

令和 4 年 8 月 31 日現在

機関番号：50101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04433

研究課題名(和文) 疾患胚特有の生理機能変動計測による異常成長診断システムの開発と臨床応用

研究課題名(英文) Development of abnormal growth detection system by measurement of distinctive bio-signal in disease chick embryos

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：胎児モデルの疾患特有の体動変動を明らかにすることを最終ゴールとして、ニワトリ胚を計測モデルとしてCCDカメラによる直接録画により、初期胚における体動の発達パターンの解明に取り組んだ。本テーマでは1)膨大な手間と時間が必要だった従来の体動解析システムの改良を行い解析の手間を4/1296に削減した。また、誤検出データのフィルタ処理の精度向上も行った。2)18%20分低酸素-40分通常環境における体動計測例を5例得た。低酸素特有と思われる体動の減少、変動量の減少が観測されたが、すべての個体やすべての低酸素時にみられたわけではないため、低酸素症特有のパターンと断じるためにはさらなる検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は胎児モデルの疾患特有の体動変動を明らかにすることを最終ゴールとして、ニワトリ胚を計測モデルとしてCCDカメラによる直接録画により、初期胚における体動の発達パターンの解明に取り組んでいる。哺乳動物では母体の影響を受けるために胎児そのものの成長パターンや生理機能の変化を分離して知ることは難しく、ニワトリ胚だからこそなせる研究である。

現代においてもまだDNA解析では分からない疾患の方が多い。胎児疾患特有の生理機能パラメータの変動が分かれば、将来的に疾患予知につながり、その疾患をごく初期の段階で治療することが可能になる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the distinctive body movement patterns in fetal disease model as our ultimate goal, we had tackled to elucidate developmental patterns of body movement in early stages of chick embryos by direct recording with a CCD camera. In this research 1) we improved the body movement analysis system, which required an extremely large amount of time and human effort. We reduced the analysis procedure to 4/1296 steps. In addition, we improved the accuracy of the filtering for the missed matching data. (2) Body movement in five chick embryos were successfully measured in 20 minutes of 18%O₂ hypoxic environment and 40 minutes of 21%O₂ condition. Distinctive decreases of body movements that were attributed to be characteristic of hypoxia. However, since this change of body movements was not observed in all individuals or in all hypoxic conditions, which implies further experimental data is required to conclude that this body movement pattern is signal of embryonic hypoxia.

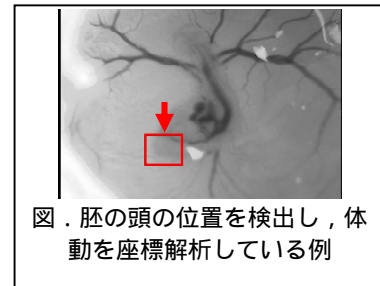
研究分野：生体情報計測

キーワード：ニワトリ胚 初期胚 胎児計測モデル 胎児疾患モデル

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（以上は科研費 KM17700412 等の成果）。

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（以上は科研費 KM23700547 等の成果）。また、これらの生体信号計測技術と解析プログラムをヒトの呼吸解析やストレス解析に応用を試みて実用化に向けた基礎データも得られていることは非常に大きな成果と言える。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、いよいよ哺乳動物（マウス）胎児への臨床応用の一歩前の研究段階に至った。



2. 研究の目的

本申請では、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) データ数の不足している初期胚における疾患時の生理機能パラメータのマルチセンシングデータ(心拍数、血圧、体温、血管成長、体動データ)の計測・解析およびデータベース化、を目標とする。

3. 研究の方法

(1) 体動量解析システムの開発

体動の解析は、あらかじめ用意しておいたニワトリ胚の頭部をテンプレート画像として、解析動画内でその画像と類似度の高い部分を追従することによって、胚の位置を算出するテンプレートマッチング法にて行った。動画データを所定の時間ごとに切り出した後に切り出した動画データの1フレームを抜き出しテンプレートマッチング法で胚の位置を検出し、座標データとして取得する。これを繰り返し全フレームに対して行い座標データ列を取得する。しかし、これだけではテンプレートマッチングの誤検出のデータが含まれている可能性があるのでフィルタリング処理を行い、最後に体動量計算を行う。

