

線虫実験新技術： 線虫カプセルと池ぽちゃアッセイ

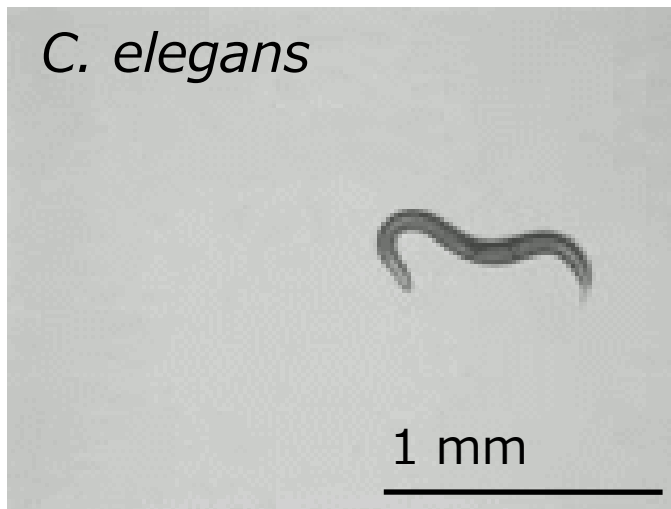
国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構
量子技術基盤研究部門高崎量子応用研究所
量子バイオ基盤研究部
主幹研究員 鈴木 芳代

2023年6月20日

研究分野の概要：線虫研究



1. モデル生物の線虫 (*C. elegans*) を対象とした生命科学研究



- ・体が透明で生きたまま組織を観察可能
→ 生物研究の対象、理科学習教材として有用
- ・優れた嗅覚や味覚（バイオセンサ）を有する
→ 微量の物質（匂いなど）の検出に利用
- ・平均寿命は約3週間で寿命解析が容易
→ 寿命遺伝子 *age-1* の発見で老化研究が加速

基礎研究や産業応用に資する簡便で高精度な線虫実験技術が不可欠

2. 農林業における害虫である植物寄生性線虫の防除研究

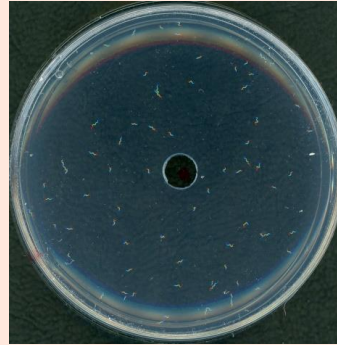
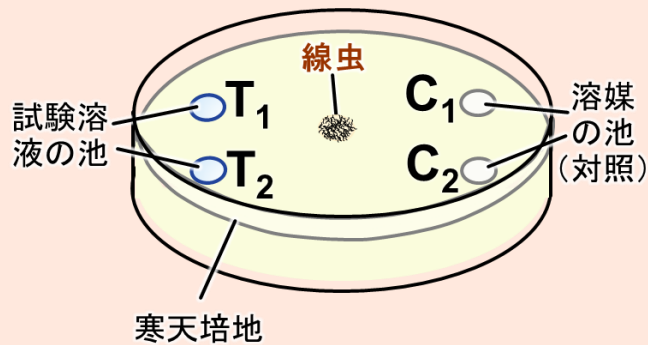
- ・植物（農作物）寄生性線虫による農作物の損害：世界で数十兆円/年
- ・植物（樹木）寄生性線虫による松枯れ被害：マツ材線虫病が46都府県で発生

