

2022年度 技術交流助成 成果報告（日本留学）

2022年 6月10日

氏名 Muhammad Amin（ムハマッド アミン）



留 学 先：金沢大学大学院 自然科学研究科 環境
デザイン学専攻

受入先担当者：金沢大学理工研究域・教授 古内正美

留 学 期 間： 2020年 4月1日～2022年 3月30日

1. 留学中に実施した研究テーマ

研究テーマ Bioaerosol Measuring Technology

概要： 本研究は、気中微生物を浮遊状態で蛍光染色する新しい技術を提案・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技術を実現しようとするものである。

1) 微生物の短時間染色特性に及ぼす環境中の相対湿度履歴の影響：浮遊微生物をエアロゾル染色する際の短時間微生物染色特性に及ぼす染色前の環境湿度履歴の影響に基礎的検討を加える。酵母 *S. cerevisiae*（イースト菌）を試料微生物として、相対湿度と保持時間をパラメータとして様々な湿度履歴を持つ微生物試料を作成し、蛍光染色する際の短時間染色特性に検討を加える。

2) 静電噴霧染色粒子の静電沈着を利用した気中浮遊微生物蛍光染色の効率化：従前に検討・確認されている蛍光染料ミストと微生物エアロゾルの混合による気中微生物の染色効率を大幅に改善することを目的として、静電噴霧で蛍光染料粒子を帯電ナノ粒子化して発生させ、これと対局単極荷電した微生物エアロゾルを混合して微生物表面に染料粒子を沈着、その後水蒸気凝縮で染色する方法を提案し、各構成要素技術に実験的検討を行う。

3) 気中微生物のオンライン検知：従前の研究成果と本研究の検討結果に基づき、既存の自家蛍光検知に基づくオンライン検知技術と本研究で提案するエアロゾル染色技術を組み合わせ、対象を限定した微生物を検知する方法について検討を加え、到達技術目標であるエアロゾル・フローサイトメトリー技術の基礎情報を蓄積する。

2. 留学期間中の研究成果

1) 微生物の短時間染色特性に及ぼす環境中の相対湿度履歴の影響

超純水で洗浄したイースト顆粒を供試試料とした。洗浄・乾燥した試料 (0.01g) をスライドガラスに広げ、デシケーター中で一定温度 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$)・相対湿度で保持して、環境履歴 (相対湿度) を模擬した環境調質試料を作成した。ここで、相対湿度は、デシケーター底にシリカゲル, MgNO_3 飽和溶液, 超純水を置くことで、それぞれ相対湿度約 3, 50, 100% に調整した。また保持時間は 6, 12, 36, 60 時間とした。環境調質試料を純水に分散させた ($100 \mu\text{g}/\text{ml}$) 蛍光分析試料と $0.01, 3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で調製した 2 種類の蛍光色素 (4', 6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI) および Auramine-O) を蛍光分析装置内で混合させ (図 1 参照)、混合直後からの蛍光強度の秒単位の経時変化を測定した。図 2 に示すように、平衡水分量に達していると考えられる 60 時間の保持時間の場合、染色時間 (最大蛍光強度 I_{max} に達するまでの時間 (緩和時間) で代表) は、DAPI 濃度の増加に関してピーク値を持つが、その増加とともに秒オーダーまで減少すること、ある程度染料濃度が上がると環境曝露時間にはほぼ影響されないことを明らかにした。Au-O については、湿潤条件時に緩和時間が減少するなど DAPI と若干の差異があるが、十分な染料濃度が確保されれば秒オーダーで染色できることがわかった。このことは、2) で検討する微生物表面への染料粒子沈着が、染色効率の改善に寄与する可能性を示唆している。さらに、保持時間が 30 時間超の場合には、保持時間の影響が少ないことが示唆された。

