

課題名 B-0902 黄砂現象の環境・健康リスクに関する環境科学的研究

課題代表者名 那須 正夫 (大阪大学大学院薬学研究科 衛生・微生物学分野)

研究実施期間 平成21～23年度

累計予算額 84,552千円 (うち23年度 25,272千円)
予算額は、間接経費を含む。

研究体制

- (1) 黄砂付着微生物の微生物生態学的解析 (大阪大学)
- (2) 黄砂付着微生物の遺伝子生態学的解析 (大阪大谷大学)
- (3) 黄砂の環境毒性学的解析 (大阪大学)
- (4) 黄砂現象の環境および健康への影響評価 (大阪大学)

研究概要

1. はじめに (研究背景等)

黄砂の日本への飛来量は年間100万トン以上と見積もられており、そこに微生物が大量に付着している場合、飛来先の環境や生態系に影響を与える可能性がある。しかし、黄砂を微生物の長距離移動におけるキャリアーとして捉える研究は、黄砂中の微生物を高精度に検出・解析するための手法的制約から、限られている。そこで、環境中の微生物動態解析における実績をもとに、これまで開発・応用してきた「培養に依存しない分子微生物生態学的手法」を用い、黄砂が微生物のキャリアーとなりうるのかを詳細に検討した。また、日本に飛来する黄砂は粒径が0.5-5 μ mの微粒子であることから、花粉症や喘息の発症・悪化に関与していることが疑われている。そこでマイクロ・ナノパーティクルの環境毒性学的評価の実績をもとに、黄砂の生体・健康への影響を、粒子としての黄砂の面から明らかにした。

黄砂による微生物の移動や健康への影響などに関しては未知である部分が多いにも関わらず、従来メディアやインターネット上などでは、植物やヒトに対する病原菌などが飛来する、あるいはアレルギーとなるなどのニュースが流れており、科学的裏づけに基づくリスク・コミュニケーションが緊急の課題になっている。本研究は、黄砂現象による微生物移動の実態や微小粒子である黄砂が健康に及ぼす影響を科学的に解明するものであり、環境、そして健康に対するリスクを評価する上で必須のものであるとともに、社会的な意義も大きい。

2. 研究開発目的

本研究は、国境を越えた地球規模での環境問題となっている黄砂現象を環境微生物学的また環境毒性学的に解明し、黄砂の環境および健康へのリスク評価を行うにあたって必要不可欠な基盤的知見を集積することを目的とする。そこで、微生物のキャリアーとしての黄砂と、微小粒子としての黄砂の生体への影響の両面から経年的に研究を行うことにより、黄砂現象の普遍的な影響を考察した。

(1) 黄砂付着微生物の微生物生態学的解析

これまで独自に開発・応用してきた「培養に依存しない」新たな分子微生物生態学的手法を用いて、黄砂現象にともなう微生物の移動を実証した。さらに、その移動量や多様性を明らかにするとともに、細菌群集構造解析を行い、黄砂に付着している細菌の特徴を明らかにした。

(2) 黄砂付着微生物の遺伝子生態学的解析

黄砂現象とともに飛来する微生物の移動を考察する上で必要不可欠である黄砂発生源(タクラマカン沙漠、ゴビ沙漠、黄土高原)に生息する細菌の特徴を遺伝子を指標として明らかにした。さらに、黄砂飛来量が日本に比べて多く、黄砂の環境・健康への影響を考察する上で重要な地点である中国・北京市へ飛来した黄砂中の細菌についても特徴を明らかにした。

(3) 黄砂の環境毒性学的解析

黄砂を「微小粒子」としての観点から捉え、黄砂およびモデル粒子の吸引暴露後の鼻腔粘膜や気管、肺等における細胞内取り込みや、血中への移行性などを精査した。さらに、黄砂粒子による炎症惹起機構についても研究を進めた。

(4) 黄砂現象の環境および健康への影響評価

効率的かつ高精度な黄砂サンプリング法を確立し、飛来する黄砂粒子の特徴を明らかにするとともに、サブテーマ(1)および(2)において得られた黄砂現象にともなう微生物の移動量や属種に関する定量的な情報とサブテーマ(3)で得られた生体への影響、また生体内での動態に関する情報を総合し、黄砂現象の環境、生態系、そして健康への影響について考察した。

3. 研究開発の方法

(1) 黄砂付着微生物の微生物生態学的解析

1) 黄砂粒子上の微生物の定量のための分子微生物生態学的方法の最適化

黄砂粒子が微生物のキャリアーとなることを直接的に証明するために、黄砂粒子上に付着した微生物を可視化するためのバイオイメージング法について検討した。さらに、黄砂とともに飛来する細菌の現存量およびその群集構造を明らかにするために、微量な試料からの細菌分析法を検討した。

2) 日本上空で採取した黄砂試料中の微生物の可視化、細菌の現存量測定および多様性解析

2010年3月から11月および2011年4月から5月の黄砂飛来時を中心に、日本上空（鳥取県北部および兵庫県南部の沿岸部：高度1,000–2,000 m）で採取した黄砂（合計23試料）について、黄砂粒子上に付着した微生物を直接可視化するとともに、マイクロコロニー法を応用し、増殖活性についても評価した。また、細菌の16S rRNA遺伝子を標的として、定量的リアルタイムPCR法により細菌現存量を測定するとともに、PCR-DGGE (PCR-Denaturing gradient gel electrophoresis) 法を用いて、その細菌群集構造を明らかにした。さらに、大規模な黄砂現象が観測された2010年11月12日、2011年5月2日の黄砂について、クローンライブラリを作成し（合計2,000クローン）、細菌群集構造を明らかにした。

(2) 黄砂付着微生物の遺伝子生態学的解析

1) 黄砂発生源土壌における細菌群集構造解析

黄砂発生源であるタクラマカン沙漠、ゴビ沙漠、黄土高原の土壌中に存在する細菌について、細菌の16S rRNA遺伝子を標的としてクローンライブラリを作成し（合計450クローン）、その細菌群集構造を明らかにした。

2) 北京で採取した黄砂中の細菌の現存量測定および多様性解析

中国・北京市（中国農業大学）において、2010年3月から5月、2011年3月から5月に連続して毎日試料採取を行い、自然降下した粒子を採取した。50 mg/24時間以上の採取量が得られた試料について、細菌の16S rRNA遺伝子を標的として、定量的リアルタイムPCR法により細菌現存量を測定した。また、上述(2)-1)と同様にクローンライブラリを作成し（合計150クローン）、細菌群集構造を明らかにした。また、T-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length polymorphism) 法を用いて、細菌群集構造の経時的な比較解析を行った。

(3) 黄砂の環境毒性学的解析

1) 黄砂モデル粒子であるシリカ粒子の起炎性評価および炎症惹起メカニズムの解明

黄砂モデル粒子として、シリカ粒子（粒径1 μm ）を用い、その起炎性を評価した。ヒトマクロファージ細胞株THP-1細胞にシリカ粒子を添加し、透過型電子顕微鏡により細胞内への移行を観察した。また、各種阻害剤存在下でのIL-1 β 産生能を指標として、炎症惹起メカニズムについて検討した。

2) 黄砂および黄土高原土壌粒子の起炎性評価および炎症惹起メカニズムの解析

中国・北京市（中国農業大学）で採取した黄砂および黄砂発生源の一つである黄土高原で採取した土壌を用い、黄砂粒子の起炎性を評価した。黄砂および発生源土壌をマウスマクロファージ細胞株Raw264.7細胞に添加し、炎症性サイトカイン（TNF- α およびIL-6）産生能を指標として、黄砂粒子の起炎性を評価するとともに、その炎症惹起メカニズムについて検討した。

3) 黄砂および黄土高原土壌粒子の体内動態と生体影響評価

上述の(3)-2)で用いた黄砂および黄土高原土壌を、BALB/cマウスに経鼻投与し、肺組織、鼻腔粘

膜に与える影響について、病理所見を指標に評価した。また、鼻腔粘膜、肺、脳、肝臓、脾臓を摘出し、透過型電子顕微鏡で観察し、粒子の体内動態について明らかにした。また、主要臓器における障害マーカーを指標として、生体影響を評価した。

(4) 黄砂現象の環境および健康への影響評価

1) 日本上空における黄砂の採取法の最適化

小型航空機を用いた日本上空での黄砂採取方法を最適化するとともに、粒子径・元素組成などの黄砂粒子の特徴を明らかにするために、走査型電子顕微鏡を用いた粒度分布測定法および元素組成分析法を開発・最適化した。

2) 日本へ飛来した黄砂粒子の粒度分布測定および元素組成分析

日本上空（鳥取県北部および兵庫県南部の沿岸部：高度1,000–2,000 m）において、2010年3月から11月および2011年4月から5月の黄砂飛来時を中心に、合計23回の試料採取を行った。採取した黄砂について、上述(4)-1)で開発した方法を用い、粒度分布を測定した。さらに、粒径が0.5–1 μmおよび1–5 μmの粒子画分について、SEM-EDXを用いて各100粒子の元素組成を測定した。

3) 黄砂現象の環境・健康への影響評価

黄砂現象の環境・健康への影響を評価するために、サハラダストやオーストラリアンダストを含む風送ダストに関する文献調査を行った。さらに、一般的な大気中の微生物に関する情報収集を行うとともに、大阪大学大学院薬学研究科屋上において、黄砂飛来時および非黄砂時の大気中の細菌現存量を測定した。

本サブテーマにおける結果とサブテーマ(1)から(3)で得られた結果を総合し、「微生物のキャリアーとしての黄砂」と「微小粒子としての黄砂」の両面から、黄砂現象の環境・健康への影響について考察した。

4. 結果及び考察

(1) 黄砂付着微生物の微生物生態学的解析

1) 黄砂粒子上の微生物の定量のための分子微生物生態学的方法の最適化

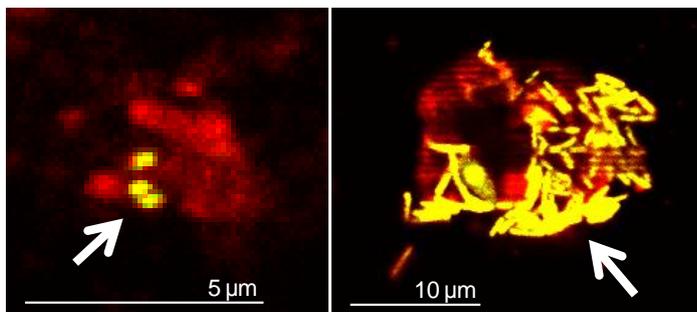
黄砂粒子上の微生物を可視化するために、蛍光染色法を最適化するとともに、共焦点レーザー顕微鏡を用いた顕微分光法により、蛍光波長にもとづいた微生物と粒子の識別を可能にし、黄砂粒子上の微生物のバイオイメージング法として確立した。また、細菌の16S rRNA遺伝子を標的とした遺伝子増幅法を検討し、その検出感度を100倍以上向上させ、微量試料における細菌分析法として確立した。

2) 日本上空で採取した黄砂試料中の微生物の可視化、細菌の現存量測定および多様性解析

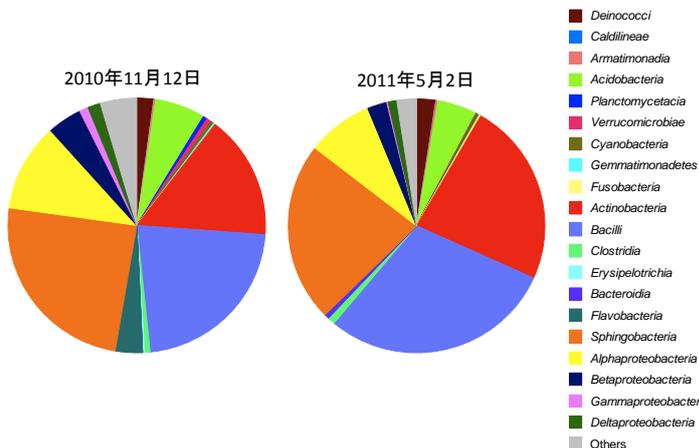
大規模な黄砂現象が観測された2010年11月12日、2011年5月2日に日本上空（鳥取県北部の沿岸部：高度約1,000 m）で採取した黄砂について、バイオイメージングにより黄砂粒子上に微生物が付着していることを確認した（図(1)-1）。また、粒子の粒径が大きいほど微生物が付着している割合が高く、特に直径5 μm以上の粒子においてその傾向が顕著であることがわかった。さらに、マイクロコロニー法により、黄砂粒子上の微生物が増殖活性をもっていることを明らかにした。

また、黄砂試料から直接DNAを抽出し、定量的リアルタイムPCR法により細菌現存量を測定した結果、黄砂飛来時の大気1 m³あたりの細菌数は、最大時で約10⁴ cellsであり、黄砂現象の終息とともにその現存量は10² cells/m³以下に減少した。以上の結果より、黄砂現象とともに細菌が移動していることを明らかにした。

さらに、黄砂現象とともに飛来する細菌種について、16S rRNA遺伝子を標的としてクローンライブラリを作成し（合計960クローン）、細菌群集構造解析を行った結果、優占種として*Actinobacteria*、*Bacilli*、*Sphingobacteria*、*Alphaproteobacteria*に属する細菌が検出され、これまで報告されていた以上に多様な種の細菌が黄砂現象とともに飛来していることを明らかにした（図(1)-2）。また、黄砂中の細菌を液体培地で培養後、同様にクローンライブラリを作成し（合計960クローン）、細菌群集構造を解析した結果、*Bacilli*、*Sphingobacteria*に属する細菌が優占しており、これらの細菌種が増殖活性を有していることがわかった。



図(1)-1. バイオイメージングによる
黄砂粒子上の微生物の可視化
左：黄砂粒子に付着している微生物
右：黄砂粒子上で増殖し、マイクロコロニーを形成した微生物



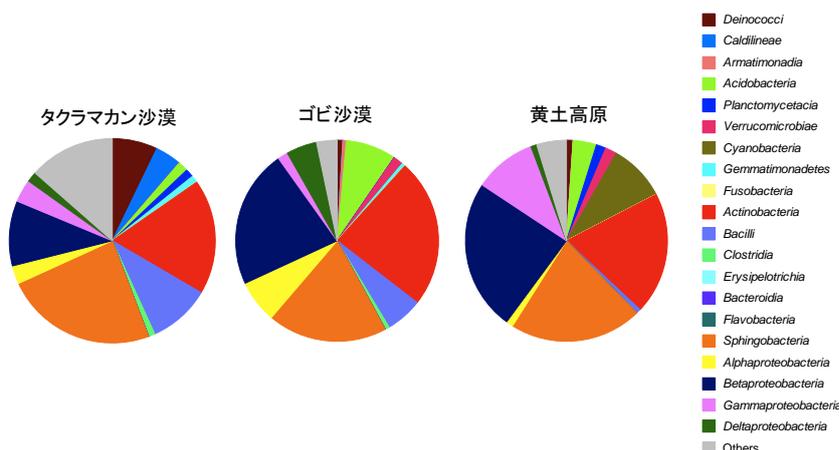
図(1)-2. 日本上空で採取した
黄砂中に存在する細菌の多様性

本サブテーマにより、黄砂粒子は微生物のキャリアーとなることを直接的に証明するとともに、黄砂現象にともなって日本へ飛来する細菌現存量を明らかにした。さらに、その属種についても明らかにするとともに、黄砂現象とともに日本へ飛来する約2,000クローンの細菌データベースを構築した。なお、本データベースは公開する予定である。

(2) 黄砂付着微生物の遺伝子生態学的解析

1) 黄砂発生源土壌における細菌群集構造解析

黄砂発生源であるタクラマカン沙漠、ゴビ沙漠、黄土高原について合計450クローンのクローンライブラリを作成し、細菌群集構造を解析した結果、これらの土壌中には多様な種の細菌が存在することを明らかにした(図(2)-1)。タクラマカン沙漠では、*Actinobacteria*、*Bacilli*、*Sphingobacteria*、*Betaproteobacteria*に属する細菌の構成比率が高く、ゴビ沙漠においてもタクラマカン沙漠同様、*Actinobacteria*、*Bacilli*、*Sphingobacteria*、*Betaproteobacteria*に属する細菌の構成比率が高かった。一方、黄土高原においては、*Actinobacteria*、*Sphingobacteria*、*Betaproteobacteria*に加えて、*Gammaproteobacteria*の構成比率が高かった。また、特に黄土高原において*Gammaproteobacteria*などヒトや動物由来と考えられている細菌種の構成比が高くなっていったことは、黄土高原が大農業地帯であり、堆肥等の投入が行われていることが要因の一つであると考えられた。以上の結果から、乾燥地である黄砂発生源においても、多様な種の細菌が存在していることを明らかにした。



図(2)-1. 黄砂発生源土壌
中に存在する細菌の多様性

2) 北京で採取した黄砂中の細菌の現存量測定および多様性解析

中国・北京市（中国農業大学）において、採取した黄砂について、細菌の16S rRNA遺伝子を標的として、定量的リアルタイムPCR法により細菌現存量を測定した結果、黄砂1gあたりの細菌数は、 10^8 – 10^9 cellsであり、黄砂の規模と細菌現存量との間に関連性は認められなかった。また、T-RFLP法を用いて細菌群集構造を比較した結果においても、試料採取日に関わらず、細菌群集構造は類似していることがわかった。

さらに、中国・北京市において大規模な黄砂現象が確認された2010年3月20日には、採取できた黄砂試料の量も十分であったことから、合計150クローンのクローンライブラリを作成し、より詳細に細菌群集構造を解析した。その結果、発生源土壌や、日本と同様に多様な細菌種が存在しており、*Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Bacilli*、*Sphingobacteria*、*Alphaproteobacteria*に属する細菌が優占種であることを明らかにした。

本サブテーマにより、黄砂発生源土壌および中国・北京市に飛来した黄砂中には、多様な種の細菌が存在していることを明らかにし、日本へ飛来する細菌種が多様であることを裏付けるデータを得た。また黄砂発生源においては、農業が盛んに行われている地域もあり、ヒトや動物由来の細菌が飛来する可能性があることも明らかになった。

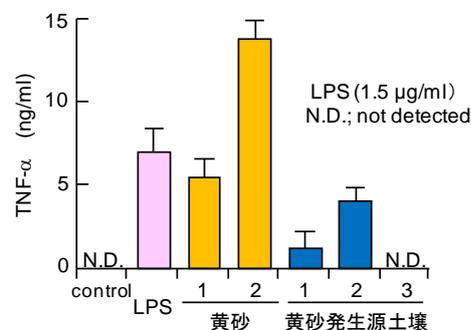
(3) 黄砂の環境毒性学的解析

1) 黄砂モデル粒子であるシリカ粒子の起炎性評価および炎症惹起メカニズムの解明

黄砂モデル粒子である粒子径1 μ mのシリカ粒子とヒトマクロファージ細胞を反応させた結果、シリカ粒子がエンドソームもしくは細胞質内に多数取り込まれていることがわかった。また、シリカ粒子が強い起炎性を有することを示した。さらに、その炎症惹起メカニズムについて検討した結果、シリカ粒子は細胞にエンドサイトーシスで取り込まれた後、活性酸素の産生を誘発し、活性酸素がリソソームを破壊することでカテプシンBが細胞質に流出し、インフラマソームの活性化を誘導することが明らかになった。

2) 黄砂および黄土高原土壌粒子の起炎性評価および炎症惹起メカニズムの解析

黄砂および黄砂発生源土壌をマウスマクロファージ細胞株に作用させ、炎症性サイトカイン産生を指標に起炎性を評価した結果、黄砂作用群では、陽性コントロールとして用いたリポポリサッカライド（LPS）作用群と同程度のTNF- α およびIL-6産生が認められ、黄砂は強い起炎性を示すことが明らかとなった（図(3)-1）。また、黄砂発生源土壌作用群でのTNF- α 、IL-6産生量は黄砂作用群と比較して有意に低かったことから、黄砂は黄砂発生源土壌よりも起炎性が強いことが示された。そこで、種々の阻害剤を用い、黄砂の炎症惹起メカニズムを検討した結果、黄砂はマウスマクロファージ細胞株に取り込まれた後、活性酸素産生を誘発し、MAPKを活性化することで炎症性サイトカインを産生誘導することが明らかになった。

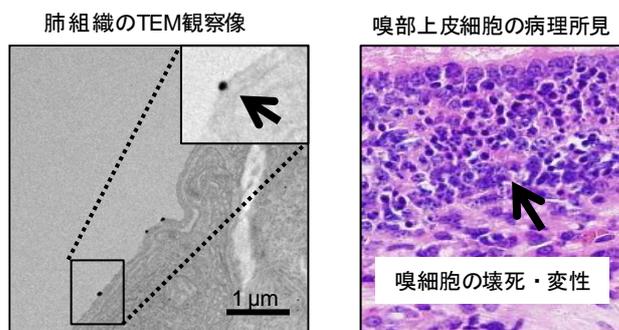


図(3)-1. 黄砂粒子による炎症性サイトカインの誘導

3) 黄砂および黄土高原土壌粒子の体内動態と生体影響評価

黄砂および黄砂発生源土壌を生体マウスに経鼻投与し、粒子の体内動態を評価したところ、黄砂投与群においてのみ、肺胞上皮細胞内に粒子が観察され、上皮細胞を通過して体内に移行する可能性が示された（図(3)-2）。さらに、肺組織における炎症を評価した結果、黄砂の暴露により、肺組織において、貪食系細胞や好酸球などの炎症性細胞浸潤に伴う強い炎症反応が誘導される可能性が考えられた。

また、病理学的解析により、投与局所である鼻腔の嗅上皮細胞において、黄砂投与群で壊死・変性が認められたことから、黄砂曝露が嗅覚器に損傷を与える可能性が示された（図(3)-2）。



図(3)-2. 生体マウスへの黄砂暴露による黄砂粒子の体内動態および病理所見

本サブテーマにより、黄砂が体内に侵入する可能性があることを示した。さらに、黄砂粒子は黄土高原土壌よりも強い起炎性を有することを明らかにするとともに、その炎症惹起メカニズムの一部を明らかにし、「微小粒子としての黄砂」の健康への影響を評価するための基礎的知見を得た。

(4) 黄砂現象の環境および健康への影響評価

1) 日本上空における黄砂の採取法の最適化

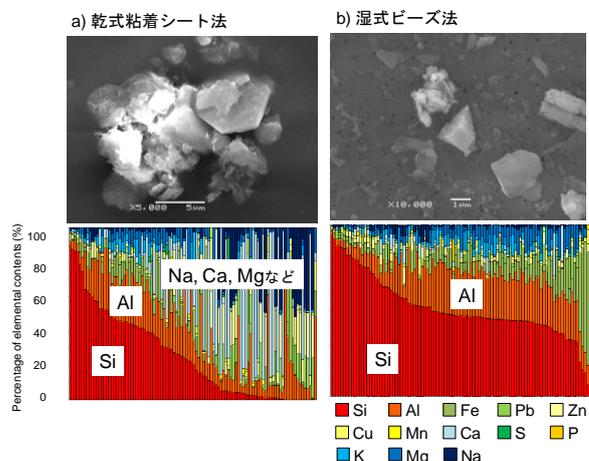
日本上空（鳥取県北部および兵庫県南部の沿岸部：高度1,000–2,000 m）において、解析に十分な黄砂粒子を採取するために、独自に黄砂捕集装置を開発し、短時間で大量の黄砂捕集を可能にした（湿式ビーズ法）。さらに、粘着シートを用いた乾燥状態での黄砂採取法を確立した（乾式粘着シート法）。また、微量な試料においても粒度分布測定を可能とするため、走査型電子顕微鏡画像を用いた独自の画像解析プログラム（PaSDAS：Particle Size Distribution Analysis Software）を開発した。

2) 日本へ飛来した黄砂粒子の粒度分布測定および元素組成分析

日本上空において、2010年3月から11月および2011年4月から5月に合計23回の試料採取を行った。

採取した黄砂粒子の粒度分布を測定した結果、黄砂飛来時においても $1\mu\text{m}$ 以下の粒子画分が全体の60–80%を占め、非常に粒径の小さい粒子が飛来していることが明らかになった。その一方で、大規模な黄砂現象が確認された2010年11月および2011年5月に鳥取県北部の沿岸部（高度約1,000 m）で採取した黄砂粒子では、 $1\mu\text{m}$ 以下の粒子画分が最も多く存在する点は変わらないものの、粒径 $2\text{--}5\mu\text{m}$ の粒子画分の割合が増加していたことから、大規模な黄砂観測時には粒径の大きい粒子も飛来している可能性が示された。またSEM-EDXによる元素組成分析の結果、黄砂飛来時にはケイ素（Si）あるいはアルミニウム（Al）の割合が高い粒子が多く、これらの粒子は土壌由来の粒子であることが推定された（図(4)-1）。

一方、乾式粘着シート法で採集した黄砂粒子を分析した結果、日本に飛来する黄砂中には細かな粒子以外に、粒子同士が結合した凝集体が存在することが明らかになった（図(4)-1）。また、湿式ビーズ法で採取した試料に比べ、ケイ素を多く含む粒子の割合が低く、アルミニウムあるいはカルシウム（Ca）が表面の主成分である粒子が存在した。特にカルシウムは、湿式ビーズ法による試料では、ほとんど認められなかったことから、黄砂粒子の表面に可溶性のカルシウムが付着し、このカルシウムを含む塩により凝集体を形成していたものと考えられる。以上の結果より、黄砂粒子は水分の存在下において、より微細な粒子に分散する可能性があることが明らかになった。これは、黄砂粒子がヒト等の粘膜上においてより微細な粒子に分散する可能性があることを示しており、黄砂粒子の生体影響を明らかにする上で重要な知見である。



図(4)-1. 水分の存在下による黄砂粒子の分散と元素組成の変化

3) 黄砂の環境・健康への影響評価

黄砂の環境・健康への影響を評価するために、過去5年間の報告を中心に情報収集を行った。その結果、風送ダストに関する論文数は1000件以上あるにも関わらず、微生物に関する報告は約20件と報告数が非常に少なく、社会的関心が高いにも関わらず未知な部分が多いことがわかった。また、微生物の検出法としては培養法が中心であり、検出された微生物数も少なく、風送ダストの環境や健康への影響を評価するために必要な定量的データはほとんどないことがわかった。また、ヒトが生活する一般的な環境の大気中におけるダスト濃度や細菌数に関するデータについてもほとんど報告がなかった。

そこで、ヒトが生活する環境における大気中の細菌現存量について測定を行った結果、その値は環境によって大きく異なるものの、 $10^2 - 10^4$ cells/m³であることがわかった。サブテーマ(1)の黄砂中の細菌現存量と比較すると、黄砂中に存在する細菌量は通常の大気環境中と同程度以下であることが明らかになった。

本サブテーマおよびサブテーマ(1)から(3)により得られた「微生物のキャリアーとしての黄砂」と「微小粒子としての黄砂」の基盤的知見を総合し、黄砂現象の環境・健康への影響を考察した。

微生物の面から健康へのリスクを考えた場合、黄砂とともに飛来する細菌の現存量は大規模な黄砂飛来時でも1 m³あたり約 10^4 cellsであり、我々の生活する一般的な環境の大気中の細菌現存量と比較しても同程度以下であること、加えて検出された細菌種についても土壌や河川など幅広い環境中に生息する一般的な細菌種が大部分であり、深刻な感染症等の起因菌は検出されていないことから、黄砂とともに飛来する細菌による感染症の発生等のリスクは低いと考えられた。その一方で、黄砂は数百万から数千万年にわたって飛来しており、地球学的な時間スケールでは膨大な量の細菌が地球上を移動していると考えられる。またその属種についても多種多様であることから、飛来地での定着や遺伝子伝播を通じて、今後も地球上の微生物生態系に影響を与える可能性が考えられる。

一方で粒子としての黄砂は、炎症を惹起するとともに、生体内に侵入し、細胞障害を起こす可能性が示され、さらに細かい粒子ほど起炎性が強くなることが明らかになった。黄砂粒子がヒトの粘膜上でさらに微細な粒子に分散する可能性も示されたことから、粒子としての黄砂は生体に影響を与える可能性があると考えられた。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

黄砂等の風送ダストによる健康被害は、日本や中国・韓国・台湾といった東アジアにおいて、社会的に関心を集めている。さらに、近年の急激な大気汚染・温暖化に伴い、予期せぬ成分や微生物が付着した黄砂の飛来による生体に及ぼすリスク上昇が懸念されている。

本研究により得られた黄砂現象とともに移動する細菌の量、属種に関する定量的なデータは、黄砂現象の健康影響を評価する上で不可欠な基盤的知見となるだけでなく、これまで考えられていた以上に多様な細菌が地球上を移動していることを明らかにしたことから、地球規模での生態系あるいは環境に与える影響を考える上でも重要な知見である。

また、微小粒子としての黄砂の生体影響という観点から、トキシコキネティクスなどを有効活用し、黄砂の物性(成分)とその体内動態、さらには免疫毒性の評価を行った。今後、本研究で得られた成果と、疫学的調査結果を併せて解析することで、黄砂をはじめとする微粒子に起因した疾患の発症・悪化のメカニズム解明が期待される。

(2) 環境政策への貢献

本研究では、黄砂とともに飛来する細菌の現存量および多様性、ならびに黄砂粒子の生体影響に関する基盤的知見を得た。これらの成果を学術的に公表するとともに、種々のメディアを通じて一般社会に紹介し、成果の広報・普及に努めることにより、科学的根拠のない情報によって生じる黄砂現象に対する過度の社会不安を取り除き、科学的データに立脚した環境リスクのマネジメントやリスク・コミュニケーション等の政策に貢献できる。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表 (2012年3月末現在)

<査読付き論文>

- 1) T. Morishige, Y. Yoshioka, H. Inakura, A. Tanabe, X. Yao, S. Narimatsu, Y. Monobe, T. Imazawa, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, Y. Mukai, N. Okada and S. Nakagawa: *Biomaterials*, 31, 6833-6842 (2010)
 “The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1beta production, ROS production and endosomal rupture”
- 2) N. Yamaguchi, A. Sakotani, T. Ichijo, T. Kenzaka, K. Tani, T. Baba and M. Nasu: *Biol. Pharm. Bull.*, 35, 1187-1190 (2012)
 “Break down of Asian dust particle on wet surface and their possibilities of cause of respiratory health effects”
- 3) N. Yamaguchi, T. Ichijo, A. Sakotani, T. Baba and M. Nasu: *Sci. Rep.* (in press)
 “Global dispersion of bacterial cells on Asian dust”

<その他誌上発表 (依頼原稿)>

- 1) 山口進康、那須正夫: *ファルマシア*, 46, 659-663 (2010)
 「地球を巡る微生物—健康な生活を保証する—」
- 2) 那須正夫: *化学療法の領域*, 26, 2372-2375 (2010).
 「環境の変化と微生物生態系 (総論)」
- 3) 山口進康: *化学療法の領域*, 26, 2434-2444 (2010).
 「環境微生物検出技術のイノベーション」

(2) 主な口頭発表 (学会等)

<国内発表>

- 1) 馬場貴志、一條知昭、天野翔子、山口進康、那須正夫: フォーラム 2009 衛生薬学・環境トキシコロジー (2009)
 「黄砂現象にともなう細菌の長距離移動」
- 2) 馬場貴志、一條知昭、見坂武彦、山口進康、那須正夫: 第 24 回日本微生物生態学会 (2009)
 「黄砂現象にともなう細菌の長距離移動」
- 3) 那須正夫: 第 4 回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2010)
 「黄砂飛来にともなう微生物およびその遺伝子の移動に関する環境微生物学的研究」
- 4) 馬場貴志: 第 4 回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2010)
 「黄砂現象により移動する細菌の現存量」
- 5) 馬場貴志、一條知昭、天野翔子、山口進康、那須正夫: 第 83 回日本細菌学会総会 (2010)
 「黄砂現象にともなう細菌の長距離移動」
- 6) 一條知昭、姫澤由佳、馬場貴志、那須正夫: 日本薬学会第 130 年会 (2010)
 「黄砂粒子の粒度分布測定を目指した画像解析プログラムの開発」
- 7) 馬場貴志、天野翔子、一條知昭、山口進康、那須正夫: 日本薬学会第 130 年会 (2010)
 「黄砂現象にともなう細菌の長距離移動」
- 8) 一條知昭、馬場貴志、姫澤由佳、山口進康、那須正夫: 第 26 回日本微生物生態学会 (2010)
 「黄砂現象とともに移動する細菌の現存量」
- 9) 馬場貴志、一條知昭、更家信、榎木香奈美、山口進康、那須正夫: 第 26 回日本微生物生態学会 (2010)
 「黄砂現象とともに移動する細菌の多様性」
- 10) 馬場貴志、姫澤由佳、一條知昭、山口進康、那須正夫: 日本薬学会第 131 年会 (2011)
 「レーザー顕微鏡を用いた黄砂粒子に付着している微生物の可視化」
- 11) 馬場貴志、更家信、一條知昭、山口進康、那須正夫: 日本薬学会第 131 年会 (2011)
 「黄砂現象に伴って移動する細菌の多様性」
- 12) 馬場貴志、榎木香奈美、一條知昭、山口進康、那須正夫: 日本薬学会第 131 年会 (2011)
 「増殖活性にもとづいた黄砂現象に伴って移動する細菌の系統解析」
- 13) 藤村真穂、吉岡靖雄、山下浩平、東阪和馬、森下裕貴、潘慧燕、小椋健正、鍋師裕美、吉川友章、伊藤徳夫、馬場貴志、山口進康、那須正夫、堤康央: 日本薬学会第 131 年会 (2011)
 「黄砂の健康リスク解析を目指した免疫毒性に関する基礎的評価」

- 14) 吉岡靖雄、藤村真穂、山下浩平、東阪和馬、森下裕貴、潘慧燕、小椋健正、長野一也、阿部康弘、鎌田春彦、角田慎一、鍋師裕美、馬場貴志、山口進康、伊藤徳夫、吉川友章、那須正夫、堤康央：第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会（2011）
「ヒト健康へのリスク解析に資する黄砂の免疫毒性に関する基礎的評価」
- 15) 一條知昭、馬場貴志、姫澤由佳、山口進康、那須正夫：第 27 回日本微生物生態学会（2011）
「黄砂現象による細菌の長距離移動」
- 16) 馬場貴志、更家信、榎木香奈実、山口進康、那須正夫：第 27 回日本微生物生態学会（2011）
「黄砂現象に伴い移動する細菌の系統解析」
- 17) 一條知昭、馬場貴志、姫澤由佳、更家信、榎木香奈実、山口進康、那須正夫：第 6 回大気バイオエアロゾルシンポジウム（2011）
「黄砂とともに飛来する細菌の現存量と多様性」
- 18) 馬場貴志、姫澤由佳、一條知昭、山口進康、那須正夫：第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会（2011）
「黄砂現象とともに飛来する微生物の可視化」
- 19) 馬場貴志、榎木香奈実、更家信、一條知昭、山口進康、那須正夫：第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会（2011）
「黄砂現象に伴い移動する細菌の多様性」
- 20) 馬場貴志、姫澤由佳、一條知昭、山口進康、那須正夫：フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー（2011）
「黄砂現象とともに飛来する微生物の可視化」
- 21) 山口進康、馬場貴志、榎木香奈実、更家信、一條知昭、那須正夫：フォーラム 2011 衛生薬学・環境トキシコロジー（2011）
「黄砂現象に伴い移動する細菌の多様性」
- 22) 馬場貴志、一條知昭、山口進康、那須正夫：第 85 回日本細菌学会総会（2012）
「黄砂現象にともなう細菌の長距離移動」
- 23) 馬場貴志、一條知昭、迫谷有希子、山口進康、那須正夫：日本薬学会第 132 年会（2012）
「黄砂現象にともなう細菌の長距離移動」

<国際発表>

- 1) T. Baba, T. Ichijo, S. Amano, N. Yamaguchi and M. Nasu: 13th International Symposium on Microbial Ecology, Seattle, USA, 2010
“Estimation of abundance of bacteria on Asian dust by quantitative PCR”
- 2) Y. Yoshioka, T. Morishige, H. Inakura, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, Y. Mukai, N. Okada and S. Nakagawa: The Asia/Pacific Chapter of Environmental Toxicology and Chemistry 2010 Conference (SETAC), Guangzhou, China, 2010
“Silica particle, major component of Asian dust, induces IL-1 β production through NALP3 activation mediated by cathepsin B “
- 3) K. Higashisaka, Y. Yoshioka, K. Yamashita, Y. Morishita, T. Yoshida, M. Fujimura, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, N. Itoh, S. Tsunoda, T. Yoshikawa and Y. Tsutsumi: The Asia/Pacific Chapter of Environmental Toxicology and Chemistry 2010 Conference (SETAC), Guangzhou, China, 2010
“Development of biomarkers for the safety scientific assessment of nanosilica, major component of Asian dust “
- 4) K. Yamashita, Y. Yoshioka, K. Higashisaka, Y. Morishita, T. Yoshida, M. Fujimura, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, N. Itoh, S. Tsunoda, T. Yoshikawa and Y. Tsutsumi: The Asia/Pacific Chapter of Environmental Toxicology and Chemistry 2010 Conference (SETAC), Guangzhou, China, 2010
“The safety scientific assessment of reproductive and developmental toxicity of nanosilica, major component of Asian dust”
- 5) Y. Morishita, Y. Yoshioka, K. Yamashita, K. Higashisaka, T. Yoshida, M. Fujimura, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, N. Itoh, S. Tsunoda, T. Yoshikawa and Y. Tsutsumi: The Asia/Pacific Chapter of Environmental Toxicology and Chemistry 2010 Conference (SETAC), Guangzhou, China, 2010
“Distribution analysis of nanosilica, major component of Asian dust, to the testis for

the safety scientific assessment”

- 6) N. Yamaguchi, T. Ichijo, Y. Himezawa, K. Enoki, M. Saraya, T. Baba and M. Nasu: The 4th International Symposium on Environment of Rim of the Japan/East Sea, Jeju-do, Korea, 2010
“Abundance and population structure of bacteria on Asian dust determined by PCR-based approaches”
- 7) T. Baba, T. Ichijo, M. Saraya, K. Enoki, Y. Himezawa, N. Yamaguchi and M. Nasu: 111th American Society for Microbiology General Meeting, New Orleans, USA, 2011
“Long distance movement of bacteria by Asian dust”
- 8) T. Baba, T. Ichijo, M. Saraya, K. Enoki, Y. Himezawa, A. Sakotani, N. Yamaguchi and M. Nasu: 111th IUMS, Sapporo, Japan, 2011
“Long distance movement of bacteria by Asian dust”
- 9) Y. Yoshioka, M. Fujimura, K. Yamashita, K. Higashisaka, Y. Morishita, H. Pan, T. Ogura, H. Nabeshi, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, S. Tsunoda, T. Baba, N. Yamaguchi, M. Nasu, N. Itoh, T. Yoshikawa and Y. Tsutsumi: SETAC North America 32nd Annual Meeting, USA, 2011
“Fundamental assessment for clarification of relationship between Asian dust and influenza infection-1; Potential immunotoxicity of Asian dust for the future risk-analysis”
- 10) K. Yamashita, Y. Yoshioka, M. Fujimura, K. Higashisaka, Y. Morishita, H. Pan, T. Ogura, H. Nabeshi, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, S. Tsunoda, T. Baba, N. Yamaguchi, M. Nasu, N. Itoh, T. Yoshikawa and Y. Tsutsumi: SETAC North America 32nd Annual Meeting, USA, 2011
“Fundamental assessment for clarification of relationship between Asian dust and influenza infection-2; Biodistribution and inflammatory effects of Asian dust for the future risk-analysis”
- 11) N. Yamaguchi, T. Ichijo, A. Sakotani, T. Baba and M. Nasu: 112th American Society for Microbiology General Meeting, San Francisco, USA, 2012
“Global dispersion of bacterial cells on Asian dust “ (アブストラクト提出済)
- 12) M. Nasu: 2012 International Bioaerosol Symposium, Seoul, Korea, 2012
“Global dispersion of bacterial cells with Asian dust “ (招待講演)

