

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25380985

研究課題名(和文) 遺伝子疾患モデル動物(ゼブラフィッシュ)の知覚・学習機能の解明

研究課題名(英文) Investigation of perceptual and learning characteristics of a genetic disease model animal (Zebrafish)

研究代表者

眞邊 一近 (MANABE, Kazuchika)

日本大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：80209676

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ゼブラフィッシュは、知覚・学習機能を含む生物医学動物モデルとして確立されている。しかし、行動指標を用いた聴覚閾値や、知覚可能な最大点滅頻度、知覚可能な最小コントラスト等の基本的な知覚機能が十分解明されていない。本研究では、新たに開発した実験装置を用いて、ゼブラフィッシュの点滅光の知覚はヒトと同程度であり、コントラスト感度は金魚よりも低く、聴力は、生理反応を利用した測定で得られた値より良いという結果が得られた。また、脳機能の一つの指標である学習の柔軟性は、生後420日付近を境として急激に低下することが見いだされた。

研究成果の概要(英文)：Zebrafish are becoming popular vertebrate animal models for many biomedical investigations including perceptual and learning research. However, basic behavioral perceptual and learning characteristics, such as behavioral audiogram, behavioral Critical Flicker Fusion Frequency (CFF) and spatial contrast sensitivity function (CSF) have not been determined yet. We have developed equipment for measuring characteristics of zebrafish perception. In addition to the studies of perception, age-dependent change in learning flexibility that can be used as an index of aging of brain function has been examined using a repeated reversal learning paradigm.

Behavioral auditory threshold was lower than physiological data. Behavioral CFF of zebrafish was almost same as that obtained in humans. Spatial CSF obtained in the present experiment was lower than in goldfish. Our learning flexibility experiment revealed that brain flexibility of zebrafish drastically decreased around 420 days post hatch.

研究分野：行動分析学

キーワード：ゼブラフィッシュ 遺伝子疾患モデル動物 オーディオグラム 光臨界融合周波数 コントラスト感度
学習の可塑性

1. 研究開始当初の背景

今日、遺伝子の役割を視野に入れた研究は世界中で急速に進みつつある。中でもゼブラフィッシュは、ゲノム配列がいち早く決定された、ヒトと同じ脊椎動物であり、また多産で世代交代までの時間が短いこと、管理が容易であることから、視・聴覚疾患を発症する Usher 症候群 (Williams, 2008 他) やアルツハイマー (Newman, Verdile, Martins, & Lardeli, 2011 他) 等の遺伝子疾患研究、さらに環境汚染物質・麻薬・神経作用薬物の行動への影響 (Sison & Gerlai, 2010 他) 等の動物モデルとして使用されており、*Zebrafish* という国際学術誌も発行されているほどである。

遺伝的知覚疾患、薬理研究等での機能評価基準となる標準型のゼブラフィッシュの知覚・学習特性の解明および測定方法の確立が達成されれば、その成果は、遺伝的疾患を持つミュータントや再生技術によって作成された再生器官の知覚・学習機能不全の有無および障害の程度の評価や、薬物による機能の変化の評価を可能にし、神経遺伝学、行動薬理学等への貢献、ひいては新薬の開発や、遺伝子治療等の医療へとつながることが期待できる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、知覚・学習に関連する行動遺伝学や薬物効果等の研究に応用可能な、ゲノム配列が決定されているゼブラフィッシュの自動化された行動訓練方法・装置開発を行うことを第一の目的とした。

(2) 次に、開発された方法・装置により、ゼブラフィッシュの遺伝的疾患のない標準型の視覚・聴覚、および学習特性を明らかにすることを目的とした。聴覚特性として、400Hz から 2000Hz までの純音の刺激閾 (オーディオグラム) を測定することとした。視覚特性としては、時間分解能の指標である LED の点滅頻度を上昇させていったときに、点滅が知覚可能な最大の点滅周波数である光臨界融合周波数 (Critical Flicker Fusion Frequency; CFF) を測定することとした。空間分解能及びコントラスト感度の指標としては、白黒の縞模様の単位面積あたりの本数を様々に変化させ、同時に白黒の縞模様のコントラストを変化させたときに、縞模様が知覚できる最小のコントラスト比である空間コントラスト感度曲線 (Spatial Contrast Sensitivity Function; SCSF) を測定することとした。

