

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H04275

研究課題名（和文）超多チャンネル生体信号計測と分布定数回路モデルに基づくゼブラフィッシュの情動評価

研究課題名（英文）Emotion evaluation of zebrafish based on ultra-multi-channel biosignal measurement and distributed constant circuit model

研究代表者

曾 智（Soh, Zu）

広島大学・先進理工系科学研究科（工）・助教

研究者番号：80724351

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000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が発する運動と呼吸に起因する生体電気信号に着目し、自由遊泳中のゼブラフィッシュから生体電気信号が計測可能なシステムを開発した。そして、生体電気信号から生理状態と運動状態を同時抽出し、生理・運動状態から恐怖／不安状態、欲求状態、ニュートラル状態という3種類の情動状態を識別できることを示した。本手法はカメラシステムを必要としないため光環境や水槽背景を問わず運動が計測可能という利点がある。また、生体電気信号から生理状態と運動状態を同時計測という本研究独自のアイデアには、これまで運動解析に依拠してきた魚の情動評価法を一新する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

自由遊泳状態でゼブラフィッシュの生体電気信号を計測する新たな技術が開発できたことにより、呼吸と全身運動と生体電気信号との関係を世界で初めて明らかにできる可能性がある。また、運動解析によって主に急性的な恐怖情動を評価してきた従来研究に対し、新たに呼吸状態が観測できるようになったため、多種多様な情動に対する生理状態と運動状態の応答を体系的に明らかにできる可能性がある。以上より、本成果は創薬分野において情動に作用する化合物候補のスクリーニング法の開発や、情動発現のメカニズムを探索するための方法論として脳科学分野の発展に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In this research, we focused on the bioelectrical signals generated by the locomotion and respiration of zebrafish, and developed a system to measure these signals from freely swimming zebrafish. We demonstrated that physiological and locomotor states can be simultaneously estimated from the bioelectrical signals, and used to identify three types of emotional states: fear/anxiety, appetitive, and neutral states. One advantage of this method is that it does not require a camera system, allowing for locomotion measurement regardless of the lighting environment or tank background. Furthermore, the unique idea of simultaneous measurement of physiological and locomotor states from bioelectrical signals in this study has the potential to revolutionize the evaluation of fish emotions, which has traditionally relied on locomotion analysis.

研究分野：知能機械，医用電子工学

キーワード：生体電気信号 感性情報学 ゼブラフィッシュ 機械学習

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、情動発現に関する神経基盤の理解や、PTSD に代表される精神疾患に対する薬理的治療法の開発のためのモデル生物としてゼブラフィッシュというインド原産の熱帯魚が広く用いられている[Caramillo et al. 2015]. ゼブラフィッシュの情動状態は主に運動によって評価されているが、突進と転回の不規則な反復という明確な運動変化を呈示する急性的な恐怖情動が主な評価対象とされており、運動変化が明確でない慢性的な不安やポジティブな情動状態に関する評価はほとんどなされていない。また、運動と情動状態を1対1で関連付けることが困難な場合が存在し、たとえば、疲労や休息による運動の低下は恐怖情動状態に由来する無動状態と混同される可能性がある。そのため、多種多様な情動状態に対する評価法を確立することの重要性と必要性が生物学分野の専門家から指摘されている [Kalueff et al. 2012].

人間の場合、生理状態を反映する指標を用いて情動評価を行った事例が多数報告されている。たとえば、研究代表者らは連続血圧と指尖容積脈波から推定した末梢血管粘弾性から人間の匂い感覚を評価した[IEEE EMBC'18 2018]. ゼブラフィッシュについても情動処理を担う手綱核などの各脳部位が環境刺激や内部刺激に応答し自律神経活動を修飾するため、人間と同様に情動状態は生理状態に反映される。そのため、生理状態が計測できれば、運動に反映されていない情動状態を評価できる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究ではゼブラフィッシュが発する呼吸と運動に起因する生体電気信号に着目した。そして、自由遊泳中のゼブラフィッシュの生体電気信号を計測できるか、生体電気信号から生理状態と運動状態が同時抽出できるか、生理・運動状態から多種多様な情動状態が評価可能かという3点を核心をなす学術的「問い」とし、これらを解決することにより世界初の生体電気信号に基づくゼブラフィッシュの情動評価法を開発することを試みた。具体的には、以下4項目の課題を解決することを本研究の目的とした。