7. 研究者略歴

課題代表者：那須正夫

1950年生まれ、大阪大学大学院医学研究科博士課程修了、医学博士、
現在、大阪大学大学院薬学研究科教授

研究参画者

(1) 1) : 山口進康

1968年生まれ、大阪大学大学院薬学研究科修了、博士(薬学)、
現在、大阪大学大学院薬学研究科准教授

2) : 馬場貴志

1974年生まれ、鳥取大学大学院農学研究科修了、博士(農学)、
現在、大阪大学大学院薬学研究科助教

(2) : 谷佳津治

1962年生まれ、大阪大学大学院薬学研究科修了、博士(薬学)、
現在、大阪大谷大学薬学部教授

(3) : 堤康央

1969年生まれ、大阪大学大学院薬学研究科修了、博士(薬学)、
現在、大阪大学大学院薬学研究科教授

(4) : 那須正夫(課題代表者)

B-0902 黄砂現象の環境・健康リスクに関する環境科学的研究**(1) 黄砂付着微生物の微生物生態学的解析**

大阪大学大学院薬学研究科

山口 進康

馬場 貴志

平成21～23年度累計予算額：36,047千円

(うち、平成23年度予算額：9,986千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨] 黄砂現象の環境・健康リスクを考える上で、黄砂粒子に付着して飛来する細菌の量やその属種を明らかにすることが重要である。しかしながら、日本上空で採取できる黄砂の量は限られているため、より微量の試料からも信頼性の高い結果を得るための方法が必須である。そこでまず、これまでの分子微生物生態学的方法の開発における様々な実績をもとに、微量な黄砂試料での細菌現存量の測定および多様性の解析を可能にした。

次に、日本上空（鳥取県北部および兵庫県南部の沿岸部：高度1,000–2,000 m）で採取した黄砂粒子上の微生物を可視化することにより、黄砂粒子が微生物のキャリアーとなり、黄砂現象とともに微生物が長距離移動していることを直接的に証明した。また、増殖活性をもつ微生物も黄砂とともに飛来していることを明らかにした。さらに、定量的リアルタイムPCR法により細菌現存量を測定し、黄砂飛来時の大気中には 10^4 cells/m³の細菌が存在することを明らかにした。また16S rRNA遺伝子を標的として、黄砂とともに飛来する細菌について約2,000クローンのライブラリを作成し、これまで考えられていた以上に系統学的に多様な細菌種が黄砂現象とともに日本へ飛来していることを明らかにした。

[キーワード] 黄砂、バイオイメーjing、細菌現存量、多様性、クローンライブラリ

1. はじめに

日本には毎年おもに3月から5月にかけて中国大陸から黄砂が飛来し、その総量は年間100万トン以上¹⁾、多い年には200万から300万トンにおよぶとされている²⁾。黄砂は中国やモンゴルの乾燥・半乾燥地域を発生源とする土壌粒子であることから、発源地域に存在する微生物が黄砂粒子に付着し、長距離移動している可能性が考えられ、黄砂に多量の微生物が存在する場合、飛来先の環境や生態系、あるいは我々の健康に影響を与えるものと推察される。しかしながら、黄砂を微生物のキャリアーとして捉える研究は、環境中の微生物を高精度に検出・解析するための手法的制約から限られている。

そこで本サブテーマでは、これまでに環境中の微生物動態を精度よく解析するために開発・応用してきた「培養に依存しない分子微生物生態学的手法」^{3),4)}を用い、「微生物のキャリアーとしての黄砂」の観点から詳細に検討を行った。

2. 研究開発目的

黄砂現象の環境、生態系あるいは健康への影響を評価するためには、黄砂現象による微生物の移動を直接的に証明するとともに、その現存量や属種に関する定量的データが必要不可欠である。

細菌の検出法として広く用いられている培養法は感度が高い方法であるが、環境中に生息するほとんどの細菌は、通常の培養条件下では増殖困難であることから^{5),6)}、細菌群集全体を対象とする場合は定量性が低い点が課題となる。したがって、黄砂を微生物のキャリアーとして捉え、その環境・健康影響を明らかにするためには、このような方法論的制約を解決するための新たな方法が必要となる。

そこで本サブテーマにおいては、これまでに開発・応用してきた蛍光染色法^{7),8)}を発展させ、黄砂飛来時に日本上空で採取した黄砂粒子に付着した微生物をシングルセルレベルで可視化し、黄砂現象にともなう微生物の移動を直接的に証明した。さらに、遺伝子を標的とした分子微生物生態学的手法を、黄砂など微量試料においても信頼性の高いデータを得るために最適化し、日本に飛来する黄砂中の細菌現存量および細菌群集構造を明らかにした。

3. 研究開発方法

(1) 黄砂粒子上の微生物の定量のための分子微生物生態学的手法の最適化

1) 黄砂粒子に付着した細菌の可視化

サブテーマ(4)において調製した中国・黄土高原の土壌を10 μm以下に分級した土壌試料に大腸菌を添加し、蛍光染色した後、レーザー顕微鏡を用いた顕微分光により、粒子および細菌由来の蛍光波長のパターンを分析した。また、得られた蛍光波長および強度に関する基礎データをもとに、バイオイメージング法として最適化した。

2) 微量試料からの細菌DNA増幅法

黄砂発生源である中国・黄土高原の土壌より細菌のDNAを抽出し、16S リボソームRNA

(rRNA) 遺伝子を標的とした定量的リアルタイムPCR法によりコピー数を測定した。抽出DNAの濃度が 10^6-10^2 copies/ μ lとなるように段階希釈したものを試料とし、全ゲノム増幅法およびNested PCR法による遺伝子増幅とその定量限界を検討した。全ゲノム増幅にはillustra GenomiPhi DNA Amplification Kit (GE healthcare)を用いた。Nested PCRでは、細菌の16S rRNA遺伝子を標的として、まずそのほぼ全長をPCRにより増幅した。それぞれのDNA増幅産物に対して、16S rRNA遺伝子のV6-V8領域を標的としたPCRを行い、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動(DGGE: denaturing gradient gel electrophoresis)法⁴⁾で解析し、微量試料からのDNA増幅法として確立した。

(2) 日本上空で採取した黄砂中の微生物の可視化、細菌現存量の測定および多様性評価

日本上空(鳥取県北部および兵庫県南部の沿岸部: 高度1,000-2,000m)において、第一航空株式会社の協力のもと、黄砂を採取した。2010年3月から11月および2011年4月から5月の黄砂飛来時を中心に、合計23回の試料採取を行った。

1) 黄砂現象とともに日本へ飛来した黄砂粒子上の微生物の可視化

黄砂粒子をポリカーボネートフィルター上に捕集し、パラホルムアルデヒドで処理した後、洗浄、脱水を行い、蛍光染色した。共焦点レーザー顕微鏡を用い、(1)-1)で決定した条件下で観察した。さらに、黄砂粒子上の微生物の増殖活性の有無を明らかにするため、マイクロコロニー法⁹⁾の最適化を行った。試料をポリカーボネートフィルター上に捕集したのち、フィルターを標準寒天培地、1/100標準寒天培地、0.05% Yeast extract寒天培地、R2A寒天培地上に静置し、25°Cで培養した。上述と同様の方法で蛍光染色し、(1)-1)で決定した条件下で観察した。

2) 黄砂現象とともに日本へ飛来した細菌の現存量測定

黄砂試料から、Kawaiらの方法¹⁰⁾にしたがって、直接DNAを抽出した。細菌現存量の測定にあたっては、細菌の16S rRNA遺伝子のV6-V8領域を標的として、定量的リアルタイムPCR法により細菌数を測定した¹¹⁾。また、DNA抽出時に内部標準として既知量のルシフェラーゼ遺伝子を添加し、DNA抽出後に定量することにより、DNA回収率を算出した。

3) PCR-DGGE法による細菌の多様性評価

細菌の多様性評価にあたっては、前述の(2)-2)にしたがって、黄砂試料から直接DNAを抽出した。(1)-2)で決定した細菌DNA増幅法により遺伝子増幅を行った後、細菌の16S rRNA遺伝子のV6-V8領域を標的としたDGGE法による分析を行った。DGGEゲルから主要なバンドを切り出し、シーケンス解析を行った。DNA Data Bank of Japan (DDBJ; <http://www.ddbj.nig.ac.jp>)のデータベースの既知配列から相同性の高いものを検索し、細菌種を推定した。さらに、多重アライメントを行い、近隣結合法により系統樹を作成した。

4) クローンライブラリ法による細菌の多様性評価

大規模な黄砂現象が確認された2010年11月12日および2011年5月2日に日本上空(鳥取県北部の沿岸部: 高度1,000-2,000m)で採取した黄砂について、細菌の16S rRNA遺伝子の全長を

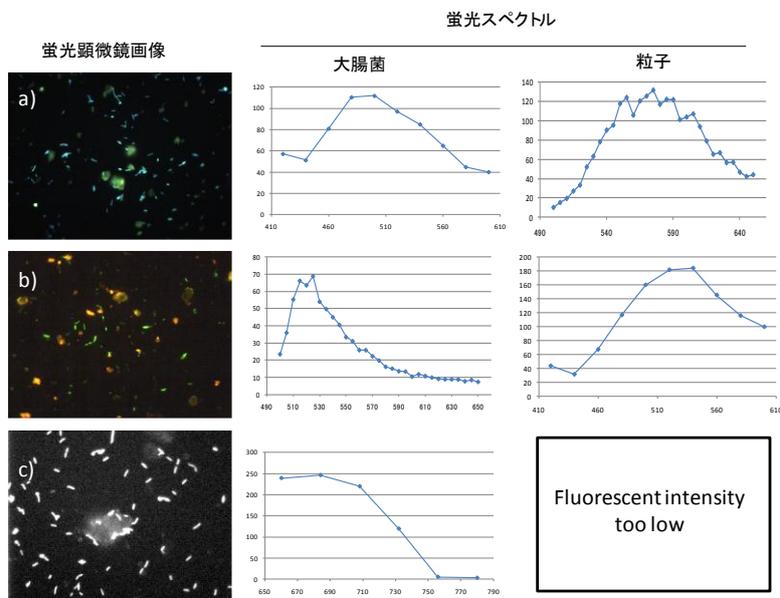
標的としたクローンライブラリを作成し、細菌群集構造を解析した。さらに、増殖活性をもつ細菌種についても明らかにするために、採取した黄砂粒子を2種の液体培地（標準培地、R2A培地）に接種した後、25°Cで振とう培養し、培地からDNAを抽出し、上述と同様の方法でクローンライブラリを作成し、細菌群集構造を解析した。

4. 結果及び考察

(1) 黄砂粒子上の微生物の定量のための分子微生物生態学的方法の最適化

1) 黄砂粒子に付着した微生物の可視化

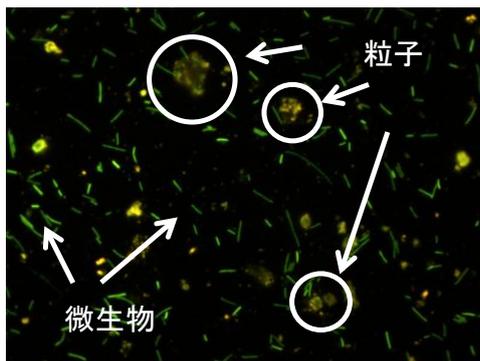
黄砂が微生物のキャリアーとなることを直接証明するためには、黄砂粒子に付着した微生物を可視化する必要がある。そこでレーザー顕微鏡を用いた新たなバイオイメージング法の検討を行った。日本上空で採取した黄砂粒子は5 μm 以下であることから、大きさで微生物と粒子を区別することが困難であり、また黄砂粒子は自家蛍光を発するため、通常の蛍光染色法のみでの検出は困難であった。そこで、微生物由来の蛍光波長と黄砂粒子由来の自家蛍光波長を詳細に解析した（図(1)-1）。核酸結合性染色剤で染色し、最適波長のレーザー光で励起した結果、UV励起光下では蛍光強度が強いものの、粒子と微生物の蛍光波長域が重なっており、区別は困難であった（図(1)-1a）。赤色励起光下では赤外域に蛍光波長をもつため目視はできないが、粒子の蛍光強度が弱く、細菌のみを検出可能であった（図(1)-1c）。一方、青色励起光下では、大腸菌は520 nm付近にピークがあるのに対し、粒子は550 nm以降になだらかなピークをもつことがわかった（図(1)-1b）。これらの結果より、染色剤の選択と顕微分光の最適化を行うことにより、粒子上に付着した微生物を蛍光波長の違いから粒子と区別できる可能性があることがわかった。



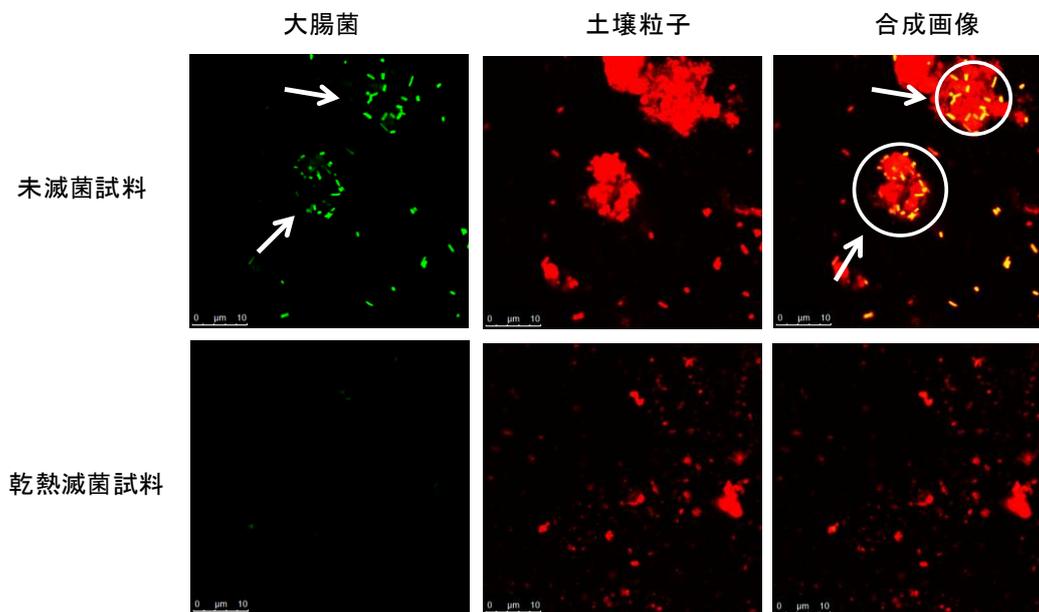
図(1)-1. 蛍光染色した大腸菌および黄砂発生源土壌粒子の蛍光顕微鏡画像および蛍光波長
a) UV励起光、b) 青色励起光、c) 赤色励起光

この結果をもとに、土壌粒子に大腸菌を添加した試料を用いて、レーザー顕微鏡を用いた顕微分光法による細菌の可視化のための条件を決定した。各波長域の蛍光を検出することにより、微生物、粒子それぞれの蛍光画像を取得し、さらにその画像を合成することにより、粒子に付着した細菌を可視化できることがわかった（図(1)-2b）。さらに、試料を乾熱滅菌処理することにより、微生物由来の蛍光のみが消失していることから（図(1)-2b）、黄砂粒子上の微生物の新たなバイオイメージング法として確立した。

a) 蛍光顕微鏡画像



b) レーザー顕微鏡画像

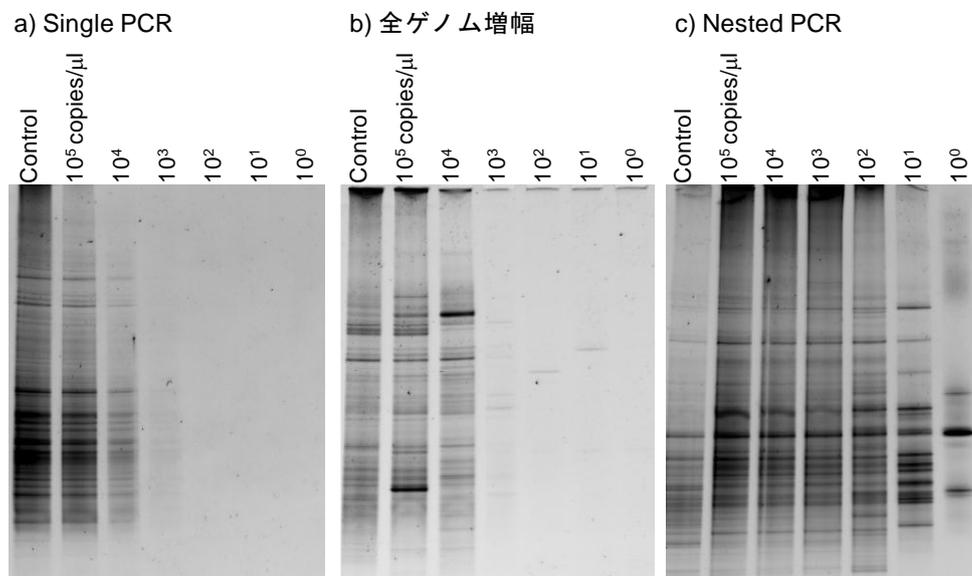


図(1)-2. 蛍光顕微鏡およびレーザー顕微鏡による黄砂発生源の土壌粒子に添加した大腸菌の検出

2) 微量試料からの細菌DNA増幅法

微量試料における細菌群集構造解析を行うために、全ゲノム増幅およびNested PCR法を検討し、DGGE法により評価した(図(1)-3)。その結果、通常のSingle PCRでは、 10^4 copies/ μ lまでバンドを確認できた(図(1)-3a)。全ゲノム増幅では 10^3 copies/ μ l以下ではそのバンドパターンは大きく異なり、 10^4 copies/ μ lが再現性をもった結果を得られる限界であった(図(1)-3b)。一方、Nested PCR法では 10^2 copies/ μ lまでcontrolと類似したバンドパターンが確認でき、さらに、 10^1 copies/ μ l以下の濃度においても、パターンは異なるもののバンドが確認できた(図(1)-3c)。したがって、Nested PCR法を用いることにより、 10^2 copies/ μ lまで検出限界を下げることを可能にした。また、 10^1 copies/ μ lの濃度であってもバンドが確認できることから、そのバンドを切り出し、シーケンス解析を行うことにより、試料中に存在した細菌種を推定することが可能となる。また、本手法を用いるにあたっては、PCRの際に使用する酵素由来の細菌DNAが増幅することがあるため、8-methoxypsoralenを使用し、その増幅を抑制することが重要であることもわかった。

過去の我々の研究から、黄砂試料から抽出した細菌DNA濃度は 10^3 – 10^4 copies/ μ lと推定されることから、本手法を用いることで、信頼性の高い結果を得ることができると考えられた。また、細菌群集構造解析において、DGGE法はそのバンドパターンを同一ゲル間でしか比較できないものの、特徴的なバンドを切りだしてシーケンスを行うことにより、その属種を推定できるという利点があるため、その検出感度を向上できた意義は大きい。



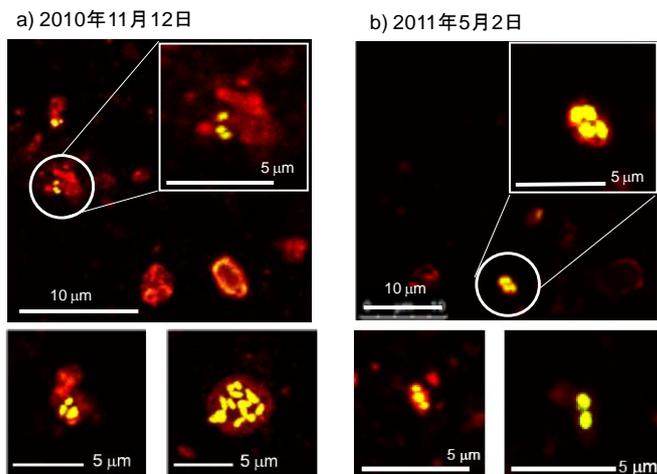
図(1)-3. 16S rRNA遺伝子を標的とした各遺伝子増幅法の検討

a) 通常の解析方法、b) 全ゲノム増幅法、c) Nested PCR法。

10^6 copies/ μ lのDNAを通常の方法で解析した結果をControlとし、DGGE解析のバンドパターンにより増幅効率を評価した。

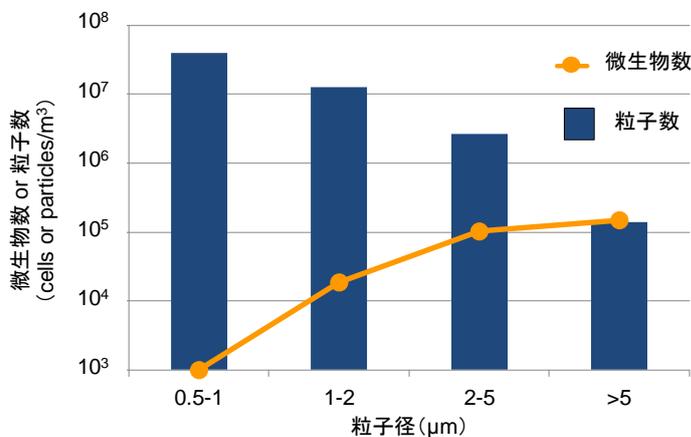
(2) 日本上空で採取した黄砂粒子上の微生物の可視化、細菌現存量の測定および多様性評価
 1) 黄砂現象とともに日本へ飛来した黄砂粒子上の微生物の可視化

大規模な黄砂現象が確認された2010年11月12日および5月2日に日本上空（鳥取県北部の沿岸部：高度1,000–2,000m）で採取した黄砂粒子に付着した微生物について、(1)-1)で開発した手法を用いて可視化を行った結果、黄砂粒子上に微生物が付着していることが確認できた（図(1)-4）。地上からの影響を極力さげ、上空において採取した黄砂粒子上の微生物を可視化したことにより、黄砂現象にともなって微生物が日本へ飛来していることを直接的に証明した。



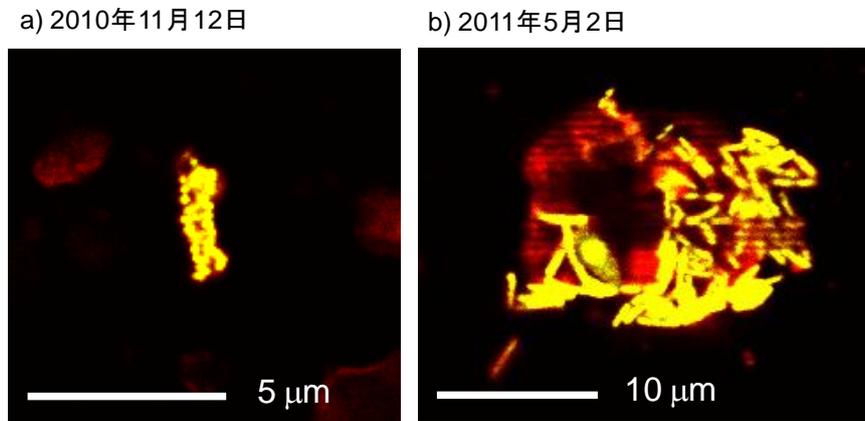
図(1)-4. 日本上空で採取した黄砂粒子に付着した微生物の可視化
 a)、 b) の両日ともに大規模な黄砂現象が確認された。

また、約2,000–8,000 個の黄砂粒子を観察した結果、微生物が付着している粒子は粒径5–10 μmの比較的大きな粒子であり、一つの粒子に複数の微生物が付着していることがわかった。さらに、黄砂粒子の粒度分布と粒子径ごとの微生物数を図(1)-5に示した。大規模な黄砂現象が確認された2010年11月12日には、粒子径の大きな粒子が比較的多く、付着していた微生物も粒子径が大きな粒子ほど増加し、粒径5 μm以上の粒子で特に多い傾向があった。



図(1)-5. 黄砂粒子の粒度分布と各粒子画分の黄砂粒子に付着していた微生物数
 黄砂粒子上の微生物数は、レーザー顕微鏡を用いて200視野（2,000–8,000粒子）を観察し、微生物数を計数するとともに、微生物が付着していた粒子径を測定し、算出した。

さらに、マイクロコロニー法により、微生物が黄砂粒子上で増殖することを確認した（図(1)-6）。このことは、黄砂粒子に付着した微生物が増殖活性をもっていることを示すものであり、黄砂現象とともに「生きている」状態で微生物が飛来していることを明らかにした。



図(1)-6. 日本上空で採取した黄砂粒子上で増殖し、マイクロコロニーを形成した微生物
黄砂粒子をフィルター上に捕集し、寒天培地上で培養した後、レーザー顕微鏡を用いて観察した。

以上の結果より、黄砂粒子は微生物のキャリアーとなり、微生物が黄砂現象とともに日本へ飛来していること、また増殖活性をもつ微生物も飛来していることを直接的に証明した。

2) 黄砂現象とともに日本へ飛来した細菌の現存量測定

前述の(2)-1)ように、黄砂粒子上の微生物を可視化することにより、黄砂現象とともに微生物が飛来していることが明らかになった。飛来する微生物の環境や健康への影響を明らかにするためには、その細菌現存量に関する定量的データが必要となる。そこで、細菌の16S rRNA遺伝子を標的とした定量的リアルタイムPCR法により細菌現存量を測定した。

2010年3月から2010年11月においては、兵庫県南部の沿岸部（高度1,000–2,000m）において試料採取を行った（表(1)-1a）。黄砂飛来が観測された2010年3月21日に 4×10^3 cells/m³が検出されたのをはじめ、黄砂観測時には約 10^3 cells/m³の細菌が存在することがわかった。また、非黄砂時期である6月から9月においても、大気中には 10^2 – 10^4 cells/m³の細菌が存在することが明らかになった。

一方、2010年11月には、本研究期間において最大規模の黄砂現象が確認されたことから、これまでの兵庫県南部の海上に加え、鳥取県北部の海上においても試料採取を行った。さらに、黄砂飛来前の11日から、黄砂飛来時の12日、徐々に拡散していく13日、降雨により完全に黄砂現象が終息した16日まで連続的に試料採取を行った。11月12日の日本上空における大気中の細菌現存量は 10^4 cells/m³であり、これまでで最も多い細菌が検出された（表(1)-1b）。

その後、黄砂の拡散とともに細菌数は検出限界以下まで低下していることから、黄砂現象とともに細菌が飛来し、その現存量が変化していることが示された。また、2011年5月2日に観測された大規模な黄砂飛来時においても、 7×10^4 cells/m³の細菌が検出されており、黄砂飛来時には大気中の細菌現存量が増加し、最大で 10^4 cells/m³であることがわかった（表(1)-1c）。この値は、一般的な土壌と比較しても非常に微量であることがわかった。一方で、従来の培養法ではほとんど細菌が検出できなかったことから（data not shown）、培養に依存しない手法による解析の重要性も明らかになった。

a) 2010年3月～11月

採取地点	採取日	黄砂	採取高度 (m)	細菌数 (cells/m ³)
兵庫県	20 Mar.	+	1,800	$< 3 \times 10^3$
南部	21 Mar.	+	1,500	4×10^3
	22 Mar.	+	1,800	$< 6 \times 10^3$
	26 Mar.	+	1,500	8×10^3
	28 Apr.	+	1,500	5×10^2
	29 Apr.	+	1,500	2×10^3
	22 May	-	1,500	7×10^3
	24 Jun.	-	1,500	5×10^4
	23 Jul.	-	1,500	4×10^4
	19 Aug.	-	1,800	$< 3 \times 10^3$
	28 Sep.	-	1,800	2×10^3
	05 Nov.	-	1,800	$< 5 \times 10^2$

b) 2010年11月

採取地点	採取日	黄砂	採取高度 (m)	細菌数 (cells/m ³)
兵庫県	11 Nov.	-	1,500	$< 3 \times 10^2$
南部	12 Nov.	++	900	1×10^4
	13 Nov.	+	750	$< 8 \times 10^2$
	16 Nov.	-	900	$< 2 \times 10^2$
鳥取県	12 Nov.	++	900	4×10^4
北部	13 Nov.	+	750	2×10^4
	16 Nov.	-	900	$< 4 \times 10^2$

表(1)-1. 日本上空で採取した黄砂中に存在する細菌の現存量

後述(2)-4)のクローンライブラリの結果をもとに、細菌あたりの16S rRNA遺伝子のコピー数を4コピーとして細菌数を算出した。

c) 2011年4月～5月

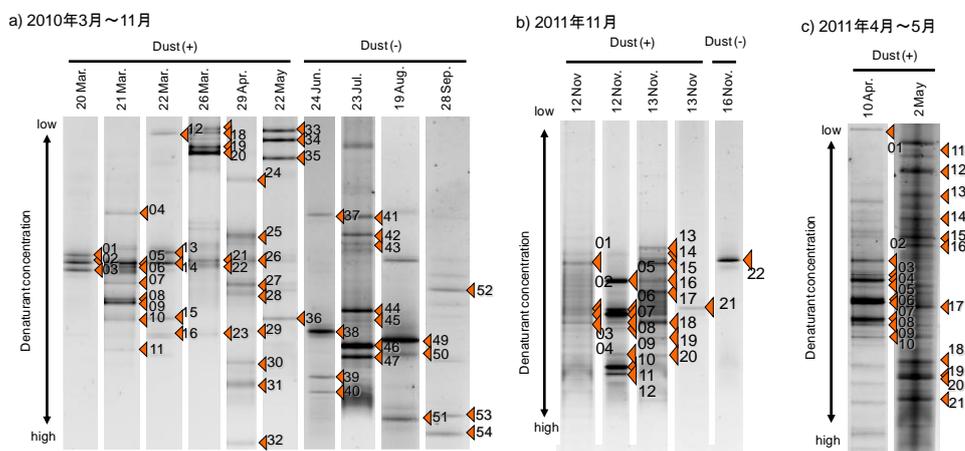
採取地点	採取日	黄砂	採取高度 (m)	細菌数 (cells/m ³)
	10 April	+	900	9×10^3
	02 May	++	900	7×10^4

以上の結果より、黄砂現象とともに飛来する細菌の環境・健康への影響を評価する上で不可欠である細菌数に関する定量的な情報を得ることができた。また、黄砂飛来時を中心として非黄砂時も含めて合計23回にわたる測定を行ったこと、さらに、黄砂飛来前から終息までの細菌数の変化を捉えることができ、黄砂現象にともなう大気中の細菌の動態に関する基盤的情報を得ることができた。

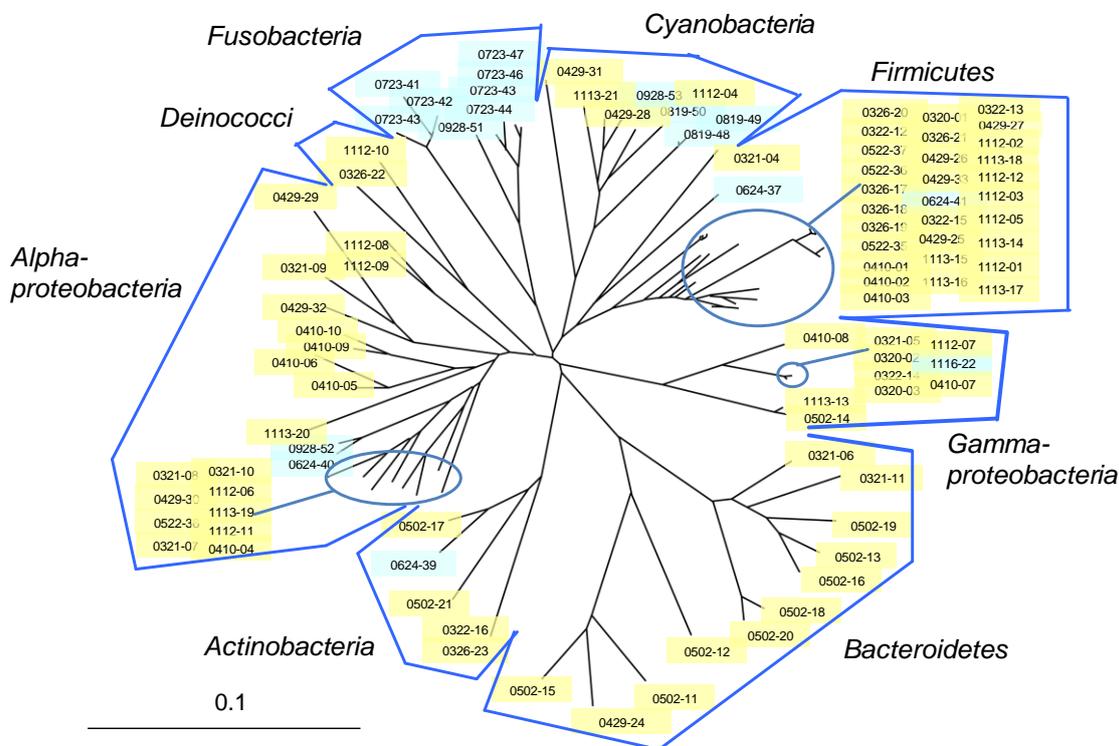
3) PCR-DGGE法による細菌の多様性評価

黄砂に付着した細菌数は前述(2)-2)の結果からも微量であることが明らかである。そこで、前述(1)-2)で最適化したNested PCR法およびPCR-DGGE法を用いて、黄砂とともに飛来する細菌種を推定した。まず、日本上空（鳥取県北部および兵庫県南部の沿岸部：高度1,000–2,000 m）で採取した黄砂試料から直接DNAを抽出し、PCR-DGGE法で解析した結果、黄砂試料中には多様な種の細菌が存在していることがわかった（図(1)-7）。さらに、特徴的なバンド（オレンジで示すバンド）を切り出し、シーケンスを行い、細菌種を推定するとともに、系統解析を行った（図(1)-8）。その結果、黄砂中には*Firmicutes*、*Bacteroidetes*、*Alphaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Actinobacteria*、*Cyanobacteria*に属する多様な細菌が存在することが推

定され、黄砂現象にともなって多様な種の細菌が飛来していることを明らかにした。また、これまでに報告のある *Firmicutes*、*Actinobacteria* といったグラム陽性菌だけでなく、本研究では *Bacteroidetes*、*Alphaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria* などのグラム陰性菌も検出され、比較的多くの系統学的クラスターが形成されていることが明らかになった。



図(1)-7. 日本上空で採取した黄砂中に存在する細菌のDGGEプロファイル
オレンジ色で示すバンドを切りだし、シーケンス解析を行った。

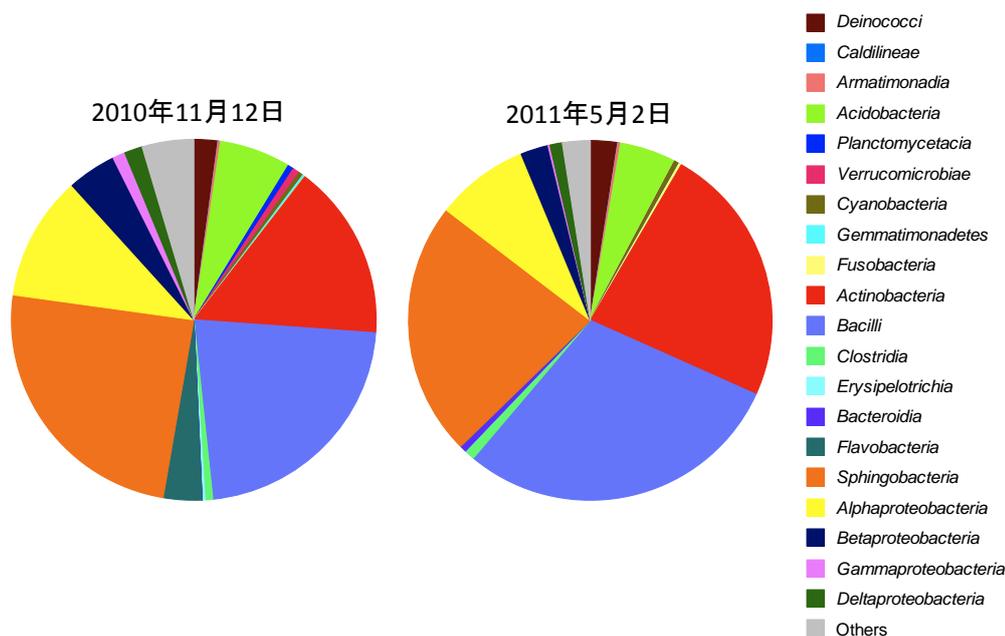


図(1)-8. 日本上空で採取した黄砂中に存在する細菌の系統解析
図(1)-7のオレンジ色で示すバンドを切りだし、シーケンスを行い、系統樹を作成した。
黄色が黄砂飛来時、青色が非黄砂時を示す。

4) クローンライブラリ法による細菌の多様性評価

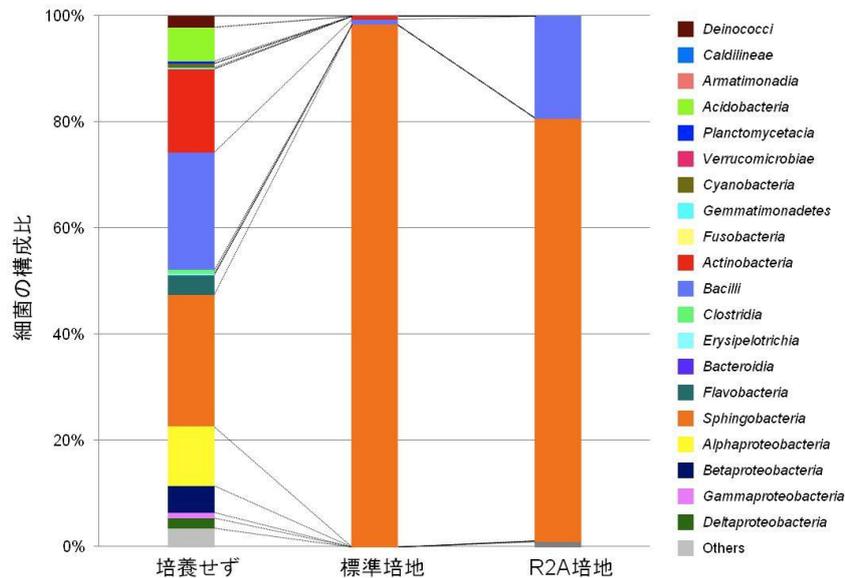
前述(2)-3)でのPCR-DGGE法による群集構造解析は、Nested PCR法を併用することで、微量な試料からの検出を可能にしている一方で、定量的な結果を得ることができない。一方で、クローンライブラリ法は、定量的な群集構造解析が可能で、多量のDNAが必要となる。

本研究期間においては、大規模な黄砂現象が観測された2010年11月12日および2011年5月2日の試料においてのみ、クローンライブラリ法に十分なDNA量を得ることができたことから、その解析を行った。黄砂試料から直接DNAを抽出し、細菌の16S rRNA遺伝子の全長を標的としてクローンライブラリを作成した。各480クローンの塩基配列を解析した結果、黄砂とともに飛来する細菌は、従来報告されていた以上に系統的に多様であることを明らかにした(図(1)-9)。また、重篤な病原性が報告されている種の細菌は検出されず、土壌など一般的な環境中での存在が報告されている細菌がほとんどであった。従来の報告では、*Bacillus*属の細菌が多く検出されており、芽胞を形成することによる環境ストレス耐性に起因すると考えられていた。しかし本研究では、*Bacillus*属の細菌も多く存在するものの、*Actinobacteria*、*Sphingobacteria*、*Alphaproteobacteria*が高い割合で存在することがわかった。また、構成比率は少ないものの、*Gammaproteobacteria*や*Betaproteobacteria*なども存在することが明らかになった。さらに、異なる黄砂イベントであっても、構成比率は変わるものの、多様な細菌が存在することが明らかになった。



