

成層圏における微生物採集

山岸 明彦¹・横堀 伸一¹・南川 純一¹・清水 久美子¹
山上 隆正²・飯嶋 一征²・井筒 直樹²・福家 英之²・斉藤 芳隆²・川崎 朋実²・
松坂 幸彦²・並木 道義²・太田 茂雄²・鳥海 道彦²・山田 和彦²・瀬尾 基治²

Microbe sampling at stratosphere

By

Akihiko Yamagishi¹・Shin-ichi Yokobori¹・Jun-ichi Minamikawa¹・Kumiko Shimizu¹・
Takamasa Yamagami²・Issei Iijima²・Naoki Izutsu²・Hideyuki Fuke²・Yoshitaka Saito²・
Tomomi Kawasaki²・Yukihiko Matsuzaka²・Michiyoshi Namiki²・Shigeo Ohta²・
Michihiko Toriumi²・Kazuhiko Yamada²・Motoharu Seo²

Abstract: The microorganism sampling experiment of the stratosphere and the troposphere was conducted by using the airplane by Tokyo University of Pharmacy and Life Science. The bacteria with high ultraviolet resistance have been isolated from stratosphere and the troposphere. However, the highest altitude of the sampling was limited to about 12 km. In this work, collaborative sampling experiment of ISAS and Tokyo University of Pharmacy and Life Science was conducted to collect microbes at the atmosphere in a higher stratosphere. The microbes were filtrated with ultra-membrane filter at high altitude using balloon and the filters were placed on the medium. Several strains of microbes were isolated.

概 要

これまで東京薬科大学において、航空機を用いた成層圏、対流圏での微生物採集実験が行われ、紫外線耐性をしめす細菌株が単離された。しかし、その採集は航空機を用いているために12km以下に限られていた。そこで、東京薬科大学と宇宙科学研究本部の共同で大気球を用いた微生物採集実験を行った。成層圏でろ過したフィルターから微生物株を単離することができた。

重要語 成層圏, 紫外線耐性菌, 微生物採集

1. はじめに

平成13年度より、宇宙科学研究本部と東京薬科大学の協力による成層圏における微生物の採集実験が大気球を用いて行われている。本研究では成層圏大気を長時間採集することによって、その中の微生物の分子生物学的解析を行うとともに、紫外線耐性菌の分布を明らかにしようとするものである。

¹東京薬科大学 生命科学部

²宇宙航空研究開発機構 宇宙科学研究本部

2. 研究の背景

大気圏での微生物採集実験の歴史は古く1930年代から、大気球、飛行機あるいは観測用ロケットを用いた実験が行われてきた [1-3]。また様々な採集方法を用いて採集実験が行われた (表1)。しかし、その実験の回数は少なく、またそれらの実験が1980年代から始まった分子生物学手法の発展以前に行われたために、単なる微生物採集とその記載にとどまっていた。

そこで、われわれは航空機を用いて12kmまでの大気を採集し、その中の微生物の単離とその解析を行ってきた。その結果は大気球シンポジウムにおいても発表してきた [4, 5]。結果を要約するならば次の様である。すなわち、地上3kmから12kmまでの高度で航空機に搭載した微生物採集装置で大量の大気を吸引しその中の微生物を捕捉した。何回かの採集の結果、5株の細菌株を得た。その微生物密度は、表1で示されている以前の研究結果と矛盾しない値であった。それらの細菌株の紫外線耐性を調べたところ、そのうちの2株がこれまで最も高い紫外線耐性を持つとされている *Deinococcus radiodurans* と同等かあるいはそれ以上の紫外線耐性を示した。また、その16SrRNA 遺伝子のクローニングと塩基配列の解析を行ったところ、これら2株は *Deinococcus radiodurans* と92%程度の相同性を持っており、属レベルで *Deionococcus* 属と類縁の菌であると推定された。

