

機関番号：50101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008 ～ 2010

課題番号：20700388

研究課題名(和文)

非線形心拍ゆらぎ解析システムの開発と種々の疾患モデルへの臨床応用

研究課題名(英文)

Development of non-linear analysis for heart rate fluctuations and clinical adaptation to various disease model of chick embryo

研究代表者

森谷 健二 (Moriya Kenji)

函館工業高等専門学校 電気電子工学科 准教授

研究者番号：90342435

研究成果の概要(和文)：

ヒトと同じ心臓構造をもち、温度と酸素環境があれば母体から独立して成長できる(母体の生理的影響を受けずに成長できる)ニワトリ胚をヒト胎児の疾患モデルとして用いて、心拍数や体動などのパラメータを計測して異常成長の予測を目指した。本研究では主に未解明であった妊娠初期に当たる初期胚の体動に焦点を当てた。その結果、正常に成長する胚の体動にはある発達パターンが存在することがわかった。このことは、逆に異常成長を予知できる可能性を示唆しており、今後のさらなる発展が期待できる。

研究成果の概要(英文)：

We attempted to predict an abnormal growth of chick embryos which can't be investigated with a genetic engineering. The chick embryos have some advantages for a measurement model: their incubation environment (temperature and oxygen concentration) can be easily changed, a heart structure of the chick embryo is same as that of a human fetus. We elucidate that 1) the chick embryo begin to move at a 70 h of the incubation, 2) body movements in normal-growth embryos have similar developmental pattern. These results indicate the possibility of prediction to the abnormal-growth of chick embryo. Detail investigations should be required in further research.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|---------|-----------|
| H20 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| H21 年度 | 1,000,000 | 300,000 | 1,300,000 |
| H22 年度 | 700,000 | 210,000 | 910,000 |
| 総計 | 3,300,000 | 990,000 | 4,290,000 |

研究分野：生体情報計測

科研費の分科・細目：分科：人間医工学 細目：医用生体工学・生体材料工学

キーワード：生体情報計測、心拍ゆらぎ解析、ニワトリ胚、体動、画像処理、生体機能利用

1. 研究開始当初の背景

鳥類胚は人間と同じ不完全な二心房二心室構造の心臓をもち、母体から独立して成長できるため胎児のみの生体情報を計測できるモデルとして用いられてきた。孵化期に心拍動と連動したガス交換呼吸から肺呼吸によるガス交換呼吸へ移行するので、特に呼吸循環器機能の胎児計測モデルとして用いられてきた。

その一方で、胎児期の心拍ゆらぎなどの生体情報にもカオスに代表される非線形現象がありそれらの病態疾患への応用研究が期待されていたが、哺乳動物ではどうしても母体の影響を受けるので胎児のみのパラメータによる解析が期待されていた。

本研究室ではDNA解析で予見できない、成長過程における病態疾患の予測を目標にして、第一に胎児の様々な生理パラメータの正常成長パターンを明らかにして、次に疾患モデルとの比較検討により特徴を抽出することを目指してきた。

これまで、ニワトリ胚の瞬時心拍数計測システムを構築して様々な心拍ゆらぎが起きていることを突き止めた(森谷健二, 科学研究費補助金 若手研究B, No. 14750355)。

その後、それらの心拍ゆらぎの成因を調査して、体温調節に特有な心拍ゆらぎの存在や、ある種の不規則な心拍ゆらぎが自律神経の亢進に起因するであろう事を突き止めた。さらに、これらの研究の中で低酸素症疾患と思われる死亡胚では死亡直前に一拍動毎に心拍数が増減する特異な現象が現れることが明らかになり、死亡予測に関する研究が一気に躍進した(森谷健二, 科学研究費補助金 若手研究B, No. 17700412)。

