

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

(2) 黄砂バイオエアロゾルの分離培養・同定・分類に関する研究

金沢大学 理工研究域物質化学系 牧 輝弥

<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 2, 536千円
(うち、平成20年度予算額 1, 234千円)

※上記の合計予算額金額には、間接経費585千円を含む

[要旨] 黄砂粒子に付着した微生物(黄砂バイオエアロゾル)が、中国大陸から日本まで飛来し、生態系(動植物や微生物)や人健康へ影響をおよぼす可能性が高く、社会的かつ学術的関心を集めつつある。特に、本研究では、環境ストレス全般に強い耐性をもつ耐塩細菌に注目し、「大気中で生残しやすい耐塩細菌が、黄砂とともに長距離輸送され、生息範囲を広げる」と想定した。しかし、大気エアロゾルの捕集には高度な技術を要するため、大気中の細菌群についての核心的な報告例は少ない。

そこで、係留気球を用いて、黄砂の発生源(中国敦煌市(タクラマカン砂漠))および黄砂の飛来地(金沢、珠洲)の上空(地表から高度600-1000m)から黄砂バイオエアロゾルを入手し、大気微生物群に関する以下の知見を得た。1、蛍光顕微鏡観察によって黄砂粒子に付着する細菌粒子を確認した。2、大気中の耐塩細菌を対象とした生物学的分析手法を確立し、大気中の細菌群が、15%から20%の高塩分濃度下でも増殖でき、高い耐塩性を示すことを明らかにした。3、全調査地点の大気中およびタクラマカン砂漠で得られた耐塩細菌からは、共通の遺伝子配列が検出され、地上から大気へと耐塩細菌が垂直混合されており、長距離輸送の可能性のある細菌種(*Bacillus*属)を突き止めた。

今回確立した、「耐塩細菌群を対象としたバイオエアロゾル分析手法」は、日本へ飛来する耐塩細菌群の分散状態の解析を可能とし、自然生態系、農作・牧畜・養殖業および人健康への影響について有意義な知見を構築できると思われる。また、大気中での挙動が分かっていない耐塩細菌の生理生態の解明は、微生物生態学に新たな知見を築くとともに、新奇の耐塩細菌の分離につながるであろう。

しかし、調査地点数および回数がまだ少ないため、今後、黄砂飛来地である環日本海において調査地を増やし、日本へ飛来する耐塩細菌群の分散状態を明らかにしたい。

[キーワード] バイオエアロゾル、耐塩細菌、微生物生態系、微生物種組成、黄砂

1. はじめに

黄砂はモンゴル北部及び中国北部の砂漠地域を起源とし、偏西風によって数日で日本まで風送される^{1,2)}。黄砂は、建造物や車などを汚し、視程を悪化させ交通機関などに影響を与えるのみならず、人健康へも被害を及ぼす³⁾。また、黄砂粒子に付着する微生物群が、日本や韓国、中国の各地に運ばれ、微生物生態系に与える影響にも関心があつまりつつある。実際、黄砂には、ウイル

スや細菌、カビ、花粉が含まれており、こうした生物由来の粒子は、黄砂バイオエアロゾルと呼ばれる。近年、疫病的調査及び動物実験によって、黄砂バイオエアロゾルが呼吸器系疾患を引き起こす危険性が指摘された。しかし、大気エアロゾルの捕集には高度な技術を要するため、大気に浮遊する微生物群を直接調査した核心的な報告例は少なく、あっても西インド諸島やアメリカ大陸のバイオエアロゾル研究に限られる^{4,5)}。従って、アジア上空の大気に生息する細菌群の生理生態に学術的および社会的関心が非常に高まりつつある。しかし、黄砂発生地から日本や韓国への微生物の輸送に着目した研究は少数であり^{6,7)}、黄砂発生地における大気中のバイオエアロゾルの生理学的特徴及び微生物種組成は、まだ明らかになっていない。

一方、大気中において微生物が生残するには、気温変化や、乾燥、酸素制限、紫外線照射などの過酷な環境ストレスへ順応し耐える必要がある^{8,9)}。日本海を經由して飛来する黄砂粒子には、多分に塩分が含まれることから¹⁾、高い塩分に耐性がある耐塩細菌が大気中で生残しつづける可能性が高い。なお、耐塩細菌は、pH及び気温変化や乾燥などのストレス因子にも耐えうる膜構造を有するため¹⁰⁾、『耐塩細菌は、大気中で生存しやすく、黄砂とともに長距離輸送され、生息範囲を広げる』という仮説を立てた。実際に、関東一円には同種の好塩細菌種が分布しており、この分布は黄砂によって細菌が分散したためと推察されている⁸⁾。従って、大気中から耐塩細菌に焦点を絞って、分離培養し、細菌種組成を明らかにすることで、大気による長距離輸送に関わる細菌群が検出されると考えた。

一方、これまでの砂塵による微生物の長距離輸送の研究では、培養できる細菌のみを対象にしてきた^{11,12)}。しかし、自然環境に存在する細菌群の90-99%は、従来の培養法では培養できないものの、環境中で増殖して生きていることが認識されている(viable but unculturable bacteria)¹³⁾。そのため、分離培養とは独立した変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法(Denaturing gradient gel electrophoresis :DGGE法)によって環境試料から直接抽出したDNAの16S rRNA遺伝子のPCR産物を解析した結果、微生物種組成は、陸上や海洋の動的環境因子によって影響を受けることが明らかとなった^{14,15)}。しかし、大気中におけるviable but unculturable bacteriaに関する情報は少ない。そこで、耐塩細菌を集積培養によって分離するのと同時に、分離できない細菌群についてもその種組成を解析する価値がある。

2. 研究目的

黄砂発生地(タクラマカン砂漠敦煌市)及び黄砂飛来地(能登半島珠洲市、金沢市、天草市)において、地上(地上から10 m)と上空(地上から800 mから1000m)のバイオエアロゾルを採取し、細菌分離手法および遺伝学的分類手法を用いて微生物種を明らかにし、黄砂によって長距離輸送される微生物種に目処をつけた。1) 各調査地点のバイオエアロゾル試料を、塩分濃度を変えて添加した培地に接種し(塩分集積培養)、耐塩細菌群の生残を評価する。2) バイオエアロゾルを対象とした16S rDNAのPCR-DGGE法を確立する。3) 塩分集積培養物およびバイオエアロゾル試料中のゲノムDNAを、PCR-DGGE法で解析し、種組成のデータベースを構築する。

3. 研究方法

(1) 調査

日本金沢市（2007年4月20日実施）、日本珠洲市（2008年5月7日実施）および中国敦煌市（2007年8月17日および2007年10月23日実施）において、エアポンプを搭載した係留気球をあげ、孔径0.2 μm のメンブランフィルター上にエアロゾルを1時間吸引捕集した（大気量200 cm^3 ）（図2-1）¹⁶⁾。各地点の高度は、600mから1000mの範囲であった。なお、地上から10 m上空の粒子もフィルター上に捕集した。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、耐塩細菌の集積培養、微生物の分離培養および直接DNA抽出に供した。

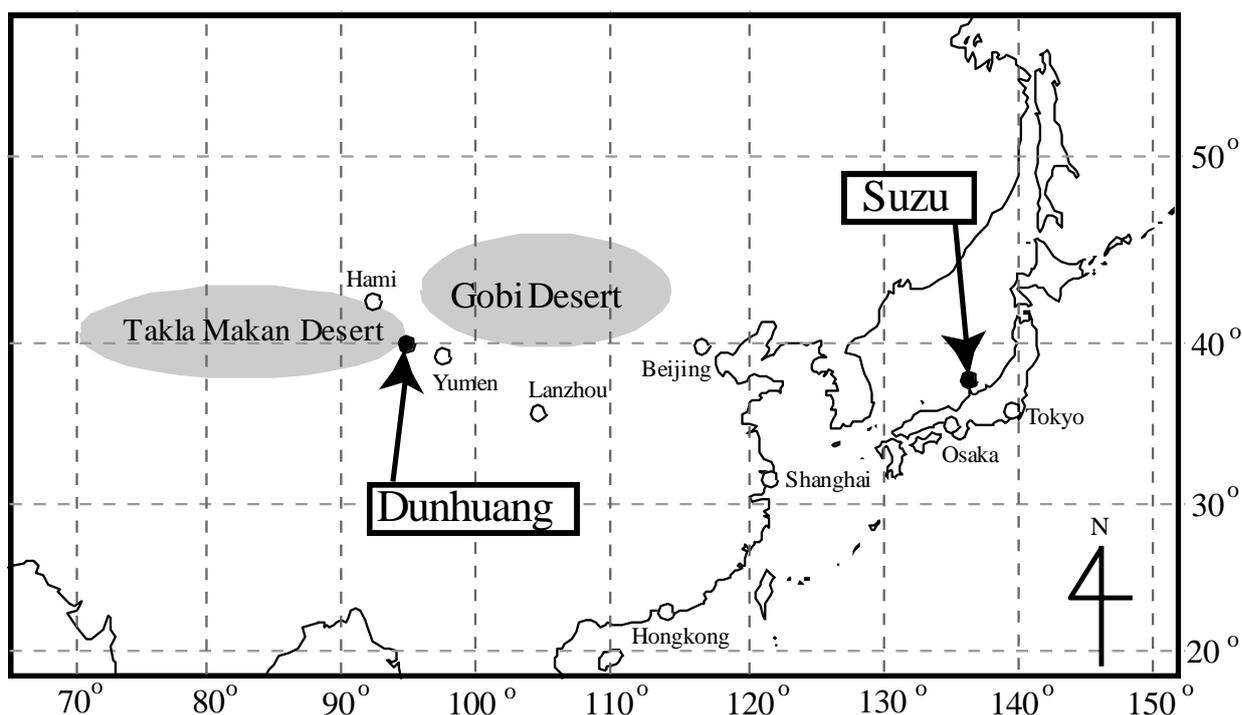


図2-1 中国敦煌市と日本珠洲市のサンプリング地点地図

(2) 耐塩細菌を対象とした馴化試験

バイオエアロゾル懸濁液5 mLを10 mL TS液体培地に加え、その液体培地1 mLを、塩分(NaCl)濃度0%, 3%, 10%及び20%のTS液体培地19 mLに接種し、8日間培養した。培養を開始した後、波長550 nmの吸光光度を測定することで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、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を分析した。また、培養を寒天培地塗抹することで、細菌株の分離も行った。