3. 実験概要

本研究では、さらに上層の大気での紫外線耐性菌の存在を検討するために大気球を用いた採集実験を行った [6-9]。平成13年第一回成層圏微生物採集気球実験では高度20kmで約1,000リットルの吸引をおこなったが、微生物の採集はできなかった。平成16年第二回成層圏極限環境微生物採集実験からは大気の吸引量を増大するために新たに微生物採集装置を開発し、高度20kmで9,000リットルの大気を採集した。また平成17年度第三回成層圏微生物採集気球実験では高度20~25kmにおいて9,000リットルの大気を採取した。これらの採集実験から多数の微生物株の単離に成功した。

表1 初期の大気圏での微生物採集実験

Year	Mission	Altitude	Device	Species	Cell density	Reference
1936	Balloon	11~12km	Sterile cylindrical sampling device descending by parachute	<i>Bacillus</i> sp. Fungi	0.14m ³	Rogers, L. A., Meier, F. C.
1966	Aircraft	3 km	On soluble gelatin foam filters	Fungi <i>Bacillus</i> <i>Micrococcus</i>	5~200m ³	Fulton, J. D.
1967	Balloon	10~30km	Drawing large volumes of air by a fan through polyurethane foam filters	<i>Micrococcus</i> <i>Alternaria</i> <i>Cladosporium</i>	0.8~0.02m ³	Bruch, C.W.
1976	Meteorological rockets	48~58km	Nutrient medium on a film	<i>Micrococcus</i> <i>Micobacterium</i>	31 (Total cells isolated)	Imshenetsky, A. A., Lysenko, S. V., Kazakov, G. A., Ramkova, N. V.

4. 微生物採集と培養

平成16年度，平成17年度の2回の大気球を用いた微生物採集をおこなった。平成16年度は平成16年8月25日，平成17年度は平成17年6月6日に放球が行われそれぞれ約9,000リットルの大気の濾過を20～25kmでおこなった。ゴンドラに搭載した吸引ポンプを作動し，ゴンドラ外から大気を吸引し，孔径0.45 μm のメンブランフィルターでろ過した。微生物採集装置および気球を用いた採集の詳細に関しては既に報告した [10]。微生物採集装置を搭載したゴンドラは気球から切り離され着水の後，回収され三陸気球観測センターに運ばれた。平成16年度の実験では気球観測センター内に設置した簡易型の無菌フード中でメンブランフィルターを取り外し，培養液を含む寒天培地上にのせた。平成17年度の実験では，フィルター保持部を採集装置から取り外し，東京薬科大学へ持ち帰り，無菌循環型クリーンベンチ中でメンブランフィルターを取り外して培養液を含む滅菌脱脂綿上にのせて培養を行った。

5. 平成16年度微生物培養結果

平成16年度の採集フィルターから生育したクローンの一覧を表2にまとめた。採集装置の大気吸入孔付近には大気球上昇中の微生物が付着している可能性があるため，先ず10分間フィルター1を用いて大気の吸引ろ過を行った。その後，吸入孔のクリーニングを確認するために10分間フィルター3を用いて大気の吸引ろ過を行った。その後に，本採集のためにフィルター2を用いて27時間の吸引ろ過を行った。30 $^{\circ}\text{C}$ で培養の後生育したコロニー数を表2にまとめた。多数のカビのコロニーの生育が三つのフィルターで観察された。しかし，バクテリアコロニーはフィルター上では観察されなかった。大変奇妙なこととして，フィルター外の培地上でカビとバクテリアのコロニーの生育が観察された。その理由としては以下の二つの可能性が考えられた。1) フィルターを培地に移す際に，本来はフィルターをフィルター支持基盤（金属性の網）からはずしてフィルターだけを寒天培地に移す予定であった。しかし，長時間の吸引ろ過の過程でフィルターがフィルター支持基盤に固着してはずすことができなかった。そこで急遽，フィルター基盤ごと寒天培地にのせた。しかし，フィルター支持基盤の厚みのためにフィルターとフィルター基盤をかなり強い力で押しつけて，フィルター基盤を寒天培地中に押し込む必要があった。この作業中にフィルター上の細胞が飛び散った可能性がある。2) 上述の理由で通常に比べて大幅に作業に時間がかかった。フィルターを寒天培地上にのせる操作を簡易型の無菌フード中で行ったが，このフードは外気の流入を防ぐことができない。この複合的理由により作業中に外気中の微生物のフード中への流入が起きて寒天培地上に混入生育した可能性がある。

