

令和元年6月10日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02934

研究課題名(和文) 気中微生物オンライン測定のためのエアロゾル・フローサイトメトリーの開発

研究課題名(英文) Development of an aerosol flow cytometry technology for online measurement of airborne microorganisms

研究代表者

古内 正美 (Furuuchi, Masami)

金沢大学・地球社会基盤学系・教授

研究者番号：70165463

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、「リアルタイム」で「特定の気中微生物情報」を獲得する「エアロゾル・フローサイトメトリー」の実現を自指し、「気中微生物の蛍光染色」の可能性を検証すると共に装置開発を試みた。エアロゾル機器で必須の「短時間の微生物染色の実現の可否」、気中微生物・蛍光染料ミスト混合による「エアロゾル染色実現の可否」、染色効率化のための「エレクトロスプレー染料粒子生成」を検討し、適切な条件設定で「10秒以内」の染色が可能なること、「エアロゾル混合による染色」を検証し、試作装置による安定したエレクトロスプレー染料粒子生成を確認した。これは世界で初めての「気中微生物の浮遊状態での蛍光染色」の成功例となる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在最も信頼ある微生物の迅速測定法は微生物を液中で蛍光染色し、観察またはレーザー散乱光から情報抽出する「フローサイトメトリー(FCM)」によるものであるが、「気中では蛍光染色できない」ため、気中微生物も液中へトラップした後、培養や蛍光染色を行う必要があり、この時間と手間が迅速性を損なっていた。本研究では「気中微生物蛍光染色技術」に必須となる「短時間(10秒以内)での蛍光染色」「気中での微生物粒子と蛍光染料の直接混合による染色」の可能性を検証し、世界で初めての「気中微生物の浮遊状態での蛍光染色」の成功例を示した。本成果は今後気中微生物の「迅速で正確なその場測定技術」の開発へ応用される予定である。

研究成果の概要(英文)：A rapid method for the online detection of bio-aerosols could be useful for the efficient management of areas that are contaminated with bio-aerosols. Airborne microbes of interest can be stained by exposing them to a fluorescent dye in the form of a mist, and the resulting stained microbes can be detected by an optical detection method. To accomplish this, we have tested the possibility as follows:

- 1) The rapid staining of yeast (*S. cerevisiae*) in an aqueous solution of typical dyes, such as DAPI and Auramine-0, was examined using a fluorescence spectrophotometer. The relaxation time, which corresponds to ~63.2% of the maximum fluorescence intensity, could be adjusted to below 10 seconds.
- 2) Mixtures of aerosols of microbes and a mist of a fluorescent dye solution were examined as a possible method for staining microbes. By simply mixing an aerosol yeast and dye mist, a certain fraction of yeast could be confirmed to be stained.

研究分野：大気環境工学

キーワード：バイオエアロゾル 蛍光染色

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

気中微生物は古くは肺結核、近年でもレジオネラなどの感染症を引き起こす健康リスク要因となっている。また、風送ダストに同伴される微生物や汚水の気中飛散等で生じた環境中の気中微生物による潜在的な健康リスクが「気づかないが」確実に高まっている。こうした問題は、エアロゾルや微生物研究者の関心を集めているが、気中微生物の分析には煩雑な手順、豊富な経験と時間が必要で、リスク発生時や時々刻々と変化する発生源の特定に必要とされる高い時間解像度の分析ができないため、「見えないリスク」となっている。現在最も信頼ある微生物の迅速測定法は微生物を液中で蛍光染色し、観察またはレーザー散乱光から情報抽出する「フローサイトメトリー (FCM)」によるものであるが、「気中では蛍光染色できない」ため、気中微生物も液中へトラップした後、培養や蛍光染色を行う必要があり、この時間と手間が迅速性を損なっている。FCM 技術は液中の細胞計測装置として実用化されて以降、医工計測技術分野に大きなインパクトを与え続けており、現在は環境微生物の分析にも広く使われている。一方で、「気中」に浮かぶ微生物の検出・分析技術は大幅に遅れており、「気中微生物」の挙動把握の情報は、液中に比べて非常に少ないのが現状である。「気中微生物蛍光染色技術」が実現すれば、これまで存在しなかった「迅速で正確なその場測定」が実現し、医療機関内の感染リスクや作業環境管理、環境モニタリング、気中微生物の動態解析などの分野に大きなインパクトを与えると考えられる。また、こうした分野に、微生物を専門とする分野以外からの参入が容易になるため、あらたな学問・産業分野が生まれると考えられ、その波及効果は非常に大きいと期待される。

### 2. 研究の目的

本研究は、気中微生物を「浮遊状態で蛍光染色」するというこれまでにない新しい技術を提案・確立し、これと、液中サンプル分析に確立されている微生物が発する蛍光を直接検出して微生物特有の情報を取り出せる「フローサイトメトリー技術」の「気中微生物への応用」を組み合わせることで、「リアルタイム」で「気中微生物情報」を獲得できる「エアロゾル・フローサイトメトリー」をひとつのシステムで実現しようとするものである。

### 3. 研究の方法

本研究の目的の達成には、「気中微生物蛍光染色技術」として、気中での蛍光色素と微生物の効果的接触と、蛍光染色に要する時間に渡るエアロゾル状態の保持が、また「気中微生物蛍光検出技術」として、ノイズ要因の蛍光色素単体粒子や微小粒子の分離と情報量増のための濃縮といった「エアロゾル分離・濃縮技術」および気中微生物の特性・濃度に応じた流路・光学系・制御系の設計が必要となる。

既往の研究が皆無であるため未知であるが本研究では極めて重要な「短時間の染色特性」と、生成される「蛍光色素特性に与えるエレクトロスプレー操作条件」の影響、モデル微生物エアロゾルを用いた「染色効率」の検討を行うため、下記の検討を行った。

