

平成 31 年 4 月 12 日現在

機関番号：50101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K06397

研究課題名(和文)疾患胚モデルの生理機能マルチセンシングと成長診断システムの臨床応用

研究課題名(英文) Development of diagnosis system for embryonic disease with multi-measurement of bio-signal in chick embryo.

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・教授

研究者番号：90342435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：ニワトリ胚を母胎の影響を受けない胎児モデルとして用い、胎児成長時の疾患に特有な生理機能変動を調査した。胎児期によく起きる低酸素状態において正常成長胚で見られない胎動が起きる可能性が示された。この現象を詳細に調べるためには簡潔性で任意低酸素濃度での孵卵環境が必要であり、これを開発した。

このシステムを用いて低酸素環境における胎動計測を行った。低酸素症により成長が遅れ始める時期(孵卵約110時間、平均値)と本来起こるはずの胎動の減少時期が一致した事から、少なくとも胎動頻度の比較により110時間の段階で異常を診断できる可能性が示された。

今後は例数を重ねて【異常】の診断の精度を向上する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNA解析による様々な疾患に関する研究が進められ、予め疾患予防、疾患対策が出来るようになってきた。しかし、疾患は遺伝的に起こるばかりではなく、大部分の場合は環境に依存している。本研究は胎児の成長における遺伝的ではない疾患特有の現象を明らかにし、治療が可能な初期の段階でそれを診断する事を最終目的としてニワトリ胚をモデルとして行った。母胎の影響を受けない胎児のみの疾患状況を明らかにし、後に哺乳動物、人への応用を目指す。胎児期の健康をモニタリングする事は社会的・学術的にも改めて言うまでもなく重要な意義がある。

研究成果の概要(英文)： Distinctive body movements pattern in hypoxia was reported in previous research, therefore, to investigate whether this phenomenon was actual distinctive signal of embryonic hypoxia or not was required for an embryonic disease prediction system. We developed the arbitrary oxygen concentration control system with high accuracy and short transition time.

Using this system, we can investigate body movement pattern in not only a chronic hypoxia but also an intermittent hypoxia which is actual maternal hypoxic condition. Beginning time of embryonic growth delayed due to hypoxic condition (approx. 110h, average) coincided with the decrease of body movements which was supposed to increase drastically in normal developing embryos. This result indicating that not only distinctive pattern of body movements but also amount of body movements is the one of significant signals of embryonic hypoxia.

研究分野：計測工学

キーワード：胎児疾患モデル 生体信号計測 生体信号処理 ニワトリ胚

1. 研究開始当初の背景

ニワトリ胚は哺乳類と同様の不完全な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、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、鶏胚とヒナにおける多様な心拍ゆらぎパターン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、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、病態ごとに特有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有な心拍ゆらぎに関する研究が期待された（以上は科研費助成成果：H14-16年度若手B, KM, No.14750355 および H17-19年度若手B, KM, 17700412）。

これらの成果を受け、未解明であった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、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、心拍数や体動を画像処理法で定量化する手法を確立した(右図は計測例)。これは文献を調べる限り、世界初の報告になる。この研究結果から、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、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。これらの成果から、生理機能パラメータのマルチセンシングにより、DNA解析では現れない成長環境依存性の疾患を診断、さらに予知できる可能性が示唆された。

2. 研究の目的

本研究では、胎児モデルの疾患診断というゴールに向けて、1) 特定疾患環境、特に低酸素環境を任意に作成するシステムの構築、2) 開発したシステムを利用した間歇性低酸素における体動データの蓄積と解析をメインの目標とする。これに加えて、心拍数計測や音響刺激の応答など様々な環境変化応答についても調査を進める。以下の研究成果についてはメインの目的について報告する。

3. 主となるテーマにおける研究の方法と研究成果

(1)任意酸素濃度制御システムの開発(文献3, 4より抜粋, 編集)

1.1 システムの構成

本研究で製作するシステムは、孵卵器内部の計測用チャンバー内に任意の時間で任意の酸素濃度環境を作り出し、これを正確に制御する必要がある。システム全体のブロック図を Fig.1-1 に示す。実線が制御信号の流れを示し、破線が気体の流れを示している。チャンバーに接続されている100[%]窒素ポンペ、30[%]酸素ポンペは電磁弁を介して接続されている。この電磁弁はマイコンボードに接続されていて、マイコンボードからオン・オフの命令があった時のみ動作し、接続されている100[%]窒素ポンペや30[%]酸素ポンペから気体をチャンバー内部へ出力し、チャンバー内部の酸素濃度をユーザが設定した目標酸素濃度へ変化させる。その際に実際の酸素濃度と目標とする酸素濃度との差が時間の変化により発生してしまうため、それらの差を埋めるために、逐次混合する気体の流量を制御しなければならない。そこで、本研究では電磁弁の制御に Arduino を使用した。この Arduino の A/D 変換ポートを用いて、チャンバー内部に接続されている酸素濃度計のセンサから現在の酸素濃度を読み取り、現在の酸素濃度と目標酸素濃度を逐次比較してその差に応じ電磁弁を開閉させることでチャンバー内部の酸素濃度を目標とする酸素濃度で一定に保てるようにした。

