(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2022年9月22日(22.09.2022)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2022/195945 A1

(51) 国際特許分類:
G01N 33/48 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2021/039211

(22) 国際出願日： 2021年10月25日(25.10.2021)

(25) 国際出願の言語： 日本語

(26) 国際公開の言語： 日本語

(30) 優先権データ：
特願 2021-046605 2021年3月19日(19.03.2021) JP

(71) 出願人: 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構 (**NATIONAL INSTITUTES FOR QUANTUM SCIENCE AND TECHNOLOGY**) [JP/JP]; 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目９番１号 Chiba (JP).

(72) 発明者: 鈴木 芳代 (**SUZUKI, Michiyo**); 〒2638555 千葉県千葉市稲毛区穴川四丁目９番１号 国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構内 Chiba (JP).

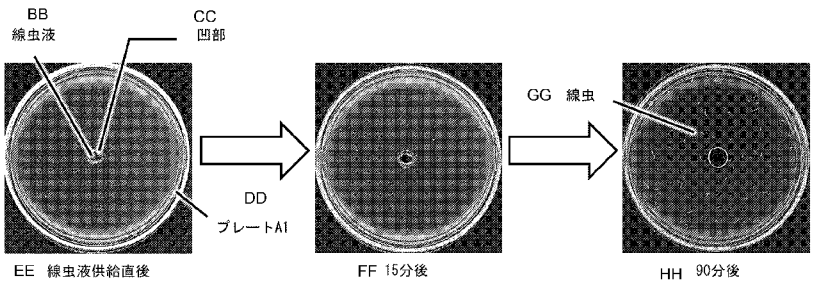
(74) 代理人: 特許業務法人ＨＡＲＡＫＥＮＺＯ ＷＯＲＬＤ ＰＡＴＥＮＴ ＆ ＴＲＡＤＥＭＡＲＫ (**HARAKENZO WORLD PATENT & TRADEMARK**); 〒5300041 大阪府大阪市北区天神橋２丁目北２番６号 大和南森町ビル Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ,

(54) **Title:** TEST METHOD AND NEMATODE TEST PLATE

(54) 発明の名称： 試験方法および線虫試験用プレート

AA 図 1



AAFIG. 1
BBNematode solution
CC Depressed part
DD Plate A1
EEImmediately after supplying nematode solution
FF After 15 min
GG Nematode
HH After 90 min

(57) **Abstract:** Provided is a test method that is capable of controlling the starting position of a nematode movement without being affected by human manipulation, in a test using nematodes. The test method of the present invention, in which nematodes are used, comprises a supplying step for supplying a nematode solution containing the nematodes to at least one supply part formed on a nematode test plate, and a drying step for, after supplying, drying the nematode solution and thus allowing the nematodes to move on the plate, wherein the supply part is processed so as to prevent the nematode

WO 2022/195945 A1

［続葉有］

BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, IT, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告(条約第21条(3))

solution from spreading.

(57) 要約:線虫を用いる試験において、線虫の移動開始位置を制御でき、人による操作の影響を受けない試験方法を提供する。本発明の線虫を用いる試験方法は、線虫試験用プレート上に設けられた少なくとも１つの供給部に、前記線虫を含む線虫液を供給する供給工程、および供給後に前記線虫液を乾燥させて、前記プレート上での前記線虫の移動を可能にさせる乾燥工程を含み、前記供給部には前記線虫液の広がりを抑える加工が施されている。

明　細　書

発明の名称 ： 試験方法および線虫試験用プレート

技術分野

[0001]　本発明は試験方法および線虫試験用プレートに関する。

背景技術

[0002]　線虫（Ｃａｅｎｏｒｈａｂｄｉｔｉｓ　ｅｌｅｇａｎｓ）の化学物質等への応答（走性）を調べる試験方法（走性試験方法）を用いた生体物質の検査方法の開発が進んでいる。例えば、特許文献１、２には線虫による人のがん検査方法が開示されている。この検査方法は線虫ががん患者の尿に誘引されるという一種の化学走性（走化性）に注目した走性試験方法である。また、線虫の該走性試験方法を基盤としたがんスクリーニング検査は実用化が進み、既に検査工程の大部分が自動化されている。

[0003]　走性試験方法では、寒天平板（固体培地）などを設けた線虫試験用プレート上で行われる。線虫を線虫試験用プレートに放す操作では、まず、線虫を含む液体（以下では「線虫液」と示すことがある。）を滴下する。線虫は、線虫液中で遊泳し、線虫試験用プレート上に線虫液が落下した後も、その液滴の中にとどまる。従来技術では、吸水性の高い紙ワイパーで線虫液の液成分を吸収、または自然乾燥して、遊泳できなくなった線虫を線虫試験用プレート上に這い出させることによって、試験を開始させる。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：国際公開第２０１８／０４７９５９号

特許文献2：国際公開第２０１５／０８８０３９号

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005]　しかしながら、従来の紙ワイパーによって線虫液の液成分を吸収して線虫を線虫試験用プレート上に供給する操作では、紙ワイパーで液成分を拭き取

っている間にも一部の線虫が線虫試験用プレート上に這い出してしまう。そのため、線虫の移動開始地点が厳密に制御できず、検査結果に影響を及ぼす場合がある。また、線虫の嗅覚系は感度が極めて高いため、液成分を拭き取る作業において、人の手指の匂いまたは紙ワイパーに予期せず付着した試料等の匂いが線虫試験用プレートに付着すること、および人による操作のばらつきが試験結果に影響することが問題となる。さらに、従来の線虫を線虫試験用プレートに放す操作は自動化が進んでおらず、人が手作業で行う必要があるため、人件費がかかる。このように、従来の線虫を線虫試験用プレートに放す操作は、検査の安定性およびコストの面で課題がある。

[0006] 本発明は上記の問題点に鑑みてなされたものであり、その目的は、線虫を用いる試験において、線虫の移動開始位置を制御でき、人による操作の影響を受けない試験方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0007] 上記の課題を解決するために、本発明の一態様に係る試験方法は、線虫を用いる試験方法であって、線虫試験用プレート上に設けられた供給部に、前記線虫を含む線虫液を供給する供給工程、および供給後に前記線虫液を乾燥させて、前記線虫試験用プレート上での前記線虫の移動を可能にさせる乾燥工程を含み、前記供給部には前記線虫液の広がりを抑える加工が施されている、試験方法である。

[0008] また、本発明の一態様に係る線虫試験用プレートは、容器および該容器内に形成された固相を備え、前記固相は、その表面上で線虫が移動可能なものであり、前記固相に、前記線虫を含む線虫液が供給される部分である供給部が設けられており、前記供給部には前記線虫液の広がりを抑える加工が施されている、線虫試験用プレートである。

発明の効果

[0009] 本発明の一態様によれば、試験開始時の線虫の移動開始位置を制御でき、人が操作することによる影響を与えずに試験を開始することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]本発明の一実施形態における線虫試験用プレートＡ１に線虫を供給した際のプレート全体の様子を示す図である。

[図2]従来の線虫試験用プレートＡ２に線虫を供給した際のプレート全体の様子を示す図である。

[図3]従来の線虫試験用プレートＡ２’に線虫を供給した際の供給部の様子を示す図である。

[図4]実施例２において本発明の一実施形態における線虫試験用プレートＡ１に線虫を供給した供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図5]実施例２において本発明の一実施形態における線虫試験用プレートＢ１に線虫を供給した供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図6]実施例２において本発明の一実施形態における線虫試験用プレートＣ１に線虫を供給した供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図7]実施例３において本発明の一実施形態における線虫試験用プレートＤ１に線虫を供給した供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図8]実施例３において本発明の一実施形態における線虫試験用プレートＥ１に線虫を供給した供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図9]実施例３において本発明の一実施形態における線虫試験用プレートＦ１に線虫を供給した供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図10]比較例１において従来の線虫試験用プレートＤ２に線虫を供給した供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図11]比較例１において従来の線虫試験用プレートＥ２に線虫を供給した供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図12]比較例１において従来の線虫試験用プレートＦ２に線虫を供給した供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図13]実施例４において本発明の一実施形態における線虫試験用プレートＤ１に線虫を供給した供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図14]実施例４において従来の線虫試験用プレートＤ２に従来の方法にて線虫を供給した供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図15]実施例５において本発明の一実施形態における線虫試験用プレートＡ１を用いて水溶性物質に対する線虫の化学走性試験を行った結果を示す図である。

[図16]実施例５において従来の線虫試験用プレートＡ２を用いて水溶性物質に対する線虫の化学走性試験を行った結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 以下、本発明の一実施形態について、詳細に説明する。

[0012] 〔線虫を用いる試験方法〕

本発明の一実施形態における、線虫を用いる試験方法は、線虫試験用プレート（以下、単に「プレート」という場合もある。）上に設けられた供給部に、線虫を含む線虫液を供給する供給工程、および供給後に線虫液を乾燥させて、プレート上での線虫の移動を可能にさせる乾燥工程を含んでいる。供給部には線虫液の広がりを抑える加工が施されている。

[0013] 供給工程において、線虫液により供給された線虫は、乾燥工程において線虫液の液成分が乾燥すると移動可能となり、プレート上にリリースされる。供給部に線虫液の広がりを抑える加工が施されていることで、液が乾燥するまでの間に線虫液が広がってしまうことを防ぎ、線虫を所定の範囲内にとどめておくことができる。これにより、線虫のリリースのタイミングを制御することができる。なお、本明細書において、「リリース」とは、供給された線虫液の液成分が乾燥して線虫がプレート上に這い出すことを指す。また、本明細書において、「乾燥」とは、線虫が自由にプレート上を移動できるまで線虫液中の液成分が除去されることを意図し、典型的には液成分が８０％以上除去された状態のことを指す。

[0014] 線虫を用いる試験は特に限定されず、線虫の走性を用いた試験であってもよく、例えば、特定濃度のＮａＣｌに誘引されるという正の化学走性を調べる試験、がん患者の尿に誘引されるという正の化学走性を調べる試験、および特定濃度のジアセチルから逃避するという負の化学走性を調べる試験等の化学走性試験、ならびに特定の温度に対する走性を調べる温度走性（走温性

）試験が挙げられる。

[0015] （線虫）

本発明における線虫とは、生物分類学上の線形動物門に属する動物（以下、単に「線形動物」と示す。）および類線形動物門に属する動物（以下、単に「類線形動物」と示す。）の両方を意図している。これらに含まれる動物のうち、陸生または半陸生であって、固相上で移動することができるものであれば特に制限はない。

[0016] 線形動物としては、非寄生性線虫（または自由生活性線虫）、植物寄生性線虫、昆虫寄生性線虫、昆虫等便乗性線虫、および哺乳類等寄生性線虫の各種線虫などが挙げられる。

[0017] 非寄生性線虫としては、例えば、セノラブディティス・エレガンス（Caenorhabditis elegans、以下では「C．エレガンス」と示すことがある。）、ニセネグサレセンチュウ（Aphelenchus avenae）、セノラブディティス・アンガリア（Caenorhabditis angaria）、セノラブディティス・ブレンネリ（Caenorhabditis brenneri）、セノラブディティス・ブリッグサエ（Caenorhabditis briggsae）、セノラブディティス・ジャポニカ（Caenorhabditis japonica）、セノラブディティス・レマネイ（Caenorhabditis remanei）、およびプリスティオンクス・パシフィクス（Pristionchus pacificus）などが対象として挙げられる。

[0018] 植物寄生性線虫としては、例えば、サツマイモネコブセンチュウ（Meloidogyne incognita）、アレナリアネコブセンチュウ（Meloidogyne arenaria）、ジャワネコブセンチュウ（Meloidogyne javanica）、キタネコブセンチュウ（Meloidogyne hapla）、ダイズシストセンチュウ（Heterodera glycines）、ジャガイモシストセンチュウ（Globodera rostochiensis）、ジャガイモシロシストセンチュウ（Globodera pallida）、キタネグサレセンチュウ（Pratylenchus penetrans）、ミナミネグサレセンチュウ（Pratylenchus coffeae）、クルミネグサレセンチュウ（Pratylenchus vulnus）、ナミクキセンチュウ（Ditylenchus dipsaci）、イネシンガレセンチュウ（Aphelenchoides b

esseyi）、コムギツブセンチュウ（Anguina tritici）、イモグサレセンチュウ（Ditylenchus destractor）、ハガレセンチュウ（Aphelenchoides ritzemabosi）、ナガハリセンチュウ（Longidorus spp.）、ブドウオオハリセンチュウ（Xiphinema index）、イチゴセンチュウ（Aphelenchoides fragariae）、パイナップルネグサレセンチュウ（Pratylenchus brachyurus）、セノラブディティス・イノピナータ（Caenorhabditis inopinata）、およびコーヒーオオハリセンチュウ（Xiphinema brevicolle）などが対象として挙げられる。

[0019] 昆虫寄生性線虫としては、例えば、マルハナバチタマセンチュウ（Sphaerularia bombi）、スズメバチタマセンチュウ（Sphaerularia vespae）、スキムシノシヘンチュウ（Hexamermis zuimyshi）、スタイナーネマ・カルポカプサエ（Steinernema carpocapsae）、スタイナーネマ・クシダイ（Steinernema kushidai）、ヒラタケヒダコブセンチュウ（Iotonchium ungulatum）、イオトンキウム・カリフォルニクム（Iotonchium californicum）、イオトンキウム・カテニフォルメ（Iotonchium cateniforme）、イオトンキウム・ラカリエ（Iotonchium laccariae）、イオトンキウム・ルスレ（Iotonchium russulae）、セノラブディティス・アウリキュラリエ（Caenorhabditis auriculariae）、およびブルサフェレンクス・タダミエンシス（Bursaphelenchus tadamiensis）などが対象として挙げられる。

[0020] 昆虫等便乗性線虫としては、例えば、セノラブディティス・ジャポニカ（Caenorhabditis japonica）、プリスティオンクス・パシフィクス（Pristionchus pacificus）、マツノザイセンチュウ（Bursaphelenchus xylophilus）、クワノザイセンチュウ（Bursaphelenchus conicaudatus）、タラノザイセンチュウ（Bursaphelenchus luxuriosae）、テラトラブディティス・シンパピラータ（Teratorhabditis synpapillata）、セノラブディティス・ブリッグサエ（Caenorhabditis briggsae）、およびセノラブディティス・レマネイ（Caenorhabditis remanei）などが対象として挙げられる。これらのうち、セノラブディティス・ジャポニカ、プリスティオンクス・パシフィクス、セノ

