

閉鎖生態系生命維持システム (CELSS) における水の衛生微生物学的安全性評価システムの開発

大阪大学大学院薬学研究科 山口 進康, 一條 知昭, 永瀬 裕康, 馬場 貴志, 那須 正夫

Development of new methods for microbiological quality assurance of water used in controlled ecological life support systems

Nobuyasu Yamaguchi, Tomoaki Ichijo, Hiroyasu Nagase, Takashi Baba and Masao Nasu

Osaka University, Suita, Osaka 565-0871

E-mail: nasu@phs.osaka-u.ac.jp

Abstract: A Controlled Ecological Life Support System (CELSS) is essential for habitation in extreme environments (space, polar regions, ocean depths, etc.) and an enormous amount of freshwater is used and regenerated for drinking and living. In order to assure human health in closed habitations, microbiological quality control of freshwater used in CELSS is required, and bacterial population dynamics in the system should be determined rapidly and accurately. In this study, bacterial abundance and the numbers of bacteria with physiological activity in freshwater used and regenerated in Closed Ecology Experiment Facilities (CEEF; Aomori, Japan) during the Closed Habitation Experiments were determined to understand bacterial abundance and activity in a closed habitation. Our results suggest that bacterial numbers and their activities in freshwater used in CELSS could be accurately determined within a few hours by fluorescent vital staining. PCR-DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) analyses revealed that α -proteobacteria was abundant in freshwater and hydroponics used in the CEEF. Rapid microbiological methods would contribute to the technical progress in the quality assurance of freshwater used in CELSS. For further simple and automated microbiological monitoring, we developed a microfluidic system for quantification of bacteria in freshwater. Comparisons of counts of *Escherichia coli* by the microfluidic system and by fluorescence microscopy closely correlated ($r^2=0.98$). Bacteria in purified household tap water were rapidly and accurately counted by using this system with on-chip fluorescent staining. A culture-independent DNA fingerprinting technique, Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism (T-RFLP) analysis is widely used for profiling bacterial populations in aquatic environments. Capillary electrophoresis systems are usually used for the T-RFLP analysis; however this system is rather time-consuming. We developed a protocol for T-RFLP analysis using a microchip electrophoresis system. The time required for this analysis was 15 min, while 80 min was required for conventional T-RFLP analysis using a capillary electrophoresis system. These methods might contribute to technical progress in the microbiological quality control of freshwater used in closed habitations.

Key words; Space Habitation, Freshwater, Microbiological Monitoring, Rapid Microbiological Methods, Microfluidic System

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。

宇宙居住においては、大量の淡水が使用され、さらにその再利用が必要となる。したがって、宇宙居住の実現のためには、再利用する淡水の衛生微生物学的な安全性の確保が重要となる。そのためには、閉鎖居住空間内の水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しなければならない。

これまで微生物を検出・同定する手法として、培養法が一般的に用いられてきた。しかしながら、水環境中に生息する細菌の多くは、通常の培養法では目に見えるコロニーを形成しないことが明らかとなってきた。また培養過程に時間を要するとともに、微生物を増殖させることからバイオハザードのリスクが上昇する等の問題点がある。そこで、閉鎖居住システムで用いられる水の衛生微生物管理には、迅速かつ高精度な新たな微生物検出法が求められている。

我々は蛍光染色法や分子微生物生態学的手法など、微生物を培養することなく個々の細胞レベルで検出し、さらに群集構造を解析するための方法を開発してきた²⁾。核酸結合性蛍光染色剤を用いて微生物を直接染色することにより、その現存量を把握できる。また蛍光活性染色法を用いることにより、エステラーゼ活性を有する細菌数を数分間で測定できる。そこでこれらの手法を用いて、閉鎖型生態系実験施設 (CEEF; Closed Ecology Experiment Facilities)³⁾における生活用水および水耕栽培用水中に存在する細菌の現存量を測定し、その生理活性を評価した。

さらに、宇宙居住空間において使用される水を微生物学的に安全保証するためには、日常的に①細菌数を迅速に測定し、②細菌群集構造の変化をモニタリングするとともに、異常が見られた場合に③有害微生物の有無を高精度に測定することが有効であると考えられる。

そこで、細菌モニタリングの自動化のために、マイクロ流路デバイスを用いた細菌数測定法を開発するとともに、マイクロチップ電気泳動装置を用いた細菌群集構造プロファイリング法を作成した。

