

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：12614

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660155

研究課題名(和文) バイオセンサによる魚類のストレス応答モニタリング：魚のきもちを知ることは可能か？

研究課題名(英文) A new attempt to use biosensor for real-time monitoring fish stress

研究代表者

遠藤 英明 (Hideaki, Endo)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授

研究者番号：50242326

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、バイオセンサシステムを用いることにより、魚を自由に遊泳させた状態で体内のストレス指標をリアルタイムモニタリングするという全く新しいアプローチ法により、ストレスとされる行為が魚体に及ぼす影響を解析することを目的とした。すなわち、魚を遊泳させながら生化学的および行動生理的なストレス因子を負荷し、この状態で血中グルコース濃度をモニタリングし、各因子とそれに伴う生理状態、行動変化との関係を明らかにすることを試みた。これにより「魚の真のストレス応答」を測定・解析し、魚類の行動と生理との間の新たな相関関係を見出し、究極的には「魚のきもち」を知るための可能性について探求した。

研究成果の概要(英文)：We developed wireless biosensor system to monitor the physiological condition of fish. As an important indicator of stress, glucose concentrations are monitored using in vitro blood analysis. This system enables artificial stress-free and non-lethal analysis, and allows for reliable real-time monitoring of fish stress. We investigated stress due to alterations in water chemistry, including dissolved oxygen and ammonia-nitrogen compounds. Stress perceived from behavioural interactions, including attacking behaviour and visual irritation, was also monitored. Water chemistry alterations induced increases in the glucose concentration (stress) that decreased with removal of the stimulus. For behavioural interactions, stress levels change with avoidance, sensory behaviour and activity. We believe that the proposed biosensor system could be useful for rapid, reliable, and convenient analysis of the fish physiological condition and accurately reflects the stress experienced by fish.

研究分野：生体機能利用学

キーワード：バイオセンサ 魚類 ストレス グルコース 魚類行動 魚類生理 モニタリング

1. 研究開始当初の背景

魚の生理学的なストレス応答は、コルチゾルやカテコールアミンなどのホルモン系の変化よりなる一次応答から始まり、これらストレスホルモンの代謝活性化によって生じる血中グルコースの濃度変化としての二次応答、生き続けられるかどうかが決まるまでの三次応答に分類される。その要因となるものは、外敵から威嚇されたときのような行動生理的要因をはじめ、流速、温度、接触などの物理的要因、アンモニア、亜硝酸、毒物などの有害物質や感染による生化学的要因などが挙げられる。現在までの魚類のストレス応答の研究では、上記の一次及び二次応答におけるコルチゾルやグルコースの濃度変化を指標とすることが一般的であった。

ところで、これら指標の測定には従来よりヒト用臨床検査キットが用いられてきた。しかしながらこの方法では、魚の捕獲、血液の採取とその血漿化、吸光分析法による測定など煩雑な操作と時間を必要としていた。特に、水中を生活の場としている魚にとっては、網で捕獲され、空气中に暴露されながら採血されることで既に多くのストレスを受けた状態といえ、加えて実験者のサンプリングのテクニックもストレスの指標物質の分析に影響を与えてしまう。また、ストレスを与えてからコルチゾルやグルコースの濃度に変化が見られるまでの時間的経過についても十分には解明されていない。このため得られた応答値が、実験目的のために負荷されたストレスのみに由来する真のストレス応答値とは言い難かった。

一方、我々は平成 20~22 年度科研費基盤研究(B)「魚類のための生体留置型ワイヤレスバイオセンサの創出に関する研究(代表)」において、魚を捕獲することなく自由に遊泳させた状態で血中グルコース濃度をリアルタイムにモニタリングできる新しいバイオセンサの開発に成功していた。そこでこのバイオセンサを、魚類のストレス応答測定の中核に適用することを提案した。本システムは、魚体に装着した直後はそのストレスにより、急激な血中グルコース濃度の増加が認められるが、その後 12 時間ほど経過すると、値は平常値に戻り魚体は平静な状態となることが確認されている。したがって、センサの出力信号が安定し、魚が馴致したところで上記ストレス応答を測定すれば、ストレス因子から生じる「真のストレス応答」を知ることができると考えた。

