

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：84407

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25281030

研究課題名(和文) 黄砂とともに飛来する微生物の群集構造の網羅的解析：環境・生態系・健康影響評価

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of microbial population transported by Asian dust events and investigation of their effects on environment and health

研究代表者

山口 進康 (Yamaguchi, Nobuyasu)

大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・総括研究員

研究者番号：20252702

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、黄砂の発生源に近い中国・北京および発生源から離れた日本の大阪において、生活環境の大気中の微生物(細菌および真菌)を対象として、黄砂非発生時も含めた連続モニタリングを実施し、微生物群集を網羅的に解析することにより、黄砂現象にともなって移動する微生物が下流域の環境・生態系や健康に与える影響を、時間的かつ空間的に考察した。細菌群集構造解析の結果、大阪では発生源に由来する細菌は減少し、移動経路の地上の影響および測定地周辺の影響をより強く受けていた。したがって、黄砂現象が環境およびヒトの健康に与える影響は、発生源から離れるにつれて、小さくなっていくと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Aeolian dust particles are known to carry microbes. The effect of wind-borne microbes on public health and ecosystems at various downwind distances from the dust source regions must be clarified, but has not yet been reported and most studies have only investigated the effects during dust seasons. This study monitored and compared the microbial abundance and community composition in outdoor aerosol samples collected in Osaka, Japan and Beijing, China. The Asian dust in Beijing contained bacterial cells 4 times higher than in Osaka. Dominant bacteria in Asian dust collected in Osaka and Beijing were similar, however the bacterial community composition in Asian dust days varied more widely in Beijing than in Osaka. These results indicate that bacteria in Asian dust does not immediately influence indigenous bacterial communities in distant downwind areas, but atmospheric bacterial communities nearer the dust source are more affected by aeolian dust than their distant counterparts.

研究分野：環境微生物学

キーワード：黄砂 バイオエアロゾル 微生物群集構造解析 環境影響 健康影響

1. 研究開始当初の背景

黄砂による微生物の移動に関しては、未知の部分が多いにもかかわらず、病原微生物が飛来する等の情報もあり、科学的な裏付けにもとづくリスク・コミュニケーションが緊急の課題となっている。その解決のためには、黄砂現象にともなって移動する微生物の現存量や群集構造(属種の構成)に関する高精度なデータを得るとともに、移動にともなう変化を明らかにする必要がある。

さらに、黄砂発生時と非発生時の大気中の微生物群集の変化を比較し、非発生時における変動をふまえた考察を行う必要がある。

しかしながら、これまでの研究は、特定の地点で黄砂発生時に採取した試料のみを用いて実施されたものが多く、黄砂発生時と非発生時とを比較した研究は行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、黄砂の発生源に近い中国・北京および発生源から離れた日本の大阪において、生活環境の大気中の微生物(細菌および真菌)を対象として、黄砂非発生時も含めた連続モニタリングを実施し、微生物群集を網羅的に解析することにより、その変動を黄砂の発生および季節・経年変動をふまえて解析すること、さらにその結果をもとに、黄砂現象にともなって移動する微生物が下流域の環境・生態系や健康に与える影響を時間的かつ空間的に考察することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 大気エアロゾルのサンプリング

国内におけるサンプリングは、大阪大学(大阪府)の屋上で、2013年5月から2015年4月まで行い、計44試料を得た。黄砂発生の有無は、環境省のLIDARデータおよびサンプリング地点における視程により判断した。

中国におけるサンプリングは、中国農業大学(北京)のベランダで、2015年4月から6月にかけて行い、計57試料を得た。黄砂発生の有無は、捕集した大気エアロゾルの重量およびサンプリング地点における視程により判断した。また、中国国内の大気状況のレポート(<http://www.chinaairdaily.com/>)も利用した。

サンプリングにはハイボリュームサンプラーを用い、孔径0.6 μmのガラスファイバーフィルターに大気約100 m³を吸引し、大気エアロゾルを捕集した。サンプリング時には気温、湿度、風向、風速を測定するとともに、パーティクルカウンターを用いて粒度分布を測定した。

(2) 微生物DNAの抽出

大気エアロゾルを捕集したガラスファイバーフィルターをビーズビートングにより粉碎した後、Tsai法によりDNAを抽出し

た。抽出したDNAは市販のキットを用いて精製した。

(3) 微生物現存量の測定

細菌現存量の測定には、16S rRNA遺伝子を標的とした定量的PCR法を用いた。プライマーは16S rRNA遺伝子の相同領域を標的とするEUB f933およびEUB r1387を用いた。

