

## 高効率な多視点マーカレス動物歩行解析のための 全自動歩行動画収集システム

フェノバンス合同会社

塩野 鈴佳、遠藤 俊裕

### ■開発の経緯

歩行解析は、対象者の歩行速度や関節角度、歩幅、左右対称性の変化といった病態の詳細を解析するための手法として、これまで脳性まひ・脳卒中・パーキンソン病・ハンチントン病・脊髄損傷等の診断、治療計画の立案、治療効果のモニタリング等に活用されてきました<sup>1</sup>。典型的には、複数のカメラにより歩行中の当事者の体表に取り付けられた反射マーカースの位置と動きを追跡し、各体部位の三次元的な動作範囲や移動速度等を定量化する三次元歩行解析という手法が普及しています(図1)。

このような歩行解析技術は、いま、げっ歯類をはじめとした運動障害モデル動物の解析にも応用されはじめています<sup>2</sup>。特に現在、高性能GPUの低価格化や、動物の姿勢・運動を自動で2D/3D追跡するためのオープンソース深層学習ツール(DeepLabCut)の普及により、研究者にとっての技術的/コスト的障壁も下がっています。これまでの実験動物における運動機能解析が、概して効率性や定量性に乏しかったこともあり<sup>2</sup>、これらの技術革新は今後の神経・筋疾患分野や老化分野の基礎・前臨床研究の進展に大きく寄与することが期待

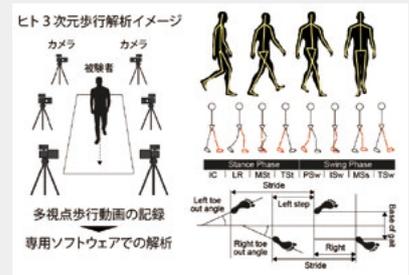


図1 ヒト3次元歩行解析のイメージ

されています。私達の研究グループでも、このようなげっ歯類における精緻な3次元歩行解析に大きな可能性を感じ、当初Zörnerらの先行研究<sup>2</sup>に倣い、撮影用レーン上を移動するマウスにおいて、3方向から撮影された歩行動画の収集と解析を試みました(図2左『従来型』による)。

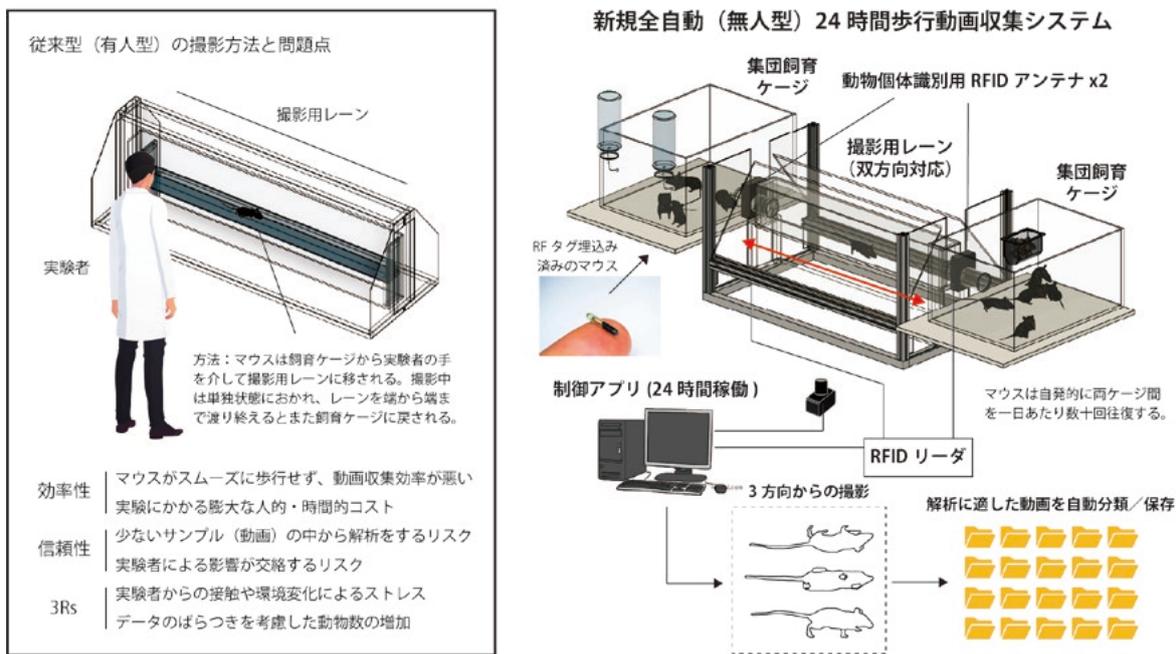


図2 実験用小動物の歩行解析のための定点動画撮影を目的とした従来型(左)および新規開発システム(右)

