

【序論】

ストレスは、一般社会においても馴染みの深い用語であり、また同時に社会問題ともなっている。硬骨魚類も悪化した水質や高密度環境などの劣悪な環境においてストレスを感受し、成長の遅延や産卵数の減少などの悪影響が及ぼされる。ストレスは動物の行動へも影響を与えることが経験的に知られている。本研究では、小型魚類であり観察が容易なメダカ (*Oryzias latipes*)を用いて、稚魚および成魚に高密度ストレスを与えた際の行動の変化を数値的に解析し、ストレス応答の指標となり得る行動を見出すことを目的とし、研究を進めた。

多くの硬骨魚類において高密度の飼育条件によりストレスマーカーホルモンである cortisol の血中濃度の上昇が報告されている。本研究ではさらに、稚魚において cortisol を正確に測定する手法を開発し、稚魚におけるストレス応答行動と考えられる burst swimming と cortisol の関係を明らかにすることを試みた。

【結果】

1) メダカ稚魚の行動への高密度飼育の影響

16 ml の飼育水の入った直径 60 mm のシャーレに メダカ稚魚 4 匹 (222 fishes / L)、8 匹 (444 fishes / L)、12 匹 (667 fishes / L)、16 匹 (889 fishes / L) をそれぞれ入れ行動を観察したところ、それぞれのシャーレについて 150 秒間における遊泳速度、遊泳距離に顕著な差は見られなかった。2次元行動モニタリングソフト「Larvae」を用いて稚魚の行動軌跡をトレースし、比較したが、飼育密度との明らかな相関関係はみられなかった。

また、魚体をくねらせ、突発的に遊泳速度を上昇させる行動 (burst swimming) の頻度が密度の上昇と共に増加する傾向が認められた (図 1)。ただし、burst swimming の頻度は、個体差が大きく、シャーレに 16 匹を投入した条件においては、最低 0.7 回、最高 9.7 回と、大きなばらつきが観測された。

2) メダカ稚魚における cortisol 定量

本研究では、メダカ稚魚において、他の刺激による影響を極力排除した状態で、cortisol を定量する手法を開発した。cortisol はストレスマーカーとして広く受け入れられており、様々な刺激を受けた際に非特異的に生産、分泌される。その為、個体の cortisol 定量の際は、瞬時に液体窒素で処理し、実験操作に起因する cortisol の増加を防いだ。

更に、稚魚をネットで採取し、1 L 水槽から、シャーレに移す際に、cortisol の増加が見られた。3 時間後には cortisol 量は低下し回復した。この結果から、水槽からシャーレに移し、3 時間静置した後に cortisol 定量を行うことにした。

3) cortisol と burst swimming の関係

16 ml の飼育水の入った直径 60 mm のシャーレに孵化後 2 週間のメダカ稚魚 4 匹 (222 fishes / L)、8 匹 (444 fishes / L)、12 匹 (667 fishes / L)、16 匹 (889 fishes / L)、32 匹 (1778 fishes / L) をそれぞれ入れ、3 時間静置し

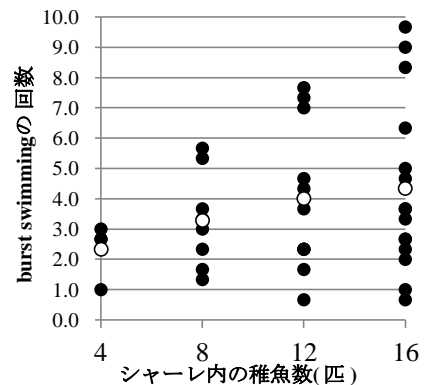


図 1.密度による burst swimming の回数の変化

●は各個体の burst swimming、
○はその密度における burst swimming 回数の平均値を示す。

た。その後、行動を家庭用ビデオカメラで撮影し、個々の個体のコルチゾールを定量した。また撮影した動画から、burst swimming 頻度を計測した。

両者を対応させたところ、メダカ稚魚における burst swimming の回数とコルチゾール量、個体密度とコルチゾール量に明確な相関性は認められなかった。

4) コルチゾールと体長の関係

16 ml の飼育水の入った直径 60 mm のシャーレに孵化後 2±1 週間メダカ稚魚を 4 匹 (222 fishes / L)、8 匹 (444 fishes / L)、12 匹 (667 fishes / L)、16 匹 (889 fishes / L) をそれぞれ入れ、10 分後に個体を採取しコルチゾールを定量した。

