明　細　書

発明の名称 ： ハエの抗菌ペプチド誘導方法および装置

技術分野

[0001]　本発明は虫、特に昆虫、例えばイエバエで抗菌ペプチドを誘導（生産）する方法および装置に関するものである。

背景技術

[0002]　抗菌ペプチドとはアミノ酸が連なって形成された細菌、ウイルス、真菌などに抗菌作用を示すペプチドの総称で、新しい抗菌薬や防疫手段の開発が期待されている。特に、抗生物質が添加された飼料添加剤は動物またはヒトに使用される抗生物質に対する耐性を示すスーパー細菌の出現につながり、使用規制が強化されているので、抗生物質に代わる安全で環境に優しい代替物質が添加された飼料添加剤としての抗菌ペプチドの開発が要求されている。

[0003]　［特許文献１］（特許第３６６１５４９号明細書）にはセンチニクバエ由来の抗菌活性を示す２６－ｋＤａプロテアーゼの部分ペプチドと、それを含有する抗菌剤が記載されている。このポリペプチドはセンチニクバエの蛹中期の幼虫中に腸内でのみ出現する２６－ｋＤａプロテアーゼで、グラム陽性細菌に対して選択的な抗菌活性を発揮する２３９個のアミノ酸から構成される直鎖ポリペプチドである。

[0004]　抗菌ペプチドを誘導するために生物、例えば昆虫に傷を付ける方法は古くから用いられている。例えば、［特許文献２］（特許第２６７１９１２号明細書）にはタイワンカブトムシ幼虫の体表傷害時にその体液中に抗菌性蛋白が誘導されることが記載されている。また、［非特許文献１］(Kawasaki et al. Drug Discoveries & Therapeutics 2017, page 1-5, Advance Publication)では、針で傷をつけたイエバエの幼虫から回収された体液が、黄色ブドウ球菌や緑膿菌などのグラム陽性菌とグラム陰性菌両方に対してはっきりとした抗菌活性を示すことが確認され、加熱処理後も抗菌活性が体液中に優位に保持されることから、傷をつけた幼虫は抗菌剤の医療資源であることが示さ

れている。

[0005] 上記の傷を付ける作業は一般に個々の個体、例えば各昆虫に針を刺す作業であり、非効率で手間がかかる作業である。すなわち、イエバエの幼虫は蛹になる直前に最大に成長するが、その段階でも１匹（１頭）当たり２５ｍｇと小さく、その全てに適切に針で傷をつけるのは手間がかかる作業で、技量も必要になり、傷の付け方で誘導効果に相違が生じる。例えば、イエバエの幼虫のどの部分に針を刺すかで誘導効果に差が生じる。脂肪体を刺激すればよいとの報告もあるが、抗菌ペプチドの誘導機構はまだ正確には解明されていない。

[0006] ［特許文献３］（特開２００９－２６８４４８号公報）にはセンチニクバエの幼虫を水分維持下で餌から隔離して待機させた後、冷却麻酔して刺傷し、抗菌ペプチドを産生させる装置が開示されている。この特許ではトレイ上の多数の３齢幼虫を画像処理し、各３齢幼虫の位置情報を求め、上下駆動される針で真上から３齢幼虫の一匹ずつに刺傷を与える。この場合、幼虫の刺傷は幼虫をほぼ貫く程度に行われるが、自己治癒力により数分以内に傷口が塞がるため体液が漏洩することはないとされている。

[0007] しかし、幼虫の表皮を構成するタンパク質は固く、１０匹も針で傷をつけると針先が丸まってしまい、その後も無理に傷をつけようとすると幼虫を死なせてしまう。そのために頻繁に針を交換する必要があり、手間と費用が大量生産を阻んでいた。そのため、ハエ幼虫を針で傷付けるのではなく、ハエ幼虫を遺伝子組換えし、遺伝子組換え後のハエ幼虫を用いて抗菌ペプチドを誘導（産生）して生物飼料添加剤を製造する方法が提案されている（［特許文献４］（中国特許第ＣＮ１１４４５９７号明細書）参照）。

[0008] 本発明者は、針によって幼虫を傷つける方法よりもコストがかからない方法がないものかと色々と試してきた。「塩酸や硫酸を幼虫に滴下する方法」、「サナギタケのような幼虫に寄生するキノコの菌糸、胞子で幼虫を刺激する方法」、「急激な温度変化によるストレスを幼虫に与える方法」等を試してきたが、イエバエ幼虫の抗菌ペプチドを効果的に誘導する方法は見付から

