

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：50101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23700547

研究課題名(和文) 胚成長モデルのマルチセンシングシステムの確立と疾患モデルにおける臨床応用

研究課題名(英文) Development of multi-sensing system for physiological signals of chick embryo and clinical adaptation to various disease model.

研究代表者

森谷 健二 (Moriya, Kenji)

函館工業高等専門学校・生産システム工学科・准教授

研究者番号：90342435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円、(間接経費) 990,000円

研究成果の概要(和文)：胎児モデルの疾患特有の生体情報を調査するために以下の研究を行い、成果を得た。第一に、慢性低酸素環境にある胚の特徴的な体動パターンを調査し、通常成長胚よりも体動は少なく、体動関連データが疾患の特長となり得ることを見いだした。第二に、間歇性の低酸素症についても調査する必要があるが、任意の酸素濃度制御システムは市販されていないために、その開発を行った。目標濃度に対して0.1%程度の精度で1分以内に制御するシステムが完成したので、今後はこれを用いて実験を行う。最後に、800MHz帯の電磁波が胚に及ぼす影響について調査し、特に生理器官形成期間である孵卵初期(妊娠初期相当)が影響を受けやすいことが解った。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate distinctive physiological-signal involved in the various disease of chick embryo, we performed three experiments and obtained results as follows. Firstly, we examined characteristic pattern of the body movements in chronically hypoxic embryos. The pattern of embryonic body movement in hypoxic environment tended to less than that of normal environment. Secondly, we developed a control system of low oxygen environment which can be configured oxygen concentration and hypoxic duration by users. Finally, we investigated affects on the mortality rate, growth rate and hatching rate of chick embryos exposed to electromagnetic waves(EMW) of the cell phone(800MHz). As a result of statistical analysis, the hatching rate in EMW exposed group was significantly lower( $p<0.01$ ) than that in the control group. Additionally, the possibility is indicated that EMW of 800MHz affect embryonic growth on the early stages of incubation period.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学・医用生体工学

キーワード：ニワトリ胚 疾患予知 体動 低酸素環境

## 1. 研究開始当初の背景

ニワトリ胚は哺乳類と同様の2心房2心室であり、出産時において完全な肺呼吸に移行することから母胎の影響を受けない胎児の成長モデルとして、また哺乳類肺胞モデルとして特に循環・呼吸機能パラメータの計測・解析モデルとして有用である。申請者はこれまで独自の瞬時心拍数計測システムを開発し、胎児および新生児の生体モデルとして鳥類胚および雛における心拍ゆらぎを明らかにしてその成因の解明を試みてきた。その結果、鶏胚とヒナにおいて多様な心拍ゆらぎパターンがみられ、そのゆらぎの成因が呼吸性不整脈、メラトニン分泌周期、体動による交感神経亢進などに関連があることを明らかにしてきた。これらの研究成果から、申請者らの開発したりアルタイム瞬時心拍解析システムは、人ならびに疾患モデル等における生理機能評価に応用可能であると考えに至った。また、平成17年度より科学研究費補助金(若手B, KM, 17700412)の助成を受け孵化中に死亡した胚において、特異な心拍ゆらぎが共通して発現していたことを突き止めた。この結果は、病態ごとに特異な心拍ゆらぎを解析することで呼吸循環動態機能異常や死亡予測ができる可能性を示唆する重要な研究成果であり、今後の詳細な病態特異な心拍ゆらぎに関する研究が期待された。

さらに、平成20年度より科学研究費補助金(若手B, KM, 20700388)の助成を受けて、個体発生段階である孵化期とともに生理機能の発達の詳細な様子が明らかになっていない個体形成段階である孵卵開始直後の初期胚に関する研究を始め、胚の録画システムおよび心拍数算出システムおよび初期胚の体動解析システムを開発してきた。このシステムにより、孵卵3日令から孵化する21日目までの、胚の連続録画に成功した。これは文献を調べる限り世界で初めての報告になる。同時に、心拍数や体動を画像処理によって定量化するシステムも開発した。この研究はこれまでにやってきた死亡予測に関して、さらに早い段階での異常予知、特徴予知の可能性を示唆しており、事実、これまでの解析から胚の体動の頻度がその後の個体成長に大きな影響を及ぼしている可能性があり、重要なパラメータであることが明らかになった。

