

生きている細胞を記録するための顕微鏡タイムラプス観察システムの工夫

小林浩三¹

筑波大学人間総合科学等支援室

〒305-8575 茨城県つくば市天王台 1-1-1

1. はじめに

今回のテーマを実現する装置は、顕微鏡メーカーから顕微鏡にオプションを追加することで可能となる製品が販売されている。しかし、顕微鏡に専用のオプションを装着する仕様となっていて、高額な商品である。そこで、既存の倒立顕微鏡と一般的な周辺装置や機器の組み合わせや条件を工夫することで簡便で実用的な装置を経済的に構築したので報告する。

2. 概要

顕微鏡観察下で生きている細胞のタイムラプスムービーを取得するためには以下の装置が必要である；顕微鏡、カメラ、カメラコントローラー、温度を一定に保つための装置、湿度を一定に保つための装置。本報告で紹介する観察システムは、以上の条件を満たし、必要とされる実験データを得られる実用的なレベルまで達した。実験内容によっては、二酸化炭素濃度を調節し一定に保つための装置を必要とする場合があるかもしれない。今回の試みでは気相下で pH を安定させることのできる緩衝液（HEPES）を適量、培地に混ざることによって、安定した条件が得られたので、二酸化炭素濃度のコントロールを省くことができた。

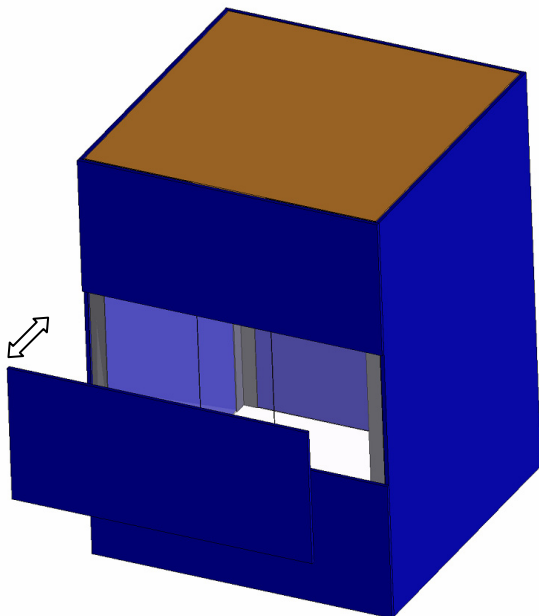


図 1. 恒温チャンバー

3. 恒温チャンバー

3.1 構造

金属製のフレームの枠組みに断熱シートを張り、卓上型の恒温チャンバーを作製した。断熱材は、2重にすることで保温効果を高めた。また、外側の材質は、非光透過にすることでチャンバー内の温度への影響を防ぐ効果を得られる。前面外側の断熱シートは、横に3分割して、それぞれが独自に取り外せる。観察中、チャンバー内へのアクセス時に3分割された中の必要なシートだけ外すことによりチャンバー内の温度が急激に変化することがない。（図1）

チャンバーの大きさは、必要な数の顕微鏡、撮影装置に応じた大きさにすることで複数のシステムを置くこともできる。

3.2 攪拌ファン

チャンバー内の天井にファンを設置した。ヒーター付属のファンでは、チャンバー内の温度を均一に保てなかった。また、ヒーター付近や顕微鏡の照明装置付近は、温度が高くなる。大きめのファンの低



図 2. サーモスタット

¹ E-mail: kkouzou@md.tsukuba.ac.jp; Tel : 029-853-3034

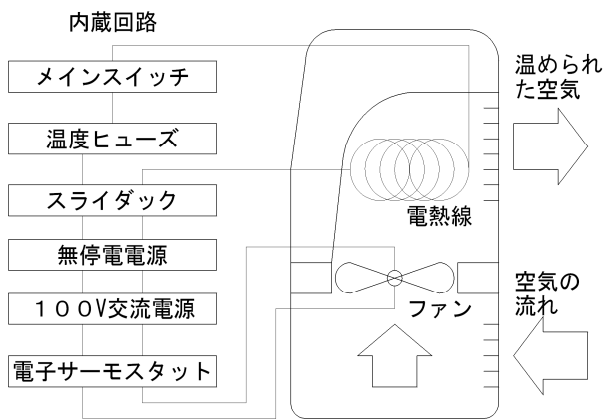


図3. ヒーター回路図

表1. 回路毎の結果

	回路1	回路2
電熱線	コントロール	常時ON
ファン	常時ON	コントロール
スライダック	無	有
結果	不可	良

回転による攪拌で、チャンバー内の温度のばらつきを極力抑えることができた。(図1)