(3) 寒天培地を用いた微生物の分離培養

バイオエアロゾル懸濁液あるいは塩分集積培養液50 μL を、ポテトデキストロース寒天培地(Becton, Dickinson and Company)あるいはTrypticase-soy-broth (TS)寒天培地上に塗抹し、室温で12時間培養し、コロニーの形状を観察した。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¹⁷⁾。なお、各試料について寒天培地3枚ずつ使用した。この際、使用していない滅菌済メンブレンフィルターを滅菌水で洗浄し、洗浄水を寒天培地に塗抹したところ、コロニーは確認されなかったため、作業自体は無菌的であると判断した。

(4) 分離細菌の簡易同定

採取した菌株の形態学的・生理性状的試験は、細胞形態観察、グラム染色性、孢子の有無、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。孢子の有無は、マラカイトグリーン（関東化学）によって孢子を染色させ、光学顕微鏡観察によって判断した¹³⁾。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¹³⁾。オキシダーゼ反応、VPテストには、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）を用いた。形態学的・生理性状的試験の後、Bergeyの菌株推定マニュアルを用いて同定した¹⁵⁾。

(5) 16S rRNA遺伝子情報を用いたPCR-DGGE法

バイオエアロゾル試料のフィルター洗浄液1 mLあるいは集積培養5 mLに、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、proteinase K、及びlysozymeを加えることで微生物細胞を溶解させ、ゲノムDNAを抽出した。得られたゲノムDNAを、フェノール-クロロホルム抽出およびエタノール沈殿により精製した後、ゲノムDNAを鋳型としてPCR法により16S rRNA遺伝子を増幅した。この際、PCR-DGGE解析用のオリゴヌクレオチドprimer F-341(GC クランプ含有: 5' -GC クランプ -CCTACGGGAGGCAGCAG-3')とprimer 907R(5' -CCGT CAATTCCTT[A/G]AGTTT-3')を使用した²⁰⁾。各PCR反応では、抽出DNA10 ngにdNTP 2 $\mu\text{mol L}^{-1}$ 、各primer 2nmol L^{-1} 、Taq DNA polymerase 1Uを含むPCR mastermix 20 μL を加えた。混合液を94°Cで5分間保温した後、以下94°Cで1分間、55°Cで1分間、72°Cで2分間の反応を34サイクル行い、72°Cで10分間保温した。次に、得られたPCR産物を、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上に電気泳動した(100%変性剤は、7 mol L^{-1} の尿素と40%のホルムアミドを含む)。電気泳動は、1×TAE buffer中において、温度60°C、90Vで16時間、電気泳動槽を用いて行った。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(ATT0)を用いてゲルイメージを撮影した。さらに、アクリルアミドゲル上のいくつかのバンドを切り出し、核酸塩基配列の決定に用いた。

(6) 核酸塩基配列を用いた系統分類学的解析

切り出したゲル片をPCRチューブに移し、PCR産物をフェノール-クロロホルム抽出、クロロホルム抽出、エタノール沈殿で精製した。ヌクレオチド塩基配列を、Dye Deoxy Terminator Cycle Sequencing kit 及びDNA autosequencing systemを用いて決定した。シーケンスprimerとしてGC クランプを除いたprimer F-341を用いた。決定した塩基配列をBLASTとFASTAプログラムを用いて

DDBJデータベース(DNA Data Bank of Japan)上で比較した²¹⁾。すべての塩基配列を含む系統樹は、TreeViewPPCを用いて近隣結合法により作成した²²⁾。

(7) 細菌分離株の遺伝学的系統分類解析

寒天培地上に形成されたコロニーを、TS培地に接種し、室温で数日間培養した後、15000rpmで5分間遠心分離することで微生物細胞を回収した。得られた微生物細胞を純水に懸濁させ、ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、proteinase K、及びlysozymeを用いてゲノムDNAを抽出した。このゲノムDNAを鋳型としてPCR法により16S rRNA遺伝子を増幅した。この際、PCR-DGGE解析用のオリゴヌクレオチドprimer F-27とprimer 1492Rを使用した²³⁾。PCR産物をアガロースゲル電気泳動でバンドとして確認した後、バンドを切り出し、前述と同様に核酸塩基配列を決定し、近縁細菌種を検索した。

4. 結果・考察

(1) 敦煌市におけるバイオエアロゾル

1) バイオエアロゾル試料の採取調査

敦煌市の上空800 m地点の大気中におけるエアロゾル粒子数は、いずれの粒子サイズでも上空20 m以下の地点よりも少なかった。しかし、粒子サイズごとの分布数は、高度800 mと20 m以下の大気で類似しており(図2-2)、大気成分の垂直混合が示唆される。両高度において、粒径0.3~0.5 μm の粒子が91000 particles L^{-1} 以上の高い濃度であり、全粒子数の90%は0.3 μm より大きいことになる。さらに粒径0.5~2.0 μm の粒子数は、0.3~0.5 μm の粒子数と比較して1オーダー低く、2100~9200 particles L^{-1} の範囲であった。2.0 μm より大きい粒子も、高度800 mと20 m以下ともに、800~1150 particles L^{-1} の濃度範囲で検出された。敦煌市のあるタクラマカン砂漠は、周囲を山脈が取り囲み、大きな盆地になっており、常に風が盆地の中を混合しているため、地上の砂粒子が上空へと巻き上げられている³⁾。従って、黄砂発生源におけるエアロゾルは、恒常的に垂直方向に分散しており、地上の微生物が粒子とともに上空へと巻き上げられている可能性が高い。

2) 耐塩細菌の集積培養

バイオエアロゾル試料を、塩分濃度を変えたTS培地で培養した際、塩分濃度0及び3%の培地中での微生物生長量は、培養3日以内に急速に増加し、吸光度は、実験期間内で1200以上に達した(図2-3)。塩分濃度10%の培地では、高度10 mと800 m両方の試料中の微生物は、徐々に生長し、吸光度は、培養7日で1200以上に増加した。塩分濃度20%の培地では、培養6日目までに観測された微生物生長は弱く、実験期間中600以下の低い吸光度を保った。好塩細菌は、乾燥、UV照射、極限温度、酸素限界、高塩分など高いストレスに抵抗力を有し、極限環境で生残する能力がある¹⁰⁾。Echigoらは、日本の東京周辺数地点の塩分を含まない環境から耐塩細菌を分離し、細菌株が同種であることを示し、耐塩細菌が黄砂発生により輸送された可能性があることを報告した²⁴⁾。従って、敦煌市の上空においても、耐塩細菌が生残し、大気中の厳しい環境ストレスに耐えていると考えられる。

3) 上空の細菌種組成

バイオエアロゾル試料に含まれる微生物の16S rDNA遺伝子のPCR増幅産物を、変成剤濃度勾配ゲル上に電気泳動したところ、各バイオエアロゾル試料のPCR産物から2つの共通するバンドが検出され(図2-4)、高度10 mと800 mで捕集したバイオエアロゾル試料のDGGEバンドパターンは概ね一致した。試料を塩分濃度0、3、10、20%の培地に接種した培養を、PCR-DGGE解析に供した結果、塩分濃度0%と3%の培地では、高度10 mと800 mの試料で共通したバンドが検出され、低塩分培地で生長する細菌群は同一であることが示唆された。ゲルの上部と中央部の少数のバンドは、すべての塩分濃度での培養から検出され、一方で、ゲルの下部の他のバンドは、塩分濃度10%、20%での培養に特有で、高度10 mと800 mで捕集した試料で異なった。

DGGEゲルから19本のバンドを切り出し、核酸塩基配列を決定したところ、8つのタイプが得られ(表2-1)、グラム陽性細菌グループに属し、*Bacillus*属と*Staphylococcus*属の細菌種とクラスターを形成した(図2-5)。従って、調査時の敦煌市上空の大気中の微生物群の多様性は低く、*Bacillus*属と*Staphylococcus*属の少数のグラム陽性細菌種が優占していると推察できる。2006年8月の敦煌市の高度100 mで捕集したバイオエアロゾル試料からも、*Bacillus*属のグラム陽性細菌種が分離されている¹⁶⁾。*Bacillus*属は、芽胞を形成するため、環境ストレスに耐えて大気中で生残し続けることが知られている²⁵⁾。タクラマカン砂漠のような乾燥状態が続く大気中では、芽胞を形成する細菌のみが生残し続け、他の微生物種が死滅し、微生物群の多様性が減少したと言える。