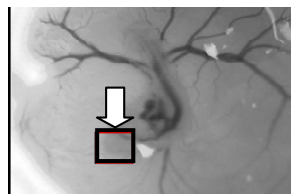


図1. 胚の頭の位置を検出し、体動を座標解析している例

## 2. 研究の目的

DNA解析には現れない、胎児の成長環境や個体毎の疾患の早期予知を最終目的として、

本研究期間では以下の2点に焦点を当てることとした。

### 1) 低酸素症疾患と体動との関連調査

胎児期には様々な疾患が起こり得るが、ヒトでもニワトリでも起こり得る疾患の一つに低酸素症がある。これはヒトではシャントのねじれによるものであるが、ニワトリ胚でも低酸素症と思われる死亡例がよく見られていた。したがって、比較対照としての正常成長胚の体動パターンを明らかにした後に、慢性低酸素環境における体動パターンの調査を行い、疾患との関連を明らかにする。また、次のステップとして実際に起こりうる可能性が高い間歇性低酸素状態における体動パターンを調査するために任意の時間に任意の酸素濃度に制御するシステムの開発を行った。なお、今期は間歇性低酸素環境制御システムの開発までを目標として、実際の計測はH26年度以降とした。

### 2) 電磁波の胎児の成長に及ぼす影響調査

胎児に考えられる様々な疾患のうち、近年利用者の増加に伴い、その影響が議論されているものの、明確にはなっていない電磁波の影響について、胎児への影響を調査することとした。

## 3. 研究の方法

### 3-1. 慢性低酸素環境下におけるニワトリ雛の体動解析

実験卵はブロイラー種の卵を使用し、孵卵の適正環境である、温度約38[ ]および湿度約60[%]に調節された恒温器内で孵卵を行った。これを通常孵卵環境とし、低酸素環境には、15%酸素ガスを使用し、ガスボンベから通常孵卵環境と同条件の温度・湿度に保たれている計測用チャンバーに配給した。解析用動画データの撮影は通常孵卵開始後、血管や心臓が確認できるようになる孵卵72時間後からビデオによる体動解析ができなくなってしまう144時間で終了した。

孵卵72時間において胚の存在を確認し、CCDカメラにより撮影した映像をビデオキャプチャーボードによりコンピュータに取り込む。体動解析の手順を図2に示す。体動の解析時間を撮影した1時間ごとの動画データの最初の5分とし、切り出した。切り出した動画データから1フレーム選定し、輪郭が明確である頭部付近を抜き出しテンプレート画像とし、テンプレートマッチング法で胚の位置を検出した。全フレームに対してを行い、座標データ列を取得した。しかしこれだけではテンプレートマッチングの誤検出データが含まれている可能性があるため、フィルタリング処理を行い、移動量を算出した。体動の移動量とパターンについて調べたいため、この移動量を卵内における絶対位置としてではなく、

5 分間の座標の平均値を中心とする相対移動量とした。データ数と計算時間の問題から、1 時間毎の最初の 5 分間の胚の移動量を体動量として算出した。

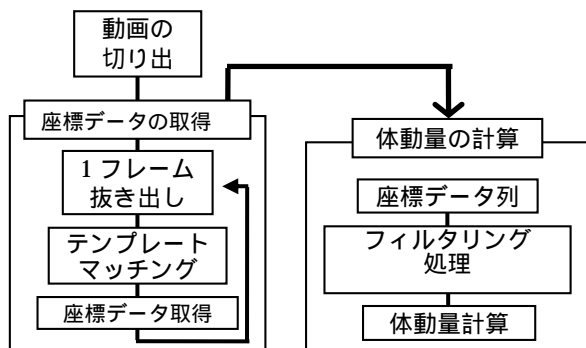


図 2 体動解析の手順

### 3-2. 間歇性低酸素環境制御システムの構築

#### 3-2-1. システムの機能

本研究で開発するシステムは、チャンバ内で任意の酸素濃度環境を実現するために目標酸素濃度を 0.1[O<sub>2</sub>%]刻みで設定できること、間歇性低酸素環境での計測が満足に行うことができる許容量として目標酸素濃度に対する平均誤差が ±0.1[O<sub>2</sub>%]以下の精度で制御を行うこと、目標とする酸素濃度に到達するまでの時間と通常酸素濃度まで回復させるまでにかかる時間を一分以内をすることを目標とした。また、誰でも簡単に使用できるようにインターフェイスを改良した。

