

# 成層圏における微生物捕獲実験：biopause プロジェクト

大野宗祐、石橋高、三宅範宗、山田学、小林正規、松井孝典(千葉工大惑星探査研)、河口優子、山岸明彦、仁田原翔太(東薬大)、山田和彦、野中聡(JAXA)、瀬川高広、近藤伸二(極地研)、高橋裕介、原田大樹(北大)、石川裕子(日本全薬工業)、所源亮(アリジェン製薬)、山内一也(東大)、梯友哉、福家英之、吉田哲也、JAXA 大気球実験グループ(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。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。中層大気は地球生物圏の上端“biopause”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 年度は、開発中のインパクター式の微生物採取装置を用い、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。また、蛍光顕微鏡と

SEM 観察の分析手法を確立する。

平成 29 年度以降は、平成 28 年度に行った実証試験の結果を踏まえ、インパクト式高感度試料採取装置を用い微生物を採取・分析する。1) 成層圏浮遊微生物の物理状態(単独か凝集体か塵に付着か)の観察、2) 難培養性の成層圏浮遊微生物の同定と遺伝子配列の解読、3) 成層圏微生物の寿命制約、4) 成層圏浮遊微生物の高度分布観測、の 4 つの成果を上げることを目標とする。中層大気中の微生物の形態と高度分布を実際に観測することで、先行研究では全く手つかずであった微生物の対流圏から中層大気への輸送メカニズムや中層大気中での滞留時間と寿命に関する制約を与えたい。

### 3. 観測の具体的な方法

インパクト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。インパクト型微粒子採取法は、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。インパクト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(大きさ 10cm 角)。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輸送する。大樹実験場内のクリーンベンチ内で採取装置から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。残りの試料採取板はそのまま密閉し、千葉工大の SEM を用いて観察する。

## 4. インパクト式微生物採集装置の準備状況

### 4-1 採集装置の概念

本気球実験では、気球で成層圏まで上昇した後、気球からゴンドラを切り離し、パラシュードで落下する最中に、成層圏中に浮遊する微生物を採集する。落下中に採集することにより、気球をはじめとする実験装置外壁に付着していた微生物(地上で気球に付着したもの)によるコンタミネーションを防ぐことができると考えられる。

採集装置は、装置の降下により大気を受動的に装置内に取り込み、微生物をインパクションプレート上に採集する。円筒状の筒の内部にノズルとインパクションプレートを設置する。装置下部から取り込まれた大気はインパクションプレートを避けるように流れるが、含まれる微粒子はインパクションプレートに衝突し付着する。細胞を持つ微生物の大きさは約  $1 \mu\text{m}$  よりも大きいことが知られており、本気球実験ではサイズ  $1 \mu\text{m}$  以上の微生物の採集を目指す。採集機構部の入口と出口にはゲートバルブが設置されており、指定したタイミングにより開閉を行い、目的とする高度での採集を行う。

この採集方法は、あくまでも地上に於ける能動的吸引による微粒子採集方法を参考としているため、成層圏中における受動的取り込みにより微生物の採集ができるのかどうか、確認する必要がある。さらに、効率良く微生物を採集するためには、装置の最適化が必要である。そこで、風洞実験と流体計

算によるそれらの確認作業を実施している。

#### 4-2 風洞実験

まず必要なのは、成層圏中における受動的取り込みにより微生物の採集ができるのかどうかの確認である。そこで、成層圏に相当する低圧環境で風洞実験を行い、成層圏浮遊微生物と同サイズの微粒子を捕集する実証実験を行った。また、微生物を効率良く採集する為には、装置内部を大気が効率良く通り抜けることが必要条件となる。そこで、筒にインパクションプレート等を取付けた模型を用いて風洞実験を行い、装置内の大気の流れを調べた。

実験は、宇宙航空研究開発機構の惑星環境風洞で行った。大気の流れを知るために、装置の出入り口やノズルのスロート部の静圧を測定した。ノズルのスロート部の直径や、インパクションプレートの直径、ノズルとインパクションプレートの距離、流れに対する装置の角度、流速、風洞内の圧力などを変えながら測定を行った。また、風洞内で採取装置模型の上流側に蛍光ビーズ(サイズ 1 ミクロン、5 ミクロン)の放出機構を設置し、成層圏内でのパラシュートによる降下状態に相当する 0.05kPa・30m/s における、模型を用いた微粒子捕集の実証実験を行った。蛍光ビーズを用いたのは、採集の可否や採集個数の確認を蛍光顕微鏡で行うためである。

風洞実験の結果、装置内の流量が最峽部の断面積に依存することが示された。また、蛍光ビーズ粒子の捕集実証に成功した。これにより、受動的インパクター型試料採取装置で成層圏を浮遊する微生物相当サイズの微粒子を確かに捕集できることが実証できた。

#### 4-3 流体計算

風洞実験で測定できるのは離散的箇所での静圧のみであるため、装置内全体の流れ場を知るために、流体計算を行い、風洞実験結果との比較を行った。まず、ノズルのみ、ついでインパクションプレートありの場合の計算を行った。得られた結果(各圧力測定点の圧力)は、風洞実験の結果と良く一致した。流体計算では風洞実験における流れ場を

