

安全・安心を提供する空飛ぶ バイオエアロゾル検出評価技術

富山大学 学術研究部 理学系
教授 田中 大祐

2021年9月16日

大気バイオエアロゾルの把握の必要性

- 大気汚染は世界で深刻な環境問題となっている。

世界保健機関(WHO)の報告によれば, 大気汚染により, 世界で毎年700万人が亡くなっていると推計されている。

(https://www.who.int/health-topics/air-pollution#tab=tab_1)

- 大気中の生物粒子(バイオエアロゾル)の組成について, 調査研究が十分進んでいない。

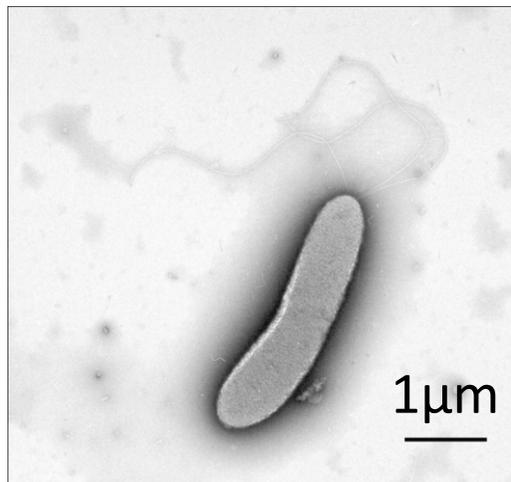
現状では, エアロゾル(PM2.5など)の化学組成のモニタリングは活発に行われている。バイオエアロゾルについては, 分子生物学的手法によるモニタリング法の構築が必要となってきた (Yoo et al., *J. Environ. Sci.*, 2017; Ruiz-Gil, Tanaka (4/7人) et al., *Environ. Int.*, 2020)。

- バイオエアロゾルへの関心は急速に高まっている。

世界で猛威を振るっている新型コロナウイルスもエアロゾルを介した感染が考えられている (Mittal et al., *J. Fluid Mech.*, 2020; Zoran et al., *Sci. Total Environ.*, 2020; Xie et al., *Front. Environ. Sci. Eng.*, 2021)。

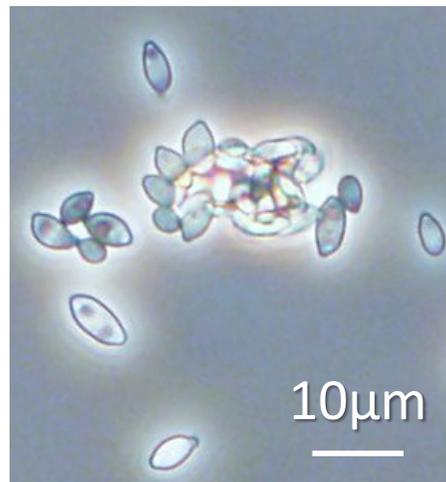
バイオエアロゾルについて

- 細菌, 真菌, ウィルス, 花粉, 原生生物等の生物粒子
⇒ ヒトの健康, 農業, 生態系, 気象等に影響
- 大きさは, 0.01 ~ 100 μm 程度



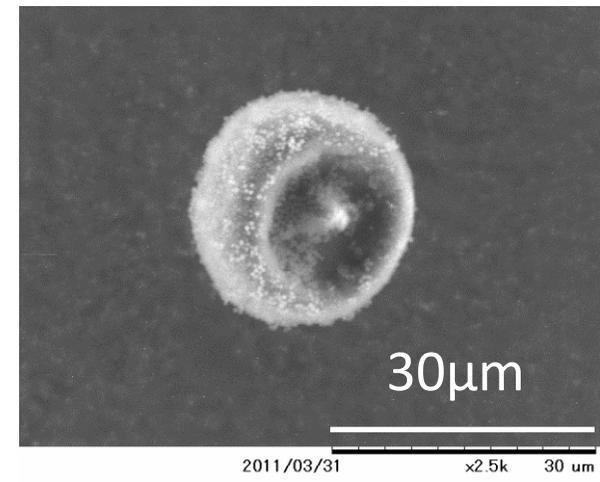
細菌

(*Pseudomonas* sp.)



真菌の胞子

(*Cladosporium* sp.)



