



| | |
|--------------|---|
| Title | 宇宙居住環境の微生物モニタリングに関する基礎的研究 |
| Author(s) | 稗田, はつき |
| Citation | 大阪大学, 2013, 博士論文 |
| Version Type | VoR |
| URL | https://hdl.handle.net/11094/50073 |
| rights | |
| Note | |

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

宇宙居住環境の微生物モニタリングに関する基礎的研究

稗田 はつき

目次

| | |
|--------------------------------|----|
| 緒論 | 1 |
| 本論 | |
| 第一章 | |
| 宇宙居住環境の微生物モニタリングにおけるサンプリング方法の | |
| 検討 | 3 |
| 第二章 | |
| 国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」内の細菌モニタリング | 17 |
| 総括 | 32 |
| 結論 | 34 |
| 謝辞 | 35 |
| 引用文献 | 36 |

緒論

宇宙科学研究は我々の生活に革新を与えるものとして期待されている。その要となるのが宇宙居住であり、その実現により恒常的な宇宙科学研究が可能となる。そこで1970年代より、宇宙ステーション Salyut (ソ連; 1971年~1985年)、SkyLab (アメリカ; 1973年~1974年)、Mir (ソ連、ロシア; 1986年~2001年)において、物理学、化学、生物学研究に加えて、宇宙滞在が人体に与える影響の評価等が進められてきた。現在運用されている国際宇宙ステーション (International Space Station; ISS) は、これらの宇宙ステーション計画での成果をもとにしている。ISSにおいては半年を超える長期宇宙滞在も実施されており、超長期宇宙滞在や宇宙居住の実現のための宇宙医学研究が行われている。これらの実績をもとに、アメリカ航空宇宙局 (National Aeronautics and Space Administration; NASA) や欧州宇宙機関 (European Space Agency; ESA) においては、月面居住や有人火星探査を目標とした宇宙利用計画が進められている。

宇宙居住環境は、多くの面で我々が地上で生活する環境と大きく異なる。宇宙居住施設は閉鎖環境であるため、水や空気の再利用が必須となる。これらの再生システムにおいては、管理が不適切であった場合にシステム内で微生物が増殖する可能性が考えられるため¹⁾、その適切な微生物学的管理が重要となる。また、これまでの宇宙実験により、宇宙居住環境ではヒトの免疫能が低下することが報告されており²⁾、*Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ネズミチフス菌) においては病原性が高くなるとの結果も得られている³⁾。さらに、微小重力であるため、ダストが落下することなく、空気中にとどまることが確認されている。したがって、宇宙居住環境はこれまでに人類が蓄積してきた科学的知見のみでは居住者の安全を保証することが難しく、地上環境以上に微生物による健康障害に対する注意が必要とされている。また宇宙ステーション Mir においては、センサーの被覆部に真菌が発生し、トラブルの原因となったことが報告されており⁴⁾、微生物は健康障害のみならず、システムトラブルの原因にもなることが明らかとなっている。そこで各国宇宙機関では、今後の宇宙居住を

実現するために、宇宙居住環境におけるヒトと微生物の係わりに関する研究を中心とする「宇宙微生物学」の推進が期待されている。

宇宙居住の実現にあたっては、衛生微生物学的な安全を確保する必要があるため、微生物管理が最重要課題となる^{5,6,7)}。そこで各国宇宙機関はすでに ISS 内において継続的な微生物モニタリング等を実施し、内部データとして蓄積している。しかし、サンプリング方法も含め、手法の国際的な標準化がなされているとはいえ、現状ではデータの共有が十分ではないため、手法を含めた標準化が課題となっている。また、宇宙居住環境における微生物の動態を明らかにし、微生物に関する健康障害指標を決定することが重要である。

そこで本研究では、ISS 内の微生物モニタリングを行うにあたり、標準化が可能なサンプリング法の提案を行うとともに、3 年間にわたって日本実験棟「きぼう」内でモニタリングを行い、ISS 内における細菌のカタログデータベース構築の第一歩を築くことを目的とした。「きぼう」内の細菌モニタリングにあたっては、分子微生物生態学的手法を用いた。現在、ISS 内における細菌の現存量測定や同定、群集構造解析には、一般的に培養を基本とした方法が用いられている。培養法は簡便な方法であり、操作に特殊な技術を必要としない優れた方法であるが、環境中に生息する細菌の 90%以上が通常の培養法では検出できないことが、この約 20 年間の環境微生物学分野の研究により明らかになってきている⁸⁾。そこで、蛍光染色法や定量的 PCR 法による細菌現存量の測定とともに、変性剤濃度勾配ゲル電気泳動 (DGGE) 法を用いた細菌群集構造解析を行った。

本論

第一章 宇宙居住環境の微生物モニタリングにおけるサンプリング方法の 検討

従来、宇宙居住環境内の微生物サンプリングにはスワブ法が用いられてきた。しかしながら、スワブ法には統一されたプロトコールが無く、微生物回収率に個人差が生じやすいという課題があった。そこで本研究では、操作性が高く、かつ個人差の無いサンプリングプロトコールの作成を行った。また、宇宙居住環境内でのサンプリング後のスワブは、地上での解析までに数か月の保存期間を経ることとなる。そのため本研究では、試料採取後のスワブの保存が細菌現存量測定、および細菌群集構造解析に及ぼす影響を評価した。

実験材料と方法

細菌試料

供試菌株として、*Acinetobacter lwoffii* ATCC 15309T、*Bacillus subtilis* 168、*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* GTC00232、*Pseudomonas putida* ATCC 12633、*Staphylococcus epidermidis* IFO 3762を用いた。*L. lactis* は 10 ml の GAM ブイヨン培地（日水製薬）において 37 °C で一晩静置培養した。また、*A. lwoffii*、*B. subtilis*、*P. putida*、*S. epidermidis* は 10 ml の LB 液体培地中で 37 °C で一晩振とう培養した。なお、*A. lwoffii*、*B. subtilis*、*P. putida*、*S. epidermidis* は ISS 内から検出された細菌種と同種の細菌である⁴⁾。

サンプリングプロトコールの検討

L. lactis 1.0×10^7 cells を ISS 内の細胞培養インキュベーターに使用されているプレートと同種のプレート（宇宙航空研究開発機構[Japan Aerospace Exploration Agency: JAXA]より貸与）

上に 5 cm×5 cm の範囲に均等に塗抹し、室温で完全に風乾した後、スワブ(TX761、Texwipe) のヘッド部をろ過滅菌水で湿らせ、

- a) スワブと被検面との接触面を変えずに、縦・横・斜めに全面を拭う。
- b) スワブと被検面との接触面を変えずに、1 cm 間隔で横に 1 回ずつ拭う。
- c) スワブと被検面との接触面を変えずに、1 cm 間隔で横に往復で拭う。
- d) スワブと被検面との接触面を変えずに、1 cm 間隔で横・縦に 1 回ずつ拭う。
- e) スワブと被検面との接触面を変えずに、1 cm 間隔で横・縦に往復で拭う。
- f) スワブと被検面との接触面を一行毎に替えながら、1 cm 間隔で横・縦に往復で拭う。

の 6 種類の方法 (Fig. 1) により塗抹した細菌を回収した。スワブにて回収した細菌をそれぞれ 10 ml のろ過滅菌水中に懸濁し、各方法での細菌回収率を測定した。なお、a) は医薬品製造環境における微生物検査に一般的に用いられている方法である。

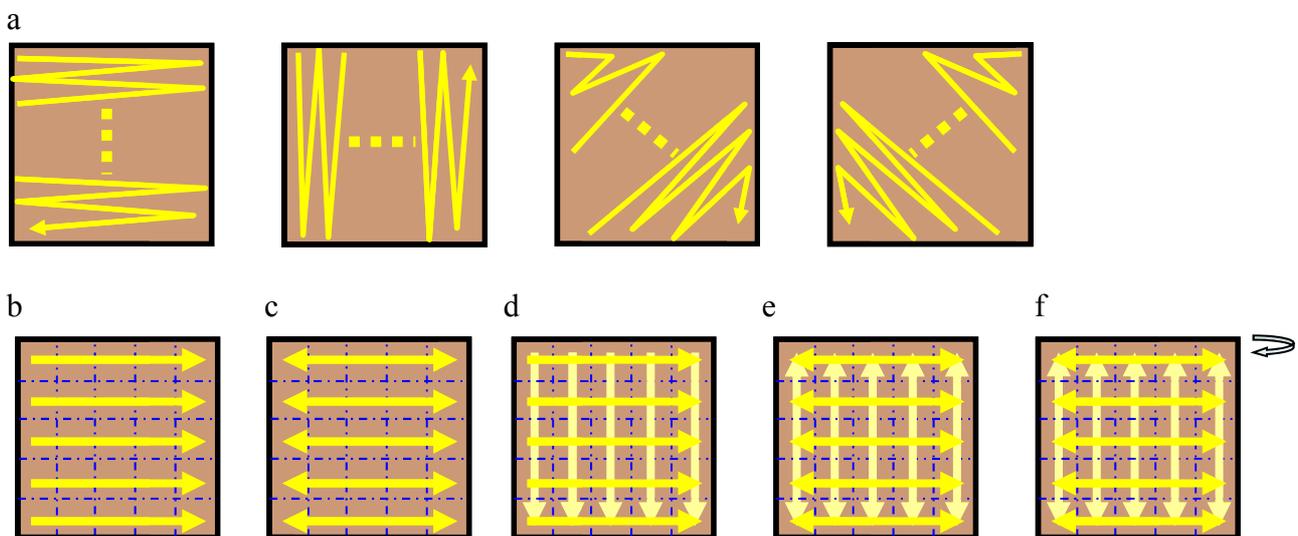


Fig. 1. Six swabbing techniques examined in this study.