体長と個々のコルチゾール量をグラフで示した (図 2)。メダカ稚魚において、体長とコルチゾール量に正の相関が見られた。また、体長 0.7 cm 以下の個体においてコルチゾールは、ほとんど合成されないことが明らかになった。

5) メダカ成魚の行動への高密度飼育の影響

200 ml の飼育水が入った水槽に、1 匹 (5 fishes / L)、2 匹 (10 fishes / L)、3 匹 (15 fishes / L)、4 匹 (20 fishes / L)、8 匹 (40 fishes / L) のメダカ成魚を入れ、5 日間、1 日 3 回 (10±1 時、13±1 時、18±1 時) それぞれの行動を 10 分間の動画として撮影した。その後、撮影した動画を水質管理ソフト「めだか de モニタ」により数値的に解析し、遊泳速度、遊泳距離を算出し、メダカの動きを数値化した。

成魚において、1 匹のみの場合は、複数匹が遊泳する水槽の個体に比較して遊泳速度がより大きく (図 3)、2 日目以降遊泳距離が、より大きい傾向が認められた。また、十分にメダカが遊泳可能である大きな水槽 (9 L) においても、遊泳速度、遊泳距離において同様の差が認められたことから、遊泳スペース が狭まった事による影響ではなく、メダカの群れ認識に起因する行動であると考えられる。

運動解析ソフトウェア bohboh を用い、個別に行動をトレースし行動軌跡を観察した際においても 1 個体遊泳時と複数個体遊泳時で違いが見られた。1 個体遊泳時には、水槽半分、あるいは全体を遊泳していたのに対し、複数個体遊泳時では、水槽、側面や水面を沿うように反復的に遊泳する行動が頻繁に見られた。また、複数個体遊泳時において反復的な遊泳をする個体は、1 匹に従って、数匹もしくはその水槽にいる他の全ての個体が同様の行動をすることが見られた。

【結論】

Burst swimming 行動は、個体密度が大きくなるとより頻繁に見られたことから高密度ストレスに対する行動だと考えられる。しかし、体長が小さい個体がより頻繁に burst swimming 行動を増す傾向にあり、メダカ稚魚において、コルチゾールの合成能力は、体長約 0.7 cm 以上に成長しないと獲得されないことからコルチゾールの合成をストレスの指標とする場合には、Burst swimming をストレス行動の指標と断言することは難しい。

稚魚において 0.7 cm 以下の個体は、ストレスを感受するかも不明であるが、稚魚においても密度を感知し、行動を密度とともに変化させることは、本研究で示すことができたものとする。また、成魚において、複数個体飼育では、個体同士の相互作用が確認された。本研究は、メダカは環境により行動を変化させるが、その行動変化の意味を明らかにすることで、行動からメダカのストレス状態を知る技術となる可能性を示唆した。

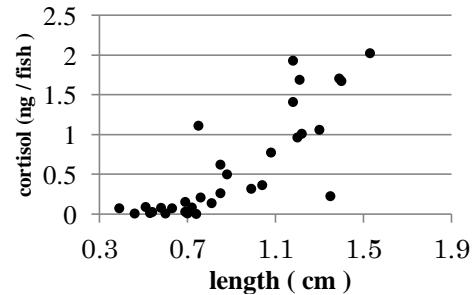


図 2. 体長とコルチゾール濃度の相関関係

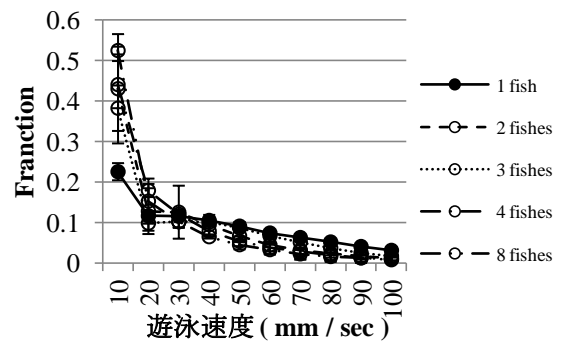


図 3. 密度差による遊泳速度プロファイルの差異