

論文の要旨

氏名 竹中 啓

論文題目 Development of Rapid Measurement Methods of Micro Biological Particles in Sphere of Human Habitation

(生活圏内の生物由来粒子群迅速計測技術に関する研究)

本論文は全 6 章から構成される。各章について概要を以下に纏める。

第 1 章ではこの研究の背景を述べた。地球上には、細菌やウイルスなど様々な生物由来粒子群が存在しており、これらの生物由来粒子群は、人間の活動に大なり小なり影響を与えている。特に我々が取り込む食物や吸気、あるいは体が直接接触するモノなどに存在する生物由来粒子群、いわゆる生活圏に存在する生物由来粒子群の性質・動態を細かく把握することは、快適かつ健康的な生活を送る上で、不可欠である。今後、新しい生物由来粒子群の発見や、その働きに関する基礎的知見が加速度的に増大するものと思われるが、それに伴い、測定対象となる生物由来粒子群の性質、動態を適格に捉えるための、目的に合致した生物由来粒子群の計測技術を迅速に提供することが求められてくる。そこで私たちは、これら生物由来粒子群の密度や組成、性質を迅速に捉えるための計測技術について統計的な側面から整理し、目的に応じた計測方法と、それに合わせたシステム構成を迅速に提示可能な方法論を提案し、3 種類の実機開発への適用を図った。

まず手始めに、現状で明らかになっている生活圏に存在する生物由来粒子群の種類、粒径、引き起こす症状について調べ、次にこれらの生物由来粒子群に対する既存の計測法と、計測精度向上のため実施されている前処理操作について調査・分類を行った。

第 2 章では、上記調査結果に基づき、生活圏内の生物由来粒子群の計測について統計的側面から整理・考察を行った。その結果、生物由来粒子の群としての性質を把握するためには、大量の粒子を実用的な時間内で測定する必要がある点、また、その方法としては、粒子を検出するための測定領域（以下プローブ域と称す）と粒子群を含む標本試料の存在空間（対象試料空間）の相対位置関係から、大きく以下の三つの方法、あるいはその組み合わせに分けられると考えた。まず(1) 対象試料空間内をくまなく、プローブ域を高速に走査させ、内包するすべての粒子を直接計測する方法（スキャン方式）、(2) プローブ域は固定し、対象試料空間自体を前記のプローブ域に移送・集中させ、高速に通過する生物由来粒子群を逐次計測する方法（フロー方式）と、(3) 対象試料空間をプローブ域の体積に近いスケールまで濃縮して一気に群としての性質を把握する方法（濃縮方式）である。(1)スキャン方式と(2)フロー方式は、比較的サイズの大きい粒子など、1 個ずつ認識することが可能な場合に有効な方法であり、(3)濃縮方式は、ウイルス粒子などの極めて微小であり、1 個ずつ認識することが難しい場合に有効な方法である。

空間中に分散する生物由来粒子群が相互干渉せず独立性が保たれるとの前提の下では、生物由来粒子群の個数分布はポアソン分布に従う。そのため、上記(1), (2), (3)のそれぞれの方法について、ポアソン分布に基づく統計理論から、測定結果のばらつきや計数損失の許容範囲を仕様として与えることで、対象試料空間の体積やプローブ域（計測器の視野範囲）の寸法などのコアとなる測定部の仕様を統一的な考え方で導出できるようにした。

次に、これらの方法論を、以下に述べる3種類の粒子計測装置、すなわち食品中の生菌数計測装置、液中微粒子の蛍光指紋計測装置、気中ウイルス含有粒子の検知装置の研究開発に適用した。各々の研究事項及び得られた成果等についてそれぞれ第3章から第5章に纏めた。

第3章では、食品懸濁液中の生菌数を簡便・迅速に計測する装置の開発について述べた。食品中の生菌数計測に一般的に使用されている培養法は、網羅的に生菌数を把握することはできるが、測定に1, 2日要するなど迅速性に欠ける。そこで、本研究では、上記生物由来粒子群の計測方法(1)に相当するフロー方式を導入した。さらに簡便性を向上させるために、食品残渣の除去、生菌の蛍光染色、蛍光フローサイトメトリー法による生菌数計測の工程をカートリッジ内で自動実施する生菌数迅速計測装置を開発し、以下の結論を得た。

- (a) 上記統計理論に基づく仕様決定法により、計数損失が0.05以下、圧力損失が 1.0×10^5 Pa以下となる蛍光フローサイトメトリー用の微小流路の設計を行い、短辺20 μm 、長辺40 μm の矩形の微小流路を設計した。また、50個以上の生菌が含まれる確率が99.9%以上となるように、検体(菌の最小数密度1000個/mL)の測定量を計算し、測定量を100 μl と設定した。
- (b) 生菌及び死菌を染色する蛍光色素にSYTO 41®(最大蛍光波長:450 nm)とLDS751(最大蛍光波長:720 nm)を、死菌を染色する蛍光色素にSYTOX ORANGE®(最大蛍光波長:570 nm)を選択した。生菌のみがSYTO 41®とLDS751の蛍光を発し、夾雑物である死菌、蛍光色素の粒子、野菜の色素体と生菌の判別が可能になった。
- (c) 大腸菌液中の生菌数を本装置と培養法で計測し、相関性を調べた。上記統計理論で決定した生菌数密度範囲(1.0×10^3 - 1.0×10^6 個/mL)で相関係数 R^2 は0.97となり、本装置の測定結果と培養法の測定結果は高い相関性があり、上記統計理論に基づく仕様決定方法は、有効であることを確認した。
- (d) 野菜のホモジナイズ液中の生菌数を本装置と培養法で計測し、計測結果の相関性を調べた。生菌数濃度が 1.0×10^3 - 1.0×10^6 個/mlの範囲で相関係数 R^2 はほうれん草が0.96、人参が0.91、紫キャベツが0.90、もやしが0.93となり、本装置は培養法と高い相関性があり、蛍光色素による生菌判別法は有効であることを確認した。

