

20 海水を電極として利用した魚のための生体電気計測

才木常正, 瀧澤由佳子, 兼吉高宏

1 目 的

現在、海洋環境問題が山積しており、近い将来、水産資源の枯渇の恐れがある。水産資源の持続的利用、絶滅危惧種の保護、生態系の保全のためには、海洋生物の生態を知ることが重要となる。そこで、生理学、行動学（生態学）、環境学の観点から、生体電気計測¹⁻⁴⁾、バイオロギング⁵⁻⁹⁾、DNA（ゲノム）分析¹⁰⁻¹⁵⁾がそれぞれ行われている。近年の技術革新に伴い、バイオロギングと DNA 分析については研究が急速に進んでいる。他方、生体電気計測に用いられている技術はこれら技術に比べて立ち後れ感が否めない。

しかしながら、養殖業においては海洋生物の健康状態を知るために、病態生理学的な意味で生体電気計測が必要とされている。更に、生体電気計測の一つである心電図計測は、人のように海洋生物の精神（心理的）ストレスを推定¹⁶⁻¹⁹⁾できる可能性があるため、大きな期待が持たれている。また、学術的な目的で、心電図計測は魚類の行動⁴⁾や生理状態¹⁾を把握することに活用されており、計測手法の改良はこれらの学問の発展にも寄与できる。

海洋生物を対象とした生体電気計測を行う場合、1 対の生体電極を導電体である海水を介して短絡しないようにするため、専門家が開腹手術等で生体内部にこれら電極を埋め込んでいる。このため、実験者の作業負荷と実験対象の体力消費が大きくなる。そこで、これらを軽減するため、我々は海水（導電体）を共通電極として利用し、測定部位毎に一つの生体電極を生体外から挿入する新規の生体電気計測法を提案した²⁰⁾。

2 生体電気計測法の提案

本提案手法では、図 1 に示すように、金属を沈めた海水を大きな生体電極（以後、海水電極）とする。そして、海洋生物（魚）の測定部位には海水と隔離した一つの小さな生体電極（以後、隔離電極という）を挿入する。なお、図 2 に示すように、この隔離電極は信号線側を絶縁した針状電極である。これを外部から表皮を貫通させて針先を筋肉部まで突き刺すことで、針先導電部が海水と隔離される。こうすることで、海

水電極と隔離電極間に生じる生体電気信号が計測可能となる。

故に、本提案手法で多点計測を行う場合、各測定部位には 1 対の生体電極が必要な従来手法に比べて必要な生体電極数を半分とすることができる。なぜなら、本提案手法による生体電気計測では、海水電極を共通生体電極とすることができるので、各測定部には隔離電極 1 つのみを装着するだけで良い。更に、本提案手法は、この生体電極を生体外から挿入して装着するため、従来手法のように開腹手術を必要としない。以上の 2 つの利点より、我々は本提案手法を実験者の作業負荷と海洋生物への肉体的ストレスを低減した非常に簡単な生体電気計測であると自負している。

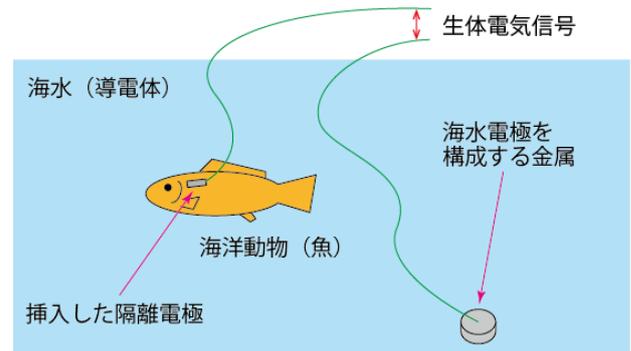


図 1 海水を電極として利用した生体電気計測の原理

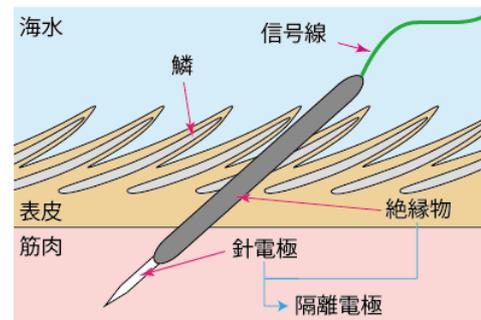


図 2 隔離電極の挿入イメージ（断面）

3 提案計測システム

新規の海水を電極として利用した生体電気計測法を実証するための実験システムの写真を図 3 に示す。本システムは海洋生物である魚を生

存させるための容器、魚の生体内で発生した生体電気信号を検出する電極（海水電極と隔離電極）、生体電気信号を増幅するための生体アンプ、増幅された生体電気信号を観測および記録する機器の4つで構成される。