良く再現していると言える。計算結果を見ると、今回調べた範囲においては、ノズルのスロート部断面積が流れのボトルネックとなっており、インパクションプレートの面積はあまり影響がないことがわかった。また、流れに対する迎角があっても装置内の流量は低下しない(むしろやや増加する)という意外な結果も得られた。実際の気球実験において採集装置が落下する際には、パラシュートを頂点とする円錐振り子運動になり、装置は落下方向に対して角度を持つ。したがって、今回の結果は、そのような条件に於ける微生物採集に対してポジティブなものである。

#### 4-4 制御部の開発

微生物採集機構の開発と並行して、装置の制御部の検討・開発を行った。本採集装置は、気球のゴンドラに搭載されて成層圏まで上昇した後、ロープカッターにより気球から切り離され、ゴンドラごと落下する最中に、成層圏中の微生物の採集を行う。本装置の制御は、地上からの直接コマンドに加え圧力計とタイマーを用いたシーケンス制御により行われる。製作した制御部基板をはじめラズベリーパイ等は気密容器に収め、大気圧の空気で密封する。また、あまり低温にならないようヒーターと温度計による温度制御を行う。ロープカッターによる切り離しの信号によりシーケンサーが作動し、以降指定したタイミングでゲートバルブの開閉を行う。ゲートバルブはエア駆動式で、電磁弁により圧縮空気を制御して開閉を行う。安全の為、制御部封入用密閉容器は、製作者者に依頼し陽圧負圧とも耐圧性能を確認した。

#### 4-5 平成 27 年度大気球実験:採取装置実機の製作・組み立て・試験

上記の検討・試験を基に、平成 27 年度(8 月、大樹実験場)の大気球実験に向け、実機の製作を行った。ゴンドラ、試料採取板などは千葉工業大学工作センターの協力で製作した。ゴンドラにはインパクター型試料採取装置装置を試料採取用とコントロール用の 2 セットの他、制御部、バッテリー、ゲート

バルブ開閉用高圧ガスタンク、JAXA 大気球 G の HK 装置一式等を搭載した。試料採取装置の洗浄・滅菌は千葉工業大学惑星探査研究センター及び大樹実験場内で行った。ゲートバルブ単独の低温・真空環境下での動作試験は別途行い、 $-50^{\circ}\text{C}$ でも作動することを確認したが、凍結の可能性を減らす為保温と温調を行うこととした。コンタミ軽減の為、試料採取部の先端はゴンドラの下部に突き出した形に設置した。そのため、放球直前まで使う為の専用支持台を別途製作し、ゴンドラの下に設置した。試料採取部の先端ノズル部への地上微生物の付着はコンタミの原因になり得るので、放球直前に取り外せる蓋を別途製作し、ノズル部に取り付けた状態で洗浄・滅菌を行った。

平成 27 年度実験では、大樹実験場にて最終組み立てと配線、パッキング、感度試験を行い、放球準備が整っているということが FRR にて認められた。しかし、前日の最終チェックにおいてコマンドが通らなくなり、手動での再起動以外では復帰できない状態となった為、実験延期となった。

#### 4-6 事後試験と生じた問題への対応策の確立

平成 27 年度大気球実験の延期決定後、試料採取装置一式の実時間低温低圧試験を、JAXA 相模原キャンパスの大型恒温槽を用いて行った。その結果、制御系のシーケンスやコマンドによる制御が低温低圧かつ実時間でも問題が生じないことが確認出来た。また、ゲートバルブや制御部容器内の保温とバッテリー寿命も問題がないことが確認出来た。しかしながら、試料採取部のゲートバルブ 2 個のうち 1 個が正常に動作しなかった。試験後、ゲートバルブを分解し調べたところ、内部のベアリング周辺が錆び付いていることが判明した。これは、洗浄剤・滅菌剤の洗い流しと乾燥が不十分なまま長時間が経過してしまったことが理由であると考えられる。

平成 27 年度実験と事後試験において発生した問題のうち重大なものは、1) 実験延期の原因となった、コマンドが通らなくなる問題、2) 事後試験で

発生したゲートバルブのさび付き問題、の 2 項目である。1) については、搭載されている制御用のラズベリーパイを再起動出来れば問題がないことが分かっている。複数の方法でラズベリーパイが再起動できるよう、地上からのコマンド、ラズベリーパイ内部プログラム、制御基板の FPGA から、の 3 つの方法を検討しており、最低 2 つは搭載する準備をしている。2) については、千葉工大で念入りに洗浄・乾燥を行ったゲートバルブには問題が生じなかった一方、大樹実験場にて洗浄・乾燥を短時間で行ったものは錆が生じていた。そのため、洗浄と乾燥を念入りに行うことに加え、滅菌剤を次亜塩素酸から酸化反応を起こさないエタノールに変更する予定である。この洗浄／滅菌／乾燥方法の変更により問題が生じないことを、確認実験を行い確かめた。錆が生じた条件で洗浄／乾燥を行い再現試験を行う一方、錆発生防止を考慮した新しい洗浄／滅菌／乾燥手順を新しいゲートバルブに施して錆などの問題が生じないことを確認した。

#### 4-7 今後の開発予定

実験延期にはなってしまったものの、平成 27 年度大気球実験へ向けて装置他の検討・開発・準備を行って来たので、ベースラインは完成している。平成 28 年度実験では、採取装置内部の透過流量を測定するためのダミー採取装置を新たに搭載する予定であり、現在検討を行っている。また、ゲートバルブ他を取り付けた状態の採取装置を用いて低圧環境下の風洞実験を行い、実機を用いた微粒子採取の実証試験を行う。また、同時に流量測定も行う予定である。

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 27 年度中に準備が完了するようスケジュールを組み、平成 28 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。