農薬に頼らない病害線虫防除法の開発が喫緊の課題

線虫関連のQSTの新技術



新技術1：池ぽちゃアッセイ



池ぽちゃアッセイ法

線虫リリース法

基礎研究や産業応用に資する
簡便で高精度な線虫実験技術

新技術2：線虫カプセル

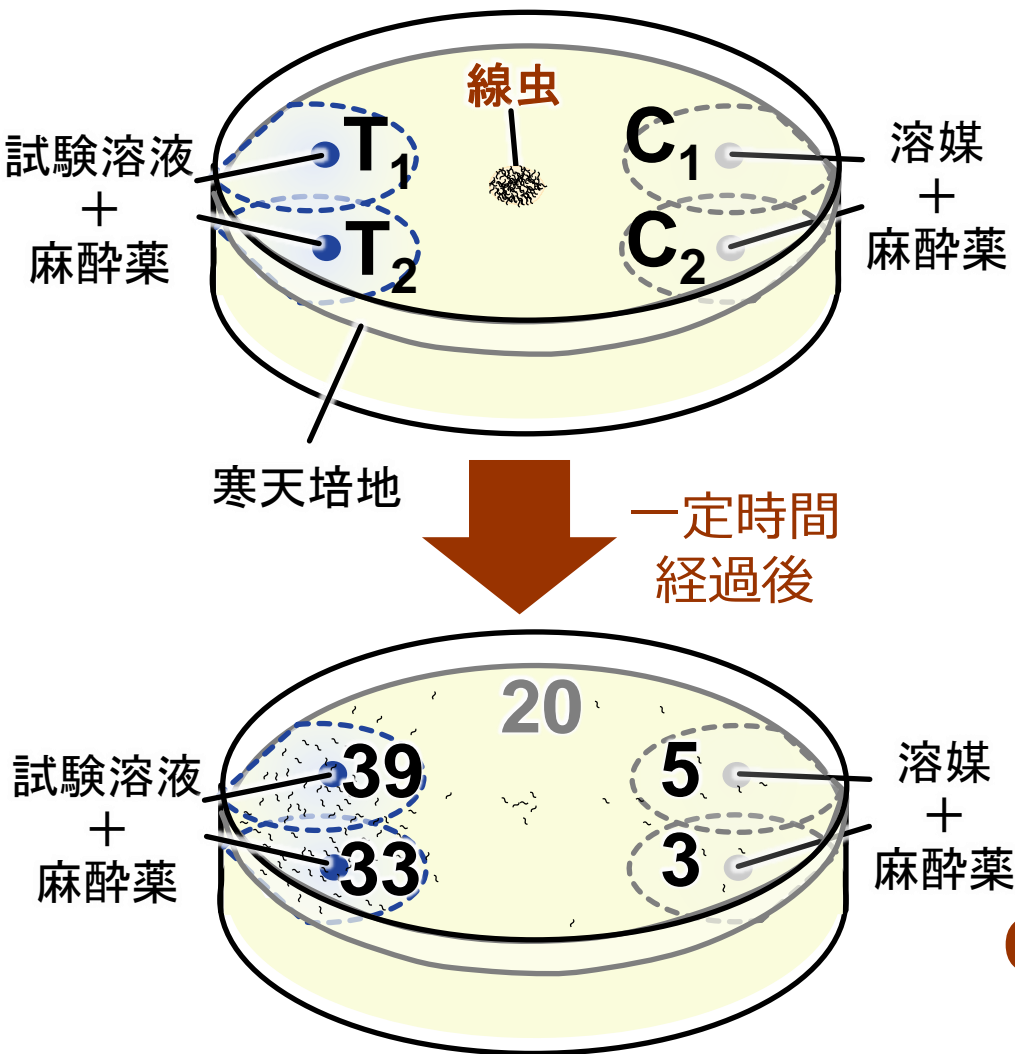


農薬に頼らない病害線虫
防除に資する線虫供給技術

従来技術：線虫化学走性アッセイ法



--- で示す評価エリア内の線虫を計数し、化学物質への応答を評価

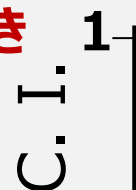


化学走性インデックス (C. I.)

線虫がどちらを選んだかの評価指標

$$C. I. = \frac{(\text{T}_1 \text{ の匹数} + \text{T}_2 \text{ の匹数}) - (\text{C}_1 \text{ の匹数} + \text{C}_2 \text{ の匹数})}{\text{T}_1 \text{ の匹数} + \text{T}_2 \text{ の匹数} + \text{C}_1 \text{ の匹数} + \text{C}_2 \text{ の匹数}}$$

試験物質が**好き**



全ての線虫が
T₁ または T₂ に
行くと **1**

全ての線虫が
C₁ または C₂ に
行くと **-1**

試験物質が**嫌い**

$$C. I. = \frac{(39 + 33) - (5 + 3)}{39 + 33 + 5 + 3} = 0.80$$

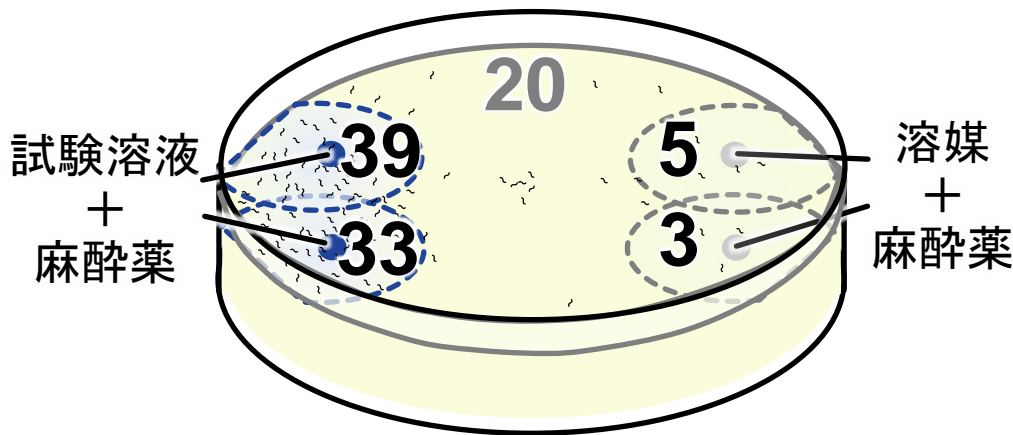
試験物質が**好き**

従来技術の問題点(1/2)

