

令和 6 年 6 月 26 日現在

機関番号：55401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K06195

研究課題名(和文)呼吸波の信号成分分析による魚類のストレス度推定法に関する研究

研究課題名(英文) Study on Estimation Method of Stress Level of Fish by Analyzing Ventilatory Signals

研究代表者

平野 旭 (HIRANO, AKIRA)

呉工業高等専門学校・電気情報工学分野・准教授

研究者番号：60594778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：これまで魚類のストレス度合いの分析には、血中コルチゾル濃度の分析が用いられてきた。分析の際、微小な血管から採血をするために、解剖や採血の際に被験魚が死んでしまうという課題があった。本研究では、水中に電極を配置することで計測できるバイオシグナル(呼吸波)を用いたストレス受容の推定可能性について研究を行った。人間が緊張すると呼吸間隔にゆらぎがなくなるのと同様の傾向が確認された。個体を死亡させることなく、ストレス受容の様子を確認できる一手法の可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

海洋資源の減少問題を受けて、近年、特に海外では養殖業に注目が集まっている。養殖魚にとってストレスの少ない環境を分析する際、個体差を踏まえて分析を試みると、多くの被験魚の犠牲が必要となる。本手法は、魚類のストレス状態を非侵襲的な方法で推定できる。養殖業および観賞魚にとってストレスの少ない環境・水質を分析する場面において役立つ可能性が考えられる。また、従来から取り組んできた「呼吸波の変化から水中への毒物混入を検出する『水質バイオアッセイ法』」に組み込むことで、その性能を一段と高められる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Stress levels in fish have been analyzed by measuring blood cortisol concentrations. However, the fish are killed during dissection and blood sampling because blood is drawn from tiny blood vessels. In this study, we investigated the possibility of estimating stress acceptance using bio-signals (ventilatory waves) that can be measured by placing electrodes in water. We confirmed a similar trend to that of humans, in which fluctuations in the breathing interval decrease when the human is under tension. It was suggested that this method could be used to confirm stress acceptance in animals without killing them.

研究分野：生体情報工学

キーワード：呼吸波 ストレス推定

### 1. 研究開始当初の背景

世界の海面漁業生産量が頭打ちとなる中、世界の養殖生産量は増大を続けており、今後の世界の水産物需要は養殖業によって支えられると国連食糧農業機関 (FAO) が分析している。我が国では、クロマグロ養殖への新規参入が増加しており、平成 22 年には 78 社であった養殖業者は、平成 29 年時点で 92 社に増えている。もともと、自然界から採捕した種苗を用いる養殖形態がほとんどであったが、近年では、人工的に採卵・ふ化した種苗を用いた自然に優しい養殖への取組が各地で行われている。また、トラフグやヒラメなどの陸上養殖の取組がみられるほか、米国・香港・EU 等への養殖ブリの輸出なども行われている。

一方、高効率の養殖を目的に、養殖魚のストレス状態を把握するシステムの開発も盛んに行われている [引用 1]。魚のストレスは、「一次応答」から「三次応答」に分類され、急性ストレスを意味する「一次応答」は、血中の「コルチゾル」と呼ばれるタンパク質の量で評価される。このタンパク質量を生化学的に分析する装置を搭載した小型デバイスを養殖魚に取り付け、ストレス状態をリモートセンシングするシステムが注目を集めている [引用 2]。しかしながら、デバイスの小型化の限界により、数センチサイズの小魚や稚魚に搭載するデバイスの開発は難航している。

もし、稚魚サイズの小魚のストレス計測を非侵襲かつ遠隔で計測可能になれば、現行の稚魚養殖法に対する問題点の検討や、水族館での小型水息生物に対するストレスフリーな環境提供など、次世代の水産資源管理手法が検討可能になりうる可能性が高い。

[引用 1] 「魚類のための生体留置型ワイヤレスバイオセンサーの創出に関する研究」

科学研究費助成事業 基盤研究 B 20380119

[引用 2] 「魚類のストレスの見える化：可視光通信技術を用いたバイオセンシングシステムの創出」科学研究費助成事業 基盤研究 B 26292114

### 2. 研究の目的

本研究では、魚のバイオシグナルのうち、数センチサイズの小魚であっても非侵襲かつ遠隔計測可能なバイオシグナルである「呼吸波 (呼吸信号)」を計測対象とし、そのパターン変化から小型魚のストレス状態を推定する手法の提案を目的とする。

### 3. 研究の方法

人間の場合、心拍の周波数分析における低周波成分 (LF : Low Frequency) と高周波 (HF : High Frequency) の比率で自律神経系の活動状態 (交感神経・副交感神経の活動バランス) が推定可能であることが神経生理学的に明らかにされ、「ストレス度」の指標に利用されている。主に、LF は血管の収縮、HF は呼吸状態に由来する信号成分とされ、脊椎動物以上では共通のメカニズムであることが知られている。

