

画像解析によるヒラメ心拍数の計測

廣田 裕*, 矢田 貞美*

Measurement of heart rate in *Paralichthys olivaceus* by image analysis

Yutaka HIROTA*, Sadami YADA*

Abstract : To count heart rates, we tried to analyze image of heartbeat movement which it permeated with the fiber light. In this paper, we used the juvenile flounder *Paralichthys olivaceus* in the case of normal and albinism fish body. The results are as follows.

1. In the same fish body width, a transmissivity of a fiber light of albinism fish was higher by 1.2 ~1.6 times than normal one.
2. There was need 10,030 lx for analyzing the fish body width 6.85 mm. When a fish body width was widened, a minimum illuminance to permeate the heart increased.
3. The high correlation was recognized between operculum moving number and heart rate in condition of optical irradiation.
4. The preparation time to measure the heart rate with this system needs for approximately 40 minutes.

This measuring method is useful to research the physiological influence of fish body in the external environment changing and the anesthesia treatment.

Keywords : heart rate, operculum moving number, *Paralichthys olivaceus*, image analysis

1. はじめに

魚類の心電図を計測する方法には、まず電極を開心腔に埋め込む体内導出法 (OITS *et al.*, 1957; NOSEDA *et al.*, 1963; NOMURA *et al.*, 1969; 難波ら, 1973; 難波, 1978, 1996) があげられる。体内導出法は、麻酔処理した魚の心臓部をリード線と一体となった一対の電極で挟持して心電図を計測する。心筋の起電力が小さいコイ科の魚類や遊泳魚体でも波形解析が可能であるが、麻酔処理および体内への電極挿入が安静状態の心拍数に影響を及ぼすことが危惧される。次に、電極を魚体表面に設置する体表面導出法 (OETS, 1950; 山森ら, 1971a; 伊東, 1998) があげられる。心臓の起電力が大きいウナギでは、水中の魚体表面近傍に電極を設置することでも心電図の計測が可能である (山森ら, 1971b)。体表面導出法は固定した供試魚の鰓に麻酔液を環流し、体表面における電

極設置部位別の心電図を長時間計測することが可能であるが、やはり麻酔処理が必要である。そこで、非接触かつ非麻酔処理で遊泳魚の体表面より微弱電流を取り出す計測方法 (野村・秋山, 1984) が開発された。この方法は魚体を損傷させないが、遊泳魚の心電図計測では、電極近傍に魚体をとどめるために適当な水流条件下において前進遊泳を停止させる (以降、滞泳と称する)。そのため、魚体の大小および魚種により流速を変化させる必要があり、一定の運動量下における計測は困難である。

一方、光照射が魚類に与える影響については、魚類の行動および生理の分野において研究されてきた。魚類は、低照度下においては光源に蟄集するが、高照度下においては光源から逃避する (今村, 1968)。魚類生理学の分野では、光に対する魚の網膜反応の程度を判定する際に、心電図や心拍数を利用した研究が多く行われている。これらの研究には、コントラスト (HESTER, 1968; ANTHONY, 1981)、偏光 (KAWAMURA *et al.*, 1981; HAWRYSHYN and McFARLAND, 1987)、紫外線 (HAWRYSHYN and BEAUCHAMP, 1985)、レーザ光 (川村ら, 1991) およびストロボ光 (安・有元, 1994) を10

* 東京水産大学海洋生産学科
〒108-8477 東京都港区港南4-5-7
Department of Marine Science and Technology, Tokyo University of Fisheries, 4-5-7 Konan, Minato, Tokyo, 108-8477 Japan

