JDX-2023013B

2022 年度
「きぼう」利用テーマ・船内科学研究に係る
科学成果評価結果
報告書

宇宙航空研究開発機構

有人宇宙技術部門

きぼう利用センター

1. 概要

本資料は、2022年度（2022年7月から2023年3月）に実施した、「きぼう」船内を利用した科学研究テーマの科学成果評価の結果および評価への入力となった対象テーマの成果報告書等を取り纏めたものである。

2. 評価対象

評価対象となったテーマを表1に示す。
これらのテーマは、2015年度～2020年度の間に軌道上実験を実施した4件の科学研究テーマである。

3. 評価の目的、評価指標

「きぼう」で行われた研究成果の達成状況とその意義、分野学術や社会への貢献、波及効果に対する評価を通じて、各々の研究成果のアピールポイントを効果的に情報発信すること、また、きぼう利用に関する改善点、利用の方向性等へ提言を得て、今後の利用計画設定に資することを目的として評価が行われた。この目的に照らし、表2に示す各評価項目に基づき、書類審査、面接審査（成果報告会）が実施され、評価結果は、最終的に、以下の4段階の総合評価指標および提言として取り纏められた。

S：目標を高度に達成し、特筆すべき成果を上げた（エクストラサクセス相当）.
A：目標を充分に達成した（フルサクセス相当）.
B：目標を一部達成した（ミニマムサクセス相当）.
C：成果として不足・不十分であり、目標を達成していない.

※2017 年度までの基準(以下)と異なる。
S：目標を高度に達成し、特筆すべき成果を上げた.
A：目標を充分に達成した（エクストラサクセス相当以上）.
B：目標を達成した（フルサクセス相当）.
C：目標達成に不足・不十分な点があり、引き続き解析・検討を要す.

4. 評価体制

評価は、生命医科学分野あるいは物質・物理科学分野のきぼう利用テーマ選考評価委員会（以下、「選考評価委員会」）により実施された。また、分野専門家3名のピアレビューアをテーマ毎に設定し、書類審査を併せて行い、選考評価委員会は、これを参考として審査を行った。
ここで、選考評価委員会は、きぼう利用において、応募されたテーマ等の選考、設定された利用テーマ等の評価を行うために設置された JAXA 有人宇宙技術部門長の諮問委員会であり、物質・物理科学分野及び生命医科学分野の2分野が設定されている。
今回、評価に当った選考評価委員会の構成員リストを表3に示す。

5. 評価プロセス

研究成果報告の提出から成果評価の公表までの評価プロセスを図4に示す。

6. 科学成果評価に係る文書

本資料に含めるテーマ毎の研究成果報告書、科学成果評価結果等を、表5に示す。

表1　評価対象テーマ （所属は報告書提出当時）

テーマ名	研究代表者 （評価時）	実験時期（※）	成果評価 （委員会）	分野
重力刺激による脊髄背側血管への血管ゲート形成と分子発現の解析 （Gravity Gateway Reflex）	北海道大学 教授　村上正晃	2019 年 5 月 ～6 月	2022 年 7 月 6 日	生命医科学
宇宙滞在中の液体生検による血漿中核酸のゲノム・エピゲノム解析 ～cfDNA 等を用いた低侵襲体内モニタリングに向けて～（Cell-Free Epigenome）	筑波大学 教授　村谷匡史	2017 年～ 2019 年	2022 年 10 月 31 日	
宇宙環境における健康管理に向けた免疫・腸内環境の総合評価 （Multi-Omics）	理化学研究所 生命医科学研究センター 副センター長 大野博司	2017 年 8 月 ～9 月（マウス） 2015 年～ 2019 年（ヒト）	2023 年 3 月 2 日	
微小重力を用いた多成分会合コロイド系の相挙動の研究(Colloidal Clusters)	名古屋市立大学 教授　山中淳平	2020 年 7 月	2023 年 3 月 17 日	物質物理科学

※　医学実験の地上でのベースデータコレクションは含む。その他実験の地上対照実験は含まない。人対象研究については年単位の記載としている。

表2　評価項目

科学的・技術的成果	(1)　研究目標の意義および達成度 • 研究目標の意義は高いか（ミッション選定/準備段階移行以降に修正された場合）. また、時間経過により減じていないか. • 研究目標は達成されたか. サクセスクライテリアに照らした達成度のレベル.
	(2)　実施体制 • 研究チームおよび JAXA の体制は適切であったか.
	(3)　科学的、技術的成果 • 得られた成果は、国際的なレベルに照らして、高いか. • 設定された目標を越える成果があったか.
	(4)　活用、波及効果 • 関連科学分野・技術領域への波及効果があったか、また、期待されるか. • 科学的、技術的に活用が見込めるか、成果活用の意義・重要性は高いか.
	(5)　きぼう利用の必然性 • きぼうで行う必然性があったか.
総合評価・提言	(6)　総合評価 • 成果インパクト、応用・波及効果などのポテンシャル、他、アピールポイント. • 今後の宇宙実験に向けての課題、改善すべき点. • 当該科学分野・領域におけるきぼう利用の発展性、継続の意義.

表3　きぼう利用テーマ選考評価委員会　構成員
（評価時）

物質・物理科学分野

委員長	長井　寿　物質・材料研究機構　名誉研究員
委員	石川　正道　同志社大学高等研究教育院　客員教授
	江刺　正喜　株式会社メムス・コア　CTO
	柴田　浩幸　東北大学　多元物質科学研究所　教授
	西岡　牧人　筑波大学システム情報系　教授

生命医科学分野

委員長	山口　朗　東京歯科大学口腔科学研究センター　客員教授
委員	牛田　多加志　東京大学大学院工学系研究科　名誉教授
	緒方　徹　東京大学大学院医学研究科　外科学専攻　感覚・運動機能医学講座リハビリテーション医学分野　教授
	武田　伸一　国立精神・神経医療研究センター　神経研究所　産学連携顧問／名誉所長
	田村　宏治　東北大学大学院生命科学研究科　教授
	中村　幸夫　理化学研究所バイオリソース研究センター　細胞材料開発室　室長
	本間　研一　北海道大学　医学部　名誉教授
	諸橋　憲一郎　九州大学大学院医学研究院　主幹教授

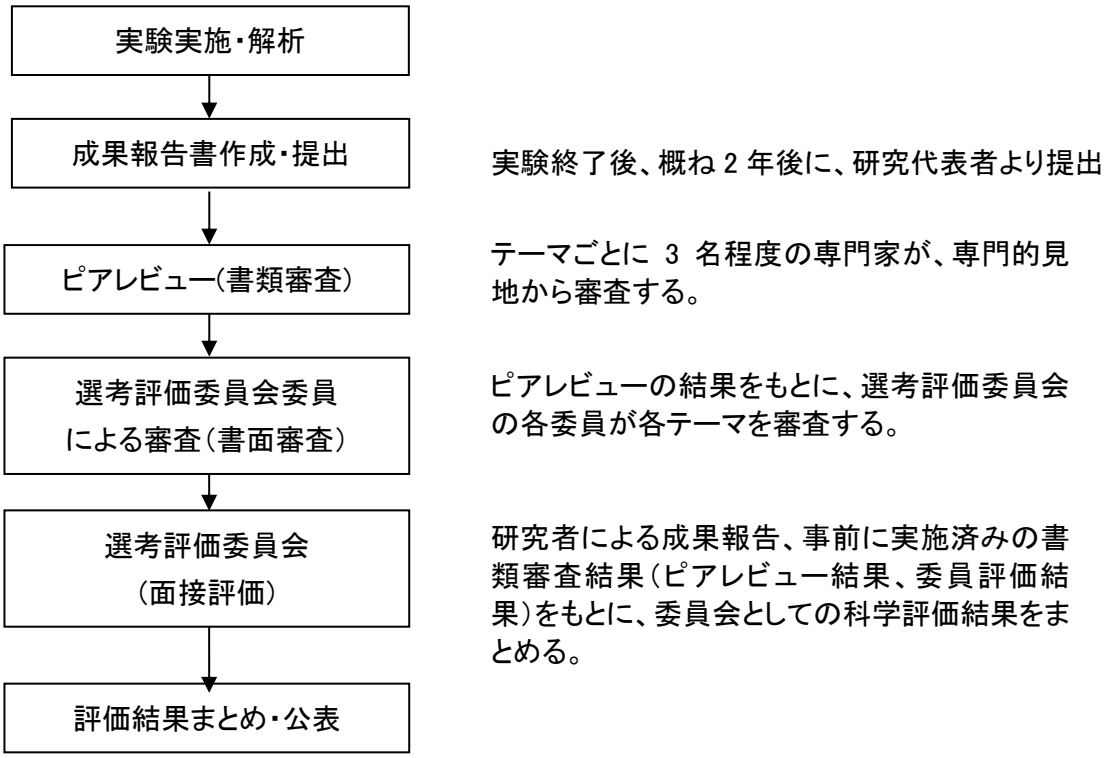


図4　科学成果評価プロセス

表５　添付文書の構成

テーマ名	研究成果報告書	評価結果	研究成果概要書(日)	研究成果概要書(英)
重力刺激による脊髄背側血管への血管ゲート形成と分子発現の解析（Gravity Gateway Reflex）	（※）	別紙 1-2	別紙 1-3	別紙 1-4
宇宙滞在中の液体生検による血漿中核酸のゲノム・エピゲノム解析～cfDNA 等を用いた低侵襲体内モニタリングに向けて～（Cell-Free Epigenome）	別紙 2-1	別紙 2-2	別紙 2-3	別紙 2-4
宇宙環境における健康管理に向けた免疫・腸内環境の総合評価（Multi-Omics）	（※）	別紙 3-2	別紙 3-3	別紙 3-4
微小重力を用いた多成分会合コロイド系の相挙動の研究(Colloidal Clusters）	別紙 4-1	別紙 4-2	別紙 4-3	別紙 4-4

（※）　論文公表後に公開

以上

別紙1-2

2022年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

重力刺激による脊髄背側血管への血管ゲート形成と分子発現の解析
（Gravity gateway reflex）

代表研究者：村上正晃（北海道大学）

総合評価

A: 目標を充分に達成した(フルサクセス相当)

本研究の目的は、重力刺激による脊髄背側血管への血管ゲート形成と分子発現を解析することである。ISSにおける微小重力下でのマウスの長期飼育という、他に得られない環境を活用し、また、JAXAとの連携の下、周到に準備された実験計画により、重力刺激の喪失で血管ゲート形成が観られないことを実証し、世界をリードする成果を得たと評価する。骨、筋肉における変化の分子メカニズムの解明、さらに、多発性硬化症等の免疫システムが関与している疾患の治療法や予防法の開発を含め、今後の研究の深化、進展に期待する。

一方、本研究により得られた主要な成果が未公表であり、分野コミュニティの評価を得るためにも、早期に論文として纏め、公表を行うことを強く推奨する。

2022年7月
きぼう利用テーマ選考評価委員会（生命医科学分野）

ISS・きぼう利用ミッション

「重力刺激による脊髄背側血管への血管ゲート形成と分子発現の解析

（Gravity gateway reflex）」

研究成果概要書

代表研究者：村上 正晃（北海道大学）

2022 年 4 月

1. 諸言

我々はマウスモデルを用いて、重力刺激を介するヒラメ筋からの感覚神経刺激が近傍の交感神経を活性化し、第 5 腰髄（L5）の背側血管付近でノルアドレナリンを分泌して血管内皮細胞から免疫細胞の遊走因子ケモカインを発現させることによって、血液脳関門に免疫細胞の侵入口（血管ゲート）を形成し、自己免疫疾患を誘導することを証明してこの現象を「重力ゲートウェイ反射」と命名した（Arima et al, Cell 2012）。その後、痛み、人為的な電気刺激、ストレス、光、微小炎症の5つのゲートウェイ反射を見出し、論文発表してきた（Arima et al, eLife 2015、Arima et al, eLife 2017, Stofkova et al, Sci Rep 2019、Hasebe et al, JEM 2022 など）。これらの知見は、神経刺激の導入部位、種類に応じて血管ゲートの形成される位置が規定され、自己反応性 CD4+ T 細胞が一定数以上存在すれば病態が引き起こされることを示している。さらに、血管ゲートを開放するための機構として IL-6 アンプ（血管内皮細胞など非免疫細胞での NFkB と STAT3 同時活性化にて誘導される過剰な NFkB 活性化）を同定した（Ogura et al, Immunity 2008, Murakami et al, Immunity 2019, Murakami et al, JEM 2011 等）。本研究では、中枢神経系抗原と網膜抗原を認識する2種類の自己反応性 CD4+ T 細胞を静脈内に投与したマウスを微小重力状態の宇宙にて飼育した場合に L5 や網膜の血管ゲートの形成がどうなるのか、他の部位に移動するのかを調べることを目的とした。

2. 実験結果および成果

（1）自己反応性 CD4+ T細胞ラインの作製

今回の宇宙実験では、ロケットの突然の打上遅延などに対しても、より柔軟に対応できるようにするために、自己反応性 CD4+ T細胞ラインを事前に作製、大量に凍結ストックし、それをケネディ宇宙センターに輸送して用いる計画とし、フィージビリティスタディ期間中に自己反応性 CD4+ T 細胞ラインを確立した。ミエリンペプチド（MOG）またはフォト受容体ペプチド（IRBP）を認識する CD4+ T細胞ラインの確立に成功し論文発表した（Tanaka et al. 2017）。

（2）MHU-4 ミッション概要

ミエリンペプチドとフォト受容体ペプチドに対する自己反応性 CD4+ T細胞ラインを移入したマウスをケネディ宇宙センターにて調製した。馴化飼育を終えた C57BL/6J マウス 12 匹に 2 種類の自己反応性 CD4+ T細胞を打上 3 日前に移入し、最終的に 6 匹のマウスをフライト群として選

抜し、打上げ/回収支援装置（TCU）に搭載した。2019 年 5 月 4 日に、これらの C57BL6 マウス 6 匹は、ケネディ宇宙センターから打ち上げられ、国際宇宙ステーションにて飼育を開始し、約 31 日間飼育（国際宇宙ステーションの飼育ケージ（HCU）内での飼育期間は約 27 日間）された。軌道上飼育終了後、マウスは帰還用の TCU に搭載され、6 月 3 日に地球に全頭無事に帰還した。地上帰還後に体重を測定すると 1 匹が 2 割ほど減少していた。このため当該マウスは免疫系の解析からは除外し、残りの 5 匹にて実施した。地上対照実験は、TCU/HCU 飼育装置の地上モデルを利用して、飼育環境など宇宙実験の実験条件を模擬し、宇宙実験と同様にミエリンペプチドとフォト受容体ペプチドをそれぞれ認識する 2 種類の自己反応性 CD4+ T細胞を移入した C57BL6 マウス 6 匹を用いて、2019 年 10 月 20 日打上模擬、11 月 19 日帰還模擬として筑波宇宙センターにて実施した。

（3）<u>MHU-4 ミッションの結果と成果</u>

微小重力環境で飼育されたマウスと地上対照マウスを用いて、様々な実験を実施し、ISS・きぼう利用ミッション「重力刺激による脊髄背側血管への血管ゲート形成と分子発現の解析（Gravity gateway reflex）」により、以下の6項目の成果が得られた。

a. 宇宙実験のために中枢神経系抗原であるミエリンオリゴデンドロサイト糖タンパクと網膜神経細胞のフォト受容体タンパクに対する2つの自己反応性 CD4+ T細胞ラインの作製を行って論文発表した（Tanaka et al, Bio Protoc. 2017）。

b. MHU-4 ミッションで自己反応性 CD4+ T 細胞を移入した 3 匹のマウスを国際宇宙ステーションに送って、1 ヶ月ほど滞在させ、当該マウスを生存回収した。

c. 重力ゲートウェイ反射の解析では、微小重力状態では地上で認められる L5 ゲートが消失しており、「重力によって、免疫恒常性が制御される」という重力ゲートウェイ反射仮説が実証でき、中枢神経系に対する重力の新たな影響を証明した。

d. 光ゲートウェイ反射の発見の論文は、本研究開発の地上対照実験から発表され（Stofkova et al, Sci Rep 2019）、微小重力環境で飼育したマウスの解析では、微小重力状態では地上で認められる光ゲートウェイ反射で示した網膜ゲートが増強し、「重力によって、免疫恒常性が制御される」という仮説が中枢神経系以外でも実証でき、重力の新たな影響を証明した。

e. 下肢筋肉、骨解析では、微小重力状態の自己反応性 T 細胞存在でヒラメ筋の重量、筋肉種の変容、下肢骨の骨量、骨ミネラル量の減少が抑制され、「重力によって、免疫恒常性が制御される」との仮説が中枢神経系以外でも実証でき、重力の新たな影響を証明した。

f. 関連英語学術論文は、フェイズビリティの段階での２報を含めて１３報発表されている。宇宙実験自体の成果である3報の論文は準備中である。

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission:
"Characterization of blood vessel gateway formation and molecule expression at dorsal vessels of spinal cords by gravity stimulation"
(Gravity gateway reflex)

Principal Investigator, Masaaki Murakami (Hokkaido University)

April 2022

1. Introduction

Using mouse models, we have demonstrated that gravity-mediated sensory nerve stimulation from the soleus muscle induces sensory-sympathetic crosstalk. This crosstalk leads to the secretion of noradrenaline around the dorsal vessels of the fifth lumbar spinal cord (L5) and induces the expression of immune-cell chemotactic factors, such as chemokines, from vascular endothelial cells, leading to a gateway for autoreactive CD4+ T cells at the blood-brain barrier (Arima et al, Cell 2012). This phenomenon was named the "gravity gateway reflex" and shown to induce tissue-specific autoimmune diseases. Since then, we have found and published five other gateway reflexes: pain, artificial electrical stimulation, stress, light, and microinflammation (Arima et al, eLife 2015, Stofkova et al, Sci Rep 2019 etc.). These studies showed that the location of the gate is defined by the site and type of nerve stimulation and that the presence of autoreactive CD4 T cells in the blood is sufficient to trigger the pathology. Furthermore, we identified the IL-6 amplifier (IL-6 amp) as a mechanism for opening the gate. The IL-6 amp describes enhanced NFkB activation after the simultaneous activation of NFkB and STAT3 in nonimmune cells (Ogura et al, Immunity 2008, Murakami et al, Immunity 2019, Murakami et al, Cell Reports 2013). In this study, we aimed to determine the effects of gate formation in the L5 and retina when mice were kept in a microgravity condition in the presence of autoreactive CD4T cells that recognize central nervous system (CNS) and retinal antigens and administered intravenously.

2. Experimental Results and Outcomes

(1) Preparation of self-reactive CD4+ T cell lines

In this space experiment, in order to respond more flexibly to sudden launch delays of the rockets, etc., the autoreactive CD4+ T cell lines will be prepared in advance, frozen in large quantities, and transported to the Kennedy Space Center for use. The establishment of autoreactive CD4+ T cell lines was examined during the feasibility study. CD4+ T cells were isolated from mice immunized with myelin peptide (MOG) or photoreceptor peptide (IRBP), and T cell lines were established by periodic antigen stimulation in vitro. By devising antigen stimulation methods and culture media, we succeeded in establishing CD4+ T cell lines against these self-antigens and published a paper in 2017.

(2) MHU-4 Mission Summary

To investigate the effects of microgravity on the gateway reflex, mice transferred with autoreactive CD4+ T cell lines against a myelin peptide and a photo-receptor peptide were

prepared and cultured at the Kennedy Space Center. Twelve C57BL/6J mice that had completed acclimation and rearing were transferred with 1×10^7 cells of each of the two types of autoreactive CD4+ T cells 3 days prior to launch. Six mice were then selected as the final flight group and loaded into the launch/retrieval support unit (TCU) on May 4, 2019, and started rearing on the International Space Station, where they were kept for approximately 31 days.

The ground control experiment was conducted using the ground model of the TCU/HCU breeding apparatus to simulate the experimental conditions of the space experiment, such as the breeding environment, etc. Six C57BL6 mice were used for the launch simulation on October 20, 2019, and then returned on November 19, 2019, to the Tsukuba Space Center. After completion of the on-orbit breeding, the mice were loaded into the TCU for return, and all mice returned safely to earth on June 3, 2019. After returning to earth, the weight of one mouse was found to have decreased by about 20%. Therefore, this mouse was excluded from the immune system analysis, and the remaining five mice were used.

(3) Results and achievements of the MHU-4 mission

Various experiments were conducted on earth using mice bred in a microgravity environment and ground control mice. The ISS/Kibo utilization mission produced the following six results.

a. Two autoreactive CD4+ T cell lines against MOG, a CNS antigen, and IRBP in retinal neurons were generated for space experiments and published in a paper in 2017 (Tanaka et al, Bio Protoc. 2017).

b. Three mice transferred with autoreactive CD4+ T cells on the MHU-4 mission were sent to the International Space Station, where they stayed for about one month and were recovered alive.

c. Analysis of the gravity gateway reflex showed that the L5 gate, which is observed on the ground, disappeared under microgravity conditions, demonstrating the gravity gateway reflex hypothesis that "immune homeostasis in the CNS is controlled by gravity" and proving a new effect of gravity on the CNS.

d. The paper that first reported the light gateway reflex used ground-based control experiments in 2019 (Stofkova et al, Sci Rep 2019), but the analysis of mice bred in microgravity showed that the retinal gate for the light gateway reflex is enhanced in microgravity conditions. Thus, the hypothesis that "gravity regulates immune homeostasis in the retina" was proven to be true outside the CNS, proving a new effect of gravity.

e. An analysis of changes in lower limb muscles and bone showed that the presence of autoreactive CD4+ T cells in microgravity suppressed changes in soleus muscle weight, muscle type alteration, bone mass and bone mineral content, demonstrating that the hypothesis "gravity regulates immune homeostasis in muscles" is also true outside of the CNS and proving a new effect of gravity.

f. Thirteen scientific papers in English have been published from this mission, with three more in preparation about the results of the space experiments.

別紙2-1

ISS・きぼう利用ミッション

「宇宙滞在中の液体生検による血漿中核酸のゲノム・エピゲノム解析

～cfDNA 等を用いた低侵襲体内モニタリングに向けて～

（Cell-Free Epigenome）」

研究成果報告書

研究代表者； 村谷　匡史 （筑波大学）

令和 4(2022)年 8 月

1. 緒言

1.1 研究内容、目標の概要

宇宙滞在では放射線、微小重力、閉鎖環境ストレスが複合的な影響を生体に与え、深宇宙への有人探査に向けて、その医学的理解と対応策の開発は重要な課題である。また、地球上の生命が、これまで進化上経験したことのない微小重力環境に対して示す応答は、生物学的にも非常に興味深い。JAXA と本研究の提案者らは、2016 年に国際宇宙ステーション（ISS）で世界初の人工1G 環境を対照とした第 1 回小動物飼育ミッション（MHU-1）を行い、生命が地球上で普遍的に受ける重力が、環境シグナルとして骨・筋・免疫系、さらに代謝や神経調節の恒常性維持に重要であることを見出した(参考文献 1)。しかし、限られた実験機会と技術的制約により、その生物学的解釈では不明瞭な部分も多く残されている。

モデル生物を用いた実験結果のヒトでの検証と、より柔軟なタイムコース実験の実施を目的として、MHU-1 ミッションの準備と並行して宇宙飛行士を対象とした液体生検（リキッドバイオプシー）による宇宙環境応答の評価を行う研究計画を 2014 年に提案し、国際公募ライフサイエンスおよび宇宙医学分野 ISS 利用実験テーマとして採択された。本研究では、6名の宇宙飛行士の血漿中の細胞外 RNA（cell-free RNA, cfRNA）を対象としたトランスクリプトーム解析と細胞外 DNA（cell-free DNA, cfDNA）のメチル化解析を行うことで、ヒトの体内深部で起こる変化を組織・細胞種単位で予測することを目標とした。モデル生物で得られた結果との比較により宇宙環境応答の生体影響を複数種間で検討する本研究は、ヒトを対象とした宇宙分野のオミックス研究を開拓する取り組みとしても先駆的かつ重要であり、これまでの MHU ミッションを通して蓄積された微量検体のエピゲノム解析技術を駆使して実施されたものである。

1.2 研究内容の重要性、分野・領域での位置づけ、意義

宇宙飛行士が経験する骨筋系の機能低下、前庭系、循環、免疫系などの生理的変化を理解し、対応策を開発するために、宇宙生命科学・医学研究の推進が世界的な協力のもとに進められている。宇宙実験の近年の重要な発展として、新たなハードウェアの開発とモデル動物の長期飼育が挙げられる。宇宙短期滞在から長期滞在への移行とともに、長期間の安定した飼育環境管理を可能にする実験装置の開発が進められ、NASA がげっ歯類の飼育実験を行い、JAXA は遠心力を用いた人工重力装置を備えた小動物飼育装置を ISS に設置するなど、地球低軌道における魚類やマウスなどのモデル生物を用いた宇宙環境応答の研究が行われている。

また、ゲノミクス、プロテオミクス、メタボロミクスなどを含むマルチオミックス解析も宇宙生命科学分野で近年急速に導入が進んでいる。これらを組み合わせた研究成果として、本研究に参加する高橋を PI として、JAXA が 2016 年に実施した人工1G 環境を対照とした MHU-1 ミッションがある。この研究では微小重力下で 35 日間飼育されたマウスの、骨格筋、骨、胸腺、心臓、脳を含む 30 種類以上の組織を摘出し、RNA シーケンスおよび ChIP シーケンスを用いた網羅的解析を行った。その結果、変化が期待されていた筋骨系では予想以上に急速な機能低下が見られ、さらに、免疫系、神経系、生殖系などの幅広い組織においても宇宙滞在に付随した変化がみられた。さらに、オミックスデータを様々なバイオインフォマティクス手法を用いて解析することにより、重力変化の影響を受ける遺伝子制御ネットワークや細胞内パスウェイの同定に成功した。

これまで 7 回の MHU ミッションのほか、メダカやゼブラフィッシュの宇宙飼育実験、NASA のげっ歯類を用いた研究プロジェクトなど、多数の宇宙実験が行われ、マルチオミックス計測の標準化、データベース化と再解析が進んでいる。さらに、複数の研究を統合して機械学習や数理モデルを応用した解析を行うデータサイエンスが、本研究の提案者である村谷が日本の代表者を務める国際宇宙オミックスコンソーシアム（International Standards for Space Omics

Processing, ISSOP）や GeneLab の Analysis Working Group 等で展開されている。日本でも JAXA と東北大学が共同で宇宙研究のヒトへの還元を目指すデータベースとして宇宙生命科学統合バイオバンク（Integrated Biobank for Space Life Science, ibSLS）を設立している。このように、モデル生物の ISS での長期飼育と帰還にかかわるハードウェア開発とオミックス計測技術の導入により、異なる生物種で得られた宇宙環境応答機構の理解をヒトへ還元するための研究を推進する機運が世界的に高まっている。

このような状況の中、宇宙飛行士を対象とした検体採取と詳細なオミックスデータの欠如が研究推進のボトルネックとなっている。宇宙飛行士からの組織検体採取の機会は限られており、体内深部組織を直接扱う解析が困難であることは、モデル生物を用いた研究とは状況が大きく異なる。研究計画の公募から各国の倫理申請を経てアクセスできる限られた機会で有意義な研究を行うためには、準備にも数年を要する。これらの問題の解決法として、本研究は比較的低侵襲な採血により得られた血漿検体を用いて、細胞外 RNA と DNA を対象とした「リキッドバイオプシー」の手法を宇宙飛行士の体内深部の分子状態の予測に応用することで、サンプリングの制約を新技術の導入によって補うものである。さらに、研究提案申請から 8 年を経た現在でも、1 名の長期宇宙滞在宇宙飛行士の解析を行った NASA の Twins Study に次いで、複数名の長期宇宙滞在宇宙飛行士を対象とした世界初の血漿中 RNA・DNA の解析研究であり、得られたデータの新規性も極めて高い(参考文献 2,3,4)。また、6 名の定量データを統計値として公開する点でも、オープンサイエンスに基づく宇宙生命科学研究の国際連携をヒト対象研究に広げる重要な意義を持つ研究である。

1.3 研究動機、バックグラウンド

血漿中には多様な細胞外小胞が含まれており、細胞死によって生じるものや、細胞から放出され機能的な分子を含み細胞間連絡に関与するものなどが知られている。また、血漿中でたんぱく質や脂質と複合体を形成することで分解を免れた DNA や RNA が存在し、生化学的検査の対象となっている血液成分とは別に、それぞれの分子の由来組織・細胞の状態を反映することが期待される。このため、血液や尿などの低侵襲的に採取できる液性検体を用いて体内深部組織を解析する手段として「リキッドバイオプシー」と呼ばれている。

先行する MHU-1 ミッションでは、全身の多様な組織を解析できるが、宇宙飛行士と共通した検体種類と解析手法を用いることができるのは血液検体のみである。本研究は MHU-1 ミッションで血漿の細胞外 RNA を解析した研究者が提案し、解析を行うことでヒトとマウスデータの効果的な統合解析を実現した。一方で、MHU ミッションでは複数タイムポイントでの検体採取は困難であるが、宇宙飛行士は軌道上で複数回の採血を行うことが可能で検体ボリュームも大きい。医学応用に直接つながるヒトを対象としたタイムコース採血と十分な量の検体を活用した多角的な解析手法の応用を、マウスデータと組み合わせることを念頭に本研究を計画した。

本研究の提案者らはこれまで複数の MHU ミッション(MHU-1,2,3,4,5,7)に PI、CI、論文共著者として参加し、研究代表者は新学術領域研究「宇宙に生きる」等の研究を通して、ゼブラフィッシュと線虫の宇宙実験検体と他の動植物を用いた地上実験にゲノミクス解析支援も行っている。さらに、GeneLab の解析ワーキンググループへの参加を通して異なる生物種のマルチオミックス解析データを俯瞰できる立場から、宇宙飛行士のリキッドバイオプシー解析を遂行することで、新しい視点の獲得と宇宙生命科学への貢献を目指した。

2. 研究計画

2.1 研究目標

本研究では細胞外 DNA および RNA の解析によるリキッドバイオプシーを計画した。血漿中には、死細胞由来の DNA および RNA が含まれ、体内組織で起こる細胞のターンオーバーのモニタリングを可能にする（図 2.1）。また、エキソソーム等の細胞外小胞は機能的マイクロ RNA などの RNA を含み、宇宙環境応答のバイオマーカーとしての利用や、細胞間連絡の分子機構の手がかりとなる。血漿中の cfDNA、cfRNA の解析目標として以下の項目を計画した。

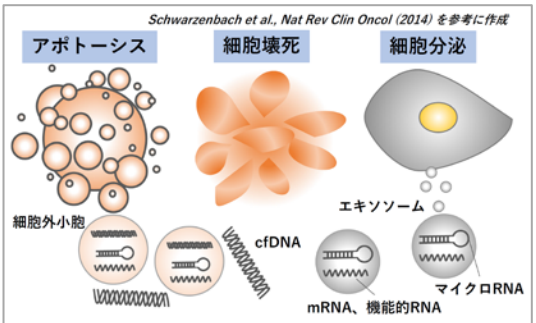


図 2.1 cfDNA, cfRNAの由来と液体生検としての利用

1）タイムコース検体採取

MHU-1 ミッションでは、組織検体の回収は輸送機が着水してから約2日後であり、人工1G と μG 条件間の軌道上での飼育環境に加え、地上1G 環境への再順応過程が結果に影響した可能性がある。このため、宇宙環境の影響を受けている遺伝子群は特定できたものの、宇宙環境への応答と帰還後の再順応の過程が重なった遺伝子発現プロファイルの解釈には不明瞭な点もあった。本研究ではフライト前からフライト後までの 11 ポイントのサンプリングを行うことで、時系列変化を明らかにすることを目標とした。これにより、各宇宙飛行士のフライト前、フライト中、フライト後の検体をそれぞれ比較することが可能となる。初期の宇宙環境応答と再順応の解釈に重要なタイムポイントである打ち上げと帰還後の最初のタイムポイントは、3 日程度を目標に運用面での調整を行い、3-5 日程度のタイミングを確保した。研究対象者数は必要な研究期間も考慮して6名を目標とした。

2） cfRNA シーケンス解析

組織特異性が詳しく報告されているマーカー遺伝子が多数データベースに登録されていることから、コーディング遺伝子の RNA シーケンス解析は cfRNA の由来組織の推定に有用である。特定の組織や細胞種に限局して発現する RNA の検出は、cfRNA の由来組織を示唆する情報となるため、宇宙環境に応答する体内深部の組織の同定を目標とし、RNA シーケンス解析の手法を用いてこれを達成する。一方で、幅広い細胞種で発現する細胞周期関連遺伝子や DNA 損傷応答にかかわる遺伝子群の変化が低軌道での宇宙放射線に応答して変化する可能性がある。したがって、cfRNA シーケンスによる環境応答遺伝子の発現変化の推定も目標とした。

3） マイクロ RNA・Small-RNA 解析

マイクロ RNA を含む非コード RNA を対象とする small-RNA シーケンスでは、これまでに軌道上で飼育したマウスで発現が顕著に変化するマイクロ RNA 群が見いだされており、ヒトのホモログが同様に変化するのかを検証することを目標とした。マイクロ RNA の定量データは、標的遺伝子予測と、マウスの各組織の RNA 発現プロファイルとの比較に用いることができる。このため、他の宇宙実験との比較に応用できるリソースとしても重要なマイクロ RNA の解析を目標とした。

4) cfDNA のメチル化解析

核 DNA の血漿への放出は細胞死によるものと期待できるため、そのエピゲノム修飾を調

べることで、体内深部で起こる細胞のターンオーバーを推定できる。DNA のメチル化には細胞種特異的なパターンがあり、cfDNA のメチル化状態がフライト前後で変化している遺伝子領域を同定することで、cfDNA の由来組織を推定する。RNA シーケンス解析に加えて DNA のメチル化解析も目標に加えることで、RNA と DNA の2つの手法で組織・細胞種特異性を確認する。

5) データ解析目標

これまでの MHU ミッションは、骨筋系、循環器、免疫、神経系などの幅広い組織種で宇宙環境応答が見られた。特に老化関連表現型を引き起こす分子機構がヒトとマウスでどの程度共通するのか、さらに、これらに関連する分子のバイオマーカーとしての評価を検討する。また、全身でシステミックに起こる宇宙表現型の包括的な理解に取り組むことを目標とした。このために、AI や機械学習のデータ解析への応用など、本研究の参加者以外の様々な研究者によるコミュニティーレベルの解析を本研究の出口として想定し、ヒトデータの活用をデータベース上での研究成果の公開を通して促進することを目標とした。

（サクセスクライテリア）※本表に限り当初設定時（平成 29（2017）年 12 月）の被験者という用語を利用。

ｻｸｾｽﾚﾍﾞﾙ	サクセスクライテリア	補足（設定根拠等）
ミニマム サクセス	以下を達成すること。 1) 宇宙環境滞在により発現変化する RNA を血漿サンプルで確認することができる。 2) 血漿中 cfDNA 量をモニターすることができる。	【判断時期】 全被験者データ取得後 1 年 【設定根拠】 宇宙滞在中及び前後の血液サンプルから遺伝子レベルの宇宙環境応答を世界で初めて複数被験者で解析できる。
フル サクセス	ミニマムサクセスに加えて、以下をすべて達成すること。 3) 組織特異的 RNA の発現情報から、宇宙環境の影響を受けている組織を推定することができる。 4) 血漿中 cfDNA の解析から宇宙環境の影響を受けている組織を推定することができる。 5) DNA メチル化解析から発現調節を受けている遺伝子を同定する。	【判断時期】 全被験者データ取得後 1 年 【設定根拠】 宇宙滞在による DNA 障害を血液サンプルから捉えるという試みに加え、比較的非浸潤的な手法による宇宙滞在中体内組織生理状態モニタリングを世界で初めて実施する。
エクストラ サクセス	作業仮説を超える、以下のいずれかを達成すること。 6) 宇宙環境におけるストレス状態をモニターできるバイオマーカー候補を挙げるとともに、解析手法を提案することができる。 7) 宇宙滞在だけではなく地上における老化メカニズム等に対する新たな知見または医薬品開発等につなげることができる。	【判断時期】 全被験者データ取得後 1 年 【設定根拠】 宇宙医学の応用と社会への貢献に繋がる。

