

呼吸波計測に基づく小型魚類遊泳行動の非接触・非拘束計測

来山茂央*・曾智**・平野旭***
辻敏夫*・滝口昇****・大竹久夫**

Unconstrained and Noninvasive Measurement of Swimming Behavior of Small Fish Based on Ventilatory Signals

Shigehisa KITAYAMA*, Zu SOH**, Akira HIRANO***,
Toshio TSUJI*, Noboru TAKIGUCHI**** and Hisao OHTAKE**

Ventilatory signal is a kind of bioelectric signals reflecting the ventilatory conditions of fish, and has received recent attention as an indicator for assessment of water quality, since breathing is adjusted by the respiratory center according to changes in the underwater environment surrounding the fish. The signals are thus beginning to be used in bioassay systems for water examination. Other than ventilatory conditions, swimming behavior also contains important information for water examination. The conventional bioassay systems, however, only measure either ventilatory signals or swimming behavior. This paper proposes a new unconstrained and noninvasive measurement method that is capable of conducting ventilatory signal measurement and behavioral analysis of fish at the same time. The proposed method estimates the position and the velocity of a fish in free-swimming conditions using power spectrum distribution of measured ventilatory signals from multiple electrodes. This allowed the system to avoid using a camera system which requires light sources. In order to validate estimation accuracy, the position and the velocity estimated by the proposed method were compared to those obtained from video analysis. The results confirmed that the estimated error of the fish positions was within the size of fish, and the correlation coefficient between the velocities was 0.906. The proposed method thus not only can measure the ventilatory signals, but also performs behavioral analysis as accurate as using a video camera.

Key Words: behavioral analysis, bioelectric signals, small fish

1. はじめに

呼吸波は、魚の生命活動に伴って発生する生体電気信号の一種であり、呼吸の深さやリズムといった有益な情報を含んでいる。呼吸波の発生要因である呼吸は延髄に存在する呼吸中枢により調整されており¹⁾、呼吸波の周期と鰓蓋の開閉周期はほぼ一致している^{2),3)}ことから、呼吸波は呼吸中枢の状態を反映していると考えられる。また、鰓の血管系は自律神

経に影響されるため⁴⁾、呼吸波は自律神経の状態にも関係している可能性があり、水質などの外部環境の変化に対して敏感な反応を示すこと⁵⁾から、水質推定のための新たな情報源として注目されている^{3),6)~8)}。

近年では、呼吸波を利用した水質検査用のバイオアッセイが開発されており、たとえば、Shedd and Schalie⁷⁾や Terawaki et al.^{3),8)}は、それぞれブルーギルとメダカから計測された呼吸波から呼吸頻度に関する情報を抽出し、その変化を捉えて水質汚染の判別を行なうシステムを提案している。

魚を用いて水質を推定することを考えた場合、化学物質に対する忌避や誘引といった遊泳行動の情報も重要となる。特に、水質変化の影響が遊泳行動のみに現れた場合や遊泳行動によって呼吸波が変動してしまった場合には、呼吸波だけに注目していると水質異常の有無を誤判別してしまう危険性がある。そのため、呼吸波解析と行動解析を同時に実現可能な水質検査バイオアッセイシステムが求められている。

魚の行動に関しては、従来からカメラシステムを用いた手法が多く提案されている^{9)~11)}。たとえば、川端⁹⁾や Kang et al.¹⁰⁾は水槽内を遊泳するメダカやグッピーなどを撮影し、画像解析することによって、運動の減少や異常行動を検出す

* 広島大学大学院工学研究科 東広島市鏡山 1-4-1

** 大阪大学大学院工学研究科 吹田市山田丘 2-1

*** 呉工業高等専門学校電気情報工学科 呉市阿賀南 2-2-11

**** 金沢大学理工研究域 金沢市角間町

* Graduate School of Engineering, Hiroshima University, 1-4-1 Kagamiyama, Higashihiroshima

** Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita

*** Department of Electrical Engineering and Information Science, Kure National College of Technology, 2-2-11 Agaminami, Kure

**** Graduate School of Natural Science and Technology, Kanazawa University, Kakumamachi, Kanazawa

(Received March 1, 2011)

(Revised December 19, 2011)

るシステムを提案している。

しかしながら、このようなカメラを用いた行動解析システムでは身体が半透明な魚を追従することはできない。また、カメラ撮影に必要な光量の確保や水面の反射光などの影響を考慮した環境光のコントロールが必要となり、この環境光そのものが魚への刺激となってしまう可能性がある¹²⁾。

そこで、本論文では電氣的に計測した呼吸波信号から魚の行動情報を推定する新たな魚類行動解析システムを提案する。提案システムでは、水槽の底面に配置した複数の電極から呼吸波を計測し、呼吸波のパワースペクトルの空間分布から信号源である魚の位置と速度を推定する。この方法を用いることにより、提案システムは光量が十分でない環境においても魚の行動情報と呼吸情報を同時に計測することができ、また非接触かつ非拘束の計測法であるため魚に付加的な刺激を与える必要がないという特徴を有している。ただし、本論文では水深を浅く設定した水槽を用いて、水平方向の行動情報のみを推定の対象とした。以下、まず、魚から発生する呼吸波と試験魚について説明する。続いて、呼吸波を計測し魚の行動を解析するシステムの構成について述べ、提案システムを用いた位置と速度の推定実験およびその結果について示す。