真菌現存量の測定にあたっては、真菌群集構造解析の結果をもとに、優占種であった*Alternaria alternata*を対象とし、本菌の18S rRNA遺伝子を標的とした定量的PCR法により行った。プライマーはAaltF1およびAltrR1-1、増幅産物の特異的検出用プローブはAaltP1を用いた。

(4) 微生物群集構造の解析

細菌および真菌の群集構造の解析はamplicon sequencing法を用いて行った。

細菌群集構造の解析には16S rRNA遺伝子のV6からV8領域を標的とするプライマーである968fおよび1401rを用いた。

真菌群集構造の解析には18S rRNA遺伝子のITS領域を標的とするプライマーであるITS1FおよびITS2を用いた。

各試料の群集構造の類似度解析には多次元尺度法を用いた。

4. 研究成果

(1) 国内(大阪)の生活環境の大気中の微生物群集

黄砂発生源から3,000~5,000 kmと遠く離れた大阪においては、生活環境の大気中の細菌量は黄砂現象にともなって黄砂非発生時の約5倍に増加するものα(平均10⁴ cells/m³)、黄砂非発生時においても10³~10⁴ cells/m³の範囲で大きく変動し、黄砂発生時に近い値まで増加することもあること、また降雨の影響や季節変動は見られないことを明らかにした(図1)。

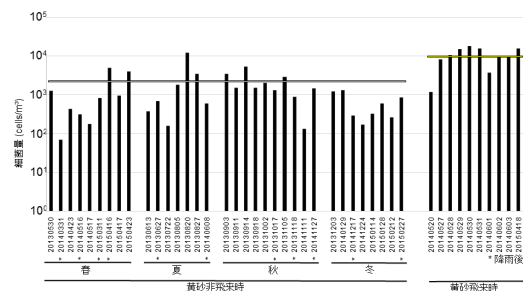


図1. 大阪における生活環境の大気中の細菌現存量 (cell 数計算: 3.1 ~ 5.7 copies/cell)

細菌群集構造は黄砂発生時と非発生時で大きな変化はなく、黄砂発生時の優占種は土壌をはじめとする環境中に広く分布する*Actinobacteria* (25 ± 9%)、乾燥に強い耐性を持つ*Cyanobacteria* (15 ± 8%)、主に土壌中に存在する*Acidobacteria* (13 ± 6%)、芽胞を形成する*Bacilli* (11 ± 7%)であったのに対し、非発生

時の優占種は *Acidobacteria* ($25 \pm 19\%$)、*Actinobacteria* ($17 \pm 9\%$)および *Bacilli* ($15 \pm 16\%$)であった。また、黄砂非飛来時であっても芽胞形成菌が細菌群集の8割を超える日があることがわかった(図2)。

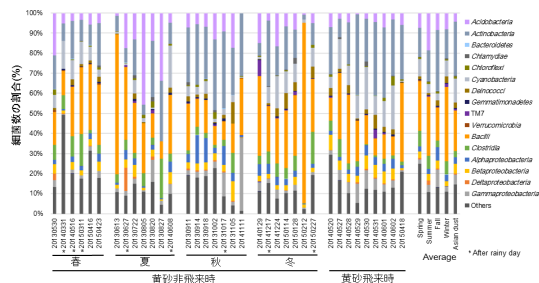


図2. 大阪における生活環境の大気中の細菌群集構造(平均リード数: 3,226 reads)

一方、真菌群集については、黄砂発生時に *Alternaria* 属菌の割合が増加し(図3)、*A. alternata* の現存量が増加することがわかった(図4; 黄砂飛来時の平均値 1×10^5 copies/m³、黄砂非飛来時の平均値 3×10^4 copies/m³)。

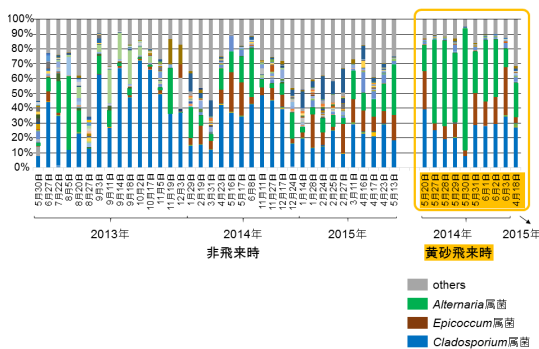


図3. 大阪における生活環境の大気中の真菌群集構造(平均リード数: 約 30,000 reads)