(3) 上記の測定に加え、遺伝的疾患を持つミュータントの視覚・聴覚疾患の評価基準およびアルツハイマーモデルの行動指標である学習の可塑性の行動評価基準、並びに、薬物効果の行動評価基準を提供することを目的とし、遺伝的疾患のない標準型のゼブラフィッシュが加齢に伴って、学習の可塑性が低下するかどうか？その変化を測定するこ

とを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 聴覚特性測定実験 (オーディオグラム測定) 実験

・被験体 ワイルドタイプのゼブラフィッシュ 10 個体が用いられた。

・装置開発

水中スピーカーと空中のスピーカーでは閾値測定結果に大差が無いことが明らかになっていることから (Ladich & Wysocki, 2009)、音提示は、より設置が容易で開発が不要な空気中からの音提示で実施することとした。

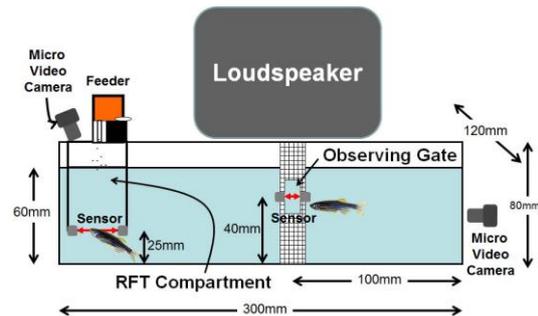


図1 音検出訓練装置 (サイドビュー)

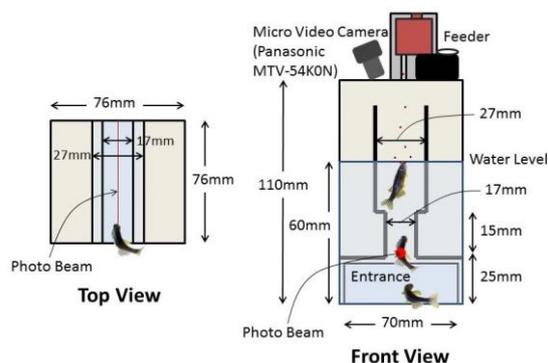


図2 音検出訓練装置 強化コンパートメント

音を透過する黒色のプラスチックメッシュからなる訓練装置は、ゼブラフィッシュが通過すると試行が開始される 100mm×10mm の開口部を持つ観察ゲートと、音の提示中に 76mm×17mm の開口部から入ると強化子が提示される強化コンパートメントからなっていた (図1)。それぞれの開口部及び入り口にはアンプ (Keyence, FS-V21X) に繋がったファイバーセンサー (Keyence, FU-70TZ) が取り付けられており、ゼブラフィッシュが通過したことを検出することができた。スピーカーは、観察ゲートの真上に設置された。アクリルパネルで作られた強化コンパートメント (図2) の上部には、強化子 (殻剥きブラインシュリンプ) を極微量提示可能なフィーダー (Manabe, Dooling, & Takaku, 2013) と、小型ビデオカメラが取り付けられていた。装置全体は、水面が装置底面から 60cm の位置になるように水槽に設置され、水槽全体は、防音ボックスに入れられていた。水温は、27

～28° C に保たれた。実験の制御と反応の記録は、I/O (Pololu Mini Maestro 12-channel USB servo controller) と PC で行われた。

音圧を、観察ゲートの開口部の中央に設置された水中マイクロフォン (Bruel and Kjaer, ミニチュアハイドロホン 8103) により、キャリブレーションを行った。

・音検出課題

訓練は、強化コンパートメントへの進入反応を強化し、進入反応を形成した後、観察ゲートをくぐると長さ 120ms の 800Hz の純音が、140ms 間隔で断続的に 30 秒間提示された。純音の立ち上がり時間と立ち下がり時間はそれぞれ 20ms であった (図 3)。