以上の結果の一部を 2020 年度エアロゾル科学技術研究討論会 (オンライン実施) で公表した。また、その結果を SCI 英文誌投稿論文として準備中である。

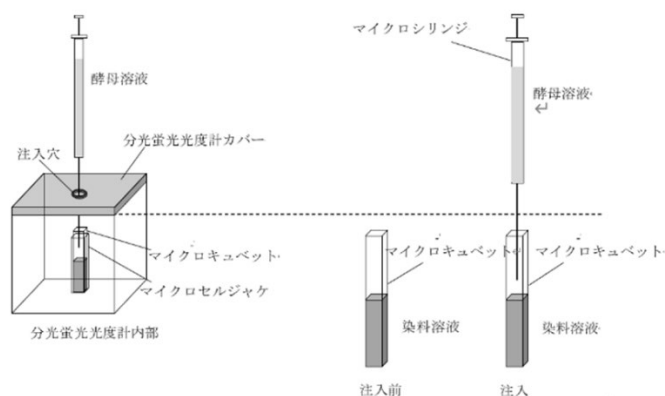


図 1 分光蛍光光度計による短時間染色特性の計測

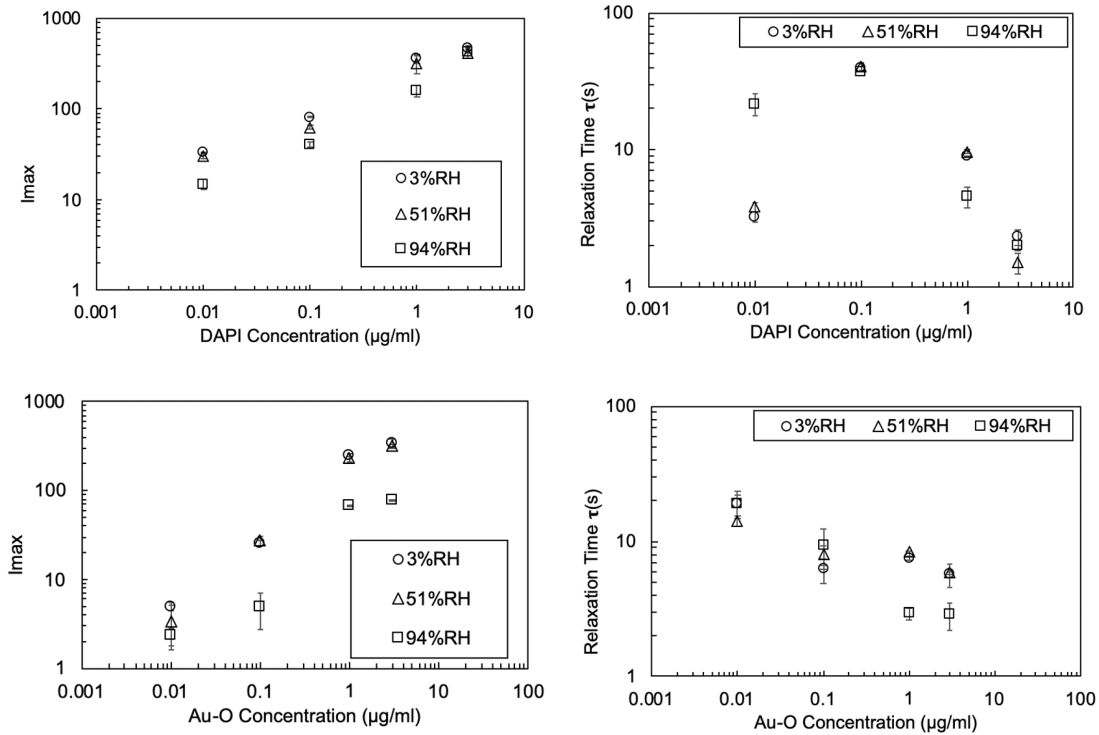


図2 最大蛍光強度と緩和時間に及ぼす蛍光染料濃度と環境履歴湿度の影響

2) 静電噴霧染色粒子の静電沈着を利用した気中浮遊微生物蛍光染色の効率化

蛍光染料溶液の静電スプレーによる生成蛍光染色粒子の粒子径分布に及ぼす蛍光染料濃度と表面張力調整のためのメタノール混合の影響を検討した。DAPI と Auramin-O の場合について、それぞれ図3、4に示す。いずれの蛍光染料の場合も、静電スプレーで40nm(水溶液)付近にピークを持つ正荷電粒子を生成できること、染料濃度を変えることで発生粒子濃度・荷電量を調整できること、適切な濃度のメタノールを添加すると単分散に近い粒子を生成できることが分かった。気中微生物の負極単極荷電装置の試作・性能確認を完了した。