高度10 mと800 mで捕集したバイオエアロゾル試料の8つの遺伝子タイプの中でも、3つのタイプは複数のバンドから検出された。塩分濃度0、3、10%の培養から得られたDAd-11、DAd-17、DAd-22の塩基配列とバイオエアロゾル試料から直接抽出したDNAから得られたDDd-30およびDDd-32の塩基配列は、1つの系統タイプに属し、*Bacillus pumilus*と99.6%の高い相同性で近縁になった。一方、DAd-1、DAd-3、DAd-7、DAd-12、DAd-16、DAd-18で構成されるバンドも99.4%の高い相同性で*B. pumilus*と近縁となった。調査時の大気中においては、*B. pumilus*の近縁細菌種が、砂粒子とともに上空に舞い上がる優占細菌種であると見なせる。*B. pumilus*のある株は、人に対して毒素を生成する病原菌として分離されており²⁶⁾、African dust発生時に北カリブのエアロゾル²⁷⁾および海洋環境からも分離された^{28, 29)}。高度10 mと800 mでのエアロゾル粒子のサイズの分布も類似しており(図2-1)、砂漠の砂由来のエアロゾル粒子は、垂直混合していることが示唆された(図2-2)。また、*Bacillus*属に属する細菌は、高度20000 mで分離されたことから³⁰⁾、*Bacillus*属の細菌は地球の対流圏を越えて垂直輸送され得る。従って、中国の黄砂発生地域で垂直混合が起り、鉱物粒子に付着して耐塩細菌が生きのまま上空を浮遊している可能性は高い。

一方、DAd-13、DAd-27、DAd-29の3つの塩基配列は、塩分濃度10、20%の培養に特有で、*Staphylococcus*属に属する2つの系統タイプに分類された。高度10 mで捕集したバイオエアロゾル試料の培養から検出された系統タイプDAd-27、DAd-29は、*Staphylococcus xylosus*と別の系統タイプが確認され、高度800 mで捕集したバイオエアロゾル試料の培養は、99.8%の高い相同性で*S. epidermidis*と近縁となり、高度による細菌種の違いが示された。これらの細菌群は、耐塩細菌であり生長にはある程度の塩分濃度を必要としている。これらの系統タイプは、バイオエアロゾル試料から直接抽出したDNAからは検出されていないため、*Staphylococcus*属の近縁種は、敦煌市や黄砂発生地域の上空において、非優占種であると見なせる。*Staphylococcus*属の一部は、人の肌や口腔内でコロニーを形成し、病気の原因となる可能性があり^{31, 32)}、エアロゾルによる輸送

で生残することが知られている。*S. xyloso*および*S. epidermidis*などと近縁の細菌種も、African dust発生中に北カリブで捕集したエアロゾルで確認されている³³⁾。よって、*Staphylococcus*種は大気中の砂塵による大気の攪乱においても生残し続け、容易に生息域を拡大する可能性がある。

4) 分離細菌株の種組成解析

敦煌市で採取したバイオエアロゾルの懸濁液を寒天プレートに塗抹したところ、微生物分離株全20株を単離した。2006年8月16日に地上50から100 m (上空)において分離株BADH U01からBADH U05を採取し、8月15日に地上10 m (地上付近)では分離株BADH D01からBADH D05を採取し、8月16日にも地上10 mから分離株BADH D11からBADH D15を得た。砂漠の砂試料からは5菌株BADH S01からBADH S05を分離した。分離した合計20菌株の形態学的・生理性状学的特性を試験し、同定した。

光学顕微鏡下においてグラム染色の判定を行った結果、BADH D05株とBADH U01株が球菌であり、残り18株が桿菌であった。また、BADH D11、BADH D12およびBADH D13の3株がグラム陰性となり、その他の菌株は全てグラム陽性であった(表2-2)。よって、20菌株は3つの菌群に大別できた。第1のグループは、グラム陽性桿菌群であり、全20株中の15菌株(BADH S01-S05、BADH D01-D04、BADH D14、BADH D15、BADH U02-U05)が含まれた。一方、グラム陰性桿菌群の3菌株(BADH D11-D13)が第2グループを形成した。第3のグループは、グラム陽性球菌群でBADH D05とBADH U01の2菌株が含まれた。第1グループ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)および砂漠の砂試料のいずれの試料からも検出され、タクラマカン砂漠に普遍的な細菌群であると考えられる。

さらに、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、属レベルで細菌株を分類した(表2-3)。第1グループである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かったため、*Bacillus*属菌株である可能性が高い¹⁸⁾。第2グループ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。従って、大腸菌などを含む腸内細菌(*Enterobacteriaceae*)であると推定できる^{18,19)}。第3グループであるグラム陽性球菌と思われていたBADH D05株とBADH U01株は、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と推定できる。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*のいずれかに属すると考えられる¹⁹⁾。BADH U01株はコロニーが赤紅色を呈していたので、*Rhodotorula*、*Rhodospiridium*、*Sporobolomyces*および*Sporidiobolus*である可能性が高い¹⁸⁾。一方、*Lipomyces*、*Cryptococcus*、*Rhodotorula*および*Rhodospiridium*は、酵母の中でも発酵性を持たない¹⁹⁾。BADH U01株は、赤色酵母で非発酵性であることから*Rhodotorula*あるいは*Rhodospiridium*であると予想される。しかも、*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³⁴⁾。本菌株では、孢子が確認されたので*Rhodospiridium*属の菌であると言える。

一方、2007年8月に上空および地上において採取したバイオエアロゾルの懸濁液あるいは塩分集積培養を寒天プレートに塗抹したところ、細菌株全14株(Di-1からDi-14)を単離した。細菌株の16S rDNA塩基配列を用いて細菌群を分類した結果、14株の内、8株が同一のグループとなり、

*Bacillus pumilus*と高い相同性を示した（表2-4）。一方、地上のバイオエアロゾルで、高塩分に耐性のある細菌株は、*Staphylococcus*属に属した。その他の細菌株は、*Kocuria flavus*、*Gracilibacillus dipsosauri*、あるいは*Amycolatopsis palatopharyngis*などのグラム陽性細菌と近縁となり、いずれも上空800mから分離された。*B. pumilus*および*Staphylococcus*属の細菌種に近縁な核酸塩基配列は、PCR-DGGE解析においても検出されたため、これらの細菌は生残しながら、大気中で優占していることが裏付けられた。また、2007年および2008年の調査で、いずれも*Bacillus*属の細菌が検出されたため、通年で*Bacillus*属の細菌群が大気中に優占していると考えられる。