2. 研究の目的

本研究は、上記バイオセンサシステムを用いて魚の「真のストレス応答」をリアルタイムにモニタリングすることにより、各種ストレスが魚体に及ぼす影響についての新しいアプローチを行うことを目的とした。すなわち、魚を遊泳させながら生化学的および行動生理的なストレス因子を負荷し、この状態で

血中グルコース濃度をモニタリングし、各因子とそれに伴う生理状態、行動変化との関係を明らかにすることを試みた。これにより「魚の真のストレス応答」を測定・解析し、魚類の行動と生理との間の新たな相関関係を見出し、究極的には「魚のきもち」を知るための可能性について探求することを目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、図 1 に示すような生体内留置型ワイヤレスバイオセンサシステムを用いて魚のストレス応答をリアルタイムモニタリングすることにより、各種ストレスが魚体に及ぼす影響について検討した。

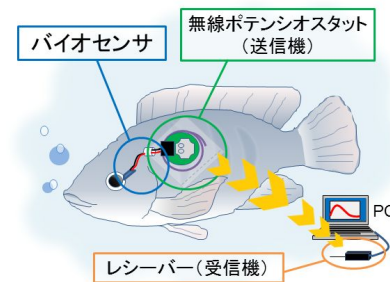


図 1 ワイヤレスバイオセンサシステム

まず、本実験に適した長時間のモニタリングが可能なバイオセンサを製作するために、生体適合性を有する機能性ポリマーの利用を試みた。次に、作製したバイオセンサが装着された魚を水槽内で遊泳させ、生化学的(溶存酸素濃度、アンモニア性窒素化合物濃度等)および行動生理的なストレス(テリトリー争い、攻撃等)を負荷し、この状態で血中のグルコース濃度をモニタリングした。そして得られたストレス応答値とそれに伴う生理状態や行動の変化との関係を考察した。

(1) ワイヤレスバイオセンサの製作

これまでのバイオセンサは、ティラピアを試験魚とした場合、24 時間以上測定を行うとセンサの出力が徐々に低下する傾向が認められていた。この主な理由としては、センサを構成している電極の素材が金属であるため、生体に対する適合性が低いと考えられる。すなわち、体内タンパク質をはじめとする夾雑物質がセンサ表面に吸着し、酵素活性の低下が生じたものと推察される。そこで本研究では、生体適合性を有する機能性ポリマー(MPC ポリマー)をセンサの検出部に装着することにより、長時間のモニタリングが可能なセンサの製作を試みた。まず、グルコース測定用センサの構築には、作用極に白金イリジウム線を、対極に銀塩化銀を用いて、針型微小電極を作製した。電極反応部には、電極反応に及ぼす夾雑物質の影響を軽減するためにナフィオンを塗布し、その上に前述の生体適合性ポリマーとグルコースオキシダーゼを固定化することにより、バイオセンサを構築した。なお、バイオセンサの留置管

所については、前報 H. Endo et al. Biosens. Bioelectron. 24, 1417-1423 (2009) に従い、眼球外膜内部に存在する間質液に (EISF) 中に挿入し、そのグルコース濃度をリアルタイムモニタリングした。また、コントロールとして 2-フェノキシエタノールによる麻酔後に採血した血漿の血糖値の測定も従来法 (ヒト臨床検査用キット) を用いて行った。

(2) 生化学的因子が及ぼすストレス応答の検討

作製したグルコース測定用バイオセンサを試験魚 (ティラピア, *Oreochromis niloticus*) に装着し、水槽中で血中グルコース濃度が平常値になるまで、約 12 時間自由に遊泳させて馴致させた。その後、水槽中の溶存酸素濃度を変化させ、センサによるグルコースの測定値とストレス応答との関係を検討した。また、アンモニア性窒素化合物 (アンモニア, 亜硝酸, 硝酸) を任意の濃度で添加し、ストレス応答との関係についても検討した。

