

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：13201

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）

研究期間：2019～2022

課題番号：19KK0263

研究課題名（和文）南米チリにおける大気汚染とバイオエアロゾルの統合解析による健康影響評価基盤の構築

研究課題名（英文）Establishment of basis for evaluation of airborne microbiological safety to human health through the integrated analyses of air contamination and microbiome in Chile

研究代表者

田中 大祐（Tanaka, Daisuke）

富山大学・学術研究部理学系・教授

研究者番号：40360804

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,100,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、研究報告がほとんどない南米チリの大気微生物について実態を把握し、大気汚染との関連を把握することとした。2021年にテムコにて捕集された大気試料について、細菌群集構造ではProtobacteria門、Firmicutes門、Actinobacteria門が、真核生物群集構造では真菌類、緑色植物、原生生物が優勢であり、季節変化が認められた。一方、テムコの大気から単離された細菌24株について同定を行ったところ、Arthrobacter属、Pseudomonas属、Psychrobacter属などが認められ、これらの菌株の紫外線耐性と乾燥耐性についてデータを得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究での成果は、大気汚染が重要な問題となっている南米チリの大気微生物に関する基礎データとなり、今後長期に渡り当該国でのバイオエアロゾル研究や公衆衛生に貢献することが期待できる。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to understand airborne microorganisms in Chile and their relationship to air pollution. We analyzed the bacterial community structure of air samples collected at Temuco in 2021. Protobacteria, Firmicutes, and Actinobacteria were dominant, and the community structure tended to change with seasons. In the eukaryotic community structure, fungi (phylum Basidiomycota, Ascomycota), plants (phylum Streptophyta), and protists (phylum Apicomplexa) were dominant, and seasonal changes were also observed. Meanwhile, 24 bacterial strains were isolated from outdoor air samples in Temuco using the culture methods. They were mainly belonged to the genera Arthrobacter, Pseudomonas, and Psychrobacter. Regarding UV resistance of these strains, Arthrobacter and Psychrobacter showed higher resistance than Pseudomonas. There was no significant difference in drought tolerance among these three genera.

研究分野：環境微生物学

キーワード：チリ バイオエアロゾル モニタリング 細菌 真核生物 メタゲノム解析 大気汚染物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

大気中には、細菌、真菌、花粉などの生物粒子(バイオエアロゾル)が至るところに存在している。これらは、ヒトの健康、農業、生態系に影響することが懸念され、研究が世界的に活発化している。その影響力から、バイオエアロゾルに関する研究報告は増加してきていた一方で、その現状が南半球では不明であった。そこで、本国際共同研究では、南米チリにおけるバイオエアロゾルの実態を把握するため、現地の研究者、とくに極限環境微生物学者と連携して実施する必要があった。

チリではバイオエアロゾルに関する研究は我々が知る限り僅か3報であった (Barraza et al. 2016; Escalante et al. 2014; Henríquez et al. 2001)。そのため、チリ側の共同研究者も現状を把握すべくバイオエアロゾル研究を推進したいと考えており、サンプリングと予備実験をすでに開始していた。チリは、一部の都市を除いては人為的な大気汚染が少なく、また地理的に近隣諸国からの越境汚染の影響が少ないため、その都市の大気汚染の有無と大気微生物の関連を調べるのに適している。また、チリは南北に細長く、北部の砂漠気候から南部のツンドラ気候に至るまで気候が幅広いので、気候変動の観点から長期モニタリングが求められる大気バイオエアロゾルと大気循環との関連を研究していくのに魅力があり、本国際共同研究を中長期的に維持・発展していく意義が大きいと考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、研究報告がほとんどない南米チリの大気微生物について病原性を有するものに着目して実態を把握し、大気汚染との関連や、大気汚染物質による細胞保護作用を把握する。また、長期モニタリングが求められる本課題の持続的な発展のため、本国若手研究者を部分的に主体とした交流を活性化させることとした。

3. 研究の方法

大気試料は、粗大粒子 PM₁₀、微小粒子 PM_{2.5}、そして 0.5 μm 以上の微粒子を全て高速吸引捕集できるサンプラーで捕集した。サンプラーとしては、粗大粒子 PM₁₀ と微小粒子 PM_{2.5} はハイボリュームサンプラー (HV-500R, 柴田科学) にて、バイオエアロゾルは丸山が保有する液体サイクロンエアサンプラー (コリオリス μ) を用いた。サンプリングは、ハイボリュームサンプラーは 24 時間、コリオリス μ は 5 分間、それぞれ行った。これらの作業をテムコとプンタアレナスの 2 地点で行った。捕集した試料について、メタゲノム解析 (微生物群集)、化学成分分析 (大気汚染物質) などを行い、気象データ (気温、湿度、風速、降水量、) も含めてサンプリング時の状況を多面的に把握した (表 1)。

