

ISS・きぼう利用ミッション

「国際宇宙ステーション内における微生物動態に関する研究 (Microbe)」

研究成果報告書

代表研究者: 榎村 浩一 (帝京大学)、那須 正夫 (大阪大学)

平成 29 年 2 月

目次

1. 緒言	2
2. 研究計画	2
2.1 研究目標	2
2.2 体制	3
2.3 スケジュール	4
3. 実験準備・運用	5
4. 実験結果および成果	6
4.1 真菌	6
4.2 細菌	17
5. 結語	27
成果リスト	
1. 学術論文・総説	29
2. 出版	30
3. 学会発表	30
4. 取材・報道などパブリシティ	39

1. 緒言

微生物はあらゆる環境に生息している。宇宙居住においても例外ではない。そこでは、微生物の生態系が地上とは異なる可能性のあることから、ヒトと微生物との関係や微生物が材料などの性質にどのような影響を及ぼすのかを明らかにする必要がある。本研究の目的は、「きぼう」船内の真菌・細菌を、独自の視点からモニタリングし、環境微生物学的に評価することにある。そのため、新たなサンプリング法を開発するとともに、最新の方法を用いて解析する。得られた成果は、「きぼう」船内の微生物学的な環境管理に役立つものと期待されている。さらには、長期滞在が必要になる有人の月面基地や火星探査などにも重要な情報を提供する。

各宇宙機関においては、今後の有人惑星探査をふまえて、ISS 環境中の微生物に関する研究が推進されている。たとえば NASA においては、ISS に存在する微生物の全体像理解を目的に「Microbial Observatory」計画が進められている。本研究では、当研究グループがこれまでに開発してきた手法を用いて、ISS「きぼう」内の微生物を高精度にモニタリングすることにより、宇宙ステーションの微生物管理に役立つ基盤的知見を集積する。さらに、宇宙ステーションでの滞在・居住における衛生微生物学的な安全・安心を保証するための微生物モニタリング法を提案し、宇宙ステーション内の搭乗者や機器等に対する微生物の影響を最小限にとどめることを目的とする。

今回の研究により、ISS「きぼう」における微生物の動態が明らかになり、これらの成果をもとに NASA や ESA、ESA 等の各国宇宙機関と積極的な情報交換を行うことで、統合的な考察が可能となり、宇宙居住環境の「安全」、「アラート」、「アクション」の各レベルの衛生微生物学的な判断を的確に行うことが可能となる。これにより、宇宙ステーションの安全な運用や超長期宇宙居住を支援する宇宙研究の推進が可能となる。

2. 研究計画

2.1 研究目標

当研究課題では、最終的な Microbe-III 実施時期に表 1 のサクセスクライテリアを設定した。

表 1. Microbe サクセスクライテリア

サクセス	クライテリア
Minimum success	従来の手法で採取した試料に加え、空気中および水中に浮遊する菌を採取し回収された試料が、研究者らが研究開発してきた手法で解析できた場合。
Full success	培養、または培養に依存しない新規の環境微生物学的手法を活用し、真菌・細菌等微生物の現存量測定や同定、群集構造解析ができ、Microbe-I/II からの経時的変化が解析できること。 さらに、Particle Counter と Air Sampler については、データの相関関係が明らかにできること。
Extra success	上記の解析手法により得られた結果が、新規の発見等に繋がるものであった場合。

Minimum success は「従来の手法で採取した試料に加え、空気中および水中に浮遊する菌を採取し回収された試料が、研究者らが研究開発してきた手法で解析する」である。真菌では、従来用いられてきた培養法により、機器表面の生存真菌を軌道上において発育させることによって、検出する。細菌では、NASA を始め、一般的に使用されているスワブ法での試料採取に加え、新規に開発した粘着集菌シートを使用した試料採取を行い、試料の解析を行う。Full success は「培養、また

は培養に依存しない新規の環境微生物学的手法を活用し、真菌・細菌等微生物の現存量測定や同定、群集構造解析ができ、Microbe-I/II からの経時的変化が解析できること。」である。真菌においては、軌道上において培養検出された真菌を画像ダウンリンクによって確認する。また、回収された菌株を形態学的・分子生物学的に同定することによって、「きぼう」船内における真菌叢の経時変化を明らかにする。併せて、培養検体採取部位に近接した箇所から採取したスワブ検体に対して、PCR-clone 解析を行なうことによって、培養法との比較検討を行なう。さらに、真菌は空気環境を汚染する傾向が高いことから、エアサンプラーによる真菌検出結果(集落形成単位)とパーティクルカウンター計測値との比較を行なう。細菌では、採取した試料から培養を経ずに抽出した DNA をもとに、定量的 PCR 法による細菌の現存量測定、また、新規の環境微生物学的手法である次世代シーケンサーを使用したアンブリコンシーケンスにより、群集構造を解析する。また、2009 年から 2012 年までのサンプルで同様の解析を行うことで、経時的変化を追うことができる。

2.2 体制

Microbe の研究チーム体制を表 2 に、JAXA の支援体制を表 3 に記載した。

表 2. Microbe の研究チーム体制

	氏名	所属 ^(注)	研究分担
代表研究者	榎村 浩一	帝京大学	真菌(研究全般)
	那須 正夫	大阪大学	細菌(研究全般)
共同研究者	佐藤 一朗	帝京大学	真菌
	月井 雄二	法政大学	真菌
	杉田 隆	明治薬科大学	真菌
	高鳥 浩介	日本獣医生命科学大学	真菌
	辨野 義己	理化学研究所	真菌
	山口 進康	大阪大学	細菌
	馬場 貴志	大阪大学	細菌
研究コーディネーター	泉 龍太郎	日本原子力研究開発機構	コーディネーター
	高橋 雄一	JAXA	コーディネーター
	谷垣 文章	JAXA	コーディネーター
	飛田 将光	JAXA	コーディネーター
	山崎 丘	JAXA	コーディネーター

(注) 所属は当時

表 3. JAXA からの Microbe への支援体制

氏名	所属 ^(注)	分担
高橋 雄一	JAXA 宇宙環境利用センター	研究コーディネーター
谷垣 文章	JAXA 宇宙環境利用センター	研究コーディネーター
飛田 将光	JAXA 宇宙環境利用センター	研究コーディネーター
福井 啓二	日本宇宙フォーラム	研究コーディネーター
嶋津 徹	日本宇宙フォーラム	研究コーディネーター
山崎 丘	JAXA ISS 科学プロジェクト室	研究コーディネーター

(注) 所属は当時

PIからのJAXA支援体制への評価

微生物学においては真菌学、及び細菌学は密に連携しながらもそれぞれ独自に発展してきた。本研究課題では、それぞれの分野の専門家が、一つの大きな目標を掲げ、本分野の新たな時代を切り拓くことを目指している。微生物学の基盤は培養であり、また近年、分子生物学が発展していることから、それぞれの分野の専門家が連携して、本チームを構築した。宇宙微生物学においては、サンプリングが重要な意味を持ち、軌道上のサンプリングにあたってはJAXAの担当者に、宇宙微生物学研究の重要性を十二分に理解していただき、国際協力体制を構築しながら着実に実施することができた。またサンプリングサイトの決定にあたっては、これまでの軌道上での実験をもとに、的確な提案をいただき、大きな成果を上げることができた。一部サンプリングにおいて、当初計画より回収が遅れたことから、JAXA、日本宇宙フォーラムの担当者がJAXA内で調整し、追加サンプリングの機会を得ることができた。

2.3 スケジュール

本ミッションの採択から飛行後解析までのスケジュールを表4に示した。

表4. 採択から飛行後解析までのスケジュール

●:Microbe-I ○:Microbe-II △:Microbe-III ▼採択 実験要求書	2008年度	2009年度		2010年度		2011年度		2012年度
		上半期	下半期	上半期	下半期	上半期	下半期	上半期
ベースライン化		●	○ △					
供試体設計 フライト品製作		●		△	△			
		パーティクルカウンター搭載化						
適合性 ・安全性確認		●	○	△ 0/I/II	△ III			
運用要求検討・ 手順検討		●	○		△			
射場作業移行 審査		●		○	△			
輸送 ・軌道上実験		●		○		△		
軌道上実験後 解析			●		○		△	

Microbe	打ち上げ	回収
-I	2J/A 2009.8	17A 2009.9
-II	ULF4 2010.5	ULF6 2010.7
-III	HTV3 2011.7	CRS-2 2011.9

3. 実験準備・運用

Microbe 実験は 2008 年 2 月に採択され、軌道上でのサンプリングのみの Microbe-I、Microbe-II 実験と、パーティクルカウンター、エアサンプラーを加えた Microbe-III 実験に分けて順次実施した(表 5、図 1)。

Microbe-I 実験は JEM 打上直後の船内微生物環境をモニタリングする為に、できるだけ少ない打上物品・クルータイムで実施できる内容として、テーマ採択から 1 年程度でフェーズ移行して軌道上実験を半年後には実施できた。Microbe-II 実験ではサンプリングポイントを増やし、新たに PI が開発した粘着サンプリングシートを利用してサンプリングを行った。Microbe-II の実施と並行して空気中の微生物をモニタリングできるパーティクルカウンターの搭載化を進め、同時に NASA が搭載しているエアサンプラーの借用交渉を進め、Microbe-III で実施できた。パーティクルカウンターは市販品の改造(図 2A)、エアサンプラーは NASA 品を借用(図 2B)することで、開発コストを圧縮し、開発スケジュールを短くすることができた。エアサンプラーの使用にあたっては、NASA 開発の特殊なバッテリーを採用せず、民生品の単3乾電池を利用できるバッテリーホルダーを開発してコスト低減と運用性向上を図った(図 2C)。このバッテリーホルダーは、その後、NASA の要望により逆に貸すこととなり、Win-Win の国際協力事例となった。

軌道上運用では Microbe-II 実験の回収予定スペースシャトルが遅延したことから、再実施(Run2)することとなり、供試体製作と搭載準備など迅速に対応し、実験にインパクトの生じないようタイムリーに実験することができた。

表 5. ISS「きぼう」でのサンプリング実施スケジュール

	Microbe-I	Microbe-II Run1	Microbe-II Run2	Microbe-III
キット打ち上げ	29 Aug., 2009 (Discovery)	15 May, 2010 (Atlantis)	22 Jan., 2011 (HTV2)	21 Jul., 2012 (HTV3)
サンプリング実施日	5 Sep., 2009	29 Oct., 2010	27 Feb., 2011	16 Oct., 2012
担当宇宙飛行士	Frank de Winne	Shanonn Walker	Scott Kelly	Akihiko Hoshide
サンプル到着日	13 Sep., 2009 (Discovery)	14 May, 2011 (Endeavor)	9 Mar., 2011 (Discovery)	28 Oct., 2012 (Dragon SpX-1)

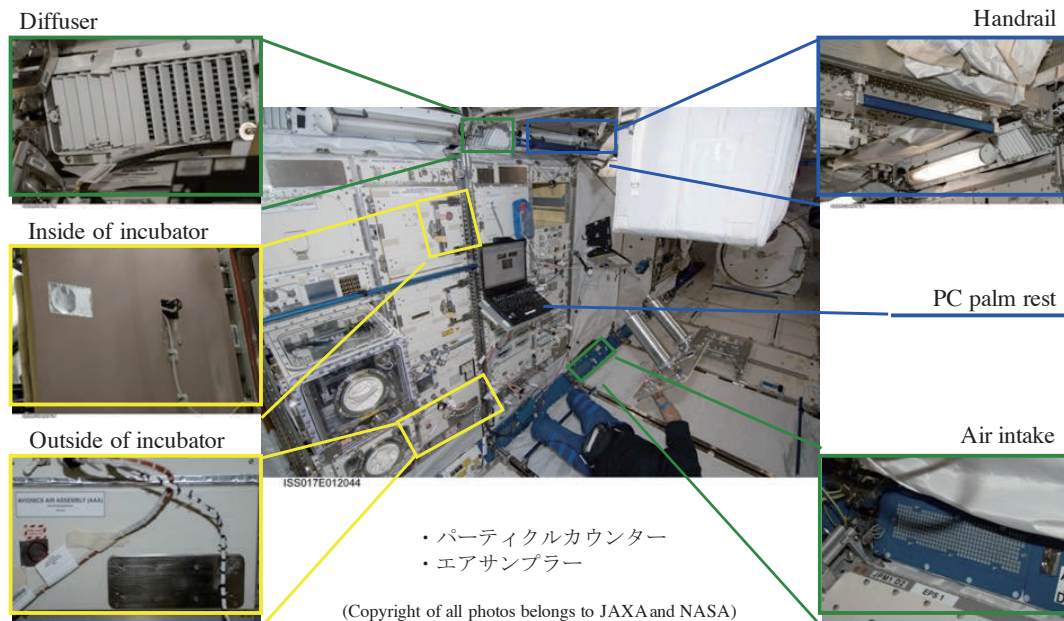


図 1. ISS「きぼう」でのサンプリング箇所 (Ichijo et al., npj microgravity, 2016 改)

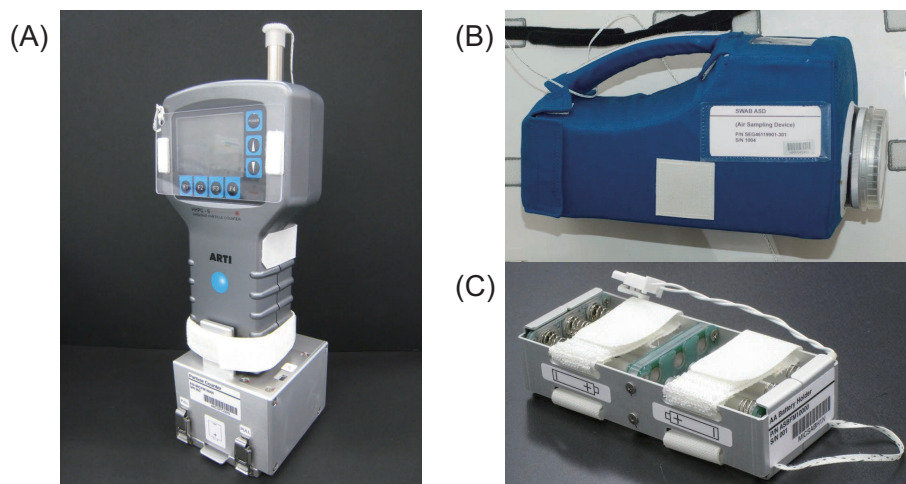


図 2. パーティクルカウンター、エアサンプラー. (A) 市販品を改造したパーティクルカウンター (写真提供: JAXA)、(B) エアサンプラー (写真提供: NASA)、(C) バッテリーホルダー (写真提供: JAXA)

4. 実験結果および成果

4.1 真菌

真菌に関しては、Microbe-I、II、および III にわたり、表面サンプリング解析として①Microbial Detection Sheet による培養発育試験、②スワブ検体抽出 DNA に対する clone 解析試験を行なうと共に、当初目標に含まれなかったが、ISS 内より地上に帰還した③機器 (MPC: Multi-Protocol Converter) 内の真菌叢を培養法ならびに clone 解析法によって検出・解析した。併せて、④CBEF 加湿器廃水試験を追加して実施した。また、Microbe-III においては、空気中の真菌叢を解析するために、⑤エアサンプラーおよびパーティクルカウンターを用いたサンプリングと解析を行なった。

4.1.1 Microbial Detection Sheet (MDS: サニ太くん) による培養発育試験

本試験では、ISS「きぼう」船内のサンプリング箇所からスタンプ法によって採取した表面菌叢を、軌道上において培養し、船内における培養画像の取得による菌叢発育の評価。確認を行なうと共に、地上回収サンプルの解析により、詳細な菌叢の解析を可能にした。

本試験における試料採取場所を表 6 に示した。

表 6. Microbe-I、II、III サンプリング箇所

	Microbe-I	Microbe-II	Microbe-III		Microbe-I ^a Ground control
Inside of incubator (Door)	NT ^b	✓	✓	Surface of facilities	✓
Diffuser (Fin)	✓	✓	✓	Door push plate	✓
Air intake (Grill)	NT	✓	✓	Lab bench	✓
Handrail	✓	✓	✓	Air conditioner	✓
Outside of incubator (Rack)	✓	✓	✓	swab (before use)	✓

^aSatoh *et al.*, 2011

^bNot Tested.

