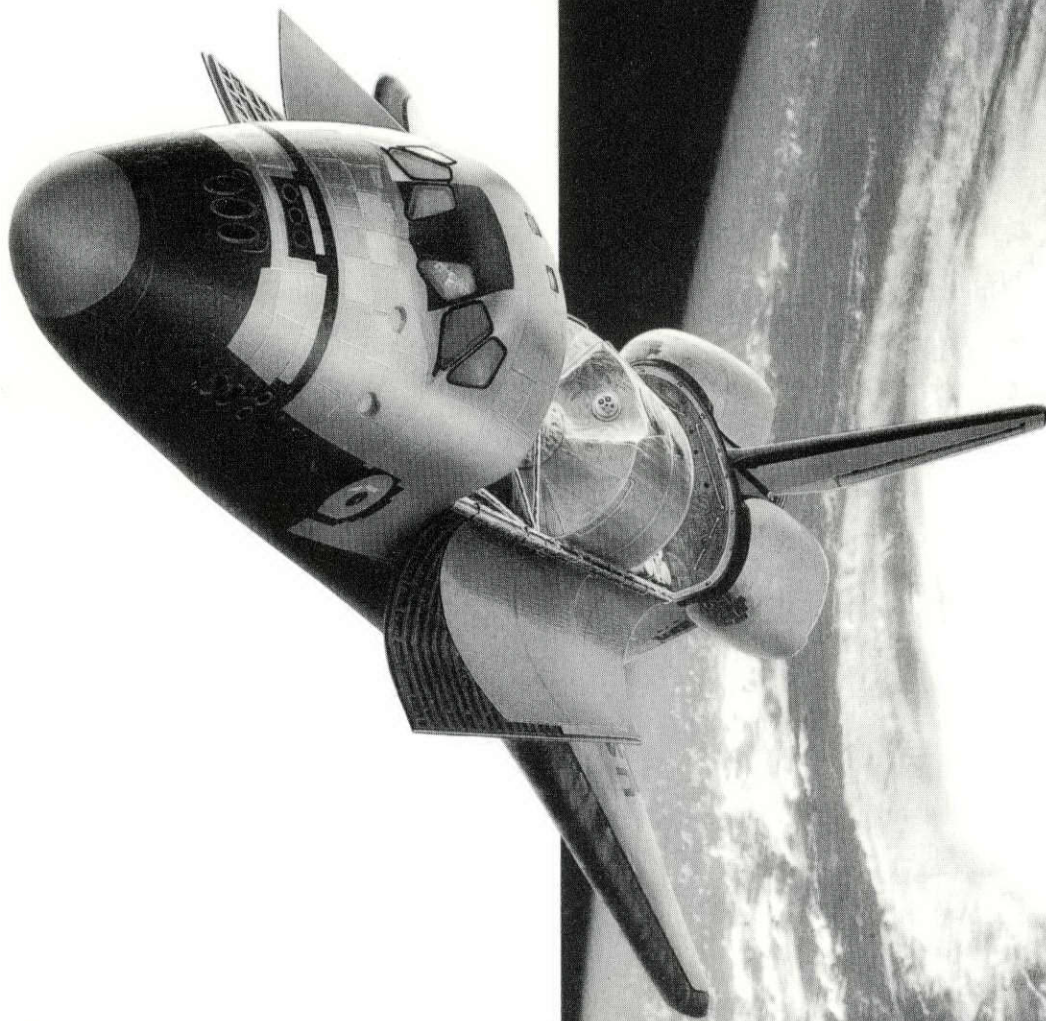


宇宙開発事業団技術報告

# IML-2 宇宙実験 成果報告



1996年 3月

# NASDA

NASDA-TMR-960004

宇宙開発事業団技術報告  
NASDA Technical Memorandum

IML-2 宇宙実験 成果報告  
Final Report of IML-2 Experiments

宇宙開発事業団

宇宙環境利用システム本部 宇宙実験グループ

Space Experiment Department  
Office of Space Utilization Systems  
National Space Development Agency of Japan

## まえがき

NASAが世界に呼びかけ、開始された国際協力による宇宙実験プログラムである国際微小重力実験室（IML）計画の2回目のミッションであるIML-2計画は、わが国が宇宙環境利用プログラムの一環として参加する本格的宇宙実験の3回目のフライトとなりました。IML計画は、第1回目（IML-1）が1992年2月に実施され、日本からは、二つの実験装置と実験テーマがそれぞれ実施され、つづいて、同年9月には日本独自のミッションとして、毛利衛宇宙飛行士が搭乗した、FMPT「ふわっと`92」が実施されました。

IML-2ミッションはこれらの宇宙実験の準備が最終準備段階に入ろうとしていた、1989年7月に宇宙開発委員会で参加が了承され、その年の11月にはNASAが日本の実験装置を含め搭載を内定したのを受けて、日本国内のテーマ募集と選定が行われました。同年12月25日に締め切られた時点で75テーマの応募があり、ライフサイエンス、微小重力科学などの分野から、最終的に12テーマの実験が選定されました。NASAもその後日本と共同研究する米国研究者4名を選定し、合わせて16名の代表研究者が日本の実験装置を利用し実験を行うこととなりました。

一方、NASAでの装置内定を期に、1990年2月にはIML-2のための実験装置の開発が開始されるとともに、1991年には実験適合性試験、詳細設計、フライトモデルの製作、試験などが進められ、その後も順調に開発が行われました。実験装置の主要部分は、1993年6月にNASAケネディー宇宙センターに輸送され、スペースラブへの組み込み、検査作業が行われました。

IML-2はIML-1と同様、NASAが打ち上げ経費を負担し、参加各国が搭載実験装置を提供する国際協力ミッションで、米国（NASA）、日本（NASDA）、欧州宇宙機関（ESA）、フランス国立宇宙研究センター（CNES）、カナダ宇宙機関（CSA）ドイツ航空宇宙機関（DLR）、ドイツ航空宇宙研究所（DLR）の7機関が、参加する13カ国の研究者を支援する形で行われました。このミッションに搭載された主要な実験装置は、全体で19種類、その内日本からは、6種類の実験装置が提供されました。研究分野も微小重力科学（材料科学、流体物理、臨界点物理、微小重力環境計測）やライフサイエンス（重力生物学、細胞生物学、発生生物学、宇宙医学、生理学、放射線生物学、バイオテクノロジー）など非常に広範囲であり、その中には各国の研究者が工夫を凝らした多彩な研究が盛り込まれ、最終的な実験テーマ数は82と、これまでのスペースラブミッションとしては最大規模となりました。

このミッションの実験を担当するペイロードスペシャリスト（搭乗科学者）は、参加する代表研究者が組織する会合（IWG）が各代表研究者から推薦された候補者を絞り込み、その中からNASAが決定することとなっており、多数の候補者から最終的にわが国の向井千秋博士に決定しました。向井博士は、わが国初の女性宇宙飛行士として搭乗し、NASAのアメリカ人宇宙飛行士とともに約2週間のフライト中、計画された膨大な実験の多くを担当しました。

IML-2の実験装置を搭載したスペースシャトル「コロンビア号」は、1994年7月8日の予定された時刻に打ち上げられ、7月23日に約15日間の飛行を終え無事帰還しました。

飛行後の実験結果は、これまでこのミッションに参加した代表研究者と多くの共同研究者によって、1年以上の時間をかけて解析が行われてきました。この報告書は、IML-2ミッションで、わが国が提供した6種類の実験装置を利用して行われた、日米合わせて16の研究テーマの成果の詳細と実験装置を開発、運用したNASAの技術成果についてとりまとめたものです。

これまで、各実験テーマの解析状況に関してはNASAが主催した、飛行後6カ月報告会と12カ月後の最終報告会において発表されており、日本においても1995年11月1日に行われた「IML-2宇宙実験成果報告会」にて発表されております。また、実験装置の稼働結果、不具合などについても、これまでに宇宙開発委員会技術評価部会にて検討され、評価意見、今後への反映事項などがまとめられております。

飛行後1年半余を経過した今、本報告書をまとめることができましたことは、参加していただいた全研究者、装置開発メーカーや実験運用、射場作業場などで支援をしていただいた関連企業の技術者各位のご協力の賜物であります。関係各位にあらためてお礼を申し上げるとともに、このミッションから得られた多くの科学的な成果と技術経験およびはじめての大規模な国際協力による宇宙実験の経験を、まもなく始まる宇宙ステーションの本格的利用に向けて有意義に役立てることができれば幸いです。

## 目次

1. IML-2プロジェクトの概要	
1.1 序	
1.1.1 IML-2計画の概要	3
1.1.2 IML-2計画の目的	3
1.2 搭載実験システムの概要	
1.2.1 スペースシャトル/スペースラブ	4
1.2.2 搭載実験装置	5
1.3 打上げまでの作業経過	
1.3.1 射場整備作業の経過	6
1.3.2 実験運用作業の経過	8
1.3.3 搭乗員訓練及び日本人搭乗科学技術者の健康管理の経過	9
1.4 打上げ飛行の結果	
1.4.1 打上げ結果の概要	12
1.4.2 軌道上飛行及び帰還の概要	12
1.5 実験運用の結果	
1.5.1 実験運用計画と結果の概要	13
1.5.2 日本人搭乗科学技術者の実験操作と健康管理の結果及び考察	13
1.6 飛行中及び帰還後実験研究者関連作業	
1.6.1 地上対照実験の実施	16
1.6.2 搭載試料の研究者への引渡し	16
1.6.3 実験成果の解析状況	17
1.7 総合評価	18
2. 実験装置開発成果	
2.1 水棲生物飼育装置(AAEU)	
2.1.1 装置概要	21
2.1.2 装置稼働状況	22
2.1.3 機能性能評価	24
2.1.4 反映事項	30
2.2 細胞培養キット(CCK)	
2.2.1 装置概要	31
2.2.2 装置稼働状況	33
2.2.3 機能性能評価	37
2.2.4 反映事項	41

2.3 電気泳動装置(FFEU)	
2.3.1 装置概要 .....	42
2.3.2 装置稼働状況 .....	43
2.3.3 機能性能評価 .....	45
2.3.4 反映事項 .....	55
2.4 放射線モニター装置(RRMD)	
2.4.1 装置概要 .....	57
2.4.2 装置稼働状況 .....	58
2.4.3 機能性能評価 .....	60
2.4.4 反映事項 .....	64
2.5 高温加圧型電気炉(LIF)	
2.5.1 装置概要 .....	65
2.5.2 装置稼働状況 .....	67
2.5.3 機能性能評価 .....	67
2.5.4 反映事項 .....	75
2.6 制振実験装置(VIBES)	
2.6.1 装置概要 .....	76
2.6.2 装置稼働状況 .....	78
2.6.3 機能性能評価 .....	78
2.6.4 反映事項 .....	83
3. 宇宙実験成果	
・微小重力下における魚の前庭順応機構の研究 (GOLDFISH) .....	87
藤田保健衛生大学 高林 彰	
・イモリの宇宙における産卵および受精卵の発生 (ASTRONEWT) .....	101
宇宙科学研究所 山下雅道	
・メダカの宇宙における交尾・産卵行動 (MEDAKA) .....	115
東京大学 井尻憲一	
・Early Development of a Gravity-Receptor Organ in Microgravity (OTOCONIA) .....	129
University of Texas M.L.Wiederhold	
・骨由来培養細胞の増殖・分化機能発現に及ぼす微小重力の影響 (OSTEOGENE) .....	141
東京医科歯科大学 桑井康宏	
・宇宙空間における細胞性粘菌の分化 (SPORE) .....	153
奈良県立医科大学 大西武雄	

・ Gravity and the Stability of the Differentiated State of Plant Somatic Embryos (PEMBSIS) . . . . .	163
State University of New York at Stony Brook A.D.Krikorian	
・ 電気泳動による線虫C.elegansの染色体DNAの分離 (CHROMOSOME) . . . . .	179
城西大学 小林英三郎	
・ 微小重力環境における高密度動物細胞培養液の分離精製実験 (ANTIBODY) . . . . .	193
日立製作所 奥沢 務	
・ Electrophoretic Separation of Cells and Particles from Rat Pituitary (PITUITARY) . . . . .	205
The Pennsylvania State University W.C.Hymer	
・ 宇宙船内における重粒子線による線量計測とその生物効果実験 (RADIATION) . . . . .	221
早稲田大学 道家忠義	
重粒子線による線量計測 (早稲田大学 道家忠義ら) . . . . .	221
D.radioduransのDNA修復能に対する微小重力の影響 (日本原子力研究所 渡辺 宏ら) . . . . .	235
宇宙天気予報とは (通信総合研究所 富田二三彦ら) . . . . .	243
大腸菌細胞とプラスミドDNAについて (宇宙開発事業団 長岡俊治ら) . . . . .	251
・ 多元系化合物半導体融液の均一分散・混合化 (MARANGONI) . . . . .	259
早稲田大学 平田 彰	
・ 微小重力下におけるTiAl系金属間化合物の組織制御とその機械的性質 (INTERMETALLICS) . . . . .	271
金属材料技術研究所 佐藤 彰	
・ Liquid Phase Sintering in a Microgravity Environment (SINTERING) . . . . .	283
The Pennsylvania State University R.M.German	
・ 自然対流と拡散に対する重力加速度揺らぎ (gジッタ) の影響 (CONVECTION) . . . . .	295
航空宇宙技術研究所 東 久雄	
・ 微小重力下での熱駆動流の研究 (CAPILLARY) . . . . .	307
宇宙開発事業団 古川正夫	
付録 略語表 . . . . .	325

# 1. IML-2プロジェクトの概要





## 1.1 序

宇宙開発事業団は、米国航空宇宙局(以下「NASA」という。)が推進する第2次国際微小重力実験室(The Second International Microgravity Laboratory, 以下「IML-2」という。)計画に参加して宇宙実験を行った。その概要について以下に述べる。

### 1.1.1 IML-2計画の概要

IML-2計画は、NASAが国際協力のもとに進めるスペースラブを利用した国際微小重力実験室(IML)計画の第2回目のものであった。IML計画は参加各国が実験装置を提供し、NASAが飛行の機会を提供する。NASA及び参加各国はその実験装置を使用して夫々の実験を行う。

IML-2計画では、米国、カナダ、ヨーロッパ、日本などの7機関が19の実験装置を提供し、13カ国の研究者が参加して81テーマの実験が行われた。日本では、宇宙開発事業団が6つの実験装置を提供し、日本の12テーマ及び米国の4テーマの実験を行った。

### 1.1.2 IML-2計画の目的

第一次材料実験(FMPT)計画等の開発成果を活用し、宇宙ステーション時代における有人宇宙実験に必要な共通実験技術及び装置開発のための技術の蓄積を図る。また、日本人宇宙飛行士の参加機会の確保を図る。

## 1.2 搭載実験システムの概要

### 1.2.1 スペースシャトル/スペースラブ

我が国の実験装置は、他の参加機関が提供する実験装置とともにスペースラブに組込まれたのち、飛行に供された。また、IML-2ミッションが搭載されたスペースシャトルには、STS-65という飛行番号が付されていた。図 1.2.1-1 にスペースシャトル・オービタにスペースラブ等が搭載された STS-65 / コロンビア号の外観図を示す。

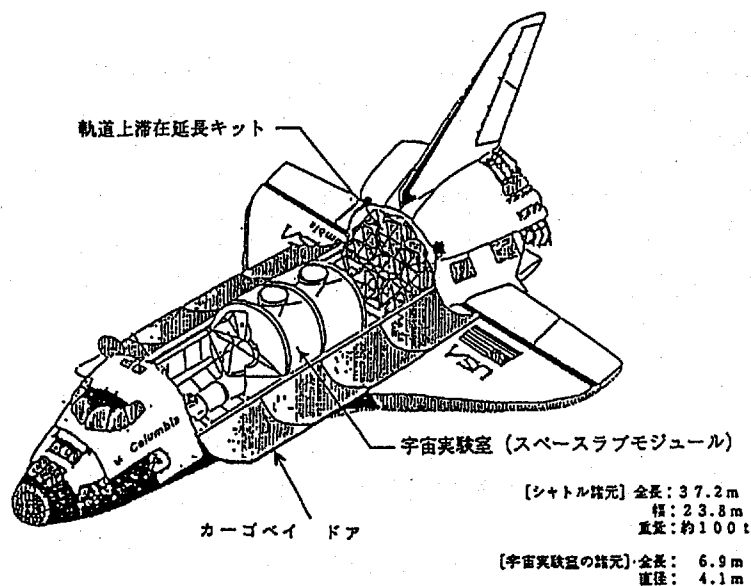


図 1.2.1-1 スペースラブ等が搭載されたコロンビア号外観図

スペースラブは、ヨーロッパ宇宙機関(ESA)が開発を担当したスペースシャトル・オービタ搭載型の宇宙実験室で、IML-2ではロングモジュールと呼ばれる円筒型の与圧モジュールが使用された。

与圧モジュールは、実験装置等を搭載するラックと実験試料等を収納するコンテナ等から構成され、スペースシャトル・オービタから、電力の供給、排熱及びデータ送受信のサービスを得て機能するシステムになっている。スペースラブの外観を図 1.2.1-2 に示す。

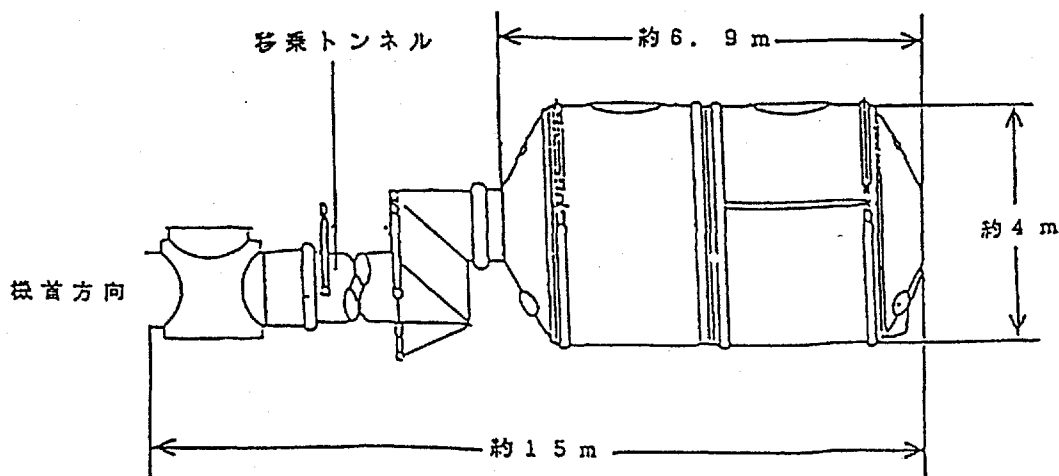


図 1.2.1-2 スペースラブの外観図

## 1.2.2 搭載実験装置

我が国の実験装置は、ライフサイエンス系4装置と材料系等2装置から構成され、スペースラブ内のラック No.3 とラック No.7 に搭載された。また、実験試料等が、ミッドデッキロッカー、オーバーヘッドコンテナに搭載された。

IML-2 実験装置ラックの外観図を図 1.2.2-1 に、搭載された実験装置と実験テーマの対応を表 1.2.2-1 に示す。

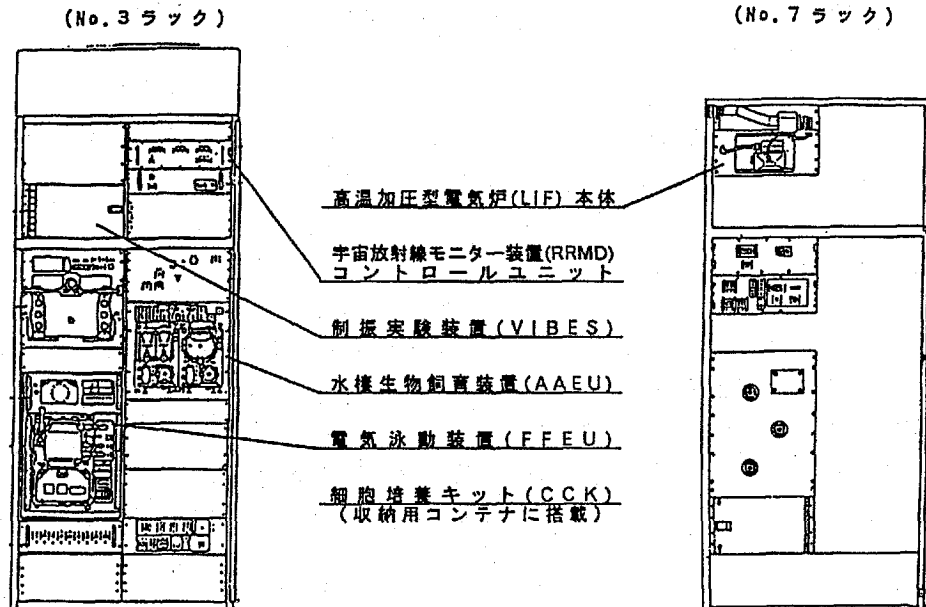


図 1.2.2-1 IML-2 実験装置搭載ラックの外観図

表 1.2.2-1 IML-2 日本関係実験装置／実験テーマ一覧

実験装置名	日本の実験テーマ	米国の実験テーマ
水棲生物飼育装置	「微小重力下における魚の前庭順応機構の研究」 高林 彰 (藤田保健衛生大学) 「イモリの宇宙における産卵および受精の発生」 山下 雅道 (宇宙科学研究所) 「メダカの宇宙における交尾・産卵行動」 井尻 憲一 (東京大学)	「微小重力下での重力感受器官の初期発生の研究」 M. L. ヴィダホルド (テキサス大学)
細胞培養キット	「骨由来培養細胞の増殖・分化機能発現に及ぼす微小重力の影響」 桑井 康宏 (東京医科歯科大学) 「宇宙空間における細胞性粘菌の分化」 大西 武雄 (奈良県立医科大学)	「植物胚芽の分化状態の安定性への重力関与の研究」 A. D. クリコリアン (ニューヨーク州立大学)
電気泳動装置	「電気泳動による線虫 <i>C.elegans</i> 染色体 DNA の分離」 小林 英三郎 (城西大学) 「微小重力環境下における高密度動物細胞培養液の分離精製実験」 奥沢 務 (日立製作所)	「ラット脳下垂体細胞及び細胞内顆粒の電気泳動分離実験」 W. C. ハイマー (ペンシルバニア州立大学)
放射線モニター装置	「宇宙船内における重粒子線による線量計測とその生物効果実験」 道家 忠義 (早稲田大学)	
高温加圧型電気炉	「微小重力における TiAl 系金属間化合物の組織制御とその機械的性質」 佐藤 彰 (金属材料技術研究所) 「多元系化合物半導体融液の均一分散・混合化」 平田 彰 (早稲田大学)	「液相焼結における重力の効果」 R. M. ジャーマン (ペンシルバニア州立大学)
制御実験装置	「自然対流と拡散に対する重力加速度ゆらぎ( $g$ ジッタ)の影響」 東 久雄 (航空宇宙技術研究所) 「微小重力下での熱駆動流の研究」 古川 正夫 (宇宙開発事業団)	

### 1.3 打上げまでの作業経過

#### 1.3.1 射場整備作業の経過

##### 1.3.1.1 搭載実験装置の NASA 搬入

ライフサイエンス実験系の装置を平成5年6月30日(電気泳動装置(FFEU)は8月14日)に、材料実験系装置を同7月14日(制振実験装置(VIBES)は12月6日)に、米国フロリダ州のNASAケネディ宇宙センター(KSC)に搬入し、搬入後、輸送後射場整備作業を実施し、ライフサイエンス実験系及び材料実験系の装置を同7月30日(FFEUは9月1日、VIBESは4月5日)にNASAへ引渡(ターンオーバー)した。図1.3.1.1-1に、実験装置のNASA搬入以降の射場整備作業の実施スケジュールを示す。

##### 1.3.1.2 搭載実験装置の射場整備作業

ターンオーバー後は、KSCでの作業としてNASA主体のオンライン作業に移行した。オンライン作業は、実験装置をフライトトラック及びフライトフロアに搭載しインターフェースを確認するレベルⅣ、フライトフロアをスペースラブモジュールに搭載しインターフェースを確認するレベルⅢ/Ⅱ、それ以降のレベルに大きく分かれる。レベルⅢ/Ⅱが終了すると、スペースラブはO&C(Operations & Checkout)ビルからOPF(Orbiter Processing Facility)に移りオービタのカーゴベイに搭載されるレベルⅠ作業を行う。

IML-2のレベルⅣ IVT(インターフェース・ベリフィケーションテスト)及びMST(ミッションシーケンステスト)は平成6年1月に実施され、レベルⅢ/Ⅱ IVT及びICT(インターフェース・コンパティビリティテスト)は同年3月に行われた。これら一連のNASAオンライン作業において宇宙開発事業団は、フライトハードウェア及び地上支援装置の整備、テスト中のデータモニタ・評価等に関する技術支援を行った。又、これら各オンライン作業の間に搭乗員訓練及び電気泳動装置のバイオクリーニング等の宇宙開発事業団によるオフライン作業が実施された。

レベルⅢ/Ⅱ作業の終了にともない平成6年3月28日～4月1日にNASDA最終確認審査会を開催し、レベルⅠ作業への移行が可能であることを確認した。その後のNASA作業も順調に進み、コロンビア号は、同5月9日にOPFからVAB(Vehicle Assembly Building)へ、さらに同5月15日にVABから射点へ移行した。

##### 1.3.1.3 生物試料等準備作業

生物試料の準備、処理についてはハンガーLと呼ばれるライフサイエンス支援専用の施設が使用されている。宇宙開発事業団では、平成5年9月～10月及び平成6年4月～5月の2回にわたって、リハーサルを実施し、試料準備に備えた。平成6年6月2日より、実験研究者の参加を得てハンガーLにて生物試料の準備作業に入った。その後、同6月23日にNASAより打上げ日として同7月8日と決定されたことを受け、以後所定のスケジュールに沿って生物試料の調製作業及び実験機材の整備作業を行い、打上げ直前にスペースシャトルに搭載(これを「レイトアクセス」という。)した。このレイトアクセスの概要を次に示す。





務の3交代制(実験装置運用作業)のシフト勤務を行い、引継方法及び実験経過記録の取り方を考慮した訓練も同時に行った。

また、これらのシミュレーションに先立ち国内でドライラン(机上訓練)等要員訓練を行った。

1) CS#1 (Cadre Simulation #1)

Cadre (NASA の運用要員の呼称)内の各種インターフェースの確立を目的としたシミュレーション。宇宙開発事業団からは主要運用要員がオブザーバとして参加した。

2) CS#2 (Cadre Simulation #2)

上記シミュレーションの第2回目。

3) CPS#1 (Cadre PI Simulation #1)

Cadre と PI チーム(宇宙開発事業団を含む。)のインターフェースの確立を目的としたシミュレーション。

4) CPS#2 (Cadre PI Simulation #2)

上記シミュレーションの第2回目。

5) JIS#1 (Joint Integrated Simulation #1)

NASA ジョンソン宇宙センター(JSC)のミッションコントロールセンター(MCC)が参加する統合シミュレーション。

6) JIS#2 (Joint Integrated Simulation #2)

上記シミュレーションの第2回目。

### 1.3.2.2 実験運用装置等の準備

NASA の POCC 計算機システムの端末に組み込んだ IML-2 実験運用ソフトウェアの検証作業を平成6年4月に実施した。

また、実験装置の稼働状況を監視する EGSE (地上支援装置)を同4月に POCC 内に設置し、さらに打上げ直前には、これらの最終機能確認を行い問題のないことを確認した。

### 1.3.3 搭乗員訓練及び日本人搭乗科学技術者の健康管理の経過

#### 1.3.3.1 搭乗員訓練の経過

搭乗員に対する実験訓練は図 1.3.3.1-1 に示す日本国内訓練を平成5年5月に終了した。同8月には向井搭乗科学技術者(PS)が渡米し、飛行準備訓練、NASA 側実験訓練を米国で開始した。

NASA / マーシャル宇宙飛行センターの PCTC (Payload Crew Training Complex)での訓練は平成5年10月から行われた。その時点から打上げまでの訓練作業の経過スケジュールを図 1.3.3.1-2 に示す。

主な訓練は以下の通りである。

- 1) 実験テーマ毎の操作訓練及び実験予定スケジュールに沿ったタイムライン統合訓練



- 2) 特定テーマを対象とする熟達訓練及び実試料を使用した操作訓練(一部 KSC で実施)
- 3) 搭載実験装置のミッションシーケンステストへの参加訓練
- 4) スペースシャトル/スペースラブ搭乗のための飛行準備訓練

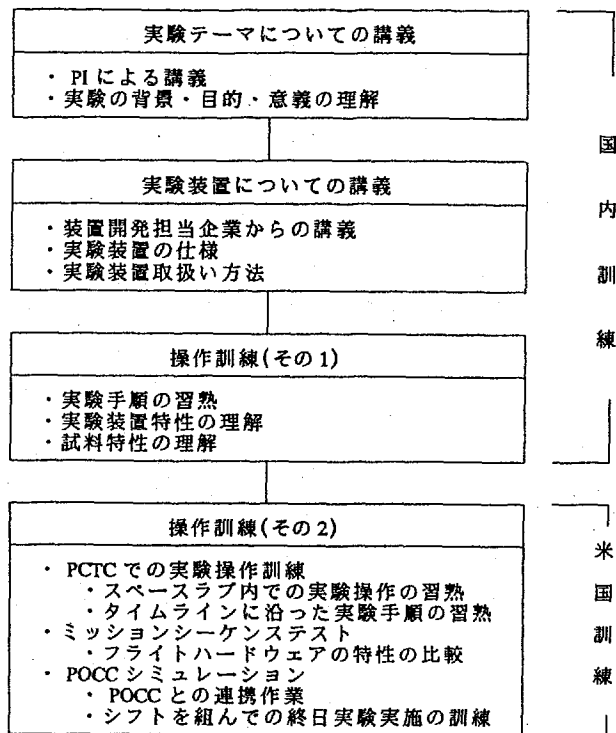


図 1.3.3.1-1 実験訓練実施の流れ

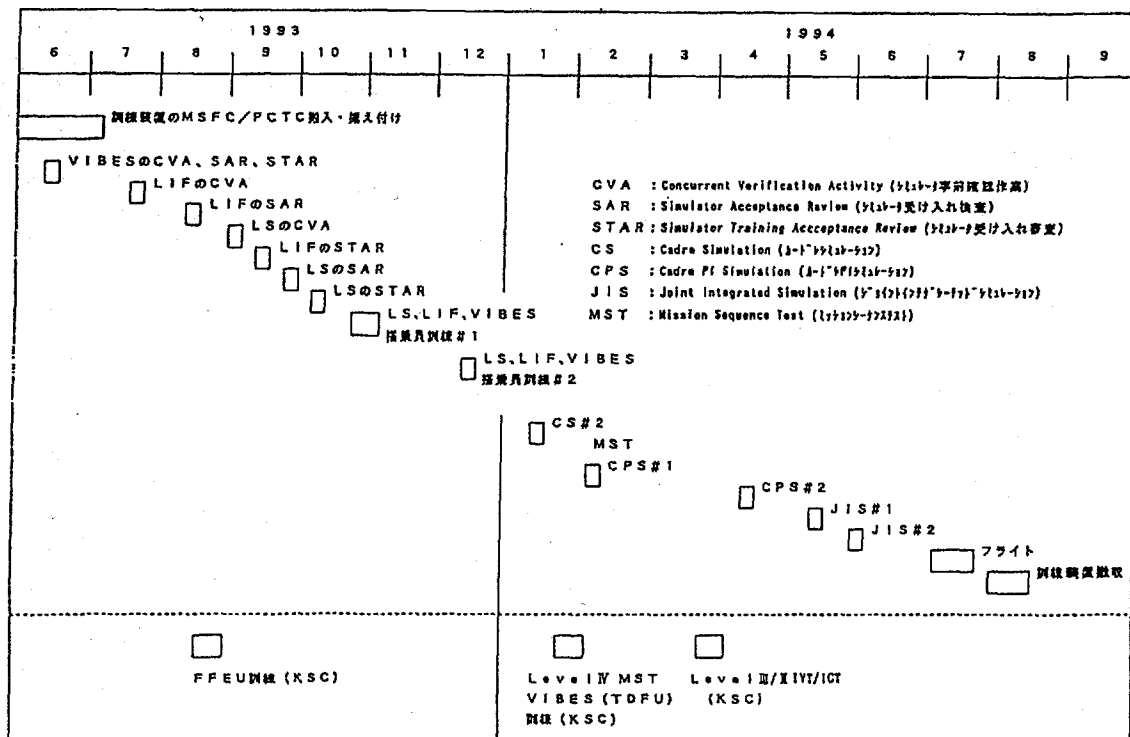


図 1.3.3.1-2 搭乗員訓練スケジュール

### 1.3.3.2 日本人搭乗科学技術者の健康管理の経過

平成4年のIML-2 / PSの選定後、NASAの規定に基づく年次医学検査の支援、宇宙開発事業団による年1回の健康診断を実施した。

打上げ3ヶ月前から、宇宙開発事業団 / 宇宙航空医師(FS)をNASA ジョンソン宇宙センターに派遣し、必要な訓練及びシミュレーションを実施した。

打上げ直前には、宇宙開発事業団 / FSは、NASA / FSによる以下の健康管理業務の支援を行った。

1) 打上げ10日前医学検査

平成6年6月28日に内科診察、尿血液検査を実施した。

2) 打上げ2日前医学検査

同7月4日に血液尿検査検体採取を実施した上で、7月6日内科診察を実施した。

3) 打上げ当日医学検査

打上げ当日朝、KSC / スーツ装着室において、PSの健康状態を確認した。

以上いずれにおいても、飛行に影響をおよぼすような医学的問題は発見されなかった。

## 1.4 打上げ飛行の結果

### 1.4.1 打上げ結果の概要

IML-2を搭載したスペースシャトル・コロンビア号は平成6年7月8日午後0時43分(米国東部夏時間)に米国NASAケネディ宇宙センター(KSC)から打上げられた。打上げ時の天候(予報)は、晴、南東風約5~8m/秒であった。

コロンビア号の発射約19時間前には予定どおり生物試料の搭載作業(レイトアクセス)が行われ、約8時間前には外部タンクへの燃料、酸化剤の充填を開始、約3時間前には所定の健康管理、検査を終えた搭乗員が搭乗した。その後、発射約6.6秒前にメインエンジンに点火、推力が正常であることが確認された後、固体ロケットブースタ(SRB)に点火し、リフトオフした。リフトオフ後、コロンビア号は姿勢を変更しながら上昇を続け、約40分後には軌道修正用のエンジンを噴射して所定の円軌道に投入された。

### 1.4.2 軌道上飛行及び帰還の概要

コロンビア号は、当初約14日間の飛行予定であったが、着陸日のKSCの天候が思わしくなかったため、飛行期間を1日延長した。

この約15日間の飛行期間中、コロンビア号は我が国の16テーマを含む81テーマの実験を実施するとともに広報イベント等を行った後、7月8日午前6時38分(米国東部夏時間)にKSCに帰還した。

IML-2の打上げ、飛行の計画と結果の概要を表1.4.2-1に示す。

表 1.4.2-1 IML-2の打上げ、飛行計画と結果の概要

項目	計 画	実 績
打上げ日	1994年7月8日*	7月8日
打上げ時刻	午後0時43分*	午後0時43分
打上げ場所	KSC、射点LC-39A	LC-39A
軌道高度	約300km(160/163海里)	投入時高度： 160.3~162.9海里
軌道傾斜角	約28.5度	同左
姿勢制御方式	重力勾配安定方式 (機尾が地球方向へ向く姿勢安定)	同左
飛行期間	13日18時間	14日17時55分間
周回周期	約90分	同左
主要シーケンス・オブ・イベント	(経過時間)日/時:分:秒	(経過時間)日/時:分:秒
リフトオフ	0/00:00:00	0/00:00:00
軌道投入(軌道修正エンジン噴射)	0/00:42:00	0/00:39:55
ペイロードベイドア 開	---	0/01:36:00
スペースラブ アクチベート	0/03:15:00	0/03:14:00
スペースラブ デアクチベート	13/10:55:00	13/11:15:00
ペイロードベイドア 閉	---	14/14:27:05
デオービット パーン	13/16:56:05	14/16:57:38
ランディング	13/17:56:00	14/17:55:00
着陸地	米国フロリダ州ケネディ宇宙センター(KSC)	同左
着陸日	1994年7月22日*	7月23日
着陸時刻	午前6時43分*	午前6時38分
代替着陸地	米国カリフォルニア州 ドライデン飛行研究センター(DFRC)	使用せず

(注) \* 6月23日のNASA/KSCでのFRR(飛行準備完了審査)において設定された。  
なお、本表では全て米国東部夏時間で示す。

## 1.5 実験運用の結果

### 1.5.1 実験運用計画と結果の概要

我が国の実験装置による IML-2 搭載実験は、ライフサイエンス実験関係 11 テーマ、材料実験関係 5 テーマの合計 16 テーマが、14 日間のスペースシャトル飛行中に実施された。

IML-2 搭載実験に係るタイムライン(実験予定スケジュール)の実績の概要を図 1.5.1-1 に示す。実験は概ね順調に実施された。当初計画と異なる点を次項に示す。

#### 1) HRM ch.7 (ライフサイエンス系)データ不具合

ライフサイエンス系実験装置の軌道上での起動時から、ライフサイエンス系のテレメータデータを受信することができなかった。原因は、NASA シャトル/スペースラブの HRM (High Rate Multiplexer) のチャンネル 7 (ライフサイエンス系のチャンネル) の不具合と推定され、IFM (In Flight Maintenance、軌道上修理) の結果、コネクタの接触不良であることがわかり、修理され、テレメータデータを受信することができた。放射線モニター実験に関しては、実験開始が遅れたことから当初予定していた 4ヶ所の計測のうち、ポジション 4 (ラック No. 3 表面) での計測が取りやめられた。

#### 2) 電気泳動装置不具合

FFEU (電気泳動装置) 冷却水ループの不具合のため 2 日間にわたり IFM を実施し、装置の修理に成功した。IFM のため、3 つの電気泳動実験はいずれも実験時間を短縮して実施された。実験中、本不具合は再発しなかったが、泳動槽に気泡の存在が推測され、実験結果にかなりの影響を与えたと推定される。

#### 3) イモリの死亡

飛行 5 日目 A-2 タンクのイモリが死亡したため、他のイモリやメダカに悪影響を与えないように当該タンクを引き抜き収納した。飛行 9 日目に A-1 タンクのイモリが死亡した。今回は A-1 タンクに入っていた卵を生かすため、イモリを IFM でタンクから取り出し、タンクは AAEU に戻した。

#### 4) 飛行期間の延長

KSC の天候不順のため、直前になって着陸が 1 日延期された。スペースラブではすでにディアクティベーション(実験装置完了作業)がされており、追加の実験操作は行われなかった。

### 1.5.2 日本人搭乗科学技術者の実験操作と健康管理の結果及び考察

IML-2 の各実験は向井千秋搭乗科学技術者(PS)を含むパイロットクルー 4 名が 2 名ずつ 12 時間シフト(レッドシフト、ブルーシフト)に分かれ実施された。パイロットクルーとは、ミッションスペシャリスト(MS)のリック ヒープ、ドン トーマス、リロイ チャオ及び向井パイロードスペシャリストのことを示し、向井 PS は MS のリック ヒープとともに軌道投入直後から作業を行うレッドシフトにて実験作業を行った。一部の実験で操作が必要な場合はパイロットクルーの他にパイロットのジェームズ ハルセルや MS のカール ウォルツが実験作業を行った。



向井 PS を含む各搭乗員は、手順書に定められた実験手順を問題なく実施した。また、電気泳動装置の冷却水ループの修理や HRM の修理等の異常事態に対する処置についても地上の実験運用管制所との連携により効率的かつ的確な作業を行った。

飛行中の PS の健康管理については、地上からの NASA / 宇宙航空医師 (FS) による 24 時間体制の医学サポートが実施され、宇宙開発事業団の FS (2 名) は、PS の覚醒時間中、健康状態のモニターおよび実験手順の変更に伴う安全確保等の医学サポートの支援を行った。また、帰還後は、NASA / FS とともに着陸直後の診察、血液尿検査、3 日目に内科診察、血液尿検査、メディカルデブリーフィング(飛行中の医学的エピソードの聴取、医薬品服用の有無等の調査)を実施した。

PS の健康状態は、飛行中、帰還後ともに良好であった。

以上より、搭乗員訓練および向井 PS の健康管理の目的は充分達成されたといえる。

## 1.6 飛行中及び帰還後実験研究者関連作業

### 1.6.1 地上対照実験の実施

ハンガーLにおいては、EMA (Experiment Monitoring Area)と呼ばれる POCCと同様に軌道からのダウンリンク・データのモニタ等を行うことのできる部屋がある。IML-2では、EMAで取得した実験装置のダウンリンクデータ及びPOCCからFAXにて送られてきた実験進捗状況サマリを基にして、7月8日のIML-2打上げ後各実験の特性により、2～4時間の遅れ(RRMDの一部のみ24時間遅れ)で軌道上実験を追従する形で地上対照実験を行った。地上対照実験の概要を表1.6.1-1に示す。

地上対照実験は実験研究者主体で実施され、宇宙開発事業団は軌道上実験のモニタあるいは上記データの実験研究者への配布等の作業を24時間/2交替で行うことによりこれを支援した。

ハンガーLでの地上対照実験は、軌道上実験と連携をとりつつ、また地上実験試料の生育状態等を観察して軌道上実験の作業へ反映しつつ無事終了した。

表 1.6.1-1 地上対照実験の概要

試料名(実験コード)	主要使用機材	制御・モニタ項目	主要実験内容
金魚(GOLDFISH) メダカ(MEDAKA) イモリ(ASTRONEWT) イモリ卵(OTOCONIA)	AAEU (BBM)	温度, 明暗周期, pH, 水圧, 流量, 溶存酸素量	・観察と背光反射測定 ・観察と給餌 ・観察とホルモン注射 ・観察と色素染色
細胞性粘菌(SPORE)	インキュベータ	温度, 湿度	培養と観察
骨由来細胞(OSTEOGENE)	インキュベータ	温度, 湿度, CO <sub>2</sub> 濃度	培養と観察
高密度動物細胞 (ANTIBODY)	インキュベータ	温度, 湿度, CO <sub>2</sub> 濃度	培養と観察
ラット細胞(PITUITARY)	インキュベータ	温度, 湿度, CO <sub>2</sub> 濃度	培養と観察
乾燥菌体(RADIATION)	インキュベータ	温度	培養と乾燥菌体の活性化

### 1.6.2 搭載試料の研究者への引渡し

#### 1.6.2.1 材料実験系試料

LIFの試料は9月中旬にNASAからの引渡しを受けた。

#### 1.6.2.2 ライフサイエンス実験系試料

ライフサイエンス実験系の試料は、帰還後早期のNASAによる作業によりミッドデッキ及びスペースラブ・モジュールより取り出さ(これを「アーリーリムーバル」という。)れた。着陸当日は、その3時間後までに動植物細胞、粘菌といった培養実験の試料等がミッド

デッキから、また6時間後までに金魚・メダカ等の水棲生物及び電気泳動実験の試料がスペースラブより取り出され、各々ハンガーLまで運ばれた後、宇宙開発事業団に引き渡された。また、翌日(33時間後)には残りの試料(RRMDの生物試料)の他、ビデオテープ、フィルム等が引き渡された。

これらの実験試料はNASAよりの引渡しの後、即座に実験研究者に引き渡され、飛行後実験あるいは帰還後処理に供された。

#### 1.6.2.3 ライフサイエンス実験系帰還後作業(ハンガーL)

ライフサイエンス実験では、試料が生存している場合、重力への再適応のために帰還後時々刻々と状態が変化するため迅速に観察/処理する必要がある。

このため、水棲生物実験においては、実験装置より試料(金魚、メダカ、イモリ/イモリ卵)を取り出した後、行動観察や卵の孵化率の確認が行われ、各々の実験目的に応じて飼育及び解剖/固定が行われた。

また、一部の電気泳動実験では帰還後の試料により地上における泳動実験が行われ、粘菌実験では胞子の発生率の確認が行われた。また、RRMDの試料の一部についても電気泳動による分離が行われた。その他の試料についても、凍結状態を維持したまま研究者の実験室へ返送され、その後の解析に供された。

#### 1.6.3 実験成果の解析状況

実験成果に関する宇宙開発委員会への中間報告については、実験研究者から提出された搭載実験終了後6ヶ月の報告をもとに平成7年3月8日に実施し、実験終了後1年後の報告を平成7年10月に宇宙開発委員会に報告するとともに、11月1日に成果報告会等を開催した。

また、実験結果の解析にあたっては、実験研究者に対して、実験装置開発側として宇宙開発事業団が協力を行い、今後の宇宙実験計画へ反映していく予定である。



## 1.7 総合評価

IML-2は、FMPTに続く本格的宇宙実験として、有人宇宙実験に必要な共通技術及び装置開発のための技術の蓄積並びに日本人搭乗科学技術者の参加機会の確保を目的として実施された。

日本が提供した6台の実験装置は全て稼働し、当初の計画どおりライフサイエンス実験および材料実験等を合わせて計16テーマ(内米国4テーマ)の実験が実施され多くの貴重なデータを取得することができた。また、向井千秋宇宙飛行士がペイロードスペシャリストとしてスペースシャトル「コロンビア号」に搭乗し、15日間(当初予定14日間)にわたり各国の搭載実験を実施した。

以上のとおり、IML-2の所期の目的は達成されたものと考えられる。なお、電気泳動装置の起動不良、恒温恒湿槽の湿度制御異常などを含め、今後の宇宙実験計画に対する反映事項が明らかにされており、ニューロラブ、MSL-1、宇宙ステーション計画等に確実に反映されることが重要である。

## 2. 実験装置開発成果



## 2.1 水棲生物飼育装置(AAEU)

### 2.1.1 装置概要

水棲生物飼育装置は微小重力環境下で小型の水棲生物を19日間以上にわたり飼育、維持することが可能な装置で、宇宙でこれらの生物の産卵、受精、胚発生などの生物学実験や、生理学、行動学などの実験に応用できる。(図 2.1.1-1)

#### 仕様

生物試料収容水槽	アクアリウムパッケージ水槽(カセット式) フィッシュパッケージ水槽	内容量 240 ml 内容量 3300 ml	4 個 1 個
生命維持機能 -制御系 -生命維持期間 -O <sub>2</sub> 供給/CO <sub>2</sub> 除去 -温度制御 -排泄物除去	アクアリウムパッケージ、フィッシュパッケージを独立に制御 19日間以上 人工肺によるキャビンエアとのガス交換 15～25℃ 硝化菌担持シボラックス、活性炭によるアンモニア、有機物等の除去		
装置寸法/重量	483W × 444H × 606D (mm)	約 78 kg	

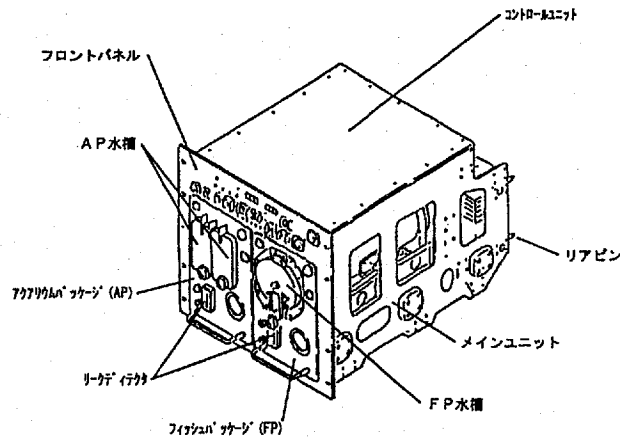


図 2.1.1-1 AAEU 外観図

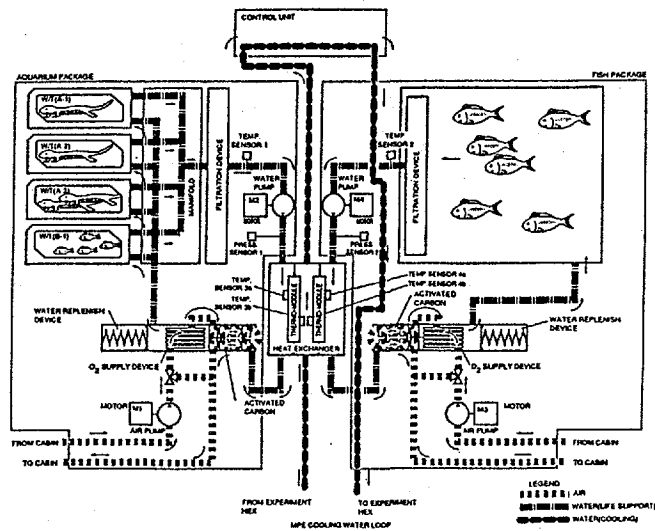


図 2.1.1-2 AAEU 系統図

## 2.1.2 装置稼働状況

- 1) 水棲生物飼育装置(AAEU)は、レイトアクセスによりパワー ON され、その後アーリーアクセスにより、アクアリウムパッケージ(AP)、フィッシュパッケージ(FP)を取出すまで連続運転された。軌道上での温度データを図 2.1.2-1 に、圧力データを図 2.1.2-2 に示す。AP 温度は 24 °C に設定されていたが、A-1 及び A-2 タンクのイモリが死亡したために MET Day 09 / 00 時頃に 23 °C に設定変更された。全期間を通じて、AP、FP の各温度は、設定値に対して ± 0.5 °C 以内に制御されていた。圧力は AP / FP 共に規定値 (0.12 ~ 0.6 kg/cm<sup>2</sup>G) 内ではあるが、AP が 0.27 ~ 0.16 kg/cm<sup>2</sup>G、FP が 0.33 ~ 0.27 kg/cm<sup>2</sup>G と、FP の方がやや高い圧力を維持していた。これは AP 側はイモリ/メダカ観察のためのタンク着脱があり、脱時に水が微小リークし、一方エアが混入して人工肺より抜けるためである。

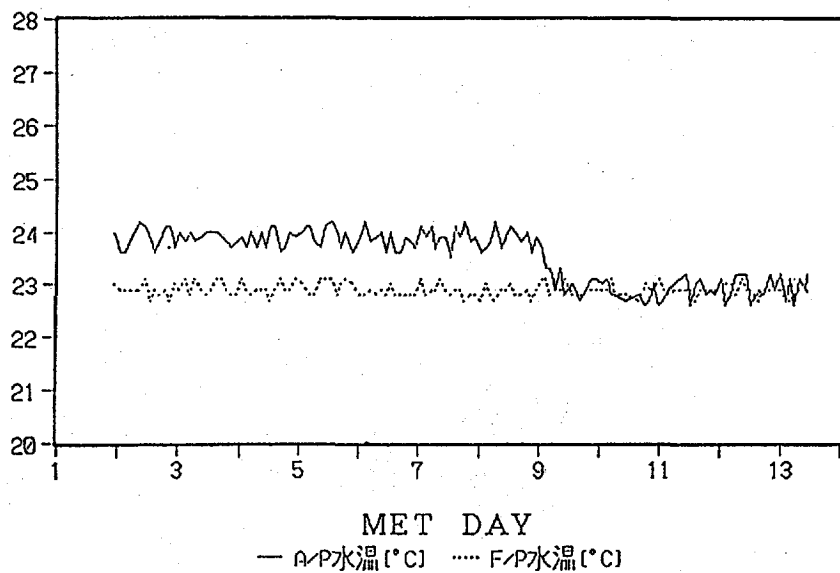


図 2.1.2-1 AAEU 水温データ推移

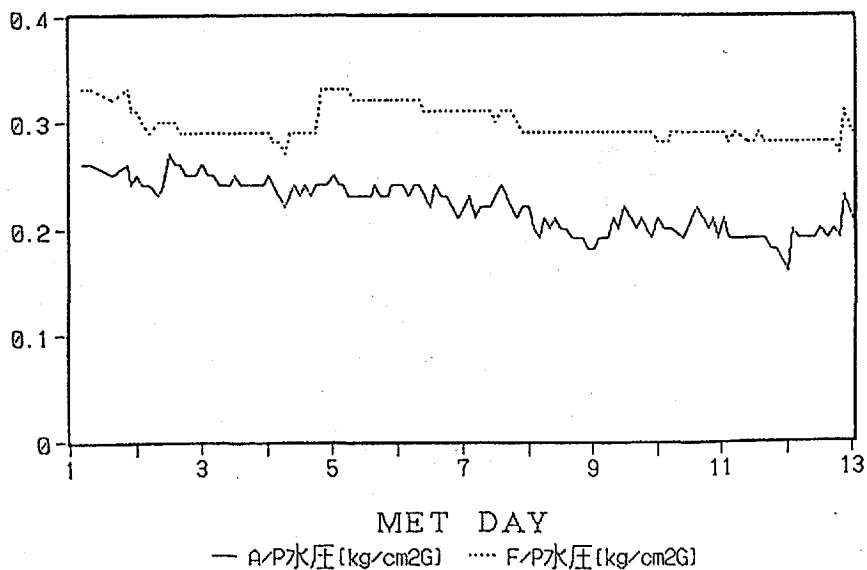


図 2.1.2-2 AAEU 水圧データ推移

2) FP又はAPへ飼育水を補給するためのアキュムレータのストロークを図 2.1.2-3 に示す。レイトアクセス時のストロークは、APが3.3、FPが4.1であったが、MET Day 00 / 22 時頃のクルー報告では、APが1.5、FPが0.5となっていた。その後のアキュムレータへの注水状況は、以下の通りである。

- AP 1回目 30 cc 注水 MET Day 09 / 06 時 35 分
- 2回目 20 cc 注水 MET Day 12 / 19 時 40 分
- FP 1回目 30 cc 注水 MET Day 00 / 23 時 59 分
- 2回目 30 cc 注水 MET Day 04 / 18 時 48 分
- 3回目 30 cc 注水 MET Day 12 / 19 時 40 分

FPでは、この注水に対応してアキュムレータストロークが復帰し、その後徐々にストロークが減少する傾向が、データ上も明らかであるが、APでは、前述のタンク着脱の影響があつて、評価できない。

3) APの各タンクでは、QD (Quick Disconnecter) 着脱に伴うエア混入が観察された。特に、メダカのB-1タンクでは、大きなエアが観察され、タンクの着脱に伴って徐々に成長していった。

4) モータ電流、サーモジュール(TM)温度については、特に異常は見られなかった。

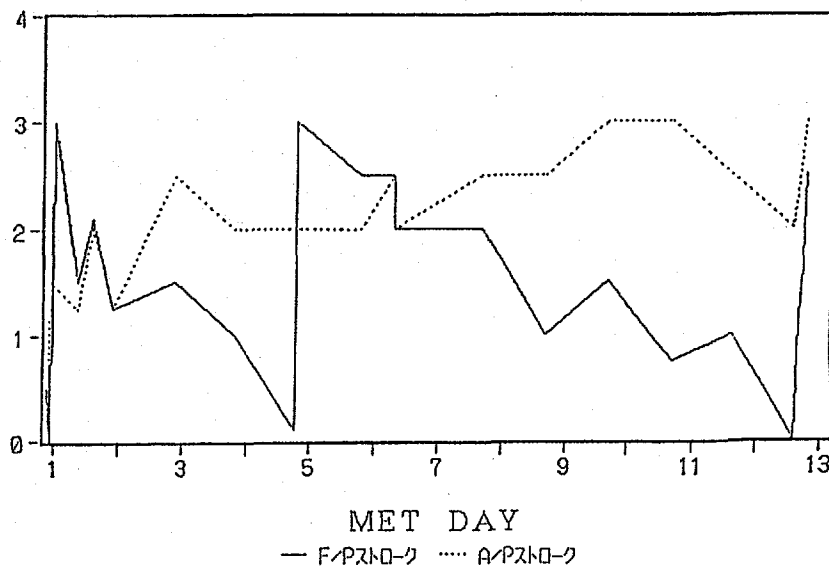


図 2.1.2-3 AAEU ストロークデータ推移

## 2.1.3 機能性能評価

### 2.1.3.1 減水特性評価

- 1) 打上げ直後に、AP、FP共に大きく減水した原因としては、装置に残留していたエアが打上げ時の振動及びその後の微小重力状態の影響で流動し、人工肺から抜けたと推定される。又エアが装置内に残留する要因としては、QD着脱によるエア混入及び打上げ前の充填量のばらつきが考えられる。QD着脱によるエア混入量を確認するため、装置作動状態でA-1及びB-1タンクについて、5回の着脱操作を行い、その前後でのタンク重量を計測した結果は以下の通りである。

