

解 説

魚類における脳波解析を用いた睡眠測定方法

林 正裕* §

Measurement Methods for Fish Sleep using the Electroencephalogram Analysis

Masahiro Hayashi* §

要約：哺乳類において科学的に睡眠を研究する場合は、脳波を主体とする電気生理学的指標に基づく「脳波睡眠」によって睡眠が測定されている。行動観察から魚も眠ると考えられるが、脳波を基に魚類の睡眠を判定した報告は見当たらない。魚類の睡眠を解明するためには、脳波に基づく魚類の睡眠測定法が必要不可欠である。本稿では、海洋生物環境研究所が開発した魚類、特に海産魚類の脳波睡眠を安定的に測定する技術について解説する。

キーワード：魚類, 睡眠, 脳波, ナンヨウブダイ, マダイ

まえがき

魚類の脳は、他の脊椎動物と同様に各種感覚の処理や統合に関与し、学習や本能の中枢を担っている。脳には、多数の神経細胞（ニューロン）が存在し、神経細胞ネットワークを形成している。ニューロンは、外部刺激により活動電位を発生させ、他のニューロンに電気信号で情報を伝達する。この活動電位生成と電気信号伝達により脳波が発生する。従って、脳波は、脳の活動を反映する生体信号であり、脳波測定は脳の機能や状態を理解するための有用な手法の一つとなる。例えば、人間では、神経疾患、意識障害などの診断に脳波測定を利用している。

脳波と密接に結び付いている生理現象の一つが睡眠である。睡眠は、一般的には周期的に繰り返す生理的な意識喪失の状態と定義されるが、哺乳類において科学的に睡眠を研究する場合は脳波を主体とする電気生理学的指標に基づく「脳波睡眠」によって睡眠が測定されている。魚類の睡眠につ

いては、行動観察から得られた行動的指標に基づく「行動睡眠」が定義され (Meddis, 1975)、行動観察から魚類も眠ると考えられている。ゼブラフィッシュ *Danio rerio* 仔魚を用いた分子遺伝学的研究や高度なイメージング技術を用いた神経生理学的研究により、魚には人間と類似した睡眠パターンがあり、レム睡眠とノンレム睡眠と共通する性質を有することが分かってきた (Leung *et al.*, 2019)。しかしながら、既往の研究手法は、多様な魚種や生態、或いは天然の生息環境でも使用できるような汎用性のある手法ではない。

魚類の脳波測定については若干の報告 (Enger, 1957; Karmanova *et al.*, 1981; Mori *et al.*, 1981; 小栗ら, 1991) はあるが、いずれも魚類の睡眠の解明には至っていない。魚類における睡眠機構を解明するためには、「脳波睡眠」の存否を確認する必要がある。

本稿では、海洋生物環境研究所が開発した魚類、特に海産魚類の脳波睡眠を安定的に測定する技術について解説する。

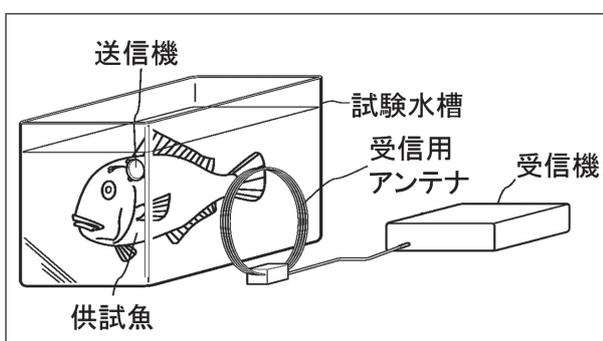
(2022年11月7日受付, 2022年11月30日受理)

* 公益財団法人海洋生物環境研究所 事務局 (〒162-0801 東京都新宿区山吹町347番地 藤和江戸川橋ビル7階)

§ E-mail: hayashi@kaiseiken.or.jp

魚類の脳波測定

従来、水中で魚類の生体信号（動物が発する電気的な信号；脳波，筋電位，心電位，角膜網膜電位，視覚誘発電位等）を測定するためには，測定装置本体に有線接続したセンサーやカテーテル等を，生体内に取付けておく必要があった（Enger, 1957; Karmanova *et al.*, 1981; Mori *et al.*, 1981; 小栗ら, 1991など）。このため，供試魚の自由な動きをある程度抑制する必要がある，拘束等の処置によって供試魚に大きなストレスがかかるため，