スギ花粉

新技術：DNA分析による大気バイオエアロゾルのモニタリング

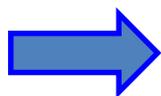
大気試料



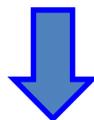
エアサンプラー

富山大学理学部の屋上で試料採取し、研究室で分析まで行っている。

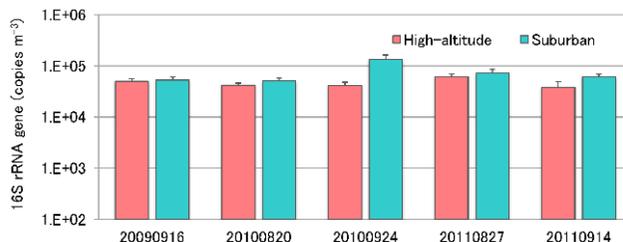
抽出



DNA

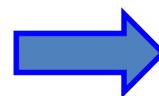


リアルタイムPCR



微生物の定量

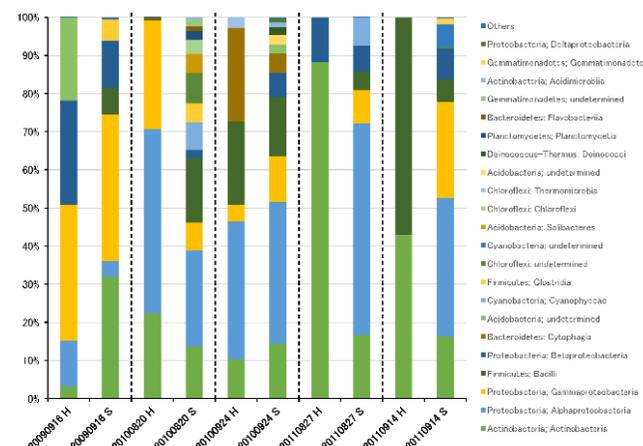
PCR



PCR産物



次世代シーケンス



微生物群集構造解析

従来技術とその問題点

従来技術である蛍光検出法は、迅速安価で微生物の定量が可能であるが、微生物の同定はできない。

競合技術である培養法と MALDI-TOFMS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計) を組み合わせた技術は、病院検査室での微生物同定で普及が進んでいるが、バイオエアロゾルの検出では実績がほとんどない。

新技術の特徴・従来技術との比較

- 同定可能な微生物の種類は、DNA データベースが充実していて極めて多く、詳細に提示できる。
- リアルタイム PCRを用いた微生物の定量は、正確であることから、よりの確な検証結果を提示できる。
- 次世代シーケンス技術は、近い将来に更なる高速化かつ安価になり普及・促進につながると期待される。

想定される用途

- 健康、農業、生態系への大気バイオエアロゾルの影響を評価するための調査
- 屋内外におけるアレルギー対策に向けたカビや花粉などのアレルゲンの検出・評価
- 医薬品工場、食品工場、病院等における環境管理のための室内バイオエアロゾルの分析・評価

実用化に向けた課題

- 迅速性：DNA抽出や解析時間などで時間を要する。但し、次世代シーケンズの技術は日進月歩で進んでおり、今後さらに迅速になると期待できる。
- コスト：現在、DNA分析に必要な機器や試薬は安価と言えないが、一度に得られる配列データは多量であるので配列あたりでは安価になる。技術的進歩により安価になると期待できる。

企業への期待

- 人の健康への影響や動植物に被害が及ぶようなバイオエアロゾルの状況を速やかに検出し、注意喚起等に役立つシステムを企業と構築していくこと。
- IoT+BigData+AIの考えを取り入れ、自動化を進め、ビジネスモデル特許(マネタイズ含めて)を取得する取り組みでの連携。

本技術に関する知的財産権

- 特許出願は、随時、産学連携部門と検討を重ねている。本技術は、コロナ禍のこともあり注目を浴びてきた技術で、JST A-STEP機能検証フェーズにも採択されている。
- 今後、企業との連携は必須であり、企業のを借り、IoT+BigData+AIの考えを取り入れ、自動化を進め、ビジネスモデル特許(マネタイズ含めて)を取得したい。

産学連携の経歴

- 2016年-2020年 企業との共同研究実施
- 2019年-2020年 JST 2019年度A-STEP機能検証
フェーズ試験研究タイプ第2回公募
に採択
(課題名：健康、農業、生態系に影響する大気バイオ
エアロゾルのモニタリングシステムの構築)
- 2020年 共著論文発表 (Scientific reports 誌,
プレスリリースも行う)

共著論文:

日本の都市域(横浜市)および地方都市
郊外(富山市)における
細菌バイオエアロゾルの特徴

SCIENTIFIC
REPORTS

natureresearch



OPEN

Size resolved characteristics of urban and suburban bacterial bioaerosols in Japan as assessed by 16S rRNA amplicon sequencing

Daisuke Tanaka^{1✉}, So Fujiyoshi^{2,3}, Fumito Maruyama^{2,3}, Motoshi Goto¹,
Shinichi Koyama⁴, Jun-ichi Kanatani⁵, Junko Isobe⁵, Masanori Watahiki⁵, Akihiro Sakatoku¹,
Shigehiro Kagaya¹ & Shogo Nakamura¹

To study the size-resolved characteristics of airborne bacterial community composition, diversity, and abundance, outdoor aerosol samples were analysed by 16S rRNA gene-targeted quantitative PCR and amplicon sequencing with Illumina MiSeq. The samples were collected using size-resolved samplers between August and October 2016, at a suburban site in Toyama City and an urban site in Yokohama City, Japan. The bacterial communities were found to be dominated by Actinobacteria, Firmicutes, and Proteobacteria. At the genus level, we found a high abundance of human skin-associated bacteria, such as *Propionibacterium*, *Staphylococcus*, and *Corynebacterium*, in the urban site. Whereas, a high abundance of bacteria associated with soil and plants, such as *Methylobacterium* and *Sphingomonas*, was observed in the suburban site. Furthermore, our data revealed a shift in the bacterial community

北日本新聞と
富山新聞に掲載
2020年(令和2年)
7月23日(木曜日)

背景と目的

- 大気中の細菌は、粒子状物質(PM)に付着している場合が多く、孢子、栄養細胞、または分裂細胞の形で存在する。
 - 粒子サイズは、吸入の程度に関わる。
 - ・粗大粒子：胸郭外や気管に沈着
 - ・微小粒子：気管支や肺胞領域に沈着
- ヒトの健康へ影響が大きい

目的:

都市域(横浜市)と郊外(富山市)における、大気中細菌群集の特徴と影響を粒径と関連させて把握する。

アンダーセンエアサンプラー

エアロゾルを9段階の粒径別に分級捕集
分粒範囲：0.43～11.0 μm



Stage No.