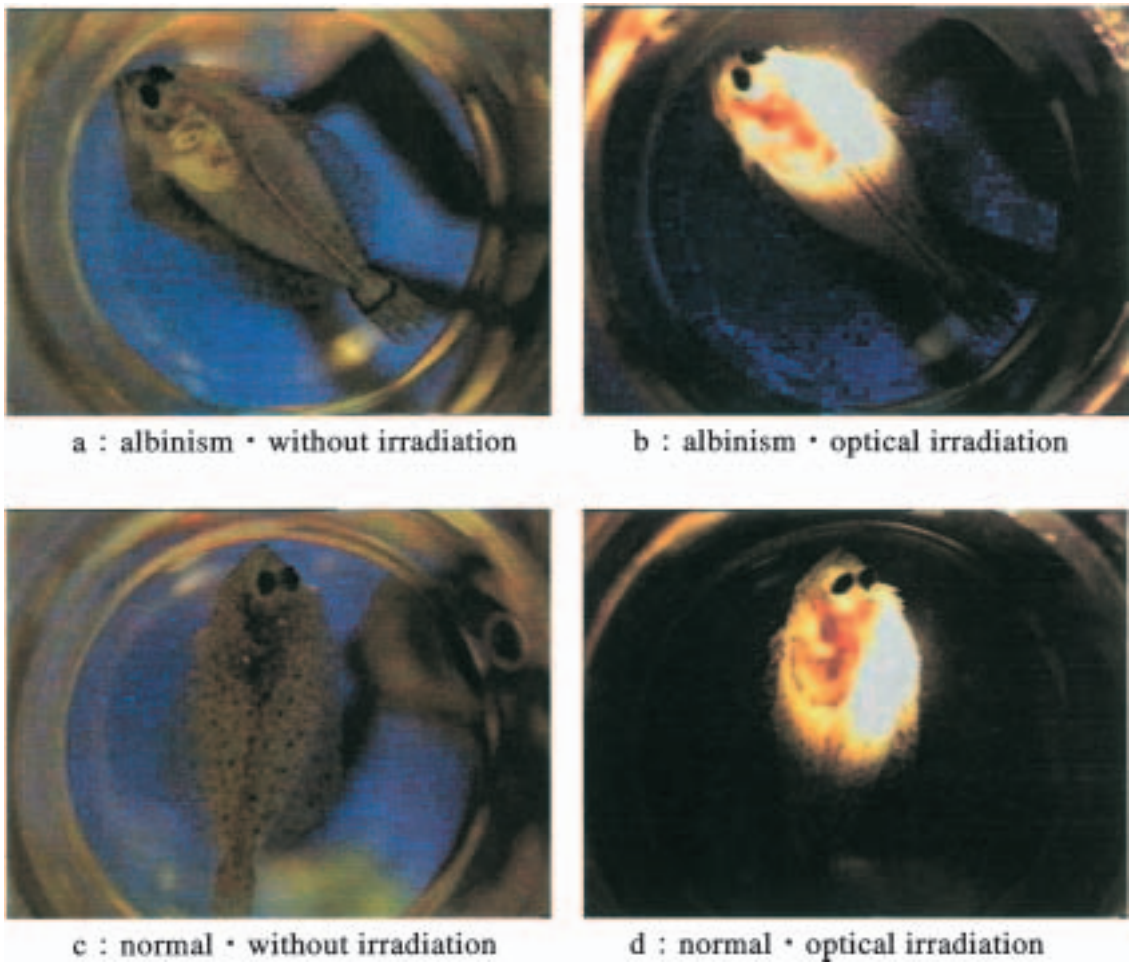


Fig. 1. Photography image of *Paralichthys olivaceus*

a : albinism • without irradiation. b : albinism • optical irradiation. c : normal • without irradiation. d : normal • optical irradiation.

a : Heartbeat movement can observe from back of fish body without irradiation. b : Heartbeat movement can observe under the low illuminance. c : Heartbeat movement can't observe without irradiation. d : Heartbeat movement can observe under the high illuminance.

Table 1 Size of test *Paralichthys olivaceus*

	Albinism Mean S.D.	Normal Mean S.D.
Body length (mm)	26.21±1.27	56.65±8.00
Body width (mm)	2.75±0.08	4.64±0.55
Body weight (g)	0.41±0.05	3.03±0.82
<i>n</i>	10	10
Relationship BL vs BW	$y=0.06x+1.1, r=0.99$	$y=0.06x+0.82, r=0.99$

秒以内の短時間光照射したものや白熱灯（安，1996）を連続照射したものが含まれる。しかし、心拍数の計測を目的とした光利用に関する報告は見あたらない。既往の心拍数計測方法では、麻酔処理および体内への電極挿入が心拍数に影響を及ぼす短所があった。