3つのフィルターは上空でのサンプリングの順にNo. 1，No. 3，No. 2である。またこれらのサンプリング

表2 平成16年度採集フィルター生育コロニー数

Sample	No.1	No.3	No.2
Purpose	Cleaning	Test	Sampling
Sampling time	10min	10min	27hour
Bacteria	0	0	0
Fungi	2	2	4
Bacteria (out side)	0	1	7
Fungi (out side)	3	2	8

4日間室温で培養後引き続き7日間30 $^{\circ}\text{C}$ で培養後の結果。Out sideはフィルターの外側に形成されたコロニー。

時間も異なる。バクテリアとカビのコロニー総数は No. 2 で最も多いが、これがサンプリング時間も最も長い。次に、フィルターの寒天培地への移動もこの順で行った。従って、外気の無菌フードへの混入もこの順で多くなることが予想される。従って、観察されたカビとコロニーの数から二つの理由の内のどちらがより可能性が高いのかを判定することはできない。

6. 平成17年度微生物培養結果

そこで、平成17年度にはこうした問題点の改良を加えたサンプリングと培養を行った。図1は平成17年度微生物採集における気球の飛行高度と、3つのフィルターのサンプリングを図示した。平成17年度の採集では、フィルターをフィルターフォルダーごと東京薬科大学へ持ち帰り、無菌循環型クリーンベンチ内でフィルターの培地への移動を行った。また、寒天培地の代わりに培地をしみこませた脱脂綿を用いることで、フィルターに物理的力を与えることをさけた。その結果生育した菌数を表3に示した。

この結果は平成16年度の結果と様々な点で事なっている。まず、生育したコロニーの数ははるかに少ない。また、カビの生育は観察されなかった。平成17年度の陸上での微生物サンプリング実験から、三陸大気球観測所周

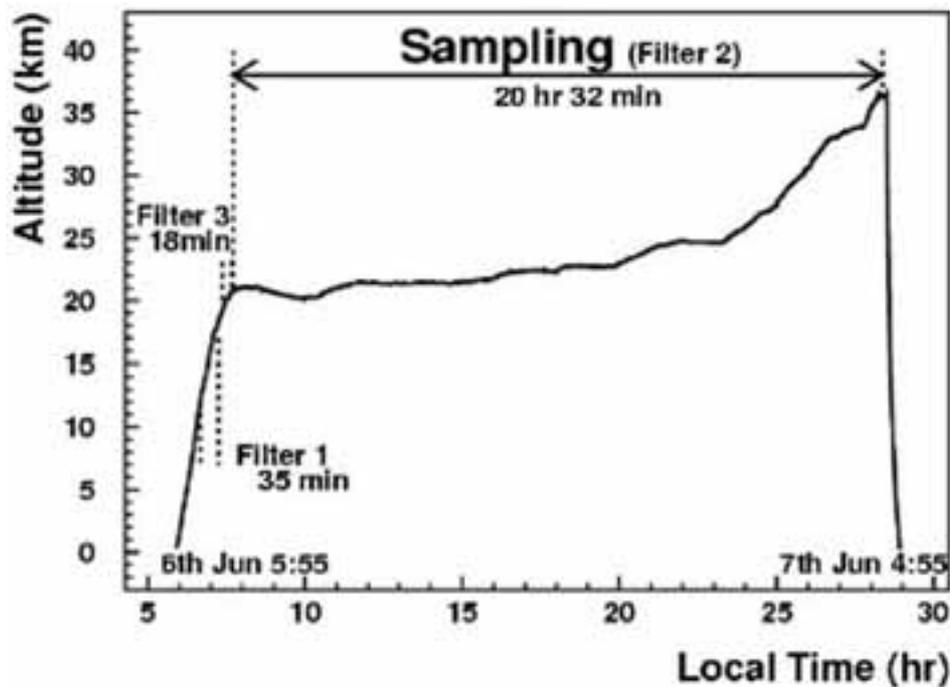


図1 平成17年微生物採集実験飛行高度および採集時間

表3 平成17年度採集フィルター生育コロニーおよびその性質

Filter	Strain	Color	Growth after UV illumination
1 (Cleaning)	BL511	Brown	+
	BL512	Purple	+
3 (Test)	BL531	Brown	+
2 (Sampling)	BL521	White	+

