

魚類の聴性誘発反応に関する基礎的研究^{*1}

須賀 友大^{*2}

Basic study for fish auditory brainstem response

Tomohiro SUGA

Abstract : The Auditory brainstem response (ABR) method is an alternative method to measure the fish auditory threshold. The ABR method allows quick and repeatable measurement of fish without invasive surgery. In this work we developed a method to measure audiograms of fishes.

To date, there is no method available to determine the effect of water displacement on method to measure fish hearing, because the measurement of displacement is quite difficult in an auditory experiment. A well-known method to eliminate water displacement when measuring fish audiograms is to face two loudspeakers towards each other and then place a fish between the speakers. This study describes another method to eliminate water displacement. This method measured audiogram in air. Audiogram of marbled sole *Pleuronectes yokohamae* obtained in air was higher than those obtained in water. This difference was presumably due to inner ear or lateral line sensitivity to water displacement around the center of the water tank.

Next we demonstrated that some of the ABR components of fishes are derived from peripheral organs such as the saccule, lagena and utricle in the inner ear. In this experiment, we used sound stimuli of different durations to demonstrate that the ABR of goldfishes *Carassius auratus* was contaminated with microphonic potential. The durations of the ABR were in proportion with the durations of the sound stimuli.

Next the ABR of fishes is commonly measured by bringing the heads of the fishes out of the water in a small tank, however this method is inapplicable to experiments for large fishes that are economically important in large space such as the sea or in a large tank. This study describes a method to record the ABR for fishes in water without exposing the fish heads in air using a water proof and insulated electrode. To evaluate the effectiveness of this method, the goldfish was investigated, and the ABR waveform and auditory thresholds measured in water were compared with these measured on the surface. Both ABR waveforms and auditory thresholds showed similar trend between the two methods. The “underwater ABR method” is considered to be useful to measure the larger fish auditory threshold in a natural or on site environment as in the sea, net enclosures and large aquaria in which precise positioning of the fish is not possible, though more improvement is needed to apply this method to large fishes.

Next we used ABR method to measure audiograms for juvenile Japanese sand lance to determine if they are capable of sensing the sound produced by fishing vessels. And we investigated the sensitivity to ultrasound of spot-lined sardine by ABR method to know the

2008年12月22日受理 (Received on December 22, 2008)

^{*1} 北海道大学審査学位論文 (投稿に際し投稿規定に沿って一部修正した)

^{*2} 水産工学研究所 〒314-0408 茨城県神栖市波崎7620-7 (National Research Institute of Fisheries Engineering Fisheries Research Agency, 7620-7, Hasaki, Kamisu, Ibaraki 314-0408, Japan)

possibility whether this fish escape when fish respond to the ultrasound that created by fisheries sonar. Japanese sand lance responded to low frequency sounds between 128 Hz and 512 Hz with sound pressure level of 115 to 125 dB. As the test frequency decreased, so did the auditory threshold level, and the level was about 116 dB at 128 Hz and 181 Hz. These results indicate that Japanese sand lance can detect low frequency sound but are less sensitive than other fish species. The ABR amplitude of spot-lined sardine to ultrasound (40 kHz, 60 kHz, 80 kHz, and 100 kHz) were approximately $0.125 \mu\text{V} \sim 0.75 \mu\text{V}$. These ABR amplitudes to ultrasound stimuli were quite smaller than those of species capable of detecting ultrasound. Spot-lined sardine are not sensitive to ultrasound presentation of 40 kHz, 60 kHz, 80 kHz, and 100 kHz at sound pressure levels from 180 dB to 190 dB.

This experiment indicate that spot-lined sardine can not detect bio-sonar of porpoise and fishing echo-sounders at distance more than 100 to 300 m from sound source in spherical spreading where the sound pressure level drops less than 180 dB \sim 190 dB.

Keywords : fish, auditory threshold, hearing, ABR

緒 言

聴覚は魚類等の水棲動物にとっては重要な感覚である。音は水中では減衰が少なく方向の探知も可能であることから水棲動物の餌の探索や捕食者の接近の感知等に有効に使われていると考えられる。

魚類の音の感覚器には内耳と魚体の体側にある側線器がある。また鰾も聴覚に有効な器官の1つである。魚類の内耳も人間のように頭部に存在するが、耳介、外耳、中耳は存在せず、内耳のみが存在する(川村, 安楽, 1998)。内耳は聴覚と平衡機能に関与することが知られている。内耳迷路は前庭(通囊, 小囊, 壺囊)と三半規管から構成され、前庭には炭酸カルシウムでできた耳石が存在する。小囊にある耳石は最も大きく、解剖しても肉眼でよく観察することができる。音により頭部が揺らされると密度の高い耳石は取り残され、その周りにある有毛細胞との相対的位置が変わる。そして有毛細胞が曲げられて傾くことにより、受容細胞が刺激される。音により直接的に頭部が揺らされて内耳にある有毛細胞を刺激する場合と、鰾を介して間接的に内耳にある有毛細胞を刺激する場合とがある。

キンギョ *Carassius auratus* では聴覚器官について比較的詳しく研究されており、聴覚神経である小囊の第8神経には直径 $15 \mu\text{m}$ 位の太い線維(S1線維)と $5 \mu\text{m}$ 位の細い線維(S2線維)とが別々の束で存在することが解明されている。太い方のS1線維は極性の異なる2つの有毛細胞に接続していて音の圧縮期と減圧期の両方に反応することができるため音刺激の2倍の周波数で活動電位が起こることが知られている(古河, 1977)。硬骨魚類の半円堤(TS)は大きく発

達した視蓋に覆われるため表面からは見えず、中脳室に取り込まれた状態になっている。一般の魚種では半円堤は機能的に内側と外側に分けられ、内耳神経によって受容された音刺激と側線神経によって受容された機械的刺激に対応している(伊藤, 吉本, 1991)。

魚類の聴覚はマウスナー細胞と呼ばれる逃避行動を駆動するニューロンと直接結合していることも知られている(小田, 2004; デルコミン, 1999)。この細胞は聴神経が刺激されると刺激された側と反対の胴筋を一斉に収縮させ、瞬時の逃避運動を引き起こすことで知られる。マウスナー細胞には側線や視覚からの刺激も入力されるが、側線からの入力は逃避行動を引き起こすほどではなく、視覚からの入力は遅い逃避行動しか引き起こさない(小田, 2004)。このため魚類の聴覚と逃避行動とは密接な関係がある。小型魚類の捕食者となる大型の魚類は数100~数1,000 Hzの遊泳音や摂餌音を発することが知られている(竹村, 1984; 間庭, 1984)。イルカ類はエコーロケーションで20~150 kHz程度の超音波を使って魚類を捕食することが知られている(Au, 1993)。シャチ *Orcinus orca* は魚群を尾鰭で叩いて捕食行動を行うことが知られているが、このときも大きな超音波が生じることが報告されている(Malene *et al.*, 2005)。また漁船の推進機関からは数100 Hzの低周波雑音が発せられており(Hatakeyama *et al.*, 1997)、調査船などでも使われる魚群探知器では数10~数100 kHzの超音波が使われている(高尾, 1994; 和田, 1994)。このような環境下では魚が捕食者や漁船と遭遇し、これらが発する周波数の音を聴いた時、すぐに逃避行動を起こす(小田, 2004)か、もしくは音を学習して逃避行動を起

こすようになる可能性 (Popper, 1972a; Popper, 1972b) が考えられる。魚類の逃避行動についてはスキニングソナーを用いて船舶の接近に対する魚群の逃避行動が計測されている (李ら, 2000)。また船から発せられる 1 kHz 以下の低周波騒音が魚の行動に影響を与えるのではないかという指摘もなされ、船からの騒音を減らす試みもされている (Yoshimura and Koyanagi, 2004)。

さらに海上空港、橋脚などの大型土木建設工事とともに魚類への影響評価や石油堀削、海底資源探査とともに大音圧放射の魚類への影響評価など、海洋開発を行う上で魚類聴覚の計測は欠かせない (Hatakeyama *et al.*, 1997)。トンネル発破作業が及ぼす漁業への影響も検討されてきている (Hatakeyama *et al.*, 1997)。特に水産有用魚種が陸上あるいは海上における土木工事によって発せられる騒音によって受ける生理、生態面における影響についても、今後明らかにされるべきであろう。

一方、養殖業や作り育てる漁業の一環として、稚魚期の段階で水中音の放音と給餌を同時に与えることで条件付けを行い、後に成魚になってから音の放音だけで魚を集める音響馴致システムの構築も試みられている (Anraku *et al.*, 1997)。

1982年に締結された国連海洋法条約により沿岸漁場の重要性が高まり、より効率的な漁場利用と資源管理が必要となっている。漁業形態も獲る漁業からつくり育てる漁業へと資源管理型漁業の推進に向けて政策の転換が図られている。そして様々な魚種の種苗生産及び放流が行われるようになってきている。このような資源管理型漁業の一環として音響馴致養殖がある。音を使って魚の摂餌行動を制御し魚を一定範囲に集めて餌を与えることで広範囲に餌を散布する必要がなくなるため集約的かつ効率的な給餌が可能となり、労働コストの削減も可能となるなどの経営面でのメリットがあげられる。また稚魚から成魚まで天然の自然海域で育てることができるために大型の施設を設置する必要がないことと水中で減衰が少なく遠方まで届く音の物理的特性によって数百 m 離れた魚の行動制御も期待できる。

このような音響馴致養殖を水産有用魚種へ適用する計画がなされ、これまでマダイ *Pagrus major* やヒラメ *Paralichthys olivaceus* で成果が上がりつつあることが報告されている (Anraku *et al.*, 1997, 1998; 渡辺ら, 1990; 安沢ら, 1995)。

音響馴致に用いる音源を選別することや魚類が漁船騒音等を感知しているかを知るためには対象となっている魚種の聴覚特性を示す聴覚閾値曲線を調べ、

特に感受性の鋭敏な周波数範囲を知る必要がある。Kenyon ら (Kenyon *et al.*, 1998) は骨鰈類であるキンギョ *Carassius auratus* の聴覚閾値曲線を求め、100 ~ 5,000 Hz の範囲で最も聴覚閾値の低い周波数は 400 ~ 1,000 Hz であり、閾値は約 64 dB であると報告している。非骨鰈魚に関しては Chapman and Hawkins (1973) がタラ *Gadus morhua* の聴覚閾値曲線を 30 ~ 470 Hz の範囲で求め、60 ~ 380 Hz に閾値の低い領域を持つ曲線を示し、閾値は 74 ~ 82 dB の範囲にあるとしている。無鰈魚では Chapman and Sand (1974) がツノガレイ *Pleuronectes platessa* とマコガレイ属の *Limanda limanda* で 30 ~ 200 Hz の範囲で聴覚閾値曲線を求め、110 Hz で閾値が最も低くなり、90.6 dB となっている。

聴覚閾値曲線の計測方法には心電図導出による刺激時の心拍間隔の伸長を指標とした方法 (以下、心電図法と呼ぶ) と魚体頭部に電極を取り付け聴性誘発反応を記録する方法 (以下、聴性誘発反応法と呼ぶ) の 2 つが主に使われている。

Chapman and Hawkins (1973) はタラ *Gadus morhua* の聴覚閾値を心電図法を用いて計測し、鰈が聴覚の補助器官として重要な役割を果たしていることを指摘している。Chapman (1973) はタラ科魚類 (Haddock *Melanogrammus aeglefinus*, Pollack *Pollachius pollachius*, Ling *Molva molva*) の聴覚閾値曲線を心電図法で計測し、聴覚閾値が海中の雑音によって 20 ~ 30 dB 上昇することを明らかにしている。また、タイセイヨウタラ *Gadus morhua* の超音波に対する感受性が心電図法を用いて実験され、一定の距離でソナーを感知できることが指摘されている (Astrup and Mohl, 1993)。

国内でも魚類の聴覚計測には心電図法が多く用いられている。Sawa (1976) はキンギョ *Carassius auratus*、Ishioka ら (1988) はマダイ *Pagrus major*、Kojima ら (1992) はサクラマス *Onchorhynchus masou*、Park ら (1995) はスケトウダラ *Theragra chalcogramma*、Motomatsu ら (1996) はクロソイ *Sebastes schlegeli*、Yamakawa (1998) はニジマス *Onchorhynchus mikiss*、Zhang ら (1998) はマコガレイ *Pleuronectes yokohamae* の聴覚閾値曲線を求めている。

魚類の聴性誘発反応法は近年使われ始めた比較的新しい方法で、ヒトでは既に研究成果が臨床に応用されている (Jewett *et al.*, 1970; 加我君, 1998; 船坂, 2000; 加我君, 1987~1988)。魚類の聴性誘発反応は Corwin (1981) によってエイ科のソーンバックギターフィッシュ *Platyrrhinoidis triseriata* の聴性誘

発反応が研究され、それ以降の研究は心電図法と比べると少なかったが、近年、増えつつある。Kenyonら(1998)は聴性誘発反応法と心電図法等で求めた聴覚閾値曲線とを比較して聴性誘発反応法が心電図法と比べて手術の影響が少ないことや短時間で計測できる等の長所を示している。Enger and Mann (2005)は珊瑚礁に生息するオヤビッチャ属のサージャントメジャー *Abudefduf saxatilis* の幼魚が自らの生息場所である珊瑚礁を探すときに珊瑚礁から生じている音を頼りに方向を定めているのではないかと推測し、珊瑚礁海域の音響特性と聴覚閾値曲線との比較から1 km以内の距離では珊瑚礁の方向探知に役立っているとしている。Lovellら(2005, 2006)は音圧調節をすることでイリノイ川に生息する土着の魚種(ヘラチョウザメ *Polyodon spathula*, カワリチョウザメ *Acipenser fulvescens*)は侵入させ、土着でない魚種(ヌメリゴイ科のハクレン *Hypophthalmichthys molitrix*, コクレン *Aristichthys nobilis*)を侵入させないように排除するための音響フェンスを設置するために各魚種が感知可能な周波数と閾値を求めている。Akamatsuら(2003)はマイワシ *Sardinops melanostictus* の聴覚閾値曲線を求めて漁船のエンジン音が聴こえているか調べている。また、鰯が聴覚閾値を低くする効果が有ることを証明している。

聴覚閾値曲線を求めるための心電図法では刺激音の放音方法として対向した1組のスピーカの中央に供試魚を置いた装置が用いられている。また供試魚は水槽内の水中に置かれることになり、水粒子変位の影響がおよぶ近距離効果の範囲で行われているにも関わらず、音圧についてのみ測定されている。このため水中音圧計では計測されない近距離効果による水粒子変位に対する感受性によって、本来音圧に対する感受性として測定されたはずの閾値が影響を受けた可能性も考えられる。そこで本研究では魚体を水中に固定した場合と空中に固定した場合の2つの方法で計測し、近距離効果の影響について検証した。

また、近距離効果を排除するためには自然の海や大型の水槽で実験を行うことも有効な手段である。心電図法では計測例(Chapman and Hawkins, 1973; Chapman and Sand, 1974; Chapman, 1973)があるが、聴性誘発反応法を用いて海や大型水槽で計測する実験は国内でも国外でも未だ行われていない。海や大型水槽で聴性誘発反応法を使って魚類の聴覚を計測する方法を確立させ、大型魚等の多くの魚種を扱えるように適用範囲を広げることも必要である。

本研究では第1章でマコガレイ *Pleuronectes yokohamae* を用いて近距離効果の影響を除外するた

めに空中に魚を固定し、心電図を利用した古典的条件付け法で聴覚閾値曲線を求め、近距離効果の影響が含まれていると考えられる水中に魚を固定した実験結果と比較して実験方法の妥当性を検証した。第2章では聴覚特性について詳しく研究されているキンギョを用いて聴性誘発反応の発生する部位について検証した。第3章では聴性誘発反応の計測を電極部まで水没させて行い、この計測法を発展させる可能性について検討した。第4章では水産有用魚種への応用例として、これまで計測が困難であった小型魚のイカナゴ *Ammodytes personatus* について聴性誘発反応法により聴覚特性を調べた。また浮魚のマイワシ *Sardinops melanostictus* の超音波に対する応答の計測も試みた。総合考察では聴性誘発反応法と心電図法の比較と本研究で使用した魚種の聴覚性能について考察し、聴性誘発反応法の有用性について検討した。

第1章 スピーカ対向法の近距離効果の分離

音圧成分は遠方まで減衰せずに届く性質をもつことから音響馴致に利用する場合、対象となる魚類の音圧成分に関する閾値を知ることが重要になる。魚類の聴覚閾値の計測は主に実験室内の小型の水槽に魚を保定して行う方法が用いられてきている。この方法では水槽内部に発生する音源に起因する水粒子変位(Harris, 1964; Parvulescu, 1966)(近距離効果)も同時に魚に刺激として与えられており、音圧成分(遠距離効果)のみを刺激源とした計測をすることが困難であることが指摘されている(阿部, 1976)。したがって従来とは違う計測法を用いることが必要となる。

近距離効果を除去するためによく使われている方法はスピーカを対向させて音を同位相同振幅で放音し、魚を保定している水槽の中心で水粒子変位を相殺させることで抑制する方法(以下、スピーカ対向法)である(阿部, 1976)。しかし、これまで行われてきた研究では、水粒子変位量の測定が可能な装置が使えなかったことから、音源と供試魚間の距離が近距離効果の範囲であるにも関わらず、水中音圧計により供試魚の位置における音圧のみが計測されてきた。したがって、供試魚が感知している可能性がある水粒子変位の影響がどの程度、計測値に含まれているかが不明のままであった。特にカレイのような異体類は音圧ではなく水粒子変位に対してより鋭い感受性をもつ魚といわれている(Hawkins and Maclellan, 1975)ため、スピーカ対向方法で音圧を指標として計測されたマコガレイ *Pleuronectes yokohamae* の聴覚閾値曲線(Zhang et al., 1998)には、水粒子変位に反応した計測値が含

まれている可能性がある。そこで本研究では水中と空中では水粒子変位と空気粒子変位との違いはあるが圧力波の性質はどちらの媒質でも同じであることに着目した。そして従来方法である供試魚を水中に置くのではなく、魚体全体を空中に暴露した状態で固定することで水粒子変位を抑制し、音の圧力波のみが供試魚に与えられる条件で聴覚閾値曲線を求める実験を行うことにした。この方法と従来方法とを比較するために供試魚にはマコガレイを用い、閾値の計測には心電図法を使用し、聴覚閾値曲線の違いから本実験方法の有効性について検討した。

1-1 供試魚

実験には平均全長23 cmのマコガレイ10尾を使用した。供試魚の全長、体重をTable 1-1に、マコガレイの写真をFig. 1-1に示す。供試魚は北海道函館市近郊の札幌町と知内町から入手し、FRP水槽（190 cm × 100 cm × 45 cm）で飼育した。

マコガレイは、日本沿岸域の北は石狩湾、南は東シナ海まで分布し、中でも北海道道南地域では年間を通して漁獲され、非常に美味で市場価値が高い。このためマコガレイについても音響馴致養殖への適用の可能性が検討されている。



Fig. 1-1. marbled sole *Pleuronectes yokohamae*.

Table 1-1. Total length and body weight of fish

No.	TL (cm)	BW (g)
A1	25.4	324
A2	25.8	381
A3	19.1	165
A4	19.3	125
A5	23.8	289
A6	23.8	319
A7	21.4	259
A8	24.1	313
A9	25.3	268
A10	26.8	381
Mean	23.5	282.8
SD	2.7	83.5

1-2 実験装置および方法

実験装置の概略を Fig. 1-2に、写真を Fig. 1-3に示す。供試魚を固定する固定台と相対する1組のスピーカを厚さ2 cmの発泡スチロールでできた防音箱の中に入れ実験室内の雑音を排除した。固定台の底面四隅には振動を低減させるための防振ゴムを敷いた。防音箱の内側には吸音材として厚さ2.5 cmのグラスウールを貼り付け、外側の全面にアルミ箔を貼って接地しハムノイズの混入を防いだ。刺激音は空中スピーカで放声し、2つのスピーカの中央に供試魚を置き、音源の延長線上に魚の内耳が位置するようにした。

電極を装着した供試魚はL型アングルで組んだ固定台の上の金網に置き、メッシュサイズ約1.5 mmのナイロンメッシュを被せてから直径約1.0 mmのナイロンモノフィラメントを使って縫うように固定し、口から鰓へ呼吸確保のための灌流を行った。灌流水用に上部に置いたタンクには閾値測定時以外はエアレーションをして酸素を十分に供給した。下の排水タンクに溜まった海水は小型ポンプで上の灌流タンクへ揚水した。

空中に固定した供試魚の呼吸確保に必要なとされる灌流量は灌流タンク内の溶存酸素量とマコガレイの一般

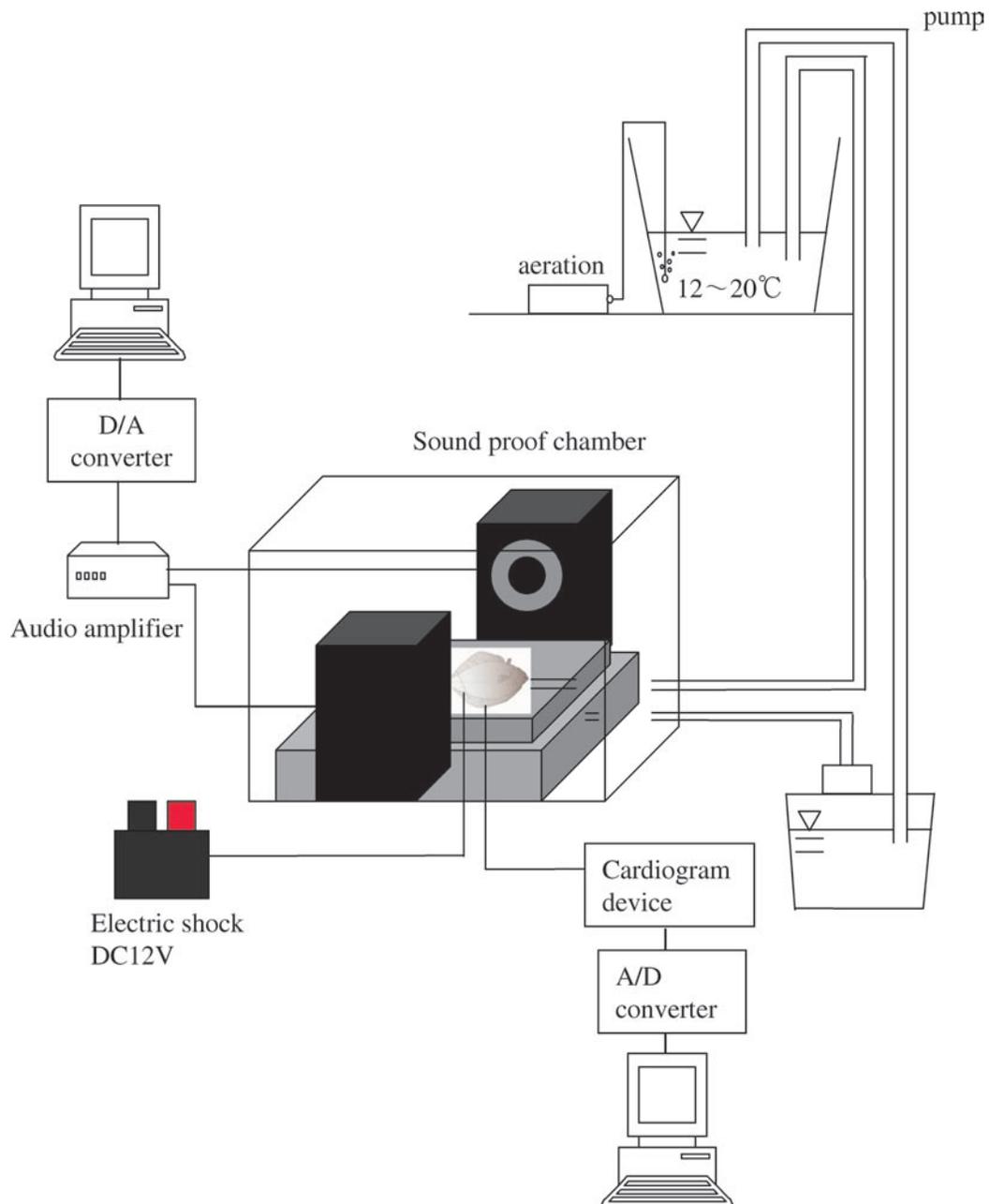


Fig. 1-2. Equipment used for determining the auditory threshold of marbled sole.



Fig. 1-3. Photograph of equipment used for determining the auditory threshold of marbled sole.

的な酸素消費量（板沢，1970；板沢，1991）から計算でき，100 g の体重で1秒間に0.43 ml 必要であることがわかった。本実験における流量は約2.28 ml/s であり，実験魚の体重は最大でも400 g 以下で，十分な流量であった。灌流タンク内の溶存酸素量はDOメーター（TOX-90/TOX90i，東興化学研究所）で計測した。灌流水の水温は14.7℃～20.1℃であった。

刺激音はアンプで増幅してスピーカより放音した。供試魚に装着した電極を心電計（FX1201，フクダ電子）とA/D変換器内蔵パソコン（NEC，PC-9801）に接続し，心電位を計測した。A/D変換のサンプリング周波数は100 Hz とした。刺激音はパルスの最初と最後の0.2秒間を緩やかに立ち上がり，立ち下がるように処理した2秒間の単一音（シングルバースト）を使用した（Fig. 1-4）。刺激音には63 Hz，100 Hz，160 Hz，200 Hz，315 Hz，400 Hz，500 Hz，630 Hz，1,000 Hz の周波数音を使用した。パソコンへの刺激音の波形の取り込みはサンプリング周波数10 kHz で1.63秒間（16,384点）の音をA/D変換して行った。刺激音の音圧は1/3オクターブFFTにより得られた周波数成分より求めた。

心電図導出 実験では飼育水槽から取り出した供試魚を0.02%フェノキシエタノール（関沢，1981）で薬浴麻酔した後，心電図導出用の電極を心臓付近へ挿入した。電極には一般に市販されている直径0.8 mm の

10芯コード線を用い，先端から3 cm の位置でビニール被膜を3 mm 程剥いて導出部とした。直径1.7 mm，長さ70 mm の注射針を麻酔した供試魚の無眼側胸鳍基部から腹鳍前縁へ向かって刺し込み，無眼と有眼の境目からやや有眼よりの場所に貫通させた。次に針先から電極を挿入して注射針を抜き取り，電極の露出部をあらかじめ位置を確認しておいた心臓付近になるようにした。心電図導出用の電極と電極挿入に使用した注射針の写真をFig. 1-5に手術状況の写真をFig. 1-6に示す。

条件付け 空気中に固定した供試魚は電極装着手術から回復し，心拍数が安定するまでに約10時間を要した。心拍数が安定してから音と電気ショックによる条件付けを行った。条件付けの放音音圧は100～1,000 Hz では約135～145 dB，63 Hz に関しては153.1 dB とした。放音の直後に無条件刺激として電気ショックを供試魚の尾部に与えて放音時に心拍間隔の伸長が生じるようにした。この条件付けの試行を5～15分の間隔で条件付け完了まで約10回繰り返した。さらに30分後に放音直後の心拍間隔が明らかに伸長することを2回確認して条件付けの完了と判断した。Fig. 1-7に条件付けの完成後の放音時に心拍間隔が伸長した例を示す。

聴覚閾値測定 供試魚が放音を感知したか否かの判定は，放音前の30拍の間隔と放音時の間隔についてMann-WhitneyのU検定を行い，音刺激の供与によ

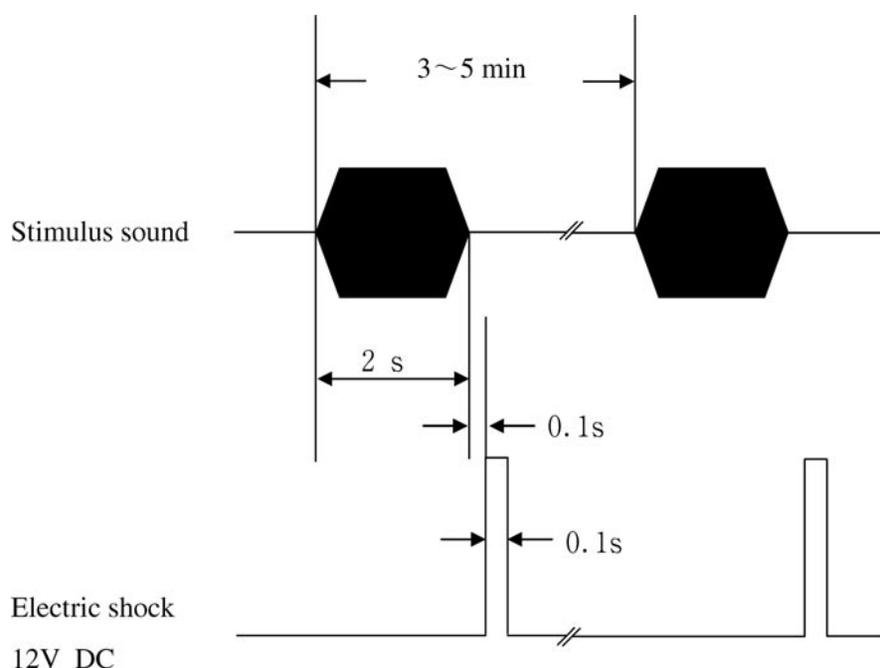


Fig. 1-4. Conditioning method. Upper trace shows the sound stimuli from the air speaker, Lower trace shows the 0.1s 12V-DC electric shock applied 0.1s after the end of the sound stimulus.