しかし、実際には撮影用レーンに移された直後のマウスは、ほとんどの場合しばらく不動状態になるか、動いたとしても、立ち上がりや立ち止まり、スニッフリング、ジャンピング、失禁等を繰り返し、正常な歩行動画の収集に膨大な時間がかかることがわかりました。特に高齢マウス（12～24か月齢）においてはレーン上で顕著に不動状態になりやすく、自然で自発的な歩行動画を収集するのは極めて困難でした。反復的な環境馴化や、報酬の提示、エアパフ、音、棒を用いた尾部への接触、照明条件の調整等を駆使し、マウスがレーンの端から端に歩行してくれるように工夫を凝らしましたが、大きな成果は得られませんでした。そこで私達は、このような現象は主にヒトとの接触や急激な環境変化等に伴うマウスのストレス反応であると考え、歩行動画撮影における無人化・自動化システムの開発を着想するに至りました。

### ■新規システムの概要と検証

上記の問題を解決するため、私達はマウスにとってより低ストレスな集団飼育ホームケージ内環境で、ハイスループットに多視点歩行動画を24時間全自動収集できるシステムを独自開発しました（図2右、『新規全自動（無人型）24時間歩行動画収集システム』）。

本システムには以下の5つの要素が組み合わされています（図3）。第一に、Zörnerらの方法<sup>2</sup>に倣い、全長600mmの透明ア

クリル製撮影用レーンに2枚の鏡を取り付けることで、単一のカメラの画角内で、マウスの体を右側、左側、底側から見た映像を、各々完全に時間的同期がとれた状態で同時撮影できるようにしました。第二に、撮影用レーンの両端にマウスの集団飼育ケージを連結し、マウスがその2ケージ間を撮影用レーンを通じて24時間いつでも自由に移動できるようにしました。この時、片側のケージだけに餌を入れ、もう片側のケージだけに給水ボトルを置くことにより、マウスに両ケージ間を往復する動機を持たせました。暗期には撮影用レーンに沿って配置された赤外線照明が自動点灯することで撮影ができるようにしました。これにより、マウスが普段十分に慣れているケージ内で、24時間定点歩行撮影を可能にしました。第三に、マウスにとってストレス、不安、恐怖の抑制に重要な要素である「集団」での生活環境中において、撮影用レーンを通過しているマウスを識別するため、RFID（無線個体識別技術）を用いました。それぞれのマウスの後頸部の皮下には、あらかじめ麻酔下で小型のRFタグ（いわゆるマイクロチップ）が埋め込まれており、レーンの両端に設置されたアンテナによって動物に埋め込まれたRFタグのIDを読み取ることができます。これにより、集団飼育環境下であっても、確実な個体識別ができるようになりました。第四に、実験の目的に応じて、自由に撮影用レーンの種類を変更

できるようにしました。具体的には、平面を歩行させる通常のレーン、梯子の上を歩行させるレーン、1cm程度の水をはったプールを歩行させるレーン、細い梁の上を歩行させるレーンなどを作成しました。梯子上歩行用のレーンでは、実験者が任意に高さ方向に3段階、平面方向に5mm単位で梯子のバーの位置を調整できるようにしたため、難易度や運動負荷の調整ができるようになりました。最後に、専用の制御用PCアプリを作成し、アプリがRFIDの情報をリアルタイムでモニターしながらカメラを制御することで、解析に適している歩行動画だけを自動的に取捨選択して保存できるようにしました。具体的には、1匹のマウスが単独でレーンの端から端までを規定の時間範囲内に通過した時だけ、その動画にIDを含めたファイル名を付けて既定のフォルダに保存されるようにしました。

