

令和元年6月19日現在

機関番号：55401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K16368

研究課題名(和文)メダカの呼吸信号予測器を用いた逐次判別型水質バイオアッセイ法の基礎研究

研究課題名(英文)Study on a bioassay technique based on ventilatory signal predictor of killifish

研究代表者

平野 旭 (Akira, Hirano)

呉工業高等専門学校・電気情報工学分野・准教授

研究者番号：60594778

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：メダカの呼吸パターンを連続的かつ長時間計測した知見が無いため、まず、メダカの呼吸信号を連続的かつ長時間計測する簡易システムを開発した。構築したシステムによる計測実験では、同じ水質であっても、個体ごとに呼吸パターンが異なることを確認した。また、呼吸の頻度および振幅の大きさは、特に水質変化が無い場合でも、頻繁に変化することを確認した。従って、呼吸に伴う生体信号を利用して急激な水質変化や毒物混入を検出する場合、直近の呼吸パターンでモデルを作成し、外れ値検出法を用いた検出が有効であると考え、one class SVMを用いた水質変化を検出する方法を提案するとともに、その有効性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メダカの生体信号を用いて水質変化を検出するためのアルゴリズムを提示している。また、浄水場をはじめとした水質管理現場において、長時間連続的に水質を監視するためのバイオアッセイシステムについて、具体的なハードウェア例を提示している。

研究成果の概要(英文)：Bioassay monitoring is a method for detecting environmental change using animals. It has an advantage over the traditional chemical analysis methods in continuous monitoring of potential toxicity risks on the animals. Therefore, a bioassay method has been proposed using ventilatory signals of killifish; however, the conventional systems were limited to short-term monitoring. In this study, we developed a system that enables long-term measurement of ventilatory signal continuously. The measurement results demonstrated that the ventilator signal patterns frequently change even under the same water qualities. We also proposed a toxicity detection algorithm for water using one class support vector machine and verified that the algorithm could detect artificial administration of toxic substance within a few hours.

研究分野：生体情報工学

キーワード：バイオアッセイ メダカ 生体信号

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2001年のアメリカ同時多発テロ以降、国内のダムや河川におけるテロ対策が急務とされ、浄水場への監視カメラの設置や水道施設の巡回強化の方策がとられた。一方で、魚類を用いた水質検査法(水質バイオアッセイ法)による水質の常時監視が有効策と考えられ、整備が進められた。バイオアッセイとは、生物の応答から環境状態を判別する手法であり、昔から様々な場面で採用されてきた。一例には、空気の変化に敏感なカナリアを炭鉱内へつれて入っていた例が挙げられる。坑内に蔓延する有毒ガスが人間に悪影響を及ぼさない希薄な濃度のうちにカナリアが死ぬことを利用して、進入路の先に潜む危険性を判断していた事例がある。化学的手法では検出対象とする毒性物質が限定されてしまう一方、バイオアッセイであれば我々人間の生命維持に危険を及ぼす未知の毒物も検出できる点で優位といえる。しかし、古来から用いられてきた「動物の生死を利用したバイオアッセイ法」では検出時間も長く、用いる生物によっては倫理的問題が発生する。そこで現在では、生命維持機能の異常を初期段階で捉えることを狙い、生体信号を利用するタイプのバイオアッセイ法が注目されている。

水質バイオアッセイの場合には小型魚類が用いられる。近年では、ゼブラフィッシュやメダカが被験魚に採用されている。特にメダカは、OECD(経済開発協力機構)テストガイドラインの試験生物に指定されており、化学物質に対する感度が優れ、バイオアッセイに適するとされている。水中に混入した毒物に反応する以外にも、環境ホルモンが蔓延する環境では、オスがメス化する点を利用すれば多重のバイオアッセイができる可能性も有している。メダカを用いたバイオアッセイ法の従来研究は、(a)カメラによる行動監視で異常行動から毒物混入を捉える手法と(b)生体信号の時系列変化に着目して毒物混入を捉える手法の2種類に大別することができる。すでに取水場へ設置されている手法(a)の代表例としては、メダカが危険を察知したときに集団を形成する性質を利用し、カメラから取得した画像の処理によって集団形成を判別して水質検査を可能にしているシステムがある。水道法に基づく水質基準値シアン化合物イオン濃度0.01mg/Lに対して5時間48分で警報を発することに成功しているが、数時間オーダーの検出能力では、汚染毒物が家庭への給水ラインに波及している可能性が指摘される。一方、手法(b)は、生体信号の変化に着目しているため、毒物の神経系への影響を直接的に検出できる点で、手法(a)よりも早急に毒物混入を検出できる可能性が期待されている。近年の研究では、(b-1)複数匹が遊泳する水槽から取得した呼吸信号の信号強度で判別する手法や、(b-2)一匹の呼吸信号の時系列変化を利用した判別法などが提案されている。

