

ゼブラフィッシュのRRIに対する影響の解析



茨城県立日立第一高等学校 生物部 菊池冬青、日向寺颯汰、石井颯泰、笠井歩

振動により自律神経は影響を受ける

先行研究

- 可聴範囲の高周波帯域(20kHz以下)を増幅下降した音楽の聴取は交感神経活動が抑制され、疲労感を軽減させる。
- 45分間の車の運転の振動により、副交感神経活動が優位となる。
- 音波による高齢者への全身振動刺激は副交感神経活動を活性化させる。

中島淑恵, et.al.(2011). 音楽の周波数特性が心理及び自律神経系活動に与える影響. 順天堂大学 医療看護学部 医療看護学研究, 第7巻, P47-51.

山口勝機.(2010). 心拍変動による精神負荷ストレスの分析. 志学館大学人間関係学部研究紀要, Vol.31, No.1.

崔 元哲, 水上 勝義. (2020). 音波による全身振動刺激が高齢者の気分, 自律神経系機能, 脳機能に及ぼす影響について. 日本老年医学雑誌, 57巻, 4号, P411-499.

目的

振動を生み出すデバイス

- 偏心モーター プーンプーンという振動を発生させる
- Taptic Engine触覚を振動により再現する技術。トントンという振動を発生させる。



Fig.1 偏心モーターの例



Fig.2 Taptic Engine (iPhone 6)

本実験の目的

ヒトを対象とした実験には倫理的制約が伴うため、本研究ではその代替としてモデル生物であるゼブラフィッシュを用い、モーターによる振動刺激がゼブラフィッシュに与える影響を検討する。

心拍変動

心電図の最もピーク時をR波といい、R波の間隔をRRIという。

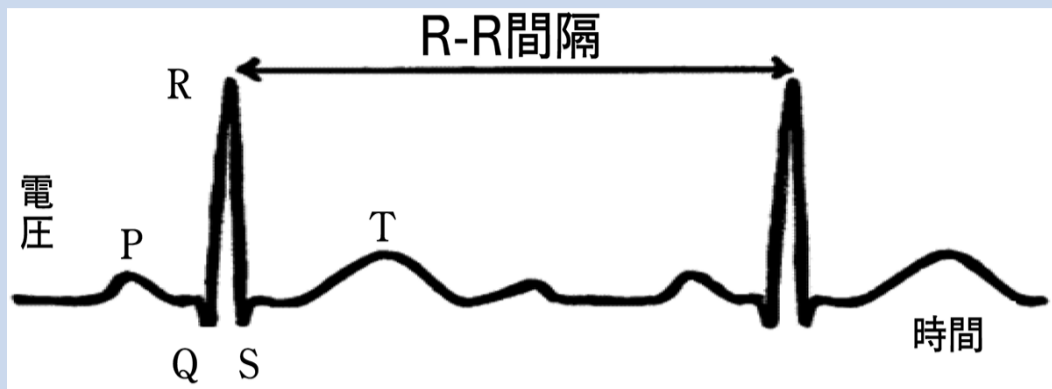


Fig.3 R-R間隔 (三島利江子(2021))

RRIの変動：心拍変動(HRV)

交感神経優位→HRVが小さくなる。
(RRIの変動が小さい)

副交感神経優位→HRVが大きくなる。
(RRIの変動が大きい)

- RMSSD：隣接するRRIの差の根平均二乗。副交感神経の活動の指標。
- SDNN：RRIの標準偏差。自律神経全体の活動の指標。
- RRIのパワースペクトル解析。
- 低周波成分と高周波成分の比：RRIの大きさを表す。

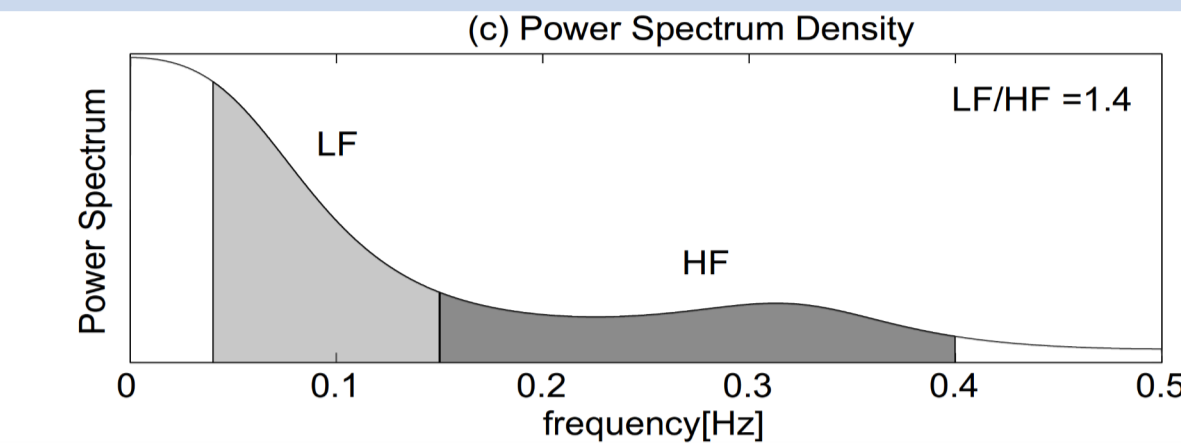


Fig.4 Power Spectrum (藤原幸一(2017))