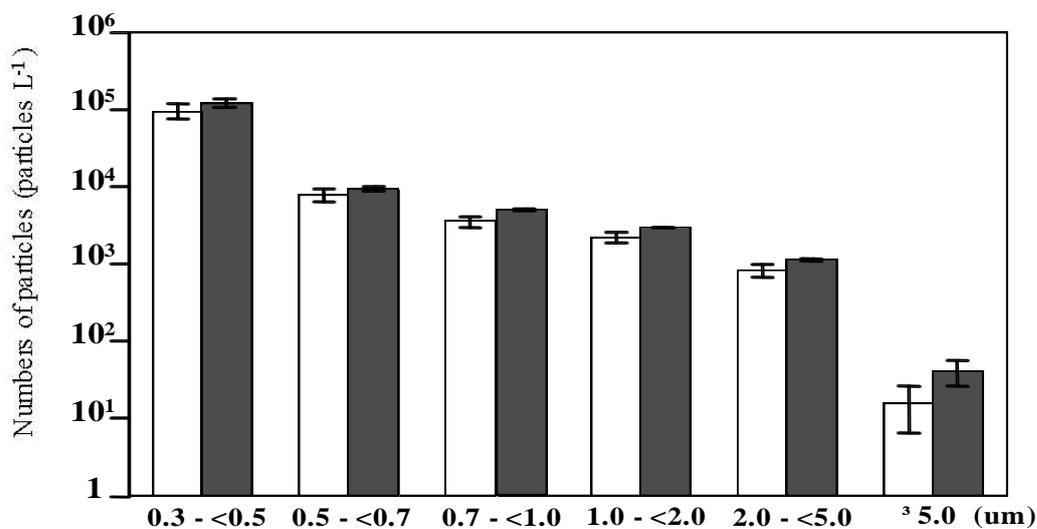


図2-2 粒径と粒子濃度（敦煌市上空）

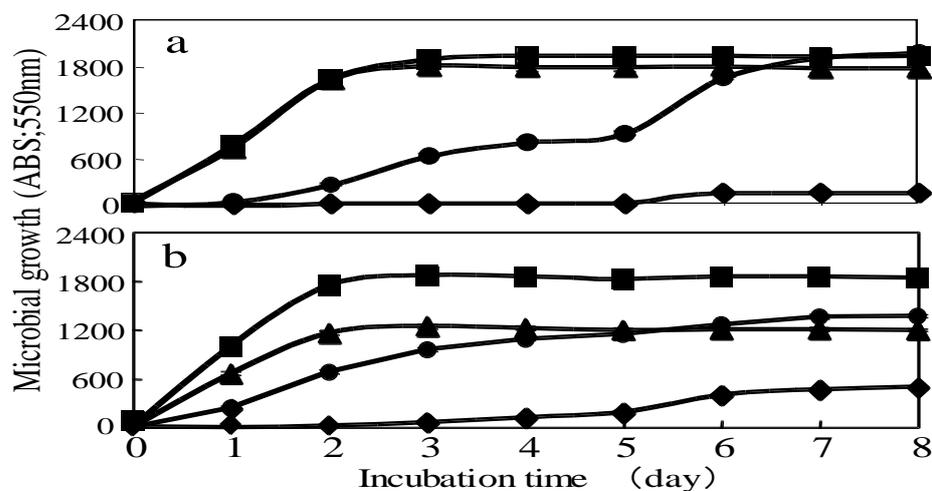


図2-3 上空800 m(a)と10 m(b)で採集したバイオエアロゾルの増殖（敦煌市上空）

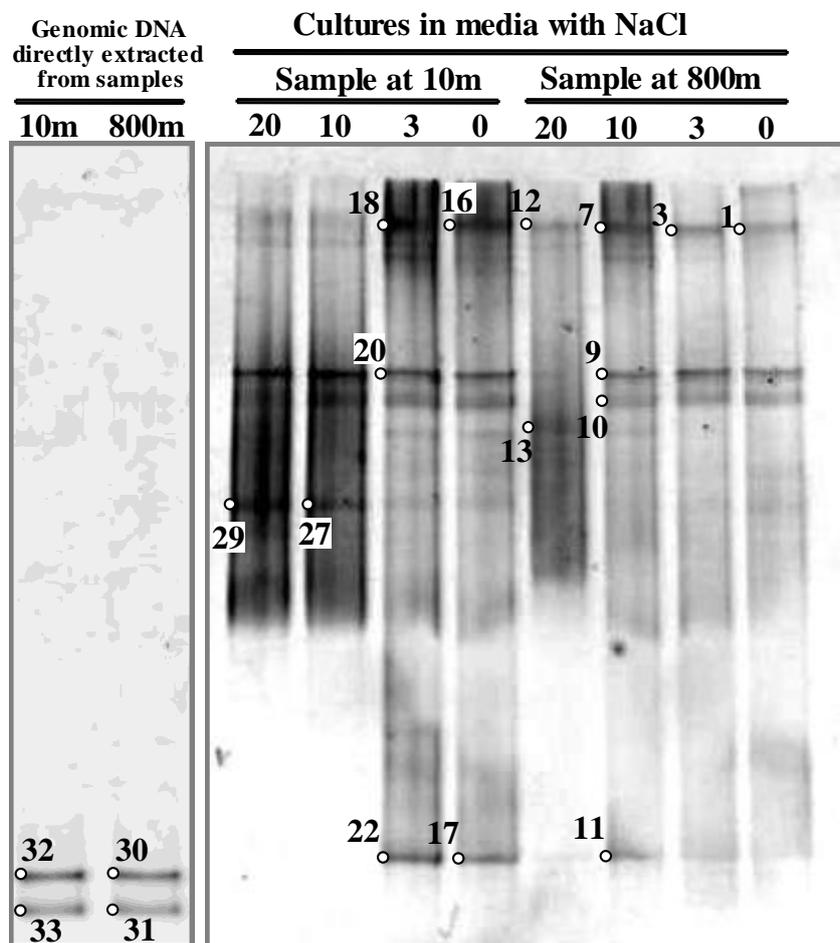


図 2-4 上空800 mと10 mで採集したバイオエアロゾルサンプルの
DGGE解析結果 (敦煌市上空)

表 2 - 1 DGGE解析のバンドのシーケンス検索結果 (敦煌市上空)

DGGE band No. ^{*1}	Sampling location ^{*2}	Sample condition ^{*3}	Length (bp)	Category	GenBank accession no.	Closest relative	Similarity (%) ^{*4}
DAd-1, 3, 7, 12, 16, 18	10m and 800m	<20%NaCl	481	Gram- positive group	AB455151	<i>Bacillus pumilus</i>	99.4
DAd-9	800m	10%NaCl	424	Gram- positive group	AB455152	<i>Bacillus pumilus</i>	97.4
DAd-10	800m	10%NaCl	422	Gram- positive group	AB455153	<i>Bacillus pumilus</i>	96.7
DAd-11, 17, 22 DDd-30, 32	10m and 800m	<10%NaCl direct extracted DNA	473	Gram- positive group	AB455154	<i>Bacillus pumilus</i>	99.6
DAd-13	800m	20%NaCl	485	Gram- positive group	AB455155	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	99.8
DAd-20	10m	3%NaCl	424	Gram- positive group	AB455156	<i>Bacillus pumilus</i>	98.1
DAd-27, 29	10m	20%NaCl	486	Gram- positive group	AB455157	<i>Staphylococcus xylosus</i>	100
DDd-31, 33	10m and 800m	direct extracted DNA	487	Gram- positive group	AB455158	<i>Bacillus pumilus</i>	99.6

*1 Numbers of the bands in Fig. 3 refer to the numbering of the DAd or DDd series.

*2 Height above ground.

*3 Cultures cultivated with NaCl at concentrations of 0%, 3%, 10% and 20%, and genomic DNA directly extracted from the bioaerosol samples.

*4 Similarity value between each isolate and the closest relative in databases.

表 2 - 2 単離菌の形状学的生理性状学的分析 (敦煌市上空)

Test	Strain				
	BADH U01	BADH U02	BADH U03	BADH U04	BADH U05
Cell shape	Cocci	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram staining	+	+	+	+	+
Sporuation	+	+	+	+	+
Motility	-	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Production of acid from glucose	-	+	+	+	+
Production of gas from glucose	-	-	-	-	-
OF-test	-	-	-	-	-

Test	Strain				
	BADH D01	BADH D02	BADH D03	BADH D04	BADH D05
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Cocci
Gram staining	+	+	+	+	+
Sporuation	+	+	+	+	-
Motility	+	+	+	+	-
Oxidase	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Production of acid from glucose	+	+	+	+	-
Production of gas from glucose	-	-	-	-	-
OF-test	-	-	-	-	F

Test	Strain				
	BADH D11	BADH D12	BADH D13	BADH D14	BADH D15
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram staining	-	-	-	+	+
Sporuation	-	-	-	+	+
Motility	+	+	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+
Production of acid from glucose	+	+	+	+	+
Production of gas from glucose	-	+	-	-	-
OF-test	F	F	F	-	-

Test	Strain				
	BADH S01	BADH S02	BADH S03	BADH S04	BADH S05
Cell shape	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Gram staining	+	+	+	+	+
Sporuation	+	+	+	+	+
Motility	+	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	-
Catalase	+	+	+	+	+
Production of acid from glucose	+	+	+	+	+
Production of gas from glucose	-	-	-	-	-
OF-test	-	-	-	-	-

+=Positive; -=Negative; F=Fermentative; O=Oxidative

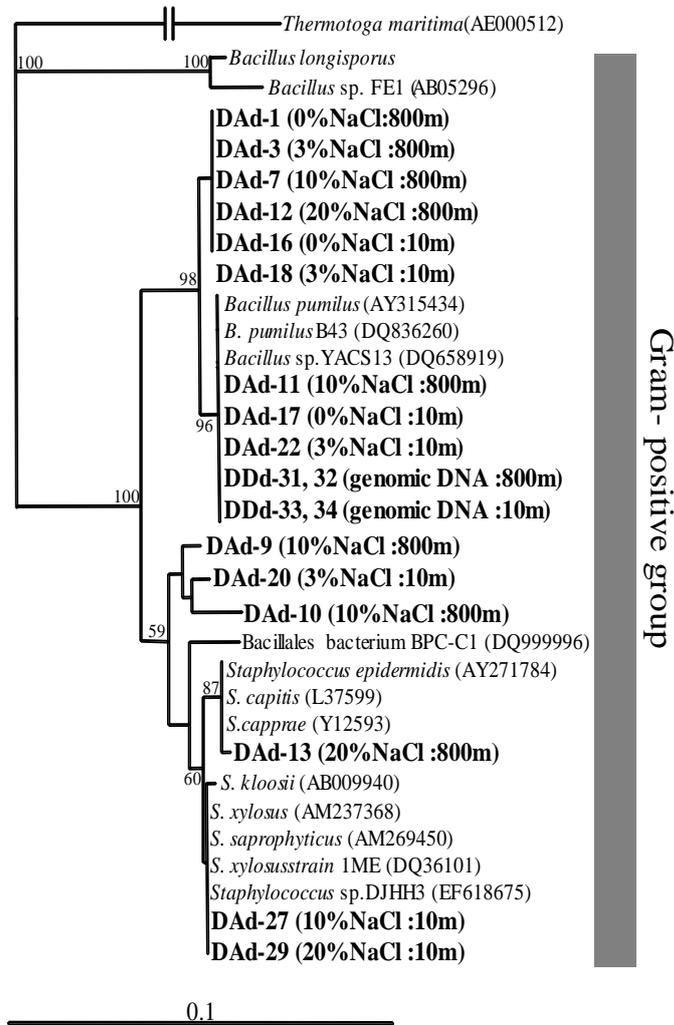


図 2 - 5 16S rDNAの系統樹解析結果 (敦煌市上空)

表 2 - 3 単離菌の同定結果（敦煌市上空）

Altitude (above the ground level)	Strain (Accession number)	Estimated taxonomic group
50-100 m	BADH U01 (AB275376)	<i>Rhodospiridium sphaerocarpum</i>
	BADH U02 (AB275377)	<i>Bacillus cereus</i>
	BADH U03 (AB275378)	<i>Bacillus cereus</i>
	BADH U04 (AB275379)	<i>Bacillus cereus</i>
	BADH U05 (AB275380)	<i>Bacillus cereus</i>
10 m	BADH D01 (AB275366)	<i>Bacillus cereus</i>
	BADH D02 (AB275367)	<i>Bacillus cereus</i>
	BADH D03 (AB275368)	<i>Bacillus cereus</i>
	BADH D04 (AB275369)	<i>Bacillus cereus</i>
	BADH D05 (AB275370)	<i>Candida parapsilosis</i>
	BADH D11 (AB275371)	<i>Pantoea agglomerans</i>
	BADH D12 (AB275372)	<i>Enterobacter endosymbiont</i>
	BADH D13 (AB275373)	<i>Pantoea agglomerans</i>
	BADH D14 (AB275374)	<i>Bacillus cereus</i>
BADH D15 (AB275375)	<i>Bacillus cereus</i>	
0 m (Sand samples)	BADH S01 (AB275361)	<i>Bacillus subtilis</i>
	BADH S02 (AB275362)	<i>Bacillus subtilis</i>
	BADH S03 (AB275363)	<i>Bacillus subtilis</i>
	BADH S04 (AB275364)	<i>Bacillus subtilis</i>
	BADH S05 (AB275365)	<i>Bacillus atrophaeus</i>