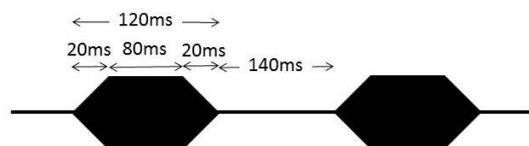


図 3 提示された純音

観察ゲートをくぐり、強化コンパートメントへの進入行動が形成された後、検出課題訓練に移行した。検出課題では、ゼブラフィッシュが観察ゲートをくぐると、純音が提示される音試行と、提示されない無音試行が 0.5 の確率でランダムに開始された。音試行では、音が提示されている 20～30 秒内に強化コンパートメントに入ると、強化子が提示された。一方、無音試行では、ゲートをくぐってから 20～30 秒内に強化コンパートメントに入ると、次の試行の開始が 30 秒間遅延される 30 秒間のタイムアウトが与えられた。訓練の初期は、十分に知覚可能であると考えられる 130dB 程度の音圧から開始した。正答率が 75% を超えた計 120 試行のセッションの次のセッションでは、音圧を徐々に下げていき、正答率が 75% に到達しなくなったところで、その周波数の純音の訓練を打ち切り、直前の音圧を閾値とする手続きと、音提示試行での反応比と無音試行での反応比 (オッズ比) が有意に異なった場合 ($p < .001$)、次のセッションで音圧を下げ、異ならなかった場合は、次のセッションで音圧を上げるセッション間 UP-Down 法の 2 種の方法で閾値を測定した。

(2) 視覚特性測定実験 (光臨界融合周波数 (CFF) 測定・コントラスト感度測定) 実験

① 光臨界融合周波数 (CFF) 測定

- ・被験体 理研ワイルドタイプのゼブラフィッシュ 4 個体が用いられた。
- ・装置開発

実験装置は、音検出課題装置と同様に、30mm×15mm の開口部を持つ観察ゲートと 30mm×10mm の開口部を持つ乳白色の半透明アクリルパネルで作られた強化コンパートメントからなっていた。ゲート及び強化コンパートメントへの進入反応はファイバーセンサーで検出された。コンパートメントの上部

に設置された白色 LED の光が、黒色の熱収縮チューブで外側を覆われたアクリルパイプを通してコンパートメントの内側を照明し、コンパートメント全体を光らせることができた (図 4)。実験水槽は、ポリプロピレン製の容器で作られており、実験中は黒色の発泡スチロールで全体を覆われ、実験セッション中は、新鮮な水が実験水槽と濾過タンクの間で循環されていた。

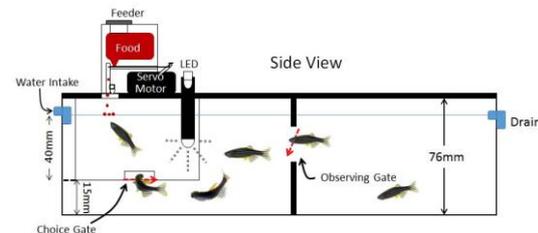


図 4 光臨界融合周波数測定訓練装置

・点滅光検出課題

音検出課題と同様に、観察ゲートをくぐった後、強化コンパートメントに入る訓練が終了した後、点滅光検出課題に移行した。点滅光と常時点灯光では見かけの明るさが異なって見えるため、ゼブラフィッシュが観察ゲートをくぐると、低周波数 (10Hz) で点滅する試行と、点滅が知覚可能な閾値を遙かに超えると考えられる 200Hz の点滅光の試行がランダムに開始された。低周波数試行で点滅開始から 30 秒以内に強化コンパートメントに侵入すると強化子が提示され、200Hz 試行では、ゲートをくぐってから 30 秒内に強化コンパートメントに入ると、次の試行の開始が 30 秒間遅延される 30 秒間のタイムアウトが与えられた。提示光の輝度は、26cd/m² から開始され、8.5 cd/m²、2.6 cd/m² の順に低下された。それぞれの輝度の点滅光セッションにおいて、正答率が 75% を超えた次の試行から、低周波数試行の点滅周波数を 20Hz に増加し、その後 2Hz ずつ増加した。15 セッション経過しても正答率の上昇が見られなくなったところでその輝度での訓練を終了した。点滅は明暗が徐々に変化するサイン関数によって制御された。1 セッション最大 80 強化とした。

② コントラスト感度測定

- ・被験体 理研ワイルドタイプのゼブラフィッシュ 4 個体が用いられた。
 - ・装置開発
- 3D プリンター (Opencreators, Almond) で作成された実験水槽は、開口部が 15mm×20mm の観察ゲートと、高コントラストの 5 インチ有機 EL モニター (Sony, AC-940W) で提示される 2 つの弁別刺激を前方に見ることができ 30mm×15mm の 2 つの選択ゲートからなっていた。観察ゲートの開口部の両サイドは、透明なアクリル板が取り付けられており、そのアクリル板を通して、弁別刺激を見ることができた。選択ゲートとモニター画面の間は、

