

ゼブラフィッシュの飼育・監視システムの提案

野海 颯^{1,a)} 山本 眞也^{1,b)} 告 恭史郎^{2,c)} 嶋本 顕^{2,d)}

概要：

ゼブラフィッシュは、生命科学分野のほぼ全ての領域において、極めて有用なモデル動物としてケミカルスクリーニングをはじめとした様々な実験に用いられている。一般的に、ゼブラフィッシュは飼育しやすく、観賞用熱帯魚としても初心者向けであると言われているが、研究においては安定した飼育が必要不可欠であるため、完全な自動化が望ましい。また、薬剤の投与実験においては、胚や稚魚に薬剤を投与し、それによる影響を長期に渡って観察することもあるため、外部からの影響のない環境における主観の入らない定量的な長期行動監視システムの実現が期待されている。本稿では、生命学研究におけるモデル動物の実験ロギングを目的としたゼブラフィッシュの自動飼育・監視システムを提案する。

1. はじめに

ゼブラフィッシュは、創薬、発生遺伝学、遺伝性疾患研究、先天異常研究、環境毒性学研究などの生命科学分野のほぼ全ての領域において、極めて有用なモデル動物としてケミカルスクリーニングをはじめとした様々な実験に用いられている [1], [2]。その理由として、

- 水槽という閉じられた狭い空間で飼育可能であり、大がかりな施設を必要としない
- 飼育コストが低く飼育が容易である
- 多産かつ繁殖が容易であり、受精が胎外で成立する
- 胚発生が胎外で進み、胚発生が早く、胚が透明であるため、外部から器官を観察することが容易である
- 世代交代が早いので遺伝学的手法を用いた研究が容易である
- ゲノムの全塩基配列解析が完了し、全ての遺伝子構造が明らかにされているため、汎用性のあるモデル動物としての必要条件を満たす
- 脊椎動物であり、哺乳類と同等の遺伝子組成および器官・組織を備えているため、ヒトのモデルとなりうる
- 動物実験の 3R (Replacement : 代替, Reduction : 削減, Refinement : 改善) の概念と高度に適合しており、哺乳類の代替生物の候補として極めて有力である

などが挙げられ、各研究機関でゼブラフィッシュの飼育・

繁殖・採卵が盛んに行われている [3], [4]。

ゼブラフィッシュの一般的な飼育環境として、活発に活動すると言われている、明/暗周期 14 時間/10 時間、水温 28.5 °C 前後、水素イオン指数 pH7.3 前後を保つ必要があるが、最低限の飼育環境としては、水槽、濾過装置、ヒーター、照明、それらを載せるための耐荷重性を持つ台があれば良く、消耗品も、水と餌を除けば濾過装置の交換フィルターなどのごく限られたものがあれば良い。

多くの研究機関では、管理を簡単にするために、自動で照明の点消灯と水温の維持ができる IWAKI 製小型魚類集合水槽システム LABREED [5] のような棚状のプラントで循環水槽装置を用いて、水温と水素イオン指数をモニタリング・調整しながら飼育されている。具体的には、水温の安定化のためにポンプを用いて RO 水を循環させ、水素イオン指数は基本的に低下するために pH 値に応じて調整用珊瑚を補給することによって手動で調整する。さらに、水質の安定化のためにフィルタで大きな塵を取りつつ週 1 回のペースで水槽の掃除を行う。これらが調整不能になった場合には、強制排水し環境をリセットする。給餌は、ゼブラフィッシュの様子をみながら 1 日 2 回手動で行なわれ、主食に観賞魚用として一般に流通している配合飼料、副食に塩湖に生息する動物プランクトンであるブラインシュリンプを与える。

一般的に、ゼブラフィッシュは餌の選り好みも少なく、病気にもかかりにくいので、飼育は容易であり、観賞魚としても初心者向けであると言われているが、研究においては安定した飼育が必要不可欠であるため、完全な自動化が望ましい。特に、ゼブラフィッシュは、幼時にはすべての

