

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23653219

研究課題名(和文)クマノミ類の社会行動：行動内分泌学の新たな実験モデルの確立

研究課題名(英文) Analysis of Social Behavior of Clownfish: A New Experimental Model for Behavioral Endocrinological Research

研究代表者

小川 園子 (OGAWA, Sonoko)

筑波大学・人間系・教授

研究者番号：50396610

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：攻撃行動、性行動、養育行動などの社会行動に加え、近年では、個体間認知に関する行動にもホルモンの脳内作用が重要な役割を果たしていることが明らかとなっている。本研究では、このような個体間行動が、集団内の社会的構造の構築にどのように関わっているのかについて、群れの中の個体間の絆が強く、社会的性決定機構により各個体の地位が明確に定義できる性転換魚であるカクレクマノミ(*Amphiprion ocellaris*: common clownfish)を用いた行動解析を行い、社会性の形成、維持、変容についての新しい実験モデルとして確立した。

研究成果の概要(英文)：It has been well recognized that not only sex-typical social behavior such as aggressive, sex and parental, but also behavioral associated social cognition may be regulated by various hormones acting on the brain. In the present study, we use a sex-changing fish, common clownfish (*Amphiprion ocellaris*), which is known to form a strong social bonding. In anemonefish, social rank of each individual in a group is clearly defined based on their sex. Therefore it is suitable to study social cognitive behavior that may be critical for the formation of a social group. We have analyzed social behavior in details and established a new experimental model for behavioral endocrine studies for formation, maintenance and modulation of social bonding.

研究分野：行動神経内分泌学

科研費の分科・細目：実験心理学

キーワード：社会的性決定 個体間認知 脳内ホルモン機構 行動レパートリー 性転換

1. 研究開始当初の背景

申請者はこれまで、個体間に見られる社会行動を対象に、その発現調節に果たすホルモンの役割とその脳内作用機構についての研究を進めてきた。例えば、雄間にみられる攻撃行動、雄・雌間に見られる性行動、新生仔に対する養育行動等には各々特定のステロイドホルモンやペプチドホルモンが関与していることを示してきた(Ogawa et al., 2006, Review)。最近では更に、これら特徴的な表現型を呈する行動の表出ばかりでなく、個体間関係の樹立に関わる個体認知・記憶、弁別、嗜好にも、ホルモンが影響していることが明らかとなってきた。例えば、視床下部で産生された後に扁桃体や前頭前野等に作用するオキシトシンが、他個体に対する認知・記憶 (Social Recognition) や親和性 (Affiliation) の確立に重要な役割を果たしていることが、申請者を含む複数の研究者によって確かめられている (Ferguson, et al., 2000; Choleris, et al., 2003; Young & Wang, 2004; Takayanagi, et al., 2005)。

これらの行動解析では、1) 実験者の設定した特定刺激個体への行動を、2) 比較的短い時間 (短いもので2分程度、長いものでも2時間程度) のテストを繰り返して、測定するという方法をとっている。その範囲内で、特定のホルモンのレベルやその受容体の有無によって、社会行動にどのような影響が見られるのかを解析している。ところが、このような解析では、ホルモンの脳内作用を基盤として表出された行動が、その後のより長期的な個体間関係や集団内の社会構造構築にどのように影響するのかについては一切知ることができず、新たな実験モデルの確立が望まれた。

2. 研究の目的

本研究では、個体間行動が、集団内の社会的構造の構築にどのように関わっているのかについて、より長期的視点にたった解析を

進めることを目的として行われた。具体的には、群れの中の個体間の絆が強く、社会的性決定機構により各個体の地位が明確に定義できる性転換魚であるカクレクマノミ (*Amphiprion ocellaris*: common clownfish) を用いた行動解析を行い、社会性の形成、維持、変容についての新しい実験モデルとして確立することを目指した。クマノミ類は、イソギンチャク (Sea Anemone) を巣として数匹の集団で住んでおり、グループ内の個体間の絆が極めて強いことや、巣に近づいてくるグループ外の個体に対しては激しく攻撃行動を示すことが知られており、社会行動が多彩で観察がしやすいという特性がある。また、クマノミの個々の集団内には必ず、体が最も大きい雌、次に大きい雄が1匹ずつおり、その他の個体はすべて無性である。このような性の分布は、クマノミ類が雄から雌に変わる種類 (雄性先熟) の性転換魚であることによる。しかし、生殖腺の性転換のメカニズムに関する研究は比較的進んでいる (Miura et al., 2008; Kobayashi et al., 2010) もの、性転換に至る過程で、個体間に見られる行動がどのような役割をはたしているのかについては、ほとんどわかっていない。なぜ集団の中の特定の個体の生殖器が雌に転換するのか? そもそも自身と他個体との体の大きさの違いをどのように認知しているのか? 等の数々の疑問が山積している。我々は、雌、雄、無性という内分泌的特性によってはっきり定義される個体からなる社会構造が構築され、維持、変容していく過程において、各個体の役割の決定に寄与する個体間行動が存在するのではないかと考えた。その行動を見つけ出し、無性から雄、雌と変化していく過程での行動の変化とそれに対応する脳内のホルモン機構の変化を解析することにより、「行動」、「ホルモン」、「認知」を結びつける全く新しい実験モデルが創出できると考えた。