強化コンパートメントになっていて、正の弁別刺激（縞模様）が提示された選択ゲートから進入した場合は、上部に取り付けられたフィーダーから強化子が提示された。負の弁別刺激（同輝度の様な灰色）が提示された選択ゲートから進入した場合は、5秒間のタイムアウトが与えられた（図5、図6）。実験中は黒色のカードボードで装置全体が覆われていた。1セッションの総強化数は64に設定された。

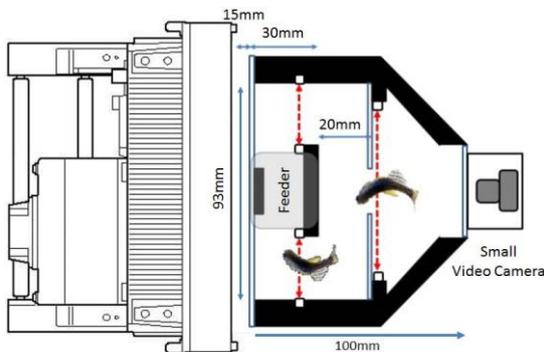


図5 コントラスト感度測定実験装置 (Top View)

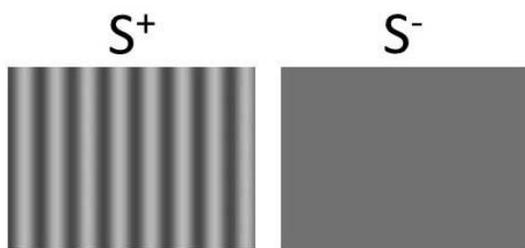


図6 正 (S+) と負 (S-) の弁別刺激

(3) 学習の可塑性実験 (連続弁別逆転実験)

・被験体 理研から導入した個体と自家繁殖した理研ワイルドタイプの孵化後 180~580日のゼブラフィッシュ 12個体が用いられた。

・装置開発

装置は、光臨界融合周波数測定訓練装置と以下の点を除いてほぼ同様であった。試行を開始する観察ゲートが強化コンパートメントに隣接して取り付けられていた点と、強化コンパートメントに2つの選択ゲートがあり、それぞれの選択ゲートには半透明な乳白色のプレートが取り付けられており、試行が開始されると、それぞれのプレートが赤色と緑色になるようにLEDにより照明された。2色が提示される位置は左右ランダムであった。ゼブラフィッシュが正刺激に割り当てられた色光の選択ゲートから強化コンパートメントに侵入すると強化子が提示され、負の色光刺激が提示されている選択ゲートから侵入すると、20秒間のタイムアウトが与えられた（図7）。正答率が80%を超えたところで、正と負の弁別刺激を逆転させ、再度正答率が80%を超えたところで、再逆転する逆転弁別訓練を繰り返した。逆転セッション内での学習量として、学習可能残余率（完全学習であ

る1.0とセッション開始直後の20試行の正答率との差)に対する正答率の増加量（最終20試行の正答率と開始直後20試行の正答率との差）を示す指標 (WII) を計算した。値が1.0に近いほど、学習量が大きく可塑性が高いことを示す。1セッションの総強化数は100とした。

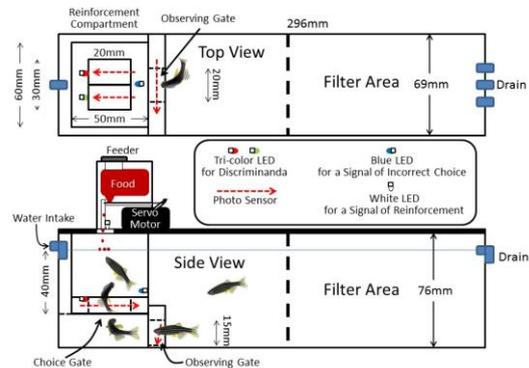


図7 色弁別訓練装置

4. 研究成果

(1) 聴覚特性測定実験 (オーディオグラム測定) 実験

正答率及びオッズ比に基づいた閾値の推定法により得られた値に大きな差が認められなかったため、両結果をまとめて図8に示している。1000Hzの純音に対する閾値が最も低い谷型のオーディオグラムが得られた。概して金魚でも行動に基づいたオーディオグラムの方が低い閾値が得られているが、本実験の行動に基づいたオーディオグラムも聴性脳幹反応 (ABR) で得られたゼブラフィッシュのオーディオグラムよりも低い閾値になっている。

