

RF-072 黄砂バイオエアロゾルの越境的健康被害調査のためのサンプリング・同定に関する研究

(1) 中国（敦煌）と日本（金沢）における黄砂バイオエアロゾルのサンプリングに関する研究

金沢大学 理工研究域自然システム学系 小林史尚
 熊本県立大学環境共生学部（元金沢大学自然科学研究科） 山田 丸

<研究協力者> 中国科学院大気物理研究所 石 廣玉
 中国科学院大気物理研究所 陳 彬

平成19～20年度 合計予算額 11,023千円
 （うち、平成20年度予算額 6,112千円）

※上記の合計予算額金額には、間接経費2,543千円を含む

[要旨] 近年、黄砂は地球環境に重要な寄与をする現象として多くの研究者によってその影響評価が行われている。韓国や中国において「黄砂の健康被害」として大きな社会的問題となっており、疫学的手法による研究等が盛んに行われている。黄砂バイオエアロゾルの長距離輸送とその越境的健康影響の可能性が言われているものの、いまだ誰も黄砂バイオエアロゾルの実態をつかんだ研究者はみあたらない。また、国際的にみても一部の研究者がサハラ砂漠のエアロゾルとバイオエアロゾルについて報告しているのみで、黄砂バイオエアロゾルに関する報告は全く無いといっている。

黄砂バイオエアロゾルの長距離輸送による微生物の飛来の実相調査と病原性微生物飛来による健康被害の可能性を検討することを最終目標とし、本サブテーマは、黄砂発源地域である中国敦煌市と黄砂降下地域である日本金沢・珠洲・天草における大気混合層上部あるいは自由対流圏下部の黄砂バイオエアロゾルのサンプリングを行った。黄砂バイオエアロゾルの自由対流圏におけるサンプリング手法（係留気球及びサンプラー）を現有のものを改良することによって開発し、中国敦煌と日本金沢・珠洲・天草にて実際にサンプリングを実施した。

[キーワード] 黄砂、バイオエアロゾル、直接空中サンプリング、係留気球、バイオエアロゾルサンプラー

1. はじめに

近年、黄砂は地球環境に重要な寄与をする現象として多くの研究者によってその影響評価が行われている¹⁾。黄砂の地球環境への影響としては、(1)黄砂粒子が太陽光を散乱・吸収することで生じる放射強制力の変化、(2)黄砂に含有するアルカリ成分による酸性雨の中和作用、(3)砂漠化に伴う大気中への黄砂粒子供給量の増加、(4)急速に発展している中国都市部で排出された有害物質が黄砂と共に輸送される越境問題などがあげられてきた。著者らは黄砂粒子の長距離輸送や粒子の構成成分・変質について研究し、黄砂の硫黄化合物の含有量から長距離輸送中に硫黄を含むガス状物質（例えばSO₂等）が存在することや長距離輸送現象におけるタクラマカン砂漠の寄与等について明らかにした²⁻⁵⁾。

一方、バイオエアロゾルとは、大気中に浮遊する生物粒子でウイルス、細菌、真菌、花粉などである。バイオエアロゾルを対象としてきた分野は、有害微生物の混入が危惧される発酵工業を含む食品加工業や院内感染が問題となる医学の分野であった。最近、バイオエアロゾルが上空に舞い上がり、雲核や氷晶核として作用していると報告されている⁶⁾。また、黄砂に付着した微生物あるいは微生物単体で黄砂とともに偏西風に乗って移動する可能性が示唆されており、大陸間の微生物拡散メカニズムの解明に期待されている¹⁾。黄砂バイオエアロゾル（黄砂と挙動を共にする生物粒子）の存在を仮定したならば、勿論落下地点の気候環境に適した場合にはあるが、微生物は生態系の根幹をなすので生物環境全般に影響を及ぼし、農業を含め人間活動を左右し、環境そのものを変化させることが考えられる。特に、ヒトを含めた動植物の病原菌、食物等の変敗菌、昆虫病原菌などの影響は甚大であると予想される。韓国や中国においては「黄砂の健康被害」として大きな社会的問題となっており、主として気管支疾患や心血管疾患などの疫学的手法による研究等が盛んに行われている⁷⁻⁹⁾。

黄砂バイオエアロゾルの長距離輸送について調査するためには、黄砂の発生地域、輸送中及び降下地域におけるバイオエアロゾルについて、また輸送中におけるバイオエアロゾルの状況（黄砂鉱物粒子に付着した形態か単独に浮遊しているかなど）を検討しなければならない。しかしながら、国際的にみてもKelloggとGriffin¹⁰⁾がサハラ砂漠のエアロゾルとバイオエアロゾルについて報告しているのみで、黄砂バイオエアロゾルに関する報告は全く無いといっている。

そこで本サブテーマでは、黄砂発生源地域である中国敦煌市と黄砂降下地域である日本金沢・珠洲・天草における大気混合層上部あるいは自由対流圏下部のバイオエアロゾルの採取を行い、黄砂バイオエアロゾルの採集方法について検討した。

2. 研究目的

本研究の最終的な目的は、黄砂バイオエアロゾルの長距離輸送による微生物の飛来の実相調査と病原性微生物飛来による健康被害の可能性を検討することにある。本サブテーマにおいては、黄砂バイオエアロゾルの長距離輸送による微生物の飛来の実相調査として、黄砂発生源地域である中国敦煌市と黄砂降下地域である日本金沢・珠洲・天草における大気混合層上部あるいは自由対流圏下部のバイオエアロゾルの採取を行い、黄砂バイオエアロゾルの採集法について検討した。

3. 研究方法

(1) サンプルング装置とサンプルング地点

サンプルング手法の改良は以下のようにして行った。現在まで係留気球を用いた黄砂鉱物粒子サンプルングでは、インパクターを用いてきた。インパクターとは、慣性衝突を利用して採集する装置のことで、粒子の大きさを分けて捕集できるので粉体工学分野など広範囲で用いられている。この場合、流速がかなり速いため、捕集板に衝突する際のエネルギーにより、鉱物粒子の場合は硬いので問題はないが、生物粒子の場合軟らかいので破壊され死滅することが日本の地上で行った予備実験でわかった。そこで、本研究ではフィルターを用いた方法を採用した。このフィルターは空気を滅菌させる（浮遊している生物粒子を全て捕集してガスを無菌にするために用いる滅菌フィルター（孔径0.2 μm ））ものを用いた。黄砂鉱物粒子のサンプルング時間は、吸引時間を約5分で行ってきた。黄砂バイオエアロゾルの場合、それまで全くと言っていいほど知見がな

かったので、吸引時間が約2時間のサンプリングまで可能にする必要があった。そこでサンプラーに搭載している吸引ポンプ稼動用のバッテリーをアルカリ電池からリチウム電池にした。黄砂鉍物粒子のサンプリングと黄砂バイオエアロゾルのサンプリングにおいてもっとも異なるのがコンタミネーション（雑菌汚染）の防止にある。サンプリング装置のセッティングから捕集、分析まで目的の高度に浮遊している生物粒子以外のものがフィルターに付着しないようにしなければならない。サンプラー内のチューブ、フィルターホルダーやメンブレンフィルターは蒸気滅菌可能なものを選択し、搭載できるようにサンプラーを改良した。あらかじめチューブなどは滅菌処理をして、サンプラーへのセッティングの際はクリーンベンチあるいは滅菌バックを用いて行った。また、サンプラーの吸引口にシャッターを設けた。これは、目的の高度に達するまではシャッターが閉じており、バイオエアロゾルのコンタミネーションを防止する。目的の高度に達すると遠隔操作にてシャッターを開け吸引ポンプを稼動させてサンプリングを開始する。サンプリング時間の設定はサンプラー内の電子部品によってプログラミングされており、サンプリング終了とともに吸引ポンプが停止し、シャッターが閉じ、その後係留気球を降下させている際のコンタミネーションを完全に防止している。以上のような種々のサンプリング手法の改良は、試作機の実験も含め主に日本（金沢大学）における地上で行われた予備実験から創意工夫されたものである。中国敦煌におけるサンプリングでは、地上100 mおよび700 mにおけるサンプリングに成功した。日本金沢においては、地上500 mにおいてサンプリングに成功した。また、比較のために中国敦煌市付近のタクラマカン砂漠の砂を採取するとともに地上10 mのサンプリングも行った。日本金沢においても同様に土壌と地上2 mにおけるサンプリングを行った。採取地点の粒子数濃度の測定は光散乱式粒子カウンター（リオン、OPC KR-12A）を用いて行った。

（2）DAPI染色分析と分離培養・同定

上空でサンプリングした黄砂粒子に生物が含まれているかどうか確認するために、サブテーマ2と連携して、DAPI染色実験を行った。DAPIとは、4',6-diamino-2-phenyl-indoleという試薬でDNAに特異的に結合し、発色するものである。1%のグルタルアルデヒドでフィルターを洗浄し、0.5 μ g-DAPI μ L⁻¹によって15 min染色した。染色された標本は、落射型蛍光顕微鏡（オリンパス製）にて観察した。

分離培養・同定はサブテーマ2と連携して以下の方法で行った。回収されたメンブレンフィルターはすぐに0.5%酵母エキス（日本製薬）、1.0%ペプトン（Becton, Dickinson and Company）、1.0%グルコース（和光純薬工業）を含むLB+glucose液体培地10 mLで5回逆洗し、その培養液500 μ Lをポテトデキストロース寒天培地（Becton, Dickinson and Company）上にコンラージ棒を用いて逆洗回数毎に3枚ずつ蒔き室温で12時間培養した。環境中の微生物の中には貧栄養下で存在している微生物もいると言われているものの本実験では比較的富栄養の培地を用いた。この理由は、KelloggとGriffin¹⁰⁾が指摘しているがバイオエアロゾル適用培地がまだ確立しておらず、本実験においては貧栄養状態でのみ生活できる菌株よりむしろ富栄養下で増殖できる菌株の分離培養を試みたことによる。操作は全て無菌エアバック（精宏）を用いて無菌状態で行った。無菌操作の確認のために、コントロールとして採取に使用していない滅菌済メンブレンフィルターを用いて同様の操作を行った。バイオエアロゾル供給源としての砂漠の砂に含まれる微生物に関しては、採取した砂をその場でLB+glucose培地に加え、無菌エアバック内で同様の操作を行った。