2.2 体制（2022 年 7 月末時点）

研究代表者

村谷匡史 （筑波大学・医学医療系・教授）

研究の統括と検体処理、データ解析

研究分担者

高橋智 （筑波大学・医学医療系・教授）

マウス研究データとの比較および解釈

連携研究者

工藤崇 （筑波大学・医学医療系・准教授）

マウス実験とヒト実験データの比較解析

研究代表者の研究グループ所属の連携研究者　検体処理、データ解析

Lindsay Rutter （日本学術振興会外国人特別研究員）

検体を用いたゲノム・エピゲノム解析

藤田晋一郎 （人間総合科学研究科・生命システム医学専攻）

マウスデータを用いたデータ解析手法の開発と条件検討

Nailil Husna （グローバル教育院・ヒューマニクス学位プログラム）

マウス実験とヒト実験データの比較解析

斉藤良佳 （インターンシップ学生・京都大学医学部）

マウス実験とヒト実験データの比較解析

JAXA 関係者

総括責任者（所属長等）

久留　靖史（JAXA・有人宇宙技術部門宇宙飛行士・運用技術ユニット・ユニット長）

（所属長等：JAXA が担当する「人を対象とする研究」の運営管理上、所属部署の担当業務（研究含む）の状況を把握するとともにそれらの監督を行う。原則、研究業務に直接は携わらない。ただし、研究業務に携わる必要が生じた場合、所属長が指名する者（準ずる職責を有する者）がその監督を行う。）

研究コーディネーター

（宇宙実験の準備、運用、本宇宙実験の資料・情報の収集）

JAXA・宇宙飛行士運用技術ユニット・宇宙医学生物学研究グループ

古川　聡　　技術領域上席

井上夏彦　　主任研究開発員

相羽達弥　　主任研究開発員 （個人情報管理者（匿名化担当）

芝　　大　　JAXA・きぼう利用センター・主幹研究開発員

本研究の研究チームと JAXA の役割分担を下表に示す。研究チームは下記分担に基づき、JAXA　有人宇宙技術部門 宇宙飛行士運用技術ユニット（飛行ユニット）およびきぼう利用センターと調整し、各作業を実施した。

作業項目	研究者チーム	JAXA	
		飛行ユニット	きぼう利用センター
実験要求、運用要求、実験条件の検討、策定	○	支援	支援
実施計画の策定	―	○	支援
地上予備実験	○	支援	―
生物適合性試験	支援	○	―
ヒト倫理対応（JAXA、NASA）	支援	○	―
運用準備(ODF作成)、輸送	支援	○	―
軌道上サンプル回収	―	○	―
地上対照実験	○	支援	―
飛行後解析	○	支援	―
小動物飼育ミッションとの連携解析	○	―	支援
成果発表※	○	○	支援

※成果発表：研究者はサイエンスの観点、JAXAは有人宇宙活動の観点

2.3 スケジュール

フライト実験準備移行審査（フェーズ移行審査）からフライト後解析までの、当初の全体スケジュールを図 2.3-1 に示す。

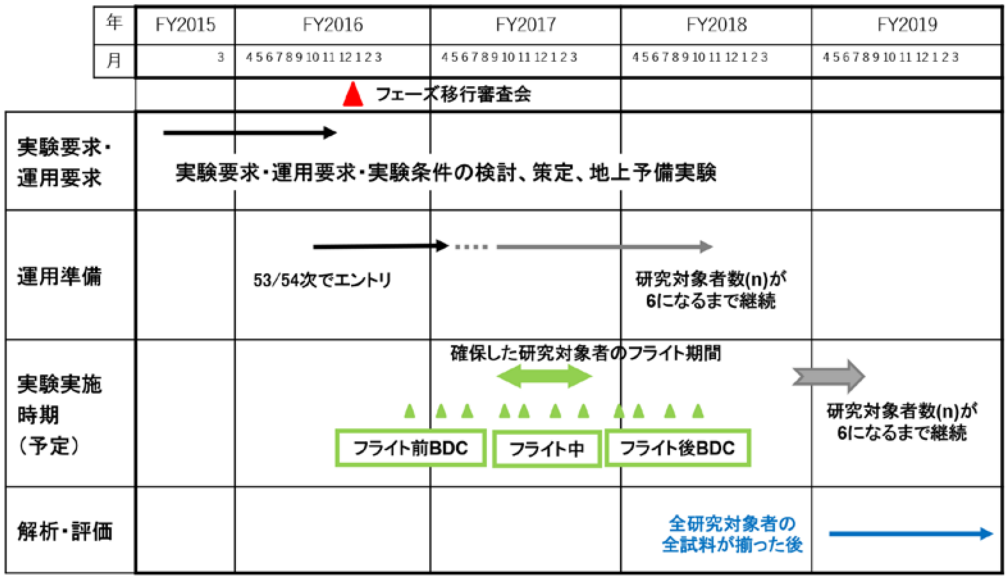


図 2.3-1 フェーズ移行審査からフライト後解析までの当初全体スケジュール

本テーマは、「2014 年国際公募ライフサイエンスおよび宇宙医学分野 ISS 利用実験テーマ募集」の、日本の宇宙実験候補テーマとして 2015 年 3 月に選定された。本募集は、国際公募参加国が運営する、国際科学評価パネル、国際技術評価パネルでの評価を経て国際調整を行い、ISS・きぼう利用推進委員会、およびその下委員会等にて審査され、日本の候補案となり 2015 年 3 月に選定された。

2016 年 12 月にフェーズ移行に係る外部審査会、2017 年 5 月にプロジェクトに係るフェーズ移行審査会が実施され、フライト実験として承認後、実験準備を開始した。

その後の実績スケジュールを、図 2.3-2 に示す。

宇宙飛行士に対し、インフォームドコンセントを、研究対象者 6 名となるまで継続した。なお、genetic study とみなされた本研究のインフォームドコンセント・ブリーフィングは、倫理審査委員会からの指示にて JAXA 宇宙医学生物学研究グループ長が代理で実施した。並行して、NASA ジョンソン宇宙センタ（JSC）、欧州宇宙飛行士センター（EAC）、もしくは筑波宇宙センター（TKSC）での地上対照データ取得（Baseline Data Collection, BDC）を開始するにあたり、JSC 安全審査である Test Readiness Review（TRR）を、医療監視レベル 4（基本的にリスクが最小限に抑えられた手順、医師による電話相談が可能）に準じ書類審査を受審し、承認された。本 TRR は倫理申請とともに年次更新を継続した。

なお、本テーマはヒトゲノム解析研究であり、NASA 倫理委員会と調整を行い、取得試料やデータの取扱いを定義し、匿名化（対応表有）にて進められた。実験参加の同意を得るためのインフォームドコンセントブリーフィングは、研究者チームが研究対象者を特定できないよう、JAXA 研究コーディネーターが、代替説明、インフォームドコンセントフォームへの同意署名を実施した。

同意を得られた研究対象者候補で実験に割り当てられた宇宙飛行士にそれぞれ対し、フライト前 3 回、フライト中 4 回、フライト後 4 回の計 11 回の採血を実施した。

2017 年から実験を開始し 2019 年 10 月に 6 名への実験が完了し、全試料は 2019 年 12 月に研究代表者に一括引き渡しされた。

その後、研究者チームによる解析を経て 2022 年 4 月より、学会発表要旨と論文の投稿が進められている。

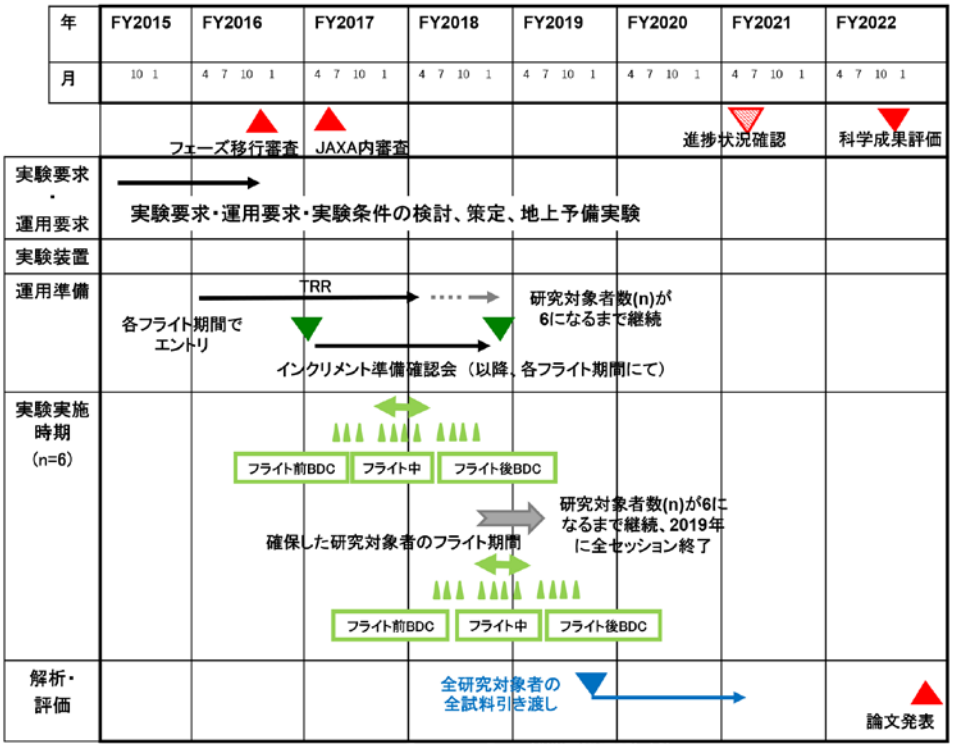


図 2.3-2 フェーズ移行審査から論文発表までの実績

3. 実験準備・運用

3.1 地上予備実験

テーマ採択後、実験要求の詳細化検討を実施した。地上予備実験の中で、軌道上で実際に利用する採血管（BD #362788）を用いた採血凍結保存条件、DNA/RNA 収量、および血漿分離性、DNA/RNA 精製の確認を実施した。また、マウス検体を用いた RNA 解析法の確認、DNA メチル化解析フローの確認実験を実施した。

3.2 倫理関連準備

本テーマはヒトゲノム解析研究であり、JAXA の人を対象とする研究開発倫理審査委員会（JAXA倫理委員会）の細則として国の指針（「人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」（令和 3 年 3 月 23 日制定、令和 4 年 3 月 10 日一部改正）文部科学省、厚生労働省、経済産業省）に準拠し取扱った。また、NASA Genetic Research Policy（JID 1800.4 SA-14-053, SA-15-027）では、NASA の宇宙飛行士から採取した残余試料の提出、データ提出の義務化が記載されているが、NASA 倫理委員会（NASA IRB）との調整の結果、NASA 宇宙飛行士に関しては要求があればNASAに提供することとし、JAXAにて管理することとなった。

3.3 実験運用

軌道上採血に関して、遠心機（利用採血管に対する遠心速度）、冷凍庫、採血キット、実績のある採血管種類の調整を、科学要求に基づき NASA 運用技術者と実施した。また、他国テーマとの相乗りによる、採血・遠心・凍結作業のクルータイム削減およびクルー手順の詳細確認を行った。

BDC に関しては、NASA JSC Clinical Lab、EAC、TKSC(各国内法に基づき)にて各医療資格者と、遠心機、冷凍庫、採血管の調達などを確認し、初回セッションでは研究コーディネータが現地立会いを行い、要求を満たしていることを確認した。

3.4 データシェア要求

軌道上・フライト前後の宇宙飛行士健康管理用（MEDB）の下記の血液生化学検査データのデータシェアを要求した。別途、研究対象者への質問票として毎採血時に、24 時間以内の薬剤履歴および運動履歴情報を入手した。

データシェア要求項目
薬剤履歴 (MEDB 1.1/ 1.3)
血液検査データ (MEDB 2.1)
運動履歴 (MEDB 4.1/ 5.1/ 5.2/ ASCR Exercise)
栄養評価 (MEDB E2.04)
放射線量　(MEDB 004L)

これらのデータは、前述のとおり個人情報保護の観点から、JAXA 個人情報管理者(匿名化担当)が収集・管理し、研究者チームの解析に特殊な結果が出た場合のみ、全研究対象者に対する統計値として研究代表者に開示される計画として、JAXA 倫理委員会に承認された。

3.5 装置・機器

3.5.1 BDC 装置・器具・消耗品

全て以下の市販品の装置・器具・機器・消耗品を利用した。

①実験装置

No.	装置名称	要求事項等
1	遠心分離機	1,600xg , 30 分、常温（または冷却）の遠心が可能。 ※g 条件は下限 1,000g～上限 2,000g の間で変更可能、遠心時間は 15 分～30 分の間で変更可能。 ※遠心機はアングル固定式、スウィングバケット式のどちらも可能。実験の途中から変更することも許容。
2	ディープフリーザー	-80℃

②器具・消耗品

No.	器具類名称	要求事項等
1	採血キット	ターニケット、バタフライ採血針、ガーゼ、バンドエイド等）を、Human Research Facility のサプライキットは NASA が供給。EAC、TKSC では JAXA で供給。
2	5mL 血漿用採血管 （BD #362788）	軌道上利用採血と同じ、抗凝固剤 EDTA を含む、血漿分離ゲル入り 5mL 採血管(BD Vacutainer® plastic molecular diagnostics tube, Product Number: 362788)。
3	4mL 採血管 （BD #367861） 全血用、各研究対象者初回 1 回のみ	抗凝固剤 EDTA を含む 4 mL 採血管。 (BD Vacutainer® Product Number: 367861).

3.5.2 軌道上装置・器具・消耗品

以下に示す ISS 既存装置、および NASA 共通備品を利用した。

No.	装置名称	要求事項等
1	遠心分離機	1,600xg、30 分、常温(または冷却）の遠心が可能。 ※g 条件は下限 1,000g～上限 2,000g の間で変更可能、遠心時間は 15 分～30 分の間で変更可能。 ※遠心機はアングル固定式、スウィングバケット式のどちらも可能。実験の途中から変更することも許容。 （軌道上遠心機設定値） RC Spin Time (minutes) 30.00 RC Spin Speed 3800 RC Ramp-Up Speed 6 RC Braking Speed 9 RC Spin Time (seconds) :00 （本設定の場合、1239g の g 条件）
2	軌道上保管 冷凍冷蔵庫 MELFI （Minus Eighty- degree Laboratory Freezer for ISS)（-95℃、2℃） 帰還時 冷凍冷蔵庫 GLACIER/	-95℃（-100～-68℃）

	POLAR	

②器具類・消耗品

No.	器具類名称	要求事項等
1	採血キット	NASA 共通品
2	プラスチック手袋	NASA 共通品
3	5mL 血漿用採血管 （BD #362788）	NASA 共通品 抗凝固剤 EDTA を含む血漿分離ゲル入り 5mL 採血管 (補足)NASA 採血キットの「Blood 7ml EDTA（P/N SJG46121810-704）」として登録。

3.6 実験運用

研究対象者 1 名につき、合計 11 回、血漿用 5mL 採血を実施した。

フライト前は打ち上げ 24 週間前（L-168(±14)d）、16 週間前（L-112d(±14)d）、8 週間前（L-56d(±14)d）の計 3 回、軌道上では、フライト 5 日後 （FD5(±1d) 、30 日後（FD30(±7d)）、60 日後（FD60(±14d)）、120 日後（FD120 (±14d)もしくは帰還 8 日前（R-8(-14/+0))の計 4 回、フライト後は、ISS から帰還 3 日後（R+3d(-0/+3d)）、30 日後（R+30 (±7)d）、60 日後（R+60(±14)d）、120 日後（R+120(±14)d）の計 4 回である。

別途、各研究対象者の初回 1 回（フライト前 1 回目（Pre#1））のみ、DNA 精製のための全血用 4mL 採血を行った。

各研究対象者の測定ポイントと全体の流れについては、図 3.6 に示す。

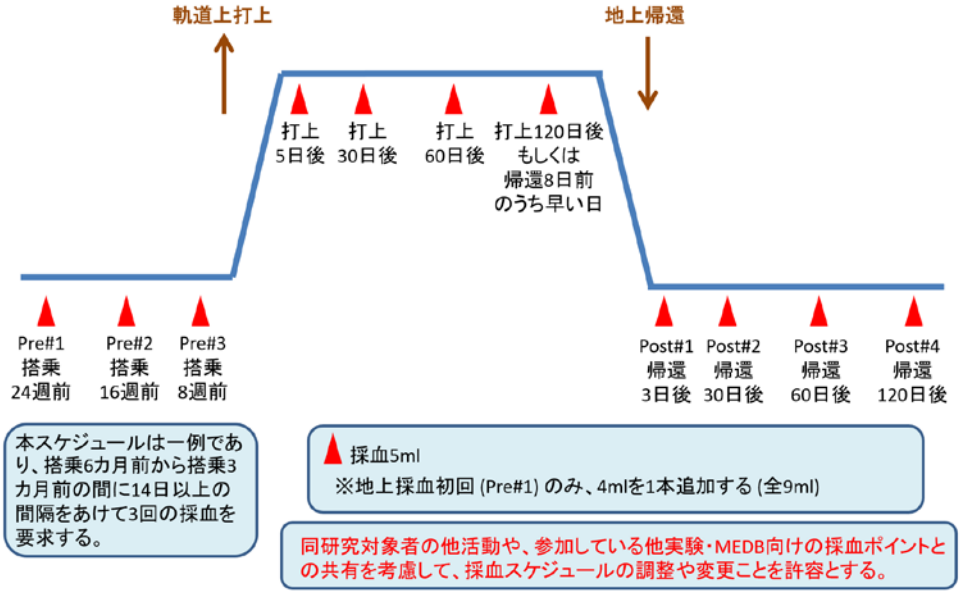


図 3.6 各研究対象者の測定ポイントと全体の流れ

採血日は研究対象者の負担軽減の目的で、他テーマの採血機会と同時に設定されるため、「フライト前は 14 日以上の間隔をあけて 3 回採血する」のみ要求し、他は調整や変動を許容することとした。

なお、研究対象者には以下の制約を設定した。

✓ 採血前 8 時間絶食後、翌朝の朝食前に採血を行う。

✓ 採血前の水分摂取は可、ただし糖、脂質を含まないものとする。
✓ 研究対象者は検体採取前 24 時間以内に以下を実施しない。
・ 筋生検
・ 激しい運動(最大酸素摂取量測定、船外活動訓練を含む)
・ スリープシフト

3.7 実験手順

3.7.1 BDC手順

以下のとおり。採血時間は1回あたり15分。

1) 試料識別番号を振った採血管を準備する。
2) 採血前8時間絶食後、翌朝の朝食前に5mL採血する。
3) 採血後ゆっくり8～10回転倒混和して2時間以内に遠心(2000xg、15分、常温)し、血漿を分離する。
4) −80℃フリーザーに入れて輸送時期まで凍結保管する。

3.7.2 軌道上手順

以下のとおり。クルータイムは1回あたり40分。

1) 採血キット、採血管などを準備する。
2) 採血前8時間絶食後、翌朝の朝食前に5mL採血する。
3) 採血後、ゆっくり8～10回転倒(回転)混和して2時間以内に遠心分離し (g条件は下限1,000g～上限2,000gの間で変更可能、遠心時間は15分～30分の間で変更可能、常温)、血漿を分離する。
4) 分離した後、1時間以内に−95℃のMELFI にて凍結保存する。

3.8 使用する機器・薬品等の危険性評価と安全体制

利用装置・消耗品類は、軌道上装置以外全て市販品であり、医療機械として承認されている。採血手順は軌道上および JSC、EAC、日本の医療機関で標準的に実施されているものであり、JAXA/NASA/ESA/国際倫理委員会で承認され、TRR の承認を得た。

安全体制は、軌道上実験では ISS 計画での通常運用時の医療体制に、フライト前後 BDC では各極の BDC 医療体制の運用に従った。具体的には、JSC では医療監視レベル 4、EAC では DLR(ドイツ宇宙センタ)の安全体制、TKSC では、緊急時は安全管理者(医師)のオンコール、ケガ発生時は安全管理者へ連絡であり、全セッションにおいて対象事例はなかった。

3.9 研究対象者の個人情報の保護

試料・個人情報の取り扱いは、以下の指針に準じた。

・ヒトゲノム遺伝子解析研究の倫理指針(平成 26 年 11 月 25 日一部改正:文部科学省、厚生労働省、経済産業省)
・NASA:「NASA (JID i800.4 for international ISS Partner Led Protocols)」(調整内容)
・人を対象とする生命科学・医学系研究に関する倫理指針」令和 3 年 3 月 23 日制定、令和 4 年 3 月 10 日一部改正)文部科学省、厚生労働省、経済産業省)

フライト前後および軌道上の採血試料は、JSC で一時保管された。全ての血液試料は識別番号を記載され、初回データまたは試料取得までに無作為に割当てられた。試料は、JAXA または実験支援者が JSC で受け取り、JAXAへ輸送した。研究対象者保護のため、筑波大学へは全研究対象者の全試料が揃ったのち一括で引き渡された。

解析まで、および解析後における試料・データの取扱いは下表のとおり、JAXA 有人部門セキュリティ管理実施要領【JJX-2012005】に従い管理し、環境・健康・運動・投薬データ、研究対象者の個人情報については、匿名化（対応表有）を行い、JAXA 個人情報管理者が管理した。必要に応じ、研究対象者集団の情報として研究代表者に提示することとし、匿名化の対応表については、JAXA 個人情報保護者が管理し、提案者には渡されない。

なお、NASA 宇宙飛行士に関して要求があれば NASA に提供することとして調整した。(※1)

種類		検体		データ	
		血液	抽出DNAおよびRNA	シークエンシング生データ※1)	解析データ※1)
非識別化	～解析	JAXAがコード化し、非識別化	既に非識別化された血液から抽出		
	解析～	(残サンプル)非識別化、JAXA保管		非識別化、JAXA保管 ※1)NASA宇宙飛行士に関するデータをNASA提供する場合、先方の倫理委員会の審査など必要手続きを得た上で提供	
研究者への受け渡し方法	～解析	全研究対象者の全検体が揃った後、一括で筑波大学に渡される	N/A		
	解析～	N/A		※1)NASA提供時は希望があれば匿名化（対応表有）した上でNASA指定のファイル交換システムを使用して伝送、もしくは、ハードディスクに収めて手渡し	
保護方法	～解析	データと研究対象者が結び付けられる可能性を減少させるため、全検体は非識別化され、鍵のかかるインキュベータで保管		筑波大学において施錠されたキャビネットおよびパスワード保護されたコンピュータに保管	
	解析～	JAXAセキュリティ規程に準じてJAXA内管理		JAXAのセキュリティ規程に準じてJAXA内で管理。*1)NASAでの保管についてはNASA規程(JID1800.4)に基づき管理	
保管場所	～解析	筑波大学			
	解析～	JAXA		JAXA/NASA*1)	

3.10 研究対象者や医療データの提供者への本研究で得られた結果の提示

本研究では遺伝子情報を解読することが目的ではないため、疾患関連遺伝子や人種等個人情報が得られる可能性は低いが、シーケンス解析により偶発的に情報が得られた場合、通知を希望した研究対象者には得られた情報を通知することとした。情報通知希望の意思は、予め同意書で確認した。結果の意味や信頼性については JAXA 研究コーディネーター、個人情報管理者を介して研究者から、医療面への影響については別途紹介のカウンセラーから説明する。重篤な病気に関する遺伝子が発見された場合、JAXA 以外の宇宙機関に所属する宇宙飛行士が研究対象者の場合は、JAXA から当該研究対象者を担当するフライトサージャンに通知し、担当フライトサージャンを通じて研究対象者に通知する。研究対象者の了解を得て、JAXA が各機関の指定する遺伝カウンセラーに情報開示を行い、研究対象者のカウンセリングを行う。JAXA の宇宙飛行士が研究対象者の場合は、研究対象者の了解を得て、JAXA あるいは本研究提案者の所属機関（筑波大学）が契約する遺伝カウンセラー情報開示を行い、研究対象者のカウンセリングを行う計画としたが、該当事例はなかった。

3.11 研究対象者に与える可能性のある影響と対策

採血は、穿刺部分の一時的な不快感または痛み、紫斑を経験する可能性、感染、過剰出血、めまいや失神の低い可能性がある。静脈穿刺に伴うリスクを軽減するため JSC または DLR 在勤の医療資格者あるいは医療資格を有する JAXA 職員ないしは JAXA の委託する機関の医療資格者によって実施した。

また、潜在的なリスクの一つとして、個人・機密情報が外部に公表・特定されるリスクを識

別した（①研究者チームと同様手順で血液試料を収集した場合、公開データベースに保管されているデータを特定される、②研究提案者チームのメンバーにより情報を外部に公表された場合、プライバシーが損害される、③本研究で収集された健康情報が外部に知られた場合（研究参加が医療記録に記載された場合など）、健康・生命・または傷害保険を取得できなくなる、今後、雇用を拒否される、④研究成果に関する情報が医療記録に記載された場合、保険提供者がこの情報にアクセスする等）。

データと研究対象者が結び付けられる可能性を減少させるため、全試料は JAXA 個人情報管理者(匿名化担当者)がコード化し、研究対象者に関する情報と共に情報セキュリティ規程及び個人情報保護規程に基づき管理した。コード化された試料から得られたデータは筑波大学において施錠キャビネット、パスワード保護されたコンピュータに保管され、試料採取日時など間接的に宇宙飛行士の身元とデータ/成果が結び付けられる情報を科学議会、学術誌、または GenBank などの公開データベースに保管されるデータで発表することはない。データ解釈にあたり、年齢や薬剤履歴を公開する可能性もあるが、個々の試料についての詳細なデータは示さず、研究対象者群全体の情報として公表される。研究対象者保護の観点から、血液は全研究対象者の全試料が揃ったのち一括で筑波大学に渡された。

3.12 運用上の事例

フライト前採血 1 セッションにて、他テーマと手順が取違えられた事例があった。要求とは異なり、上清が分注された後凍結されていた。臨床検査会社(SRL)による検査結果により、上清は Ca=0 だったため、使用された採血管は要求通りの EDTA 採血管であったと推測される。採血後の遠心条件は不明だが、本テーマは採血後 2 時間以内に遠心する要求であるため、他テーマ要求の 30 分間凝固を実施しても許容範囲内とみなされ、分注試料は使用可能と考えられた。宇宙実験では試料を得る機会が非常に限定されており、研究対象者を尊重するという研究倫理の観点から、取違い試料を有効活用し、本研究に利用することで、倫理委員会の承認を得た。

4. 実験結果及び成果

4.1 血漿 RNA および DNA の精製と定量

凍結状態で受け取った血漿を保管用に分注し、それぞれ 100μl を用いて TRIZOL 試薬による RNA 精製、フェノール抽出による DNA 精製を行った。先行研究から地上における健常者の血漿中 cfRNA の大部分は血球系細胞由来であることが予想されていた(参考文献 5)。RNA の収量にはフライト前(Pre)、フライト中（Flight）、フライト後(Post)を 3 群とした場合に有意な差は見られなかった（図 4.1.A）。複数のタイムポイントで各1検体、RNA 量がフライト中とフライト後で増加していたが、これらはそれぞれ別の宇宙飛行士の検体であった。cfDNA についても同様に有意な差は見られなかった（図 4.1.B）。がんのリキッドバイオプシー研究ではステージの進行と血漿中 DNA の増加の相関を示した報告があるが、宇宙滞在では一部のがん患者に見られるようなベースラインからの顕著な DNA 量の増加は見られないと結論付けた（サクセスクライテリア 2 の要件に該当）。

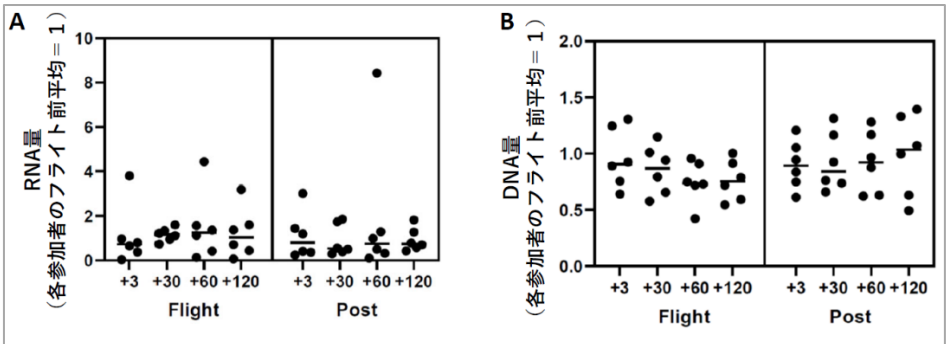


図 4.1 血漿DNA、RNAの定量
６名の宇宙飛行士の各血漿検体から精製したRNA(A)とDNA(B)について、フライト中(Flight)、フライト後(Post)の定量値を、フライト前の平均を１としてプロットした。RNA収量：（平均7.3ng/100μL血漿、1.02-41.23)、 DNA収量：平均9.61ng/100μL血漿、3.96-15.92）。

4.2 テロメアおよびミトコンドリア DNA コピー数の定量

NASA が行った Twins Study（参考文献 2,3）では宇宙飛行士1名の解析ではあったが、1年間の ISS 滞在中のテロメアコピー数とミトコンドリア DNA の増加が報告されていた。テロメアコピー数については、本研究でも一部の検体で増加が見られたが、ばらつきが大きくフライト中とフライト後の比較では有意差は無かった（図 4.2.A）。ミトコンドリア DNA の定量では、顕著なコピー数の増加がフライト中に起こり、フライト後に地上ベースラインと同様の水準に戻る変化が見られた（図 4.2.B）。

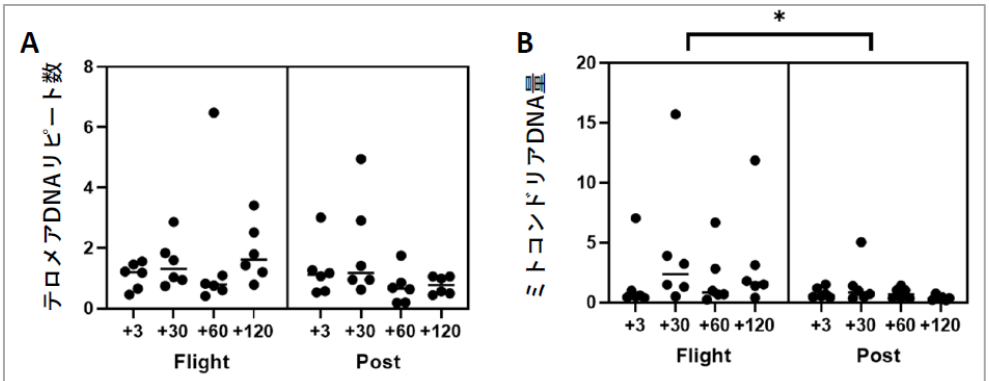


図 4.2 テロメア、ミトコンドリアDNAの定量
血漿DNAのテロメアリピート数(A)、ミトコンドリアDNAコピー数(B)をリアルタイムPCRにより定量しフライト前平均を１としてプロットした。*フライト中 vs フライト後、nested t-test、p=0.019。

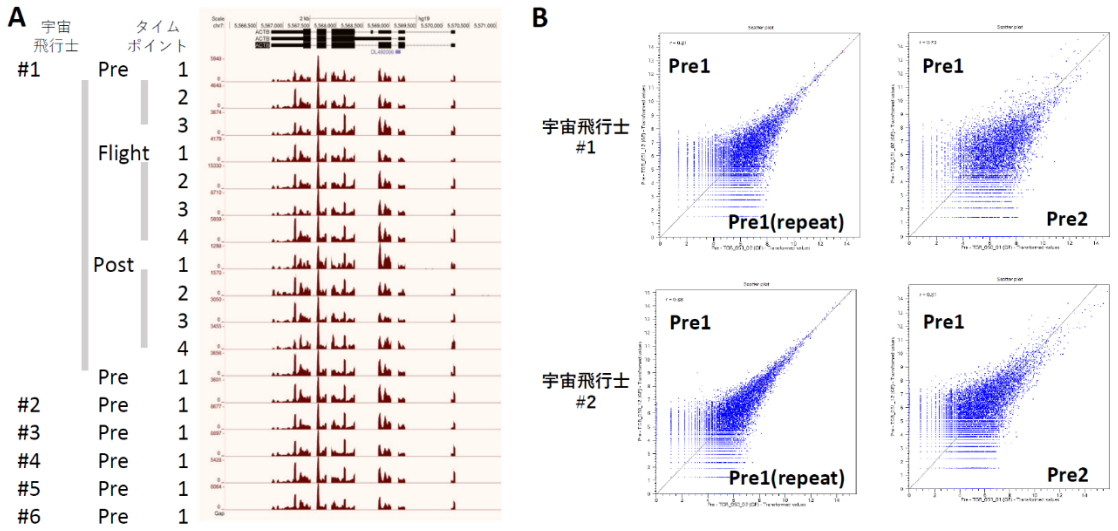


図 4.3-1 血漿RNAシーケンス解析のデータ品質確認
(A) ACTB遺伝子付近のリードのゲノムブラウザ上での可視化。 6 名の宇宙飛行士(#1-6)、#1検体について、フライト前(Pre)、フライト中(Flight)、フライト後(Post)とテクニカルリピートの計12検体を可視化した。(B) データの再現性を確認するため、宇宙飛行士 2 名のフライト前(Pre1 vs Pre2またはテクニカルリピート間)データの比較を示した。同じ検体を再解析した場合の測定にかかわるTechnical variation、および、同一参加者の異なる日の採血検体間のBiological variationを含む測定値のばらつきを評価した。

4.3 RNA シーケンス解析

血漿 RNA を用いて rRNA-depletion 法による RNA シーケンス解析を行った。シーケンスリードのマッピングをハウスキーピング遺伝子領域で可視化することにより、エクソン・イントロンのパターンが検体間でよく揃ったデータが得られていることを確認した（図 4.3-1.A）。このデータを用いて全ゲノムの遺伝子についてリードの定量値を得た。RNA シーケンス解析では、最も RNA 量の少ない検体では 0.5ng 未満の微量 RNA を用いて解析を行っており、テクニカ

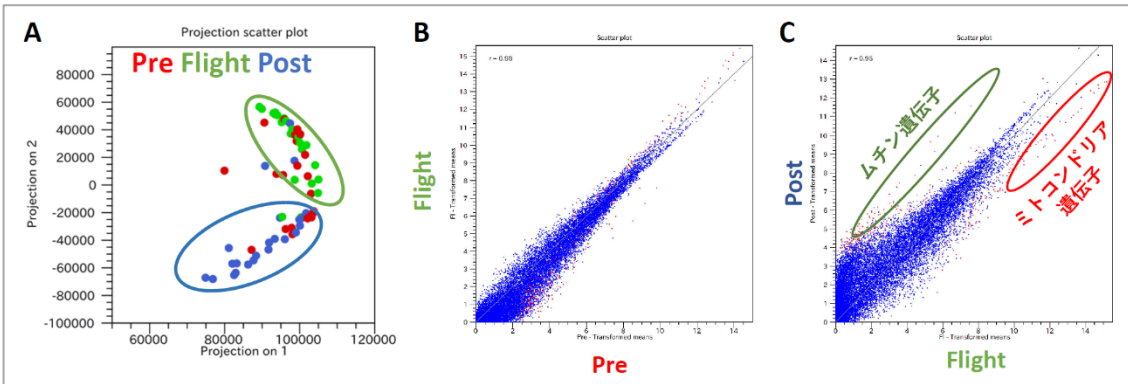


図4.3-2　血漿RNAシーケンス定量解析
(A) 6名、各11検体より65検体(1検体はデータ品質不良のため除外)の定量値をもとに作成したPCAプロット。地上ベースライン測定では参加者間の差があったのに対し、フライト中、フライト後の検体ではPCAプロットで同様の傾向が見られた。(B) 6名のタイムポイントをまとめ、フライト前後、フライト中 3 群として統計解析を行った。各群の平均値をScatter plotで表した。フライト前(Pre)は参加者間のばらつきが大きく、フライト中との比較では定量値に明確な差がある遺伝子群は少ない傾向があった。(C) 参加者、タイムポイント間で傾向が似ていたフライト中 vs フライト後の比較では、ムチン遺伝子群、ミトコンドリア遺伝子群が顕著に変化し、そのFold change値が似ているため、Scatter plot上ではX=Yに平行な線上に位置した。(3群ANOVA解析FDR補正p-value<0.05, |Fold change|>2x, difference>50の条件でフィルタリングして得られた286遺伝子を赤色で表示)。

