

# 国際宇宙ステーションから回収した機器における細菌の現存量

大阪大学大学院薬学研究科 山口 進康, 稗田 はつき, 一條 知昭, 那須 正夫

## Bacterial abundance on multi protocol converter used in the International Space Station

*Nobuyasu Yamaguchi, Hatsuki Hieda, Tomoaki Ichijo and Masao Nasu*

Osaka University, Suita, Osaka 565-0871

E-mail: [nasu@phs.osaka-u.ac.jp](mailto:nasu@phs.osaka-u.ac.jp)

**Abstract:** Microbes exist everywhere, even in a space habitat. The microbial ecosystem may differ from those on Earth in such a closed environment under microgravity. It is necessary to investigate the relationship between humans and microbes, and how microbes influence the systems and materials in this environment. The objective of our experiment is to monitor the abundance of bacteria and predict their dynamics in “KIBO”, the Japanese experiment module of the International Space Station (ISS), from our own viewpoints. This time, we measured the bacterial abundance on a multi protocol converter (MPC) used in the ISS. Bacterial cells on the surfaces and parts outside and inside of a MPC were collected with swab or “microbe-collecting adhesive sheet (Yamaguchi, et al. *J. Microbiol. Methods*, 53: 405, 2003)”, and bacterial number was measured by quantitative real-time PCR targeting bacterial 16S rRNA gene sequences following DNA extraction from bacterial cells collected with swab or sampling sheet. Sampling method with the adhesive sheet is simple, rapid, and reproducible. This sheet does not require water to recover the bacteria from the targeted surface, while the swab method needs water to moisturize the head. This sampling sheet is suitable to collect bacterial cells on solid surfaces and we believe this sheet would be useful device in the field of astrobiology.

**Key words;** Space Habitation, Microbiological Monitoring, Sampling, Rapid Microbiological Methods

### 1. 緒言

これまで宇宙ステーションにおける安全対策は、物理的・化学的な側面からは十分に図られてきたが、衛生微生物学的な安全対策についてはその重要性が認識されているものの、未だ十分な知見が集積されていない。微小重力下ではヒトの免疫能が低下するという報告があり、地上では健康人に対してはほとんど病原性がないとされる微生物による日和見感染のリスクが高くなる可能性があるため、地上での生活以上に微生物汚染に対して注意を払う必要があると言われている<sup>1)</sup>。また宇宙ステーション内の微生物は搭乗者の健康に対するリスクとなるばかりではなく、電子機器や配線等を腐食させ、機器のトラブルの原因になることも報告されている<sup>1)</sup>。したがって、宇宙ステーション内を衛生微生物学的に評価し、宇宙滞在や宇宙居住における安全・安心を保証するための基盤を構築しなければならない。そのためには、宇宙居住環境中に存在する微生物の現存量や生理状態を正確に把握することに加え、危害微生物を特異的に検出する必要がある。そこで当研究室では、JAXA (宇宙航空研究開発機構) と協力し、国際宇宙ステーション (ISS) 日本実験棟「きぼう」における細菌モニタリングを進めている (研究テーマ: MICROBE; <http://kibo.jaxa.jp/experiment/theme/second/>

microbe/)。今回、その一環として、ISS 内で使用されていた高精細ビデオ画像伝送処理システム「マルチプロトコルコンバータ (Multi Protocol Converter: MPC)」に付着している細菌数を測定した。

細菌モニタリングにおいては、サンプリングが重要となる。通常、室内環境における細菌のサンプリングにはスワブが広く用いられている。スワブ法は比較的容易に被検面からのサンプリングが可能であり、拭取り法の最適化により回収率の個人差を軽減できる<sup>2)</sup>。しかしながら、スワブには回収率を上げるために水で濡らす必要がある、曲面には使用しにくいという課題がある。当研究室ではサンプリング用デバイス「粘着集菌シート」<sup>3)</sup>を独自に開発している。本シートは開封後すぐに使用できるように操作がしやすく、曲面からの回収がしやすい、回収効率はスワブと同等<sup>3)</sup>などの特長をもつ。そこで本研究では、スワブに加えて、粘着集菌シートを用いたサンプリングも行い、定量的 PCR 法により MPC に付着している細菌の現存量を測定した。