ラブディティス・ブリッグサエ、およびセノラブディティス・レマネイは、実験室にて自由生活性線虫（非寄生性線虫）同様に扱われる。

[0021] 哺乳類等寄生性線虫としては、糞線虫、フィラリア、回虫（蛔虫）、アニサキス、鞭虫、鉤虫、顎口虫、および旋毛虫（トリヒナ）などが対象として挙げられる。

[0022] 糞線虫としては、主たる宿主の分類群別に、両生網無尾目寄生性糞線虫（Strongyloides pereira（以下では、糞線虫の属名である「Strongyloides」を単に「S.」と略記することがある。）、S. carinii、S. amphibiophilus、S. bufonis、S. physali、S. spiralis、S. prokopici、およびS. mascomaiなど）、爬虫網トカゲ目寄生性糞線虫（S. cruzi、S. darevskyi、およびS. ophiusensisなど）、爬虫網ヘビ目寄生性糞線虫（S. ophidiae、S. mirzai、S. gulae、およびS. serpentisなど）、鳥網コウノトリ目寄生性糞線虫（S. cubaensis、S. ardeae、およびS. herodiaeなど）、鳥網キジ目寄生性糞線虫（S. avium、S. oswaldoi、およびS. pavonisなど）、鳥網ガンカモ目寄生性糞線虫（S. minimumなど）、鳥網チドリ目寄生性糞線虫（S. turkmenicaなど）、鳥網スズメ目寄生性糞線虫（S. quiscali Barusなど）、哺乳網有袋目寄生性糞線虫（S. thylacisなど）、哺乳網食虫目寄生性糞線虫（S. akbari、およびS. rostombekowiなど）、哺乳網霊長目寄生性糞線虫（S. stercoralis、S. fuelleborni、S. fuelleborni kellyi、およびS. cebusなど）、哺乳網異節目寄生性糞線虫（S. dasypodis、およびS. shastensisなど）、哺乳網有鱗目寄生性糞線虫（S. leiperiなど）、哺乳網齧歯目寄生性糞線虫（S. chapini、S. ratti、S. myopotami、S. venezuelensis、S. agoutii、S. robustus、およびS. sigmodontisなど）、哺乳網食肉目寄生性糞線虫（S. nasua、S. felis、S. mustelorum、S. erschowi、S. planiceps、S. puttori、S. martis、S. vulpis、S. tumefasciens、S. lutrae、およびS. procyonisなど）、哺乳網長鼻目寄生性糞線虫（S. elephantisなど）、哺乳網奇蹄目寄生性糞線虫（S. westeriなど）、および哺乳網偶蹄目寄生性糞線虫（S. papillosus、およびS. ransomiなど）などが対象として挙げられる。これらのうち、S. st

ercoralis、S. fuelleborni、およびS. fuelleborni kellyiは、人に寄生するいわゆるヒト糞線虫である。また、アライグマ糞線虫であるS. procyonis、およびブタ糞線虫であるS. ransomiなども人に寄生することがある。

[0023] フィラリアとしては、犬糸状虫（Dirofilaria immitis）、バンクロフト糸状虫（Wuchereria bancrofti）、ロア糸状虫（Loa loa）、回旋糸状虫（Onchocerca volvulus）、およびマレー糸状虫（Brugia malayi）などが対象として挙げられる。

[0024] 回虫（蛔虫）としては、ヒト回虫（Ascaris lumbricoides）、ブタ回虫（Ascaris suum）、頚部膿瘍カイチュウ（Lagochilascaris minor）、ウシ回虫（Neoascaris vitulorum）、ウマ回虫（Parascaris equorum）、アライグマ回虫（Baylisascaris procyonis）、イヌ回虫（Toxocara canis）、およびネコ回虫（Toxocara cati）などが対象として挙げられる。

[0025] アニサキスとしては、アニサキス・ピグレフィー（Anisakis pegreffii）、アニサキス・シンプレックス・センス・ストリクト（Anisakis simplex sensu stricto）、およびアニサキス・シンプレックスＣ（Anisakis simplex C）のいわゆるアニサキスＩ型、アニサキスＩＩ型（Anisakis physeteris）、およびシュードテラノバ（Psudoterranova decipiens）などが対象として挙げられる。

[0026] 鞭虫としては、ヒト鞭虫（Trichuris trichiura）などが対象として挙げられる。

[0027] 鉤虫としては、ズビニ鉤虫（Ancylostoma duodenale）、アメリカ鉤虫（Necator americanus）、およびイヌ鉤虫（Ancylostoma caninum）などが対象として挙げられる。

[0028] 顎口虫としては、日本顎口虫（Gnathostoma nipponicum）、有棘顎口虫（Gnathostoma spinigerum）、剛棘顎口虫（Gnathostoma hispidum）、およびドロレス顎口虫（Gnathostoma doloresi）などが対象として挙げられる。

[0029] 旋毛虫（トリヒナ）としては、Trichinella britovi、Trichinella spiralis、Trichinella nativa、Trichinella nelsoni、およびTrichinella pseudo

spiralisなどが対象として挙げられる。

[0030] 上記以外の哺乳類等寄生性線虫として、フィリピン毛細線虫（Capillaria philippinensis）および肝毛細線虫（Capillaria aerophila）などの毛細線虫（毛頭虫ともいう。）、および東洋眼虫（Thelazia callipaeda）などが対象として挙げられる。

[0031] また、類線形動物としては、ハリガネムシなどが対象として挙げられる。ハリガネムシとしては、フトハリガネムシ（Gordius robustus）、オガタハリガネムシ（Gordius ogatai）、タンガニーカハリガネムシ（Pseudogordius tanganykae）、およびニホンザラハリガネムシ（Chordodes japonensis）などが対象として挙げられる。

[0032] （供給工程）

本実施形態において、供給工程では、線虫を含んだ線虫液をプレートの供給部に供給することにより、任意の数の線虫をプレートに供給する。供給方法は、試験に影響がない範囲内であれば特に限定されないが、例えばピペット等を用いて任意の量（ボリューム）の線虫液を供給部に供給してもよい。以下では、特に明記がない限りは、線虫としてＣ．エレガンスを対象とした場合の条件等を例示するが、これに限定されるものではなく、プレートのサイズおよび線虫液の量（ボリューム）などの任意の条件は、対象とする線虫の体のサイズおよび特性等に照らして調整すればよい。

[0033] 供給工程において線虫液が好適に供給されない場合、後述する乾燥工程において線虫をリリースするのに支障をきたす虞がある。例えば、線虫のリリース時に線虫の集団が発生する虞がある。線虫の集団とは、線虫が集合して塊状の集団となることであり、主に線虫の個体数密度が高い場合に発生する。線虫の集団は解消しない場合があり、また、解消するとしても数十分から数時間を要するため、試験の実施および実施した試験の精度に影響を及ぼす虞がある。

[0034] 線虫液に含まれる線虫の個体数、線虫液に用いる液体の種類および線虫液の量（ボリューム）などは、試験条件および試験内容等に応じて適宜変更す

ればよい。

[0035] 線虫液に含まれる線虫の個体数は、線虫の種類、容器のサイズに応じて適宜に調整すればよい。例えば、線虫の種類としてＣ．エレガンスを用い、内径約５．２ｃｍの円形容器をプレートに使用する場合には試験を好適に行う観点から、成虫２００匹以下とすることが好ましい。また、Ｃ．エレガンスを用い、内径約８．２ｃｍの円形容器をプレートに使用する場合には、成虫５００匹以下とすることが好ましい。使用する線虫液は、試験に適した線虫個体数を考慮して、個体数密度を適宜調整すればよい。

[0036] 線虫液に用いる液体は、特に限定されないが、線虫に備わる極めて高い学習・記憶能力により、液体に含まれる特定の味または匂いへの条件付けが生じ、その後の試験に影響する場合があるため、試験の目的によって選択するのが望ましい。例えば、線虫の試験に通常用いられる緩衝液および超純水等であってもよい。線虫に対する脱水抑制の観点では、線虫の保湿効果がある緩衝液の使用が好ましく、例えば、保湿効果のあるゼラチンを含む、線虫の洗浄に用いられる公知のＷａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒを好適に使用することができる。一方、脱水を促進する虞のある塩分濃度の比較的高い液体、例えば生理食塩水は、これを使用すべき特段の事情がない限り避けるのが好ましい。

[0037] 線虫液を作製する前に、線虫を任意の液体で洗浄してもよい。例えば、線虫を洗浄する液体は、特に限定されないが、液体に含まれる特定の味または匂いへの条件付けが生じ、その後の試験に影響する場合があるため、試験の目的によって選択する必要がある。例えば、線虫の試験に通常用いられる緩衝液および超純水等であってもよい。線虫に対する脱水抑制の観点では、例えばＷａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒが好ましく、脱水を促進する虞のある塩分濃度の高い液体、例えば生理食塩水よりも塩分濃度の高い液体は避けるのが好ましい。

[0038] 供給部に供給する線虫液の量（ボリューム）は、試験に影響がない範囲内であれば特に限定されない。線虫液の量は後述する乾燥工程の時間に影響する。例えば、その他の条件が同一の場合、線虫液の量が少ないほど乾燥工程

に要する時間は短くなる。また、線虫液の量が同じであれば、該線虫液に含まれる線虫の個体数が多いほど乾燥工程に要する時間は短くなる。乾燥工程の時間を考慮して、線虫液の量および線虫の個体数密度を決定してもよい。

[0039] 供給工程において、供給部に供給する線虫液の量（ボリューム）は、容器サイズ、および、詳細を後述する凹部を設ける場合には、当該凹部の容積などを参照して決定すればよい。例えば、容器サイズが内径約５．２ｃｍまたは約８．４ｃｍである円形プラスチックディッシュに、固体培地を注入し、凹部を１つ設けたプレートを用いる場合、供給する線虫液の量は１μＬ以上、５０μＬ以下であればよく、２μＬ以上、３０μＬ以下であることがより好ましい。

[0040] また、供給部に供給する線虫液の量（ボリューム）は、乾燥工程の時間に影響するため、乾燥工程の時間を参照して決定してもよい。以下、内径約８．４ｃｍの円形プラスチックディッシュに３０ｍＬ以下の固体培地を注入し、凹部を１つ設けたプレートを用いる場合を例として、供給部に供給する線虫液の量と線虫がリリースされるまでの時間との関係について説明する。

[0041] 供給工程から２分～１０分後に線虫がリリースされるようにする場合は、供給部に供給する線虫液の量（ボリューム）は、３μＬ以下とすることが好ましく、２μＬ以下とすることがより好ましい。

[0042] 供給工程から９０分以上経過してから線虫がリリースされるようにする場合、供給部に供給する線虫液の量（ボリューム）は２０μＬ以上であってもよい。供給する線虫液が当該範囲内であることで、線虫液の乾燥に時間を要し、線虫がリリースされるまでの時間を十分に長くすることが可能となる。

[0043] （供給部）

本実施形態において、プレートは供給工程で線虫液を供給する供給部を固相に備えている。供給部には、線虫液の広がりを抑える加工が施されている。線虫液の広がりを抑える加工であることで、線虫の移動開始位置を十分に制御することができる。線虫液の広がりを抑える加工であれば具体的な態様は制限されないが、例えば、供給部を凹部にすること、および供給部の底表

面、すなわち、線虫液を滴下する面を疎水性にすることなどが挙げられる。なお、本実施形態において、特に明記がない限りは、固相が固体培地である場合について説明する。なお、固相についての詳細は、後述の〔線虫試験用プレート〕を参照されたい。

[0044] はじめに、供給部を凹部にすることについて説明する。供給部を凹部とすることで、その内部で線虫液を保持することができるため、線虫液の広がりを抑えることができる。また、凹部内で線虫が重なって塊状の集団となった場合は、凹部の固体培地表面側の開口部に近い線虫から順番に固体培地表面に這い出すため、線虫のリリース時には線虫の集団を解消させることができる。このため、凹部を設けることで、たとえ線虫の塊状の集団が発生したとしても、集団の状態が持続するのを防ぐことができる。

[0045] 凹部は、固体培地の表面から固体培地の底部に向かって延びるように形成されている。凹部の深さは、凹部の効果が得られる範囲内であれば特に限定されない。例えば、固体培地の底表面まで到達していても、到達していなくてもよい。

[0046] 凹部を開口部側から見たときの形状は特に限定されないが、凹部内の線虫を正立顕微鏡で観察する際の観察し易さ、および線虫液の液成分が乾燥した後の線虫の固体培地表面への這い上がり易さの観点からは、凹部の開口部は凹部の底表面と同じ形状、または底表面よりも広くなっている形状であることが好ましい。

[0047] 凹部の形成方法は特に限定されない。例えば、固体培地をくり抜いて凹部を形成する方法および予め凹部形成のための構造が設けられた容器に固体培地を注入して凹部を形成する方法が挙げられる。

[0048] 凹部の容積は特に限定されない。例えば、固体培地をくり抜いて凹部とする場合、凹部の容積は固体培地の厚さに依存する。

[0049] 固体培地を形成させる容器は、サイズ、形状および材質に特に制限はなく、プラスチックディッシュ等の市販の容器を用いることができる。

[0050] 凹部を有するプレートとして、例えば、底表面内径約８．４ｃｍ、底表面

積約５５ｃｍ^{2}の円形プラスチックディッシュに、内径５ｍｍの円筒形の凹部（底表面積は約０．２ｃｍ^2）を１つ有する固体培地を形成してもよい。

[0051] 凹部が固体培地を貫通しており、凹部の底表面において容器が露出していてもよい。容器の底表面が疎水性である場合、その一部が凹部において露出し、供給した線虫液が疎水性部分に触れていることにより、線虫液の乾燥を早めることができる。

[0052] 本実施形態において疎水性とは、線虫液を弾く性質のことを指す。例えば、滴下した線虫液と、線虫液が接する疎水性の面と、の接触角は、５０度以上、望ましくは７５度以上、より望ましくは９０度以上である。

[0053] 供給部が凹部であるとき、凹部底表面が疎水性であることにより、凹部底表面に供給（滴下）された線虫液が全体に広がった後に、凹部底表面外周部に速やかに移動し、まず、凹部底表面の中央が乾燥状態となる。そのため、線虫液を線虫が固体培地表面に這い上がる際の動線である凹部内壁に続く凹部底表面外周部に効率よく移動させることができる。これにより、線虫を固体培地表面へと好適に供給することができる。

[0054] 凹部の底表面において容器が露出する場合、容器全体を疎水性とすることで、凹部底表面の疎水性の加工としてもよい。凹部底表面が疎水性であることで、線虫液が疎水性部分に弾かれるため、線虫液を凹部底表面中央から凹部底表面外周部に速やかに移動させることができる。このような観点から、容器の材質は、液体を吸収または透過しない素材であることが好ましい。このような材質としては、例えば、プラスチック、ガラス、およびポリジメチルシロキサン（ＰＤＭＳ）等のシリコーン樹脂等、またはアルミニウム等の金属を選択できる。