粒径 (μm)

0 >11.0
1 7.0-11.0
2 4.7-7.0
3 3.3-4.7
4 2.1-3.3
5 1.1-2.1
6 0.65-1.1
7 0.43-0.65
Backup <0.43

粗大粒子

微小粒子

材料と方法

➤ 大気試料

・アンダーセンエアサンプラー

流量 28.3 L min^{-1} で, 24時間 (11:00から翌日の11:00)

石英繊維フィルター(東京ダイレック)



➤ DNA抽出

・PowerSoil DNA isolation kit (MO BIO社製, USA)



➤ 16Sメタゲノム解析 Illumina MiSeq

・16S rRNA遺伝子V3-V4領域を標的とする細菌群集構造解析

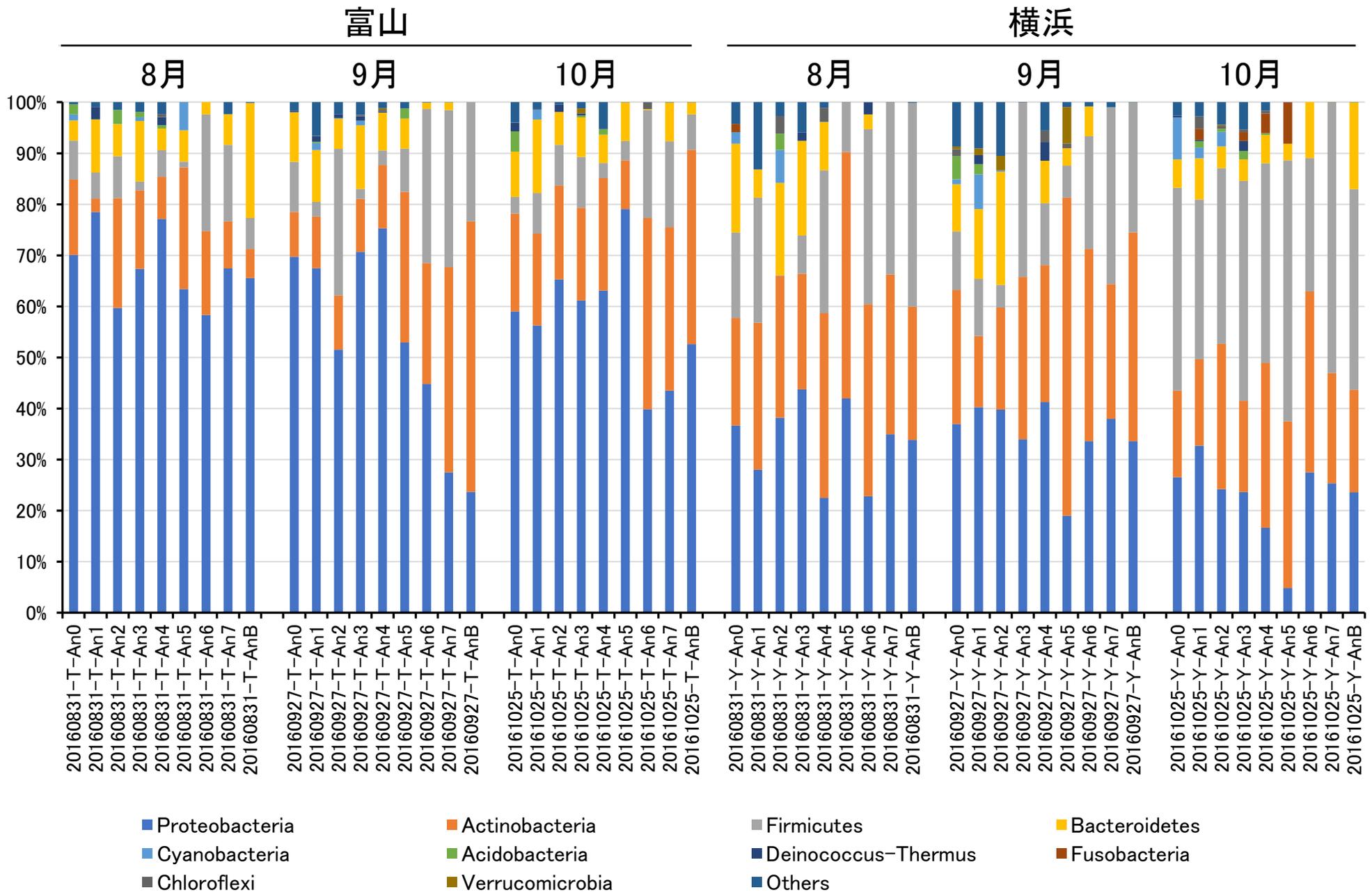
(どのような細菌がどれくらい存在しているかの解析)

