

RFID技術を用いた 集団飼育環境下全自動マウス 行動解析システム IntelliCage

フェノバンス合同会社 代表 遠藤 俊裕

1. はじめに

脳や心の研究は、超高解像度の構造/機能的イメージングや、光遺伝学、ゲノム編集技術など、ノーベル賞級の輝かしい先端科学技術を駆使して日々進められています。しかしながら、脳や心の状態がより包括的・直接的に可視化される「行動」の解析手法については、他の解析分野のような技術革新が遅れ、長らく効率性や精度の面で問題視されてきました。

本稿では、近年、マウスの次世代型行動解析システムとして登場し、急速に普及しているIntelliCage（インテリケージ）システムについて、その仕組みや強み、弊社における運用例や関連サービスなどについて紹介いたします。

2. IntelliCageシステム 5つの特徴と強み

伝統的なマウス行動試験法の多くは半世紀ほど前に確立し、現在に至っても未だ標準的な手法とされています。典型的には、実験者がマウスを飼育ケージから1匹ずつ手で取り出し、特殊な試験装置に移し、そこで数分から数十分程度観察します。しかし、マウスはそのような環境変化やヒトとの接触等に慣れることが難しく、特に後者には強いストレス反応を示

し、活動量・体温・血中ストレスホルモン量等が1時間以上上昇する、といった知見が蓄積しています。2000年頃からは、そのような要因がマウス行動試験の再現性や解釈の一般化可能性を大きく損なっていると繰り返し指摘されてきました。

チューリッヒ大学のHans-Peter Lipp教授（当時）らのグループは、実験用マウスの行動を、ヒトとの接触のない普段の集団生活環境下において、“準自然的”な状態としてそのまま記録・解析するための方法として、RFID（非接触個体識別）技術をベースとしたIntelliCageシステムを開発しました。その主な機能的特徴と強み、外観を図1にまとめました。

以下では、その詳細と、世界的な普及状況、応用分野、弊社での運用例、関連サービスの内容などについて順に紹介いたします。

実験に用いるマウスには、まず、麻酔下で頸部周辺に円筒型のRFIDトランスポンダ、いわゆるマイクロチップ（ISO11784/11785準拠 FDX-B規格）（図2a）を専用のインジェクタで埋め込みます。IntelliCageの四隅には各々小さな部屋（「コーナー」と呼ばれています）があり、マウスはその中に一匹ずつ入ることができます（図

- IntelliCageシステム 5つの特徴と強み
- ①ヒトとの接触に伴うマウスへのストレスを最小化
 - ②ホームケージ環境下での“準自然的”な行動の記録
 - ③RFIDによる確実な個体識別と社会的環境下での試験
 - ④研究の目的に応じた多様な行動試験プログラムの作成
 - ⑤実験の大規模化、行動指標の多様化、ビッグデータ化

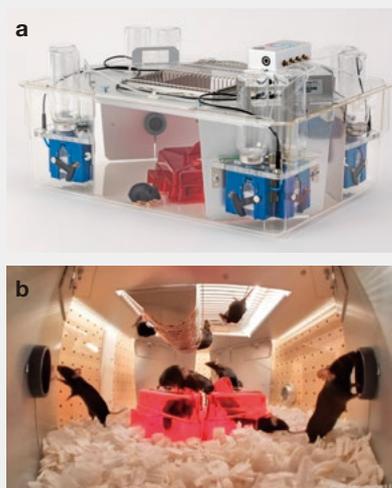


図1. (a) IntelliCageシステム外観、(b) IntelliCage内において飼育・実験中のマウス

2b)。コーナーの入り口には、マウスのマイクロチップに記録された個体識別番号を読み取るアンテナがついています（図2c）。コーナーの中には、左右にひとつずつ穴があり、マウスが穴に鼻を近づける（ノーズポークする）と、センサーがそれを検知します（図2d）。ノーズポークをした穴の奥には上下に開閉するドアがあり、さらに、開