なかった。

[0009] 本発明者は、レーザ照射で幼虫に傷を付けることでイエバエ幼虫に抗菌ペプチドを効果的に誘導できないかと考えたが、イエバエ幼虫にレーザを単に照射しただけではイエバエ幼虫が全滅してしまった。これはレーザの出力が大きすぎたと考え、レーザ照射の出力を小さくした実験を繰り返してレーザ照射後の幼虫の生存率を上げることには成功したが、抗菌ペプチドを誘導することはできなかった。すなわち、「イエバエ幼虫にレーザを照射」したときの生存率は上昇できたが、抗菌ペプチドの誘導はできなかった。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：特許第３６６１５４９号明細書

特許文献2：特許第２６７１９１２号明細書

特許文献3：特開２００９－２６８４４８号公報

特許文献4：中国特許第ＣＮ１１４４５９７号明細書

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Kawasaki et al. Drug Discoveries & Therapeutics 2017, page 1-5, Advance Publication

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 本発明の目的は、イエバエ幼虫にレーザを照射した時のイエバエ幼虫の生存率を上昇させ、しかも、抗菌ペプチドの誘導効率を高くすることが可能なイエバエ幼虫に抗菌ペプチドを効率的に誘導（生産）させる方法を提供することにある。

本発明の他の目的は、抗菌ペプチドの生産効率を上げることが可能な抗菌ペプチド生産方法および装置を提供することにある。

本発明のさらに他の目的は、イエバエ幼虫に抗菌ペプチドを効率的に誘導（生産）させるためのレーザの利用にある。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明の第１の対象は、虫に損傷を与えることによってその虫に抗菌ペプチドを誘導させる方法において、虫の表皮にレーザを照射し、その虫に回復不可能なダメージを与えない状態で、レーザビームによって昆虫の表皮を貫通する穴を開けて虫に損傷を与えることを特徴とする虫に抗菌ペプチドを誘導させる方法にある。

[0014] 本発明の好ましい実施態様では、上記の虫はイエバエの幼虫であり、レーザはCO_2レーザであり、イエバエの幼虫の表皮を貫通する穴の直径は１～３００μｍである。

[0015] 本発明の好ましい実施態様では、凍る直前の温度で虫の幼虫の動きを封じた状態で幼虫にレーザを照射する。

[0016] 本発明の好ましい実施態様では、レーザ照射後に、レーザ照射されたイエバエの幼虫を湿球温度２０℃～３５℃の環境に移し、３時間～４８時間サナギにならないようにして幼虫自身に抗菌ペプチドを誘導させる。

[0017] 本発明の好ましい実施態様では、イエバエの幼虫を２０℃～３５℃に維持した浸透圧に近い液体を含む濡れた表面上に配置し、その液体に触れさせて蛹化を抑制する。

[0018] 本発明の好ましい実施態様では、CO_2レーザ照射装置と、虫の位置情報を求める位置情報取得手段と、この位置情報取得手段で求めた虫の位置情報を虫の位置情報に伝達する手段とを含む本発明方法で使用する装置にある。

[0019] 本発明の好ましい実施態様では、上記装置は虫の幼虫を凍る直前の温度まで冷やして虫の幼虫の動きを封じた手段をさらに含む。

[0020] 本発明の第３の対象は、虫の表皮を貫通する穴を開けることによって虫の体内に抗菌ペプチドを誘導させる方法でのCO_2レーザの使用にある。

図面の簡単な説明

[0021] [図1]本発明方法を説明するための概念図。

[図2]イエバエの幼虫群にレーザビームをスキャン照射する時の概念図。

[図3]本発明の抗菌ペプチド誘導方法を画像処理装置を用いて実行する時の概

念図。

[図4]イエバエの幼虫群のカメラ撮影画像を二値化処理して得たイエバエの幼虫群の位置情報を示す概念図

[図5]画像処理システムの一つの実施例で使用する画像処理のフロー図。

[図6]精密な位置情報から得られるイエバエ腹部位置の画面表示。

[図7]各イエバエの腹部を識別するときの画像処理の一つの実施例の概念図。

[図8]本発明の実施例および比較例の抗菌活性測定結果をまとめて示す図で、図の縦軸は黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ）を示す。