➤ リアルタイムTaqMan PCR

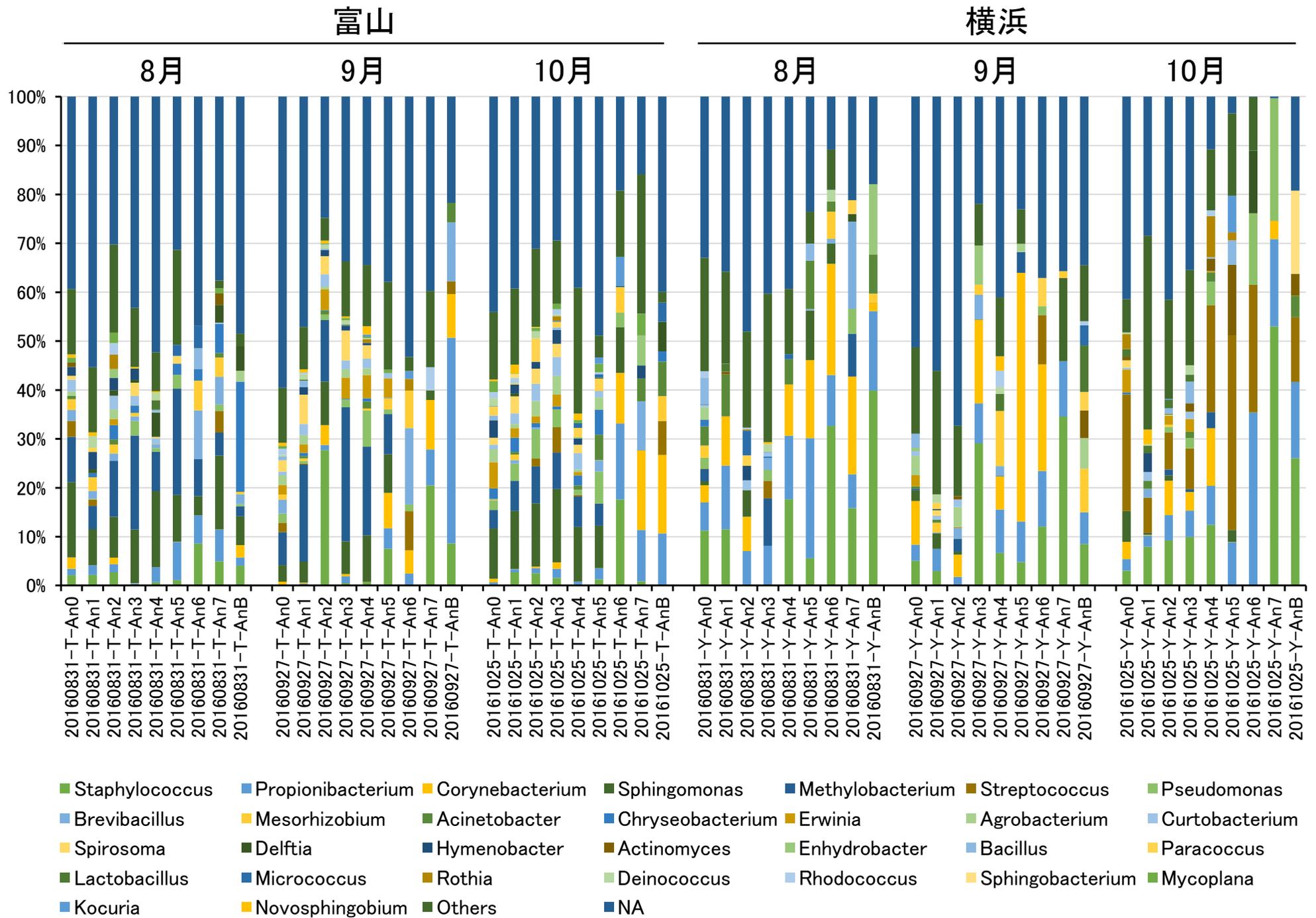
・16S rRNA遺伝子V8領域を標的とする全細菌の定量

(細菌の遺伝子のコピー数を調べる)