微生物群集構造解析は、まず大気試料から FastDNA SPIN Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いてゲノム DNA を抽出した。抽出した DNA を鋳型とし、細菌の 16S rRNA 遺伝子の V3-V4 領域と真核生物の 18S rRNA 遺伝子の V8 領域を PCR 法により増幅した。増幅産物は、Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter) を用いて精製した。精製した増幅産物を等モル濃度になるよう加え、MiSeq を用いてペアエンド法によるシーケンスを行った。得られた塩基配列は、細菌の 16S rRNA 遺伝子解析のためには、葉緑体およびミトコンドリアの配列を除去した。

また、培養法による微生物の単離を行った。その際に R2A 培地と YPD 培地を用いた。さらに、単離された細菌について、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく同定を行った。微生物機能の解析として、乾燥耐性と紫外線耐性を調べた。乾燥耐性については、PEG6000 を加えた液体培地により検討した (Ghosh et al., 2019)。紫外線耐性については、UV-C ランプ (GL-15, HITACHI) と Nutrient Agar を用いて検討した (Tian et al., 2007)。

表1. サンプリングに関する情報 (テムコ)

No.	Sampling date	Fraction	Temperature (°C)	Relative humidity (%)	Wind speed (m s ⁻¹)	Precipitation (mm)	PM2.5 (μg m ⁻³)	PM10 (μg m ⁻³)
1	2021/6/14	PM10	4.5	84.7	1.4	0	87	90
2	2021/6/15	PM2.5	7.2	66.5	1.1	0	66	78
3	2021/6/17	PM2.5	13.9	86.7	0.6	0	153	173
4	2021/6/16	PM10	15.9	84.3	0.8	0	140	164
5	2021/6/23	PM10	10.3	82.5	2.4	0	12	15
6	2021/6/29	PM10	5.3	91.2	0.6	0	157	182
7	2021/6/30	PM2.5	7.8	95.3	1.0	0	117	125
8	2021/9/7	PM2.5	9.6	75.7	1.1	0	28	36
9	2021/9/8	PM10	12.9	87.9	1.4	0	36	42
10	2021/10/12	PM10	16.0	86.5	1.0	0	18	15
11	2021/10/13	PM2.5	4.6	81.4	2.8	0	11	45

4. 研究成果

(1) 細菌群集構造解析

2021年にラ・フロンテラ大学（テムコ）にて捕集された大気試料について解析を行った（表1）。まず、細菌群集構造を16S rRNA遺伝子を標的としたアンプリコンシーケンスにて解析したところ、門レベルではProtobacteria門、Firmicutes門、Actinobacteria門が、綱レベルではBacilli綱、Actinobacteria綱、Alphaproteobacteria綱、Clostridia綱、Betaproteobacteria綱、Gammaproteobacteria綱がそれぞれ優勢であり、粒径よりも季節によって群集構造が異なる傾向が認められた（図1）。さらに、ヒトの健康に影響する可能性がある*Acinetobacter*属、*Clostridium*属、*Legionella*属、*Mycobacterium*属、*Pseudomonas*属、*Staphylococcus*属、*Streptococcus*属の細菌が検出された。