そこで本報では、一般に心臓の鼓動数と心拍数は同数であるので、光照射による心臓部の撮影画像の解析、すなわち心臓の鼓動数を心拍数として計測する方法の確立を目的とした。また、供試魚を計測用容器に移し換える行為ならびに光照射照度の高低が心拍数に及ぼす影響を定量的に捉え、安静時における心拍数の計測について検討した。

なお、本研究は、色素が薄いため室内レベルの照度でも魚体裏面より心臓の鼓動が目視可能な白化個体の特徴に着目したものである。白化現象は、人工採苗した稚魚に多く見られ、その原因解明および防除のための研究が行われている（京都府海洋センター，1983；福所ら，1986；竹内，1998）。

2. 方法

1) 供試魚

ヒラメ *Paralichthys olivaceus* の幼魚を供試した。正常個体および体色異常の白化個体各10尾を水温 20 ± 1.0 °C の透明アクリル製水槽（縦30cm×横59cm×高さ34cm）で蓄養した。

Table 1にヒラメのサイズを、Fig. 1にヒラメの撮影画像をそれぞれ示す。正常個体および白化個体の体長と体幅との間には正の相関が認められた。白化個体では、約250 lxの照度下で目視による心拍数の計数が可能であった。

2) 計測装置

Fig. 2に計測システムの概略図を示す。同システムは主に、光源、ガラス水槽、計測用容器、ビデオカメラ、ディスプレイおよび濾過装置で構成される。光源には魚体および水槽内の海水に熱影響を与えない高輝度冷光装置（林時計（株）製，150 W）を使用した。同冷光装置および発光部を接続するファイバースコープの先端径は5mmであり、被接写体位置の照度を1,400～16,000 lxまで無段階に調整可能である。供試体の遊泳範囲を制限するため、主実験領域であるガラス水槽（縦19cm×横29cm×高さ20cm）内に、さらに透明アクリル製の計測用容器（縦10cm×横10cm×高さ10cm）を設置した。ガラス水槽および計測用容器の水深は3.5cmに設定し、人工海水（千寿製薬社製，Marine art SF）を使用した。水質保持を目的として、実験中は散気および濾過装置を稼働させ、蓄養水槽と同様に水温を 20 ± 1.0 °C に制御した。

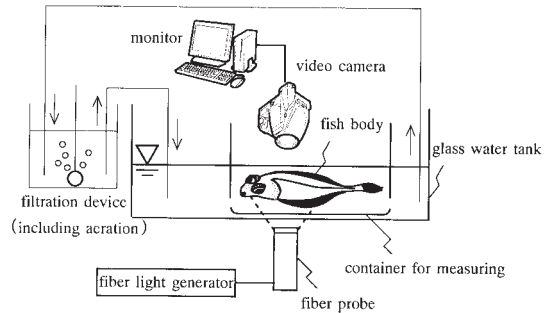


Fig. 2. System for measuring heart rate.

3) 計測方法

(1) 概要

計測容器内における魚体の心臓部を冷光照射し、撮影画像の解析により鰓蓋開閉数および心拍数を計測する方法の概要を以下に述べる。まず、蓄養水槽からガラス水槽内の計測用容器へ魚体に移し換える（以降、水槽移換と称する）。水槽移換から平常状態、すなわち鰓蓋開閉数および心拍数が安静時の値まで回復（以降、安静化と称する）した魚体の心臓部に冷光を照射して透過する。次に、魚体の鰓蓋および心臓部の画像をビデオカメラで撮影し、その記録画像から毎分の鰓蓋開閉数および心拍数を計数する。

ここで事前に、ヒラメの心臓部の光透過特性と、供試魚が水槽移換および光照射直後から安静状態に達するまでの時間（以降、安静化所要時間と称する）とを把握しておく必要が生じる。心臓部の光透過特性に関しては、まず一定照度の冷光を照射して光透過率を求めた。次に、徐々に照度を上昇させて光透過限界照度を求めた。安静化所要時間に関しては、まず自然飼育、すなわち魚体に刺激を与えない状態の鰓蓋開閉数および心拍数を計数し、これを安静時の各値と定義した。次に、撮影画像より魚体の水槽移換および光照射後の鰓蓋開閉数および心拍数を計数して、安静化所要時間を求めた。