4.1.1.1 軌道上実験の結果・解説

Microbe-I 宇宙実験では、船内画像上 MDS に真菌の発育を認めず、また回収サンプルから如何なる真菌も発育をみとめなかった。Microbe-II 宇宙実験では、船内画像上各 MDS より合計 5 種 10 集落の真菌発育が確認された(図 3)。回収サンプルとして、これらを直ちに MDS のまま直接、走査電子顕微鏡にて観察した像を図 4~6 に示した。地上における各菌種の発育像と比較して明らかな相違は見いだせない。併せて分離培養した菌株を形態学的ならびに分子生物学的に同定した結果、各々 *Penicillium expansum*、*Aspergillus niger*、および *Rhodotorula minuta* であることが明らかとなった。また、これらに加えて *Penicillium* 属の 2 種も同定された。これらの解析によって、ISS 歴 460 日時点の Microbe-I ではいかなる菌も分離できなかった「きぼう」においても、1000 日時点となる Microbe-II では各種真菌の発育を許す環境となっていることが示された。また、併せて、本培養系が軌道上の真菌の検出・保存を可能にするものであることが実証された。

軌道上 1500 日程度を経過した Microbe-III 宇宙実験では、軌道上サンプリング・培養条件において各 MDS より合計 36 集落 4 種の真菌が発育し、船内画像によって確認された(図 7)。回収サンプル解析によって得られた菌種と集落数の推移を表 7 に示した。集落数の推移から真菌の発育量が増大していることが示唆される。また、この間分離された菌種には、日和見感染の原因となりうる *Aspergillus sydowii* や *Penicillium expansum*、敗血症を引き起こす *Rhodotorula mucilaginosa* や、アレルギーとなり、あるいはマイコトキシン産生菌となりうる *Eurotium* 属や *Penicillium* 属の各種が含まれることが明らかになった。

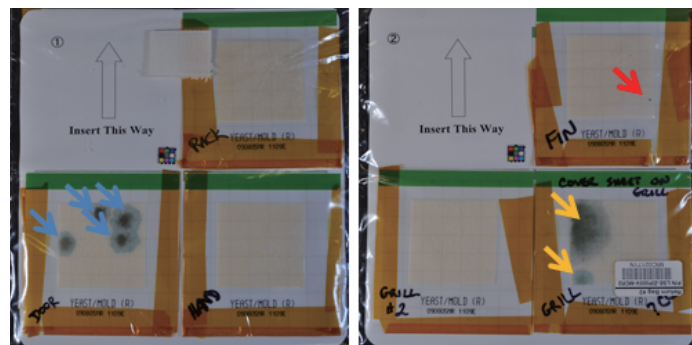


図 3. 軌道上サンプリング・培養によって Microbial Detection Sheet (サニ太くん) に発育を認めた真菌集落(船内画像:5 種 10 集落)

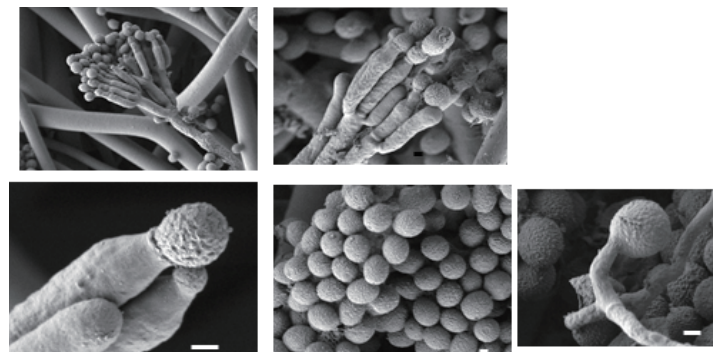


図 4. Returen Grill から分離培養された *Penicillium expansum* の走査電顕像

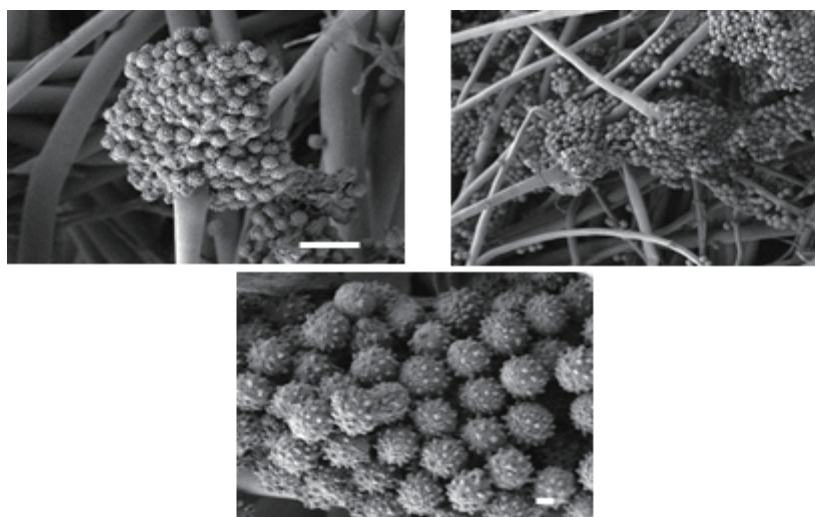


図 5. インキュベータ・ドア内側から分離培養された *Aspergillus sydowii* の走査電顕像

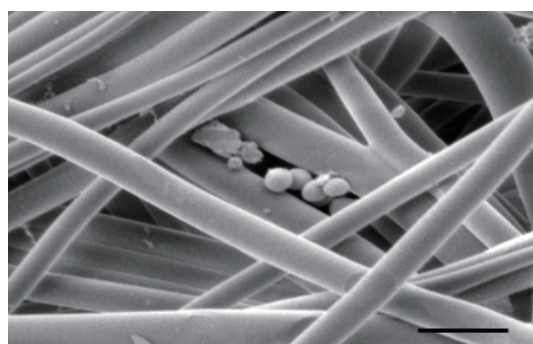


図 6. Air diffuser から分離培養された *Rhodotorula mucilaginosa* の走査電顕像



図 7. 軌道上サンプリング・培養によって Microbial Detection Sheet (サニ太くん) に発育を認めた真菌集落(船内画像:4種 36株分離)

表 7. MDS 上で培養、分離された真菌のコロニー数

Mission (Year)	Pre (2007) ^a	I (2009)	II (2010-2011)	III (2012)
Colony #	0	0	10	36
Species #	0	0	5 ^b	4 ^c

^a「きぼう」射場(打ち上げ前)におけるサンプリング

^b*Aspergillus sydowii*、*Penicillium digitatum*、*Penicillium echinulatum*、*Penicillium expansum*、*Rhodotorula mucilaginosa*

^c*Eurotium herbariorum*、*Penicillium cavernicola*、*Penicillium corylophilum*、*Penicillium solitum*

4.1.2 スワブ検体抽出 DNA に対する clone 解析試験

本試験では、ISS「きぼう」船内のサンプリング箇所からスワブ法によって採取した表面菌叢を、PCR-clone 解析試験によって明らかにしたものである。

4.1.2.1 軌道上実験の結果・解説

Microbe-I~III サンプリング (7×7 cm² 表面) によって「4.1.1 Microbial Detection Sheet (MDS: サニ太くん) による培養発育試験」と同様のサンプリング箇所から回収されたスワブを 1 mL の 0.05% Tween 80 で 5 分間振盪し、サンプル懸濁液を得た。得られた懸濁液は 200 μL ずつに分注し、-80°C に保存した。200 μL の懸濁液から 30 μL の DNA 溶液を精製し、内 1 μL (0.33 cm² に相当) をリアルタイム PCR 解析の鋳型として用いた。サンプル中の真菌 DNA の種類は、全真菌を対象としたリアルタイム PCR 解析およびその産物のクローンライブラリー法により測定した。リアルタイム PCR の標的領域は核 rRNA 遺伝子の ITS1 領域とした。陽性コントロールは *Aspergillus niger* TIMM 0115 の標的領域を組み込んだプラスミドを用いた。

得られた真菌 DNA の多様性を図 8~10 に示した。打ち上げ前の「きぼう」はフロリダの湿潤な気候を反映した *Alternaria* 属、*Cladosporium* 属、*Cryptococcus* 属が優占する菌叢を示した。打ち上げ後およそ 460 日経過した Microbe-I ではヒトの皮膚常在真菌である *Malassezia* 属が優占種となっていた。地上の実験室において対照として採取した DNA ではヒトが普段触らない場所である Surface of facilities、Air conditioner において *Cladosporium* 属、*Inonotus* 属、*Penicillium* 属などの環境真菌が優占しており、ヒトが頻繁に触るドアの押し板では「きぼう」の環境と同様に *Malassezia* 属が優占していた。Lab bench は重力の影響を反映して、Surface of facilities より多くの真菌種が検出された(図 8)。

打ち上げからおおよそ 900~1000 日が経過した Microbe-II Run 2 では、Handrail でのみ *Malassezia* 属が優占しており、他の箇所では *Alternaria* 属、*Aspergillus* 属、*Rhodotorula* 属などの環境真菌が優占または独占していた(図 9)。

打ち上げからおおよそ 1500 日が経過した Microbe-III では、Door、Grill、Handrail、Rack の箇所から *Malassezia* 属が優占的に検出された。Fin では *Malassezia* 属が検出されたが、*Rhodotorula* 属が優占していた(図 10)。Microbe-II、III から Fin では *Rhodotorula* 属が定着していることが示唆された。Microbe-I に比べると II、III では *Malassezia* 属が優占ではあるものの、割合が低下し、環境真菌の割合が増加していた。これにより土壌などの真菌供給源から隔離された ISS「きぼう」の内部では、ヒトの鱗屑などを主な真菌供給源とする真菌叢が形成されていることが示唆された。

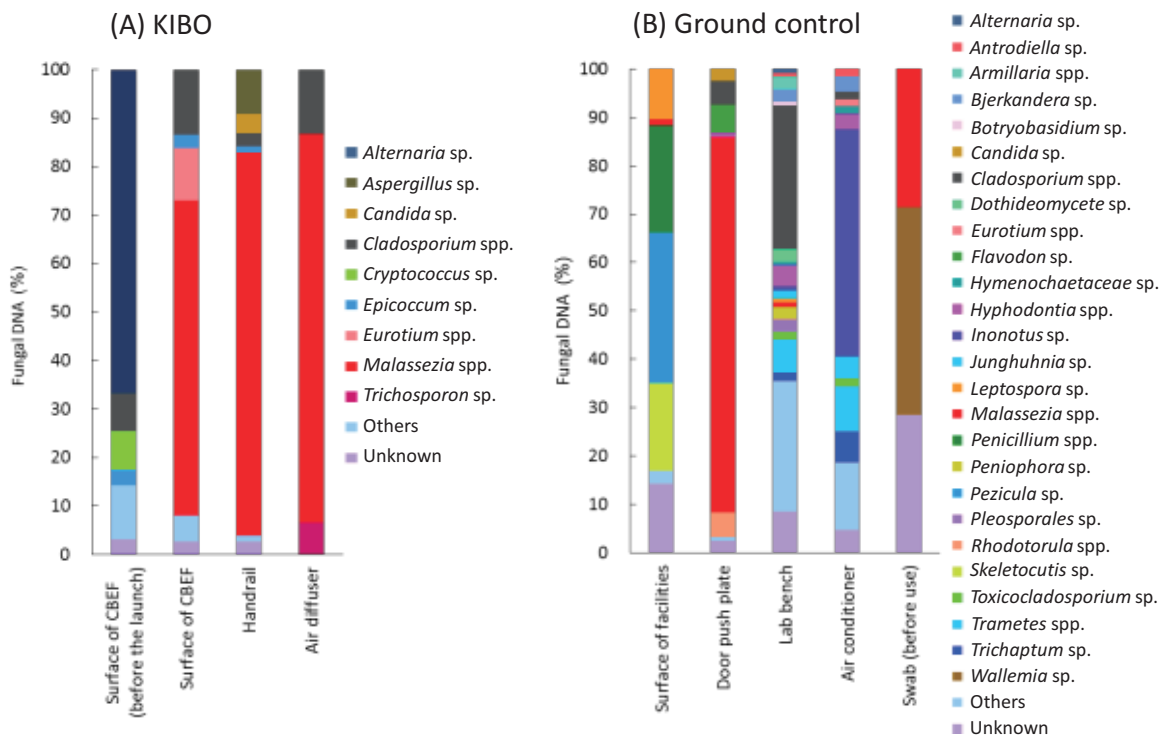


図 8. Microbe-I サンプルング箇所における真菌 DNA の多様性 (Satoh *et al.*, *Microbiol. Immunol.*, 2011 改)

検出された真菌には、*Alternaria* 属、*Aspergillus* 属、*Cladosporium* 属、*Malassezia* 属、*Penicillium* 属、*Rhodotorula* 属、*Trichosporon* 属などシックビルディング症候群の起因菌やアレルギーをはじめとする健康障害を起こすものが含まれていた。今後長期的なミッションを行うにあたり、クルーの健康や設備の維持管理のためにも継続的な微生物叢の解析が必要と考えられる。

