

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 5 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580276

研究課題名(和文) LED集魚灯設計スペックに対応する水産生物の視感度評価方法の確立

研究課題名(英文) Establishment of evaluation method of spectral light sensitivity of fish vision for LED fishing light development

研究代表者

安樂 和彦 (Anraku, Kazuhiko)

鹿児島大学・水産学部・准教授

研究者番号：50274840

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：魚類の分光視感度を計測・評価するための簡易な網膜分光吸収計測システムを考案し構築した。市販小型分光器と広帯域LED光源を主要部品とし、暗順応状態で摘出した網膜小片を対象に、波長420-700nmの間で信頼性の高い分光吸収特性を推定可能な計測システムと評価できた。集魚灯漁業対象魚種のマアジ、カタクチイワシ、カタボシイワシの他に、マダイ等計10種の分光視感度を明らかにした。計測した桿体細胞の最大分光感度波長は、沿岸性および外洋性、さらに深海性魚類で相違した。本研究で得た分光視感度曲線を用い、灯光の視覚への作用効率を推定可能なエクセルワークシートを作成し、開発メーカーに提供し、試用段階に至っている。

研究成果の概要(英文)：We developed a simple measurement system of spectral light absorbance of piece of retina containing different types of photoreceptors by using a standard portable spectrophotometer and wide spectrum LED. The system was verified by comparing a known photoreceptor's absorbance spectrum and it was concluded that this system (method and device) can be a quick and portable assessment tool for evaluating the spectral sensitivity of fish retinæ. In this study, a total of 10 species retinæ were measured including target species of light fishing, such as Japanese anchovy and jack mackerel, and other fishery important species. Peaks of absorbance of retinæ showed differences by their habitat; peak absorbance of coastal fishes appeared >500 nm while offshore and deep water species had <500 nm. A spread worksheet by which evaluates light efficiencies of various wavelength of fishing light to vision of target species was made and has been tested by a maker company of fishing light.

研究分野：魚類行動生理学

キーワード：魚類視覚 桿体細胞 分光吸収 網膜 集魚灯

### 1. 研究開始当初の背景

省エネおよび炭酸ガス排出量削減の達成ならびに、近年の高輝度 LED の開発と普及を背景に、我が国の漁業生産を支える灯火漁業において、LED 集魚灯の開発や普及が産官学により進められてきている。LED の特徴として、光量当たりの消費電力が小さい、発光スペクトルを任意に制御できる等の集魚灯への応用に対する高い利便性を持つ。それ故に、漁獲対象生物の視感度に見合ったスペクトル特性を持つ集魚灯の開発により、さらにエネルギー効率を高めることも可能となるため、水産有用魚種において、特に光の波長(色)に対する感覚特性を解明し、かつ、その成果を集魚灯設計にフィードバックする理論と技術を構築する必要がある。

### 2. 研究の目的

魚類視覚の波長に対する感覚特性(スペクトル感度)を調べる研究には様々な方法が用いられてきている。最も古典的な方法は行動学的手法であるが、光刺激に対する感覚神経あるいは細胞の電気的な活動を記録する電気生理学的方法や、網膜から抽出した光を吸収する視物質や単一視細胞そのものを対象としそれらの各波長に対する吸収特性(分光吸収特性)を調べる方法等が多用されている。各実験手法により得られる知見は少し相違する。電気生理的研究では波長に対する感度だけでなく、どれだけ微弱な光を受容可能か(感覚閾値)も解明可能である。ただし、実験に時間を要す手法の制約上、1 回の実験で試験可能な波長の数には限界がある。また、微弱な電位変化を読み取って行う感覚閾値の判定は研究者毎に異なる方法で行われているのが現状で、客観的な方法の確立が望まれるところである。一方、網膜あるいは単一視細胞の分光吸収を調べる実験は摘出細胞を生理食塩水中に保存しつつ行え、かつ設定した波長範囲において分解能 1 nm 程度の精度で分光吸収特性を調べられる。

本研究課題の目標を鑑み、開発すべき技術項目を整理し、以下にまとめた。電気生理実験としては比較的簡易手法である網膜電図記録法により安定した視覚閾値計測を実施するための客観的閾値判定法を構築する、運搬や飼育が困難な場合が多い水産有用魚種の視覚の分光感度を推定するための、従来より簡易な網膜分光吸収計測システムを構築する、研究で明らかにされた分光視感度を集魚灯メーカー等が発光波長の設計・評価に利用可能な理論と方法を構築する。本研究では ~ について計画した内容を実施したので、それぞれの成果を下に記す。