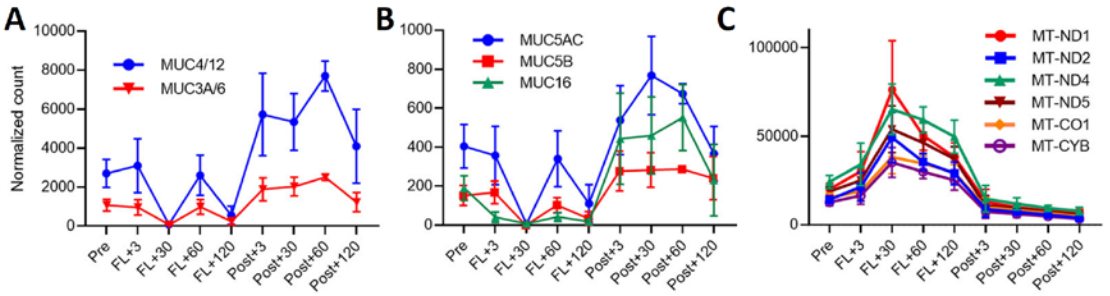


図 4.3-3 血漿RNAシーケンス解析において顕著な変化があったムチン遺伝子ファミリーとミトコンドリア遺伝子

各遺伝子のノーマライズ後の定量値からN=6間の平均値と標準誤差を算出し、プロットとエラーバーで示した。MUC4/12、MUC3A/6遺伝子についてはそれぞれ遺伝子配列の相同性が高く、マルチマッピングの影響で類似した定量値を示したため、最初に記載した遺伝子の定量値を用いた。MT-遺伝子はミトコンドリアゲノムにコードされた遺伝子を示す。

ルなリピート間でのばらつき(technical variation)とベースライン検体間のばらつき(biological variation)の状態を把握するために各研究対象者につき1検体を選んで、2 回目のライブラリ作製とシーケンスを行った。テクニカルリピート間では相関係数 r>0.8 程度と、微量検体の RNA シーケンスとしては良好なデータを得た(図 4.3-1.B)。ベースライン検体間のばらつきを考慮し、以降の統計解析では 6 名分のデータをまとめて各群 N=6 実験として扱った。

6 名の研究対象者の 11 タイムポイントにあたる計 66 検体の RNA シーケンスデータを取得し、Principal component analysis (PCA)プロットを作成した。1検体は他の 65 検体から大きく外れていたため、除外し、65 検体のデータを用いて解析を行った。PCA プロットの傾向から、フライト前の検体では、6 名の宇宙飛行士の各タイムポイントでのばらつきが比較的大きいことが示された。一方で、フライト中、フライト後では全ての研究対象者で似通った傾向を示した(図 4.3-2.A)。フライト前検体の間でばらつきがあったことから、これをベースラインとして用いた定量解析では RNA カウントが有意に変化する遺伝子の数は少ない傾向があった(図 4.3-2.B,C)。しかし、フライト中とフライト後の比較では N=6 間でのばらつきが少なかった。本研究の解析では、フライト前・中・後を 3 群として ANOVA 解析を行い有意に変化した遺伝子群を得た。

フライト中に顕著に RNA が減少する遺伝子群としてムチン遺伝子ファミリー、上昇する遺伝子群としてミトコンドリア遺伝子が見られた。これらの遺伝子は Scatter plot 上では X=Y 直線と平行にプロットされ、発現量の変動の倍率が似ていたことがわかる。このような Scatter plot でのパターンは、個々の遺伝子の発現変化ではなく、これらの遺伝子群を含む細胞外小胞などの総量が変化することにより、複数の遺伝子に由来する RNA が等倍で変化していることを示唆している。さらに各遺伝子の発現量をタイムポイントに分解することで、ムチン遺伝子ファミリーRNA のフライト中の減少、フライト後の増加、さらにフライト後 120 日のタイムポイントではフライト前のレベルに戻る傾向が確認できた。ミトコンドリア遺伝子ではこれと逆の傾向が見られ、フライト中の顕著な増加が見られた(図 4.3-3)。

ムチンファミリー遺伝子、ミトコンドリア遺伝子以外の機能的傾向を検討するために3群比較で変化のあった 286 遺伝子について Metascape ツールによるパスウェイ解析を行った。ミトコンドリアに関連する酸化的リン酸化や血液細胞由来の血小板関連遺伝子の他にもビタミン D レセプターシグナリング、神経・シナプス関連遺伝子のエンリッチメント結果が得られた(図 4.3-4A)。さらに、同解析の細胞・組織特異性の結果からは、小脳、骨格筋関連遺伝子の変化が認められた(図 4.3-4B)。ビタミン D は骨筋系、消化器、副甲状腺の調節機能と関連し、ミネラル恒常性の維持において中心的な働きを担うことが知られている。MN1、TRIM24、

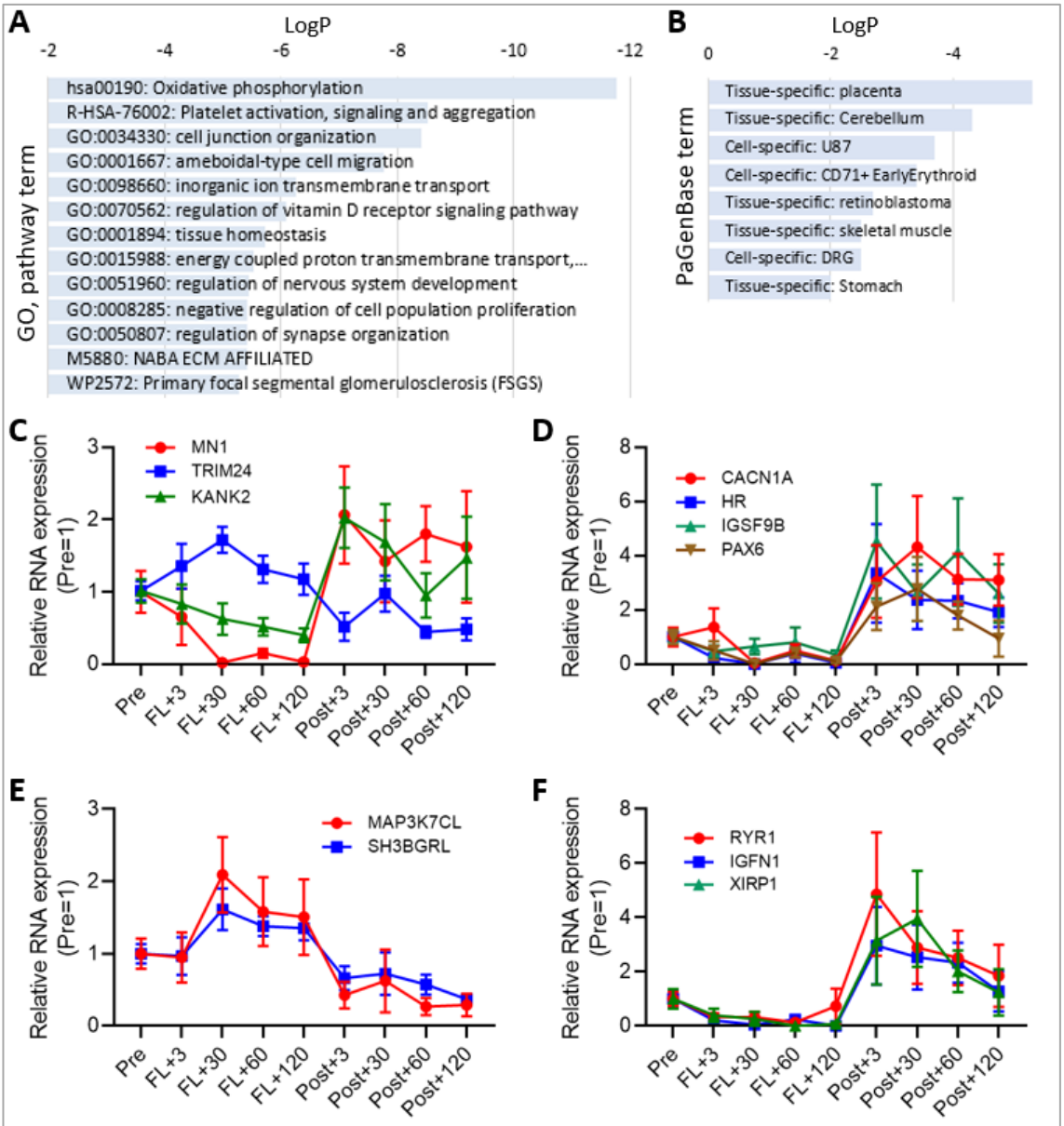


図 4.3-4 RNAシーケンスで変化が見られた組織特異性に関連する遺伝子
(A) 図4.2-2のフィルタリングで得られた286遺伝子のMetascapeパスウェイ解析結果。(B) 組織特異性の解析結果。(C) ビタミンDレセプターシグナリング関連遺伝子、TRIM24、MN1、KANK2の発現量の平均値のプロット。 (D) 小脳関連遺伝子。(E,F) 骨格筋関連遺伝子。

KANK2 はともに核内ホルモン受容体を介した遺伝子発現調節に関わる因子であり、これらの変化が cfRNA に現れていることは臓器連環における恒常性のシステミックな変化を示唆する（図 4.3-4C）。宇宙飛行士のビタミン D 摂取は骨密度低下対策として行われており、関連分子は地上の疾患研究でも創薬ターゲットとして研究されていることから（参考文献 6,7）、新たな医薬品やバイオマーカーとしての利用価値のある遺伝子が含まれている可能性がある。そのほか、小脳に関する組織特異的遺伝子としてデータベース登録されている CACNA1A、HR、IGSF9B、PAX6(図 4.3-4D)、および骨格筋に関連する遺伝子群(図 4.3-4E,F)にもフライト中に増減する遺伝子が含まれていた。これらの結果をもとに、6 名の宇宙飛行士で共通した RNA 発現変化の傾向が見られ、フライト中とフライト後で変化する血漿 cfRNA を同定することができた（サクセスクライテリア 1 の要件に該当）。

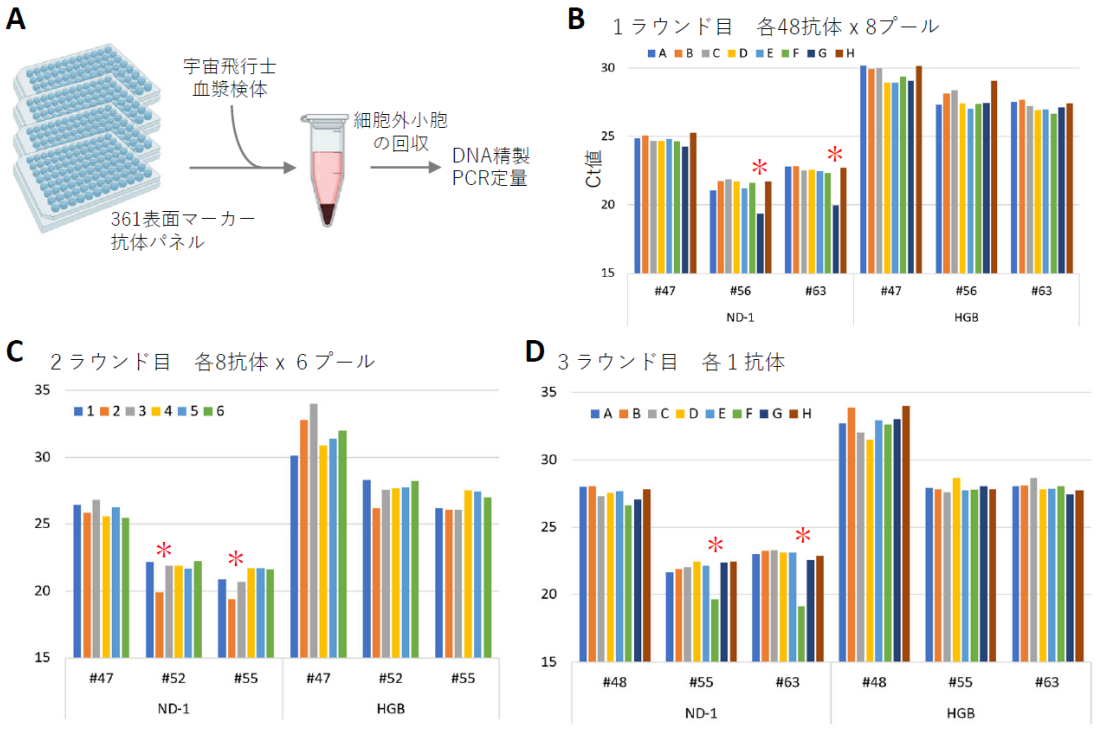


図 4.4-1 ミトコンドリア分画の表面マーカースクリーニング
(A) 細胞表面マーカーに対する抗体パネルを用いたスクリーニングの手順。96ウェルプレートに分注された抗体を行・列ごとにプールし、血漿中の細胞外小胞を免疫沈降、精製DNA中のミトコンドリアゲノムDNAをリアルタイムPCRで定量した。(B)4プレート分の抗体をA-Hの 8 プールに混合し、ミトコンドリア遺伝子(ND-1)と核ゲノム、グロビン遺伝子(HBG)についてリアルタイムPCRで定量し、Ct値をプロットした。フライト前検体(#47)では顕著に見られないミトコンドリアDNAの回収がフライト検体(#56, #63)のプールGで見られた。(C) プールGに含まれていた48種類の抗体を6プールに分注し、同様のアッセイを繰り返した。プール 2 でミトコンドリアDNAが他のプールよりも多く回収できている。(D) プール 2 の抗体をそれぞれ用いた結果、抗CD36抗体でミトコンドリアを含む分画を回収できた。

4.4 ミトコンドリア DNA を指標とした血漿中の細胞外小胞の分画と RNA 解析

血漿中の細胞外ミトコンドリア（extracellular mitochondria, exMT）については、NASA の Twins Study が宇宙飛行士 1 名について報告している。本研究で 6 名の宇宙飛行士の解析でも同様の現象が見られたことから、exMT に関連する細胞・組織種の探索を試みた。細胞外に放出された exMT はその外膜に由来細胞の表面マーカーを保持している可能性がある。この原理を利用し、細胞表面マーカーに対する抗体 361 種類を含む抗体パネルを用いて、ミトコンドリア DNA を指標とした免疫沈降によるスクリーニングを行った（図 4.4-1）。フライト前とフライト中の検体を用いてすべての抗体を複数のプールに分けて網羅したところ、血漿中ミトコンドリア DNA が増加していたフライト中検体に特異的にミトコンドリア分画を濃縮できる抗体として抗 CD36 抗体が見出された。

CD36 は幅広い細胞種に発現するが、血小板表面のスカベンジャー受容体としての機能が文献で詳しく報告されている。血漿分離ゲルが含まれる採血管では血小板は血漿とは分離される機構であるが、ミトコンドリアの大半が血小板由来である可能性がある。これを検証するため、CD36 抗体で精製したフライト中血漿検体の分画から RNA を抽出し、RNA シーケンスを行った（図 4.4-2）。未精製の血漿 RNA のプロファイルに比べてエンリッチされた遺伝子リストを用いてパスウェイ解析を行ったところ、脳・神経系、骨格筋に関連する経路が上位に

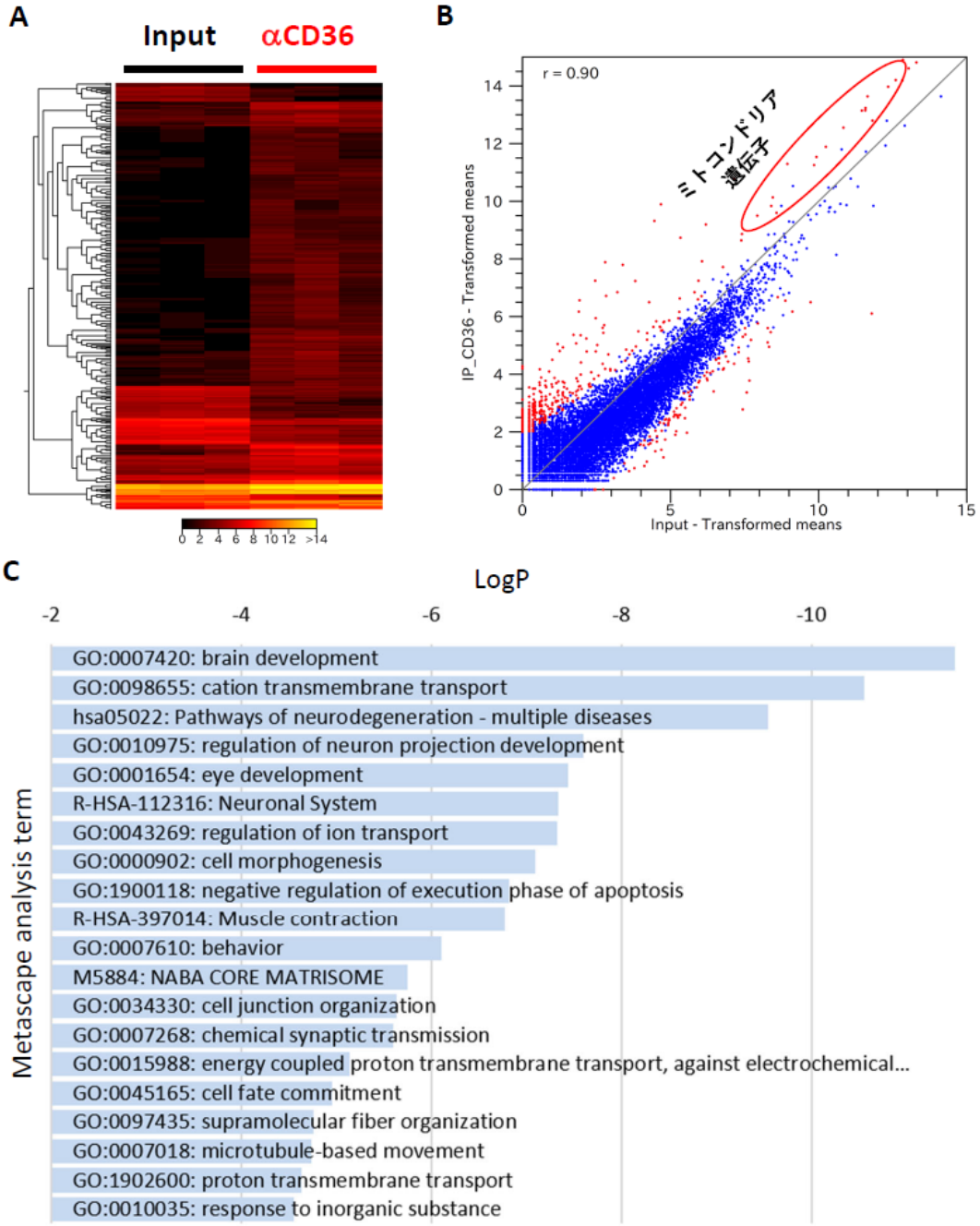


図 4.4-2 ミトコンドリア分画のRNAシーケンス解析
(A) 抗CD36抗体を用いてフライト検体を免疫沈降し、未精製およびCD36分画から精製したRNAのシーケンス解析を行った。RNA定量解析において変化した遺伝子の発現量をヒートマップで示した (Empirical Analysis of DGE, FDR補正p-value < 0.05, |fold change|>2, 508遺伝子)。(B) CD36精製前後のRNAプロファイルを比較したノーマライズした平均値のプロット。ミトコンドリア関連遺伝子のRNAのエンリッチメントが確認できた。(C) CD36分画でエンリッチされたRNAの遺伝子機能のパスウェイ解析。

見られた。同様に CD36 抗体を用いた精製と RNA シーケンスをフライト後のミトコンドリア DNA・RNA が減少した検体で行ったところ、血小板と巨核球が上位を占めていた。したがって、フライト中の血漿中 exMT はこれまでに詳しく知られている血小板由来ではなく、神経、筋組織などに由来するものであることが示唆された。

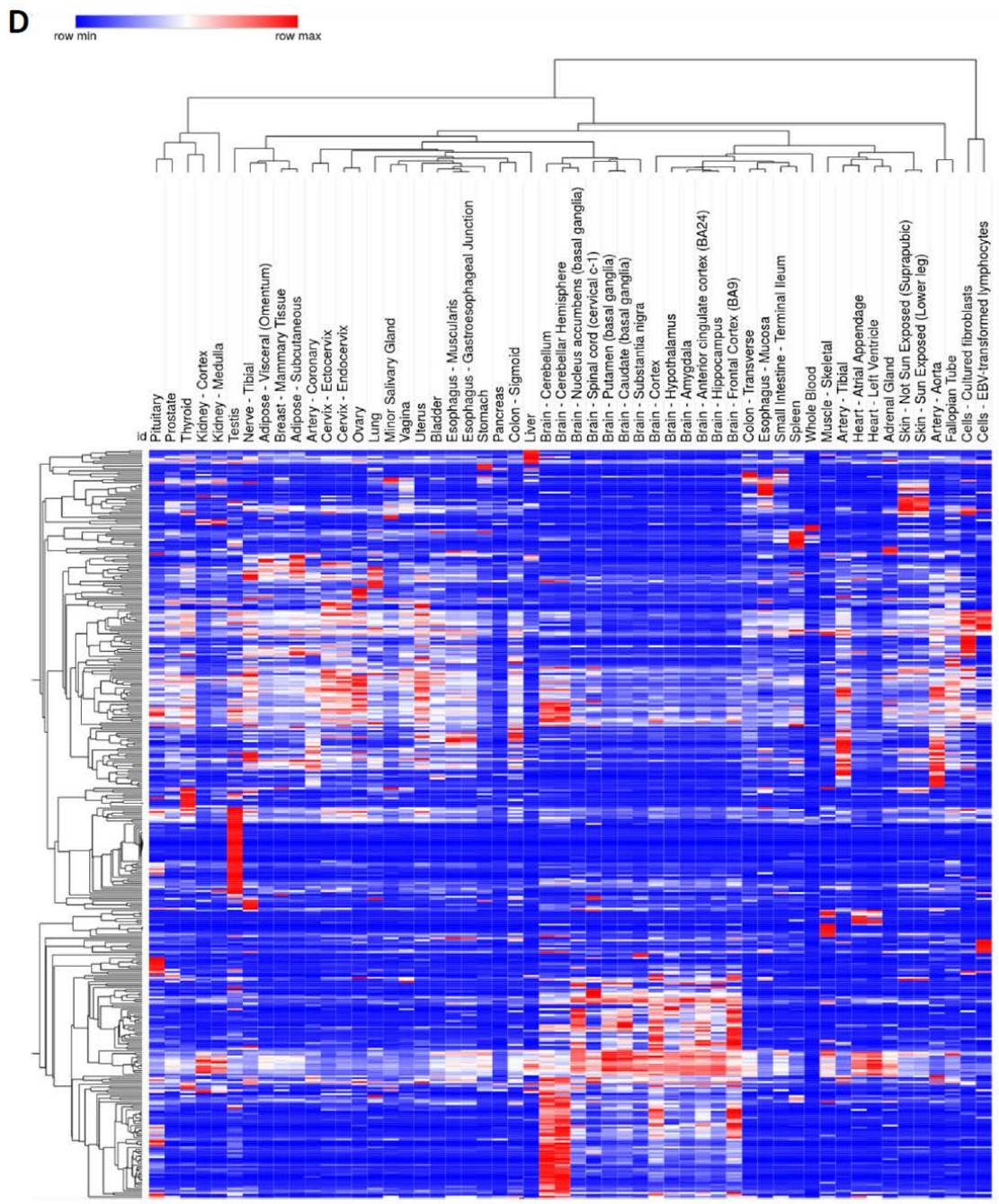


図 4.4-2 ミトコンドリア分画のRNAシーケンス解析（続き）
(D) CD36分画でエンリッチされたRNAのヒト組織での発現プロファイル。GTExデータベースの各組織の発現量を抽出し、クラスタリングした。

CD36 分画の RNA にエンリッチされていた遺伝子の組織特異性を遺伝子発現データベースの情報をもとに推定するため、GTExプロジェクト（Genotype-Tissue Expression Project）データベースで公開されている 54 種類の組織・細胞種での発現量を調べ、ヒートマップに表した（図 4.4-2D）。パスウェイ解析で上位に位置した脳、骨格筋に加え、肝臓、心臓、動脈血管、胸腺、皮膚、下垂体などで特異的に発現する遺伝子の RNA が CD36 分画に含まれていることが明らかとなった。小動物飼育ミッションから得られたマウスのデータでは多くの組織種でミ

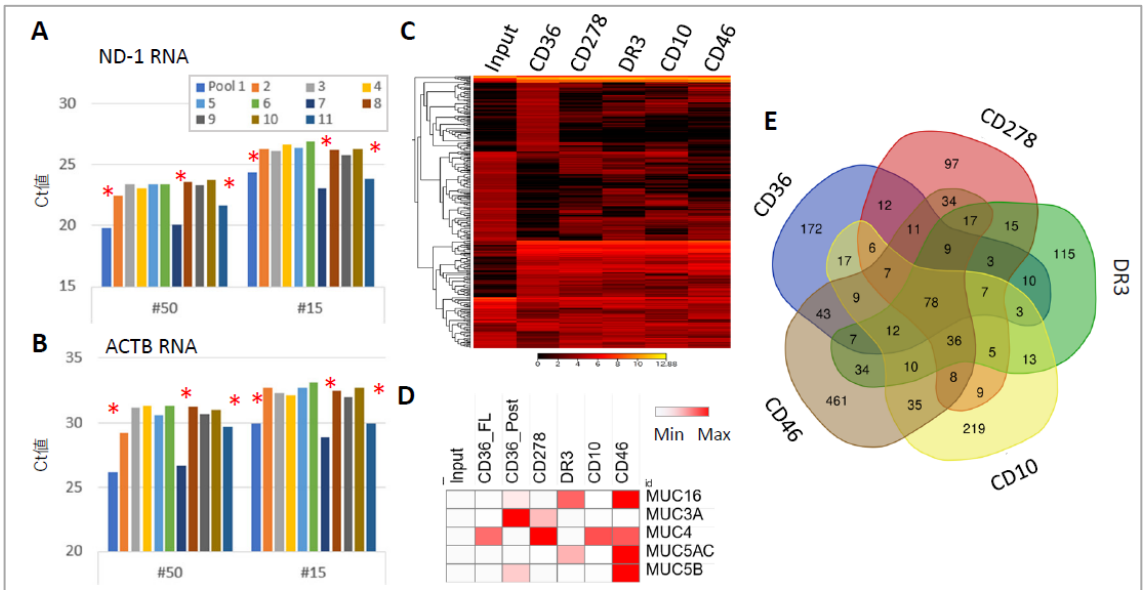


図 4.5 RNAを指標とした抗体パネルスクリーニング
(A, B) ミトコンドリアDNAを指標としたスクリーニングと同じ抗体パネルについて、ミトコンドリアRNA(ND-1)、核ゲノム遺伝子(ACTB)の定量を行ったスクリーニングのリアルタイムPCR例。*免疫精製によりRNAが回収できている抗体プール。(C) 各抗体で回収した細胞外小胞のRNAシーケンス解析を行い、インプットに対して変化した遺伝子についてヒートマップを作製した(Baggerly's test in CLC Main Workbench, FDR補正p-value < 0.05、|fold change| >2)。(D) ムチン遺伝子ファミリーの各分画でのRNAリードカウント。(E)各表面抗原による血漿分画のRNAシーケンスでエンリッチされた遺伝子リストのベン図による比較。

トコンドリア遺伝子の変化が認められたが、ヒトについても幅広い組織種でミトコンドリアに関連した宇宙環境応答が確認できたと言える(バルク cfRNA の組織特異性解析、さらに、表面抗原による血漿分画法の開発と応用により、サクセスクライテリア 3 および 6 に相当)。

4.5 RNA を指標としたスクリーニング

フライト中の検体におけるミトコンドリア RNA の由来の推定と同様に、ムチンファミリー遺伝子と帰還後に上昇する RNA について組織特異性を検討するため、ミトコンドリア RNA(ND-1 遺伝子)と核ゲノムにコードされる ACTB(β-アクチン)RNA を指標に、再度抗体パネルのスクリーニングを行った。

ミトコンドリア DNA とは異なり、顕著に両 RNA を含む分画を濃縮できる抗体だけでも、再度確認された CD36 を含め5種類、その他にもさらに複数の抗体が cfRNA を含む分画の濃縮に有効であることを示唆するスクリーニング結果を得た(図 4.5A,B)。フライト検体を消費する前に一旦地上の臨床検体バイオバンクの検体を用いた実験に戻るべきと考え、すべての抗体を試みることはできなかったが、これら 5 種類(CD36、CD278、DR3、CD10、CD46)の抗体を用いて濃縮した血漿分画についても RNA シーケンスを行った。

バルク cfRNA 解析ではムチン遺伝子の RNA のフライト後の増加が見られたことから、フライト後検体を用いて免疫沈降を行った。これらの分画から精製した RNA のシーケンス解析を行ったところ、ムチン遺伝子群 RNA の濃縮がそれぞれ異なるパターンで見られた(図 4.5C-E)。このことから、多様な発現パターンを持つムチンファミリー遺伝子は、特定の組織種に由来するものではなく、全身的な環境応答を反映するものであることが推定された。MUC4, 5AC、5B、16 を濃縮した CD46 は、多くの細胞種で発現するが、補体活性化の制御因子であり、体内での細胞死に関連している可能性がある。

また、抗体を用いて濃縮された RNA のベン図を作成して検討し、パスウェイ解析を行ったところ、T 細胞、細胞外マトリックス等の細胞経路のエンリッチメントが見られ、フライト中の

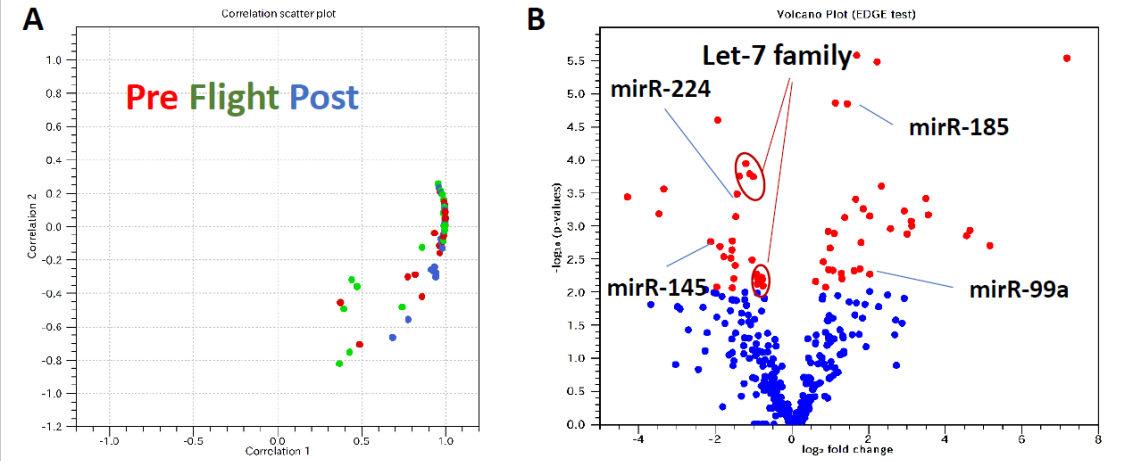


図 4.6 Small-RNAシーケンスによるマイクロRNAの定量解析
(A) 66検体のPCAプロット。フライト前後とISS滞在中として３群N=6として解析を行った。(B) 定量結果のVolcano plot。マウスの血漿miRNA解析でも変化の認められたmiRNAを示した。

CD36 分画とは異なる組織特異性を示した。前述のように、ミトコンドリア DNA がベースライン水準に戻っているフライト後の血漿検体から得られた CD36 分画では血小板と巨核球関連遺伝子の RNA の顕著な濃縮が見られた。このことから、抗 CD36 抗体の特異性が確認できたとともに、フライト中の検体から得られた CD36 分画が宇宙環境に応答した特異的な細胞外小胞であることが再度確認された。本研究では組織特異性の指標に GTExデータベースを用いたが、今後、Human Cell Atlas などで 1 細胞解析を含む全身の細胞種の遺伝子発現データベースがさらに整備されれば、各抗体で精製される分画の由来組織の精度が向上すると期待される。

4.6 血漿中マイクロ RNA シーケンス解析

血漿中のマイクロ RNA は、エキソソームによって細胞間輸送されているとの報告があり、代謝や骨筋系の制御などにかかわる多臓器連環での機能を持つ。宇宙環境応答のメカニズムを説明するマイクロ RNA の探索を目的として、small-RNA シーケンスによる解析を行った（図 4.6）。Let-7、miR-145 は JAXA の第 1 回小動物飼育ミッション（MHU-1）、Twins Study で共通して変化していたマイクロ RNA であり、本研究でもさらにフライト中の変化が確認できた。

4.7 cfDNA のメチル化状態の解析

DNA のメチル化パターンは細胞種特異的であることが知られており、環境応答や疾患との関連も報告されている。cfDNA の由来組織の推定や宇宙環境応答によるエピゲノム制御状態を検討するため、cfDNA のメチル化解析を行った。この解析ではメチル化シトシンに対する抗体を用いて cfDNA の免疫沈降を行い、その DNA をシーケンスする methylated DNA

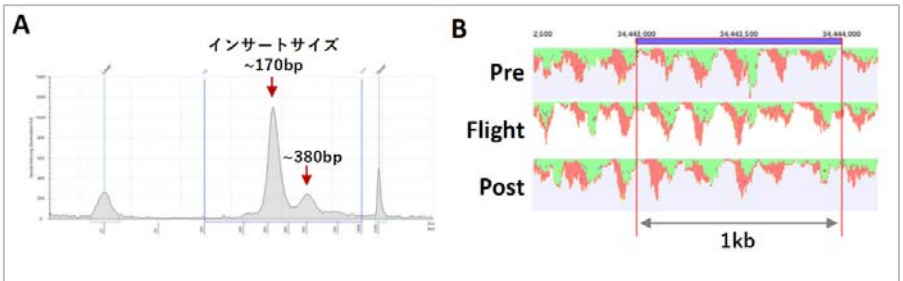


図 4.7-1 血漿DNAの次世代シーケンス解析
(A) cfDNAシーケンスライブラリのTapestation解析例。ヌクレオソーム単位に相当する170bpと380bpにサイズ分布ピークを持つ。(B) 既知のヘテロクロマチン領域におけるcfDNAリードの可視化。それぞれのペアエンドリードの上流側を赤、下流側を緑で表示した。リードの方向性が順逆のパターンを示しており、ヌクレオソーム解像度の情報が得られることを示す。

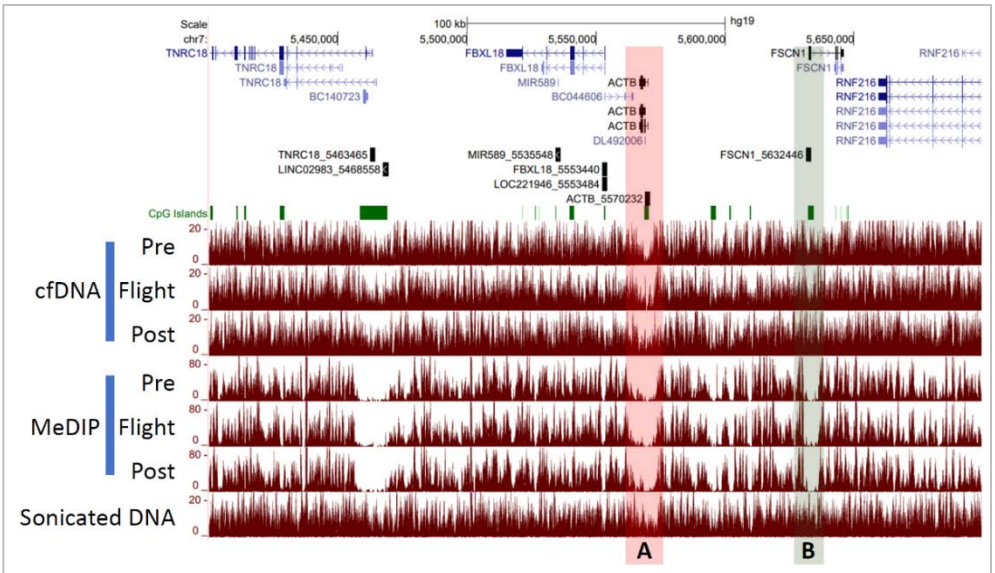


図 4.7-2 血漿cfDNAとMeDIPシーケンスリードの可視化
リードカバレージを遺伝子アノテーションとともに約200kbのスケールで可視化した。ACTB遺伝子付近(A)はcfDNAコピー数が低いオープンクロマチン領域であること、FSCN遺伝子プロモーター領域(B)はDNAメチル化レベルが低く、これらのハウスキーピング遺伝子領域のデータから、良好なデータ品質を示している。定量解析に用いた遺伝子プロモーター領域およびCpG island領域のトラックを表示した。