第4章では、粒子群の計測方法(1)フロー方式を更に発展させて、液中の単粒子群のより詳細な性質を迅速に計測可能とする装置の研究開発を実施した。蛍光分光光度計で励起・蛍光スペクトル(蛍光指紋)を計測することは液体中の粒子分布の把握に有効だが、粒子の蛍光指紋を順次一個ずつ計測することは現状では不可能であるため、少ない粒子群を捉えることが困難である。そのため本研究では分光した白色光を励起光とする蛍光フローサイトメーターを開発し、単粒子の蛍光指紋による粒子判別を実施し、以下の結論を得た。

- (a) 上記統計理論に基づく仕様決定法により、設計した測定領域(プローブ域)(200 $\mu\text{m} \times 350$ μm)に分光した励起光(波長域:400 nm - 650 nm)を照射し、粒子の蛍光指紋(波長域:450 nm - 700 nm)を計測可能な光学系を設計・製作した。粒子の流れ方向に励起光の波長を短波長から長波長に変化させることで、粒子の蛍光指紋を取得する。
- (b) 蛍光微粒子(粒径:2 μm 、最大励起波長:441 nm、最大蛍光波長:486 nm)の測定を実施した。上記統計理論から決定した粒子数濃度の範囲内(1.0×10^5 個/L以下)において、複数微粒子の同時計測は発生せず、単粒子の蛍光指紋を計測することができた。上記統計理論による仕様決定方法は有効であることを確認した。
- (c) トマト及びほうれん草の懸濁液を本装置で測定し、蛍光指紋の違いによる、懸濁液中の微粒子分析を実施した。トマトの懸濁液には細胞由来の微粒子が多く、一方、ほうれん

草の懸濁液は、細胞由来の粒子の他、葉緑体に由来する粒子が多いことを確認した。

第5章では気中のウイルス含有粒子の計測装置の開発を実施した。呼気中のウイルス含有粒子を検知することで呼吸器系感染症の自己検査が可能になる。ただしウイルス自体は極めて微小（最小粒径 $0.3 \mu\text{m}$ ）なため、本研究においては、上記生物由来粒子群の計測方法（3）に相当する濃縮方式を導入した。具体的には呼気を含むサンプリングバッグとカートリッジを用いる装置の設計、試作及び評価を実施し、以下の結論を得た。

- (a) 本研究では濃縮方式の一つであるインパクション法を導入し、ウイルス含有粒子の捕集と蛍光検知を組み合わせた方法を考案した。
- (b) 上記統計理論に基づく仕様決定法に加えて、気流のレイノルズ数とストークス数の検討と、粒子軌道解析の結果から、109個のノズル（孔径 $70 \mu\text{m}$ ）を備えたインパクション用カートリッジを設計・試作した。カートリッジはエアロゾル化した粒径 $0.3 \mu\text{m}$ の微粒子を97%以上捕集した。
- (c) エアロゾル化した大腸菌の計測を実施し、上記統計理論で決定した数密度範囲（ 1.0×10^5 個/L 以下）において、粒子数と装置の出力値は高い相関性があり、上記統計理論による仕様決定方法は有効であることを確認した。
- (d) インフルエンザウイルス粒子（数密度： 8.3×10^3 - 1.0×10^4 個/L）の計測を実施し、粒子数と装置の出力値は高い相関性があり、微小なインフルエンザウイルス粒子の計測が可能であることを確認した。

第6章では、最初にここまで得られた研究成果をまとめ、提案した方法論の有効性について総括する。

- (1) 食品中の生菌数計測装置を設計・試作した。 10^3 - 10^6 個/ml の生菌数密度における本装置の測定結果と培養法の測定結果は高い相関性（ $R^2=0.97$ ）があり、計測可能であることを確認した。
- (2) 液中微粒子の蛍光指紋計測装置を設計・試作した。決定した粒子数密度範囲（ 1.0×10^4 個/L 以下）において、粒子1個の蛍光指紋の計測が可能とであることを確認した。
- (3) 気中ウイルス含有粒子をインパクション捕集・蛍光検知するカートリッジおよび装置を設計・試作した。決定した粒子数密度範囲（ 1.0×10^5 個/L 以下）にて粒子数と装置の出力値は高い相関性があり、計測可能であることを確認した。

以上より、上記統計理論に基づく仕様決定方法は、生活圏内の生物由来粒子群の計測装置の設計に有効であることを確認した。