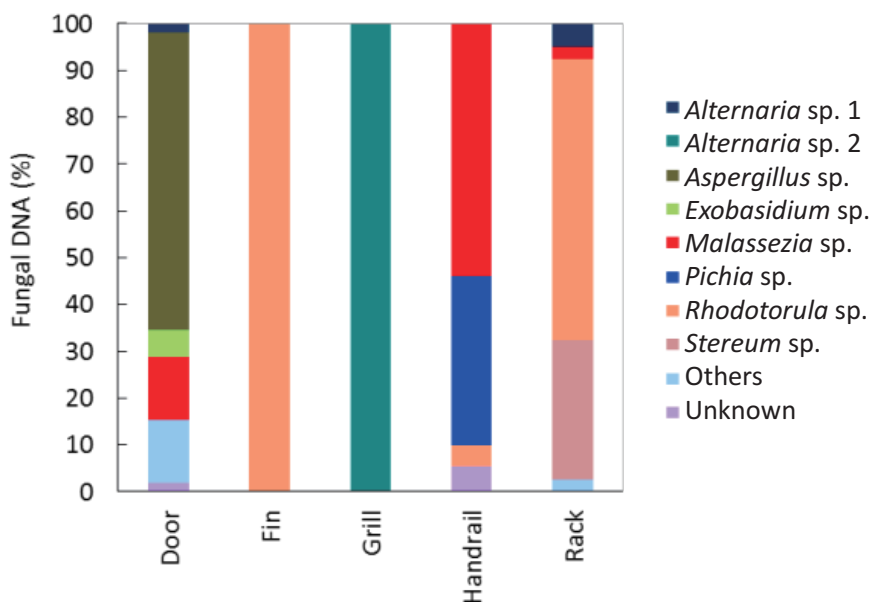


図 9. Microbe-II サンプルング箇所における真菌 DNA の多様性

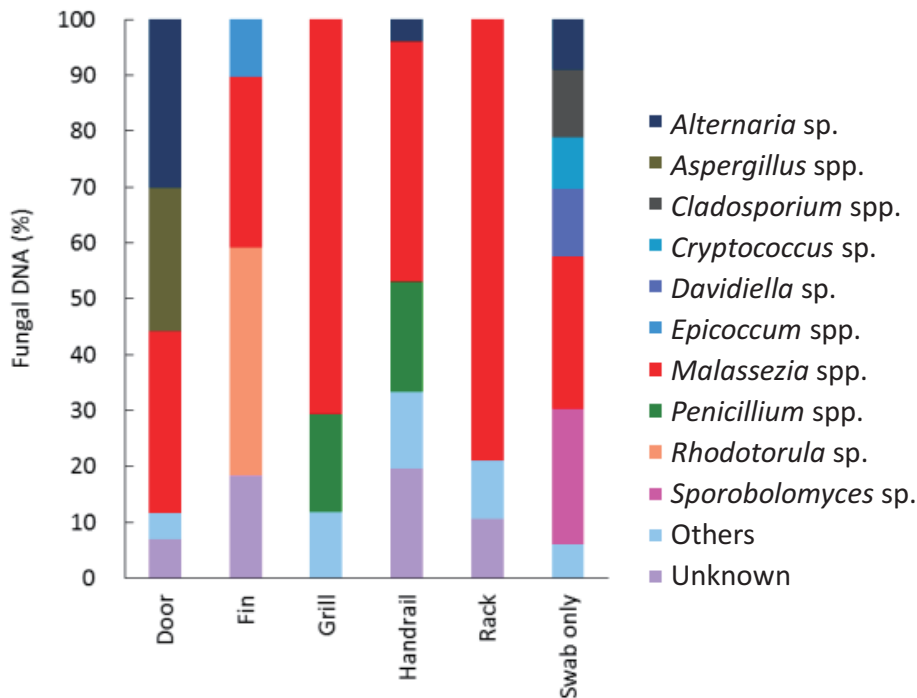


図 10. Microbe-III サンプルング箇所における真菌 DNA の多様性

4.1.3 地上帰還機器内の真菌叢解析

本試験は、軌道上の ISS「きぼう」より地上に帰還した機器 (MPC: Multi-Protocol Converter) 内の塵埃をスワブ法によって回収・懸濁した同一の検体を、各々培養法および PCR-clone 解析法によって解析したものである。MPC は菌叢解析を目的として製造・設置・運用されたものではないが、その冷却を目的としたファンを有しており、結果的に設置されていた船内空気環境を反映した塵埃を内包しているものと考えられることから、その菌叢を解析したものである。

4.1.3.1 軌道上実験の結果・解説

スワブ懸濁検体の培養結果では、表 8 に示す多彩な菌種の分離培養が得られた。これら菌種は Microbe-I, II, III の MDS 培養によって分離培養された菌種と一部重複するものの、より多菌種が得られた。本検討の結果より ISS 中に棲息する、より多くの感染症、アレルギー原因菌またはマイコトキシン産生菌の存在が明らかとなった。また、分離された菌株の抗真菌薬感受性測定試験結果 (表 9) によれば、これら菌株の感受性は地上における分離株と顕著な差を認めることはなく、微小重力環境においても地上同様の抗真菌薬による感染あるいは環境管理が可能となることが示唆された。

培養に用いた懸濁検体の一部を PCR-clone 解析に供した結果を図 11 に示す (方法は、「4.1.2 スワブ検体抽出 DNA に対する clone 解析試験」に準じた)。ここで、培養法によって得られた菌は 16 種、DNA として検出された菌は 8 種であり、その重複は 1 菌種 (*Aspergillus sydowii*) に限られていた。すなわち、Microbe-I, II, III サンプルングにみられた培養結果と PCR-clone 解析結果の間に認められた事と同様の検出菌種の乖離が、同一検体由来の懸濁液においても観察された。この現象は、真菌の PCR-clone 解析における DNA 抽出と増幅には限界がある事と、同解析による検出下限に相当する菌体量であっても発育が可能な有性胞子、または分生子、あるいはその他の栄養体としての在り方が環境においてあり得ることを示している。このことから、環境真菌叢を明らかにするためには、分子生物学的手法のみでは充分ではなく、培養法によってこれを補完する必要性が示唆された。

表 8. MPC から分離培養された真菌 (Sato *et al.*, *Microbiol. Immunol.*, 2016)

Launching date	Recovery date	Sampling date	Sampling site	ISS/Space shuttle	Equipment	Isolates (n)	Strain No.	DDBJ/EMBL/GenBank accession No. examples of 100% similarity (target)	Medical significance for humans
24 Oct 2007	12 Sep 2009	9 Nov 2009	TKSC	ISS	MPC 1	<i>Penicillium chrysogenum</i> (6)	958, 959, 960, 961, 962, 964	KT151602 (ITS), JF922035 (D1/D2), KT253242 (β-tubulin)	Central nervous system infection (24)
						<i>Aspergillus cibarius</i> (3)	963, 965, 966	FR848828 (ITS, D1/D2), KJ528497 (β-tubulin)	Unknown
24 Oct 2007	27 Nov 2009	10 Feb 2010	TKSC	ISS	MPC 2	0			
11 Ma, 2009	24 May 2009	7 Oct 2010	TKSC	Space Shuttle (STS-125, Atlantis)	MPC 3	<i>Penicillium chrysogenum</i> (1)	1253	KT151602 (ITS), JF922035 (D1/D2), KT253242 (β-tubulin)	Central nervous system infection (24)
						<i>Penicillium corylophilum</i> (1)	1256	AF034456 (ITS, D1/D2), KJ775120 (β-tubulin)	Non-atopic asthma and upper respiratory disease (25)
						<i>Alternaria tenuissima</i> (1)	1267	KP267518 (ITS), FJ755192 (D1/D2), KP276098 (Tma22), KP275923 (Pgs1), KP276005 (Rev3)	Multifocal cutaneous infection (26)
						<i>Cladosporium cladosporioides</i> (2)	1252, 1257	KP701913 (ITS1), KC585410 (D1/D2)	Phaeohyphomycosis (27)
ND	ND	7 Oct 2010	TKSC	ND (Used by NASA mission)	MPC 4	<i>Penicillium chrysogenum</i> (1)	1254	KT151602 (ITS), JF922035 (D1/D2), KT253242 (β-tubulin)	Central nervous system infection (24)
						<i>Penicillium corylophilum</i> (3)	1255, 1258, 1259	AF034456 (ITS, D1/D2), KJ775120 (β-tubulin)	Non-atopic asthma and upper respiratory disease (25)
						<i>Penicillium paxilli</i> (1)	1268	LC120832 (β-tubulin)(24), JN617687 (ITS), EU427293 (D1/D2)	Mycotoxin-producer (28)
						<i>Aspergillus penicilloides</i> (1)	1289	EF652036 (ITS, D1/D2), LC127195 (β-tubulin) [†]	Allergic rhinitis and rhinosinusitis (29)
						<i>Aspergillus sydowii</i> (1)	1261	LC105690 (ITS), AM883159 (D1/D2), KC795921 (β-tubulin)	Aspergillosis (30)
						<i>Cladosporium sphaerospermum</i> (1)	1265	KT151594 (ITS), KM458639 (D1/D2)	Hay fever (29)
continued									
ND	ND	10 Jul 2011	TKSC	ISS	T-CBEF	<i>Toxicocladosporium irritans</i> (2)	1263, 1264	LN834443 (ITS), EU040243 (D1/D2)	Skin irritation (31)
						<i>Leptosphaerulina chartarum</i> (1)	1260	HQ607815 (ITS1), LC071452 (D1/D2) [†]	Unknown
						<i>Sordariomycetes</i> sp. (1) (34)	1266	LC120831 (ITS) [†] , LC071453 (D1/D2) [†]	Unknown
						<i>Penicillium chrysogenum</i> (1)	1495	KT151602 (ITS), JF922035 (D1/D2), KT253242 (β-tubulin)	Central nervous system infection (24)
15 May 2008	1 June 2011	20 Jan 2012	Meisei	ISS	Power Supply	<i>Penicillium daleae</i> (1)	1555	KM458834 (ITS), LC071454 (D1/D2) [†] , LC120833 (β-tubulin) [†]	Mycotoxin-producer (32)
						<i>Aspergillus sydowii</i> (3)	1493, 1554, 1575	LC105690 (ITS), AM883159 (D1/D2), KC795921 (β-tubulin)	Aspergillosis (30)
						<i>Cladosporium cladosporioides</i> (1)	1556	KP701913 (ITS1), KC585410 (D1/D2)	Phaeohyphomycosis (27)
						<i>Phaeophleospora hymenocallidicola</i> (2)	1583, 1589	KR476739 (ITS), LC071455 (D1/D2) [†]	Unknown
						<i>Paecilomyces variotii</i> (1)	1496	JQ796880 (ITS), FJ345354 (D1/D2)	Pneumonia (33)
						<i>Trametes elegans</i> (1)	1494	LC120834 (ITS) [†] , LN774884 (D1/D2)	Unknown
						<i>Sordariomycetes</i> sp. (1) (34)	1588	LC127196 (ITS) [†] , JQ761840 (D1/D2)	Unknown
						0			

STS; Space Transportation System, ND; no data, D1/D2; D1/D2 region of 28S ribosomal RNA gene.
[†]this study.

表 9. MPC から分離培養された真菌の抗真菌薬感受性試験結果
(Sato *et al.*, *Microbiol. Immunol.*, 2016)

Name	Strain No.	Habitat	MEC		MIC				
			Micafungin	Amphotericin B	Flucytosine	Fluconazole	Itraconazole	Voriconazole	Miconazole
<i>Penicillium chrysogenum</i>	958	MPC 1	<0.015	1	16	>64	0.25	0.25	1
Reference data (24)			ND	2	0.125	8	1	0.1	ND
<i>Penicillium corylophilum</i>	1255	MPC 4	<0.015	0.12	4	>64	0.06	0.12	0.06
<i>Penicillium daleae</i>	1555	T-CBEF	<0.015	1	2	>64	1	1	1
<i>Penicillium paxilli</i>	1268	MPC 4	<0.015	4	8	>64	2	>8	1
<i>Aspergillus cibarius</i>	966	MPC1	<0.015	0.25	4	4	0.06	0.12	0.25
<i>Aspergillus penicillioides</i>	1289	MPC 4	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG
<i>Aspergillus sydowii</i>	1261	MPC 4	<0.015	1	32	>64	0.25	0.12	4
Reference data (35)			ND	1	ND	ND	0.5	2	ND
Reference data (21)			ND	4	ND	>128	>128	ND	ND
<i>Cladosporium cladosporioides</i>	1252	MPC 3	0.25	2	8	64	0.5	2	1
Reference data (36)			ND	0.32	0.5	25.39	0.25	0.08	0.63
<i>Cladosporium silenes</i>	1556	T-CBEF	<0.015	0.5	1	>64	0.25	1	0.5
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	1265	MPC 4	<0.015	1	32	>64	>8	1	>16
<i>Toxicocladosporium irritans</i>	1263	MPC 4	0.12	0.25	0.25	16	0.03	0.5	0.12
<i>Phaeophleospora hymenocallidicola</i>	1583	T-CBEF	0.3	2	8	>64	1	0.25	8
<i>Alternaria tenuissima</i>	1267	MPC 3	0.12	1	>64	32	2	4	2
Reference data (37)			ND	1.54	256	58.6	0.7	ND	4
<i>Paecilomyces variotii</i>	1496	T-CBEF	<0.015	0.12	<0.12	>64	0.12	8	4
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	1260	MPC 4	0.03	0.12	2	32	2	0.5	0.25
<i>Trametes elegans</i>	1494	T-CBEF	8	0.06	>64	>64	0.25	0.25	2
<i>Sordariomycetes sp.</i>	1588	T-CBEF	0.003	0.5	32	>64	2	2	2
<i>Sordariomycetes sp.</i>	1266	MPC 4	NG	NG	NG	NG	NG	NG	NG

Concentration: μg/mL [AMPH-B; μg(titer)/mL]. MEC, minimum effective concentration; MIC, minimum inhibitory concentration; NG, negative growth in RPMI medium; ND, no data.

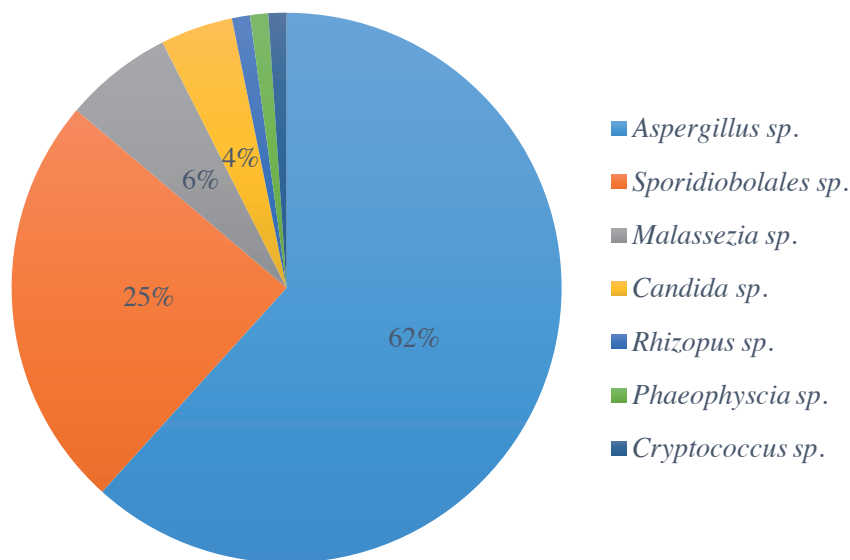


図 11. MPC 検体のクローン解析結果

4.1.4 CBEF 加湿器廃水試験

本試験は、ISS「きぼう」の CBEF 内に設置された加湿器内における菌叢を、培養法および PCR-clone 解析法によって解析したものである。加湿器水は船内において唯一常時存在する環境水であり、各種微生物発育の温床となりうることからその観察が必要と考えられた。

4.1.4.1 軌道上実験の結果・解説

加湿器の排水側水は十分な検体(水)が得られたことから、培養に供したところ、*Paecilomyces variotii* が純培養状に検出された。本菌は、環境真菌であるものの、日和見感染原因菌としても知られている真菌である。PCR-clone 解析には、注水側水および排水側水の各々を用いた。結果を図 12 に示す。何れの検体からも主に *Aspergillus* 属が得られたが、MPC 塵埃の解析結果同様、培養結果と一致する *Paecilomyces variotii* の DNA は検出し得なかった。

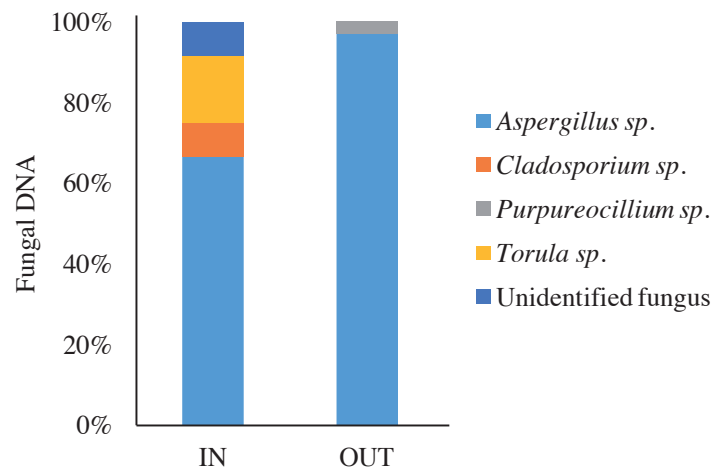


図 12. 加湿器注水側水 (IN) および排水側水 (OUT) の PCR-clone 解析結果

4.1.5 エアサンプラーおよびパーティクル・カウンターによる空気環境試験

本試験は、エアサンプラー (ASD: Air Sampling Device) によって回収される真菌叢とパーティクルカウンターによって計測される軌道上船内空気中の粒子量との関連を明らかにすると共に、将来的なモニタリングの手法としてパーティクルカウンターを用いた非培養系による空気環境評価の可能性を模索することを目的としたものである。