いたドアの奥には給水ビンのノズルの先端があり、マウスはそこから水を飲むことができます。この時、給水ノズルの先端もセンサーとして機能しており、マウスがどの程度ノズルの先端を舐めたかも自動で記録されます。

このような飲水機会は、行動試験中において「報酬」として呈示されます。反対に、マウスの行動に対し、「罰」としてコーナーの天井部から圧縮空気を吹き付けることもできます。

ユーザーは、マウスの自発的な行動の特性や認知機能を調べる目的で、付属の試験課題作成ソフト(Designer)を使い、目的に応じた最適な試験内容をプログラムすることができます。具体的には、マウスが、いつ、どこで、何をしたときに、報酬または罰を与えるかなどを自在に設定します。作成したプログラムは、IntelliCageに接続した制御用PCから実行することができます(図3)。

IntelliCage内部の床面積は、4つのコーナー部分を除いておよそ1612cm²で、ILARやEU等の国際的なガイドラインに従うと、1つのIntelliCageにつき最大16匹まで収容し実験をすることができます。さらに、1つの制御PCから同時に複数台のケージを連結して制御することができるため、同時に100匹以上のマウスの自動行動解析を行うことも可能です。

得られるデータは、一般的な表計算ソフトで開いてみると、一日に数十万行以上になることもあります。その膨大なデータの中から、遺伝子型や環境型の影響、化合物の薬効や副作用などの詳細を探索していくことができます。