細菌回収率の個人差の評価

L. lactis 1.0×10^7 cells を ISS 内の細胞培養インキュベーターに使用されているプレートと同種のプレート上に 5 cm×5 cm の範囲に均等に塗抹し、室温で完全に風乾した後、スワブのヘッド部をろ過滅菌水で湿らせ、スワブと被検面との接触面を変えずに、1 cm 間隔で横・縦

に1回ずつ拭い (Fig. 1[d])、回収した細菌を10 ml のろ過滅菌水に懸濁した。この操作を異なる3名が行い、細菌回収率の個人差の有無を判定した。なお、この3名としてそれぞれ、スワブ法を全く行ったことが無い学生、スワブ法を行った経験のある学生、スワブ法に習熟している研究者を選んだ。

細菌種による回収率の差の評価

A. lwoffii、*B. subtilis*、*S. epidermidis* それぞれ 1.0×10^7 cells を ISS 内の細胞培養インキュベーターに使用されているプレートと同種のプレート上に $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ の範囲に均等に塗抹し、完全に室温で風乾した後、スワブのヘッド部をろ過滅菌水で湿らせ、スワブと被検面との接触面を変えずに、1 cm 間隔で横・縦に1回ずつ拭い (Fig. 1[d])、回収した細菌を10 ml のろ過滅菌水に懸濁し、細菌種ごとの回収率を測定した。

地上の研究施設でのサンプリング

大阪大学薬学部棟内にてスタッフの接触頻度の高い場所 (エレベーターのスイッチ、手すり)、通風口 (エアコンの吹き出し口) およびスタッフの接触頻度が低い場所 (衛生・微生物学分野の試薬棚の上部) について、スワブのヘッド部をろ過滅菌水で湿らせ、スワブと拭き取り面との接触面を変えずに、1 cm 間隔で横・縦に1回ずつ拭い (Fig. 1[d])、回収した細菌を10 ml のろ過滅菌水に懸濁し、細菌数を測定した。なお、エレベーターのスイッチの拭き取り面積は 7.5 cm^2 であり、その他の場所の拭き取り面積は 25 cm^2 であった。

冷凍保存が細菌数および細菌群集構造に及ぼす影響の評価

A. lwoffii、*B. subtilis*、*P. putida*、*S. epidermidis* それぞれ 1.0×10^6 cells および 1.0×10^8 cells を ISS 内で細胞培養インキュベーターに使用されているプレートと同種のプレート上に $5 \text{ cm} \times 5 \text{ cm}$ の範囲に均等に塗抹し、室温で完全に風乾した後、スワブのヘッド部をろ過滅菌水で湿らせ、スワブと拭き取り面との接触面を変えずに、1 cm 間隔で横・縦に1回ずつ拭い (Fig. 1[d])、細菌を回収した。その後スワブを拭き取り後ただちに、もしくは -80 で1、2、

4、8、12 週間保存した後、10 ml のろ過滅菌水に懸濁し、全細菌数、エステラーゼ活性を有する細菌数およびコロニー形成細菌数の測定、ならびに細菌群集構造解析を行った。

全細菌数およびエステラーゼ活性を有する細菌数の測定

全細菌数およびエステラーゼ活性を有する細菌数を同時に測定する際には、室温で解凍したスワブを 10 ml のろ過滅菌水中に攪拌し、適当量を孔径 0.2 μm の黒色ポリカーボネートフィルター (Advantec) 上に捕集し、染色用バッファー (0.1 M phosphate buffer [pH 8.5]、5% [w/v] NaCl、0.5 mM EDTA) 中で終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ の 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma-Aldrich) および終濃度 150 $\mu\text{g/ml}$ の 6-carboxyfluorescein diacetate (6CFDA; Sigma-Aldrich) で 3 分間染色後、3 ml のろ過滅菌水で 2 回洗浄した。フィルターを風乾した後、無蛍光性イマルジョンオイル (Olympus) で封入し、蛍光顕微鏡を用いて青色励起光下でエステラーゼ活性を有する細菌数を、また UV 励起光下で全細菌数を測定した。全細菌数のみを測定する際には、試料を孔径 0.2 μm の黒色ポリカーボネートフィルター上に捕集し、終濃度 1 $\mu\text{g/ml}$ の DAPI で 3 分間染色後、3 ml のろ過滅菌水で 2 回洗浄し、フィルターを風乾した後、無蛍光性イマルジョンオイルで封入し、蛍光顕微鏡を用いて UV 励起光下で計数を行った。

コロニー形成細菌数の測定

室温で解凍したスワブを 10 ml の注射用水中に攪拌し、その 500 μl ずつを 3 枚ずつの SCD 培地上に塗抹し、37 $^{\circ}\text{C}$ で 7 日間培養した後、コロニー形成細菌数を測定した。

DNA 抽出

試料中の細菌を孔径 0.2 μm の白色ポリカーボネートフィルター (Advantec) 上に捕集し、以下の方法で DNA 抽出を行った。細菌を捕集したフィルターを細かく刻んで 2 ml のバイアルに移し、1.8 g の粒径 0.1 mm ガラスビーズ (BioSpec Products) および 350 μl の平衡化中性フェノール (pH 8.0)、60 μl の 10% SDS、750 μl の TE buffer (10 mM Tris-HCl [pH 8.0]、1 mM EDTA [pH 8.0]) を加えた。MINI-BEADBEATER (和研薬) を用いて 4,800 rpm で 90 秒攪拌

することにより細胞を破碎した。5 分間氷上に静置し、遠心分離 (19,000×g、5 分) により水層と有機層に分離させた後、水層を回収し、さらに等量の PCI (平衡化中性フェノール [pH8.0] : クロロホルム : イソアミルアルコール=25: 24: 1) を加え激しく攪拌し、3 分間氷上に静置した。その後遠心分離 (19,000×g、5 分) し、水層とフェノール層に分離した。この操作を再度繰り返して水層を回収した。DNA の回収率を向上するために、有機層に 650 μl の TE buffer を加えて同様の操作を行った。回収した水層に、1/10 量の 3M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) と 2.5 倍量の 100%エタノールを加え、- 80 °C で 1 時間静置した。その後、遠心分離 (19,000×g、30 分) を行い、上清を静かに除いて 200 μl の 70%エタノールを加えた。再び遠心分離 (19,000×g、30 分) し、上清を静かに除いて 10 分間真空乾燥した。乾燥させた抽出 DNA を 50 μl の TE buffer に懸濁した。TE buffer に懸濁した DNA を保存する際には、- 80 °C にて冷凍保存した。

PCR

プライマーセットには、真正細菌の 16S rRNA 遺伝子を標的とした EUB f933、EUB r1387 を用いた⁹⁾。DGGE 解析にあたっては、EUB f933 の 5'末端に GC クランプを付加した⁹⁾。使用したプライマーの塩基配列を Table 1 に示した。

PCR 反応液は全量を 50 μl とし、その組成を 1×PCR buffer II、3.0 mM MgCl₂、0.2 mM dNTPs、0.4 μM プライマー-EUB f933-GC-clamp およびプライマー-EUB r1387、1.25 U Ampli TaqGold (Applied Biosystems)、0.1 mg/ml Bovine serum albumin (タカラバイオ) とした。PCR はアニリング温度を各サイクル毎に 0.5 °C ずつ減少させるタッチダウンで行った。反応条件は 95 °C 9 分間でホットスタートし、94 °C 1 分 (denaturation)、66 °C から 56 °C まで各サイクル毎に 0.5 °C ずつ減少させ 1 分 (primer annealing)、72 °C 3 分 (primer extension) を 20 サイクル行った後、94 °C 1 分 (denaturation)、56 °C 1 分 (primer annealing)、72 °C 3 分 (primer extension) を 10 サイクル、72 °C 7 分 (final extension) とした。

DGGE

得られた PCR 産物を変性剤濃度勾配を 40% ~ 70%としたゲル(6.5% アクリルアミド)を用いて 55 、 100 V で 14 時間泳動した。なお、変性剤濃度 100%は 40%ホルムアミドと 7 M 尿素とした。泳動後のゲルは SYBR Gold (Invitrogen) を用いて 30 分間染色した後、GelDoc XR (BIO-RAD) でスキャンし、デジタルイメージを得た。

Table 1. Positions and sequences of primers used in this study

| Primer | Target gene and position * | Sequence (5'-3') | Reference |
|-----------|----------------------------|--|-----------|
| EUB f933 | 16S rRNA, 933-955 | GCA CAA GCG GTG GAG CAT GTG G | (9) |
| EUB r1387 | 16S rRNA, 1387-1368 | GCC CGG GAA CGT ATT CAC CG | (9) |
| GC-clamp | | CGC CCG CCG CGC GCG GCG GGC GGG GCG GGG GCA CGG GGG G | (9) |

* *Escherichia coli* numbering system

統計解析

統計解析には、大阪大学遺伝情報実験センターが提供している MEPHAS プログラム (<http://www.gen-info.osaka-u.ac.jp/testdocs/tomocom/>) を用いた。細菌回収率の有意差の有無は Student の t 検定を用いて判定した。

結果と考察

サンプリングプロトコルの決定

本研究で用いるスワブを選定するにあたって、綿製スワブとポリエステル製スワブを比較したところ、どちらのスワブにおいても使用前から付着している粒子数は定量限界以下であった。しかし綿製スワブは、ろ過滅菌水に懸濁した際に繊維が分散し、蛍光顕微鏡下での細菌の計数が困難であった。一方、ポリエステル製スワブは、ろ過滅菌水に懸濁した際に繊維がほとんど分散しなかった。そこで本研究では、Texwipe 社のポリエステル製スワブを用い

て実験を行った。

プロトコールに用いる拭き取り方法においては、十分な細菌回収率があることと、操作性が高いことが重要である。そこでまず、操作性が高く細菌回収率が十分であるサンプリングプロトコールを決定するために、6種類の方法を検討した。各方法ごとの細菌回収率を Table 2 に示した。b) c) では細菌回収率がおよそ 50~60%であったのに対し、a) d) e) f) では細菌回収率がおよそ 70%であった。a) d) e) f) の細菌回収率の間には有意差は無いことから ($P > 0.05$) 操作が最も簡便である d) を採用した。