### 3. 研究の方法

前述の 3 項目について下記の様な方法で研究を実施した。

(1)網膜電図( Electroretinogram、ERG )を用いた視感度閾値の客観的評価方法の確立

供試魚に視細胞種類と桿体・錐体視細胞の分光吸収が既知であるキンギョを用いた。暗環境下において、麻酔と筋弛緩剤により不動化した供試魚を呼吸を確保しつつ実験台に固定した。キセノンランプの光をレンズを用いてビーム状にし、自作の波長・減光調整装置を用いて、任意の波長および強度の光を供試魚の眼球部に照射するようにした。照射時間は 50 ms とし、各刺激波長・刺激強度毎に 10 s 間隔で複数回刺激した。供試魚の眼球表面には銀線電極を接触させ、網膜中の視細胞が光を受容した時に生じる微弱な電位変化を導出できるようにした。導出電位は生体電気増幅器と AD 変換器を介して PC に記録した。刺激波長毎に様々な刺激強度に対して記録した応答波形を元に、後述の研究成果に示す、相互相関法による刺激に対する応答有無の判定法を考案し、その実行を市販の表計算ソフト上で行えるようにした。

### (2)網膜の分光吸収計測装置の確立と水産有用魚種における計測評価

本研究では、単一視細胞の分光吸収計測を行う顕微分光計測装置と、多数の視細胞を含む網膜片を対象に分光吸収計測を行う装置の開発を行った。前者の開発は光学機器メーカーの協力を得た。後者は 1950 年代に試みられた計測手法をモデルとし、現代の小型分光器や光源を用いて研究室独自に設計した。単一視細胞の分光吸収計測を行う顕微分光計測装置の概要は既往の多くの論文等に示される通りである。独自に開発した網膜分光計測装置の概要やその成果については後述の研究成果に記す。

### (3)魚類の分光視感度に基づく LED 光の各魚種視覚に及ぼす作用効率の推定

上述の(2)の手法により、集魚灯漁業対象種を含む多魚種の分光視感度を計測・推定した。また、その成果を用い、任意の分光放射照度特性を持つ光源の光が、独自の視感度特性を持つ各魚種の視覚にどのように作用するか推定する方法と、それを表計算ソフト上で実行するワークシートの開発を行った。その成果概要は後述の研究成果に記す。

### 4. 研究成果

#### (1)網膜電図計測結果のテンプレート法による分析方法の構築

図 1 は強い光刺激と弱い光刺激に対する ERG 応答波形を示している。これらの 2 波形は光刺激強度により応答振幅と応答出現時間に相違はあるものの、波形は相似であることが明白であった。図 2 は、本研究で開発した、表計算スプレッドシートで作製した分析アプリで、実験に使用した最大強度の光刺激に対する ERG 応答波形  $f(t)$  と任意強度の刺激に対する応答波形  $g(t)$  を相互相関法により比較し、両波形の類似性を示す相関関数  $r$  と  $f(t)$  に対する  $g(t)$  の遅延時間  $\tau$  を求め、実験者が

設定する  $r$  および  $\tau$  の閾値に基づいて、 $g(t)$  に光刺激に対する応答波形が含まれているか否かを客観的に判定するように作成した。表計算シートでの応答有無の判定は実験者による ERG 応答波形の詳細な目視観察結果に基づく判定と同等かそれ以上と判断できた。本開発手法は、これまで各実験者独自の手法に委ねられてきた閾値判定の客観的手法として有効に利用されるものと考えられる。