表 2-4 DGG解析のバンドに含まれる菌株の同定結果 (敦煌市上空)

Location	Strain	Sampling location ¹	Solution	Treatments ²	Year	bp	Category	Closest relative	Similarity (%) ³
Dunhuang	Dt-1	800m	Seawater	Seawater-amendment	2007	1424	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus pumilus</i>	100
	Dt-2	800m	TS-wash	3%NaCl-amendment	2007	1193	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus pumilus</i>	99.7
	Dt-3	800m	TS-wash	3%NaCl-amendment	2007	496	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus pumilus</i>	100
	Dt-4	800m	TS-wash	10%NaCl-amendment	2007	496	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus pumilus</i>	100
	Dt-5	10m	Seawater	Seawater-amendment	2007	478	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus pumilus</i>	99.8
	Dt-6	10m	TS-wash	3%NaCl-amendment	2007	496	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus pumilus</i>	99.6
	Dt-7	10m	TS-wash	3%NaCl-amendment	2007	492	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus pumilus</i>	99
	Dt-8	10m	TS-wash	10%NaCl-amendment	2007	497	Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus</i> sp. CIJK5	99.6
	Dt-9	10m	TS-wash	20%NaCl-amendment	2007	529	Gram-positive bacteria	<i>Staphylococcus</i> sp. PDD-6b-1	99.9
	Dt-10	800m	TS-wash	3%NaCl-wash	2007	552	Gram-positive bacteria	<i>Kocuria flavus</i>	100
	Dt-11	800m	TS-wash	3%NaCl-wash	2007	477	Gram-positive bacteria	<i>Gracilithabacillus diposauri</i>	98.7
	Dt-12	800m	TS-wash	3%NaCl-wash	2007	552	Gram-positive bacteria	<i>Amycolatopsis palatopharyngis</i>	98
	Dt-13	800m	TS-wash	3%NaCl-wash	2007	509	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus pumilus</i>	100
	Dt-14	800m	TS-wash	3%NaCl-wash	2007	509	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus pumilus</i>	100

*1 Height above ground.

*2 Cultures cultivated with NaCl at concentrations of 0%, 3%, 10% and 15%, and genomic DNA directly extracted from the bioaerosol samples.

*3 Similarity value between each isolate and the closest relative in databases.

(2) 日本上空におけるバイオエアロゾル

1) バイオエアロゾル試料の採取調査

珠洲市での調査期間3日間(2008年5月6~8日)の大気中のバイオエアロゾル量を、OMIエアロゾルインデックスデータで解析したところ、ゴビ砂漠、タクラマカン砂漠及び黄土高原などの黄砂発生地域から韓国や日本にかけて、大型の粒子が広く分布していた。また、調査期間中の流跡線解析では、中国大陸から大気が移送されてきたことが示された。一方、気象庁の気象データに基づく、調査期間中の珠洲市上空20 m以下では、東向きに風速 1 m s^{-1} 以下の風が記録されている。従って、上空と地上では異なる向きに風が吹いていたことが示された。

調査時において、粒径 $0.5 \mu\text{m}$ を超えるエアロゾル粒子数は、高度600 mの方が、高度20 m以下よりも多く、粒径 $0.3\sim 0.5 \mu\text{m}$ の小粒子の数は、高度20 m以下より少なくなった(図2-6)。サイズごとの粒子数の分布は、高度600 mと20 m以下の大気中で異なり、高度600 mの大気中の粒子組成は、他の地域に由来することが示される。両高度において、 $0.3\sim 0.5 \mu\text{m}$ の粒子は、 $78000 \text{ particles L}^{-1}$ と高い密度を示し、構成する粒子全体の約90%を占めた。さらに、粒径 $0.5\sim 2.0 \mu\text{m}$ の粒子密度は、粒径 $0.3\sim 0.5 \mu\text{m}$ の粒子数と比較して1オーダー小さく、 $1400\sim 7100 \text{ particles L}^{-1}$ の範囲であった。 $2.0 \mu\text{m}$ を超える大粒子は、 $560\sim 790 \text{ particles L}^{-1}$ の密度範囲で、両高度で検出された。

高度600 m地点の比較的大きいサイズの粒子は、高度20 m以下の粒子数に比べて多く(図2-6)、地上20 m以下では風速 1 m s^{-1} 以下の東向きの風が吹いていたという気象庁のデータを鑑みても、高度600 mの大気中のエアロゾル粒子は、東の海方角の地域に由来していると考えられる。一方で、高度20 m以下の大気中の粒子は、主に珠洲市の東から飛来したとみなせる。従って、今回得られた黄砂飛来地域(珠洲市)のバイオエアロゾル試料について、細菌種の垂直方向の分布を調べることは、中国方面から日本に輸送される細菌種組成の特定につながる可能性が高い。

2) 耐塩細菌の集積培養

バイオエアロゾル試料を、塩分濃度を変えたTS培地で培養した際、塩分濃度0%と3%のTS培地での微生物生長量は、培養2日以内で急速に増大し、実験期間内で吸光度は $23\sim 190$ (約 $108\sim 109 \text{ cells mL}^{-1}$)を維持した(図2-7)。塩分濃度10%の培地では、高度10 mと600 mの両方の試料において、吸光度が徐々に増大し、培養15日間で吸光度80を超えた。塩分濃度15%のTS培地では、培養7日目から弱い吸光度の増大がみられ、実験期間中、低い吸光度(約 10 : 約 $107 \text{ cells mL}^{-1}$)を保ち続けた。これらの結果から、高度10 mと600 mに生残する微生物が、塩分濃度3%、10%および15%の培地で増殖することが実証された。敦煌市のバイオエアロゾルを用いた塩分集積培養の結果と同様に、珠洲市の大気中にも耐塩細菌が生残し、東方向の海上及び中国大陸など他の地域から輸送されて来たと推察できる。

3) 上空の細菌種組成

珠洲上空で採取したバイオエアロゾル試料から直接抽出したゲノムDNAから16S rDNAのPCR増幅産物を得て、アクリルアミドゲル上で展開した。その結果、高度10 mと600 mの試料でDGGEバンドパターンが異なり、それぞれ1つのDGGEバンド(それぞれSDd-1及びSDd-7)を示した(図2-8)。塩分濃度0%、3%、10%及び15%の集積培養をPCR-DGGE法を用いて解析したところ、高度10 mと600 mで

バンドパターンが異なり、2本のバンドが優占した。高度600 mの集積培養では、2本のバンドのうち、低い位置のバンド(SDd-1、SAd-2、SAd-3、SAd-5及びSAd-6)がすべての塩分濃度で共通して見られ、高度10 mで捕集した試料の塩分濃度3%での集積培養からも検出された。一方で、高度10 mの試料の2つのバンドのうち、高い位置のバンド(SDd-7、SAd-8、SAd-9、SAd-11及びSAd-13)がすべての塩分濃度で共通してみられ、同じ位置のバンドは、高度600 mの塩分濃度10%の集積培養でも現れた。残りのバンド(SAd-12)は、高度10 mで捕集した試料の塩分濃度10%の培養に特有であった。これらの結果から、高度600 mと高度10 mのバンドパターンは異なるものの、いくつかのバンドは両高度で共通した。

アクリルアミドゲル上のバンド13本に含まれる核酸塩基配列を決定し、比較したところ、4つの系統タイプに分かれた(図2-9)。すべての塩基配列は、*Bacillus*属に属し、*B. cereus*グループと*B. subtilis*グループの細菌種とクラスターを形成した(図2-9)。従って、珠洲市上空の大気中には、*Bacillus*属のグラム陽性細菌種が優占していると考えられる。*Bacillus*属の細菌種は、芽胞を形成し、環境ストレスに強い耐性をもつことが知られている^{28,29)}。よって、大気中の乾燥状態では、芽胞を形成する細菌のみが生残り、他の微生物種が淘汰され、微生物群の多様性が減少したと考えられる。今回の調査では、高度600 mの比較的サイズの大きいエアロゾル粒子は、高度10 m由来の大気からの巻き上がりではなく、東の方角から移送されてきたと見なせる(図2-8)。

バイオエアロゾル試料から得た16S rDNAの部分塩基配列を系統分類学的に解析したところ、高度10 mと600 mでは優占細菌の種組成が異なった(図2-9)。高度600 mの試料に由来する核酸塩基配列(バンドSDd-1、SAd-2、SAd-3、SAd-5及びSAd-6)を含む系統タイプは、高度10 mの試料の塩分濃度3%の集積培養からもバンドSAd-10として検出された。高度600 mの試料の塩基配列は、*B. subtilis*グループに属し、一方で、高度10 mの試料は、*B. subtilis*グループと*B. cereus*グループの系統タイプで構成されていた。前述のように、気象データの解析では、調査期間中、高度10 mと600 mでは異なる向き(それぞれ、東向きと西向き)に風が吹いていた。従って、高度600 mの大気中のバイオエアロゾル粒子が地表に垂直に降下して、上空の細菌種が地上で検出されたと推察できる。*Bacillus*属に属する細菌は、上空20000 mでも分離されており、高度600m以上の大気においても微生物の垂直輸送が示唆されている³⁰⁾。そのため、日本の黄砂飛来地域での混合過程で、珠洲市の大気中から地上へ鉱物粒子に付着した生残り耐塩細菌が輸送される可能性がある。

