

大気球を用いた成層圏微生物採取実験: Biopause プロジェクト

大野宗祐、三宅範宗、奥平修、石橋高、前田恵介、山田学、松井孝典(千葉工大惑星探査研)、河口優子、山岸明彦(東薬大)、山田和彦、野中聡(JAXA)、瀬川高弘(山梨大)、高橋裕介、原田大樹(北大)、石川裕子(リンカーン大)、所源亮(ISPA)、山内一也(東大)、梯友哉、福家英之、吉田哲也(JAXA)

1. 研究の背景

古くは1936年から、大気球あるいはロケットを用いた成層圏での微生物サンプリングが行われ、成層圏にも生命が存在しているということが報告されている(総説 Yang et al. 2009a)。本実験の共同研究者である東京薬科大学山岸のグループでも、平成16年、17年に大気球を用いた微生物採集実験で成層圏での微生物の採集に成功した(Yang et al. 2008a)。また、1999年から2000年にかけて数回にわたり、航空機を用いた成層圏、対流圏での大気中塵埃の採取とrRNA 遺伝子の解析および紫外線耐性の解析を行い、これまで知られている最も紫外線耐性の菌 *Deinococcus radiodurans* よりもさらに高い耐性を示す菌を2株得た(Yang et al. 2008b, 2009b, 2010)。以上のように、中層大気、特に成層圏に微生物が存在していることがわかってきている。中層大気は地球生物圏の上端にあたり、明確な境界面の有無やそれを決定するメカニズム、さらには地球生物圏が宇宙に向かって閉じているのか開いているのかを理解する上で重要な鍵となる。

ところがここで問題となるのが、どのような状態で微生物が成層圏に存在しているかがよくわかっていないことである。成層圏で採取された微生物は紫外線等の耐性が高いとはいえ、一個体が単独で浮遊している場合には短時間で死滅してしまうはずである。そのため、微生物の生存の観点からは、成層圏の微生物は数個体以上が凝集体として集まっている、もしくは数ミクロン以上のサイズの岩石の塵の内部に付着している等、紫外線から何らかの形で遮蔽されているはずである。しかし、微生物の凝集体でも岩石の塵でも大きさが数ミクロン以上の粒子は、ストークス沈降を考えると終端速度が大きいため成層圏にとどまることが出来るのは短時間に限られてしまう。数ミクロン以上の粒子が中層大気中にとどまるためには、微生物を上空へ持ち上げる何らかのメカニズムが働く必要があるが、これは未だ確認されていない。この矛盾を解き、生物の地球からの流出/地球への流入のフラックスに制約を加えるためには、中層大気中の微生物の形態・サイズ分布と高度分布を測定し、難培養性微生物を含めた動態を理解する必要がある。

ところが、多くの先行研究では、採取した微生物をまず培養するという分析手順が採用されている。そのため、採取された微生物の状態を観察することが困難であった。培養法では、一個体が単独で浮遊しているのか凝集体でも塵に付着しているのかの区別は難しい。また、難培養性微生物や死んだ微生物も検出できない。一方高度分布に関しても、これまでに報告されている中層大気中の微生物の高度分布は、ロケット、気球、飛行機実験などの異なる手法、異なる場所、異なる時期に得られたデータをコンパイルしたものである。同じ手法で系統的に同じ場所における異なる高度の微生物分布を調べた例は存在しない。そのため、それぞれの手法のバイアスや誤差、水平方向の数密度の違い、季節変動などの影響を受けてしまい、鉛直方向の輸送メカニズムや中層大気での滞留時間等を定量的に評価することが出来ない。

2. 本研究の目的

そこで本研究では、中層大気中の微生物の形態と高度分布を観測することを目的とし、大気球を用いた中層大気中の微生物採集実験を行うこととする。また、採取した試料を、蛍光顕微鏡/SEMによる観察、直接DNA分析、培養の3種類の方法で多角的に分析し、成層圏中の浮遊微生物の種類と物理状態を調査する。平成28年度に行った第1回実験では、開発中のインパクト式微生物採取装置を用いたパラシュートによる降下時に試料採取の実証試験を行うとともに、蛍光顕微鏡とSEM観察の分析手法を確立することができた。また、成層圏の難培養性微生物数密度に関する世界初の観測結果を得た。