#### (1) モデル微生物を用いた染色特性評価

DAPI とオーラミン 0 でイースト菌を蛍光染色する際の蛍光反応の短時間時間特性を、蛍光顕微鏡による画像観察と蛍光分光光度計で計測される強度から評価した。

#### (2) 蛍光色素ミスト生成特性の評価

エレクトロスプレーとアトマイザを用いて、種々の生成条件 (エレクトロスプレー電圧等運転条件、蛍光染料溶液濃度、溶媒種類) で蛍光色素溶液ミストを生成し、ミスト径分布、荷電量、蛍光色素量 と生成ミスト中色素濃度などの蛍光色素粒子の状態を評価し、安定的に発生できる条件を検討した。

#### (3) 蛍光色素ミストによるモデル微生物エアロゾルを用いた染色特性の評価

気中染色特性を確認するために、気中微生物エアロゾルを発生する乾燥粉体エジェクタ、湿度と濃度を調整するバフファ、別途発生した蛍光染料粒子と混合するチャンバからなる「気中微生物蛍光染色部」を試作し、染色状態を保持したままトラップするインピンジャーと、既存の気中微生物の蛍光検出装置 (TSI BIOTRAK) で染色特性の評価を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) モデル微生物を用いた染色特性評価

DAPI や Auramine-0 などの典型的な色素の水溶液中でのイースト菌の蛍光染色特性を蛍光分光光度計で測定するため、イースト菌を分散させた懸濁液と蛍光染料溶液を試料キュベット内で混合し混合直後の蛍光強度を 1 秒間隔で測定した結果、最大蛍光強度の約 63.2% に相当する「緩和時間」が、DAPI とオーラミン 0 のどちらでも 10 秒以下に調整できることを確認した。特に、イースト菌濃度 10 $\mu$ g/ml、DAPI 濃度 1 $\mu$ g/ml 以上、またはオーラミン 0 濃度 0.1 $\mu$ g/ml 以上の組み合わせで迅速 (緩和時間 5 秒未満) かつ安定した染色が確認された。

## 2) 蛍光色素ミスト生成特性の評価

エレクトロスプレーとアトマイザの両方で蛍光色素粒子の発生を確認した。エレクトロスプレーでの発生濃度がアトマイザでの発生濃度より低かったため、以下3)の検討ではアトマイザを先行して使用した実験を行い、エレクトロスプレーでの発生条件の最適化を継続した。

### (3) 蛍光色素ミストによるモデル微生物エアロゾルを用いた染色特性の評価

インピンジャーと、気中微生物蛍光検出装置の結果は概ね一致しており、エアロゾル酵母と染料ミストを混合することによって、イーストが染色されたことを確認することができた。具体的には、混合エアロゾルの染料濃度と湿度に依存した蛍光強度とV/T比の明確な変化を確認した。この変化に相対湿度が大きな影響を及ぼすことも確認され、DAPIとオーラミン0で異なる結果を示したことから、微生物細胞の活性と染料の浸透に深く関わっていることが示唆された。

これらの結果から、エアロゾル機器で必須の「短時間の微生物染色の実現の可否」、気中微生物・蛍光染料ミスト混合による「エアロゾル染色実現の可否」、染色効率化のための「エレクトロスプレー染料粒子生成」を検討し、適切な条件設定で「10秒以内」の染色が可能なること、「エアロゾル混合による染色」を検証し、試作装置による安定したエレクトロスプレー染料粒子生成を確認した。これは世界で初めての「気中微生物の浮遊状態での蛍光染色」の成功例となる。

## 5. 主な発表論文等

### 〔雑誌論文〕(計1件)

Piriyakarnsakul, Suthida, Kaoru Takarada, Mitsuhiko Hata, and Masami Furuuchi.  
“ Investigation of the Time Dependency for the Staining Process of Microbes: Key Behavior of Microbes for Bio-Aerosol Online Monitoring. ” Japan Sea Reserach 49 (March 26, 2018): 1-10.

### 〔学会発表〕(計2件)

- 1) Suthida Piriyakarnsakul, Kaoru Takarada, Mitsuhiko Hata, Masami Furuuchi, Investigation into Time Dependency of Staining Process of Microbes for Bio-aerosol Online Monitoring, 3rd International Symposium to Promote Joint Usage/Research Center “ International Collaboration Research Base for Reaction of Atmosphere-Marine-Ecosystem Caused by Aerosol ” (国際学会), 2017年
- 2) ピリヤカンスクン スティダー, 寶田 馨, 那須正夫, 畑 光彦, 古内正美, オンライン計測を目的とした微生物気中染色法の検討, 第35回エアロゾル科学・技術研究討論会(ベストポスター賞受賞), 2018年

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名: 畑 光彦

ローマ字氏名: HATA MITSUHIKO

所属研究機関名: 金沢大学

部局名: 地球社会基盤学系

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 00334756

研究分担者氏名: 瀬戸 章文

ローマ字氏名: SETO AKIFUMI

所属研究機関名: 金沢大学

部局名: フロンティア工学系

職名: 教授

研究者番号(8桁): 40344155

研究分担者氏名: 那須 正夫

ローマ字氏名: NASU MASAO

所属研究機関名: 大阪大谷大学

部局名: 薬学部

職名: 客員教授

研究者番号(8桁): 90218040

(2)研究協力者

研究協力者氏名：ピリヤカンサクン スティダー

ローマ字氏名：PIRIYAKARNSAKUL SUTHIDA

研究協力者氏名：アミン ムハンマド

ローマ字氏名：AMIN MUHAMMAD

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。