生存容器としては、プラスチック製の直径36cmのたらい（新輝合成製、アシスト洗桶36）を用い、それに神戸市須磨海岸で採取した自然の海水（温度：20℃、電気伝導率：5.0S/m）6Lを満たした。たらい内の海水にはエアポンプで空気を供給している。そして、この海水に図4(a)に示した1つのM5ネジ（鉄/ユニクローム）と3つの六角ナット（鉄/ユニクローム）で構成される金属を沈めることで、海水電極を構築している。一方、魚には図4(b)に示した針状の隔離電極が挿入されている。なお、この隔離電極は、抜け防止の2つの返しを有する先端を尖らせた銀線（直径0.8mm）と信号線（AWG24）を圧着スリーブ（ニチフ製、B-0.5）で繋ぎ、先端10mmを残してゴム塗料（PDI製、PROT）で絶縁コーティングして作製した。

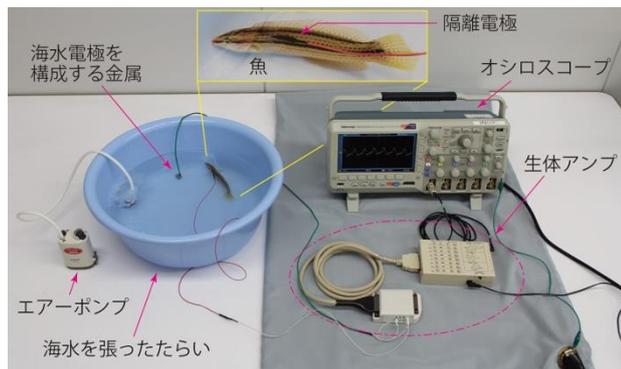


図3 海水を電極として利用した生体電気計測の実証実験システムの写真



(a) 海水電極を構成する金属



(b) 隔離電極

図4 実験で用いた生体電極の写真

これら隔離電極と海水電極により検出された生体電気信号は生体アンプ（TEAC製、BA1008）で1000倍の増幅とハイパスとローパスフィルタによって処理され、生体アンプに接続されたオシロスコープ（Tektronix製、MSO2024）で観測および記録される。なお、これら装置のアースは海水電極に接続している。

4 実験方法

本研究では、全長20cm前後のキュウセン（*Parajulis poecilepterus*）3個体を対象として生体電気計測を行った（図5参照）。本種は沿岸部に多く生息しているため、被検魚は海岸からの釣りにより捕獲した。計測時の魚体の安静状態を確保するため、捕獲した魚は20±2℃の自然海水を55L程度満たした水槽（底にサンゴ砂、濾過器としてプロテインスキーマ等）で2週間馴致飼育してから実験で用いた。なお、飼育中の被検魚は1日の殆どを砂中に潜って休眠しており、日中にたまに砂から出てきてゆっくりと泳ぎ回っていた。

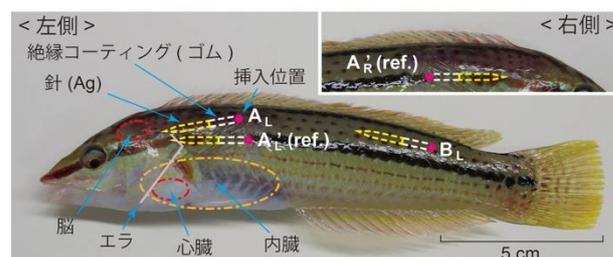


図5 被検魚（キュウセン）の写真と隔離電極の挿入位置

実験の直前に、これら被検魚を水槽から取り出し、隔離電極を魚体後端の筋肉部から頭部方向に挿入、つまり、信号線を尾びれ側へ配線した。本提案手法を検証するために隔離電極を挿入した位置は図5に示す魚の左面のエラ上部のA_Lと尾の側線上部のB_Lの2カ所である。これらの位置は生存に直接関わる脳や消化器等を傷つけないで隔離電極を挿入でき、且つ心臓からの距離が比較的近い部位と遠い部位である。更に、本提案手法との比較のため、従来手法としてA_L位置より下部のA_L'とその逆面のA_R'にも1対の隔離電極を挿入した。なお、陸上でのこれら隔離電極の挿入作業は数分程度で完了した。

