(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
2023年6月15日(15.06.2023)

WIPO | PCT

(10) 国際公開番号
WO 2023/106318 A1

(51) 国際特許分類:
C12N 11/04 (2006.01) *G01N 33/48* (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号： PCT/JP2022/045039

(22) 国際出願日： 2022年12月7日(07.12.2022)

(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 2021-199634 2021年12月8日(08.12.2021) 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: 弁理士法人 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).

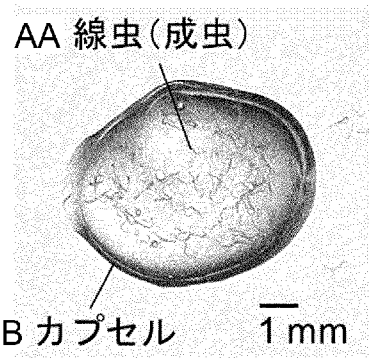
(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM,

(54) **Title:** NEMATODE-SEALED CAPSULE, METHOD FOR PRODUCING NEMATODE-SEALED CAPSULE, AND USE OF NEMATODE-SEALED CAPSULE

(54) 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

図 1



AA Nematode (imago)
BB Capsule

(57) **Abstract:** A nematode-sealed capsule according to the present disclosure includes: a sealing composition containing nematodes; and at least one film containing the sealing composition. The film contains, as a main component, a water-soluble polymer which is gelled through a reaction with a cation.

(57) 要約: 本開示の線虫封入カプセルは、線虫を含む封入組成物と、当該封入組成物を包含する少なくとも１層の皮膜と、を含む。皮膜は、カチオンと反応することによってゲル化する水溶性高分子を主成分として含む。

［続葉有］

WO 2023/106318 A1

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, ME, 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：

一　国際調査報告（条約第21条(3)）

明　細　書

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

技術分野

[0001] 本発明は、線虫を封入したカプセル（以下では、「線虫封入カプセル」と示す場合がある。）、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に関する。具体的には、線虫封入カプセル、線虫封入カプセルの製造方法、線虫の応答評価方法、がん検査方法、線虫応答評価キット、および、線虫封入カプセルを製造するための製造キットに関する。

背景技術

[0002] 特許文献１および２に記載されるように、尿を試料とした線虫によるがん検査が近年注目されている。当該注目に伴い、医療機関または個人での線虫の培養のニーズが高まっている。例えば、非特許文献１に記載されるように、線虫の研究者等の熟練者間での線虫の供給は、線虫の餌となる大腸菌を塗布した寒天培地に線虫を培養した状態で常温輸送が行われている。そして、研究者等は寒天培地上の線虫を回収して目的の試験に適した条件で培養を行っている。

[0003] また、非特許文献２には、線虫と餌とを封入する専用パックを用いて、線虫を用いる実験方法が記載されている。当該実験方法は宇宙実験用に開発された方法である。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：日本国特開２０１８－６１５１５号公報

特許文献2：国際公開第２０２０／２１８５０１号

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Stiernagle, T. Maintenance of C. elegans (February 11, 2

006), WormBook, ed. The C. elegans Research Community, WormBook
非特許文献2：Akira Higashibata et al., Microgravity elicits reproducible alterations in cytoskeletal and metabolic gene and protein expression in space-flown Caenorhabditis elegans. npj Microgravity (2016) 2,15022.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 非特許文献１に記載された線虫の供給方法には、相応の知識、技術および設備が必要であり、誰でも簡単に実施することができるとはいえない。また、非特許文献２に記載された実験方法は、培養条件等が特殊であり、線虫を用いたがん検査および種々の基礎生物実験には必ずしも適しているとはいえない。したがって、線虫を用いる実験等を日常的に行う等、線虫の培養または実験に習熟している研究者等のような、いわゆる熟練者でなくても簡単に線虫を実験または検査等に用いることができるようにするための技術の開発が望まれている。

[0007] 本発明の一態様は、熟練者でなくても簡単に線虫を用いることができるようにするための技術を実現することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者は鋭意検討した結果、生体適合性の人工膜内に線虫を封入したカプセルを用いることによって、熟練者でなくても簡単に線虫を用いることができることを見出し、本発明を完成するに至った。

[0009] 本発明の一態様に係る線虫封入カプセルは、線虫を含む封入組成物と、当該封入組成物を包含する少なくとも１層の皮膜と、を含み、上記皮膜はカチオンと反応することによってゲル化する水溶性高分子を主成分として含む、線虫封入カプセルである。

発明の効果

[0010] 本発明の一態様によれば、熟練者でなくても簡単に線虫を用いることがで

きる。

図面の簡単な説明

[0011] [図1]実施例１において、線虫の成虫を封入した球状のカプセルを上側から撮像した顕微鏡像である。

[図2]実施例１において、線虫の成虫を封入した種々のサイズの球状のカプセルを上側から撮像した顕微鏡像である。

[図3]実施例１において、線虫の成虫を封入した任意形状のカプセルを上側から撮像した顕微鏡像である。

[図4]実施例２において、線虫の卵を封入した球状のカプセルを上側から撮像した顕微鏡像である。

[図5]実施例３において、線虫の卵を封入した球状のカプセルの様子を１日ごとに上側から撮像した顕微鏡像である。

[図6]実施例４において、線虫の成虫を封入した球状のカプセルの様子を１日ごとに上側から撮像した顕微鏡像である。

[図7]実施例４において、線虫封入カプセルから線虫の成虫および幼虫が這い出る様子を上側から撮像した顕微鏡像である。

[図8]実施例５において、放射線照射線虫の成虫を封入した球状のカプセルの様子を１日ごとに上側から撮像した顕微鏡像である。

[図9]実施例５において、線虫封入カプセルから放射線照射線虫の成虫が這い出る様子を上側から撮像した顕微鏡像である。

[図10]実施例６において、孵化抑制剤曝露線虫の成虫を封入した球状のカプセルの様子を１日ごとに上側から撮像した顕微鏡像である。

[図11]実施例６において、線虫封入カプセルから孵化抑制剤曝露線虫の成虫が這い出る様子を上側から撮像した顕微鏡像である。

[図12]実施例６において、孵化抑制剤を添加しない条件で培養した線虫の成虫を封入した球状のカプセルの様子を１日ごとに上側から撮像した顕微鏡像である。

[図13]実施例７において、線虫の成虫を封入した２種類のサイズの球状のカ

プセルをプラスチックディッシュに封入した様子を示す図である。

[図14]実施例８において、線虫の成虫を封入した球状のカプセルをプラスチックディッシュに敷き詰めた腐葉土に撒き、１日ごとに上側から撮像した画像である。

[図15]実施例９において、線虫試験用プレートＡ１に線虫の成虫を封入したカプセルを供給し、供給部を継時観察した結果を示す図である。

[図16]実施例９において、線虫試験用プレートＡ２に線虫の成虫を封入したカプセルを供給し、供給部を継時観察した結果を示す図である。

[図17]比較例１において、線虫試験用プレートＡ１に従来の方法で線虫を供給し、供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図18]比較例１において、線虫試験用プレートＡ２に線虫を供給し、供給部の様子を継時観察した結果を示す図である。

[図19]実施例１０において、線虫試験用プレートＡ３に線虫の成虫を封入したカプセルを供給し、揮発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20]比較例２において、線虫試験用プレートＡ３に従来の方法で線虫を供給し、揮発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21]本実施形態に係る線虫封入カプセルの製造方法の一例を示すフローチャートである。

発明を実施するための形態

[0012] 〔線虫封入カプセル〕

本実施形態に係る線虫封入カプセルは、線虫を含む封入組成物および少なくとも１層の皮膜を含む。本明細書において、カプセルとは、封入組成物をその内部に包含する少なくとも１層の皮膜を意図している。

[0013] （封入組成物）

上記封入組成物は線虫を含む。本明細書において、線虫には、各発生段階（ステージ）の線虫が含まれる。各発生段階の線虫には、線虫の卵（受精卵

を含む）、幼虫（１齢～４齢）および成虫が含まれる。また、線虫の成虫には、各性別の線虫が含まれる。各性別の線虫には、線虫の雄および雌雄同体が含まれる。

[0014] ［線虫］

本明細書において、線虫は、生物分類学上の線形動物門に属する動物および類線形動物門に属する動物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。

[0015] 線形動物門に属する動物としては、非寄生性線虫（または自由生活性線虫）、植物寄生性線虫、昆虫嗜好性線虫（病原線虫、捕食寄生性線虫、寄生性線虫、便乗性線虫が含まれる）、および哺乳類等寄生性線虫の各種線虫等が挙げられる。

[0016] 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」と示す場合がある。）、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）等が対象として挙げられる。

[0017] 植物寄生性線虫としては、例えば、アクロベロイデス・ナヌス（Acreberoides nanus）、バスチアニア・グラシリス（Bastiania gracilis）、ウィルソネマ・オトフォルム（Wilsonema othophorum）、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）、シバネコブセンチュウ（Meloidogyne marytlandi）、リンゴネコブセンチュウ（Meloidogyne mali）、ダイズシス

トセンチュウ（Heterodera glycines）、テンサイシストセンチュウ（Heterodera schachtii）、オカボシストセンチュウ（Heterodera elachista）、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）、レンコンネモグリセンチュウ（Hirschmanniella diversa）、イマムラネモグリセンチュウ（Hirschmanniella immamuri）、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）、ムギネグサレセンチュウ（Pratylenchus neglectus）、チャネグサレセンチュウ（Pratylenchus loosi Loof）、チャピンセンチュウ（Pratylenchus curvitatus）、クマモトネグサレセンチュウ（Pratylenchus kumamotoensis）、ニセミナミネグサレセンチュウ（Pratylenchus pseudocoffeae）、ナミクキセンチュウ（Ditylenchus dipsaci）、ナミラセンセンチュウ（Helicotylenchus dihystera）、チャラセンセンチュウ（Helicotylenchus erythrinae）、カナヤサヤワセンチュウ（Hemicriconemoides kanayaensis）、シバユミハリセンチュウ（Paratrichodorus mirzai）、ヒメユミハリセンチュウ（Paratrichodorus minor（Colbran）Siddiqi）またはTrichodorus minor Colbran）、ユミハリセンチュウ（Trichodorus porosus）、モロコシネグサレセンチュウ（Pratylenchus zeae Graham）、サトウキビイシュクセンチュウ（Tetraopes annulatus）、フタワイシュクセンチュウ（Tylenchorhynchus nudus）、イネシンガレセンチュウ（Aphelenchoides besseyi）、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）、イチゴメセンチュウ（Nothotylenchus acris）、パイナップルネグサレセンチュウ（Pratylenchus brachyurus）、バナナネモグリセンチュウ（Radopholus similis）、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）等が対象

として挙げられる。

[0018] 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）、ウンカシヘンチュウ（Agamermis unka）、ズイムシシヘンチュウ（Amphimermis zuimushi）、スキムシノシヘンチュウ（Hexamermis microamphidis）、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）、コントロティレンクス（Contortylenchus sp.）、コントロティレンクス・ゲニタリコラ（Contortylenchus genitalicola）、ロマノメルミスクリキウォラクス（Romanomermis culicivorax）等が対象として挙げられる。

[0019] 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）、ニセマツノザイセンチュウ（Bursaphelenchus mucronatus）、Bursaphelenchus doui、Bursaphelenchus firmae、クワノザイセンチュウ（Bursaphelenchus conicaudatus）、タラノザイセンチュウ（Bursaphelenchus luxuriosae）、オニユリネセンチュウ（Bursaphelenchus hunti）、ブルサフェレンクス・オキナワエンシス（Bursaphelenchus okinawaensis）、Bursaphelenchus yongensis、Bursaphelenchus kiyoharai、Bursaphelenchus cocophilus、Bursaphelenchus niphades、Bursaphelenchus sexdentati、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）等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。

[0020] 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）等が対象として挙げられる。

[0021] 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等）、爬虫網トカゲ目寄生性糞線虫（S. cruzi、S. darevskyi、およびS. ophiusensis等）、爬虫網ヘビ目寄生性糞線虫（S. ophidiae、S. mirzai、S. gulae、およびS. serpentis等）、鳥網コウノトリ目寄生性糞線虫（S. cubaensis、S. ardeae、およびS. herodiae等）、鳥網キジ目寄生性糞線虫（S. avium、S. oswaldoi、およびS. pavonis等）、鳥網ガンカモ目寄生性糞線虫（S. minimum等）、鳥網チドリ目寄生性糞線虫（S. turkmenica等）、鳥網スズメ目寄生性糞線虫（S. quiscali Barus等）、哺乳網有袋目寄生性糞線虫（S. thylacis等）、哺乳網食虫目寄生性糞線虫（S. akbari、およびS. rostombekowi等）、哺乳網霊長目寄生性糞線虫（S. stercoralis、S. fuelleborni、S. fuelleborni kellyi、およびS. cebus等）、哺乳網異節目寄生性糞線虫（S. dasypodis、およびS. shastensis等）、哺乳網有鱗目寄生性糞線虫（S. leiperi等）、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等）、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等）、哺乳網長鼻目寄生性糞線虫（S. elephantis等）、哺乳網奇蹄目寄生性糞線虫（S. westeri等）、および哺乳網偶

蹄目寄生性糞線虫（S. papillosus、およびS. ransomi等）等が対象として挙げられる。これらのうち、S. stercoralis、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等も人に寄生することがある。

[0022] フィラリアとしては、多乳頭糸状虫（Parafilaria multipapillosa）、沖縄糸状虫（Stephanofilaria okinawaensis）、バンクロフト糸状虫（Wuchereria bancrofti）、マレー糸状虫（Brugia malayi）、頚部糸状虫（Onchocerca cervicalis）、ギブソン糸状虫（Onchocerca gibsoni）、咽頭糸状虫（Onchocerca gutturosa）、回旋糸状虫（Onchocerca volvulus）、イヌ皮下糸状虫（Acanthocheilonema reconditum）、指状糸状虫（Setaria digitata）、ウマ糸状虫（Setaria equina）、唇乳頭糸状虫（Setaria labiatopapillosa）、マーシャル糸状虫（Setaria marshalli）、イヌ糸状虫（Dirofilaria immitis）、およびロア糸状虫（Loa loa）等が対象として挙げられる。

[0023] 回虫（蛔虫）としては、ヒト回虫（Ascaris lumbricoides）、ブタ回虫（Ascaris suum）、クマ回虫（Baylisascaris transfuga）、頚部膿瘍回虫（Lagochilascaris minor）、ウシ回虫（Toxocara vitulorum、またはNeoascaris vitulorum）、ウマ回虫（Parascaris equorum）、アライグマ回虫（Baylisascaris procyonis）、イヌ回虫（Toxocara canis）、ネコ回虫（Toxocara cati）、イヌ小回虫（Toxascaris leonine）、およびタヌキ回虫（Toxocara tanuki）等が対象として挙げられる。

[0024] 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（マッコウクジラアニサキス（Anisakis physeteris）ともいう。）、スジイルカアニサキス（Anisakis typica）、トドシュードテラノバ（Psudoterranova decipiens）、およびアザラシコントラシーカム（Contracaecum osculatum）等が対象として挙げら

れる。

[0025] 鞭虫としては、ウシ鞭虫（Trichuris discolor）、ネズミ鞭虫（Trichuris muris）、ヒツジ鞭虫（Trichuris ovis）、ブタ鞭虫（Trichuris suis）、ヒト鞭虫（Trichuris trichiura）、およびイヌ鞭虫（Trichuris vulpis）等が対象として挙げられる。

[0026] 鉤虫としては、ブラジル鉤虫（Ancylostoma braziliense）、イヌ鉤虫（Ancylostoma caninum）、セイロン鉤虫（Ancylostoma ceylanicum）、ズビニ鉤虫（Ancylostoma duodenale）、串間タヌキ鉤虫（Ancylostoma kusimaense）、マレー鉤虫（Ancylostoma malayanum）、宮崎タヌキ鉤虫（Arthrostoma miyazakiense）、ネコ鉤虫（Ancylostoma tubaeforme）、狭頭鉤虫（Uncinaria stenocephala）、ウシ鉤虫（Bunostomum phlebotomum）、ヒツジ鉤虫（Bunostomum trigonocephalum）、ブタ鉤虫（Globocepharus urosubulatus）、およびアメリカ鉤虫（Necator americanus）等が対象として挙げられる。

[0027] 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）、ドロレス顎口虫（Gnathostoma doloresi）、Gnathostoma procyonis、およびGnathostoma vietnamicum等が対象として挙げられる。

[0028] 旋毛虫（トリヒナ）としては、Trichinella britovi、Trichinella spiralis、Trichinella nativa、Trichinella nelsoni、およびTrichinella pseudospiralis等が対象として挙げられる。

