

疑似微小重力下での日和見感染症の宿主細胞の変化の解析

山田 剛史（東北大・農），暮地本 宙己（東京慈恵会医科大），近藤 大輔（帯広畜産大），
村越 ふみ（東北大・学際研），加藤 健太郎（東北大・院・農）

Analyses of host cell reaction for opportunistic infection under microgravity

Takafumi Yamada¹, Hiroki Bochimoto², Daisuke Kondoh³, Fumi Murakoshi¹, Kentaro Kato^{1,*}

¹Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Osaki, Miyagi, 989-6711

²The Jikei University School of Medicine, Tokyo, 105-8461

³Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro, Hokkaido, 080-8555

*E-Mail: kentaro.kato.c7@tohoku.ac.jp

Abstract: Although the opportunistic infection occurs most of people in the world, the healthy human and animals don't show the clinical condition, just show the latent infection. Once host immunity becomes suppressed, these pathogens reactivate, propagate in the host, and show the clinical condition. However, such a scenario happens on the earth with gravitational field. The reports of the real phenotypes of the microbes under no gravity or microgravity in the universe, an extreme environment, have been published little. No one knows this result. When many people stay in the universe, the dormant pathogens which are infected latently with most of humans can reactivate and show the clinical condition. Therefore, these situations are very dangerous. In this study, we aim to analyze the clinical change and phenotype of opportunistic infection in the microgravity environments in the universe. At first, we analyzed the phenotypes of host cells for the opportunistic pathogens. We characterized two types of cells; Vero cells as cell lines and HFF cells as primary cells using the three-dimensional (3D) clinostat. Our final goal is to evaluate the onset risk of opportunistic infection during human long time stay in universe by the experiment in International Space Station.

Key words; Host cell, Opportunistic infection, Microgravity.

1. はじめに

感染症の中でも日和見感染症は世界人口の大部分が感染しているにも関わらず、健康なヒトや動物の場合には病態を引き起こすことはなく、体内に潜伏感染している。ひとたび宿主の免疫状態が低下すると再活性化（再燃）し、宿主の中で増殖することで病態を発現する。しかし、これらのシナリオは地球上の重力圏での話である。実際に宇宙の極限環境、特に無重力、微小重力環境において微生物はどのような表現型を示すのかは、研究報告が極めて少なく、未知である。宇宙空間での生活が現実味を帯びてくると人類の多くに潜伏感染している病原体が微小重力下で再活性化し、病態を引き起こす危険性が考えられる。実際にこれまでのスペースシャトルで延べ742名の搭乗員に29件の感染症が報告されている¹⁾。日和見感染症には、トキソプラズマ（世界人口の約30%以上が感染）等の原虫、ヒトヘルペスウイルス（約95%が感染）等のウイルス、メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）、緑膿菌、セラチア等の細菌、アスペルギルス、カンジダ、ニューモチスティス等の真菌といった病原体が引き起こす感染症が含まれる。日和見感染症は、移植患者や免疫不全患者、免疫抑制剤の使用による免疫低下状態になると発症しやすくなる。国際宇宙ステーショ

ン(ISS)の軌道上及び模擬微小重力条件下(クリノスタット利用(Advanced Engineering Services co.); Fig. 1)では、自然免疫系及び獲得免疫系の両方において免疫細胞やサイトカインの変化が起こり、日和見感染症の発症リスクが増すことが報告されている²⁾。



Fig. 1. 3D clinostat in CO₂ incubator.

本研究の目的は、トキソプラズマをモデルとして日和見感染症が宇宙の極限環境に近い微小重力環境においてどのような病原性の変化や表現型を発現するかを明らかにし、最終的にはISSでの宇宙実験を通して宇宙環境でのヒトの長期滞在における日和見感染症の発症リスクを評価することである。

無重力下、微小重力下での感染現象の国内外の研究動向としては、日本はもとより国際的にもほとんど行われておらず、以下のような報告があるばかりである。(i) 宇宙空間において抗生物質に対して耐性を持つ大腸菌が増える^{3,4)}。(ii) サルモネラ、緑膿菌の病原性が上がる^{5,6)}。(iii) アスパラギン酸代謝経路に関連している細菌因子が変化し、セラチア菌の病原性が上がる⁷⁾。

一方で、無重力下、微小重力下での宿主側の免疫の変化については、以下の報告がある。(i) 軌道上滞在中の宇宙飛行士の好中球からの分泌サイトカインが増加する⁸⁾。(ii) マクロファージは組織の微小重力環境変化に応じて、極性化とよばれる可逆変化を生じ、M1 及び M2 マーカーの発現が大幅に減少する^{9,10)}。

以上のような研究動向から、来るべき宇宙時代において微小重力環境下で宿主免疫の低下が起こり、日和見感染症の発症が懸念される。本研究では著者らが一貫して行ってきた潜伏感染する病原体についての解析手法をフル活用し、新しい微小重力系を使って感染メカニズム(宿主細胞と病原体の相互作用)にどのように重力が関わっているかを解析する。まず、日和見感染症を引き起こす病原体の宿主細胞への微小重力の影響について解析した。

2. 重力下と疑似微小重力下における宿主細胞（細胞株）の表現型の比較

潜伏感染による日和見感染症を引き起こす *Toxoplasma gondii* や herpes simplex virus type 1 (HSV-1) を *in vitro* で培養する場合には、宿主細胞として Vero 細胞（アフリカミドリザルの腎臓上皮細胞由来細胞株）が汎用される。*Toxoplasma gondii* の疑似微小重力下での影響を解析する前に、まず宿主細胞である Vero 細胞の表現型を微小重力下で解析した。

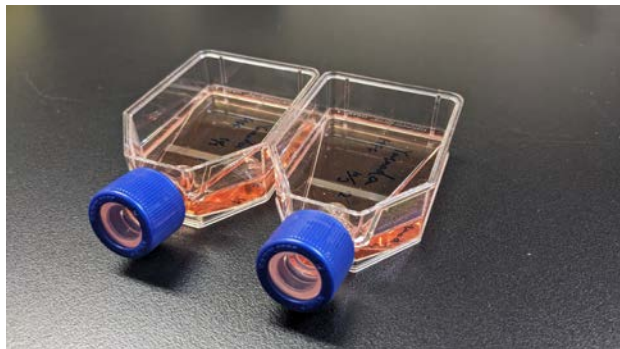


Fig. 1. iP-TEC Flask-25 with vent cap.