なお、安静時および水槽移換後の心拍数の計測には、魚体裏面から鼓動が観察可能な白化個体のみを供試した。

(2) 心臓部の光透過特性

供試魚を1尾ずつ計測用容器内に入れ、冷光の照度を2,000 lxに設定し、魚体下方1cmから心臓部に対して垂直上向きに照射した。光軸上の透過光の照度を魚体上方10cmに設置した照度計（東京硝子器械（株）製，FLX-1334）により計測し、心臓部の光透過率（%）を次式（1）より求めた。

$$T_s = \frac{L_\beta}{L_\alpha} \times 100 \quad (1)$$

ただし、 T_s ：心臓部の光透過率（%）、 L_α ：照射光の照度（lx）、 L_β ：心臓部の透過照度（lx）である。

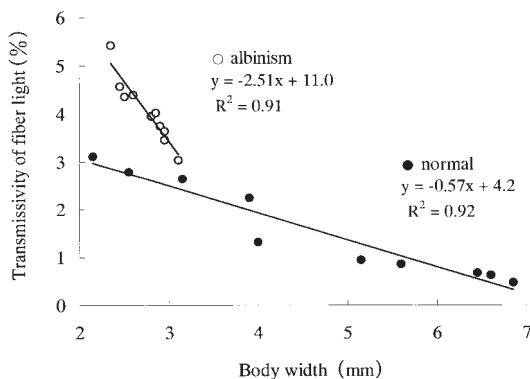


Fig. 3. Relationship between transmissivity of a fiber light and body width.

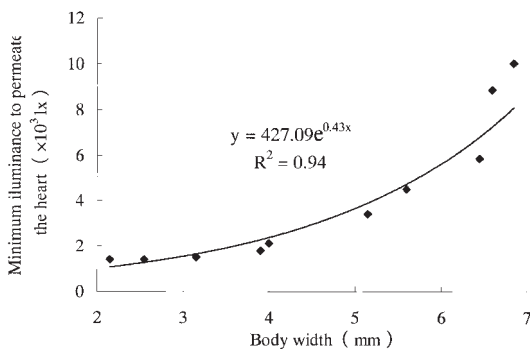


Fig. 4. Relationship between minimum illuminance to permeate the heart and body width.

さらに、体幅と心臓部の透過限界照度との関係を求めた。供試魚を1尾ずつ計測用容器内に入れ、冷光を魚体下方1cmから心臓部に対して垂直上向きに照射し、光源の照度を設定下限である1,400 lxから徐々に上昇させる。魚体上方10cmから垂直下向きに撮影した心臓部の画像をディスプレイ上で観察し、鼓動が観察可能となる下限照度を心臓部の光透過限界照度とした。

(3) 安静時の鰓蓋開閉数および心拍数の計測

鰓蓋開閉数の計測には正常個体および白化個体を供試し、飼育水槽内における鰓蓋開閉数を目視で計数した。10分間の鰓蓋の開閉数より、毎分の平均鰓蓋開閉数を算出した。心拍数の計測には白化個体のみを供試し、計測用容器へ水槽移換60分後から10分間魚体を撮影した。ビデオカメラを魚体下方10cmに設置し、垂直上向きに撮影した画像より、毎分の平均心拍数を算出した。

(4) 水槽移換後の鰓蓋開閉数および心拍数の計測

飼育水槽から計測用容器内へ魚体を水槽移換した直後

から60分間、魚体を撮影した。鰓蓋開閉数の計測には正常個体および白化個体を供試し、ビデオカメラを魚体上方10cmに設置して、垂直下向きに撮影した。心拍数の計測には白化個体のみを供試し、ビデオカメラを魚体下方10cmに設置し、垂直上向きに撮影した。撮影画像より、毎分の平均鰓蓋開閉数および心拍数を算出し、安静化所要時間を求めた。

(5) 光照射後の鰓蓋開閉数および心拍数の計測

計測用容器内で安静化した正常個体および白化個体の心臓部に冷光を照射し、照射直後から60分間、魚体を撮影した。光源を魚体下方1cmに設置し、垂直上向きに照射した。心臓部の光透過限界照度の測定結果より、照度は1,800 lx (以降、低照度と称する) および10,030 lx (以降、高照度と称する) の2段階に設定した。なお、低照度では大型の正常個体の心臓部は光透過できないので、体幅が3.5mm以下の魚体のみを供試した。ビデオカメラを光軸の延長線上に設置し、魚体上方10cmから垂直下向きに撮影した。撮影画像より、毎分の平均鰓蓋開閉数および心拍数を算出し、安静化所要時間を求めた。