[0029] 上記以外の哺乳類等寄生性線虫として、コーカサス胃虫（Abbreviata caucasica）、ネコ胃虫（Physaloptera praeputialis）、東洋眼虫（Thelazia callipaeda）、ロデシア眼虫（Thelazia rhodesi）、スクリャービン眼虫（Thelazia skrjabini）、小口ウマ胃虫（Habronema microstoma）、ハエウマ胃虫（Habronema muscae）、大口ウマ胃虫（Draschia megastoma）、アカボウ旋尾線虫(Crassicauda giliakiana)、美麗食道虫（Gongylonema pulchrum)、類円ブタ胃虫（Ascarops strongylina）、および六翼ブタ胃虫（Physocephalus sexalatus）等が対象として挙げられる。また、ロバ円虫（Strongylus asin

i）、無歯円虫（Strongylus edentates）、ウマ円虫（Strongylus equinus）、および普通円虫（Strongylus vulgaris）等の円虫、および有環毛細線虫（Eucoleus annulate）、捻転毛細線虫（Eucoleus contorta）、ネコ膀胱毛細線虫（Pearsonema feliscati）、穿通毛細線虫（Eucoleus perforans）、フィリピン毛細線虫（Paracapillaria philippinensis、またはCapillaria philippinensis）、および肝毛細線虫（Calodium hepatica、またはCapillaria aerophila）、ウシ毛細線虫（Aonchotheca bovis）、肺毛細線虫（Eucoleus aerophile）、および膀胱毛細線虫（Pearsonema plica）等の毛細線虫（毛頭虫ともいう。）が対象として挙げられる。また、胃毛様線虫（Trichostrongylus axei）、蛇状毛様線虫（Trichostrongylus colubriformis）、および東洋毛様線虫（Trichostrongylus orientalis）等の毛様線虫、捻転胃虫（Haemonchus contortus）およびウシ捻転胃虫（Mecistocirrus digitatus）等の捻転胃虫、糸状肺虫（Dictyocaulus filaria）、ウシ肺虫（Dictyocaulus viviparus）、細頸毛様線虫（Nematodirus filicollis）、広東住血線虫（Angiostrongylus cantonensis）およびコスタリカ住血線虫（Angiostrongylus costaricensis）等の住血線虫、ブタ肺虫（Metastrongylus elongatus）、イヌ肺虫（Filaroides hirthi）等が対象として挙げられる。さらに、ヒト蟯虫（Enterobius vermicularis）、ウサギ蟯虫（Passalurus ambiguous）、ラット盲腸蟯虫（Syphacia muris）、マウス盲腸蟯虫（Syphacia obvelata）、およびウマ蟯虫（Oxyuris equi）等の蟯虫が対象として挙げられる。

[0030] また、類線形動物門に属する動物としては、ハリガネムシ等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）等が対象として挙げられる。

[0031] 本実施形態に係る線虫封入カプセルに封入される線虫は、セノラブディティス・エレガンス（Caenorhabditis elegans）またはその近縁種であることが好ましい。C．エレガンスの近縁種としては、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）、およびセノラブディティス・イノピナータ（Caenorhabditis inopinata）等が挙げられる。

[0032] 上記封入組成物は線虫以外のその他の成分を含んでいてもよい。その他の成分として、カチオンと反応することによってゲル化する水溶性高分子；水および緩衝液等の線虫が生存可能な液；線虫の培養液；大腸菌等の線虫の餌；大腸菌の培養液；酵母等の大腸菌の餌；封入組成物を視認し易くするための色素および蛍光物質等の標識物質；細菌または真菌等によるコンタミネーションを予防するための抗生物質；孵化抑制剤（孵化阻害剤ともいう。）；等が挙げられる。水溶性高分子の詳細については後述する。

[0033] 封入組成物中の大腸菌等の餌の量を調整することによって、線虫の栄養状態を調整し、線虫の発生段階または成長速度を制御することができる。線虫の発生段階または成長速度を制御することによって、線虫封入カプセルの中長期運搬または中長期保存がし易くなる。

[0034] 線虫封入カプセルに封入する線虫の発生段階が卵である場合、封入組成物中の大腸菌等の餌の量が少ないと、１齢幼虫（Ｌ１幼虫）段階で発生が停止する。この発生が停止した状態の線虫は耐性幼虫と呼ばれる。耐性幼虫は１か月程度栄養がない状態でも生存できる。栄養状態等の環境条件が改善すれば、耐性幼虫は通常の発生段階に戻り、成虫まで成長する。封入組成物中の大腸菌等の餌の量が少ない場合として、例えば、線虫封入カプセル製造直後において、封入組成物中の卵の量を１００質量％としたときの餌の量が１０％以下、または、５％以下の状態が含まれる。

[0035] 線虫封入カプセルに封入する線虫の発生段階がＬ１幼虫である場合、封入組成物中の大腸菌等の餌の量が少ないと、Ｌ１幼虫段階で発生が停止し、耐性幼虫となる。封入組成物中の大腸菌等の餌の量が少ない場合として、例えば、線虫封入カプセル製造直後において、封入組成物中のＬＩ幼虫の量を１

００質量％としたときの餌の量が１０％以下、または、５％以下の状態が含まれる。

[0036] 孵化抑制剤の例として、ＤＮＡ合成阻害剤であるフルオロデオキシウリジン（5-Fluoro-2’-deoxyuridine：ＦＵｄＲ、別名：フルクスウリジン）、アセチルコリンエステラーゼ活性を阻害する有機リン系殺虫剤であるＳ，Ｓ－ビス（１－メチルプロピル）＝Ｏ－エチル－ホスホロジチオアート（S,S-Bis(1-methylpropyl)=O-ethyl-phosphorodithioate、別名：カズサホス（Cadusafos））、等が挙げられる。孵化抑制剤によって、線虫封入カプセル使用後の線虫の増殖を抑制し、環境中への線虫の拡散を防止することができる。

[0037] 上記封入組成物中の線虫の数は、線虫封入カプセルの用途および大きさ等に応じて適宜選択することができ、１匹（卵にあっては１つ）であってもよいし、複数匹（卵にあっては複数個）であってもよい。

[0038] 線虫は放射線照射された線虫であってもよい。放射線照射された線虫を用いることによって、孵化する卵の割合を調整することができる。また、放射線照射された幼虫を用いることによって、発生を制御する（例えば、発生を停止させる、発生を遅らせる、等）ことができる。放射線照射については後述する。

[0039] また、線虫は孵化抑制剤処理（典型的には、曝露）された線虫であってもよい。一定時間孵化抑制剤に曝露された線虫の成虫を用いることによって、成虫の産卵数または孵化する卵の割合を調整することができる。孵化抑制剤処理については後述する。

[0040] さらに、線虫は、不妊化処理された線虫であってもよい。不妊化処理された線虫を用いることによって、線虫封入カプセル使用後の線虫の増殖を抑制し、環境中への線虫の拡散を防止することができる。不妊化処理については後述する。

[0041] （皮膜）

本実施形態に係る線虫封入カプセルの皮膜は、線虫封入カプセルの外相を形成している膜であり、これにより線虫を含む封入組成物をその内側に封入

するものである（以下では、「外相膜」と示す場合がある。）。当該皮膜はカチオンと反応することによってゲル化する水溶性高分子を主成分として含む。本明細書において、「水溶性高分子を主成分として含む」とは、皮膜中の液成分を除く成分を１００質量％としたときに上記水溶性高分子を５０質量％以上含有することをいう。

[0042] 上記皮膜は、線虫が食用としない材質、線虫に悪影響を及ぼさない材質、および／または、酸素透過性がある材質から構成されることが好ましい。

[0043] ［水溶性高分子］

カチオンと反応することによってゲル化する水溶性高分子は、好ましくは、２価カチオン（例えば、Mg^{2+}、Ca^{2+}）と反応することによってゲル化する水溶性高分子である。より好ましくは、カルシウムイオンと反応することによってゲル化する水溶性高分子（カルシウム凝固性高分子化合物）である。

[0044] 上記水溶性高分子の例として、タンパク質および多糖類等が挙げられる。水溶性高分子の具体例としては、グアーガム、カゼイン、ペクチン、繊維素グリコール酸ナトリウム、アルギン酸ナトリウム、ポリアクリル酸ナトリウム、寒天、κ（カッパ）カラギーナン、ι（イオタ）カラギーナン、λ（ラムダ）カラギーナン、グルテン、デキストリン、キサンタンガム、メチルセルロース、澱粉、ゼラチン、ローカストビーンガム、ガラクタン、アルブミンおよびケラチン等が挙げられる。常温以下で水に溶けるものが好ましい。これらの中で、アルギン酸ナトリウムがより好ましい。熱湯には溶けるが、冷水に溶けないものであっても、ナトリウムの塩にすれば溶ける等、低温での調製が可能であればよい。また、水溶性高分子は１種類であってもよいし、２種類以上であってもよい。

[0045] 上記皮膜は、上記水溶性高分子以外のその他の成分を含んでいてもよい。その他の成分として、色素；蛍光物質等の標識物質；線虫；水および緩衝液等の線虫が生存可能な液成分；線虫の培養液成分；大腸菌等の線虫の餌；大腸菌の培養液成分；酵母等の大腸菌の餌；細菌または真菌等によるコンタミ

ネーションを予防するための抗生物質等が挙げられる。皮膜に色素または標識物質が含まれると、目視観察または顕微鏡観察（例えば、蛍光顕微鏡観察）の際に線虫封入カプセルの外形を視認し易くなる。

[0046] 皮膜の厚さおよび硬さは、線虫封入カプセルの用途および大きさ等に応じて適宜選択することができる。例えば、皮膜を薄くすることによって、封入された線虫が皮膜を破って線虫封入カプセル外に脱出することを誘導することができる。

[0047] 本実施形態に係る線虫封入カプセルにおいて、皮膜は単層であってもよく、多層であってもよい。

[0048] （線虫封入カプセルの形状）

本実施形態に係る線虫封入カプセルの形状は、当該カプセルに目的量の線虫を封入することができれば、特に限定されない。当該カプセルの形状の例として、球、楕円、涙粒およびひょうたん型等が挙げられる。また、当該カプセルは、１面以上が平面になっていてもよい。

[0049] 本実施形態に係る線虫封入カプセルの大きさは、当該カプセルに封入する線虫の種類、発生段階（卵、幼虫、成虫、等）、封入前の線虫の不妊化処理の有無、性別、大きさおよび数等に応じて適宜選択すればよい。当該カプセルの外径は、数μｍであってもよいし、数十μｍであってもよいし、数百μｍであってもよい。また、当該カプセルの外径は、数ｍｍであってもよいし、数十ｍｍであってもよいし、数百ｍｍであってもよい。また、当該カプセルの外径は１０ｃｍ以下であってもよいし、１ｃｍ以下であってもよい。また、当該カプセルの外径は１０μｍ以上であってもよいし、２０μｍ以上であってもよい。本明細書において、カプセルの外径とは、カプセルの断面の最大径を示す。

[0050] 本実施形態に係る線虫封入カプセルに封入された線虫の生存には、酸素が不可欠だが、当該カプセルの皮膜が酸素透過性であるため、当該カプセル内で数日間生存することが可能である。また、線虫封入カプセルの封入組成物に大腸菌等の線虫の餌が含まれている場合、当該カプセル内で線虫を成長さ

せることができる。

[0051] また、本実施形態に係る線虫封入カプセルは、プラスチックディッシュ等の容器に入れて密封しても、数日間良好な状態で保存することができる。すなわち、本実施形態に係る線虫封入カプセルを輸送し、輸送された目的地で当該カプセルに封入された線虫を用いることができる。また、当該カプセルに封入された線虫はカプセルに孔をあける等の簡便な操作によって取り出すことができる。したがって、熟練者でなくても当該カプセルを用いることによって、線虫を用いる実験等を実施することができる。

[0052] 本実施形態に係る線虫封入カプセルを保存するときに、保存容器中に水等の液体を注入してもよい。水等の液体を保存容器中に注入することによって、輸送時の振動による線虫への影響を軽減することができる。

[0053] また、同一保存容器中の線虫封入カプセルの数を増やして密な状態で保存すると、輸送時の振動による各線虫封入カプセルの転がりまたは破損等を抑制できる。また、線虫封入カプセルの形状が、球状ではなく、１面以上が平面になっている場合、当該面を下にして保存容器中に配置することで振動による当該カプセルの転がりを抑制でき、輸送時の振動による当該カプセル内の線虫への影響を軽減することができる。

[0054] 〔線虫封入カプセルの製造方法〕

本実施形態に係る線虫封入カプセルの製造方法として、（１）カプセルの外相膜となる皮膜の作製と同時に線虫を封入する方法（以下、「方法（１）」と示す場合がある。）と、（２）カプセルの外相膜となる皮膜の作製後に線虫を注入する方法（以下、「方法（２）」と示す場合がある。）、等が挙げられる。以下、これらの２つの方法について、図２１のフローチャートに沿って説明する。

[0055] ［（Ｓ１）カプセルに封入する線虫の発生段階（ステージ）等諸条件の決定、線虫の培養］

本ステップでは、線虫封入カプセルの用途等に応じて、封入する線虫の種類、発生段階（卵、幼虫、成虫、等）、封入前の線虫の不妊化処理の有無、

性別および封入する線虫の数または線虫を含む液体（以下では、「線虫液」と示す場合がある。）の量（ボリューム）、ならびに餌の量等を決定する。所望の発生段階の線虫を得るために封入前に線虫を培養してもよい。

[0056] 〔線虫封入カプセル封入前の線虫の不妊化処理〕

線虫封入カプセルに封入する線虫を不妊化処理することで、次世代の発生を抑制し、線虫が実験等での使用後に増殖すること、または、むやみに環境中に線虫を拡散することを予防できる。不妊化処理の方法としては、放射線照射または孵化抑制剤等の薬剤処理の他、生殖機能不全の突然変異体を用いる等の方法があり、目的に応じて選択することができる。

[0057] （放射線照射による線虫の不妊化処理）

線虫に放射線（Ｘ線、ガンマ線、電子線、重粒子線、陽子線、等）を照射することで、線虫の生殖機能を抑制することができる。線虫への放射線の照射方法は、放射線照射施設、線虫の種類、照射の目的等に応じて選べばよい。線虫への放射線の照射の例として、培養プレート上への照射、遠沈管（チューブ）に入れた培養液中への照射、線虫保定用マイクロチップに封入した状態での照射、等が挙げられる。また、線虫への放射線の照射の例として、線虫を収容した容器全体を照射することで、線虫の全身に放射線を照射する方法、および、特定部位を狙って放射線を照射できる特殊な照射装置（例えば、重イオンマイクロビーム照射装置等）を用いて、線虫の生殖巣のみを照射する方法、等がある。

[0058] 放射線照射された世代から生まれた全ての受精卵を孵化できなくするために必要な線量（以下では、「不妊化線量」という。）は、線虫の種類、発生段階または性別、放射線の種類（線質）または線量率等によって異なる。線虫の性別は、雌、雌、雌雄同体に分けられる。放射線照射個体が雄の場合は、照射後における、不妊化処理をしていない雌または雌雄同体との交尾により受精した次世代（受精卵）が孵化できるかどうかを評価する。放射線照射個体が雌の場合は、照射後における、不妊化処理をしていない雄との交尾により受精した次世代（受精卵）が孵化できるかどうかを評価する。一方、放

射線照射個体が雌雄同体の場合は、放射線照射前または照射後に自家受精した次世代（受精卵）、または、照射後における、雄との交尾により受精した次世代（受精卵）が孵化できるかどうかを評価する。例えば、Ｃ．エレガンスの産卵前の雌雄同体の成虫に照射する場合、孵化率を３７％まで低減する効果がある線量（Ｅｆｆｅｃｔｉｖｅ　Ｄｏｓｅ）であるED_{37}は、Ｘ線またはガンマ線では約１８４Ｇｙ（グレイ：吸収線量の単位）、重粒子線の一種である炭素線では炭素線では約４１Ｇｙであるとの報告がある。孵化率を０％にするしきい線量（不妊化線量：ED_{0}）は、Ｘ線またはガンマ線では約５００Ｇｙである。不妊化線量より低い線量の放射線を成虫に照射することで、一定の割合の卵のみが孵化するように調整することができる。また、不妊化線量より低い線量の放射線を受精卵や幼虫に照射することで、線虫の発生を止めるまたは遅らせることができる。一方、不妊化線量よりはるかに高い線量の放射線を照射することで、線虫の運動を一時的に抑制することもでき、線虫封入カプセルを線虫の観察の目的で用いる場合には、好都合である。

[0059]　（薬剤処理による線虫の不妊化処理）

線虫の生殖機能を抑制（不妊化）する方法として、例えば、孵化抑制剤の一種であるフルオロデオキシウリジン（以下では、「ＦＵｄＲ」という。）を添加した培地上、または、ＦＵｄＲを含む培養液中で線虫を培養するなどの化学処理も選択できる。

[0060]　薬剤処理された世代が産んだ全ての卵を孵化できなくするために必要な薬剤の用量は、線虫の種類、発生段階または性別、薬剤の種類または処理（曝露）時間等によって異なる。例えば、ＦＵｄＲ溶液を培養プレートに添加して、Ｃ．エレガンスの産卵前の雌雄同体の成虫に１日曝露をする場合、次世代の孵化率を０％にする不妊化用量は、０．５ｍｇ／ｍＬ以上である。不妊化用量より低い用量の薬剤に産卵前の成虫を曝露することで、一定の割合の卵のみが孵化するように調整することができる。

[0061]　（封入時の孵化抑制剤添加処理）

線虫封入カプセルに封入する線虫が、幼虫、または、成虫のうち産卵前の

成虫または孵化抑制剤を処理されていない成虫であれば、ＦＵｄＲ等の薬剤を線虫封入カプセルの封入組成物に添加しておくこともできる。この場合、線虫封入カプセル中での卵の孵化を抑制することができる。

[0062] ［（Ｓ２）水溶性高分子およびカチオン水溶液の選定と濃度等諸条件の決定、調製］

本ステップでは、カルシウム凝固性高分子化合物等の水溶性高分子およびカルシウム塩水溶液等のカチオンを選定し、濃度等諸条件を決定する。カルシウム凝固性高分子化合物としてはアルギン酸ナトリウムがあり、その凝固に好適なカチオンとしては、乳酸カルシウム水溶液および塩化カルシウム水溶液等のカルシウム塩水溶液が挙げられる。水溶性高分子とそれに対応するカチオンを選定後、当該水溶性高分子を含む溶液およびカチオン水溶液を調製する。濃度等諸条件は、いわゆる、人工粒状物の製造に係る公知の方法で用いられている条件をもとに決定すればよい。例えば、特開平７－１３３２０９号公報等に記載されている条件を参照すればよい。