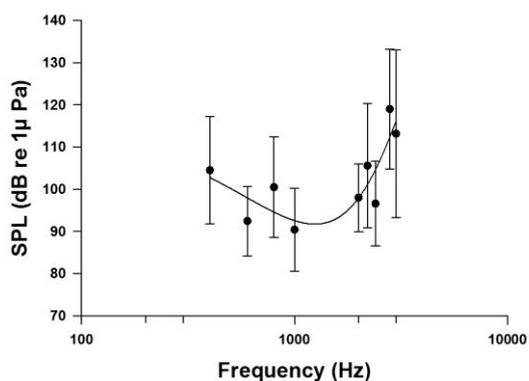


図8 ゼブラフィッシュのオーディオグラム

(2) 視覚特性測定実験 (光臨界融合周波数 (CFF) 測定・コントラスト感度測定) 実験

・光臨界融合周波数 (CFF)
輝度を $2.6 \text{ cd/m}^2 \sim 26 \text{ cd/m}^2$ に変化させたときのゼブラフィッシュの光臨界融合周波数とヒトの光臨界融合周波数測定結果が、図9に示されている。ヒトの閾値の測定は、空中でゼブラフィッシュと同様な手続きで測定

したものである。ヒトとゼブラフィッシュに有意な差は見られなかった ($F(1,16)=0.08, p>.7$)。また、ゼブラフィッシュの光臨界融合周波数は、ヒトと同様に輝度の対数関数になる Ferry-Porter Law に従うことが確かめられた。

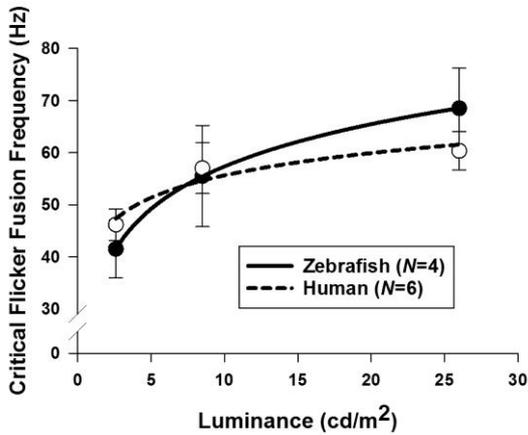


図 9 ゼブラフィッシュとヒトの光臨界融合周波数曲線

・コントラスト感度

図 10 に、観察ゲートから見た場合の視野角度あたりの空間周波数 (1 度あたりの縞模様の本数) を、0.14 あるいは 0.16 に固定し、コントラスト比を下げていったときの 1 個体の学習曲線が示されている。空間周波数が 0.14cpd の場合は、マイケルソンコントラスト比 ((最大輝度-最小輝度) / (最大輝度+最小輝度)) が 0.52 までは正答率が統計的に有意なレベルを超えたが、コントラスト比が 0.44 になると、正答率の明らかな上昇が見られなくなり、閾値が 0.52 と 0.44 の間にあることが推定される。空間周波数が 0.16cpd の場合は、0.26 と 0.16 の間の 0.21 近傍が閾値であることが推定される。

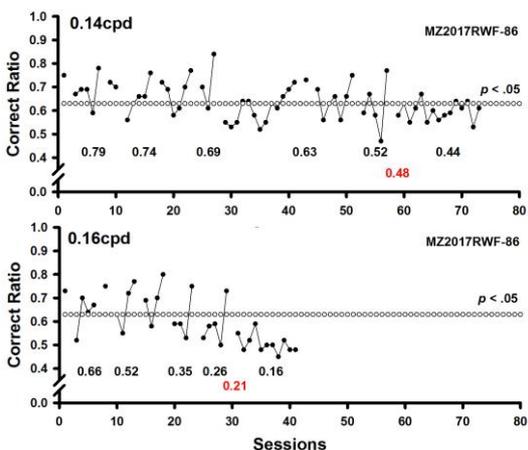


図 10 被験体 MZ2017RWF-86 の学習曲線

他の 3 個体の同様な方法で得られた閾値が表 1 に示されている。被験体 MZ2017RWF-86 は、他の個体に比べてかなり低い閾値を示しており、個体差が大きい結果となった。この差は、被験体 MZ2017RWF-86 は、負刺激が提示されている選択ゲートに進入する直前に