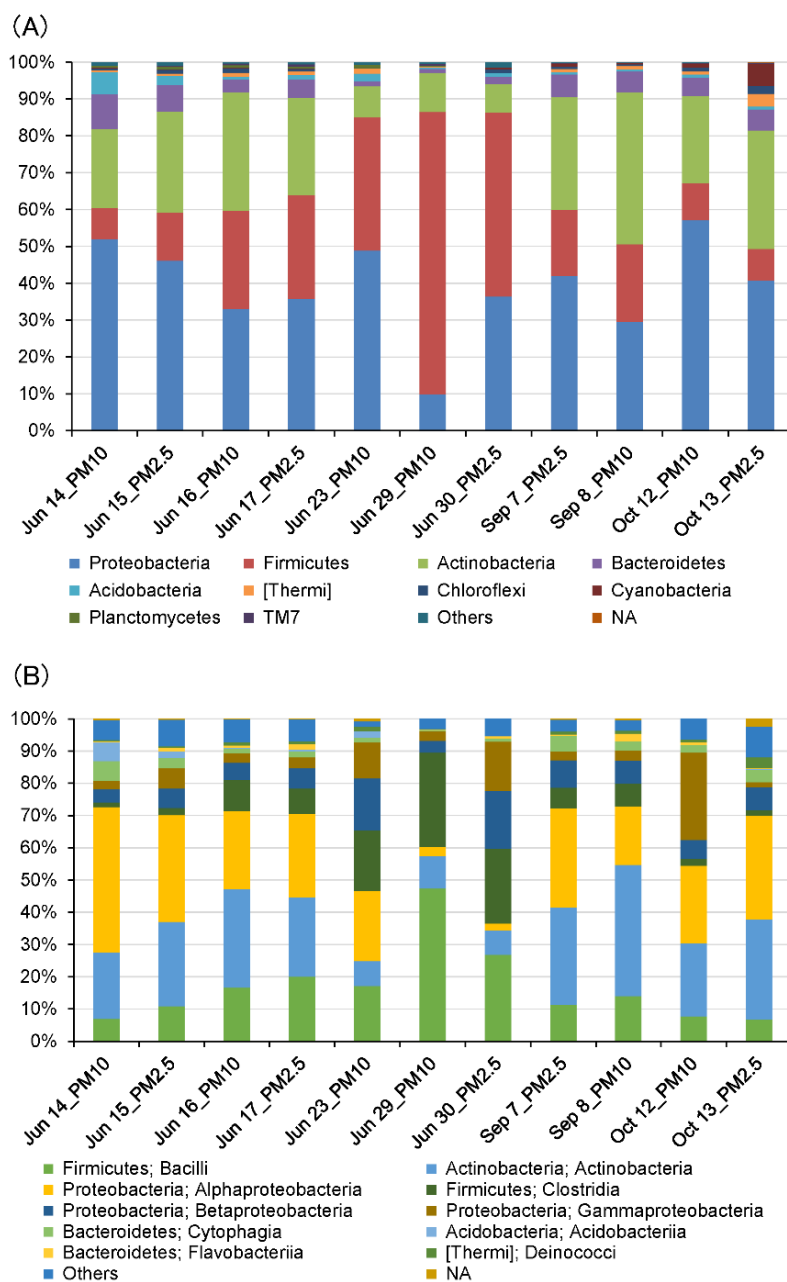


図1. テムコで捕集された微小粒子（PM_{2.5}）および粗大粒子（PM₁₀）における、門（A）および綱（B）レベルでの優勢な細菌の相対存在量

(2) 真核生物群集構造解析

真核生物群集構造に関して、門レベルでは真菌類 (Basidiomycota 門, Ascomycota 門), 緑色植物 (Streptophyta 門), 原生生物 (Apicomplexa 門) が、綱レベルでは真正担子菌綱 (Agaricomycetes 綱), マツ綱 (Pinopsida 綱), クロイボタケ綱 (Dothideomycetes 綱), モクレン綱 (Magnoliopsida 綱), コノイド綱 (Conoidasida 綱) が優勢であり、こちらも季節によって群集構造が異なる傾向が認められた (図 2)。さらに、ヒトの健康に影響する可能性がある *Alternaria* 属, *Aspergillus* 属, *Cladosporium* 属, *Fusarium* 属の真菌が検出された。