- (1) ゼブラフィッシュが発する生体電気信号を自由遊泳下で計測可能な新たな技術の開発
- (2) 生体電気信号から呼吸と運動を推定するアルゴリズムの開発
- (3) 情動誘発物質を用いた実生物実験による生理・運動状態と情動状態との関係解析
- (4) 生理・運動状態を情動状態空間にマッピングする情動状態推定モデルの開発

3. 研究の方法

(1) ゼブラフィッシュが発する生体電気信号を自由遊泳下で計測可能な新たな技術の開発

ゼブラフィッシュの呼吸波を計測するため、多電極呼吸波計測システムを開発した。本システムは計測水槽と生体アンプ、信号処理 PC で構成されており(Fig. 1(a) 参照)、非接触、かつ、非拘束条件の下でゼブラフィッシュの呼吸波と運動が同時計測できる。

計測水槽には、ゼブラフィッシュ1個体が必要とする水量を容れることができる直方体(横 210×縦 140×高さ 65 mm)を用いた。なお、水槽底面は二重底とし、上底面には14枚の計測電極用固定板(Fig. 1(b) 右)を嵌入し、下底面には参照電極を固定するためのくぼみを設けた。そして、上底面の計測電極用固定板に計126個のAg-AgCl電極(Fig. 1(b) 参照)を配置し、下底面のくぼみに基準電極と参照電極を固定した。このように計測電極と参照電極の距離を空けることで参照電位が呼吸波の影響を受けないようにした。また、計測電極の上にガーゼ(18×120 mm)を敷くことにより、魚の接触ノイズを防いだ。

計測信号の増幅には微弱な生体電気信号(μV オーダー)が計測可能な生体アンプ(EEG-1200, 日本光電工業, 東京, 日本)

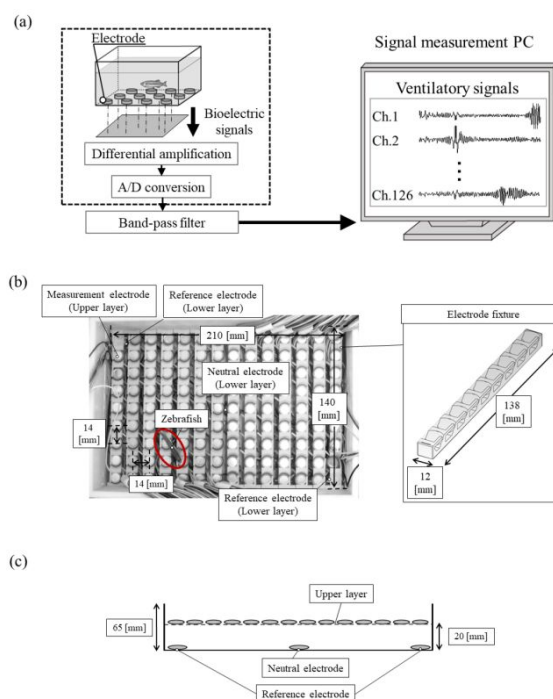


Fig. 1: Multi-electrode ventilatory signal measurement system. (a) shows the system configuration. (b) shows overhead view of the measurement aquarium and an arrangement of the 126 measurement electrodes. (c) shows cross-sectional view of the measurement aquarium.

を用いた．増幅された信号はサンプリング周波数 100 Hz で信号処理 PC に取り込み，3 次のバンドパスフィルタ（低域カットオフ周波数 0.5 Hz，高域カットオフ周波数 10 Hz）で濾波した．そして，呼吸波が含まれる周波数帯域の信号を抽出するとともに，次項に示すアルゴリズムに基づき遊泳運動を推定した．

(2) 生体電気信号から呼吸と運動を推定するアルゴリズムの開発

多電極呼吸波計測システムを用いて計測した呼吸波について，その発生源を追跡することで魚の運動を推定した．呼吸波の発生原理の詳細は明らかになっていないが，鰓運動とともに体内と体外をイオンが流入し，これが移流拡散することで生じると考えられている．予備実験を行った結果，ゼブラフィッシュの頭部と尾部の2箇所を中心に電場の時間変化が観測された．そこで，次式に示すようにイオンの移流拡散方程式のグリーン関数を2つ重ね合わせて呼吸波の瞬時空間分布を表現した．

$$V(x, t; \theta(t)) = V(x, t - \Delta t) + \sum_{s=1}^2 q_s(t) G_s(x, \Delta t; \theta_s(t)) \quad (1)$$