デバイスの開発

- モーターを振動させる機材 Raspberry Pi
- 振動させるためのコード Pythonを用いて、モーターを1.8Hzで振動させた。

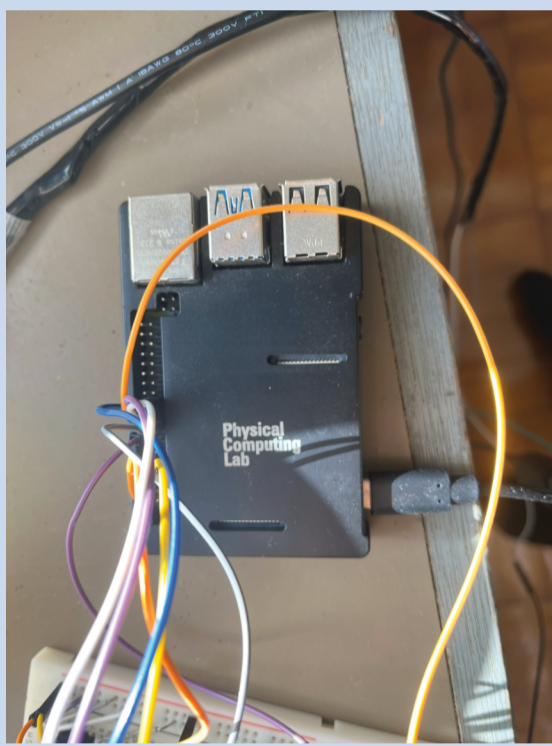


Fig.5 Raspberry Pi

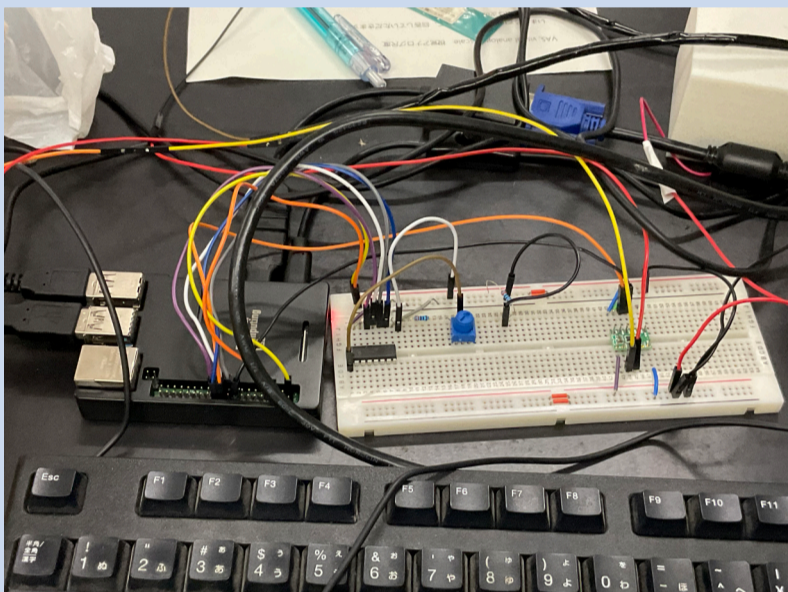


Fig.6 ブレッドボード

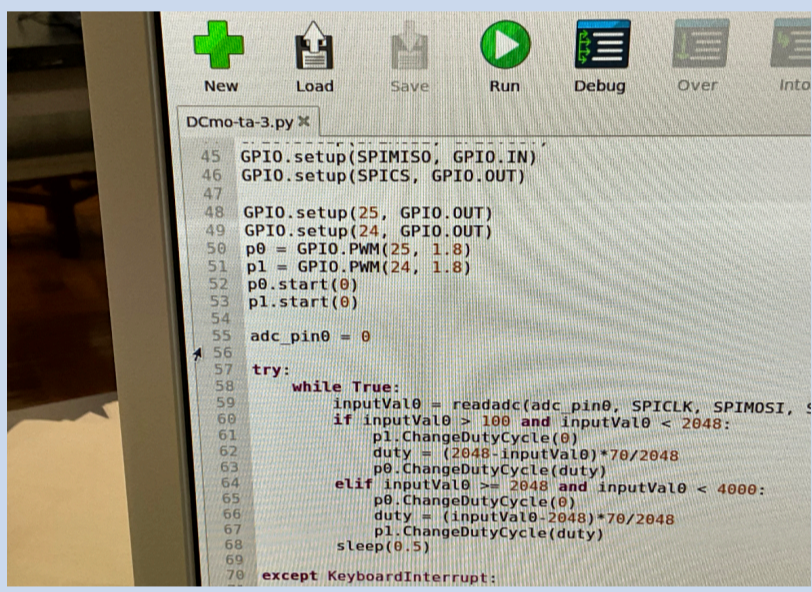


Fig.7 振動を発生させたコード

ゼブラフィッシュ

ゼブラフィッシュを用いた理由

- 胚や幼体の際、体が透明である。