Immunoprecipitation Sequencing (MeDIPseq)の手法を用いた。ムチン、ミトコンドリア、筋関連遺伝子などの RNA 量が特にフライト中とフライト後 30 日のタイムポイントで大きく変化していたことから、DNA 解析でもこれらのタイムポイントでの解析を優先した。

免疫沈降前の cfDNA であるインプット DNA（cfDNA）と免疫沈降によって得られたメチル化された DNA（MeDIP）を用いたシーケンス解析では、前処理でのサイズ選択により、約 170bp のモノヌクレオソーム、約 380bpの 2 量体ヌクレオソームに相当する DNA が主な解析対象となる（図 4.7-1A）。得られたシーケンスデータは、ヌクレオソーム単位の情報を保持しており、既知のヘテロクロマチン領域ではヌクレオソーム構造のピッチと一致するリード分布の周期性が確認できた（図 4.7-1B）。

さらにメチル化 DNA の選択が機能していることを確認するため、cfDNA、MeDIP シーケンスのリードを可視化したところ、転写調節の面で活性化されてヌクレオソーム構造が開いている ACTB 遺伝子等では期待通り cfDNA のカバレージが低かった。さらにメチル化レベルの低い遺伝子領域で MeDIP によってリード数が低下しているパターンが確認でき、cfDNA シーケンスによるクロマチン構造の推定、およびメチル化状態の解析に十分な品質のデータがゲノムワイドで得られていたことが確認できた（図 4.7-2）。

メチル化の制御を受けるゲノム領域には遺伝子本体、非コード制御領域、CpG アイランドなど、多様な機能領域が含まれる。本研究では、最初の解析対象として遺伝子プロモーター領域（転写開始点の−/+1kb）のメチル化の変化を解析した。cfDNAseq と MeDIPseq のリード数をそれぞれプロモーター領域で定量した後にノーマライズしたところ、フライト前後で6名の研究対象者間で類似したプロファイルが得られた（図 4.7-3A,D）。cfDNA シーケンスデータは、メチル化シトシンに対する免疫沈降を行っていない「インプット」の DNA の解析にあたる。このため、cfDNA シーケンスカウントの変化は、遺伝子制御によるクロマチン構造の変化、および cfDNA の由来細胞種の変化を反映している。MeDIP シーケンスカウントは、cfDNA のうち、メチル化を受けている領域を示し、エピゲノム制御状態とcfDNA の由来の変化を示していると期待される。

宇宙環境によってエピゲノム制御が変化したゲノム領域に相当する遺伝子の機能や組織

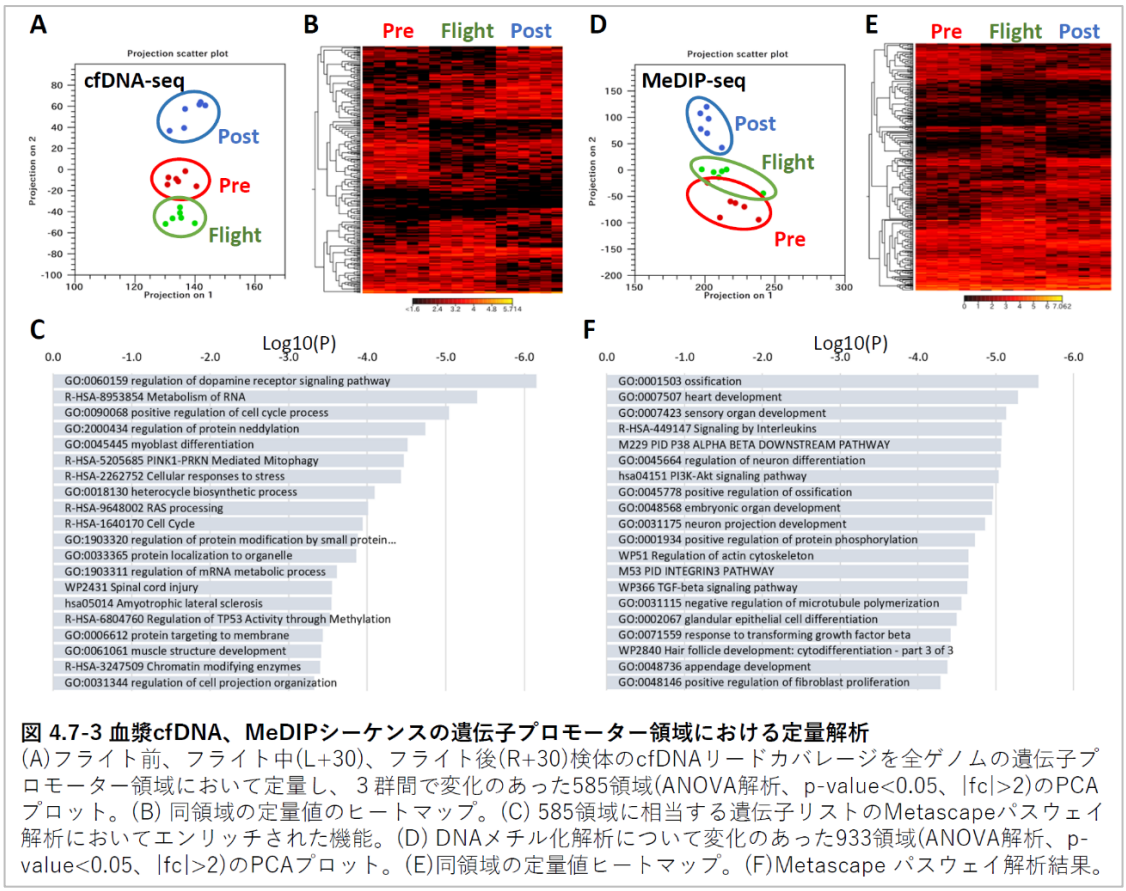


図 4.7-3 血漿cfDNA、MeDIPシーケンスの遺伝子プロモーター領域における定量解析
(A)フライト前、フライト中(L+30)、フライト後(R+30)検体のcfDNAリードカバレージを全ゲノムの遺伝子プロモーター領域において定量し、3群間で変化のあった585領域(ANOVA解析、p-value<0.05、|fc|>2)のPCAプロット。(B) 同領域の定量値のヒートマップ。(C) 585領域に相当する遺伝子リストのMetascapeパスウェイ解析においてエンリッチされた機能。(D) DNAメチル化解析について変化のあった933領域(ANOVA解析、p-value<0.05、|fc|>2)のPCAプロット。(E)同領域の定量値ヒートマップ。(F)Metascape パスウェイ解析結果。

特異性を検討するため、フィルタリング後の遺伝子リストを用いて Metascape ツールによるパスウェイ解析(図 4.7-3C,F)、および GTExデータベースに基づいた組織特異性の評価を行った(図 4.7-4)。これらは神経系と筋組織に関連する遺伝子カテゴリーを含んでおり、cfRNA シーケンスの結果と共通している。さらに、DNA メチル化プロファイルでは骨形成に関わる機能が最上位に見られ、宇宙飛行士や小動物飼育ミッションでも顕著に見られる宇宙滞在中の骨組織の変化に関連するエピゲノム変化を捉えているものと推測できる(サクセスクライテリア4の要件に該当)。

一方で、組織特異性の低い遺伝子群についてもパスウェイ解析で検出された Positive regulation of cell cycle process、Cell cycle、Regulation of TP53 activity through methylation にはストレス応答による細胞周期制御にかかわる TP53 経路の遺伝子が含まれ、メチル化解析でもストレス応答性 MAPK 経路の p38 経路や DNA 損傷応答経路として知られる PI3K-Akt 経路の変化が見られたことから、低軌道における宇宙線や活性酸素等による生体分子の損傷への応答を反映していることが示唆された(サクセスクライテリア 5 の要件に該当)。

4.8 マウス cfRNA データとの比較

血漿中の cfRNA 解析はヒトとマウスの両方で共通して行えるため、種間で共通した宇宙環境応答の検討や、タイムコース測定データの解釈での有用性が期待される。MHU-1 ミッションの血漿検体を用いて cfRNA のシーケンス解析を行った。このデータを用いて地上コントロール(Ground control、GC)、人工1G 環境(Artificial-G、AG)、微小重力環境(Micro-G、MG)間でコーディング遺伝子の RNA 定量を行い、各条件間で差のあった遺伝子リストを得た。この実験では 35 日間の ISS フライト後、帰還したマウスの解剖時に採血が行われた。各群 N=6、GC 群は採血できなかった1個体を除いた 5 個体分のデータを解析した。

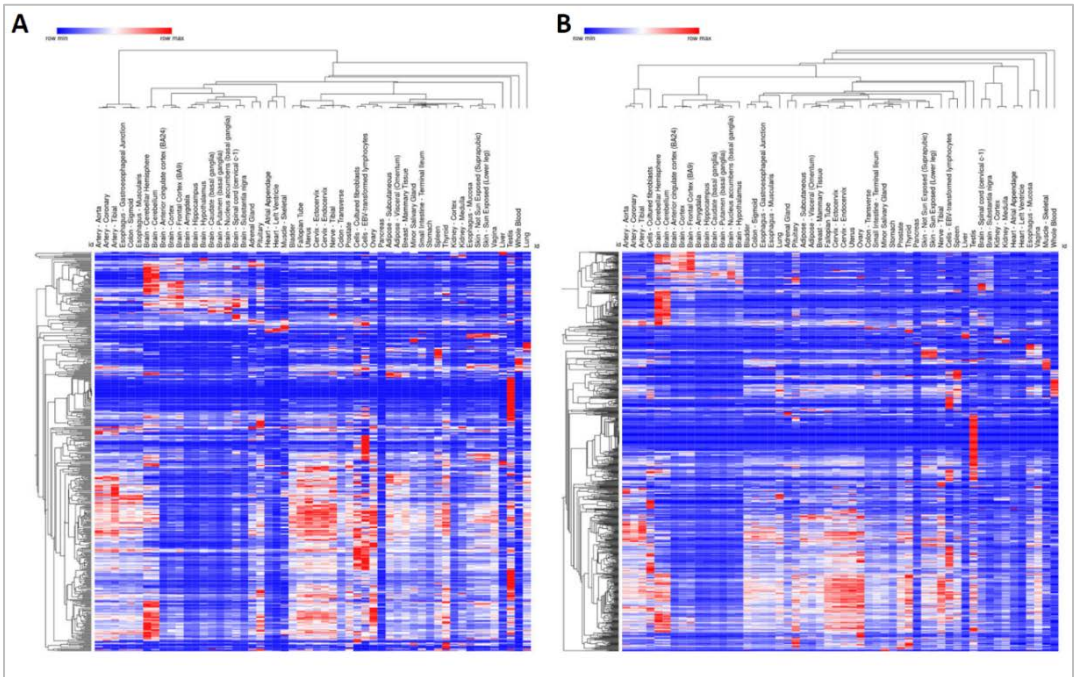


図 4.7-4 血漿cfDNA、MeDIP解析で変化していた遺伝子の組織特異性予測
(A) GTExデータベースに登録されている52種類の組織におけるRNA発現量をcfDNA解析で変化のあった585領域に対応する遺伝子についてヒートマップで表示した。幅広い組織種で発現する遺伝子と組織特異的な遺伝子が含まれていることが示された。(B) MeDIPで変化していた933領域について、同様にGTExの発現値を表示した。

宇宙飛行士の cfRNA 解析でミトコンドリア遺伝子 RNA の変化が見られたのと同様に、マウスでも Cytochrome b (Cytb)遺伝子と NAD hydrogenase(ND)サブユニット遺伝子で AG-MG 間の差が見られた(図 4.8-1)。マウス検体は帰還後 2 日程度経過したタイミングでの採血で得られたものあり、地上環境への再順応の過程を捉えている可能性があるが、ヒトとマウスで共通した変化が確認できた。ミトコンドリアゲノムにコードされた遺伝子のうち、ヒトとマウスで RNA シーケンスのリードカウントが得られた遺伝子には、他に ATPase と Cytochrome oxygenase 遺伝子があるが、これらの遺伝子の RNA では有意な変化が見られず、細胞外ミトコンドリア全体の量だけでなく、Cytb、ND 遺伝子が特異的な制御を受けていることが示唆された。

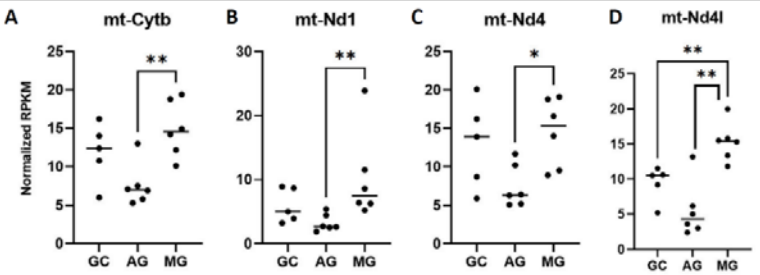


図 4.8-1 マウスcfRNA解析におけるミトコンドリア遺伝子の変化
マウスcfRNAシーケンスにおいてGC(地上コントロール)、AG(人工1Gコントロール)、MG(微小重力)間で変化のあった遺伝子ミトコンドリア遺伝子(Mann-Whitney test, * P<0.05、** P<0.005)。

ヒトとマウスで共通した宇宙環境応答を探索するとともに、宇宙飛行士データから重力環境の影響を抽出することを目的に、マウスで cfRNA が変化した遺伝子群をヒトのホモログ遺伝子に変換してパスウェイ解析を行った。Metascape 解析ではヒトとマウスの AG-MG 群比較で共通する遺伝子機能が見られた(図 4.8-2)。ヒト疾患関連遺伝子のデータベースに基づいたエンリッチメント解析では、マウスの重力環境変化で検出された 121 の疾患分類のうち 58(48%)がヒトでも同様にエンリッチされていた。この 58 疾患分類に複数回出現するキーワードには、mitochondria、muscle のほか、心血管系に関連する arterial、cardiac、hypertension、

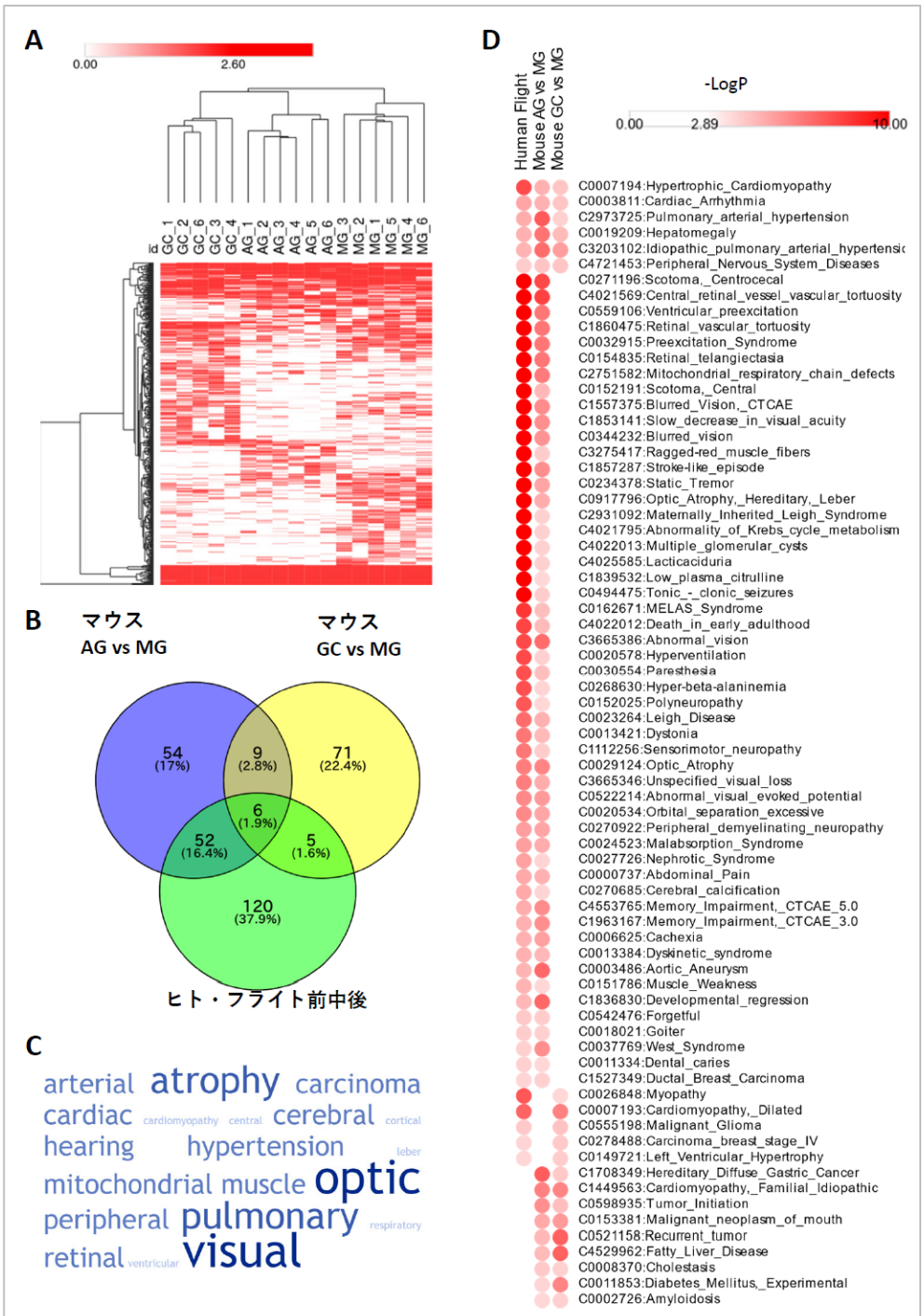


図 4.8-2 マウスcfRNA解析と宇宙飛行士データとの比較
(A)マウスcfRNAシーケンスにおいてGC、AG、MG間で変化のあった遺伝子をヒートマップで示した。各2群間のedgeR解析、p-value<0.05、469遺伝子。（B）Metascape 解析のDisGeNETヒト疾患遺伝子エンリッチメント結果。（C）マウス重力変化（AG vs MG）と宇宙飛行士結果で共通していた58疾患分類についてワードクラウドで頻出キーワードを示した。（D）ベン図Bにおいて2つ以上の円の重なりに相当する疾患分類のリスト。-LogP値をヒートマップで示した。

神経・感覚系に関連する cerebral、hearing が含まれていた。さらに optic、retinal、visual のキーワードは、長期宇宙滞在で大きな問題である視覚障害との関連が示唆される。この疾患分類が特に重力変化と関連していることは、宇宙で起こる視覚障害が微小重力環境による体液シフトと脳髄液の圧力増加に起因するとの研究報告とも一致する。

以上の結果について、RNA 解析を中心とした論文を作成しており、抗 CD36 抗体によるミトコンドリア分画の由来組織と宇宙環境での代謝ストレスについて報告する予定である。この中で、血漿中の CD36 や exMT が宇宙環境ストレスマーカーの候補となること、また、その由来組織に神経系、循環器系、目などの体内深部組織の状態に関連する RNA が含まれており、バイオマーカーとして今後のさらなる研究の方向性を示すものである。また、表面マーカーを利用して血漿中の細胞外小胞を由来組織や生成経路別に分画することにより、より高い感度と精度で体内深部の分子状態を解析するリキッドバイオプシー法の開発と応用を提案する結果を得たと言える(サクセスクライテリア 6 に関連)。

DNA 解析については、コード遺伝子以外のエンハンサーやサイレンシングに関わるゲノム調節領域など、多様な解析を展開し、後続の論文として発表するために引き続き解析を継続している。RNA、DNA 解析に関するデータについては、6 名の宇宙飛行士の定量値から平均値と標準誤差を算出したものを GeneLab データベースを介して公開する。シーケンスリードのデータに関しても、リード数の生データをプールしたマッピング結果を公開することで、研究者コミュニティーによる再解析や論文化を推進する。

5. 研究に関連した活動等について

本研究は 2014 年の国際公募への申請からデータ取得と当初の目標を達成する解析を行うまでに約 8 年を要した。この間に、宇宙飛行士を対象とした世界初のゲノム解析を含むマルチオミックス解析として NASA の Twins Study の研究が行われ、本研究は複数の宇宙飛行士が参加する初めての研究例となった。Twins Study に携わった研究者との交流を通して、本研究の遂行に関してもアドバイスを受けることができた。研究コミュニティーでの将来的な研究計画の策定に向けた経験の共有も重要であるとの認識のもと、次に述べる活動を行った。

5.1 解析プロトコルの標準化と宇宙飛行士を対象としたオミックス研究データの共有

本研究では、ヒトとマウスの両方でリキッドバイオプシー解析を行い、データを比較することから、特にマウスの検体量に対応できる微量サンプルの解析手法を用いた。より少ない検体から高品質なデータを得られる解析手法の共有は、血漿検体以外のマウスの組織検体の解析等でも重要である。これに関連して、フライト実験に関わるメタデータや検体処理、データ解析手法の標準化を目指し、NASA、ESA プロジェクトの研究者とともに 2019 年に国際コンソーシアム「International Standards for Space Omics Processing (ISSOP)」を設立し総説論文(成果リスト 3 番)を発表した。さらに、宇宙におけるヒトを対象としたオミックス研究についての技

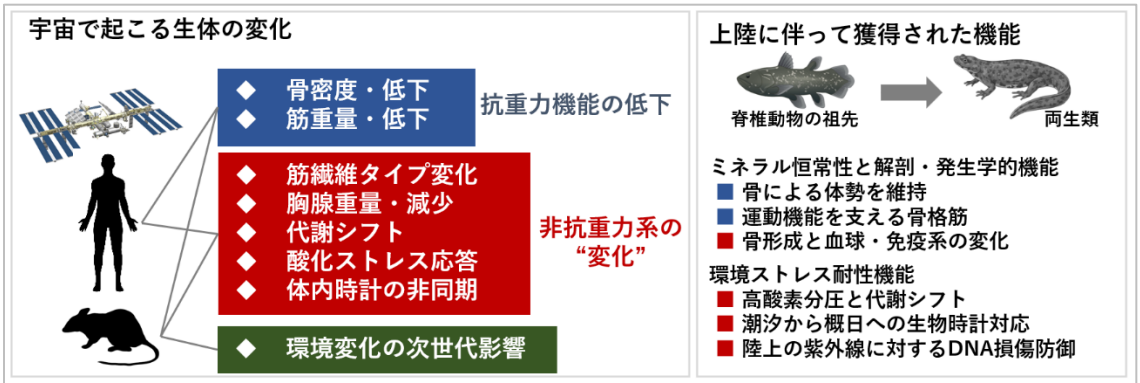


図 5.2-1 宇宙表現型と脊椎動物の陸上への適応と進化の関連
宇宙表現型を抗重力機能と環境応答の次世代伝播について分類し、それぞれに対応する上陸に伴う機能獲得と対応させた。

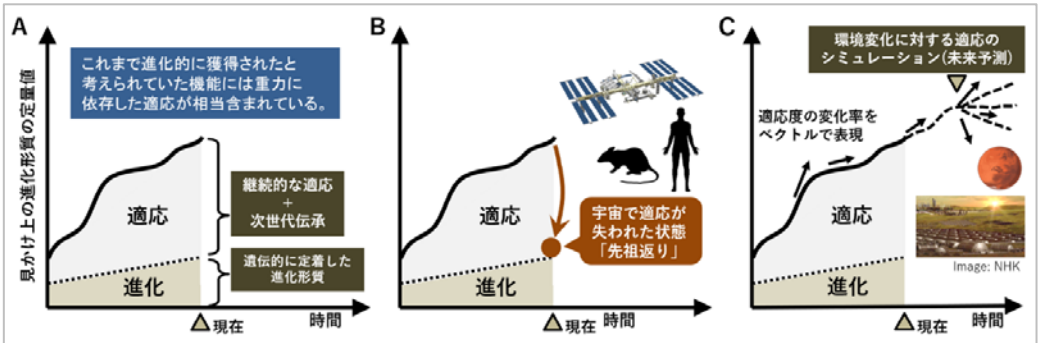


図 5.2-2 恒常性維持系などの基幹機能が宇宙で失われる現象を説明したモデル
(A) 見かけ上の進化形質の維持に関わる適応。(B) 宇宙で「重力への適応」が失われることによる表現型のシフト。(C) 適応に関してはシミュレーションと実験的な検証が可能であり、未来予測も可能となる。

術面や倫理面での課題をまとめ、宇宙機関や研究コミュニティーへの提言を行った総説(成果リスト 4 番)の発表にも参加し、本研究の進め方を共有した。

5.2 宇宙生命科学の新しい切り口としての「適応と進化」テーマの提案

本研究で得られた重要な成果のひとつは、これまでにマウス研究で発見されていた、抗重力機能に見かけ上関連しない代謝系、とストレス応答経路、表皮(いずれも MHU-1 ミッションでは RNA シーケンス解析の対象に含まれていなかった、皮膚・消化器・肺を含む)等の応答がヒトでも起こっていることを示唆する結果を得たことである。また、ビタミン D シグナリングや甲状腺、副甲状腺、下垂体等の神経分泌器官の応答など、脊椎動物の祖先が上陸に際して獲得したと考えられる機能との類似性が改めて示され、これらの変化がヒトとマウスのデータの比較から、微小重力環境によって引き起こされることが示唆された。これまで、宇宙環境応答は主に骨密度低下や筋委縮など、「抗重力機能の低下」との関連で議論されてきたが、本研究の結果をもとにマウスデータを改めて評価し直すことで、「宇宙環境応答」が「脊椎動物が海から陸へと進出する過程で獲得した機能の包括的衰退」であるとの仮説へと拡張し、様々な角度から重力シグナルと身体機能の恒常性維持や老化の概念を研究するプログラムへと発展させることができた(図 5.2-1)。さらに、これまで進化的に獲得されたと考えられてきた脊椎動物の恒常性維持系が宇宙で短期間に破綻する現象から、これまでの生命科学研究で解析されることが無かった「重力への適応」とその知見の応用を目指すオープンサイエンステーマ「Space, Adaptation and Evolution」を開始し、地球生命の環境適応のモデリングと未来予測に向けた国際的な共同研究に向けた活動を進めている(図 5.2-2)(サクセスクライテリア 7 の要件に該当)。

6. 結語

きぼう利用テーマ「宇宙滞在中の液体生検による血漿中核酸のゲノム・エピゲノム解析～cfDNA 等を用いた低侵襲体内モニタリングに向けて～」により、以下の成果が得られた。

(1) RNAseq、Small-RNAseq データを取得し、N=6 解析によりフライト前後に変化する遺伝子リストを得た。
(2) 血漿中の cfDNA 量はフライト前後で変化しない一方で、ミトコンドリア DNA のコピー数はフライト中に増加したことが確認できた。
(3) RNAseq 解析により、遺伝子群として顕著に変化したミトコンドリア遺伝子、ムチン遺伝子ファミリーに加え、筋および神経系等での特異性が知られている遺伝子の変化を検出できた。このことから、宇宙飛行士からの採血により、体内深部組織の宇宙環境応答を分子レベルで検出する目標を達成した。
(4) フライト前後で cfDNA プロファイルが変化する遺伝子領域を特定することで、

DNA を用いた解析でも、RNA 解析と同様な由来組織種の推定結果を得た。これにより、細胞外に DNA、RNA を放出している組織・細胞種の同定を達成した。

(5) cfDNA の分布とメチル化状態をゲノムワイドで解析することで、DNA 損傷やストレス応答による細胞周期制御に関わる TP53 関連遺伝子のプロモーター領域のエピゲノム変化を検出した。

(6) ミトコンドリア DNA 及び RNA を指標として血漿中の細胞外小胞を分画する新たな手法を開発し、その表面マーカーである CD36 およびミトコンドリア DNA・RNA が宇宙環境応答の指標となる可能性を提案した。

(7) 抗重力機能と直接関連しないヒトとマウスで共通する宇宙表現型も微小重力の影響下にあることを示し、これまで認識されていなかった「重力への適応」の脊椎動物の適応や進化との関連を提案した。

(8) 複数の宇宙飛行士が参加する世界初のリキッドバイオプシー研究の遂行にあたり、国際的な研究者コミュニティーとの連携を図るとともに、国際コンソーシアムの設立、解析手法と結果の共有等を通して将来的な宇宙医学研究の発展に向けた活動を行った。

（サクセスクライテリアの達成度）

ｻｸｾｽﾚﾍﾞﾙ	サクセスクライテリア	達成状況
ミニマム サクセス	以下を達成すること。 1) 宇宙環境滞在により発現変化する RNA を血漿サンプルで確認することができる。 2) 血漿中 cfDNA 量をモニターすることができる。	1) ◎（達成） 根拠：血漿検体から精製した RNA のシーケンシング解析を実施し、RNA 定量値の変化する遺伝子を確認できたため。（4.3 項記述） 2) ◎（達成） 根拠：血漿検体から精製した DNA の量を定量し、バルク cfDNA としては顕著な変化が無いことを確認できたため。（4.1 項記述）
フル サクセス	ミニマムサクセスに加えて、以下をすべて達成すること。 3) 組織特異的 RNA の発現情報から、宇宙環境の影響を受けている組織を推定することができる。 4) 血漿中 cfDNA の解析から宇宙環境の影響を受けている組織を推定することができる。	3) ◎（達成） 根拠：cfRNA 解析において組織特異性がデータベースに報告されている遺伝子群の宇宙での変化を確認できたため。（4.4 項記述） 4) ◎（達成） 根拠：cfDNA シーケンス結果により、遺伝子プロモーター領域の cfDNA 量が変化する組織特異的遺伝子を確認できたため。（4.7 項記述）

	5） DNA メチル化解析から発現調節を受けている遺伝子を同定する。	5） ◎（達成） 根拠：cfDNA の MeDIP シーケンス結果により、ストレス応答 MAPK-p38 経路と DNA 損傷応答等に関わる PI3K-AKT パスウェイ遺伝子群のメチル化の変化を確認できたため。（4.7 項記述）
エクストラサクセス	作業仮説を超える、以下のいずれかを達成すること。 6） 宇宙環境におけるストレス状態をモニターできるバイオマーカー候補を挙げるとともに、解析手法を提案することができる。 7） 宇宙滞在だけではなく地上における老化メカニズム等に対する新たな知見または医薬品開発等につなげることができる。	6） ◎（表面抗原の同定と利用は当初想定されていなかった） ヒトとマウスで共通する宇宙ストレスマーカーとして exMT を確立し、CD36 マーカーの同定により、由来組織の推定を行った。（4.4 項記述） 7） ○（見かけ上の進化に隠された「重力への適応」の提唱） マウスとヒトで共通したヒト疾患カテゴリーが重力環境の影響を受けることを示し、抗重力機能以外の応答を含む概念を提唱した。（5.2 項記述）

［参考文献］

1. Shiba D et al. (2017) Development of new experimental platform 'MARS'-Multiple Artificial-gravity Research System-to elucidate the impacts of micro/partial gravity on mice. *Sci Rep.* 7(1):10837. doi: 10.1038/s41598-017-10998-4.
2. Garrett-Bakelman FE et al. (2019) The NASA Twins Study: A multidimensional analysis of a year-long human spaceflight. *Science.* 2019 Apr 12;364(6436):eaau8650. doi: 10.1126/science.aau8650.
3. da Silveira WA et al. (2020) Comprehensive Multi-omics Analysis Reveals Mitochondrial Stress as a Central Biological Hub for Spaceflight Impact. *Cell.* 183(5):1185-1201.e20. doi: 10.1016/j.cell.2020.11.002.
4. Bezdan D et al. (2020) Cell-free DNA (cfDNA) and Exosome Profiling from a Year-Long Human Spaceflight Reveals Circulating Biomarkers. *iScience*. 23(12):101844. doi: 10.1016/j.isci.2020.101844.
5. Koh W et al. (2014) Noninvasive in vivo monitoring of tissue-specific global gene expression in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 111(20):7361-6. doi: 10.1073/pnas.1405528111.
6. Lang T et al. (2017) Towards human exploration of space: the THESEUS review series on muscle and bone research priorities. *NPJ Microgravity.* 3:8. doi: 10.1038/s41526-017-0013-0.
7. Shah VV et al. (2021) Mammary-specific expression of Trim24 establishes a mouse model of human metaplastic breast cancer. *Nat Commun.* 12(1):5389. doi: 10.1038/s41467-021-25650-z.

［成果リスト］

学術論文

1. Fujita SI, Rutter L, Ong Q, Muratani M. (2020) Integrated RNA-seq Analysis Indicates Asynchrony in Clock Genes between Tissues under Spaceflight. ***Life***. 10(9):196. doi: 10.3390/life10090196.