3. 結果

1) 心臓部の光透過特性

Fig. 3に正常個体および白化個体の体幅と心臓部の光透過率との関係を示す。光透過率は、体幅が大きいくほど減少し、同体幅の場合、白化個体の方が正常個体より1.2~1.6倍高かった。Fig. 4に正常個体の体幅と心臓部の光透過限界照度との関係を示す。体幅が大きいくほど光透過限界照度は増加し、体幅2.55mm以下では1,400 lxで鼓動が観察できたが、体幅6.85mmでは10,030 lxを要した。白化個体は体幅の大小にかかわらず、1,400 lxで鼓動が観察できた。

2) 安静時の鰓蓋開閉数および心拍数

Table 2に安静時の鰓蓋開閉数および心拍数を示す。正常個体および白化個体の毎分の平均鰓蓋開閉数はほぼ同程度であった。白化個体の毎分の平均心拍数は約88回であった。

3) 水槽移換後の鰓蓋開閉数および心拍数

Fig. 5に水槽移換直後から30分間の鰓蓋開閉数および心拍数を5分間隔で示す。水槽移換直後の鰓蓋開閉数は安静時の1.5~1.7倍に、心拍数は安静時の1.4~1.5倍に増加した。鰓蓋開閉数および心拍数の安静化所要時間は10分程度であった。なお、水槽移換に要した時間は約3秒であった。

4) 光照射後の鰓蓋開閉数および心拍数

Fig. 6に低照度光照射直後から30分間の鰓蓋開閉数および心拍数を5分間隔で示す。光照射直後の鰓蓋開閉数は白化の有無にかかわらず、安静時の約1.2倍増加した。

Table 2 Operculum moving number and heart rate when a fish body is normal condition.

	Albinism Mean S.D.	Normal MeanS.D.
Operculum moving number (times/min)	54.2±1.25	54.3±1.01
Heart rate (times/min)	87.8±1.97	—
<i>n</i>	10	10

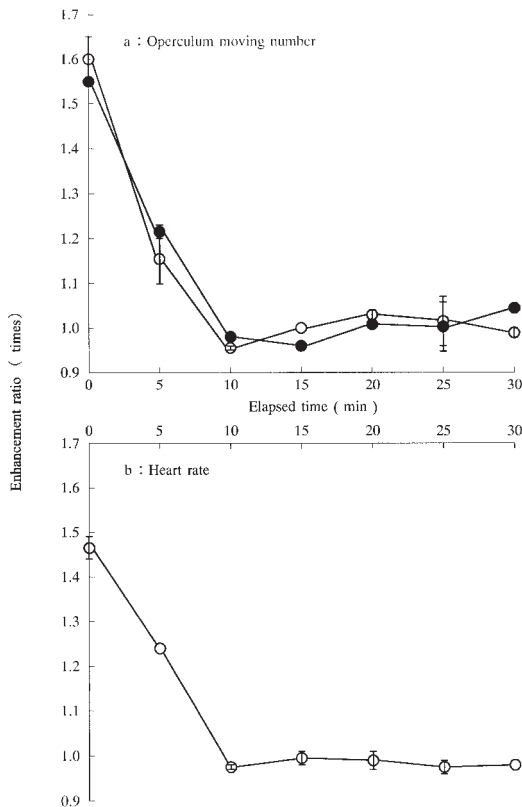


Fig. 5. The enhancement ratio of operculum moving number and heart rate when a fish body was transferred into other water tank. ● : normal. ○ : albinism.

