

インピーダンス法による初期胚の瞬時心拍数計測

電気・情報系（電気電子工学科） 小師 隆

1. 緒言

多くの哺乳類動物の胎児が母親の胎内で発育するのと異なり、鳥類胚は、母体から分離・独立しており、卵殻を介して直接外部環境に曝されている。このため、母体の影響を受けずに個体発生途中の胚の生理機能を探ることができる。また、卵殻内外の環境を容易に広範囲に、そして持続的に変えることが可能であるため、様々な環境への適応を見ることがもできる。従って、鳥類卵は生体の生理機能の計測という立場から考えると、格好の生体モデルである。

鳥類卵の呼吸はガス交換により行われ、ガス交換・輸送を直接担っている血液は、心臓の拍動によって循環系を流れるので、循環機能の解明においても、環境変化に対する応答を知る上でも、心拍数は重要な生理学的情報の一つである。

これまでの研究では、主に孵卵開始から10日以降の胚についての測定が行われてきたが、それ以前の初期胚に対しても興味をもたれるところである。

現在、卵の胚の心拍数計測には、卵殻に針電極を刺入して心臓の収縮に伴う電気信号を記録する心電図(ECG)法や、心臓の拍動による卵殻の微小振動をオーディオ・カートリッジやレーザ変位計、 piezo 薄膜素子により検出する心弾動図(BCG)法、さらに心拍動に伴う圧力伝搬波を卵殻表面からコンデンサマイクロフォンで検出するアコースト・カーディオグラム(ACG)法などがある。また、これら生体の能動的特性を測定する方法のほか、生体に外部より物理量を与え、その応答を見らるといった、生体の受動的特性を測定する方法も考えられる。それらの中に、卵殻に針電極を刺入して電流を流し、心臓の拍動によるインピーダンス変化を検出するインピーダンス法(ICG)がある。

しかし、研究・開発されている循環機能情報の取得方法の中で、BCG法、ACG法では孵卵初期の胚の心拍動は十分に大きくないので、計測は困難である。そこで本研究では、心臓が形成される孵卵初期の胚に対して、電極を3本用いるECG法より簡便なインピーダンス法を用いて瞬時心拍数を長期間計測し、平均心拍数の成長パターンと瞬時心拍数の変動特性を調べることが目的とする。

2. 実験

2.1 計測方法

インピーダンス変化を検出するためには2本の電極が必要であり、この電極として、長さ25mm

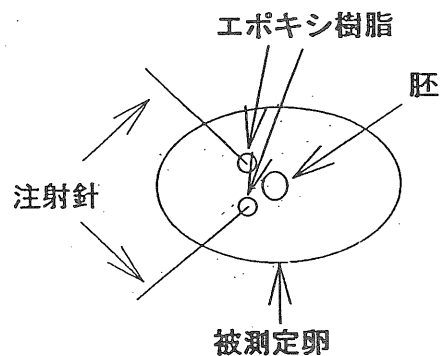


図1 針電極の刺入位置

の注射針を用い、針の先端を4mm～5mm程直角に曲げ刺入する。刺入した針電極はエポキシ樹脂系の接着剤で固定する。針電極は、卵の下からライトを当てて検卵(胚の有無及び位置を確認する作業)を行い、卵殻表面に胚の位置を記入して、それを挟むように刺入する。電極の刺入位置を図1に示す。

実際に測定する時には孵卵器内に被測定卵を設置して測定するので、胚の周囲の温度は約38℃に保たれる。しかし、被測定卵に針電極を刺すのは室内温度で行うため、一時的に卵の温度は下がる。そのため、孵卵器内に移してから約30分から1時間以上経過してから測定を開始する。

2.2 計測システムの構成

卵殻に刺入した針電極をインピーダンス・コンバータに接続し、一定電流を流すことにより、心拍動に起因したインピーダンス変化に対応した電圧変化信号が出力される。この出力信号は、きわめて小さいので生体用増幅器で約40～60dB増幅する。生体用増幅器により増幅された信号は、電源ノイズなどの雑音成分を含んでいるので、アナログフィルタを用いて1Hz以下、10Hz以上の周波数成分をカットする。サンプリング周波数50Hzで信号を取り込み、コンピュータによって記録・処理を行う。ここで、サンプリング