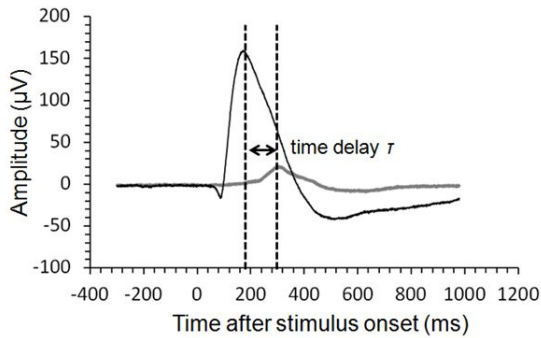


図 1. キンギョを用いて記録した、強い光刺激と弱い光刺激に対する ERG 応答波形。横軸は刺激時刻を基準とする経過時間を示す。

Important: MathRange (?ms to ?ms)		Go to Surface	(f/ms)	raw f(t)	raw g(t)	smooth ed f(t)	smooth ed g(t)	Zero mean Norm f(t)	Zero mean Norm g(t)	#
Sampling Freq (kHz)	800		0	-2.304	-1.292	-2.30	-1.29	-0.24	-0.33	0
DataNum	1024		1	-2.038	-1.135	-2.04	-1.13	-0.23	-0.30	1
Num of Moving Average Points	0	Mov.Ave	2	-1.777	-0.98	-1.79	-0.98	-0.21	-0.28	2
Ct Max Time τ (ms)	100	Mov.Ave	3	-1.525	-0.83	-1.52	-0.83	-0.19	-0.25	3
Pearson's CorrCoe (0-1000ms)	0.973	Mov.Ave	4	-1.284	-0.696	-1.28	-0.69	-0.19	-0.23	4
PeakAmplitude (max-ave)	6.53	Mov.Ave	5	-1.056	-0.55	-1.06	-0.55	-0.17	-0.20	5
Decision	YES	Mov.Ave	6	-0.844	-0.424	-0.84	-0.42	-0.16	-0.18	6
Criterion R	0.7	Mov.Ave	7	-0.651	-0.307	-0.65	-0.31	-0.15	-0.16	7
Criterion Implicit Time	150	Mov.Ave	8	-0.476	-0.202	-0.48	-0.20	-0.14	-0.14	8
		Mov.Ave	9	-0.323	-0.108	-0.32	-0.11	-0.14	-0.13	9
		Mov.Ave	10	-0.19	-0.027	-0.19	-0.03	-0.13	-0.11	10
		Mov.Ave	11	-0.08	0.041	-0.08	0.04	-0.12	-0.10	11
		Mov.Ave	12	0.009	0.096	0.01	0.10	-0.12	-0.09	12
		Mov.Ave	13	0.077	0.139	0.08	0.14	-0.12	-0.09	13
		Mov.Ave	14	0.124	0.17	0.12	0.17	-0.11	-0.08	14
		Mov.Ave	15	0.152	0.189	0.15	0.19	-0.11	-0.08	15
		Mov.Ave	16	0.162	0.198	0.16	0.20	-0.11	-0.08	16
		Mov.Ave	17	0.157	0.197	0.16	0.20	-0.11	-0.08	17
		Mov.Ave	18	0.137	0.188	0.14	0.19	-0.11	-0.08	18
		Mov.Ave	19	0.106	0.171	0.11	0.17	-0.11	-0.08	19
		Mov.Ave	20	0.065	0.146	0.06	0.15	-0.12	-0.08	20
		Mov.Ave	21	0.017	0.121	0.02	0.12	-0.12	-0.09	21
		Mov.Ave	22	-0.036	0.09	-0.04	0.09	-0.12	-0.09	22
		Mov.Ave	23	-0.091	0.057	-0.09	0.06	-0.13	-0.10	23
		Mov.Ave	24	-0.147	0.024	-0.15	0.02	-0.13	-0.11	24
		Mov.Ave	25	-0.202	-0.009	-0.20	-0.01	-0.13	-0.11	25
		Mov.Ave	26	-0.253	-0.04	-0.25	-0.04	-0.13	-0.12	26
		Mov.Ave	27	-0.299	-0.069	-0.30	-0.07	-0.14	-0.12	27
		Mov.Ave	28	-0.339	-0.095	-0.34	-0.10	-0.14	-0.13	28
		Mov.Ave	29	-0.372	-0.117	-0.37	-0.12	-0.14	-0.13	29
		Mov.Ave	30	-0.398	-0.135	-0.40	-0.13	-0.14	-0.13	30
		Mov.Ave	31	-0.415	-0.148	-0.42	-0.15	-0.14	-0.14	31
		Mov.Ave	32	-0.424	-0.155	-0.42	-0.15	-0.14	-0.14	32