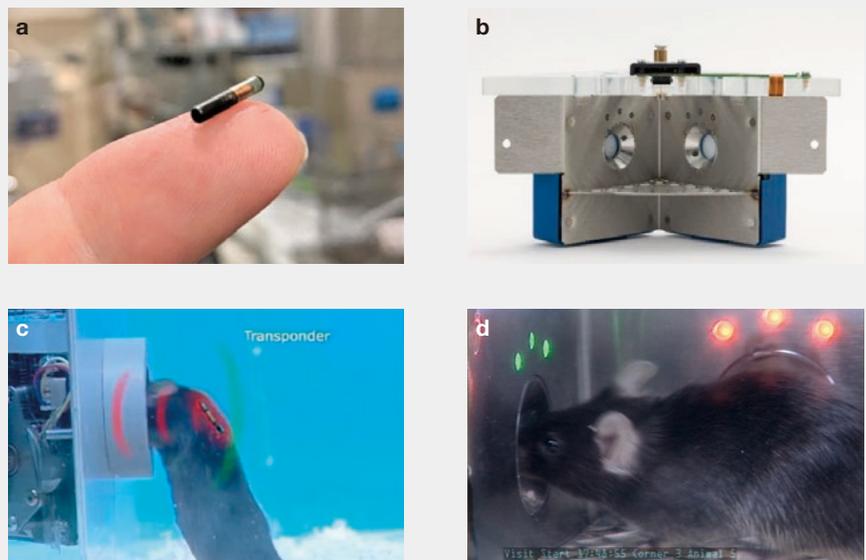


図2. (a) マウスの皮下に埋め込むRFID個体識別用マイクロチップ、(b) コーナー内部、(c) コーナー入口でのID読取アンテナ、(d) ノーズポーク行動

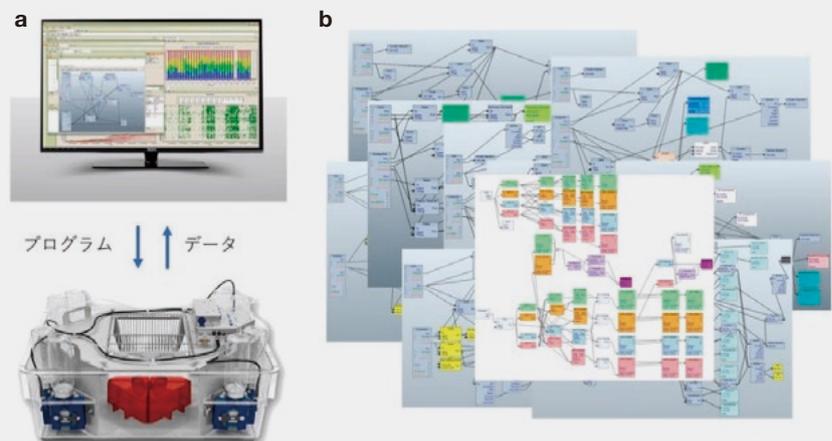


図3. (a) 実験中のイメージ、(b) ユーザーは付属のDesignerソフトウェアを用いて、自由に行動試験プログラムを作成できる

3. IntelliCageの普及状況

(1) 販売台数

IntelliCageシステムの現・販売元であるTSE Systems社より提供いただいた2020年末時点での資料によれば、これまで少なくとも欧州で172台、アジアで64台、北米で51台のIntelliCageシステムが販売されています。

特に神経科学分野、精神神経疾患分野の研究において世界をリードするドイツ(57台)、アメリカ(49台)、そして近年科学技術分野において著しい躍進をみせる中

国(31台)などで積極的に導入されており、疾患・創薬研究などに活用されています。国内でも特にこの2~3年で10台ほどが新たに企業・大学・その他研究機関に導入され、世界では中国に次ぐ合計30台ほどが導入されています。

(2) 学術論文数

学術文献上でのIntelliCageシステムの初出はGalsworthyらによる2005年の論文(Behav. Brain Res., 2005)です。その後欧州を中心に世界的に普及し、2020年末時点では少なくとも200を超える学術論文が発表されています(図4, 特許

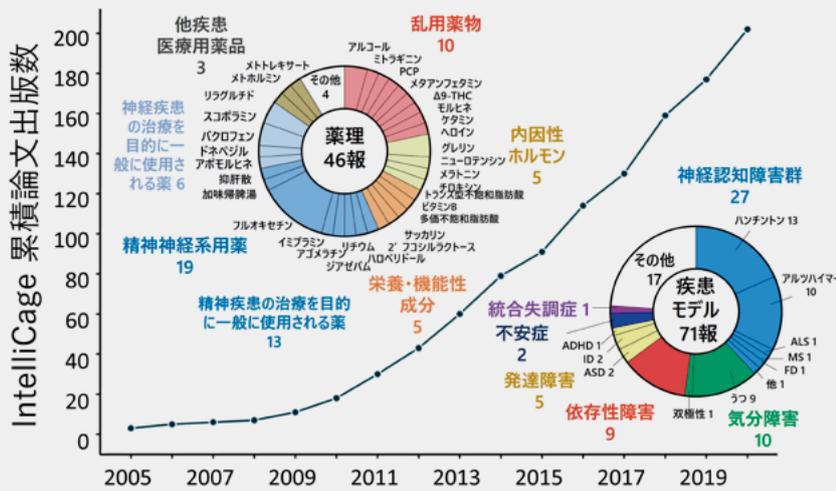


図4. IntelliCageが使用されている研究の累積学術論文数(折れ線グラフ)および使用用途や方法の詳細(円グラフ)

文献は含まず)。IntelliCageの開発の経緯やこれまで出版された文献についての詳しい総括は、Kirykらによる2020年のレビュー論文(Behav. Brain Res., 2020)が参考になります。

(3) 研究用途

IntelliCageシステムは、これまで、疾患モデル動物の表現型解析(71報)や、薬効薬理試験や栄養・機能性成分効果の探索(46報)、化合物や環境化学物質の安全性評価/毒性評価など、主に医学・薬学・健康科学領域の研究に多く利用されています。疾患モデルとしては、気分障害、依存性障害、自閉スペクトラム症等の精神疾患/発達障害モデル、アルツハイマー型認知症やパーキンソン病等の神経変性疾患モデル、コストロ症候群やコフィン・ローリー症候群等の希少疾患モデル等を用いた試験が発表されています。薬理的研究としては、各種抗うつ薬、抗不安薬、ハロペリドール、リチウム、ドネペジル、加味帰脾湯といった既存の薬剤の評価や、新規化合物の評価、乱用薬物等を用いた研究が広く行われています。マウスの系統としては少なくとも12系統以上が