- 2万個あまりとされているヒトの遺伝子と1万3000個ほど共有している。

ゼブラフィッシュは自律神経があり、胚や幼体の際に心臓の動きを外から観察できるため、本研究の目的に一致している。



Fig.8 ゼブラフィッシュ

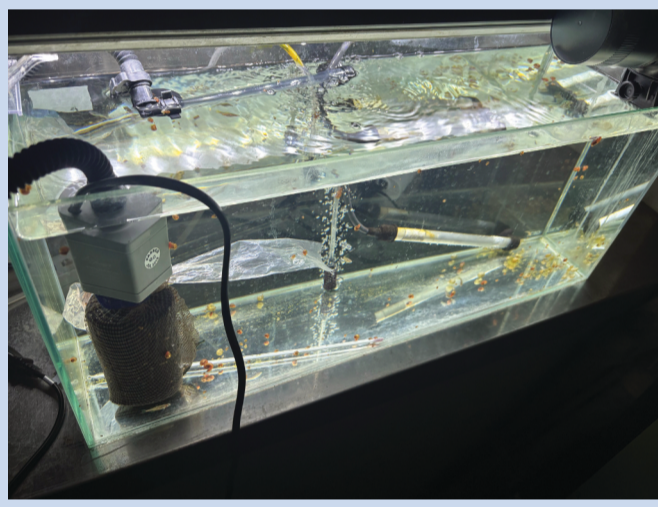


Fig.9 飼育の様子

RRIの解析

- ゼブラフィッシュの心拍をiPhoneのスローモーション撮影機能を用いて撮影した。
- 動画をffmpegを用いてフレームを抽出した。
- Fiji(ImageJ)を用いてR波を抽出した。
- 作成したプログラムにR波を入力し、RMSSD, SDNN, R波のパワースペクトルの低周波成分と高周波成分の比を算出した。