4つの系統タイプのうち1つの系統タイプは、高度600 mで捕集した試料に由来する塩基配列SDd-1、SAd-2、SAd-3、SAd-5及びSAd-6および高度10 mの試料に由来するSAd-10を含んだ。これらの塩基配列は、*Bacillus*種Z17と100%の高い相同性を示し、*B. subtilis*グループに属した。DDBJデータベースでは、*Bacillus*種Z17は、中国の高山湿地から分離されている。さらに、高度10 mと600 mで捕集した試料の集積培養から検出されたSAd-4とSAd-12を含む系統タイプは、それぞれ*B. subtilis*グループの細菌群と近縁であった。東広島市とゴビ砂漠の大気中で発見された*B. subtilis*が同一の複数の配列を有することも明らかになっている。従って、黄砂によって、細菌が輸送され、降下している可能性は高い。*B. subtilis*の近縁細菌種は、African dust発生時の北カリブ³⁵⁾と黄砂の起源となるタクラマカン砂漠¹⁶⁾で捕集したエアロゾルからも分離されてきた。本研究では、大気中を砂塵が輸送される際、*B. subtilis*の近縁細菌が、生残り維持したまま大気中を移動し、珠洲市をふくむ環境域に向けて生息範囲を拡大する可能性がある。

高度10 mで捕集した試料で特異的に検出されたSDd-7、SAd-8、SAd-9、SAd-11及びSAd-13の塩基

配列を含む系統タイプは、*B. cereus*、*B. thuringiensis*および*B. mycooides*などの*B. cereus*グループの細菌種と100%の相同性で一致した。さらに、この系統タイプに含まれるSDd-7は、バイオエアロゾル試料から直接抽出したDNAから得られており、高度10 mの大気中で優占していると言える。SAd-4の塩基配列は、高度600 mの試料の塩分濃度10%での集積培養から得られ既知細菌とは99.4%の低い相同性を示し、*B. subtilis*グループに属した。高度10 mの塩分濃度10%の集積培養から得られたSAd-12の系統タイプは、系統樹上で*B. amyloliquefaciens*を含む*B. subtilis*グループの細菌群とクラスターを形成した。

黄砂発生時に珠洲市上空でバイオエアロゾルを採取し、細菌種を検出したところ、*Bacillus*属に属する耐塩細菌群が生残していることが明らかとなった。*B. subtilis*グループの近縁細菌種は、珠洲市上空600 mの大気中で優占したが実証され、高度10 mで捕集したバイオエアロゾル試料の培養の1つから検出された。高度10 mの大気中では、*B. cereus*グループの細菌種は、*B. subtilis*グループと同様に検出された。その結果、黄砂が発生した際、鉱物粒子に付着した細菌細胞が、珠洲市上空600 mから地表への境界層を越えて下降したと推察できる。現在、*Bacillus*属の細菌種は、黄砂飛来地域(珠洲市)と黄砂発生地域(敦煌市)の両方で検出されているものの、今回、珠洲市で得られた細菌の16S rDNA塩基配列は、敦煌市のバイオエアロゾルにおける細菌群の塩基配列とは一致しなかった³⁶⁾。この細菌種の不一致は、サンプリング期間の違いによって生じたのであろう。

4) 分離細菌株の種組成解析

2008年5月に上空および地上において採取したバイオエアロゾルの懸濁液あるいは塩分集積培養を寒天プレートに塗抹したところ、細菌株全12株(Si-1からSi-12)を単離した。細菌株の16S rDNA塩基配列を用いて細菌群を分類した結果、12株のすべてが*Bacillus*属に属した(表2-5)。ただし、3グループに大別でき、それぞれのグループの核酸塩基配列は*Bacillus sp. Z*シリーズ、*B. amyloliquefaciens*および*B. mojavensis*に近縁となった。また、*Bacillus sp. Z*シリーズと*B. mojavensis*の近縁グループは600mのエアロゾルサンプルで検出され、10mでは見られなかった。従って、調査時の上空と地上の大気は混合されておらず、*Bacillus sp. Z*シリーズと*B. mojavensis*の近縁グループの細菌群は、珠洲市の北西側の大气から飛来した可能性が高い。しかしながら、珠洲市および敦煌市の調査で、大気中からいずれも*Bacillus*属の細菌が検出されたため、日本および中国の大气中には*Bacillus*属の細菌群が優占していると考えられる。

(3) 敦煌市及び珠洲市のバイオエアロゾルに含まれる微生物群の比較

中国タクラマカン砂漠及び能登半島の珠洲市の上空数百mにおいて、バイオエアロゾル試料を捕集し、その細菌種組成をPCR-DGGE解析で分析したところ、大気中には*Bacillus*属に属する細菌種が優占しており、生残していることが確認された。これらの細菌群は、高い塩分にも耐性をもち、環境ストレスに耐えて、黄砂によって長距離輸送されている可能性がある。更に、タクラマカン砂漠では、地上と上空のバイオエアロゾルが混合しており、珠洲市では、上空から地上へとバイオエアロゾルが降下していることが本調査で実証された。従って、タクラマカン砂漠の地上に生息する耐塩細菌が、黄砂が舞いあがるのに乗じて、上空大気と垂直混合され、黄砂粒子に付着したまま、能登半島珠洲市にまで飛来して地上に降下したと考えられる。

ただし、両地点では、細菌種の完全な一致は認められなかった。これは、試料を捕集する時期

が異なったのが原因と考えられる。今後の研究では、同時期に黄砂発生地および黄砂飛来地の両地点で試料を捕集する必要がある。また、16S rDNAの塩基配列のみで種を同定しても、同種であることしか言及できない。細菌群の長距離輸送を実証するには、株レベルでの一致を判断する必要がある。今後は、耐塩機能や抗ストレス機能をコードする保存性の低い機能遺伝子を標的とした解析が望まれる。

耐塩細菌を標的にした生物分析化学的手法は、大気中に生息する細菌群を検出するのに適しており、細菌の越境輸送実証につながるであろう。今後、黄砂発生によって中国から日本へと飛来する微生物群を特定することは、風下の生態系の変化や人間及び動物への健康影響を議論するのに必須である。

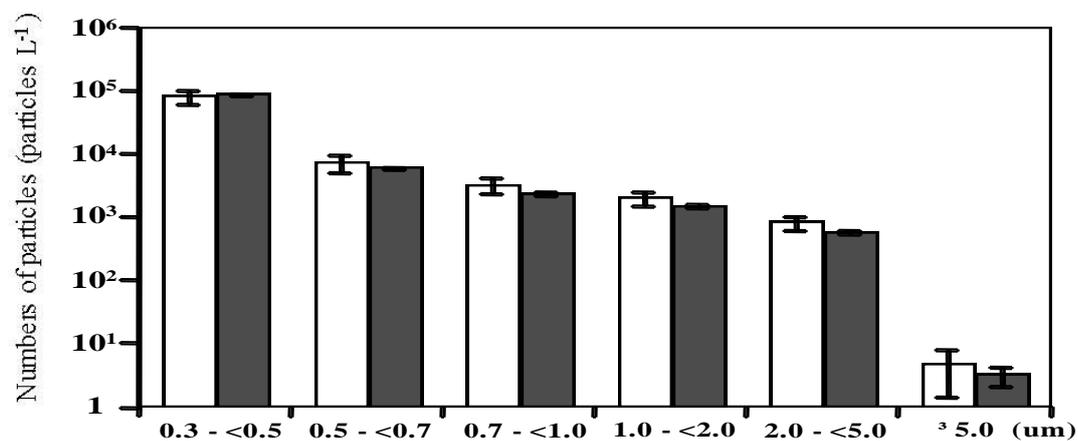


図2-6 粒径と粒子濃度（珠州市上空）

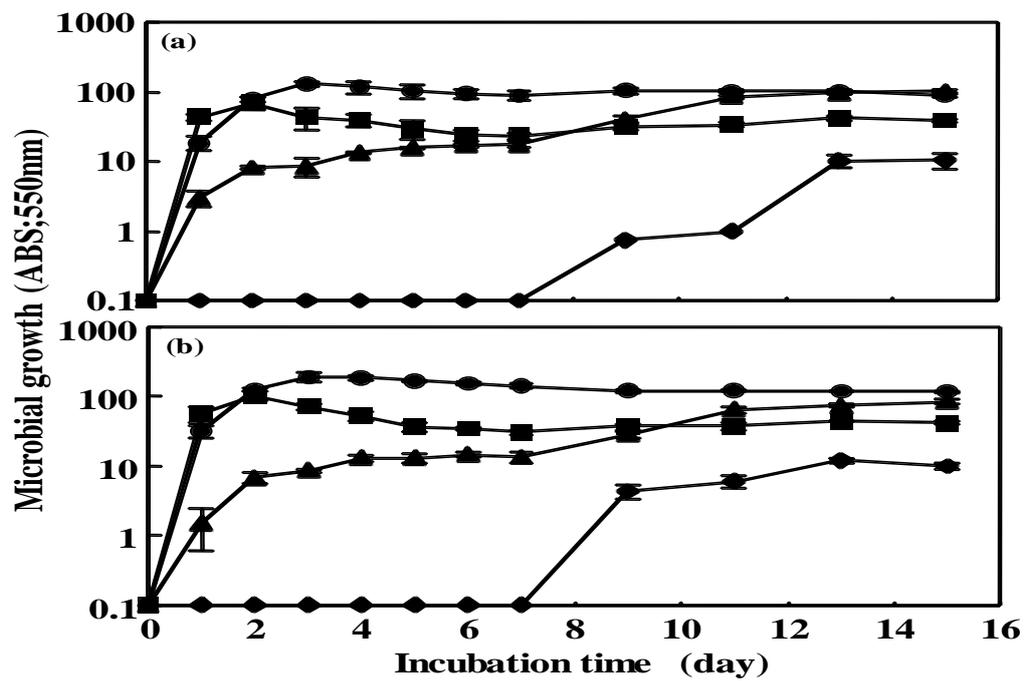


図 2-7 上空600 m(a)と10 m(b)で採集したバイオエアロゾルの増殖 (珠洲市上空)

