

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3809526号
(P3809526)

(45) 発行日 平成18年8月16日(2006.8.16)

(24) 登録日 平成18年6月2日(2006.6.2)

(51) Int. Cl.		F I		
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34 D
C 1 2 M	1/42	(2006.01)	C 1 2 M	1/42
G O 1 P	3/36	(2006.01)	G O 1 P	3/36 C

請求項の数 7 (全 8 頁)

(21) 出願番号	特願2003-165978 (P2003-165978)	(73) 特許権者	501203344
(22) 出願日	平成15年6月11日(2003.6.11)		独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構
(65) 公開番号	特開2005-47 (P2005-47A)		茨城県つくば市観音台3-1-1
(43) 公開日	平成17年1月6日(2005.1.6)	(74) 代理人	100107870
審査請求日	平成15年6月11日(2003.6.11)		弁理士 野村 健一
		(74) 代理人	100098121
			弁理士 間山 世津子
		(72) 発明者	乙部 和紀
			茨城県つくば市観音台三丁目1番地1 独立行政法人農業技術研究機構内
		(72) 発明者	伊藤 賢治
			茨城県つくば市観音台三丁目1番地1 独立行政法人農業技術研究機構内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 微小動物行動計測制御装置

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

相互に連結する複数の微細な凹型構造が表面に形成されている第一の平板と、第一の平板の凹型構造面と接し、前記凹型構造の開口部を覆う第二の平板とから構成され、凹型構造内に微小動物を導入してその行動を計測又は制御することのできる微小動物行動計測制御装置。

【請求項2】

第一の平板と第二の平板を収納することのできる容器を有する、請求項1記載の微小動物行動計測制御装置。

【請求項3】

導入する微小動物が、後生動物又は原生動物である、請求項1又は2記載の微小動物行動計測制御装置。

【請求項4】

第二の平板に微細電極が形成されている、請求項1乃至3のいずれか1項記載の微小動物行動計測制御装置。

【請求項5】

凹型構造の深さと最大幅が0.02mm以上である、請求項1乃至4のいずれか1項記載の微小動物行動計測制御装置。

【請求項6】

第一の平板又は第二の平板に貫通孔が設けられている、請求項1乃至5のいずれか1項記

載の微小動物行動計測制御装置。

【請求項 7】

第一の平板及び第二の平板が透明である、請求項 1 乃至 6 のいずれか 1 項記載の微小動物行動計測制御装置。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、土壌や動植物組織など三次元的な微細構造を有する空間内での微小動物（原生動物、後生動物など）の行動（学習、走性、忌避、探索など）を計測又は制御するための装置に関する。この装置は自然に近い行動環境を人工的に作り出すことにより容易かつ高い再現性で微小動物の行動学的解析を可能にするため、生物学、農学、環境工学などの分野で利用できる。

10

【0002】

【従来技術】

微小動物の生息環境は主に土壌または液中であることから、微小動物の行動を計測するための行動空間として寒天培地(非特許文献 1)、培養液(非特許文献 2)、土壌(非特許文献 3)、微粒子充填容器(非特許文献 4)などが用いられる。それらの内部あるいは表層での微小動物の行動を顕微鏡による観察あるいは媒体を通過して外部に現れた頭数などから移動速度、行動半径、行動軌跡、刺激に対する応答時間などを計測する手法が広く使われてきた。また、それらの行動空間内に様々な化学組成を有する溶液を添加して、微小動物の行動を制御して計測するなどの研究が行われてきた。

20

【0003】

【非特許文献 1】

PLINE, M. and DUSENBERY, D. B. 1987. Responses of plant-parasitic nematode *Meloidogyne incognita* to carbon dioxide determined by video camera - computer tracking. *Journal of Chemical Ecology* 13: 873-888.

【0004】

【非特許文献 2】

KENNEDY, M. J. 1979. The responses of miracidia and cercariae of *Bunodera mediovittellata* (Trematoda: Allocreadiidae) to light and gravity. *Canadian Journal of Zoology* 57: 603-609.

30

【0005】

【非特許文献 3】

WALLACE, H. R. 1958. Movement of eelworms - 1. The influence of pore size and moisture content of the soil on the migration of larvae of the beet eelworm, *Heterodera schachtii* Schmidt. *Annals of Applied Biology* 46: 74-85.