表 2.1.3.1-1 QD 脱着によるエア混入量

項目	タンク	A-1	B-1
満水重量(g)		1386.4	1400.4
着脱後重量(g)		1380.8	1394.6
エア混入量(cc)		5.6	5.8
エア混入量(cc) 着脱1回当たり(cc)		1.12	1.16
エア混入量(cc) 着脱1回当たり平均(cc)		1.14	

又パッケージと本体側とのQDについては、タンクQDに対し、1.3倍長いため、 $1.14 \times 1.3 \div 1.5$  ccのエア混入が生じると考えられる。

この結果を用いて、AP、FPへのQD着脱によるエア混入量を推定すると、表2.1.3.1-2に示すように、APで12.1 cc、FPで7.5 ccとなる。また、FPは、金魚を入れた時に、金魚が浮き袋を調節するために吸うエアとして、25 ccのエアを、別に注入していた。

表 2.1.3.1-2 AP, FP へのエア混入量推定

QD 着脱事象	AP	FP
AFDU 取付	1.5 cc	-
AFDU 脱着(試料入れ)	-	1.5 cc + 25 cc *1
タンク脱着(試料入れ)	$1.14 \times 4ヶ分 = 4.6$ cc	-
AFDU 取出し、 H/C バイパス配管取付	1.5 cc	1.5 cc
PFLS に装着	1.5 cc	1.5 cc
PFLS 取出し、 H/C バイパス配管取付	1.5 cc	1.5 cc
本体に装着	1.5 cc	1.5 cc
(合計)	12.1 cc	7.5 cc + 25 cc

AFDU: AAEU 駆動用 GSE H/C: ハンディキャリア PFLS: ポータブルフィッシュライフサポート

\*1 FPは、金魚を入れた時に、25 ccのエアを注入した。

又打上げ前の充填量のばらつきを確認するために、構造的にエアが抜けにくいAPの水充填を3回繰り返して、そのときの重量測定を実施することにより、エア残留の可能性を確認した。なお、この試験では、使用済で水充填のまま保管していた人工肺を更に2日間通水して使用した。従って、人工肺ファイバー内の水量は安定しているものとし、その他のAP内部でのエア残留を確認したものである。本試験は、KSCでのAAEU準備手順書に従って行ったものであるが、水系充填材は、ゼオライトと活性炭を使用してお

り、エア系については、水充填とは無関係なため充填材は使用していない。なお、試験は測定器の都合により、水充填は、20 gの精度でしか測定できなかったが、3回の試験結果はすべて同じ重量であった。

更に、人工肺部でのエア残留及び振動によるエア抜けを確認するため、別途新品の人工肺を使用し、KSCでの手順を模擬した上で、簡易的に振動を与え、減水状況を観察した。この結果、加振前後での人工肺からのエア発生量は約2 ccであった。又、加振迄の手順に要した時間は、約20時間であり、この間約6 ccのエアが溜まることが確認された。KSCでは、1.5日前にターンオーバーしているのもので、実際には、6 ccの1.5倍の約9 ccのエアが溜まり、振動で更に約2 ccのエアが溜まり、軌道上で人工肺から、抜けたこととなる。即ち、約11 ccが減水したこととなる。

2) 打上前後での、AAEU減水量は、以下の通りである。

表 2.1.3.1-3 AAEU減水量

	AP	FP
打上前アキュムレータストローク (アキュムレータ容量)	3.3 (46.2 cc)	4.1 (57.4 cc)
打上後アキュムレータストローク (アキュムレータ容量)	1.5 (21 cc)	0.5 (7 cc)
減水量	25.2 cc	50.4 cc

この減水量に対して、前述のQD着脱によるエア混入量と、自然減水及び振動による減水量11 ccを差し引くと、

$$AP \quad 25.2 \text{ cc} - 12.1 \text{ cc} - 11 \text{ cc} = 2.1 \text{ cc}$$

$$FP \quad 50.4 \text{ cc} - (7.5 + 25) \text{ cc} - 11 \text{ cc} = 6.9 \text{ cc}$$

となり、APで2.1 cc、FPで6.9 ccの減水原因が不明となる。しかしながら、前述のAP重量計測における計測精度が20 ccであることを考えると、上記不明分は、水充填時のばらつきによるものと推定される。

### 2.1.3.2 イモリ死亡評価

AP水槽4個の内、A-1、A-2に収納していたイモリ2匹が死亡した原因について、ハードウェア上の要因が考えられるか検討をした。イモリ死亡のFTAを図2.1.3.2-1に示す。同じ系で飼育していた水槽A-3のイモリ(2匹)と水槽B-1のメダカ(4匹)が健全であったことから、装置共通ラインについては異常になった可能性はないと考える。

#### 1) 酸素供給不足

##### ① 水系統の不良

配管は装置共通ラインなので異常はなかったと考える。死亡イモリを取り出した後の水槽A-1でエッグコンテナのイモリ卵は生還しているので水槽A-1の詰まりの可能性はない。水槽A-2はイモリ死亡後冷凍されたので、イモリ卵の生存については不明であるが、軌道上で冷凍後、水槽から取り外したQDに詰まりはなかった。また、フィルターは帰還後、目視にて詰まりのあるような汚れがなかったことを確認しており、PIからもフィルターの汚れ、詰まりについての情報は受けていないので軌道上でも異常なかったと思われる。



また、水槽を AP に装着する時は水槽の QD が完全に結合する位置まで水槽を押し込みロックピンで固定することになっているが、この操作を怠ると QD の結合が緩み水が流れなくなり酸素供給不足になる。この結合不良は、ミッションの後半で 1 回発生しているが、イモリの死亡したミッション前半については、クルーからの報告はなかった。

② エア系統は、装置共通ラインなので異常がなかったと考える。

2) 水圧異常

圧力センサ、水ポンプ・モータは共通ラインなので異常がなかったと考えられる。

3) 温度異常

水槽を完全に取り出している時、水槽温度はキャビン温度に影響を受けるが、POCC ターミナルデータ上はスペースラブ内温度は最大でも 25.6℃であることから、大きな温度変化はなかったと言える。その他の要因については、共通ラインなので異常はなかったと考える。

4) 手順の問題

実験手順を間違っていたり、ホルモン注射でイモリを引き寄せるときに強く押さえすぎるとイモリにダメージを与える可能性がある。

以上のことから、イモリ死亡の要因として、QD 結合不良、試料取扱不良等の取扱上の要因は残るが、少なくともハードウェアの誤動作、故障によるものではないと考える。

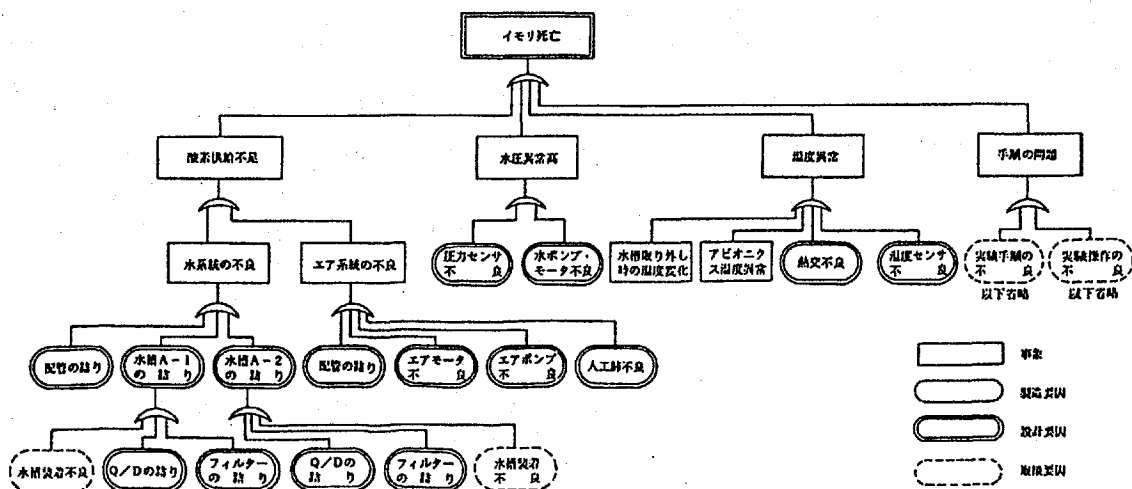


図 2.1.3.2-1 AAEU イモリ死亡 FTA

### 2.1.3.3 開発成果

AAEUの主な機能に対する本ミッションにおける開発成果を以下に示す。

- 1) イモリ、メダカ等水棲小動物に対する宇宙実験技術を確立した。イモリに対するホルモン注射、産卵後の親イモリと卵との隔離操作、イモリ卵の近接撮影、メダカへの給餌等、軌道上での特殊な試料操作も問題なく実施できた。
- 2) 硝酸菌を使用したバイオフィルターは、所期の性能を発揮し、13日のミッション中、問題のない水質維持が達成できた。
- 3) AAEUハードウェアの評価詳細については、表 2.1.3.3-1 にまとめた。

表 2.1.3.3-1 AAEU 評価結果

No	項目	ミッション時の状況	結果
1	飼育水制御 (1) 温度  (2) 圧力	FP は 23 °C 設定、AP はイモリが死亡したため、MET 9 に 24 °C から 23 °C に設定変更した。両方とも規定値 ± 0.5 °C で問題はなかった。 水槽の着脱と注水の影響で、± 0.1 kg/cm <sup>2</sup> G 程度の変動はあったが規定値 0.12 ~ 0.6 kg/cm <sup>2</sup> G 内で問題はなかった。	機能検査で正常に作動することを確認した。
2	減水特性及びエア混入	打上げ及びその後の微小重力の影響でアキュムレータストロークがゼロ近くになった。ミッション中 FP は 90 cc (30 cc × 3 回)、AP は 50 cc (30 cc + 20 cc) 注水した。FP には目立ったエアは確認されていない。AP の特にメダカ B-1 タンクには大きなエアが観察され、タンクの着脱に伴って徐々に大きくなっていった。	打上前作業準備時の残留エアが抜けたことにより減水したと推定される。 QD 着脱によりエアが混入したと推定される。
3	タンク操作性	AP タンクの着脱、イモリの引き寄せ、ホルモン注射、産卵テープの巻き取り、メダカの給餌等特に問題なく実施できた。	機能検査で正常に作動することを確認した。
4	その他構成機器の作動	減水時のアキュムレータへの補水、明暗サイクル機能、観察等問題なく実施できた。	機能検査で正常に作動することを確認した。
5	総合	減水量、エアの混入は予想以上に多かったが AAEU の機能は正常に作動した。	

### 2.1.3.4 水棲生物飼育装置(AAEU)の微生物汚染解析

#### 2.1.3.4.1 検討方法の概要

IML-2 ライフサイエンス実験搭載装置および試料より飛行後解析用試料を採取し、軌道上実験における微生物汚染等を解析する。併せて、ハンガー L 内で実施された地上対照実験からも、本実験に対応した試料を採取し同様の評価を行う。

#### 2.1.3.4.2 試料採取および輸送・保存

##### 1) 試料採取

###### 第 1 回

採取日 1994 年 7 月 19 日 ~ 8 月 7 日

場所 NASA ケネディ宇宙センター(KSC) ハンガー L

## 第2回

採取日 1994年9月12日～9月21日

場所 NASA KSC O&Cビル(Operations & Checkout Building)

### 2) 試料採取法

実験装置や機器の表面からの微生物の採取は、滅菌生理食塩水に浸漬したスワブ(綿棒)あるいは滅菌ガーゼを用いた拭き取り法によって行った。水性試料は滅菌シリンジあるいは滅菌ピペット等により採取し、滅菌済のプラスチックチューブ内に保存した。いずれの試料も現地で普通寒天培地、サブロー寒天培地を用いて、微生物の培養を行った。

### 3) 試料の輸送・保存

採取試料および培養後のプレートは、ハンガーL内の冷蔵庫あるいは冷凍庫で保存した。KSCから鎌倉の(株)東レリサーチセンターまでは、冷蔵品については保冷剤を入れて、冷凍品についてはドライアイスを詰めた状態で輸送し、同社到着後は実験に用いるまで所定の冷蔵庫、冷凍庫で保存した。

#### 2.1.3.4.3 微生物の培養・計測

##### 1) 使用培地

###### [細菌類用]

輸送培地 : 普通寒天培地(栄研化学(株))

肉エキス	0.5 %
ペプトン	1.0 %
塩化ナトリウム	0.5 %
寒天	1.5 %
	pH 7.0

分離計数培地 : 標準寒天培地(栄研化学(株))

酵母エキス	0.25 %
トリプトン	0.5 %
グルコース	0.1 %
寒天	1.5 %
	pH 7.1

###### [真菌類用]

輸送培地 : サブロー寒天培地(栄研化学(株))

ペプトン	1.0 %
グルコース	4.0 %
寒天	1.5 %
	pH 6.0

分離計数培地 : クロラムフェニコール 50 ppm 添加  
ポテトデキストロース寒天培地

馬鈴薯浸出液	20 %
グルコース	2.0 %
寒天	1.5 %
	pH 5.6

##### 2) 培養条件

細菌類については 37℃で2日間、真菌類(酵母、カビ)については 25℃で5～7日間インキュベーター中で培養を行った。

### 3) 菌数計数法

拭き取り試料は、適量の滅菌生理食塩水に浸漬後その浸漬液を同液を用いて適宜希釈し上記の平板寒天培地に塗抹、水性試料はそのまま適宜希釈後塗抹培養し、コロニーカウント法により出現したコロニーを計数した。なお、真菌類用培地には細菌類の生育を極力抑えるため 50 ppm の抗生物質クロラムフェニコールを加えたが、完全に細菌類の増殖を抑制することは困難であった。したがって、真菌類の菌数計数値には試料によっては細菌類も含まれていることに留意する必要がある。

### 4) 菌数計測結果

採取した 59 検体について細菌類と真菌類に分けて菌数測定を行ったが、そのうち飛行後解析試料を中心とした 15 検体についての結果を表 2.1.3.4.3-1 に示す。なお、表に記載の N.D. は菌が検出されない場合を示す。

AAEU は生物試料を搭載するため生物や飼育水に微生物が存在し、飛行前、飛行後のいずれの試料からも多種、多量の微生物が検出された。また、KSC 内での実験水についても微生物検査を行ったところ、水道水以外の脱イオン水、蒸留水から微生物が検出された。これらは微生物汚染を起こす原因となりうることから、滅菌処理を施す必要があると思われる。

表 2.1.3.4.3-1 飛行後解析サンプルリストおよび菌数測定結果

装置名：水棲生物飼育装置(AAEU)

単位：CFU/ml

試料	採取日	採取量等	備考	No.	細菌類	真菌類
死亡イモリ凍結融解 2	7/24	250 ml	飛行後	74	$3.3 \times 10^8$	$1.3 \times 10^3$
FP 金魚飼育水	7/24	100 ml	飛行後	75	$2.2 \times 10^3$	20
AP メダカ飼育水 1	7/23	40 ml	飛行後	76	$4.0 \times 10^5$	$2.0 \times 10^3$
AP メダカ飼育水 2	7/23	15 ml	飛行後	77	$3.0 \times 10^7$	$1.2 \times 10^5$
AP イモリ飼育水 1	7/23	30 ml	飛行後	78	$2.9 \times 10^4$	$3.8 \times 10^3$
AP イモリ飼育水 2	7/23	42 ml	飛行後	79	$1.4 \times 10^6$	$5.0 \times 10^3$
AP イモリ圧抜き水	7/23	6.5 ml	飛行後	80	$3.1 \times 10^6$	10
AP イモリ凍結融解 1	7/23	15 ml	飛行後	81	$5.3 \times 10^8$	$1.0 \times 10^7$
イモリホルモン 45S/N005	7/23	0.2 ml	飛行後	82	$5.5 \times 10^4$	$5.0 \times 10^6$
イモリホルモン 45S/N001	7/23	0.2 ml	飛行後	83	$1.5 \times 10^4$	$8.0 \times 10^5$
FP 飼育水	7/22	100 ml	地上対照	88	$2.1 \times 10^4$	$2.5 \times 10^6$
シャトル飲料水	7/27	16 ml	飛行後	150	$8.1 \times 10^4$	$1.5 \times 10^4$
実験用脱イオン水①	7/23	250 ml	ハンガー L	151	10	$7.3 \times 10^4$
実験用水道水①	7/23	250 ml	ハンガー L	152	N.D.	N.D.
実験用蒸留水①	7/23	250 ml	ハンガー L	153	110	N.D.

#### 2.1.4 反映事項

1998年2月のニューロラブミッションではFMPTの前庭機能実験装置(VFEU)を海水仕様の実験装置に改修して搭載する計画である。また、JEMにおいても水棲生物の実験装置の計画があるためIML-2での下記改善事項を次期ミッションへ生かすことが必要である。

- 1) 水充填作業時に装置内にエアが残留しにくい構造とし、打ち上げ前にエア残留の有無を精密重量計で計測し確認する。
- 2) QD着脱によるエアの混入を少なくするためQDを変更する。
- 3) 水ポンプにエアが多く溜ると空運転となる可能性があるため軌道上でもポンプのエア抜き操作が行えるようにする。

なお、上記2)、3)については、ニューロラブの設計に既に反映済みである。

## 2.2 細胞培養キット(CCK)

### 2.2.1 装置概要

細胞培養キットは宇宙での動物・植物細胞および微生物などの培養実験に使用可能な汎用の小型培養実験器具をキットの形にまとめたもので、微小重力下での培養に必要な無菌的な液処理や細胞の観察、記録などを含めた本格的な実験を行うことが可能である。本キットは通常、恒温恒湿槽(TEI)中での培養実験に使われる。また、生物顕微鏡や画像記録のためのビデオカメラと組み合わせることも可能である。(図 2.2.1-1)

#### 仕様

細胞培養容器	動物細胞、植物細胞および胚に適用可能 内容積 20 ml (最大 25 ml) 中隔模による二重構造、観察窓付き
植物細胞培養容器	植物の組織培養に適用可能 寒天培地型 100 φ × 30 (mm)
粘菌培養容器	粘菌の培養に適用可能 4分割ろ紙式培地(大腸菌を含む)
培地容器	最大容積 30 ml (シリンジ型)
採液/廃液容器	最大容積 30 ml (シリンジ型)
細胞固定液容器	最大容積 30 ml (シリンジ型)
ソフトケース	4 培養容器/ケース
シリンジケース	16 シリンジ/ケース

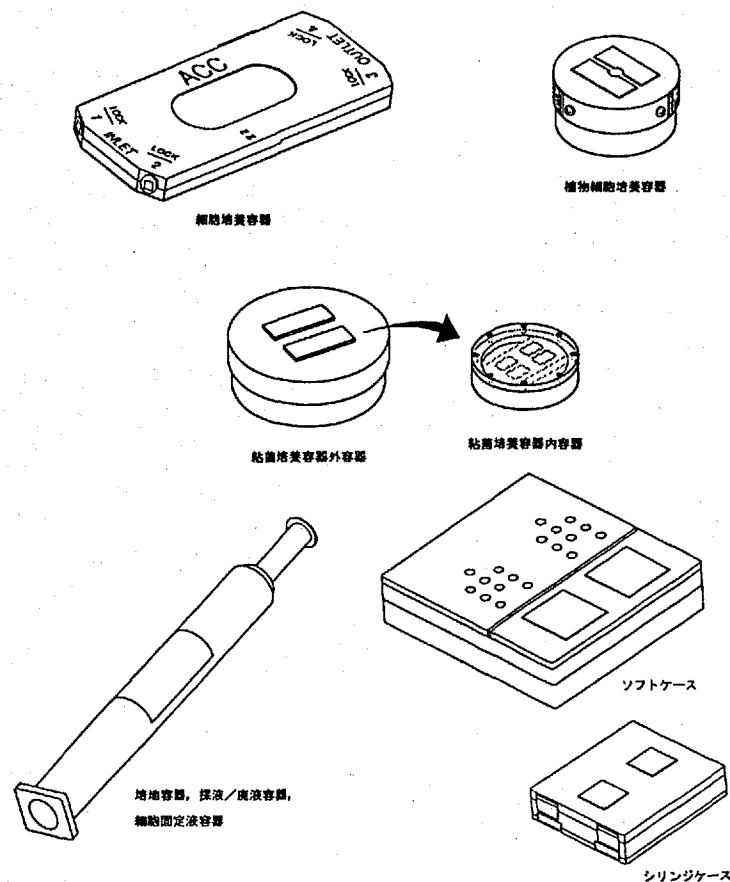


図 2.2.1-1 CCK 外観図

恒温恒湿槽は熱電素子による加熱、冷却の双方向制御が可能なインキュベータであり、温度、湿度、CO<sub>2</sub>ガス濃度を同時に制御できる。設定温度を変えることにより、細胞培養実験、生物飼育実験、タンパク質結晶成長実験など、恒温或いは恒湿を必要とする種々の実験に使用することができる。IML-2 ミッションでは、細胞培養キットおよび電気泳動装置を用いた実験の支援装置として使用した。(図 2.2.1-2)

仕様

設定温度 - 高温モード - 低温モード	37 °C 22 °C
温度制御精度	± 1 °C
湿度制御範囲	60 %RH
湿度制御精度	± 10 %RH
CO <sub>2</sub> 設定濃度	5 Vol% $\pm$ 1 Vol% (高温モード時のみ)
有効収容容積	28 l
装置寸法/重量 - 本体 - CO <sub>2</sub> ガス供給ユニット	483W × 444H × 606D (mm) 約 49 kg 483W × 221H × 444D (mm) 約 15 kg

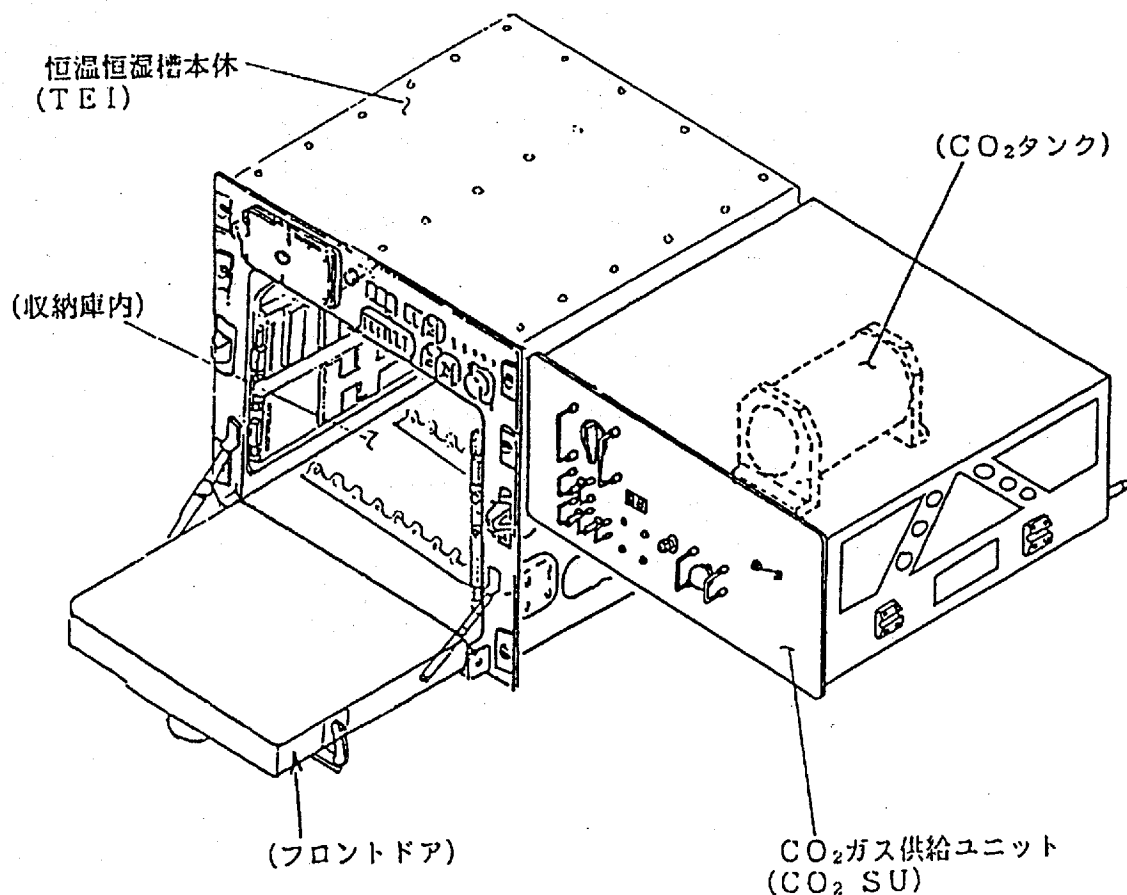


図 2.2.1-2 TEI 外観図

## 2.2.2 装置稼働状況

### 2.2.2.1 TEI

1) TEIはMET Day 00 / 07時頃にパワーONとなり、それから約7時間後のクーラー報告で温度37℃、湿度61%に整定していることが確認された。この状況はしばらく継続していたが、MET Day 02 / 10時頃を境に湿度が設定値(60%)よりも高くなる状態が始まり、最終的には70～75%の高い値を維持する状態がMET Day 12のTEIパワーOFFまで継続した。この間、TEI制御はドア閉時常に減湿モードとなっていたが湿度は下がらなかった。また、TEIドアヒーター廻りに水滴が付着しているとのクーラー報告があった。これに対する処置として、庫内の結露を拭き取ることを搭乗員に依頼し、MET Day 04 / 04時及びMET Day 08 / 11時に実施した。しかし、1回目は結露はなかった。装置としては、異常であるが、庫内湿度が高いこと自体は、実験サンプルにとっては、むしろ良い方向であるためTEIは、このままの状態での運転された。なお、温度については、全期間 $37 \pm 1$ ℃の範囲で制御されており、問題はなかった。図2.2.2.1-1に温度及び湿度データを示す。

2) 図2.2.2.1-2にCO<sub>2</sub>濃度データを示す。MET Day 07以降MAX値5.5～5.7%となり規定値(4.0～5.0%)を越えている。CO<sub>2</sub> BLOWのイベントデータのON時間からCO<sub>2</sub>タンク圧変化に対するCO<sub>2</sub>流量特性を推定すると、タンク圧力減少に伴って、庫内へのガス流量が増える傾向のあることが判明した。この特性は飛行後試験においても確認できた。この特性は配管系統におけるレギュレータとオリフィスの組合せ特性として説明できる。このため、ミッション進捗に伴いタンク圧が低下するとともに庫内へのCO<sub>2</sub> BLOW 1回あたりのガス供給量が増加したため、CO<sub>2</sub> BLOW直後に濃度が増加したものと推定される。

なお、生物試料にとっての許容値は4～6%であり、実験に影響を与えることはなかった。

3) 図2.2.2.1-3にCO<sub>2</sub>圧力データを、図2.2.2.1-4にCO<sub>2</sub> BLOW及びDOOR OPENのイベントデータを示す。ドア閉時のCO<sub>2</sub> BLOW間隔は、ミッション初期では、規定値の200分以上であったが、MET Day 08～09及びMET Day 11～12において100分程度と、規定値を大幅に下回っている。これは、ドア閉時の庫内気密性能が劣化し、CO<sub>2</sub>リーク量が増大したことを示している。このリーク量の増大にもかかわらず、CO<sub>2</sub>圧力は、タンク圧5.4 kg/cm<sup>2</sup>Gを残して終了している。これは、ドア開時のCO<sub>2</sub>放出量が微小重力状態では、地上よりもかなり少なくなっていることによると推定される。

なお、飛行後の機能点検時もCO<sub>2</sub> BLOW間隔は100分程度となっており、気密性が劣化した状況が続いている。飛行後の機能点検で、庫内各部の気密性をチェックしたところ、エアポンプを本体に接続するブラケット部において、開口部をおおうカバー装着部より、リークのあることが分かった。この部位は、カバー形状からパッキンだけでは、気密性保持が困難なためシリコンポッティングを使用していたが、その施行が不十分であったものと思われる。

本部位のポッティングを再施行したところ、CO<sub>2</sub> BLOW間隔は240分となりノミナル値200分以上となった。



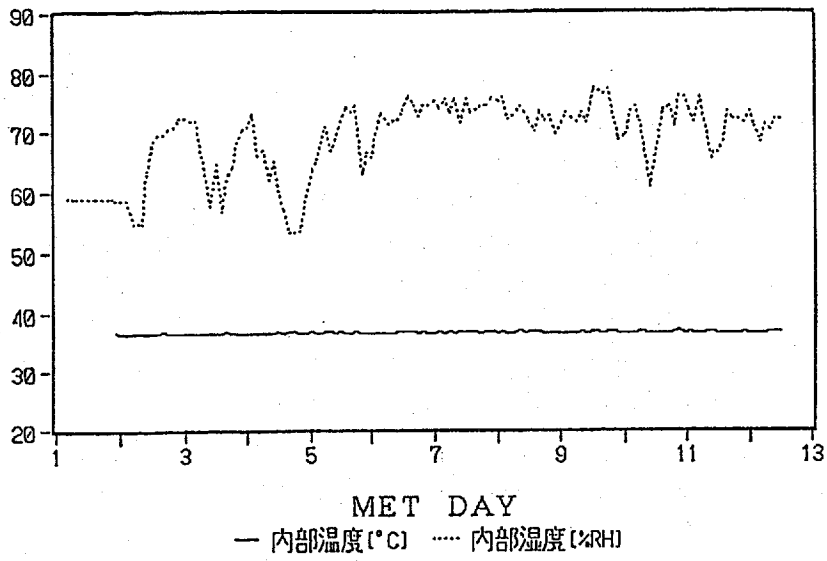


図 2.2.2.1-1 TEI 温度、湿度データ推移

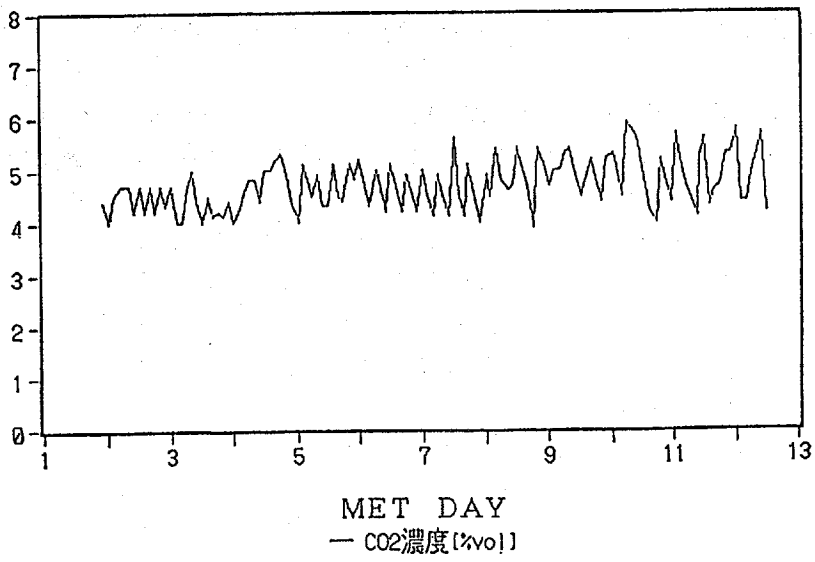


図 2.2.2.1-2 TEI CO<sub>2</sub> 濃度データ推移

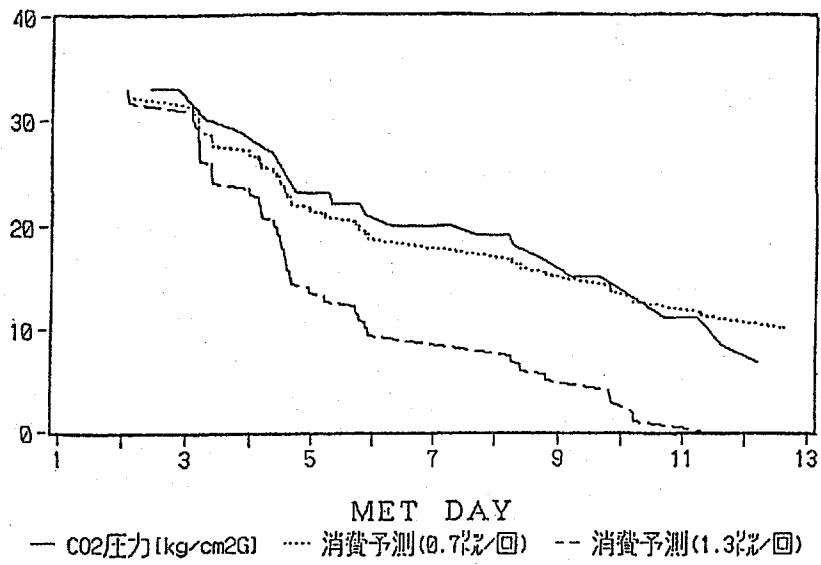


図 2.2.2.1-3 TEI CO<sub>2</sub> 圧カデータ推移

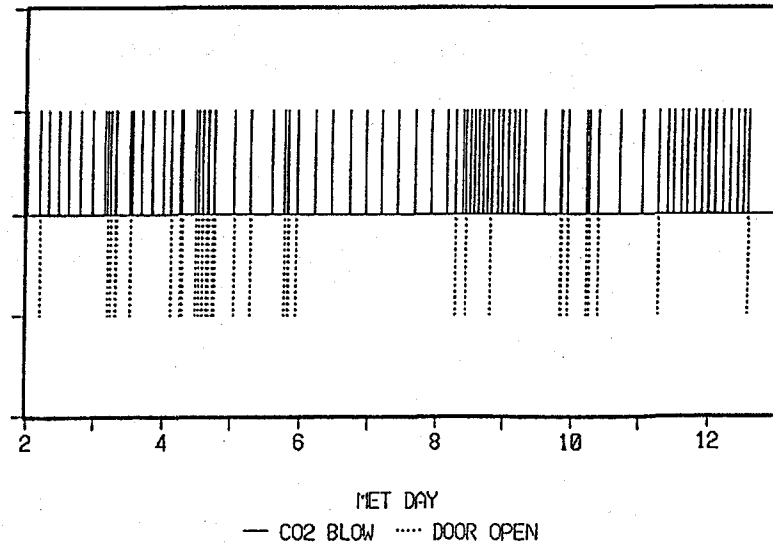


図 2.2.2.1-4 TEI CO<sub>2</sub> BLOW / DOOR OPEN 推移

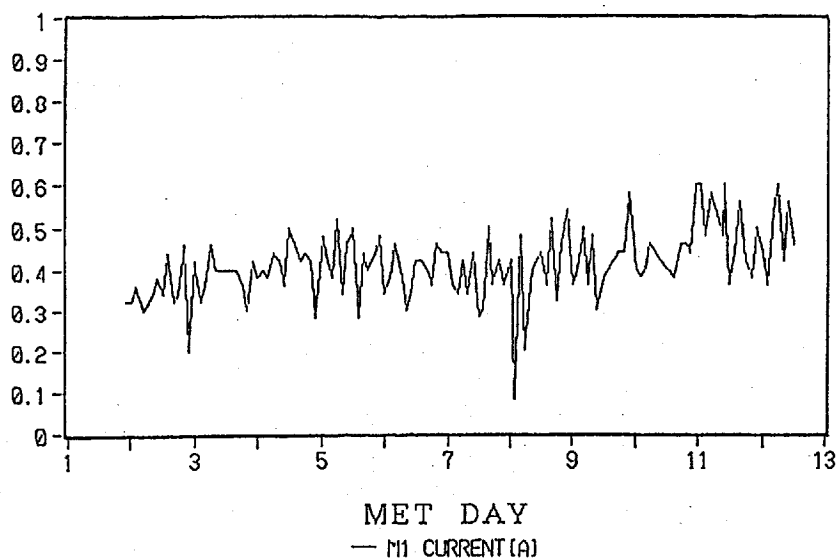


図 2.2.2.1-5 TEI モータ電流データ推移

- 4) 図 2.2.2.1-5 にモータ電流を示す。MET Day 08 頃に 0.2 A を切っているが、一時的な軽負荷現象であり、特に問題はない。飛行後の機能点検では電流値は、0.5 A と正常値であった。
- 5) サーモジュール温度データ、加湿器ヒータ温度データ、ドアヒータ温度データについては特に異常は見られなかった。

#### 2.2.2.2 CCK

- 1) 細胞培養キットについては、ほぼ予定通りの操作を実施した。
- 2) 培養容器は正常に機能し、技術目的を達成した。粘菌については一連の培養操作は予定通り終了したが、培養途中で粘菌胞子がアメーバ状態から先に分化していないことがわかり、実験を短縮し終了した。原因としては宇宙環境で予想以上の影響を受けたか、KSCにおける試料準備時の環境等に粘菌のアメーバ形成能や DNA 合成を阻害する要因が含まれていたと推定される。  
骨芽細胞については、培養細胞の状態を軌道上で判断し実験を早めに終了したが一連の培養操作は予定通り終了した。
- 3) 細胞培養容器 1 個にリークがあったが、クルーの報告からクルーの操作上のミスであったと推定される。
- 4) クルーよりシリンジのリークが報告され、飛行後、該当品のリークチェックを実施したが不具合は再現しなかった。(軌道上で締付等の修理が行われたと考えられる。)なお、外観点検においてもポリカーボネイト部分にクラック等の異常も認められず、まわり止め接着等処置も行われていないため最終組立後オートクレーブ処置等でニードル組立のねじ部にゆるみが生じた可能性が高いと推定される。

## 2.2.3 機能性能評価

### 2.2.3.1 高湿度異常評価

1) 高湿度異常となる要因を図 2.2.3.1-1 に示す。

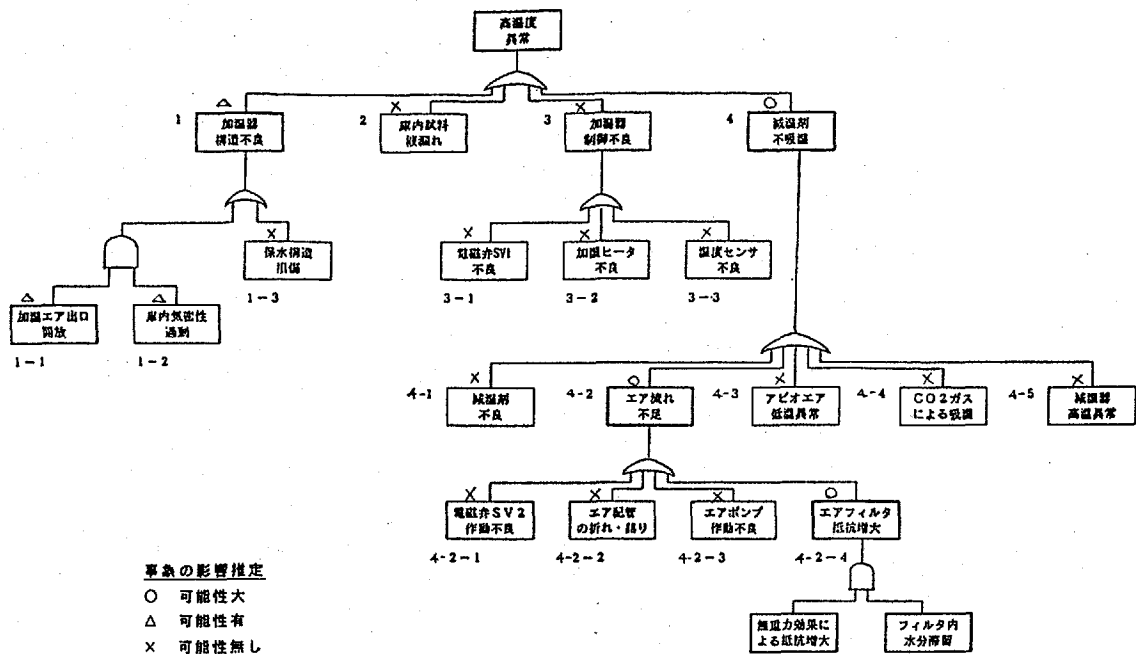


図 2.2.3.1-1 TEI 高湿度異常要因分析

2) NASA ケネディ宇宙センター(KSC)での TEI の飛行後点検結果は次の通りであった。

ミッション終了後約1ヶ月を経た94年9月、NASA KSCにおいてTEIを回収しこの機会に外観検査・加湿水及び減湿剤消費量の計測を行った。

この結果、加湿水消費量は87ccと予測より少なかったが、これは、ドア開閉時の水蒸気放出量が微小重力状態では地上より少なくなったためと考えられる。

減湿剤消費量(吸湿量)についてはミッション中常時減湿モードであったことから、相当量の吸湿があるものと予想されたが、計測の結果吸湿量はほとんどゼロであることがわかった。

外観検査においては、エア配管(透明チューブ)内に多量の水滴が付着しており、特にエアポンプ出口側のエアフィルタ部には約17ccの水分残存が確認された。

3) 国内での検証試験の結果は、次のとおりであった。

68時間の連続運転を行ったが、湿度は59%～60%を維持し、減湿モードONとはならなかった。うち17時間はTEIの天地を逆転してみたが、状況は変わらなかった。運転後、エアフィルタ内部には約10ccの水分残存が確認された。なお、上記連続運転に先立って行われた個別機能点検の結果、ハードウェア上、特に異常は見出されなかった。また、KSCにて、取出した減湿剤の単体機能は、正常であった。

当初考えられた要因のうち、湿度制御系を構成するエアポンプ、電磁弁、加湿器、及び減湿剤の飛行後の機能に異常がなかったため、何らかの原因で飛行中に湿度制御系のエアが正常に流れなかったことが疑われた。

図 2.2.3.1-2 に示すように加湿器、減湿器へはエアポンプからフィルタ及び電磁弁を通してエアが供給される。このエア流れ系統においては、エアフィルタの抵抗が比較的大きく、エアポンプ単体の吐出量 2.0 NL/min に対して、エアポンプ+フィルタの組み合わせでは 1.5 NL/min と減少する。

また地上で TEI を静置している状態では、エアフィルタはポンプの下方 100 mm に配置されているため、微小重力下においては、高低差がなくなるためフィルタの見かけの抵抗が増すことが予想された。そこでエアフィルタをエアポンプと同じ高さにし、試験を行った。この結果、フィルタをポンプと同じ高さとするると吐出量が 1.0 NL/min に減り、更に回収時状態を再現してフィルタ内に 20 cc の水を充填したところ、吐出量はゼロとなることがわかった。この状態ではエアポンプに吸引されたエアはポンプベアリング部、モータ軸を經由し庫内にバイパスされているものと考えられる。

またこの状態を放置すると、放置後 5～6 Hr で庫内湿度が 70～75 % まで上昇し、飛行時の現象を再現することがわかった。

この試験後、減湿剤の吸湿量を計測したところ、吸湿量はゼロであった。

これらのことから、高湿度異常及び減湿剤不吸湿の現象は以下に示す過程で発生したものと推定される。

#### 過程 1 (ミッション開始～MET Day 02 / 10 時):

庫内加湿にともないエアポンプ出口のエアフィルタ内に水分が露結・滞留する。

#### 過程 2 (MET Day 02 / 10 時):

フィルタ内の水分量が一定量 (約 20 cc) に達すると、フィルタのエア流れ抵抗がエアポンプ吐出量より大きくなり、エアはフィルタを通り抜けられなくなり、ポンプ軸部から庫内にバイパス・環流するようになる。

#### 過程 3 (MET Day 02 / 10 時～ミッション終了):

フィルタ内水分がエアポンプに吸い込まれ庫内に流入するため、庫内湿度が 75～80 % まで上昇する。TEI 制御は減湿モードとなり減湿器に通じる電磁弁が開くが、減湿器にエアは流れず庫内湿度は減少しない。

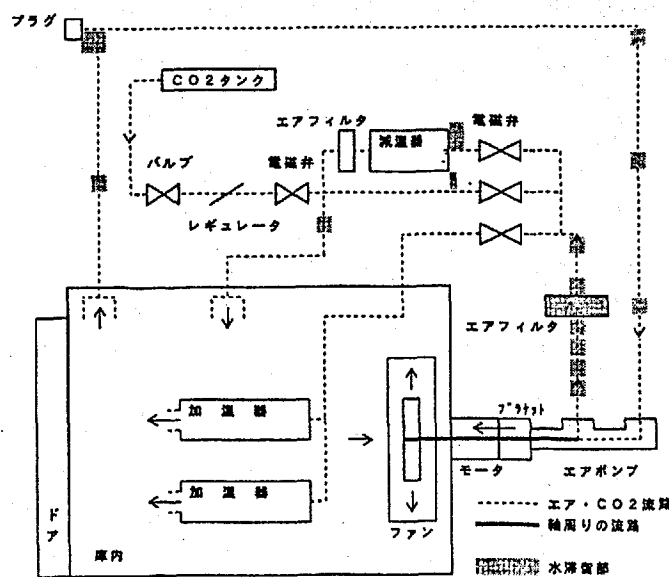


図 2.2.3.1-2 TEI エア循環図

- 4) 以上のことから、今回の高湿度異常の原因としては、エアフィルタ内部の水分が減湿器へのエアの流れを阻害し、かつ庫内への加湿源となったことが原因であると推定される。(図 2.2.3.1-2 参照)

フィルタ内部に水がたまって抵抗となりやすい構造となっていること及び、地上試験時に微小重力状態を考慮した試験を行っていないことが設計・検証上の問題であった。

- 5) 打上前の状態としては TEI は、打ち上げ 1 年前にラックに搭載され、減湿剤、加湿器については、打ち上げ 2 ヶ月前に最終充填を行っている。この間 3 回にわたり NASA の試験が行われており異常は発生していない。しかし、飛行後の試験結果から、この試験時にエアフィルタには水が滞留していた可能性は高い。但しラック搭載状態では目視確認ができない。

- 6) FMPT 用 TEI との構造の違いは、艙装が多少異なること、CO<sub>2</sub> 濃度を保持するためカップリング部にカバーを取り付けられていることである。つまり、FMPT と比較するとシール性が向上していることが湿度高を起こした原因の一つである。

### 2.2.3.2 開発成果

- 1) TEI 庫内への CO<sub>2</sub> 供給システムは、若干のオーバーシュートが見られたが、ほぼ所定の CO<sub>2</sub> 濃度を維持することができた。高圧ガスタンクは厳しい NASA 側の安全審査をクリアした上で、コンパクトにまとめることができた。
- 2) 実ミッションでは高温用 (HT) としてのみの使用となったが、MPE (Mission Peculiar Equipment) 冷却水ループを切り替えることにより、高温用 (HT) にも低温用 (LT) にも使用可能なシステムを開発した。
- 3) 粘菌培養容器、植物細胞培養固定容器、2 分割型動物細胞培養容器等、研究者の要求に対応して、新規に試料収納容器を開発し、それらは、軌道上で所期の機能を果たした。
- 4) TEI ハードウェアの評価詳細については、表 2.2.3.2-1 にまとめる。

表 2.2.3.2-1 TEI 評価結果

No	項目	ミッション時の状況	結果
1	庫内温度制御	ミッションを通じてノミナル値 37 ± 1 °C を維持した。	飛行後試験においても 37 ± 1 °C を維持。異常なし。
2	庫内湿度制御	MET 2/10 からミッション終了まで 75 ~ 80 % とノミナル値 (60 %) より高い値を維持した。この間減湿モードとなっていたが湿度は下がらなかった。実験試料は高湿度を好むため実験に悪影響はなかった。	エアポンプ出口部に位置するフィルタ内に水が滞留したことと微小重力の効果により、エアがフィルタを通らずに庫内に環流したことが原因と推定される。
3	庫内 CO <sub>2</sub> 濃度制御	ミッション後半において、一時的にノミナル値 (4.0 ~ 5.0 %) を上回る 5.5 ~ 5.7 % を示した。実験試料の許容範囲は 4.0 ~ 6.0 % であり実験に悪影響はなかった。	CO <sub>2</sub> ガス供給系の特性上、タンク圧減少にともない流量が増加することが原因と判明した。
4	CO <sub>2</sub> ガス消費量	タンク保有量 70 L のうち 60 L を消費し、ほぼ予想通りであった。	ミッション後半において、庫内へのリーク量が増大していたが、微小重力効果によるドア開時の放逸量減少と相殺し、トータル消費量は予想通りとなった。
5	その他構成機器の作動	モータ電流が MET 8 に一時的に低下したことを除いて、異常はなかった。	
6	総合	実験に悪影響を与えることなく、ミッションを通じておおむね正常に作動した。	

### 2.2.3.3 細胞培養キット(CCK)の微生物汚染解析

#### 2.2.3.3.1 検討方法の概要

IML-2ライフサイエンス実験搭載装置および試料より飛行後解析用試料を採取し、軌道上実験における微生物汚染等を解析する。併せて、ハンガーL内で実施された地上対照実験からも、本実験に対応した試料を採取し同様の評価を行う。

#### 2.2.3.3.2 試料採取および輸送・保存

- 1) 試料採取
- 2) 試料採取法
- 3) 試料の輸送・保存

2.1.3.4.2項参照

#### 2.2.3.3.3 微生物の培養・計測

- 1) 使用培地
- 2) 培養条件
- 3) 菌数計算法

2.1.3.4.3参照

#### 4) 菌数計測結果

採取した81検体について細菌類と真細菌類に分けて菌数測定を行ったが、そのうち飛行後解析試料を中心とした15検体についての結果を表2.2.3.3.3-1に示す。なお、表に記載のN.D.は菌が検出されない場合を示す。

表 2.2.3.3.3-1 飛行後解析サンプルリストおよび菌数測定結果

装置名：細胞培養キット(CCK)

単位：CFU/ml or CFU/cm<sup>2</sup>

試料	採取日	採取量等	備考	No.	細菌類	真菌類
AMC1 残液	7/23	7 ml	飛行後	25	N.D.	N.D.
AMC2 残液	7/23	4 ml	飛行後	26	$1.7 \times 10^9$	$2.4 \times 10^5$
AMC3 残液	7/23	3 ml	飛行後	27	$7.6 \times 10^9$	$2.7 \times 10^6$
AMC4 残液	7/23	3.5 ml	飛行後	28	N.D.	N.D.
AMC7 残液	7/23	6.5 ml	飛行後	29	$9.4 \times 10^9$	$4.1 \times 10^5$
AMC8 残液	7/23	5 ml	飛行後	30	$5.4 \times 10^9$	$1.4 \times 10^6$
AWC1 残液	7/23	12 ml	飛行後	31	N.D.	N.D.
AWC2 残液	7/23	10 ml	飛行後	32	N.D.	N.D.
AMC1	7/24	拭き取り	飛行後	58	N.D.	N.D.
AMC2	7/24	拭き取り	飛行後	59	$3.0 \times 10^9$	$3.4 \times 10^7$
AMC3	7/24	拭き取り	飛行後	60	$1.7 \times 10^6$	$2.8 \times 10^6$
AMC4	7/24	拭き取り	飛行後	61	N.D.	N.D.
AMC7	7/24	拭き取り	飛行後	62	N.D.	N.D.
AMC8	7/24	拭き取り	飛行後	63	N.D.	N.D.
AEC1	7/24	拭き取り	飛行後	71	$2.8 \times 10^4$	$5.0 \times 10^7$

飛行前の試料については無菌性が良く保たれていたが、飛行後試料ではかなりの試料について微生物汚染が確認された。これらの試料はすべて解析対象とならない残液であるが、主として操作時にキャビン空気と接したことにより雑菌が混入したものと考えられる。

#### 2.2.4 反映事項

次期ミッションへの反映事項としては、以下の3点があげられる。

- 1) エア流路が設計通り確保されるための対策
  - ・ 減湿ループ庫外エア配管を保温することによる、結露防止。
  - ・ エアポンプ吐出能力の向上。
  - ・ 庫外エア配管がない湿度制御システムの検討。
- 2) CO<sub>2</sub>濃度が一定保持されるための対策
  - ・ レギュレータ／オリフィス絞りの見直し。
  - ・ 流量変化に応じてCO<sub>2</sub> BLOWのタイミングを変化させる。
- 3) 庫内気密性の確保
  - ・ ポンプブランケット部パッキンの改善。
  - ・ 各部のポッティング施行法の改善。

なお、上記1), 3)項については、JEM用細胞培養装置に既に反映済みである。



## 2.3 電気泳動装置 (FFEU)

### 2.3.1 装置概要

電気泳動装置 (FFEU) は細胞、DNA、タンパク質あるいはこれらの混合物など、溶液中で電荷を持つ移動緩衝液中の生体試料に外部から電場を加え、試料の移動度の違いにより連続的に分離・精製 (無担体電気泳動) する装置である。微小重力下においては比重差による沈降や熱対流による外乱が非常に小さいので地上用装置に比べて数倍厚い泳動槽を用いることができる。本装置の泳動槽厚は 4 mm である。(図 2.3.1-1)

#### 仕様

泳動諸元 - 有効泳動範囲 - バッファ流速 - サンプル流速 - 印加電圧範囲	60W × 100H × 4D (mm) 2 ~ 10 cm/分 1 ~ 5 cm/分 最大 600 V
緩衝液容量	1200 ml 及び 1500 ml/タンク (交換可能)
泳動試料	最大 2 ml/カセット (交換可能)
試料分取	最大 60 本/回 (2.5 ml/本)
分離検出機構	吸光度検出 (254 nm, 1回/10秒) 検出範囲 51.2 mm (分解能 0.1 mm) サブユニットの吸光度モニタに表示及びダウンリンク
装置寸法/重量 - 本体 - サブユニット	483W × 533H × 609D (mm) 約 95 kg 483W × 221H × 486D (mm) 約 15 kg