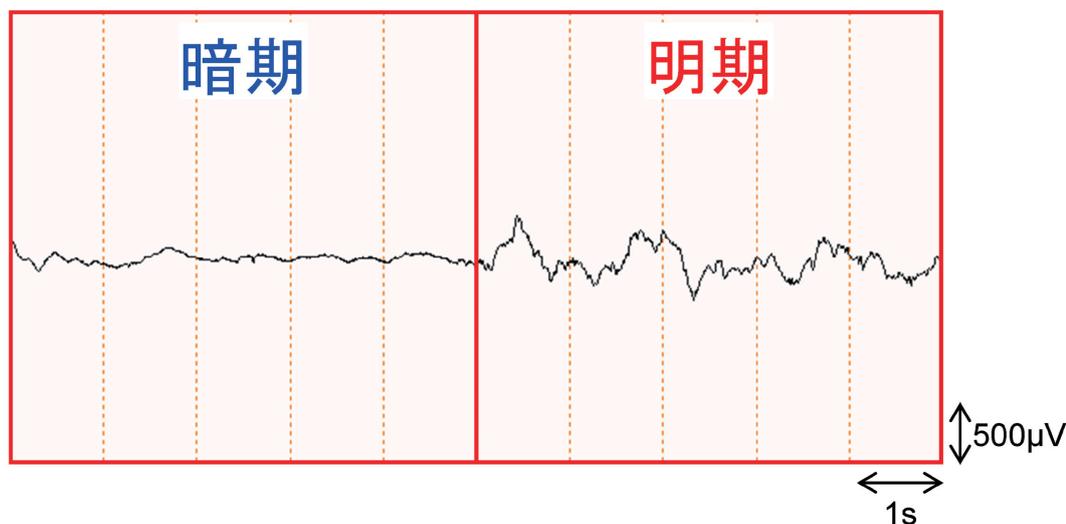
第1図 無線式測定システムの概略図

供試魚に装着した電極から得られた生体信号は，送信機から送信され受信用アンテナ（ナンヨウブダイの脳波測定で使用したアンテナの直径は約20cm）を介して受信機に取り込まれる。受信用アンテナは，脳波を受信するために供試魚の側面に沿って試験水槽の横（ナンヨウブダイの脳波測定ではアンテナと水槽の距離は約3cm）に配置されている。

測定者が習熟した技術と知識を有しない場合には生体信号を正常に測定できない可能性がある。また，我々が実施した事前検討試験において，センサーと測定装置を接続する信号線が供試魚に接触すること等によって，測定される生体信号にノイズが発生するという現象があり，特に海水中では顕著な問題であった。

そこで，このような問題を解消するため，水生動物の脳波を適切に測定できる水生動物用無線生体信号測定装置および測定システム（以下，「無線式測定システム」と省略）を開発した（実用新案登録第3183625号）。この無線式測定システムは，水生動物の体に生体信号取得用の電極を装着し，その電極から得られた生体信号を無線通信によって送受信してパソコン内に記録するという技術である（第1図）。この技術によって，泳いでいる魚からも脳波を安定的に取得することが可能になった。なお，無線式測定システムについての仕様の詳細および魚類への装置取付方法については，林ら（2014）を参照されたい。

開発した無線式測定システムを用いて日中と夜間の行動が明瞭に異なるナンヨウブダイ（*Chlorurus microrhinos*；本種は，夜間，サンゴや岩陰に隠れ鰓から出す透明な粘液で体の周りを寝袋状に覆い，その場からほとんど動かなくなる）の脳波を連続的に記録した（第2図）。得られた脳波記録から，暗期には脳の振幅に明らかな違いが認められ，魚類でも脳波から睡眠判定ができる可



第2図 連続記録されたナンヨウブダイの脳波の一例を示す波形図

ナンヨウブダイを，水槽内で自由遊泳させた状態で脳波の測定を行った。左側が暗期（19時～7時）の例，右側が明期（7時～19時）の例を示す。縦の点線の間隔は1秒間を示す。