本システムにおけるキーは、目標酸素濃度に到達させるための気体流量制御、すなわち電磁限の開閉パルスの時間であった。このパルス幅は、長すぎると目標酸素濃度を大きく超えてしまい、また小さすぎると目標酸素濃度に到達するまでに時間がかかってしまった。そこで、適切なパルス幅を求めるために、パルス幅の制御時間を関数化するなど、何度も設定と実験を繰り返した。

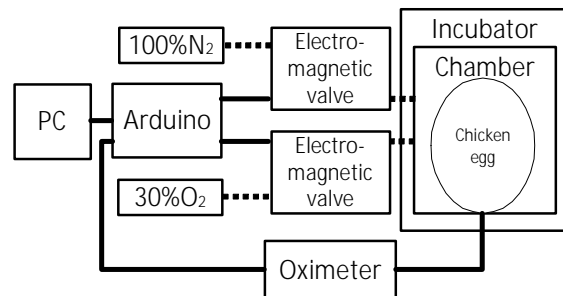


Fig. 1-1. Overall view of the oxygen concentration control system.

1.2 完成した制御システムによる任意酸素濃度の制御結果

完成した任意酸素濃度制御システムを用いて 3 分間の 15-18% の低酸素濃度を制御した結果を Fig.1-2 に示し、その各パラメータを Table.1-1 に示す。測定時間を 5 分間とし、最初の 3 分間を低酸素環境、残りの 2 分間を通常環境で制御し、6 回測定したものを平均した。低酸素環境は目標酸素濃度 18, 17, 16, 15[%] で制御し、通常環境は目標酸素濃度約 20.9[%] で制御した。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た。

チャンパー内の酸素濃度は目標酸素濃度に達し、その後、目標酸素濃度値を維持することが出来た。Table.1 より、すべての目標酸素濃度において平均到達時間、平均回復時間を 1 分以内に収め、ばらつきを ±0.1[%] 以下で制御することができた。

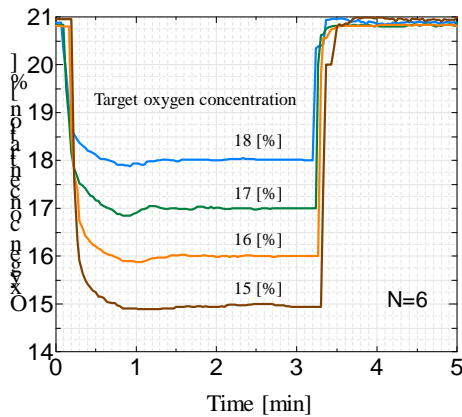


Fig. 1-2. Result of oxygen concentration control.

Table 1-1. Each parameter of target oxygen concentration.

	Target oxygen concentration [%]			
	(N=6) 18	17	16	15
Average response time[s]	36.7	36.7	39.7	40
Average oxygen concentration[%]	18	16.98	15.98	14.95
Variation[%]	± 0.055	± 0.055	± 0.050	± 0.055
Average recovery time[s]	15.3	22.7	28	30

(2) 低酸素環境における体動量と成長の関係(文献 3, 5~8, 10, 12 より抜粋, 編集)

2.1 体動の撮影方法

実験卵はブロイラー種の卵を使用し、室温 38℃、相対湿度 60% の恒温恒湿度器内で通常環境孵卵を行った。孵卵開始後 72 時間(3 日令)から 144 時間(6 日令)まで通常環境下、慢性低酸素環境下における孵卵及び撮影を行った。酸素濃度について 21%O₂ (通常環境下)、15%O₂、10%O₂ 環境下の 3 条件で実験を行った。孵卵 72 時間の卵のエアセル側に直径約 1.5cm の穴をあけて胚を確認し、胚が確認できた卵にスペーサを介してカメラを取り付け、孵卵開始 72 時間になった時点から低酸素環境下での孵卵及び撮影を開始する。CCD カメラで撮影した映像は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んだ(Fig.2-1)。