[0055] また、凹部の底表面において疎水性材質の容器部分を露出させるのではなく、撥水性ポリマーなどの疎水性材料を凹部の底表面に塗布することでも同様の効果を得ることができる。また、撥水性ポリマーなどの疎水性材料を凹部に塗布する場合、底表面に限らず、凹部の内壁（側面）側に塗布するものであってもよい。

[0056] なお、供給部としての凹部は設けずに凹部以外の供給部を設ける場合、供給部表面を疎水性とする加工は特に限定されない。例えば、任意の材質および形状の疎水性シートをプレート上に載せ、該シート上を供給部とすることが挙げられる。

[0057] 供給部が凹部の場合、凹部の底表面と開口部とをつなぐ凹部内壁が吸水性であってもよい。凹部内壁が吸水性であることにより、線虫液が固体培地に吸収されるため、凹部内の線虫液の乾燥を早めることができる。

[0058] 本実施形態において吸水性とは、固体培地が線虫液の液成分（水に限定されない）を吸収する性質のことを指す。例えば、線虫液の供給から約３０分以内に、線虫液の液成分の４０％以上、好ましくは５０％以上、より好ましくは７０％以上を固体培地が吸収することを指す。

[0059] 凹部の底表面を疎水性とし、凹部の内壁を吸水性としてもよい。この構成により好適に線虫液が凹部底表面外周部に移動する。このため、凹部の内壁においてより好適に線虫液が吸収されるため、乾燥工程を短縮することができる。

[0060] 凹部の内壁を吸水性とする方法は、特に限定されない。例えば、固体培地をくり抜いて凹部を形成することによりその内壁を吸水性とするものであってもよい。固体培地をくり抜いて凹部を形成することで、固体培地の固化に伴って内部に形成された微細な孔（す）が凹部の内壁に露出し、露出した孔の作用によって、凹部内壁を吸水性とすることができる。

[0061] なお、予め凹部形成のための構造が設けられた容器、例えば凸材を装着または挿入した容器に固体培地を注入して固化させる方法で形成した凹部に比べて、固体培地をくり抜く方法で形成した凹部の内壁は表面が粗くなり、凹部内壁の面積が増す。このように、凹部をくり抜いて形成することで、線虫液の液成分を吸収可能な面積、および微細な孔（す）の数が増すものと推定される。このため、凹部をくり抜いて形成することが好ましい。

[0062] 凹部の内壁の面積は、特に限定されないが、凹部の内壁での線虫液の吸水性を高める観点から、０．１ｃｍ^{2}以上、４ｃｍ^{2}以下であることが好ましく

、０．２ｃｍ^{2}以上、２ｃｍ^{2}以下であることがより好ましい。

[0063] 吸水性の凹部内壁の面積が大きくなれば吸水性は高まる。一方で、固体培地の増量によって凹部内壁の面積が増加すると、プレート内、ひいては凹部内の湿度が増すなどの理由により、線虫液の乾燥が抑制される。さらに、線虫液の乾燥に要する時間は、プレートのサイズおよび形状、凹部のサイズ、形状および数、線虫液の量（ボリューム）、固体培地の量（ボリューム）、ならびに線虫個体密度などの各種条件の影響を受ける。このため、凹部内壁の面積は、上述した範囲およびその他の条件を参照しながら、適宜選択すればよい。

[0064] 凹部の深さは、線虫を好適にリリースする観点から、０．１ｃｍ以上、１ｃｍ以下であることが好ましく、０．１４ｃｍ以上、０．６ｃｍ以下であることがより好ましい。凹部の深さがとりわけ下限を下回らないことで、凹部の内壁の面積を十分な範囲とすることができるため、凹部の内壁の吸水性を十分に保つことができる。また、凹部の深さがとりわけ上限を上回らないことで、線虫が凹部から這い出すまでの距離を短くすること、および凹部内の湿度を好適な範囲内に制御することができる。このため、線虫がリリースされるまでの時間を短縮することができる。

[0065] 固体培地の厚さを比較的薄くすることで、凹部の深さを低く設定してもよい。これにより、凹部底表面から固体培地表面までの距離が短くなり、凹部の底面から固体培地表面側の開口部に向かって内壁に沿って積み重なる線虫の数を制限できるため、線虫の集団のサイズを抑制できる。さらに線虫が這い上る凹部内壁上の距離が短くなることで、線虫のリリースがスムーズになる。例えば、凹部の深さが０．１７ｃｍ以上、０．２５ｃｍ以下である場合、線虫液供給後３分以内に線虫のリリースを開始することができる。

[0066] 固体培地の量（ボリューム）は、固体培地の作製方法、容器のサイズ、および後述する乾燥工程の条件によって適宜変更してもよい。以下、固体培地の量について、容器に培地を注入して固化させ、室温で密封性の高い保存容器内に一昼夜静置した固体培地を例に、供給部を凹部とした場合について説

明する。なお、固化後の保存時間の長短により固体培地の含水率が変化するため、供給工程および後述する乾燥工程の条件等は、固体培地の状態に合わせて調整すればよい。

[0067] 固体培地の量（ボリューム）は、凹部に供給した線虫液が固体培地表面に溢れない程度の厚さとすることを原則として、好適に試験を実施できる範囲内であれば特に限定されない。例えば、線虫液を好適に乾燥させる観点では、固体培地の量は容器の容積の４０％以下とすることが好ましい。下限は特に設定されないが、１０％以上であれば、線虫液が固体培地に溢れることはなく、試験を実施できる範囲内である。当該範囲内の固体培地の量とするためには、例えば、底表面内径約８．４ｃｍ、容積約７２ｃｍ^{3}の円形ディッシュを用いる場合、固体培地の量は１０ｍＬ～３０ｍＬ程度、すなわち厚さ０．２ｃｍ～０．６ｃｍ程度とすればよい。また、底表面内径約５．２ｃｍ、容積約２１ｃｍ^{3}の円形ディッシュを用いる場合、固体培地の量は３ｍＬ～１０ｍＬ程度、すなわち厚さ０．１４ｃｍ～０．５ｃｍ程度とすればよい。

[0068] なお、固体培地をくり抜くことで凹部を形成する場合、凹部の深さは固体培地の厚さと同じであり、固体培地の量（ボリューム）に依存するため、凹部の深さが上述した通りの範囲内となるように調整してもよい。

[0069] 固体培地の量（ボリューム）は容器の容積の２０％以下としてもよい。供給される線虫液の量等の他の条件が同一の場合、当該範囲内の固体培地を用いると、この範囲よりも多い量の固体培地を用いる場合に比べ、線虫液の液成分の乾燥速度が速くなる。このため、乾燥工程に要する時間を比較的短くしたい場合において当該範囲内の固体培地を好適に使用できる。なお、本実施形態において「乾燥工程に要する時間が比較的短い」とは、典型的には乾燥工程に要する時間が２５分以内であることを意味する。当該範囲内の固体培地の量とするためには、例えば、底表面内径約８．４ｃｍ、容積約８２ｃｍ^{3}の円形ディッシュを用いる場合、固体培地の量は１０ｍＬ程度、すなわち厚さ０．２ｃｍ～０．４ｃｍ程度とすればよい。また、底表面内径約５．２ｃｍ、容積約２５ｃｍ^{3}の円形ディッシュを用いる場合、固体培地の量は３ｍ

Ｌ程度、すなわち厚さ０．１５ｃｍ程度とすればよい。

[0070] 試験に応じて、固体培地の量（ボリューム）は容器の容積の４０％以上としてもよい。固体培地の量の上限に制限はないが、試験のし易さの観点からは容器の容積の５０％以下であることが好ましい。供給される線虫液の量（ボリューム）等の他の条件が同一の場合、この範囲よりも少ない量の固体培地を用いる場合に比べ、線虫液の液成分の乾燥速度が遅くなる。このため、乾燥工程に要する時間を比較的長くしたい場合において当該範囲内の固体培地を好適に使用できる。なお、本実施形態において「乾燥工程に要する時間が比較的長い」とは、典型的には乾燥工程に要する時間が６０分以上、１８０分以内であることを意味する。なお、１８０分を超える時間を要する場合、試験に使用する線虫が飢餓状態になり、通常の試験には適さなくなることがあるが、飢餓状態の線虫を使用する試験では、１８０分を超える極めて長い時間を要する乾燥を選択することもできる。

[0071] 供給部の数、形状、サイズ、および形成される位置に特に制限はなく、使用する線虫の種類および数、被験物の種類および数、ならびに試験の目的等に応じて適宜に条件を変更すればよい。供給部の数は、例えば、１、２、３、４、５、もしくは６またはそれ以上とすることができる。供給部の形状は、例えば供給部を水平方向に切断した場合の断面の形状が円形状、矩形状、多角形状などであってもよい。

[0072] 供給部のサイズは、プレートのサイズに比して十分に小さいことが好ましい。例えば、供給部を凹部とした場合、凹部のプレート表面側の開口部の面積の合計は、固体培地の表面の概ね２％以下であってよく、より好ましくは０．４％以下である。凹部の開口部の面積が上記範囲内であることで、試験の実施を妨げることなく、線虫液の広がりを好適に抑えることができる。また、供給部の位置は典型的にはプレートの中央付近であるが、特に限定されず、試験の目的および内容などによって決めればよい。

[0073] 線虫試験用プレートに用いる容器のサイズは、試験に適したサイズであれば特に限定されない。例えば円形容器の場合、容器底表面の内径が３．０ｃ

ｍ以上、１５．０ｃｍ以下、および高さ（内高）０．５ｃｍ以上、３ｃｍ以下であることが好ましく、内径が５．０ｃｍ以上、１０．０ｃｍ以下、および高さ（内高）１ｃｍ以上、１．５ｃｍ以下であることがより好ましい。また、容器が長方形の場合の内寸は、縦（典型的には短辺）３ｃｍ以上、３０ｃｍ以下、横（典型的には長辺）３ｃｍ以上、３０ｃｍ以下、高さ０．５ｃｍ以上、３ｃｍ以下であることが好ましく、縦５ｃｍ以上、１５ｃｍ以下、横５ｃｍ以上、２５ｃｍ以下、高さ１ｃｍ以上、１．５ｃｍ以下であることがより好ましい。容器底表面の内寸がこの範囲内であることで、嗅覚に関する化学走性試験における被験物の匂い勾配、味覚に関する化学走性試験における塩分等の濃度勾配、および温度走性試験における温度勾配などの各種勾配をプレート内に好適に形成することができる。また、容器の容積は３．６ｃｍ^{3}以上、２７００ｃｍ^{3}以下であることが好ましく、１９．５ｃｍ^{3}以上、５６５ｃｍ^{3}以下であることが好ましい。

[0074] （乾燥工程）

本実施形態において、乾燥工程とは、供給工程の後に、前記供給工程でプレート上に供給された線虫液を乾燥させることで、線虫をプレート上にリリースする工程のことである。乾燥工程での乾燥方法は試験の実施またはその精度に影響がないものであれば、特に限定されない。乾燥方法としては、例えば、線虫液の蒸発および固体培地による吸収を含む自然乾燥、および線虫液の液成分の少なくとも一部を自然乾燥以外の方法で除去する方法が挙げられ、それらを組み合わせて線虫液を乾燥させてもよい。なお、自然乾燥以外の方法で線虫液の液成分の少なくとも一部を除去する工程を、以降では「除去工程」と称する。すなわち、乾燥工程は除去工程を含むものであってもよい。

[0075] 乾燥工程の自然乾燥において、線虫液の乾燥速度は、プレートの形状およびサイズ、プレートに被せるカバーの有無、供給部の形状、サイズおよび数、滴下した線虫液の量（ボリューム）、ならびに固相の量（ボリューム）等の条件によって変動する。当該条件は、乾燥工程が好適に行えるように、適

宜に調整してもよい。また、乾燥速度は、周囲雰囲気の湿度によっても変動し得る。

[0076] 乾燥工程に要する時間は、試験によって適宜変更してもよく、特に限定されない。例えば、乾燥工程は２分以上、２５分以下であってもよい。また、乾燥工程が０秒以上、２分未満となるように条件を調整して、供給直後に線虫がリリースできるように設定してもよい。さらに、乾燥工程は１分以上、９０分以下となるように条件を設定して、線虫液の供給から一定時間経過後に線虫を固体培地表面にリリースしてもよい。

[0077] 乾燥工程およびその後の試験においてはプレートにカバーを被せて静置してもよい。

[0078] 乾燥工程は、線虫液の供給後に線虫液から液成分の少なくとも一部を自然乾燥以外の方法で少なくとも１回除く除去工程をさらに含んでもよい。この工程により、自然乾燥させる線虫液の量（ボリューム）が減少するため、乾燥工程全体の所要時間を短縮させ、線虫液の供給直後に線虫をリリースすることが可能となる。

[0079] 除去工程によって除く線虫液の量は特に限定されない。例えば、線虫を早くリリースする観点から、自然乾燥で乾燥させる線虫液の量（ボリューム）を１μＬ以下にしてもよい。

[0080] 除去工程において、液成分を除去する方法は線虫試験用プレートに人の手指および試料等の匂いが付着しない方法であれば、特に限定されない。例えば、ピペットで液成分を吸引することによって線虫液の除去を行ってもよい。

[0081] ピペットによる液成分の吸引を行う場合、線虫を吸引しない程度の穴径を有するチップを用いればよい。例えば、線虫がＣ．エレガンスの場合には、典型的には、穴径２００μｍ以下のチップを装備したピペット、より好ましくは、先端の穴径５０μｍ程度に加工したパスツールピペットによる線虫液の液成分の吸引を行えばよい。

[0082] 除去工程の回数は特に限定されない。除去工程は、１回のみ行ってもよい

し、線虫液の液成分が乾燥するまでの間に複数回行ってもよい。また、除去工程を行うタイミングは特に限定されない。例えば、除去工程は供給工程の直後に複数回連続して行ってもよいし、または１回目の除去工程を行った後に、時間を空けてから２回目以降の除去工程を行ってもよい。

[0083] 〔線虫試験用プレート〕

本発明の一実施形態における、線虫試験用プレートは、容器および該容器内に形成された固相を備え、固相は、その表面上で線虫が移動可能なものであり、固相に、線虫を含む線虫液が供給される部分である供給部が設けられており、供給部には線虫液の広がりを抑える加工が施されている。

