

魚類の記憶能力に関する
実験心理学的研究

金子 三四朗

2019 年

目次

1. 序論	1
2. 報酬訓練および罰訓練条件におけるマダいの記憶保持能力	7
(1) 研究の背景	8
(2) 報酬訓練	10
(3) 罰訓練	22
(4) 報酬訓練と罰訓練の比較および個体差に関する考察	33
3. 長期記憶に適した訓練手法の開発	36
(1) 研究の背景	37
(2) 訓練間隔がマダいの記憶保持に与える影響	39
4. マダいの学習能力および記憶保持能力の個体発生	48
(1) 研究の背景	49
(2) 報酬訓練および罰訓練におけるマダイ稚魚の記憶保持能力の成長に伴う変化	51
(3) 報酬訓練におけるマダイ稚魚の学習能力および記憶保持能力の個体発生	64
5. マダいの記憶保持能力と個性	76
(1) 研究の背景	77
(2) マダいの記憶保持能力と横臥傾向の関係	79
6. 学習能力および記憶保持能力の魚種間比較	88
(1) 研究の背景	89
(2) 報酬訓練におけるキジハタの学習能力と記憶保持能力	91
(3) 報酬訓練におけるマアジ集団内の未学習個体の検証	100
(4) 報酬訓練におけるマアジの学習能力の個体差	108
(5) 学習および記憶能力と生活史特性の魚種間比較に関する考察	115
7. 総合考察	118

1. 序論

学習とは、経験を記憶することによる行動の変容と定義される (Mazur, 1999)。動物は学習を通して新しい行動を獲得することで、多様な生活環境への適応が可能である (Kieffer & Colgan, 1992)。学習が成立するためには、特定の刺激と何らかの事象や物体、もしくは行動とを関連づける能力と、学習した情報を一定の期間保持する能力、すなわち記憶能力が不可欠となる (Kaneko *et al.*, 2019)。それゆえ、記憶能力の備わっていない動物たちは、単純な反射と型にはまった行動を繰り返すことしかできない (Okano *et al.*, 2000)。

記憶とは、過去に経験したことを一定の時間的経過後まで保持し再現する精神活動であると一般に定義される。心理学の分野においては、記銘 (memorization) ないしは符号化 (encoding)、貯蔵 (storage) ないしは保持 (retention)、そして検索 (retrieval) という3つの過程を総称して記憶とよぶ (山内, 2001)。記銘とは情報を刻み込み覚える過程であり、貯蔵とは記銘した情報を失わないよう保持する過程で、そして検索とは保持している情報を必要に応じて記憶貯蔵庫から取り出す過程のことである。これらの過程が1つでも欠けると、記憶は成立しない (永井ら, 2007)。また、記憶は保持時間の長さによって、数百ミリ秒から数秒ほどの非常に短い感覚記憶、15~30秒ほどの短期記憶、そしてそれ以上の長期記憶の3種に大別される。長期記憶はさらに、言葉によって記述することができる宣言的記憶 (declarative memory) と、さまざまな認知的活動を追行する際の手法に関する手続き的記憶 (procedural memory) に細分される (森ら, 1995)。実験心理学で広く用いられている古典的条件づけは、後者の手続き記憶に相当する。

今日まで、非常に多岐にわたる動物群において、学習および記憶能力の有無や特性が検証されており、脊椎動物では哺乳類（永井ら, 2007）、鳥類（Vander Wall, 1982）、爬虫類（Petrillo *et al.*, 1994）、両生類（Gonzalo *et al.*, 2010）、無脊椎動物では軟体動物（Yamada *et al.*, 1992）、昆虫（Matsumoto & Mizunami, 2002）、甲殻類（Hazlett *et al.*, 2002）など、多くの動物が学習や記憶の能力を用いて自然環境に適応していることが示されてきた。また、近年では魚類についても研究が進んでおり、索餌（Brydges *et al.*, 2008; Ingraham *et al.*, 2016）、捕食者（Brown, 2001; Dill, 1974）、回遊（Dodson, 1988）、空間認知（Schluessel & Bleckmann, 2012）、生息場所（Fricke, 1974）、他魚種や他個体の認識（Csányi *et al.*, 1989; Fricke, 1974）など、様々な情報に関する学習能力を有することが明らかとなっている。しかしながら、魚類の学習能力について検討した研究例が豊富に存在するのに対し、その記憶能力まで明らかにしたものは非常に少なく、特に海産魚に関する知見は極めて少ない。また、記憶能力の検証を試みた研究は、単一の訓練手法を用いて単一魚種の記憶保持期間について検証したものがほとんどであり、魚類の記憶能力に関する普遍的な理解は欠如している。一方で、先に述べた通り記憶能力は動物の学習が成立するうえで不可欠な能力であることから、記憶能力の検証は魚類の生態について理解を深めるうえで非常に重要と考えられる。

近年、魚類の学習に関する知見は、生態学や動物行動学の分野からの興味だけでなく、水産分野への応用にも期待が寄せられている（Brown & Day, 2002）。たとえば、人工種苗を天然の海へと放流することで天然資源の増大を図る栽培漁業では（Masuda, 2004）、放流直

後の急激な減耗が主要な課題となっている (Masuda & Tsukamoto, 1998; Le Vay *et al.*, 2007)。こうした減耗の原因の1つとして、安全な環境で飼育されてきた人工種苗は天然個体にはみられない不用意な行動を示すことが影響していると考えられている (Blaxter, 1976; Le Vay *et al.*, 2007)。それゆえ、放流前に訓練を実施し、自然界を生き抜くうえで必要な行動を学習させることができれば、放流後の減耗率を改善できる可能性がある (Brown & Laland, 2001)。たとえばマダイ *Chrysophrys major* では、人工種苗を捕食者であるオニオコゼ *Inimicus japonicas* と遭遇させると、その後の生産率が向上することが知られている (藤川 & 佐々木, 2001)。ヒラメ *Paralichthys olivaceus* (Hossain *et al.*, 2002) やシロク
ラベラ *Choerodon schoenleinii* (河端ら, 2011) など他の魚種においても、同様の結果が報告されている。また、音響馴致を利用した海洋牧場に関する研究も古くから行われている (Fujiya *et al.*, 1980; Masuda & Tsukamoto, 1998; Zion *et al.*, 2012)。音響馴致とは、特定の音波と餌との関連性を魚に学習させることで、魚に音源に寄り付く行動を獲得させる訓練手法である (安樂 *et al.*, 1998)。海洋牧場では、この音響馴致を施した魚を天然の海へと放流し、放流後も同一の音波を用いて魚を呼び集めることで、一定の海域内での放流魚を管理することを目指している。しかしながら、海洋牧場における放流魚の回収率は非常に低く、今日においても実用化には至っていないのが現状であり、その原因の1つとして、魚が訓練により学習した音波と餌との関連性を短期間で忘却している可能性が挙げられる (Zion *et al.*, 2011)。仮に、対象種の記憶能力の低さが影響しているのであれば、上述の栽培漁業

における種苗の訓練など、他の応用においても期待されるような効果は得られていない可能性もある。

そこで本研究では、我が国の水産重要種であり、栽培漁業や海洋牧場の対象種でもあるマダイを主な対象魚種とし（内田ら, 1993; Tsukamoto *et al.*, 1989; Shishidou, 2002）、実験心理学的手法を用いて多様な側面から本種の学習および記憶保持能力について検討することで、海産魚の記憶能力やそのメカニズムに関する基礎的な知見の集積を試みた。本種については、上述の捕食者学習訓練の他にも、学習能力に関する基礎的な研究が存在し、条件づけの手法もある程度確立している（Takahashi *et al.*, 2015; Takahashi & Masuda, 2018）。

まず本論文の第 2 章では、マダイ稚魚の記憶保持能力についての検証を試みた。実験では、古典的条件づけ手法を応用した報酬訓練および罰訓練の 2 種の訓練手法を用いて、それぞれの記憶保持期間について検証し、長期記憶に適した学習内容についても検討した。第 3 章では、長期記憶に適した訓練手法の開発を目的として、訓練の間隔が本種の記憶に与える影響について検討した。そして第 4 章では、学習および記憶保持能力の個体発生過程を明らかにすることで、両能力と本種の生態との関わりについて考察するとともに、記憶保持能力という観点から栽培漁業および海洋牧場における適切な放流サイズについて検討した。また第 5 章では、魚の記憶保持能力と個性との関係を調べることで、記憶保持能力の優れた種苗を選別できる可能性を提案した。最後に第 6 章では、本種と生態的特徴の異なる他魚種との間で、学習および記憶保持能力を比較することで、各魚種の生態と両能力との関係

について考察するとともに、学習および記憶保持能力という観点から栽培漁業における人工種苗の訓練や、海洋牧場等の応用に適した魚種について検討した。これらの研究を通して、海産魚の具体的な記憶保持期間について明らかにし、これをもとに魚類の記憶能力と生態との関わりについて考察した。また、栽培漁業や海洋牧場等での応用を想定し、長期記憶に適した学習内容および訓練手法の開発や、学習および記憶保持の能力の優れた魚種や放流サイズについて提言した。

2. 報酬訓練および罰訓練条件におけるマダイの記憶保持能力

2 - (1) 研究の背景

報酬とは、ある行動に続いて提示することでその行動の出現頻度を増大させる機能をもつ強化子を指す。そして報酬訓練ならびに報酬学習とは、被検体が示す特定の反応後にこの報酬を提示することで、その反応の出現頻度を増大させることを目的とした訓練である。一方罰訓練ならびに罰学習とは、被検体の特定の反応の出現に続いて嫌悪刺激を提示する訓練である。嫌悪刺激は、その刺激を提示することで特定の行動の発生頻度を低下させる機能をもつ。被検体にとって適切な罰が与えられれば、その個体は罰せられる反応を示した後に嫌悪刺激がくることを予測できるようになり、その反応の発生頻度が低下する機構となっている。こうした罰学習は、ヒトや他の動物が環境に適応するために重要であるとされる(実森・中島, 2009)。また報酬訓練および罰訓練は、魚類を含む様々な動物群において成立することが知られており、家畜やペットの躰(上野, 2007, 藤田, 2015)、害獣対策(川村ら, 1983; 高山ら, 2013)など、多様な応用事例が存在する。

水産分野においても同様に、報酬訓練および罰訓練を用いた応用研究が多数存在する。たとえば、特定の音波と餌との関連性を学習させることで、魚に音源に寄り付く行動を獲得させる音響馴致と呼ばれる報酬訓練が存在する(安樂 *et al.*, 1998)。本訓練は放流種苗を対象に行われており、放流後も音波を使って魚を集めることで、一定の海域内で放流魚を管理すること目的としている。このような漁業は海洋牧場と呼ばれており、古くから研究が行われ

ている (Fujiya *et al.*, 1980; 安樂 *et al.*, 1997)。また栽培漁業においては、罰訓練を応用することで人工種苗に捕食者の危険性を学習させ、放流後の生残率の向上を目指す捕食者学習訓練が存在する (藤川 & 佐々木, 2001)。しかしながら、前者の海洋牧場においては、ほとんどの対象種において回収率が 5~20% と非常に低く (Moksness & Stole, 1997)、依然として実用化にはいたっていない。この低い回収率は、被食 (Bartley & Bell, 2008)、天然集団との競合や放流魚の逸散 (La Mesa *et al.*, 2008)、そして魚の記憶保持能力の低さ (Zion *et al.*, 2011) が影響していると考えられている。仮に、魚が訓練により学習した情報を短期間で忘却するようでは、報酬訓練および罰訓練ともに期待されるような訓練の効果は得られないであろう。しかしながら、両訓練の学習に関する先行研究が多数存在するのに対し、学習した情報の記憶保持期間まで検証した事例は非常に少なく、特に海産魚に関する知見は極めて少ない。

そこで本研究では、我が国の水産重要種であり、かつ学習能力の応用研究が盛んなマダイの人工孵化稚魚を用いて、訓練により獲得した情報の記憶保持期間について検討した。実験では、報酬訓練および罰訓練の 2 種の訓練を実施し、それぞれの記憶保持期間について検討することで、長期記憶に適した学習内容についても検討した。

2 - (2) 報酬訓練

2 - (2) - 1 材料と方法

2 - (2) - 1 - 1 供試魚

2013年5月29日、有限会社まる阿水産より標準体長約20mmのマダイ人工孵化稚魚を約100個体購入した。これらを京都大学舞鶴水産実験所へ輸送し、透明な円形200Lの飼育水槽に導入した。飼育水には、舞鶴水産実験所の地先の海からポンプでくみ上げ、濾過槽を通して得られた濾過海水を使用し、換水は海水かけ流し方式で行った(4L/min)。飼育水槽内にはエアレーションを1つ設置した。また、魚のストレスを軽減するために、飼育水槽の外周は不透明な青色のシートで覆った。魚が水槽から飛び出さないよう、水槽の上部はネットで覆った。飼育期間中は毎日9:00と18:00前後に1度ずつ、配合飼料(おとひめS2; Marubeni Nisshin Feed Co. Ltd.)を飽食させた。飼育期間は後述する通り実験区ごとに異なり、最短で43日間、最長で95日間の飼育期間を経た後、実験に使用した。合計48個体の稚魚(標準体長63-95mm)を実験に供した。

2 - (2) - 1 - 2 実験水槽

実験水槽には、60cm透明アクリル水槽(L×W×H:600mm×300mm×360mm)を使用した(Fig.2-1)。飼育水には飼育水槽と同様の濾過海水を使用し、換水は海水かけ流

し方式で行い（約 0.6 L/min）、水深は 250 mm とした。また、実験水槽の中央にエアレーションを 1 つ設置し、後述の訓練時のみ遠隔操作で起動させた。実験水槽は縦横に並べて設置しており、隣接する他の実験水槽からの影響を抑えるため、水槽の外周は不透明な黒色のシートで覆った。さらに、実験者が供試魚に与える影響を抑えるため、塩ビ管を用いて実験水槽の周囲に骨組みを構築し、同様のシートを巻き付けることで、水槽の周囲を高さ 1650 mm まで覆った。実験時は、水槽の上部 1650 mm の位置にビデオカメラ (Sony HDR-PJ590V) を設置し、魚の行動を撮影した。実験は、2013 年 7 月 10 日から 9 月 11 日にかけて実施した。実験期間中、濾過海水用の原海水をくみ上げる海底付近の水温は 23.1–29.6°C であった。

2 - (2) - 1 - 3 実験方法

本実験では Takahashi *et al.* (2012) や Guttridge & Brown (2014) と同様、魚に訓練を施すことでエアレーションと餌（報酬）との関連性を学習させた。一定の間隔を設けて同様の訓練を 2 度実施し、前者を初期訓練、後者を記憶テストとすることで、学習および記憶能力を評価した。また、この訓練間隔を実験区とし、3 日、9 日、30 日、60 日の実験区を設け、それぞれ 12 個体のマダイを実験に使用した。マダイはなわばり行動を示すことが知られており（山岡ら, 1991）、他個体との干渉が学習や記憶の評価に影響すると予想されたため、訓練は単独で行った。

初期訓練

訓練開始 2 日前の正午に、飼育水槽からランダムに供試魚を取り出し、2-フェノキシエタノールを用いて麻酔処理を施したのち、標準体長を測定し、イラストマー蛍光タグ (VIE タグ: Northwest Marine Technology, Inc.; www.nwr.com) を用いて個体を識別した。その後、実験水槽にマダイを 1 個体ずつ投入し、約 2 日間かけて馴致させた。馴致期間中は、9:00 および 18:00 前後に配合飼料をそれぞれ 30 粒ずつ給餌した。その際、マダイに実験水槽の特定のエリアを餌場として学習させないため、配合飼料が水槽に均等に広がるよう注意した。初期訓練前日の 18:00 の給餌で、全ての個体が餌を食べていることを確認したのち、翌日より訓練を開始した。

訓練では、まず水槽内に設置されたエアレーションを起動した (0.25 L/min)。続いて 30 秒後、エアレーションの真上から配合飼料を約 6 粒給餌した。さらに、給餌から 30 秒経過したところでエアレーションを停止させた。したがって、エアレーションの起動時間は 60 秒間となる。この一連の過程を訓練 1 セットとした。訓練の間隔は約 1 時間とし、2 日間かけて 20 回の訓練を実施した。訓練開始 (1 回目, 11 回目) の時刻は 9:00 頃、訓練終了 (10 回目, 20 回目) の時刻は 18:00 とした。訓練時の魚の行動は、実験水槽の上部に設置したビデオカメラで撮影した。それぞれの実験区で 12 個体ずつ、計 48 個体のマダイ稚魚に初期訓練を施した結果、20 回の訓練中常に水槽の端で静止していた個体が 2 個体、また 1 回目の訓練でエアレーションに寄り付いた個体が 1 個体みられたため、これらの 3 個体についてはその後の実験から除外した。

訓練休止期間

初期訓練後、実験区ごとに魚を実験水槽から 1 つのストック水槽へと移した。ストック水槽は実験水槽と同様の 60 cm 透明アクリル水槽を使用した。ただし、ストック水槽内にエアレーションは設置しなかった。換水は海水かけ流し方式で行い（約 1.0 L/min）、水深は 300 mm とした。また実験水槽と同様、不透明な黒色のシートを用いて水槽の外周、および水槽の周囲を高さ 1650 mm まで覆った。さらに、魚が水槽から飛び出さないよう水槽の上部をネットで覆った。訓練休止期間中は、毎日 9:00 と 18:00 に配合飼料を飽食量与え、残餌や糞は適宜除去した。

記憶テスト

記憶テストを実施する 2 日前に、魚をストック水槽から再び実験水槽へと移し、初期訓練時と同様の方法で実験水槽へと馴致させた。その後、訓練を 1 回だけ実施した。記憶テスト実施後、麻酔処理を施したのち各個体の標準体長を測定し、VIE タグをもとに個体を識別した。

2 - (2) - 1 - 4 データ解析

エアレーションと餌との関連性を学習したマダイは、エアレーションが起動しただけでエアーストーン付近に接近することが予想される。そこで本実験では、エアーストーンを中心とした給餌エリア（L × W × H: 160 × 160 × 250 mm; Fig. 2-1）を設定し、給餌を行う

前のエアレーション起動時 30 秒中の給餌エリアへの滞在時間（以下、寄り付き時間）を計測し、学習および記憶の指標とした。その際、マダイの体が少しでも給餌エリアに侵入していれば滞在していると判断し、時間を計測した。

まず、魚が初期訓練においてエアレーションと餌との関連性を学習していたかどうかを確認するために、一般化線形混合モデル（GLMM: generalized linear mixed models）による解析を行った。訓練 1 回目と 20 回目の寄り付き時間を応答変数とし、訓練回数（1 回目もしくは 20 回目）、実験区（3 日、9 日、30 日、60 日区）、標準体長を説明変数とした。また、個体差をランダム要因として考慮し個体番号をランダム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。各応答変数の有意性は Wald test を用いて評価した。統計解析にはフリーソフト R3.4.1（R statistical software, www.r-project.org, 以下 R）を用い、特に GLMM の解析には lme4 package (Bates *et al.*, 2015) を使用した。また、初期訓練時に実験区間で魚の反応に明確な差が生じていなかったことを確認するために、Kruskal-Wallis test を用いて訓練 1 回目および 20 回目の寄り付き時間を実験区間で比較した。

記憶テストでは、魚が初期訓練により学習した情報を記憶していれば、学習した魚と同じようにエアレーションに寄り付く行動がみられるはずである。前述の GLMM 解析により、初期訓練時の訓練 20 回目までに魚が学習していたことが確認できたため、Wilcoxon signed-rank test を用いて、実験区ごとに初期訓練の 20 回目と記憶テスト時とで寄り付き時間を比

較し、後者の寄り付き時間が有意に短ければ忘却していると判断した。さらに、個体レベルでの記憶の有無を判別するために、初期訓練に使用した全個体の訓練 1 回目の寄り付き時間の中で、最も滞在時間の長かった個体の値を未学習の指標とした。すなわち、記憶テスト時の寄り付き時間がこの指標を上回ることができなければ、その個体は忘却していると判断した。

2 - (2) - 2 結果

2 - (2) - 2 - 1 初期訓練

初期訓練に使用したマダイ稚魚 48 個体のうち、30 個体について学習および記憶保持能力の評価結果を得た (Table 2-1)。Wald test により、説明変数のうち訓練回数および実験区に有意差がみられたが、標準体長にはみられなかった (初期訓練 20 回目: $Z = 19.07$, $P < 0.001$; 9 日区, $Z = 2.50$, $P < 0.05$; 30 日区, $Z = -2.72$, $P < 0.01$; 60 日区, $Z = -1.42$, $P > 0.05$; 標準体長, $Z = -1.71$, $P > 0.05$; Table 2-2)。これらの結果は、訓練 20 回目においてマダイ稚魚がエアレーションと餌との関連性を学習しており、実験区間で反応に差が生じていたこと、また今回の実験に使用したマダイ稚魚の標準体長の違いは学習能力に影響していなかったことを意味している。

実験区間で初期訓練時の訓練 1 回目および 20 回目の寄り付き時間を比較した結果、訓練 1 回目の寄り付き時間には差はなかったが (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 6.67$, $df = 3$, $P > 0.05$),

20 回目の寄り付き時間には有意差がみられた(Kruskal–Wallis test, $\chi^2 = 10.41$, $df = 3$, $P < 0.05$)。さらに多重比較を行ったところ、9 日区と 30 日区の間にも、明確な差が認められた(Mann–Whitney U-test with Bonferroni correction, $U = 1$, $P < 0.01$, $\alpha = 0.0083$)。

2 - (2) - 2 - 2 記憶テスト

実験区ごとに初期訓練時の 20 回目と記憶テスト時とで寄り付き時間を比較した結果、3 日区、9 日区、30 日区では明確な差はなかったが、60 日区のみ有意差がみられた(Wilcoxon signed-rank test, 3 days, $T = 7.00$, $n = 9$, $P > 0.05$; 9 days, $T = 2.50$, $n = 7$, $P > 0.05$; 30 days, $T = 10.00$, $n = 7$, $P > 0.05$; 60 days, $T = 2.00$, $n = 7$, $P < 0.05$; Fig. 2-2)。これらの結果は、マダイ稚魚は初期訓練で学習した情報を 30 日後までは保持するが 60 日後には忘却することを示唆している。また初期訓練の結果、未学習の指標は 7 秒となった ($n = 30$)。この指標をもとに個体レベルでの記憶の有無を検証した結果、それぞれの実験区で記憶していた個体の割合は、3 日区で 56%、9 日区で 86%、30 日区で 43%、60 日区で 29%となった(Fig. 2-3)。

2 - (2) - 3 考察

本研究の結果から、マダイ稚魚は報酬訓練により獲得した情報を、少なくとも 30 日まで記憶する能力を有し、60 日後には忘却する傾向が示された。また、個体レベルで記憶を

評価した結果、記憶していたと判断された個体の割合は、9日区、3日区、30日区、60日区
の順に減少する傾向がみられた。一般的に、記憶は時間経過とともに衰退していくもので
あるが、本研究では9日区の記憶個体数が3日区よりも高かった。その理由の1つとして、
水槽間の移動による魚体へのストレスが考えられる。本実験でマダイ稚魚は、3度の水槽間
の移動を経験しており（飼育水槽から実験水槽、実験水槽から訓練休止期間中のストック水
槽、ストック水槽から実験水槽）、訓練休止期間の短い3日区は短期間でこれらすべての移
動を経験したことになる。その結果、3日区は記憶テスト時において他の実験区よりも大き
なストレスがかかり、警戒心が高まったことで、相対的に低いスコアを示したのではないかと
推察される。実際、ゼブラフィッシュ *Danio rerio* では、新規の環境を経験した際、水槽
の中心付近を避け外壁付近に留まったり、外壁に沿って移動するような不安様行動を示す
ことが報告されている(Champagne *et al.*, 2010)。一方、記憶テスト時において9日区の成
績が優れていた理由として、初期訓練時の訓練20回目における9日区の寄り付き時間が他
の実験区と比べて高かったことが影響している可能性も考えられる。しかしながら、本実験
はすべて同一の実験者が行っており、訓練方法にも差がないため、実験区間で初期訓練時の
反応に差が生じた要因を特定することは困難である。

個体レベルでの記憶の有無を判別した結果、集団では忘却と判断された60日区で2個体
が記憶と判断され、また記憶と判断されたその他の実験区でも、すべての個体が記憶してい
たわけではなく忘却と判断された個体が存在しており、マダイ稚魚の記憶保持期間には非

常に大きな個体差があることが明らかとなった。この結果は、集団で記憶能力の測定を行うことの不確かさを示唆している。魚の群れ構造に関する先行研究では、群れの中では個体間の誘引力が作用することが報告されている (Herbert-Read *et al.*, 2011; Katz *et al.*, 2011)。つまり、集団で記憶能力の測定を行った場合、たとえ多数の個体が忘却していたとしても、記憶していた個体への誘引力が働くことで、見かけ上はすべての個体が記憶していたかのようにふるまう可能性がある。実際、本研究で対象としたマダイ稚魚も、放流直後は群れを形成する傾向が報告されている (Yamada *et al.*, 1992; Kudoh *et al.*, 1999)。それゆえ、本種のように社会性の強い魚種について記憶能力を適切に評価するためには、単独で実験を行うことが重要と考えられる。

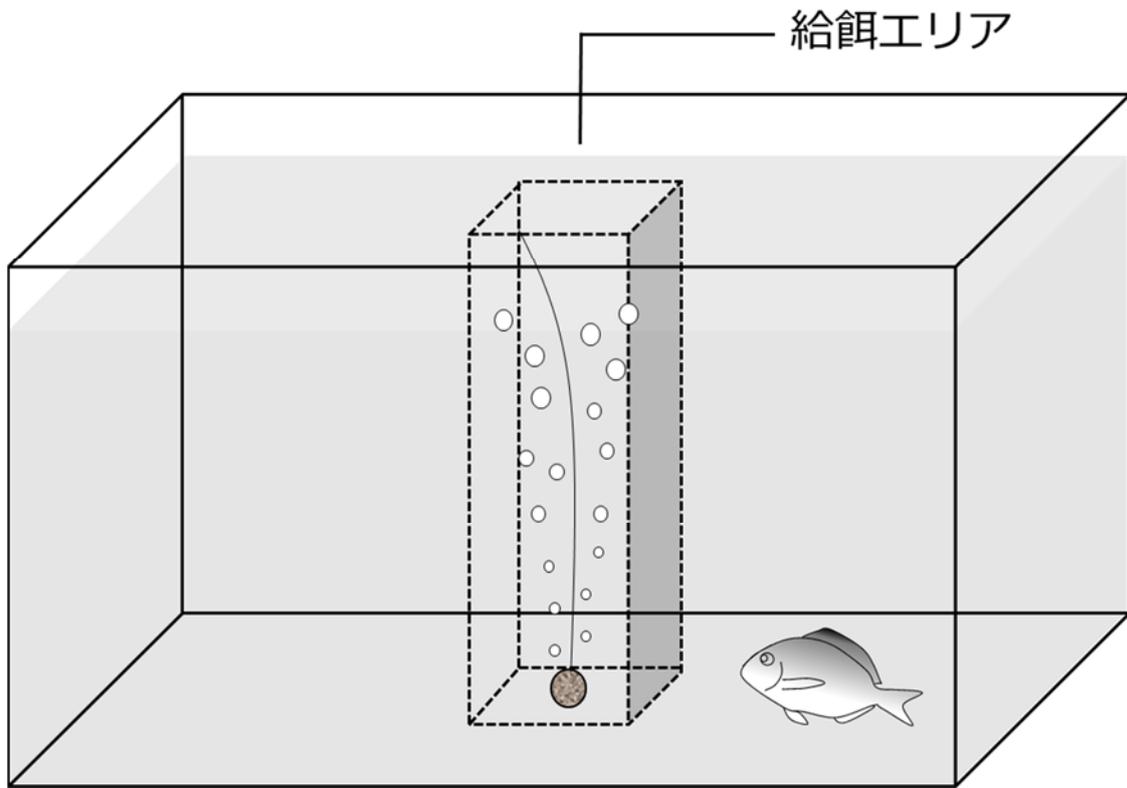


Fig. 2-1 報酬訓練に使用した実験水槽の側面図。破線は給餌エリアを示す。

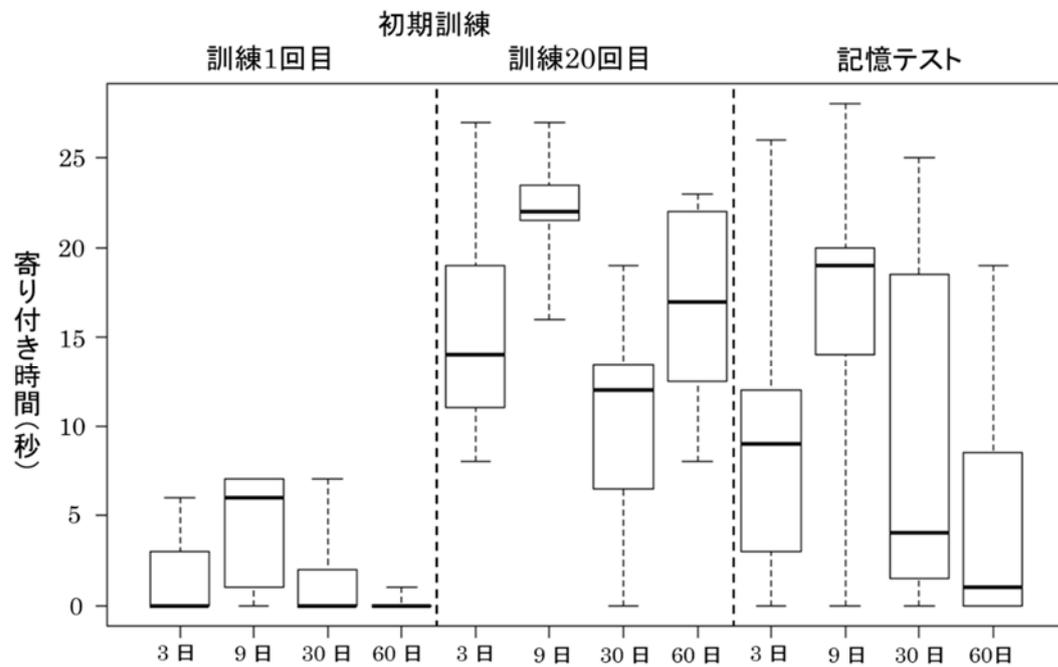


Fig. 2-2 各実験区における初期訓練時の訓練1回目, 20回目, および記憶テスト時の寄り付き時間。

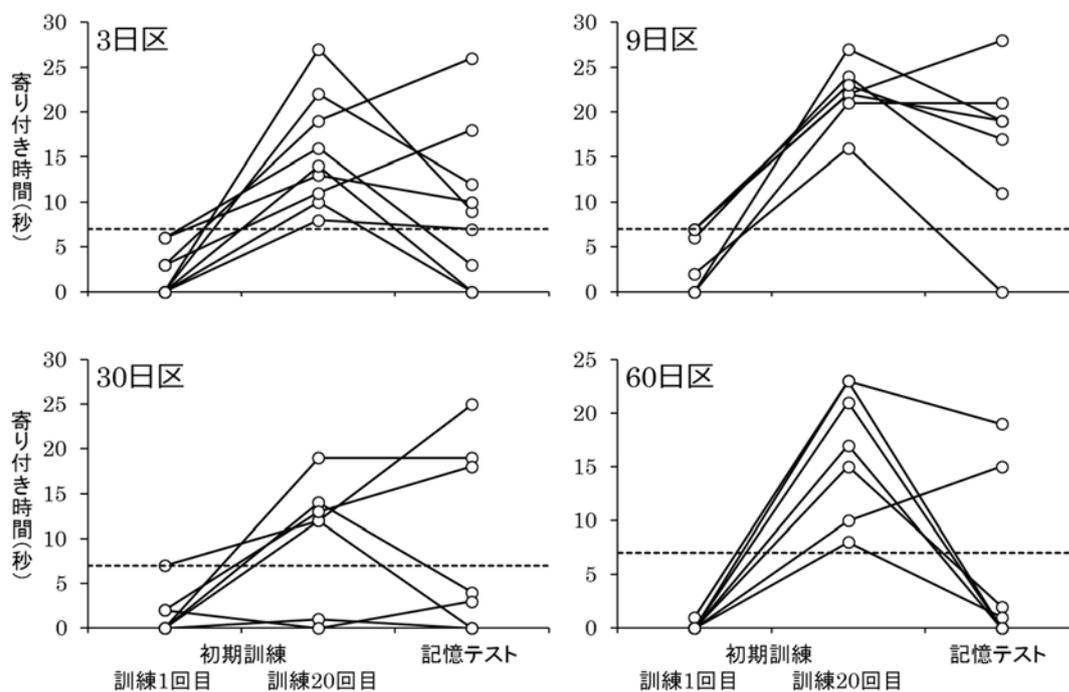


Fig. 2-3 各実験区における個体レベルの寄り付き時間 (○)。破線は未学習の指標を示す(7秒)。

Table 2-1. 各実験区の個体数および標準体長

実験区	斃死個体数	実験済個体数	初期訓練	記憶テスト
			平均 ± S.D.	平均 ± S.D.
3 日区	1	9	87.56 ± 4.92 mm	89.33 ± 3.89 mm
9 日区	4	7	85.86 ± 3.72 mm	91.43 ± 3.06 mm
30 日区	5	7	80.14 ± 3.40 mm	96.00 ± 2.93 mm
60 日区	5	7	73.71 ± 5.50 mm	108.57 ± 3.70 mm