2. 呼吸波と試験魚

魚体の周囲には Fig. 1 に示すような電場が形成されている¹³⁾。図より、鰓と肛門付近 (Fig. 1 矢印) において、等電位線が密になっていることがわかる。この電位の発生には魚の浸透圧機構が関係している。鰓蓋が開いているとき、生体膜では体内と体外をイオンが移動し¹⁴⁾、鰓蓋が閉じているときはイオンの移動が制限されるため、鰓蓋が開閉すると魚の身体周囲に電位変動が生じる。鰓蓋の開閉運動は呼吸に同期しているため、この電位変動は呼吸波と呼ばれている¹³⁾。これまでに、著者らの研究グループでは呼吸波が 2~10 Hz の周波数帯に存在し、そのピーク値は 2~6 Hz に現れることを確認している^{3), 8)}。呼吸は、延髄に存在する呼吸中枢の自律的なリズムにより発生しており¹⁾、化学環境の変化に鋭敏に反応する¹⁵⁾ことが知られている。また、鰓の血管の収縮と弛緩は、迷走神経と節後神経から伝わる副交感神経や、交感神経幹から伝わる交感神経の状態によって調整されていることから、呼吸波は間接的に自律神経の影響を受けていると考えることができる⁴⁾。以上より、呼吸波は水質を推定するための重要な信号であると考えられている⁵⁾。

提案システムでは、試験魚として OECD(経済協力機構) テストガイドラインにおいて試験生物に指定されている¹⁶⁾ゼブラフィッシュを用いた。ゼブラフィッシュは体長が 20~30 mm 程度の小型魚類であり、胚から幼魚の時期では体が透明であることから蛍光タンパク質 (GFP) により神経細胞を発現させることで、脳の機能¹⁷⁾や逃避行動中の神経活動¹⁸⁾などを観測することが可能である。また、ゼブラフィッシュは金属や農薬などの毒性物質に対する研究が数多く報告されており¹⁹⁾、毒性検査に関する知見が豊富に蓄積されているこ

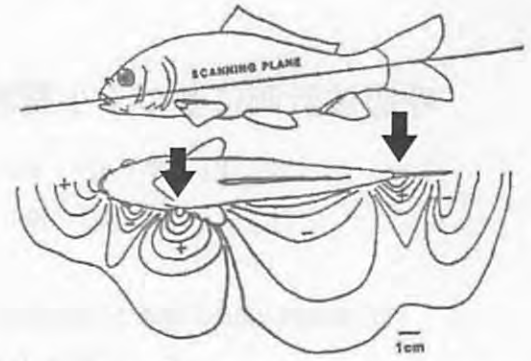


Fig. 1 Electric field distribution around the carp recorded by Asano and Hanyu (revised Fig. 6 in the literature¹³⁾)

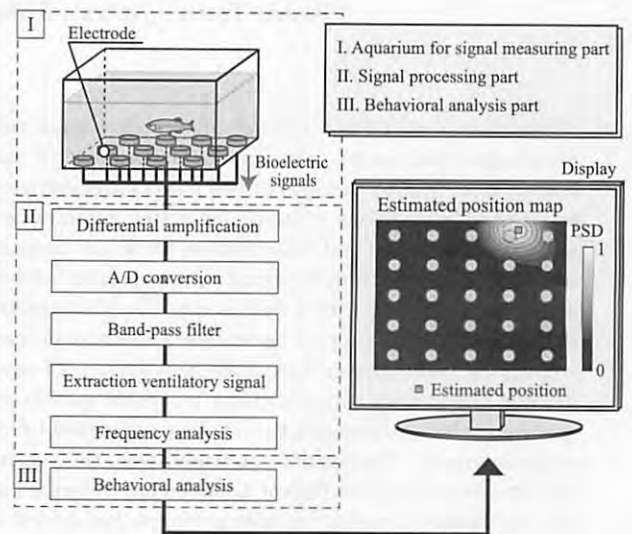


Fig. 2 Structure of the signal measurement and analysis system

とからバイオアッセイの試験魚として採用した。

3. 魚類行動解析システム

呼吸波を用いた行動解析を実現するためには、(1) 微弱な呼吸波信号を自由遊泳中に捉えるための信号計測手法と、(2) 計測した信号から行動情報を抽出するアルゴリズムを構築する必要がある。提案システムを Fig. 2 に示す。本システムは、信号計測用水槽部、信号処理部、行動解析部から構成されており、信号計測用水槽部と信号処理部では呼吸波信号を捉え、行動解析部では行動情報を抽出している。以下、各部について説明する。

3.1 信号計測用水槽部

信号計測用水槽部では、 10^{-6} V オーダーの微弱な電気信号である呼吸波を試験魚を拘束することなく計測するため、 L 個の電極を水槽底面に格子状に配置し (Fig. 3 参照)、微弱な生体電気信号計測を可能とする脳波計 (EEG-1200: 日本光電) を用いて計測した信号を増幅する。ただし、ゼブラフィッシュが水槽底面に配置した電極から水面の方向に一定距離 (約 70 mm) 以上離れると呼吸波が減衰し計測信号の

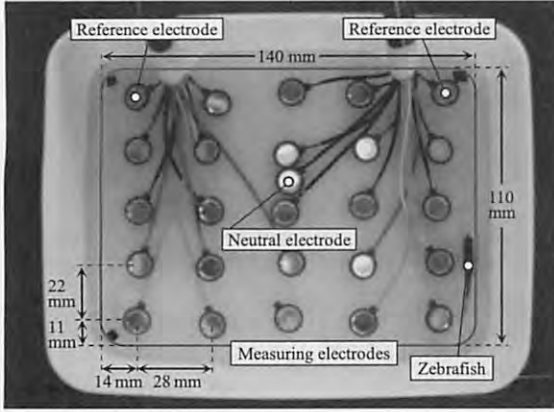


Fig. 3 Electrode arrangement in the measurement aquarium

S/N 比が低下すること、また、ゼブラフィッシュが水平移動と垂直移動を同時に行なうとさらに S/N 比が低下してしまうことなどを考慮し、ゼブラフィッシュの垂直方向の移動をできるだけ防ぐために横幅 140 × 縦幅 110 × 高さ 50 mm の水槽を採用し、水深を約 20 mm に制限することにより水平方向の行動情報のみを推定対象とした。

また、S/N 比の向上を目的として、計測信号に対し双極導出法による差動増幅を行なった。差動増幅器の正の入力は各電極で計測した電位であり、負の入力は Fig. 3 において上端の両隅に配置した 2 つのリファレンス電極の平均電位である。なお、増幅器の基準点となるニュートラル電極は水槽中央部に配置した (Fig. 3 参照)。計測電極には、生体信号の計測に一般的に用いられている Ag-AgCl 電極を採用した。