反転する反応が盛んに観察された一方、他の個体は、その様な反転反応はほとんど見られず、観察ゲートから選択ゲートへの直進反応が優位に生じていた。被験体 MZ2017RWF-86 と他個体では刺激を選択する位置が異なり、その結果、視野角度に相違が生じ、大きな個体差になった可能性が考えられる。また、被験体 MZ2017RWF-86 以外の個体は、選択ゲートに突進する傾向があり、被験体 MZ2017RWF-86 に比べて他の個体は衝動性が高かったために、学習の進行に相違が生まれた可能性も考えられる。また、金魚の古典的条件づけに基づくコントラスト感度 (Bilotta & Powers, 1991) に比べてかなり低い値になっていることからこの種の測定では、被験体が刺激に十分に注意し、衝動的な反応が少なくなるような方法の開発が必要かもしれない。

表 1 各空間周波数における閾値

	cpd	被験体			
		RWF85	RWF86	RWM87	RWM88
空間周波数	0.11			0.69	0.63
	0.12	0.63	0.48		
	0.14	0.69			
	0.16		0.21	0.69	0.69

(3) 学習の可塑性実験 (連続弁別逆転実験)

図 11 に、連続逆転訓練時の正反応率の推移が示されている。逆転直後のセッションでは正答率が低下し、急峻に正答率が上昇する個体と、正答率の上昇が緩やかな個体が見られる。

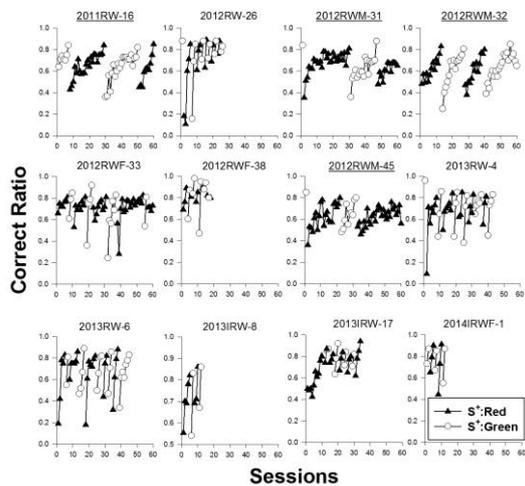


図 11 連続逆転弁別学習曲線

学習の可塑性の指標として、最初の弁別訓練セッション、最初の逆転弁別セッション、2 回目の逆転弁別セッション、および 3 回目の逆転弁別セッションのセッション内での正答率の上昇率 (WII: Within-session Improvement Index) の加齢に伴う変化が図 12 に示されている。それぞれのセッション時での日齢との間の直線回帰直線の決定係数 (R^2) は、弁別訓練開始直後の最初のセッションと、最初の逆転直後のセッションでは、.20、2 回目の逆転直後のセッションで

は、15、3回目の逆転直後のセッションでは、.67であり、3回目の逆転セッションの指標の回帰式への当てはまりが一番良くなっている。

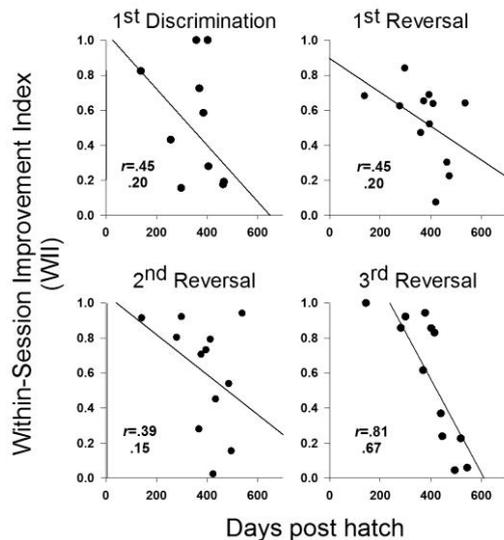


図 12 日齢とセッション内正答率上昇指標の相関

最も当てはまりが良い3回目の逆転直後のセッションの結果について、さらにロジスティック回帰曲線 (SigmaPlot Ver. 14.0) の決定係数を計算したところ、.92であり、直線への当てはまりより、急激な低下を示すロジスティック回帰曲線の方の当てはまりが良くなっている。アルツハイマー等の加齢研究におけるゼブラフィッシュの有用性が示されており、ゼブラフィッシュの認知機能は加齢に伴って低下することが知られている (Yu, Tucci, Kishi, & Zhdanova, 2006)。本研究の結果は、認知機能の特性の一つである学習の可塑性は、ゼブラフィッシュでは加齢に伴って徐々に低下するのではなく、420日前後を境に、急激に低下することを示唆している。

