

植物防疫基礎講座

土壌モデルを利用した線虫行動解析装置

中央農業総合研究センター 乙 部 和 紀

はじめに

「植物に寄生する線虫は土壌をどのように移動して植物に到達するのか？」という疑問は、線虫害の研究において、初歩的でありながらも重要な疑問である。例えば、移動様式が明らかとなれば、その移動を阻害する物理的要因もまた明確になるため、土壌環境に阻害要因を付加する方向で防除対策を考えることが可能となるであろう。

現在広く認められている線虫の移動様式に関する知見の多くは、光学顕微鏡を頼りに1970年代までに蓄積されたものである(CROLL, 1970)。それ以降、移動様式よりも移動理由(忌避、誘引など)の生理や遺伝学的解析に重点が置かれ、線虫の移動様式自体に関する研究は稀少となった。しかしながら、今日においても前出の疑問に対する明快な答えが与えられていないことを考えれば、移動様式に関する研究の余地はまだあるといえよう。

以下に紹介する線虫行動解析装置は、線虫の移動様式に関する疑問をあらためて問い直し、明確な答えを探るためのツールとして開発された。直接観察することの不可能な土壌中における線虫の行動を正確に推定するために、「詳細に観察可能」という要求と「土壌内の環境に近い」という要求の両方を満たすべく、最新のテクノロジーを利用して開発した土壌モデルがこの装置の要である。本稿ではこの線虫行動解析装置について、開発の元となっている作業仮説とともに、実施例を交えて概説する。

I 線虫の移動様式

1 水の表面張力を利用した移動

線虫の移動様式として知られている学説は、WALLACE (1959) の提唱した水膜表面張力の利用による移動説で

ある。線虫の単純な(平滑面上での)移動様式に関する理論であるが、様々な観察結果と合致するものであり、異論を差し挟む余地はない。観察の容易さも手伝って、今日では寒天ゲルプレート上での線虫行動(活動性、走性など)解析が定法として行われている。

上記学説の骨子を、以下にかいつまんで説明する。線虫の生息には水分の存在が不可欠であり、水没状態を除けば、線虫は図-1のように体表面が水の膜で覆われた状態で生息している。この水の膜は空気中の水滴と同じように、表面張力によりその形状が保持されている。そして水の膜内部には、膜表面から膜に対して垂直に内向きの力(水圧)が常に働いている。したがって、線虫はこの水滴内に閉じこめられているのと同じ状態であると考えてよい。一方、水の膜は線虫が置かれている平面とも接しており、水の膜が線虫の動きに連動して移動しようとしても、平面との摩擦力により水の膜と平面との境界線は動きが妨げられる。この力は線虫が平面から受ける摩擦力よりもはるかに大きいため、線虫は体を平面に対して平行に波打たせることにより、水の膜から受ける力と水の膜が平面から受ける力を足がかりにして体を移動させることができる。

ただし、水の膜の境界線を移動させなければ、線虫自身も移動することはできず、水滴内で全身を波打たせるだけに終わってしまう。そこで線虫が前進する場合には、

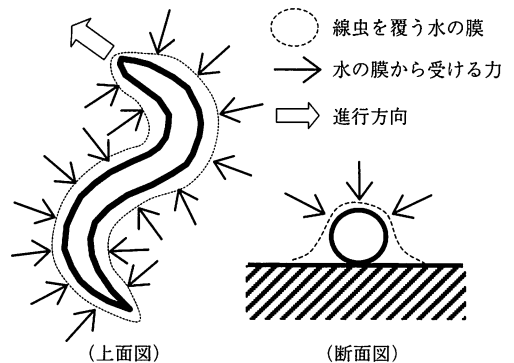


図-1 ゲルプレート上に置いた線虫の移動様式(模式図)
線虫は水の膜に覆われて移動する。

水の膜から受ける力を足がかりにして、頭部で水の膜を突き破って境界線を移動させている。こうすれば、頭部の受ける水の膜からの力が小さくて済み、なおかつ頭部の前進に追従して水の膜の移動を容易に起こすことができる。この繰り返しで、水の表面張力を利用した線虫の移動様式である。