(3) 行動生理学的因子が及ぼすストレス応答の検討

ティラピアの雄魚は顕著な縄張り行動を示し、狭い水槽の中では激しく争うことが知られている。まず、図 2 に示すように、1 尾の中型個体 (約 250 g) のティラピア雄魚にバイオセンサを装着し、水槽内 (約 50 L) で遊泳させた (a)。そしてセンサの出力電流値が安定したところで、この個体よりも小型のティラピア雄魚を同じ水槽に入れて混泳させ、両者の行動を観察すると共にセンサの出力からストレス応答を測定した (b)。

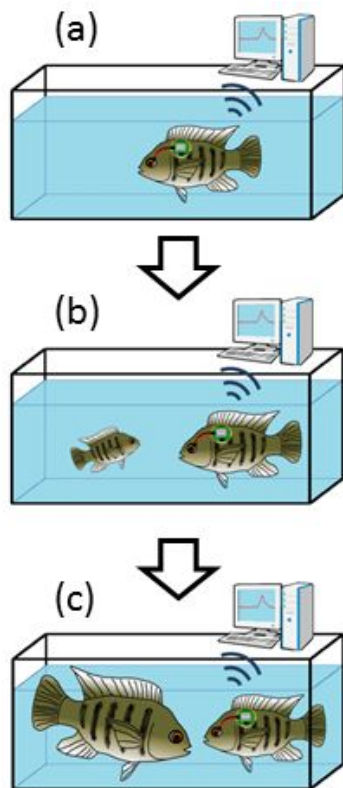


図 2 行動生理学的因子が及ぼすストレス応答の測定

その後、小型個体を取り出し、センサの出力が安定したところで、(c) に示すような大型の個体を投入して混泳させ、同様に観察すると共にストレス応答を測定した。

さらに、これと同一の実験方法で、両者の間に仕切り板を設け、物理的接触が無い状態でのストレス応答を測定した。これにより、前者は争いの時に生じる物理的接触と行動生理学的なストレスの両方による応答結果が、後者においては主に行動生理学的ストレスによる応答結果が得られると推察されるため、両者の結果から物理的要因と行動生理学的要因のストレス応答の差異を観察した。

本研究の遂行にあたっては、水産学をはじめ生体機能利用学、生物化学、電子化学、魚類行動学、魚類生理学などの多分野に渡る知識と経験が必要なことから、次に示すような研究協力体制を構成するに至った。まず初年度においては、各種バイオセンサの基本設計、製作は研究代表者の遠藤英明 (生体機能利用学、電子化学) が担当した。また、魚体への生化学的ストレス因子の検討については東北大学大学院農学研究科の中野俊樹 (水産化学、魚類生理学、魚類栄養学) が、行動生理学的因子の検討については東京海洋大学大学院海洋技術研究科の有元貴文 (魚類行動学) が連携研究者として担当した。

4. 研究成果

(1) 生化学的因子が及ぼすストレス応答の検討

水槽中の溶存酸素濃度を変化させ、魚にストレスを負荷し、ストレス応答とセンサによる測定値との関係を検討した結果を図 3 に示す。図中、実線はバイオセンサにより測定された EISF 中にグルコース濃度を示し、●印は採血による実際の血糖値を示す。また図中の矢印は、溶存酸素量を減少させるために窒素ガスを添加した点を示す (酸素濃度: 7.8 → 3.1 ppm)。この図から、溶存酸素濃度の低下により血中グルコース濃度の上昇が認められる。一般に魚類のグルコース濃度は、ストレスの作用によって増加することが知られており、この現象は呼吸難により魚にストレスが生じたものと推察される。