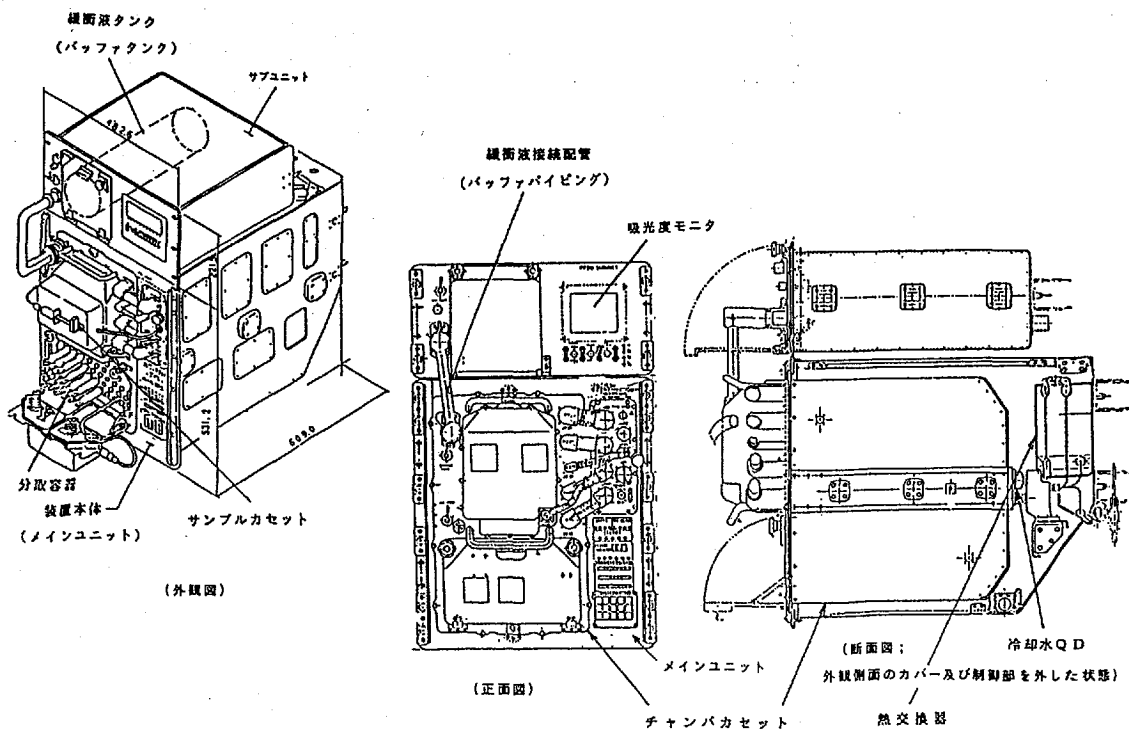
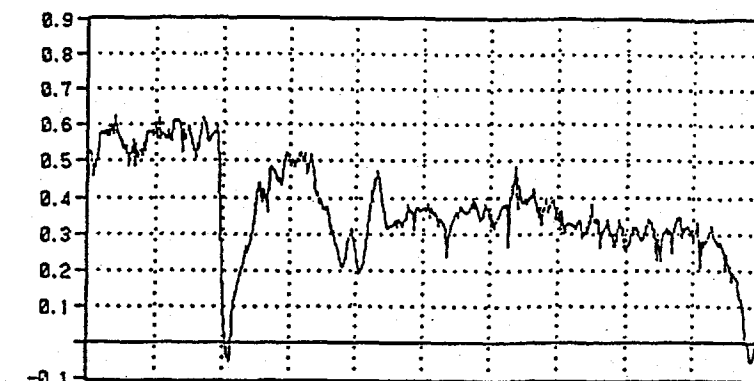


図 2.3.1-1 FFEU 外観図

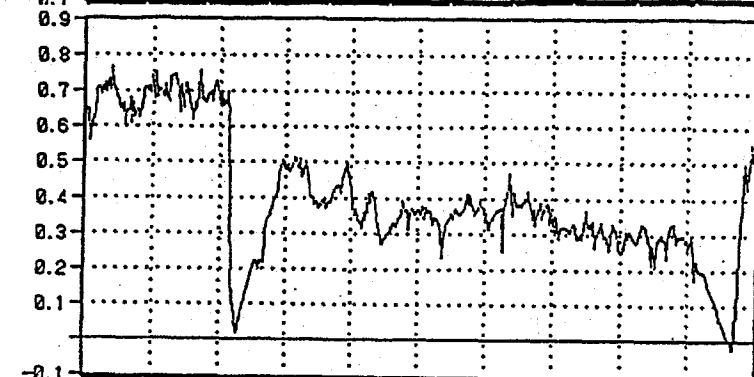
### 2.3.2 装置稼働状況

- 1) MET 04 / 23 時 46 分に CHROMOSOME FO (Functional Objective) -12 が開始され、FFEU は電源投入された。その後のクルー報告で、冷却水水圧低アラームが点灯し、水ポンプが停止してしまっただことが判明した。その後の再起動でも冷却水水圧は上らず軌道上修理 (IFM: In-Flight Maintenance) を検討することとなった。
- 2) QD (Quick Disconnecter) 付シリンジによる FFEU チャンバカセット冷却水配管への注水 / 補充作業を MET 06 に 1 回、MET 07 に 2 回実施した。徐々に冷却水水圧は上昇する傾向を見せ、最後の IFM では、冷却水水圧は  $0.34 \text{ kg/cm}^2\text{G}$  に達し、一旦は起動した。しかしながら、約 30 分後、冷却水水温が  $40^\circ\text{C}$  に達し、電源が自動遮断された。冷却水配管内にエアが残留しているため、これがポンプ内に滞留すると、ポンプが空回りし、冷却水を断続的にしか流すことができなくなり、温度上昇をまねいたものと推定された。
- 3) 約 350 cc の飲料水用バッグを使用して、多量にチャンバカセット冷却水配管に通水することにより、エアを除去する IFM を MET 08 に 2 回実施した。この結果、直径約 2 ~ 3 cm のエアが 2 回除去できたが、2 回目の起動後、約 80 分で冷却水水温高により電源断となった。
- 4) MET 09 / 3 時 27 分に再度同じ手順で IFM を行い装置を起動したところ、ほぼ正常に起動され、以後実験終了時まで連続運転できた。
- 5) 上記の IFM でかなりのクルータイムを使ってしまったため、各泳動実験は、各々本泳動のみを実施した。また、図 2.3.2.1-1 に示すように、リファレンス(基準光量)データは広い範囲で低下し、槽内に大きなエアが混入していると推定された。また、図 2.3.2.1-2 に CHROMOSOME の泳動時吸光度データを示すが、いずれの実験でも槽左端にサンプルが集中していた。
- 6) 泳動時の装置作動データについては、電極用モータ(M1)電流を除きすべて正常であった。M1 電流のみ規定を外れているが、飛行後の試験の結果、流量は規定の  $20 \pm 2 \text{ cc/min}$  以内であったが、長期間使用の結果、シリコンチューブとベリスタポンプ間の抵抗が減少し、負荷が軽くなっていることが原因であると確認された。
- 7) MET 10 / 7 時頃、PITUITARY 用バッファタンクをサブユニットに装着しても、タンク装着信号が出ないことが判明した。本信号は泳動実験スタートのインタロック条件となっているため、対策としてサブユニット側近接スイッチにアルミテープを貼り付け装置検出信号を発生させ対処した。KSC 帰還後のハードウェア点検の結果、不具合の発生したバッファタンク QD 寸法が他のものと比べ、0.5 mm 程度長く、このため、検出範囲を外れてしまったことが判明した。  
バッファタンクが予備品であったこともあり、サブユニットとの組み合わせ確認ができなかったことが不具合発生の原因となった。
- 8) KSC 帰還後、分取容器内のサンプル量を確認したところ、ほとんどの分取容器において、分取量が規定の  $2.5 \pm 0.1 \text{ cc}$  を大きく外れていることが明らかとなった。

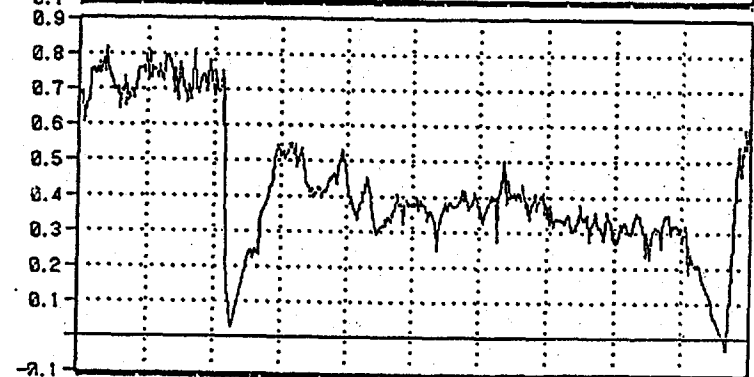
TX034  
CHROMOSOME



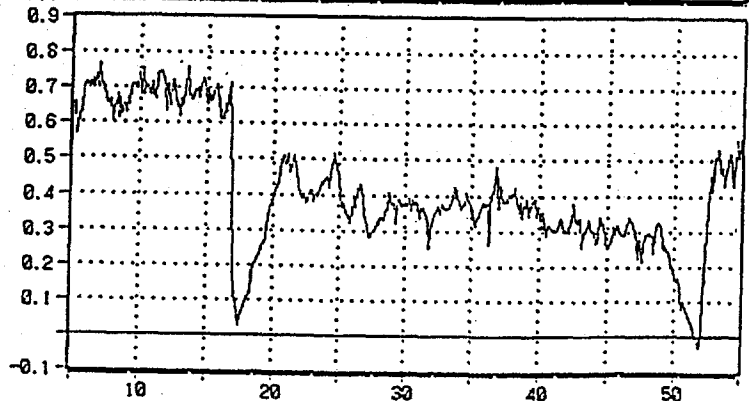
TX101  
PITUITARY  
データ(1)



TX101  
PITUITARY  
データ(2)



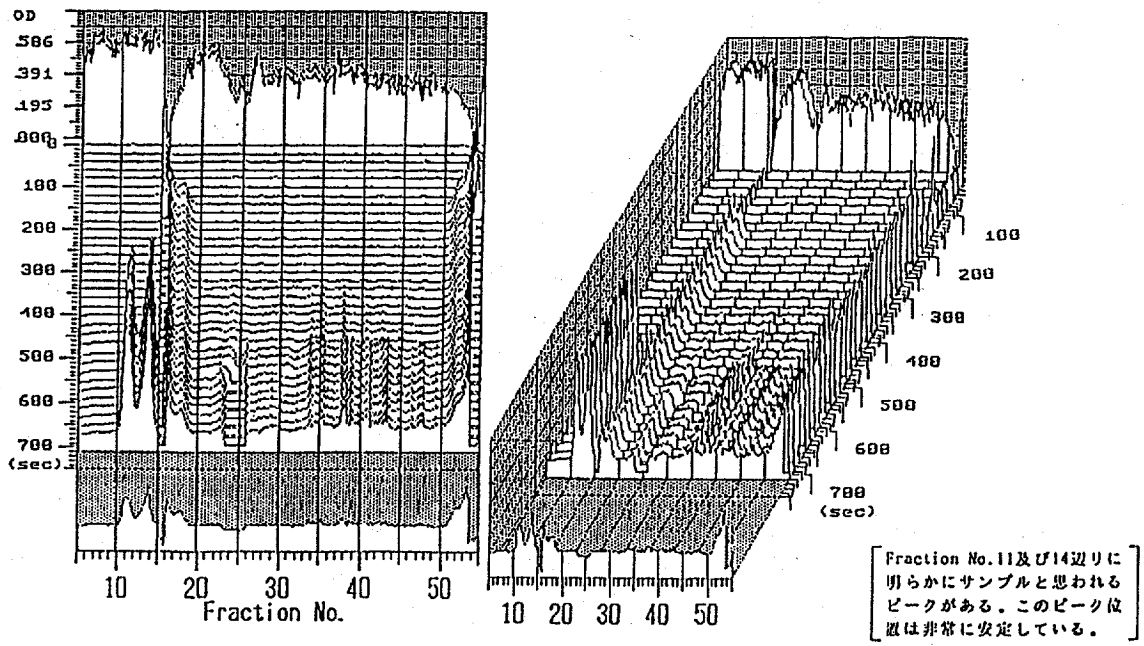
TX044  
ANTIBODY



Fraction No.

時間の経過と共にエアとバッファ液の気液界面位置は徐々に内側に寄ってきており、吸光度検出位置で見ると、エアが次第に小さくなってきていることが分かる。なお、Fraction No. 15より右位置の正常と考えられる範囲の光量に変動しているのは、バッファ液の差異及び光源部の温度変動の影響である。

図 2.3.2.1-1 リファレンスデータ推移



BUFFER FLOWRATE:3.0[cm/min] SAMPLE FLOWRATE:2.5[cm/min] EP VOLTAGE:200[V]

図 2.3.2.1-2 吸光度 3次元データ (CHROMOSOME)

### 2.3.3 機能性能評価

#### 2.3.3.1 起動不良不具合解析

1) 図 2.3.3.1-1 に起動不良となる要因を FTA (Fault Tree Analysis) で示す。この中で可能性ありと判断されるものについて、KSC 及び国内で検証試験を実施した。

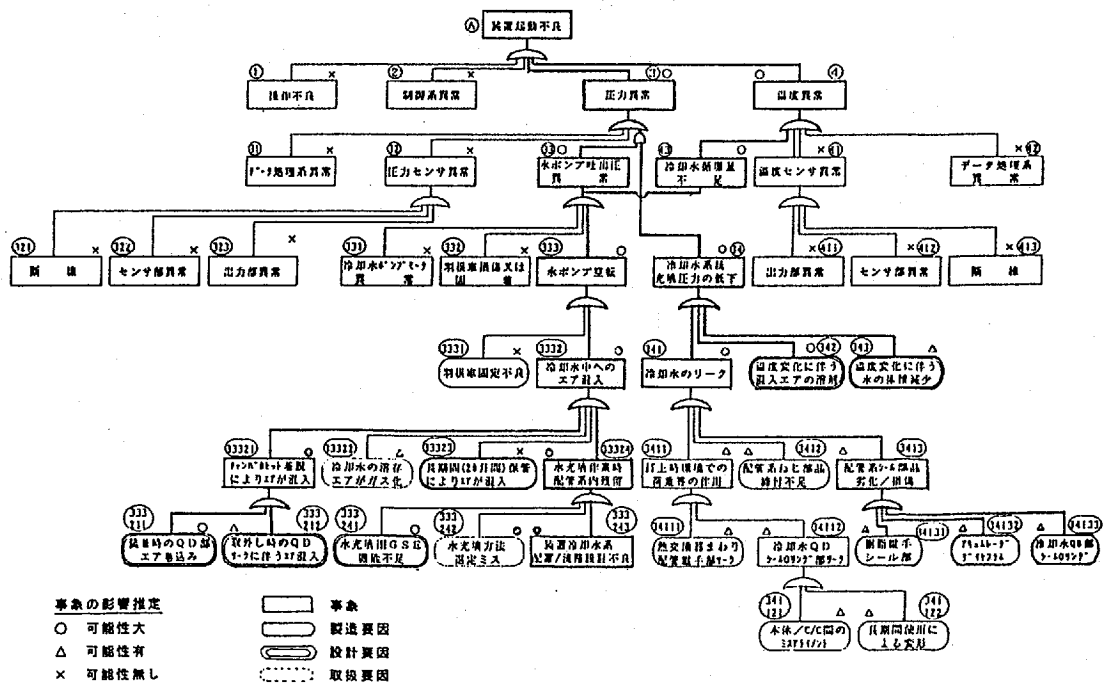


図 2.3.3.1-1 装置起動不良要因分析

- 2) KSCでの検証の結果、判明した事項は次の通りである。
- ① 装置本体(熱交換機側)に対し、正立位置での従来手順による水充填の後、横転位置にて再充填した結果、更に 67 cc の追加が可能であった。このことにより従来手順では熱交換器側にこの程度のアエア残留することが判明した。(熱交換器は、スペースラブラックに取り付けられた状態であり、正立位置でしか水充填作業が実施できなかった。)
  - ② チャンバカセット側へは、姿勢変更を含んだ従来手順で 593 cc の水充填が可能であるが、帰還後のチャンバカセット側水充填量が 549 cc あったことから考えると、チャンバカセット側は従来手順で問題なく水充填ができたと判断できる。
  - ③ 冷却水系 QD 1 組の着脱によるエア混入量は 3 回の平均で 1.12 cc であった。

3) KSCにおける水充填実操作確認により不具合の直接的な原因は、装置本体側への水充填時の熱交換部でのエア残留であることが判明した。装置全体の系統を図 2.3.3.1-2 に示す。上記以外にチャンバカセット着脱時 QD からのエア混入も認められたが、全エア残留量(約 60 ~ 70 cc)に対する影響は上記 2)-③の結果より 1 割程度と推定される。

一方、冷却水圧力低下の原因は、長期保管によるエア及び水蒸気のリーク、温度変化に伴うエア及び水の体積減少及び温度変化に伴う混入エアの溶解と推定される。

帰還後のヘリウムリーク試験では、冷却水 QD 部からかなりのリークが認められた。地上試験結果では冷却水充填後 16 日間放置後の圧力低下は 0.08 kg/cm<sup>2</sup>G であることから、約 2 ヶ月間の保管で 0.32 kg/cm<sup>2</sup>G 程度の圧力低下があったと推定される。

また他にも地上での冷却水充填時(25℃)と軌道上運転時(15℃)の温度差から、温度変化に伴う冷却水の体積減少、残留エアの体積減少、残留エアの冷却水への溶解も圧力低下に寄与したと推定される。

初期与圧約 0.4 kg/cm<sup>2</sup>G に対し、これらの 4 つの原因により、冷却水系統への与圧能力を失い、インタロック冷却水圧力下限 0.1 kg/cm<sup>2</sup>G を下回ったと推定される。

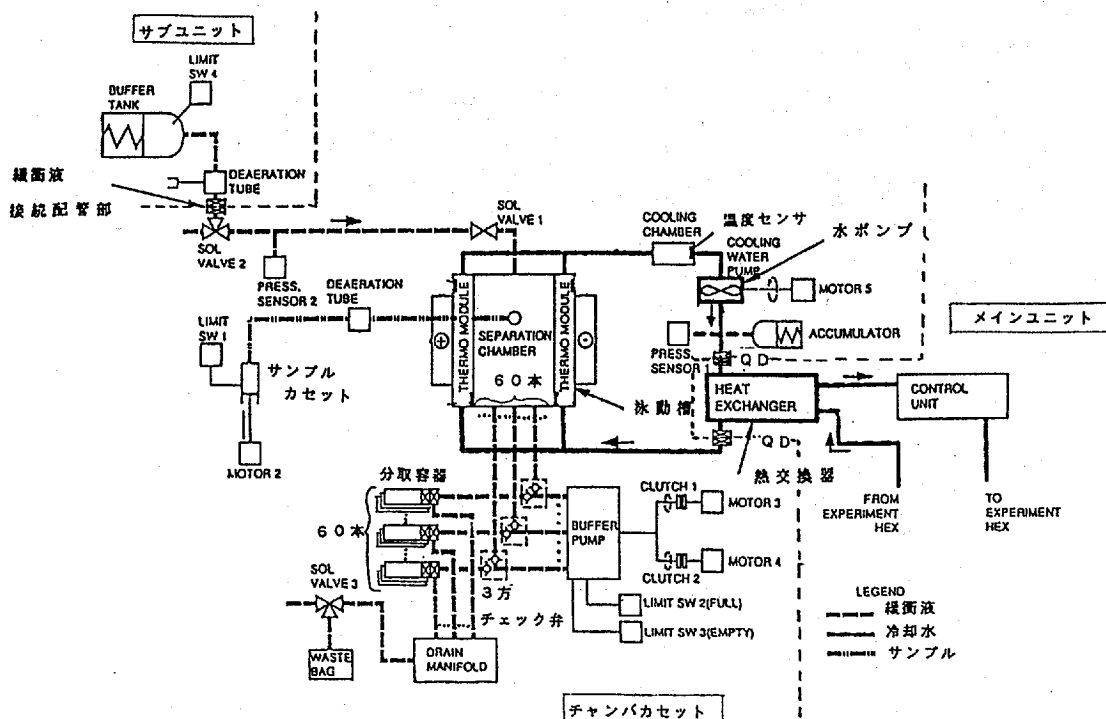


図 2.3.3.1-2 FFEU 系統図

- 4) 熱交換器へのエア残留に関して地上においては、打ち上げ2ヶ月前(最終アクセス時)装置が起動、安定することを確認したが、エアが特定の場所に溜まり、水ポンプまで循環されることがなかったため、不具合は発生しなかった。しかし軌道上で微小重力になったときエアが循環し水ポンプに溜まり空転状態になり不具合が発生したと推定される。装置製作・試験時には、チャンバカセットと比べると、装置本体の冷却水系統は単純な配管と熱交換器だけであることから、充填方向を変え数度充填を繰り返せばエアは除去できると考えていた。
- 5) 冷却水系に関して、FMPTとの違いは、水ポンプ、熱交換器、冷却水 QD の仕様である。熱交換器は IML-2 ではコルゲートフィンタイプで流路は並列になっており、FMPT ではプレートフィンタイプであり流路が直列であるので、エアが残留しにくい構造であった(図 2.3.3.1-3)。水ポンプは IML-2 の遠心ポンプと異なり FMPT ではギアポンプであり、エアをかんでも強制的にエアを押し出す傾向が強い(図 2.3.3.1-4)。IML-2 にて、改修し

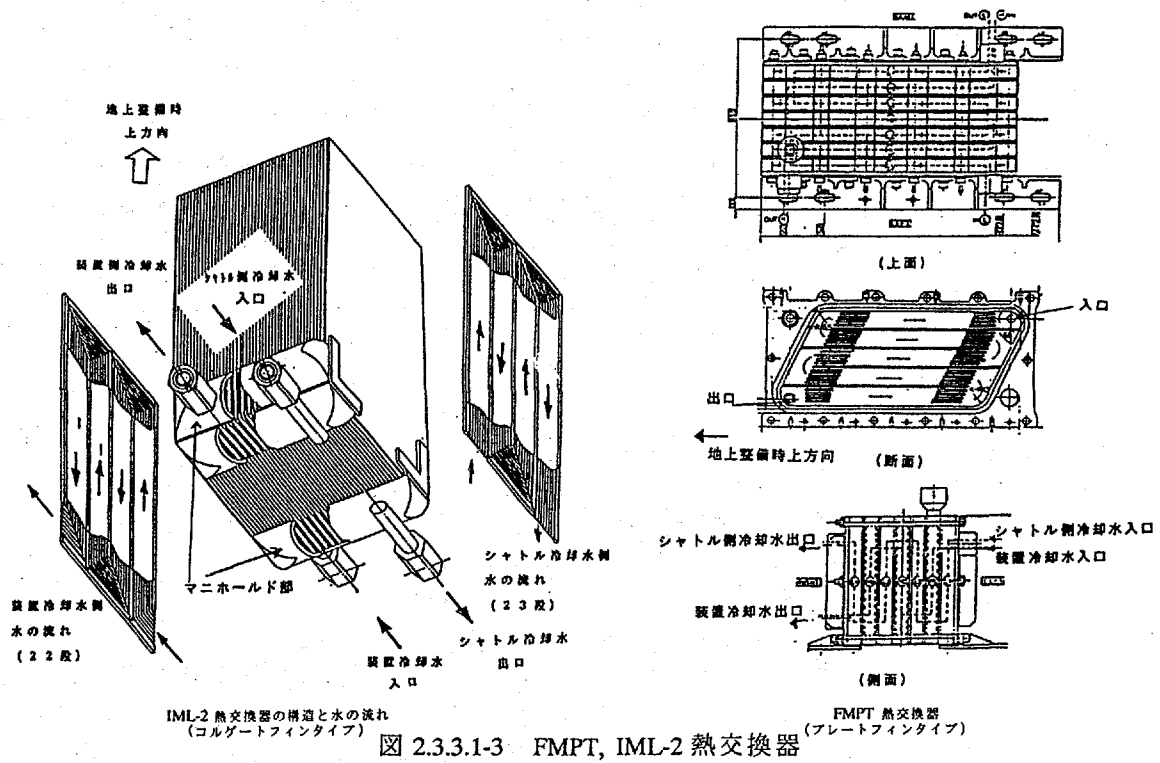
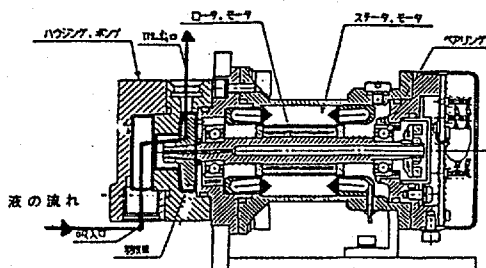


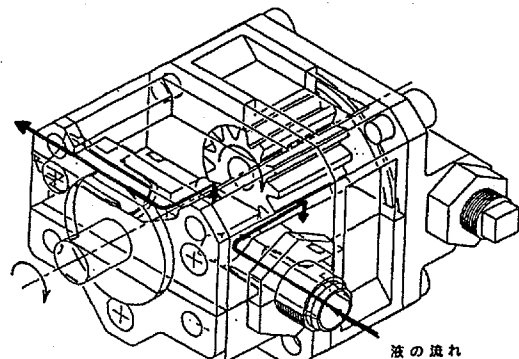
図 2.3.3.1-3 FMPT, IML-2 熱交換器

仕様(ノミナル)  
流量: 1.5 l/min  
圧力: 0.5 kg/cm<sup>2</sup> (但し、MAX. 1 kg/cm<sup>2</sup>)  
回転数: 6500 r.p.m.

流量: 1.5 l/min  
圧力: 約 0.5 kg/cm<sup>2</sup>  
回転数: 1500 r.p.m.



IML-2 水ポンプ



FMPT 水ポンプ

図 2.3.3.1-4 FMPT, IML-2 水ポンプ

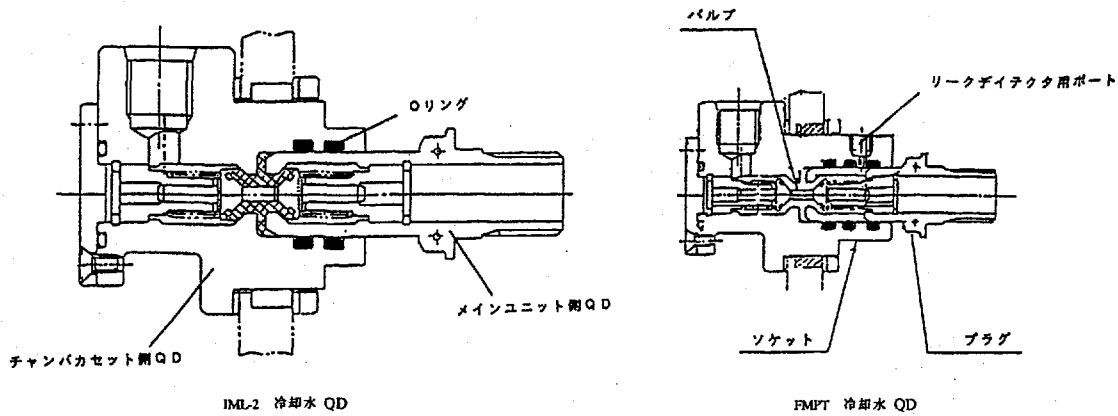


図 2.3.3.1-5 FMPT, IML-2 冷却水 QD

た理由は、ポンプの長寿命化、発生騒音低減、熱交換器の重量低減、圧力損失低減である。冷却水 QD に関しては、FMPT ではチャンバカセットがレイトアクセス品であったため、リークディテクタがあり QD 部に Oリングが 1 つ多く取り付けられている(図 2.3.3.1-5)。つまり QD 脱着により、エアが混入する量は減少している。

圧力低下に関しては、FMPT ではチャンバカセットがレイトアクセス品であったため保管期間が約 1 日と短く、微小リークは問題にはならなかったが、IML-2 では約 2 ヶ月と長く、微小リークが蓄積し、顕在化しやすい傾向にある。

2.3.3.2 泳動異常不具合解析

1) 図 2.3.3.2-1 に泳動異常となる要因を FTA で示す。

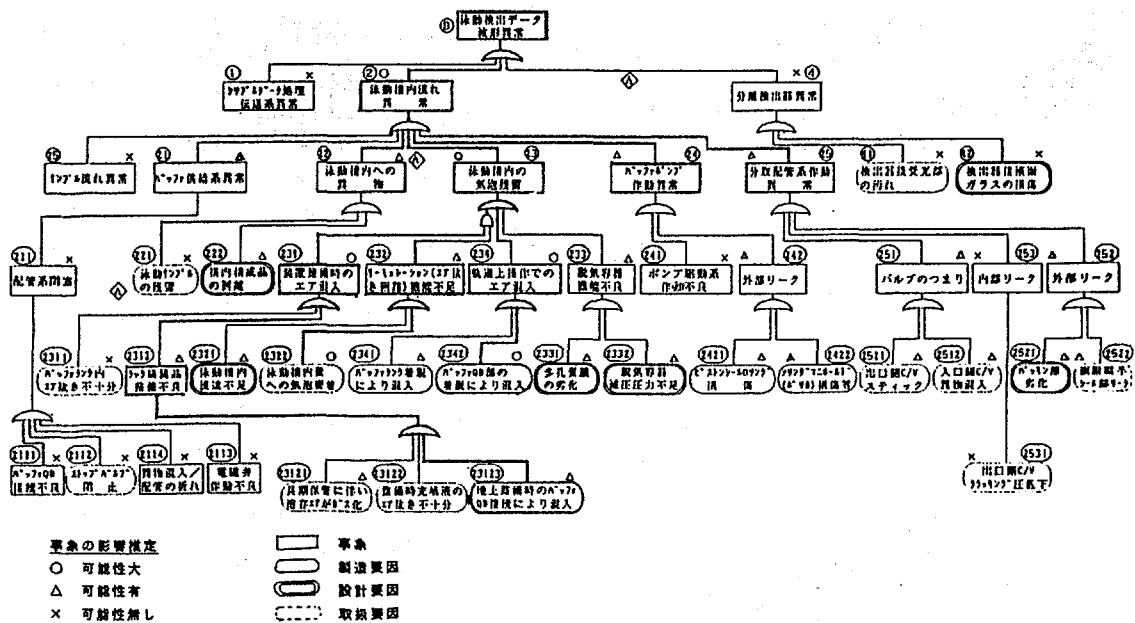


図 2.3.3.2-1 吸光度検出データ異常要因分析

2) KSCでの検証の結果、判明した事項は次の通りである。

① 帰還後の泳動槽より、約 12 cc のエアが回収された。また、泳動槽上流側配管からも約 2 cc のエアが回収された。

但し、この中には、打ち上げ前のバッファ液配管 QD 取付 1 回分による混入エアを含む。

② エアを混入させた状態で装置全体を横転させ、吸光度データを取得したところ、軌道上と同様の吸光度データが再現した。

③ 装置の機能点検の結果、水ポンプより間欠的な異音がする外は、ハードウェア上特に異常は見られなかった。なお、この異音については、軌道上での水ポンプの空運転の結果、ベアリングが磨耗したものであることが国内での検査結果より判明した。

3) 国内にて、バッファ液 QD 着脱によるエア混入量を計測した結果は、1 回あたり平均 0.9 cc であった。(6 回 × 6 セット実施)

4) 以上のことから装置帰還時泳動槽内に残留していたエア (約 12 cc) にほぼ相当する量のエアが軌道上の装置修理作業 (冷却水軌道上メンテナンス) のチャンバカセット着脱に伴うバッファ配管 (両端 QD 接続) により混入することが主な原因と確かめられた。泳動槽内に入ったエアはバッファ流速が低いこと、並びに槽出口部が比較的濡れ性の悪いフッ素系樹脂であることから槽内に止まり、流れを阻害したと考えられる。また、混入したエアが完全に除去されなかった原因は、エアの大きさから考えバッファポンプの能力では引ききれなかったのではないかと推定される。

5) バッファ系に関し、FMPT との違いは、FMPT ではバッファタンク 1 つで数種類の実験を行ったが、IML-2 では、実験毎にバッファ液の交換が可能なようにサブユニットをメインユニットとは別に搭載した。このことにより、メインユニットとサブユニットをつなぐバッファパイピングが必要となった。

### 2.3.3.3 分取不良不具合解析

1) 図 2.3.3.3-1 に分取不良となる要因を FTA で示す。

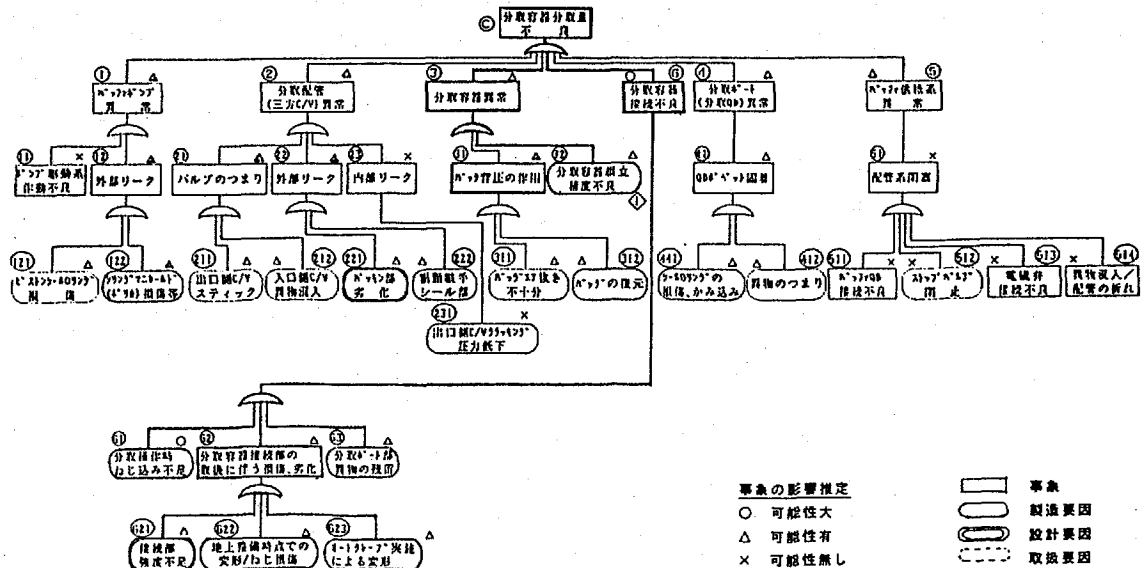


図 2.3.3.3-1 分取容器分取不良要因分析



2) KSCでは、未使用の地上対照品を使用し、ほぼ分取機能に問題がないことが確認された。

3) 国内にて、フライト分取容器を使用して、分取量を計測した結果を図 2.3.3.3-2 に示す。CHROMOSOME, PITUITARY 用分取容器は軌道上と同傾向の分取量となった。ANTIBODY については、分取量のばらつきはあるが、軌道上とは異なる傾向を示している。

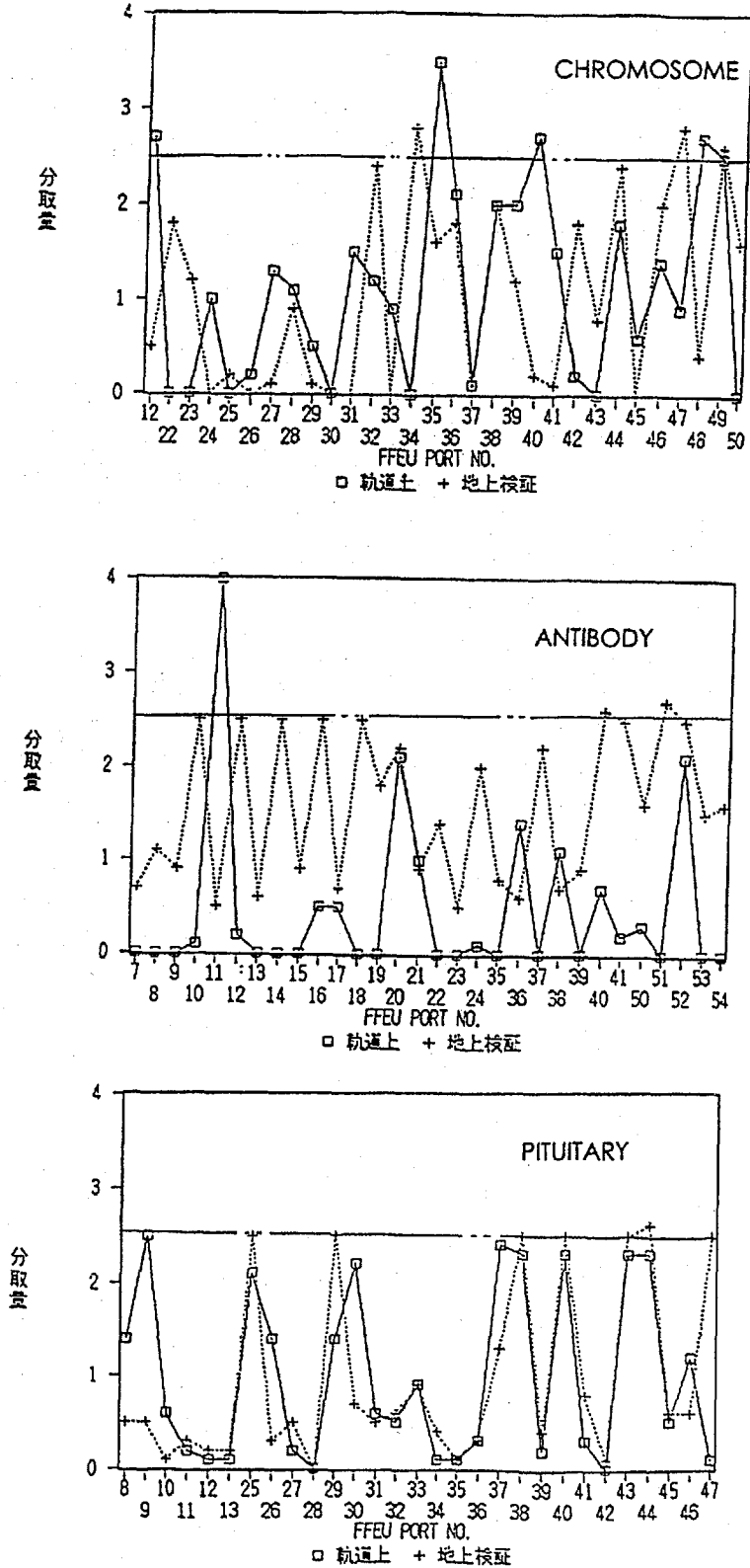


図 2.3.3.3-2 分取容器分取量結果

4) フライト品分取容器については、QD 取り付け部隙間が一定でなく変形していることが拡大目視観察の結果認められている。

① 原因としては、分取容器 QD 接続部底面の曲がりにより、分取ポートとの干渉がおき、分取ポート側ボベットシール用 Oリングの押しつぶし(0.2 mm)による流路切換えができなくなったためと考えられる。(図 2.3.3.3-3)

② 分取容器 QD 接続部底面の曲がりは、設計的には分取容器ノブを指で回す程度以上の力には強度的に耐えられないものであったが、このことが十分周知徹底できていなかったため外筒部を手で握り強く締め付けたことにより発生したと推定される。

実運用では器材の取り扱いに対する認識の少ない要員が操作する可能性があると言う前提で強度をもたせた設計にすべきであった。

5) 分取量が規定量から離れるほど多くでる不具合は飛行前の分取配管点検では生じていない。原因としては、三方チェック弁内の出口側チェックバルブが常時開の状態になってしまい、分取容器を取り付けた段階で泳動槽側から液がリークしていたため分取量が多くなったと推定される。但し、必ずしも再現はしておらず、チェックバルブへの異物の混入等が原因ではないかと推定される。なお、ANTIBODY については、上記分取容器の変形だけではなく、軌道上での接続不良も要因として考えられる。

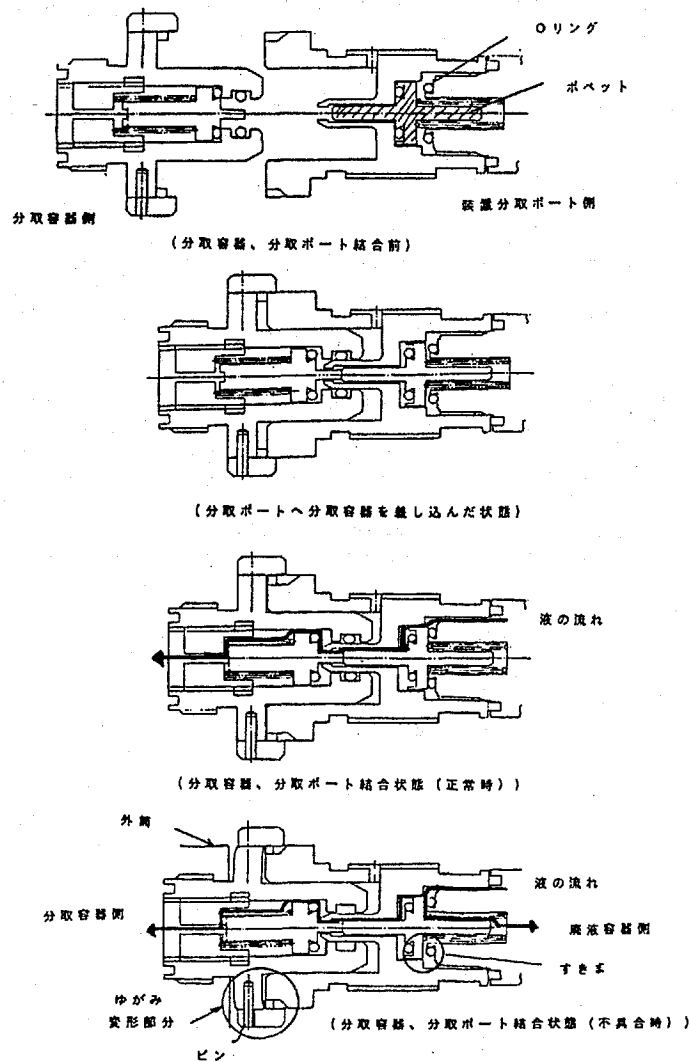


図 2.3.3.3 分取容器結合部

- 6) 受入試験時には、分取治具による全分取ポートとの組み合わせ確認及び分取容器のランダムに5ヶ所のポートとの組合せ確認を実施し問題のないことを確認している。その後、打ち上げ直前には容器洗浄等PIによる準備作業が行われ、外観検査を行い、問題の少ないものを搭載した。FMPTとの比較という点では、設計は全く同一であるにもかかわらず、FMPTでは同様の不具合は発生しなかった。

### 2.3.3.4 開発成果

FFEUの主な機能に対する本ミッションにおける開発成果を以下に示す。

- 1) 低圧水銀灯とイメージセンサを使用した吸光度データ検出器は、所期の性能を発揮し、泳動データを得ることができた。また軌道上での吸光度モニタシステムも問題なく作動した。
- 2) 軌道上で泳動バッファタンクを取り替えることにより各種の泳動実験に対応でき、かつレイトアクセスする機器を必要最小限とすることができた。
- 3) バッファタンク、チャンバカセット等のバイオクリーニング技術を、ほぼ確立することができた。
- 4) 培養と泳動実験等を組合せ、一連の試料処理を軌道上で行うことができた。特に顆粒濃縮器具は新規開発であったが問題なく機能することが確認できた。
- 5) FFEUハードウェアの評価詳細については表2.3.3.4-1に示す。

表 2.3.3.4-1 FFEU 評価結果

No	項目	ミッション時の状況	結果
1	バッファ液の軌道上交換	3組の内1組について近接スイッチ不動作が生じたがバッファ液供給は可能であった。	該当バッファタンクは配管接続 QD の寸法が大きかったことにもよるので、液供給は問題無し、またタンクを十分押し込むことによりスイッチ作動が可能であった。
2	吸光度モニタ	軌道上及び地上共吸光度データの取得が可能であった。	軌道上泳動実験時の槽中央部データの異常は槽内へのエア混入によるもので、検出器は正常であった。
3	循環モード運転によるエア抜き	軌道上実験実施前に循環モード運転を行ったが、完全なエア抜きは行えなかった。(作動は正常に行われた)	脱気容器自体のエア抜きは可能な状況であったが、泳動槽内にエアが滞留し循環回路(脱気容器)にまわらなかった。
4	試料分取	大半の分取容器が規定量以下の分取量となった。また一部のものは規定量を越えて分取された。	地上整備段階での分取容器 QD 部変形により、流路の切換が十分行えなかった。また分取ポート側3方チェックバルブのクラッキング圧低下により、バッファがリークし分取量を増加させた。
5	主要コンポーネント 冷却水ポンプ	エアのかみ込みにより初期段階では空回りしたが冷却水追加充填後は正常に作動した。	ポンプ機能は確保されたが水潤滑方式のベアリングを有するポンプを空まわりさせたため、転走面が損傷し異音が発生した。
	熱交換器	地上整備段階で内部にエアが残留した。冷却水追加充填後は正常に熱交換/排熱が行えた。	冷却水出口方向を上向きとすることにより装置作動に支障のないレベルまでエア抜き/水充填できることが確認された。
6	付属器具類 培養容器/移し替え 器材	PITUITARY では実施されなかったが、ANTIBODY では試料培養、移し換えの操作で試料準備が行えた。	バッファシリンジのつまりについては、特に不具合と考えられる状態は確認されなかった。
	培養容器/顆粒濃縮 器具	細胞顆粒試料の調製/濃縮が可能で、移し替え操作の上で試料準備が行えた。	
7	装置運用	チャンバカセットのレイトアクセスをやめ、発射直前のシャトル搭載品は付属器具類のみとした。	シャトル内での長期保管に伴う冷却水系の圧力低下(微小リーク)が生じ装置起動不良の一因となった。配管接続部では、発射整備終了前での点検等も考慮が必要と考えられる。

### 2.3.3.5 バイオクリーニング作業評価

打ち上げ前に実施したサブユニット、チャンバカセット、バッファタンクのバイオクリーニングの結果及び飛行後の微生物検査の結果をふまえて、一連のバイオクリーニング作業の評価を行った。

#### 1) 打ち上げ前のバイオクリーニング作業

スケジュールは、NASAによる実験装置のラックへのインテグレーション作業に合わせ、バイオクリーニング後の保管期間を極力短くするように配慮した。国内基礎試験、国内実証試験の結果に基づき計画および手順を定めた。すなわち、実験ラックに直接取り付けられるサブユニットは最も早い時期にバイオクリーニングを実施する必要があった。電気泳動装置の中心部分であるチャンバカセットはスペースラブがシャトルオービターに搭載される直前にバイオクリーニングを行った。バッファタンクおよびサンプルカセット、分取容器その他の収納品はレイトアクセスが可能なため打ち上げ直前にバイオクリーニングを実施した。サンプルカセットや分取容器などは実験試料を直接取り扱うものであるため、実験研究者に作業を委ねた。

#### 2) 結果判定の方法

##### ① 飛行前作業

バイオクリーニング作業の過程の各作業段階毎に、装置内部の洗い液の一部を採取した。各液をミリポア社製ウォーターサンプラーキットを用いてSPC総生菌、総生菌、大腸菌群、カビ酵母について生残菌の有無を調べた。

生残菌が検出された場合はその作業段階を繰り返し、生残菌の無い状態にして次の作業段階に進んだ。さらに、搭載直前に試料を抜き取り、上述の方法で無菌であることを確認するとともに一部を飛行後まで冷蔵保管した。

検出された生残菌について、ケネディ宇宙センターの微生物検査を担当するバイオネティクス社の微生物学部門に依頼して菌種を同定した。

##### ② 飛行後評価

飛行後の試料及び地上対照の試料を、本来の実験目的を損なわない範囲で実験研究者からもらい受け、検査を行った。

#### 3) 飛行前バイオクリーニング作業の結果

バイオクリーニング作業の進行に従って作業計画を大幅に変更せざるを得ない状況が生じた。第1点は酸化エチレン(EO)ガス滅菌が適用できなくなったことである。サブユニット配管をガス滅菌した後にポリカーボネート部材にクラックが発見されたため、以後ポリカーボネート部材に対し、EOガス滅菌を適用しないことになった。

第2点はチャンバカセットの分取配管内の汚染が極めて執拗かつ頑固な点であった。当初は分取配管系を分解せずガス滅菌する計画であったが、前記の理由により効果の低い次亜塩素酸塩溶液による洗浄に変更したところ、系内の汚染物が一挙には除去されず徐々に際限なく排出され続けた。そのため、全体を部品レベルまで分解して個々に超音波洗浄を行い、再組立後更に全体を次亜塩素酸溶液で殺菌した。

以上のような困難はあったものの、結果的に無菌性が求められるバッファタンク、サブユニット配管、チャンバカセット、サンプル容器、分取容器について、雑菌が一切検出されない状態にして搭載する事ができた。

#### 4) 飛行後

無菌性が求められるバッファタンク、サブユニット配管、チャンバカセット、サンプルカセット、分取容器について帰還後、微生物汚染状態を検査した。全てのバッファタンクおよび軌道上で使用しなかったサンプルカセット、分取容器は無菌状態を保っていた。それ以外のサンプルおよび分取容器は研究者によって本来の実験目的に使われたため微生物汚染の解析はできなかったが、特に実験に影響するような汚染は報告されていない。

泳動槽を含むチャンバカセット各部からは多数の雑菌が検出された。これは、軌道上では完全無菌操作が不可能であるため、実験の過程で少量の空气中浮遊細菌が混入しミッション終了から装置の回収までの約1ヶ月半のあいだに増殖したものと推測される。

以上をまとめると、全体として実験要求を満足するバイオクリーン度が達成されていたと結論できる。

#### 5) 全体評価

電気泳動システム全体としての生物学的清浄度を保つために最も重要な泳動バッファは飛行後まで無菌性を維持することができたことは評価できる。

泳動槽が軌道上実験の時点で無菌であったことを証明する直接のデータは、本来の実験目的を優先する以上取りようがなく、推論に頼らざるを得ない。しかし、仮に極僅かな微生物汚染があっても、大量の無菌のバッファで洗い流されかつ無菌の試料が注入されるため、泳動実験には全く支障はなく、泳動槽内のデータが無くても、今回実施したバイオクリーニング作業は有効であったと結論できる。

飛行後に検出された泳動槽内の微生物汚染は以下のように説明できる。上述のバッファタンク内部は無菌であったが、QD接続部など実験操作中に外気に触れる部分で且つ少量の液が付着することが避けられない箇所には雑菌が検出された。これらの雑菌がQDの脱着などによって泳動槽内に侵入し、帰還後から検査を実施できるまでの約1ヶ月間の取り出し作業期間中に増殖したと考えるのが自然である。

問題点は、このようなバイオクリーニング作業が必要であったという点である。はじめから装置が内部の洗浄と滅菌を想定して設計されていることが理想的である。

### 2.3.3.6 電気泳動装置(FFEU)の微生物汚染解析

#### 2.3.3.6.1 検討方法の概要

IML-2 ライフサイエンス実験搭載装置および試料より飛行後解析用試料を採取し、軌道上実験における微生物汚染等を解析する。併せて、ハンガーL内で実施された地上対照実験からも、本実験に対応した試料を採取し同様の評価を行う。

#### 2.3.3.6.2 試料採取および輸送・保存

- 1) 試料採取
- 2) 試料採取法
- 3) 試料の輸送・保存

##### 2.1.3.4.2 項参照

### 2.3.3.6.3 微生物の培養・計測

- 1) 使用培地
- 2) 培養条件
- 3) 菌数計数法

2.1.3.4.3 参照

#### 4) 菌数計測結果

採取した 100 検体について細菌類と真菌類に分けて菌数測定を行ったが、そのうち飛行後解析試料を中心とした 9 検体についての結果を表 2.3.3.6.3-1 に示す。なお、表に記載の N.D. は菌が検出されない場合を示す。

飛行前の試料については無菌性が良く保たれていた。飛行後においてもすべてのバッファタンク内は完全に無菌環境が維持されていた。廃液バッグ中にはかなりの菌の混入が見られたが、軌道上でのメンテナンスに伴うパイプラインの脱着の際に混入した可能性が高い。

表 2.3.3.6.3-1 飛行後解析サンプルリストおよび菌数測定結果

装置名：電気泳動装置(FFEU) (水溶液試料)

単位：CFU/ml

試料	採取日	採取量等	備考	No.	細菌類	真菌類
バッファタンク (CHROMOSOME)	7/27	100 ml	飛行後	156	N.D.	N.D.
バッファタンク (PITUITARY)	7/27	100 ml	飛行後	157	N.D.	N.D.
バッファタンク (ANTIBODY)	7/27	100 ml	飛行後	158	N.D.	N.D.
廃液バッグ (ANTIBODY)	7/26	200 ml	飛行後	159	$5.0 \times 10^4$	$1.2 \times 10^5$
廃液バッグ (PITUITARY)	7/26	200 ml	飛行後	160	$4.0 \times 10^5$	$1.0 \times 10^6$
廃液バッグ (PITUITARY)	7/26	200 ml	飛行後	161	$7.0 \times 10^6$	$7.4 \times 10^6$
メインユニット冷却水	9/14	15 ml	飛行後	261	$3.7 \times 10^3$	$3.7 \times 10^3$
チャンバセット冷却水	9/14	13 ml	飛行後	262	$2.4 \times 10^4$	$9.9 \times 10^3$
エア抜きポート残液	9/16	2.2 ml	飛行後	271	$6.3 \times 10^5$	$4.0 \times 10^5$

### 2.3.4 反映事項

次期ミッションへの反映事項としては、次の点があげられる。

#### 1) エア抜き対策

- ・ 流体ラインにエアが溜まりにくい構造の採用。
- ・ 若干の流体体積の変動があっても与圧を保持できるようなアキュムレータの採用。
- ・ エア混入を防ぎ、かつ定量的に充填/確認可能な方法の確立。
- ・ エア混入の際にも、安定した性能を示すポンプの採用。

- ・ 軌道上でのメンテナンスを前提としたハードウェア設計。
  - ・ 残留エアのハンドリング技術の開発。
  - ・ QD脱着に伴うエア混入量の低減。
- 2) 分取容器 QD 部の設計見直し
- ・ 人間工学的観点から分取容器の取付け機構の簡略化。
  - ・ QD 部の剛性を高める等装置の再現性の確保。
  - ・ 地上実験時の試料からの異物の混入の防止。
- 3) バイオクリーニング方法に適したシステム、構造への設計変更
- ・ 特定の滅菌方法が適用可能な部材毎にブロック化する設計配慮が求められる。
  - ・ 今後は通常の泳動条件だけでなく洗浄・滅菌等のメンテナンス性も考えた設計にすべきである。

## 2.4 放射線モニター装置 (RRMD)

### 2.4.1 装置概要

放射線モニター装置はスペースラブの船内に達する高エネルギーの宇宙放射線をリアルタイムで計測するための装置である。この装置の特徴は、宇宙放射線の性質、例えば入射時刻、入射方向、エネルギースペクトルなどをリアルタイムで計測し、伝送することが可能なことである。センサー部は粒子放射線のエネルギー符号と大きさを直接計測できる分光型センサーを持っており、スペースラブの任意の場所に取り付けることができる。生物試料をセットしたサンプルホルダーはセンサー部の上部に固定される。(図 2.4.1-1)

#### 仕様

検出粒子の線種	
入射核種(イオン)	検出エネルギー/核(MeV)核電荷に対して
He	10 - 55
C	18 - 110
Ne	24 - 130
Mg	26 - 160
Si	28 - 180
Ca	34 - 210
Fe/Ni	38 - 210

検出開口角	120度 × 120度
電荷分解能	核電荷 40 以下において 0.1 acu
電送データ	入射時刻、入射方向、エネルギースペクトル
装置寸法/重量	
- コントロールユニット	483W × 133H × 300D (mm) 約 10 kg
- センサー部	320W × 160H × 350D (mm) 約 13 kg