ここで， $\theta(t) = (\theta_1(t)^T, \theta_2(t)^T)^T = [\{X_1^T(t), q_1(t)\}, \{X_2^T(t), q_2(t)\}]^T$ であり， $X_s^T(t) \in \mathbb{R}^2$ は信号源の位置座標， $q_s(t)$ は瞬時振幅， s は信号源に与えられるインデックス， $\Delta t > 0$ はサンプリング間隔， $V(x, t - \Delta t)$ は時刻 $t - \Delta t$ における位置 $x \in \mathbb{R}^2$ での呼吸波の電位を表す．移流拡散方程式のグリーン関数 $G_s(x, \Delta t; \theta_s(t))$ は次式で与えられる．

$$G_s(x, \Delta t; \theta_s(t)) = \frac{1}{4\pi D \Delta t} \exp\left[-(x - X_s(t))^T \Sigma^{-1} (x - X_s(t))\right] \quad (2)$$

ここで D は拡散係数， $\Sigma = 4D\Delta t I$ は拡散行列， $I \in \mathbb{R}^{2 \times 2}$ は単位行列を表している．

魚の運動を追跡するため，最急降下法を用いて呼吸波の瞬時空間分布モデルを実測の呼吸波 $V(x, t)$ にフィッティングして $\theta(t)$ を推定した．これにより魚の位置は，魚の位置 $X_s(t)$ の平均位置 $\bar{X}(t) = (X_1(t) + X_2(t))/2$ で与えることができる．

ここで，2つのグリーン関数($s = 1, 2$)は頭部，もしくは，尾部の信号源を近似するが，そのどちらを近似するかはフィッティングに与える初期値に依存するため，時間 t で一貫しない．この問題を解決するため，水流がほとんどない計測水槽の中では魚の移動方向が頭部方向とほぼ一致すると仮定し，推定位置ベクトル $\bar{X}(t)$ を時間微分して移動方向ベクトルを求め，その前方と後方に位置する2つのグリーン関数をそれぞれ頭部と尾部に割り当てた．以上により，呼吸波の瞬時振幅は $q_s(t)$ ，頭部方向ベクトルは $X_1(t)$ と $X_2(t)$ のなす角から推定することが可能になった．

(3) 情動誘発物質を用いた実生物実験による呼吸・運動状態と情動状態との関係解析

生理・運動状態と情動状態との関係を解析するため，恐怖/不安状態を誘起する警報物質と欲求/期待状態を誘起するアルコールを用いた実生物実験を行った．

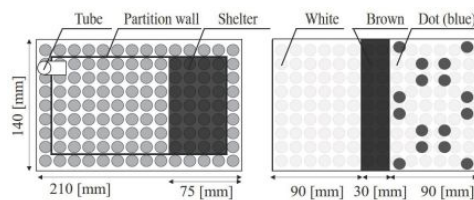
恐怖/不安状態誘起実験

警報物質は魚の表皮から抽出することができる．この警報物質は捕食者の攻撃などにより，表皮細胞が壊れることで水中に放出され，魚の嗅覚を刺激し，仲間に危険を知らせる役目を担っているため，恐怖/不安状態を人為的に誘発するために用いられている[Parra et al., 2009]．

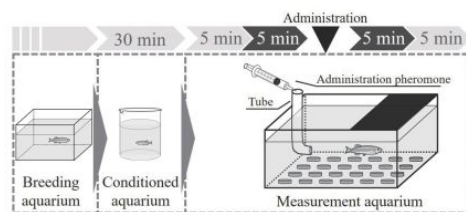
恐怖/不安状態誘起実験では，Fig. 2 (a)左に示すように，計測水槽にシェルターと警報物質を投与するためのチューブを設置した．そして，Fig. 2 (b)に示すように，ゼブラフィッシュを馴化水槽において30 min 馴化させ，静かに計測水槽に投入した．ゼブラフィッシュ投入の10 min 後，警報物質1/100 匹分を投与し，投与前5 min と投与後5 min を解析対象とした．