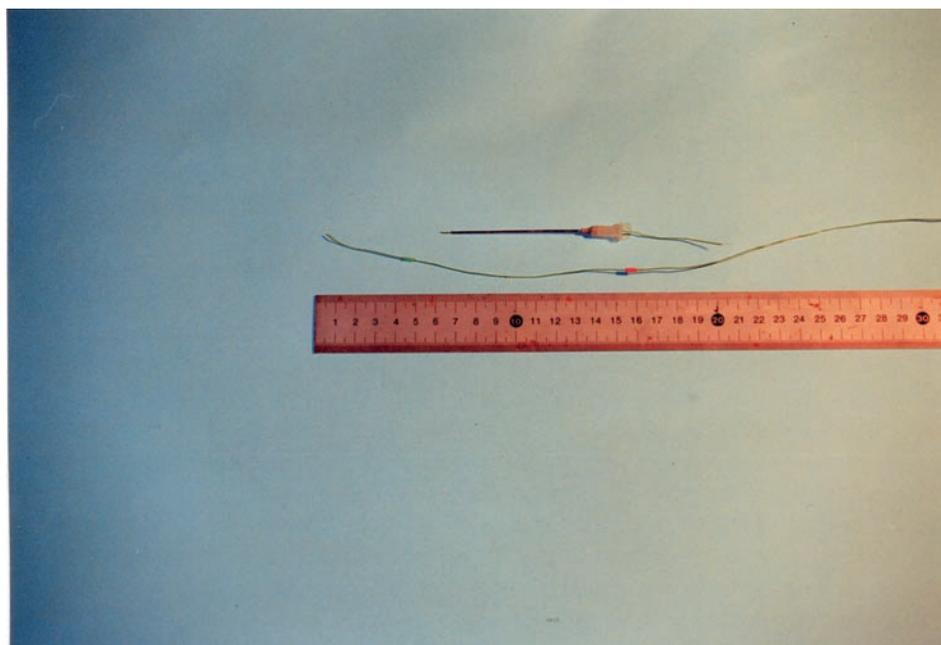


Fig. 1-5. Electrode for recording cardiac potentials.

り心拍間隔が有意に伸びた（有意水準 5 %、片側検定）ことを指標とした。聴覚閾値の測定は反応がみられない音圧の 75 ~ 80 dB から始め、上記の指標により反応有りとな認められるまで音圧を上げ、反応が見られた場合は音圧を下げることを 3 dB ステップで行い、音圧を階段状に変化させ、なおかつ同一音圧で 2 回反応有りとな判定された場合、この音圧を聴覚閾値とした（Fig. 1-8）。

本実験では魚体は水中ではなく空中に露出しているため、空中から放音した音は魚体内に入射するときに媒質の異なる空気から水（魚体の密度は水とほぼ等しい）へと音が入射するため音圧が減衰する可能性がある（Urlick, 1972）。そこで魚の位置での音圧計測を魚体の頭部付近へ小型ハイドロホン（B&K8103, Bruel and Kjaer）を埋め込んで行った。また魚体内へ音が入射したときの音圧の減衰量を求めるため、魚体に小型ハイドロホンを埋め込んだ計測とは別に、魚の固定位置での魚体外部での音圧計測も空中騒音計（NL-05, Rion）を使用して行った。魚体内部での音圧計測には

全長 22.2 cm の死亡した 1 個体を使用した。空中音圧は水中音圧とは異なり基準音圧が dB re 20 μ Pa であるため 26 dB を加えることで基準音圧が dB re 1 μ Pa である水中音圧へと換算した。

Fig. 1-9 にマコガレイの魚体内に小型ハイドロホンを埋め込んだ部位の模式図と写真を示す。小型ハイドロホンはメスを使って魚の頭部を切開して挿入した後、魚肉の圧力で自然と固定された。小型ハイドロホンの出力はアンプ（B&K2635, Bruel and Kjaer）で増幅し、パソコンに取り込んで解析に用いた。アンプのアースは実験室の外に接地した。アンプの電源は電氣的ノイズの混入を防ぐため、交流電源は使わずにバッテリーによる直流電源を使用した。

また、実験室内の背景雑音は魚を固定したときの内耳の位置に空中騒音計（NL-05, Rion）を置いて、20 : 25 ~ 07 : 29 の間に 1 時間ごとに計測し、空中騒音計からの出力をサンプリング周波数 10 kHz で A/D 変換し、1.63 秒間のデータをコンピュータへ取り込み、平均した後 1/3 オクターブ分析を行った。

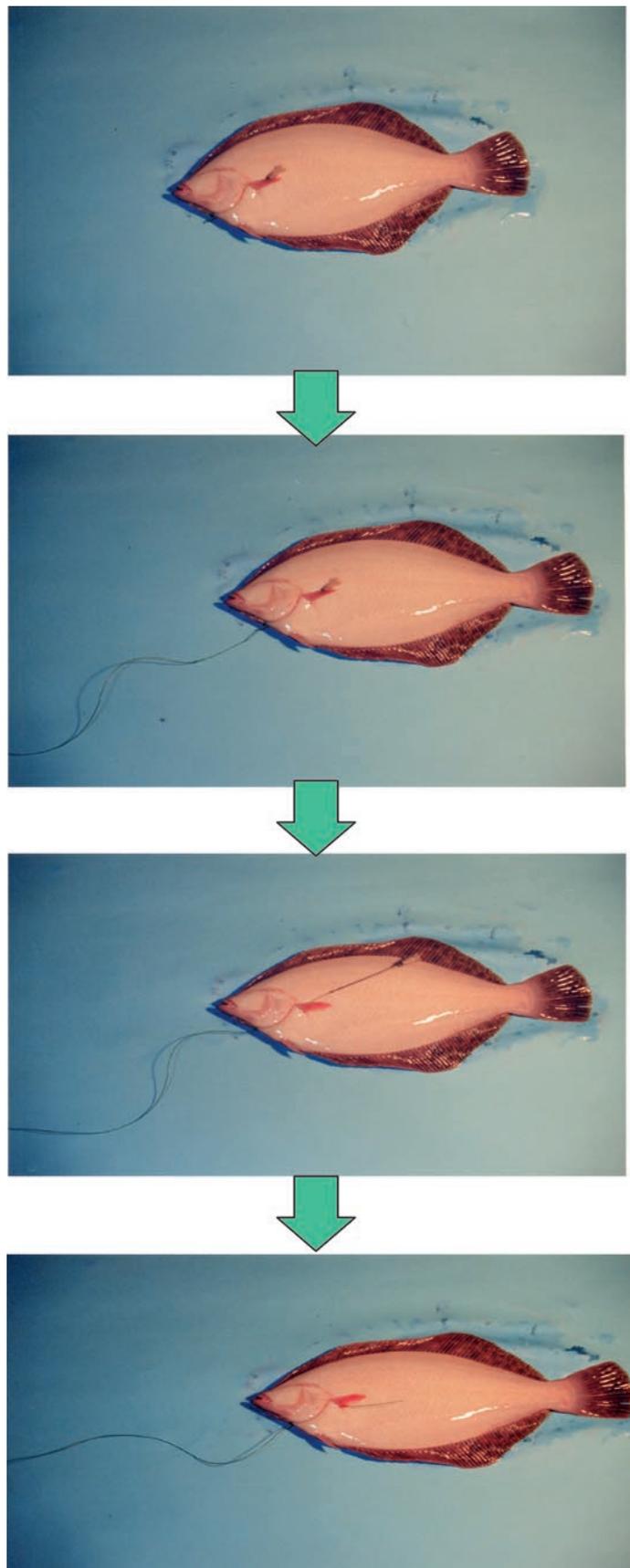


Fig. 1-6. Operation to record electrocardiogram.

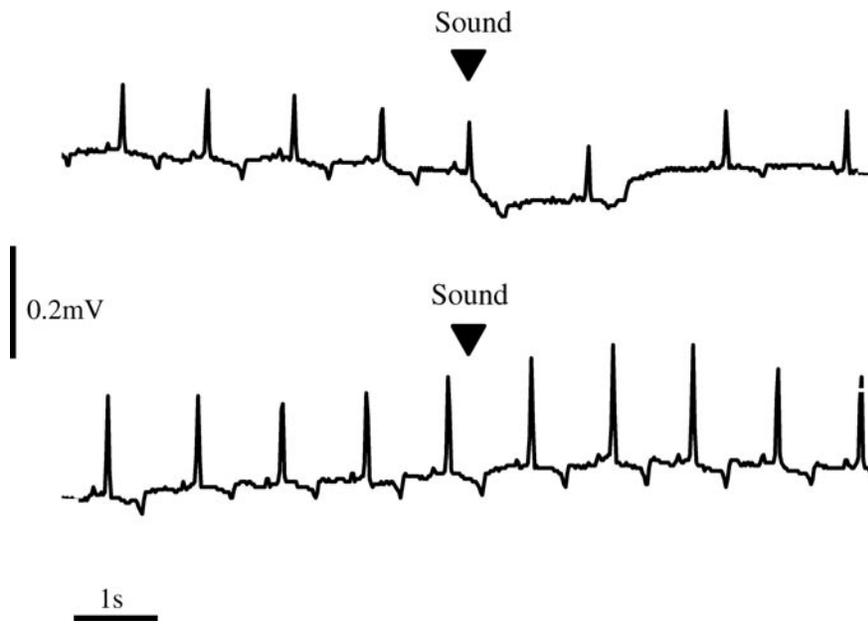


Fig. 1-7. Electrocardiogram of tested fish to sound stimulus. Upper trace shows a positive response. Lower trace shows a negative response.

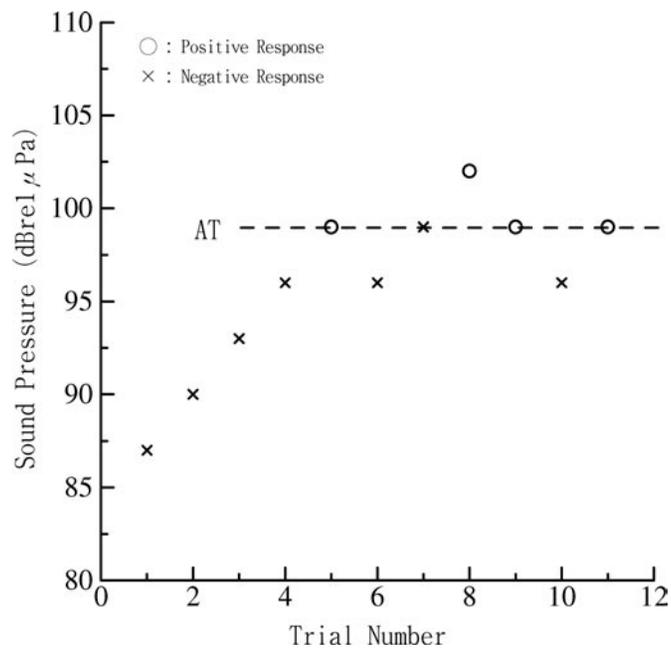


Fig. 1-8. Determination of auditory thresholds. Broken line shows the auditory threshold (AT).

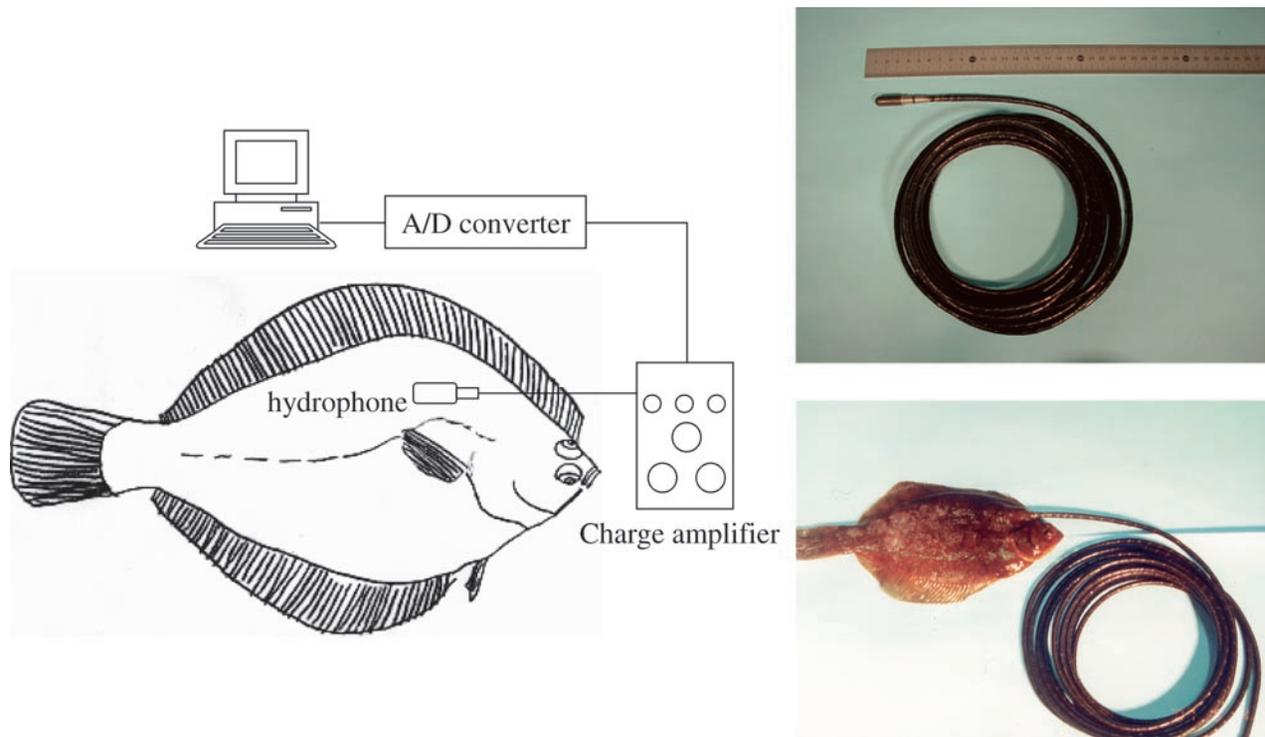


Fig. 1-9. Block diagram of equipment used for calibration the sound pressure of signal inside the fish bodies.

1-3 実験結果

魚体の内部に小型マイクを挿入して計測した音圧と魚体の外部で空中騒音計を使って計測した音について、100 Hz の波形と振幅を比較した図を Fig. 1-10 に示す。魚体内部で計測した音は波形の乱れはあるが魚体外部で計測した音と比較し、音圧が著しく減衰していることはなかった。Fig. 1-11には100 Hz と160 Hz の刺激音を80 dB から150 dB まで3 dB ステップで放音した時の魚体内部と外部の音圧を比較した図を示す。周波数63 Hz, 100 Hz, 200 Hz, 315 Hz, 400 Hz, 500 Hz では魚体内部と外部とでほとんど同じ音圧を示したが、160 Hz, 630 Hz, 1,000 Hz ではやや音圧差が大きくなり、160 Hz で最大約7.7 dB の差が見られた。したがって聴覚閾値の値は魚体内部の音圧を用いた。

各個体の聴覚閾値と平均の聴覚閾値を Table 1-2

に、聴覚閾値曲線を Fig. 1-12 に示す。聴覚閾値は160 Hz で最も小さく、平均で106.7 dB となった。160 Hz 以下の低い周波数では本実験で求めた聴覚閾値は上昇し、63 Hz の聴覚閾値は平均で131.1 dB であった。160 Hz 以上の高い周波数では閾値は緩やかに増加し、630 Hz での聴覚閾値は平均で143.5 dB となった。水中に魚を固定し、空中スピーカ対向方法で計測している Zhang の聴覚閾値 (Zhang *et al.*, 1998) と本研究で得られた聴覚閾値とを Mann Whitney の U 検定 (有意水準 5 %, 片側検定) を用いて比較すると、100 Hz, 200 Hz, 500 Hz, 1000 Hz で、本研究で得られた聴覚閾値の方が有意に高い結果となった。400 Hz に関しては有意な差は見られなかった。他の周波数は Zhang の使用した周波数と一致していなかったため比較は行わなかった。

本実験の実験室の背景雑音は63 Hz で68.6 dB が最

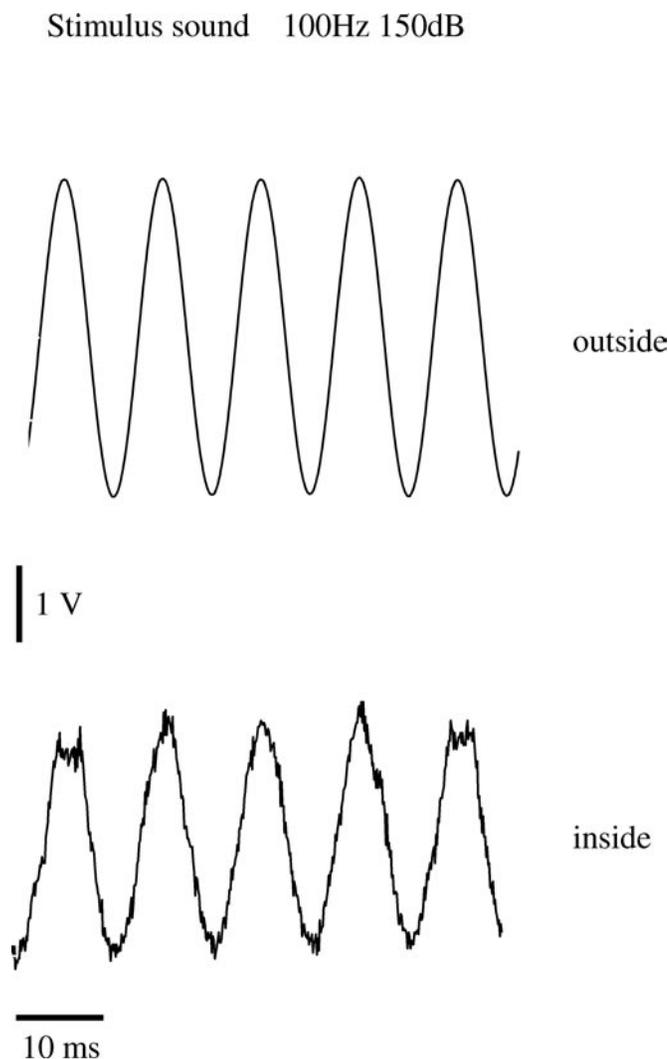


Fig. 1-10. Comparison of 100Hz waveforms recorded inside and outside the bodies of marbled sole.

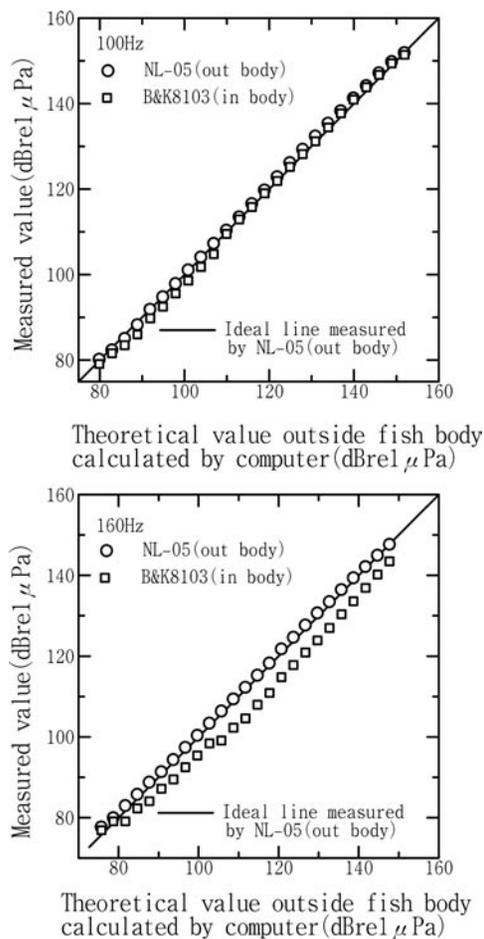


Fig. 1-11. Comparison of sound pressure inside and outside the bodies of marbled sole.

Table 1-2. Auditory threshold of ten marbled sole

No	Frequency (Hz)								
	63	100	160	200	315	400	500	630	1000
A1	148.7	140.7	104.5	136.4	—	—	—	—	140.4
A2	151.6	140.7	107.1	108.3	115.8	122.0	120.8	143.5	140.4
A3	98.8	113.0	111.4	131.1	125.0	—	—	—	—
A4	—	—	—	—	—	125.0	—	—	140.4
A5	123.8	103.9	104.5	120.5	124.6	115.6	123.6	140.5	140.4
A6	—	140.7	—	127.2	115.8	—	—	—	—
A7	—	103.9	107.1	—	—	122.0	—	—	—
A8	109.8	—	96.0	111.4	128.2	—	—	—	—
A9	136.2	119.8	—	117.4	—	—	—	—	—
A10	107.5	103.9	104.5	114.3	118.8	109.6	130.3	—	—
Mean	140.4	132.5	105.8	125.6	122.6	120.3	125.7	142.0	140.4

(Unit : dB re 1 μ Pa)

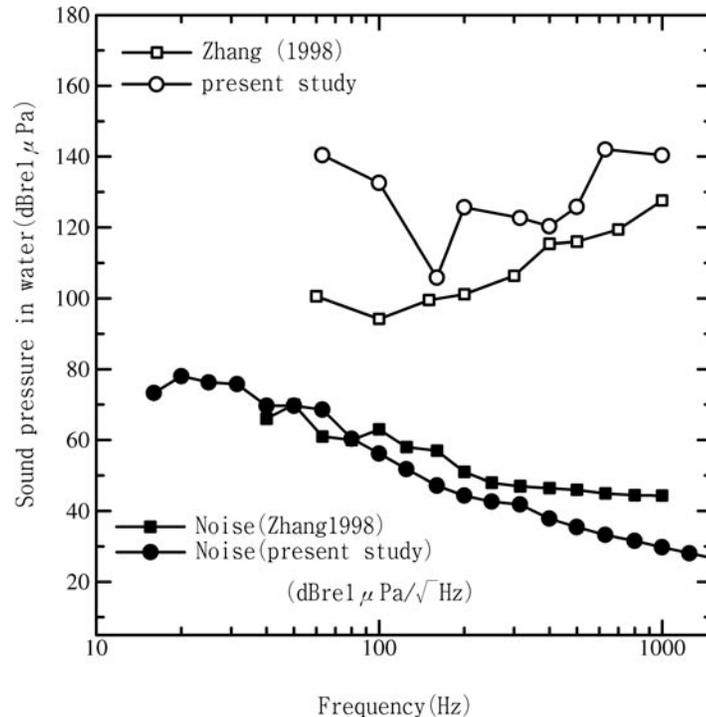


Fig. 1-12. Comparison of audiograms measured using two speakers facing each other to eliminate displacement (Zhang, 1998) and using sound stimulation in air (present study).