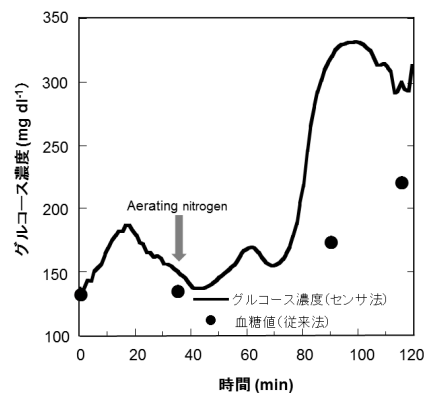


図 3 溶存酸素濃度の影響

次に本研究では、水質悪化の際に生じるアンモニア性窒素化合物濃度とストレス応答との関係について検討した。すなわち、通常の飼育水に魚を馴致した後、アンモニア(A)、亜硝酸(B)、硝酸(C)の濃度を各々 25mg dl^{-1} に変化させた(図4)。まず、アンモニアと亜硝酸については添加後、数十分でグルコース濃度の上昇が認められた。これらの化学物質は魚類に対して強い毒性を示すことが知られている。前述のように、魚類のグルコース濃度は、ストレスの作用によって増加するため、この現象も魚体が明らかにストレスを受けたものと推察される。

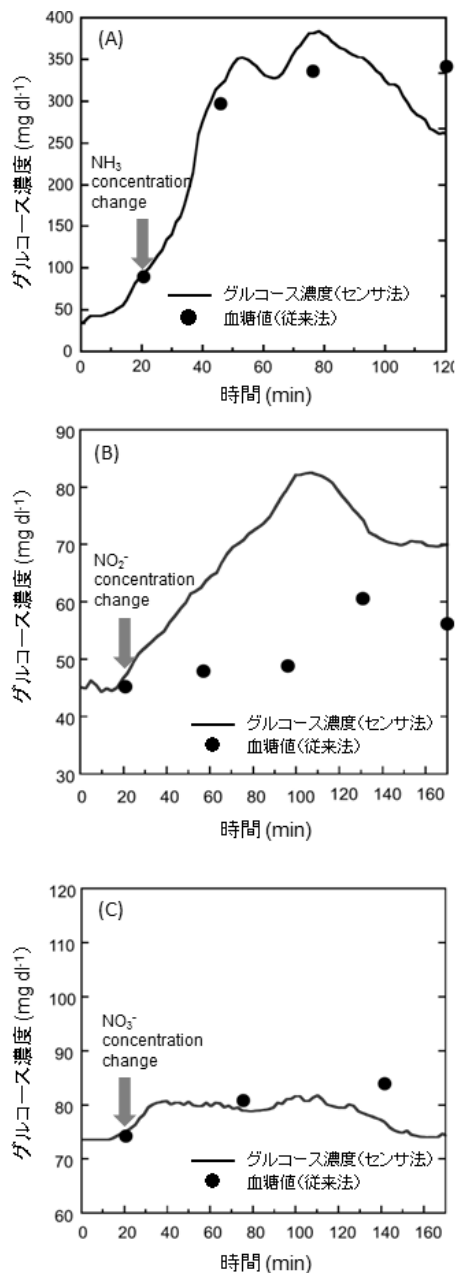


図4 アンモニア性窒素化合物濃度の影響

一方、硝酸塩濃度を变化させた場合は、グルコース濃度の変化がほとんど認められなかった(C)。この理由として、硝酸塩はアンモニアや亜硝酸に比べて、魚類への毒性が低

いことが知られているため、魚体へのストレスがそれほど大きくないものと考えられる。

以上の結果より、本バイオセンサシステムを用いることにより、生化学的ストレス因子による魚類のストレス応答との関係を明らかにすることができた。

(2) 行動生理学的因子が及ぼすストレス応答の検討

ティラピアの雄魚は縄張りをつくり、同種の雄に対して威嚇行動をとることが知られている。この際、魚体には何らかのストレスが負荷されているものと推察されるが、具体的なストレス因子はほとんど明らかにされていない。そこで、魚類のストレス応答と個体間の威嚇行動との関係を調べるために、バイオセンサを用いて魚体のグルコース濃度のリアルタイムモニタリングを行った。

