

令和元年6月5日現在

機関番号：15401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K12513

研究課題名（和文）生体電気信号から魚の心理を推定する：『生物感性工学』への挑戦

研究課題名（英文）Estimating the psychological states in fish using bioelectric signals: a challenge to "Biological affective engineering"

研究代表者

辻 敏夫 (Tsuji, Toshio)

広島大学・工学研究科・教授

研究者番号：90179995

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究課題では、ゼブラフィッシュの生体電気信号である呼吸波を計測し、動画像解析システムとほぼ同等の精度で魚の位置と遊泳速度を推定可能なシステムを提案するとともに、呼吸指標と運動指標を組み合わせることで魚の心理状態を推定する手法を提案した。警報物質とエタノールを用いて、それぞれ、不快状態と快状態を誘起する実験を行い、呼吸指標と運動指標軸上に魚の不快状態と快状態が表現できることを示した。また、研究代表者が独自に開発した識別機LLGMNを用い、評価指標から心理状態が推定できることを確認した。そして、魚の心理状態の遷移予測を行い、馴化開始時間のある程度推定できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は魚の心理・感性を定量評価するための新たな方法論を提案するものであり、『生物感性工学』という世界初の学術分野の創出につながる可能性がある。これまで詳細に解析されていなかった快状態の検出を可能にしたことから、本研究成果は情動分化という進化論上の問題を解決するための糸口となり得るだけでなく、魚の心理状態モニタリングによるヒトと飼育魚間のコミュニケーションシステムという社会実装への展開も期待できる。さらに、本研究で提案した魚の情動状態推定法は、ゼブラフィッシュの行動を評価することにより薬効検証を行っている創薬分野にも応用できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a system that can measure bioelectric signals of zebrafish called ventilatory signals and enable estimation of the swimming position and velocity from the measured ventilatory signals with the equivalent accuracy as a video-analysis system, and proposed a method to estimate the affective state of a zebrafish in the combination of the evaluation indices related to ventilation and motion. Experiments were conducted to induce unpleasant and pleasant states using alarm substances and ethanol, respectively, and found that the induced affective states can be expressed on the axes composed of evaluation indices and can be estimated from the evaluation indices using our original classifier called Log-Linearized Gaussian Mixture Network. Finally, a method to predict the transition of the affective state and estimation of the start time of habituation in zebrafish was also proposed.

研究分野：サイバネティクス，医用電子工学，計算論的神経科学，生体感性モデリング

キーワード：小型魚類 感性計測評価 生体信号計測 行動計測

### 1. 研究開始当初の背景

2015年初頭、葛西臨海水族園においてマグロなどの大量死が発生した。大量死の原因はいまなお解明されていないが、異常遊泳の結果、脊椎を骨折した個体が複数確認されていることから、魚には異常行動の引き金となる心理的・生理的ストレスがかかっていたと考えられている。魚のストレスは一般に行動監視によって評価されているが[Kaluuff et al. 2013], 異常行動が発見された時点では既に大きなストレスがかかってしまっており、異常行動を未然に防ぐことは不可能である。近年では、熱ショックタンパク質などのバイオマーカー[Vincze et al. 2015 など]を用いてストレスを評価する手法が提案されているが、魚から血液や臓器細胞を採取する必要があるためストレスの常時監視には利用できない。一方で、魚の心理に関しては主にモデル生物であるゼブラフィッシュを対象に恐怖の発現メカニズムが研究されており、脳の手綱核が重要な役割を担っていることが明らかにされているが[Amo et al. 2010], 魚の心理状態を評価する研究は進んでおらず、その必要性・重要性が生物学分野の専門家から指摘されている[Kaluuff et al. 2012].

### 2. 研究の目的

本研究ではモデル生物であるゼブラフィッシュとメダカを対象として、生体電気信号から魚の生理状態と運動状態を解析し、心理状態を推定する手法を提案する(図1)。研究代表者はこれまでに魚の生体電気信号を計測し、呼吸情報と大まかな位置情報を抽出することに成功しており、照明環境を急激に変化させて心理的なストレスを与えたとき、遊泳速度と呼吸リズムが急激に変化することを発見した