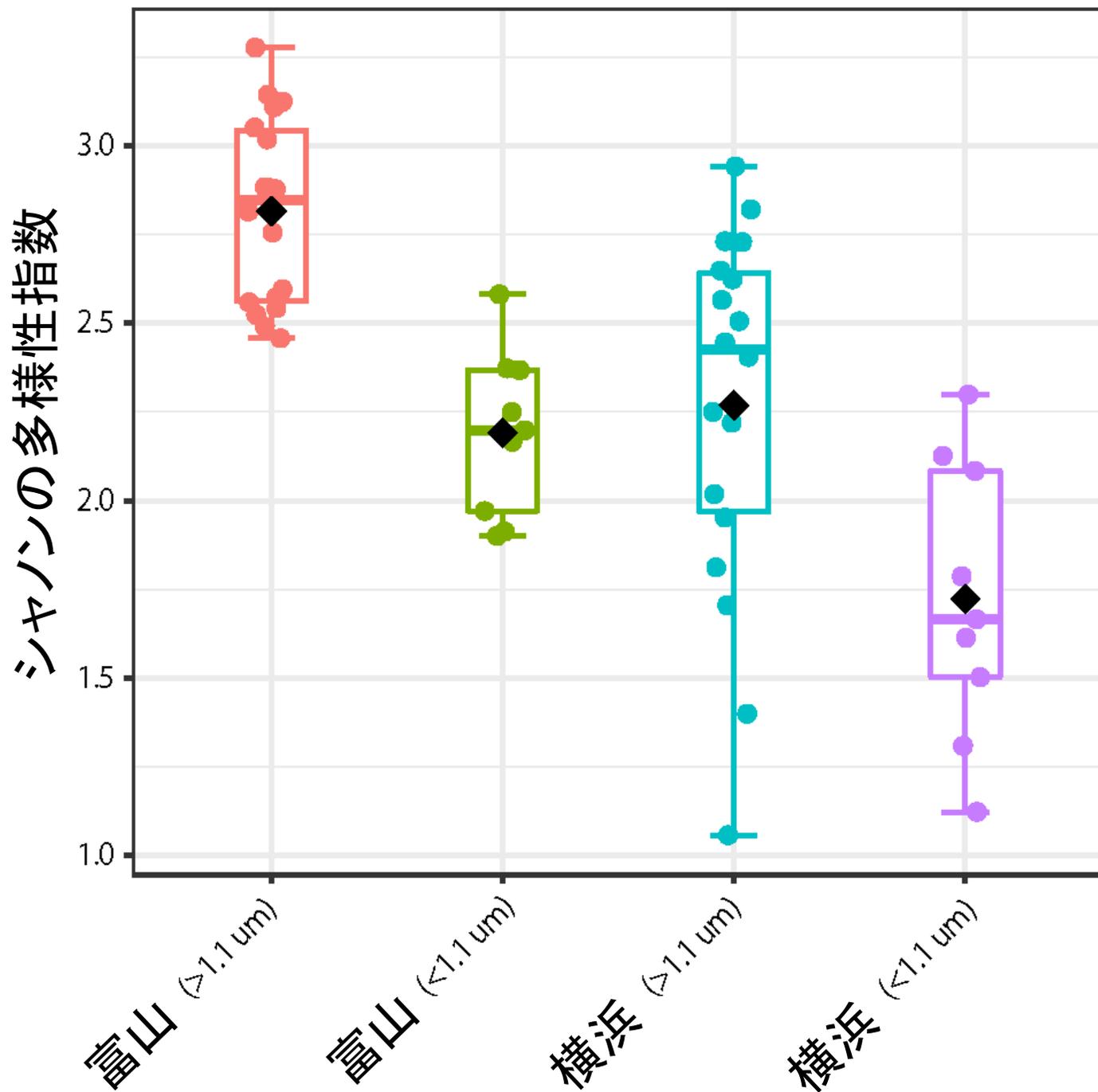
分級捕集した大気試料中の細菌群集構造 (門レベル)



分級捕集した大気試料中の細菌群集構造 (属レベル)