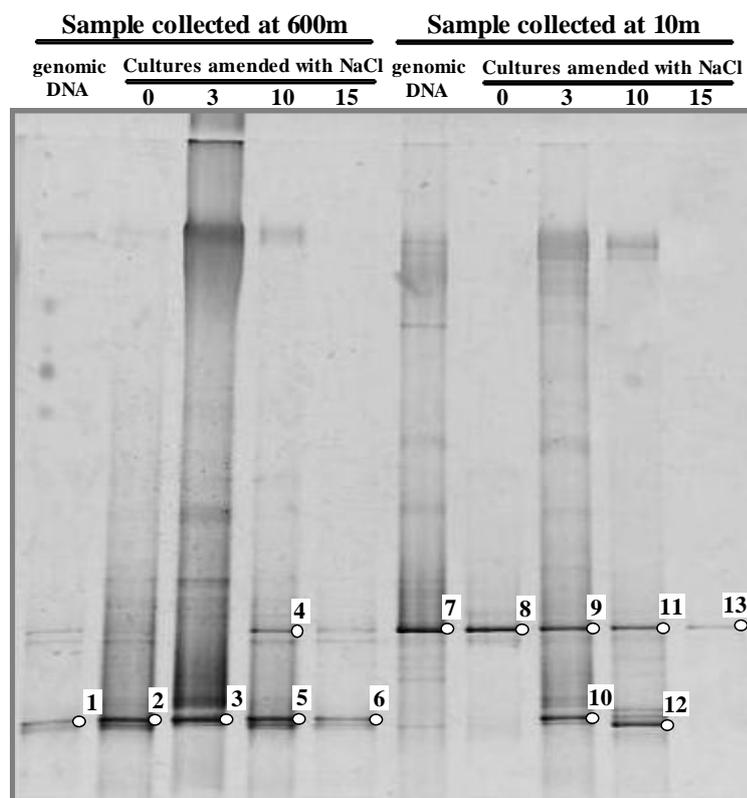


図 2 - 8 上空600 mと10 mで採集したバイオエアロゾルサンプルのDGGE解析結果（珠洲市上空）

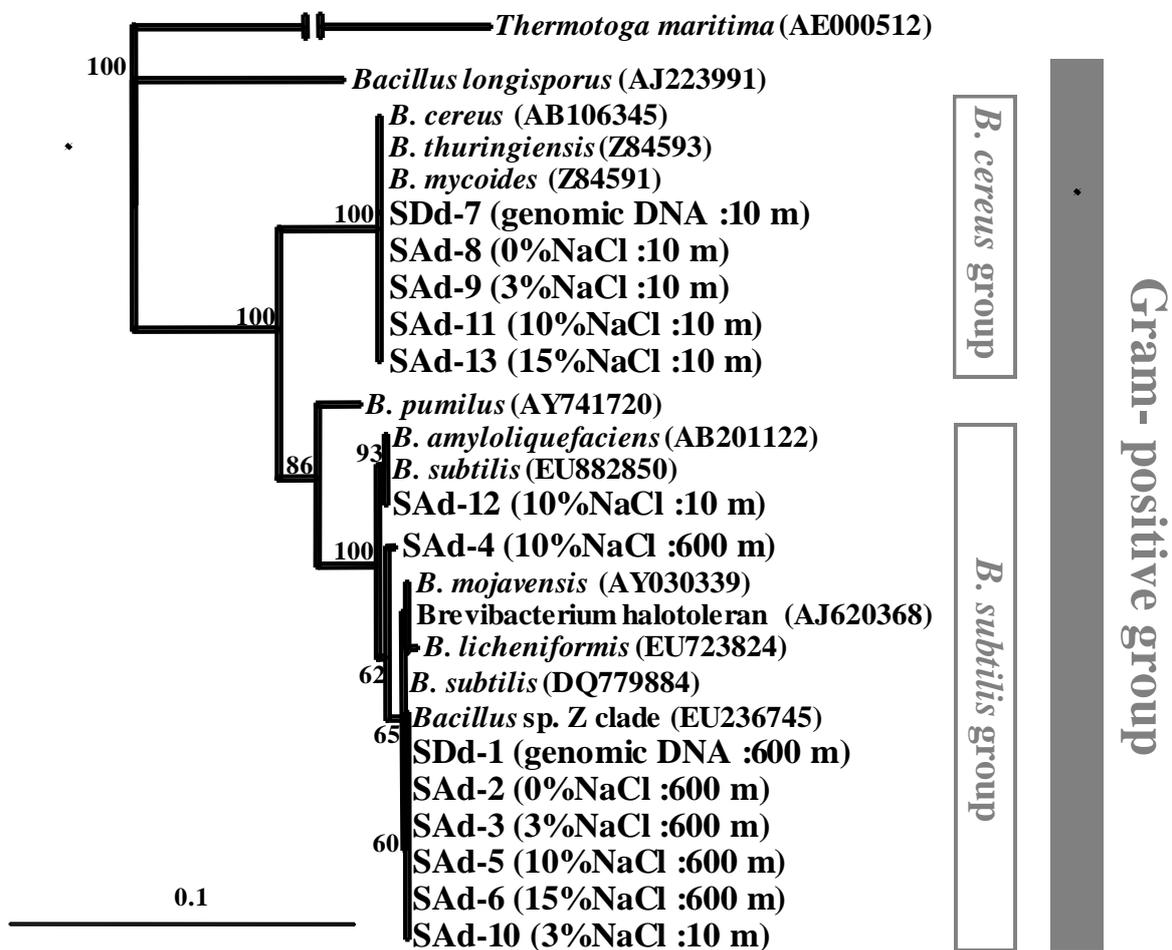


図 2 - 9 16S rDNAの系統樹解析結果 (珠洲市上空)

表 2-5 DGGP解析のバンドに含まれる菌株の同定結果 (金沢市・珠洲市上空)

Location	Strain	Sampling location ¹	Solution	Treatments ²	Year	bp	Category	Closest relative	Similarity (%) ³
Kanazawa	Ki-1	3m	TS-wash	10%NaCl-amendment	2007	491	gamma-proteobacteria	<i>Raoultella ornithinolytica</i>	99.1
	Ki-3	600m	TS-wash	3%NaCl-amendment	2007	504	gamma-proteobacteria	<i>Citrobacter</i> sp. T1E1C07	98.8
Suzu	Si-1	600m	TS-wash	3%NaCl-wash コロニー-1	2008	702	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus</i> sp. Z20 (シリ-ズ)	100
	Si-2	600m	TS-wash	3%NaCl-wash コロニー-2	2008	702	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus</i> sp. Z20 (シリ-ズ)	100
	Si-3	600m	TS-wash	3%NaCl-wash コロニー-3	2008	691	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus</i> sp. Z20 (シリ-ズ)	100
	Si-4	10m	TS-wash	0%NaCl-amendment	2008	694	Gram-positive bacteria	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99.7
	Si-5	10m	TS-wash	3%NaCl-amendment	2008	697	Gram-positive bacteria	<i>B. amyloliquefaciens</i>	99.7
	Si-6	10m	TS-wash	10%NaCl-amendment	2008	549	Gram-positive bacteria	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100
	Si-7	10m	TS-wash	10%NaCl-amendment	2008	697	Gram-positive bacteria	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100
	Si-8	10m	TS-wash	15%NaCl-amendment	2008	702	Gram-positive bacteria	<i>B. amyloliquefaciens</i>	100
	Si-9	600m	TS-wash	0%NaCl-amendment	2008	707	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus mojavensis</i>	100
	Si-10	600m	TS-wash	3%NaCl-amendment	2008	704	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus mojavensis</i>	100
	Si-11	600m	TS-wash	10%NaCl-amendment	2008	691	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus mojavensis</i>	99.7
	Si-12	600m	TS-wash	15%NaCl-amendment	2008	706	Gram-positive bacteria	<i>Bacillus mojavensis</i>	99.7

*1 Height above ground.

*2 Cultures cultivated with NaCl at concentrations of 0%, 3%, 10% and 15%, and genomic DNA directly extracted from the bioaerosol samples.

*3 Similarity value between each isolate and the closest relative in databases.

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

中国タクラマカン砂漠の上空1000 mおよび日本珠洲市の上空800mにおいて捕集した黄砂粒子に細菌が付着している証拠を蛍光顕微鏡観察で確認した。この試料を、塩分濃度を変えた培地で順化培養したところ、塩分に強い耐性をもつ細菌群（耐塩細菌）の増殖が確認でき、上空においても微生物の生存を実証できた。さらには、遺伝学的に細菌種を特定した結果、日本上空および中国上空ともに大部分の細菌群が*Bacillus*属に属した。また、地上と上空で優占している細菌群も近縁となり、バイオエアロゾルの垂直混合が示唆された。まとめると、環境ストレスに耐性のある細菌群は生きてそのまま上空まで舞い上がり、黄砂粒子と挙動をともにして、日本まで飛来する可能性がある。本研究成果は、これまで推測の域を出なかった大気による微生物の輸送を、具体的に実験データによって裏付けするものである。特に、上空では*Bacillus*属の細菌群が優占しており、大気を経由することでその生息範囲を拡大できる可能性がある。大気の長距離輸送は、陸水中の微生物を介した物質循環のみならず、動植物への病害影響および伝統的な酒造や醸造業に使用される微生物の起源を考察する上で、生物環境学として不可欠な現象となる。日本の微生物生態学に大気からのアプローチの重要性を示唆することができた。また、大気中での挙動が分かっていない耐塩細菌の生理生態の解明は、微生物生態学に新たな知見を築くとともに、新規の耐塩細菌の分離につながり、そのストレス耐性機能は遺伝子工学（生物工学）的に応用可能であろう。