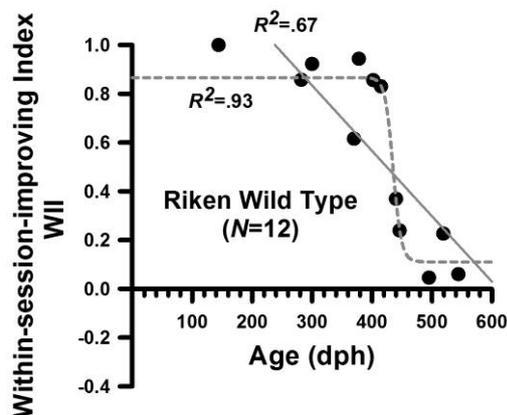


図 13 3回目の逆転セッションでのセッション内正答率上昇指標の加齢に伴う変化

引用文献

Bilotta, J., & Powers, M. K. (1991). Spatial contrast sensitivity of goldfish: mean luminance, temporal frequency and a new psychophysical technique. *Vision Res*, 31(3), 577-585.

Ladich, F., & Wysocki, L. E. (2009). Does speaker presentation affect auditory evoked potential thresholds in goldfish? *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 154(3), 341-346.

Manabe, K., Dooling, R. J., & Takaku, S. (2013). An automated device for appetitive conditioning in zebrafish (*Danio rerio*). *Zebrafish*, 10(4), 518-523.

Yu, L., Tucci, V., Kishi, S., & Zhdanova, I. V. (2006). Cognitive Aging in Zebrafish. *PLoS ONE*, 1(1), e14.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

① Manabe, K. (2017). The Skinner box evolving to detect movement and vocalization. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*, 43(2), 192-211. 査読あり

② 眞邊一近. (2017). 実験的行動分析学における新たな種への挑戦—いかにして動物実験を実施するか?—. *行動分析学研究*, 31, 163-180. 査読あり
〔学会発表〕 (計 6 件)

① Manabe, K. Behavioral Contrast Sensitivity in Zebrafish (*Danio rerio*). 44th Annual convention of the Association for Behavior Analysis International in San Diego. 2018

② Manabe, K., Xiccato, T., & Bisazza, A. A Low-Cost Video Tracking System for Operant Conditioning of Small Fish Using Raspberry Pi 9th international conference of the Association for Behavior Analysis International in Paris, France, 2017

③ Manabe, K. Interval Timing in small fish. Comparative and Quantitative Analysis of Behaviour, Denver, 2017

④ Manabe, K. Challenges to New Species in the Experimental Analysis of Behavior: How to Conduct Animal Studies. 8th international conference of the Association for Behavior Analysis International in Kyoto, Japan. 2015

⑤ Manabe, K., Dooling, Roesch, M. Interval Timing in Zebrafish (*Danio rerio*). 41st Annual convention of the Association for Behavior Analysis International in San Antonio. 2015

⑥ 眞邊一近・RJ.Dooling・高久信一(2014). ゼブラフィッシュ (*Zebra Danio*) における連続弁別逆転学習, 日本行動分析学会第 32 回大会発表論文集, 32, 32.

〔図書〕 (計 1 件)

① 眞邊一近. (2018). 付録 1. 被験体とその飼育方法 1.3 ゼブラフィッシュ 基礎心理学会 (編) 基礎心理学実験法ハンドブック 朝倉書店 pp. 496-498. 総ページ数 608 頁

6. 研究組織

(1) 研究代表者

眞邊一近 (MANABE, Kazuchika)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 80209676

(2) 研究分担者

高久 信一 (TAKAKU, Shinichi)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 40102636

(3) 研究分担者

朝比奈 潔 (ASAHINA, Kiyoshi)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号: 10147671