Table 2. Bacterial recovery rates by six swabbing techniques

| Swabbing | Number of recovered cells (cells) | Bacterial recovery rate (%) |
|----------|-----------------------------------|-----------------------------|
| a | $(7.1 \pm 1.3) \times 10^6$ | 71 \pm 13 |
| b | $(5.9 \pm 1.0) \times 10^6$ | 59 \pm 10 |
| c | $(5.0 \pm 1.0) \times 10^6$ | 50 \pm 9.9 |
| d | $(6.9 \pm 1.1) \times 10^6$ | 69 \pm 11 |
| e | $(7.2 \pm 1.5) \times 10^6$ | 72 \pm 15 |
| f | $(7.1 \pm 1.4) \times 10^6$ | 71 \pm 14 |

n=10, * Mean \pm S.D

次に、ISS 内ではサンプリングを担当する宇宙飛行士が必ずしも同一ではないことから、プロトコールに用いる拭き取り方法は個人差の少ないものである必要がある。そこで、d) を用いて異なるオペレーターごとに操作を行い、細菌回収率の個人差の有無を明らかにした (Table 3)。その結果、個人ごとの細菌回収率の間には有意差は無かった ($P > 0.01$)。

Table 3. Bacterial recovery rate by different operators

| Operator | Number of recovered cells (cells) | Bacterial recovery rate (%) |
|----------|-----------------------------------|-----------------------------|
| A | (5.4±1.2)*×10 ⁶ | 54±12 |
| B | (6.4±1.6)×10 ⁶ | 64±16 |
| C | (6.7±0.9)×10 ⁶ | 67±9.1 |

n=11, * Mean±SD

さらに、サンプリングにあたっては全細菌を偏り無く回収できることが重要であるため、*L. lactis* に加え、ISS 内より検出された細菌種と同種である *A. lwoffii* (グラム陰性桿菌)、*B. subtilis* (グラム陽性桿菌)、*S. epidermidis* (グラム陽性球菌) をそれぞれ金属板上に塗抹し選定したサンプリング方法 (Fig. 1[d]) により回収し、細菌種ごとの細菌回収率の差の有無を明らかにした (Table 4)。4 種の細菌間で回収率に有意差は無かったため ($P > 0.05$)、d) を ISS 内における微生物サンプリング法として決定した。

Table 4. Recovery rates of four bacterial strains

| Bacterial strain | Number of recovered cells (cells) | Bacterial recovery rate (%) |
|------------------------------------|---|-----------------------------|
| <i>L. lactis</i> ^a | (6.9±1.1) ^c ×10 ⁶ | 69±11 |
| <i>A. lwoffii</i> ^b | (7.3±2.0)×10 ⁶ | 73±20 |
| <i>B. subtilis</i> ^b | (7.0±1.3)×10 ⁶ | 70±13 |
| <i>S. epidermidis</i> ^b | (6.1±1.0)×10 ⁶ | 61±10 |

^a n=10, ^b n=11, ^c Mean±SD

冷凍保存が細菌数に与える影響の評価

冷凍保存が細菌数に与える影響を評価するにあたり、検討を行う際に妥当な細菌数を決定するため、まず大阪大学薬学部棟内の内装表面の細菌数測定を行った。各サンプリング地点

における全細菌数とエステラーゼ活性を有する細菌数を Table 5 に示した。この結果から、スタッフがよく手を触れる場所やエアコンの噴き出し口には全細菌数として $10^4 \sim 10^5$ cells/cm² の細菌が存在することがわかった。すなわち、25 cm² あたりには $10^5 \sim 10^6$ cells の細菌が存在することから、保存期間が細菌数測定に与える影響を評価するために、塗抹する細菌量を 4.0×10^6 cells/25 cm² とした。同時に、細菌量の差による変化の違いを明らかにするため、塗抹する細菌量を 4.0×10^8 cells/25 cm² とした実験も行った。なお、これまでに ISS 内から検出されているグラム陰性桿菌の *A. lwoffii* と *P. putida*、グラム陽性球菌の *S. epidemidis*、グラム陽性桿菌である芽胞形成細菌 *B. subtilis* を等量ずつ用い、試料とした。

Table 5. Bacterial numbers on interior surfaces in research facility

| Sampling point | Total bacterial cells (cells/cm ²) | Esterase-active cells (cells/cm ²) |
|-------------------------------------|--|--|
| Upper part of locker | $< 1.7 \times 10^4$ | $< 1.7 \times 10^4$ |
| Handrail | $(8.4 \pm 6.9) \times 10^4$ | $< 1.7 \times 10^4$ |
| Elevator button | $(1.4 \pm 0.7) \times 10^5$ | $< 5.6 \times 10^4$ |
| Air-conditioner facility (diffuser) | $(4.7 \pm 0.2) \times 10^4$ | $< 1.7 \times 10^4$ |

n=3, *Mean±SD

保存期間と細菌数測定結果を Fig. 2 ならびに Fig. 3 に示した。 4.0×10^6 cells/25cm² の細菌をサンプリング後-80 で保存した場合、全細菌数はほとんど変化しなかった。一方、コロニー形成細菌数は保存を経ない時点から定量限界以下であった。また、 4.0×10^8 cells/25cm² を塗抹しサンプリング後-80 で保存した場合、全細菌数に変化は見られなかった。一方、エステラーゼ活性を有する細菌数およびコロニー形成細菌数には減少傾向が見られた ($P < 0.05$)。

以上の結果より、サンプリング後、冷凍保存を経ることで、活性を有する細菌数は減少するものの、全細菌数は変化しないことがわかった。

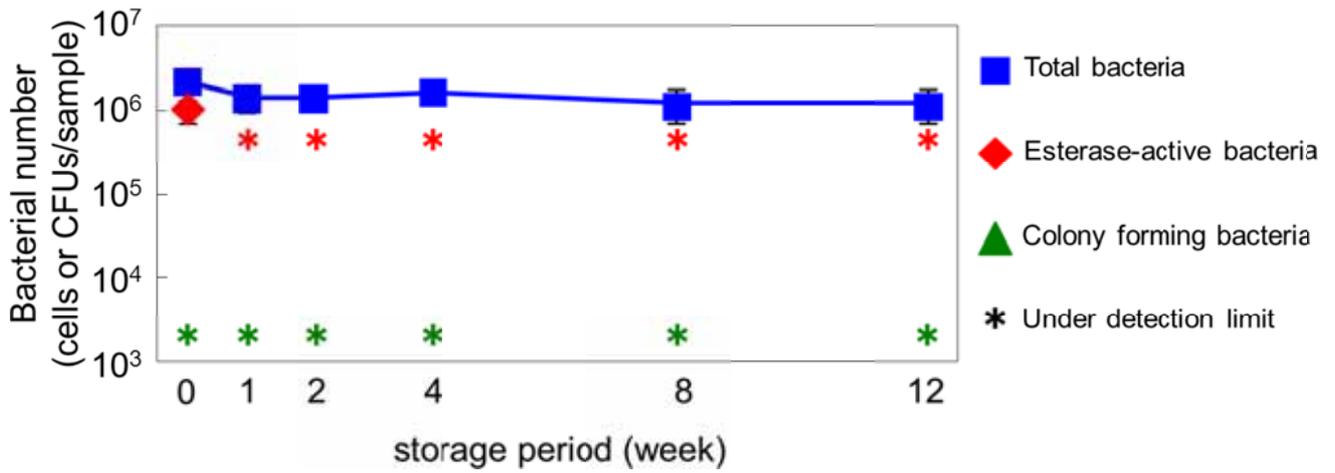


Fig. 2. Bacterial number after storage (initial bacterial number: 4.0×10^6 cells/25 cm²; n=8).

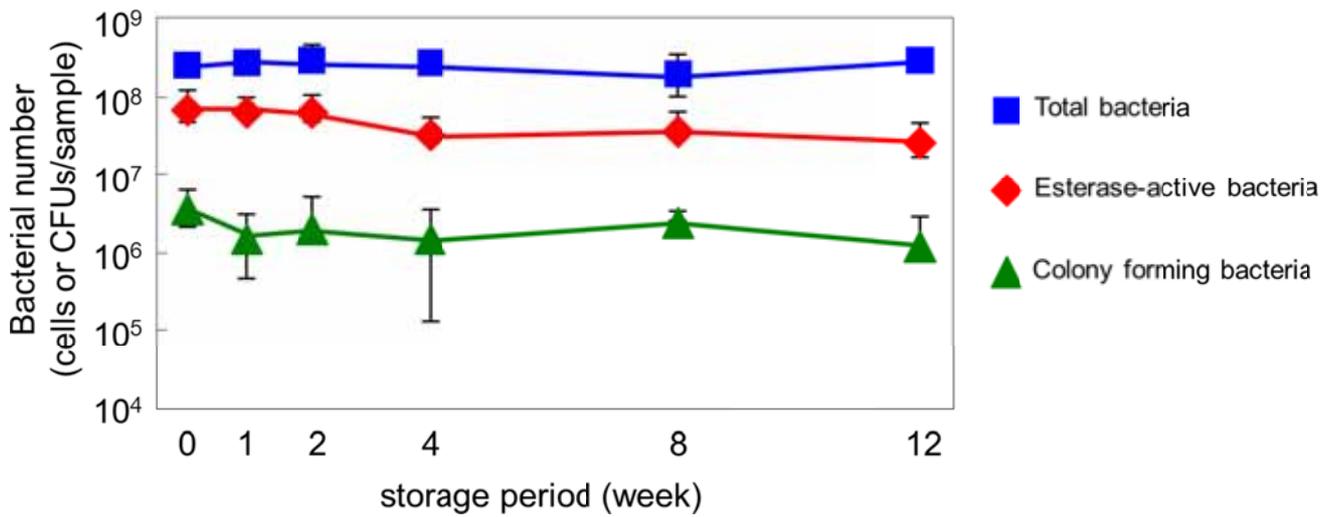
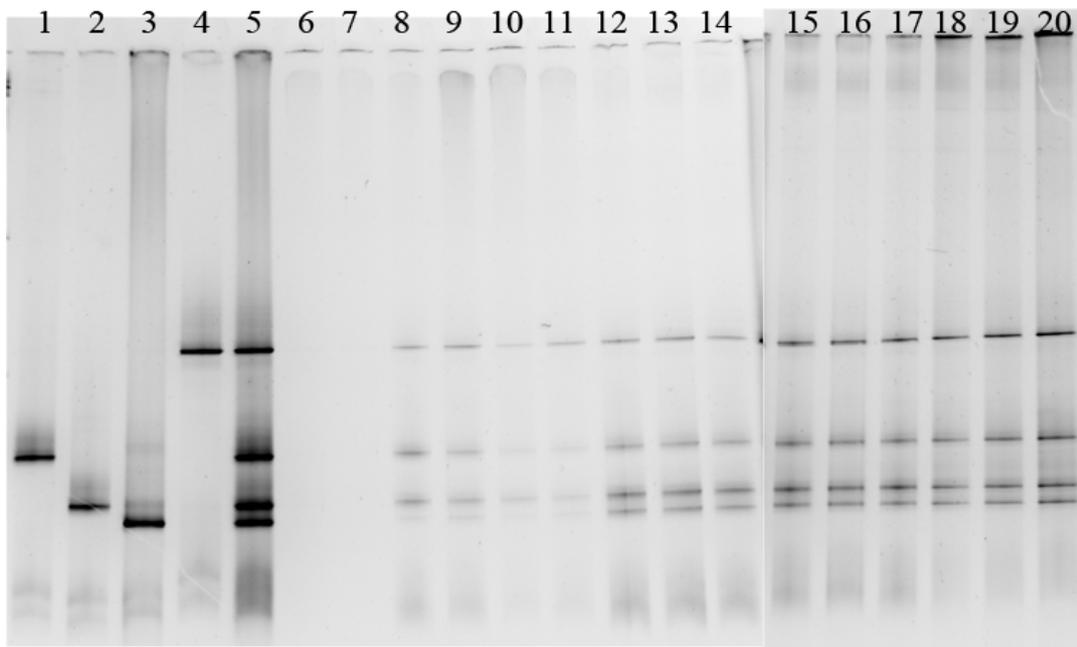