2 土壤の微細構造を利用した移動

土壤は様々な大きさの粒子からできており、粒子間の空隙の形状・寸法もまた様々である。間げきはところにより数十～数百 μm 径の細孔を形成し、特に土壤団粒内部では細孔が発達している。土壤中での生息環境という観点からすれば、「平滑な寒天ゲル表面を移動することと、多孔性の土壤中を移動することが、等価であり得るのか?」という疑問が生じるのは自然な流れであろう。結論からいえば、「土壤構造とその内部の物理的要因(空げき率や水分など)が線虫の移動に影響を与える」という考え方が有力である。そのため従来から、実際に線虫が生息している環境と同じ、あるいは同等と見なされる土壤を充填したカラム(土壤モデル)内での移動が詳細に研究されてきた。

しかし、このような土壤モデルを用いた検証には以下の点に起因する困難が存在する:

- ①土壤内環境(構造, 水分など)の制御が難しい。
- ②土壤構造を常に同じ状態に作る事が難しい。
- ③どのように行動しているのかを逐一観察することが難しい。

①と②は、実験の再現性を確保するのが難しいことを表しており、その理由として粒子を充てんする際に必ず生じる粒子同士の摩擦や付着と、それによる空げき形成の不均一さが避けられないことがあげられる。③は、顕微鏡視野内での粒子による線虫像の隠蔽に起因しており、これもまた通常の土壤を利用する限りは避けられない。このため、土壤構造内での移動様式についてはあまり研究がなされず、いまだにあいまいなままである。わずかな例としては、粒子間空げきを水浸状態にすると、土壤粒子の粗さと線虫の体長との兼ね合いで移動速度が変化し、その際には粒子を足がかりにして線虫が移動しているという報告がある(WALLACE, 1958)。

II 開発に当たっての作業仮説

筆者の研究グループでは、線虫の行動と土壤の微細構造に関して次のような仮説を採用し、この仮説に基づい

て単純化を図った土壤モデルを製作し、線虫行動観察装置に取り入れた:

- ①土壤の微細構造は細孔同士がランダムにつながったネットワーク状になっている。
- ②線虫は移動に際して上下(重力)方向の認識をしない(すなわち細孔ネットワークは上下方向になくてもよい)。
- ③細孔壁面は親水性(濡れ性)が高い。
- ④湿度100%の細孔内は水滴が生じやすい(水に浸かった状態にある)。
- ⑤線虫が多く生息している土壤細孔径は30～90 μm 程度である。
- ⑥線虫は微細構造を足がかりとして移動できる。

上記の仮説はすべて従来から存在する仮説・知見によっているが、どれも実際の土壤レベルでの完全な実証には至っていない。④は実際の土壤レベルでは仮説の域を出ていないが、本装置を用いた実験では、この仮説を支持する現象が観察された。仮に土壤微細構造内環境が④の仮説通りであるとすると、水膜表面張力による移動様式は有効に働かない環境であることから、移動様式に関する議論において重要な要素となる可能性がある。

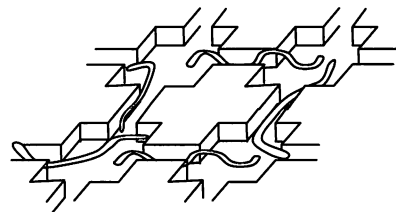


図-2 細孔ネットワーク内を移動する線虫(模式図)

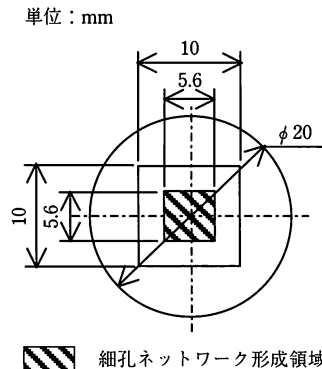


図-3 シリコンゴム製土壤モデル基板の平面図(基板の厚さ: 2 mm)

III 装 置 概 要

本装置を簡単に説明すると、土壌団粒内部の空げきに相当する直径の細孔を一定間隔で2次元的に配置した透明基板(土壌モデルに相当)を用いて、細孔内に閉じこめた線虫の移動様式を顕微鏡で観察する装置である。観察のイメージとしては、図-2のように凹凸がある平面(ただし、上からガラス板でふたをされている)の凹部分(細孔)内に行動が制限された状態の線虫が体を波打たせて移動する様子を、上方または下方から観察する形である。以下にその詳細を説明する。