2. 研究の目的

これまでの研究において、孵化期の胚と雛の心拍ゆらぎや体温調節機能との関連などはある程度明らかになったが、外部刺激と成長の関係についての調査は残っていた。一方で孵卵全期間のうち、孵卵初期、ヒトで言う妊娠初期という出産期と並んで重要な期間の生理機能の発達パターンの詳細は明らかになっていなかった。孵卵初期においては胎児の体動と正常成長との関係が議論され始めたが明らかになっていなかったため、本研究では主にこれらの解明を目的とした。また、孵卵全期において電磁波が胎児に及ぼす影響についても携帯電話の普及とともに問題視され始めていたがはっきりとした結果はまだ無かったので、この影響調査も目的とした。同時に、臨床応用を目指した解析プログ

ラムの継続開発も目的とした。本報告では、これらの研究のうち主に(1)初期胚の体動成長パターンと(2)電磁波の影響結果に焦点を絞り報告を行う。

3. 研究の方法

(1)ニワトリ初期胚の体動解析

①録画システムと体動解析

胚の体動は、CCDカメラにより直接録画を行い、画像処理によってその移動量を算出するシステムを構築した(図1)。

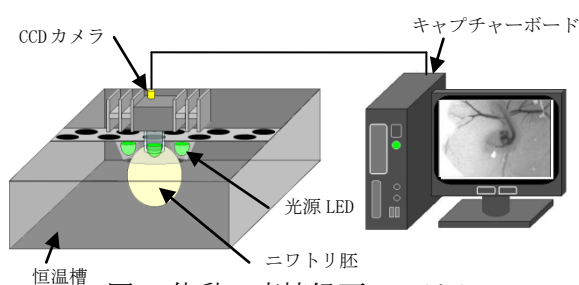


図1. 体動の直接録画システム

計測した画像にテンプレートマッチング法を用いて胚の頭の位置を座標として計算し、それらから胚の移動量を体動として計算した。

②周波数解析

体動の周期性についてはフーリエ変換による周波数解析を行った。誤検出によるノイズをデジタルフィルタでカットしたあと加算平均処理を用いたフーリエ変換によって周期性を確認した。

(2)電磁波のニワトリ胚への影響調査

本実験では、最初に電磁波の影響があるか、無いか、について調査したかったので安価な微弱高周波出力装置を用いて電磁波を照射した(図2)。実験に使用した孵卵器は十分に電磁波シールドを施している。

電磁波照射グループでは1時間に5分間の電磁波照射を孵卵開始から孵化するまで毎日行った。実験は全部で9回、電磁波曝露群166個とコントロール群99個の計265個の有精卵において行った。

生理機能への影響についてはおもに両者の孵化率、成長率(ハンバーガハミルトン法

による嘴と爪の長さから成長ステージを判定, 図 3) に着目することとして, その違いを統計的に判断した.

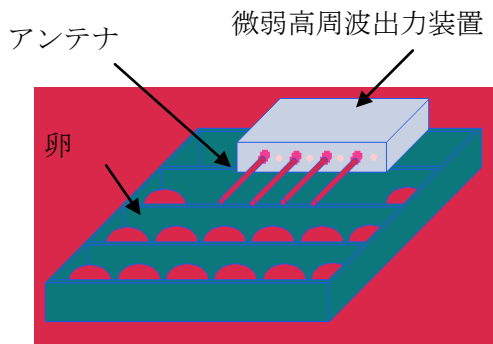


図 2 電磁波曝露の様子

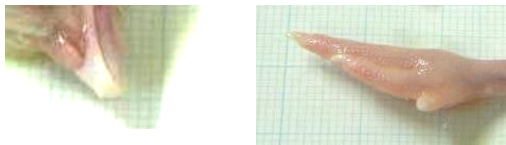


図 3 ハンバーガハミルトン法での成長(ステージ)判定に用いる部位

4. 研究成果

(1) ニワトリ初期胚の体動解析

①胚の直接録画及び解析

我々の研究グループはこれまでもこのシステムを構築して短期間での心臓の拍動の様子や血管形成などの報告を行ってきたが, 本研究において高精度な温度調整や光源の改良を行った結果として 100 時間を超える連続計測を可能とした. このような初期胚の成長の様子を連続的に記録した報告はこれまでになかったため, 体動の解析以前に, 胚の成長の連続記録自体が貴重なデータとなった.