Fig. 3. Bacterial number after storage (initial bacterial number: 4.0×10^8 cells/25 cm²; n=7).

冷凍保存が細菌群集構造に与える影響の評価

各塗抹細菌数の試料を PCR-DGGE により解析した画像を Fig. 4 に示す。 $10^7 \sim 10^8$ cells/25cm² の細菌を塗抹したときに DGGE の明瞭なバンドが得られたので、保存の細菌群集構造解析への影響を評価するために、細菌の塗抹量を各細菌種につき 1.0×10^8 cells/25cm² とした。

保存期間と PCR-DGGE 法による分析結果を Fig. 5 に示した。各保存期間を経たサンプルにおいてバンドの位置・数・輝度に顕著な変化は見られなかったことから、12 週間までの保存により細菌群集構造は変化しないと考えられた。



Lane 1: *A. lwoffii* ATCC 15309

Lane 2: *B. subtilis* 168

Lane 3: *P. putida* ATCC 12633

Lane 4: *S. epidermidis* IFO 3762

Lane 5: Mixture of template DNA of four bacterial strains

Lane 6 ~ 8: Sample (spread 1.0×10^4 cells/25 cm²)

Lane 9 ~ 11: Sample (spread 1.0×10^5 cells/25 cm²)

Lane 12 ~ 14: Sample (spread 1.0×10^6 cells/25 cm²)

Lane 15 ~ 17: Sample (spread 1.0×10^7 cells/25 cm²)

Lane 18 ~ 20: Sample (spread 1.0×10^8 cells/25 cm²)

Fig. 4. DGGE profiles of 16S rRNA gene fragment of each bacterial strains and mixture.

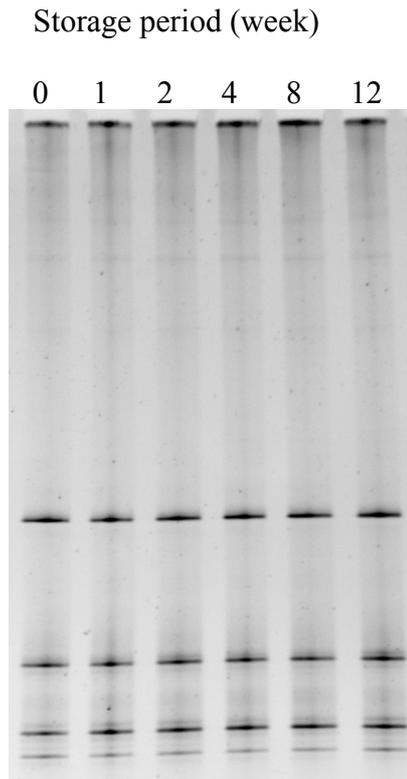


Fig. 5. DGGE profiles of 16S rRNA gene fragment obtained from samples following swabbing bacterial cells (4.0×10^8 cells/25 cm²).

小括

1. 宇宙居住環境における微生物モニタリングのために、簡便かつ十分な回収率があり、個人差の無いサンプリングプロトコールを決定した。
2. サンプリング後のスワブの - 80 での保存は、12 週間まで細菌現存量および細菌群集構成に影響を及ぼさないことがわかった。

第二章 国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」内の細菌モニタリング

宇宙居住の実現にあたっては、衛生微生物学的な安全を確保する必要があるため、微生物管理が重要となる。そのため、各国宇宙機関では宇宙居住環境内の微生物に関する基礎的知見の収集を図っている。本研究では、有人宇宙施設の運用に伴う細菌現存量、および細菌群集構造の変化に関する知見を得ることを目的とした。そのために、第一章にて決定したサンプリングプロトコールに基づき、JAXA と共同して、2008 年 6 月に運用が開始された ISS 日本実験棟「きぼう」内の細菌モニタリングを 2009 年から 2012 年の 3 年間にわたって行った（プログラム名"Microbe": <http://iss.jaxa.jp/kiboexp/theme/second/microbe/>）。

実験材料と方法

ISS「きぼう」内のサンプリング

「きぼう」内のスワブによる細菌サンプリングは、2009 年 9 月 5 日（Microbe-I）、2011 年 2 月 27 日（Microbe-II）、2012 年 10 月 16 日（Microbe-III）の計 3 回行った（Table 6）。また、当研究室で開発した粘着集菌シート¹⁰⁾を用いた細菌サンプリングを 2010 年 10 月 29 日に行った（Microbe-II）。なお、日付はすべて世界標準時にて表記した。

Table 6. Schedules and astronauts of “Microbe”

| | Microbe-I | Microbe-II | Microbe-III | |
|------------------------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|
| Launch (Transfer vehicle) | 29 Aug. 2009 (Discovery) | 15 May 2010 (Atlantis) | 22 Jan. 2011 (HTV2) | 21 Jul. 2012 (HTV3) |
| Sampling date | 5 Sep. 2009 | 29 Oct. 2010 | 27 Feb. 2011 | 16 Oct. 2012 |
| Sampling devise | swab | adhesive sheet | swab | swab |
| Astronaut | Frank de Winne | Shanonn Walker | Scott Kelly | Akihiko Hoshide |
| Return (Transfer vehicle) | 13 Sep. 2009 (Discovery) | 14 May 2011 (Endeavour) | 9 Mar. 2011 (Discovery) | 28 Oct. 2012 (Dragon) |

サンプリング地点は、Microbe-I では居住員の接触頻度が低いと考えられる細胞培養インキュベーターの表面 (Fig. 6[B])、居住員の接触頻度が高いと考えられる手すり (Fig. 6[C])、「きぼう」内の空気を循環させる空調機の吹き出し口(Fig. 6[D])の 3 点とした。Microbe-II、Microbe-III のサンプリングでは、初回の 3 地点に加え、温度・湿度が細菌の生残・増殖に適している細胞培養インキュベーター内部 (Fig. 6[E]) と、空気中のダストが濃縮されると考えられる空調機吸気口 (Fig. 6[F]) の 2 地点を選定した。スワブでのサンプリング面積は、手すりのみ 21 cm²、その他の 4 地点は 25 cm² とした。また、粘着集菌シートによるサンプリング面積は全ての地点において 6.25 cm² とした。