1 微細加工による土壌モデル

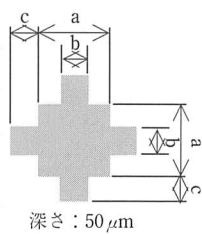
製作した土壌モデルは図-3に示したシリコンゴム製の円形平板であり、その片面中央部に幅と深さが数十 μm の流路(細孔)が規則的に直交したネットワーク状に微細加工されている。細孔形成領域の外側(10 mm角の正方領域との間)は流路と同じ深さで、平滑な広場を形成している。今回実験に用いた基板は2種類で、表-1に示した寸法で要素形状を配置して粗さや細孔径の異なる細孔ネットワークが形成されている。参考までに、1基板に同時形成可能な要素形状・寸法の種類は1種類に限らず、多様な形状・寸法のパターンを1基板上に形成する手法も既に確立されている。

2 土壌モデルの格納

土壌モデルを図-4のようなガラス製容器に格納してふたをすると、2枚のガラス平板で挟み込む構造になり、

表-1 細孔ネットワーク構成要素の寸法

細孔タイプ	寸法 (μm)		
	a	b	c
稠密型	100	40	50
粗大型	200	80	100



流路は上下が密閉されて細孔ネットワークが形成される。この装置構成の利点は、行動可能範囲が2次元平面内に限定されるため、顕微鏡により移動様式を詳細に観察可能なことである。また、ふたの細孔形成領域中央に接する部分に貫通穴(直径約2 mm)を設けることで、ガラス平板でふたをしたまま、細孔内に線虫を導入できるように工夫されている。この穴に注入された懸濁液中の線虫は自重で沈降して細孔形成領域に到達した後、無作為的な動きに伴ってガラス平板下の細孔にもぐり込む。

3 微細加工による土壌モデルの特徴

微細加工技術の詳細な説明は割愛するが、大まかにいえば、近年確立されたシリコンゴムのマイクロモールド(微細型取り)技術を用いて上記基板を作製している。この手法の特長は、鑄型があれば数 μm 程度の微細な立体構造を有する基板でも、低コストで精密に製造可能な点にある。

シリコンゴムは架橋硬化後、化学的に安定化するため、化学物質に対する線虫の行動様式を解析するうえで、化学的にクリーンな環境を提供できる。その一方で、安定であるがゆえに化学的な修飾などの表面改質が困難で、扱いにくいというイメージもある。実際には、シリコンゴムの表面改質に関する技術開発は工業的なニーズも多いことから進んでおり、表面に様々な官能基を導入する表面処理剤により、容易に表面の化学修飾を実現できる。特にシリコンゴムはそのままでは表面が極端な疎水性であるため、用いる土壌モデルは親水化するための表面処理剤により表面を親水化している。

従来から、2次元的に配置したガラスビーズや土壌粒子で構成された土壌モデルを利用して、線虫の移動様式を詳細に解析しようという試みがなされてはいるが、粒子の充てんにより再現性よく微細な空げきを形成することは至難の業である。微細加工技術はこの点を克服するうえでうってつけの技術であり、マイクロモールド技術

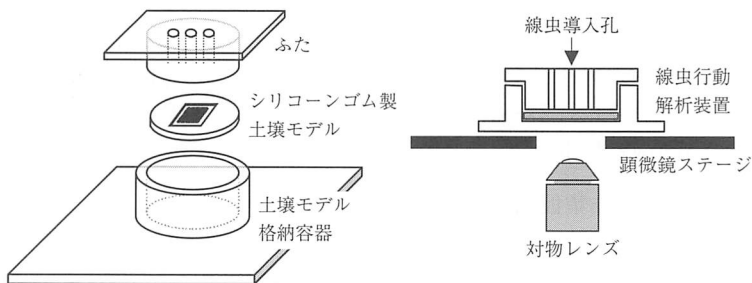


図-4 線虫行動解析装置の構成(左図)と倒立顕微鏡による観察のしかた(右図)

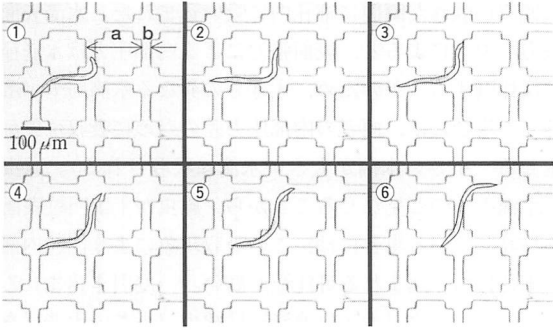


図-5 細孔ネットワーク（稠密型）内をサツマイモネコブセンチュウ二期幼虫が移動する様子の連続写真（aは細孔間隔（200 μ m）、bは最小細孔幅（40 μ m）を示す）