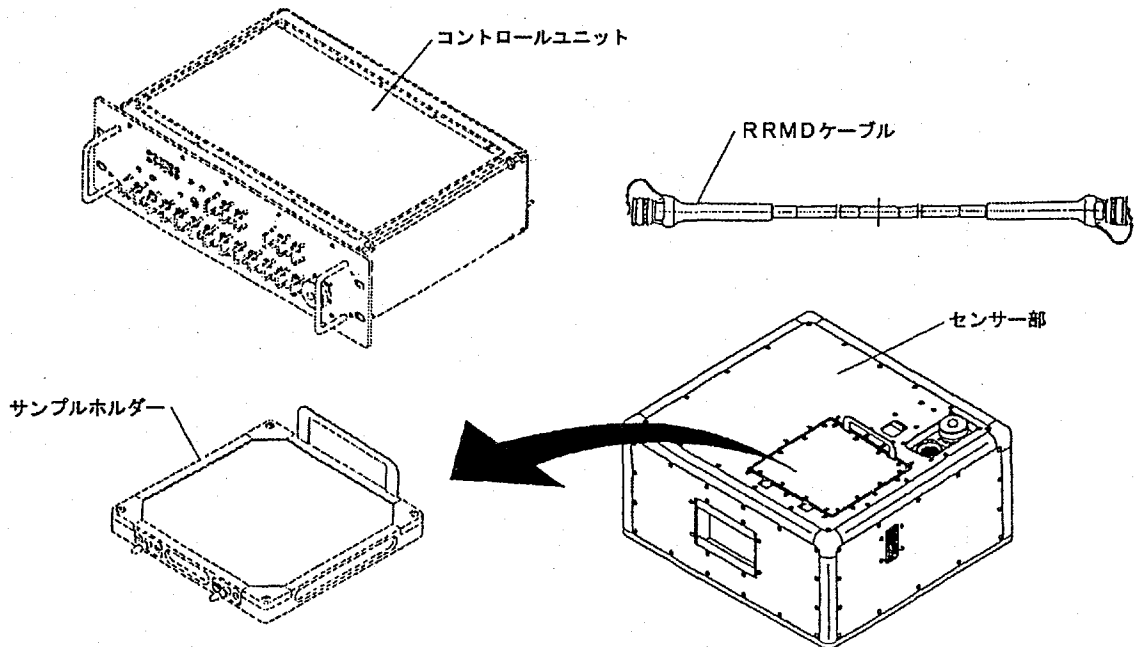


図 2.4.1-1 RRMD 外観図



## 2.4.2 装置稼働状況

- 1) 放射線モニター装置(RRMD)は MET Day 00 / 08 時頃に一旦パワー ON されたが、スベスラブ HRM (High Rate Multiplexer)系不具合のため、実験データは取得できなかった。その後 MET Day 00 / 23 時頃、PDB (Power Distribution Box)スイッチの誤操作により、RRMD パワーが落ちたので HRM 系が復旧するまで、そのままパワー OFF することとした。
- 2) MET Day 01 / 21 時頃、HRM 系が復旧したため、MET Day 01 / 22 時頃、RRMD のキャリブレーションを Position 1 で実施した。但し、キャリブレーションモードのままとなっていたため、搭乗員に連絡し、計測モードに戻してもらった。その後 MET Day 05 に Position 1 での方向変更を、MET Day 07 に Position 2 への位置変更を実施した。
- 3) MET Day 08 / 02 時頃にバイアス電流が高くなったので、フィルターを点検してもらったが、目詰まりはなかった。その後もバイアス電流は上昇を続けたため、MET Day 09 / 21 時頃、一旦 Position 1 に位置を戻した。(この時点では Position 3 は他実験と干渉し、使用できなかった。)
- 4) MET Day 10 / 18 時頃 Position 3 へ位置変更を実施、MET Day 12 / 13 時頃パワー OFF し、実験を終了した。パワー OFF 前のバイアス電流 1 / 2 は 219  $\mu$ A / 348  $\mu$ A であった。(リミット値は各 400  $\mu$ A)
- 5) 図 2.4.2-1 にバイアス電圧データを図 2.4.2-2 にバイアス電流データを図 2.4.2-3 に温度データを示す。バイアス電流は温度の関数であり、温度の上昇に伴って、増加しているが、センサ部温度が高々 23  $^{\circ}$ C であることから考えて、何らかの原因で検出素子のリーク電流が増加したものと考えられる。

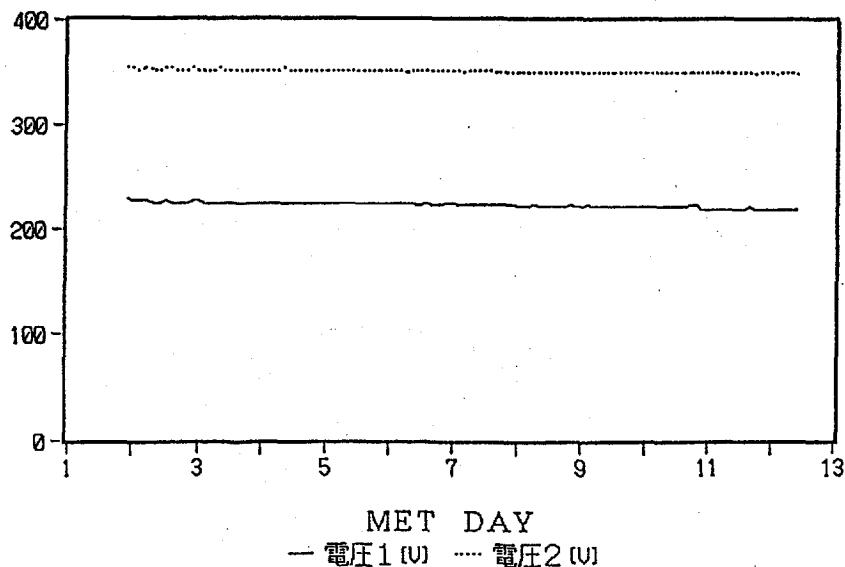


図 2.4.2-1 RRMD バイアス電圧データ推移

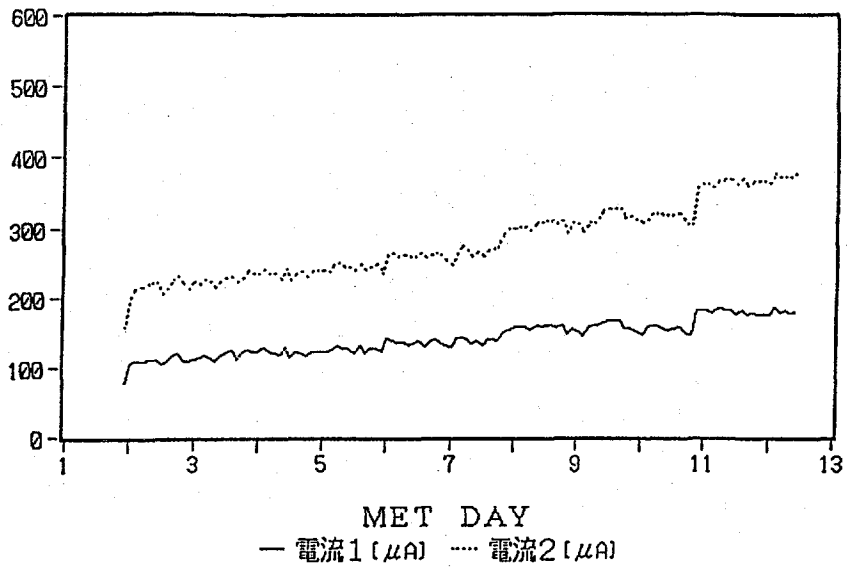


図 2.4.2-2 RRMD バイアス電流データ推移

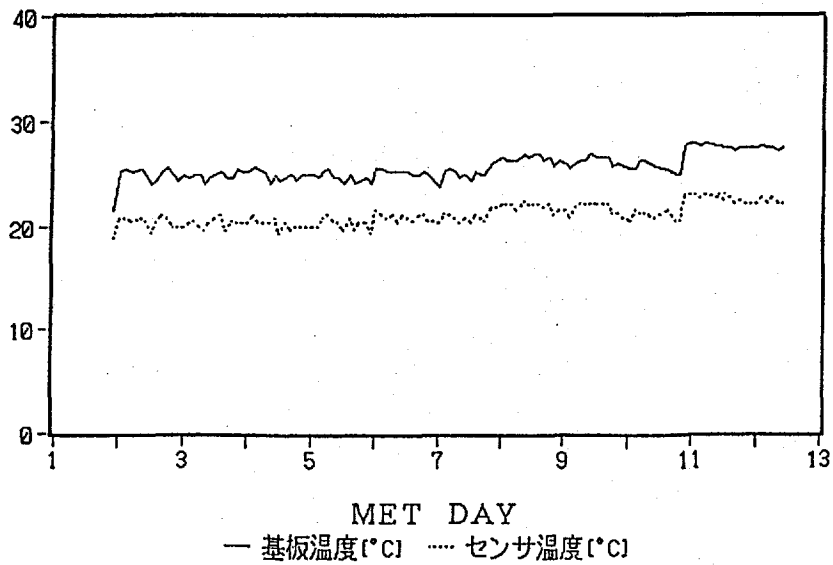


図 2.4.2-3 RRMD 温度データ推移

## 2.4.3 機能性能評価

### 2.4.3.1 バイアス電流評価

RRMDは、本年7月8日 KSCより打ち上げられたスペース・シャトルに搭載され14日18時間の飛行の後、シャトルのKSCへの帰還に伴い回収され、実時間で251.3時間稼働したが、その間Li-drift型シリコン検出器の特性はかなりの劣化を示した。その原因を明らかにするために、地上で保存された予備品と実際にフライトで使用されたものについて漏洩電流と電氣的雑音によるエネルギー分解能の劣化を調べ、これまでのデータと比較検討することを試みた。ここに、これまでに得られた結果を表2.4.3.1-1(漏洩電流)、表2.4.3.1-2(電氣雑音によるエネルギー分解能)に示す。この表で、1994年12月の日付のあるものは今回の測定であり、1994年7月はフライト初期のシャトル内での測定結果である。それ以前の測定は、地上での実測結果である。

図2.4.3.1-1にミッション期間も含めたバイアス電流、温度のデータを示す。バイアス電流がミッション期間で急激に増加していることから、スペースラブ内エアの吸引によるコンタミネーションがリーク電流の増加原因と推定される。

#### 1) 漏洩電流特性

表2.4.3.1-1には、今回の測定値と共に、予備品では1年4ヶ月前の測定値を、フライト品では2年7ヶ月前の測定値を示してある。予備品では、規定電圧下での漏洩電流は、若干改善ぎみのD3、D4を除き増加の傾向にあるが大差はない。これに対し、フライト品では、PSD-1とPSD-2が若干改善ぎみでありD3の漏洩電流の増加が僅かなのに対し、他は、4.5倍から13.5倍程度漏洩電流の増加を見ている。特にD4の増加は著しく13.5倍にも達している。D3、D4、D5、D6の和は434.3  $\mu\text{A}$  となり400  $\mu\text{A}$  を越えるのは当然である。後でも述べるようにD4とD5はフライトの後半で電氣的雑音のレベルが増加し不安定となった。漏洩電流と電氣的雑音のレベルは必ずしも対応しないがある程度の相関が見られたことは確かである。

表 2.4.3.1-1 漏洩電流

1994年12月9日			1994年12月9日		
	1994年12月測定 21°C 32%	1993年8月測定 20°C 46%		1994年12月測定 21°C 32%	1992年5月測定 20°C 60%
HV 電圧 (V)	予備モデル ( $\mu\text{A}$ )	予備モデル ( $\mu\text{A}$ )	HV 電圧 (V)	フライトモデル ( $\mu\text{A}$ )	フライトモデル ( $\mu\text{A}$ )
PSD-1			PSD-1		
120	1.4	1.4	120	1.9	1.5
PSD-2			PSD-2		
120	2.2	1.9	120	1.9	1.4
D1			D1		
120	12.5	8.6	120	27.2	5.7
D2			D2		
240	66.1	60.8	240	238.0	33.3
D3			D3		
360	15.7	15.9	360	23.6	14.6
		(355V)			
D4			D4		
360	16.5	18.7	360	206.0	15.3
		(355V)			
D5			D5		
360	30.8	23.6	360	77.4	17.2
		(350V)			
D6			D6		
360	50.0	37.4	360	127.3	15.9

2) 電氣的雑音のレベル

これらの測定に用いられた増幅回路系のピーキング・タイムは1993年の測定ではすべて15 μsecとし、1994年の測定では、PSDに対してのみ15 μsecを、他の検出器に対しては10 μsecを使用した。RRMDでは10 μsecを使用しているので予備品の15 μsecでの測定値は10 μsecの測定値に比べ若干悪く出ているが、1993年と1994年の間に大きな差はないので、測定結果をそのまま比較することにする。表2.4.3.1-2はそれらの測定結果をまとめたものである。表中の、本年7月の測定は、フライト初期に実測された。予備品についての今回の測定値は、1年4ヶ月前の値と比べPSD-2とD1とがほぼ倍の増加を示しているが、その他の増加の割合はせいぜい30%程度に過ぎない。このような予備品と比べ、飛行後のフライト品はPSD-1とPSD-2を除き、6から13倍と極めて著しい増加を示した。しかも飛行当初の実測値はほとんど1年8ヶ月前の値と変わっていないことを考慮すれば、この劣化は、飛行中から飛行後に起こったと考えざるを得ない。漏洩電流が、飛行開始と共に急激に増加し、その後ほとんど変化しなかったことは実測されている。このことを考慮すると、漏洩電流と電氣的雑音レベルの相関が100%でないことを考慮してもこの電氣的雑音レベルの変化は、シャトルの飛行と共に起こったと考えるべきであろう。しかしD4とD5を除き比較的安定に検出器が動作したことを考えると、電氣的雑音レベルは、漏洩電流に比較して増加したとは考えられない。しかし飛行中に受けた検出器劣化の原因が電氣的雑音レベルの増加につながっていることは明らかである。

表 2.4.3.1-2 電氣雑音によるエネルギー分解能

予備モデルの結果 (Shaping Time : 15μsec, Peaking Time : 150ns)						フライトモデルの結果 (Shaping Time : 5μsec, Peaking Time : 150ns)					
HV 電圧 (V)		Pulse Peak		半 値 幅		HV 電圧 (V)		Pulse Peak		半 値 幅	
		(ch)	(MeV)	(ch)	(MeV)			(ch)	(MeV)	(ch)	(MeV)
<b>PSD - 1</b>						<b>PSD - 1</b>					
120	1993.8	262.3	5.41	7.0	0.140	120	1991.10	345.0	5.46	8.5	0.129
	1994.12	447.3	5.41	13.0	0.181		1994.12	454.0	5.47	13.0	0.157
<b>PSD - 2</b>						<b>PSD - 2</b>					
120	1993.8	264.0	5.44	5.5	0.110	120	1991.10	345.0	5.45	9.0	0.137
	1994.12	450.3	5.37	19.0	0.230		1994.12	453.3	5.46	13.0	0.157
<b>D 1</b>						<b>D 1</b>					
120	1993.8	269.0	5.45	39.0	0.779	120	1993.5	297.7	53.20	12.3	2.195
	1994.12	231.1	5.52	68.8	1.640		1994.7	296.5	53.00	10.0	1.791
<b>D 2</b>						<b>D 2</b>					
240	1993.8	77.0	5.38	23.0	1.517	240	1993.5	269.9	54.60	20.8	4.207
	1994.12	237.8	5.55	84.5	1.970		1994.7	268.4	54.30	25.4	5.147
<b>D 3</b>						<b>D 3</b>					
360	1993.8	122.0	5.54	37.0	1.318	360	1993.5	332.9	53.40	14.7	2.350
	1994.12	229.0	5.50	71.3	1.710		1994.7	332.0	53.30	19.9	3.196
<b>D 4</b>						<b>D 4</b>					
360	1993.8	416.0	5.60	23.0	0.299	360	1993.5	318.8	51.70	36.0	5.828
	1994.12	460.5	5.53	22.5	0.270		1994.7	318.8	51.70	57.8	9.377
<b>D 5</b>						<b>D 5</b>					
360	1993.8	122.0	5.54	38.0	1.553	360	1993.5	298.1	54.90	30.8	5.664
	1994.12	232.6	5.44	77.0	1.800		1994.7	298.5	54.90	56.6	10.411
<b>D 6</b>						<b>D 6</b>					
360	1993.8					360	1993.5	331.9	51.40	32.2	4.982
	1994.12	217.6	5.54	39.3	1.000		1994.7	329.1	51.00	51.2	7.943
							1994.12	347.1	274.30	38.3	30.290

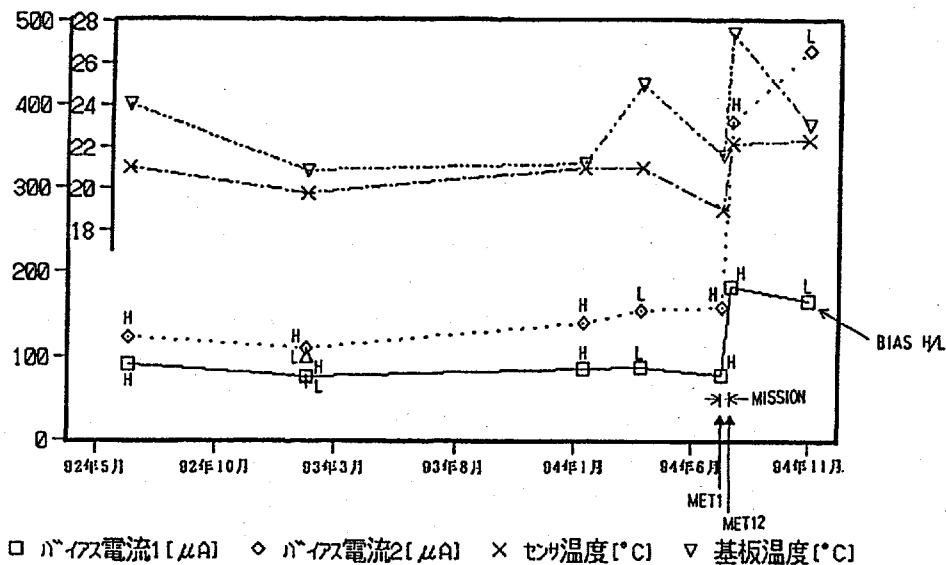


図 2.4.3.1-1 RRMD バイアス電流経緯

3) フライト品の特性劣化の原因

まず、始めに考えられることは、飛行中のシャトル内の環境がかなり悪かったのではないかと云う点である。例えば、宇宙飛行士から発散される汗に含まれるナトリウムなどが気中に浮遊し、それらがシリコン検出器の表面に付着する。これは、検出器の漏洩電流を増やす原因となるばかりでなく表面のポテンシャル障壁の破壊につながる。特にRRMDの場合は検出器を冷却するために空気を循環させておりそれが検出器の劣化を早めたと考えられる。PSDはイオン・インプランテーションで表面のポテンシャル障壁を作っているため若干のナトリウム・イオンの付着はその障壁に影響を与えないがSi(Li)検出器の場合は、表面障壁型となっているため顕著にその影響を受けることとなる。一方、ナトリウム・イオンの表面付着は漏洩電流の増加を来すが、表面のポテンシャル障壁を破壊するにはナトリウム・イオンはあるていど内部に入り込む必要があり、そのために時間が掛かるとすれば漏洩電流の増加と電氣的雑音レベル劣化の時間差の説明は附く。

2.4.3.2 開発成果

- 1) RRMDは、所期の機能を果たし、リアルタイムによる放射線検出及び地上でのデータ解析を問題なく行うことができた。
- 2) 放射線検出部を可搬型とすることにより、軌道上で位置、方向を任意に変更することができるシステムを開発した。

### 2.4.3.3 放射線モニター装置(RRMD)の微生物汚染解析

#### 2.4.3.3.1 検討方法の概要

IML-2 ライフサイエンス実験搭載装置および試料より飛行後解析用試料を採取し、軌道上実験における微生物汚染等を解析する。併せて、ハンガーL内で実施された地上対照実験からも、本実験に対応した試料を採取し同様の評価を行う。

#### 2.4.3.3.2 試料採取および輸送・保存

- 1) 試料採取
- 2) 試料採取法
- 3) 試料の輸送・保存

2.1.3.4.2 項参照

#### 2.4.3.3.3 微生物の培養・計測

- 1) 使用培地
- 2) 培養条件
- 3) 菌数計数法

2.1.3.4.3 項参照

#### 4) 菌数計測結果

採取した 31 検体について細菌類と真菌類に分けて菌数測定を行ったが、そのうち飛行後解析試料を中心とした 14 検体についての結果を表 2.4.3.3.3-1 に示す。なお、表に記

表 2.4.3.3.3-1 飛行後解析サンプルリストおよび菌数測定結果

装置名：ドシメーター

単位：CFU/cm<sup>2</sup>

試料	採取日	採取量等	備考	No.	細菌類	真菌類
ドシメーター①-1	7/23	拭き取り	飛行後	1	N.D.	N.D.
ドシメーター①-2	7/23	拭き取り	飛行後	2	N.D.	N.D.
ドシメーター①-3	7/23	拭き取り	飛行後	3	N.D.	N.D.
ドシメーター①-4	7/23	拭き取り	飛行後	4	N.D.	N.D.
ドシメーター①-5	7/23	拭き取り	飛行後	5	N.D.	N.D.
ドシメーター①-6	7/23	拭き取り	飛行後	6	N.D.	N.D.
ドシメーター①-7	7/23	拭き取り	飛行後	7	N.D.	N.D.
ドシメーター②-1	7/23	拭き取り	飛行後	37	N.D.	N.D.
ドシメーター②-2	7/23	拭き取り	飛行後	38	N.D.	N.D.
ドシメーター②-3	7/23	拭き取り	飛行後	39	$1.3 \times 10^4$	$1.5 \times 10^3$
ドシメーター②-4	7/24	拭き取り	飛行後	40	N.D.	N.D.
ドシメーター②-5	7/24	拭き取り	飛行後	41	N.D.	N.D.
ドシメーター②-6	7/24	拭き取り	飛行後	42	0.4	N.D.
ドシメーター②-7	7/24	拭き取り	飛行後	43	N.D.	N.D.

載の N.D. は菌が検出されない場合を示す。

飛行前、飛行後ともに装置表面にほとんど菌の付着は認められなかった。RRMD やドシメーターなどの金属表面においては一般に菌の繁殖はわずかである。ふきとりにより菌の認められた試料については、何らかの有機物の付着が原因と思われる。

#### 2.4.4 反映事項

次期ミッションへの反映事項としては、検出素子の劣化防止対策として、空冷方法の見直しがあげられる。すなわち、検出素子部をスペースラブ空気より、隔離することが必要である。なお、フェーズ I 宇宙放射線計測に対しては、本件は既に反映済みである。

## 2.5 高温加圧型電気炉(LIF)

### 2.5.1 装置概要

高温加圧型電気炉(LIF; Large Isothermal Furnace)は、宇宙の微小重力環境を利用して、材料の溶融・凝固実験や焼結実験などを高温中で実施できる実験装置である。

この装置は、高温加圧型電気炉本体、制御装置、ガス供給装置、バルブアクセスパネル、真空排気パネルなどから構成されている。実験試料は試料カートリッジに封入して電気炉本体に組み込む。試料カートリッジは宇宙飛行中に交換が可能で、1回の飛行で複数の実験を実施できる。試料カートリッジには通常タイプのほかに試料加圧機構付きのタイプがある。加圧機構付き試料カートリッジでは、ガス供給装置から供給されるヘリウムガスの圧力で加圧ロッドを駆動することにより、実験中に試料を加圧することができる。この装置の運転は試料カートリッジの装着及び取り出し以外は自動化されており、あらかじめ設定した温度プロファイルにしたがって、加熱や冷却などが行われる。冷却時には、ガス供給装置からヘリウムガスを炉内へ導入して、試料を急速に冷却することも可能である。

LIFの仕様を表 2.5.1-1 に、概観写真、ラック内実験装置配置図を図 2.5.1-1、2 に示す。

表 2.5.1-1 高温加圧型電気炉の仕様

加熱温度	最高温度 1600 °C
加熱特性	室温から 1600 °Cまで 80 分以内
冷却特性	1600 °Cから 45 °Cまで 240 分以内 (ヘリウムガスで急速冷却したとき)
試料温度均一性(軸方向) ・ 試料温度が 1600 °Cのとき - 試料長さ 100 mm に対して - 試料長さ 160 mm に対して ・ 試料温度が 750 °Cのとき - 試料長さ 90 mm に対して	真空雰囲気; タングステン試料 最高/最低温度の差 5 °C以下 最高/最低温度の差 8 °C以下 ヘリウムガス雰囲気; チタン試料 最高/最低温度の差 18 °C以下
温度制御 - カートリッジ温度設定精度 - カートリッジ温度変動度	± 3 °C(常温から加熱開始後 100 分以内にて) ± 1.5 °C(定常状態での 60 分間にて)
試料寸法	最大 26 φ × 168 (mm)
試料加圧力	最大 6.5 kg/cm <sup>2</sup> (絶対圧)
装置寸法/重量	スペースラブ用ダブルラックの 1/2 に相当 約 175 kg



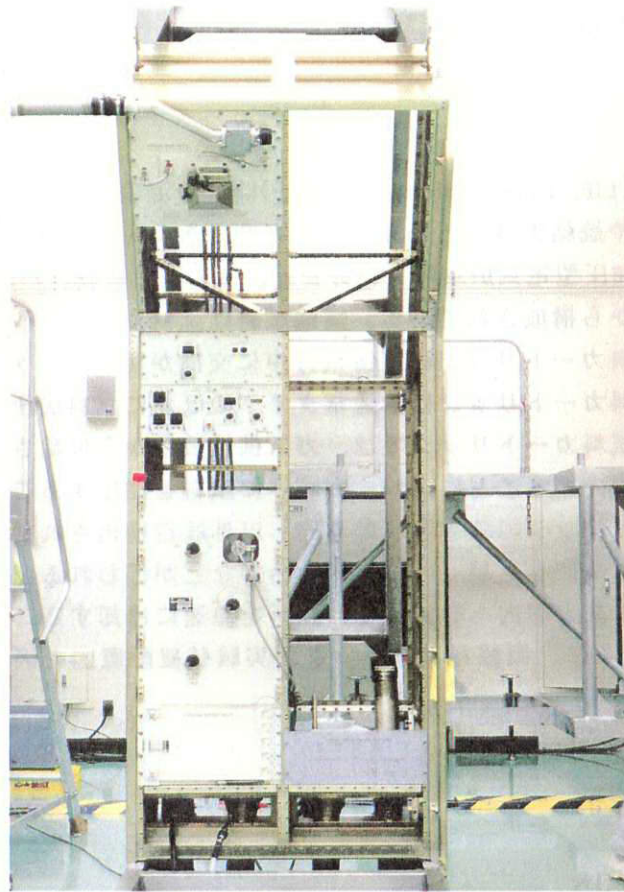
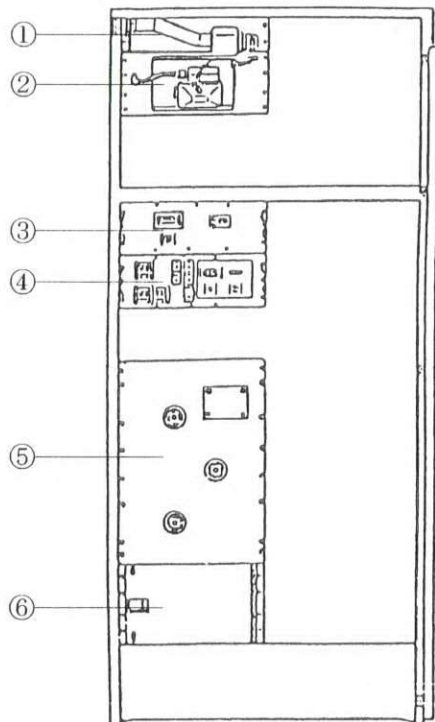


図 2.5.1-1 高温加圧型電気炉 概観写真



- ① 真空排気パネル
- ② 電気炉本体
- ③ 制御装置－実験部
- ④ 制御装置－データインターフェイスユニット
- ⑤ ガス供給装置
- ⑥ バルブアクセスパネル

図 2.5.1-2 ラック内実験装置配置図

## 2.5.2 装置稼働状況

### 2.5.2.1 装置稼働の概要

軌道上実験期間中、実験準備、各サンプルの加熱試験および実験後処理が実施された。すべてのイベントは、良好に計画どおり終了した。それぞれの実験テーマの実施状況は表 2.5.2.1-1 に示す。

表 2.5.2.1-1 実験テーマ実施状況

実験テーマ	実施状況
The Gravitational Role in Liquid Phase Sintering	良好
多元系化合物半導体融液の均一分散・混合化	良好
微小重力下における TiAl 系金属間化合物の組織制御とその機械的性質	良好

各実験とも、加熱冷却制御は正常であり、真空弁・電磁弁等の機器の作動も正常であった。クルー操作によるカートリッジ交換及びカバーの開閉等も支障なく実行された。全ての実験が計画通り実施された。表 2.5.2.1-2 に加熱試験の結果について示す。

表 2.5.2.1-2 加熱試験実施状況

実験 No	開始時刻 *	終了時刻	結果
IM02A	MET Day 05 / 03 時 10 分	MET Day 05 / 09 時 41 分	良好
IM02B	MET Day 08 / 20 時 54 分	MET Day 09 / 03 時 32 分	良好
IM02C	MET Day 09 / 03 時 43 分	MET Day 09 / 12 時 08 分	良好
IM03	MET Day 09 / 12 時 34 分	MET Day 09 / 16 時 39 分	良好
IM04	MET Day 10 / 03 時 20 分	MET Day 10 / 09 時 21 分	良好

\* 試料交換開始時刻を示す。

(注)各実験 No. はサンプル No. を示し対応する実験テーマ名称は以下のとおり。

IM02A/B/C-- ” The Gravitational Role in Liquid Phase Sintering ”

IM03----- ” 多元系化合物半導体融液の均一分散・混合化 ”

IM04----- ” 微小重力下における TiAl 系金属間化合物の組織制御とその機械的性質 ”

## 2.5.3 機能性能評価

### 2.5.3.1 機能性能評価詳細

軌道上実験においての装置の機能性能はすべて良好であった。装置稼働時の各系の詳細評価を下記に示す。

#### 1) 制御系

試料交換後、真空排気、加熱、ヘリウムガス充填等タイムシーケンスは正常に実行された。

一部の試験でカートリッジ基部温度が予定時間内で 45℃以下に降温せず安全上、試料交換モードへ移行しないようなプログラムが動作した。調査の結果実験中の冷却水差

圧が予定した値より低くこのため冷却水流量が低下しているものと推定され、クーリーによるバイパスバルブの全閉、およびインレットバルブの全開操作を実施した。尚、これによる実験およびタイムラインへの支障はなかった。他、加熱実験中における作動状態表示、カートリッジカバーロック等の動作において、エラー、ウォーニング等の発生はなく、正常に作動したことを確認した。

各テーマ実験における加熱制御は、電力、ヒータ近傍温度、カートリッジ基部温度等のフィードバック制御により実施されたが、良好に作動した。

各実験テーマで得られた温度プロファイルを図 2.5.3.1-1～5 に示す。

各温度プロファイルの評価は下記の通りである。

a) 実験 No. IM02A

加熱開始後 66 分はヒータ温度制御による昇温でその昇温速度は制御目標が 21.4 °C/分に対して加熱開始より 40 分間が 21.2 °C/分、その後 66 分までは 20.7 °C/分でほぼ直線的に昇温した。切替え後のカートリッジ基部温度制御では均熱保持時間の 1 分間(加熱開始より 81 分～82 分の間)が目標温度 1510 ± 5 °C に対し、1506 °C～1508 °C で計画通りに制御された。また、制御冷却は目標 3.0 °C/分(均熱保持終了時より 1352 ± 5 °C まで)に対し 3.0 °C/分で降温しており目標値を満足した。

b) 実験 No. IM02B

加熱開始後 75 分はヒータ温度制御による昇温でその昇温速度は制御目標が 18.8 °C/分に対して加熱開始より 40 分間が 18.3 °C/分、その後 75 分までは 18.5 °C/分でほぼ直線的に昇温した。切替え後のカートリッジ基部温度制御では均熱保持時間の 15 分間(加熱開始より 80 分～95 分の間)が目標温度 1510 ± 5 °C に対し、1510 °C～1507 °C で計画通りに制御された。また、制御冷却は目標 3.0 °C/分(均熱保持終了時より 1352 ± 5 °C まで)に対し 3.0 °C/分で降温しており目標値を満足した。

c) 実験 No. IM02C

加熱開始後 75 分はヒータ温度制御による昇温でその昇温速度は制御目標が 18.8 °C/分に対して加熱開始より 40 分間が 18.3 °C/分、その後 75 分までは 18.5 °C/分でほぼ直線的に昇温した。切替え後のカートリッジ基部温度制御では均熱保持時間の 120 分間(加熱開始より 80 分～200 分の間)が目標温度 1510 ± 5 °C に対し、1510 °C～1507 °C で計画通りに制御された。また、制御冷却は目標 3.0 °C/分(均熱保持終了時より 1352 ± 5 °C まで)に対し 3.0 °C/分で降温しており目標値を満足した。

d) 実験 No. IM03

加熱開始より 15 分間の昇温は電力制御であり、計画値 700 ± 21 W (実験値 688 W) が投入された。その後電源 OFF の 25 分までの 10 分間はヒータ温度制御による加熱であり、目標値を満足した。この時の試料カートリッジ中の各試料の数値熱解析による推定値を図 2.5.3.1-6 に示す。図中のサンプル番号は、本実験テーマ中の解説に示されるものである。熱解析実施にあたっての前提条件を本項末尾の参考に示す。

e) 実験 No. IM04

加熱開始後 65 分はヒータ温度制御による昇温でその昇温速度は制御目標が 21.9 °C/分に対して加熱開始より 40 分間が 21.3 °C/分、その後 65 分までは 21.0 °C/分でほ

ほぼ直線的に昇温した。切替え後のカートリッジ基部温度制御では均熱保持時間の2分間(加熱開始より80分~82分の間)が目標温度1530±5℃に対し、1530℃~1534℃で計画通りに制御された。また、制御冷却は目標10.0℃/分(均熱保持終了時より1430℃まで)に対し10.4℃/分で降温しており目標値を満足した。また、試料加圧プロフィールも良好であった。

(参考)実験 No. IM03 熱解析の条件

- ・試料カートリッジ： フライト・サンプルと同一コンフィギュレーション
- ・封入ガス： GHe 20 [Torr]
- ・ヒータ制御点： ヒータ温度
- ・ヒータ電力制限： 700 [W]
- ・ヒータ制御目標温度： 0~15 min 1500 [°C]、15~25 min 750 [°C]
- ・ヒータ電力投入時間： 25 [min]
- ・試料物性は下記とした。

試料材料	融点 [°C]	融解熱 [kJ/kg]	密度 [kg/m³]	比熱 [J/kg·K]
In	156	28.42	7300	259
Sb	630	163.17	6700	258
Ga*	712	200.0	5700	398

Ga\*=GaSb

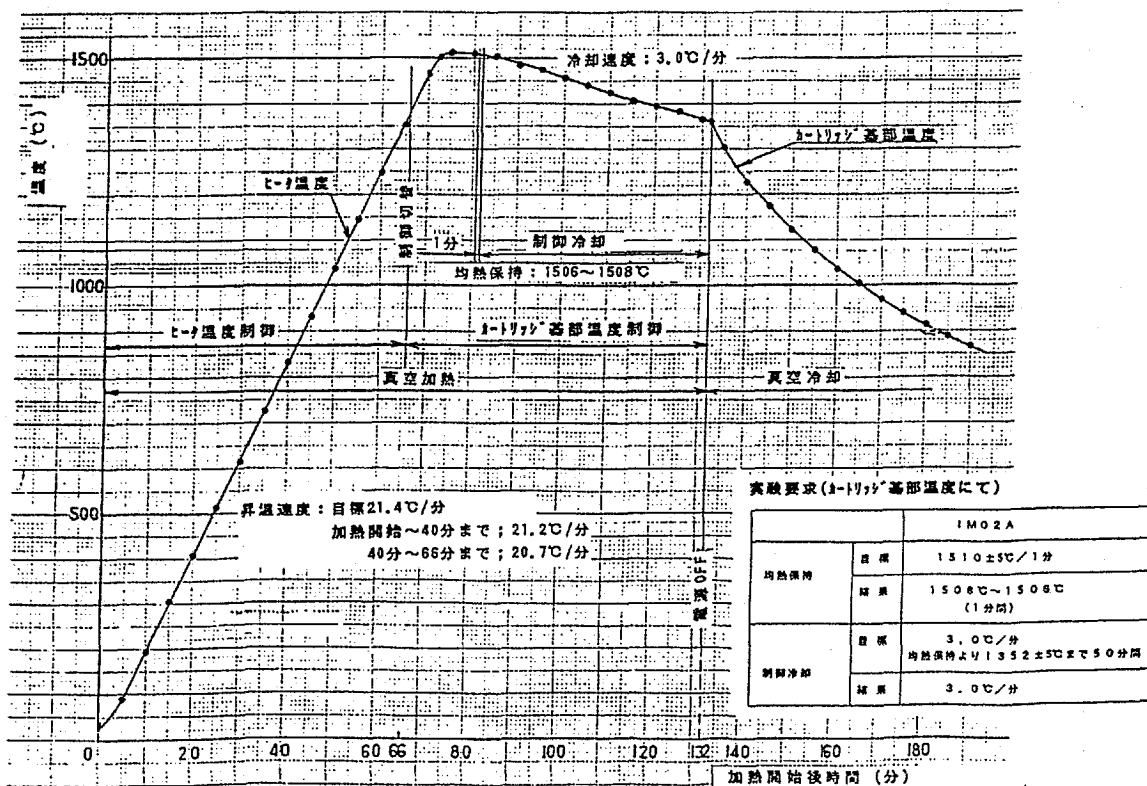


図 2.5.3.1-1 IM02A 温度プロフィール(実験結果)



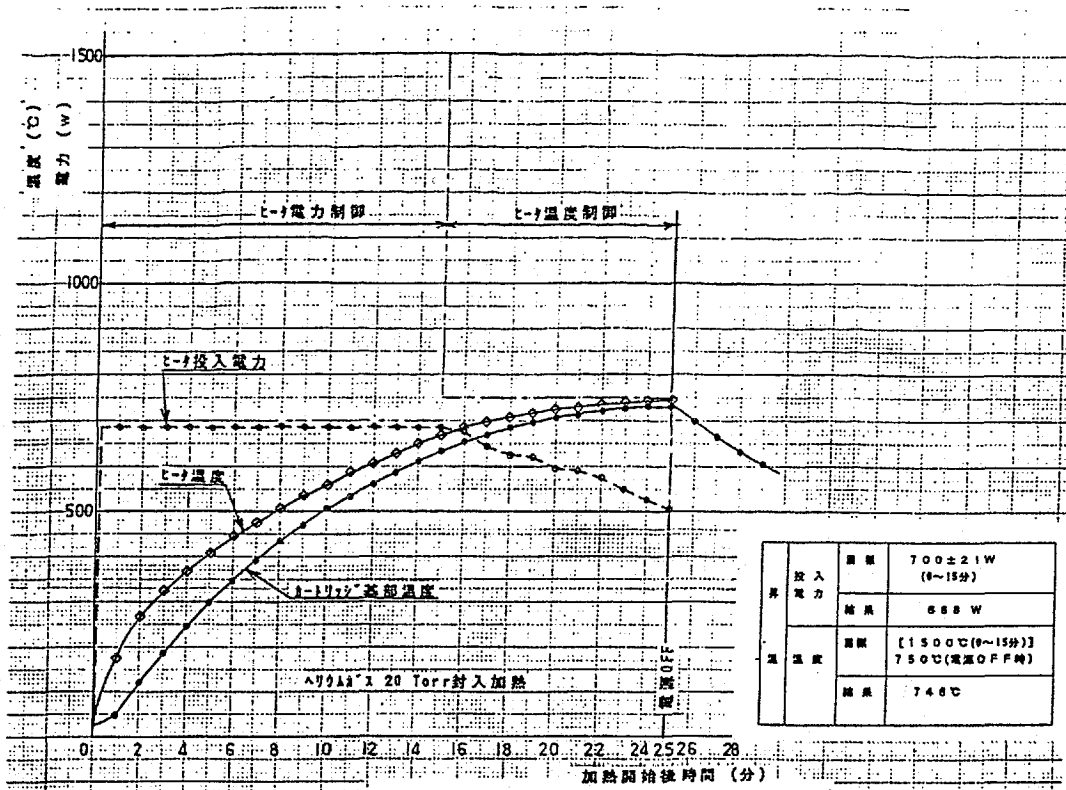


図 2.5.3.1-4 IM03 温度/電力プロファイル(実験結果)

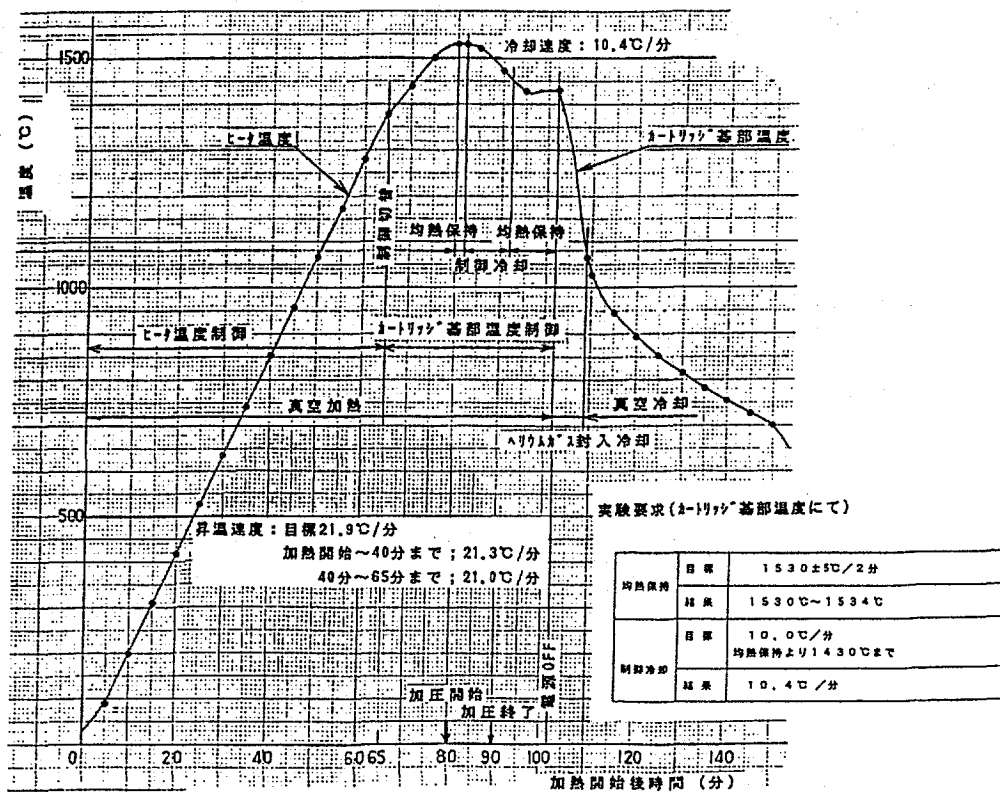


図 2.5.3.1-5 IM04 温度プロファイル(実験結果)

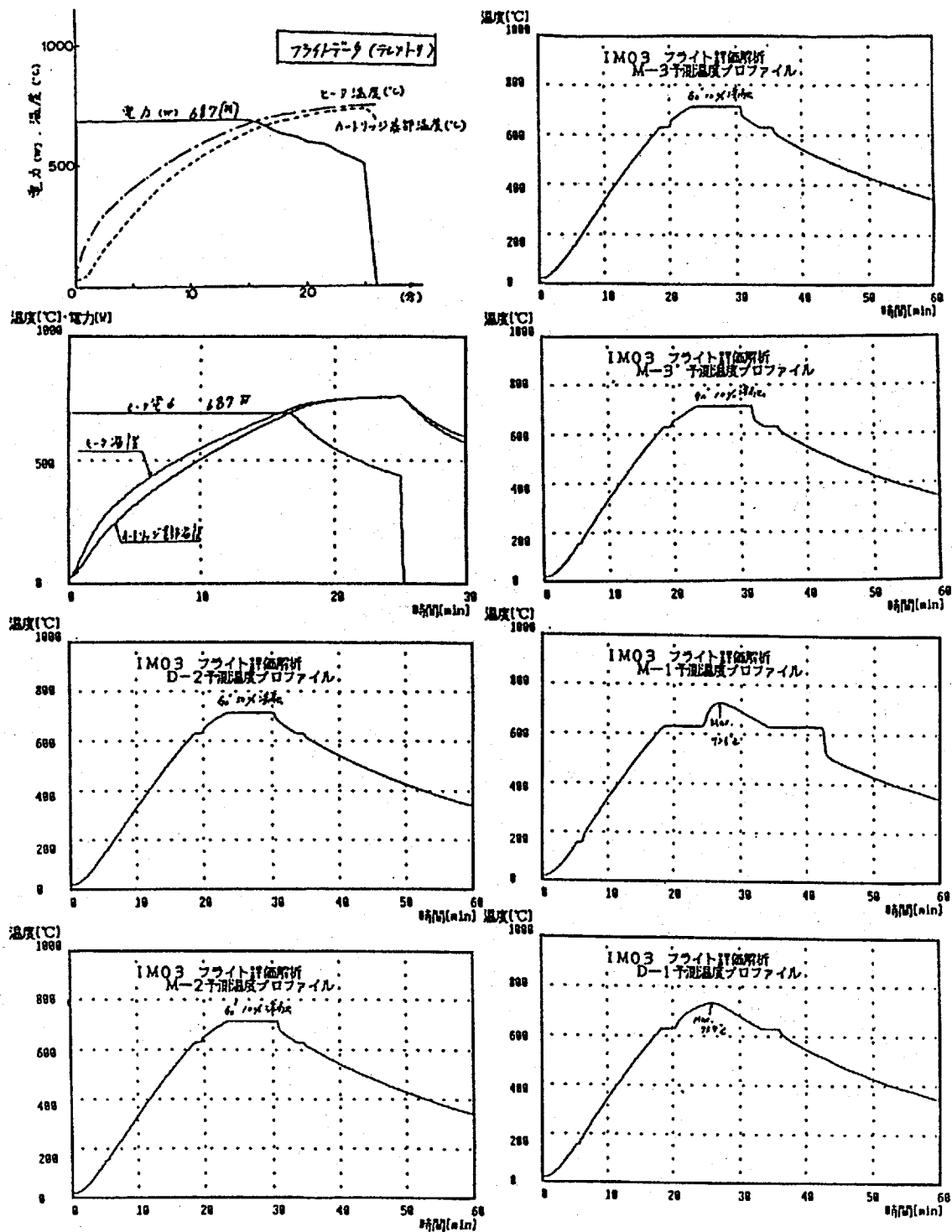


図 2.5.3.1-6 フライト実験データに基づくフライト実験予測解析結果

## 2) ガス供給・真空排気系

調圧弁、電磁弁、真空弁等の機器類は、正常に作動し全ての実験で、適切にヘリウムガス供給、真空排気がなされた。また、ケネディ宇宙センターでの射場整備作業中、ガス供給・真空排気系の圧力センサーが不具合により使用不能となったため、軌道上でのガス消費状況を解析により予測する手法をとったが、飛行後の解析で予想値との一致が確認され適切な運用がなされたことが確認された。

## 3) 通信系

軌道上の時刻データ及び HRM (High Rate Multiplexer) ダウンリンク・データ(軌道上からの実験ダウンリンクデータ)は良好に取得された。尚、時刻データが間欠的に瞬断する事象がケネディ宇宙センター射場整備作業にて認められていたが、運用上支障のない範囲であったためそのまま使用した。

### 2.5.3.2 技術開発成果

#### 1) 試料温度制御性能の向上

FMPT の高温加圧型電気炉と比較して以下に示す試料温度制御性能の改善を行った。地上試験では、その達成を確認していたが、実際のフライト実験データからも達成を確認した。評価の対象とした実験結果は加熱時間が比較的長く、加熱がほぼ定常状態となる IM02C である。

	IML-2	FMPT
・カートリッジ基部温度設定精度	: $\pm 3^{\circ}\text{C}$	( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ )
・カートリッジ基部温度変動度	: $\pm 1.5^{\circ}\text{C}$	( $\pm 5^{\circ}\text{C}$ )

ダウンリンクされたカートリッジ基部を 10 秒毎にアウトプットしたものより 1 分毎のバラツキ範囲を求めたものを図 2.5.3.2-1 に示す。これより加熱開始後 140 分以降加熱終了までの 60 分間では制御装置の分解能の限界によるバラツキとノイズの影響と思えるデータを除くとカートリッジ基部温度は 1503.9 ~ 1506.5  $^{\circ}\text{C}$  の間(2.6  $^{\circ}\text{C}$  の幅)で制御されておりこのことより温度設定精度および温度変動度とも要求を達成することができた。

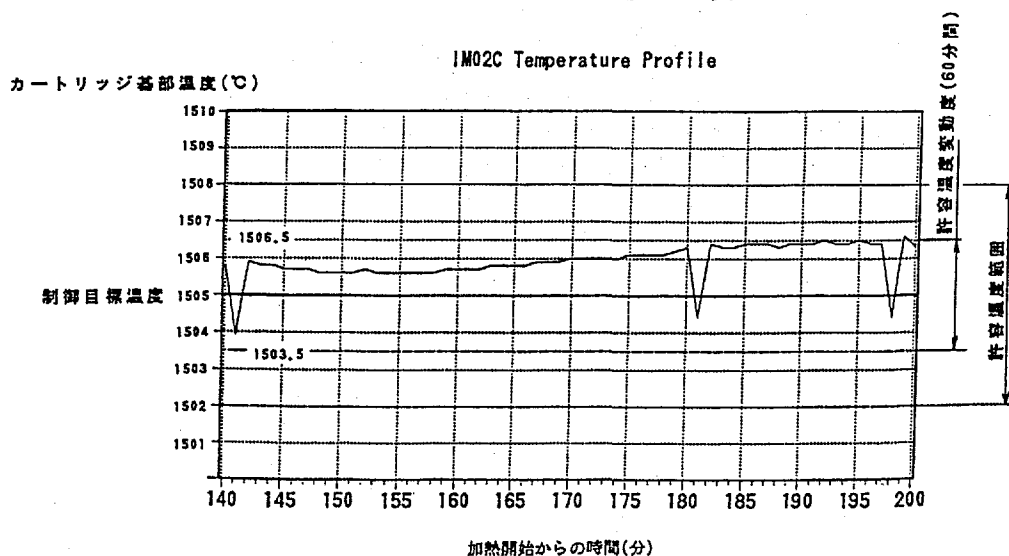


図 2.5.3.2-1 加熱制御性能の評価



2) 実験達成率向上のための制御装置/ソフトウェアの改良

FMPT/LIFでは、制御系統の単一故障でも実験停止となっていたが、以下の改良を行い実験達成率の向上を図ったものである。

- ・熱電対断線検知機能の追加により試料温度制御用熱電対が断線しても、ヒータ温度制御用熱電対に自動的に切り換わり実験進行可能とした。
- ・ドア・ロック/バルブ類の開閉信号の誤り(マイクロスイッチの故障等)等の軽微な故障で実験が停止した場合、クルーの判断により引き続き実験が行えるようにした。
- ・実験中に異常停止となった場合、試料交換可能温度(45℃以下)になるまでの時間を短縮させ、実験機会をより多く獲得できるようにクルー操作によりヘリウムガスを炉内に規定量供給するシーケンスを追加した。

尚、これらの改良点についてはシステム試験によりその有効性を確認した。

3) 炉内ガス封入加熱による実験手法の確立

微小重力環境下で炉内中にヘリウムガスを封入したコンフィギュレーションでの実験は、地上実験時の雰囲気ガスの対流による熱伝導の効果を予測しがたく、実験上の試料温度等を推定するためには熱解析により補完せざるを得ない。今回の軌道上実験の結果データを基にしたコリレーション解析から、地上においては熱対流による伝導の効果が予想結果よりも大きくかつ微小重力環境においてはヘリウムガスの伝導による熱伝達の効果が予想よりも小さいことが判った。結果として、軌道上の各試料部の温度プロファイルは約数度低めに設定された。これらの解析結果から、今後、炉の運転条件を定めるにあたり重要となる地上実験では予測困難な微小重力環境でのヒータとカートリッジ間のヘリウムガスによる伝熱効果を定量的に把握できた。

4) 試料流出抑制カートリッジの開発

図 2.5.3.2-2 に示されるような試料格納室/加圧機構分離型の加圧型カートリッジの開発を行った。これは、加圧型試料カートリッジは圧力封入に使用する封止材等の選択が材料適合性の点から困難であり試料格納室から流出した試料が加圧機構の機能を阻害する可能性が大きいのを改善したものである。実験の結果、加圧機構は良好に作動したものの試料自体は全ストロークは加圧されなかった。これは試料内部の圧力が地上実験と比較して高かったためと推定される。

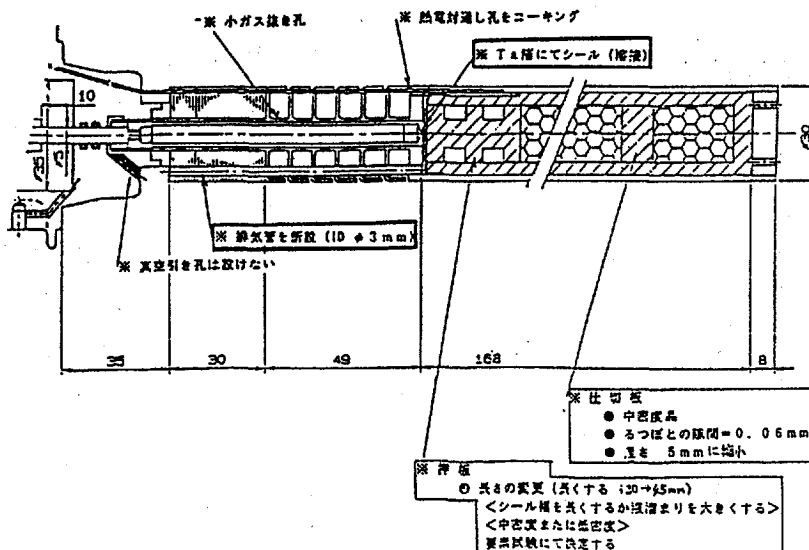


図 2.5.3.2-2 試料流出抑制カートリッジ構造

## 2.5.4 反映事項

今後、宇宙ステーション JEM での運用を想定して、均熱炉本体の温度均一性、温度制御性能等の基本性能の向上に加えて、幅広い実験要求に対応できるような運用技術開発が必要になると考えられる。主な点は下記の通りである。

1) 温度均一性、温度安定性、温度設定精度の改善

JEM 共通実験装置の設計にて基本設計により改善を図る。

2) 高精度拡散定数測定実験技術の開発

JEM 共通実験装置での、冷却チャンバー等の開発を行っているほか、MSL-1 (1997.4 打ち上げ スペースラブ) 大型均熱炉、TR-1A 小型ロケット均熱炉等のミッションでガス急冷試料カートリッジ、シア・セル型拡散試料カートリッジ等の技術開発を実施する。

3) テレサイエンス運用技術の開発

実験条件の地上からの変更、運用要員の効率的な配置などを意図して、実験パラメータのコマンドによるアップリンク技術の開発、リモート POCC 運用技術の開発等を MSL-1 ミッションにて実施する。

## 2.6 制振実験装置(VIBES)

### 2.6.1 装置概要

制振実験装置は、宇宙実験室内部での搭乗員作業やほかの実験装置によって発生する加速度ゆらぎ( $g$ ジッタ)が、流体物理実験のような良質の無重力環境を必要とする系にどのような影響をおよぼすかを調べるができる実験装置である。