有用性の検証のため、このシステムのケージ内に12匹のマウス（C57BL/6J, 10週齢雄, 入手元：ジャクソン・ラボラトリー・ジャパン株式会社）を入れ、無人状態でシステムを稼働させました。その結果、全てのマウスがわずか数分以内に自ら撮影用レーンに出入りするようになり、初めの24時間が経過した時点で1匹あたり数十ファイル分の歩行動画が自動で記録されました。続いて、これまで特に歩行動画の撮影の収集が困難であった高齢マウス（C57BL/6J, 2年齢, 雄, 入手元：ジャクソン・ラボラトリー

**効率化・信頼性・3Rを向上させる技術要素**

- 単一カメラによる低コストな多視点動画撮影
- 低ストレスな集団飼育ホームケージ内での撮影
- 無線個体識別 (RFID) による個体識別
- 多様な歩行パターン (平面・梯子・水中・梁等)
- 制御ソフトウェアによる24時間全自動動画収集

図3 本システムにおける主たる技術要素

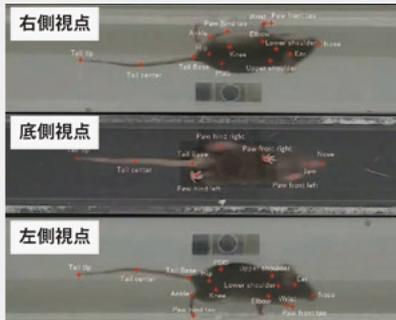


図4 合計39点の体部位ラベリングの例

部位ラベル	歩行様式	指標カテゴリ
PHTR NB PHTL	平面歩行	距離
AR J AL		
KR PFR KL	梯子上歩行	角度
HR PFL HL		
PSISR PHR PSISL	梁上歩行	速度
USR PHL USL		
LSR TBB LSL	水中歩行	潜時
ER TCB EL		
WR TTB WL	その他	変動
PFTR NL PFTL		
TBR NR TBL	その他	対称性
TCR EL TCL		
TTR ER TTL		

図5: 解析指標のバリエーション

図5 解析指標のバリエーション

ー・ジャパン株式会社) 12匹を同システムに入れたところ、若齢マウスと同様にすぐに自発的に撮影用レーンに出入りするようになり、1日あたり平均でおよそ40ファイル、最も多く記録された個体では1日でおおよそ150ファイルもの歩行動画を記録することができました。以前の実験者が手作業で進める従来型(有人型)の撮影装置(図2左)では、マウスの装置馴化と数ファイル分の歩行動画の撮影に、活発な若齢のマウスであっても2週間

程度、老齢のマウスではそれ以上の期間を要しても解析可能な動画を得ることに苦勞していた状況からすると、本システムによって歩行動画収集の効率性は格段に向上していることが十分に確認できました。

次に、本システムにより収集された歩行動画から、先述のDeepLabCutを用いて運動に関するパラメータを数値化するためのフローを説明します。上記の通り、私達は、動物の左側、右側、底側の3方向からの動画を撮影しています。この動画から、まず39の基本的な体部位を同定します(図4)。このために、あらかじめDeepLabCutを用いて作成した学習モデルを用い、各マウスの3秒程度の歩行動画から、自動的にフレームごとに39の体部位とその座標を自動検出します。その後、目視でもフレームごとの体部位ラベリングに問題がないか確認し、位置ずれ等があれば適宜修正します。こうして得られたフレームごとの各体部位の座標情報から、図5にあるような種類の運動指標を得ます。カメラの視点(右側/底側/左側)、歩行様式(平面歩行、梯子上歩行、水中歩行、梁上歩行等)、指標カテゴリ(距離、角度、速度、潜時、変動、対称性等)の組み合わせから、私達は現在合計で294の運動指標を解析対象としています(図5)。

**■自然老化マウスを用いた研究事例**

以上の方法を用い、私達は先述の週齢の異なる若齢・老齢C57BL/6Jマウスの歩行解析を行い、老化の影響がどのようなパラメータに表れるかをスクリーニングしました。それぞれの週齢のマウス合計24匹は、事前に皮下にRFタグを埋め込まれたのち、本システムのケージで飼育されました。はじめ、装置馴化の期間として3日間、その後同じく3日間同じ撮影レーンで平面歩行解析用の動画を収集しました。得られた動画について、39の体部位をラベリングし、フレームごとの座標情報を得ました。例として、右側視点からの後肢の部位5点(PSIS, Hip, Knee, Ankle, Paw)をラベリングし追跡した画像の例を図6に示します。この視点からは、老齢マウスにおいて明らかに後肢の歩幅が狭くなっている様子がよくわかります。