隔離電極を装着して被検魚をたらいに入れ10分程度したら、被検魚は遊泳しなくなり休息

(その場で静止してエラのみを動かしている) するようになる。この状態で、生体電極専用の抵抗計(ニホンサンテック製、MaP811)で生体電極間の抵抗を測定し、これら隔離電極の挿入具合を確認した。適切に隔離電極が挿入され、海水と隔離電極の先端部導体が絶縁されていれば、表1に示すように隔離電極と海中電極間の抵抗値は海中に放置した隔離電極と海水電極間のその2倍以上となる。

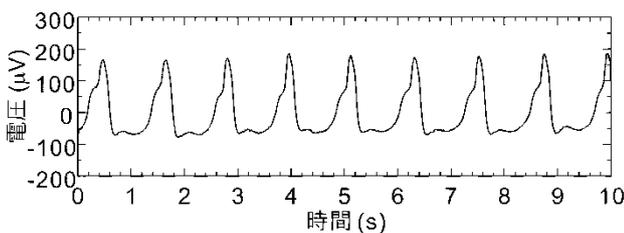
このようにして、実験準備が整った後に、安静時と運動時の魚の生体電気信号をオシロスコープで測定した。ここでは、安静時の魚を一時的に運動させるため、魚眼に意図的に手を近づけて視覚刺激を与えた。

表1 生体電極間の典型的な抵抗値

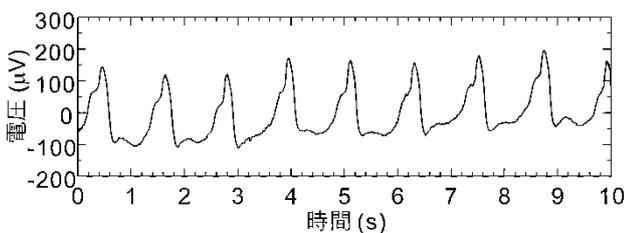
電極対	抵抗値 (kΩ)
隔離電極 (A _L) vs 海水電極	1.1
隔離電極 (B _L) vs 海水電極	1.4
隔離電極 (A' _L) vs 隔離電極 (A' _R)	1.9
海水に置かれた隔離電極 vs 海水電極	0.4

5 実験結果と考察

安静時の魚のエラ上部で得られた生体電気信号の例を図6に示す。(a)、(b)はそれぞれ本提案手法(A_L位置の隔離電極と海水電極間)と従来手法(A'_L'とA'_R'位置の隔離電極間)で検出された信号波形である。これら信号波形は同時に計測しており、0.53Hzのハイパスと30Hzのローパスフィルタリングされた波形である。



(a)本提案手法

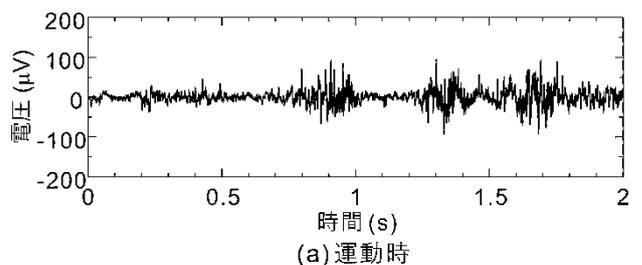


(b)従来手法

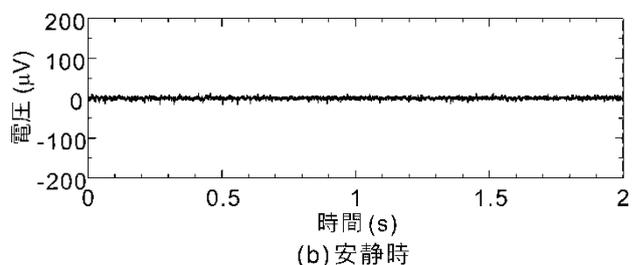
図6 安静時の被検魚エラ上部から得られた生体電気信号の例

これら図6(a)、(b)を見ると、極めて類似した波形となっており、波形のピークが0.45、1.65、2.80、3.95、5.14秒と約1.2秒間隔で規則的に並んでいることがわかる。このような時間間隔で規則的な波形は生体から発せられる電気信号として心電図以外にはないと考えられる。なお、他2匹の被検魚においても同様に規則的に並んだ波形ピークが観測されている。これらることより、魚のエラ付近に隔離電極を差し込むことで、従来手法だけではなく本提案手法においても、同様に心電図計測が可能であることが明らかになった。