図 2. 表計算スプレッドシートを用いて作製した、ERG 応答波形に基づいて、相互相関法を用いて応答の有無を判定するアプリケーション。

(2)網膜の分光吸収計測法の確立と多魚種での計測事例

ここでは、本研究で多魚種の分光吸収計測を実施した後者の装置の概要と計測結果について述べる。

分光吸収計測装置は、運搬や水槽での飼育や困難な魚種での実験を実現するために可能な限りコンパクトな設計を念頭に置き、光源には帯域幅の広い発光波長を持つ高演色 LED を採用し、光計測を行う分光器には CCD アレイセンサを搭載する小型分光器を用いた(図 3)。LED 光は光ムラを軽減する目的で自作の積分球を通してコリメーターレンズで

平行光とし、シャッターを介して対物レンズを用いて集光するようにした。光ビームの落射部に分光器を置き、分光器の光取り込み部に自作の導光レンズと金属製ステージを置き、計測対象とする網膜片を固定できるようにした。計測は、a)標本ステージに網膜片を置き、b)分光器による網膜を透過した光の放射照度の連続的記録を開始し、c)シャッターを開いて標本に光を照射することで行った。放射照度の計測は、光照射直後からの約 20 s 間と、光照射開始から 120 s 経過後の約 20 s 間の 2 回実施した。つまり、最初の計測は光照射にともなって網膜中の視細胞が持つ視物質の光褪色過程の記録  $I(\lambda)$  とし、後者を視物質が光吸収機能を完全に失った後の記録  $I'(\lambda)$  として計測した。これらの記録を元に、網膜による光の吸収(吸光度  $A(\lambda)$ )を下式(2)によって求めた。

$$A(\lambda) = \log(I'(\lambda)/I(\lambda)) \quad (2)$$

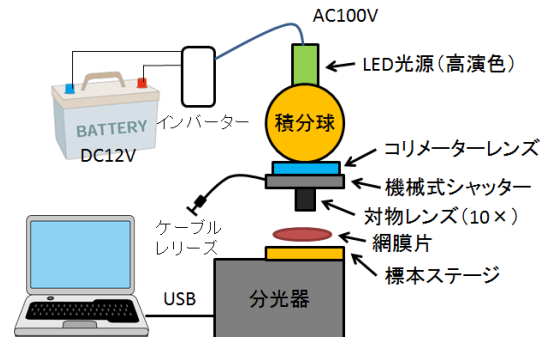


図 3. 市販ポータブル分光器と高演色 LED を用いて製作した、魚類網膜の分光吸収特性計測装置。

図 4 には本研究で計測を行った集魚灯漁業対象種であるカタクチイワシの計測事例を示す。図中の点は計測した 10 標本の分光吸収計測結果を重ね合わせたもので、本研究で開発した機器での計測により安定した結果を得られることを示している。分光吸収が最大を示す波長(分光吸収極大波長、 $\lambda_{max}$ )は 503 nm と推定された。Kondrashev *et al.* (2013) の研究において、カタクチイワシの各種視細胞の分光吸収を計測した事例が報告されており、夜間に機能する高感度な桿体細胞の分光吸収極大波長を 502 nm としている。この波長は本研究結果と同等と見なせ、図 3 に示す方法では計測対象とした視細胞種類は同定できないものの、計測された結果は、網膜中に最も多数存在しかつ高感度である桿体細胞の特性を強く反映する者であることが強く示唆された。開発機器の携帯性は高く、本手法による計測所要時間は比較的短時間である。類似計測技術として網膜から視物質を抽出し懸濁液とし、その分光吸収特性を計測する方法も存在するが、本計測手法は微小な網膜片そのものを対象に十分な精度で分光吸収計測を行える点で利便性が高いと考えられる。なお、開発した ERG の閾値判定

法は、タナゴ類やトゲウオ類の生殖行動と視覚の関係に関する2編の論文に適用した。

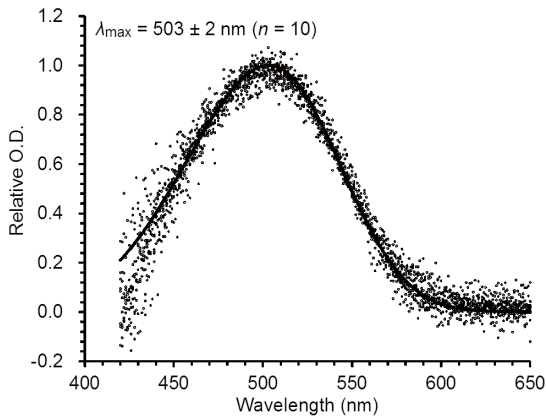


図4. カタクチイワシ網膜の分光吸収特性。図中の実線は Govardovskii *et al.*(2000) による視物質の分光吸収テンプレート式を本計測結果に当てはめて求めた曲線。