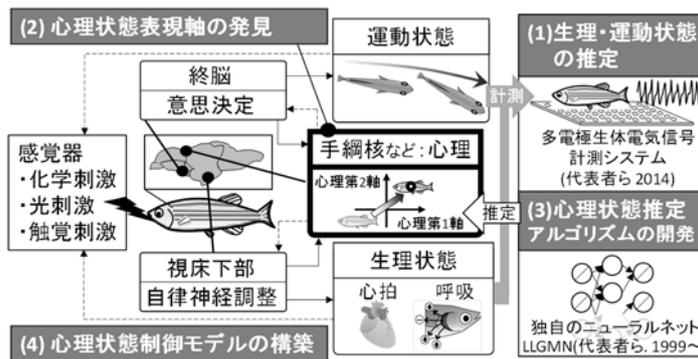


図1. 本研究:魚の心理状態の推定

[Soh et al. 2014]. このことは、生理状態と運動状態から心理状態を推定できる可能性を示唆している。本研究は、(1)生体電気信号から生理状態と運動状態を同時計測する方法を新たに開発し、(2)人間の感性工学分野で一般的に用いられている Russel の感情円環モデルに基づいて心理刺激を魚に与えたときの生理状態と行動状態を解析することにより魚特有の心理状態表現空間軸を見出すとともに、(3)計測した生理・運動状態を心理状態空間にマッピングする心理状態推定法を開発する。さらに、(4)魚の心理状態の遷移予測を実現するという4つの小目標を研究期間内に達成する。

### 3. 研究の方法

目標(1): 生体電気信号から生理状態と運動状態を同時計測する方法を新たに開発する

本研究では水槽底面に電極を格子状に敷き詰めることで呼吸波と呼ばれる魚の生体電気信号を計測し、魚の呼吸指標と運動指標をリアルタイムで同時解析可能なシステムを開発した。提案システムは信号計測部、データ通信部、信号処理部、位置推定部、呼吸・運動指標抽出部から構成される(図2)。以下、各部について説明する。

・信号計測部: 信号計測部では、計測水槽により、非接触・非拘束条件の下で試験魚の呼吸波を計測する。本システムが計測対象とする呼吸波は  $\mu V$  オーダーであるため、微弱な生体電気信号を計測可能とする脳波計(EEG-1200: 日本光電 東京)を信号増幅器として用いた。そのため、計測水槽は脳波計の Ag-AgCl 皿電極が固定できるように設計した。計測水槽は、魚の体長と比較して十分な容積をもつ二重底構造の直方体(横 210 × 縦 140 × 高さ 65[mm])とし、上層には等間隔

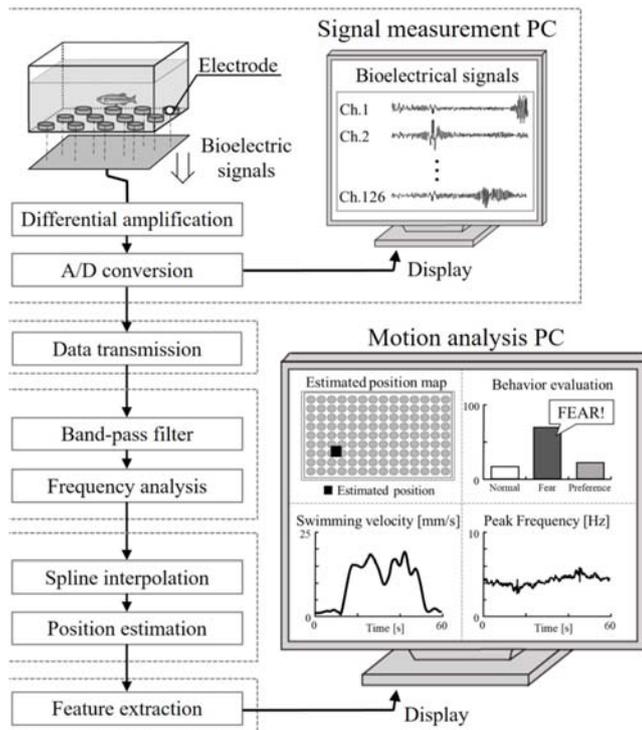


図2. オンラインカメラレス遊泳運動計測システム

(14[mm])で格子状に126個の計測用電極(Ag-AgCl)を、下層には基準電極を配置した。本水

槽は3Dプリンタ (Dimension BST 1200es : Stratasy) を用いて製作した。そしてデジタル脳波計 (EEG-1200:日本光電 東京) を用いて信号を増幅し, サンプリング周波数  $f_s$  [Hz] で魚の生体電気信号を計測し, ディスプレイに各 ch の生体電気信号を時系列で表示した。

