

長野県諏訪清陵高等学校附属中学校

科学部 ミドリムシ班

國分 慎一 小松 和滉 矢野 雄大

深層学習を用いたミドリムシの動き方の定量化による ステップアップ・ダウン光驚動反応の解明

急激な青色光の変化に対し、遊泳方向を変える習性

目的 - 深層学習により光驚動反応と振動驚動反応時の動き方を解明、明暗周期の運動への影響の解明

ミドリムシの光驚動反応について、その動きの傾向について深層学習を用いて追跡し、分析した。研究の過程において、振動に対しても光驚動反応と同様の反応が見られたため、振動驚動反応と名付け、その動きの傾向を分析した。動きの解析に加え、明暗周期を変数として実験を行い、反応の違いを調べた。

動機

ミドリムシには光驚動反応と振動驚動反応（我々が命名）と呼ばれる、外的刺激に対して遊泳方向を変えたり、運動を激しくしたりする特性がある。これらの発生条件や相関関係を解明することは、ミドリムシの運動活性化に繋がり、培養効率向上も期待できる。また、医療への応用などの可能性なども見込まれる。

培養効率の向上は、ミドリムシの有する多様な機能を活用する機会の増加にも繋がる。ミドリムシは、微生物として、食料として、燃料としてなど、様々な分野での応用が期待されている。

本研究によって、運動メカニズムの解明、環境問題解決への貢献を目指した。

研究方法

(1) 条件

以下の条件下において実験を実施している。

使用個体: Euglena gracilis 明暗周期: 0h 12h 24h 撮影: HD 240fps

(2) 実験

(a) 光驚動反応について

1. スライドガラス上に 50μl のミドリムシ培養液をのせる。
2. 顕微鏡の下部より LED ライトを照射する。
(光の強さは電流と相関関係→電流の大きさで光の強さを制御)
3. LED 照射開始と同時に 1 分間撮影する。