一方、心拍数は、正常個体で安静時の約1.1倍に、白化個体で安静時の約1.2倍に増加した。鰓蓋開閉数および心拍数の安静化所要時間は、15分程度であった。

Fig. 7に高照度照射直後から30分間の鰓蓋開閉数および心拍数を5分間隔で示す。照射直後の鰓蓋開閉数は、正常個体で安静時の約1.2倍に、白化個体で安静時の約1.3倍に増加した。一方、心拍数は、白化の有無にかかわらず、安静時の約1.2倍に増加した。鰓蓋開閉数および心拍数の安静化所要時間は、25~30分程度であっ

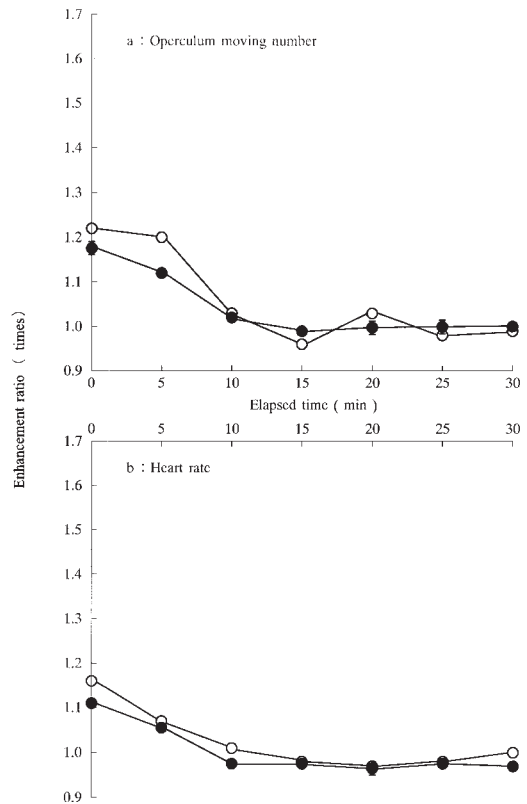


Fig. 6. The enhancement ratio of operculum moving number and heart rate under the low illuminance. ● : normal. ○ : albinism.

た。

5) 鰓蓋開閉数と心拍数との関係

水槽移換後、照射後に同一個体から同時に得られた、鰓蓋開閉数と心拍数との関係をFig. 8に示す。白化の有無にかかわらず、鰓蓋開閉数と心拍数との間には高い正の相関が認められた(正常個体: $r=0.96$, 白化個体: $r=0.92$)。

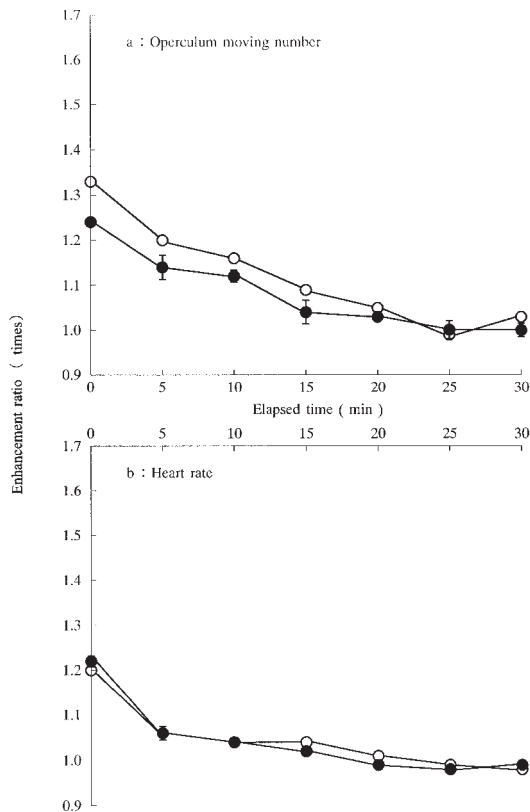


Fig. 7. The enhancement ratio of operculum moving number and heart rate under the high illumination. ● : normal. ○ : albinism.

4. 考察

鰓蓋開閉数と心拍数との間には、高い正の相関が認められた (Fig. 8)。このことより、鰓蓋開閉数は心拍数を示す指標となり得るものと考えられる。水槽移換後には、正常個体および白化個体の鰓蓋開閉数に差は認められず (Fig. 5)、また白化個体の鰓蓋開閉数と心拍数との間には正の相関が認められることから、正常個体の心拍数の安静化所要時間も、白化個体と同様に10分程度であると推定される。

光照射直後の正常個体および白化個体の心拍数は、安静時と比べて1.1~1.3倍に増加した (Fig. 6, 7)。白熱灯を照射したコイの心拍数は、水中における照度が300 lx下では照射前とほとんど変化がなく、700 lx下では照射前の約1.5倍に、1,400 lx下では照射前の3~4倍に増加する (安, 1996)。本報とは魚体への光照射の目的および方法は異なるが、いずれも光照射による心拍数の増加を回避することはできない。