2. 材料と方法

試料

(財)環境科学技術研究所内の閉鎖型生態系実験施設において、閉鎖居住実験(2005年8月15日から2007年10月30日)時に、上水タンク、居住区、動物室および水耕栽培区より試料水を採取した(Fig. 1)。居住区では浄水器を通した飲用水の他、流し、シャワー、バスルームの蛇口より水または湯を採取した。動物室では流しの水および動物飼育用ボトルの水を採取した。植物栽培区ではタンク、サイズやイネの栽培槽から栽培液を採取し、同時に凝結水を採取した。

コロニー形成細菌数 (CFU) の測定

各試料を段階希釈し、その100 µlを水環境中の細菌検出に用いられる貧栄養培地であるR2A寒天培地に塗抹した。25°Cで7日間培養した後、培地表面に生じたコロニーを計数した。

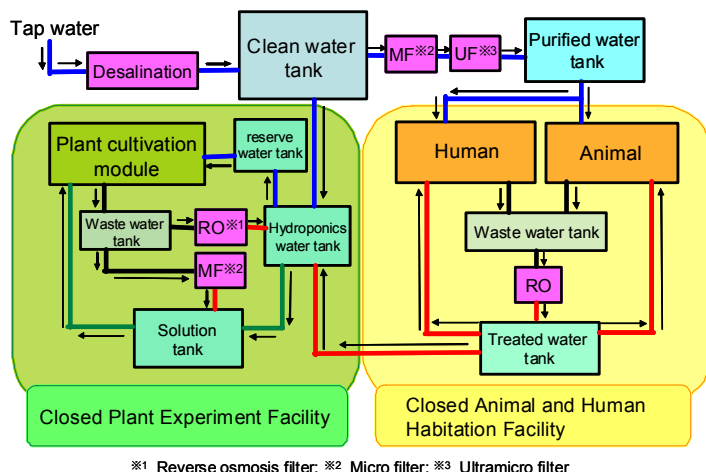


Fig. 1. Water flow in the Closed Ecology Experiment Facilities (CEEF). 12 samples in this system were collected and analyzed: Purified water in tank, Closed Animal and Human Habitation Facility, hydroponic solution in tank, Closed Plant Experiment Facility.

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

全細菌数の測定には4',6-diamidino-2-phenyl indole (DAPI)を用い、エステラーゼ活性を有する細菌数測定にはcarboxyfluorescein diacetate (CFDA)を用いた⁴⁾。試料中の細菌をポリカーボネートフィルター(孔径0.2 µm)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)を添加した後、6CFDA溶液(10 mg/ml DMSO溶液)およびDAPI溶液(10 µg/ml水溶液)をそれぞれ終濃度150 µg/ml, 1 µg/mlとなるように添加し、約3分間染色を行った。観察にあたっては、蛍光顕微鏡(E-400; ニコン)の青色励起光下でエステラーゼ活性を有する細菌を計数し、UV励起光下で全細菌を計数した。計数にあたっては、20視野を計数し、「細菌数の平均値が2以下」または「0の視野数が5視野以上」の場合に検出限界以下とした。

マイクロコロニー形成細菌数 (mCFU) の測定

試料中の細菌をポリカーボネートフィルター(孔径0.2 µm)上に捕集し、フィルターのろ過面を上にしてR2A培地上、25°Cで24時間静置した。その後4%ホルマリンを染みこませたろ紙上にフィルターを30分以上静置してフィルター上の細菌を固定した。SYBR Gold溶液(invitrogen社;原液を1,000倍希釈,2%[w/v] Tween 20を添加)を染みこませたろ紙の上に10分間静置し染色した後、無菌水を染みこませたろ紙上に約1分間静置してフィルターを洗浄し、蛍光顕微鏡を用いてマイクロコロニーを観察・計数した。観察にあたっては、蛍光顕微鏡(E-400)の青色励起光下で計数した。計数にあたっては、20視野を計数し、「マイクロコロニー数の平均値が2以

下」または「0の視野数が5視野以上」の場合に検出限界以下とした。

マイクロ流路システム

マイクロ流路デバイスは、polydimethylsiloxane (PDMS) およびスライドガラスで作製した。ソフトリソグラフィーにより、PDMS に微小流路を作製した⁵⁾。マイクロ流路デバイスのサイズは 50 mm × 25 mm となるように作製した。

細菌数測定にあたっては、蛍光染色剤と試料のそれぞれをマイクロシリンジ内に充填し、マイクロ流路デバイスとシリコンチューブでつないだ。シリンジポンプを用いてマイクロシリンジ内の蛍光染色剤および細菌試料をデバイスの微小流路に一定の速度で流し、デバイス上で細菌を染色した。蛍光顕微鏡にカラーCCDカメラをマウントし、青色励起光下で微小流路を流れる細菌の映像を、パーソナルコンピュータのハードディスクに記録した。記録した映像を独自に作成したプログラム(C++で作成)により解析し、一定時間内に流路内を流れる細菌数を測定した (Fig. 2)。