#### 3-2-2. システムの構成

制御にはマイコンボードの一種である Arduino を採用し、インターフェイス側のプログラムは Processing を用いた。システム全体のブロック図を図 3 に示す。

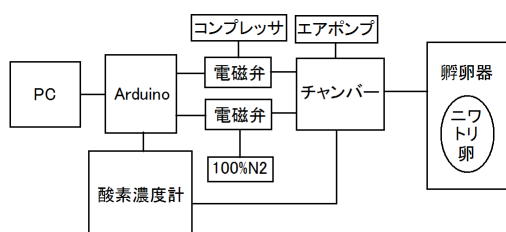


図 3. 酸素濃度制御システム全体のブロック図

### 3-3. ニワトリ胚における 800MHz 帯電磁波曝露の影響

本研究では、スカイプ機能を利用してスマートフォンへの発信制御を行うプログラムを独自に開発して携帯電話による電磁波照射を実施した。照射時間は携帯電話によるメールや電話の使用頻度よりも長めの 1 時間あたり 30 分間として、21 日令まで毎時間照射した（電磁波曝露群）。使用する携帯電話は日本で使用が許可されている周波数帯かつ、減衰が少なく通信が安定する 800[MHz]帯の

周波数を用いた。また、電磁波を曝露させないグループをコントロール群とする。なお、両グループとも簡易アルミ遮蔽シールドを行い、孵卵器への電磁波の出入りを軽減させている。電磁波照射の有無以外の孵卵環境は通常温度 3[ ], 相対湿度約 65[%], 3 時間毎の自動転で共通である。

成長度にはハンバーガ・ハミルトン法に基づいた stage 判定を用いた。この方法での孵化は stage46 と定義されている。

結果については有意水準 5%および 1%で統計的な手法で際を調査している。

## 4. 研究成果

### 4-1. 慢性低酸素環境下におけるニワトリ胚の体動解析

通常孵卵環境胚 7 例、低酸素環境胚 2 例について実験を行い、解析可能なデータが 7 例得られた。7 例について、1 時間ごとの最初の 5 分間の総体動量を図 4 に示した。個体 A・B・C が通常孵卵環境生存胚、個体 C・D が通常孵卵環境死亡胚、個体 F・G が低酸素環境生存胚である。図 4 より、通常孵卵環境生存胚 A・B・C は正常成長胚であり、孵卵時間が経過するにつれて総体動量が増える傾向だった。一方、通常孵卵環境死亡胚である個体 C・D は大きく異なった発達パターンとなった。個体 C では撮影開始時点で他の胚に比べて明らかに違い、体動量が多かった。特に死亡前の孵卵時間約 90 時間から体動量が大きく増減を繰り返し、最大で約 6[キロピクセル]になり、その後はもう一度ピークが来たあとに体動量が減少し、孵卵時間 103 時間に死亡を確認した。一方で個体 D は、孵卵開始した時点の 73