3. 研究の方法

株式会社 K2 ライフラボ（岡山）より購入したカクレマノミ（イレギュラーバンド）を用いた。予備実験および実験飼育開始前の待機集団飼育のためには、60cm x 30cm x 36cm のガラス待機水槽、実験飼育中には、40cm x 24cm x 30cm のガラス実験水槽を用いた。すべての水槽には、底砂を敷き、上部には、外部フィルター（待機水槽はデュアルクリーン600SP、実験水槽は簡単ラクラクパワーフィルターS、ともにジェックス株式会社）を設置した。飼育水には、人工海水を純水に溶かし、比重が 1.020~1.024 となるように作製したものを用いた。餌は、ひかりプレミアムメガバイトレッド（キョーリンフード工業株式会社）を用いた。飼育室は、室温 25~26℃、9:00 点灯、21:00 消灯の明暗周期に設定した。すべての実験は、水槽の前に設置したデジタルビデオカメラで記録し、デジタルイベントレコーダーにより行動解析を行った。

実験 1 では、8匹ずつ待機水槽で飼育中の 16 匹のカクレマノミの初期体重を測定し、各々の水槽から 1 匹ずつ選び、体重差が 0.2g 以内となるようにマッチさせた 8 組のペアを作った。その内 4 組を自由摂取群 (Cont 群)、4 組を強制摂取群 (Fix 群) とした。毎日の給餌中に、Cont 群については 2 つに仕切られた部屋の片方に 2 匹の被験体が入るように、Fix 群についてはそれぞれの部屋に 1 匹ずつの被験体が入るように、実験用水槽に仕切り板を投入した。仕切り板投入後、被験体の入っている部屋に餌、Cont 群では 50mg をまとめて、Fix 群では 2 つの部屋に 25mg ずつを投入した。仕切り板投入後、30 分後または 15 分後に仕切り板を取り出した。給餌のために仕切り板を投入してから取り出すまでを 1 試行とし、1 日 1 試行、42 日間にわたって試行を繰り返した。試行開始前 5 分間 (pre) 及び試行終了後 5 分間 (post) において前述の行動レパートリーにしたがって社会的行動を観察した。また全ての被験体の体重測定を、42 日間の実験期間中に 6 回行った。42 日目の値を

最終体重とした。

実験 2 では、実験 1 において、もともとは体重差が最小になるようにして組み合わせた 8 ペアのうち、2 年後まで生き残った 2 ペアを対象として、これまでに確立した行動レパートリーをもとに行動解析を行った。

4. 研究成果

(1) 予備実験：カクレマノミの社会行動レパートリーの確立

行動を通して確立される個体間関係が、性転換という内分泌事象に反映される過程を理解するための基盤として、カクレマノミの社会行動レパートリーの確立を図った。予備実験用にカクレマノミを集団飼育した水槽内で見られる個体間行動について、ビデオ記録をもとに観察を行った。その結果、下記の行動項目を抽出した。