[0084] 本明細書において固相とは、容器内に形成された固体状の層を意図しており、その表面で線虫が移動可能であれば特に制限はない。具体的には、水分を含み、それにより表面が湿った状態にある層が想定される。固体状の層としては、非限定的な例として、寒天、アガロース、ゼラチンおよびコンニャク等から形成されたゲル、ペクチン、グアーガム、カラギーナンおよびキサンタンガム等のゲル化剤または増粘安定剤を液体に添加することで形成されたゲル等が挙げられる。線虫の固体培地表面での円滑な運動を担保する観点からは、寒天等により固化、またはゲル化した固体培地が好ましい。また、線虫の生物学的特性を阻害しない、すなわち生体適合性の観点からは、寒天等の天然由来の原料により固化、またはゲル化した固体培地が好ましい。さらに、走性試験を行う場合は、線虫試験用プレートを用いた試験に影響がないように、固体培地は無味無臭であることが好ましい。また、固体培地には、硫黄源、リン酸塩、および微量のミネラルを添加することもできる。例えば、硫酸マグネシウム（$MgSO_4$）、リン酸二水素カリウム（KH_2PO_4）、リン酸水素二カリウム（K_2HPO_4）、および塩化カルシウム（$CaCl_2$）等を添加することがある。固相は、例えば、生物用培地をゲル化または固化した培地であり得る。なお、本明細書では、説明の便宜上、固相について、生物用培地を寒天等により固化、またはゲル化した固体培地を例にして説明するが、これに限定されるものではない。

[0085] 線虫が固体培地の内部に侵入することを防ぐ観点から、ゴム硬度計を使用し、ＪＩＳ　Ｋ　７３１２（タイプＣ）熱硬化性ポリウレタンエラストマー成形物の物理試験方法の規定に準拠した方法で測定された固体培地のデュロメータ硬さが５以上であることが好ましく、８以上であることがより好ましく、１５以上であることがさらに好ましい。当該デュロメータ硬さが５以上であることにより、固体培地表面の液滴および凹部内の線虫液の液成分等、固体培地に接する液相中を遊泳中の線虫が固体培地の内部に侵入することを防ぐことができる。また、当該デュロメータ硬さが８以上であることにより、空腹等のストレスがない状態で用いられた線虫が固体培地の内部に侵入することを防ぐことができる。

[0086] 固体培地の状態が試験中、または保存期間中に一定に保たれるように、固体培地中の水分が蒸発しにくいもの、または固体培地自体が自然乾燥しにくいことが好ましく、このような固体培地の例としては、コンニャクが挙げられる。一方で、寒天およびゼラチンなど、比較的自然乾燥しやすい固体培地を使用する場合には、プレートにカバーを被せてテープで密封する、または、密封ケースに保存するなどの方法で乾燥を防げばよい。

[0087] なお、固相は、その表面で線虫が移動可能な層として形成されていればよく、その層の下側に別の層（下層）が形成されていてもよい。例えば、表面の層として、線虫の移動および後述する被験物の拡散等に適した層を採用し、下層として、線虫の内部への侵入の抑制および被験物の拡散の抑制に適した層を採用することが可能である。なお、２層とする場合に、このような性質の層の組み合わせには限らない。また、３層以上としてもよい。

[0088] さらに、容器の底表面は顕微鏡下で観察するのに十分な可視光・紫外光透過率を有することが好ましい。具体的には、容器の底表面は、波長３６０ｎｍ～８６０ｎｍの光の透過率が７０％以上であることが好ましく、８０％以上であることがより好ましく、９０％以上であることがさらに好ましい。また、波長８６０ｎｍ～１５００ｎｍの光の透過率が７０％以上であることが好ましく、８０％以上であることがより好ましく、９０％以上であることが

さらに好ましい。また、自家蛍光のない、または自家蛍光の少ない素材を母材としたものであってもよい。このような母材を用いた容器は、蛍光観察に好適に用いることができる。例えば、母材としてプラスチックを用いる場合、光透過性に優れ、自家蛍光の少ないプラスチックはとしては、ポリエチレンテレフタレート（ＰＥＴ）等のポリエステル、ポリメタクリル酸メチル（ＰＭＭＡ）、ポリカーボネート（ＰＣ）、シクロオレフィンポリマー（ＣＯＰ）およびエポキシ樹脂等が挙げられる。

[0089] 容器の形状、典型的には容器の内側形状は、例えば、円形、矩形および正方形などであり得る。なお、本明細書において容器の形状とは、容器を上から見たときの形状を意図している。

[0090] また、固体培地表面の被験物エリアの線虫および対照物エリアの線虫の計数を行うために、自動撮像機能を備えた一体型顕微鏡（一体型蛍光顕微鏡を含む）を使用する場合、あるいは、画像解析による線虫の計数に特化した、実体顕微鏡（蛍光実体顕微鏡を含む）、撮像装置および画像処理装置からなる解析システムが構築されている場合には、容器の形状およびサイズは、それらの試料ステージに合わせた形状およびサイズとすることが好ましい。

[0091] プレートは、試験中にプレートと組み合わせて用いられる、プレートとは別体のカバーをさらに備えていてもよい。カバーは、試験中に、プレート内の状態を均一に保つために使用される。カバーをプレートに被せることにより、固体培地の自然乾燥および線虫液の乾燥の抑制、およびプレート内の湿度の保持などが達成でき、試験環境を一定に保つことが可能となる。また、匂い物質に対する化学走性試験を行う場合に、匂い物質の拡散の抑制、およびプレート外部からの匂い物質の混入の防止なども達成でき、試験環境が一定に保たれる。さらには、カバーをプレートに被せることにより、プレートから線虫が脱出することを阻止することができる。さらに密封性を高める目的で、カバーをプレートに被せた後、疎水性のテープなどで、カバーの端部を覆うとともにプレートの外周に固定することで密封してもよい。

[0092] カバーは、カバーを被せた状態でも顕微鏡下でプレートの観察が可能とな

るように設計されていることが好ましい。すなわち、カバーは、顕微鏡下で観察するのに十分な可視光・紫外光透過率を有することが好ましい。具体的には、カバーは、波長３６０ｎｍ～８６０ｎｍの光の透過率が７０％以上であることが好ましく、８０％以上であることがより好ましく、９０％以上であることがさらに好ましい。また、波長８６０ｎｍ～１５００ｎｍの光の透過率が７０％以上であることが好ましく、８０％以上であることがより好ましく、９０％以上であることがさらに好ましい。また、自家蛍光のない、または自家蛍光の少ない素材を母材としたものであってもよい。このような母材を用いたカバーは、蛍光観察に好適に用いることができる。

[0093] （線虫試験用プレートの作製）

線虫の化学走性試験または温度走性試験を行う際には、公知の手法に従って、化学物質の濃度勾配または温度勾配を予め形成することが好ましい。以下、化学走性試験を行う場合の線虫試験用プレートの作製方法の一例について説明する。

[0094] 化学走性試験用の被験物は線虫試験用プレート上の任意の位置に供給されている。ここで、化学走性試験用の被験物とは、被験物自体が気相中に拡散して匂い物質となる場合の他、被験物に含まれる物質が被験物から気相に放出されて当該物質が匂い物質となる場合、および水溶性物質がプレートの固体培地等に染み込んで拡散する場合等があり得る。

[0095] 線虫試験用プレートに被験物を供給する方法としては、被験物を任意の位置に滴下、または塗布するなどであればよい。被験物の溶媒の種類、量（ボリューム）、温度、供給のタイミングは特に限定されず、試験内容によって適宜変更すればよい。プレートに対照物を供給する場合、被験物を含まないことを除き、溶媒の種類、量、温度および注入のタイミングを全て、被験物と同様にして供給する。

[0096] 被験物と対照物を供給する位置は、特に限定されない。線虫試験用プレートの中心を中心とする点対称の位置となるように、それぞれを供給してもよい。

[0097] 化学走性試験を行う場合の線虫試験用プレートにおいては、匂い物質の放出または拡散速度を制御する処理を行ってもよい。匂い物質の放出または拡散速度を制御することで、線虫の匂い検知感度の最適化が可能となる。

[0098] 例えば、被験物から放出される匂い物質が線虫試験用プレート内空間で飽和すること、または固体培地表面への匂い物質付着状態も密度勾配が維持される以上に高密度となることによって、線虫の化学走性試験が困難になる。これを防ぐために、被験物を供給するタイミングの調整、または分子飛び出し率を低下させる薬剤を被験物の試験液に添加することが可能である。一方で、匂い物質が気化しにくい物質である場合には、増感剤となる薬剤を被験物の試験液に添加する。対照物を設ける試験では、対照物となる標準液にも試験液と同一の薬剤を同量添加する。

[0099] 分子飛び出し率を低下させる薬剤としては、従来公知の気化抑制作用を有する物質を使用できる。また、増感剤となる薬剤としては、従来公知の気体拡散作用を有する物質を使用できる。これらにより、試験対象の匂い物質の拡散量、速度および範囲を制御することができ、線虫の匂い等検知感度を制御することが可能となる。匂い物質の放出または拡散速度の制御が可能となることで、線虫試験用プレートのサイズを最適化（特に最小化）することが可能となる。

[0100] 本発明は上述した各実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、異なる実施形態にそれぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。

[0101] （作用効果）

本実施形態における供給工程において、供給部内で線虫液が広がることなく残存すると、液体の表面張力によって線虫が線虫液に引き込まれたまま、線虫液内部にとどまる。このため、線虫の供給直後に線虫が線虫試験用プレート上に拡散するのを防ぐことができる。

[0102] 本実施形態の乾燥工程において、自然乾燥によって線虫液を乾燥させる場

合であっても、線虫のリリースのタイミングを調整すること、および線虫の集団の発生を防ぐことが可能となる。さらに、線虫液の拭き取り作業が発生しないため、手指の匂いまたは紙ワイパーに予期せず付着した試料等の匂いの線虫試験用プレートへの付着を回避することが可能となる。

[0103] 上述の通り、本実施形態における供給工程および乾燥工程を組み合わせることによって、本実施形態における試験方法は、従来の試験方法よりも厳密に線虫のリリースのタイミングを制御できる。さらに、試験実施者による操作が少なく、操作が簡便なため、試験実施者の手技への依存が少ない。このため、従来よりも高い精度の試験方法となる。

[0104] 本実施形態の線虫試験用プレートは、供給部において、線虫液の広がりを抑える加工が施されている。線虫の試験において本実施形態のプレートを用いることで、任意のタイミングまで供給部内に線虫をとどめておくことができる。このため、試験開始時に線虫がプレート上に広がるのを防ぐことができる。本実施形態の線虫試験用プレートにより、より厳密な試験が可能となる。

[0105] （まとめ）

本態様１に係る試験方法は、線虫を用いる試験方法であって、線虫試験用プレート上に設けられた供給部に、前記線虫を含む線虫液を供給する供給工程、および供給後に前記線虫液を乾燥させて、前記線虫試験用プレート上での前記線虫の移動を可能にさせる乾燥工程を含み、前記供給部には前記線虫液の広がりを抑える加工が施されている。この構成により、従来よりも工程が簡便で、高い精度の試験が可能となる。

[0106] 本態様２に係る試験方法は、前記態様１において、前記加工が、前記供給部を凹部にすることである。この構成により、供給工程において線虫液が供給部内に好適に保持される。

[0107] 本態様３に係る試験方法は、前記態様１または２において、前記加工が、前記供給部を疎水性にすることである。この構成により、供給工程において線虫液が供給部内に好適に保持される。

[0108] 本態様４に係る試験方法は、前記態様１～３のいずれかにおいて、前記乾燥工程が、前記線虫液の供給の後に線虫液から液成分の少なくとも一部を自然乾燥以外の方法で少なくとも１回除く除去工程をさらに含む。この構成により、乾燥工程を短縮させ、線虫液の供給直後に線虫をリリースすることが可能となる。

[0109] 本態様５に係る線虫試験用プレートは、容器および該容器内に形成された固相を備え、前記固相は、その表面上で線虫が移動可能なものであり、前記固相に、前記線虫を含む線虫液が供給される部分である供給部が設けられており、前記供給部には前記線虫液の広がりを抑える加工が施されている。この構成により、供給部内に線虫液をとどめることができるため、自然乾燥による線虫のリリースであっても、そのタイミングを調整することが可能となる。

[0110] 本態様６に係る線虫試験用プレートは、前記態様５において、前記加工が、前記供給部を凹部にすることである。この構成により、より好適に線虫液を供給部内に保持することが可能となる。

[0111] 本態様７に係る線虫試験用プレートは、前記態様６において、前記凹部の底表面において前記容器が露出している。この構成により、より好適に凹部内に線虫液を保持することが可能となる。

[0112] 本態様８に係る線虫試験用プレートは、前記態様７において、前記容器の材質がプラスチック、ガラス、シリコーン樹脂または金属である。この構成により、容器底表面において好適に線虫液をはじくことができ、線虫液を供給部内にとどめることが可能となる。

[0113] 本態様９に係る線虫試験用プレートは、前記態様５～８のいずれかにおいて、前記加工が、前記供給部表面を疎水性にすることである。この構成により、線虫液の広がりを抑えることが可能となる。

[0114] 本態様１０に係る線虫試験用プレートは、前記態様６～８のいずれかにおいて前記凹部の内壁が吸水性である。この構成により、乾燥工程を短縮することができる。

[0115] 本態様１１に係る線虫試験用プレートは、前記態様６～８、および１０のいずれかにおいて前記凹部の底表面が疎水性である。この構成により、乾燥工程を短縮することができる。

[0116] 以下に実施例を示し、本発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、本発明は以下の実施例で示す実施形態に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることはいうまでもない。さらに、本発明は上述した実施形態に限定されるものではなく、請求項に示した範囲で種々の変更が可能であり、それぞれ開示された技術的手段を適宜組み合わせて得られる実施形態についても本発明の技術的範囲に含まれる。また、本明細書中に記載された文献の全てが参考として援用される。

実施例

[0117] 以下に示す各実施例では、線虫としてＣ．エレガンスを用いて各試験を行った。また、各実施例では、線虫試験用プレートの容器としてサイズの異なる２種類の市販の円形プラスチックディッシュを使用した。２種類の円形プラスチックディッシュとしては、底表面内径が約５．２ｃｍのものと約８．４ｃｍのものを使用した。なお、内径が約８．４ｃｍの円形プラスチックディッシュの容積は、約５．２ｃｍのものの約３．９倍である。