申請者は、水槽底面に配置した多チャンネルの電極からメダカの呼吸信号を被侵襲・非接触で計測し、計測された信号パターンをニューラルネットワーク(NN)に学習させ、学習した信号パターンから大きく外れた場合に警報を発する(b-2)タイプの手法を提案してきた。この提案法は、被験魚ごとの呼吸パターンをNNに学習させて“個体ごとの基準パターン”をつくる為、信号パターンの個体差を考慮しなくても良い点で優れていた。この手法に限らず、被験魚は毒物が混入しなくても数カ月程度を限度として死亡する為、必ず被験魚の交換が必要になる。被験魚を変えると呼吸信号が計測できなくなることがよく起こる。被験魚が環境の変化に驚いて呼吸をひそめる為と考えるのが一般的であるが、新しい環境への適応時間の参考データもない為、真偽は検証されていない。また、被験水を変えた場合も同様に計測ができなくなることがあるが、新しい水に対して被験魚が怯えた為か、水質要因の何かが影響して原理的に計測できなかったのかは原因が究明できていない。もし、水質条件に応じて計測される呼吸信号パターンのデータベース、もしくは、1匹の個体に対して長時間連続的に計測したデータ、および、水質に応じた信号パターンの予測ツールがあれば原因究明が可能となる上、統計データに基づいた信頼性の高いバイオアッセイ法の開発および既提案法の改善が可能になりうる。

2. 研究の目的

小型魚類の生体信号を利用した水質バイオアッセイ法の実用化に向け、一定の水質条件で長時間連続的に計測した呼吸信号のデータを得る。ただしそのデータは、水の循環の無い水槽におけるデータではなく、水の循環がある条件におけるデータとする。その傾向にもとづいて、毒物混入などの水質変化を検出可能にする実用的なアルゴリズムについて研究する。

3. 研究の方法

- (1) 本研究ではメダカを対象として、同じ水質に対する複数匹の呼吸信号を同時かつ長時間連続的に計測する。同じ水質条件下では“種”として同じ呼吸パターンが観測されるか、個体ごとで異なるかを明らかにする。そのために専用の計測システムの開発を行う。
- (2) 水質変化のない条件下において、従来研究でスタンダードとされている4Hzの呼吸パターンが常に観測されるか、もしくはどのように変化するかを明らかにする。
- (3) 得られた呼吸パターンの傾向に基づき、毒物混入などを検出可能にする有効なアルゴリズムを検討する。

4. 研究成果

(A) 呼吸波計測システムの構築

呼吸波のデータベースを構築する為には、(a-1)多くの個体に対して同じ水を供給するシステムが必要となる。さらに長時間連続して計測するために、(a-2)メダカの呼吸をロストしないた

めの電極配置を検討した計測用水槽の設計，(a-3)数マイクロボルトの呼吸波信号を増幅する為の信号増幅アンプ，(a-4)増幅した信号を AD 変換してデータ化した上でサーバに転送するユニットが必要となる．それらについて開発するとともに精度検証を行った．

(a-1) 複数個体同時計測システム

図 1 にシステムの外観を示す．研究室の水道蛇口から得られる水を活性炭フィルタ（環境テクノス社製 AF-17）に通水し，塩素を除去した水を主水槽へ給水し，メダカが遊泳する各水槽へポンプで配水する．これにより，同じ水質条件の水を複数個体に与え続けることを可能にした．