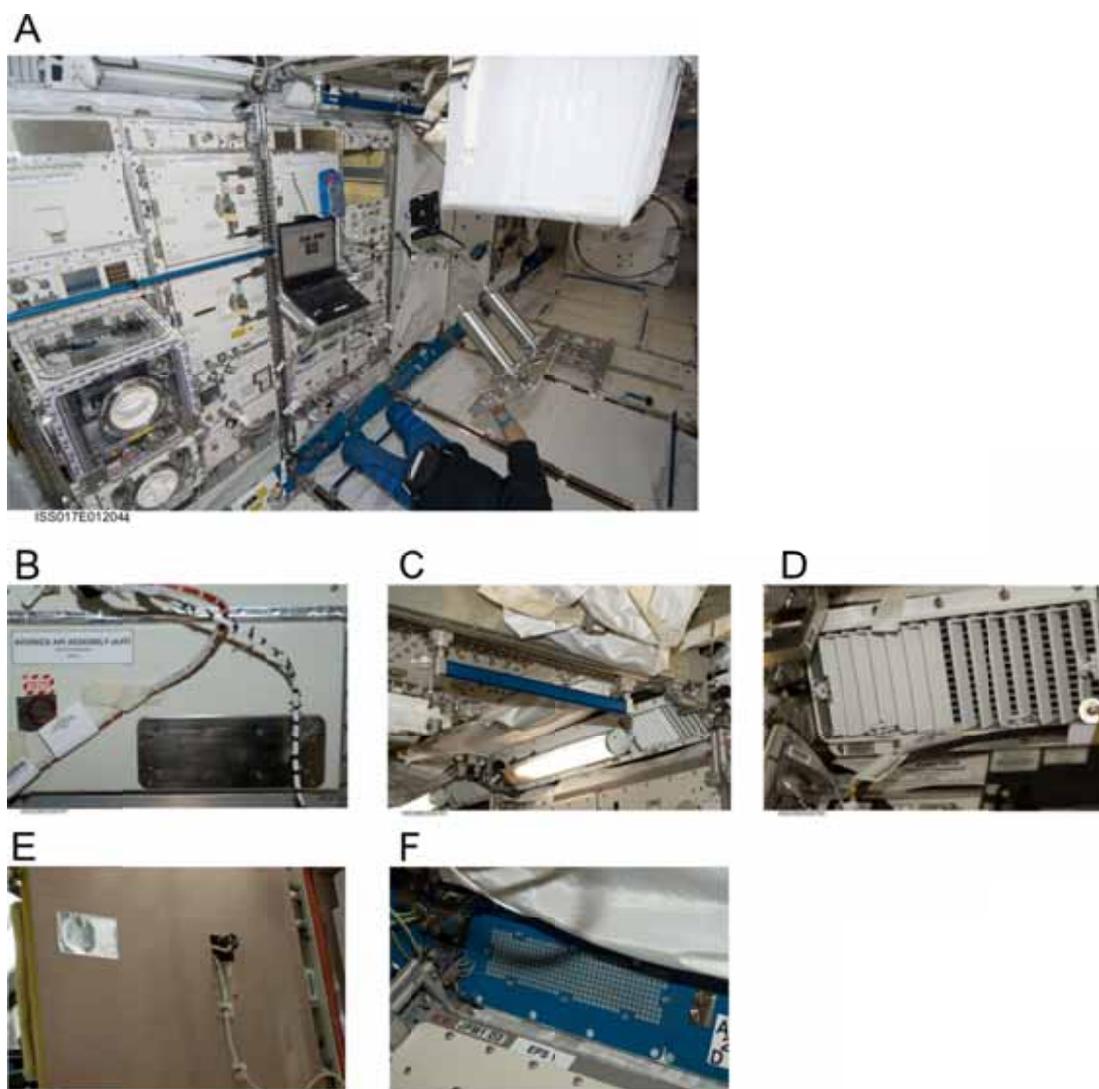


Fig. 6. Scene and sampling points in the Kibo; (A)scene in the Kibo; (B)surface of Cell Biology Experiment Facility(CBEF); (C)handrail; (D)diffuser; (E)inside of CBEF; (F)air intake. (Courtesy of JAXA; <http://jda.jaxa.jp/index.php>)

試料の保存

「きぼう」内部表面のサンプリングを行ったスワブは、スワブへの汚染を防ぐためチューブに密閉し、さらにジップロックのバッグに入れた状態で「きぼう」内の冷凍庫 MELFI (Minus Eighty degree Celsius Laboratory Freezer for ISS) にて - 80 で保存した。また、粘着集菌シートについては粘着面への汚染を防ぐために保護シートでカバーした後、ジップロックのバッグに入れて MELFI にて - 80 で保存した。試料は - 80 に保たれた状態で大阪大学大学院薬学研究科 衛生・微生物学分野まで運搬された。

直接計数法による全細菌数測定

スワブ試料については、室温で解凍したスワブを 10 ml の注射用水 (大塚製薬) 中で攪拌し、その 1 ml もしくは 5 ml をろ過面積 13 mm² のガラスファンネル (Advantec、KGS-04) を用いて孔径 0.2 μm の黒色ポリカーボネートフィルター上に捕集した。1 × SYBR Green (Invitrogen) で 15 分間染色後、3 ml の注射用水で 2 回洗浄しフィルターを風乾した後、無蛍光性イマルジョンオイルで封入した。粘着集菌シートについては、粘着面の中央部 5 mm × 5 mm を切り取り、直接計数に使用した。粘着集菌シート上に捕集した細菌は 1 × SYBR Green II で染色した。各試料を染色後、蛍光顕微鏡下で全細菌数を測定した。

DNA 抽出

スワブ試料については蛍光顕微鏡下での全細菌数測定後、試料を捕集したフィルターより、以下の方法で DNA 抽出を行った。フィルターを 15 ml のコーニングに移し、lysis solution (15 mg/ml リゾチーム、150 mM NaCl、100 mM EDTA) 1 ml を添加し 37 にて 30 分間保温した後、extraction buffer (100 mM NaCl、500 mM Tris-HCl [pH 8.0]、10% SDS) を加え攪拌し、液体窒素にて凍結し氷上で 3 分間保冷後、65 にて融解した。この凍結融解を 3 回繰り返した後、3 ml の PCI を加え激しく攪拌し、65 で 5 分間保温した後、氷上で冷却した。その後、遠心分離 (1,500×g、20 分) し、水層 (約 1.2 ml) を回収して 75 ml の 10% SDS と 2 ml の PCI を加え激しく攪拌し、さらに遠心分離 (1,500×g、20 分) した。水層 (約 1 ml) を回

収し、等量の CIAA を添加し激しく攪拌した後に遠心分離 (1,500×g、20 分) し、水層 (約 1 ml) を回収した。回収した水層に、等量のイソプロパノールと 1/10 量の 3M 酢酸ナトリウムを添加し、-20 で 1 時間静置したのち、4 に冷却しながら遠心分離 (19,000×g、20 分) し、その後上清を除き、1 ml の 70%エタノールを加え、4 に冷却しながら遠心分離 (19,000×g、10 分) した。その後上清を除き、15 分間真空乾燥した後、50 µl の TE buffer を加えよく懸濁した。TE buffer に懸濁した抽出 DNA を保存する際には、-80 にて冷凍保存した。

また、粘着集菌シートからの DNA 抽出は、FastDNA Spin Kit for Soil (MP Biomedicals) を用いて行った。

定量的 PCR 法による細菌現存量測定

LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostic) を用いて 16S rRNA 遺伝子の定量を行った¹¹⁾。PCR 溶液は全量 10 µl とし、組成は LightCycler DNA Master SYBR Green I、4 mM MgCl₂、0.5 µM プライマー EUB f933 および EUB r1387、4.5 ng/µl 8-methoxypsoralen とした。LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I および試料 DNA は、PCR 溶液に 5 分間 UV を照射した後に加えた。PCR は 95 15 秒 (denaturation)、60 10 秒 (annealing)、72 30 秒 (extension)、86 5 秒 (signal detection) で 45 サイクル行った。DNA の抽出効率を測定するために、DNA 抽出時に内部標準として luciferase (*luc*) 遺伝子の PCR 産物を添加した。PCR 産物を添加して DNA 抽出した後、試料 DNA 中に含まれる *luc* 遺伝子のコピー数を LightCycler を用いて定量した。定量には LightCycler Fast Start DNA Mater Hybridization Probe (Roche Diagnostic) を用い、PCR 溶液は全量 10 µl とした。PCR 溶液は組成は LightCycler Fast Start DNA Master Hybridization Probe、4 mM MgCl₂、0.5 µM プライマー pgl1908F および luc175r、0.2 µM 3'-FITC 標識 n-LucHP1 プローブおよび 5'-LCRed640 標識 n-LucHP2 プローブとした (Table 7)。定量的 PCR は 95 で 10 分間ホットスタートした後、95 15 秒、60 10 秒、72 15 秒で 40 サイクル行った。DNA 抽出効率は、DNA 抽出前後の *luc* 遺伝子のコピー数より算出した。また、細菌数は 16S rRNA 遺伝子を 4 copies/cell と換算して算出した。

定量的 PCR のデータの解析はライトサイクラーソフトウェア version 3.5 および version 4.1 (Roche Diagnostic) を用いた。

Table 7. Primers and probes used in this study

| Primer | Target gene and position ^c | Sequence (5'-3') | Reference |
|-----------------------|---|--|-----------|
| pgl1908f | <i>luc</i> gene, 1908-1927 ^d | AGG AAG CTT TCC ATG GAA GA | (12) |
| luc175r | <i>luc</i> gene, 2063-2082 ^d | CAG CGT AAG TGA TGT CCA CC | (12) |
| n-LucHP1 ^a | <i>luc</i> gene, 2008-2029 ^d | TGA AGA GAT ACG CCC TGG TTC C | (12) |
| n-LucHP2 ^b | <i>luc</i> gene, 2030-2058 ^d | GGA ACA ATT GCT TTT ACA GAT GCA CAT A | (12) |
| EUB 8f | 16S rRNA gene, 8-27 | AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG | (13) |
| EUB 518r | 16S rRNA gene, 534-518 | ATT ACC GCG GCT GCT GG | (14) |
| EUB 517f | 16S rRNA gene, 517-532 | GCC AGC AGC CGC GGT AA | (14) |
| EUB 926r | 16S rRNA gene, 926-907 | CCG TCA ATT CCT TTR AGT TT | (15) |
| EUB 1492r | 16S rRNA gene, 1510 -1492 | TAC CTT GTT ACG ACT T | (13) |
| M13-F | | GTT TTC CCA GTC ACG AG | |
| M13-R | | CAG GAA ACA GCT ATG AC | |

^a 3' FITC labeled; ^b 5' LightCycler Red640 labeled; ^c *Escherichia coli* numbering system;

^d Numbering bases of pGeneGRIP-Luc.

nested PCR-DGGE

試料より抽出した DNA に対して、16S rRNA 遺伝子を標的とした nested PCR を行った。一段階目の PCR では反応液は 50 µl とし、その組成を 1 × PCR buffer II、0.2 mM dNTPs、2.5 mM MgCl₂、0.4 mM プライマー-EUB 8f およびプライマー-EUB 1492r、25 µg/ml 8-methoxypsoralen、1.25 U Ampli Taq Gold とした。反応条件は 95 °C にて 10 分間の後、95 °C 1 分 (denaturation)、54 °C 1 分 (annealing)、72 °C 2 分 (extension) で 30 サイクル、72 °C 10 分 (final extension) とした。この PCR 産物を Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) を用いて精製し、二段階目の PCR に用いた。二段階目の PCR では反応液を 100 µl とし、そ

の組成を 1×PCR buffer II、0.2 mM dNTPs、3 mM MgCl₂、0.4 mM プライマー-EUB f933-GC clamp およびプライマー-EUB r1387、25 µg/ml 8-methoxypsoralen、2.5 U Ampli Taq Gold とした。反応条件は 95 9 分間でホットスタートし、94 1 分 (denaturation)、65 から 55.5 まで各サイクル毎に 0.5 ずつ減少させ 1 分 (primer annealing)、72 3 分 (primer extension) を 20 サイクル行った後、94 1 分 (denaturation)、55 1 分 (primer annealing)、72 3 分 (primer extension) を 10 サイクル、72 7 分 (final extension) とした。DGGE は第一章と同様の方法で行った。泳動後の DGGE ゲルよりバンドを切り出し、100 µl のろ過滅菌水中に 4 で一晩静置することで DNA を抽出し、塩基配列解析に用いた。