採取した菌株の形態学的・生理性状学的試験は、細胞形態観察、グラム染色性、胞子の有無、

運動性の有無、カタラーゼ反応、オキシダーゼ反応、VPテスト、OFテストの各項目について行った。細胞形態は、光学顕微鏡（ニコン、X2F PH-21）を用いた観察によって判断した。グラム染色性は、フェイバーG「ニッスイ」（純正化学）を用いて光学顕微鏡観察によって決定した。胞子の有無は、マラカイトグリーン（関東化学）によって胞子を染色させ、光学顕微鏡観察によって判断した¹¹⁾。運動性の有無は、光学顕微鏡観察とVPテストで用いた半流動性培地の結果によって判断した。カタラーゼ反応は、スライドガラスに3%過酸化水素水を1滴置き、これに新鮮な培養菌体を白金耳で蒔き、気泡が認められれば陽性とした¹¹⁾。オキシダーゼ反応、VPテストは、それぞれポアメディアチトクローム酸化酵素試験用オキシダーゼテスト、ポアメディアVP試験用VP半流動培地、OF試験用ポアメディアOF培地（純正化学）を用いて行った。形態学的・生理性状学的試験からの菌種推定には主にBergeyの菌株推定マニュアルを参考にして行った¹²⁾。

16S rDNAあるいは18S rDNAの部分塩基配列を用いた帰属分類群の推定は、Lysozyme、Mutanolysin、Proteinase K（Sigma-Aldrich Japan）を用いてゲノムDNAを抽出した。抽出したゲノムDNAを鋳型として、プライマーF1（5' -AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'）とR1（5' -GGCTACCTGTTACGACTT-3'）により真正細菌の16S ribosomal RNA 遺伝子¹³⁾、プライマーF2（5' -TGTTGATCCTGCCAGAGG-3'）とR1により酵母の18S ribosomal RNA 遺伝子領域をPCRにより、それぞれ約1.5k bp増幅した。PCRは、サーマルサイクラーにTakaRa Diceを使用し、反応を95°C, 3 min、（95°C, 30 sec 54°C, 30 sec 72°C, 1 min 30 sec）×30サイクルで行った。その後、PCR産物をBigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, ABI PRISM 310 Genetic Analyzer（Applied Biosystems）を用いて、ダイレクトシーケンスし、F1プライマーから約750 bpの部分塩基配列を決定した。16S rDNAあるいは18S rDNAを用いた帰属分類群の推定には、BLAST¹⁴⁾により国際塩基配列データベース

（GenBank/DDBJ/EMBL）に対し相同性検索を行った。*Bacillus cereus* groupの菌種同定に関しては、*Bacillus anthracis*の同定は、PCRにより毒素遺伝子（プライマーPA5: 5' -TCCTAACACTAACGAAGTCG-3' , PA8: 5' -GAGGTAGAAGGATATACGGT-3'）領域596 bpと莢膜遺伝子（プライマーCAP1234: 5' -CTGAGCCATTAATCGATAT G-3' , CAP1301: 5' -TCCCCTTACGTAATCTGAG-3'）領域846 bpの増幅産物の有無により行った¹⁵⁾。また陽性コントロールとして、多くの*Bacillus cereus* groupの菌種（*Bacillus cereus*、*Bacillus thuringensis*）が有する毒素遺伝子cerA, B（プライマーPf: 5' -GAGTTAGAGAACGGTATTTATG-3' , Cr: 5' -ATCCCAAGTCGC TGTATGTC-3'）領域の1.5k bpを用いた¹⁶⁾。*Bacillus cereus*と*Bacillus thuringensis*の判別にはParasporal crystalの有無による方法によって判断した^{14, 17)}。菌体をポテトデキストロース寒天培地（Becton, Dickinson and Company）に接種し、30°C 24 hrs培養した。その後、室温で3日放置し孢子嚢を溶解させた。スライドガラスに加温固定及びメタノール固定をして、Ziehl-Neelsen Carbol-Fuchsin 染色液（ナラカイトスク）にて加温染色し、顕微鏡観察によってParasporal crystalの有無を確認した。

粒子捕集2時間以内に、フィルター上の粒子を滅菌水で洗浄し、10 mLのTrypticase-soy-broth(TS)液体培地に懸濁させた。なお、TS培地は、エアロゾル中に含まれる細菌群を分離する際に一般的に使用される培地である。なお、懸濁液に含まれる粒子をDAPIで染色した後、落射型蛍光顕微鏡によって観察した。エアロゾル懸濁液から、フェノール・クロロホルム処理を用いてゲノムDNAを抽出精製した。得られたゲノムDNAを鋳型としてPCR法により16S rDNAを増幅した。増幅には、細菌の16S rDNA配列に特異的なプライマー341F(GCクランプ有)と907Rを使用した。次に、DNA

変性剤（尿素）で上部40%および下部50%と勾配をつけて含むポリアクリルアミドゲルを作成した。この変性剤勾配ゲルを用いてPCR産物を1電気泳動した後、ゲルを核酸染色剤（サイバーゴールド）で染色し、254 nmUV励起でバンドパターンを確認し、Printgraph(ATTO)を用いてゲルイメージを撮影した。ゲル上のバンドに含まれる核酸の塩基配列を決定した後、塩基配列を用いてDNA Date Bank of Japan (DDBJ) 上のFASTA及びBLAST programを用いた相同性検索を行い、近隣結合法によって系統樹を作成した。タクラマカン砂漠捕集したバイオエアロゾル粒子の懸濁液を、塩分(NaCl)濃度0%,3%,10%及び20%のTS液体培地に接種し、8日間培養した。培養を開始した後、吸光度測定によって微生物の生長量を定量した。生長の見られた培養をPCR-DGGE法に供し、前述の通り16S rDNA情報を用いた系統分類学的解析によって細菌種組成も分析した。

4. 結果・考察

(1) サンプル装置とサンプリング地点

図1-1と1-2は、本サブテーマで独自に開発した黄砂バイオエアロゾル用サンプラーの写真を示す。黒い箱型のものがリチウムバッテリー、円筒のものが吸引ポンプ、透明の円筒のものが蒸気滅菌可能なフィルターユニット、図1-2の左側にあるのがシャッターと電子部品類である。この電子部品類によって、目的高度に達するとシャッターと吸引ポンプが稼動し、サンプリングが終了とともに閉じるよう制御されている。図1-3は中国敦煌におけるサンプリングの概略図を示す。係留気球は15 m³の水素が充填されたものを用いた。日本におけるサンプリング同様の方法で行ったが、日本においては水素ではなくヘリウムを充填した係留気球を用いた。

図1-4、1-5、1-6は、それぞれ2006年8月中国敦煌、2007年4月日本金沢、2007年8月に行った中国敦煌におけるサンプリング風景の写真を示す。黄砂発生源バイオエアロゾル採取地点は、中国敦煌 (Dunhuang ; 40.15 °N, 94.68 °E, 海拔約1200 m) に立地する敦煌市気象局を中心に行った。敦煌はタクラマカン砂漠東端に位置している。タクラマカン砂漠の周辺は4,000メートル級の山並みが連なり、東側だけが山の障壁がない。上空は一般的には偏西風が吹き、舞い上がった砂塵はこの風によって西から東へ運ばれる。障壁のない、開けたところはしばしば砂塵の吹き出し口として知られており、ここに敦煌があるので、敦煌周辺は黄砂の長距離輸送初期段階を観察するのに適した場所として注目されている^{1,2)}。本研究は、黄砂発生源におけるバイオエアロゾルの種類と挙動の解明を目的としているので、敦煌市を採取地点とした。降下地点における金沢のサンプリングは、金沢大学のD駐車場にて行った。

表1-1は、2006年8月に中国敦煌においてサンプリングしたときの黄砂粒子の分布を示す。2006年8月15日の当地はダストストームではないが比較的風が強く、大気中のエアロゾル濃度が増加したためかなり視程が低下し、前日まで見えていた砂山（鳴砂山：観測点から15 km）が見えない状況であった。この日は敦煌市気象台屋上にて地上10 m（地上付近）のバイオエアロゾル採取をエアポンプとメンブレンフィルターを用いて試みた。係留気球を用いた地上50から100 m（上空）のバイオエアロゾルの採取は強風のため中止せざるをえなかった。翌日の2006年8月16日は前日に比べ風が弱まり、砂の浮遊が比較的小さまっていた。バイオエアロゾルの採取は地上50から100 m（上空）と地上10 m（地上付近）の両方行った。大気中のエアロゾル粒子数濃度は、特に粒径1 μm以上（黄砂粒子の典型的なサイズ）において、2006年8月15日の方が2006年8月16日よりも数倍濃度が高かった。これは8月15日に地表付近で風が強く、地表面から多量の砂漠の砂など鉱物

粒子が大気中に舞い上がったためと考えられる。採取・培養後の寒天プレートは、逆洗1回目からは多くのコロニーが観察され、逆洗3回目になるとコロニーが数個、4回目以上になるとコロニーは全く観察されなかった。これは、メンブレンフィルターに捕集されたバイオエアロゾルが逆洗とともに回収され、3回目でほとんど全て回収されたためと考えられる。逆洗4回目からは全くコロニーは確認されなかったため、採取された菌はほとんど全て回収、培養されたと思われる。すべての条件においても逆洗4回目以降はコロニーが確認されなかった。地上50から100 m（上空）の寒天プレートでは、3枚のプレートとも逆洗1回目から約100個のコロニー、2回目から約50個のコロニー、3回目からはほぼ3個のコロニーから確認された。係留気球で採取したバイオエアロゾルは、概算ではあるが、0.5 m³の空気量に約3000個のバイオエアロゾル、すなわち6 cfu L⁻¹の濃度で存在したことがわかった。分離培養法を用いたので全てのバイオエアロゾルを計測できなかったが、少なくとも6 cfu L⁻¹以上のバイオエアロゾルが存在すると考えられる。

2007年に用いてきたバイオエアロゾルサンプラーの改良を行った。サンプラーは軽量でかつ吸引量を増加することによって、分析の精度があがるので、吸引ポンプをこれまでのダイヤフラム型からロータリー型に変更した。この変更によって吸引量は、14 L min⁻¹から23 L min⁻¹まで急激に増加した。また、吸引時の圧力損失を減少させるために、フィルターユニットを改良した。電力を増加するために、バッテリーの容量も増加させた。図1-7は、改良された黄砂バイオエアロゾルサンプラーの写真を示す。これまでは、1台のサンプラーのみしか係留気球に搭載できなかったが、分析効率を上げるためには2台のサンプラーを搭載できる方が好ましい。そこで、今までの気球（ヘリウム容量12 m³）よりも浮力のあるヘリウム容量18 m³の気球を採用した。図1-8はこの度改良された係留気球を示す。