この装置は、防振機構、加速度計測装置、および実験ユニットで構成されている。防振機構は、シリコンゲルによって $g$ ジッタに対して受動的に制振を行う機構で、必要に応じてロックすることが可能なので、内部に保持した実験ユニットで行う実験結果を防振状態と非防振状態で比較することができる。実験ユニットは宇宙飛行中に交換可能で、IML-2ミッションでは対流拡散実験ユニット(実験ユニット1)と熱駆動流実験ユニット(実験ユニット2)の2つの実験ユニットを準備している。実験ユニット内の状態は、観察窓をとおして観察することができ、ビデオカメラ等を用いて収録することが可能である。加速度計測装置は、実験中の加速度環境を、防振機構に保持されたユニット部分とその外部(スペースラブ環境)の2カ所で同時に計測し、メモ리카セットにデータを保存する。この装置は、スペースラブ内のラックストウェーシコンテナに収納することができ、このコンテナ内に入れたままで実験が実施される。

装置仕様を表 2.6.1-1 に示す。また、装置写真及びコンポーネント名称を図 2.6.1-1 に示す。

#### 各々の実験ユニットの概要

##### 1) 対流拡散実験ユニット(実験ユニット1)

対流拡散実験ユニットは、内部に試料液を封入した容器(ベッセル)の一面を加熱して、微小重力下での対流/拡散の様子を観測する実験ユニットである。試料液の中には、

表 2.6.1-1 制振実験装置の仕様

(本体部)	
防振機構	粘弾性体の複合防振機構で、外部からの振動を制振する
実験装置容器 - 収納体積 - 収納重量	実験装置を収納する 最大 190 × 200 × 100 (mm) 最大 3.5 kg
加速度計測装置 - 計測範囲 - 最大分解能 - サンプリング周波数 - メモリ容量	± 4 g 10 $\mu$ g 50 Hz 1 Mbyte / メモ리카セット
装置寸法/重量	370W × 247H × 439D (mm) 約 15 kg

##### (実験ユニット1 対流拡散実験ユニット)

液体試料を封入した容器(ベッセル)の一面を加熱して内部に対流を生じさせ、その様子を観察するための装置	
試料加熱	ヒーター加熱
試料温度	ベッセル内 8 カ所を温度センサーで計測し、LED ディスプレイに表示
試料観察	観察窓をとおしてビデオカメラなどで撮影可能
観察用照明	シート状白色 EL 光源
電源	アルカリーマンガン乾電池

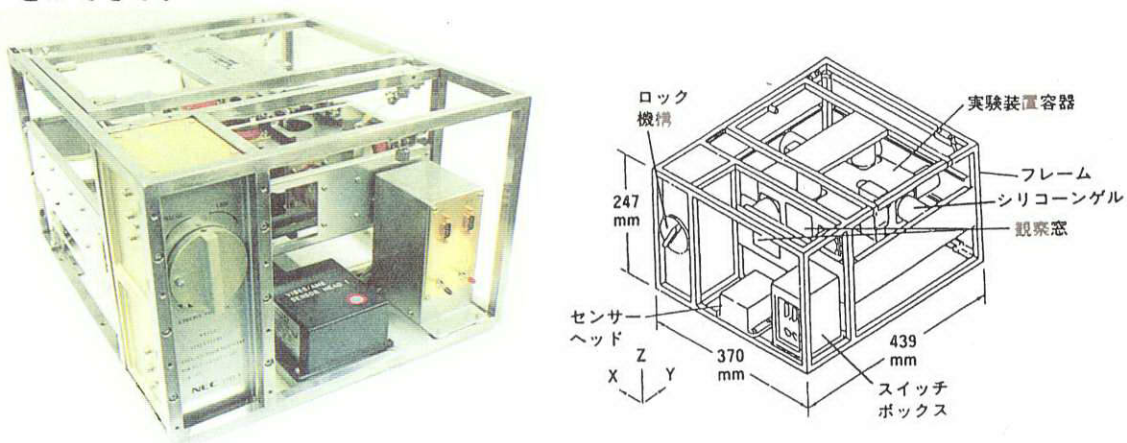
##### (実験ユニット2 熱駆動流実験ユニット)

液体試料を封入した2つの容器(ベッセル)を連結し、それぞれを加熱、冷却して毛細管流により液を移送し、液体の様子を観察するための装置	
試料加熱/冷却	ペルチエ素子による加熱/冷却
試料温度	ベッセル内 2 カ所を温度センサーで計測し、LED ディスプレイに表示
試料観察	観察窓をとおしてビデオカメラなどで撮影可能
観察用照明	LED ランプ
電源	アルカリーマンガン乾電池

フェノールフタレインが含まれていて、食塩水の電気分解によるイオンに反応して発色し、流れの様子が可視化できるようになっている。また、加熱部を含む8ヶ所の温度を測定し、ディスプレイに表示することができる。

## 2) 熱駆動流実験ユニット(実験ユニット2)

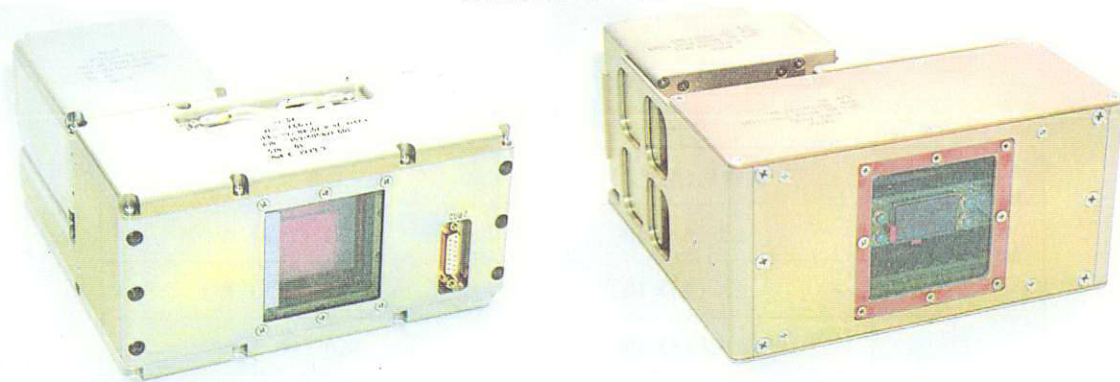
熱駆動流実験ユニットは、連結管でつながれた2つの容器(ベッセル)の中に封入された飽和蒸気圧状態の液が加熱/冷却によりベッセル間を移動する様子を観測する実験ユニットである。ベッセルの内部には細かい溝があり、この間に液体が入り込み表面張力により液面を構成する。加熱を受けた方の飽和蒸気圧は、膨張し、液面を押し下げ、液体は溝を伝わる毛細管流により冷却されている方のベッセルに移動し、液面を押し上げる。その様子を観測窓より観測し、2つのベッセルの温度をディスプレイに表示することができる。



防振機構



加速度計測装置



実験ユニット1 (対流拡散実験ユニット)      実験ユニット2 (熱駆動流実験ユニット)

図 2.6.1-1 制振実験装置の装置写真

## 2.6.2 装置稼働状況

予定されていた実験すべて及び科学的成果増大のための追加実験を実施し、稼働結果良好であった。

各実験の実施状況は下記の通りである。

- 1) 「自然対流と拡散に対する重力加速度ゆらぎ( $g$  ジッタ)の影響」  
ノミナル2回の流体実験を実施した。これに加えて、科学的成果増大のための追加実験1回を計画したが飛行期間内での実施はできなかった。
- 2) 「微小重力下での熱駆動流の研究」  
ノミナル2回の流体実験を実施した。これに加えて科学的成果増大を期して、実験結果に基づく追加実験1回を計画し実施した。

## 2.6.3 機能性能評価

### 2.6.3.1 機能性能評価結果の概要

各コンポーネントの機能性能評価を以下に示す。

#### 1) 防振機構

ユニット交換機能、ロンチロック機能等良好に機能した。ロンチロック機構のケブラーコードのロック/リリース状況も良好であった。飛行後解析で得られた加速度データの解析結果から、防振機構を動作させることにより、振動が0.89～0.47に低減されることは確認できた。指加振のデータより解析した防振機構の特性を表2.6.3.1-1に、周波数応答解析結果を図2.6.3.1-1に示す。固有振動数は地上とほぼ同じであったが、ダンピングは地上よりも高いことがわかった。定常時の伝達関数解析結果の一例(CDU ケース1：防振時)を図2.6.3.1-2に示す。各ケースとも低周波での伝達関数が1とならず、しかも顕著なピークも認められない。指加振時の応答解析がピークを示す形をしていることから、防振機構は正常に機能していると考えられるが、定常時の加速度の小さい状態にあわせた周波数解析手法の改善が必要であると考えられる。

表 2.6.3.1-1 防振特性

軸方向	固有値(地上)	ダンピング(地上)
X	3.2 (2.6) Hz	17.9 ( 9.8) %
Y	2.6 (2.7) Hz	12.9 (12 ) %
Z	2.9 (2.6) Hz	16.0 (14 ) %

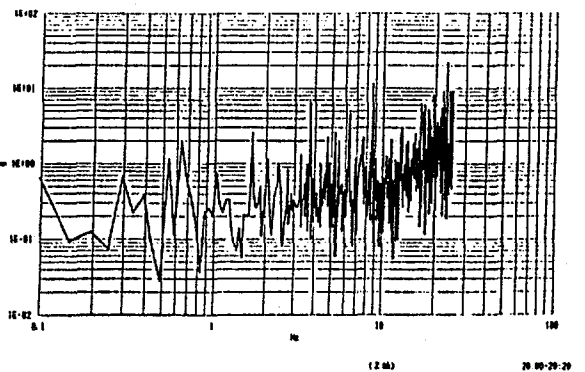
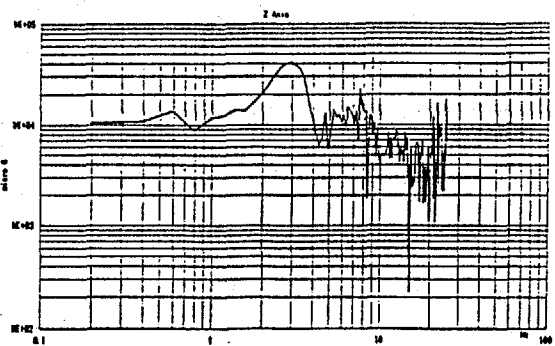
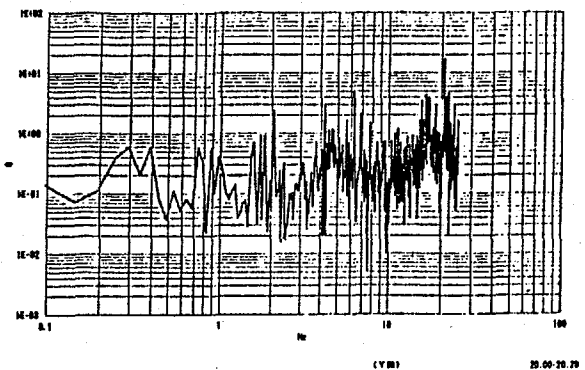
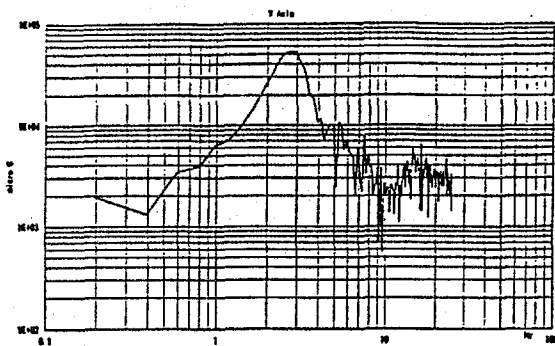
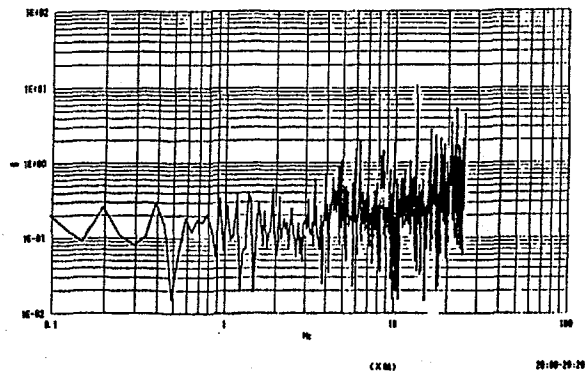
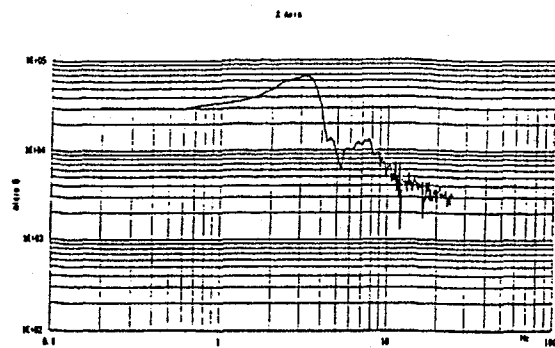
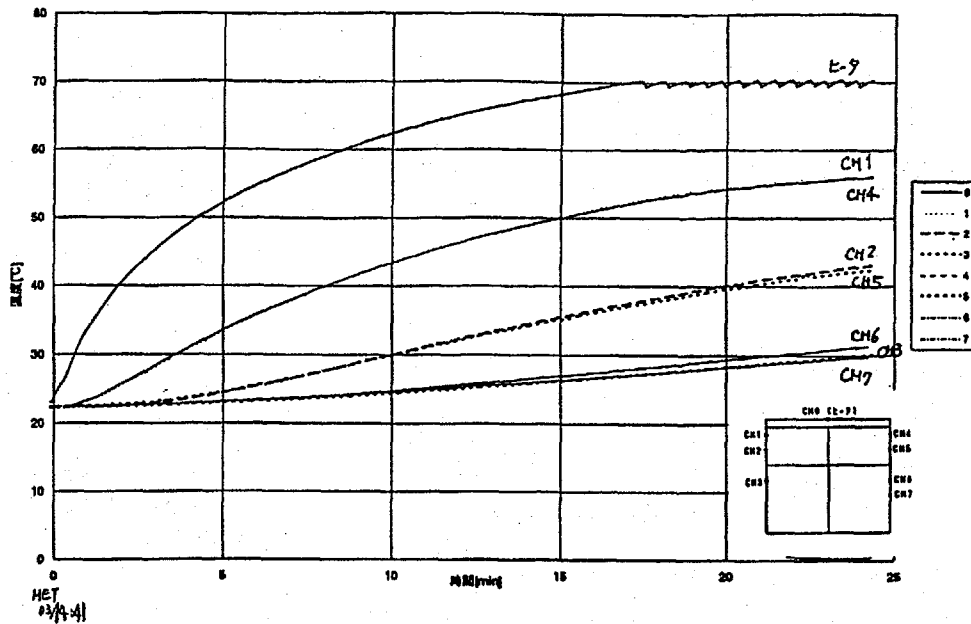


図 2.6.3.1-1 指加振時の周波数応答関数

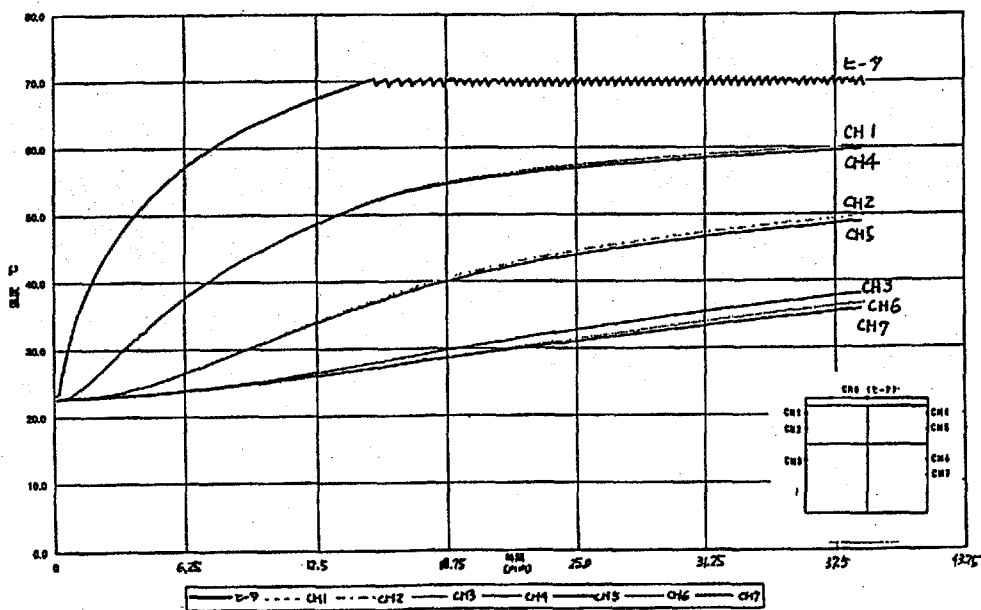
図 2.6.3.1-2 伝達関数 解析例

## 2) 対流拡散実験ユニット(実験ユニット1)

電極電流、ヒータ加熱、温度測定機能等良好に作動した。ただし、試料液中に若干の気泡が観察された。飛行後のベッセルのリーク試験等の結果に異常が認められないことから、射場整備作業での試料液の脱気手順等が原因と推定される。8つの温度センサーでの試料液体中の温度測定結果を図 2.6.3.1-3 に示す。この結果からのベッセル内の温度勾配の推定結果は表 2.6.3.1-2 に示す。なお、実験中 NASA のビデオカメラ及びカメラサポートを使用していたが、カメラサポートの剛性が小さく画像の定期的な振動が残った。



ケース 1



ケース 2

図 2.6.3.1-3 対流拡散実験ユニット温度測定結果

表 2.6.3.1-2 ベッセル内の温度勾配計算結果(最終時)

	ヒータ	7 CH	温度差
ケース 1	70.0 ± 0.5 °C	29.8 °C	約 40 °C
ケース 2	70.0 ± 0.5 °C	35.8 °C	約 34 °C

ケースは、実験 No. を示し、実験テーマの説明と同一の定義である。

3) 熱駆動流実験ユニット(実験ユニット2)

ペルチェ素子加熱機能、温度測定機能等良好に作動した。左右ベッセルの温度測定結果を図 2.6.3.1-4 に示す。

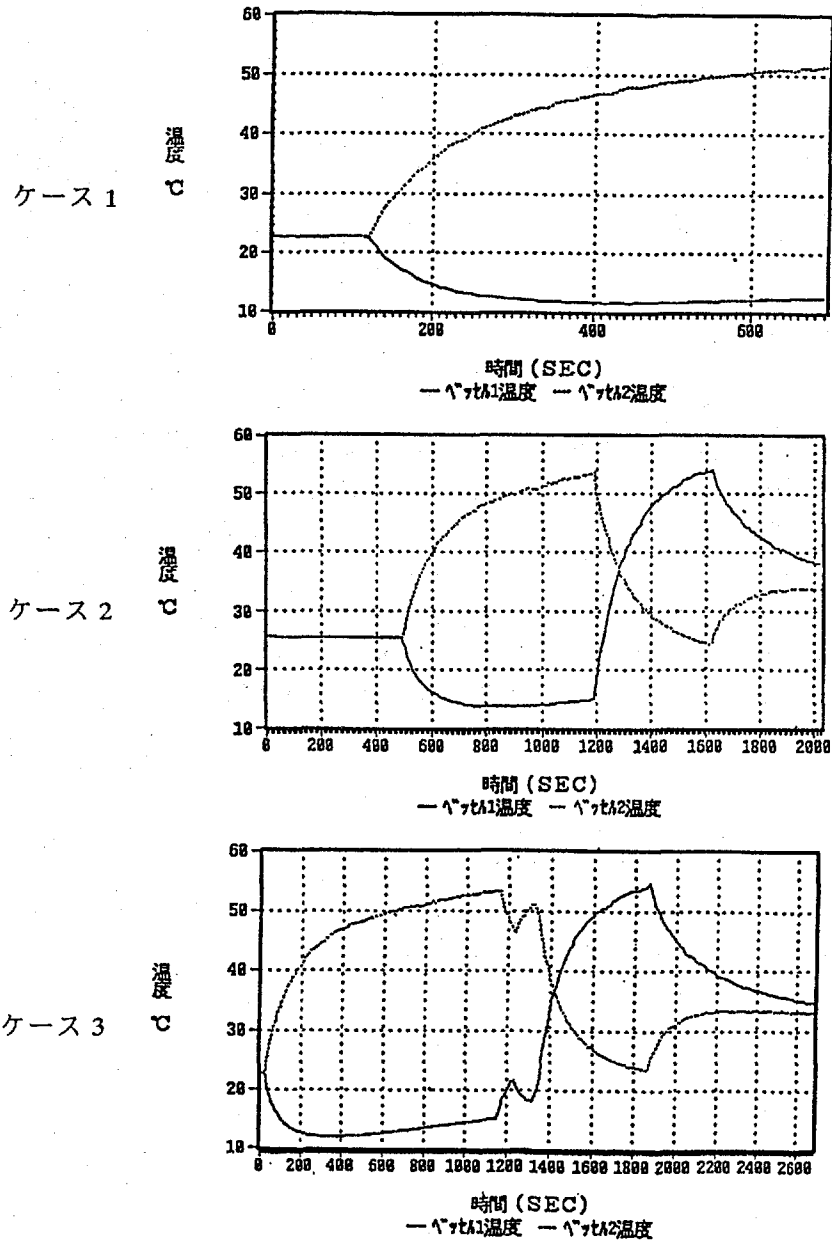


図 2.6.3.1-4 熱駆動流実験ユニットベッセル温度測定結果



#### 4) 加速度測定装置

加速度計測機能良好に作動した。データ記録状況を表 2.6.3.1-3 に示す。

表 2.6.3.1-3 加速度計測装置 データ記録状況

VIBES(イベント)	AMEイベント						備考
	稼働時刻 (MET)	稼働時間	使用バリエット	使用アンテナバリエット	データ記録時間	記録開始時刻	
CDU Case1	02/12:50-02/13:34	45分	No.1	No.1	22分48.70秒	02/13:11:59	SW-2 on 時刻とそれによる加速度記録の擾乱の対応から推定
CDU Case2	03/14:28-03/15:22	54分	No.2	No.2	26分12.70秒 (満杯)	03/14:40:55	SW-2 on 時刻(14:41:05)とそれによる加速度記録の擾乱の対応から推定
TDFU Case1	03/15:47-03/16:09	22分	No.3	No.3	9分28.36秒	03/16:00:20	AME Power Off time と記録されたデータの量から推定
TDFU Case2	03/17:19以前- 03/17:51	32分強	No.4	No.4	26分53.50秒	03/17:25:55	SW-2 on 時刻とそれによる加速度記録の擾乱の対応から推定

#### 2.6.3.2 開発成果

##### 1) 受動制振応用技術の開発

TR-1A 小型ロケット等にて取得したシリコンゲル制振材の特性を応用し、制振条件下での実験が可能な簡易式実験装置の開発を行った。能動的制振装置に比較して受動制振装置はコンパクトでコストが低いのが特徴であるが、本装置は、全システムをスペースラブラックストウェージコンテナ2つに収納し、かつ、スペースラブからのクルータイム以外のリソース供給をほとんど受けない独立型システムを確立した。結果として、多くの実験が当初計画から一部目標を下げざるをえない中、ミッション期間内での追加実験の実施を実現した。また、共通の防振機構の中で複数実験を交換実施する手法を確立した。

##### 2) 簡易式バッテリー技術の開発

市販品のアルカリ・マンガン電池を用いてのシャトル搭載用簡易式バッテリーユニットの開発を行った。NASAの安全基準を市販品を使用したバッテリーユニットを作製する場合、液漏れ等のハザード基準がきびしい。制振実験装置の中、実験ユニット1、実験ユニット2、加速度計測装置の3つのコンポーネントでこの簡易式のバッテリーユニットを安全設計、開発し、運用データは放電特性等の基礎的な共通化したデータを利用する運用技術を開発した。これによって、極めて安価な簡易式電力リソースを確保することができた。また、ミッションに先立ち解析を行った電力リソース消費プロファイルを利用して追加実験に対応した。今後、再実験、不具合処置等に幅広く応用可能であると考えられる。

##### 3) 簡易式加速度計測システム技術の開発

スペースラブと独立したシステムで稼働する簡易式の加速度計測システムを開発した。ミッションペイロードの加速度センサの個数や電力リソース等に左右されることなく、実験に合わせて簡易的に測定を行うことができるため、多くの実験に対応できると考えられる。

#### 4) 耐腐食性試料ハンドリング技術の開発

スペースラブミッション等の軌道上実験では打ち上げ時の制約条件から、生物、腐食性物質等の取扱いは打ち上げ作業等でレイト・アクセス等のリソースを多く要する。このため、腐食性物質の1つとして食塩水によりレイト・アクセス等の必要のない試料電解実験容器の開発、運用手順の確立を行った。

### 2.6.4 反映事項

#### 1) 簡易式実験システムのさらなる簡素化

IML-2のシステムでは、ラックストウェーჯコンテナへの搭載等のコンパクトな設計を試みたために小さいコンポーネントが多くなり、ヘルクロオペレーションが煩雑化するとともに、クルータイムの節約にまだ改善の余地が考えられる。今後、コンポーネント点数の削減、オペレーション手順の簡素化を行い、全リソースの削減を行い、実験成果の対リソース比の増大を行う必要があり、今後 JEM 共通支援装置等への反映を行う。

#### 2) 画像系の改善

画像取得系を NASA リソースに頼ったため、NASA 分担分のカメラサポート等のシステムの剛性評価等が十分でなかった。実施する実験に合わせた画像系を考慮するよう JEM 等の各実験に反映を行う。

#### 3) 受動実験システムの応用

今後に予測される実験計画にあわせ受動制振系を応用していくことにより、実験成果を容易に高められる可能性がある。JEM 汎用供試体、JEM 共通支援装置等への反映を行う。



### 3. 宇宙実験成果



## 微小重力下における魚の前庭順応機構の研究 (GOLDFISH)

代表研究者： 高林 彰\*<sup>1</sup>

共同研究者： 小原 健\*<sup>1</sup>、大村輝江\*<sup>1</sup>、渡邊 悟\*<sup>2</sup>、森 滋夫\*<sup>2</sup>、  
田中正文\*<sup>2</sup>、桜木惣吉\*<sup>3</sup>、R. von Baumgarten \*<sup>4</sup>

\*1 藤田保健衛生大学、\*2 名古屋大学 環境医学研究所、\*3 愛知教育大学、

\*4 マインツ大学、ドイツ

In a space experiment, the adaptation of goldfish behavior during flight and readaptation after landing were investigated. Six goldfish (1 normal, 1 with otoliths removed on both sides, 4 with otoliths removed on one side) were flown in a fish package (F/P) of Aquatic Animal Experiment Unit (AAEU). The dorsal light responses (DLRs) of fish with otoliths removed were recorded after operation until launch and after landing. The behavior of the fish in microgravity were recorded with a video camera on mission elapsed time (MET) Day-00, 02, 05, 08, 12.

On MET Day-00, the two fish with otoliths removed on one side showed flexion of the body toward the operated side. These fish also showed rolling behavior toward the operated side. However, the body flexion disappeared on MET Day-05 or MET Day-08. No rolling behaviors were observed after that time, which might indicate adaptation in microgravity. The normal fish and the fish with otolith removed on both sides showed backward looping responses during the 13 days mission. Although the frequency of looping episodes decreased after MET Day-08, five fish still showed looping response at MET Day-12, that was the last day of video recording on orbit. In microgravity, visual system of fish did not seem to provide sufficient cues to prevent them from looping and rolling.

After landing, no looping and no rolling behavior were observed. However, the tilt angle of the DLR increased in the fish with otolith removed 5 months before launch but not in normal and those with otoliths removed 2 weeks before launch. These results suggest that the behavioral dysfunction and the adaptational process in space are dependent on vestibular inputs.

### 実験の目的、意義

宇宙における微小重力環境は、生体の各種機能に影響を与える。感覚入力の変化、特に重力加速度のセンサーとして重要な耳石器への入力の消失が種々の機能的変調を引き起こすと考えられている。一方、これらの機能的変調は時間の経過とともに、地上での基準あるいは宇宙での基準へ順応することが知られている。同様な順応過程は、長期宇宙滞在から地上1G環境への帰還時にもみられる。

重力感覚の変容は、姿勢調節にも種々の影響を与える。運動・姿勢の制御は、視覚系、前庭系、体性感覚系などの感覚受容器からの信号を中枢神経系内で統合処理し、筋張力の連続的調節の結果と考えられているが、宇宙の微小重力環境下では、前庭器、特に耳石からの入力消失が最も大きな影響を与えると考えられている。これらの、感覚入力の役割の重要度の変化は、微小重力環境暴露の初期にみられる宇宙順応症候群 (Space Adaptation Syn-

drome; SAS)の機序を考える上でも重要である。

魚の行動においても、微小重力暴露の初期段階でみられた異常な回転行動が、微小重力滞在時間の経過とともに減少することが報告されている<sup>1)</sup>。魚の背光反応行動は、視覚-前庭感覚相互作用の研究対象として実験が行われてきた<sup>2~10)</sup>。魚は一般に光に背を向け、重力の方向に腹を向ける性質を有している。この姿勢は主に、光の方向と強さを両眼の網膜からの視覚入力として、および加速度の方向と強さを両側前庭器、特に耳石器からの入力としたバランスによって制御されると考えられている。

1994年7月に行われたIML-2(第二次国際微小重力実験室)では、前庭を摘出した金魚の遊泳運動、背光反応を指標として微小重力への順応および地上帰還後の再順応を調べた。これによって、地上における前庭機能の違いが、宇宙の微小重力での行動と、その順応にいかなる効果を与えるかを検討した。

## 実験の方法と試料

### 実験方法

宇宙飛行実験に用いた金魚は体長7~8 cm、体重7.5~11 gのフナオの紅白和金であった。飛行実験には、正常金魚1匹、両側前庭摘出金魚を1匹、片側前庭摘出金魚4匹を用いた。両側前庭摘出および片側前庭器摘出群の内2匹の手術はスペースシャトルの打ち上げ約5ヶ月前に行われた。残りの2匹の片側前庭摘出手術は2週間前に行われた。前庭器摘出手術は、1万分の1から4万分の1のMS222による軽い麻酔下で、金魚を灌流しながら固定して行った。前庭器摘出手術は、頭骨にあけた小孔から卵形囊耳石および半器官の一部を摘出し、その後小孔を骨蠟にて封じた。

5ヶ月前の前庭摘出手術は約60匹に対して行い、約4ヶ月にわたって背光反応を記録し、解析結果を参考に両側前庭摘出金魚10匹、片側前庭摘出金魚20匹を選抜し、正常金魚90匹を加え、計120匹をNASAケネディ宇宙センターへ空輸した。輸送した正常金魚のうち20匹に対して、片側前庭摘出手術を打ち上げ2週間前に行った。以上の金魚のなかから飛行群6匹、バックアップ群6匹および地上対照群6匹を選抜し、打ち上げ36時間前にフィッシュパッケージに入れた。飛行前実験記録を行った後、NASAへ引き渡しスペースシャトルのラボ内にある、水棲動物実験装置(AAEU)へ積み込まれた。

飛行中は毎日のシフトの最初にフィッシュパッケージのカバーを開け、そのシフトの終了時に閉じることによって昼夜リズムを形成することとした。カバーの開閉時に、金魚の状態が音声によって報告された。飛行実験はミッション経過時間(MET)の0、2、5、8、12日目の計5回行われた。1回の実験は30分のビデオ記録からなり、最初の10分間は上方からの一定光照射中の行動記録で残りの20分間は、上方とこれと90度横方向からの光照射がそれぞれ20秒ごとに切り換わる条件下での行動記録であった。スペースシャトル帰還後約6時間で試料を受取り、ただちに飛行後実験をおこなった。飛行前後の実験は飛行中と同様である。その後、フィッシュパッケージから金魚を取り出し、個体毎に背光反応を計測した。背光反応の計測は、帰還後1週間にわたって毎日行った。

クルーによって毎日の金魚の状態を報告してもらうため、教育訓練においては、予想される魚の健康状態、あるいは行動の異常を例示し理解してもらった。また、手術の方法を示し、各個体の行動における差、およびその特徴を理解し適切な表現を行えるようにした。実際の個体識別は金魚の紅白の模様によって行った。最終的に飛行金魚として選抜された

個体の模様を描き、クルーに持参してもらった。

## 地上予備実験

暗黒中あるいは両眼摘出をおこなった金魚では、前庭器が正常であれば重力方向に腹を向けた安定な姿勢を示す。したがって、視覚入力が増断された場合は耳石器からの入力を主にした制御によって姿勢の安定が保たれると考えられる。片眼のみを摘出した金魚では、上方からの光照射に対して、正常眼の方にわずかに傾斜する傾向を示すが、ほぼ直立姿勢を示す。一方、この片眼盲目金魚の背光反応は、正常眼の方に大きく傾斜する。このことは、視覚入力の左右差が大きいにもかかわらず、直立姿勢を維持する傾向が大きくなると考えられ、地上の1G環境下では前庭入力の重みが大きいものと推定される。

一方、前庭器摘出直後の金魚は、非常に不安定な姿勢を示すが、2時間以上経過した後では安定な姿勢を示した。特に、一側破壊の金魚では、術側への傾斜が大きく、不安定となった。約4ヶ月経過すると、術側への最大傾斜角度は減少し、健側へのそれはほとんど変化せず、結果的には左右両方への傾斜角度はほぼ等しくなった。この特性は時間の経過とともに、正常魚のそれに近付くが、等しくはならなかった。

両側前庭摘出金魚では、背光反応に左右の差はないが、最大傾斜角度および速度は一側破壊魚の術側への傾斜角度および速度より大きかった。また、両側前庭破壊でも時間とともにこれらの特性は正常魚のそれに近づいた。この結果は、一側でも前庭器が正常であれば、背光反応の傾斜角度は抑制されるが、地上の1G環境下で順応することに関して、前庭器以外の重力検出器官が関与していることを示唆している。

地上1G環境下で3ヶ月以上順応した金魚の背光反応を、放物線飛行によって得られる低重力環境において計測した。低重力下では、正常魚、一側前庭破壊魚ともに最大傾斜角度が90度となる。これらの魚の傾斜速度も1G環境下に比べて増大傾向を示した。一方、両側前庭破壊魚においても、最大傾斜角度は順応後に比べて大きく、また、傾斜速度では、順応後あるいは摘出手術直後に比べても大きい傾向を示した。両側前庭破壊魚においては耳石器からの重力加速度変化の入力はないと考えられるから、低重力における背光反応特性の変化には他の感覚入力の影響があると思われた。両側前庭摘出魚では、摘出手術後の時間経過の比較的短い順応以前の時期においても、低重力下で行動の変化が観察されており、重力の変化に起因する他の感覚入力の変化が考えられる。

また、両側前庭器摘出後、3ヶ月以上経過した金魚を盲目にしてその行動を観察した。両眼摘出直後には、姿勢が不安定になるが数時間後には直立姿勢を維持できるようになった。このことは、両側前庭器摘出によって、視覚入力の姿勢制御に対する重みが増加しており、この視覚入力の消失によって姿勢が不安定になったと推測される。しかし、それにもかかわらず一応の直立姿勢が維持できることを示しており、視覚、前庭系以外の感覚入力が増与するものと考えられる。このような両眼盲目で両側前庭器摘出金魚の微小重力下での行動を観察した。背光反応はもちろん観察されないが、微小重力にともなう直立姿勢がくずれることが観察された。このことは、1G環境下では、視覚、前庭入力以外の重力検出感覚系が働いて姿勢の安定を維持していたが、微小重力下ではこの感覚入力も消失したため姿勢が不安定になったと解釈できる。

水圧、浮力は重力加速度の低下に応じて変化し、これらの影響を受ける感覚入力としては、側線器、浮袋からのものが考えられ、側線が背光反応にどのように関与するかについて検討した。両側前庭器摘出後3ヶ月以上経過した金魚の頭部側線をキシロカインによって麻酔した後の背光反応は、最大傾斜角度がほぼ90度となり、前庭器摘出直後の値とほ



ほぼ等しくなった。しかし、傾斜速度はほとんど変化を示さなかった。正常魚および片側前庭器摘出後3ヶ月以上経過した金魚に対する側線器麻酔の背光反応の最大傾斜角度に与える効果を調べると、正常魚、および片側前庭器摘出金魚では側線器の麻酔効果はみられないが両側前庭器摘出金魚では最大傾斜角度が増大した。このことは、背光反応における側線器からの入力加重が前庭器が片側でも機能している場合には小さいが、両側ともに機能しない時には重力に関連した入力センサーとしてその加重が増大したものと理解された。しかし、傾斜速度は変化しないことから、関与のしかたは前庭器のそれとは異なることが推定された。これらの感覚入力の加重の変化は、地上の1G環境へ帰還した時の再順応過程においても重要な役割をはたすと予想された。

## 飛行実験の結果

### 飛行中の行動

片側前庭器摘出してから5ヶ月経過した金魚の一匹と、術後2週間の金魚の一匹が術側へ湾曲する姿勢を示し、その方向へローリング行動をした(図1)。この姿勢は、術後6ヶ月の金魚(L-64)ではMET Day 05まで観察されたがDay 08には見られず、術後2週間の金魚(L-90)ではMET Day 05では観察されなかった。湾曲の程度は、術後の経過時間が長い方が大きかった。

飛行中は、地上対照群あるいは飛行前の記録に比べて、全般に活発な遊泳行動、姿勢の方向性の乱れが観察された。MET Day 00に正常金魚、両側前庭器摘出金魚および片側前庭

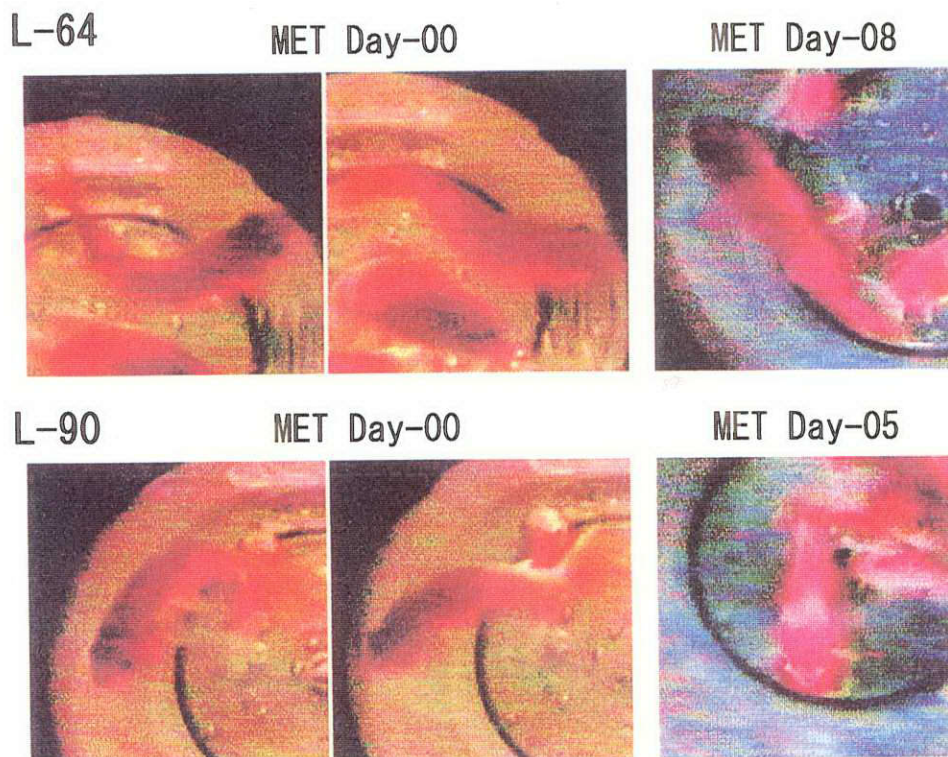


図1 飛行中に観察された体の湾曲とその回復

器摘出金魚の一匹にルーピング行動がみられた(図3)。このルーピングは、従来報告されていた腹を内側にした回転ではなく<sup>11)</sup>、背を内側にした回転であった。また、このルーピングは記録期間中に連続したものではなく、数回以上の回転が断続的に行われることが観察された。飛行期間中にルーピングを示した金魚は、6匹中の5匹であり、前庭器摘出の有無あるいは術後の経過時間に無関係であった。ルーピングの回数を20秒間隔ごとに計測した結果を図2に示す。

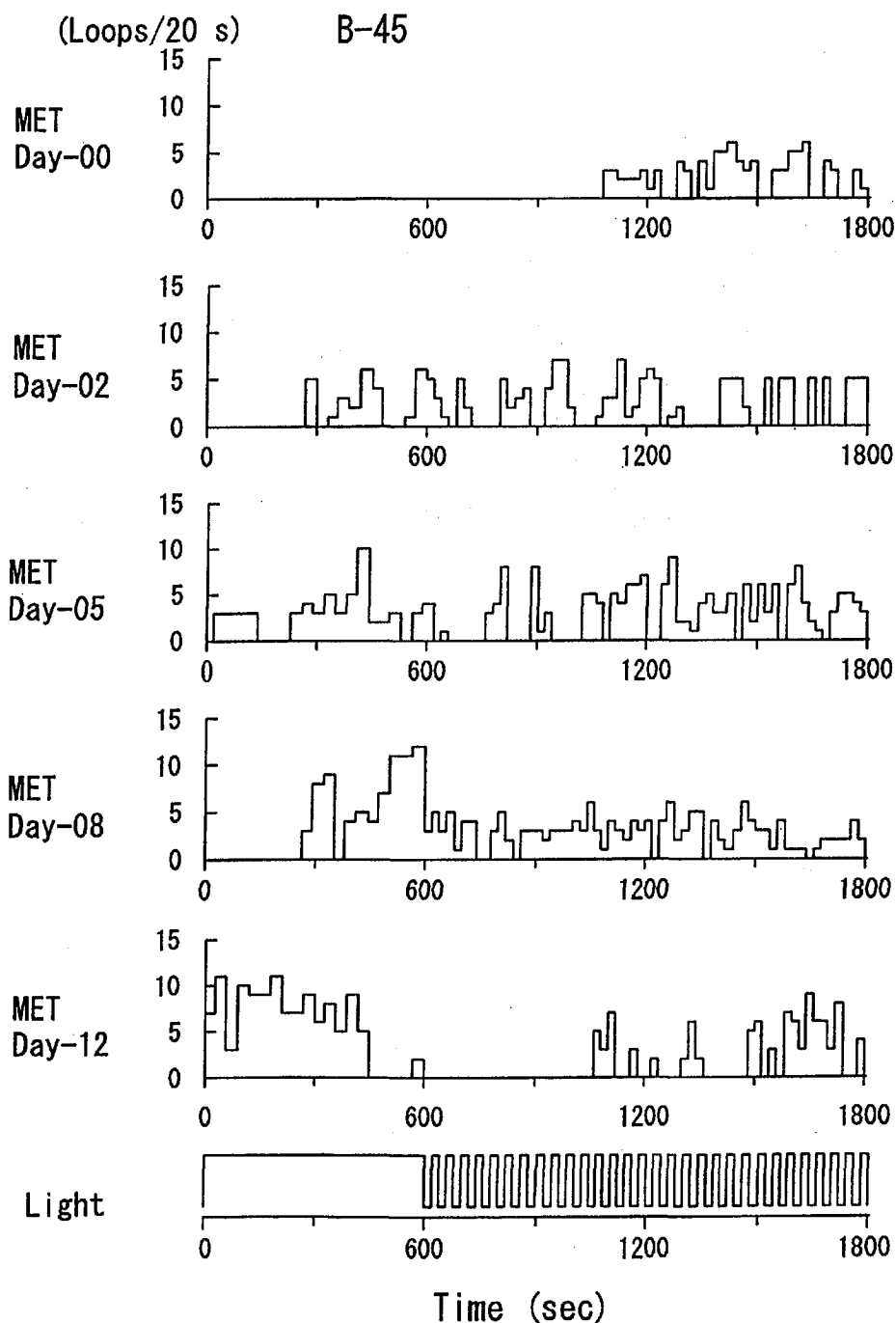


図2 飛行中に観察されたルーピング行動の時間的変化

飛行中に観察された異常行動の一つにローリングがあった(図4)。ローリングが観察されたのは、すべて片側の前庭器を摘出した金魚で、4匹中3匹に観察されたが、回転方向は、すべて術側であった。この内の2匹は、飛行の初期において、体の湾曲が観察された金魚であり、この期間中はほぼ連続的なローリングが観察された(図5)。

### B-45

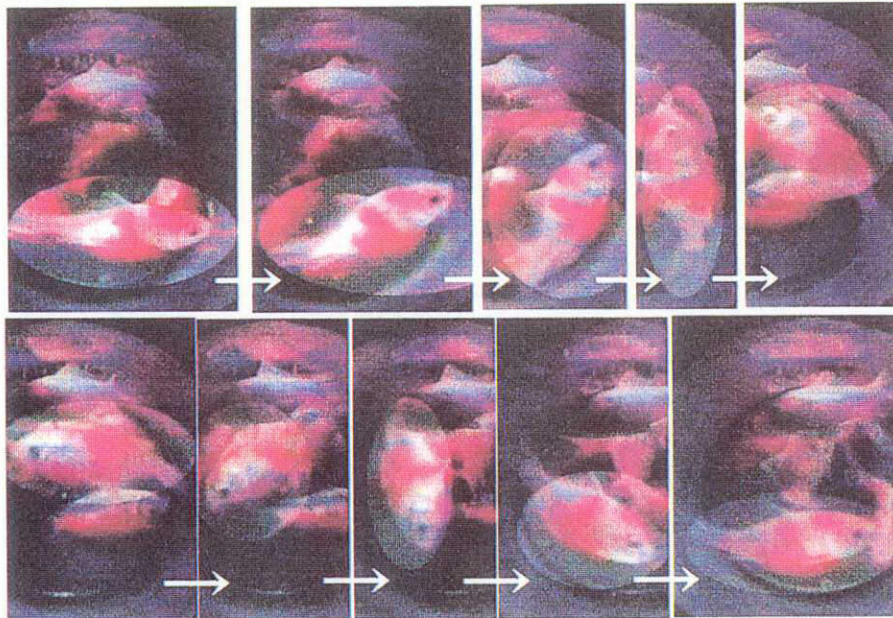


図3 飛行中に観察されたルーピング行動

### L-64

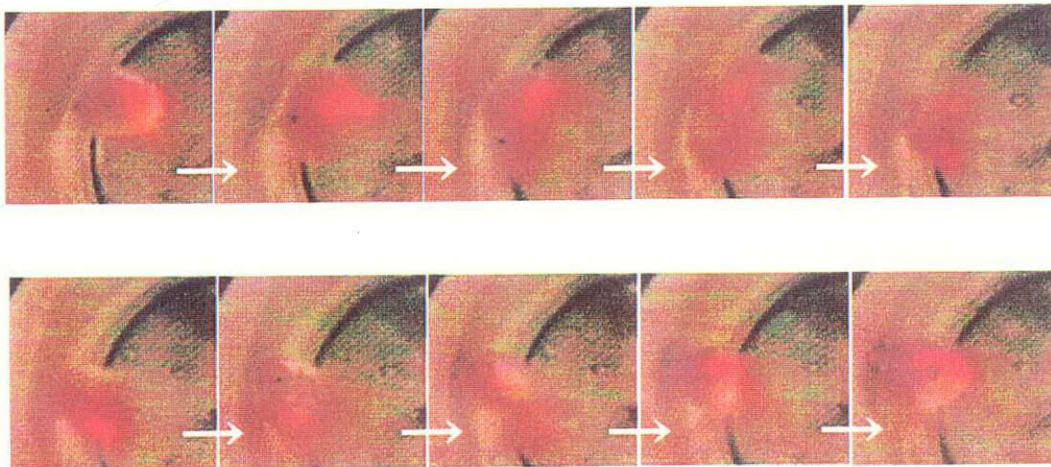


図4 飛行中に観察されたローリング行動

飛行実験の、行動記録時間は30分であるが、最初の10分間は光照射が一定の方向からおこなわれており、その後の20分間は20秒間隔で光照射の方向を切り換えることによって背光反応を調べた。これらの光照射条件下で、ルーピング行動やローリング行動が行われているということは、光の方向に背を向けた姿勢を維持していないことであり、背光反応をしていないことを意味する。ルーピングもローリングもしない期間中で、2秒以上にわたって背を光方向にむけている時間を調べた結果の一例を図6に示す。他の金魚においても同様な結果であり、飛行中は全く背光反応を示さなかった。

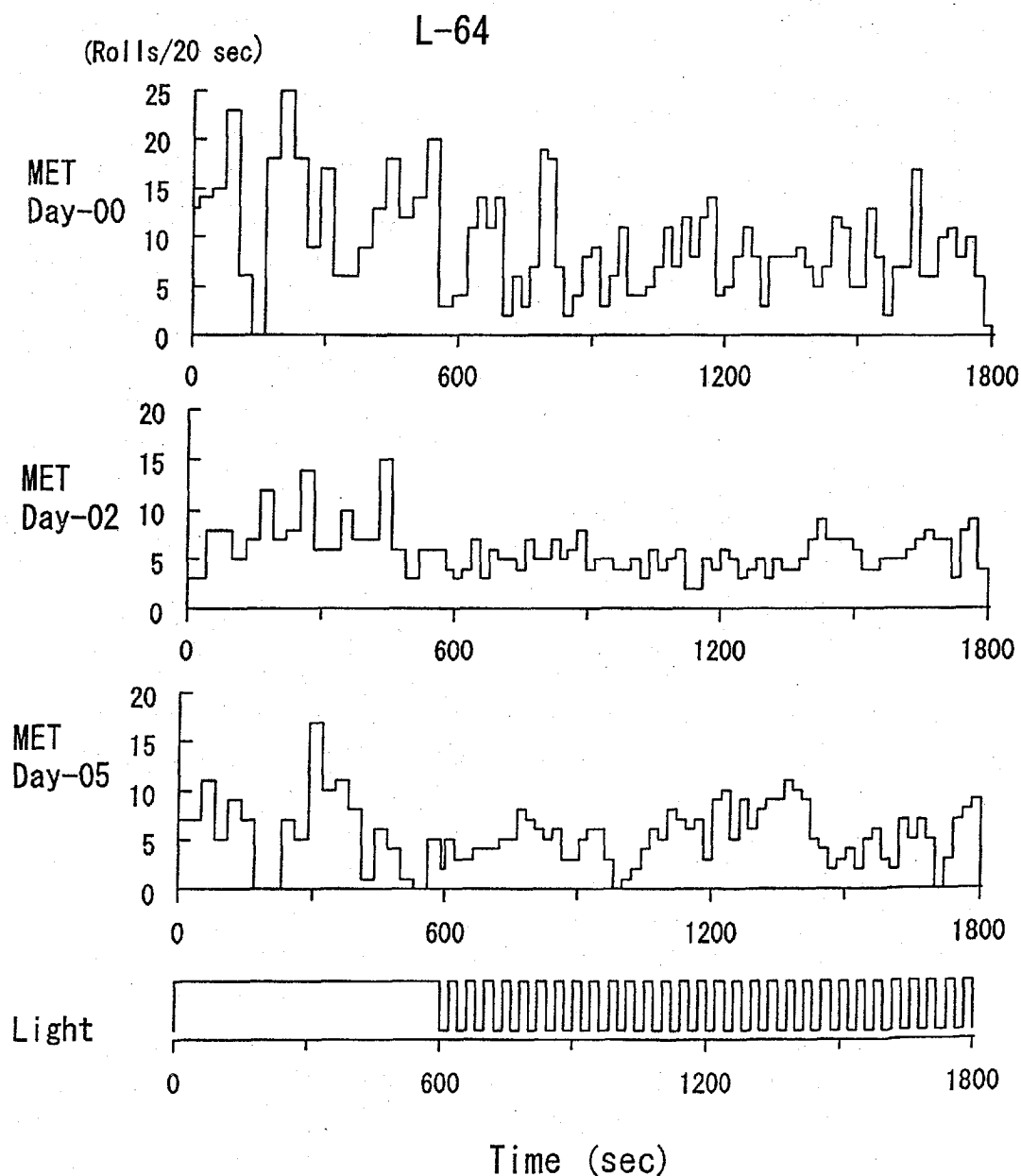


図5 飛行中に観察されたローリング行動の時間的変化。  
20秒間における回転数を示す。

## N-25

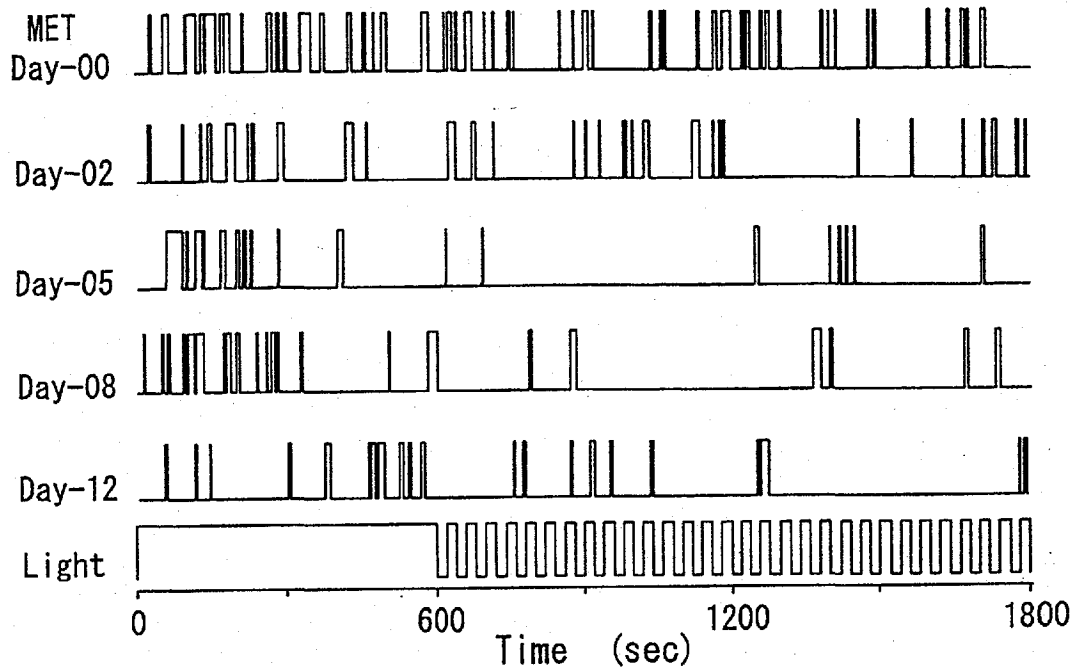


図 6 飛行中に背を光に向けた時間

### 飛行前後の背光反応

スペースシャトル帰還後約6時間で試料を受取り、ただちに飛行後実験をおこなった。飛行前後の実験は飛行中と同様にAAEU内で行った。その後、フィッシュパッケージから金魚を取り出し、個体毎に背光反応を計測した。背光反応の計測は、帰還日に2回(着陸後8時間と16時間後)およびそれ以後、24時間間隔で6回の計測を行った。飛行前の背光反応の記録および解析は、手術直後の1週間以内に約3回、以後3週間間隔で打ち上げ直前まで行われた。飛行に用いられた被検体の、背光反応の最大傾斜角度の変化は、予備実験で得られた結果と一致したものであった。つまり、手術直後においては、術側への傾斜角度が30-40度に増大し、健常側への傾斜は、ほとんど変化しないかあるいは、少し増大する傾向を示す。この術側への傾斜角度の増大は、48時間後には減少が認められ、以後数ヶ月にわたって徐々に減少する傾向を示す。結果的に、術後に観察された背光反応の左右差が消失するように順応する。

打ち上げ直前の背光反応の傾斜角度は、2週間前に手術を行った金魚の方が多少大きい傾向が残っているものの、自由遊泳行動に差はみられなかった。飛行前後の背光反応の、傾斜角度の変化の例を図7に示す。前庭摘出手術を、打ち上げ5ヶ月前に行った金魚では、飛行後に、傾斜角度の増大が認められた。打ち上げの2週間前に、片側の前庭器を摘出した金魚も、背光反応の傾斜角度は同様な経過をたどるが、飛行後の傾斜角度に大きな変化は認められなかった(図7: R-85)。