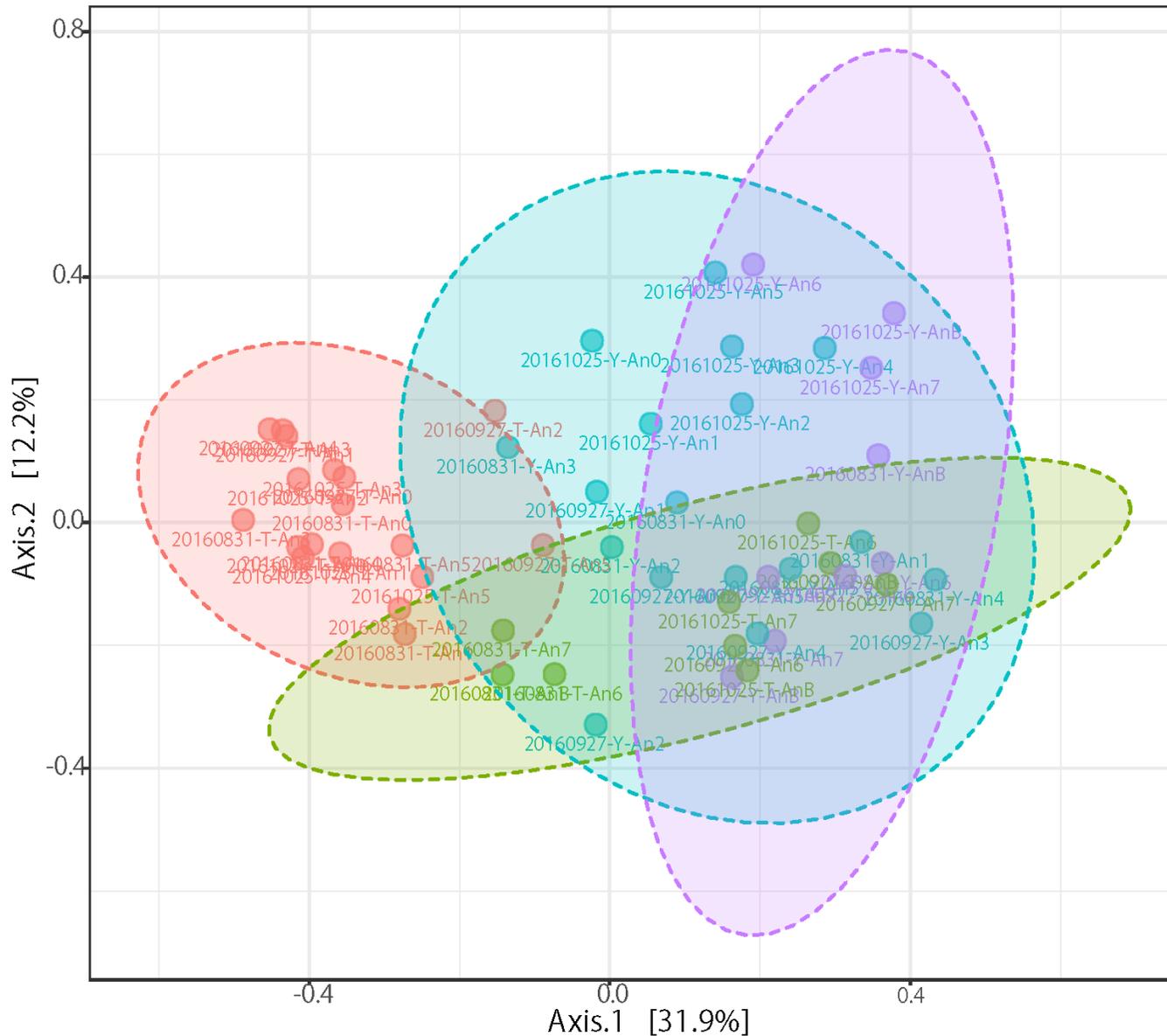


大気試料における細菌多様性指数の比較



赤色で示す富山の
粒径 $1.1\mu\text{m}$ 以上の大
気試料は、細菌の種
の多様性が高い。

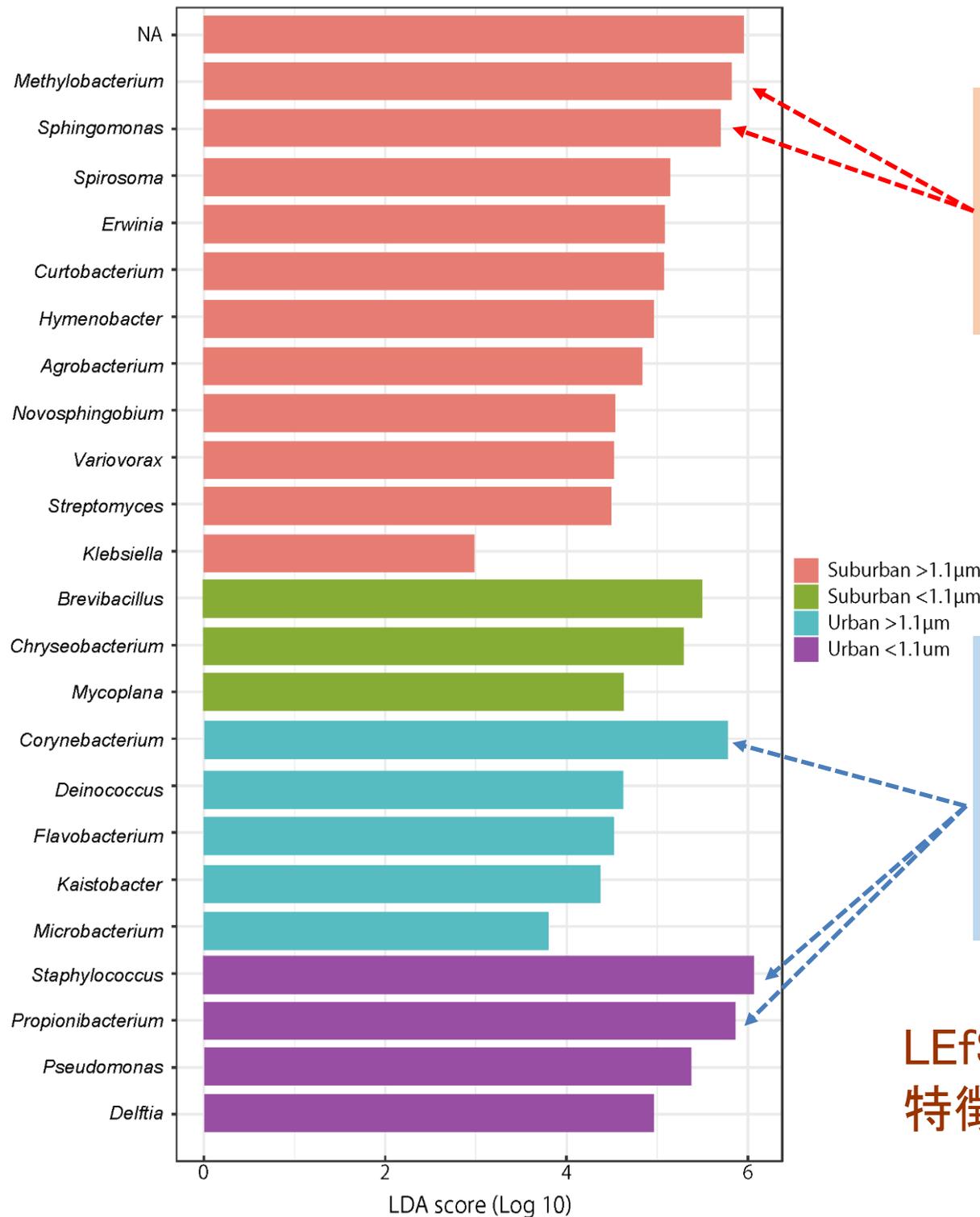
主座標分析の結果



Sample group

- Toyama (>1.1 um)
- Toyama (<1.1 um)
- Yokohama (>1.1 um)
- Yokohama (<1.1 um)

