A-6

ザリガニの心筋活動を長期間記録するための計測システム開発

Development of a measurement system for long-term recording of cardiac activity in crayfish

○大川匠[1]，小松﨑良将[2]
Takumi Okawa[1]，Yoshimasa Komatsuzaki[2]

Abstract: To investigate the cardiac activity of crayfish (*Procambarus clarkii*), we developed a sensor board, amplification circuit, and recording software to measure infrared reflections noninvasively. As a result, we confirmed that oscillatory activity of 2 to 2.5 times per second was observed. These results indicate that the heart rate of the crayfish is about 120 to 150 per minute, suggesting that measurements consistent with previous studies can be made at low cost. In addition, since this measurement system can be provided as an experimental kit, it is expected to be used in student experiments. Furthermore, by attaching the system to multiple crayfish, we can propose a method to study crayfish sociality and the effects of stress to which crayfish are subjected.

１．はじめに

甲殻類は環境変化に敏感であり，神経活動やホルモンなど様々な生理反応により脈波や心拍が変動することが知られている．そのため，心筋活動を長期間記録することで，環境ストレスの影響や心理状態を捉えることができ，光害[1]や汚染などによる水中環境が変化した場合の判断材料となりうる．また，心筋は中枢神経系によって制御されているため，心筋活動を通して脳活動や高度認知機能に関する研究へ応用できる可能性がある．Pautsina[2]らは，赤外光 LED（IR LED）とフォトトランジスタをザリガニの背側部に当て，その光強度を測定することで，非侵襲的に心筋活動を測定できることを示した．ザリガニの血液中に含まれるヘモシアニンは酸素分子の運搬を担っており，その酸素飽和度によって光の吸収度が異なる．この変化をセンサで取得することにより，心筋の活動状態を測定することが可能である．しかし，実験装置が大きいため，小さなザリガニや，限られたスペースでの測定は困難である．また，使用する AD コンバータや増幅器などの専用機器は高価である．そこで本研究では，実験装置の小型化・低コスト化に着目し，モデル動物であるアメリカザリガニの心筋活動を非侵襲で測定できるシステムを開発することを目的とした．

２．実験方法

本システムで使用するセンサー回路基板，センサーホルダ，記録用ソフトウェアは全て当研究室で設計および製作した．なお，製作費は約 5,000 円であった．センサー回路はチップ抵抗器，フォトトランジスタ，IR LED を表面実装し，3D プリンタで作製したホルダに収納することで，周囲の光を遮断して赤外光の反射をフォトトランジスタで受光できるようにした．フォトトランジスタから出力された光電流をオペアンプで増幅し，16 ビット AD コンバータを介して Arduino で受け取る．受信した測定値は，シリアル通信により接続されたパソコン（PC，Windows）に 10 ms 間隔で送信され，記録用ソフトウェアによりリアルタイムにグラフの描画およびデータの保存が行われる（Fig. 1）．

本研究では船橋校舎の近くの用水路で 2019 年に採集し，研究室内で飼育されたアメリカザリガニ（*Procambarus clarkii*）のオスを用いた．実験に使用するザリガニをキムタオルで包み，ハサミと足，尻尾が

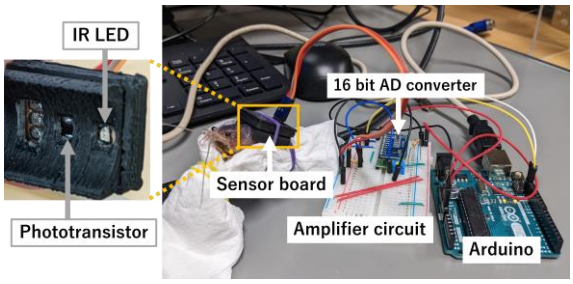

Figure 1. A measurement system for recording the cardiac activity of crayfish.

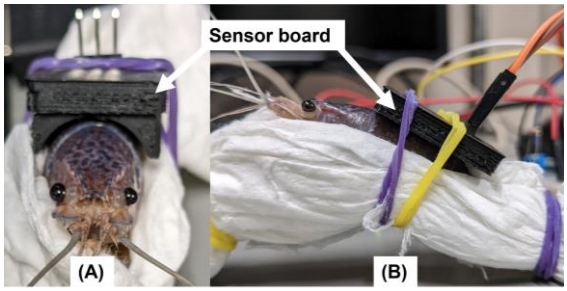

Figure 2. Sensor holder for measuring cardiac activity attached to a crayfish. (A) is front view and (B) is side view.