SD, 標準偏差

Table 2-2. 報酬訓練における GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	Z	P
訓練 20 回目	3.14	0.16	19.07	< 0.001
9 日区	0.93	0.37	2.50	< 0.05
30 日区	-1.19	0.44	-2.72	< 0.05
60 日区	-0.79	0.55	-1.42	> 0.05
標準体長	-0.05	0.03	-1.71	> 0.05
Intercept	1.41	2.60	0.54	> 0.05

2 - (3) 罰訓練

2 - (3) - 1 材料と方法

2 - (3) - 1 - 1 供試魚

2013年10月17日、有限会社まる阿水産より標準体長約15 mmのマダイ人工孵化稚魚を200個体購入した。これらを舞鶴水産実験所へ輸送し、透明な円形200Lの飼育水槽に導入した。飼育に際しては、給餌条件を除いて「2 - (2) 報酬訓練」と同様の手法を用いた。給餌については、標準体長が20 mmに達するまでは粒形の小さな配合飼料（おとひめ C1; Marubeni Nisshin Feed Co. Ltd.）を与え、これ以降はより粒形の大きなもの（おとひめ S2）を与えた。飼育期間は、後述する通り実験区や個体間で異なり、最短で22日間、最長で75日間の飼育期間を経た後、実験に使用した。合計73個体の稚魚（標準体長21-57 mm）を実験に供した。

2 - (3) - 1 - 2 実験水槽

実験水槽には、ポリエチレン製の角形容器（L × W × H：1420 mm × 980 mm × 220 mm）を使用した。この水槽に、不透明な黒色のアクリル製の正六角柱（1辺100 mm、高さ185 mm）を5台並べ、それらの間に同じ材質のアクリル板（W × H: 50 mm × 185 mm）を差し込むことで、経路の幅50 mm、長さ100 mmのY字型迷路を作製した（Fig. 2-

4)。また、同じ材質の板を用いて実験水槽内の空いたスペースを区画し、18個のストックエリアを設けた (L × W × H: 100 mm × 150 mm × 185 mm)。飼育水には濾過海水を使用し、換水は海水かけ流し方式で行い (2.1 L/min)、水槽の水深は 150 mm とした。実験は、2013年11月8日から2014年1月1日にかけて実施した。実験期間中の水温は 12.9–21.5°Cであった。

2 - (3) - 1 - 3 実験方法

本実験では、マダイ稚魚に Y 字型迷路の不正解の経路と罰との関連性を学習させた。罰の条件づけは、Brown & Warburton (1999) や Yue *et al.* (2004) に習い、手網を使用した方法を用いた。「2 - (2) 報酬訓練」と同様、一定の間隔を設けて同様の訓練を 2 度実施し、前者を初期訓練、後者を記憶テストとすることで、学習および記憶能力を評価した。訓練間隔は 1 日、3 日、9 日、30 日の計 4 条件を設定した。訓練に際しては魚をすべて単独で扱った。

初期訓練

飼育水槽からランダムに供試魚を取り出し、標準体長を測定したのち、Y 字型迷路のスタートエリア (Fig. 2-4) に収容した。これを 10 分間エリア内に馴致させたのち、訓練を開始した。訓練では、まず迷路の入口の不透明な黒色アクリル板 (以下、ゲート) を取り除き、その直後にスタートエリアの後方から静かに手網 (W × H: 45 mm × 200 mm) を水中に

入れ、3秒後に網をゆっくりと前進させ（約 50 mm/s）、マダイを奥へと誘導することで迷路の左右の経路を選択させた。その際、マダイが Y 字型迷路の左側の経路を選択した場合は正解、右側を選択した場合は不正解と設定した。マダイが右側の経路を選択した場合は、そのまま手網を経路の奥まで前進させ、迷路の先端の狭い空間（罰エリア）に 30 秒間閉じ込めるという罰を与えた（Fig. 2-4）。そして 30 秒後に手網を取り除き、ストレスを最小限にするために透明なアクリル板（W × H: 50 mm × 185 mm）を用いて魚をスタートエリアへと誘導した。魚がスタートエリアに戻ったら、ゲートを挿入して再び入口を封鎖し、30 秒間休息させた。一方、マダイが左側の経路を選択した場合は、経路の分かれ道の手前で網を取り除き、罰を与えずに経路内で 30 秒間休息させた。その際、魚がスタートエリアや右側の経路へと侵入することを防ぐために、左の経路の入り口に上述の透明なアクリル板を挿入した。そして 30 秒後にアクリル板を取り除き、右の経路を選択した際と同様の方法で魚をスタートエリアへと戻し、さらに 30 秒間休息させた。この一連の過程を訓練 1 セットとした。本訓練において、魚が同じ経路を偶然に 7 回連続で選択する確率は 1%未満であることから、魚が正解の経路を 7 回連続で選択した時点で学習が成立したとみなし、訓練を終了した。また予備実験において、ほとんどのマダイ稚魚が総訓練回数 30 回以内に不正解の経路と罰との関連性を学習することが分かっていたため、30 回以内に学習できなかった個体はその時点で訓練を終了し、その後の実験から除外した。また、手網を投入した際に過剰に怯えたり、横臥行動を示してしまい、自発的に経路を選択することが出来なかった個体

も実験から除外した。

訓練休止期間

初期訓練において学習が成立したマダイを迷路からストックエリアへ移し、記憶テストを実施するまでの期間単独で飼育を行った。訓練休止期間中は、毎日 9:00 と 18:00 に配合飼料を飽食量与え、残餌や糞は適宜除去した。

記憶テスト

訓練休止期間後、標準体長を測定してから魚をストックエリアから再びスタートエリアへと移し、10 分間馴致させたのち、初期訓練時と同様の訓練を実施した。記憶テストにおいて 30 回の訓練で学習が成立しなかった個体については、シーリング値として 30 回を割り当て、記憶の評価を行った。

2 - (3) - 1 - 4 データ解析

記憶テストにおいて、魚が初期訓練により学習した情報を記憶していれば、初期訓練時よりも少ない訓練回数で学習が成立するはずである。そこで、GLMM を用いて初期訓練時と記憶テスト時とで、学習成立に要した総訓練回数を比較した。総訓練回数を応答変数とし、訓練の種類（初期訓練もしくは記憶テスト）、実験区（1 日、3 日、9 日、30 日区）、標準体長、そして水温を説明変数とした。また、個体差をランダム要因として考慮し個体番号をランダム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。各応

答変数の有意性は Wald test を用いて評価した。統計解析にはフリーソフト R を使用し、GLMM の解析には lme4 package を使用した。

また、上述の GLMM 解析の結果、訓練の種類および実験区が総訓練回数に影響していることが明らかとなったため、実験区ごとに初期訓練時と記憶テスト時の総訓練回数を比較し、記憶保持期間を推定した。検定には Wilcoxon signed-rank test を用い、後者の回数が有意に少なければ記憶していると判断した。

さらに、記憶保持量の程度を示す指標として、実験区ごとに節約率 (Ebbinghaus, 1885, as cited in Mazur, 2006, $((\text{初期訓練時の総訓練回数}) - (\text{記憶テスト時の総訓練回数})) / (\text{初期訓練時の総訓練回数}) \times 100$) を算出することで忘却曲線を作成し、時間の経過に伴う記憶の減衰過程の検証を試みた。

また、マダイ稚魚の側性を評価するために、初期訓練時の訓練 1 回目において、左側の経路を選択した個体の割合を実験区ごとに算出し、魚がランダムに左右の経路を選択した場合に期待される 50% と比較することで、経路の選択に偏りが生じていないかを確認した。

さらに、初期訓練時と記憶テスト時の訓練 1 回目において、同じ経路を選択した個体の割合を算出し、個体の選択に偏りが無い場合に期待される 50% と比較することで、個体の側性についても確認した。いずれについても、検定には binomial test を用いた。

2 - (3) - 2 結果

73 個体のマダイに初期訓練を実施した結果、42 個体のマダイが Y 字型迷路の不正解の経路と罰との関連性を学習した。その後、訓練休止期間中に 1 個体が斃死したため、最終的に 41 個体の学習および記憶能力の評価結果を得た (Table 2-3)。また、記憶テスト時に横臥行動を示し自発的に経路を選択することが出来なかった個体が 3 個体みられたため、これらの個体にはシーリング値を割り当てた。Wald test の結果、4 つの説明変数すべてに有意差がみられた (記憶テスト, $Z = -9.39, P < 0.001$; 3 日区, $Z = -1.27, P > 0.05$; 9 日区, $Z = 3.85, P < 0.001$; 30 日区, $Z = 5.04, P < 0.001$; 標準体長, $Z = -2.71, P < 0.001$; 水温, $Z = -5.33, P < 0.001$; Table 2-4)。これらの結果は、記憶テスト時は初期訓練時よりも少ない訓練回数で学習が成立していたが、その反応が実験区間で大きく異なっていたことを示している。また標準体長が大きな個体の方が、そして水温が高い方が学習に要する総訓練回数が少なかったことを示唆している。

実験区ごとに初期訓練時と記憶テスト時の総訓練回数を比較した結果、1 日区のみ有意差がみられたが (Wilcoxon signed-rank test, $T = 3.00, n = 10, P < 0.01$)、その他の実験区では差がなかった (3 days, $T = 9.50, n = 10, P > 0.05$; 9 days, $T = 16.00, n = 11, P > 0.05$; 30 days: $T = 27, n = 10, P > 0.05$; Fig. 2-5)。また、記憶テスト時において初期訓練時よりも総訓練回数が少なかった個体の割合は、1 日区で 80%、3 日区で 70%、9 日区で 64%、30 日区で 50%となった。もし魚が初期訓練により学習した情報を忘却していれば、総訓練回数には差が生じないためこの値は 50%に近づくものと考えられる。これらの結果は、マダイ

稚魚は初期訓練で学習した情報を 1 日後までは保持するが、3 日後には忘却することを示唆している。また、実験区ごとに節約率を算出して忘却曲線を作成した結果、マダイ稚魚の記憶は時間の経過とともに指数関数的減衰を示した (Fig. 2-6)。

初期訓練時の 1 回目の訓練で左側の経路を選択した個体の割合は、各実験区で 50.0%–63.6%となり、どの実験区においても 50%との有意な差はみられなかった (binomial test, all treatments and total, $P > 0.05$)。さらに、初期訓練時と記憶テスト時で訓練 1 回目と同じ経路を選択した個体の割合は 44.7%となり、こちらも 50%との差はみられなかった (binomial test, all treatments and total, $P > 0.05$)。これらの結果は、側性が本実験の結果に影響していなかったことを示している。

2 - (3) - 3 考察

本研究では、マダイ稚魚は罰学習により獲得した情報を、1 日後までは保持するが 3 日後には忘却することが示された。また、体長が大きい個体ほど少ない訓練回数で学習が成立する傾向が示された。本研究では、記憶テスト時の体長を統一するために訓練休止期間中の魚の成長を考慮し、休止期間が短い実験区ほど体長の大きな個体を使用している。そのため、この結果は実験区の違いが影響した可能性が高いと考えられる。なお、GLMM 解析において標準体長の影響の推定値は非常に値が小さいことから、体長の違いによる影響は極めて小さいものと言える。

忘却曲線を作成した結果、マダイ稚魚の罰学習に関する記憶が時間の経過に伴い指数関数的な減衰を示すことが示唆された。同様の減衰傾向はヒトやラットでも報告されており (Ebbinghaus, 1885, as cited in Mazur, 2006; Bolhuis *et al.*, 1986; Hesse & Franz, 2009), 脊椎動物全般の記憶と忘却の普遍的なメカニズムによるものかもしれない。しかしながら、今回の近似曲線は各実験区の節約率の平均値をもとに作成したものであり、実際は顕著な個体差が存在していた点にも留意すべきであろう。

本実験で得られた罰学習の記憶の保持期間は非常に短く、栽培漁業や海洋牧場といった事業において種苗に訓練を施すことを想定すると、その効果が期待できるとは言い難い。それゆえ、魚類の学習能力を水産分野へと応用する際は、対象種の学習能力のみならず、記憶保持の期間についても検討することが重要であると考えられる。

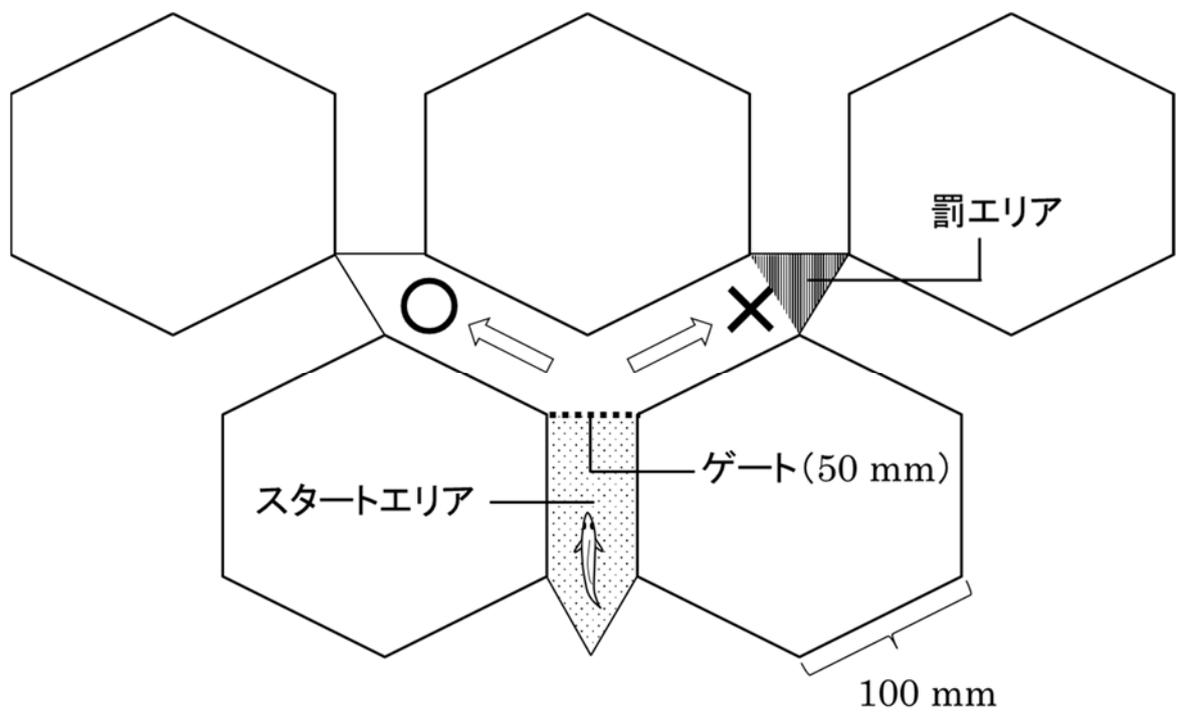


Fig. 2-4 罰訓練に使用した Y 字型迷路の上面図。

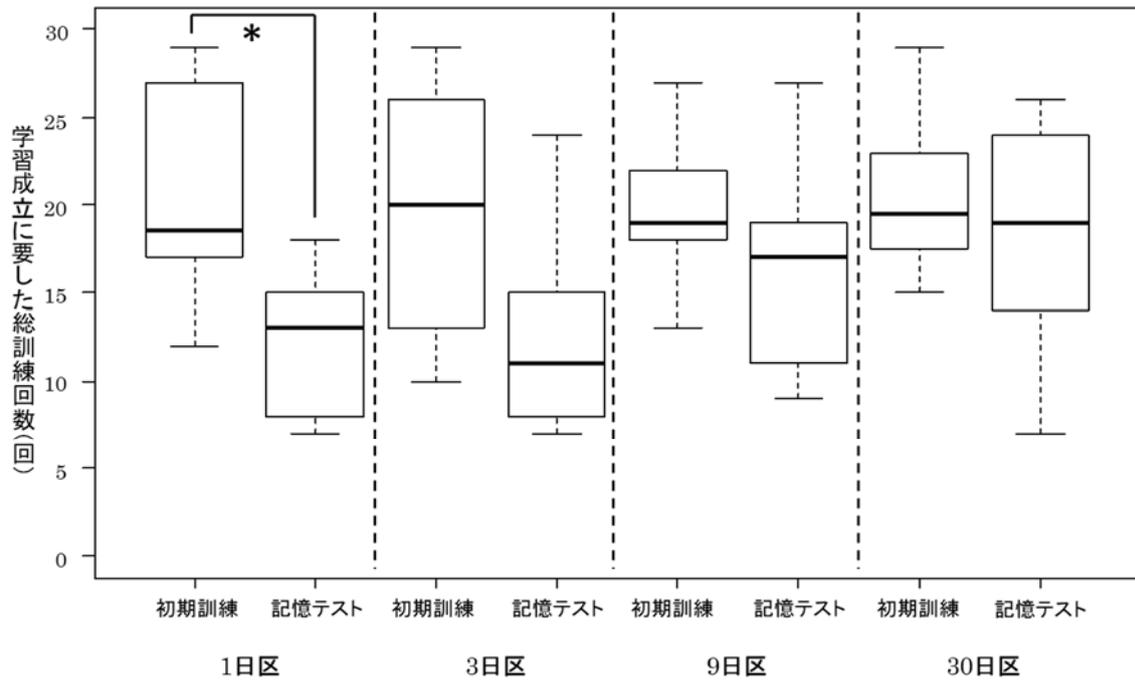


Fig. 2-5 各実験区における初期訓練時および記憶テスト時の学習成立に要した総訓練回数。アスタリスク (*) は有意差があることを示す (Wilcoxon signed-rank test, $P < 0.01$)。

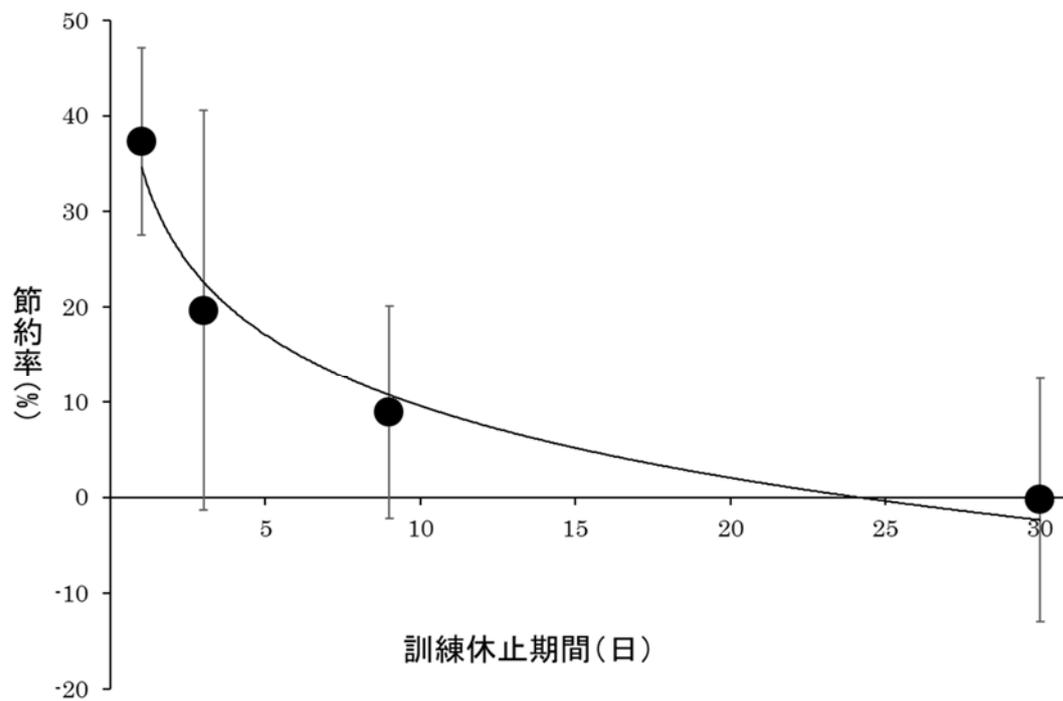


Fig. 2-6 各実験区の節約率 (mean \pm SE) をプロットして得た忘却曲線 (1日区, 3日区, 9日区, 30日区: $y = -10.87\ln(x) + 34.59$, $R^2 = 0.97$)。

Table 2-3. 各実験区の個体数および標準体長

実験区	初期訓練		訓練休止期間 斃死個体数	記憶テスト	
	学習成立 個体数	平均 ± S.D. (mm)		テスト実 施個体数	平均 ± S.D. (mm)
	1 日区	10	50.50 ± 2.01	0	10
3 日区	10	48.30 ± 4.00	0	10	48.80 ± 3.97
9 日区	11	47.45 ± 2.62	0	11	50.82 ± 2.32
30 日区	11	35.20 ± 5.55	1	10	53.70 ± 6.18

SD, 標準偏差

Table 2-4. 罰訓練における GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	Z	P
記憶テスト	-1.18	0.13	-9.39	< 0.001
3 日区	-0.36	0.29	-1.27	> 0.05
9 日区	1.20	0.31	3.85	< 0.001
30 日区	1.64	0.32	5.04	< 0.001
標準体長	-0.04	0.02	-2.71	< 0.001
水温	-0.34	0.06	-5.33	< 0.001
Intercept	7.65	1.63	4.70	< 0.001

2 - (4) 報酬訓練と罰訓練の比較および個体差に関する考察

2 - (4) - 1 報酬訓練と罰訓練の記憶保持期間の違いについて

本研究では、マダイ稚魚を用いて「2 - (2) 報酬訓練」および「2 - (3) 罰訓練」において記憶保持期間を検討した。その結果、同じ魚種であっても学習内容や訓練方法等の違いによって記憶保持期間が大きく異なることが示された。

先行研究では、タイセイヨウダラ *Gadus morhua* が報酬訓練により獲得した特定の光と餌との関連性についての情報を、少なくとも 3 ヶ月間は記憶することが報告されている (Nilsson *et al.*, 2008)。また、コイ *Cyprinus carpio* では特定の音と餌との関連性を、少なくとも 4 ヶ月間は記憶することが報告されている (Sloan *et al.*, 2013)。一方罰訓練に関する先行研究としては、ゼブラフィッシュは視覚的な目印で区画された水槽内の特定のスペースへの侵入と電気ショックによる罰との関連性を、12 時間後には忘却することが報告されている (Valente *et al.*, 2012)。このように魚類の記憶は、罰訓練よりも報酬訓練により獲得した情報についての方が、その保持期間が長い可能性が考えられる。実際、昆虫の記憶に関する先行研究では、報酬訓練よりも罰訓練の方が記憶の減衰が速いことが報告されている (Tempel *et al.*, 1983; Unoki *et al.*, 2005)。また、上述の先行研究の訓練方法を比較すると、タイセイヨウダラとコイでは訓練間隔がそれぞれ 4 時間、8 時間であり、どちらも 10 日かけて訓練を実施している。対照的に、ゼブラフィッシュの訓練期間は 30 分間であり、魚

が特定のエリアに侵入するたびに罰を与えるという方法で訓練を行っている。本研究では、報酬訓練の訓練間隔は 1 時間であり、訓練は 2 日間かけて実施している。一方、罰訓練では訓練間隔は 30 秒間であり、訓練はおおよそ 30 分ほどで完了する。魚類以外の先行研究では、ヒトを含む多くの動物において、適切な訓練間隔を設けて繰り返し訓練を実施する分散学習の方が、集中学習よりも記憶保持期間が長くなることが報告されている (Kogan *et al.*, 1997; Gerber *et al.*, 1998; Hermitte *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 2011)。魚類においても、こうした訓練間隔等の訓練方法の違いが記憶保持期間に影響する可能性は十分考え得る。そのため本論文の第 3 章では、訓練間隔の違いがマダイ稚魚の記憶保持期間に与える影響についての検討を試みた。

いくつかの海産魚において学習能力が成長段階によって異なることが報告されており (Masuda & Ziemann, 2000; Makino *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2010)、学習と密接に関わる記憶能力についても、成長段階の違いが影響する可能性が考えられる。実際、本研究では罰訓練よりも記憶保持期間の長かった報酬訓練において、体長の大きな個体を実験に使用している。また罰訓練における Wald test では、体長の違いがわずかながら学習や記憶に影響したという結果が得られている。本論文の第 4 章では、この記憶能力の個体発生に焦点をあて、成長段階ごとにマダイ稚魚の記憶能力を検証した。

飼育環境は魚の学習能力や脳の発達に影響することが報告されており (Kihlslinger & Nevitt, 2006; Makino, *et al.*, 2015)、こうした環境要因も記憶保持期間に影響する可能性が

ある。実際、キンギョ *Carassius auratus* では水温の違いが記憶保持期間に影響することが報告されている (French, 1942)。本研究の罰学習においても、Wald test の結果、水温が学習や記憶に影響したことが示唆されていることから、今後はこうした環境要因の影響についても詳しく検討すべきであろう。

2 - (4) - 2 記憶保持期間の個体差について

「2- (2) 報酬訓練」の考察でも述べた通り、本研究の結果マダイ稚魚の記憶保持期間には非常に大きな個体差が存在することが明らかとなった。しかしながら、今回の実験結果では、この個体差を生んだ要因を特定することは難しい。Brown *et al.* (2013) では、よりボールドな個性をもつニジマス *Oncorhynchus mykiss* は、シャイな個体よりも記憶保持期間が短いことを報告しており、個性と関連する行動特性が記憶保持期間に影響したのではないかと結論付けている。またグッピー *Poecilia reticulata* の学習においても個性が影響することが報告されている (Trompf & Brown, 2014)。そのため本論文の第 5 章では、マダイ稚魚の対捕食者行動であり、種苗性の指標としてもよく知られる横臥行動に着目し、横臥傾向の違いと記憶保持期間の関係について検討した。

3. 長期記憶に適した訓練手法の開発

3 - (1) 研究の背景

近年、魚類の学習能力を水産分野へと応用することで、水産事業の生産性が向上する可能性が示されつつある。栽培漁業では、天然稚魚にはみられない人工種苗の不適切な行動が、放流後の生残率の低下につながるということが知られているが (Blaxter, 1976; Le Vay *et al.*, 2007), こうした行動も魚の学習能力を利用することによって改善できることが報告されている。