大となり、これ以上の周波数では緩やかに減少していた。

1-4 考察

本研究で求めたマコガレイの聴覚閾値曲線は Fig. 1-12 に示すように小型水槽を使って水中に供試魚を固定して空中でスピーカを対向させて求められた Zhang の聴覚閾値曲線 (Zhang *et al.*, 1998) よりも高くなった。灌流により呼吸は確保しているものの魚体が空気に触れているため水中で生活している魚にとって影響があったとも考えられる。また、スピーカ対向方法によって同位相同振幅で放音したときの水粒子変位を計測した結果、中心は抑制されるが、中心の周り 10 cm の範囲内で水粒子変位が著しく、水粒子運動が生じているという報告⁶¹⁾もある。したがって水中に魚を固定して求められている Zhang *et al.* (1998) の実験結果には完全には抑制されない水粒子変位 (近距離効果) にマコガレイが反応した結果、音圧だけに対する感受性よりも閾値が低くなったと考えられる。

スピーカ対向方法で使われたマコガレイと本実験で使ったマコガレイは別の時期に漁獲された個体群であるが、供試魚はスピーカ対向方法と本実験で全長、水

温、実験場所、生息海域はほぼ同じであり、個体群間で聴覚閾値に差がある可能性は少ないことから閾値曲線の形状の違いについて考える。

魚類の聴覚器官である内耳と側線のうち、側線器官の感覚毛やクブラは音の波長より十分細く、パスカルの原理により四方から同じ力が作用するため、圧力波によって揺動することはないとされている (下澤, 加納, 1987)。さらに感覚毛の長さは境界層の厚さの 1.8~6.7 倍のとき最大の感度を示し (Shimozawa and Kanou, 1984)、水中の動物の感覚毛は水の境界層に対応しているため、境界層の厚さが水中の 4 倍ある空気中では感度が低下することも知られている (下澤, 加納, 1987)。したがって本章の実験では音圧成分を側線ではなく内耳で受容していたと考えられる。本研究と Zhang *et al.* (1998) の実験を比較すると、160 Hz 以上は 2 つの曲線ともほぼ同じ傾向で増加しているが、160 Hz 以下では内耳のみの受容による本研究の結果は閾値が高くなり、Zhang *et al.* (1998) の実験結果には側線による受容が含まれていることから閾値が低くなっていると考えられる。さらに 160 Hz 以下では近距離効果の影響が著しく、Zhang *et al.* (1998) の実験では内耳と側線の両方の器官で近距離

効果を感じたため閾値が低くなったことも考えられる。

本実験の結果から判断すると従来の水中に魚体を固定してスピーカを対向させた実験方法では水粒子変位が完全には抑制されず、近距離音場での実験になっていたと考えられる。また本研究で用いた実験方法の妥当性を検証するためには実海域のような遠距離音場が確実な場所で実験を行い、本実験の結果と比較する必要がある。

第2章 空中電極固定法と反応発生部位

1章では水中に供試魚を固定してスピーカを対向させる方法における近距離効果（水粒子変位）の影響が明らかになった。供試魚を空中に固定することで近距離効果を排除することが可能であることがわかったが、本来、魚は水中で生棲しているため実験は水中で行うことが自然である。そこで2章以下の章では供試魚は水中に固定し、なるべく刺激周波数の波長より小さい水槽を使うことで、水槽全体を圧縮膨張させ圧力刺激のみを与えるようにして近距離効果の影響を排除し（Parvulescu, 1966）実験を行った。

聴覚閾値の測定には第1章で示した心電図法が主に用いられてきた。この方法は条件付けに時間がかかり、同一個体の測定回数が限られる欠点がある。この点を改善する方法として近年聴性誘発反応を測定する方法（聴性誘発反応法）が用いられるようになってきている。聴性誘発反応法は小型の実験水槽に魚を入れ、頭部表皮を水面から軽く露出させ、マンピュレータを使って電極を確実に頭部表皮へ固定させて行う方法（空中電極固定法と名付ける）である。ヒトの聴性誘発反応と同様に外科的手術が不要で、反応電位は電極を頭部表皮に置くことで得られる。聴性誘発反応は個別の神経からの反応電位ではなく、中枢で生じている反応を間接的に導出している。ヒトの反応とは異なり音刺激に対応して反応波形が変化し、一定のパターンが見られないのに加え、10 ms以上の比較的持続時間の長い音刺激でも明瞭な反応が得られる特徴を有する（Mann *et al.*, 2001; Wysocki and Ladich, 2003）。

内耳を始めとする半円堤などの聴覚器官に直接、微小電極を挿入して得られる電位は一般に刺激音の2倍周波数が含まれることが知られている（安楽, 1998）。例えばキンギョでは内耳の小囊斑から得られるマイクロホン電位に音刺激周波数の2倍周波数成分を持つこと、内耳の小囊神経に電極を挿入して得られる following response にも音刺激と同一か2倍周波数成分を持つことが知られている（古河, 1977）。ハゼ

Dormitator latifrons でも壺囊や通囊から音刺激周波数の2倍周波数成分を持った反応が計測できることが知られている（Lu *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004）。さらにコイの脳を露出させて半円堤からの聴覚応答を記録した例では音刺激周波数の2倍周波数成分をもった反応が記録されている（安楽, 1998）。またニシン科魚類では周波数600 Hz、持続時間20 msの音に対し、刺激音の2倍の周波数成分を持つ聴性誘発反応が得られている（Mann *et al.*, 2001）。このように聴音時に中枢神経から直接得られる電位に見られる周波数成分の特徴が間接的に頭部から得られる電位にも見られることも確かめられて来ている。したがって魚類の聴性誘発反応は内耳の小囊、通囊、壺囊のような低次の処理器官で発生した反応が頭骨を通じて測定されている可能性がある。

キンギョの内耳の小囊から得られるマイクロホン電位や following response は刺激音の持続時間が長くなれば、それに応じて反応も長くなる特徴がある。そこで本章ではキンギョの聴性誘発反応を記録し、刺激音の持続時間に対する誘発電位の反応持続時間や2倍周波数成分の有無などの反応波形の特徴を明らかにし、これまで中枢神経から直接得られているマイクロホン電位等の反応波形と比較し、魚類の聴性誘発反応の発生部位について調べた。

2-1 供試魚

実験には尾叉長が4.4～7.4 cmのキンギョ *Carassius auratus* 5尾を使った。供試魚の写真をFig. 2-1に、尾叉長、体重をTable 2-1に示す。キンギョは聴覚閾値の低い魚であり、多くの研究者によって聴覚閾値曲線が求められている。

2-2 実験装置および方法

実験装置の概略をFig. 2-2に示す。実験水槽（34.0×20.0×24.5 cm）は実験室の床からの振動を防ぐために空気テーブルの上に設置した。また周辺環境からの騒音を除去するために防音室に入れた。供試魚は頭部を除いてネオプレーンゴムで包み、包んだゴムをプラスチックのクリップで留め、クランプを使って挟みこむように固定した。聴性誘発反応を導出するための電極にはテフロンでコーティングされた直径約0.1 mmのタングステンを使った。電極をFig. 2-3に示す。電極の一方（関電極）は中脳中心部に相当する頭部表皮からやや内部へ0.5 mm挿入し、もう一方（不関電極）は中心部へ挿入した電極の約5 mm前方へ同様に挿入した（Fig. 2-4）。聴性誘発反応は生体電気アンプ（MEG1200, 日本光電）で増幅し、500 ms間



Fig. 2-1. Goldfish *Carassius auratus*.

Table 2-1. Total length and body weight of fish

No.	TL (cm)	BW (g)
B1	6.3	7.0
B2	6.0	6.9
B3	4.4	3.8
B4	5.4	5.5
B5	7.4	12.5
Mean	5.9	7.1
SD	1.1	3.3

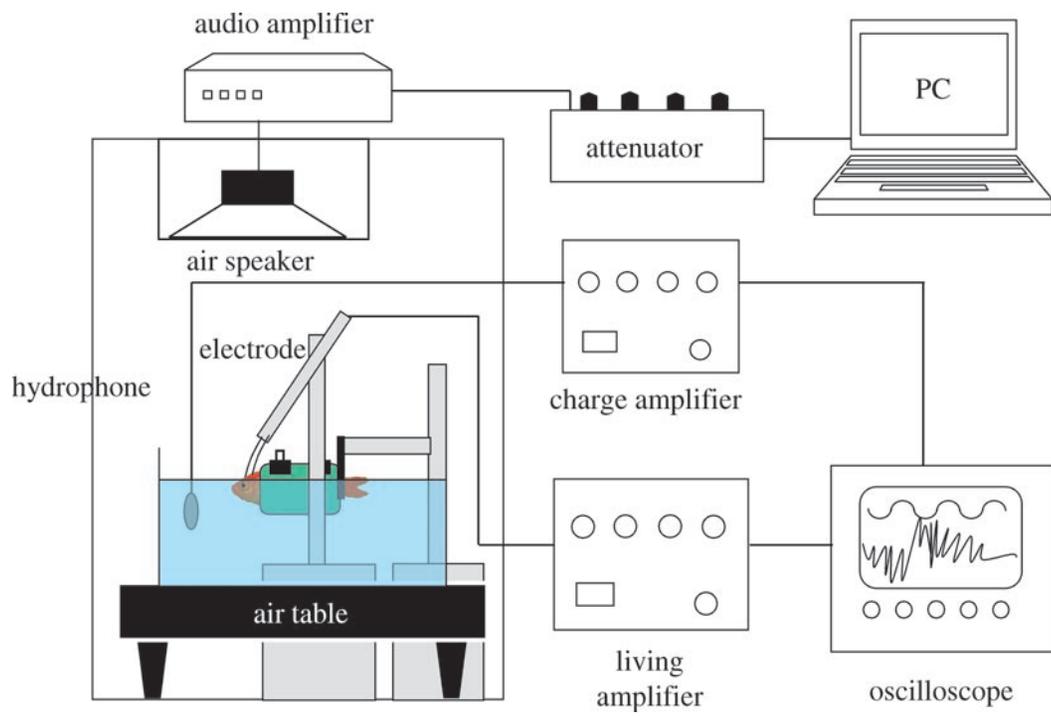


Fig. 2-2. Schematic diagram of the ABR normal recording setup.

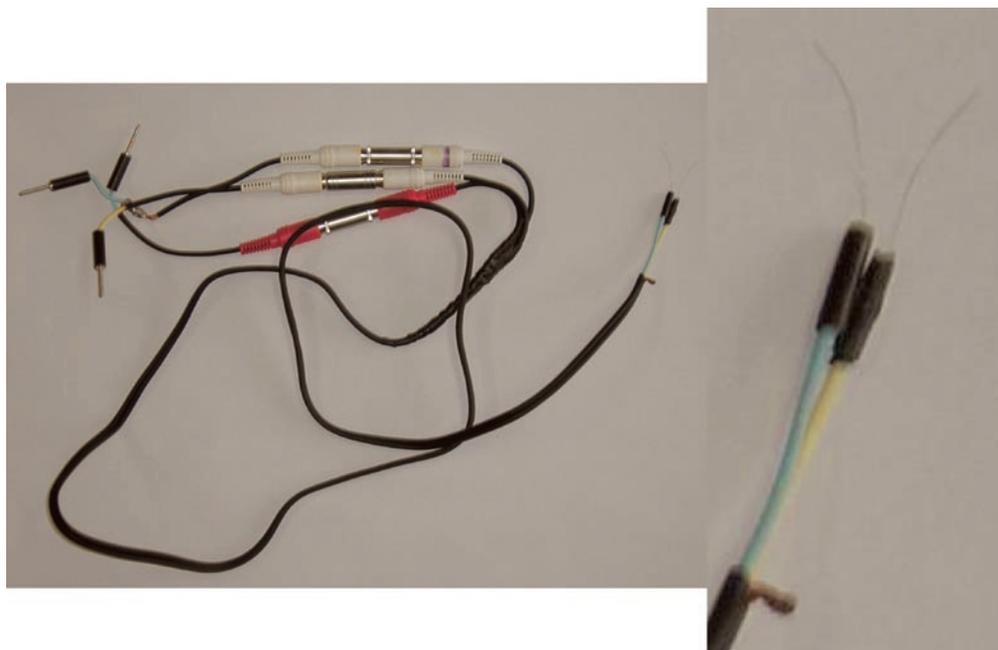


Fig. 2-3. Electrode to record ABR.

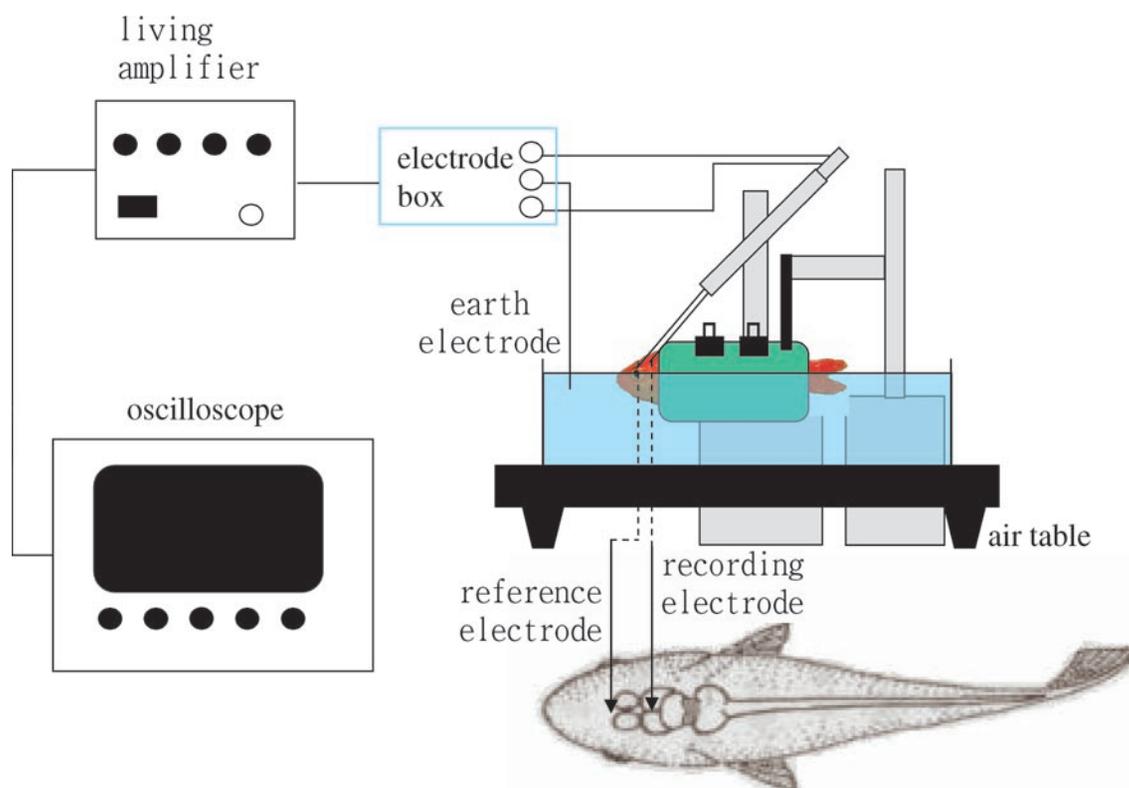


Fig. 2-4. Schematic diagram of the ABR normal recording setup. Dorsal view (citation oda 2004) .

隔で放音される同じ音刺激に対する反応を300回加算平均してオシロスコープ (LC334M, LeCroy) に記録した。生体電気アンプに接続する電極箱のアースは水槽内へ入れた。実験に使用したマニピュレータ、オシロスコープを Fig. 2-5 に示す。

刺激音の放音方法を Fig. 2-6 に示す。用いた刺激音は周波数 1 kHz, 音圧 120 dB のトーンバースト音 (立上がり立下がり 2 波) で、音波形を編集して出力することのできるアプリケーションソフトウェア (Cool Edit 2000, フリーソフト) を使って作成し、オーディオアンプ (AC 3, PIONEER) を使って増幅し、刺激波形の反応波形に対する影響を取り除くために放音毎に位相を 180° 反転させ、空中スピーカから断続的に放音した。刺激音の持続時間は 1 ms, 5 ms, 10 ms, 20 ms に変化させた。

供試魚の位置での刺激音の音圧はハイドロホン (B&K8103, Bruel & Kjaer) を使って計測した。ハイドロホンで拾った音刺激の音波形はチャージ増幅器 (B&K2635, Bruel & Kjaer) で増幅し、オシロスコープ (LC334M, LeCroy) に記録し、その振幅から音圧を求めた。音圧校正の状況を Fig. 2-7 に示す。

聴性誘発反応波形の周波数特性の解析は FFT によ

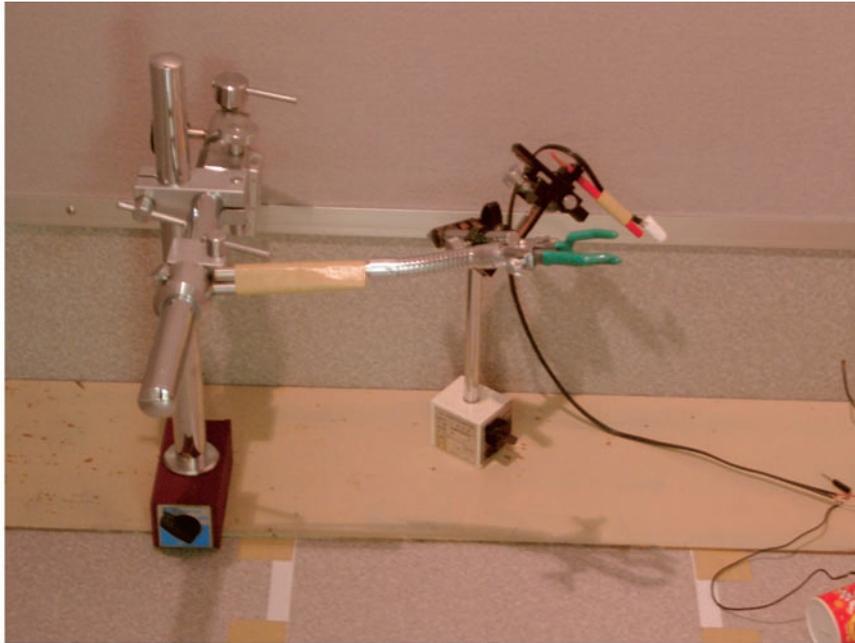
り行った。刺激音の持続時間と聴性誘発反応の持続時間との関係は各刺激音の持続時間に対して得られた反応の持続時間の全ての計測値 (5 個体の各個体で 1 ms, 5 ms, 10 ms, 20 ms の音それぞれに対し 2 回ずつ計測した反応波形) を使用し、回帰直線 (石居, 1975) を求めて検討した。

実験装置に聴性誘発反応以外の信号が含まれていないかを確かめるために死亡個体に関しても刺激音を放音して聴性誘発反応を計測したが電位反応は見られなかった。

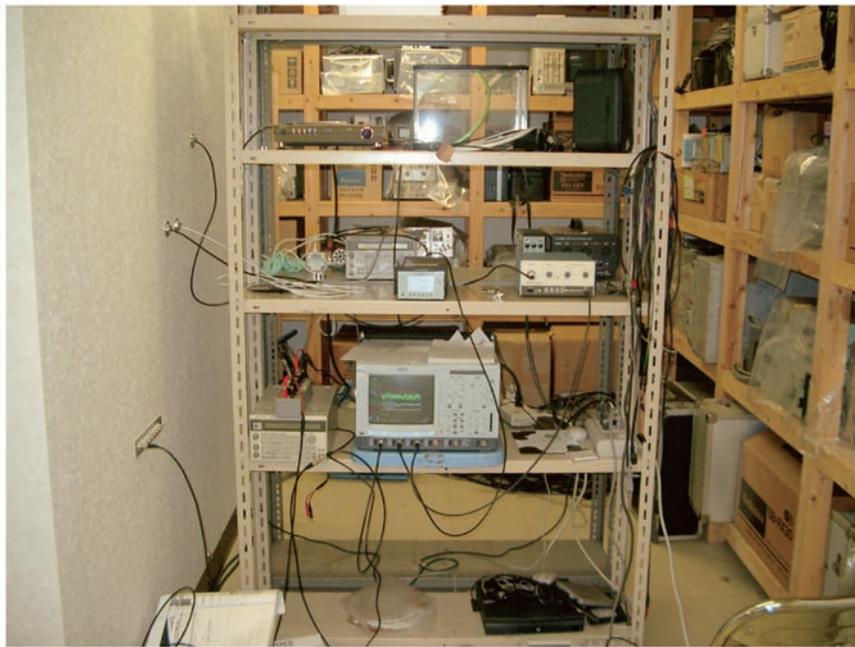
2-3 実験結果

1 ms, 5 ms, 10 ms, 20 ms の各持続時間の刺激に対して 5 個体全てから 2 回ずつ反応波形を記録することができた。Fig. 2-8 に供試個体 B1 の波形の一例を示す。また Table 2-2 に各持続時間の音刺激に対する反応持続時間および平均値と標準偏差を示す。計測できた聴性誘発反応の振幅は peak to peak で約 $5 \mu V$ 以下であった。

Fig. 2-9 に各刺激音の持続時間とそれに対応した反応持続時間の関係を示す。(Fig. 2-9) 相関係数は $R=0.97$ となり、有意な正の相関関係 ($\alpha = 0.05$, t 検定,



manipulator



oscilloscope, living amplifier, audio amplifier, attenuator

Fig. 2-5. Device for normal ABR method

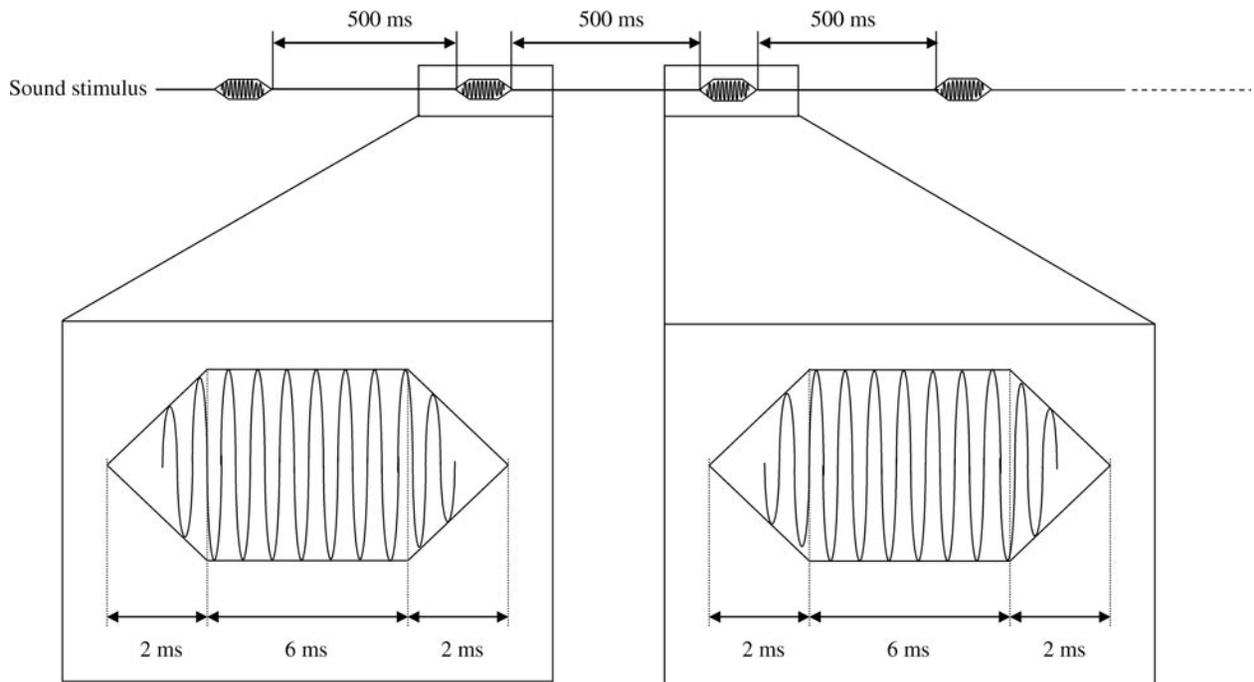


Fig. 2-6. Method to play sound stimulus (example of 10ms toneburst)

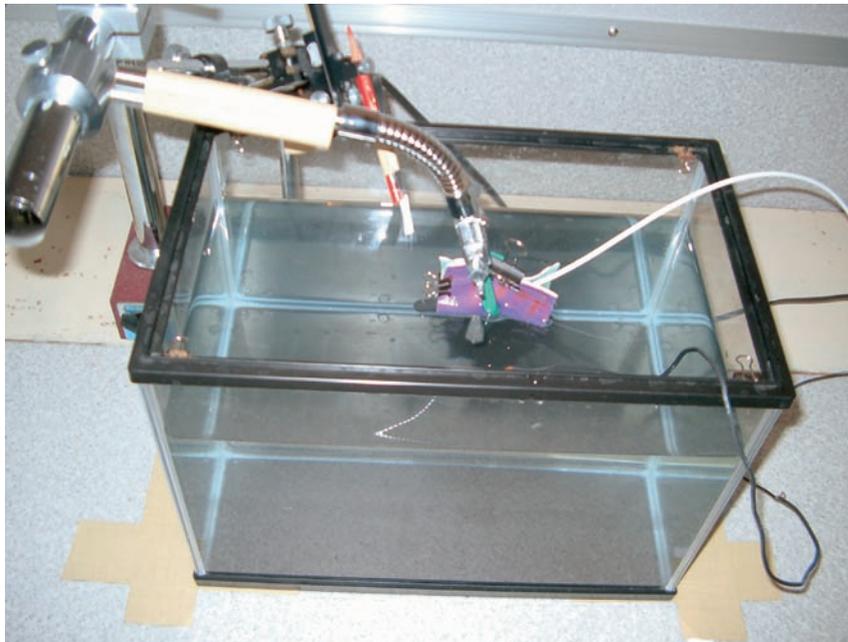


Fig. 2-7. Calibration of sound stimulus.