### 2. 材料と方法

#### マルチプロトコルコンバータ

MPC 2 台のうち 1 台 (No. 3) は ISS 内で週に約 10 時間、4～5 ヶ月間使用されていた。一方、もう 1

台 (No. 2) はスペースシャトル内で使用され、No. 3 に比べて使用頻度が低かった。本装置ではファンを用いて外部の空気を装置内に導入し、装置内の冷却後、排気を行う。したがって、通気部に埃が付着することがある。



Fig. 1. Multi Protocol Converter (MPC) used in the ISS.

### サンプリング

サンプリングは2010年10月7日に実施した。クリーンベンチ内で2台のMPCを分解し、細菌の回収を行った。

被検面として、MPCのカバー内部や回路基板の部品の表面、ファンの羽や通気口などを選び、スワブならびに粘着集菌シートにより細菌を回収した。



Fig. 2. Sampling of bacterial cells from MPC with microbe-collecting adhesive sheet.

### スワブで回収した細菌からのDNA抽出

スワブをろ過滅菌水中でよく攪拌して回収した細菌を再懸濁した後、孔径0.2 μmのポリカーボネートフィルター (ADVANTEC) 上に捕集した。フィルターを細かく切断して容量2.2 mlのバイアルに移し、ガラスビーズ (直径0.1 mm; BioSpec Products) 800 μl、

TE緩衝液 (10 mM Tris-HCl [pH 8.0]、5 mM EDTA) 750 μl、中性緩衝化フェノール 350 μl、および1% SDS溶液 60 μlを加え、Bead Smash 12 (和研薬) を用いて4,800 rpmで90秒間攪拌して細菌を破碎した。冷却後、ビーズ層・フェノール層・水層を遠心分離してDNAが含まれている水層を回収し、等量のPCI (フェノール:クロロホルム:イソアミルアルコール=25:24:1)を加えて2回精製した。その後、エタノール沈殿によりDNAを回収し、25 μlのTE緩衝液に懸濁した。

### 粘着集菌シートで回収した細菌からのDNA抽出

Tsai法<sup>4)</sup>により、粘着集菌シートに回収した細菌からDNAを抽出した。抽出したDNAの精製は、PCIにより行った。

### 定量的PCR法による細菌量測定<sup>5)</sup>

LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche Diagnostic) を用いて16S rRNA遺伝子の定量を行った。PCR溶液は全量10 μlとし、組成はLightCycler DNA Master SYBR Green I、4 mM MgCl<sub>2</sub>、0.5 μM プライマー-EUB933f (5'-GCACAAGCGGTGGAGCATG TGG-3')およびEUB1387r (5'-GCCCGGGAACGTATT CACCG-3')、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denaturation: 95°C・15秒、annealing: 60°C・10秒、extension: 72°C・30秒、signal detection: 86°C・5秒で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ルシフェラーゼ (luc) 遺伝子のPCR産物を添加し、定量的PCRにより測定した。

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1菌体あたりの16S rRNA遺伝子のコピー数を5コピー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。

## 3. 結果と考察

### 定量的PCR法によるMPCの細菌数測定

今回の測定に先立ち、研究室内のロッカーやエアコン吹き出し口、手すりの表面の細菌をスワブ法により回収し、それらの現存量を測定したところ、 $1.0 \times 10^3$  cells/cm<sup>2</sup>以下であった。

MPCの各部位からスワブ法により回収した細菌数の測定結果をTable 1に、粘着集菌シートにより回収した細菌数の測定結果をTable 2に示した。