能性が示唆された。一方、コイ *Cyprinus carpio* を用いた研究では、活動時と休止時の脳波に変化が認められたものの、睡眠脳波は特定できず、睡眠脳波の出現がない可能性が示唆された（小栗ら，1991）。しかし、このコイの研究において、脳波の測定はコイに電極を有線接続した状態で実施されており、コイの動きが抑制された可能性がある。

無線式測定システムは、比較的遊泳しない底生魚類や拘束が困難なタコ類などの生体信号測定にも有効と考えられる。また、リアルタイムで生体信号を観察でき、データをパソコン内に直接記録するため、大量のデータ（長期間のデータ）を収集できるといった利点がある。一方、無線通信の通信距離が律速要因となるため、試験水槽の大きさや測定環境などが制限される。従って、遊泳能力の高い魚種や天然の環境での使用には不向きである。

汎用性のある脳波睡眠測定システム

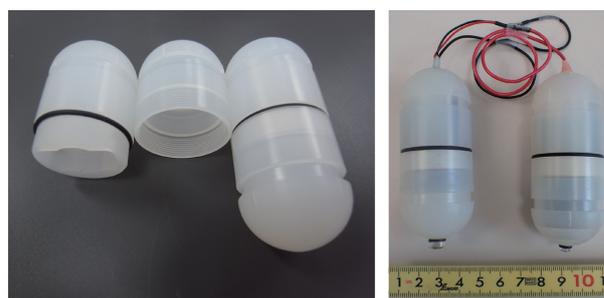
魚類の「脳波睡眠」の存在を明らかにするためには、多様な魚種の脳波を収集し解析する必要がある。また、睡眠は動物の行動に深く関わっていることから、魚類の行動に出来る限り制限を加えずに脳波を測定することが望まれる。

そこで、無線式測定システムを改良し、自由遊泳する魚類においても容易に脳波データを収集でき、魚類全般に使用可能な汎用性のある魚類用脳波測定データロガーを作製した（第3図）。

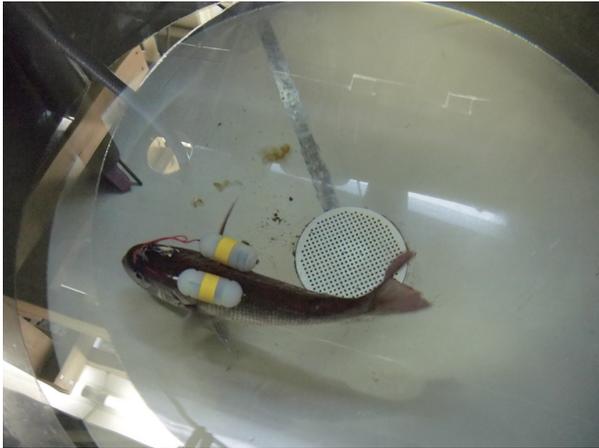
このデータロガーは、本体と電源ボックスからなり、本体には無線式測定システムの電気信号受付部、フィルタ部およびアンプ部の電気回路を一つに統合して小型化した回路が内蔵されている。また、本体からは魚の頭部に装着した電極を繋ぐケーブルと電源ボックスを繋ぐケーブルが出ている。本体には、電源スイッチが付いておりこのスイッチを入れることで測定が開始され、測定が開始されるとLEDランプが点滅し外部からロガーの可動状態を確認できる仕組みになっている。脳波データは本体に装着したmicro SDカードにバイナリファイルとして保存される。データロガーは防水ケース（第4図）に入れて魚体に装着し、単4電池2本で約2週間脳波を記録できる。作製したデータロガーを装着したマダイ *Pagrus major* を容量500Lの円形水槽に収容し自由遊泳させて（第5図）、脳波を測定した。明暗周期は、明期7時～



第3図 魚類用脳波測定データロガーの全体像
本体（外形寸法：W41mm×D24mm×H15mm，重量：14.3g，消費電流：約35mA）と電源ボックス（外形寸法：W62mm×D25mm×H15mm，電池を入れた重量：28.5g）からなり、脳波データは本体に装着したmicro SDカードに保存される。



第4図 防水ケースの全体像
右図は、データロガーを防水ケースに内蔵した様子（左のケースに本体が、右のケースに電源ボックスが内蔵されている）。防水ケースに入れたデータロガー全体の重量は124.3gだが、防水ケース内に空隙があるため海水では浮く。