たとえばヒラメでは、天然稚魚と比較して人工種苗の摂食の際の離底頻度や離底時間が長く、こうした無警戒な行動が放流後の被食につながることを懸念されている (古田, 1998)。

そこで Takahashi *et al.* (2013) は、人工種苗の摂食行動の改善を目的とした手網追尾訓練 (net chasing treatments) を開発し、訓練を通して人工種苗の摂食行動が改善することを示した。その他にも、人工種苗に捕食者の危険性を学習させることで、被食率が低下することが多くの魚種で報告されている (藤川 & 佐々木, 2001; 河端ら, 2011)。また海洋牧場では、音響馴致を利用することで放流魚を一定の海域内で管理することを目指している (Fujiya *et al.*, 1980; Masuda & Tsukamoto, 1998)。しかしながら、初期の研究から約 40 年が経過した今日においても、海洋牧場はその回収率の低さから実用化には至っていない (Zion *et al.*, 2012)。この低い回収率を生む要因の 1 つに、魚が訓練により学習した情報を短期間の内に忘却している可能性が挙げられる (Zion *et al.*, 2011)。実際、本論文の第 2 章では、マダイ稚魚の報酬訓練における記憶保持期間が 30 日以上 60 日未満であったのに対し、罰訓練に

おける記憶はわずか3日で忘却すること示された。上述の水産事業における応用研究では、目的によって求められる記憶保持期間が異なることが予想されるが、わずか3日で忘却するようではいずれの訓練においても効果は期待できないであろう。

そこで本研究では、魚類の長期記憶に適した訓練手法の開発を目的として、分散学習と集中学習に着目した。多くの動物群において、同じ訓練時間であっても短期間に集中して訓練を実施した集中学習より、適度な訓練間隔を設けじっくりと訓練を実施した分散学習の方が、一般に記憶保持期間が長くなることが知られている (Kogan *et al.*, 1997; Gerber *et al.*, 1998; Hermitte *et al.*, 1999; Okamoto *et al.*, 2011)。しかしながら、魚類においては淡水魚に関する知見が散見するのみであり (Wolman, 2011)、海産魚においては皆無であった。それゆえ、本研究ではマダイの人工孵化稚魚を用いて、訓練間隔の違いが記憶保持期間に与える影響について検討するとともに、長期記憶に適した訓練手法の開発を目指した。

3 - (2) 訓練間隔がマダイの記憶保持に与える影響

3 - (2) - 1 材料と方法

3 - (2) - 1 - 1 供試魚

2014年5月2日、有限会社まる阿水産より標準体長約30mmのマダイ人工孵化稚魚を200個体購入した。これらを京都大学舞鶴水産実験所へ輸送し、透明な円形200Lの飼育水槽に導入した。飼育水には、舞鶴水産実験所の地先の海からポンプでくみ上げ、濾過槽を通して得られた濾過海水を使用し、換水は海水かけ流し方式で行った(4L/min)。飼育水槽内にはエアレーションを1つ設置した。また、魚のストレスを軽減するために、飼育水槽の外周は不透明な青色のシートで覆った。魚が水槽から飛び出さないよう、水槽の上部はネットで覆った。飼育期間中は毎日9:00と18:00前後に1度ずつ、配合飼料(おとひめS2; Marubeni Nisshin Feed Co. Ltd.)を飽食させた。これらを約2ヵ月間飼育したのち、合計36個体の稚魚(標準体長71-84mm)を実験に供した。

3 - (2) - 1 - 2 実験水槽

実験水槽には「2 - (2) 報酬訓練」と同様の60cm透明アクリル水槽(L×W×H:600mm×300mm×360mm)を使用した。飼育水には濾過海水を使用し、換水は海水かけ流し方式で行い(約0.6L/min)、水深は250mmに維持した。また、実験水槽の中央にエア

レーションを1つ設置し、後述する報酬訓練の条件刺激として使用した。「2 - (2) 報酬訓練」と同様、水槽の外周および周囲（高さ 1650 mm）は不透明な黒色のシートで覆い、実験時は水槽の上部 1650 mm の位置に設置したビデオカメラを用いて魚の行動を撮影した。実験は 2014 年 6 月 25 日から 8 月 12 日にかけて実施した。

3 - (2) - 1 - 3 実験方法

本実験では、「2 - (2) 報酬訓練」と同様の訓練手法を用いて、魚にエアレーションと餌との関連性を学習させた。ただし本訓練では、訓練間隔の異なる 3 条件を実験区として設けた（30 分区、1 時間区、2 時間区）。それぞれの実験区において、約 30 日間の間隔を設けて同様の訓練を 2 度実施し、前者を初期訓練、後者を記憶テストとすることで、訓練間隔の違いが学習および記憶に与える影響について評価した。訓練はすべて単独で実施した。

初期訓練

訓練開始 2 日前の正午に、飼育水槽からランダムに供試魚を 12 個体取り出し、2-フェノキシエタノールを用いて麻酔処理を施したのち、標準体長を測定し、VIE タグを用いて個体を識別した。その後、12 個の実験水槽に 1 個体ずつ魚を投入し、約 2 日間かけて水槽に馴致させた。馴致期間中は、9:00 および 18:00 前後に配合飼料をそれぞれ 30 粒ずつ給餌した。その際、魚が実験水槽の特定のエリアを餌場として学習しないよう、配合飼料が水槽に均等に広がるよう注意して給餌を行った。初期訓練前日の 18:00 の給餌で、全ての個体が餌を食

べていることを確認したのち、翌日より訓練を開始した。

訓練では、まず水槽内に設置されたエアレーションを起動した (0.25 L/min)。続いて 30 秒後に、エアレーションの真上から配合飼料を約 6 粒給餌した。その後、給餌から 30 秒が経過したところで、エアレーションを停止させた。この一連の過程を訓練 1 セットとし、3 実験区ともに合計 20 回の訓練を実施した。訓練開始時刻は 9:00 頃、終了時刻は 18:00 とし、30 分区では 1 日、1 時間区では 2 日間、2 時間区では 4 日間かけて 20 回の訓練を実施した。訓練中の魚の行動は、実験水槽上部に設置したビデオカメラを用いて撮影した。

訓練休止期間 (約 30 日間)

初期訓練後、実験区ごとに魚を実験水槽から 1 つのストック水槽へと移した。ストック水槽には「2 - (2) 報酬訓練」と同一の装置を用いた。換水は海水かけ流し方式で行い (約 1.0 L/min)、水深は 300 mm に維持した。また、不透明な黒色のシートを用いて水槽の外周、および水槽の周囲を高さ 1650 mm まで覆った。さらに、魚が水槽から飛び出さないよう水槽の上部をネットで覆った。訓練休止期間中は、毎日 9:00 と 18:00 に配合飼料を飽食量与え、残餌や糞は適宜除去した。

記憶テスト

記憶テストを実施する 2 日前に、魚をストック水槽から 1 個体ずつ実験水槽へと移し、初期訓練時と同様の方法で馴致させた。その後、それぞれの実験区において初期訓練時と同様の訓練間隔で 20 回の訓練を実施した。記憶テスト実施後、麻酔処理を施したのち各個体

の標準体長を測定し、VIE タグをもとに個体を識別した。

3 - (2) - 1 - 4 データ解析

魚の行動解析の指標には、「2 - (2) 報酬訓練」で使用した「寄り付き時間」を採用した。魚が初期訓練においてエアレーションと餌との関連性を学習していたことを確認し、さらに訓練間隔の違いが学習に与える影響について検討するために、GLMM による解析を行った。寄り付き時間を応答変数とし、訓練回数 (1~20 回)、実験区 (30 分区, 1 時間区, 2 時間区)、標準体長を説明変数とした。また、個体差をランダム要因として考慮して個体番号をランダム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。各応答変数の有意性は Wald test を用いて評価した。統計解析にはフリーソフト R を使用し、GLMM の解析には lme4 package を使用した。

訓練間隔の違いが記憶に与える影響についても検討するために、記憶テスト時の結果についても初期訓練時と同様の方法で GLMM による解析を行った。すなわち、寄り付き時間を応答変数とし、訓練回数、実験区、標準体長を説明変数とした。また、個体差をランダム要因として考慮し個体番号をランダム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。

3 - (2) - 2 結果

3 - (2) - 2 - 1 初期訓練

初期訓練に使用した 36 個体のうち、24 個体について初期訓練および記憶テストの実験結果を得た (Table 3-1)。初期訓練ではすべての実験区において、訓練を重ねるにつれて寄り付き時間が増加する傾向がみられた (Fig. 3-1)。Wald test により、説明変数の訓練回数には有意差がみられたが、実験区および体長にはみられなかった (訓練回数: $Z = 48.44$, $P < 0.001$; 1 時間区: $Z = -0.96$, $P > 0.05$; 2 時間区: $Z = -0.07$, $P > 0.05$; 標準体長, $Z = -0.77$, $P > 0.05$; Table 3-2)。これらの結果は、初期訓練 20 回目までにマダイ稚魚がエアレーションと餌との関連性を学習していたことを示している。また、本実験で設定した訓練間隔の違いや、供試魚の標準体長のばらつきが、学習に明確に影響していなかったことを意味している。

3 - (2) - 2 - 2 記憶テスト

記憶テストでは、3 実験区ともに初期訓練時よりも少ない訓練回数で寄り付き時間が増加する傾向がみられ、全体を通して 30 分区が比較的高い値を示したが、訓練終盤ではどの実験区においても初期訓練時より低い値を示した (Fig. 3-2)。Wald test により、説明変数の訓練回数には有意差がみられたが、実験区および体長にはみられなかった (訓練回数: $Z = 16.26$, $P < 0.001$; 1 時間区: $Z = -1.28$, $P > 0.05$; 2 時間区: $Z = -0.69$, $P > 0.05$; 標準体長, $Z = 0.45$, $P > 0.05$; Table 3-3)。これらの結果は、記憶テストでは 30 分区が比較的高い寄り付き時間を示したが、実験区間で統計的な差はみられず、訓練間隔の違いや体長のばらつき

が記憶に影響していなかったことを意味している。

3 - (2) - 3 考察

本研究において、訓練間隔の違いがマダイ稚魚の報酬訓練における学習および記憶に与える影響について検討した結果、間隔の違いが30分から2時間程度であれば、明確な影響はないことが示された。背景で述べた通りヒトを含む多くの動物では、短い訓練間隔で短期間に訓練を施す集中学習よりも、適切な訓練間隔を設けて繰り返し訓練を実施する分散学習の方が、記憶保持期間が長くなることが報告されている。本研究においても、1日ですべての訓練が完了する30分区は、訓練に4日間を要する2時間区や、2日間要する1時間区と比較して、記憶保持期間が短くなることが予想された。しかしながら、実験区間で初期訓練時および記憶テスト時の反応に明確な差はみられず、むしろ記憶テストでは30日区が最も良い成績を示した。このことから、マダイ稚魚では訓練間隔が30分間もあれば、分散学習が成立する可能性が示唆された。しかしながら、ヒトの分散学習に関する先行研究では、分散学習と集中学習の効果の差は、学習の反復回数が増すほど広がることが報告されており（Underwood, 1970）、本種においても、同様の条件で訓練の反復回数を増やした追加実験が必要であろう。

また本研究では、3実験区ともに、初期訓練時と比較して記憶テスト時の訓練終盤の寄り付き時間が低下する傾向がみられた。本結果は、訓練休止期間中に魚が成長し、学習能力が

衰退したことが影響したのではないかと考えられる。ナンヨウアゴナシ *Polydactylus sexfilis* (Masuda & Ziemann, 2000) やイシダイ *Oplegnathus fasciatus* (Makino *et al.*, 2006) では、幼魚期の比較的早い段階で、報酬訓練に関する学習能力の衰退がはじまることが報告されている。実際マダイについても、後述する「4 - (3) 報酬訓練におけるマダイ稚魚の学習能力および記憶保持能力の個体発生」の中で、同様の結果が得られている。

最後に、本研究の結果から魚類の学習能力の水産分野への応用を考えると、栽培漁業等において放流種苗の訓練を実施する際は、必ずしも長期にわたって継続して訓練を行う必要はなく、放流の前日に 1 日だけ訓練を実施すれば、十分な効果が得られる可能性が示された。今後は、本実験で設定した 30 分区よりも短い訓練間隔を設けた追加実験を実施し、本種の分散学習と集中学習の境界を明確にすることで、より効率的な訓練手法の確立が可能になるものと期待される。

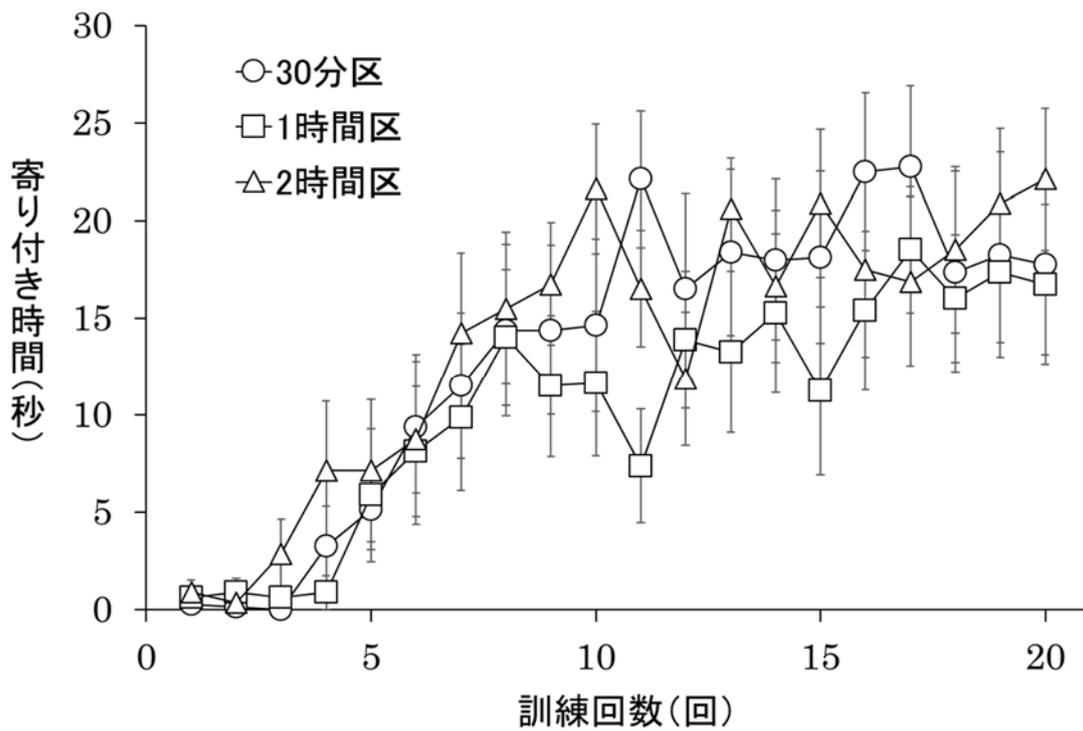


Fig. 3-1 訓練間隔の異なる各実験区の初期訓練時の寄り付き時間 (mean ± SE, n = 8)。

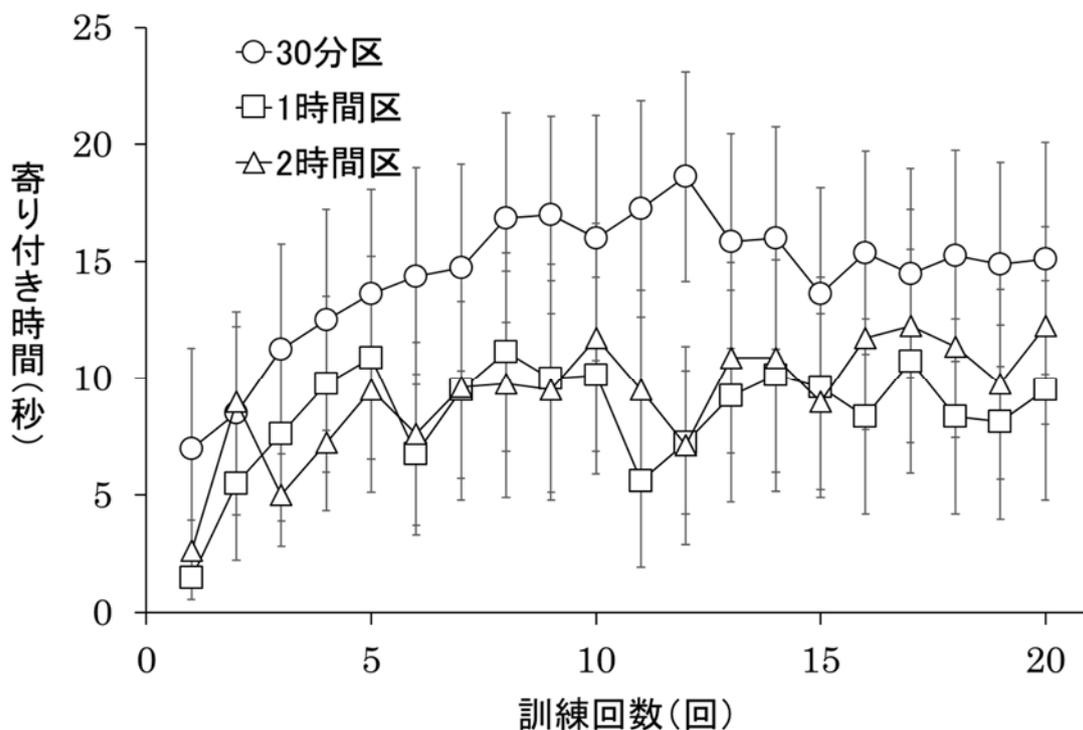


Fig. 3-2 訓練間隔の異なる各実験区の記憶テスト時の寄り付き時間 (mean ± SE, n = 8)。

Table 3-1. 各実験区の個体数および標準体長

実験区	斃死個体数	実験済個体数	初期訓練	記憶テスト
			平均 ± S.D.	平均 ± S.D.
30 分区	4	8	77.38 ± 2.56 mm	96.75 ± 4.33 mm
1 時間区	4	8	78.00 ± 3.63 mm	104.00 ± 3.63 mm
2 時間区	4	8	74.13 ± 2.30 mm	92.13 ± 2.42 mm

SD, 標準偏差

Table 3-2. 初期訓練における寄り付き時間の GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	Z	P
訓練回数	0.21	0.004	48.44	< 0.001
1 時間区	-0.77	0.79	-0.96	> 0.05
2 時間区	-0.07	0.88	-0.07	> 0.05
標準体長	-0.09	0.12	-0.77	> 0.05
Intercept	4.42	9.24	0.48	> 0.05

Table 3-3. 記憶テストにおける寄り付き時間の GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	Z	P
訓練回数	0.07	0.004	16.26	< 0.001
1 時間区	-2.36	1.84	-1.28	> 0.05
2 時間区	-1.09	-1.58	-0.69	> 0.05
標準体長	0.08	0.17	0.45	> 0.05
Intercept	-8.74	16.67	-0.52	> 0.05

4. マダイの学習能力および記憶保持能力の個体発生

4 - (1) 研究の背景

ヒトを含む様々な動物群において、学習能力が成長にともない変化することが報告されている (Nottebohm, 1970; 畑 & 岡市, 1997; Ichikawa & Sasaki, 2003)。魚類においても、シマアジ *Pseudocaranx dentex* (塚本ら, 1995), ナンヨウアゴナシ (Masuda & Ziemann, 2000), イシダイ (Makino *et al.*, 2006), マアジ *Trachurus japonicus* (Takahashi *et al.*, 2010), ゼブラフィッシュ (Valente *et al.*, 2012) で同様の報告がある。上述のイシダイの学習能力の個体発生についての先行研究では、学習能力の発達および衰退時期が、生息環境の移行時期と一致していることが報告されており、本種の生態と学習能力との関わりについて考察されている。こうした魚類の学習能力の個体発生に関する知見は、生態を理解するうえで有用な知見であるとともに、栽培漁業や海洋牧場等の水産事業において、種苗の適切な放流サイズを検討するうえでも重要な知見と成り得る。

一方、学習と関係の深い記憶能力についても、成長に伴って変化することが哺乳類や鳥類において報告されている (Rovee, 1999; Reger *et al.*, 2009; Akers *et al.*, 2012)。しかしながら、これまで魚類の記憶能力の成長に伴う変化について検証した研究は皆無であった。仮に魚類の記憶能力が成長に伴い変化するのであれば、生態との関わりが予想されるとともに、上述の水産事業においても記憶という視点から種苗の適切な放流サイズを検討すべきであろう。

そこで本章の「4 - (2) 報酬訓練および罰訓練におけるマダイ稚魚の記憶保持能力の成長

に伴う変化」では、マダイ人工孵化仔魚を用いて、まず本種の記憶保持能力が成長に伴い変化するかどうかを検証した。そして「4 - (3) 報酬訓練におけるマダイ稚魚の学習能力および記憶保持能力の個体発生」では、より幅広いサイズのマダイを実験に使用することで、本種の学習能力および記憶保持能力の個体発生の過程について明らかにした。本研究は、魚類の記憶保持能力の個体発生について検討し、本能力と生態との関わりについて考察するとともに、栽培漁業や海洋牧場等の水産事業において、記憶保持能力という新しい視点から放流魚の最適なサイズについて検討することを目的としている。

4 - (2) 報酬訓練および罰訓練における マダイ稚魚の記憶保持能力の成長に伴う変化

4 - (2) - 1 材料と方法

本研究では、報酬訓練および罰訓練におけるマダイ稚魚の学習および記憶保持能力について、成長段階の異なる2つのグループを用いて比較を行った。本論文2章において「2 - (2) 報酬訓練」では体長80 mm前後の個体を使用していたのに対し、「2 - (3) 罰訓練」では50 mm前後の個体を使用しており、成長段階の違いが記憶保持期間の結果に影響した可能性があった。それゆえ本章では、体長50 mm区と80 mm区を設定し、記憶保持能力を比較した。報酬訓練の50 mm区については今回新たに実験を実施し、本論文の「3 - (2) 訓練間隔がマダイの記憶保持に与える影響」で得た訓練間隔1時間区の結果（以下、80 mm区）と比較した（標準体長：78.00 ± 3.63 mm, n = 8）。罰訓練では80 mm区の実験を実施し、本論文の「2 - (3) 罰訓練」で得たデータ（以下、50 mm区）と比較した（標準体長：47.80 ± 2.49 mm, n = 10）。

4 - (2) - 1 - 1 供試魚

報酬訓練

本論文の「3 - (2) 訓練間隔がマダイの記憶保持に与える影響」のために入手したマダイ人工種苗の中から、実験に使用していない12個体を実験に供した。実験開始までは、上記の実験と同一の条件で飼育を行った。

罰訓練

本論文の「2 - (3) 罰訓練」のために入手したマダイ人工種苗の中から、実験に未使用の個体について、上記実験と同一の条件で2013年10月17日から2014年5月16日まで飼育を続け、体長が80 mm前後まで成長した34個体を実験に供した。

4 - (2) - 1 - 2 実験水槽

報酬訓練

「3 - (2) 訓練間隔がマダイの記憶保持に与える影響」で使用した装置と同一のものをを用いた。

罰訓練

「2 - (3) 罰訓練」で使用した装置と同一のものをを用いた。

4 - (2) - 1 - 3 実験方法

報酬訓練および罰訓練ともに、一定の間隔を設けて同一の訓練を2度実施し、前者を初期訓練、後者を記憶テストとすることで、学習および記憶保持能力を評価した。本論文の第2章の結果を踏まえ、報酬訓練では訓練休止期間を30日間に設定し、罰訓練では9日間とした。

報酬訓練

「3 - (2) 訓練間隔がマダイの記憶保持に与える影響」の訓練間隔1時間区と同一の訓練

手法で、魚にエアレーションと餌との関連性を学習させた。訓練開始 2 日前の正午に、飼育水槽からランダムに供試魚を 12 個体取り出し、2-フェノキシエタノールを用いて麻酔処理を施したのち、標準体長を測定し、VIE タグを用いて個体を識別した。その後、12 個の実験水槽に 1 個体ずつ魚を収容し、約 2 日間かけて水槽に馴致させた。馴致期間中は、9:00 および 18:00 前後に配合飼料をそれぞれ 30 粒ずつ給餌した。その際、魚が実験水槽の特定のエリアを餌場として学習することのないよう、配合飼料が水槽に均等に広がるよう注意した。初期訓練前日の 18:00 の給餌で、全ての個体が餌を食べていることを確認したのち、翌日より訓練を開始した。

訓練では、まず水槽内に設置されたエアレーションを起動した (0.25 L/min)。続いて 30 秒後に、エアレーションの真上から配合飼料を約 6 粒給餌した。その後、給餌から 30 秒が経過したところで、エアレーションを停止させた。この一連の過程を訓練 1 セットとし、訓練間隔 1 時間で、2 日間かけて 20 回の訓練を実施した。訓練開始 (1 回目, 11 回目) の時刻は 9:00 頃、訓練終了 (10 回目, 20 回目) の時刻は 18:00 とした。訓練中の魚の行動は、実験水槽上部に設置したビデオカメラを用いて撮影した。今回、12 個体のマダイ稚魚に初期訓練を施した結果、20 回の訓練中常に水槽の端で静止していた個体が 1 個体、また 1 回目の訓練でエアレーションに寄り付いた個体が 1 個体みられたため、これらの 2 個体についてはその後の実験から除外した。

初期訓練後、実験区ごとに魚を実験水槽から 1 つのストック水槽へと移し、約 30 日間エアレーションのない環境で飼育した。ストック水槽には「2 - (2) 報酬訓練」と同一の装置

を用いた。換水は海水かけ流し方式で行い（約 1.0 L/min）、水深は 300 mm に維持した。

訓練休止期間中は、毎日 9:00 と 18:00 に配合飼料を飽食量与え、残餌や糞は適宜除去した。

記憶テストを実施する 2 日前に、魚をストック水槽から 1 個体ずつ実験水槽へと移し、初期訓練時と同様の方法で馴致させた。その後、初期訓練時と同一の手法で訓練を 20 回実施した。記憶テスト実施後、麻酔処理を施したのち各個体の標準体長を測定し、VIE タグをもとに個体を識別した。

罰訓練

「2 - (3) 罰訓練」と同一の訓練手法を用いて、マダイ稚魚に Y 字型迷路の不正解の経路と罰との関連性を学習させた。飼育水槽からランダムに供試魚を取り出し、標準体長を測定したのち、Y 字型迷路のスタートエリア（「2 - (3) 罰訓練」に詳記）に収容した。これを 10 分間エリア内に馴致させたのち、訓練を開始した。訓練では、まず迷路の入口の不透明な黒色アクリル板（以下、ゲート）を取り除き、その直後にスタートエリアの後方から静かに手網を水中に入れ、3 秒後に網をゆっくりと前進させ（約 50 mm/s）、マダイを奥へと誘導することで迷路の左右の経路を選択させた。その際、マダイが Y 字型迷路の左側の経路を選択した場合は正解、右側を選択した場合は不正解と設定した。マダイが右側の経路を選択した場合は、そのまま手網を経路の奥まで前進させ、迷路の先端の狭い空間に 30 秒間閉じ込めるという罰を与えた。そして 30 秒後に手網を取り除き、ストレスを最小限にするために透明なアクリル板を用いて魚をスタートエリアへと誘導した。魚がスタートエリアに戻ったら、ゲートを挿入して再び入口を封鎖し、30 秒間休息させた。一方、マダイが左側の経

路を選択した場合は、経路の分かれ道の手前で網を取り除き、罰を与えずに経路内で30秒間休息させた。その際、魚がスタートエリアや右側の経路へと侵入することを防ぐために、左の経路の入り口に上述の透明なアクリル板を挿入した。そして30秒後にアクリル板を取り除き、右の経路を選択した際と同様の方法で魚をスタートエリアへと戻し、さらに30秒間休息させた。この一連の過程を訓練1セットとした。「2-(3) 罰訓練」と同様に、魚が正解の経路を7回連続で選択した時点で学習が成立したとみなし、訓練を終了した。また、30回以内に学習できなかった個体、および手網を投入した際に過剰に怯えたり、横臥行動を示して、自発的に経路を選択することが出来なかった個体については、実験から除外した。

初期訓練において学習が成立したマダイについては、「2-(3) 罰訓練」と同一のストック水槽に収容し、記憶テストを実施するまでの約9日間単独で飼育した。訓練休止期間中は、毎日9:00と18:00に配合飼料を飽食量与え、残餌や糞は適宜除去した。

訓練休止期間後、標準体長を測定し、魚を実験水槽のスタートエリアに収容し、10分間馴致させたのち、初期訓練時と同様の訓練を実施した。

4-(2)-1-4 データ解析

報酬訓練

報酬訓練における魚の行動解析の指標には、「2-(2) 報酬訓練」で使用した「寄り付き時間」を採用した。魚が初期訓練においてエアレーションと餌との関連性を学習していたことを確認し、さらに50mm区と80mm区とで学習能力を比較することを目的として、GLMM

による解析を行った。寄り付き時間を応答変数とし、訓練回数（1~20回）、実験区（50 mm 区、80 mm 区）を説明変数とした。また、個体差をランダム要因として考慮して個体番号をランダム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。各応答変数の有意性は Wald test を用いて評価した。統計解析にはフリーソフト R を使用し、GLMM の解析には lme4 package を使用した。

さらに、50 mm 区と 80 mm 区とで記憶保持能力を比較することを目的として、記憶テスト時の結果についても初期訓練時と同様の方法で GLMM による解析を行った。すなわち、寄り付き時間を応答変数とし、訓練回数、実験区を説明変数とした。また、個体差をランダム要因として考慮し個体番号をランダム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。