3.2 信号処理部

信号処理部では、インターフェースモジュール (PCI-3521: インタフェース) を用いて計測した信号を AD 変換し、サンプリング周波数 f_s [Hz] で解析用 PC に取り込み、呼吸波の抽出処理を行なう。まず、全電極から計測された L チャネルの信号に対して N_b 次のバンドパスフィルタ (低域カットオフ周波数 f_{low} [Hz], 高域カットオフ周波数 f_{high} [Hz]) で濾波することにより、呼吸波が含まれる周波数領域の信号を抽出する。

つぎに、サンプリング時刻 n における各チャネルの信号の実効値を (1) 式により算出し、その最大値 R_{max} [μ V] を求める。これに対して閾値 $[R_{low} R_{high}]$ を設け、この範囲内に含まれた信号を呼吸波として抽出する。

$$R_{max}(n) = \max_l \sqrt{\frac{1}{N} \sum_{\tilde{n}=n-N}^n V_l(\tilde{n})^2} \quad (\tilde{n} > 0) \quad (1)$$

ここで、 N は時間窓、 $V_l(\tilde{n})$ は第 l チャネルの計測信号 ($l = 1, 2, \dots, L$) を表す。 R_{low} [μ V], R_{high} [μ V] の値は、事前に数匹の個体を用いて呼吸波を計測し、その信号の平均実効値 R_{ave} [μ V] から、次式により決定する。

$$\begin{cases} R_{high} &= a_{sup} R_{ave} \\ R_{low} &= a_{inf} R_{ave} \end{cases} \quad (2)$$

ここで、 a_{sup} , a_{inf} はそれぞれ、呼吸波振幅の上限値と下限値を設定するための係数で、信号の減衰とノイズの混入による影響をできるだけ排除するために設定している。したがって、計測した信号が $[R_{low} R_{high}]$ の範囲内に含まれていなかった場合は、呼吸波は計測できなかったものとして、以降の信号処理は行なわない。

最後に、全 L チャネルの信号の周波数スペクトルを求め、行動解析部へ出力する。周波数解析では、突発的なノイズの影響を受けにくい特長を有する自己回帰 (AR) モデル²⁰⁾を用いて、信号の周波数スペクトルを求める。AR モデルは次式で与えられる。

$$V_l(n) = - \sum_{k=1}^K a(k) V_l(n-k) + \varepsilon(n) \quad (3)$$

ここで、 $V_l(n-k)$ は k 時刻前の計測信号、 $\varepsilon(n)$ は予測誤差を表す。また、 K は AR モデルの次数である。なお、AR モデルのパラメータは時間窓 $T_w = N/f_s$ [sec] として Yule-Walker 法により算出し、次数 K は赤池情報量規準 (AIC)²¹⁾ を参考に分解能と計算時間のトレードオフを考慮して設定した。パワースペクトル密度 (PSD) $P_l(f)$ [μ V²/Hz] は、求めた AR モデルを用いて次式により計算できる。

$$P_l(f) = \frac{\sigma_\varepsilon^2}{\left| 1 + \sum_{k=1}^K a(k) e^{j2\pi kf} \right|^2} \quad (4)$$

ここで、 σ_ε^2 は予測誤差の分散である。

3.3 行動解析部

行動解析部では、算出した PSD を用いて魚の位置と遊泳速度を推定する。魚と電極間距離が小さいほど計測される信号のパワーが大きい³⁾ことから、PSD のピーク値が最大となる座標を推定し、これを魚の位置とする。

まず、信号処理部において算出した各チャネルにおける PSD のピーク値 ($q_l = \max_f P_l(f)$) を求め、隣接する電極間を S 等分した座標における PSD のピーク値 $q_{(x, y)}$ をスプライン補間²²⁾により推定する。つぎに、PSD のピーク値の位置分布に注目するため、次式により $q_{(x, y)}$ を正規化する。

$$q'_{(x, y)} = \frac{q_{(x, y)}}{\max q_{(x, y)}} \quad (5)$$

このようにして求めた水槽内における PSD のピーク値の位置分布を表わすマップ (位置推定マップと呼ぶ、Fig. 2, および後出 Fig. 6 参照) を作成する。そして、作成した位置推定マップにおいて PSD のピーク値が最大値を示す座標を魚の推定位置とする。なお、推定位置はマップ更新周波数 $f_m = f_s/N$ [Hz] で計算する。

遊泳速度は推定した位置座標を微分フィルタで処理し算出する。このとき、位置推定誤差に起因する時間軸方向における突発的な変化を抑制するために N_l 次のローパスフィルタ (カットオフ周波数 f_{cut} [Hz]) で濾波する。そして、遊泳の速さを評価するために速度の絶対値を計算する。

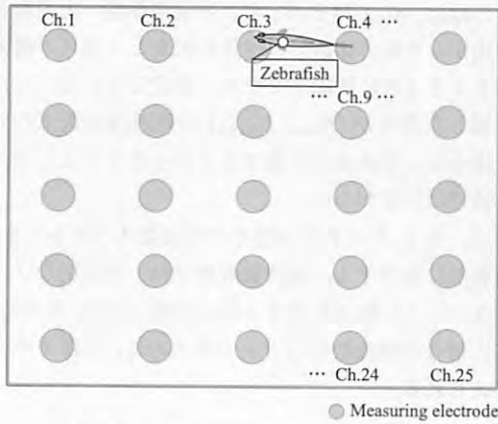


Fig. 4 Location of Fish 1 in resting state

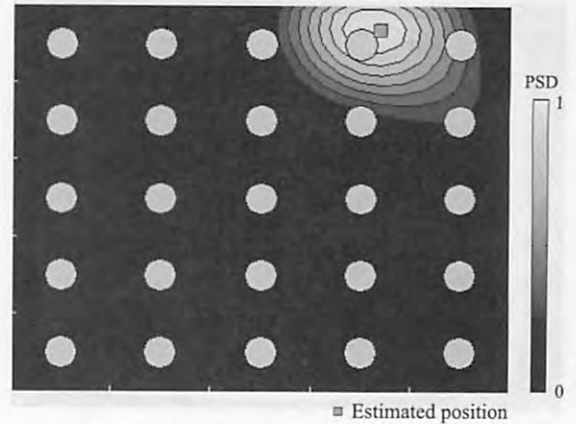


Fig. 6 Estimated position map (Fish 1)