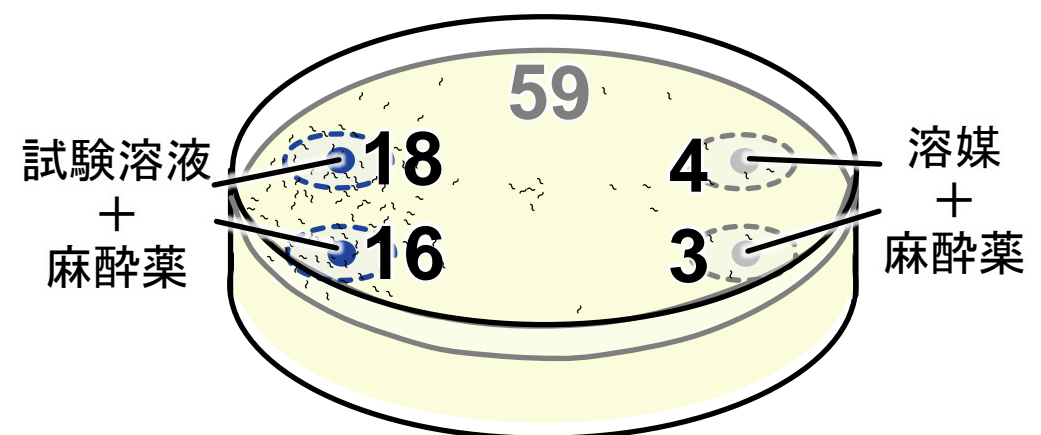


- 評価エリア（境界線）の設定次第で結果が変わる

A. 評価エリアが広い



B. 評価エリアが狭い



C. I. = 0.80
試験物質が**好き**

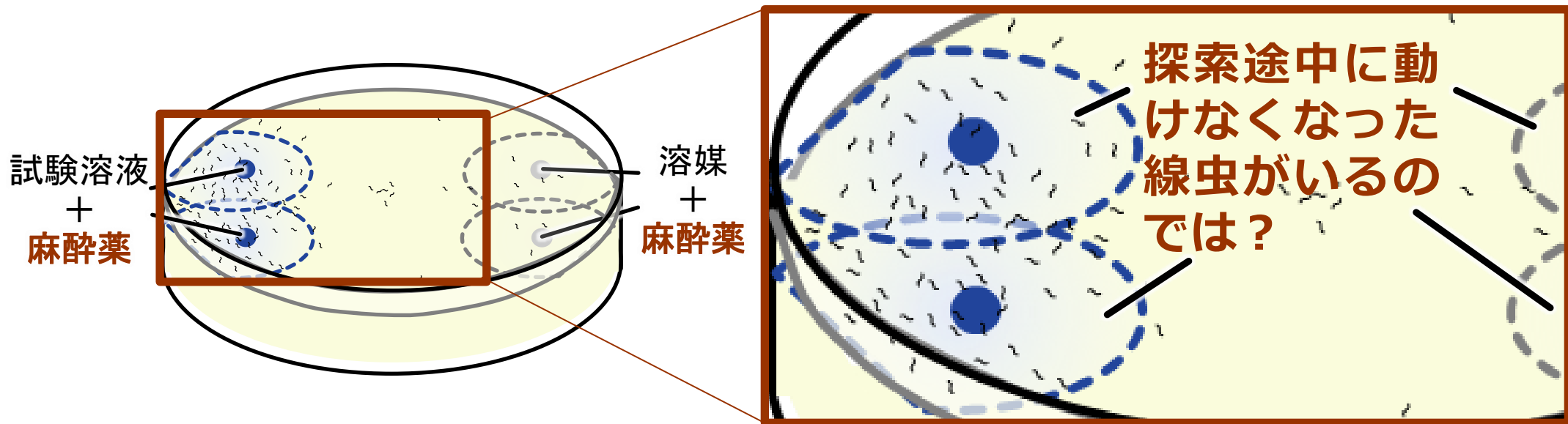
境界線の設定によって
結果 (C.I.) が異なる

C. I. = 0.66
試験物質が**好き**

- ✕ 予め培地上での濃度勾配を測定できない混合物中の物質（尿中の未知の物質など）に対する応答を調べる際の適切な評価エリア設定は極めて困難
- 予め培地上での濃度勾配を計測できる物質では、評価エリア設定は可能

従来技術の問題点(2/2)

- 線虫捕捉用の麻酔薬が結果に影響することがある



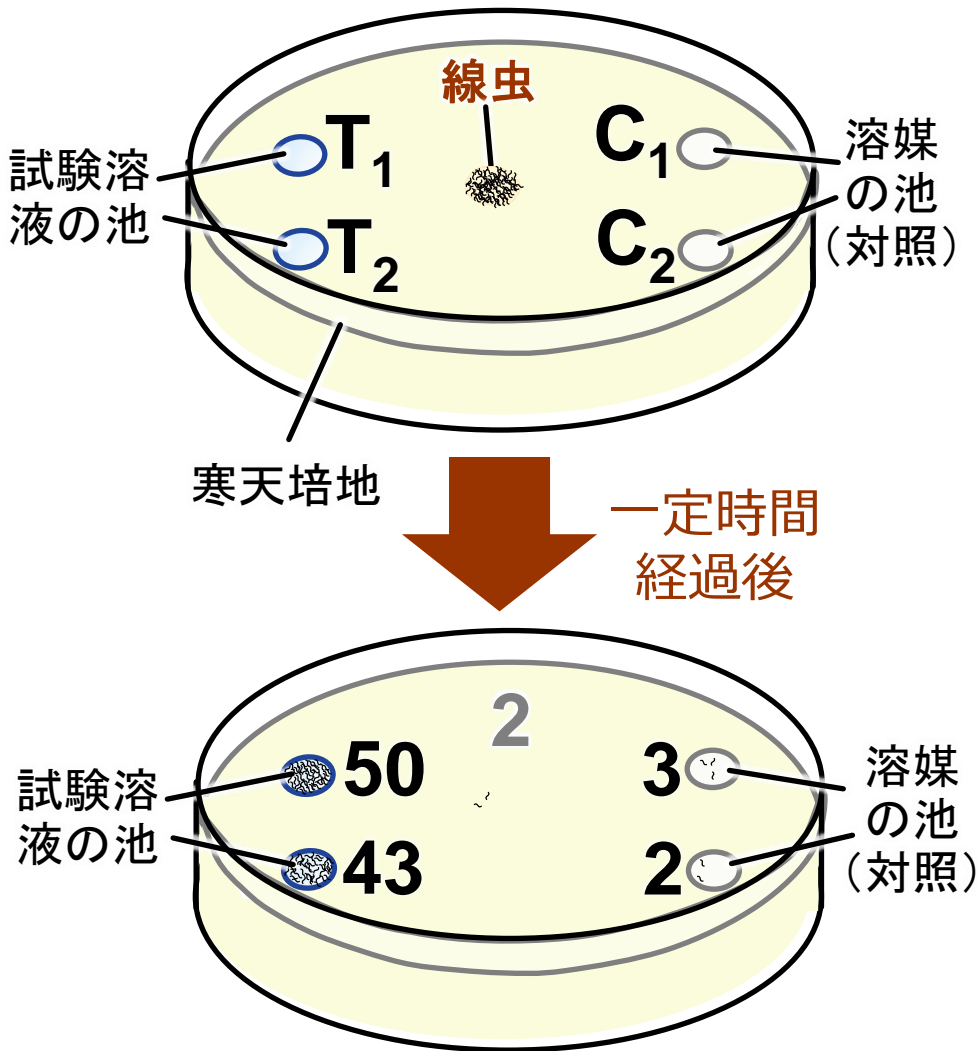
- ✕ たまたま評価エリア内に入ったら麻酔薬で動けなくなった線虫と自ら選んで評価エリア内に入った（とどまった）線虫の判別は不可能

新技術1：池ぽちゃアッセイ

新技術：池ぽちゃアッセイ法

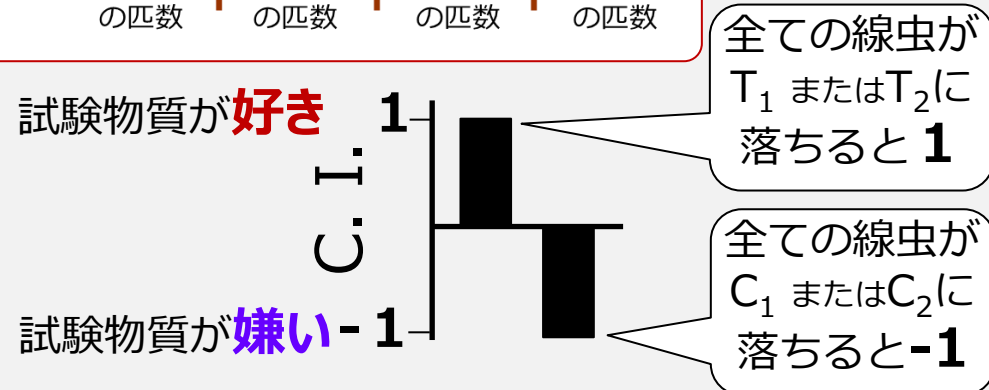


池の中の線虫だけ計数し、化学物質への応答を評価



化学走性インデックス (C. I.)
線虫がどちらを選んだかの評価指標

$$C. I. = \frac{(\text{○T}_1 \text{ の匹数} + \text{○T}_2 \text{ の匹数}) - (\text{○C}_1 \text{ の匹数} + \text{○C}_2 \text{ の匹数})}{\text{○T}_1 \text{ の匹数} + \text{○T}_2 \text{ の匹数} + \text{○C}_1 \text{ の匹数} + \text{○C}_2 \text{ の匹数}}$$



$$C. I. = \frac{(50+43) - (3+2)}{50+43+3+2} = 0.90$$

試験物質が**好き**

新技術の特徴(1/3)