辺にはカビ胞子が多数浮遊していることが明らかとなっている。従って、17年度の結果とあわせて考えると、16年度に多数検出されたカビの胞子は気球観測所での大気の混入による可能性が高い。他方、平成17年度の採集ではカビ胞子は観察されなかった。3枚のフィルターから合計5株の細菌株が単離された。これらの細菌株に20分間紫外線照射した後の生育を試験した。この処理で通常の細菌は死滅する。今回得られた5株の細菌はいずれも20分紫外線照射後も生育が確認された。しかし、この実験は定性的な実験であり、これらの菌の紫外線耐性の強度を調べるためには今後定量的実験が必要である。今後、詳細な紫外線耐性実験とともに16SrRNA 遺伝子のクローニングと塩基配列決定をおこない。菌種の同定を行う予定である。

謝 辞

この成層圏における微生物採集実験は宇宙科学研究本部と東京薬科大学との共同実験として実施されたものである。この計画から実施までに多大な助言とご指導をいただいた宇宙科学研究本部 山下雅道教授をはじめ関係各位に感謝の意を表します。また、微生物採集装置の各機器の製作、気球の製作に尽力下さった関係各社の皆様にあつく感謝の意を表します。この実験にあたり、ご協力頂いた三陸大気球実験班各位に心より感謝の意を表します。

参 考 文 献

- [1] Rogers, L. A., and Meier, F. C., "The collection of microorganisms above 36,000 feet", *Natio. Geographic Soc. Stratosphere Series*. 2 (1936) 146.
- [2] Bruch, C. W., "Microbes in the upper atmosphere and beyond", *Airborne microbes: symposium of the society of general microbiology* (Gregory, P. A. and Monteith, J. L. Eds.), 17 (1967) 385. Cambridge University Press.
- [3] Imshenetsky, A. A., Lysenko, S. V., Kazakov, G. A. and Ramkova, N. V., *Microorganisms of the stratosphere. Life Scie. Space Res.* 14 (1976) 359-362.
- [4] 山岸明彦, 板橋志保, "成層圏での極限環境微生物の分布", 大気球シンポジウム (平成12年度)
- [5] 山岸明彦, 横堀伸一, 板橋志保, 並木道義, 山上隆正, "大気球を用いた極限環境微生物の探索", 大気球シンポジウム (平成13年度)
- [6] 山岸明彦, 板橋志保, 横堀伸一, 並木道義, 山上隆正, "成層圏・対流圏から単離した新規紫外線耐性菌", 大気球シンポジウム (平成14年度)
- [7] 山岸明彦, 横堀伸一, 板橋志保, 並木道義, 山上隆正, "気球シンポジウム大気球を用いた成層圏からの微生物の採集", 大気球シンポジウム (平成15年度)
- [8] 山岸明彦, 板橋志保, 横堀伸一, 飯嶋一征, 井筒直樹, 斉藤芳隆, 山上隆正, "大気球を用いた成層圏での微生物採集", 大気球シンポジウム (平成16年度)
- [9] 山岸明彦, 横堀伸一, 南川純一, 清水久美子, 山上隆正, 斉藤芳隆, 井筒直樹, 福家英之, 飯嶋一征, "成層圏における微生物採集", 大気球シンポジウム (平成17年度)
- [10] 飯嶋一征, 井筒直樹, 福家英之, 斉藤芳隆, 川崎朋実, 松坂幸彦, 並木道義, 太田茂雄, 鳥海道彦, 山上隆正, 山田和彦, 瀬尾基治, 山岸明彦, 横堀伸一, "微生物採集装置の開発", 宇宙航空研究開発機構研究開発報告 JAMA RR-05-012, 117-128 (2006).