次に、本提案手法により魚の尾部で得られた生体電気信号の例を図7に示す。(a)、(b)はそれぞれ運動時と安静時で得られた信号波形である。これらの波形は10Hzのハイパス、1000Hzのローパスと60Hz(商用周波数)のノッチフィルタリングされている。



(a)運動時



(b)安静時

図7 被検魚の尾部から得られた生体電気信号の例

図7(a)の運動時には0.9秒、1.3秒、1.7秒付近に比較的大きく急激に変化する波形がある。このような変化波形は他の2匹の被検魚でも確認することができる。なお、このような変化波形が出現すると同時に、被検魚の尾が動いていることを目視で確認している。一方、図7(b)の安静時を見ると、運動時のような急激な変化波形は観測されず、±10μV程度の電圧幅を持つ均一な波形が観測された。このような波形が得られている間は、当然であるが被検魚の尾は動いていないことも目視で確認している。以上のことより、運動時において急激に変化する

波形は生体電気信号では筋電図以外にはないと言える。このことから、本提案手法において、魚の心電図のみならず筋電図測定もできることが実証された。

ちなみに、隔離電極が体の大きさに対して比較的大きいにもかかわらず、これら被検魚は飼育水槽にて死なずに生きていた。この事実より、生体隔離電極の微小化が進めば本提案手法は魚にとってストレスフリーの生体電気計測となり、養殖現場での健康管理等に気軽に使われるようになるかと考えている。

6 結 論

本研究では、海洋生物として魚（キュウセン）を取り上げた実験を基に、周囲の海水を共通の生体電極として利用した新規の生体電気計測法（心電図、筋電図）を確立した。この新規の方法は測定点毎に海水と隔離した針状電極一つを海洋生物へ挿入するだけの非常に簡単な方法である。今後、養殖現場で利用可能な本提案手法を用いた計測技術を確立するため、養殖魚を対象として X 線を用いて隔離電極の正確な挿入位置を把握しながら得られる生体電気信号を計測し、魚種にあった最適な計測位置を調べる予定である。

なお、本報告は Scientific reports 誌（Nature research 出版）誌に掲載された著者らの論文²⁰⁾の大半を和訳したものであり、興味のある読者はそちらも是非参照して頂きたい。

参 考 文 献

- 1) M. Riyanto, and T. Arimoto, Fish. Sci., 81, 1083 (2015)
- 2) Y. Makiguchi, et al., J. Physiol. Sci., 59, 115 (2009)
- 3) P. A. Cotter, and K. J. Rodnick, Comp. Biochem. Physiol., Part. A, 145(2), 158 (2006)
- 4) T. Kojima, R. Kawabe, K. Shirasu, and Y. Naito, Polar Biosci., 16:104-111 (2003)
- 5) K. Tsuchiya, Y. Tsumaki, K. Mori and R. Okamoto, Adv. Robot., 33(3-4), 195 (2019)
- 6) K. Honda, et al., Ichthyol. Res., 64(3), 357 (2017)
- 7) T. Mori, et al., Fish. Sci., 81(5), 871 (2015)
- 8) H. Tanoue, et al., Fish. Sci., 78(3), 533 (2012)
- 9) K. Aarestrup, et al., Sci., 325(5948), 1660 (2009)
- 10) Z. Cao, et al., Fish Shellfish Immunol., 93, 879 (2019)
- 11) K. M. Choi, et al., Fish Shellfish Immunol., 93, 50 (2019)
- 12) A. Suzuki, et al., J. Appl. Microbiol., 126(1), 31 (2019)
- 13) M. Verleih, et al., Mar. Biotechnol., 17(5), 576 (2015)
- 14) M. S. Myers, et al., Aquat. Toxicol., 88(4), 277 (2008)
- 15) C. Goarant, and F. Merien, J. Microbiol. Methods, 67(1), 27 (2006)
- 16) C. F. Emery, et al., J. Psychosom. Res., 110, 54 (2018)
- 17) H. W. Hwang, et al., J. Oral Maxillofac. Surg., 75(5), 931 (2017)
- 18) M. Fallahi, et al., Appl. Ergon., 52, 95 (2016)
- 19) J. J. G. de Vriesa, C. S. Pauws, and M. Biehl, Neurocomputing, 151-2(5), 873 (2015)
- 20) T. Saiki, Y. Takizawa, K. Miyahara, M. Arima, Sci. Rep., 10.1038/s41598-020-73485-3 (2020)

(問合せ先 才木常正)