(b) 振動驚動反応について

1. スライドガラス上に 50μl のミドリムシ培養液をのせる。
2. 顕微鏡ステージに設置した振動モーターを振動させる。
3. 振動終了後 1 分間撮影する。

(c) 振動を数値化するため、振動モータにかけた電圧ごとの重力加速度を示す。

(3) 解析

解析方法については右部を参照。

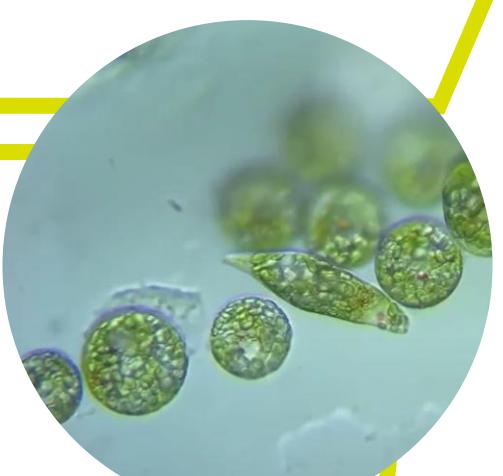


Fig.1 ミドリムシ

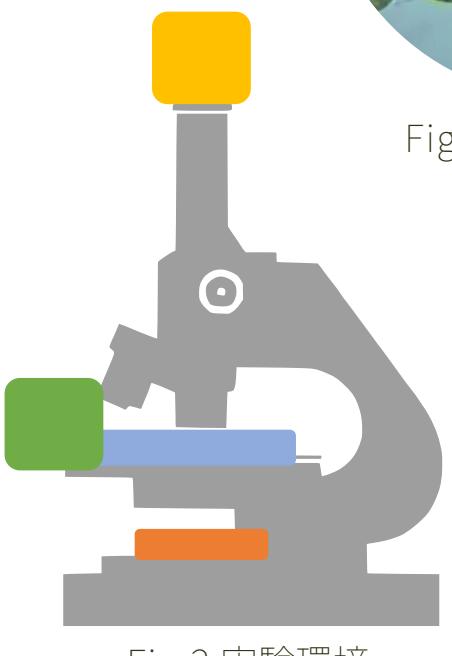
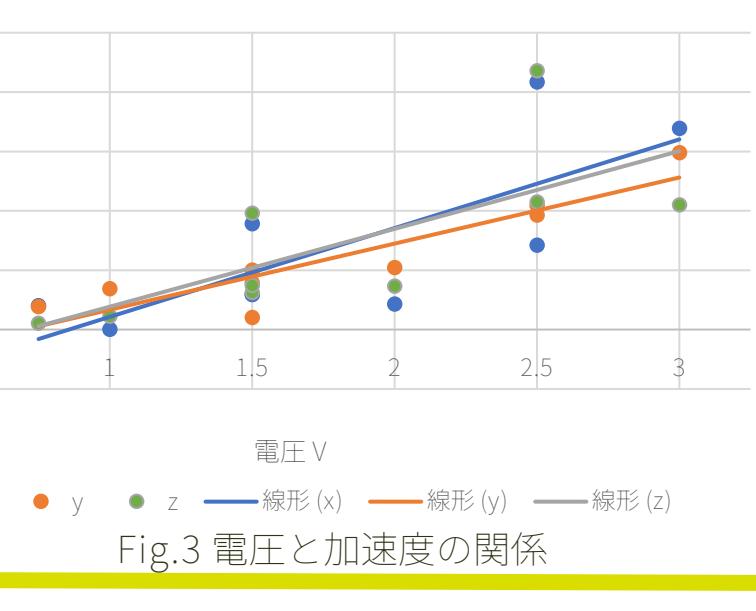


Fig.2 実験環境



研究方法

① 座標追跡

物体検出モデルであるYOLOv8を用い、深層学習によって動画内のミドリムシの座標を追跡した。物体検出の手法にセグメンテーションを用いることによって、ミドリムシの形を構成する点の位置も検出することが可能となった。

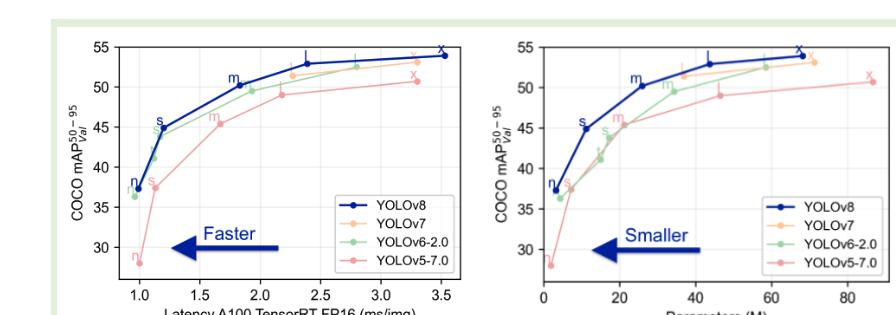


Fig.4 YOLOv8の性能図

② 頭部の検出

セグメンテーションを用いない物体検出では、検出対象を構成する点の位置や対象の回転等の分析ができないが、セグメンテーションを用いたことで頭部座標が検出できるようになった。

ミドリムシの平均的なセグメントの図は右図通りである。頭部を検出するため、セグメント間の距離を調べ、セグメントが最も長い2点、2番目に長い2点が共有する点が頭部または尻部だと判断した。

