

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：82101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15728

研究課題名（和文）小型霊長類における自閉スペクトラム症モデル評価系の確立

研究課題名（英文）Development of Assay System for Autism Spectrum Disorder Models in Small Primates

研究代表者

ベナー 聖子（Benner, Seico）

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康領域・主任研究員

研究者番号：70772002

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、RFID技術を用い、Enrichment環境における集団飼育コモンマーモセットの行動を、全自動で24時間365日連続的にモニタリングし続けるシステムを開発した。これにより得られる大規模な行動データから、動物の自然で多様な行動レパートリーを解析することで、多岐にわたる日常的な行動パターン、社会的関係性、および認知機能の評価に成功した。本手法は、自閉症スペクトラム症をはじめ、様々な疾患モデルの表現型解析および薬物投与効果等の評価において重要な知見を提供するものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した手法は、これまで行動データ収集が困難とされてきたマーモセットを対象に、多様な行動指標を、長期にわたり、再現性高く、効率的に収集できるため、精神医学分野における創薬研究の精度と効率性の向上に貢献する。さらに、動物のストレスを軽減し、かつ信頼性の高い行動情報を一頭からより多く得ることができるため、動物福祉の向上に貢献する。実験動物の福祉に対する社会的な関心が高まるなか、倫理的な実験手法の確立は必須である。本アプローチは、マーモセットに限らず様々な動物モデル研究への応用が可能で、広範な分野での進展を促すと期待される。

研究成果の概要（英文）：We developed a fully automated, RFID-based behavioral monitoring system for group-housed common marmosets kept in an enriched environment, that operates 24/7 continuously. By analyzing the animals' natural and diverse behavioral repertoire from the large scale behavioral data obtained from this system, we have successfully evaluated a wide variety of daily behavioral patterns, social relationships, and cognitive functions. This method provides crucial insights for phenotypic analysis of various disease models, including autism spectrum disorders, and for assessing the effects of drug administration.

研究分野：behavioural neuroscience

キーワード：コモン・マーモセット 全自動行動解析 自閉スペクトラム症

## 1. 研究開始当初の背景

精神医学領域における創薬研究の最大の課題は、ヒトの複雑な症状を部分的にも再現し得る、臨床予測性の高い動物モデルが不足していることである(日本学術会議による提言 2017)。特に「社会的コミュニケーションおよび相互関係における持続的障害」を主徴とする自閉スペクトラム症(Autism spectrum disorder: 以下、ASD)においては、国際標準とされてきたげっ歯類モデルよりもヒトに近い様式や頻度で社会的コミュニケーション行動をとる動物種を用いて ASD モデルを確立する必要がある。このため、高度な社会性をもつ小型霊長類コモン・マーモセット(以下、マーモセット)の活用が期待されている(AMED 革新脳など)。しかしながら、マーモセットの社会性行動を ASD 研究に活用している例は世界的にもごく僅かである。その理由のひとつとして、従来の医学生物学研究で標準的に用いられる飼育・実験環境と行動観察法が、マーモセットの行動学的/生態学的特性に最適化されていない可能性が指摘される。第一に、一般的に使用される飼育ケージのような狭く社会的刺激の乏しい居住空間では、マーモセットは発声の減少や喪失、他個体に対する恐怖反応や攻撃行動、育児放棄、過剰な毛づくろい、過剰な匂い付け、自傷など多くの異常行動を示す(文献<sup>1,2</sup>)。第二に、実験者の動物への接触や環境の変化といった刺激は動物にとってストレスとなり、その行動に影響を与える(文献<sup>3</sup>)ため、よく慣れた居住空間内において無人下で行動を観測するのでなければ、信頼性の高い行動データを得ることはできない。第三に、標準的な手法では、限られたタイミングにおいて、数分程度行動を観察して結論を得ようとするため、取得できる情報量が圧倒的に少ない。したがって、マーモセットを ASD モデルとして確立するには、適切な飼育環境下において、実験者の介入を最小限にしつつ継続的に行動データを取得する必要があるが、そのような方法はまだ標準化されていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、ASD 研究基盤としてのマーモセット行動評価系を確立することを目的とした。マーモセットが本来持つ豊かな行動から、臨床対応性に優れる表現型情報を得るために、(1)行動学的/生態学的特性への最適化を図ったエンリッチメント環境を構築し、その中で飼育しながら、(2)各個体の日常的な行動イベントを無人下すなわち全自動で追跡する「生態観察型(ビバリウム型)」行動記録システムの開発を行った。

環境エンリッチメントとは動物のウェルビーイングを増進し、かつ動物種に固有の行動を発現しやすくなるような刺激、構造物および資源を提供するもの(米国の ILAR ガイド第 8 版より)で、近年では動物福祉的観点のみならず、その動物を「ヒトのモデル」として使用することの確からしさ(環境的妥当性)や、研究の信頼性・再現性向上を目指す上でも重要であると指摘されている(文献<sup>4</sup>)。特に、社会的な動物種においては、多頭飼育することもエンリッチメントとして不可欠である。