・**データ通信部**: データ通信部では, 信号計測用 PC と運動解析用 PC 間のデータ送受信を制御し, 本システムのリアルタイム計測を可能にする。リアルタイムで各指標を確認することは, 実験中におけるシステム不具合に対して早急な対処が可能であり, 条件付け学習のスループットを向上させる。信号計測用 PC では, 各 ch の生体電気信号を表示するとともに, 運動解析用 PC に TCP/IP プロトコルに基づいてデータ送信を行う。運動解析用 PC では, 生体電気信号データを受信し, 動画解析と同等のサンプリング周波数  $f_m$  [Hz] で魚の位置や速度などの運動指標のリアルタイム解析を実現した。

・**信号処理部**: 信号処理部では, 受信した生体電気信号データを  $M_b$  次のバンドパスフィルタ (低域カットオフ周波数  $f_{low}$  [Hz], 高域カットオフ周波数  $f_{high}$  [Hz]) で濾波し, 呼吸波が含まれる周波数帯域の信号を抽出する。そして, 解析時間窓を  $T_w$  とし, 電極  $l$  から計測された時刻  $n$  における呼吸波のパワースペクトル密度  $P_{n,l}(f)$  [ $\mu V^2/Hz$ ] を  $K$  次の自己回帰モデルにより求めた。

・**位置推定部**: 位置推定部では, 各電極における PSD のピーク値 ( $q_l(n)=\text{argmax}_f P_{n,l}(f)$ ) の分布を用いて魚の位置を推定した。突発的なノイズの影響を抑制するため,  $M_{lm}$  次のローパスフィルタ (カットオフ周波数  $f_{cut1}$  [Hz]) で重心座標の時系列データを濾波し, これを魚の推定位置  $m(n) = (m_x(n), m_y(n))$  とした。

・**呼吸・運動指標抽出部**: 呼吸・運動指標抽出部では, 生物学的知見に基づいて魚の情動に関係する評価指標 (i) 遊泳速度, (ii) 静止確率, (iii) 呼吸波のピーク周波数, および, (i)~(iii) のそれぞれの標準偏差) を抽出した。

**目標(2): 人間の感性工学分野で一般的に用いられている Russel の感情円環モデルに基づいて心理刺激を魚に与えたときの生理状態と行動状態を解析することにより魚特有の心理状態表現空間軸を見出す**

ゼブラフィッシュの心理状態の変化を定量的に評価するため, 水槽中に警報物質を投与して不快状態を誘発する実験を行い, 呼吸・運動指標を組み合わせた不快状態の評価を行った。また, エタノールの嗜好性を利用した条件付け場所嗜好性試験 (CPP 法) を行い, 不快状態とは対極に位置する快状態の評価を行った。

・**不快状態評価実験**: 計測水槽の一部にゼブラフィッシュが身を隠すためのシェルターと警報物質を投与するためのチューブを設置した。そして, 馴化水槽において 30[**min**] 馴化させ, 静かに試験魚を計測水槽に投入した 10[**min**] 後, 警報物質 1/100[**匹分**] を投与し, 投与前 5[**min**] と投与後 5[**min**] の評価指標を解析した。

・**快状態評価実験**: 従来文献[Priya *et al.* 2011]に基づいて計測水槽を白:茶:点=3:1:3 の区画で構成し, 連続した 3 日で実験を行った。1 日目では, 試験魚を仕切りの中に投入し, 30[**s**]後に仕切りを除去した。仕切り除去から 2[**min**] の馴化後, 5[**min**] の初期嗜好を計測した。2 日目では, 1 日目で嗜好を示した区画において, 脱塩素水を 20[**min**] 暴露した。また, 嗜好を示さなかった区画においては, エタノールを 20[**min**]暴露しコンディショニングを行った。3 日目では, 1 日目と同様の手順で 5[**min**]の最終嗜好を計測した。

**目標(3): 計測した生理・運動状態を心理状態空間にマッピングする心理状態推定法を開発する**  
生理・運動指標を心理表現空間軸上にプロットすると, 心理刺激に対応した複数のクラスタが形成されると考えられる。そこで, 抽出された生理・運動指標がどの心理状態クラスタに属するかを研究代用者らが開発した確率分布構造を内包するニューラルネット Log-linearized Gaussian mixture network (略称: LLGMN) [Tsuji *et al.* 1999]を用いて自動識別するアルゴリズムを開発した。まず, 学習データとして, 心理状態に対応するクラスタにラベル付けされた生理・運動指標で構成される特徴量ベクトルを用意する。そして, 学習データを用いて LLGMN のパラメータ調整を行い, 未学習の特徴量ベクトルを入力したときに正しく心理状態を識別できるか検証した。