赤色で示す富山の粒径
1.1 μ m以上のグループ
は、細菌群集構造(種
組成の構成)が異なる。

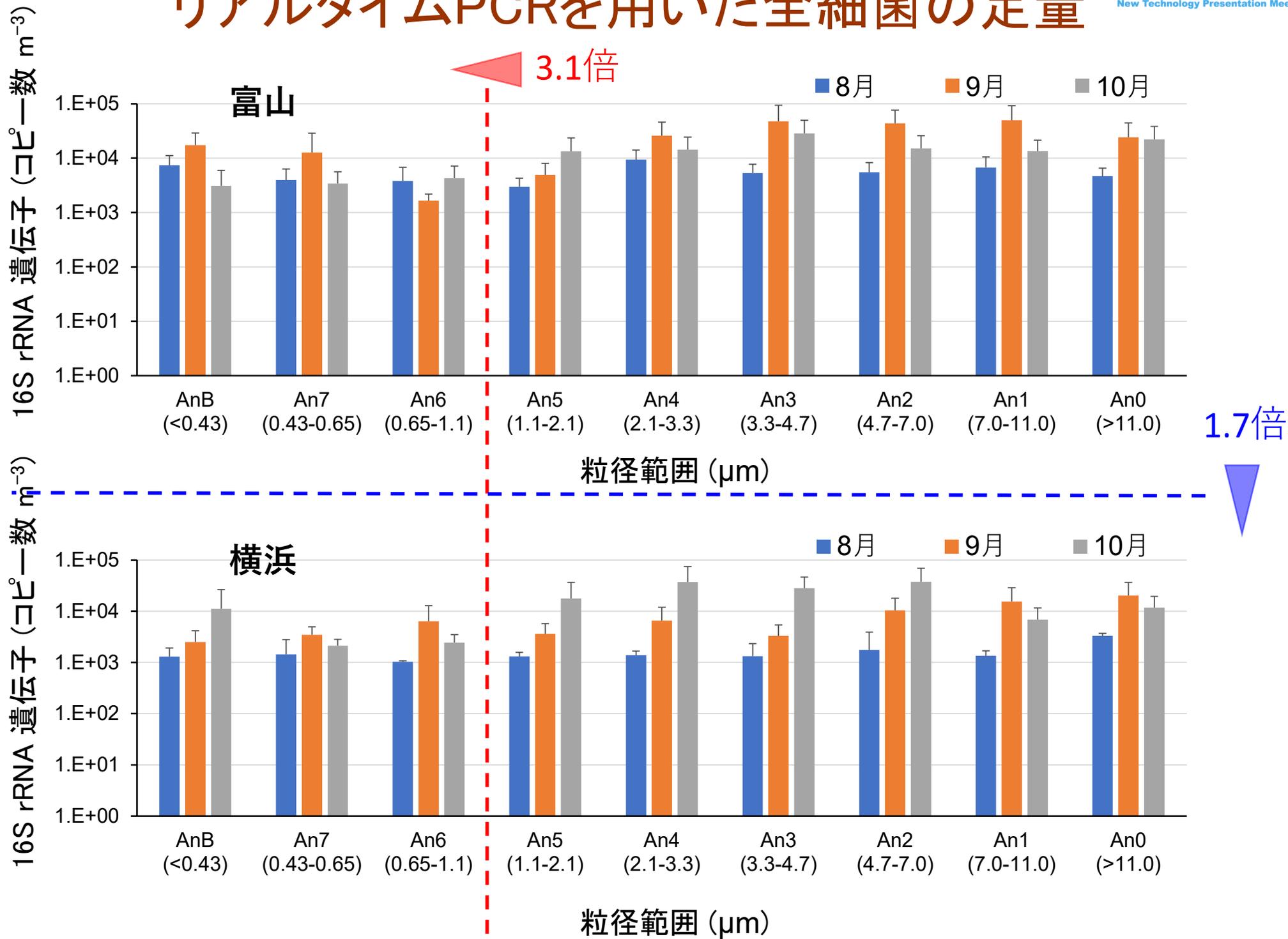


郊外の富山では、土壌・植物関連細菌が特徴的
*Methylobacterium*属,
*Sphingomonas*属

都市域の横浜では、ヒトの皮膚関連細菌が特徴的
*Propionibacterium*属,
*Staphylococcus*属,
*Corynebacterium*属

LEfSe解析による各グループで特徴的な細菌属の探索結果。

リアルタイムPCRを用いた全細菌の定量

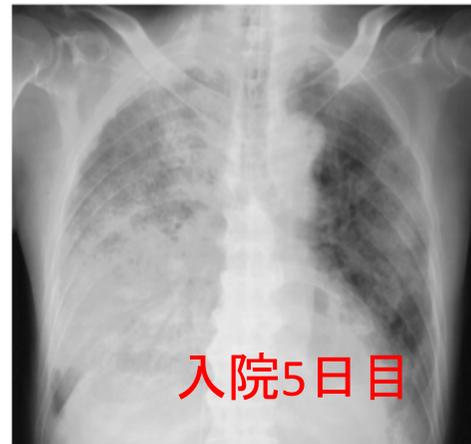


レジオネラ症 (legionellosis)

レジオネラ・ニューモフィラ (*Legionella pneumophila*) を代表とするレジオネラ属菌を含むエアロゾルを吸い込むことによる細菌感染症で、2つの病型が重要である。

