

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：12102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658270

研究課題名(和文) 黄砂は病原性ウイルスの「長距離の運び屋」として機能しうるか？

研究課題名(英文) Does KOSA (Yellow Sand) work as a long-distance carrier of pathogens?

研究代表者

森尾 貴広 (MORIO, Takahiro)

筑波大学・国際部・准教授

研究者番号：10292509

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：大陸から飛来する黄砂に付着した病原性細菌・ウイルスが感染性、病原性等の生物活性を保ったまま海を渡ることが出来るかどうかを検証するために、フラスコ内に黄砂を入れて攪拌することによって浮遊させ、温度、気圧、湿度などを調節することによって黄砂が大陸から日本へ飛来する状況を実験室内で再現する装置を製作することを試みた。

本研究期間内ではこの装置の試作、条件検討並びに黄砂が飛来する間に曝される環境の分析を行ったが、今後は実際にモデルとなる病原性を持たない微生物、ウイルスを黄砂に付着させ、この装置再現した環境内で生物活性を保てるかどうかを調べる予定である。

研究成果の概要(英文)：In order to investigate whether KOSA (Yellow Sand) can keep infectivity and pathogenicity of pathogenic bacteria and viruses which stick on the surface of the sand particles during their long trip from the continent to Japan, I tried to make an apparatus which reproduces the conditions to which the KOSA is exposed during its trip. The apparatus consisted of a round flask in which sand sample is put and whirled up by magnetic stirrer, small freezer and heater unit which control the temperature, connection to vacuum pump to reduce atmospheric pressure and injector through which chemicals are put into the flask.

In the period of the project, I made some prototypes of the apparatus and investigated the environmental condition to which the sand particles are exposed on the way from the continent to Japan. Based on the results, I will put some model bacteria and viruses with no pathogenicity into the apparatus to investigate whether they are 'alive' after the long journey.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：黄砂 病原体 微環境 大気汚染物質 緩衝作用

### 1. 研究開始当初の背景

ヒトや家畜の広域伝染病の伝播の要因、経路、メカニズムを明らかにすることは、これらの伝染病の発生リスクを適切に評価し、感染が拡大する前に防疫上の対策を講じる上で重要である。これらの長距離に渡る伝播は感染したヒト、家畜の移動、渡り鳥などの未感受性の野生動物の移動、肉、乳、毛皮など感染動物由来の食品・加工品の流通、病原体に汚染された飼料、衣服、車両、航空機等による間接的な伝播、そして風によるものが挙げられる。

風による病原体の伝播においては浮遊微粒子の表面に病原性の微生物・ウイルスが付着して風に乗って運ばれるが、このときに微粒子の表面に存在する適度な緩衝作用を持つ溶液、あるいは微粒子の表面構造そのものが病原体を保護することによって感染性・病原性を長く維持でき、広範囲の伝播を助長する可能性が考えられる。特にウイルスの場合、微生物における胞子のような乾燥や極度の高温あるいは低温に対する耐性を持つ構造体を作ることが出来ないため、この効果はより大きいと考えられる。

近年、春期の日本における黄砂の観測日数が増加傾向にあり、黄砂そのものの被害に加え、黄砂に付着して運ばれる環境汚染物質および病原体に対するリスクが議論されている。例えば、2007年に24年ぶりに大分と山口で発生した麦さび病や2000年に実に92年ぶりに宮崎と北海道、そして2010年に宮崎で発生した口蹄疫に関しては、黄砂によって病原体が運ばれてきたことを指摘する議論があるが(日本学術会議 農学委員会 風送大気物質問題分科会、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、2010年2月)、科学的な検証がなされておらず、推測の域にとどまっている。特に口蹄疫に関しては日本で採取された黄砂より FMDV 遺伝子由来の RNA 断片を検出したという報告 (Shi, F. et al., J. Arid Land Studies 19 483-489, 2009) がある一方で、1967年に英国での大発生当時の気象状況から FMDV の風による伝播条件を推定した研究 (Hurst, G.W. Vet. Rec. 82 610-614, 1968) から、FMDV が感染能を持ったまま黄砂により大陸から日本に運ばれる可能性については、否定的な見解が取られているが、決定的な証拠が得られていない。