[図9]実施例１でレーザ照射を行った時にイエバエ幼虫の表皮に約２５０μｍの穴が開いていることを示す写真。

[図10]比較例５でＵＶレーザ照射を行った時にイエバエ幼虫にレーザビームが当たった時にイエバエ幼虫の表皮に穴が開かないことを示す写真。

発明を実施するための形態

[0022] 「虫」とは、一般には節足動物の昆虫を意味するが、本明細書では学問上の厳密な分類にこだわらずに、ミミズ、クモ、ムカデ、カタツムリ等を含む多様な小動物を含む意味で使用する。本発明はハエ、ミズアブ、ミールワーム、コオロギ、カイコ等に好ましく適用でき、とくにハエ、ミズアブ、ミールワームに好ましく適用できる。

[0023] 本明細書ではイエバエ（Musca domestica）を例にして本発明を説明するが、本発明はイエバエに限定されるものではなく、本発明方法が適用可能な限り、昆虫を含む任意の「虫」に適用可能である。また、虫の幼虫について説明するが、本発明方法は虫の幼虫だけでなく、蛹と成虫にも適用できる。

[0024] イエバエはその表面に共生しているグラム陰性桿菌との栄養塩競合によって真菌の増殖を抑制しており、体に損傷を受けた際に抗菌ペプチドを誘導すると考えられている。従って、その体に損傷を与えることで抗菌ペプチドの産生を促進できる。

[0025] 本明細書で「その虫に回復不可能なダメージを与えない状態」とは、虫が抗菌ペプチドを誘導する前に死んでしまわない状態を意味する。本発明方法

ではレーザを照射後に３時間～４８時間の抗菌ペプチド誘導時間が必要であり、この抗菌ペプチド誘導時間中に虫が死なないことが望ましい。一般には乾燥または冷凍、冷蔵することによる保存措置を行い、飼料として提供する。蛹にすると抗菌ペプチドが消失する可能性があるので一般には蛹にはしない。

[0026] 虫の用意

イエバエ幼虫は本出願人の特許（特許文献５、特許第５５７９１２２号明細書）に記載の方法で供給できる。

特許文献5：特許第５５７９１２２号明細書

[0027] 本発明方法が適用可能な他の虫、例えばミミズ、ミールワーム、コオロギ、カイコ等の生育、飼育方法は多数の特許文献に記載されている。

[0028] 本発明方法では、イエバエの成虫が産卵した卵から成長させ、幼虫を飼育し、蛹変態前の３齢幼虫を使用する。上記特許文献５では幼虫の皮膚に擦過傷を付けることで抗菌ペプチドを作らせているが、本発明ではレーザ照射によって幼虫の皮膚に穴を開けて抗菌ペプチドを作らせる。

[0029] レーザ照射

「レーザビームによって虫の表皮を貫通する穴を開ける」とは、レーザビームを照射して虫に単にストレスを与えるのではなく、レーザビームによって虫の表皮を貫通する穴を実際に開けることを意味する。虫の表皮を貫通する穴を開けることが可能なレーザの種類とレーザビームの強度および照射時間は、虫の種類および使用するレーザ照射装置の種類に依存し、実験で簡単に決定できる。

[0030] イエバエの成虫の場合には、虫の表皮を貫通する穴の寸法は一般に１～３００μｍの範囲、好ましくは１０～２５０μｍの範囲にするのが好ましい。１μｍ以下では本発明の効果は期待できず、３００μｍを超えるとイエバエの成虫のダメージが大きくなる。

[0031] 「レーザ」の種類は虫の表皮を貫通する穴を開けることが可能なものであれば任意のレーザが使用できるが、一般にはCO_2レーザが使用される。種々

のレーザ照射装置が市販されているが、本発明では種々のワーク（works）上にマークを刻む（印字）するのに使用するレーザマーカとして市販の装置が好ましく使用できる。特に、本発明ではワークとしての虫の立体形状に応じてレーザビームを３軸自動制御可能なレーザマーカが有利に使用できる。そうしたレーザマーカは例えばキーエンス社から市販されている。