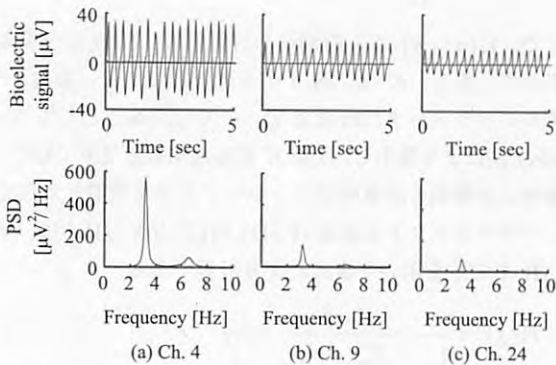


Fig. 5 Examples of experimental results (Fish 1)

4. 実験

提案システムの有効性を検証するために、まず、周期的な信号である呼吸波が計測できるか確認した。つぎに、位置と速度の推定精度の検証を行なった。

4.1 実験方法

計測対象は体長約 25 mm のゼブラフィッシュ 7 匹 (Fish 1, ..., Fish 7) とし、各個体 $T=600$ sec ずつ信号を計測した。以下に提案システムについて設定したパラメータを示す。

● 信号計測用水槽部

電極数: $L=25$, 格子状 (5×5) に配置 (Fig. 3 参照)

水量: 300 ml (水位: 約 20 mm)

● 信号処理部

サンプリング周波数: $f_s=1000$ Hz

バンドパスフィルタ: $N_b=6$, $f_{low}=1$ Hz, $f_{high}=10$ Hz

呼吸波抽出: 時間窓 $N=500$, $R_{ave}=14 \mu V$, $a_{inf}=0.1$,

$$a_{sup}=5, R_{low}=1.4 \mu V, R_{high}=70 \mu V$$

AR モデル: 次数 $K=200$, 時間窓 $T_w=0.5$ sec,

分解能 0.122 Hz

● 行動解析部

2 電極間補間分解能: $S=5$

推定位置のサンプリング周波数: $f_m=2$ Hz

ローパスフィルタ: $N_l=3$, $f_{cut}=0.16$ Hz

4.2 呼吸波信号計測実験

実験結果の一例として Fish 1 における結果を Fig. 4~Fig. 6 に示す。Fig. 4 は水槽を上から見たときの魚と電極の位置を表わした図である。魚が図中の位置にいるときに Ch.4, 9, 24 の電極から計測された信号を Fig. 5 に示す。それぞれ、上段が計測信号の時間波形、下段がパワースペクトル密度 (PSD) である。図より、魚に近い電極ほど信号の振幅と PSD のピーク値が大きいことから、魚が信号源であることがわかる。また、計測された信号は周期的で、そのピーク周波数が 2~10 Hz の帯域にあることがわかる。これらは、呼吸波の特徴³⁾とよく一致していることから、提案システムによって呼吸波を計測できていることを確認できた。

4.3 位置・速度推定実験

Fig. 6 に提案法により呼吸波から算出した位置推定マップを示す。Fig. 6 は、PSD のピーク値の等高線をグレースケールで色分けした図であり、より白いほうが PSD のピーク値が高いことを示している。Fig. 4 と Fig. 6 を比較すると、この時間帯においては推定位置と実際の魚の位置はほぼ一致していることがわかる。なお、尾部側に提案システムの推定位置がずれている原因は、呼吸波が魚の身体周り全体から計測されることから¹³⁾ (Fig. 1 参照)、この時間帯では肛門付近の電極から計測された信号が鰓付近の電位よりも高くなっているためであると考えられる。

つぎに、全時間帯および全個体を対象として、位置推定と速度推定の精度について検証を行なった。ただし、Fish 7 については、提案システムが呼吸波を抽出できたと判断した時間帯が全計測時間の 30% 以下であったため、試験魚として不適切であるとして除外した。行動解析精度の検証には、カメラによって撮影した魚の動画画像から画像解析により算出した魚の重心点 (鰓付近) の座標を用いた。動画画像は 60 fps で撮影し、画像解析は「Move-tr/3D」(ライブラリー)を用いて水平面を対象とした 2 次元の行動解析を行なった。

4.3.1 位置推定精度

Fig. 7 に提案システムによる推定位置の軌跡とカメラ画像により算出した魚の重心位置の軌跡の一例を示す。図より、

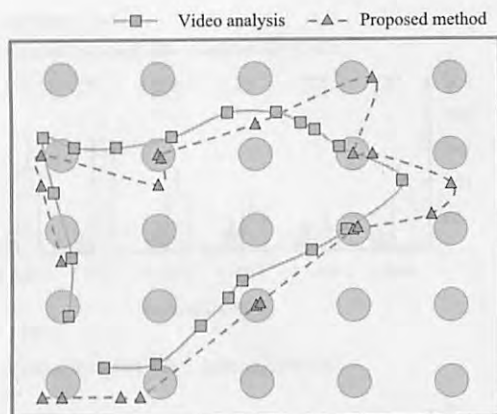


Fig. 7 Fish trajectories estimated by the proposed method and the video analysis

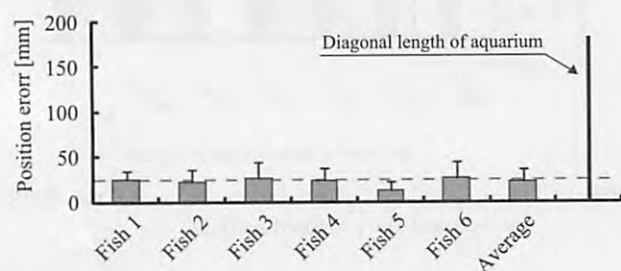


Fig. 8 Estimated position errors between the proposed method and the video analysis