上記の方法が適用できない場合は、最も長い線分の中点座標を用いた。

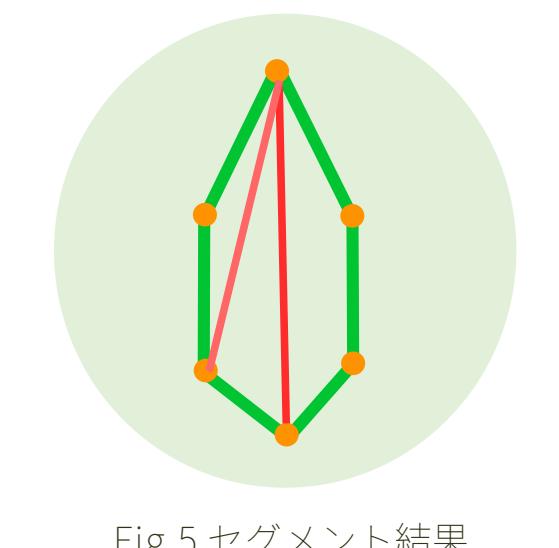


Fig.5 セグメント結果

③ 移動データの計算

a. ミドリムシの回転数

ミドリムシの頭部座標2点をもつ線分が交差する回数を求めた。一度交差した線分以前の線分は考慮せずに交差回数を計測した。

b. ミドリムシの速度

映像のピクセルあたりの距離を求めて、経過時間で割り計算した。

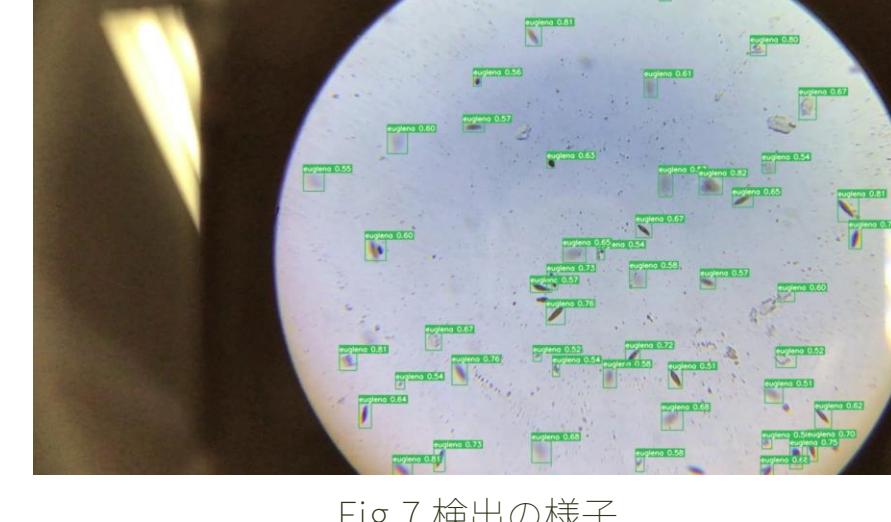


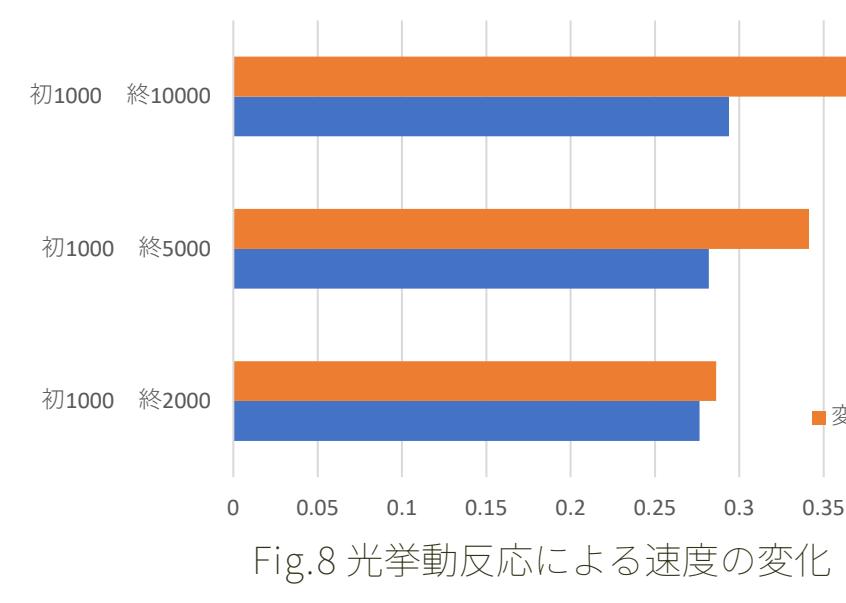
Fig.6 交点検出の様子

実験1 - 光驚動反応

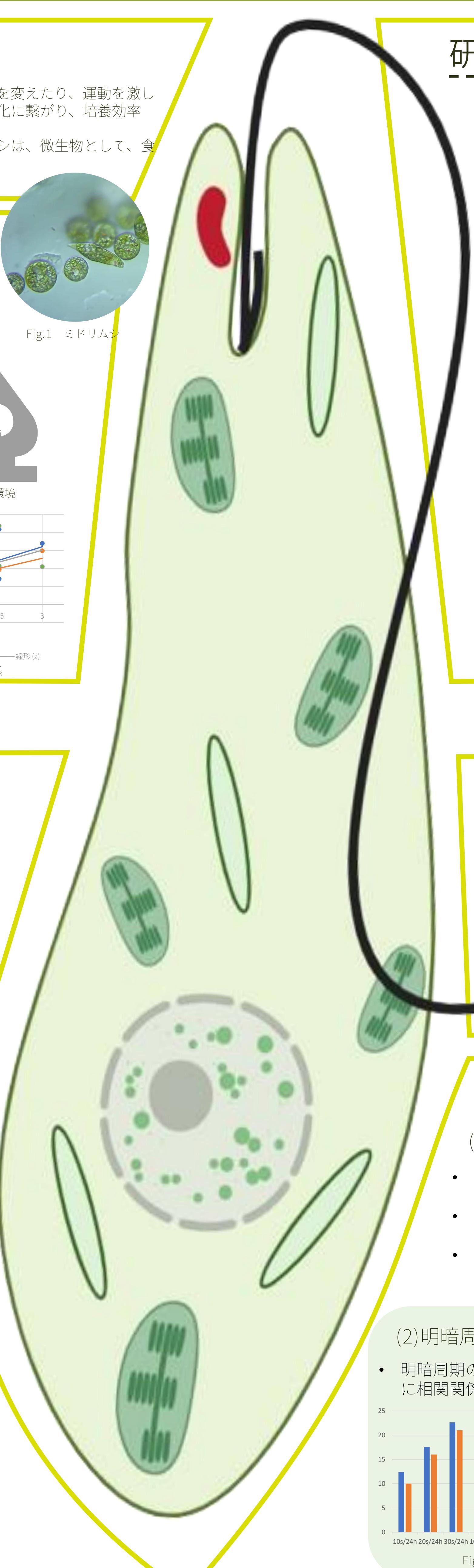
仮説 I

- 光驚動反応は青色光の急激な増減に反応して遊泳方向を変化させる反応であるため、ミドリムシに照射する光の強度を変化させると動き方が変化するのではないか。（光驚動反応）
- 光驚動反応は、光強度が増加する場合の方が動き方の変化は大きくなるのではないか。（光強度増加に合わせて遊泳方向を変化させるのはミドリムシの強い光に対する防衛反応であるが、光強度現象に合わせて遊泳方向を変化させるのはミドリムシがより効率よく光合成をするためのものであり、生存における重要性に大きな違いがあるため）
- 光の上昇幅が大きいほど、動き方は大きく変化するのではないか。

結果 I



- 光の強度の上昇幅が大きくなるほど、光の強さを変更した後の速度は速くなる。
- ミドリムシは光が強くなるほど、長時間光驚動反応を行う。
- また、光撃動反応による回転運動は光の上昇幅が大きくなるほど、多く、細かく回転する。