3.3 設置

装置は、チャンバー内部の温度への影響を極力抑さえるためにエアコンにより温度コントロールされた部屋に設置した。チャンバー内部には、顕微鏡、撮影装置を置く構造とした。

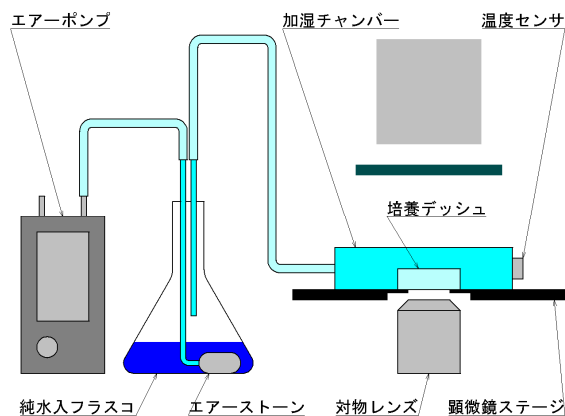


図4. 加湿システム

4. 温度コントロール

温度を正確にコントロールするためにチャンバーの容積を大きくすることは、外部からの温度変化の影響を受けにくく有利であった。温度変化が大きい場合、顕微鏡フォーカスノブに用いられているグリースが温度変化に応じて膨張収縮し、タイムラプス観察中にフォーカスがずれることがあった。従って正確な温度コントロールを実現する必要があった。

4.1 熱源

熱源には、市販のサーモスタット(図2)を介し、改造した汎用ヒーターを用いた。ヒーター内蔵のサーモスタットでは、期待通りの温度コントロールは出来なかった。そこで、電気回路に改造を施した(図3)。内蔵のサーモスタットを回路から外して、電熱線とファンを別回路とした。当初、表1の回路1で試験を行ったが、思うような結果は得られなかった。原因は、サーモスタットの機能により電熱線の電源がOFFの状態から再びサーモスタットの機能により電源がONになっても、電熱線の発熱効果が得られるまでの間にチャンバー内の温度が目標値より下がってしまった。次に回路2で試験したところ、回路1よりは良好であった。回路2は、ファンが運転・停止する。ファンが停止中の電熱線の異常加熱は回避された。

