

ゼブラフィッシュの不安行動の 定量化とその個体数の割合

徳島県立城南高等学校応用数理科 3 年

遠藤優斗 中川朋香 幸五晴

目次

1. 研究の概要	3
2. 動機・目的	3
3. 仮説	3
4. 実験器具・準備	3
5. 実験方法	4
6. 実験結果	6
7. 考察	9
8. 結論・今後の展望	9
9. 参考文献	9

1. 研究の概要

私たちは、先行研究よりゼブラフィッシュが不安を感じることは非得異的で、より持続的だと考え定量することが可能だと考えた。そこで、ゼブラフィッシュの不安行動をとるレベルは区別できるのか、全体の中で不安行動とる個体数の割合はどれくらいなのかを調べようと思った。

明暗選好性テストでは、2分間馴致させた後、5分間で明るいエリアへ移動した回数と滞在時間、オープンフィールドテストでは、5分間で内側エリアに移動した回数と滞在時間、ノーベルタンクテストでは、6分間で不安行動（上層への移動回数や滞在時間、初めて上層に移行するまでの時間など）をとった回数と時間を計測した。それぞれ3回ずつテストを行った。

2. 動機・目的

金魚すくいであつてきた金魚を水槽に入れると、初めは水槽の下にいて、大きな動きを示さないが、そのうち水槽の環境に慣れ、水槽内を泳ぐようになる。この行動は、先天性ストレス応答という反応が関係しており、初めての環境において、魚が不安を感じた際、暗い所や水槽の外側、下層に移動する習性があるからだを知った。この不安行動は、個体差が存在し、遺伝的要素によって決まっている。不安行動についての研究は少ないが、モデル生物であるゼブラフィッシュに関する論文がある。ゼブラフィッシュを用いた明暗選好性テスト、オープンフィールドテスト、ノーベルタンクテストを行うことで、不安行動を定量化できるとある（吉田将之 2016）。そこで私たちは、実験室内で明暗選好性テスト、オープンフィールドテスト、ノーベルタンクテストを行い、ゼブラフィッシュを用いた不安行動の定量化ができるか検証した。また不安行動の定量化を行うことにより、不安行動をとりやすい個体とそうでない個体の割合はどれくらい存在するのかも合わせて検証することで、個体の不安行動に関する知見を増やすことを目的とした。

3. 仮説

ゼブラフィッシュの中で不安を感じる個体は、暗いエリアや外側エリア、下層エリアに長く滞在し、不安をあまり感じない個体は、明るいエリアや暗いエリア、上層エリアに長く滞在することが先行研究よりわかっている。そこで、私たちは、実験装置を私たちでもできるように変化を加えた状態でもゼブラフィッシュの不安行動を定量化できると推測した。また、ゼブラフィッシュが、どのくらい不安を感じるのかははっきりと区別することができ、全体の中での不安を感じる個体と感じない個体の割合を求めることができると推測した。