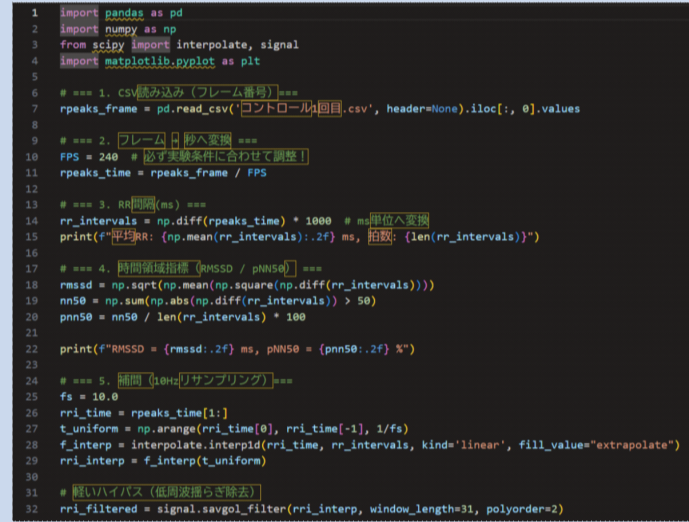


Fig.10 解析に用いたコード

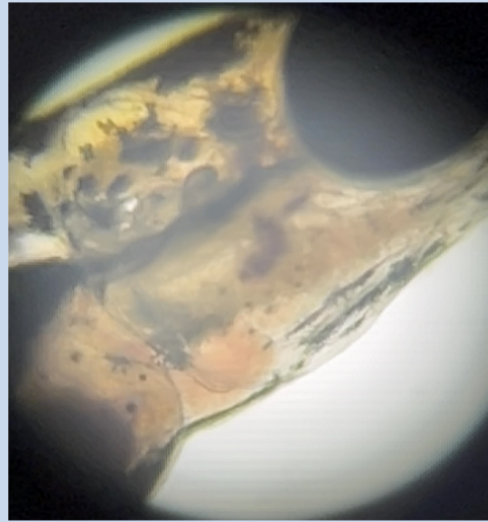


Fig.11 顕微鏡で見たゼブラフィッシュ

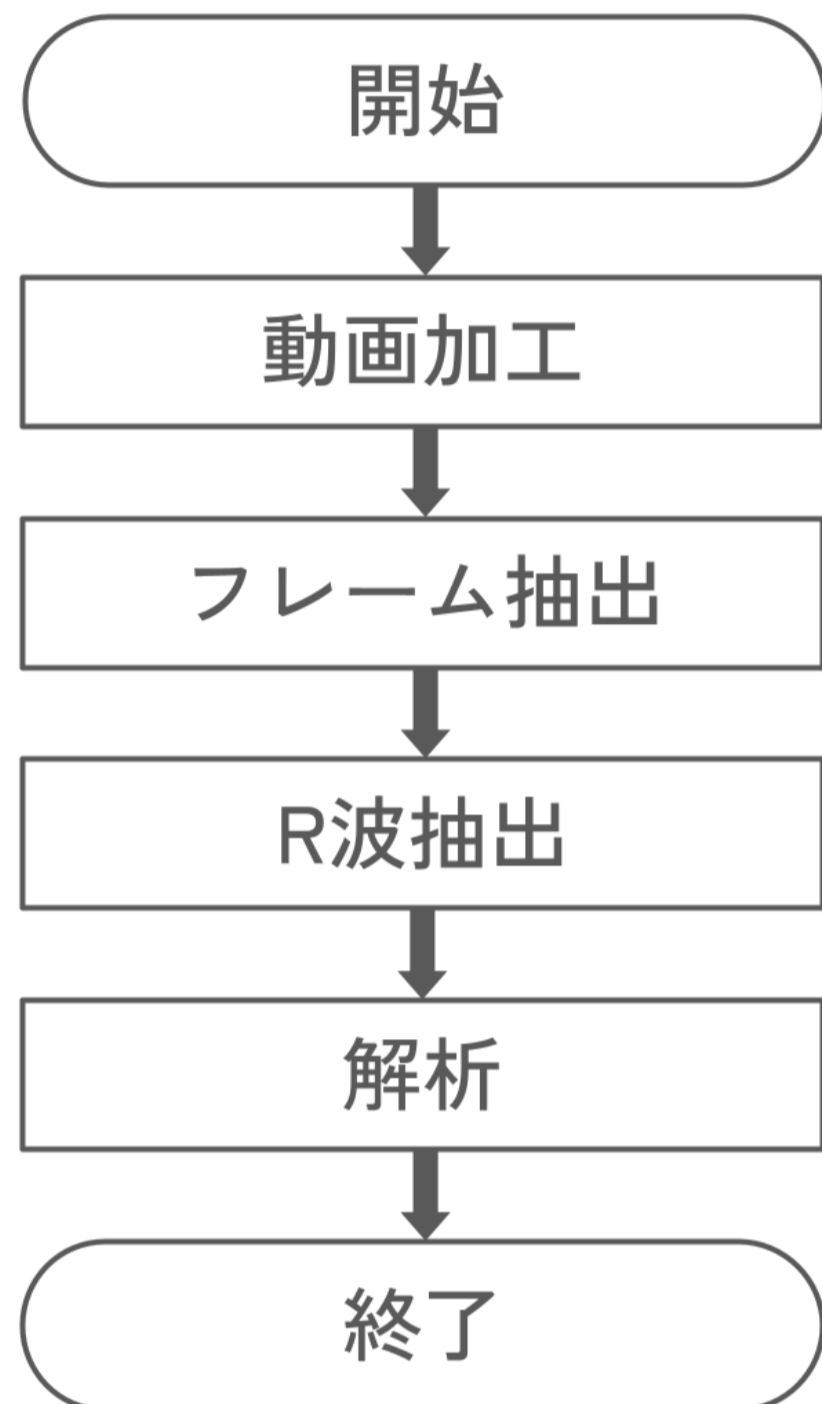


Fig.12 解析のフローチャート

ゼブラフィッシュへの振動付与

実験手法

ゼブラフィッシュを60mm シャーレ上の小型樹脂製リングに静置し、麻酔(Tricaine)を付与した。

シャーレにモーターを装着して振動を付与しながら、心臓の動きをiPhoneのスローモーション撮影機能(240fps)を用いて5分間撮影した。

無振動状態をコントロールとした。