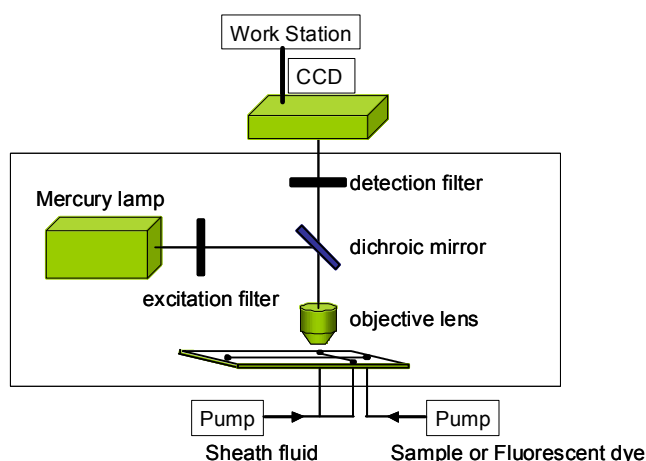


Fig. 2. Schematic representation of microfluidic system.

マイクロ流路システムの細菌数測定精度の確認にあたっては、大腸菌 O157:H7 ATCC43888 株を 10^4 から 10^6 cells/ml となるように無菌水で希釈し、微小流路内で DAPI 染色後、先述の計数システムを用いて細菌数を測定した。同じ細菌試料を DAPI で染色し、先述の方法により蛍光顕微鏡下で計数し、マイクロ流路システムで得られた結果と比較した。

さらに、飲用水 (浄水器を通した水道水) 中の細菌数についてもマイクロ流路システムで測定し、蛍光顕微鏡で得られた計数値と比較した。

核酸抽出・精製

試料 (*Aeromonas sobria*, *Alcaligenes faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*,

Staphylococcus epidermidis) から凍結融解法により DNA を抽出し、フェノール処理により精製した。

PCR

プライマーは 16S rRNA 遺伝子の *E. coli* ナンバリング 8~926 の領域を増幅するプライマーを用いた。なお、リバープライマーの 5'末端を Cy5 で蛍光標識した。DNA の増幅は、次のサイクルで行った: 94°C で 1 分, 65°C(*)で 1 分, 72°C で 3 分を 1 サイクルとし、これを 20 回繰り返した (*: 1 サイクル毎に 0.5°C ずつ温度を下げた)。その後 94°C で 1 分, 55°C で 1 分, 72°C で 3 分のサイクルを 10 回繰り返した。

制限酵素処理

PCR 産物に制限酵素を添加し、37°C で 2 時間半処理を行なった。これをマイクロチップ電気泳動装置、またはキャピラリー電気泳動装置で分析した。

細菌群集構造のプロファイリング

制限酵素処理後のサンプルにサイズマーカー (Lower Marker 100 bp, Upper Marker 600 bp) を混ぜて、マイクロチップ電気泳動装置で分析をした。

また、同じサンプルを CEQ Sample Loading Solution (Beckman Coulter) で 10~20 倍希釈し、サイズマーカーに希釈したサンプルを加えて CEQ 8000 (Beckman Coulter) で分析した。

3. 結果と考察

閉鎖居住空間における細菌数と生理活性

居住区において、全細菌数は 10^4 ~ 10^5 cells/ml であり、地下水などの清浄な水環境中の細菌数と同程度であった。また全細菌の約 40% がエステラーゼ活性または増殖活性を有していた。水耕栽培区における全細菌数は 10^5 ~ 10^6 cells/ml であり、居住区と比べ 10 倍高くなっていた。しかしながら、商業的に利用されている水耕栽培システムでは全細菌数が 5×10^6 cells/ml を超えることも頻繁にあることから、CEEF 内の水耕栽培システムでは細菌の顕著な増殖は起こっていなかったことがわかった。

CEEF における水耕栽培液は毎週交換されており、このような管理方法は、閉鎖型システムで使用する水の微生物管理方法として有効であると考えられる。

また閉鎖居住空間においては、細菌数の測定だけではなく、その生理活性についても評価し、システムの状態を評価することが重要であるとわかった。

PCR-DGGE 法により CEEF 内の水環境における細菌の優占種を確認したところ、 α -proteobacteria が普遍的に存在することがわかった。

マイクロ流路システム

大腸菌および飲用水試料について、マイクロ流路

システムで得られた細菌数は、蛍光顕微鏡で求めた値の80~90%であった。したがって、今回作製した計数システムは、蛍光顕微鏡と同等の定量性を有していることがわかった (Fig. 3)。