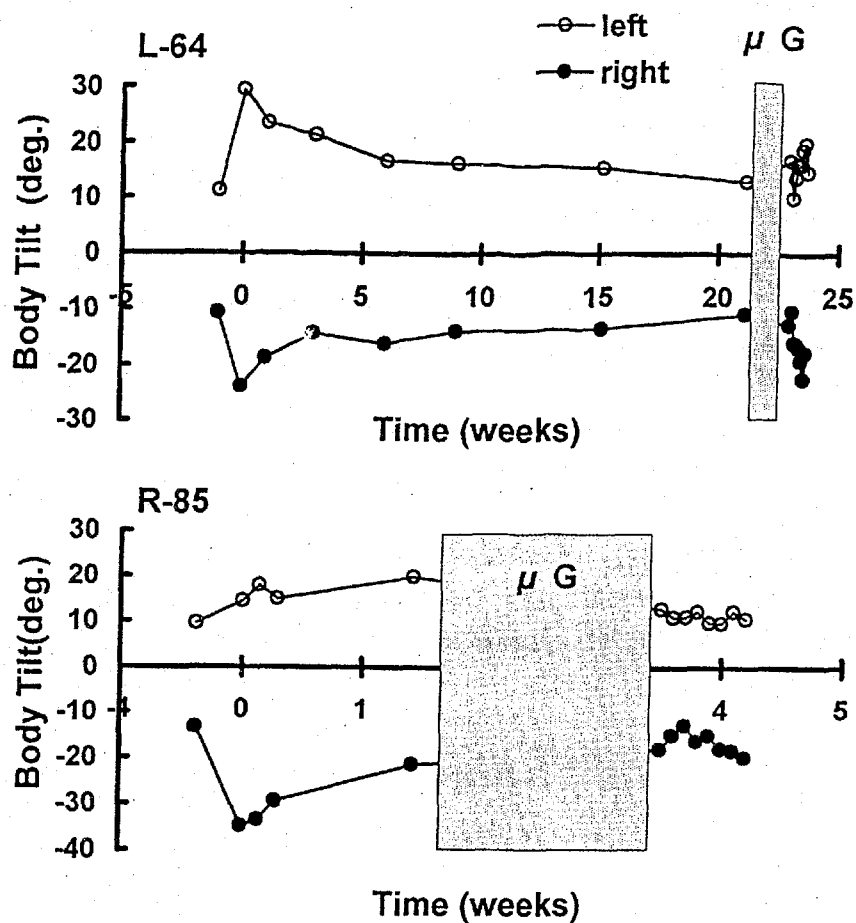


図7 前庭摘出後の背光反応の変化。  
 $\mu G$  は宇宙飛行の期間を示す。

## 解析と考察

### 飛行中の順応

片側前庭摘出して5ヶ月経過した金魚の一匹と、術後2週間の金魚の一匹が術側へ湾曲する姿勢を示し、その方向へローリング行動をした。術側へ曲る、非対称性筋緊張は手術直後に観察される姿勢であるが、1時間以内には代償がおこり正常な姿勢をとるようになる。飛行中におけるこのような非対称性の筋緊張は、微小重力によって代償が無くなった結果再度現れたものと考えられる。この姿勢は、術後5ヶ月の金魚ではMET Day 05まで観察されたがDay 08には見られず、術後2週間の金魚ではMET Day 05では観察されなかった。また、術後2週間の金魚はそれ以後ルーピング行動を示したが、術後5ヶ月の金魚はルーピング行動を示さなかった。これらは、微小重力環境における順応と考えられた。

飛行機による放物線飛行で得られる微小重力下では、明中ではルーピングは観察されず

暗中で、腹を内側にしたゆっくりしたルーピングが観察されたのみであった。また、放物線飛行中には、頭を腹の方向に向けるダイビング反応はしばしば観察されており、腹を内側にしたルーピングもこの反応の延長であると考えられていた<sup>10, 11)</sup>。今回の結果で放物線飛行と異なる行動を示した原因が、水槽の違い、微小重力の時間(放物線飛行で得られる微小重力期間は約20秒)の違い、あるいは微小重力の前に過重力期間(約2.5 G)が存在することによるのかは今後の検討を要する。

また、両側前庭摘出金魚も背を内側にしたルーピングを示した。この金魚は約5ヶ月前に手術を受けており、地上での背光反応の傾斜角度は減少を示していた。この金魚も微小重力の影響を受けたことは、前庭器以外の重力感知器官によるのか、あるいは卵形囊以外の耳石器官が関与している可能性を示唆している。

飛行期間中に行われた、5回の行動記録について、各30分に対するルーピングあるいはローリングを示した時間の割合を図8に示す。ルーピングは宇宙飛行の初期には比較的少なく、約1週間経過後に最大となり、その後再度減少傾向を示した。しかし、飛行期間中に完全に消失することはなく、ルーピング行動でみる限り、宇宙での順応には2週間以上かかることが示唆された。一方、ローリングは飛行の初期のみに観察され、1週間以内に消失し、以後は観察されず、完全に順応したことを示すと考えられた。

6匹のいずれの金魚も光の照射方向の切り換えに対して、明確な背光反応を示さなかった。これは、光によってルーピングが止らなかつたことによると考えられるが、逆に、視覚の手がかりが姿勢の安定化の役割を果たさなかつたことを示すと考えられた。水槽内の光反射や光源の強さの検討も必要であるが、微小重力による前庭系の混乱、あるいは、視覚-前庭系の相互作用における混乱が大きかつたことが示唆される。

#### 帰還後の再順応

帰還後はルーピングやローリングは観察されず、自由遊泳行動の地上への再順応は非常に速かつた。しかし、地上へ帰還後、1週間にわたって計測された背光反応では、前庭摘出の有無と地上での順応の期間の異なることに対応した差異が認められた。飛行後の背光反応の変化を、飛行直前と比較した結果を図9に示す。正常金魚においては、宇宙飛行の前後で、背光反応の傾斜角度に全く変化がみられなかつた。前庭器が正常であれば、地上への再順応は速いと考えられた。一方、前庭摘出手術を受けた金魚は、片側摘出および両側摘出を含めて、術後十分に地上の環境に順応した後、微小重力を体験した魚と、まだ十分に順応しないで微小重力を体験した魚に分けられる。帰還初日(R+0)では、背光反応の傾斜角度は、飛行直前と同じか、あるいは多少の減少傾向があつた。飛行前の術後の経過が長い例では、帰還後、徐々に傾斜角度が増大する傾向が認められた。帰還後の計測は1週間であつたが、それ以後は再度減少する傾向があつた。一方、術後、2週間で微小重力を体験した例では、帰還後の背光反応の傾斜角度は増大傾向を示さなかつた。これらの結果から、前庭順応の期間が長いほど、微小重力の影響を受けやすいことが示唆された。

#### 行動以外の解析

行動の解析以外に、微小重力では、筋の萎縮が報告されていることから、筋の組織学的解析が大平充宣助教授(鹿屋体育大学)によって行われた。また、血中カルシウム濃度の調節ホルモンを分泌する器官である、鰓後体の組織学的検索が高木 勇教授(藤田保健衛生大学)によって、各種臓器におけるストレス蛋白質の分析が、大西武雄教授(奈良県立医大)

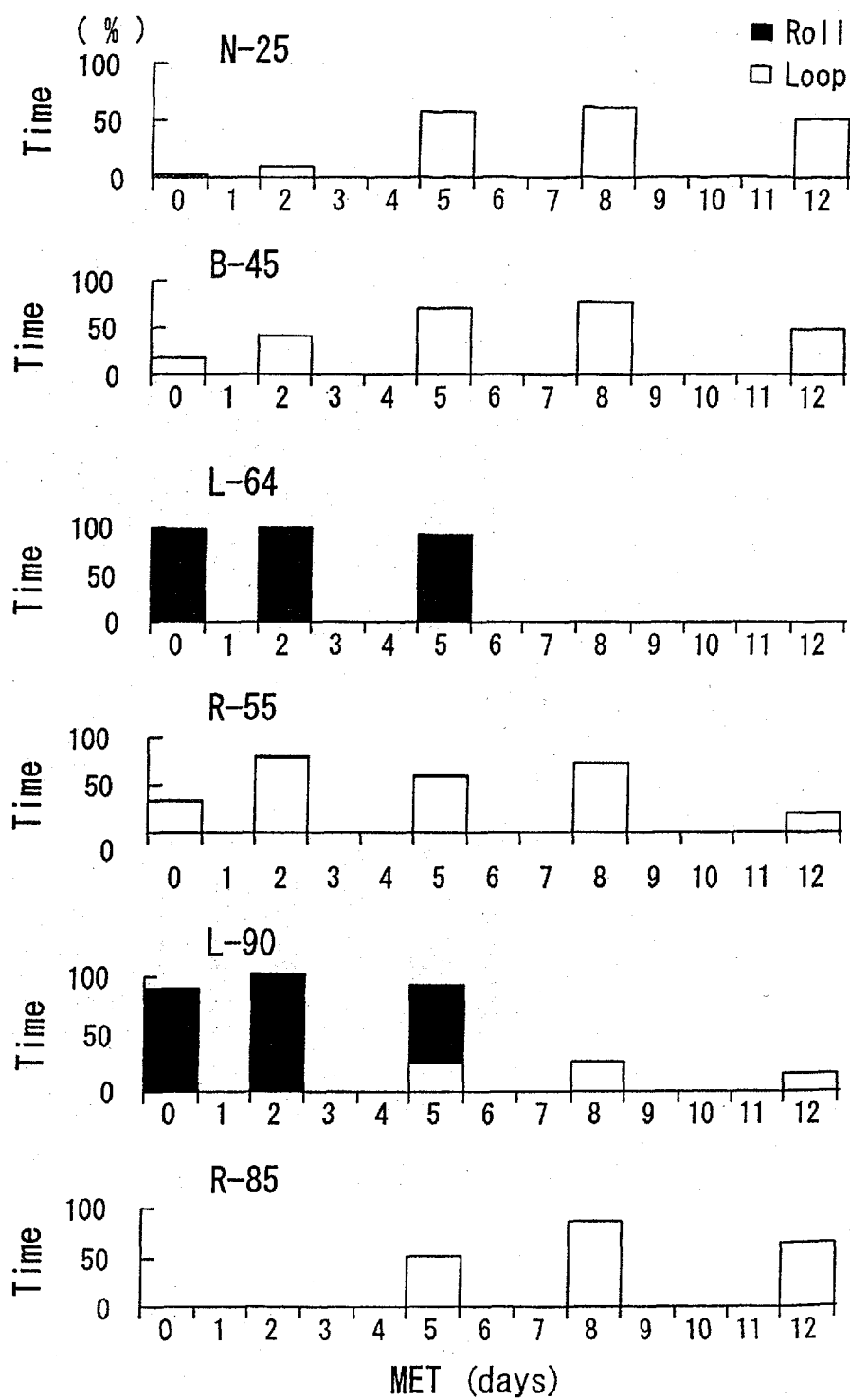


図 8 飛行中にルーピングあるいはローリング行動をした時間の割合



によって行われた。水棲動物である、金魚では本来の環境が準無重量であり、明確な抗重力筋が存在しないこともあって、微小重力の影響は検出されなかった。また、鰓後体の組織学的差異も認められなかった。一方、筋、皮膚、脾臓におけるストレス蛋白(HSP72)は、地上の対照群に比べて有意な増大が認められた。これらのストレスが、微小重力の直接の効果なのかあるいは、宇宙放射線あるいは、打ち上げや帰還時のGの変化によるものなのかは不明であるが、行動では検出できなかったストレスがあったことが確認された。

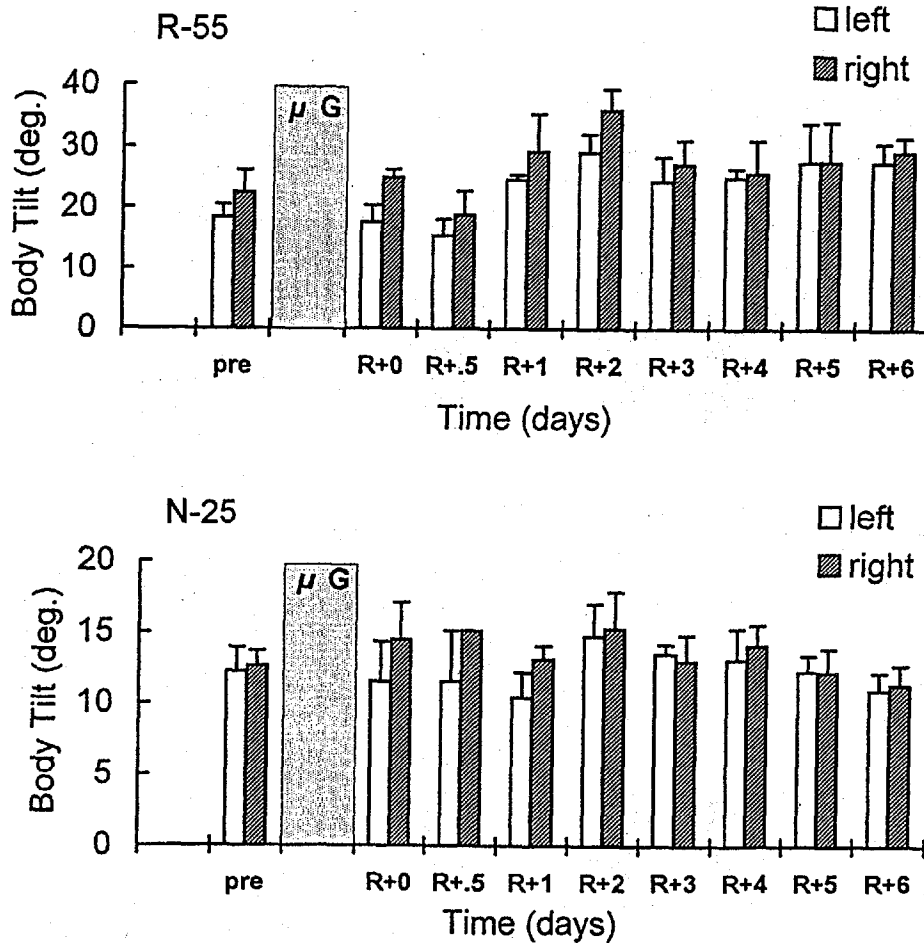


図9 地上帰還後の背光反応の変化

## 結論

微小重力下では、前庭器への入力消失による、遊泳行動や姿勢の変調が観察された。その程度は正常金魚、両側前庭摘出金魚、片側前庭摘出金魚の間で差異があった。片側前庭摘出金魚に現れた非対称性筋緊張が、最も明確な順応を示した。また、前庭感覚入力の左右差による、ローリング行動も飛行期間中に順応を示した。一方、前庭感覚の前後の感覚異常によると考えられるルーピング行動は、微小重力に暴露された直後より時間的遅れをもって最も激しくなり、その後減少するが2週間の飛行期間中では、完全な順応を示さなかった。

帰還後の、自由遊泳における再順応は速かったが、背光反応の傾斜角度を指標とした再順応過程は、前庭器官の有無と前庭摘出手術後の地上での順応期間の長さに依存していた。前庭摘出後の地上での順応期間が長い方が、地上へ帰還後の再順応に1週間以上の時間を要することが示唆された。

#### 参考文献

- 1) von Baumgarten, R.J., Simmonds, R. C., Boyd, J. F. and Garriott, O. K. Effects of prolonged weightlessness on the swimming pattern of fish aboard Skylab 3. *Aviat. Space Environ. Med.* **46**, 902-906 (1975).
- 2) 御手洗玄洋, 森 滋夫, 高木貞治, 高林 彰, 榊原 学, 臼井支朗. 無重力環境下の運動制御とその順応に関する研究 I. 姿勢変化と視葉活動からみた鯉の背光反射特性について. *環研年報.* **31**, 1-8 (1980).
- 3) 御手洗玄洋, 高木貞治, 森 滋夫, 高林 彰. 無重力環境下の運動制御とその順応に関する研究 VI. 鯉の背光反射と中枢活動の観察. *環研年報.* **32**, 14-17 (1981).
- 4) 御手洗玄洋, 森 滋夫, 高木貞治, 高林 彰. 無重力環境下の運動制御とその順応に関する研究 VIII. 鯉の背光反射行動と小脳活動. *環研年報.* **33**, 16 (1982).
- 5) 御手洗玄洋, 高林 彰, 森 滋夫, 高木貞治. 無重力環境下の運動制御とその順応に関する研究 XIII. 鯉の背光反射と眼球運動. *環研年報.* **34**, 1-6 (1983).
- 6) 高木貞治, 高林 彰, 森 滋夫, 渡辺 悟, 佐竹裕孝, 植木俊介, 伊藤貴代子, 山崎孝, 関本洋一, 御手洗玄洋. 無重力環境下の運動制御とその順応に関する研究 XXIV. 回転水槽中における鯉の姿勢変化. *環研年報.* **36**, 12-17 (1985).
- 7) 渡辺 悟, 高木貞治, 高林 彰, 森 滋夫, 御手洗玄洋. 無重力環境下の運動制御とその順応に関する研究 XXVI. 脳各部の破壊による背光反射の中枢経路の検索. *環研年報.* **37**, 1-3 (1986).
- 8) 森 滋夫, 渡辺 悟, 高林 彰, 榊原 学, 古賀一男, 高木貞治, 臼井支朗. 無重力環境下の運動制御とその順応に関する研究 XXVI. 放物線飛行実験における鯉の背光反射と小脳活動の解析. *環研年報.* **38**, 13-19 (1987).
- 9) Takabayashi, A., Watanabe, S., von Baumgarten, R., Wetzig, J. and Ohta, H. Postural control of fish during parabolic aircraft flight. In *Biological Sciences in Space*, ed. by S. Watanabe, G. Mitarai and S. Mori, Myu Research, Tokyo (1987). 163-172.
- 10) 高林 彰, 小原 健, 渡邊 悟, 森 滋夫, 田中正文, 桜木惣吉. 金魚の姿勢制御に与える微小重力の効果. *第9回宇宙利用シンポジウムプロシーディング* (1992). 119-122.
- 11) von Baumgarten, Baldrighi, G. and Shllinger, G. L. Jr. Vestibular behavior of fish during diminished G-force and weightlessness. *Aerospace Med.* 626-632 (1972).

#### 外部発表

- 1) Takabayashi, A., Watanabe, S., Mori, S., Tanaka, M., Sakuragi, S. and Takagi, S. Posture control of goldfish in microgravity. *Proceedings of the seventeenth international symposium of space technology and science* (1990). 2015-2020.

- 2) Takabayashi, A., Watanabe, S. and Takagi, S. Posture control of fish related to gravity input. *Proceedings of the eighteenth international symposium of space technology and science* (1992). 2059-2063.
- 3) 高林 彰, 小原 健, 渡邊 悟, 森 滋夫, 田中正文, 桜木惣吉, von Baumgarten, R. 微小重力下における魚の前庭順応機構. 第7回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1990). 261-265.
- 4) 高林 彰, 小原 健, 渡邊 悟, 森 滋夫, 田中正文, 桜木惣吉, von Baumgarten, R. 微小重力での感覚入力の変化と金魚の姿勢制御. 第8回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1991). 96-100.
- 5) 高林 彰, 小原 健, 渡邊 悟, 森 滋夫, 田中正文, 桜木惣吉. 金魚の姿勢制御に与える微小重力の効果. 第9回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1992). 119-122.
- 6) 高林 彰, 小原 健, 渡邊 悟, 森 滋夫, 田中正文, 桜木惣吉. 宇宙と地上における魚の前庭順応. 第10回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1993). 102-106.
- 7) 高林 彰, 小原 健, 渡邊 悟, 森 滋夫, 田中正文, 桜木惣吉, von Baumgarten, R. IML-2における金魚の行動観察実験. 第11回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1994). 8-11.
- 8) 高林 彰, 渡邊 悟, 森 滋夫, 田中正文, 桜木惣吉. 宇宙の微小重力環境下における金魚の行動. 第72回日本生理学会大会, 名古屋(1995).
- 9) 高林 彰, 小原 健, 渡邊 悟, 森 滋夫, 田中正文, 桜木惣吉, von Baumgarten, R. 微小重力下における魚の前庭順応機構 - IML-2における金魚の行動観察実験 -. 環境医学研究所年報. 46, 16-18 (1995).
- 10) 高林 彰, 小原 健, 大村輝江, 渡邊 悟, 森 滋夫, 田中正文, 桜木惣吉, 長岡俊治. 宇宙の微小重力における魚の行動順応. 第12回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1995). 6-9.
- 11) 高林 彰, 小原 健, 大村輝江, 渡邊 悟, 森 滋夫, 田中正文, 桜木惣吉, 長岡俊治. IML-2(第二次国際微小重力実験室)における魚の前庭順応実験. 日本マイクログラフィティ応用学会誌. 12, 157-162 (1995).

## イモリの宇宙における産卵および受精卵の発生 (ASTRONEWT)

代表研究者： 山下雅道\*<sup>1</sup>

共同研究者： 黒谷明美\*<sup>1</sup>、最上善広\*<sup>2</sup>、浅島 誠\*<sup>3</sup>、小池 元\*<sup>3</sup>、今溝真理\*<sup>4</sup>、  
奥野 誠\*<sup>3</sup>、Carl J. Pfeiffer \*<sup>5</sup>、駒崎伸二\*<sup>6</sup>、佐々木史江\*<sup>7</sup>、  
大平充宣\*<sup>8</sup>、鹿島 勇\*<sup>9</sup>、菊山 栄\*<sup>10</sup>、大西武雄\*<sup>11</sup>、駒田 聡\*<sup>12</sup>

\*<sup>1</sup> 宇宙科学研究所、\*<sup>2</sup> お茶の水女子大学、\*<sup>3</sup> 東京大学、\*<sup>4</sup> 東邦大学、

\*<sup>5</sup> Virginia Polytech. Inst. State Univ.、\*<sup>6</sup> 埼玉医科大学、\*<sup>7</sup> 鶴見大学、\*<sup>8</sup> 鹿屋体育大学、

\*<sup>9</sup> 神奈川歯科大学、\*<sup>10</sup> 早稲田大学、\*<sup>11</sup> 奈良県立医科大学、\*<sup>12</sup> 富士通研究所

The newt egg is a large single cell. The heavier vegetal hemisphere orienting downward by gravity gives a fixed reference of morphogenesis with respect to gravity. Effects of gravity on the early development of Japanese red bellied newt were studied. In this experiment (named as AstroNewt), four female newts were sent to orbit. They were treated by gonadotrophic hormone to ensure egg laying in space and fertilization with sperm stored in their body cavity.

Eggs were laid during the flight. Some of eggs were at the stage of late morula, tail bud, and fore limb formation on MD5 and 12. Morphology of embryo was normal judged by the close up video images. Early developmental process of newt undertakes without gravity. However, at a small sample size and lack of histological survey on embryo, this conclusion can not be generalized further.

During the mission, two newts were lost on MD5 and MD9. In contrast to the flight group, all four ground control newts were kept quite healthy and laid many eggs. Based on AAEU water pressure log, water circulation seemed to be blocked in the cassette after winding egg laying tape on MD4, a day before the newt in it was found lost. Microscopic examination on the two newts that were recovered in alive from orbit revealed many biological effects of space flight. Liver, stomach and lung of flight samples showed pathological changes that were not found in the ground controls.

### 実験の目的、意義

重力は質量に作用することから、大きな質量や比重差がある場合に重力に関係する現象は熱的な散逸を凌駕する。両生類の卵はその発生初期には巨大な細胞であるとともに、軽い動物半球が上方に向く定位回転が受精時に見られる。このことから、生命の基本単位である細胞への重力の支配を明らかにするのに両生類の卵は格好の対象として考えられてきた。宇宙実験の初期から両生類の卵の発生が繰返し取り上げられ、微小重力下でも正常に発生が進む結果が示されてきた。ただし、これらの宇宙実験は地上である程度発生が進行した卵を打ち上げており、受精卵の極めて初期の発生段階から宇宙環境に曝露したものはなかった。一方、過重力を印加する実験などから、重力は第一卵割以前に支配的な働きをしていることがわかってきた。本実験の準備期間中に、Souzaらによりアフリカツメガエルの実験が実施され、第一卵割以前から卵を微小重力に曝露しその後の発生過程が詳しく調べられた。その結果、アフリカツメガエルでは受精を含めた初期発生を宇宙で行わせ

ても、終局的には正常なオタマジャクシに育つことがわかった。これは、受精時の重力による卵の定位回転が胚軸の決定に重要な役割を果たしているとの従来の説を覆す発見として注目された。同じく両生類であるイモリの発生はアフリカツメガエルに比べて約 1/5 の速度で進む。また卵細胞の分化が開始する時期に磁場の強度を変動させると胚の生存率が低下するなど、イモリの卵は環境要因に鋭敏に反応する。このことから、微小重力がイモリの初期発生に大きな影響を与えるか、あるいはイモリの初期発生においても生命の調節能力の強靭さが示されるかを明らかにすることとした。

## 実験の方法と試料

イモリは秋にも婚姻行動を行い、冬眠中精子嚢が雌の体腔内に保持される。春に水温が上昇するとこの精子により受精した卵を産卵することができる。冬眠中の雌イモリを採集してそのまま冷蔵状態で維持し、ホルモン処理すれば受精卵を任意の時に得ることができる。雌のイモリのみを軌道上に送り、ホルモン処理することにより宇宙での産卵を誘発する。受精卵を第一卵割以前から宇宙環境に曝すために、雄イモリや人工受精手段を要しないことが本実験の特徴である。卵および精子を雌イモリにより保持するこの実験系は、生命維持機能を雌イモリそのものに依存するといえる。また、イモリは肺呼吸をするものの潜水状態でも維持できる。このイモリの特性は、微小重力下で難しい気液二相のハンドリングなしに、水棲動物実験装置(AAEU)での実験を可能とした。

イモリの実験では AAEU のアクアリウムパッケージ(AP)のタンク(カセット式水槽)3つを用いた。4匹のイモリを2群に分け、2匹には打ち上げ前に産卵を誘発するのに十分な量のホルモンを投与し、イモリ用のタンク一つに搭載した(地上処理群)。他の2匹には地上で地上処理群の半量以下のホルモンを投与してタンク2つに搭載し、軌道上で産卵の見られない場合にホルモンを追加投与した(軌道上処理群)。これは、打ち上げの延期があると打ち上げまでに多くの卵が産卵される危険性、および軌道上でのホルモン処理の困難さを勘案したものである。イモリには卵を水草の葉に産みつける習性がある。薄いプラスチックフィルムのテープを与えるとテープを卵に巻きつけながら産卵する。打ち上げ前に地上で産卵された卵を識別するため、産卵テープを軌道上で展開し、これに産みつけられた卵を宇宙で産卵されたものと判定できるようにした。

イモリの宇宙での卵の発生はビデオカメラおよびその近接撮影系を用いて記録した。また、宇宙飛行がイモリ成体に与える影響を検索するために、試料回収直後に解剖して各器官を固定した。軌道上での実験と平行して飛行実験装置と同じ装置による地上対照実験が行われ、軌道上での実験操作と同じ操作をこの地上対照群に対して実施した。

潜水状態でイモリに産卵させる本実験の設計は、水温の設定において大きな問題があることが飛行実験装置のライフサポート試験において判明した。ホルモンを投与しても、気液二相で維持して肺呼吸させれば、設定された 25℃であっても産卵する。ホルモン処理をして高い温度で水中に維持すると、処理後産卵が誘発される 2,3 日で死亡する率が高い。また水温を 2℃下げれば顕著に死亡率が減少し産卵率が增大するといった強い温度依存性が見られる。

イモリの幼生は外鰓をもち水中で生活する。鰓が退化し肺が発達するとイモリは陸上にも上がるようになり、また水中に居るときも時折水面に浮上して肺に空気を吸い込む。温度が上昇すると、水中の溶存酸素濃度は低下し、一方イモリの酸素要求量は増大する。二酸化炭素は主に皮膚から排出され、冬眠中は皮膚からの酸素の摂取の割合が高いといわれ

る。イモリは冬眠中ほとんど水中あるいは水底の堆積物の中で過ごす。カエルについては、甲状腺ホルモンの作用により夏季に代謝が二倍ほどに増大すること、低温環境に順応した個体の代謝速度は高いことが知られている。

水中で維持したイモリの死亡の原因が、ホルモン処理により代謝が増大し、呼吸要求が皮膚呼吸能より上回るのか、皮膚呼吸が阻害されて呼吸要求を満たせないのか、あるいはその他の要因によるのかを探るために、イモリの酸素消費量を測定した。冬眠状態から昇温させると、昇温後2日ほどの時定数をもって増大していく。ホルモン処理後のイモリの酸素消費速度は産卵開始まで顕著に増大し、産卵開始後は再び元の値に戻る。産卵誘発時に皮膚呼吸のみでは酸素要求量に不足することが、水中維持時のイモリの死亡の要因の一つであることが示唆された。

また、長時間肺呼吸をさせながら高温状態に適応させたのちにホルモン処理し潜水させれば死亡率は低下することから、温度の変化に対する未適応を死亡原因の一つに挙げることができる。従来から実験に用いてきたイモリは主として寒冷な地方で採集したイモリである。平均気温が高い地方で高温に順応していると考えられるイモリを採集し、特性を比較したが、これらのイモリはかえって高い死亡率を与えた。採集してから実験に用いるまで5℃で維持するため、保存時の低温や大きな温度変動に対して温暖地方のイモリの耐性は低いものと思われた。

過剰なホルモンの投与や、体内ホルモン濃度のピーク値が高いと往々にしてイモリの死亡をもたらす。ホルモンの投与方法の改善のために、徐放する製剤の有効性を住友製薬の協力のもとに検討した。ホルモンを棒状のコラーゲンの中に封入してイモリに投与すると、通常の投与方法に比較して、投与から産卵のピークまでの日数が2-3日遅れ、投与から5日後に産卵ピークを与えること、また産卵継続日数も10-14日と倍増することがわかった。打ち上げ2日前に実施するホルモン処理、および最大3日の打ち上げ延期があっても試料の交換ができないという実験条件に対して、このホルモン製剤は体内のホルモン濃度を低く平滑化することによりイモリの宇宙での産卵を誘発するのに有効であり、イモリの高い産卵率と低い死亡率が得られることを確かめた。

イモリの産卵・生存特性には、地域・季節によって大きな差異がある。冬眠から醒める直前に採集したイモリでは、昇温後直ちにホルモン処理して水中に維持すると死亡率が高い。産卵を誘発させる適切なホルモン量も、それぞれの母集団について定める必要がある。採集時期は晩秋の冬眠直前、冬眠中、冬眠から醒める前とし、採集後の実験室での維持は、水150 mlあたり1匹以下の個体密度で、遮光しながら5℃に保冷し、1週に1度飼育水を交換する方法をとった。

飛行実験装置あるいはこれと同等の装置を用いた実験機能実証試験において、以上の予備的な試験で決定した実験プロトコルを適用し、AAEUでのイモリの産卵・生存が可能なことを確かめ飛行実験にのぞんだ。

## 飛行実験の結果

イモリは、1993年10月より1994年3月にかけて、新潟県、岩手県、鹿児島県において採集し、総計9群を冬眠状態で維持した。9群の中から潜水状態での生存産卵特性の優れた母集団を選ぶ試験を幾度か行い、打ち上げの1月前に約千匹のイモリを二度に分け射場に輸送した。このうち半数は耳石の実験に用いる卵を採卵するためのイモリにあてた。試料の射場への搬入後、コールドルーム内にイモリを収容し、遮光状態で個別飼育容器に1

匹ずつ入れた。個別の飼育容器に1匹ずつ入れることで障害の伝搬を防止し、また週3回飼育水(キシミ・ミネラル水)を交換してイモリに付着する水カビや原生動物により実験系が汚染される危険を低減した。射場でのホルモン投与量決定試験、潜水産卵特性試験、およびホルモン投与方法の実証試験などの結果を参考にして搭載する母集団を選定した。

最終的に選定した飛行実験群は1994年3月に岩手県三陸町の二カ所で採集した221匹の母集団から選び出した。なお、米国PIの実験に供する卵の採卵用には鹿児島、新潟で採集されたイモリが使用された。これらは、産卵率および発生の進行する卵の割合が高い群として評価された。これに対して本実験用の群には高温潜水産卵誘発状態での生存率が高い岩手県で採集したイモリ母集団2つを候補とした。この母集団のなかから打ち上げの9日前に搭載試料候補26匹を選び、冬眠状態から半日に5度ずつ昇温して5日間肺呼吸させながら実験時の温度24℃に順応させた。一度試料がシャトルに載せられてしまってから打ち上げが延期された場合には、最初の打ち上げ予定日の3日後に試料の交換をすることとしていた。このためのバックアップ試料用に、打ち上げの3日前にもう一群のイモリを冬眠状態からさました。

打ち上げの30時間前にNASAへ試料を搭載した装置を引き渡すため、次のような手順がとられた。打ち上げ二日前に第一回選抜群のイモリにホルモン剤を投与し、外傷や活動度、腹の触診、体重などの検査により8匹を選んだ。このうち4匹を飛行装置に、4匹を地上対照用の装置に搭載した。4匹のイモリのうち2匹は産卵を誘発するのに十分な量のホルモン剤を投与して一つのタンクに2匹をいれ(地上処理群)、2匹は産卵誘発のしきい値以下のホルモン剤を投与して1匹ずつ2つのタンクにいれた(軌道上処理群)。装置内での水カビおよび原生動物の繁殖を防止するため、産卵テープは70-60℃の水に浸して滅菌した。生物試料のマラカイトグリーン薬浴が提案されたが、薬浴試験群のイモリに死亡がみられたためこの操作は適用せず、搭載前に毎日飼育水を新しくして汚染を最小限とする手順を適用した。

打ち上げられた(MD0)9時間後に、地上ホルモン処理群のイモリのタンク(Flt A-3)が観察され、二つの卵がすでに産卵されていることが確認された。飛行3日目(MD2)には、軌道上処理群のタンク二つ(Flt A-1およびFlt A-2)が観察され、Flt A-2タンクではすでに産卵が見られたために軌道上での追加のホルモン処理は実施しなかった。飛行実験群では3タンク中2つ(Flt A-2およびFlt A-3)に産卵が認められ、ビデオカメラによる卵、胚の記録がなされた。図1にMD2およびMD5に撮影されたFlt A-3タンクに産卵された卵の画像を、図2、3にMD5およびMD12に取得されたFlt A-3タンク中のイモリ胚の近接ビデオ画像を示す。MD2でのFlt A-3タンクのビデオ撮影操作では、時間の

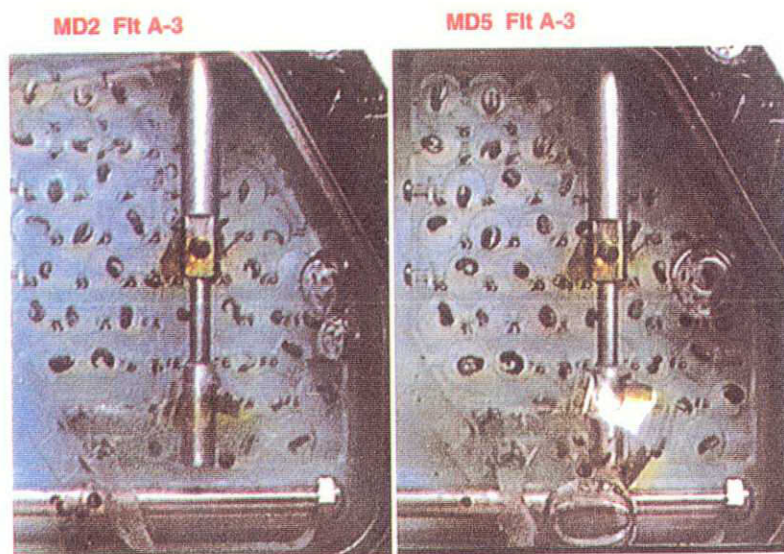


図1 Flt A-3タンク中に産卵された卵  
MET Day 02およびMET Day 05に撮像

制約から予定されていた近接撮影はできなかった。図4に、MD5に近接撮影されたFlt A-2タンク中の卵を示す。

親イモリについては、MD5にFlt A-2タンク中の一匹のイモリの死亡が報告され、このタンクはAAEUから切り離され収納された。さらにMD9にもう1匹のイモリ(Flt A-1タンク)の死亡が報告された。このときは死亡したイモリをタンクから取り出し、イモリの胚の入ったタンクをAAEUのAP水ループに復帰させた。

タンク中のイモリおよび冷凍状態で保存されたイモリの死体を受領したのはシャトル着陸後5時間あまりたった時点であった。Flt A-3タンク中で産卵された卵については、発生しなかった卵が回収されたのみで、MD12にビデオ記録されていた発生の進行していた胚はタンク中に発見できなかった。

一方、地上では飛行したAAEUと同じ装置(BBM)を用い、全ての実験操作を飛行実験群に対して4時間遅れで実施した。ただし、シャトルへの積み込み操作や打ち上げ、帰還時に搭載試料が経験した振動や加速度は模擬していない。シャトルへのAAEUの積み込み時には、水循環ループが金魚の実験装置(FP)と一度つながる等の操作がなされた。また、飛行実験装置では、MD5にFlt A-2タンクでのイモリの死亡が確認された後このタンクが引き抜かれたが、地上対照群ではこの操作はタンクの挿抜操作を模擬しただけで、Gnd A-2タンクはAAEU BBMに組み込んだまま対照実験を続行した。



図2 Flt A-3タンク中でMET Day 05に撮像された胚



図3 Flt A-3タンク中でMET Day 12に撮像された胚



生きて回収されたイモリは飛行実験群および地上対照群ともに写真記録、体重測定、マイクロフォーカス管による X 線撮像の後、解剖し、各臓器をグルタルアルデヒド、パラホルムアルデヒドなどで固定、もしくは冷凍保存した。固定した臓器は成体の下顎、脳、眼、脊髄、心臓、肺、肝、胃、腸、卵巣、腹筋、血液、皮膚、脚、尾である。軌道上で死亡した Flt A-1, Flt A-2 については、解凍して、外観、皮膚の色、眼の色、注射(地上および軌道上)位置、体重、体表のカビの有無などを調べた。X 線撮像ののち、腹部を開き内臓を観察し、開腹した状態で固定保存した。



図 4 Flt A-2 タンク中で MET Day 05 に撮像された胚

## 解析と考察

宇宙でイモリが産卵し、産卵された卵のうちいくつかの卵の発生過程が観察された。宇宙環境下においてもイモリの初期発生は基本的には進行することが示された。初期の卵割パターン記録や、発生が進んでいた胚を回収して詳しく調べることはできなかったが、取得された画像から、宇宙環境でのイモリ卵の発生が地上とかわりなく進んだか、あるいは形態や発生のタイムコースなどに何らかの変化があったかを調べた。

Flt A-3 タンクの MD2、5、12 に撮像された画像および搭乗実験者の観察から、このタンクの中で発生の進行した卵は MD0 から 2 の間に産卵されたと推定される。MD5 に近接撮像された胚は尾芽胚(発生段階 26)であり、MD12 には発生段階 36 となっている。取得されている画像でみるかぎり、これらの胚の形態に地上でみられる形態と異なる点はない。発生の進行は温度に依存するが、24 から 23 °C の温度範囲での発生のタイムコースから観察された発生の進行は外れるものではなかった。

地上対照群では、イモリ 4 匹全てが生存し、タンク 3 つともに多数の産卵があり、発生の進行した卵の数も多かった。Gnd A-1 には MD5 に 64、Gnd A-2 には 69、Gnd A-3 には 43 の卵が実験中に確認されている。これに対して飛行実験群では、Flt A-2 に 37、Flt A-3 に 9 である。

親イモリの生死という点では、飛行実験群と地上対照群で大きな違いがあった。冷凍状態で軌道上から回収された試料をみると、MD5 に死亡が発見されたイモリ(Flt A-2)の姿勢は四肢を広げ首を上にもたげており、潜水状態で死亡するイモリによく見られる姿勢と異なるものであった。解剖すると、このイモリの輸卵管の径が通常より倍近くになっていた。一方、MD9 に死亡が発見されたイモリ(Flt A-1)には、潜水状態で死亡したイモリによく見

られる腹腔内の出血があった。生きて軌道上から帰還したイモリ2匹(Flt A-3a, b)は、タンクの窓を開けた直後に、異常に活発な運動を示した。これら2匹には解剖した時点では特に異常な所見はなかった。飛行実験群および地上対照群の全てのイモリについてホルモン剤は腹腔内に入っており、またホルモン処理により臓器が傷つけられてはいなかった。

回収試料(Flt A-2)についてみられた輸卵管の膨らみが、産卵誘発時および産卵後の輸卵管の太さの分布範囲にあるのかを調べた。飛行実験群と同一母集団のイモリにホルモン処理し、産卵前後のイモリの輸卵管や卵巣をみたが、輸卵管の太さには個体差が大きいものの Flt A-2 で見られたほどの太さの輸卵管を持つイモリは見られなかった。

また Flt A-2 の頭部の X 線像には耳石の密度の不均衡がみられた。死亡後の試料の保存履歴を模擬した処理を試料に対して加えたうえその X 線像を観察すると、不均衡な像が観察できることから、室温に 1 - 1.5 日放置による変化、その後の凍結により耳胞の膜が破壊したものと推定した。

イモリ成体が宇宙飛行によってどのような影響を受けたか、また 2 匹の死亡要因は何であったかが調べられた。生きて回収された飛行実験群(Flt A-3a および A-3b)について次のような結果が得られている。

肝臓では細胞死している部分があるほか、オスミウムに親和性の強い顆粒を多く含む OG 細胞(osmiophilic granulohepatocyte)が図 5 に示すように多く見られた。この顆粒細胞の機能の一つにフリーラジカルを捕捉するという機能が示唆されており、その細胞の密度の

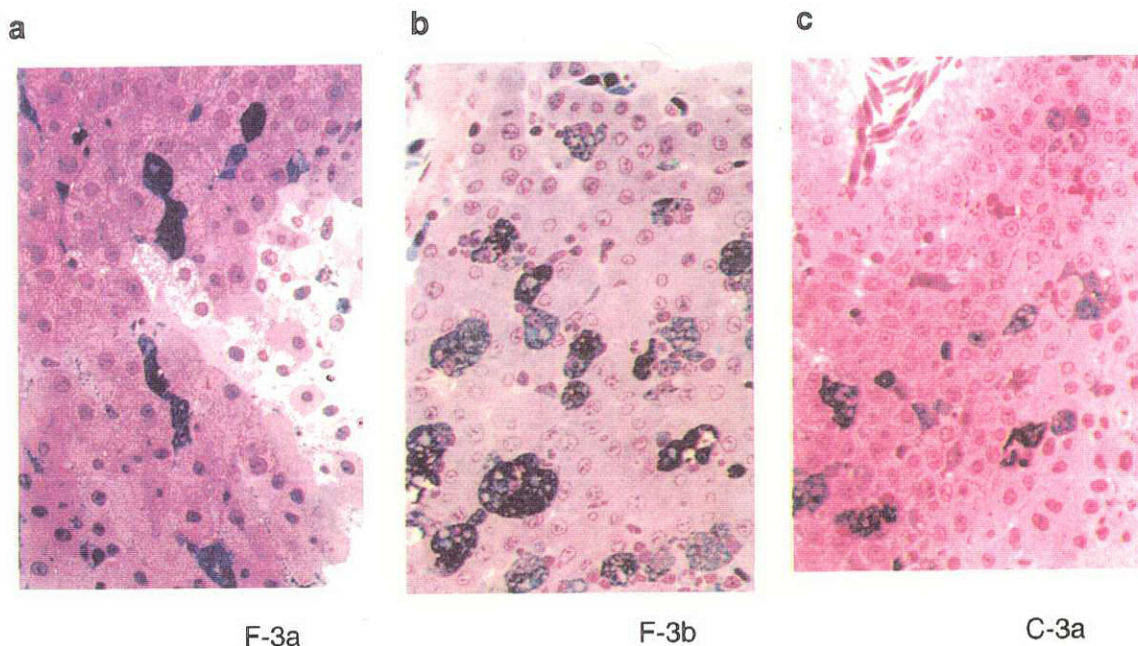


図 5 肝組織の光学顕微鏡像

a: 飛行実験群 Flt A-3a、白く抜けている部分は細胞死の状態、b: 飛行実験群 Flt A-3b、暗色の細胞が OG cell でありその密度が高い、c: 地上対照群 Gnd A-3a、正常な肝細胞の状態、紡錘状の細胞は赤血球 (Pfeiffer)

増加は毒素に対する反応として考えられている。イモリ成体に対して特異的な毒性成分が飛行実験装置の水循環系内に発生・溶存していたか、あるいは他の要因でこのようなOG細胞の変化をもたらされたと推定される。さらに、図6に示すように、肝細胞の核小体の小型化、粗面小胞体の量的な減少と形態変化、ミトコンドリアの形態変化が見られる。これは、肝細胞での蛋白合成系が宇宙飛行により影響をうける可能性を明らかにしたものである。宇宙基地ミールに8日間飛行したニホンアマガエルについて高橋周七らが明らかにした肝におけるタンパク総量の減少とも関連する結果である。

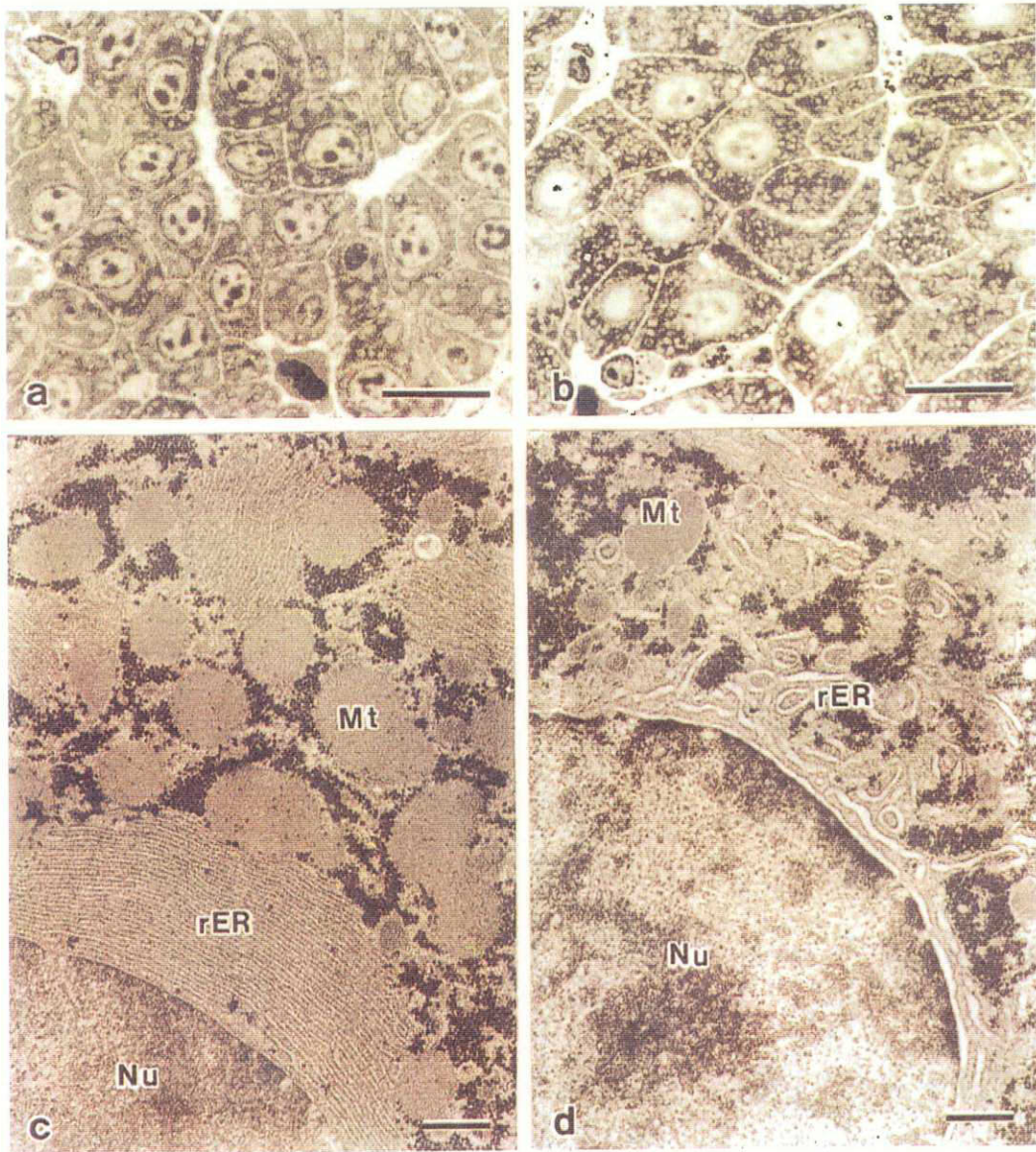
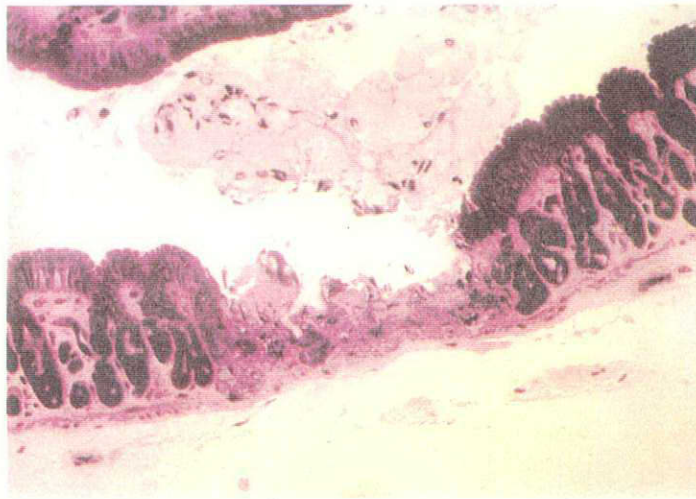


図6 肝細胞内の形態変化

aとcは地上対照群、bとdは飛行実験群の肝細胞を示す。地上対照群ではよく発達した核小体が見られるが、飛行実験群では核小体は小さく見える。飛行実験群では粗面小胞体が量的に減少するとともに、著しい形態の変化が見られる。ミトコンドリアの形態も変化している。aとbのバーは50  $\mu\text{m}$ 、cとdのバーは1  $\mu\text{m}$ 。Mt; ミトコンドリア、Nu; 核、rER; 粗面小胞体。(駒崎)



F-3a

図7 飛行実験群 Flt A-3a の胃にみられた潰瘍 (Pfeiffer)

Flt A-3a の胃には図7に示すように深い潰瘍や粘膜下に水腫があるなどの病変があった。Flt A-3a および Flt A-3b とともに、腸には病変は見られていない。

肺粘膜の上皮細胞の破壊、脱落が Flt A-3a および Flt A-3b とともにみられ、Flt A-3b では、肺粘膜上皮細胞の microvilli の消失などの形態異常や上皮細胞層の断裂がみられた。図8にこれらの細胞の電顕像を示す。Flt A-3b では、肺の毛細血管の異常な拡張がみられたが、これについては地上対照群のうち2個体でも同様な変化があった。

骨について X線撮像したところ、飛行実験群と地上対照群の間で差異はなかった。四肢骨格筋線維のタイプおよびサイズについては、宇宙飛行の影響は検出されなかった。心筋、骨格筋の細胞の細胞小器官の形態変化はみられなかった。心臓における心房性ナトリウム利尿ペプチド (ANP) 含有細胞の変化については解析中である。Heat Shock Protein (HSP) の発現量を肝、肢、脊椎についてウエスタンブロット解析したところ、いずれの臓器でも宇宙飛行による HSP の誘導は見られなかった。

生きて回収された飛行実験群2個体に特異的に見られた肝、胃、肺における病変は、軌道上での2個体の死亡とあわせ、地上対照群とは際だって異なる結果をあたえた。これが宇宙環境への曝露に由来するのか、あるいは他の要因が関与しているのかを判定する上で、次の事項について検討した。

軌道上での AAEU の AP 水圧データの解析によりタンク中の循環水流量がどのように推移したか推定できる。タンクを着脱すると、アキュムレータ部と水循環ポンプ吐出部近くの水圧測定部の間の流体コンダクタンスが増減して水圧が変化する。アキュムレータ部では、スペースラブ内の圧力が水ループに伝達される。水圧の変動の記録から、軌道上でのタンクの着脱操作がどんな時刻に実施されたか、また、タンク部分での流路の閉塞があったか否かを確認できる。循環水の蒸発などにより水量が少なくなると、アキュムレータでのバネの押し圧は小さくなり、水圧は低下する。タンクと同じく水循環ポンプとアキュムレータの間にあるフィルター部に老廃物が堆積したり微生物相が発達してコンダクタンスが低下して測定している水圧は低下する。実験中水圧は、これら二つの要因もあり、長期的には低下していく傾向があった。水圧は、外していたカセットを装着したり、外部から水を補給したときに上昇した。



図 8 肺上皮細胞の微細構造  
 a: 通常のイモリ、矢印は microvilli および glycocalyx、 b: 飛行実験群 Flt A-3b、矢印は細胞死の状態、 c: 地上対照群 Gnd A-2 (佐々木)

AAEU APについて軌道上で実施された操作に対応させて、外したタンクを水ループに戻したときに圧力が上昇するかを細かい時間刻みの記録から調べてみると、図9aに示すように、MD4の2時半頃に実施したA-2タンクを引き出し産卵テープを巻きとる操作の後で圧力の上昇が不明瞭であった。図9bにMD2に実施されたタンク操作に対応した水圧の変化を示す。3つのタンクについて施された操作に対応した明瞭な水圧の変化が見られる。軌道上実験の手順書には、イモリのタンクを水循環ループから外しておく最長時間を20分と規定したが、水がタンクに循環されない状態はイモリにとって累積的にストレスを与える。しかし搭乗実験者には20分外しておくことと理解されていたことが、図9bの水圧記録でわかるようにA-1タンクの操作でちょうど20分の間このタンクがループから外れていたり、注射してからループに戻されるまで数分かかっていることからうかがえる。

Flt A-2のイモリ成体はMD5に死亡しているのが発見され、また回収後にその死体の姿勢が通常のそれと異なっていた。AP水圧の記録からみると、MD4に実施した産卵テープの巻きとり操作後に、産卵テープとともに卵が巻きとられタンク内の水流路を塞いだ、あるいはタンクのクイックディスクコネクタの差し込まれ方が不十分であったことにより、A-2タンク部のコンダクタンスが低下してこのタンクへの循環水流量が低下し、イモリを衰弱させた可能性がある。