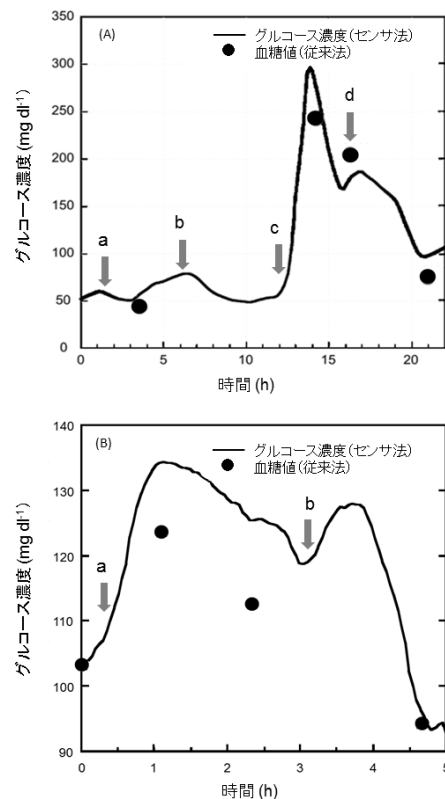


図5 行動生理学的因子の影響

まず図5(A)は、中型個体のティラピアが遊泳する水槽に、それよりも小型の個体を投入して(a)、一定時間混泳させた後水槽より取り出し(b)、さらに数時間後に、中型個体よりも大型の個体を投入して(c)、一定時間混泳後再度取り出した(d)結果である。この図から認められるように、小型の個体を投入した場合は、中型個体のグルコース濃度はほとんど変化していないため、この個体はストレスをあまり受けていないことが推察される。次に大型個体を投入した場合は、中型個体のグルコース濃度は著しく上昇した。この時、大型個体が中型個体を追い回す様子がしばしば観察され、中型個体はかなりストレ

スを受けていたものと推測される。

一方、図 5 (B) は、水槽の中央に透明な仕切り板を設置することにより個体同士が直接接触しない状態をつくり、中型個体と大型個体を対面させ (a)、一定時間後に大型個体を水槽より取り出した (b) 結果を示す。この図から認められるように、対面直後には中型個体のグルコース濃度は徐々に上昇したものの、大型個体を取り出した後は、元の平常値に戻ってゆく現象が確認できる。この実験系では個体間の物理的接触がないことから、中型個体は視覚により刺激を受け、それがストレスとなって応答しているものと推察される。しかしながら、この実験系では、仕切り板により接触は妨げられてはいるものの、飼育水は混ざっている状態であるため、嗅覚等の刺激の関与も考えられ、必ずしも視覚のみによるものではないとも推察される。この点については、今後の更なる検討が必要と思われるが、魚の視覚的な刺激を理解する上で本結果は一つの手がかりになるといえる。

以上のようなバイオセンサを用いた斬新な方法論によって得られた成果は、今後の魚類行動学、魚類生理学および魚類養殖学等の分野に応用可能な新しい知見を提供するとともに、これを基盤として水圏環境における水質監視や修復、さらには漁業などの応用分野にも貢献できると考えられる。例えば、水質監視の分野では魚類を用いたバイオアッセイが普及しているが、その殆どが個体の生死で判定している。そこで、本法により原因危害物質と魚体内の生理的变化との関係を明らかにできれば、魚の体調変化から初期の水質異変を早期に検出できる新規バイオアッセイモニタリングシステムの構築が期待できる。

また近年では、水圏における環境修復の活動が活発に行われているが、「ヒトにとりきれいな水 (例：透明度が高く、雑菌が存在せず美味しく飲めるような水)」と「魚にとりきれいな水 (例：餌となるプランクトンが豊富で濁度のある水)」との間には、ヒトと魚との認識・好みの違いが大きく、生息している魚のための水修復とはいえない事例がしばしば認められる。そこで、実際に修復された水に魚を泳がせ、本法を用いてストレス応答を測定すれば魚にとって最適な環境条件を明らかにできる可能性があり、今後の環境修復事業や養殖法および水族館などの観賞魚の飼育法に新しい提言ができる。