誤差は見られるものの、両者の軌跡はほぼ同様の変化を示している。Fig. 8に各個体の全計測時間における提案法とカメラ画像の推定位置の差の平均 E_c [mm] と標準偏差、および全試験魚の平均値を示す。なお、カメラで計測した画像の重心座標と提案システムで推定した呼吸波の PSD ピーク座標とは必ずしも一致しないため、許容差を魚の体長の 25 mm とした。Fig. 8において、破線は魚の体長、横軸の右端の実線は計測水槽の対角線の長さ (178 mm) を示している。なお、座標誤差の平均値 E_c は次式で算出した。

$$E_c = \frac{1}{f_m T} \sum_{n=0}^{f_m T} \|(x_p(n), y_p(n)) - (x_v(n), y_v(n))\| \quad (6)$$

ここで、 $(x_p(n), y_p(n))$ 、 $(x_v(n), y_v(n))$ はそれぞれ提案法とカメラ画像による推定位置の座標、 T は全計測時間 (600 sec)、 f_m はマップ更新周波数 (2 Hz) を表わす。図より、各個体の推定座標の差はほぼ一定で、全個体の推定座標の差の平均は 23.0 ± 13.6 mm であり、魚の体長以下に収まっていることがわかる。以上より、ある程度の精度で位置推定が可能であることが示された。

4.3.2 遊泳速度推定実験

遊泳速度は推定した位置座標に微分フィルタを適用し、時間微分することで算出した。Fig. 9に提案法とカメラ画像により推定した遊泳速度の絶対値の一例を示す。一部波形が途切れている部分は、提案システムが呼吸波を計測できていないと判断した時間帯である。図より提案法とカメラ画像による

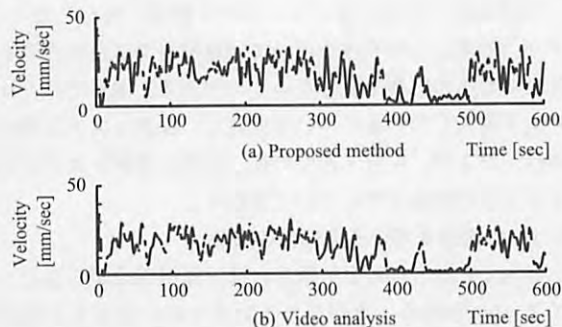


Fig. 9 Estimated velocity calculated by the proposed method and the video analysis (Fish 2)

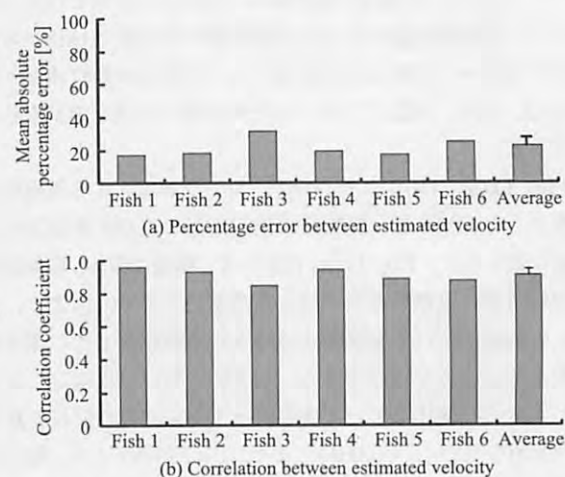


Fig. 10 Comparison between estimated velocity using the proposed method and video analysis

推定速度の絶対値は、全体的に一致した傾向 (相関係数 0.981 ($p < 0.001$)) を示していることが確認できる。Fig. 10(a), (b) に各個体における提案法とカメラ画像の推定速度のパーセント誤差、および、相関係数を示す。なお、パーセント誤差は次式により算出した。

$$\%Error = \frac{1}{f_m T} \sum_{n=0}^{f_m T} \left| \frac{V_p(n) - V_v(n)}{V_v(n)} \times 100 \right| \quad (7)$$

$V_p(n)$ 、 $V_v(n)$ はそれぞれ提案法とカメラ画像による推定速度の絶対値を表わす。ただし、魚が静止していた場合はカメラ画像の推定速度 $V_v(n)$ がほぼ 0 となるため、 $V_v(n)$ の全個体における最大値の 10 % 以上を評価対象とした。その結果、推定速度間のパーセント誤差は 16 ~ 30 % であり、その平均は 20.7 ± 5.9 % であることがわかった。また、Fig. 10(b) より、どの個体に対しても 0.8 以上の相関があり、全個体の平均では 0.906 ± 0.045 の強い相関があることがわかる。以上の結果から、一定の推定誤差があるものの、提案法による遊泳速度の推定結果はカメラ画像による推定結果と同様の傾向を示すことを確認した。

5. 考 察

提案法の特徴は、生体電気信号の中でも魚が継続的に発し

ている呼吸波の周波帯域のスペクトル情報に着目したこと、および、計測した呼吸波を用いて行動解析するため環境光が変化してもその影響を受けないことである。本章ではこれらの特徴を導入した効果について検証し、提案システム的应用可能性、および、位置・速度の推定誤差と提案システムを運用する上での制限条件について考察する。

5.1 呼吸波を用いる有効性の検証

水槽内で計測される電気信号には、商用電源から混入したノイズ (50/60Hz)、魚がひれを動かす際に発生する高周波の筋電位信号や遊泳行動に起因する低周波のイオンの拡散など、呼吸波のほかにさまざまな周波数帯の信号が含まれている²³⁾。そこで、呼吸波の周波数帯に着目した効果を検証するために、生体電気信号の全周波数帯域の実効値 (RMS) の位置分布を用いて位置と速度を推定し、提案法の推定精度と比較した。以降、本論文ではこの比較対象の手法を RMS 法と表記する。