用いられており、さらには野外で捕獲されたモリアカネズミ(wood mouse)やヨーロッパヤチネズミ(bank vole)等の行動解析にも使用されています。

4. フェノバンス合同会社におけるIntelliCage関連サービス

弊社は、IntelliCageシステムの開発者であるHans-Peter Lipp博士にScientific Advisorとしてご協力いただき、同じく同システムに深く精通した共同研究者チームによって設立されました。IntelliCageに関連する事業としては、①IntelliCage受託試験サービス(表現型解析、薬効薬理試験等)、②IntelliCageシステムの輸入・販売、③ユーザーサポートを行っています。以下では、弊社におけるIntelliCageシステムの実際の運用状況、および上記①の受託試験サービスについて詳しく紹介させていただきます。

(1) 環境条件

弊社では、IntelliCageシステムを最適な環境で運用するため、IntelliCage試験とその前後の期間での短期的な飼育のみを行う専用の実験施設を備えています。その

中で、個々のIntelliCageは、専用の「アイソレーションボックス」(弊社製 PRT-IC0033)内で使用しています(図5)。このアイソレーションボックスは、IntelliCage周囲の環境条件の標準化を図るとともに、不必要な騒音や実験者の気配等の軽減、ボックスごとの環境条件の調節(明暗周期条件の変更など)、詳細な実験環境モニタリング(温度・湿度・騒音・照度・二酸化炭素濃度等の測定、異常値の検出、監視カメラでの画像的記録など)を行えるようにしています。実験施設間での環境条件の違いや同一施設内での環境条件のばらつきは、行動試験の結果を大きく左右し得るため、このような環境条件の統制や監視体制は重要であると考えています。

(2) 行動試験ライブラリ

IntelliCageシステムの最大の利点の1つは、ユーザーが自由に、研究の目的に応じた多様な行動試験プログラムを作成・実施できる点にあります。しかし、実際のところ、適切に行動試験をデザインし、得られたデータを見ながらさらに詳細なパラメータ調整をしていく過程には、マウス行動学とIntelliCageシステムの両面における深い理解と熟練を要します。過去の文献を見ると、ほとんどのグループがこの利点をほとんど活用できておらず、システムの購入時にサンプルとして付属するごく簡単なプログラムをそのまま使用して2~3種類の実験が行われているという事例も多いようです。



図5. 専用の「アイソレーションボックス」を利用したIntelliCageシステム専用実験環境

弊社では、同システムを10年以上にわたり運用し実施してきた様々なモデルマウスの解析を通じ、その有用性が確認された70種類以上の行動試験プログラムを揃え、これを独自の「行動試験ライブラリ」と名付けて活用しています(図6)。この行動試験ライブラ

りでは、評価カテゴリーとして、探索的行動、場所学習、行動系列学習/作業記憶、行動柔軟性、各種オペラントスケジュール、注意と衝動抑制、恐怖条件付け、うつ病の症状としての快感消失(アンヘドニア)/モチベーション、感覚過敏/鈍麻(視覚・味覚・嗅覚刺激に対する反応)、不安と順応、社会性、リズム/ストレス、視覚的弁別学習、長期記憶(報酬/罰ベース)の全14カテゴリーがあり、それぞれについて複数のバリエーションプロトコルがあります。これにより、研究の目的に応じて必要な試験プログラムを組み合わせ、最適な試験スケジュールを組むことができます。(詳しくは2021年3月に日本チャールス・リバー(現・ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン)のウェビナーでお話しさせていただきましたので、オンデマンド配信をご覧ください)²⁾。