【0006】

【非特許文献 4】

ROBINSON, A. F. 1994. Movement of five nematode species through sand subjected to natural temperature gradient fluctuations. *Journal of Nematology* 26: 46-58.

40

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

はじめに線虫の行動軌跡や行動半径、移動速度、刺激への応答時間を計測する場合に従来使われている寒天培地法を例示して説明する。この方法は行動を簡便かつ詳細に観察できるという利点がある反面、土壌あるいは動植物組織中で生息する線虫の自然な行動を必ずしも反映したものとはならないという問題点がある。すなわち、土壌や動植物組織は障害物と空隙からなる三次元的な微細構造物であり、かつその内部では毛細管現象などによる溶液の移動が生じていることから、自然状態の線虫はそれらの物理的要因を利用して行動していると考えられる。しかし寒天培地には上述のような三次元的微細構造がないことや毛細管現象による溶液移動がない、などの点で線虫本来の自然な行動を計測しているとは

50

言い難い。さらに、様々な化学組成に対する応答やそれらによる行動制御を実施する際には寒天培地上に溶液を滴下して実験を行うが、平坦な空間で液浸状態の線虫は行動が制限される、開放系であるために浸透や蒸散などにより作用濃度の制御が困難、などの問題がある。

【0008】

一方、実際の生息環境に近い状態での計測方法としては、線虫の易動度のみを単純に計測する場合に用いられる土壌や微粒子を充填した容器による方法がある。この方法では、自然な状態での易動度を計測できるという利点がある反面、行動を外部からいっさい観察できない、容器内の物理的条件（充填状態、気泡の有無など）を均一に制御するのが難しい、などの理由により容器がブラックボックス化してしまうという問題点がある。

10

【0009】

この発明は、前述したような当該技術の有している課題を解決するために、障害物と空隙からなる三次元的な微細構造を有し、かつそれらの形態、サイズ、物理的条件などを土壌や動植物組織内部のような環境に近くなるように制御された人工的な行動環境を提供することにより、三次元的な微細構造内部での微小動物の行動を自然な状態に近づけて簡便に計測制御できる装置を提供するものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意検討を重ねた結果、微細精密加工技術を援用して平板上にミクロンオーダーでサイズや形状を制御した三次元微細構造物を形成し、かつ該微細構造面に対して上から平板状の蓋を密着させることにより、土壌や動植物組織内のような障害物と空隙からなる三次元的な微細構造を有する行動空間を作り出すことを着想した。こうして形成された空間内に微小動物を導入することにより微細構造内に微小動物を閉じこめ、かつ閉空間であることを利用して物理化学的条件を精密に制御しながら、顕微鏡などにより自然状態に近い形で三次元的な微細構造内での行動を簡便かつ詳細に計測制御できることを見だし、本発明を完成した。

20

【0011】

即ち、本発明は、以下の(1)～(7)の発明を含む。

(1) 相互に連結する複数の微細な凹型構造が表面に形成されている第一の平板と、第一の平板の凹型構造面と接し、前記凹型構造の開口部を覆う第二の平板とから構成され、凹型構造内に微小動物を導入してその行動を計測又は制御することのできる微小動物行動計測制御装置。

30

(2) 第一の平板と第二の平板を収納することのできる容器を有する、(1)記載の微小動物行動計測制御装置。

(3) 導入する微小動物が、後生動物又は原生動物である、(1)又は(2)記載の微小動物行動計測制御装置。

(4) 第二の平板に微細電極が形成されている、(1)～(3)のいずれか一つに記載の微小動物行動計測制御装置。

(5) 凹型構造の深さと最大幅が0.02mm以上である、(1)～(4)のいずれか一つに記載の微小動物行動計測制御装置。

40

(6) 第一の平板又は第二の平板に貫通孔が設けられている、(1)～(5)のいずれか一つに記載の微小動物行動計測制御装置。

(7) 第一の平板及び第二の平板が透明である、(1)～(6)のいずれか一つに記載の微小動物行動計測制御装置。

【0012】

【発明の実施の形態】

本発明の微小動物行動計測制御装置は、相互に連結する複数の微細な凹型構造が表面に形成されている第一の平板と、第一の平板の凹型構造面と接し、前記凹型構造の開口部を覆う第二の平板とから構成される。また、この装置は、第一の平板と第二の平板を収納する容器を有していてもよい。