[0063] 上記水溶性高分子を含む溶液の水溶性高分子の濃度を調整することによって、製造される線虫封入カプセルの皮膜の厚さおよび硬さを調整することができる。

[0064] ［（Ｓ３）カプセル外相膜の作製前に線虫を封入？］

本ステップでは、方法（１）または方法（２）のいずれの方法によって線虫封入カプセルを製造するかを決定する。

[0065] ［（Ｓ４）水溶性高分子を含む溶液中への線虫の投入］

本ステップは、（Ｓ３）で方法（１）を選択した場合に行うステップである。（Ｓ２）で調製した水溶性高分子を含む溶液に線虫を注入することによって、封入組成物を調製する。（Ｓ２）で調製した水溶性高分子を含む溶液はゾル状であり、線虫液を注入することによって、線虫含有ゾルを調製することができる。また、培養プレートから白金線ピッカーを用いて１匹ずつ線虫を回収し、水性ゾル中に移してもよい。水溶性高分子を含む溶液中に入れる線虫の数または線虫液の量（ボリューム）は、線虫封入カプセルの用途お

よび大きさ等に応じて適宜選択することができる。

[0066] 図２１のフローチャートでは、水溶性高分子を含む溶液に線虫液を注入する例を示しているが、線虫液に水溶性高分子を添加して封入組成物を調製してもよい。

[0067] ［（Ｓ５）カプセル外相膜の作製］

本ステップでは、（Ｓ４）で調製した線虫を含む封入組成物と（Ｓ２）で調製したカチオンを含む溶液とを反応させて、線虫封入カプセルの外相膜となる皮膜を作製する。例えば、（Ｓ４）で調製した線虫を含む封入組成物に（Ｓ２）で調製したカチオンを含む溶液を滴下するまたは吹き付けることによって、線虫封入カプセルの外相膜となる皮膜を作製する。または、（Ｓ２）で調製したカチオンを含む溶液に（Ｓ４）で調製した封入組成物を滴下するまたは吹き付けることによって、線虫封入カプセルの外相膜となる皮膜を作製する。

[0068] カチオンを含む溶液と反応させる封入組成物の量（ボリューム）を調整することによって、線虫封入カプセルの大きさおよび形状を調整することができる。

[0069] （Ｓ４）で調製した線虫を含む封入組成物に（Ｓ２）で調製したカチオンを含む溶液を滴下する場合、または、（Ｓ２）で調製したカチオンを含む溶液に（Ｓ４）で調製した封入組成物を滴下する場合、皮膜作製後、所望の皮膜の厚さおよび硬さになるまで、滴下物を受液中で浸漬させる。選択する水溶性生体高分子の種類にもよるが、例えば、カルシウム凝固性化合物の場合には、浸漬時間が長いほど（例えば、５分程度）、皮膜は厚くなりかつ硬くなる。一方、浸漬時間が短時間（例えば、３０秒未満）であると、皮膜は薄くかつ柔らかい。皮膜が薄く、かつ柔らかいと、線虫封入カプセルに封入された線虫は、自ら皮膜を破って線虫封入カプセル外に脱出することができる。

[0070] 滴下物を受液中で浸漬後、滴下物を受液から取り出し、皮膜の硬化が進行しないように、滴下物を超純水等で洗浄して皮膜の外側に付着した受液成分

を除去してもよい。

[0071] 操作の簡便性等の点から、（Ｓ２）で調製したカチオンを含む溶液に（Ｓ４）で調製した封入組成物を含む溶液を滴下することが好ましい。

[0072] （Ｓ４）で調製した封入組成物に（Ｓ２）で調製したカチオンを含む溶液を滴下する場合は、特開平５－９２９０９号公報等を参照すればよい。（Ｓ２）で調製したカチオンを含む溶液に（Ｓ４）で調製した封入組成物を滴下する場合は、特開平７－１３３２０９号公報等を参照すればよい。

[0073] ［（Ｓ６）カプセル外相膜の作製］

本ステップは、（Ｓ３）で方法（２）を選択した場合に行うステップである。（Ｓ２）で調製した水溶性高分子を含む溶液と（Ｓ２）で調製したカチオンを含む溶液とを反応させることによって、カプセルの外相膜となる皮膜を作製する。（Ｓ６）カプセル外相膜の作製は、（Ｓ５）カプセル外相膜の作製と同様に行えばよい。

[0074] ［（Ｓ７）カプセル内部に線虫を注入？］

本ステップでは、カプセル内部に線虫を注入するか否かを決定する。

[0075] ［（Ｓ８）カプセル内部への線虫の注入］

本ステップは、（Ｓ７）「カプセル内部に線虫を注入？」で線虫を注入することを選択した場合に行うステップである。（Ｓ６）で作製したカプセルの外相膜の内部に線虫を注入する。線虫の注入方法としては、注射による注入等が挙げられる。

[0076] ［（Ｓ９）外相膜の線虫注入口の封止］

本ステップでは、（Ｓ８）で線虫を注入後に、線虫注入口を封止する。線虫の注入時に開けた線虫注入口を封止する方法としては、注入口に水溶性高分子化合物溶液を滴下するか吹き付けた後、カチオンの水溶液を滴下するか吹き付けることで、注入口を塞ぐ皮膜を形成させる方法等が挙げられる。

[0077] ［（Ｓ１０）カプセル内部に線虫封入済み？］

本ステップは、（Ｓ７）「カプセル内部に線虫を注入？」で線虫を注入しないことを選択した場合に行う判定のステップである。カプセルが多層であ

り、（Ｓ６）のカプセルの外相膜の作製以前に内部に線虫を封入したカプセルを作製済みの場合には（Ｓ１１）に進む。カプセルが直前に（Ｓ６）で作製した単層の外相膜からなる場合、または、多層であるが、線虫を内部に封入していない場合には、（Ｓ２）に戻って線虫封入カプセルの製造を継続する。

[0078] ［（Ｓ１１）皮膜をさらに重ねて作製？］

本ステップでは、（Ｓ１１）の直前に作製したカプセルが単層の場合には、線虫封入カプセルの皮膜を単層として終了するか皮膜を重ねて多層とするかを決定する。また、多層の場合には、更に皮膜を重ねるか否かを決定する。皮膜を重ねると決定した場合、（Ｓ２）に戻り、皮膜が多層である線虫封入カプセルの製造を継続する。

[0079] 多層の皮膜を含む線虫封入カプセルについて、内層の皮膜中または内層に包含された封入組成物中に線虫を封入せずに、内層と外層との間、または、外層中に封入してもよい。また、封入位置によって、線虫の種類や発生段階、性別等を異ならせてもよい。

[0080] 本実施形態に係る線虫封入カプセルの製造方法は、カチオンと反応することによってゲル化する水溶性高分子と、カルシウムイオン等のカチオンとを反応させることによってゲルを発生させる。そして、当該ゲルの表面に皮膜が形成させる。皮膜に包含された封入組成物は液状またはゾル状であるため、流動性を維持しつつ線虫を線虫封入カプセル中に封入することができる。

[0081] 本実施形態に係る線虫封入カプセルの製造方法においては、加熱によりゲル化を誘導しないので、線虫にヒートショック等の影響を生じさせない。また、当該製造工程および線虫封入カプセルの成分によって線虫に化学的影響を生じさせないという利点がある。さらに、本実施形態に係る線虫封入カプセルの製造方法において形成される皮膜は、酸素透過性であり、線虫封入カプセルに封入された線虫の生存に不可欠な酸素供給を維持することができる。

[0082] 〔線虫封入カプセルへの放射線照射〕

線虫封入カプセルの製造後に、当該カプセルに放射線を照射することで、封入された線虫の卵、または成虫が当該カプセル内で産卵した卵の孵化を抑制することもできる。この場合、線虫封入カプセルを容器に入れ、容器全体に照射すればよい。不妊化線量は、上述の通り、線虫の種類、発生段階または性別、放射線の種類または線量率等によって異なる。放射線照射によって線虫封入カプセルの皮膜が分解することがあるため、不妊化線量をはるかに超える高線量の照射は避けることが望ましい。

[0083] 〔線虫の応答評価方法〕

本実施形態に係る線虫の応答評価方法は、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。）に線虫封入カプセルを供給する工程と、線虫封入カプセルから線虫を放出させる工程と、線虫の応答を評価する工程と、を含む。

[0084] （線虫試験用プレートに線虫封入カプセルを供給する工程）

本工程は、被験物が一部に供給された線虫試験用プレートに、線虫封入カプセルを供給する工程（以下、「供給工程」と示す場合がある。）である。

[0085] 線虫試験用プレートとしては、線虫の応答評価試験に用いることができるものであれば、特に制限はない。一例としては、特許文献２（国際公開２０２０／２１８５０１号）に記載されている落とし込み槽を有する線虫トラップ用プレート（以下、「線虫トラップ用プレート」と示す場合がある。）を用いてもよい。線虫トラップ用プレートを用いる場合は、特許文献２に記載された線虫の応答評価方法に準じて行えばよい。

[0086] また、別の例としては、線虫を供給するための供給部が設けられている線虫試験用プレートであって、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液のプレート上での広がりを抑えるような加工が当該供給部に施されているプレート（以下、「供給部加工プレート」と示す場合がある。）を用いてもよい。供給部加工プレートを用いる場合、線虫封入カプセルを当該供給部に供給することで、線虫を供給することができる。以下、供給部加工プレートについて説明する。

[0087] （供給部加工プレート）

供給部加工プレートは供給工程で線虫封入カプセルを供給する供給部を固相に備えている。供給部には、後述の線虫封入カプセルから線虫を放出させる工程で当該カプセルから流出する、線虫封入カプセルの線虫を含む溶液の広がりを抑える加工が施されている。広がりを抑える加工であることで、線虫が所定の範囲内にとどまり、線虫の移動開始位置を十分に制御することができる。線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶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、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液が接する面を疎水性にすること等が挙げられる。以下、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。

[0088] 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、その内部で線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液を保持することができるため、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液のプレート上で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。また、凹部内に線虫封入カプセルをとどめておくことができるため、線虫封入カプセルのプレート上への供給も容易となる。

[0089] 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。

[0090] 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、および線虫封入カプセル中の溶液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。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 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。

[0094] 凹部を有する供給部加工プレートとして、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。

[0095] 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、供給した線虫封入カプセルから流出した線虫を含む溶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。本明細書において疎水性とは、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液の液成分を弾く性質のことを指す。

[0096] 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、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液を、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。

[0097] 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、線虫封入カプセルからプレート上に流出する線虫を含む溶液の液成分が疎水性部分に弾かれるため、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶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。

[0098] 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、撥水性ポリマー等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、撥水性ポリマー等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。

[0099] なお、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線虫試験用プレート上に載せ、該シート上を供給部とすることが挙げられる。

[0100] 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、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液の液成分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。

[0101] 本実施形態において吸水性とは、固体培地が線虫封入カプセルから流出する溶液（水に限定されない）の液成分を吸収する性質のことを指す。例えば、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液の供給から約３０分以内に、当該溶液の液成分の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。

[0102] 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封入カプセルから流出する線虫を含む溶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封入カプセルから流出する線虫を含む溶液の液成分が吸収されるため、当該溶液の乾燥

時間を短縮することができる。

[0103] 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。

[0104] 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、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶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。

[0105] 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。

[0106] 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、供給部加工プレート内、ひいては凹部内の湿度が増す等の理由により、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液の液成分の乾燥が抑制される。さらに、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液の液成分の乾燥に要する時間は、供給部加工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、線虫封入カプセル中から流出する線虫を含む溶液の量（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等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。

[0107] 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。

[0108] 供給部加工プレートに注入する固体培地の量（ボリューム）を比較的多くする、すなわち、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、線虫封入カプセルから線虫を放出後３分以内に線虫のリリースを開始することができる。

[0109] 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。

[0110] 固体培地の量（ボリューム）は、凹部に供給した線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶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、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液の液成分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、線虫封入カプセルか

ら流出する線虫を含む溶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。

[0111] 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。

[0112] 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。供給される線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶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、供給される線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液の液成分の乾燥速度が速くなる。このため、後述する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用いることができる。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３ｍＬ程度、すなわち厚さ０．１５ｃｍ程度とすればよい。

[0113] 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。供給される線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液の量（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、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶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用いることができる。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、試験に用い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、飢餓状態の線虫を用いる試験では、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。

[0114] 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、用い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、多角形状等であってもよい。

[0115] 供給部のサイズは、供給部加工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、線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液のプレート上で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供給部加工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によって決めればよい。

[0116] 供給部加工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３．０ｃｍ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等の各種勾配を供給部加工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。

[0117] （線虫封入カプセルから線虫を放出させる工程）

本工程は、上記供給工程によって供給された線虫封入カプセルから線虫を放出させる工程（以下、「放出工程」と示す場合がある。）である。例えば、線虫封入カプセルに孔を設けることによって線虫を放出させてもよい。線虫放出後、線虫の密度が一定になるように、線虫を含む溶液をピペッティング等行ってもよい。

[0118] 供給部加工プレートを用いる場合、上記放出工程後、線虫封入カプセルから流出した線虫を含む溶液の液成分を乾燥させて、当該プレート上での線虫の移動がし易くなる乾燥工程を行ってもよい。線虫封入カプセルから流出した線虫を含む溶液の液成分の乾燥は、当該溶液の蒸発等によって行えばよい。乾燥工程を行うことによって、線虫封入カプセルから流出した線虫を含む溶液の液成分が乾燥し、線虫が移動し易くなり、供給部加工プレート上に線虫がリリースされる。供給部に線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液のプレート上での広がりを抑えるための加工がなされていることで、線虫を含む溶液の液成分が乾燥するまでに当該溶液の広がりを防ぎ、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、特に、封入組成物の量（ボリューム）が多い外径数ｃｍ程度の線虫封入カプセルを用いる場合には、線虫のリリースのタイミングを制御することができる。本明細書において

、「リリース」とは線虫封入カプセルから流出する線虫を含む溶液の液成分が乾燥して線虫が供給部加工プレート上に這い出すことを指す。また、本実施形態において、「乾燥」とは、線虫が供給部加工プレート上を自由に移動できる程度まで、線虫封入カプセルから流出した線虫を含む溶液の液成分が除去されることを意図し、典型的には当該液成分が８０％以上除去された状態のことを指す。

[0119] （線虫の応答を評価する工程）

本工程は、上記放出工程で放出された線虫の被験物に対する応答（例えば、走性）を評価する工程（以下、「応答評価工程」と示す場合がある。）である。

[0120] 線虫は、特定濃度の塩化ナトリウム（ＮａＣｌ）に誘引されるという化学走性（走化性）、特定濃度のジアセチルから逃避するという化学走性、およびがん患者の尿に誘引されるという走性、ならびに特定の温度に対する走性（温度走性）を有する。

[0121] たとえば、被験物が被験者から採取された尿である場合、応答評価工程によって、当該被験者のがん罹患可能性を判定することができる。すなわち、本実施形態に係る線虫の応答評価方法を、がん検査方法に用いることができる。がん検査では、例えば、線虫試験用プレートの一部に、目的の被験物を供給する（目的の被験物の濃度勾配を形成する）工程と、所定の位置に上記線虫封入カプセルを供給する工程と、線虫封入カプセルから線虫を放出させる工程と、一定時間経過後、被験物に誘引されたまたは被験物から逃避した線虫の数、または当該線虫の数と相関する要素を計測する工程と、を含んでいてもよい。線虫試験用プレートとしては、線虫のがんに対する応答評価試験に用いることが可能なものであれば、特に制限はない。一例としては上記線虫トラップ用プレートを用いてもよい。線虫トラップ用プレートを用いる場合は、特許文献２に記載されたがん検査方法に準じて行えばよい。被験物に誘引された線虫の数は、例えば、当該一部から所定の領域内に存在する線虫の数であってもよい。また、線虫試験用プレートの一部から逃避した線虫

の数は、当該一部から所定の領域外に存在する線虫の数であってもよい。

[0122] がん検査方法に用いるときの被験物として、例えば、被験者から採取された生体試料が挙げられる。当該生体試料としては、例えば、尿、汗、唾液、胸水、腹水、便汁および血液（血液から分離した個別の成分、例えば、血漿、血清等を含む）等の体液；生検細胞等の細胞、生検組織および組織切片等のがん組織；生体組織等の保存液および培養液等；が挙げられる。被験物は、好ましくは、検査対象となる哺乳類からの採取が容易な体液であり、より好ましくは、尿または血液である。

[0123] また、本実施形態に係る線虫の応答評価方法を用いて、匂い物質を放出する被験物に対する線虫の嗅覚試験または味を有する被験物に対する線虫の味覚試験を行ってもよい。これらの化学走性試験では、線虫試験用プレートの一部に、目的の被験物を供給する（目的の被験物の濃度勾配を形成する）工程と、所定の位置に上記線虫封入カプセルを供給する工程と、線虫封入カプセルから線虫を放出させる工程と、一定時間経過後、被験物に誘引されたまたは被験物から逃避した線虫の数、または当該線虫の数と相関する要素を計測する工程と、を含んでいてもよい。例えば、当該嗅覚試験によって、植物寄生性線虫に対する対抗または忌避生物選抜試験を行うことができる。線虫試験用プレートとしては、線虫の化学走性試験に用いることが可能なものであれば、特に制限はない。上記線虫トラップ用プレートを用いる場合は、特許文献２に記載された線虫の応答評価方法に準じて行えばよい。被験物に誘引された線虫の数は、例えば、当該一部から所定の領域内に存在する線虫の数であってもよい。また、線虫試験用プレートの一部から逃避した線虫の数は、当該一部から所定の領域外に存在する線虫の数であってもよい。