罰訓練

罰訓練における学習および記憶保持能力の指標には「2 - (3) 罰訓練」と同様に、学習成立に要した総訓練回数を採用した。50 mm 区と 80 mm 区とで学習および記憶保持能力を比較することを目的として、GLMM による解析を行った。総訓練回数を応答変数とし、訓練の種類（初期訓練もしくは記憶テスト）、実験区（50 mm 区、80 mm 区）を説明変数とした。また、個体差をランダム要因として考慮し個体番号をランダム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。各応答変数の有意性は Wald test を用いて評価した。統計解析にはフリーソフト R を使用し、GLMM の解析には lme4 package を使用した。

また上述の GLMM 解析の結果、80 mm 区の方が 50 mm 区よりも総訓練回数が少ないことが示された。そのため、学習および記憶保持能力のどちらに差が生じていたのかを明確にするために、Mann-Whitney U test を用いて初期訓練時および記憶テスト時それぞれの総訓練回数について、50 mm 区と 80 mm 区で比較した。

4 - (2) - 2 結果

4 - (2) - 2 - 1 報酬訓練

本実験で初期訓練に使用した 12 個体のうち、10 個体について学習および記憶保持能力の評価結果を得た（50 mm 区: 50.50 ± 3.84 mm, $n = 10$ ）。初期訓練時における Wald test の結果、説明変数のうち訓練回数に有意差がみられたが、実験区にはみられなかった（訓練回数: $Z = 42.14$, $P < 0.001$; 50 mm 区, $Z = 1.00$, $P > 0.05$; Table 4-1)。この結果は、初期訓練 20 回目までにマダイ稚魚がエアレーションと餌との関連性を学習していたことを示している。また、50 mm 区と 80 mm 区では、学習能力に差がなかったことを示唆している (Fig. 4-1)。

一方記憶テストにおける Wald test では、説明変数のうち訓練回数と実験区ともに有意差がみられた（訓練回数: $Z = 15.47$, $P < 0.001$; 50 mm 区, $Z = 3.29$, $P < 0.001$; Table 4-2)。この結果は、記憶テスト時では 50 mm 区は 80 mm 区よりも高い寄り付き時間を示していたことを意味している。また、初期訓練では両者の学習能力に差がみられなかったことから、本結果は 50 mm 区の記憶保持能力が優れていたことを示唆している (Fig. 4-2)。

4 - (2) - 2 - 2 罰訓練

34 個体のマダイ稚魚に初期訓練を実施した結果、14 個体が Y 字型迷路の不正解の経路と罰との関連性を学習した。その後、訓練休止期間中に 2 個体が斃死し、さらに 1 個体が記憶テスト時の人為的なミスで欠番となったため、最終的に 11 個体から学習および記憶能力の評価結果を得た (80 mm 区: 76.63 ± 6.24 mm, $n = 11$)。Wald test の結果、説明変数のうち訓練の種類および実験区ともに有意差がみられた (記憶テスト, $Z = -6.91$, $P < 0.001$; 50 mm 区, $Z = 2.42$, $P < 0.05$; Table 4-3)。この結果は、記憶テスト時は初期訓練時よりも少ない訓練回数で学習が成立していたことを示している。また 80 mm 区の学習能力、もしくは記憶保持能力が、50 mm 区よりも優れている可能性を示唆している。

Mann-Whitney U test を用いて、初期訓練時の総訓練回数を 50 mm 区と 80 mm 区とで比較したところ、明確な差はみられなかった ($U = 51.50$, $P > 0.05$)。一方記憶テスト時では、両者の総訓練回数に有意差がみられた ($U = 23.00$, $P < 0.05$)。これらの結果は、80 mm 区の記憶保持能力が 50 mm 区よりも優れていたことを示唆している (Fig. 4-3)。

4 - (2) - 3 考察

本研究の結果、マダイ稚魚の報酬訓練における記憶保持能力は、80 mm 区よりも 50 mm 区の方が優れていることが明らかとなった。一方罰訓練では、逆に 80 mm 区の方が優れた記憶保持能力をもつことが示された。これらの結果は、50 mm 程度のマダイ稚魚が摂餌重

視の戦略を取るのに対し、80 mm 程度まで成長すると対捕食者重視の戦略へとシフトさせる可能性を示唆している。一般に、魚類の初期生活史においては、成長速度が速い個体ほど生残率が高いといわれる (Anderson, 1988)。その理由の 1 つに、成長に伴いサイズと遊泳力が増加すると捕食者に食べられにくくなり、また餌を捕獲する能力も高まることから、死亡率は低下するという「Bigger is Better 仮説」がある (山下, 2010)。それゆえ本種においても、生活史初期に摂餌重視の戦略を取ることは、生き残りを考えるうえで有効であろう。本研究では、体長の小さな 50 mm 区の方が報酬訓練における記憶保持能力がすぐれていたことから、学習および記憶保持能力についても初期生活史において摂餌重視の戦略をとっている可能性が窺える。

また、本種は稚魚期に沿岸浅所の藻場や砂地で採食なわばりを形成するが、体長が 50–80 mm 程度まで成長すると生息域を沖合へと拡大していく (猪子ら, 1978)。両環境における捕食者からの逃避について推察すると、沿岸浅所は比較的構造が複雑であり、一時的な避難場所が数多く存在することから、捕食者からの逃避は容易であろう。一方、沖合は沿岸よりも構造が単調であり避難場所が少ないため、捕食者の攻撃から逃れるのは困難であることが予想される。実際、藻場状の構造物の存在が、マダイ稚魚の被食率を著しく低下させることが報告されている (小路, 2009)。それゆえ沖合環境では、学習した情報をもとにいち早く捕食者の存在に気づくことや、本研究の罰訓練のように安全な避難場所までの経路を正確に記憶しておくことが、生存率を高めるうえで重要であると推測される。本研究でみられた報酬訓練における記憶保持能力の衰退および罰訓練における記憶能力の発達、本種の

生息域拡張期と概ね一致していることから、マダイ稚魚が生息環境の変化に合わせて記憶保持能力を摂餌重視から対捕食者重視へと戦略的に変化させている可能性を示唆している。

以上の通り、本節の実験は魚類の記憶保持能力が成長に伴い変化することを示しただけでなく、その発達および衰退時期が学習する内容によって異なることを示した初めての研究である。

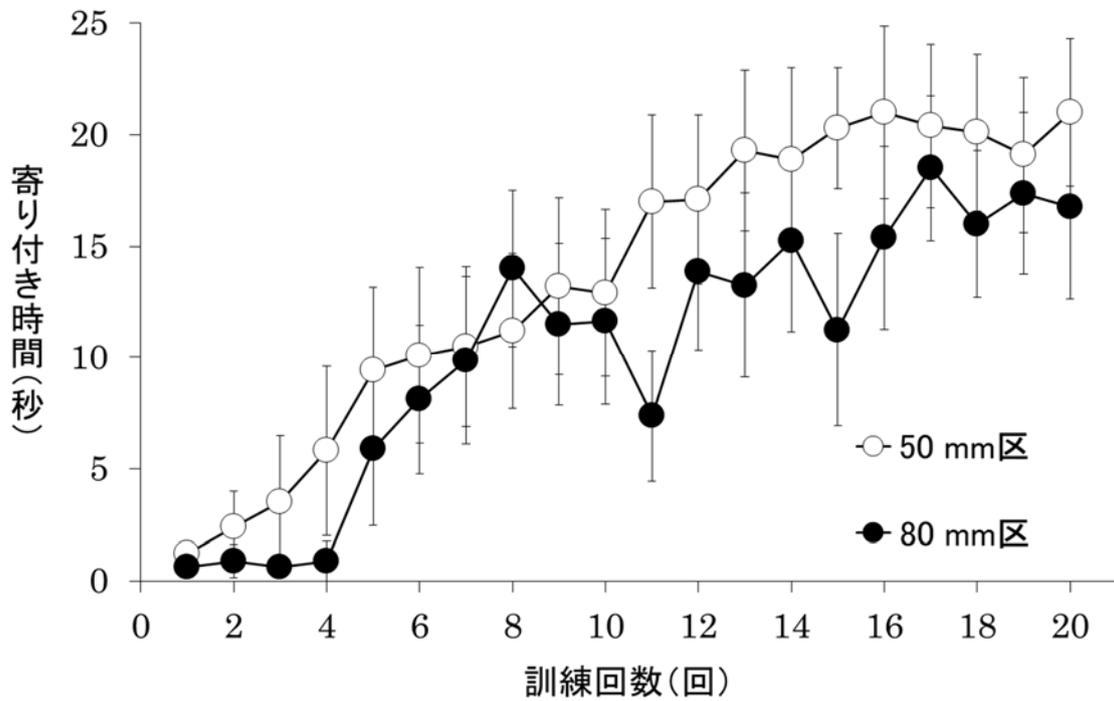


Fig. 4-1 成長段階の異なる 2 集団の報酬訓練における初期訓練時の寄り付き時間 (mean \pm SE, 50 mm 区: n = 10, 80 mm 区: n = 8)。

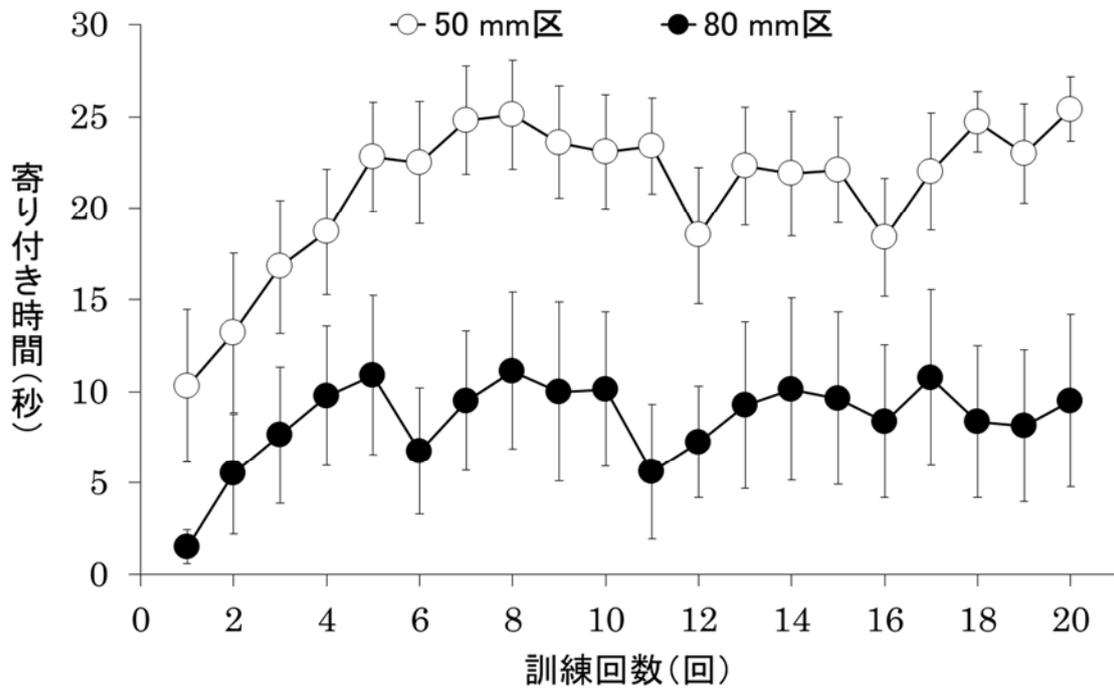


Fig. 4-2 成長段階の異なる 2 集団の報酬訓練における記憶テスト時の寄り付き時間 (mean \pm SE, 50 mm 区: n = 10, 80 mm 区: n = 8)

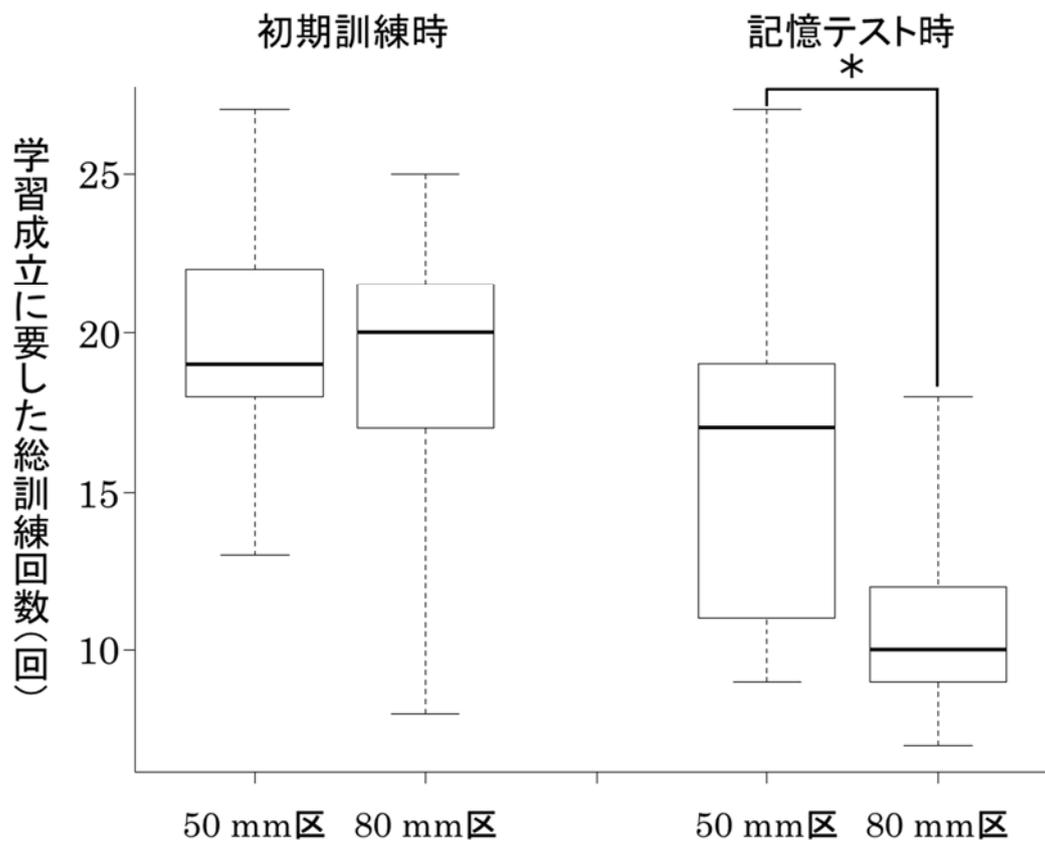


Fig. 4-3 成長段階の異なる2集団の罰訓練における初期訓練時および記憶テスト時の学習成立に要した総訓練回数 (50 mm 区: n = 10, 80 mm 区: n = 11)。アスタリスク (*) は有意差があることを示す (Mann-Whitney U test, $P < 0.05$)。

Table 4-1. 報酬訓練の初期訓練における寄り付き時間の GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	<i>Z</i>	<i>P</i>
訓練回数	0.24	0.006	42.14	< 0.001
50 mm 区	0.93	0.93	1.00	> 0.05
Intercept	-3.83	0.70	-5.50	< 0.001

Table 4-2. 報酬訓練の記憶テストにおける寄り付き時間の GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	<i>Z</i>	<i>P</i>
訓練回数	0.08	0.005	15.47	< 0.001
50 mm 区	3.47	1.06	3.29	< 0.001
Intercept	-3.03	0.79	-3.82	< 0.001

Table 4-3. 罰訓練における GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	<i>Z</i>	<i>P</i>
記憶テスト	-0.82	0.12	-6.91	< 0.001
50 mm 区	0.54	0.22	2.42	< 0.05
Intercept	0.33	0.16	2.09	< 0.05

4 - (3) 報酬訓練におけるマダイ稚魚の学習能力および

記憶保持能力の個体発生

4 - (3) - 1 材料と方法

4 - (3) - 1 - 1 供試魚

2015年5月4日、有限会社まる阿水産より標準体長約20 mmのマダイ人工孵化稚魚を300個体購入した。これらを京都大学舞鶴水産実験所へ輸送し、2つの透明な円形200L水槽に均等に分けて導入し、飼育を行った。飼育水には、舞鶴水産実験所の地先の海からポンプでくみ上げ、濾過槽を通して得られた濾過海水を使用し、換水は海水かけ流し方式で行った(4L/min)。それぞれの飼育水槽内に、エアレーションを1つ設置した。また、魚のストレスを軽減するために、飼育水槽の外周は不透明な青色のシートで覆った。魚が水槽から飛び出さないよう、水槽の上部はネットで覆った。飼育期間中は毎日9:00と18:00前後に1度ずつ、配合飼料(おとひめS2)を飽食させた。これらのうち、合計で64個体を実験に供した(標準体長18-110 mm)。

4 - (3) - 1 - 2 実験水槽

実験水槽には「2 - (2) 報酬訓練」と同様の60 cm透明アクリル水槽(L × W × H : 600 mm × 300 mm × 360 mm)を使用した。飼育水には濾過海水を使用し、換水は海水かけ流し方式で行い(約0.6 L/min)、水深は250 mmに維持した。実験水槽の中央にエアレーシ

ヨンを1つ設置し、後述する報酬訓練の条件刺激として使用した。また「2-(2) 報酬訓練」と同様に、実験者が魚に与える影響を極力抑えることを目的として、水槽の外周および周囲（高さ 1650 mm）を不透明な黒色のシートで覆い、実験時は水槽の上部 1650 mm の位置に設置したビデオカメラを用いて魚の行動を撮影した。実験は、2015 年 5 月 21 日から 2015 年 10 月 16 日にかけて実施した。

4-(3)-1-3 実験方法

本実験では、供試魚として様々な成長段階のマダイ稚魚を用いることで、本種の学習および記憶保持能力の個体発生について検討した。また、本実験は次章の「5-(2) マダイの記憶保持能力と横臥傾向の関係」と並行して行っており、実験前に横臥傾向の観察を実施している。訓練では、「2-(2) 報酬訓練」と同様の手法を用いることで、魚にエアレーションと餌との関連性を学習させた。約 30 日間の間隔を設けて同様の訓練を 2 度実施し、前者を初期訓練、後者を記憶テストとすることで、学習および記憶保持能力について評価した。訓練はすべて単独個体で実施した。

初期訓練

2つの飼育水槽からランダムに供試魚を取り出し、横臥傾向について観察した（次章「5-(2) マダイの記憶保持能力と横臥傾向の関係」に詳述）。その後、2-フェノキシエタノールを用いて麻酔処理を施し、体長測定を行ったのち、約 2 日かけて魚を実験水槽へと馴致させた。馴致期間中は、1 日目の 18:00 および 2 日目の 9:00, 18:00 に配合飼料を給餌し

た。その際、標準体長が 30 mm 未満の個体については 15 粒ずつ、30 mm 以上の個体については 30 粒ずつ給餌した。また、魚が実験水槽の特定のエリアを餌場として学習させないため、配合飼料が水槽に均等に広がるよう注意して給餌した。そして初期訓練前日の 18:00 の給餌で、魚が餌を食べていることを確認したのち、翌日より訓練を開始した。訓練では、まず水槽内に設置されたエアレーションを起動した (0.25 L/min)。続いて 30 秒後に、エアレーションの真上から配合飼料を給餌した。給餌量は、標準体長が 30 mm 未満の個体には約 3 粒ずつ、30 mm 以上の個体については約 6 粒ずつとした。給餌から 30 秒が経過したところで、エアレーションを停止させた。この一連の過程を訓練 1 セットとし、訓練間隔 1 時間で 2 日間かけて計 20 回の訓練を実施した。訓練開始時刻は 9:00 頃 (1 回目, 11 回目), 終了時刻は 18:00 (10 回目, 20 回目) とした。訓練中の魚の行動は、実験水槽上部に設置したビデオカメラを用いて撮影した。

訓練休止期間 (約 30 日間)

初期訓練後、魚を実験水槽からストック水槽へと移した。ストック水槽にはポリエチレン製の角形容器 (L × W × H: 1420 mm × 980 mm × 220 mm) を使用した。この容器内に、硬質な黒色のプラスチック製のネット (目合 7.5 mm) を用いて 28 個のストックエリア (L × W × H: 240 mm × 240 mm × 220 mm) を作製し、それぞれの区画に 1 個体ずつ魚を収容した。飼育水には濾過海水を使用し、換水は海水かけ流し方式で行い (6.0 L/min), 水槽の水深は 150 mm に維持した。訓練休止期間中は、毎日 18:00 前後に配合飼料を飽食量与え、残餌や糞は適宜除去した。

記憶テスト

記憶テストを実施する 2 日前に、魚をストック水槽から再び実験水槽へと移し、初期訓練時と同様の方法で実験水槽へと馴致させた。記憶テストでは、初期訓練時と同様の手法で 2 日間かけて 20 回の訓練を実施した。本テスト終了後、麻酔処理を施したのち、各個体の標準体長を測定した。

4 - (3) - 1 - 4 データ解析

魚の行動解析の指標には、「2 - (2) 報酬訓練」で使用した「寄り付き時間」を採用した。解析に際して、まず魚が初期訓練においてエアレーションと餌との関連性を学習していたことを確認し、さらに学習能力の個体発生について検討するために、GLMM による解析を行った。寄り付き時間を応答変数とし、訓練回数 (1~20 回) および標準体長を説明変数とした。また、個体差をランダム要因として考慮して個体番号をランダム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。各応答変数の有意性は Wald test を用いて評価した。統計解析にはフリーソフト R を使用し、GLMM の解析には lme4 package を使用した。また、各成長段階における学習能力の差を明確にすることを目的として、各個体の初期訓練 20 回分の寄り付き時間の総和を算出し、学習能力の指標とした (以下、学習スコア)。本指標は、エアレーションと餌との関連性を早く学習した個体ほど、高い値を示すものと考えられる (最大値 600 秒: 30 秒 × 20 回)。

記憶保持能力の個体発生についても検討するために、記憶テスト時の結果についても初

期訓練時と同様の方法で、GLMMによる解析を行った。すなわち、寄り付き時間を応答変数とし、訓練回数および標準体長を説明変数とした。また、個体差をランダム要因として考慮し個体番号をランダム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。また記憶テストでは、魚が初期訓練により学習した情報を記憶していれば、初期訓練時よりも少ない訓練回数でエアレーションに寄り付く行動が生じるため、記憶テスト時の学習スコアは初期訓練時よりも高い値を示すことが予想された。そこで、記憶テスト時の学習スコアから初期訓練時のスコアを引いた値を、各個体の記憶保持能力の指標とした（以下、記憶スコア）。すなわち、本指標が正の値を示した個体は記憶しており、0に近い値を示した個体は忘却していると判断することで、各成長段階における記憶保持能力について検討した。学習スコアおよび記憶スコアは、両スコアと体長との間のスピアマンの順位相関係数を算出することで、個体発生について検討した。また、実験に供した個体を初期訓練時の体長をもとに成長段階ごとにグループ化し、Kruskal-Wallis testを用いてグループ間の差についても検討した。

4 - (3) - 2 結果

初期訓練に使用した64個体のうち、7個体が実験水槽からの飛び出しにより斃死したため、合計57個体から初期訓練の実験結果を得た（18–110 mm）。また、その後の訓練休止期間および記憶テスト時に9個体が斃死したため、合計48個体から記憶テスト時の結果を得た（49–121 mm）。両訓練の結果、当初の予想通り、記憶テスト時は初期訓練時と比較し

てより少ない訓練回数でエアレーションに寄り付く行動が発現する傾向がみられた (Fig. 4-4)。初期訓練における Wald test の結果, 説明変数の訓練回数には有意差がみられたが, 体長にはみられなかった (訓練回数: $Z = 44.54, P < 0.001$; 標準体長, $Z = 0.76, P > 0.05$; Table 4-4)。これらの結果は, 初期訓練 20 回目までにマダイ稚魚がエアレーションと餌との関連性を学習していたこと, また成長段階の違いが学習に影響していなかったことを意味している。各個体の学習スコアを算出し, 体長との間のスピアマンの順位相関係数を算出した結果, 明確な相関はみられなかった (スピアマンの順位相関係数, $r = -0.10, P > 0.05$, Fig. 4-5)。しかしながら, 結果を 20 mm ごとにグループ化したところ, 51~70mm で学習能力のピークを迎える傾向が示された (Fig. 4-6)。ただし, グループ間で統計的な差はみられなかった (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 4.17, df = 4, P > 0.05$)。

記憶テスト時における Wald test の結果, 説明変数の訓練回数, 標準体長ともに有意差がみられた (訓練回数: $Z = 32.22, P < 0.001$; 標準体長, $Z = -5.19, P < 0.001$; Table 4-5)。これらの結果は, マダイ稚魚の記憶保持能力が成長に伴い衰退することを示唆している。各個体の記憶スコアを算出し, 体長との間のスピアマンの順位相関係数を算出した結果, 有意な相関がみられた (スピアマンの順位相関係数, $r = -0.45, P < 0.05$, Fig. 4-7)。さらに, 初期訓練時と同様に 20 mm ごとにグループ化したところ, 体長が 50 mm を越えたあたりから, 急激に記憶スコアが低下する傾向が示された (Kruskal-Wallis test, $\chi^2 = 12.46, df = 4, P < 0.05$, Fig. 4-8)。ただし, ボンフェローニ補正を行った Mann-Whitney U test による多重比較では有意差はみられなかった。

4 - (3) - 3 考察

本研究の結果から、マダイ稚魚の記憶保持能力が 50 mm を越えたあたりから急激に衰退する傾向が示された。また、学習能力については 51~70 mm 前後にピークがみられる可能性が示された。今回、記憶保持の指標として記憶スコアを採用したが、本スコアは訓練休止期間中に魚が成長し、それに伴い学習能力が発達すると、記憶テスト時に忘却している個体であっても、本スコアが正の値を示すことが予想された。実際、記憶スコアが最も高い値を示した体長 30 mm 以下のグループは、記憶テスト時には 49~58mm に成長しており、学習能力の発達による影響も多少あったことが予想される。しかしながら、学習スコアについてはグループ間で統計的な差がみらなかったことから、結果を大きく変えるほどの影響はなかったものと考えられる。

Y 字型迷路を用いた報酬訓練を用いてイシダイの学習能力の個体発生について調査した Makino *et al.* (2006) の研究では、体長 70 mm 前後で最も高い学習能力を示すことが報告されている。また上述の先行研究では、イシダイ稚魚の学習能力の発達時期が、本種が沖合から沿岸の岩礁域へと生息環境を移す時期と一致していることから、新規環境への適応における学習能力の重要性について考察している。また、マアジの空間学習能力について調べた Takahashi *et al.* (2010) の研究では、学習能力のピークが 51.7 mm 前後に存在することが報告されており、本種においても沖合から沿岸の岩礁域に生息環境を移行する時期と、学習能力の発達のピークが一致すると考察されている。本研究の対象種であるマダイ稚魚は、

全長 12~15 mm 前後に成長すると浮遊生活から底生生活へ移行する(田中, 1979)。その後、沿岸浅所の藻場や砂地で採食なわばりを形成し(工藤 & 山岡, 1998)、体長 50~80 mm に成長すると、生息域を沿岸浅所から水深の深い沖合へと拡大していく(生息域拡張期: 猪子ら, 1978)。学習能力という視点から本生態を考察すると、本種が沿岸浅所で採食なわばりを形成する際は餌場情報に関する学習能力が重要であるのに対し、比較的構造が単調な沖合環境では学習能力の重要性は低下すると推測される。実際、本研究で確認されたマダイ稚魚の学習能力のピークは、本種の生息域拡張期とほぼ一致していることから、上述のイシダイ稚魚やマアジと同様に、マダイ稚魚も生息環境の変化に合わせて戦略的に学習能力を変化させている可能性がある。

一方、魚類の記憶保持能力の個体発生に関する先行研究は皆無である。記憶保持能力という視点から本種の生態を考察すると、本種が沿岸浅所で学習した情報は、沖合への生息環境の移行に伴いその有用性が消失することが予想されるため、記憶保持にエネルギーを費やすことは有益ではないと考えられる。実際、本研究で確認された記憶保持能力の衰退時期は、生息域拡張期への移行とほぼ同時に始まっており、記憶保持能力においても生息環境の変化に合わせて戦略的に変化している可能性が高い。以上の通り本節の実験は、魚類の記憶能力の個体発生について検討した初めての研究であり、その結果は本種の生態に関する既往の知見とよく符合した。

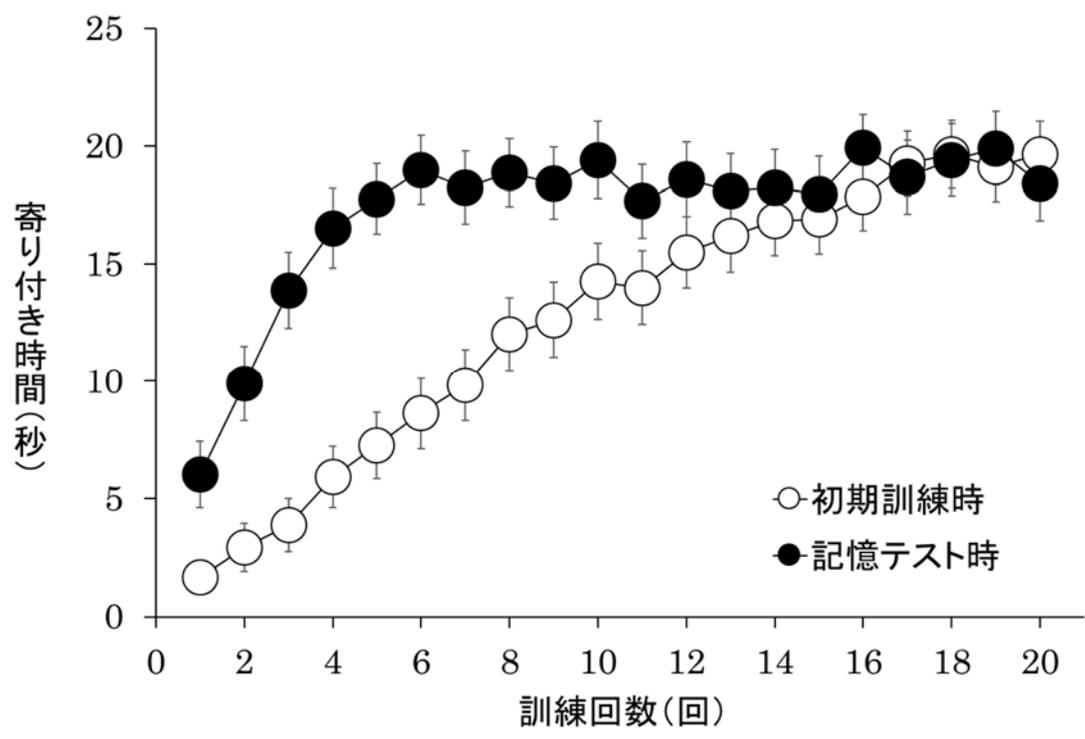


Fig. 4-4 初期訓練時 (○) および記憶テスト時 (●) の寄り付き時間 (mean ± SE, 初期訓練時: n = 57, 記憶テスト時: n = 48)。