[0118] 以下に示す各実施例では、容器内に寒天を主とする固体培地を作製して、線虫試験用プレートとして用いた。固体培地は、寒天粉末２０ｇを超純水９９３mLで溶かした液体を加圧滅菌した後、１ＭＭｇＳＯ$_4$（１ｍＬ）、１Ｍリン酸カリウム（ｐＨ６．０、５ｍＬ）、および１ＭＣａＣｌ$_2$（１ｍＬ）を添加し、撹拌して１Ｌ調製した。固体培地をくり抜くことで１つの凹部を作製して供給部とした。なお、作製した凹部は固体培地の中心を中心とする内径５ｍｍの円筒形の凹部であった。実施例で用いた線虫試験用プレートの詳細を表１に示す。以下では、表１に示す線虫試験用プレートの名称を用いて説明する。

[0119]

[表1]

名称	固体培地			容器		
	固体培地量 (mL)	厚さ (cm)	供給部の有無	容器底表面内径 (cm)	容器底表面積 (cm^2)	容器内高 (cm)
プレートＡ１	3.0	約0.14	○	約5.2	約21.0	1.2
プレートＡ２	3.0	約0.14	－			
プレートＢ１	5.0	約0.24	○			
プレートＢ２	5.0	約0.24	－			
プレートＣ１	10.0	約0.48	○			
プレートＣ２	10.0	約0.48	－			
プレートＤ１	10.0	約0.18	○	約8.4	約55.0	1.5
プレートＤ２	10.0	約0.18	－			
プレートＥ１	20.0	約0.36	○			
プレートＥ２	20.0	約0.36	－			
プレートＦ１	30.0	約0.55	○			
プレートＦ２	30.0	約0.55	－			

[0120] 供給工程で用いる線虫液としては、緩衝液で洗浄済みの線虫の成虫を含むＷａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒを用いた。Ｗａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒは、ゼラチン粉末０．５ｇを超純水９９３mLで溶かした液体を加圧滅菌した後、１ＭＭｇＳＯ$_4$（１ｍＬ）、１Ｍリン酸カリウム（ｐＨ６．０、５ｍＬ）、および１ＭＣａＣｌ$_2$（１ｍＬ）を添加し、撹拌して１Ｌ調製した。以下に示す各実施例では、線虫（Ｃ．エレガンス）の至適温度である２０℃に冷却し、線虫の洗浄および線虫液に使用した。

[0121] 〔実施例１．線虫供給工程の検討〕

３ｍＬの固体培地を注入し中央に凹部を１つ形成したプレートＡ１と、同様に固体培地を３ｍＬ注入するものの、凹部を設けないプレートＡ２およびプレートＡ２と同様にして作製したプレートＡ２’を用いて、本発明の線虫供給工程と従来公知の線虫供給工程とによる線虫リリースを継時的に観察した。まず、線虫液をピペットで吸い出し、プレートＡ１、プレートＡ２およびプレートＡ２’のそれぞれの供給部、すなわち、プレートＡ１においては凹部、プレートＡ２およびプレートＡ２’においてはプレート中央に、概ね１５０匹の成虫を含んだ線虫液を２０μＬずつ滴下して供給した。プレートＡ１においては、供給した線虫液の液成分を自然乾燥させる方法を用いた乾燥工程によって、線虫をリリースした。プレートＡ２においては、従来公知

の方法である、供給した線虫液の液成分を紙ワイパーで拭き取る方法で、また、プレートＡ２’においては、供給した線虫液の液成分を自然乾燥により乾燥させる方法を用いた乾燥工程によって、線虫をリリースした。線虫供給直後から、プレートＡ１、プレートＡ２およびプレートＡ２’の全体を、イメージスキャナーを用いて底表面から撮像し、固体培地表面に線虫が拡散する様子を観察した。

[0122] （実施例１の結果）

線虫液供給直後、１５分後および９０分後のプレートＡ１の画像を図１に左から順に示す。また、線虫供給直後および線虫液拭き取りから２分後のプレートＡ２の画像を図２に示す。また、線虫液供給直後および６０分後のプレートＡ２’の画像を図３に左から順に示す。

[0123] 図１に示す通り、プレートＡ１においては、線虫供給直後には供給部である凹部内に全ての線虫がとどまっており、線虫の移動開始位置が適切に制御されている。さらに１５分経過後もその状態が維持されており、９０分かけて全ての線虫が固体培地表面にリリースされた。

一方、図２に示す通り、プレートＡ２においては、プレート底表面に記した黒い点を目印としてプレート中央に線虫液を供給した。供給直後にはプレートＡ２の固体培地表面に線虫が広がっており、個体ごとに移動開始位置が異なっていることがわかる。

[0124] また、図３に示す通り、プレートＡ２’においては、少なくとも６０分は線虫液の形状がほとんど変化せず、線虫のリリースに十分なほどには、線虫液の乾燥が進まないことがわかる。図中のスケールバーは５ｍｍであり、以下の供給部の画像でも同様とする。さらに、図示しないが、凹部を設けなかったプレートＢ２およびプレートＣ２を用いて、プレートＡ２’と同様の試験を行った。プレートＢ２はプレートＡ２’と同じ固体培地をプレートＡ２’よりも多い５ｍＬ注入したプレートであり、プレートＣ２はプレートＡ２’と同じ固体培地をプレートＡ２’よりもさらに多い１０ｍＬ注入したプレートであった。プレートＢ２およびプレートＣ２を用いた試験の結果、プレ

ートＡ２’と同じ結果が得られた。すなわち、少なくとも６０分は線虫液の形状がほとんど変化せず、線虫のリリースに十分なほどには、線虫液の乾燥が進まなかった。

[0125] 以上より、プレートＡ１を用いた場合は、プレートＡ２、プレートＡ２’、プレートＢ２、およびプレートＣ２を用いた場合と比較して、線虫の移動開始位置が適切に制御され、好適に線虫がリリースされることがわかった。

[0126] 〔実施例２．固体培地の量（ボリューム）の検討１〕

プレートＡ１と、固体培地の量をそれぞれ５ｍＬ、１０ｍＬとした以外はプレートＡ１と同じであるプレートＢ１およびプレートＣ１を用いて、固体培地の量の違いによる乾燥工程への影響を調べた。乾燥工程として、供給した線虫液の液成分を自然乾燥による方法を用いて乾燥させた。まず、線虫液をピペットで吸い出し、各プレートの凹部に概ね５０匹の成虫を含んだ線虫液を３μＬずつ滴下して供給した。供給直後から２０秒ごとに４０分間、顕微鏡に取り付けたデジタルカメラを用いて凹部を中心とする約１．４ｃｍ四方を上側から撮像し、固体培地表面に線虫が拡散する様子を観察した。

[0127] （実施例２の結果）

プレートＡ１、プレートＢ１およびプレートＣ１の凹部を継時観察した結果を図４、図５および図６に示す。なお、各図では、線虫液供給直後、３分後、６分後と、凹部から全ての線虫がリリースされた時点の画像を左から順に示す。

[0128] 図４および図５に示す通り、３μＬの線虫液を供給した場合、プレートＡ１およびプレートＢ１を用いると、約２０分で線虫リリースが完了することがわかった。また、プレートＡ１では、線虫液供給から６分後でも線虫リリースはほとんど始まっていなかったのに対し、プレートＢ１では、３分後には線虫リリースが始まり、プレートＡ１に比べて線虫液中の液成分の乾燥が速かったことが示唆される。これには、固体培地をくり抜いた凹部の内壁の面積がプレートＢ２の方が大きく、固体培地中への液成分の吸収が進んだことが関係していると考察した。

[0129] 図６に示す通り、プレートＣ１では、約３０分で線虫リリースが完了することがわかった。プレートＣ１では、プレートＢ１と同様に、３分後には線虫リリースが始まり、線虫液の乾燥が進んだものの、プレートＢ１よりも線虫リリースの完了に時間を要した。この理由の一つとして、固体培地の厚さ、すなわち凹部の深さがプレートＢ１の２倍あり、乾燥により凹部底表面に重なり合う状態となった複数の線虫が凹部内壁を上って固体培地表面に這い出すのに余分に時間を要したことが関係していると考えられた。

[0130] 以上の結果から、少なくとも、容器容積の１０％以上、４０％以下の量の固体培地を注入したプレートに設けた直径５ｍｍの円筒形の凹部に、概ね５０匹の成虫を含んだ線虫液を３μＬ滴下して供給し、乾燥工程として自然乾燥による方法を用いた場合には、その固体培地の量によらず、供給直後から３０分以内に線虫リリースが完了することが明らかとなった。

（実施例１および２の考察：線虫液の量（ボリューム）による影響）

実施例２において、プレートＡ１に３μＬの線虫液を供給し、乾燥工程として自然乾燥による方法を用いた場合、図４に示す通り線虫リリースは２０分で完了したが、実施例１において、プレートＡ１に２０μＬの線虫液を供給した場合には、乾燥工程が実施例２と同一であるにもかかわらず、図１に示す通り凹部への線虫液供給後１５分経過しても、線虫液の乾燥が十分に進まず、凹部内の全ての線虫が固体培地表面に這い出るまでに概ね９０分を要した。線虫供給後２０分程度で線虫のリリースが完了する実施例２の結果と比較すると、線虫の供給からリリースまでの時間が長くなっていることは明らかである。この結果より、乾燥工程として自然乾燥による方法を用いた場合において、線虫液の量を調整することによって、線虫リリースのタイミングを制御できることは明らかである。

[0131] 〔実施例３．固体培地の量（ボリューム）の検討２〕

直径約８．４ｃｍの円形プラスチックディッシュに、固体培地を１０ｍＬ、２０ｍＬおよび３０ｍＬ注入して凹部を設けたプレートをそれぞれ作製して、それぞれプレートＤ１、プレートＥ１およびプレートＦ１とした。プレ

ートＤ１、プレートＥ１およびプレートＦ１に、線虫液を供給して、自然乾燥による方法を用いた乾燥工程における固体培地の量および容器のサイズによる影響を調べた。まず、実施例２と同様にして線虫液を供給し、固体培地表面に線虫が拡散する様子を撮像して観察した。

[0132] （実施例３の結果）

プレートＤ１、プレートＥ１およびプレートＦ１の凹部を継時観察した結果を図７、図８および図９に示す。なお、各図では、線虫液供給直後、３分後、６分後と、凹部から全ての線虫がリリースされた時点の画像を左から順に示す。

[0133] 図７、図８および図９に示す通り、３μＬの線虫液を供給した場合、プレートＤ１では約２５分、プレートＥ１およびプレートＦ１では約３０分で線虫リリースが完了することがわかった。また、いずれのプレートでも、線虫液供給から３分後には線虫リリースが始まっていた。以上の結果から、実施例２の結果と同様、少なくとも、容器容積の１０％以上、４０％以下の量の固体培地を注入したプレートに設けた直径５ｍｍの円筒形の凹部に、概ね５０匹の成虫を含んだ線虫液を３μＬ滴下して供給し、乾燥工程として自然乾燥による方法を用いた場合には、その固体培地の量によらず、供給直後から３０分以内に線虫リリースが完了することが明らかとなった。

[0134] （実施例２および３の考察：容器サイズによる影響）

さらに、プレートＡ１～Ｃ１を用いて行った実施例２と比べても、プレートＤ１～Ｆ１を用いた実施例３の自然乾燥による方法を用いた乾燥工程に要する時間に大きな違いは認められなかった。このことから、少なくとも、容器容積に占める固体培地の割合が実施例２または実施例３の範囲内であれば、容器サイズの違いによって乾燥工程に要する時間に違いが生じないことは明らかである。

[0135] 〔比較例１．従来プレートを用いる場合の乾燥工程〕

凹部を設けなかった以外は、実施例３で使用したプレートＤ１、プレートＥ１およびプレートＦ１と同様にして、プレートＤ２、プレートＥ２および

プレートＦ２をそれぞれ作製し、凹部の有無による、自然乾燥による方法を用いた乾燥工程の進行を調べた。実施例３と同様にして線虫液を供給し、固体培地表面に線虫が拡散する様子を撮像して観察した。

[0136] （比較例１の結果）

プレートＤ２、プレートＥ２およびプレートＦ２の凹部を継時観察した結果を図１０、図１１および図１２に示す。なお、各図では、滴下による線虫液供給の直後、２０分後、３０分後および４０分後の供給部付近の画像を左から順に示す。

[0137] 図１０、図１１および図１２に示す通り、供給部を設けない固体培地表面に線虫液を供給しただけでは、２０分間経過後も線虫が供給部の線虫液内にとどまっていた、または線虫液が自然乾燥した後も、線虫液を供給した地点周辺で複数個体が塊状の集団になってとどまっていた。図１０および図１２に示す通り、プレートＤ２およびプレートＦ２を用いた場合は、線虫液は供給から２０分後に乾燥していたが、線虫の集団が発生した。さらに、プレートＤ２を用いた場合は、図１０に示す通り、線虫液の供給から４０分経過しても線虫が供給した地点（黒い点）付近に手段と集団としてとどまっていた。また、図１１に示す通り、プレートＥ２を用いた場合は、線虫液は供給から３０分経過しても十分に乾燥しなかった。

[0138] なお、実施例３では、凹部を設けた以外の試験条件は本比較例と同じだが、いずれのプレートにおいても３０分以内に液成分が乾燥して線虫リリースが完了し、線虫が集団にならず拡散した。以上から、凹部を設けた本発明の一実施形態に係る線虫試験用プレートが、乾燥工程における線虫の好適なリリースに、極めて有効であることは明らかである。

[0139] 〔実施例４．除去工程を含む乾燥工程の検討〕

プレートＤ１およびプレートＤ２を用いて、乾燥工程におけるピペットによる線虫液の液成分の吸引による効果、すなわち除去工程による効果を調べた。まず、線虫液をピペットで吸い出し、プレートＤ１およびプレートＤ２の供給部、すなわち、プレートＤ１においては凹部、プレートＤ２において

はプレート中央に、概ね１００匹の成虫を含んだ線虫液を３μＬずつ滴下して供給した。プレートＤ１においては、線虫液の供給直後に、該線虫液の液成分をピペットで吸引する除去工程を１回行うことにより線虫液を乾燥させて線虫をリリースした。プレートＤ２においては、供給した線虫液の液成分を従来の方法、すなわち紙ワイパーで拭き取る方法により線虫をリリースした。

[0140] 供給直後から２０秒ごとに２分間、供給部を中心とするエリアを上側から撮像し、固体培地表面に線虫が拡散する様子を観察した。

[0141] （実施例４の結果）

プレートＤ１およびプレートＤ２の線虫液供給部を継時観察した結果を図１３および図１４に示す。なお、図１３では、線虫液供給（供給工程）直後、線虫液の液成分除去（除去工程）直後、２０秒後および２分後の画像を左から順に示す。図１４では、線虫液供給直後、液成分拭き取り直後、２０秒後および２分後の画像を左から順に示す。