図(1)-9. 日本上空で採取した黄砂中に存在する細菌の多様性
黄砂試料から直接DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子の全長を標的として、各480クローンについて解析した。両日ともに大規模な黄砂現象が観測された。

一方、黄砂試料を標準培地およびR2A培地で培養した場合についても同様に各480クローンについて塩基配列を解析した結果、細菌群集構造は大きく変化し、一部の種の細菌が優占し、さらに培地の種類によっても異なることが明らかになった（図(1)-10）。この結果は、これらの種の細菌が増殖活性をもっていることを示すとともに、培養法のみでは偏った結果を導く可能性があることを示している。



図(1)-10. 培養にともなう細菌群集構造の変化

黄砂試料を液体培地で培養した後、DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子の全長を標的として、各480クローンについて解析した。

本サブテーマにより、黄砂粒子は微生物のキャリアーとなることを直接的に証明するとともに、黄砂現象とともに日本へ飛来する細菌の現存量を明らかにした。さらに、その属種についても明らかにするとともに、黄砂現象とともに日本へ飛来する細菌について約2,000クローンのデータベースを構築した（表(1)-2：巻末に記載）。なお、本データベースは公開する予定である。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

黄砂やサハラダストなどの風送ダストは地球規模での環境問題となっている。本サブテーマでは、日本上空において直接採取した黄砂粒子上に細菌が付着していること証明するとともに、その現存量に関する情報を得ることができた。また、従来報告されていた以上に多様な種の細菌が飛来しており、増殖活性をもった細菌も飛来していることを明らかにした。今回得られた成果は黄砂現象にともなう地球規模での微生物移動および環境・健康への影響を評価するうえで、基盤的なデータとなる。

また、本サブテーマで検討し、最適化した「微量試料からのDNA増幅法」や「固体表面の細菌の可視化法」は、環境微生物学分野のみならず、微生物検査や品質管理など、環境中の細菌を対象とする様々な分野で応用が可能である。

(2) 環境政策への貢献

地上からの影響を受けることなく日本上空で捕集した黄砂に付着した細菌の現存量およびその属種に関する定量的データは、黄砂そのものの環境・健康への影響を明らかにするうえで必須のデータであり、これらの基盤的データをもとにして、黄砂に対する国際的な議論が可能となる。また、多種多様な細菌が風送ダストにより移動しているという事実は、COP10等で論議されている微生物遺伝子の資源としての妥当性を考えるうえでも重要な知見である。

6. 国際共同研究等の状況

中国農業大学・李品芳教授（中国）に研究協力を依頼し、黄砂発源地域での試料採取にあたっては同行いただき、コーディネーションならびに現地での情報収集等に協力いただいている。2010年6月には馬場が中国・黄土高原において試料採取を行う際にも同行をいただき、現地での土壌採取を行うとともに、中国における黄砂発生の現状や土地利用、農業形態に関する情報を提供いただいた。また、2011年7月には山口・馬場が中国・ゴビ沙漠で試料採取を行う際にも同行いただくとともに、内蒙古自治区の水利土木局への協力要請などのコーディネーションにも協力いただくなど、密接な関係を築いている。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) N.Yamaguchi, A. Sakotani, T. Ichijo, T. Kenzaka, K. Tani, T. Baba and M. Nasu: Biological and Pharmaceutical Bulletin, 35, 1187-1190 (2012)
“Break down of Asian dust particle on wet surface and their possibilities of cause of respiratory health effects”
- 2) N. Yamaguchi, T. Ichijo, A. Sakotani, T. Baba and M. Nasu: Sci. Rep. (in press)
“Global dispersion of bacterial cells on Asian dust”

<その他誌上発表（依頼原稿）>

- 1) 山口進康、那須正夫：ファルマシア, 46, 659-663 (2010)
「地球を巡る微生物－健康な生活を保証する－」
- 2) 山口進康：化学療法の領域, 26, 2434-2444 (2010)
「環境微生物検出技術のイノベーション」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 馬場貴志、一條知昭、天野翔子、山口進康、那須正夫: フォーラム2009 衛生薬学・環境トキシコロジー(2009)
「黄砂現象にともなう細菌の長距離移動」
- 2) 馬場貴志: 第4回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2010)
「黄砂現象により移動する細菌の現存量」
- 3) 馬場貴志、一條知昭、天野翔子、山口進康、那須正夫: 第83回日本細菌学会総会(2010)
「黄砂現象にともなう細菌の長距離移動」
- 4) 馬場貴志、天野翔子、一條知昭、山口進康、那須正夫: 日本薬学会第130年会 (2010)
「黄砂現象にともなう細菌の長距離移動」
- 5) T. Baba, T. Ichijo, S. Amano, N. Yamaguchi and M. Nasu: 13th International Symposium on Microbial Ecology, Seattle, USA, 2010
“Estimation of abundance of bacteria on Asian dust by quantitative PCR”
- 6) 馬場貴志、一條知昭、更家信、榎木香奈美、山口進康、那須正夫: 第26回日本微生物生態学会 (2010)
「黄砂現象とともに移動する細菌の多様性」
- 7) N. Yamaguchi, T. Ichijo, Y. Himezawa, K. Enoki, M. Saraya, T. Baba and M. Nasu: The 4th International Symposium on Environment of Rim of the Japan/East Sea, Jeju-do, Korea, 2010
“Abundance and population structure of bacteria on Asian dust determined by PCR-based approaches”
- 8) 馬場貴志、姫澤由佳、一條知昭、山口進康、那須正夫: 日本薬学会第131年会 (2011)
「レーザー顕微鏡を用いた黄砂粒子に付着している微生物の可視化」
- 9) 馬場貴志、更家信、一條知昭、山口進康、那須正夫: 日本薬学会第131年会 (2011)
「黄砂現象に伴って移動する細菌の多様性」
- 10) 馬場貴志、榎木香奈実、一條知昭、山口進康、那須正夫: 日本薬学会第131年会 (2011)
「増殖活性にもとづいた黄砂現象に伴って移動する細菌の系統解析」
- 11) 馬場貴志、更家信、榎木香奈実、山口進康、那須正夫: 第27回日本微生物生態学会 (2011)
「黄砂現象に伴い移動する細菌の系統解析」
- 12) 馬場貴志、姫澤由佳、一條知昭、山口進康、那須正夫: 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2011)
「黄砂現象とともに飛来する微生物の可視化」
- 13) 馬場貴志、榎木香奈実、更家信、一條知昭、山口進康、那須正夫: 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会 (2011)
「黄砂現象に伴い移動する細菌の多様性」
- 14) 馬場貴志、姫澤由佳、一條知昭、山口進康、那須正夫: フォーラム2011 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011)
「黄砂現象とともに飛来する微生物の可視化」

- 15) 山口進康、馬場貴志、榎木香奈実、更家信、一條知昭、那須正夫：フォーラム2011 衛生薬学・環境トキシコロジー（2011）
「黄砂現象に伴い移動する細菌の多様性」
- 16) N. Yamaguchi, T. Ichijo, A. Sakotani, T. Baba and M. Nasu: 112th American Society for Microbiology General Meeting, San Francisco, USA, 2012
“Global dispersion of bacterial cells on Asian dust”（アブストラクト提出済）

（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4回大気バイオエアロゾルシンポジウム（金沢大学との共催）（2010年3月14日、名古屋市ポートビル、参加者約40名）
- 2) 黄砂現象の環境・健康影響 —微生物および化学物質の長距離移動—（総合地球環境学研究所、金沢大学との共催）（2011年4月15日、総合地球環境学研究所 セミナー室1・2、参加者約30名）
- 3) Health and Environment: environmental problem and infection diseases（2012年3月19日、大阪大学 特別講義室、参加者約30名）

（5）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

（6）その他

- 1) 第61回日本薬学会近畿支部総会・大会（2011）ポスター賞
「黄砂現象とともに飛来する微生物の可視化」
馬場貴志、姫澤由佳、一條知昭、山口進康、那須正夫
- 2) 112th American Society for Microbiology General Meeting (2012) ハイライトに選出
“Global dispersion of bacterial cells on Asian dust”
N. Yamaguchi, T. Ichijo, A. Sakotani, T. Baba and M. Nasu

8. 引用文献

- 1) 長崎県環境保健研究センター資料
<http://www.pref.nagasaki.jp/eiken/taiki/kousa.html>
- 2) 西川雅高 他：天気, 38, 221-228, 1991.
「黄砂エアロゾルの降下量分布」
- 3) 山口進康, 那須正夫：日本細菌学雑誌, 61, 251-260, 2006.
「蛍光染色による細菌の可視化と迅速・高精度検出」

- 4) T. Iwamoto et al.: FEMS Microbiol. Ecol., 32, 129-141, 2000.
“Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE”
- 5) R.I. Amann, W. Ludwig and K-H. Schleifer: Microbiol. Rev., 143–169, 1995.
“Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation”
- 6) N. Yamaguchi and M. Nasu: J. Appl. Microbiol., 83, 43–52, 1997.
“Flow cytometric analysis of bacterial respiratory and enzymatic activity in the natural aquatic environment”
- 7) M. Kawai et al.: J. Appl. Microbiol., 86, 496-504, 1999.
“Rapid enumeration of physiologically active bacteria in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process”
- 8) T. Baba, R. Matsumoto, N. Yamaguchi and M. Nasu: Microbes Environ., 24, 163-167, 2009.
“Bacterial population dynamics in a reverse-osmosis water purification system determined by fluorescent staining and PCR-denaturing gradient gel electrophoresis”
- 9) T. Baba, N. Inoue, N. Yamaguchi and Nasu: Microbes Environ.
“Rapid enumeration of active *Legionella pneumophila* in freshwater environments by the microcolony method combined with direct fluorescent antibody staining” (in press)
- 10) M. Kawai et al.: Appl. Environ. Microbiol., 68, 699-704, 2002.
“16S ribosomal DNA-based analysis of bacterial diversity in purified water used in pharmaceutical manufacturing processes by PCR and denaturing gradient gel electrophoresis”
- 11) Y. Nishimura et al.: Microbes Environ., 25, 22-27, 2010.
“Similarity of bacterial community structure between Asian dust and its sources determined by rRNA gene-targeted approaches”

(2) 黄砂付着微生物の遺伝子生態学的解析

大阪大谷大学薬学部

谷 佳津治

<研究協力者>

大阪大谷大学薬学部

見坂 武彦

迫谷 有希子

平成21～23年度累計予算額：2,746千円

(うち、平成23年度予算額：863千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

黄砂現象の環境・健康リスクを考える上で、中国から黄砂とともに飛来する細菌の量やその属種を把握しておくことが重要である。しかしながら、タクラマカン沙漠、ゴビ沙漠、黄土高原といった黄砂発生源とされる乾燥地域における細菌群集に関する知見はほとんどない。そこで本サブテーマでは、中国の黄砂発生源に存在する細菌種について、16SリボソームRNA (rRNA) 遺伝子を標的としてクローンライブラリを作成し、その系統解析を行った。その結果、乾燥地域であっても、系統的に多様な細菌が存在することを明らかにした。優占種としては、*Actinobacteria*、*Bacilli*、*Sphingobacteria*、*Betaproteobacteria*に属する細菌であり、*Gammaproteobacteria*などヒトと密接なつながりを持つ細菌も存在することがわかった。さらに、中国・北京市へ飛来した黄砂中に存在する細菌も多種多様であったことから、サブテーマ(1)の結果：「日本へ飛来する細菌種の多様性」を裏付けるデータを得ることができた。中国国内においては、日本と比較して黄砂の規模が大きいことから、黄砂現象の環境・生態系への影響はより顕著であると考えられ、日本における黄砂の影響を比較・評価する上で重要な知見を得た。

[キーワード] 黄砂、黄砂発生源、中国・北京、細菌群集構造、系統解析

1. はじめに

黄砂は中国やモンゴルの乾燥・半乾燥地域を発生源として、中国国内のみならず、韓国や日本など東アジアの広範な地域へ飛来しており、日本へ到達する総量は年間100万トン以上¹⁾、多い年には200万から300万トンにおよぶとされている²⁾。黄砂現象の環境や生態系、あるいは健康への影響を明らかにするためには、黄砂発生源に存在する細菌種に関する情報が不可欠である。過去の研究において、我々の研究グループは、黄砂発生源の一つである黄土高原の土壌中には、多様な細菌種が存在することを明らかにしている³⁾。また、中国・北京市に飛来した黄砂中の細菌群集構造と発生源土壌の細菌群集構造との比較解析を行っている⁴⁾。しかしながら、その他に、黄砂発生源とされるタクラマカン沙漠、ゴビ沙漠、黄土高原などに存在する微生物に関する知見はほとんどない。黄砂の環境・健康への影響を考える上で、発生源土壌に存在する細菌種に関する情報が必須であり、さらに、黄砂の飛来について、発生源から日本へいたる経路において、その細菌現存量や細菌種に関するデータを蓄積し、黄砂現象を連続的な事象として捉える必要がある。

2. 研究開発目的

細菌の長距離移動による環境や健康への影響を明らかにするためには、黄砂発生源に存在する細菌種に関する情報が不可欠であるにもかかわらず、発生源は「沙漠」というイメージが定着しており、非常に特殊な極限環境であるという認識があることから、黄砂現象とともに乾燥耐性などの特徴をもつ種の細菌が飛来すると考えられている^{5),6)}。しかしながら、発生源における細菌群集については未知な部分が多い。また、黄砂が発生源から日本へいたる経路において、その中間に位置する中国・北京市においては、日本と比較して飛来する黄砂の量、頻度ともに高く、その影響を顕著に受けていると考えられることから、黄砂の環境や生態系、あるいは健康への影響を考察する上で重要な知見となると考えられるが、中国国内で採取した黄砂中の微生物に関する知見も非常に少ない。

そこで、本サブテーマでは、黄砂の健康・環境への影響を評価するための基盤的情報の蓄積を目的として、黄砂発生源であるタクラマカン沙漠、ゴビ沙漠、黄土高原に存在する細菌の16SリボソームRNA (rRNA) 遺伝子の配列を決定し、比較検討した。さらに、中国・北京市において、飛来した黄砂粒子を採取し、その細菌現存量や属種、さらに群集構造を明らかにした。

3. 研究開発方法

(1) 黄砂発生源土壌における細菌群集構造解析

大阪大学大学院薬学研究科のグループが採取したタクラマカン沙漠、ゴビ沙漠、黄土高原の各土壌から、Nishimuraらの方法⁴⁾にしたがって、直接DNAを抽出した。細菌の16S rRNA遺伝子の全長を標的として、各発生源について3地点から150クローン(合計450クローン)のクローンライブラリを作成し、細菌群集構造を解析した。

(2) 北京で採取した黄砂試料中の細菌の現存量測定および多様性解析

中国・北京市にある中国農業大学屋上に滅菌した黄砂採取装置を設置し、2010年3月から5月および2011年3月から5月に連続して毎日試料採取を行った。装置設置から24時間に自然降下した粒子を採取した。50 mg/24時間以上の採取量が得られた試料について、黄砂試料から直接DNAを抽出した。

1) 黄砂中の細菌現存量の測定

黄砂試料からNishimuraらの方法⁴⁾にしたがって、直接DNAを抽出した。細菌現存量の測定にあたっては、細菌の16S rRNA遺伝子のV6-V8領域を標的として定量的リアルタイムPCR法により細菌数を測定した。また、DNA抽出時に内部標準として既知量のルシフェラーゼ遺伝子を添加し、DNA抽出後に定量することにより、DNA回収率を算出した。

2) 黄砂中の細菌群集構造解析

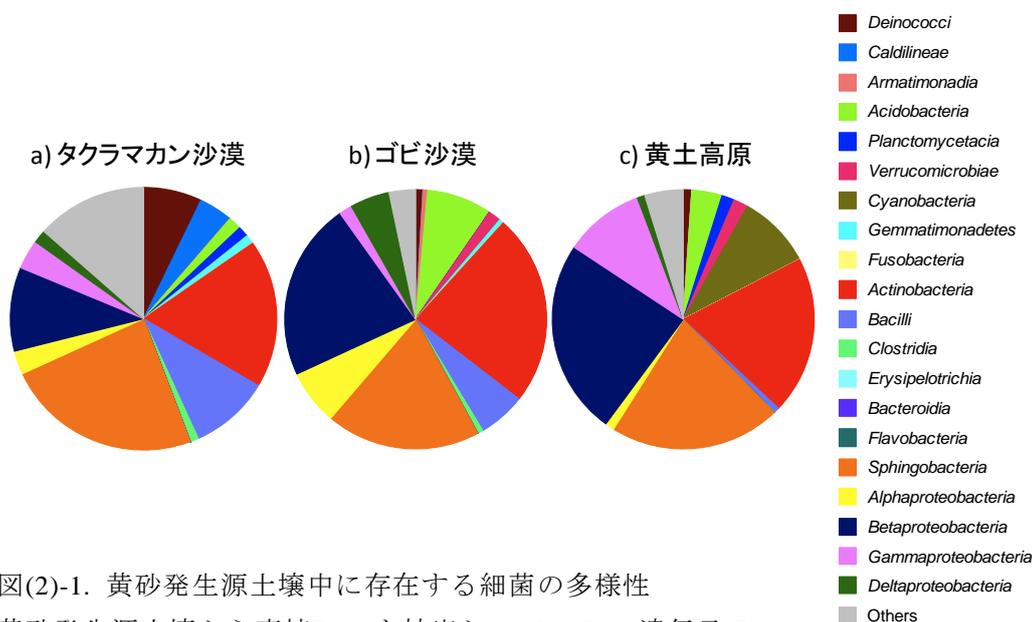
大規模な黄砂現象が確認され、黄砂採取量が最も多かった2010年3月20日の黄砂試料について、前述の(1)と同様の方法で150クローンのクローンライブラリを作成し、細菌群集構造を解析した。黄砂試料から直接抽出したDNAについて、サブテーマ(1)で最適化したPCR-DGGE法を用いて解析を行った。得られたDGGEプロファイルから、各試料に特徴的なバンドを切り出し、シーケンスにより塩基配列を決定した。データベースと比較することにより細菌種を推定した。さらに、16S rRNA遺伝子を標的としたT-RFLP (Terminal-Restriction Fragment Length polymorphism) 法⁴⁾により細菌群集構造解析を行った。標的遺伝子をPCRにより増幅した後、制限酵素*Msp* Iにより処理し、キャピラリー電気泳動を行い、得られたT-RFLPプロファイルについて比較検討を行った。

4. 結果及び考察

(1) 黄砂発生源土壌における細菌群集構造解析

黄砂発生源であるタクラマカン沙漠、ゴビ沙漠、黄土高原について合計450クローンのクローンライブラリを作成し、細菌群集構造を解析した結果、これらの土壌中には系統的に多様な細菌が存在することがわかった(図(2)-1)。タクラマカン沙漠では、*Actinobacteria*、*Bacilli*、*Sphingobacteria*、*Betaproteobacteria*に属する細菌の構成比率が高かった(図(2)-1a)。ゴビ沙漠においてはタクラマカン沙漠同様、*Actinobacteria*、*Bacilli*、*Sphingobacteria*、*Betaproteobacteria*に属する細菌の構成比率が高かった(図(2)-1b)。特に、*Betaproteobacteria*の構成比率が高くなっていた。一方、黄土高原においては、*Actinobacteria*、*Sphingobacteria*、*Betaproteobacteria*に加えて、*Gammaproteobacteria*の構成比率が高かった(図(2)-1c)。これらの結果から、乾燥地においても、多様な種の細菌が存在していることが明らかになった。また、特に黄土高原において*Gammaproteobacteria*などヒトや動物由来と考えられる種の細菌の構成比が他の土壌と比較して高くなっていた。これは、黄土高原が大農業地帯⁷⁾であり、堆肥等の投入が行われていることが要因の一つであると考えられた。広大な黄砂発生源のうち、各3地点のみの解析であるため、サブテーマ(1)での日本における細菌群集構造と比較検討す

るには限界があるが、日本に飛来する黄砂中の細菌群集構造が多様であることを裏付けるデータを得るとともに、ヒトや動物由来の細菌も飛来する可能性があることを明らかにした。



図(2)-1. 黄砂発生源土壌中に存在する細菌の多様性
黄砂発生源土壌から直接DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子の全長を標的として、各150クローンについて解析した。

(2) 中国・北京市で採取した黄砂試料中の細菌の現存量測定および多様性解析

1) 黄砂試料中の細菌の現存量測定

2010年3月から5月および2011年3月から5月に中国・北京市にある中国農業大学において、ほぼ毎日試料採取を行った。分析を行うにあたっては、信頼できる結果を得ることができる50 mg/24時間以上の採取量が得られた試料について、細菌現存量を測定した(表(2)-1)。その結果、もっとも黄砂採取量が多かった2010年3月20日には、黄砂1 g中に 10^9 cellsの細菌が存在していた。一方で、すべての試料において $10^8 - 10^9$ cell/gの細菌が存在しており、黄砂採取日あるいは採取量と細菌現存量との間に関連性は認められなかった。また、この細菌量は一般的な土壌と比較しても少ないことがわかった。

2010年3月～5月

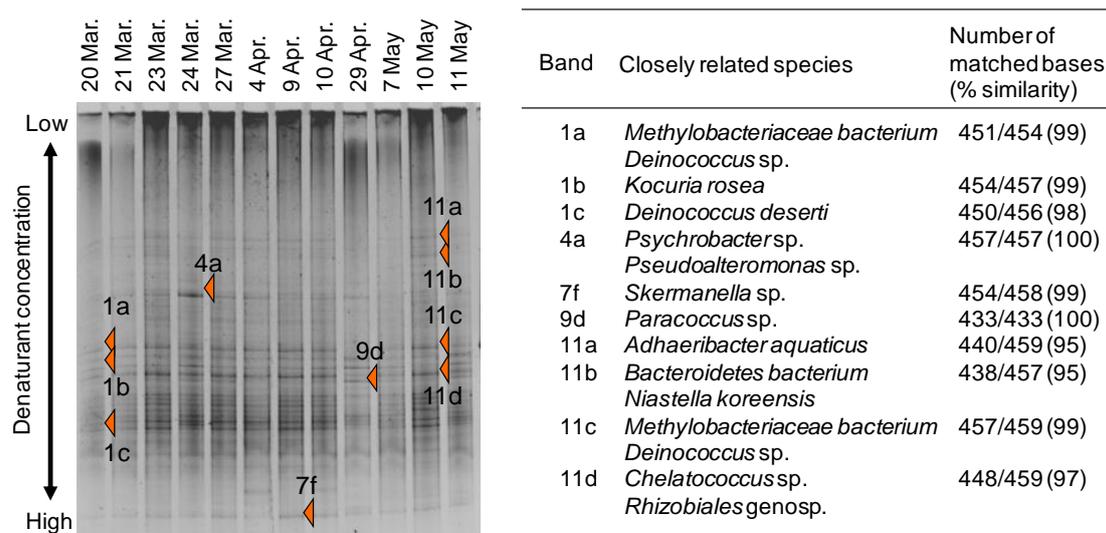
採取日	黄砂採取量 (mg)	細菌数 (cells/g)
20 Mar.	>5,000	3×10^9
21 Mar.	166	6×10^8
23 Mar.	203	3×10^9
24 Mar.	71	2×10^9
27 Mar.	100	2×10^9
4 April	55	1×10^9
9 April	80	1×10^9
10 April	92	4×10^8
7 May	65	2×10^8
10 May	1,129	3×10^9
11 May	70	6×10^8

表(2)-1. 中国・北京市で採取した黄砂中に存在する細菌現存量

中国農業大学屋上において、24時間で自然降下した粒子を採取した。後述(2)-2)のクローンライブラリの結果をもとに、細菌あたりの16S rRNA遺伝子のコピー数を4コピーとして細菌数を算出した。

2) 中国・北京市で採取した黄砂の細菌の多様性解析

細菌種の推定にあたっては、細菌の16S rRNA遺伝子を標的としたPCR-DGGE法により分析した。その結果、北京で採取した黄砂中のDGGEプロファイルはすべての試料において類似していることがわかった(図(2)-2)。検出されたバンドのうち、各試料に特徴的あるいは試料間で共通したバンド(オレンジ色で示したバンド)について切り出し、シーケンス解析を行い、細菌種を推定した。その結果、*Alphaproteobacteria*、*Gammaproteobacteria*、*Deinococcus*、*Bacteroidetes*、*Actinobacteria*に属する細菌種が推定された。

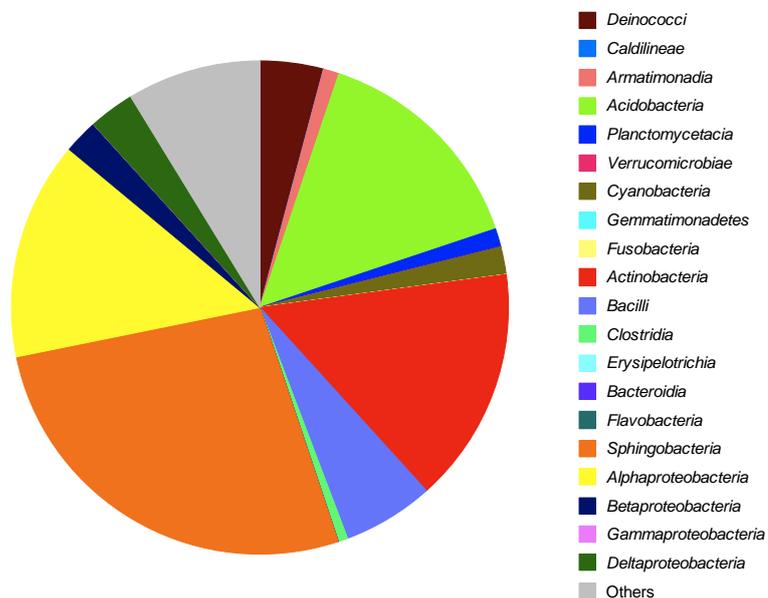


図(2)-2. 中国・北京市で採取した黄砂中に存在する細菌種の推定

さらに、2010年3月20日には、北京市において大規模な黄砂現象が確認され、採取できた黄砂試料の量も十分あったことから、前述(1)の発生源土壌と同様に、合計150クローンのクローンライブラリを作成し、より詳細に細菌群集構造を解析した。その結果、発生源土壌や日本上空で採取した黄砂中と同様に、多様な種の細菌が存在していることがわかった(図(2)-3)。構成比率の高い細菌種としては、*Acidobacteria*、*Actinobacteria*、*Bacilli*、*Sphingobacteria*、*Alphaproteobacteria*に属する細菌であった。

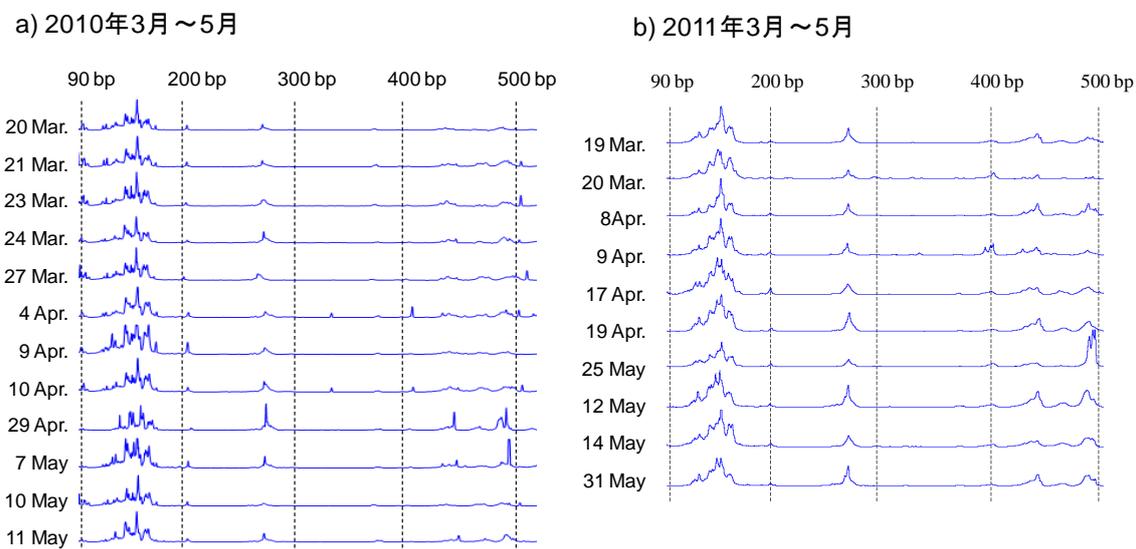
年次変動や地点間の細菌群集構造の比較解析にあたっては、再現性が高く、過去のデータとの比較が可能なT-RFLP法が有用である。そこで、T-RFLP法を用いて細菌群集構造を比較した結果、試料採取日に関わらず、細菌群集構造は類似していることがわかった(図(2)-4)。特に150 bpおよび275 bp付近にすべての試料に共通するピーク群が検出された。また、275 bpのピークは共通して検出されているものの、その強度は試料によって異なっていた。その一方で、450 bpから500 bp付近には試料に特徴的なピークが検出された。以上の結果より、黄砂試料中の細菌群集構造は類似しているものの、黄砂飛来状況により部分的に変動している可能性があることがわかった。さらに、2010年および2011年においても、そのT-RFLPプロファ

イルは類似していることがわかった。また、日本へ飛来した黄砂中の細菌群集についても T-RFLP法による解析を試みたが、DNA量が少なく、解析できなかった。



図(2)-3. 中国・北京市で採取した黄砂中に存在する細菌の多様性

中国・北京市において採取した黄砂試料から直接DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子の全長を標的として、150クローンについて解析した。



図(2)-4. 中国・北京市で採取した黄砂中の細菌群集構造のT-RFLPプロファイル

中国・北京市において採取した黄砂試料から直接DNAを抽出し、16S rRNA遺伝子を標的として解析した。

本サブテーマにおいて、黄砂発生源土壌に存在する細菌種を明らかにするとともに、中国・北京市に飛来した黄砂中の細菌現存量および細菌群集構造を明らかにし、中国国内における黄砂現象に関わる約600クローンの細菌データベースを構築した（表(2)-2：巻末に記載、サブテーマ(1)のデータと合わせて公開予定）。発生源土壌および北京に飛来した黄砂中にも多様な種の細菌が存在することが確認できたことから、日本へ飛来する細菌が多様であることが裏付けられた。また黄砂発生源においては、農業が盛んに行われている地域もあり、ヒトや動物由来の細菌が飛来する可能性があることもわかった。さらに、今後、T-RFLP法による解析データを蓄積していくことにより、年次変動を含めてより詳細な解析が可能になると考えられた。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

黄砂現象にとまなう細菌の移動を考察する上で、黄砂発生源に存在する細菌種に関する情報が必要不可欠である。また、黄砂発生源と日本の間に位置する中国・北京市では、黄砂飛来量が日本に比べて圧倒的に多く、黄砂粒子の環境・健康への影響を考察する上で重要な地点である。本サブテーマでは、黄砂発生源土壌における細菌群集について詳細に明らかにし、乾燥地域において、多様な細菌種が存在していることを明らかにした。また中国・北京市においても、黄砂現象とともに飛来する細菌の現存量およびその群集構造に関する定量的知見を得た。

(2) 環境政策への貢献

黄砂発生源に存在する細菌種を知ることが、黄砂飛来にとまなう細菌の長距離移動による環境や健康への影響を評価するうえで有用な知見となる。また、黄砂発生源と日本の間に位置し、黄砂飛来量およびその頻度も日本に比べて大きい北京市に飛来した黄砂に付着している微生物に関する情報は、国内に飛来する黄砂の環境や健康への影響を評価するうえで有用な知見となる。また、T-RFLP法のような再現性の高い、統一的な解析方法の必要性を提示することで、黄砂を含めた風送ダストの影響について、国際間での評価を進めるにあたっての基礎データを共有できると考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) N. Yamaguchi, A. Sakotani, T. Ichijo, T. Kenzaka, K. Tani, T. Baba and M. Nasu: Biological and Pharmaceutical Bulletin, 35, 1187-1190 (2012)
“Break down of Asian dust particle on wet surface and their possibilities of cause of respiratory health effects”
- 2) N. Yamaguchi, T. Ichijo, A. Sakotani, T. Baba and M. Nasu: Sci. Rep. (in press)
“Global dispersion of bacterial cells on Asian dust”

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 馬場貴志、一條知昭、見坂武彦、山口進康、那須 正夫: 第24回日本微生物生態学会（2009）
「黄砂現象にともなう細菌の長距離移動」
- 2) T. Baba, T. Ichijo, M. Saraya, K. Enoki, Y. Himezawa, A. Sakotani, N. Yamaguchi and M. Nasu: 111th IUMS, Sapporo, Japan, 2011
“Long distance movement of bacteria by Asian dust”
- 3) 馬場貴志、一條知昭、迫谷有希子、山口進康、那須正夫: 日本薬学会第132年会（2012）
「黄砂現象にともなう細菌の長距離移動」

(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）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) 長崎県環境保健研究センター資料
<http://www.pref.nagasaki.jp/eiken/taiki/kousa.html>
- 2) 西川雅高 他：天気, 38, 221-228, 1991.
「黄砂エアロゾルの降下量分布」
- 3) T. Kenzaka et al.: Microbes Environ. 25, 53-57, 2010.
“Soil microbial community structure in an Asian dust source region (Loess Plateau)”

- 4) Y. Nishimura et al.: *Microbes Environ.* 25, 22-27, 2010.
“Similarity of Bacterial Community Structure between Asian Dust and Its Sources Determined by rRNA Gene-Targeted Approaches”
- 5) W.L. Nicolson et al.: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* Sept. 2000, 548–572, 2000.
“Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments”
- 6) C.A. Kellogg and D.W. Griffin: *Trends Ecol. Evol.*, 21, 638-644, 2006.
“Aerobiology and the global transport of desert dust”
- 7) 李文華 他：環境綜合治理和農業区域協調發展戰略研究，農業生態問題與綜合治理，
中國農業出版社 362-363, 2008.
「中國區域農業資源合理配置」

(3) 黄砂の環境毒性学的解析

大阪大学大学院薬学研究科

堤 康央

<研究協力者>

大阪大学大学院薬学研究科

吉岡 靖雄

吉川 友章

平成21～23年度累計予算額：30,837千円

(うち、平成23年度予算額：9,553千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

古来より、黄砂は発生源である中国やモンゴルのみならず、日本や中国・韓国・台湾といった東アジアにおいても、毎年のように飛来が確認されており、黄砂による被害は、国境を越えた環境問題となっている。これまでの疫学調査により、黄砂の飛来時には、東アジアを中心とした各国で循環器疾患・呼吸器疾患の罹患率が上昇するといった健康被害が報告されており、炎症性免疫疾患の発症・悪化のリスクファクターの一つとして推定されている。しかし、黄砂による健康被害情報の多くは疫学調査に基づくものであり、黄砂の体内動態や詳細な免疫応答メカニズムなどに基づいた情報は未だに乏しい。黄砂の健康への影響を明らかにするためには、黄砂およびその主成分であるシリカ粒子の①物性解析、②体内・細胞内動態の検討（曝露機会や吸収性、蓄積性といった曝露実態の把握）、③免疫毒性の評価および病態発症・悪化との関連解明が必要不可欠となる。

本サブテーマでは、黄砂およびその成分の吸引曝露後の細胞内取込みや血中への移行性などを精査するとともに、アレルギー誘発への影響を評価することで、安全な健康環境の将来的な確保に資することを目指した。本研究の成果は、従来までの疫学調査に基づく黄砂の安全性懸念情報に科学的裏付けを付与し、黄砂に起因した疾患の予防・治療に重要な指針を提供するのみならず、地球環境保全に必須の基盤情報を国内外に提示するために有用と考えられる。

[キーワード] 黄砂、黄砂発生源土壌、健康影響、免疫毒性、サイトカイン、体内動態

1. はじめに

黄砂現象とは、東アジアの沙漠域（ゴビ沙漠、タクラマカン沙漠など）や黄土高原からの土壌粒子が強風により大気中に巻き上げられ、偏西風に乗って輸送されつつ降下する現象である。我が国においても昨今、アレルギー疾患等との関連性で注目されつつあるが、一方で推定ではあるものの、万葉集でも季語（春霞）として頻繁に歌われるなど、なじみ深い。このように、古来より、黄砂は発生源である中国やモンゴルのみならず、日本や中国・韓国・台湾といった東アジアにおいても飛来が確認されており、黄砂による被害は、まさに国境と時間、即ち、時空を超えた環境問題となっている。欧米においても、サハラ砂漠を由来として同様の現象が見られ、黄砂をはじめとする風送ダストに対する関心は世界規模で高まっている。日本では黄砂の飛来が年間を通して確認されており、特に2月から増加し始め、4月にピークを迎える。日本に飛来する黄砂は、サブミクロンサイズ以上の微粒子シリカを主成分とし、リポポリサッカライド（LPS）・ β -グルカンなどの菌体成分や空気中の有害化学物質などから構成されており、最近では、細菌までもが黄砂に付着している可能性が示唆されている。このような黄砂現象による被害は、樹木の倒壊、農作物の被害や視界不良による航空機の欠航などといった物理的・経済的被害のみならず、ヒト健康に対する被害も大きな問題となってきた。既に疫学調査により、黄砂の飛来時には、東アジアを中心とした各国で循環器疾患・呼吸器疾患の罹患率/死亡率が上昇するといった健康被害が報告されている^{1), 2)}。例えば韓国では、黄砂が特に深刻な日の呼吸器疾患死亡率が36.5%、65歳以上の死亡率が2.2%増加したという報告がなされている³⁾。日本においても、小児喘息の発症と黄砂の飛来の間に強い関連が証明され、黄砂が各種呼吸器疾患の発症やアレルギー疾患と密接に関与していることが強く疑われているなど、吸気暴露により、抗原特異的あるいは非特異的な免疫応答を過剰に惹起し、アレルギー疾患を誘発するものと考えられている⁴⁾。しかし、黄砂による健康被害情報の多くは疫学調査に基づくものであり、黄砂の体内動態や詳細な免疫応答メカニズムなどに基づいた情報は未だに乏しいのが現状である。例えば、黄砂の体内吸収性など体内動態に関する情報すら世界的にも非常に乏しく、情報が不明瞭な状態のまま、ヒト健康に対する懸念のみが闇雲かつ漠然と高まっている状況である。黄砂は、国境を超える環境問題であることから、国際活動に支障をきたすことなく、ヒト健康への影響を最大限に考慮しつつ、規制を実施することが必要不可欠である。そのためには我が国も、十分な疫学調査と共に、黄砂の生体影響を科学的に解明し、早急にその対策を講じなければならない。

2. 研究開発目的

黄砂のヒト健康への影響を追求するためには、①黄砂およびその成分の物性解析、②黄砂およびその成分の体内・細胞内動態（トキシコキネティクス）の検討（曝露機会や吸収性、蓄積性といった曝露実態の把握）、③免疫毒性の評価と病態発症・悪化との連関解明が必要不可欠となるものの、これまでのところ、①・②・③の連関を詳細に追求した例は殆ど無い。そこで本研究では、黄砂を「微小粒子」として捉え、黄砂およびその主成分であるシリカ粒子の吸引曝露後の細胞内取り込みや血中への移行性などを精査するとともに、アレルギー疾患誘発への影響を評価することで、将来的に、安全な健康環境の確保

に寄与しようとするものである。本研究の成果は、従来までの疫学調査に基づく黄砂の安全性懸念情報に科学的裏付けを付与し、科学的根拠のない情報による黄砂現象に対する社会不安を取り除くとともに、黄砂アレルギーや花粉症などの発症・悪化メカニズムの解明と、その予防・治療に重要な基盤情報を提供することで国民の健康確保に寄与すると考えられる。

