

平成 22 年 6 月 25 日現在

研究種目： 若手研究 B

研究期間： 2008～2009

課題番号： 20760260

研究課題名（和文） 画像計測による孵卵初期胚の体動解析

研究課題名（英文） Analysis of embryonic activity using video recording in early stage of chick embryos

研究代表者

秋山 龍一 (AKIYAMA RYUICHI)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号： 00322876

研究成果の概要（和文）： 胚の成長に関して重要なパラメータの一つである、胚の体動を長期に連続計測を行うシステムの構築を行った。計測システムでは、CCD カメラからの画像を LAN を用いて計測し、画像処理を行うことで胚眼球の位置の測定を行う。このシステムによる結果、正常胚では体動が観測され、徐々に大きく動き、周期的な円運動を行うことが確認された。また死亡した胚では体動がほとんどなく、正常に発達するための重要な動きと考えられる。

研究成果の概要（英文）： The acquisition system of CCD video was developed using system in early stage of embryos. The embryonic activity was analyzed from the video data by video analysis. The embryonic activity was frequently with embryonic development, and then increased in normal condition of embryos. However, in abnormal condition of embryo, no activity was found.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2009 年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野： 計測工学

科研費の分科・細目： 工学・電気電子工学・計測工学（5107）

キーワード： 画像計測、画像処理、体動、鶏胚

1. 研究開始当初の背景

哺乳類胎児における循環器機能の生体実験モデルとして、鳥類胚（胎児）を用いた研究が行われている。中でも入手が容易である鶏胚（孵卵日令 21 日）での研究が数多く行われており、個体発生段階の心拍数変動やサーカディアンリズムの発達、成長異常胚の

DNA 解析などが、研究代表者も参加した World's Poultry Science Association (WPSA) 分科会（2005、2007 年 10 月 ドイツ・ベルリン）などで報告されている。中でも、心臓構造が管状構造から 2 心房 2 心室へと発達する孵卵初期（日令 7 日目まで）において、心拍数の長期連続計測や呼吸器官であ

る絨毛尿膜の発達に関連すると考えられる体動の計測は、成長解明のための研究として重要視されている。

研究代表者は、これまで困難であった孵卵初期胚の生体パラメータ計測として、CCDカメラと画像処理を用いた心拍数、胚表面積の研究を進めてきた。本研究ではこれらのパラメータに加え、胚の体動および呼吸器官である絨毛尿膜を計測できるシステムに発展させることにより、未知であったパラメータの解析が可能となることが特色である。特に、今まで重要であるが計測例数が少ない体動の解析は、胎児の成長における新たな知見を得られる特徴ある研究だと考えている。WPSA 分科会の主催者であったベルリン自由大学（ドイツ）のトゥンハート教授の研究グループも、体動研究に関しては多大な興味を示してくれており、学術的に重要な研究であると考えている。この体動の成分を明らかにすることによって、他の生理パラメータの計測において問題が少なからずあった体動によるノイズを減少させること可能となり、計測技術への貢献が期待できる。

呼吸器官である絨毛尿膜の発達を調べる際には、これまでは長期連続で調べることは行われてはならず、重要な器官の発達スピードを明らかにすることができ、体動との関連が示されることにより発達要因に関する研究が進められると考えている。さらに心拍数と体動、胚そのものの成長との関連を調べることができ、胎児の成長解明へ少なからず貢献できると考えている。また様々な生理パラメータの計測では、しばしばこの体動が原因であるノイズが計測を妨害することがWPSA 分科会でも報告されており、体動のパターンが解明されればこれらのノイズを除去できる可能性が考えられ、計測・解析システムの構築は非常に重要であると考えられる。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに、小型 CCD カメラを用いた卵内画像計測から画像処理によって、胚の体表面積計測や 1 拍動ごとの心拍数である瞬時心拍数、毛細血管網の発達を胚の成長を阻害せずに計測するシステムを構築してきた。この中で、胚の体動は一方向から多方向、円運動へと動きが変化していき、一時的ではあるが周期的な体動も確認された。また何らかの影響で孵化前に死亡した胚では、体動が明らかに少ない現象が見られていた。体動は胚の成長を促す重要な運動であることが考えられ、体動の運動方向や周期などを調べることができれば、成因究明とともに成長への影響を解明できると考えられる。また、酸素-二酸化炭素の交換器官である絨毛尿膜と呼ばれる毛細血管網の発達には