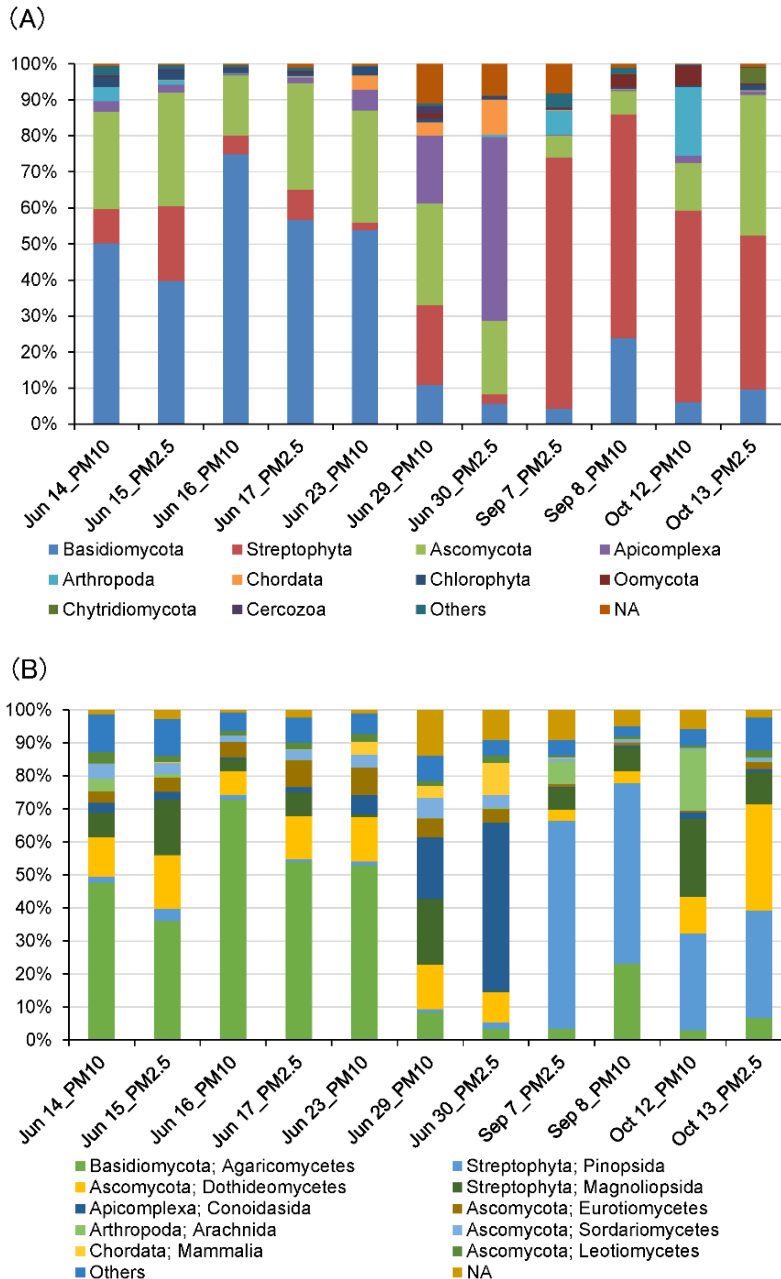


図 2. テムコで捕集された微小粒子 (PM_{2.5}) および粗大粒子 (PM₁₀) における, 門 (A) および綱 (B) レベルでの優勢な真核生物の相対存在量