光照射直後の鰓蓋開閉数および心拍数の増加率は、高

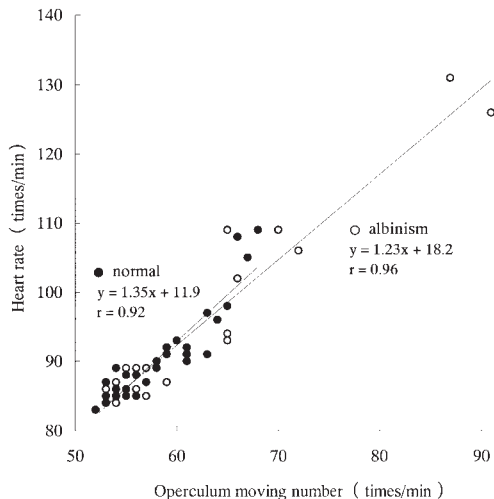


Fig. 8. Relationship between operculum moving number and heart rate.

照度光照射直後の心拍数を除いて、白化個体の方が正常個体より高い傾向が見られた。この原因としては、心臓部の光透過率が白化個体の方が正常個体より高く (Fig. 3)、より多くの光刺激を視覚に受けたためと考えられる。

安静化所要時間は、水槽移換後で10分程度、低照度光照射後で15分程度、高照度光照射後で30分程度であった。これらを合計すると、本システムにより心拍数を計数するための準備時間は最長で40分程度を要するが、水槽移換と光照射を行うことで、水槽移換の影響を光照射の影響に抱合させることができ、安静化所要時間を短縮できるものと推定される。光照射後の安静化所要時間の方が、水槽移換後の安静化所要時間より長かったことから、ヒラメは接触刺激よりも、光刺激に対する環境順応に長時間を要するものと考えられる。

本方法の特徴は、魚体に非接触かつ非麻酔処理で心拍数を計測することにあるが、魚体への光照射を回避することはできない。実験中に供試魚が発光部から逃避することはほとんど認められなかったが、これはヒラメの低移動性、ならびに同魚の両眼が光照射方向と反対の魚体表面に位置することによるものと思われる。それゆえに、カレイなど移動性が低く体幅の小さい魚類、ならびに魚体色素の薄いトランスルーセントキャットフィッシュ、カワエビなどの心拍数の計測には有用と思われる。移動性の高い魚種へ適用する場合、魚体サイズに適合した容器、もしくは適当な水流条件が設定可能な水槽を準備し、滞泳する魚体の心臓部と光源が同軸上になるように設定する必要がある。

今後、プローブ先端径の大小、同プローブと被接写体間の距離、ならびに光源の出力を変化させることにより、画像撮影位置における照度をより細かく調整することが

可能となる。本方法では、同一の撮影画像から鰓蓋開閉数および心拍数を計数するために、ヒラメのサイズならびに鰓蓋と心臓間の距離を考慮し、先端径5mmのプロープを使用した。心拍数のみを計数する場合、プロープ先端径を小さくすることで、供試魚の視覚に対してより低刺激の状態で計数が可能になるものと考えられる。現行装置の照度の設定下限は1,400 lxであるが、プロープと被接写体間の距離を長くすることで照射スポット径は拡大し、1,400 lx以下の調光が可能となる。光透過率の高い魚種、ならびに体幅の小さい魚体には、より低照度かつ低刺激で計数が可能となる。これに対して、強力な光源を用いることで、照度を現行装置の設定上限である16,000 lx以上に設定できると、光透過率の低い魚種、ならびに体幅の大きい魚体にも心臓部の光透過が可能になると期待される。

本方法では、魚体裏面から光を照射しているため、魚体表面に魚眼を持つヒラメは魚体を透過した照度を体感していると考えられる。本方法を利用して、ストロボ光やレーザー光などの各種刺激光に対する網膜反応の程度を判定する際には、心臓部への照射光が魚眼への刺激光に重複されることを考慮に入れる必要がある。その一方で本方法は、例えば計測用容器内の水質および水温などの環境変化、ならびに麻醉処理が鰓蓋開閉数および心拍数に及ぼす生理的影響を明らかにするには好適と思われる。