第5図 魚類用脳波測定データロガーを装着したマダイ（体重：1876 g，尾叉長：42.3cm）の様子

19時，暗期19時～7時とした。また，脳波はサンプリングレート100Hzで記録した。測定の結果，脳波データを約1週間収集することに成功した（第6図）。

魚類用脳波測定データロガーは，自由遊泳する魚類での測定が可能であるため，装着できる供試魚の種類が格段に増え，大型水槽や海や河川などの環境下でも使用できるようになった。一方，作製したデータロガーには，以下の課題が残っている。

- 本体と電源ボックスが分かれており，さらに防水ケースを使用するため装置自体が大きく，供試魚の体サイズにより使用が制限される。

る。

→（解決策）本体と電源ボックスを統合した上で，データロガーの小型化と完全防水化を行う。

- 記録できる期間が約2週間とまだ短い。

→（解決策）現行で使用している電池よりも長寿命で高性能の電源を探索し採用する。

- データファイルサイズを小さくするためバイナリファイルを使用しているが，現行では脳波データとして出力できない。

→（解決策）バイナリファイルを脳波データに変換するソフトを開発する。

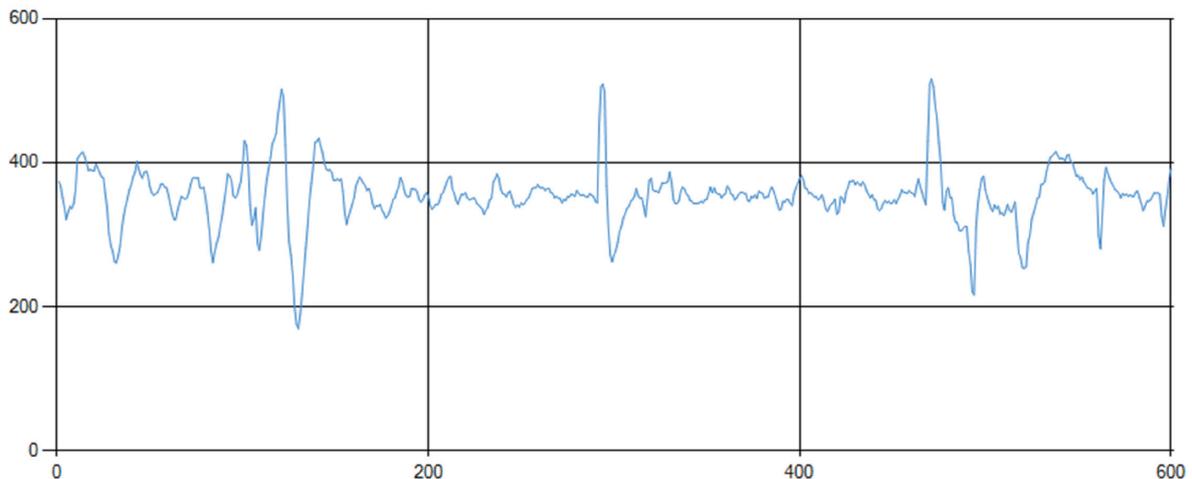
- 入出力チャンネルが1チャンネルであるため，1つの生体信号（現行では脳波のみ）しか測定できない。

→（解決策）電気回路とプログラムを改良し，複数チャンネルで測定できるようにする。

今後，作製したデータロガーをプロトタイプとして，明らかになった課題の解決を進めていく。

魚類の睡眠判定までのプロセス

無線式測定システムおよび魚類用脳波測定データロガーにより，魚類の脳波を測定できるようになったが，脳波を測定しただけでは睡眠を判定することはできない。哺乳類では，脳波を周波数帯域ごとに δ 波（デルタ波：1～3Hz）， θ 波（シータ波：4～7Hz）， α 波（アルファ波：8～13Hz），



第6図 魚類用脳波測定データロガーにより収集したマダイの脳波データの例（明期）
グラフは加工前のバイナリファイルの生データを可視化した。縦軸は出力値，横軸はタイムスケールを示す。なお，変換ソフトが未開発のため，出力値から振幅への変換およびタイムスケールから時刻への変換は実施できていない。