ベントキャップ付きのフラスコ(サンブラテック; Fig. 2)に DMEM を充填し、まず重力下で約 80%コンフルエントになるまで Vero 細胞を培養した。続いて、重力下と疑似微小重力下で 7 日間維持培養した。光学顕微鏡の観察によって、両者の違いを比較した。

疑似微小重力下で 7 日間維持培養した結果、Vero 細胞は細胞塊を形成した。重力下で培養したものには細胞塊は観察されなかった。疑似微小重力下では、細胞塊は開始 4 時間で細胞塊の形成がすでに観察された。

これらの細胞塊の形成が不可逆的であるかを解析するために、Vero 細胞を疑似微小重力下で 24 時間培養した後、重力下で 24 時間培養した。この結果、疑似微小重力下で 24 時間培養した後に形成された細胞塊は、重力下で 24 時間培養した後も消失しなかった。従って、細胞塊の形成は不可逆的である。

次にヨウ化プロピジウム (PI) 染色を用いて、疑似微小重力下で Vero 細胞において形成される細胞塊が細胞死を起こしているか解析を行った。PI は核染色色素であり、死細胞を染色することができる。その結果、細胞塊において PI で染まった細胞は少なく、細胞塊は生きた細胞で構成されていることが明らかとなった。

3. 重力下と疑似微小重力下における宿主細胞（初代培養細胞）の表現型の比較

疑似微小重力下で細胞株である Vero 細胞において細胞塊の形成が見られたため、初代培養細胞での表現型について解析を行った。本実験では、*Toxoplasma gondii* の培養に用いられる Human Foreskin Fibroblast (HFF)を使用した。

疑似微小重力下で Vero 細胞において細胞塊の形成が見られる 3 日目においても光学顕微鏡観察で明確な細胞塊は観察されなかった。疑似微小重力下 7 日目では細胞塊は見られるものの、Vero 細胞に比べて HFF は細胞塊を形成しにくいと考えられる。

4. まとめ

本研究において、潜伏感染による日和見感染症を引き起こす病原体の疑似微小重力下における表現型を解析することを目的として、まずこれらの病原体の宿主細胞（細胞株と初代培養細胞）の表現型の解析を行った。

疑似微小重力下の Vero 細胞は細胞塊を作り、この細胞塊は不可逆的な変化である。さらに、疑似微小重力下で、Vero 細胞、HFF 細胞の増殖が促進された。

今後は、疑似微小重力下での細胞小器官(オルガネラ)の形態変化を観察する必要がある。電子顕微鏡観察等の詳細な解析の必要がある。さらに、本研究の目的である疑似微小重力下で、トキソプラズマ感染細胞での変化の解析を行う。

5. 謝辞

本研究は、JAXA 宇宙科学研究所宇宙環境利用専門委員会 2023 年度フロントローディング研究の助成を受けて行われたものである。

参考文献

- 1) Crucian B *et al.* Evidence Report: Risk of Crew Adverse Health Event Due to Altered Immune Response. (2015)
- 2) Mehta SK, Crucian BE, Stowe RP, Simpson RJ, Ott CM, Sams CF, Pierson DL. *Cytokine* 61, 205-209 (2013).
- 3) Lapchine L, Moatti N, Gasset G, Richoilley G, Templier J, Tixador R. Antibiotic activity in space. *Drugs Exp Clin Res.* 12, 933-938 (1986).
- 4) Zea Luis, Larsen Michael, Estante Frederico, Qvortrup Klaus, Moeller Ralf, de Oliveira Sílvia Dias, Stodieck Louis, Klaus David. Phenotypic Changes Exhibited by *E. coli* Cultured in Space. *Front Microbiol.* 8, 1598 (2017).
- 5) Wilson James W *et al.* Media ion composition controls regulatory and virulence response of *Salmonella* in spaceflight. *PLoS One.* 3, e3923 (2008).
- 6) Crabbé Aurélie *et al.* Transcriptional and proteomic responses of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 to spaceflight conditions involve Hfq regulation and reveal a role for oxygen. *Appl Environ Microbiol.* 77, 1221-30 (2011).
- 7) Gilbert Rachel, Tanenbaum Nicole, Bhattacharya Sharmila. Asparagine biosynthesis as a mechanism of increased host lethality induced by *Serratia marcescens* in simulated microgravity environments. *Heliyon.* 8, e09379 (2022).
- 8) Stervbo Ulrik *et al.* Gravitational stress during parabolic flights reduces the number of circulating innate and adaptive leukocyte subsets in human blood. *PLoS One* 13, e0206272 (2018).
- 9) Wang Chongzhen *et al.* Microgravity activates p38 MAPK-C/EBP β pathway to regulate the expression of arginase and inflammatory cytokines in macrophages. *Inflamm Res* 64, 303-11 (2015).
- 10) Shi Lu *et al.* Spaceflight and simulated microgravity suppresses macrophage development via altered RAS/ERK/NF κ B and metabolic pathways. *Cell Mol Immunol* 18:1489-1502 (2021).