**目標(4): 魚の心理状態の遷移予測を実現**

魚は未知の環境刺激が提示されると恐怖や不安情動を発現し, 馴化するにしたがってこれらの情動が消失する。この情動の遷移はこれまでに抽出した遊泳状態と生理状態を反映する評価指標の分布の変化によって表現できると考えられる。そこで, 快状態評価実験で用いた計測水槽を用いて魚に新奇環境刺激を与え, 評価指標の分布の時間変化を KL 情報量により評価し, 馴化開始時間を予測した。具体的には, 評価指標をその主成分空間上に射影し, 時間区間  $t$  における主成分空間上の評価指標  $x_t \in R_d$  の確率密度分布  $p(x_t)$  をカーネル密度推定を行うことで近似する。そして, 隣り合う時間区間 (時間区間  $t$  と  $t'$  の対) の確率密度分布の違いを KL 情報量  $D(p(x_t)||p(x_{t'}))$  で表現した。魚が馴化し始めると定常的な行動をとり, 評価指標の分布の変化が小さくなると仮定し, 刺激が提示された後 KL 情報量が初めて閾値  $\theta$  以下になった時間を馴化開始時間として予測した。

#### 4. 研究成果

**目標(1): 生体電気信号から生理状態と運動状態を同時計測する方法を新たに開発する**

運動推定精度を評価するため、ゼブラフィッシュ 5 匹を用いて提案システムによる魚の行動推定と 2 次元のカメラシステム (Move-tr/2D:ライブラリー, 東京) による運動解析結果を比較した. その結果, 位置座標の平均絶対値誤差は  $9.75 \pm 3.12[\text{mm}]$ (体長の 1/3 程度), 遊泳速度の相関は平均  $r=0.93 \pm 0.07$  であり, カメラに匹敵する計測精度が得られることを確認した.

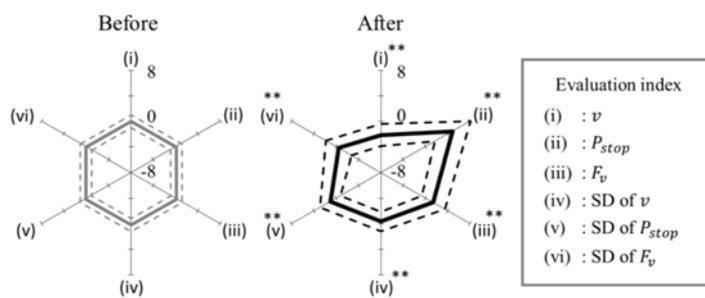


図 3. 不快状態評価実験結果

目標(2): 人間の感性工学分野で一般的に用いられている Russel の感情円環モデルに基づいて心理刺激を魚に与えたときの生理状態と行動状態を解析することにより魚特有の心理状態表現空間軸を見出す

・不快状態評価実験: 図 3 に警報物質の投与前後における評価指標のレーダーチャートを示す. 投与前 5[ $\text{min}$ ] の指標を基準に標準化を行っており, 投与前後において各評価指標が大きく変化していることがわかる. 警報物質を投与することで, 遊泳速度の低下と呼吸周波数, シェルター滞在確率, 静止確率の有意な増加を確認した. これは, 警報物質によって誘発された恐怖・不安情動によるすくみ行動や高い呼吸速度を特徴とするフリージングという行動が発現したためであり, 不快状態に関する行動を提案指標により検出できることを示している.

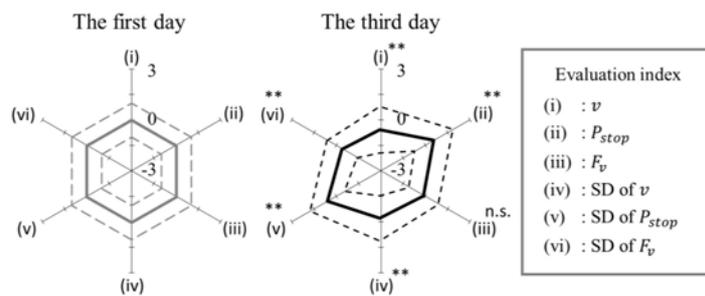


図 4. 快状態評価実験結果

・快状態評価実験: 図 4 に 1 日目と 3 日目の 5[ $\text{min}$ ] 間における評価指標のレーダーチャートを示す. 1 日目の指標を基準に標準化を行っており, エタノールを用いた 2 日目のコンディショニングにより, 快状態では各指標のばらつきが増加していることが確認できる. また, 呼吸周波数の標準偏差は有意に低下した. 以上の結果より, 快状態は多様な運動を誘発するとともに, 呼吸のリズムを安定させており, 提案指標によって快状態を検出できる可能性を示している.