の確立により本装置が実現できたともいえる。

4 使用方法

観察直前に、あらかじめ水約2mlを容器に入れてから、微細加工面を上にして基板を完全に水没させて格納し、その上から容器のふたを基板に押しつけて密着させる。この際、観察の目的にもよるが、表面についた気泡は完全に除いておく必要がある（移動阻害要因となるため）。続いて、ふたの線虫導入孔（直径約2mm）から水に懸濁した状態の線虫をマイクロピペット等により5 μ l（目安として20頭程度）注入することで、水中を沈降した線虫が微細加工面に導入される。流路内は導入孔部分を除いて、ガラスとシリコンゴムにより密閉されているため、水の移動がほとんど生じない。線虫サイズの世界では、水の移動は台風にも等しいため、データの再現性を確保するうえでもこれは重要な条件である。

IV 行動解析

サツマイモネコブセンチュウ二期幼虫の移動様式を本装置により観察した例を以下に示す。移動要因の解析を単純化するため、細孔ネットワークが完全に水浸しており、かつ細孔内に気泡が全く存在しない状態で観察を行った。

1 移動速度の計測

試作した土壌モデルの細孔配置は規則的であることから、一定時間にいくつの細孔を移動したかを数えるだけで線虫の移動速度を計算することができる。線虫導入孔から細孔ネットワーク中に導入された二期幼虫は、細孔の凹凸を足がかりとして図-5のように身をよじりなが

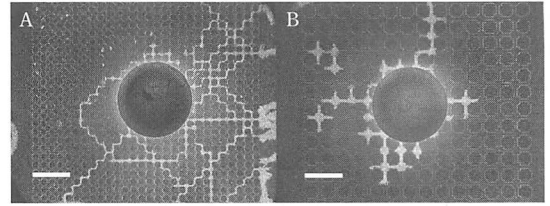


図-6 稠密型（A）と粗大型（B）の細孔ネットワークにおけるサツマイモネコブセンチュウ二期幼虫の移動様式の違い
白い軌跡は10分間の移動経路を表す。

ら移動する様子が観察された。移動速度を測定した結果では、最速の場合に5mm/minの速さでネットワーク内を移動した（この計測に用いた基板は稠密型で、10秒間の連続移動距離から計算した値である）。これはあくまでも規則的な微細構造内での結果ではあるが、身体能力のポテンシャルとして、実際の土壌中においても阻害要因がなければ同等の速さで移動できると考えられる。

2 細孔ネットワーク構造の影響

微細加工面が平滑であることから、位相差検鏡による線虫の高コントラスト観察（暗視野に対して線虫が白く浮き出る）を行うと、データ解析しやすい。ビデオ画像を撮影しておけば、画像処理により線虫画像を抽出可能であり、時系列画像データから移動軌跡を容易に描くことができる。この方法により、線虫の移動性に対する流路ネットワーク構造の影響を可視化した結果を示す（図-6）。線虫の移動軌跡はネットワーク内の白い軌跡として現れている。太い軌跡は線虫の動きが停滞していることを表し、細い軌跡はスムーズに移動したことを表す。図-6Aより、稠密型の細孔ネットワーク中では、一定時間内に長距離の移動を示す軌跡が多数みられる。これに対して粗大型（図-6B）では、短距離の移動軌跡しかみられないことから、細孔が大きく、間隔が粗いほうが線虫の移動を制限する傾向があると考えられる。以上の結果から、細孔ネットワークの粗さが線虫の移動距離に大きく影響を及ぼすことが示された。

V 移動阻害要因

本装置を用いて、これまでに様々な条件でサツマイモネコブセンチュウ二期幼虫の行動を観察した結果、目にする機会がないために見過ごされていた現象がクローズアップされてきた。線虫行動観察装置による実験プロト

コル確立の過程で明らかになった現象であるが、このような微細構造由来の物理現象が線虫行動に及ぼす影響について以下に述べる。

1 気泡

1 mm に満たない体長の線虫にとっては、細孔内での表面張力は壁にも等しいことが、気泡を細孔内に形成した状態で実施した実験において観察された。その際、二期幼虫は気泡に遭遇すると、細孔壁面に足がかりとなる突起がなければ気泡を通過できずに、その場に滞留する傾向がみられた。このような現象が実際に土壌内で起きているとすれば、気泡生成量のばらつきが土壌を用いた移動現象の解析を困難にする要因となることは、容易に想像できる。