図 2 ICG 計測システム

周波数を50Hzとしたのは、サンプリング周波数をさらに高くすればデジタル化が細かく行われ、波形情報が忠実に取り出せるが、データ量が膨大になるのを避けるためである。また、これらの作業はオシロスコープにより信号波形を確認しながら行っている。システム全体の構成図を図2に示す。

2.3 波形処理と瞬時心拍数計算

測定して得られたデータはコンピュータを用いて処理を行い、瞬時心拍数の計算を行う。

ICG波形は図3に示すような波形である。波形から瞬時心拍数を求めるには、心拍動によるピーク間隔を求めることにより算

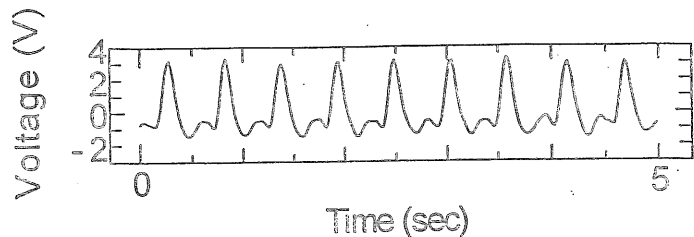


図 3 ICG波形 (日令3日目)

出できる。しかし、サンプリング周波数50Hz測定波形において、ピークの検出による心拍数計算では時間分解能が悪いため、ピークのずれによる誤差が大きくなる。そこで心

拍数計算の精度を上げるためにサンプリング定理によるsinc再現を行う。瞬時心拍数は、ピーク位置が求まれば計算できるので、波形の全てのサンプリング点にsinc再現を行う必要はない。まず、測定波形からピーク位置を求め、その前後の点をsinc再現により補間し、精度の良いピークを検出する。しかし、図4(a)に示す測定波形のようにピーク

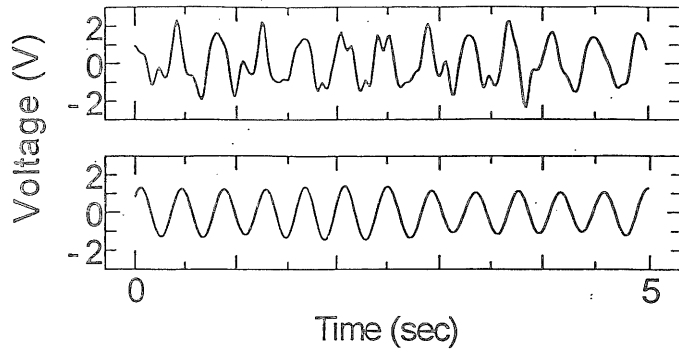


図4 フィルタ処理による波形
 (a) ピークのわかりにくい波形 (上段)
 (b) 処理後の波形 (下段)

の振幅が変化するものなどがあり、しきい値を決めてピークを検出することは難しい。従って、ピークを明確にするために、デジタルフィルタを掛ける。図4(b)にフィルタ処理後の波形を示す。瞬時心拍数計算の処理として、まず測定波形にデジタルフィルタを掛ける。次にフィルタによる周波数応答波形のピークを検出する。このピークはデータの差分の符号の変化により簡単に求めることができる。これにより求めたピークと前後のサンプリング点との間をsinc再現により補間する。sinc再現の式を次に示す。

$$x(t) = \sum_{-\infty}^{\infty} x(n\Delta t) \frac{\sin \omega_c(t - n\Delta t)}{\omega_c(n\Delta t)} \quad (2.1)$$

ここで、 Δt はサンプリング間隔、 $\omega_c = \pi / \Delta t$ はナイキスト (Nyquist) の折り返し周波数とよばれ、サンプリング周波数の2分の1に相当する。

具体的にはsinc再現により50Hzのサンプリング点の間を120点補間する。これによりサンプリング周波数50Hzのデータを6000Hzのデータに相当する分解能の波形再現ができる。この補間では式(2.1)の n を-50~50として行った。

sinc再現により得られた点から、前述の方法を用いてピークを求める。求められたピークからピーク間隔 Δp (秒)を求め次式から瞬時心拍数*ihr* (beats/min (拍動数/分))を計算する。

$$ihr = \frac{60}{\Delta p} \quad (2.2)$$

3. 結果及び考察

胚の心臓は日令2日目から活動を開始すると報告されているが、日令2日目の段階では、検卵による胚の位置確認が困難であるため、本研究では日令3日目から測定を開始することにした。その後、日令9日目までそれぞれの胚について30分間の計測を行った。