欲求/期待状態誘起実験

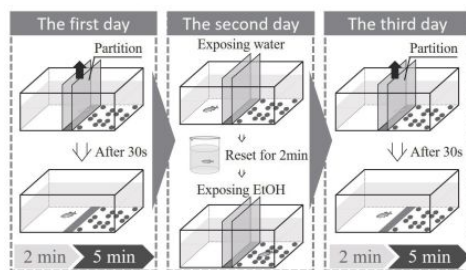
ゼブラフィッシュはエタノールに対して高い嗜好性を示すことが行動実験から明らかにされている[Priya et al. 2011]．水槽中の特定の区画でエタノールに暴露された個体は，その後エタノールが提示されなくても，その区画内に長く滞在するという場所選好性を示す．これはエタノールに対する再摂取欲求が引き起こされているものと示唆されているため，期待状態を人為的に誘発するための化学物質として用いることができる．



(a) Experimental environment in the measurement aquarium



(b) Flow of the experiment to administer the alarm pheromone



(c) Flow of the conditioned place preference method

Fig. 2. Experimental protocols

欲求 / 期待状態誘起実験では, Fig. 2 (a)右に示すように, 計測水槽の内部を 3:1:3 の比率で 3 区画に分割し, それぞれ白, 茶, 点の模様をつけた. そして, Fig. 2 (c)に示すように, 実験は連続した 3 日間を通して行った. 1 日目は, ゼブラフィッシュを水槽真ん中の茶色区画に投入し, 30 s 後に仕切りを除去し, その 2 min 後に 5 min の初期場所選好性を計測した. 2 日目は, 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 暴露した. 3 日目は, 1 日目と同様の手順で 5 min の場所選好性を計測した.

呼吸・運動状態と情動状態との関係解析を行うため, (3)項に基づいて推定した運動と呼吸から遊泳速度, 静止確率, 呼吸波のピーク周波数, および, 各指標の標準偏差を求めた. そして, welch の *t* 検定を用い, ニュートラル状態, 恐怖 / 不安状態, 欲求 / 期待状態における各指標の平均を比較した.

(4) 呼吸・運動状態を情動状態空間にマッピングする情動状態推定モデルの開発

(3)項で求めた呼吸・運動状態指標から情動状態を推定した. まず, 6 つの呼吸・運動状態指標について主成分分析を行い, 呼吸・運動状態の主成分軸を抽出した. そして, 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, Fisher の線形判別分析と確率ニューラルネットワーク Log-Linearized Gaussian Mixture Network (以下, LLGMN と略記する) [Tsuji et al., 1999] という非線形識別器を用いて情動状態の識別を行った. 識別精度は leave-one-fish-out cross-validation により評価した.

4. 研究成果

以下, 研究目的の項目別に研究成果を述べる.

(1) ゼブラフィッシュが発する生体電気信号を自由遊泳下で計測可能な新たな技術の開発

カフェインを投与しなかった個体と 100 mg/L 投与した個体について推定した呼吸波例を Fig. 3 (a), (b)にそれぞれ示す. 図より, 頭部 (オレンジ) と尾部 (青) の呼吸波の位相はおおむね反転していることが分かる. この結果は, 従来報告と一致する [浅野, 1987; Vulesevic, 2006]. また, カフェイン投与群は呼吸波の周波数が増加していることが確認できる. Fig. 3 (c) に 6 個体から計測された呼吸波の平均ピーク周波数を示す. カフェインを投与しなかった群の呼吸周波数は平均 4.4 Hz, 100 mg/L のカフェインを投与した群の呼吸周波数は平均 6.7 Hz であった. Student の *t* 検定 (Bonferroni 法で調整) を用いて比較した結果, カフェインを投与しなかった群に対してカフェイン 100 mg/L 投与群の呼吸周波数は有意 ($p < 0.01$) に増加していることが明らかになった. この結果は, 提案法によりカフェインの薬理作用 [Papadeli, 2002] が検出可能であることを示している.

(2) 生体電気信号から呼吸と運動を推定するアルゴリズムの開発

Fig. 4 (a)に提案法と動画解析から推定された遊泳軌跡を示す. 赤線は提案法による推定位置結果, 青線は動画解析結果を示している. 図より, ゼブラフィッシュは主に水槽の縁を回遊しており, 提案法は動画解析に近い遊泳軌跡を推定できていることが示された. 提案法と動画解析から推定された位置間のユークリッド距離を各個体でサンプリング時刻ごとに求め, これを位置推定誤差と定義した. Fig. 4 (b) より, 頭, 中心, 尾のいずれも位置推定誤差の平均は約 8 mm であることが明らかになった. ゼブラフィッシュの体長は約 30 mm ~ 40 mm であるため, この位置推定誤差は魚の体長の約 1/5 ~ 1/4 程度に相当する.