(3) データ・プログラム例

弊社がこれまでIntelliCageシステムを用いて解析したデータの一例として、基底活動の多変量解析の例(7系統比較試験および加齢影響評価試験より)と弊社の行動試験ライブラリより課題の一例を紹介いたします。

まず、図7にある解析では、特別

な行動試験プログラムは用いていません。マウス達がケージ内で自由に活動している期間の基底活動データから、遺伝子型(系統)や加齢による基底活動への影響を探索した例です。いずれも重判別分析(MDA)と呼ばれる手法により、系統ごと、週齢ごとの行動の特徴を二次元平面状で分類することができました。ここから、さらに具体的にどのような行動指標がそれぞれの群の行動を特徴づけているかを知ることもできます。例えば、C57BL/6Jマウスでは、加齢が進むにつれて「常同的行動」が増加しているということがわかり、行動レベルにおける新しい老化マーカーを得ることができました。

次に、先述の弊社の行動試験ライブラリから、SP-FLEX (self-paced behavioral flexibility test) と名付けた課題を紹介いたします(図8)。

この課題では、マウスは報酬を効率よく得るために、4つのコーナーを特定のルールに従って順に訪れなければいけません。例えば、あるマウスは対角線上に位置する2つの離れたコーナーを交互に行き来することで効率的に報酬を得られることを学習します(行動系列の学習)。個々のマウスの学習成績はシステムによって常に監視されており、SPRTと呼ばれる統計学的検定法により一定の正答率を超えたと判断されると、そのマウスには自動的に別のルールの課題が与えられます。つまり、そのマウスはその時点までに学習した行動習慣から脱し、あらたなルールに即した行動を学習しなければなりません。このSP-FLEXは、日々刻々と変化する状況にどれほど柔軟に適応できるか(=行動柔軟性)

IntelliCage 行動試験ライブラリ (2021年度)

C1: 探索行動	C2: 場所学習	C3: 行動系列学習/作業記憶	C4: 行動柔軟性	C5: オペラントスケジュール	C6: 注意と衝動抑制	C7: 恐怖条件付け
EX-IC	PL-Np	BST-2Cnr	FLEX-CS-CX	OP-FRX-Np	TL-Np-H/W	FC-C
EX-SA	PL-Np-S	BST-3Cnr	FLEX-CS-FR2	OP-VRX-Np	TL-Np-DRL	FC-AC
EX-BC	PL-Cnr	BST-4Cnr	FLEX-CS-CV	OP-PRX-Np	TL-Np-DRLH	FCC-C
EX-Rand	PL-Cnr-S	BST-WM	FLEX-CS-UI	OP-FRX-Cnr	TL-Cnr-DRL	FCC-AC
EX-NpAd			FLEX-PS-CV	OP-VRX-Cnr	TL-Cnr-DRLH	FCC-C-SA
			FLEX-PS-CX	OP-PRX-Cnr	TL-IRP	
			FLEX-CS-PS-CX	OP-FRX-Cnr-S	TL-IRP-P	
			FLEX-CS-Pr-CX		TL-IRP-S	
			FLEX-CS-PS-Pr-CX		TL-IRP-P-S	
			FLEX-3Cnr-CX			

C8: アンヘドニア	C9: 感覚過敏/鈍麻	C10: 不安と順応	C11: 社会性	C12: リズム/ストレス	C13: 視覚的弁別学習	C14: 長期記憶
TASTE-CX	ODOR-Soc-SS	AXAD-Snd-LX	SOC-Comp-CLX	RS-JL-Adv	VDL	LTM-R
TASTE-CV	ODOR-Soc-OS	AXAD-Snd-LV	SOC-Comp-CLV	RS-JL-Dly	VDL-S	LTM-P
TASTE-PR-CX	ODOR-NSoc	AXAD-Lit-BX	SOC-Comp-SA-CLX	RS-JL-Chr		
	ODOR-F	AXAD-Lit-BV	SOC-LF-CX	RS-L		
	ODOR-SA	AXAD-Lit-SA-BX	SOC-LF-SR-CX	RS-DD		
	TASTE-V	AXAD-Ap	SOC-LF-SR-CX-S	RS-N		
	LED-V	AXAD-Ap-Rep	SOC-3CS-SA	RS-L		
			SOC-3CSR-SA			
			SOC-ColSAd			