それを踏まえ、第2回の気球実験となる平成 29 年度の実験では、1) 同時同地点異高度における成層圏微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測、2) 蛍光顕微鏡による微生物検出と培養法との比較、3) 第1回実験で未達成であったコントロール試料の回収と分析、4) 実験的な試料採取部内大気流量測定手法確立、の4点を目標とする。

上記実験目標4項目が達成されれば、生物圏界面 biopause の決定の為に最も重要な成層圏微生物の高度分布情報を得ることができる。また、成層圏微生物の先行研究との比較を行うため必要な培養法との定量的な比較が可能となる。単独でも重要な成果であるが、プロジェクト目的達成の為に不可欠なステップとなる。

3. 観測の具体的な方法

インパクター型高効率試料採集装置は、密閉用ゲートバルブと中空の鉛直管、内部に取り付けた試料採取板からなり、バルブの動作は地上から制御する。ゴンドラをパラシュートで降下させる途中にバルブを開け、管内部を通り抜ける空気中の微生物を試料採取板に衝突させ、捕獲する。インパクター型微粒子採取法は、一般的な市販の微粒子採取装置でも採用されている等、地上では一般的な手法である。インパクター式を採用することにより、既存のフィルター型採集装置の 24 時間分を落下距離わずか 1km で採取できる(最狭部断面積 100cm² の場合)。上空での動作がバルブ開閉のみですむ上に試料採取時のコンタミの危険性が大きく減ずるため、気球実験、特に微生物高度分布測定には非常に適している。密閉用バルブは、滅菌手順に耐え衝撃に強くコンダクタンスが大きい、フジテクノロジー社製・圧縮空気制御ゲートバルブを用いる。バルブ制御は地上からのコマンド、搭載した気圧計に基づく制御、気球切り離しからのタイマーの 3 通りを用い、メイン制御と冗長計で使い分ける。試料採取板と中空管はアルミを用い、風洞実験の結果を受けて形状の最適化を行い、既に製作を行った。放球前には洗剤とアルコールを用いて滅菌・洗浄を行った上でゲートバルブを密閉し、その状態のまま大樹実験場へ輸送し、気球実験に用いる。

採取・着水・回収後、試料採取装置は密閉したまま大樹実験場へ漁船で輸送する。その状態では採取装置内圧は成層圏圧力となっておりコンタミのリスクがある為、外壁を洗浄後大樹実験場内のクリーンベンチ内に持ち込み、採取装置にフィルターを通した外気を導入し内圧を外気圧に戻す。クリーンベンチ内で試料採取板を取り外し、一部の試料採取板は蛍光色素で染色後密閉し、千葉工大の蛍光顕微鏡を用いて観察する。SEM 用の試料採取板は金蒸着し、千葉工大の SEM を用いて観察する。また、培養用の試料は試料採取板から培地に移し培養する。

4. 平成 28 年度大気球実験

平成 28 年度に第 1 回の大気球実験を行った。実験装置一式を搭載した大気球は 6 月 8 日早朝に大樹航空宇宙実験場から放球された。気球に搭載された実験装置は高度 28km まで上昇し、気球を切り離し、その後パラシュートによる降下中に試料採取を行った。試料採取部の入口・出口のゲートバルブは予定通り動作し、高度 27km から高度 13km までの成層圏微生物試料採取に成功した。その後実験装置一式は回収船によって回収され、密閉されたまま大樹航空宇宙実験場へと輸送された。

蛍光顕微鏡で観察した結果、放球前にゴンドラ側面に塗布した蛍光ビーズは全く確認されなかった。これは、ゴンドラに付着した地上微生物のコンタミがなかったことを示す。また、合計で 21 個の微生物を検出した。これは、標準大気(1 気圧 15°C)換算で 73 個/m³ の微生物数密度に相当する。一方、SEM観察の結果、エアロゾルをインパクター式採取装置で採取した場合に特有の「サテライト構造」を持つ微粒子を多数発見した。加速されインパクター板に衝突した柔らかい微粒子(硫酸エアロゾル等)以外はサテライト構造を持たないので、この構造は成層圏で確かに微粒子を捕集できた証拠である。現在までに採取板のごく一部しか観察できていないが、46 個のサテライト構造を持つ粒子を発見した。

