

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, 稚田 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

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. Microbial. 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、地上では健常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¹⁾。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¹⁾。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²⁾。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」³⁾を独自に開発している。本シートは開封後すぐに使用するために操作がしやすく、曲面からの回収がしやすい、回収効率はスワブと同等³⁾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⁴⁾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⁵⁾

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 MgCl₂、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-methoxypsonalen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、ライトサイクルソフトウェア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、研究室内的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、1.0×10³ cells/cm²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。

Table 1. Number of bacteria collected from MPC with optimized swab method and determined by quantitative PCR.

MPC No. 2 (使用頻度: 低)		MPC No. 3 (使用頻度: 高)			
測定箇所	サンプリング 細菌数 面積(cm ²) (cells/cm ²)	測定箇所	サンプリング 細菌数 面積(cm ²) (cells/cm ²)		
ファンの羽A	8	5.7 × 10 ^{1*}	ファンの羽A	8	1.6 × 10 ^{2*}
ファンの羽B	8	3.1 × 10 ^{1*}	ファンの羽B	8	1.0 × 10 ^{2*}
ファンの通気口	20	3.9 × 10 ¹	ファンの通気口	20	3.5 × 10 ^{1*}
装置内部壁面	30	1.2 × 10 ^{1**}	回路基板表面	15	3.1 × 10 ^{1**}
回路基板表面A	15	6.3 × 10 ¹	回路基板の部品A	4	1.9 × 10 ^{2**}
回路基板表面B	15	2.1 × 10 ^{1*}	回路基板の部品B	9	6.7 × 10 ^{1*}
回路基板の部品A	9	1.0 × 10 ²	回路基板の部品C	4	3.9 × 10 ²
回路基板の部品B	4	1.8 × 10 ^{2*}	回路基板の部品D	15	5.9 × 10 ^{1*}
回路基板の部品C	15	3.7 × 10 ¹	回路基板の部品E	10	3.6 × 10 ^{1**}
回路基板の部品D	15	2.6 × 10 ^{2*}	回路基板の部品F	15	4.1 × 10 ^{1**}
内部底面A	20	1.9 × 10 ²	外面・白いシミ	2	4.4 × 10 ^{2**}
内部底面B	20	9.1 × 10 ^{0**}	外面・茶色いシミ	2	1.6 × 10 ³

*: 4回測定中、定量限界以下が1回；**: 4回測定中、定量限界以下が2回

Table 2. Number of bacteria collected from MPC with microbe-collecting adhesive sheet and determined by quantitative PCR.

MPC No. 2 (使用頻度: 低)		MPC No. 3 (使用頻度: 高)			
測定箇所	サンプリング 細菌数 面積(cm ²) (cells/cm ²)	測定箇所	サンプリング 細菌数 面積(cm ²) (cells/cm ²)		
蓋裏面A	6.25	1.2 × 10 ¹	蓋裏面A	6.25	2.0 × 10 ^{0*}
蓋裏面B	6.25	5.1 × 10 ¹	蓋裏面B	6.25	1.9 × 10 ^{0*}
蓋裏面C	6.25	3.0 × 10 ¹	蓋裏面C	6.25	1.1 × 10 ^{0*}
蓋裏面D	6.25	5.1 × 10 ¹	蓋裏面D	6.25	0.91 × 10 ^{0*}
蓋裏面E	6.25	1.2 × 10 ¹	メッッシュ部A	6.25	1.1 × 10 ^{0*}
メッッシュ部A	6.25	1.2 × 10 ^{0*}	メッッシュ部B	6.25	1.0 × 10 ^{0*}
メッッシュ部B	6.25	2.2 × 10 ^{0*}	回路基板表面	6.25	0.94 × 10 ^{0*}
			回路基板の部品	6.25	4.2 × 10 ^{0*}
			内部底面A	6.25	0.67 × 10 ^{0*}
			内部底面B	6.25	2.4 × 10 ^{0*}

*: 定量限界以下

今回測定した MPC の細菌数は MPC の使用頻度にかかわらず、ほぼすべての箇所で 1.0×10^3 cells/cm² 以下であった。通気部においては若干の埃の付着が見られたが、細菌数に他の部位との大きな違いは無かった。したがって、現状では微生物学に適切に管理されていることがわかった。

4. 結論

今後の長期宇宙滞在における衛生微生物学的な安全を保証するためには、宇宙居住空間における的確な微生物モニタリングを行い、その動態を解析することにより、知識ベースを構築することが重要である。そのためには、簡便かつ回収率の高いサンプリング法を用いる必要がある。

今回の研究により、宇宙居住空間内で用いられてきた装置の表面から、粘着集菌シートを用いて、微生物を簡便に回収できることが確認できた。

今後は JAXA と共同で研究を進めている ISS 「きぼう」 内での細菌モニタリングでも粘着集菌シートを活用し、ヒトの滞在にともなう細菌の動態を明らかにする予定である。

5. 謝辞

本研究は JAXA および日本宇宙フォーラムが推進している「きぼう」船内実験室第 2 期利用に向けた候補テーマの一環として行ったものである。

MPC からのサンプリングにあたっては、JAXA の谷垣文章氏ならびに篠原秀明氏にご協力いただいた。

6. 参考文献

- 一條知昭, 那須正夫 : 宇宙居住環境中の微生物. 生態工学会誌, 19: 185-189 (2007)
- Yamaguchi, N., Hieda, H., Nasu, M.: Simple and reliable swabbing procedure for monitoring microbes in the International Space Station. Eco-Engineering, 22: 27-30 (2010)
- Yamaguchi, N., Ishidohiro, A., Yoshida, Y., Saika, T., Senda, S., Nasu, M.: Development of an adhesive sheet for direct counting of bacteria on solid surfaces. J. Microbiol. Methods, 53: 405-410 (2003)
- Tsai, Y-L and Olson, B. H.: Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1070-1074 (1991)
- 大阪大学大学院薬学研究科遺伝情報解析学分野 (衛生化学) : 環境微生物学実験プロトコール. KEY LAB, 大阪, 2006.