(2) 地球環境政策への貢献

「耐塩細菌群を対象としたバイオエアロゾル分析手法」は、大気中に生息し移送される細菌群を検出するのに適しており、細菌の越境輸送実証につながるであろう。今回得られた研究成果は、大気学および微生物学をつなぐ新たな研究分野の開拓につながり、新規にバイオエアロゾルシンポジウムの発展に貢献した。さらに、第2回から第4回のバイオエアロゾルシンポジウムにおいて研究成果が発表され、著名な微生物学者や海洋学者の注目をあつめ、大気中を移動する微生物の重要性に多くの科学者が関心を持つようになった。今後、バイオエアロゾルシンポジウムを、黄砂によって中国から日本へと飛来する微生物群の情報発信源とすることで、風下の生態系の変化や人間及び動物への健康影響の政策を有意義に議論できるようになるであろう。そして、実際に、本研究活動は、朝日新聞、NHK放送、朝日放送をはじめ数々の地方新聞から取材を受け、全国的に公表されつつあり、世論の関心も集めつつある。

6. 引用文献

- 1) R. A. Duce, C. K. Unni, B. J. Ray, J. M. Prospero, J. T. Merrill: Science, 209, 1522- 1524 (1980)

“Long-range atmospheric transport of soil dust from Asia to the tropical North Pacific temporal variability”

- 2) Y. Iwasaka, H. Minoura, K. Nagaya: Tellus, 35B, 189-196 (1983)

“The transport and spacial scale of Asian dust-storm clouds: a case study of the dust-storm event of April 1979”

- 3) Y. Iwasaka, M. Yamato, R. Imasu, A. Ono, *Tellus* 40B: 494-503 (1988)
“The transport of Asia dust (KOSA) particles; importance of weak KOSA events on the geochemical cycle of soil particles”
- 4) J. M. Prospero, E. Blades, G. Mathison, R. Naidu, Interhemispheric transport of viable fungi and bacteria from Africa to the Caribbean with soil dust, *Aerobiologia*, 21, 1-19 (2005)
“The transport of Asia dust (KOSA) particles; importance of weak KOSA events on the geochemical cycle of soil particles”
- 5) A. M. Jones, R. M. Harrison, *Sci. Total Environ.*, 326, 151-180 (2004)
“The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations- a review”
- 6) P. C. Wu, J. C. Tsai, F. C. Li, S. C. Lung, H. J. Su: *Atmospheric Environ.*, 38, 4879-4886 (2004)
“Increased levels of ambient fungal spores in Taiwan are associated with dust events from China”
- 7) H. G. Yeo, J. H. Kim: *Atmospheric Environ.*, 36, 5437-5442 (2002)
“SPM and fungal spores in the ambient air of west Korea during the Asian dust (Yellow sand) period”
- 8) M. J. Alan, R. M. Harrison, *Sci. Total. Environ.* 326, 151-180 (2004)
“The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations - a review”
- 9) A. A. Imshenetsky, S. V. Lysenko, G. A. Kazakov: *Appl. Environ. Microbiol.*, 35, 1- 5 (1978)
“Upper boundary of the biosphere”
- 10) L. J. Rothschild, R. L. Mancinelli, *Nature*, 409, 1092-1100 (2001)
Life in extreme environments
- 11) D. W. Griffin: *Clin. Microbiol. Rev.*, 20, 459- 477 (2007)
“Atmospheric movement of microorganisms in clouds of desert dust and implications for human health”
- 12) D. W. Griffin, C. A. Kellogg, *EcoHealth*, 1, 284- 295 (2004)
“Dust storm and their impact on ocean and human health: Dust in Earth’ s atmosphere”
- 13) R. A. Olsen, L. B. Bakken, Viability of soil bacteria; *Microb. Ecol.*, 13, 59-74 (1987)
“Optimization of plate-counting technique and comparison between total counts and plate counts within different size groups”
- 14) N. Lorenz, T. Hintemann, T. Kramarewa, A. Katayama, T. Yasuta, P. Marschner, E. Kandeler: *Soil Biol. Biochem.*, 38, 1430-1437 (2006)
“Response of microbial activity and microbial community composition in soils to long-term arsenic and cadmium exposure”
- 15) F. Suehiro, T. Kobayashi, L. Nonaka, B. C. Tuyen, S. Suzuki: *Microbial Ecol*, 52, 19-25

- (2006)
 “Degradation of tributyltin in microcosm using mekong river sediment”
- 16) F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamanda, B. Chen, G. Y. Shi, Y. Iwasaka : Earozoru Kenkyu, 22, 218-227 (2007)
 “Study on atmospheric diffusion of bioaerosols in a KOSA source region”
- 17) M. P. Fabian, S. L. Miller, T. Reponen, M. T. Hernandez : J. Aerosol. Sci., 36, 763-783 (2005)
 “bioaerosol indices for indoor air quality assessments of flood reclamation”
- 18) T. Hasegawa, Biseibutuno Bunruito Doutei, Gakkai Syupan Centre (1975) (in Japanese)
- 19) R. E. Buchanan, and N. E. Gibbons, (eds), Bergey’ s Manual of Determinative Bacteriology, Waverly Press, (1974)
- 20) G. Muyzer, E. C. de Waal, A. G. Uitterlinden : Appl. Environ. Microbiol., 59, 695- 700 (1993)
 “Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA”
- 21) S. F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, D. J. Lipman: J. Mol. Biol., 215, 403-410 (1990)
 “Basic local alignment search tool”
- 22) N. Saitou, M. Nei: Mol. Biol. Evol., 4, 406-425 (1987)
 “The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees”
- 23) B. L. Maidak, G. J. Olsen, N. Larsen, R. Overbeek, M. J. McCaughey, C. Woese: Nucleic Acids Res., 25, 109-111 (1997)
 “The RDP (Ribosomal Database Project)”
- 24) A. Echigo, M. Hino, T. Fukushima, T. Mizuki, M. Kamekura, R. Usami: Saline Systems, 2005, 1-8 (2005)
 “Endospores of halophilic bacteria of the family Bacillaceae isolated from non-saline Japanese soil may be transported by Kosa event (Asian dust storm)”
- 25) P. J. Riesenman, L. Nicholson: Appl. Environ. Microbiol., 66, 620-626 (2000)
 “Role of the spore coat layers in *Bacillus subtilis* spore resistance to hydrogen peroxide, artificial UV-C, UV-B, and solar UV radiation”
- 26) B. Hoult, A. F. Tuxford: J. Clin. Pathol., 44, 455-458 (1991)
 “Toxin production by *Bacillus pumilus*”
- 27) D. W. Griffin, C. A. Kellogg, V. H. Garrison, J. T. Lisle, T. C. Borden, E. A. Shinn: Aerobiologia, 19, 143- 157 (2003)
 “Atmospheric microbiology in the northern Caribbean during African dust”
- 28) S. Banerjee, T. N. Devaraja, M. Shariff, F. M. Yusoff: J. Fish Dis. 30: 383-389 (2007)
 “Comparison of four antibiotics with indigenous marine *Bacillus* spp. in controlling pathogenic bacteria from shrimp and *Artemia*”
- 29) E. P. Ivanova, M. V. Vysotskii, V. I. Svetashev, O. I. Nedashkovskaya, N. M. Gorshkova,

- V. V. Mikhailov, N. Yumoto, Y. Shigeri, T. Taguchi, S. Yoshikawa: *Int. Microbiol.*, 2, 267-271 (1999)
- “Characterization of *Bacillus* strains of marine origin”
- 30) D. W. Griffin: *Aerobiologia*, 20, 135- 140 (2004)
- “Terrestrial microorganisms at an altitude of 20,000 m in Earth’ s atmosphere”
- 31) B. Spellerberg, K. Steidel, R. Lütticken, G. Haase: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect Dis.*, 17, 61-62 (1998)
- “Isolation of *Staphylococcus caprae* from blood cultures of a neonate with congenital heart disease”
- 32) Y. Q. Zhang, S. X. Ren, H. L. Li, Y. X. Wang, G. Fu, J. Yang, Z. Q. Qin, Y. G. Miao, W. Y. Wang, R. S. Chen, Y. Shen, Z. Chen, Z. H. Yuan, G. P Zhao, D. Qu, A. Danchin, Y. M. Wen: *Mol. Microbiol.*, 49, 1577-1593 (2003)
- “Genome-based analysis of virulence genes in a non-biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis* strain (ATCC 12228)”
- 33) H. Wisplinghoff, A. E. Rosato, M. C. Enright, M. Noto, W. Craig, G. L. Archer: *Antimicrob. Agents Chemother.*, 47, 3574-3579 (2003)
- “Related clones containing SCCmec type IV predominate among clinically significant *Staphylococcus epidermidis* isolates”
- 34) M. Yanagishima, Y. Oshima, M. Osumi, Koubono Kaibou, Koudansya (1981) (in Japanese)
- 35) C. A. Kellogg, D. W. Griffin, V. H. Garrison, K. K. Peak, N. Royal, R. R. Smith, E. A. Shinn: *Aerobiologia*, 20, 99- 110 (2004)
- “Characterization of aerosolized bacteria and fungi from desert dust events in Mali, West Africa”
- 36) T. Maki, S. Susuki, F. Kobayashi, M. Kakikawa, M. Yamada, T. Higashi, B. Chen, G. Shi, C. Hong, Y. Tobo, H. Hasegawa, K. Ueda, Y. Iwasaka: *Air Qual. Atmos. 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”

7. 国際共同研究等の状況

本サブテーマでは、黄砂発源地域として中国タクラマカン砂漠東端にあたる敦煌市の気象台上空の黄砂バイオエアロゾルサンプル（サブテーマ1が主として実施）の分離培養・同定やDGGE解析などの生物分析を行った。この分析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, Dunguang 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）
“珠洲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)