¹ 山陽小野田市立山口東京理科大学 工学部 電気工学科

² 山陽小野田市立山口東京理科大学 薬学部 再生医療学分野

a) f216038@ed.socu.ac.jp

b) shiny-ya@rs.socu.ac.jp

c) ktsuge@rs.socu.ac.jp

d) shim@rs.socu.ac.jp



図 1 集合水槽システムに格納された水槽で飼育されるゼブラフィッシュ

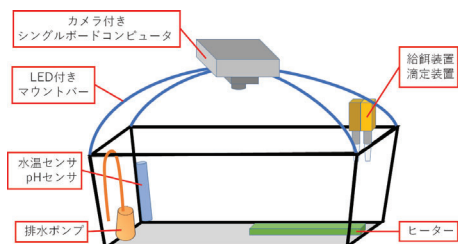


図 2 提案システムの概略

個体が卵母細胞様の生殖細胞を持ち、ある時期を境に環境によって精巣と卵巣の区別が明瞭となってくる幼時雌雄同体型であるため、環境の安定化は重要である。また、薬剤の投与実験においては、胚や稚魚に薬剤を投与し、それによる影響を長期に渡って観察することもあるため、外部からの影響のない環境における主観の入らない定量的な長期行動監視システムの実現が期待されている。

本稿では、特に定量的な長期行動監視システムの実現に注目し、集合水槽システムのうち任意の水槽をピックアップし簡易な飼育・監視システムを装着するだけで外部からの影響を極力排除しつつ長期的なロギングを実現するためのゼブラフィッシュの飼育・監視システムを提案する。

2. 提案手法

提案するゼブラフィッシュの飼育・監視システムは、多くの研究機関で用いられる集合水槽システム全体ではなく、図1のような集合水槽システムに格納された水槽のうちのひとつに装着する。

提案する飼育・監視システムは、RaspberryPi に代表されるシングルボードコンピュータをコアとし、電子制御可能な監視カメラ、水温・pH センサ、給餌装置、滴定装置、ヒーター、排水ポンプ、LED ライトをもつものとする(図2)。また、シングルボードコンピュータは、Wi-Fi によって LAN に接続され、外部からアクセス可能であるとする。これらを用いて、以下の飼育環境の調整、異常検知・通知、解析用ログの取得を実現する。

飼育環境の調整

飼育環境の要素は、大きく (a) 明暗周期、(b) 水温、(c) 水素イオン指数、(d) 水質、(e) 給餌 の5つに分類でき、こ

れらをシングルボードコンピュータの時計、監視カメラ、水温・pH センサの情報をもとに、LED ライト、給餌装置、滴定装置、ヒーター、排水ポンプの制御を行うことで調整する。

- (a) 明暗周期は LED ライトで制御する。あらかじめ設定された明暗周期に合わせて LED ライトの点灯/消灯を行う。
- (b) 水温は、水温センサから得られた値が、許容範囲を逸脱した場合には、ヒーターを動作させる。ゼブラフィッシュの飼育に最適とされる水温は既知のため、ヒーターの運転時間は容易に設定可能であるが、急激に変化することのないように設定しておく必要がある。
- (c) 水素イオン指数は、基本的に酸性へと遷移するため、pH センサから得られた値がしきい値を下回った場合に、滴定装置を動作させ、アルカリ性の調整薬を滴定する。滴定量は水槽容量と調整薬の種類によって容易に算出可能であるが、急激に変化することのないように設定しておく必要がある。
- (d) 水質は、基本的には集合水槽システムによって水が循環しているが、監視カメラの映像において一定間隔でゼブラフィッシュが検出できないフレームが増加した場合には、水が濁っていると判断し枯渇しない程度に排水ポンプを動作させることで水の循環を促進する。
- (e) 給餌は、明暗周期と同様に時間によって給餌装置を動作させることによって制御する。ただし、監視カメラ映像から得られる活動量から餌への食いつきが良くないと判断した場合には、給餌時間の変更または次回の給餌を副食に変更する。

異常通知

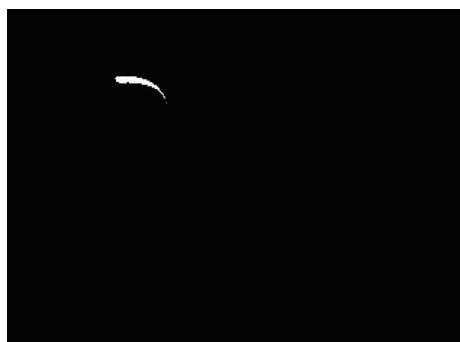
水温、pH 値、水質が制御不能になった場合、ゼブラフィッシュの餌への食いつきが改善されないと判断した場合、ゼブラフィッシュが死んだと判断した場合には、異常と判断し、ログに異常状態を記録し、ユーザに通知を送る。通知手段として、通知用 SNS への投稿、指定されたアドレスへメールの送信、無線通信で十分に離れた場所に配置されたスピーカやライトで警報を発音・点灯などの手段が考えられ、ユーザの利用環境によって選択可能とする。