Table 2-2. ABR duration to each stimulus duration

No.	ABR duration (ms)			
	Stimulus duration (ms)			
	1	5	10	20
B1	4.44	6.44	12.28	21.52
	4.48	6.44	12.12	21.60
B2	3.60	11.16	20.56	24.96
	3.48	11.12	20.80	25.40
B3	5.20	6.84	11.76	21.68
	5.20	6.92	11.88	21.68
B4	3.92	7.70	11.67	21.93
	3.74	7.34	11.85	21.92
B5	5.37	6.33	10.30	20.10
	5.16	5.82	10.13	20.10
Mean	4.46	7.61	13.34	22.09
SD	0.74	1.93	3.94	1.77

片側)があった。聴性誘発反応の持続時間は刺激音の持続時間に対応して長くなることがわかった。

20 ms の音刺激への反応波形は刺激音周波数の約 2 倍の周波数である 2 kHz 周辺の成分が卓越していた。これに対して、持続時間の最も短い 1 ms の時の反応は 2 倍周波数成分が小さくなり、卓越成分はほとんど見られなくなった。

キンギョの聴性誘発反応は通常は先行研究(Kenyon *et al.*, 1998)でも示されているように反応開始から基線が負の方向へ移動し、続いて正の方向へ移動して元の位置に戻るといった特徴がある。本章で計測した反応波形は 1 ms ~ 20 ms のどの反応波形でも最初の立ち上がりが正の方向へ移動した。本章では供試魚頭部に挿入した電極の関極と不関極の固定位置が反対になったため基線が最初に正に移動したと思われる。1 ms への反応では波形が振動しながら正から負へ移るのに対し、5 ms 以上の音に対する反応では反応開始から約 5 ms までは 1 ms の時と同様の波形であるが、約 5 ms 以降は波形の基線が移動し、反応波形全体が低周波数の振動をしているように見える。これに関しては交流ノイズの 50 Hz に起因する振動が混入してきている可能性も考えられるが確かめることはできなかった。

2-4 考察

本実験では Fig. 2-8, Fig. 2-9 に示したように刺激音の持続時間が長くなると、反応持続時間が長くなる傾向が見られた。これらをキンギョのマイクロホン電位(古河, 1977)や frequency following response(古河, 1977), ハゼ *Dormitator latifrons* の内耳や通囊から得られる反応(Lu *et al.*, 2003; Lu *et al.*, 2004)など、中枢神経から直接導出される電位波形と比較すると、いずれの反応波形も刺激音の 2 倍周波数成分を持つこと、音の持続時間と対応した反応が得られること(1 ms に対する反応は除く)、刺激音の持続時間が長くなるにつれて聴性誘発反応の反応持続時間も長くなること、反応波形が正弦波であること等、多くの点で共通する傾向が見られた。1 kHz の刺激音については 1 ms の持続時間には、波数が 1 つであるためエネルギーが小さく、2 倍周波数成分が出にくかったものと考えられる。

これらのことからキンギョの頭部表皮に電極を軽く挿入して計測する聴性誘発反応は一定の持続時間以上であれば内耳の小囊、通囊や壺囊等の器官に由来して発生した反応電位が間接的に頭部表皮から記録されていると考えられる。

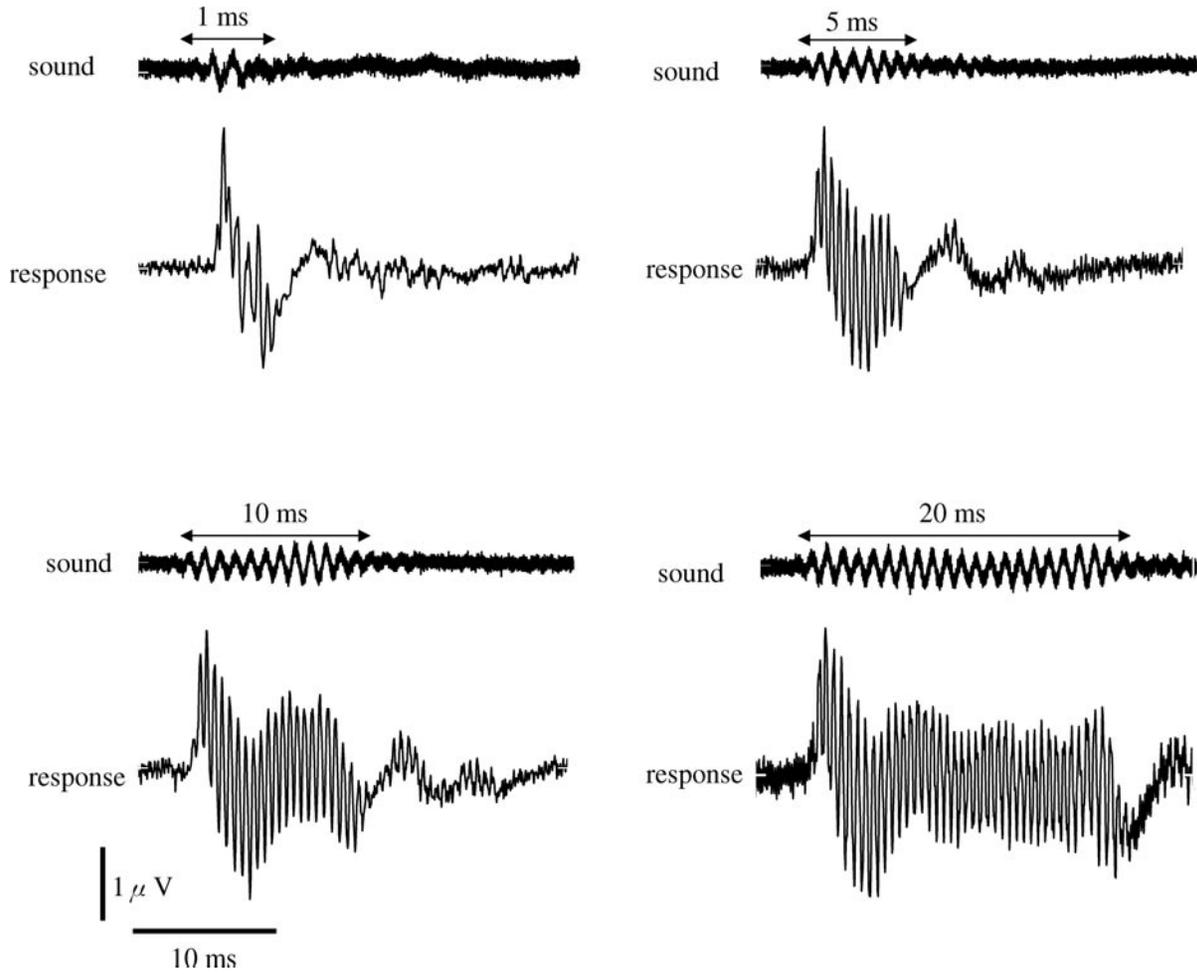


Fig. 2-8. ABR responses to each duration test sound stimuli (fish B1).

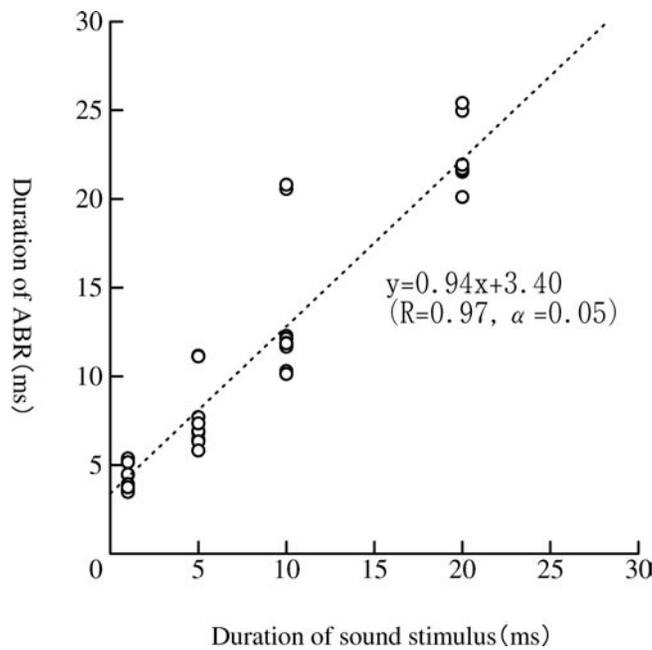


Fig. 2-9. Correlation between duration of sound stimulus and ABR

第3章 水中電極固定法

従来の魚類の聴性誘発反応の計測法（空中電極固定法）では小型の実験水槽に魚を入れ、頭部表皮を水面から軽く露出させ、マンピュレータ等を使って電極を確実に頭部表皮へ固定させる必要がある（Kenyon *et al.*, 1998；Akamatsu *et al.*, 2003）。空中電極固定法はキンギョ等の小型魚の計測に適しており、雑音除去の面から主に実験室で行われている。しかし商業的に重要な魚種であるマグロ類等の大型魚種については海中や大型水槽で実験することが必要となるため、これらの魚類の聴性誘発反応の計測には空中電極固定法を発展させる必要がある。また空中電極固定法は水槽の水面付近に魚を固定するが、水槽の水面付近は水槽の中心付近と比べ、音を放音したときの水の乱れが大きいことが考えられる。このようなことから供試魚を水中に沈め、大型水槽や海中でも聴性誘発反応が計測可能な方法を検討した。

水中で自由遊泳させた状態で臭いをかがせ、脳からの反応を計測する実験がヒメマス *Onchorhynchus nerka* やコイ *Cyprinus carpio* で行われている（佐藤, 上田, 1984；Kudo *et al.*, 1997）。また空中電極固定法の発展を目的としたものではないが防水された電極を使って、小型水槽に沈めて固定したアメリカンシャド *Alosa sapidissima* の聴性誘発反応が計測されている（Higgs *et al.*, 2004）。これらの報告ではいずれも魚体が水中に没した状態でも電位波形が記録されている。

本研究ではこれらの研究を参考にし、水槽の中央付近の水中に魚体を固定した方法（水中電極固定法と名付ける）で聴性誘発反応の計測を試みた。この方法で計測することが可能であれば大型水槽の中や海中でも聴性誘発反応を計測可能な方法に発展させることができると考えられる。最初の段階として、小型水槽を使

って空中電極固定法と水中電極固定法とでキンギョの聴性誘発反応と聴覚閾値を計測し、計測方法の課題と改良方法について検討した。なお、本実験では同一の個体を使ってこの二つの方法で聴性誘発反応と聴覚閾値を計測した。

3-1 供試魚

実験には尾叉長6.4～7.2 cmのキンギョ *Carassius auratus* 4尾を使用した。Table 3-1に供試魚の尾叉長と体重を示す。

3-2 実験装置および方法

Fig. 3-1に水中電極固定法での計測装置の概略を示す。頭部に電極を固定した供試魚を体サイズに合うように切り取ったネオプレンゴムを使って動かないように包み、プラスチック製のクリップで留め、方形ガラス水槽（34.0 cm × 20.0 cm × 24.5 cm）の中におもりをつけて約10 cm沈めて、包んだネオプレンゴムに糸を結んで反対側の糸にはクリップを結んで水槽の上枠の四隅にそのクリップで固定した。聴性誘発反応は50 Hz～10 kHzのバンドパスフィルターを通して生体電気アンプ（MEG1200, 日本光電）で増幅し、同一刺激音に対する反応を300回加算平均してからオシロスコープ（LC334M, LeCroy）に記録した。

聴性誘発反応を導出するための電極はテフロンコーティングされたタングステンを用い、基本的な部分は2章で用いたものと同様である。水中に没した魚で聴性誘発反応を計測するためには電極と電極に繋がれたコードの水没する部分を絶縁、防水する必要がある。そこで絶縁、防水できる自己融着テープ（スミテープ, 住友電工）を使って電極とコードの水没する部分を丁寧に巻いた。さらに、テープの隙間から水が侵入しないようにするため、塗料（カシュー）をテープの隙間に塗付した。電極の関極と不関極との間隔を広くする

Table 3-1. Total length and body weight of fish

No.	TL (cm)	BW (g)
C1	7.2	13
C2	6.4	10
C3	7.1	14
C4	7.0	13
Mean	6.9	12.5
SD	0.4	1.9

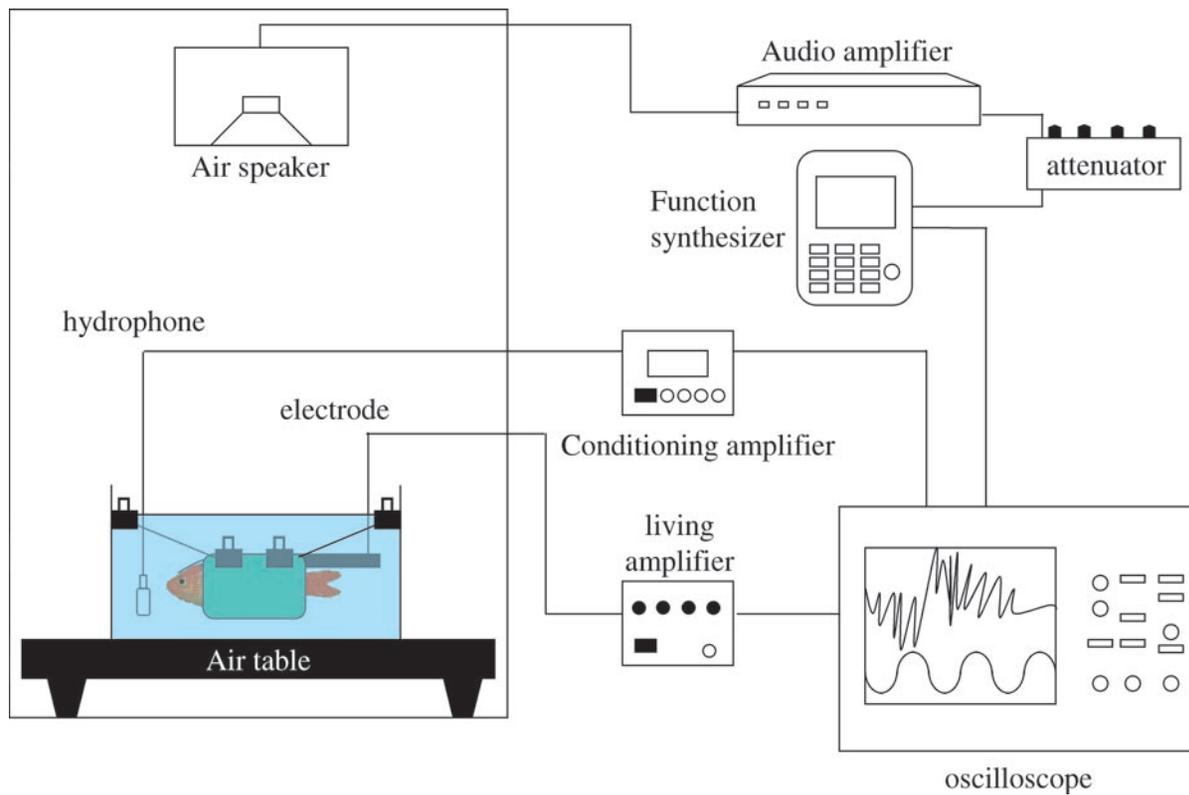


Fig. 3-1. Schematic diagram of the underwater ABR normal recording setup.

と電氣的ノイズが入るため、5 mm 程度の間隔としてノイズを防いだ。電極の位置はキンギョの頭部に見える中脳の中心に電極の関極を、そこから約 5 mm 前方へ不関極を表皮から約 0.5 mm 挿入した位置で生体接着剤 (DERMA BOND, Johnson & Johnson) を使って接着した。Fig. 3-2に絶縁防水した電極の構造図と、電極を魚に固定する方法を示す。また Fig. 3-3に電極の写真を示す。

刺激音はどの周波数も 5 周期分のトーンバースト音をマルチファンクションシンセサイザー (NF1930A, NF 回路設計ブロック) を使って発生させ、オーディオアンプ (SM-SX1, Sharp) で増幅し、供試魚から 1 m 以上上方に離れた空中スピーカから放音した。刺激音の音圧校正は第 2 章で示した方法に基づいて行った。刺激音には周波数 250 Hz, 500 Hz, 1 kHz, 2 kHz, 4 kHz の音を使用した。サンプリング周波数は 50 kHz もしくは 20 kHz に設定した。刺激音と聴性誘発反応とは時間軸を同じにしてオシロスコープで観察し、記録した。供試魚の固定と電極の配置の写真を Fig. 3-4に示す。

水中電極固定法で計測した電位波形が空中電極固定法で計測した電位波形と同じであることを以下の方法で

確認した。Fig. 3-5に解析に用いた値の定義を示す。1 kHz の刺激音を与えたときの反応波形で最初の負の peak を N, 正の peak を P とし、反応が開始 (振動が負になり始める点) してから N までの時間 Δt_1 (ms) と N から P までの時間 Δt_2 (ms) を符号検定により空中電極固定法と水中電極固定法とで差があるか検定した。

また N と P の振幅の絶対値を各々 $|AN|$, $|AP|$ とし、各個体毎に $|AP| + |AN|$ を求めて比較し、符号検定により差があるか検定を行った。さらに $|AP| + |AN|$ と音圧との関係を空中電極固定法と水中電極固定法別に回帰式で表わした。反応波形の周波数成分の分析は記録した反応波形の FFT によって行った。

電氣的ノイズの最大振幅 EN (μV) と反応波形の最大振幅 $|AP| + |AN|$ (μV) との比 (S/EN 比) に関しても 1 kHz の刺激音の場合について水中電極固定法と空中電極固定法とで同程度の音圧に対する反応波形から求め、水中電極固定法と空中電極固定法とで S/EN 比に差があるかどうかを符号検定により検定した。

聴覚閾値の計測方法は赤松 (Akamatsu *et al.*,

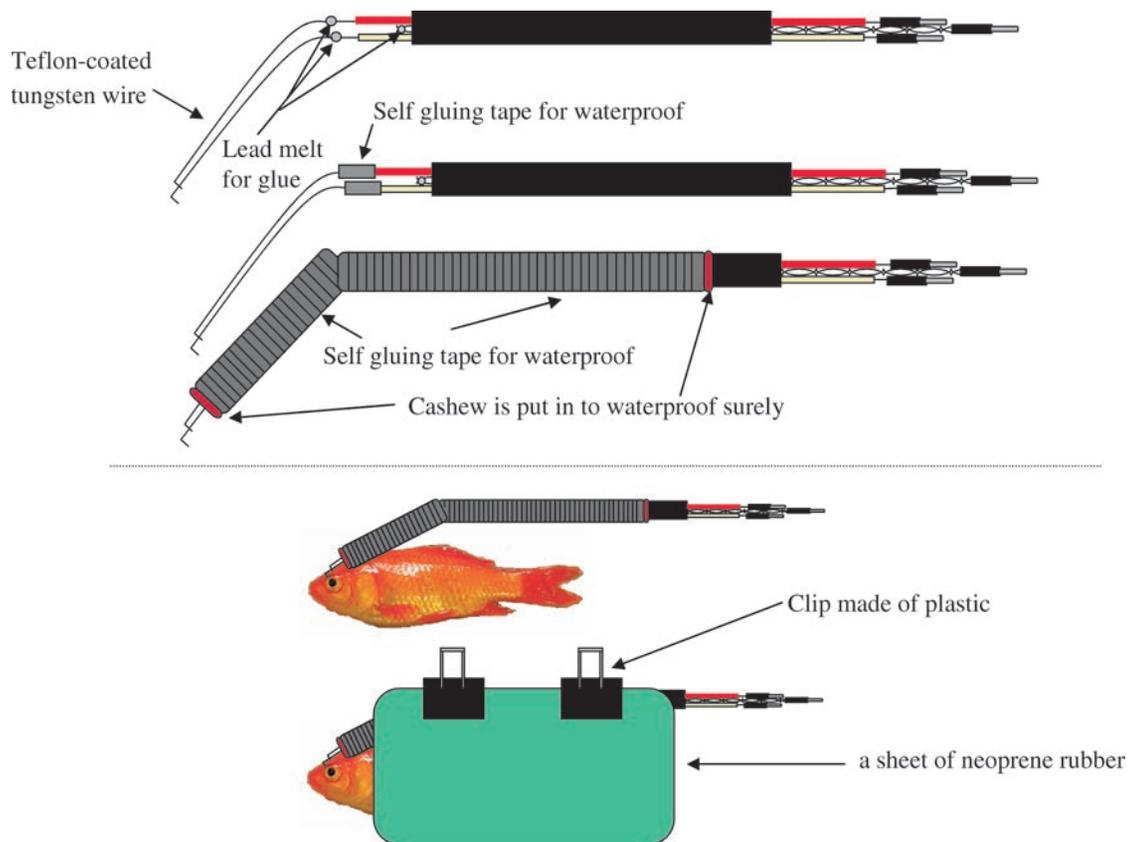


Fig. 3-2. Insulation and waterproof structure of the electrode and method of fixation with fish.

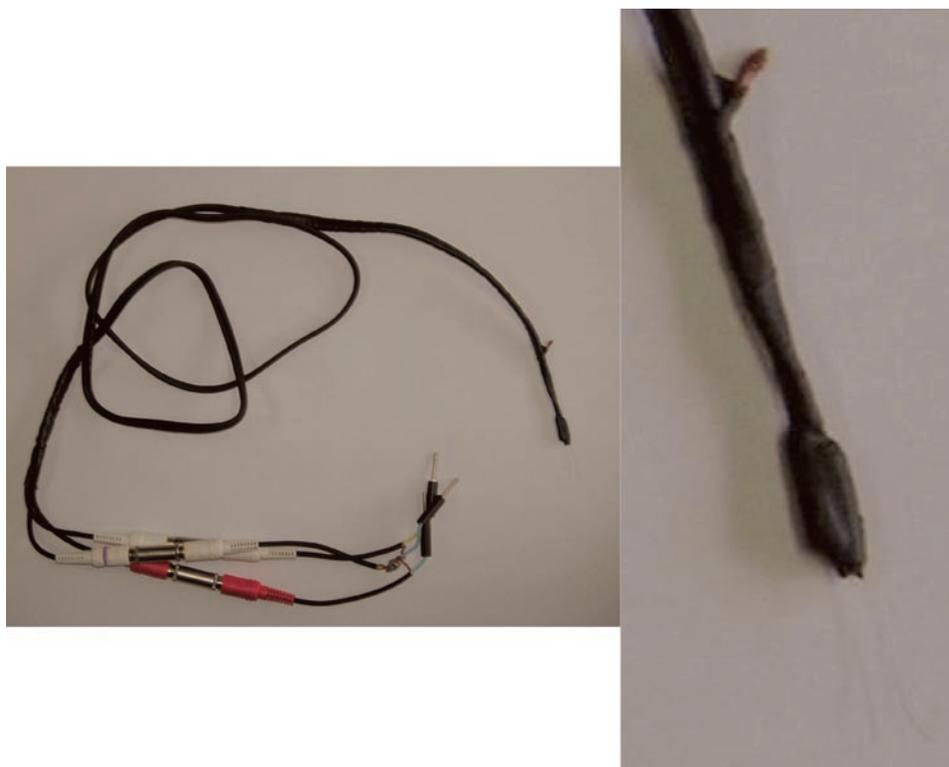


Fig. 3-3. Waterproof electrode to record ABR in underwater.

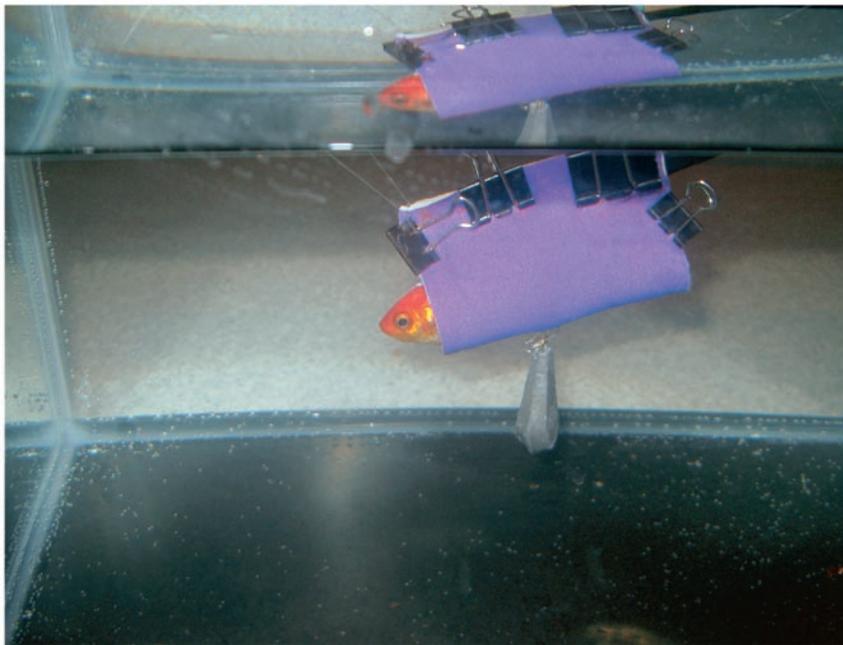
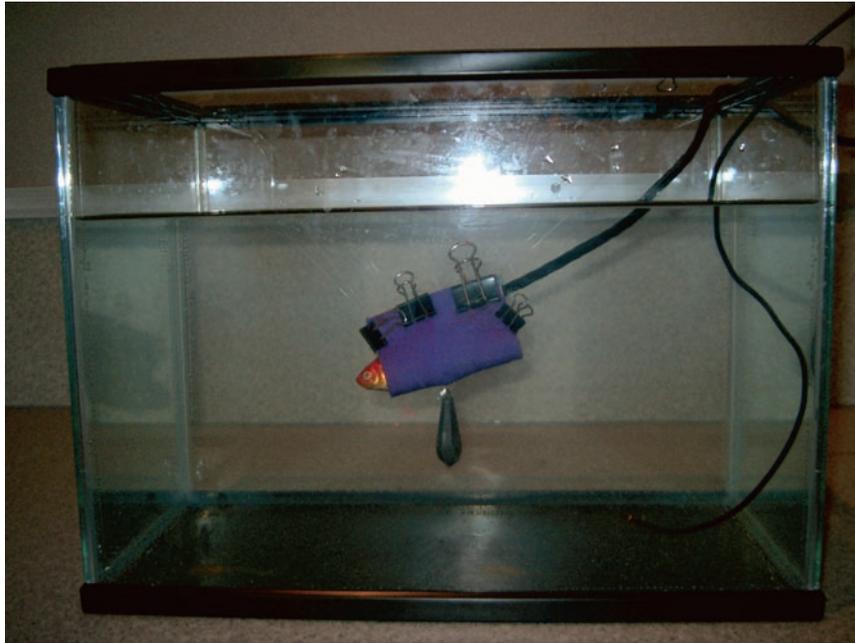


Fig. 3-4. Waterproof electrode and fixation with fish in underwater.

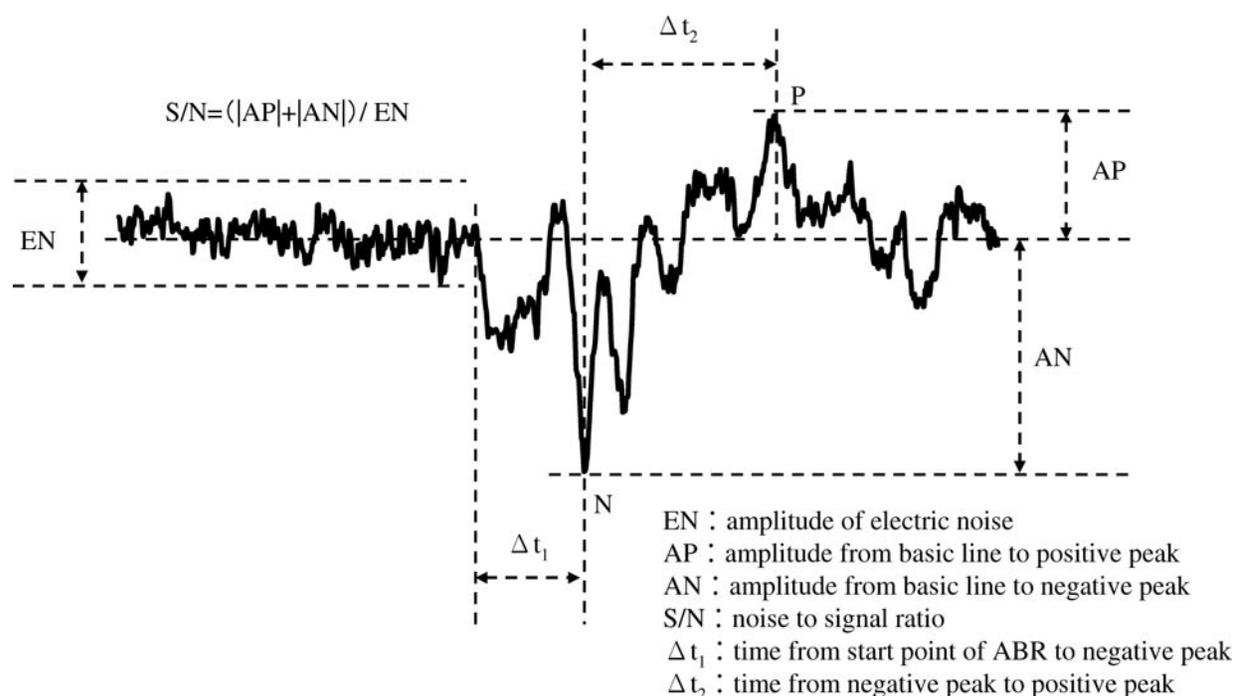


Fig. 3-5. Definition of ABR wave.