2008年度には、5月には黄砂降下地域として石川県珠洲市にてサンプリングを行った。石川県珠洲市は能登半島の先端に位置し、日本海を渡ってくる黄砂バイオエアロゾルを日本列島国土の影響なく直接採取できる。10月には黄砂発生源である中国敦煌市で、11月にはサブテマ5と連携して、黄砂長距離輸送の中間地点である韓国Chongju市にてサンプリングを行った。Chongju市におけるサンプリングは、Chungbuk国立大学の屋上にてサンプラーを用いて行った。12月には、熊本県天草市においてサンプリングを行った。天草は東シナ海を渡ってくる黄砂バイオエアロゾルが直接サンプリングできる地点として選定した。図1-9は、2007年度と2008年度に各地で計7回行ったサンプリング地点の地図を示す。2008年度に行ったサンプルのほとんどは現在分析中である。

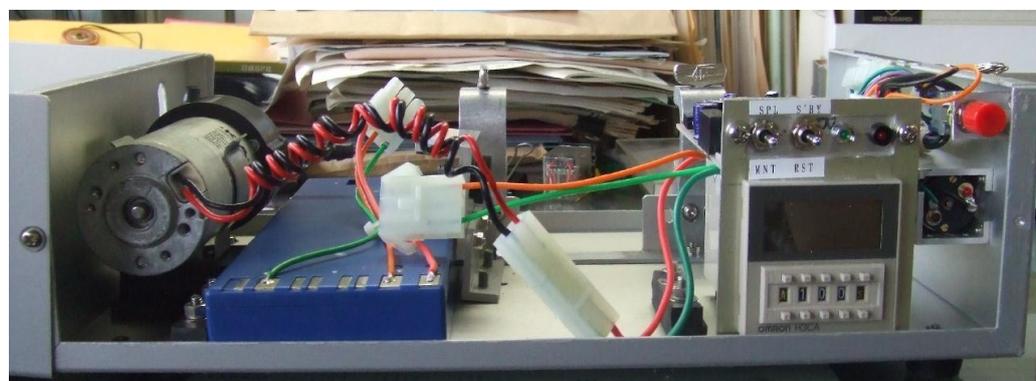


図1-1 黄砂バイオエアロゾルサンプラー写真（側面から）

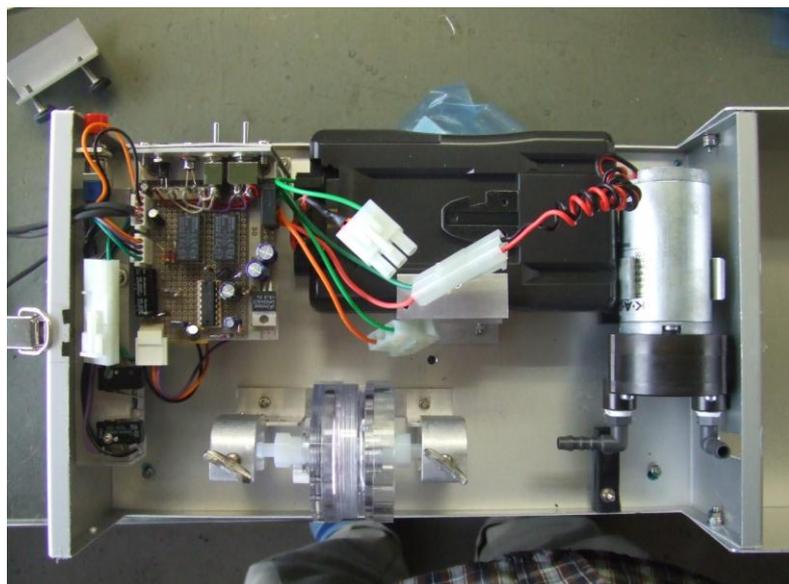


図 1-2 黄砂バイオエアロゾルサンプラー写真 (上部から)

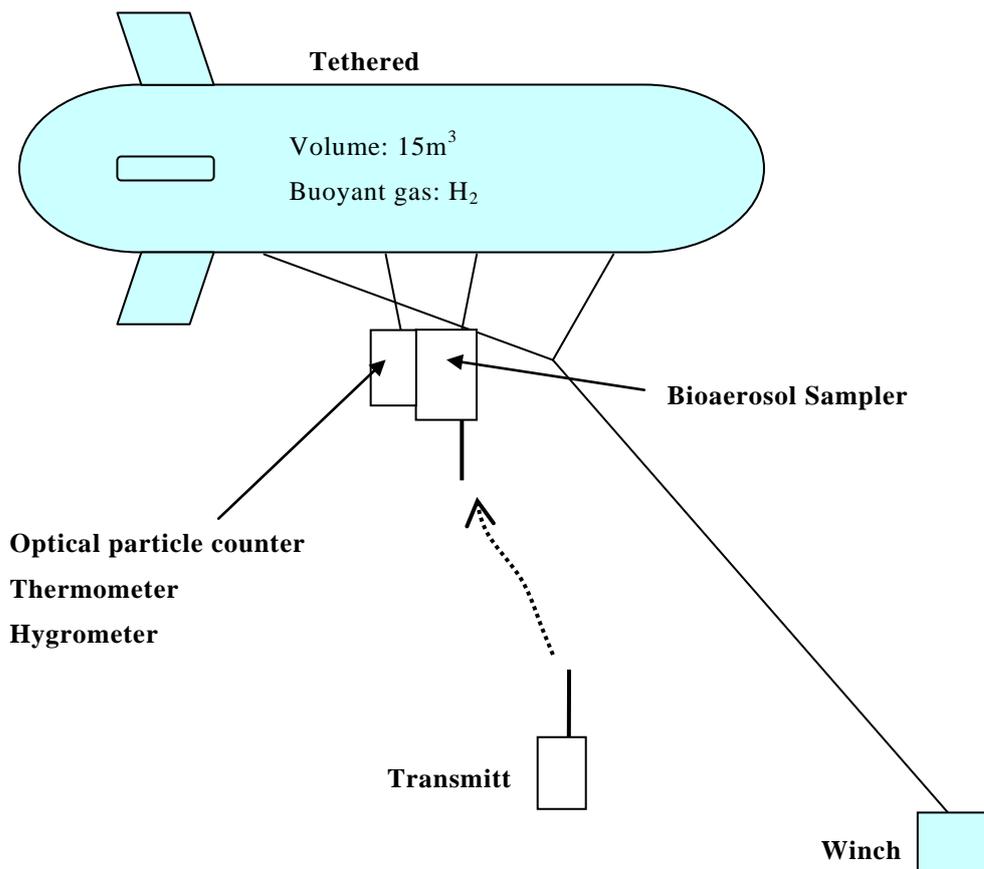


図 1-3 サンプリングの概略図



図 1 - 4 2006年8月に行った中国敦煌におけるサンプリング風景写真



図 1 - 5 2007年4月に行った日本金沢におけるサンプリング風景写真



図 1-6 2007年8月に行った中国敦煌におけるサンプリング風景写真

表 1-1 2006年8月に中国敦煌においてサンプリングしたときの黄砂粒子の分布

Date		15-Aug-06	16-Aug-06	
Temperature (°C)		35	36	
Weather		Fine (Dusty)	Fine	
Altitude (above the ground level)		10 m	10 m	50-100 m
Wind	Direction	NE	NE	NE
	Speed (m s ⁻¹)	4-6	3-5	3-5
Number concentration of particles (L ⁻¹)	0.3-0.5 μm	28484	37068	32287
	0.5-0.7 μm	12905	8013	7666
	0.7-1.0 μm	7796	3704	3665
	1.0-2.0 μm	11902	4683	4783
	2.0-5.0 μm	12229	3774	3437
	> 5.0 μm	1064	137	65