4. 実験器具、準備

明暗選好性テストで使う水槽、ノーベルタンクテスト 個体を判別できるよう分けて飼育したゼブラフィッシュ 5 匹

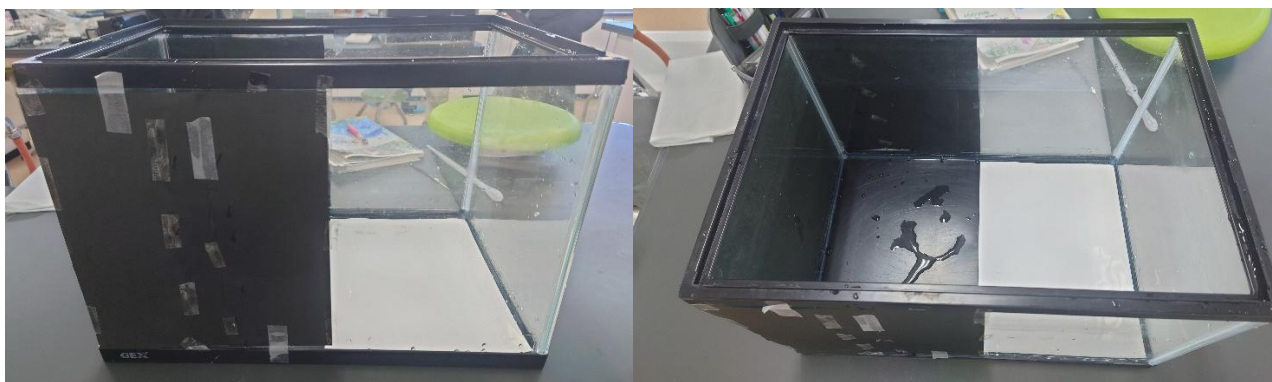


図1. 明暗選好性テストの実験装置



図2. オープンフィールドテストの実験装置

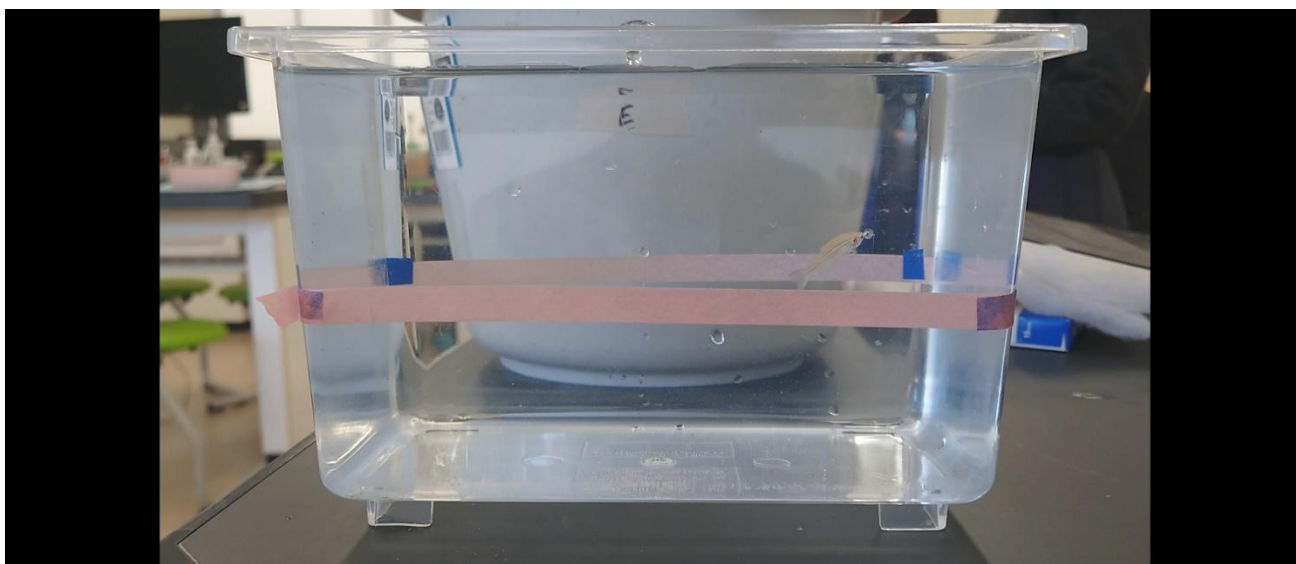


図3. ノーベルタンクテストの実験装置

5. 実験方法

ゼブラフィッシュ 5 個体をバケツでそれぞれ 1 匹ずつ飼育し、個体識別を行った。それぞれの個体を個体 A～個体 E とし、次に示す実験 1～3 を各 3 回ずつ実施した。