[0124] さらに、本実施形態に係る線虫の応答評価方法を用いて、温度に対する線虫の応答（温度走性）を調べる試験を行ってもよい。温度走性試験では、線虫試験用プレートの一部を、目的の温度に調節する工程と、所定の位置に上記線虫封入カプセルを供給する工程と、線虫封入カプセルから線虫を放出させる工程と、一定時間経過後、上記一部に誘引されたまたは上記一部から逃

避した線虫の数、または当該線虫の数と相関する要素を計測する工程と、を含む。線虫試験用プレートとしては、線虫の温度走性試験に用いることが可能なものであれば、特に制限はない。上記線虫トラップ用プレートを用いる場合は、特許文献２に記載された線虫の応答評価方法に準じて行えばよい。線虫試験用プレートの一部に誘引された線虫の数は、例えば、当該一部から所定の領域内に存在する線虫の数であってもよい。また、線虫試験用プレートの一部から逃避した線虫の数は、当該一部から所定の領域外に存在する線虫の数であってもよい。

[0125] 〔線虫応答評価キット〕

本実施形態に係る線虫応答評価キットは、上記線虫封入カプセルを含む。当該カプセルの他に、線虫試験用プレートを含んでいてもよい。線虫試験用プレートとしては、線虫の応答評価試験に用いることが可能なプレートであれば特に制限はなく、例えば、上述の供給部が形成された供給部加工プレートおよび線虫トラップ用プレート等が挙げられる。また、当該評価キットには、線虫応答を評価するための手順等を記載した指示書を含んでもよい。紙もしくはその他の媒体に書かれていても印刷されていてもよく、または磁気テープ、コンピューター等の読み取り可能なディスクまたはＣＤ－ＲＯＭ等のような電子媒体に付されてもよい。指示書に代えて、線虫応答を評価するための手順等を解説した音声ファイル、または動画ファイルを含んでもよい。磁気テープ、コンピューター等の読み取り可能なディスクまたはＣＤ－ＲＯＭ等のような電子媒体に付されてもよいし、アクセス可能なクラウドサーバー等に保存され、インターネット回線を介して参照する形式のものでもよい。

[0126] 上述の通り、線虫はがん患者の尿に誘引されるという性質（一種の走性）を有するため、本実施形態に係る線虫応答評価キットはがん検査用キットとして用いてもよい。

[0127] 〔線虫封入カプセルを製造するための製造キット〕

本実施形態に係る線虫封入カプセルを製造するための製造キットは、線虫

と、水溶性高分子と、カチオンの塩、とを含む。線虫は、放射線照射処理、孵化抑制剤曝露処理、または、その他の不妊化処理をされた線虫であってもよい。水性高分子としては、アルギン酸ナトリウム等のアルギン酸塩等が挙げられる。カチオンの塩としては、塩化カルシウムおよび乳酸カルシウム等のカルシウム塩等が挙げられる。また、製造キットには、孵化抑制剤（例えば、粉状もしくは液状）または、当該薬剤を含む液体が含まれていてもよい。

[0128] また、当該製造キットには、線虫封入カプセルを製造するための手順等を記載した指示書を含んでもよい。紙もしくはその他の媒体に書かれていても印刷されていてもよく、または磁気テープ、コンピューター等の読み取り可能なディスクまたはＣＤ－ＲＯＭ等のような電子媒体に付されてもよい。指示書に代えて、線虫封入カプセルを製造するための手順等を解説した音声ファイル、または動画ファイルを含んでもよい。磁気テープ、コンピューター等の読み取り可能なディスクまたはＣＤ－ＲＯＭ等のような電子媒体に付されてもよいし、アクセス可能なクラウドサーバー等に保存され、インターネット回線を介して参照する形式のものでもよい。

[0129] 以上に示した本実施形態に係る線虫封入カプセルおよびこれを利用した各技術によって、実験等に必要な線虫を培養する技術および設備がない実験者も、手軽に実験を実施できる。具体的には、実験実施時に線虫封入カプセルの膜を爪楊枝またはチップの先などで突いて破る操作、クエン酸ナトリウム溶液などのキレート剤を膜に添加して溶解する操作、または、微生物や化学物質等の混合物に接触させる（典型的には、土壌に撒く）操作だけで、カプセル内部から線虫を脱出させ、線虫試験用プレート等に線虫を供給できる。例えば、実験者の操作の削減と試料保存スペースの縮小を求められる宇宙実験において本実施形態に係る線虫封入カプセルの使用は有効である。また、学校教育および家庭等における実験（体験）のように実験者自身に線虫培養の手技または設備が備わっていないことが想定される実験場面においても、本実施形態に係る線虫封入カプセルの使用は有効である。すなわち、宇宙実

験または熟練者ではない実験者による実験場面において、本実施形態に係る線虫封入カプセルを入手することによって、簡便な操作で実験等に適した良好な状態の線虫を用いることが可能となる。さらに、病害線虫防除などの目的で、線虫培養等の熟練者ではない農業従事者や病害線虫駆除業者等が任意の線虫を環境中に放出する場面において、本実施形態に係る線虫封入カプセルを入手することによって、簡便な操作で任意の線虫を用いることが可能となる。

[0130] また、線虫を良好な状態で封じ込める線虫封入カプセルは、膜を破る、または膜を溶解せず当該カプセルのまま線虫を観察したい場合、または、一定の位置に線虫をとどめておくことが有効な実験（例えば、特定の組織の数十μｍの範囲を狙って放射線を照射するイオンマイクロビーム照射実験）において効率的に実施することにも貢献する。

[0131] 線虫封入カプセルを学校教育および家庭等における実験（体験）で用いる場合、使用後の線虫封入カプセル内の線虫の増殖を抑制し、環境中への線虫の拡散を防止することが好ましい。その点で、不妊化処理された線虫が封入された線虫封入カプセルを学校教育および家庭等における実験（体験）で用いることが好ましい。

[0132] また、不妊化処理された病害線虫または当該線虫の捕食線虫等が封入された線虫封入カプセルを土壌に撒く、または、樹木に注入すること（不妊虫放飼）によって、農作物または樹木に甚大な被害を及ぼす病害線虫を防除することが想定される。この場合、例えば、線虫封入カプセルを土壌または樹木に撒く、混ぜる、または埋めるなどした後、放置し、土壌または樹木に含まれる微生物や化学物質等によってカプセルの皮膜を数時間から数日かけて緩徐に分解させ、線虫を放出させることができる。環境中に任意の線虫が必要以上に拡散することを防ぐために、不妊化処理された線虫が封入された線虫封入カプセルを用いることが好ましい。

[0133] さらに、現状では、専門の検査機関での実施に限られる線虫を用いるがん検査を、医療機関、家庭、または職場または地域における集団検診等で実施

するための「簡易検査キット」の製品化には、検査用の線虫を良好な状態で供給する技術が不可欠である。本発明の一態様の線虫封入カプセルに線虫を封入し培養することで、低コストで良好な状態の線虫の供給が可能になる。線虫を用いるがん検査または線虫の応答評価試験等では、本発明者による線虫試験用プレートおよび線虫試験方法等に関する公開公報（例えば、特許文献２）に記載された技術を併用することもできる。

[0134] 本実施形態に係る線虫封入カプセル等を用いたがん検査によって、簡便かつ定期的にがん検査を行うことができる。これにより、健康を害する虞のある危険因子の早期検出、危険因子緩和および危険因子回避のための対策を強化することができ、以て健康寿命の延伸をもたらし、持続可能な開発目標（ＳＤＧｓ）の達成に貢献できる。

[0135] 〔まとめ〕

本発明の態様１に係る線虫封入カプセルは、線虫を含む封入組成物と、当該封入組成物を包含する少なくとも１層の皮膜と、を含み、上記皮膜はカチオンと反応することによってゲル化する水溶性高分子を主成分として含む。

[0136] 本発明の態様２に係る線虫封入カプセルは、上記の態様１において、線虫封入カプセルの外径が１０ｃｍ以下であってもよい。

[0137] 本発明の態様３に係る線虫封入カプセルは、上記の態様１または２において、上記線虫がセノラブディティス・エレガンス（Caenorhabditis elegans）またはその近縁種であってもよい。

[0138] 本発明の態様４に係る線虫封入カプセルは、上記の態様１～３のいずれかにおいて、上記水溶性高分子がタンパク質および多糖類からなる群から選択される少なくとも１種の水溶性高分子であってもよい。

[0139] 本発明の態様５に係る線虫封入カプセルは、上記の態様１～４のいずれかにおいて、上記線虫が放射線照射された線虫であってもよい。

[0140] 本発明の態様６に係る線虫封入カプセルは、上記の態様１～５のいずれかにおいて、上記線虫が孵化抑制剤処理された線虫であってもよい。

[0141] 本発明の態様７に係る線虫封入カプセルは、上記の態様１～６のいずれか

において、上記線虫が不妊化処理された線虫であってもよい。

[0142] 本発明の態様８に係る線虫封入カプセルは、上記の態様１～７のいずれかにおいて、上記封入組成物がさらに孵化抑制剤を含んでいてもよい。

[0143] 本発明の態様９に係る線虫封入カプセルの製造方法は、上記の態様１～８のいずれかの線虫封入カプセルの製造方法であって、上記線虫および上記水溶性高分子を混合して封入組成物を調製する工程と、上記封入組成物と上記カチオンを含む溶液とを反応させて線虫封入カプセルを製造する工程を含む。

[0144] 本発明の態様１０に係る線虫封入カプセルの製造方法は、上記の態様１～８のいずれかの線虫封入カプセルの製造方法であって、上記水溶性高分子を含む溶液と上記カチオンを含む溶液とを反応させて線虫封入カプセルの皮膜の基剤を調製する工程と、上記基剤に上記線虫を注入することによって、線虫封入カプセルを製造する工程を含む。

[0145] 本発明の態様１１に係る線虫封入カプセルの製造方法は、上記の態様９において、上記線虫封入カプセルに放射線を照射する工程を含んでいてもよい。

[0146] 本発明の態様１２に係る線虫封入カプセルの製造方法は、上記の態様１０において、上記線虫封入カプセルに放射線を照射する工程を含んでいてもよい。

[0147] 本発明の態様１３に係る線虫の応答評価方法は、線虫試験用プレートの一部に、被験物を供給する工程と、所定の位置に上記の態様１～８のいずれかの線虫封入カプセルを供給する工程と、上記線虫封入カプセルから上記線虫を放出させる工程と、上記被験物に対する上記線虫の応答を評価する工程と、を含む。

[0148] 本発明の態様１４に係る線虫の応答評価方法は、上記の態様１３において、上記被験物に対する上記線虫の応答を評価する工程が、一定時間経過後、上記一部に誘引されたまたは上記一部から逃避した線虫の数または当該線虫の数と相関する要素を計測する工程を含んでいてもよい。

[0149] 本発明の態様１５に係る線虫の応答評価方法において、上記の態様１３または１４において、上記被験物が、匂い物質を放出する被験物または味を有する被験物であってもよい。

[0150] 本発明の態様１６に係るがん検査方法は、上記の態様１３～１５のいずれかの応答評価方法によって被験者から採取された生体試料に対する線虫の応答を評価する工程と、上記評価によって当該被験者のがん罹患可能性を判定する工程と、を含む。

[0151] 本発明の態様１７に係る温度に対する線虫の応答評価方法は、線虫試験用プレートの一部を、目的の温度に調節する工程と、所定の位置に上記の態様１～８のいずれかの線虫封入カプセルを供給する工程と、上記線虫封入カプセルから上記線虫を放出させる工程と、一定時間経過後、上記一部に誘引されたまたは上記一部から逃避した線虫の数、または当該線虫の数と相関する要素を計測する工程と、を含む。

[0152] 本発明の態様１８に係る線虫応答評価キットは、上記の態様１～８のいずれかの線虫封入カプセルを含む。

[0153] 本発明の態様１９に係る線虫応答評価キットは、上記の態様１８において、がん検査用であってもよい。

[0154] 本発明の態様２０に係る線虫封入カプセルを製造するための、製造キットは、上記の態様１～４のいずれかの線虫封入カプセルを製造するための製造キットであって、線虫と、水溶性高分子と、カチオンの塩と、を含む。

[0155] 本発明の態様２１に係る線虫封入カプセルを製造するための、製造キットは、上記の態様５の線虫封入カプセルを製造するための製造キットであって、放射線照射処理された線虫と、水溶性高分子と、カチオンの塩と、を含む。

[0156] 本発明の態様２２に係る線虫封入カプセルを製造するための、製造キットは、上記の態様６の線虫封入カプセルを製造するための製造キットであって、孵化抑制剤処理された線虫と、水溶性高分子と、カチオンの塩と、を含む。

[0157] 本発明の態様２３に係る線虫封入カプセルを製造するための、製造キットは、上記の態様７の線虫封入カプセルを製造するための製造キットであって、不妊化処理された線虫と、水溶性高分子と、カチオンの塩と、を含む。

[0158] 本発明の態様２４に係る線虫封入カプセルを製造するための、製造キットは、上記の態様８の線虫封入カプセルを製造するための製造キットであって、線虫と、水溶性高分子と、カチオンの塩と、孵化抑制剤と、を含む。

[0159] 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、本発明の以下の実施例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

[0160] 以下に示す各実施例および各比較例では、線虫としてＣ．エレガンスの雌雄同体を用いた。Ｃ．エレガンスは、至適温度である２０℃で培養および飼育した。実施例ごとに異なる線虫封入カプセルの製造条件のうち、封入する線虫の発生段階、事前の不妊化処理の有無、線虫の回収方法および水性ゾルへの添加方法、線虫洗浄液および線虫液として使用する緩衝液等の種類、線虫封入カプセル中の餌の有無について、表１に示す。

[0161]

[表1]

実施例	封入する線虫（主なもの）	不妊化処理	線虫回収・添加方法	線虫液の種類	カプセル中の餌
1	成虫（孵化後3日目）	無	線虫液	Wash buffer	無
2	卵	無	線虫液	Wash buffer	無
3	卵	無	線虫液	Wash buffer	有
	卵	無	線虫液	M9 buffer	有
4	成虫（孵化後3日目）	無	線虫液	M9 buffer	有
5	成虫（孵化後3日目）	放射線照射	線虫液	M9 buffer	有
6	成虫（孵化後4日目）	孵化抑制剤曝露	白金線ピッカー	—	有
	成虫（孵化後4日目）	無	白金線ピッカー	—	有
	成虫（孵化後4日目）	孵化抑制剤曝露	線虫液	M9 buffer	有
7	成虫（孵化後3日目）	無	線虫液	Wash buffer	有
8	成虫（孵化後3日目）	無	線虫液	M9 buffer	有
9	成虫（孵化後3日目）	無	線虫液	Wash buffer	有
10	卵	無	線虫液	Wash buffer	有

[0162] 以下では、線虫封入カプセルの製造工程およびカプセル内での線虫培養に関する実施例を示す。

[0163] 〔実施例１．線虫の個体（成虫）を封入したカプセルの製造〕

本発明の一態様の線虫封入カプセルの典型的な製造方法は、線虫を封入したカルシウム凝固性高分子化合物の水性ゾルをカルシウム塩の水溶液中に滴下してゲル化させることである。本実施例では、この方法で線虫成虫封入カプセルを製造した。線虫の洗浄には、Ｗａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒを用いた。また、水性ゾルへの注入で用いる線虫液としては、洗浄済みの線虫（卵または個体）を含む２０℃の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、１Ｍの$MgSO_4$（１ｍＬ）、１Ｍのリン酸カリウム（ｐＨ６．０、５ｍＬ）、および１Ｍの$CaCl_2$（１ｍＬ）を添加し、撹拌して調製した。本実施例で製造する線虫封入カプセルには、餌となる大腸菌を添加しないこととした。

[0164] （水性ゾルおよびカルシウム塩溶液の調合）

まず、線虫の培養または各種試験に一般的に用いられるＳ－ｂａｓａｌ　ｂｕｆｆｅｒ

２００ｍＬにアルギン酸ナトリウム（２ｇ）を溶かし、撹拌して線虫封入カプセルの母材となる水性ゾルを調製した。Ｓ－ｂａｓａｌ　ｂｕｆｆｅｒは、ＮａＣｌ（５．９ｇ）を超純水９４９ｍＬで溶かした液体に、コレステロール（５ｍｇ）を溶かしたエタノール（１ｍＬ）を添加して加圧滅菌した後、１Ｍリン酸カリウム（ｐＨ６．０、５０ｍＬ）を添加し、撹拌して調製した。次に、水性ゾルをゲル化させる製造工程で用いるカルシウム塩水溶液として、超純水２００ｍＬに乳酸カルシウム（２ｇ）を溶かし、撹拌して調製した。

[0165] （線虫成虫封入カプセルの製造）

まず、孵化後３日目の線虫の成虫を含むＷａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒを上記の水性ゾルに滴下し、線虫入りの水性ゾル（以下、「線虫ゾル」と示す場合がある。）を作製した。次に、マイクロピペットまたは電動ピペッターを用いて線虫ゾルを吸い出し、ビーカーに満たした乳酸カルシウム溶液に滴下して５分程度浸漬した。これにより、線虫の成虫を封じ込めた線虫成虫封入カプセルを製造した。最後に、乳酸カルシウム溶液から線虫成虫封入カプセルを取り出し、当該カプセルの外相膜を超純水で洗浄した。