QST公式YouTubeチャンネルで公開中の池ぽちゃアッセイ紹介動画



新技術の特徴(2/3)



- 評価エリアは、**池の中のみ**
 - 寒天培地上での濃度勾配を測定できない混合物に対する応答を調べる実験も実施可能
 - 評価エリア設定によって、同一実験の結果が変わる問題が生じない
- 池に落ちた線虫は培地上に這い上がれないため、麻酔薬を使わずに確実に捕捉できる
 - 線虫を池ごとに回収して別の分析を実施可能
 - 麻酔薬（毒物）不要で学校現場でも実施可能

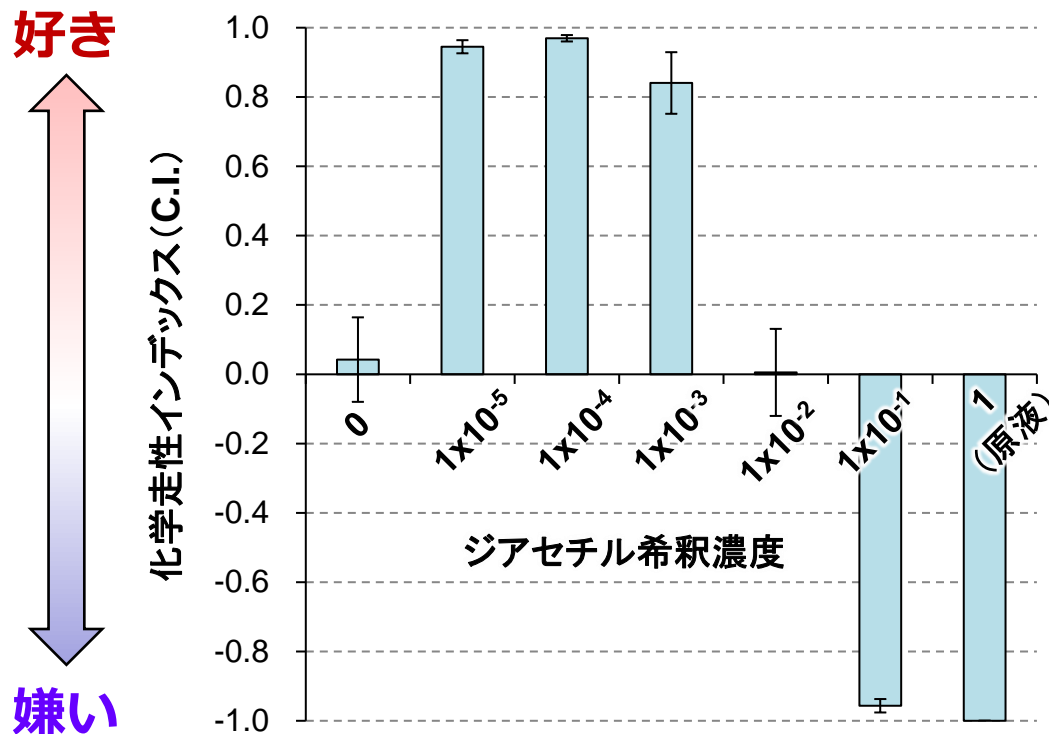
新技術の特徴(3/3)