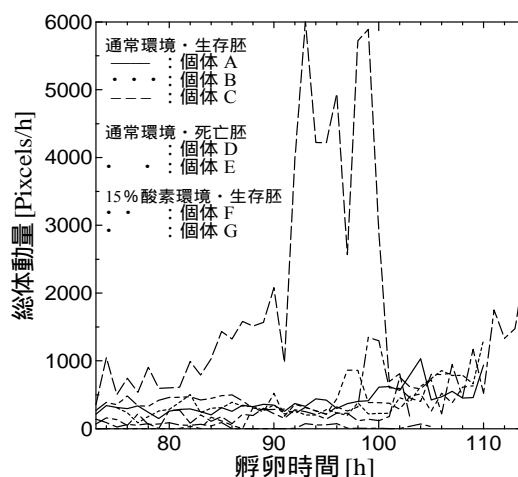


図 4 孵卵時間に対する 5 分間当たりの体動量の比較

時間目から死亡する孵卵時間 105 時間目まで、ほとんど体動を確認できなかった。

次に、体動パターンについて調査を行った結果、慢性低酸素環境胚では図 5 に示すよう

な、断続的な比較的早い周期の変動が見られた。図の例では孵卵 100 時間付近において 100 秒間以上続く周期的かつ断続的な体動パターンであり、この体動パターンは孵卵 107 時間における別の低酸素環境生存胚の個体でも確認された。このことはこのような変動が低酸素環境特有の体動パターンであることを示唆するとともに、疾患シグナルになりうることを意味する。今回の解析では 60 分ごとの最初の 5 分間の解析を行っているが、今後はこれを全時間において詳細な解析をして確認していく必要があるだろう。

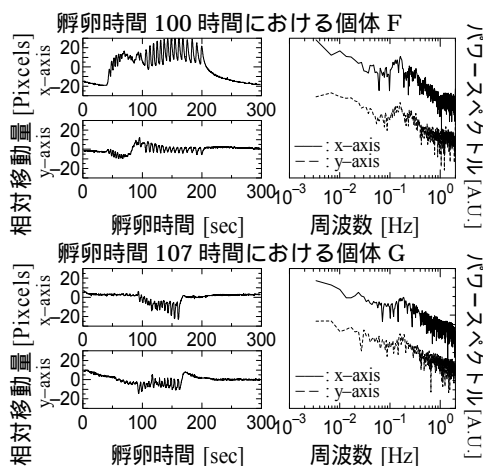


図5 慢性低酸素環境胚における特徴的な体動パターンとその周波数スペクトル

#### 4-2. 間歇性低酸素環境制御システムの構築

窒素ボンベ圧を 0.07 [MPa]、コンプレッサ圧を 0.05 [MPa] 一定とし、電磁弁の開閉時間を、濃度差に応じてパルス幅を変化させて制御した結果を図 6 に示す。これらの 6 回の計測平均値を表 1 に示した。低酸素環境の制御が開始した後にチャンパー内が目標酸素濃度に到達するまでの時間の平均を平均到達時間、通常環境の制御が開始した後にチャンパー内が通常酸素濃度に到達するまでの時間の平均を平均回復時間と定義している。図 6 より、チャンパー内の酸素濃度は目標酸素値にすばやく達し、その後、濃度値を維持することが出来た。表 1 より、18, 17 [O<sub>2</sub>%] の場合には平均誤差が 0.1 [O<sub>2</sub>%] 以内で制御できた。しかし、16, 15 [O<sub>2</sub>%] の場合は目標制御濃度である 0.1 [O<sub>2</sub>%] を上回っていた。また、目標酸素濃度に対する平均到達時間は平均で 16.5 秒となり、通常酸素濃度に対する平均回復時間は平均で 77.59 秒となった。回復時間が目標より遅いが、この点はチャンパーの開放により一気に通常酸素環境にすることが可能であろう。

今後は本システムを用いて間歇性低酸素状態の体動パターンを明らかにしていく。

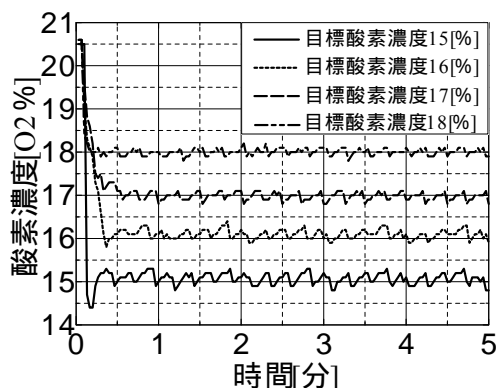


図6 各種酸素濃度環境設定時における酸素濃度の推移

表1 設定酸素濃度に対する各パラメータの平均値

(N=6)	設定酸素濃度 [O <sub>2</sub> %]			
	18.0	17.0	16.0	15.0
平均到達時間 [s]	8.33	23.67	26.00	8.00
平均濃度 [O <sub>2</sub> %]	18.00	16.98	16.09	15.04
平均誤差 [O <sub>2</sub> %]	±0.078	±0.095	±0.139	±0.157
平均回復時間 [s]	99.00	54.67	52.67	104.00