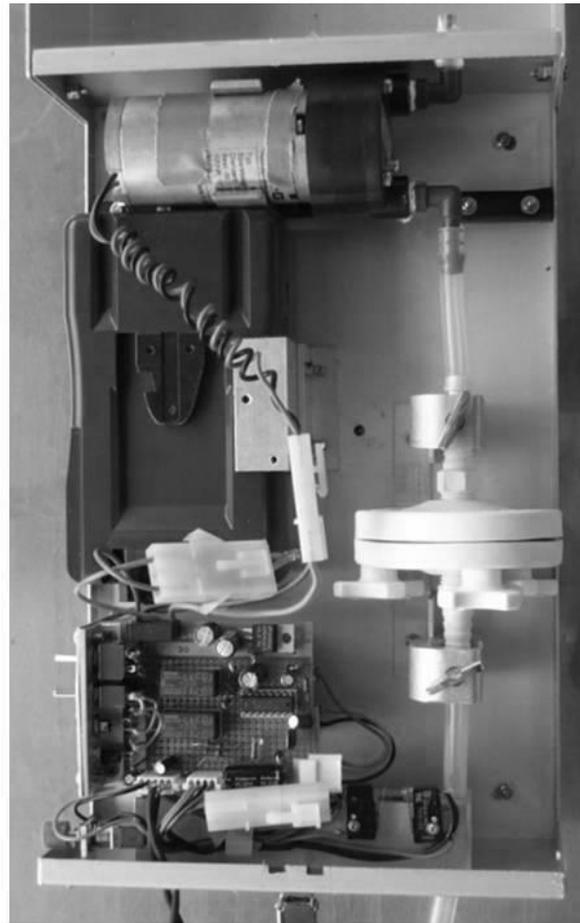


図 1 - 7 改良された黄砂バイオエアロゾルサンプラー写真



図 1 - 8 サンプラーを 2 台搭載できる 18 m³の係留気球

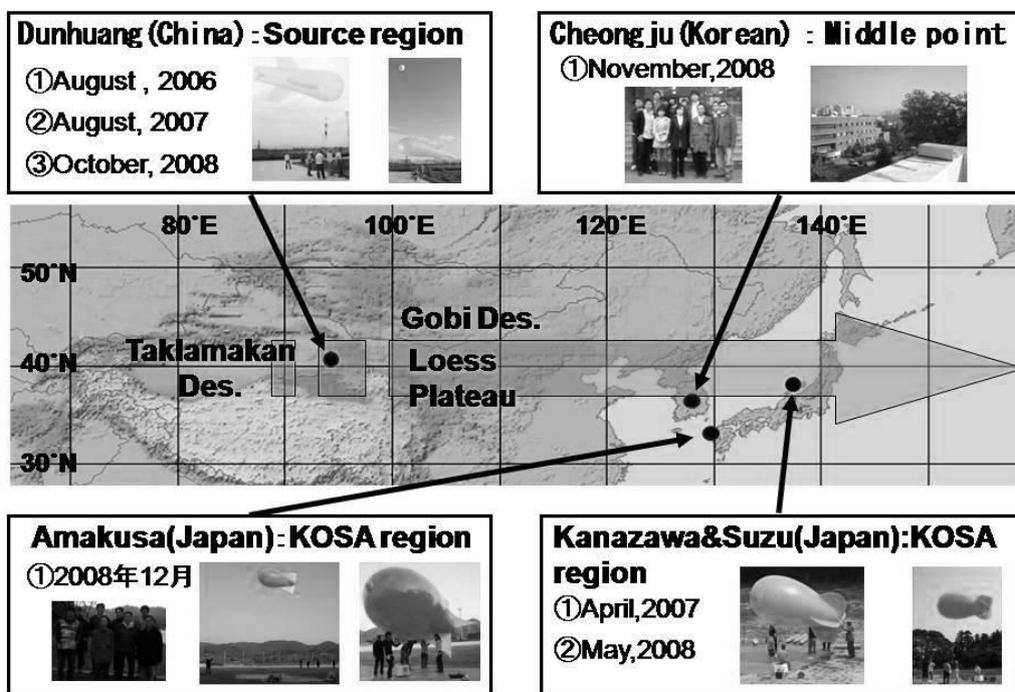


図 1 - 9 2007年度および2008年度各地で計7回行ったサンプリング地点

(2) DAPI染色分析と分離培養・同定

図1-10は、2007年8月に敦煌上空800 m (標高約2,000 m) にて係留気球と黄砂バイオエアロゾルサンプラーを用いて採取したサンプルをDAPI染色し、蛍光顕微鏡にて観察した写真を示す。直径約5 μ mの薄く発光しているものが黄砂粒子であり、1 μ m以下の強く発光しているものがDNAである。この結果より、黄砂発生源においてDNAが黄砂粒子に付着して舞い上がっていることが明らかとなった。また、DNAが付着していない粒子も観察され、付着している粒子は全粒子数の約10%であったことから、黄砂粒子の1割程度、バイオエアロゾルが付着し舞い上がっていることがわかった。黄砂粒子は発生源から降下地域である日本まで飛来することがわかっているため、この黄砂バイオエアロゾルが長距離輸送して日本に到達している可能性も考えられる。

形態学的・生理性状学的特性は、培養された寒天プレートから、それぞれ5菌株を単一コロニーになるまでスクリーニングし、計20菌株を単離した。計20菌株の形態学的・生理性状学的特性から同定を試みた。なお、BADH S01株、BADH S03株及びBADH S05株が莫高窟 (Mogao caves) 付近の地点から、BADH S02株とBADH S04株が鳴沙山 (Mingshashan) 付近の地点から採取された砂を用いて単離された菌株である。

最初に、グラム染色と光学顕微鏡による形態観察を行った。BADH D05株とBADH O1株を除き全ての菌株が桿菌であり、BADH D05株とBADH O1株は球菌であった。グラム染色性は、BADH D11、BADH D12、BADH D13の菌株だけがグラム陰性であり、その他の菌株は全てグラム陽性であった。以上の結果から本研究で単離された20菌株は大きく3つの菌群に大別できることがわかった。図1-11は3つの菌群のグラム染色顕微鏡写真と単離された菌株名を示す。最初の菌群は、グラム陽性桿菌群でBADH S01からBADH S05、BADH D01からBADH D04、BADH D14、BADH D15、BADH U02からBADH U05の15菌株からなる。次はグラム陰性桿菌群でBADH D11からBADH D13の3菌株であり、最後はグラム陽性球菌でBADH D05とBADH U01の2菌株であった。最初のグラム陽性桿菌群は地上50から100 m (上空)、地上10 m (地上付近)、砂漠の砂のいずれの条件にも存在し、バイオエアロゾルの挙動に関して興味深いグループである。

さらに属の同定を進めるために、孢子形成、運動性、オキシダーゼ反応性、カタラーゼ反応性、VPテスト、OFテストの6項目における生理性状特性を検討した。グラム陽性桿菌群は、好気性で孢子・芽胞形成能があり、オキシダーゼ陰性、カタラーゼ陽性、グルコースからの酸発生がありガス発生がないので、Bergey's Manualによれば*Bacillus*属菌株である可能性が高い。

第2の菌群であるグラム陰性桿菌は、いずれも通性嫌気性のグラム陰性桿菌で孢子・芽胞をもたず、オキシダーゼ陰性、カタラーゼ陽性、グルコースを発酵的に分解したので大腸菌などを含む腸内細菌 (*Enterobacteriaceae*) であると推定することができる。

第3の菌群であるBADH D05株とBADH U01株は、大きなグラム陽性球菌であり、コロニーの形状や生理性状試験の結果から真菌類の酵母の一種であることが推定できる。BADH D05株は、顕微鏡観察の結果、菌糸あるいは仮性菌糸が認められたので、*Saccharomycopsis*、*Hansenula*、*Nematospora*、*Candida*、*Trichosporon*のいずれかである可能性が示唆された。BADH U01株はコロニーが赤紅色を呈していたので、*Rhodotorula*、*Rhodospiridium*、*Sporobolomyces*、*Sporidiobolus*である可能性が高かった。酵母の中で発酵性を持たないことも属の特徴の一つであり、*Lipomyces*、*Cryptococcus*、*Rhodotorula*であることが考えられる。赤色酵母で非発酵性であることからBADH U01株は*Rhodotorula*あるいは*Rhodospiridium*であることが考えられるが、*Rhodotorula*は孢子を形成

しない無孢子酵母であるのに対し*Rhodospiridium*は有性世代のある孢子を形成する酵母である。本菌株は孢子が確認されたので*Rhodospiridium*属の菌であると考えられる。

形態学的・生理性状学的特性の検討から、本研究で単離された菌株は大きく3つの菌群に分類され、その菌群は地上50から100 m（上空）、地上10 m（地上付近）、砂漠の砂いずれにも存在する*Bacillus*属系菌群、地上10 m（地上付近）にのみ存在する腸内細菌系菌群、地上50から100 m（上空）と地上10 m（地上付近）に存在する酵母系菌群であった。特に、地上50から100 m（上空）、地上10m（地上付近）、砂漠の砂いずれにも存在する*Bacillus*属系菌群は、バイオエアロゾルの拡散に関して興味ある菌集団である。そこで、各菌株間における16S rDNAの部分塩基配列の相同性を検討し、同一菌であるか否かを考察した。*Bacillus*属系菌群の全ての菌株間における16S rDNAの部分塩基配列（約500 bp）を比較した結果、BADH U02～BADH U05、BADH D01～D04、BADH D14、BADH D15の10菌株は98%以上の高い相同性を示した。これら10菌株は同種菌株であると推定される。なかでもBADH U03、BADH U04、BADH D01、BADH D02、BADH D03、BADH D04、BADH D15の7菌株は、約500 bpにおける16S rDNAの部分塩基配列が一致し、同一菌である可能性が高いことが判明した。地上50から100 m（上空）と地上10 m（地上付近）で、また異なる日でも*Bacillus*属系の同一菌が単離されたことから、黄砂発生源において*Bacillus*属系の菌株が地上付近から上空にバイオエアロゾルとして舞い上がっていることを示唆している。特に、タクラマカン砂漠周辺では、山谷風の影響で接地境界層から自由大気への砂（黄砂粒子）のまきあげが頻繁にあることが知られている。このようなことを考えに入れば地上50から100 m（上空）で見られたものも同様にこの地域独特の風系による影響を受け、かなり上空（6000 m程度）まで舞い上がっていると推定することは、きわめて妥当と考えられる。

さらに、本研究で単離された菌株の16S rDNAの部分塩基配列、約750 bpを用いたより詳細な帰属分類群の推定をBLAST検索により行った。*Bacillus*属系菌株同一種菌株（BADH U02～BADH U05、BADH D01～BADH D04、BADH D14、BADH D15）は、*Bacillus thuringensis* (Accession no. DQ864491)、*Bacillus cereus* (Accession no. AB271745) と*Bacillus anthracis* (Accession no. AY920253) の相同性が99.2%であった。この3菌株、*Bacillus thuringensis*、*Bacillus cereus*と*Bacillus anthracis*は、16S rDNA塩基配列、約1.5k bpにおいて酷似しており、16S rDNA塩基配列のみでは鑑別が難しい。*Bacillus anthracis*は特有の毒素遺伝子と莢膜遺伝子を持っているため、PCRによりそれら遺伝子領域の増幅を行い*Bacillus anthracis*であるか否かを判断した。その結果は、*Bacillus anthracis*の毒素遺伝子および莢膜遺伝子領域ともにPCRで増幅産物が認められなかった。一方、陽性コントロールとして、多くの*Bacillus cereus* groupの菌種（*Bacillus cereus*、*Bacillus thuringensis*）が有する毒素遺伝子*cerA*, B領域1.5k bpはPCR増幅された。以上の結果から、これらの菌株は*Bacillus thuringensis*あるいは*Bacillus cereus*である可能性が高いことが判明した。*Bacillus thuringensis*あるいは*Bacillus cereus*の判別は難しいが、Parasporal crystalの有無による方法が知られている。Parasporal crystal形成を確認した結果、これら同一種菌株は*Bacillus cereus*であることがわかった。*Bacillus cereus*は、米飯の変敗原因菌といわれ、溶血活性をもつ毒素を産生する食中毒原因菌の一つにも挙げられている^{18,19}。この菌が黄砂とともに上空まで舞い上がっているとすると他地域に拡散しその環境に大きく影響を及ぼしていると思われる。*Bacillus*属菌株であるBADH S01からBADH S04は同一菌で*Bacillus subtilis* (Accession no. AY553095) と相同性が99.7%であった。これらの菌が*Bacillus subtilis*であることは、形態学的・

生理性状学的特性結果と一致している。BADH S05は*Bacillus atrophaeus* (Accession no. DQ848135)と相同性が最も高く99.2%であった。2箇所の砂漠の砂から単離されたBADH S01からBADH S05が全て*Bacillus*属菌株でBADH S01からBADH S04までが同じ*Bacillus subtilis*であったことから、本研究におけるサンプリング地点による相違がないことがわかった。