本手法は蛍光染色した細菌をフィルター上に捕集することなく約15分間で計数可能である。すなわち、マイクロ流路デバイスを用いることにより、細菌を培養することなく、迅速にその計数ができる。またマイクロ流路デバイスは閉鎖系であるために、バイオハザードのリスクを軽減することができる。したがって、細菌数測定の前自動化に大きく寄与するものと考えられる。

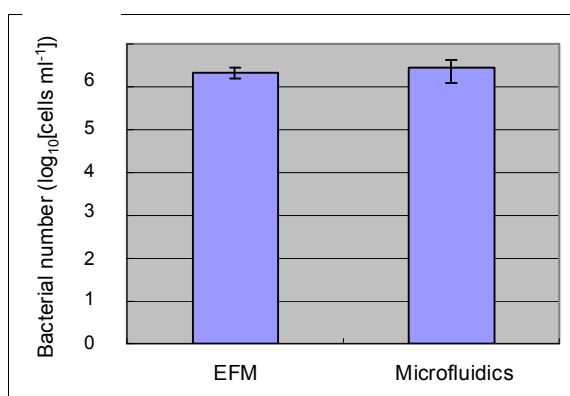


Fig. 3. Bacterial numbers in potable water determined by epifluorescence microscopy (EFM) and microfluidic system (Microfluidics).

マイクロチップ電気泳動装置を用いた細菌群集のプロファイリング

5種の標準菌株から得られたPCR産物をそれぞれ3種の制限酵素によって切断したサンプルをキャピラリー電気泳動装置およびマイクロチップ電気泳動装置で分析し、得られた結果を比較したところ、両者の値は近似していた (Table 1)。

T-RFLP プロファイルの分析にあたり、通常のキャピラリー電気泳動装置では数十分を要したが、マイクロチップ電気泳動装置を用いることにより15分以内に短縮できた。また分析精度は既存の方法とほぼ同等であった。したがって本手法を用いることにより、水環境中の細菌群集の迅速かつ簡便なプロファイリングが可能になるものと考えられる。

4. 結論

蛍光活性染色法により、閉鎖居住空間における細菌の現存量や生理状態の変化を数時間内に知ることができ、これらの情報をもとに的確な対策ができるようになる。したがって、蛍光活性染色法は閉鎖居住システムの衛生微生物学的に安全な運用のために有用であると考えられる。

またマイクロ流路デバイスを用いることにより、

細菌数を自動かつ、より安全に測定できることがわかった。さらに、マイクロチップ電気泳動装置を用いることにより、細菌群集構造の変化を迅速に知ることができた。

したがって、これらの方法を用いることにより、閉鎖居住空間内における水の衛生微生物学的な安全性の評価を、迅速かつ高精度に行うことが可能となると考えられる。

Table 1. Similarity of fragment sizes of bacterial DNAs measured by capillary electrophoresis and microchip electrophoresis.

Strains	Measured fragment size (bp)	
	Capillary	Microchip
<i>Alcaligenes faecalis</i> / Hha I	65	72
<i>Pseudomonas fluorescens</i> / Hha I	65	72
<i>Aeromonas sobria</i> / Msp I	66	74
<i>Escherichia coli</i> / Msp I	67	74
<i>Staphylococcus epidermidis</i> / Mbo I	151	155
<i>Aeromonas sobria</i> / Mbo I	222	228
<i>Escherichia coli</i> / Mbo I	222	216
<i>Pseudomonas fluorescens</i> / Msp I	313	313
<i>Escherichia coli</i> / Hha I	347	343
<i>Aeromonas sobria</i> / Hha I	348	350
<i>Alcaligenes faecalis</i> / Msp I	421	452

5. 謝辞

本研究は (財) 日本宇宙フォーラムが推進している「宇宙環境利用に関する地上研究公募」プロジェクトの受託研究として行ったものである。CEEFは青森県からの委託事業として運用された。

6. 参考文献

- 1) 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)
- 2) 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ル. KEY LAB, 大阪, 2006.
- 3) 馬場貴志, 山口進康, 篠原正典, 多胡靖宏, 那須正夫: 閉鎖型生態系実験施設 (CEEF) の水環境中における細菌の動態. 生態工学会誌, 20: 11-17 (2008)
- 4) Yamaguchi N., Kenzaka T., Nasu M.: Rapid in situ enumeration of physiologically active bacteria in river waters using fluorescent probes. Microb. Environ., 12: 1-8 (1997)
- 5) Yamaguchi, N., Sakamoto C., Yamada M., Nagase H., Seki M, Nasu M.: Rapid quantification of bacterial cells in potable water using a simplified microfluidic device. J. Microbiol. Methods, 68: 643-647 (2007)