#### 4-3. ニワトリ胚における 800MHz 帯電磁波曝露の影響

電磁波曝露群 53 個体、コントロール群 106 個体について実験をおこなった。21 日令の段階で孵化しなかった卵はその中を確認し、死亡胚、生存胚、無精卵に分類した。なお、無精卵は実験データから除外している。死亡胚は電磁波曝露群で 46 個、コントロール群で 102 個だった。生存胚は電磁波曝露群で 7 個、コントロール群で 2 個だった。通常の孵化予定日 21 日において孵化しなかった個体についてはどの成長段階 (stage) であったかを調査し、成長遅れの度合いや死亡推定日令を確認した。図 7 に 21 日令の段階でのすべての有精卵における stage を比較したグラフを示す。なお、stage37 から stage41 のニワトリ胚は確認されなかったため、stage 比較の横軸を省略している。

孵化した個体について電磁波曝露群とコントロール群を比較した結果、孵化率に有意な差があり (p<0.01)、携帯電話の電磁波がニワトリ胚の孵化率に影響を与える可能性が考えられた。統計的解析の結果からは stage36 以下のニワトリ胚では電磁波曝露群とコントロール群の死亡率には有意な差があり、電磁波曝露群の死亡率がコントロール群よりも高いことが確認された (p<0.01)。よって各器官の形成初期に電磁波を照射したほうが影響は出やすいという可能性も示唆された。

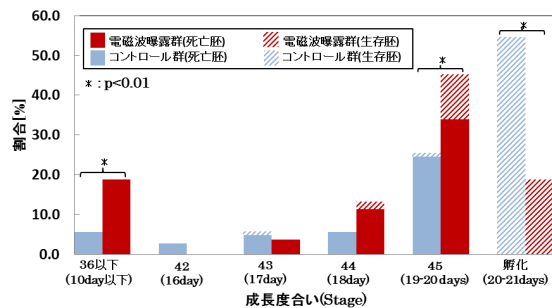


図7 両群の成長度合いの比較

また、stage43 から stage45 のニワトリ胚では電磁波曝露群とコントロール群の死亡率には有意な差は認められなかった。stage42 では電磁波曝露群のデータは得られなかったので比較はできなかった。また、図5について stage36 以下、stage42、stage43、stage44、stage45 の stage に分類し、stage 間の電磁波曝露群とコントロール群の死亡率の比較を分散分析で行った結果、stage 間の電磁波曝露群、コントロール群の死亡率には有意な差が認められなかった。

## 5. 総括

胚成長モデルにおける生体情報のマルチセンシング技術(計測システムの構築を含む)が確立され、疾患モデルに適用を試みた。次のステップでは個別の解析知見から、これらの複数データを用いた総合的な解析と疾患予測に取り組み、マウス・ラットなどの哺乳動物に応用を試みる。

## 6. 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10件)

【1】M. Okuzaki, K. Takeuchi and K. Moriya, Influence of Japanese students' shallow and rapid respiratory rhythms on their listening and reading comprehension in English -Features of students grouped by TOEIC score-, 7th International Symposium on Advances in Technology Education, pp.231-236, 2013.(査読有り) 本申請テーマの技術提供成果に当たる

【2】M. Okuzaki, K. Takeuchi and K. Moriya, Influence of Japanese students' shallow and rapid respiratory rhythms on their English comprehension -Characteristics of students groups By TOEIC score -, Proceedings of the 41st SEFI Annual Conference, p.182, 2013.(査読有り) 本

申請テーマの技術提供成果に当たる

【3】久保皓哉, 古川 椋, 森谷健二, 疾患時におけるニワトリ初期胚の体動解析, 函館工業高等専門学校紀要 第47号, pp. 29-32, 2013.(査読無し)

【4】M. Okuzaki and K. Moriya, Influence of Japanese Students' Shallow and Rapid Respiratory Rhythms on Their Listening and Reading Comprehension in English, 6th International Symposium on Advances in Technology Education, pp.177-181, 2012.(査読有り), 本申請テーマの技術提供成果に当たる