Fig. 11(a), (b) に、それぞれ、カメラ画像による推定値を基準とした RMS 法と提案法の推定位置の誤差と推定速度の相関係数を示す。Fig. 11(a) において、横軸は個体、縦軸は全計測時間帯の座標誤差の平均と標準偏差を示す。図より、いずれの個体においても提案法のほうが座標誤差とその標準偏差が小さいことを確認できる。t 検定を用いて比較したところ、すべての個体において提案法と RMS 法との間に有意な差が認められた ($p < 0.001$)。また、Fig. 11(b) より、推定速度の平均相関係数はそれぞれ、提案法が 0.906 ± 0.045 、RMS 法が 0.280 ± 0.299 であり、t 検定による比較の結果、両者に有意な差が得られた ($p < 0.01$)。以上の結果から、提案法は RMS 法よりも正確に位置と速度を推定できることが示され、呼吸波の周波数域に注目する有効性を確認した。

5.2 環境光変化による影響の確認

生物学的分野において、光刺激に対する魚の応答を調べるために環境光を変化させながら行動解析を行なう場合がある²⁴⁾。このような応用例を想定し、環境光を定期的に変化させてカメラ画像と提案法から推定した速度を比較した。実験は、カメラ画像を用いて行動解析できるように照明の光量を調整した環境下から計測を開始し、30 秒ごとに照明を繰り返し点灯・消灯するという条件のもとで行なった。実験対象は一匹のゼブラフィッシュとし、その他の実験条件は 4.1 節と同様とした。

Fig. 12(a), (b) に、それぞれ、提案法とカメラ画像により推定した遊泳速度を示す。横軸は時間、縦軸は推定速度であり、陰影部は照明を消灯させた時間帯を表わしている。図より、提案法では点灯・消灯によらず速度を推定できていることが確認できる。一方、カメラ画像を用いた手法では、点灯時は速度推定値が変化しているのに対し、消灯時では、その値が 0 mm/sec になっていることが確認できる。この理由は、光量の減少によってゼブラフィッシュと計測環境間の輝度差が小さくなり、画像解析ソフトが追跡を中断したためである。なお、点灯時において、カメラ画像と提案手法で求め

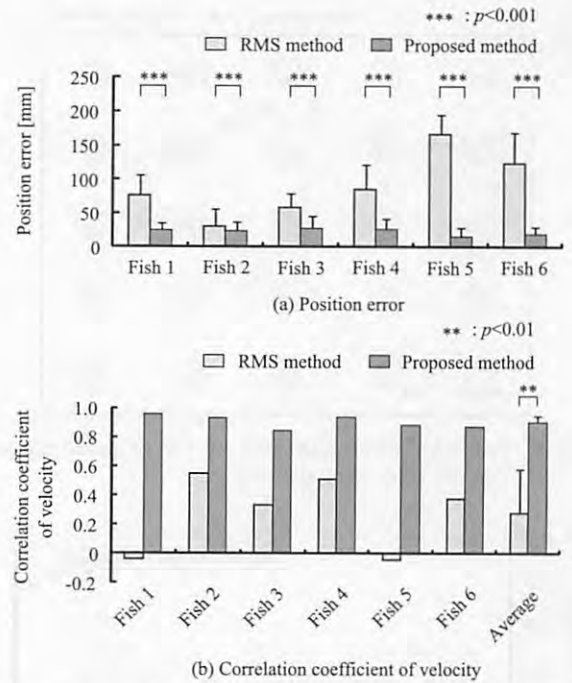


Fig. 11 Comparison of behavioral results using the RMS method and the proposed method

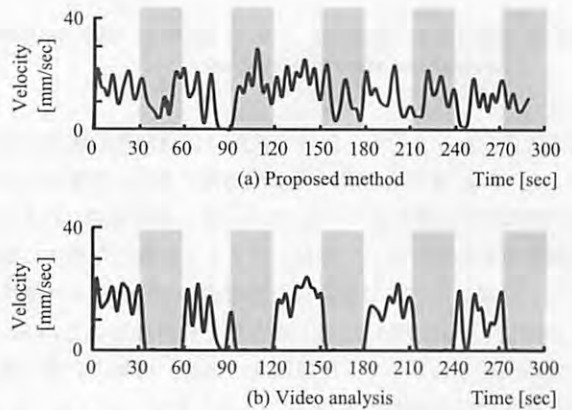


Fig. 12 Comparison between the estimated velocities by using the video analysis and the proposed method under changing-light condition

た速度の相関は 0.80 ($p < 0.001$) であった。

以上の結果から、提案システムは環境光を変化させる必要がある実験条件において、行動解析ツールとして利用できると考えられる。

5.3 推定誤差の要因

位置推定実験において、カメラ画像と提案システムによる推定位置の差は平均 23.0 mm であり、魚の体長程度であった。この誤差は計測ノイズなどさまざまな要因が混在して発生したものと考えられるが、その一つに呼吸波に関する電場が魚の身体全体に分布している点がある。この点について考察するために、鰓と肛門の近くの電極から計測した呼吸波を 4.1 に示した条件の下で解析した。解析結果を Fig. 13 に示す。図において、Fig. 13(a) が呼吸波であり、Fig. 13(b) が