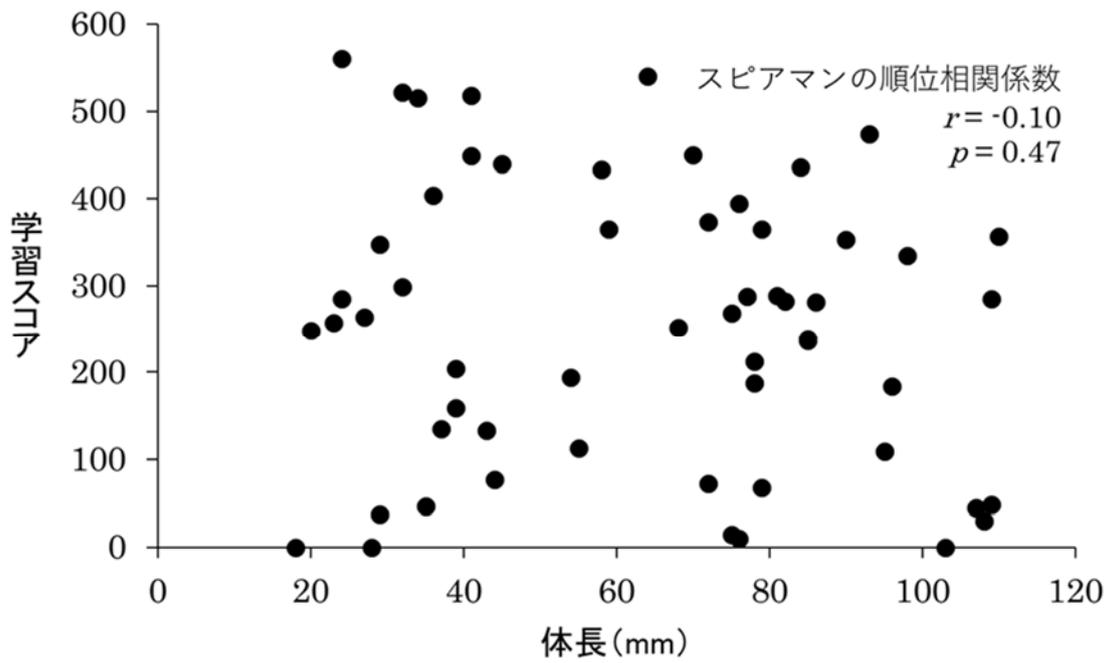


Fig. 4-5 体長と学習スコアの関係。

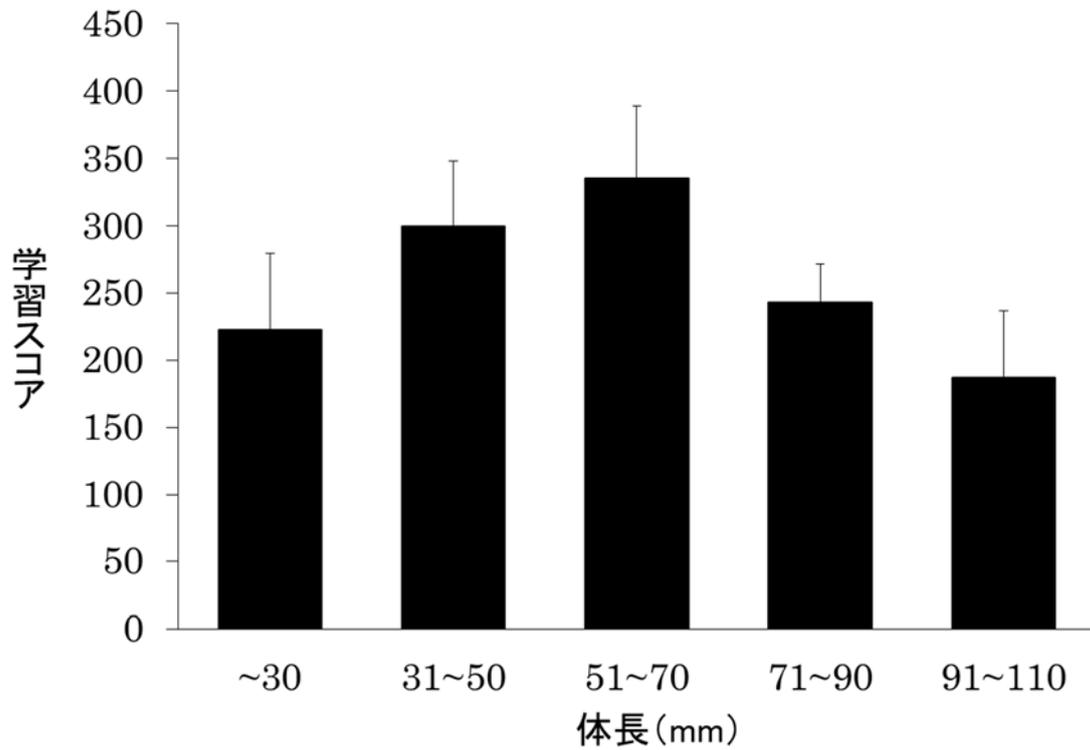


Fig. 4-6 各成長段階における初期訓練時の学習スコア (mean ± SE, ~30: n = 9, 31~50: n = 13, 51~70: n = 7, 71~90: n = 18, 91~110: n = 10)。

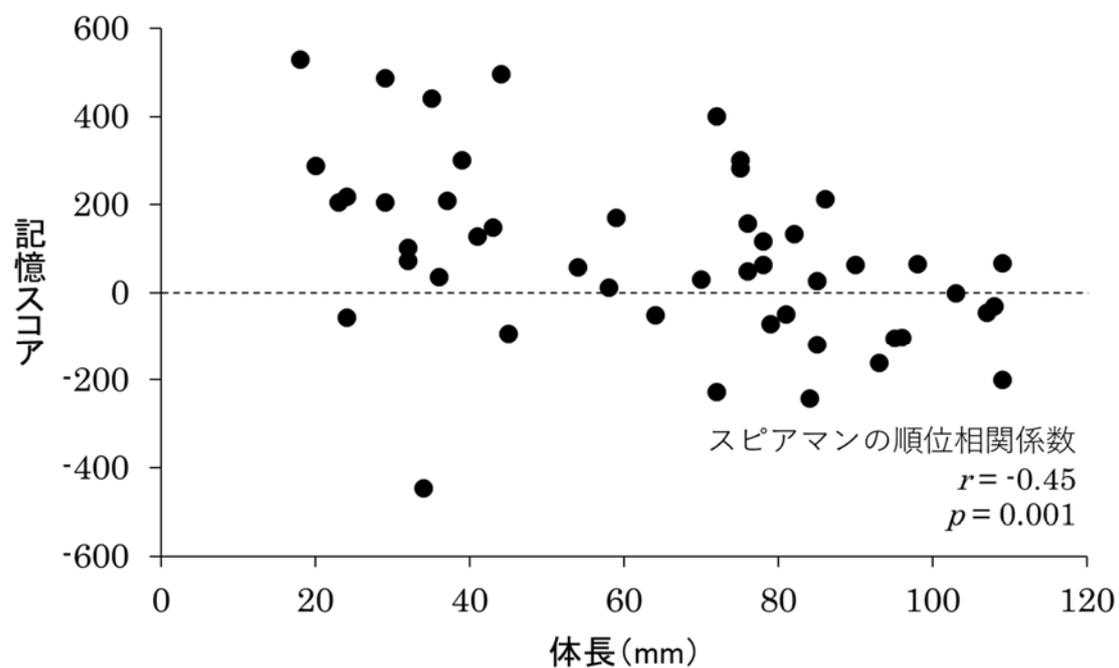


Fig. 4-7 体長と記憶スコアの関係。

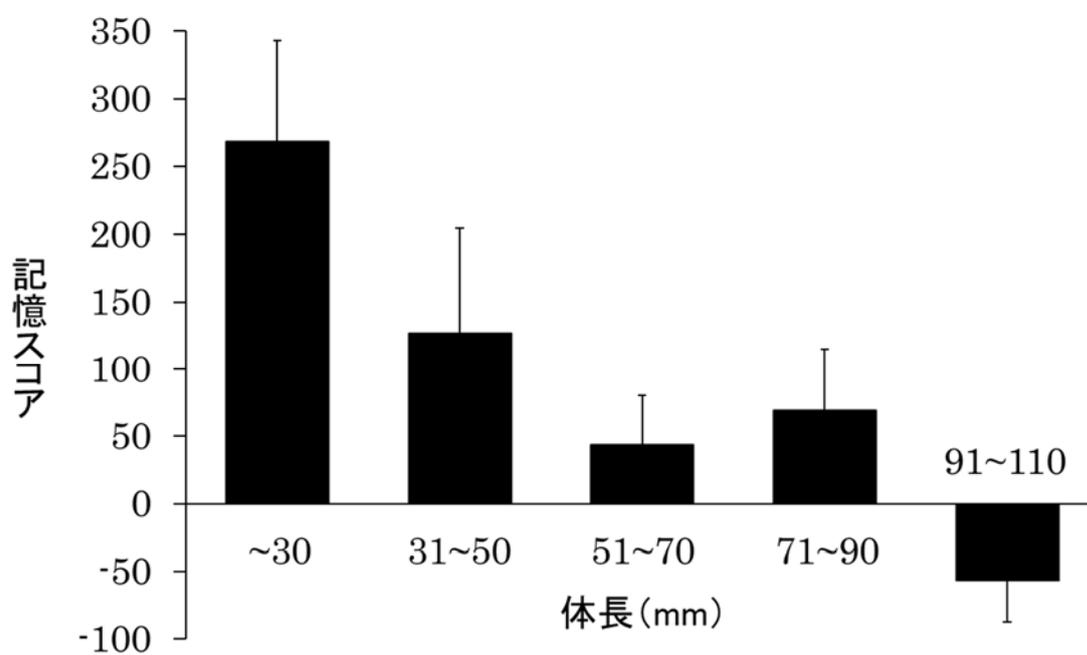


Fig. 4-8 各成長段階における記憶スコア (mean ± SE, ~30: n = 7, 31~50: n = 11, 51~70: n = 5, 71~90: n = 16, 91~110: n = 9)。

Table 4-4. 初期訓練時における GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	Z	P
訓練回数	0.14	0.003	44.54	< 0.001
標準体長	0.009	0.01	0.76	> 0.05
Intercept	-4.85	0.85	-5.70	< 0.001

Table 4-5. 記憶テスト時における GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	Z	P
訓練回数	0.09	0.003	32.22	< 0.001
標準体長	-0.06	0.01	-5.19	< 0.001
Intercept	4.83	1.11	4.37	< 0.001

5. マダイの記憶保持能力と個性

5 - (1) 研究の背景

ヒトの行動には個人差が存在し、この「個人の行動にみられる他の人と異なる特徴」のことを、一般に「性格」と呼ぶ（今野ら, 2014）。この「性格」はヒト以外の動物にも存在することが古くから知られており、今日まで哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類、昆虫、無脊椎動物と、多岐にわたる動物群において性格に関する研究がなされてきた。魚類の行動の個体差（behavioral syndrome）についても、近年飛躍的に研究が進んでいる（Conrad *et al.*, 2011）。この behavioral syndrome とは、状況に応じて現れる個体ごとに一貫した一連の行動様式と定義される（益田, 2013）。Reale *et al.* (2007) では、behavioral syndrome について、大胆さ・用心深さ（boldness-shyness）、探索・逃避（exploration-avoidance）、活動性（activity）、攻撃性（aggressiveness）、社会性（sociability）という5つの次元で表すことを提案している。たとえば、大胆さ・用心深さは、捕食者やヒトなど潜在的な危険を伴う状況に対する反応の個体差のことを指し（今野ら, 2014）、魚類においても非常に研究が盛んなテーマである。また魚類においてこの大胆さ・用心深さを計測する際は、一般に新規の物体への接近に要した時間や（Frost *et al.*, 2007）、隠れ家から出てくるまでの時間（Brown *et al.*, 2005）、新規の餌を摂餌するかどうか（Sundstrom *et al.*, 2004）といった指標によって評価される。

近年、魚類の大胆さ・用心深さに関する研究が進んだことで、こうした個性の違いが学習

や記憶にも影響を及ぼすことが明らかとなった。たとえばニジマスに光刺激と餌との条件づけを行った先行研究では、大胆な個体は用心深い個体よりも少ない訓練回数で学習が成立することが報告されている (Sneddon, 2003)。一方、ニジマスに警報物質と特定の魚種の匂いとの条件づけを行った先行研究では、学習能力には明確な差がみられなかったものの、大胆な個体の方が早く忘却している (Brown *et al.*, 2013)。しかしながら、こうした魚類の個性と学習および記憶との関係について調査した研究は事例が極めて少なく、海産魚に関しては皆無である。仮に、本論文の前章までに確認された報酬訓練や罰訓練におけるマダイ稚魚の記憶保持能力の個体差を、本種の個性によって説明することができれば、長期間に及ぶ学習・記憶実験を実施することなく記憶保持能力の優れた種苗の選別が可能となり得る。

そこで本研究では、マダイ稚魚の個性と学習および記憶との関係について検討した。実験では、個性の指標として本種の横臥行動に着目した。横臥行動とは、マダイ稚魚が何らかのストレスに対して警戒した際に発現する行動であり、体表に縞模様を出した状態で背鰭、腹鰭、胸鰭をいっばいに開き、体を底に接して静止する行動を示す (内田ら, 1993)。この行動は発現の強さが個体間で異なることから、魚類の大胆さ・用心深さを示す指標に適していると考え、本実験ではこの横臥傾向を個性の指標とした。また先行研究では、横臥傾向が強い個体ほど捕食者の攻撃を受けにくいことが報告されており (内田ら, 1993)、このことは栽培漁業における本種の種苗性の評価にも利用されている。しかしながら、横臥行動の発達に関する知見が不足していたことから、本研究では横臥傾向の個体発生過程についても検討した。

5 - (2) マダイの記憶保持能力と横臥傾向の関係

5 - (2) - 1 材料と方法

5 - (2) - 1 - 1 供試魚

「4 - (3) 報酬訓練におけるマダイ稚魚の学習能力および記憶保持能力の個体発生」で使用したマダイ稚魚と同一の個体を実験に使用した。

5 - (2) - 1 - 2 実験水槽

実験水槽には、プラスチック製の小型水槽 (L × W × H : 235 mm × 160 mm × 155 mm) を使用した。この水槽に、舞鶴水産実験所の地先の海からポンプでくみ上げ、濾過槽を通して得られた濾過海水を水深約 13 cm まで注ぎ、止水環境で実験を行った。

5 - (2) - 1 - 3 横臥傾向の測定

タモ網を用いて飼育水槽から可能な限り短時間で供試魚を1個体取り出し、宮島ら(2014)と同様に魚に適度なストレスを与えることを目的として、手網を使って30秒間魚を空気中に曝露したのち、実験水槽へと収容した。その後、ビデオカメラを用いてマダイ稚魚の行動を30分間撮影した。撮影終了後、2-フェノキシエタノールを用いて麻酔処理を施し、体長測定を行ったのち、「4 - (3) 報酬訓練におけるマダイ稚魚の学習能力および記憶保持能力の

個体発生」の実験に供した。また、実験水槽内の水を全て捨て、水槽内を軽く洗浄したのち、再び新鮮な濾過海水で満たしてから、次の個体の観察を行った。

マダイ稚魚の横臥行動のパターンは、内田ら（1993）に基づき、横臥行動期、浮上期、回転遊泳期、正常遊泳期の4ステージに分類し、それぞれのステージに移行するのに要した時間を計測した。内田ら（1993）によると、横臥行動とはマダイが魚体に縞模様を生じて水槽底に接して静止する行動である。また浮上期には、魚体の縞模様は淡くなり、稚魚は胸鰭だけを動かして水槽底部を離れて浮上するものの、移動せずに定位する。回転遊泳期は水平方向への回転を示すステージであり、正常遊泳期は攻撃行動や索餌行動をとともなう連続的な遊泳行動を示すステージであるとされる。本実験で横臥行動を解析した結果、横臥行動期から浮上期へ移行する際、多くの個体が浮上と横臥を繰り返したため、両ステージの明確な判別が困難であったことから、本実験では浮上期への移行に要した時間については横臥傾向の指標から除外した。また同様に、正常遊泳期に移行したと思われる個体であっても、すぐに水槽底部に定位し、再び浮上および回転遊泳を繰り返す個体が多くみられたことから、正常遊泳期への移行に要した時間についても、本指標から除外した。すなわち本実験では、横臥行動期および回転遊泳期への移行に要した時間を横臥傾向の指標に用いた。前者の指標は、一般に横臥傾向が強い個体ほど小さな値を示すといわれており（内田ら、1993）、本実験では魚を実験水槽へ収容してから水槽底部で定位する行動が発現するまでの時間を計測した。後者については、横臥傾向が強い個体ほど高い値を示すとされる（内田ら、1993）。本実験では、収容後に魚が体を水槽底部から浮かせた状態で、周囲を観察するように1回

転する行動が発現するまでの時間を、回転遊泳期移行に要した時間と定義した。

30 分間の行動観察の中で、回転遊泳期への移行が確認できなかった個体については、シーリング値として 1800 秒を割り当てた。また、実験水槽投入後に横臥行動を示さず、すぐに自然遊泳を示した個体については、以降の実験から除外した (n = 2)。

5 - (2) - 1 - 4 統計解析

横臥傾向の個体発生について検討することを目的として、本実験の横臥傾向の指標である「横臥行動期移行に要した時間」および「回転遊泳期移行に要した時間」と、各個体の標準体長との間のスピアマンの順位相関係数を算出した。

また同様に、横臥傾向と学習・および記憶能力の関係について検討することを目的として、上述の横臥傾向と、「4 - (3) 報酬訓練におけるマダイ稚魚の学習能力および記憶保持能力の個体発生」で得られた「学習スコア」および「記憶スコア」との間のスピアマンの順位相関係数を算出した。

5 - (2) - 2 結果

57 個体のマダイ稚魚について横臥行動の観察を試みたところ、カメラの不具合等が原因で 3 個体のデータが欠損となった。また、横臥行動を示さなかった個体が 2 個体みられたことから、合計で 52 個体から横臥傾向の観察結果を得た (標準体長:18-110 mm)。

横臥傾向と体長との間のスピアマンの順位相関係数を算出した結果、「横臥行動期移行に

要した時間」には有意な相関がみられたが（スピアマンの順位相関係数, $r = 0.47$, $P < 0.05$, Fig. 5-1), 「回転遊泳期移行に要した時間」との間にはみられなかった ($r = 0.19$, $P > 0.05$, Fig. 5-2)。この結果は、体長の大きな個体ほど横臥行動期への移行に多くの時間を要すること、すなわち横臥傾向が衰退することを意味している。

学習スコアと横臥傾向との間のスピアマンの順位相関係数を算出した結果、横臥傾向の両指標ともに明確な相関はみられなかった（横臥行動期: $r = -0.04$, $P > 0.05$, Fig. 5-3; 回転遊泳期: $r = -0.15$, $P > 0.05$, Fig. 5-4)。

記憶スコアと横臥傾向との間のスピアマンの順位相関係数を算出した結果、「横臥行動期移行に要した時間」には有意な相関がみられたが ($r = -0.40$, $P < 0.05$, Fig. 5-5), 「回転遊泳期移行に要した時間」との間にはみられなかった ($r = 0.004$, $P > 0.05$, Fig. 5-6)。この結果は、横臥傾向の強い個体ほど記憶保持能力が優れている可能性を示唆している。

5 - (2) - 3 考察

5 - (2) - 3 - 1 横臥傾向の個体発生

本研究の結果から、マダイ稚魚の横臥傾向が成長に伴い衰退する傾向が示された。内田ら (1993) の先行研究では、栽培漁業への応用を目的として、全長 40 mm までの個体のマダイ稚魚の横臥傾向を分析し、この範囲では成長に伴い横臥傾向が強まることを報告している。本研究では上記の研究よりも幅広い標準体長 18–110 mm の個体を実験に供したことが、

両者の結論の相違を引き起こしたと考えられる。実際、Fig. 5-1 をみると、標準体長 40 mm 未満ではすべての個体が実験水槽投入直後に横臥行動を示したのに対し、50 mm を越えると横臥行動期への移行に比較的長い時間を要する個体が増えている。それゆえ、横臥傾向のピークが体長 40 mm 前後にあると推察すると、先行研究とは矛盾をきたさない。また、本種は体長 50~80 mm に成長すると生息域拡張期を迎える（猪子ら, 1978）。その際、新規環境を探索中に突然捕食者と遭遇した場合は、おそらく横臥行動を示すよりも、遊泳による逃避を選択した方が生存率は高いことが予想される。今回観察された横臥傾向の衰退時期は、この生息域拡張期とも重なることから、本研究結果は、マダイ稚魚が生息域拡張期に横臥行動を戦略的に衰退させることで捕食者からの回避率を高めている可能性を示唆している。また、本研究のように動物の個性が成長にともない変化することを示した研究は、他の動物群においても非常に事例が少なく、新規性が高いと考えられる。

5 - (2) - 3 - 2 記憶保持能力と個性

本研究の結果から、横臥傾向の強い個体ほど記憶保持能力が優れている可能性が示唆された。しかしながら、「4 - (3) 報酬訓練におけるマダイ稚魚の学習能力および記憶保持能力の個体発生」において、記憶保持能力が成長に伴い衰退することが示されており、かつ本研究において横臥傾向が成長に伴い衰退することが分かったため、本結果は体長が潜在変数となった疑似相関である可能性がある。それゆえ、横臥傾向と記憶保持能力に実際に相関があるかどうかを確認するためには、供試魚の体長を統一した状態で横臥傾向と記憶スコア

の測定を行った追加実験が必要であろう。また、今回「回転遊泳期移行に要した時間」については、学習および記憶との相関は確認できなかった。本研究では、横臥傾向をもとに報酬訓練における学習および記憶能力の個体差の説明を試みたが、その結果は横臥傾向と報酬訓練との間に関連性がなかったことを示唆している。実際、魚類の行動は単一の指標ですべての行動が説明できるわけではなく、パンプキンシードサンフィッシュ *Lepomis gibbosus* の大胆さ・用心深さの個性に関する先行研究では、新奇の物体に対する探索行動と採餌における積極性との間に関連がなかったことが報告されている (Coleman & Wilson, 1998)。それゆえ、今後同様の実験を実施する際は、behavioral syndrome の5つの次元、すなわち大胆さ・用心深さ、探索・逃避、活動性、攻撃性、そして社会性の中から複数の指標について計測したうえで、学習および記憶保持能力の測定を行うのが望ましいと考えられる。

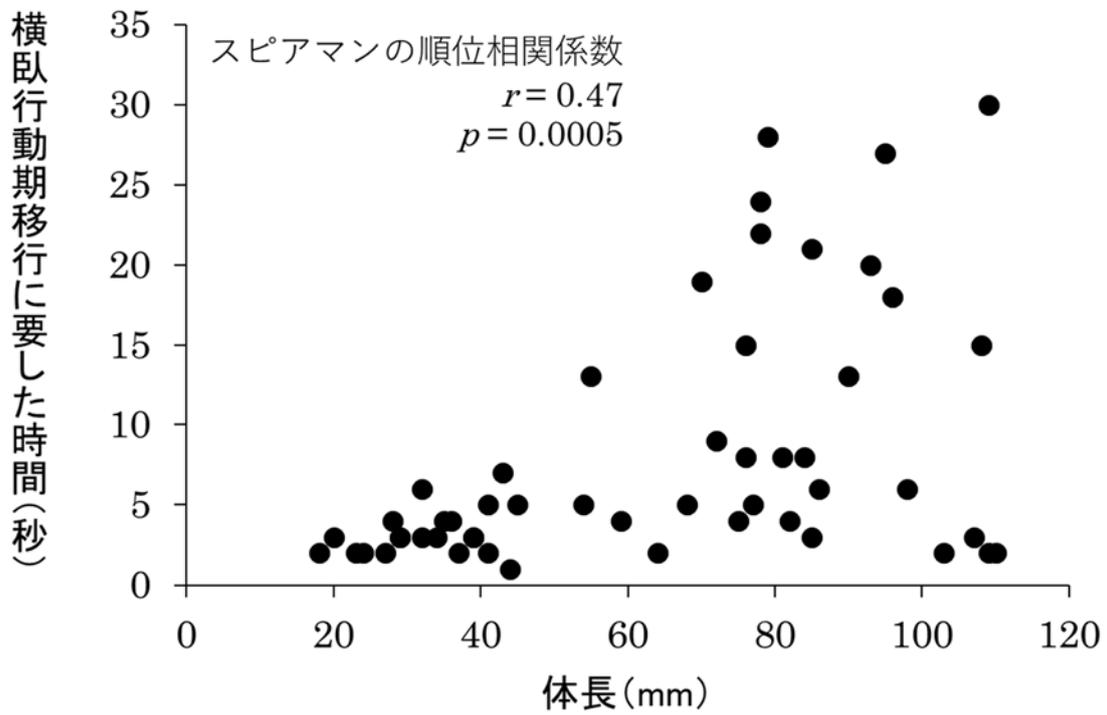


Fig. 5-1 マダイ稚魚の横臥傾向の個体発生 (横臥行動期移行に要した時間; n = 52)