様々な仮説があるが、体動の有無によって絨毛尿膜の発達に違いが見受けられることから、このパラメータの解析が重要であると考えられる。そのため、本研究では初期段階での体動と絨毛尿膜の表面積を同時に長期連続で計測するシステムの構築を行い、正常成長胚と死亡胚の比較研究を行っていくことを目的とした。

3. 研究の方法

これまでの研究において用いた小型 CCD カメラによる映像計測システムは、CCD カメラを卵内に挿入することとなるが、成長を阻害せず孵化まで達することが確認されている。カメラからの映像データはネットワーク・ストリーミングを利用し、受信側のコンピュータで一元的に映像を記録するシステムの導入を行う。このシステムの利点として各映像を計測するためのキャプチャー機能が必要なく、ハード管理が容易であるのに加え、外部にいても異常チェックができることも上げられる。

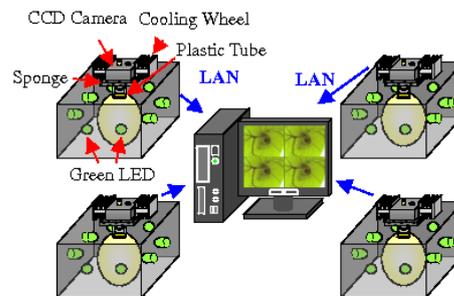


図1 計測システム

このシステムによって得られた映像より、フレームごとに画像を抽出し、RGB 各成分の数値フィルタを通した後に部位のオブジェクト化を行い、胚、卵黄血管網、絨毛尿膜を分離する。卵黄血管網と絨毛尿膜はそれぞれ、画像のピクセル数から表面積を算出して時系列データとして保存する。

これにより、胚の位置情報（胚の目玉を指標）から体動のパターンや絨毛尿膜の発達スピードも明らかにすることができる。また CCD カメラからの映像から心臓の面積をピクセル値として算出することで、時系列データとして面積変化を求めることができ、波形再現などの信号処理によって 1 拍動ごとの心拍数である瞬時心拍数を求めることが可能となる。

光源は血管に吸収される波長帯である緑色 LED を用いており、カメラで発生する熱の影響を卵に与えないために、放熱板を取り付けている。CCD カメラは、卵のエアセル（空気室）上に開けた穴にビニールチューブをかぶせ、このチューブに取り付けている。この方法を用いることにより、胚が孵化まで生存できることが予備実験より確認できている。

このシステムを用いることで、同時に多数のデータを計測することができ、効率的にデータを収集することができる。

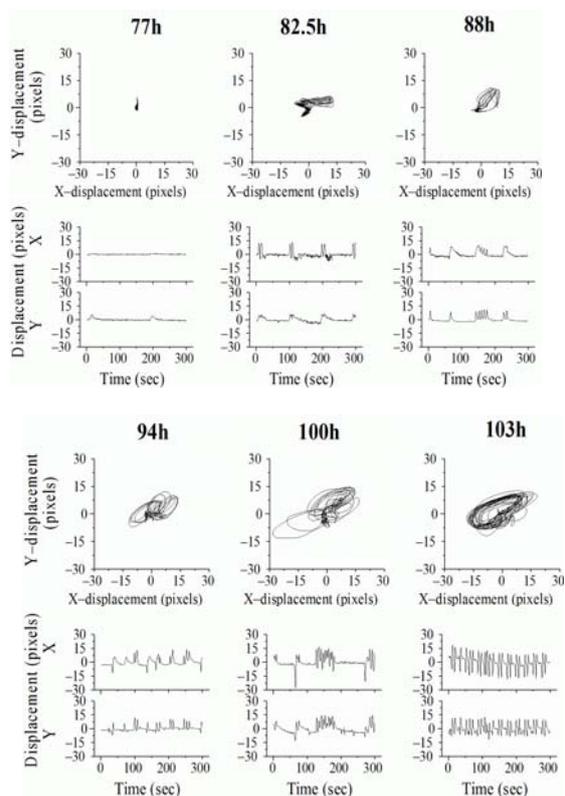
本システムを用い、孵卵開始 48 時間から連続的に孵卵 120 時間まで計測を行った。計測画像から胚の目部分のみを抽出できるような円画像のフィッティング及び色変化による画像処理を行い、中心部分の位置を測定した。この中心点の位置計測をフレームごとに行い、時系列データとして記録した。データは X 方向、Y 方向を記録しており、平面上の動きおよび各方向の時系列解析が可能である。