4.1.5.1 軌道上実験の結果・解説

4.1.5.1.1 エアサンプラーによる回収検体に対する培養および PCR-clone 解析

ASD によって得られたゼラチンフィルターサンプルは各々半分を培養試料、残りの半分を群集解析試料とした。DG18 培地で 28°C 1 ヶ月間の培養を行った結果、いずれのフィルターからも真菌の発育は認められなかったが、PCR-clone 解析では 10 サンプル中 9 サンプルにおいて真菌 DNA が検出された(図 13)。検出された真菌 DNA の中では、ヒトの皮膚常在菌である *Malassezia* 属が目立つが、それ以外の各種屋内環境真菌 DNA が得られている。地上におけるエアサンプラー解析結果と比較して、全体的に酵母の比率が高いように見える。これは、より小さく乾燥した分生子の飛散が多い 1G 環境に比して微少重量環境であることから、より湿度を有し、結果的に粒子径が大型になる酵母も船内空気環境中に飛散しやすいことに起因するものと考えられる。

4.1.5.1.2 パーティクルカウンターによる気中粒子の解析

軌道上よりダウンロードされたパーティクルカウンターの数値の検討を行った。パーティクルカウンターは、与圧部内に浮遊する微粒子を採取し、その粒径ごとに分けて計数する装置であり、大気中の微粒子の粒径とそれらの濃度をリアルタイムで測定することができる。図 14 は地上実験で得られた結果であり、フィルターにトラップされ培養された真菌数と、パーティクルカウンターの数値のとの相関を示すグラフである。培養陽性となるものは粒子径 2~10 μm の範囲に収まるものが多く、主要環境真菌である *Cladosporium* 属、*Penicillium* 属、*Aspergillus* 属の分生子の多くは、このサイズに合致する。

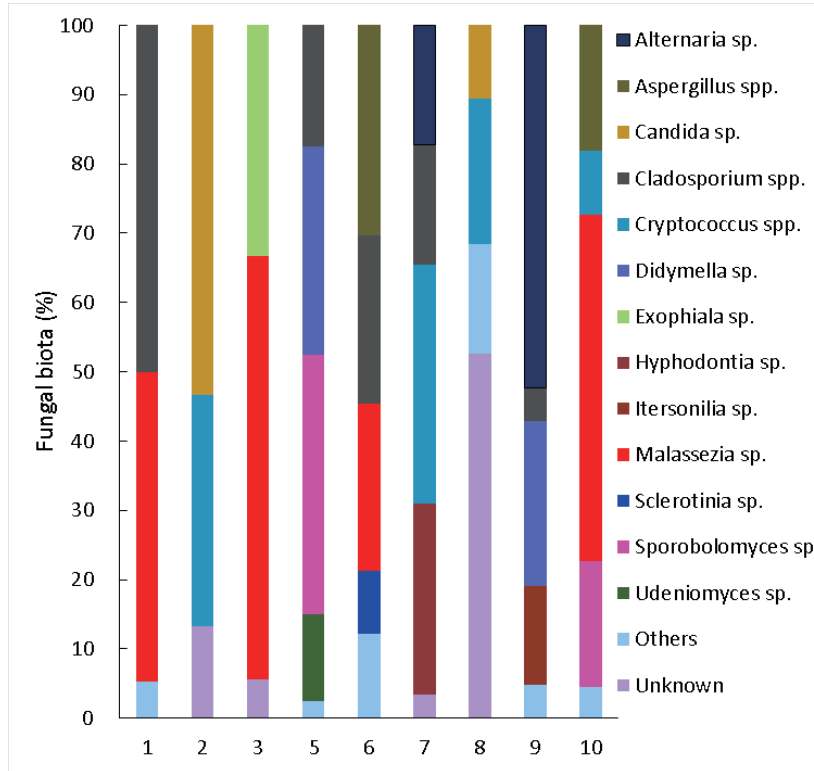


図 13. エアサンプラーによる回収検体に対する PCR-clone 解析結果

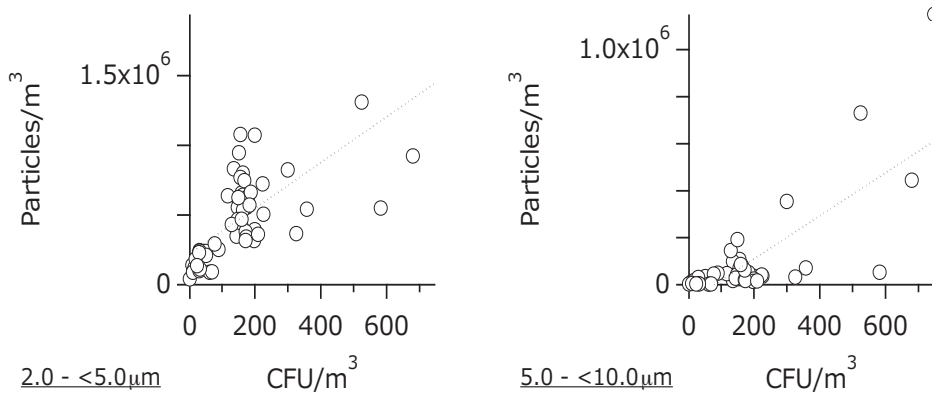


図 14. 1G 下粒子径および粒子数と真菌培養結果の相関

NASA やロシアの微生物モニタリング結果によれば、過去に ISS 与圧部内エアの微生物量は、ISS で定められた許容値(真菌 100 cfu/m³、細菌 1,000 cfu/m³)を度々超えたことがあると報告されている。各国の研究者で構成されている微生物ワーキンググループにおいても、「きぼう」内が同じようになる可能性があることが予てから議論されていた。しかしながらパーティクルカウンターの結果によれば、図 15 に示されるように運用後 1500 日時点の「きぼう」船内の空気中粒子数は少なく、表 10 に示されるとおり与圧部内のエアは、クラス 1,000 のクリーンルームの条件(0.5 μm 以上の粒子が基準)を満たす程度の、比較的高い清浄度が保たれていた。「きぼう」内の HEPA フィルターが効果的に機能していることが理由であると考えられる。

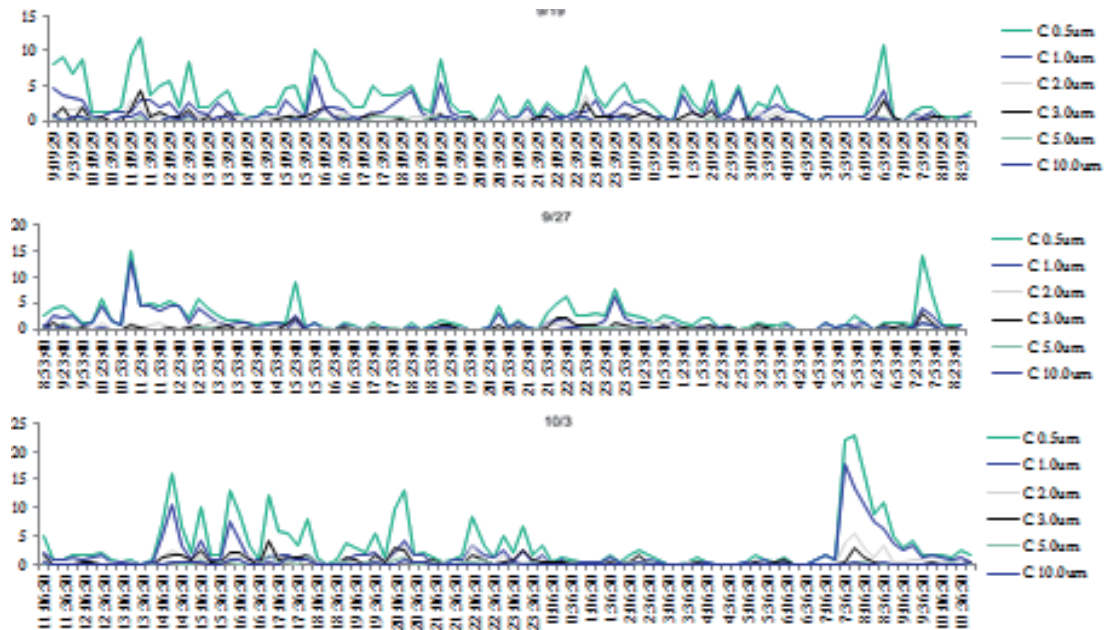


図 15. パーティクルカウンターにより計測した「きぼう」内の浮遊粉塵数 (2.832L 当たり)

表 10. Microbe-III におけるパーティクルカウンターによる微粒子計数結果

粒径(μm)	0.5 ≤	1.0 ≤	15 ≤
最大粒子数 (/m3)	23,000	11,000	6,700
平均粒子数	3,000	1,500	400

表 11. 空気清浄度の ISO 基準 14644-1 (JIS 準拠) *

クラス	最大空中塵埃数 / 立方メートル						米国209E 基準相当値
	≥0.1 μm	≥0.2 μm	≥0.3 μm	≥0.5 μm	≥1 μm	≥5 μm	
ISO 1	10	2.37	1.02	0.35	0.083	0.0029	
ISO 2	100	23.7	10.2	3.5	0.83	0.029	
ISO 3	1,000	237	102	35	8.3	0.29	クラス 1
ISO 4	10,000	2,370	1,020	352	83	2.9	クラス 10
BCR 基準 ISO 5	100,000	23,700	10,200	3,520	832	2.9	クラス 100
ISO 6	1.0 × 10 ⁶	237,000	102,000	35,200	8,320	293	クラス 1,000
ISO 7	1.0 × 10 ⁷	2.37 × 10 ⁶	1,020,000	352,000	83,200	2,930	クラス 10,000
ISO 8	1.0 × 10 ⁸	2.37 × 10 ⁷	1.02 × 10 ⁷	3,520,000	832,000	29,300	クラス 100,000
ISO 9	1.0 × 10 ⁹	2.37 × 10 ⁸	1.02 × 10 ⁸	35,200,000	8,320,000	293,000	室内クラス

* ISO 基準は粒径 0.1 μm 以上の粒子数で決定されるが、ここでは 0.5 μm 以上の粒子数測定結果を用い、従来の米国 209E 基準で議論する。

表 11 は、空気清浄度の ISO 基準を示したものである。最も高い清浄度が要求されるバイオクリーンルーム(BCR)は、0.5 μm 以上の粒子について米国 209E におけるクラス 100 (100 個/ft³) である。Microbe-III における結果によれば、粒子径 0.5 μm 以上の粒子については、クラス 1,000 を満たしている(35,200 個以下)。しかしながら、真菌の分生子などに相当する 5 μm 以上の粒子につ

いては、クラス 10 万と、2 ランク下の基準を満たすに留まっている(29,300 個以下)。これは、軌道上では大気中を浮遊する大粒子径の物質が排除されにくいことを意味しており、地上では重力の影響で地上に落下しやすい物質が軌道上では浮遊し続けるために、小粒子径の物質に比べると相対的に除去されにくい環境となっている事が示された。

また、上述の通りエアサンプラー回収フィルターの培養によって如何なる真菌の発育も認められなかった。この結果は現状において「きぼう」船内が清浄に保たれていることと関連した結果である。

4.1.6 まとめ

- (1) 軌道上において画像のダウンリンクによって真菌発育像を評価する事が可能となった。
- (2) 培養同定によって軌道上真菌叢の変遷を明らかに出来た。
- (3) 日和見感染原因菌、マイコトキシン産生菌、およびアレルゲンとなる真菌を船内表面、水、および空気から見出し、潜在的なヒト健康障害の可能性を示すことが出来た。
- (4) 環境真菌の検出上、培養法と PCR-clone 解析法は補完するべきものであり、可能な限り共に実施することが望ましいことを示した。
- (5) エアサンプラーによる培養結果とパーティクルカウンター計測値ともに船内空気環境の清浄性を共に示すことが出来た。
- (6) エアサンプラー検体の PCR-clone 解析により、空气中真菌叢を評価することが出来た。
- (7) パーティクルカウンター計測により、軌道上では大気中を浮遊する大粒子径の物質が小粒子径の物質に比べると相対的に除去されにくい環境となっている事が示された。

4.1.7 サクセスクライテリアに係る自己評価

(Minimum success)

従来の手法で採取した試料に加え、空气中および水中に浮遊する菌を採取し回収された試料が、研究者らが研究開発してきた手法で解析できた場合 ◎

(Full success)

培養、または培養に依存しない新規の環境微生物学的手法を活用し、真菌・細菌等微生物の現存量測定や同定、群集構造解析ができ、Microbe-I/II からの経時的変化が解析できること ◎

Particle Counter と Air Sampler については、データの相関関係が明らかにできること ◎

(Extra success)

上記の解析手法により得られた結果が、新規の発見等に繋がるもの ◎

4.1.8 国際的位置付け、関連分野および社会生活への波及効果

経時的に「きぼう」船内の表面・空気・水を含む総合的な微生物環境をモニタリングすることで、宇宙環境などの極限環境下に設置される居住システムにおける、衛生微生物学的な安全・安心の保証の実現、並びに微生物災害の防止につながる。しかし、係る観点から推進されている研究は本研究を除いて国際的に存在しない。また、地上への還元としては、微生物サンプリングの標準的手法確立に貢献することで、感染・アレルギー等の管理を要する医学的分野、微生物管理を必要とする分野はもとより、産業用超純水等の淡水の製造・利用、および空気環境の管理にかかわる幅広い分野における微生物モニタリングへの応用が可能となる。

4.2 細菌

4.2.1 Swab 法のプロトコールの決定

swab 法には複数のプロトコールがあり、拭取り方法が既定されていないため、サンプリング結果に個人差が生じやすい。そこで、ISS 内で swab 法により微生物サンプリングを行うにあたり、プロトコール

ルを最適化した。なお本研究においては、swab の繊維が傾向顕微鏡観察等の鍾愛になることを防ぐために、めんではなく、ポリエステル製の swab を用いた。

まず、ISS 内の細胞ラックで用いられている金属版上に 1.0×10^7 cells となるように、*Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* GTC00323 を塗抹した。次に① swab と被検面との接触面を変えずに縦・横・斜めに全面を拭う、② swab 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、③ swab 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、④ swab 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、⑤ swab 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、⑥ swab と被検面との接触面を一行毎に変えながら 1 cm 間隔で横・縦に往復で拭うの 6 手法を用いて金属板上から細菌を回収した (図 16)。回収した細菌をそれぞれ 10ml のろ過滅菌水中に懸濁し、核酸結合性蛍光染色剤 SYBR Green II を用いた蛍光染色法により、各方法での細菌回収率を測定した。

その結果、表 12 に示したとおり、②、③では細菌回収率がおよそ 50 ~ 60%であったのに対し、①、④、⑤、⑥では細菌回収率がおよそ 70%であった。①、④、⑤、⑥の細菌回収率の間には有意差は無かったことから ($P>0.05$)、操作が最も簡便である④を採用することと決定した。

次に、④のプロトコールにおける回収率の個人差を検討した。*L. lactis* subsp. *Lactis* GTC00323 を 1.0×10^7 cells となるように、ISS 内の細胞ラックで用いられている金属版上に塗抹した。この試料に対し、④のプロトコールを用いて 3 名がサンプリングを行い、細菌の回収率を比較した。その結果、3 名とも回収率は約 60 ~ 70%であり、有意差は見られなかった ($P>0.01$)。