2 細孔内における粘度増大

細孔サイズの微細化に伴う粘度の急激な増大は、一たび通水された細孔内の水を強固に保持する役割を果たす。線虫行動解析装置においても土壌モデル格納の際に起こりやすいが、大きな気泡の混入により細孔ネットワーク内の水が押し出された後に、水滴がところどころ残る現象として現れる。一度この状態になると水を入れ直すだけでは気泡が残り、土壌モデル基板を取り出して風乾してから、あらためて容器内に設置し直す以外に回避する方策がない。実際の土壌においても、重力水が抜けた後の土壌には水浸状態または気泡が混在する細孔が多数生じていると推測される。

3 細孔内圧力変化による水滴の生成

水浸せずに湿度 100% の状態にした線虫行動解析装置の細孔内部では、わずかな圧力変化により水滴を生じる現象が観察される。この現象は、線虫の移動を阻害する要因となるため観察時には避けたい現象であるが、土壌モデルにふたを押しつける圧力をわずかに変えるだけで容易に生じる。そのため、湿度 100% で全く水滴のない環境を作り出して線虫行動を観察するには技術を要する。これはモデル土壌特有の現象ではなく、高湿度条件にある土壌内の細孔においても、わずかな気圧変動で液滴が生じやすい状態にあると考えられる。

4 表面張力による細孔内への引き込み

この現象は、土壌モデルの細孔ネットワーク内だけを水浸（外側の平滑領域には水がない）状態にして二期幼虫の移動を観察している際にみられた。このとき、水のない平滑領域に取り残された二期幼虫は、表面張力だけを利用して細孔ネットワーク領域に移動し、細孔の水滴

に頭部が触れた瞬間に細孔内に吸い込まれた。水滴表面張力の力学によると、表面張力による内部圧力は水滴径に反比例する。そのため、大きさの異なる水滴同士が遭遇した場合には、両者の内部圧力差のために吸収現象が生じる（小さい水滴が大きい水滴に吸収される）。線虫も水滴の一つと見なせることから、線虫が土壌団粒表面を移動している場合には、この吸収現象により団粒内部の細孔に引き込まれる可能性が高い。一度引き込まれると、細孔内の水（大きい液滴）は線虫（小さい水滴）を内部圧力差により常に引きとめる作用をする。このようなメカニズムにより、線虫は土壌細孔内にトラップされた状態に陥りやすいと考えられる。

おわりに

現在、食性の異なる多様な線虫を供試することにより、「植物への寄生」という生活様式に寄与する土壌内の物理的・化学的要因の探索を本装置により推進している。物理的要因については、土壌環境において普遍的に存在する移動阻害要因にもかかわらず、現実には植物寄生線虫が土壌内を移動して植物の根に到達するという事実が、最大の謎として立ちはだかっている。現時点では、土壌中のわずかな水の移動が線虫の行動に大きな影響を与えうることを示唆するデータ（未発表）が得られており、走性との関連から仮説を構築して研究を進めている。また、センサ化への取り組みとして、デジタル顕微鏡一体型のポータブルな線虫行動解析装置を民間企業と共同で開発中である。将来的には「行動」という側面から、線虫の土壌中での活動制御につながるような知見を生かした、環境にやさしい線虫防除法の開発などにつなげることができれば、これに勝る喜びはない。

最後に、本研究の推進に当たっては、独立行政法人農業・生物系特定産業技術研究機構中央農業総合研究センター虫害防除部線虫害研究室水久保隆之室長、ならびに同機構北海道農業研究センター生産環境部線虫研究室伊藤賢治主任研究官の多大なご支援をいただいております。この場をお借りして感謝申し上げます。また、本研究は平成 15 年度環境省環境技術開発等推進事業の支援のもとで実施されたことを申し添える。

引用文献

- 1) CROLL, N. A. (1970) : The Behaviour of Nematodes, Edward Arnold Ltd, London, 117 pp.
- 2) WALLACE, H. R. (1959) : Ann. Appl. Biol. 47(2) : 366 ~ 370.
- 3) ——— (1958) : ibid. 46(1) : 86 ~ 94.