近年、この指標を利用し、ストレス状態を推定する種々の医療機器や、健康維持を目的としたウェアラブルデバイスが流行している。心拍動分析による HF 成分に頼らず、「ひずみゲージ」などのセンサデバイスを胸部に取り付け、肺の伸長・収縮運動を計測することで、呼吸状態を捉えようとするケースもあるが、肺の動きでは直接的に呼吸状態を正確に計測できるわけではない点多用されていない。また、口元に直接、呼気・吸気を計測するセンサを取り付けた実験が医学分野では実施されてきたが、重篤な事故につながった事例もあり、精度的にも安全面においても心拍動解析の LF 成分の利用が有用とされ、人間の場合には心拍動のみが計測されるケースが多い。

魚類に対しては、メダカやゼブラフィッシュなどの小型魚類の呼吸波を水中に配置した電極から非侵襲で計測し、そのパターン変化をとらえることで毒物混入などを検出する「水質バイオアッセイ法」が研究されている。申請者らも、同じ水質に対するメダカの呼吸波を複数匹同時に 24 時間連続で計測するシステム「呼吸波計測装置」を開発し、呼吸の振幅と周波数が様々に変化することを確認してきた [引用 3]。小型魚の心拍動計測としては、生物学科の学生実験で実施されるような「針電極」を用いた侵襲的な方法と、微小領域に軟固定を行って光学的な手法で心拍動を解析する方法などがあるが、生きたまま小魚の心拍を連続的に計測する手法としてはどちらも利用困難である。従って、魚類の自律神経系の活性状態を推定する場合には、心拍動よりも呼吸を計測する方が有効策といえる。

本研究 Gr. では、OECD (経済開発協力機構) テストガイドラインの試験生物に指定され、化学物質に対する感度が優れメダカを被験魚として、その呼吸波の長時間連続計測と分析を行ってきた [引用 3]。その知見とシステムを有効活用する観点でメダカを被験魚とし、呼吸信号の変化からストレス分析を行うものとした。

[引用 3] 「メダカの呼吸信号予測器を用いた逐次判別型水質バイオアッセイ法の基礎研究」科学研究費助成事業 若手研究 (B) 16K16368

#### 4. 研究成果

メダカの呼吸波の計測には、約 15 万から 20 万倍程度の信号増幅器が必要となる。実験用水槽に移送した直後など、「緊張状態」になると特徴的な 4~8Hz の呼吸パターンが観測される。波形としては、主要な周波数成分  $f_1$  [Hz] に、約倍周期の  $f_2$  [Hz] が  $f_1$  の半分くらいの大きさで重畳した形状で、マウスなどの呼吸信号と同じ波形である。これまで「普通の状態」では約 4Hz の信号が計測され、実験水槽に移送された「異常状態」では約 8Hz に推移するといった主要周波数  $f_1$  の変化が着目されてきた[引用 4]。しかしながら、毒物を投与しないような通常状態においても、水温が高めで元気よく遊泳する場面では 8Hz に近い周波数が観測された。逆に、水槽を移送した直後でも、個体によっては 4Hz に近いままの信号が確認された。そこで、自律神経系の活動状態を解析する「LF/HF」の根本的なメカニズムに着目し、人と同じように、呼吸間隔の揺らぎに着目して分析を行うものとした。呼吸間隔の揺らぎについては、バンドパスフィルタを用いて倍周期成分  $f_2$  を除去後、ピーク間隔を時間領域で分析し、変動係数  $CV$ =標準偏差/平均で求めることで解析を行った。なお解析の時間幅は、約 5 秒とした。その結果、実験水槽への移送直後には変動係数が 0.05 以下、水槽に慣れたと推定される 24 時間後には 0.1 以上の値となる傾向が確認された。また、壁面の網に引っかかって「宙づり状態」になった際にも変動係数が 0.05 以下、救出後には 0.1 以上の傾向が確認された[引用 5]。特に、「宙づり状態」の個体は、救出後の数時間後に死亡が確認されているため、生死にかかわるストレス状態、もしくは身体的な異常が変動係数に反映されていたものといえる。

ストレス指数の正当性を確認するためのコルチゾール分析については、保留とした。理由については、各年度の報告の通り、倫理面を考慮した麻酔薬の国際的議論を踏まえた選定問題、採血量が微量であるがゆえに正確性の高いコルチゾール量の分析が困難が主な理由である。代替策として、種々の刺激を与えながら、呼吸波（変動係数）と遊泳状態（正常・異常）の長時間分析を各個体について行うことが妥当であると判断し、継続して分析中である。有用性がうかがえている「変動係数を用いた魚類のストレス推定」の追加データとして、結果が出次第報告する予定である。

[引用 4] Zu Soh et al.: "Bioassay System Based on Behavioral Analysis and Bioelectric Ventilatory Signals of a Small Fish," IEEE TRANSACTIONS ON INSTRUMENTATION AND MEASUREMENT 62(12) 3265-3275 2013.

[引用 5] 保本ら：“生体信号を用いた小型魚類のストレス指標の提案”，2021 年度(第 72 回)電気・情報関連学会中国支部連合大会講演論文集，R21-14-03，2021。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 保本拓海, 平野旭, 城明舜磨, 曾智, 辻敏夫
2. 発表標題 生体信号を用いた小型魚類のストレス指標の提案
3. 学会等名 2021年度(第 72 回)電気・情報関連学会中国支部連合大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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
---------	---------