3. 研究開発方法

(1) 黄砂モデル粒子であるシリカ粒子の起炎性評価

1) 細胞およびシリカ粒子

ヒトマクロファージ細胞株THP-1細胞は、10% ウシ胎仔血清、2 mM L-グルタミン含有RPMI1640を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で培養した。マウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞は、10%ウシ胎仔血清含有DMEMを用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で培養した。黄砂のモデル粒子として、粒子径1 μmの非晶質シリカ粒子を用いた。

2) 透過型電子顕微鏡によるシリカ粒子の細胞内取り込みの確認

Lab-Tek II Chambered Coverglassに 1.0×10^5 cells/500 μL/wellでTHP-1細胞を播種した。その後、シリカ粒子を300 μL添加した。6時間後、細胞をRPMI 1640で1回洗浄し、氷冷した2.5% グルタルアルデヒド中で2時間固定した。その後、0.1 Mリン酸緩衝液に置換し、氷冷しながら10分間の洗浄を3回繰り返した。続いて、1% 四酸化オスミウム液を加えて氷冷しながら1時間振盪し、後固定を行った。その後、濃度の異なるエタノール中で脱水した後、酸化プロピレンで置換し、Epon-812樹脂で包埋した。作製したサンプルブロックからダイヤモンドナイフでおよそ60 nmの超薄切片を作製し、酢酸ウラニルとクエン酸鉛での染色後にtransmission electron microscope (TEM) 観察を行った。

3) 起炎性評価

THP-1細胞を各プレートに播種した後、0.5 μM Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 存在下で24時間培養することで、マクロファージ様細胞に分化させた。その後、RPMI 1640で1回洗浄を行うことで、PMAを完全に除去した。以降、本研究において用いたTHP-1細胞は全て同様の処理を施している。96穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μL/wellでTHP-1細胞を播種した。その後、10% FBS-RPMI 1640で調製した100 μg/mLのシリカ粒子、ATP (3 mM) あるいはLPS (1.25 μg/mL) を200 μL加えた。12時間後、培養上清中のIL-1β濃度をELISAにより測定した。以降、特に記載のない場合、シリカ粒子・阻害剤などの希釈は全て細胞培養培地にて行っている。また、記載濃度は全て終濃度である。

(2) 黄砂モデル粒子であるシリカ粒子の起炎性惹起メカニズムの解明

1) Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

6穴プレートに 7.0×10^5 cells/3 mL/wellでTHP-1細胞を播種した。その後、シリカ粒子 (100 μg/mL) を添加し、3時間培養後、総RNAを定法通りに調製した。DNase I処理の後、5 μgの総

RNA、Oligo dT₂₀、SuperScript III Reverse Transcriptaseを使用し、50°C、30分間の逆転写反応により一本鎖cDNAを得た。このcDNAを鋳型として、IL-1β、glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に対するプライマーを用い、denaturation : 95°C (30 sec)、annealing : 60°C (30 sec)、extension : 72°C (60 sec) の条件で20サイクルのPCRを行った。PCR産物は2%アガロースゲル中で電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色することで可視化した。

2) 各種阻害剤存在下でのIL-1β産生誘導能評価

96穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μL/wellでTHP-1細胞を播種した。その後、cytochalasin D (5 μM)、zYVAD-fmk (10 μM)、bafilomycin A₁ (250 nM)、CA-074-Me (2 μM)、BHA (150 μM) あるいは DPI (60 μM) 存在下で、シリカ粒子 (100 μg/mL)、ATP (3 mM) をそれぞれ200 μL加えた。6時間後、培養上清中のIL-1β濃度をELISAにて測定した。また、阻害剤を用いる場合、記載濃度において全て30分間の前処理を行っている。なお、cytochalasin Dはアクチン重合阻害によるエンドサイトーシス阻害剤として、zYVAD-fmkはcaspase-1特異的阻害剤として、bafilomycin A₁はカテプシンBの阻害剤として、CA-074-MeはカテプシンB特異的阻害剤として、BHAは活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) スカベンジャーとして、DPIはROS 産生を司る酵素であるnicotinamide adenin dinucleotide phosphate (NADPH) -oxidaseの阻害剤として作用する。

3) NALP3 inflammasomeの観察

Lab-Tek II Chambered Coverglassに 1.0×10^5 cells/500 μL/wellでTHP-1細胞を播種した。その後、ASC-CFP plasmid (2 μg) -ExGen500 (50 μL) の複合体含有培地を添加した後、60時間培養することでASC-CFPタンパク質を十分に発現させた。その後、細胞をRPMI 1640で1回洗浄し、シリカ粒子 (100 μg/mL) を加えて4時間培養した。再び細胞を洗浄し、4% paraformaldehyde (PFA) で15分間固定を行った後、Prolong Gold anti-fade reagentで包埋し、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞を観察した。

4) 細胞内におけるデキストランの挙動解析

Lab-Tek II Chambered Coverglassに 1.0×10^5 cells/500 μL/wellでTHP-1細胞を播種した。その後、10 kDa dextran conjugates Alexa Fluor 594 (500 μg/mL) とシリカ粒子 (100 μg/mL) の混合液を、BHA (150 μM) 存在下、非存在下で300 μL添加した。6時間後、細胞をRPMI 1640で1回洗浄し、4% PFAで15分間固定した。その後、DAPIで核を染色し、共焦点レーザー顕微鏡にて細胞を観察した。

5) ROS産生量評価

96穴black wellプレートに 1.5×10^4 cells/100 μL/wellでTHP-1細胞を播種した。その後、シリカ粒子 (100 μg/mL) を加え、さらに24時間培養した。その後、H₂DCFDA (10 μM) を添加し、45分間培養した後、マルチモードプレートリーダーにて蛍光強度 (Ex:485nm - Em:530 nm) を測定した。なおH₂DCFDAは、細胞中のヒドロキシル、ペルオキシルもしくは他の反応性酸素種活性により酸化され、蛍光を発することが知られるROS測定

試薬である。また、ROS産生量は、細胞培養液のみを作用させた群の値を100%として次式により算出した。ROS production intensity = Fluorescence / cell viability

(3) 黄砂および黄土高原土壌の起炎性評価

1) 黄砂・黄土高原土壌

黄砂は、中国・北京市にある中国農業大学屋上に滅菌した黄砂採取装置を設置し、2010年3月24日から3日間採取した黄砂を黄砂1と定義し、2010年3月20日の黄砂を黄砂2と定義して実験に用いた。黄土高原の異なる3地点で採取した土壌を、黄土高原1、2、3と定義し、黄砂発生源土壌試料として実験に用いた。

2) 黄砂および黄土高原土壌の形状観察

黄砂、および黄土高原土壌を走査型電子顕微鏡にて観察した。脱イオン水で0.25 mg/mLに調整した各試料を試料台に滴下し、水分が蒸発するまでホットプレート上で乾燥させた。その後、試料を走査型電子顕微鏡で観察した。

3) 黄砂および黄土高原土壌のRAW264.7細胞に対する細胞傷害性試験

96穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ L/wellでRAW264.7細胞を播種し、24時間培養した後、黄砂および黄土高原土壌を加えた。24時間後、25%グルタルアルデヒドにて15分間細胞を固定し、水で3回洗浄後、0.05%メチレンブルー溶液で15分間細胞を染色した。染色した細胞を洗浄した後、0.33N HClにより色素を溶解した。続いて吸光度 (655-415 nm) を測定し、メディアウムコントロールを100%として細胞生存率を算出した。

4) 黄砂および黄土高原土壌の炎症性サイトカイン誘導

96穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ L/wellでRAW264.7細胞を播種し、24時間培養後、黄砂、黄土高原土壌を加えた。24時間後、培養上清中におけるIL-6、TNF- α 産生量をELISAで測定した。

(4) 黄砂の炎症惹起メカニズムの基礎的解析

1) 各種阻害剤存在下でのRAW264.7細胞の炎症性サイトカイン産生量の評価

96穴プレートに 1.5×10^4 cells/100 μ L/wellでRAW264.7細胞を播種し、24時間培養した。その後、ROS阻害剤であるBHA (250 μ M)、NADPH oxidase 阻害剤であるDPI (2 μ M)、Extracellular Signal-regulated Kinase 1/2 (ERK1/2) 阻害剤であるU0126 (30 μ M)、c-jun Nterminal Kinase (JNK) 阻害剤であるSP600125 (50 μ M) またはnuclear factor-kappa B (NF- κ B) 阻害剤であるSN50 (50 μ M) を添加した。30分後、各種阻害剤と各粒子 (100 μ g/mL) を加えた。6時間後、培養上清中のTNF- α 濃度をELISAにて測定した。

(5) 黄砂および黄土高原土壌の体内動態と生体影響の基礎的評価

1) 体内動態観察

黄砂および黄土高原土壌の体内移行性を評価するために、BALB/cマウス (6週齢、雌性)

にPBSで希釈した黄砂および黄土高原土壌（30 $\mu\text{g}/\text{匹}$ ）を経鼻投与した。24時間後に、鼻腔粘膜、肺、脳、肝臓、脾臓を摘出し、およそ1 mm角にカットした後、氷冷した2.5% グルタルアルデヒド中で2時間固定した。固定液を廃棄し、冷0.1 Mリン酸緩衝液を加えた後、氷冷しながら10分間の洗浄作業を3回繰り返した。その後、冷1%四酸化オスミウム液を加えて氷冷しながら1時間振盪し、後固定を行った。続いて、濃度の異なるエタノール中で脱水した後、酸化プロピレンで置換し、Epon-812樹脂で包埋した。作製したサンプルブロックをダイヤモンドナイフで薄切し、およそ60 nmの超薄切片を作製した。この超薄切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で染色後、透過型電子顕微鏡観察を行った。また、酢酸ウラニルとクエン酸鉛での染色を行わない状態でも超薄切片の観察を行った。

2) in vivo における起炎性試験

黄砂および黄土高原土壌の起炎性を評価するため、BALB/cマウスをネンブタールにより麻酔し、PBSで希釈した各濃度の黄砂、および黄砂発生源土壌を経鼻投与した。24時間後、マウスをネンブタールにより麻酔を施し、PBS 1 mLで肺胞内を洗浄し、肺胞洗浄液（BALF）として回収した。BALF内の細胞数はヌクレオカウンターにより計数した。また、肺組織は、ヘマトキシリン-エオジン染色で病理学的に解析した。

3) 血液生化学試験

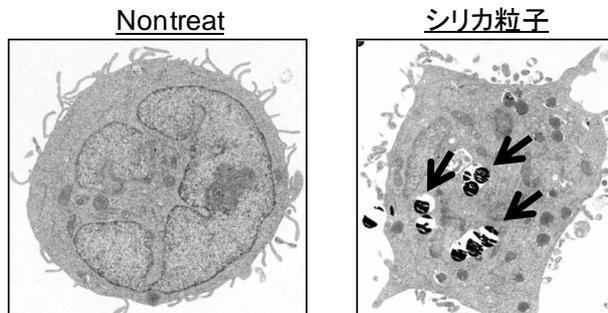
BALB/cマウス（6週齢、雌性）に PBS で30 $\mu\text{g}/\text{匹}$ に調整した黄砂分散液を20 μL ずつ経鼻投与した。投与24時間後に、ネンブタール麻酔下で心臓より採血を行った。採血は 5 IU/mL のヘパリン溶液であらかじめ湿らせたシリンジおよび注射針を用いて行った。回収した血液は、1750 \times g、15分間の遠心分離により血漿を回収し、血液生化学検査に供した。血漿中のアラニンアミノトランスフェラーゼ（ALT）、血中尿素窒素（BUN）を比色法にて測定した。ALT活性は、基質であるL-アラニンのアミノ転位反応によって生じたピルビン酸が、ピルビン酸オキシダーゼと反応することで生じる過酸化水素とジアリールイミダゾールロイコ色素の反応によって生成した青色色素を測定した。BUNは、ウレアーゼの作用によって生成したアンモニアとブロムクレゾールグリーンとの反応によって生じた緑色色素を測定した。

4. 結果及び考察

(1) 黄砂モデル粒子であるシリカ粒子の起炎性評価

生体が黄砂を吸引した場合、まず肺組織中に多数存在する貪食細胞が黄砂粒子を取り込み、異物排除に働くと考えられている。その過程で、マクロファージなどの貪食細胞は、多くの炎症性サイトカインを産生することで、炎症を誘発し、花粉症や喘息などの免疫疾患を惹起すると考えられる⁵⁾。そこで本研究では、まずはじめに、黄砂粒子（発生源土壌の黄土粒子を含む）および黄砂の主たる微粒子成分である1 μm 以上のシリカ粒子を、免疫担当細胞に作用させ、細胞内動態及び免疫賦活化能を評価することで、黄砂の免疫攪乱作用の全貌解明に向けた基礎情報収集を図った。本検討で用いたシリカ粒子は、均一な球状であり非常に分散性に優れていることを既に確認している。まず、粒子径約1 μm のシリカ粒子を用い、ヒトマ

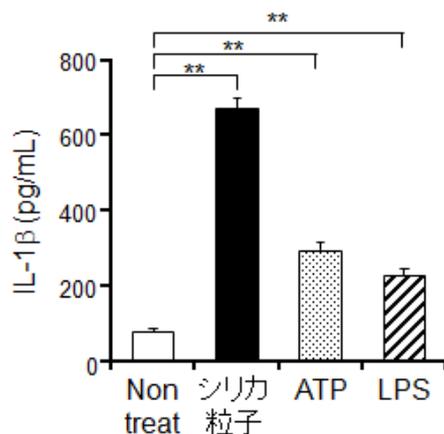
クロファージ細胞株THP-1細胞に作用させた際の細胞内動態を透過型電子顕微鏡により観察した。その結果、シリカ粒子はエンドソームもしくは細胞質内に多数取り込まれていることが判明した（図(3)-1）。



図(3)-1. シリカ粒子を作用させた細胞の透過型電子顕微鏡像

THP-1細胞にシリカ粒子を6時間作用させ、細胞をTEM観察した。矢印は取り込まれたシリカ粒子を示す。

次に、THP-1細胞にシリカ粒子を作用させた際の、培養上清中の炎症性サイトカインIL-1 β 産生量を測定することで、シリカ粒子の起炎性を評価した。その結果、シリカ粒子作用群において有意なIL-1 β 産生が認められ、陽性コントロールとして用いたLPSやATPよりもIL-1 β を産生することが示された（図(3)-2）。



図(3)-2. シリカ粒子作用によるIL-1 β 産生評価.

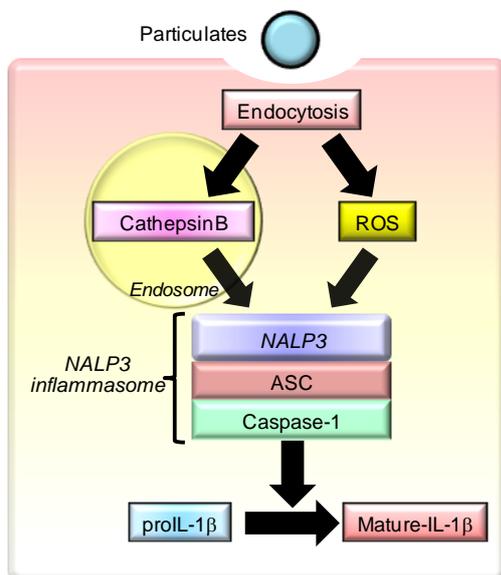
THP-1細胞にシリカ粒子を24時間作用させ、培養上清中のIL-1 β 量をELISAで評価した。値は、平均値 \pm 標準偏差で示している。**P < 0.01

以上の結果から、シリカ粒子が強い起炎性を有することが示された。IL-1 β は、炎症反応のトリガーとしてTNF α やIL-6など種々炎症性サイトカインの産生を誘導し、過剰な免疫応答や、さらにはアレルギーや自己免疫疾患の発症などに関与することが報告されている。事実、IL-1 β は昨今甚大な健康被害を引き起こしたアスベストへの長期・多量曝露により発現するアスベストosisの発症要因であることが明らかとされている⁶⁾。従って、黄砂によるマクロファージからのIL-1 β 産生が発端となり、種々呼吸器疾患が誘発されることが示唆された。

(2) 黄砂モデル粒子であるシリカ粒子の起炎性惹起メカニズムの解明

近年、アスベストや尿酸結晶を始めとした粒子状物質によるIL-1 β 産生が、the nacht domain, leucine-rich repeat, and pyrin domain containing protein 3 (NALP3) インフラマソームと呼ばれ

る分子複合体により制御されていることが報告され始めている⁷⁾。NALP3インフラマソーム形成の中心的役割を担うNALP3は、病原体関連分子パターン (pathogen-associated microbial patterns; PAMPs) や、異物認識などにより惹起される“Danger signal”関連分子パターン (danger-associated molecular patterns; DAMPs) に対する細胞内レセプターと考えられている。これらPAMPsやDAMPsを認識したNALP3は重合体を形成し、アダプター分子である apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase recruitment domain (ASC)、さらには未成熟なpro-caspase-1をリクルートすることで、NALP3インフラマソームを形成する。この複合体形成がトリガーとなりcaspase-1が活性化し、未成熟なpro-IL-1 β は活性型のmature-IL-1 β へと変換され、細胞外へと分泌される (図(3)-3)。このように、NALP3インフラマソームは、caspase-1の活性、並びにIL-1 β 産生を厳重に制御していると考えられている。しかし、その活性化メカニズムには不明な点が数多く残されている。

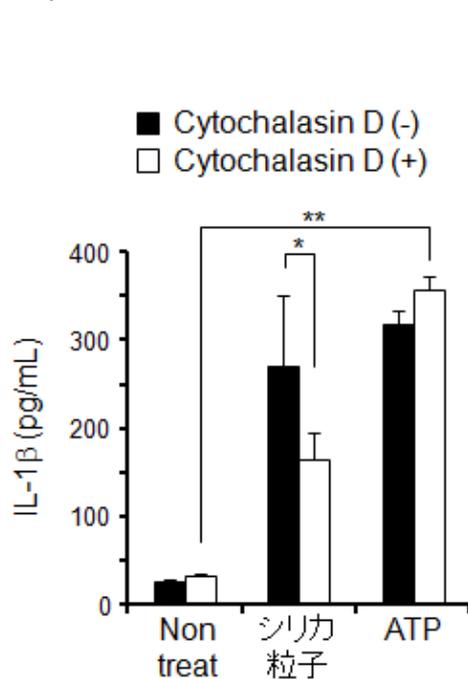


図(3)-3. 微粒子によるIL-1 β 活性化メカニズム。NALP3は、アダプター分子であるASC、未成熟なpro-caspase-1をリクルートすることで、NALP3インフラマソームを形成する。この複合体形成によりcaspase-1が活性化し、未成熟なpro-IL-1 β は活性型の成熟IL-1 β へと変換され、細胞外へと分泌される。

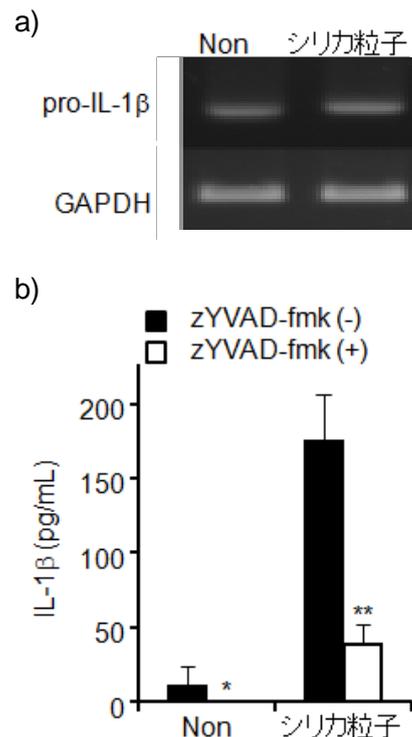
そこで、黄砂による炎症性免疫疾患誘発メカニズムの解明を最終目標に、シリカ粒子のIL-1 β 産生メカニズムの解明を試みた。粒子状異物によるIL-1 β 産生は、その貪食過程 (エンドサイトーシス) を経ることで誘導されると考えられている。そこで、シリカ粒子によるIL-1 β 産生がエンドサイトーシス依存的であることを確認する目的で、エンドサイトーシス阻害剤であるcytochalasin D存在下における、シリカ粒子のIL-1 β 産生誘導能を評価した (図(3)-4)。なおATPは、細胞表面のP2X7受容体に結合し、細胞質内のK⁺を細胞外に流出させることで、エンドサイトーシス非依存的にIL-1 β 産生を促進することが知られており、コントロールとして用いた。その結果、cytochalasin Dは、ATPによるIL-1 β 産生にはほとんど影響を与えなかったのに対し、シリカ粒子によるIL-1 β 産生を有意に抑制した。従って、マクロファージによるエンドサイトーシスが、シリカ粒子によるIL-1 β 産生の第一のシグナルの一つであることが判明した。

次に、シリカ粒子がpro-IL-1 β の発現量、及びcaspase-1の活性化のいずれに作用したのかを、

半定量的RT-PCR、並びにcaspase-1阻害剤を用いることで評価した（図(3)-5）。その結果、pro-IL-1 β の発現量は、シリカ粒子作用群、未作用群の両者において、ほとんど差が認められなかった一方で（図(3)-5a）、caspase-1特異的阻害剤であるzYVAD-fmk存在下においては、シリカ粒子によるIL-1 β 産生がほぼ完全に抑制されることが判明した（図(3)-5b）。なお、シリカ粒子未作用群においてもzYVAD-fmkはIL-1 β 産生を抑制したが、これはTHP-1細胞で認められる内因性のcaspase-1活性を抑制したものと考えられる。従って、シリカ粒子は、pro-IL-1 β のmRNA発現には影響を及ぼさず、caspase-1を活性化することでIL-1 β 産生を誘導したものと考えられた。

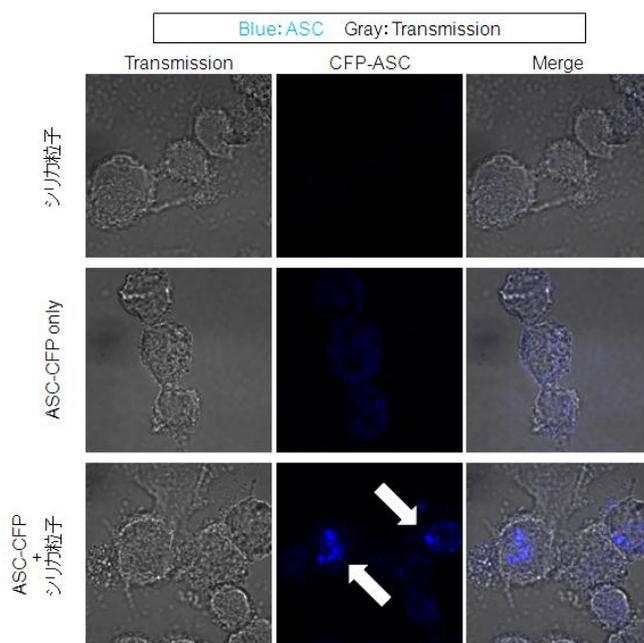


図(3)-4. シリカ粒子によるIL-1 β 産生誘導におけるエンドサイトーシスの関与. THP-1細胞に、サイトカラシン存在下および非存在下でシリカ粒子を6時間作用させ、培養上清中のIL-1 β 量をELISAで評価した。値は、平均値 \pm 標準偏差で示している。* P < 0.05、** P < 0.01



図(3)-5. シリカ粒子作用によるIL-1 β 産生評価. THP-1細胞にシリカ粒子を24時間作用させ、培養上清中のIL-1 β 量をELISAで評価した。値は、平均値 \pm 標準偏差で示している。** P < 0.01

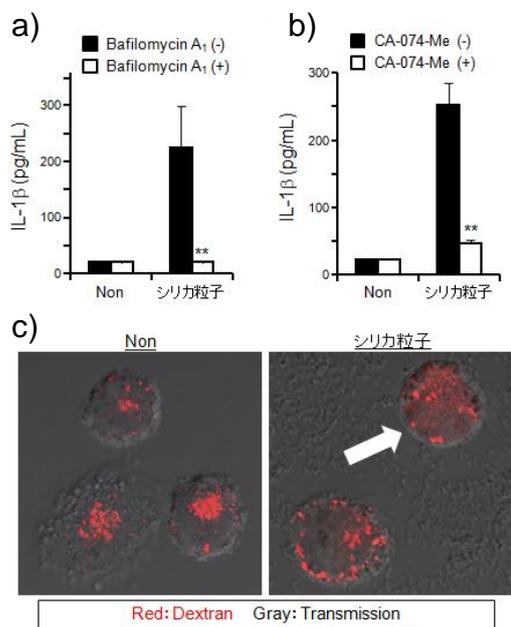
次に、シリカ粒子によるIL-1 β 産生が、インフラマソームの形成を介しているのか、その構成分子であるASCの細胞内挙動を指標として検討した（図(3)-6）。青色蛍光タンパク質であるCFPとASCの融合タンパク質（ASC-CFP）を強制発現させたTHP-1細胞を作製し、シリカ粒子を作用した際のASC-CFPの挙動を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。その結果、シリカ粒子未作用群においては、ASC由来の青色蛍光は細胞質全体に拡散していたのに対して、シリカ粒子作用群ではASCの凝集を示すドット状の青色蛍光が観察された。以上の結果から、シリカ粒子はインフラマソームを介してIL-1 β 産生を惹起していることが強く示唆された。



図(3)-6. シリカ粒子作用によるNALP3活性化
 青色蛍光タンパク質であるCFPとASCの融合タンパク質(ASC-CFP)を強制発現させたTHP-1細胞に、シリカ粒子を作用した際のASC-CFPの挙動を共焦点レーザー顕微鏡により解析した。

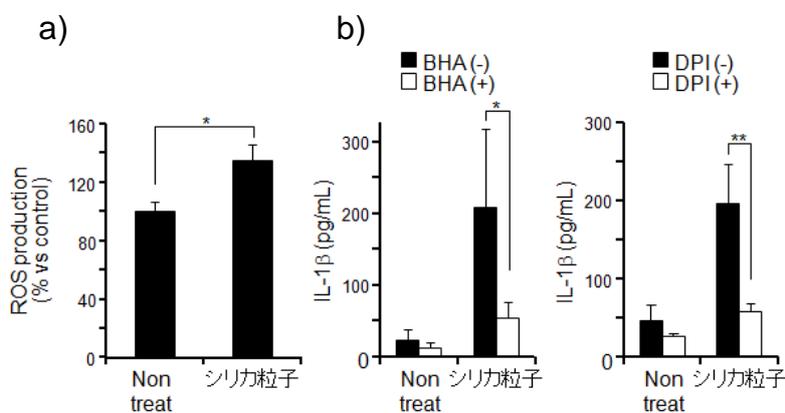
近年、活性酸素種(ROS)及びリソソーム内酵素であるカテプシンBが、インフラマソームの活性化因子として作用することが報告されている。そこでまず、代表的なカテプシンB阻害剤であるbafilomycin A₁あるいはCA-074-Me存在下における、シリカ粒子のIL-1 β 産生誘導能を評価した(図(3)-7a,b)。その結果、いずれの阻害剤もシリカ粒子によるIL-1 β 産生をほぼ完全に抑制することが判明した。すなわち、カテプシンBがシリカ粒子によるIL-1 β 産生に必須であることが明らかとなった。そこで、本来エンドソーム、あるいはリソソーム内にのみ存在するカテプシンBが、細胞質に存在するインフラマソームを活性化するメカニズムの解析を試みた。赤色蛍光標識したデキストラン(エンドソームマーカー)とシリカ粒子をTHP-1細胞に共作用させ、デキストランの細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により評価した(図(3)-7c)。その結果、シリカ粒子未作用群においては、安定なエンドソームを示すドット状の赤色蛍光のみが観察されたのに対し、シリカ粒子作用群においては、細胞質全体にデキストランが拡散している様子が観察された。本結果は、シリカ粒子がエンドソームを破壊したことを強く示唆しており、これにより細胞質へと漏出したカテプシンBが、インフラマソームの形成を誘導したものと考えられた。続いて、シリカ粒子によるIL-1 β 産生に対するROSの関与を解析した。まず、シリカ粒子作用群におけるROS産生量を評価したところ、シリカ粒子は有意にROS産生を誘導することが判明した(図(3)-8a)。次に、ROS阻害剤であるBHA、DPI存在下における、シリカ粒子のIL-1 β 産生誘導能を評価したところ、いずれの阻害剤もシリカ粒子によるIL-1 β 産生をほぼ完全に抑制することが明らかとなった(図(3)-8b)。すなわちシリカ粒子は、カテプシンBの漏出及びROS産生の両者を誘導することでIL-1 β 産生を惹起することが判明した。そこで、ROSとカテプシンBが1つのシグナル伝達経路を構築している可能性を考え、ROS阻害剤存在下でのエンドソームの細胞内挙動を、先ほどと同様、デキストランを指標として解析した(図(3)-9)。その結果、ROS阻害条件下においては、シリカ粒子作

用群で観察されたデキストランの拡散が、ほぼ完全に抑制されることが判明した。すなわち、シリカ粒子作用時に観察されるエンドソームの破壊が、シリカ粒子の取り込みなどにより誘導されたROS依存的に惹起されることが明らかとなった。



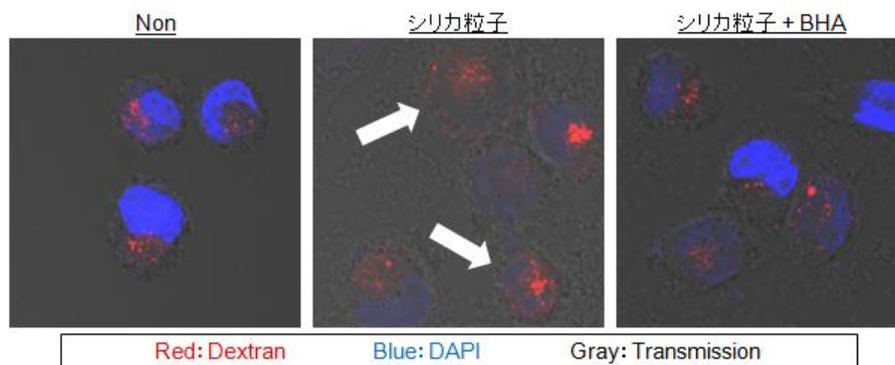
図(3)-7. シリカ粒子によるIL-1 β 産生誘導におけるカテプシンBの関与

THP-1細胞に、(A) bafilomycin A₁もしくは(B) CA-074-Me存在下および非存在下でシリカ粒子を作用させ、培養上清中のIL-1 β 量をELISAで評価した。値は、平均値 \pm 標準偏差で示している。** $P < 0.01$ (C) 赤色蛍光標識したデキストランとシリカ粒子をTHP-1細胞に共作用させ、デキストランの細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により評価した。



図(3)-8. シリカ粒子により誘導されるROSのIL-1 β 産生への関与

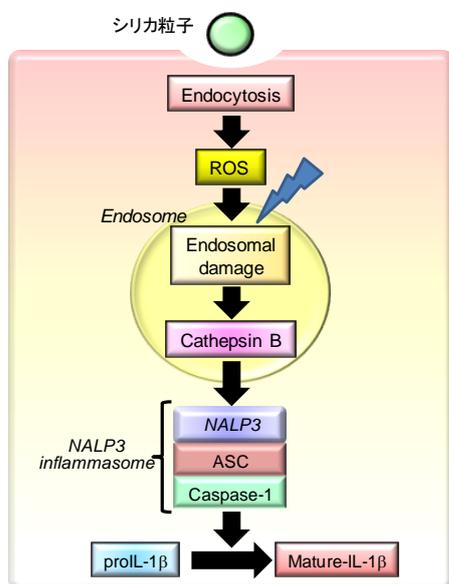
(a) THP-1細胞にシリカ粒子を作用させた後、H₂DCFDAを用いてROS量を測定した。未処理細胞のROS量を100%に設定し、相対値を示した。値は、平均値 \pm 標準偏差で示している。THP-1細胞に、(b) ROS阻害剤であるBHAもしくはDPI存在下および非存在下でシリカ粒子を作用させ、培養上清中のIL-1 β 量をELISAで評価した。値は、平均値 \pm 標準偏差で示している。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$



図(3)-9.エンドソームの動態評価

ROS阻害条件下において、赤色蛍光標識したデキストランとシリカ粒子をTHP-1細胞に共作用させ、デキストランの細胞内動態を共焦点レーザー顕微鏡により評価した。

以上の結果から、図(3)-10に示す通り、シリカ粒子は細胞にエンドサイトーシスで取り込まれた後、ROSの産生を誘発し、ROSがリソソームを破壊することでカテプシンBが細胞質に流出し、インフラマソームの活性化を誘導することが明らかとなった。従って、黄砂によるROS産生を阻害することで、黄砂による免疫疾患誘発を予防できる可能性が示唆された。



図(3)-10. シリカ粒子により誘導されるIL-1 β 産生経路の模式図

シリカ粒子はエンドサイトーシスにより取り込まれ、NADPH-oxidaseの活性化、ROS産生、エンドソームの崩壊、cathepsin Bの漏出、インフラマソームの活性化、を介してカスパーゼ1の活性化を誘導する。

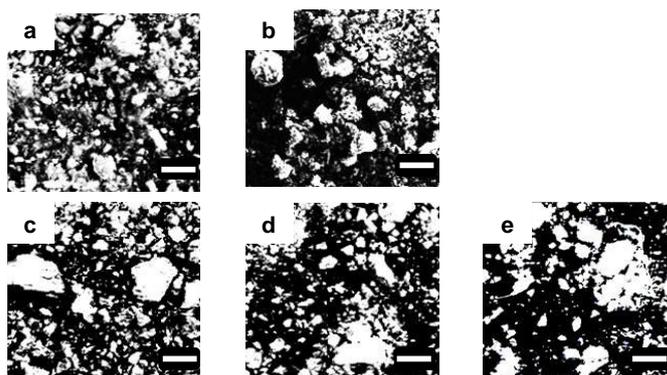
(3) 黄砂および黄土高原土壌の起炎性評価

次に、黄砂の起炎性を評価した。中国・北京市で採取した黄砂と、黄砂発生源の一つである黄土高原で採取した土壌（黄土高原土壌）の起炎性を、マクロファージの炎症性サイトカイン産生を指標として評価した。本検討では、2010年3月24日から3日間、中国農業大学屋上で採取した黄砂を黄砂1と定義し、2010年3月20日に同様の方法で採取した黄砂を黄砂2と定義して実験に用いた。さらに、黄砂発生源土壌である黄土高原の異なる3地点から採取した土壌を、黄土高原1、黄土高原2、黄土高原3と定義して実験に用いた。なお、これら黄砂および黄土高原土壌に含まれる細菌菌体外毒素であるリポポリサッカライド（LPS）量は0.04 ng/mg以下であり、起炎性を惹起しない含有量であることを確認している。

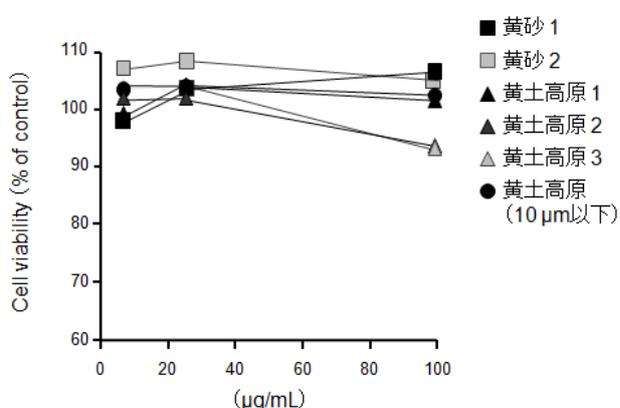
まず、黄砂および黄土高原土壌の一次粒子径および表面性状を走査型電子顕微鏡で観察した。その結果、いずれの黄砂・黄土高原土壌も、粒子表面は粗く、不揃いな形状の粒子であり、凝集している粒子も存在することが判明した（図(3)-11）。また、いずれの黄砂中にも100 μm以上の粒子はほとんど観察されなかったのに対し、全ての黄土高原土壌中には100 μm以上の粒子も多数観察された。

次に、黄砂および黄土高原土壌をマウスマクロファージ細胞株であるRaw 264.7細胞に作用させ細胞傷害性を評価した。その結果、いずれの黄砂および黄土高原土壌においても、検討した濃度では細胞傷害性は全く認められなかった（図(3)-12）。さらに、黄砂と黄土高原土壌の起炎性を評価した。シリカ粒子の起炎性評価においては、IL-1β産生を指標に起炎性を評価した一方で、基礎的検討として黄砂粒子をマウスに投与した場合、IL-1βではなく、TNF-αやIL-6などの炎症性サイトカインが産生されることを見出している（data not shown）。そこで本検討では、マウスマクロファージ細胞株RAW264.7細胞に黄砂を添加した後の、培養上清中の炎症性サイトカインTNF-α、IL-6量を指標として起炎性を評価した。その結果、黄砂作用群でTNF-α、IL-6産生がコントロール群と比較して有意に増加し、強い免疫活性化能を有するLPS作用群と同程度またはそれ以上の産生が認められた（図(3)-13）。一方で、黄土高原土壌作用群では、TNF-α、IL-6量はコントロール群と同程度であった。以上の結果から、黄砂は黄土高原土壌と比較して、強い起炎性を有する可能性が示された。黄砂中に含まれるLPS量は、炎症性サイトカイン産生に影響しない量であることから、黄砂の強い起炎性はLPS以外の要因が関与していると考えられた。

次に、サブテーマ(4)において調製した中国・黄土高原の土壌を10 μm以下に分級した土壌試料を黄土高原（10 μm以下）と定義し、実験に用いた。粒子径と起炎性の関係性を評価するため、黄土高原土壌あるいは黄土高原（10 μm以下）をRAW264.7細胞に作用させ、培養上清中のTNF-α量を評価した。その結果、黄土高原土壌作用群と比較して、黄土高原（10 μm以下）作用群ではTNF-α産生量が有意に増加していた（図(3)-13）。以上の結果から、黄砂によるサイトカイン産生誘導には、黄砂の粒子径が大きく関与しており、小さな粒子ほど強い起炎性を有することが示唆された。

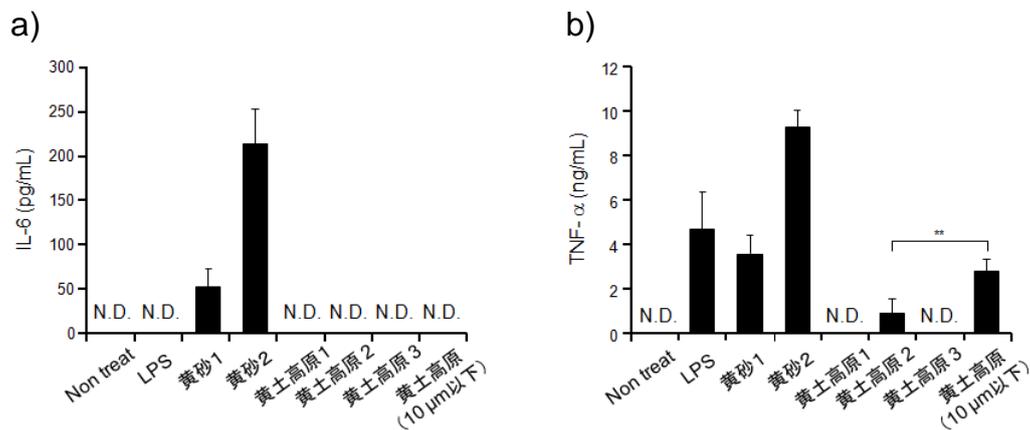


図(3)-11. 走査型電子顕微鏡による黄砂及び黄土高原土壌の観察
黄砂 (a,b) 及び黄土高原土壌 (c-e) を走査型電子顕微鏡で観察した。スケールバーは、100 μm を示している。