[0166] （実施例１の結果）

線虫の成虫を約１００匹封入した球状カプセルを顕微鏡に取り付けたデジタルカメラを用いて上側から撮像した画像を図１に示す。また、電動ピペッターの先端の径またはマイクロピペットのチップの先端径と、線虫ゾルの滴下量を調整することで、様々なサイズに形成した球状の線虫（成虫）封入カプセルの例を図２に示す。さらに、乳酸カルシウム水溶液の液量を減らすまたは線虫ゾルの滴下位置を乳酸カルシウム水溶液の液面直上にする等により、任意形状に形成した線虫（成虫）封入カプセルの例を図３に示す。

[0167] 図１に示す通り、カプセル内に線虫の成虫が封入されていることがわかる。また、図２に示す通り、線虫ゾルの滴下量を調節する等により、様々なサイズの線虫封入カプセルを自在に製造できることは明らかである。さらに、球状に限らず、図３に示すように、涙粒型またはひょうたん型等、任意形状

の線虫封入カプセルを制御して、または偶発的に製造できることは明らかである。

[0168] 以上より、水性ゾルに線虫液を注入した線虫ゾルをカルシウム塩溶液に滴下して浸漬することで、内部に線虫を封じ込めた線虫封入カプセルを製造できることは明らかである。

[0169] 〔実施例２．線虫の卵を封入したカプセルの製造と低栄養下での線虫の培養〕

線虫の卵を封入したカルシウム凝固性高分子化合物の水性ゾルをカルシウム塩の水溶液中に滴下してゲル化させることで、卵を封入した線虫卵封入カプセルを製造した。水性ゾルへの注入で用いる線虫液としては、Ｗａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒを用いて洗浄済みの線虫（卵または個体）を含む２０℃のＷａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒを用いた。ここで製造する線虫卵封入カプセルには、餌となる大腸菌を添加しないこととし、低栄養状態での線虫卵封入カプセルの生存状況を継時観察した。

[0170] （線虫卵封入カプセルの製造）

まず、従来公知の方法で線虫の成虫から採卵を行った。次に、卵を含むＷａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒを実施例１で調合したのと同じ水性ゾルに滴下し、線虫の卵入りの水性ゾル（以下、「卵ゾル」と示す場合がある。）を作製した。続いて、マイクロピペットを用いて線虫ゾルを吸い出し、ビーカーに満たした乳酸カルシウム溶液に滴下して５分程度浸漬した。これにより、線虫の卵を封じ込めた線虫卵封入カプセルを製造した。最後に、乳酸カルシウム溶液から線虫卵封入カプセルを取り出し、当該カプセルの外相膜を超純水で洗浄した。

[0171] （実施例２の結果）

線虫の卵を約１０個封入した球状カプセルを顕微鏡に取り付けたデジタルカメラを用いて上側から撮像した画像を図４に示す。図４に示す通り、カプセル内に線虫の卵が封入されていることがわかる。実施例１の結果を踏まえれば、卵でも個体でも同様の方法で線虫封入カプセルを製造できることは明

らかである。なお、図は示さないが、カプセル内の線虫は１日後には、孵化してＬ１幼虫になった。ただし、線虫卵ゾル中に餌となる大腸菌を添加しなかった本実施例では、成長のための栄養が不足していたことから、線虫は飢餓状態のときに発生段階（ステージ）を一旦停止する耐性幼虫に切り替わり、少なくとも１か月間、当該カプセルの中で生存した。このことから、カプセル中の栄養状態を調節することで、積極的に線虫を耐性幼虫の状態で長期間維持できることが明らかとなった。

[0172] 〔実施例３．線虫の卵を封入したカプセルの製造と餌の大腸菌存在下での線虫の培養〕

実施例２と同様の方法で、線虫の卵を封入したカルシウム凝固性高分子化合物の水性ゾルをカルシウム塩の水溶液中に滴下してゲル化させることで、卵を封入した線虫封入カプセルを製造した。水性ゾルへの注入で用いる線虫液としては、Ｗａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒを用いて洗浄済みの線虫（卵または個体）を含む２０℃のＷａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒを用いた。ここで製造する線虫卵封入カプセルには、餌となる大腸菌を添加し、富栄養状態での線虫卵封入カプセル内の線虫の生存状況を継時観察した。

[0173] （線虫卵封入カプセルの製造）

実施例２と同様に、孵化後３日目の線虫の成虫から採卵し、卵を含むＷａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒを実施例１で調合したのと同じ水性ゾルに滴下し、線虫の卵ゾルを作製した。続いて、卵ゾルに、餌となる大腸菌の懸濁液を添加した。マイクロピペットを用いて線虫ゾルを吸い出し、ビーカーに満たした乳酸カルシウム溶液に滴下して５分程度浸漬した。これにより、線虫の卵と餌となる大腸菌を封じ込めた線虫卵封入カプセルを製造した。最後に、乳酸カルシウム溶液から線虫卵封入カプセルを取り出し、当該カプセルの外相膜を超純水で洗浄した。

[0174] （実施例３の結果）

線虫の卵約１００個封入した球状カプセルを製造直後から２４時間（１日）ごとに、顕微鏡に取り付けたデジタルカメラを用いて上側から撮像して、

観察した。直後から２日後までの結果を図５に示す。

[0175] 図５に示す通り、製製造直後には、線虫封入カプセル内に線虫の卵が封入されていることがわかる。また、１日後にはカプセル内で線虫の卵が孵化して幼虫（Ｌ１）になり、２日後と徐々に成長した。さらに、図は示さないが、３日後には成虫となり、４日後には次世代の産卵が開始されたことを確認した。低栄養状態により耐性幼虫となった実施例２の結果に対し、本実施例では、正常な速度での成長が観られたことから、卵カプセル中の栄養状態を調節することで、線虫を適切に成長させる（培養する）ことが可能であることが明らかとなった。

[0176] また、図は示さないが、実施例３におけるＳ－ｂａｓａｌ　ｂｕｆｆｅｒに代えて、線虫の培養または各種試験に一般的に用いられるＭ９　ｂｕｆｆｅｒを用いて同様に線虫卵封入カプセルを製造し数日間観察した結果、溶液としてＭ９　ｂｕｆｆｅｒを用いた場合でも線虫が卵から成虫まで良好に生育することを確認した。Ｍ９　ｂｕｆｆｅｒは、ＮａＣｌ（５０ｇ）、KH_2PO_4（３０ｇ）、Na_2HPO_4（６０ｇ）を超純水で溶かした液体（約１００ｍＬ）を加圧滅菌した後、１ＭのＭｇSO_4（１ｍＬ）を添加し、撹拌した。この溶液に滅菌済みの超純水超純水を加えて１０倍に希釈し、攪拌して調製した。

[0177] 〔実施例４．線虫の成虫を封入したカプセルの製造と餌の大腸菌存在下での線虫の培養〕

孵化後３日目の線虫の成虫を封入したカルシウム凝固性高分子化合物の水性ゾルをカルシウム塩の水溶液中に滴下してゲル化させることで、線虫成虫封入カプセルを製造した。水性ゾルへの注入で用いる線虫液としては、Ｍ９　ｂｕｆｆｅｒを用いて培養プレートから回収した線虫（成虫）を含む２０℃のＭ９　ｂｕｆｆｅｒを用いた。

[0178] （線虫成虫封入カプセルの製造）

線虫の成虫から採卵し、孵化後３日目まで大腸菌を塗布したプレート上で培養した。孵化後３日目の成虫を培養プレートからＭ９　ｂｕｆｆｅｒで回

収し、実施例１で調合したのと同じ水性ゾルに滴下し、線虫の成虫ゾルを作製した。続いて、マイクロピペットを用いて線虫ゾルを吸い出し、プラスチックディッシュに満たした乳酸カルシウム溶液に滴下して５分程度浸漬した。これにより、線虫の成虫および餌となる大腸菌を封じ込めた線虫成虫封入カプセルを製造した。最後に、乳酸カルシウム溶液から線虫成虫封入カプセルを取り出し、当該カプセルの外相膜を超純水で洗浄した。

[0179] （実施例４の結果）

孵化後３日目の線虫の成虫約１０匹を封入した球状カプセルを製造直後から２４時間（１日）ごとに、顕微鏡に取り付けたデジタルカメラを用いて上側から撮像して、観察した。直後から２日後までの結果を図６に示す。図６に示す通り、線虫成虫封入カプセル製造直後から、当該カプセル内の線虫の成虫が産卵を始めていることがわかる。また、１日後にはカプセル内で線虫の卵が孵化し、１００匹以上の幼虫が確認できた。また、２日後にはさらに幼虫の数が増え、カプセルを埋めつくした。カプセル内で成虫が産卵した卵の孵化速度は培地上での一般的な培養時と差がなく、正常な発生が確認できた。以上から、カプセル内での成虫の産卵及び卵の孵化が可能であることが明らかとなった。

[0180] 次に、線虫封入カプセル内で成長させた線虫を取り出し、その移動運動を確認した。線虫試験用プレートの容器として底表面の内径が８．４ｃｍの市販の円形プラスチックディッシュを用いた。容器内に寒天を主とする１０ｍＬの固体培地を注入して、プレートＡ１として用いた（後述）。このプレートＡ１上に、製造２日後の線虫封入カプセルをピンセットで移し、滅菌済みの爪楊枝で複数回突き、当該カプセル内部を露出させた。この直後に、プレートＡ１上に線虫が這い出した様子を図７に示す。図７から、線虫封入カプセル製造時に封入した成虫（親）が、カプセル内で産卵した卵が孵化し、当該幼虫がカプセルから這い出してプレートＡ１上を正常に動き回ることが確認できた。また、線虫封入カプセル内の成虫（親）の数が当該カプセルのサイズに比して多い場合には、次世代（子）が大量に発生し、親世代が衰弱ま

たは死滅することがあることも明らかとなった。

[0181] なお、図は示さないが、製造後１日後に線虫封入カプセルを滅菌済みの爪楊枝で複数回突き、当該カプセル内部を露出させた場合には、当該カプセルに封入された成虫（親）が次世代の幼虫と共に這い出した。この結果から、次世代の大部分が、卵からＬ１幼虫の段階にある産卵後１日以内であれば、線虫の成虫も正常に維持できることが明らかとなった。

[0182] 以上を踏まえ、線虫封入カプセルに封入した線虫の親世代をカプセルから取り出して使用する実験では、親世代が次世代と共に生き残るように、カプセルに封入する個体数またはカプセルのサイズ、封入日数などのカプセル製造条件および培養条件等を調整することが有効である。また、後述する、卵の孵化抑制の方法も選択できる。

[0183] 〔実施例５．放射線照射した線虫の成虫を封入したカプセルの製造と餌の大腸菌存在下での線虫の培養〕

放射線照射によって不妊化した線虫を封入した線虫封入カプセルの有効性を確認する実験を行った。コバルト６０（^{60}Ｃｏ）ガンマ線を照射した孵化後３日目の線虫の成虫を封入したカルシウム凝固性高分子化合物の水性ゾルをカルシウム塩の水溶液中に滴下してゲル化させることで、放射線照射線虫封入カプセルを製造した。水性ゾルへの注入で用いる線虫は、Ｍ９　ｂｕｆｆｅｒの入ったチューブの中を遊泳した状態でコバルト６０ガンマ線を照射された線虫の成虫とし、線照射直後の線虫液を用いた。

[0184] （線虫への放射線照射）

実施例４と同様に、線虫の成虫から採卵し、孵化後３日目まで大腸菌を塗布したプレート上で培養した。孵化後３日目の成虫を培養プレートからＭ９　ｂｕｆｆｅｒで回収しチューブに懸濁した線虫液に、コバルト６０ガンマ線を雌雄同体の不妊化線量に相当する５００Ｇｙ照射した。

[0185] （放射線照射済みの線虫の成虫封入カプセルの製造）

ガンマ線を照射した線虫液を、照射直後に、実施例１で調合したのと同じ水性ゾルに滴下し、不妊化線虫の成虫ゾルを作製した。続いて、マイクロピ

ペットを用いて線虫ゾルを吸い出し、プラスチックディッシュに満たした乳酸カルシウム溶液に滴下して５分程度浸漬した。これにより、放射線照射線虫の成虫および餌となる大腸菌を封じ込めた放射線照射線虫封入カプセルを製造した。最後に、乳酸カルシウム溶液から不妊化線虫封入カプセルを取り出し、当該カプセルの外相膜を超純水で洗浄した。

[0186] （実施例５の結果）

ガンマ線照射した直後の孵化後３日目の線虫の成虫約１０匹を封入した球状カプセルを製造直後から２４時間（１日）ごとに、顕微鏡に取り付けたデジタルカメラを用いて上側から撮像して、観察した。直後から２日後までの結果を図８に示す。図８に示す通り、線虫封入カプセル製造直後から、当該カプセル内の線虫の成虫が産卵を始めていることがわかる。１日後、２日後にも、成虫がカプセル内で動く様子が確認できたが、成虫が産んだ卵は孵化せず、幼虫は確認されなかった。

[0187] 実施例５は、線虫封入カプセルの製造前に線虫の成虫にガンマ線を照射したこと以外は、実施例４と全て同じ条件および手順で実施した。実施例４の結果も踏まえれば、放射線照射により不妊化（孵化抑制）処理をすることで、産卵を始める孵化後３日目の成虫を封入しても、次世代の発生が抑制され、当該カプセル製造当初の親世代のみの状態で維持することができることは明らかである。

[0188] 次に、線虫封入カプセル内で成長させた線虫を取り出し、その移動運動を確認した。実施例４と同様に、プレートＡ１上に、製造２日後の放射線照射線虫封入カプセルをピンセットで移し、滅菌済みの爪楊枝で複数回突いて当該カプセル内部を露出させた。この直後に、プレートＡ１の表面に線虫が這い出した様子を図９に示す。従来から、コバルト６０ガンマ線を５００Ｇｙ照射した線虫では、移動運動が一時的に低下するものの、１日後には回復することが知られている。本実施例でも、照射直後にカプセルに封入され、２日後に線虫封入カプセルから脱出させた成虫（親）では、移動運動に顕著な異常は認められなかった。この結果から、不妊化線量に相当する線量の放射

線を照射した線虫の成虫をカプセルに２日間程度封入しても、運動機能に問題が生じないことは明らかである。

[0189] 〔実施例６．孵化抑制剤曝露した線虫の成虫を封入したカプセルの製造と餌の大腸菌存在下での線虫の培養〕

[0190] 孵化抑制剤処理をした孵化後４日目の線虫の成虫を封入したカルシウム凝固性高分子化合物の水性ゾルをカルシウム塩の水溶液中に滴下してゲル化させることで、孵化抑制剤処理線虫封入カプセルを製造した。本実施例では、線虫液を用いず、培養プレートから白金線ピッカーを用いて１匹ずつ線虫の成虫を回収し、大腸菌と共に水性ゾル中に移した。

[0191] （線虫への孵化抑制剤処理）

大腸菌を塗布したプレート上で孵化後３日目の成虫（産卵開始前）になるまで線虫を培養した。この線虫培養プレートにＦＵｄＲ溶液を添加して、さらに１日培養した。ＦＵｄＲ溶液は、ＦＵｄＲ粉末５ｍｇを滅菌済みの超純水１０ｍＬで溶かし、撹拌して調製した。ＦＵｄＲを添加した培養プレート上で線虫の成虫はある程度産卵したものの、卵は孵化しないことを確認した。

[0192] （孵化抑制剤曝露済みの線虫の成虫封入カプセルの製造）

白金線ピッカーを用いて、１日孵化抑制剤を曝露した孵化後４日目の線虫の成虫を培養プレートから大腸菌と共に回収し、実施例１で調合したのと同じ水性ゾルに滴下して、不妊化線虫の成虫ゾルを作製した。続いて、マイクロピペットを用いて線虫ゾルを吸い出し、プラスチックディッシュに満たした乳酸カルシウム溶液に滴下して５分程度浸漬した。これにより、孵化抑制剤曝露線虫の成虫と餌となる大腸菌を封じ込めた孵化抑制剤処理線虫封入カプセルを製造した。最後に、乳酸カルシウム溶液から不妊化線虫封入カプセルを取り出し、当該カプセルの外相膜を超純水で洗浄した。

[0193] （実施例６の結果）

ＦＵｄＲ曝露による孵化抑制を施した孵化後４日目の線虫の成虫約１０匹を封入した球状カプセルを製造直後から２４時間（１日）ごとに、顕微鏡に

取り付けたデジタルカメラを用いて上側から撮像して、観察した。直後から２日後までの結果を図１０に示す。図１０に示す通り、線虫封入カプセル製造直後から、当該カプセル内の線虫の成虫が産卵を始めていることがわかる。１日後、２日後にも、成虫がカプセル内で動く様子が確認できたが、成虫が産んだ卵は孵化せず、幼虫は確認されなかった。

[0194] 次に、線虫封入カプセル内で成長させた線虫を取り出し、その移動運動を確認した。実施例４と同様に、プレートＡ１上に、製造２日後の孵化抑制剤処理線虫封入カプセルをピンセットで移し、滅菌済みの爪楊枝で複数回突いて当該カプセル内部を露出させた。この直後に、プレートＡ１の表面に線虫が這い出した様子を図１１に示す。製造２日後に線虫封入カプセルから脱出させた成虫（親）では、移動運動に顕著な異常は認められなかった。この結果から、孵化抑制剤を曝露した線虫の成虫をカプセルに２日間程度封入しても、運動機能に問題が生じないことは明らかである。