目標(3): 計測した生理・運動状態を心理状態空間にマッピングする心理状態推定法を開発する

不快および快状態評価実験により得られた評価指標に対して, 主成分分析を用いて次元の圧縮を行った結果を図 5 に示す. 図より, 主成分空間において, 不快状態は比較的分布が纏まっているのに対し, 快状態は広く分散していることが分かる. この結果は, 自然界において不快は生命の危機に直結し, 反射行動を含む画一的な逃避行動を引き起こす一方, 快は脳において複雑な情報解釈に基づいて多様な行動が発現されることを反映していると考えられる.

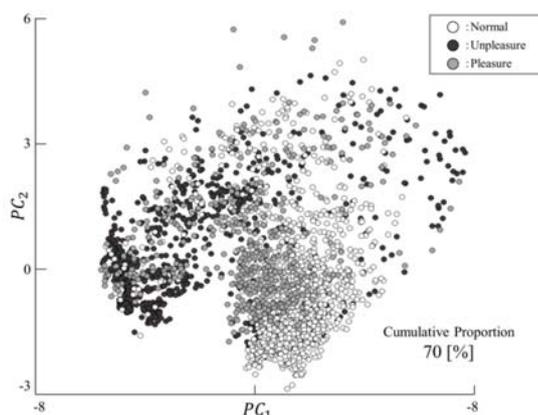


図 5. 主成分空間における呼吸と運動評価指標の分布

次に, 通常・不快・快の 3 つの心理状態について, Fisher の線形判別分析と研究代表者によって考案された確率ニューラルネットワーク LLGMN を用いて心理状態の識別を行った. 第 1 主成分から第 6 主成分まで 1 主成分ずつ入力を追加し, それぞれについて leave-one-out cross-validation により識別精度を評価した. 第 1 から第 4 主成分までを入力として用いたとき, LLGMN によって最良識別精度 (通常: 88.0[%], 不快: 76.8[%], 快: 51.7[%]) が得られた. ここで, 快状態の識別率は第 4 主成分が追加されたときに大きく上昇していることが分かった. 第 4 主成分において指標 (vi) 呼吸波のピーク周波数の標準偏差に対する主成分負荷量が最も大きいことから, 運動に加えて呼吸を組み合わせた心理状態評価の有効性が示された.

目標(4): 魚の心理状態の遷移予測を実現

馴化評価実験において、得られた全評価指標について主成分分析を行った。図6に1個体の0~1[*min*], 4~5[*min*], 9~10[*min*], 14~15[*min*]の主成分空間における指標分布を示す。図より、時間経過とともに指標分布の変動が小さくなっていることが確認できる。これは、ゼブラフィッシュが環境に馴化し、一定の行動パターンに収束していく過程を表していると考えられる。

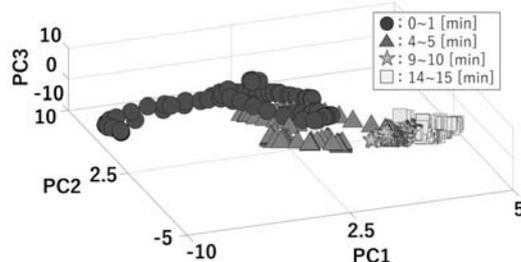


図6. 主成分空間における指標分布の時間変化

ここで、時間経過による指標分布の変動の大きさを評価するため、隣り合う時間区間における指標分布  $p(x_i)$  と  $p(x_{i+1})$  の KL 情報量  $D(p(x_i)||p(x_{i+1}))$  を求めた。Leave-one-out 交差検証法に基づき、評価対象の魚を除いた全個体の馴化進行区間の KL 情報量の平均を閾値  $\theta$  とし、馴化開始時間の予測精度を検証した。専門家の判断と推定馴化開始時間を比較した結果、平均誤差  $1.5 \pm 1.6$  [*min*] で馴化開始時間を予測できることが分かった。

