ニワトリ胚体動計測のための任意酸素濃度制御システムの開発

天満 晃希^a 横田 朝陽^a 千葉 裕弥^a 森谷 健二^a

^a函館工業高等専門学校

1. はじめに

本研究では、ニワトリ胚を計測モデルとして CCD カメラによる直接録画により、初期胚における体動の発達パターンの解明に取り組んできており、通常環境下と慢性低酸素環境下での体動量や体動パターンに興味深い違いがあることが報告されてきた⁽¹⁾。現在では、間歇的な低酸素環境下における体動解析を行っており、そのために任意の時間において孵卵器内の酸素濃度を任意に設定するシステムが開発された⁽²⁾。しかし、いくつかの改善点が検討されたため、本研究ではさらに高精度なシステムの構築を目指した。

2. 酸素濃度制御システム

2.1 システムの概要

本研究で開発するシステムは、チャンバー内で任意の酸素濃度環境を実現するために目標酸素濃度を 0.1[%]刻みで設定できることとし、間歇性低酸素環境での計測が満足に行うことが出来る許容量として目標酸素濃度に対するばらつきが ± 0.1 [%]以下の精度で制御を行うこと、目標とする酸素濃度に到達するまでの時間と通常酸素濃度まで回復させるまでにかかる時間を 1 分以内をすることを目標とし、より高精度なシステムを目指した。

2.2 システムの構成

制御にはマイコンボードの一種である Arduino を使用し、Arduino に目標酸素濃度値などのデータを入力するために Processing というソフトウェアを用いた。どちらもプログラム言語が C 言語に酷似しており、これまでに習った C 言語の知識が生かせるため採用した。システム全体のブロック図を Fig.1 に示す。

3. 酸素濃度制御について

3.1 Arduino のプログラム

本システムにおいてチャンバー内を目標とする酸素濃度にするための制御プログラムについて説明する。Fig.2 に Arduino のフローチャートを示す。①では、Arduino IDE のセットアップ関数を用いてプログラムの初期設定を行い、シリアル通信の準備等を行う。この関

数は一度しか実行されない。③では、②にて 1[ms]に 1 回の頻度で 1[s]間読みとった値を平均する。その際、Arduino と Processing 間の通信は整数しか取り扱うことができないという理由から、読み取り値の平均を 10 倍し int 型にキャストする。④にて、Arduino で読み取った酸素濃度平均値、Processing で設定した目標酸素濃度値、現在の環境を決定するフラグ変数の同期通信を行う。Arduino から読み取った酸素濃度平均値を Processing に送信し、Processing 側は値を受け取ったことを確認すると Arduino に対し目標酸素濃度の値とフラグ変数を送信する。

Fig.1. Overall view of the oxygen concentration control system

Fig.2. Arduino control flowchart

Fig.3. Adjustment of the pulse time to open the valve

Fig.4. Result of oxygen concentration control

Table 1. Each parameter of target oxygen concentration

(N=6)	Target oxygen concentration [%]			
	18	17	16	15
Average time to reach[s]	36.7	36.7	39.7	40
Average oxygen concentration[%]	18	16.98	15.98	14.95
Variation[%]	±0.055	±0.055	±0.050	±0.055
Average recovery time[s]	15.3	22.7	28	30

3.2 パルス幅の調節

本システムでは、チャンバー内を通常環境から目標酸素濃度へと遷移させる方法として、窒素を注入する方法をとっている。制御方法として、目標酸素濃度ごとにパルス幅の設定を決めておくという手法を行っている。適切なパルス幅を求めるために、パルス幅の制御時間を

関数化するなど、何度も設定と実験を繰り返した。その結果得られた酸素濃度差とパルス幅のグラフを Fig.3 に示す。この図は酸素濃度差が小さいときは電磁弁を開く時間を短くして窒素を少量注入し、酸素濃度差が大きいときは電磁弁を開く時間を長くし窒素をたくさん注入するというを示している。そうすることで、酸素濃度差が大きい時は目標とする酸素濃度へと素早く到達し、酸素濃度差が小さい時は精密な制御を行う。

4. 酸素濃度の制御結果

システムの計測 6 回の平均をとった結果を Fig.4 に示し、各パラメータを Table 1 に示した。低酸素環境の制御が開始した後にチャンバー内が目標酸素濃度に到達するまでの時間の平均を平均到達時間、通常環境の制御が開始した後にチャンバー内が通常酸素濃度に到達するまでの時間の平均を平均回復時間と定義した。Fig.4 より、チャンバー内の酸素濃度は目標酸素濃度に達し、その後、目標酸素濃度値を維持することが出来た。表 1 より、すべての目標酸素濃度において平均到達時間、平均回復時間を 1 分以内に収め、ばらつきを±0.1[%]以下で制御することができた。

5. おわりに

本研究では、低酸素症疾患を想定した間歇的な低酸素環境を制御するシステムを構築した。CCD カメラによる直接録画計測のために撮影環境を整え、本システムを用いて間歇性低酸素環境で体動測定を行い、解析例を増やしていくことで特有の体動パターンがないか調査していきたい。また、様々な酸素濃度、曝露時間で体動測定を行い、通常環境や慢性低酸素環境の結果と比較を行っていきたい。

付記および謝辞

本研究は本校生命倫理審査委員会の承認を受けて行われた事を付記します。本研究の一部は文部科学省科学研究費補助金 (K.M.No.16K06397) を受けて行われました。ここに謝意を示します。

文 献

- (1) 久保皓哉, 古川 椋, 森谷健二:「疾患時におけるニワトリ初期胚の体動解析」, 函館工業高等専門学校紀要, 第 48 巻, pp.29-32, 2014
- (2) 天満晃希, 千葉裕弥, 森谷健二:「比例制御電磁弁を用いた酸素濃度制御システムの開発」, 函館工業高等専門学校紀要, 第 52 巻, pp.9-12, 2018
- (3) Kenji Moriya, Yuya Chiba and Akito Shimouchi: “Body movements during the early stages of chick embryo under intermittent hypoxic environment”, IGNITE Advanced Materials for Innovative Technologies, 2017