図(3)-12. 黄砂及び黄土高原土壌の細胞傷害性評価

マウスマクロファージ細胞株であるRAW264.7細胞に、黄砂もしくは黄土高原土壌を各濃度 (6.25, 25, 100 μg/ml) で添加した後、メチレンブルー法により細胞生存率を算出した。メディウムコントロールを100%とした。結果は、 $\text{平均値} \pm \text{標準偏差}$ で表記した。



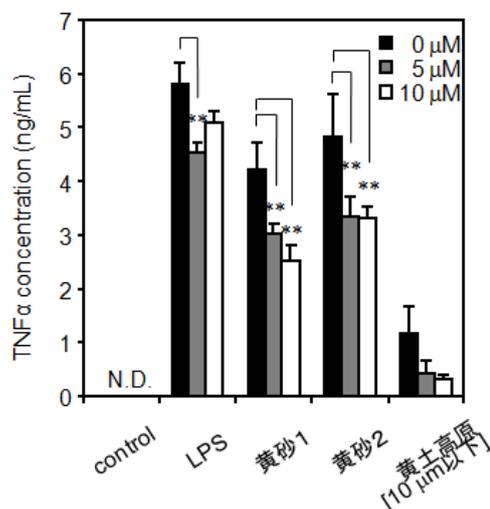
図(3)-13. 黄砂及び黄土高原土壌の起炎性評価

マウスマクロファージ細胞株であるRAW264.7細胞に、LPSもしくは黄砂及び黄土高原土壌 (最終濃度100 μg/ml) を添加した。24時間後に培養上清を回収し、IL-6 (A) とTNF-α (B) 量をELISAにより評価した。結果は、 $\text{平均値} \pm \text{標準偏差}$ で表記した。** $P < 0.01$ 、N.D.; 検出限界以下

黄砂には、LPSのみならず β -グルカンといった菌体成分、輸送過程で付着したアンモニウムイオン、硫酸イオン、硝酸イオンといった化学物質などが付着していることが報告されている。さらに近年、黄砂が塩化カルシウムなどに覆われ、液滴化することによって生体反応性が変化するという知見も明らかとなりつつある。従って、黄砂と黄土高原土壌の起炎性の違いは、黄砂の粒子径が小さくなることにより表面積が増加し、付着する化学成分の量が多くなることに起因する可能性も考えられる。今後、より詳細に黄砂の物性や付着する成分に着目した評価を進めることで、黄砂の起炎性をより詳細に明らかにできると考えている。

(4) 黄砂の炎症惹起メカニズムの基礎的解析

我々は既に、貪食細胞であるマクロファージが粒子状物質を貪食すると、nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-oxidase (NADPH oxidase) が活性化されることで、ROSが産生され、MAPK経路を活性化することを明らかにしている⁸⁾。そこで、黄砂の起炎性誘発メカニズムを、TNF- α 産生誘導メカニズムに焦点を絞り解析した。黄砂による起炎性のエンドサイトーシス依存性を、マウスマクロファージ細胞株Raw264.7細胞を用いて評価した。エンドサイトーシス阻害剤であるcytochalasin D存在下で、RAW264.7細胞に黄砂を作用させ、培養上清中のTNF- α 量を指標に起炎性を評価した(図(3)-14)。その結果、cytochalasin Dは、黄砂によるTNF- α 産生を有意に抑制することが判明した。すなわち、マクロファージによるエンドサイトーシスが、黄砂によるTNF- α 産生の第一のシグナルの一つであることが判明した。

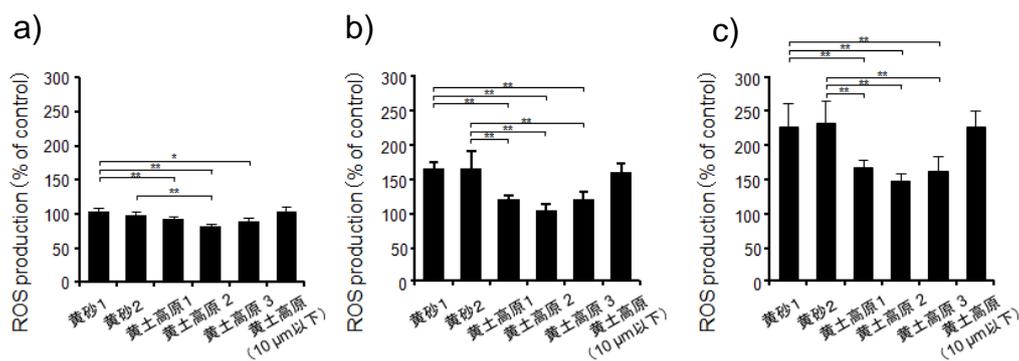


図(3)-14. 黄砂の炎症惹起におけるエンドサイトーシスの関与

マウスマクロファージ細胞株であるRAW264.7細胞に、エンドサイトーシス存在下で黄砂及び黄土高原土壌を添加した。24時間後に培養上清を回収し、TNF- α 量をELISAにより評価した。結果は、平均値 \pm 標準偏差で表記した。

** $P < 0.01$, N.D.; 検出限界以下

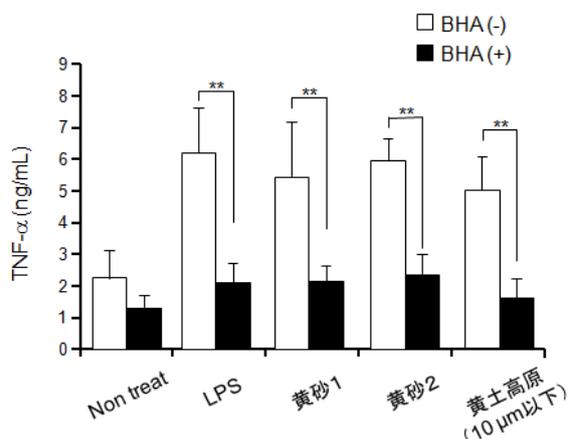
次に、黄砂によるROS産生メカニズムについて検討した。ROSは、NF- κ BやMAPKシグナルなど炎症性サイトカイン産生に関連する複数のシグナル応答を活性化することが報告されている。そこでまず、黄砂のマクロファージに対する起炎性とROSとの関連を精査するため、黄砂がROS産生に及ぼす影響を評価した。RAW264.7細胞に黄砂および黄土高原土壌を作用させ、ROS産生を評価した。その結果、黄砂や黄土高原(10 μ m以下)は黄土高原土壌よりも強くROS産生を誘導する傾向が認められた(図(3)-15)。



図(3)-15. 黄砂及び黄土高原土壤のROS産生誘導能評価

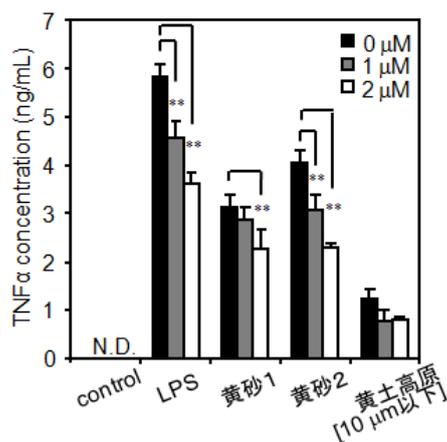
RAW264.7細胞をDCFH-DAで30分間処理した。その後、黄砂及び黄土高原土壤（最終濃度100 μg/ml）を添加した。a) 30分、b) 2時間、c) 6時間後に細胞中の蛍光量を指標に、ROS産生を評価した。結果は、平均値±標準偏差で表記した。 $*P < 0.05$ 、 $**P < 0.01$

そこで次に、ROS阻害剤であるBHA存在下でRAW264.7細胞に黄砂および黄土高原（10 μm以下）を作用させ、培養上清中のTNF-α量を評価した。その結果、いずれの黄砂および黄土高原（10 μm以下）作用群においても、コントロール群と比較して有意なTNF-α産生の上昇が認められたが、ROS阻害剤を作用させることで、コントロール群と同程度までTNF-α産生が抑制された（図(3)-16）。以上の結果から、黄砂による炎症性サイトカインの産生には、ROSなどの酸化ストレス因子の産生が関与していることが示唆された。



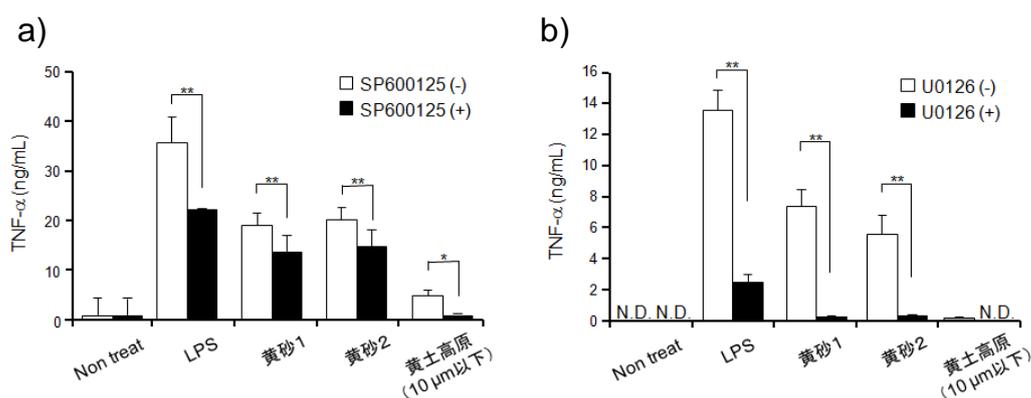
図(3)-16. ROS阻害剤存在下における黄砂及び黄土高原土壤の起炎性評価。RAW264.7細胞をROS阻害剤であるBHAで30分間処理した。その後、黄砂及び黄土高原土壤を添加した。6時間後に培養上清を回収し、TNF-α量をELISAにより評価した。結果は、平均値±標準偏差で表記した。 $**P < 0.01$

次に、黄砂によるROS産生メカニズムについて検討した。ROSは、細胞膜・エンドソーム膜に存在するNADPH oxidaseやミトコンドリアが主な産生源として知られている。そこで、黄砂によるROS産生メカニズムとNADPH oxidaseとの関連を、NADPH oxidase阻害剤であるDPIを用いて評価した。DPI存在下でRAW264.7細胞に黄砂または黄土高原土壤を作用させ、培養上清中のTNF-α量を指標に起炎性を評価した。その結果、いずれの黄砂および黄土高原土壤を添加したマクロファージにおいても、TNF-α産生はDPIにより抑制された（図(3)-17）。以上の結果から、黄砂によるROS産生には、NADPH oxidaseが関与していることが示唆された。



図(3)-17. NADPHオキシダーゼ阻害剤存在下における黄砂及び黄土高原土壌の起炎性評価. RAW264.7細胞をNADPHオキシダーゼ阻害剤であるDPIで30分間処理した。その後、黄砂及び黄土高原土壌を添加した。6時間後に培養上清を回収し、TNF- α 量をELISAにより評価した。結果は、平均値 \pm 標準偏差で表記した。N.D.; 検出限界以下

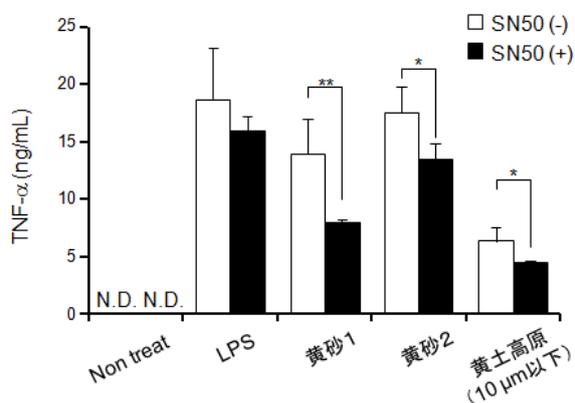
MAPKは、細胞が外部からのストレスやサイトカイン刺激を受けると、リン酸化を受けて活性化となり、炎症性サイトカイン産生に關与する転写因子などを活性化するリン酸化酵素である⁸⁾。そこで次に、黄砂によるマクロファージ活性化にMAPK経路が及ぼす影響を評価した。代表的なMAPKであるJNK、ERKの阻害剤存在下で、RAW264.7細胞に黄砂および黄土高原(10 μm 以下)を作用させ、培養上清中のTNF- α 量を評価した。その結果、黄砂、黄土高原(10 μm 以下)によるTNF- α 産生は、JNK阻害剤により有意に抑制された(図(3)-18a)。また、ERK阻害剤で処理することによっても、コントロール群と同程度にまでTNF- α の産生が強く抑制された(図(3)-18b)。以上の結果から、黄砂によるTNF- α の産生誘導に、MAPK経路が関与していることが示唆された。以上の結果より、マクロファージに黄砂を作用させることで、ROSが産生し、そのROSの活性化によってMAPK経路が活性化すると考えられる。一方で、MAPK経路が活性化しROSが産生されることも知られていることから、今後、シグナル伝達経路を詳細に検討する必要があると考えている。



図(3)-18. MAPK阻害剤存在下における黄砂及び黄土高原土壌の起炎性評価
RAW264.7細胞をJNK阻害剤であるSP600125 (a)、ERK阻害剤であるU00126 (b)で30分間処理した。その後、黄砂及び黄土高原土壌を添加した。6時間後に培養上清を回収し、TNF- α 量をELISAにより評価した。結果は、平均値 \pm 標準偏差で表記した。* $P < 0.05$ 、** $P < 0.01$ 、N.D.; 検出限界以下

MAPKは、TNF- α の代表的な転写因子として知られるNF- κ Bをはじめ多くの転写因子を活性化することが知られている。そこで、黄砂の炎症性サイトカイン誘導におけるNF- κ Bの関与を検討するため、NF- κ B阻害剤であるSN50存在下でRAW264.7細胞に黄砂および黄土高原（10 μ m 以下）を作用させ、培養上清中のTNF- α 量を評価した。その結果、NF- κ B阻害剤を作用させることで、黄砂によるTNF- α の産生が有意に抑制された（図(3)-19）。一方で、NF- κ B阻害剤ではTNF- α の産生を完全に抑制できていないことから、黄砂によるTNF- α の産生には、NF- κ B以外の転写因子も関与している可能性が考えられた。今後、ROSやMAPKが活性化する転写因子をより詳細に明らかにする必要があると考えられる。

これまでの結果をまとめて考察すると、黄砂によるサイトカイン産生は、貪食細胞による、黄砂のエンドサイトーシス、NADPH oxidase活性化によるROSの産生、MAPKの活性化、NF- κ Bの活性化により誘導されると考えられた。



図(3)-19. NF- κ B阻害剤存在下における黄砂及び黄土高原土壌の起炎性評価
RAW264.7細胞をNF- κ B阻害剤であるSN50で30分間処理した。その後、黄砂及び黄土高原土壌を添加した。6時間後に培養上清を回収し、TNF- α 量をELISAにより評価した。結果は、平均値 \pm 標準偏差で表記した。* P < 0.05、** P < 0.01、N.D.; 検出限界以下

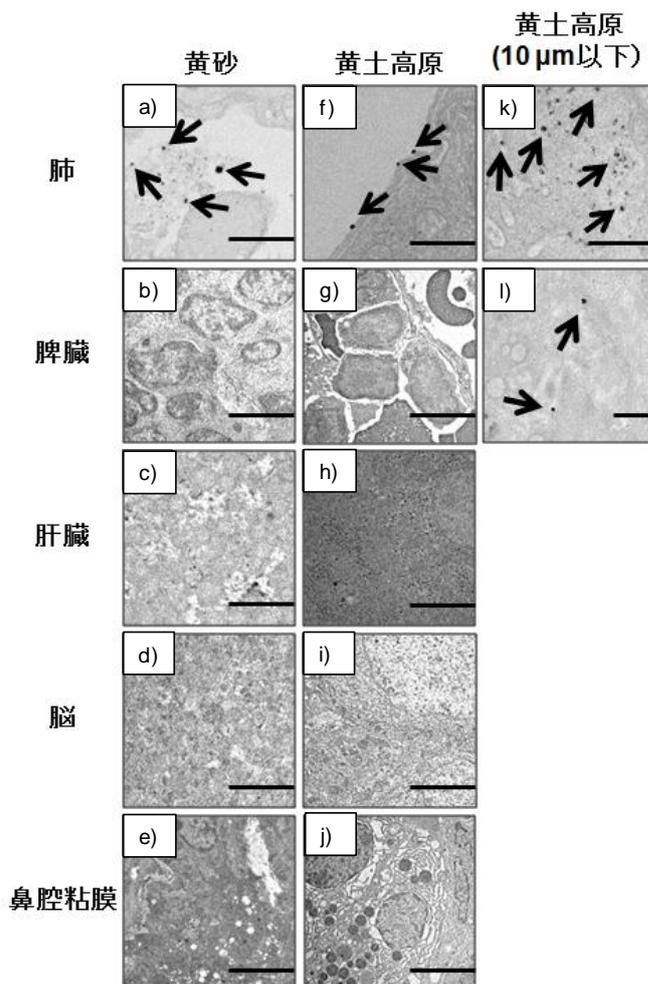
(5) 黄砂および黄土高原土壌の体内動態と生体影響の基礎的評価

黄砂に限らず粒子状物質は、吸引曝露した場合、直径1 μ m以下のものは肺胞にまで到達することが知られている。しかし、黄砂の体内動態に関する情報は世界的にも非常に乏しく、黄砂が体内に侵入するのかどうかといった基礎的な情報さえ不明な点が多い。従って、黄砂が移行する臓器や細胞を明らかとすることは、科学的根拠に基づいた黄砂の安全性情報を提示し、黄砂による生体影響のメカニズム解明に非常に有用な情報であると考えられる。そこで、マウスに黄砂を経鼻投与し、主要臓器への移行性を評価した。

中国・北京市において、一日にヒトが曝露する黄砂の量は約20 mgにも及ぶと考えられている。ヒトの曝露量をマウス1匹に換算すると、一日で約10 μ gの黄砂を曝露することになる。そこで、日常的に黄砂を鼻から吸引することを想定し、30 μ g/mouseで投与し、黄砂の体内移行性を評価した。黄砂および黄土高原土壌をBALB/cマウスに経鼻投与し、24時間後に肺、脾臓、肝臓、脳、鼻腔粘膜を回収した。回収した各臓器を透過型電子顕微鏡で観察したところ、脾臓、肝臓、脳、鼻腔粘膜に移行した黄砂および黄土高原土壌は認められなかった（図(3)-20b-e, g-j）。一方で肺においては、黄砂、黄土高原土壌投与群ともに粒子の存在が確認された（図(3)-20a, f）。また、黄砂投与群においては、肺胞の上皮細胞内に侵入している粒子も確認された（図(3)-20a）。さらに、黄土高原（10 μ m以下）投与群では、黄砂投与群よりも多くの粒

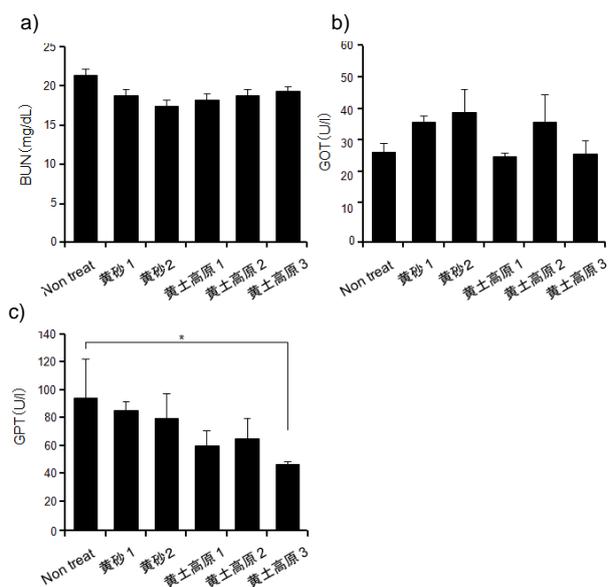
子が肺胞上皮細胞内に侵入していることが観察されるとともに（図20K）、脾臓のリンパ球においても粒子が確認された（図(3)-20I）。以上の結果から、今後、定量的な検討が必要ではあるものの、黄砂が経鼻投与によって、上皮細胞バリアーを通過し体内に侵入する可能性が示された。また、黄土高原（10 μm 以下）の結果ではあるが、黄砂は経鼻投与によって体内に吸収され、何らかの経路を通り、各臓器にまで移行する可能性が考えられた。

黄砂が生体内に侵入することが示唆されたことから、黄砂を経鼻投与後に、主要臓器における障害マーカーを指標として生体影響を評価した。黄砂および黄土高原土壌をマウスに経鼻投与し、24時間後、血液を回収し血漿を生化学検査した。その結果、肝障害マーカーであるALTやAST、腎障害マーカーであるBUNはいずれの群においても顕著な変化はなく、臨床的に意義のある異常値は認められなかった（図(3)-21）。次に、黄砂が経鼻投与後に肺組織にまで到達することを鑑み、黄砂を経鼻投与後の肺組織における炎症を評価した。黄砂をマウスに経鼻投与し、経時的に肺胞洗浄液を回収し、肺胞洗浄液中の浸潤細胞数を指標に、肺の炎症度を評価した。その結果、黄砂投与群の浸潤細胞数は、コントロール群と比較して有意に増加した（図(3)-22）。従って、黄砂曝露により、肺組織において、貪食系細胞や好酸球などの炎症性細胞浸潤に伴う強い炎症反応が誘導される可能性が考えられた。今後、浸潤細胞の同定など、黄砂の経鼻投与による影響を精査することで、黄砂特有の起炎性を明確にする必要があると考えている。

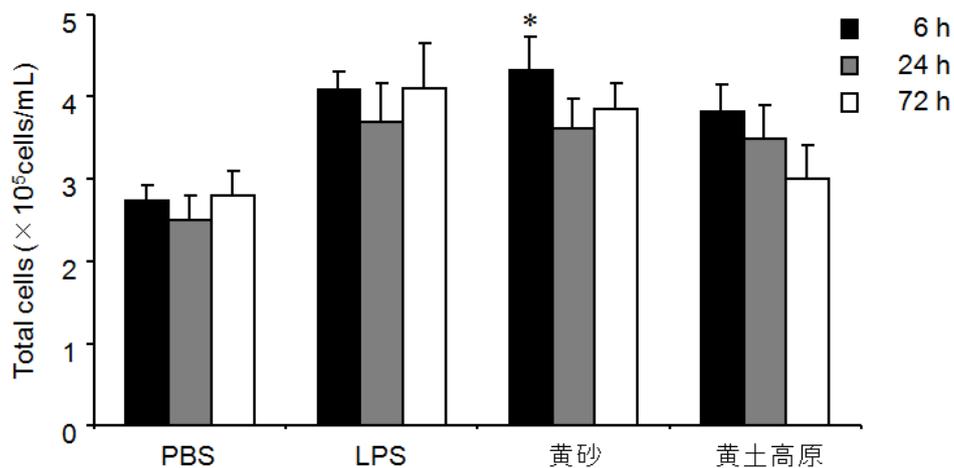


図(3)-20. 透過型電子顕微鏡による黄砂及び黄土高原土壌の体内動態評価

BALB/cマウスに、30 μg /マウスの黄砂 (a-e)、黄土高原土壌 (f-j) もしくは黄土高原土壌 (10 μm 以下) (k,l) を経鼻投与した。24時間後に、肺 (a, f, k)、脾臓 (b, g, l)、肝臓 (c, h)、脳 (d, i)、鼻腔 (e, j) を透過型電子顕微鏡で観察した。矢印は粒子を示している。スケールバーは、500 nm (a)、1 μm (f, k, l)、5 μm (b-e, g-j) を示している。

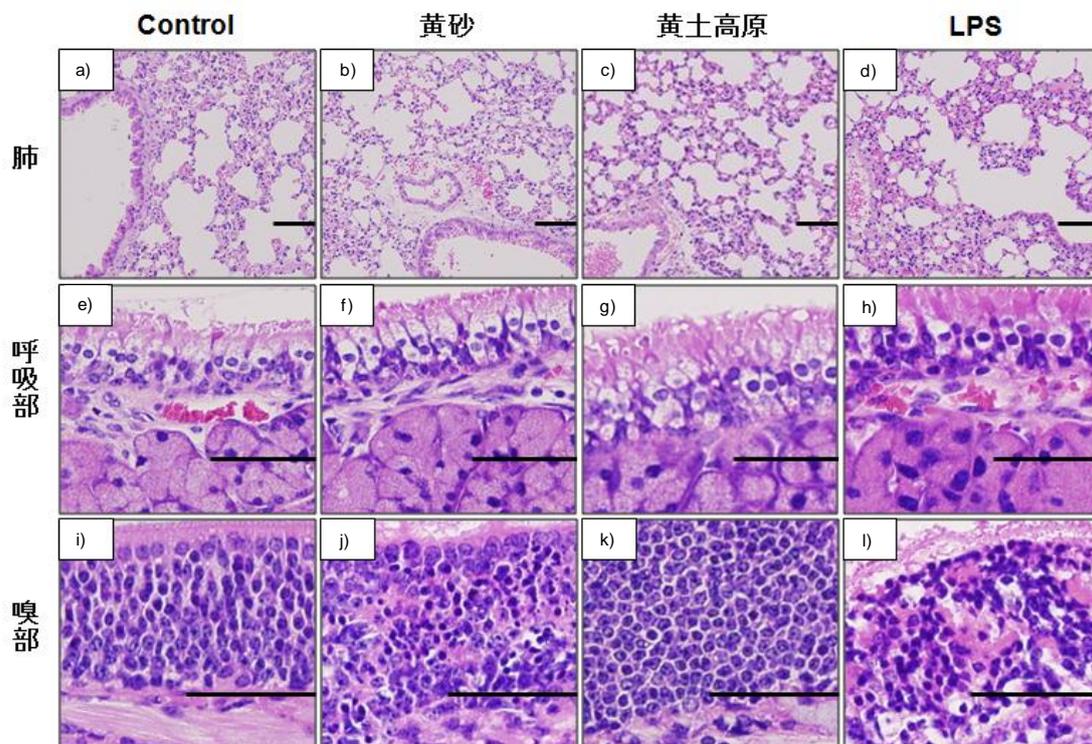


図(3)-21. 黄砂及び黄土高原土壌を経鼻投与したマウスの血液生化学検査
BALB/cマウスに、30 μg の黄砂もしくは黄土高原土壌を経鼻投与し、24時間後に心臓より血液を採取した。採取した血液から血漿を回収し、生化学試験を実施した。結果は、平均値 \pm 標準偏差で表記した。* $P < 0.05$



図(3)-22. 黄砂を経鼻投与したマウスの肺における炎症性細胞の浸潤
BALB/cマウスに、30 μg の黄砂またはPBSを経鼻投与し、肺胞洗浄液を回収した。回収した肺胞洗浄液中の細胞数をセルカウンターにより測定した。結果は、平均値 \pm 標準偏差で表記した。* $P < 0.05$

次に、黄砂および黄土高原土壌が肺組織や鼻腔粘膜に与える影響を、病理学的所見を指標に評価した。黄砂および黄土高原土壌をマウスに経鼻投与し、24時間後、肺組織、鼻腔粘膜を摘出した。鼻腔粘膜は、鼻腔の入り口で、鼻毛・汗腺が存在する鼻前庭部、吸気を加湿・加温・洗浄する呼吸部、そして嗅覚器である嗅細胞を含む嗅部の3つに分かれており、本検討では呼吸部と嗅部を検討した。その結果、いずれの群においても、肺組織や鼻腔粘膜の呼吸部上皮では異常所見は認められなかった（図(3)-23a-h）。一方で、黄土高原土壌投与群の嗅上皮では異常は認められなかったのに対し（図(3)-23k）、黄砂投与群の嗅上皮では、嗅細胞の壊死や変性が認められた（図(3)-23j）。この結果は、少なくとも黄砂の曝露が嗅覚器に何らかの損傷を与える可能性を示唆している。今後、検討数を増やすことで、黄砂投与による組織への影響を、より明確に評価するとともに、黄砂が血中に移行した際の体内動態を、黄砂の物性と連関させて考察したい。



図(3)-23. 黄砂もしくは黄土高原土壌を経鼻投与したマウスの病理解析. BALB/cマウスに、PBS (a, e, i) もしくは、30 μg の黄砂 (b, f, j)、黄土高原土壌 (c, g, k)、2 μg のLPS (d, h, l) を経鼻投与し、24時間後に肺 (a-d)、呼吸部 (e-h)、嗅部 (i-l) の組織を回収した。回収した各組織をHE染色した後に、病理組織学的に評価した。スケールバーは、100 μm (a-d)、50 μm (e-l) を示している。

まとめ

近年、地球温暖化や深刻な砂漠化の進行によって、黄砂の規模（年間の飛来回数や量）が拡大している。それに伴い、人口の多い都市域にも黄砂が到達するようになり、黄砂による健康問題が表面化してきた。これまでの疫学調査から、黄砂は呼吸器疾患を始めとした多くの健康被害を誘発する危険性が指摘されており、今後も黄砂による被害は増加の一途を辿ると考えられている。しかし、黄砂の生体影響に関しての科学的根拠に基づいた情報は乏しく、幾つかの研究機関で小規模な試験のみが実施されているという危機的な状況にある。言わば、科学的なエビデンスのないまま、国際問題にもなりかねない越境課題となりつつあり、感情的反発が高まっている。しかし、古くから春霞等々の季語として、我が国でも歌われ、共存してきたことも事実であり、今こそ、冷静かつ客観的に黄砂問題を見つめ直す必要がある。そこで本研究ではこのような危機的状況を強く鑑み、中国北京市に浮遊する黄砂と、比較対象として黄土高原土壌を用いて、体内動態や生体への影響を精査した。本結果は、今後のより詳細な検討が必要ではあるが、黄砂が体内に侵入する可能性を示唆し、黄土高原土壌よりも強い起炎性を有することを提示した。呼吸時に黄砂を吸引する場合、黄砂が少しずつ生体内へと蓄積し、過剰かつ慢性的な免疫応答を引き起こす可能性が考えられる。過去のアスベストの事例のように、体内に侵入する量はごく僅かであっても、生体内へと蓄積し生体の許容量を超えた時に、初めて予想だにできなかった病態を惹き起こす可能性もある。従って今後、更にヒト健康確保を目指した研究へと発展させるためには、例えば、今回の検討で明らかになった短期投与での体内動態の他に、長期投与による体内動態の検討も急務である。また、黄砂の生体に対する影響は、本検討以外にも、一般毒性や特殊毒性試験など他の評価系や、使う生物の種類や形態など様々な検討項目を体系的に評価し、総合的に判断されるべきである。今後、種々情報を総合することで、将来的には、本研究で得られた成果と、疫学的調査結果を併せて解析することで、黄砂に起因した疾患の発症や悪化のメカニズム解明とその予防・治療への対策へと繋げたいと考えている。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

黄砂等の風送ダストによる健康被害は、日本や中国・韓国・台湾といった東アジアのみならず、世界各国でも問題視されている。そのうえ昨今では、中国での急激な大気汚染の拡大や温暖化とも相俟って、大気中SO_x・NO_x量や花粉抗原が増大していることから、黄砂に付着する有機物の多様化とその増量が懸念されている。本研究において、種々の採取場所由来の黄砂の物性（成分）とその体内動態、さらには免疫毒性の連関解明を図った。特に、黄砂が吸引曝露により体内に侵入し得ることを明らかにし、さらに、免疫毒性の発症メカニズムを明らかにした。本研究成果は、黄砂により誘発される種々免疫疾患の発症・悪化の予防・治療法の開発に向けた基盤情報になり得るものと考えられる。さらに近年、本邦において、ディーゼル粒子や都市大気粉塵による大気汚染も深刻化している。従って、将来的には、本研究で得られた成果と、疫学的調査結果を併せて解析することで、黄砂をはじめとする微粒子に起因した疾患の発症・悪化のメカニズム解明とその予防・治

療への対策、ヒト健康環境の改善に大きく貢献するものと期待される。本研究の成果は、従来までの疫学調査に基づく黄砂の安全性懸念情報に科学的裏付けを付与し、黄砂に起因した疾患の予防・治療に重要な指針を提供するのみならず、地球環境保全に必須の基盤情報を国内外に提示するための基盤情報になり得ると考えられる。

(2) 環境政策への貢献

黄砂は、国境を超える環境問題であることから、国際活動に支障をきたすことなく、ヒト健康への影響を最大限に考慮しつつ、対策を講じることが必要不可欠である。そのためには我が国も、早急に、十分な疫学調査と共に、黄砂の生体影響を科学的に解明せねばならない。本研究の成果は、従来までの疫学調査に基づく黄砂の安全性懸念情報に科学的裏付けを付与し、科学的根拠のない情報による黄砂現象に対する社会不安を取り除くとともに、黄砂アレルギーなどの発症・悪化メカニズムの解明と、その予防・治療に重要な基盤情報を提供することで国民の健康確保に寄与すると考えられる。さらに、科学的根拠に立脚した環境リスクのマネジメントやそのレギュレーションに有用な情報を提供するものと期待される。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

T. Morishige, Y. Yoshioka, H. Inakura, A. Tanabe, X. Yao, S. Narimatsu, Y. Monobe, T. Imazawa, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, Y. Mukai, N. Okada, S. Nakagawa: *Biomaterials*, 31, 26, 6833-6842, 2010
 “The effect of surface modification of amorphous silica particles on NLRP3 inflammasome mediated IL-1 β production, ROS production and endosomal rupture”

<その他誌上発表(査読なし)>

特に記載すべき事項はない

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) Y. Yoshioka, T. Morishige, H. Inakura, S. Tsunoda, Y. Tsutsumi, Y. Mukai, N. Okada and S. Nakagawa: The Asia/Pacific Chapter of Environmental Toxicology and Chemistry 2010 Conference (SETAC), Cuangzhou, China, 2010
 “Silica particle, major component of Asian dust, induces IL-1 β production through NALP3 activation mediated by cathepsin B”
- 2) K. Higashisaka, Y. Yoshioka, K. Yamashita, Y. Morishita, T. Yoshida, M. Fujimura, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, N. Itoh, S. Tsunoda, T. Yoshikawa and Y. Tsutsumi: The Asia/Pacific Chapter of Environmental Toxicology and Chemistry 2010 Conference (SETAC), Cuangzhou,

China, 2010

“Development of biomarkers for the safety scientific assessment of nanosilica, major component of Asian dust“

- 3) K. Yamashita, Y. Yoshioka, K. Higashisaka, Y. Morishita, T. Yoshida, M. Fujimura, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, N. Itoh, S. Tsunoda, T. Yoshikawa and Y. Tsutsumi: The Asia/Pacific Chapter of Environmental Toxicology and Chemistry 2010 Conference (SETAC), Guangzhou, China, 2010
 “The safety scientific assessment of reproductive and developmental toxicity of nanosilica, major component of Asian dust”
- 4) Y. Morishita, Y. Yoshioka, K. Yamashita, K. Higashisaka, T. Yoshida, M. Fujimura, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, N. Itoh, S. Tsunoda, T. Yoshikawa and Y. Tsutsumi: The Asia/Pacific Chapter of Environmental Toxicology and Chemistry 2010 Conference (SETAC), Guangzhou, China, 2010
 “Distribution analysis of nanosilica, major component of Asian dust, to the testis for the safety scientific assessment”
- 5) 藤村真穂、吉岡靖雄、山下浩平、東阪和馬、森下裕貴、潘慧燕、小椋健正、鍋師裕美、吉川友章、伊藤徳夫、馬場貴志、山口進康、那須正夫、堤康央：日本薬学会 第131年会（2011）
 “黄砂の健康リスク解析を目指した免疫毒性に関する基礎的評価”
- 6) 吉岡靖雄、藤村真穂、山下浩平、東阪和馬、森下裕貴、潘慧燕、小椋健正、長野一也、阿部康弘、鎌田春彦、角田慎一、鍋師裕美、馬場貴志、山口進康、伊藤徳夫、吉川友章、那須正夫、堤康央：第38回日本トキシコロジー学会学術年会（2011）
 “ヒト健康へのリスク解析に資する黄砂の免疫毒性に関する基礎的評価”
- 7) Y. Yoshioka, M. Fujimura, K. Yamashita, K. Higashisaka, Y. Morishita, H. Pan, T. Ogura, H. Nabeshi, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, S. Tsunoda, T. Baba, N. Yamaguchi, M. Nasu, N. Itoh, T. Yoshikawa and Y. Tsutsumi: SETAC North America 32nd Annual Meeting, USA, 2011
 “Fundamental assessment for clarification of Relationship between Asian dust and influenza infection-1; Potential immunotoxicity of Asian dust for the future risk-analysis”
- 8) K. Yamashita, Y. Yoshioka, M. Fujimura, K. Higashisaka, Y. Morishita, H. Pan, T. Ogura, H. Nabeshi, K. Nagano, Y. Abe, H. Kamada, S. Tsunoda, T. Baba, N. Yamaguchi, M. Nasu, N. Itoh, T. Yoshikawa and Y. Tsutsumi: SETAC North America 32nd Annual Meeting, USA, 2011.
 “Fundamental assessment for clarification of Relationship between Asian dust and influenza infection-2; Biodistribution and inflammatory effects of Asian dust for the future risk-analysis”

(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）

特に記載すべき事項はない

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

特に記載すべき事項はない

8. 引用文献

- 1) A. Echigo et al.: Saline Systems, 20, 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)”
- 2) I. Mori, M. Nishikawa, T. Tanimura, H. Quan: Atmos. Environ., 37, 4253-4263, 2003
“Change in size distribution and chemical composition of kosa (Asian dust) aerosol during long-range transport”
- 3) H.J. Kwon et al.: Environ. Res., 90, 1-5, 2002
“Effects of the Asian dust events on daily mortality in Seoul, Korea”
- 4) K.T. Kanatani et al.: Am. J. Respir. Crit. Care Med., 182, 1475-1481, 2010
“Toyama Asian Desert Dust and Asthma Study Team. Desert dust exposure is associated with increased risk of asthma hospitalization in children”
- 5) Y. Goto et al.: Am. J. Respir. Crit. Care Med., 170, 891-897, 2004
“Particulate matter air pollution stimulates monocyte release from the bone marrow”
- 6) C. Dostert et al: Science., 320, 674-677, 2007
“Innate immune activation through Nalp3 inflammasome sensing of asbestos and silica”
- 7) F. Martinon, A. Mayor and J. Tschopp: Annu. Rev. Immunol., 27, 229-65, 2009
“The inflammasomes: guardians of the body”
- 8) T. Morishige et al.: Arch. Toxicol., 2012 [Epub ahead of print]
“Suppression of nanosilica particle-induced inflammation by surface modification of the particles”

(4) 黄砂現象の環境および健康への影響評価

大阪大学大学院薬学研究科

那須 正夫

<研究協力者>

大阪大学大学院薬学研究科

一條 知昭

平成21～23年度累計予算額：14,922千円

(うち、平成23年度予算額：4,870千円)

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

黄砂現象の環境・健康リスクを考えるにあたっては、地上から舞い上がった土壌粒子の影響を受けることなく黄砂粒子を採取するとともに、黄砂粒子の大きさ、元素組成など粒子としての特徴を把握する必要がある。そこで、本サブテーマでは、黄砂試料の採取方法から検討し、黄砂のより詳細な解析を可能にし、黄砂現象の環境・健康への影響を評価するための基盤的知見を得た。

黄砂中の細菌現存量は、通常的生活環境における大気中の細菌現存量と比較しても、同程度以下であることから、感染症の原因となる可能性は低いと考えられた。しかしながら、これまでの報告以上に多種多様な細菌種が黄砂現象とともに飛来していることから、定着や遺伝子伝播により生態系に影響を及ぼしうると考えられた。一方、微小粒子としての黄砂は、炎症の惹起や生体内への侵入など、生体へ影響を与える可能性があることがわかった。また、日本へ飛来する黄砂粒子は、水分の存在下でより微細な粒子へ分散することから、ヒトの粘膜上でも分散する可能性が示され、細粒子としての黄砂の健康影響を考える必要があることが明らかになった。