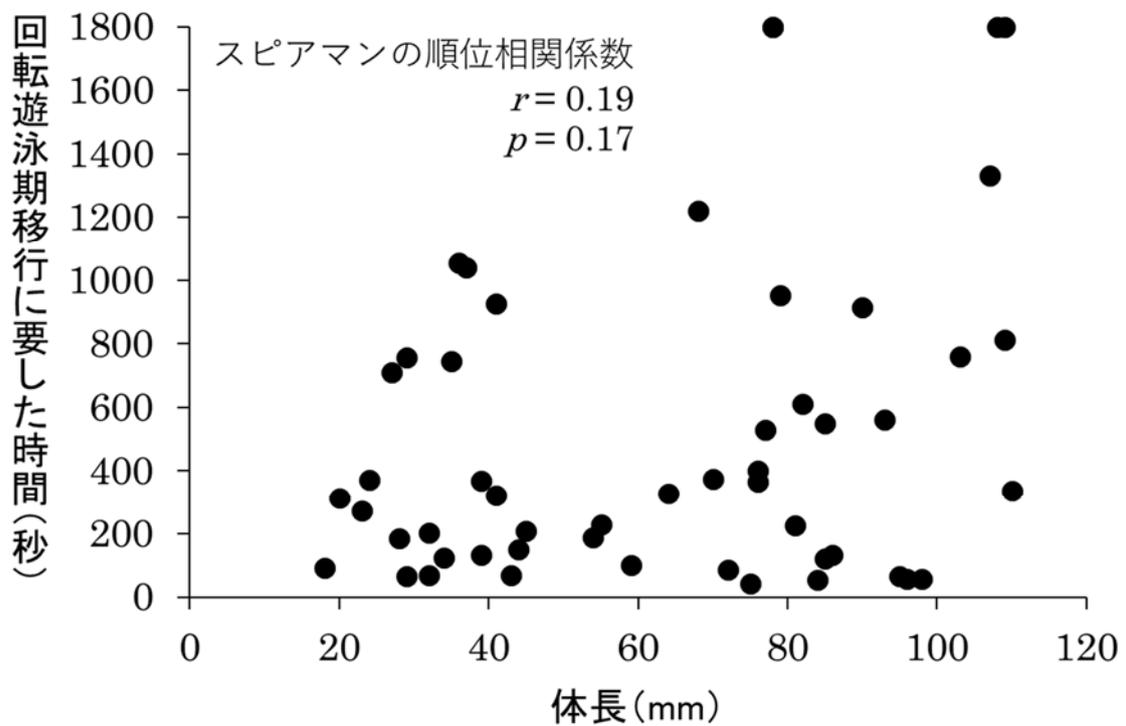


Fig. 5-2 マダイ稚魚の横臥傾向の個体発生 (回転遊泳期移行に要した時間; n = 52)。

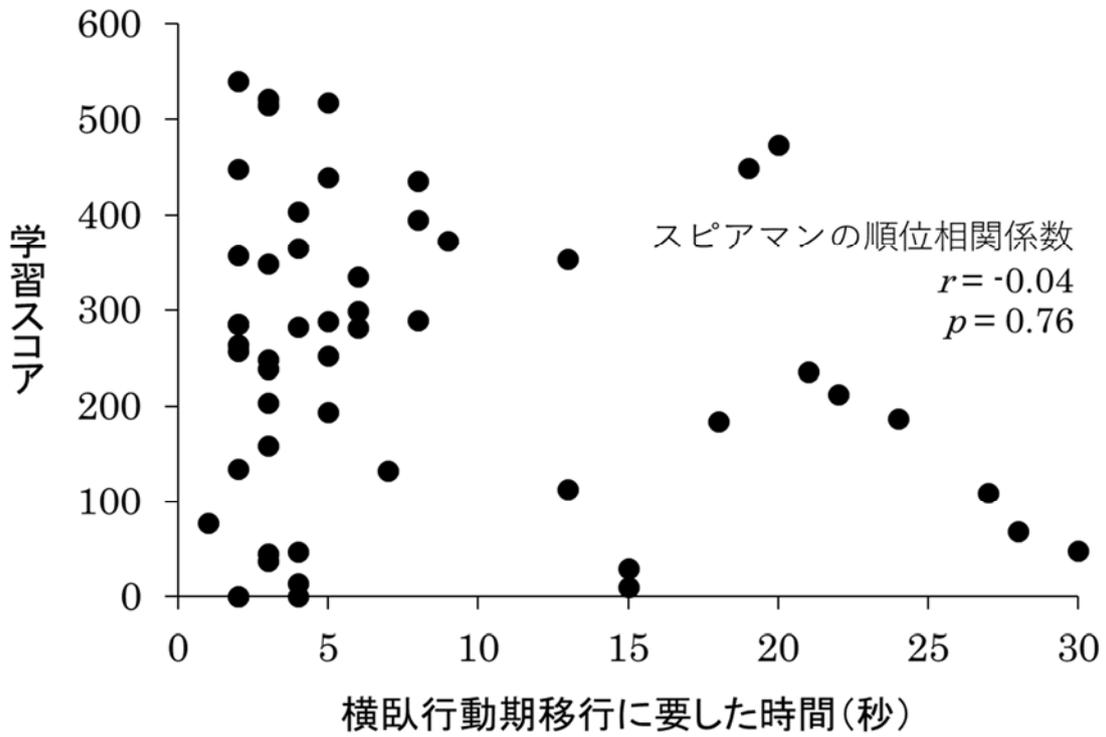


Fig. 5-3 マダイ稚魚の学習スコアと横臥傾向の関係（横臥行動期移行に要した時間; n = 52）。

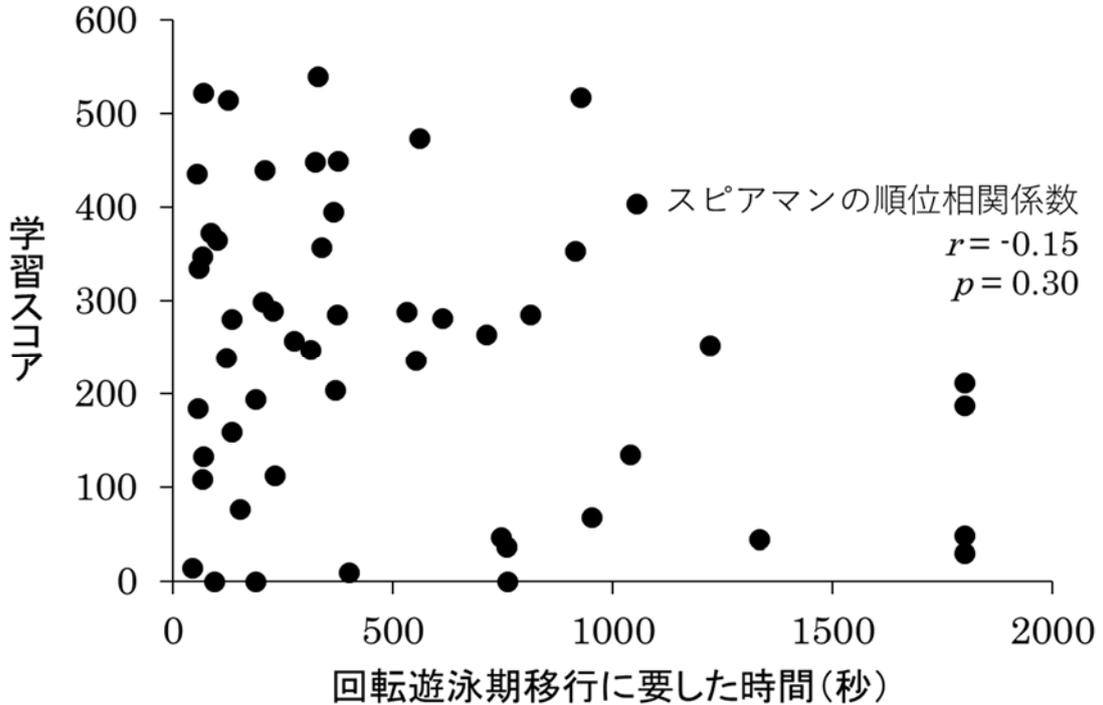


Fig. 5-4 マダイ稚魚の学習スコアと横臥傾向の関係（回転遊泳期移行に要した時間; n = 52）。

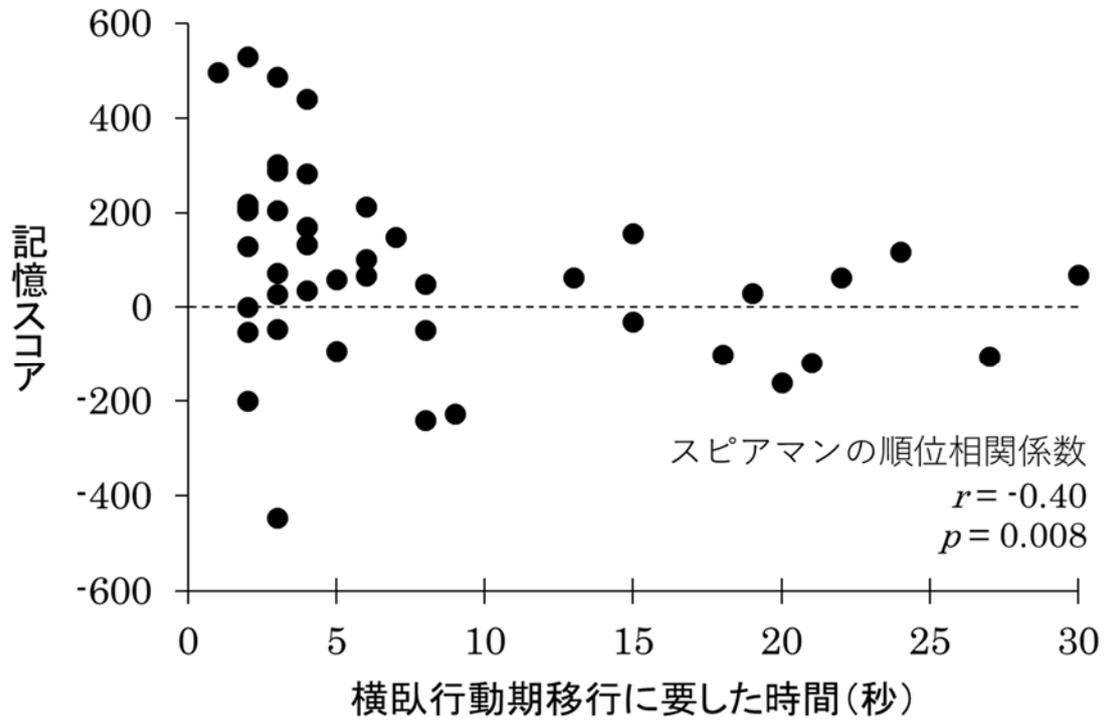


Fig. 5-5 マダイ稚魚の記憶スコアと横臥傾向の関係（横臥行動期移行に要した時間; n = 43）。

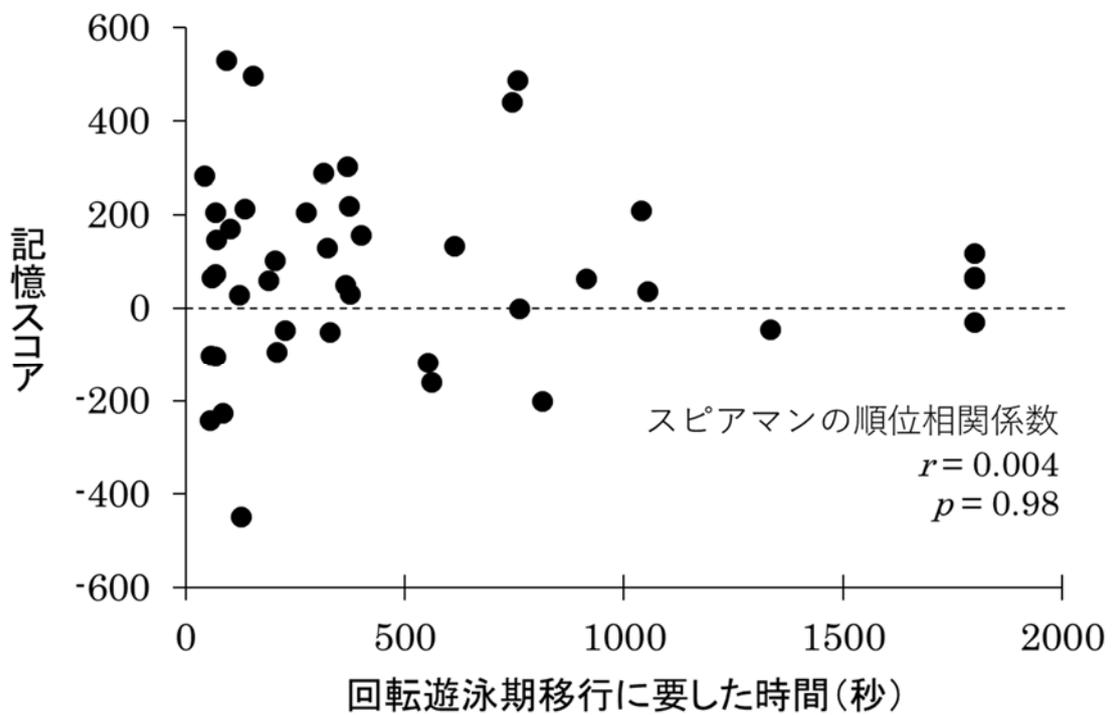


Fig. 5-6 マダイ稚魚の記憶スコアと横臥傾向の関係（回転遊泳期移行に要した時間; n = 43）。

6. 学習能力および記憶保持能力の魚種間比較

6 - (1) 研究の背景

近年、魚類の学習に関する研究が進んだことで、学習能力と生態との関わりが明らかとなりつつある。Makino *et al.* (2006) は、イシダイの報酬訓練における学習能力が、生息環境の変化に合わせて発達・衰退することを示した。また Odling-Smee & Braithwaite (2003) では、同種のイトヨ *Gasterosteus aculeatus* であっても、生息場所の違いによって学習に用いる手がかりが異なることを報告している。

一方、記憶能力と生態との関わりについての知見は皆無である。しかし本論文の第 4 章において、マダイ稚魚の記憶保持能力が上述のイシダイの学習能力と同様に生息環境の変化に合わせて変化する可能性が示された。それゆえ、魚類の記憶保持能力についても生態との何らかの関わりがある可能性がある。また、これまでの魚類の学習および記憶能力に関する研究は、単一の魚種について検証したものが多く、複数の魚種を用いて検証した事例は皆無であった。しかしながら、魚類の学習および記憶保持能力と生態とのより普遍的な関わりについて検討するためには、生態の異なる複数の魚種を用いて両能力を比較し、各魚種の生態から考察することが重要と考えられた。

そこで本研究ではマダイ、キジハタ *Epinephelus akaara*, そしてマアジの学習および記憶保持能力について検討することで、各魚種の生態と、学習および記憶保持能力との関わりについて検討した。キジハタは定着性が強いことから、栽培漁業の対象種として有望であり

(奥村 & 小畑, 2006), 音響馴致に関する応用研究も存在する (菅野ら, 2001)。本論文の第4章では, マダイ稚魚の報酬訓練における記憶保持能力が, 生息域の変化に合わせて衰退する傾向が示されたことから, 定着性の強いキジハタではマダイよりも本訓練における記憶保持能力が優れていることが予想された。また, マアジのように群れを形成する魚種では, 個体間で相互誘引性が働くことが報告されている (益田, 2005)。それゆえ, マアジでは必ずしも群れの中の全個体が学習する必要はなく, 一部の個体が学習すれば群れ全体として学習行動を示す可能性が考えられた。そこで本研究では, まず「6 - (3) 報酬訓練におけるマアジ集団内の未学習個体の検証」において集団で報酬訓練を実施し, その後集団を単独に分けて再度訓練を実施することで, 実際に学習していた個体の割合について検討した。その結果, 実際に学習していた個体の割合が約3割程度であったことから, 「6 - (4) 報酬訓練におけるマアジの学習能力の個体差」において, 最初から単独で訓練を実施し, 学習能力を有する個体の割合について検討することを目的とした追加実験を実施した。本研究は, 魚類の記憶保持能力と生態との関わりについて検討するとともに, 学習および記憶保持能力という新しい視点から, 栽培漁業や海洋牧場に適した魚種について選定することを目的としている。

6 - (2) 報酬訓練におけるキジハタの学習能力と記憶保持能力

6 - (2) - 1 材料と方法

6 - (2) - 1 - 1 供試魚

2016年1月6日、大阪府立環境農林水産総合研究所 水産技術センターより実験用に譲り受けたキジハタ人工孵化稚魚を、京都大学舞鶴水産実験所へと輸送した（2015年6月15日孵化個体）。これらを透明な円形 200L 水槽に導入し、飼育を行った。飼育水には、舞鶴水産実験所の地先の海からポンプでくみ上げ、濾過槽を通して得られた濾過海水を使用し、換水は海水かけ流し方式で行った。給餌の際は、配合飼料（おとひめ S2）を飽食量与えた。魚が水槽から飛び出さないよう、水槽の上部はネットで覆った。

6 - (2) - 1 - 2 実験水槽

実験水槽には「2 - (2) 報酬訓練」で使用したものと同様の 60 cm 透明アクリル水槽を使用した。換水は、濾過海水を用いたかけ流し方式で行い（約 0.6 L/min）、水深は 250 mm とした。また、実験水槽の中央にエアレーションを 1 つ設置し、後述する報酬訓練の条件刺激として使用した。「2 - (2) 報酬訓練」と同様、水槽の外周および周囲（高さ 1650 mm）は不透明な黒色のシートで覆い、実験時は水槽の上部 1650 mm の位置に設置したビデオカメラを用いて魚の行動を撮影した。実験は 2016 年 6 日 7 日から 7 月 15 日にかけて実施した。

6 - (2) - 1 - 3 実験方法

本実験では、「2 - (2) 報酬訓練」と同様の訓練手法を用いて、魚にエアレーションと餌との関連性を学習させた。約 30 日間の間隔を設けて同様の訓練を 2 度実施し、前者を初期訓練、後者を記憶テストとすることで、学習および記憶能力を評価した。訓練はすべて単独個体で実施した。

初期訓練

訓練開始 2 日前の正午に、飼育水槽からランダムに供試魚を取り出し、2-フェノキシエタノールを用いて麻酔処理を施したのち、標準体長を測定した。その後、12 個の実験水槽に 1 個体ずつ魚を投入し、約 2 日間かけて水槽に馴致させた。馴致期間中は、9:00 および 18:00 前後に配合飼料をそれぞれ 30 粒ずつ給餌した。その際、実験水槽の特定のエリアを餌場として学習させないため、配合飼料が水槽に均等に広がるよう注意して給餌した。初期訓練前日の 18:00 の給餌で、全ての個体が餌を食べていることを確認したのち、翌日より訓練を開始した。

訓練では、まず水槽内に設置されたエアレーションを起動した (0.25 L/min)。続いて 30 秒後に、エアレーションの真上から配合飼料を約 6 粒給餌した。その後、給餌から 30 秒が経過したところで、エアレーションを停止させた。この一連の過程を訓練 1 セットとし、訓練間隔 1 時間で 2 日間かけて計 20 回の訓練を実施した。訓練開始時刻は 9:00 頃 (1 回目、11 回目)、終了時刻は 18:00 (10 回目、20 回目) とした。訓練中の魚の行動は、実験水槽

上部に設置したビデオカメラを用いて撮影した。

訓練休止期間（約 30 日間）

初期訓練後、魚を実験水槽からストック水槽へと移した。ストック水槽にはポリエチレン製の角形容器（L × W × H：1420 mm × 980 mm × 220 mm）を使用した。この容器内に、硬質な黒色のプラスチック製のネット（目合 7.5 mm）を用いて 12 個のストックエリア（L × W × H：240 mm × 240 mm × 220 mm）を作製し、それぞれに 1 個体ずつ魚を収容した。飼育水には濾過海水を使用し、換水は海水かけ流し方式で行い（2.1 L/min）、水槽の水深は 150mm とした。訓練休止期間中は、毎日 18:00 前後に配合飼料を飽食量与え、残餌や糞は適宜除去した。

記憶テスト

記憶テストを実施する 2 日前に、魚をストック水槽から再び実験水槽へと移し、初期訓練時と同様の方法で実験水槽へと馴致させた。記憶テストでは訓練を 1 回だけ実施し、学習行動の有無を調べた。記憶テスト終了後、麻酔処理を施したのち、各個体の標準体長を測定した。

6 - (2) - 1 - 4 データ解析

エアレーションと餌との関連性を学習したキジハタ稚魚は、「2 - (2) 報酬訓練」のマダイ稚魚と同様、エアレーションが起動しただけでエアストーン付近へと接近することが予想された。そのため、学習および記憶の指標には「2 - (2) 報酬訓練」で使用した「寄り付

き時間」を採用した。また、キジハタ稚魚が普段からエアーストーン付近に滞在しているわけではなくエアレーションに反応して給餌エリア付近に接近していることを確認するため、エアレーション起動前の寄り付き時間（30 秒）についても計測した。

初期訓練において魚が学習していたかどうかを確認するために、GLMM による解析を行った。寄り付き時間を応答変数とし、訓練回数（1~20 回）、標準体長を説明変数とした。また、個体差をランダム要因として考慮し個体番号をランダム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。各応答変数の有意性は Wald test を用いて評価した。統計解析にはフリーソフト R を使用し、GLMM の解析には lme4 package を使用した。

記憶テストでは、魚が初期訓練により学習した情報を記憶していれば、エアレーションに寄り付く行動が観察されるはずである。前述の GLMM 解析により、初期訓練時の訓練 20 回目までに魚が学習していたことが確認されたため、Wilcoxon signed-rank test を用いて、初期訓練の 20 回目と記憶テスト時とで寄り付き時間を比較し、両者に有意差がみられなければ記憶していると判断した。

また、初期訓練における学習個体数、および記憶テスト時における記憶個体数を評価するために、「2-(2) 報酬訓練」と同様、初期訓練に使用した全個体の中で訓練 1 回目の寄り付き時間が最も長かった個体の値を、未学習の指標とした。すなわち、学習テスト時の訓練 20 回目にこの指標を上回っていた個体は学習していると判断し、記憶テスト時に上回っていれば記憶と判断した。

6 - (2) - 2 結果

初期訓練を実施した 12 個体すべてのキジハタ稚魚から、学習および記憶保持の評価結果を得た（標準体長: 72.25 ± 3.62 mm）。初期訓練の結果、訓練を重ねるにつれてエアレーション起動時の寄り付き時間が増加する傾向がみられた（Fig. 6-1）。また、エアレーション停止時についても、若干の増加傾向がみられた（Fig. 6-1）。Wald test により、説明変数の訓練回数には有意差がみられたが、標準体長にはみられなかった（訓練回数: $Z = 28.28$, $P < 0.001$; 標準体長, $Z = 0.29$, $P > 0.05$; Table 6-1）。これらの結果は、初期訓練 20 回目までにキジハタ稚魚がエアレーションと餌との関連性を学習していたこと、また標準体長の違いが学習に影響しなかったことを意味している。

初期訓練時の 20 回目と記憶テスト時とでエアレーション起動時の寄り付き時間を比較したところ、有意差がみられなかったことから、キジハタ稚魚は約 30 日後も初期訓練で学習した情報を記憶していたと判断した（Wilcoxon signed-rank test, $T = 32.50$, $n = 12$, $P > 0.05$; Fig. 6-1）。

初期訓練の結果、未学習の指標は 10 秒となった（ $n = 12$ ）。この指標をもとに個体レベルで学習および記憶の有無を判定した結果、初期訓練時に学習していた個体の割合は約 67%（8/12）、記憶テスト時に記憶していた個体は約 83%（10/12）となった（Fig. 6-2）。さらに、初期訓練時に学習していると判断された個体は、記憶テスト時においてもすべての

個体が記憶と判断された。

6 - (2) - 3 考察

本研究の結果から、キジハタ稚魚は報酬訓練により獲得した情報を、少なくとも 30 日までは保持する能力を有することが示された。また、個体レベルで学習および記憶の有無を評価した結果、初期訓練においては約 7 割の個体が学習と判断されたのに対し、記憶テスト時では約 8 割の個体が記憶と判断された。今回、学習個体数を記憶個体数が上回った理由として、未学習の指標が高かったことが挙げられる。他魚種の実験における本指標は、「2 - (2) 報酬訓練」のマダイ稚魚では 7 秒、また後述する「6 - (4) 報酬訓練におけるマアジの学習能力の個体差」のマアジでは 2 秒であったのに対し、本実験では 10 秒と比較的高い値を示した。そのため、本課題を学習していたにも関わらず未学習と判定された個体が存在していたものと思われる。実際、初期訓練 20 回目において未学習と判断された 2 個体が、記憶テスト時においては本指標を上回り記憶と判断されている。

また今回の実験では、初期訓練時において、訓練を重ねるごとにエアレーション停止時の寄り付き時間が若干増加する傾向を示した。これは、おそらく実験者の足音等が条件刺激となり、新たな学習が生じていたためではないかと考えられる。しかしながら、記憶テスト時には、エアレーション停止時に寄り付く行動が完全に消失した。ニジマスでは初期訓練時の条件付けに使用する刺激の強さが記憶の保持期間に影響することが報告されている (Ferrari *et al.*, 2010)。今回の反応も、実験者の気配といったおそらく何らかの弱い刺激を手

掛かりに学習が成立していたことが予想される。

本結果を「2 - (2) 報酬訓練」で得られたマダイ稚魚の結果と比較すると、両種の大きな違いは記憶保持能力の個体差の有無にあるといえる。マダイ稚魚では、記憶保持能力に非常に大きな個体差がみられたのに対し、今回初期訓練時において学習と判断されたキジハタ稚魚は、30 日後もすべての個体が記憶していた。こうした記憶保持能力の違いは、両種の生態的特性の違いから生じるものであると考えられる。キジハタは定着性が強い魚種であるため（奥村 & 小畑, 2006）、学習した情報を長期間にわたって保持しておくことは、餌場やなわばりを確保するうえで重要であると考えられる。一方、マダイ稚魚は成長に伴い生息域を沖へと拡大することが報告されている（猪子ら, 1978）。本種が新しい環境へ移行した際、以前の環境で学習した情報の大半は、その有用性を失うことが予想される。このように、キジハタ稚魚では長期間にわたって学習した情報を保持しておくことが生存するうえで有利に働くが、マダイ稚魚では必ずしも有益とは言えない。そのため、両種の記憶保持能力の違いがみられたのではないかと考えられる。

本実験結果から、キジハタはその生態的特徴だけでなく、学習および記憶能力という観点からも、栽培漁業に非常に適した魚種である可能性が示された。また、本種は音響馴致を応用した海洋牧場事業にも適していると考えられる。

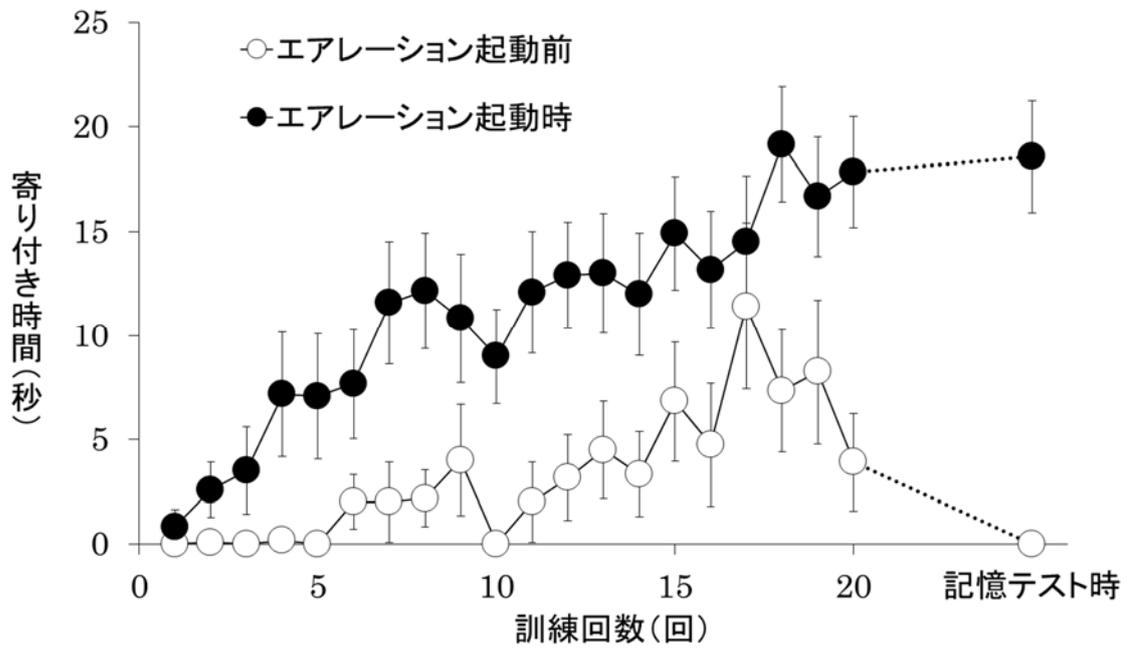


Fig. 6-1 キジハタの初期訓練および 30 日後の記憶テスト時におけるエアレーション起動前 (○) と起動時 (●) の寄り付き時間 (mean ± SE, n = 12)。

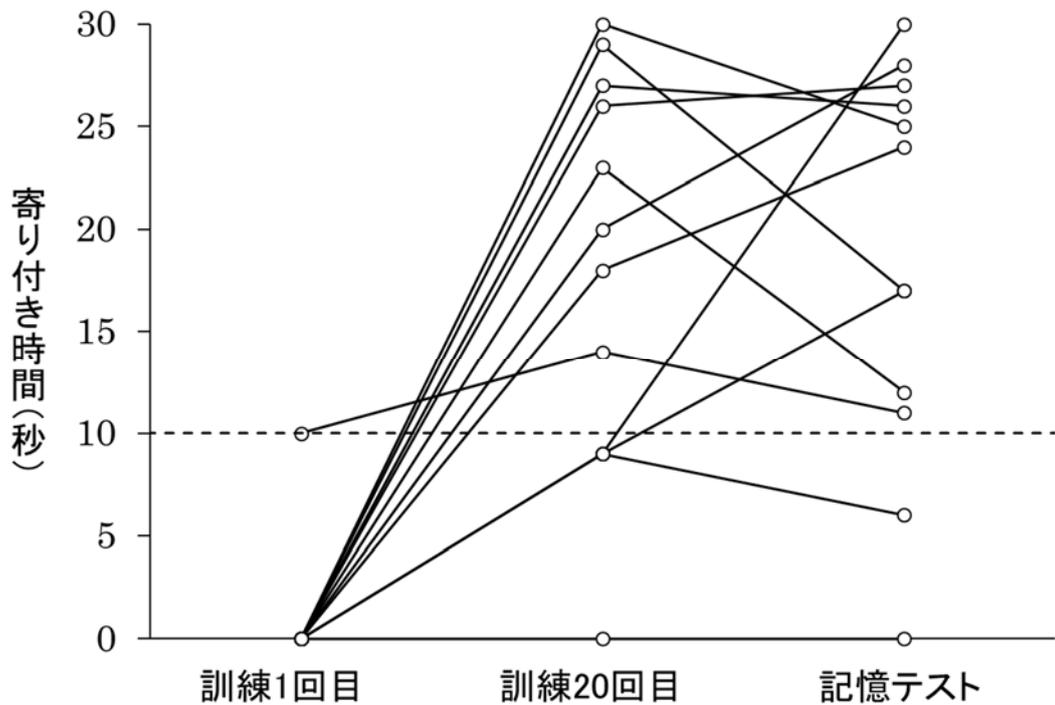


Fig. 6-2 キジハタの個体レベルでのエアレーション起動時の寄り付き時間 (n = 12)。破線は未学習の指標を示す (10 秒)。実線は各個体の寄り付き時間の推移を示す。

Table 6-1. GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	<i>Z</i>	<i>P</i>
訓練回数	0.17	0.006	28.28	< 0.001
標準体長	0.001	0.005	0.29	> 0.05
Intercept	-2.99	0.73	-4.12	< 0.001

6 - (3) 報酬訓練におけるマアジ集団内の未学習個体の検証

6 - (3) - 1 材料と方法

6 - (3) - 1 - 1 供試魚

2015年7月14日から11月22日にかけて、京都府舞鶴市長浜の京都大学舞鶴水産実験所地先で、サビキ釣りにより釣獲したマアジを実験に供した。実験に使用するまでの期間、マアジは黒色の円形200L水槽に収容した。飼育水には舞鶴水産実験所の地先の海からポンプでくみ上げ、濾過槽を通して得られた濾過海水を使用した。換水は海水かけ流し方式で行い(4L/min)、さらにエアレーションを1つ設置した。魚が水槽から飛び出さないよう、水槽の上部はネットで覆った。飼育期間中は、毎日18:00前後に配合飼料(おとひめS2)を飽食させた。