- **レジオネラ肺炎**

重症化傾向が強い。潜伏期間は2～10日で、50～70歳の男性に多い。



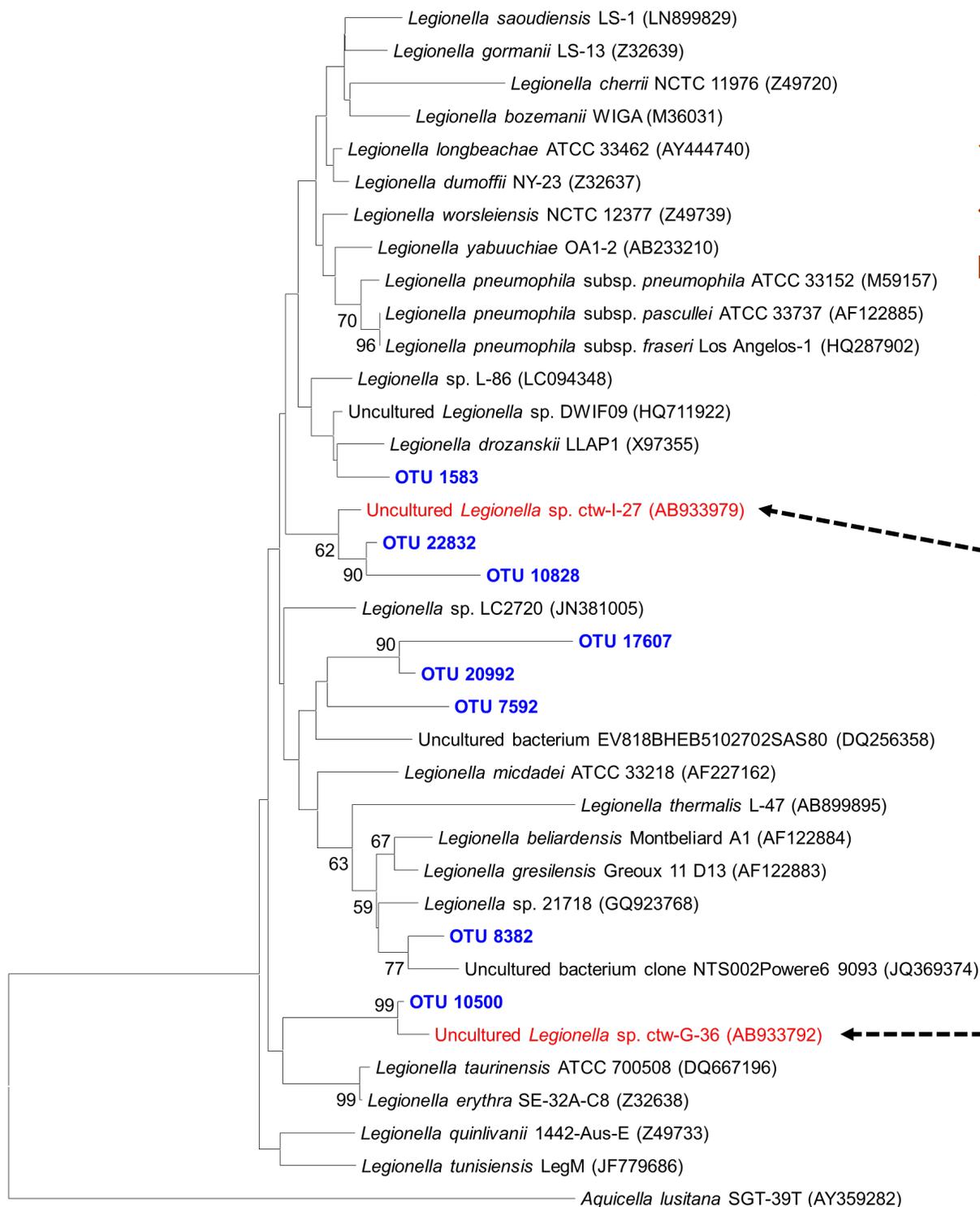
急速進行性レジオネラ肺炎症例の胸部X線像

出典：「レジオネラ症防止指針 第4版」, 2017

- **ポンティアック熱**

自然治癒型でインフルエンザに似た熱性疾患であり、エアロゾル吸入後12時間～3日程度で発症する。

次世代シーケンサーで検出されたレジオネラ属菌の16S rRNA遺伝子塩基配列(OTU 1583~22832, 青色)を含む系統樹。



福岡県の冷却塔水からのレジオネラ属菌の塩基配列 (Inoue et al., 2015)

埼玉県の冷却塔水からのレジオネラ属菌の塩基配列 (Inoue et al., 2015)

【研究成果のポイント】

- 日本の都市域（横浜市）および地方都市郊外（富山市）において大気試料を粒径別に捕集し、次世代シーケンサーによる網羅的なメタゲノム解析を行ったところ、粒径1.1 μmの閾値で細菌の群集構造（細菌叢）、多様性、密度が異なることが両地域で明らかとなった。
- 都市域では *Propionibacterium* 属、*Staphylococcus* 属、*Corynebacterium*属などヒトの皮膚常在細菌が特徴的に認められたのに対し、郊外では *Methylobacterium*属や *Sphingomonas*属などの土壌や植物に関連する細菌が特徴的に認められた。
- 呼吸器感染症を引き起こす可能性のあるレジオネラ属菌（大気中の細菌の中で僅か0.5%程度含まれる）が、両地域の主に粒径2.1μm以上の粗大粒子側で検出され、系統解析の結果から冷却塔に生息するレジオネラ属菌が大気を介して国内で広がっている可能性が示された。

Tanaka, D. *et al.* (2020) *Scientific reports* 10: 12406

お問い合わせ先

国立大学法人 富山大学

学術研究・産学連携本部 高橋修

TEL 076-445-6936

FAX 076-445-6397

e-mail t-sangyo@adm.u-toyama.ac.jp