

「きぼう」内における細菌の網羅的解析

一條 知昭, 山口 進康, 那須 正夫 (阪大)

Bacterial Monitoring in the International Space Station-“Kibo”

Tomoaki Ichijo*, Nobuyasu Yamaguchi, Masao Nasu

*Osaka University, Suita, Osaka 565-0871

E-Mail: ichijo@phs.osaka-u.ac.jp

Abstract: In order to ensure crew safety and understand microbial dynamics in space habitation environments, continuous microbial monitoring is required. We have been continuously performing microbial monitoring in the Japanese Experiment Module “Kibo” on the International Space Station in cooperation with JAXA since 2009 (experiment title: “Microbe”). In this research, abundance and phylogenetic affiliation of bacteria on interior surfaces of Kibo has been determined with culture independent techniques. According to phylogenetic affiliation of bacteria, most of detected bacteria belonged to human microbiome; thus, bacterial cells are supposed to be transferred to the surface in Kibo via astronaut. Bacterial abundance of many samples collected in Kibo was equivalent to or less than the quantification limit ($< 10^4$ cells/cm²). From these aspects of bacterial abundance and their phylogenetic affiliation, the Kibo has been microbiologically well maintained; however, microbial abundance in Kibo may increase with prolonged stay of the astronauts.

Key words; International Space Station (ISS), bacterial monitoring, comprehensive bacterial community analysis

1. はじめに

微生物は幅広い環境に生息し、またヒトと微生物は密接な関係を築いている。先行研究により、微小重力下ではネズミチフス菌の病原性が上昇すること (Wilson *et al.*, 2007) や、宇宙飛行に伴い、ヒトの免疫が低下することが報告されている (Borchers *et al.*, 2002, Crucian *et al.*, 2015)。また、宇宙ステーション「ミール」ではカビの発生が通信システムに障害を与えたことから、宇宙居住は、ヒトと微生物の関わりに大きな影響を与えることが考えられる。すなわち、宇宙居住の安全・安心を保障するためには、宇宙居住環境中の微生物に関する理解が必須である。

本研究グループでは、宇宙居住空間における微生物

物の動態を明らかとするために、国際宇宙ステーション (ISS) 「きぼう」を対象として、JAXA と共同で 2009 年度から継続的な微生物モニタリングを進めている (通称: Microbe)。そこで、これまでに完了している Microbe-I、II、III により得られた成果を報告する (Ichijo *et al.*, in press)。

2. 「きぼう」でのサンプリング

「きぼう」内ではハンドレール、ノートパソコンパームレスト、細胞培養ラック表面、インキュベーター内側、空調機吸気部、空調機吹き出し部よりサンプリングを行った。ハンドレール、ノートパソコンパームレストは宇宙飛行士の接触頻度が高い場所として、

Table 1. Sampling date and devices.

	Microbe-I	Microbe-II Run-1	Microbe-II Run-2	Microbe-III	Microbe-IV Run-1	Microbe-IV Run-2	Microbe-IV Run-3	Microbe-IV Run-4
	5 Sep. 2009	29 Oct. 2010	27 Feb. 2011	16 Oct. 2012	27 Feb. 2015	28 Aug. 2015	12 Feb. 2016	3Q of 2016
Air diffuser	S		S	S	A	S, A	A	S, A
Surface of incubator	S	A	S, A	S, A	A	S, A	A	S, A
Handrail	S	A	S	S, A	A	S, A	A	S, A
Air intake		A	S, A	S, A	A	S, A	A	S, A
Inside of incubator		A	S, A	S, A	A	S, A	A	S, A
Laptop PC palm rest		A	A	A	A	S, A	A	S, A
IMV Fan					A	S, A	A	S, A
Wall of storage space					A	S, A	A	S, A
Foot hold					A	S, A	A	S, A
MELFI door					A	S, A	A	S, A