実験 1 明暗選好性テスト

水槽の側面半分は黒い画用紙を、もう半分の底面に白い光沢紙を貼り、明るいエリアと暗いエリアを区別する。これとは別の水槽にゼブラフィッシュを1匹入れ、2分間馴致させる。馴致後、画用紙・光沢紙を貼った水槽にゼブラフィッシュを入れ、5分間計測し、ゼブラフィッシュが暗いエリアから明るいエリアに移動する回数と明るいエリアに滞在する時間を計測する。不安を感じる個体は暗いエリアにとどまり、明るいエリアを忌避する行動をとる。

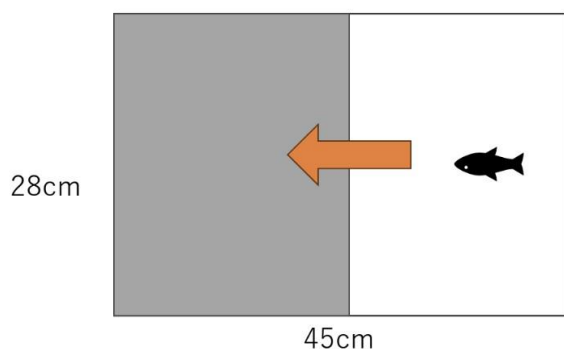


図4．明暗選好性テストの模式図

実験2 オープンフィールドテスト

水槽の底面が正方形になるように仕切りを置き、水槽の側面全てが暗くなるように黒い画用紙で覆った。黒く覆った水槽にゼブラフィッシュを入れ、5分間計測し、ゼブラフィッシュが外側エリアから内側エリアに移動する回数と内側エリアに滞在する時間を計測する。不安を感じる個体は、外側にとどまり、不安を感じない個体は、外側エリアと内側エリアを行き来する。

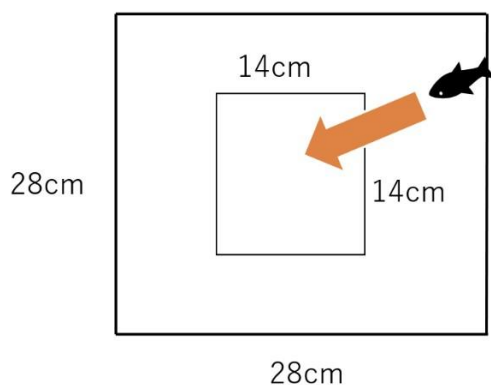


図5．オープンフィールドテストの模式図

実験3 ノーベルタンクテスト

この実験では、図3で示した縦12cm、横20.5cm、高さ12cmの実験装置にゼブラフィッシュを導入し、すぐに6分間観察を開始する。観察するのは以下の7つの項目である。ただし、本論文では、特に結果が顕著であった上層への移行回数（以下項目①とする）、上層滞在時間（以下項目②とする）、初めて上層に移動するまでの時間（以下項目③とする）の結果を記載・考察する。

行動指標（単位）	値が大きい時の解釈
上層への移行回数	不安レベル低
上層滞在時間（秒）	不安レベル低
上層での移動距離（m）	不安レベル低
初めて上層に移行するまでの時間（秒）	不安レベル高
奇異な動き*の出現回数	不安レベル高
フリージングの回数	不安レベル高
フリージングの時間（秒）	不安レベル高