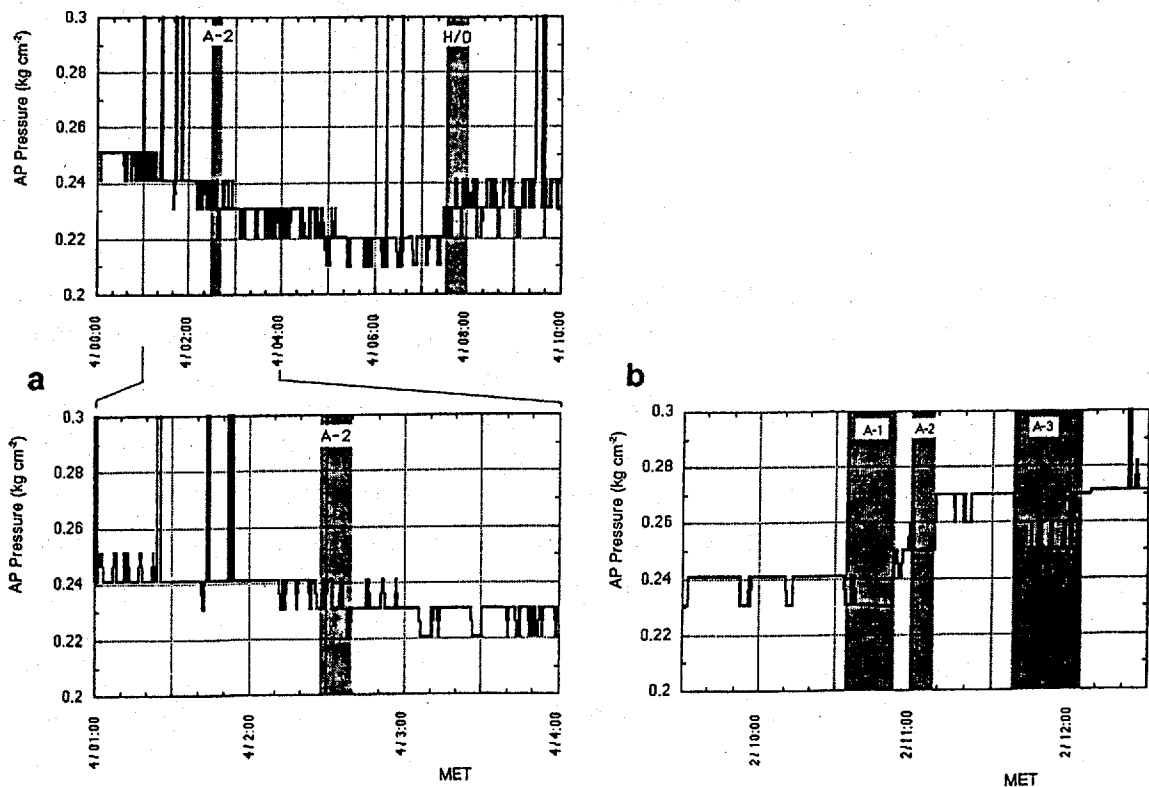


図9 AAEUアクアリウムパッケージの水圧変化からみた飼育水循環流路のコンダクタンスの履歴

値が上方の枠に達する部分はデータの欠損している部分

- a: MET 4dayにおける水圧の履歴。02:28ころにA-2タンクが引き出され、産卵テープの巻きとり操作が実施された。A-2タンクが循環水ループに戻された時の水圧の上昇が不明瞭である。07:30から08:00がハンドオーバーの時間帯。
- b: MET 2dayにおける水圧の履歴。10:33にA-1タンク抜き取り、10:49にホルモン注射、10:53に循環水ループへ戻している。10:59にA-2タンク抜き取り、産卵していたために注射せず11:08に水ループへ戻した。11:38にA-3タンクを抜き取り、ビデオ撮影後12:04に水ループへ戻している。いずれの操作においても水ループにカセットを戻したときの水圧の上昇が記録されている。

イモリへの宇宙飛行の効果を結論するには、地上対照実験がいかに飛行実験装置と宇宙環境という点を除いて同等だったかが問題となる。アクアリウムパッケージ(AP)やそのタンクそのものの設計は飛行装置(FM)と地上対照実験用(BBM)は同じであるが、水循環系の熱交換器部分や配管、ポンプなどにいくつかの相違があった。飛行実験時の地上対照実験に用いたBBMではタンク内の水圧が高く、タンクの窓が膨れるほどであった。FMのタンクには大なり小なり気泡があったのに対して、地上のBBMでは気泡はタンク中に見られなかった。このようなタンク内の気泡の有無については、飼育水の循環路内の圧力分布の相違に起因すると推定した。空気の圧力の高い場所で水に空気が溶解し、流路の水圧の低い部分で溶けていた空気は溶脱して気泡を形成する。人工肺部の気体側圧力とタンク中の圧力は、FMでは前者が高く、BBMでは逆であったために起こったと考えられる。またBBMは多数回の試験で用いられたが、FMは寿命管理等の制約から試験回数も少なく、このような装置の履歴が生物適合性に影響していたかもしれない。

これらの要因についてFMおよびBBMをともに地上で運転する飛行後の対照実験により検討した。この対照実験は飛行実験と同一季節に実施されたものではないが、FMおよびBBMともに産卵が見られた。飛行群のイモリ成体試料に特徴的に見られた病変部位を中心に、飛行後対照実験で得たイモリ成体試料について検索中である。現在までのところイモリの肝などでFMおよびBBMで飼育された試料の間で系統的な差は見いだされていない。この結果は、生きて回収された飛行実験群2個体の肝などで見られた変化が微小重力環境への曝露をはじめとする宇宙飛行の影響であると示唆するものである。

## 結論

イモリの宇宙での産卵がみられ、受精卵をその発生初期から宇宙環境に曝して重力の発生におよぼす影響をさぐることができた。イモリの初期発生は、本実験で観察されたかぎりにおいては、宇宙環境においても進行し、胚の外観形態や発生のタイムコースに地上でのそれらと異なるところはなかった。胚軸の決定など発生の基本的ステップは重力の無い環境においても進むことがイモリにおいても示された。

イモリ成体への宇宙飛行の影響は、飛行実験群と地上対照群の間の死亡率の差、および生きて回収された飛行実験群2個体の肝、肺、胃で見られた病変においてみることができるとは、しかし、被験個体数の少ないため断定的な結論は下せず、またこれら飛行実験群に特異的にみられた変化が死亡したイモリと循環飼育水をしばらく共有していたことからする二次的な影響であることを否定することはできない。肝細胞で見いだされた変化は、宇宙飛行したカエルの肝で得られた結果とも関連するものであり、今後の宇宙実験の課題を示すものである。

## 外部発表

- 1) Wiederhold, Michael L., Larsen, K., 山下雅道, 黒谷明美, 小池 元, 浅島 誠, 長岡俊治. Developmental Changes in the Vestibular System of Imori. 第9回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1992). 127-131.
- 2) 山下雅道, Wiederhold, Michael L., 黒谷明美, 小池 元, 浅島 誠, 最上善広, 奥野 誠, 河崎行繁, 駒田 聡. イモリ宇宙実験の予備実験. 第9回宇宙利用シンポジウム

- プロシーディング(1992). 132-134.
- 3) 小池 元, 中村貢治, 西村光輔, 黒谷明美, 山下雅道, 鹿島 勇, Wiederhold, M. L., 浅島 誠. 日本産アカハライモリの胚発生における耳石の形成. 第10回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1993). 92-95.
  - 4) 今溝真理, 小池 元, 最上善広, 黒谷明美, 山下雅道, 長岡俊治, 吉田光孝, 浅島 誠. イモリの宇宙での産卵. 第10回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1993). 49-52.
  - 5) 今溝真理, 小池 元, 最上善広, 黒谷明美, Wiederhold, Michael L., 長岡俊治, 山下雅道, 浅島 誠. イモリは宇宙で産卵できるか. 宇宙生物科学. 7, 256-257 (1993).
  - 6) 小池 元, 中村貢治, 西村光輔, 山下雅道, 鹿島 勇, Wiederhold, Michael L., 浅島 誠. イモリの胚発生における耳石形成. 宇宙生物科学. 7, 254-256 (1993).
  - 7) 山下雅道, 黒谷明美, 最上善広, 浅島 誠, Wiederhold, M. L. IML-2 における AstroNewt 実験. 第39回日本宇宙航空環境医学会総会予稿集(1993). 29.
  - 8) Mogami, Y., Imamizo, M., Yamashita, M., Izumi-Kurotani, A., Wiederhold, M. L., Koike, H. and Asashima, M. AstroNewt: Early Development of Newt in Space. *Adv. Space Res.* 17, (6/7)257- (6/7)263 (1994).
  - 9) 山下雅道, 黒谷明美, 今溝真理, 最上善広, 奥野 誠, 小池 元, 浅島 誠. 「宇宙におけるイモリの産卵と受精卵の初期発生」の実験運用. 宇宙生物科学. 8, 210-211 (1994). (宇宙生物科学会第8回大会プロシーディング)
  - 10) 山下雅道, 黒谷明美, 今溝真理, 最上善広, 奥野 誠, 小池 元, 浅島 誠. IML-2 におけるイモリ実験運用. 第11回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1994). 13-16.
  - 11) 今溝真理, 吉田光孝, 藤岡敬治, 高田義博, 黒谷明美, 山下雅道. 徐放性ホルモン製剤のイモリ宇宙実験への適用. 第11回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1994). 127-130.
  - 12) 山下雅道. IML-2: イモリを用いた宇宙実験. *IN SPACE '94 前刷集*(1994). 23-29.
  - 13) Imamizo, M., Yoshida, M., Fujioka, K., Takada, Y., Hisada, A., Izumi-Kurotani, A. and Yamashita, M. Sustained Release of hCG Minipellet for Newt Experiment in Space. *Biol. Sci. in Space.* 8, 226-230 (1994).
  - 14) 佐々木史江, 西川純雄, 平田純子, 高橋祐次. IML-2 AstroNewt 肺の細胞学的解析. 第12回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1995). 12-15.
  - 15) 山下雅道, 黒谷明美, 長岡俊治. 微小重力下での気泡の挙動: 水棲動物実験装置によるイモリの IML-2 宇宙実験. 日本マイクロ重力応用学会誌. 12, 150-156 (1995).
  - 16) Pfeiffer, C. J., Yamashita, M. and Asashima, M. Cytopathologic Observation of the lung of adult newts (*Cynops pyrrhogaster*) onboard the Space Shuttle, during the Second International Microgravity Laboratory experiments. *J. Submicroscopic Cytol. Pathol.* In press (1995).





## メダカの宇宙における交尾・産卵行動 (MEDAKA)

代表研究者： 井尻憲一\*<sup>1</sup>

共同研究者： 江口星雄\*<sup>2</sup>、水野利恵\*<sup>1</sup>、藤井鉄男\*<sup>1</sup>、田口泰子\*<sup>3</sup>、  
山下雅道\*<sup>4</sup>、黒谷明美\*<sup>4</sup>

\*<sup>1</sup> 東京大学 アイソトープ総合センター、\*<sup>2</sup> 東京大学、\*<sup>3</sup> 放射線医学総合研究所、  
\*<sup>4</sup> 宇宙科学研究所

In the second International Microgravity Laboratory (IML-2/ STS-65) mission carried out in 1994, four of a small Japanese killifish (Medaka, *Oryzias latipes*) made a space travel of 15 days. These four Medaka fish performed their successful mating behavior in space for the first time among vertebrate animals. Moreover, the eggs they laid developed normally till hatching fry (baby fish) in space. Usually, fish swim in loop patterns when they are exposed to microgravity. In prior experiments using parabolic flights of airplane, we have found a special strain of this fish species that does not exhibit looping behavior at all. The success of the present space experiment owes much to the use of this strain.

Two scenes of mating behavior were down-linked in real-time from space, and more mating scenes have been recorded in the video-tapes brought back. In this fish species, shedding of eggs and fertilization of eggs take place at the same time during their mating behavior. Fish mated and laid eggs everyday during the first week, and near the end of the mission most of the eggs had a well-developed body with two pigmented eyes. At the end of 12th day, a baby fish was detected and the crew successfully took a picture of a baby fish. In total, 43 eggs were laid (detected), out of which 8 baby fish were born (hatched out of eggs) in space, as truly 'space-originated' babies. 30 baby fish hatched within 3 days after landing. This is the normal hatching rate, comparing with the ground-based data.

Four adult fish re-started mating and laying eggs on the 7th day after landing and continued to do so everyday afterward. So far, we could not detect any effects of 15-day space travel on their offspring. The 'space-originated' babies are, so to speak, Adam and Eve came from space. Such alien fish have already grown up in our lab and started creating their colony on the Earth.

### 実験の目的、意義

#### IML-2 メダカ実験の目的

この宇宙実験ではメダカを用いて、将来、宇宙で可能な魚類養殖の方式を検討するための基礎的なデータを出すことを目的とした。ただし、IML-2は2週間の飛行のため、具体的には、1)宇宙でメダカが産卵行動を行うことができるかを調べた(産卵行動)。とともに、2)産卵された卵が宇宙で正常に発生できるかどうか、すなわち、受精からふ化までが正常に進行するかを調べ(胚発生)、3)また、地上へ帰還後も産卵させ、2週間の飛行が子孫へ及ぼす影響についても調べた(子孫への影響)。



図1について簡単に説明しておく。微小重力下で、①交尾・産卵行動がとれるか？が最初のチェック項目である。もし、これが不可能つまりNoならば、代わりに宇宙で養殖した雌雄成魚からの卵と精子を用いて、人工授精を行う必要がある。微小重力下で、②正常に受精するか？また受精した卵はその後③胚の発生は正常か？が次に確認すべき項目となる。これらが難しい場合には、地上で受精させた受精卵あるいは発生胚を宇宙へ運ぶことが必要となる。現在、これらを凍結して保存する技術は盛んに研究され、解凍時の正常発生率も上がってきており、この方法は期待できる。もちろん、地上から稚魚を水中で飼育しながら輸送することも可能な手段ではある。これらの場合すなわち凍結した受精卵や胚、あるいは稚魚を宇宙へ輸送する場合には、宇宙での何世代にもわたる飼育(つまり継代飼育)はできず、つねに地上から運ぶ受精卵、胚、稚魚に依存する、つまり、供給者(地球)に全面的に依存する養殖の形となる。

④成魚まで正常に育つか？がNoの場合は、微小重力下での魚類の養殖は断念せざるを得ないし、實際上、行う価値はない。その場合には、むしろ月面基地(低重力)などでの飼育あるいは継代飼育の可能性を、これらのチェック項目に従って検討するのがよい。また、地上そして微小重力下でともに可能な項目については、月面基地でも可能と考えてよい。⑤生殖細胞形成は正常か？さらに⑥二世魚は交尾・産卵をするか？がYesと確認できれば、あとは継代飼育の実験、CELSS (Controlled Ecological Life Support Systems)への組み込み実験といった大規模な実験を行っていく。最終的には、肉質向上といったことも重要となる。

確認すべき項目のうちで、④成魚まで正常に育つか？以降の項目については、どうしても長期間の実験となるので、宇宙ステーション等での実験となる。この意味で、今回のIML-2計画で行う実験項目は①～③である。しかし、この①～③の項目を確かめることで、将来の宇宙での魚類養殖の採るべき形態がほぼ明らかになる。このように、今回実施した実験テーマの内容は宇宙ステーションでの長期・継代飼育実験を行う前に結論を出しておくべき重要な課題であった。今回の実験では宇宙で産卵した卵の発生を調べ、さらに地上へ降りてからも成魚の子孫への影響を調べたので、⑤の項目についても部分的ではあるが情報を得ることができた。

## 実験の方法と試料

			メダカ	
分類	学名	<i>Oryzias latipes</i>		
成魚	体重	約0.7g	体長	約3cm
	雌雄の見分け方	図のように背びれと尻びれの形が違う 背びれ：雄の背びれは大きく、切れ込みがある 雌の背びれは小さい 尻びれ：雄は尻びれも大きく、平行四辺形 雌の尻びれは尾の方に行くにつれ、小さくなる		
				♂ ♀
				メダカの雄と雌
産卵のための条件	明暗サイクル	14時間の明期/10時間の暗期		
	水温	23～28℃		
メダカの産卵の特徴	明暗サイクル、水温といった条件が整っている場合には、一度産卵を始めると、数カ月にもわたり毎日産卵を続ける 明暗サイクルで明期になってから(つまり照明が点灯してから)2時間以内に産卵が行われる			
卵の発生	卵の大きさ	直径1mm		
	産卵数	雌1匹が産卵する卵は1日約5～25個		
	ふ化	受精(産卵)後約10日(24℃)で、卵膜から稚魚が出てくる(ふ化)		

## メダカの産卵行動

産卵行動が宇宙(微小重力)でとれるかどうかがこの実験の目的の1つである。一般に魚は微小重力下ではぐるぐると回転運動を行うことが知られている。ジェット機を放物線を描くように飛行(放物線飛行)させることで約20秒間の微小重力が作り出せる。代表研究者らはこの方法で多くのメダカをテストし、微小重力下でまったく回転せず普通に泳ぐ微小重力に強いメダカの系統を探し出した。しかもこの性質は、親から子へ、そして孫へと遺伝する。そこで、この系統のメダカ(ccT系統、いわゆる東大メダカ)を用い、宇宙での行動を詳しく調べるとともに、産卵行動および産卵された卵が発生していくようすを観察した。

このように微小重力でふつうに泳げる系統を用いるものの、宇宙で産卵させるためには地上で(日本で、そして引き続き NASA ケネディ宇宙センター(KSC)で)、状態の良いメダカを用意して宇宙実験用のメダカ用タンクに搭載する必要があった。今回の宇宙でのメダカ産卵実験の成功はほとんど、良いメダカの選抜にかかっていた。メダカ選抜については後述する。

## 交尾という用語について

地上での観察でも、雄が産卵行動らしき振舞いをするのだが、雌がそれに答えない場合も時折ある。このような場合(たとえば、雌だけが宇宙酔いになった場合)も、ビデオ記録により、そのことがわかるはずである。実験テーマの正式名が交尾・産卵行動となっているのは、たんに雄と雌の抱接だけでなく、雄から雌への求愛行動も含めた、広い意味での産卵行動を見るからである。なお、魚の場合、交尾という語よりは、「抱接」という方が正しい。しかし、宇宙実験の成果は広く一般にもマスコミ等で公開されることを考慮し、抱接という耳慣れぬ用語に代えて、交尾を使用した。つまり、mating behavior という語の日本語訳として何が適切かを考えた末、雄が雌を抱きながらの産卵ということを明確にする意味で、「交尾・産卵」という語を用いた。実際、我々研究者の間でもメダカの一連の産卵行動の中で、交尾という語が使われている。

## 20秒 vs. 2週間

微小重力に強いメダカの系統を見い出したと言っても、これまで行った航空機実験(ダイヤモンドエアサービス社、MU-300)のデータは、当然ながら、すべて20秒の微小重力状態の話である。微小重力状態になったのほんの初期の反応を見ているにすぎない。今回のIML-2ミッションの2週間では初期反応、定常に達した状態、順応を示す状態などが時間とともに出現し、20秒とは全く別の反応も考えられた。これを調べるのも目的の1つであった。

## 胚発生を観察

メダカの卵はそれを囲む膜(卵膜)が透明なだけでなく、ふ化するまではからだの表面はほぼ透明で、たとえば内臓ができていくようすも外から詳しく観察できる。微小重力下で脊椎動物の受精卵が正常に発生し、ふ化(誕生)するかについては、まだはっきりとした結論が出ていない。これは地球上で重力が発生の過程にどのように作用しているかを知るう

えでも重要な研究テーマである。

メダカの卵は産卵後 10 日間でふ化する(24℃の場合)。今回の宇宙滞在期間は約 2 週間と長いので、その後半には卵膜からふ化した稚魚の行動も観察できた。

## 2 世代飼育装置

簡単ではあるが、親メダカと卵・稚魚とを分離して飼育する機構を考案した。交尾・産卵後しばらく卵は雌の腹からぶら下がっているが、やがて雌の体から離れていく。元来、親メダカは自分自身が産んだ卵でさえ食べてしまう。卵の回収は水流を利用して行うことにした。卵は通過するが、親メダカは通れない金網をつけ、水の排出口には目の荒いナイロンフィルターを置き、卵や稚魚が排出口に引き込まれないようにした。このフィルターの網目は立体的なため、ふ化した稚魚が入り込み、心地よく滞在できる構造になっている。水の流れとこのように機構により、稚魚もこの隔離機構(金網によって隔てられている部分)に留まっていることを期待し、簡単な 2 世代飼育を計画した。

### 前もって搭載するメダカ胚の宇宙実験

もし、親メダカが宇宙で交尾・産卵しなければ、胚発生の観察は不可能となる。このような場合も想定し、胚発生に関して以下の 1)、2) の実験も実施した。

#### 1) 前もって搭載するメダカ胚の発生および稚魚の行動

このために、2つの金網ボックスが用意された。これらの中に前もって地上で受精し発生の進んだ胚を入れておき、その発生の様子、およびその後ふ化した稚魚の行動をビデオで記録した。一方の金網ボックスには HO5 系統の卵が、もう一方には ccT 系統の卵が入れられた。KSC の実験室で産卵した卵を採集し、発生段階の進んだ胚(黒い眼がすでに出来ている段階、stage 26/27 付近)を用意した。打上げ後、MET Day 02、Day 04、Day 07、Day 09、Day 11 に、この金網上の全ての胚の拡大像がビデオに記録された。と同時に、その映像が地上に送信された(ダウンリンク)。

水温 24℃では産卵後(受精後)ふつう 10 日前後でふ化(hatch)するため、MET Day 04、Day 07 のビデオ観察時には、ふ化した稚魚が多数出現していた。金網ボックスに搭載したのは ccT と HO5 系統の卵である。ccT という系統は微小重力に強いことが、航空機による微小重力実験(パラボリックフライト、20 秒間の微小重力)で判明している。つまり、ccT 系統の成魚は微小重力でもふつうに泳げる。ふ化したばかりの稚魚に微小重力で姿勢を制御できるという、この能力があるのかどうかを、これらのビデオ観察から判定した。逆に、HO5 系統の成魚は微小重力でぐるぐると回転する。微小重力で発生した稚魚は回転するのか、しないのか。これもビデオ観察を行った。姿勢制御に関する神経系の発達の様子を知る上で、重要な観察データである。

#### 2) ccT 系統と他の系統の胚の発生能の比較

さらに別の場所(金魚水槽奥の金網容器)にも ccT 系統と他の系統(数系統)の胚を入れ、これも宇宙でふ化させた(ただし、これらについては、ビデオ観察は行わなかった)。地上へ帰還後にふ化率を調べ、微小重力での発生・ふ化に系統によって違いがあるかを調べた。つまり、発生能力という点から、宇宙に適した系統があるかどうかを調べるためである。

## 宇宙飛行後の解析

地上に回収した稚魚については行動を観察するとともに、成長させ、産卵させることによって、その子孫への影響を調べた。宇宙旅行をした4匹の成魚についても、地上で産卵を継続させた。この場合、産卵された卵が発生するかどうかを調べることで、微小重力下において成魚のからだの中で生殖細胞(卵子や精子)が正常に形成されたか、またその形成過程のどの時期が微小重力の影響を受けやすいかが判定できる。

宇宙で撮影したビデオテープは7時間余にわたっていた。この詳細な解析を行った。

## 成魚メダカの系統

メダカ用タンク(カセット式水槽)に搭載した成魚4匹(雄2匹、雌2匹)は、ヒメダカ・タイプ(だいたい色のメダカ)である。系統はccT系統(いわゆる東大メダカ)と称される系統である。航空機による微小重力実験から、微小重力に強い(ふつうに泳げる)メダカの系統はこのccT系統とHNI-II系統の2系統だけであった(他の系統のメダカは微小重力ではぐるぐると回転してしまった)。

宇宙で用いるメダカ用タンク内での飼育実験(地上実験)を繰り返したが、HNI-II系統はかなり神経質であり、水槽の狭さと水槽内の流れがストレスとなるらしく、地上でさえ産卵を中止することが時折おこった。このような理由で、微小重力に強く、しかもストレスに比較的強いccT系統の成魚を搭載することに決定した。

## メダカの宇宙食

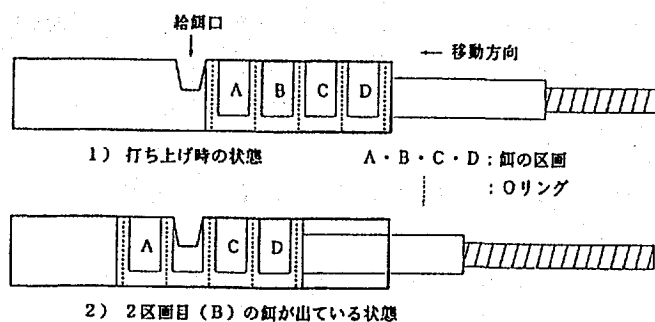


図2 給餌機構

今回メダカについては産卵の継続を目的としているため、餌を与える必要がある。今回のメダカ用タンクの給餌機構に入れる餌には適度の膨潤性が必要であった。これに嗜好性などの要因を考えて、特別に餌を製作した。当然ながら、地上でもこの餌で飼育を続けたメダカを宇宙へ上げた。なお、本番でのメダカ用宇宙食は工場で小分けしてアルミ袋に真空パックされたもので、KSCでは

滅菌操作はせず、クリーンベンチ内で開封後すぐに図2に示すような給餌機構に充填した。

給餌機構において、餌の収納部は4区画あり、シリンダーの中でOリングによって、飼育水から完全に隔離された状態となっている。ネジを回転させるとAの区画が給餌口(開口部)に進み、餌が水を吸い膨潤して給餌口から盛り上がり食べ易くなる。また給餌口からも、メダカが頭を入れてシリンダー内の餌をある程度は食べることができる。3日後には、ネジを再び回転させ、B区画を給餌口に進める。これにより、A区画はシリンダー内に格納される。このようにして、餌が飼育水と接するのはその時与えている区画の餌のみで、他の区画の餌や食べ残しはシリンダー内に封じ込められており、餌による水質の悪化を最小限に抑える機構となっている。

## メダカの選抜(東大にて)



図3 追従装置による視覚検査。ある速度で回転する白黒の縞模様にて、メダカが追従できるかを検査する(外部発表9を参照)。

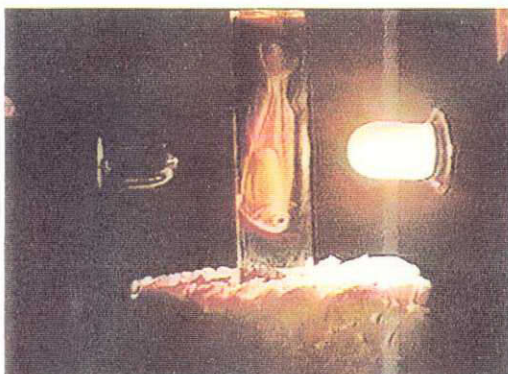


図4 背光反射能力の検査(方式I)。左右のランプは交互に点灯。能力は反応時間で測定(外部発表9を参照)。

1994年の春には、前年より育てた ccT 系統(いわゆる東大メダカ)の1年魚約2000匹が東京大学アイソトープ総合センターの屋上で飼育されていた。その後、大きさや形状から選んで、約1500匹を飼育室に入れた。白黒縞模様追従テスト(図3)で約6割が合格。背光反射能力チェックとしては2方式を考えた。当初、日本で2方式とも行うつもりであった。しかし1つの方式(方式II)は時間がかかるので、KSCで行うこととし、日本での背光反射検査としては方式I(図4)のみを実施した。さらに、産卵のチェックにより実際にミニ容器+水流に入れた組は114組、最終的に6月1日の時点で82組が残った。

輸送するメダカの選抜としては、まず大きさ、形状をもとに選び、つぎに白黒の縞模様を回転してそれに対する追従を調べて、速い速度でも追従するものを選んだ。合格したメダカについて、徐々に照明のつく時間をずらし、KSCの現地時間に合わせていった(日本出発の2週間前にはほぼ昼夜逆転の状態とした、飼育室の照明時刻20:00～10:00、暗期10:00～20:00)。雌雄の産卵、受精能力を確認した後、雌2匹、雄2匹(計4匹)を1組として、ミニ容器(容量250ml、宇宙で用いるメダカ用タンクとほぼ同じ容量)に入れ、水中ポンプで水流をつけ、飼育を続けた。ミニ容

器へ入れるのは5月10日から開始、産卵能力が確認できた雌雄4匹がで次第、順次ミニ容器に移していった。ミニ容器に入れた組は、全部で114組となった。容器の狭さや水流で衰弱し、死亡したものなどは取り除き、最終的に6月1日の時点で82組が残った。

## メダカの輸送

このうち、50組(計200匹)を第一陣(荷物便)で6月2日に輸送した。同時に受精卵を搭載する実験用に、ccT系統以外の成魚100匹も輸送した。荷物便の輸送は近鉄エクスプレス(KWE)が行い、輸送経路は成田ーロサンジェルスーオーランド、オーランドから陸路でKSCへ。メダカの状態は良好、死亡なしとの報告を受けた。そこで、6月6日のハンドキャリア(手持ち)は当初予定通りの100匹(25組)とした。

6月6日に100匹をハンドキャリアで研究代表者がKSCへ運んだ。これまでのリハーサルでは米国内での通関および経路の関係でノースウェスト社を使用したため、本番でも同社を利用した。搭乗時のセキュリティでX線での手荷物検査を行わないよう、その旨を記した依頼状を持って行った。NW002便に乗り、2人で成田ーロスーミネアポリスーオー



ランド(以上すべて NW)を使用しオーランド空港まで運び、迎いの車で KSC へ輸送した。

### メダカの選抜(KSCにて)

シャトル搭載候補の 75 組(計 300 匹)については、KSC でミニ容器+水流で飼育を続け、最終的に残った組で、産卵を継続している組から宇宙へ打上げる 1 組を選んだ。なお、KSC へ着いてからは、現地のミネラルウォーター(キシミー(地名)水、FMPT (First Material Processing Test) でコイの飼育に使った)を飼育水として使用した。KSC ではすべてのメダカについて、回転する白黒縞模様への追従テストを再度行うとともに、背光反射能力も検査した。背光反射の検査は方式 II を採用した(図 5)。



図 5 背光反射能力の検査(方式 II)。片側(左)のみから照明し、メダカの傾きで能力を判定する(外部発表 9 を参照)。

### 飛行実験の結果

地上で産卵を続けている雌雄 2 ペア(計 4 匹)のメダカを水棲生物飼育装置に入れ、スベースラブで飼育した。クルーは 3 日ごとに給餌機構を動かし、新しい餌を補給する。産卵を継続させるために 14 時間の明期と 10 時間の暗期の明暗サイクルを繰り返し、水温は 24 °C に設定した。産卵を続けているメダカは毎朝 1 回、明期開始後 2 時間以内に産卵行動をとる。クルーはその朝に産卵が行われたことを雌の腹部に付着している受精卵の存在、あるいは卵隔離機構内にその日産卵した卵があることで確認し、翌日の明期開始後にタンクにビデオカメラをセットして、メダカのように 2 時間にわたって撮影した(MET Day 02, Day 04, Day 07)。これにより、産卵行動が確実に記録できた。産卵された卵は水流によってタンクの片隅にある卵隔離用の区画に運ばれるようにしてあるので、親メダカに食べられることはない。さらに、卵の発生していく状況を日々を追って観察し、これもビデオにおさめた。

### 経過報告

以下は簡単な経過報告である。

- 1) KSC では最終的に 4 匹のメダカ(雄 2 匹、雌 2 匹)を選抜し、雄にコスモと元気、雌に夢と未来(みき)と名付けた。これらの名前は予め日本宇宙少年団の子供たちにより決められたものである。
- 2) 4 匹のメダカは打上げ 30 時間前にシャトルに搭載された。
- 3) シャトルは定刻(日本時間 7 月 9 日午前 1 時 43 分)に打上がり、約 24 時間後には産卵

した卵3個がタンク内にあると向井 PS (Payload Specialist) の報告があった。

- 4) 翌日には卵が10個に増えていることが彼女から報告された。メダカは交尾と産卵を同時に行うので、卵の増加からメダカが宇宙で交尾を行っていることは確信できた。なお、ここでの交尾とは一連の産卵行動の中で、雄メダカが雌を背びれと尻びれを使って抱き、ひれの刺激によって雌の腹から卵を出させると同時に、精子をかけ受精させることを言う(「交尾という用語について」参照)。
- 5) メダカは毎朝、産卵行動をとるので、翌日はビデオカメラをセットしてもらい、光がついてからの行動を録画するとともに、リアルタイムで画像を送ってもらった。交尾シーンが地上へ届き、感激したことを覚えている(図6)。

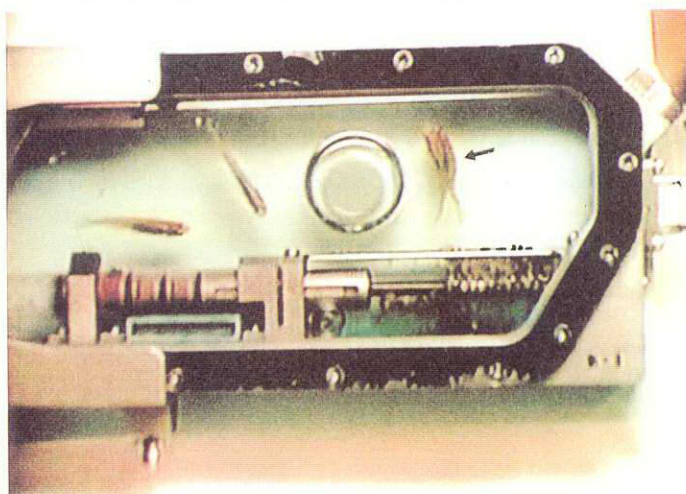


図6 宇宙でのメダカの交尾行動(矢印)

6) 向井 PS から初日に産んだ卵にすでに眼ができていたとの報告を受け、発生が宇宙でも正常に進んでいることを確信した。

7) 前回のビデオ撮影では産卵直後の卵の様子がはっきりとわからなかったので、再びビデオカメラで交尾シーンとともに、産卵直後に雌の腹についている卵をアップで撮影してもらった。

8) メダカの卵は順調に発生を続けており(図7)、そろそろ赤ちゃんメダカの誕生が期待された。ただし水を共有するイモリのために水温を下げたため、宇宙滞在中にふ化が実現できるか、かなりの不安があった。

- 9) 12日目の終り、向井 PS がメダカのベビーを見つけた。母親と一緒に泳ぐ赤ちゃんメダカの映像は、ミッションの報告として全米に流された(図8)。

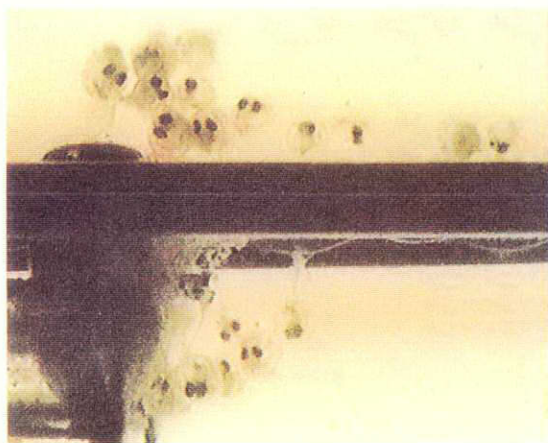


図7 宇宙で産卵した卵は正常に発生を続けた。胚のほとんどが黒く大きな眼をもち、ふ化直前の状態である。

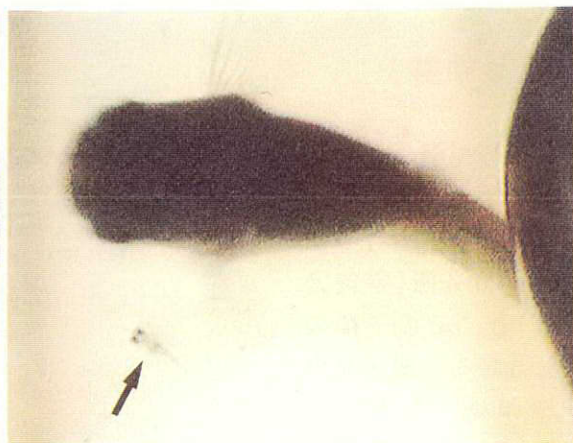


図8 母メダカと泳ぐ宇宙誕生メダカ(矢印)

- 10) シャトルは1日滞在期間を延長し無事着陸。着陸を見届けた後、メダカのタンクが出てくるのを待つ。タンクの底に沈んだまま動かない4匹のメダカを見て、関係者はみんなまっ青になる。ひれが正常に動いていることを確認し、やっと、重力の重さでメダカが下に沈んでいることが理解できた。一匹が、さらにまた一匹が泳ぐ努力をするのを見た時、初めて全員に笑顔が戻った。
- 11) 驚きは続いた。宇宙で誕生した赤ちゃんメダカはなんと8匹にもなっていた。シャトルの帰還が延期されたことが、さらなる成功をもたらしたことになる。
- 12) 宇宙から帰ってきた親メダカ4匹は、実は浮き袋の使い方を忘れてしまっていた。重力のない宇宙では浮き袋を使う必要が無かったのである。このため地上ではタンクの底に沈んだまま、上へあがろうとするがすぐに底へ落ちるといふ、滑稽な動きが続いた。これに反し、赤ちゃんメダカは地上でも正常に泳いでいた。
- 13) 地上に戻って4日目には親メダカはほぼ正常に泳げるようになり、1週間後つまり7月30日に東大に持って帰ったとたん、米国時間の朝に両方のペアが産卵を開始し、以後も毎日産卵を続けた。
- 14) 宇宙を飛行したメダカ4匹(これらは世間で宇宙メダカと称されている)は、コスモと未来をペアに、また元氣と夢をペアにして飼育し、約40日にわたって産卵数、受精率、ふ化率を調べた。2週間の宇宙飛行(微小重力、宇宙放射線)の影響は認められていない(「子孫への影響」参照)。
- 15) このようにしてふ化した稚魚はその後成長させ、2000匹を超えた。これら宇宙メダカ2世はその里親募集を行い、現在までに全国304カ所(小学校など)に配布した。配布先からは3世、さらに4世の誕生が報告されている。
- 16) 当然ながら東大でも、宇宙メダカ3世そして4世も誕生している。とともに、宇宙で誕生した赤ちゃんメダカ(「宇宙誕生メダカ」または「宇宙起源メダカ」と称す)も産卵を始め、その子も育っている。

## 解析と考察

### 子孫への影響

図9は宇宙へ行った親メダカ4匹(宇宙メダカ)と、その子孫の近況である。親メダカの産卵は1994年7月30日(シャトル打ち上げから22日)から再び開始された。雌雄1匹

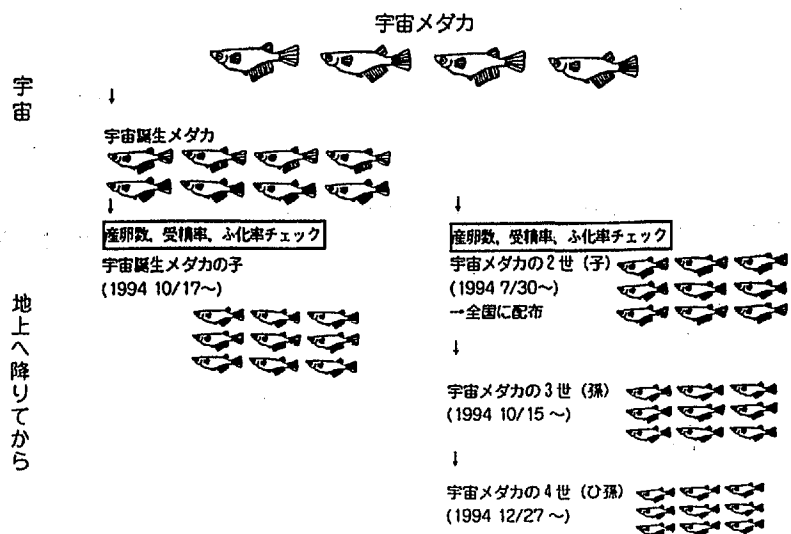


図9 宇宙メダカとその子孫

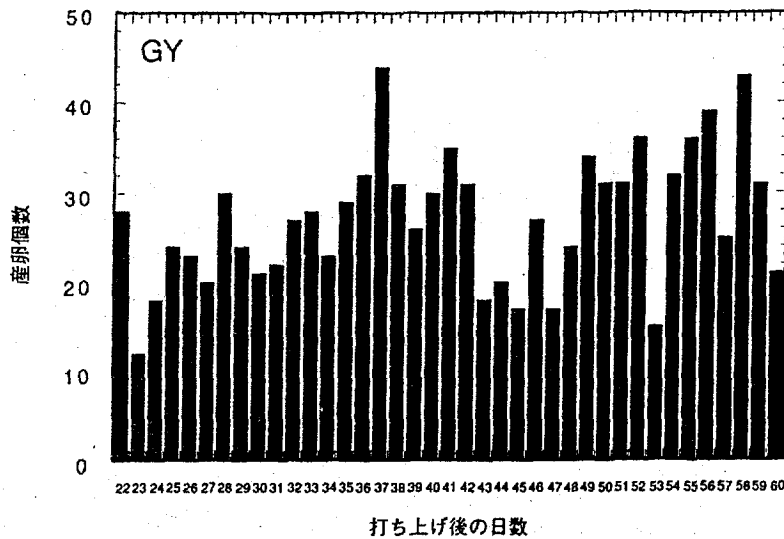


図 10 帰還してからの宇宙メダカ 1ペア (GY) による産卵数。横軸はシャトル打ち上げからの日数で表示。

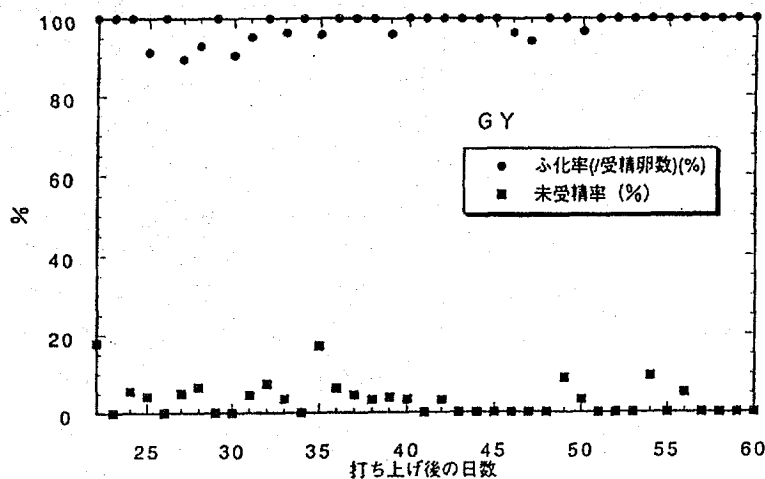


図 11 帰還してからの宇宙メダカ 1ペア (GY) による卵のふ化率、未受精率。横軸はシャトル打ち上げからの日数で表示。

産卵データである。宇宙で受精からふ化までが進行した個体であるが、全く影響は認められない。宇宙誕生メダカについては、産卵データの記録を今しばらく続ける。

#### 産卵行動に関する実験結果

前述したように、メダカは宇宙へ行った最初の日から交尾・産卵を行った。メダカにとって微小重力はあまり影響がなかったようにみえる。しかしながら、ビデオ映像の詳細な解析からメダカたちもかなりのストレス状態にあったこと、また微小重力の交尾にも、てこずっていた事実が判明している。詳細については報告書「宇宙メダカ実験のすべて」(請求方法は外部発表9に記載)を参照。

ずつをペアとして飼育し、産卵を継続させ、産卵数、受精率、ふ化率を調べた。図 10 は雄である元気 (G) と雌である夢 (Y) による毎日の産卵数のデータ (GY と表示) である。このペアについて、その卵のふ化率、未受精率を図 11 に示す。ふ化率、未受精率とも、研究室で正常に飼育しているメダカによる産卵データと比べ、数値的にも違いは認められない。もう一つのペア、雄がコスモ (C)、雌が未来 (M) の場合についても同様のデータが得られている (外部発表 9 を参照)。産卵数、受精、そしてふ化でみる限り、15 日間の宇宙飛行は親メダカの生殖細胞へはこれといった影響を及ぼしていない。

図 9 に示したように、宇宙で誕生した赤ちゃんメダカ (宇宙誕生メダカ) も雌雄 2 匹が大きく育ち、産卵を開始している。図 12 はその

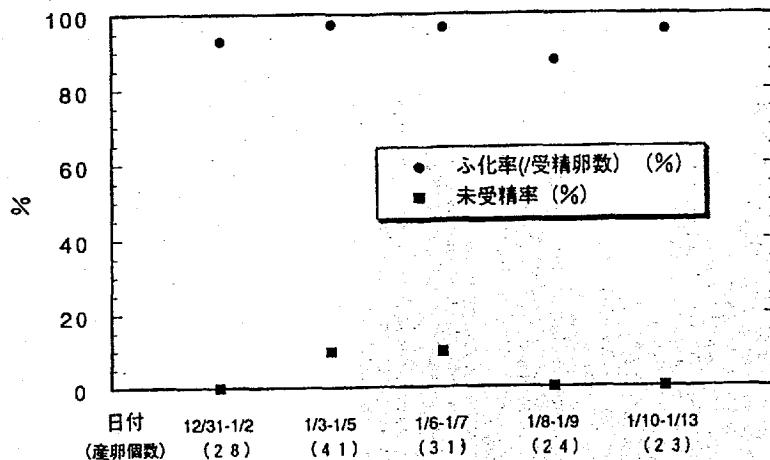


図 12 宇宙誕生メダカ 1 ペアの産卵データ。数日にわたって産卵した卵を、1 つにまとめてデータを出してある。日付は産卵日を示し、1994 年 12 月 31 日から 1995 年 1 月 13 日まで。

## 宇宙で産卵した卵の発生

宇宙では合計 43 個の卵が産卵され、8 匹が宇宙で赤ちゃんメダカになった。ふ化までの時間が足りず、30 個は地球に帰ってふ化した。残りの 5 個は未受精卵あるいは初期の発生段階で死亡した(地上での実験室でも同程度の死亡は起こる)。このことについて説明しておく。シャトルが帰還して 6 時間後に試料(成魚、稚魚)を取り出した。この時、ふ化していた稚魚は 11 匹確認された。その

うち 3 匹は形状、挙動から、ふ化して間もない(つまり、着陸後にふ化した)可能性もあった。確実に宇宙飛行中にふ化した稚魚を扱うという目的から、これら 3 匹を除く 8 匹を「宇宙誕生メダカ」と称し、その行動を観察、顕微鏡標本用に固定、あるいは成長させて子孫への影響を研究することとした。27 個の胚は正常に発生しており、stage 32 ないし stage 33 の発生段階にあった。これらの胚は着陸後 2 日目(7 月 25 日)で 26 個が、残り 1 個が 3 日目(7 月 26 日)にふ化した。卵と判断できるものがあと 5 個あり、これは初期の発生段階(おそらく stage 16 以前、体軸形成以前)で死亡したか、あるいはもともと受精しなかった卵(未受精卵)である。しかし、産卵後日数が経っており、そのどちらであるかの区別は不可能であった。このように、少なくとも 43 個の卵が宇宙で産卵されたことがわかった。卵隔離用の区画内に移動する前に成魚メダカが食べることもあったと考えられ、実際の産卵数はこの数よりも多い可能性はある。

## 前もって搭載したメダカ胚の実験

### 1) 前もって搭載したメダカ胚の発生および稚魚の行動

地上で発生を開始させたメダカ胚を金網ボックスに入れ、打ち上げの 30 時間前にシャトルに搭載した。1 つの金網ボックスには ccT 系統の胚を、他方の金網ボックスには HOS 系統の胚を入れておいた。多くの胚は MET Day 04 にはふ化しており、宇宙飛行士からの報告では、どちらの稚魚も回転していないとのことであった。ビデオ画像の解析からも、ccT 系統の稚魚も HOS 系統の稚魚も宇宙で回転していないことが確認できた。

成魚では ccT 系統は微小重力(20 秒、航空機実験)で回転しない系統であり、HOS は回転する系統である。今回の稚魚の行動観察から言えることは、親が遺伝的に微小重力で回転するかしないかに関わらず、その子供はどちらの系統も微小重力で回転せず、ふつうに泳ぐということである。つまり、微小重力での姿勢制御に関する感覚混乱は稚魚では生じないというのが結論である。地球上(重力のある場所)で長く育ったものが経験により身につけた感覚が存在してこそ、微小重力で感覚混乱が起こるのであろう。宇宙酔いのメカニズムを考察する上でも興味深い結果である。

## 2) ccT 系統と他の系統の胚発生能の比較

ccT 系統と他の系統の卵を入れ、これらを宇宙でふ化させた。この実験の目的は微小重力での発生・ふ化に系統によって違いがあるか、つまり発生能力という点から宇宙に適した系統があるかを調べるためであった。

結果は ccT 系統のふ化率の方が、他の系統の胚よりも成績が良かった。たとえば ccT 系統は搭載した 175 系統の胚のうち 130 個がふ化した(ふ化率 74%)が、他の系統は(他の 3 つの系統の胚の合計として)、98 個を搭載し、54 個がふ化した(ふ化率 55%)。地上の実験でも、一般に ccT 系統の胚は薬剤や放射線といったストレスに比較的強いことが知られている。微小重力というストレスに対してもこの傾向が認められたことになる。ccT 系統は成魚でも胚でも、宇宙ステーションでの実験に適したメダカの系統と言える。

## 結論

今回のメダカ宇宙実験では魚が微小重力でも交尾・産卵が行え、発生も正常に(少なくともふ化までは)微小重力で進行することが示された。雌雄による交尾・産卵は脊椎動物では初めてである。実験は微小重力(0g)での魚の交尾・産卵・ふ化を証明したが、地上(1g)でも当然可能なわけで、この結果が意味するところは、少なくとも 0g から 1.0g の範囲の重力下では、魚の交尾・産卵・ふ化が可能ということである。たとえば月面基地(約 1/6g)でも魚の飼育は実現でき、人工的に重力を作って生活するスペースコロニー計画ではその中心(0g)からのあらゆる場所で魚が飼えるということになる。帰還後の産卵データからも、生殖細胞に及ぼす微小重力の影響は認められていない。

図 1 に示した「魚類養殖に向けての確認項目」で、少なくとも①、②、③がすべて Yes と結論が出た。その結果、図 1 の右側に示した他の代替法を考える必要がなくなった。宇宙で産卵した卵の発生や、地上へ降りてからの子孫への影響の有無を調べた研究から、⑤の問いに対しても、成魚になってからの生殖細胞形成のみについてであり、部分的ではあるが、微小重力で Yes という答えが得られた。

## 宇宙ステーション実験へ

今回のメダカ実験は宇宙ステーションでの、さらなる実験を目指したものであった。宇宙でメダカが産卵行動をとれること、卵が正常な稚魚になることがわかったが、この成果によって、長期の実験が可能な宇宙ステーションで、メダカを何世代も飼育(継代飼育)する可能性が開けたのである。メダカは実験室内では、卵から 3 カ月で、次の世代を産卵できるまでに成長する脊椎動物である。人が 20 歳で子供を作るとしても、その約 80 倍の速さで世代交代を繰り返す計算になる。人類が宇宙へ進出し、そこで子孫を増やしていく時、どのような変化が生じていくのかが、メダカを用いれば 80 倍早く予知できる。このように、マウスやラットの交尾が実現できるまでは、脊椎動物であり継代飼育の可能性を示したメダカは、非常に有力な宇宙実験用の動物となろう。もちろん、メダカの継代飼育の一番の目的は、宇宙での魚類養殖のための基礎研究である。

実は、私自身がとくに興味を持っていることは、無重力への生物の適応である。地球に生命が誕生して 35 億年と言われるが、この間、生命は無重力という環境を一度も経験したことがない。無重力という新しい環境に置かれたメダカが、世代を繰り返していく時、どのように適応し変化していくのだろうか。DNA の遺伝情報の、どの遺伝子を使って適応

していくのだろう。今回のメダカ宇宙実験において、人工授精ではなく、雌雄による自然な形で産卵が行えるかをあえて調べたのは、このような研究目標のためである。無重力に適応した個体のみが盛んな生殖活動をし、子孫を増やしていくはずである。それが遺伝する変化であれば、何十世代も繰り返した後の宇宙メダカ集団は、地球のメダカと違っていてもいい。このような進化の一断面が検証できたら、どんなに興味深いことだろう。これがメダカ宇宙実験に抱く、生物学研究者としての私の夢である。

#### 参考文献

- 1) 井尻憲一．無重力に強いメダカと弱いメダカ．日本マイクログラビティ応用学会誌．10, 158-166 (1993)．
- 2) 井尻憲一．微小重力下におけるメダカの行動．宇宙航空環境医学．31, 20-23 (1994)．
- 3) 特別インタビュー「宇宙で誕生するメダカ」, 井尻憲一・東京大学アイソトープ総合センター助教授に聞く．ニュートン．1994年5月号, 86-91．

#### 外部発表

- 1) Ijiri, K. Life sciences experiments on IML-2(2): Mating behavior of the fish Medaka and development of their eggs in space. *Proceedings of "IN SPACE '94"* (1994). 31-36.
- 2) Ijiri, K., Mizuno, R., Taguchi, Y. and Eguchi, H. IML-2 space medaka experiment. *Proceedings of the Eleventh Space Utilization Symposium* (1994). 12.
- 3) Ijiri, K. A preliminary report on IML-2 medaka experiment: Mating behavior of the fish medaka and development of their eggs in space. *Biol. Sci. in Space*. 8, 231-233 (1994).
- 4) Ijiri, K. Fish mating experiment in space -- What it aimed at and how it was prepared. *Biol. Sci. in Space*. 9, 3-16 (1995).
- 5) Ijiri, K. Medaka fish had the honor to perform the first successful vertebrate mating in space. *Fish Biol. J. MEDAKA*. 7, in press (1995).
- 6) 井尻憲一．IML-2宇宙メダカ実験の成果と宇宙ステーションへの展開．第11回宇宙ステーション講演会／第8回有人宇宙飛行技術シンポジウム講演集(1995)．S. 7-8．
- 7) 井尻憲一．未知への挑戦——宇宙実験の意義と課題(宇宙メダカ実験と宇宙放射線を中心として)．第6回計測連合シンポジウム、先端計測'95資料集(1995)．49-60．
- 8) 井尻憲一．宇宙メダカ実験．日本マイクログラビティ応用学会誌．12, 144-149 (1995)．
- 9) 井尻憲一．「宇宙メダカ実験のすべて」(57頁)．RICUT発行(1995)．

なお、対応する英語版として 'The First Vertebrate Mating in Space - A Fish Story' (57 pages) があります。他に、「宇宙メダカの子どもたち——飼育報告集」(230頁)は、全国に配布した宇宙メダカ2世の飼育・観察記録です。宇宙メダカ2世の里親の方々からの報告書を、そのまま写真製本してあります。これらの報告書を希望される方は、希望する本と配達先住所を明記し、封書で井尻憲一まで請求してください。ただし、実費として1冊当たり1,000円分を頂きます(定額小為替または現金書留でお送りください。郵送費は当方で負担)。報告書請求先：〒113 東京都文京区弥生 2-11-16、東京大学 アイソトープ総合センター、井尻 憲一(宛)。

# Early Development of a Gravity-Receptor Organ in Microgravity (OTOCONIA)

Principal Investigator: Michael L. Wiederhold \*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> University of Texas Health Science Center at San Antonio

The object of this experiment was to determine what role the gravitational field might have on the initial development of the gravity-sensing portions of the inner ear. Particular emphasis was placed on the formation of the otoliths, test masses on which gravitational and linear-acceleration forces act. If the growth of the otoliths is somehow regulated by their weight, their mass should be increased in reduced gravity. Pre-fertilized eggs of the Japanese red-bellied newt, some at developmental stages before any portion of the inner ear had formed and others just before the otoliths are formed were flown in the Aquatic Animal Experiment Unit. During the fifteen day flight, these eggs reached larval stages in which the inner ear neared its adult form. The otoliths of the saccule and utricle, the two gravity-sensing portions of the inner ear, were not of significantly different volumes when prepared for histologic study within the week after return of the shuttle. The endolymphatic duct and sac extend dorsally from the saccule and, in the adult newt, cover the brain stem and portions of the spinal cord. In the adult, these structures are filled with a different form of otoconia. This system develops earlier and is significantly larger in the flight-reared larvae, compared to ground-controls. At the stages the larvae reached at the end of the flight, endolymphatic otoconia begin to appear in the saccule and contribute to the saccular otolith. In X-ray microfocus studies performed by our Japanese collaborators, the saccular otolith and endolymphatic otoconial mass are seen to be significantly larger in one flight-reared larvae maintained in Japan for several months post-flight. Thus, the system of otoconia formed in the endolymphatic sac is greatly accelerated in the flight-reared animals and leads to a long-lasting increase in the saccular otolith in the one specimen maintained for months afterlanding.

