

ゼブラフィッシュの不安行動を数値化する方法

井上陽央里 黒川杏莉

【概要】

恐怖や不安は、動物の生命存続のためにはなくてはならない情動である。情動の中の不安の分野の研究は少ない。そこで、研究魚と呼ばれているゼブラフィッシュを使用して不安行動を数値化し、個体ごとの不安行動の差を見ることで、個体が生まれながらに持つ不安行動のとりやすさを知ること、不安行動のとりやすさと生存率との関係などの研究につながると考えた。

不安行動を定量化する方法は、オープンフィールドテストとノーベルタンクテストと明暗選好性テストを行った。これらのテストで5個体のゼブラフィッシュの不安行動を数値化した。結果、2個体で不安行動をとりやすいかとりにくいかははっきりとしたデータが得られた。しかし、残りの3個体でははっきりとしたデータが得られなかったため、生まれながらに不安行動をとる個体、どちらでもない個体、不安行動をとらない個体の3種に大分できる可能性が示唆された。

Fear and anxiety are emotions that are essential for the survival of animals. Research in the field of anxiety in emotion is scarce. Therefore, we thought that by using zebrafish, which are known as research fish, to quantify anxious behavior and see the differences in anxious behavior among individuals, we could learn the innate susceptibility of individuals to anxious behavior, which would lead to research on the relationship between susceptibility to anxious behavior and survival rate, and so on.

We used zebrafish to perform Open field tests, Novel tank tests and Light-dark preference tests, investigated the susceptibility to stress in five animals. As a result, clear data were obtained on whether two individuals were more or less likely to exhibit anxious behavior. However, no clear data were obtained for the remaining three individuals, suggesting that there may be three types of individuals: those born with anxious behavior, those born with neither, and those born with no anxious behavior.

【研究動機と目的】

先行研究により、魚類であるゼブラフィッシュが感じる不安を数値化する先行研究があり、その方法を用いれば、生まれながらに不安行動を感じやすい個体とそうでない個体に分類できるのではないかと思い、調べようと考えた。

【はじめに】

ゼブラフィッシュ(学名: *Danio rerio*)はコイ目コイ科ラスボラ亜科に属している。活発で、水中を素早く泳ぎ回るといった性質がある。更に、温和なので他魚との混泳も同程度のサイズの魚となら問題ない。多産で、1組の雌雄が一度に数百の卵を産む。透明の体で観察や実験操作が容易である。

ゼブラフィッシュにはストレスを感じると暗いところに行こうとする、先天性ストレス応答がある。恐怖は、直近の脅威を知覚もしくは予期している状態で、一過性であり、恐怖の対象がなくなると速やかに消失する。一方、不安は非特異的で、はっきりとは予期できない脅威によって引き起こされ、恐怖と比べてより持続的な状態である。この研究では、ゼブラフィッシュを強制的に群れから1匹にさせたときに感じるストレスをもとに実験を行った。

【実験1 ノーベルタンクテスト】

【実験方法】

水槽の半分の高さに透明のテープを貼って、上

層と下層で区切った。テープでゼブラフィッシュの動きが見えにくくならないように透明のテープで行った。上記の水槽（写真1）を用意して、ゼブラフィッシュを1匹入れた。5分間で、ゼブラフィッシュが下層から上層に移動する回数を計4回計測した。

不安を感じる個体は下層にとどまり、上層への移動回数が少なくなり、不安を感じにくい個体は上層への移動回数が多くなると考えられる。

【実験1の結果】

4回の実験結果(表1)を示す。各個体の平均は、個体1(39.25回)、個体2(32回)、個体3(7.25回)、個体4(10回) 個体5(3.5回)であった。個体1の移動回数が最も多く、それに続き個体2が多い。逆に個体3や個体4については移動回数が少なく、同じくらいの回数となっている。最も少ない移動回数であったのは個体5であった。



写真1

	個体1	個体2	個体3	個体4	個体5
1回目	21	13	8	4	2
2回目	9	7	8	5	6
3回目	7	10	6	7	1
4回目	9	8	7	5	3

図1

【実験2 オープンフィールドテスト】

【実験方法】

水槽を内側エリアと外側エリアでわけ、そこにゼブラフィッシュを1匹入れ、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を計測する。

不安を感じる個体は外側エリアにとどまる傾向があると考えられる。

すべての壁が透明であると、壁に沿う行動が不安による行動なのか、出口を求める逃避の行動か分からなくなるため、水槽の側面をすべて不透明にする(写真2)。出口を求める行動は、むしろ積極的な探索行動を反映していると考えられる。不安を感じる個体は壁に沿うように移動し、中央部分への移動は少なくなる。このような行動は多くの生物で見られる。

