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

横田 朝陽^a 天満晃希^a 千葉裕弥^a 森谷健二^a

^a函館工業高等専門学校

1. はじめに

本研究では、ニワトリ胚をヒト胎児の生体計測モデルとして重要な成長パラメータである体動を調査している。この成長パラメータを調査する方法として画像処理が有効だと報告されてきた(1)。通常成長時における体動パターンについてはある程度明らかになってきた。また、慢性低酸素環境下では通常環境下に比べ、体動量が減少しており成長が遅れていることが報告されてきた(2)。本研究ではこの慢性低酸素環境下での成長の遅れと体動に着目し、画像処理を用いた 1) ニワトリ初期胚の大きさの二次元的測定と 2) 体動解析プログラムの改良について検討を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 孵卵, 酸素環境, 撮影

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いての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ぺ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。

2.2 成長度解析

胚の成長度解析の手順を Fig. 1 に示す。孵卵 72 時間(3 日令)から孵卵 144 時間(6 日令)の間, 1 時間ごとに最初の 1 フレームを抜き出しニワトリ胚の輪郭をプログラム上で抽出した。その後輪郭内を白色に塗りつぶし, この白色部分のピクセル数をプログラムでカウントすること

Fig.1. Procedure of area calculation

Fig.2. Calculation of chick position

で 2 次元的にニワトリ胚の成長を算出した。これらの手順を酸素濃度 21%(通常環境), 15%, 10%環境下で行った。

輪郭抽出の際に Canny 法を用いたがそれぞれ時間ごとに適切な閾値が違ったため, 手動で閾値を決定した。

2.3 体動解析

本研究で従来使用していた体動解析プログラムでは, 「最も激しく動く」と言う理由からニワトリ胚の頭をテンプレートとしたテンプレートマッチング法を用いていた(1)。今回, 胚全体の動きについて解析するために胚の重心座標の変化から体動解析をするプログラムを作成した。Fig.2 に今回作成したプログラムの手順を示す。動画から 1 フレーム抜き出し, 胚全体をテンプレートとしてテンプレートマッチング, マッチングエリア内を R(赤)成分でグレースケール化, 2 値化胚を識別, 胚部分の重心検出を行い, 体動量計算を行った。これらの手順を 10 フレームに 1 回行った。ニワトリ胚の成長に伴いテンプレートマッチングに誤差が出るので, 5 分毎にテンプレートを更新した。また, 卵内における絶対位置よりも体動の移動量とパターンが重要であることから 5 分間の平均座標を中心とした相対移動量を求めた。

Growth analysis and body movement analysis using image processing of embryos in hypoxia environment

Asahi Yokota^a, Koki Tenma^a, Yuya Tiba^a, Kenzi Moriya^a

^aNational Institute of Technology Hakodate Callege

3. 結果と考察

3.1 成長度解析

酸素濃度 10%, 15%, 21% 環境下での 3 例で解析を行った。結果を Fig.3 に示す。酸素濃度 15% 環境下において孵卵したニワトリ胚が孵卵開始 128 時間で死亡したため表示時間を 130 時間としている。

孵卵開始 100 時間まではすべての酸素濃度環境下で成長度合いの大きい差異は見られなかった。酸素濃度 21% 孵卵胚について、孵卵開始 100 時間を境に急激に成長した。酸素濃度 15% 孵卵胚について、酸素濃度 21% 孵卵胚よりは小さいが徐々に面積が大きくなっている。酸素濃度 10% 孵卵胚について、孵卵開始 115 時間以降は胚の面積は一定であり成長が見られなかった。

ニワトリ胚は通常環境下に比べ低酸素環境の体動が少ないという報告がある(1)。また、過去の体動解析結果から体動が活発になる時間が孵卵開始 110 時間であり(2)、ニワトリ胚が急激に成長する時間も同じ孵卵開始 110 時間である。以上の事より、体動解析を用いることで低酸素症における胚の成長遅れを同時に判定できると考えられる。

3.2 体動解析プログラムの改良

計測した体動解析結果と従来の体動解析結果を Fig.4 に示す。今回の解析結果では多くても 2[pixel]程度なのに対し、従来の解析結果では 8[pixel]程度動いている。このことから頭の動きに対し重心はあまり動かないのではないかと仮説を立て、頭と重心の座標変化を調査した。結果を Fig.5 に示す。縦軸はそれぞれの y 座標、横軸は x 座標を表している。重心は一定の場所にとどまることが多く頭は周期的な動きをすることが Fig.5 よりわかる。このことからニワトリ初期胚の体動は重心を中心とした体動であり、重心位置の算出では体動解析は難しいことがわかった。

4. おわりに

本研究ではニワトリ初期胚の成長解析と体動解析プログラムの改良を試みた。

成長解析についてニワトリ胚は低酸素環境下で成長が遅れること、急激に成長する時間と体動が活発になる時間が同じことがわかった。しかし各酸素濃度に対する解析例が 1 例のみと少なく今後計測回数を増やす必要がある。

体動解析プログラムの改良について、重心位置の計測による体動解析を試みたがニワトリ胚の体動が重心を中心とした体動であるため重心検出では体動解析が難しいことがわかった。

Fig.3. Growth comparison

Fig.4. Comparison of analysis data

Fig.5. Head and center of gravity locus

付記及び謝辞

本研究は本校生命倫理審査委員会の承認を受けて行われた事を付記する。また、本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金(K.M. No. JP16K06397)を受けて行われた。

文 献

- (1) 中田小春, 千葉裕弥, 森谷健二:「任意酸素濃度制御システムの改善と間歇性低酸素環境下におけるニワトリ胚の体動解析」, 函館工業高等専門学校紀要, 第 52 号, pp.5-8, 2017
- (2) 久保皓哉, 古川 暲, 森谷健二:「疾患時におけるニワトリ初期胚の体動解析」, 函館工業高等専門学校紀要, 第 48 号, pp.29-32, 2014