上記条件下での行動記録を実現するため、RFID (Radio frequency identification) 技術をベースとしたシステムの開発を行った。RFID 技術は、死角が多い複雑な環境や暗闇でも、頭数に限りなく正確に(決して取り違えや見失いなく)個体識別することが可能であり、また、データ容量が軽いため長期間のデータ収集に適しているためである。

## 3. 研究の方法

**動物倫理:** マーモセットの飼育と実験は、浜松医科大学精神医学講座にて実施し、浜松医科大学動物実験委員会の承認のもと、動物実験の実施に関する法令、ガイドライン、3R の原則を遵守して行った。

**動物と処置:** 浜松医科大学内で繁殖して得た雌雄の個体に加え、国内ブリーダー(日本クレア株式会社および日本エスエルシー株式会社)より雌雄の個体を購入し、個体同士の相性を適宜確認しながら集団飼育を行った。本研究期間内において、飼育部屋には 6 頭から 10 頭の雌雄が同居した。実験に必要な処置として、RF タグ(2.12 x 12 mm)を各個体の皮下に埋め込んだ。この際、3 種混合麻酔筋肉注射(0.4mL/kg:ドミトール 0.05mg/kg, ドルミカム 0.5mg/kg, ベトルファール 0.5mg/kg)のうえ、イソフルラン吸入麻酔下(1%で開始し上限 3%まで、必要に応じ導入 4%)で行うことで、苦痛の軽減を図った。術中はモニターでバイタル確認をし、術後速やかにアンチセダン(アチパメゾール 5mg/mL 現役を 10%希釈したものを 3 種混合麻酔液と同僚投与)を投与し、覚醒するまでヒートパッドの上で休養させた。術後から翌週にかけて麻酔や埋込による影響がないか観察し、問題のないことを確認後に実験を開始した。実験期間中、下記の飼育兼実験環境内には適宜防球ネットで囲った区域やパーテーション等を設け、相性の悪い個体同士が過度に接触しないようにした。平日は毎朝、餌の交換、水の補充、糞の除去、個体の状態観察を行うため入室したが、その他はすべて無人下で実験を実施した。

**飼育・実験環境:** 4.7 m x 3.8 m x 2.5 m の動物飼育室に鉄製の柵を設け、その中で放し飼いにした。床

には、砂とパークチップを敷き、定期的に清掃を行った。空間内には木製のエンリッチメント構造物のほか、ハンモック、ネット、カーテン、パーテーション、柵、鉢、玩具などの各種エンリッチメント資材を多く設置することで、実験のエンドポイントとなる豊かな行動レパートリーの表出をうながすとともに、群れのストレスを軽減し、逃げ場・隠れ場となる場所を増やし、個体同士の喧嘩による負傷等が起りにくくなるよう工夫した。餌場は計 4 か所、水飲み場は計 4 か所、巣箱は大きさの異なるものを計 6 か所設けた。

**日常行動記録:**皮下に埋めた RF タグを認識するアンテナを生活空間内に自由に多数配置することで、集団飼育下の個々のマーモセットの日常生活行動を全自動(無人下)で長期的に記録した。本研究で用いたアンテナ(フェノバンス合同会社)は、内径 10 cmのリング状のもので、任意の場所へ自在に多数配置可能であり、速いタグ読み取り速度と、アンチコリジョン機能(複数タグを同時に検出可能)を持つ。このため、集団飼育下においても、各個体のアンテナへのアクセスを記録し続けることができる。本研究では、計 20 個のアンテナを、巣箱、餌場、水飲み場、玩具に設置した。データ解析のため、オープンソースのターミナル・エミュレータを用いてアンテナによるログ情報を出力した。

**認知機能評価:**RFID により個体識別が可能で、かつ全自動で制御可能なオペラントチャンパー装置を、マーモセットに適用するため調整し、居住空間内に設置した。本装置は、多様な課題を自在に設計可能で、それを個別に全自動で実行できる仕様のものである。

**研究協力:**浜松医科大学精神医学講座、フェノバンス合同会社

#### 4. 研究成果

本研究では、エンリッチメント環境において集団で自由に生活するマーモセットの行動を、実験者による干渉を最小限に抑えながら、全自動で 24 時間 365 日連続的にモニタリングし続けるシステムを開発した。まず、居住空間としてエンリッチメント環境を整備し、その中で 6 頭以上のマーモセットの日常生活行動を 1 年以上にわたり、無線通信技術 RFID 技術を用いて全自動で連日データ収集することに世界で初めて成功した。これにより得られる大規模な行動データから、下記に示す行動指標が得られることを示した。

**基底活動・日常的な行動パターン:** アンテナを居住空間内に多数配置することで、各個体の給餌、給水、巣箱への出入り、玩具への接触などの行動イベントを年間通して継続的に取得することができた。このようにして記録したデータからは、各個体の基底活動量、活動リズム、移動パターンおよびそのランダム性、場所の嗜好性の抽出に成功した。これらは、ASD の中核症状である「限定された反復する様式の行動、興味、活動」および周辺症状としての多動や不眠などに対応する指標である。