6 - (3) - 1 - 2 実験水槽

実験水槽には「2 - (2) 報酬訓練」で使用したものと同様の60cm透明アクリル水槽を使用した。濾過海水を用いたかけ流し方式で換水を行い(約0.6 L/min)、水深は250 mmに維持した。また、実験水槽の中央にエアレーションを1つ設置し、後述する報酬訓練の条件刺激として使用した。「2 - (2) 報酬訓練」と同様、水槽の外周および周囲(高さ1650 mm)は不透明な黒色のシートで覆い、実験時は水槽の上部1650 mmの位置に設置したビデオカ

メラを用いて魚の行動を撮影した。実験は 2015 年 7 月 24 日から 12 月 7 日にかけて実施した。

6 - (3) - 1 - 3 実験方法

「2 - (2) 報酬訓練」と同様の訓練手法を用いて、魚にエアレーションと餌との関連性を学習させた。本実験では、4 個体からなるマアジ集団で訓練を実施し、魚の学習行動を観察した。その後、これらを単独に分けて 4 つの実験水槽に収容し、単独で同様の訓練を実施することで（以下、学習テスト）、集団内における未学習個体の存在について検証した。

初期訓練（集団訓練）

訓練開始約 2 日前の正午に、飼育水槽から供試魚をランダムに 4 個体取り出し、2-フェノキシエタノールを用いて麻酔処理を施したのち、標準体長を測定した。その後、個体識別は行わずに、4 個体を 1 つの実験水槽へと収容し、2~3 日間かけて馴致させた。馴致期間中は、9:00 および 18:00 前後に配合飼料をそれぞれ 100 粒ずつ給餌した。その際、実験水槽の特定のエリアを餌場として学習させないため、配合飼料が水槽に均等に広がるよう注意した。初期訓練前日の 18:00 の給餌の際に、すべての個体が餌を食べていることを確認したのち、翌日より訓練を開始した。

訓練では、まず水槽内に設置されたエアレーションを起動した (0.25 L/min)。続いて 30 秒後、エアレーションの真上から配合飼料を約 20 粒給餌した。さらに、給餌から 30 秒経過したところでエアレーションを停止させた。この一連の過程を訓練 1 セットとした。訓

練の間隔は約 1 時間とし、2 日間かけて 20 回の訓練を実施した。訓練開始（1 回目、11 回目）の時刻は 9:00 頃、終了（10 回目、20 回目）の時刻は 18:00 とした。訓練時の魚の行動は、実験水槽の上部に設置したビデオカメラで撮影した。初期訓練は 12 集団で実施し、合計 48 個体のマアジを実験に使用した（Table 6-2）。

学習テスト（単独訓練）

初期訓練終了後、集団を 1 個体ずつに分け、別々の実験水槽へと収容した。そして約 20 時間馴致した後、再び初期訓練と同様の手法で訓練を 1 回実施し、学習の有無について調べた。

6 - (3) - 1 - 4 データ解析

エアレーションと餌との関連性を学習した集団のマアジは、エアレーションが起動しただけでエアストーン付近へと接近することが予想されたため、学習の指標には「2 - (2) 報酬訓練」と同様に「寄り付き時間」を採用した。その際、集団訓練の行動解析では個体の識別が困難なため、4 個体の寄り付き時間の総和を計測し、その平均値を集団の寄り付き時間とした。

まず、集団訓練において魚が学習していたかどうかを確認するために、GLMM による解析を行った。訓練 1 回目と 20 回目の寄り付き時間を応答変数とし、訓練回数（1 回目もしくは 20 回目）、標準体長、そして訓練実施日を説明変数とした。その際、標準体長には各集団の平均値を使用した。また、集団間の差をランダム要因として考慮し集団番号をランダ

ム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。各応答変数の有意性は Wald test を用いて評価した。統計解析にはフリーソフト R を使用し、GLMM の解析には lme4 package を使用した。

前述の GLMM 解析により、初期訓練 20 回目において魚が学習していたことが確認できたため、Mann-Whitney U-test を用いて、初期訓練 20 回目と学習テスト時の寄り付き時間を比較し、未学習個体の有無について検討した。さらに、4 個体で構成される各集団の初期訓練における訓練 1 回目の寄り付き時間を未学習の指標とし、学習テスト時の寄り付き時間をもとに、集団ごとに初期訓練で実際に学習していた個体の割合を算出した。すなわち、学習テスト時における寄り付き時間がこの指標を上回っていた個体については、学習個体と判定した。

6 - (3) - 2 結果

マアジ 12 集団 (n = 48) に報酬訓練を実施した結果、集団番号 12 番の 1 個体が実験水槽からの飛び出しで斃死したため、合計 11 集団 (n = 44) より学習能力および学習テストの評価結果を得た (Table 6-2)。Wald test により、説明変数のうち訓練回数には有意差がみられたが、標準体長および実験実施日にはみられなかった (初期訓練 20 回目: $Z = 9.57$, $P < 0.001$; 標準体長, $Z = -0.64$, $P > 0.05$; 訓練実施日 (9 月 10 日), $Z = 0.45$, $P > 0.05$; 訓練実施日 (12 月 7 日), $Z = 1.13$, $P > 0.05$; Table 6-3)。これらの結果は、初期訓練においてマアジ集団がエアレーションと餌との関連性を学習していたこと、また今回の実験に使

用したマアジの体長の違いやサンプリング日の違いが学習に影響していなかったことを意味している。

Mann-Whitney U-test の結果、初期訓練 20 回目と学習テスト時の寄り付き時間に有意差がみられた ($U = 84, P < 0.01$)。この結果は、集団内に未学習個体が存在していた可能性を示唆している (Fig. 6-3)。さらに、実際に学習していた個体の割合を算出するために、未学習の指標となる各集団の訓練 1 回目の寄り付き時間を計測したところ、0-16 秒となった。この指標をもとに、集団ごとに学習個体数を算出した結果、学習個体の割合は約 32% (14/44) となった (Fig. 6-4)。

6 - (3) - 3 考察

本研究の結果から、集団訓練において学習行動を示したマアジであっても、単独で訓練を実施すると 6 割以上の個体で学習行動が消失することが示された。学習テスト時において、単独のマアジがエアレーションに寄り付かなかった要因として、1 つ目に集団内に未学習個体が存在した可能性が考えられる。群れを形成する魚種では、個体間で相互誘引性が働くことが報告されており (益田, 2005)、本研究においても、学習能力をもたない未学習個体が学習個体に誘引されたことで、学習したかのようにふるまっていた可能性がある。魚類が群れを形成する理由については諸説あるが、捕食者の回避、索餌の最適化、学習の場、繁殖相手の確保、そして回遊精度の向上の 5 点が広く受け入れられてきた仮説であり (益田, 2006)、

本研究のように学習個体と非学習個体の共存という視点からアプローチした研究は皆無である。2つ目の可能性として、水槽の移動によるストレスが影響した可能性が考えられる。今回の実験では、初期訓練を終えたマアジは、直後に別の実験水槽へと移され、約20時間後に学習テストを施されている。ゼブラフィッシュではストレスを感じると、水槽の中央での行動を避ける傾向が報告されている (Champagne *et al.*, 2010)。本実験では、エアストーンを水槽の中央に設置しているため、水槽の移動によるストレスからの回復が不十分であれば、エアレーションに寄り付かない可能性は高い。3つ目に、単独によるストレスが影響した可能性が考えられる。サンゴ礁に生息するデバスズメダイ *Chromis viridis* では、群れからの隔離がストレスとなることが報告されている (Nadler *et al.*, 2016)。本研究においても、集団で訓練されていたマアジが、学習テストの際に単独で実験水槽に収容されたことで、多少なりともストレスを感じていた可能性がある。

本実験では上述の仮説の検証は難しいため、「6-(4) 報酬訓練におけるマアジの学習能力の個体差」を実施した。すなわち次節の実験では、単独で初期訓練を実施することで、水槽の移動によるストレスや単独によるストレスの影響について検討した。

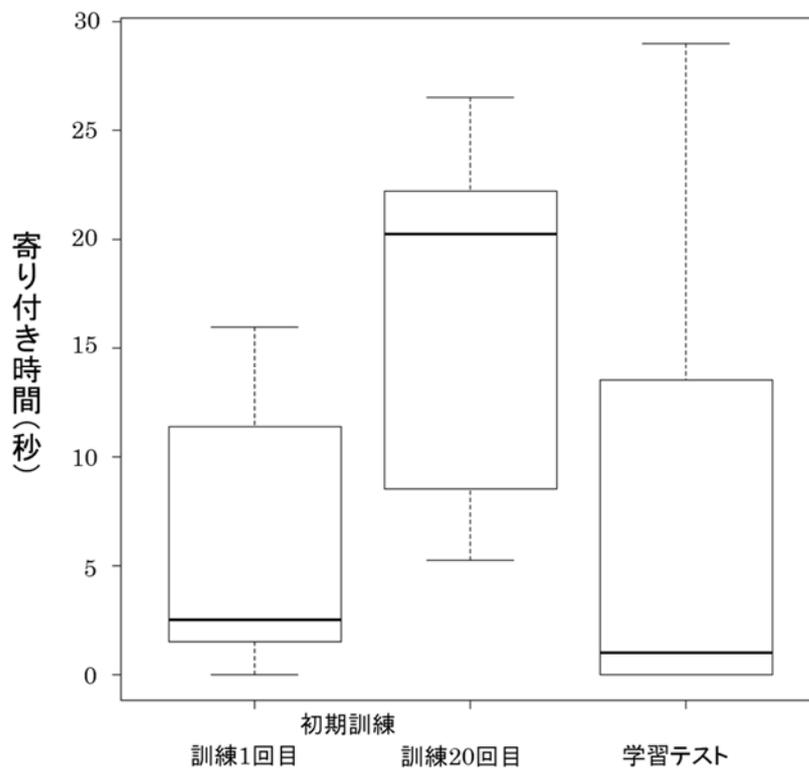


Fig. 6-3 集団で訓練したマアジにおける初期訓練時および学習テスト時の寄り付き時間。

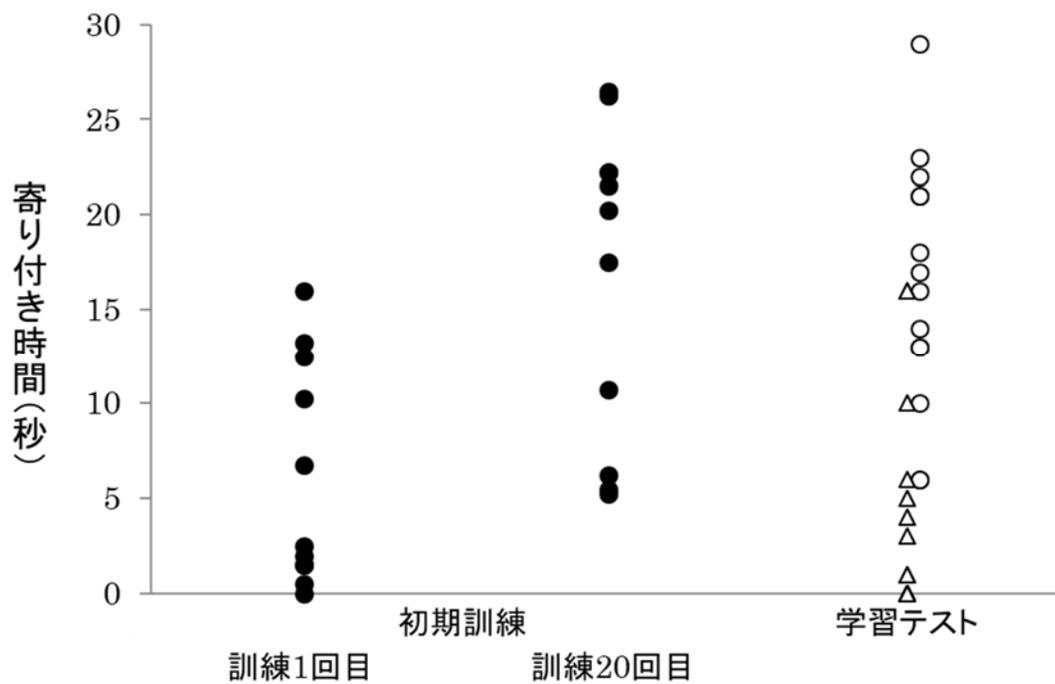


Fig. 6-4 マアジの初期訓練における各集団レベル (n = 11), および学習テスト時における個体レベルの寄り付き時間 (n = 44)。○は学習テスト時において学習が確認された個体を示し (n = 14), △は未学習個体を示す (n = 30)

Table 6-2. 各マアジ集団の採集日と実験実施日および標準体長

集団 番号	採集日	初期訓練開始日	標準体長 (平均 ± S.D.)
1	7月14日	7月26日	65.75 ± 9.54 mm
2	7月14日	7月26日	68.00 ± 4.62 mm
3	7月14日	7月26日	68.50 ± 8.89 mm
4	7月14日	7月26日	67.75 ± 6.85 mm
5	7月23, 30日	9月10日	93.50 ± 3.87 mm
6	7月23, 30日	9月10日	102.50 ± 5.32 mm
7	7月23, 30日	9月10日	94.50 ± 8.58 mm
8	7月23, 30日	9月10日	90.00 ± 2.94 mm
9	11月17, 20, 22日	12月7日	92.50 ± 5.26 mm
10	11月17, 20, 22日	12月7日	99.25 ± 2.87 mm
11	11月17, 20, 22日	12月7日	98.00 ± 8.52 mm
12	11月17, 20, 22日	12月7日	96.50 ± 8.19 mm

SD, 標準偏差

Table 6-3. GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	Z	P
訓練回数 20 回目	1.92	0.20	9.57	< 0.001
標準体長	-0.05	0.08	-0.64	> 0.05
訓練実施日 (9月10日)	1.03	2.30	0.45	> 0.05
訓練実施日 (12月7日)	2.75	2.43	1.13	> 0.05
Intercept	1.60	5.46	0.29	> 0.05

6 - (4) 報酬訓練におけるマアジの学習能力の個体差

6 - (4) - 1 材料と方法

6 - (4) - 1 - 1 供試魚

前節の実験のために採集した集団（11月17日、20日、22日に釣獲）のうち、実験に使用していない12個体をランダムに選別し、本節での実験に供した。実験開始までは、前節と同様の方法で飼育した。

6 - (4) - 1 - 2 実験水槽

実験水槽には、前節で使用した装置と同一のものを用いた。

6 - (4) - 1 - 3 実験方法

前節と同様の手法を用いて、魚にエアレーションと餌（報酬）との関連性を学習させた。ただし、本節の実験では単独のマアジに初期訓練を施すことで、学習能力の有無を検証した。また前節の実験で問題となった、学習テスト時の水槽移動によるストレスの影響を検討するために、本節においても初期訓練後に魚を別の実験水槽へと移し、再度単独で訓練を行った（学習テスト）。

初期訓練（単独訓練）

訓練開始2日前の正午に、飼育水槽からランダムに供試魚を12個体取り出し、2-フェノ

キシエタノールを用いて麻酔処理を施したのち、標準体長を測定した。その後、1 個体ずつ 12 個の実験水槽に収容し、約 2 日間かけて馴致させた。馴致期間中は、9:00 および 18:00 前後に配合飼料をそれぞれ 25 粒ずつ給餌した。その際、実験水槽の特定のエリアを餌場として学習させないため、配合飼料が水槽に均等に広がるよう注意した。初期訓練前日の 18:00 の給餌で、魚が餌を食べていることを確認したのち、翌日より訓練を開始した。

訓練では、まず水槽内に設置されたエアレーションを起動した (0.25 L/min)。続いて 30 秒後、エアレーションの真上から配合飼料を約 5 粒給餌した。さらに、給餌から 30 秒経過したところでエアレーションを停止させた。この一連の過程を訓練 1 セットとした。訓練の間隔は約 1 時間とし、2 日間かけて 20 回の訓練を魚に施した。訓練開始時刻は 9:00 頃 (1 回目, 11 回目), 終了時刻は 18:00 (10 回目, 20 回目) とした。訓練時の魚の行動は、実験水槽の上部に設置したビデオカメラを用いて撮影した。

学習テスト

前節と同様、初期訓練終了後に魚を別の実験水槽へと移送し、約 20 時間後に訓練を 1 回実施することで、水槽の移動によるストレスが魚の学習行動に与える影響について検討した。

6 - (4) - 1 - 4 データ解析

前節と同様、エアレーションと餌との関連性を学習した単独のマアジは、エアレーションが起動しただけでエアストーン付近へと接近することが予想されたため、学習の指標

には「寄り付き時間」を採用した。また本実験では、マアジが普段からエアーストーン付近に滞在しているわけではなくエアレーションに反応して給餌エリア付近に寄り付くことを確認するために、エアレーション起動前（30 秒）と起動後（30 秒）それぞれの寄り付き時間を計測した。

解析に際してはまず、魚が学習していたかどうかを確認するために、GLMM による解析を行った。寄り付き時間を応答変数とし、訓練回数（1~20 回）、標準体長を説明変数とした。また、個体差をランダム要因として考慮し、個体番号をランダム効果として組み込み、誤差構造は二項分布、リンク関数はロジット関数とした。各応答変数の有意性は Wald test を用いて評価した。統計解析にはフリーソフト R を使用し、GLMM の解析には lme4 package を使用した。

さらに、学習能力を有する個体の割合を評価するために、「2-(2) 報酬訓練」と同様、初期訓練に使用した全個体の中で訓練 1 回目の寄り付き時間が最も長かった個体の値を未学習の指標とした。すなわち、初期訓練時の訓練 20 回目の寄り付き時間がこの指標を上回っていた個体を学習個体と判定した。また学習個体については学習テスト時においても学習の有無を確認することで、水槽の移動によるストレスの影響について検討した。

6-(4)-2 結果

初期訓練に使用した 12 個体すべてのマアジから、学習能力および学習テストの評価結果

を得た（標準体長：96.08 ± 6.04 mm）。初期訓練の結果、エアレーション起動時のマアジの寄り付き時間は、訓練を重ねるにつれて増加する傾向がみられたが、エアレーション起動前の値には明確な増加傾向はみられなかった（Fig. 6-5）。また、エアレーション起動時の反応には、個体間で大きなばらつきがあった（Fig. 6-5）。Wald testにより、説明変数のうち訓練回数には有意差がみられたが、標準体長にはみられなかった（訓練回数: $Z = 22.22$, $P < 0.001$; 標準体長, $Z = -0.90$, $P > 0.05$; Table 6-4）。これらの結果は、訓練を重ねるにつれてマアジがエアレーションと餌との関連性を学習したこと、また今回の実験に使用したマアジの標準体長の違いは学習に影響していなかったことを意味している。

初期訓練の結果、未学習の指標は2秒となった（ $n = 12$ ）。この指標をもとに個体レベルで学習の有無を判定した結果、学習個体数は4個体（約33%）となった（Fig. 6-6）。その後の学習テストでは、これらの学習個体のうち1個体が本指標を下回った（Fig. 6-6）。

6 - (4) - 3 考察

本研究の結果から、報酬訓練によってエアレーションと餌との関連性を学習できるマアジは、全体の3割程度しか存在しない可能性が示された。また学習した個体であっても、水槽の移動によるストレスで、エアレーションに寄り付かなくなる個体が少数存在することが示された。それゆえ前節の実験においても、水槽の移動が学習テスト時の魚の行動に影響した可能性はあるが、結果を大きく変えるほどのものではなかったと思われる。また、今回

の実験では全個体に同条件で訓練を施していることから、マアジの学習能力の個体差を生んだ要因は、遺伝等の先天的な要因によるものと、成育環境の違い等の後天的な要因によるものが予想される。イシダイの学習能力を調べた先行研究では、飼育環境の違いが学習能力に影響することが報告されていることから (Makino, *et al.*, 2015)、本種においても釣獲前の成育環境や成長速度といった何らかの要因が学習に影響した可能性がある。

本節の実験結果は、前節の実験で確認された、集団学習において実際に学習していた個体の割合 (約 32%) とほぼ一致している。このことから、マアジの群れは、3 割程度の学習能力を有する個体と、それ以外の集団で構成されている可能性は高いといえる。これらの実験結果から、自然下においてマアジの群れが餌場を学習する際、学習能力を有する個体が群れのリーダーとなり、他の個体を餌場へと誘導することで、群れ全体として学習の恩恵を得ていることが予想される。このように群れ形成には、群れ全体として有用な学習情報を共有することができるというメリットがあるのかもしれない。しかしながら、本実験だけでは単独によるストレスが学習を妨げた可能性について否定することは難しい。今後、本実験において単独で学習が確認できなかった個体を集めて新たに集団を構成し、集団で再び訓練を実施する追加実験が必要であると考えられる。

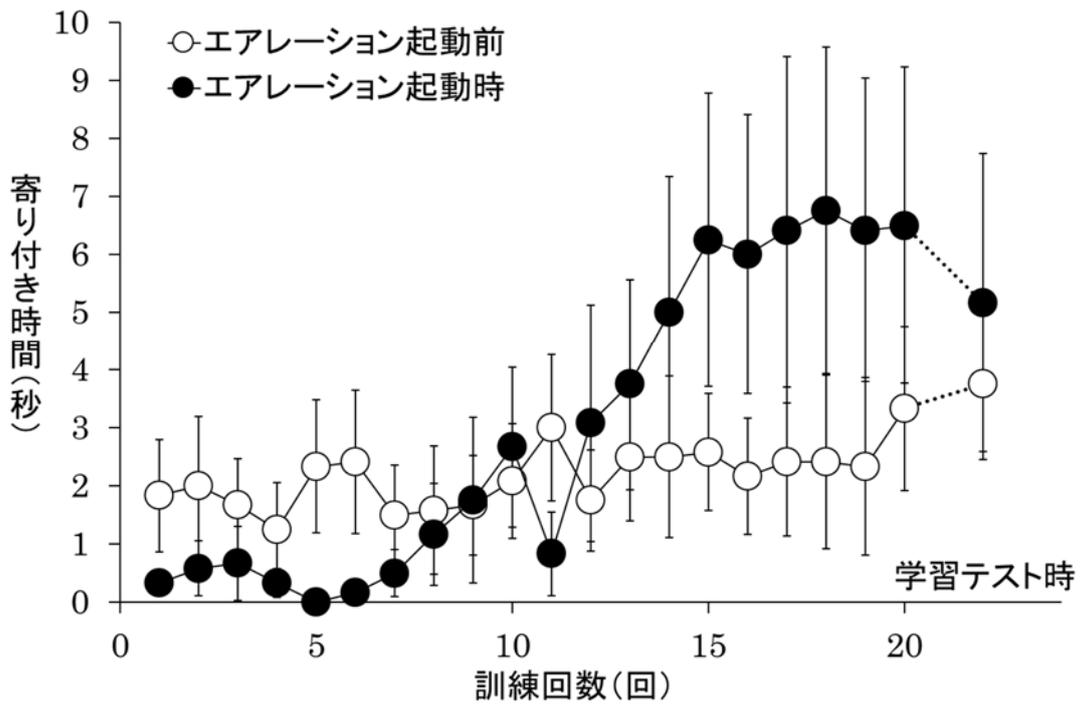


Fig. 6-5 単独で訓練したマアジの初期訓練および学習テスト時におけるエアレーション起動前 (○) と起動時 (●) の寄り付き時間 (mean ± SE, n = 12)。

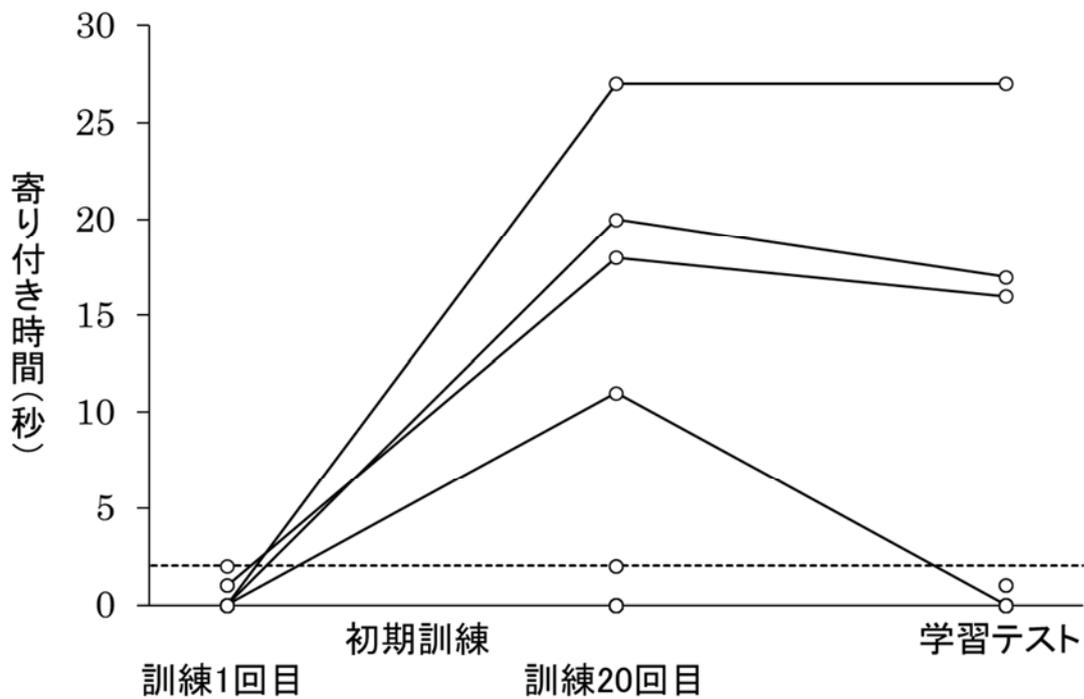


Fig. 6-6 マアジの個体レベルのエアレーション起動時の寄り付き時間 (n = 12)。破線は未学習の指標を示す (2 秒)。訓練 20 回目において未学習の指標を上回った 4 個体のみ、寄り付き時間の推移を実線で示す。

Table 6-4. GLMM 解析および Wald test の結果

Explanatory variable	Estimate	Standard Error	Z	P
訓練回数	0.29	0.01	22.22	< 0.001
標準体長	-0.17	0.19	-0.90	> 0.05
Intercept	7.23	17.96	0.40	> 0.05

6 - (5) 学習および記憶能力と生活史特性の魚種間比較に関する考察

本章では、本論文の種たる研究対象種であるマダイの学習および記憶能力について、他魚種と比較することを目的とし、キジハタ稚魚およびマアジのこれらの能力を検討した。本章で得られた結果と、「3 - (2) 訓練間隔がマダイの記憶保持に与える影響」におけるマダイ稚魚の実験結果（1時間区）とを比較をした（Fig. 6-7）。その結果、マダイとキジハタでは大半の個体が学習能力を有していたのに対し、マアジでは集団内の約 3 割程度しか学習能力をもたないことが明らかとなった（学習個体割合：マダイ約 75%、キジハタ約 67%、マアジ：約 33%）。マダイ稚魚は自然下では単独でなわばりを形成して生活する（工藤 & 山岡, 1998; 富岡ら, 2011）。同様に、キジハタも群れを形成せず単独で生活する（玉木, 2000）。両種のように孤立性の強い魚種では、各個体が餌場等に関する学習能力を有する必要があると予想される。一方、マアジは稚魚期以降ほとんどの場合群れを形成して生活するため（Masuda, 2009）、群れの中に一定の割合で高い学習能力を有する個体が存在すれば、学習能力の低い個体に大きな不利はないと考えられる。実際、本実験において集団で訓練を実施したマアジでは、初期訓練の 20 回目において、マダイやキジハタと遜色のない学習行動を示している（Fig. 6-7）。本結果は、マアジが群れ全体で 1 つの情報プールを形成することで多様な個体の生存を可能にしていることを示唆しており、群れ形成の生態的機能に関する新規かつ重要な側面を提示している。

記憶に関しては、マダイでは著しい個体差が観察されたのに対し、キジハタではほぼすべ

での個体が優れた記憶保持能力を有することが示された（記憶個体割合：マダイ約 25%，キジハタ約 83%）。この結果についても、「6-(2) 報酬訓練におけるキジハタの学習能力と記憶保持能力」の考察で述べた通り、両種の生態的特徴と密接に関わっていることが予想される。

本章で明らかとなった、各魚種の生態的特徴と学習および記憶能力との関わりは、他の魚種にも共通する普遍的な性質である可能性がある。しかしながら、「2-(4) 報酬訓練と罰訓練の比較および個体差に関する考察」や「4-(3) 学習能力および記憶保持能力の個体発生」で述べた通り、魚類の学習能力や記憶保持期間は、その訓練方法や成長段階によって異なる。本研究では、報酬訓練という単一の訓練手法を用いることで、魚種間の客観的な比較を試みた。今回用いた訓練手法によって各魚種の最大限の能力を評価し得たという保証はない点には注意が必要である。

最後に、本章の結果を踏まえ魚類の学習能力の水産分野への応用を考えると、キジハタはその定着性の強さだけでなく、学習および記憶保持能力という観点からみても、栽培漁業や海洋牧場に非常に適した魚種といえる。今後は、対象種の魚価や生態的観点だけではなく、こうした学習および記憶能力という視点を取り入れ、水産分野への応用に最適な魚種や発育段階を選定していくことで、より効率的な栽培漁業が実現するものと期待される。