50

【0013】

凹型構造の開口部を第二の平板で覆うことにより、障害物と空隙からなる微細構造空間を形成させることができる。本発明の装置では、この微細構造空間の障害物や空隙の大きさ、形状、空隙表面の性質、空隙を満たす媒質の種類やその他の物理化学的条件を自在かつ精密に設定可能であり、それら環境条件の制御を通じて微小動物の行動制御も行える。

【0014】

また、第一の平板又は第二の平板に貫通孔を設けることで、微細構造空間内に微小動物、それらの必須栄養物、その他の化学物質などを導入・循環させることが可能であり、両平板を密閉可能な容器に格納することにより、精密に微細構造空間の環境制御を行うことが可能である。

10

【0015】

第一の平板の材質は可塑性があればどのようなものでもよいが、凹型構造を形成するための原版との親和性が高い、化学反応性が低い、透明性が高いなどの特性を有するものが好ましい。このような材料としては、ポリジメチルシロキサン、ポリジメチルシランなどを例示できる。

【0016】

第一の平板の形状及び寸法は、微小動物が行動可能な微細構造空間が形成できるようなものであれば特に限定されない。

【0017】

凹型構造は、微細加工樹脂平板成型用の原版を使用して形成できる。微細加工樹脂平板成型用の原版を製造する方法は、ミクロンオーダーの加工精度が保証される三次元微細加工法であればどのようなものでもよいが、微小動物の大きさを考慮して0.01mm以上の大きさを有する微細構造を形成できる方法であることが好ましい。製造方法として、シリコン基板を用いた場合にはシリコン結晶異方性エッチング法、収束イオンビーム法、金属基板を用いた場合にはメタルエッチング法、電鍍法などを例示できる。

20

【0018】

第一の平板を成型する方法は特に規定しないが、ガラス、雲母、または金属などの平坦な板の上に、原版を接着剤、磁力、または毛細管現象により密着固定させて、該原版を被覆するように第一の平板材料を滴下して硬化せしめることが好ましい。

【0019】

第一の平板には、相互に連結する複数の微細な凹型構造が形成されている。凹型構造の形状は、相互に連結することにより微小動物に対する適当な障害物と空隙になり得るものであればどのようなものでもよい。凹型構造の寸法は、深さ及び最大幅が0.02mm以上であることが好ましいが、微小動物の大きさや行動形態に応じてこれより小さくてもよい。例えば、植物寄生性線虫は通常体長が約0.4mm、体幅が約0.02mmであることから、凹型構造の寸法は、図1に示すような寸法で深さを0.05mmとしてもよい。複数の凹型構造のそれぞれが異なる形状及び寸法であってもよいが、すべてが同一の形状及び寸法であることが好ましい。凹型構造は第一の平板上にランダムに配置されていてもよいが、縦横に等間隔に整然と配置されていることが好ましい。凹型構造を形成させる範囲は特に限定されないが、図2に示すように第一の平板の中央付近とすることが好ましい。

30

40

【0020】

第二の平板の材質は、顕微鏡などで観察するために透明かつ平坦度の高いものが好ましく、また、化学反応性の低いものが好ましい。具体的には、ガラス、石英、アクリル樹脂などを例示できる。

【0021】

第二の平板には微小電極を形成させていてもよく、これにより微小動物を電氣的に検出することや電氣的に行動制御することが可能になる。微小電極を構築する場合、クロム、白金、インジウムスズ酸化物などのパターンを第二の平板上に形成する必要があるため、これらのパターン形成工程に耐えられる材質である必要がある。また、微小電極表面に電氣的絶縁性を付与する必要がある場合には、透明絶縁性樹脂で電極部の一部または全面を被

50

覆ることが好ましい。

【0022】

第二の平板の形状及び寸法は、第一の平板の凹型構造部分の開口部を覆うことができるものであればできる特に限定されない。

【0023】

容器は第一の平板と第二の平板を収納することのできるものであればどのようなものでもよい。材質は、顕微鏡などで観察するために、第一の平板と密着する部分が透明かつ平坦度の高いものが好ましく、また、化学反応性の低いものが好ましい。このような材質としてはガラス、石英、アクリル樹脂などを例示できる。