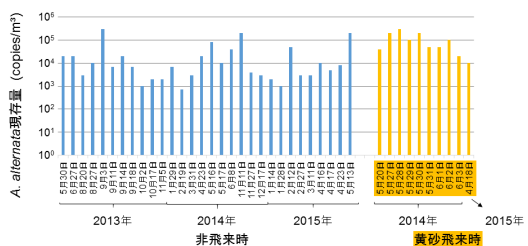


図4. 大阪における生活環境の大気中の *A. alternata* 現存量

(2) 中国(北京)の生活環境の大気中の微生物群集

黄砂発生源により近い(500~2,500 km)中国・北京においては、大規模な黄砂の発生時(2015年4月15日)に生活環境の大気中の細菌の現存量が非発生時の1,000倍に増加すること、および黄砂非発生時の細菌現存量は北京と大阪で大きな差がないことがわかった(図5)。

また黄砂発生源から離れた大阪とは異なり、黄砂発生時の細菌群集構造が試料間で大きく変化することを明らかにした。黄砂飛来時には黄砂非飛来時と比べ、芽胞形成菌である *Bacilli* および *Clostridia* が増加し、5月後半から *Cyanobacteria* が増加した(図6)。

これらの結果より、黄砂発生源に近い地域では遠い地域に比べて、大気中の細菌群集が黄砂現象の影響をより強く受けることを実証した。

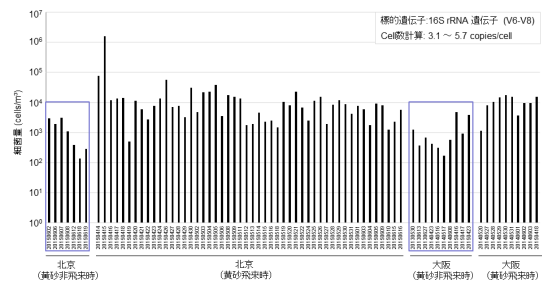


図5. 北京における生活環境の大気中の細菌現存量 (cell 数計算: 3.1 ~ 5.7 copies/cell)

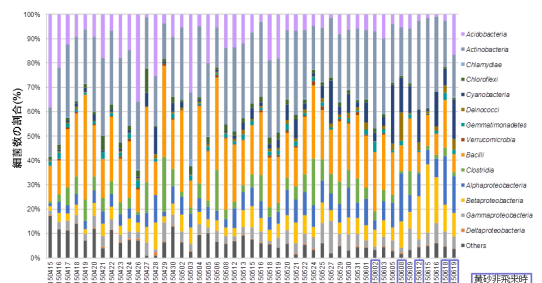


図6. 北京における生活環境の大気中の細菌群集構造(平均リード数: 5,100 reads)

また、北京に2015年4月15日に到達した黄砂が4月18日に大阪に到達したことから、これらの試料について細菌現存量を比較した結果、北京では 10^6 cells/m³ であったのに対し、大阪では 10^4 cells/m³ と1/100に減少していた。細菌群集構造については、北京・大阪ともに *Acidobacteria*、*Actinobacteria* や *Bacilli* が優占しているものの、*Acidobacteria* の割合が2015年4月15日の北京では38%であったのに対して、4月18日の大阪では20%に減少した一方、大阪では北京よりも *Actinobacteria* と *Bacilli* の割合が増加した(それぞれ20%、30%、14%、23%)。これは黄砂が北京から大阪まで移動する間に、細菌群集が温度変化や紫外線照射、水分や栄養分の枯渇などの影響を受けた結果、環境ストレスに強い細菌が残存したものと考えられた。

一方、生活環境の大気中の真菌に関しては、黄砂発生時の真菌群集構造が北京と大阪で類似しており(図7)、また大阪と同様に北京においても黄砂発生時に *A. alternata* の現存量が増加することがわかった(図8)。