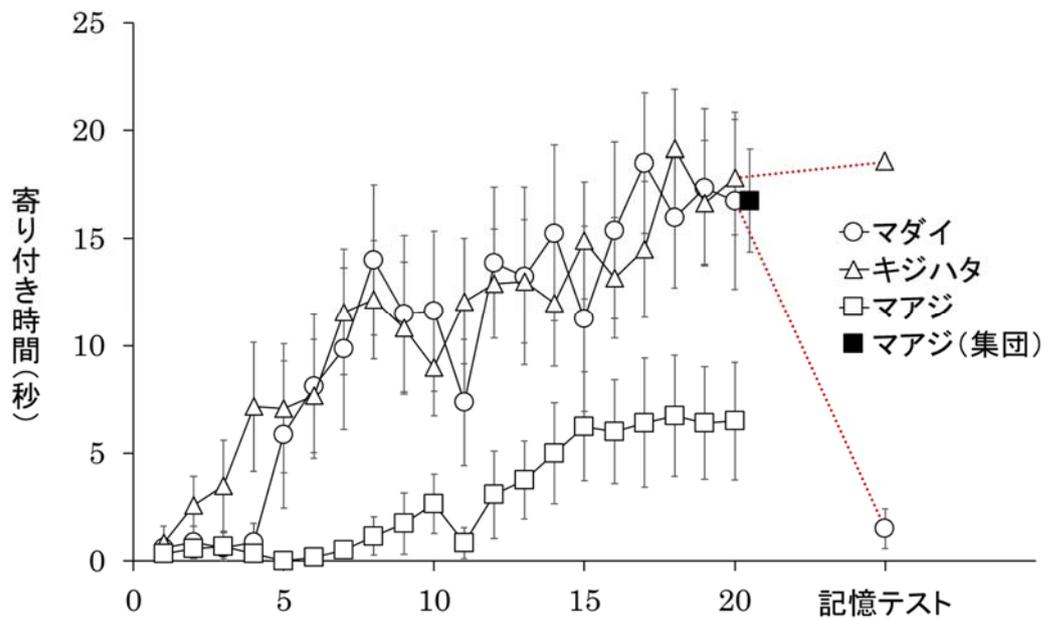


Fig. 6-7 異なる3魚種に餌場学習の訓練を施した際の初期訓練および記憶テスト時の餌場への寄り付き時間 (mean \pm SE, マダイ: n = 8, キジハタ: n = 12, マアジ: n = 12)。■は、4個体で構成されたマアジ集団の訓練20回目の寄り付き時間を示す。

7. 総合考察

本研究ではまず、実験心理学的手法を用いてマダイ稚魚の記憶保持期間について検討した。その結果、マダイ稚魚の報酬訓練における記憶保持期間は30日以上60日未満と評価されたのに対し、罰訓練では1日以上3日未満と極めて短いことが明らかとなった。これらの結果は、学習する内容や訓練手法によって魚類の記憶保持期間が大きく異なることを示唆している。このように、本研究は海産魚の記憶能力について定量的に示した初めての成果である。なお、ヒトの記憶に関する研究では、記憶の減衰が外部からの刺激や新しい情報による干渉によって生じるとされる干渉説が存在する（森ら、1995）。それゆえ、環境がより複雑で変化の激しい自然下では、本研究で示された結果よりも記憶保持期間が短くなる可能性がある点には留意が必要であろう。

また本研究の結果、マダイ稚魚の記憶保持能力には非常に大きな個体差が存在することが明らかとなった。この結果は、記憶保持期間を検証するような実験において、集団で訓練することの問題点を示唆している。すなわち、群れを形成する魚種では個体間に相互誘引性が働くため（Herbert-Read *et al.*, 2011; Katz *et al.*, 2011）、集団で記憶テストを実施すると、集団内の大半の個体が忘却していたとしても、記憶保持能力の優れた個体がわずかに混じっていれば、他の個体も記憶個体に追従することで、見かけ上は全体として記憶していたかのようにふるまう可能性がある。実際、マダイ稚魚も放流直後に群れを形成することが報告されていることから（Yamada *et al.*, 1992; Kudoh *et al.*, 1999）、記憶保持能力を検証する際は、本研究のように単独で実験を行う方がより正確な知見が得られるであろう。

また記憶保持能力の個体発生について検討したことで、魚類の記憶保持能力が成長に伴い変化することが明らかとなり、さらに報酬訓練と罰訓練では記憶能力の発達と衰退の時期が異なることがわかった。フタホシコオロギ *Gryllus bimaculatus* では、報酬訓練と罰訓練では情報を伝達するニューロンや伝達物質が異なることが報告されている (Unoki *et al.*, 2005)。それゆえマダイにおいても、本研究で記憶保持能力に差がみられた 50 mm および 80 mm 前後の個体について脳やニューロンを観察することで、それぞれの記憶を司る脳の領域の特定など、記憶のより詳細なメカニズムについて解明できる可能性がある。また、本研究で観察された記憶保持能力の発達および衰退時期と、自然下において本種が生息環境を移行する時期がほぼ一致していたことから、魚類の記憶保持能力は生態と深い関わりをもつ可能性が示された。

さらにマダイ、キジハタ、マアジを用いて、学習および記憶保持能力について魚種間の比較を行った結果、魚種ごとにこれらの能力は大きく異なり、さらにその傾向は各魚種の生態に関する既往の知見とよく一致する可能性が示された。今回観察された傾向は、魚類全般に共通する普遍的な性質の可能性があり、たとえば大きな群れを形成するような魚種では、今回マアジで示されたものと同様に同種内で学習能力の異なる個体が混在しているものと推察される。一方、イトヨを用いた先行研究では、同種内でも生息している環境の安定性の違い、すなわち河川か湖沼かによって、記憶保持の期間が異なることが報告されている (Brydges *et al.*, 2008)。今後は、系統的に近縁でありかつ生態の大きく異なる魚種間で、学

習および記憶保持能力を比較することで、魚類の記憶に関するより普遍的な知見が得られるものと期待される。魚類の記憶能力に関するこうした研究は、その生態を理解するうえでの重要な情報になると考えられる。

本研究で得られた結果は、栽培漁業における種苗の訓練や海洋牧場の事業化など、魚類の学習能力の水産分野への応用を考えるうえでも一助となり得る。まず上述の通り、魚類の記憶保持期間が学習する内容や訓練手法によって大きく異なることが示されたことから、今後応用を実施する際は学習能力だけでなく記憶保持期間についても検討すべきであると考えられる。また、仮に対象種の記憶保持期間が期待された期間より短い場合は、学習内容や訓練手法を調整することで記憶保持期間を延長できる可能性がある。さらに、記憶保持能力の個体差を利用して、記憶保持能力の優れた種苗を選別することができれば、より効果的な応用が可能になるものと期待される。一方、同種であっても成長段階によって記憶保持能力が大きく異なることから、今後は記憶という観点からも適切な訓練時期や放流時期について検討すべきであろう。さらに、魚種ごとに学習及び記憶保持能力の傾向が大きく異なることから、対象種の魚価や生態的観点だけではなく、学習および記憶能力を評価したうえで適切な魚種を選定していく必要性を提言できる。

以上の通り、本研究は実験心理学的手法を用いて、様々な側面から魚類の記憶保持能力について定量的な検証を行い、魚類の記憶能力と生態との関わりについて考察した。また、栽培漁業や海洋牧場といった事業において、放流に適した魚種や放流サイズを決定し、種苗に

馴致や訓練を施すうえでも一助となり得る知見を得た。今後は本研究をもとに、より応用的な研究を進めていくことで、栽培漁業における生産性の向上や、海洋牧場の実用化へとつながっていくものと期待される。

謝辞

本論文の執筆にあたり、京都大学大学院農学研究科への入学から約 7 年間、長期にわたって終始親切丁寧なご指導をいただきました。京都大学フィールド科学教育研究センターセンター長 山下 洋教授、そして京都大学舞鶴水産実験所 所長 益田玲爾准教授に対し、心よりの感謝を申し上げます。研究者、教育者、そして一人の人間としても心から尊敬できるお二人のもとで研究を進めることができ、私は本当に幸せ者でした。また、京都大学フィールド科学教育研究センター 荒井修亮教授には、副査として大変貴重なご助言をいただきました。終始温かくご指導をいただきましたことに、心よりお礼申し上げます。

そして、これまで多くのご支援とご指導をいただきました高橋宏司氏を始めとする舞鶴水産実験所の教職員、先輩、そして後輩のみなさま方には、大変感謝しております。多くの出会いや別れがありましたが、常に素晴らしい方々に囲まれ、本当に恵まれた 5 年間でした。

キジハタの実験に際して、快く人工種苗をご提供くださいました大阪府漁業振興基金栽培事業場 森 政次場長、そして辻村浩隆氏に対し、心より御礼申し上げます。

本研究の一部は、実施した罰訓練の実験装置は、2013 年度 笹川科学研究助成の援助を得て、実施されました。ここに記し、感謝申し上げます。

最後に、私が描く進路に対して一切否定することなく、常に背中を押し続けてくださった両親に対して感謝の意を表し、謝辞といたします。

References

- Akers, K. G., Arruda-Carvalho, M., Josselyn, S. A. & Frankland, P. W. (2012). Ontogeny of contextual fear memory formation, specificity, and persistence in mice. *Learning & Memory*, **19**, 598–604.
- Anderson, J. T. (1988). A review of size dependent survival during pre-recruit stages of fishes in relation to recruitment. *Journal of Northwest Atlantic Fisheries Science*, **8**, 55–66.
- 安樂和彦, 松田宗之, 中原真弥, 重里憲広 & 川村軍蔵 (1997). 断続音によるマダイ音響馴致効果の検討. *日本水産学会誌*, **6**, 934–938.
- 安樂和彦, 松田宗之, 重里憲広, 中原真弥 & 川村軍蔵 (1998). 300Hz 断続音に馴致されたヒラメの200-800Hz 断続音への反応. *日本水産学会誌*, **64**, 755–758.
- Atkinson, R. C. & Shiffrin, R. M. (1971). The control of short-term memory. *Scientific American*, **225**, 82–90.
- Bartley, D. M. & Bell, J. D. (2008). Restocking, stock enhancement, and sea ranching: arenas of progress. *Reviews in Fisheries Science* **16**, 357–365.
- Blaxter, J. H. S. (1976). Reared and wild fish – how do they compare? In G. Persoone & E. Jaspers (Eds.), 1. Research in mariculture at laboratory and pilot scale. *Proceedings of the 10th European Symposium on Marine Biology*, **1**, (pp. 11–26). Wetteren: IZWO.
- Brown, C. (2001). Familiarity with the test environment improves escape responses in the

- crimson spotted rainbowfish, *Melanotaenia duboulayi*. *Animal Cognition*, **4**, 109–113.
- Brown, C. & Laland, K. (2001). Social learning and life skills training for hatchery reared fish. *Journal of Fish Biology*, **59**, 471–493.
- Brown, C. & Day, R. (2002). The future of stock enhancements: lessons for hatchery practice from conservation biology. *Fish and Fisheries*, **3**, 79–94.
- Brown, C., Jones, F. & Braithwaite, V. (2005). In situ examination of boldness-shyness traits in the tropical poeciliid, *Brachyrhaphis episcopi*. *Animal Behaviour*, **70**, 1003–1009.
- Brown, G. E., Ferrari, M. C. O., Malka, P. H., Fregeau, I., Kayello, I. & Chivers, D. P. (2013). Retention of acquired predator recognition among shy versus bold juvenile rainbow trout. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **67**, 43–51.
- Brydges, N. M., Heathcote, R. J. P. & Braithwaite, V. A. (2008). Habitat stability and predation pressure influence learning and memory in populations of three-spined sticklebacks. *Animal Behaviour*, **75**, 935–942.
- Champagne, D. I., Hoefnagels, C. C. M., de Kloet, R. E. & Richardson, M. K. (2010). Translating rodent behavioral repertoire to zebrafish (*Danio rerio*): relevance for stress research. *Behavioural Brain Research*, **214**, 332–342.
- Coleman, K. & Wilson, D. S. (1998). Shyness and boldness in pumpkinseed sunfish: individual differences are context-specific. *Animal Behaviour*, **56**, 927–936.

- Conrad, J. L., Weinersmith, K. L., Brodin, T., Saltz, J. B. & Sih, A. (2011). Behavioural syndromes in fishes: a review with implications for ecology and fisheries management. *Journal of Fish Biology*, **78**, 395–435.
- Csányi, V., Csizmadia, G. & Miklosi, A. (1989). Long-term memory and recognition of another species in the paradise fish. *Animal Behaviour*, **37**, 908–911.
- Dill, L. M. (1974). The escape response of the zebra danio (*Brachydanyo rerio*) II. The effect of experience. *Animal Behaviour*, **22**, 723–730.
- Dodson, J. J. (1988). The nature and role of learning in the orientation and migratory behavior of fishes. *Environmental Biology of Fishes*, **23**, 161–182.
- Ferrari, M.C.O., Brown, G.E., Jackson, C.D., Malka, P.H., Chivers, D.P. (2010). Differential retention of predator recognition by juvenile rainbow trout. *Behaviour*, **147**, 1791–1802.
- French, J. W. (1942). The effect of temperature on the retention of a maze habit in fish. *Journal of Experimental Psychology*, **31**, 79–87.
- Fricke, H. (1974). Öko-Ethologie des monogamen Anemonenfisches *Amphiprion bicinctus*. *Zeitschrift für Tierpsychologie*, **36**, 429–512.
- Frost, A. J., Winrow-Giffen, A., Ashley, P. J. & Sneddon, L. U. (2007). Plasticity in animal personality traits: does prior experience alter the degree of boldness? *Proceedings of the Royal Society*, **274**, 333–339.

藤川裕次 & 佐々木 正 (2001). 人工種苗マダイの捕食者回避における学習効果. *水産増殖*, **49**, 151–156.

藤田和生 (2015). 動物たちは何を考えている？ 日本動物心理学会監修, 藤田和生編著, 技術評論社.

Fujiya, M., Sakaguchi, S. & Fukuhara, O. (1980). Training of fishes applied to ranching of red sea bream in Japan. In J. E. Bardach, J. J. Magnuson, R. C. May, & J. M. Reinhart (Eds.), *Fish behavior and its use in the capture and culture of fishes* (pp. 200–209). Manila, Philippines: ICLARM.

古田晋平 (1998). ヒラメ人工種苗と天然稚魚の摂食行動の比較. *日本水産学会誌*, **64**, 393–397.

Gerber, B., Wustenberg, D., Schutz, A. & Menzel, R. (1998). Temporal determinants of olfactory long-term retention in honeybee classical conditioning: nonmonotonous effects of the training trial interval. *Neurobiology of Learning and Memory*, **69**, 71–78.

Gonzalo, A., López, P. & Martín, L. (2010). Risk level of chemical cues determines retention of recognition of new predators in Iberian green frog tadpoles. *Behavioral Ecology and Sociobiology*, **64**, 1117–1123.

畑 敏道 & 岡市広成 (1997). Morris 型水迷路におけるラットの場所学習の発達. *The Japanese Journal of Animal Psychology*, **47**, 3–11.

- Hazlett, B. A., Acquistapace, P. & Gherardi, F. (2002). Differences in memory capabilities in invasive and native crayfish. *Journal of Crustacean Biology*, **22**, 439–448.
- Herbert-Read, J. E., Perna, A., Mann, R. P., Schaerf, T. M., Sumpter, D. J. T. & Ward, A. J. W. (2011). Inferring the rules of interaction of shoaling fish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 18726–18731.
- Hermitte, G., Pedreira, M. E., Tomsic, D. & Maldonado, H. (1999). Context shift and protein synthesis inhibition disrupt long-term habituation after spaced, but not massed, training in the crab *Chasmagnathus*. *Neurobiology of Learning and Memory*, **71**, 34–49.
- Hesse, C. & Franz, V. H. (2009). Memory mechanisms in grasping. *Neuropsychologia*, **47**, 1532–1545.
- Hossain, M. A. R., Tanaka, M. & Masuda, R. (2002). Predator–prey interaction between hatchery-reared Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus* and sandy shore crab, *Matuta lunaris*: daily rhythms, anti-predator conditioning and starvation. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **267**, 1–14.
- Ichikawa, N. & Sasaki, M. (2003). Importance of social stimuli for the development of learning capability in honeybees. *Applied Entomology and Zoology*, **38**, 203–209.
- Ingraham, E., Anderson, N. D., Hurd, P. I. & Hamilton, T. J. (2016). Twelve-day reinforcement-based memory retention in African cichlids (*Labidochromis caeruleus*).

Frontiers in Behavioural Neuroscience, **10**, 157.

猪子嘉生, 溝上昭雄 & 高場 実 (1978). マダイの種苗放流・追跡－1. 昭和 52 年度野生
海域における小型種苗の大量集中放流. *栽培技研*, **7**, 21-26.

実森正子 & 中島定彦 (2009). 学習の心理. サイエンス社.

Kaneko, S., Masuda, R. & Yamashita, Y. (2019). Memory retention capacity using two
different training methods, appetitive and aversive learning, in juvenile red sea bream
Chrysophrys major. *Journal of Fish Biology*, **94**, 231-240.

Katz, Y., Tunstrom, K., Ioannou, C. C., Huepe, C. & Couzin, I. D. (2011). Inferring the
structure and dynamics of interactions in schooling fish. *Proceedings of the National
Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 18720-18725.

河端雄毅, 山田秀秋, 佐藤 琢, 小林真人, 平井慈恵, 照屋和久 & 荒井修亮 (2011). シロ
クラベラ人工種苗の被食回避における捕食者学習効果. *日本水産学会誌*, **77**, 625-629.

川村俊蔵, 田中 健 & 泉山茂之 (1983). 強煙火システムによる野生ニホンザルの耕地回
回避学習実験, その 1. *哺乳類科学*, **45**, 53-70.

Kieffer, J. D. & Colgan, P. W. (1992). The role of learning in fish behaviour. *Reviews in Fish
Biology and Fisheries*, **2**, 125-143.

Kihslinger, R. I. & Nevitt, G. A. (2006). Early rearing environment impacts cerebellar growth
in juvenile salmon. *Journal of Experimental Biology*, **209**, 504-509.

Kogan, J. H., Frankland, P. W., Blendy, J. A., Coblenz, J., Marowitz, Z., Schutz, G. & Silva, A. J. (1997). Spaced training induces normal longterm memory in CREB mutant mice. *Current Biology*, **7**, 1–11.

今野晃嗣, 長谷川壽一 & 村山美穂 (2014). 動物パーソナリティ心理学と行動シンドローム研究における動物の性格概念の統合的理解. *動物心理学研究*, **64** (9), 19–35.

工藤孝也 & 山岡耕作 (1998). 天然マダイおよびチダイ稚魚のなわばり形成場所と摂食行動. *日本水産学会誌*, **64**, 16–25.

Kudoh, T., Suetomo, K. & Yamaoka, K. (1999). Distribution and behavior of wild and artificially reared juveniles of red sea bream *Pagrus major* at Morode Cove in Ehime prefecture (in Japanese with English abstract). *Nippon Suisan Gakkaishi*, **65**, 230–240.

La Mesa, G., Longobardi, A., Sacco, F. & Marino, G. (2008). First release of hatchery juveniles of the dusky grouper *Epinephelus marginatus* (Lowe, 1834) (Serranidae: Teleostei) at artificial reefs in the Mediterranean: results from a pilot study. *Scientia Marina* **72**, 743–756.

Le Vay, I., Carvalho, G. R., Quintio, E. T., Lebata, J. H., Ut, V. N. & Fushimi, H. (2007). Quality of hatchery-reared juveniles for marine fisheries stock enhancement. *Aquaculture*, **268**, 169–180.

Makino, H., Masuda, R. & Tanaka, M. (2006). Ontogenetic changes of learning capability

under reward conditioning in striped knifejaw *Oplegnathus fasciatus* juveniles. *Fisheries Science*, **72**, 1177–1182.

Makino, H., Masuda, R. & Tanaka, M. (2015). Environmental stimuli improve learning capability in striped knifejaw juveniles: the stage-specific effect of environmental enrichment and the comparison between wild and hatchery-reared fish. *Fisheries Science*, **81**, 1035–1042.

Masuda, R. (2004). Behavioural approaches to fish stock enhancement: A practical review. In K. M. Leber, S. Kitada, H. L. Blankenship & T. Svåsand (Eds.), *Stock enhancement and sea ranching* (pp. 83–90). Oxford: Blackwell Publishing.

益田玲爾 (2005). 魚類の群れ行動の発達心理学, 海洋と生物, **37**, 410–415.

益田玲爾 (2006). 魚の心をさぐる –魚の心理と行動–, 成山堂書店.

Masuda, R. (2009). Behavioural ontogeny of marine pelagic fishes with the implications for the sustainable management of fishery resources. *Aqua-BioScience Monographs*, **2**, 1–56.

益田玲爾 (2013). 魚類の行動研究と水産資源管理, 棟方有宗, 小林牧人, 有元貴文編. 恒星社厚生閣, pp.116–127.

Masuda, R. & Tsukamoto, K. (1998). Stock enhancement in Japan: review and perspective. *Bulletin of Marine Science*, **62**, 337–358.

- Masuda, R. & Ziemann, D. A. (2000). Ontogenetic changes of learning capability and stress recovery in Pacific threadfin juveniles. *Journal of Fish Biology*, **56**, 1239–1247.
- Matsumoto, Y. & Mizunami, M. (2002). Lifetime olfactory memory in the cricket *gryllus bimaculatus*. *Journal of Comparative Physiology*, **188**, 295–299.
- Mazur, J. E. (2006). メイザーの学習と行動. 日本語版第2版磯博行訳, 二瓶社.
- 宮島悠子, 益田玲爾, 栗原紋子, 山下 洋 & 竹内俊郎 (2014). ミズクラゲ給餌によるマダイ人工孵化稚魚の横臥傾向の改善. *日本水産学会誌*, **80**, 934–945.
- Moksness, E. & Stole, R. (1997). Larviculture of marine fish for sea ranching purposes: is it profitable? *Aquaculture*, **155**, 341–353.
- 森 敏昭, 井上 毅 & 松井孝雄 (1995). 『グラフィック認知心理学』. サイエンス社.
- Nilsson, J., Kristiansen, T. S., Fosseidengen, J. E., Ferno, A. & van den Bos, R. (2008). Learning in cod (*Gadus morhua*): long trace interval retention. *Animal Cognition*, **11**, 215–222.
- Nadler, L. E., Killen, S. S., McClure, E. C., Munday, P. L. & McCormick, M. I. (2016). Shoaling reduces metabolic rate in a gregarious coral reef fish species. *Journal of Experimental Biology*, **219**, 2802–2805.
- 永井 拓, 田熊一徹, 亀井浩行, 溝口博之, 鍋島俊隆 & 山田清文 (2007). 放射状迷路を用いた Delayed spatial win-shift 課題による空間作業記憶の評価. *日本薬理学雑誌*, **129**,

457–462.

Nottebohm, F. (1970). Ontogeny of bird song. *Science*, **167**, 950–56.

Odling-Smee, L. & Braithwaite, V. A. (2003). The influence of habitat stability on landmark use during spatial learning in the three-spined stickleback. *Animal Behaviour*, **65**, 701–707.

Okamoto, T., Endo, S., Shirao, T. & Nagao, S. (2011). Role of cerebellar cortical protein synthesis in transfer of memory trace of cerebellumdependent motor learning. *Journal of Neuroscience*, **31**, 8958–8966.

Okano, H., Hirano, T. & Balaban, E. (2000). Learning and memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 12403–12404.

奥村重信 & 小畑泰弘 (2006). キジハタ増殖魚礁の開発と漁港への応用. *日本栽培学会誌*, **72** (3), 463–466.

Petrillo, M., Ritter, C. A. & Powers, A. S. (1994). A role for acetylcholine in spatial memory in turtles. *Physiology & Behavior*, **56**, 135–141.

Reale, D., Reader, S. M., Sol, D., McDougall, P. T. & Dingemanse, N. J. (2007). Integrating animal temperament within ecology and evolution. *Biological Reviews*, **82**, 291–318.

Reger, M. L., Hovda, D. A. & Giza, C. C. (2009). Ontogeny of rat recognition memory measured by the novel object recognition task. *Developmental Psychobiology*, **51**, 672–

678.

Rovee, C. C. (1999). The development of infant memory. *Current Directions in Psychological Science*, **8** (3), 80–85.

Schluessel, V. & Bleckmann, H. (2012). Spatial learning and memory retention in the grey bamboo shark (*Chiloscyllium griseum*). *Zoology*, **115** (6), 346–353.

Shishidou, H. (2002). Stocking effectiveness of red sea bream *Pagrus major* in Kagoshima Bay, Japan. *Fisheries Science*, **68** (Suppl. I), 904–907.

小路 淳 (2009). 藻場とさかなー魚類生産学入門ー. 成山堂書店.

Sloan, J. I., Cordo, E. B. & Mensinger, A. F. (2013). Acoustical conditioning and retention in the common carp (*Cyprinus carpio*). *Journal of Great Lakes Research*, **39**, 507–512.

Sneddon, L. U. (2003). The bold and the shy: individual differences in rainbow trout. *Journal of Fish Biology*, **62**, 971–975.

萱野泰久, 林 浩志 & 片山貴之 (2001). 音響馴致放流したキジハタの人工魚礁域における滞留状況. *水産工学*, **38** (2), 185–191.

Sundstrom, L. F., Petersson, E., Hojesjo, J., Johnsson, J. I. & Jarvi, T. (2004). Hatchery selection promotes boldness in newly hatched brown trout (*Salmo trutta*): implications for dominance. *Behavioral Ecology*, **15**, 192–198.

Takahashi, K., Masuda, R. & Yamashita, Y. (2010). Ontogenetic changes in the spatial

learning capability of jack mackerel *Trachurus japonicus*. *Journal of Fish Biology*, **77**, 2315–2325.

Takahashi K., Masuda R. & Yamashita Y. (2013). Bottom feeding and net chasing improve foraging behavior in hatchery-reared Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* juveniles for release. *Fisheries Science*, **79**, 55–60.

Takahashi, K., Masuda, R. & Yamashita, Y. (2015). Can red sea bream *Pagrus major* learn about feeding and avoidance through the observation of conspecific behavior in video playback? *Fisheries Science*, **81**, 679–685.

Takahashi, K. & Masuda, R. (2018). Net-chasing training improves the behavioral characteristics of hatchery-reared red sea bream (*Pagrus major*) juveniles. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **75** (6), 861–867.

高山耕二, 吉田美代, 石井大介, 廣瀬 潤, 大島一郎, 赤井克己 & 中西良孝 (2013). 4 段張り電気柵による牧場採草地へのシカ侵入防止効果. *日本畜産学会報*, **84**, 81–88.

玉木哲也 (2000). 兵庫県但馬沿岸におけるキジハタの行動とすみ場. *水産工学*, **37**, 63–65.

富岡健太, 大前信輔, 阿部文彦 & 山岡耕作 (2011). 汀線付近転石域に出現するマダイ稚魚のなわばりと摂食生態. *黒潮圏科学*, **4**, 159–167.

田中 克 (1979). マダイ稚魚の浮遊期から底生生活への移行過程. *水産土木*, **16**, 47–57.

Tempel, B. l., Bonini, N., Dawson, D. R. & Quinn, W. G. (1983). Reward learning in normal

and mutant *Drosophila*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **80**, 1482–1486.

Trompf, I. & Brown, C. (2014). Personality affects learning and trade-offs between private and social information in guppies, *Poecilia reticulata*. *Animal Behaviour*, **88**, 99–106.

Tsukamoto, K., Kuwada, H., Hirokawa, J., Oya, M., Sekiya, S., Fujimoto, H. & Imaizumi, K. (1989). Size-dependent mortality of red sea bream, *Pagrus major*, juveniles released with fluorescent otolith tags in News Bay, Japan. *Journal of Fish Biology*, **35**, 59–69.

塚本勝巳, 塩澤 聡, 小金隆之, 阪倉良孝 & 水田洋之助 (1995). 成長に伴うシマアジの学習能の変化. *栽培技研*, **24** (1), 45–51.

内田和男, 桑田 博 & 塚本勝巳 (1993). マダイの種苗性と横臥行動. *日本水産学会誌*, **59**, 991–999.

上野糧正 (2007). ブタの学習能力に関連する行動研究の動向. *人間社会環境研究*, **13**, 259–273.

Underwood, B. J. (1970). A breakdown of the total time law in free-recall learning. *Journal of Verbal Learning and Verbal Behavior*, **9**, 573–580.

Unoki, S., Matsumoto, Y. & Mizunami, M. (2005). Participation of octopaminergic reward system and dopaminergic punishment system in insect olfactory learning revealed by pharmacological study. *European Journal of Neuroscience*, **22**, 1409–1416.

- Valente, A., Huang, K. H., Portugues, R. & Engert, F. (2012). Ontogeny of classical and operant learning behaviors in zebrafish. *Learning & Memory*, **19**, 170–177.
- Vander Wall, S. B. (1982). An experimental analysis of cache recovery in Clark's nutcracker. *Animal Behaviour*, **30**, 84–94.
- Wolman, M. A., Jain, R. A., Liss, L. & Granato, M. (2011). Chemical modulation of memory formation in larval zebrafish. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 15468–15473.
- Yamada, A., Sekiguchi, T., Suzuki, H. & Mizukami, A. (1992). Behavioral analysis of internal memory states using cooling-induced retrograde amnesia in *Limax flavus*. *Journal of Neuroscience* **12**, 729–735.
- Yamada, T., Yamaoka, K. & Taniguchi, N. (1992). Behaviour, distribution and population size change of artificially-bred 0-group red sea bream released in a small fishing port (in Japanese with English abstract). *Nippon Suisan Gakkaishi*, **58**, 611–617.
- 山下 洋 (2010). 魚類生態学の基礎, 塚本勝巳編. 恒星社厚生閣, pp.172–184.
- 山内光哉 & 春木 豊 (2001). 『グラフィック学習心理学』. サイエンス社.
- Zion, B., Karplus, I., Grinshpon, Y., Rosenfeld, I. & Barki, A. (2011). Periodic reinforcement of acoustically conditioned behavior in St. Peter's fish, *Sarotherodon galilaeus*, for ranching purposes. *Aquaculture*, **315**, 394–399.

Zion, B., Karplus, I. & Barki, A. (2012). Ranching acoustically conditioned fish using an automatic fishing machine. *Aquaculture*, **330**, 136–141.