表1 新奇水槽テストにおける不安評価のための主な行動指標（文献14より）
* 急激・急角度の方向転換や突進の繰り返し

図6. ノーベルタンクテストで観察する行動指標

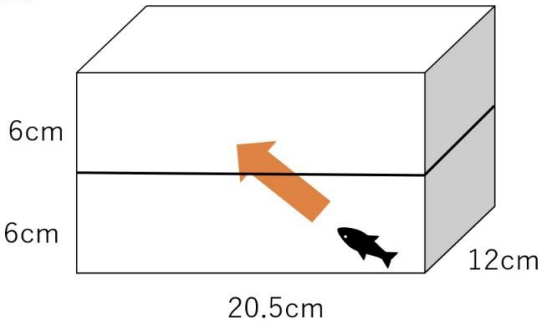


図7. ノーベルタンクテストの模式図

6. 実験結果

実験1 明暗選好性テスト

3回の実験結果を示す。各個体の暗いエリアから明るいエリアへの平均移動回数は、個体A（3回）、個体B（2.3回）、個体C（7回）、個体D（4回）、個体E（4.7回）となった。また、明るいエリアでの平均滞在時間は、個体A（28秒）、個体B（64.7秒）、個体C（100.7秒）、個体D（56秒）、個体E（78秒）となった。移動回数については、個体Cが最も多く、続いて個体E、個体D、個体Aとなった。個体Bは移動回数が最も少なかった。滞在時間については、個体Cが最も長く、続いて個体E、個体B、個体Dとなった。個体Bは滞在時間が最も短かった。

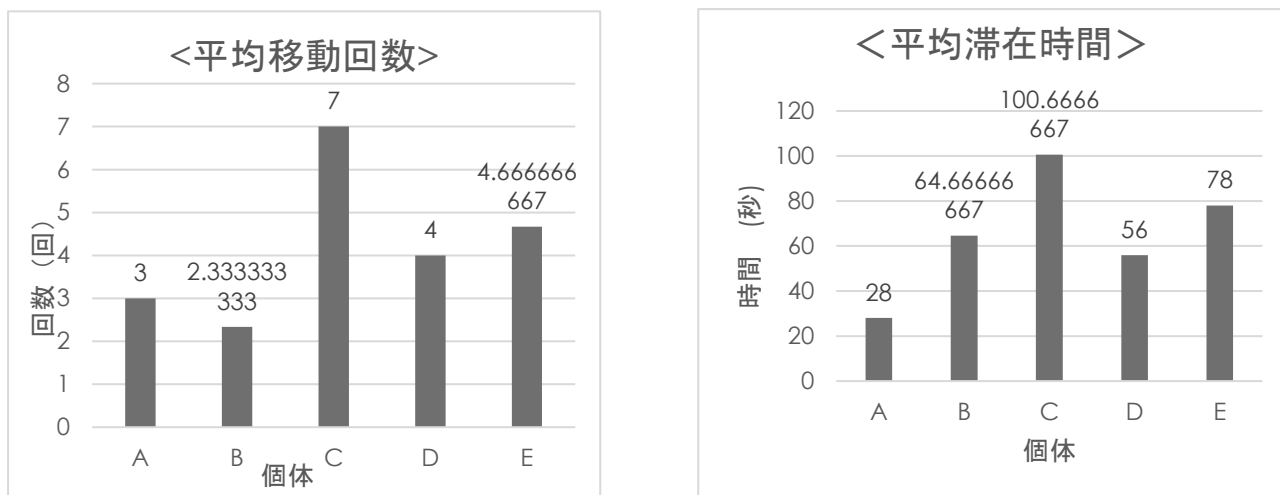


図 8.

実験 2 オープンフィールドテスト

3回の実験結果を示す。各個体の外側エリアから内側エリアへの平均移動回数は、個体A（11.3回）、個体B（5回）、個体C（3.7回）、個体D（16.3回）、個体E（3.3回）となった。また、内側エリアでの平均滞在時間は、個体A（64.7秒）、個体B（175秒）、個体C（10.7秒）、個体D（112秒）、個体E（10.4秒）となった。平均移動回数では、個体Dが最も多く、続いて個体A、個体B、個体C、個体Eが最も少なかった。平均滞在時間では、個体Bが最も長く、続いて個体D、個体A、個体C、個体E最も短かった。