これらのパラメータを一般的な成長環境である 38℃、酸素濃度 20% だけではなく、負荷環境下（低・高濃度酸素、低・高温環境）でも行うことで、正常状態の胚におけるパターンに加え、環境負荷がこれらのパラメータに与える影響を評価していく。また、心拍数との同時計測によって、心拍数と体動、胚そのものの成長や絨毛尿膜の発達など、これまでに得られていなかったパラメータ間の関連を調べることで、正常胚と負荷環境胚（または死亡胚）間の違いを明らかにしていく。

4. 研究成果

カメラ映像をネットワークを介して複数計測するシステムにより、一般孵卵温度である 38℃ における鶏胚の体動計測を行った。体動は鶏胚の目を画像処理によって抽出することにより検出でき、画像の X-Y 平面上での動きに加え、X、Y 方向それぞれの動きを解析することができた。これにより、正常成長杯においては、孵卵開始 90 時間後ほどから一方向にゆらゆらと動き始め、その後その移動幅が大きくなっていくことが確認された。その後円運動へと動きが変化していき、孵卵開始 120 時間あたりでは周期的な変動となっていくことがわかり、この周期は成長と共に短くなっていくことが確認された。

また体動が明らかに少ない胚は、原因は分からないが計測中に死亡していた。さらに孵卵温度を上げた場合には、体動のパターンに変化が見られたあと、頻度が減少し正常に発達できないことも確認された。このことから、体動は胚が正常に成長していくかの判断パラメータの一つとして有意であると考えられ、成長を評価する上で重要な成果だと考えている。体動が大きくなっていく時期は、初期胚のガス交換器官である絨毛尿膜が大きく発達する期間であり、関連性が考えられるが絨毛尿膜の成長スピードとの相関を明らかにすることはできなかった。しかし、明らかに体動の少ない胚の絨毛尿膜はほとんど発達しておらず、この発達に体動が大きく関連していると考えられる。今後は、体動の計測を他の生理パラメータと同時に行ってい



くことにより、異常成長胚の原因解明につながると思われる。

図 2 体動の時間変化

さらに孵卵温度を上げた場合には、体動のパターンに変化が見られたあと、頻度が減少し正常に発達できないことも確認された。このことから、体動は胚が正常に成長していくかの判断パラメータの一つとして有意であると考えられ、成長を評価する上で重要な成果だと考えている。

絨毛尿膜の発達は、地球の重力と親鳥が行う転卵が作用しているのではとの報告はあるが、孵卵器での実験では有効な成果が得られていない場合もある。この疑問に対して今回の実験結果からは明確な指針は得られていない。しかしながら、体動が非常に少ない胚では絨毛尿膜の発達は見られていない。このことは、胚内部で何かの問題があり、体動も絨毛尿膜の発達もなかったか、これらに関連性があったために発達が見られなかったかを調べる必要がある。

また、このシステムを応用することにより、心臓画像からの瞬時心拍数計測は可能であり、心拍数との関連に興味を持たれる。しかし、初期胚の瞬時心拍数には明確な心拍数変動は見られていないとの報告があるため、平均心拍数と心臓構造、絨毛尿膜の発達との関連に興味を持たれる。

本研究で開発した体動計測システムは、今後新たな知見を得られる可能性があると考えられる。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋山 龍一 (AKIYAMA RYUICHI)
室蘭工業大学・大学院工学研究科・助教
研究者番号 : 00322876