[0142] 図１３に示す通り、乾燥工程が線虫液の供給直後に液成分を吸引する除去工程を含む場合、線虫液中で遊泳していた線虫がすぐさま凹部の内壁を上り始めて凹部内壁を埋め尽くした。そして、２０秒後にはその中から数匹の線虫が固体培地表面に到達し、２分後には大部分の線虫が固体培地表面に這い出して拡散した。一方、図１４に示す通り、紙ワイパーを用いて液成分を拭き取る従来法による線虫リリースでは、拭き取った直後から線虫が移動を開始し、２分後には固体培地表面に拡散した。

[0143] 凹部を供給部とした本発明の線虫リリースに要する時間および線虫が固体培地表面に拡散する様子は、図１４に示す紙ワイパーを用いて液成分を拭き取る従来法と同等であった。すなわち、２分という極めて短時間で１００匹程度の線虫リリースを実現できることは明らかである。また、比較例１に示した自然乾燥を行う従来法の場合のように、線虫が集団となって供給部付近に長時間とどまることもなく、好適にリリースされていることは明らかである。

[0144] 〔実施例５．線虫供給工程および乾燥工程を用いた水溶性物質に対する化学走性試験〕

水溶性物質の一種である塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）を用いて、水溶性物質に対する線虫の化学走性試験を行った。まず、実施例１で用いたプレートＡ１およびプレートＡ２を作製し、プレートの中心から左側に向かって約２ｃｍに位置する固体培地表面の１か所に、被験物であるＮａＣｌを高濃度で含むプラグを静置した（ＮａＣｌスポット）。プラグからＮａＣｌを固体培地に拡散させて濃度勾配を形成させるためにプラグを固体培地表面に一晩静置した後、取り除いた。なお、ＮａＣｌの濃度勾配の形成に用いたプラグは、ＮａＣｌを最終モル濃度が１００ｍＭとなるように含有させた以外はプレートＡ１およびプレートＡ２の固体培地と同一の組成とした固体培地を直径５ｍｍの円筒状にくり抜いたものである。

[0145] 一方、当該中心から右側に向かって約２ｃｍに位置する点対称の位置を対照スポットとした。次いで、２つのスポットに麻酔薬の一種である０．５Ｍアジ化ナトリウムを１滴ずつ滴下した。滴下した液体が乾く、またはプレートＡ１およびプレートＡ２の固体培地に染み込むまで、当該プレートにカバーを被せて静置した。その後、プレートＡ１の中央に位置する凹部およびプレートＡ２の中央に、概ね１００匹の線虫を含んだ線虫液を３μＬ滴下して供給した。線虫の供給後にプレートＡ１およびプレートＡ２にカバーを被せてテープで密封した上で、遮光環境下で少なくとも１時間静置して、自然乾燥による方法を用いた乾燥工程を行った。その後、プレートＡ１およびプレートＡ２全体を、イメージスキャナーを用いて底表面から撮像した。なお、プレートＡ１の凹部のプレート表面側開口部の面積は、固体培地の表面積の約０．９％と十分に小さく、試験を妨げることなく、線虫液の広がりを好適に抑え、線虫の移動開始位置を制御できていることは明らかである。

[0146] （実施例５の結果）

図１５にプレートＡ１を用いた場合の試験結果の一例を示し、図１６にはプレートＡ２を用いた場合の試験結果の一例をそれぞれ示す。図１５および

図１６に示すように、ＮａＣｌスポットを中心とした同心円状のＮａＣｌエリアと、対照スポットを中心とした同心円状の対照エリアをプレートに設けて、各エリアに移動する線虫の様子を観察した。各エリアの設定は、従来公知の線虫の化学走性試験方法に従った。

[0147] 図１５および図１６に示すように、プレートＡ１およびプレートＡ２のいずれを用いた場合でも、線虫がＮａＣｌエリアに誘引された。特に、プレートＡ１を用いた試験方法では、ほぼ全ての線虫がＮａＣｌエリアに移動しており、より精度の高い試験が可能となることがわかった。

産業上の利用可能性

[0148] 本発明は、線虫を用いる試験方法に利用することができる。

請求の範囲

[請求項1] 線虫を用いる試験方法であって、

線虫試験用プレート上に設けられた供給部に、前記線虫を含む線虫液を供給する供給工程、および

供給後に前記線虫液を乾燥させて、前記線虫試験用プレート上での前記線虫の移動を可能にさせる乾燥工程を含み、

前記供給部には前記線虫液の広がりを抑える加工が施されている、試験方法。

[請求項2] 前記加工が、前記供給部を凹部にすることである、請求項１に記載の試験方法。

[請求項3] 前記加工が、前記供給部を疎水性にすることである、請求項１または２に記載の試験方法。

[請求項4] 前記乾燥工程が、前記線虫液の供給の後に線虫液から液成分の少なくとも一部を自然乾燥以外の方法で少なくとも１回除く除去工程をさらに含む、請求項１～３のいずれか１項に記載の試験方法。

[請求項5] 容器および該容器内に形成された固相を備え、

前記固相は、その表面上で線虫が移動可能なものであり、

前記固相に、前記線虫を含む線虫液が供給される部分である供給部が設けられており、

前記供給部には前記線虫液の広がりを抑える加工が施されている、線虫試験用プレート。

[請求項6] 前記加工が、前記供給部を凹部にすることである、請求項５に記載の線虫試験用プレート。

[請求項7] 前記凹部の底表面において前記容器が露出している、請求項６に記載の線虫試験用プレート。

[請求項8] 前記容器の材質がプラスチック、ガラス、シリコーン樹脂または金属である、請求項７に記載の線虫試験用プレート。

[請求項9] 前記加工が、前記供給部表面を疎水性にすることである、請求項５

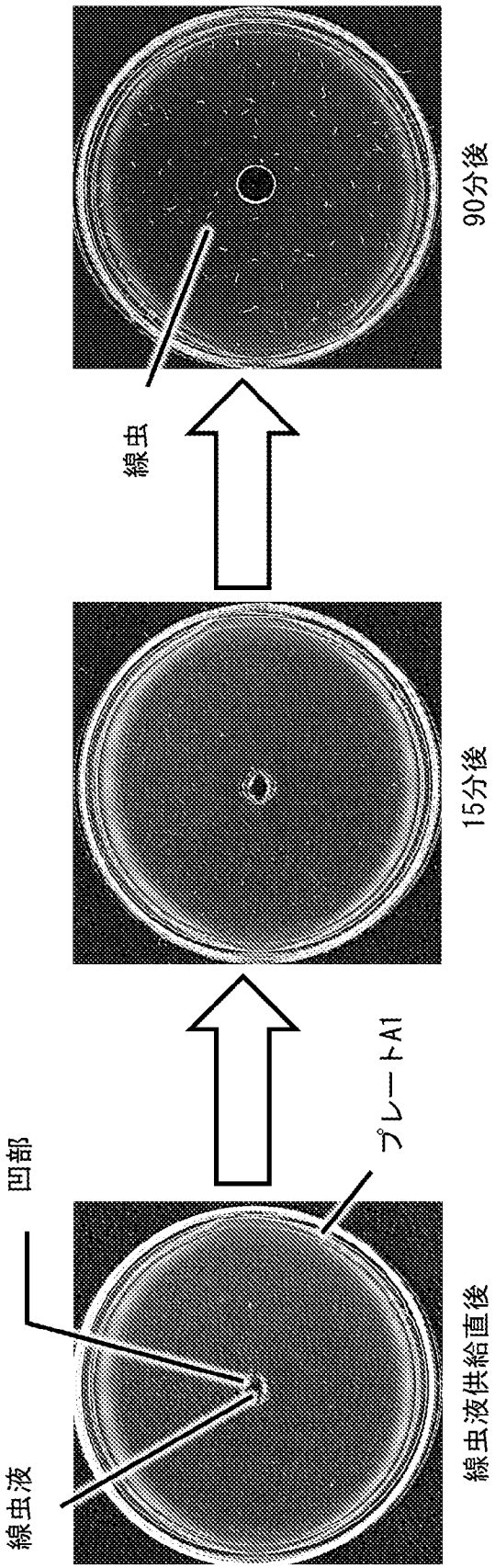
～８のいずれか１項に記載の線虫試験用プレート。

[請求項10] 前記凹部の内壁が吸水性である、請求項６～８のいずれか１項に記載の線虫試験用プレート。

[請求項11] 前記凹部の底表面が疎水性である、請求項６～８および１０のいずれか１項に記載の線虫試験用プレート。

[図1]

図 1



[図2]

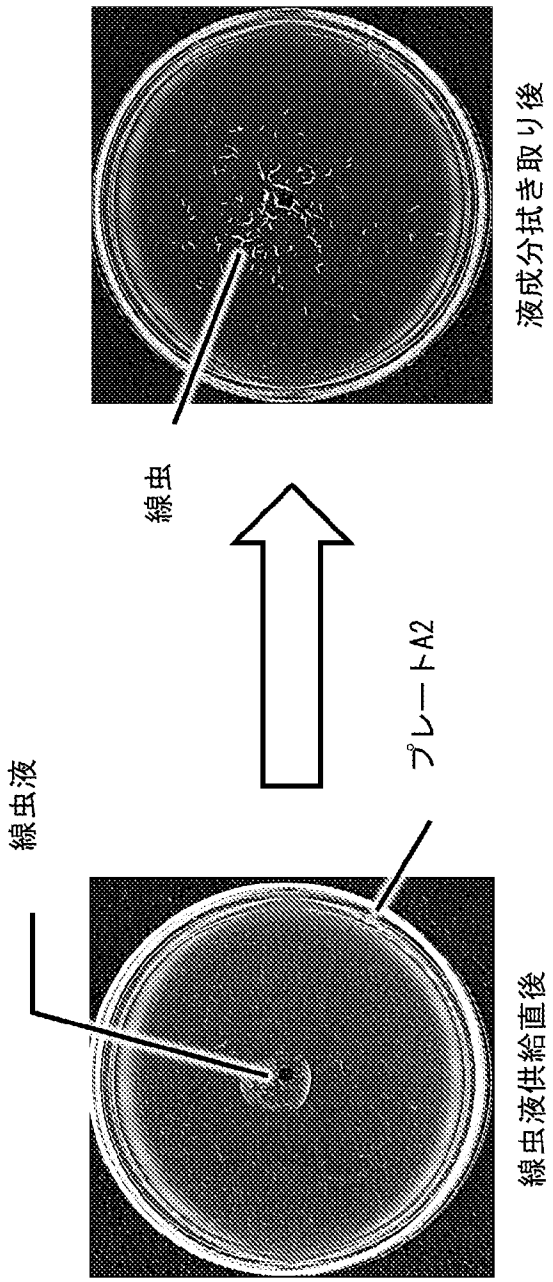
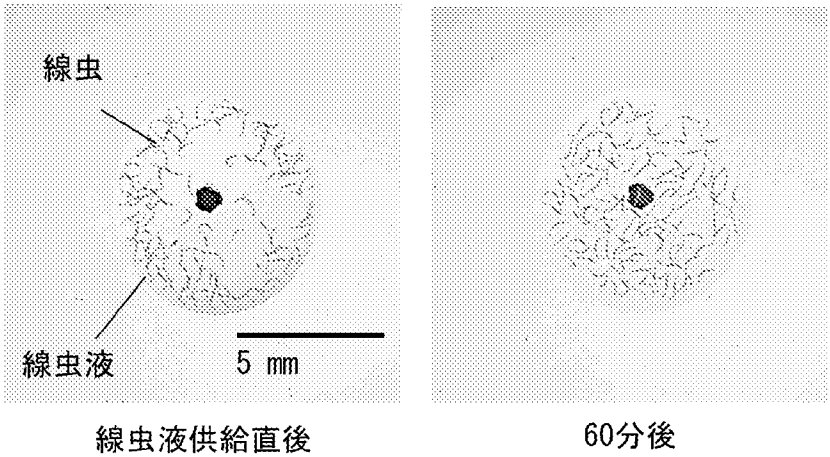


図 2

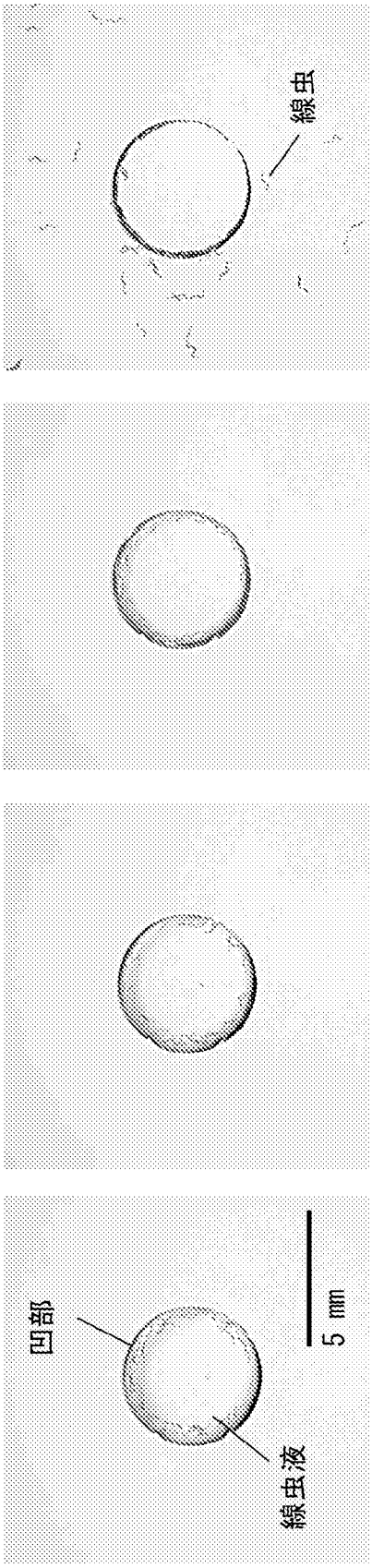
[図3]