さらに、菌種による回収率の差が無いかを確認した。*L. lactis* subsp. *Lactis* GTC00323 および ISS 内でこれまでに検出された細菌と同種の 3 株 (*Acinetobacter hwoffii* ATCC 15309, *Bacillus subtilis* 168, *Staphylococcus epidermidis* IFO 3762) を液体培養後、各々を 1.0×10^7 cells となるように、ISS 内の細胞ラックで用いられている金属版上に塗抹した。風乾後に swab 用いて各菌を回収し、核酸結合性蛍光染色剤 SYBR Green II を用いた蛍光染色法により、検出を行った。その結果、表 13 に示したように菌種による回収率の違いは見られず、グラム陽性菌、グラム陰性菌ともに十分に回収できることを確認した。

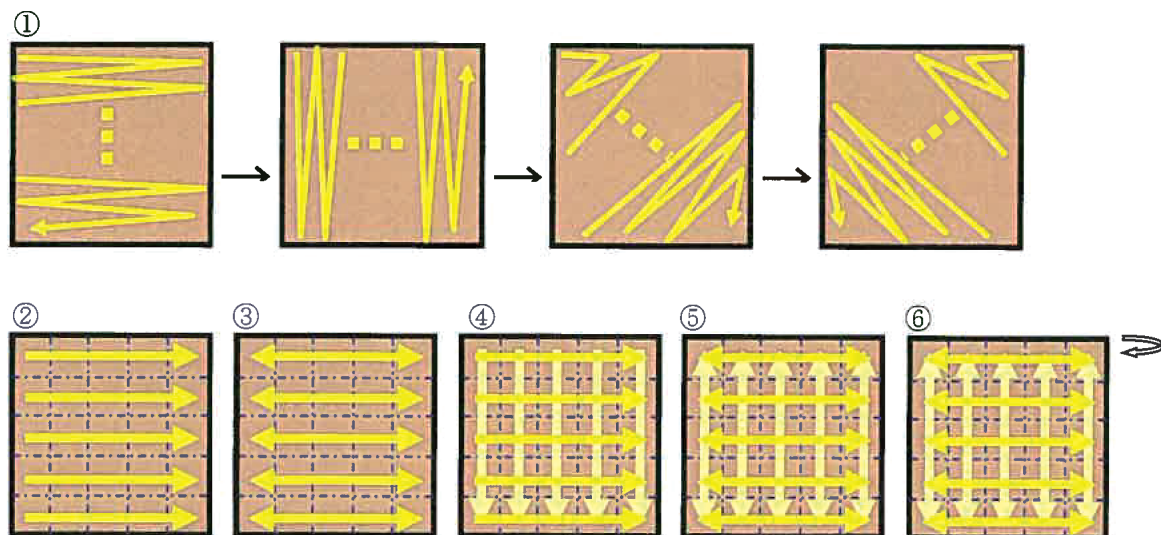


図 16. 検討したスワブの操作 (Yamaguchi *et al.*, *Eco-Engineering*, 2010)

表 12. 各スワブ法での細菌回収率 (Yamaguchi *et al.*, *Eco-Engineering*, 2010)

Swabbing	Number of recovered cells (cells)	Bacterial recovery rate (%)
①	$(7.1 \pm 1.3) \times 10^6$	71 ± 13
②	$(5.9 \pm 1.0) \times 10^6$	59 ± 10
③	$(5.0 \pm 1.0) \times 10^6$	50 ± 9.9
④	$(6.9 \pm 1.1) \times 10^6$	69 ± 11
⑤	$(7.2 \pm 1.5) \times 10^6$	72 ± 15
⑥	$(7.1 \pm 1.4) \times 10^6$	71 ± 14

n=10, * Mean±S.D

表 13. 細菌回収率の細菌種による違い (Yamaguchi *et al.*, *Eco-Engineering*, 2010)

Bacterial strain	Recovered cells (cells)	Bacterial recovery rate (%)
<i>L. lactis</i> *	$(6.9 \pm 1.1) \times 10^6$	69 ± 11
<i>A. lwoffii</i> **	$(7.3 \pm 2.0) \times 10^6$	73 ± 20
<i>B. subtilis</i> **	$(7.0 \pm 1.3) \times 10^6$	70 ± 13
<i>S. epidermidis</i> **	$(6.1 \pm 1.0) \times 10^6$	61 ± 10

*n=10 **n=11

4.2.2 粘着集菌シートの作製およびサンプリングプロトコルの決定

付着細菌のサンプリングには swab 法が一般的に用いられるが、サンプリング時の破損の恐れがあること、水を使用すること、曲面のサンプリングが難しいことなどの課題がある。そこで新規に粘着集菌シートを開発した。サンプリング後に粘着面を汚染しないようにするために、図 17 の様な形状とした。また、サンプリングプロトコルを決定した。

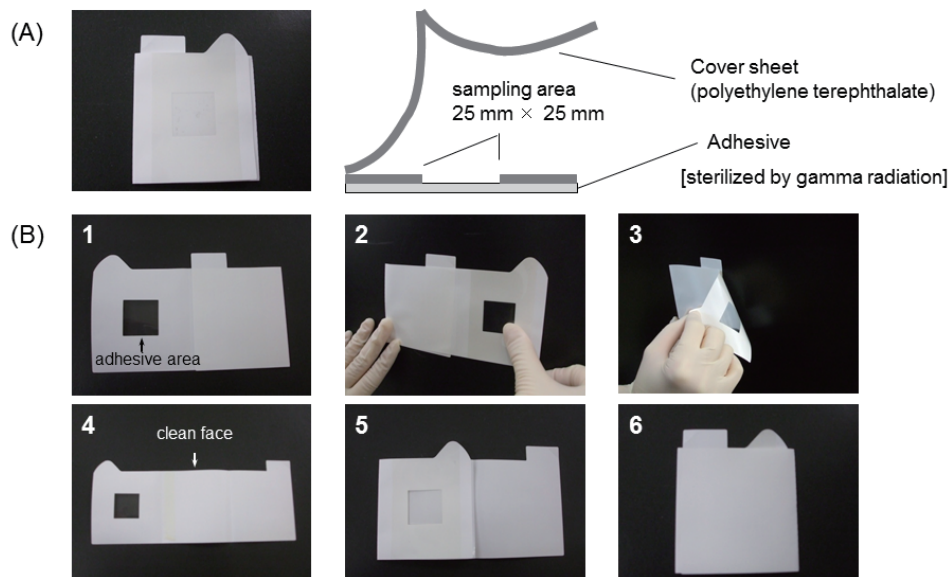


図 17. 新たに作製した粘着集菌シート及びサンプリングプロトコル (Ichijo *et al.*, *Microbes Environ.*, 2013)

シートの基材をポリエチレンテレフタレート(PET)とし、アクリル系の粘着テープを用いて作製した。シートの大きさは 7 cm × 8.5 cm、粘着面積を 25 mm × 25 mm とし、三つ折にすることで、サンプリン

グ後の粘着面の汚染を防ぐこととした。シートは個別に包装し、ガンマ線により滅菌した。

使用にあたっては、①シートの三角のタブがついている部分を開いた後、②粘着面を被検対象に押し付け、③圧着と剥離を3回繰り返す。④シートの四角のタブがついている部分を開き、⑤清浄面で粘着面を保護した後、⑥3つ折の状態 で保管することとした。

粘着集菌シート法による細菌の検出が可能かどうか確認するため、以下の検討を行った。ISS 内でこれまでに検出された細菌と同種の4株 (*Ac. Lwoffii* ATCC 15309, *B. subtilis* 168, *Pseudomonas putida* ATCC 12633, *S. epidermidis* IFO 3762) を液体培養した後に混合し、ISS 内の細胞ラックで用いられている金属板上に塗抹した。風乾後に粘着集菌シートを用いて細菌を回収し、核酸結合性蛍光染色剤 SYBR Green II を用いた蛍光染色法により、検出を行った(図 18A)。また、研究室内のロッカー表面の細菌を粘着集菌シートにより回収し、同様に蛍光染色し検出した結果を図 18B に示した。図中のバーは 10 μm を示す。その結果、粘着集菌シートを用いて、機器等の表面の細菌を明瞭に検出できることを確認した。

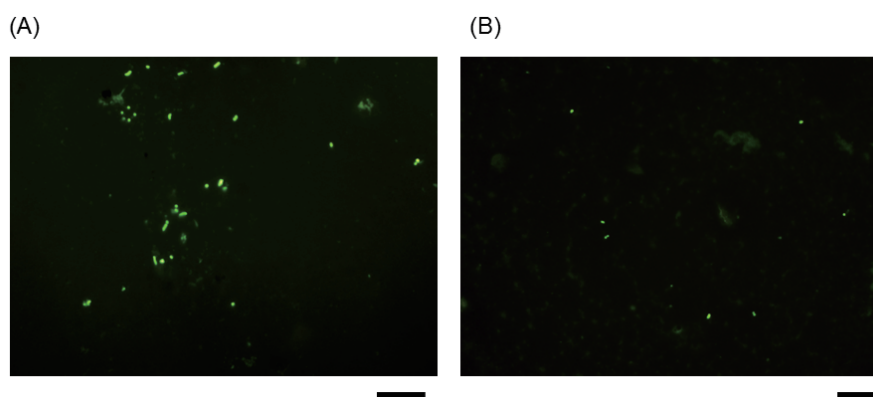


図 18. 粘着集菌シートで回収した細菌 (Ichijo *et al.*, *Microbes Environ.*, 2013)

次に、Swab 法と粘着集菌シート法の細菌回収率の比較を行うために、ISS 内でこれまでに検出された細菌と同種の4株 (*Ac. lwoffii*, *B. subtilis*, *P. putida*, *S. epidermidis*) を液体培養後、混合し、ISS 内の細胞ラックで用いられている金属板上に 1.0×10^7 cells となるように塗抹した(各細菌の量はそれぞれ 2.5×10^6 cells)。風乾後に swab および粘着集菌シートを用いて細菌を回収し、核酸結合性蛍光染色剤 SYBR Green II を用いた蛍光染色法により、細菌数を測定した。

その結果、swab 法での細菌回収率は $69 \pm 11\%$ であったのに対し、粘着集菌シートでは $78 \pm 12\%$ であり ($n=10$)、両方法の回収率に有意差は無いことがわかった ($P > 0.05$)。

ISS 内でのサンプル採取後、輸送船の状況により回収されるまで時間を要する可能性がある。このため、最後に冷凍保存が試料に及ぼす影響の確認を行った。ISS 内でこれまでに検出された細菌と同種の4株 (*Ac. lwoffii*, *B. subtilis*, *P. putida*, *S. epidermidis*) を液体培養後、混合し、ISS 内の細胞ラックで用いられている金属板上に 1.8×10^5 cells となるように塗抹した(各細菌の量はそれぞれ 4.5×10^4 cells)。風乾後に、粘着集菌シートで回収した。このシートを室温(約 20°C)、冷蔵庫(4°C)、冷凍庫(-80°C)で保存した。各温度での保存1ヶ月後、4ヶ月後、8ヶ月後、12ヶ月後に試料を取り出し、核酸結合性蛍光染色剤 SYBR Green II を用いた蛍光染色法により、粘着集菌シート上の細菌数を測定した。その結果、 -80°C で保存した場合は、細菌数が 12ヶ月変化しないことがわかった(図 19)。

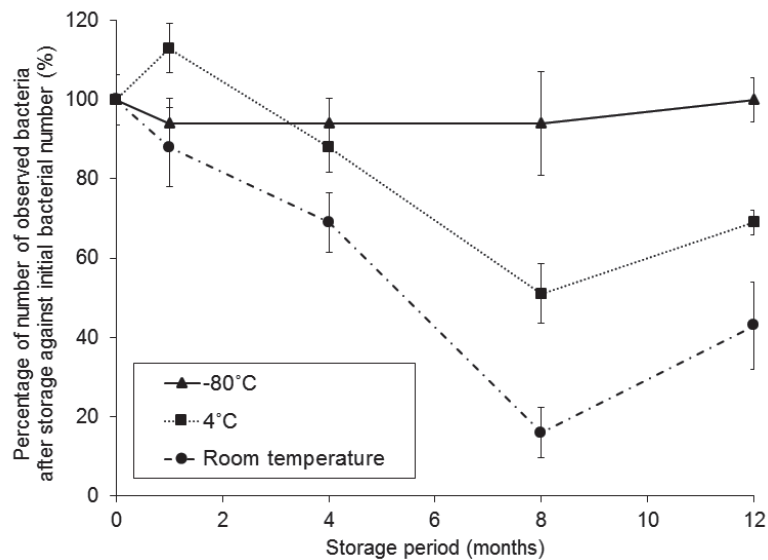


図 19. 長期保存にともなう細菌数の変化 (Ichijo *et al.*, *Microbes Environ.*, 2013)

4.2.3 Swab および粘着集菌シートからの細菌 DNA の回収法の決定

ISS 内でこれまでに検出された細菌と同種の4株 (*Ac. lwoffii*, *B. subtilis*, *P. putida*, *S. epidermidis*) を液体培養後、混合し、ISS 内の細胞ラックで用いられている金属板上に滴下した。風乾後に swab および粘着集菌シートで細菌を回収し、以下の各手法により DNA を抽出した。抽出した DNA 量を定量的 PCR により測定し、結果を比較した。定量的 PCR にあたり、プライマーセットはほぼ全ての属種の細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅可能な EUB f933、EUB r1387 を使用した。swab 試料からの細菌 DNA の回収法については、これまで環境試料中の細菌を対象とした DNA 抽出に一般的に用いている Tsai 法 (酵素処理 + 凍結融解法) および beads beating 法を比較した。その結果、菌量が少ない試料においては、Tsai 法の方が DNA 回収量が多かった。

粘着集菌シートからの細菌 DNA の回収法について、Tsai 法および DNA 抽出キット (FastDNA SPIN Kit for Soil; MP-Biomedicals 製) を比較した。その結果、Tsai 法では約 50% であったのに対し、DNA 抽出キットでは 80% 以上となった。

4.2.4 ISS「きぼう」における細菌現存量測定

4.2.4.1 材料と方法

サンプリング

サンプリングは、細胞培養ラック表面 (RACK)、細胞培養ラックのドア内側 (DOOR" D")、手すり (HANDRAIL)、エアコン送風部 (FIN)、エアコン吸気部 (GRILL" H") およびコンピューター・パームレスト (SSC15) で行った。運搬・保管・操作中の異常発生を確認するための negative control は、開封されないまま、回収した。また、地上保管品も negative control として測定に用いた。

サンプルの採取は、Microbe-I では 2009 年 9 月 5 日、Microbe-II Run 1 では 2010 年 10 月 29 日、Microbe-II Run 2 では 2011 年 2 月 27 日、Microbe-III では 2012 年 10 月 16 日に、各サンプリング法のトレーニングを受けた宇宙飛行士により行われた。

なお、Microbe-II Run 1 のサンプルについては、スペースシャトルの打ち上げの延期にともない、ISS 内の冷凍庫で保管後、2011 年 6 月 6 日に JAXA 筑波宇宙センターに到着した (保管期間: 約 7 ヶ月)。Microbe-I、Microbe-II Run 2 および Microbe-III の各試料の保管期間は 1 ヶ月未満であった。

平板培養法による細菌数測定

Swab サンプルについて、swab を 10 mL の particle free water (注射用蒸留水) 内で攪拌することにより、swab 面に回収した微生物を particle free water 中に懸濁させた。その 5 mL について、普通寒天培地 5 枚に 500 μ L ずつ、R2A 寒天培地 5 枚に 500 μ L ずつを塗抹した。普通寒天培地は 37°C で、R2A 寒天培地は 25°C でそれぞれ 1 週間培養し、培地上に生じたコロニー数を測定した。