2003)の方法を参考にして行った。聴覚閾値は聴性誘発反応がオシロスコープ上で観察できた時の最も小さい音圧とした。聴覚閾値の計測方法をFig. 3-6に示す。まず初めに確実に反応が観られる音圧で聴性誘発反応を計測し、オシロスコープのスクリーンで反応を確かめた後に、刺激音の音圧を約10 dBステップで減衰させていった。聴性誘発反応の振幅は音圧を下げるにつれて小さくなり、反応の振幅が通常生じている電気的な背景雑音に近づくと音圧減衰を5 dBステップへ変えて計測した。反応が観られるか雑音の方が大きくなって反応が観られなくなるかの聴覚閾値の音圧付近では2.5 dBステップで音圧を変化させて計測を行った。また聴覚閾値に差が生じているかどうかを周波数毎に符号検定法によって検定した。

空中電極固定法での実験は水中電極固定法での実験が終了後、第2章と同様な方法で、魚を水槽水面付近にマニピュレータを使って固定して行った。

3-3 実験結果

Fig. 3-7に500 Hzの刺激音を聴かせたときに水中電極固定法で計測した聴性誘発反応と空中電極固定法により計測した聴性誘発反応とを供試個体C1の例で示す。典型的な反応波形の特徴は水中電極固定法で計測した波形も空中電極固定法で計測した波形もY軸(電圧軸)の基線が最初に負へ振れ、続いて正へ移動する

変化であった。

Table 3-2に比較に用いた刺激音の音圧と供試個体の対応を示す。音圧別に刺激音を各々S1, S2, S3と呼ぶことにする。Table 3-3にS1刺激音を聴かせたときの反応波形で反応が開始してからNまでの時間 Δt_1 (ms)とNからPまでの時間 Δt_2 (ms), $|AN| + |AP|$ を示す。

Δt_1 は水中電極固定法で求めた波形では平均 $3.88 \text{ ms} \pm 1.88$, 空中電極固定法では平均 $2.60 \text{ ms} \pm 0.27$ となり水中電極固定法と空中電極固定法で求めた波形に有意な差($p=0.625 > p=0.05$ 符号検定, 両側)はなかった。 Δt_2 は水中電極固定法で求めた波形では平均 $2.17 \text{ ms} \pm 0.63$, 空中電極固定法では平均 $3.51 \text{ ms} \pm 0.95$ となり有意な差($p=0.625 > p=0.05$ 符号検定, 両側)はなかった。 $|AN| + |AP|$ は水中電極固定法で求めた波形では平均 $3.86 \mu\text{V} \pm 0.90$, 空中電極固定法では平均 $3.24 \mu\text{V} \pm 0.13$ となり有意な差(符号検定, $p=0.75 > p=0.05$)はなかった。

Table 3-4に $|AP| + |AN|$ と刺激音の音圧との関係で空中電極固定法と水中電極固定法で求めた回帰直線を示す。Table 3-5, 3-6, 3-7に1 kHzの音を聴かせたときの反応波形に関して電気的ノイズの最大振幅ENと反応波形の最大振幅Sとの比をとったS/EN比の値を、刺激音の音圧別に示す。刺激音S1では水中電極固定法で求めた波形でS/EN比は

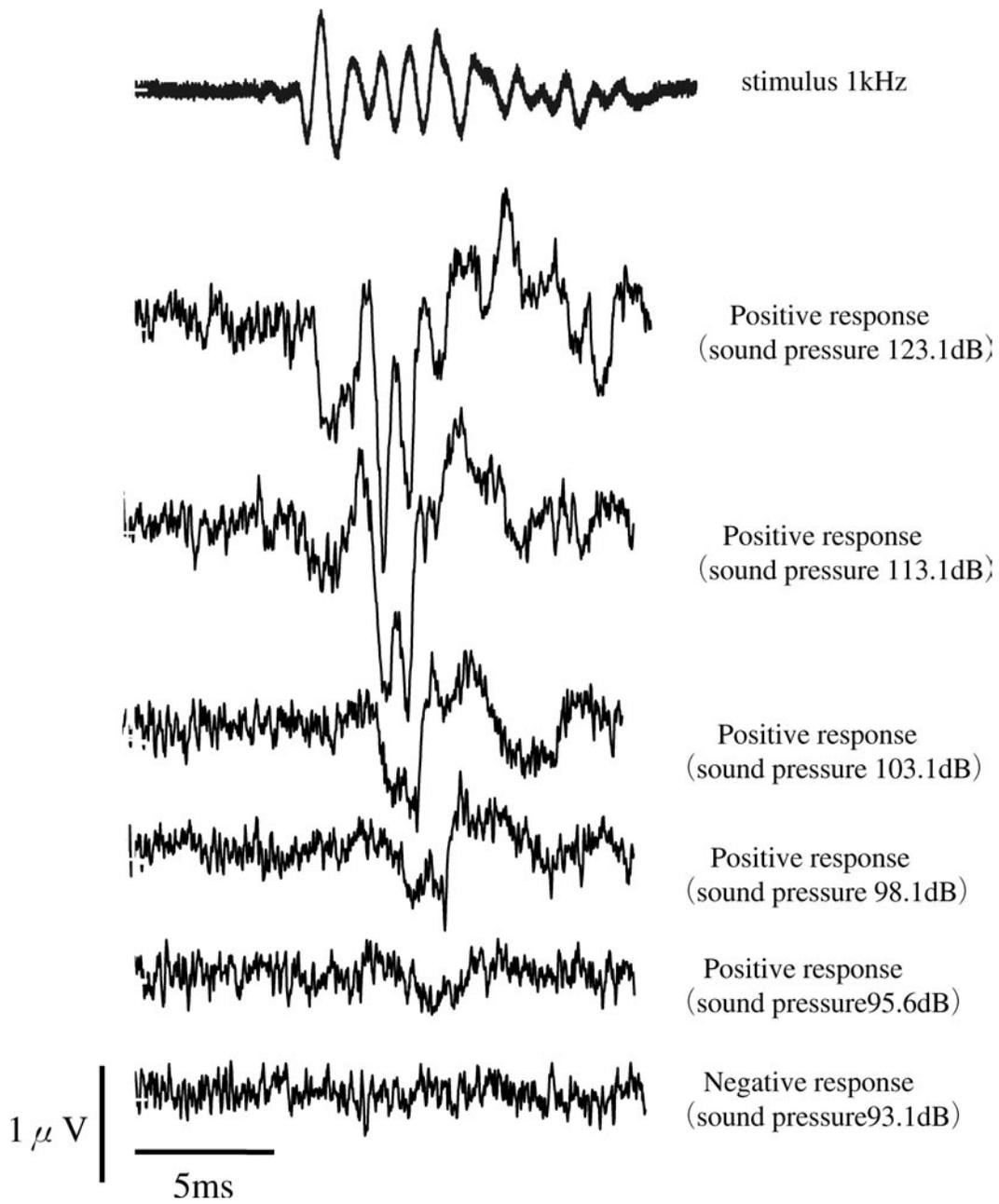


Fig. 3-6. The method to determine auditory thresholds.

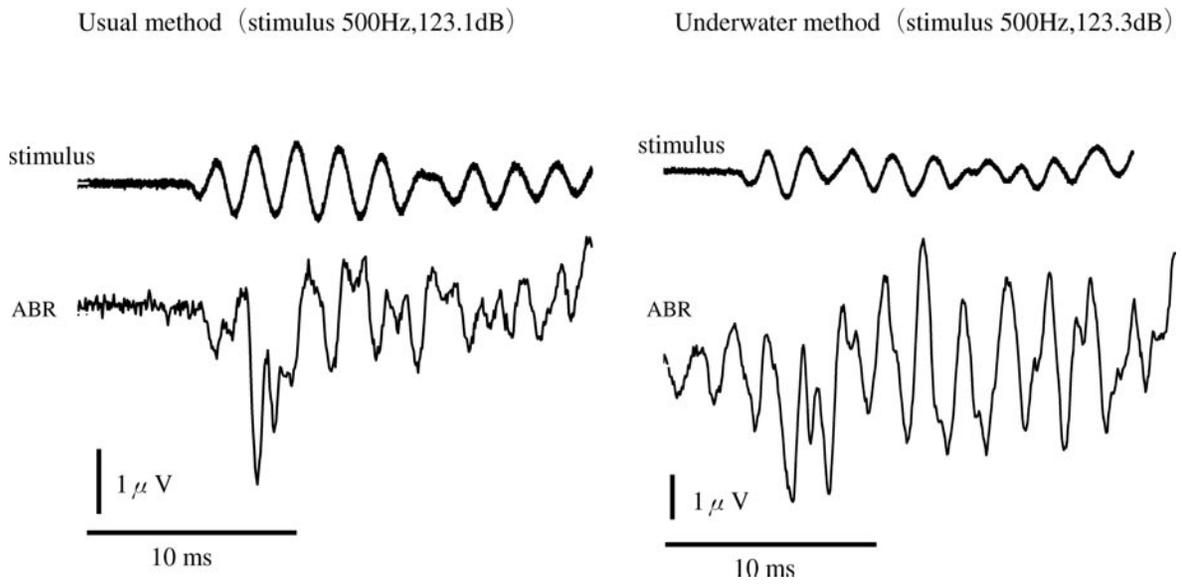


Fig. 3-7. Comparison between the ABR waveform to 500 Hz tone bursts of same fish recording by usual method and underwater method. Left side ABR is measured by usual method and right side is by underwater method. (fish C1).

Table 3-2. Sound pressure level used for each test

stimulus	Sound pressure (dB re 1 μ Pa)	
	Underwater method	Usual method
S1	122.1(C1,C2), 123.5(C4,C5)	123.1(C1,C2,C4,C5)
S2	112.1(C1,C2), 113.5(C4,C5)	113.1(C1,C2,C4,C5)
S3	102.1(C1,C2), 103.5(C4,C5)	103.1(C1,C2,C4,C5)

Table 3-3. Δt_1 (ms), Δt_2 (ms), $|AN| + |AP|$ to stimulus S1

No.	Δt_1 (ms)		Δt_2 (ms)		$ AN + AP $ (μ V)	
	underwater	usual	underwater	usual	underwater	usual
C1	9.50	2.44	1.70	4.30	6.17	3.19
C2	1.96	2.28	0.86	4.58	2.62	3.60
C3	1.60	2.28	3.85	4.48	2.27	2.99
C4	2.44	3.40	2.28	0.68	4.38	3.18
Mean	3.88	2.60	2.17	3.51	3.86	3.24
SD	3.77	0.54	1.26	1.89	1.80	0.28

Table 3-4. Regression line between $|AP| + |AN|$ and stimulus ($\alpha = 0.05$)

No.	Usual method	Underwater method
	$y=1.51x+1.19$	$y=4.35x+1.53$
C1	$F_{cal}=19.49 > F_{n-2}^1=7.71$ (n=6)	$F_{cal}=7.92 > F_{n-2}^1=7.71$ (n=6)
	$y=1.39x+1.95$	$y=1.07x+1.37$
C2	$F_{cal}=4.86 < F_{n-2}^1=10.13$ (n=5)	$F_{cal}=8.10 < F_{n-2}^1=18.51$ (n=5)
	$y=1.23x+1.39$	$y=0.85x+0.92$
C4	$F_{cal}=12.75 > F_{n-2}^1=7.71$ (n=6)	$F_{cal}=15.12 > F_{n-2}^1=5.12$ (n=11)
	$y=1.21x+1.51$	$y=2.44x+1.37$
C5	$F_{cal}=5.13 < F_{n-2}^1=10.13$ (n=5)	$F_{cal}=34.31 > F_{n-2}^1=5.99$ (n=8)
	$y=1.37x+1.47$	$y=1.70x+1.28$
Total	$F_{cal}=39.55 > F_{n-2}^1=4.35$ (n=22)	$F_{cal}=13.55 < F_{n-2}^1=4.21$ (n=29)

平均 6.35 ± 2.20 , 空中電極固定法では平均 6.02 ± 0.73 となり有意な差 ($p=0.625 > p=0.05$ 符号検定 両側) はなかった。刺激音 S2 では水中電極固定法で求めた波形で S/EN 比は平均 7.04 ± 2.36 , 空中電極固定法では平均 4.80 ± 0.42 となり有意な差 ($p=0.75 > p=0.05$ 符号検定 両側) はなかった。刺激音 S3 では水中電極固定法で求めた波形で S/EN 比は平均 4.15 ± 0.86 , 空中電極固定法では平均 3.94 ± 0.44 となり有意な差 ($p=0.75 > p=0.05$ 符号検定 両側) はなかった。

反応の持続時間は水中電極固定法と空中電極固定法とでほぼ同じ音圧で計測できた C1 と C5 の二個体についてみると刺激音の持続時間 (250 Hz, 約20 ms; 500 Hz, 約10 ms; 1 kHz, 約5 ms; 2 kHz, 約2.5 ms; 4 kHz, 約1.25 ms) に対して水中電極固定法と空中電極固定法のどちらの方法でも少し長く反応が記録された。

空中電極固定法と水中電極固定法とで計測したキンギョの聴覚閾値を Table 3-8, 3-9に, 聴覚閾値曲線を Fig. 3-8に示す。水中電極固定法と空中電極固定法で求めた聴覚閾値のうちで最も聴覚閾値が低くなった周波数は水中電極固定法で計測された500 Hzであり, 音圧は約78 dBであった。

同一個体を使って水中電極固定法と空中電極固定法で求めた聴覚閾値の計測値に差が生じているかどうかを250 Hzで4個体, 500 Hzで4個体, 1 kHzで4個体に関して符号検定法で調べた結果, 250 Hz ($p=0.75 > 0.05$ 両側), 500 Hz ($p=0.125 > p=0.05$ 両側), 1 kHz ($p=0.125 > p=0.05$ 両側) でいずれも有意差はなかった。2 kHzと4 kHzは計測値が2個体以下と少なかったため検定は行わなかった。水中電極固定法と空中電極固定法で求めた聴覚閾値の平均値で比較した周波数は1 kHzと2 kHzであったが, どちらの周波数でも差は約5 dBであり, 過去の報告で求められているキンギョの聴覚閾値の標準偏差の範囲 (Kenyon *et al.*, 1998) に入る差であった。

実験水槽の水温は $8.5^\circ\text{C} \sim 11.8^\circ\text{C}$ だった。防音室内の騒音の音圧はFFT分析では各刺激音の周波数でそれぞれ約60 dB以下であった。

3-4 考察

反応波形は水中電極固定法で計測した波形も空中電極固定法で計測した波形もY軸(電圧軸)の0 Vを基準として最初に基線が負へ移動し, 続いて正へ基線が移動する変化があった。第2章でも述べたが, こ

Table 3-5. S/N ratio to S1 stimulus

No.	S/N	
	Underwater method	Usual method
C1	12.80	4.02
C2	2.90	7.32
C4	4.63	5.84
C5	5.05	6.89
Mean	6.35	6.02
SD	4.40	1.47

Table 3-6. S/N ratio to S2 stimulus

No.	S/N	
	Underwater method	Usual method
C1	14.02	3.83
C2	5.84	5.67
C4	4.02	4.39
C5	4.28	5.32
Mean	7.04	4.80
SD	4.72	0.84

Table 3-7. S/N ratio to S3 stimulus

No.	S/N	
	Underwater method	Usual method
C1	4.95	2.81
C2	2.44	4.63
C4	—	4.62
C5	5.06	3.68
Mean	4.15	3.94
SD	1.48	0.87

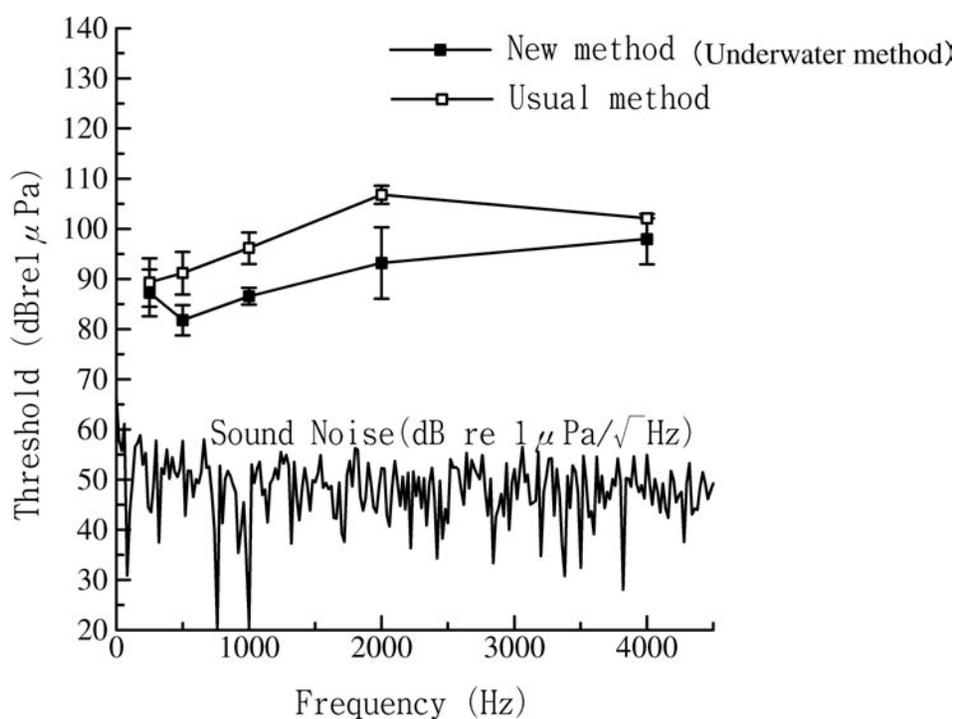


Fig. 3-8. Mean auditory thresholds and standard deviation of four goldfish (*Carassius Auratus*) obtained by usual and new underwater ABR method.

Table 3-8. Auditory threshold of goldfish *Carassius auratus* by usual ABR method

No.	Auditory threshold (dB re 1 μ Pa)				
	Stimulus sound (Hz)				
	250	500	1000	2000	4000
C1	83.1	93.1	95.6	105.6	102.1
C2	88.1	85.6	93.1	—	—
C4	93.1	90.6	95.6	—	—
C5	93.1	95.6	100.6	108.1	—
Mean	90.2	92.0	96.7	106.9	102.1
SD	4.79	4.27	3.15	1.77	—

(Unit : dB re 1 μ Pa)

Table 3-9. Auditory threshold of goldfish *Carassius auratus* by underwater ABR method

No.	Auditory threshold (dB re 1 μ Pa)				
	Stimulus sound (Hz)				
	250	500	1000	2000	4000
C1	83.8	83.2	87.1	91.3	105.8
C2	91.3	78.2	92.1	103.8	100.8
C4	85.6	85.3	88.5	103.7	—
C5	90.6	82.8	88.5	103.7	—
Mean	88.4	82.7	89.3	101.2	103.7
SD	3.69	2.99	2.14	7.19	3.54

(Unit : dB re 1 μ Pa)

のように負から正へと基線が移動する特徴はこれまでに報告されている聴性誘発反応の特徴 (Wysocki and Ladich, 2002) と一致する。

Δt_1 (ms) と Δt_2 (ms) は水中電極固定法と空中電極固定法で求めた波形に有意な差はなかった。また 1 kHz で得られた反応波形の | AN | + | AP | も有意な差はなかった。1 kHz の音を聴かせたときに計測できた | AP | + | AN | と、そのときの音刺激の音圧との関係についても空中電極固定法と水中電極固定法とで有意な差は無かった。魚を固定する計測位置や電極の位置が違うため波形の特徴が多少異なることは考えられるが、水中電極固定法と空中電極固定法で計測した反応波形はほぼ似た特徴を持っていることがわかる。反応の継続時間が各音刺激の持続時間よりも少し長く記録されたことについては小型水槽での実験であったため音刺激が水槽内で反射して音刺激が少し長く生じていたことが原因である可能性がある。

本実験での水中電極固定法と空中電極固定法の 2 つの方法で求めた聴覚閾値は以前に求められているキンギョの聴覚閾値 (Kenyon *et al.*, 1998) より高くなった。本実験は水温 8.5 °C ~ 11.8 °C で行ったが先行研究の実験では水温約 25.0 °C で行われている。ニジマス *Onchorynchus mikiss* では水温が低くなると聴覚閾値が高くなるという報告がされている (Yamakawa *et al.*, 1998) ため、聴覚閾値が高くなった原因の 1 つには水温の影響が考えられる。

本研究では水中電極固定法でも空中電極固定法で計測したときと同じような反応波形と聴覚閾値を得ることができた。この水中電極固定法を大型魚種を対象として海中や大型水槽で行うためには対象種に応じた電極の位置の検討や雑音除去の方法等様々な課題を克服する必要がある。

第 4 章 空中電極固定法を用いた水産有用魚類の聴覚計測

聴性誘発反応法は心電図法と比較して、同一個体を繰り返し使用できることや小型の魚類についても手術等を行うことなく適用が可能なことが利点である。また第 3 章で用いた水中電極固定法を発展させることで多くの魚類について聴覚特性を測定できる可能性もある。この聴性誘発反応を用いて従来測定されてこなかった魚種について聴覚特性を調べることにした。

4-1 イカナゴ稚魚の聴覚閾値

イカナゴ *Ammodytes personatus* は日本に置ける重要な水産資源であり、正確な資源量の推定が必

要となっている。個体群構造は詳細に研究され、(Funakoshi, 1998) 漁獲量は 1978~1982 年にかけて減少したが、その後、資源を増やす努力がなされてきている (Hashimoto, 1984; 永島, 2001)。資源量推定は標識を取付けた魚を再捕して検討する方法、魚群探知器で受波する魚群からのエコーによって魚群量を推定する方法等で行われている。この時、調査船の騒音によってイカナゴが逃避し、推測される魚群量が少なく見積られていることが考えられる。したがって船の騒音に反応してイカナゴがどのように行動するかを調べる必要がある。このためにはイカナゴの聴覚特性を知る必要がある。一般に船から発せられる騒音は主に 100 ~ 500 Hz の周波数範囲にあることが知られている (Hatakeyama *et al.*, 1997)。またブリ *Seriola quinqueradiata* 等のイカナゴ捕食者 (柳橋ら, 1997) の遊泳音は数 10 ~ 数 100 Hz であることが報告されている (藤枝ら, 1994)。そこでイカナゴの聴覚閾値を 100 ~ 500 Hz の周波数範囲で求め、船の騒音との関連について検討した。

4-1-1 供試魚

実験には瀬戸内海で漁獲された尾叉長 6.3 ~ 8.8 cm のイカナゴ *Ammodytes personatus* 13 尾を使用した。供試魚の尾叉長を Table 4-1-1 に、イカナゴの写真を Fig. 4-1-1 に示す。なお供試魚は底に砂を敷いたガラス水槽の中で水温 21.8 ~ 24.8 °C で飼育した。

4-1-2 実験装置および方法

実験装置の概略を Fig. 4-1-2 に示す。供試魚は実験時に飼育水槽から取り出し、魚のサイズに切り取ったプラスチックのメッシュ (目合約 2 mm) で包んでからクリップで留めて保定し、中脳のある頭皮の部分を数 mm 水面より空气中へ露出させ、残りの部分は水没させて海水を満たした角形のガラス水槽 (34.0 × 20.0 × 24.5 cm, 供試個体 D1 ~ D7 のイカナゴで使用)、もしくは角形のプラスチック容器 (41.0 × 28.5 × 4.5 cm, 供試個体 D8 ~ D13 のイカナゴで使用) 内にクランプを使って固定した。実験水槽は最初、角形ガラス水槽を使っていたが、魚の固定が容易なことから D7 を計測した後、角形プラスチック容器へ換えた。このため 2 つの水槽で実験を行ったが同じ時期の同じ場所 (位置) での計測であるため背景雑音は変わらないとした。魚体への電極の挿入、装着は第 2 章の方法と同様に行った。電極から導出される微小電位は生体電気アンプ (MEG1200, 日本光電) で増幅してオシロスコープ (LC334M, LeCroy) に記録し、同一刺激に対する 0.1 秒間の反応を 300 回加算平均して記録し

Table 4-1-1. Total length of fish

No.	TL (cm)
D1	7.5
D2	7.4
D3	7.9
D4	7.1
D5	7.2
D6	7.3
D7	7.3
D8	7.7
D9	7.2
D10	6.6
D11	6.3
D12	8.8
D13	7.4
Mean	7.4
SD	0.59

Fig. 4-1-1. Japanese sand lance *Ammodytes personatus*.

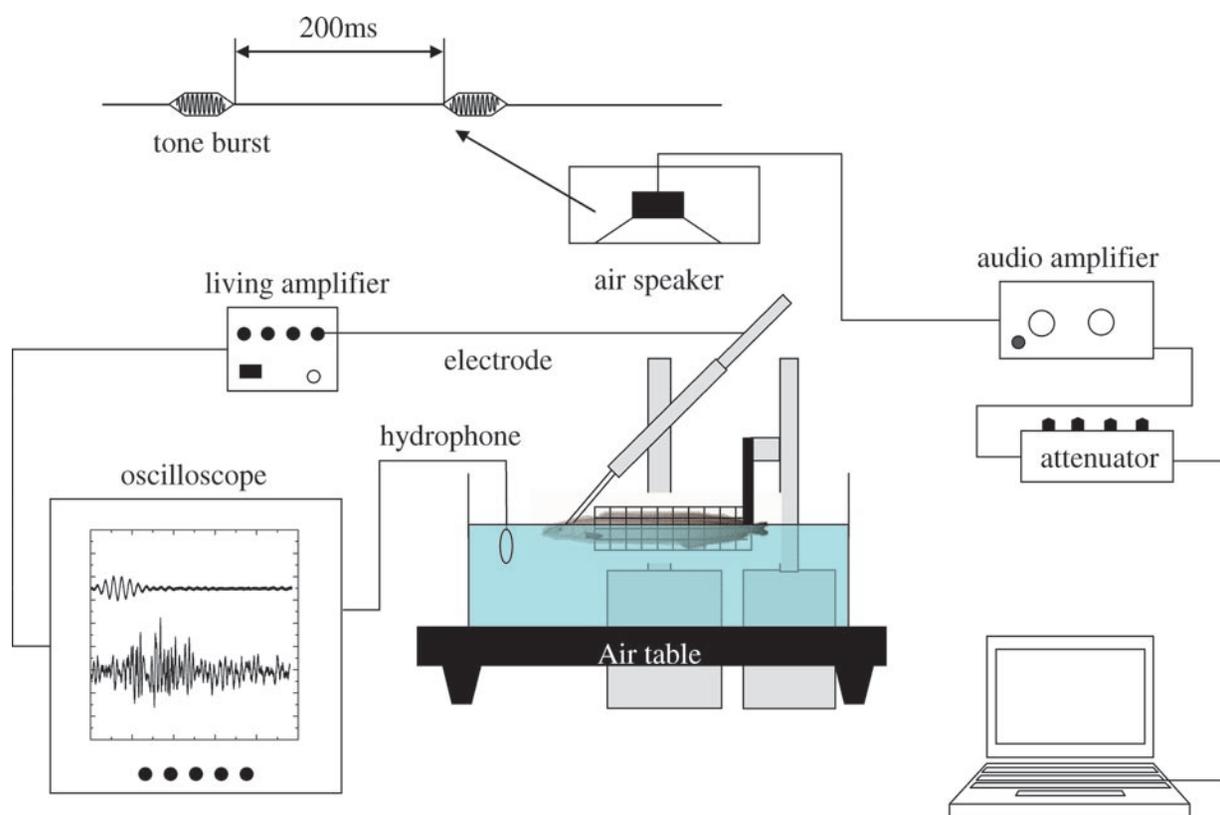


Fig.4-1-2. Schematic diagram of the ABR recording setup.