[0032] ［図１］は市販のレーザマーカを用いて本発明方法を実施する時の説明図である。一般には、本発明方法はヘッド（１）からのレーザビーム（２）をＸ－Ｙ面内で左右上下にスキャンすることで容器、例えばトレー（３）に入れた多数の虫（４）に順次貫通孔を形成していく（すなわち、所望の記号を印字していく）ことで実施できる。実際の使用時にはモニター（６０）やキーボード（６１）を使用してコンピュータ（６）に必要な各種パラメータ（レーザ出力、スキャン速度、パルス周波数等）を入力するだけで済む。各種パラメータはレーザマーカ装置のメーカ推薦の設定に従うのが好ましい。

[0033] 容器（３）に入れた一群のイエバエの幼虫（４）は活発に動きまわるので、各虫の位置は時間の経過とともに変化し、各虫の正確な位置を知ることは難しい。しかし、本発明ではレーザビームがイエバエの幼虫（４）に当たればよいので、［図１］の装置でレーザビームをスキャンさせ、所定間隔で照射すれば、一群のイエバエの幼虫（４）の少なくとも一部にはレーザビームが当たる。この場合、レーザビームに複数回当たる幼虫（４）もあれば、レーザビームに当たらない幼虫（４）もいるが、イエバエの幼虫（４）に当たる確率が高くなるような最適条件を実験によって見つけることで、最適なスキャンおよび照射の条件を選択することができる。

[0034] ［図２］は本発明方法を実施するために２つの典型的なマーキングパターン（パターンＡ、パターンＢ）を概念的に示している。［図２］のパターンＡはレーザビームを一定長さの線分のパターンにして照射（スキャン）する方式の概念図であり、パターンＢはレーザビームをドット状に照射する場合概念図である。いずれの方式でもレーザビームによって虫の表皮を貫通する穴を開けることができる。市販のレーザマーカではレーザビームを連続的ま

たはパルス状に照射してワーク上に所望のマーク（記号）をマーク（印字）できるようになっているので、本発明方法は市販のレーザマーカで容易に実施することができる。

[0035] 上記のように、イエバエ幼虫の場合には、３齢幼虫は活発に動きまわるので、各幼虫の厳密に正確な位置にマーキングをすることはできない。すなわち、虫（ワーク）の位置は時間の経過とともに変化する。従って、レーザ照射時に幼虫の動きを止めるのが好ましい。

[0036] 幼虫の動きを止める方法は任意であるが、一般にはイエバエの幼虫を凍る直前まで冷やすことで幼虫の動きを止めることができる。この温度変化の利用を利用する他に、化学品、例えばCO_2ガスのような麻酔剤の利用、物理的拘束等で幼虫の動きを止めることもできる。

[0037] イエバエの幼虫を凍る直前まで冷やして幼虫の動きを止める場合、凍ってしまうと幼虫は死亡してしまうが、１０℃以下の温度で幼虫の動きはかなり鈍くなるので、そうすることで複数のイエバエ幼虫になるべく均等にレーザビームを照射して、傷をつけることができる。実際には、冷蔵庫で約３℃程度に冷却したトレイの中に３齢幼虫群を平面上に並べることで幼虫の動きを止める、または、ほぼ止めることができる。動きが止まった一群のイエバエの幼虫（４）にレーザビームをスキャン、照射することで複数のイエバエ幼虫になるべく均等にレーザで穴を開けることができる。最初にテスト印字を行い、穴の位置と間隔を調整するのが好ましい。

[0038] レーザビームの強度と照射時間はレーザ照射装置の種類および虫の種類に依存し、実験を行うことで決定できる。例えば、波長１０．６μｍ、出力３０ＷのCO_2レーザマーカを用いた場合、１匹のイエバエ幼虫に０．００９６Ｊに相当する熱量を加えることでイエバエ幼虫の表皮を貫通する穴を開けることができる。このレーザビームの強度と照射時間は使用するレーザ照射装置に応じて実験で決定できる。CO_2レーザでは熱によってイエバエ幼虫の表皮に穴をあける。この孔開けによってイエバエ幼虫の体内への影響は今のところ不明であるが、本発明のレーザ照射方法ではイエバエ幼虫は死なず、有効

に抗菌ペプチドが誘導される。

[0039] イエバエ幼虫の位置を精密に検出しないでレーザスキン照射方法する場合には、レーザビームの当った場所によっては死ぬイエバエ幼虫もいる。例えばレーザビームが心臓等の重要部位に当たるとイエバエ幼虫は死んでしまう。実際の生存率が８０％程度になることもある。この場合、死んだイエバエ幼虫は必要に応じて取り除いてもよいが、取り除かないで飼料として提供することもできる。