蛍光染色法による細菌数測定

swab サンプルについては、上記②で得た細菌試料 10 mL のうちの 5 mL を孔径 0.2 μ m、ろ過面積 13 mm² のポリカーボネート・フィルター上に捕集した後、核酸結合性蛍光染色剤 SYBR Green II により染色し、蛍光顕微鏡下で細菌数を測定した。

粘着集菌シートについては、粘着面の中央 (5 mm 四方) を滅菌したカミソリで切り出した。粘着面のうち残りの部分は、下記④の DNA 抽出に使用した。核酸結合性蛍光染色剤 SYBR Green II を滴下し、細菌を染色したのち、蛍光顕微鏡下で細菌数を測定した。

なお、3 人の試験者が別々に各試料について 50 視野 (0.5 mm² に相当) を計数し、その平均値をもって細菌数を算出した。定量限界は swab 試料では 2×10^2 cells/cm²、粘着集菌シート試料では 2×10^4 cells/cm² であった。

定量的 PCR 法による細菌現存量の測定

swab サンプルについては、上記②で細菌計数に用いたフィルターから、Tsai 法により DNA を抽出した。

粘着集菌シートについては、粘着面を滅菌したカミソリで切り出し、FastDNA SPIN Kit for Soil を使用して、粘着面上の細菌の DNA を抽出した。

抽出した DNA に含まれる 16S rRNA 遺伝子量を定量的 PCR 法で測定し、細菌数を算出した。定量にあたり、プライマーセットは、ほぼ全ての属種の細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅可能な EUB f933、EUB r1387 を使用した。

4.2.4.2 結果

平板培養法による細菌数測定

Microbe-I においては、ラック表面サンプルから R2A 寒天培地で 3 個のコロニーを得たが、ハンドレール、エアコン送風部ではコロニー数は 0 であった。なお、分離したコロニーについて 16S rRNA の配列を解析した結果、*Acinetobacter* sp.、*Brevundimonas* sp.、*Paracoccus* sp. であった。

Microbe-II Run 2 においては、エアコン吸気部サンプルから普通寒天培地でコロニーを 1 個得たが、他のサンプルではコロニー数は 0 であった。なお、分離したコロニーについて 16S rRNA の配列を解析した結果、*Bacillus* sp. であった。

Microbe-III においては、エアコン吸気部サンプルから普通寒天培地でコロニーを 1 個得たが、他のサンプルではコロニー数は 0 であった。なお、分離したコロニーについて 16S rRNA の配列を解析した結果、*Brevibacillus* sp. であった。

これまでの報告により *Acinetobacter* 属、*Bacillus* 属および *Pseudomonas* 属などの細菌が ISS 内部より検出されていること、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 の他のモジュール内と同様に「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。

なお、いずれの試料においても、細菌数は平板培養法の定量限界以下であった。

細菌数測定

swab 法の各試料について、蛍光染色法により測定した細菌現存量、定量的 PCR 法により測定した細菌現存量をそれぞれ表 14 に示した。

表 14. 直接計数法により測定した細菌現存量 (Ichijo *et al.*, *npj Microgravity.*, 2016)

	Microbe-I		Microbe-II Run 2		Microbe-III	
	TDC	qPCR	TDC	qPCR	TDC	qPCR
Outside of incubator (Rack)	2×10 ³	4×10 ³	2×10 ³	<1×10 ²	2×10 ²	<1×10 ²
Diffuser (Fin)	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
Air intake (Grill)	NT	NT	<2×10 ²	1×10 ²	<2×10 ²	<1×10 ²
Inside of incubator (Door)	NT	NT	<2×10 ²	1×10 ²	<2×10 ²	<1×10 ²

Abbreviations: NT, not tested; qPCR, quantitative PCR; TDC, total direct counting

Unit: cells/cm²

4.2.4.3 考察

多くの地点で細菌現存量は地上の研究室内の機器表面の細菌数 (10⁵ cells/cm²) 以下であり、ISS「きぼう」は現状では微生物学的に適切に管理されている空間であると考えられる。しかしながら、エアコン吸気部では 10⁷ cells/cm² の細菌が検出されたこともあり、ISS における宇宙飛行士の長期滞在にとともなう、継続的なモニタリングの必要性が示された。

なお、Microbe-II Run 2 および Microbe-III では、定量限界付近または定量限界以下のデータが多かった。そこで、サンプリングの曜日を確認した。その結果、Microbe-I は土曜日、Microbe-II Run 1 は金曜日、Microbe-II Run 2 が日曜日、Microbe-III が月曜日のサンプリングであった。ISS「きぼう」においては、土曜日の午後に清掃（清拭）が行われることから、Microbe-II Run 2 および Microbe-III で細菌現存量が減少した理由として、清拭による被検面の細菌数の減少が考えられた。したがって、清掃直後ではなく清掃前にサンプリングを行うよう、サンプリングスケジュールを考える必要がある。

4.2.5 ISS「きぼう」における細菌群集構造解析

4.2.5.1 材料と方法

サンプリング

「4.2.4 ISS「きぼう」における細菌現存量測定」と同じ試料について、細菌群集構造解析を行った。
細菌群集構造解析

i) nested PCR-DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis; 変性剤濃度勾配ゲル電気泳動) 法

Microbe-II Run 1 の粘着集菌シート試料から抽出した DNA に対し、16S rRNA 遺伝子を標的とした nested PCR-DGGE を行った。すなわち、ほぼ全ての属種の細菌の 16S rRNA 遺伝子を増幅可能な 8f と 1492r のプライマーセットを用いた PCR により 16S rRNA 遺伝子のほぼ全長を増幅した後、EUB f933-GC clamp、EUB r1387 のプライマーセットを用いた PCR を行った。増幅産物を DGGE により分離し、DGGE ゲルから各バンドを切り出した後、シーケンス解析を行った。

ii) アンプリコンシーケンス法

Microbe-I、Microbe-II Run 2 および Microbe-III の各試料 (swab および粘着集菌シート) から抽出した DNA を鋳型として、ほぼ全ての属種の細菌の 16S rRNA 遺伝子 (V6 - V8 領域) を増幅可能な 968f、1401r プライマーを使用し PCR を行った。968f には Roche 454 用アダプター配列およびバーコード配列を、1401r にはアダプター配列を付加した。各試料から得られた増幅産物を混合した後、GS FLX+ (Roche) を用いて配列解析を行った。得られた配列は細菌群集構造解析パイプ

ライン Qiime 上で処理し、系統解析を行った。なお、各試料につき 7,500 reads 以上について、配列を解析した。

4.2.5.2 結果と考察

i) nested PCR-DGGE 法

Microbe-II Run 1 において粘着集菌シートで採取した試料について、nested PCR-DGGE 法により細菌群集構造解析を行った結果を図 20 に示した。

宇宙飛行士が頻繁に触れるパソコンや手すりの表面から、*Actinobacteria* や *Firmicutes* を中心に、多様な細菌が検出された。これらの検出された細菌はヒトの常在細菌であり、宇宙飛行士の接触により、体表面から各機器等の表面に移行したものと考えられた。

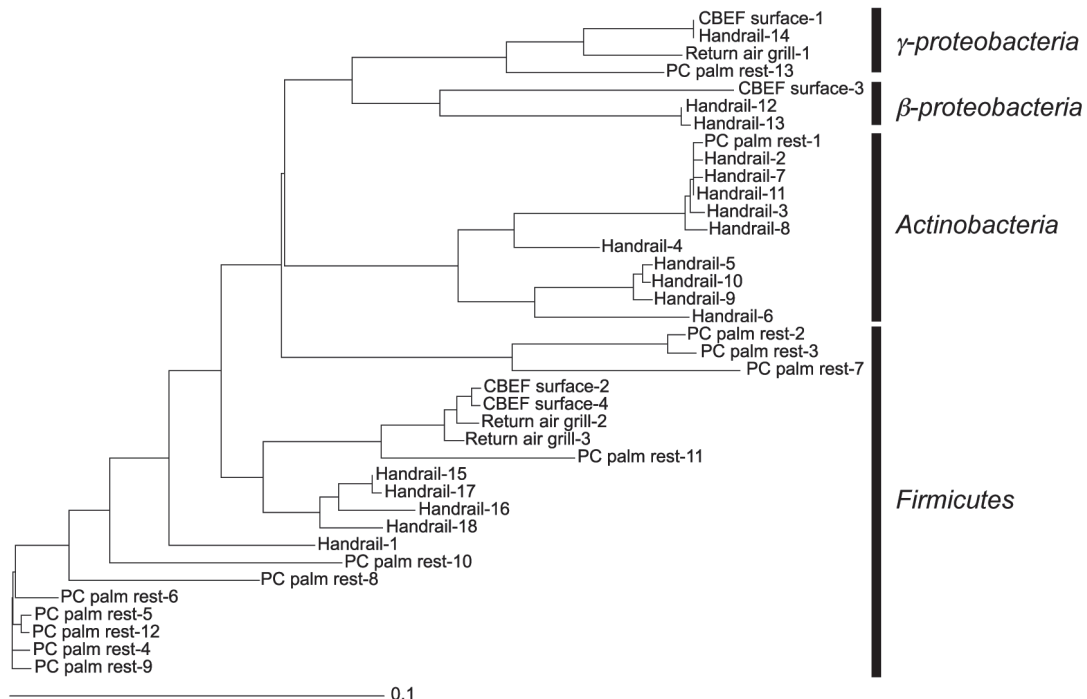


図 20. ISS「きぼう」に存在する細菌の系統学的関係 (Ichijo *et al.*, *Microbes Environ.*, 2012)

ii) アンプリコンシーケンス法

Microbe-I、Microbe-II Run 2 および Microbe-III の各試料について、アンプリコンシーケンス法により細菌群集構造を解析した結果を図 21 及び図 22 に示した。

nested-PCR DGGE の結果同様、*Firmicutes* を中心に、多様な細菌が検出された。*Firmicutes* においては、表皮ブドウ球菌が多く検出され、これは宇宙飛行士が頻繁に触れる手すりやパソコン・パームレストで顕著であったことから、宇宙飛行士の体表面から各機器等の表面に移行したものと考えられた。また、エアコンの吸気部でも *Firmicutes* の割合が多くなった。定量的 PCR の結果と合わせて、吸気部は微生物が集積されやすい場所であることがわかった。

なお、swab と粘着集菌シートでは得られた結果に差が認められ、これは DNA 抽出法の違いによるものと考えられた。前述のとおり、swab 法においては Tsai 法(酵素処理 + 凍結融解法)、粘着集菌シートは beads beating 法を用いたキットにより、DNA を抽出している。swab の結果では、粘着集菌シートの結果に比べてグラム陽性菌の割合が低かったことから、Tsai 法では細胞壁の強固なグラム陽性菌から DNA を抽出しにくかったのではないかと考えられた。

nested PCR-DGGE 法や clone library 法に比べて、アンプリコンシーケンス法ではより多くの情報を得ることができるため、ISS「きぼう」内の細菌群集構造解析に適していることを確認した。

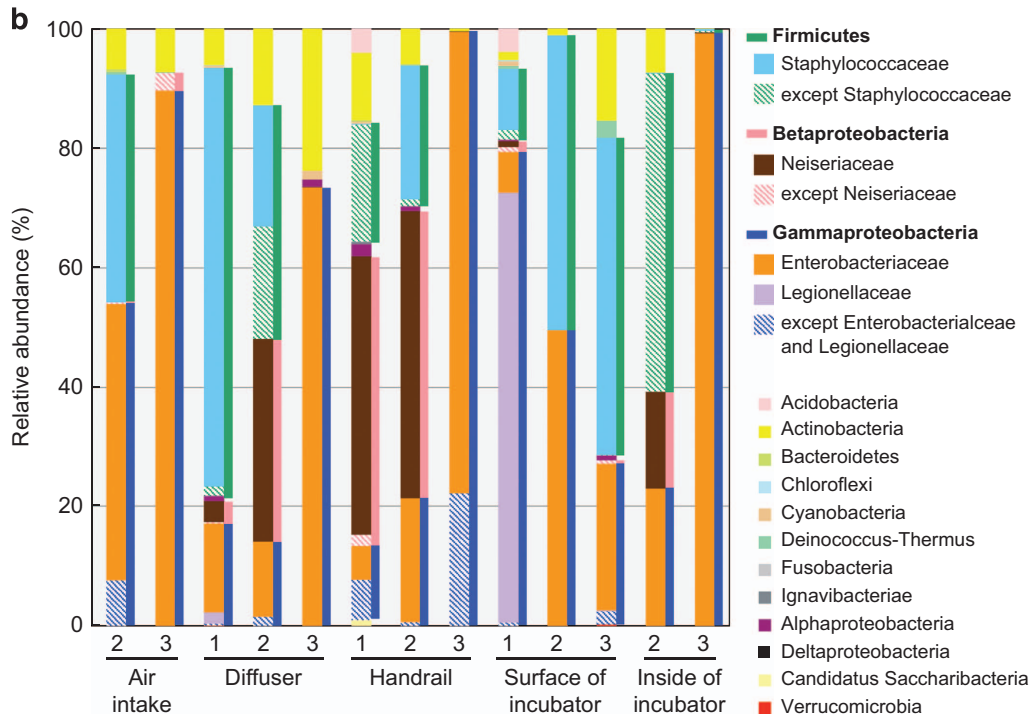


図 21. ISS「きぼう」内機器表面の細菌群集構造 (swab 試料; Ichijo *et al.*, *npj Microgravity.*, 2016)

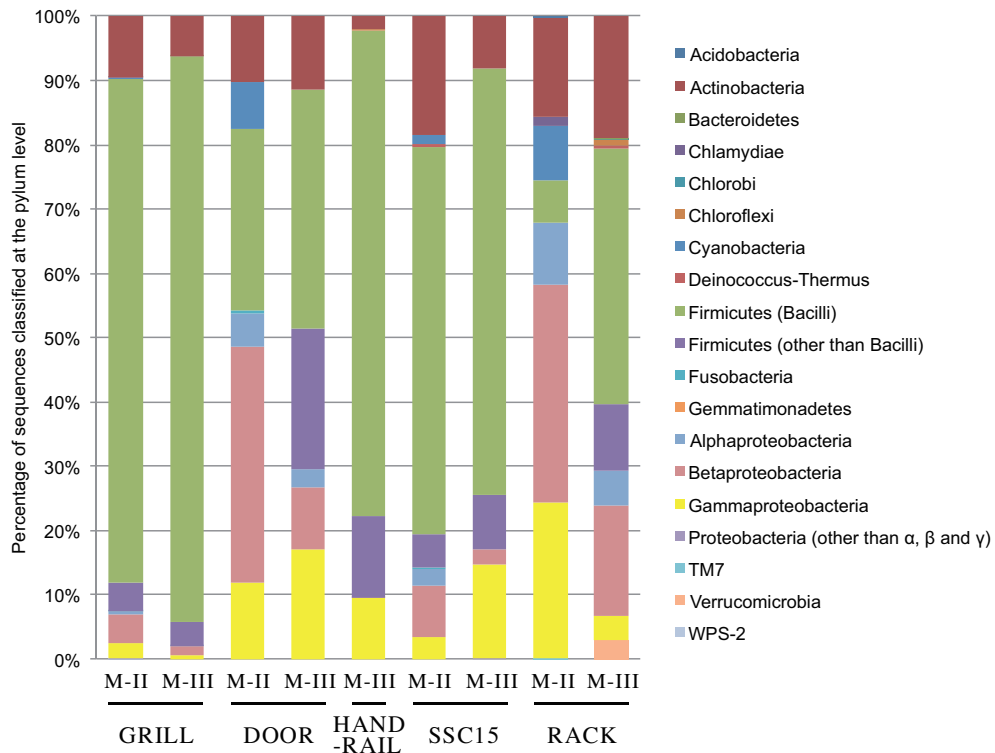


図 22. ISS「きぼう」内機器表面の細菌群集構造 (粘着集菌シート試料; Yamaguchi *et al.*, *ISTS 30th.*, 2015)