また, 頭部と尾部の位置から頭部方向ベクトルを推定し, 動画解析と提案法の頭部方向ベクトルがなす角の差を推定角度誤差と定義し, その推定精度を検証した結果, 頭部方向ベクトルの角度推定誤差の平均は約 8.99 deg であることが明らかになった. 魚が大きく転回する瞬間に遊泳速度が 0 に近づき, 遊泳速度ベクトルと頭部方向

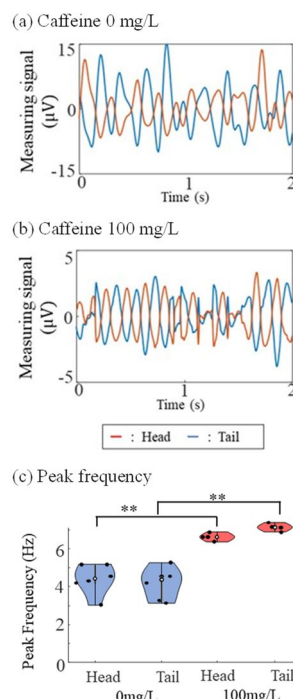


Fig. 3 Ventilatory frequencies responding to caffeine

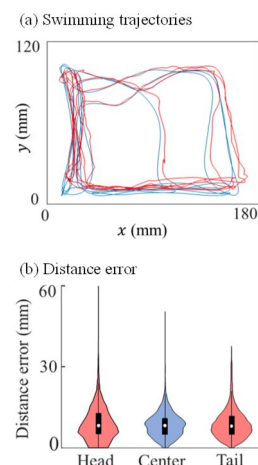


Fig. 4. Position estimation results

ベクトルが逆方向を向くときがあるため、180 deg という大きな誤差が現れることがあったが、ほとんどの時間帯では高い精度で推定できることが示された。

以上より、提案システムはカメラと同等の精度で呼吸波から魚の運動を推定できることが明らかになった。

(3) 情動誘発物質を用いた実生物実験による生理・運動状態と情動状態との関係解析

Fig. 5 (a)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。図において、各指標は投与前5 minの値を用いて平均0、分散1の正規分布に標準化している。図より、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、不快状態に関係する行動を提案指標により検出できる可能性を示している。

Fig. 5 (b)に欲求/期待情動誘発実験における1日目と3日目の評価指標を示す。各指標は1日目の値を用いて平均0、分散1の正規分布に標準化している。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。

(4) 呼吸・運動状態を情動状態空間にマッピングする情動状態推定モデルの開発

各情動状態について呼吸・運動指標の第1と第2主成分スコアをプロットした図をFig. 6 (a)に示す。この主成分平面において、恐怖/不安状態とニュートラル状態は比較的分布が纏まっているのに対し、欲求/期待状態は恐怖/不安状態とニュートラル状態にまたがって広く分散していることが明らかになった。自然界において恐怖/不安状態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、欲求/期待状態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。

Fig. 6 (b)にLLGMNの識別結果を示す。ニュートラル状態、恐怖/不安状態、欲求/期待状態について最良のFスコアはそれぞれ0.84、0.76、0.59であった。このFスコアは、第4主成分を追加したときに達成された。第4主成分の最大の主成分負荷量は呼吸ピーク周波数の標準偏差であったため、呼吸指標が欲求/期待状態の識別に重要であることが示された。

本研究課題により、ゼブラフィッシュの運動と呼吸の同時計測が可能になり、これを用いた情動推定に世界で初めて成功した。今後はまだ取り扱っていない情動状態に対しても同様のアプローチを適用し、ゼブラフィッシュの情動状態を解明していく予定である。

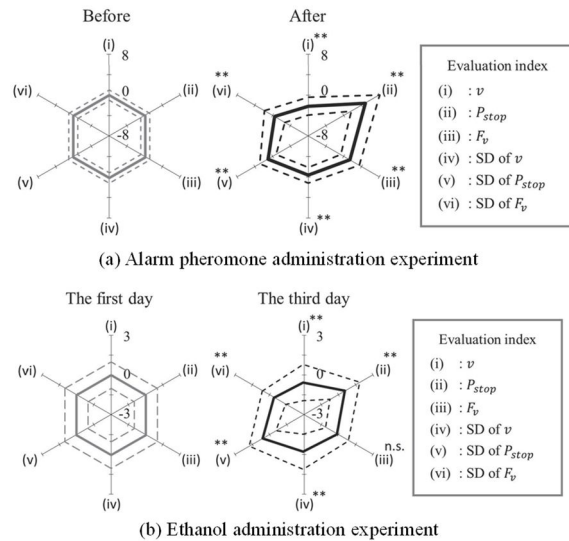
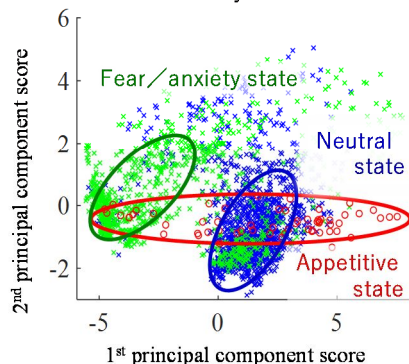