β 波（ベータ波：14~30Hz）に大別した上で、脳波、筋電位および行動量から総合的に睡眠判定を行う。覚醒時の脳波は、主に α 波や β 波といった高周波の成分で構成され、睡眠状態になると δ 波や θ 波といった低周波の成分が多くなる。魚類では、このような哺乳類で見られる脳波パターンと必ずしも一致しない可能性がある。また、小栗ら（1991）は、魚類の場合、高等脊椎動物とは独立した睡眠判定基準の必要性を示唆している。

従って、今後の研究では、昼夜の行動が明らかに違う魚種をターゲットにした脳波データを出来る限り多数収集し、行動と脳波データとの相関を見出す必要がある。また、我々が実施した先行研究において、マダイの行動が哺乳類で既知の睡眠誘発物質（ジアゼパム）で鎮静化し、覚醒促進物質（カフェイン）で活発化することを確認しており、これらの物質を投与したマダイの脳波を測定することによって、魚類の脳の活動状態と脳波帯域との相関を明らかにすることを計画している。最終的に、これらの実験で得られた情報を基に、魚類独自の睡眠判定基準を構築することができ、魚類の睡眠判定が確立すると考えている。

おわりに

魚類の睡眠測定技術が開発されれば、生態学および生理学の発展に資することはもとより、様々な調査研究や産業に貢献できる技術になると考えられる。

例えば、科学的根拠に基づいた魚類の概日リズムの把握が可能となる。魚類養殖において、概日リズムに基づく栄養学的な観点からの給餌時間を見出すことができれば、飼料栄養成分の効率的な消化吸收を促し、飼料効率の優れた養殖魚の生産が可能となるだけでなく、余剰飼料による海洋汚染リスクを低減させた持続可能な養殖業の確立に貢献できる。

また、魚類の睡眠と成長の関係が分かれば、日長条件を人為的に調節することで、養殖魚の成長促進を図れる可能性がある。加えて、飼育下の魚類の睡眠を管理・評価することで、魚に対しストレスの少ない生育環境の最適化を進めることができる。

現在、洋上風力発電や海底鉱物資源開発といった新たな海洋開発事業が進められており、これら

の開発に伴い発生する海中音が及ぼす生物への影響が懸念されているが、現状では適切な影響評価手法を模索している状況である。魚類における脳波や睡眠の測定が、これらの新たな開発事業の環境アセスメントにおいて、評価手法の一つになり得る可能性がある。

謝 辞

本研究の一部は、JSPS科研費 15K14794の助成を受けた。本稿を査読し重要なご指摘を頂いた古谷 研氏に謝意を表す。

引用文献

- Enger, P.S. (1957). The electroencephalogram of the codfish (*Gadus Callarias*); spontaneous electrical activity and reaction to photic and acoustic stimulation. *Acta Physiol. Scand.*, **39**, 55-72.
- 林 正裕・高田陽子・三上 隆・裏出良博 (2014). 無線生体信号測定装置—ナンヨウダイの脳波測定の試み—. 海生研研報, **No.18**, 71-74.
- Karmanova, H., Belich, A.I. and Lazarev, S.G. (1981) An electrophysiological study of wakefulness and sleeplike states in fish and amphibians. In "Brain mechanisms of behaviour in lower vertebrates. (ed. Laming, P.R.), Cambridge University Press, Cambridge, 181-202.
- Leung, L.C., Wang, G.X., Madelaine, R., Skariah, G., Kawakami, K., Deisseroth, K., Urban, A.E. and Mourrain, P. (2019). Neural signatures of sleep in zebrafish. *Nature*, **571**, 198-204.
- Meddis, R. (1975). On the function of sleep. *Anim. Behav.*, **23**, 676-691.
- Mori, S., Mitarai, G., Takagi, S., and Usui, S. (1981). Electroencephalographic analysis of activities in the optic tectum of unrestrained carp. *Behav. Brain Res.*, **2**, 335-346.
- 小栗 頁・白川修一郎・内山 真・大川匡子 (1991). 魚類の睡眠行動の探索—休止時におけるコイ (*Cyprinus carpio*) 視葉脳波の解析—. 東邦大学教養紀要, **23**, 35-42.