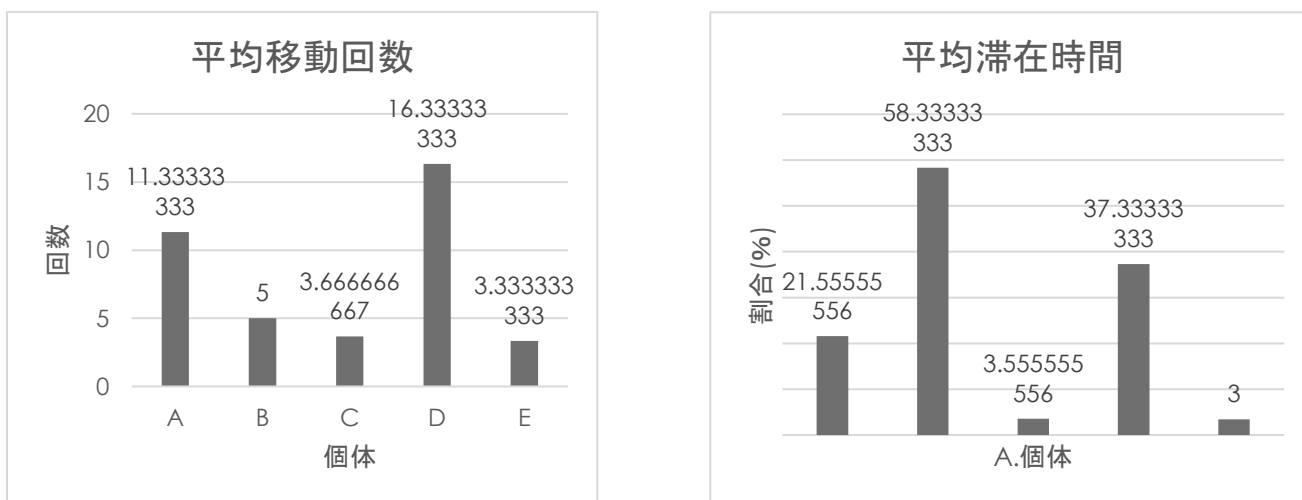


図 9. オープンフィールドテストの結果の平均グラフ

実験 3 ノーベルタンクテスト

3回の実験結果を示す。項目①においては、平均が個体A(0回)個体B(0.3回)個体C(1.7回)個体D(2.3回)個体E(2回)となった。項目②においては、平均が個体A(0秒)個体B(120秒)個体C(303秒)

個体 D(61.2 秒) 個体 E(301 秒) となった。項目③においては、平均が個体 A(360 秒) 個体 B(240 秒) 個体 C(0 秒) 個体 D(300.3 秒) 個体 E(27.3 秒) となった。以下は各項目の詳細な結果とその平均を表した表とグラフである。

	① (回)				② (秒)				③ (秒)			
個体	1回目	2回目	3回目	平均	1回目	2回目	3回目	平均	1回目	2回目	3回目	平均
A	0	0	0	0	0	0	0	0	360	360	360	360
B	0	0	1	0.333333	0	0	360	120	360	360	0	240
C	3	1	1	1.666667	189	360	360	303	0	0	0	0
D	3	2	2	2.333333	37	65	83	61.666667	261	360	280	300.333333
E	3	2	1	2	293	322	288	301	0	0	82	27.333333