得られた動画をプログラムにより解析し、RMSSD, SDNNを算出した。

プログラムを用いて、コントロールと偏心モーターの平均のRRIパワースペクトル解析を行い、高周波成分と低周波成分の基準を算出した。

低周波成分と高周波成分の比を算出した。

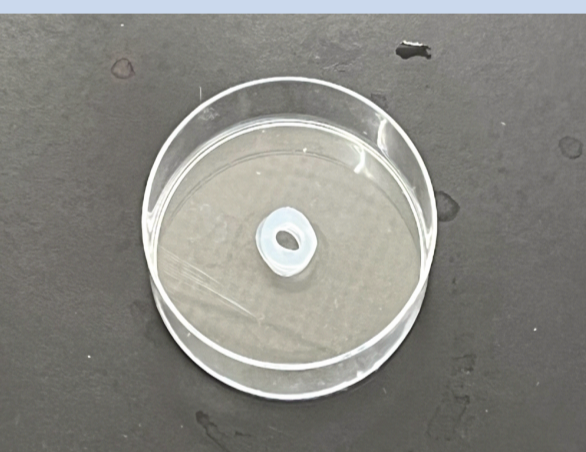


Fig.13 シャーレと樹脂製リング

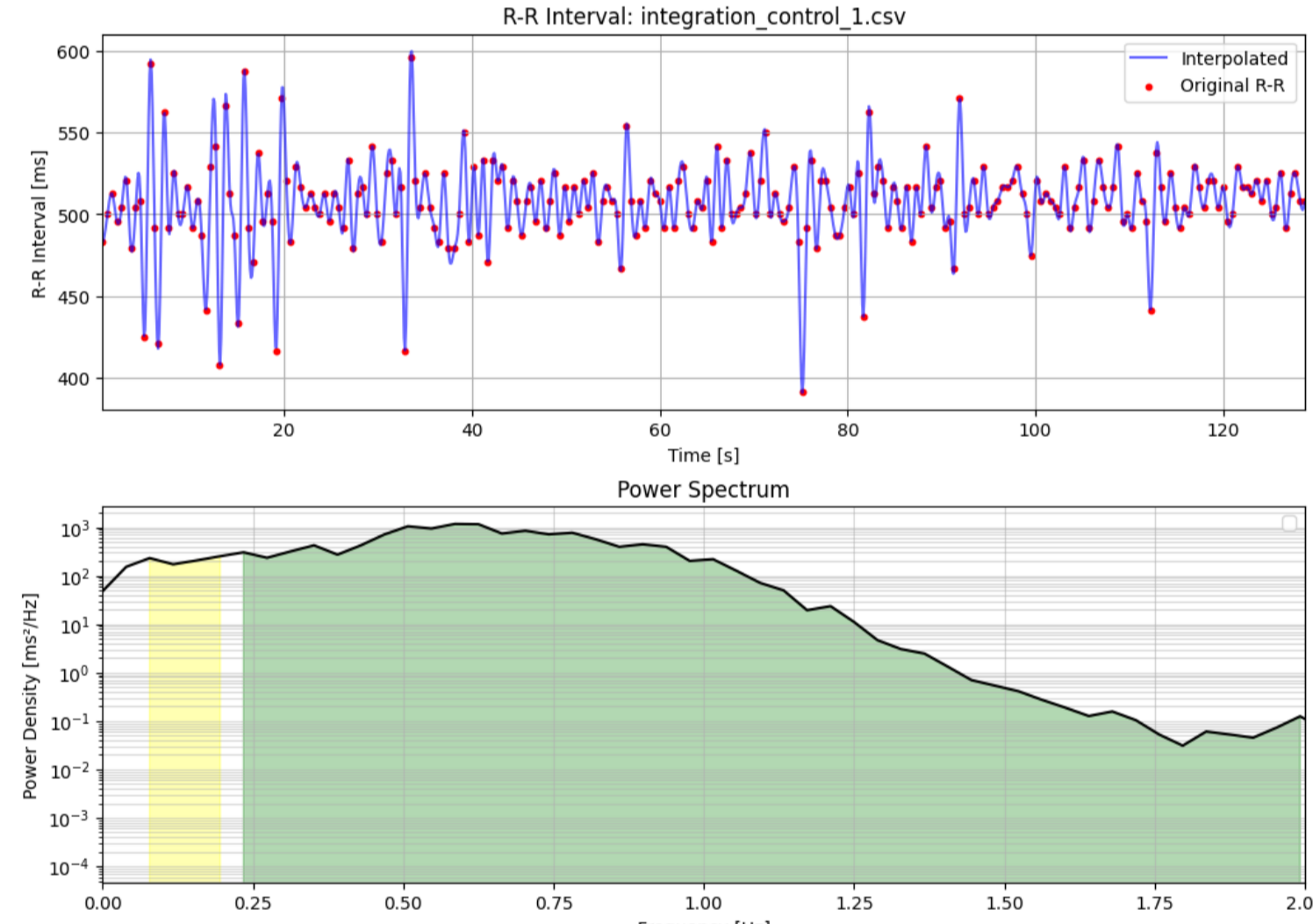


Fig.16 コントロールのPower Spectrum

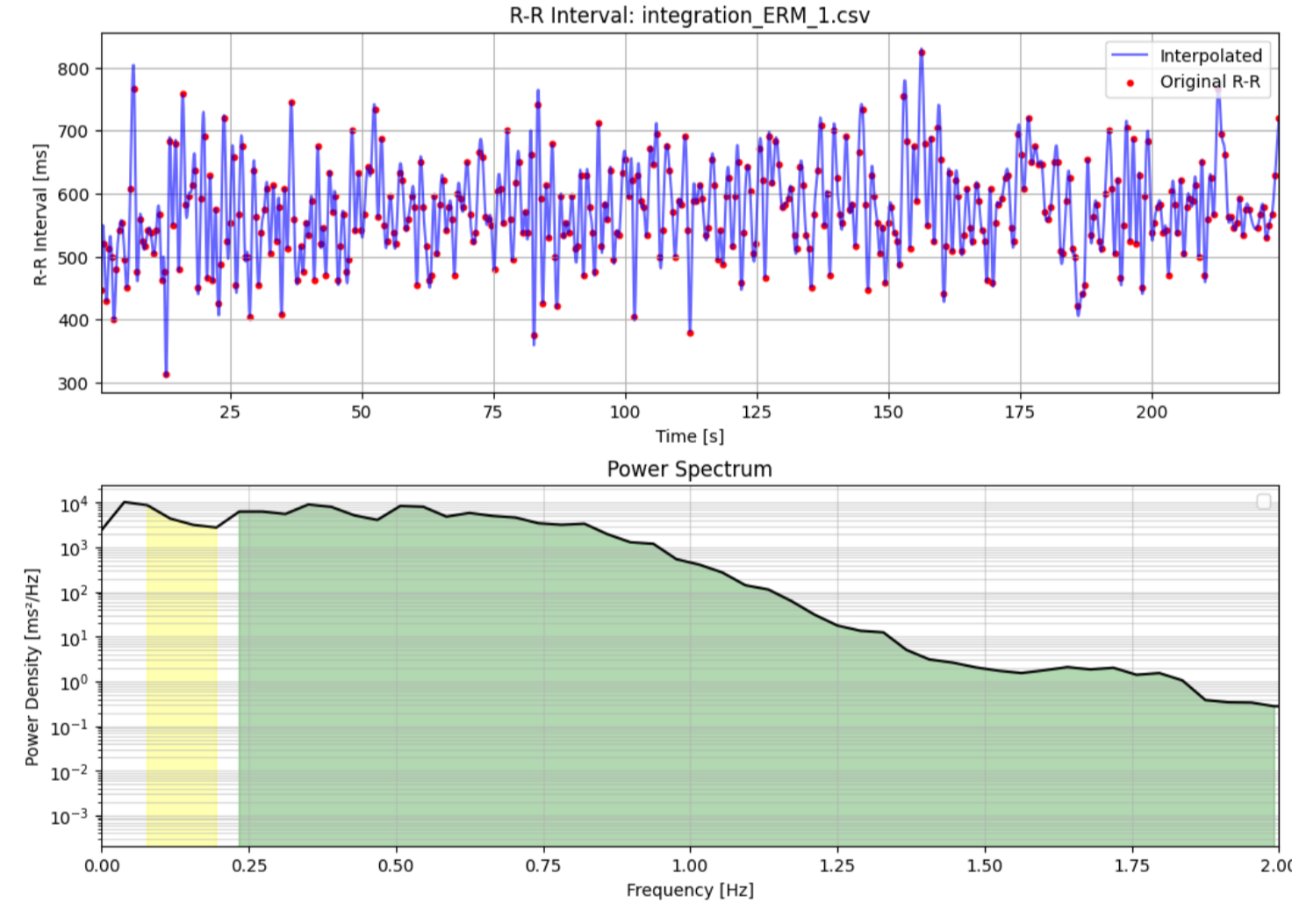


Fig.17 偏心モーターのPower Spectrum

Table 1 RMSSD, SDNNの測定結果

	コントロール	偏心モーター	Taptic Engine
RMSSD (ms)	345.9	870.1	113.0
SDNN (ms)	0.35	0.79	75.7
高周波成分 (ms ²)	24.2	48.76	3908.6
低周波成分 (ms ²)	522	3707.7	526.3
低周波成分/高周波成分	0.05	0.14	0.13

偏心モーターはコントロールに比べてRMSSDを約2.5倍、SDNNを約2.3倍に上昇させ、低周波成分と高周波成分の比を2.8倍に上昇させた。Taptic Engineはコントロールに比べてRMSSDを約0.33倍に低下させ、SDNNを約216.2倍、低周波成分と高周波成分の比を2.6倍に上昇させた。