[0040] 画像処理を用いた方法

市販のレーザマーカをそのまま使用した場合には、虫（ワーク）の位置情報を精密に測定することができないため、レーザビームが当たらない虫（ワーク）や、複数化のレーザビーム当たる虫（ワーク）もいる。また、虫（ワーク）の存在しない場所にレーザビームが照射されることもある。従って、虫（ワーク）の画像を画像処理することで本発明方法の効率を向上させることができる。

[0041] ［図３］は本発明方法で画像処理を使用する場合の概念図で、［図１］のレーザマーカにＣＣＤカメラ（８）を追加したものである。レーザマーカの内臓カメラを使用することができるが、小型カメラ（ＣＭＯＳカメラ）またはＣＣＤカメラ（ＣＣＤセンサー）を市販のレーザマーカとは独立して設置するか、レーザマーカに外付けするのが好ましい。本発明方法は［図１］のレーザマーカにＣＣＤカメラ（８）を追加することで簡単に実施できる。

[0042] ［図３］に示すように、ＣＣＤカメラ（８）で取得した画像をＰＣ（６）に送り、そこで画像処理し、虫（ワーク）の位置情報が演算し、その位置情報をコントローラ（７）（［図１］）で使用してレーザマーカのヘッド（１）からのレーザビームの運動を制御する。市販のレーザマーカの中にはＷＯＲＤデータやビットマップデータをそのまま取り込んでレーザマーキングができるものがあるので、レーザマーカに画像処理を追加するだけで、正確な位置情報に基づいてレーザビームの運動を簡単に制御できる。

[0043] 容器、例えばトレー（３）に入れた一群のイエバエの幼虫（４）の画像を

ＣＣＤカメラ（８）で撮影した後、トレー（３）をレーザマーカのヘッド（１）の下に移動させる。この移動は自動でも手動でもよい。簡単には、トレー（３）を支持する支持体（９）をコンベアベルトにし、矢印方向に送ればよい。ＣＣＤカメラ（８）で撮影した画像とレーザマーカのヘッド（１）に内臓された位置検出カメラで撮影した画像との基準位置としてトンブボ（３１）（図４、図７参照）が使用できる。

[0044] ［図３］の装置に他の手段や装置をさらに組み込むこともできる。例えば、イエバエの幼虫を冷やしてその動きを止める手段、例えば冷凍手段、一群のイエバエの幼虫の分布を均一にする手段、例えば振動装置、トレー（３）の自動搬入・排出装置を組み込むこともできる。

[0045] 画像処理は一般にＰＣに組み込まれている（または後で追加した）簡単なソフトウエアで実行できる。［図４］は二値化処理で簡単に画像処理を行って得られる画面の概念図である。この場合には、ＣＣＤカメラ（８）で得たイエバエの幼虫群のカメラ撮影画像をＰＣ（６）に送り、そこでイエバエの幼虫のみを取り出す画像処理を行うことで［図４］に示すようなイエバエの幼虫（４１）の二値化画面が容易に得られる。こうして得られるイエバエの幼虫群の二値化処理された位置情報をそのままレーザマーカで使用できる場合もある。好ましくは、二値化処理された位置情報を、必要に応じてさらにノイズを削除する等の処理をして、虫（ワーク）の位置情報を演算し、その位置情報をレーザマーカのコントローラ（７）へ送り、このコントローラ（７）の指令でレーザマーカのヘッド（１）からのレーザビームの運動を制御する。

[0046] より精密な位置情報の取得

虫（ワーク）の特定の場所、例えば、イエバエの腹の部分のみにレーザビームを照射したい場合にはより精密な位置情報をコントローラ（７）へ送る必要がある。この場合にはＡＩ画像処理技術等を使用することができる。この処理には市販されているＡＩ画像処理ソフトを使用することができる。

[0047] ［図５］は本発明方法をイエバエで実施する場合に、より精密な位置情報を

取得するための基本操作の一つの例を示すフローチャートである。

（１）「画像の取得」では、カメラ等を使用してイエバエの群れの画像を撮影する。

（２）「画像の前処理」では、イエバエの正規化、ノイズ低減等の処理をする。

（３）「特徴抽出」では、事前トレーニング済みの畳み込みニューラル ネットワーク （ＣＮＮ）、例えばＲｅｓＮｅｔ、ＭｏｂｉｌｅＮｅｔ、ＹＯＬＯを使用してイエバエの特徴を抽出する。