しかしながら, 胚の成長に伴って胚がフレームアウトしたり卵黄に隠れたりし始めたため孵卵 130 時間以降の録画及び解析は誤検出が頻発し, 困難となった(図 4). 今後は複数カメラによりこの問題を解決するとともに, まだ成功していない心臓の初鼓動にも挑む.

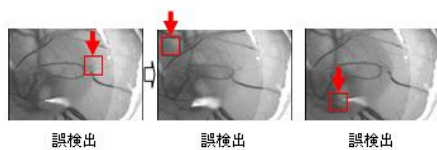


図 4 胚の成長に伴う位置誤検出の様子

②初期胚の体動発達パターン

孵卵開始 72 時間から 125 時間までの胚の体動を図 5 に示す. 図 5 左は胚の様子, 図 5 中央はそれぞれ X 軸方向, Y 軸方向における胚の移動量を, 図 5 右はその XY 表示である.

図 5 に示されるように, 胚は 85 時間程度から 1 方向に動き始め, 100 時間になる頃には周期性をもって円運動になる. さらに胚が成長して 120 時間を超える頃には周期性は消失して不規則な運動となる事がわかった. この発達パターンは正常成長した胚に今のところ共通してみられており, 正常成長しているかどうかの指標の一つとなる事がわかった. なお, 解析の終えている個体のうち正常成長と思われる 3 例の周期性の発達についての詳細を図 6 に示した. 個体 C は正常ではあるが, パターン変化の時間が早い. これは他の個体より成長が早いためと思われる.

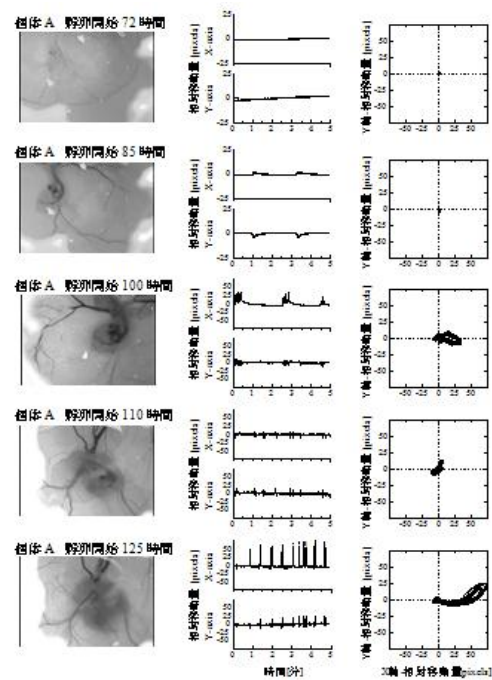


図 5. 初期胚の体動の発達パターン例

孵卵 85 時間周辺において体動は周期性をもち, その後不規則になっていくが, この周期はこれまでに解明してきた体温調節や自律神経活動起因の周期とも異なっており(そもそも, それらは孵卵後半に形成されるので 85 時間の段階ではそれらに由来することはありません), 生理学的にどのような変化, あるいは器官の形成が起きているのか追跡調査が必要である.

また, 図 7 に前述の個体とは別個例の孵卵 87~93 時間までの 6 時間における体動解析結果の連続表示例を示す. 下段はそれぞれ 87-88h, 88-89h の 1 時間を抜き出している.