【5】K. Moriya, M. Kudo and R. Akiyama. Developmental pattern of body movements in early stages of chick embryos, *Proceeding of the 5th combined workshop on fundamental physiology and perinatal development in Poultry*. P76, 2011.(査読有り)

【6】K. Moriya and R. Akiyama. Influence of electromagnetic waves at frequency band of mobile phones on development of chick embryos, *The 5th combined workshop on fundamental physiology and perinatal development in Poultry*. 2011.(査読有り)

【7】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.(査読無し)

【8】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.(査読無し)

【9】田中美友、森谷健二, 学生生活における精神的ストレスに関する研究、函館工業高等専門学校紀要 第45号, pp. 43-48, 2011.(査読無し)

【10】奥崎真理子、森谷健二, 小山慎哉, 工藤雅嗣, 木村司, 総合評価を上げる特別研究英語プレゼンテーションの考察(2)、函館工業高等専門学校紀要 第45号, pp. 55-58, 2011.(査読無し) 本申請テーマの技術提供成果に当たる

[学会発表](計11件)

【1】M. Okuzaki, K. Takeuchi and K. Moriya, Influence of Japanese students' shallow and rapid respiratory rhythms on their listening and reading comprehension in English -Features of students grouped by TOEIC score-, The 7th International Symposium on Advances in Technology Education(ISATE), 2013, Sep. Nara, Japan.

本申請テーマの技術提供成果に当たる

【2】M. Okuzaki, K. Takeuchi and K. Moriya,

Influence of Japanese students' shallow and rapid respiratory rhythms on their English comprehension -Characteristics of students groups By TOEIC score -, The 41st SEFI Annual Conference, 2013, Sep, Leuven, Belgium. 本申請テーマの技術提供成果に当たる

【3】奥崎真理子, 森谷健二 浅く速い呼吸リズムが英語の聴解と読解に与える影響 函館高専生の読解についての予備研究, The Council of College English Teachers 第37回全国高等専門学校英語教育学会, 2013年. 本申請テーマの技術提供成果に当たる

【4】奥崎真理子, 竹内貢太, 森谷健二, 浅く速い呼吸リズムが英語の聴解と読解に与える影響 呼吸トレーニング実験の効果, 平成25年度全国高専教育フォーラム, 2013年8月, 東京 本申請テーマの技術提供成果に当たる

【5】古川椋, 久保皓哉, 森谷健二, 疾患時における鶏初期胚の体動解析、平成25年度電気・情報関係学会北海道支部連合大会, 2013年10月, 室蘭

【6】久保皓哉, 古川椋, 森谷健二, 酸素濃度制御システムの開発, 平成25年度電気・情報関係学会北海道支部連合大会, 2013年10月, 室蘭

【7】M. Okuzaki and K. Moriya, Influence of Japanese Students' Shallow and Rapid Respiratory Rhythms on Their Listening and Reading Comprehension in English, The 6th International Symposium on Advances in Technology Education (ISATE), 2012, Sep. Kita-kyusyu Japan. 本申請テーマの技術提供成果に当たる

【8】奥崎真理子, 山谷祐吾, 森谷健二, 浅く速い呼吸リズムが英語の聴解と読解に与える影響 函館高専生の読解についての予備研究, 平成24年度全国高専教育フォーラム, 2012年8月, 東京 本申請テーマの技術提供成果に当たる

【9】K. Moriya, M. Kudo and R. Akiyama. Developmental pattern of body movements in early stages of chick embryos. *The 5<sup>th</sup> combined workshop on fundamental physiology and perinatal development in Poultry. 2011, Sep., Wageningen, The Netherlands.*

【10】K. Moriya and R. Akiyama. Influence of electromagnetic waves at frequency band of mobile phones on development of chick embryos. *The 5<sup>th</sup> combined workshop on fundamental physiology and perinatal development in Poultry. 2011, Sep., Wageningen, The Netherlands.*

【11】清将人, 秋山龍一, 森谷健二 多目的生体情報計測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, 2011年10月, 函館.

## 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生産システム工学科准教授

研究者番号: 90342435

### (2) 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