図 3



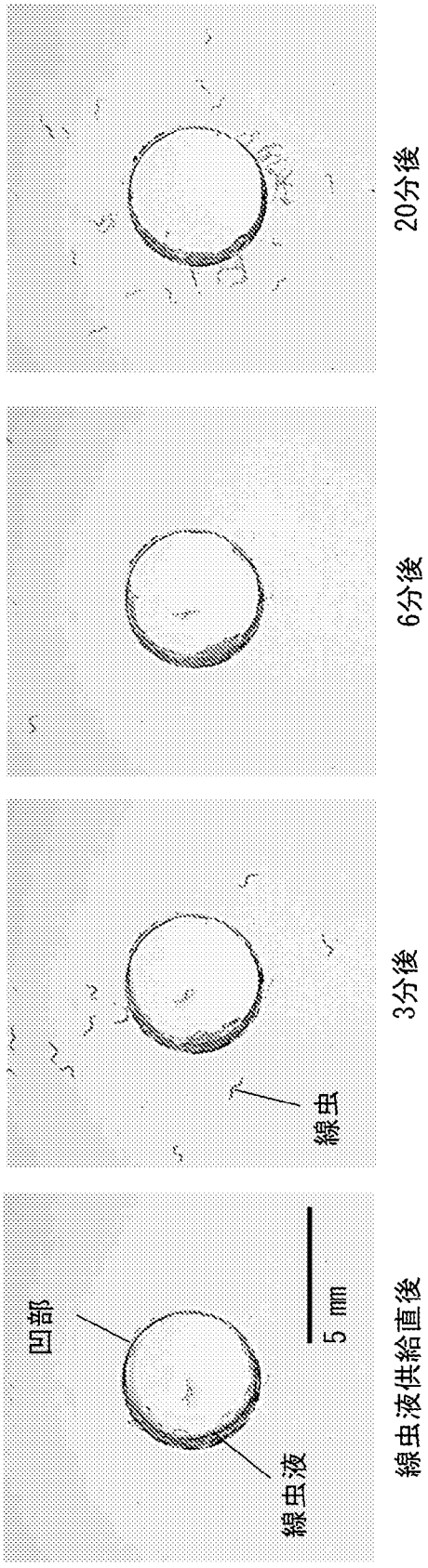
[図4]

図 4



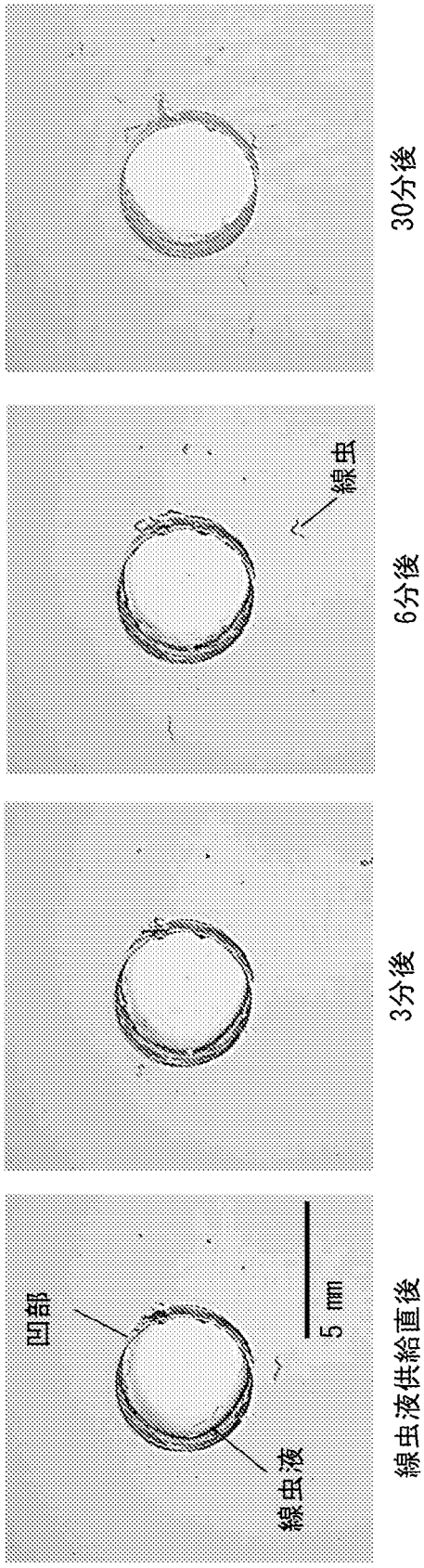
[図5]

図5



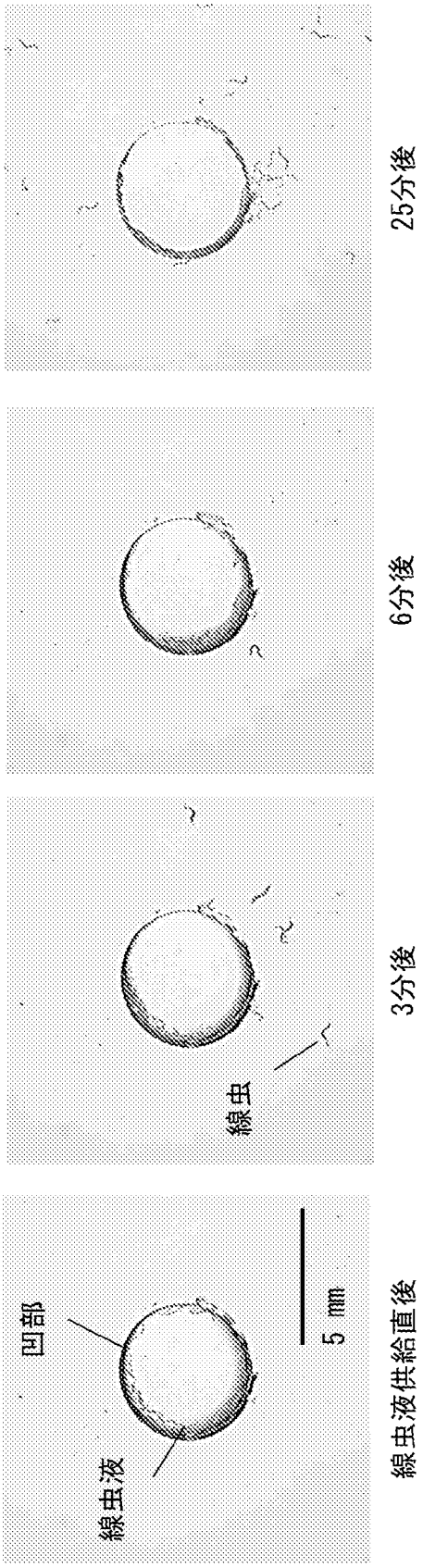
[図6]

図 6



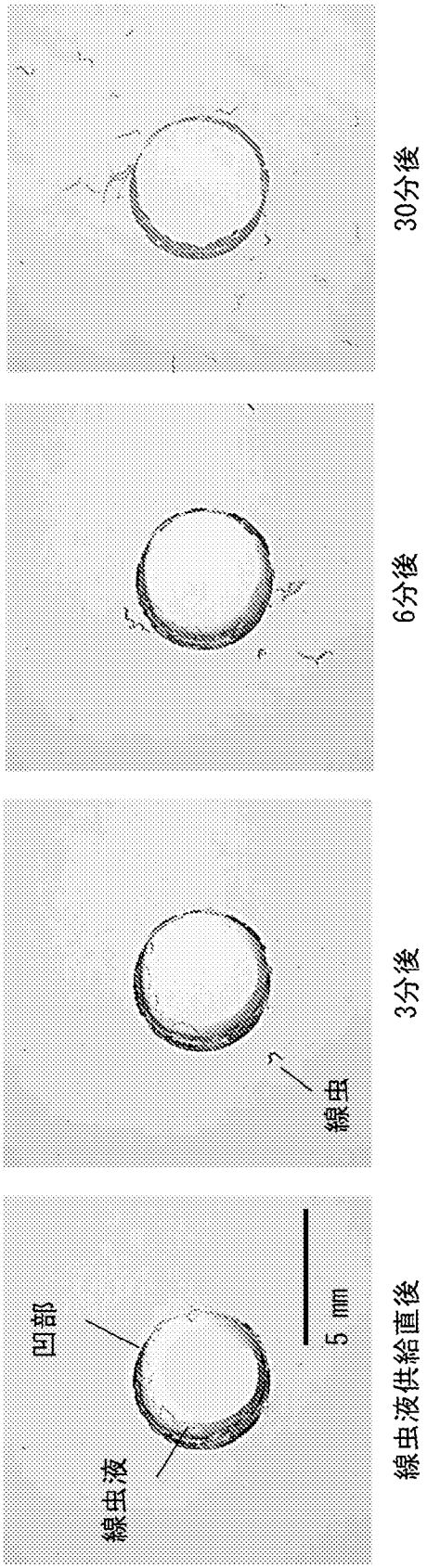
[図7]

図 7



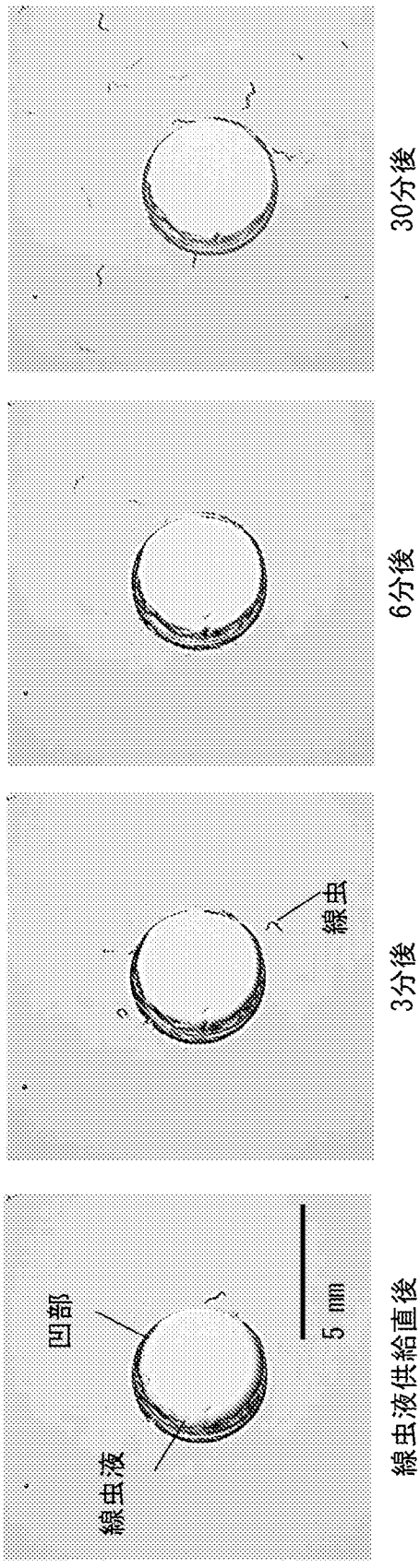
[図8]

図８



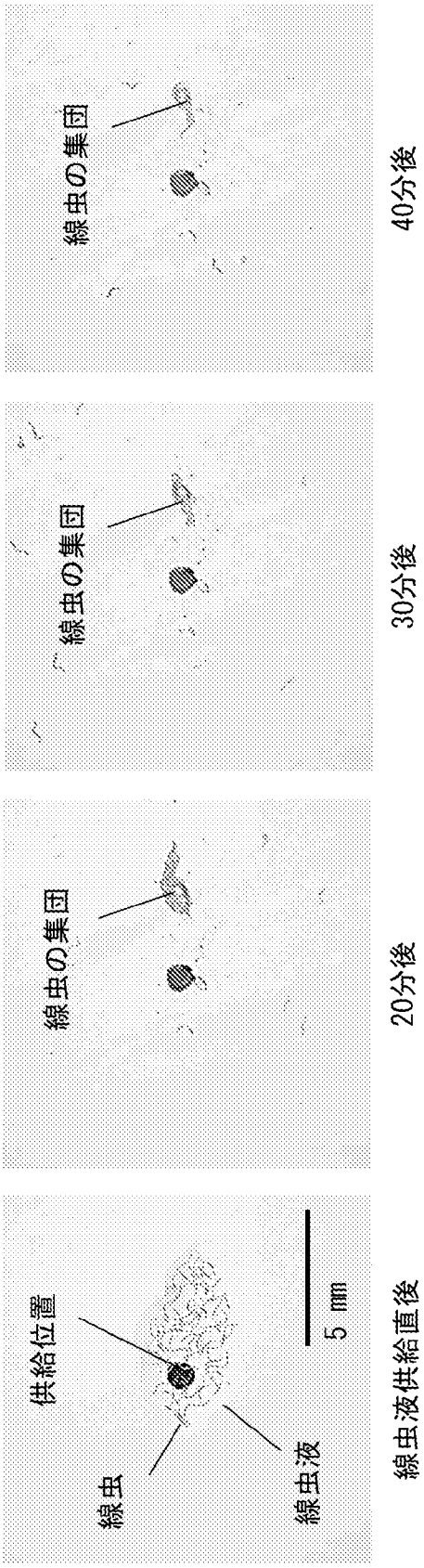
[図9]

図９



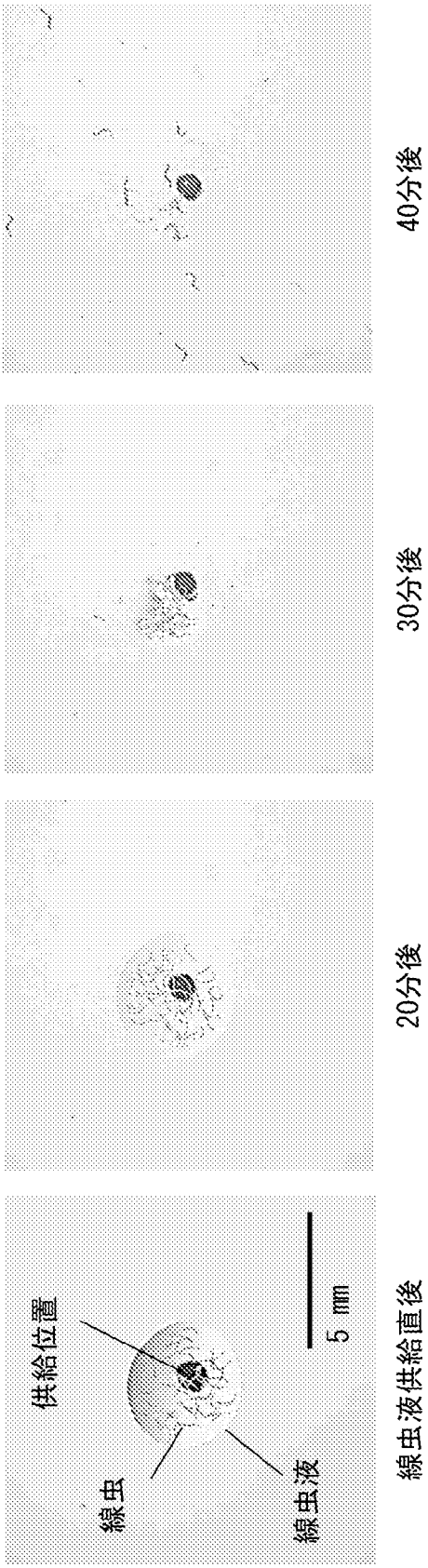
[図10]

