

顕微鏡用簡易CO₂インキュベータの制作 (続報)

Production of a simple CO₂ incubator for microscopes

櫻井 勝^{*, **, ***, ****}, 横井 修^{*, **}, 山崎 時生^{*****}, 竹田 悠純^{*****}
蔡 承達^{*, ****}, 羽田 克彦^{*, ***, ****}, 金子 雅希^{*****}

Masaru SAKURAI^{*, **, ***, ****}, Osamu YOKOI^{*, **}, Tokio YAMAZAKI^{*****}
Yuto TAKEDA^{*****}, Chengta TSAI^{*, ****}
Katsuhiko HATA^{*, ***, ****} and Masaki KANEKO^{*****}

CO₂ (二酸化炭素) インキュベータとは温度、CO₂濃度を一定で安定にすることで、細胞をより生理的条件に近い状態で培養するための装置である。研究実験等で培養した細胞や細菌は顕微鏡で観察するが、一般的な顕微鏡にチャンバーや保温装置が設置されているものは少ない。そのため、特殊な顕微鏡の購入を検討するのだが、そのような顕微鏡は一般に高額である。そこで我々は、限られた研究資金の中でも利用し得る安価なCO₂インキュベータを作成する。CO₂インキュベータは国士舘大学にある位相差顕微鏡IMT2の台上に構築した。本報告書では、前年度に続いて、センサーの精度実験と実際の細胞を使った、培地による細胞培養をレポートする。

部分に別れ、1つは試料を置く観察用チャンバー、もう1つは温度、CO₂を制御するコントロールボ



図1 インキュベータシステムの外観

I. 顕微鏡上の設置

1. 外観

制作されたCO₂インキュベータは位相差顕微鏡IMT2 (オリンパス) の上に設置された。(図1) 温度とCO₂の濃度を維持するためチャンバーは気密性の高い容器を使用する。チャンバーは2つの

* 数理医科学研究センター (Research Center for Mathematical Medicine)

** 国士舘大学防災・救急救助総合研究所 (Research Institute of Disaster management and Emergency medical system, Kokushikan University)

*** 国士舘大学体育学部スポーツ医科学科 (Department of Sport and Medical Science, Kokushikan University)

**** 国士舘大学救急システム研究科 (Department of Emergency Medical System, Kokushikan University)

***** KYB メディカルサービス (KYB Medical Service Co., Ltd.)

***** 東京理科大学大学院理学研究科物理学専攻 (Department of Physics, Tokyo University of Science, Tokyo, Japan)

***** 国士舘大学体育研究所 (The Institute of Physical Education, Kokushikan University)

ックスである。接合部分はゴムで密着され、この2つの部分は気密性が保たれている。観察用チャンバーはアクリル容器を使用し、保温のため、発泡スチロールで覆う。発泡スチロールの真ん中には穴が空いており、試料を直接、顕微鏡で観察できる。

2. インキュベータ内の温度低下の問題

インキュベータは温度を 37℃ に維持しなければならないが、初期の温度テストの時、チャンバーの中央に位置する観察部分の温度が下がる問題が発生した。チャンバーの温度がもれないように発泡スチロールで覆っているが、残念ながら保温性が足りなかったようで、ダンボールで補強し改善した。(図2)

II. CO₂ センサーの精度測定

1. CO₂ のセンサーの概要

CO₂ を検出方法は NDIR 方式と呼ばれる方法で、NDIR 方式はそれぞれのガスが持つ特有の吸収波長領域を利用したガス濃度の計測方式である。



図2 保温ケース（ダンボール+発泡スチロール）と顕微鏡 IMT2

CO₂ は赤外領域の波長 4.26μm を吸収している。気体中を透過する赤外線量は、そこに含まれる二酸化炭素の濃度に依存するため、この現象を使って二酸化炭素濃度を数値化する事が可能である。

CO₂ の検出には 20% 濃度の CO₂ を検出できる ExplorIR-W20% を使用する。参考にした Web のサイトはこのセンサーの上位製品である SprinterIR-W20% を使用しているが、入手性、価格の面から、ExplorIR を選択した。SprinterIR との違いは読み取りスピードで ExplorIR の読み取りスピードが 0.5 秒に一回であるのに対して、SprinterIR は 0.05 秒で 10 倍違う。しかし、CO₂ のばらつきと電磁弁制御の処理時間（2 秒くらい）から ExplorIR でも十分機能すると判断した。