た。

音圧レベルは減衰器 (Kenwood RA920A, Kenwood) を使って調節した。放音のための空中スピーカは魚から45 cm 以上離れた上方の位置に設置した。刺激音には128 Hz, 181 Hz, 256 Hz, 362 Hz, 512 Hz の周波数を使用し、音圧の較正は第2章の方法に基づいて行った。

音を感知しているのかどうかの判定は先行研究 (Kenyon *et al.*, 1998) を参考とし、反応の振幅がノイズレベル (常時記録されている脳幹からの波形と電気的ノイズの合計) より大きければ感知しているものとし、ノイズレベルと同レベルであれば感知無しとした。死亡個体で同様の測定を行っても導出電位がノイズレベルと同等になることも確認した。

各周波数で求めた反応波形にどの程度再現性があるのかを知るために D8 ~ D13 に関して実験の最初と最後に聴覚閾値より比較的高い音圧を繰り返し与えた時に記録した2つの反応波形 (300回加算平均した2つの波形) を用いてケンドールの相関係数 τ を求めた。2つの反応波形で振幅が最大となる範囲を含む0.02秒間のデータを使用した。検定には電圧値 (Y 軸) のみ

を使用した。 τ は $-1 \sim 1$ の間の値をとり、2つの波形同士が類似しているほど τ は1に近づき (全く同じだと τ は1)、異なっているほど -1 に近づく (波形が全く反対だと τ は -1)。

聴覚閾値の計測は先行研究 (Akamatsu *et al.*, 2003) を参考に約130 dB re $1 \mu\text{Pa}$ の音圧から始め、第3章と同様に刺激に対する反応が波形の中に明瞭に見られなくなった音圧を聴覚閾値とした (Fig. 4-1-3)。各周波数で得られた各個体の聴覚閾値を平均し、聴覚閾値曲線を求めた。また Wilcoxon の符号順位検定法と符号検定法によって測定周波数間の聴覚閾値の差を検定した。また記録した聴性誘発反応波形の周波数成分の特徴を求めるために300回加算平均して記録した0.1秒間の反応波形をFFT解析した。

4-1-3 実験結果

刺激音の周波数のすべてについてイカナゴの聴性誘発反応を計測することができた。Fig. 4-1-4に256 Hz の刺激音に対して得られた聴性誘発反応の例を示す。また128 ~ 362 Hz の音に対して得られた聴性誘発反応波形はFFT解析の結果から刺激音周波数の約2倍

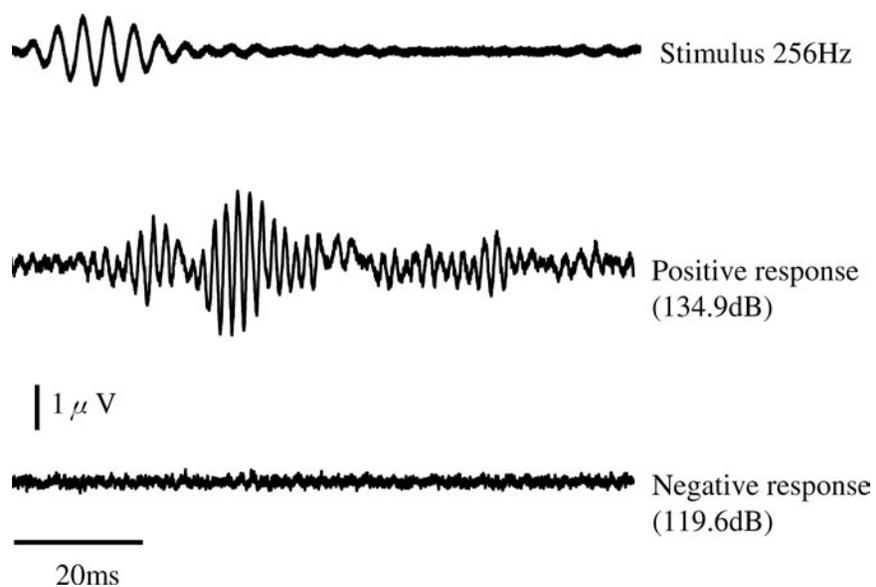


Fig. 4-1-3. Example of positive and negative ABR to 256 Hz sound stimulus.

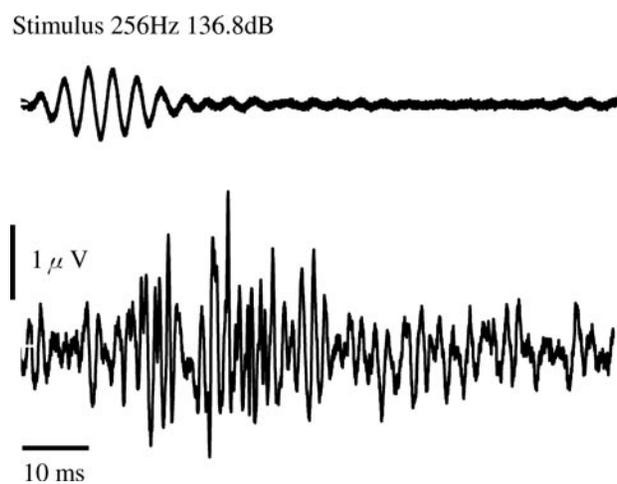


Fig. 4-1-4. Example of ABR to 256 Hz sound stimulus (D8).

の周波数成分を持っていた。FFT 解析の結果のうち刺激音256Hzの例を Fig. 4-1-5に示す。実験水槽内の騒音はFFT分析により求めると60 dB以下であった。

反応波形の特徴は基線（約0 V）についても振動が見られることである。反応は放音が終わっても継続し、オシロスコープの記録限界時間を超えても反応が続いており、今回の計測機器では持続時間を計測できなかった。

Fig. 4-1-6, 4-1-7に同一の音刺激に対して2回計測したD10の256 Hz, 136.8 dBの刺激音とD13の362 Hz, 135.3 dBの刺激音に対する反応波形を例として示す。2つの波形からケンドールの相関係数 τ を求めた時の音圧と求めた τ の結果を Table 4-1-2, Table 4-1-3に示す。 $\tau = 0.3$ 以下だと反応波形は違った波形に見え、0.3以上だと同じ波形に見えるため Yan (2000) は聴性誘発反応が生じているかどうかの基準となる相関係数を0.3としている。この値を基準とすると τ は23回計測した実験の内、刺激音周波数128Hzで1個体、および512 Hzで3個体において0.3以下となった以外は全て0.3以上となった。

Fig. 4-1-8にイカナゴが活魚の状態と死魚の状態で

計測した聴性誘発反応を256 Hzの音刺激に対する1個体の反応を例として示す。死魚では聴性誘発反応は見られず、電気的なノイズのみが記録されている。

すべての供試魚で得られた各周波数の聴覚閾値を Table 4-1-4, 4-1-5に示す。個体D8～D13に関して聴覚閾値の平均値を用いて求めた聴覚閾値曲線を Fig. 4-1-9に示す。

聴覚閾値は128～256 Hzの範囲で低くなり、約113～118 dBであった。ガラス水槽とプラスチック水槽で得られた各周波数の聴覚閾値について対応する隣同士の周波数の聴覚閾値を総括して Wilcoxon の符号順位検定法で検定した結果、128 Hzと181 Hz ($n=10$), 181 Hzと256 Hz ($n=11$), 256 Hzと362 Hz ($n=10$) 間では有意差はなく ($\alpha = 0.05$), 362 Hzと512 Hz ($n=9$) 間で有意差があった ($\alpha = 0.05$)。一方、符号検定では128 Hzと181 Hz ($n=10, P=1.246 > 0.05$ 両側) および181 Hzと256 Hz ($n=11, P=1.0 > 0.05$ 両側) 間では有意差はなく ($\alpha = 0.05$), 256 Hzと362 Hz ($n=10, P=0.0214 < 0.05$ 両側) および365 Hzと512 Hz ($n=9, P=0.0039 < 0.05$ 両側) では有意差が認められた ($\alpha = 0.05$)。なお、実験時の水温は20.0～25.1℃であった。

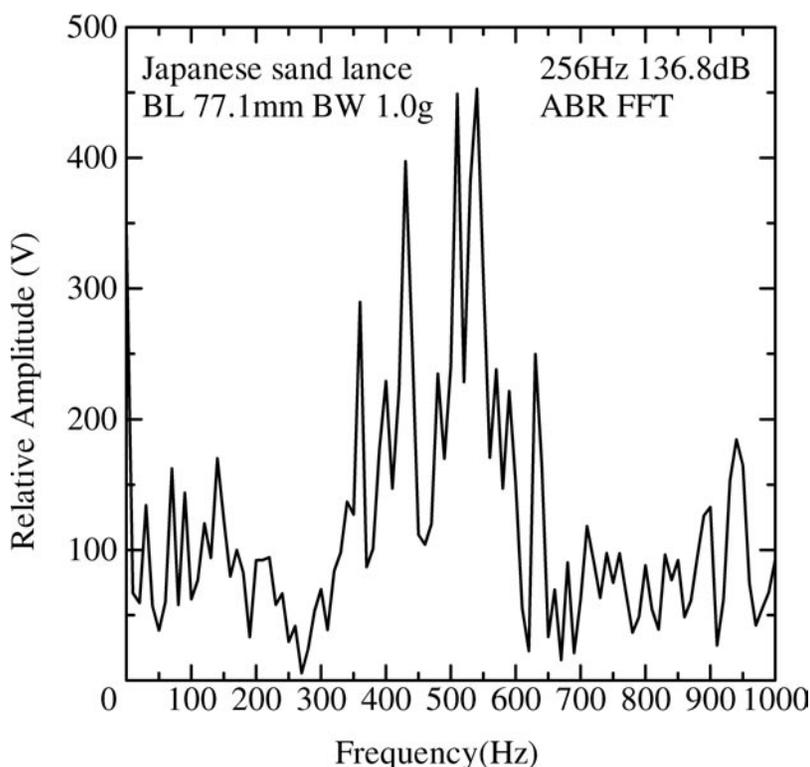


Fig. 4-1-5. Fourier transforms of ABR waveform for Japanese sand lance to 256 Hz stimulus.

Stimulus 256Hz, 136.8dB

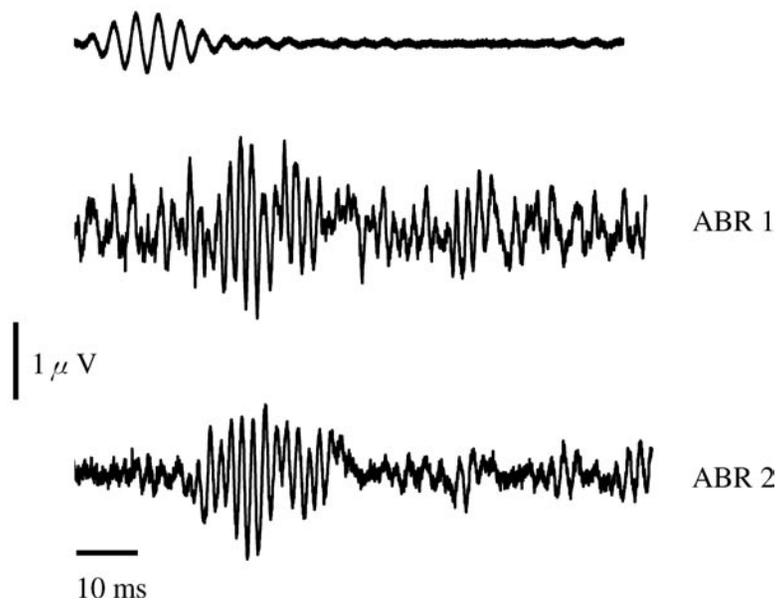


Fig. 4-1-6. Two ABR wave to stimulus 256 Hz, 136.8 dB. Kendall correlation coefficient $\tau = 0.580$.

Stimulus 362Hz, 135.3dB

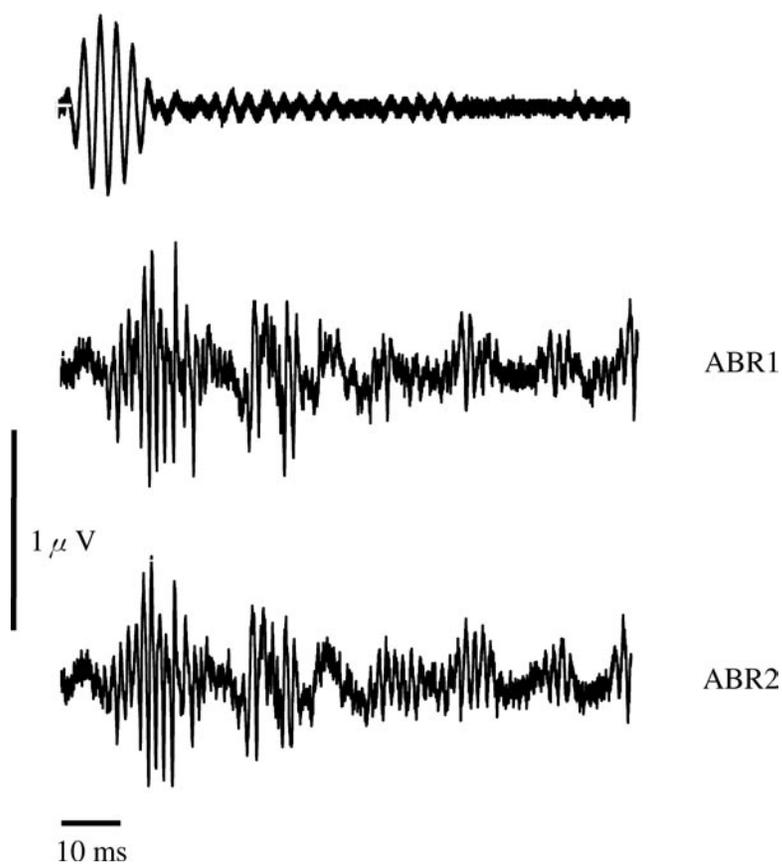


Fig. 4-1-7. Two ABR wave to stimulus 362 Hz, 135.3 dB. Kendall correlation coefficient $\tau = 0.777$.

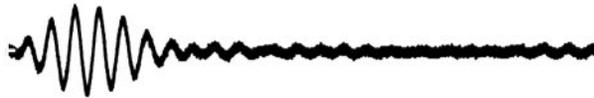
Table 4-1-2. Sound pressure of ABR experiment for calculating Kendall correlation coefficient.

No.	Sound pressure (dB)				
	frequency (Hz)				
	128	181	256	362	512
D8	122.6	—	134.9	135.3	—
D9	122.6	128.1	131.8	135.3	133.2
D10	122.6	128.1	136.8	135.3	133.2
D11	122.7	128.1	—	135.3	143.5
D12	—	—	136.8	—	—
D13	122.6	128.1	136.8	135.3	133.2

Table 4-1-3. Kendall correlation coefficient τ

No.	frequency (Hz) / sound pressure (dB)								
	128/122.6	128/127.7	181/128.1	256/131.8	256/134.9	256/136.8	362/135.3	512/133.2	512/143.5
D8	0.266	—	—	—	0.537	—	0.779	—	—
D9	0.649	—	0.762	0.307	—	—	-0.309	0.495	—
D10	0.411	—	0.841	—	—	0.580	0.696	0.219	—
D11	—	0.428	0.828	—	—	—	0.421	—	0.195
D12	—	—	—	—	—	0.329	—	—	—
D13	0.709	—	0.439	—	—	0.593	0.777	0.211	—

Stimulus 256Hz, 136.8dB



living fish



1 μ V

10ms dead fish



Fig. 4-1-8. Response of living fish and dead fish (D13)

Table 4-1-4. Auditory threshold (dB re 1 μ Pa) of Japanese sand lance. (water tank 34×20×24.5 cm)

No.	Auditory threshold (dB re 1 μ Pa)				
	frequency (Hz)				
	128	181	256	362	512
D1	115.4	120.0	114.5	119.2	131.3
D2	—	124.5	119.1	—	—
D3	115.4	115.4	120.6	125.2	131.3
D4	111.2	113.9	119.1	124.2	127.7
D5	116.8	121.5	111.5	122.2	131.3
D6	119.7	124.5	120.6	127.0	131.3
D7	118.2	124.5	119.1	—	—
Mean	116.5	121.5	118.3	124.0	130.7
SD	2.93	4.45	3.45	2.99	1.61

Table 4-1-5. Auditory threshold (dB re 1 μ Pa) of Japanese sand lance. (water tank 41×28.5×4.5 cm)

No.	Auditory threshold (dB re 1 μ Pa)				
	frequency (Hz)				
	128	181	256	362	512
D8	120.1	115.1	119.6	126.4	—
D9	116.1	105.4	119.6	120.9	131.4
D10	120.1	115.1	122.7	128.3	133.2
D11	125.2	118.4	118.0	131.9	141.8
D12	—	—	128.8	—	—
D13	107.2	102.2	127.3	117.2	128.0
Mean	119.5	113.2	123.7	126.4	135.2
SD	6.72	7.02	4.46	5.88	5.88

4-1-4 考察

同一音に対して2回記録した反応波形間のケンドールの相関係数 r は23例中、4例を除いて全て聴性誘発反応が生じている証拠の基準とされる0.3以上 (Yan *et al.*, 2000) となった。この結果から聴性誘発反応の測定ではほぼ安定した応答を測定できていると考えられる。聴性誘発反応が刺激音周波数の2倍の周波数成分をもっていたことは、同様にニシン科魚類の聴性誘発反応 (Mann *et al.*, 2001) でも計測されていることから、魚類の聴性反応の特徴の一つであると考えられる。

周波数128～512 Hzの範囲では256 Hz以下の周波数範囲が比較的感度が良いが、362 Hzや512 Hzの高周波数になると閾値がやや高くなる傾向がある。512 Hzでは反応に2倍の周波数成分が含まれなくなった。2倍の周波数成分が含まれなくなると周波数弁別ができなくなるという報告 (安楽, 1998) もあり、また音圧を上げて相関係数が0.3以下となったことから、計測周波数範囲では512 Hzが最も感知能力の悪い周波数であったと考えられる。

イカナゴ稚魚の聴覚閾値は128～362 Hzで約120 dBとなり、第3章で求めたキンギョの聴覚閾

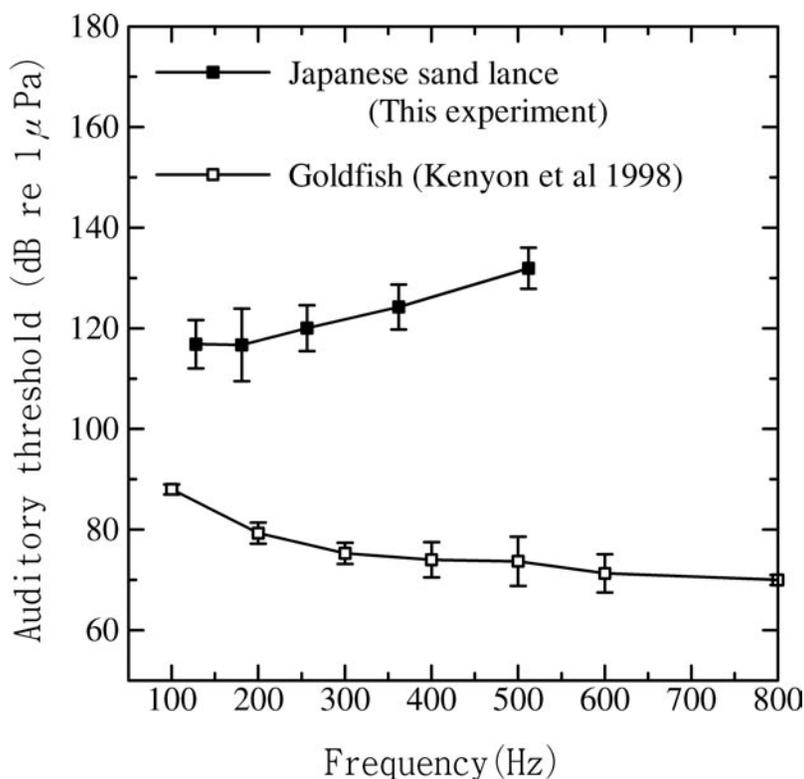


Fig. 4-1-9. Audiograms for each frequency of Japanese sand lance.

値より高くなった。キンギョは骨鰾魚であり、鰾と内耳とがウェーバー小骨で連結されている。そのため、聴覚感度が良いことが知られている (Ladich and Wysocki, 2003) のに対し、イカナゴはこのような聴覚補助器官と考えられている鰾を有していない (Yamashita *et al.*, 1985) ため、聴覚閾値が高くなったと考えられる。

海に生息する魚類が実際に聴くことのできる音の大きさは、実験室で騒音が極力排除された静かな環境で求められた聴覚閾値とは異なり、周辺の雑音に影響されるマスキング現象が生じる。この時の臨界比は20～30 dB (Chapman, 1973) とされている。海での環境雑音は海域によって異なることが考えられるが、静寂時では周波数100 Hz～1 kHzで約110 dB以上であるとの報告 (Wenz, 1962) があり、これを参考にするとイカナゴ稚魚が実際に聴くことのできる音圧は周波数約100 Hz～500 Hzで約130 dB以上となる。音源から約100 m離れた距離で漁船により発せられる騒音の周波数は100～500 Hzで音圧は127～146 dBであることが知られている (Hatakeyama, *et al.*, 1997)。これらのことからイカナゴ稚魚はこのような漁船からの騒音を感知していると考えられる。

魚の聴覚閾値は認識できる周波数と音圧を示しているが魚が音刺激に対して反応行動を示すかどうかは別に考える必要がある。行動観察では、カタクチイワシ *Engraulis japonicus* 700尾を海中に沈めた生簀に収容して100～700 Hzの音を放音したときの反応行動が報告されている (Akamatsu *et al.*, 1996)。この結果ではカタクチイワシを吃驚させて反応行動を起こす音は一番感度のよい300 Hzでも146.8 dBと一般に求められている魚類の聴覚閾値より高くなっている。このような行動実験をイカナゴ稚魚について行い、聴覚閾値と行動との関連についても調べる必要がある。

4-2 マイワシの超音波の聴覚計測

近年、魚類の資源量推定には魚群探知器が用いられるようになってきている (和田, 1994)。これに伴って魚群探知器から発せられる超音波の魚類への影響の有無も検討され始めている (Astrup and Mohl, 1993)。もし漁船や魚群探知器から発せられる騒音や超音波に反応して魚が逃避行動を起こしているとすると資源量推定が過小に評価される可能性が考えられる。魚類が魚群探知器の超音波を感知可能であれば、魚群探知器に使われている超音波の周波数の改善等が

必要になる可能性もある。

超音波感受性に関してはニシン科魚類の一部 (Mann *et al.*, 2001) とタイセイヨウタラ *Gadus morhua* (Astrup and Mohl, 1993) で、その感知が報告されている。ニシン科魚類ではアメリカンシャド *Alosa sapidissima* やガルフメンハーデン *Brevoortia patronus* 等のシャド亜科 *Alosinae* に属する魚種のみで超音波を感知できるのではないかと推測されている (Mann *et al.*, 2001; Higgs *et al.*, 2004)。ニシン科魚類が超音波を感知するメカニズムは最近の報告で少しずつ解明されてきている Higgs (2004)。ニシン科魚類は喉鰾類と呼ばれ、他の魚とは異なる独特の聴覚器官を持っている。内耳と隣接して聴胞器 (otic bulla) と呼ばれるガスで満ちた器官が存在し、鰾と連結しているため内耳の聴覚感度を向上させていることが知られている (川村, 安樂, 1998)。Blueback herring *Alosa aestivalis* では聴胞器の直径が2.1 mm, 共振周波数が120 -130 kHzである (Nestler *et al.*, 1992) ことが知られているが、超音波が感知できる種とそうでない種とで、この器官にある通囊の構造、形態に違いが見られることが指摘されている Higgs (2004)。一方タイセイヨウタラ *Gadus morhua* でも超音波 (38 kHz, 194.4 dB) を感知できることが報告されている (Astrup and Mohl, 1993) が、受容器に関しては鰾なのか側線なのか、別の器官なのか明らかではない (Astrup, 1999)。このように一部の魚種の超音波感受性が解ってきているが、超音波を感知できる魚種

と、その受容器の部位と種類に関しては未だ解明されていない。

イルカ類はエコーロケーションによる被食魚の探索を行う水棲動物である。したがってイルカ類に捕食される魚種では、同様に超音波を感知できるように機能が進化しても良いはずである。そこでカマイルカ *Lagenorhynchus obliquidens* に捕食されることが知られており (岩崎俊秀, 1996), 水産有用魚種であり、比較的入手が容易なマイワシ *Sardinops melanostictus* を実験対象として、その超音波の感知能力の有無を、聴性誘発反応法を用いて確かめることを試みた。

4-2-1 供試魚

実験には千葉県銚子市の近海で巻網によって漁獲された尾叉長13.8 cm ~16.4 cm のマイワシ *Sardinops melanostictus* 8尾を使用した。実験魚の尾叉長を Table 4-2-1に、写真を Fig. 4-2-1に示す。マイワシは300 Hz ~2 kHz の範囲の音を感知でき、特に1 kHz の音に感度がよいことが報告されている (Akamatsu *et al.*, 2003)。また航空機により発生する水中音を録音し、湾内の生簀に収容されたマイワシに放音すると145 dB 位から反応し始め、155 dB ではかなり顕著な逃避行動を示したことも報告されている (Hatakeyama *et al.*, 1997)。このようにマイワシでは約200 Hz ~2 kHz の可聴周波数範囲における船舶や航空機による水中騒音が及ぼす影響が検討されてきている。

Table 4-2-1. Total length of fish

No.	TL (cm)
E1	15.1
E2	16.4
E3	15.8
E4	13.9
E5	15.3
E6	16.2
E7	16.1
E8	15.9
Mean	15.9
SD	0.83



Fig. 4-2-1. Spot-lined sardine *Sardinops melanostictus*

4-2-2 実験装置および方法

マイワシは実験水槽内で固定すると4時間以上生存することがなかったという報告 (Akamatsu *et al.*, 2003) があるため、測定は4時間以内に終わらせる必要がある。心電図法では手術や、音と電気ショックによる条件付けを行う必要があるため、他魚種を用いた計測では一般的に4時間以上要することが知られている。一方、既存の聴性誘発反応を使った低周波に対するマイワシの聴覚計測では4時間以内に計測が終了できることが報告されており、この方法を用いることができる (Akamatsu *et al.*, 2003)。

実験装置の概略図を Fig. 4-2-2 に示す。イカナゴと同様な方法で海水を入れた方形ガラス水槽 (34.0×24.0×24.5 cm) に供試魚を固定した。電極の挿入、装着は第2章に示した方法と同様に行った。