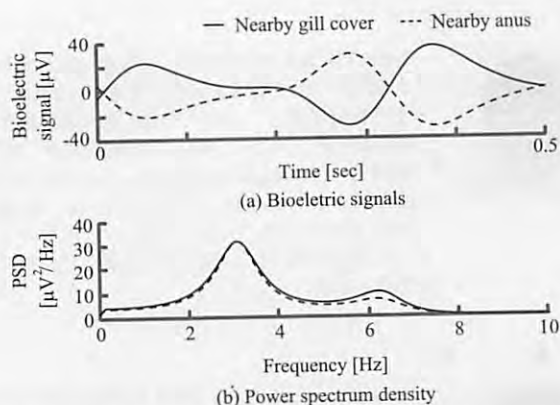


Fig. 13 Measured signals nearby gill cover and anus

パワースペクトル密度 (PSD), 実線が鰓付近, 破線が肛門付近の電極から計測した信号を表わしている. Fig. 13(a) より, 鰓と肛門付近からは位相が反転した呼吸波が計測されており, その振幅は同程度であることがわかる. また, Fig. 13(b) より, PSD の形状はほぼ一致しており, PSD のピーク値もほぼ同じ値であることがわかる. 以上の結果は, Fig. 1 において魚の身体周りに分布する等電位線が鰓付近と肛門付近 (Fig. 1 矢印部分) で密になっているという知見と一致する. このように, 呼吸波は魚の身体周り全体から計測されるため, 呼吸波の PSD のピーク値を用いて推定した位置座標は魚の体長ほどの計測誤差が生じるものと推察される. また, 同様の理由で, カメラ画像と提案システムによる推定速度の間にも差 (Fig. 10 参照) が生じたと考えられる. この点については, 今後, さらに詳細に検討し, 位置推定精度を改善するための方法を導入したいと考えている.

最後に, 魚の垂直方向への移動の影響を検討した. 本研究で算出した速度推定は水平方向の行動情報のみしか考慮していないため, 魚が垂直方向に移動した場合には推定速度に誤差が生じてしまう. そこで, 魚の垂直方向の位置変化による影響を検討するため, ビデオカメラを用いた3次元行動解析を行なった. Fig. 14 は, 水槽の底面を 0 mm としたときの Fish 5 の垂直方向の位置を表わしている. 本研究では魚の垂直方向への移動を制限するために水深を約 20 mm に設定した. そのため, Fig. 14 から試験魚は全時間帯において 10 mm 付近に滞在しており, 垂直方向への急激な移動は見られない. 以上より, 本研究の実験条件では魚の垂直方向への移動の影響は軽微であることが確認できた. 今後, 水槽の側面にも電極を配置することにより, 水平方向と垂直方向の行動を同時に計測する方法について検討できればと考えている.

6. まとめと今後の課題

本論文では, 魚類の呼吸波を利用して魚の位置と遊泳速度を推定する手法を提案した. 提案システムは, 水槽底面に複数の電極を格子状に配置し, 各電極から計測した呼吸波の周波数スペクトルを解析することにより, 非拘束で自由遊泳中の試験魚の呼吸波を観測すると同時に, ビデオカメラを用い

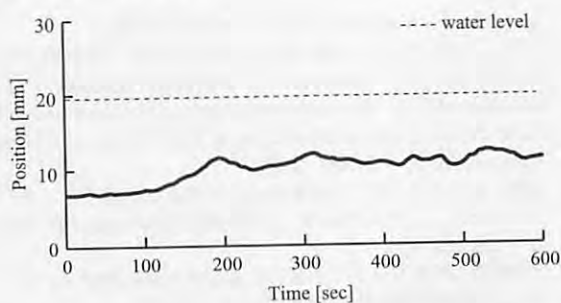


Fig. 14 Position of fish from the bottom of the measurement aquarium (Fish 5)

ずに魚の位置と遊泳速度を推定することが可能である. カメラ画像を用いて算出した魚の位置, および, 遊泳速度と比較した結果, 一定の推定誤差があるものの, カメラ画像と提案システムによる推定結果は同様の傾向を示すことを確認した. 提案システムは, 生体信号と遊泳行動を同時に計測できるため, その両方を必要とする水質検査のためのバイオアッセイシステムに応用できる可能性がある.

しかしながら, 提案システムの実用には, (1) 位置・速度の推定精度の向上, (2) 深さ方向の位置推定手法の開発などの課題を解決する必要がある. また, (3) 提案システムは水槽底面に配置された電極間の電位差を計測しているため, 計測される信号の振幅は水の導電率に影響されるという問題がある. 本論文の実験に用いた水の導電率は $56.8 \sim 180 \mu\text{S}/\text{cm}$ であったが, 塩化ナトリウムやその他イオンなどの混入によって導電率が $4 \text{ mS}/\text{cm}$ 以上に上昇すると, 各電極が導通してしまうため電極間の電位差がなくなり, 呼吸波信号が計測できなくなってしまう. したがって, 提案システムをバイオアッセイシステムとして運用するためには, 試験対象とする水の導電率を事前に調整しておく必要がある. 今後は, これらの課題について詳細に検討し, 毒性物質を曝露した後の魚の行動と呼吸波から水質汚染を判別するアルゴリズムを開発する予定である.

参考文献

- 1) E.D. Adrian and F.J.J. Buytendijk : Potential changes in the isolated brain stem of the goldfish, *J. Physiol.*, **71-2**, 121/135 (1931)
- 2) 松尾雄三 : フナのえら蓋の活動電位による急性毒性の監視実験, *水道協会雑誌*, **54-10**, 17/25 (1984)
- 3) M. Terawaki, A. Hirano, Z. Soh and T. Tsuji : Unconstrained and Noninvasive Measurement of Bioelectric Signals from Small Fish, *Artificial Life and Robotics*, **14**, 728/733 (2009)
- 4) M.G. Jonz and G. Zaccane : Nervous control of the gills, *Acta histochem.*, **111**, 207/216 (2009)
- 5) American Society for Testing and Materials (ASTM) : Standard Guide for Ventilatory Behavioral Toxicology Testing of Freshwater Fish, E1768-95 (2008)
- 6) M. Thomas, A. Florion and D. Chretien : A Newwarning Biomonitor Using a Weakly Electric Fish, *Apteronotus Albifrons (Gymnotiformes)*, and The Effect of Temperature on The Bioelectric Responses, *Environmental Moni-*