徐々に体動が頻発し、一次元的運動が円運動となり、さらに周期的になる様子が明確にわかる。

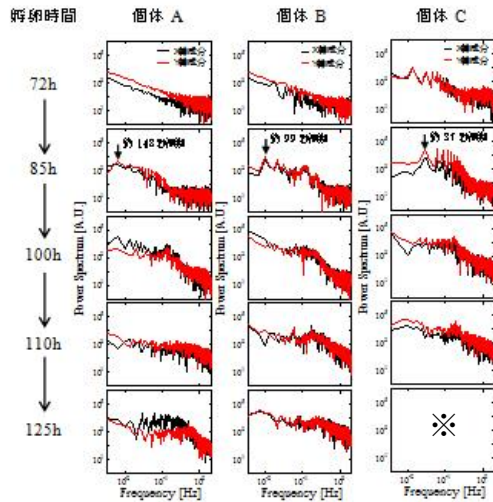


図6 正常成長個体3例におけるX, Y方向の周期性解析例. ※は成長により解析不能であった時間である。

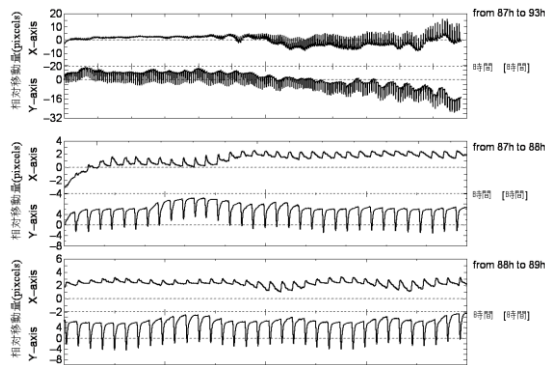


図7 胚の体動量の長期連続表示

今後は、これらの正常成長パターンと疾患時、例えば卵殻に泥や水などがつくことによる呼吸障害に起因する急性・慢性の低酸素疾患時の体動パターンとを比較し、自動的に予測・警告するプログラムの開発を行っていく。

(2) 電磁波のニワトリ胚への影響調査

電磁波の影響についてはショウジョウバエの不妊化など、生殖機能への悪影響の可能性が指摘されていた。本研究では卵の孵化率と成長率に対する影響に焦点を当てて調査を行った。

図8に電磁波暴露群と通常孵卵群（以後、コントロール群）における孵化率を示す。図中の「孵化中」は孵化しているべき日数でも

まだ孵化活動中であった胚で、成長遅れを意味している。電磁波暴露群の胚はコントロール群に対して有意に孵化率が低く、かつ死亡していたことが明らかになった ($P < 0.01, 0.05$)。ただし、興味深いことに、これらは全体の統計的結果であって、個別の実験では逆に電磁波暴露群の孵化率が高いこともあり、何らかの条件により必ずしも負の影響を残している。今後の研究が待たれる結果である。なお、孵卵器は電磁波シールドを施してはいるが強制的な換気が行われているので孵卵環境に起因する酸欠による死亡ではなかったことを記しておく。

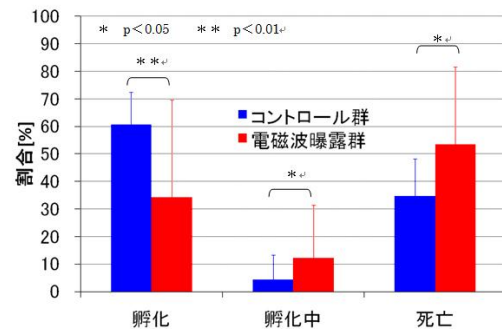


図8 電磁波照射による孵化率への影響

孵化率は孵化予定日である21日の段階で確認するので死亡していた胚がどの段階で死亡していたのかについて追跡調査した結果が図9である。stage42以降は孵化期(出産器)で通常孵卵においてももっとも死亡率の高くなる繊細な期間である。stage38以下の初期段階ですでに死亡していたと言う事実注目したい。すなわち、電磁波の影響は成長初期段階でより強く受ける可能性があるということである。今後は、影響を受ける成長段階の特定、電磁波の強度や周波数帯との関係などの詳細を調査していく。

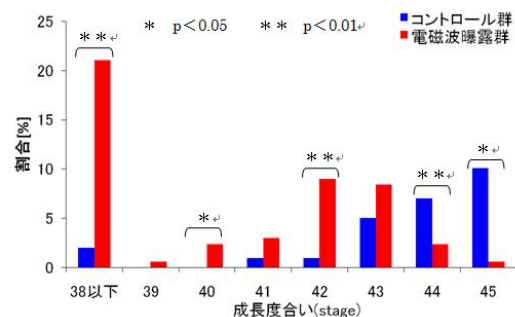


図9 死亡胚の成長状態

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 8 件)