交差検証法に基づき、評価対象の魚を除いた全個体の馴化進行区間の KL 情報量の平均を閾値  $\theta$  とし、馴化開始時間の予測精度を検証した。専門家の判断と推定馴化開始時間を比較した結果、平均誤差  $1.5 \pm 1.6$  [*min*] で馴化開始時間を予測できることが分かった。

本研究課題では、魚類の呼吸波を利用してリアルタイムに魚の位置と遊泳速度を推定し、呼吸と運動の指標を組み合わせることで魚の心理状態を評価する手法を提案した。提案システムは、魚の呼吸波を計測するとともに、動画像解析システムとほぼ同等の精度で魚の位置と遊泳速度が推定できることを確認した (目標 1)。警報物質とエタノールを用いて、それぞれ、不快状態と快状態を誘起する実験では、提案システムが抽出した評価指標軸上に魚の不快状態と快状態が表現できることを示した (目標 2)。また、評価指標をその主成分空間に射影することで通常・不快・快状態に対応する指標の分布の特徴を確認することができた。そして、研究代表者が独自に開発した識別器 LLGMN を用いて、評価指標から心理状態を識別する手法を提案した (目標 3)。最後に馴化を対象として魚の心理状態の遷移予測を行い、馴化開始時間をある程度予測できることを示した (目標 4)。以上より、当初予定していた4つの目標を達成した。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計4件)

[1] Soh, Z., Matsuno, M., Yoshida, M., and Tsuji, T. Real-Time cameraless measurement system based on bioelectrical ventilatory signals to evaluate fear and anxiety. *Zebrafish*, 査読有, 2018, Vol. 15, No. 2, pp. 133-144.

[2] Mukaidani, N., Soh, Z., Higashijima, S., and Tsuji, T., Force and Motion Analysis of larval zebrafish (*Danio rerio*) using a body dynamics model, *Journal of robotics, networking and artificial Life*, 査読有, 2017, Vol.4, No. 3, pp. 183-190.

[3] Takiyama, T., Hamasaki, S., and Yoshida, M. Comparison of the visual capabilities of an amphibious and an aquatic goby that inhabit tidal mudflats. *Brain, behavior and evolution*, 査読有, 2016, Vo. 87, No. 1, pp. 39-50.

[4] 吉田将之, キンギョもいろいろ考えている, *Nextcom*, 査読無, 2016, Vol. 26, pp. 52-53.

〔学会発表〕 (計5件)

[1] Soh, Z., Sekimoto, R., Yoshida, M., and Tsuji, T., Evaluating habituation to a novel environment of zebrafish using bioelectrical signals, *SICE Annual Conference 2019*, 2019

[2] Mukaidani, N., Soh, Z., Asakawa, K., Kawakami, K., and Tsuji, T., Biomechanical analysis of C-start and cyclic swimming in larval zebrafish using a computational fluid dynamics model, *Proceedings of the 2019 International Conference on Artificial Life and Robotics (ICAROB2019)*, 査読有, 2019, B-con plaza, Beppu.

[3] Yoshida, M., and Handa, T., A new technique for monitoring the heartbeat and its application to classical conditioning in zebrafish larvae, 第38回日本比較生理生化学会, 査読有, 2016, 玉川大学

[4] 松野 一輝, 曾 智, 吉田 将之, 平野 旭, 栗田 雄一, 辻 敏夫, 小型魚類の呼吸波を用いたオンラインカメラレス遊泳運動計測システムの開発, 第25回計測自動制御学会中国支部学術講演会論文集, 査読有, 2016, pp.140-141, 広島大学

[5] 吉田将之, 小脳と情動 ～キンギョの恐怖学習から～, 埼玉大学脳科学セミナー, 招待講演, 2016, 埼玉大学

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://bsys.hiroshima-u.ac.jp>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：吉田 将之  
ローマ字氏名：Yoshida Masayuki  
所属研究機関名：広島大学  
部局名：生物圏科学研究科  
職名：准教授  
研究者番号（8 桁）：70253119

研究分担者氏名：平野 旭  
ローマ字氏名：Hirano Akira  
所属研究機関名：呉工業高等専門学校  
部局名：電気情報工学分野  
職名：准教授  
研究者番号（8 桁）：60594778

研究分担者氏名：曾 智  
ローマ字氏名：Soh Zu  
所属研究機関名：広島大学  
部局名：工学研究科  
職名：助教  
研究者番号（8 桁）：80724351

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

※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。