図 1 水循環システム

(a-2) 電極配置の検討と計測用水槽のデザイン

メダカの呼吸波は，周期が 2～5 Hz，振幅は数マイクロボルト程度と非常に微弱な信号である．一般的に信号を計測するための信号増幅には，脳波計や筋電位計が用いられる．計測のための電極配置は，脳波計用の皿電極を水槽底面にたくさん敷き詰める多電極方式と，水槽壁面に電極を配置して被験魚をはさむ少電極数方式の 2 種類に大別できるが，前者の場合には多くの電極からの信号を高速に処理する必要があるため，脳波計に代表される高性能なシステムが必要になる．さらに，信号を確実に計測するためには水深を深くとることができない．後者の場合，電極数が少なく計測システムは簡素化できるが，メダカの体軸と計測電極対が 45 度以上ずれると呼吸波の計測が困難となるため，信号をロストしないためには 2 チャネル以上の電極対が必要になる．電極面積や電極間距離が適切でないと，計測対象とする信号とノイズの SN 比を高く取れないなどの検討項目が多い．本研究で開発した計測用水槽の基本デザインを図 2 に示す．水槽固有の振動数が呼吸波の周波数帯域から外れ，極力，10 Hz 以上になることを狙い，水槽形状には正方形を採用した．電極は 2 チャネル分を水槽の上部と下部に配置し，材質は，

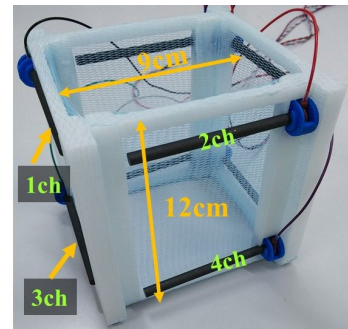
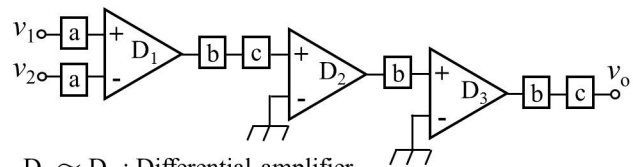


図 2 計測水槽

分極効果や析出物が起こりにくい炭素棒電極とした．水の給水は，主水槽からシリコンチューブとポンプを用いて水槽上部へ行き，水に交じって流入する化学物質等は自然沈下することを想定し，排水はオーバーフロー式とした．あふれた水は，図 1 の主水槽に戻る．なお，給水ポンプから伝達される電源ノイズを除去することを目的とし，給水位置は極力，水槽上部の中央付近とした．次の(a-3)の項目で示す信号増幅アンプを用い，差動増幅による信号増幅の有効性を確認した．

(a-3) 呼吸信号増幅アンプの設計

信号増幅アンプの概要を図 3 に示す．3 つの差動増幅アンプ $D_1 \sim D_3$ とアナログフィルタで構成される．端子 v_1, v_2 は信号の入力端子， v_0 は出力端子である．図中の a はハイパスフィルタ，b はローパスフィルタ，c は電源ノイズ除去用のフィルタである．計測対象とするメダカの呼吸波は，ピーク to ピークで約数マイクロボルトと知られているため，マイコンボードの内部参照電圧 5V 未満で計測することを考慮し，約 12 万倍程度の増幅率とした．



$D_1 \sim D_3$: Differential amplifier
a : High-pass filter
b : Low-pass filter
c : Power-supply noise filter

図 3 呼吸信号増幅アンプ

初段 D_1 と 2 段目 D_2 の増幅率を 105 倍程度とし，3 段目 D_3 を 11 倍程度で設計すると，給水用ポンプからの電源ノイズの影響で出力信号 v_0 がひずむ確率が高い．初段 D_1 で増幅した信号に約 20 mV 程度の電源ノイズが確認される傾向が強いため， D_1 と D_2 の後にノッチフィルタ c を挿入することの有効性を確認した．

(a-4) 計測ユニットの構築

信号増幅アンプで増幅した信号を AD 変換し，デジタル信号として保存する為のユニットには，Raspberry Pi 3 Model B を採用した．ただし，AD コンバータが搭載されていない為，別途，AD コンバータが必要になる．計測ユニットの構成および信号増幅アンプとの接続関係を図 4 に示す．

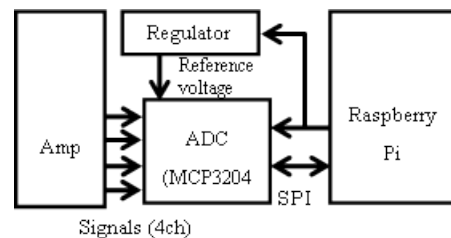


図 4 計測ユニット

AD 変換器には，分解能 12bit で 4ch 処理可能な逐次比較型の MCP3204 を採用した．Raspberry Pi と MCP3204 間の通信には SPI 通信を使用した．MCP3204 の電源は Raspberry Pi から供給可能であるが，ノイズが発生しやすいスイッチングレギュレータによって生成される．また，CPU