Lunging - Stop: 相手個体から離れた地点から素早く接近し、相手個体から離れた地点で接近を止める行動。

Lunging - Avoid: 相手個体から離れた地点から素早く接近し、相手個体の周囲に接近してから視線を外して相手個体とは別方向に泳ぎ去る行動。

Lunging - Approach: 相手個体から離れた地点から素早く接近し、相手個体の周囲まで接近する行動。

Lunging - Peck to front: 相手個体から離れた地点から素早く接近し、相手個体の顔に口先を接触させる行動。

Lunging - Peck to side: 相手個体から離れた地点から素早く接近し、相手個体の胴に口先を接触させる行動。

Lunging - Peck to back: 相手個体から離れた地点から素早く接近し、相手個体の尾に口先を接触させる行動。

Push: 相手個体の周囲で相手個体に向かって顔を突き出すが、接触しない行動。

Push - Peck to front: 相手個体の周囲で相手個体に向かって顔を突き出し、相手個体の顔

に口先を接触させる行動。

Push - Peck to side:相手個体の周囲で相手個体に向かって顔を突き出し、相手個体の胴に口先を接触させる行動。

Push - Peck to back:相手個体の周囲で相手個体に向かって顔を突き出し、相手個体の尾に口先を接触させる行動。

Stare:相手個体の周囲で相手個体に視線を向けながら、しばらく静止する行動。

Chase:泳いでいる相手個体の後を追いかけて、素早く泳ぎ続ける行動。

Trembling:泳ぎを止め、その場で体を小刻みに震わせる行動。この行動中は、体を縦向きにする、体を横倒しにする等の他の行動中には見られない状態を取りやすい。

Flight:相手個体とは別方向に視線を向け、素早く泳いで相手個体から離れる行動。

Avoiding:相手個体の接近時、少し動いて相手個体を避ける行動。

Freezing:相手個体の周囲で相手個体に視線を向けながら、体を傾けてその場に留まる行動。

(2)実験 1：食餌量の統制が社会的地位の確立に及ぼす影響の検討

カクレクマノミの個体間に見られる行動を継続的に記述し、1匹の雌、1匹の雄という社会構造の構築に至る過程に、社会行動（個体間行動）がどのような役割を果たしているのかを明らかにすることを試みた。そのため、本研究では、餌量調節テストパラダイムを用いた実験を行った。

各ペアにおいて、被験体ごとに試行前後における優位行動及び劣位行動の頻度、初期体重及び最終体重、初期体重と最終体重との差（増加値・減少値）を求めた。実験開始から終了までの体重変化を見ると、2匹ともに増加したペアは存在しなかった。一方が増加し、もう一方が減少したペアはCont群においては4組中1組、Fix群においては4組中3組であった。さらに、優位行動及び劣位行動の頻度から、ペアごとに被験体を優位個

体または劣位個体に定めた。最終的に優位個体の方が劣位個体よりも体重の増加値が大きい、または減少値が小さいペアは、Cont群においては4組中2組、Fix群においては4組中4組であった。Cont群の方がFix群よりも体重増加したペアが少なかったことから、採餌中の社会的接触は体重増加に不利であることが示唆される。またCont群の優位個体よりもFix群の優位個体の方が体重増加しやすかったことから、採餌中に社会的接触がない環境は、優位個体に有利であることが示唆される。以上の結果から、少なくとも42日間の観察期間中における優位行動から判断される個体の優位性の確立には、餌摂取時における競争（Cont群）が関与しているとは言えないと結論された。

(3)実験 2：社会的地位の確立したグループにおける長期的な社会行動の観察

実験 2において、もともとは体重差が最小になるようにして組み合わせた8ペアのうち、2年後まで生き残った2ペアを対象として、これまでに確立した行動レパートリーをもとに行動解析を行った。その結果、ペア形成の2年後に社会的に優位な行動を示す個体は、1)劣位の個体に比べて体重、体長とも勝っていること、2)最初にペア飼育を開始した2日後には、すでに優位行動を示していたことがわかった。現在、これらのカクレクマノミの脳および生殖腺の組織の解析を進めている。

(4)本研究では、生殖生物学分野以外では、これまでほとんど研究対象になっていないクマノミ類を用いて新しい実験モデルを確立することを目指した。これまでのマウスの行動解析を通じて培ってきた方法論をカクレクマノミの行動解析に適用することにより、研究基盤が確立された。今後は、現在も進行中の神経組織学的解析をさらに推進することにより、これまで明らかにされてこなかったクマノミ類の個体認知のメカニズムの解明に繋がる新しい発見が期待される。また、本研究で確立された、行動レパートリー、社

会行動テストパラダイムや実験条件を用いることにより、今後、クマノミ類に限らず、社会性の強い魚類を用いた行動実験が普及することが期待される。その結果、認知機能という極めて心理学的課題と、脳内ホルモン機序とを架橋する研究領域（行動内分泌学）が活性化されるものと考えられる。最後に、より現実的問題として、心理学分野でマウスを初めとするげっ歯類を用いる動物実験研究を推進することは、動物愛護・倫理的配慮に加え、SPF 施設での維持・管理にかかる労力と費用のため、年々、困難を極めるようになってきていることがあげられる。このような状況を鑑みると、本研究をきっかけとして、魚類を用いた行動観察が、今後、心理学を専攻する学生の基礎実験として取り入れられるようになれば、実験心理学の教育の充実という波及効果も期待できる。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計2件）