- toring and Assessment, 51-3, 605/620 (1996)
- 7) T.R. Shedd, W.H. van der Schalie, M.W. Widder, D.T. Burton and E.P. Burrows : Long-Term Operation of an Automated Fish Biomonitoring System for Continuous Effluent Acute Toxicity Surveillance, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **66**-3, 392/399 (2001)
 - 8) 寺脇, 曾, 平野, 辻 : 小型魚類の生体電気信号を利用したバイオアッセイシステムの提案, 計測自動制御学会論文集, **47**-2, 119/125 (2011)
 - 9) 川端雅博 : 複数のメダカを使った水質連続監視装置「オルセイバー」, 資源環境対策, **42**-2, 78/80 (2006)
 - 10) I.J. Kang, J. Moroishi, A. Nakamura, K. Nagafuchi, S.G. Kim and Y. Oshima : Biological monitoring of detection of toxic chemicals in water by the swimming behavior of small freshwater fish, *Journal of the Faculty of Agriculture Kyushu University*, **54**-1, 209/214 (2009)
 - 11) A.S. Kane, J.D. Salierno, G.T. Gipson, T.C. Molteno and C. Hunter : A video-based movement analysis system to quantify behavioral stress responses, *Water Res.*, **38**-18, 3993/4001 (2004)
 - 12) R. Spence, G. Gerlach, C. Lawrence and C. Smith : The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio.*, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **83**-1, 13/34 (2007)
 - 13) 浅野, 羽生 : 魚類の行動と生体電気, 回遊魚の生物学 (森沢正昭編), 181/195, 学会出版センター (1987)
 - 14) 岩田, 平野 : 浸透圧機構, 魚類生理学 (坂沢靖男編), 東京恒星社厚生閣 (1991)
 - 15) 尾崎久雄 : 呼吸の生理, 魚類生理学講座第2巻, 43, 緑書房 (1970)
 - 16) Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) : Test No.203: Fish, Acute Toxicity Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals (1992)
 - 17) 岡本, 相沢, 揚妻, 青木 : ゼブラフィッシュを使った情動系神経回路網の可視化と操作, 蛋白質核酸酵素, **53**-4, 475/481 (2008)
 - 18) 小田洋一 : 後脳分節に構築された逃避運動回路, 蛋白質核酸酵素, **53**-4, 506/511 (2008)
 - 19) A.J. Hill, H. Teraoka., W. Heideman and R.E. Peterson : Zebrafish as a Model Vertebrate for Investigating Chemical Toxicity, *Toxicol. Sci.*, **86**-1, 6/19 (2005)
 - 20) 白井, 伊藤, 三田 : 生体信号処理の基礎, 107/155, オーム社 (1985)
 - 21) H. Akaike : A new look at the statistical model identification, *IEEE Trans. Autom. Cont.*, **19**-6, 716/723 (1974).
 - 22) 市田, 吉本 : スプライン関数とその応用, 教育出版 (1979)
 - 23) B.C. Jayne and G.V. Lauder : How swimming fish use slow and fast muscle fibers: implications for models of vertebrate muscle recruitment, *J. Comp. Physiol. A*, **175**-1, 123/131 (1994)
 - 24) R. Gerlai, M. Lahav, S. Guo and A. Rosenthal : Drinks like a fish: zebra fish (*Danio rerio*) as a behavior genetic model to study alcohol effects, *Pharmacol Biochem Behav.*, **67**-4, 773/782 (2000)

[著者紹介]

来山 茂 央



2010年広島大学工学部第二類卒業。2012年広島大学工学研究科博士課程前期修了見込み。魚類の生体信号解析, 信号処理, 行動解析に関する研究に従事。

曾 智



2006年広島大学工学部第二類卒業, 2008年同大学院工学研究科博士課程前期修了。2010年同博士課程後期修了。2009~2010年日本学術振興会特別研究員(DC2)。現在, 同特別研究員(PD)。工学博士。International Symposium on Artificial Life and Robotics (AROB) Young Author Award などを受賞。人工生命体, ニューラルネット, 生体信号解析などの研究に従事。日本神経回路学会の会員。

平野 旭



1980年8月15日生。2008年広島大学大学院工学研究科博士課程後期修了。民間企業勤務を経て, 2010年より呉工業高等専門学校助教, 現在に至る。工学博士。人工生命体, シミュレーション生物学, バイオミメティクス制御などの研究に従事。

辻 敏 夫 (正会員)



1959年12月25日生。85年広島大学大学院工学研究科博士課程前期修了。同年広島大学工学部助手。94年同助教を経て, 2002年より同大学院工学研究科教授, 現在に至る。工学博士。計測自動制御学会学術奨励賞(86), 論文賞(2002, 2008), バイオメカニズム学会論文賞(90), 日本義肢装具学会論文賞(2000), 日本医科器械学会論文賞(2003), 日本機械学会ロボティクス・メカトロニクス部門学術業績賞(2004), IEEE R & A Society The K. S. Fu Memorial Best Transactions Paper Award (2004) などを受賞。人間とロボットの運動制御, 生体信号解析, ニューラルネット, ヒューマン・マシンシステムなどの研究に従事。

滝口 昇



1998年大阪大学工学研究科応用生物工学専攻修了。同年広島大学大学院先端物質科学研究科助手。2007年同助教を経て, 2009年より金沢大学理工研究域自然システム学系准教授, 現在に至る。工学博士。第32回生物工学奨励賞(照井賞)(2009), 2003年度化学工学会奨励賞(實吉雅郎記念賞)(2004), 2004年日本農芸化学会B.B.B.論文賞(2005) などを受賞。生物機能, バイオプロセスなどの研究に従事。化学工学会, 日本生物工学会, 日本味と匂学会に所属。

大竹 久 夫



1978年大阪大学大学院工学研究科博士課程修了。同年島根大学農学部助手。80年同助教。82年東京大学応用微生物研究所助教授。85年広島大学工学部教授。2001年より同大学院先端物質科学研究科教授を経て, 2003年より大阪大学大学院工学研究科教授, 現在に至る。工学博士。リン資源リサイクル, バイオプロダクション, 環境バイオテクノロジーなどの研究に従事。リン資源リサイクル推進協議会会長。日本生物工学会, 環境バイオテクノロジー学会などに所属。