実験2 - 振動驚動反応

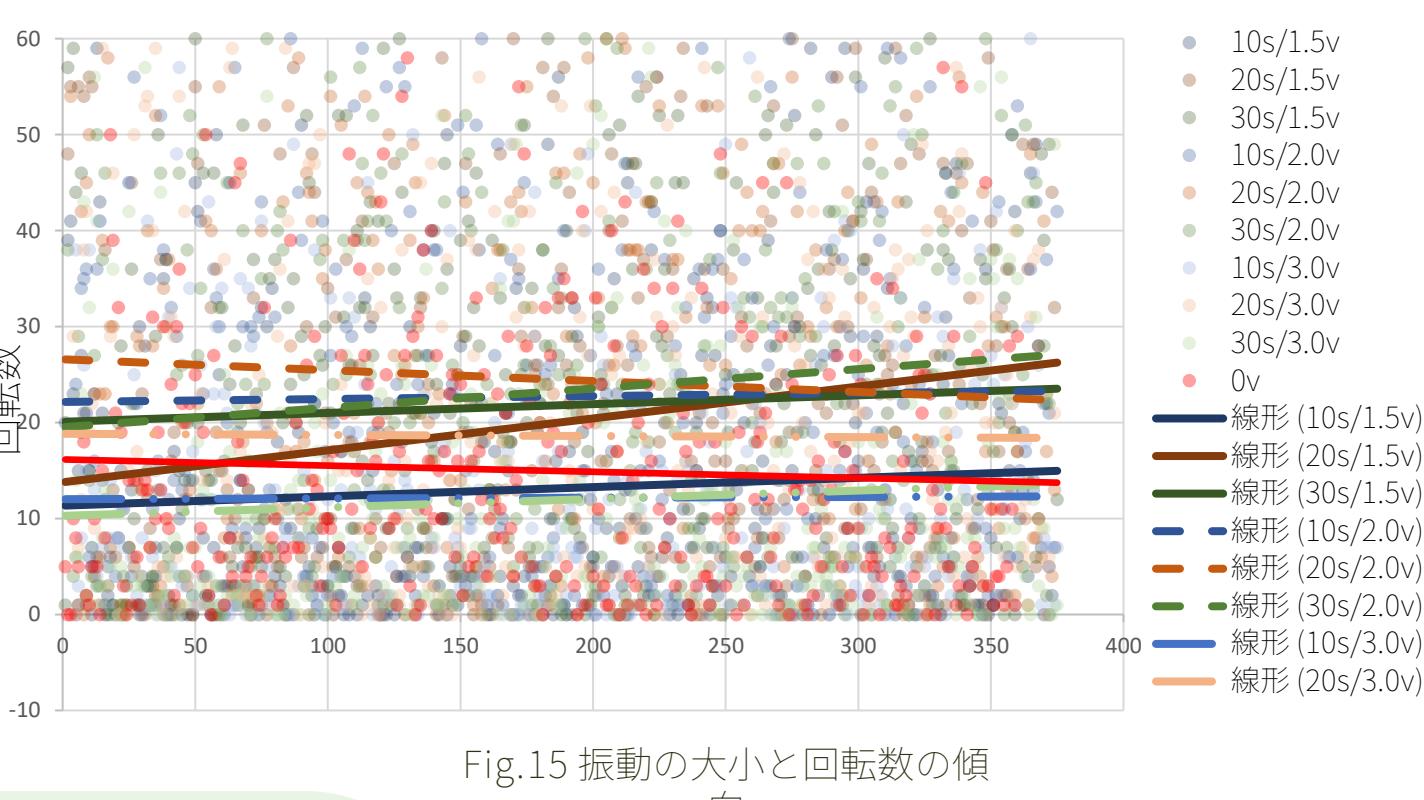
仮説 II

- ミドリムシは止水や浅い水のまわりなど水の流れがない環境に生息する生物である。そのため、環境の大変化回避することが生存における重要な要素である。そのため、ミドリムシは環境の変化の1つの指標である水の振動（流れ）を感じ、動き方を変化させるのではないか。（振動驚動反応）
- 振動驚動反応が生存するための機能であるとすれば、環境の大変化である、強い刺激に対してより激しく振動驚動反応を見せるのではないか。
- ミドリムシの培養に適した明暗周期は中期12時間から14時間である。よって、悪条件で培養されている中期24時間、中期0時間の個体は、振動驚動反応が明暗周期12時間の個体と比較すると弱くなっているのではないか。