総説論文

2. Afshinnekoo E, Scott RT, MacKay MJ, Pariset E, Cekanaviciute E, Barker R, Gilroy S, Hassane D, Smith SM, Zwart SR, Nelman-Gonzalez M, Crucian BE, Ponomarev SA, Orlov OI, Shiba D, Muratani M, Yamamoto M, Richards SE, Vaishampayan PA, Meydan C, Foox J, Myrrhe J, Istasse E, Singh N, Venkateswaran K, Keune JA, Ray HE, Basner M, Miller J, Vitaterna MH, Taylor DM, Wallace D, Rubins K, Bailey SM, Grabham P, Costes SV, Mason CE, Beheshti A. (2020) Fundamental Biological Features of Spaceflight: Advancing the Field to Enable Deep-Space Exploration. ***Cell***. 183(5):1162-1184. doi: 10.1016/j.cell.2020.10.050.
3. Rutter L, Barker R, Bezdan D, Cope H, Costes SV, Degoricija L, Fisch KM, Gabitto MI, Gebre S, Giacomello S, Gilroy S, Green SJ, Mason CE, Reinsch SS, Szewczyk NJ, Taylor DM, Galazka JM, Herranz R, Muratani M. (2020) A New Era for Space Life Science: International Standards for Space Omics Processing. ***Patterns***. 1(9):100148. doi: 10.1016/j.patter.2020.100148.
4. Cope H, Craig WRG, Matthew MJ, Rutter LA, Toh LS,Williams P, Herranz R, Borg J, Bezdan D, Giacomello S, Muratani M, Mason CE, Etheridge T, Szewczyk NJ. Routine Omics Collection is a Golden Opportunity for European Human Research in Space and Analogue Environments. ***Patterns.*** Published online. doi: 10.1016/j.patter.2022.100550

投稿予定学術論文

1. Rutter et al., CD36-associated extracellular mitochondria as a hallmark of space response. (TBD). 2022 年 10 月投稿予定
2. 腎臓機能解析 (TBD). GeneLab データシェアによる共同研究 2022 年投稿予定
3. ミトコンドリア解析 (TBD). GeneLab データシェアによる共同研究 2022 年投稿予定

投稿予定総説論文

4. 宇宙飛行士のオミックス解析に関する総説. (2022 年 10 月投稿予定)

著書・総説・学位論文

1. 村谷匡史（特集企画）医学のあゆみ「宇宙生命科学の進歩と医学応用への展望」(279)6
2. Lindsay Rutter, 村谷匡史. (2021) 宇宙生命科学におけるオミックス解析の標準化・自動化と国際連携. 医学のあゆみ. (279)6:623 頁.
3. 村谷匡史. (2021) リキッドバイオプシー解析を介したモデル生物研究成果のヒトへの投射. 医学のあゆみ. (279)6:647 頁.
4. 藤田晋一郎. (2021) 宇宙飛行中のバイオマーカー候補を探索するための RNA 発現プロファイルのインシリコ分析（博士学位論文）

学会発表・応募中の学会発表

1. 村谷匡史, Lindsay Rutter, 藤田晋一郎, 高橋智. 宇宙飛行士のリキッドバイオプシー解析から見た宇宙環境応答の多臓器連環. 日本宇宙生物科学会第35回大会. (2021年9月、オンライン口頭発表)
2. Muratani M. Space life science research to predict the future of life on and beyond Earth. GeneLab Analysis Working Group Symposium 2022 (2022年6月30日、オンライン口頭発表)
3. Rutter L, Husna N, Aiba T, Fujita SI, Saito Y, Shiba D, Kudo T, Takahashi S, Furukawa S, Muratani M. Tissue deconvolution and cross-species analysis of plasma cell-free RNA highlight homeostatic throwback phenotypes in space. ISS R&D Conference 2022. Washington DC, USA. (2022 年 7 月 25-28 日、口頭発表)
4. Rutter L et al., Molecular characterization of space environment responses in internal tissues by cell-free DNA and RNA analysis of plasma samples collected from six astronauts. American Society for Gravity and Space Research (ASGSR) Annual Conference 2022. Huston, USA. (2022 年 11 月、発表応募中)
5. Camera A et al., ミトコンドリア解析 (TBD). ASGSR Annual Conference 2022. Huston, USA. (2022 年 11 月、発表応募中)
6. 村谷匡史, 宇宙研究からアプローチする適応・進化の理解と地球生命の未来予測. 第 45 回日本分子生物学会年会, ワークショップ, クロマチン潜在能に働きかけるエピゲノムと核内構造体 (2022 年 12 月 1 日、口頭発表予定)

獲得外部競争的資金

1. 村谷匡史（代表）, 科学研究費, 基盤研究（B)「宇宙飛行士の血漿中核酸エピゲノム解析による宇宙環境応答の統合評価」
2. Lindsay Rutter, 村谷匡史（受入研究者） 日本学術振興会, 外国人特別研究員および特別研究員奨励費「血漿中 DNA・RNA エピゲノム解析による宇宙環境と老化ストレス評価」
3. 村谷匡史(代表) TIA 連携プログラム調査研究課題「宇宙研究からアプローチする適応・進化の理解と地球生命の未来予測」

その他取材協力など

1. Animals in Space. National Geographic. October 21, 2020.

以上

2022年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

宇宙滞在中の液体生検による血漿中核酸のゲノム・エピゲノム解析
～cfDNA 等を用いた低侵襲体内モニタリングに向けて～
（Cell-Free Epigenome）

代表研究者：村谷 匡史（筑波大学）

総合評価
A: 目標を充分に達成した(フルサクセス相当)

本研究は、宇宙飛行士の飛行前・中・後の細胞外DNA、RNAおよび、細胞外小胞の詳細な解析を行い、宇宙環境の人体組織への影響を調査したものであり、宇宙滞在が、様々な臓器、組織に影響を与えている可能性を提示するなど、重要な成果を得た。また、リキッドバイオプシーを用いた解析手法を確立したことは、月面長期滞在など、国際有人宇宙探査計画の具体化が進む中、必須となる宇宙医学の発展に向けて、大きなインパクトのある成果であると評価する。

一方、本研究による成果の多くが未公表であり、提示されている出版計画に従い、早期の公表を目指して、論文纏めに注力して欲しい。その評価を基盤として、地上生命の重力への応答に関わる新規課題の提案を期待する。地上における老化メカニズムに対する新たな知見の蓄積にも期待する。

2022年10月31日
きぼう利用テーマ選考評価委員会（生命医科学分野）

ISS・きぼう利用ミッション

「宇宙滞在中の液体生検による血漿中核酸のゲノム・エピゲノム解析 ～cfDNA 等を用いた低侵襲体内モニタリングに向けて～ (Cell-Free Epigenome)」

研究成果概要書

研究代表者； 村谷 匡史 （筑波大学）

令和 4(2022)年 8 月

研究の背景と目標

宇宙滞在では放射線、微小重力、閉鎖環境ストレスが複合的な影響を生体に与え、深宇宙への有人探査に向けて、その医学的理解と対応策の開発は重要な課題である。また、地球上の生命が、これまで進化上経験したことのない微小重力環境に対して示す応答は、生物学的にも非常に興味深い。JAXA と本研究の提案者らは、2016 年に国際宇宙ステーション(ISS)で世界初の人工1G 環境を対照とした第1回小動物飼育ミッション(MHU-1)を行い、生命が地球上で普遍的に受ける重力が、環境シグナルとして骨・筋・免疫系、さらに代謝や神経調節の恒常性維持に重要であることを見出した。しかし、限られた実験機会と技術的制約により、その生物学的解釈では不明瞭な部分も多く残されている。

モデル生物を用いた実験結果のヒトでの検証と、より柔軟なタイムコース実験の実施を目的として、宇宙飛行士を対象とした液体生検(リキッドバイオプシー)による宇宙環境応答の評価を行った。本研究では、6 名の宇宙飛行士の血漿中の細胞外 RNA (cell-free RNA, cfRNA) を対象としたトランスクリプトーム解析と細胞外 DNA (cell-free DNA, cfDNA) のメチル化解析を行うことで、ヒトの体内深部で起こる変化を組織・細胞種単位で予測することを目標とした。

研究結果の概要

宇宙滞在中に生じる細胞外ミトコンドリアと由来組織の推定

本研究ではフライト前、フライト中、フライト後の 11 タイムポイントでの採血を行った。ミトコンドリアDNAの定量と cfRNA のシーケンス解析を行った結果、血漿中に放出される細胞外ミトコンドリアのフライト中の顕著な増加が見られた。これは、ISS に長期滞在した1名の宇宙飛行士を対象とした NASA の Twins Study を再現する結果であった。本研究ではさらに、細胞外ミトコンドリアを含む細胞外小胞の表面抗原のスクリーニングを宇宙飛行士の検体を用いて行い、CD36 分子を同定した。CD36 に対する抗体を用いて精製したミトコンドリアを含む血漿分画には、ヒトの体内の様々な器官、組織や細胞種で特異的に発現することが知られている RNA が含まれており、これによって宇宙滞在中に代謝関連ストレスを受ける組織の網羅的な同定に成功した。これらの組織には、宇宙滞在中に萎縮する骨格筋のほか、神経系、心臓と動脈血管、肝臓、胸腺、下垂体、皮膚などが含まれていた。細胞外ミトコンドリアについては様々な要因で損傷を受けたミトコンドリアの除去機構や臓器間のストレスシグナリングに関する機能が報告されており、比較的低侵襲な採血により、体内の細胞のストレス応答に関する分子変化と組織特異性を検出できることが、本研究によって示された。

また、ミトコンドリアにコードされる遺伝子以外の RNA を指標としたスクリーニングでは、さらに多くの表面抗原により多様な由来を持つ細胞外小胞分画が得られ、それぞれ異なる RNA プロファイルが得られることが示された。このことから、宇宙医学研究分野だけでなく、細胞外ミトコンドリアの関連する代謝性疾患のほか、様々な疾患の臨床研究や生体のモニタリング手法として、表面抗原を指標とした高精細なリキッドバイオプシー技術のさらなる開発と応用

への可能性を示す結果が得られた。

cfDNA解析による体内の細胞ターンオーバーとエピゲノム制御状態の予測

細胞核ゲノムの血漿中 cfDNA は、体内で起こる細胞死によって生じると予想される。ヌクレオソーム単位に相当するサイズ分画のcfDNA に対してシーケンス解析を行ったところ、宇宙フライト中に変化が起こる遺伝子領域として、RNA 解析と同様な組織特異性が見られた。また、DNA 損傷やストレス応答により細胞周期を制御する TP53 関連遺伝子群が同定された。さらに、cfDNA のメチル化状態を解析したところ、PI3K-Akt シグナリングに関連したストレス応答関連遺伝子でのエピゲノム修飾変化が検出できた。cfDNA のサイズ分布とメチル化制御の両方が変化し、さらに細胞死を起こす体内の細胞種の変化が重なった複雑なプロファイルの解釈については、機械学習等を用いた解析やモデリングへと今後展開する予定である。本研究によって、ヌクレオソーム解像度の DNA のエピゲノム制御状態が採血検体から得られることが示され、宇宙で起こる細胞死の低侵襲なモニタリング手法としての有用性が評価できた。

ヒトとマウスのリキッドバイオプシーデータの比較による微小重力影響の評価

宇宙環境ストレスに含まれる、微小重力、放射線、閉鎖空間、ノイズや気圧など様々な要因の個別の影響評価は難しい。ISS きぼう日本実験棟には遠心力を利用した人工重力装置が設置され、MHU-1 ミッションでは、人工１G群を対象としたマウスの宇宙飼育が行われた。このミッションで得られた血漿検体でも cfRNA 解析を行い、ヒトのデータと直接比較することで、本研究でフライト中に見られた変化から重力変化の影響と共通する項目を検討した。この結果、フライト群での血漿中ミトコンドリア RNA が重力の影響を受けるほか、心血管系、神経系、さらに宇宙飛行士で障害が報告されている目の機能に関する RNA の変化が微小重力群と人工 1G 群との比較と一致した。この結果は、骨筋系で見られる抗重力機能の減退を中心に認識されてきた微小重力の影響を、多様な臓器・組織における全身性の応答として理解する必要性を示すものである。この点からも、ミネラル恒常性や骨筋を含む多臓器連環を司るビタミンDシグナリング等に関連する遺伝子群が cfRNA 解析で変化していたことは宇宙環境応答のメカニズムを理解する手がかりとなる。

まとめと今後の展開

本研究は提案から約 8 年をかけて、多極間の宇宙機関における調整、軌道上での複数宇宙飛行士からのタイムコースサンプリング、DNAと RNA を対象とした複数のゲノミクス解析、マウス研究との連携など、複雑な要素の調整を経て実施された。臨床研究としては比較的少ない 6 名の研究対象者から得られたデータをもとに、長期宇宙滞在の影響や地上での再順応の影響が認められ、NASA の Twins Study の結果の再現やマウスで検出された微小重力影響に関する遺伝子カテゴリーの 48%が本研究でも確認された。したがって、本研究では宇宙環境応答に関する重要なデータと新たな知見が得られたことに加え、今後のヒトを対象とした医学研究、さらに生命科学研究に応用できる様々なノウハウも獲得できた。これらの成果の背景には、先行研究を行った宇宙機関や研究者との国際的な連携があり、本研究もまた、後続の研究プロジェクトや研究コミュニティーとの情報共有を、GeneLab 解析ワーキンググループや、解析手法の標準化に向けて新たに設立された国際コンソーシアムを通して推進した。JAXA と NASA によって行われた ISS での複数の小動物飼育ミッションと、本研究を含むヒトを対象とした研究結果をマルチオミックス解析の視点から統合・俯瞰することにより、様々な発見があった。特に、重力の環境シグナルとしての重要性の評価と、それに対する生物の適応に関して新しい視点が得られたことで、宇宙から見た地球生命の理解の面からも国際的な協力による今後の研究の方向性を示すことができた。

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission,

"Cell-Free Epigenome:

Genome and epigenome analysis of circulating nucleic acid-based liquid biopsy"

Principal Investigator: Masafumi Muratani (University of Tsukuba)

August 2022

Research background and goals

Understanding the physiological impact of the space environment, which includes stressors such as radiation, microgravity, and a closed environment, is critical for the development of countermeasures towards crewed exploration into deep space. The response of life on Earth to microgravity, which has never been experienced in evolution, is of great biological interest. In 2016, JAXA and researchers involved with this project conducted the world's first mouse spaceflight mission, which utilized an on-board artificial-1G environment on the International Space Station (ISS) to evaluate the impact of microgravity. We found that the gravitational force exerted on the body is important as an environmental signal for maintaining the homeostasis of bones and muscles. However, due to limited experimental opportunities and technical constraints, biological interpretations of many observations remain unclear. To verify the results of mouse experiments in humans and to conduct a more flexible time-course analysis, we performed a liquid biopsy analysis on astronauts. In this study, we performed transcriptomic analysis of extracellular RNA (cell-free RNA, cfRNA) and methylation analysis of extracellular DNA (cell-free DNA, cfDNA) in the plasma collected from six astronauts to determine the molecular functions and tissue types responding to the space environment.

Summary of research results

Characterization of extracellular mitochondria (exMT) release during spaceflight

Blood samples were collected at 11 time points before, during, and after spaceflight. Quantification of mitochondrial DNA and sequencing of cfRNA showed a marked increase of exMT released into the plasma during spaceflight. This result confirmed mitochondrial dysregulation observed in the NASA Twins Study, which analyzed one astronaut staying on the ISS for a 1-year mission. We searched for surface markers on extracellular vesicles containing exMT, and identified the CD36 molecule. Plasma fractions containing exMT, purified using antibodies against CD36, contained RNAs known to be specifically expressed in various organs, tissues, and cell types in the human body. These tissue-specific RNAs indicated tissue types that undergo metabolic stress in space. These tissue types present skeletal muscles as well as nervous system, heart and arteries, liver, thymus, pituitary gland, and skin. exMT have been implicated in the removal of mitochondria damaged by various factors and stress signaling between organs. Our results may indicate tissue damage and repair processes inside the human body, and suggest that exMT could be a potential biomarker to evaluate internal tissue responses.

We also detected multiple plasma fractions that contained distinct populations of RNAs using a panel of antibodies against cell surface markers. Although the current study was limited by the list of antigen markers and cell-type-specific RNAs, these results motivate future development and applications of high-definition liquid biopsy combined with fractionation of extracellular vesicles for space medicine as well as for health monitoring and clinical sample analysis on Earth.

Prediction of cell turnover and epigenetic regulation in vivo by cfDNA analysis

Chromosomal cfDNA in plasma is expected to be produced during cell death (apoptosis) inside the body. We performed sequencing analysis of cfDNA in size fractions corresponding to

nucleosome units. Spaceflight-associated changes in cfDNA showed tissue-specificity similar to that of cfRNA. One of the gene categories affected by spaceflight included TP53-related genes, which regulate the cell cycle response to stressors such as DNA damage. Furthermore, analysis of cfDNA methylation status allowed us to detect epigenomic modifications in stress response-associated genes involved in PI3K-Akt signaling. cfDNA and methylation profiles represent overlapping signals of tissue-specificity of cellular turnover and epigenetic regulation. We intend to continue to work on these datasets to deconvolute effects of cell-type composition and epigenetic control to model molecular events in the human body. Our current study demonstrated that the epigenetic regulation of DNA at nucleosome resolution can be obtained from blood samples collected in space.

Evaluation of microgravity effects by comparing human and mouse liquid biopsy data

It is difficult to evaluate the individual effects of various factors such as microgravity, radiation, isolation, noise, and air pressure, which are all stressors in the space environment. An artificial gravity device that uses centrifugal force was installed in the ISS Kibo Experiment Module, and mice were reared in space to compare with the artificial 1G control group during the MHU-1 mission. Plasma samples obtained from this mission were subjected to cfRNA analysis, and by direct comparison with human data, we identified common changes seen in humans and mice. Plasma mitochondrial RNA were affected by microgravity in mice as well Changes in RNA related to the cardiovascular system, nervous system, and optical system, which has been reported to be impaired in astronauts, was observed both in humans and mice. These findings confirm the idea that, in addition to muscle and bone loss, which represent classical examples of functional decline by disuse and mechanical unloading, a broader range of events are affected by gravity loss. From this point of view, changes in gene groups related to vitamin D signaling, which regulates multi-organ linkages including mineral homeostasis and bone and muscle health, observed in this study may provide one of the potential clues for understanding the mechanism of systemic physiological responses to the space environment.

Conclusion and future development

Over the course of about eight years since its proposal, this research has been carried out through coordination between multiple space agencies, time-course sampling from multiple astronauts, combinations of genome-wide analysis of DNA and RNA, and communications with the mouse mission. Based on the data obtained from six astronauts, consistent molecular changes during spaceflight and re-adaptation to the ground environment were detected. These results confirmed major findings from the NASA Twins Study and mouse liquid biopsy analysis. The successes of this project are due to extensive communication with international collaborators from space agencies and the research community providing their know-how from previous missions. Technical and scientific input aimed at integrative multi-omics research in GeneLab Analysis Working Groups and International Standards for Space Omics Processing (ISSOP), a newly established international consortium for the standardization of space omics, also helped with the planning and execution of this study. This study represents one of the first examples of highly coordinated human and mouse cross-species spaceflight omics analysis. The combination of datasets from multiple mouse flight missions from NASA and JAXA, together with the human data obtained in this study, provided unprecedented viewpoints to refine our scientific questions and interpretation of results. We wish to continue to contribute to the open science led by the international research community through sharing and utilization of the results from this study.

別紙3-2

2022年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

宇宙環境における健康管理に向けた免疫・腸内環境の総合評価
（Multi-Omics）

代表研究者　大野 博司 （理化学研究所）

総合評価
A: 目標を充分に達成した(フルサクセス相当)

本研究は、宇宙環境に起因する腸内細菌叢の変動と免疫との関係を評価することを目標として、マウスおよびヒトを対象とした実験を計画したものである。宇宙環境における免疫・腸内環境をMulti-Omics解析により総合的に評価できることを示し、微小重力下におけるマウス糞便中のバイオマーカーとなり得る候補を見出すなど、大変興味深い知見を得た。これらの優れた成果は、軌道上でのヒトの健康維持のみならず、近年重要性を増す腸内環境研究にも寄与することも期待される。

一方で、これらの貴重な実験データに基づく優れた成果の多くが、現時点で論文公表に至っていないため、これらの研究成果を早急に論文化することを期待する。

2023年3月2日
きぼう利用テーマ選考評価委員会（生命医科学）

ISS・きぼう利用ミッション
「宇宙環境における健康管理に向けた免疫・腸内環境の総合評価（Multi-Omics）」
（マウス実験/ヒト実験）
研究成果概要書

代表研究者： 大野 博司 （理化学研究所）

2022年 12月

微小重力・宇宙放射線・閉鎖空間などを特徴とする宇宙環境においては、人体の生理的リスクの1 つとして免疫低下が起こることが報告されている。近年の次世代型超高速シーケンサーによる腸内細菌叢のメタゲノム解析により、長い間不明であった腸管内環境の実態の解明が急速に進んでいる。腸管粘膜には多くの免疫細胞が集積しており、腸内細菌叢は宿主免疫系に大きく影響することが近年明らかにされている。また、腸内環境を改善するプレバイオティクスやプロバイオティクスが腸管免疫制御に関与していることも判明している。しかしながら、宇宙飛行に起因する腸内細菌叢と免疫機能の変動を総合的に評価した研究は、本研究開始時点でまだなかった。そこで本研究提案では、宇宙飛行士、および宇宙飛行マウスのサンプルを用いて、宇宙環境における腸内細菌叢、代謝産物、免疫系の変動を評価し、併せてプレバイオティクスであるフラクトオリゴ糖(fructoolicosaccharide; FOS)の効能を評価することを目的とした。

予備試験として、地上飼育マウスでは、宇宙環境での重力の影響評価系として後肢ギプス固定試験、荷重力試験における腸内細菌叢・代謝物等の変化の確認を行い、また FOS の影響についても検証した。加えて、軌道上マウス飼育ミッション特有の装置、手順等への適合性試験として、糞便採取刺激によるストレス評価試験、飼育餌および飼育水の検証実験、フライト成形餌とペレット餌による摂取量検証、JAXA が開発したマウス軌道上飼育装置 (Mouse Habitat Unit-2: MHU-2)による地上飼育検証実験等を行った。

軌道上飼育マウスでは、宇宙空間における複合的なストレスによる腸内環境の変化、通常餌に加えて FOS を摂餌することによる変動、MHU-2 を利用した人工重力（artificial gravity; AG）および微小重力 (microgravity: MG)による腸内環境を比較し、糞便は、飛行前、軌道上、帰還後で経時的に採取し、時系列変動を追跡した。また、帰還後にマウスを解剖し、各種臓器重量やその遺伝子発現、FACS による免疫細胞の組成を検証した。

国際宇宙ステーションでの MHU-2 による AG/MG 環境で飼育されたマウスの各種生理機能測定は正常範囲内であり、MHU-2 の有用性が示された（成果リスト1）。MG 環境下での体重の減少および胸腺、脾臓の萎縮が確認された。一方で FOS 摂取マウスでは AG-MG 間での体重差が小さくなり、各臓器での MG 群との差が少なくなったことから、FOS は微小重力環境での免疫系への影響を軽減する効果が示唆された。

AG 群・MG 群と地上対照群の比較から、宇宙滞在による腸内細菌叢の変動が認められた。一方、糞便中の網羅的な代謝物の測定から、MG 群では AG 群・地上対照群と比較して糞便中の代謝プロファイルが変動すること、特に代謝物 A と代謝物 B が顕著に増加することが示された(図 1)。さらに、これら

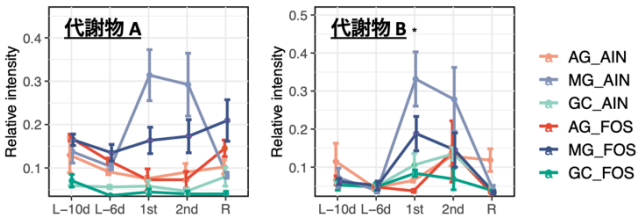


図１． 微小重力下で大きく変動したマウス糞便中代謝物の経時変化

の変化は FOS 摂取によって小さくなることから、FOS による生体機能調節機能が示唆された。メタゲノム解析ではこれらの変化に寄与すると考えられる腸内細菌関連機能遺伝子の変動は認められないことから、MG 環境における代謝物の変動は宿主側の変動による可能性が示唆された。そこで、糞便中で増加した代謝物 A の腸管組織からの吸収を検討するために、小腸組織に存在するトランスポーター遺伝子の発現を調べた。複数のトランスポーター遺伝子の発現量を測定した結果、特に代謝物 A の腸管上皮からの吸収に関連するトランスポーター遺伝子が MG 群で有意に低下することが示された。したがって、MG 下では宿主機能の変動により糞便中に代謝物 A や代謝物 B の排出が見られ、宇宙環境による微小重力による影響が宿主に腸肝循環に影響を与えていることが示唆された。

また、胸腺については、MG 群では胸腺の萎縮と細胞周期制御遺伝子の発現低下が見られるが、AG 群では胸腺萎縮、遺伝子発現低下が共に軽減することが明らかとなった（成果リスト 2）。

宇宙飛行士試験に関しては、糞便保存方法の影響の検討、手順検証実験等により、飛行試験のための試験法の最適化を行った。また FOS 摂取による腸内環境変動の地上予備試験では、腸内細菌構成の個体差により FOS が異なる影響を及ぼすことが明らかとなり、個体によっては FOS 摂取が悪影響を及ぼす可能性も示唆されたことから（成果リスト3）、宇宙飛行士においても個体差による腸内機能遺伝子の変動等の精査が重要であると考えられた。

宇宙飛行士を対象とした実験では、糞便および唾液の細菌叢は個人差が大きいものの、宇宙環境で大きく変動し、糞便細菌叢は FOS 摂取により変動が飛行前に回復するが、唾液では FOS による回復は見られなかった(図2)。糞便メタボローム解析においても、宇宙滞在により酪酸、フマル酸、ギ酸,アミノ酸などが変動することが示された。加えて、軌道上マウス飼育ミッションで変動した代謝物 A は、1 名の宇宙飛行士で宇宙滞在によって大きく増加することが示された。唾液中のメタボロームからは特に短鎖脂肪酸が変動しており、宇宙滞在による口腔内代謝物が大きく変動していることが示された。

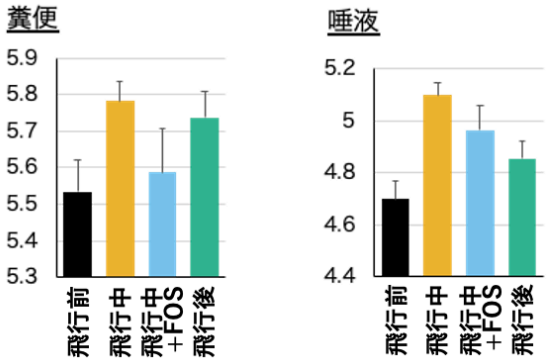


図２．宇宙飛行士細菌叢の変動

宇宙飛行士の末梢血液免疫細胞の FACS 解析から、帰還直後の白血球の増加、赤血球およびヘモグロビン濃度の減少が見られ、6 ヶ月まで元の数値に戻らなかった。

このように、宇宙飛行士および軌道上で飼育したマウスからサンプルを回収し、それぞれのサンプルから統合オミクス解析を行った。飛行マウスから微小重力下に特徴的に変動する糞便中のバイオマーカー物質 A、物質 B を同定し、1 名ではあるが宇宙飛行士でも糞便中の物質 A の増加が認められた。加えて、宇宙飛行士および宇宙滞在マウスの FOS 摂取による結果は宇宙環境におけるプレバイオティクスの有効性を示唆しており、宇宙飛行士の健康管理に利用できる可能性が示された。

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission, “Multi-omics analysis of human-microbial metabolic cross-talk in the space ecosystem“

Principal Investigator; Hiroshi Ohno (RIKEN)

Dec, 2022

It has been reported that the space environment characterized by microgravity, cosmic radiation, closed space and so on causes immunosuppression as one of the physiological risks to the human body. In recent years, the development of next-generation sequencer-based metagenome analysis has made rapid progress in understanding of the intestinal environment. Many immune cells accumulate in the intestine, and it has recently been clarified that the intestinal microbiota strongly impacts the host immune system. It has also been found that gut environment-improving prebiotics and probiotics are involved in intestinal immune regulation. However, no study has yet comprehensively evaluated changes in gut microbiota and host immune functions due to space flight. To tackle the problem, we collected samples from astronauts and space-flight mice to evaluate changes in the gut microbiota, metabolites, and the immune system in the space environment. In addition, we evaluated the effect of a prebiotics fructooligosaccharide (FOS) on the host during space flight.

As pre-tests with mice on earth, we examined the changes in gut microbiota and metabolites with cast fixation of the hind paws and over-gravity load as the evaluating methods of the effects of gravity in the space environment. We also verified the effects of FOS in these tests. In addition, to evaluate the suitability of the equipment and procedures for the orbital mouse rearing mission, a stress evaluation of mice for fecal collection, verification of the devices feeding diets and water, comparison of accessibility to flight molded diet or normal pellet diet, and the ground rearing verification of the Mouse Habitat Unit-2 (MHU-2) developed by JAXA.

In orbit-reared mice, in order to evaluate the changes in the intestinal environment due to combined stresses in space, changes due to feeding FOS in addition to normal diet, artificial gravity (AG) and microgravity (MG) using MHU-2, fecal samples were collected before the flight, on orbit, and after return, to trace the chronological changes. In addition, the weights of various organs, their gene expression, and the composition of immune cells by FACS analysis were examined on the returned mice. Various physiological function measurements of mice raised in the AG/MG environment by MHU-2 on the International Space Station (ISS) were within normal ranges, indicating the usefulness of MHU-2 (published in the Publication list 1). Bodyweight loss and atrophy of the thymus and spleen were observed under the MG environment. By contrast, in FOS-fed mice, the weight difference between AG and MG decreased, as well as the difference in each organs, suggesting that FOS could improve the adverse effect of MG in the host immune system. A comparison among the AG, MG and the ground control group revealed the changes in the gut microbiota due to space flight. Comprehensive fecal metabolome analysis revealed that the fecal metabolic profiles changed in the MG group compared to the AG and the ground control groups, especially with a significantly

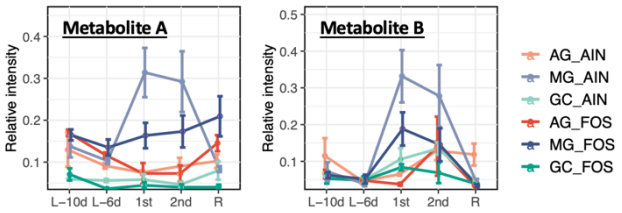


Fig. 1. Time course of the fecal metabolite changing drastically under microgravity

marked increase in Metabolite A and Metabolite B (Fig. 1). Furthermore, these changes were reduced by FOS intake, suggesting that FOS may improve the host biological functions. Metagenome analysis did not reveal changes in gut microbial functional genes related to changes in these metabolites, suggesting that the changes in these metabolites in the MG mice may be due to host-side changes. In order to investigate host-intrinsic changes during space flight, we measured the expression of transporter genes in the small intestinal tissue, and found that the transporter gene for Metabolite A was significantly reduced in the MG group. Taken together, Metabolite A and Metabolite B were excreted in feces due to changes in host functions under MG, suggesting that microgravity in the space environment affects the host enterohepatic circulation.

Thymus atrophy and decreased expression of cell cycle control genes were observed with MG, and both the thymic atrophy and decreased gene expression were reduced with AG (Publication List 2).

Regarding the astronaut study, the protocol was optimized for the stool preservation and experimental procedures. In addition, in a ground FOS intake test, it was revealed that FOS had distinct effects depending on the individual differences in the gut microbiota composition, which suggests that FOS intake may have an adverse effect on some individuals. (Publication List 3); this is an important implication for astronauts study.

Experiments on astronauts have shown that fecal and salivary microbiota vary greatly among individuals; nevertheless, space flight changes the microbial compositions both in feces and saliva. The fecal microbiota changes tended to return to pre-flight with FOS intake . On the other hand, changes in salivary microbiota with space flight were not affected with FOS intake (Fig. 2). Fecal metabolome analysis showed changes in butyrate, fumarate, formate and amino acids during space flight. In addition, Metabolite A, which increased in the MG mice, was shown to increase significantly during the space flight in one astronaut. From the metabolome in saliva, short-chain fatty acids were significantly increased, suggesting that oral metabolites were also influenced by space flight.

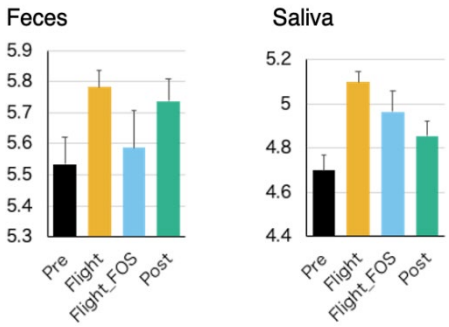


Fig. 2. Microbial changes in astronauts

FACS analysis of astronauts' peripheral blood immune cells showed an increase in leukocytes and a decrease in red blood cells and hemoglobin concentrations immediately after return to earth, which did not recovered to the preflight level until 6 months later.

In conclusion, we collected samples from astronauts and space-flight mice, and performed integrated omics analysis. We identified Metabolites A and B as fecal biomarkers that increase characteristically under microgravity from flying mice, as well as increased fecal Metabolite A in one astronaut. In addition, results of FOS intake with astronauts and space-flight mice suggest the effectiveness of prebiotics in the space environment, indicating the possibility of using them for health management of astronauts.

きぼう利用テーマ

「微小重力を用いた多成分会合コロイド系の相挙動の研究(Colloidal Clusters)」

研究成果報告書

研究代表者;山中淳平(名古屋市立大学) 2023年1月

1 諸言

1.1 研究の背景

近年、屈折率が周期的に変化する人工物質である「フォトニック結晶」の研究が盛んである[1]。**図1**は1次元、2次元、および3次元フォトニック結晶の模式図である。フォトニック結晶の中の光の伝搬は、半導体結晶における電子のエネルギーバンドと同様に、光子のエネルギーに対する「フォトニックバンド」を用いて表現できる。フォトニックバンド構造の形状によっては、物質中を電磁波が伝播できない周波数領域が存在することがあり、これをフォトニックバンドギャップ(光の伝搬禁止帯、PBGと略)と呼ぶ。あらゆる方向からの光に対して光伝搬が禁止されるとき、物質の持つPBGは「完全フォトニックバンドギャップ」(完全PBG)と称される。

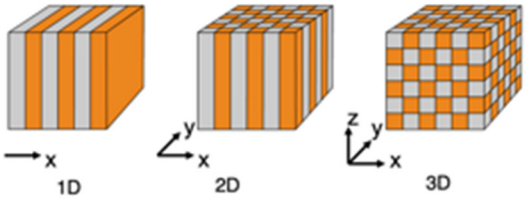


図1 1次元、2次元、および3次元フォトニック結晶の模式図.

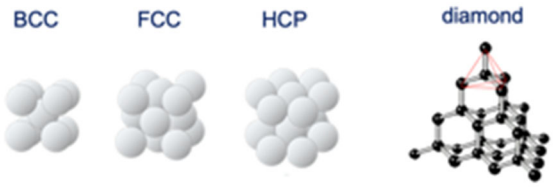


図2 様々な結晶構造の模式図.

これまでに、誘電体粒子がダイヤモンド格子型の結晶構造を形成するとき、完全PBGが生じることが理論的に示されている[1] **図2**には粒子が作る様々な結晶構造の模式図を示す。**図3**は面心立方(FCC)格子およびダイヤモンド格子のフォトニックバンドの計算結果の一例である(空気中に屈折率～3.5の誘電体粒子を並べた構造について計算。ダイヤモンド格子の縦軸(周波数)の単位は、光速度cと格子定数a の比 c/a) [2]。また、ミリ波領域の電磁波については、バルクの誘電体に規則的な孔を設けることで、ダイヤモンド構造に類似した構造が得られており[1]、PBGの存在が確認されている。ただし、光学材料として重要な、可視光から近赤外光領域に完全PBGを持つフォトニック結晶の作製法は確立されていない。なお近年、インコの一種(コンゴウインコ)の羽の発色が、可視光域にPBGを持つダイヤモンド格子類似の構造によることが明らかになるなど、生物の組織にも当該構造が存在することが明らかになっている[3](**図4**)。

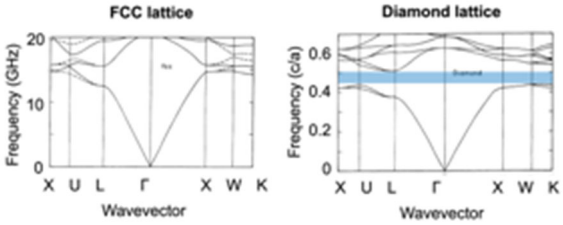


図3 FCC およびダイヤモンド格子のフォトニックバンド構造(文献 2 より).

図4 コンゴウインコの羽に存在するアモルファスダイヤモンド構造(文献 3 より).

1.2 研究内容と目標

フォトニック結晶として有用な、可視～近赤外光波長（0.4μmから数μm程度）に完全PBGを有するダイヤモンド格子の構築手法として、コロイド粒子の自己集合を利用する方法が活発に検討されている。コロイド粒子は分散液中で様々な粒子間力により自発的に規則正しく集合して、「コロイド結晶」構造を形成する[4]。ただし、分散液中の粒子が1種類（1成分系）で、かつ、粒子間相互作用が等方的な場合、結晶構造は、体心立方（BCC）格子、FCC格子、六方最密充填（HCP）格子に限られる[4]。ダイヤモンド格子の空間充填率は0.34と低く（FCCでは0.74）、エントロピー的に不利であるため、安定相としては出現しない。このため、多成分系や、異方的な粒子間相互作用を利用した手法が検討されている。

その一つが、正および負に荷電したコロイド粒子がクーロン力により形成する会合体の利用である。**図5**に模式的に示すように、反対荷電の2成分コロイド粒子系では、様々な会合体が得られる。正四面体型のコロイド粒子会合体を作成し、**図6**に示すように、これを最小要素として積み上げれば、ダイヤモンド構造が得られる。

＊なお**図5**に示すように、本報告書では、コロイド粒子が集合した構造全般を「会合体」と呼び、正四面体型の会合体のように、1個の荷電（正または負）粒子に、1個以上の反対符号の粒子が結合した会合体を「クラスター」と記載する。結合した反対符号の粒子数を「会合数」（m）と呼ぶ。また、会合体に正および負の粒子がそれぞれ複数含まれる、目標構造と異なる構造は、「凝集体」と呼んで区別する。

我々はこれまでに、正・負に荷電したコロイド粒子の混合系で、様々な会合数を持つクラスターが生成することを確認している（**図7**）。しかし、 粒子の電荷数と会合数の関係といった、生成条件に関する基本的な情報は、未だ明らかではない。また、完全PBGを得るためには、ダイヤモンド格子を構成する粒子が、媒体のおよそ2倍以上の屈折率n_rを持つ必要がある[2]。チタニアの屈折率は2.72 であり、水との屈折率比は2.04となり、2を超える。したがって、粒子の材質としてチタニアは有用であるが、チタニアの比重は3.9から4.2と大きいため、地上で静置した場合、数mm/hr以上の速さで沈降し、容器底に沈殿・凝集するためデータ取得が著しく困難である。

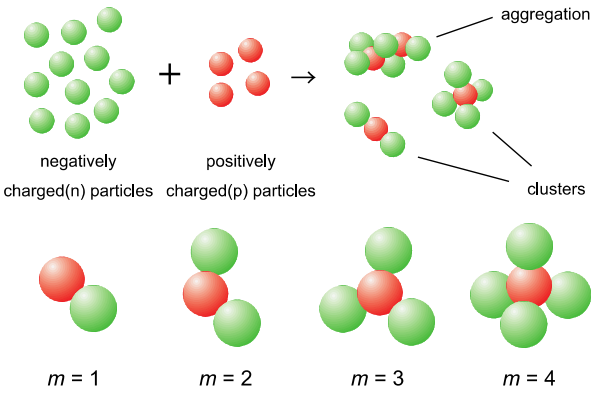


図5　正負に荷電したコロイド粒子の会合体、クラスター、および凝集体の模式図

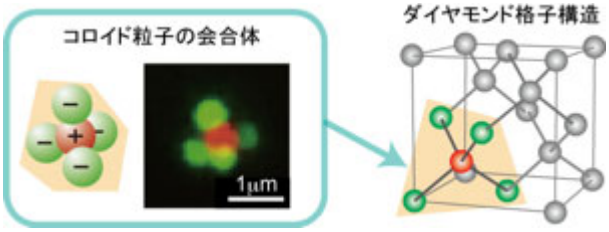


図6　コロイド粒子の四面体クラスターとダイヤモンド格子構造.