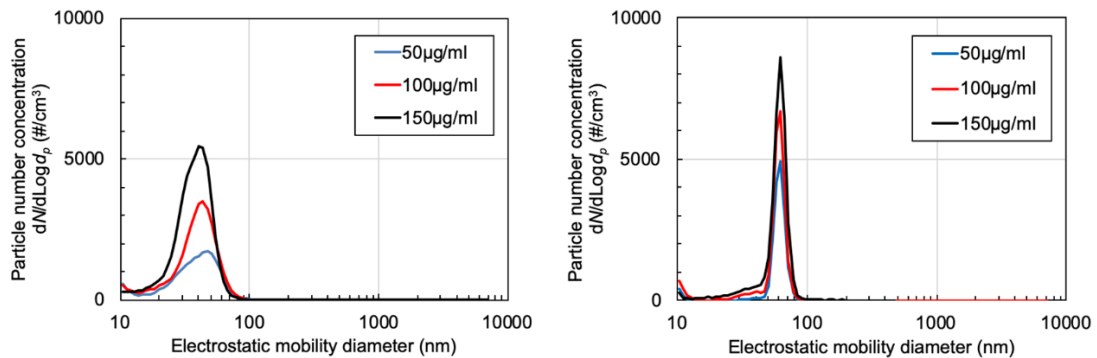


図3 静電噴霧蛍光染料粒子の粒子径分布 (DAPI)

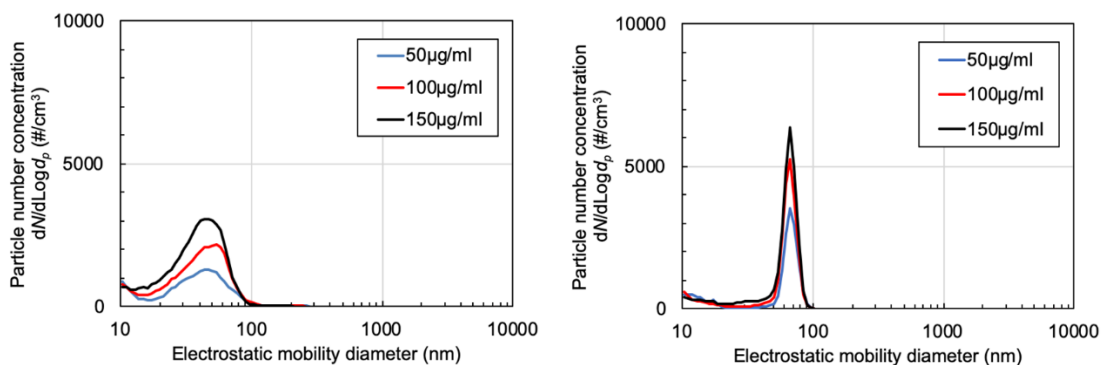


図4 静電噴霧蛍光染料粒子の粒子径分布 (Au-0)

3) 空中微生物のオンライン検知

単極荷電したナノ蛍光染料粒子エアロゾルとイースト菌エアロゾルの混合による静電沈着に及ぼす荷電量やエアロゾル混合条件の影響を検討し、最適な沈着条件を明らかにするため、図5に示す実験装置を試作した。安定した静電沈着条件下で生成する染料粒子沈着イースト菌エアロゾルに水蒸気凝縮させるユニットを追加し、本手法による染色効率の改善を検証している。上述した静電噴霧蛍光染料粒子の静電沈着に基づくエアロゾル染色ユニットと既存の自家蛍光検知に基づくオンライン検知技術を組み合わせ、室内エアロゾル等対象を限定した微生物を検知する方法について基礎的検討を加える。