図 10



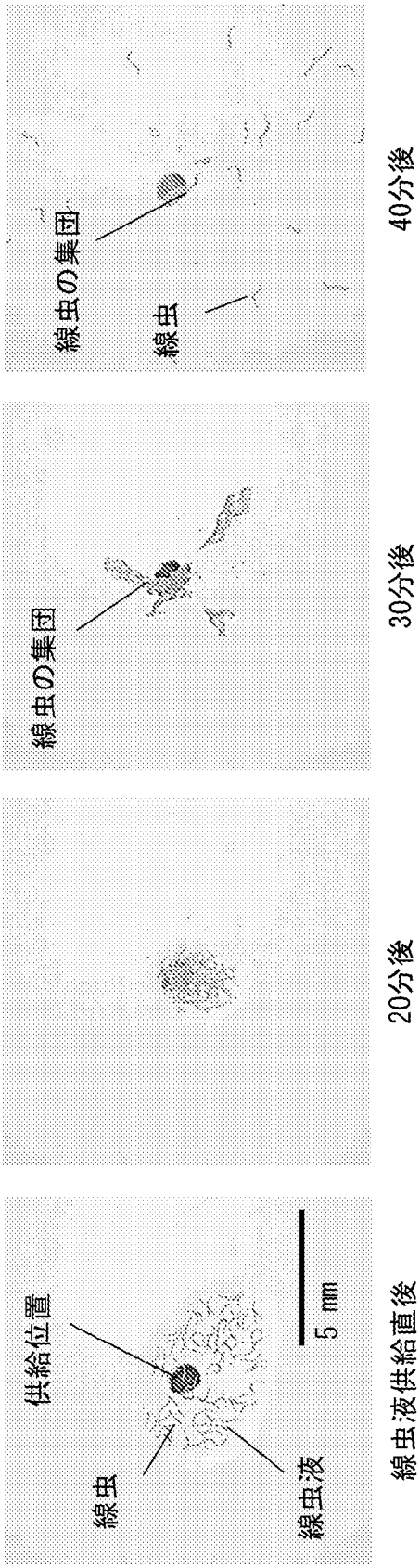
[図11]

図 11



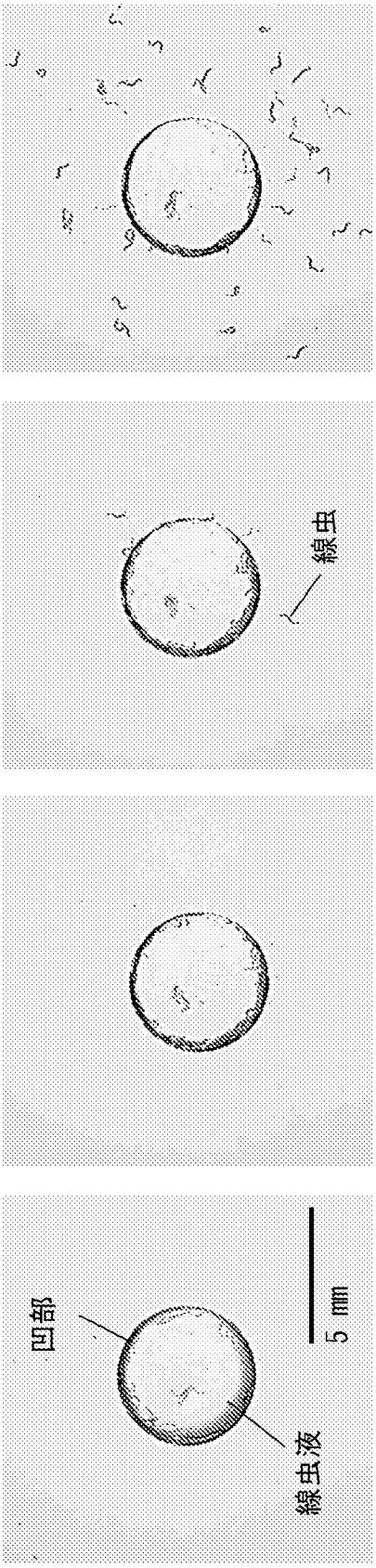
[図12]

図 12



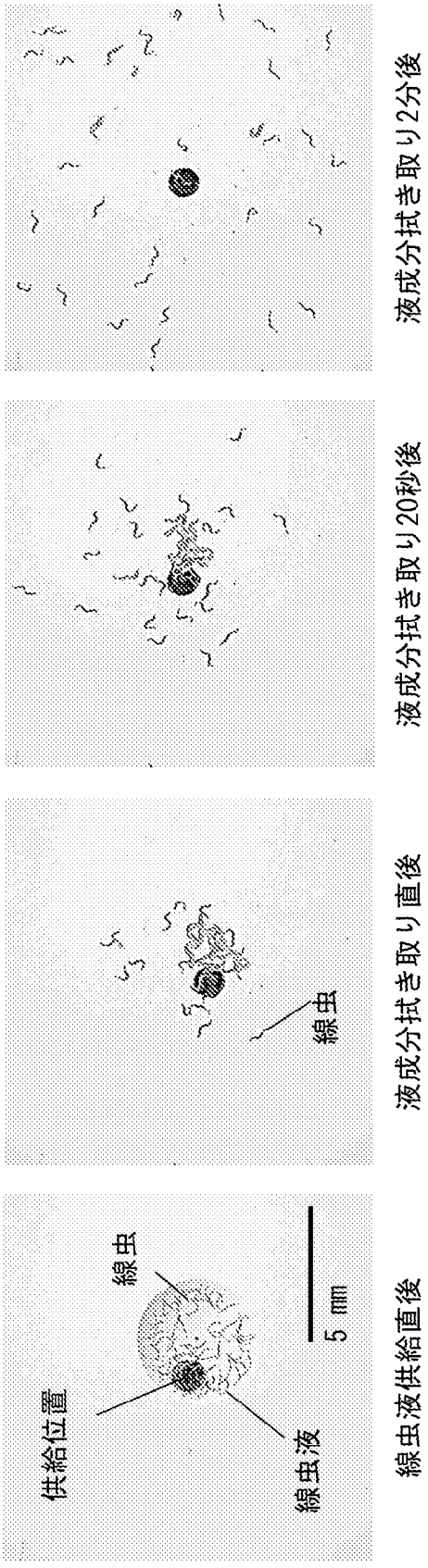
[図13]

図 13



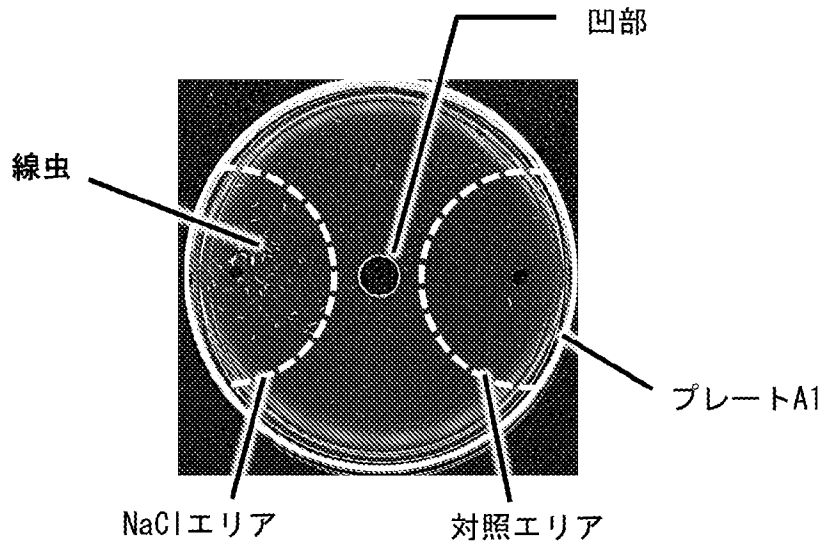
[図14]

図 14


線虫液供給直後
液成分拭き取り直後
液成分拭き取り20秒後
液成分拭き取り2分後
供給位置
線虫
線虫液
5 mm
線虫

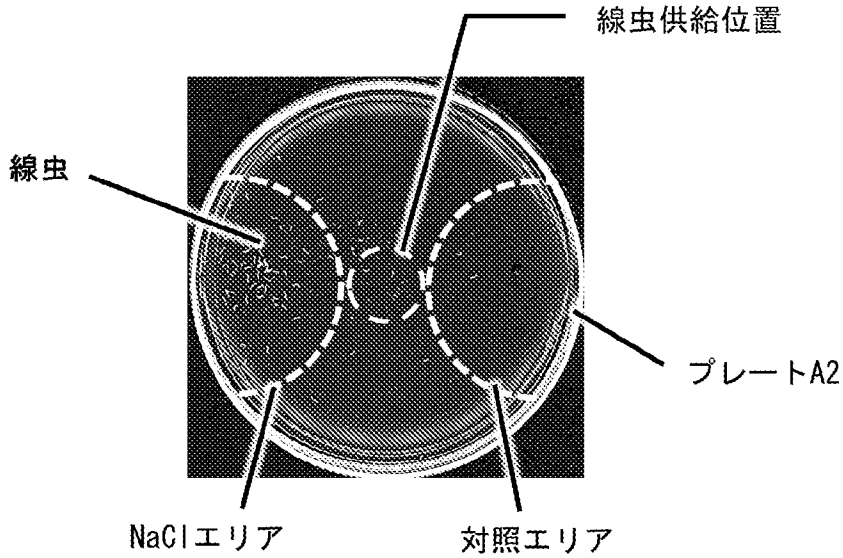
[図15]

図 15



[図16]

図 16



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/039211

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/48(2006.01)i
FI: G01N33/48 N; G01N33/48 T

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N33/48; A01K67/033

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2021
Registered utility model specifications of Japan 1996-2021
Published registered utility model applications of Japan 1994-2021

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	JP 2018-165705 A (PROJECT SEVEN CO LTD) 25 October 2018 (2018-10-25) claims, paragraphs [0024]-[0031], fig. 1-5	5
Y	claims, paragraphs [0024]-[0031], fig. 1-5	1, 4
Y	WO 2020/218501 A1 (NATIONAL INSTITUTES FOR QUANTUM AND RADIOLOGICALSCIENCE AND TECH) 29 October 2020 (2020-10-29) paragraphs [0116]-[0121]	1, 4
Y	WO 2016/147268 A1 (HITACHI LTD) 22 September 2016 (2016-09-22) paragraph [0139], fig. 23	1, 4
X	WO 2019/225633 A1 (NATIONAL INSTITUTES FOR QUANTUM AND RADIOLOGICALSCIENCE AND TECH) 28 November 2019 (2019-11-28) claims, paragraphs [0023], [0073]-[0087], fig. 2	5-8
A	WO 2018/047959 A1 (HIROTSU BIO SCIENCE INC) 15 March 2018 (2018-03-15) entire text, all drawings	1-11

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
12 November 2021	**30 November 2021**
Name and mailing address of the ISA/JP **Japan Patent Office (ISA/JP)** **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2021/039211

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2016/0016169 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 21 January 2016 (2016-01-21) entire text, all drawings	1-11
A	JP 2018-025432 A (HITACHI LTD) 15 February 2018 (2018-02-15) entire text, all drawings	1-11
A	WO 2017/094066 A1 (HITACHI LTD) 08 June 2017 (2017-06-08) entire text, all drawings	1-11

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2021/039211

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
JP 2018-165705 A	25 October 2018	(Family: none)	
WO 2020/218501 A1	29 October 2020	(Family: none)	
WO 2016/147268 A1	22 September 2016	(Family: none)	
WO 2019/225633 A1	28 November 2019	(Family: none)	
WO 2018/047959 A1	15 March 2018	US 2019/0369084 A1 entire text, all drawings	
US 2016/0016169 A1	21 January 2016	WO 2014/138203 A2 entire text, all drawings	
JP 2018-025432 A	15 February 2018	(Family: none)	
WO 2017/094066 A1	08 June 2017	US 2018/0313839 A1 entire text, all drawings	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2021/039211

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N 33/48(2006.01)i
FI: G01N33/48 N; G01N33/48 T

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（ＩＰＣ））

G01N33/48; A01K67/033

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	１９２２－１９９６年
日本国公開実用新案公報	１９７１－２０２１年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２１年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２１年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

C. 関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
X	JP 2018-165705 A (株式会社プロジェクトセブン) 25.10.2018 (2018-10-25) 特許請求の範囲、段落［００２４］－［００３１］、図１－５	5
Y	特許請求の範囲、段落［００２４］－［００３１］、図１－５	1,4
Y	WO 2020/218501 A1 (国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構) 29.10.2020 (2020-10-29) 段落［０１１６］－［０１２１］	1,4
Y	WO 2016/147268 A1 (株式会社日立製作所) 22.09.2016 (2016-09-22) 段落［０１３９］、図２３	1,4
X	WO 2019/225633 A1 (国立研究開発法人量子科学技術研究開発機構) 28.11.2019 (2019-11-28) 特許請求の範囲、段落［００２３］、［００７３］－［００８７］、図２	5-8
A	WO 2018/047959 A1 (株式会社ＨＩＲＯＴＳＵバイオサイエンス) 15.03.2018 (2018-03-15) 全文、全図	1-11

☑ Ｃ欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

＊ 引用文献のカテゴリー
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献
“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の１以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日	国際調査報告の発送日
12.11.2021	30.11.2021

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目４番３号

権限のある職員（特許庁審査官）

大瀧　真理 2J 4781

電話番号 03-3581-1101 内線 3252

C.　関連すると認められる文献

引用文献のカテゴリー*	引用文献名　及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する請求項の番号
A	US 2016/0016169 A1 (BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) 21.01.2016 (2016-01-21) 全文、全図	1-11
A	JP 2018-025432 A (株式会社日立製作所) 15.02.2018 (2018-02-15) 全文、全図	1-11
A	WO 2017/094066 A1 (株式会社日立製作所) 08.06.2017 (2017-06-08) 全文、全図	1-11

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2021/039211

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
JP 2018-165705 A	25.10.2018	（ファミリーなし）	
WO 2020/218501 A1	29.10.2020	（ファミリーなし）	
WO 2016/147268 A1	22.09.2016	（ファミリーなし）	
WO 2019/225633 A1	28.11.2019	（ファミリーなし）	
WO 2018/047959 A1	15.03.2018	US 2019/0369084 A1 全文、全図	
US 2016/0016169 A1	21.01.2016	WO 2014/138203 A2 全文、全図	
JP 2018-025432 A	15.02.2018	（ファミリーなし）	
WO 2017/094066 A1	08.06.2017	US 2018/0313839 A1 全文、全図	