[キーワード] 黄砂、環境影響、健康影響、粒度分布、元素組成

1. はじめに

日本においては、2000年から2002年にかけて発生した大規模な黄砂現象を契機として、黄砂の環境や健康に与える影響について、社会的関心が高まっている^{1),2)}。特に健康影響に関する注目は高く^{3),4)}、大量に飛来する黄砂粒子に付着した微生物や化学物質などの影響が懸念されている。

このような黄砂現象の影響を正確に評価するためには、黄砂の採取にあたって可能な限り地上の影響を排除する必要がある。環境科学研究において、試料採取はもっとも基本かつ重要であり、最適化された方法論ならびに研究実施体制を構築しておかなければならない。また黄砂が環境や健康へ与える影響を評価するためには、黄砂粒子の量や粒度分布、元素組成などの粒子の特徴を把握し、黄砂発生源土壌から日本へいたる飛来経路において採取した黄砂と比較検討しなければならない。また、サハラダストを始めとした風送ダストや、一般的な生活環境における大気中のダストについても情報を収集しておく必要がある。

2. 研究開発目的

黄砂による環境・健康影響を評価するためには、地上から舞い上がった土壌粒子の混入を防ぎ、黄砂粒子を確実に採取し、分析しなければならない。そこで、これまでの研究で製作した独自の黄砂捕集装置を最適化するとともに、日本上空での試料採取体制を構築した。その上で、2010年3月から継続的に日本上空において黄砂粒子を捕集し、粒度分布および元素組成分析によりその粒子としての特徴を明らかにした。

また、環境・健康への影響を評価するためには、比較対象となる知見も必要となる。そこで、サハラダストなど世界各地で行われている風送ダスト研究に関して、本研究の特徴でもある微生物に関する研究を中心に情報収集を行うとともに、一般的な生活環境における空気中のダストについても情報収集を行った。さらに、日本上空での試料採取だけでなく、地上においても試料採取を行い、サブテーマ(1)から(3)の成果と合わせて、黄砂現象の環境・健康へのリスクについて考察した。

3. 研究開発方法

(1) 日本上空における黄砂の採取法の最適化

これまでの研究において作製した湿式ビーズを用いた独自の黄砂捕集装置について、装置からの黄砂回収法およびその回収率を評価した。黄砂発生源土壌の一つである黄土高原で採取した土壌粒子を分級し、10 μm以下の粒子画分について、既知量を装置に添加した。滅菌水を用いて洗浄し、回収した土壌粒子数を後述の(2)で開発した画像解析プログラム (PaSDAS) を用いて計数し、回収率を求めた。さらに、ビーズの洗浄方法、滅菌方法を最適化した。

また、飛来した黄砂粒子の形状を明らかにするために、粘着シート⁵⁾を用いた乾式の黄砂捕集法を検討した。

(2) 黄砂粒子の粒度分布測定用画像解析プログラムの開発

走査型電子顕微鏡を用いた粒度分布測定のために、新たな画像解析プログラム (PaSDAS)

を開発した。プログラミングにあたっては、ANSI C言語を用いた。アルゴリズムは、1) 走査型電子顕微鏡像の読み込み、2) 画像の二値化、3) 粒子の検出（ラベリング）、4) 各粒子の面積測定、5) 粒度分布測定、6) ファイリングである。なお、粒子径はHeywood径（粒子の投影面積と同じ面積を持つ円の直径）とした。開発したプログラムの精度評価にあたっては、市販の微小粒子（0.3–10 μm ）を用い、その走査型電子顕微鏡像をPaSDASで解析した。

（3）日本へ飛来した黄砂粒子の粒度分布測定および成分分析

日本上空（鳥取県北部および兵庫県南部の沿岸部：高度1,000–2,000m）において、第一航空株式会社の協力のもと、黄砂を採取した。2010年3月から11月および2011年4月から5月の黄砂飛来時を中心に、合計23回の試料採取を行った。試料採取にあたっては、地上の山脈等からの影響を受けないようにルートを決定した。

黄砂粒子の粒度分布測定にあたっては、採取した黄砂粒子をポリカーボネートフィルター上に捕集し、走査型電子顕微鏡（JSM 5610L, JEOL）を用いて画像を取得し、前述の(2)で開発した画像解析プログラム（PaSDAS）を用い、粒度分布を測定した。各試料について2,000–8,000粒子の計測を行った。

黄砂粒子の元素組成測定にあたっては、SEM-EDX（Scanning electron microscope equipped energy-dispersive X-ray）による元素組成分析を行った。各試料について、粒径0.5–1 μm および1–5 μm の粒子画分について、各100粒子の測定を行った。測定対象とした元素は、ナトリウム(Na)、マグネシウム(Mg)、アルミニウム(Al)、ケイ素(Si)、リン(P)、硫黄(S)、カリウム(K)、カルシウム(Ca)、マンガン(Mn)、鉄(Fe)、銅(Cu)、亜鉛(Zn)、鉛(Pb)の13元素であり、これらの元素の存在比を求めた。また、粘着シートにより採取した粒子についても同様の分析を行った。

（4）黄砂の環境・健康への影響評価

黄砂現象の環境・健康への影響を評価するためには、黄砂現象のみならず、サハラ沙漠を発生源とするサハラダストやオーストラリア沙漠でのオーストラリアンダストを含む風送ダスト全般について現状を把握する必要がある。風送ダストに関する研究はサハラダストに関する研究を中心に行われてきており、粒子の気象への影響や化学成分など多くの知見が報告されている。そこで、黄砂の環境および健康への影響を考察するための比較対象として、微生物を中心に、風送ダストに関する文献調査を行うとともに、我々が生活している一般的な環境の空気中の微生物に関しても情報収集を行った。

さらに、ヒトが生活する環境における細菌現存量および細菌群集構造を明らかにするために、大阪大学屋上において黄砂飛来時および非黄砂時に大気を採取し、サブテーマ(1)で最適化した定量的PCR法による細菌現存量測定およびPCR-DGGE法による細菌群集構造解析を行った。

本サブテーマにおける結果とサブテーマ(1)から(3)で得られた結果を総合し、微生物のキャリアーとしての黄砂と微小粒子としての黄砂の両面から、黄砂現象の環境・健康への影響について考察を行った。

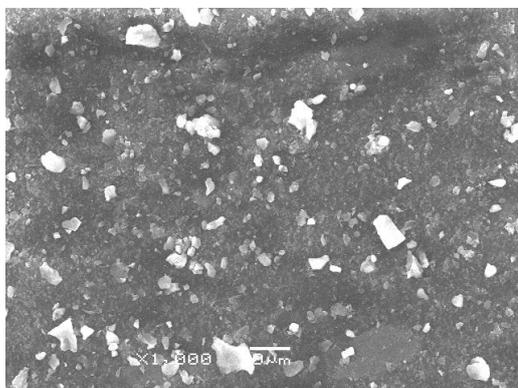
4. 結果及び考察

(1) 日本上空における黄砂の採取法の最適化

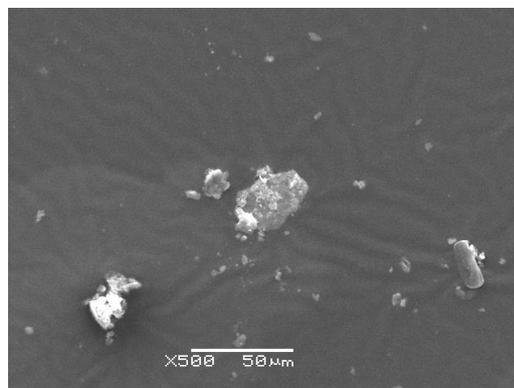
従来から行われている黄砂の採取法としては、地上におけるサンプリングが一般的である。しかしながら、地上における試料採取では、地表面から舞い上がった粒子の影響を含めて分析することになり、黄砂の影響のみを評価することは困難である。また、黄砂粒子および黄砂粒子上の微生物について、定量的な解析を行うためには、十分量の黄砂を採取する必要がある。そこで本研究では、日本上空（鳥取県北部および兵庫県南部の沿岸部：高度1,000–2,000 m）において黄砂粒子を直接採取した。その際に、独自に開発した黄砂捕集装置を用いた。本捕集装置はポンプを使用することなく、100–120 L/minの流速で外気を装置内に送り込み、大気中に含まれる黄砂粒子を装置内に充填した濡れたビーズで採取するものである（湿式ビーズ法：（図(4)-1a））。この流速は他の装置に比べて約10倍高く、また粒子の回収率も70%以上であることから、短時間で大量の黄砂の採取を可能にした。また、洗浄、滅菌をすることによりコンタミネーションを防ぐことができることを確認した。

湿式ビーズ法は大量の黄砂試料を採取する必要がある微生物分析には非常に有用である一方で、水を使用するため、粒子表面に付着した化学成分の分析には不向きである。そこで、浮遊する粒子を乾燥した状態で採取するために、粘着シートを用いた捕集法の検討を行った（乾式粘着シート法：（図(4)-1b））。本研究で用いる粘着シートは当研究室で開発し⁵⁾、機器等の表面に存在する微生物のサンプリング法として、国際宇宙ステーション内の微生物モニタリングにも応用されている。

a) 湿式ビーズ法



b) 乾式粘着シート法



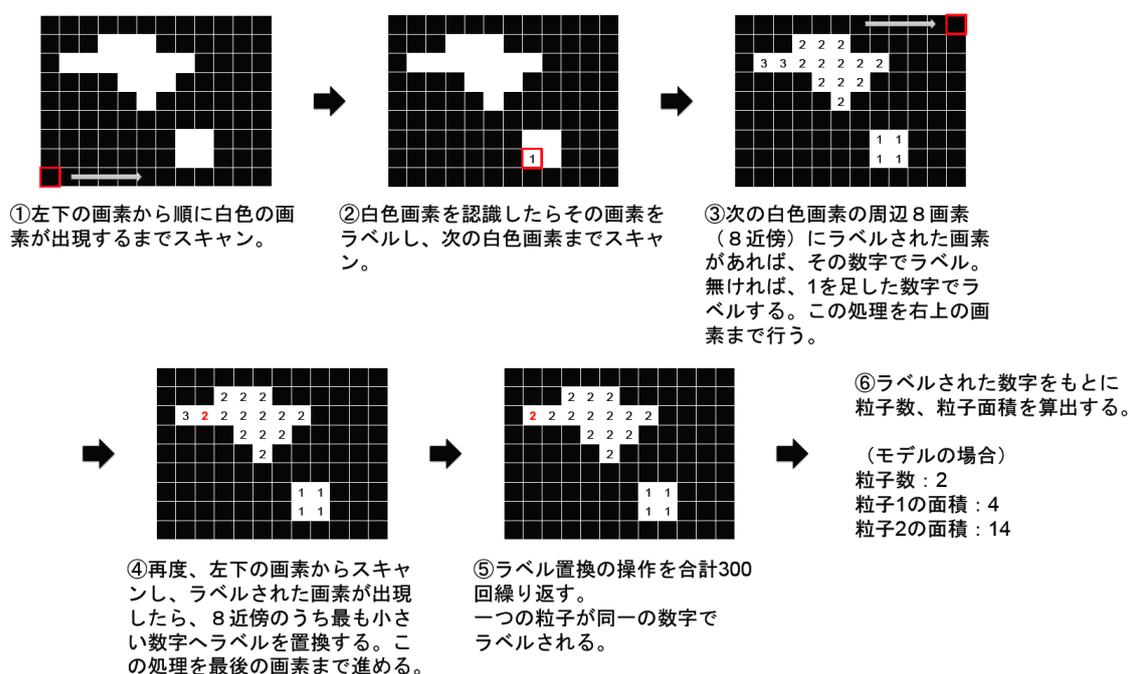
図(4)-1. 日本上空において採取した黄砂粒子の電子顕微鏡画像

a) 湿式ビーズ法、b) 乾式粘着シート法により採取した。

以上の結果より、湿式ビーズ法による大量サンプリングと乾式粘着シート法による乾燥した粒子のサンプリングの両方を可能にし、黄砂現象にともない飛来する細菌および黄砂粒子そのもののより詳細な解析を可能とした。

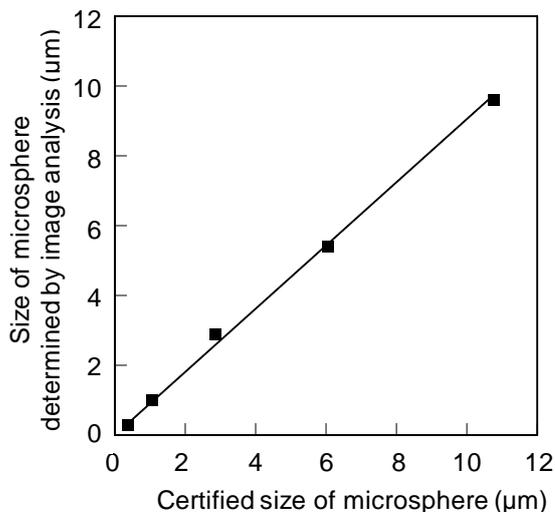
(2) 黄砂粒子の粒度分布測定用画像解析プログラムの開発

黄砂粒子の健康影響を明らかにするためには、黄砂粒子の粒径に関する情報は必要不可欠である。本サブテーマでは、黄砂捕集装置の改良により、従来よりも大量の試料採取を可能としたものの、採取できる黄砂量では、粒度分布測定を行う際に従来用いられているレーザー一回折式粒度分布測定装置を用いることができなかつた。そこで、微量な試料においても粒度分布測定を可能とするため、走査型電子顕微鏡画像を用いた独自の画像解析プログラム（PaSDAS：Particle Size Distribution Analysis Software）を開発した。PaSDASにおいては、図(4)-2の方法で粒子ラベリングを行うことにより、歪な形状をした粒子の分析に対応した。



図(4)-2. 画像解析プログラム（PaSDAS：Particle Size Distribution Analysis Software）による粒子のラベリング過程

また、既知の粒子径の微小粒子（0.3 - 10 μm ）を用いて、その計数精度を確認した。その結果、実際の粒子径とPaSDASでの測定値の間に高い相関関係が認められ、本プログラムを用いることにより高精度な粒度分布測定が可能であることがわかつた（図(4)-3）。また、600個以上の粒子を計測することにより、測定値の誤差が小さくなることから、黄砂粒子の粒度分布測定においては、1,000粒子以上を測定することとした。



図(4)-3. 画像回解析プログラム
 (PaSDAS : Particle Size
 Distribution Analysis Software) に
 よる粒子の計数精度
 既知の粒子径のビーズを用い、計
 数精度を確認した。

従来のレーザー回折式粒度分布測定装置では、粒子の散乱光を利用した粒径測定であるため、土壌粒子のような不定形の粒子においてはばらつきが大きくなる。しかし、本プログラムにおいては、走査型電子顕微鏡画像を用いるため、計数している粒子の形状を確認できるという利点もあり、微量な試料の分析が可能である点も含め、黄砂粒子の粒度分布測定のみならず、さまざまな粒子の解析に応用可能である。

(3) 日本へ飛来した黄砂粒子の粒度分布測定および成分分析

日本上空（鳥取県北部および兵庫県南部の沿岸部：高度1,000–2,000m）において、2010年3月から11月および2011年4月から5月に合計23回の試料採取を行った。試料採取場所を図(4)-4に示した。試料採取にあたっては、高層天気図、環境省、気象庁、LIDARによる観測情報をもとに、第一航空株式会社の協力のもと、黄砂飛来時を中心に行った。



図(4)-4. 試料採取地点
 および試料採取に用いた
 小型航空機と独自に
 開発した黄砂捕集装置

日本上空における試料採取時の状況を表(4)-1に示した。合計23回の試料採取のうち、2010年3月から11月においては、兵庫県南部の沿岸部(高度:約1,000-2,000m)で行った(表(4)-1a)。また、2010年3月20日から5月22日の計7回の試料採取時には、黄砂飛来が観測された。一方、2010年6月24日から11月5日の計5回の試料採取時には、黄砂現象は観測されておらず、また気圧配置等の気象条件を考慮しても非黄砂時であり、バックグラウンドとして試料採取を行った。

一方、2010年11月には、本研究期間内において最大規模の黄砂現象が観測された(図(4)-5)ことから、高層天気図、気象庁の黄砂観測状況、LIDAR、METAR等の情報を総合し、従来の試料採取地点である兵庫県南部よりも大気中の黄砂濃度が高いと判断された鳥取県北部の沿岸部においても試料採取を行った(表(4)-1b)。さらに、黄砂飛来前の11月11日から、黄砂が飛来した12日、徐々に黄砂が拡散した13日、降雨により完全に黄砂が終息した16日まで、連続的に試料採取を行った。

また、2011年4月10日および大規模な黄砂現象が観測された5月2日に鳥取県北部の沿岸部において試料採取を行った(表(4)-1c)。

a) 2010年3月～11月

採取地点	採取日	黄砂	採取高度 (m)	採取量 (L)
兵庫県	20 Mar.	+	1,800	10,500
南部	21 Mar.	+	1,500	6,600
	22 Mar.	+	1,800	8,000
	26 Mar.	+	1,500	10,000
	28 Apr.	+	1,500	11,000
	29 Apr.	+	1,500	9,000
	22 May	+	1,500	11,500
	24 Jun.	-	1,500	8,000
	23 Jul.	-	1,500	10,000
	19 Aug.	-	1,800	10,000
	28 Sep.	-	1,800	7,500
	05 Nov.	-	1,800	11,000

b) 2010年11月

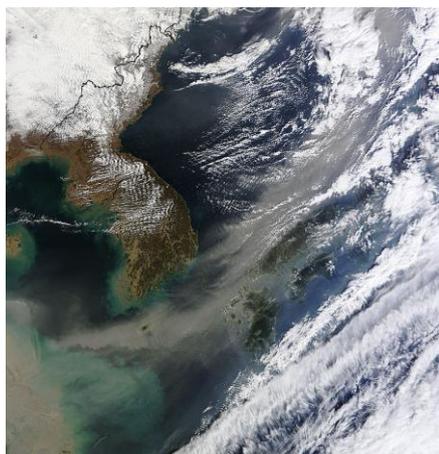
採取地点	採取日	黄砂	採取高度 (m)	採取量 (L)
兵庫県	11 Nov.	-	1,500	11,000
南部	12 Nov.	++	900	2,100
	13 Nov.	+	750	3,500
	16 Nov.	-	900	9,000
鳥取県	12 Nov.	++	900	15,000
北部	13 Nov.	+	750	12,000
	16 Nov.	-	900	10,000

c) 2011年4月～5月

採取地点	採取日	黄砂	採取高度 (m)	採取量 (L)
鳥取県	10 April	+	900	13,000
北部	02 May	++	900	12,000

表(4)-1. 日本上空における試料採取状況

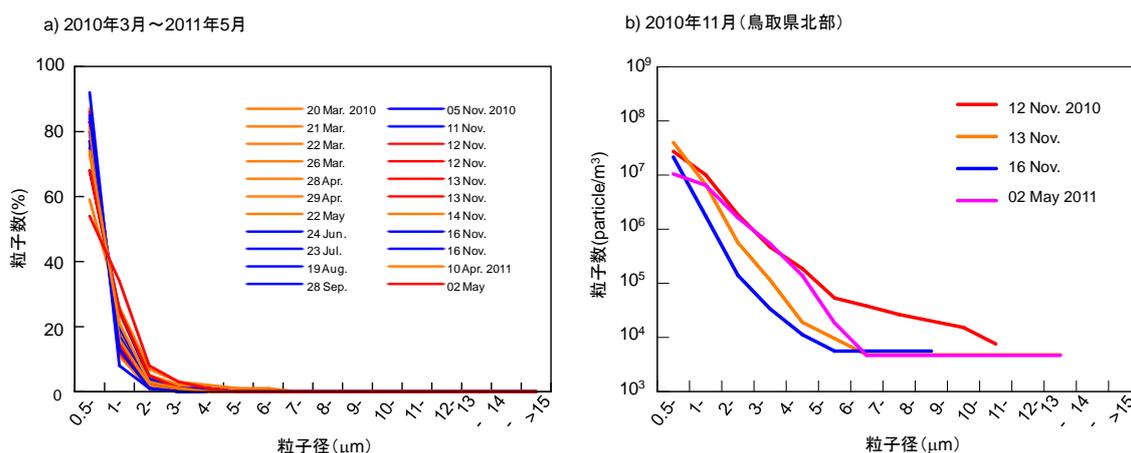
黄砂の飛来はSYNOP、LIDAR、METARおよび試料採取高度における機長の観測を総合して判断した。



図(4)-5. 2010年11月12日に日本へ飛来した黄砂の衛星画像（11:20 (JST)）

(<http://rapidfire.sci.gsfc.nasa.gov/gallery/?20103161112/SeaofJapan.A2010316.0220.2km.jpg>)

前述(2)において開発したSEM画像を用いた画像解析プログラムを用いて、2010年3月から2011年5月に日本上空で採取した黄砂粒子の粒度分布を図(4)-6a)に示した。黄砂飛来時においても1 μm 以下の粒子が全体の60–80%を占め、非常に粒径の小さい粒子が飛来していることがわかった(図(4)-6a)。また試料採取日によらず、ほぼ同様の粒度分布を示した。一方で、大規模な黄砂現象が確認された2010年11月に日本上空（鳥取県北部の沿岸部、高度1,000–2,000 m）で採取した黄砂粒子では、1 μm 以下の粒子が最も多く存在する点は変わらないものの、2 μm 以上の粒子数が増加していた(図(4)-6b)。また、2010年11月と同様に大規模な黄砂現象が確認された2011年5月2日においても、2–5 μm の比較的粒径の大きな粒子数が増加していたことから、大規模な黄砂観測時には粒径の大きい粒子が飛来している可能性が示された。

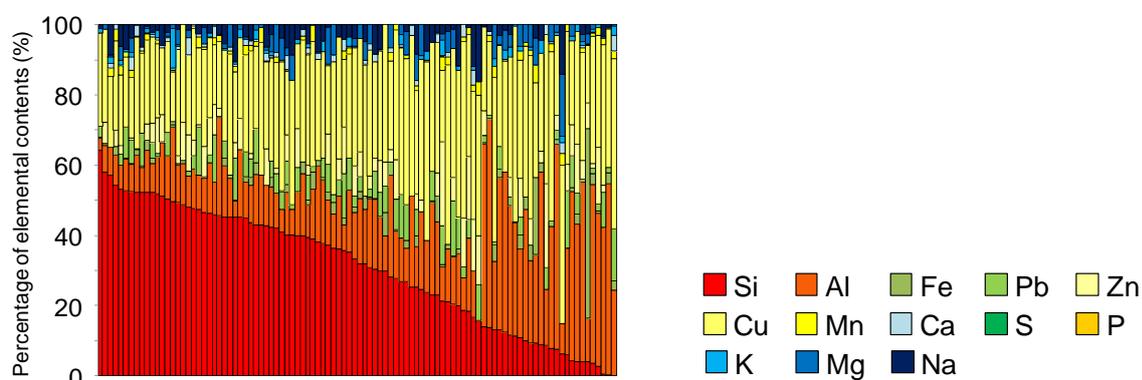


図(4)-6. 日本上空で採取した黄砂粒子の粒度分布

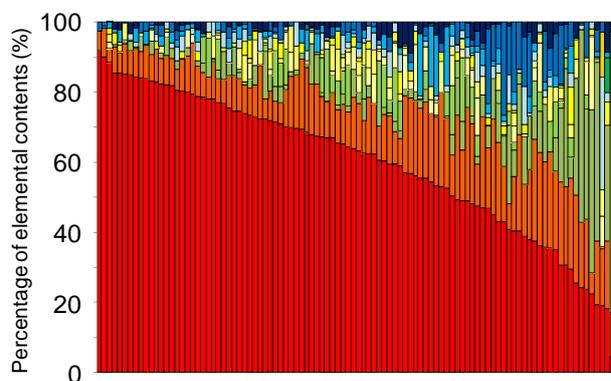
黄砂粒子の電子顕微鏡画像を用い、独自に開発した画像解析プログラムにより、各粒子のハイウッド径を算出した。各試料について、3,000粒子以上を測定した。

また、採取した黄砂粒子の元素組成分析を行った結果、ケイ素（Si）およびアルミニウム（Al）を主成分とする粒子が多く存在することがわかった（図(4)-7）。非黄砂時期である2010年8月19日には、ケイ素（Si）やアルミニウム（Al）を主成分とする粒子の割合が少なく、亜鉛や銅などの割合が高い粒子が多かった図(4)-7a）。一方で大規模な黄砂現象が観測された2010年11月12日には、ケイ素（Si）やアルミニウム（Al）を主成分とする土壌由来と考えられる粒子の割合が明らかに高くなった（図(4)-7b）。さらに粒子数が増加した1-5 μm の画分の粒子についても、ケイ素（Si）やアルミニウム（Al）を主成分とする土壌由来と考えられる粒子の割合が高くなった（図(4)-7c）。

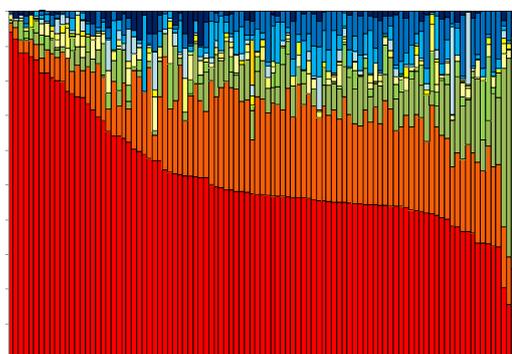
a) 2010年8月19日（粒子径:0.5~1 μm ）



b) 2010年11月12日（粒子径: 0.5~1 μm ）



c) 2010年11月12日（粒子径: 1~5 μm ）



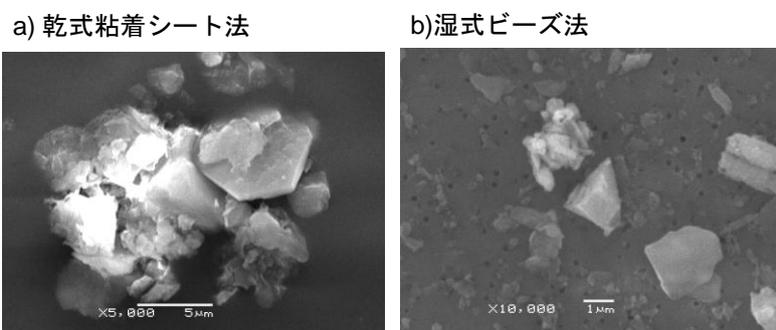
図(4)-7. 日本上空で採取した黄砂粒子の元素組成
黄砂粒子元素組成をSEM-EDXを用いて測定した。

a) 2010年8月19日（粒径0.5-1 μm ）、b) 2010年11月12日（粒径0.5-1 μm ）

c) 2010年11月12日（粒径1-5 μm ）

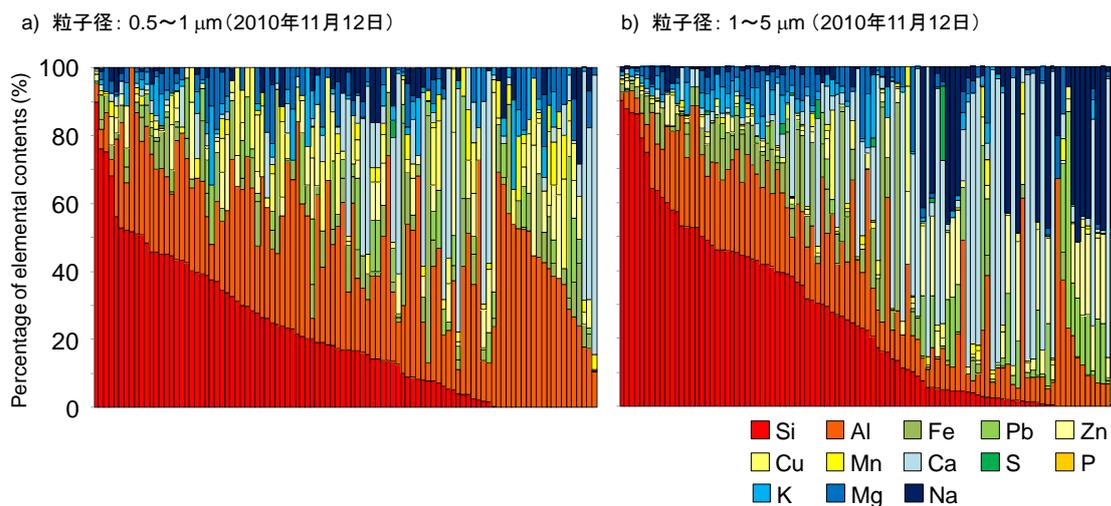
各粒子画分について、それぞれ100粒子について測定した。

湿式ビーズ法による試料採取では、10,000 L以上の採取を可能にし、信頼できるデータの蓄積が可能である反面、水を使用するため、黄砂粒子に付着した成分の溶解や粒子の細分化が起きている可能性がある。そこで、粘着シートを用いて直接粒子を採取し、走査型電子顕微鏡を用いて観察した(図(4)-8)。その結果、日本に飛来する黄砂中には細かな粒子以外に、粒子同士が結合した粒径の大きな凝集体が存在することがわかった(図(4)-8a)。さらに、粘着シート法で採取した試料について元素組成分析を行った結果、湿式ビーズ法で採取した試料に比べ、ケイ素(Si)を多く含む粒子の割合が低く、アルミニウム(Al)あるいはカルシウム(Ca)が主成分である粒子が存在した(図(4)-9a,b)。特にカルシウム(Ca)は、湿式ビーズ法による試料ではほとんど認められなかったことから、黄砂粒子の表面に可溶性のカルシウムが付着していたものと考えられる。また、鳥取県北部の上空で採取した粒径1-5 μm の画分の粒子のみに、ナトリウム(Na)、亜鉛(Zn)、鉛(Pb)を主成分とする粒子が認められた。



図(4)-8. 乾式粘着シート法および湿式ビーズ法により日本上空で採取した黄砂粒子の電子顕微鏡画像

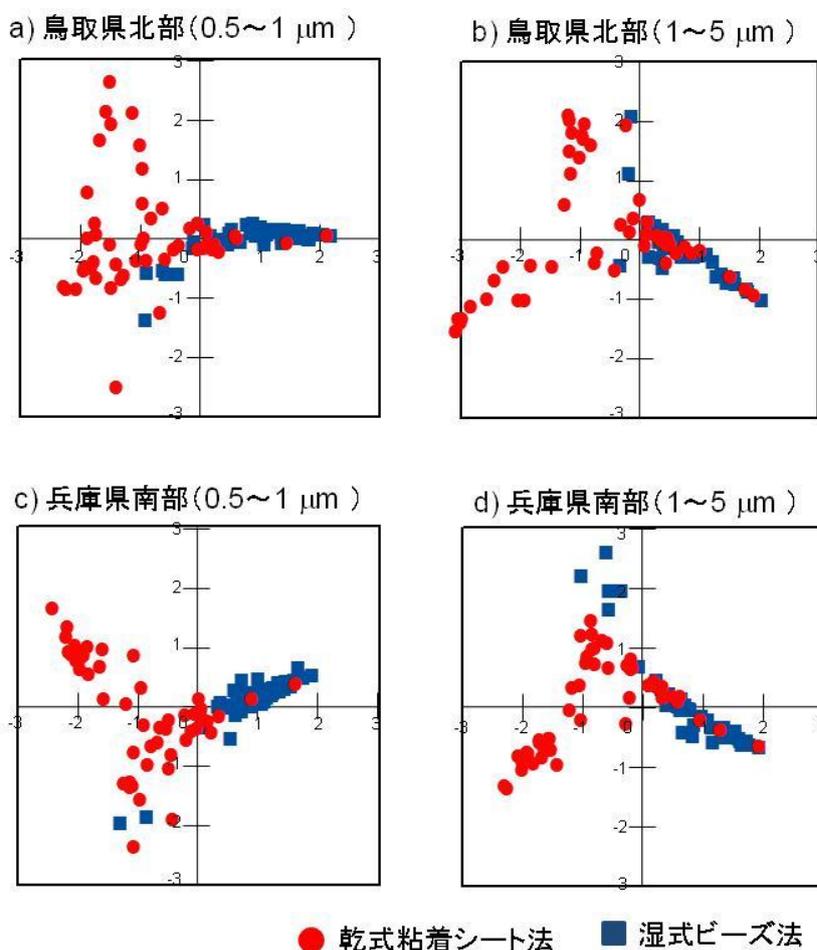
a) 乾式粘着シート法、b) 湿式ビーズ法



図(4)-9. 乾式粘着シート法により日本上空で採取した黄砂粒子の元素組成
黄砂粒子元素組成をSEM-EDXを用いて測定した。a) 粒径0.5-1 μm 、b) 粒径1-5 μm 各粒子画分について、それぞれ100粒子について測定した。

さらに、湿式ビーズ法で採取した粒子と粘着シート法で採取した粒子の元素組成について、多次元尺度法を用いた比較解析を行った（図(4)-10）。2010年11月12日に鳥取県北部の沿岸部（高度:1,000–2,000 m）で採取した黄砂粒子では、粒径0.5–1 μm と1–5 μm の両方の粒子画分において、元素組成が大きく異なっていることがわかった（図(4)-10a,b）。さらに、湿式ビーズ法のプロットが密集しているのに対して、粘着シート法におけるプロットは広がっており、粒子ごとの元素組成が大きく異なっていることがわかった。また、その傾向は兵庫県南部の沿岸部（高度:1,000–2,000 m）において採取した黄砂粒子においても認められた（図(4)-10c,d）。

多次元尺度法は細菌群集構造の比較解析にも応用されており⁶⁾、今後最適化を進めることで、黄砂などの多様な構成要素を併せ持つ試料の有用な統計解析手法となると考えられる。



図(4)-10. 多次元尺度法による黄砂捕集法の違いによる黄砂粒子の元素組成解析
黄砂粒子は、2010年11月12日に日本上空（鳥取県北部および兵庫県南部の海上、高度1,000–2,000 m）で採取した。

a) b) 鳥取県北部、c) d) 兵庫県南部、a), c) 粒径0.5–1 μm 、b), d) 粒径1–5 μm
赤色：乾式粘着シート法、青色：湿式ビーズ法

以上の結果より、黄砂には、粒径の小さい粒子に加えて、粒径の小さい粒子の凝集体が混在しており、大規模な黄砂観測時には、粒径の大きい粒子数が増加する可能性のあることがわかった。また水分の存在下において、黄砂粒子が分散する可能性があることが明らかになった。このことは、黄砂粒子がヒト等の粘膜上において、より微細な粒子に分散する可能性があることを示しており、黄砂粒子の生体影響を明らかにする上で重要な知見となった。さらに、黄砂観測時の日本上空には、ケイ素(Si)あるいはアルミニウム(Al)の含有率の高い土壌由来と考えられる粒子が多く存在しているとともに、その粒子表面には多様な元素が付着していることがわかった。また湿式ビーズ法と粘着シート法での比較により、黄砂飛来時には水溶性のカルシウム(Ca)を含む粒子が多く存在することが明らかになり、これらの水溶性成分により粒子同士が付着している可能性があることがわかった。

(4) 黄砂の環境・健康への影響評価

黄砂の環境・健康への影響を評価するためには、黄砂に関して詳細なデータを蓄積するとともに、サハラダスト等を含めた風送ダストに関する研究の現状を把握しておく必要がある。そこで、過去5年間の報告を中心に情報収集を行った。その結果、風送ダストに関する論文数は1000件以上あり、その内訳としてはサハラダストが最も多かった。次に黄砂 (Asian dust, Yellow sand, Kosa) が多く、約400件あった。しかしながら、微生物に関する報告は約20件と報告数が非常に少なく、社会的関心が高いにも関わらず未知な部分が多いことがわかった。さらに試料採取方法等も様々であり、単純に比較できない。また微生物の検出については培養法が中心であり、検出された微生物数も少なく、風送ダストの環境や健康への影響を評価するために必要な定量的データはほとんどなかった。したがって、小型航空機を用いて上空で試料を採取するとともに解析に十分量の試料を確保し、定量的な解析を行った本研究は、黄砂とともに飛来する微生物に関する重要な基盤的知見となるとともに、地球規模での風送ダスト現象の影響を明らかにする上でも重要である。

さらに、ヒトが生活する様々な大気環境中におけるダストおよび細菌数に関するデータを収集した結果、家畜舎など非常にダスト粒子濃度の高い環境や、逆にクリーンルームなど非常に粒子濃度が低い環境など両極端な環境下での報告が多く、ヒトが生活する一般的な環境におけるダスト濃度や細菌数に関する報告がほとんどないことがわかった。そこで、ヒトが生活する環境における大気中の細菌現存量について測定を行った結果、細菌現存量は環境によって大きく異なるものの、 10^2 – 10^4 cell/m³であることがわかった。サブテーマ(1)の結果と比較すると、黄砂とともに飛来する細菌現存量は、通常の大気中と同程度以下であると考えられる。しかしながら、黄砂の影響を評価するための生活環境における大気中の細菌に関する知見は不足しており、今後更なる研究が必要であると考えられる。

本研究全体の目的は、黄砂を「微生物のキャリアー」と「微小粒子」として捉え、黄砂現象の環境・健康への影響を評価するための基盤的知見を蓄積することにあつた。そのために、試料採取方法から検討し、地上の影響を極力排除し、黄砂そのものについて解析を行った。

黄砂の影響について、微生物の面から健康へのリスクを考えた場合、黄砂とともに飛来する細菌の現存量は大規模な黄砂飛来時でも1 m³あたり約10⁴ cellsであり、我々の生活する一般的な大気中と比較しても同程度以下であること、加えて細菌種についても土壌や河川など幅広い環境中に存在する一般的な細菌種が大部分であり、深刻な感染症等の起因菌は検出されていないことから、細菌による感染症の発生等のリスクは低いと考えられた。その一方で、黄砂は数百万から数千万年にわたって飛来しており、地球学的な時間スケールでは膨大な量の細菌が地球上を移動していると考えられる。またその属種についても多種多様であることから、飛来地での定着や遺伝子伝播を通じて、地球上の微生物生態系に影響を与えてきた可能性があり、一般的な環境における細菌群集が高い多様性を維持している機構を考える上でも大きな成果である。

一方で粒子としての黄砂は、炎症を惹起するとともに、生体内に侵入し、細胞障害を起こす可能性が示され、さらに細かい粒子ほど起炎性が強くなることが明らかになった。黄砂粒子がヒトの粘膜上でさらに微細な粒子に分散する可能性も示されたことから、粒子としての黄砂は生体に影響を与える可能性があると考えられた。

本研究により、黄砂の環境・健康への影響を評価するための基盤的知見を得た。今後、黄砂の健康・環境への影響を評価するためには、我々の生活圏における大気中の微生物に関する知見の蓄積が必要であり、本研究で用いた分子微生物学的方法論はそのための有用なツールとなると考えられる。また、黄砂の健康影響を評価するにあたっては、微生物、黄砂粒子など単独の影響に加え、化学物質、ディーゼルや花粉など他の浮遊粒子との複合影響も併せて考えていく必要がある。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

黄砂等の風送ダストによる健康被害は、日本や中国・韓国・台湾といった東アジアにおいて、社会的関心を集めている。さらに、近年の急激な大気汚染・温暖化に伴い、予期せぬ成分や微生物が付着した黄砂が飛来することによる我々の健康に対するリスクの上昇が懸念されている。

本研究により得られた黄砂現象とともに移動する細菌の量、属種に関する定量的なデータは、黄砂現象の健康影響を評価する上で不可欠な基盤的知見となるだけでなく、これまで考えられていた以上に多様な微生物が地球上を移動していることを明らかにしたことから、地球規模での微生物およびその遺伝子の移動、また微生物生態系における多様性維持の機構を考える上でも重要な知見である。

また、粒子としての黄砂の生体影響という観点から、トキシコキネティクスなどを有効活用し、黄砂の物性（成分）とその体内動態、さらには免疫毒性の評価を行った。今後、本研究で得られた成果と、疫学的調査結果を併せて解析することで、黄砂をはじめとする微粒子に起因した疾患の発症・悪化のメカニズム解明などに大きく貢献するものと期待される。

(2) 環境政策への貢献

本研究では、黄砂とともに飛来する細菌の現存量および多様性、ならびに黄砂粒子の生体影響に関する基盤的知見を得た。これらの成果を学術的に公表するとともに、種々のメディアを通じて一般社会に紹介し、成果の広報・普及に努めることにより、科学的根拠のない情報によって生じる黄砂現象に対する過度の社会不安を取り除き、科学的データに立脚した環境リスクのマネジメントやリスク・コミュニケーション等の政策に貢献できる。

6. 国際共同研究等の状況

中国農業大学・李品芳教授（中国）に研究協力を依頼し、北京市・中国農業大学屋上において黄砂捕集を行っている。また、2010年4月には李教授が大阪大学を訪問、2010年6月には研究代表者である那須が中国農業大学を訪問し、黄砂現象や黄砂発生の要因の一つでもある黄砂発生源地域における農業や土地利用、さらに水利に関するディスカッションを行うなど、密接な協力関係を築いている。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文（査読あり） >

- 1) N. Yamaguchi, A. Sakotani, T. Ichijo, T. Kenzaka, K. Tani, T. Baba and M. Nasu: Biol. Pharm. Bull., 35, 1187-1190 (2012)

“Break down of Asian dust particle on wet surface and their possibilities of cause of respiratory health effects”

- 2) N. Yamaguchi, T. Ichijo, A. Sakotani, T. Baba and M. Nasu: Sci. Rep. (in press)

“Global dispersion of bacterial cells on Asian dust”

< その他誌上発表（依頼原稿） >

- 1) 山口進康、那須正夫：ファルマシア, 46, 659-663 (2010)

「地球を巡る微生物－健康な生活を保証する－」

- 2) 那須正夫：化学療法の領域, 26, 2372-2375 (2010).