さらにその後、およそ3から4日ごとに撮影用レーンを変更し、平面歩行、梯子上歩行、深さ10mmの水中歩行の3種類について歩行動画収集を行いました。(図7左)。そして、それぞれの歩行様式の動画から、各体部位の座標をもとに合計で294の歩行解析指標を算出しました。図7右上は、歩行様式ごとの解析指標を群間の効果量(Bias corrected Hedges' g)の降順にならべた結果を示しています。この図では、スクリーニングの目的で、このうち効果量の絶対値が1以上となった指標を、老化による強い影響が見られた指



## ■今後の展開について

私達は現在、社外の研究グループと共同研究で、本システムを用い、筋ジストロフィモデルマウス（mdx マウス）の歩行解析、周産期環境化学物質曝露による歩行への影響の解析、自然加齢マウスの歩行解析、そしてマウス以外の動物種（両生類、魚類）の移動解析まで並行して幅広く活用しており、その明らかな有用性、応用可能性の高さを確認しています。これにより、2025年の1月からはシステムの

販売、および弊社での受託試験サービスを開始したいと考えています。本システムを活用した共同研究、システムの導入、試験の委託等にご興味のある方は、下記の弊社ウェブサイト（www.phenovance.com）よりお問い合わせをいただけますと幸いです。

### 参考文献

1. Perry, 歩行分析 正常歩行と異常歩行, 医歯薬出版 (第二版), 2012/3/1
2. Zörner et al., Profiling locomotor recovery: comprehensive quantification of impairments after CNS damage in rodents, Nature Methods, 2010

3. Brooks and Dunnett, Tests to assess motor phenotype in mice: a user's guide, Nature Reviews Neuroscience, 2009
4. Denommé and Mason, Social Buffering as a Tool for Improving Rodent Welfare, J Am Assoc Lab Anim Sci, 2022
5. Bellardita and Kiehn, Phenotypic characterization of speed-associated gait changes in mice reveals modular organization of locomotor networks, Current Biology, 2015

### 会社ウェブサイト

www.phenovance.com

(日動協ホームページ、LABIO21カラーの資料の欄を参照)

## 令和6年度（第40回）実験動物技術者資格認定試験結果

令和6年度（第40回）実験動物技術者資格認定試験は、2級学科試験を8月4日（日）、1級学科試験を9月14日（土）に実施し、また、実技試験は2級を11月23日（土）、1級を11月24日（日）に実施しました。その結果が判明したので報告します。なお、今年度の実技試験は、昨年と同様、1級の必須科目は生体を用いて実施し、2級及び1級の選択科目は生体を用いない多肢選択式、記述式で実施しました。

### 1. 2級技術者試験（欠席者を除く）

区分	高校	専門学校	大学（一般扱）	一般	合計
学科受験者	80	37	80	305	502
学科合格者	27	29	73	270	399
学科合格率（%）	34	78	91	89	79
実技受験者	24	26	77	239	366
実技合格者	22	26	77	215	340
実技合格率（%）	92	100	100	90	93

備考：その他、過年度学科又は実技合格者、通信教育スクーリング修了試験合格者を含め、総合合格者数は374名である。

### 2. 1級技術者試験（欠席者を除く）

区分	白河研修生	一般	大学・専門	学科免除者*	合計
学科受験者	31	84	99	—	214
学科合格者	15	38	51	—	104
学科合格率（%）	48	45	52	—	49
実技受験者	15	38	33	50	136
実技合格者	14	29	30	39	112
実技合格率（%）	93	76	91	78	82

備考：①1級学科試験に合格した者のみが実技試験受験者となる。

②学科免除者とは過年度（過去2年）に学科試験に合格した者である。

なお、例年掲載している1級及び2級実験動物技術者試験の優秀者一覧については、合否判定時期が遅れたことから次号掲載とさせていただきます。