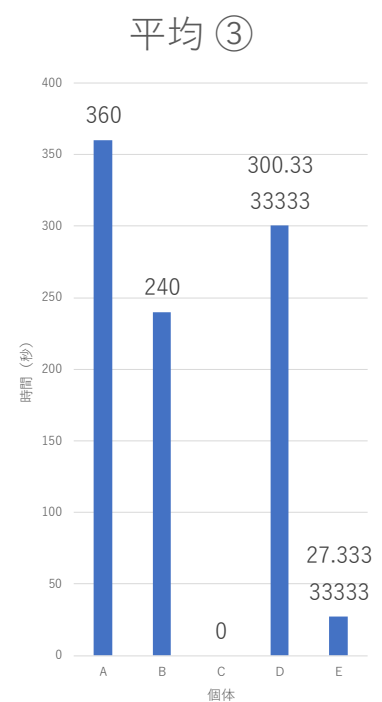
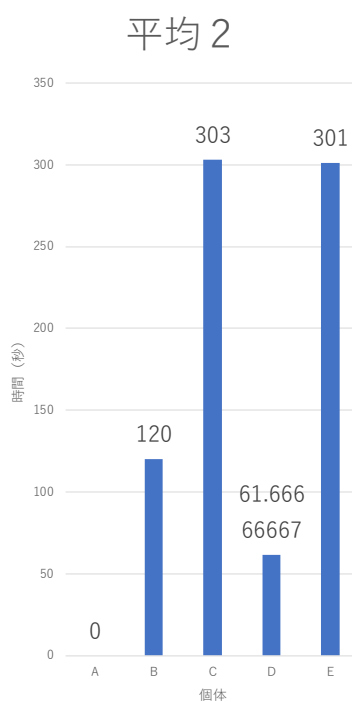
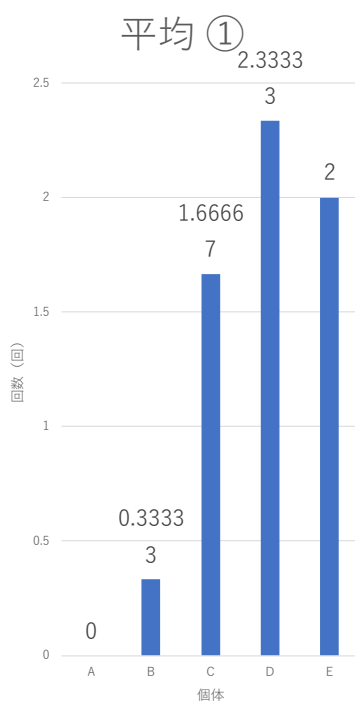


図 10. オープンフィールドテストの各項目の結果とその平均のグラフ

7. 考察

明暗選好性テスト、オープンフィールドテスト、ノーベルタンクテストの3種類の実験を行った結果、どのテストにおいても1回の移動で数秒しか明るいエリアに滞在しなかった個体があったことから、平均移動回数より平均滞在時間の結果を重視すべきだと考えた。よって、平均滞在時間が長い個体ほど不安レベルが高いと判断した。実験1の明暗選好性テストでは、移動回数において個体Cの数値が最も高く、個体Bの数値が最も低かった。滞在時間においては、個体Cの数値が最も高く、個体Aの数値が最も低かった。このことから、実験1においては、個体Cの不安レベルは低く、個体A、Bの不安レベルは高いといえる。

実験2のオープンフィールドテストでは、移動回数において個体Dの数値が最も高く、個体Eの数値が最も低かった。滞在時間においては、個体Bの数値が最も高く、個体Eの数値が最も低かった。このことから、実験2においては、個体B、Dの不安レベルは低く、個体Eの不安レベルは高いといえる。

実験3のノーベルタンクテストでは、移動回数において個体Dの数値が最も高く、個体Aの数値が最も低かった。滞在時間においては、個体Cの数値が最も高く、個体Aの数値が最も低かった。このことから、実験3においては、3つの項目から判断して最も不安レベルが高い個体は個体Aであり、次いで個体D、個体B、個体E、個体Cであると判断した。この結果より、不安レベルが極度に高い個体は判断できるが、不安レベルが低い個体は判断が難しく、不安レベルを区別することは困難であると考察した。また、今回行った3つの実験では、5個体に1個体の割合で極度に不安レベルが高い個体がいると判断し、不安を感じやすい個体は約20%程度であると示唆される。しかし、実験の都合により、実験回数及び実験に用いたゼブラフィッシュの個体数は十分ではなかったため、今後は実験に用いるゼブラフィッシュの個体数を増やし、さらに実験回数を重ねていきたい。

8. 結論・今後の展望

3種類の実験を行った結果、不安レベルの高い個体はその他の個体と区別できることが分かった。今後はさらに実験を重ね、不安を感じやすい個体の割合を調べていきたい。また、不安レベルが低いと思われる個体の不安レベルを判断する方法についても模索していきたい。

9. 参考文献

『魚類における恐怖・不安行動とその定量的観察』 広島大学大学院生物圏科学研究科 吉田 将之