の負荷状態によって大きく電圧も変動するため、MCP3204の基準電圧には高精度な電圧を供給することができるCMOSタイプの3端子レギュレータを使用するものとした。

Raspberry Piを核とする「計測ユニット」のソフトウェア処理は、次の3つのステップに分けることができる。まず、システムの時間情報から年(Y)、月(m)、日(d)、時間(H)、分(M)、秒(S)を用いてYYYY-mmddHHMMSS.txtの形式でファイル名を決定し、計測値を記録するためのファイルをSDカード上に作成する。計測開始直後からの経過時間とAD変換器から送られてくる測定値をメモリ上の配列に保存する。処理を一時停止するsleep関数だけで次のサンプリングまでの待ち時間を設定すると、サンプリング間隔を一定に保てない。そこで、できる限り正確なサンプリング周期を確保するため、次の方法を用いた。まず、datetime.datetimeクラスを用いて、現在時刻を取得して T_1 とする。次に、AD変換器から送られてくるデータを取得する。この処理が終了したタイミングで、現在時刻を取得して T_2 とする。A/D変換に要した時間 $\Delta T = T_2 - T_1$ を計算し、次のサンプリングまでの待ち時間 T_w は $T_w = T_s - \Delta T$ で計算するものとした。 T_s は、計測条件として指定したサンプリング時間である。sleep関数を用いて待ち時間 T_w の間、処理を停止する。計測指定時間T秒の計測が終了したら、SDカード上に作成したファイルへメモリに蓄えた全計測データを出力する。その後、データ蓄積用のFTPサーバと通信し、日別にフォルダを作成し、計測ファイルをアップロードする。サーバと接続が確立できなかった場合には一定時間ごとに再接続を試み、接続でき次第、SDカードに保存した測定データをアップロードするものとした。

AD変換ユニットの精度を確認するため、直流安定化電源から出力した信号3VをAD変換ユニットに入力し、計測した電圧値とデジタルマルチメータで計測した電圧値を比較した。その結果、電圧値の誤差率は約0.61%であることを確認した。なお、図4中のレギュレータを用いない場合には、電圧値の誤差率が約2.26%に増大することを確認された。また、ファンクションジェネレータから V_{pp} 2V、周波数4Hz、オフセット電圧1.5Vの正弦波を構築したシステムに入力し、サンプリングの抜け、および、サンプリング時間の遅延について確認実験を行った。メダカの呼吸信号が2~10Hzであることから、計測ユニットのサンプリング周波数は100Hzとした。検証実験の結果、連続50秒間の計測における遅延時間は、平均約630msec、標準偏差は8.65msecであり、サンプリングごとの平均遅延時間は約0.13msecであり、計測対象とする信号の周波数帯に対して問題となる大きな遅延が生じないシステムであることを確認した。

(B) 開発したシステム全体の精度検証と基礎計測実験

計測水槽は、直射日光は当たらないが、ブラインドから外光が差し込む場所に設置した。計測システムのサンプリング周波数は100Hz、1回の連続計測時間は50秒とし、1回の計測が終わるごとに「データ蓄積サーバ」に転送される。同じ被験魚で約48時間の計測を行った。水槽付近への人の出入りおよび実験室の照明点灯は可能な限り抑制し、夜間も照明はつけないものとした。試験水の水温調整は行わないものとし、水温は約29°C、導電率は約10 μ Sであった。

計測水槽にメダカを投入後、約1時間後にCh.3の電極対で計測されたデータを図5(a)に示す。横軸は時間、縦軸は信号増幅後の電圧値である。約5Hzの特徴的な呼吸波が確認できる。図5(b)は、約31時間半後にCh.1の電極対から計測された信号である。周波数は約7Hzに変化していることがわかる。図5(c)は、48時間の連続計測実験後、メダカを除去した際の計測データである。図5(c)におけるCh.1の電圧は、平均2.50Vで標準偏差22mV、Ch.3は平均2.50Vで標準偏差18mVであった。以上の結果より、構築した計測システムにおいて、水の流入入によるノイズと呼吸波のSN比を十分に確保できていることが確認できた。また、特に水質が変化しない場合においても、呼吸パターンが変化することが確認された。