開発するシステムの流れを図1に示す。従来のプログラムは全て独立しているプログラムであったために、72[h]の動画データに対して、1296回の作業を行う必要があった。そのため、動画の読み込みを一度で行うことで、作業量の削減を図る。また、体動はテンプレートマッチング法によって検出していたが、胚の成長のために、テンプレートの更新が必要であった。従来はこのテンプレートの更新を手動で行っていたため、テンプレートの自動化を試みた。また、体動量算出時の誤検出ノイズの対策も改良を行った。

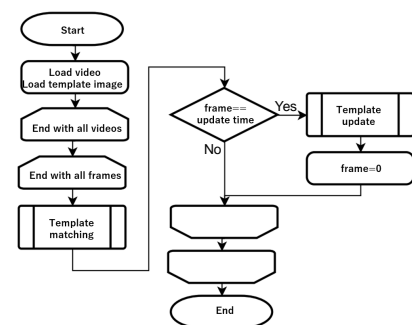


図1 システムの流れ

作成したテンプレート自動更新システムの流れを図2に示す．テンプレートは5分ごとに更新される．10フレームごとにテンプレートマッチング法で算出された類似度の比較を行い，現在のテンプレートとの類似度が0.95よりも大きければ，その座標を保存し，画像の抽出を行い，新たなテンプレートの候補とする．これを20回繰り返し，20の候補の中で一番類似度の高い画像を新たなテンプレートとした．

従来は，20分間における胚の座標平均の $\pm 50\%$ を許容移動範囲として，それ以外を胚座標の誤検出としてノイズ処理していたが，この手法ではまだ多くの誤検出データが含まれていた．過去の研究から，1フレーム(1/30秒)におけるニワトリ胚の体動量は50[pixel]も起こらないことは分かっているため，計測期間における1フレームあたりの最大体動量を調査し，その値を閾値とするフィルタリング処理を行った．調査の結果，一番大きく動いたのが9.4[pixel]であったため，10[pixel]よりも大きな体動を誤検出とすることにした．

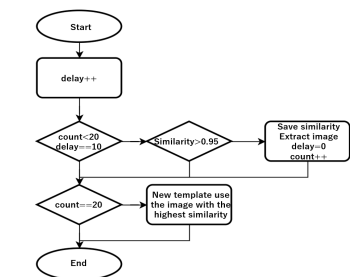


図2 テンプレート自動更新

(2) 間歇性低酸素環境の体動量への影響調査

これまでの研究より，ニワトリ胚の体動は孵卵開始 80 時間前後から起きることがわかっているため，72 時間(3 日)まで通常孵卵をし，体動が起こる数時間前の孵卵開始 72 時間(3 日)後から間歇性低酸素環境下で録画を開始した．USB カメラで撮影し，MPEG2 形式の動画データとしてコンピュータ内に保存される．録画が終了した後，(1)で開発した体動解析システムによって動画データの解析を行う．低酸素にするタイミングについては18%低酸素環境20分，通常酸素環境(約21%)40分，計1時間を1セットとし，孵卵開始144時間まで繰り返した．また，前章で開発した体動解析システムを用いて体動量の解析を行った．

4. 研究成果

(1) 開発した「体動量解析システム」の評価

従来の解析法による結果を図3上に，テンプレートの更新は従来法と同じ手動かつ，改良フィルタリング処理を適用した結果を図3中に示し，テンプレートの自動更新かつ改良フィルタリング処理を適用した結果を図3下に示す．改良フィルタリング処理によって，赤丸の誤検出を除去することができた．また，体動量が従来法から増加している．これは従来法のアルゴリズムでは正しい体動をノイズとして除去していたためと考えられる．手動テンプレート更新と自動テンプレート更新を比較すると，テンプレート画像が異なるため，完全に一致とはならなかったが，20分から40分までの体動量が他の時間と比較して小さいという体動量の傾向は一致した．また，72[h]の動画データに対して，従来は1296回であった作業回数をわずか4回に削減できた．