【0024】

計測及び制御の対象とする微小動物は特に限定されず、後生動物、原生動物のいずれでもよい。原生動物としては、繊毛虫類、肉質虫類、鞭毛虫類などを例示でき、後生動物としては、線虫類、吸虫類、原虫類などを例示できる。計測及び制御の対象とする最も好ましい微小動物は線虫類である。

【0025】

以下に本発明の装置の一態様を図面により説明する。

【0026】

図1は第一の平板上に形成する凹型構造の寸法図、図2は凹型構造を形成した第一の平板の寸法図、図3は第一の平板と第二の平板を収納する容器の寸法図、図4は第二の平板の寸法図、図5は微小動物行動計測装置の組み立て図、図6は微小動物行動計測装置の使用例を示す図である。

【0027】

図1において、黒色部分は樹脂平板面よりも0.05mmの深さで均一に凹んだ部分を表す。図2において、斜線の正方形部分は、前述の凹みが縦横に整列した状態で連なっている領域を表す。斜線の正方形の外側の正方形は、均一に凹んだ部分を表している。図3において、上側の図は第一の平板を収納・固定するための円形空間を形成した円形容器の上面図で下側の図はその側面図示している。図4において、上側の図は第二の平板の上面図で下側がその側面図を示している。図5は、図2～図4までの部品の組み合わせ方を示し、51は第二の平板、52は第一の平板、53は容器である。第一の平板を容器内に収納した後、第二の平板を第一の平板に密着させ、かつ容器上端に突き当てるように上からはめ込んで固定する。図6において、図5の微小動物行動計測装置を用いた顕微鏡観察による計測方法が図示されており、61は微小動物導入用送液管、62は溶液注入管、63は溶液送出管、64は微小動物行動計測装置、65は倒立型顕微鏡、66は対物レンズである。

【0028】

以下、微小動物として線虫を用い、顕微鏡観察により線虫の移動速度を計測する場合を例として、微小動物の行動計測方法を説明する。最初に、容器の第一の平板を収納する部分に蒸留水を入れた状態で、凹型構造面を上にして第一の平板を沈める。次に、第二の平板を容器上端に突き当てるようにはめ込み、第一の平板を容器と第二の平板にはさみ、しっかりと密着させる。これにより、微小動物が三次元微細構造内から容器内に漏れないような構造になる。微小動物導入用送液管、溶液注入管、溶液送出管を取り付けて蒸留水中に懸濁された線虫を微小動物導入用送液管からマイクロピペットにより注入することにより、線虫は自重により沈降して微細構造面に到達する。第二の平板に設けられている微小動物導入用送液管、溶液注入管、溶液送出管の貫通孔にあたっている微細構造面では上方が解放空間になっているため、線虫の行動は微細構造の制約無しに行動することができるが、貫通孔部分から外れたところでは線虫は微細構造の凹型部分に沿って行動する。図6に示すように倒立顕微鏡の試料台にのせて対物レンズを通して微細構造面上での線虫の行動を観察することができる。この状態で線虫の行動を制御するために、たとえば餌となる物質（植物組織や動物組織の粉碎物）、光照射、電磁氣的刺激、振動、溶液中の溶存ガス濃度制御、溶液流動などを与えることもできる。行動の計測として、たとえば線虫の移動速度を計測する場合には、顕微鏡画像を記録装置に保存しておき、一定時間内に線虫が通過

10

20

30

40

50

した凹型構造の数を数えることで移動距離を計算し、時間でわり算することにより簡便に計測できる。あるいは画像処理により線虫の行動軌跡を自動追尾してリアルタイムで線虫の移動速度を計測することも可能である。

【0029】

【実施例】

図1に示した凹型構造を図2に示した第一の平板上に構築したものをを用いて図6の構成で石英製の容器に格納して計測を実施した。第一の平板の材料はポリジメチルシランを用い、シリコン結晶異方性エッチング法により製造した原版から厚さ1mm、直径20mmの透明な第一の平板を作製した。計測対象として昆虫寄生線虫 *Steinernema carpocapsae* の感染体幼虫をシャーレ中で蒸留水に懸濁した試料を用いた。実体顕微鏡で虫体の存在を確認しながらマイクロピペットにより 5×10^{-3} ml の蒸留水と共に虫体を吸引し、図6の微小動物導入用送液管内に吐出して線虫を微細構造面に導入した。導入された線虫は外部からの光刺激を受けて活発に活動し、凹型構造内を移動する様子を倒立顕微鏡に取り付けたCCDカメラにより記録した。線虫の移動軌跡解析のために、記録した動画像に対して画像処理を行うことにより全画像中から虫体の画像だけを抽出して重ね合わせた結果、図7のように行動していることが明らかとなった。また移動速度は10秒間に移動した凹型構造の数を数えることにより、最も早く移動する線虫の場合には約0.5mm/秒と計測することができた。

