが、ストレス状態からの立ち直りが経験区よりも遅くなっていた。つまり、社会学習によって警戒心は向上するが、ストレス耐性は向上しないことが示された。このことから、ストレス環境学習には社会学習は利用できないことが明らかにされた。一方で、警戒心の向上効果がみられたことから、本手法は放流魚の行動改善などには効果的な訓練手法として利用できるかもしれない。また、自身の経験と他者の経験観察によって学習効果が異なるというのは、学習心理学において新しい知見であり、動物の心理を探る上では重要な知見であるといえる。

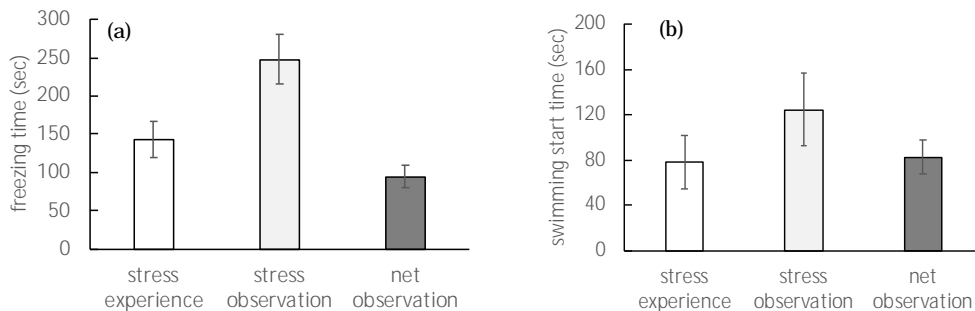


図 2 ストレス経験および観察区のストレス負荷時の行動：(a)freezing 反応、(b)sheltering 反応高温ストレステスト。 は訓練区、 は対照区の時間ごとの値。

(5) ゼブラフィッシュおよびキンギョにおけるストレス認知刺激の検討

本研究において、魚類のストレス訓練方法を確立するにはまだまだ課題が多いことが示された。効果的なストレス訓練を検討していく上では、どのような刺激がストレスを誘引する刺激となるのかを明らかにすることはとても重要な情報となる。そこで、ゼブラフィッシュを用いて、ストレスを誘引する刺激について、孤独ストレスおよび警報物質に注目して実験を行った。

孤独ストレスの検討において、複数尾と単独個体で手網追尾ストレスを与えた際の血中グルコース濃度では、集団ストレス区は単独ストレス区よりも低い傾向がみられたが、顕著な差は確認されなかった。しかし、グルコース濃度は個体差が大きく、この効果を明らかにする上では、実験個体数を増やしてさらなる検討が必要であると考えられる。

警報物質に対するストレス反応では、同種他個体から抽出した警報物質には過去の報告と同様に顕著な警戒反応が観察されたが、自身の鱗から抽出した警報物質に対しても強い警戒反応がみられた。つまり、ゼブラフィッシュでは、自身から放出される警報物質もストレス誘引物質として機能するということが明らかにされた。このことから、ストレス訓練のテストにおいて、自身の警報物質が影響する可能性があり、テストの際にはこの点にも留意すべきであろう。また、警報物質に関しては、その機能について長年議論されてきたが、本研究で明らかにされた自己警報物質に対する反応は、これまでには報告がない。警報物質の進化という、行動生態学の研究においても、本実験でえられた成果は価値のあるものになることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 4件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高橋宏司
2. 発表標題 Learning psychology of fish and the applicability to fisheries science
3. 学会等名 日本動物心理学会第79回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋宏司
2. 発表標題 魚類における逃避行動の観察を通じた個体の警戒特性の伝播 -メダカの情動伝染?-
3. 学会等名 日本動物行動学会第38回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋宏司
2. 発表標題 生態に適応的な魚類の学習能力
3. 学会等名 日本動物行動学会第38回大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋宏司
2. 発表標題 魚類の社会学習能力と生態の関係
3. 学会等名 日本生態学会第66回全国大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋宏司
2. 発表標題 海産魚類の学習能力に関する生態学的研究
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高橋宏司
2. 発表標題 コルチゾール配合飼料飼育によるマダイのストレス耐性獲得効果についての行動学的検討
3. 学会等名 平成31年度日本水産学会春季大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 高橋宏司，細谷和海，桑村哲生	4. 発行年 2019年
2. 出版社 丸善出版	5. 総ページ数 704
3. 書名 魚類学の百科事典 日本魚類学会編. (6章 行動, 学習)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関