コロニー形成細菌数測定およびコロニー形成細菌の分離

室温で解凍したスワブを 10 ml の注射用水中で攪拌し、その 500 µl ずつを 3 枚ずつの普通寒天培地上および R2A 培地上に塗抹し、それぞれ 37 と 25 で 7 日間培養した後、コロニー形成細菌数を測定した。なお、7 日目以降も培養を続け、形成されたコロニーはその後純培養し、プライマー-EUB 8f と EUB 1492r を用いてコロニー-PCR を行った。PCR 反応液は全量を 100 µl とし、その組成を 1×PCR buffer II、MgCl₂ 1.5 mM、dNTPs 0.25 mM、プライマー各 0.5 µM、2.5 U Ampli Taq Gold とした。反応条件は 95 9 分間でホットスタートし、80 1 分 (denaturation)、40 1 分 (primer annealing)、72 3 分 (primer extension) ののちに、95 1 分 (denaturation)、40 1 分 (primer annealing)、72 3 分 (primer extension) を 34 サイクル行った後、72 7 分 (final extension) とした。PCR 産物は MinElute PCR Purification kit (QIAGEN) を用いて精製した。

塩基配列解析

塩基配列を解析する PCR 産物を pGEM-T Easy Vector System (Promega) を用いて大腸菌 JM109 に導入し、50 µg/ml のアンピシリンを加えた LB 培地に isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside (100 mM, 100 µl) および N,N'-dimethyl formamide に溶解した 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside (50 mg/ml, 20 µl) とともに塗抹し、37

で一晩培養した。その後、白色コロニーを選択し、M13-F および M13-R のプライマーセットを用いて PCR を行い、インサートの確認を行った。使用したプライマーの塩基配列を Table 7 に示した。PCR 反応液は全量を 150 μ l とし、その組成を 1 \times PCR buffer II、MgCl₂ 3.0 mM、dNTP 0.2 mM、プライマー各 0.4 μ M、Ampli Taq Gold 1.25 U、Bovine serum albumin 0.2 mg/ml とした。反応条件は 95 $^{\circ}$ C 9 分間でホットスタートし、94 $^{\circ}$ C 1 分 (denaturation)、55 $^{\circ}$ C 1 分 (primer annealing)、72 $^{\circ}$ C 1 分 (primer extension) を 25 サイクル行った後、72 $^{\circ}$ C 7 分 (final extension) で行った。インサートの挿入を確認したクローンは、MinElute PCR Purification kit を用いて PCR 産物を精製した。その後、CEQ DTCS Quick Start Kit (BECKMAN COULTER) を用いて塩基配列決定のためのサンプルを調製した。塩基配列決定にあたり、プライマーは、16S rRNA 遺伝子の全長を解析するためには EUB 8f、EUB 517f、EUB f933、EUB 518r、EUB 926r、EUB 1492r を、V6-V8 領域の塩基配列決定のためには EUB f933、EUB r1387 を用いた。CEQ8000 (BECKMAN COULTER) により電気泳動を行い波形データを取得後、Codoncode Aligner (Codoncode Corporation) を用いてベースコール、アッセンブルし、16S rRNA 遺伝子の配列を得た。この配列に関して BLAST (<http://blast.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>) を用いて、遺伝子データベースの中から相同性の高い細菌種を検索した。

結果と考察

「きぼう」内の細菌現存量

本研究において、「きぼう」の打ち上げ前に細胞培養インキュベーター表面よりサンプリングを行い、その細菌現存量を直接計数法により測定した。「きぼう」は可能な限り微生物汚染を防ぐ環境で組み立てられており、細胞培養インキュベーター表面の細菌現存量は定量限界以下であった。このことから、運用開始前の「きぼう」内部の細菌現存量は定量限界以下であったと推定できる。なお、「きぼう」は打ち上げ前に 70%エタノールを用いて清拭された後に ISS にドッキングした。

「きぼう」運用開始後の「きぼう」内部よりスワブもしくは粘着集菌シートを用いてサンブ

リングを行い、直接計数法、定量的 PCR 法および平板培養法により測定した細菌現存量を Table 8 に示した。なお、粘着集菌シートでの細菌回収率は $(78 \pm 12)\%$ であり、スワブと同等の回収率である。スワブ試料の定量的 PCR 法による測定にあたっては、サンプル量が限られるため、直接計数法にて蛍光染色した細菌より抽出した DNA を用いた。1 週間の培養で、どのサンプルでもコロニー形成細菌 (colony forming unit: CFU) は検出されなかった。非培養法では、Microbe-I においては、細胞培養インキュベーター表面の細菌現存量は直接計数法と定量的 PCR 法との両測定において 10^3 cells/cm² だったものの、手すりでは両方法において定量限界と同等、空調機吹き出し口では定量的 PCR 法では 10^3 cells/cm² であり、直接計数法では定量限界と同等だった。Microbe-II においては、直接計数法では細菌現存量は全て定量限界と同等、もしくは定量限界以下だった。定量的 PCR においても同様であり、唯一粘着集菌シートによりサンプリングを行った空調機吸気口において細菌現存量が 10^6 cells/cm² であった。Microbe-III においては、全てのサンプリング地点においては細菌現存量は定量限界と同等、もしくは定量限界以下だった。これらのことから、空調機吸気口のようにダストが溜まりやすい地点においては細菌現存量が高くなる可能性はあるものの、「きぼう」内部の細菌現存量は概ね 10^4 cells/cm² 以下で推移していたと考えられる。地上の研究施設の内装表面の細菌現存量は 10^5 cells/cm² であることから、現段階では「きぼう」内部の細菌現存量は適切に管理されていると考えられた。

これまでに、ISS 内の微生物現存量については培養法 4) や、エンドトキシンなどの細胞壁成分を指標とした方法 16, 17) での測定による報告があり、トイレや運動設備、寝室など、ヒトの活動と密接に関わる設備を有するモジュールにおいて測定値が高いという傾向が見られている。一方、実験モジュールでは多くの場合、検出限界以下と報告されている。「きぼう」は実験モジュールであるため、コロニー形成細菌数が全て 0 だったという本研究の結果は、これまでに他のモジュールで得られた結果と合致していた。

Table 8. Bacterial abundance on the interior surfaces in the Kibo, determined with fluorescent staining and quantitative PCR

| Sampling point | Bacterial number (cells or CFUs/cm ²) | | | | | | | | | | | | | |
|----------------------|---|---------------------------|-----|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----|----------|-----------------------------|-----------------------------|-----|---|
| | Microbe-I | | | | Microbe-II | | | | | | Microbe-III | | | |
| | swab | | | | sheet | | swab | | | | swab | | | |
| | FM ^a | qPCR ^b | CFU | | FM | qPCR | FM | qPCR | CFU | | FM | qPCR | CFU | |
| Nutrient | | | R2A | Nutrient | | | | | R2A | Nutrient | | | R2A | |
| Surface of incubator | + (2×10 ³) | + (4×10 ³) | 0 | 0 | - (< 2×10 ⁴) | - (< 1×10 ⁴) | ± (2×10 ²) | - (< 1×10 ²) | 0 | 0 | - (< 2×10 ²) | - (< 1×10 ²) | 0 | 0 |
| Inside of incubator | NT ^c | NT | 0 | 0 | NT | NT | - (< 2×10 ²) | ± (1×10 ²) | 0 | 0 | - (< 2×10 ²) | - (< 1×10 ²) | 0 | 0 |
| Handrail | ± (7×10 ²) | ± (5×10 ²) | 0 | 0 | - (< 2×10 ⁴) | - (< 1×10 ⁴) | - (< 2×10 ²) | ± (1×10 ²) | 0 | 0 | ± (2×10 ²) | - (< 1×10 ²) | 0 | 0 |
| Diffuser | ± (9×10 ²) | + (2×10 ³) | 0 | 0 | NT | NT | ± (1×10 ²) | ± (3×10 ²) | 0 | 0 | ± (2×10 ²) | - (< 1×10 ²) | 0 | 0 |
| Air intake | NT | NT | 0 | 0 | Not countable | + (2×10 ⁶) | - (< 2×10 ²) | ± (1×10 ²) | 0 | 0 | ± (3×10 ²) | - (< 1×10 ²) | 0 | 0 |

-, below quantification limit (2 × 10² cells/cm² [fluorescent microscopy, swab], 1 × 10² cells/cm² [quantitative PCR, swab.], 2 × 10⁴ cells/cm² [fluorescent microscopy, sheet], and 1 × 10⁴ cells/cm² [quantitative PCR, sheet]);

±, same order of magnitude as quantification limit; +, positive

^a fluorescent microscopy

^b quantitative PCR; bacterial number was calculated as 4 copies of 16S rRNA gene/cell.