4.2.6 まとめ

- (1) ISS「きぼう」で微生物サンプリングを行うにあたり、swab 法のプロトコールを決定した。
- (2) ISS「きぼう」で微生物サンプリングを行うにあたり、新たなサンプリングデバイスとして、粘着集菌シートを作製し、そのプロトコールを決定した。
- (3) 細菌現存量の測定結果から、ISS「きぼう」は現状では微生物学的に適切に管理されている空間であると考えられる。しかしながら、エアコン吸気部では地上の一般的な室内環境を超える量の細菌が検出されたこともあり、ISS における宇宙飛行士の長期滞在にとまなう、継続的なモニタリングの必要性が示された。
- (4) 細菌群集構造の解析結果から、宇宙飛行士が頻繁に触れるパソコンや手すりの表面において、*Actinobacteria* や *Firmicutes* を中心に多様な細菌が検出された。これらの検出された細菌はヒトの常在細菌であり、宇宙飛行士の接触により、体表面から各機器等の表面に移行したものと考えられた。

4.2.7 サクセスクライテリアに係る自己評価

(Minimum success) 従来の手法で採取した試料に加え、空気中および水中に浮遊する菌を採取し回収された試料が、研究者らが研究開発してきた手法で解析できた ◎

(Full success) 培養、または培養に依存しない新規の環境微生物学的手法を活用し、真菌・細菌等微生物の現存量測定や同定、群集構造解析ができ、Microbe-I/II からの経時的変化が解析できること。 ◎

(Extra success) 上記の解析手法により得られた結果が、新規の発見等に繋がるものであった場合 ◎

4.2.8 国際的位置付け、関連分野および社会生活への波及効果

経時的に「きぼう」船内の表面・空気・水を含む総合的な微生物環境をモニタリングすることで、宇宙環境などの極限環境下に設置される居住システムにおける、衛生微生物学的な安全・安心の保証の実現につながる。本研究の塩基配列データは NASA GeneLab (<https://genelab.nasa.gov>) にすでに登録されており、各機関の研究者がアクセス可能である。また、NASA microbial Tiger team の基盤となるデータの一つとなっている。地上への応用としては、軌道上の実験で使用したサンプリング手法、新手法が日本薬局方に参考情報として収載され、医薬品製造環境の環境モニタリングに使われ始めようとしている。

5. 結語

- (1) 軌道上において画像のダウンリンクによって真菌発育像を評価する事が可能となった。
- (2) 培養同定によって軌道上真菌叢の変遷を明らかに出来た。
- (3) 日和見感染原因菌、マイコトキシン産生菌、およびアレルギーとなる真菌を船内表面、水、および空気から見出し、潜在的なヒト健康障害の可能性を示すことが出来た。
- (4) 環境真菌の検出上、培養法と PCR-clone 解析法は補完するべきものであり、可能な限り共に実施することが望ましいことを示した。
- (5) エアサンプラーによる培養結果とパーティクルカウンター計測値ともに船内空気環境の清浄性を共に示すことが出来た。
- (6) エアサンプラー検体の PCR-clone 解析により、空气中真菌叢を評価することが出来た。
- (7) パーティクルカウンター計測により、軌道上では大気中を浮遊する大粒子径の物質が小粒子径の物質に比べると相対的に除去されにくい環境となっている事が示された。
- (8) ISS「きぼう」で微生物サンプリングを行うにあたり、swab 法のプロトコルを決定した。
- (9) ISS「きぼう」で微生物サンプリングを行うにあたり、新たなサンプリングデバイスとして、粘着集菌シートを作製し、そのプロトコルを決定した。
- (10) 細菌現存量の測定結果から、ISS「きぼう」は現状では微生物学的に適切に管理されている空間であると考えられる。
- (11) 細菌群集構造の解析結果から、宇宙飛行士が頻繁に触れるパソコンや手すりの表面において、ヒトの常在細菌である *Actinobacteria* や *Firmicutes* を中心に多様な細菌が検出され、これらは宇宙飛行士の接触により、体表面から各機器等の表面に移行したものと考えられた。

ISS・きぼう利用ミッション

「国際宇宙ステーション内における微生物動態に関する研究 (Microbe)」

成果リスト

1. 学術論文・総説

- (1) 榎村浩一. 宇宙: 近未来のヒト生活環境と微生物(1) - 真菌から見た宇宙におけるヒト生活環境 - ウォストークからミールまで. *The Chemical Times*, 2009;211: 22-25.
- (2) 山崎丘、杉田隆、榎村浩一. 宇宙環境における微生物に関する研究. *International Journal of Microgravity Science and Application*, 2009;26(4):290-5. Review.
- (3) Yamaguchi N, Hieda H, Nasu M. Simple and reliable swabbing procedure for monitoring microbes in the International Space Station. *Eco-Engineering* 2010;22(1):27-30. doi: 10.11450/seitaikogaku.22.27.
- (4) Satoh K, Nishiyama Y, Yamazaki T, Sugita T, Tsukii Y, Takatori K, Benno Y, Makimura K. Microbe-I: fungal biota analyses of the Japanese experimental module KIBO of the International Space Station before launch and after being in orbit for about 460 days. *Microbiology and Immunology* 2011 Dec;55(12):823-9. doi: 10.1111/j.1348-0421.2011.00386.x.(インパクトファクター:1.428)
- (5) Makimura K, Satoh K, Sugita T, Yamazaki T. Fungal biota in manned space environment and impact on human health. *Nihon Eiseigaku Zasshi* 2011 Jan;66(1):77-82. Review. (Japanese) doi: 10.1265/jjh.66.77
- (6) Ichijo T, Hieda H, Ishihara R, Yamaguchi N, Nasu M. Bacterial monitoring with adhesive sheet in the international space station-"Kibo", the Japanese experiment module. *Microbes and Environments* 2013;28(2):264-8. doi: 10.1264/jsme2.ME12184.(インパクトファクター: 2.075)
- (7) Yamaguchi N, Roberts M, Castro S, Oubre C, Makimura K, Leys N, Grohmann E, Sugita T, Ichijo T, Nasu M. Microbial monitoring of crewed habitats in space - current status and future perspectives. *Microbes and Environments* 2014;29(3):250-60. Review. doi: 10.1264/jsme2.ME14031.(インパクトファクター:2.075)
- (8) Yamaguchi N, Nasu M. Microbes and Crewed Space Habitat. *Journal of Disaster Research*, 2015;15(6):1022-4. doi: 10.20965/jdr.2015.p1022.
- (9) Shirakawa M, Tanigaki M, Yamazaki T. Microbial Observatory Research in the International Space Station and Japanese Experiment Module "Kibo". *Journal of Disaster Research*, 2015;15(6):1025-30. doi: 10.20965/jdr.2015.p1025.
- (10) Ichijo T, Yamaguchi N, Nasu M. Bacterial monitoring in the International Space Station - "Kibo". *Journal of Disaster Research*, 2016; 15(6): 1035-9. doi: 10.20965/jdr.2015.p1035.
- (11) Yamaguchi N, Ichijo T, Nasu M. Bacterial monitoring in the International Space Station-Kibo based on rRNA gene sequence. *Transactions of the Japan Society for Aeronautical and Space Sciences, Aerospace Technology Japan*, 2016;14(ists30):Pp_1-Pp_4. doi: 10.2322/tastj.14.Pp_1.

(12) Ichijo T, Yamaguchi N, Tanigaki F, Shirakawa M, Nasu M. Four-year bacterial monitoring in the International Space Station—Japanese Experiment Module “Kibo” with culture-independent approach. *npj Microgravity*, 2016;2:16007. doi: 10.1038/npjmgrav.2016.7.

* *npj microgravity* 誌は、2015年に発刊された雑誌であり、インパクトファクターは付与できない。本論文の社会的インパクトの指標となる Altmetric Attention Score は 23 であり、同スコアが付与されている約 7,000,000 の論文のうち、トップ 5% に位置付けられるスコアである。また、2016 年末までに *npj microgravity* 誌で報告された 47 の論文のうち、5 位となっている。すなわち、本論文は社会的に影響の強い論文であると考えている。

(<https://www.altmetric.com/details/6862867#score>)

(13) Satoh K, Yamazaki T, Nakayama T, Umeda Y, Alshahni MM, Makimura M, Makimura K. Characterization of fungi isolated from the equipment used in the International Space Station or Space Shuttle. *Microbiology and Immunology* 2016;60(5):295-302. doi: 10.1111/1348-0421.12375. (インパクトファクター : 1.428)

(14) Nakayama T, Yamazaki T, Yo A, Tone K, Alshahni MM, Fujisaki R, Makimura K. Detection of Fungi from an Indoor Environment using the Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) Method. *Biocontrol Science* in press. (インパクトファクター : 0.677)

2. 出版

(1) 山口進康. 「宇宙居住環境中の微生物」. 環境と微生物の事典 (日本微生物生態学会 編). 朝倉書店. 2014;279-80.

3. 学会発表

第 25 回宇宙利用シンポジウム(東京;2009 年 1 月)

「2008 年度宇宙微生物学研究班 WG 活動報告」

大森 雅之、石岡 憲明、泉 龍太郎、江崎 孝行、大石 浩隆、太田 寛行、加藤 憲二、喜多 正和、那須 正夫、東端 晃、福井 啓二、藤本 信義、榎村 浩一、山崎 丘

真菌症フォーラム第 10 回学術集会(愛知;2009 年 2 月)

「宇宙ステーション内生活環境および乗員の体内外における真菌検出システムの研究開発」

佐藤 一郎、山田 剛、榎村 浩一、石原 由美子、西山 彌生、安部 茂

第 82 回日本細菌学会総会(愛知;2009 年 3 月)

「粉塵計並びに定量 PCR を用いた非培養系による環境真菌計測法の評価」

宮嶋 良治、佐藤 一郎、榎村 浩一

「菌体成分の定量による環境および臨床検体における微生物検出系の検討」

榎村 浩一、佐藤 一郎、藤崎 竜一、山村 麻倫子、宮嶋 良治、山田 剛、西山 彌生、安部 茂

日本薬学会第 129 年会(京都;2009 年 3 月)

「宇宙ステーション内の衛生微生物学的環境評価のためのプロトコール作成」

山口 進康, 稗田 はつき, 那須 正夫(発表日:2009年3月26日)

The International Society for Human and Animal Mycology 2009(東京;2009年5月)

“Specific detection and identification of fungal DNA using quantitative PCR and loop-mediated isothermal amplification; their advantages and limitations”

Koichi Makimura

“Rapid direct colony PCR from fungi by ampdirect plus”

M. Alshahni, K. Makimura, K. Satoh, Y. Ishihara, K. Takatori, T. Sawada

“Development of analyzing system for microbial flora on board International Space Station and astronauts”

K. Makimura, K. Satoh, T. Yamada, Y. Nishuyama, S. Abe, Y. Tsukii, T. Sugita, K. Takatori, Y. Benno, T. Yamazaki

6th International Space Life Sciences Working Group International Workshop on Space Microbiology(ソノマ、アメリカ;2009年8月)

“Microbe-II: Monitoring of bacterial cells in “KIBO”, the Japanese experimental module of the ISS”

N. Yamaguchi, T. Yamazaki and M. Nasu

“Monitoring of bacterial cells in freshwater by microfluidic system”

N. Yamaguchi and M. Nasu

The 23rd Annual Meeting of the Japanese Society for Biological Sciences in Space(茨城;2009年10月)

“Microbiological research on board International Space Station/ “KIBO””

K. Makimura, K. Satoh, Y. Nishiyama, Y. Tsukii, T. Sugita, K. Takatori, Y. Benno, T. Yamazaki

グルカン研究会(東京;2009年10月)

「Microbes in space.」

榎村 浩一

第83回日本細菌学会総会(神奈川;2010年3月)

「携帯パーティクルカウンターを用いた浮遊真菌数の推定法の開発」

宮嶋 良治、佐藤 一朗、榎村 浩一

「国際宇宙ステーション「きぼう」における微生物研究」

榎村 浩一、佐藤 一朗、西山 彌生、杉田 隆、宮嶋 良治、辨野 義己

日本薬学会第130年会(岡山;2010年3月)

「国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」における細菌モニタリング ～試料保存法の検討～」

山口 進康, 稗田 はつき, 那須 正夫

<講演ハイライトに選抜:「宇宙居住における細菌学的安全保証～「きぼう」の細菌モニタリング～」>

第80回日本衛生学学会学術総会(宮城;2010年5月)

「宇宙ステーション内生活環境における真菌叢と健康に対するインパクト」

シンポジウム「宇宙医学分野に寄与する衛生学研究」

榎村 浩一

フォーラム 2010: 衛生薬学・環境トキシコロジー (東京; 2010 年 9 月)

「粘着集菌シートを用いた国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」における細菌モニタリング」
山口 進康, 石原 理絵, 大野 愛子, 那須 正夫

第 57 回日本臨床検査医学会学術集会 (東京; 2010 年 9 月)

「国際宇宙ステーション日本実験モジュール「きぼう」の真菌叢解析」
佐藤 一朗, 西山 彌生, 月井 雄二, 杉田 隆, 高鳥 浩介, 辨野 義己, 山崎 丘, 槇村 浩一

第 54 回日本医真菌学会総会 (東京; 2010 年 10 月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」における微生物研究: Microbe-I 成果報告」
槇村 浩一, 佐藤 一朗, 西山 彌生, 高鳥 浩介, 杉田 隆

第 56 回日本宇宙航空環境医学会大会 (埼玉; 2010 年 11 月)

「宇宙ステーション内微生物叢と健康障害惹起の可能性」
サテライトシンポジウム「宇宙基地における環境要因」
槇村 浩一

第 27 回宇宙利用シンポジウム (神奈川; 2011 年 1 月)

「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」
山口 進康, 稗田 はつき, 一條 知昭, 那須 正夫

Geobiology in Space Exploration (マラケシュ、モロッコ; 2011 年 2 月)

“A new sampling device, “microbe-collecting adhesive sheet”, for sampling microbial cells on solid dry surfaces”
N. Yamaguchi, T. Ichijo and M. Nasu

日本薬学会第 131 年会 (静岡; 2011 年 3 月)

「粘着集菌シートを用いた国際宇宙ステーション「きぼう」の細菌モニタリング」
山口 進康, 石原 理絵, 大野 愛子, 那須 正夫
<講演ハイライトに選抜: 「宇宙居住における細菌学的安全保証～粘着シートによる「きぼう」の細菌モニタリング～」>
「国際宇宙ステーション内で使用されていた画像変換システム内部における細菌現存量」
山口 進康, 稗田 はつき, 一條 知昭, 那須 正夫

7th International Space Life Sciences Working Group International Workshop on Space Microbiology (クレルモン・フェラン、フランス; 2011 年 5 月)

“Microbe-II: Monitoring of bacterial cells in “KIBO”, the Japanese experiment module of the ISS”
N. Yamaguchi, T. Yamazaki and M. Nasu
“Monitoring of fungal biota in environmental and human body samples on board “KIBO””
K. Makimura, K. Satoh, T. Sugita, T. Yamazaki, Y. Nishiyama, M. Ohmori, N. Ishioka
“Rapid monitoring of bacterial cells in freshwater by using a microfluidic system”
N. Yamaguchi and M. Nasu

SKO symposium(ソウル、韓国;2011年6月)

“Bacterial monitoring in the Japanese experiment module “Kibo”, a part of the International Space Station”

N. Yamaguchi, H. Hieda, T. Ichijo and M. Nasu

カビ相談センター講演会(東京;2011年7月)