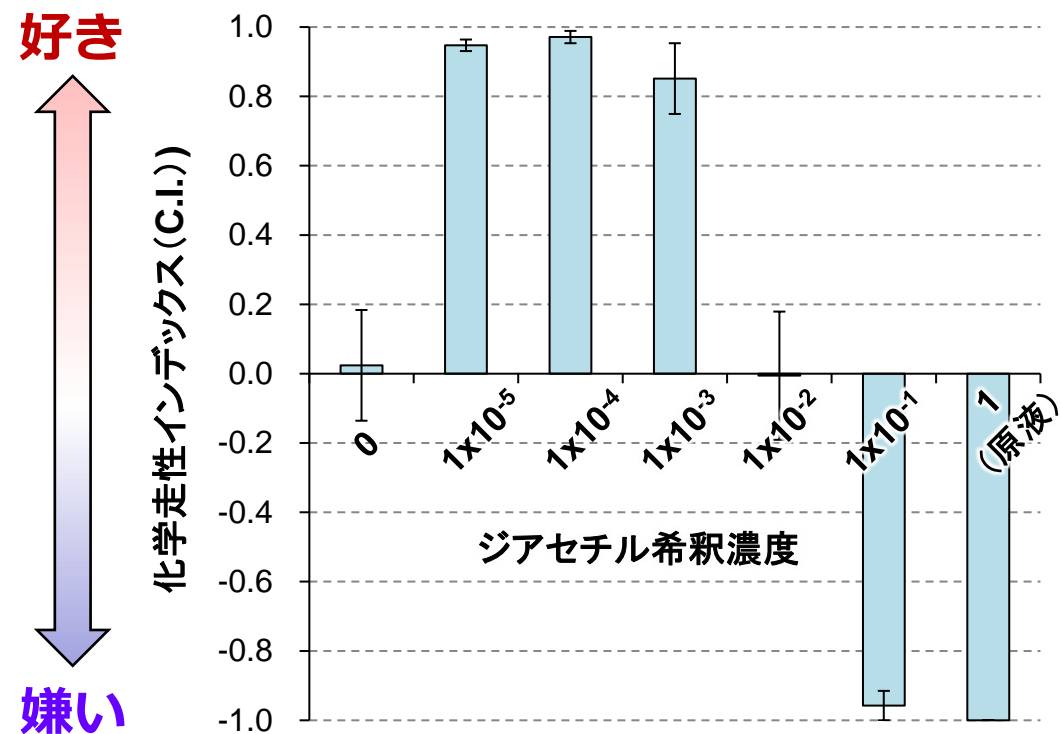
池ぼちゃ法によるジアセチル応答実験の結果

<実験条件> ・直径10 cm (寒天培地 10 mL) プレート使用 ・左右各2個の直径5 mmの穴に試験液又は溶媒(純水)を注入

6回実験



3回実験

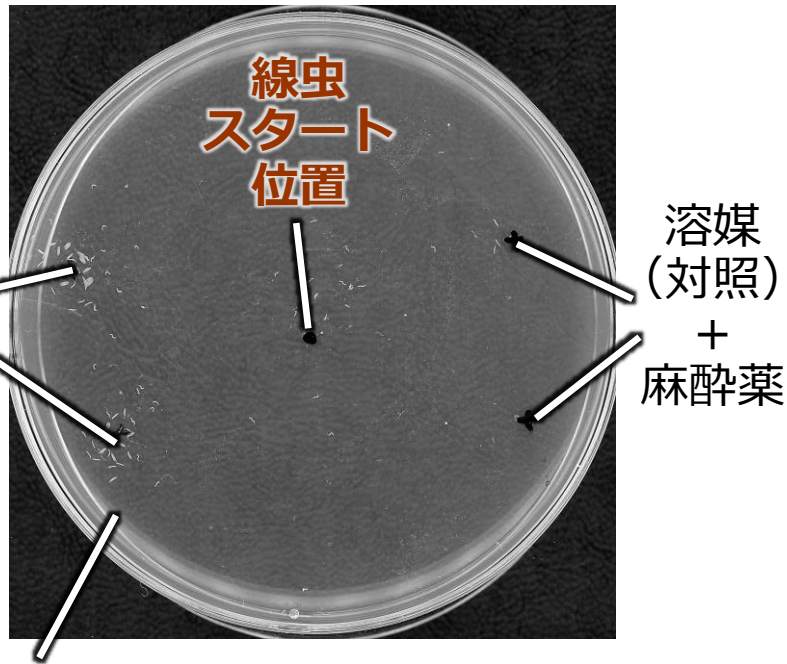


3回実験で6回実験と同様の結果が得られ、極めて再現性が高い
→ 実験の反復回数は3回でよい

新技術と従来技術の比較(1/2)