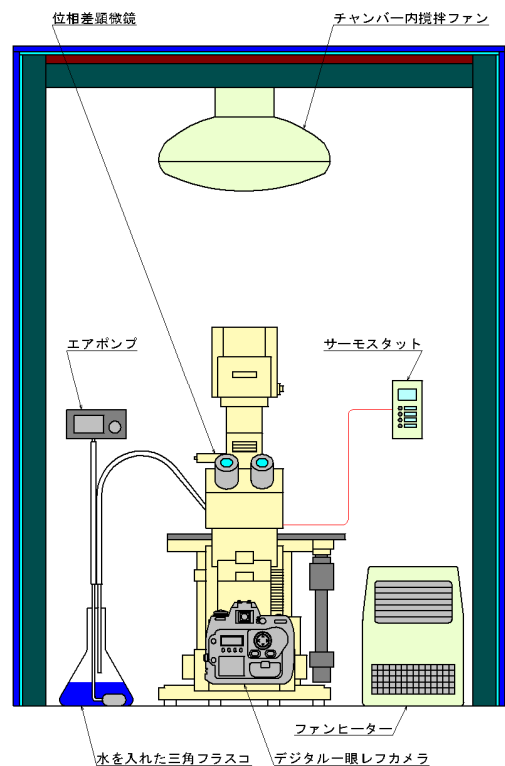


図5. 全体図

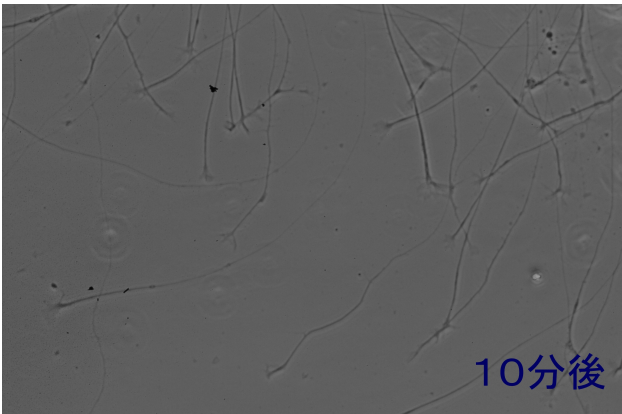
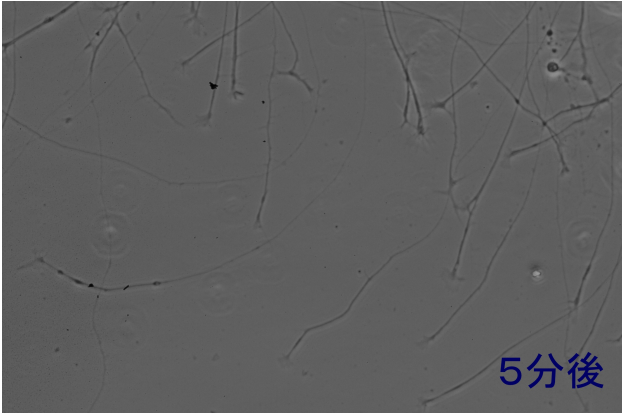
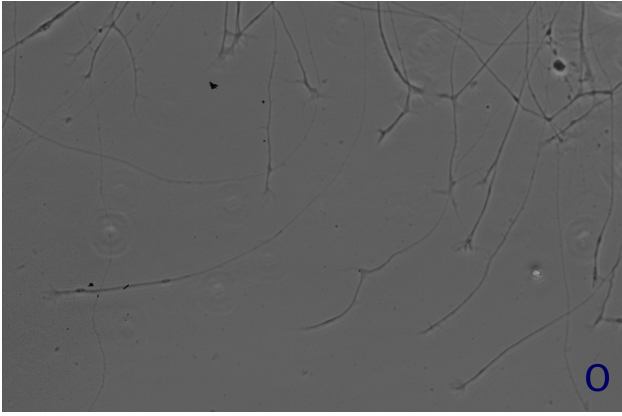


図6. 記録された画像

5. 湿度コントロール

培養デッシュの加湿にあたっては、恒温チャンバーの容積が大きいこと、チャンバー内の機器への影響を考慮して、加湿チャンバーを設置した。

図4の通り、三角フラスコ内の純水中で散気により得る加湿された空気を加湿チャンバーへ供給した。このとき三角フラスコやエアポンプをチャンバー内に設置することで温度に影響がないよう配慮した。

6. タイムラプス撮影

6.1 デジタルカメラ

今回、採用したデジタルカメラは FujiFilm 社製の FinePix S3Pro で、インターバル撮影機能を有する。パソコンのカメラコントロールアプリケーションにより動作を制御した。

観察対象となる現象のタイムスケジュールによって必要とされる時間解像度は異なるが、S3Pro では6秒以上のインターバル撮影に対応し、実用上十分であった。また、1画像の解像度も適宜調節可能であった。

6.2 ムービー作成

一連の画像（図6）から動画作成アプリケーション（QuickTime,Apple）でタイムラプスマービーを作成した。

謝辞

本報告の顕微鏡タイムラプス観察システムの工夫に当たって、人間総合科学研究科感性認知脳科学専攻（基礎医学系）一條裕之助教授、人間総合科学研究科感性認知脳科学専攻（博士前期課程一年）安藤覚氏には、多大なる協力をいただいたことに感謝します。製作に協力いただいた人間総合科学等支援室沼尻久氏に感謝します。

4.2 電圧調整

コンセントから得る交流電源電圧は、建物によって1日の中で変動がある。スライダックによる電圧調節には、限界があり、温度コントロールに大きく影響した。

御存知の通り、交流電圧の安定化電源は、高価な商品である。そこで、代わりの手段を検討した結果、パソコン用の無停電電源の一部は、入力電圧の変動にかかわらず一定の出力電圧が得られるインバーター方式を採用していることがわかり、今回の装置では、パソコン用の製品で電気容量的に十分使用可能であった。