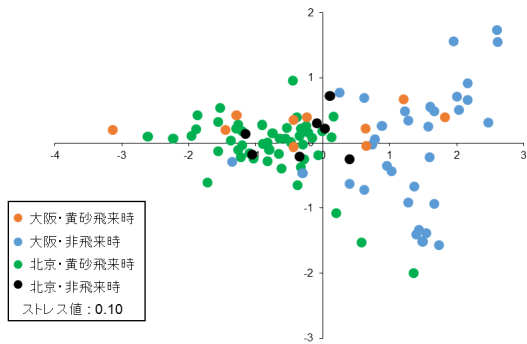


図7．北京および大阪の生活環境の大気中の真菌群集の類似度

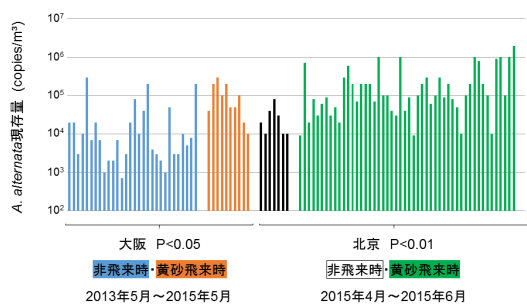


図8．北京および大阪の生活環境の大気中の *A. alternata* 現存量の比較

(3) 総括

今回の研究により、黄砂発生源に近い地域では遠い地域に比べて、生活環境の大気中の細菌群集が黄砂現象の影響をより強く受けることを実証した。一方、真菌群集については、黄砂発生源からの距離にかかわらず、黄砂発生時に *Alternaria alternata* の現存量が増加し、真菌群集の多様性が減少することを示した。

これらの結果をふまえ、微生物が黄砂現象にともなって長距離移動する際には、発生源から離れるにつれて、発生源に由来する細菌は減少し、移動経路間の地上の影響および測定地周辺の影響をより強く受けることから、環境およびヒトの健康に与える影響は少なくなっていくことが考えられた。しかし、大規模な黄砂の発生時には、黄砂発生源に近い北京において細菌現存量や群集構造が激しく変化したことや、黄砂発生源から離れた大阪でも特定の細菌の割合が増加したことから、発生源から遠い地域における大規模な風送ダストの飛来時の影響をより詳細に明らかにしていく必要があると考えられる。

なお、本研究では日本上空において小型航空機を用いた黄砂サンプリングも試みたが、飛来した黄砂の量が十分ではなく、精度の高いデータを得ることができなかった。

<引用文献>

Y. L. Tsai, B. H. Olson. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments.

Appl. Environ. Microbiol., 57: 1070-1074 (1991).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

N. Yamaguchi, J. Park, M. Kodama, T. Ichijo, T. Baba, M. Nasu. Change in the airborne bacterial community in outdoor environments following Asian dust events. *Microbes Environ.*, 査読有, 29: 82-88 (2014).

doi: 10.1264/jsm2.ME13080

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jsm2/29/1/29_ME13080/_article

N. Yamaguchi, T. Ichijo, T. Baba, M. Nasu. Long-range transportation of bacterial cells by Asian dust. *Genes Environ.*, 査読有, 36: 145-151 (2014).

doi: org/10.3123/jemsge.2014.015

https://www.jstage.jst.go.jp/article/jemsge/36/3/36_2014.015/_article

N. Yamaguchi, T. Baba, T. Ichijo, Y. Himezawa, K. Enoki, M. Saraya, P.-F. Li, M. Nasu. Abundance and community structure of bacteria on Asian dust particles collected in Beijing, China, during the Asian dust season. *Biol. Pharm. Bull.*, 査読有, 39: 68-77 (2016).

https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/39/1/39_b15-00573/_html

J. Park, T. Ichijo, M. Nasu, N. Yamaguchi. Investigation of bacterial effects of Asian dust events through comparison with seasonal variability in outdoor airborne bacterial community. *Sci. Rep.*, 査読有, 6: 35706 (2016).

doi: 10.1038/srep35706

<https://www.nature.com/articles/srep35706>

〔学会発表〕(計19件)

山口 進康. 黄砂現象による細菌の長距離移動. 平成25年度日本環境変異原学会 公開シンポジウム. 2013. 5. 25, 慶應義塾大学(東京): 招待講演

N. Yamaguchi, M. Nasu. Change in airborne bacterial community in outdoor environments following Asian dust event. 2013 Bioaerosol Symposium. 2013. 6. 11, COEX Convention Center (Seoul, Korea): 招待講演

馬場 貴志, 平田 景祐, 一條 知昭, 山口 進康, 那須 正夫. 室内の空气中に存在する微生物のリボソーム RNA 遺伝子を標的とした網羅的解析. 第63回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2013. 10. 12, 同志社女子大学(京都)

山口 進康, 平田 景祐, 一條 知昭, 馬場 貴

志, 那須 正夫. rRNA 遺伝子を指標とした室内大気中の微生物群集構造の網羅的解析. 第 8 回大気バイオエアロゾルシンポジウム. 2014. 1. 21 - 22, 大阪大学中之島センター(大阪)

山口 進康, 平田 景祐, 一條 知昭, 馬場 貴志, 那須 正夫. rRNA 遺伝子を指標とした室内大気中の微生物群集構造の網羅的解析. 日本薬学会第 134 年会. 2014. 3. 28 - 30, 熊本市総合体育館(熊本)