（４）「関心領域の検出」では、画像内でイエバエの腹部が存在する可能性のある領域を特定する。

（５）「腹部検出」では、追加のニューラル ネットワークまたは画像処理技術を使用して検出された領域をさらに絞り込み、イエバエの腹部を具体的に識別する。

（６）「後処理」では、誤検知をフィルタリングで除外し、境界ボックスを調整する等で結果を改良する。

（７）「出力」では、画像内のイエバエの腹部のＸ－Ｙ座標での位置を示す最終結果を表示し、保存する。

[0048] ［図６］は、例えば[図５]の記載のフローチャートに従って得られる精密な位置情報から得られるイエバエ（４２）の例えば腹部の位置を画面表示したものである。レーザマーカのコントローラ（７）はこの位置情報に基づいてヘッド（１）からのレーザビームの運動を制御する。

[0049] ［図７］は各イエバエ（４）の「個別領域」（１０）を検出し、その腹部（４３、黒丸印）を識別するときの画像処理の概念図である。この場合には互いに重なったイエバエ（１１）の処理をどうするかを予め決めて置くこともできる。

[0050] 抗菌ペプチドの誘導

レーザ照射後、イエバエの体内に抗菌ペプチドを誘導させるために３時間～４８時間、イエバエを放置する。例えば、サナギにならないようにするた

めに、イエバエの幼虫を湿球温度２０℃～３５℃の環境に移し、３時間～４８時間、維持して幼虫自身に抗菌ペプチドを誘導させる。

[0051] 抗菌ペプチドの回収

抗菌ペプチド誘導後に、イエバエから抗菌ペプチドを回収する。実際には、イエバエの先端を切断し、その切り口から体液を漏出させ、氷上のチューブに回収する。血球を除くために体液を１０分間、１００ｇで遠心し、上清を回収し、－３０℃で保存することができる。

[0052] 抗菌活性測定

定法に従って細菌を寒天培地に蒔いて培養して抗菌活性を測定し、抗菌ペプチド誘導能を評価する。細菌としては黄色ブドウ球菌、表皮ブドウ球菌、大腸菌、緑膿菌等を選択できる。

[0053] 以上の説明で使用した各図は概念図または部分拡大図で、その寸法は厳密なものではない。また、画像処理と位置情報の取得方法は上記のものに限定されるものではない。

以下、本発明の実施例を記載するが、本発明が下記の実施例に限定されるものではない。

実施例

[0054] 実施例１

以下の装置および方法を使用した。

レーザ装置

キーエンス社のＭＬ－Ｚ９６２０のCO_2レーザマーカを用いた。これはＸ、Ｙ、Ｚ－３軸同時スキャニング方式のCO_2レーザマーカで、このマシンは１００×１００㎜または３００×３００㎜のワーキングスペースに波長１０．６μｍ、出力３０Ｗのレーザビームをスキャニング方式で照射することができる。

[0055] レーザ照射方法

ガラスのトレイ（１００×１００㎜）をイエバエ幼虫が凍る直前の温度（約３℃の温度）に冷却し、その中に約１０００匹のイエバエ幼虫を入れ、幼虫

群が重ならないように平面上に並べる。冷却したトレイ上ではイエバエ幼虫の動きは大幅に低下する。上記のCO_2レーザマーカを用いて、１ｍｍ×１ｍｍ格子のマーキングパターンで、印字線分長を０．１㎜、スキャンスピードを２５０㎜/sに設定してイエバエ幼虫群にレーザビームを「スキャン印字」方式で照射した。レーザパワーは出力の８０％にした。加えた熱量は０．００９６Ｊに相当する。

[0056] 抗菌ペプチドの誘導

幼虫の浸透圧に近い濃度の生理食塩水を含ませた濡れたガーゼを２０℃～３５℃に維持し、その上にレーザ照射済のイエバエ幼虫を２４時間放置して、イエバエ幼虫の体内に抗菌ペプチドを誘導させた。