BADH D11とABDH D13は*Pantoea agglomerans* (Accession no. DQ855292)と最も相同性が高く、それぞれ97.8と97.2%であった。BADH D12は*Enterobacter endosymbiont* (Accession no. AY753172)と相同性が高かった(99.2%)。これらの菌の特性は形態学的・生理性状学的特性とほぼ一致した。*Pantoea agglomerans*や*Enterobacter endosymbiont*といった腸内細菌が地上50から100 m(上空)に単離されず、地上10 m(地上付近)にのみ単離された。この理由は、詳細は不明だが、主にヒトや動物の腸管などに生息するので地上付近には存在できるが、孢子・芽胞を形成できないので乾燥に弱く、コロニーの性状である粘着性などから上空には拡散できないことと考えられる。

BADH D05とBADH U01は、形態学的・生理性状学的特性からは酵母の一種であると推定された。18S rDNAの部分塩基配列における相同性検索の結果では、BADH D05は*Candida parapsilosis* (Accession no. AY055855)が最も相同性が高く99.7%であり、BADH U01は*Rhodotorula mucilaginosa* (Accession no. DQ832199)及び*Rhodospiridium sphaerocarpum* (Accession no. AB073275)と相同性が100%であった。BADH U01は孢子を形成するので*Rhodotorula mucilaginosa*ではなく*Rhodospiridium sphaerocarpum*であると考えられる。地上10 m(地上付近)で単離された*Candida parapsilosis*は無孢子酵母であるが、地上50から100 m(上空)で単離された*Rhodospiridium sphaerocarpum*は孢子を形成する。孢子が大気混合層におけるバイオエアロゾル拡散に大きく影響していると考えられる。

本研究で単離された菌株のDNAデータベースにおける16S rRNA遺伝子配列のAccession numberと推定帰属分類群を示す。地上50から100 m(上空)からは単離された5菌株のうち4菌株が*Bacillus cereus*であった。地上50から100 m(上空)のバイオエアロゾル濃度は6 cfu L⁻¹であった。分離培養法では用いた寒天培地の種類にもよるが全菌株の1%が培養できるといわれている²⁰⁾ので、全バイオエアロゾル濃度は600 cfu L⁻¹程度であると予想できる。*Bacillus cereus*の大きさが約1×5 μmである¹²⁾ことと、連鎖桿菌であることから、5 μmを超える生物粒子の状態で存在していると思われる。黄砂粒子分布より5.0 μmを超える粒子は65 L⁻¹であり、600 cfu L⁻¹よりかなり少なく矛盾する。孢子・芽胞の大きさは約1 μmあるいはそれ以下であり、0.7から1 μmの3665 L⁻¹と矛盾なく、全粒子の約16%がバイオエアロゾルであったと推算できる。以上のことから、黄砂発生源の大気混合層のバイオエアロゾルは、孢子・芽胞の状態で浮遊していると思われる。また、一般に孢子・芽胞は乾燥、熱、薬品(酸、アルカリ、ハロゲン等)、放射線などに対する抵抗性が著しく高いと言われている。*Bacillus*属菌株がバイオエアロゾルとして単離された理由は、この孢子・芽胞形成能にあると考えられる。また、黄砂粒子は長距離輸送中に硫黄を含むガス状物質(例えばSO₂等)と混合し黄砂粒子表面に硫酸塩や硝酸塩を形成することが確認されている。孢子・芽胞は高pHや低pHに耐性があることから、今後の黄砂バイオエアロゾル研究の結果をみないと詳細はわからないが、*Bacillus*属菌株の孢子・芽胞が黄砂の長距離輸送に耐えることができると考えることができる。

黄砂発生源上空におけるバイオエアロゾルには、食中毒原因菌(*Bacillus cereus*)も含まれており、それらの菌が地上約100 mまでの大気混合層に拡散していることが確かめられた。これらの

菌がさらに舞い上がり、黄砂とともに、あるいは黄砂に付着して自由対流圏において朝鮮半島やさらに日本まで移動している可能性もタクラマカン砂漠その周辺の風系の特徴から高いと考えられる。微生物の拡散は、生態系を含め人間をとりまく環境そのものに大きく影響を及ぼすので、本研究の結果はこの可能性を示唆することとなった。

2007年10月に黄砂発生源である敦煌上空800 m（標高約2,000 m）でサンプリングし、分離培養した結果、ニュートリエント寒天培地から2種の糸状菌が確認された。DNA分析を行った結果、黒カビが*Cladosporidium* sp.（図1-11（a））であり、もう一方のカビが*Aspergillus* sp.（図1-11（b））であることがわかった。*Aspergillus*菌は、酒など発酵食品に用いられる菌であり、これまで黄砂バイオエアロゾルが人間の生活に強く影響したことも考えられる。さらに、*Aspergillus*菌は、アスペルギルス症の原因菌であり、また花粉症を悪化させる β -グルカンを構成成分として多く含むので、黄砂日に花粉症が悪化するという疫学的調査結果を示唆するものとなった。