１：日大理工・学部・物理　２：日大理工・教員・物理

動かないように固定した．次に，センサー回路をホルダに入れ，ザリガニの背側部に輪ゴムで固定し，増幅回路と接続した（Fig. 2）．増幅回路の出力端子を 16 ビット AD コンバータの入力端子に接続し，シリアルクロック（SCK）とシリアルデータ（SDA）の端子を Arduino 側の SCK，SDA 端子に接続した．Arduino の 3.3 V の電圧出力を増幅回路とセンサ回路に，5 V の電圧出力を AD コンバータにそれぞれ接続することで，各回路への電源供給を行った．Arduino と PC を USB 接続した後，記録用ソフトウェアを起動し，部屋を暗くした状態でザリガニの心筋活動を 10 分間測定してデータを記録した．このとき，ザリガニには刺激を与えずになるべく動かさないような状態を保持した．

３．結果

反射赤外光の強度を電圧として捉え，心臓の容積変化に伴う経時変化を Fig. 3A に示した．10 分間測定した実験結果を拡大すると，1 秒間に 2 回～2.5 回電圧の周期的な変動が続く現象が観測できた（Fig. 3B）．この結果より，心拍数は毎分 120～150 回であることが推測できる．また，振動波形は，ピークに達する直前の 150～200 ms 程度のほぼ一定の電圧値であるものと，三角波のように変化するものの 2 種類が観測された（Fig. 3C）．

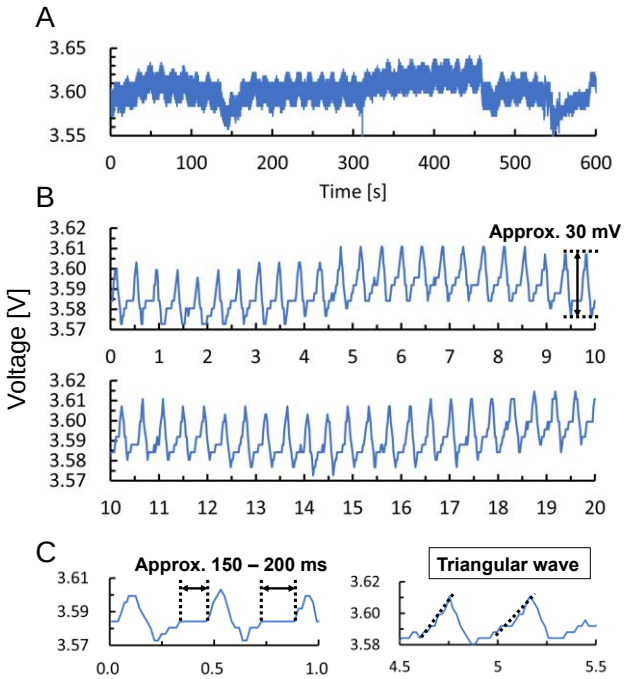

Figure 3. Spontaneous cardiac activity measured by attaching a sensor to the back of a crayfish in a dark room. (A) 10-minutes measurement of cardiac activity. (B) Enlarged views of (A) 0-10 seconds and 10-20 seconds. (C) Detailed waveform changes of cardiac activity. Biphasic waveform on the left, and triangular wave-like waveform on the right.

４．考察・まとめ

本研究では，先行研究よりも小型かつ低コストで非侵襲的に心筋活動を測定できる実験装置を開発し，アメリカザリガニの心筋活動を測定できることを実証した．これは心筋の収縮と膨張による心臓の容積変化でヘモシアニン量が増減したことによる，赤外光の吸収度変化を捉えることができたためと考えられる．この現象は甲殻類だけでなくヒトの血液に含まれるヘモグロビンでも同様の変化が起こることが示されており，本装置をパルスオキシメータとして運用すれば血管年齢の分析に応用することができる [3]．また，Fig. 3C では，左図はピークに向けて 2 段階の増加が見られることから，1 周期に心筋が小さく 2 回収縮しており，右図はピークまでに一定の速度で 1 回で収縮しており，収縮パターンは少なくとも 2 つあるのかもしれない．

本研究で開発したシステムでは，センサからの出力電圧が十分大きくなく，波形の分解能が低い．そのため，増幅回路を改良して増幅率を上げるとともに，増幅に伴って発生するノイズを抑えるフィルタ回路を設計する必要がある．また，センサーホルダに防水対策を施すことで，水中での心筋活動計測が可能になる．さらに，センサと Web カメラを併用することで，心筋活動の変化が生じた際のザリガニの行動を記録し，その行動に伴う心理状態を解析することも可能である．実験装置の小型化により，複数のザリガニを同じ水槽で飼育した場合のザリガニの社会性行動やストレスに対する心理状態を把握する実験や，低コスト化による導入のしやすさから学生実験への利用も期待できる．

５．参考文献

[1] Clay S., Steven J. C., Erika J. E.: “Artificial light at night does not alter heart rate or locomotor behaviour in Caribbean spiny lobster (*Panulirus argus*): insights into light pollution and physiological disturbance using biologgers”, Conserv. Physiol., Vol.8(1), coaa097, 2020.

[2] Pautsina A. et al.: “Noninvasive crayfish cardiac activity monitoring system”, Limnol. Oceanogr.: Methods, Vol.12, pp670-679, 2014.

[3] Willie B. M., Patrick A. F.: “The peripheral pulse wave: Information overlooked”, J. Clin. Monit., Vol.12, pp365–377, 1996.