線虫の匂い物質（ジアセチル）への応答実験後のプレート

従来法

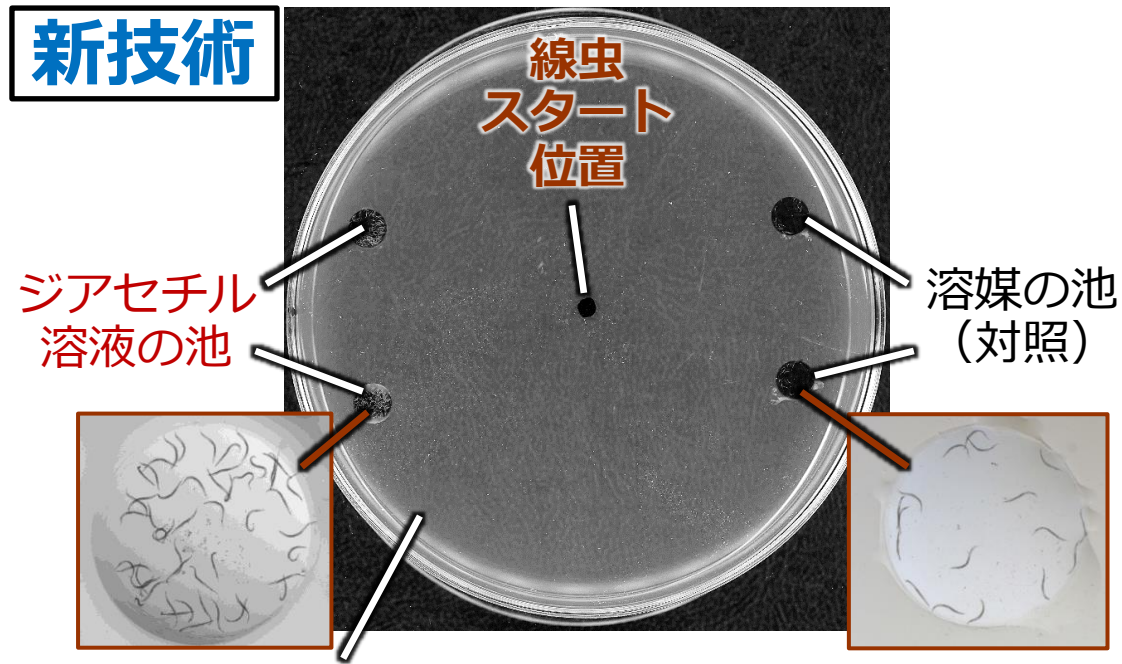


寒天培地（直径10 cmプレート）

線虫がプレート上に広く拡散

△ 顕微鏡下またはプレート画像をもとに、プレート上の線虫を計数

新技術



寒天培地（直径10 cmプレート）

ほぼ全ての線虫が池の中へ

○ 池画像をもとに池の線虫のみを計数（独自ソフトウェア使用）

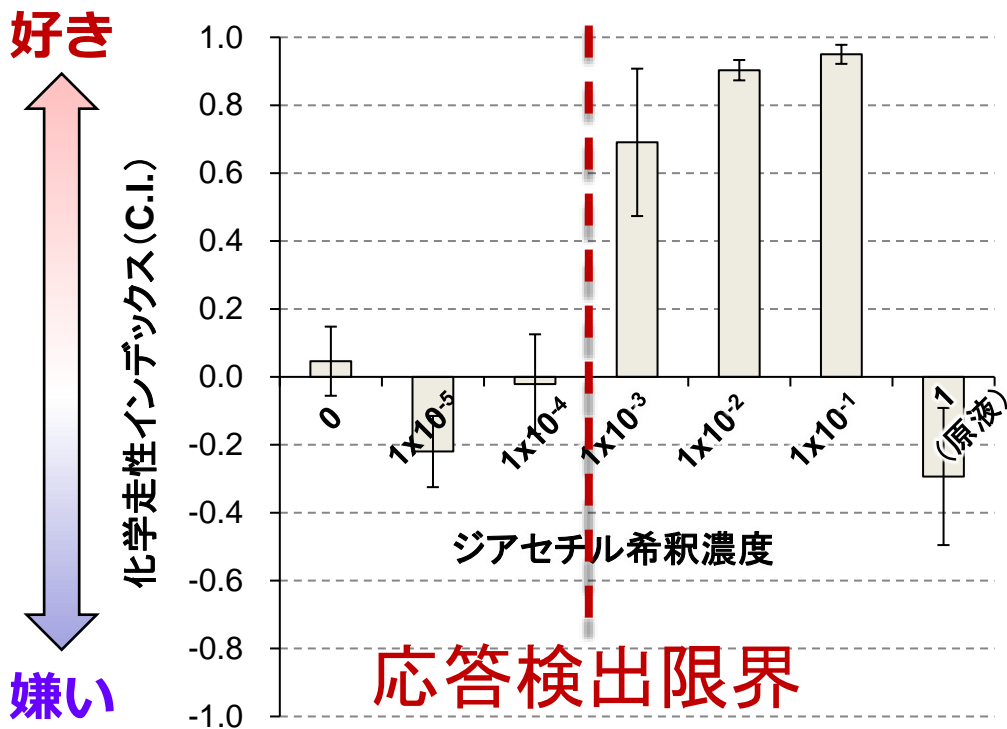
新技術と従来技術の比較 (2/2)

線虫のジアセチル応答実験の結果 (同一実験者による各3回実験)

従来法

<実験条件>

- ・直径10 cm (寒天培地 10 mL) プレート使用
- ・左右各2点にジアセチル溶液又は溶媒と麻醉を滴下

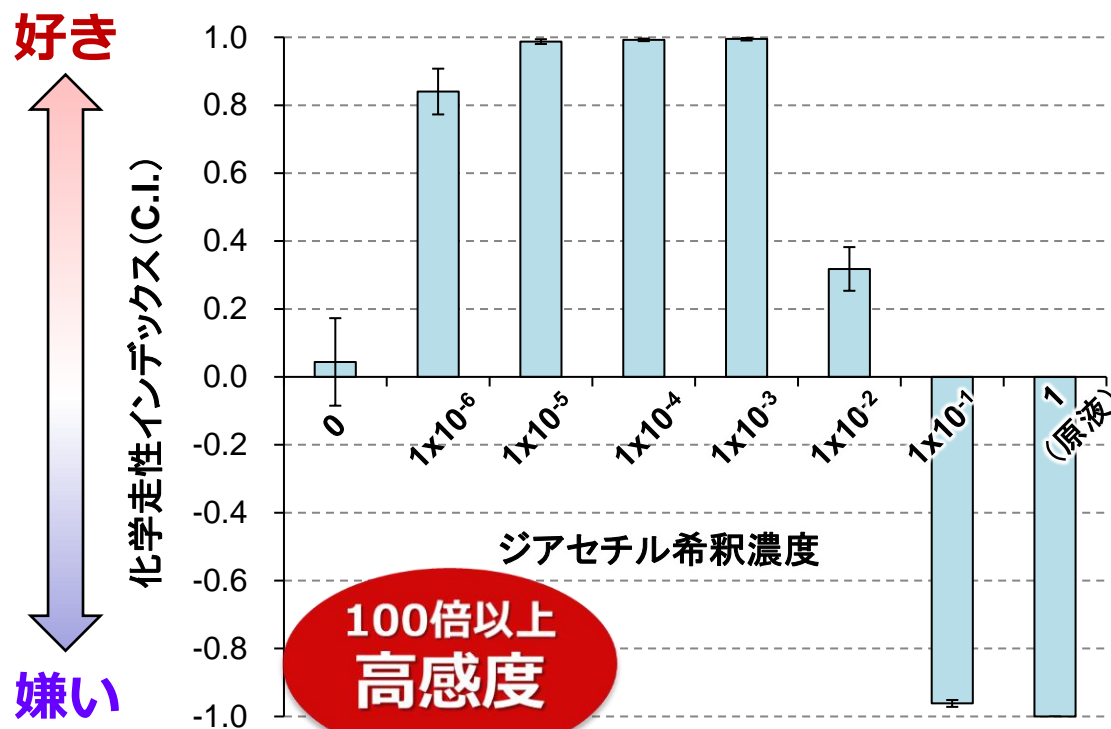


低濃度領域では結果がばらつく

新技術

<実験条件>

- ・直径10 cm (寒天培地 10 mL) プレート使用
- ・左右各2個の直径5 mmの穴に試験液又は溶媒を注入



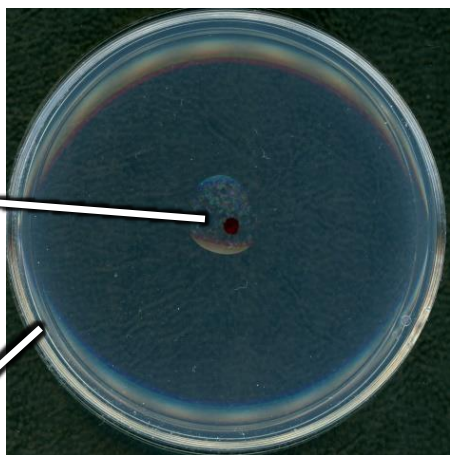
低濃度領域でも結果の再現性が高い

高精度・高効率化に資する追加技術

従来法

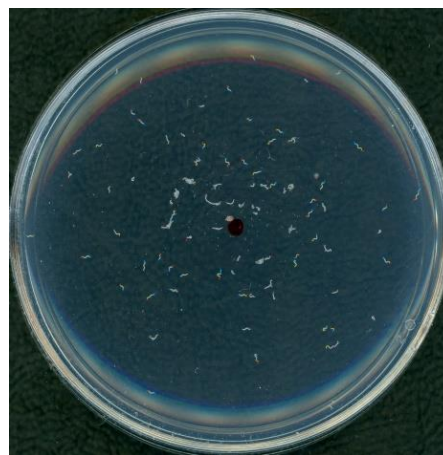
滴下した線虫液
(直径約1 cm)

アッセイプレート
(直径6 cm)