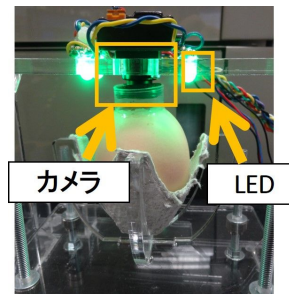


Fig.2-1. The direct measurement system of early stages of chick embryo

2-2. 慢性低酸素環境下における体動量と成長遅れとの関連

慢性低酸素環境において正常成長胚では見られない周期での周期的な体動変動や孵卵約 110 時間以降の体動の減少が報告された。このような低酸素環境における胚の成長(ここでは胚の大きさを成長度と定義する)についても画像処理により解析を行った。Figs.2-2,2-3 に孵卵 120 時間における等倍率での胚の画像と画像処理による胚の大きさ(値は



Fig.2-2. Embryos at 120 hours

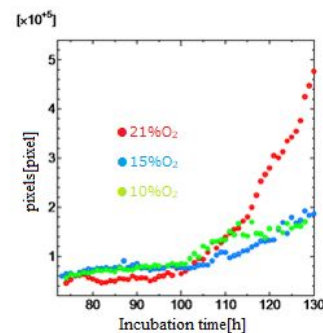


Fig.2-3. Embryonic growth

ピクセル数)を示す。低酸素環境下において、体動が減少すると報告された孵卵開始約 110 時間に、胚の大きさ、すなわち成長度が正常成長胚に対して明らかに低くなった事が分かった。通常の胚の体動は弧を描くように動く事が多いため、胚の大きさ(ここでは直径に相当する)が変われば円周長も変化するので、胚の大きさの違いが体動量の減少として反映された可能性がある。しかしながら、逆の見方をすれば体動量解析によって胚の大きさをチェックする事も可能である事が示唆された。また、体動のパターンは規格化の必要がある事も示唆された。

2-3. 間欠性低酸素環境における体動解析例

計測したビデオから画像処理により胚の位置を検出し、フレームごとの移動距離を 5 分ごとに積算して体動量として算出した Fig.2-4 に最初の 10 分を 18%の低酸素環境にした場合の体動量の例を Fig2-5 に 30 分を 18%低酸素環境にした場合の例をそれぞれ示す。それぞれにおいて矢印で示すような体動量の増加が確認されたものの、低酸素環境事において必ず起きているわけではなかった。また、同じ孵卵時間・同じ低酸素濃度における暴露時間の違いについて 10 分と 30 分では大きな違いは見られなかった。

今後は低酸素症が原因である体動増加パターンと通常の体動増加パターンに違いがあるのか、深層学習でそのパターンをどれくらいの精度で識別出来るのかが、課題となる。また、慢性・間欠性どちらの場合においても、低酸素環境においてすぐに特異な現象が発現しなくてもその蓄積により何らかのシグナルが現れる可能性も考えられるので孵卵中期まで連続的に計測する必要もある。

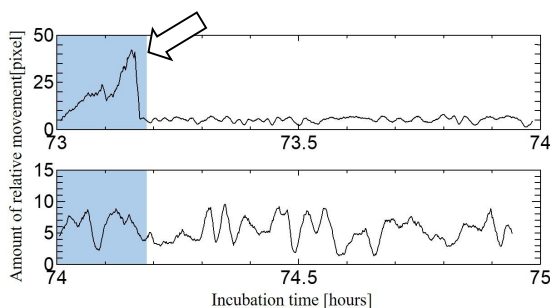


Fig.2-4. Example of amount of body movements of chick embryo at 73h of incubation under 18% O₂ condition.

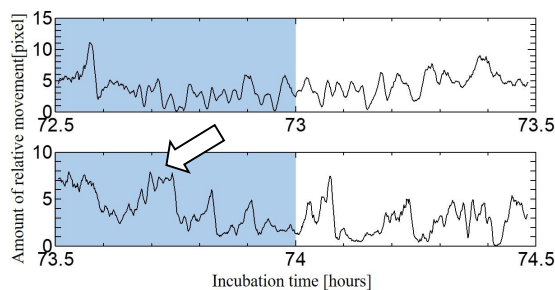


Fig.2-5. Example of amount of body movements of chick embryo at 72.5h of incubation under 18% O₂ condition.