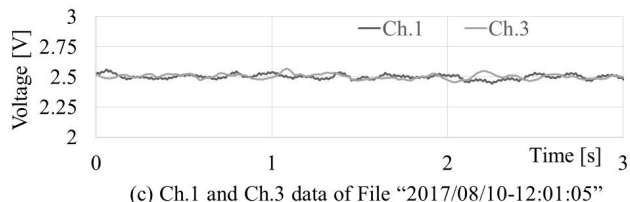
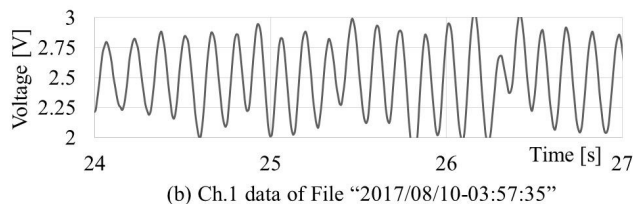
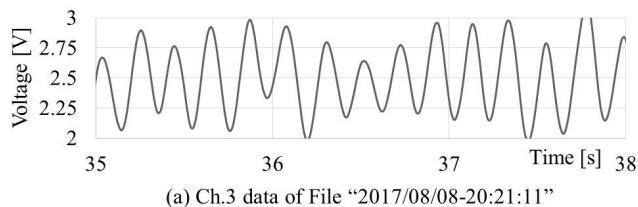


図5 計測システムによる計測データ例

(C) One class SVMを用いた毒物検出アルゴリズムの提案と有効性確認

毒物混入を想定した長時間連続計測実験を行った。午前7:00から午後11:00まで計16時間連続して呼吸波の計測を行った。この間、水温は27°C、導電率122.4 μ S、pH6.4に保った。人工的に水質に毒性を与えるため、午後5:20にタバコから成分を抽出した液体(以降、毒物と

記載する)を水槽内に投与した。

図6に水質正常時の呼吸波を示す。図6(a)において、ピーク周波数は約2.9 [Hz]、振幅は約0.05 [μ V]である。図6(b)において、ピーク周波数は約2.5 [Hz]、振幅は約0.15 [μ V]である。また、図7に毒物投入後の呼吸波を示す。図7(a)において、ピーク周波数は約4 [Hz]、振幅は約0.2 [μ V]である。図7(b)ではピーク周波数は約3.5 [Hz]、振幅は約0.15 [μ V]である。以上より、呼吸波の特徴量は水質に関わらず、時々刻々と変化していることが確認された。さらに、毒物投入後、ピーク周波数の上昇が確認された。

魚の呼吸は心理状態によって時々刻々と変動しており、水質正常時においても多様なパターンを示すため、これらすべてをNNに学習させることは困難であることが分かった。そこで本研究では、呼吸波の異常検出という観点から One

Class Support Vector Machine (OC-SVM)を用いた異常検出アルゴリズムを提案した。水質が正常時の呼吸波の特徴量空間を構成し、この特徴量空間上で外れ値が観測される確率を用いて水の毒性を検出するものとした。心理状態など、水質に起因しない呼吸パターンの変化を考慮するため、呼吸波の時間変化に追従して特徴量空間を更新するものとした。この手法の場合、水質異常時の呼吸パターンを仮定する必要がない上、呼吸パターンの時間変化に対応できるという点で従来法よりも優れていた。

計測したデータから呼吸波の特徴量を抽出するため、 T [s]の計測信号を t_1 [s]の矩形窓で $t_1/2$ [s]秒ずつシフトさせ、 $Q = 2T/t_1 - 1$ 区間に分割する。各区間内の計測信号にハミング窓をかけ、FFTによる周波数解析を行う。計測チャンネル4Chのパワースペクトル密度(PSD)の中から、最大のPSDピークが観測された優先Chを求める。優先Chから t_1 秒間の呼吸波のパワー A_1 とピーク周波数 A_2 、および、白色ノイズの割合 A_3 を呼吸波の特徴量として抽出する。なお、 A_3 は次式に示す自己相関関数 $C(\tau)$ から求めた。

$$C(\tau) = \overline{x(t) x(t+\tau)} = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{T} \int_{-T/2}^{T/2} x(t) x(t+\tau) dt$$

ここで、 $x(t)$ は t_1 秒間の計測信号であり、 τ は時間シフトを表す。得られた Q 区間の特徴量をOC-SVMに入力し、各区間の特徴量に対して異常検出を行う。このとき、 Q 区間の中で異常であると検出された区間の数を q とし、 q/Q を異常確率と定義する。 $q=0$ の場合は、特徴量 $A_1 \sim A_3$ を用いてOC-SVMの再学習を行う。なお、再学習する場合には、最も古い Q 個のデータは除去する。以上により呼吸波の時間変化に追従させる。