解析用ログの取得

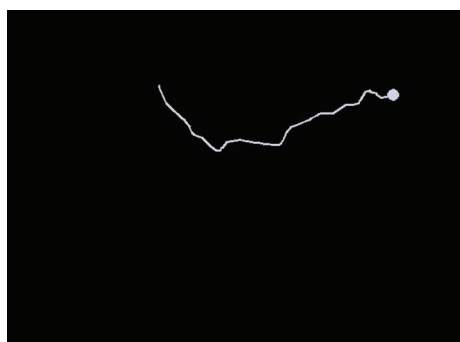
監視カメラから水槽を撮影した映像を画像解析による動体検出によって、ゼブラフィッシュの移動軌跡・活動量を算出する。動体検出および移動軌跡は、動画の輝度・コントラスト比・ホワイトバランスを調整することによって、図3のように OpenCV を用いることによって検出可能であるが、尾びれを使って泳ぐ魚類の動きは哺乳類と根本的に異なるため、単純な移動量だけでなく頭と尾びれの動きに注目する必要がある。また、生命科学における実験では、移動量だけではなく、行動履歴そのものも重要となる。



(a) 撮影映像



(b) 動体検出



(c) 移動軌跡抽出

図 3 移動軌跡の抽出

て、各部の座標履歴，行動履歴，活動量のログを数値として取得することで、アニメーションによる再現も容易なことから、ユーザがカメラ映像を確認せずともゼブラフィッシュの行動を容易に把握できる。また、コンピュータによる自動解析も可能となる。

3. おわりに

本稿では、生命科学分野におけるモデル動物の実験ロギングを目的としたゼブラフィッシュの自動飼育・監視システムを提案した。提案システムでは、実験目的で飼育されるゼブラフィッシュにおいて、集合水槽システムのうち任意の水槽をピックアップし簡易な飼育・監視システムを装着するだけで外部からの影響を極力排除しつつ長期的なロギングを実現することができる。本稿では、画像解析による動体検出により、魚類の移動軌跡を取得することができることを示した。今後の課題として、異常行動の検出手法，ログデータの自動解析，幼生状態のロギング対応，複数匹の同時検出への対応，システムの実装と評価が挙げられる。

参考文献

- [1] Kyoshiro, T., Ryo, I., Kazushi, M., Tomoaki, I., Osamu, K., Atsuo, K., Soken, T. and Yukihiko, S.: "Molecular and pharmacological characterization of zebrafish 'relaxant' prostanoid receptors", *Biochemical and Biophysical Research Communications* 436, pp.685-690, 2013.
- [2] 田中 利男: "循環器システムズ薬理学とゼブラフィッシュ創薬", *CARDIAC PRACTICE Vol.27 No.2*, pp.49-53, 2016.
- [3] 川原 玄理: "医学研究におけるゼブラフィッシュの活用法", *東医大誌* 73 (2), pp.111-113, 2015.
- [4] 蔣池 勇太, 松岡 雅人: "ゼブラフィッシュモデルの環境毒性研究における有用性", *日衛誌*, pp.227-235, 2016.
- [5] IWAKI 小型魚類集合水槽システム LABREED : <https://www.iwakipumps.jp/products/system/devices/labreed>

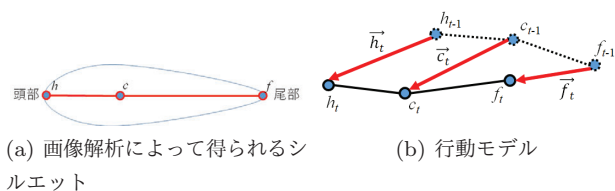


図 4 ゼブラフィッシュのモデル

そこで、ゼブラフィッシュの行動履歴を取得するために、図4のように、画像解析によって得られる重心座標 $c = (x_c, y_c)$ を基準にもっとも遠い画素を尾部座標 $f = (x_f, y_f)$ ，反対方向にあるもっとも遠い画素を頭部座標 $h = (x_h, y_h)$ と考え、それぞれの点を節とする線分であらわす。このとき、ある時間 t における各部座標を h_t, c_t, f_t としたとき、各部座標について、 $t-1$ とのベクトルを行動 $M_t = \{\vec{h}_t, \vec{c}_t, \vec{f}_t\}$ とする。また、これらベクトルの大きさの総和を単位時間あたりの活動量 $A_t = |\vec{h}_t| + |\vec{c}_t| + |\vec{f}_t|$ とする。これによ