①小川園子 2013 社会行動の調節を司るホルモンの働き, 動物心理学研究, 63, 31-46. 査読あり

②Handa, R. J., Ogawa, S., Wang, J. M., and Herbison, A. E. 2012 Roles for estrogen receptor beta in adult brain function. *Journal of Neuroendocrinology*, 24, 160-173. 査読あり

〔学会発表〕（計13件）

①小川園子 脳に働くホルモンと環境要因による社会行動の調節 第25回日本発達心理学会シンポジウム「社会行動の発達を司る脳の働き・ホルモンの働き：行動神経内分泌学の最前線」2014年3月21日 京都.

②Ogawa, S. Neuroendocrine Basis of Sex Differences in Social and Emotional Behavior. 第90回日本生理学会大会シンポジウム『生理学からみた性差とダイバーシティの理解』2013年3月29日 東京.

③Ogawa, S. Life-Long Action of Steroid Hormones on Social Bonding. In the Symposium on "New Animal Models for Social Neuroscience", January 24, 2013, Okazaki, Japan.

④Ogawa, S. Neurobehavioral mechanism of affiliative behavior and cooperation: prospects for translational advances for psychiatric disorders. 第35回日本神経科学大会ランチタイムミニシンポジウム『日米脳：日米科学技術協力事業「脳研究」分野の紹介』, 2012年9月20日 名古屋.

⑤小川園子 脳に働くホルモンと環境要因による情動・社会行動の調節 第30回日本小児心身医学会学術集会メインシンポジウム「子どもの心身症は予防できるか～周産期からの支援を通して～」2012年9月8日 名古屋.

⑥小川園子 社会行動の調節を司るホルモンの働き 第72回日本動物心理学会大会チュートリアル講演 2012年5月13日 西宮.

⑦小川園子 社会行動を制御する神経内分泌機構 第117回日本解剖学会総会・全国学術集会「行動制御に関わる神経系とその相互関係」2012年3月28日 山梨.

⑧Ogawa, S. Neural mechanisms of social behavior: Role of steroid receptors. In The US-Japan Joint Seminar on "Neurobehavioral Mechanisms of Affiliative Behavior and Cooperation: Prospects for Translational Advances for Psychiatric Disorders", Atlanta, USA, October 23, 2011.

⑨小川園子 情動行動・社会行動の調節を司る神経内分泌機構 生理学研究所情動研究会 2011年10月5日 岡崎.

⑩小川園子 エストロゲンによる社会行動制御の脳内機構 第82回日本動物学会旭川大会シンポジウム「脊椎動物の行動を制御する神経とホルモンのはたらき」2011年9月21日 旭川.

⑪Ogawa, S. Hormonal and Environmental Regulation of Social Behavior. 第34回日本神経科学大会シンポジウム「ホルモンと環境情報による行動制御とこころの健康維持」2011年9月15日 横浜.

⑫小川園子 ステロイドホルモンと行動
第 71 回日本動物心理学会自由集会「脳
とホルモンの行動学」2011 年 9 月 8 日
東京.

⑬ Ogawa, S. Brain mechanisms of
estrogenic regulation of social
behavior. In The Sino-Japan Joint
Seminar on "Neurobiological Basis of
Social Behavior", Xi' an, China, July
26, 2011.

[図書] (計 2 件)

①小川園子 2013 感性認知脳科学の方法
論：行動科学からのアプローチ 筑波大
学感性認知脳科学研究プロジェクト
(編) 感性認知脳科学への招待, 199
(11-22), 筑波大学出版会.

②小川園子 2013 情動と動機づけ 森寿
志他 (編) 神経科学イラストレイテッド
(3rd Ed.), 397 (242-248), 羊土社.

[その他]

ホームページ:

[http://www.kansei.tsukuba.ac.jp/~ogawa
lab/](http://www.kansei.tsukuba.ac.jp/~ogawa/lab/)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 園子 (OGAWA, Sonoko)
筑波大学・人間系・教授
研究者番号: 5 0 3 9 6 6 1 0

(2) 研究分担者

坂本 敏郎 (SAKAMOTO, Toshiro)
京都橘大学・健康科学部・准教授
研究者番号: 4 0 3 2 1 7 6 5