### 2. 研究の目的

本研究は黄砂による病原体の輸送の可能性について実証的に検証することを目的とする。特に、黄砂粒子表面の構造あるいは表面で保持される水溶液の緩衝作用の有無に着目し、黄砂の飛来の際に曝露される乾燥、温度及び pH の変化等の環境変化に対し黄砂粒子が細菌、ウイルスなどの病原体の活性を保持することが出来るかどうかをまず実験室内環境で検証する。本研究期間にお

いては黄砂粒子の環境変化に対する緩衝作用を可能であれば粒子レベルで測定する方法論を開発すると共に、モデル病原体(細菌、ウイルス)を用いて生物的活性保持能を検証することを目指した。

### 3. 研究の方法

本研究は実験室内で黄砂の飛来状況を再現し、その条件下において病原体が活性を保持することが出来るかどうかを検証するために、

- (1) 黄砂が大陸で発生し、日本に飛来するまでに曝される環境(温度、湿度、気圧、黄砂粒子表面上の化学物質)を実験室内で再現出来る装置の作製
- (2) 黄砂粒子の表面上における緩衝作用(特に湿度、微生物・ウイルスの生物活性保持に必要な塩、pHがある範囲内に保たれているかどうか)を粒子単位で観察・評価出来る系の確立
- (3) 病原体のモデルとなる微生物・ウイルスを用いた黄砂粒子による生物学的活性の保持の評価

を行い、黄砂が病原体の「運び屋」として機能しうるかを検証する。それぞれの具体的な研究方法は以下の通りである。

- (1) 実験室における黄砂の飛来環境の再現系の構築

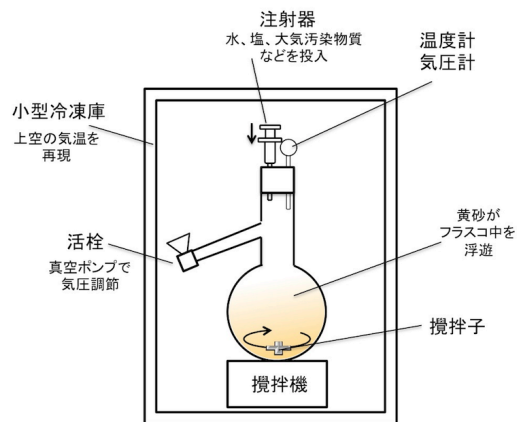


図. 実験装置の概要

上記の様な装置を作製し、砂サンプルを丸型フラスコ内に入れ、気象データ等により推測した黄砂が通過した地点のエアロゾル組成(汚染物質、塩などの化学物質)および水蒸気圧に合わせた空気を加えて密閉し、当該の温度条件下で攪拌子により攪拌し、砂粒子を浮遊させる。当該地域の通過時間に相当する時間が経過した後、次の通過地点の大気を模した空気に入れ換え、同様の攪拌を繰り返す。この様にして黄砂の飛来時に黄砂粒子が曝される環境を実験室で再現する。

- (2) 病原体を保持するための黄砂粒子表面の緩衝作用を評価する方法論の確立

粒子の表面の温度、湿度、pH、各種イオン濃度の変化といった黄砂が大陸から日本へ

飛来する際に黄砂粒子周辺の環境変化に対し、黄砂粒子の表面に保持されている水溶液の pH、イオン濃度がどのように変わるかを 1 粒子レベルでモニター出来るような方法論の確立を試みる。特に、イオン濃度については  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  に加え、pH 緩衝能が期待される  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{CH}_3\text{COO}^-$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  に着目し、検出法の開発を試みる。

これらのイオン強度及び pH については細胞内イオン濃度・pH を測定する際に用いられる、それぞれに対応する蛍光プローブを用い (Han, J. et al., *J. Am. Chem. Soc.* 131 1642-1643, 2009, Kumar et al., *Org. Lett.* 10 5549-5552, 2008, 埼玉大学 (発明者: 久保、野中)、特開 2009-186350, 平成 21 年)、高感度デジタルカメラを接続した蛍光顕微鏡で検出する。特に蛍光プローブの溶媒については、以下の (2) での実験でプローブが黄砂粒子からはがれ落ちることなく、かつ粒子が持つことが期待される緩衝作用への影響を最小限にとどめるよう種類、組成、粘性について条件検討を行う。