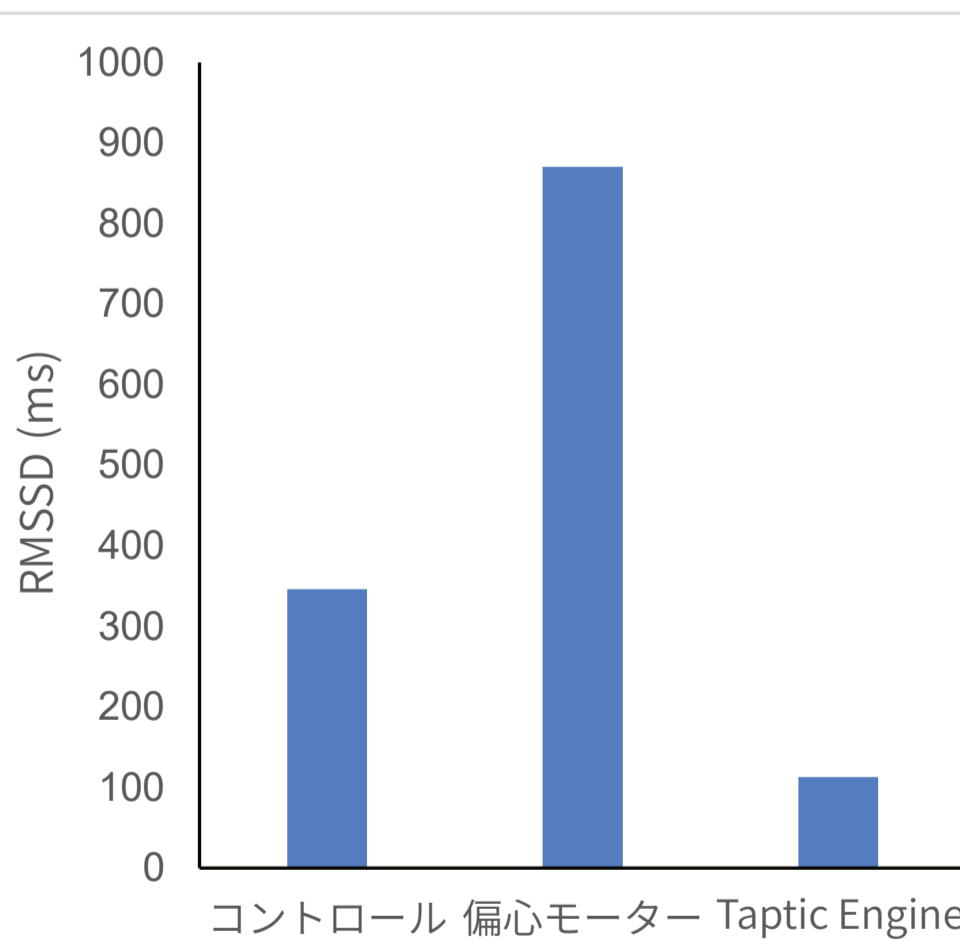


Fig.14 RMSSD

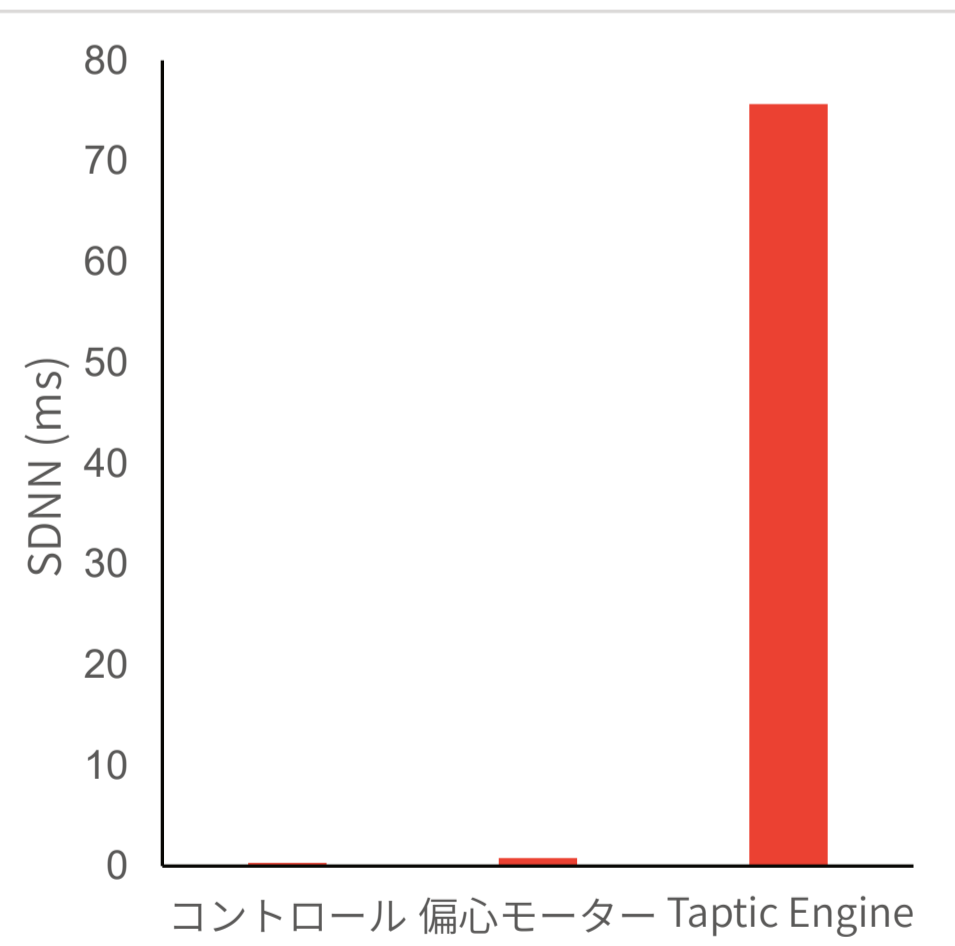


Fig.15 SDNN

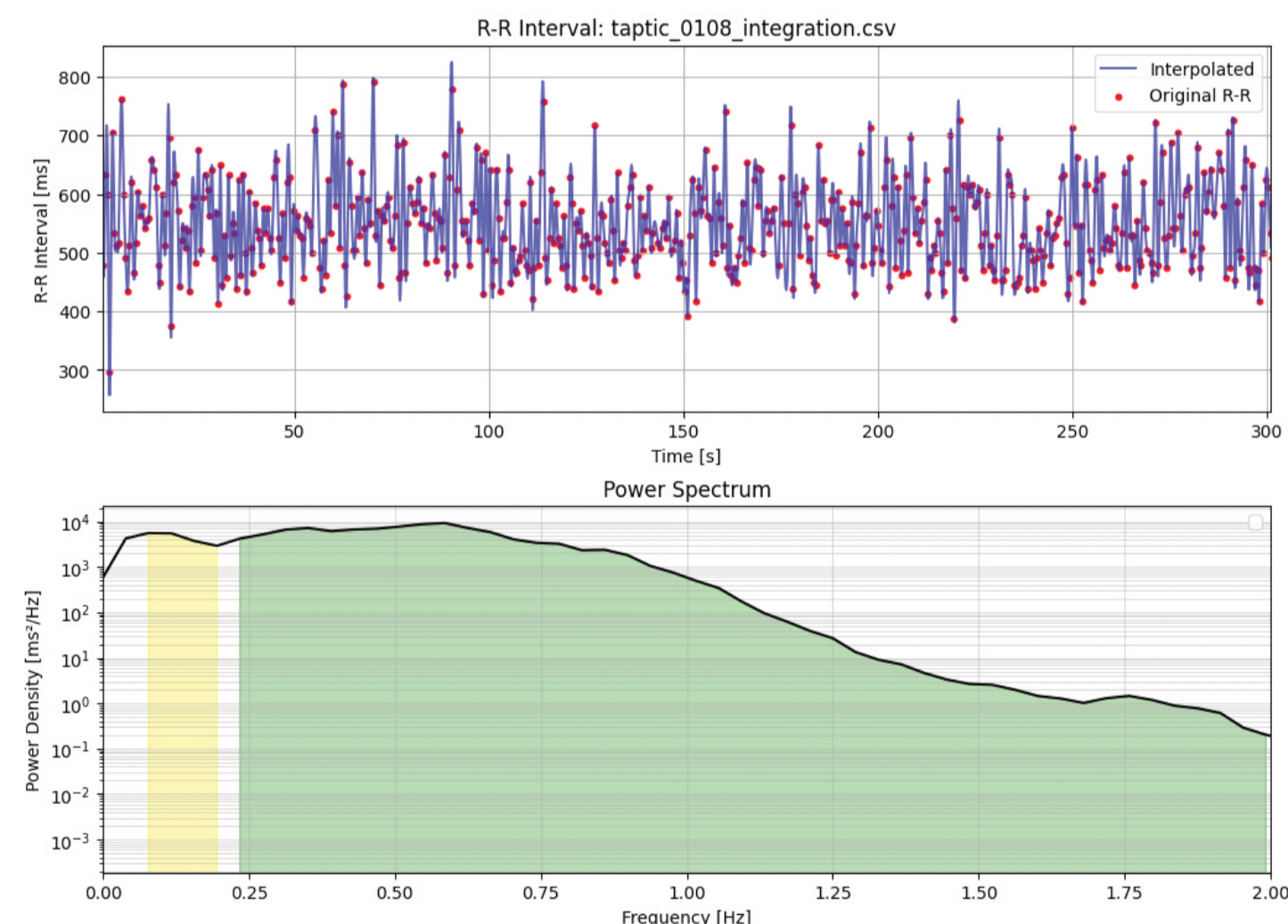


Fig.18 Taptic EngineのPower Spectrum

考察

コントロールに対して偏心モーターのRMSSD、SDNNが上昇した理由として、偏心モーターが副交感神経を優位にしたと考えられる。低周波成分と高周波成分の比が上昇した理由として、偏心モーターが心拍の間隔を大きくしたと考えられる。コントロールに対して、Taptic EngineのRMSSDが低下した理由として、Taptic Engineはコントロールに対して、交感神経を優位にしたと考えられる。SDNNの大幅な増加に関しては物理的なノイズが混入した結果だと考えられる。

結論

麻酔下のゼブラフィッシュにおいて、偏心モーターは、コントロールに対して副交感神経を優位にし、心拍の間隔を大きくした。Taptic Engineは、コントロールに対して交感神経を優位にした。

謝辞

本研究を進めるにあたり、ゼブラフィッシュの分譲および飼育・扱いに関する多くのご助言を賜りました。筑波大学小林研究室の小林麻己人教授に深く感謝申し上げます。また、実験手技や観察方法について丁寧にご指導くださった同研究室大学院生の川本壮志氏にも、心より御礼申し上げます。

今後の展望

麻酔による自律神経の抑制を避けるため、非麻酔下での測定手法を確立する。交感神経活動の指標であるLF/HFを算出するために、交感神経活動を抑制する薬剤であるプロプラノロール投薬時のパワースペクトラムと副交感神経活動を抑制する薬剤であるアトロピン投薬時のパワースペクトラムの違いを見ることが、LFとHFの閾値を設定する。また、この結果をもとに、ヒトに振動を付与して自律神経に働きかけるデバイスを開発する。