

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, 稗田 はつき, 石原 理絵, 馬場 貴志, 一條 知昭, 那須 正夫 (大阪大・薬)

Microbiological Monitoring in the International Space Station - KIBO by Adhesive Sheet Sampling

Nobuyasu Yamaguchi, Hatsuki Hieda, Rie Ishihara, Takashi Baba, Tomoaki Ichijo and Masao Nasu

Osaka University, Suita, Osaka 565-0871

E-mail: yamaguti@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, named “MICROBE”, 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 several equipments used in the ISS. Bacterial cells on the door and inside of incubator, air conditioner, handrail, palm-rest of laptop computer were collected with swab and “microbe-collecting adhesive sheet (Yamaguchi, et al. *J. Microbial. Methods*, 53: 405, 2003)”, and bacterial number was determined 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 a 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、また一部の細菌の病原性が高くな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されている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・安心を保证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) および日本宇宙フォーラムと協力し、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/>)。

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、保管にスペースを要する、サンプリングの際にスティック部分が折れる危険性がある等の課題がある。当研究室ではこれまでに、固体表面からの微生物サンプリング用デバイスである「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³⁾などの特長をもつ。

本研究では、スワブおよび粘着集菌シートを用いて ISS 内の機器等の表面の細菌をサンプリングし、それらの現存量を測定した結果を報告する。

2. 材料と方法

サンプリング

サンプリングは 2011 年 2 月 28 日未明 (日本時間) に行われた。被検面として、細胞培養ラックの表面 (RACK) および同ラックのドア内側 (DOOR)、エアコン送風部 (FIN) および吸気部 (GRILL)、手すり (HANDRAIL)、ラップトップ型パーソナルコンピュータのパームレスト (PC) を選び、スワブ²⁾ならびに粘着集菌シートにより細菌を回収した。

各サンプルはスペースシャトルで ISS から NASA ケネディ宇宙センターに運搬された後、JAXA 筑波宇宙センターに運ばれた。サンプルの保存・運搬は冷凍状態で行われた。

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。本フィルターから Tsai and Olson の方法 (Tsai 法)⁴⁾を用いて、DNA を抽出した。

粘着集菌シートで回収した細菌からの DNA 抽出

滅菌したカミソリで粘着集菌シートの粘着面を切り取った後、FastDNA SPIN Kit (MP Biomedicals) を用いて DNA を抽出した。

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 MgCl_2 、0.5 μM プライマー EUB933f (5'-GCACAAGCGGTGGAGCATG TGG-3') および EUB1387r (5'-GCCCCGGAACGTATT 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 4.1 (Roche Diagnostic) を用いた。

3. 結果と考察

定量的 PCR 法による細菌数測定

今回の測定に先立ち、粘着集菌シートで回収した細菌からの DNA 抽出法を検討した結果、一般的に使用されている Tsai 法よりも FastDNA SPIN Kit を用いた方が抽出効率が高かった。したがって、粘着集菌シートで回収した細菌からの DNA 抽出には、FastDNA SPIN Kit を用いた。

ISS 「きぼう」の各設備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 in the ISS-KIBO collected with optimized swab method and determined by quantitative PCR.

サンプリング箇所		定量結果 (測定値)
細胞ラック	RACK	—
表面		
細胞ラック	DOOR	$\pm (1 \times 10^2 \text{ cells/cm}^2)$
ドア内側		
エアコン送風部	FIN	$\pm (3 \times 10^2 \text{ cells/cm}^2)$
エアコン吸気部	GRILL	$\pm (1 \times 10^2 \text{ cells/cm}^2)$
手すり	HANDRAIL	$\pm (1 \times 10^2 \text{ cells/cm}^2)$

定量限界 : $1 \times 10^2 \text{ cells/cm}^2$

— : 定量限界以下

\pm : 定量限界付近

Table 2. Number of bacteria in the ISS-KIBO collected with microbe-collecting adhesive sheet and determined by quantitative PCR.

サンプリング箇所		定量結果 (測定値)
細胞ラック	RACK	—
表面		
細胞ラック	DOOR	—
ドア内側		
エアコン吸気部	GRILL	$\pm (1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2)$
パソコン	PC	$\pm (1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^2)$

定量限界 : $6 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$

— : 定量限界以下

\pm : 定量限界付近

研究室内のインキュベーター表面および PC のパームレストについて、細菌を粘着集菌シートにより回収し、それらの現存量を測定したところ、それぞれ $1 \times 10^5 \text{ cells/cm}^2$ であった。これらの値と Table 1 お

よび Table 2 の結果を比較した結果、ISS「きぼう」内の各被検面は、地上の実験室と比べても細菌数が少ないことがわかった。

なお、ISS内のNASAの施設では、今回得られた「きぼう」内よりも高い細菌数が得られている。この理由としては、「きぼう」が実験棟であるのに対し、NASAの施設内では飲食等の生活行為が行われていること、また「きぼう」に比べてNASAの施設はISSでの運用期間が長く、宇宙飛行士の滞在の影響をより長期にわたって受けていることなどが考えられる。

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経時的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いる装置の表面から、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を確認できた。

今後もISS「きぼう」内での細菌モニタリングを継続し、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との共同研究として行ったものである。

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) 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)
- 3) Yamaguchi, N., Ishidoshiro, 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)
- 4) 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)
- 5) 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.