開発手法を用いて、これまでに、カタクチイワシ ( $\lambda_{max} = 503 \text{ nm}$ )、マアジ ( $\lambda_{max} = 505 \text{ nm}$ )、ウルメイワシ ( $\lambda_{max} = 506 \text{ nm}$ )、カタボシイワシ ( $\lambda_{max} = 506 \text{ nm}$ )、ギンガメアジ ( $\lambda_{max} = 507 \text{ nm}$ )、マダイ ( $\lambda_{max} = 505 \text{ nm}$ )、カサゴ ( $\lambda_{max} = 505 \text{ nm}$ )、オオモンハタ ( $\lambda_{max} = 505 \text{ nm}$ )、ヒラスズキ ( $\lambda_{max} = 507 \text{ nm}$ )、キュウリエソ ( $\lambda_{max} = 478 \text{ nm}$ )、ヨウジエソ ( $\lambda_{max} = 480 \text{ nm}$ )、アカグツ ( $\lambda_{max} = 494 \text{ nm}$ )、ニホンウナギ ( $\lambda_{max} = 507 \text{ nm}$ )、*Anguilla bicolor bicolor* ( $\lambda_{max} = 506 \text{ nm}$ ) 等の  $\lambda_{max}$  を推定している。これらの成果は、次節で述べる人工照明の分光放射照度が如何に魚の視覚に作用するか推定する計算過程の基礎資料として使用している。一方、学術的発見として、本研究での成果は、沿岸性、外洋性、中深層性魚類で網膜の分光吸収極大波長に差異が認められることを強く示唆するものであった。今後、多様な生息域での魚種間の比較を行うことで、水生生物の水中光環境への適応戦略についての知見を深められることが期待できる。

(3)集魚灯光の魚類視覚への作用効率推定ワークシート

本研究で構築した網膜分光吸収計測により得られる各魚種の網膜分光吸収結果を常用される視物質分光吸収テンプレート式 (Govardovskii *et al.*, 2000) に当てはめ、暗所視分光視感度曲線 (関数,  $V(\lambda)$ ) を求め、集魚灯メーカー等が開発・使用するLED光源などの分光放射照度  $I(\lambda)$  と共に下式(1)を用いて任意光源の光が対象魚種の視覚に作用する効率  $E$  を求められるようにした。計算は表計算スプレッドシートにより実行できるようにし、汎用性と操作性を高めた(図5)。

$$E = (I(\lambda) \cdot V(\lambda)) / I(\lambda) \quad (1)$$

例として、集魚灯光源として用いられる白熱灯とK社が開発したLED集魚灯の作用効率推定結果を示す(図6)。図6の青線は両種光源の分光放射照度分布を示す。白熱灯は長波長に向かいエネルギーを高く持つ。一方、LED光源の波長分布は任意に制御でき、ここで示す計測事例は魚類の視感度に合わせた発光特性を持たせたLED光源の事例である。図6の赤線は分光放射照度分布に任意魚種の分光視感度関数を乗じた結果を示しており、魚が受容しうる光のエネルギー分布を示している。上述の(1)式により得られる作用効率とは、図6の青線で囲まれる面積に対する赤線で囲まれる面積の比を示す。ここで示した白熱灯およびLED光源の作用効率はそれぞれ0.21と0.58と推定され、分光視感度特性が効率に強く影響を及ぼすことが明確に示される。