10

【0030】

【発明の効果】

以上説明したように、本発明を用いることにより、土壌や動植物組織など三次元的な微細構造を有する空間内での微小動物（原生動物、後生動物など）の行動（学習、走性、忌避、探索など）を計測制御することができる。この装置は自然に近い状態で容易かつ高い再現性で微小動物の行動学的解析を可能にすることから、生物学、農学、環境工学などの分野で生物学的環境指標の計測装置として利用できる。

20

【図面の簡単な説明】

【図1】第一の平板上に形成されている凹型構造の寸法図（深さ0.05mm）。

【図2】凹型構造を形成した第一の平板の寸法図（板厚1mm）。

【図3】第一の平板と第二の平板を収納する容器の寸法図。

【図4】第二の平板の寸法図。

【図5】微小動物行動計測装置の組み立て図。

30

【図6】微小動物行動計測装置の使用例を示す図。

【図7】微小動物行動計測装置内での線虫の移動軌跡画像解析結果を示す図。

【符号の説明】

5 1 第二の平板

5 2 第一の平板

5 3 容器

6 1 微小動物導入用送液管

6 2 溶液注入管

6 3 溶液送出管

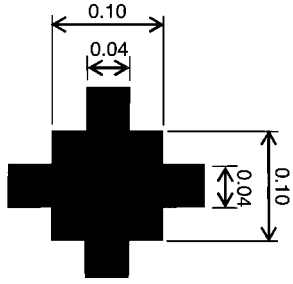
6 4 微小動物行動計測装置

40

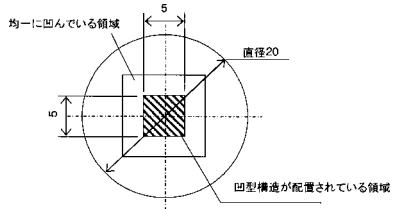
6 5 倒立型顕微鏡

6 6 対物レンズ

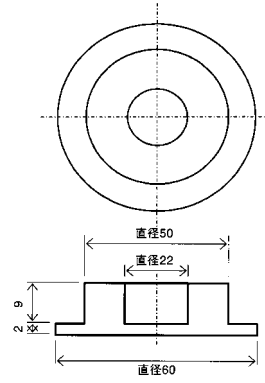
【 図 1 】



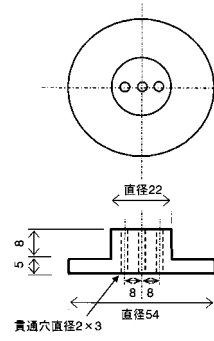
【 図 2 】



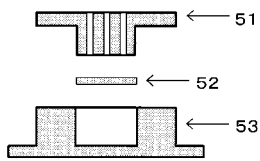
【 図 3 】



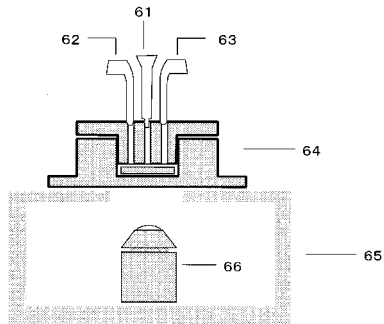
【 図 4 】



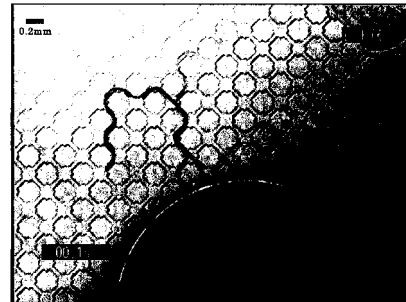
【 図 5 】



【 図 6 】



【 図 7 】



フロントページの続き

(72)発明者 水久保 隆之
茨城県つくば市観音台三丁目1番地1 独立行政法人農業技術研究機構内

審査官 森井 隆信

(56)参考文献 特開2002-159287(JP,A)
特表平02-501109(JP,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)
JSTPlus(JDream2)