図6. 弊社が保有するIntelliCageで実施可能な行動試験リスト

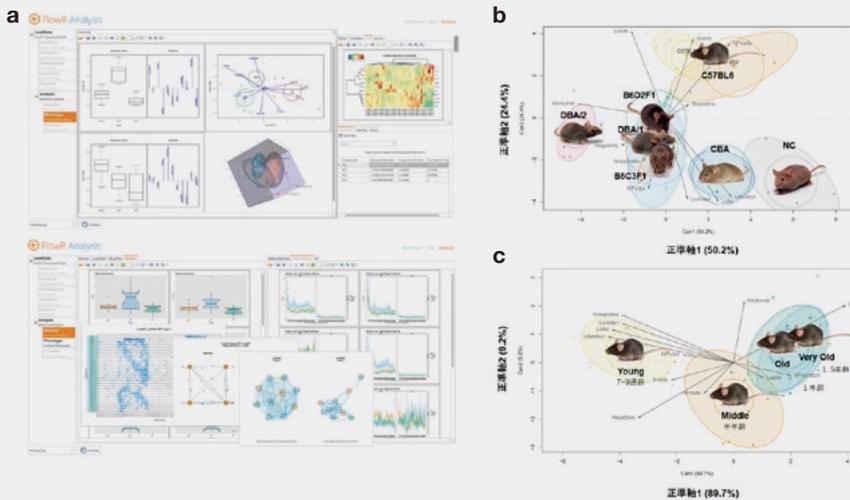


図7. (a)2週間の基底活動データを用いて行う、活動量、活動リズム、常同行動、個体間行動相関等の解析例。(b)7系統のマウスの基底活動パターンを重判別分析(MDA)を用いて分類した例。(c)様々な週齢のC57BL/6J系統マウスを用いて、異なる週齢群ごとの基底活動パターンを同じくMDAを用いて分類した例。

という、高度な認知能力を評価するための試験です。浸透圧ポンプを用いてSP-FLEX中にスコポラミンやアトロピンといった認知機能障害を引き起こす薬剤を投与すると、これらの行動系列学習や行動柔軟性が著しく阻害されることが確認できました(論文投稿準備中)。この課題がASDモデルマウスの表現型解析において用いられた例では、ASDの中核的症

状である「ルールの変化に対する適応の困難さ」がマウスにおいても繰り返し再現されることが確認されました(Shabeesh et al., 2021, Mol. Psy.)。

(4) 受託試験サービスと実験スケジュール例

弊社では、ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社より再委託を受け、上記の実験設備と行動試験ライブラリを用いた「IntelliCageマウス行動表現型解析サービス」を行っています(詳細はウェブサイト¹をご覧ください)。このサービスでは、既に決まった試験を機械的に実施するのではなく、事前ヒアリングから最適な試験計画の提案、試験の実施、詳細なレポート、フォローアップミーティングによる試験結果の解説や質疑応答までをひとまとめにしたサービスです(図9)。そのため、IntelliCageシステムや、マウスの行動解析そのものに関する知識や経験がなくても全く問題ありません。