【実験2の結果】

4回の実験結果(表2)を示す。壁のエリアを中央のエリアを横切った回数の平均は個体1(8.75回)、個体2(4.5回)、個体3(7.5回)、個体4(2.25回) 個体5(1.25回)であった。個体1の移動回数が最も多く、それに続き個体3が多い。続き、個体2や個体4となっており、最も少ない移動回数であったのは個体5であった。個体5は壁に沿い、ほとんど中央に移動しなかった。



写真2

	個体 1	個体 2	個体 3	個体 4	個体 5
1 回目	8	3	10	1	1
2 回目	12	8	5	3	0
3 回目	7	3	7	2	3
4 回目	8	4	8	3	1

図 2

【実験 3 明暗選好性テスト】

水槽の側面の半分には黒い画用紙を貼り、もう半分には白い画用紙を貼り、明るいエリアと暗いエリアをつくる。そこにゼブラフィッシュを 1 匹入れ、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を計測する。(写真 3) 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。

【実験 3 の結果】

4 回の実験結果(表 3)を示す。明るいエリアと暗いエリアを横切った回数の平均は個体 1(4 回)、個体 2(2.75 回)、個体 3(3 回)、個体 4(3.75 回) 個体 5(1 回)であった。

個体 1 の移動回数が最も多く、それに続き個体 4、個体 3、個体 2 が多い。個体 5 は移動回数が最も少なかった。



写真 3

	個体 1	個体 2	個体 3	個体 4	個体 5
1 回目	5	0	2	3	1
2 回目	3	3	2	3	1
3 回目	4	5	4	4	1
4 回目	4	3	4	5	1

図 3

【考察】

実験 1 ノーベルタンクテストでは、個体 1 と個体 2 の数値が高く、個体 3、個体 4 の数値が低く、個体 5 の数値が最も低い。このことから、個体 1 と個体 2 では、不安行動をとりにくく、個体 3、個体 4 は不安行動をややとりやすく、個体 5 は不安行動をとりやすいことが考えられる。

実験 2 オープンフィールドテストでは、個体 1 と個体 3 の数値が高く、続いて個体 2、個体 4、最後に個体 5 の数値が最も低い。個体 1 と個体 3 では、不安行動をとりにくく、個体 5 では不安行動をとりやすいことが考えられる。

実験 3 明暗選好性テストでは、個体 1 が最も数字が高く、個体 4、個体 3、個体 2 の順に数字が低くなっており、個体 5 が最も数字が低い。このことから個体 1 は不安行動をとりにくく、個体 5 が不安行動をとりやすいと考えられる。

実験 1～実験 3 を通じて、個体 1 ではすべての実験で最も不安行動をとりにくいという結果となり、個体 5 ではすべての実験で最も不安行動をとりやすいという結果となった。このことから、先天的に不安行動をとるかとならないかが個体によって決まっていることが示唆され、また実験で数値化できることが分かった。

しかし、個体 2～個体 4 については、それぞれの実験によって数字が異なりはっきり不安行動をとるかとならないかは分からなかった。このことから、生まれながらに不安行動をとる個体、どちらでもない個体、生まれながらに不安行動をとら

ない個体の3種に大分できる可能性が示唆された。しかし、実験の時間の関係で、実験回数や実験対象としたゼブラフィッシュの数は十分ではない可能性もある。今回は個体1と個体5で、2個体ではっきりとした結果が出たが、今後どれくらい実験を行えば、有効な結果となるのか、実験対象の数を増やし、どのように不安行動をとるグループに大別できるのか、検証する必要があると考える。

【まとめ】

ノーベルタンクテスト、オープンフィールドテスト、明暗指向性テストを実施した結果、今回は5匹中2個体ではっきりとした違いが見られた。1個体は不安行動をとらない個体、もう1個体は不安行動をとる個体である。残りの3匹については、十分判断できず、今回はどちらでもない個体とした。今後は実験を繰り返し、これらのテストの有用性や不安行動をとる個体やとらない個体の割合がどれくらいいるのか、またどちらでもない個体の分類ができるのかを調べていきたい。

【引用・参考文献】

吉田 将之. 魚類における恐怖・不安行動とその定量的観察. 比較生理化学. 2011, Vol. 28, No. 4, p317-315