残された課題としては、より刺激の少ない光波長域の探索があげられる。

謝 辞

査読者には懇切丁寧なご指導を頂きました。ここに、深く感謝申し上げます。

文 献

- 安永一・有元貴文 (1994): ストロボ光に対するマアジの回避行動. 日本水産学会誌, **60**, 713-718.
- 安永一 (1996): 心電図による光刺激効果の判定. 魚の行動生理学と漁法 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, **108**, 86-95.
- ANTHONY, P.D. (1981): Visual contrast thresholds in the *Cod Gadus morhua* L. *J. Fish Biol.*, **19**, 87-103.
- 福所邦彦・山本剛史・青梅忠久 (1986): ヒラメの白化体出現におよぼす飼育中の通気量の影響. *Bull. Nati. Res. Inst. Aquaculture.*, **10**, 53-56.
- HAWRYSHYN, C.W. and R. BEAUCHAMP (1985): Ultra-violet photosensitivity in goldfish; An independent U.V. retinal mechanism. *Vision Res.*, **25**, 11-20.
- HAWRYSHYN, C.W. and W.N. McFARLAND (1987): Cone photoreceptor mechanisms and the detection of polarized light in fish. *J. Comp. Physiol. A.*, **160**, 459-465.
- HESTER, F.J. (1968): Visual contrast thresholds of the goldfish. *Vision Res.*, **8**, 1315-1335.
- 今村豊 (1968): 漁業における火光の集魚効果とその操法の研究 (I). *うみ*, **6**, 17-43.
- 伊東裕子 (1998): 心電図測定による魚類の運動特性の解析に関する研究. 東京水産大学大学院水産学研究科, 修士論文, 79pp.
- KAWAMURA, G., A. SHIBATA and T. YONEMORI (1981): Response of teleosts to the plane of polarized light as determined by the heart rate. *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, **47**, 727-729.
- 川村軍群・法花正志・荒牧孝行・新村敏 (1991): マダイによるHeNレーザー光線視認. *日本水産学会誌*, **57**, 421-424.
- 京都府海洋センター (1983): 人口採苗ヒラメの体色異常の発生機構と防除に関する研究. 昭和57年度京都府海洋センター事業概要, 27-28.
- 難波憲二・村地四郎・河本真二・中野義久 (1973): 魚類の心電図に関する研究—I. 心電図の導出方法の検討. 広島大学水産学部紀要, **12**, 147-154.
- 難波憲二 (1978): 魚類心電図の導出方法. 魚の呼吸と循環 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, **24**, 129-131.
- 難波憲二 (1996): 魚類の心電図. 魚の行動生理学と漁法 (日本水産学会編), 恒星社厚生閣, 東京, **108**, 74-85.
- 野村和夫・秋山勲 (1984): 自由遊泳時の心電図測定方法の考案. *日本水産学会誌*, **50**, 959-967.
- NOMURA, S., T. IBARAKI and S. SHIRAHATA (1969): Electrocardiogram of the rainbow trout and its radio transmission. *Jap. J. vet. sci.*, **31**, 135-137.
- NOSEDA, V., F. CHIESA and R. MARCHETTI (1963): Vectorcardiogram of *Anguilla angilla* L. and *Pleurodeles waltlii* Mich. *Nature*, **197**, 816-818.
- OETS, J. (1950): Electrocardiograms of fishes. *Physiol. Comp. et Oecol.*, **2**, 181-186.
- OITS, L.S., J.A. CERF and G.J. THOMAS (1957): Conditioned inhibition of respiration and heart rate in the goldfish. *Science*, **126**, 263-264.
- 竹内俊郎 (1998): ヒラメ仔稚魚の栄養要求. 平成10年度栽培漁業技術研修事業基礎理論コース, 仔稚魚期の発育シリーズ, **11**, 11-16.
- 山森邦夫・羽生功・日比谷京 (1971a): ウナギ体表心電図の単極導出法. *日本水産学会誌*, **37**, 90-93.
- 山森邦夫・羽生功・日比谷京 (1971b): ウナギ心電図の水中電極による導出. *日本水産学会誌*, **37**, 94-97.

2002年7月7日受付

2002年12月2日受理