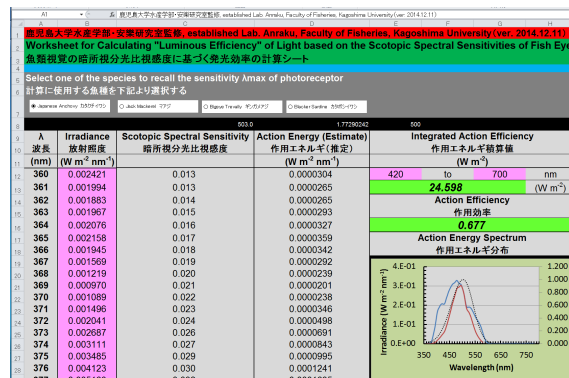


図5. 任意の分光放射照度光が特定魚種の視覚に作用する効率を推定するワークシート。

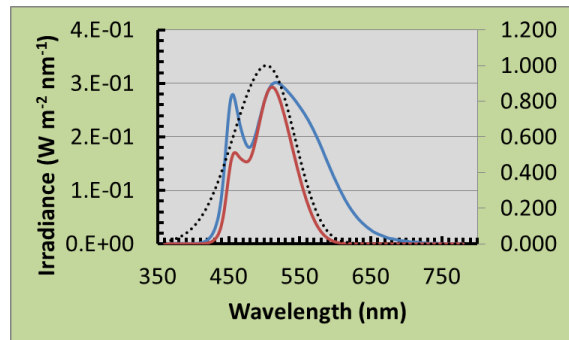
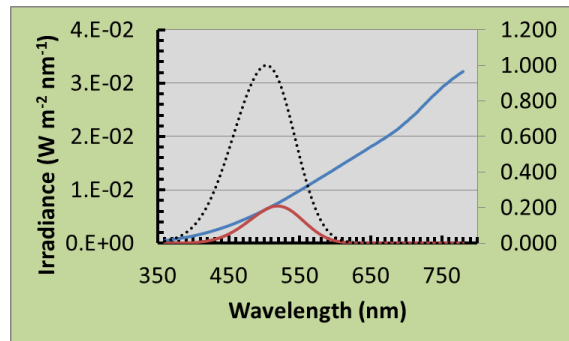


図6. 白熱灯(上)とLED光源(下)の魚類視覚への作用。

ここで開発した作用効率推定ワークシートは、現在、研究代表者との共同研究により集魚灯開発を手掛けているメーカーに提供し試用している。開発企業は、LED光源に利用する発光波長を制御する蛍光体の設計段階において魚類への刺激性を判断する指標として有効に利用している。今後、本研究課題で解明した水産有用魚種の分光視感度計測結果の論文化を行い、それらの魚種データを搭載したワークシートを公開する計画としている。

本研究課題により、魚類視覚生理実験に関わる技術開発とその成果の産業適応の理論構築に取り組めた。今後、これらの成果が普及し、国内の魚類視覚生理に関わる研究の進展と、集魚灯漁業技術の発展に寄与できれば幸いである。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計2件)

Chia-Hao Chang, Yi Ta Shao, Wen-Chung Fu, Kazuhiko Anraku, Yeong-Shin Lin and Hong Young Yan, Differentiation of visual spectra and nuptial colorations of two *Paratanakia himantegus* subspecies (Cyprinoidea: Acheilognathidae) in response to the distinct photic conditions of their habitats. *Zoological Studies*, 2015, 54(43).

Yi Ta Shao, Feng-Yu Wang, Wen-Chun Fu, Hong Young Yan, Kazuhiko Anraku, I-Shiung Chen, Bertil Borg, Androgens Increase Iws Opsin Expression and Red Sensitivity in Male Three-Spined Sticklebacks. *Plos One*, 2014, 9(6),1-10.

[学会発表](計5件)

安樂和彦、赤松佑哉、大川諒、小谷知也、水田敬、*Anguilla japonica* (ニホンウナギ) と *Anguilla bicolor bicolor* の分光視感度の比較。2015年3月27-31日、平成27年度日本水産学会春季大会、東京海洋大学、東京都・港区。

安樂和彦、大川諒、米山和良、Harold M. Monteclaro、水田敬、魚類視覚の暗所視分光視感度評価方法の開発と応用。2015年3月27-31日、平成27年度日本水産学会春季大会、東京海洋大学、東京都・港区。

大川諒、安樂和彦、魚類視覚の暗所視分光視感度評価方法の開発と応用。魚類生理学会、2014年12月6日、下関水産大学校、山口県・下関市。

安樂和彦、海中の光と魚の視覚。魚類生理学会、2013年12月7日、鹿児島大学水産学部、鹿児島県・鹿児島市。

Kazuhiko Anraku and Tatsuro Matsuoka, Development of the Evaluation Method on the Effect of Artificial Fishing Light. *ICES*

WGFTFB 2013, 2013年5月6-10日、東南アジア漁業開発センター、タイ・バンコク。

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

安樂 和彦 (ANRAKU KAZUHIKO)

鹿児島大学・水産学部・准教授

研究者番号：50274840