今後、本バイオセンサを用いて各種ストレス因子とそれに伴う行動学および生理学的な変化との関係を考察することにより、「魚のきもち」を知るための手がかりを探求できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

H. Wu, A. Aoki, T. Arimoto, T. Nakano,

H. Ohnuki, M. Murata, H. Ren, H. Endo: Fish stress become visible: a new attempt to use biosensor for real-time monitoring fish stress. *Biosens. Bioelectron.* **67**: 503-510 (2015) 査読有
DOI: 10.1016/j.bios.2014.09.015.

M. Riyanto, K. Yanase, T. Arimoto: Temperature and fatigue effect on the maximum swimming speed of jack mackerel *Trachurus japonicus*. *Fish. Sci.* **80**: 53-59 (2014) 査読有

DOI: 10.1007/s12562-013-0686-6

T. Nakano, M. Kameda, Y. Shoji, S. Hayash, T. Yamaguchi, M. Sato: Effect of severe environmental thermal stress on redox state in salmon. *Redox Biol. (Official J. Soc. Free Radic. Biol. Med. and Soc. Free Radic. Res.-Eur.)*, **2**: 772-776 (2014) 査読有

DOI: 10.1016/j.redox.2014.05.007

〔学会発表〕(計 4 件)

1) 国際会議

H. Wu, A. Aoki, T. Suzuki, J. Otsuka, K. Hibi, T. Arimoto, T. Nakano, H. Ren, H. Endo: Fish stress become visible: a new attempt to use glucose biosensor for real-time monitoring fish stress. *Biosensors 2014*, Melbourne, Australia, 27-30 May, 2014

T. Nakano, S. Hayashi, N. Nagamine, T. Yamaguchi, M. Sato: Effect of excessive doses of oxytetracycline on antioxidative capacity in coho salmon, *International Conference of Asian Environmental Chemistry 2014 (ICAEC2014)* (Convention Center, Chulabhorn Research Institute, Bangkok, Thailand, 24-26 November, 2014

2) 国内学会

青木絢裳, 有元貴文 (海洋大), 中野俊樹 (東北大農), 村田政隆 (道工技 C), 呉海雲, 任 恵峰, 遠藤英明 (海洋大): バイオセンサを用いた魚類の行動生理学的ストレスのモニタリング: 日本水産学会春季大会 東京海洋大学 2015 年 3 月 28 日

中野俊樹, 長嶺慶美, 林 聡司, 山口敏康, 佐藤 実 (東北大農): ギンザケの肝機能に及ぼすオキシテトラサイクリンの影響について: 日本水産学会春季大会 東京海洋大学 2015 年 3 月 28 日

青木絢裳, 呉海雲, 鈴木喬之, 大塚純也, 有元貴文 (海洋大)・中野俊樹 (東北大農), 村田政隆 (道工技 C), 日比香子, 任 恵峰, 遠藤英明 (海洋大): バイオセンサによる魚類ストレス応答のリアルタイムモニタリング: 日本水産学会春季大会 北海道大学 2014 年 3 月 29 日

〔その他〕

ホームページ

■遠藤英明研究室

<http://www2.kaiyodai.ac.jp/~endo/endo/index.html>

■東京海洋大学研究者総覧データベース

<http://olcr.kaiyodai.ac.jp/kenkyusha-db/kaiyokagaku.html>

6．研究組織

(1)研究代表者

遠藤 英明 (ENDO, Hideaki)

東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究
科・教授

研究者番号：50242326

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者 (2 名)

有元貴文 (Takafumi Arimoto)

東京海洋大学大学院・海洋科学技術研究
科・教授

研究者番号：20106751

中野俊樹 (Toshiki Nakano)

東北大学大学院・農学研究科・助教

研究者番号：10217797