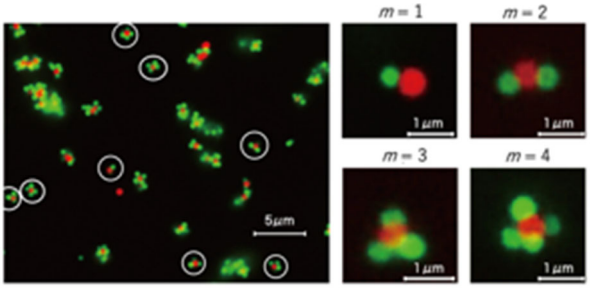


図7　正および負に荷電したポリスチレン粒子混合系で生成した会合体と様々な会合数 m を持つクラスターの拡大写真（蛍光顕微鏡写真）.

本研究では、正と負に荷電させたチタニア粒子のクラスターを微小重力環境下で形成し、以下を達成することを目的とした。

・クラスターの構造と会合数分布を調べることにより、平衡状態図(相図)を得る。

・クラスターの大きさが小さいため測定が困難であるが、チタニア四面体クラスターの光学特性の測定を試みる。

特に、媒体の塩濃度や粒子の電荷数をパラメータとして、これらが一定の条件で、クラスターの会合数の分布を顕微鏡観察で評価する。会合数分布は2日間でほぼ平衡状態に達することを確認しており、後述のように、宇宙実験では微小重力下で2日間静置したサンプル中の会合数分布を求める。なお本報告書では、クラスターの会合数の分布を「平衡状態図」と呼ぶこともある。特に、ダイヤモンド構造の最小構成要素となる正四面体クラスターを効率的に得る条件を探る。

具体的には、予め水媒体にゲル化剤を混合し、会合体形成後に紫外線を照射してゲル化させる。固定した後、地上に回収し、会合数、会合体の形状・構造、異なる形状・構造毎の数密度分布を得る。さらに、大きさが非常に小さいため測定が難しいが、正四面体クラスターの光学特性を測定し、フォトニックマテリアルへの発展可能性を調べる。

1.3 研究内容の重要性と意義、分野・領域での位置付け

完全PBGを持つフォトニック結晶は、対応する波長の光をその内部に閉じ込めることができ[2]、この特性を利用することで、光共振器、光導波[5]、負の屈折率を持つ材料[6]、不可視化（クローキング）技術への応用[7]など、革新的な光学材料の構築が可能と言われている。

既に述べたように、正四面体クラスターを最小構成要素として積み上げることによって擬似的なダイヤモンド構造を構築することで、3次元フォトニックマテリアルが将来実現できると期待される。また、ダイヤモンド構造形成に至るまでの途中経過において得られると考えられるアモルファスダイヤモンド構造（**図８**,[8]）を用いて、光メモリ、光増幅器、光導波路といった光コンピュータの必須構成要素が得ること考えられている。将来的に、金粒子などを用いれば、表面プラズモンを利用した「プラズモニックマテリアル」[4、9]も取得できる。このように、微小重力を活用した本研究により、フォトニクスおよびプラズモニクス分野での新規材料開発に重要な基礎的知見が得られるものと期待される。コロイド粒子の自己集合は、大型の材料を簡便に取得できるため有用である。

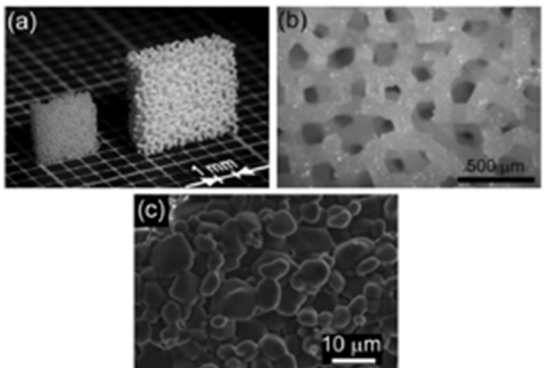


図８ ミリメートルサイズの構造周期を持つアモルファスダイヤモンド構造（文献８より）

1.4 研究の動機

本研究者代表者らはこれまで25年以上にわたり、コロイド結晶化に関する研究を行ってきた。その間に集積した知見を活用して、現在構築が期待されているダイヤモンド格子構造を作成したいと考えた。上述のように、高屈折粒子であるチタニア粒子に注目した。すでに計算機シミュレーションではクラスター形成条件検討[10]を行っていたが、高比重のため、地上では実験が困難であった。そこで、重力による沈降の影響を排除できる微小重力下での実験を計画した。

2 研究計画

2．1 研究目標

本研究では、正と負に荷電させたコロイド微粒子混合系を対象とし、以下の二項目を研究の目的とする。また、クラスターの大きさが非常に小さいため困難ではあるが、四面体クラスターの光学特性を測定し、フォトニックマテリアルの最小構成要素としての性能を評価することを試みる。

(1) チタニア粒子の四面体クラスターの作製：地上では短時間で沈降してしまうチタニア粒子を用いて、四面体クラスターを得る。

(2) 平衡状態図の作成：会合数、会合体の形状・構造を調べ、粒子の電荷数および系の塩濃度に対する平衡状態図を作成する。またその結果を、遮蔽長と粒子間相互作用の強さなどの指標に置き直し、一般化された平衡状態図としてまとめ直す。

本テーマの達成基準(サクセスクライテリア) を**表 1** に示す。なお、研究期間中にサクセスクライテリアの変更は行なっていない。

表 1　サクセスクライテリア

サクセスレベル	クライテリア	判断時期・設定根拠
ミニマムサクセス	正と負に帯電させたチタニア粒子を用いて会合体（クラスター）を形成し以下を達成できる。 • チタニア四面体クラスターを得る。	【判断時期】試料回収後半年 【設定根拠】地上では得ることが困難なチタニアの四面体クラスターが微小重力環境では得られることを確認することが先ず必要であるため。
フルサクセス	ミニマムサクセスに加え、以下を達成できる。 • クラスターの構造と会合数分布を調べることにより、平衡状態図を得る。	【判断時期】試料回収後 1 年 【設定根拠】チタニアの会合数・構造を共焦点蛍光顕微鏡で調べ、会合数に関する平衡状態図を作成することが本テーマの主な目的である。
エクストラサクセス	フルサクセスに加え、以下を達成できること。 • チタニア四面体クラスターの光学特性を評価し、将来の光デバイス開発の基礎となるデータのまとめを行い、グラフ化する。	【判断時期】試料回収後 2 年 【設定根拠】クラスターサイズが小さいため、光学特性を調べることは簡単ではないが、光閉じ込め特性が改善するとの予測があるので、その観点から調べる。

装置・供試体開発に関する遂行方針として、多目的実験ラック(MSPR, Multi-purpose Small Payload Rack) または多目的実験ラック2 (MSPR2, 2台目のMSPR) に供試体を設置して実験を行うこととし、本テーマ用の大がかりな装置開発を行わないこととした。また、 従来の物質科学・物理科学の供試体と比べて、著しく簡便な機構・構造の供試体にできるため、研究者の一層の参加促進を目指して、COTS 品と内製品を中心に使用し、大幅な開発コスト削

減と開発プロセスの合理化を図ることとした。

２．２ 体制

本テーマの実施体制を**図９**に、研究チームの役割分担を**表２**に示す。研究代表者・研究分担者からなる研究チームとの研究方針を十分すり合わせ、目的達成のために試料仕込み条件等の実験条件や実験手順を最適化した。また、適合性確認については、JAXA 有人宇宙技術部門きぼう利用センターと協力しつつ進める方針とした。

本体制は各フェーズで充分に機能し、役割を果たした。特段の問題点や課題はなく、それぞれの業務分担を着実に遂行し、宇宙実験を実施されたと考えている。代表研究者の研究室のメンバー（奥薗、豊玉）は、多くの学生とともに、コロイド粒子をはじめとする各種の試料準備の中心的な役割を果たした。また、名古屋市立大学の樋口教授は、ゲル化剤の長期安定性に関して有機化学に関する観点から役割を果たした。オーストラリア中性子科学技術機構（ANSTO） の Mata 博士は、宇宙実験サンプルの中性子散乱測定を行い、クラスターサイズに関する実験結果を集積した。

研究者側として、実験の運用は勿論、実験条件や装置の作製においてもJAXAは大きな役割を果たしたと考えている。特に以下のように、（１）低コストで信頼できる実験装置（プラスチックバッグ）の利用、および（２）ゲル化剤の経時変化に関する検討の２点は、実験の成立のために非常に重要であった。

（１）まず、フィジビリティスタディ（FS）の段階では、実験装置が確定しておらず、プラスチック注射器を利用した装置の作成を想定していた。プラスチックバッグが導入されたことで、非常に円滑に準備および宇宙実験を実施できた。

（２）ゲル化剤の経時変化に関して、加速試験などを十分に議論しながら準備を進めることができた。ゲル化剤の組成に関して十分な準備を行うことができ、実験の実施は試料調製から8ヶ月という長期間の後であったが、ゲル化剤は劣化せず、宇宙実験を無事成立させることができた。ただしゲル化反応を優先したため、ＵＶ照射時間が地上検討条件（１５分間）より長め（２時間）に設定された。当初想定しなかったことであるが、これがチタニア粒子の退色に関係している可能性がある。UV 照射時間の最適化は、今後同様の実験を行う際に改善点となる可能性がある。

研究代表者・研究分担者と有人宇宙技術部門きぼう利用センターが連携して本テーマを実施する。**表３**に作業分担および責任範囲を示す。

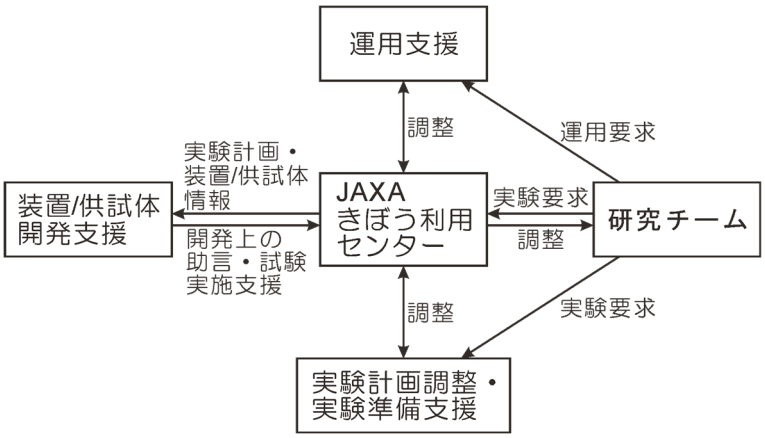


図９ 本テーマの実施体制

表2　研究チームの役割分担

研究代表者	所属・役職
山中　淳平	所属組織: 名古屋市立大学大学院薬学研究科　教授
	分担内容: 研究とりまとめ・コロイド会合実験

研究分担者	所属
奥薗　透	所属組織: 名古屋市立大学大学院薬学研究科　准教授
	分担内容: 会合の計算機シミュレーション
豊玉　彰子	所属組織: 名古屋市立大学大学院薬学研究科　講師
	分担内容: コロイド会合実験
樋口　恒彦	所属組織: 名古屋市立大学大学院薬学研究科　教授
	分担内容: 化合物の安定性評価
Jitendra Mata	所属組織: オーストラリア核科学技術機構
	分担内容: コロイド会合体の構造評価

担当組織: 宇宙航空研究開発機構・有人宇宙技術部門　きぼう利用センター 分担内容: 実験装置・供試体開発、打上げ、運用、試料回収

担当組織: (一財)日本宇宙フォーラム・宇宙利用事業部 分担内容: 地上実験支援、試料準備支援、ユーザーインテグレーション支援

表3　作業分担および責任範囲

	項目	研究チーム	JAXA
1	実験要求、運用要求、実験条件の検討、策定	○	支援
2	実施計画の策定	支援	○
3	供試体の検討、製作	支援	○
4	実験試料準備	○	支援
5	実験試料・供試体の適合性・安全性の評価、確認	支援	○
6	地上実験実施	○	支援
7	運用準備（手順書作成、宇宙飛行士訓練など)、輸送	支援	○
8	軌道上実験実施	支援	○
9	飛行後解析	○	支援
10	成果発表	○	○

2．3 スケジュール

本研究のFS選定は 2015 年 12 月、キックオフが 2016 年 2 月 9 日、実質的にFSが開始されたのが 2016 年 4 月である。FSは 2 年間実施され、フェーズ移行のための外部評価が 2017 年 12 月、JAXA 内の事業企画会議が 2018 年 1 月、フェーズ移行審査(フライト実験準備移行審査、SDR(System Design Review)相当)が 2018 年 5 月に実施された。 2017 年度から飛行後解析までのスケジュールを**表4**に示す。

表4中、△は予定、▲は実施済み項目をそれぞれ示す。また、CDR は Critical Design Review (フライト品製造開始の審査)、PQR は Post Qualification Test Review (認定試験合格

を確認する審査)、ODF は Operation Data File (軌道上クルーの作業手順書) の略称である。
回収以降のスケジュールについて、当初の予定から変更がある。当初は打ち上げ後直ちに実験が行われることを期待し、CDR 時には SpX-20 で回収の計画であったが、実現できず SpX-21 での回収となった。その結果、共同研究期間が1年間延長されている。
なお審査委員判断で CDR は PQR を兼ねることになり、また CDR 時に出荷前審査 (PSR) はきぼう利用センター内の会議に諮って了承を得た。

表4 スケジュール

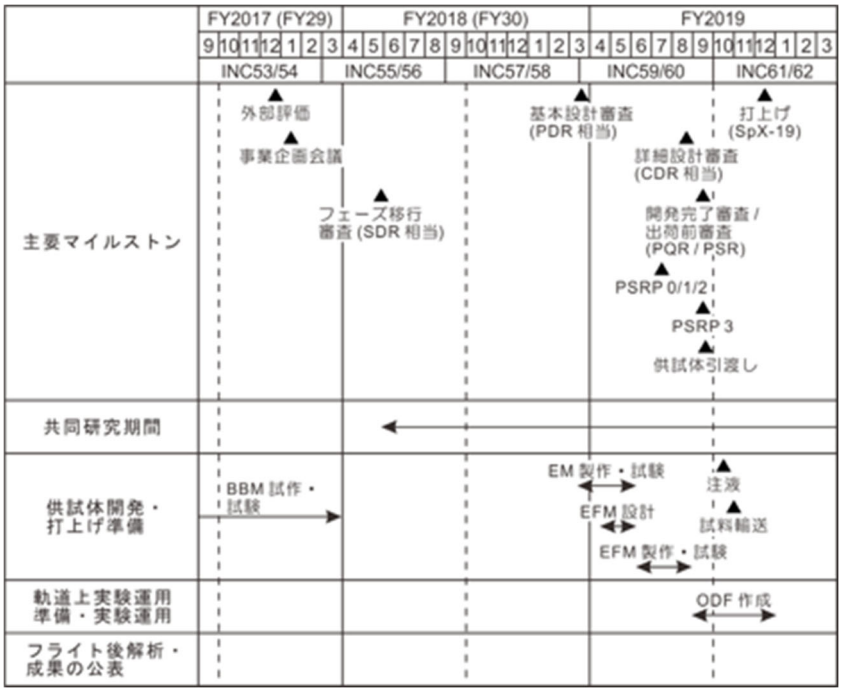
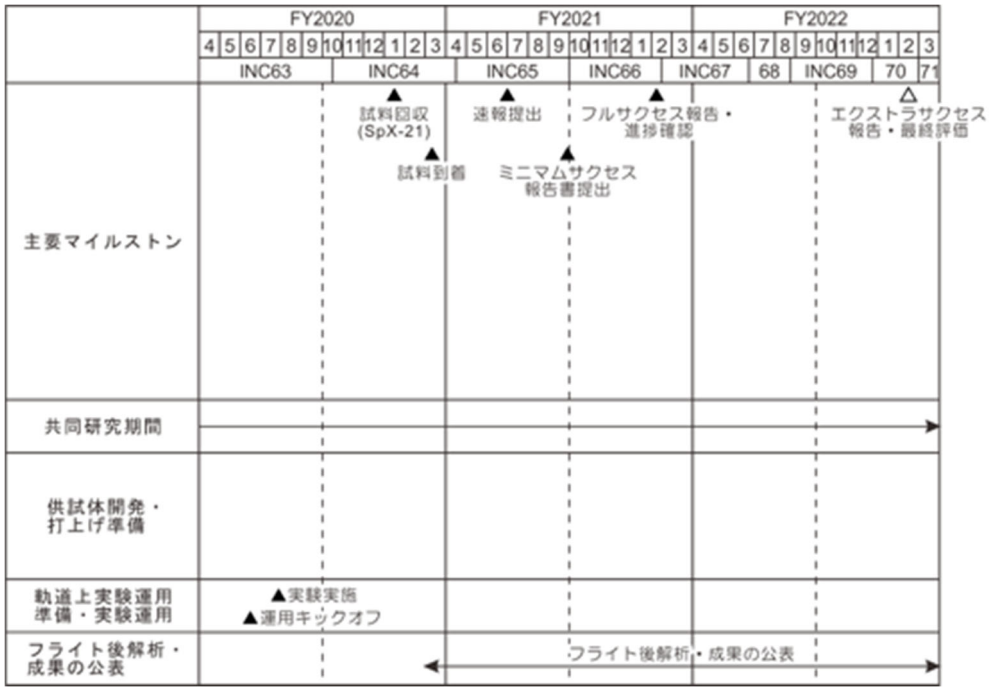


表4 スケジュール(続き)



3. 実験準備・運用

軌道上運用段階に至るまで、 JAXA で供試体の開発を行い、研究者チームは、宇宙実験用の試料合成、実験条件の設定、試薬の長期安定性試験などを実施した。検討はおよそ計画通り進捗し、当初の目標やサクセスクライテリアの変更は行っていない。以下に詳細を述べる。

3.1 宇宙実験試料の準備

実験試料については、FS期間での検討結果をもとに、合成方法を改良し、またゲル化剤組成を最適化した。

FS期間に、宇宙実験には直径約1μmのPS、シリカ、チタニア粒子系を用ること、またそれぞれ、正および負に荷電した粒子を、緑色および赤色蛍光色素で着色して識別すること、が決定していた。負荷電 PS は市販品を用いたが、それ以外の粒子は全て宇宙実験用に、研究室で合成して用いた。**図10**に、宇宙実験に用いたポリスチレン粒子およびチタニア粒子の模式図を示す。合成方法はFS期間におよそ決定していたが、チタニア粒子はゾルーゲル法で作成したアモルファス体であったため、宇宙実験に用いる試料は、約 600℃で焼成しアナターゼ型結晶構造を持つ粒子とした。また**図11**はチタニア粒子の SEM 写真である。

また、ゲル化剤について、高温での加速試験を含め、長期安定性を評価し、10 ヶ月間冷蔵庫で保ったのちもゲルが問題なく行える組成を決定した。**表5**に試料仕込み条件を示す。なお、ゲル化の組成および濃度は、ゲルモノマーとしてジメチルアクリルアミド(10 mM)、架橋剤としてメチレン-Bis-アクリルアミド(10 mM)、光重合開始剤として、VA-086(10 mg/mL)を用いた。

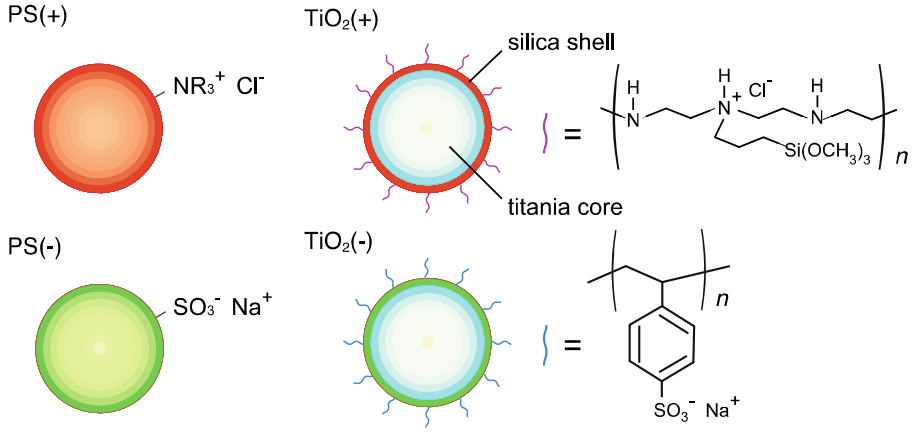


図10 正負に荷電したポリスチレン粒子およびチタニア粒子の模式図

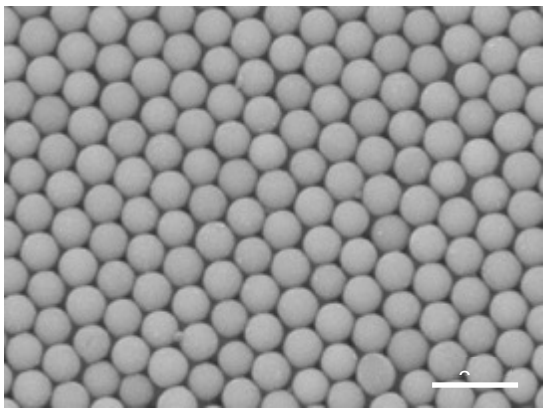


図11 チタニア粒子の SEM 写真（スケールバーは2μm）

表５ 試料仕込み条件（実験条件）

試料 No.	粒子材質		直径［nm］		電荷数［×e］		粒子数濃度［vol%］		HCl 濃度［μM］	NaCl 濃度［μM］
	+粒子	−粒子	+粒子	−粒子	+粒子	−粒子	+粒子	−粒子		
1	PS	PS	790	1030	6,400	−14,200	0.002	0.01	5	0
2	PS	PS	790	1030	6,400	−14,200	0.002	0.01	5	50
3	PS	PS	790	1030	6,400	−14,200	0.002	0.01	5	100
4	PS	PS	790	1030	6,400	−14,200	0.002	0.01	5	200
5	シリカ	シリカ	1,150	1,150	13,300	−15,500	0.002	0.048	0	0
6	シリカ	シリカ	1,150	1,150	13,300	−15,500	0.002	0.048	0	50
7	シリカ	シリカ	1,150	1,150	13,300	−15,500	0.002	0.048	0	100
8	シリカ	シリカ	1,150	1,150	13,300	−15,500	0.002	0.048	0	200
9	チタニア	チタニア	960	910	12,100	−13,600	0.002	0.048	0	0
10	チタニア	チタニア	960	910	12,100	−13,600	0.002	0.048	0	25
11	チタニア	チタニア	960	910	12,100	−13,600	0.002	0.048	0	50
12	チタニア	チタニア	960	910	12,100	−13,600	0.002	0.048	0	100
13	チタニア	チタニア	960	910	12,100	−13,600	0.002	0.048	0	200
14	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−14,100	0.002	0.048	0	0
15	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−14,100	0.002	0.048	0	25
16	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−14,100	0.002	0.048	0	50
17	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−14,100	0.002	0.048	0	100
18	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−14,100	0.002	0.048	0	200
19	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−11,600	0.002	0.048	0	0
20	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−11,600	0.002	0.048	0	50
21	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−11,600	0.002	0.048	0	100
22	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−11,600	0.002	0.048	0	200
23	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−9,100	0.002	0.048	0	0
24	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−9,100	0.002	0.048	0	50
25	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−9,100	0.002	0.048	0	100
26	チタニア	チタニア	960	1,020	12,100	−9,100	0.002	0.048	0	200
27	チタニア	シリカ	960	1,150	12,100	−15,500	0.002	0.048	0	50
28	チタニア	シリカ	960	1,150	12,100	−15,500	0.002	0.048	0	100

注１ PS: ポリスチレン

注２ 粒子直径の単分散性は Cv 値（粒子直径の分散の標準偏差を平均粒径で割った値）が 6 %以下、粒子電荷の単分散性も同じく Cv 値（粒子電荷の分散の標準偏差を平均電荷で割った値）で 12 %以下とする。

3.2 実験装置

ＦＳ期間には実験装置の詳細が未決定であったが、樹脂フィルム製バッグに決定し、ゲル化反応用の紫外 LED を備えた供試体が開発された。使用した共通実験装置を**表６** に示す。

表６ 使用した共通実験装置

共通実験装置名称	備考
多目的実験ラック（MSPR）	供試体（図１２）の設置場所は、静置時は船内保管室、紫外線 LED 照射時はワークボリューム（WV）扉である。

使用した供試体を**表７**および**図１２**に、また使用した器具類を**表８**に示す。

表７　使用した供試体

器具類名称		数量	備考
供試体（図１２）		1 式	• 試料バッグを 28 個収納可能
	筐体	1 個	• 試料バッグ、試料固定板、紫外線 LED アレイ、LED ドライバを内蔵可能。 • 材質: ジュラルミン（A2017-T3 または A2017-T351）
	紫外線照射部	1 個	• 型式: HLDL-306X244U6-SP（シーシーエス（株）製、COTS） • 入力電圧: 16 VDC+1.8 V/-2.0 V (MSPR/MSPR2 の WB 16 VDC を想定) • 消費電流: 0.51 Amax • 消費電力: 9.0 Wmax • ピーク波長: 365 nm (typ.) • 重量: 2.5 kg 以下 • LED アレイドライバ内蔵
	ケーブル	1 本	WB の 16 VDC と供試体を接続し、電力を供給する。

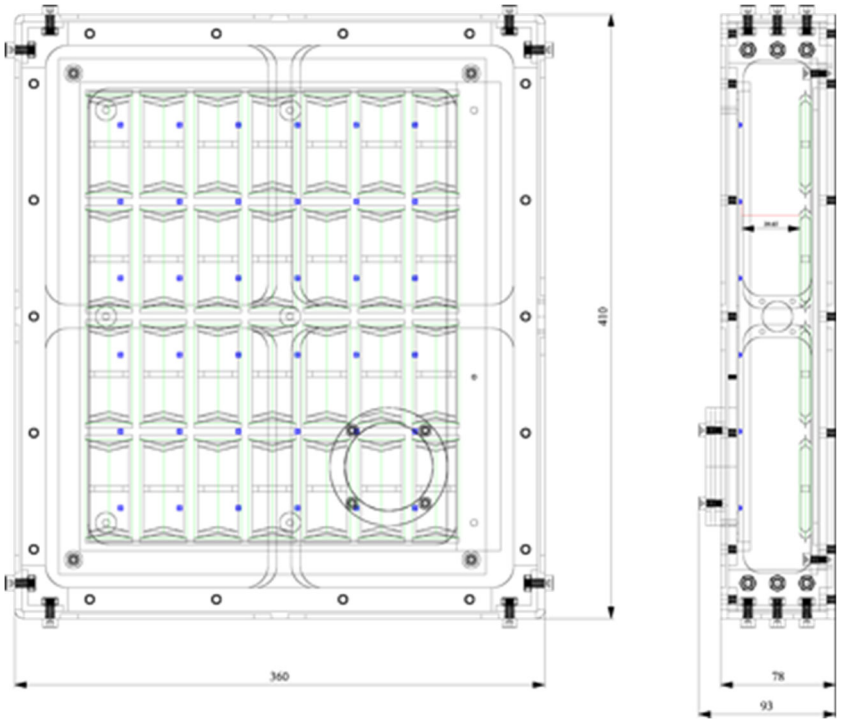


図１２　供試体（28 個の試料バッグを収納可能）

表８　使用した器具類

器具類名称	数量	備考
試料バッグ（図 13 参照）	28 個	試料を保持する容器。JAXA PCG Petit Crystallization Bag の技術で作製する。
試料バッグ収納容器	3 個	試料バッグを収納する容器。ISS までの輸送時と地上への回収時に使用。ボタン型温度ロガーを取り付ける。JAXA PCG Container と同一のもの。
Space Acceleration Measurements System-II (SAMS-II)	1 式	加速度データを取得する。
ボタン型温度ロガー	6 個	試料バッグ収納容器に 2 個組み付けて、温度を記録する。

実験に用いた試料バッグの外観を、**図１３**に示す。コロイド分散液 3 mℓ をそれぞれにバッグの四面体に仕込み、実験開始時に四面体を押しつぶして仕切りを破ってコロイド懸濁液を撹拌・混合する。これにより試料は合計 6 mℓ のコロイド分散液となる。

図１３　試料バッグ（3 重封入で試作、写真上: 仕切りを破る前の四面体 2 つが連結した状態、写真下: 仕切りを破り、撹拌した後、試料はダミー試料）

3.3 実験運用

実際の実験運用を、**表９**および**表１０**に時系列で示す。

表９　試料打ち上げから現在までの主要イベント

年月日	イベント
2019/12/6	SpX-19 で打上げ (低温保管庫使用)
2019/12/8	SpX-19 が ISS にドッキング、キャビンエア温度で試料の保管開始
2020/1/8	SpX-19 アンドック後、試料を FROST (冷凍冷蔵庫) で保管
2020/7/27	232日 (約8ヶ月) の保管後、実験開始
2020/7/28	リブースト
2020/7/30	紫外線照射による試料ゲル化、実験終了
2021/1/7 頃	供試体を NG-14 で廃棄
2021/1/14	SpX-21 で試料回収・着水
2021/3/10	筑波宇宙センターに試料到着、目視点検後 PI に試料発送
現在	試料評価中

表１０　実験運用の詳細

Day	手順
Day 1	チェックアウト (供試体外観目視点検、紫外線 LED 通電確認)
	試料を撹拌し、供試体に取り付ける。
	供試体を船内保管室で保管 (静置) する。
Day 2	保管 (静置) を継続 (リブーストあり)
Day 3	保管 (静置) を継続
Day 4	供試体を船内保管室から取り出して、多目的実験ラック (MSPR) 扉に取り付ける。
	紫外線照射 (2時間)
	試料を取り出し、試料バッグ収納容器に収納しキャビンエア温度で回収まで保管する。供試体は廃棄時まで保管する。

なお、ISS での試料静置中、2020 年 7 月 28 日の 7:38～10:47GMT のおよそ３時間の間に ISS のリブーストが行われた。**図１４**に、ISS に設置された加速度計により測定した、リブースト時の有効 G の時間変化を示す。最大の加速度は約 170μG であった。

このリブーストの宇宙実験への影響は、下記のように、無視できる程度と考えている。直径 1μm のチタニア粒子のストークス沈降速度は 3.09×10^{-10} m/s と計算され、仮にこの沈降速度が３時間継続したとき、沈降距離は 3.34μm と計算される。

試料容器はプラスチックフィルム製のバッグであり、微小重力下では、試料液体の内圧と、フィルムの弾性による力の釣り合いによりバッグの形状が決まる。リブースト時の加速度は、液体の内圧に比べて十分小さいため、容器の変形は無視できると考えられる。また、試料はバッグに封入されており、自由表面はない。さらには、液体は十分に撹拌されていることから、密度分布がほぼ無い。これらの理由により、リブースト時の加速度よる液体自身の流れは無視できると考える。

流れがないとき、全ての粒子は加速度方向に力を受け、**図１５**に示すように、ゆっくりと移動する。移動距離～3μm は粒子直径 1μm の 3 倍の大きさであるが、粒子全体が同じ方向に移動するため、バッグの壁近く以外ではリブーストの影響は無視できるものと考えられる。

また、帰還したゲル試料について、バッグのフィルムの近くにあった部分は、ゲル化が不十分で液体が残っている場合が多く、水洗によりゲル表面の粒子は脱落する。さらに、顕微鏡観察にあたっては、メスで切断したゲルの断面を観察している。

このように、バッグ表面から 3μm の範囲は評価対象から除外することにより、3μm の沈降の影響を排除した。

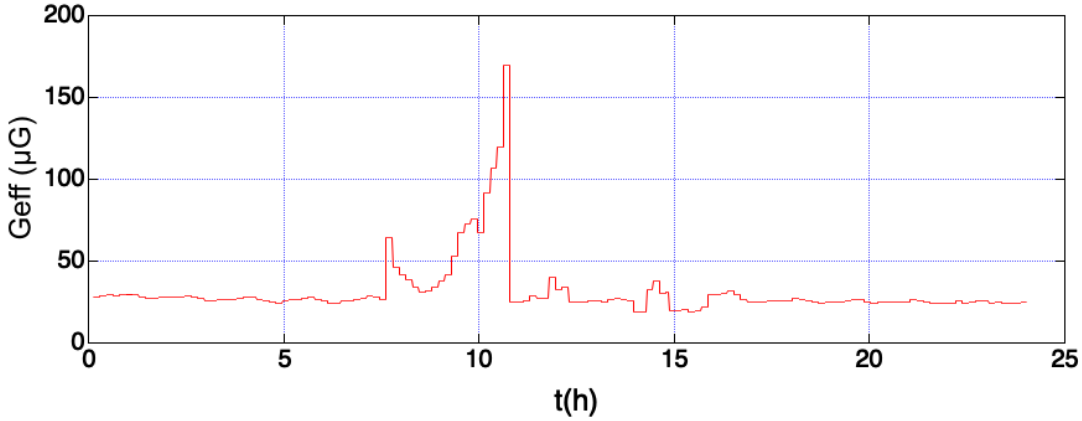


図１４　リブースト時の有効 G の時間変化（2020 年 7 月 28 日）

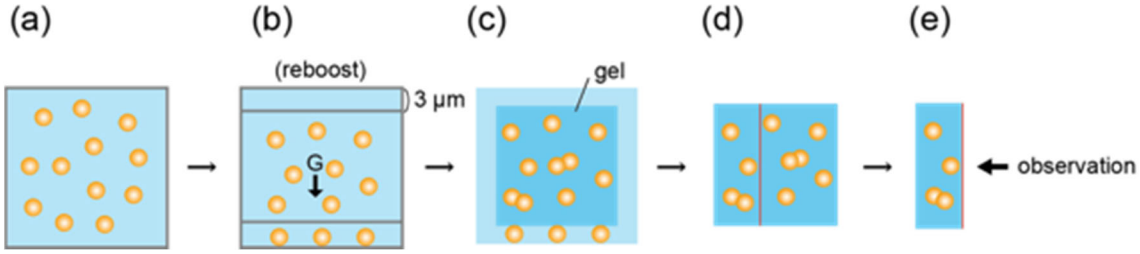


図１５　リブーストの影響の想定。(a)はじめ一様に分布する粒子は、(b)リブーストにより全体的に移動する。ただし(c)試料の壁面近傍の部分はゲル固定されないため、地上での分析にあたり除外される。また。リブースト時のわずかな沈降の影響を排除するために、(d),(e)試料を切断し内部を観察した。

4. 実験結果および成果

宇宙実験試料の解析結果と成果を項目ごとに示す。それぞれの結果の意義についても、各項目に記載した。項目4.3はミニマムおよびフルサクセスに、4.5はエクストラサクセスクライテリアに、それぞれ対応する。また、4.2、4.4、4.6は目標外の成果である。