[0195] 図１０および図１１に示した通り、孵化抑制剤曝露処理をした孵化後４日目の成虫（産卵期に相当）を封入したカプセル内では、次世代の発生が抑制され、当該カプセル製造当初の親世代の個体のみが存在する状態を少なくとも２日間維持できることを確認した。卵を除き、次世代が出現しなかったことが、孵化抑制剤曝露の効果であることを確認するために、ＦＵｄＲ溶液（ＦＵｄＲを含むＭ９　ｂｕｆｆｅｒ）を添加する代わりに、Ｍ９　ｂｕｆｆｅｒを添加した培養プレート上で１日培養した線虫を用いて、同様に線虫封入カプセルを製造した。対照結果を図１２に示す。図１２に示す通り、孵化後３日目の線虫の成虫を用いた実施例４と同様に、成虫がカプセル中で産卵し、２日後には孵化した幼虫でカプセル内が埋め尽くされた。このことから、孵化抑制剤曝露処理をした線虫の成虫を封入したカプセルにおいて、成虫が産卵したものの、卵が孵化せず幼虫が出現しなかったのは、孵化抑制剤曝露処理の効果であることは明らかである。

[0196] また、図は示さないが、後述する実施例６において、ＦＵｄＲ溶液を添加した培養プレート上で１日培養する代わりに、ＦＵｄＲを含む培養液中で１

日培養した線虫を用いて製造した線虫封入カプセルでも、ＦＵｄＲ溶液を添加した培養プレート上で培養した場合と同様の結果が得られることを確認した。

[0197] 線虫封入カプセルの製造工程およびカプセル内での線虫培養に関する実施例１～３、および４～６の結果から、カプセルに封入する線虫の発生段階、不妊化処理の有無、培養プレートからの線虫の回収方法、水性ゾルへの線虫の添加方法、線虫の洗浄または培養に用いる線虫液の種類、カプセル中への餌の添加の有無など、カプセルの製造および線虫培養に係る条件を様々に変えても、線虫封入カプセルは製造可能であることは明らかである。また、線虫の使用目的に応じて、線虫封入カプセルの製造条件または線虫の培養条件を調整することで、次世代の発生の抑制または栄養状態の制御、個体数制御などを行うことができることも確かめられた。

[0198] 以下では、線虫封入カプセルの保存および土壌での生物分解に関する実施例を示す。

[0199] 〔実施例７．線虫封入カプセルの保存〕

（線虫成虫封入カプセルの製造）

実施例１の方法で線虫ゾルを作製し、餌となる大腸菌の懸濁液を添加した。次に、マイクロピペットを用いて線虫ゾルを吸い出し、ビーカーに満たした乳酸カルシウム溶液に線虫ゾルを滴下して５分程度浸漬した。これにより、線虫の成虫を封じ込めた直径約３ｍｍの球状の線虫封入カプセルを製造した。また、電動ピペッターを用いて線虫ゾルを吸い出し、ビーカーに満たした乳酸カルシウム溶液に線虫ゾルを滴下して５分程度浸漬した。これにより、線虫の成虫を封じ込めた直径約５ｍｍの球状の線虫封入カプセルを製造した。最後に、乳酸カルシウム溶液から線虫封入カプセルを取り出し、当該カプセルの外相膜を超純水で洗浄した。

[0200] （線虫封入カプセルの保存）

洗浄した直径約３ｍｍの球状の線虫封入カプセル約３０個を、底面の直径が約２．８ｃｍのプラスチックディッシュに移した。また、洗浄した直径約

５ｍｍの球状の線虫封入カプセル約３０個を、底面の直径５．４ｃｍのプラスチックディッシュに移した。それぞれのプラスチックディッシュは、紙ワイパーで液成分を拭き取った後に蓋を被せてパラフィンフィルムで密封した。

[0201] （実施例７の結果）

２種類のサイズの球状の線虫封入カプセルを保存した２つのプラスチックディッシュの例を図１３に示す。なお、実際には、パラフィンフィルムで密封して保存するが、中身がよく見えるように、図１３ではパラフィンフィルムを巻く前のプラスチックディッシュを示している。パラフィンフィルムで密封した上で保存したプラスチックディッシュ上の線虫封入カプセル内の線虫は、３日後も良好な状態で生存していた。これにより、本実施例の保存方法が、線虫封入カプセル内の線虫の生存に悪影響を及ぼさないことは明らかである。

[0202] また、同一のプラスチックディッシュ内に保存する線虫封入カプセルの数を図１３に示した例よりも増やし、密な状態で保存することで、搬送時の振動による当該カプセルの転がりを抑制できることが明らかとなった。

[0203] さらに、別の方法として、球状ではなく、１面以上が平面になった線虫封入カプセルとすること、または、隙間を液体で満たすことにより、搬送時の振動の線虫への影響を軽減できる。

[0204] 〔実施例８．土壌における線虫封入カプセルの生物分解〕

農作物に甚大な被害を及ぼす病害線虫またはその対抗線虫を不妊化した上で土壌に戻すことで病害線虫の個体数を徐々に減らすことができる可能性がある。対象となる線虫をカプセルに封入して撒くことで、作業効率の向上や線虫の土壌への移行速度を緩徐にするなどの効果を期待できる。本実施例では、線虫封入カプセルの環境親和性の評価のために、土壌における生物分解の可否を調べた。

[0205] （線虫封入カプセルの土壌親和性評価試験）

実施例４の方法で孵化後３日目の線虫の成虫を封じ込めた直径２～３ｍｍ

の球状の線虫封入カプセルを製造した。底面の直径が５．４ｃｍの市販の円形プラスチックディッシュに市販の腐葉土を敷き詰めて水で湿らせた後、約５０個の線虫封入カプセルを撒き、蓋をして２０℃で静置した。

[0206] （実施例８の結果）

プラスチックディッシュに敷き詰めた腐葉土上の線虫封入カプセルの様子を、撒いた直後から２４時間（１日）ごとに蓋を開けて観察した。直後、１日後、２日後、および５日後の結果を図１４に示す。図１４に示す通り、製造（線虫封入）直後に腐葉土に撒いた線虫封入カプセルは、１日後、２日後と徐々に腐葉土に同化していった。５日後には、線虫封入カプセルの形状が視認できない程度にまで外相膜の生物分解が進んだ。腐葉土の一部を取り出して顕微鏡を用いて観察したところ、線虫封入カプセルの断片と腐葉土が混じり合った中で複数の線虫が動き回る様子を確認できた。

[0207] 以上から、線虫封入カプセルは、任意の線虫を土壌に移行させるための簡便かつ効率的なツールであるといえる。また、当該カプセルは、生物分解性の高い材料から成るため、環境に負荷をかけないことからも、農林水産分野での利用価値は高いことは明らかである。

[0208] 以下では、線虫の供給工程および線虫の応答評価試験に関する実施例および比較例を示す。各実施例および各比較例では、線虫試験用プレートの容器として底表面の内径が８．４ｃｍの市販の円形プラスチックディッシュを用いた。容器内に寒天を主とする１０ｍＬの固体培地を注入して、プレートＡ１として用いた。また、プレートＡ１の固体培地をくり抜いて、線虫供給部となる１つの凹部を作製したプレートＡ２、および、プレートＡ１の固体培地の左右２か所をくり抜いて、線虫落とし込み槽となる４つの凹部を形成したプレートＡ３も用いた。なお、線虫供給部となる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、線虫落とし込み槽となる凹部はいずれも固体培地内径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２に示す。プレートＡ３は、特許文献２に記載されたプレートＡ１と同一である。

[0209] [表2]

名称	固体培地				容器		
	固体培地量(mL)	厚さ(cm)	供給部の数	落とし込み槽の数	底面の内径(cm)	底面積(cm^2)	容器内の高さ(cm)
プレートA1	10.0	約0.18	0	0	約8.4	約55.0	1.5
プレートA2			1	0			
プレートA3			0	左右各2			

[0210] 〔実施例９．線虫供給工程の検討〕

１０ｍＬの固体培地を注入したプレートＡ１と、同様に固体培地を注入し線虫を供給するための供給部となる凹部を中央に１つを設けたプレートＡ２を用いて、本発明の一態様の線虫封入カプセルによる線虫供給工程を評価した。

[0211] まず、実施例１と同様の方法で製造した線虫の成虫を封入したカプセル１つをピンセットで挟み、プレートＡ１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においては中央、プレートＡ２においてはプレート中央の凹部に静置した。いずれのプレートにおいても、線虫封入カプセルを滅菌済みの爪楊枝で複数回突き、当該カプセル内部を露出させた。これにより、プレートＡ１およびプレートＡ２の供給部周辺に、線虫が這い出した。当該カプセル中に含まれる液成分は、マイクロピペットで吸い取った。線虫封入カプセル供給直後から１分ごとに、顕微鏡に取り付けたデジタルカメラを用いて、プレートＡ１およびプレートＡ２の供給部を中心とする約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。固体培地表面に線虫が拡散する様子を観察した。

[0212] （実施例９の結果）

プレートＡ１およびプレートＡ２の供給部周辺を継時観察した結果を図１５および図１６に示す。なお、各図では、線虫封入カプセル供給直後とほぼ全ての線虫が当該カプセルからプレート上に這い出た時点の画像を左から順に示す。画像中央の黒い点は、供給部の中心を示す印である。

[0213] 図１５および図１６に示す通り、線虫封入カプセルを供給した場合、プレートＡ１およびプレートＡ２を用いると、１２分以内で線虫が這い出すことがわかった。また、プレートＡ２では、３分後には線虫が這い出したことから、凹部に線虫を供給する方法（供給部加工プレートを用いた線虫供給工程）を本発明の線虫封入カプセルと組合せて用いることで、線虫の供給効率が増すことが明らかになった。

[0214] また、爪楊枝で線虫封入カプセルを突いて破る操作において、寒天上に静置したプレートＡ１の線虫封入カプセルよりも、凹部が形成され露出したプレート底面に静置したプレートＡ２の線虫封入カプセルの方が転がりにくく突き易かった。また、プレートＡ２は、線虫封入カプセルから流出した線虫を含む溶液の拡散が凹部内にとどまり、線虫の移動開始地点を一定範囲に制御できるというメリットがあった。

[0215] 〔比較例１．従来法による線虫の供給〕

１０ｍＬの固体培地を注入したプレートＡ１と、同様に固体培地を注入し線虫を供給するための凹部を中央に１つを設けたプレートＡ２（供給部加工プレートを用いた線虫供給工程）を用いて、従来公知の方法による線虫供給工程を評価した。

[0216] まず、洗浄済みの線虫の成虫を含む線虫液をマイクロピペットで吸い出し、各線虫試験用プレートの供給部に概ね１００匹の成虫を含んだ線虫液の液滴を滴下して供給した。プレートＡ１上の線虫液の液成分は、従来公知の方法、すなわち、紙ワイパーを用いて拭き取る方法で除去した。また、プレートＡ２の凹部内の線虫液の液成分は、マイクロピペットを用いて吸い取る方法で除去した。線虫液供給直後から１分ごとに、顕微鏡に取り付けたデジタルカメラを用いて、プレートＡ１およびプレートＡ２の供給部を中心とする約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。

[0217] （比較例１の結果）

プレートＡ１およびプレートＡ２の供給部周辺を継時観察した結果を図１

７および図１８に示す。なお、各図では、線虫液供給直後とほぼ全ての線虫が線虫試験用プレート上に這い出た時点の画像を左から順に示す。画像中央の黒い点は、供給部の中心を示す印である。

[0218] 図１７および図１８に示す通り、線虫液を供給した場合、プレートＡ１およびプレートＡ２を用いると、６分以内で線虫が拡散し終えた。本発明の線虫封入カプセルを用いた実施例９の線虫供給の結果と本比較例の結果を比べても、両者に大きな差はなく、従来の線虫供給方法の代替方法として本発明の線虫封入カプセルを用いることができることがわかった。

[0219] 〔実施例１０．線虫封入カプセルを用いた揮発性物質に対する線虫の応答評価試験〕

揮発性物質の一種であるジアセチル（１５℃におけるモル濃度１１．５Ｍ）およびジアセチルを１０倍と１０の５乗倍の２段階に希釈した希釈液を用いて、揮発性物質に対する線虫の応答評価試験を行った。なお、試験方法は、線虫トラップ用プレートを用いる方法とした。

[0220] まず、実施例１で用いたのと同じプレートＡ１の固体培地の左側に落とし込み槽を外周に沿って２つ並べて設け、右側の対照位置に落とし込み槽を同様にして２つ設けたプレートＡ３を作製した。左側の落とし込み槽内に試験対象の液体（以下では、「試験液」と示す場合がある。）を満たし、右側の落とし込み槽内に対照となる緩衝液を満たした。本実施例における試験液は、上述の通り、揮発性物質の一種であるジアセチルの希釈液である。なお、希釈には対照となる緩衝液を用いた。

[0221] 次いで、線虫の卵を封入して成虫まで成長させた線虫封入カプセル数個をマイクロピペットのチップの先で突いて外相膜を破り、当該カプセルから線虫を含む溶液を吸い出して、プレートＡ３の中心に滴下した。同様にして、同時に実験する濃度の異なる試験液のためのプレートＡ３にも、同じカプセル数個から吸い出した線虫を含む溶液を同量滴下した。当該溶液のその後、紙ワイパーで液成分を拭き取って、線虫をプレート上にリリースした。プレートに蓋を被せてパラフィンフィルムで密封した上で、遮光環境下で少なく

とも１時間静置した後に、落とし込み槽中に捕捉された線虫の数を計数した。

[0222] （実施例１０の結果）

試験液を満たした左側の２つの落とし込み槽のそれぞれに捕捉された線虫の合計数をN_1とし、対照の緩衝液を満たした右側の２つの落とし込み槽のそれぞれに捕捉された線虫の合計数をN_2とし、下記式で求められる値を化学走性指標（Ｃ．Ｉ．）と定義し、応答を評価した。

化学走性指標（Ｃ．Ｉ．）＝（N_1-N_2）／（N_1+N_2）

正の値は線虫が左側の落とし込み槽、すなわちジアセチルに誘引されたことを意味し、負の値は線虫が落とし込み槽から逃避したことを意味する。なお、試験は、試験液として、ジアセチルの３段階の希釈液を用い、全３濃度の試験液について実施した。独立して行った２回の試験におけるＣ．Ｉ．の値の平均値を図１９に示す。

[0223] 図１９に示す通り、１０倍希釈液では負の値となり、線虫がジアセチルから逃避したことが示された。一方、１０の５乗倍の希釈液では正の値となり、線虫がジアセチルに誘引されたことが示された。

[0224] 〔比較例２．従来の線虫供給方法による揮発性物質に対する線虫の応答評価試験〕

比較例として、従来公知の線虫供給方法に基づく線虫の応答評価を行った。実施例１０で用いたのと同じ、左右の対称位置に２つずつ落とし込み槽が形成されたプレートＡ３を用い、試験液は実施例１０と同じく、ジアセチルの２段階の希釈液とした。なお、希釈には対照となる緩衝液を用いた。

[0225] Ｗａｓｈ　ｂｕｆｆｅｒで予め洗浄した線虫を含む線虫液を線虫試験用プレートの中央に滴下し、紙ワイパーで液成分を拭き取って、線虫をプレート上にリリースした。プレートに蓋を被せてパラフィンフィルムで密封した上で、遮光環境下で少なくとも１時間静置した後に、落とし込み槽中に捕捉された線虫の数を計数した。

[0226] （比較例２の結果）

全３濃度の試験液について、独立して行った３回の試験におけるＣ．Ｉ．の値の平均値を図２０に示す。図２０に示す通り、１０倍希釈液では負の値となり、線虫がジアセチルから逃避したことが示された。一方、１０の５乗倍の希釈液では正の値となり、線虫がジアセチルに誘引されたことが示された。

[0227] 線虫封入カプセルによる供給方法で試験を行った実施例１０と、従来からの線虫供給方法で試験を行った比較例２の結果は、よく一致していた。このことから、卵の段階でカプセルに封入し、成虫まで成長させた線虫を用いて、問題なく線虫の応答評価試験を行えることは明らかである。

産業上の利用可能性

[0228] 本発明は、微生物実験、細胞培養実験、線虫を用いるがん検査、宇宙実験等、病害虫防除、教育、研究および産業の各分野における、線虫の準備および供給に関する潜在的な課題を解決する。本発明によって、各種生物実験の高効率化、低コスト化に大いに貢献するものと期待される。

請求の範囲

[請求項1] 線虫を含む封入組成物と、当該封入組成物を包含する少なくとも１層の皮膜と、を含み、

前記皮膜はカチオンと反応することによってゲル化する水溶性高分子を主成分として含む、線虫封入カプセル。

[請求項2] 外径が１０ｃｍ以下である、請求項１に記載の線虫封入カプセル。

[請求項3] 前記線虫がセノラブディティス・エレガンス（Caenorhabditis elegans）またはその近縁種である、請求項１に記載の線虫封入カプセル。

[請求項4] 前記水溶性高分子がタンパク質および多糖類からなる群から選択される少なくとも１種の水溶性高分子である、請求項１に記載の線虫封入カプセル。

[請求項5] 前記線虫が放射線照射された線虫である、請求項１に記載の線虫封入カプセル。

[請求項6] 前記線虫が孵化抑制剤で処理された線虫である、請求項１に記載の線虫封入カプセル。

[請求項7] 前記線虫が不妊化処理された線虫である、請求項１に記載の線虫封入カプセル。

[請求項8] 前記封入組成物はさらに孵化抑制剤を含む、請求項１に記載の線虫封入カプセル。

[請求項9] 前記線虫および前記水溶性高分子を混合して封入組成物を調製する工程と、

前記封入組成物と前記カチオンを含む溶液とを反応させて線虫封入カプセルを製造する工程を含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の線虫封入カプセルの製造方法。