これらの条件検討の後、(1) の系を用いて黄砂の飛来の再現実験を行い、砂粒子表面の微環境の変化をモニターし、口蹄疫ウイルス (FMDV) ほかに病原ウイルスの感染性保持条件の範囲内にあるかどうかを検証する。例えば、FMDV は pH7-9 の範囲内においては 4°C で 18 週間生存出来るが (Farez, S. and Morley R. *S. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 16 65-78, 1997)、黄砂が飛来するまでの数日間この環境条件にあれば、FMDV が黄砂によって伝播する可能性が強いものとなることが期待される。

(3) モデル病原体 (バクテリア、ウイルス) を用いた黄砂粒子による生物学的活性の保持の評価

黄砂が病原体の生物学的活性を維持したまま飛来できるかどうかを調べるために、モデル病原体を粒径、物性が黄砂に類似したモデル砂サンプルあるいは実際に採取した黄砂砂サンプルに付着させ、上記 (1) で決めた条件において、黄砂の飛来を「シミュレート」し、「日本へ飛来」したのち、生物学的活性を保持しているかを調べる。病原バクテリアのモデルとしては、枯草菌 (*Bacillus subtilis*) およびその芽胞、および大腸菌 (*Escherichia coli*) を用い、生物学的活性の検証は、処理後に寒天培地に植菌し生育能を調べることによる。一方病原ウイルスのモデルとしては市販の組換えレトロウイルスベクターシステムで生成させたレトロウイルス粒子を用い、生物学的活性の検証のために、ウイルスゲノムに蛍光タンパク質 (GFP) を挿入する。検証は (2) の条件で処理した砂サンプルをマウス培養細胞に加えて培養し蛍光タンパク質による蛍光強度を測定することにより行う。もしウイルスが感染性を保持していれば、GFP による蛍光が検出

されるはずである。

#### 4. 研究成果

まず、黄砂の飛来時の黄砂粒子周辺の環境条件を推測するために、先行研究および公開されている気象データ、衛星画像データによる黄砂の飛来経路、大陸都市部の大気汚染データ等を基に、黄砂が大陸地表より巻き上がり、大陸沿岸、海上を通過し日本に飛来するまで黄砂がどのような環境 (温度、気圧、湿度、化学物質) に曝されるかを調べた。特に、特に黄砂が都市部、工業地帯上空を通過する際には排気ガスや工場からの排煙に含まれる重金属、窒素酸化物などにより黄砂表面の物質組成、pH が影響を受ける可能性があるため、当該地域の気象データをもとに、大気に含まれる物質の組成を調べた。微生物、ウイルス等が生存出来るためには、黄砂粒子の表面がある範囲内の温度、湿度、塩濃度、pH に保たれている必要があるため、都市部を通過する際に大気汚染物質に含まれていることが予想される緩衝作用 (pH を一定に保つ作用) のある化学物質が重要な役割を果たす可能性があることが示唆された。

次に、丸型フラスコに入れた黄砂を攪拌子で攪拌することによりフラスコ内を浮遊させ、真空ポンプ、冷凍庫で気圧、温度を調節し、都市上空、海上など黄砂の移動経路上で黄砂粒子が曝露される塩水分、大気汚染物質などの化学物質を注射器でフラスコ内に注入することで、黄砂が飛来する時に砂粒子が曝される微環境を実験室内で再現する系の確立を試み、投入する砂サンプルの量、攪拌子の形状・大きさ、攪拌速度に関する条件検討を行った。現状においては細部の改良の余地があるものの、実験装置の大まかな仕様、実験条件を定めた。

黄砂粒子周辺の微環境、特に弱酸、弱塩基による緩衝作用の評価法の確立については、蛍光 pH インディケータを用いた粒子単位での測定、砂サンプルをごく少量の水で洗い流した水溶液を用いた測定法等の条件検討を行ったが、検出感度の面で本研究遂行上の要件を満たす結果が得られていない。今後、別種の pH、イオン強度蛍光インディケータを用いた測定精度の向上を進める予定である。

本研究期間において、最終的な段階であるモデル微生物、ウイルスの上記装置への投入・黄砂飛来時の状況の微環境下における生存 (感染性、生物活性の保持) の検証を行うことが出来なかったが、今後継続して上記条件検討を進め、コントロールとしてのモデル微生物・ウイルスの生存の検証および黄砂が発生する大陸で採取した土壌サンプルのフラスコ内の「飛来」実験後の生物活性の検証を行う予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者に

は下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

森尾 貴広 (MORIO, Takahiro)

筑波大学・国際部・准教授

研究者番号：10292509