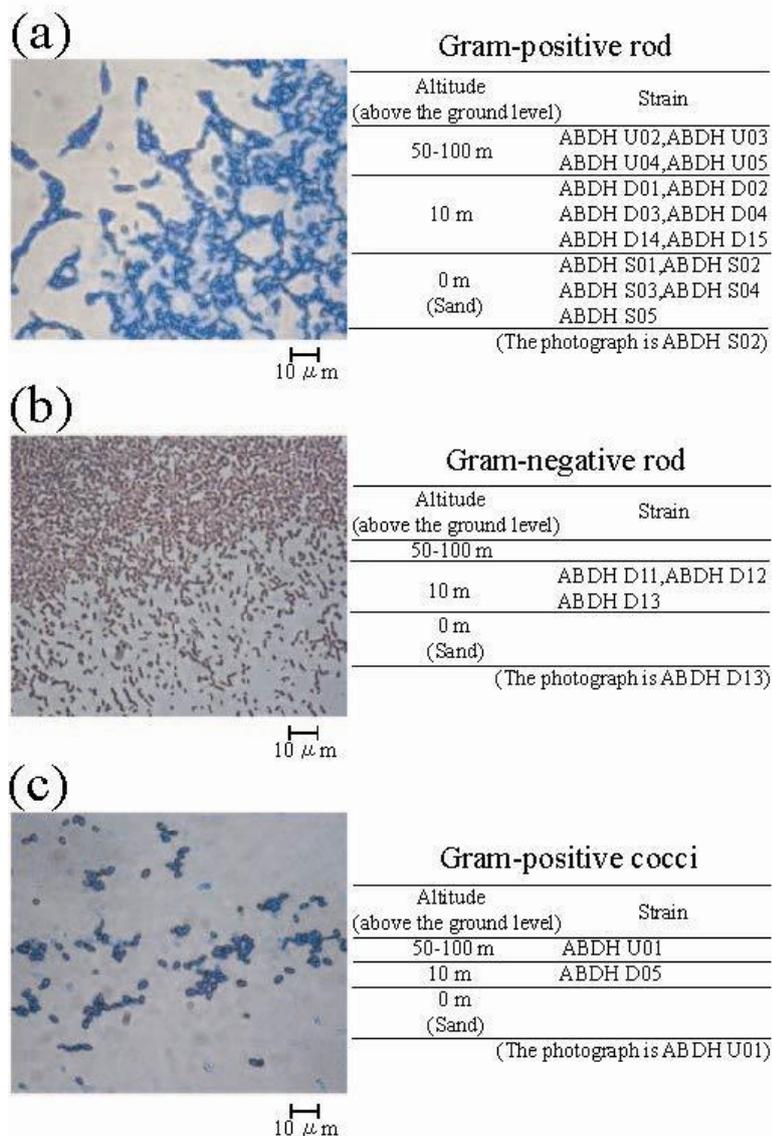


図1-10 2006年敦煌上空でサンプリングされた黄砂バイオエアロゾルのグラム染色結果

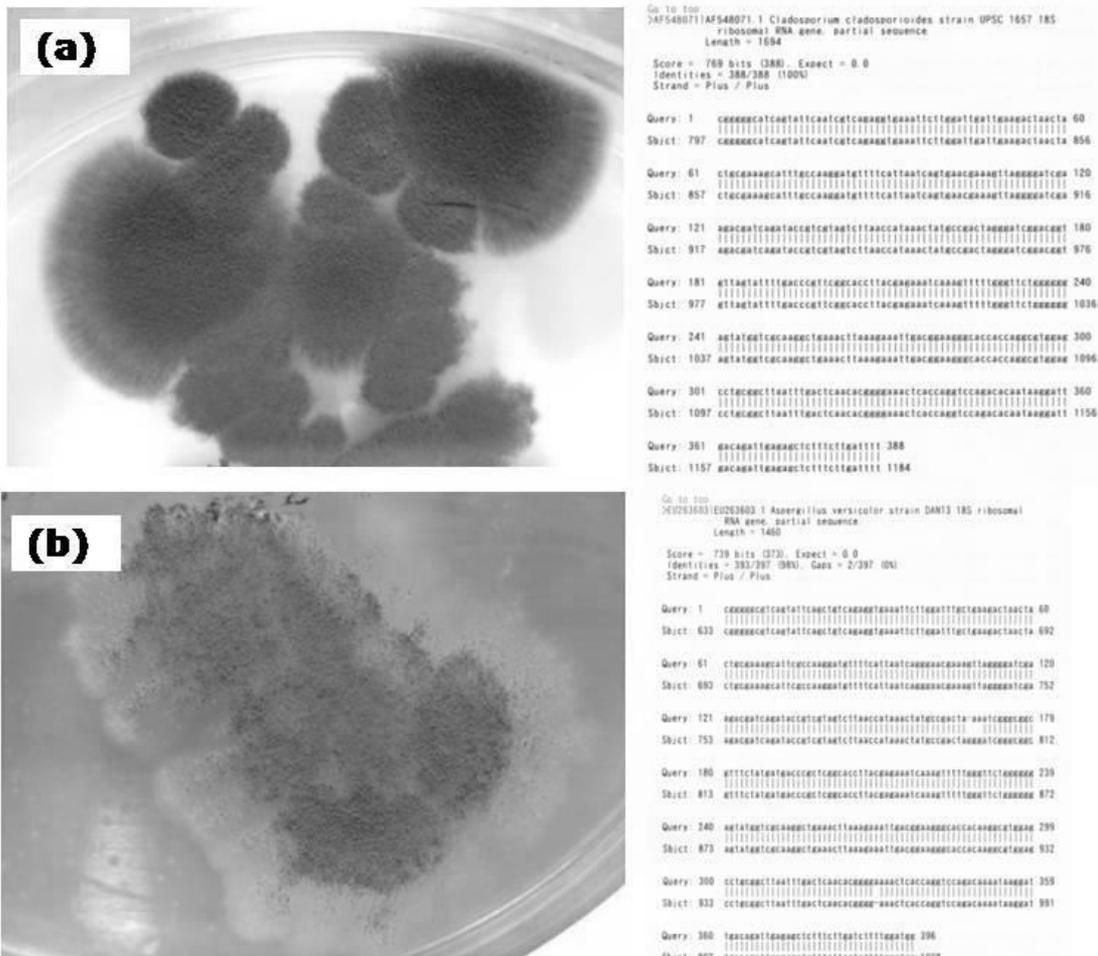


図 1 - 1 1 2007年敦煌上空800 m (標高約2,000 m) で採取したカビのプレート写真とDNAシーケンス結果

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

これまで黄砂バイオエアロゾル（黄砂と挙動をともにする生物粒子）は全く確認されていなかったが、本研究の係留気球と新規に開発されたバイオエアロゾルサンプラーを用いることにより、可能になるばかりか、次々と種々の菌株の存在が明らかになった（サブテーマ2および3参照）。舞い上がることで、生存できる微生物は、孢子・芽胞の形成能力をもつ細菌（*Bacillus*属類等）、カビ（*Cladosporium*属や*Aspergillus*属等）、担子菌（*Phlebia*族等）であることがわかった。孢子・芽胞は、紫外線や乾燥に耐性をもつため上空に舞い上がっても生存できると思われる。2006年に採取された菌株を報告した論文が2008年度日本エアロゾル学会論文賞を受賞し、学術的にも注目されている研究といえる。

(2) 地球環境政策への貢献

本研究の成果から、病原性微生物を含め種々の黄砂バイオエアロゾルが生きたまま舞い上がっていることがわかった。現在の黄砂に関する環境政策は、ヒトの健康としては鉱物粒子が及ぼす健康影響だけであったが、微生物はヒトの健康にダイレクトに影響を及ぼすので黄砂バイオエアロゾルを考慮する必要性があることを示唆した。発見された菌株には、病原性のものの他にも農林水産業などの産業に影響を及ぼすものもあったので、新たなアプローチでの黄砂に関する環境政策や黄砂予報の必要性を訴えることとなった。また、社会的にも関心が高く、新聞・テレビのメディアから取材を受けることとなった。

6. 引用文献

1) 岩坂泰信：紀伊国屋書店（2006）

“黄砂—その謎を追う”

2) M. Yamada, Y. Iwasaka, A. Matsuki, D. Trochkin, Y.-S. Kim, T. Nagatani, M. Nagatani, H. Nakata, G.-Y. Shi, D. Zhang, Z. Shen, B. Chen, G. Li: Utyukouku Kenkyu Kaihatsu Kikou Kenkyu Kaihatsu Houkoku, JAXA-RR-03-001, 105-115 (2004)

“Studies on Kosa Characterization of Atmospheric Chemistry Based on Direct Sampling of Atmospheric Aerosol: Balloon-Borne Measurement in Dunhuang, China”

3) Y. Iwasaka, Y.-S. Kim, D. Trochkin, A. Matsuki, M. Yamada, T. Shibata, T. Hase, G.-Y. Shi: Chikyū Kankyō, 7, 159-170 (2002)

“Kosa Ryushino Tyokoryo Yusoto Ryushino Henshitsu”

4) M. Yamada, Y. Iwasaka, A. Matsuki, D. Trochkin, Y.-S. Kim, D. Zhang, T. Nagatani, G.-Y. Shi, M. Nagatani, H. Nakata, Z. Shen, B. Chen, G. Li: Water, Air, and Soil Pollution: Focus, 5, 231-250 (2005)

“Feature of Dust Particles in the Spring Free Troposphere Over Dunhuang in Northwestern China: Electron Microscopic Experiments on Individual Particles Collected with a Balloon-Borne Impactor”

5) A. Matsuki, Y. Iwasaka, G.-Y. Shi, H.-B. Chen, K. Osada, D. Zhang, M. Kido, Y. Inomata, Y.-S. Kim, D. Trochkin, C. Nishida, M. Yamada, T. Nagatani, M. Nagatani, H. Nakata: Water, Air, and Soil Pollution: Focus, 5, 101-132 (2005)

- “Heterogeneous Sulfate Formation on Dust Surface and its Dependence on Mineralogy: Balloon-Bore Observations from Balloon-Borne Measurements in the Surface Atmosphere of Beijing, China”
- 6) P. A. Ariya, M. Amyot: *Atmospheric Environment*, 38, 1231-1232 (2004)
“New Directions: the Role of Bioaerosols in Atmospheric Chemistry and Physics”
- 7) H.-J. Kwon, S.-H. Cho, Y. Chun, F. Lagarde, G. Pershagen: *Environ. Res.*, 90, 1-5 (2002)
“Effect of the Asian Dust Events on Daily Mortality in Seoul, Korea”
- 8) Y.-S. Chen, P.-C. Sheen, E.-R. Chen, Y.-K. Liu, T.-N. Wu, C.-Y. Yang: *Environ. Res.*, 95, 151-155 (2004)
“Effect of Asian Dust Storm Events on Daily Mortality in Taipei, Taiwan”
- 9) T. Ichinose, M. Nishikawa, H. Takano, N. Sera, K. Sadakane, I. Mori, R. Yanagisawa, T. Oda, H. Tamura, K. Hiyoshi, H. Quan, S. Tomura, T. Shibamoto, : *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, 20, 48-56 (2005)
“Pulmonary Toxicity Induced by Intratracheal Instillation of Asian Yellow Dust (Kosa) in Mice”
- 10) C.A. Kellogg, D. W. Griffin: *TRENDS in Ecology and Evolution*, 21, 638-644 (2006)
“Aerobiology and the Global Transport of Desert Dust”
- 11) 長谷川武治: 学会出版センター(1975)
“微生物の分類と同定”
- 12) Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. (eds): Waverly Press, (1974)
“Bergey’ s Manual of Determinative Bacteriology”
- 13) Hiraishi, A.: *Lett. Appl. Microbiol.*, 15, 210-213 (1992)
“Direct Automated Sequencing of 16S rDNA Amplified by Polymerase Chain Reaction from Bacterial Cultures without DNA Purification” ,
- 14) Altshul, S. F., Madden, T. F., Schaffer, A. A., Chang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman D. J.: *Nucleic Acids Res.*, 25, 3389-3402 (1997)
“Gapped BLAST and PSI-BLAST: a New Generation of Protein Database Search Programs”
- 15) 日本臨床微生物学会: 日本臨床微生物学会 (2001)
“炭疽菌マニュアル
- 16) Schraft, H., Griffiths, M. W.: *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 98-102 (1995)
“Specific Oligonucleotide Primers for Detection of Lecithinase Positive *Bacillus* ssp. by PCR” ,
- 17) Harmon, S. M., Goepfert, J. M., Bennett, R. W.: American Public Health Association (1992)
“Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods 3rd ed.” ,
- 18) 相田浩, 高尾彰一, 柄倉辰六郎, 齊藤日向, 高橋甫: 朝倉書店 (1974)
“応用微生物学”
- 19) 日本微生物学協会: 技報堂出版 (1989)
“微生物学辞典”
- 20) 石田祐三郎, 杉田治男: 恒星社厚生閣 (2000)

“海洋環境アセスメントのための微生物実験法”

7. 国際共同研究等の状況

現在のところ、国際共同研究プロジェクトとしては立ち上がっていないが、黄砂バイオエアロゾル研究には、黄砂発生源地域である中国でサンプリングする必要がある。本サブテーマでは中国タクラマカン砂漠東端にあたる敦煌市の気象台にて黄砂バイオエアロゾルの直接サンプリングを行った。この実験実施には中国の研究者の協力が必要不可欠であり、中国科学院大気物理研究所教授 石廣玉先生および中国科学院大気物理研究所 陳彬氏に多大なる尽力を賜った。

8. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) 小林史尚, 柿川真紀子, 山田丸, 陳彬, 石廣玉, 岩坂泰信: エアロゾル研究, 22, 218-227 (2007)
“黄砂発生源におけるバイオエアロゾル拡散に関する研究”: 2008年度日本エアロゾル学会論文賞受賞
- 2) N.-P. Hua, F. Kobayashi, Y. Iwasaka, G.-Y. Shi, T. Naganuma: *Aerobiologia*, 23, 291-298 (2007)
“Detailed identification of desert-originated bacteria carried by Asian dust storms to Japan”
- 3) F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, B. Chen, G.-Y. Shi, Y. Iwasaka: *Proceeding of the 5th Asian Aerosol Conference*, 333-334 (2007)
“Isolation and identification of bioaerosols in a KOSA source region, Dunguang”
- 4) M. Yamada, Y. Iwasaka, D. Zhang, A. Matsuki, D. Trochkin, G.-Y. Shi, M. Nagatani, Y.-S. Kim, H. Nakata, B. Chen, K. Hayakawa: *Proceeding of the 5th Asian Aerosol Conference*, 380-381 (2007)
“Existence of background dust in the free troposphere over an Asian dust source region”
- 5) T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, C. Hong, Y. Toubou, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka: *Proceeding of the 2nd International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology*, 152 (2007)
“Composition of halophilic bacteria survived in bioaerosol”
- 6) T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, C. Hong, Y. Toubou, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka: *Journal of Ecotechnology Research*, 13, 309-313 (2008)
“Ecophysiological analysis of halobacteria in bioaerosol”
- 7) G.-Y. Shi, F. Kobayashi, S. Toda, M. Yamada, M. Kakikawa, T. Maki, T. Higashi, C. Hong, Y. Tobo, B. Chen, T. Naganuma, Y. Iwasaka: *Proceeding of 5th International Workshop on Sand/Duststorms and Associate Dustfall*, p.42 (2008)
“Direct sampling and identification of bioaerosols in the convective mixed layer over KOSA region, Dunhuang, using the separate culture”
- 8) M. Kakikawa, F. Kobayashi, T. Maki, M. Yamada, T. Higashi, B. Chen, G.-Y. Shi, C. Hong,