同サービスでも用いている典型的な実験スケジュールの例を

紹介いたします(図9下段)。まず、実験に使用するマウスを受け取り、施設馴化、マイクロチップの埋め込み、事前集団飼育馴化を順に行います。この段階で大きな体重の減少、極端な脱毛、深刻なケガ等が発生していないかを確認し、問題がなければそのコホートをIntelliCageに移します。マウスがIntelliCageに入った直後の数時間、数日間の行動データは「新奇環境における探索行動」の解析対象とします。続いて、そのままIntelliCage内で2週間飼育を行い、「基底活動」の解析を行うためのデータを収集します。このデータからは、活動量、活動リズム(ピリオドグラム、コサイナー法など)、常同行動、個体間活動相関性、多変量解析(主成分分析、重判別分析)などの解析を行います。その後、研究の目的に応じて選定した認知課題、例えば、「行動系列の学習」、「行動柔軟性」、「注意と衝動性」、「アンヘドニア/モチベーション」、「不安と順応」のカテゴリーに属する行動試験プログラムを順に実施していきます。それぞれの行動試験プログラムは、それぞれ平均的には数日から1週間ほど実施します。マウスの表現型解析に関しては、この2か月程度のスケジュールで幅広い項目を検査することができます。

5. さいごに

学会やセミナー等でIntelliCageシステムの紹介をさせていただくと、「非常に画期的なシステム



図8. SP-FLEX課題とスコポラミン、アトロピンを用いた実験例

だが、その分導入のハードルが高そう」、「試験プログラムの作成に不安がある」、「膨大なデータが得られても、それを解析するのが難しそう」といった声がよく聞かれます。私たちは、そのような不安や疑問を少しでも解消し、IntelliCageシステムの強みを広く知っていただくことを目標としています。本稿をお読みにになり、少しでもご興味を持たれた方は、ぜひお気軽にオンライン/オンサイトでの口頭での追加説明や、サポートのご依頼をいただければ幸いです。ウェビナーの録画資料²もぜひご活用下さい。

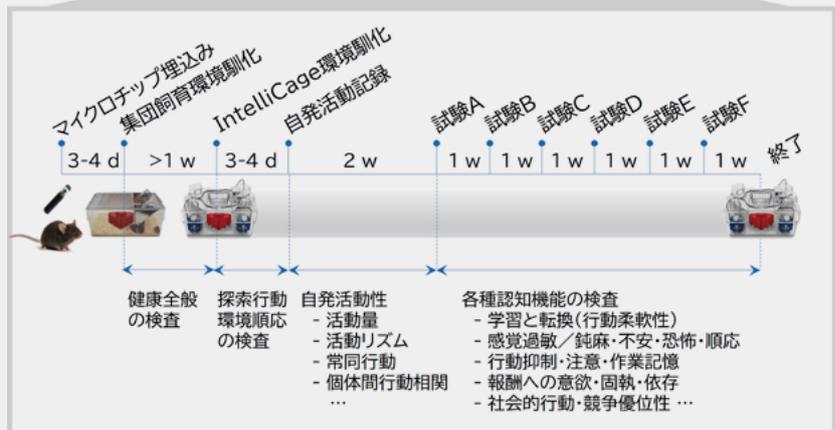
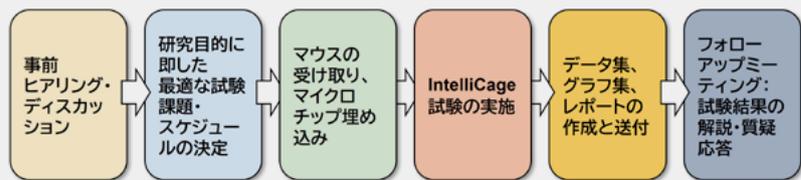


図9. IntelliCageシステムを用いた受託試験サービスの流れ

参考資料

1 「IntelliCageマウス行動表現型解析サービス」ウェブサイト (ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン) <https://www.crj.co.jp/service/gems/intellicage>

2 Charles Riverウェビナー「精神神経疾患モデルマウス行動解析の”翻訳の失敗”にどう立ち向かうか -IntelliCageを例とした“AHEAD”アプローチ-」 <https://www.crj.co.jp/event/detail/7> (バーチャル展示会より視聴可)

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)