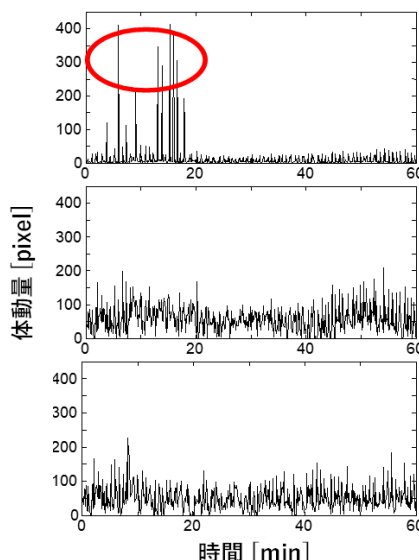


図3 テンプレートの手動更新における従来法(上)と改良フィルタリング処理を適用した結果(中)とさらにテンプレートの自動更新を適用した結果(下)

(2) 「間歇性酸素環境の体動量への影響」についての研究成果

本研究では20例の実験数に対し，3例の生存した個体(個体A, B, Cとする)，の解析可能なデータを得た．生存個体3例における低酸素環境時，通常酸素環境時それぞれの時間の総体動量を算出して図4に示す．ただし，40分の通常酸素環境時の総体動量を20分に換算した．なお，体動量は縦方向の距離やテンプレート画像により変わってくるため絶対値同士での個体間比較はできないために最大値で規格化して表示している．

図4(a)に示した個体Aでは，赤の塗りつぶしで示した108時間および125時間周辺におい

て低酸素環境時の体動量が通常酸素環境時の体動量と比較して明らかに少なくなっていた．図 4(b)の個体 B では低酸素環境時の体動量と通常酸素環境時の体動量に顕著な違いが観察できず，個体 C でも同様に明確な差は確認できなかった．

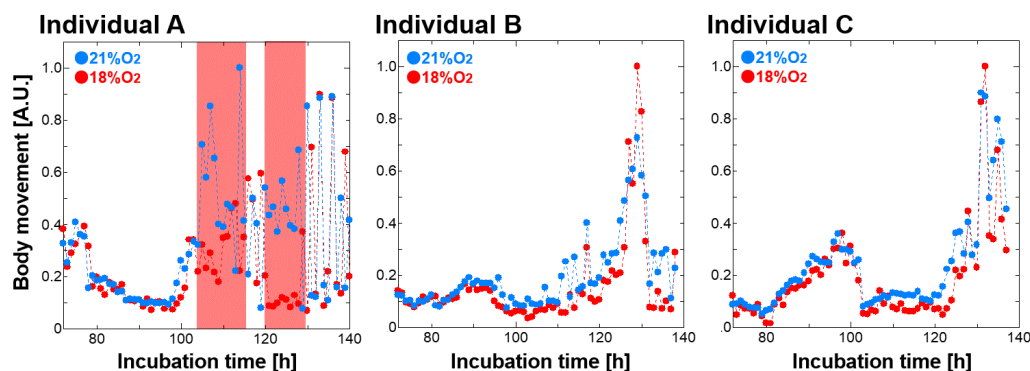


図 4 それぞれの生存個体における通常酸素環境時と低酸素環境時の 20 分毎の総体動量

個体 A の低酸素環境時と通常酸素環境時の体動量の差が顕著に表れている 125 時間後周辺に着目して，個体 A の 124 時間から 132 時間までの 8 サイクル分の体動量を 5 秒毎に合計したものを図 5 に示し，低酸素環境時の時間帯を青く塗りつぶしている．これらの図は抽出した 8 時間内での最大値で規格化した．

124-128 時間を見ると低酸素環境時には大きな体動が起きていない．また，その後の 128-132 時間を見ると，低酸素環境となって 10 分程度で体動が減少しており，低酸素環境が抑制される可能性が示唆された．しかしながら，このような低酸素環境による体動抑制は昨年までのデータと合わせて 6 個体中 2 個体で確認されているものの計測個体すべてで確認されたわけではなく，個体 A においても他の時間帯では顕著な違いが見られていないため，18%低酸素環境時に必ず生じる反応ではないと考えられる．