超音波には40 kHz, 60 kHz, 80 kHz, 100 kHz を使用した。超音波はマルチファンクションシンセサイザー (NF1930A, エヌエフ回路設計ブロック) と任意波形発生装置 (Analogic 2020, Teknet electronics) を用いて発生させ、持続時間20 ms とし、ハニング窓関数を掛けて、減衰器 (Kenwood RA920A, Kenwood) で音圧レベルを調節しながらオーディオアンプ (Pioneer A-C3, Pioneer Electronics) で増幅した後、ハイドロホン (B&K8103, Bruel & Kjaer) から100 ms 間隔で連続的に放音した。ハイドロホンはマイワシから16 cm 水平方向に離し、水面から10 cm 沈めた位置に設置した。超音波の音圧レベルはハイドロホン (B&K8103, Bruel & Kjaer) をマイワシの頭部位置の水中に設置して計測した。ハイドロホンで受波した音圧はチャージ増幅器 (B&K2692, Bruel & Kjaer) を使って増幅し、オシロスコープ (LC334M,

LeCroy) に記録した。放音波は同位相でのみ繰り返し放音すると誘発電位導出の際に放音信号の影響を受けるため、様々に位相を変えた。

超音波が感知可能かどうかの判定は過去にニシン科魚類で聴性誘発反応を計測し、超音波が感知できていることを示した先行研究の文献 (Mann *et al.*, 2001) を参考にし、基本的には計測した反応の振幅と波形の特徴から判断した。またマイワシの感受性の良い周波数帯である1.024 kHz の音 (Akamatsu *et al.*, 2003) に対する聴性誘発反応波形と超音波に対する反応波形との比較でも反応の有無を検討した。1.024 kHz 音はオーディオソフト (Cool Edit 2000, フリーソフト) を使って5波長分のトーンバースト音を作り、同ソフトの機能を使って刺激波形の反応波形に対する影響を除去するために交互に位相を180° 反転させて200 ms 間隔で連続的に放音した。各周波数の音を聴かせて得られた波形が常に刺激音に対する応答となっているかを確かめるために同一音刺激に対して2回記録した波形でケンドールの相関係数 τ を求めた。超音波に対しては E5 と E6 の2尾の供試個体で、100 kHz (音圧194.1 dB) の音刺激を聴かせたときに2回記録した波形 (0.02秒間) を用いて検証した。同様に1.024 kHz (音圧128.2 dB) の音刺激に対しても E5 と E6 の2尾の供試個体で、反応波形 (0.005秒間) の τ を求めた。

4-2-3 実験結果

Fig. 4-2-3, Fig. 4-2-4 に E5 に超音波 (40 kHz, 60 kHz, 80 kHz, 100 kHz) を放音し計測した波形を示す。アメリカンシャド *Alosa sapidissima* では40 kHz (145 dB) の刺激音で約 $5 \mu\text{V}$ の振幅, 60 kHz (145 dB) の刺激音で約 $3.5 \mu\text{V}$ の振幅, 80 kHz (145 dB)

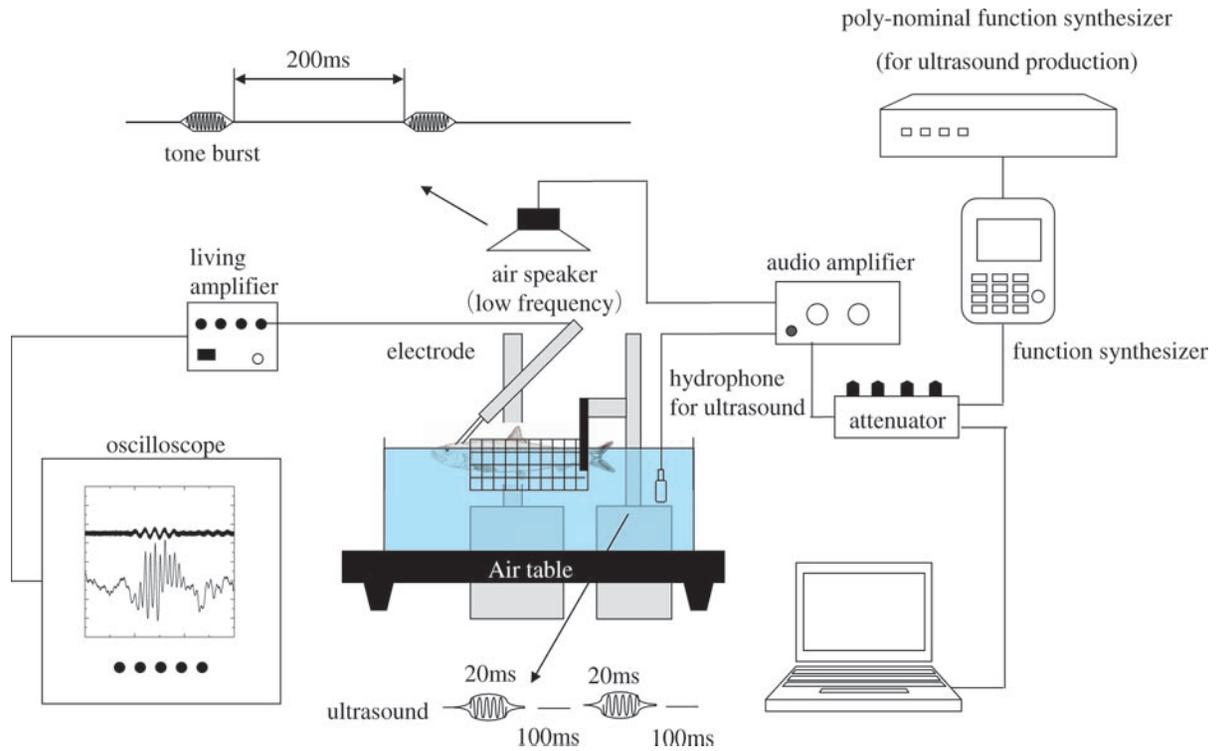


Fig. 4-2-2. Schematic diagram of the ABR recording setup.

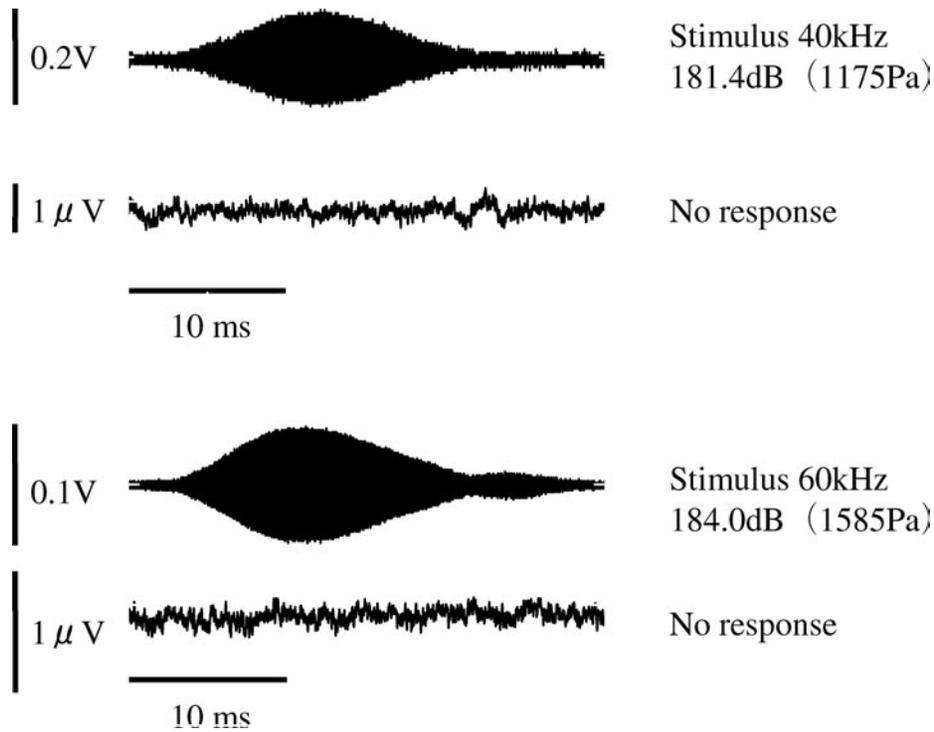


Fig. 4-2-3. No response wave to 40 kHz and 60 kHz sound stimulus (E5).

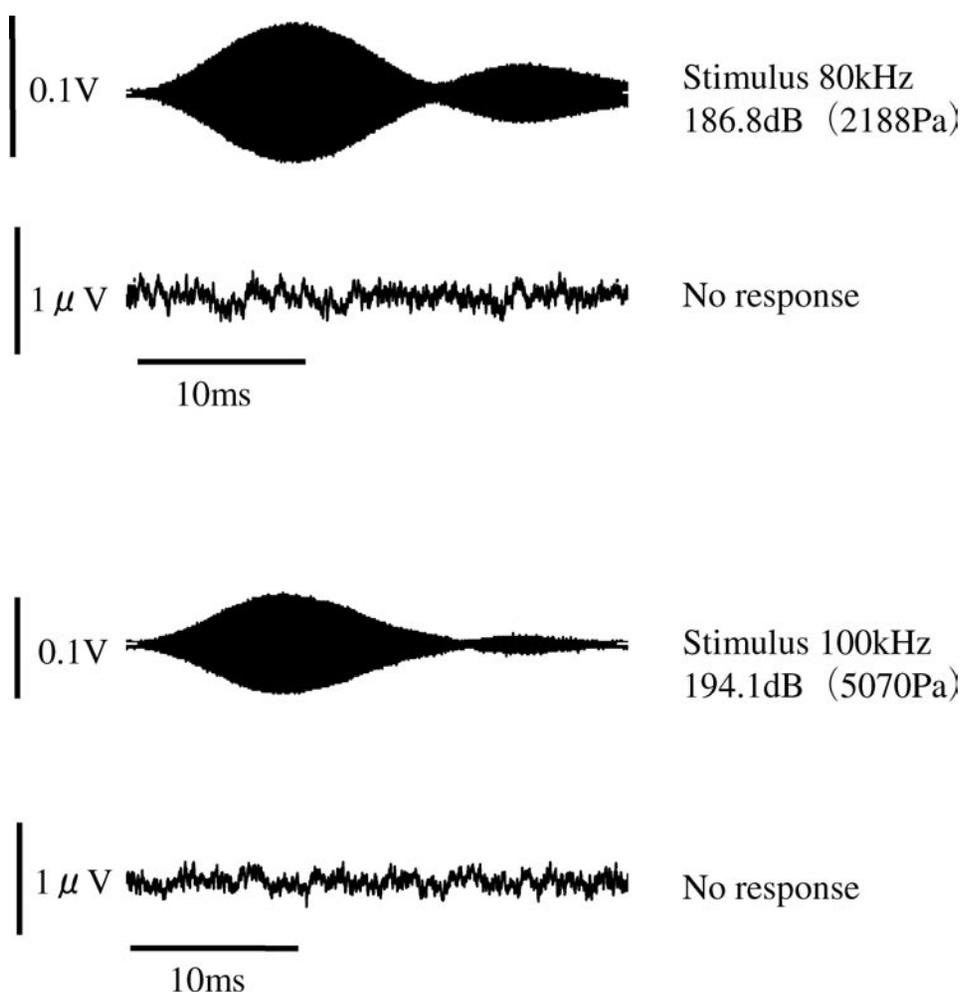


Fig. 4-2-4. No response wave to 80 kHz and 100 kHz sound stimulus (E5).

の刺激音で約 $2 \mu\text{V}$ の振幅のはっきりとした Fig. 4-2-5 に示すような V 字型 (約 10 ms 間) の反応波形が記録されることが報告されている (Mann *et al.*, 2001)。しかし本研究で超音波を聴かせて計測した波形の振幅 ($0.125 \sim 0.75 \mu\text{V}$) は先行研究で計測された波形の振幅 (約 $2 \sim 5 \mu\text{V}$) よりも小さく、反応らしき波形振幅は観られなかった。Fig. 4-2-6 に E6 に 100 kHz, 194.1 dB の音刺激と 1.024 kHz, 128.2 dB の音刺激で同一個体で同一音に対し 2 回計測した波形を示す。100 kHz の音で記録したケンドールの相関係数 τ は E5 で $\tau = 0.00$, E6 で $\tau = 0.21$ となり、反応有りの基準 (Yan *et al.*, 2000) とされる 0.3 以下であった。

1.024 kHz の音を聴かせたときの典型的な反応波形は反応の始めに基線が負へ移動した後、正へ移動していた。反応振幅は最大で約 $0.62 \sim 1.75 \mu\text{V}$ の範囲にあ

った。反応波形の周波数成分はアメリカンシャド等のニシン科魚類で 600 Hz の刺激音への反応波形の特徴として刺激音周波数の 2 倍の周波数成分を持っていることが報告されているが、本研究でも刺激音の 2 倍の周波数成分である約 2 kHz の周波数成分を持つ反応波形が得られた。E5 と E6 の 2 尾で求めた τ (Fig. 4-2-6) は、E5 で $\tau = 0.69$, E6 で $\tau = 0.55$ となり、反応の基準とされる 0.3 以上であった。

4-2-4 考察

反応波形の振幅は先行研究 (Mann *et al.*, 2001) により超音波が聴こえる魚種で計測されている反応波形の振幅よりも小さく、反応らしき波形振幅はみられなかった。また先行研究での超音波が感知できる魚種の反応波形にははっきりとした下に凸の V 字型の特徴 (Mann *et al.*, 2001) が見られるが、本研究で

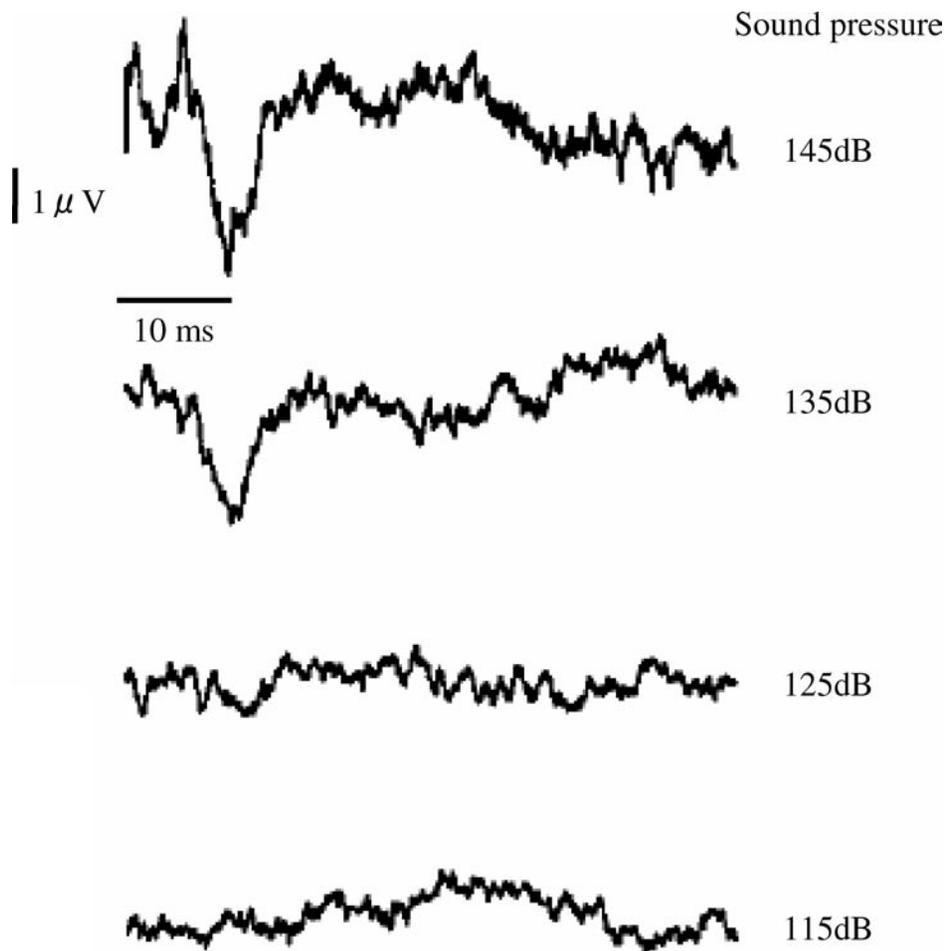


Fig. 4-2-5. ABR to 40 kHz stimulus measured from American Shad (D.A.Mann *et al* 2001).

はこのような特徴も見られなかった。また100 kHzでの記録波形でしか求めてないが、ケンドールの相関係数 r は反応有の基準とされる0.3以下となった (Fig. 4-2-6)。このようなことからマイワシは40 kHz, 60 kHz, 80 kHz, 100 kHzの超音波を音圧約180~190 dBの範囲で感知していないと考えられる。

先行研究で得られたニシン科魚類のベイアンチョビー *Anchoa mitchilli* (Mann *et al.*, 2001) の反応波形 (音刺激600 Hz, 130 dB) と本研究での1.024 kHz (128.2 dB) の刺激音の反応波形を比較すると反応波形の周波数成分に刺激周波数の2倍周波数があることや音刺激の継続時間に対応していること、反応波形の基線の変動も同じであること等、ほぼ同じような波形の特徴を示していた。超音波が聴こえるガルフメンハーデン *Brevoortia patronus* (Mann *et al.*, 2001) の反

応波形 (音刺激600 Hz, 120 dB) とも反応開始時の振動方向の極性は反対であったが、全体的に似た特徴を持っていた。これには魚種によって反応波形の極性が様々である (Wysocki and Ladich, 2002) こと等が考えられる。

アメリカンシャドやガルフメンハーデン等のニシン科シャド亜科に属する魚は Fig. 4-2-7に示すように超音波を聴くことができることが解ってきている (Mann, *et al.*, 2001; Nestler *et al.*, 1992; Ross *et al.*, 1993)。マイワシについては本研究で用いた超音波を感知することはできなかったという結果になったが、他のニシン科魚類での計測例があることから、さらに実験個体を増やしたり、周波数、音圧を変化させた実験をすることが必要である。

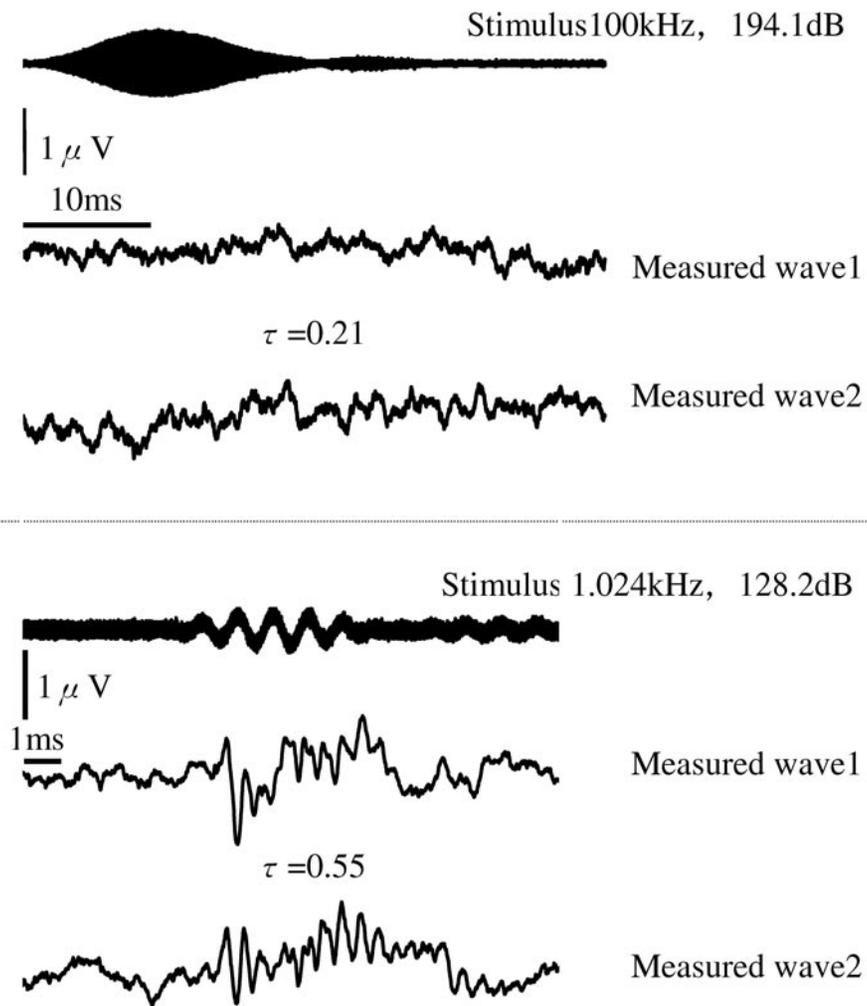


Fig. 4-2-6. Two ABR wave to stimulus 100 kHz, 194.1 dB and 1.024 kHz, 128.2 dB. Kendall correlation coefficient $\tau = 0.21$, stimulus 100 kHz, $\tau = 0.55$, stimulus 1 kHz (E6).

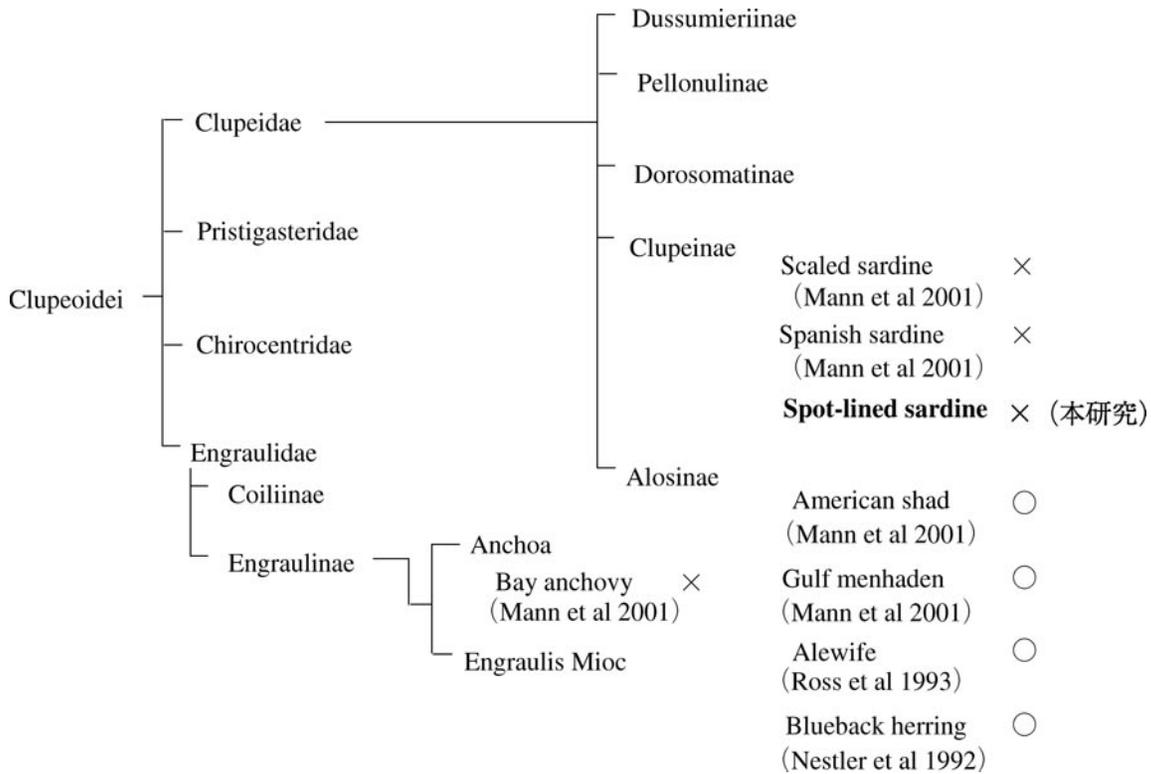


Fig. 4-2-7. A part of dendrogram of clupeiforms.
 ○ shows the sub family or genus that is sensitive to ultrasound.
 × shows the sub family or genus that is not sensitive to ultrasound.