Fig. 5. Ventilatory and motion indices: v , P_{stop} , F_v stands for swimming speed, probability of stop, and ventilatory frequency, and SD is abbreviation of standard deviation. $** p < 0.01$.

(a) Emotional states projected on principal component plane of motion and ventilatory indices



(b) Classification results of emotional states using log-linearized Gaussian mixture network

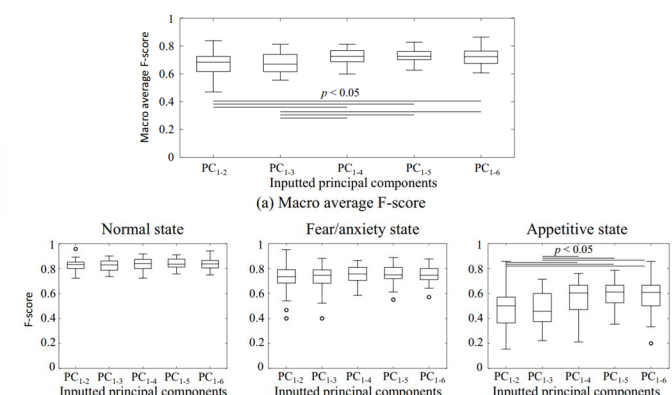


Fig. 6. Mapping and classification results of emotional states.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Soh Zu, Matsuno Motoki, Yoshida Masayuki, Furui Akira, Tsuji Toshio	4. 巻 11
2. 論文標題 Measurement of emotional states of zebrafish through integrated analysis of motion and respiration using bioelectric signals	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 187
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-80578-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Yoshida Masayuki	4. 巻 244
2. 論文標題 Recording the ventilation activity of free-swimming zebrafish and its application to novel tank tests	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physiology & Behavior	6. 最初と最後の頁 113665 ~ 113665
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.physbeh.2021.113665	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 吉田 将之
2. 発表標題 自由行動中のゼブラフィッシュからの呼吸計測と新奇場面テストへの応用 Recording of respiration wave from free-moving zebrafish and its application to the evaluation of emotional states
3. 学会等名 日本動物学会 第92回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masayuki Yoshida, Zu Soh
2. 発表標題 Monitoring the ventilation activity of free-swimming zebrafish and its application to novel tank tests
3. 学会等名 日本比較生理生化学会 第43回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 丸子 紗季, 原田 祐希, 曾 智, 吉田 将之, 辻 敏夫
2. 発表標題 呼吸波の空間分布モデルに基づくゼブラフィッシュの遊泳位置推定
3. 学会等名 第7回ゼブラフィッシュ・メダカ創薬研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Saki Maruko, Zu Soh, Shin Wakitani, Masayuki Yoshida, Toshio Tsuji
2. 発表標題 Estimation of Swimming Position of Zebrafish using a Spatial Distribution Model of Ventilatory Signals
3. 学会等名 2022 IEEE International Conference on Bioinformatics and Biomedicine (BIBM) (国際学会)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Yoshida, M	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Singapore	5. 総ページ数 189
3. 書名 Death-Feigning in Insects, Mechanism and Function of Tonic Immobility	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生体システム論研究室ホームページ, 研究紹介 https://bsys.hiroshima-u.ac.jp/research/kansei-brain-group/16636</p>
--

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
研究分担者	辻 敏夫 (Tsuji Toshio) (90179995)	広島大学・先進理工系科学研究科(工)・教授 (15401)	
研究分担者	吉田 将之 (Yoshida Masayuki) (70253119)	広島大学・統合生命科学研究科(生)・准教授 (15401)	
研究分担者	松下 光次郎 (Matsushita Kojiro) (30531793)	岐阜大学・工学部・准教授 (13701)	

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