日令が3日目、4日目の計測波形はほとんどの胚において、長時間(30分間)にわたってきれいな周期波形が得られたが、5日目以降、日令が経つに従って胚の姿勢変化、体動などによるものと思われる影響により、周期的な波形は得られにくくなる傾向が見られた。そのため、針電極を刺す位置を胚から離したり、針を数本刺し、信号が取れる位置を探すといったことも行った。

図5は、日令3日目から8日目のそれぞれの測定データの一つについての瞬時心拍数とそのヒストグラムを表したものである。また、図6に平均心拍数の日令毎の変化を示す。

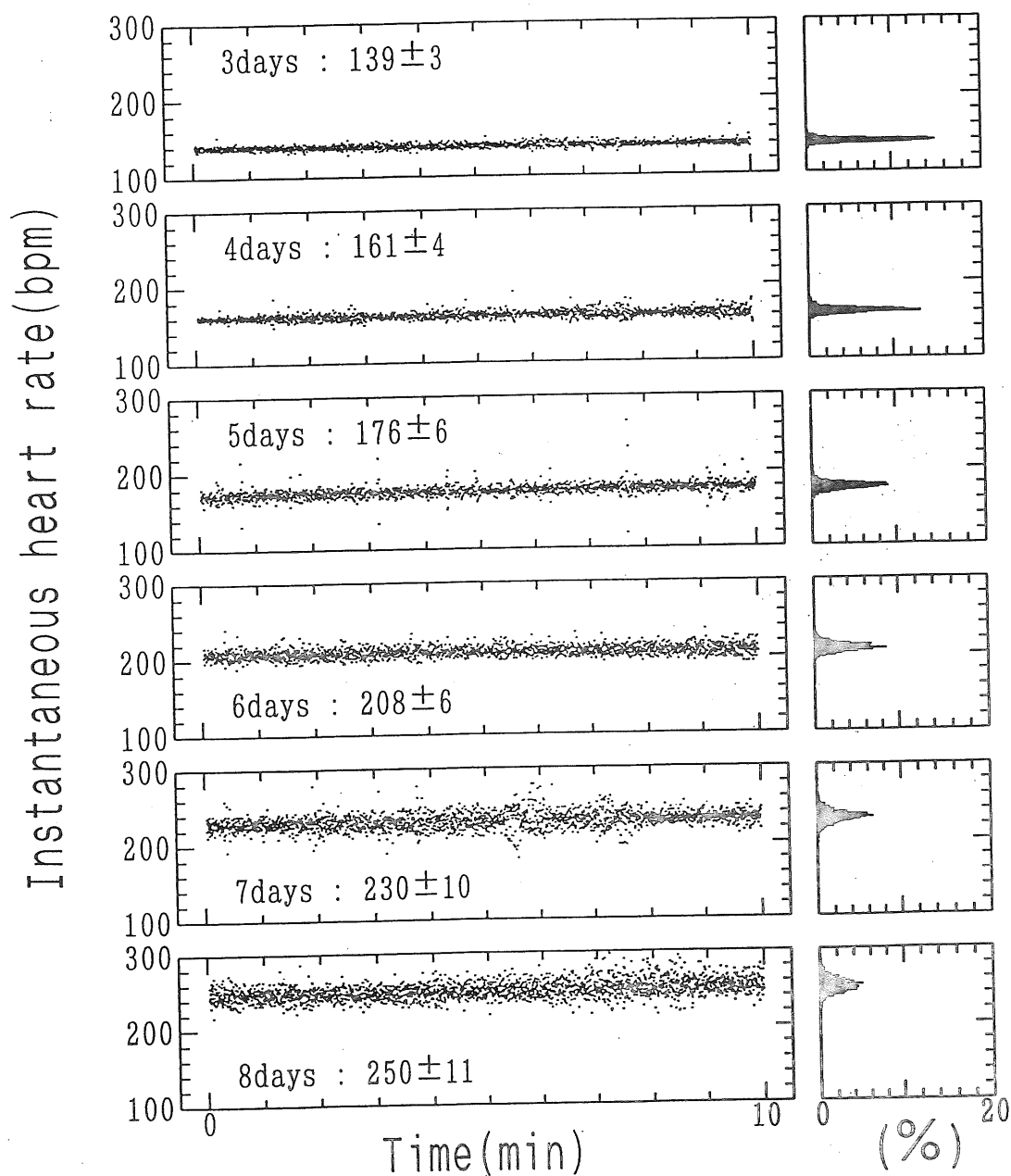


図5 瞬時心拍数計測例

図の黒丸は各測定卵の平均心拍数で折れ線が日令毎の平均心拍数を平均し、プロットしたものである。日令7日目ぐらいまで、平均心拍数は直線的に増加していることがわかる。また、孵化が近くなった胚の平均心拍数は、約280 (beats/min) 前後であるとの報告がなされているので、日令7日目の平均心拍数が230 (beats/min) 位と言うことを考えると3日目から7日目までの心拍数は急激に増加しているといえる。

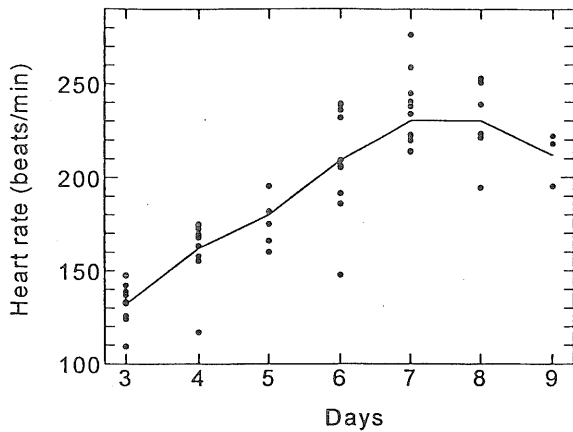


図 6 平均心拍数の日令変化

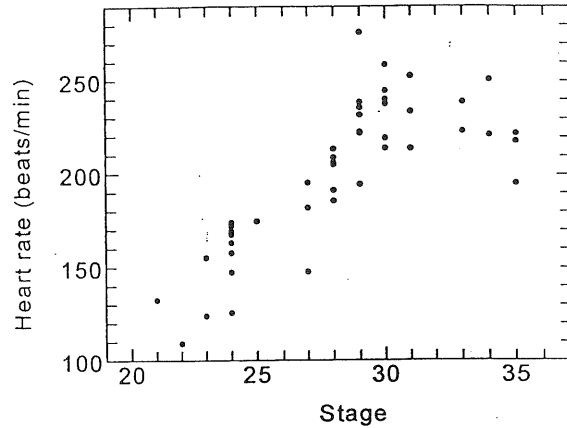


図 7 stage毎の平均心拍数の分布