第5章 総合考察

聴性誘発反応法と心電図法の比較

本研究では魚類の聴覚閾値を求める方法として聴性誘発反応法に注目し、この方法の改良と応用を試み、キングョ、イカナゴ、マイワシの聴覚特性を計測した。

本研究で用いた聴性誘発反応法は頭頂部に軽く電極をのせるのみで反応が得られ、手術が不必要、同一個体を繰り返し使える、稚魚の計測も可能といわれている (Kenyon *et al.*, 1998)。心電図法のような条件付けも必要としないため、時間もかからない。聴性誘発反応法を使ってマイワシの聴覚を計測した報告 (Akamatsu *et al.*, 2003) では4時間以内に計測が終わり、本研究でもほぼ同じ時間で計測を終了している。このような長所があるため比較的短時間で実験を終わらせる必要のある魚種では有効な方法であることがわかる。国内ではマイワシ等の長時間の実験に

耐えることのできないイワシ類は他にもいるため、そのような条件がある魚種の実験には聴性誘発反応法は有効であると考えられる。また、2つの電極をのせるだけで測定が可能であり、イカナゴのように頭部の電極を刺込む範囲の直径が数 mm の小型の魚の聴覚計測にも適用できる。

イカナゴは重要魚種でありながら今まで聴覚特性が計測されてこなかったが、聴性誘発反応法を使うことで手術の影響もなく、比較的容易に聴覚特性が計測できた。マイワシの超音波に対する聴覚特性はこれまで計測されたことはなく、本研究の結果では超音波を感知していないと考えられたが、他のニシン科の魚類についても調査し、資源量調査に使用されている魚群探知器の周波数との関連についても明らかにする必要がある。

聴性誘発反応法の課題

第2章で刺激音1 kHz の持続時間を1, 5, 10,

20 ms と変えたときの反応を計測した。持続時間が 1 ms のときは反応波形に明確な特徴は表れず, 5, 10, 20 ms のときは明確に刺激周波数である 1 kHz の 2 倍の周波数成分を含んだ反応波形が計測できた。Kenyon (1998) の報告によると刺激周波数によって聴性誘発反応を確実に収録するための刺激音の持続時間 (刺激音の波の数) が異なり, 100~300 Hz では 2 波長分の刺激音, 400 Hz ~ 2 kHz では 5 波長, 3 k ~ 5 kHz では 8 波長であることがわかっている。本研究の結果もこの報告を支持しており, 聴性誘発反応法では刺激時間の設定も重要な項目であることがわかる。また各周波数の最適な刺激音の持続時間は, より短い方がよいことも報告されている。

聴性誘発反応法等の聴覚閾値の計測方法で課題となっていることの 1 つに聴覚閾値の決定方法がある。従来の研究 (Kenyon *et al.*, 1998) でも本研究でも実験者が反応波形を観察しながら主観的に反応の有無を判定している。このため経験の有無や回数によって閾値の決定に差が生じることも考えられ, 客観的な聴覚閾値決定の方法を導入する必要がある。例えば反応のある音圧から計測し始めて, 反応があったら計測し終わったら自動的に次の音圧を下げた状態での計測を実行し, 反応がある間は計測を継続し, ノイズに埋もれたときの音圧 (閾値) を自動的に導き出せるシステムが考えられる。この場合, 1 回の計測毎に第 3 章で求めたような反応振幅とノイズ振幅の比 (S/EN 比) を計算し, S/EN 比が 1 となる直前の音圧を聴覚閾値とするなどの聴覚閾値自動計算アプリケーションソフトを作る必要もある。また, 聴性誘発反応は刺激音周波数の 2 倍の周波数成分を含んだ反応が得られることが知られている (Mann *et al.*, 2001)。従って 1 回の計測毎に反応波形の FFT 解析を行い, 2 倍の周波数成分のスペクトルレベルがある値を超えて含まれていたら反応有とし, 含まれていなければ反応無しとする方法でも客観的な計測になると思われる。または第 4 章で求めているように同一刺激音に対する 2 つの反応波形間でケンドールの相関係数 τ を求め, $\tau = 0.3$ 以上を反応有りとすることで客観的に計測可能であろう。さらに, 各魚種で周波数毎に第 3 章で示したような反応振幅と音圧の関係を回帰直線で表し, ノイズ振幅の直線との交点を聴覚閾値とするなどの手段も考えられる。

聴覚能力指数

魚類の聴覚能力は次式の聴覚能力指数 (HI) (Schellart and Popper, 1992) で表すことができる。

$$HI = \left(\frac{f_b}{Q_{10\text{dB}}} \right)^{0.5} \times 10^{\left(\frac{S_{fb}}{20} \right)}$$

$$Q_{10\text{dB}} = \frac{fb}{f_2 - f_1} \quad (5-1)$$

fb : 最高感度周波数 (Hz) ,
 S_{fb} : 最小音圧閾値 (dBre $1 \mu \text{ bar}$) ,
 f_1 : S_{fb} より 10dB 大きい閾値となる低い方の周波数,
 f_2 : S_{fb} より 10dB 大きい閾値となる高い方の周波数

この HI は受信バンド幅が広く, 最小音圧閾値 S_{fb} が小さいほど大きな値をとる。このため HI が大きな魚ほど広帯域の音が聞こえ, 小さい音まで聞こえることになる。HI の数値がかなり高い魚種をみるとキンメダイ目イトウダイ科のクロオビマツカサ *Myripristis kuntzei* では受信バンド幅 ($f_2 - f_1$) が 2,000 Hz, 閾値 S_{fb} が -50 dBre $1 \mu \text{ bar}$ (50 dBre $1 \mu \text{ Pa}$) で HI=14,000, ナマズ目ハマギギ科の魚 *Arius felis* では $f_2 - f_1$ が約 286 Hz, S_{fb} が -55 dBre $1 \mu \text{ bar}$ (45 dBre $1 \mu \text{ Pa}$) で HI=9,500 となっている。HI の数値がかなり低い魚種をみるとスズキ亜目ペルカ科のラフ *Gymnocephalus cernuus* では $f_2 - f_1$ が約 179 Hz, S_{fb} が 12 dBre $1 \mu \text{ bar}$ (112 dBre $1 \mu \text{ Pa}$) で HI=3.4, ネコザメ科のホーンシャーク *Heterodontus francisci* では $f_2 - f_1$ が約 19 Hz, S_{fb} が 17 dBre $1 \mu \text{ bar}$ (117 dBre $1 \mu \text{ Pa}$) で HI=0.61, となっており, 例外を除いて HI<10 の魚種は音を利用していない。聴覚が優れている骨鰈魚 (コイ目, カラシン目, ナマズ目) の HI は 2,600 ~ 9,800 の範囲に分布している。鰈や内耳の近傍に気泡を持つ魚種と持たない魚種の合わせて 40 魚種で求められている S_{fb} , f_b に関して, f_b が高いと S_{fb} が小さく, f_b が 10 倍になると S_{fb} が約 20 dB 減少し, 骨鰈魚等はそうでない魚種と比べて f_b が高く, S_{fb} が小さく, 底魚は浮魚に比べ f_b が低い傾向にあると説明されている (Schellart and Popper, 1992)。

本研究で聴覚閾値を求めた魚種の HI を Table 5-1 に示す。本研究の第 3 章で求めたキンギョ (水中, $fb=500$ Hz, $f_1=1,000$ Hz, $f_2=250$ Hz, $S_{fb}=-17.08$ dBre $1 \mu \text{ bar}$ (82.9 dBre $1 \mu \text{ Pa}$)) の HI は HI=195.6 となり, 骨鰈魚にしては小さい指数になった。本研究のキンギョの S_{fb} は -17.08 dB re $1 \mu \text{ bar}$ (82.9 dBre $1 \mu \text{ Pa}$) であったが S_{fb} が約 10 dB 良くなる ($S_{fb} = -30$ dBre $1 \mu \text{ bar}$ (70 dBre $1 \mu \text{ Pa}$)) と HI=866.0 となり, 20 dB 良くなる ($S_{fb} = -40$ dBre $1 \mu \text{ bar}$ (60 dBre $1 \mu \text{ Pa}$)) と HI=2,738.6 となる。HI が低くなった原因は第 3 章で述べたように水温の影響が考えられる。

Table 5-1. Auditory characteristics of 3 fish species in this experiment

Fish species	f_b (Hz)	S_{fb} (dB)	f_1 (Hz)	f_2 (Hz)	HI
Goldfish	500	-17.1	250	1000	195.6
Japanese sand lance	181	13.3	100	400	3.8
Marbled sole	160	5.5	100	200	5.3

聴覚特性と生態との関連

実験で使った各魚種の聴覚閾値を使って、聴覚能力指数 HI を計算するとイカナゴ ($f_b=181$ Hz, $f_1=400$ Hz, $f_2=100$, $S_{fb}=13.26$), マコガレイ ($f_b=160$ Hz, $f_1=200$ Hz, $f_2=100$, $S_{fb}=5.58$) の HI はそれぞれ, HI=3.76 (イカナゴ), HI=5.26 (マコガレイ) となった (Table 5-1)。イカナゴとマコガレイの HI は HI<10 となり、音を利用していない部類の魚種になると思われる。聴覚閾値曲線もキンギョと比較して高くなっている。イカナゴは夏期には海水温が約 20℃ 以上になると砂の中に潜って動かなくなる (夏眠) 行動をすることが知られている (柳橋, 船越, 1997)。夏眠中のイカナゴは摂餌をせず、夏眠中に成熟する。イカナゴが夏眠という特異な生態をもつに至った理由は代謝上の問題と食害による減耗回避という再生産上の問題が考えられている (柳橋, 船越, 1997)。このような環境では聴覚は余り必要ではなくイカナゴは夏眠行動で砂中に潜るようになって、聴覚を利用しなくなったとも考えられる。マコガレイも潜砂行動をすることから、稚魚では潜砂能力の試験が行われている (Tanda, 1990)。ツノガレイ *Pleuronectes platessa* の稚魚では砂に潜ることでボラック *Pollachius pollachius* からの捕食を回避できるとの報告がある (Ansell and Gibson, 1993)。マコガレイもイカナゴ同様、潜砂行動をすることで聴覚を利用しなくなったことが考えられる。骨鰈魚であるキンギョは淡水で生活している。キンギョの聴覚閾値が低く、敏感な周波数範囲が広い理由はヒトでもいわれるように淡水の方が海水より静かであること、淡水は音が減衰しないで良く伝わること等が考えられる (Ladich, 1999)。

イカナゴ、マコガレイの聴覚は 1 kHz 以下の周波数の音に感度が良く、遠方の音も感知していることが解った。しかし音を感知していることとそれに応じて行動を起こすこととは直接結びつくとは限らない。危険が近づいていると解るような捕食生物の遊泳音や、餌の所在が解るような音、繁殖と関係のある音では生物に備わった反射行動を起こすと考えられるが、それ以外

の音への反応は定まっていないと考えられる。また何回か漁船に遭遇することで漁船の音を学習して逃避行動を起こすようになる可能性も考えられる。このように音は魚類の行動と密接に係わっており、魚類の聴覚特性を知ることで反応行動を解析し、行動を制御する方法を見出すことも可能となる。

魚類の生棲する環境には様々な音が存在しており聴覚閾値の最も低い周波数とその魚種にとってどのような利点があるのか、どのような周波数を人間が利用可能か等、解明すべき点は多くある。このためには幼稚魚からマグロ等の高速遊泳魚まで広い範囲の魚種の聴覚特性の計測が必要であり、聴性誘発反応法は現在用いられている手法では最適である。したがって、電極の材質、寸法、取り付け方法を改善するとともに閾値判定をより客観的に判定できるシステムを確立することが必要となる。

謝 辞

本論文の作成にあたり御指導を賜った北海道大学大学院水産科学研究院行動資源計測学領域 平石智徳准教授に謝意を表す。主査をしていただいた北海道大学大学院水産科学研究院衛星資源計測学領域 齊藤誠一教授、副査をしていただいた同研究院音響資源計測学領域 飯田浩二教授に謝意を表す。北海道大学大学院 山本勝太郎名誉教授には実験の遂行に御協力頂いたことに感謝する。実験の御指導と貴重な御助言を賜った水産工学研究所赤松友成主任研究員、高尾芳三研究室長をはじめとする水産工学研究所の研究者、職員の方々に深く感謝する。また実験に御協力頂き、実験器具等に関する情報を提供して頂いた北海道大学院水産科学研究院 金成勳氏をはじめとする大学院生ならびに卒業生に感謝の意を表す。

文 献

- 1) 阿部晴子, 1976: 魚類聴覚の特性に関する基礎的研究. 東京大学大学院農学系研究科水産学博士論

- 文.
- 2) Akamatsu, T., Matsushita, Y., Hatakeyama, Y. and Inoue, Y., 1996 : Startle response level of Japanese anchovy *Engraulis japonicus* to underwater pure tone signals. *Fish. Sci.*, **62**, 648-649.
 - 3) Akamatsu, T., Nanami, A. and Yan, H. Y., 2003 : Spotlined sardine *Sardinops melanostictus* listens to 1-kHz sound by using its gas bladder. *Fish. Sci.*, **69**, 348-354.
 - 4) Anraku, K., Matsuda, M., Nakahara, M., Shigesato, N. and Kawamura, G., 1997 : Sound learned by red sea bream conditioned to intermittent 300 Hz sound. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **6**, 934-938.
 - 5) Anraku, K., Matsuda, M., Nakahara, M., Shigesato, N. and Kawamura, G., 1998 : Flounder show conditioned response to 200-800 Hz tone-bursts despite their conditioning to 300 Hz tone-burst. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **64**, 755-758.
 - 6) 安楽和彦, 1998 : コイ (*Cyprinus carpio*) の聴覚側線機能に関する電気生理学的研究. 北海道大学博士論文.
 - 7) Ansell, A. D. and Gibson, R. N., 1993 : The effect of sand and light on predation of juvenile plaice (*Pleuronectes platessa*) by fishes and crustaceans. *J. Fish. Biol.*, **43**, 837-845.
 - 8) Astrup, J. and Mohl, B., 1993 : Detection of intense ultrasound by the cod *GADUS MORHUA*. *J. Exp. Biol.*, **182**, 71-80.
 - 9) Astrup, J., 1999 : Ultrasound detection in fish - a parallel to the sonar - mediated detection of bats by ultrasound - sensitive insects?. *Comp. biochem. physiol. A.*, **124**, 19-27.
 - 10) Au, W. W. L., 1993 : The Sonar of Dolphins, Springer-Verlag, New York.
 - 11) Casper, B. M and Mann, D. A., 2007 : Dipole hearing measurements in elasmobranch fishes. *J. Exp. Biol.*, **210**, 75-81.
 - 12) Chapman, C. J., 1973 : Field studies of hearing in teleost fish. *Helgolander wiss Meeresunters.*, **24**, 371-390.
 - 13) Chapman, C. J. and Hawkins, A. D., 1973 : A field study of hearing in the cod, *Gadus morhua* L. *J. Comp. Physiol.*, **85**, 147-167.
 - 14) Chapman, C. J. and Sand, O., 1974 : Field studies of hearing in two species of flatfish *Pleuronectes Platessa* and *Limanda Limanda*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **47A**, 371-385.
 - 15) Corwin, J. T., 1981 : Audition in elasmobranches, in "Hearing and Sound Communication in Fish" (ed. by Tavolga, W. N., Popper, A. N. and Fay, R. R.), Springer Verlag, New York, Heidenberg, Berlin, pp. 81-105.
 - 16) デルコミン, 1999 : ニューロンの生物学 (小倉明彦, 富永恵子訳), 南江堂, 東京.
 - 17) Enger, S. A. and Mann, D. A., 2005 : Auditory sensitivity of sergeant major damselfish *Abudefduf saxatilis* from post-settlement juvenile to adult. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, **285**, 213-222.
 - 18) 藤枝 繁, 松野保久, 山中有一, 鄭 龍晋, 1994 : ゼロークロッキング法による魚群遊泳音の周期解析. 日水誌, **60**, 201-205.
 - 19) Funakoshi, S., 1998 : Studies on the mechanisms behind the species replacement between sardine and anchovy populations and the ecology of sand eel for the management of fishery resources. *Bull. Jpn. Soc. Fish. Oceanogr.*, **62**, 218-234.
 - 20) 船坂宗太郎, 2000 : 聴性脳幹反応とは. 必携聴性脳幹反応ガイドブック, (船坂宗太郎監修; 橋本勲, 矢野純編), メジカルビュー社, 東京, pp. 2-7.
 - 21) 古河太郎, 1977 : 聴覚, 「魚類生理」(川本信之編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 491-512.
 - 22) Harris, G. G., 1964 : Considerations on the physics of sound production by fishes, in "Marine Bio-Acoustics" (ed by Tavolga, W. N.), Vol. 1, Pergamon, Oxford, pp. 233-247.
 - 23) Hashimoto, H., 1984 : Population structure of the sandeel around Japan. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 1357-1365.
 - 24) Hatakeyama, Y., Inoue, Y., Takei, T., Sakaguchi, S., Fujii, K., Ikeda, A. and Kitagawa, T., 1997 : Effect of Underwater Sounds on Fish. *Japan. Fisheries Resource Conservation Ass.*, Tokyo, **47**, pp. 39-48.
 - 25) Hawkins, A. D. and Maclellan, D. N., 1975 : An acoustic tank for hearing studies on fish, "in Sound reception in fish", (ed by Schuijff, A and Hawkins, A. D.), Elsevier Scientific Pub. Co, Amsterdam New York, pp. 149-169.

- 26) Higgs, D. M., Plachta, D. T. T., Rollo, A. K., Singheiser, M., Hastings, M. C. and Popper, A. N., 2004 : Development ultrasound detection in American shad *Alosa sapidissima*. *J. Exp. Biol.*, **207**, 155-163.
- 27) 石居 進, 1975 : 生物統計学入門, 培風館, 東京.
- 28) Ishioka, H., Hatakeyama, Y. and Sakaguchi, S., 1988 : The hearing ability of the red sea bream *Pagrus major*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **54**, 947-951.
- 29) 板沢靖男, 1970 : 魚類生理, (川本信之編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 60-63.
- 30) 板沢靖男, 1991 : 魚類生理学, (板沢靖男, 羽生功編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 1-4.
- 31) 伊藤博信, 吉本正美, 1991 : 魚類生理学, 板沢靖男, 羽生 功編. 恒星社厚生閣, 東京, pp. 381-383.
- 32) 岩崎俊秀, 1996 : カマイルカ, 日本動物大百科哺乳類Ⅱ, (日高敏隆監修; 伊沢紘生, 粕谷俊雄, 川道武男編), 平凡社, 東京.
- 33) Jewett, D. L., Romano, M. N. and Williston, J. S., 1970 : Human auditory evoked potentials : possible brain stem components detected on the scalp. *Science.*, **167**, 1517-1518.
- 34) 加我君孝, 1987-1988 : 聴性脳幹反応の臨床応用. *Clinical Neuroscience.*, **5**, 883-892.
- 35) 加我君孝, 1998 : ヒトと動物の波形と起源. ABRハンドブック, (加我君孝編), 金原出版, 東京, pp. 9-13.
- 36) 川村軍蔵, 安樂和彦, 1998 : 魚類の聴側線器の構造と機能, 「魚類の聴覚生理」(添田秀男, 畠山良己, 川村軍蔵編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 1-62.
- 37) Kenyon, T. N., Ladich, F. and Yan, H. Y., 1998 : A comparative study of hearing ability in fishes : the auditory brainstem response approach. *J. Comp. Physiol.*, **182**, 307-318.
- 38) Kojima, T., Shimamura, T., Yoza, K., Okumoto, N., Hatakeyama, Y. and Soeda, H., 1992 : W-shaped auditory threshold curves of masu salmon *Onchorhynchus masou*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 1447-1452.
- 39) Kojima, T., Ito, H., Komada, T., Taniuch, T. and Akamatsu T., 2005 : Measurements of auditory sensitivity in common carp *Cyprinus carpio* by the auditory brainstem response technique and cardiac conditioning method. *Fish. Sci.*, **71**, 95-100.
- 40) Kudo, Y., Satou, M., Kitamura, S., Iwata, M. and Takeuchi, Y., 1997 : Underwater radio telemetry of electroencephalographic activity from the hime salmon, landlocked sockeye salmon *Onchorhynchus nerka*. *Fish. Sci.*, **63**, 687-691.
- 41) Ladich, F., 1999 : Did auditory sensitivity and vocalization evolve independently in otophysan fishes? *Brain. Behav. Evol.*, **53**, 288-304.
- 42) Ladich, F. and Yan, H. Y., 1998 : Correlation between auditory sensitivity and vocalization in anabantoid fishes. *J. Comp. Physiol. A.*, **182**, 737-746.
- 43) Ladich, F. and Wysocki, L. E., 2003 : How does tripus extirpation affect auditory sensitivity in goldfish?. *Hearing. Res.*, **182**, 119-129.
- 44) 李 遺元, 向井 徹, 飯田浩二, 2000 : スキャニングソナーを用いた船舶の接近に対する魚群行動の評価法. 日水誌, **66**, 825-832.
- 45) Lovell, J. M., Findlay, M. M., Nedwell, J. R. and Pegg, M. A., 2005 : The inner ear morphology and hearing abilities of the Paddlefish (*Polyodon spathula*) and the Lake Sturgeon (*Acipenser fulvescens*). *Comp. Biochem. Physiol. A.*, **142**, 286-296.
- 46) Lovell, J. M., Findlay, M. M., Nedwell, J. R. and Pegg, M. A., 2006 : The hearing abilities of the silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) and bighead carp (*Aristichthys nobilis*). *Comp. Biochem. Physiol. A.*, **143**, 286-291.
- 47) Lu, Z., Xu, Z. and Buchser, W. J., 2003 : Acoustic response properties of lagena nerve fibers in the sleeper goby, *Dormitator latifrons*. *J. Comp. Physiol. A.*, **189**, 889-905.
- 48) Lu, Z., Xu, Z. and Buchser, W. J., 2004 : Coding of acoustic particle motion by utricular fibers in the sleeper goby, *Dormitator latifrons*. *J. Comp. Physiol. A.*, **190**, 923-938.
- 49) Malene, S., Magnus, W., Fernando, U. and Lee, A. M., 2005 : Acoustic characteristics of underwater tail slaps used by Norwegian and Icelandic killer whales (*Orcinus orca*) to debilitate herring (*Clupea harengus*). *J. Exp. Biol.*, **208**, 2459-2466.
- 50) 間庭愛信, 1984 : 海中生物の鳴音の例と水中音に対する反応の実験と実用例. 月刊 海洋科学, **16**, 285-290.

- 51) Mann, D. A., Lu, Z. and Popper, A. N., 1997 : A clupeid fish can detect ultrasound. *Nature.*, **389**, 341.
- 52) Mann, D. A., Higgs, D. M., Tavalga, W. N., Souza, M. J. and Popper, A. N., 2001 : Ultrasound detection by clupeiform fishes. *J. Acoust. Soc. Am.*, **109**, 3048-3054.
- 53) Motomatsu, K., Hiraishi, T., Yamamoto, K. and Nashimoto, K., 1996 : Auditory threshold and critical ratio of black rock fish *Sebastes schlegeli*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **62**, 785-790.
- 54) 永島 宏, 2001 : 宮城県におけるイカナゴ漁業の全国位置と課題. 宮城県水産研究開発センター研究報告, **16**, 3-19.
- 55) Nestler, J. M., Ploskey, G. R. and Pickens, J., 1992 : Responses of blueback herring to high-frequency sound and implications for reducing entrainment at hydropower dams. *North Am. J. fish. Manage.*, **12**, 667-683.
- 56) 小田洋一, 2004 : 後脳に分節構造に基づいたニューロン回路の機能構築. 蛋白質 核酸 酵素, **49**, 486-492.
- 57) Parvulescu, A., 1966 : The acoustics of small tanks, in "Marine Bio Acoustics", (ed by Tavalga, W. N.), Vol. 2, Pergamon, Oxford, pp. 7-13.
- 58) Popper, A. N., 1972a : Auditory threshold in the goldfish (*Carassius auratus*) as a function of signal duration. *J. Acoust. Soc. Am.*, **52**, 596-602.
- 59) Popper, A. N., 1972b : Pure-tone auditory thresholds for the carp (*Cyprinus carpio*). *J. Acoust. Soc. Am.*, **52**, 1714-1717.
- 60) Ross, Q. E., Dunning, D. J., Thorne, R., Menezes, J. K., Tiller, G. W. and Watson, J. K., 1993 : Response of alewives to high-frequency sound at a power plant intake on Lake Ontario. *North Am. J. fish. Manage.*, **13**, 291-303.
- 61) 佐藤真彦, 上田一夫, 1984 : 魚類, 「実験生物学講座」(杉 晴夫, 平本幸男編), 丸善, 東京, pp. 299-312.
- 62) Sawa, M., 1976 : The audiogram of the goldfish determined by a heart rate conditioning method. *Bull. Fac. Fish. Hokkaido. Univ* (北海道大学水産学部研究彙報), **27**, 129-136.
- 63) Schellart, N. A. M and Popper, A. N., 1992 : Functional aspects of the evolution of the auditory system of actinopterygian fish, "in The Evolution Biology of Hearing" (ed by Webster, D. B. , Fay, R. R. and Popper, A. N.), Springer-Verlag, New York, Tokyo, pp. 295-322.
- 64) Scholik, A. R. and Yan, H. Y., 2002 : The effects of noise on the auditory sensitivity of the bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*. *Comp. Biochem. Physiol.*, **133A**, 43-52.
- 65) 関沢泰治, 1981 : 実験動物としての魚類, (江上信雄編), ソフトサイエンス社, 東京, pp. 174-188.
- 66) Shimozawa, T. and Kanou, M., 1984 : The aerodynamics and sensory physiology of range fractionation in the cercal filiform sensilla of the cricket *Gryllus bimaculatus*. *J. Comp. Physiol. A.*, **155**, 495-505.
- 67) 下澤楯夫, 加納正道, 1987 : 流れの感覚. 動物生理, **4**, 83-89.
- 68) Suga, T., Kawabe, R., Hiraishi, T and Nashimoto, K., 2004 : Sound pressure values in the audiogram of marbled sole *Pleuronectes yokohamae* measured in air. *Fish. Sci.*, **70**, 33-40.
- 69) Suga, T., Akamatsu, T., Sawada, K., Hashimoto, H., Kawabe, R., Hiraishi, T and Yamamoto, K., 2005 : Audiogram measurement based on the auditory brainstem response for juvenile Japanese sand lance *Ammodytes personatus*. *Fish. Sci.*, **71**, 287-292.
- 70) Suga, T., Akamatsu, T., Kawabe, R., Hiraishi, T and Yamamoto, K., 2005 : Method for underwater measurement of the auditory brainstem response of fish. *Fish. Sci.*, **71**, 1115-1119.
- 71) Suga, T., Akamatsu, T., Hiraishi, T and Yamamoto, K., 2006 : Contamination of auditory evoked potential of goldfish *Carassius auratus* with microphonic potential. *J. Marine. Acoust. Soc. Jpn.*, **33**, 13-16.
- 72) 高尾芳三, 1994 : スケトウダラの音響資源調査. 月刊海洋, **26**, 660-665.
- 73) 竹村 暘, 1984 : 魚類の遊泳音, 「海洋の生物過程」(丸茂隆三編), 恒星社厚生閣, 東京, pp. 194-197.
- 74) Tanda, M., 1990 : Studies on ability in sand and selection to the grain size for hatchery-reared marbled sole and Japanese flounder. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **56**, 1543-1548.
- 75) Urlick, R. J., 1972 : Noise Signature of Aircraft in

- Level Flight over a Hydrophone in the sea. *J. Acoust. Soc. Am.*, **52**, 993-999.
- 76) 和田時夫, 1994 : マイワシの音響資源調査. 月刊海洋, **26**, 653-656.
- 77) 渡辺和博, 大塚 修, 平野正人, 1990 : 底生魚類を対象とする海底牧場造成技術の研究. 新潟栽培漁業センター平成元年度業務研究報告書, **14**, 54-58.
- 78) Wenz, G. M., 1962 : Acoustic ambient noise in the ocean : Spectra and sources. *J. Acoust. Soc. Am.*, **34**, 1936-1956.
- 79) Wysocki, L. E. and Ladich, F., 2002 : Can fishes resolve temporal characteristics of sounds? New insights using auditory brainstem responses. *Hear. Res.*, **169**, 36-46.
- 80) Wysocki, L. E. and Ladich, F., 2003 : The representation of conspecific sounds in the auditory brainstem of teleost fishes. *J. Exp. Biol.*, **206**, 2229-2240.
- 81) Yamakawa, M., Ikeda, F. and Hatakeyama Y., 1998 : Auditory characteristics of rainbow trout *Onchorynchus mikiss*. Tokyo-To Suisan Shikenjo Chosa Kenkyu Hokoku., **210**, 21-35.
- 82) Yamashita, Y., Kitagawa, D. and Aoyama, T., 1985 : Diel vertical migration and feeding rhythm of the larvae of the Japanese sand-eel *Ammodytes personatus*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, **51**, 1-5.
- 83) Yan, H. Y., Fine, M. L., Horn, N. S. and Colon, W. E., 2000 : Variability in the role of the gas-bladder in fish audition. *J. Comp. Physiol. A.*, **186**, 435-445.
- 84) 柳橋茂昭, 船越茂雄, 向井良吉, 中村元彦, 1997 : 伊勢湾産イカナゴの夏眠期における生き残り成熟, 産卵機構. 愛知水試研報告, **4**, 23-31.
- 85) 安沢 弥, 関 泰夫, 池田 徹, 本間智晴, 渡辺誠治, 1995 : 底生魚類を対象とする海洋牧場造成技術の研究. 新潟栽培漁業センター平成五年度業務研究報告書, **18**, 39-41.
- 86) Yong-Seok, Park., Iida, K., Mukai, T. and Sakurai, Y., 1995 : Auditory characteristics of walleye Pollock *Theragra chalcogramma (Pallas)*. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **61**, 159-163.
- 87) Yoshimura, Y. and Koyanagi, Y., 2004 : Design of a small fisheries research vessel with low level of underwater-radiated noise. *J. Marine Acoust. Soc. Jpn.*, **31**, Jul, 1-9.
- 88) Zhang, G., Hiraishi, T., K. Motomatsu., and Nashimoto, K., 1998 : Auditory threshold of marbled sole *Pleuronectes yokohamae*. *Nippon Suisan Gakkaishi.*, **64**, 211-215.