S: スワブ, A: 粘着集菌シート, blank: 実施せず

細胞培養ラック表面、インキュベーター内側は接触頻度の低い場所として、空調機吸気部、空調機吹き出し部は「きぼう」内の空気の流れを考慮して選択した。

サンプリングにあたってはスワブ法 (Yamaguchi *et al.*, 2010) および独自に開発した粘着集菌シート法 (Ichijo *et al.*, 2012) を用いた。Microbe-I から Microbe-III の実施スケジュールおよび使用したサンプリング手法については Table 1 に示した。

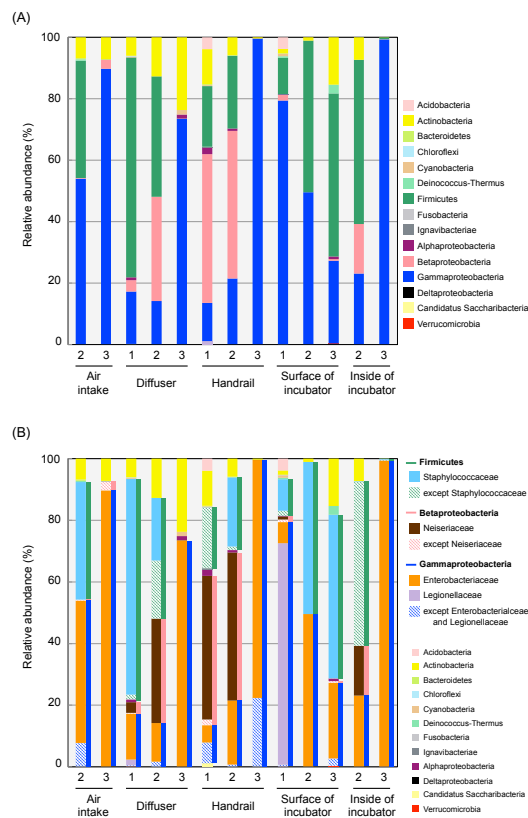


Fig. 1. Bacterial community structure on interior surfaces in Kibo (Ichijo *et al.*, in press)

3. 結果および考察

環境中の細菌の大部分は通常の条件下では培養が困難であることから、「きぼう」内の細菌の全体像に迫るには培養に依存しない新たな手法が求められる。そこで本研究では、細菌の現存量の測定には 16S rRNA 遺伝子を標的とした定量的 PCR 法および、核酸結合性蛍光染色剤 SYBR Green II を使用した全菌数直接計数法を、細菌の群集構造解析にあたっては 16S rRNA 遺伝子を標的としたアンプリコンシークエンス法 (Pyrosequencing) を用いた。なお、本稿では、Microbe-I より継続的に使用してきたことから、スワブ法

によりサンプリングしたデータを記載した。

細菌群集構造解析の結果、「きぼう」内には、Proteobacteria (beta および gamma subclasses)、Firmicutes、Actinobacteria が優占していることが明らかとなった (Fig. 1A)。また、より詳細に解析したところ、上記の細菌グループの中でも特に Enterobacteriaceae および Staphylococcaceae に属する細菌が大部分を占めていることが明らかとなった (Fig. 1B)。これらの細菌はヒトの腸内や皮膚に常在する細菌であり、「きぼう」の長期運用によって定着していると考えられる。また、これらの細菌は宇宙飛行士に由来すると推測された。

「きぼう」内機器表面における細菌現存量は、Microbe-I では約 10³ cells/cm² であった。一方、Microbe-II、Microbe-III では約 10² cells/cm²、もしくは定量限界以下であった (Table 2)。総じて、10⁴ cells/cm² を超えることはなかった。これまでに、地上においてハンドレール、エレベータのボタン、受話器の表面などの細菌現存量を測定したところ、約 10⁵ cells/cm² であったことから、その量は地上の一般的な居室に比べて 10 分の 1 であり、現状では「きぼう」は微生物学的に適切に管理されていることがわかった。