- ① 工藤雅嗣、木村友香、秋山龍一、森谷健二 ニワトリ初期胚の体動解析システムの構築、函館工業高等専門学校紀要 第 45 号、pp. 29-34, 2011. (査読 有)
- ② 中島悠希、森谷健二、音刺激に対するニワトリ後期胚の心拍数応答、函館工業高等専門学校紀要 第 45 号、pp. 35-42, 2011. (査読 有)
- ③ K. Moriya, K. Nabeshima, M. Kudou and R. Akiyama. Investigations of body movements in early stages of chick embryos using image processing. *Proceeding of The 4th combined workshop on fundamental physiology and perinatal development in Poultry. p.29, 2009, Sep., Bratislava, Slovakia.* (査読 有)
- ④ R. Akiyama, T. Komoro, K. Moriya, Investigation of development and heart rate using image processing in early stages of chick embryos. *Proceeding of The 4th combined workshop on fundamental physiology and perinatal development in Poultry. P.8, 2009, Sep., Bratislava, Slovakia.* (査読 有)
- ⑤ 沖野祥平、秋山龍一、森谷健二 DirectX を用いた心電図計測ソフトウェアの開発、函館工業高等専門学校紀要 第 43 号、pp. 37-42, 2009. (査読 有)
- ⑥ 成田晃平、鍋島一憲、秋山龍一、森谷健二、画像処理によるニワトリ初期胚の瞬時心拍数解析、函館工業高等専門学校紀要 第 42 号、pp. 43-48, 2008. (査読 有)
- ⑦ 高橋雅之、佐々木誠、秋山龍一、森谷健二、回転刺激を受けた孵卵後期のニワトリ胚における心拍ゆらぎ解析、函館工業高等専門学校紀要 第 42 号、pp. 49-54, 2008. (査読 有)
- ⑧ 下内章人、乾紀子、森万里子、野瀬和利、小久保嘉弘、森谷健二、高齢者における心拍揺らぎとストレス関連要因の関係についての検討、大阪ガス 2008 年研究助成報告書、2008. (査読 無)

[学会発表] (計 7 件)

- ① 工藤雅嗣、秋山龍一、森谷健二 ニワトリ初期胚の体動解析システムの構築、電気・情報関係学会北海道支部連合大会、2010 年 10 月 23 日、札幌。
- ② 佐々木駿、秋山龍一、森谷健二 電磁波のニワトリ胚への影響調査、電気・情報関係学会北海道支部連合大会、2010 年 10 月 23 日、札幌。
- ③ K. Moriya, K. Nabeshima, M. Kudou and R. Akiyama. Investigations of body movements in early stages of chick embryos using image processing. *The 4th combined workshop on fundamental physiology and perinatal development in Poultry. 11th, Sep. 2009, Bratislava, Slovakia.*
- ④ R. Akiyama, T. Komoro, K. Moriya, Investigation of development and heart rate using image processing in early stages of chick embryos. *The 4th combined workshop on fundamental physiology and perinatal development in Poultry. 11th, Sep., 2009, Bratislava, Slovakia.*
- ⑤ 鍋嶋一憲、土江太一郎、秋山龍一、森谷健二 画像処理によるニワトリ胚の体動解析、電気・情報関係学会北海道支部連合大会、2008 年 10 月 25 日、札幌。
- ⑥ 沖野祥平、秋山龍一、森谷健二 DirectX を用いた心電図ソフトウェアの開発、電気・情報関係学会北海道支部連合大会、2008 年 10 月 25 日、札幌。
- ⑦ 中島悠希、杵真奈見、秋山龍一、森谷健二 音楽に対するニワトリ後期胚の心拍数応答、電気・情報関係学会北海道支部連合大会、2008 年 10 月 25 日、札幌。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森谷 健二 (Moriya Kenji)

函館工業高等専門学校

電気電子工学科准教授

研究者番号：90342435

(3) 連携研究者

下内 章人 (Shimouchi Akito)
国立循環器病センター研究所 研究員
研究者番号 : 80211291

秋山 龍一 (Akiyama Ryuichi)
室蘭工業大学大学院工学研究科
しくみ情報系領域 助教
研究者番号 : 00322876