平成 28 年度実験の成果をまとめると、以下の 2 点である。

- 1) 培養できないものも含めた成層圏微生物数密度の上限値を世界で初めて観測することに成功。
- 2) 新規開発した降下式インパクター型試料採取装置で、成層圏微粒子の採取に成功。

4. 平成 29 年度大気球実験

<大気球実験>

平成 28 年度の第 1 回実験の成果を踏まえ、平成 29 年度に第 2 回の大気球実験を行った。第 2 回目の気球実験は、1) 同時同地点異高度における成層圏微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測、2) 蛍光顕微鏡による微生物検出と培養法との比較、3) 第 1 回実験で未達成であったコントロール試料の回収と分析、4) 実験的な試料採取部内大気流量測定手法確立、の 4 点を目標とし、平成 29 年 6 月に JAXA 大樹航空宇宙実験場にて実施した。

実験装置の構成は、ゴンドラ 1 台に、試料採取部は計 6 組(本分析用 4 組、コントロール用 1 組、流量測定用 1 組)、制御部一式、ガスタンク 2 個、バッテリー、流量測定機用制御部、カメラ等を搭載した。個々の試料採取部は第 1 回実験とほぼ同一であったが、高度分布観測と多角分析を行う為、本分析用試料採取部の数が 1 組から 4 組に増やした。

第 1 回実験と同様に、実験装置は高度 28km まで上昇し、気球を切り離した後パラシュートによる降下中に試料採取を行った。予定通り高度 27km から高度 13km までの成層圏微生物試料採取が行われたことを、実験装置に搭載した採取部モニタリングカメラにて確認した。太平洋への着水後、実験装置一式を回収船により回収し、装置外壁の海水の洗浄後、千葉工大へと輸送した。

<試料分析・解析>

成層圏微生物試料を取り出すため、密閉されたまま輸送された試料採取部を千葉工大にて分解したところ、採取部内部へ浸水していることが判った。本分析用 4 組、コントロール用 1 組の計 5 組全てにおいて、数十 cc の量の浸水が観測された。試料採取部内部の液体の塩分を計測したところ、約 2% の塩水であり、海水が採取部内に浸入したことが判った。

試料採取部内の採取板に水がかかってしまったものの、予定通り、1) 蛍光顕微鏡観察、2) SEM 観察、3) 培養 の 3 通りの分析を試みた。第 1 回目実験から更新した点も含め、分析手順の試験を行うことができた。蛍光顕微鏡観察、SEM 観察とも第 1 回実験と同様の手法にて、千葉工大惑星探査研究センターにて行った。蛍光顕微鏡観察では微生物、SEM 観察では成層圏エアロゾルの検出を目指したが、見つけることは出来なかった。これは、浸水時に採取板に水がかかったため、付着していた微生物や成層圏エアロゾルが洗い流されてしまった為であると考えられる。一方、培養は東京薬科大学山岸研究室にて行うこととした。事前検討で決定したとおり培養を続けているが、成層圏由来試料中の微生物増殖は確認されていない。引き続き培養・解析を行う予定である。

<浸水原因の究明>

試料採取部内部への浸水の原因を究明し対策を立てる為、データ解析と各種の事後試験を行った。

まず、採取部への浸水源は、採取部内側の沈殿物とゲートバルブ内の付着物の組成が類似していること等の理由から、ゲートバルブの弁体の O リングの可能性が高い。NW フランジの O リング、採取部コーンの大型 O リング、内圧リーク用ポートの 3 カ所も浸水源にはなり得るが、これらは可動部でもなく、耐低温性能がスペック上保証されており、実験装置回収後に緩み等も全くなかったため、浸水原因である可能性は非常に低い。念のため製造業者に装置設計図面と耐低温性能について再確認したが、問題が無いことが分かった。ネジやバルブの締め忘れがあった場合は漏れる可能性は有るが、採取部 5 組全てが浸水していることから、単純な人為的ミスの可能性も非常に低い。