しかしながら、今後の宇宙飛行士による活動や「きぼう」内での宇宙実験により、「きぼう」内の細菌現存量や群集構造は影響を受けることが考えられる。本研究グループでは、2016 年度まで細菌モニタリングを継続的に進めている。2014 年度より実施中の Microbe-IV では、合計 4 回のサンプリングを予定しており、「きぼう」内の微生物を全体視するため、新たにフットホールド、MELFI1 ドア、モジュール間通風換気吸気部、保管庫奥の 4 か所をサンプリング対象とした解析を進める (Table 1)。

これまでの結果は、単回のサンプリングではなく、継続的なモニタリングによって初めて明らかとなったものである。今後も引き続き細菌モニタリングを継続することにより、長期滞在にとまなう「きぼう」内の微生物の変遷や微生物生態系の安定性についての情報を得ることが可能となり、ヒトの長期宇宙滞

Table 2. Bacterial abundance on interior surfaces in Kibo (Ichijo *et al.*, in press)

	Microbe-I (Sep. 2009)		Microbe-II (Feb. 2011)		Microbe-III (Sep. 2012)	
	直接計数法	定量的PCR法	直接計数法	定量的PCR法	直接計数法	定量的PCR法
Incubator	2×10 ³	4×10 ³	2×10 ²	< 1×10 ²	2×10 ²	< 1×10 ²
Air diffuser	9×10 ²	2×10 ³	< 2×10 ²	3×10 ²	< 2×10 ²	< 1×10 ²
Handrail	7×10 ²	5×10 ²	< 2×10 ²	1×10 ²	< 2×10 ²	< 1×10 ²
Inside of incubator			< 2×10 ²	1×10 ²	2×10 ²	< 1×10 ²
Air intake			< 2×10 ²	1×10 ²	< 2×10 ²	< 1×10 ²

試料採取法：スワブ法
 蛍光染色剤：SYBR Green II
 定量的PCRでのプライマー：EUB f933 and EUB r1387 (5 copies/cell)

在の成功につながるものとなる。さらに、「きぼう」内の細菌は宇宙飛行士の存在と関係していることから、宇宙居住環境を無菌状態にすることを指すのではなく、宇宙居住環境に細菌が常在することを踏まえたうえで、適切に管理し共存することが重要であると考えられる。

参考文献

- 1) Wilson, J.W., Ott, C.M., Höner zu Bentrup, K., Ramamurthy, R., Quick, L., Porwollik, S. *et al.* Space flight alters bacterial gene expression and virulence and reveals a role for global regulator *Hfq*. *Proc Natl Acad Sci USA*, **104**: 16299–16304 (2007).
- 2) Borchers, A.T., Keen, C.L. and Gershwin M.E. Microgravity and immune responsiveness. *Nutrition*, **18**: 889–898 (2002).
- 3) Crucian, B., Stowe, R.P., Mehta, S., Quiariarte, H., Pierson, D. and Sams C. Alterations in adaptive immunity persist during long-duration spaceflight. *npj Microgravity*, **1**: 15013 (2015).
- 4) Ichijo, T., Yamaguchi, N., Tanigaki, F., Shirakawa, M. and Nasu, M. Four-year bacterial monitoring in the International Space Station – Japanese Experiment Module "Kibo" with culture-independent approach. *npj Microgravity*, in press.
- 5) Yamaguchi, N., Hieda, H. and Nasu, M. Simple and reliable swabbing procedure for monitoring microbes in the International Space Station. *Eco-Engineering*, **22**: 27–30 (2010).
- 6) Ichijo, T., Hieda, H., Ishihara, R., Yamaguchi, N. and Nasu, M. Bacterial monitoring with adhesive sheet in the International Space Station-‘Kibo’, the Japanese Experiment Module. *Microbes Environ.*, **28**: 264–268 (2012).