4.1 宇宙実験試料のゲル固定化の評価

帰還したサンプルを観察し、全ての試料が予定通りゲル固定されたことを確認した。**図16**(a)は、帰還後に試料バッグから取り出したチタニア試料（TiO2 # 23）の外観である。レオメーターにより測定した試料の弾性率 *E* は約 25kPa であった。試料調製後に直ちにゲル化を行った場合、*E*～35kPa であり、宇宙実験試料の値はその約 70%であったが、試料のハンドリングに十分な強度を有していたため問題は無かった。試料を鋭利かつ切り代が最小である外科手術用メスで切断し、その断面を観察した。**図16**(b),(c)は、宇宙実験試料と、地上対照試料（クリノスタットによる擬似微小重力下でゲル化）の断面の比較である。地上試料では粒子の沈降が著しく、試料の中心部は透明であるが、宇宙試料には上澄みは観察されず、微小重力の効果が確認された。

このように、ISS の微小重力環境で得られた試料を固定し、地上に帰還できることが確認できた。本実験系は今後の様々なソフトマター系の宇宙実験にも役立つものと期待する。

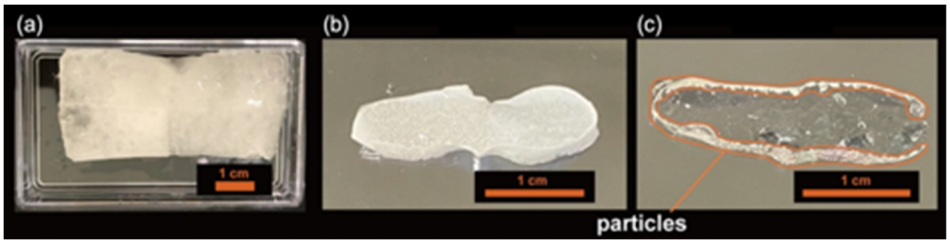


図16 実験装置と宇宙実験で使用した試料。(a）バッグから取り出したゲル固定化試料（Titania #23）。(b) 宇宙実験および(c) 地上対照試料の断面。

4.2 ポリスチレン系クラスターの解析(目標外の成果)

PS 粒子の比重は約 1.05 であり、媒体（ゲル化剤水溶液）と同程度である。このため、宇宙実験前には、PS 粒子系の結果は地上対照実験の結果と大差ないと予想していた。したがって PS 粒子系は、宇宙実験が正しく実施されたことを確認するための標準サンプルとして考えていた。しかし次に示すように、宇宙試料の方が地上対照より平均会合数が 50%程度大きく、また、4面体型クラスターの構造対称性が優れていることが示された。

[会合数分布]

図17(a)は、PS#2 ([NaCl]=50μM)の光学顕微鏡写真である。PS 試料は n 粒子を多く含むため、孤立したクラスターは1個の p 粒子が中心にあり、周囲に n 粒子が付着している。このとき付着した粒子数を会合数とした。様々な会合数 *m* を持つクラスターが生成した(代表例を、図中に白い円で囲って示す)。**図17**(b)は、試料#1～#4([NaCl]=0、50、100、200μM)について、約 1000 個のクラスターの解析から得た *m* の分布である。[NaCl]の増加に伴い、静電遮蔽効果が強くなるため、付着した粒子間のクーロン反発力は減少し、平均会合数が増加したものと考えられる。詳細は 4.7で述べる。なお、2個以上のp粒子を含む会合体も少数存在した(p 粒子全体の 6%未満)。会合数の解析にあたり、これらは「凝集体」(図中横軸に"agg"と表記)として分類した。

図17(c)は、地上対照試料の会合数分布である。対照試料のうち、[NaCl]＝0μM のものはゲル化させず、分散液のまま取り出し特性評価の実験に使用した。会合実験およびデータ解析は、[NaCl]＝50、100、200μM の試料について実施した。**図17**(d)は、平均会合数〈*m*〉対[NaCl]のプロットである。宇宙・地上実験ともに、[NaCl]の増加とともに〈*m*〉は増加し、[NaCl]＝100μM で最大となった。また、宇宙試料は地上対照に比べ平均会合数が約 50%大きかった。**図17**(d)にはモンテカルロ法による計算機シミュレーション(4.7項に記載)により得た結果も示している。計算結果は実験より大きな〈*m*〉値を与えたが、実験結果と定性的に一致した。

宇宙実験サンプルの一部は、オーストラリア原子力科学技術機構(ANSTO)に送付され、会合数および会合構造に関する情報を得るために、CI の一人である Mata 博士により小角および超小角中性子散乱実験が行われた。散乱曲線を**図18**に示す。また、**図17(e)**に、超小角中性子散乱曲線よりギニエプロットを用いて求めた平均慣性半径〈*Rg*〉と[NaCl]の関係を示す。〈*Rg*〉と〈*m*〉の塩濃度依存性の傾向はよく一致しており、統計的な手法である散乱測定によって、顕微鏡観察の結果が裏づけられた。

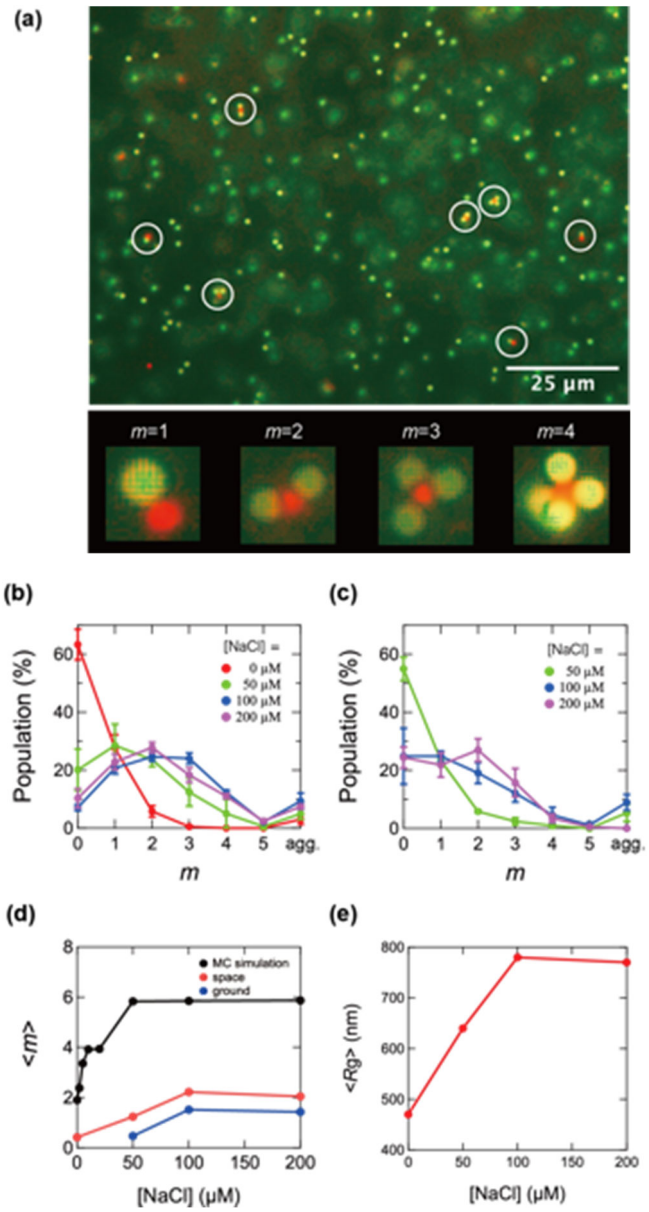


図17 (a) 宇宙実験で得られたポリスチレン(PS)クラスターの蛍光顕微鏡写真と *m*=1～4 のクラスターの拡大画像。(b)宇宙および(c)地上実験における、様々な NaCl 濃度[NaCl] での会合数 *m* の分布。(d) 平均会合数〈*m*〉と[NaCl]のプロット。(e)中性子散乱で得られたクラスターの平均慣性半径〈*Rg*〉と[NaCl]のプロット。

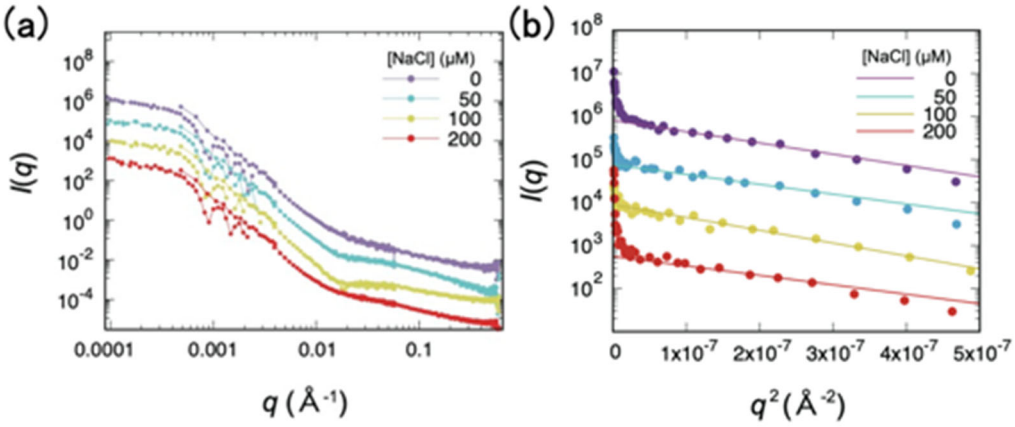


図18 PS 宇宙実験試料の(a)SANS-USANS 散乱プロファイル、および(b)ギニエプロット。縦方向にシフトして重ね合わせた結果。ギニエ領域では、散乱強度 I(q)は exp(−*R*g・q^2)に比例する。*R*g はクラスターの慣性半径、*q* は散乱ベクトルである。*R*g は log I(*q*)対 q^2 のプロットの傾きから求められる。

[会合体構造の対称性]

次に、四面体(*m*=4)型の PS クラスターの構造の対称性を調べた。共焦点顕微鏡により、四面体クラスターを構成する各粒子の重心の座標を決定した。四面体の対称性は、以下のように定義される結合配向秩序パラメータ q_{tetra} によって定量化できる。

$$q_{\mathrm{tetra}} = 1 - \frac{3}{8}\sum_{=1}^{3}\sum_{k=j+1}^{4}\left(\cos\theta_{jk} + \frac{1}{3}\right)^2$$

ここで、θ_{jk} は粒子 j と k の結合の間の角度である(模式図を併せて示す)。完全な四面体の場合、q_{tetra} = 1 である。**図19(a)**に、宇宙および地上対照実験試料について、種々の[NaCl]における q_{tetra} の平均値$\langle q_{\mathrm{tetra}}\rangle$を示す。また、**図19**(b)～**19**(d)は、3つの[NaCl]における q_{tetra} の分布を示す。実験を行った塩濃度条件で、宇宙実験試料の$\langle q_{\mathrm{tetra}}\rangle$は地上実験の値より大きく、より優れた対称性を持つことが分かる。なお、*m*=2 および *m*=3 のクラスターについても、同様に対称性を評価したが、いずれも宇宙実験が対称性に優れていた。

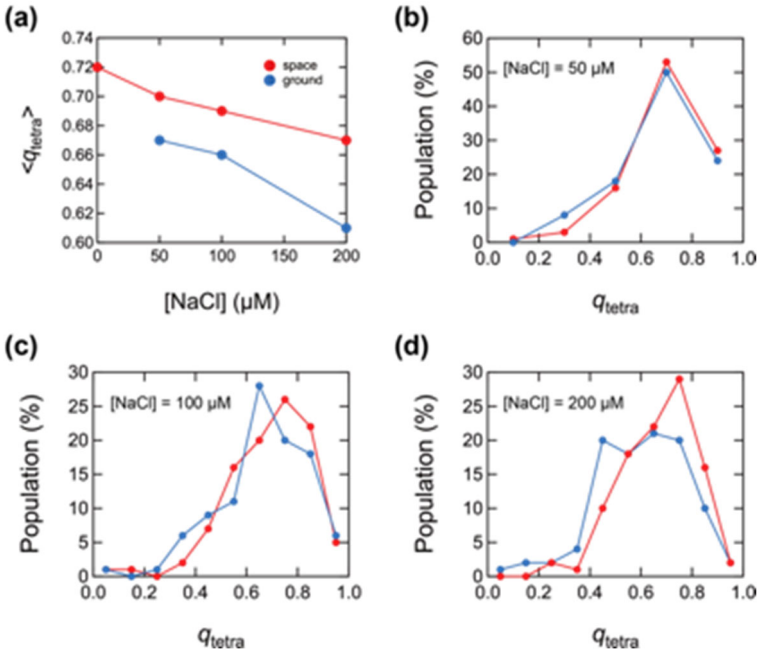


図19 宇宙実験と地上実験で生成した PS 粒子四面体の結合配向秩序パラメータ q_{tetra} の比較。(a) $\langle q_{\mathrm{tetra}}\rangle$対[NaCl]のプロット、(b)-(d) [NaCl] = 50μM、100μM、200μM における q_{tetra} の分布。

このように、宇宙実験の計画を策定した段階では想定していなかったが、比重が媒体の比重に近いポリスチレン

粒子でも、宇宙試料は地上対照に比べ平均クラスター数が約 50%大きいことが確認され、かつ宇宙試料は地上試料よりも優れた構造的対称性を示した。

本結果は、地上でのわずかな沈降や対流が、コロイドの構造形成に大きく影響することを示唆するものであり、地上で行われる当該分野の実験的研究に重要な知見であると思われる。例えば、計算機シミュレーションと実験結果を比較する際や、コロイド粒子の集合構造を用いたフォトニクス材料の構築条件の探索において重要である。

4.3 チタニア会合体の解析(ミニマムサクセスおよびフルサクセスに関わる成果)

重力沈降のため地上での研究が困難なチタニア粒子系について、クラスター形成を調査した。チタニア試料では p 粒子が過剰に存在するため、孤立クラスターの中心粒子は n 粒子である。4.1 項で述べたように、ゲル固定試料にはマクロな上澄みは認められず、沈降の影響は見られなかった。

しかし、チタニア実験試料には、予期しなかった2つの現象が認められた。まず(1)1000 個以上の粒子からなる凝集体が試料中に多数形成されていた。さらに(2)赤色の蛍光色素で染色された p 粒子の多くが赤緑色に変色していた。宇宙実験用試料と同時に調製・保存した地上対照試料でも、同様の凝集と蛍光の褪色が観察されたため、(1)および(2)とも宇宙に特有の現象ではなく、いずれも、粒子の経時劣化によるものと思われる。実験に用いたチタニア粒子の表面はシリカ層でコートしたが、試料中のケイ酸濃度を分析した結果、その一部が溶解していることがわかった。宇宙用試料と地上用試料の溶出シリカ量は、それぞれ 25%と24%で同程度であった。

一方、**図20**(a)に示すように、様々な孤立したクラスターも観察された。n 粒子は緑色に染色され、赤色の発色を示さないため、p 粒子と n 粒子は赤色成分の有無で区別した。**図20**(a)の各クラスターについて、赤色蛍光(左)と白色光(右)の画像を示している。p 粒子はどちらの画像でも観察されるが、n 粒子は白

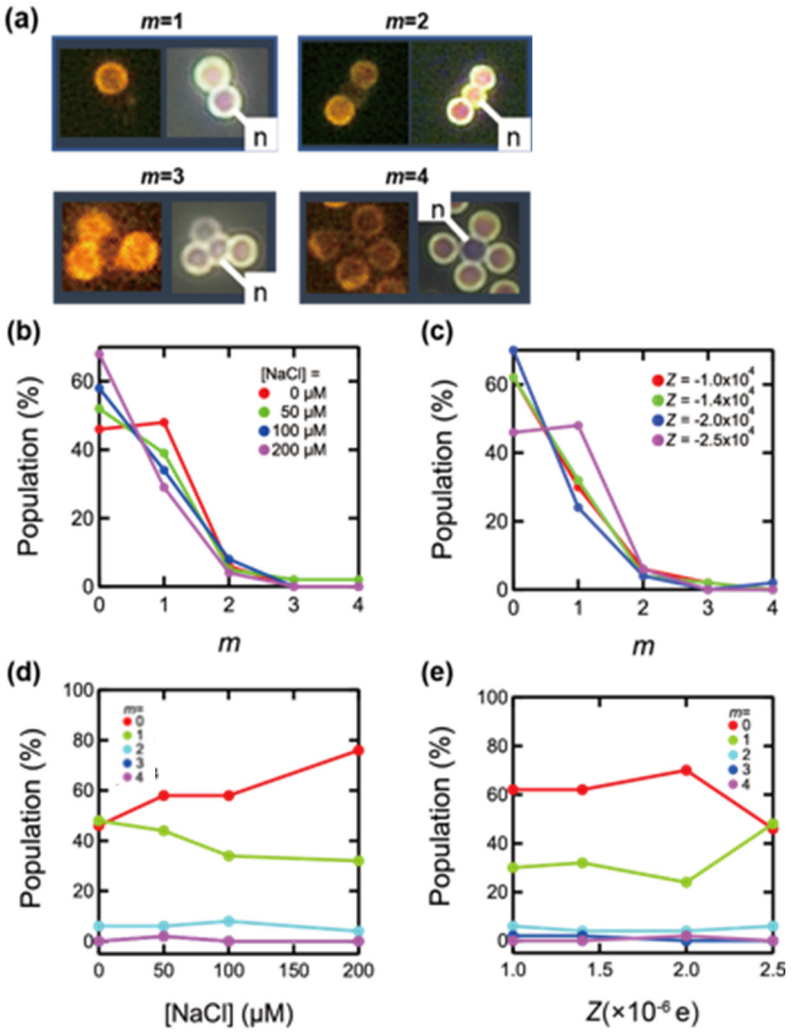


図20 (a)会合数 m=1～4 のチタニアクラスターの光学顕微鏡像。それぞれ左は赤色蛍光のモード、右は白色光源を用いたときの画像。(b)および(c)、会合数分布の [NaCl]依存性および電荷数依存性。(d)および (e)様々な会合数のクラスターがクラスターの総数に対して占める割合。[NaCl]依存性および電荷数依存性をそれぞれ示す。なお(d)では m=3 と m=4 のデータが重なっている。

色光でのみ観察される。

図20(b)は、[NaCl]の値を変化させたときの会合数分布である。[NaCl]が低いほど n 粒子と p 粒子の間の静電引力が増加するため、m=1 のクラスターの割合が増加した。また、**図20**(c)は電荷数 Z の影響を示しているが、Z が大きくなるほど m＝1 のクラスターが顕著であることが確認できた。**図20**(d)、(e)は[NaCl]と Z に対して、クラスターの割合をプロットした結果である。このようにクラスターの分布(状態図と称する)を得ることができた。

地上では沈降により形成が困難なチタニア粒子の四面体クラスターが、本宇宙実験で初めて得られた。また、[NaCl]と Z をパラメータとして、チタニア粒子のクラスターの分布(状態図と称する)を得ることができた。地上では沈降の影響で観察が困難であったが、沈降がなければ、チタニア粒子間には静電相互作用が働いて会合体が生成することが確認できたことは、地上で粒子間の相互作用を制御して集合構造を設計する上で意義深いと考えている。

4.4チタニア系の凝集構造の解析(目標外の成果)

2.3項で述べたように、チタニア系試料には、マクロな凝集体が多数生成していた。**図21**(a-1)～(a-3)は、その光学顕微鏡写真である。凝集体はほぼ p 粒子のみで構成されている。この宇宙で生成した凝集体の特性を評価するため、フラクタル次元 D_f を顕微鏡画像から決定した。**図21**(b) は、様々な値の [NaCl] のサンプルのフラクタル次元 D_f を示している(赤色の記号)。D_f は[NaCl]に大きく依存せず、反応律速凝集(D_f～2.1)と拡散律速凝集(D_f～1.7)機構の代表的な D_f 値の間にあった。このことは、凝集は短距離引力で生成したことを示唆している。引力として、主にファンデルワールス(vdW)力や電荷間の双極子相互作用が考えられる。地上では D_f～ 3 に近い高密度の凝集体が生成している(**図21**(b)に青色シンボルで示す)。これは、チタニア粒子が著しい沈降により、コンパクトな集合体を作っていることを示す。微小重力環境下で観察された D_f = 2 のかさ高い凝集体は、チタニア粒子の集合体に対する微小重力の影響を示している。D_f = 2 を持つ、かさ高い凝集体が宇宙で生成したことは、チタニア粒子の集合体に対する微小重力の影響を明瞭に示すものである。このように、空間充填率の低い構造の構築にあたり、微小重力環境が優れた効果を持つことが示された。

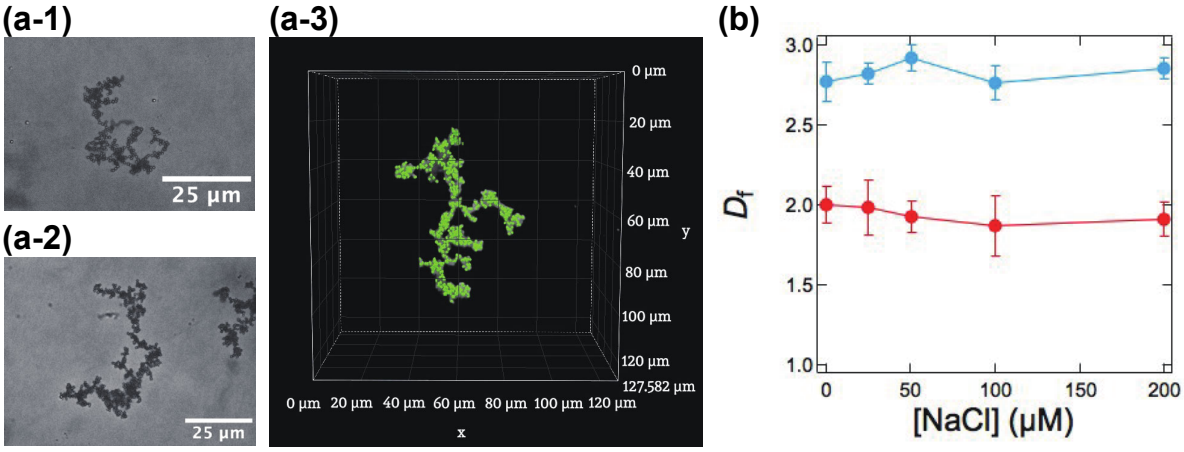


図21 チタニア系空間実験試料に形成された凝集体の顕微鏡写真。(a-1), (a-2) 倒立顕微鏡像, (a-3) 共焦点レーザー顕微鏡像 (b) 様々な値の [NaCl] を持つ試料について得られた凝集体のフラクタル次元 D_f。赤と青のシンボルは、宇宙および地上試料の結果を表す。

4.5 チタニア粒子会合体の光学特性(エクストラサクセスに関わる成果)

宇宙実験で得たチタニア粒子およびそのクラスターの光学特性を調査した。以下に、粒子の屈折率評価、宇宙実験試料中のチタニア粒子会合体の顕微分光測定、および今後の光学材用への展望について述べる。

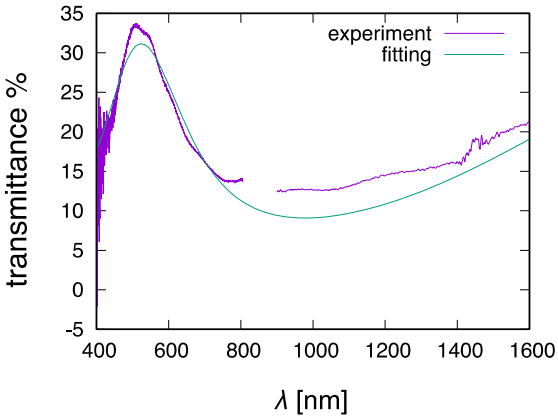


図22 チタニア粒子分散系の透過率測定結果。Mie 散乱理論を用いたフィッティング結果を併せて示す。

[チタニア粒子の屈折率の評価]

チタニア粒子の屈折率を正確に決定する方法として、分散液の透過率測定と、Mie 散乱理論による計算結果の比較が有効であった。ファイバー分光法を用い、宇宙実験で用いたチタニア粒子水分散液サンプルの可視および近赤外反射分光測定を行い、計算結果と比較した。結果を**図22**に示す。

理論曲線の計算には、粒子の屈折率 n_r と粒径 d が必要である。カーブフィッティングにより、n_r = 2.4 および d = 860nm が得られた。n_r はアナターゼ型チタニアの屈折率の文献値 2.4～3 と一致し、また d は中性子散乱から得られた値(860nm)と良好に一致した。

[顕微分光法によるチタニア粒子および四面体の反射スペクトル測定]

地上では重力沈降のため、チタニア粒子の孤立した会合体を取得することが困難であるが、宇宙実験では、マクロな凝集体に加えて、様々な会合数のチタニア粒子会合体が得られた。

1粒子および1個のクラスターからの光散乱を測定するために、宇宙実験試料について、**図23**に示す顕微分光装置を用いた。**図24**に m=0 から m=4のチタニアクラスターの反射スペクトルを示す。チタニア粒子の持つ高い屈折率のため、顕微鏡下でもスペクトル測定が可能であった。n_r = 2.4 および d = 860nm を用い、有限差分時間領域(FDTD)法による計算結果を図中に併せて示している。計算により得られたピーク位置は実験結果と良好に一致した。

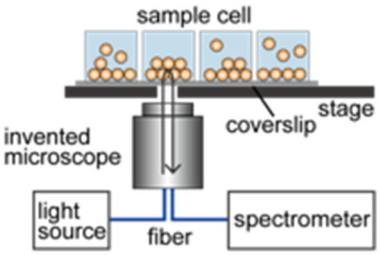


図23 顕微分光測定の模式図

また、単一粒子に比べて特に 450～500 nm 近辺でのクラスターによる光増強効果が見られた。これは現段階では光閉じ込めというよりは球レンズによる集光、反射の寄与が大きいと考えているが、実験前には想定していなかった結果である。今後この効果を活用すれば、非常に小型の光増幅器の開発につながる可能性がある。

図24の結果は孤立クラスターに対する測定結果であるが、上記のパラメータを用いて、最終的な目標とするチタニア粒子のダイヤモンド構造の光学特性を FDTD 法により計算した。結果を**図25**に示す。本宇宙実験で得られた四面体クラスターを構造単位としてダイヤモンド格子を構成すると、完全フォトニックバンド(図中に青色で示す)が得られることが確認できた。バンドの中央波長は 3.2 μm であった。

このように、宇宙実験により得られたチタニアクラスターの光学特性を測定することができ、また本研究を発展させてダイヤモンド構造が得られれば、想定された完全 PBG を持つことが計算により確認できた。これらの知見は、今後の地上での光学材料の開発に有用であると期待される。今後は地上検討を通して、チタニア粒子のダイヤモンド格子の構築を検討する。

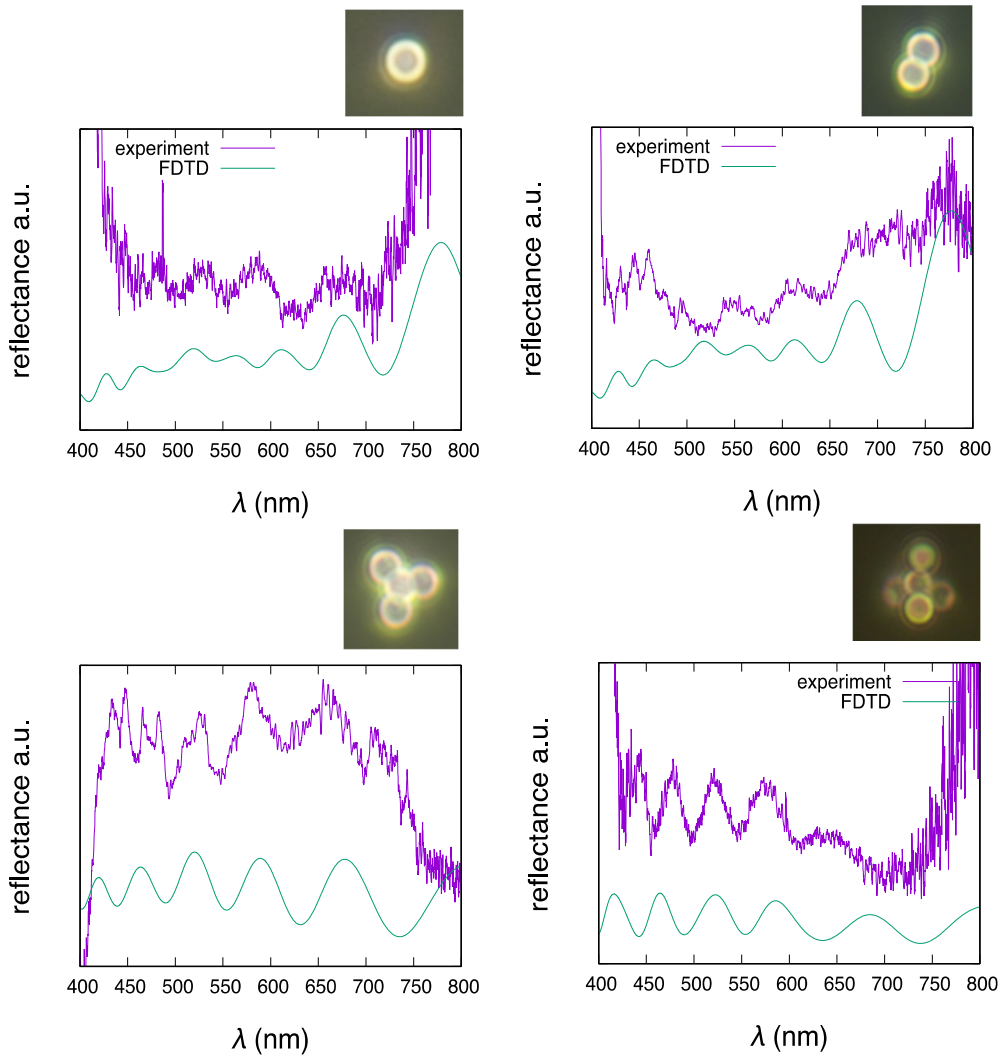


図２４　顕微分光法で得た m=0 から m＝４のチタニアクラスターの反射スペクトル（紫色）。FDTD 法による計算結果（緑色）も併せて示す。

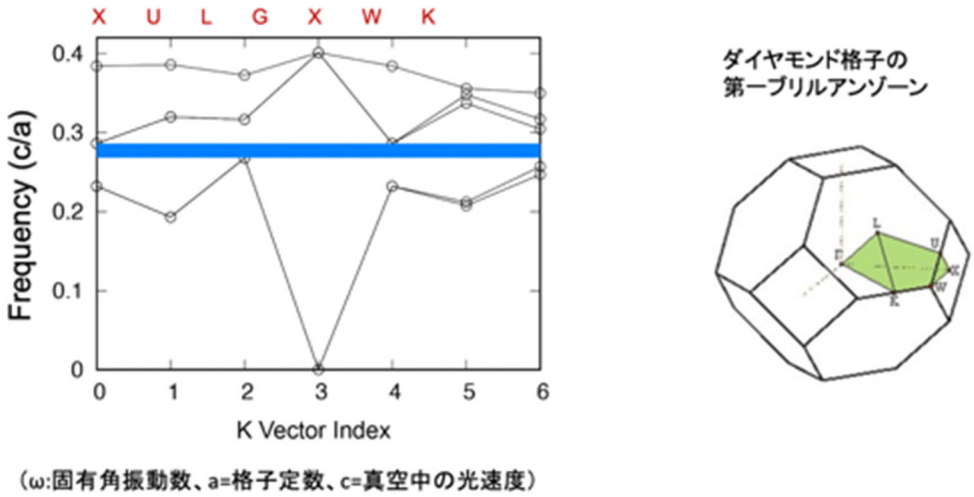


図２５　宇宙実験で得られた四面体クラスターを構造単位とするダイヤモンド格子のフォトニックバンド構造（計算結果）

4.6 チタニア粒子のレンズ効果について（目標外の成果）

宇宙実験試料の解析の過程で、チタニア粒子による光の屈折により、会合体が特徴的な発光を示すことが観察された。**図26**(a)に顕微鏡画像の一例を示す。蛍光色素を含むチタニア粒子の周囲に蛍光染色されていない粒子が付着した会合体に、蛍光色素の励起波長の光を照射すると、蛍光染色された粒子は等方的に発光する。このとき、周囲に付着した粒子のうち、中央粒子から離れた端の領域が発光することが観察された。この現象は、シリカ粒子（n_r～1.45）やポリスチレン粒子（$_r$～1.60）系では観察されなかった。

中央粒子から放射状に発せられた光の光路を、スネルの法則を用いて光の屈折を計算することで求めた(**図26**(b))。粒子 1 から出た光が、隣接した粒子 2 に入射するものとし、粒子 2 の表面における散乱光強度を θ の関数として示した。粒子と媒体の屈折率比を α とし、スネルの法則により光の軌道を計算した。高屈折粒子では、光が粒子 1 の反対側に局在化した（チタニア/水では、α =1.83。 ゲル化させても媒体の屈折率は水とほぼ同じ）。**図26（b）**に示すように、α が十分大きいとき、周囲粒子が光学レンズとして働き、中央粒子からの蛍光を集光して、周辺粒子が局所発光することが明らかになった。このように宇宙実験に用いたチタニア粒子が高屈折率粒子として特徴的な光学特性を示すことが確認できた。このことは、期待通りの性能のチタニア粒子が合成でき、宇宙実験に利用できたことを示す。

ここで観察された現象は予期していなかったものであるが、高い屈折率を持つチタニア粒子では起こり得ることが計算により理解された。新規な現象が観察できたと思われ、基礎的な観点から興味深いと思われる。また、今後、光ピンセットなど、粒子の光学特性を利用した種々の現象に応用できる可能性もある。

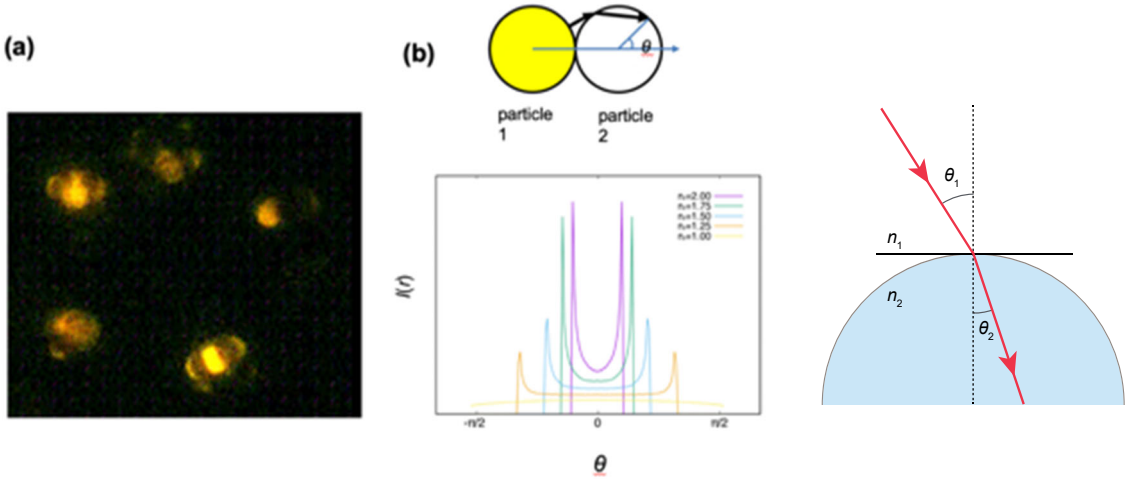


図26 (a)中央粒子が蛍光染色されたチタニア粒子会合体に見られる発光。蛍光顕微鏡画像。模式図を併せて示す。(b) 粒子表面での屈折に基づく光路と発光プロファイルの計算

4.7 クラスターの会合数分布・形状変化に関するデバイ長の影響

4.2項で、クラスターの会合数分布に関するモンテカルロ（MC）シミュレーション結果が、宇宙実験結果と定性的に一致することを述べた。クラスター形成の支配因子を把握し、また宇宙実験の条件を検討するために、MC 法およびブラウン動力学法により、本研究の実施期間を通して、計算機シミュレーションを系統的に実施した。計算にあたり、コロイド粒子間の2体間静電相互作用は、湯川型ポテンシャル(1)

$$U_{\mathrm{Yukawa}}(r) = \frac{\exp(\kappa a_1)}{1+\kappa a_1}\frac{\exp(\kappa a_2)}{1+\kappa a_2}\frac{Z_1 Z_2 e^2}{4\pi\varepsilon}\frac{\exp(-\kappa r)}{r} \qquad (1)$$

でしばしば近似され、本研究でもこれを用いた。変数 r は2粒子の中心間距離である。a_1, a_1

は 2 つの粒子半径、Z_1, Z_1は符号付き電荷数、εは媒質の誘電率、e は電気素量である。 κ はデバイパラメータであり、i 番目のイオンの濃度と価数を c_i と z_i として

$$\kappa^2 = \frac{e^2}{\varepsilon k_B T} \sum c_i z_i^2 \qquad (2)$$

で与えられる。(1)式より、静電相互作用の遮蔽距離の指標は $1/\kappa$（デバイ長）である。また、粒子半径 a は $1/\kappa$ と粒子半径 a の比κaとして（1）式に含まれるため、(1)式に従えば、粒径の影響は、$1/\kappa$の影響と同等になる。

κは添加塩濃度 C_s により変化するため、例えば会合数の C_s 依存性（4.2項）は $1/\kappa$を用いて直接的に説明できる。例えば、[NaCl] が低いとき（$1/\kappa$は大きい）、会合数 m は小さかった。これは**図27**に示すように、(a)$1/\kappa$（点線で示す）が大きいとき、粒子が新たに付着できるスペースは小さいが、(b) $1/\kappa$が小さいときは多数の粒子が付着し得るためと考えられる。

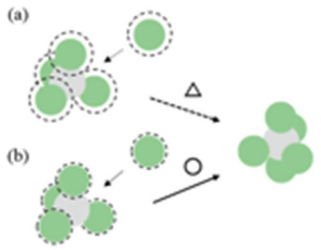


図27 クラスター形成の模式図

４面体型クラスターの対称性に関して、4.2項で、[NaCl]が低いほど q_{tetra}＝１（正４面体）に近いことを報告した。この挙動は、静電反発により粒子の見かけのサイズが増加すると、付着粒子が自由に動けるスペースが減少するためであり、$1/\kappa$を用いて定性的に解釈できる。この挙動は計算機シミュレーションでも確認できた。

4.8 成果の自己評価

以上のように、本宇宙実験を通して、目標とした項目および目標外の項目について種々の知見が得られた。チタニア粒子の経時的な劣化により凝集が生成するなど、予想外の事象があったが、サクセスクライテリアとして挙げた項目について、幸い当初予定の成果が得られたと思われる。自己評価の結果を下記にまとめる。

サクセスレベル	自己評価
ミニマムサクセス	○
フルサクセス	○
エクストラサクセス	○

本研究をさらに発展させ、地上での材料開発に繋げたい。また、将来の宇宙実験機会を得られれば、実験条件を改善して再度微小重力条件でのクラスター形成条件を検討できればと願っている。

５． 結言

きぼう利用テーマ「微小重力を用いた多成分会合コロイド系の相挙動の研究」により、以下の成果が得られた。

(1) 期待していた通りに軌道上実験を運用できた。
(2) 新たな評価法により、正電荷粒子と負電荷粒子を判別・抽出することができた。
(3) 正電荷と負電荷のチタニア粒子を用いて、地上では形成困難な会合体（クラスター）を微小重力環境下で形成できたことを確認した。
(4) 光学的応用の可能性のあるチタニア四面体クラスターを得ることに成功し、ミニマムサクセスを達成できた。
(5) チタニアクラスターの平衡状態図を得ることができ、フルサクセスを達成できた。
(6) モンテカルロシミュレーションによりポリスチレン系の会合数分布を求め、実験結果と比較検討できた。
(7) 顕微分光法により１個のチタニア四面体クラスターの光学特性を評価でき、エクストラサクセスを達成できた。

文献

[1] J. D. Joannopoulous, R. D. Meade, J. N. Winn, 藤井・井上訳，フォトニック結晶，コロナ社（2000）; 迫田和彰，フォトニック結晶入門，森北出版（2004）

[2] K. M. Ho, C. T. Chan, and C. M. Soukoulis,Phys. Rev. Lett. **65**, 3152 (1990)

[3] H. Yin, B. Dong, X. Liu, T. Zhan, L. Shi, J. Zi, and E. Yablonovitch, PNAS **109**,10798(2012).