^c Not tested

「きぼう」内部表面の細菌群集構造解析

「きぼう」内部表面より得た試料中に存在する細菌の DNA を抽出後、nested PCR により 16S rRNA 遺伝子の V6-V8 領域を増幅し、DGGE を用いてその塩基配列ごとに分離した後、塩基配列解析の結果をもとに系統樹を作成した (Fig. 7)。Microbe-I の試料では細菌の DNA 量が少なく nested PCR での増幅が起こらなかったため、Microbe-II、Microbe-III の試料に関して系統解析を行った。その結果、「きぼう」内には *Actinobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門、*Proteobacteria* 門に属する細菌が分布していることが明らかとなった。特に、*Actinobacteria* 門、*Firmicutes* 門、*Proteobacteria* 門に属する細菌は Microbe-II、Microbe-III とともに検出されたことから、これらの細菌門は「きぼう」内に定着していると考えられる。さらに、塩基配列解析により得られた塩基配列に関して BLAST を用いて相同性検索を行い、相同性の最も高かった細菌種を Table 9 に示した。これらの細菌はヒトの常在細菌として報告されている細菌目に属していることから¹⁸⁾、「きぼう」内部に分布している細菌の多くは居住員由来だと考えられる。

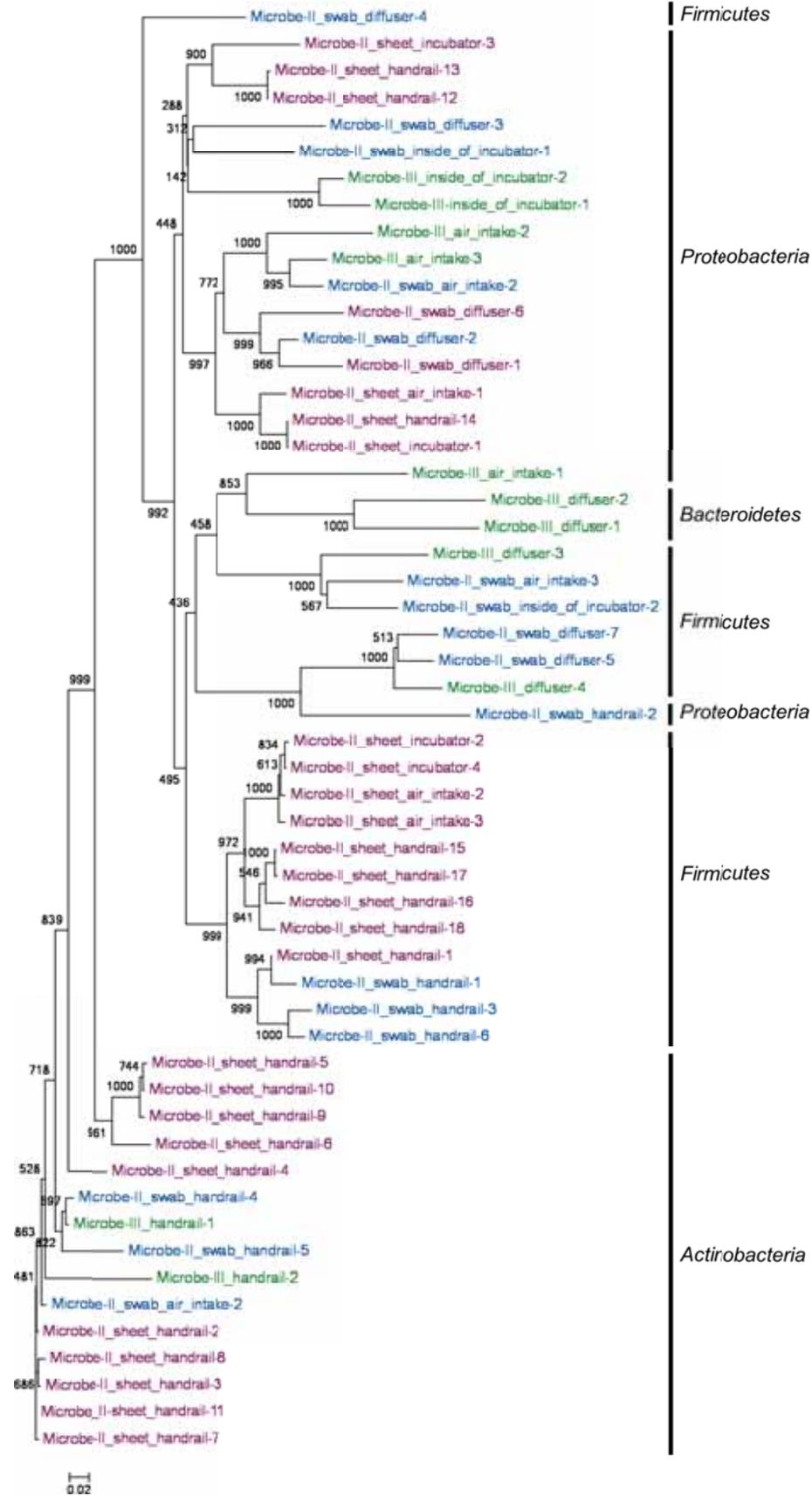


Fig. 7. Neighbor-joining tree of 16S rRNA gene sequences received from bacteria collected in the Kibo. Bootstrap values of 1,000 replicates are shown above the branches.

Table 9. Phylogenetic affiliation of DGGE bands originating from bacteria collected from the interior surfaces in the Kibo

| Sampling date | Sample | Similarity(%) | Most closely related species |
|------------------------------|-----------------------|-----------------------------------|--------------------------------------|
| 29 Oct. 2010 (Microbe-II) | incubator-1 | 100 | <i>Escherichia coli</i> |
| | incubator-2 | 99 | <i>Staphylococcus warneri</i> |
| | incubator-3 | 96 | <i>Ralstonia solanacearum</i> |
| | incubator-4 | 99 | <i>Staphylococcus warneri</i> |
| | handrail-1 | 97 | <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> |
| | handrail-2 | 99 | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| | handrail-3 | 99 | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| | handrail-4 | 99 | <i>Micrococcus luteus</i> |
| | handrail-5 | 99 | <i>Rothia mucilaginosa</i> |
| | handrail-6 | 96 | <i>Tsukamurella paurometabola</i> |
| | handrail-7 | 99 | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| | handrail-8 | 99 | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| | handrail-9 | 99 | <i>Rothia mucilaginosa</i> |
| | handrail-10 | 100 | <i>Rothia mucilaginosa</i> |
| | handrail-11 | 100 | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| | handrail-12 | 99 | <i>Neisseria meningitides</i> |
| | handrail-13 | 99 | <i>Neisseria meningitides</i> |
| | handrail-14 | 100 | <i>Escherichia coli</i> |
| handrail-15 | 98 | <i>Bacillus megaterium</i> | |
| handrail-16 | 95 | <i>Bacillus megaterium</i> | |
| handrail-17 | 98 | <i>Bacillus megaterium</i> | |
| handrail-18 | 97 | <i>Bacillus pseudofirmus</i> | |
| air_intake-1 | 97 | <i>Erwinia pyrifoliae</i> | |
| air_intake-2 | 100 | <i>Staphylococcus aureus</i> | |
| air_intake-3 | 99 | <i>Staphylococcus epidermidis</i> | |
| 27 Feb. 2011 (Microbe-II) | inside_of_incubator-1 | 92 | <i>Mesorhizobium australicum</i> |
| | inside_of_incubator-2 | 98 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| | handrail-1 | 92 | <i>Lactobacillus sakei</i> |
| | handrail-2 | 87 | <i>Moraxella catarrhalis</i> |
| | handrail-3 | 91 | <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> |
| | handrail-4 | 97 | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| | handrail-5 | 86 | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| | handrail-6 | 97 | <i>Carnobacterium maltaromaticum</i> |
| | diffuser-1 | 81 | <i>Marinomonas posidonica</i> |
| diffuser-2 | 93 | <i>Enterobacter asburiae</i> | |

| | | | |
|---------------|-----------------------|----|---------------------------------------|
| | diffuser-3 | 97 | <i>Campylobacter curvus</i> |
| | diffuser-4 | 90 | <i>Eubacterium rectale</i> |
| | diffuser-5 | 89 | <i>Streptococcus gordonii</i> |
| 27 Feb. 2011 | diffuser-6 | 90 | <i>Enterobacter asburiae</i> |
| (Microbe-II) | diffuser-7 | 92 | <i>Streptococcus gordonii</i> |
| | air_intake-1 | 94 | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| | air_intake-2 | 98 | <i>Haemophilus parainfluenzae</i> |
| | air_intake-3 | 90 | <i>Streptococcus suis</i> |
| | inside_of_incubator-1 | 82 | <i>Desulfatibacillum alkenivorans</i> |
| | inside_of_incubator-2 | 83 | <i>Anaeromyxobacter dehalogenans</i> |
| | handrail-1 | 97 | <i>Propionibacterium acnes</i> |
| | handrail-2 | 79 | <i>Pirellula staleyii</i> |
| 16 Oct. 2012 | diffuser-1 | 89 | <i>Capnocytophaga ochracea</i> |
| (Microbe-III) | diffuser-2 | 83 | <i>Capnocytophaga ochracea</i> |
| | diffuser-3 | 92 | <i>Streptococcus pneumoniae</i> |
| | diffuser-4 | 88 | <i>Streptococcus pyogenes</i> |
| | air_intake-1 | 90 | <i>Ketogulonigenium vulgare</i> |
| | air_intake-2 | 81 | <i>Haemophilus parainfluenzae</i> |
| | air_intake-3 | 96 | <i>Haemophilus parainfluenzae</i> |

「きぼう」内部表面に生息する細菌の系統解析

Microbe-I、II、III のいずれにおいても全サンプリング地点において培養開始 1 週間後には細菌はコロニーを形成しなかったものの、3 週間までの培養によりコロニー形成細菌を分離できた。これら分離株に関して、16S rRNA 遺伝子のほぼ全長の塩基配列を解析した結果を Table 10 に示す。Microbe-I で分離された細菌は、*Acinetobacter* 属、*Brevundimonas* 属、*Paracoccus* 属に属する細菌種だった。Microbe-II では *Bacillus* 属の細菌が、Microbe-III では *Brevibacillus* 属の細菌が分離された。これまでの報告により *Acinetobacter* 属、*Bacillus* 属、および *Pseudomonas* 属の細菌が ISS 内部より検出されていること⁴⁾、また *Brevundimonas* 属は *Pseudomonas* 属と、*Brevibacillus* 属は *Bacillus* 属とそれぞれ近縁の属であることから、ISS 内部と同様に「きぼう」内にもこれらの細菌属、およびその近縁の細菌属が分布していることがわかった。

Table 10. Phylogenetic affiliation of colony-forming bacteria isolated from Kibo

| Sampling date | Sampling point | Media | Similarity(%) | Most closely related species |
|-------------------------------|----------------------|----------|---------------|------------------------------|
| 5 Sep. 2009 (Microbe-I) | Surface of incubator | R2A | 99 | <i>Acinetobacter</i> sp. |
| | | | 99 | <i>Brevundimonas</i> sp. |
| | | | 98 | <i>Paracoccus</i> sp. |
| 27 Feb. 2011 (Microbe-II) | Air intake | Nutrient | 99 | <i>Bacillus</i> sp. |
| 16 Oct. 2012 (Microbe-III) | Air intake | Nutrient | 99 | <i>Brevibacillus</i> sp. |