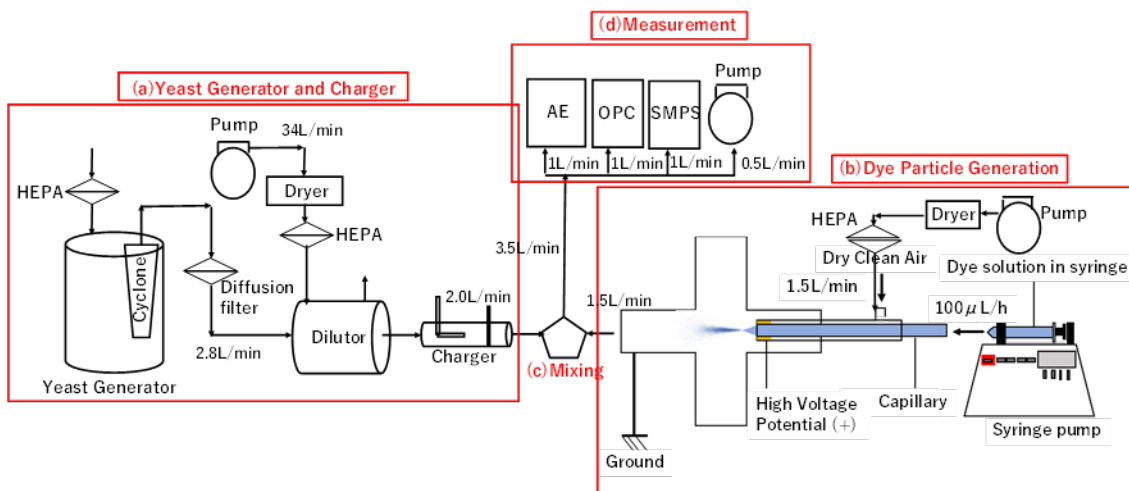


図5 微生物粒子の発生実験装置

3. 今後の研究計画

コロナ禍の状況で実験が遅れ、上記3)の項目を期間内に完了するにいたらなかった。学位取得後金沢大学博士研究員として研究を継続できることになったことから、金沢大学の学生とともに研究を継続する予定である。

4. その他と謝辞（日本での生活・交流の様子など）

財団の助成により、経済的に安定した学生生活が確立したことで、博士後期課程学生として研究室のゼミや議論をリードし、同テーマで連携する修士課程学生、学部学生とも信頼関係を持って研究を遂行することができたことを深く感謝申し上げます。研究成果が認められて早期終了を果たし、博士研究員として研究を継続する環境を得ることができました。また、プライベートの時間でインドネシアと日本の交流を精力的に推進することができたことも、学生生活を充実させたよい思い出です。今後もインドネシアと日本の間で研究・教育・交流の活動を続けたいと思います。

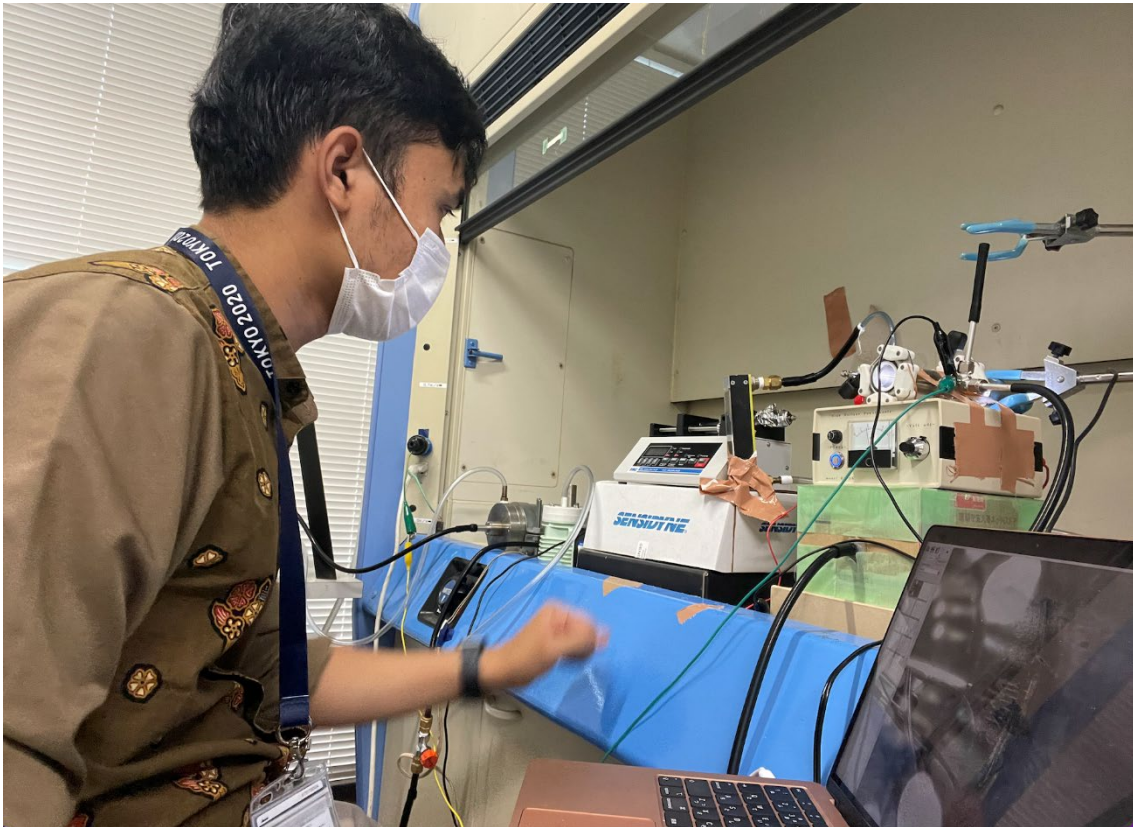


写真1 実験中の様子



写真2 日本の学生との交流