(3)今後の展望

低酸素環境において体動量をリアルタイムでモニタリングする事は疾患予知のみならず成長遅れについても診断できる可能性が示唆された。間欠性低酸素環境制御装置が完成したものの得られたデータ数が少なく、通常の体動増加か低酸素症が由来の体動増加かの判断をするためにはさらに多くの例数(すなわち、教師データ)が必要となる。また、疾患特有の現象かどうかの精度の良い判定のためには体動量算出の精度向上もまた不可欠と言える。現在はX-Y平面での解析を行っているが、Z軸方向の体動量も考慮する事でその精度をさらに向上できると考える。

また、特に初期胚における体動の減少は胚の成長にとって重要な要素であるものの、低酸素症だけが体動減少の原因かどうかはまだ明らかになっていない。疾患予知と同時にその対策(治療)を目指すためには他の要因が無いかについても検討が待たれる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

- 【1】 Kenji Moriya, Yuya Chiba and Yoshiko Maruyama, Spectrum Analysis of Heart Rate Fluctuations in Hatched and Unhatched Prenatal Chick Embryos, *Journal of the Institute of Industrial Applications Engineers*, Vol.6 No.3, pp.107-111, 2018. (DOI: 10.12792/jiiae.6.107) (査読あり)
- 【2】 Kenji Moriya, Yuya Chiba and Yoshiko Maruyama, Effects of Acoustic Stimuli on the Heart Rate Fluctuations and Autonomic Nervous System Activity of Prenatal Chick Embryos, *International Journal of Biomedical Soft Computing and Human Sciences*, Vol.23 No.1, pp.19-25, 2018 (ISSN:2185-2421). (査読あり)

- 【3】 Asahi Yokota, Koki Tenma, Yuya Chiba and Kenji Moriya, **Growth and Body Movement Analysis Using Image Processing of Chick Embryos in Hypoxia Environment**, *Proceedings of the 7th IIAE International Conference on Industrial Application Engineering 2019*, pp. 9-12, 2019. (DOI:10.12792/iciae2019.005) (査読あり)
- 【4】 Kenji Moriya, Yuya Chiba and Yoshiko Maruyama, **Heart Rate Responses to Acoustic Stimuli in Prenatal Chick Embryos**, *Proceedings of the 6th IIAE International Conference on Industrial Application Engineering 2018*, pp.20-26, 2018. (DOI:10.12792/iciac2018.007) (査読あり)
- 【5】 Kenji Moriya, Yuya Chiba and Akito Shimouchi, Body movements during the early stages of chick embryo under intermittent hypoxic environment, *Proceedings of The 3rd International Conference of Global Network for Innovative Technology (IGNITE) : Advanced Materials for Innovative Technologies*, 2016 (AIP conference proceedings ; no. 1865, ISBN: 978-0-7354-1545-4), 2017. (査読あり)

〔学会発表〕(計 7 件)

- 【6】 Asahi Yokota, Koki Tenma, Yuya Chiba, Kenji Moriya, **Growth and Body Movement Analysis Using Image Processing of Chick Embryos in Hypoxia Environment**, *The 7th IIAE International Conference on Industrial Application Engineering 2019, Kitakyusu, Japan, Mar. 2019*.
- 【7】 横田朝陽, 天満晃希, 千葉裕弥, 森谷健二, 低酸素環境下におけるニワトリ初期胚の画像処理を用いた成長解析と体動解析法の検討, *産業応用工学会全国大会 2018*, 松江, 2018 年 9 月
- 【8】 天満晃希, 横田朝陽, 千葉裕弥, 森谷健二, ニワトリ胚体動計測のための任意酸素濃度制御システムの開発, *産業応用工学会全国大会 2018*, 松江, 2018 年 9 月
- 【9】 Kenji Moriya, Yuya Chiba and Yoshiko Maruyama, Heart Rate Responses to Acoustic Stimuli in Prenatal Chick Embryos, *The 6th IIAE International Conference on Industrial Application Engineering 2018*, Naha, Okinawa, Japan, Mar. 2018.
- 【10】 天満晃希, 森谷健二, 電磁弁を用いた酸素濃度制御システムの開発, *平成 29 年度電気・情報関係学会北海道支部連合大会*, 函館, 2017 年 10 月
- 【11】 森谷健二, このニワトリ胚は無事に孵化する事ができるのか? ~ニワトリ胚の正常成長診断とヒトへの応用を目指して~, *産業応用フォーラム「多様な分野で活躍する診断・監視・支援セキュリティ技術の最新動向」*, 函館, 2017 年 8 月
- 【12】 Kenji Moriya, Yuya Chiba, Ryuichi Akiyama and Akito Shimouchi, Body movements during the early stages of chick embryo under intermittent hypoxic environment, *The 3rd International Conference of Global Network for Innovative Technology (IGNITE) : Advanced Materials for Innovative Technologies*, 2016, Jan., Penang, Malaysia.

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。