胚の成長過程でどのように心拍数が増加していくのか、その変化についても調べた。胚の成長を見るのにstageを用いた。stageとは卵が孵化するまでの胚の成長の度合いを、1から45の段階に分けたものである。stageは測定後に卵殻を破り、中に浮いている胚を取り出し、顕微鏡を用いて参考資料と照らし合わせ確認した。しかし、日令3日目では胚が小さいために取り出すことが難しく、確認ができなかったものもある。個体差があるものの日令3日目から9日目のstageは、およそ21から35位に相当している。図7にstage毎の平均心拍数の分布を示す。stage毎の平均心拍数の分布は、図6に示した平均心拍数の日令変化と似た分布を示し、stageの小さい段階で心拍数は急激に増加している。

この理由として、初めは一本の管状のまっすぐであった心臓が、このころまでに2心房・2心室の形に成長すると同時に、胚も劇的に成長しているのではないかと考えられる。つまり、胚の急激な成長に伴って必要とする酸素量が増え、心臓から拍出される血液量も増えなくてはならないので、心拍数が急速に増加するということである。

4. 結 語

ICG法は、被測定卵に針を刺入し、電流を流すといった侵襲法ではあるが、現段階では初期胚の瞬時心拍数を計測する方法として有用であることを確認した。

今後、この方法を用いることにより、初期胚の温度、酸素濃度などの環境変化に対し瞬時心拍数にどのような影響を与えるかといった研究に発展できるものと考えられる。