(3) 単離菌の環境ストレス耐性

テムコの大气から単離された細菌 24 株について、16S rRNA 遺伝子塩基配列に基づく同定を行ったところ、*Arthrobacter* 属, *Pseudomonas* 属, *Psychrobacter* 属, 他 6 属が認められた。これらの菌株について大气環境で受けるストレスに対する耐性を検討した。紫外線耐性について、*Arthrobacter* 属や *Psychrobacter* 属の菌株は比較的高い耐性を示したが、それらに比べて *Pseudomonas* 属は低い耐性を示した。乾燥耐性については、これら 3 属で大きな差異が認められなかった。また、化学成分に関して、イオン成分や無機元素成分のデータも得た。今後、ゲノム解析や大气汚染物質による微生物の保護作用について検討する予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Nakamura, A., Nakatani, N., Maruyama, F., Fujiyoshi, S., Marquez-Reyes, R., Fernandez, R., Noda, J.	4. 巻 13
2. 論文標題 Characteristics of PM2.5 Pollution in Osorno, Chile: Ion Chromatography and Meteorological Data Analyses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Atmosphere	6. 最初と最後の頁 168 ~ 168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/atmos13020168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka, D., Uei, D., Matsui, J., Matsunaga, M., Morimoto, M., Maruyama, F.	4. 巻 13
2. 論文標題 Impact of Hinoki Cypress Wood on Diversity of Microflora: A Case Study from Owase City Hall	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Diversity	6. 最初と最後の頁 473 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/d13100473	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ruiz-Gil, T., Acuna, J. J., Fujiyoshi, S., Tanaka, D., Noda, J., Maruyama, F., and Jorquera, M. A.	4. 巻 145
2. 論文標題 Airborne bacterial communities of outdoor environments and their associated influencing factors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Environment international	6. 最初と最後の頁 106156
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.envint.2020.106156	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Tanaka, D., Fujiyoshi, S., Maruyama, F., Goto, M., Koyama, S., Kanatani, J. I., Isobe, J., Watahiki, M., Sakatoku, A., Kagaya, S., and Nakamura, S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Size resolved characteristics of urban and suburban bacterial bioaerosols in Japan as assessed by 16S rRNA amplicon sequencing	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 12406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-68933-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 田中大祐
2. 発表標題 大気バイオエアロゾルの粒径別特性と健康影響の可能性
3. 学会等名 第62回大気環境学会年会 特別集会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田中大祐
2. 発表標題 安全・安心を提供する空飛ぶバイオエアロゾル検出評価技術
3. 学会等名 2021年度 新技術説明会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Daisuke Tanaka, Akihiro Sakatoku, So Fujiyoshi, Jun Noda, Fumito Maruyama
2. 発表標題 Overview of this bioaerosol research with background knowledge
3. 学会等名 A SPECIAL RESEARCH PRESENTATION（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akihiro Sakatoku
2. 発表標題 Isolation and characterization of a novel seaweed-degrading bacterium
3. 学会等名 A SPECIAL RESEARCH PRESENTATION（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Jun Noda
2. 発表標題 Atmospheric Science and One Health: Elucidating Airborne Transmission
3. 学会等名 A SPECIAL RESEARCH PRESENTATION (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fumito Maruyama
2. 発表標題 Past, current, future academic research and industry-government collaboration
3. 学会等名 A SPECIAL RESEARCH PRESENTATION (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中大祐, 藤吉奏, 丸山史人, 後藤元志, 小山慎一, 金谷潤一, 磯部順子, 綿引正則, 酒徳昭宏, 加賀谷重浩, 中村省吾
2. 発表標題 アンダーセンエアサンプラーとIllumina MiSeqを用いた富山市と横浜市における細菌バイオエアロゾルの特徴
3. 学会等名 第13回大気バイオエアロゾルシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中大祐, 嶋田崇志, 関誠, 酒徳昭宏, 中村省吾, 遠里由佳子, 小山慎一, 藤吉奏, 丸山史人
2. 発表標題 国内2地点で捕集した粒子状物質における細菌群集構造と化学組成の関係
3. 学会等名 第39回エアロゾル科学・技術研究討論会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中大祐, 藤吉奏, 丸山史人, 遠里由佳子, 嶋田崇志, 小山慎一, 関誠, 酒徳昭宏, 中村省吾
2. 発表標題 大気中における細菌群集構造と化学組成との関係
3. 学会等名 日本微生物生態学会 第35回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中大祐, 宮田凌雅, 関 誠, 酒徳昭宏, 藤吉 奏, 丸山史人
2. 発表標題 富山県の大気中における培養可能な嫌気性細菌Clostridium の季節変化
3. 学会等名 第14回大気バイオエアロゾルシンポジウム
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 関誠, 藤吉奏, 丸山史人, 遠里由佳子, 嶋田崇志, 小山慎一, 酒徳昭宏, 中村省吾, 田中大祐
2. 発表標題 日本の2地点で捕集した粒子状物質における細菌群集構造と化学組成の関係
3. 学会等名 環境化学物質3学会合同大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

日本の都市域および郊外における細菌バイオエアロゾルの特徴を解明（プレスリリース）
<https://www.u-toyama.ac.jp/outline/publicity/pdf/2020/20200727.pdf>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	酒徳 昭宏 (Sakatoku Akihiro) (20713142)	富山大学・学術研究部理学系・講師 (13201)	
研究分担者	藤吉 奏 (Fujiyoshi So) (20805808)	広島大学・IDEC国際連携機構: PHIS・助教 (15401)	
研究分担者	丸山 史人 (Maruyama Fumito) (30423122)	広島大学・IDEC国際連携機構: PHIS・教授 (15401)	
研究分担者	能田 淳 (Noda Jun) (70551670)	酪農学園大学・獣医保健看護学類・教授 (30109)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計1件

国際研究集会 A SPECIAL RESEARCH PRESENTATION	開催年 2019年～2019年
---	--------------------

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
チリ	ラ・フロンテラ大学	マガジャネス大学	ロスラゴス大学	
英国	エセックス大学			
スペイン	Barcelona Institute for Global Health			