「住宅から宇宙のカビ:生活環境の真菌と健康障害とのかかわり」

榎村 浩一

日本宇宙生物科学会第25回大会(神奈川;2011年9月)

「国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」における細菌モニタリング」

山口 進康、稗田 はつき、馬場 貴志、一條 知昭、那須 正夫

第55回日本医真菌学会学術集会(東京;2011年10月)

基礎臨床セミナー「環境真菌と健康障害:地上と宇宙の有人閉鎖環境における問題」

榎村 浩一

第55回日本医真菌学会学術集会(東京;2011年10月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」における微生物研究:Microbe-II 中間報告」

榎村 浩一、佐藤 一朗、西山 彌生、杉田 隆、高鳥 浩介、山崎 丘

第57回宇宙航空環境医学会大会学術集会(茨城;2011年11月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」における微生物研究: Microbe-I・II 中間報告」

榎村 浩一

第28回宇宙利用シンポジウム(東京;2012年1月)

「粘着集菌シートを用いた宇宙居住環境中の細菌モニタリング」

山口 進康、石原 理絵、稗田 はつき、一條 知昭、那須 正夫

第2回製品の微生物品質を確保する迅速検査・同定技術(東京;2012年3月)

「汚染指標菌の迅速検査・同定法とその実際:カビ」

榎村 浩一

室内環境学会微生物分科会(東京;2012年3月)

「人工的閉鎖環境における真菌と関連する健康障害」

榎村 浩一

日本薬学会第132年会(北海道;2012年3月)

「国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」における細菌モニタリング」

山口 進康、稗田 はつき、馬場 貴志、一條 知昭、那須 正夫

第86回日本感染症学会総会/学術講演会(長崎;2012年4月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」における真菌研究:Microbe-I&II 中間報告」

榎村 浩一、杉田 隆

第 61 回神奈川医真菌研究会(神奈川;2012 年 5 月)

特別講演「病原真菌の新しい分類と宇宙に向けた医真菌学」

榎村 浩一

The 18th Congress of International Society for Human and Animal Mycology(ISHAM)(ベルリン、ドイツ;2012 年 6 月)

“Monitoring of fungal biota in environmental and human body samples on board Japanese experiment module of International Space Station(ISS)”

K. Makimura, K. Satoh, T. Sugita, Y. Nishiyama, T. Yamazaki

14th International Symposium on Microbial Ecology(コペンハーゲン、デンマーク;2012 年 8 月)

“Culture-independent bacterial monitoring with adhesive sheet in the “Kibo”, a part of the International Space Station”

T. Ichijo, H. Hieda, R. Ichihara, N. Yamaguchi and M. Nasu

日本宇宙生物科学会第 26 回大会(徳島;2012 年 9 月)

「Monitoring of fungal biota in environmental and human body samples on board “KIBO”」

シンポジウム 3「宇宙医学」

榎村 浩一

第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会(兵庫;2012 年 10 月)

「国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」における細菌モニタリング」

山口 進康、稗田 はつき、石原 理絵、一條 知昭、那須 正夫

フォーラム 2012:衛生薬学・環境トキシコロジー(愛知;2012 年 10 月)

「国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」における細菌モニタリング」

山口 進康、稗田 はつき、石原 理絵、一條 知昭、那須 正夫

第 56 回日本医真菌学会総会(東京;2012 年 11 月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」における微生物研究:Microbe-II 中間報告 2」

佐藤 一朗、榎村 浩一、西山 彌生、杉田 隆、高鳥 浩介、山崎 丘

第 86 回日本細菌学会総会(千葉;2013 年 3 月)

「国際宇宙ステーション日本実験棟「きぼう」における細菌モニタリング」

山口 進康、一條 知昭、馬場 貴志、那須 正夫

「国際宇宙ステーション「きぼう」における微生物研究 Microbe-II 中間報告」

佐藤 一朗、西山 彌生、山崎 丘、杉田 隆、辨野 義己、榎村 浩一

日本薬学会第 133 年会(神奈川;2013 年 3 月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」における細菌モニタリング」

山口 進康、稗田 はつき、石原 理絵、馬場 貴志、一條 知昭、那須 正夫

<講演ハイライトに選抜:「宇宙居住における微生物学的安全保証～「きぼう」の細菌モニタリング～」>

第 3 回小児 Febrile Neutropenia 研究会 (広島;2013 年 4 月)

特別講演「病原真菌と有人宇宙環境における健康障害」

榎村 浩一

日本臨床皮膚科医会北海道ブロック第 55 回研修講演会 (北海道; 2013 年 4 月)

特別講演「国際宇宙ステーション「きぼう」における微生物研究」

榎村 浩一

8th International Space Life Sciences Working Group International Workshop on Space Microbiology (大阪;2013 年 5 月)

“Bacterial monitoring in the International Space Station-“Kibo”

T. Ichijo, N. Yamaguchi and M. Nasu

“Rapid monitoring of bacterial cells in freshwater by using a portable microfluidic system”

N. Yamaguchi, Y. Fujii, F. Banno and M. Nasu

第 34 回関東医真菌懇話会 (東京;2013 年 6 月)

会長講演「宇宙に開く医真菌」

榎村 浩一

2013 Congress of Asia Pacific Society for Medical Mycology (APSMM) (成都、中国;2013 年 6 月)

“Medical mycology in space”

Koichi Makimura

第 10 回日韓宇宙環境利用セミナー (ソウル、韓国;2013 年 9 月)

“Bacterial monitoring in the International Space Station – “Kibo”

N. Yamaguchi, T. Ichijo, T. Baba and M. Nasu

フォーラム 2013: 衛生薬学・環境トキシコロジー (福岡;2013 年 9 月)

「国際宇宙ステーション日本実験棟<きぼう>における細菌モニタリング」

山口 進康、一條 知昭、馬場 貴志、那須 正夫

第 27 回宇宙生物科学会 (茨城;2013 年 9 月)

「国際宇宙ステーションでの微生物モニタリング実験」

嶋津 徹、那須 正夫、山口 進康、谷垣 文章、飛田 将光、栗山 可奈、佐藤 一朗、一條 知昭、山崎 丘、榎村 浩一

第 57 回日本医真菌学会総会・学術集会 (東京;2013 年 9 月)

「真菌検出用の LAMP プライマーの設計とその利用」

山崎 丘、楊 彩佳、藤崎 竜一、榎村 浩一

第 29 回日本微生物生態学会大会 (鹿児島;2013 年 11 月)

「国際宇宙ステーション日本実験棟<きぼう>における微生物モニタリング」

山口 進康、一條 知昭、馬場 貴志、那須 正夫

第 59 回日本宇宙航空環境医学会大会 (岡山;2013 年 11 月)

認定医セミナー「航空宇宙医学における検疫、防疫、感染症防護 国際宇宙ステーション船内における環境真菌とその変遷」

榎村 浩一、山崎 丘

Workshop on “Probiotics and human health in severe environments such as space habitat” (大阪; 2014年3月)

“Bacterial monitoring in the International Space Station - “Kibo”

N. Yamaguchi

第 87 回日本細菌学会総会(東京;2014年3月)

「LAMP 法による主要真菌検出系の開発と利用」

山崎 丘、楊 彩佳、戸根 一哉、藤崎 竜一、榎村 浩一

日本薬学会第 134 年会(熊本;2014年3月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」における細菌群集構造の変化」

一條 知昭、山口 進康、馬場 貴志、那須 正夫

第 10 回東京血液感染症セミナー(東京; 2014年6月)

「病原真菌と有人宇宙環境における健康障害」

榎村 浩一

第 4 回千葉県真菌症研究会学術講演会(千葉;2014年6月)

特別講演「微生物としての真菌と宇宙環境における健康障害」

榎村 浩一

第 11 回日韓宇宙環境利用研究セミナー(東京;2014年7月)

“Bacterial community structure in the International Space Station-“Kibo””

T. Ichijo, N. Yamaguchi and M. Nasu

フォーラム 2014:衛生薬学・環境トキシコロジー(茨城;2014年9月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」における細菌モニタリング」

一條 知昭、山口 進康、馬場 貴志、那須 正夫

環境微生物系合同大会 2014(静岡;2014年10月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」における細菌群集構造」

一條 知昭、稗田 はつき、馬場 貴志、山口 進康、那須 正夫

第 58 回日本医真菌学会総会・学術集会(神奈川;2014年11月)

「主要真菌検出用 LAMP プライマーを用いた生活環境中真菌の検出」

山崎 丘、楊 彩佳、戸根 一哉、藤崎 竜一、榎村 浩一

「国際宇宙ステーション搭載機器内部から分離した真菌の特性」

佐藤 一朗、Alshahni MM、山崎 丘、榎村 浩一

第 15 回宇宙科学シンポジウム(神奈川;2015年1月)

「ISS 環境における gene ecology」

那須 正夫、大森 正之、石岡 憲昭、江崎 孝行、大石 浩隆、太田 寛行、加藤 憲二、嶋津 徹、杉田 隆、谷 佳津治、谷垣 文章、馬場 貴志、東端 晃、堀 克敏、榎村 浩一、三木 猛生、森崎 久雄、山口 進康、山崎 丘、一條 知昭、内井 喜美子

第 29 回宇宙環境利用シンポジウム(神奈川;2015 年 1 月)

「2014 年度宇宙微生物学研究班ワーキンググループ活動報告」

那須 正夫、大森 正之、石岡 憲昭、一條 知昭、内井 喜美子、江崎 孝行、大石 浩隆、太田 寛行、加藤 憲二、喜多 正和、嶋津 徹、白川 正輝、杉田 隆、谷 佳津治、谷垣 文章、馬場 貴志、東端 晃、堀 克敏、榎村 浩一、三木 猛生、森崎 久雄、山口 進康、山崎 丘

第 88 回日本細菌学会総会(岐阜;2015 年 3 月)

「国際宇宙ステーションでの宇宙微生物研究の現状 国際宇宙ステーション「きぼう」船内における真菌叢モニタリング」

シンポジウム6「国際宇宙ステーションでの宇宙微生物学研究の現状」

榎村 浩一

「国際宇宙ステーション「きぼう」における細菌モニタリング」

シンポジウム6「国際宇宙ステーションでの宇宙微生物学研究の現状」

一條 知昭、山口 進康、那須 正夫

「LAMP 法による生活環境中に存在する主要真菌検出の試み」

中山 孝子、山崎 丘、楊 彩佳、戸根 一哉、藤崎 竜一、榎村 浩一

「国際宇宙ステーション搭載機器内部から分離された真菌の特性」

佐藤 一朗、Alshahni MM、山崎 丘、榎村 浩一

115th General Meeting of the American Society for Microbiology(ニューオーリンズ、米国;2015 年 6 月)

“Four-year Bacterial Monitoring in the International Space Station-"Kibo"”

N. Yamaguchi, T. Ichijo, M. Nasu

30th International Symposium on Space Technology and Science(兵庫;2015 年 7 月)

“Bacterial monitoring in the International Space Station-Kibo based on rRNA gene sequence”

N. Yamaguchi, T. Ichijo, M. Nasu

日本宇宙生物科学会第 29 回大会(東京;2015 年 9 月)

シンポジウム 1「有人宇宙活動と微生物」

榎村 浩一

「rRNA 遺伝子を指標とした国際宇宙ステーション「きぼう」における細菌モニタリング」

山口 進康、一條 知昭、那須 正夫

「国際宇宙ステーション搭載機器内部由来真菌分離株の特性」

佐藤 一朗、Alshahni MM、山崎 丘、榎村 浩一

第 59 回日本医真菌学会総会・学術集会(北海道;2015 年 10 月)

「LAMP 法による生活環境中に存在する主要真菌検出の試み」

中山 孝子、楊 彩佳、戸根 一哉、Alshahni MM、藤崎 竜一、山崎 丘、榎村 浩一

「国際宇宙ステーション「きぼう」における真菌研究:中間報告」

佐藤 一朗、山崎 丘、榎村 浩一

日本微生物生態学会第 30 回大会(茨城;2015 年 10 月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」船内における環境微生物学的研究」

シンポジウム 11「微生物生態学の太陽系への展開可能性」

那須 正夫

第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会(大阪;2015 年 10 月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」における細菌モニタリング」

山口 進康、一條 知昭、那須 正夫

第 30 回宇宙環境利用シンポジウム(神奈川;2016 年 1 月)

「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

第 89 回日本細菌学会総会(大阪;2016 年 3 月)

国際宇宙ステーション「きぼう」における真菌動態研究:中間報告

佐藤 一郎、山崎 丘、槇村 浩一

真菌症フォーラム第 22 回学術集会(東京;2016 年 5 月)

「国際宇宙ステーションに搭載した機器内部から分離された真菌の特性」

佐藤 一郎、梅田 宜子、Alshahni MM、山崎 丘、槇村 浩一

「LAMP 反応を利用した主要環境真菌の迅速検出法」

山崎 丘、中山 孝子、楊 彩佳、戸根 一哉、Alshahni MM、藤崎 竜一、槇村 浩一

第 14 回日本予防医学会学術総会(東京;2016 年 6 月)

特別講演「宇宙微生物学への招待～国際宇宙ステーションにおける gene ecology～」

那須 正夫

「国際宇宙ステーション「きぼう」における細菌モニタリング」

メインシンポジウム「宇宙医学の最先端」～宇宙に生きる～

一條 知昭

16th International Symposium on Microbial Ecology(モントリオール、カナダ;2016 年 8 月)

“Four-year bacterial monitoring in the International Space Station – Japanese Experiment Module "Kibo" with culture-independent approach”

T. Ichijo, N. Yamaguchi, M. Nasu

20th Space Environmental Medicine Round Table Meeting(東京;2016 年 9 月)

“Bacterial monitoring in the International Space Station - Kibo – with culture independent approach”

T. Ichijo

第 60 回日本医真菌学会総会・学術集会(東京;2016 年 10 月)

「国際宇宙ステーション「きぼう」における微生物研究 Microbe 中間報告」

佐藤 一郎、山崎 丘、槇村 浩一

第 62 回日本宇宙航空環境医学会大会 日本宇宙生物科学会第 30 回大会 合同大会(愛知; 2016 年 10 月)

「モデル閉鎖環境中の微生物」

シンポジウム「宇宙に生きる」

一條 知昭

International Meeting of the Federation of Korean Microbiological Societies(高陽、韓国;2016 年 11 月)

“Detection of Fungi from an Indoor Environment using the Loop-mediated Isothermal Amplification Method”

T. Yamazaki, T. Nakayama, A. Yo, K. Tone, MM Alshahni, R. Fujisaki, K. Makimura

第 29 回日本外科感染症学会総会学術集会(東京;2016 年 11 月)

招待講演「宇宙ステーション内生活環境における真菌叢と健康に対するインパクト」

榎村 浩一

平成 28 年室内環境学会学術大会 微生物分科会(茨城;2016 年 12 月)

招待講演「宇宙環境と真菌関連健康障害」

榎村 浩一

4. 取材・報道などパブリシティ

- (1) 榎村浩一「国際宇宙ステーションは「きぼう」は現在微生物汚染なし」 Medical Tribune 2010 年 5 月 6 日;43(18):31.
- (2) 那須 正夫「国際宇宙ステーション ISS を安全空間に」産経新聞、2011 年 02 月
- (3) 榎村浩一「特集 飛ばす」事例紹介:01 国際宇宙ステーション内の環境を測る.テクノロジーで世界をつなぐ。」リオンの技術情報誌 Shake Hands 2016;2:6-8.
- (4) 榎村 浩一「経営ひと言/帝京大学・榎村浩一教授「カビ分布が偏在」」日刊工業新聞 2016 年 10 月 31 日
- (5) 榎村 浩一「宇宙でも微生物リスクへの対策を」 Medical Tribune 2017 年 1 月 19 日;50(2):13.