次に、浸水したタイミングであるが、採取部内から塩分が検出されたことから、着水後と考えられる。そこで、まず、着水後の実験場への輸送中の振動・衝撃の模擬試験を行ったが、浸水は確認されなかった。次に、採取部の千葉工大への空輸中の模擬試験として、採取部内部を陽圧にした状態での衝撃試験、実際に空輸を行う試験を行ったが、やはり浸水は確認されなかった。そこで、着水時を模擬するため、採取部一式の水中投下試験を行った。着水時の採取部と水面の角度、ゲートバルブの駆動空気圧の有無と高低をパラメタとし、試験を行った。その結果、ゲートバルブ駆動大気圧が無く、かつ採取部が水面と平行な向きに着水した場合のみ、ゲートバルブ弁体のズレが生じ着水時の浸水が起こることが判った。それ以外の条件では浸水は全く起こらなかった。

即ち、駆動空気圧が漏れたか制御用電磁弁が誤動作して駆動圧が正常に掛かっていない状態で着水した為ゲートバ

バルブのズレが生じ、その後採取部開封までの間に徐々に浸水したものと考えられる。

<今後の実験へ向けての浸水対策>

着水時にゲートバルブ閉側に駆動圧が確実に掛かるよう、ゲートバルブ制御用空気の配管ラインの構造を見直す。上空でゲートバルブ開閉用に使う高圧空気は着水前に捨て、別途ガスタンクを準備し着水時にゲートバルブの閉側のみに必ず圧が掛かるようにすることで、空気圧リークや電磁弁誤動作の場合にも着水時にゲートバルブのズレが起こりえないようにする。念のため、試料採取装置回収後、空輸は行わず、TARF で採取部を解体し、採取試料の前処理を行うこととする。

6. 平成 30 年度実験の目的と準備状況

上記のように、第2回の気球実験となる平成 29 年度の実験は、試料採取部への浸水のため、成果を上げることが出来なかった。平成 30 年度第 3 回目実験では、浸水の対策を完全に行った上で、第 2 回実験の科学目標を再度目指す。具体的には、1) 同時同地点異高度における成層圏微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測、2) 蛍光顕微鏡による微生物検出と培養法との比較、3) 第1回実験で未達成であったコントロール試料の回収と分析、4) 実験的な試料採取部内大気流量測定手法確立、の4点を目標とする。

上記実験目標4項目が達成されれば、生物圏界面 biopause の決定の為に最も重要な成層圏微生物の高度分布情報を得ることができる。また、成層圏微生物の先行研究との比較を行うため必要な培養法との定量的な比較が可能となる。単独でも重要な成果であるが、プロジェクト目的達成の為に不可欠なステップとなる。

実験装置の構成は、ゴンドラ 1 台に、試料採取部は計 6 組(本分析用 4 組、コントロール用 1 組、流量測定用 1 組で、29 年度実験と同構成の予定)、PI 制御部一式、ガスタンク 2~3 個、バッテリー、流量測定機用制御部、カメラ等を搭載する予定である。実験装置ゴンドラ等の設計もほぼ踏襲するため、今年度中に実験準備を完了できる。場合によっては各採取部にも浸水対策を施すため、各試料採取部ごとに若干の重量増を見込んでいる。浸水対策も含め、6 月までに準備を整える予定である。流量計測手法(プローブ等)も、測定精度向上のため改良する予定であるが、制御基板やその容器は平成 29 年度実験の設計を踏襲する予定であり、大気球実験システムとの通信やノイズレベルは大きく変わらないことを想定している。

制御部容器の改修、ゲートバルブのオーバーホールを含め、外注する部分は遅くとも 1 月までに揃う予定となっている。その後、制御系・PI 側地上系の動作試験や実機を用いた分析試験まで平成 29 年度中に準備が完了するようスケジュールを組み、平成 30 年度春に大樹実験場にて大気球実験を行う前提で準備を行っている。