- Y. Tobo, Y. Iwasaka : Proceeding of 5th International Workshop on Sand/Duststorms and Associate Dustfall, p.11 (2008)
 “Dustborne microorganisms in KOSA source region, Dunhuang”
- 9) M. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, B. Chen, G.-Y. Shi, C. Hong, Y. Tobo, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka : Proceeding of 5th International Workshop on Sand/Duststorms and Associate Dustfall, p.14 (2008)
 “Halotolerant bacterial community survived in atmosphere of Asian dust (KOSA) source region, Dungguang City”
- 10) M. Yamada, T. Maki, F. Kobayashi, B. Chen, D. Zhang, G.-Y. Shi, Y. Iwasaka : Proceeding of Asia Oceania Geosciences Society 2008, AS09-A011 (2008)
 “Mineral particles in the boundary layer over a desert area of the northwest China: Number concentration and mixture state with microorganisms”
- 11) S. Toda, F. Kobayashi, M. Yamada, M. Kakikawa, T. Maki, T. Higashi, C. Hong, Y. Tobo, B. Chen, G.-Y. Shi, Y. Iwasaka : Proceeding of International Aerosol Symposium 2008, p.227-228 (2008)
 “Isolation, Identification, and Direct sampling of Bioaerosols in the convective mixed layer over KOSA region, Dunhuang”
- 12) M. Yamada, Y. Iwasaka, D. Zhang, T. Miyazawa, F. Kobayashi, M. Kakikawa, K. Hayakawa : Proceeding of International Aerosol Symposium 2008, p.263-264 (2008)
 “Development of a particle counter for bioaerosol measurement”
- 13) F. Kobayashi, S. Toda, M. Yamada, M. Kakikawa, T. Maki, T. Higashi, C. Hong, Y. Tobo, B. Chen, G.-Y. Shi, Y. Iwasaka : Proceeding of International Global Atmospheric Chemistry 10th International Conference, Th123 (2008)
 “Bioaerosols in the convective mixed layer over KOSA region, Dunhuang”
- 14) M. Yamada, T. Maki, F. Kobayashi, B. Chen, M. Kakikawa, D. Zang, M. Nagatani, C. Hong, G.-Y. Shi, Y. Iwasaka : Proceeding of International Global Atmospheric Chemistry 10th International Conference, Th114 (2008)
 “Diffusion of bioaerosols linked with mineral particles in the boundary layer over a desert area of the northwest China”
- 15) T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, B. Chen, G.-Y. Shi, C. Hong, Y. Tobo, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka : Air Quality Atmosphere and Health, 1, 81-89 (2008)
 “Phylogenetic diversity and vertical distribution of a halobacterial community in the atmosphere of an Asian dust (KOSA) source region, Dunhuang City”
- 16) M. Kakikawa, F. Kobayashi, T. Maki, M. Yamada, T. Higashi, B. Chen, G. Shi, C. Hong, Y. Tobo, Y. Iwasaka : Air Quality Atmosphere and Health, 1, 195-202 (2008)
 “Dustborne microorganisms in the atmosphere over Asian dust source region, Dunhuang”
- 17) Y. Iwasaka, G. Shi, M. Yamada, F. Kobayashi, M. Kakikawa, T. Maki, T. Naganuma, B. Chen, Y. Tobo, C. Hong : Air Quality Atmosphere and Health, 2, 29-38 (2009)

“Mixture of Kosa (Asian Dust) and bioaerosols detected in the atmosphere over the Kosa particles source regions with Balloon-borne measurements: Possibility of long-range transport”

- 18) T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, A. Matsuki, C. Hong, Y. Tobo, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka : Journal of Ecotechnology Research
 “Phylogenetic diversity and vertical distribution of a halobacterial community in the atmosphere of an Asian dust (KOSA) arrival region, Suzu City” (in press)

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 小林史尚：銀行倶楽部，第507号，p.2-4（2008）
 巻頭コラム「黄砂とともに微生物がやって来る－黄砂バイオエアロゾル研究－」
- 2) 柿川真紀子，生物工学会誌，第87巻，p.239（2009）
 「バイオエアロゾルとは？」

(2) 口頭発表（学会）

- 1) F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, B. Chen, G.-Y. Shi, Y. Iwasaka : The 5th Asian Aerosol Conference (2007)
 “Isolation and identification of bioaerosols in a KOSA source region, Dunguang”
- 2) M. Yamada, Y. Iwasaka, D. Zhang, A. Matsuki, D. Trochkin, G.-Y. Shi, M. Nagatani, Y.-S. Kim, H. Nakata, B. Chen, K. Hayakawa : The 5th Asian Aerosol Conference (2007)
 “Existence of background dust in the free troposphere over an Asian dust source region”
- 3) X.Y. Yang, M. Yamada, N. Tang, T. Kameda, A. Toriba, K. Hayakawa : The 5th Asian Aerosol Conference (2007)
 “Long-range transport of fluoride from China to Japan”
- 4) T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, C. Hong, Y. Toubou, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka : 2nd International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (2007)
 “Composition of halophilic bacteria survived in bioaerosol”
- 5) 小林史尚，山田丸：環日本海域の環境シンポジウム（2007）
 “大気バイオエアロゾル学の展開”
- 6) 小林史尚：第二回大気バイオエアロゾルシンポジウム（2008）
 “黄砂バイオエアロゾルプロジェクトと敦煌・金沢におけるサンプリング”
- 7) 山田丸：第二回大気バイオエアロゾルシンポジウム（2008）
 “黄砂発生源上空のエアロゾル粒子の性状と大気鉛直構造”
- 8) 牧輝弥：第二回大気バイオエアロゾルシンポジウム（2008）
 “黄砂バイオエアロゾルの混合状態と耐塩細菌に注目した解析”
- 9) 柿川真紀子：第二回大気バイオエアロゾルシンポジウム（2008）
 “分離培養法による同定と直接ゲノム解析”
- 10) 東朋美：第二回大気バイオエアロゾルシンポジウム（2008）

- “同定・解析結果からみた健康影響の可能性”
- 11) 牧輝弥, 鈴木振二, 小林史尚, 柿川真紀子, 山田丸, 東朋美, 長谷川浩, 上田一正, 岩坂泰信 : 第56年会日本分析化学会 (2007)
“黄砂バイオエアロゾルの生態調査にむけた生理化学的分析手法の確立”
 - 12) M. Yamada, D. Zhang, T. Miyazawa, K. Hayakawa, Y. Iwasaka: The 3rd International Workshop on Asian Dust and Ocean EcoSystem (ADOES) (2007)
“Mobile bioaerosol particle counter: Development and perspective”
 - 13) M. Kakikawa, S. Hashimoto, M. Iwahara, S. Yamada : The Bioelectromagnetics Society 29th Annual Meeting (2007)
“Effect of extremely low frequency magnetic fields on anticancer drug potency”
 - 14) M. Kakikawa, Y. Oda, S. Sunata, N. Suzuki, K. Kitamura, A. Hattori, M. Iwasaka, S. Ueno, S. Yamada : The Bioelectromagnetics Society 29th Annual Meeting (2007)
“Effects of extremely low frequency magnetic fields on osteoclasts and osteoblasts: Development of a new model system using fish scale”
 - 15) M. Kakikawa, S. Maeda, R. Hosono, S. Yamada : The Bioelectromagnetics Society 29th Annual Meeting (2007)
“Learning behaviors on the nematode *C. elegans* exposed to electromagnetic fields are greatly affected”
 - 16) S. Yamada, C. Komkrit, C. Gooneratne, M. Kakikawa, M. Iwahara : The Bioelectromagnetics Society 29th Annual Meeting (2007)
“Estimation of magnetite density by needle type giant magnetoresistance probe”
 - 17) 小多雄太、柿川真紀子、鈴木信雄、山田外史、岩原正吉 : 平成19年度電気関係学会北陸支部連合大会 (2007)
“骨形成におよぼす静磁場効果に関する研究”
 - 18) 小多雄太、鈴木信雄、山田外史、柿川真紀子、北村敬一郎、服部淳彦 : 第31回日本応用磁気学会 (2007)
“骨形成におよぼす交流磁界効果”
 - 19) N. Suzuki, F. Kobayashi, M. Matada, S. Ito, Y. Oshima, A. Hattori : The Japan Society for Comparative Endocrinology (2007)
“Effect of tributyltin of the calcium metabolism in teleosts and attempt to biodegrade by marine bacteria”
 - 20) F. Kobayashi, M. Daidai, Y. Nakamura : 2nd International Conference on Environmental, Industrial and Applied Microbiology (2007)
“Landfill leachate treatment using ozone oxidation and moss”
 - 21) T. Shimada, T. Maki, W. Hirota, T. Kakimoto, H. Hasegawa, K. Ueda : 14th Asian Symposium on Ecotechnology (2007)
“Bacterial community in the lake water spiked with Dimethylarsenic acid estimated by PCR- DGGE analysis : Saul, Korea”
 - 22) T. Suzuki, T. Maki, K. Kido, A. Nakahara, T. Higashi, H. Hasegawa, K. Ueda, K. Saijoh :