線虫液滴下直後

紙ワイパーで
線虫液吸水



プレート上に散らばった線虫

× 線虫スタート地点
の制御不可

× 線虫に触れたり、
匂い勾配を乱したり、
別の匂いが混
入するリスクあり

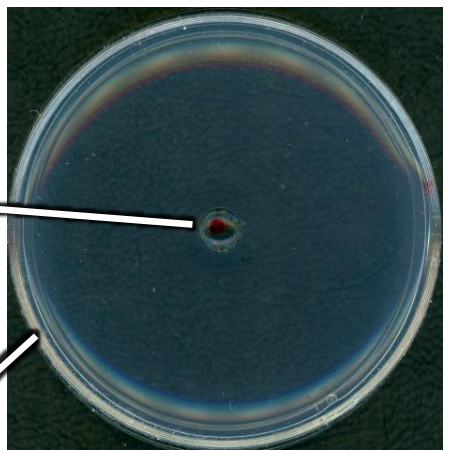
新技術

凹部

(直径5 mm)

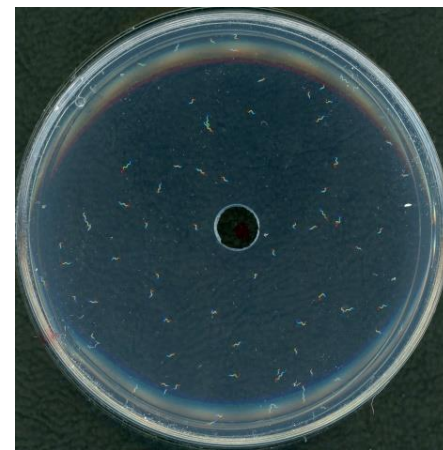
に滴下した線虫液

アッセイプレート
(直径6 cm)



凹部に線虫液滴下直後

ピペットで
水分のみ吸水
or
自然乾燥



プレート上に散らばった線虫

○ 線虫スタート地点
を凹部内に制御可

○ 線虫に触れず、匂
い勾配を乱さず、
匂いの混入もない

○ 線虫リリース作業
の自動化も可

想定される用途



- 線虫の嗅覚応答や味覚応答実験のための池ぽちゃアッセイプレート、アッセイキット
- 線虫の応答に基づく環境試料や生体試料の検査
- 病害線虫防除用の農薬や誘引物質のスクリーニング
- 線虫の応答（走性）を学ぶ生物実験教材

など

実用化に向けた課題



- 池を写した画像から個々の線虫を正確に検出して計数するソフトウェアを開発済み。実験効率化には、撮像システムと線虫計数ソフトウェアを一体化した、池ぽちゃアッセイ自動化システムの開発が必要
- 池ぽちゃアッセイを生体試料（尿など）に含まれる特定の匂い物質の検出や線虫防除に役立つ誘引物質のスクリーニングに応用するには、試験対象物質を用いた検出精度評価のための十分な実験が必要

など

本技術に関する知的財産権(1/2)

- 発明の名称 : 線虫トラップ用プレート、およびその利用
- 登録番号 : 特許第7229582号
- 出願人 : 量子科学技術研究開発機構
- 発明者 : 鈴木 芳代、服部 佑哉、齋藤 俊行、原田 良信

- 発明の名称 : NEMATODE TRAP PLATE AND USE THEREFOR
- 出願番号 : 17/605,337 (US)
- 出願人 : 量子科学技術研究開発機構
- 発明者 : 鈴木 芳代、服部 佑哉、齋藤 俊行、原田 良信

本技術に関する知的財産権(2/2)

- 発明の名称 : 試験方法および線虫試験用プレート
 - 出願番号 : PCT/JP2021/039211
 - 出願人 : 量子科学技術研究開発機構
 - 発明者 : 鈴木 芳代
-
- 発明の名称 : 試験方法および線虫試験用プレート
 - 出願番号 : 特願2022-514816
 - 出願人 : 量子科学技術研究開発機構
 - 発明者 : 鈴木 芳代

従来技術とその問題点

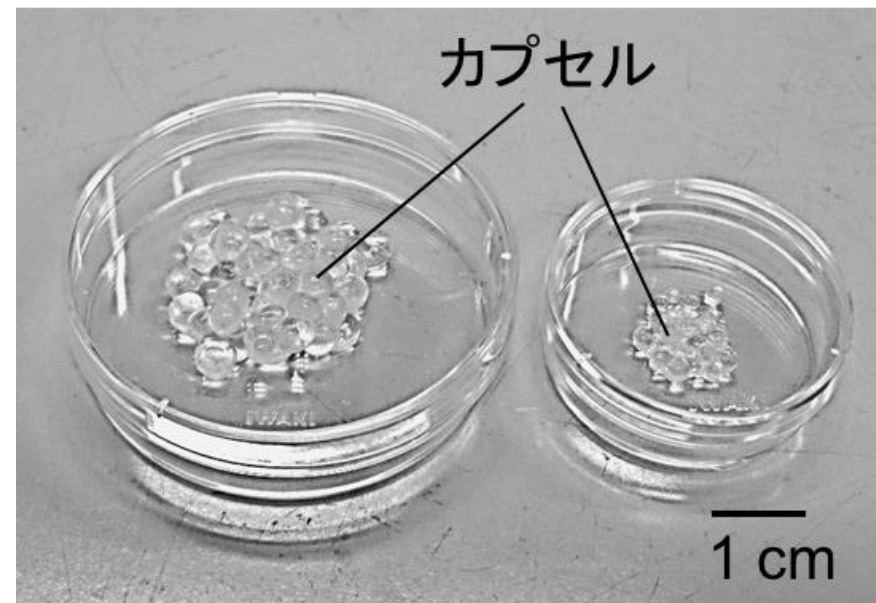
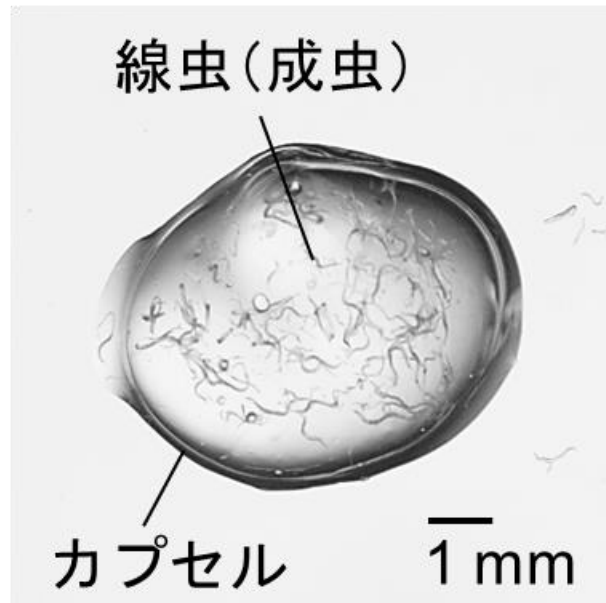