小括

1. ISS「きぼう」内の細菌現存量は、概ね 10^4 cells/cm² 以下で推移しており、3年間で大きく変化していないことがわかった。
2. ISS「きぼう」内には、*Actinobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門、*Proteobacteria* 門に属する、ヒトの常在細菌や環境中に広く存在している細菌が分布していると推測できる。
3. ISS「きぼう」内は、衛生微生物学的に適切に管理されていることがわかった。

総括

1970年代からの Salyut や SkyLab、Mir 等の宇宙ステーション計画での成果をもとに、現在、国際宇宙ステーション (International Space Station ; ISS) が運用されている。ISS においては半年を超える長期宇宙滞在も実施されており、超長期宇宙滞在や宇宙居住の実現のための研究が行われている。

宇宙居住の実現にあたっては、ライフサポートシステムの構築に加えて、宇宙居住環境における衛生微生物学的な安全を確保する必要があるため、微生物管理が最重要課題となる。しかしながら、サンプリング方法や解析法を含めた微生物モニタリング法が統一されておらず、その標準化が課題となっている。また、宇宙居住環境における微生物の動態を明らかにし、微生物に関する健康障害指標を決定することが重要である。そこで本研究では、ISS 内の微生物モニタリングを行うにあたり、ISS 内における細菌のカタログデータベース構築の第一歩を築くことを目的とした。

まず、宇宙居住環境内の微生物サンプリングの標準化のための基礎的検討として、操作性が高く十分な回収率を持つサンプリングプロトコルの検討を行った。その結果、簡便かつ回収率が従来法と同等であり、個人差の無いプロトコルを決定した。また、サンプリング後のスワブを -80°C にて保存することにより、12週間まで全細菌数および細菌群集構造が変化しないことを確認した。

サンプリングプロトコルを決定した上で、ISS「きぼう」内の細菌モニタリングを実施した。サンプリングは、2009年から2012年までの3年間に4回行った。解析にあたっては、培養の困難な細菌を含めた高精度かつ網羅的な解析を行うために分子微生物生態学的手法を用いた。16S rRNA 遺伝子を標的とした細菌現存量測定の結果、「きぼう」内部の細菌現存量は 10^4 cells/cm²以下で推移していることがわかった。また、細菌群集構造解析の結果、「きぼう」内部に存在する細菌はヒトの常在細菌に類する細菌だと推定された。地上の研究施設の内装表面の細菌現存量が 10^5 cells/cm²であることと、病原性が高いと推測される細菌は検

出されなかったことから、現段階では「きぼう」内部は衛生微生物学的に管理された状態だと考えられた。

現在、ISS 内における細菌現存量の測定や同定、群集構造解析には、一般的に培養を基本とした方法が用いられてきた。しかしながら、培養に依存した解析では増殖活性を有する細菌のみを捉えるため、過少評価の原因となる。そのため本研究では培養法のみならず分子微生物生態学的手法を用いることで、より詳細な「きぼう」内の細菌現存量測定および細菌群集構造解析を実現した。これまでに培養法や、エンドトキシンなどの細胞壁成分を指標とした方法での測定による報告では、トイレや運動施設、寝室など、ヒトの活動と密接に関わる設備を有するモジュールでは測定値が高いという傾向が見られている。一方、実験モジュールでは多くの場合、細菌現存量は検出限界以下と報告されている。今後、宇宙居住環境中の微生物の動態に関する基礎的知見の蓄積のために、分子微生物生態学的手法によるさらに網羅的な解析が望まれる。

本研究により、宇宙居住環境での微生物モニタリングの標準化に向けたサンプリングプロトコールを決定した。また、決定したサンプリングプロトコールにより ISS 日本実験棟「きぼう」内の細菌モニタリングを行い、その細菌現存量および細菌群集構造を明らかにし、ISS 内における細菌のカタログデータベース構築の第一歩を築いた。本研究は宇宙居住環境の微生物モニタリングの基礎となる研究であり、今後の超長期宇宙居住における微生物管理に貢献するものである。

結論

1. 宇宙居住環境における微生物モニタリングのために、簡便かつ十分な回収率があり、個人差の無いサンプリングプロトコールを決定した。
2. サンプリング後のスワブの - 80 °C での保存は、12 週間まで細菌現存量および細菌群集構成に影響を及ぼさないことがわかった。
3. ISS「きぼう」内の細菌現存量は、概ね 10^4 cells/cm² 以下で推移しており、3 年間で大きく変化していないことがわかった。
4. ISS「きぼう」内には、*Actinobacteria* 門、*Bacteroidetes* 門、*Firmicutes* 門、*Proteobacteria* 門に属する、ヒトの常在細菌や環境中に広く存在している細菌が分布していると推測できる。
5. ISS「きぼう」内は、衛生微生物学的に適切に管理されていることがわかった。

謝辞

本研究の遂行にあたり、終始温かいご指導とご鞭撻を賜りました、大阪大学大学院薬学研究科 教授・恩師 那須正夫先生に厚く御礼申し上げます。

研究途上、数々のご指導とご助言を賜りました大阪大学大学院薬学研究科 准教授・山口進康先生、大阪大学大学院薬学研究科 助教・馬場貴志先生、大阪大学大学院薬学研究科 一條知昭博士に深謝いたします。

また、貴重なご教示をいただきました姫路獨協大学薬学部 准教授・川井真好先生に心より御礼申し上げます。

本研究にご協力いただきました大阪大学大学院薬学研究科 衛生・微生物学分野の皆様にも御礼申し上げます。

最後に、常日頃から温かく支援して下さった家族に心より感謝いたします。

引用文献

- 1) Van Hout, R., K. Mijinendonckx, and N. Leys. 2012. Microbial contamination monitoring and control during human space missions. *Planet. Space Sci.* **60**: 115-120.
- 2) Borchers, A. T., C. L. Keen, and M. E. Gershwin. 2002. Microgravity and immune responsiveness: implications for space travel. *Nutrition* **18**: 889-898.
- 3) Wilson, J. W., C. M. Ott, K. Honer zu Bentrup, R. Ramamurthy, L. Quick, S. Porwollik, P. Cheng, M. McClelland, G. Tsaprailis, T. Tadabaugh, A. Hunt, D. Fernandez, E. Richter, M. Shah, M. Kilcoyne, L. Joshi, M. Nelman-Gonzalez, S. Hing, M. Parra, P. Dumars, K. Norwood, R. Bober, J. Devich, A. Ruggles, C. Goulart, M. Rupert, L. Stodieck, P. Stafford, L. Cattela, M. J. Schurr, K. Buchanan, L. Morici, J. McCracken, P. Allen, C. Baker-Coleman, T. Hammond, J. Vogel, R. Nelson, D. L. Pierson, H. M. Stefanyshyn-Piper, and C. A. Nickerson. 2007. Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for a global regulator Hfq. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **104**: 16299-16304.
- 4) Novikova, N., P. De Boever, S. Poddubko, E. Deshevaya, N. Polikarpov, N. Rakova, I. Coninx, and M. Mergeay. 2006. Survey of environmental biocontamination on board the International Space Station. *Res. Microbiol.* **157**:5-12.
- 5) Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA). 2012. ISS/Kibo utilization scenario toward 2020. http://iss.jaxa.jp/kiboexp/news/2020_kibo.html.
- 6) National Aeronautics and Space Administration (NASA). 2011. Space Technology Roadmaps (DRAFT). <http://www.nasa.gov/offices/oct/home/roadmaps/index.html>.
- 7) Toward Human Exploration of Space: a European Strategy (THESEUS). 2012. THESEUS roadmap. http://theseus.hd20.hosting.punkt.de/fileadmin/Docs/Eg_reports_roadmap/RoadMap_web.pdf.
- 8) Kawai, M., N. Yamaguchi, and M. Nasu. 1999. Rapid enumeration of physiologically active bacteria

- in purified water used in the pharmaceutical manufacturing process. *J. Appl. Microbiol.* **86**: 496–504.
- 9) Iwamoto, T., K. Tani, K. Nakamura, Y. Suzuki, M. Kitagawa, M. Eguchi, and M. Nasu. 2000. Monitoring impact of in situ biostimulation treatment on groundwater bacterial community by DGGE. *FEMS Microb. Ecol.* **32**: 129-141.
- 10) Yamaguchi, N., A. Ishidoshiro, Y. Yoshida, T. Saika, S. Senda, and M. Nasu. 2003. Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. *J. Microbiol. Methods* **53**: 405-410.
- 11) Yamaguchi, N., T. Ichijo, A. Sakotani, T. Baba, and M. Nasu. 2012. Global dispersion of bacterial cells on Asian dust. *Sci. Rep.* **2**: 525.
- 12) Nishimura, Y., T. Kenzaka, A. Sueyoshi, P. Li, H. Fujiyama, T. Baba, N. Yamaguchi, and M. Nasu. 2010. Similarity of bacterial community structure between Asian dust and its sources determined by rRNA Gene-Targeted Approaches. *Microbes Environ.* **25**:22-27.
- 13) Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing. p. 115-175. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*, John Wiley and Sons, New Jersey.
- 14) Henderickson, E. R., J. A. Payne, R. M. Young, M. G. Starr, M. P. Perry, S. Fahnestock, D. E. Ellis, and R. C. Ebersole. 2001. Molecular analysis of *Dehalococcoides* 16S ribosomal DNA from chloroethene-contaminated sites throughout north America. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 485-495.
- 15) Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 6955-6959.
- 16) Maule, J., N. Wainwright, A. Steele, L. Monaco, H. Morris, D. Gunter, M. Damon, and M. Wells. 2009. Rapid culture-independent microbial analysis aboard the International Space Station (ISS). *Astrobiology* **9**: 759-775.
- 17) Morris, H. C., M. Damon, J. Maule, A. Monaco, and N. Wainwright. 2012. Rapid culture-independent microbial analysis aboard the International Space Station (ISS) stage two:

quantifying three microbial biomarkers. *Astrobiology* **12**: 830-840.

- 18) Fierer, N., M. Hamady, C. L. Lauber, and R. Knight. 2008. The influence of sex, handedness, and washing on the diversity of hand surface bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**: 17994-17999.