[0057] 抗菌ペプチドの回収

２４時間後に、先端を鋭利なはさみで切断しその切り口から体液を漏出させて氷上のチューブに回収した。約５００匹の幼虫から約５００μｌの体液を回収した。血球を除くために体液を１０分間、１００ｇで遠心した後、上清を回収し、－３０℃で保存した。

[0058] 抗菌活性測定

黄色ブドウ球菌をLB培地で培養して対数増殖期（ＯＤ６００＝０．１５-０．３）にある細菌を測定に用いた。培地（２μｌ）中の黄色ブドウ球菌を１８μｌの体液サンプルと混合した。細菌／体液測定混合液を３０℃で１時間保温した後にＭｕｅｌｌｅｒ－Ｈｉｎｔｏｎｌｌ培地で希釈した。希釈した測定混合液（１００μｌ）を寒天培地に蒔き、３０℃で１日培養した。培養後、黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ，Colony forming unit）求めた。

[0059] 希釈した測定混合液（ブランク）の場合の黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ）は１６７×10^5ＣＦＵ／ｍｌであった。

[0060] これに対して、本発明方法でレーザ照射を行った場合の黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ）は０（ゼロ）ＣＦＵ／ｍｌで、黄色ブドウ球菌の増殖が効果的に抑制できることが示された。

[0061] ［図９］は実施例１でレーザ照射を行った時にイエバエ幼虫の表皮に約２５０μmの穴が開いていることを示す写真である。

[0062] 実施例２

実施例１と同じ操作を繰り返したが、マーキングパターンを１ｍｍ×４ｍｍ格子に変更した。

この場合にも黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ）は０．５×１０^{5}ＣＦＵ／ｍｌ以下で、実施例１の結果と同様に、黄色ブドウ球菌の増殖が効果的に抑制できることが示された。

[0063] 実施例３

実施例２と同じ操作を繰り返したが、レーザビームの照射方式を「スキャン印字」方式から「定点印字」方式に変えた。定点印字時間は１ｍｓで、この場合に加えた熱量は０．０２４０Ｊに相当し、熱量の点では実施例２の約２．５倍である。

この場合にも黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ）は２．３×１０^{5}ＣＦＵ／ｍｌ以下で、実施例２の結果と同様に、黄色ブドウ球菌の増殖が効果的に抑制できることが示された。

[0064] 実施例４

実施例３と同じ操作を繰り返したが、定点印字の間隔を１ｍｍ×１ｍｍ格子に変更した。

この場合にも黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ）は０．５×１０^{5}ＣＦＵ／ｍｌ以下で、実施例３の結果と同様に、黄色ブドウ球菌の増殖が効果的に抑制できることが示された。

[0065] 実施例５

レーザ照射後に生理食塩水に土を混ぜ、その土の中で幼虫を２４時間放置した。その後は、実施例４と同じ操作を繰り返した。

この場合の黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ）は２２×１０^{5}ＣＦＵ／ｍｌ以下で、黄色ブドウ球菌の増殖抑制効果が低下することが示された。

[0066] 比較例１～３

レーザ照射装置をCO_2レーザマーカの代わりにＵＶレーザマーカを使用して実施例３と同じ操作を繰り返した。

使用したＵＶレーザマーカはキーエンス社のＭＤ－Ｕ１０２０Ｃで、このＵＶレーザマーカは波長３５５ｎｍ、印字出力２．５Ｗのレーザビームを照射できる。比較例１～３での印字方式は実施例３と同じ「定点印字」方式にした。

照射条件と得られた結果（黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ））を以下の「表１」にまとめて示す。

[0067] [表1]

	定点印字時間 ｍｓ	熱量 J	照射間隔	黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット ×１０^{5}ＣＦＵ／ｍｌ
比較例１	3	0.0060	１×１ｍｍ	６９
比較例２	3	0.0060	１×４ｍｍ	６１
比較例３	4	0.0080	１×１ｍｍ	５９

[0068] ［図１０］は比較例３でＵＶレーザ照射を行った時にイエバエ幼虫にレーザビームが当たった時のイエバエ幼虫の表皮の写真で、イエバエ幼虫の表皮に穴を開けることができないことを示している。ＵＶレーザの場合には約４０μｍの細いレーザビームにして照射できるが、黄色ブドウ球菌の増殖抑制効果は低い。その理由はイエバエ幼虫の表皮に穴を開けることができなかったためと思われる。