山口 進康, 朴 鐘旭, 小玉 牧子, 馬場 貴志, 一條 知昭, 那須 正夫. 黄砂飛来にともなう生活環境における大気中の細菌群集構造の変動. 日本薬学会第 134 年会. 2014. 3. 28 - 30, 熊本市総合体育館(熊本)

J. Park, N. Yamaguchi, M. Kodama, T. Baba, T. Ichijo, M. Nasu. Variation of bacterial abundance and community structure on Asian dust and non-Asian dust days in outdoor environment. 15th International Symposium on Microbial Ecology. 2014. 8. 24 - 29, COEX Convention Center (Seoul, Korea)

山口 進康, 一條 知昭, 馬場 貴志, 那須 正夫. 黄砂現象による細菌の長距離移動 バイオイメージングによる細菌の可視化. 第 23 回日本バイオイメージング学会学術集会. 2014. 9. 5, 大阪大学銀杏会館(大阪)

山口 進康, 林 俊明, 朴 鐘旭, 一條 知昭, 那須 正夫. 黄砂飛来にともなう真菌群集構造および真菌量の変動. 第 64 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2014. 10. 11, 京都薬科大学(京都)

山口 進康, 林 俊明, 朴 鐘旭, 一條 知昭, 那須 正夫. 黄砂飛来にともなう真菌群集構造および真菌量の変動. 環境微生物系合同大会 2014. 2014. 10. 21 - 24, アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡)

朴 鐘旭, 山口 進康, 一條 知昭, 那須 正夫. 黄砂飛来にともなう生活環境の大気中の細菌群集の変動. 環境微生物系合同大会 2014. 2014. 10. 21 - 24, アクトシティ浜松コンgresセンター(静岡)

山口 進康, 朴 鐘旭, 馬場 貴志, 一條 知昭, 那須 正夫. 黄砂飛来にともなう生活環境の大気中の細菌群集の変動. 第 9 回大気バイオエアロゾルシンポジウム. 2015. 1. 28 - 29, 別府国際コンベンションセンター(大分)

山口 進康, 林 俊明, 朴 鐘旭, 一條 知昭, 那須 正夫. 黄砂飛来にともなう真菌群集構造および真菌量の変動. 日本薬学会第 135 年会. 2015. 3. 26 - 28, 神戸サンボール(兵庫)

庫)

朴 鐘旭, 山口 進康, 一條 知昭, 那須 正夫. 黄砂飛来にともなう生活環境中のバイオエアロゾルの細菌群集への影響. 日本薬学会第 135 年会. 2015. 3. 26 - 28, 神戸サンボール(兵庫)

朴 鐘旭, 山口 進康, 一條 知昭, 那須 正夫. 生活環境の大気中の細菌群集の季節変動と黄砂が与える影響. フォーラム 2015: 衛生薬学・環境トキシコロジー. 2015. 9. 17 - 18, 神戸学院大学(兵庫)

山口 進康, 林 俊明, 朴 鐘旭, 一條 知昭, 那須 正夫. 黄砂飛来にともなう真菌群集構造および *Alternaria alternata* 現存量の変動. 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会. 2015. 10. 17, 大阪大谷大学(大阪)

山口 進康, 林 俊明, 朴 鐘旭, 一條 知昭, 那須 正夫. 黄砂飛来にともなう真菌群集構造および *Alternaria alternata* 現存量の変動. 第 30 回日本微生物生態学会大会 2015. 10. 18 - 20, 土浦亀城プラザ(茨城)

J. Park, N. Yamaguchi, T. Ichijo, M. Nasu. Assessment of bacterial effect following Asian dust events through comparison with seasonal variability in airborne bacterial community. 第 30 回日本微生物生態学会大会. 2015. 10. 18 - 20, 土浦亀城プラザ(茨城)

J. Park, N. Yamaguchi, T. Ichijo, M. Nasu. Assessment of bacterial effect following Asian dust events through comparison with seasonal variability in airborne bacterial community. 16th International Symposium on Microbial Ecology. 2016. 8. 21 - 26, Palais des Congres de Montreal (Montreal, Canada)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 進康 (YAMAGUCHI Nobuyasu)
大阪府立公衆衛生研究所・衛生化学部・
総括研究員
研究者番号: 20252702

(2) 研究分担者

谷 佳津治 (TANI Katsuji)
大阪大谷大学・薬学部・教授
研究者番号: 50217113

馬場 貴志 (BABA Takashi)
鳥取大学・農学部・特任研究員
研究者番号: 20423121
(平成 28 年度より研究協力者)

(3) 研究協力者

李 品芳 (LI Pin-Fang)
中国農業大学 · 環境資源学部 · 教授