- 14th Asian Symposium on Ecotechnology (2007)
 “Effect of iron stress on gene expression in harmful microalga *Prymnesium parvum* : Saul, Korea”
- 23) T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, C. Hong, Y. Toubou, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka : 14th Asian Symposium on Ecotechnology (2007)
 ” Ecophysiological analysis of halophilic bacteria in bioaerosol : Saul, Korea”
- 24) T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, C. Hong, Y. Tobo, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka : Biomicroworld 2007 (2007)
 “Ecophysiological Analysis of Halophilic Bacteria in Bioaerosol : Spain”
- 25) W. Hirota, T. Maki, T. Kakimoto, T. Shimada, H. Hasegawa, K. Ueda, Biomicroworld 2007 (2007)
 “Seasonal dynamics of bacterial population degrading dimethylarsenic acid in Lake Kahokugata : Spain”
- 26) 牧輝弥 : こまつものづくり技術シーズ発表会 (2008)
 “ヒ素無機化細菌を利用した有機ヒ素汚染土壌のファイトレメディエーション”
- 27) 牧輝弥、鈴木峰、城戸耕介、長谷川浩、上田一正 : 第3回日本進化原生生物学研究会 (2008)
 “有害ハプト藻 *Prymnesium parvum* の鉄欠乏ストレスに関わる遺伝子群の探索”
- 28) M. Kakikawa, F. Kobayashi, T. Maki, M. Yamada, T. Higashi, B. Chen, G.-Y. Shi, C. Hong, Y. Tobo, Y. Iwasaka : The Fifth International Workshop on Sand and Dust Storms (2008)
 “Dustborne microorganisms in KOSA source region, Dunhung”
- 29) G.-Y. Shi, F. Kobayashi, S. Toda, M. Yamada, M. Kakikawa, T. Maki, T. Higashi, C. Hong, Y. Tobo, B. Chen, T. Naganuma, Y. Iwasaka : The Fifth International Workshop on Sand and Dust Storms (2008)
 “Direct Sampling and Identification of Bioaerosols in the Convective Mixed Layer Over KOSA Region, Dunhuang, Using the Separate Culture”
- 30) T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, C. Hong, Y. Tobo, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka : The Fifth International Workshop on Sand and Dust Storms (2008)
 “Halotolerant bacterial community survived in atmosphere of Asian dust (KOSA) source region, Dunhuang City”
- 31) Y. Iwasaka, G.-Y. Shi, M. Yamada, F. Kobayashi, M. Kakikawa, T. Maki, T. Naganuma, B. Chen : The Fifth International Workshop on Sand and Dust Storms (2008)
 “Mixing state of micro-biota and KOSA particles: Balloon-borne measurements at Dungguang, China”
- 32) 牧輝弥、鈴木振二、青木一真、小林史尚、柿川真紀子、山田丸、東朋美、長谷川浩、上田一正、岩坂泰信 : 日本分析化学会第57年会 (2008)
 “立山積雪断面に含まれる黄砂バイオエアロゾルからの細菌群の検出”
- 33) Susuki S., Maki T., Kobayashi F., Kakikawa M., Yamada M., Higashi T., Hong C., Toubou Y., Hasegawa H., Ueda K., Iwasaka Y. : 15th Asian Symposium on Ecotechnology (2008)
 “The bacterial species composition of the bioaerosol in the Suzu City by PCR-DGGE methods”

- 34) 牧輝弥、鈴木振二、小林史尚、柿川真紀子、山田丸、東朋美、長谷川浩、上田一正、岩坂泰信：第24回日本微生物生態学会（2008）
“珠州市上空のバイオエアロゾルにおける耐塩細菌群の種組成解析”
- 35) M.Kakikawa, T.Fujihata, M.Iwahara, S.Yamada: Asian-Pacific Symposium on Applied Electromagnetics and Mechanics (2008)
“Enhanced Potency of Anticancer Drug, Bieomycin by ELF Magnetic Fields,”
- 36) Y.Hirai, M.Kakikawa, S.Yamada, M.Iwahara: Asian-Pacific Symposium on Applied Electromagnetics and Mechanics, (2008)
“Influence of ELF Magnetic Fields on Anticancer Drug Cisplatin Potency”
- 37) C.P.Gooneratne, S.Yamada, M.Iwahara, M.Kakikawa, Y.Matsumoto: Asian-Pacific Symposium on Applied Electromagnetics and Mechanics (2008)
“Novel GMR Sensor for Detection of Magnetic Nanoparticles Inside Minute Cavities,”
- 38) 藤井邦明, 松本有加, 柿川真紀子, 岩原正吉, 山田外史：平成20年度電気関係学会北陸支部連合大会, A-44, (2008)
“磁性微粒子モデルによる磁性流体の濃度と比透磁率の関係”
- 39) 松本有加, 藤井邦明, 柿川真紀子, 岩原正吉, 山田外史：平成20年度電気関係学会北陸支部連合大会, A-45, (2008)
“磁性流体の磁性微粒子の分散状態と透磁率”
- 40) 藤畑貴史, 柿川真紀子, 岩原正吉, 山田外史：平成20年度電気関係学会北陸支部連合大会, A-46 (2008)
“抗がん剤の作用における交流磁界の影響評価”
- 41) C.Gooneratne, S.Yamada, M.Iwahara, M.Kakikawa：第32回日本応用磁気学会, 12pC-9 (2008)
“GMR Sensor Application in Detecting and Estimating Magnetic Fluid Weight Density inside Various Size Tumors”
- 42) 柿川真紀子, 平井雄一郎, 岩原正吉, 山田外史：第32回日本応用磁気学会 14a1PS-41 (2008)
“抗がん剤シスプラチンの作用における交流磁界曝露影響”
- 43) 岩坂泰信、小林史尚、牧輝弥、柿川真紀子、山田丸：第25回エアロゾル科学・技術研究討論会 A01 (2008)
“黄砂バイオエアロゾルを考えるわけ”
- 44) 柿川真紀子、小林史尚、牧輝弥、山田丸、東朋美、陳彬、石廣玉、當房豊、洪天祥、岩坂泰信：第25回エアロゾル科学・技術研究討論会 A04 (2008)
“黄砂発生源のエアロゾルに含まれる微生物”
- 45) 山田丸、小林史尚、牧輝弥、柿川真紀子、張代洲、陳彬、洪天祥、當房豊、長谷正博、東朋美、原和嵩、石廣玉、岩坂泰信：第25回エアロゾル科学・技術研究討論会 A03 (2008)
“気球を用いた対流圏バイオエアロゾルの拡散に関する研究”
- 46) 鈴木振二、牧輝弥、小林史尚、柿川真紀子、山田丸、東朋美、陳彬、石廣玉、當房豊、洪天祥、長谷川浩、上田一正、岩坂泰信：第25回エアロゾル科学・技術研究討論会 A05 (2008)
“黄砂粒子上に生残する耐塩細菌群の種組成解析”
- 47) S. Toda, F. Kobayashi, M. Yamada, M. Kakikawa, T. Maki, T. Higashi, C. Hong, Y. Tobo,

- B. Chen, G.-Y. Shi, Y. Iwasaka: International Aerosol Symposium 2008, 227-228 (2008)
 “Isolation, Identification, and Direct sampling of Bioaerosols in the convective mixed layer over KOSA region, Dunhuang”
- 48) M. Yamada, Y. Iwasaka, D. Zhang, T. Miyazawa, F. Kobayashi, M. Kakikawa, K. Hayakawa: International Aerosol Symposium 2008, 263-264 (2008)
 “Development of a particle counter for bioaerosol measurement”
- 49) 小林史尚, 牧輝弥, 柿川真紀子, 東朋美, 山田丸, 石廣玉, 岩坂泰信, 第49回年会大気環境学会 (2008)
 “敦煌気球観測で見られる微生物と黄砂”
- 50) 山田丸, 小林史尚, 牧輝弥, 柿川真紀子, 張代洲, 陳彬, 洪天祥, 當房豊, 長谷正博, 石廣玉, 岩坂泰信: 第49回年会大気環境学会 (2008)
 “気球を用いた対流圏バイオエアロゾル観測: 粒子数濃度計測とバイオエアロゾル混合状態の解析”
- 51) F. Kobayashi, S. Toda, M. Yamada, M. Kakikawa T., Maki, T. Higashi, C. Hong, Y. Tobo, B. Chen, G.-Y. Shi, Y. Iwasaka: IGAC 10th International Conference (2008)
 “Bioaerosols in the Convective Mixed Layer Over KOSA Region, Dunhuang”
- 52) M. Yamada, T. Maki, F. Kobayashi, B. Chen, M. Kakikawa, D. Zhang, M. Nagatani, C. Hong, G.-Y. Shi, Y. Iwasaka: IGAC 10th International Conference (2008)
 “Diffusion of bioaerosols linked with mineral particles in the boundary layer over a desert area of the Northwest China,”
- 53) 小林史尚, 山田丸, 牧輝弥, 柿川真紀子, 山田洋一, 東朋美, 荻野千秋, Kim Yang-Hoon: 第三回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2009)
 “黄砂バイオエアロゾルの越境的健康被害調査のためのサンプリング・同定に関する研究”
- 54) 柿川真紀子, 小林史尚, 牧輝弥, 山田丸, 東朋美, 陳彬, 石廣玉, 當房豊, 洪天祥, 岩坂泰信: 第三回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2009)
 “敦煌で採集したバイオエアロゾルのメタゲノム解析”
- 55) 牧輝弥, 鈴木振二, 小林史尚, 柿川真紀子, 山田丸, 東朋美, 岩坂安信: 第三回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2009)
 “大気バイオエアロゾル中に生残する耐塩細菌群の種組成の解明”
- 56) 山田丸, 小林史尚, 岩坂泰信, 柿川真紀子, 牧輝弥, 張代洲, 長谷正博, 陳彬, 石廣玉: 第三回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2009)
 “敦煌における対流圏バイオエアロゾルの顕微鏡観察”

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催 (主催のもの)

- 1) 第二回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2008年1月12日、熊本県立大学、約50名)
- 2) 第三回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2009年1月11日、仙台KKRホテル、約50名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 朝日新聞 (2008年6月20日、全国版一面、次頁参照)
- 2) 熊本日日新聞 (2009年4月25日、朝刊社会面)
- 3) 北國新聞 (2008年5月8日、石川版)
- 4) 北陸中日新聞 (2008年5月8日、石川版)
- 5) 朝日新聞 (2008年5月8日、石川版)
- 6) 読売新聞 (2008年5月8日、石川版)
- 7) 北陸中日新聞 (2009年4月29日、石川版)
- 8) 週刊文春 (2009年3月12日号、文藝春秋社、p. 46-49、次頁参照)
- 9) テレビ朝日報道ステーション (2009年3月17日、黄砂バイオエアロゾルの採取と同定の成果について資料提供し、5分ほど紹介)
- 10) フジテレビサキヨミLive (2009年4月19日、黄砂バイオエアロゾルの採取、分析と健康影響の成果について10分ほど紹介)
- 11) NHKサイエンスゼロ (放送日未定2009年5月30日の予定、珠洲における黄砂バイオエアロゾルの採取、分析と健康影響などについて紹介)
- 12) NHKニュース石川版 (2008年5月7日、珠洲での黄砂バイオエアロゾルサンプリングについて5分ほど紹介)
- 13) 北陸朝日放送ニュース石川版 (2008年5月7日、珠洲での黄砂バイオエアロゾルサンプリングについて5分ほど紹介)

(6) その他

2008年度日本エアロゾル学会論文賞受賞 (2008年8月21日、論文名「黄砂発生源におけるバイオエアロゾル拡散に関する研究」：8. 研究成果の発表状況 (1) 誌上発表 <論文 (査読あり)>の 1) に記載した論文、次頁参照)