結果 II

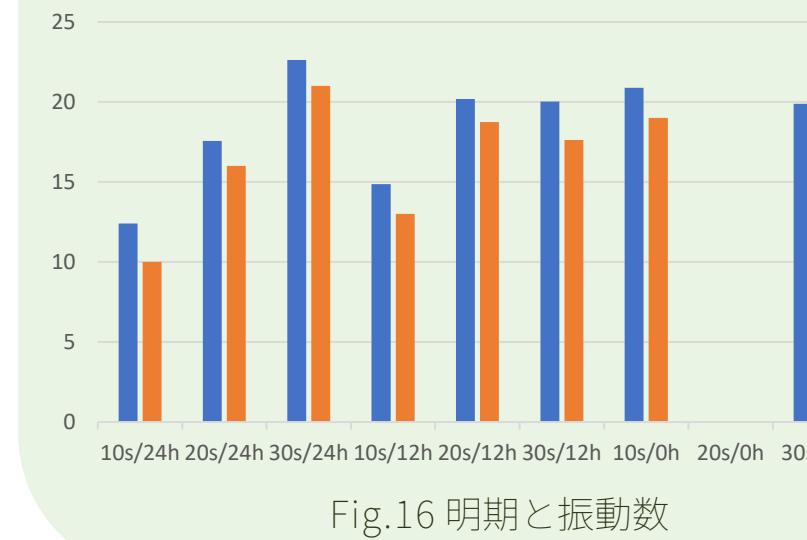
(1) 回転数

- 1変数につき、500個体以上のミドリムシを用いて検証
- プログラムの都合上、30秒間の動画に対して60回以上の回転は削除
- 2V時の振動（破線）において最も回転数が多い。



(2) 明暗周期

- 明暗周期の差の間では回転数に相関関係はない。



(2) 速さ

- 回転数との間に僅かな相関が見られる



考察 I

- 光の強度を変化させることで動き方が変化するという仮説は支持された

ミドリムシの動き速度が光強度上昇後に速くなっていること、軌跡のデータより激しい回転が見られることより光驚動反応は存在することがわかった。

- 光が強くなる方が同じだけ弱くなったときの光撃動反応より激しいのではないか。

本研究ではそのような傾向は観察されなかった

- 光強度の上昇幅が大きいほど、動き方は大きく変化するのではないか。

動き方の変化が大きいことに加え、光驚動反応の継続時間が長かった

考察 II

- 水の振動により動き方が変化するという仮説は支持された。

基準値と比較し、約10回以上の差があるため、振動はミドリムシの動きに影響を与えることがわかった。

- 強い刺激に対してより激しく驚動反応を見せるという仮説を確認できなかった。

結果では2.0V時付近の回転数が最大値と示されたが、ここにはプログラムによる誤差、統計学的誤差を否定できない。

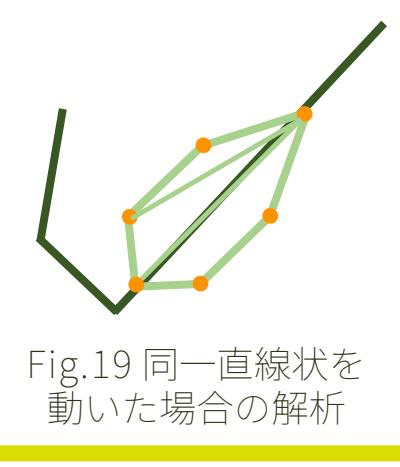
- 明暗周期は振動驚動反応に影響を与えない。

同じ明暗周期の中でも回転数が増加するもの、減少するものが混在しているため相関関係が見られない。

今後の展望 - 外的刺激によるミドリムシの動き方の変化を解析し、制御へ。

解析の信頼性向上

解析過程において、深層学習やプログラムに起因する誤差が見られた。同一直線上を動いた場合、誤検知への対策を急ぐ。



刺激の与え方を多様化

今実験での、刺激の変数が与える影響を追究するにあたり、ミドリムシの状態（ストレス）の制御、音波の活用をしていく。

ミドリムシの運動の制御

先述の実験等によって、刺激が与える運動への影響を詳細に分析し、ミドリムシの運動量を刺激によって制御する。



まとめ - ミドリムシは、光や振動といった刺激へ反応を示す。明暗周期は反応に影響を及ぼさない。