[0069] 比較例４～７

比較例４は「対照」（下記）である。

比較例５では、レーザを使用せずに、従来方法で手でイエバエ幼虫に針を刺す方法でイエバエ幼虫の体内に抗菌ペプチドを誘導させた。使用した針は直径０．３ｍｍのステンレス鋼の針でイエバエ幼虫の腹部に針を刺した。

比較例６では、実施例５との対比のために、実施例５と同様にイエバエ幼

虫に針を刺した後に生理食塩水に土を混ぜ、その土の中で幼虫を２４時間放置した。

比較例７は「ブランク」（下記）である。

[0070] レーザを照射しない点を除いて実施例１と同じ方法で抗菌ペプチド誘導させた。

比較例４～７の照射条件と得られた結果（黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ））を以下の「表２」にまとめて示す。

[0071] [表2]

	黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット ×１０^{5}ＣＦＵ／ｍｌ
比較例４（対照）	８８
比較例５	５７
比較例６	６２
比較例７（ブランク）	１６７

[0072] 「表２」の「対照」（比較例４）はレーザ照射を行なわず、針も刺さないイエバエ幼虫の場合で、実施例１と同じ方法で抗菌ペプチド誘導させた時の黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ）は８８×１０^{5}ＣＦＵ／ｍｌであった。

「ブランク」（比較例７）はイエバエ幼虫の体液を含まない点を除いて実施例１と同じ方法で抗菌活性を測定した時の結果である。この「ブランク」の場合の黄色ブドウ球菌のコロニー形成ユニット（ＣＦＵ）は１６７×１０^{5}ＣＦＵ／ｍｌであった。

[0073] 「表２」の結果から下記の点が観察される：

１） 本発明（実施例１～５）の黄色ブドウ球菌の増殖抑制効果はＵＶレーザ（比較例１～３）の効果と比較して著しく高い。

２） 本発明（実施例１～５）の黄色ブドウ球菌の増殖抑制効果は従来方法（比較例５．６）の効果と比較しても高い。このことは「レーザビームによって虫の表皮を貫通する穴を開ける」ことが黄色ブドウ球菌の増殖抑制効果

に必要であることを示している。

３）　何の処理もしないイエバエ幼虫（比較例４の対照）でもブランク（比較例７）に比べて一定の黄色ブドウ球菌の増殖抑制効果を持っている。

符号の説明

[0074] １　レーザ照射装置のヘッド

２　レーザビーム

３　トレイ

４　イエバエ幼虫

６　ＰＣ（位置検出装置）

７　コントロラ

８　カメラ

９　支持台

請求の範囲

[請求項1] 虫に損傷を与えることによってその虫に抗菌ペプチドを誘導させる方法において、虫の表皮にレーザを照射し、その虫に回復不可能なダメージを与えない状態で、レーザビームによって昆虫の表皮を貫通する穴を開けて虫に損傷を与えることを特徴とする虫に抗菌ペプチドを誘導させる方法。

[請求項2] 虫がイエバエの幼虫であり、レーザがCO_2レーザである請求項１に記載の方法。

[請求項3] イエバエの幼虫の表皮を貫通する穴の直径を１～３００μｍの範囲にする請求項１に記載の方法。

[請求項4] 凍る直前の温度で虫の幼虫の動きを封じた状態で幼虫にレーザを照射する請求項１に記載の方法。

[請求項5] レーザ照射後に、レーザ照射されたイエバエの幼虫を湿球温度２０℃～３５℃の環境に移し、３時間～４８時間サナギにならないようにして幼虫自身に抗菌ペプチドを誘導させる請求項２に記載の方法。

[請求項6] イエバエの幼虫を２０℃から３５℃に維持した浸透圧に近い液体を含む濡れた表面上に配置し、その液体に触れさせて蛹化を抑制する請求項４に記載の方法。

[請求項7] CO_2レーザ照射装置と、虫の位置情報を求める位置情報取得手段と、この位置情報取得手段で求めた虫の位置情報を虫の位置情報に伝達する手段とを含む請求項１に記載の虫の体内に抗菌ペプチドを誘導させる方法で使用する装置。

[請求項8] 虫の幼虫を凍る直前の温度に冷却して虫の幼虫の動きを封じる手段をさらに有する請求項７に記載の装置。

[請求項9] 虫の表皮を貫通する穴を開けることによって虫の体内に抗菌ペプチドを誘導させる方法でのCO_2レーザの使用。