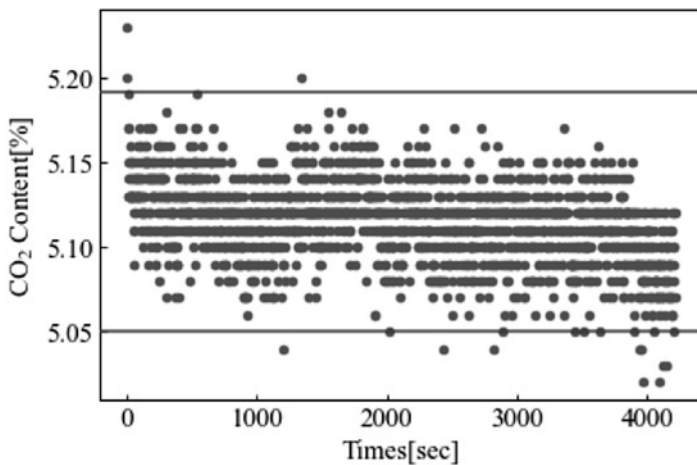
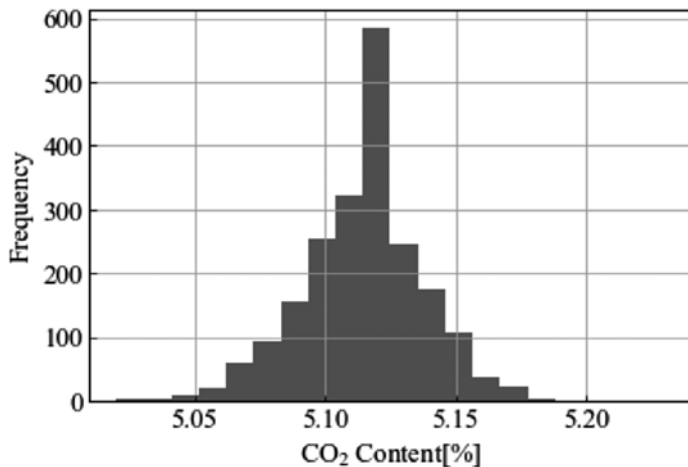
ExplorIR CO₂ センサーの精度

センサーの性能を確かめるため、ExplorIR CO₂ センサーを、CO₂ 濃度が 5% に維持された市販インキュベータ内（AS ONE E-50）に設置して、センサーからデータを読み出し精度を調べた。サンプリングは 2 秒で 60 分間測定した。CO₂ 濃度のデータのトランジェント解析とヒストグラム解析のグラフを示す。(図3, 4) センサーが市販インキュベータ内の混合ガスにさらされた場合、3σ の信頼区間で 5.12 ± 0.07% という安定した CO₂ 測定値を得ることができた。ExplorIR-W20% データシートの測定精度は 5% ± 1.25% なので、このセンサーのノイズ特性の範囲内である。

III. 細胞培養の確認

1. 細胞培養の検証

このインキュベータが実際に哺乳類細胞の増殖をサポートするか確かめる。我々は、神経分化の研究に使用される PC-12 という比較的一般的な、ラット副腎髄質褐色細胞腫より単離された株化細胞の細胞培養を始めた。この細胞は 1976 年に開発され、細胞生物学の研究において広く使用されている。

図3 CO₂センサーのトランジェント解析図4 CO₂センサーのヒストグラム解析

実験は20時間行われ、1分間隔でタイムラプス連続撮影を行った。

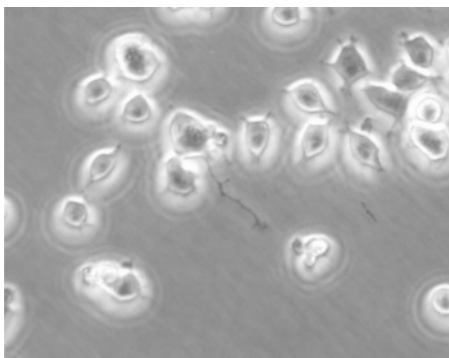
図5 (a), (b) に、撮影開始より、それぞれ2時間後、5時間後の写真を示す。中央付近の細胞が突起を伸ばしているため、神経に分化している様子が観察された。

2. 培養皿の水分蒸発の問題

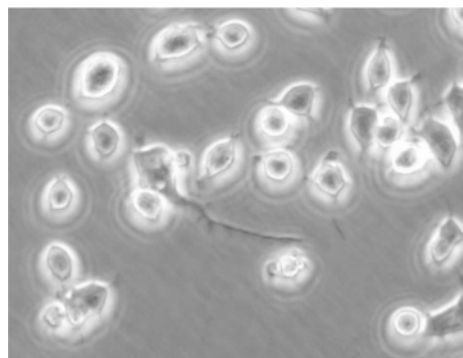
実験を数回、行うに従って、観察用チャンバー内の培養皿の水分蒸発が問題になり、貯水量が十分ではなかった可能性が考えられた。そこで現在は、大きめのペーパータオルに水を湿らせて、観察している。今後は、利便性を考えて、チャンバー内に入る大きめの貯水槽を設置したい。

3. 顕微鏡のピントが外れる問題

長時間、タイムラプスの写真を撮影していると、開始から、およそ6時間後にピントが外れて、画像が不鮮明になる問題が発生す



(a) 観察開始から2時間



(b) 観察開始から5時間

図5 培養液 (DMEM + ペニシリン・ストレプトマイシン) 中で分化するPC-12細胞

る。原因はステージが時間と共に重みで下がって
くることが考えられるのだが定かではない。微動
ハンドルを固定しても発生する為、他の原因も考
慮すべきである。今後、インキュベータ装置を取
り外して、別々に調査する必要がある。

参考文献

- 1) Andrew Pelling. "DIY CO2 Incubator Bioreactor for Mammalian Cell Culture". PELLING LAB. 2014. <https://www.pellinglab.net/post/diy-incubator>
- 2) 櫻井 勝, 横井 修, 坂 達也, 羽田 克彦 顕微鏡用簡易CO₂インキュベータの制作, 国士舘大学体育研究所報, 2020, 39, p.155-159.