**集団の社会的関係性:** ASD の中核症状である「社会的コミュニケーションおよび相互関係における持続的障害」に対応する社会的行動指標として、日常生活での個体間行動同調性を解析した。その結果、巣箱での遭遇イベントの種類から導かれる社会的関係の構造が、現場観察およびビデオ観察の結果と一致していた。これは、巣箱への出入りや滞在(頻度、時間)に基づき算出される個体間の社会的相互作用の強度と方向性によって表される指標であり、本研究期間内においては計 6 個体の社会的関係性(e.g.,他個体から最も関わりを持たれる個体、対して集団から孤立した個体)、およびその経時的な進展(同居1週目から 5 週目にかけての変化)を可視化することに成功した。このような集団内での社会的関係性は、自由な多頭飼育環境における長期全自動計測でなければ明らかになり得なかったものである。

**認知機能評価:** 基底活動や社会性行動の解析に加え、ヒトにおける「ASD らしさ」をより多角的に評価するための試みとして、エンリッチメント環境下での集団飼育マーモセットを対象に、全自動で認知課題が行えるかを検討した。本研究期間内では、その検証実験として、視覚弁別課題と Fixed ratio(FR)スケジュールの学習課題を実施した。報酬として水を用いたため、本課題実施中は、オペラントチャンパー内のみで飲水可能とした。各個体はまず、チャンパー内で飲水ができること、チャンパー内から給水瓶のノズルにアクセスするためには鼻先が手でチャンパー内のドアに触れてドアを開く必要があること、および課題遂行に必要なテスト前訓練にすべて自律的に取り組んだ(数日間~数週間)。その後、チャンパー内の LED ライトをキューとした視覚弁別課題を自律的に実施し、その成績が一定の水準を超えた個体について順次 FR スケジュールの学習課題に進んだ。課題の段階は各個体の成績に応じて移行した。計 8 個体がこの課題を遂行し、学習の効果が観察できた(文献<sup>5)</sup>)。これにより、エンリッチメント環境下において集団飼育を行っているマーモセットを対象に、実験者の介在なく複雑な認知課題が実施できることが示された。本手法は、ASD 中核症状および周辺症状評価のために応用できるものである。

以上、ASD 研究基盤としてのあらたなマーモセット行動評価系の開発に成功した。本成果の一部に

については、Lipp et al.2024、ほか第 45 回日本生物学的精神医学会年会、第 53 回日本神経精神薬理学会年会、The 46th Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society、第 13 回日本マーマーモセット研究会大会にて発表した。

< 引用文献 >

1. Buchanan-Smith, H. M.: Environmental enrichment for primates in laboratories, *Adv. Sci. Res.*, 5, 41–56, <https://doi.org/10.5194/asr-5-41-2010>, 2010.
2. Kitchen AM, Martin AA. The effects of cage size and complexity on the behaviour of captive common marmosets *Callithrix jacchus jacchus*. *Lab Anim-UK*, 30: 317–326. 1996
3. Kaplan G, Pines MK, Rogers LJ. Stress and stress reduction in common marmosets, *Applied Animal Behaviour Science*, 137: 3–4, 175-182. 2012
4. Balcombe JP. Laboratory environments and rodents' behavioral needs: a review. *Laboratory Animals* 40(3):217-35, 2006
5. Lipp et al., IntelliCage: the development and perspectives of a mouse- and user-friendly automated behavioral test system. *Frontiers in Behavioral Neuroscience*, 17. 2024

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Lipp Hans-Peter、Krackow Sven、Turkes Emir、Benner Seico、Endo Toshihiro、Russig Holger	4. 巻 17
2. 論文標題 IntelliCage: the development and perspectives of a mouse- and user-friendly automated behavioral test system	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Behavioral Neuroscience	6. 最初と最後の頁 1-34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fnbeh.2023.1270538	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 ベナー聖子
2. 発表標題 大規模行動データ収集による精神疾患モデル動物研究戦略の転換
3. 学会等名 第44回日本生物学的精神医学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ベナー聖子、遠藤俊裕、山末英典
2. 発表標題 インプラントブル/ウェアラブル生体計測技術を組み合わせた集団飼育マーマーモセットの全自動行動解析システムの構築
3. 学会等名 第11回日本マーマーモセット研究会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 ベナー聖子、遠藤俊裕、山末英典
2. 発表標題 集団飼育コモン・マーマーモセットのホームケージ内全自動認知・社会性行動評価
3. 学会等名 第53回日本神経精神薬理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 ベナー聖子、遠藤俊裕、山末英典
2. 発表標題 RFID (Radio Frequency Identification : 無線周波数識別) を用いた集団飼育コモン・マーマセットの認知・行動評価
3. 学会等名 第45回日本生物学的精神医学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山末 英典  (Yamasue Hidenori)	浜松医科大学・医学部精神医学講座	
研究協力者	遠藤 俊裕  (Toshihiro Endo)	フェノバンス合同会社	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------