[4] P. Pieranski, Contemp. Phys. **24**, 25, (1983); W. B. Russel, D. A. Saville, W. R. Schowalter,“ Colloidal Dispersions,” Cambridge University Press（1989）

[5] K. Edagawa, S. Kanoko, and M. Notomi, Phys. Rev. Lett. **100**,013901 (2008)

[6] M. Notomi, Rep. Prog. Phys. **73**,096501 (2010)

[7] T. Ergin, N. Stenger, P. Brenner, J. B. Pendry, M. Wegener, Science **328**, 337 (2010)

[8] Y. Komiyama, H. Abe, Y. Kamimura, and K. Edagawa, Appl. Phys. Lett. **108**, 191110 (2016)

[9] T. Ergin,N. Stenger, P. Brenner, J. B. Pendry, M. Wegener, Science **328**, 337 (2010)

[10] T.Okuzono, K. Odai, T. Masuda, A. Toyotama, and J. Yamanaka, Phys. Rev. **E 94**, 012609 (2016)

[11] N. Vogel, M.Retsch, C. -A. Fustin, A. del Campo, and U. Jonas, Chem. Rev., **115**, 6265（2015）; V. N. Manoharan, Science, **349**, 6251（2015）; E. Elacqua, X. Zheng, C. Shillingford, M. Liu, and M. Weck, Acc.Chem., **50**, 2756（2017）; Y. Wang, I. C. Jenkins, J. T. McGinley, T. Sinno, and J. C. Crocker, Nature Commun., **8**, 14173（2016）; S. Sacanna, W. T. M. Irvine, P. M. Chaikin, and D. J. Pine, Nature, **464**, 575（2010）

7. 成果リスト

＊ 以下に、宇宙実験結果を含む成果発表と、宇宙実験準備・実験条件検討結果の発表に分けて記載する

<宇宙実験結果>

【学術論文】

該当なし（１報を npj Microgravity 誌に投稿、査読者コメントを受けて改訂中、１報を Scientific Reports 誌に投稿準備中）

【出版】

(1) Springer-Nature Video Series
"Visual Guide to Study Self-Assembly of Colloids"
J.Yamanaka, T.Okuzono, A.Toyotama, Springer, 2022.

(2) Springer Lecture Series in Chemistry
"Self-Assembly of Colloids - From Fundamentals to Applications -"
J.Yamanaka, T.Okuzono, A.Toyotama, Springer, 2023 (to be published).

【学会発表】

(1) 三木裕之，石神瑛圭，土井眞帆，森優月，豊玉彰子，奥薗透，山中淳平，足立聡，坂下哲也，島岡太郎，永井正恵，渡邊勇基，福山誠二郎
「微小重力下における荷電コロイド粒子の会合体形成」
日本マイクログラビティ応用学会 第 34 回学術講演会（JASMAC-34），2022 年 9 月 14 日（名古屋）

(2) 土井眞帆,三木裕之，豊玉彰子，奥薗透，山中淳平，足立聡，坂下哲也，島岡太郎，永井正恵，渡邊勇基，福山誠二郎
「宇宙実験で生成した荷電コロイド粒子の集合体構造の解析」
日本マイクログラビティ応用学会 第 34 回学術講演会（JASMAC-34），2022 年 9 月 16 日（名古屋）

(3)山中淳平（キーノート講演）
「自己集合によるコロイド系の構造形成」
73 回コロイドおよび界面科学討論会，2022 年 9 月 21 日（広島）.

(4)山中 淳平、奥薗 透、豊玉 彰子（招待講演）
「界面におけるコロイド系の自己集合構造」
第 53 回中部化学関係学協会支部連合 秋季大会，2022 年 11 月 6 日（オンライン）.

【工業所有権】

（該当なし）

【獲得外部競争資金】

（該当なし）

【取材・報道等】
■大学プレスリリース
(1)国際宇宙ステーション・「きぼう」日本実験棟における実験で
微小重力でのコロイド粒子会合体の生成に成功
2021 年 10 月 11 日

■新聞報道
(1)科学新聞
「コロイド粒子会合体　微小重力下で生成」(2021 年 10 月 29 日)

■Web 報道
(1)『国際宇宙ステーション・「きぼう」日本実験棟における実験で　微小重力でのコロイド粒子会合体の生成に成功』
https://www.astroarts.co.jp/
2021 年 10 月 11 日

(2)『「きぼう」で行われた多成分会合コロイド系の相挙動に関する実験において、コロイド粒子会合体の形成に成功しました』
JAXA Website
https://humans-in-space.jaxa.jp/kibouser/subject/science/70504.html
2021 年 10 月 13 日

(3)「名市大、ISS の微小重力を活用して地上では不可能なチタニア粒子形成に成功」
2021 年 10 月 13 日
https://news.mynavi.jp/techplus/article/20211013-2125630/
https://www.mapion.co.jp/news/column/cobs2304439-1/
https://news.biglobe.ne.jp/it/1013/mnn_211013_1550989383.html
https://newspicks.com/news/6263469?ref=user_238932
https://entameplus.jp/article/index.php?id=820785219765354496　など

(4)科学技術振興機構(JST)　website（中国版）
「名古屋市立大学等在微重力下成功生成胶体粒子聚集体 – 客观日本」
（keguanjp.com）
2021 年 11 月 30 日

(5)科学技術振興機構(JST)　website（英語版）
“Nagoya City University Group succeeds in generating clusters of colloidal particles under microgravity”
2022 年 5 月 24 日

【公開講座等】
(1)山中淳平(招待講演)
「コロイド粒子の自己集合による構造形成」
2022 年度関西接着ワークショップ　第 3 回研究会 『分散・凝集の科学と技術』,
2022 年 12 月 23 日(オンライン).

<宇宙実験準備・実験条件検討>

【学術論文】
(1) T. Seki, T. Okuzono, A. Toyotama, J. Yamanaka
"Mechanism of Diffusiophoresis with Chemical Reaction on a Colloidal Particle"
Phys. Rev. E, 99 (1), 012608 (2019). [IF = 3.402]

【総説・解説】
(1) 山中淳平, 奥薗透, 豊玉彰子
「コロイド粒子の自己集合による構造形成」
高分子, **67**,647-650(2018).

(2) J. Yamanaka, T. Okuzono, A. Toyotama
"Self-Assembled Structures of Colloids"
Acc. Mater. Surf. Res., **5**, 90-97. (2018).

(3) 山中淳平, 奥薗透, 豊玉彰子
「コロイド微粒子の自己集合による構造形成」
Pharmatech Japan, **35**,185-189 (2019).

(4)青山柚里奈, 豊玉彰子, 奥薗透, 山中淳平
「コロイド微粒子の構造形成」
化学と教育, **68**,84-87(2020).

(5) 山中淳平, 三木裕之, 藤田みのり, 青山柚里奈, 豊玉彰子, 奥薗透, 武田真一
「3次元および 2 次元コロイド結晶の構築」
粉体工学会誌,**58**,193-198(2021).

(6) 山中淳平
「コロイド粒子の自己集合による構造形成と新規材料の開発」
化学と工業(2022 年 2 月号).

【学会発表】

(1) J. Yamanaka, T. Okuzono, A. Toyotama
"Clustering of oppositely charged colloidal particles"
International Association of Colloid and Interface Symposium 2018, 2018 年 5 月 22 日
(オランダ・ロッテルダム).

(2) 服部肇, 近藤陽子, 竹田優志, 山中淳平, 豊玉彰子, 奥薗透
「反対符号に荷電したコロイド粒子のクラスター形成」
第 69 回コロイドおよび界面化学討論会, 2018 年 9 月 20 日(つくば).

(3) 三木裕之, 藤田みのり, 豊玉彰子, 奥薗透, 山中淳平
「荷電コロイド粒子の四面体クラスターの構造評価」
第 69 回コロイドおよび界面化学討論会, 2018 年 9 月 20 日(つくば).

(4) T. Ishigami, A. Toyotama, T. Okuzono, J. Yamanaka
“Adsorption Behavior of Oppositely Charged Colloids”
An International Conference on Colloid & Surface Science (Okinawa Colloids) 2019, 2019 年 11 月 6 日(沖縄).

(5) 三木裕之, 豊玉彰子, 奥薗 透, 山中淳平
「反対符号に荷電したコロイド粒子の会合構造の塩濃度による変化」
第 9 回ソフトマター研究会, 2019 年 11 月 26 日(名古屋).

(6) 石神瑛圭, 豊玉彰子, 奥薗透, 山中淳平
「反対符号の電荷を持つ粒子/平板系と 2 成分粒子系の吸着挙動の相関」
第 9 回ソフトマター研究会, 2019 年 11 月 26 日(名古屋).

(7) J. Yamanaka
“Clustering of Oppositely Charged Colloidal Particles”
Space Environment Utilization Working Group Conference; “Kibo” Utilization Opportunities, 2019 年 11 月 27 日 (名古屋)

(8) J. Yamanaka (Invited Lecture)
“Self-Assembly of Charged Colloidal Particles“
e-Conference on Soft Matter (eCoSoM-2020), 2020 年 7 月 16 日(インド, オンライン).

(9) 石神瑛圭, 豊玉彰子, 奥薗透, 山中淳平
「荷電コロイド粒子の平板への静電吸着と会合体形成の相関」
第 71 回コロイドおよび界面化学討論会, 2020 年 9 月 14 日(オンライン).

(10) 山中淳平, 駒沢穂乃佳, 藤田みのり, 三木裕之, 南まどか, 石神瑛圭, 豊玉彰子, 奥薗透
「反対符号に荷電したコロイド粒子の会合体形成」
第 71 回コロイドおよび界面化学討論会, 2020 年 9 月 14 日(オンライン).

(11) 三木裕之, 山本和史, 豊玉彰子, 奥薗透, 山中淳平
「正および負に荷電したチタニア粒子の会合体形成」
第 71 回コロイドおよび界面化学討論会, 2020 年 9 月 14 日(オンライン).

(12) 三木裕之, 南まどか, 藤田みのり, 豊玉彰子, 奥薗透, 山中淳平, 足立聡, 坂下哲也, 島岡太郎, 永井正恵, 渡邊勇基, 福山誠二郎, 仲田結衣
「正および負に荷電したチタニア粒子の会合体形成と宇宙実験検討」
日本マイクログラビティ応用学会 第 32 回学術講演会(JASMAC-32), 2020 年 10 月 4 日(オンライン).

(13) 石神瑛圭, 豊玉彰子, 奥薗透, 山中淳平, 足立聡, 坂下哲也, 島岡太郎, 永井正恵, 渡邊勇基, 福山誠二郎, 仲田結衣
「宇宙実験に向けた荷電コロイド粒子の静電吸着と会合体形成の研究」
日本マイクログラビティ応用学会 第 32 回学術講演会(JASMAC-32), 2020 年 10 月 4 日(オンライン).

(14) 山中淳平，石神瑛圭，三木裕之，駒沢穂乃佳，藤田みのり，豊玉彰子
「反対符号に荷電したコロイド粒子の会合体形成」
第 49 回結晶成長国内会議，2020 年 11 月 10 日(オンライン).

(15) J. Yamanaka, H. Miki, T. Ishigami, M. Fjita, A. Toyotama, T. Okuzono
"Clustering of Oppositely Charged Colloidal Particles."
The 8th Asian Conference on Crystal Growth and Technology, 2021 年 3 月 3 日(オンライン).

(16) J. Yamanaka
"Clustering of oppositely charged colloidal particles."
11th Liquid Matter Conference 2020/2021, 2021 年 7 月 19 日(オンライン).

(17) J. Yamanaka (Invited Lecture)
"Space Experiments on Clustering of Charged Colloids."
The 8th Asian Particle Technology Symposium (APT2021), 2021 年 10 月 11 日
(大阪，オンライン).

(18) 山中淳平，三木裕之，石神瑛圭，森優月，豊玉彰子，奥薗透，足立聡，坂下哲也，
島岡太郎，永井正恵，渡邊勇基，福山誠二郎
「Colloidal Clusters 宇宙実験による荷電コロイド粒子の会合挙動の研究」
日本マイクログラビティ応用学会 第 33 回学術講演会（JASMAC-33），2021 年 10 月 13 日
(オンライン).

(19) 三木裕之，石神瑛圭，森優月，豊玉彰子，奥薗透，山中淳平，足立聡，坂下哲也，
島岡太郎，永井正恵，渡邊勇基，福山誠二郎
「Colloidal Clusters 宇宙実験における会合体形成の検討」
日本マイクログラビティ応用学会 第 33 回学術講演会（JASMAC-33），2021 年 10 月 13 日
(オンライン).

(20) J. Yamanaka, H. Miki, T. Ishigami, M. Fjita, Y. Aoyama, A. Toyotama, T. Okuzono
"Clustering of oppositely charged colloidal particles."
Pacifichem 2021, 2021 年 12 月 16 日(ハワイ，オンライン).

【工業所有権】
（該当なし）

【獲得外部競争資金】
科学研究費補助金（基盤研究（C））
山中淳平
粒子間摩擦力の制御による対称性に優れた正四面体型荷電コロイド粒子会合体の構築
2017 年度～2019 年度
4,810 千円（直接経費: 3,700 千円、間接経費: 1,110 千円）

【取材・報道等】
■大学プレスリリース
(1)「国際宇宙ステーション「きぼう」実験棟でのコロイド粒子会合実験」
平成 30 年 8 月 20 日

■新聞報道
(1) 日刊工業新聞
「コロイド粒子の会合・凝集−名古屋市立大、ISS で実験」(2018 年 8 月 22 日)

(2) 朝日新聞東海版
「先端人 − 光操る微小粒子を研究」(2018 年 9 月 2 日)

(3) 科学新聞
「コロイド粒子会合実験 ISS で来年予定」(2018 年 9 月 7 日)

【公開講座等】
(1) 山中淳平(依頼講演)
「コロイド系の構造形成と宇宙実験」
第 38 回コロイド界面技術シンポジウム「みんなを元気にするすごい技術 アフターコロナの研究開発～動向/指針/変化する研究」, 2021 年 2 月 5 日(オンライン).

(2) 山中淳平
「コロイド系の構造形成」
ディスパージョンフェスタ 2020, 2020 年 3 月 19 日(オンライン).

(3) 山中淳平(依頼講演)
「コロイド分散系の結晶化とクラスター形成」
第 10 回 CSJ 化学フェスタ, 2020 年 10 月 22 日(オンライン).

(以上)

2022年度 ISS・きぼう利用ミッション科学成果評価結果

微小重力を用いた多成分会合コロイド系の相挙動の研究
（Colloidal Clusters）

代表研究者；山中淳平（名古屋市立大学）

総合評価

A: 目標を充分に達成した(フルサクセス相当)

高屈折率のチタニアクラスターを実現できる可能性を提示し、完全フォトニックバンドギャップ材料として、チタニア粒子の有効性を提示したことは世界初であり、微小重力実験ならではの研究成果である。この実験で作られた単一クラスターで光学特性が得られたことで、基礎科学および工学応用両面で重要な成果を得た。

試料の準備や実験条件等のさらなる検討を進め、本研究で得られた知見・実験技術を発展させ、まだ実現されていないチタニア粒子の高次集積体の作製を目指して、研究を継続することを期待する。

2023年3月
きぼう利用テーマ選考評価委員会（物質・物理科学分野）

きぼう利用テーマ
「微小重力を用いた多成分会合コロイド系の相挙動の研究(Colloidal Clusters)」
概要書

研究代表者;山中淳平(名古屋市立大学) 2023年1月

近年、屈折率が周期的に変化する人工物質である「フォトニック結晶」の研究が盛んである。あらゆる方向からの光に対して光伝搬が禁止されるとき、物質は「完全フォトニックバンドギャップ」(完全PBG)を持つと表現される。すでに、誘電体のダイヤモンド格子構造で、完全PBGが生じることが理論的に示されている。

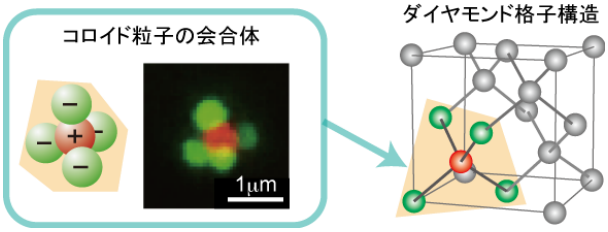


図1 コロイド粒子の四面体クラスターとダイヤモンド格子構造.

フォトニック結晶の構築に向けて、コロイド粒子の自己集合を用いた手法が盛んに検討されている。**図1**に示すように、反対荷電の2成分コロイドを用いて正四面体型のクラスターを作成し、これを最小要素として積み上げれば、ダイヤモンド構造が得られる。我々はこれまでに、このようなコロイドクラスターの構築を検討してきた。しかし、電荷数と会合数の関係といった、生成条件に関する基本的な情報が、未だ明らかではない。また、完全PBGを得るためには、ダイヤモンド格子を構成する粒子が、媒体のおよそ2倍以上の屈折率n_rを持つ必要がある。例えばチタニア(TiO2)の屈折率は2.72で、水との屈折率比は2.04となるため、この条件を満たす。しかしチタニアの比重は3～4 と大きく、地上で静置した場合、数mm/hr 以上の速さで沈降し、容器底に沈殿・凝集するためデータ取得が著しく困難である。

本研究では、微小重力環境において沈降を抑制し、正負に荷電したコロイド微粒子を混合した後ゲル化させて固定し、地上に帰還させて分析した。正と負に帯電させたチタニア粒子を用いて会合体(クラスター)を微小重力環境下で形成し、以下を達成することを目的とした。
(1)クラスターの構造と会合数分布を調べることにより、平衡状態図(相図)を得る。
(2)さらにクラスターの大きさが小さいため測定が困難であるが、チタニア四面体クラスターの光学特性の測定を試みる。(1)をフルサクセス、(2)をエクストラサクセスと設定した。加えて、地上では沈殿・凝集により得られないチタニア四面体クラスターを得ることをミニマムサクセスとした。エクストラサクセスでは、チタニア四面体クラスターの光学特性を評価することにより、将来の光デバイス開発の基礎となるデータのまとめを行い、グラフ化することを目指した。

宇宙実験は 2020 年 7 月に、国際宇宙ステーション(ISS)の日本実験棟「きぼう」で行なわれた。直径約 1μm の正荷電粒子と負荷電粒子を ISS の微小重力環境下で混合し、クラスターを形成させた。コロイド粒子として、水とほぼ同じ比重(= 1.05) のポリスチレン (PS) 粒子と、高屈折率・高比重(=約 3) のチタニア粒子を用いた。PS 粒子系は、宇宙実験が正しく実施されたことを確認するための標準サンプルと想定した。

試料は 2021 年に地上に帰還し、3 月より解析を開始した。全ての宇宙試料が、予定通りゲルで固定化されたことを確認した。**図2**(a)は、帰還後に試料バッグから取り出したチタニ

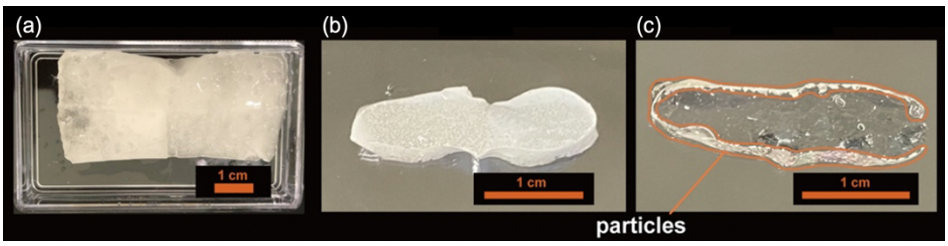


図2 (a) 試料バッグから取り出したゲル固定化チタニアコロイド試料 .(b) 宇宙および(c)地上対照試料の断面.

ア試料（TiO2 # 23）の外観である。試料を外科手術用メスで切断し、その断面を観察した。**図2**(b),(c)は、宇宙実験試料と、地上対照試料（クリノスタットによる擬似微小重力下でゲル化）の断面の比較である。地上試料では試料の中心部は透明であるが、宇宙試料には上澄みは観察されず、微小重力の効果が確認された。

PS 粒子の比重は媒体（ゲル化剤水溶液）と同程度である。このため、宇宙実験前には、PS 粒子系の結果は地上対照実験の結果と大差ないと予想していた。しかし、宇宙試料の方が地上対照より平均会合数が 50%程度大きく、また、4 面体型クラスターの構造対称性が優れていることが示された。図3(a)には PS 粒子の会合体の顕微鏡写真を示す。また図3(b) には、平均会合数 ⟨*m*⟩の塩濃度依存性を示す。モンテカルロシミュレーションによる計算結果も併せて示した。

図4には、チタニア粒子系の結果を示す。(a)は会合数 $m = 1$ から $m = 4$ までのクラスターの顕微鏡画像で、それぞれ左は赤色蛍光のみを検出した画像、右は白色光源を用いた画像である。画像中、負荷電粒子に”n”を付している。また、(b)および(c)には、*m* の分布に対する [NaCl]および電荷数 *Z* の影響を示す。このように、地上では得られないチタニア系の会合の関する知見が得られ、本宇宙実験のミニマムサクセスおよびフルサクセスが達成できた。

また、宇宙実験で得たチタニア粒子四面体の光学特性を調査した。単一粒子に比べて特に 450～500 nm 近辺でのクラスターによる光増強効果が見られた。これは現段階では光閉じ込めというよりは球レンズによる集光、反射の寄与が大きいと考えているが、実験前には想定していなかった結果である。今後この効果を活用すれば、非常に小型の光増幅器の開発につながる可能性がある。また、可視域で反射スペクトルを測定し、ダイヤモンド格子のフォトニックバンドを計算すると、3.2 μm に完全フォトニックバンドを持つ物質が得られると計算された。

このように、チタニアクラスターの光学特性を評価し、将来活用できる可能性のある結果を得たことから、エクストラサクセスを達成できたと考える。本実験で得られた成果を、今後の地上での材料開発に活用する予定である。

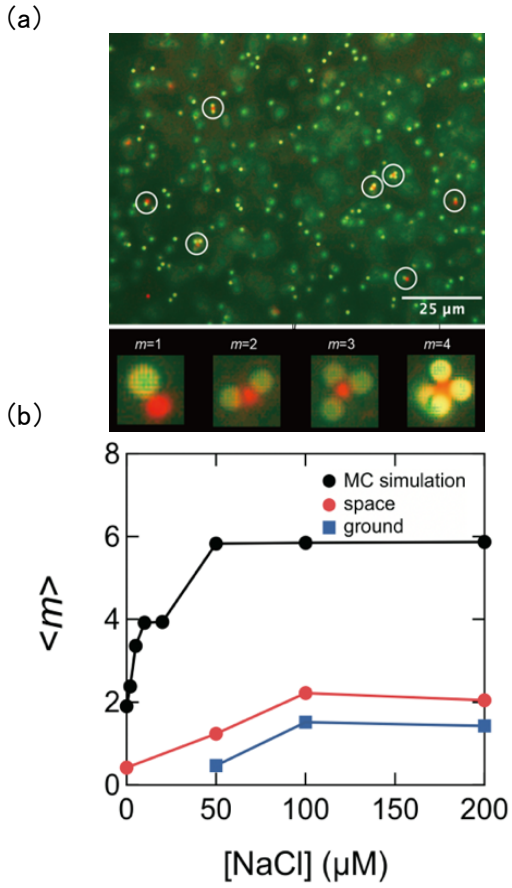


図3 (a)宇宙実験で得た PS 粒子の会合体の写真と (b)平均会合数 ⟨*m*⟩の塩濃度依存性.

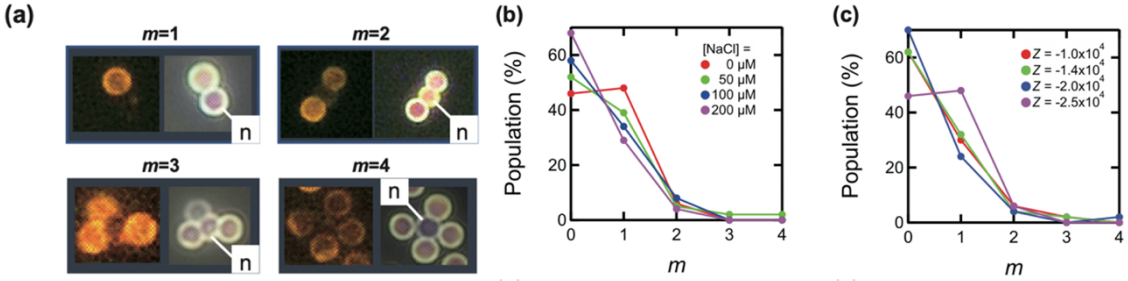


図4（a）会合数 m =1～4 のチタニア粒子クラスターの光学顕微像.左は赤色蛍光画像、右は白色光源を用いた画像.（b）、（c）*m* の分布に対する[NaCl]および粒子電荷数 Z の影響.

Summary report of the ISS-Kibo utilization mission
"Studies on phase behavior of multicomponent colloidal clusters under microgravity (Colloidal Clusters)"

Principal Investigator; Junpei Yamanaka（Nagoya City University）

Jan., 2023

In recent years, much attention has been attracted to "photonic crystals," artificial materials whose refractive index changes periodically. When light propagation is prohibited for light from all directions, the material has a "perfect photonic band gap" (perfect PBG). A perfect PBG occurs when a dielectric material forms a diamond-lattice-type periodic structure.

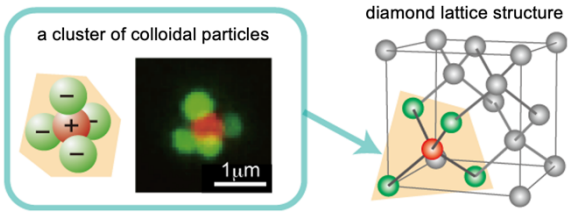


Fig. 1 Tetrahedral clusters and diamond lattice structure of colloidal particles.

The construction of photonic crystals using the self-assembly of colloidal particles has been actively investigated. As shown in **Fig. 1**, diamond structures can be obtained by creating tetrahedral-type clusters with oppositely charged two-component colloids and stacking them as the structural unit. We have previously investigated the formation of the colloidal clusters. However, basic information on the clustering conditions, including the relationship between the charge number and the association numbers, is not yet clear. In addition, to obtain perfect PBGs, the particle particles constituting the diamond lattice must have a refractive index n_r approximately twice that of the medium. For example, the refractive index of titania (TiO_2) is 2.72, which gives a refractive index ratio of 2.04 to water and satisfies the criteria. However, the specific gravity of titania is approximately 3~4, and when left on the ground, titania sediments at a rate of several mm/hr or faster, settling and agglomerating at the bottom of the container, making data acquisition extremely difficult.

In this study, positively and negatively charged colloidal particles were mixed to form clusters in a microgravity environment where particle precipitation is negligible. We fixed the sample in polymer gel and returned to the ground for analysis. The aims of the study is as follows: (1) To obtain an equilibrium state diagram (phase diagram) by examining the structure of the clusters and the distribution of the association number of titania particles. (2) To measure the optical properties of titania tetrahedral clusters, although it is difficult to do so due to the small size of the clusters. We set (1) as Full Success and (2) as Extra Success. In addition, we set Minimum Success to obtain titania tetrahedral clusters, which cannot be obtained on the ground due to precipitation. In the Extra Success, the optical properties of the titania tetrahedral clusters will be evaluated, and the data will be compiled and graphed as a basis for the development of future optical devices.

The space experiment was conducted in July 2020 on the Japanese Experiment Module "Kibo" of the International Space Station (ISS). Positively and negatively charged particles with a diameter of approximately 1 μm were mixed in the microgravity environment of the ISS to form clusters. The polystyrene (PS) particles were also used, assuming as a standard sample to confirm that the space experiment was performed correctly.

Samples were returned to the ground in 2021 and analysis began in March. All space samples were confirmed to have been immobilized in the gel as planned. **Fig. 2**(a) shows the appearance of a titania sample (TiO_2 # 23) removed from the sample bag after

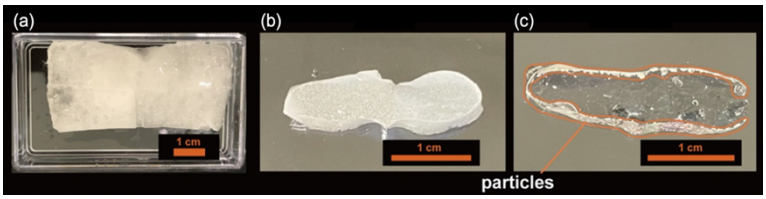


Fig. 2 (a) An overview of the gel-immobilized titania colloid sample. Cross sections of (b) space sample and (c) ground sample.

the return. The samples were cut with a surgical scalpel, and their cross-sections were observed. **Fig.2**(b) and (c) compare the cross sections of the space experimental sample and the ground control sample (gelled under quasi-microgravity with a clinostat). In the ground sample, the particles settled significantly, and the center of the sample was transparent, while no supernatant was observed in the space sample, confirming the effect of microgravity.

The specific gravity of the PS particles is about 1.05, which is comparable to that of the medium. Therefore, before the space experiment, we expected that the results of the PS particle system would not differ significantly from those of the ground control experiment. However, the space sample showed an average number of aggregates about 50% larger than the ground control, and also showed better structural symmetry of the tetrahedral clusters. **Fig.3**(a) and (b) show a photograph of the PS particle aggregates and the dependence of the mean association number <*m*> on salinity.

The results for the titania particle system are shown in **Fig.4. Fig.4**(a) is a magnified image for clusters having the association number *m* from 1 to 4, with only red fluorescence detected on the left, and with a white light source on the right. (Negatively charged particles are indicated with an "n").**Fig.4** (b) and **Fig.4** (c) show the [NaCl]-dependence and charge number Z-dependence of the *m* distribution. Thus, we obtained knowledge on the association of titania systems that could not be obtained on the ground and achieved Minimum and Full success in this space experiment.

The optical properties of the titania particle tetrahedrons from the space experiment were also investigated. Light-enhancing effects due to clusters compared to single particles were observed, especially in the vicinity of 450-500 nm. At this stage, we believe that this is largely due to the contribution of light focusing and reflection by the spherical lens rather than light confinement, but this is a result that we had not anticipated before the experiment. If this effect is utilized in the future, it could lead to the development of very compact optical amplifiers. In addition, by measuring the reflection spectrum in the visible region and calculating the photonic bands of the diamond lattice, it was calculated that a material with a perfect photonic band at 3.2 μm could be obtained.

Thus, we believe that we have achieved Extra success because we have evaluated the optical properties and obtained results that may be useful for developing optical materials. We hope that the results obtained from this experiment will be useful to design colloidal photonic crystals.

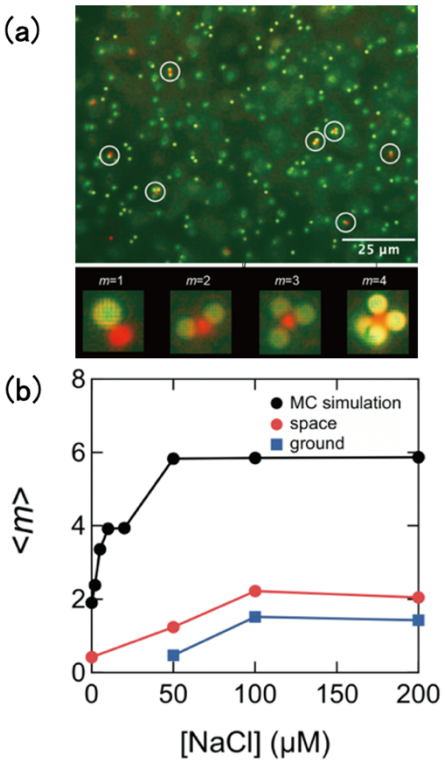


Fig. 3 (a) Photographs of clusters of PS particles obtained in the space experiment and (b) dependence of the average number of aggregates <*m*> on salinity.

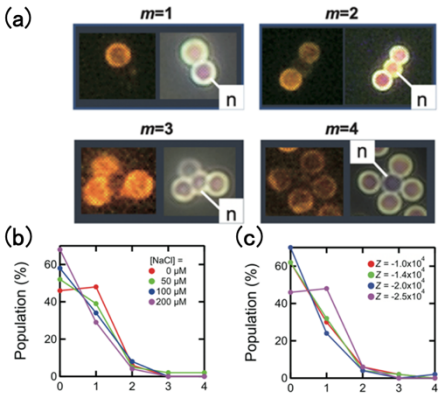


Fig. 4 (a) Magnified images of titania-based clusters from the association number *m*=1 to *m*=4 (left: red fluorescence detected, right: image with a white light source). and distribution of *m*. (b) [NaCl]-dependence and
(c) the particles charge number(*Z*)-dependence.