実際に異常検出を行う前には、水質正常時 T_h [s]間の呼吸波の特徴量をOC-SVMに学習させる。まず、 T_h [s]間の呼吸波から次式に示す水質正常時の学習データの集合 D を生成する。

$$D = \{A_n^{q,z}\}_{n=1, q=1, z=1}^{N=3, Q, T_h/T}$$

ここで、 n は特徴量に対応する添え字($n=1, 2, 3$)、 q は時間窓 T [s]を Q 等分した各時間区間に与えられる添え字、 z は全計測時間 T_h を T [s]の時間窓に分割した各時間区間に対応する添え字である。OC-SVMは p [%]の確率で外れ値が含まれることを許容した学習データ D をカーネル関数により高次元の特徴量空間上に写像する。そして、学習データ D の特徴量の分布と、特徴空間上の原点とのマージンが最大になるように分離する超平面を学習した。パラメータは、 $T = 50$ [sec]、 $t_1 = 10$ [sec]、 $f_s = 100$ [Hz]、分割データ数 $Q = 9$ とした。また、学習データに用いる呼吸波の計測時間 T_h は、試行的に3時間とした。また、学習データの中に外れ値が無いものと仮定し $p = 0$ [%]とした。

図6および図7の結果を得た実験に

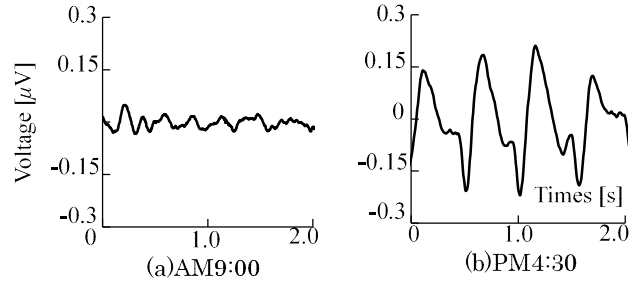


図6 正常時における呼吸波

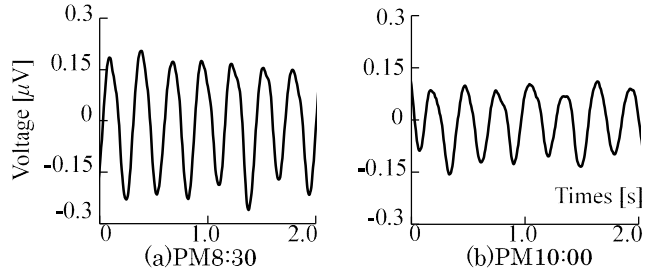


図7 毒物投入後における呼吸波

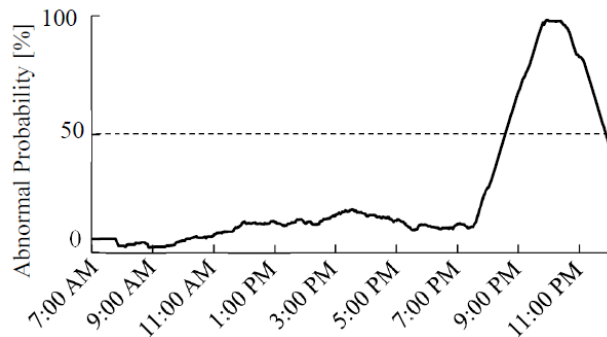


図8 提案法による異常確率推移

において、OC-SVM で求められた異常確率を図 8 に示す。毒物を投入した PM 5:20 から約 2 時間後の PM 7:20 から異常確率が上昇し始めており、PM 8:30 以降では 50 [%] を超えたことが確認できる。以上より、提案アルゴリズムによって水質の異常を検知できることが確認された。また他の個体についても同様の傾向を確認することができた。

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 3 件)

城明 舜磨, 平野 旭 (他 3 名), メダカの呼吸波を利用した水の毒性検出アルゴリズムの提案, 平成 30 年電気学会 電子・情報・システム部門大会, 2018 年

小笠原 遼一, 平野 旭 (他 2 名), Raspberry Pi を用いた呼吸波計測システムの改良, 平成 29 年度(第 68 回)電気・情報関連学会中国支部連合大会, 2017 年

城明 舜磨, 平野 旭 (他 2 名), メダカの呼吸波計測にむけた電極配置の提案, 平成 29 年度(第 68 回)電気・情報関連学会中国支部連合大会, 2017 年

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

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。