- 研究者間の線虫の譲渡方法である線虫培養プレートや凍結バイアルでの送付では、受領後、線虫を培養するなどの専門的な操作が必要となる
- 農業分野、教育分野などで、線虫に興味を持った人が線虫を扱える状況ではなく、技術の裾野が広がりにくい

新技術の特徴(1/2)



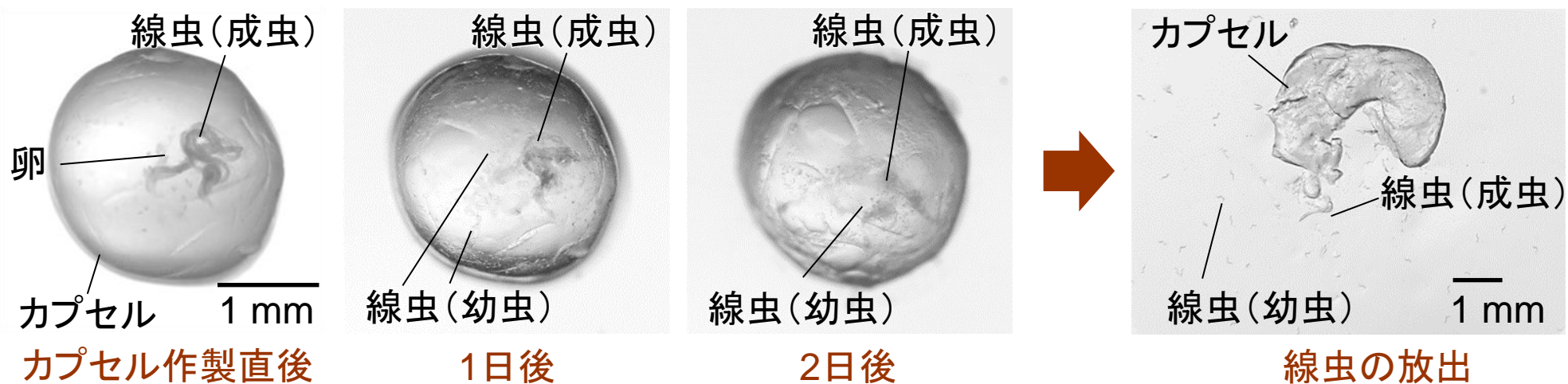
- カルシウムとのアルギン酸ナトリウムの架橋反応を利用する人工魚卵（人工イクラ）の製造方法を応用
- 任意の発生段階（卵、幼虫、成虫）、任意の数の線虫を生分解性のカプセルに閉じ込めて培養（配送可能）
- 拡散防止等のために不妊化した線虫を封入することも可能



新技術の特徴(2/2)



- 膜を破れば線虫が放出され、すぐに実験等に利用可能



- 生分解性のため、不妊化した病害線虫の土壌放飼に活用可能



想定される用途

- 研究試料、実験・観察教材として、良好な状態の線虫を提供する線虫供給サービス
- 研究者向け線虫カプセル作製キット
- 病害線虫防除における不妊線虫散布
- 制約環境下で線虫を用いる宇宙生命科学実験

など

本技術に関する知的財産権



- 発明の名称 : 線虫封入カプセル、線虫封入カプセルの製造方法、および、線虫封入カプセルの用途
 - 出願番号 : 特願2021-199634
 - 出願人 : 量子科学技術研究開発機構
 - 発明者 : 鈴木 芳代
-
- 発明の名称 : 線虫封入カプセル、線虫封入カプセルの製造方法、および、線虫封入カプセルの用途
 - 出願番号 : PCT/JP2022/045039
 - 出願人 : 量子科学技術研究開発機構
 - 発明者 : 鈴木 芳代

新技術1：池ぽちゃアッセイ

新技術2：線虫カプセル

企業への期待

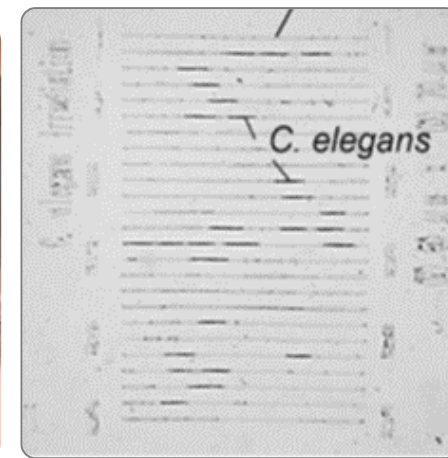
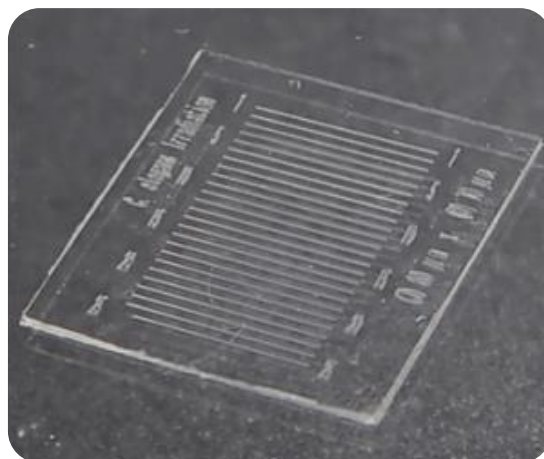


- 池ぽちゃアッセイ用プレートや線虫カプセルの製品化に向けて、生物培養技術、アルギン酸ナトリウム（カプセルの材料）製造技術、実験教材企画・開発実績などを有する各企業との連携を希望
- 池ぽちゃアッセイを用いた生体試料や環境試料の検査、農薬スクリーニングについては、当該試料を用いた十分な試験により検査精度の評価を的確に行うことができる企業との連携を希望

産学連携の経歴



- 2012年- Biocosm株式会社とPDMSマイクロチップの共同開発を実施
- 2018年 線虫保定用PDMSマイクロチップ「Worm Sheet」発売（Biocosm社）



お問い合わせ先



量子科学技術研究開発機構
イノベーションセンターまでお願いします

T E L : 043-206-3027

F A X : 043-206-4061

e-mail : chizai@qst.go.jp