「環境の変化と微生物生態系（総論）」

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) 那須正夫：第4回大気バイオエアロゾルシンポジウム（2010）

「黄砂飛来にともなう微生物およびその遺伝子の移動に関する環境微生物学的研究」

- 2) 一條知昭、姫澤由佳、馬場貴志、那須正夫:日本薬学会第130年会（2010）

「黄砂粒子の粒度分布測定を目指した画像解析プログラムの開発」

- 3) 一條知昭、馬場貴志、姫澤由佳、山口進康、那須正夫:第26回日本微生物生態学会（2010）

「黄砂現象とともに移動する細菌の現存量」

- 4) T. Baba, T. Ichijo, M. Saraya, K. Enoki, Y. Himezawa, N. Yamaguchi and M. Nasu: 111th American Society for Microbiology General Meeting, Orland, USA, 2011
“Long distance movement of bacteria by Asian dust”
- 5) 一條知昭、馬場貴志、姫澤由佳、山口進康、那須正夫: 第27回日本微生物生態学会 (2011)
「黄砂現象による細菌の長距離移動」
- 6) 一條知昭、馬場貴志、姫澤由佳、更家信、榎木香奈実、山口進康、那須正夫: 第6回大気バイオエアロゾルシンポジウム (2011)
「黄砂とともに飛来する細菌の現存量と多様性」
- 7) 馬場貴志、一條知昭、山口進康、那須正夫: 第85回日本細菌学会総会 (2012)
「黄砂現象にとまなう細菌の長距離移動」

(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4回大気バイオエアロゾルシンポジウム (金沢大学との共催) (2010年3月14日、名古屋市ポートビル、参加者約40名)
- 2) 黄砂現象の環境・健康影響 —微生物および化学物質の長距離移動— (総合地球環境学研究所、金沢大学との共催) (2011年4月15日、総合地球環境学研究所 セミナー室1・2、参加者約30名)
- 3) Health and Environment: environmental problem and infection diseases (2012年3月19日、大阪大学 特別講義室、参加者約30名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない

(6) その他

招待講演

M. Nasu: 2012 International Bioaerosol Symposium (Seoul, Korea, 2012)

“Global dispersion of bacterial cells with Asian dust”

8. 引用文献

- 1) 環境省, 黄砂
<http://www.env.go.jp/earth/dss/pamph/pdf/full.pdf>
- 2) C.C. Chan et al.: Environ. Res., 106, 393-400, 2008
“Increasing cardiopulmonary emergency visits by long-range transported Asian dust storms in Taiwan”

- 3) 環境省、黄砂問題検討委員会, 2005
「黄砂問題検討委員会報告書（平成17年9月）」
- 4) 日本学術会議農学委員会風送大気物質問題分科会, 2010
「2010年2月25日 報告 黄砂・越境大気汚染物質の地球規模循環の解明とその影響対策」
- 5) N. Yamaguchi et al.: J. Microbiol. Methods, 53, 405-410, 2003
“Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces”
- 6) T. Iwamoto et al. : FEMS Microbiol. Ecol., 32, 129-141, 2000.
“Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE”

Research on Impacts of Asian Dust on Our Health and Environment

Principal Investigator: Masao NASU

Institution: Graduate School of Pharmaceutical Sciences,
Osaka University

1-6 Yamada-oka, Suita, Osaka 565-0871, JAPAN

Tel: +81-6-6879-8172 / Fax: +81-6-6879-8174

E-mail: nasu@phs.osaka-u.ac.jp

Cooperated by: School of Pharmacy, Osaka Ohtani University

[Abstract]

Key Words: Asian dust, Bacteria, Abundance, Community structure, Inflammatory diseases

“Asian dust” is a transportation of a large amount of soil particles originated from arid regions in China and Mongolia. In Japan, more than one million tons of dust particles are estimated to fall on the ground per year. One of the major public concerns on Asian dust is its impact on our health and environment: “Can they carry any pathogenic microbes?”, “Do they cause inflammatory diseases?” however, enough scientific evidence has not yet been obtained. The purpose of this research is to obtain essential data to estimate the impact of Asian dust on our health and environment, by both microbial ecological and environmental toxicological approaches.

By direct bio-imaging visualization, we demonstrated that bacteria attach to Asian dust particles and they have potential to migrate globally during dust events. We then measured the change in bacterial abundance throughout the dust event, and determined bacterial community structure and their physiological activities, using culture-independent methods. The number of bacterial cells on Asian dust particles was estimated at 10^4 cells/m³. Phylogenetically diverse bacteria were identified on the dust particles collected in Japan as well as the soil collected in dust source regions (Taklamakan and Gobi deserts and the Loess plateau) and Asian dust particles collected in Beijing, China.

In addition, we examined the inflammatory effects and the biodistribution of Asian dust particles. We incubated mouse macrophage cells with Asian dust particles or soil of the Loess Plateau and examined the mechanisms of Asian dust particle-induced IL-6 and TNF- α production. Our results indicated that small Asian dust particles might possess a more potent inflammatory effect than large particles. In addition, analysis by transmission electron microscopy showed that Asian dust particle can be transported to mouse lung by transnasal administration. Our results

also suggest that small Asian dust particles (less than 1 μm) transported to Japan form aggregates with water-soluble salts and these aggregates probably break down into small particles on nasal mucous membranes, which may cause adverse respiratory health effects.

In conclusion, we may suggest that the bacteria carried with Asian dust probably rarely affect on our health, based on their abundance and phylogenetic composition, while these transported phylogenetically diverse bacteria could affect established ecosystems as a potential driving force of bacterial diversity maintenance or enhancement. In addition, Asian dust particles can cause inflammatory diseases as small particles.

Our findings provide fundamental information to consider the risk of Asian dust events to our health and environment.

表(1)-2. 日本上空（鳥取県北部の海上、高度：約1,000 m）で採取した黄砂中に存在する細菌種

a) 2010年11月12日

Clone ID	Accession No.	Most closely related species	Taxonomic classification
12TCLN001	AB636927	<i>Bdellovibrio bacteriovorus</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
12TCLN002	AB636928	<i>Geobacter grbiciae</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
12TCLN003	AB636929	<i>Phaselicystis flava</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
12TCLN004	AB636930	<i>Rhizobium huautlense</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN005	AB636931	<i>Rhizobium huautlense</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN006	AB636932	<i>Mesorhizobium tianshanense</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN007	AB636933	<i>Devosia chinhatensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN008	AB636934	<i>Devosia neptuniae</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN009	AB636935	<i>Sphingomonas insulae</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN010	AB636936	<i>Sphingobacter tepidarius</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN011	AB636937	<i>Sphingomonas oligophenolica</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN012	AB636938	<i>Sphingomonas aerolata</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN013	AB636939	<i>Sphingosinella microcystinivorans</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN014	AB636940	<i>Porphyrobacter tepidarius</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN015	AB636941	<i>Balneimonas flocculans</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN016	AB636942	<i>Balneimonas flocculans</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN017	AB636943	<i>Methylobacterium populi</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN018	AB636944	<i>Bosea minatitlanensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN019	AB636945	<i>Rubellimicrobium sp.</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN020	AB636946	<i>Rubellimicrobium sp.</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN021	AB636947	<i>Rubellimicrobium sp.</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN022	AB636948	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN023	AB636949	<i>Phenylobacterium composti</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN024	AB636950	<i>Rickettsia heilongjiangii</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN025	AB636951	<i>Rickettsia heilongjiangii</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN026	AB636952	<i>Paracraurococcus ruber</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN027	AB636953	<i>Paracraurococcus ruber</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN028	AB636954	<i>Belnapia moabensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN029	AB636955	<i>Roseomonas cervicalis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN030	AB636956	<i>Roseomonas aquatica</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN031	AB636957	<i>Roseomonas ludipueritiae</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN032	AB636958	<i>Piscinibacter aquaticus</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
12TCLN033	AB636959	<i>Xylophilus ampelinus</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN034	AB636960	<i>Janthinobacterium agaricidamnosum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN035	AB636961	<i>Massilia brevitalea</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN036	AB636962	<i>Massilia brevitalea</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN037	AB636963	<i>Massilia niastensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN038	AB636964	<i>Massilia timonae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN039	AB636965	<i>Massilia timonae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN040	AB636966	<i>Massilia timonae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN041	AB636967	<i>Massilia brevitalea</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN042	AB636968	<i>Massilia niastensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN043	AB636969	<i>Massilia niastensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN044	AB636970	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN045	AB636971	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN046	AB636972	<i>Derxia gummosa</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN047	AB636973	<i>Derxia gummosa</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN048	AB636974	<i>Nitrosomonas eutropha</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN049	AB636975	<i>Neisseria flavescens</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN050	AB636976	<i>Neisseria elongata</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN051	AB636977	<i>Methylocaldum szegediense</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
12TCLN052	AB636978	<i>Methylococcus capsulatus</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
12TCLN053	AB636979	<i>Lysobacter niabensis</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
12TCLN054	AB636980	<i>Lysobacter niabensis</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
12TCLN055	AB636981	<i>Lysobacter enzymogenes</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
12TCLN056	AB636982	<i>Cellvibrio gandavensis</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
12TCLN057	AB636983	<i>Pseudomonas fulva</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
12TCLN058	AB636984	<i>Desulfobacterium catecholicum</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
12TCLN059	AB636985	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN060	AB636986	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN061	AB636987	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN062	AB636988	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN063	AB636989	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN064	AB636990	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN065	AB636991	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN066	AB636992	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN067	AB636993	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN068	AB636994	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria

12TCLN069	AB636995	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN070	AB636996	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN071	AB636997	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN072	AB636998	<i>Pontibacter akesuensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN073	AB636999	<i>Pontibacter actiniarum</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN074	AB637000	<i>Pontibacter akesuensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN075	AB637001	<i>Pontibacter akesuensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN076	AB637002	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN077	AB637003	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN078	AB637004	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN079	AB637005	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN080	AB637006	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN081	AB637007	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN082	AB637008	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN083	AB637009	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN084	AB637010	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN085	AB637011	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN086	AB637012	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN087	AB637013	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN088	AB637014	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN089	AB637015	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN090	AB637016	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN091	AB637017	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN092	AB637018	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN093	AB637019	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN094	AB637020	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN095	AB637021	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN096	AB637022	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN097	AB637023	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN098	AB637024	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN099	AB637025	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN100	AB637026	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN101	AB637027	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN102	AB637028	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN103	AB637029	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN104	AB637030	<i>Hymenobacter chitinivorans</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN105	AB637031	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN106	AB637032	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN107	AB637033	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN108	AB637034	<i>Sporocytophaga myxococcoides</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN109	AB637035	<i>Sporocytophaga myxococcoides</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN110	AB637036	<i>Sporocytophaga myxococcoides</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN111	AB637037	<i>Algoriphagus aquatilis</i>	Bacteroidetes : Bacteroidetes_incertae_sedis
12TCLN112	AB637038	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN113	AB637039	<i>Flavisolibacter ginsengiterrae</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN114	AB637040	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN115	AB637041	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN116	AB637042	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN117	AB637043	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN118	AB637044	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN119	AB637045	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN120	AB637046	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN121	AB637047	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN122	AB637048	<i>Chitinophaga ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN123	AB637049	<i>Chitinophaga ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN124	AB637050	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN125	AB637051	<i>Salinimicrobium terrae</i>	Bacteroidetes : Flavobacteria
12TCLN126	AB637052	<i>Salinimicrobium terrae</i>	Bacteroidetes : Flavobacteria
12TCLN127	AB637053	<i>Salinimicrobium terrae</i>	Bacteroidetes : Flavobacteria
12TCLN128	AB637054	<i>Salinimicrobium terrae</i>	Bacteroidetes : Flavobacteria
12TCLN129	AB637055	<i>Salinimicrobium catena</i>	Bacteroidetes : Flavobacteria
12TCLN130	AB637056	<i>Flavobacterium frigidis</i>	Bacteroidetes : Flavobacteria
12TCLN131	AB637057	<i>Flavobacterium frigidis</i>	Bacteroidetes : Flavobacteria
12TCLN132	AB637058	<i>Capnocytophaga leadbetteri</i>	Bacteroidetes : Flavobacteria
12TCLN133	AB637059	<i>Gillisia limnaea</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN134	AB637060	<i>Gillisia limnaea</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN135	AB637061	<i>Chryseobacterium daeguense</i>	Bacteroidetes : Flavobacteria
12TCLN136	AB637062	<i>Mucilagibacter oryzae</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN137	AB637063	<i>Pedobacter insulae</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN138	AB637064	<i>Pedobacter steynii</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN139	AB637065	<i>Pedobacter africanus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN140	AB637066	<i>Nubsella zeaxanthinifaciens</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria

12TCLN141	AB637067	<i>Prostheco bacter de jonei</i>	Verrucomicrobia : Subdivision3
12TCLN142	AB637068	<i>Dehalogenimonas lykanthroporepellens</i>	Proteobacteria : Epsilonproteobacteria
12TCLN143	AB637069	<i>Planctomyces maris</i>	Planctomycetes : Planctomycetacia
12TCLN144	AB637070	<i>Edaphobacter aggregans</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp3
12TCLN145	AB637071	<i>Terriglobus roseus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp3
12TCLN146	AB637072	<i>Terriglobus roseus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp3
12TCLN147	AB637073	<i>Edaphobacter aggregans</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp3
12TCLN148	AB637074	<i>Terriglobus roseus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp1
12TCLN149	AB637075	<i>Terriglobus roseus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp1
12TCLN150	AB637076	<i>Geobacter grbiciae</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp6
12TCLN151	AB637077	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
12TCLN152	AB637078	<i>Terriglobus roseus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
12TCLN153	AB637079	<i>Terriglobus roseus</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
12TCLN154	AB637080	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
12TCLN155	AB637081	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
12TCLN156	AB637082	<i>Geobacter grbiciae</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
12TCLN157	AB637083	<i>Melittangium lichenicola</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
12TCLN158	AB637084	<i>Thermaerobacter subterraneus</i>	Gemmatimonadetes : Gemmatimonadetes
12TCLN159	AB637085	<i>Desulfuromonas alkaliphilus</i>	Gemmatimonadetes : Gemmatimonadetes
12TCLN160	AB637086	<i>Thermaerobacter subterraneus</i>	Gemmatimonadetes : Gemmatimonadetes
12TCLN161	AB637087	<i>Massilia aerilata</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
12TCLN162	AB637088	<i>Acidimicrobium ferrooxidans</i>	Armatimonadetes : Armatimonadia
12TCLN163	AB637089	<i>Desulfuromonas alkaliphilus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp7
12TCLN164	AB637090	<i>Terribacillus halophilus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN165	AB637091	<i>Terribacillus saccharophilus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN166	AB637092	<i>Virgibacillus kekensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN167	AB637093	<i>Halobacillus trueperi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN168	AB637094	<i>Halobacillus faecis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN169	AB637095	<i>Halobacillus trueperi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN170	AB637096	<i>Virgibacillus carmonensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN171	AB637097	<i>Bacillus vallismortis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN172	AB637098	<i>Bacillus aerophilus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN173	AB637099	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN174	AB637100	<i>Bacillus aerius</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN175	AB637101	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN176	AB637102	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN177	AB637103	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN178	AB637104	<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN179	AB637105	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN180	AB637106	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN181	AB637107	<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN182	AB637108	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN183	AB637109	<i>Bacillus akibai</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN184	AB637110	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN185	AB637111	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN186	AB637112	<i>Bacillus akibai</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN187	AB637113	<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN188	AB637114	<i>Bacillus akibai</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN189	AB637115	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN190	AB637116	<i>Bacillus akibai</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN191	AB637117	<i>Bacillus akibai</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN192	AB637118	<i>Bacillus akibai</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN193	AB637119	<i>Bacillus macyae</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN194	AB637120	<i>Bacillus mannanilyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN195	AB637121	<i>Bacillus mannanilyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN196	AB637122	<i>Bacillus decolorationis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN197	AB637123	<i>Bacillus decolorationis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN198	AB637124	<i>Virgibacillus olivae</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN199	AB637125	<i>Bacillus acidicola</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN200	AB637126	<i>Bacillus acidicola</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN201	AB637127	<i>Bacillus acidicola</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN202	AB637128	<i>Bacillus acidicola</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN203	AB637129	<i>Bacillus humi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN204	AB637130	<i>Bacillus humi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN205	AB637131	<i>Bacillus humi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN206	AB637132	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN207	AB637133	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN208	AB637134	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN209	AB637135	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN210	AB637136	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN211	AB637137	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN212	AB637138	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli

12TCLN213	AB637139	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN214	AB637140	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN215	AB637141	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN216	AB637142	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN217	AB637143	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN218	AB637144	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN219	AB637145	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN220	AB637146	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN221	AB637147	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN222	AB637148	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN223	AB637149	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN224	AB637150	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN225	AB637151	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN226	AB637152	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN227	AB637153	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN228	AB637154	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN229	AB637155	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN230	AB637156	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN231	AB637157	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN232	AB637158	<i>Bacillus pocheonensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN233	AB637159	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN234	AB637160	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN235	AB637161	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN236	AB637162	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN237	AB637163	<i>Salinimicrobium terrae</i>	Bacteroidetes : Flavobacteria
12TCLN238	AB637164	<i>Bacillus niacini</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN239	AB637165	<i>Bacillus odysseyi</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN240	AB637166	<i>Bacillus bataviensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN241	AB637167	<i>Bacillus acidicola</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
12TCLN242	AB637168	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN243	AB637169	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN244	AB637170	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN245	AB637171	<i>Bacillus firmus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN246	AB637172	<i>Bacillus odysseyi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN247	AB637173	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN248	AB637174	<i>Bacillus korlensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN249	AB637175	<i>Bacillus endophyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN250	AB637176	<i>Bacillus endophyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN251	AB637177	<i>Bacillus foraminis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN252	AB637178	<i>Bacillus foraminis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN253	AB637179	<i>Bacillus foraminis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN254	AB637180	<i>Bacillus foraminis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN255	AB637181	<i>Bacillus foraminis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN256	AB637182	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN257	AB637183	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN258	AB637184	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN259	AB637185	<i>Bacillus bataviensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN260	AB637186	<i>Bacillus bataviensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN261	AB637187	<i>Bacillus horikoshii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN262	AB637188	<i>Bacillus funiculus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN263	AB637189	<i>Bacillus cohnii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN264	AB637190	<i>Bacillus horikoshii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN265	AB637191	<i>Bacillus alkalitelluris</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN266	AB637192	<i>Bacillus humi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN267	AB637193	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN268	AB637194	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN269	AB637195	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN270	AB637196	<i>Bacillus acidicola</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN271	AB637197	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN272	AB637198	<i>Bacillus litoralis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN273	AB637199	<i>Bacillus litoralis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN274	AB637200	<i>Bacillus litoralis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN275	AB637201	<i>Bacillus litoralis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN276	AB637202	<i>Bacillus litoralis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN277	AB637203	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN278	AB637204	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN279	AB637205	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN280	AB637206	<i>Bacillus litoralis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN281	AB637207	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN282	AB637208	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN283	AB637209	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN284	AB637210	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli

12TCLN285	AB637211	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN286	AB637212	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN287	AB637213	<i>Bacillus asahii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN288	AB637214	<i>Bacillus asahii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN289	AB637215	<i>Bacillus acidicerler</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN290	AB637216	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN291	AB637217	<i>Bacillus benzoovorans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN292	AB637218	<i>Bacillus hemicellulosilyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN293	AB637219	<i>Arthrobacter agilis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN294	AB637220	<i>Bacillus niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
12TCLN295	AB637221	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN296	AB637222	<i>Bacillus methanolicus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN297	AB637223	<i>Bacillus flexus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN298	AB637224	<i>Bacillus megaterium</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN299	AB637225	<i>Bacillus megaterium</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN300	AB637226	<i>Planomicrobium chinense</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN301	AB637227	<i>Planomicrobium chinense</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN302	AB637228	<i>Planomicrobium koreense</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN303	AB637229	<i>Planomicrobium chinense</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN304	AB637230	<i>Planomicrobium chinense</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN305	AB637231	<i>Planomicrobium koreense</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN306	AB637232	<i>Planococcus antarcticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN307	AB637233	<i>Planomicrobium chinense</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN308	AB637234	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN309	AB637235	<i>Bacillus psychrodurans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN310	AB637236	<i>Bacillus massiliensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN311	AB637237	<i>Bacillus odysseyi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN312	AB637238	<i>Bacillus odysseyi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN313	AB637239	<i>Bacillus massiliensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN314	AB637240	<i>Bacillus massiliensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN315	AB637241	<i>Bacillus massiliensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN316	AB637242	<i>Bacillus odysseyi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN317	AB637243	<i>Bacillus odysseyi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN318	AB637244	<i>Bacillus odysseyi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN319	AB637245	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN320	AB637246	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN321	AB637247	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN322	AB637248	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN323	AB637249	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN324	AB637250	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN325	AB637251	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN326	AB637252	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN327	AB637253	<i>Bacillus thermoamylovorans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN328	AB637254	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN329	AB637255	<i>Ammoniphilus oxalaticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN330	AB637256	<i>Oxalophagus oxalicus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN331	AB637257	<i>Ammoniphilus oxalaticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN332	AB637258	<i>Ammoniphilus oxalivorans</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN333	AB637259	<i>Bacillus litoralis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN334	AB637260	<i>Paenibacillus sepulcri</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN335	AB637261	<i>Paenibacillus sepulcri</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN336	AB637262	<i>Paenibacillus harenae</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN337	AB637263	<i>Paenibacillus alginolyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN338	AB637264	<i>Bacillus edaphicus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN339	AB637265	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN340	AB637266	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN341	AB637267	<i>Paenibacillus zanthoxyli</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN342	AB637268	<i>Paenibacillus humicus</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN343	AB637269	<i>Paenibacillus ginsengihumi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN344	AB637270	<i>Paenibacillus soli</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN345	AB637271	<i>Paenibacillus ginsengihumi</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN346	AB637272	<i>Paenibacillus chinjuensis</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN347	AB637273	<i>Paenibacillus apiarius</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN348	AB637274	<i>Brevibacillus ginsengisoli</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN349	AB637275	<i>Turicibacter sanguinis</i>	Firmicutes : Erysipelotrichia
12TCLN350	AB637276	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN351	AB637277	<i>Arthrobacter oryzae</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN352	AB637278	<i>Kocuria polaris</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TCLN353	AB637279	<i>Curtobacterium pusillum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN354	AB637280	<i>Curtobacterium pusillum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN355	AB637281	<i>Curtobacterium pusillum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN356	AB637282	<i>Subtercola frigoramans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria

12TCLN357	AB637283	<i>Agrococcus jenensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN358	AB637284	<i>Cellulomonas chitinilytica</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN359	AB637285	<i>Cellulomonas chitinilytica</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN360	AB637286	<i>Cellulomonas aerilata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN361	AB637287	<i>Cellulomonas aerilata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN362	AB637288	<i>Cellulomonas chitinilytica</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN363	AB637289	<i>Cellulomonas fimi</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN364	AB637290	<i>Cellulomonas aerilata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN365	AB637291	<i>Cellulomonas chitinilytica</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN366	AB637292	<i>Isoptericola variabilis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN367	AB637293	<i>Actinotalea fermentans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN368	AB637294	<i>Actinotalea fermentans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN369	AB637295	<i>Janibacter melonis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN370	AB637296	<i>Serinibacter salmones</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN371	AB637297	<i>Arthrobacter tumbae</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN372	AB637298	<i>Arthrobacter tumbae</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN373	AB637299	<i>Arthrobacter agilis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN374	AB637300	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN375	AB637301	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN376	AB637302	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN377	AB637303	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN378	AB637304	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN379	AB637305	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN380	AB637306	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN381	AB637307	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN382	AB637308	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN383	AB637309	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN384	AB637310	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN385	AB637311	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN386	AB637312	<i>Arthrobacter citreus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN387	AB637313	<i>Kocuria polaris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN388	AB637314	<i>Kocuria polaris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN389	AB637315	<i>Kocuria polaris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN390	AB637316	<i>Kocuria polaris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN391	AB637317	<i>Brachybacterium faecium</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN392	AB637318	<i>Brachybacterium paraconglomeratum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN393	AB637319	<i>Ornithinimicrobium kibberense</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN394	AB637320	<i>Ornithinimicrobium kibberense</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN395	AB637321	<i>Ornithinicoccus hortensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN396	AB637322	<i>Friedmanniella spumicola</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN397	AB637323	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN398	AB637324	<i>Microlunatus panaciterrae</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN399	AB637325	<i>Propionicicella superfundia</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN400	AB637326	<i>Blastococcus aggregatus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN401	AB637327	<i>Ornithinimicrobium humiphilum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN402	AB637328	<i>Agrococcus lahaulensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN403	AB637329	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN404	AB637330	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN405	AB637331	<i>Lactobacillus gallinarum</i>	Firmicutes : Bacilli
12TCLN406	AB637332	<i>Oxobacter pfennigii</i>	Firmicutes : Clostridia
12TCLN407	AB637333	<i>Clostridium disporicum</i>	Firmicutes : Clostridia
12TCLN408	AB637334	<i>Clostridium bartlettii</i>	Firmicutes : Clostridia
12TCLN409	AB637335	<i>Clostridium saccharogumia</i>	Firmicutes : Erysipelotrichia
12TCLN410	AB637336	<i>Clostridium cellobioparum</i>	Firmicutes : Clostridia
12TCLN411	AB637337	<i>Veillonella parvula</i>	Firmicutes : Clostridia
12TCLN412	AB637338	<i>Prochlorococcus marinus</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
12TCLN413	AB637339	<i>Halospirulina tapeticola</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
12TCLN414	AB637340	<i>Prosthecomicrobium pneumaticum</i>	TM7 : TM7_genera_incertae_sedis
12TCLN415	AB637341	<i>Nautilia profundicola</i>	TM7 : TM7_genera_incertae_sedis
12TCLN416	AB637342	<i>Clostridium tepidiprofundii</i>	TM7 : TM7_genera_incertae_sedis
12TCLN417	AB637343	<i>Frigoribacterium faeni</i>	TM7 : TM7_genera_incertae_sedis
12TCLN418	AB637344	<i>Deinococcus aquaticus</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
12TCLN419	AB637345	<i>Deinococcus aquaticus</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
12TCLN420	AB637346	<i>Deinococcus deserti</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
12TCLN421	AB637347	<i>Deinococcus deserti</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
12TCLN422	AB637348	<i>Streptomyces griseocarneus</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
12TCLN423	AB637349	<i>Iamia majanohamensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
12TCLN424	AB637350	<i>Solirubrobacter soli</i>	Actinobacteria : Actinobacteria

b) 2011年5月2日

Clone ID	Accession No.	Most closely related species	Taxonomic classification
0502TCLN001	AB695733	<i>Rubellimicrobium</i> sp.	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN002	AB695734	<i>Microclunatus panaciterrae</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN003	AB695735	<i>Sphingomonas kaistensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN004	AB695736	<i>Sphingomonas kaistensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN005	AB695737	<i>Sphingomonas kaistensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN006	AB695738	<i>Sphingomonas sanxanigenens</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN007	AB695739	<i>Porphyrobacter dokdonensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN008	AB695740	<i>Porphyrobacter dokdonensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN009	AB695741	<i>Stella vacuolata</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN010	AB695742	<i>Skermanella aerolata</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN011	AB695743	<i>Caulobacter</i> sp.	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN012	AB695744	<i>Caulobacter</i> sp.	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN013	AB695745	<i>Methylobacterium rhodesianum</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN014	AB695746	<i>Methylobacterium zatmanii</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN015	AB695747	<i>Microvirga guangxiensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN016	AB695748	<i>Microvirga guangxiensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN017	AB695749	<i>Methylocystis echinoides</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN018	AB695750	<i>Mycoplana dimorpha</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN019	AB695751	<i>Pseudoxanthobacter soli</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN020	AB695752	<i>Pseudoxanthobacter soli</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
0502TCLN021	AB695753	<i>Blastococcus saxosidens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN022	AB695754	<i>Blastococcus saxosidens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN023	AB695755	<i>Cryptosporangium minutisporangium</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN024	AB695756	<i>Blastococcus saxosidens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN025	AB695757	<i>Geodermatophilus obscurus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN026	AB695758	<i>Modestobacter versicolor</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN027	AB695759	<i>Sporichthya polymorpha</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN028	AB695760	<i>Cellulomonas aerilata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN029	AB695761	<i>Cellulomonas aerilata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN030	AB695762	<i>Cellulomonas cellasea</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN031	AB695763	<i>Cellulomonas aerilata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN032	AB695764	<i>Ornithinococcus hortensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN033	AB695765	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN034	AB695766	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN035	AB695767	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN036	AB695768	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN037	AB695769	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN038	AB695770	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN039	AB695771	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN040	AB695772	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN041	AB695773	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN042	AB695774	<i>Arthrobacter oryzae</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN043	AB695775	<i>Arthrobacter agilis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN044	AB695776	<i>Arthrobacter agilis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN045	AB695777	<i>Arthrobacter agilis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN046	AB695778	<i>Arthrobacter agilis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN047	AB695779	<i>Arthrobacter agilis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN048	AB695780	<i>Arthrobacter agilis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN049	AB695781	<i>Arthrobacter agilis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN050	AB695782	<i>Kocuria polaris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN051	AB695783	<i>Kocuria rosea</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN052	AB695784	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN053	AB695785	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN054	AB695786	<i>Curtobacterium luteum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN055	AB695787	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN056	AB695788	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN057	AB695789	<i>Mycetocola tolaasinivorans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN058	AB695790	<i>Leifsonia xyli</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN059	AB695791	<i>Agrococcus jenensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN060	AB695792	<i>Curtobacterium citreum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN061	AB695793	<i>Mycobacterium tokaiense</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN062	AB695794	<i>Mycobacterium tokaiense</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN063	AB695795	<i>Corynebacterium lipophiloflavum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN064	AB695796	<i>Scardovia inopinata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN065	AB695797	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN066	AB695798	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN067	AB695799	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN068	AB695800	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN069	AB695801	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN070	AB695802	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria

0502TCLN071	AB695803	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN072	AB695804	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN073	AB695805	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN074	AB695806	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN075	AB695807	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN076	AB695808	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN077	AB695809	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN078	AB695810	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN079	AB695811	<i>Friedmanniella capsulata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN080	AB695812	<i>Microclunatus panaciterrae</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN081	AB695813	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN082	AB695814	<i>Ilumatobacter fluminis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN083	AB695815	<i>Iamia majanohamensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN084	AB695816	<i>Iamia majanohamensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN085	AB695817	<i>Herpetosiphon geysericola</i>	Chloroflexi : Thermomicrobia
0502TCLN086	AB695818	<i>Heliobacterium chlorum</i>	Armatimonadetes : Armatimonadia
0502TCLN087	AB695819	<i>Fodinicola feengrotensis</i>	Lentisphaerae : Lentisphaeria
0502TCLN088	AB695820	<i>Fodinicola feengrotensis</i>	Lentisphaerae : Lentisphaeria
0502TCLN089	AB695821	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN090	AB695822	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN091	AB695823	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN092	AB695824	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN093	AB695825	<i>Bacillus asahii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN094	AB695826	<i>Bacillus asahii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN095	AB695827	<i>Bacillus asahii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN096	AB695828	<i>Bacillus asahii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN097	AB695829	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN098	AB695830	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN099	AB695831	<i>Bacillus sp.</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN100	AB695832	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN101	AB695833	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN102	AB695834	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN103	AB695835	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN104	AB695836	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN105	AB695837	<i>Bacillus pocheonensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN106	AB695838	<i>Bacillus pocheonensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN107	AB695839	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN108	AB695840	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN109	AB695841	<i>Bacillus pocheonensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN110	AB695842	<i>Bacillus bataviensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN111	AB695843	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN112	AB695844	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN113	AB695845	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN114	AB695846	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN115	AB695847	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN116	AB695848	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN117	AB695849	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN118	AB695850	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN119	AB695851	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN120	AB695852	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN121	AB695853	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN122	AB695854	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN123	AB695855	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN124	AB695856	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN125	AB695857	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN126	AB695858	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN127	AB695859	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN128	AB695860	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN129	AB695861	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN130	AB695862	<i>Bacillus nealsonii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN131	AB695863	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN132	AB695864	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN133	AB695865	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN134	AB695866	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN135	AB695867	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN136	AB695868	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN137	AB695869	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN138	AB695870	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN139	AB695871	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN140	AB695872	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN141	AB695873	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN142	AB695874	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli

0502TCLN215	AB695947	<i>Bacillus foraminis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN216	AB695948	<i>Bacillus foraminis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN217	AB695949	<i>Bacillus foraminis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN218	AB695950	<i>Bacillus foraminis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN219	AB695951	<i>Bacillus niacini</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN220	AB695952	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN221	AB695953	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN222	AB695954	<i>Bacillus pocheonensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN223	AB695955	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN224	AB695956	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN225	AB695957	<i>Bacillus niacini</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN226	AB695958	<i>Bacillus foraminis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN227	AB695959	<i>Bacillus bataviensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN228	AB695960	<i>Bacillus soli</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN229	AB695961	<i>Bacillus bataviensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN230	AB695962	<i>Bacillus bataviensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN231	AB695963	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN232	AB695964	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN233	AB695965	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN234	AB695966	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN235	AB695967	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN236	AB695968	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN237	AB695969	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN238	AB695970	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN239	AB695971	<i>Bacillus humi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN240	AB695972	<i>Bacillus humi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN241	AB695973	<i>Bacillus alkalitelluris</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN242	AB695974	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN243	AB695975	<i>Bacillus litoralis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN244	AB695976	<i>Bacillus methanolicus</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN245	AB695977	<i>Bacillus humi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN246	AB695978	<i>Bacillus methanolicus</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN247	AB695979	<i>Bacillus methanolicus</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN248	AB695980	<i>Bacillus acidicola</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN249	AB695981	<i>Bacillus acidicola</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN250	AB695982	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN251	AB695983	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN252	AB695984	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN253	AB695985	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN254	AB695986	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN255	AB695987	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN256	AB695988	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN257	AB695989	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN258	AB695990	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN259	AB695991	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN260	AB695992	<i>Virgibacillus marismortui</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN261	AB695993	<i>Oceanobacillus picturae</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN262	AB695994	<i>Oceanobacillus picturae</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN263	AB695995	<i>Oceanobacillus picturae</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN264	AB695996	<i>Oceanobacillus picturae</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN265	AB695997	<i>Terribacillus halophilus</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN266	AB695998	<i>Brevibacterium halotolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN267	AB695999	<i>Bacillus ginsengi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN268	AB696000	<i>Bacillus ginsengi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN269	AB696001	<i>Bacillus ginsengi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN270	AB696002	<i>Bacillus ginsengi</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN271	AB696003	<i>Sporosarcina soli</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN272	AB696004	<i>Sporosarcina koreensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN273	AB696005	<i>Sporosarcina globispora</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN274	AB696006	<i>Bacillus psychrodurans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN275	AB696007	<i>Bacillus psychrodurans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN276	AB696008	<i>Bacillus massiliensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN277	AB696009	<i>Bacillus massiliensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN278	AB696010	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN279	AB696011	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN280	AB696012	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN281	AB696013	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN282	AB696014	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN283	AB696015	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN284	AB696016	<i>Bacillus alkalidiazotrophicus</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN285	AB696017	<i>Bacillus clarkii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN286	AB696018	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli

0502TCLN287	AB696019	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN288	AB696020	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN289	AB696021	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN290	AB696022	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN291	AB696023	<i>Bacillus okhensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN292	AB696024	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN293	AB696025	<i>Bacillus alkalinitrilicus</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN294	AB696026	<i>Agrococcus citreus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN295	AB696027	<i>Arthrobacter agilis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN296	AB696028	<i>Friedmanniella capsulata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
0502TCLN297	AB696029	<i>Bacillus niacini</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN298	AB696030	<i>Streptococcus oralis</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN299	AB696031	<i>Streptococcus gordonii</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN300	AB696032	<i>Paenibacillus granivorans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN301	AB696033	<i>Paenibacillus granivorans</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN302	AB696034	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN303	AB696035	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN304	AB696036	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN305	AB696037	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN306	AB696038	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN307	AB696039	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN308	AB696040	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN309	AB696041	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN310	AB696042	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
0502TCLN311	AB696043	<i>Clostridium mesophilum</i>	Firmicutes : Clostridia
0502TCLN312	AB696044	<i>Clostridium quinii</i>	Firmicutes : Clostridia
0502TCLN313	AB696045	<i>Clostridium cylindrosporum</i>	Firmicutes : Clostridia
0502TCLN314	AB696046	<i>Desulfosporosinus auripigmenti</i>	Firmicutes : Clostridia
0502TCLN315	AB696047	<i>Desulfosporosinus auripigmenti</i>	Firmicutes : Clostridia
0502TCLN316	AB696048	<i>Veillonella parvula</i>	Firmicutes : Clostridia
0502TCLN317	AB696049	<i>Fusobacterium nucleatum</i>	Fusobacteria : Fusobacteria
0502TCLN318	AB696050	<i>Deinococcus navajonensis</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
0502TCLN319	AB696051	<i>Deinococcus navajonensis</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
0502TCLN320	AB696052	<i>Deinococcus deserti</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
0502TCLN321	AB696053	<i>Deinococcus apachensis</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
0502TCLN322	AB696054	<i>Deinococcus apachensis</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
0502TCLN323	AB696055	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
0502TCLN324	AB696056	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
0502TCLN325	AB696057	<i>Halospirulina tapeticola</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
0502TCLN326	AB696058	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
0502TCLN327	AB696059	<i>Haliangium tepidum</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
0502TCLN328	AB696060	<i>Haliangium tepidum</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
0502TCLN329	AB696061	<i>Chondromyces apiculatus</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
0502TCLN330	AB696062	<i>Janthinobacterium lividum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
0502TCLN331	AB696063	<i>Janthinobacterium lividum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
0502TCLN332	AB696064	<i>Massilia brevitalea</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
0502TCLN333	AB696065	<i>Massilia brevitalea</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
0502TCLN334	AB696066	<i>Massilia brevitalea</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
0502TCLN335	AB696067	<i>Derxia gummosa</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
0502TCLN336	AB696068	<i>Aquicola tertiarycarbonis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
0502TCLN337	AB696069	<i>Bordetella hinzii</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
0502TCLN338	AB696070	<i>Aquaspirillum putridiconchylum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
0502TCLN339	AB696071	<i>Lysobacter gummosus</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
0502TCLN340	AB696072	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
0502TCLN341	AB696073	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
0502TCLN342	AB696074	<i>Terriglobus roseus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
0502TCLN343	AB696075	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
0502TCLN344	AB696076	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
0502TCLN345	AB696077	<i>Geoalkalibacter subterraneus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
0502TCLN346	AB696078	<i>Holophaga foetida</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp6
0502TCLN347	AB696079	<i>Pontibacter actiniarum</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN348	AB696080	<i>Pontibacter actiniarum</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN349	AB696081	<i>Pontibacter actiniarum</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN350	AB696082	<i>Pontibacter akesuensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN351	AB696083	<i>Pontibacter akesuensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN352	AB696084	<i>Pontibacter akesuensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN353	AB696085	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN354	AB696086	<i>Pontibacter akesuensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN355	AB696087	<i>Pontibacter akesuensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN356	AB696088	<i>Pontibacter actiniarum</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN357	AB696089	<i>Pontibacter korensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN358	AB696090	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria

0502TCLN359	AB696091	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN360	AB696092	<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN361	AB696093	<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN362	AB696094	<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN363	AB696095	<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN364	AB696096	<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN365	AB696097	<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN366	AB696098	<i>Hymenobacter norwichensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN367	AB696099	<i>Hymenobacter chitinivorans</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN368	AB696100	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN369	AB696101	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN370	AB696102	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN371	AB696103	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN372	AB696104	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN373	AB696105	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN374	AB696106	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN375	AB696107	<i>Dyadobacter crusticola</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN376	AB696108	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN377	AB696109	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN378	AB696110	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN379	AB696111	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN380	AB696112	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN381	AB696113	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN382	AB696114	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN383	AB696115	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN384	AB696116	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN385	AB696117	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN386	AB696118	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN387	AB696119	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN388	AB696120	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN389	AB696121	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN390	AB696122	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN391	AB696123	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN392	AB696124	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN393	AB696125	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN394	AB696126	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN395	AB696127	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN396	AB696128	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN397	AB696129	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN398	AB696130	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN399	AB696131	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN400	AB696132	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN401	AB696133	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN402	AB696134	<i>Ferruginibacter alkalilentus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN403	AB696135	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
0502TCLN404	AB696136	<i>Tannerella forsythia</i>	Bacteroidetes : Bacteroidia
0502TCLN405	AB696137	<i>Tannerella forsythia</i>	Bacteroidetes : Bacteroidia
0502TCLN406	AB696138	<i>Tannerella forsythia</i>	Bacteroidetes : Bacteroidia
0502TCLN407	AB696139	<i>Pedobacter panaciterrae</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria

c) 標準培地で培養 (2010年11月12日)

Clone ID	Accession No.	Most closely related species	Taxonomic classification
12TPYGCLN001	AB637351	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN002	AB637352	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN003	AB637353	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN004	AB637354	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN005	AB637355	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN006	AB637356	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN007	AB637357	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN008	AB637358	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN009	AB637359	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN010	AB637360	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN011	AB637361	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN012	AB637362	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN013	AB637363	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN014	AB637364	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN015	AB637365	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN016	AB637366	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN017	AB637367	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN018	AB637368	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
12TPYGCLN019	AB637369	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria

表(2)-2. 中国で採取した黄砂発生源土壌および黄砂中に存在する細菌種

a) タクラマカン沙漠

Clone ID	Accession No.	Most closely related species	Taxonomic classification
T4CLN1	AB696431	<i>Virgibacillus carmonensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T4CLN2	AB696432	<i>Kocuria polaris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T4CLN3	AB696433	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN4	AB696434	<i>Iamia majanohamensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T4CLN5	AB696435	<i>Herbaspirillum chlorophenicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T4CLN6	AB696436	<i>Thermoleophilum album</i>	Gemmatimonadetes : Gemmatimonadetes
T4CLN7	AB696437	<i>Clostridium cellobioparum</i>	Firmicutes : Clostridia
T4CLN8	AB696438	<i>Massilia aurea</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T4CLN9	AB696439	<i>Geobacter argillaceus</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
T4CLN10	AB696440	<i>Derxia gummosa</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T4CLN11	AB696441	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
T4CLN12	AB696442	<i>Thermoleophilum album</i>	Gemmatimonadetes : Gemmatimonadetes
T4CLN13	AB696443	<i>Blastococcus saxosidens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T4CLN14	AB696444	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN15	AB696445	<i>Planomicrobium koreense</i>	Firmicutes : Bacilli
T4CLN16	AB696446	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T4CLN17	AB696447	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T4CLN18	AB696448	<i>Marivirga tractuosa</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN19	AB696449	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN20	AB696450	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN21	AB696451	<i>Nakamurella multipartita</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T4CLN22	AB696452	<i>Tumebacillus permanentifrigoris</i>	Firmicutes : Bacilli
T4CLN23	AB696453	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
T4CLN24	AB696454	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T4CLN25	AB696455	<i>Fodinicola feengrottensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T4CLN26	AB696456	<i>Blastococcus saxosidens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T4CLN27	AB696457	<i>Sphingosinicella soli</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
T4CLN28	AB696458	<i>Blastococcus saxosidens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T4CLN29	AB696459	<i>Bacillus humi</i>	Firmicutes : Bacilli
T4CLN30	AB696460	<i>Desulfotomaculum halophilum</i>	Firmicutes : Clostridia
T4CLN31	AB696461	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN32	AB696462	<i>Marinoscillum pacificum</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN33	AB696463	<i>Marinoscillum pacificum</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN34	AB696464	<i>Cellulomonas aerilata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T4CLN35	AB696465	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
T4CLN36	AB696466	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN37	AB696467	<i>Ectothiorhodosinus mongolicus</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
T4CLN38	AB696468	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN39	AB696469	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN40	AB696470	<i>Bacillus horikoshii</i>	Firmicutes : Bacilli
T4CLN41	AB696471	<i>Marinoscillum pacificum</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN42	AB696472	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN43	AB696473	<i>Pontibacter actiniarum</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN44	AB696474	<i>Alkalilimnicola ehrlichii</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
T4CLN45	AB696475	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN46	AB696476	<i>Bacillus sp.</i>	Firmicutes : Bacilli
T4CLN47	AB696477	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T4CLN48	AB696478	<i>Maribius salinus</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
T4CLN49	AB696479	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T4CLN50	AB696480	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Caldilineae
T5CLN1	AB696481	<i>Bacillus shackletonii</i>	Firmicutes : Bacilli
T5CLN2	AB696482	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T5CLN3	AB696483	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Caldilineae
T5CLN4	AB696484	<i>Anaerolinea thermophila</i>	Chloroflexi : Anaerolineae
T5CLN5	AB696485	<i>Halobacillus faecis</i>	Firmicutes : Bacilli
T5CLN6	AB696486	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T5CLN7	AB696487	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Caldilineae
T5CLN8	AB696488	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
T5CLN9	AB696489	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T5CLN10	AB696490	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T5CLN11	AB696491	<i>Marinoscillum pacificum</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T5CLN12	AB696492	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
T5CLN13	AB696493	<i>Ornithinococcus hortensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T5CLN14	AB696494	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T5CLN15	AB696495	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
T5CLN16	AB696496	<i>Halobacillus faecis</i>	Firmicutes : Bacilli

T5CLN17	AB696497	<i>Corynebacterium tuberculostearicum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T5CLN18	AB696498	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T5CLN19	AB696499	<i>Ornithinococcus hortensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T5CLN20	AB696500	<i>Bacillus niabensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T5CLN21	AB696501	<i>Salisaeta longa</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T5CLN22	AB696502	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
T5CLN23	AB696503	<i>Cellulomonas aerilata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T5CLN24	AB696504	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
T5CLN25	AB696505	<i>Lysobacter gummosus</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
T5CLN26	AB696506	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
T5CLN27	AB696507	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
T5CLN28	AB696508	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Caldilineae
T5CLN29	AB696509	<i>Bacillus akibai</i>	Firmicutes : Bacilli
T5CLN30	AB696510	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T5CLN31	AB696511	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Dehalococcoidetes
T5CLN32	AB696512	<i>Bacillus shackletonii</i>	Firmicutes : Bacilli
T5CLN33	AB696513	<i>Planctomyces maris</i>	Planctomycetes : Planctomycetacia
T5CLN34	AB696514	<i>Salisaeta longa</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T5CLN35	AB696515	<i>Bacillus shackletonii</i>	Firmicutes : Bacilli
T5CLN36	AB696516	<i>Thermaerobacter nagasakiensis</i>	Gemmatimonadetes : Gemmatimonadetes
T5CLN37	AB696517	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T5CLN38	AB696518	<i>Derxia gummosa</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T5CLN39	AB696519	<i>Bacillus aquimaris</i>	Firmicutes : Bacilli
T5CLN40	AB696520	<i>Bacillus shackletonii</i>	Firmicutes : Bacilli
T5CLN41	AB696521	<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T5CLN42	AB696522	<i>Nocardioides albus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T5CLN43	AB696523	<i>Geobacter argillaceus</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
T5CLN44	AB696524	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
T5CLN45	AB696525	<i>Bacillus aquimaris</i>	Firmicutes : Bacilli
T5CLN46	AB696526	<i>Rhodothermus marinus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T5CLN47	AB696527	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
T5CLN48	AB696528	<i>Anaerolinea thermophila</i>	Chloroflexi : Anaerolineae
T5CLN49	AB696529	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T5CLN50	AB696530	<i>Prosthecomicrobium mishustinii</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
T10CLN1	AB696531	<i>Halobacillus faecis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN2	AB696532	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T10CLN3	AB696533	<i>Rhodopirellula baltica</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN4	AB696534	<i>Bacillus taeanensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN5	AB696535	<i>Ferrimicrobium acidiphilum</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T10CLN6	AB696536	<i>Halobacillus faecis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN7	AB696537	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T10CLN8	AB696538	<i>Bacillus bataviensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN9	AB696539	<i>Bacillus bataviensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN10	AB696540	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T10CLN11	AB696541	<i>Bacillus taeanensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN12	AB696542	<i>Bacillus taeanensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN13	AB696543	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Caldilineae
T10CLN14	AB696544	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T10CLN16	AB696545	<i>Bacillus taeanensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN17	AB696546	<i>Gracilimonas tropica</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T10CLN18	AB696547	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Caldilineae
T10CLN19	AB696548	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp21
T10CLN20	AB696549	<i>Bacillus taeanensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN21	AB696550	<i>Streptococcus salivarius</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN22	AB696551	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T10CLN23	AB696552	<i>Derxia gummosa</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T10CLN24	AB696553	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
T10CLN25	AB696554	<i>Salisaeta longa</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T10CLN26	AB696555	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T10CLN27	AB696556	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Thermomicrobia
T10CLN28	AB696557	<i>Bacillus firmus</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN29	AB696558	<i>Rhodopirellula baltica</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN30	AB696559	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Caldilineae
T10CLN31	AB696560	<i>Halobacillus faecis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN32	AB696561	<i>Geobacter pickeringii</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
T10CLN33	AB696562	<i>Nitriliruptor alkaliphilus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T10CLN34	AB696563	<i>Thermaerobacter litoralis</i>	Firmicutes : Clostridia
T10CLN35	AB696564	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Caldilineae
T10CLN36	AB696565	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T10CLN37	AB696566	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T10CLN38	AB696567	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T10CLN39	AB696568	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria

T10CLN40	AB696569	<i>Nitriliruptor alkaliphilus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
T10CLN41	AB696570	<i>Gracilimonas tropica</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
T10CLN42	AB696571	<i>Bacillus mannanilyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN43	AB696572	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Caldilineae
T10CLN44	AB696573	<i>Bacillus wakoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN45	AB696574	<i>Alkalimimicola ehrlichii</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
T10CLN46	AB696575	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
T10CLN47	AB696576	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Caldilineae
T10CLN48	AB696577	<i>Bacillus shackletonii</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN49	AB696578	<i>Bacillus taeanensis</i>	Firmicutes : Bacilli
T10CLN50	AB696579	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria

b) ゴビ沙漠

Clone ID	Accession No.	Most closely related species	Taxonomic classification
G1CLN1	AB696140	<i>Devosia insulae</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
G1CLN2	AB696141	<i>Rubellimicrobium sp.</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
G1CLN3	AB696142	<i>Altererythrobacter epoxidivorans</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
G1CLN4	AB696143	<i>Sphingosinicella soli</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
G1CLN6	AB696144	<i>Skermanella aerolata</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
G1CLN7	AB696145	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
G1CLN8	AB696146	<i>Melittangium lichenicola</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
G1CLN9	AB696147	<i>Coralloccoccus macrosporus</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
G1CLN10	AB696148	<i>Cystobacter badius</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
G1CLN11	AB696149	<i>Prostheco bacter dejongeii</i>	Verrucomicrobia : Subdivision3
G1CLN12	AB696150	<i>Desulfosporosinus lacus</i>	BRC1 : BRC1_genera_incertainae_sedis
G1CLN13	AB696151	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp3
G1CLN14	AB696152	<i>Pelobacter acetylenicus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
G1CLN15	AB696153	<i>Holophaga foetida</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp6
G1CLN16	AB696154	<i>Desulfothermus okinawensis</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
G1CLN17	AB696155	<i>Desulfuromonas alkaliphilus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
G1CLN18	AB696156	<i>Desulfonatronum cooperativum</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp10
G1CLN19	AB696157	<i>Pirellula staleyi</i>	Firmicutes : Bacilli
G1CLN20	AB696158	<i>Phaselicystis flava</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
G1CLN21	AB696159	<i>Rhodoplanes elegans</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
G1CLN22	AB696160	<i>Methylobacterium aminovorans</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
G1CLN23	AB696161	<i>Desulfuromonas alkaliphilus</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
G1CLN24	AB696162	<i>Bacillus drentensis</i>	Firmicutes : Bacilli
G1CLN25	AB696163	<i>Sphingomonas pituitosa</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G1CLN26	AB696164	<i>Curvibacter gracilis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN27	AB696165	<i>Pseudorhodiferax soli</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN28	AB696166	<i>Ramlibacter tataouinensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN29	AB696167	<i>Denitratisona oestradiolicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN30	AB696168	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
G1CLN31	AB696169	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
G1CLN32	AB696170	<i>Enhydrobacter aerosaccus</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
G1CLN33	AB696171	<i>Denitratisona oestradiolicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN34	AB696172	<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN35	AB696173	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN36	AB696174	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN38	AB696175	<i>Duganella zoogloeoides</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN39	AB696176	<i>Massilia brevitalea</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN40	AB696177	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN41	AB696178	<i>Aquincola tertiaricarbonis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN42	AB696179	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN43	AB696180	<i>Thiobacter subterraneus</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN45	AB696181	<i>Dexia gummosa</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN46	AB696182	<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN47	AB696183	<i>Massilia timonae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN48	AB696184	<i>Massilia alkalitolerans</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN49	AB696185	<i>Massilia alkalitolerans</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G1CLN50	AB696186	<i>Massilia alkalitolerans</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN1	AB696187	<i>Massilia alkalitolerans</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN2	AB696188	<i>Massilia alkalitolerans</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN3	AB696189	<i>Massilia alkalitolerans</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN4	AB696190	<i>Massilia albidiflava</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN5	AB696191	<i>Massilia timonae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN6	AB696192	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN7	AB696193	<i>Massilia albidiflava</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN8	AB696194	<i>Massilia albidiflava</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN9	AB696195	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN10	AB696196	<i>Massilia aurea</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria

G2CLN11	AB696197	<i>Massilia alkalitolerans</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN12	AB696198	<i>Massilia alkalitolerans</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN13	AB696199	<i>Massilia alkalitolerans</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN14	AB696200	<i>Massilia timonae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN15	AB696201	<i>Massilia timonae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN16	AB696202	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
G2CLN18	AB696203	<i>Steroidobacter denitrificans</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
G2CLN19	AB696204	<i>Gemmatimonas aurantiaca</i>	Gemmatimonadetes : Gemmatimonadetes
G2CLN20	AB696205	<i>Thermacetogenium phaeum</i>	Armatimonadetes : Armatimonadetes_gp4
G2CLN21	AB696206	<i>Bacillus litoralis</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN22	AB696207	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN23	AB696208	<i>Solirubrobacter soli</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN24	AB696209	<i>Solirubrobacter soli</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN25	AB696210	<i>Solirubrobacter soli</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN27	AB696211	<i>Bacillus cibi</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN28	AB696212	<i>Streptococcus sanguinis</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN29	AB696213	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN30	AB696214	<i>Bacillus endophyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN31	AB696215	<i>Bacillus endophyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN32	AB696216	<i>Bacillus endophyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN33	AB696217	<i>Bacillus endophyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN34	AB696218	<i>Bacillus endophyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN35	AB696219	<i>Bacillus endophyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN36	AB696220	<i>Bacillus endophyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN37	AB696221	<i>Bacillus endophyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN38	AB696222	<i>Planococcus rifietoensis</i>	Firmicutes : Bacilli
G2CLN39	AB696223	<i>Heliobacillus mobilis</i>	Firmicutes : Clostridia
G2CLN40	AB696224	<i>Agromyces ramosus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN41	AB696225	<i>Agromyces ramosus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN42	AB696226	<i>Kocuria rosea</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN43	AB696227	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN44	AB696228	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN45	AB696229	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN46	AB696230	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN47	AB696231	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN48	AB696232	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN49	AB696233	<i>Propionibacterium acnes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G2CLN50	AB696234	<i>Cryptosporangium minutisporangium</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN1	AB696235	<i>Blastococcus saxosidensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN2	AB696236	<i>Iamia majanohamensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN3	AB696237	<i>Iamia majanohamensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN4	AB696238	<i>Aeromicrobium alkaliterrae</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN5	AB696239	<i>Streptomyces malaysiensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN6	AB696240	<i>Anaerococcus prevotii</i>	Firmicutes : Clostridia
G3CLN7	AB696241	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN9	AB696242	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN10	AB696243	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN11	AB696244	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN12	AB696245	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN13	AB696246	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN14	AB696247	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN15	AB696248	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN16	AB696249	<i>Pedobacter agri</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN17	AB696250	<i>Pedobacter agri</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN18	AB696251	<i>Pedobacter agri</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN19	AB696252	<i>Pedobacter agri</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN20	AB696253	<i>Pedobacter agri</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN21	AB696254	<i>Pedobacter agri</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN22	AB696255	<i>Sphingobacterium mizutaii</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN23	AB696256	<i>Dyadobacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN24	AB696257	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN25	AB696258	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN26	AB696259	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN27	AB696260	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN28	AB696261	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
G3CLN29	AB696262	<i>Bacillus megaterium</i>	Firmicutes : Bacilli
G3CLN31	AB696263	<i>Bacillus megaterium</i>	Firmicutes : Bacilli
G3CLN32	AB696264	<i>Bacillus megaterium</i>	Firmicutes : Bacilli
G3CLN33	AB696265	<i>Oceanobacillus chironomi</i>	Firmicutes : Bacilli
G3CLN34	AB696266	<i>Arthrobacter polychromogenes</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN35	AB696267	<i>Arthrobacter oryzae</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN36	AB696268	<i>Arthrobacter ramosus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria

G3CLN37	AB696269	<i>Arthrobacter oryzae</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN38	AB696270	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN39	AB696271	<i>Arthrobacter globiformis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN40	AB696272	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN41	AB696273	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN42	AB696274	<i>Arthrobacter humicola</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN43	AB696275	<i>Arthrobacter ramosus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN44	AB696276	<i>Arthrobacter ramosus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
G3CLN45	AB696277	<i>Caldilinea aerophila</i>	Chloroflexi : Caldilineae
G3CLN48	AB696278	<i>Heliobacterium gestii</i>	Firmicutes : Clostridia
G3CLN49	AB696279	<i>Deinococcus deserti</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
G3CLN50	AB696280	<i>Pedobacter composti</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria

c) 黄土高原

Clone ID	Accession No.	Most closely related species	Taxonomic classification
L1CLN1	AB696281	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L1CLN2	AB696282	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L1CLN3	AB696283	<i>Solirubrobacter soli</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L1CLN4	AB696284	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L1CLN5	AB696285	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
L1CLN7	AB696286	<i>Arthrobacter ramosus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L1CLN8	AB696287	<i>Massilia timonae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L1CLN10	AB696288	<i>Flavisolibacter ginsengiterrae</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L1CLN11	AB696289	<i>Iamia majanohamensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L1CLN14	AB696290	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L1CLN15	AB696291	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L1CLN16	AB696292	<i>Zavarzinella formosa</i>	Planctomycetes : Planctomycetacia
L1CLN17	AB696293	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L1CLN18	AB696294	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
L1CLN20	AB696295	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L1CLN22	AB696296	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L1CLN23	AB696297	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L1CLN24	AB696298	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L1CLN25	AB696299	<i>Pedobacter composti</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L1CLN26	AB696300	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L1CLN27	AB696301	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L1CLN29	AB696302	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
L1CLN30	AB696303	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L1CLN31	AB696304	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L1CLN32	AB696305	<i>Nocardioides oleivorans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L1CLN33	AB696306	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L1CLN34	AB696307	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L1CLN35	AB696308	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L1CLN36	AB696309	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L1CLN37	AB696310	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L1CLN38	AB696311	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L1CLN39	AB696312	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L1CLN40	AB696313	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
L1CLN41	AB696314	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L1CLN42	AB696315	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L1CLN43	AB696316	<i>Friedmanniella lacustris</i>	TM7 : TM7_genera_incertae_sedis
L1CLN44	AB696317	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L1CLN45	AB696318	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L1CLN46	AB696319	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L1CLN48	AB696320	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L1CLN49	AB696321	<i>Massilia brevitalea</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L1CLN50	AB696322	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L1CLN51	AB696323	<i>Pseudonocardia petroleophila</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L1CLN52	AB696324	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L1CLN53	AB696325	<i>Pseudonocardia xinjiangensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L1CLN54	AB696326	<i>Arthrobacter defluvii</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L1CLN55	AB696327	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L1CLN56	AB696328	<i>Arthrobacter ramosus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L1CLN57	AB696329	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
L1CLN58	AB696330	<i>Bacillus boroniphilus</i>	Firmicutes : Bacilli
L2CLN1	AB696331	<i>Pirellula staleyii</i>	Firmicutes : Bacilli
L2CLN2	AB696332	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L2CLN3	AB696333	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L2CLN4	AB696334	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L2CLN5	AB696335	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L2CLN6	AB696336	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria

L2CLN7	AB696337	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L2CLN8	AB696338	<i>Stigmatella hybrida</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
L2CLN9	AB696339	<i>Geobacter pelophilus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp7
L2CLN10	AB696340	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L2CLN11	AB696341	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L2CLN13	AB696342	<i>Labedella gwakjiensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L2CLN14	AB696343	<i>Massilia niastensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L2CLN15	AB696344	<i>Escherichia fergusonii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L2CLN16	AB696345	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L2CLN17	AB696346	<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L2CLN18	AB696347	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L2CLN19	AB696348	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L2CLN20	AB696349	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L2CLN21	AB696350	<i>Iamia majanohamensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L2CLN22	AB696351	<i>Sporocytophaga myxococcoides</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L2CLN23	AB696352	<i>Sporocytophaga myxococcoides</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L2CLN24	AB696353	<i>Illumatobacter fluminis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L2CLN25	AB696354	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L2CLN26	AB696355	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L2CLN27	AB696356	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L2CLN28	AB696357	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L2CLN29	AB696358	<i>Geobacter pelophilus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp7
L2CLN30	AB696359	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L2CLN31	AB696360	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L2CLN32	AB696361	<i>Azotobacter chroococcum</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L2CLN33	AB696362	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L2CLN34	AB696363	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L2CLN35	AB696364	<i>Sphingosinicella soli</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
L2CLN36	AB696365	<i>Halospirulina tapeticola</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L2CLN37	AB696366	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L2CLN38	AB696367	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L2CLN39	AB696368	<i>Arthrobacter ramosus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L2CLN40	AB696369	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L2CLN41	AB696370	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L2CLN42	AB696371	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L2CLN43	AB696372	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L2CLN44	AB696373	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L2CLN45	AB696374	<i>Paucimonas lemoignei</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L2CLN46	AB696375	<i>Caenimonas koreensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L2CLN47	AB696376	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L2CLN48	AB696377	<i>Iamia majanohamensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L2CLN49	AB696378	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
L2CLN50	AB696379	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L2CLN51	AB696380	<i>Arthrobacter phenanthrenivorans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L3CLN1	AB696381	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L3CLN2	AB696382	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN4	AB696383	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
L3CLN6	AB696384	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L3CLN7	AB696385	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
L3CLN8	AB696386	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L3CLN9	AB696387	<i>Escherichia fergusonii</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L3CLN11	AB696388	<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L3CLN12	AB696389	<i>Effluviibacter roseus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L3CLN14	AB696390	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L3CLN15	AB696391	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN16	AB696392	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L3CLN17	AB696393	<i>Effluviibacter roseus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L3CLN18	AB696394	<i>Escherichia fergusonii</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L3CLN19	AB696395	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L3CLN20	AB696396	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN21	AB696397	<i>Prochlorococcus marinus</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
L3CLN22	AB696398	<i>Denitratisoma oestradiolicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN23	AB696399	<i>Desulfuromusa kysingii</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L3CLN24	AB696400	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L3CLN25	AB696401	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN27	AB696402	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L3CLN28	AB696403	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L3CLN31	AB696404	<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN32	AB696405	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L3CLN33	AB696406	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L3CLN34	AB696407	<i>Massilia albidiflava</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN35	AB696408	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria

L3CLN36	AB696409	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L3CLN37	AB696410	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L3CLN38	AB696411	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L3CLN39	AB696412	<i>Skermanella aerolata</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
L3CLN40	AB696413	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L3CLN42	AB696414	<i>Rubidibacter lacunae</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
L3CLN43	AB696415	<i>Shigella flexneri</i>	Proteobacteria : Gammaproteobacteria
L3CLN44	AB696416	<i>Herbaspirillum seropedicae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN45	AB696417	<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN46	AB696418	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN48	AB696419	<i>Herbaspirillum autotrophicum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN49	AB696420	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L3CLN50	AB696421	<i>Massilia niabensis</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN51	AB696422	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
L3CLN52	AB696423	<i>Fodinicola feengrottensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L3CLN53	AB696424	<i>Massilia albidiflava</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN54	AB696425	<i>Oxalicibacterium flavum</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
L3CLN55	AB696426	<i>Solirubrobacter soli</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L3CLN56	AB696427	<i>Actinoplanes rectilineatus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
L3CLN57	AB696428	<i>Nautilia profundicola</i>	TM7 : TM7_genera_incertae_sedis
L3CLN58	AB696429	<i>Duganella zoogloeoides</i>	Verrucomicrobia : Verrucomicrobiae
L3CLN59	AB696430	<i>Arthrobacter ramosus</i>	Actinobacteria : Actinobacteria

d) 中国・北京市で採取した黄砂 (2010年3月20日)

Clone ID	Accession No.	Most closely related species	Taxonomic classification
PEKCLN001	unassigned	<i>Bacillus circulans</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN003	unassigned	<i>Sporomusa sphaeroides</i>	Firmicutes : Clostridia
PEKCLN004	unassigned	<i>Skermanella aerolata</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN005	unassigned	<i>Rubellimicrobium sp.</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN006	unassigned	<i>Arthrobacter globiformis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN007	unassigned	<i>Geopsychrobacter electrophilus</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
PEKCLN008	unassigned	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN009	unassigned	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN010	unassigned	<i>Hymenobacter chitinivorans</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN011	unassigned	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN012	unassigned	<i>Planococcus antarcticus</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN013	unassigned	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN014	unassigned	<i>Marivirga tractuosa</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN015	unassigned	<i>Verrucomicrobium spinosum</i>	Verrucomicrobia : Spartobacteria
PEKCLN016	unassigned	<i>Massilia timonae</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
PEKCLN017	unassigned	<i>Trichococcus pasteurii</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN018	unassigned	<i>Bacillus alkalidiazotrophicus</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN019	unassigned	<i>Planomicrobium koreense</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN020	unassigned	<i>Planococcus maritimus</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN021	unassigned	<i>Methylosinus sporium</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN023	unassigned	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN025	unassigned	<i>Planococcus maritimus</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN026	unassigned	<i>Nocardioides ganghwensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN027	unassigned	<i>Skermanella aerolata</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN028	unassigned	<i>Planktothricoides raciborskii</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
PEKCLN030	unassigned	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN031	unassigned	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
PEKCLN032	unassigned	<i>Cellulomonas aerilata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN033	unassigned	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN034	unassigned	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN035	unassigned	<i>Holophaga foetida</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp6
PEKCLN037	unassigned	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN038	unassigned	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN039	unassigned	<i>Acidobacterium capsulatum</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
PEKCLN040	unassigned	<i>Anaerosporebacter mobilis</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
PEKCLN041	unassigned	<i>Prochlorococcus marinus</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Chloroplast
PEKCLN042	unassigned	<i>Deinococcus deserti</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
PEKCLN043	unassigned	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN044	unassigned	<i>Paenibacillus xylanexedens</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN045	unassigned	<i>Skermanella aerolata</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN046	unassigned	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN047	unassigned	<i>Adhaeribacter aquaticus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN048	unassigned	<i>Heliobacillus mobilis</i>	Armatimonadetes : Armatimonadia
PEKCLN049	unassigned	<i>Iamia majanohamensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN050	unassigned	<i>Brevibacterium frigoritolerans</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN051	unassigned	<i>Microcladus panaciterrae</i>	Actinobacteria : Actinobacteria

PEKCLN052	unassigned	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN053	unassigned	<i>Lutispora thermophila</i>	Firmicutes : Clostridia
PEKCLN054	unassigned	<i>Trichococcus pasteurii</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN055	unassigned	<i>Pontibacter actiniarum</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN056	unassigned	<i>Rubellimicrobium sp.</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN057	unassigned	<i>Geobacter pickeringii</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
PEKCLN058	unassigned	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN059	unassigned	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN060	unassigned	<i>Terriglobus roseus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp3
PEKCLN062	unassigned	<i>Friedmanniella spumicola</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN063	unassigned	<i>Roseivirga ehrenbergii</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN064	unassigned	<i>Sporocytophaga myxococcoides</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN065	unassigned	<i>Pseudonocardia xinjiangensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN066	unassigned	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN067	unassigned	<i>Terriglobus roseus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp3
PEKCLN068	unassigned	<i>Balneimonas flocculans</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN069	unassigned	<i>Sphingomonas kaistensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN070	unassigned	<i>Craurococcus roseus</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN072	unassigned	<i>Roseivirga ehrenbergii</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN073	unassigned	<i>Sporocytophaga myxococcoides</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN074	unassigned	<i>Terriglobus roseus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp3
PEKCLN075	unassigned	<i>Pseudonocardia xinjiangensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN076	unassigned	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN077	unassigned	<i>Terriglobus roseus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp3
PEKCLN078	unassigned	<i>Balneimonas flocculans</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN079	unassigned	<i>Sphingomonas kaistensis</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN080	unassigned	<i>Craurococcus roseus</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN081	unassigned	<i>Thermoactinomyces vulgaris</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN082	unassigned	<i>Nitrospira moscoviensis</i>	Nitrospira : Nitrospira
PEKCLN083	unassigned	<i>Carnobacterium viridans</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN084	unassigned	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN086	unassigned	<i>Planomicrobium okeanoikoites</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN088	unassigned	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
PEKCLN089	unassigned	<i>Planomicrobium okeanoikoites</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN090	unassigned	<i>Friedmanniella spumicola</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN091	unassigned	<i>Rubrobacter radiotolerans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN092	unassigned	<i>Asanoa iriomotensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN093	unassigned	<i>Bacillus cellulolyticus</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN094	unassigned	<i>Skermanella aerolata</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN095	unassigned	<i>Sinorhizobium arboris</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN096	unassigned	<i>Friedmanniella spumicola</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN097	unassigned	<i>Methylobacterium aminovorans</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN098	unassigned	<i>Arthrobacter oxydans</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN099	unassigned	<i>Trichococcus pasteurii</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN100	unassigned	<i>Adhaeribacter terreus</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN101	unassigned	<i>Halospirulina tapeticola</i>	Cyanobacteria/Chloroplast : Cyanobacteria
PEKCLN102	unassigned	<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN103	unassigned	<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN104	unassigned	<i>Derxia gummosa</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
PEKCLN105	unassigned	<i>Segetibacter koreensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN106	unassigned	<i>Thermithiobacillus tepidarius</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
PEKCLN107	unassigned	<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN109	unassigned	<i>Herbaspirillum rubrisubalbicans</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
PEKCLN110	unassigned	<i>Planococcus antarcticus</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN111	unassigned	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN112	unassigned	<i>Planomicrobium okeanoikoites</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN113	unassigned	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
PEKCLN114	unassigned	<i>Truepera radiovictrix</i>	Deinococcus-Thermus : Deinococci
PEKCLN115	unassigned	<i>Hymenobacter chitinivorans</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN116	unassigned	<i>Flavisolibacter ginsengisoli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN117	unassigned	<i>Heliobacillus mobilis</i>	Armatimonadetes : Armatimonadia
PEKCLN118	unassigned	<i>Fodinicola feengrottensis</i>	Lentisphaerae : Lentisphaeria
PEKCLN119	unassigned	<i>Nitrosomonas eutropha</i>	Proteobacteria : Betaproteobacteria
PEKCLN120	unassigned	<i>Planomicrobium glaciei</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN121	unassigned	<i>Desulfuromonas alkaliphilus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
PEKCLN123	unassigned	<i>Terrimonas ferruginea</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN124	unassigned	<i>Skermanella aerolata</i>	Proteobacteria : Alphaproteobacteria
PEKCLN125	unassigned	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN126	unassigned	<i>Friedmanniella lacustris</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN127	unassigned	<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN128	unassigned	<i>Sorangium cellulosum</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
PEKCLN129	unassigned	<i>Phaselicystis flava</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria

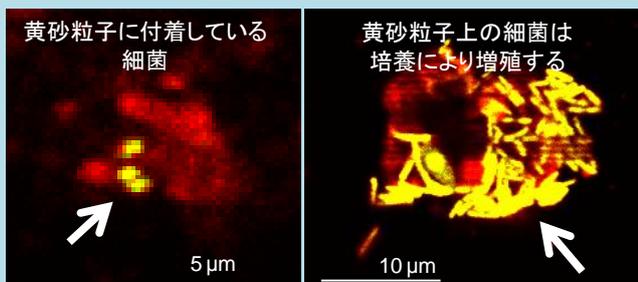
PEKCLN130	unassigned	<i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i>	Proteobacteria : Deltaproteobacteria
PEKCLN131	unassigned	<i>Pontibacter korlensis</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN132	unassigned	<i>Cellulomonas aerilata</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN133	unassigned	<i>Actinomycespora chiangmaiensis</i>	Actinobacteria : Actinobacteria
PEKCLN134	unassigned	<i>Terriglobus roseus</i>	Acidobacteria : Acidobacteria_Gp4
PEKCLN135	unassigned	<i>Helicobacter mustelae</i>	TM7 : TM7_genera_incertae_sedis
PEKCLN136	unassigned	<i>Gemmata obscuriglobus</i>	Planctomycetes : Planctomycetacia
PEKCLN137	unassigned	<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN138	unassigned	<i>Planococcus antarcticus</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN139	unassigned	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Chloroflexi : Thermomicrobia
PEKCLN140	unassigned	<i>Sporosarcina koreensis</i>	Firmicutes : Bacilli
PEKCLN141	unassigned	<i>Hymenobacter soli</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN142	unassigned	<i>Hymenobacter roseosalivarius</i>	Bacteroidetes : Sphingobacteria
PEKCLN143	unassigned	<i>Chloroflexus aurantiacus</i>	Chloroflexi : Thermomicrobia
PEKCLN144	unassigned	<i>Pirellula staleyi</i>	Firmicutes : Bacilli

- 黄砂現象の環境・健康リスクに関する環境科学的研究 -

黄砂現象の環境・生態系・健康へのリスクを評価するための
基盤的・普遍的知識ベースを構築

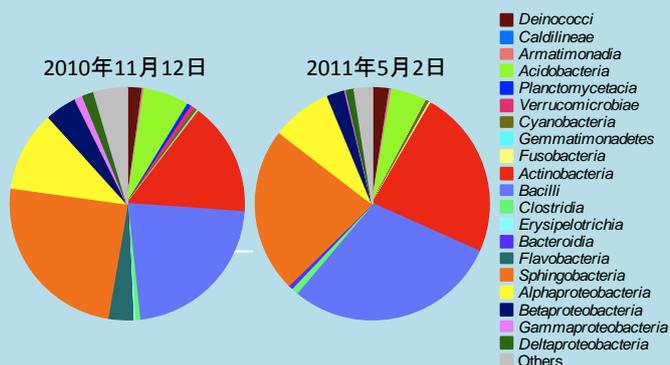
細菌のキャリアーとしての黄砂

バイオイメージングによる黄砂粒子上の細菌の可視化



黄砂粒子は細菌のキャリアーとなり、
黄砂とともに飛来する細菌は増殖活性を有する

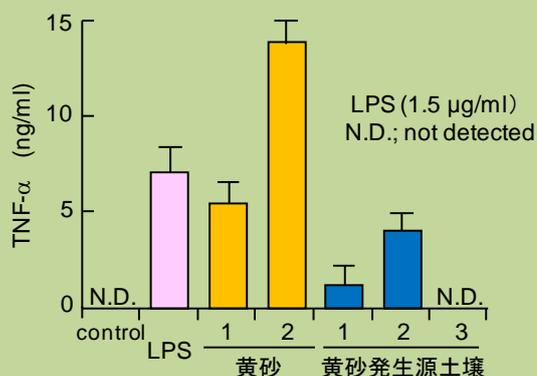
16S rRNA遺伝子を指標とした黄砂中の細菌群集構造



黄砂とともに飛来する細菌は、
これまでの報告以上に多種多様である

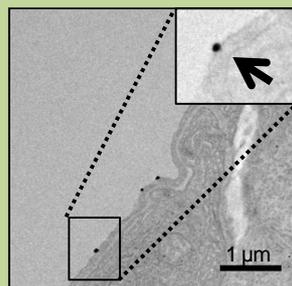
微小粒子としての黄砂

黄砂粒子による炎症性サイトカインの誘導

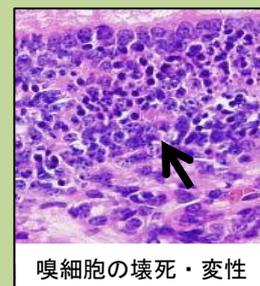


黄砂粒子は炎症を惹起する

肺組織のTEM観察像



嗅部上皮細胞の病理所見



黄砂粒子は生体内に侵入し、
細胞障害を起こす可能性がある

- ・黄砂とともに飛来する細菌は、定着や遺伝子伝播により、生態系に影響を及ぼす可能性がある
- ・微小粒子としての黄砂は、生体に影響を与える可能性がある

科学的データに立脚した環境リスクマネジメントやリスクコミュニケーション等の政策に貢献

- 国際的に公表 → 地球規模の問題解決のための政策立案、国際協力体制の確立
- 一般社会へ紹介 → 科学的根拠のない情報にもとづく過度の社会的不安を取り除く