[請求項10] 前記水溶性高分子を含む溶液と前記カチオンを含む溶液とを反応させて線虫封入カプセルの皮膜の基剤を調製する工程と、

前記基剤に前記線虫を注入することによって、線虫封入カプセルを

製造する工程を含む、請求項１～８のいずれか１項に記載の線虫封入カプセルの製造方法。

[請求項11] 前記線虫封入カプセルに放射線を照射する工程を含む、請求項９に記載の線虫封入カプセルの製造方法。

[請求項12] 前記線虫封入カプセルに放射線を照射する工程を含む、請求項１０に記載の線虫封入カプセルの製造方法。

[請求項13] 線虫試験用プレートの一部に、被験物を供給する工程と、

所定の位置に請求項１～８のいずれか１項に記載の線虫封入カプセルを供給する工程と、

前記線虫封入カプセルから前記線虫を放出させる工程と、

前記被験物に対する前記線虫の応答を評価する工程と、を含む、線虫の応答評価方法。

[請求項14] 前記被験物に対する前記線虫の応答を評価する工程が、一定時間経過後、前記一部に誘引されたまたは前記一部から逃避した線虫の数または当該線虫の数と相関する要素を計測する工程を含む、請求項１３に記載の応答評価方法。

[請求項15] 前記被験物が、匂い物質を放出する被験物または味を有する被験物である、請求項１３に記載の応答評価方法。

[請求項16] 請求項１３に記載の応答評価方法によって被験者から採取された生体試料に対する線虫の応答を評価する工程と、

前記評価によって当該被験者のがん罹患可能性を判定する工程と、を含む、がん検査方法。

[請求項17] 線虫試験用プレートの一部を、目的の温度に調節する工程と、

所定の位置に請求項１～８のいずれか１項に記載の線虫封入カプセルを供給する工程と、

前記線虫封入カプセルから前記線虫を放出させる工程と、

一定時間経過後、前記一部に誘引されたまたは前記一部から逃避した線虫の数または当該線虫の数と相関する要素を計測する工程と、を

含む、温度に対する線虫の応答評価方法。

[請求項18] 請求項１～８のいずれか１項に記載の線虫封入カプセルを含む、線虫応答評価キット。

[請求項19] がん検査用である、請求項１８に記載の線虫応答評価キット。

[請求項20] 請求項１～４のいずれか１項に記載の線虫封入カプセルを製造するための、製造キットであって、

線虫と、水溶性高分子と、カチオンの塩と、を含む、製造キット。

[請求項21] 請求項５に記載の線虫封入カプセルを製造するための、製造キットであって、

放射線照射された線虫と、水溶性高分子と、カチオンの塩と、を含む、製造キット。

[請求項22] 請求項６に記載の線虫封入カプセルを製造するための、製造キットであって、

孵化抑制剤で処理された線虫と、水溶性高分子と、カチオンの塩と、を含む、製造キット。

[請求項23] 請求項７に記載の線虫封入カプセルを製造するための、製造キットであって、

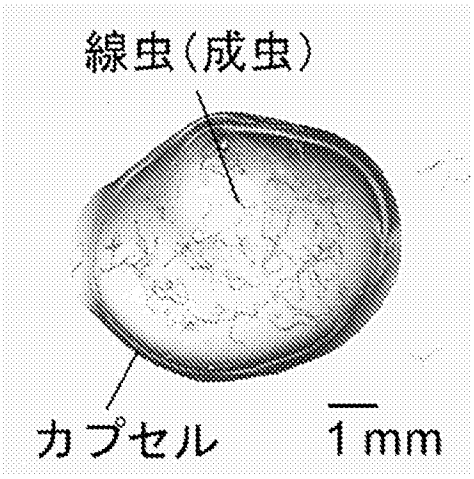
不妊化処理された線虫と、水溶性高分子と、カチオンの塩と、を含む、製造キット。

[請求項24] 請求項８に記載の線虫封入カプセルを製造するための、製造キットであって、

線虫と、水溶性高分子と、カチオンの塩と、孵化抑制剤と、を含む、製造キット。

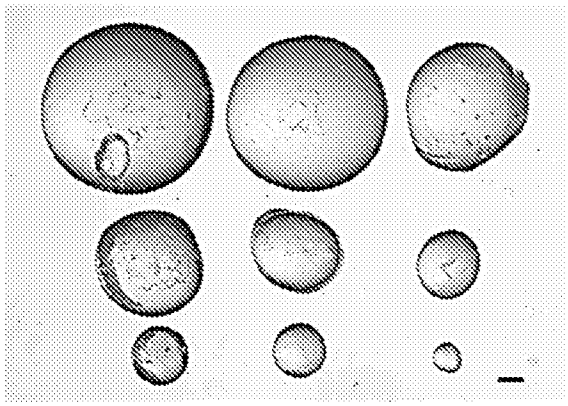
[図1]

図 1



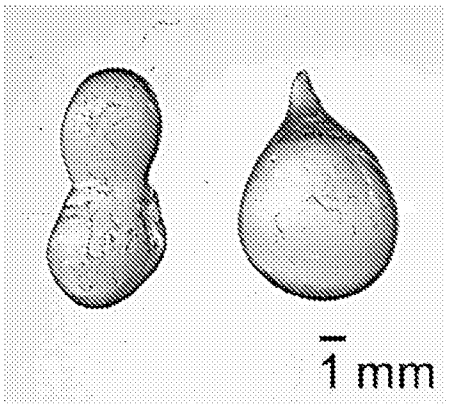
[図2]

図 2



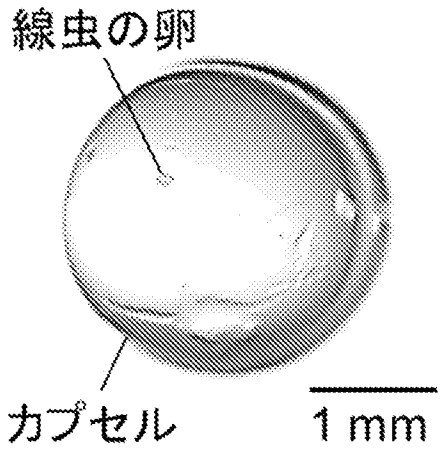
[図3]

図 3



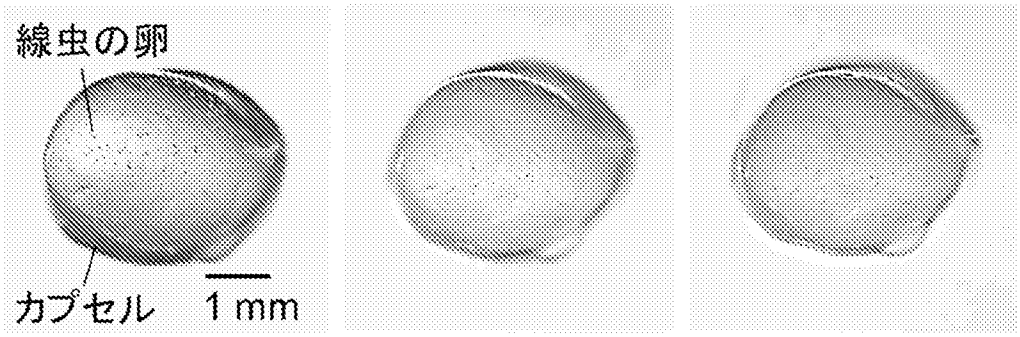
[図4]

図 4



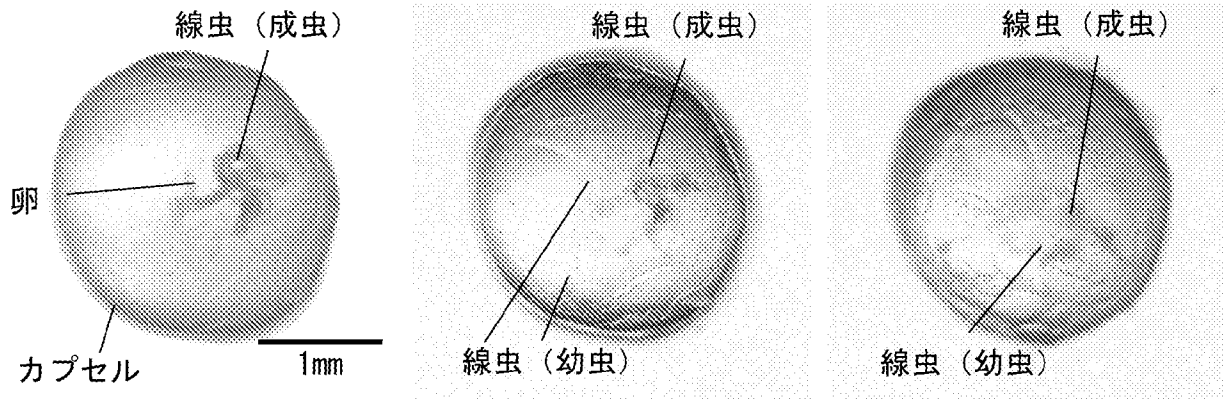
[図5]

図 5



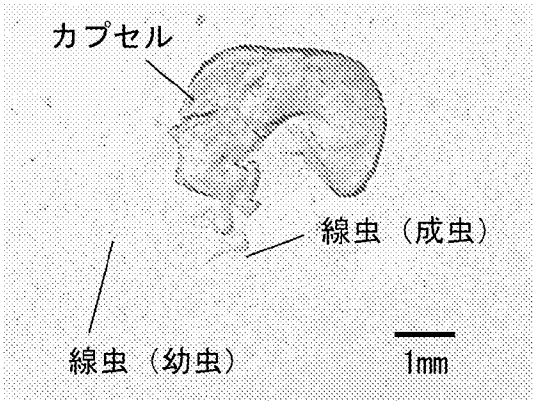
[図6]

図 6



[図7]

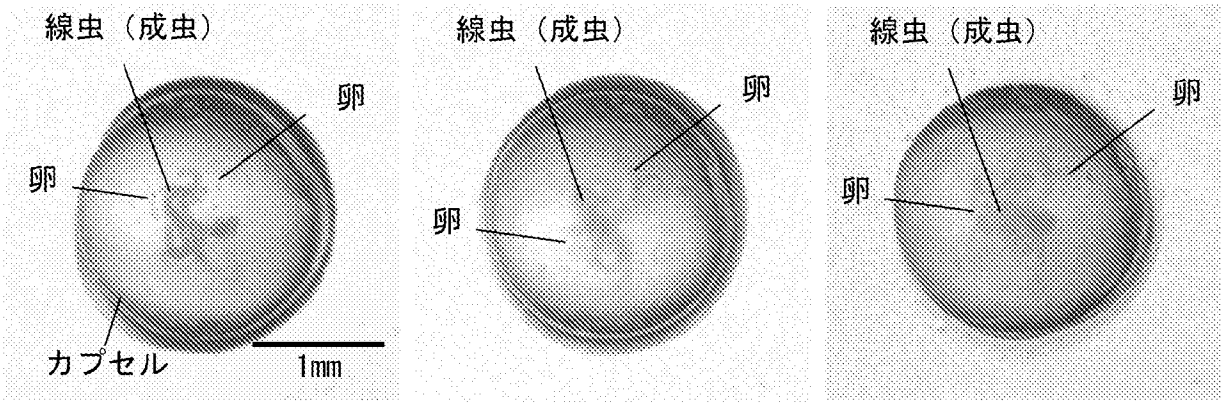
図 7



カプセル製造2日後

[図8]

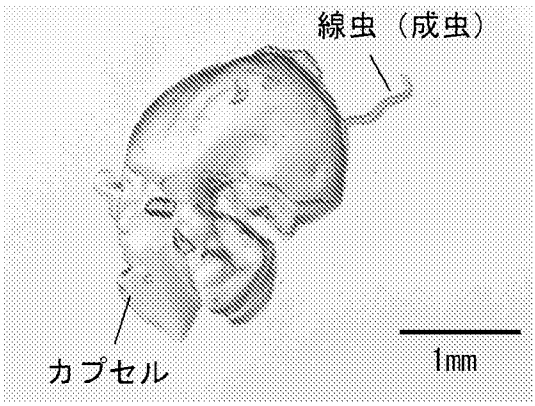
図 8



カプセル製造直後　1日後　2日後

[図9]

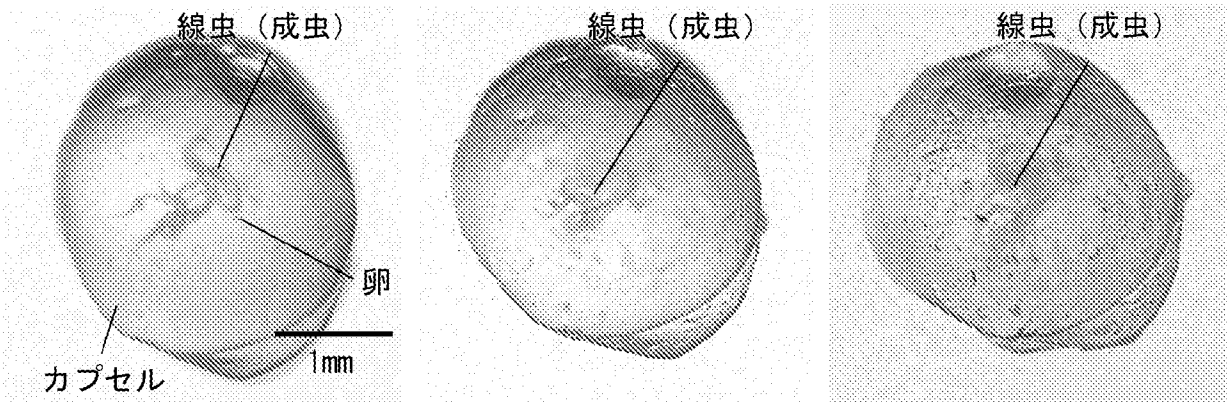
図 9



カプセル製造2日後

[図10]

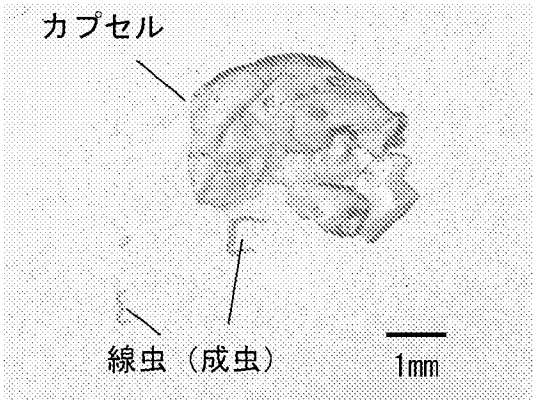
図 10



カプセル製造直後　1日後　2日後

[図11]

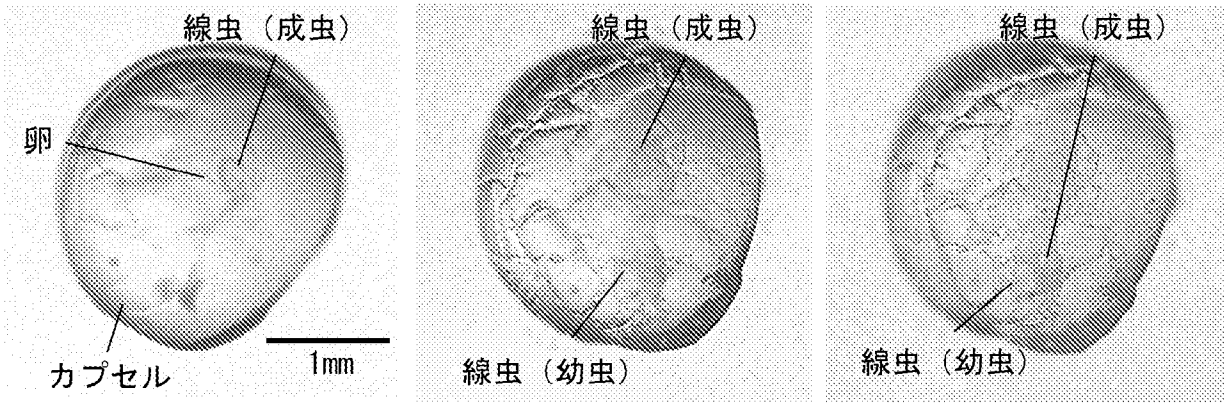
図 11



カプセル製造2日後

[図12]