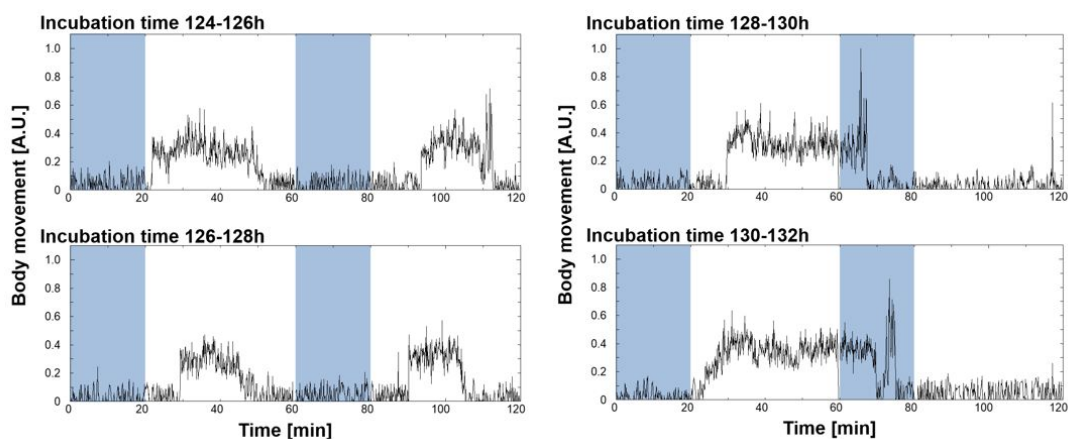


図 5 個体 A における 124-132 時間の体動量

(3) 今後の展望

本研究では，1) テンプレートの自動更新を組み込み，各システムを統合することによって，解析作業の大幅な削減を実現でき，多くの実験データにも対応できるようになった．また，フィルタリング処理を改良することで，体動量計算精度を向上することができた．今後は複数の実験環境を整えて，様々な低酸素環境でのデータを得たいと考えている．2) 20 分-40 分を 1 サイクルとする 18%間歇性低酸素環境では，低酸素環境が体動を抑制する可能性も示唆されたが，体動に影響を与える可能性は低いと考えられる．この推論はあくまでも今回の低酸素環境に対してであり，今後の実験で酸素濃度や間歇性低酸素環境のサイクルを変化させて，調査を続けていきたい．

付記：本研究は函館高専 生命倫理審査委員会にて承認されていることを付記する．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ryo Furukawa, Yuya, Chiba, Yoshiko Maruyama, Kenji Moriya, and Masahiro Nakagawa	4. 巻 25
2. 論文標題 Brain Activity during Imagining Music: Does Accuracy of Imagining Correlate to Degree of Relaxation?	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Biomedical Soft Computing and Human Sciences	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.24466/ijbschs.25.1_1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kenji Moriya, Yuya Chiba	4. 巻 -
2. 論文標題 Measurements of Body Movement in Chick Embryos During Early Stages	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the 9th IIAE International Conference on Industrial Application Engineering 2021	6. 最初と最後の頁 116-122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12792/iciae2021.022	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hiromu Sato, Yuya Chiba, Kenji Moriya, and Masahiro Nakagawa	4. 巻 -
2. 論文標題 Relationship between Creative Inspiration, Self-Evaluated Satisfaction and Brain Activity through Simplified Music Composition	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the 9th IIAE International Conference on Industrial Application Engineering 2021	6. 最初と最後の頁 123-129
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12792/iciae2021.023	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yokota Asahi, Tenma Koki, Tiba Yuya, Moriya Kenji	4. 巻 -
2. 論文標題 Growth and Body Movement Analysis Using Image Processing in Early Stages of Chick Embryos Under Hypoxic Environment	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the 7th IIAE International Conference on Industrial Application Engineering 2019	6. 最初と最後の頁 9-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.12792/iciae2019.005	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Kenji Moriya, Yuya Chiba
2. 発表標題 Measurements of Body Movement in Chick Embryos During Early Stages
3. 学会等名 The 9th IIAE International Conference on Industrial Application Engineering 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木元雅也, 千葉裕弥, 森谷健二
2. 発表標題 間歇性低酸素環境下における体動量の影響調査
3. 学会等名 日本福祉工学会九州支部大会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Asahi Yokota, Koki Tenma, Yuya Chiba, Kenji Moriya,
2. 発表標題 Growth and Body Movement Analysis Using Image Processing of Chick Embryos in Hypoxia Environment
3. 学会等名 The 7th IIAE International Conference on Industrial Application Engineering 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 横田朝陽, 千葉裕弥, 森谷健二
2. 発表標題 ニワトリ胚の体動計測を目的とした三次元計測システムの開発
3. 学会等名 日本福祉工学会第23回学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------