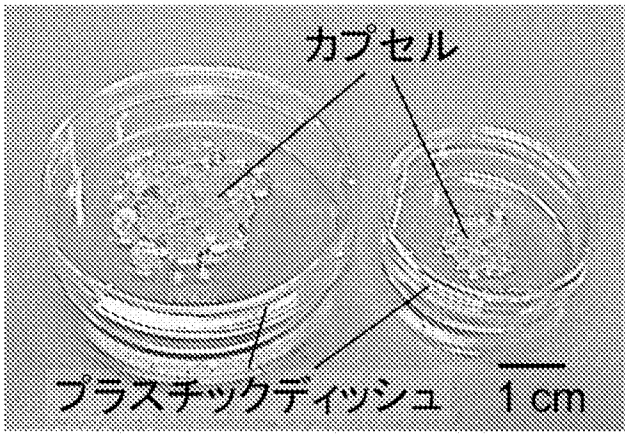
図 12



カプセル製造直後　1日後　2日後

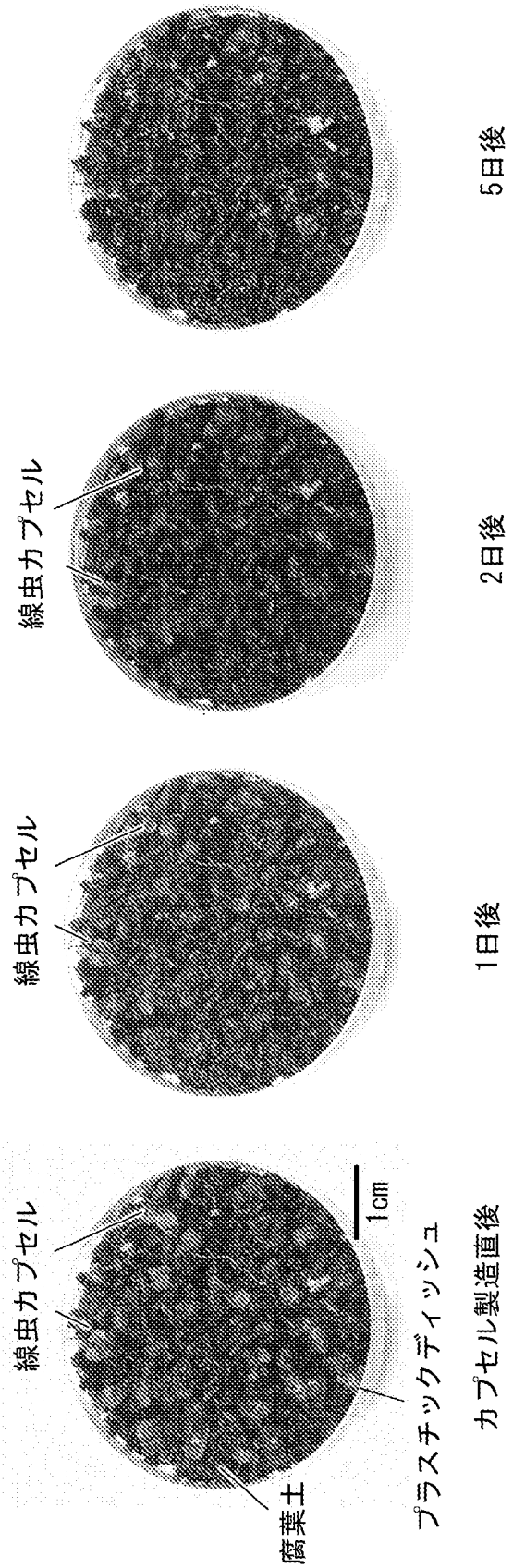
[図13]

図 13



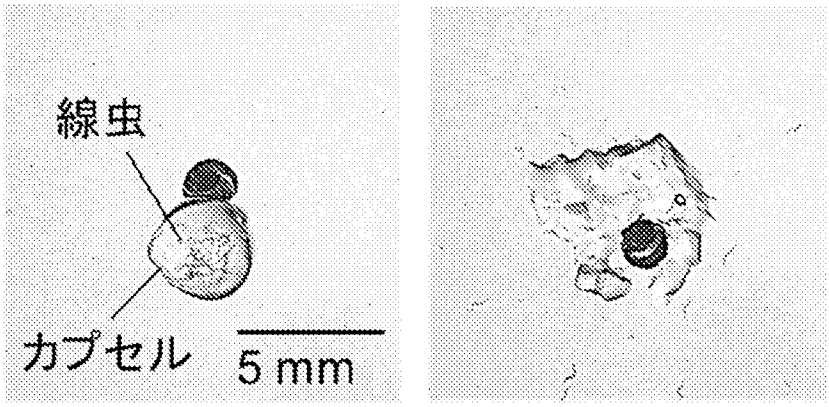
[図14]

図 14


線虫カプセル
腐葉土
1cm
プラスチックディッシュ
カプセル製造直後
線虫カプセル
1日後
線虫カプセル
2日後
5日後

[図15]

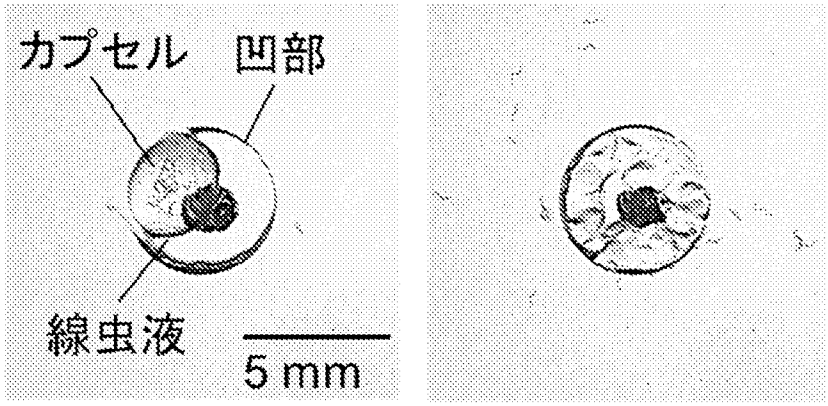
図 15



供給(静置)直後　　12分後

[図16]

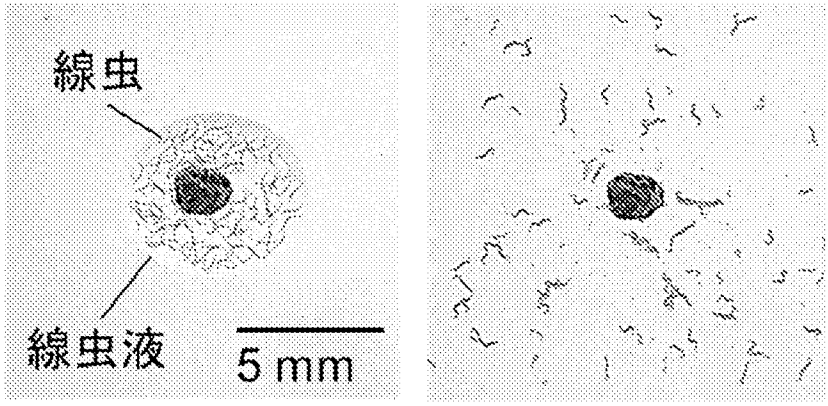
図 16



供給(静置)直後　　3分後

[図17]

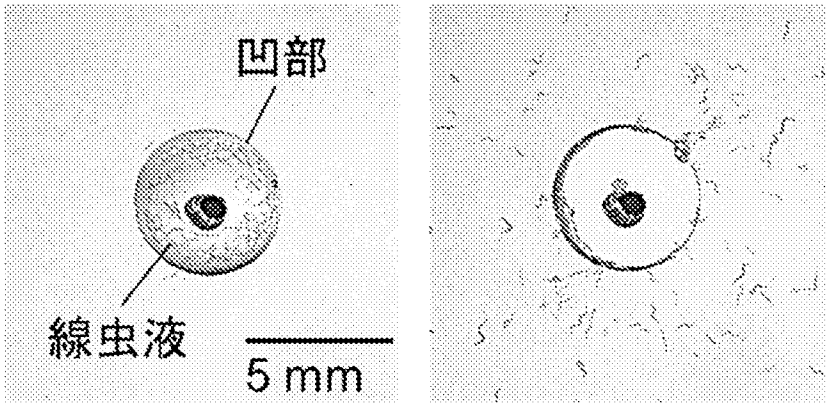
図 17



供給(滴下)直後　　3分後

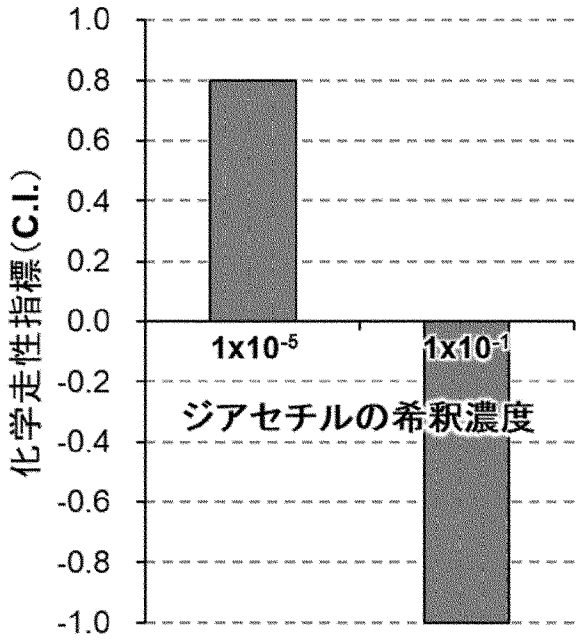
[図18]

図 18



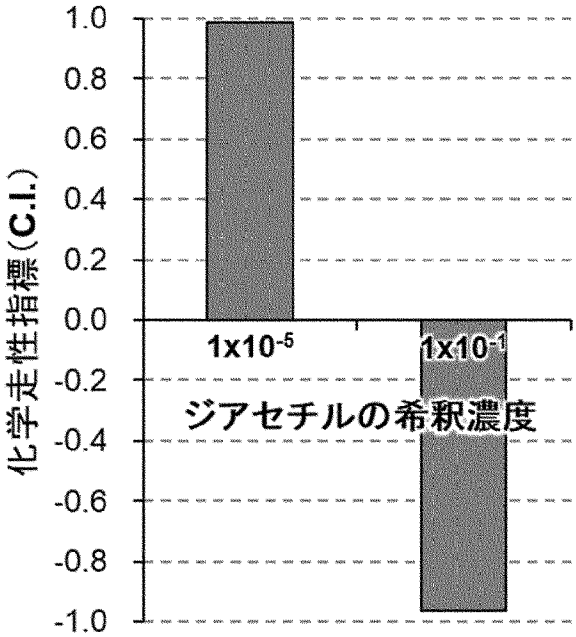
[図19]

図 19



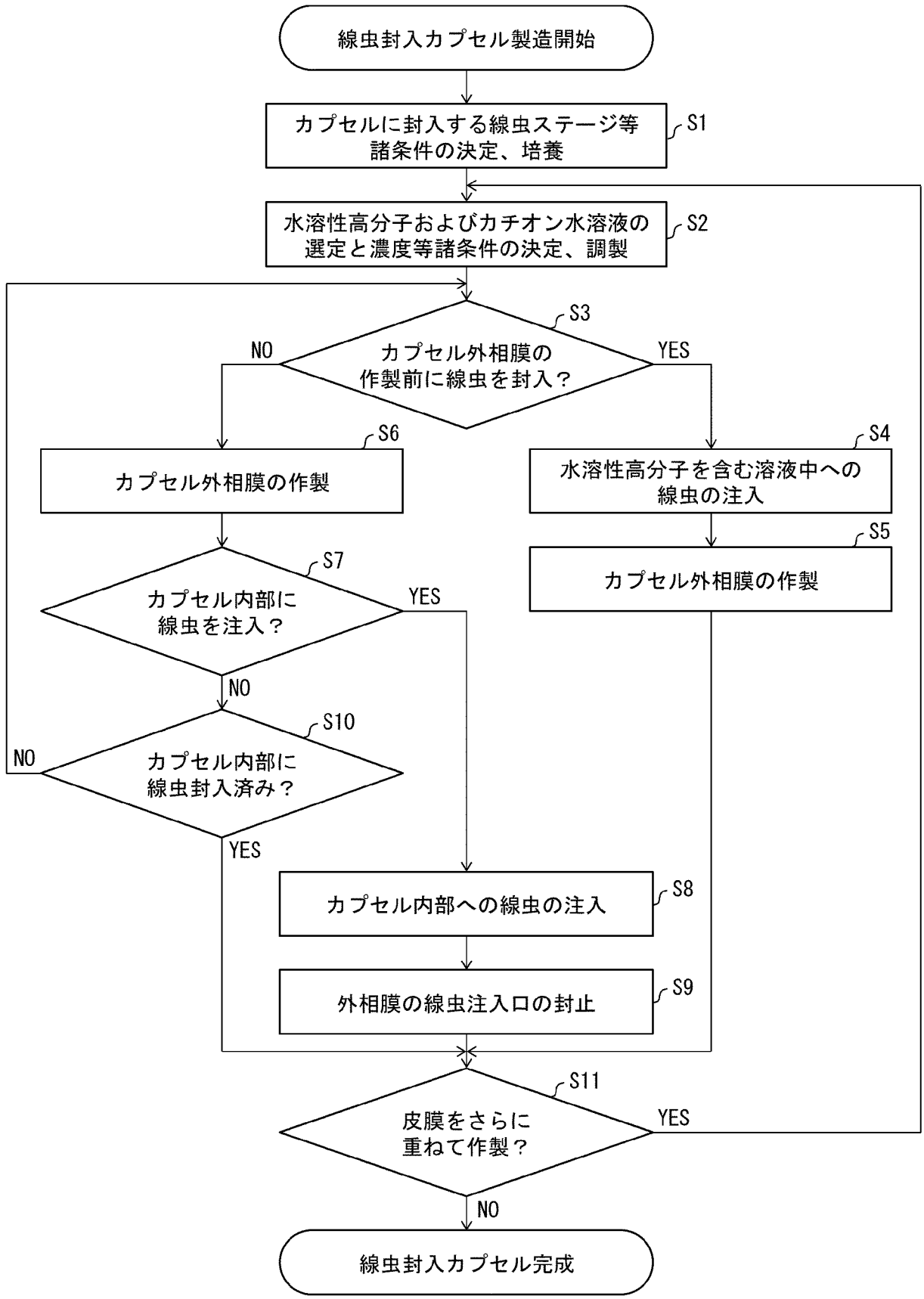
[図20]

図 20


1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
-0.2
-0.4
-0.6
-0.8
-1.0
化学走性指標(C.I.)
1x10-5
1x10-1
ジアセチルの希釈濃度

[図21]

図 21


線虫封入カプセル製造開始
カプセルに封入する線虫ステージ等
諸条件の決定、培養
S1
水溶性高分子およびカチオン水溶液の
選定と濃度等諸条件の決定、調製
S2
S3
カプセル外相膜の
作製前に線虫を封入？
NO
YES
S6
カプセル外相膜の作製
S4
水溶性高分子を含む溶液中への
線虫の注入
S5
カプセル外相膜の作製
S7
カプセル内部に
線虫を注入？
YES
NO
S10
カプセル内部に
線虫封入済み？
NO
YES
カプセル内部への線虫の注入
S8
外相膜の線虫注入口の封止
S9
S11
皮膜をさらに
重ねて作製？
YES
NO
線虫封入カプセル完成

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/JP2022/045039

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 11/04(2006.01)i; ***C12Q 1/02***(2006.01)i; ***G01N 33/48***(2006.01)i
FI: C12N11/04; G01N33/48 Z; C12Q1/02

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)

C12N11/04; C12Q1/02; G01N33/48

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 1971-2023
Registered utility model specifications of Japan 1996-2023
Published registered utility model applications of Japan 1994-2023

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KIM, J. et al. Calcium alginate beads as a formulation for the application of entomopathogenic nematodes to control rootworms. J Pest Sci. 26 February 2021, vol. 94, pp. 1197-1208 abstract, materials and methods, fig. 1	1, 2, 4, 6-10, 20, 24
A	WO 2020/218501 A1 (NATIONAL INSTITUTES FOR QUANTUM AND RADIOLOGICALSCIENCE AND TECHNOLOGY) 29 October 2020 (2020-10-29) entire text	1-24
A	BURNETT, K. et al. Rapid and gentle hydrogel encapsulation of living organisms enables long-term microscopy over multiple hours. Commun Biol. 2018, vol. 1, no. 73, pp. 1-10 results, fig. 1	1-24
A	JP 2021-26004 A (UNIV KUMAMOTO) 22 February 2021 (2021-02-22) entire text	1-24
A	WO 2019/225633 A1 (NATIONAL INSTITUTES FOR QUANTUM AND RADIOLOGICALSCIENCE AND TECHNOLOGY) 28 November 2019 (2019-11-28) entire text	1-24

☐ 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
07 February 2023	**21 February 2023**

Name and mailing address of the ISA/JP	Authorized officer
Japan Patent Office (ISA/JP) **3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915** **Japan**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2022/045039

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
WO 2020/218501 A1	29 October 2020	US 2022/0187274 A1 whole document	
JP 2021-26004 A	22 February 2021	(Family: none)	
WO 2019/225633 A1	28 November 2019	(Family: none)	

国際調査報告

国際出願番号
PCT/JP2022/045039

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（ＩＰＣ））

C12N 11/04(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; G01N 33/48(2006.01)i
FI: C12N11/04; G01N33/48 Z; C12Q1/02

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））

C12N11/04; C12Q1/02; G01N33/48

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	１９７１－２０２３年
日本国実用新案登録公報	１９９６－２０２３年
日本国登録実用新案公報	１９９４－２０２３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）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

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	KIM J. et al., Calcium alginate beads as a formulation for the application of entomopathogenic nematodes to control rootworms, J Pest Sci., 2021.02.26, Vol.94, pp.1197-1208 Abstract, Materials and Methods, Fig.1	1,2,4,6-10,20,24
A	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) 全文	1-24
A	BURNETT K. et al., Rapid and gentle hydrogel encapsulation of living organisms enables long-term microscopy over multiple hours, Commun Biol., 2018, Vol.1, No.73, pp.1-10 Results, Fig.1	1-24
A	JP 2021-26004 A (国立大学法人 熊本大学) 22.02.2021 (2021-02-22) 全文	1-24
A	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) 全文	1-24

☐ 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
07.02.2023	21.02.2023

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）
山本　匡子 4N 3038

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

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/JP2022/045039

引用文献	公表日	パテントファミリー文献	公表日
WO 2020/218501 A1	29.10.2020	US 2022/0187274 A1 whole document	
JP 2021-26004 A	22.02.2021	（ファミリーなし）	
WO 2019/225633 A1	28.11.2019	（ファミリーなし）	