## OBJECTIVES

- 1) To maintain developing larvae in microgravity through a period starting before any otoconia are formed and ending after the inner ear is substantially developed.
- 2) To compare rates of development in microgravity to those on earth.
- 3) To compare the cumulative volumes and locations of otoconia in flight and ground-reared larvae.
- 4) To compare the sensory structures of the inner ears of flight and ground-reared larvae.



- 5) To compare the otolith-ocular reflex in flight- and ground-reared larvae.
- 6) To follow the further development of the otolith systems after return to 1-g conditions of larvae reared in microgravity.

## BACKGROUND

All animals sense gravity and linear acceleration by the interaction of a specialized mass with sensory receptor cells. In vertebrates the masses are the otoliths (collections of small  $\text{CaCO}_3$  stones called otoconia or statoconia) in the utricle, saccule and, in non-mammalian species, the lagena. The size (mass) of the otoliths appears to be "appropriate" for each species and stage of development; in species which grow throughout their life, such as fish, the otoliths also continue to grow. This implies that there is some mechanism which regulates otolith growth, enabling growth where needed and preventing excessive growth in a full-sized adult. If this regulation is, in some way, based on the otolith's weight, larger-than-normal otoliths would be expected in animals which develop their inner ears in microgravity ( $\mu\text{-g}$ ). Previous studies of this hypothesis have been either inconclusive or contradictory.

A major function of the otoliths is to send signals to the brain stem cell bodies of the motor neurons to the extra-ocular muscles. These muscles serve to stabilize the eyes when an animal moves, keeping an image stable on the retina. One set of reflexes which accomplish this are the otolith-ocular reflexes. It is known in higher animals, including man, that the gain (degree of "effectiveness") of these reflexes can be modified in conditions such as a subject wearing prismatic lenses. If the reflexes rely upon comparison of gravity and linear acceleration with visual inputs during their development, it is of interest to determine how they will develop in the absence of gravity.

The Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*, is a favorable model system in which to study inner-ear development, in that fertilized eggs of any desired developmental stage can be readily obtained and the major development of the inner ear occurs from days 4 to 20 after eggs are laid, within the range of space shuttle missions. Thus, viable fertilized eggs which either have not yet begun to form the inner ear, or in which no otoconia have yet been formed, can be launched and will develop nearly adult inner ears during the duration of a shuttle mission. Upon return, the anatomy of the inner ear as well as its function can be studied and compared to ground-reared control specimens.

## METHODS

Female newts were collected from rice paddies in Japan in the spring of 1994. After the fall mating, these newts go into hibernation and the female keeps sperm and eggs separate through the period of hibernation. The animals were kept in hibernation under refrigeration until eggs were desired, when they were moved to room temperature for one or two days and injected with human chorionic gonadotropin (HCG), either 100 IU/6g on two successive days or with 200 IU/6g on one day (the average weight of the adult newts is 6 g).

Eggs were then laid over the next 3 to 5 days. Their developmental stage was determined by external morphological characteristics, as described by Okada (1947, 1989). Eggs were reared in the laboratory until loading for flight.

At approximately 36 hours before launch, eggs at stages 10 to 25 were loaded into individual egg holes (6 mm diameter, approximately 12 mm deep) in an egg container in each of three cassettes of the Aquatic Animal Experiment Unit (AAEU). This unit circulated fresh, aerated water at 24 °C continuously. A similar unit was maintained at KSC Hangar L as a ground control facility. Forty-eight eggs were loaded into each cassette. Approximately 100 eggs from the same group of females were maintained in the laboratory as additional controls.

During the flight, the developmental stages of eggs in both flight and ground control AAEU's were determined from high-magnification video taping. Using a Canon L1 video camera (which will accept any Canon EOS lens) video could be obtained in which the 6 mm egg hole took up most of the field. This allowed identification of the gill and limb development characteristic of the relevant stages. With optimal lighting, which was difficult to obtain in the Spacelab, blood flow could even be assessed in the developing gills.

The flight cassettes were retrieved about 6 hours after shuttle landing. Some larvae were fixed with 0.5 % paraformaldehyde and 1.0 % glutaraldehyde, dehydrated and embedded in Medcast plastic for sectioning. Some larvae were tested to estimate the gain of the otolith-ocular reflex. These larvae were restrained in a device that allowed rotation about the longitudinal body axis, and counter-rotation of the eyes was measured from high-magnification video records. Six flight and six ground-control larvae were studied on post-flight days 1, 3 and 5 by X-ray microfocussing of the otoliths.

Otolith volumes and areas of associated sensory epithelia were calculated from three-dimensional reconstructions of serial sections through the inner ears at the stages available. Each section was stained with methylene blue, traced with a camera lucida attachment to the microscope and then traced into a computer, using a digitizing pad. The reconstructions were computed using Jandel PC3D software.

## FLIGHT RESULTS

A total of 148 fertilized eggs were loaded into the 3 AAEU cassettes 30 hours before launch. Each cassette also contained one or two adult newts. The adult in cassette A2 died on flight day 5 and malfunction procedures called for the removal of a cassette in which an adult had died, so this cassette was removed and placed in the freezer. Thus, all 48 eggs from A2 were lost to further study. On mission day 9, the adult in cassette A1 also died. A modified malfunction procedure was developed to remove the cassette, open one side panel, remove the dead adult, replace the panel, and replace the cassette in the AAEU. This was accomplished successfully and approximately half of the eggs in this cassette survived. Sixty-two of the original eggs survived to the end of the flight.

The progression through the developmental stages was assessed from high-magnification down-linked video and video tapes reviewed after the flight. Similar observations were made on the ground-control equipment at KSC Hangar L at the same Mission Elapsed Times

(MET's). Figure 1 demonstrates, for cassette A3, that the flight and ground-control specimens developed at rates that were indistinguishable from one another by external morphological criteria. Thus, if temperature is well controlled and identical between ground and space-reared newts, they appear to develop at the same rate. By extrapolation between the stages a loading and the first in-flight observations, the flight larvae were divided into two groups, one from stages 17 to 27 and the other from stages 29 to 30 at launch, whereas the ground larvae were in groups from stages 19 to 23 and from 28 to 31. Since the otic vesicle is first seen at stage 25, all but one larva in the two younger groups were in  $\mu$ -g before any of the otic vesicle formed and in the older groups, the larvae were all in  $\mu$ -g before any otoconia were formed (otoconia are first seen at stage 33).

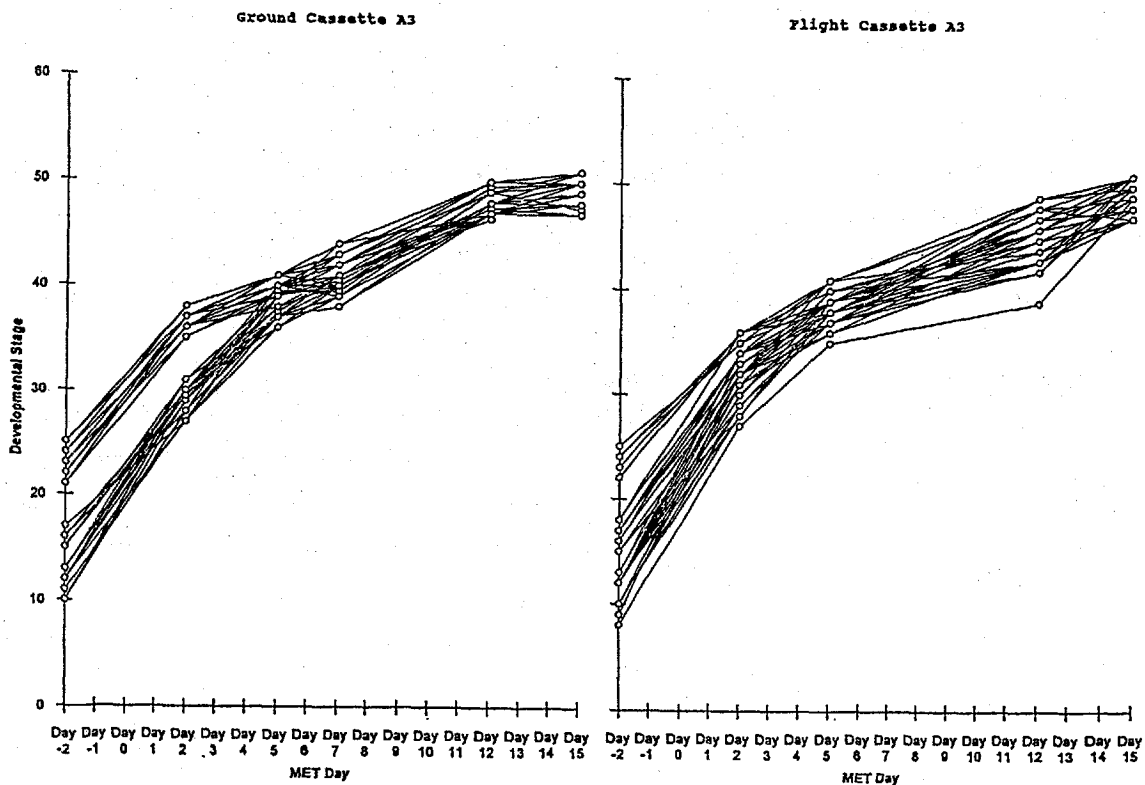


Fig. 1

Cassettes A2 and A3 were retrieved approximately 6 hours after shuttle landing. The surviving larvae had all hatched and swam vigorously, so it was not possible to clearly identify each larva with the egg hole in which it had been reared. Thus, post-flight samples were staged as they were studied or fixed for anatomical study. Sixteen flight and 12 ground-control specimens were fixed and embedded for sectioning on landing day (R + 0), 8 flight and ground on R + 3 and 18 flight and 25 ground larvae on R + 5.

Figure 2 illustrates three-dimensional reconstructions of the inner ears of a ground- and a space-reared larva at stage 52, both fixed on R + 3. Note that there is no apparent difference in the volume of the saccular or utricular otoliths between these two specimens. It is clear that the endolymphatic sac and the volume of otoconia within the sac are larger in the flight-reared specimen and there are many otoconia found in the semicircular canals, identified as "ectopic otoconia", in the flight specimen.

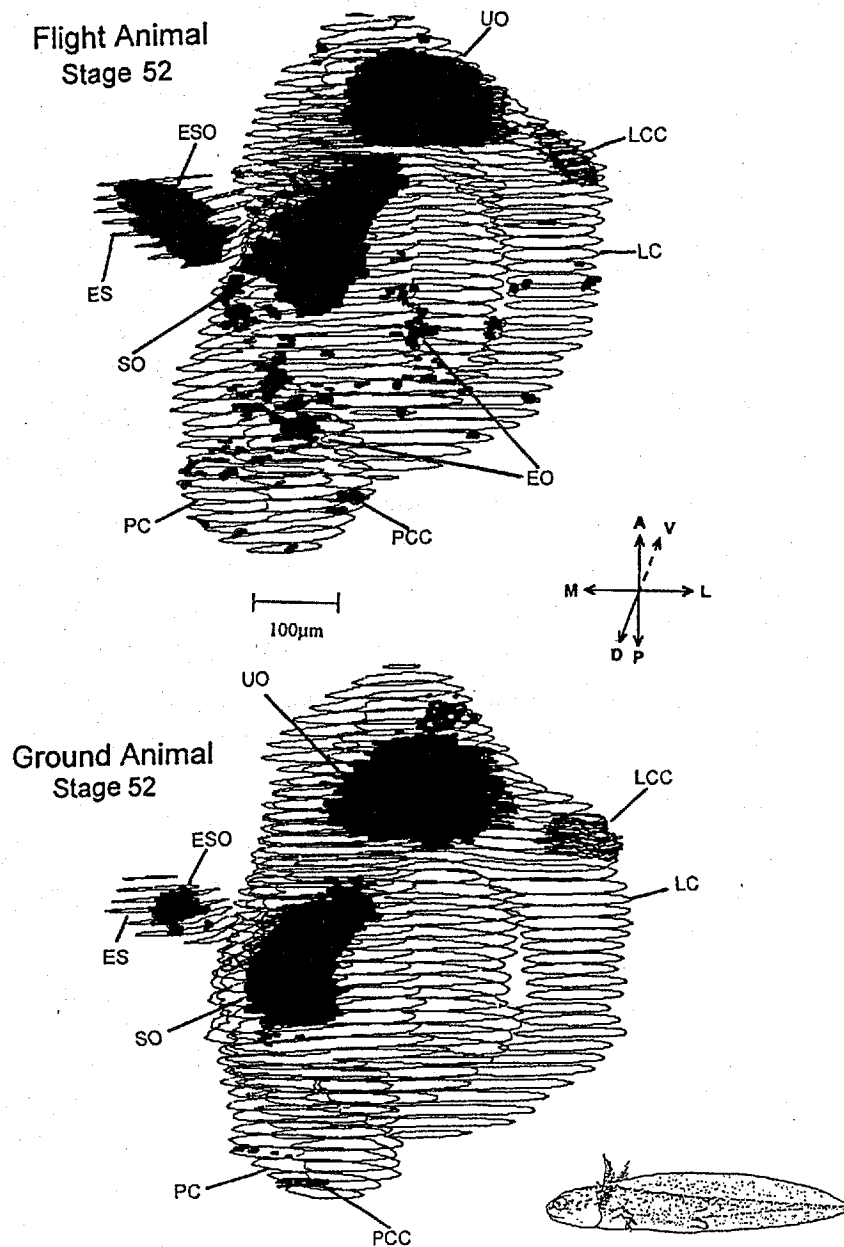


Fig. 2 Three dimensional reconstruction of serial sections through the developing otic vesicle of flight and ground-reared stage 52 larvae. Abbreviations: ES: endolymphatic sac; ESO: endolymphatic sac otoconia; EO: ectopic otoconia; UO: utricle otolith; SO: saccular otolith; LC: lateral semicircular canal; LCC: lateral canal crista; PC: posterior semicircular canal; PCC: posterior canal crista; D: dorsal; V: ventral; M: medial; L: lateral; A: anterior; P: posterior. Drawing at lower right is a stage 52 *Cynops* larva.

There is considerable variation in the volumes of otoliths within specimens at a given developmental stage. Figure 3 is a scatter plot of the volumes of the saccular and utricular otoliths for flight and ground specimens for the 21 specimens reconstructed to date (2 flight and 2 ground at stages 49 - 53 and one ground larva at stage 54). This plot illustrates the variability as well as the clear growth of otolith volume with developmental stage but does not indicate a systematic difference between the flight and ground specimens. Possibly due to the variability between specimens, it was not possible to demonstrate a significant difference in the volumes of the utricular or saccular otoliths between flight- and ground-reared specimens between stages 49 and 53 fixed within one week after return to earth. Figure 4 shows plots of the mean volumes,  $\pm$  the standard error of the mean (SEM), at each stage, along with plots (dashed lines for ground and dotted for flight-reared) of the 95 %

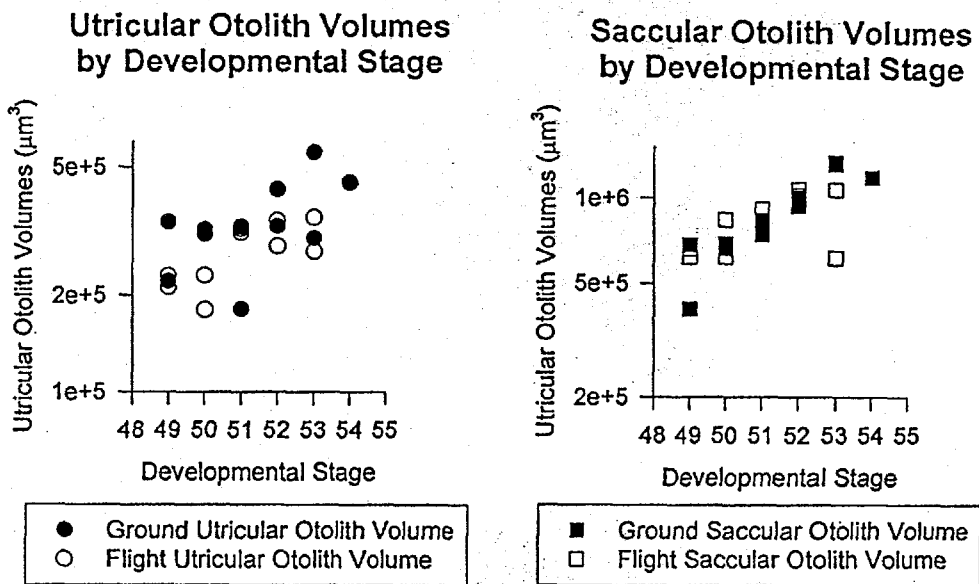


Fig. 3

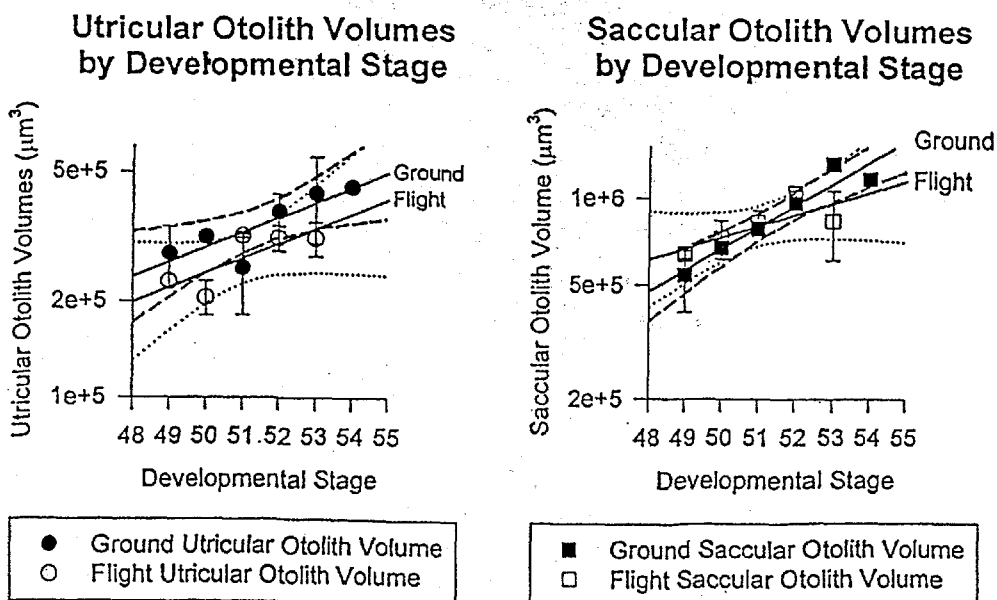


Fig. 4

confidence interval for the relationship of volume to developmental stage. It is clear that the confidence intervals for flight and ground animals in both the utricle and saccule overlap significantly.

From Figure 2, it is apparent that the flight-reared larva has a larger endolymphatic sac (ES) and duct and a larger volume of otoconia in the sac (ESO). Figure 5 shows scatter plots of ES and duct volumes for the same specimens as in Figures 3 and 4. Means and SEM's are also plotted, with 95 % confidence intervals. One flight specimen at stage 50 had an exceptionally large sac and duct, which causes a large dispersion in the 95 % confidence interval for the flight larvae. However, the average flight sac and duct volumes are above the upper 95% interval for ground larvae at stages 49 through 53. Figure 6 shows the scatter plots and regression plots, with 95 % confidence intervals, for the volumes of otoconia within

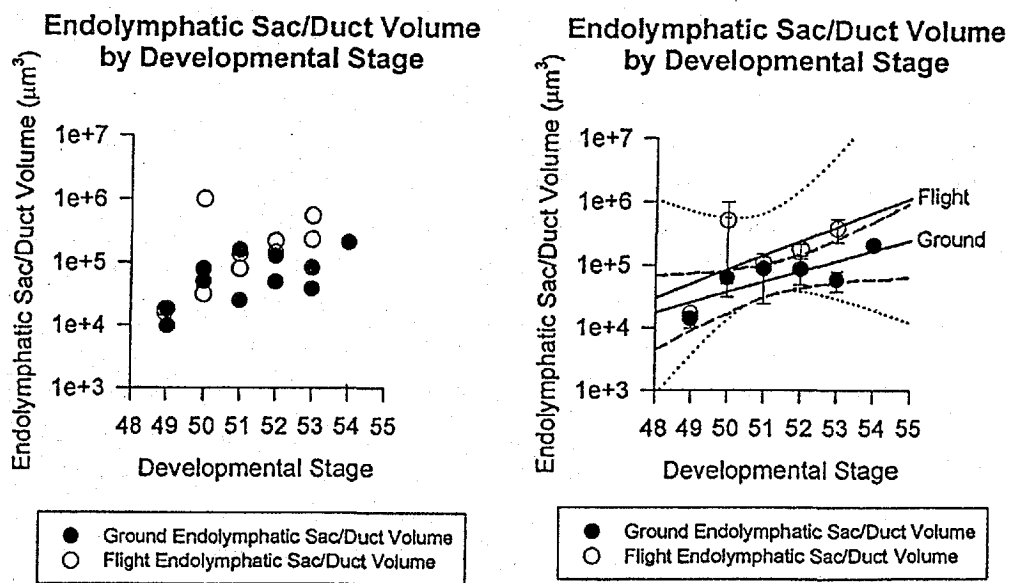


Fig. 5

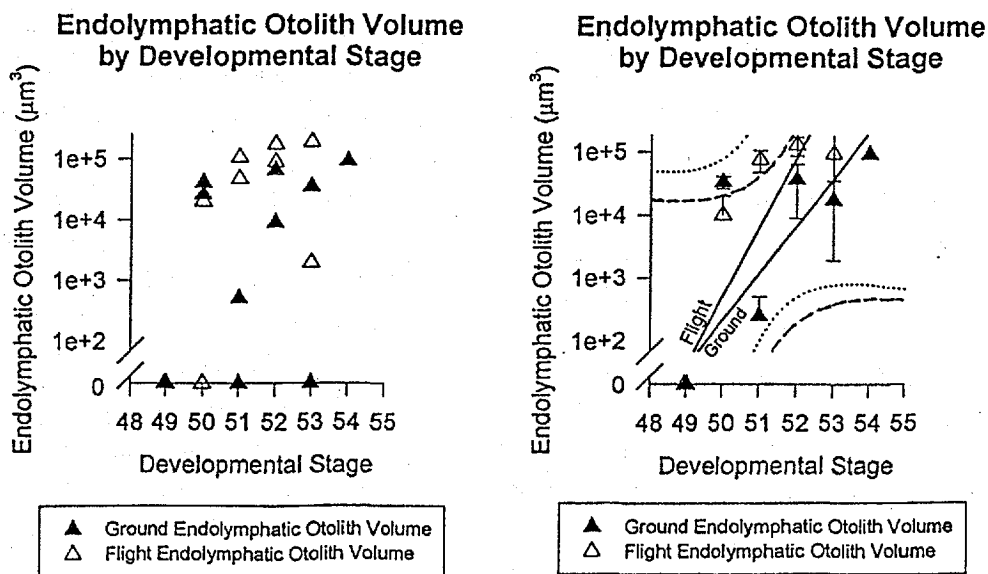


Fig. 6

the ES in the flight- and ground-reared larvae. Again, there is a strong trend for the total volume of otoconia in the sac to be larger in the flight-reared larvae. As with the saccular and utricular otoliths, there is considerable variation between specimens. Three out of 11 ground animals had no otoconia in the sac, whereas only one of 10 flight animals had no ES otoconia. As a further example of the variability, the stage 50 larva with the very large ES had no otoconia within the sac and the two ground stage-50 larvae had a relatively large volume of ES otoconia. Thus both ground-reared larval otoconial volumes are larger than the two flight-reared specimens. Neither the two ground nor the two flight larvae at stage 49 had any ES otoconia. At stage 51, the mean ESO volume of flight-reared larvae is nearly 300 times as large as in the ground larvae, at stage 52 the mean flight volume is 3.6 times larger and at stage 53 the mean flight volume is 5.5 times larger.

The above analyses combine specimens fixed on days R + 0, R + 3 and R + 5. However, there was a systematic progression across the five post-flight days in the probability of there being externally visible ESO. Before the flight, we had never seen otoconia within the endolymphatic system before stage 57. When flight-reared larvae were examined, either live or after fixation and embedding, it was noted that otoconia in the endolymphatic sac could often be seen using a dissection microscope with bright direct illumination, as reflected light similar to that from the utricular and saccular otoliths. Figure 7 shows plots of the number of specimens in which ES otoconia could be seen in ground and flight larvae on the three fixation days. On day R + 0, no ES stones were seen in either ground-control or flight animals. On day R + 3, 56 % of ground and 86 % of flight larvae had visible stones and on day R + 5, 21 % of ground and 70 % of flight larvae had visible stones. A group of larvae from the same group of females which laid the flight and ground-control eggs were maintained in the laboratory in plastic dishes on the counter top. Significantly, none of the laboratory-reared larvae, from stages 48 to 54, had visible ES otoconia. None of the lab-reared specimens has been reconstructed yet. Thus, the percentage of specimens with visible ES otoconia increases with time after return of the specimens to 1-g conditions on earth, and at days R + 3 and R + 5, the percentage of specimens with visible ES stones is substantially higher in flight, compared to ground-control specimens. On days R + 3 and R + 5, 37 % of the specimens raised in the ground AAEU had visible ES otoconia while the lab-reared larvae had none. Endolymphatic sac otoconia were visible as early as stage 49 (one case) and 50 (14 cases) in flight and ground-control larvae, whereas none were visible in the laboratory-reared larvae, up to stage 54, consistent with our previous observations from sectioned material indicating that otoconia do not appear in the endolymphatic sac before stage 57.

Using the Japanese X-ray microfocussing system, Drs. Kashima, Nakamura, Nishimura and Mr. Koike have studied the areas and total X-ray absorption of the otoliths. Their observations will be reported separately, but they do agree with our observations in the first week, in that the utricular and saccular otoliths are not of significantly different sizes between flight and ground-control specimens. However, the endolymphatic system is clearly larger in the flight-reared larva, and the saccular and utricular otoliths are also larger at 2 and 3 months after return, compared to lab-reared controls from the same original stock of eggs.

Otolith-ocular reflexes were measured in the week after return, but those data are still being analyzed.

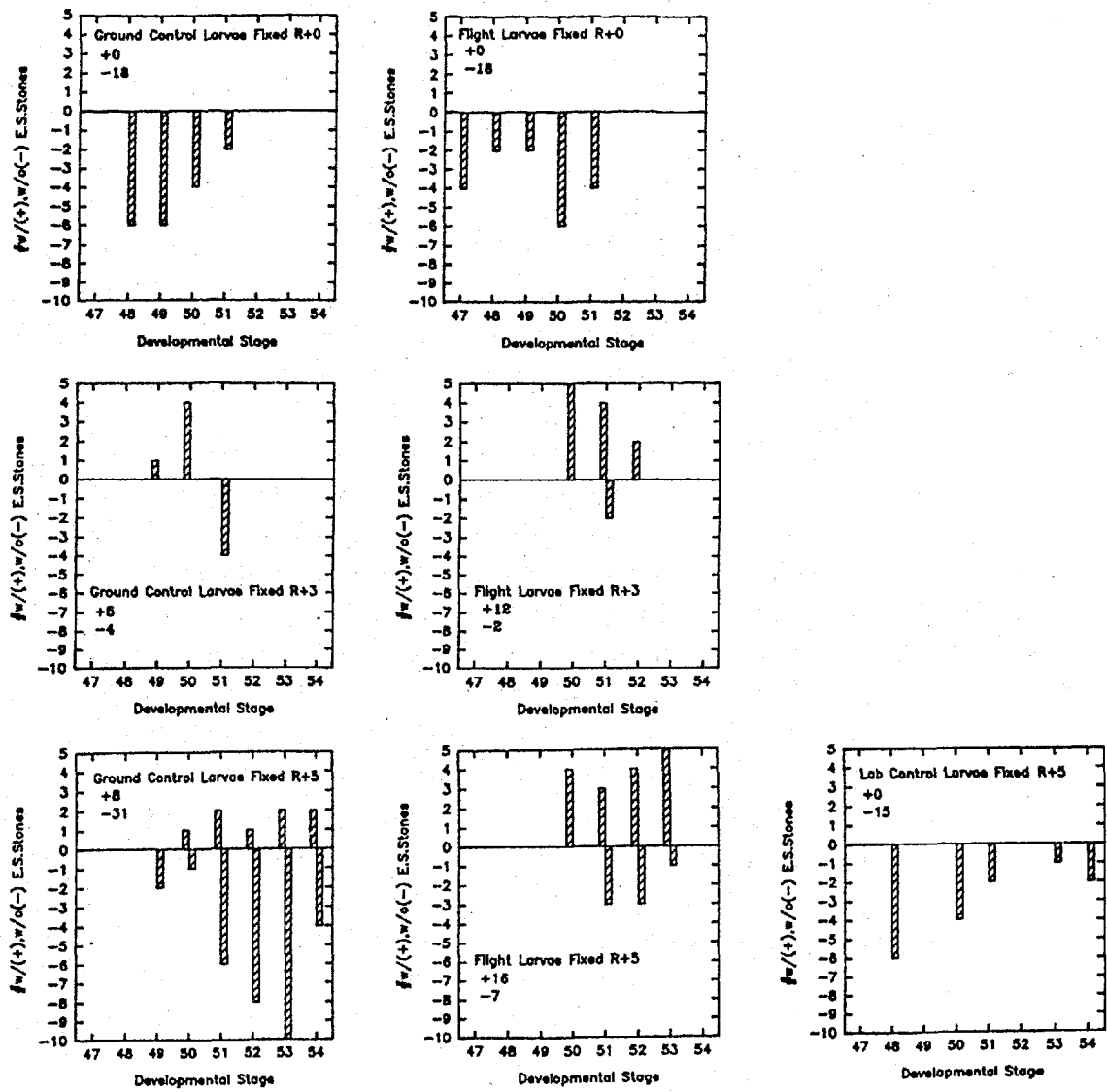


Fig. 7



## CONCLUSIONS

The newt eggs developed normally and survived well during the flight. In cassette A1, which was not opened during the flight, approximately 80 % of the eggs survived and had hatched by the end of the flight. Thus, fertilized newt eggs appear to be excellent specimens in which to study development in microgravity. Over the fifteen day flight, the animals went from early embryonic stages to hatched, swimming late-stage larvae.

One hypothesis upon which these experiments were designed was that an animal which developed its otoliths in reduced gravity would, by some mechanism, increase the mass of the otolith developed, to compensate for its reduced weight. This did not appear to happen within the first week after flight. However, the production of otoconia in the endolymphatic system was accelerated in the flight-reared larvae. In ground-based studies, we have shown that the otoconia produced in the ES are made of  $\text{CaCO}_3$  in the aragonite crystal form, which is different from the calcite form found in the utricle and early-larval stage saccule (see refs. 8) and 11), below). In normal laboratory-reared larvae, aragonitic otoconia are first seen in the saccule at stage 51 and the first noticeable collection of otoconia within the ES was seen at about stage 57<sup>8)</sup>. In the adult newt, all of the otoconia found in the saccule are made of aragonite. We have interpreted these findings to indicate that the aragonitic otoconia are produced in the ES and transported to the saccule through the endolymphatic duct.

Apparently the system which produces the aragonitic otoconia in the ES is enhanced in space-reared larvae. Amphibians store calcium in the ES otoconia since they lack trabecular bone, where calcium is exchanged in mammals. Perhaps there is some change in calcium metabolism in these larvae growing in  $\mu$ -g conditions which causes them to store more calcium than normal in the ES. Since the ES (aragonitic) otoconia contribute to the saccular otolith in later stages, the changes induced during two weeks of development in space appear to lead indirectly to a larger saccular otolith several months after return to earth, as shown by the X-ray micro-focus studies.

To increase the statistical power of the results presented here, more specimens must be analyzed. Over the next six months, we will double the number of flight and ground specimens reconstructed at each stage.

For future flight experiments, we plan to fly additional newt larvae on the ARF-02 flight, scheduled for early 1997. We hope to have the X-ray micro-focus system available for that flight also and will plan to keep more of the larvae alive for extended periods after the flight, to verify the long-lasting effects after return to 1-g conditions. The data of Fig. 2 indicate that the increase in ES otoconia began after return to earth. To determine whether this is a response to entering 1-g conditions after development in  $\mu$ -g, or might be even greater with continued development in  $\mu$ -g, will require much longer flight experiments. These could be accomplished in the Aquatic Habitat on Space Station Alpha.

Endolymphatic sac otoconia were more prevalent in the ground AAEU, compared to laboratory-reared larvae. This suggests that the AAEU egg chambers might act somehow to mimic the effects of  $\mu$ -g. In a post-flight control experiment run in Japan, the ground AAEU cassette was attached to an extender and selected larvae were video taped for two hours every other day during the 15-day flight simulation. The dorsal axis of the larvae was identified and its vector noted, relative to "up". It was found that the larvae were within 45°

of up 20 % of the time, were between 45° up and 45° down 70 % of the time and within 45° of down 10 % of the time. Thus, the orientation of the larvae was nearly random in the ground AAEU. When raised in dishes in the laboratory, newt larvae always remain dorsal-side up<sup>2)</sup>. Thus, the constraint of the egg hole appears to act as a clinostat, averaging out the direction of gravity with respect to body axes of the developing larva. Somehow this randomization may lead to enhancing the storage of calcium in the ES. Perhaps, since the larvae do not need to support themselves in the egg holes, calcium is lost from, or diverted from the developing skeleton to the endolymphatic storage system.

## PUBLICATIONS

The following publications describe ground-based studies performed as a baseline against which to compare the flight results. References 11, 13 and 14 include flight results (paper 11 is now being modified to satisfy reviewer suggestions).

- 1) Koike, H., Nakamura, K., Nishimura, K., Izumi-Kurotani, A., Yamashita, M., Kashima, I., Wiederhold, M. L. and Asashima, M. Formation of otolith during the development of Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Proceedings of the Tenth Space Utilization Symposium* (1993). 92-95.
- 2) Wiederhold, M. L., Yamashita, M., Izumi-Kurotani, A., Larsen, K., Hoike, H., Nagaoka, S. and Asashima, M. Developmental changes in the vestibular system of Imori. *Proceedings of the Ninth Space Utilization Symposium* (1992). 127-131.
- 3) Nakamura, K., Nishimura, K., Okamoto, Y., Kobayashi, S., Kashima, I., Koike, H., Asashima, M., Kurotani, A., Yamashita, M. and Wiederhold, M. L. Formation and development of otolith under microgravity. *Proceedings of the Eleventh Space Utilization Symposium* (1994). 138-141.
- 4) Nishimura, K., Okamoto, Y., Nakamura, K., Kobayashi, S., Kashima, I., Koike, H., Asashima, M., Kurotani, A., Yamashita, M. and Wiederhold, M. L. Fundamental study for quantitative analysis of otolith and bone change in IML-2 - Effect of anesthetic (MS-222) procedure under the magnification radiography. *Proceedings of the Eleventh Space Utilization Symposium* (1994). 135-137.
- 5) Wiederhold, M. L., Yamashita, M., Larsen, K. and Asashima, M. Formation of otoconia in the Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Adv. Space Res.* **14**, 327-330 (1994).
- 6) Hallworth, R. J., Wiederhold, M. L., Campbell, J. B. and Steyger, P. S. Atomic force microscope observations of otoconia in the newt. *Hear Res.* **85**, 115-121 (1995).
- 7) Mogami, I., Imamizo, M., Yamashita, M., Izumi-Kurotani, A., Wiederhold, M. L., Koike, H. and Asashima, M. Astronewt: Early development of newt in space. *Adv. Space Res.* **17**, 257-263 (1995).
- 8) Steyger, P. S., Wiederhold, M. L. and Batten, J. The morphogenic features of otoconia during larval development of *Cynops pyrrhogaster*, the Japanese red-bellied newt. *Hear Res.* **84**, 61-71 (1995).

- 9) Wiederhold, M. L., Yamashita, M., Larsen, K. A. and Batten, J. S. Development of the otolith organs and semicircular canals in the Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Hear Res.* **84**, 41-51 (1995).
- 10) Koike, A., Nakamura, K., Nishimura, K., Kashima, I., Wiederhold, M. L. and Asashima, M. Non-invasive assessment of otolith formation during development of the Japanese red-bellied newt, *Cynops pyrrhogaster*. *Hear Res.* In press (1995).
- 11) Wiederhold, M. L., Smithers, G. A., Trinh, D.V. and Steyger P. S. Developmental changes in newt otoconia crystallography determined with microscopic FTIR spectroscopy. Under review (1995).
- 12) Steyger, P. S. and Wiederhold, M. L. Visualization of Aragonitic Otoconial Matrices in the Newt. Under review (1995).
- 13) Wiederhold, M. L., Gilpatric, K. D. and Hejl, R. J. Otolith Systems in Newt Larvae Reared in Microgravity on IML-2. *ASGSB (the American Society for Gravitational and Space Biology) Bulletin.* **9** (1), 88 (1995). (Abstract)
- 14) Wiederhold, M. L., Gilpatric, K. D., Hejl, R. J., Koike, H. and Nakamura, K. Development of Otoliths and Endolymphatic Otoconia in Newt Larvae Reared in Microgravity. *The Eighteenth Midwinter Meeting of the Association for Research in Otolaryngology*, St. Petersburg Beach, Florida, February 4-8 (1996).

## 骨由来培養細胞の増殖・分化機能発現に及ぼす微小重力の影響 (OSTEOGENE)

代表研究者： 桑井康宏\*<sup>1</sup>

共同研究者： 下川仁弥太\*<sup>1</sup>、片野尚子\*<sup>1</sup>、鎌田伸之\*<sup>1</sup>、春日井昇平\*<sup>1</sup>、原 英二\*<sup>2</sup>、  
秋山英雄\*<sup>3</sup>、平野昌彦\*<sup>3</sup>、藤沢隆一\*<sup>4</sup>、久保木芳徳\*<sup>4</sup>、  
向井千秋\*<sup>5</sup>、長岡俊治\*<sup>5</sup>、Peggy A. Whitson\*<sup>6</sup>、Clarence F. Sams\*<sup>6</sup>

\*<sup>1</sup> 東京医科歯科大学 歯学部、\*<sup>2</sup> 大阪大学 医学部、\*<sup>3</sup> 東レリサーチセンター 生物科学研究部、

\*<sup>4</sup> 北海道大学 歯学部、\*<sup>5</sup> 宇宙開発事業団 筑波宇宙センター、\*<sup>6</sup> NASA/ Johnson Space Center

The increase of urinary calcium and decrease of bone density, bone demineralization have been reported in astronauts. Inhibition of bone formation was reported in rats that were flown for 2 to 3 weeks. It has been suggested that microgravity affects bone metabolism, however, the mechanism remains unknown. The purpose of this study is to clarify the mechanism of microgravity effects on cultured osteoblasts. The investigation is focused on the gene expression and cell productivity, cytokines, growth factors, and bone matrix proteins. Gene expression was analyzed by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR), whereas differentiated function of osteoblasts was investigated by quantitating cellular products using enzyme immunoassay or radioimmunoassay.

The cellular products which were secreted into the culture medium were harvested during space flight and analyzed quantitatively after return to the earth. In microgravity, prostaglandin E2 production was increased by 2- to 10-fold, whereas osteocalcin productivity was inhibited by 60 to 90 %. Prostaglandin E2 is reported to activate on osteoclast induction, whereas osteocalcin is reported to play some role in hydroxyapatite crystal formation as the bone matrix protein. The changes of cellular productivity were consistent with changes in mRNA levels for prostaglandin E2 and osteocalcin synthesis. These results suggest that microgravity affects differentiated function of osteoblasts at the transcriptional level and that the changes of the cellular products will then induce bone demineralization in microgravity.

### 実験の目的、意義

従来、宇宙飛行に伴い宇宙飛行士の尿中カルシウム量増大、骨密度減少、あるいは宇宙飛行ラットの骨形成阻害などが報告されている。微小重力が骨代謝に影響を及ぼすことが示唆されているが、そのメカニズムは解明されていない。本研究は生体内骨分化機能を培養下で再現するラット大腿骨骨髓由来骨芽細胞をスペースシャトルに搭載し、軌道上で同細胞を数日間培養し、細胞増殖、サイトカイン産生、骨基質合成などの骨分化機能発現に及ぼす微小重力の影響について、主として細胞内遺伝子発現および細胞の骨代謝関連物質産生能の変化などを指標として明らかにすることを目的とする。

## 実験の方法と試料

### 実験原理

骨代謝は全身的なカルシウム代謝調節機構の制御下であり、骨吸収と骨形成との平衡関係の下に骨の構造と骨量が維持されている。

骨吸収は破骨細胞が、また骨形成は骨芽細胞が主役となるが、破骨細胞と骨芽細胞の間には骨基質を介した密接な相互作用が存在する。破骨細胞および骨芽細胞がそれぞれの前駆細胞から分化し活性化される過程は複雑であり、全身性ホルモンの制御下で、骨芽細胞から分泌される局所性因子により営まれる。すなわち骨芽細胞およびその前駆細胞は、アルカリホスファターゼ活性、I型コラーゲン、骨シアロタンパク、オステオカルシンなどの骨基質タンパクの合成・分泌に至るまで段階的な分化を示し、それらの過程でインシュリン様成長因子、骨形成因子、Transforming Growth Factor- $\beta$  因子、プロスタグランジン E<sub>2</sub>、インターロイキンなどのサイトカイン類を分泌し、骨芽細胞のみならず破骨細胞の機能にも深く関与している。

発生過程においては骨組織は大腿骨などの長管骨にみられるように間葉系組織中にまず軟骨が形成され、その部分が骨組織に置換される軟骨内骨化と、頭蓋・顔面部の骨にみられるように間葉系組織中に直接骨が形成され、軟骨形成を経ない膜性骨化のいずれかの様式で形成される。これら2つの様式の骨組織発生形成過程で出現する骨芽細胞の形態は類似しているが由来は異なると考えられる。長管骨を形成する骨芽細胞は中胚葉性の間葉系細胞に由来し、頭部・顔面部の骨を形成する骨芽細胞には神経堤すなわち外胚葉性の間葉系組織に由来するものが多い。成長後の骨組織においては骨髄内および骨膜部に存在する骨芽細胞の前駆細胞が骨芽細胞へ分化する。

宇宙飛行士あるいは地上で長期間横臥患者の骨からのカルシウム溶出は長管骨・荷重骨に顕著である。従来の培養骨芽細胞様細胞を用いた宇宙飛行実験では、骨肉腫由来の細胞株あるいは頭頂骨由来の細胞株が使用されており、実際に荷重・非荷重に鋭敏に反応を示すといわれている生体内長管骨の骨芽細胞の機能・特徴が正確に反映されていない。他方長管骨骨髄から直接採取した骨芽細胞は生体内骨形成過程に近似した分化機能を培養下で経時的に発現することが知られている。本研究は宇宙飛行に伴う生体内長管骨の骨代謝異常の原因を解明するためにラット大腿骨骨髄より採取した培養二代目の正常骨芽細胞を実験材料・飛行試料とし、細胞内遺伝子発現、細胞生理活性等の解析により、骨芽細胞の機能に及ぼす微小重力の影響の詳細を明らかにする。

### パイロードクルーの実験教育訓練

パイロードクルーに対しては以下の内容につき延 19 日間の教育・訓練を実施した。

- 1) 細胞生物学および培養手技に関する基礎知識の講義総論(PI 研究室 2 日間)
- 2) 骨代謝および培養骨芽細胞に関する講義各論(PI 研究室 1 日間)
- 3) 培養細胞の顕微鏡写真撮影の訓練(PI 研究室 2 日間、MSFC/PCTC 3 日間)
- 4) 遺伝子発現解析の実習(PI 研究室 1 日間)
- 5) フライトシミュレーターを使用した実験操作に関する訓練(MHI 神戸 3 日間、MSFC/PCTC 2 日間)
- 6) 非正常時対策訓練(MSFC/PCTC 4 日間)
- 7) 打上げ直前の飛行試料に関する説明(KSC/LSSF 2 時間)

PI: 代表研究者

MHI: 三菱重工業

MSFC/PCTC: NASA マーシャル宇宙飛行センターベイロードクルー訓練施設

KSC/LSSF: NASA ケネディ宇宙センターライフサイエンス支援施設

## 地上予備実験

地上予備実験を以下の内容で計4年間以上にわたり順次行った。

- 1) 宇宙実験に適した合理的な飛行試料候補の選出
- 2) 骨髄由来初代および二代目培養骨芽細胞の機能発現に関する基礎的実験
- 3) 同細胞のフライト型培養容器素材上での細胞増殖、分化機能発現、遺伝子発現に関する基礎的実験
- 4) フライト型培養容器素材仕様決定
- 5) フライト型培養容器組立品を用いた骨芽細胞培養維持、細胞増殖、分化機能発現、遺伝子発現に関する性能確認試験
- 6) 飛行実験用クルー操作手順最終決定のための模擬実験
- 7) フライト用培養容器の実験適合性試験
- 8) フライト用培養容器補修のための確認試験

## 飛行実験の結果

打上げ8日前、雄性ウイスターラット(5週令)大腿骨骨髄より骨芽細胞を採取し、前培養を開始した。打上げ3日前、同細胞を $10^4$ 個/cm<sup>2</sup>の密度でフライト培養容器に植え込んだ。飛行実験用4個、地上対照実験用8個の培養容器を用意し、打上げ15時間前にシャトルミッドデッキ内に室温状態で搬送された。軌道に到達した後、培養容器は直ちに炭酸ガスインキュベータに移され、以後、37℃、5%炭酸ガス-95%空気気相中、湿度約60%の条件下で培養された。軌道上培養3日目よりクルーによる培養液交換などの実験操作が開始された。軌道上での培養細胞生育状態はクルーから音声により報告された。細胞生理活性あるいは遺伝子発現は細胞生育状態により影響をうけるため、飛行群と地上対照群との細胞生育状態の変化には特に注意した。軌道上培養4日目には地上対照群の一部の細胞生育状態が飛行群と異なる様相を呈し始めたため、軌道上培養を予定より4日間繰り上げ、軌道上5日目に培養を終了し、遺伝子固定・抽出用のグアニジン液を培養容器に注入し、冷凍庫内にて保管した。また軌道上で培養期間中回収した使用培養液は回収後直ちに冷凍庫または冷蔵庫に収納された。上記一連の実験操作について地上対照実験は全て飛行実験より3時間遅延して同調させた。飛行中の培養用インキュベータ内の温度、湿度および炭酸ガス濃度はPOCC端末で常時モニターされ、地上対照に反映された。

地上帰還後、遺伝子を含むグアニジン液を培養容器から個別に回収し、それぞれシアリングによりDNAを切断した後、セシウムトリフルオロ酢酸-EDTA液に混合し超遠心分離(30000 rpm、20時間)によりRNA、DNA、タンパクの各分画を得た。RNA沈澱物についてはグアニジン液に再度溶解し、エタノール沈殿・洗浄・溶解を繰り返し、純度の良好な最終試料を調製した。DNA、RNAの各分画については波長260 nmおよび280 nmにおける吸光度を測定し、濃度・純度を求めた。

遺伝子発現の解析は、目的とする遺伝子の塩基配列に特異的に相補的結合をするオリゴ

ヌクレオチドプライマーを合成し、<sup>32</sup>P-標識ヌクレオチドを用いて逆転写酵素-ポリメラーゼ鎖反応(RT-PCR)により等量の全 RNA をもとに cDNA 合成・遺伝子増幅を一定の割合で行った。それぞれの遺伝子転写物の増幅回数については予め増幅効率が半対数性を示す範囲で決定した。各群で増幅に用いた RNA の等量性を確認するため glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (G3PDH) 遺伝子を各遺伝子と同一条件で増幅し、比較対照とした。得られた PCR 産物の一定量をポリアクリルアミド電気泳動し、該当する遺伝子転写物のバンドの放射活性の強さをオートラジオグラフ・画像解析により求め、一定の割合で増幅された遺伝子転写物の相対量とした。

軌道上で回収した培養液は、地上帰還後融解し、少量ずつ分別したのち、直ちに -70℃ 中に保存し、凍結融解を繰り返すことなく、細胞により産生・分泌された細胞成長因子、サイトカイン、骨基質タンパクなどの定量解析に供された。得られた値は各培養容器中に含まれる細胞 DNA 総量に対し標準化したのち飛行群と地上対照群とについて比較した。

## 解析と考察

### 細胞形態・増殖

飛行群および地上対照群いずれも打上げ前に比し、細胞の順調な増殖が確認された(図1および図2)。両群ともに多数の骨芽細胞が培養容器基材上のほぼ全域に拡がる以前にグアニジン液注入により培養を終了した。両群ともに培養中の細胞はやや扁平な多角形の形態を示すものが多く、明瞭な細胞核、核小体、細胞内顆粒等が観察された。両群ともに培養容器基材上には細胞が全く生育していない箇所が認められたと同時に、また部分的に細胞増殖が過密になり、細胞同志が重なり合う箇所も観察された。

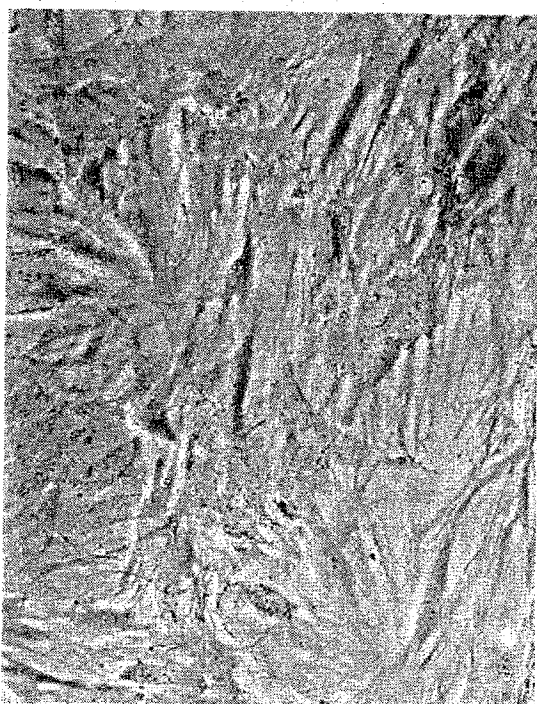


図1 飛行群骨芽細胞

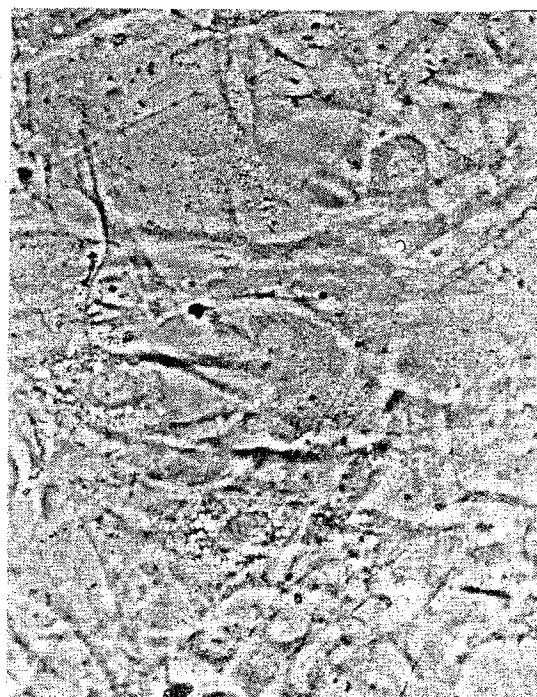


図2 地上対照群骨芽細胞

## 培養容器内 DNA 総量

培養容器内のグアニジン液を全部回収し、超遠心分離後、DNA 分画を集め 260 nm の吸光度により DNA 量を求めた。培養容器あたりの回収 DNA 総量は飛行群では 9.7 から 25.0  $\mu\text{g}$  であり、地上対照群では 9.7 から 33.4  $\mu\text{g}$  となった。回収した DNA 総量は細胞総数を反映する指標であり、また回収した時期が軌道上 4 日目及び 5 日目であったことから、飛行群と地上対照群とで若干のバラツキはあるものの、細胞は両群ともにほぼ同程度の順調な増殖を示した。

## クレアチンキナーゼ、乳酸脱水素酵素活性

回収した培養液中のクレアチンキナーゼ活性および乳酸脱水素酵素については飛行群と地上対照群との間に有意差はなく、両群の細胞障害度に差はなかった。

## 糖消費量

培養液中のグルコース濃度を測定し、細胞の糖消費量を計算した結果、飛行群と地上対照群の間に有意差はなかった。

## プロスタグランジン E2 (PGE2)

回収した培養液中に含まれる PGE2 量を酵素免疫法により吸光度測定し、標準曲線を Logit-Log 法により直線化し(直線性 0.993)、得られた吸光度より PGE2 量を計算し、さらに DNA 量に対する標準化を行った。最初の 3 日間で飛行群では計 20  $\text{pg}/\mu\text{g}$  DNA の PGE2 産生分泌が行われ、地上対照群の約 11 倍の値を示した。軌道上培養 4 日目にかけては、2.7  $\text{pg}/\mu\text{g}$

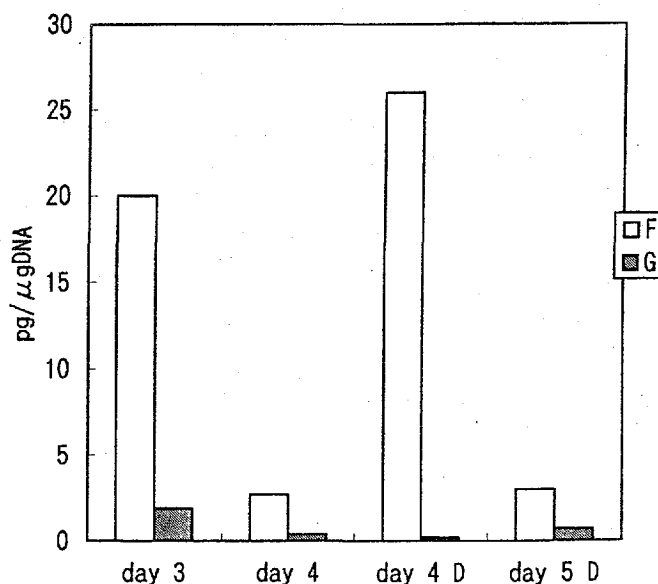


図 3 軌道上培養骨芽細胞のプロスタグランジン E2 合成・分泌  
横軸：培地回収日(ミッション経過日数)、D：活性型ビタミン D 添加  
F：飛行群 G：地上対照群



DNAとなり、地上対照群の約7倍の値となった。また活性型ビタミンD3添加による効果は認められなかった(図3)。

骨芽細胞から合成・分泌される最も重要なPGはPGE2である。PGE2合成の調節はホスホリパーゼA2およびホスホリパーゼCによるリン脂質からのアラキドン酸が遊離、そしてPG合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ(PGH合成酵素)の作用によりPGH2に変換されるが、PGH2はきわめて不安定なためPGE2、トロンボキサンなどへ変わる。骨芽細胞のPG合成とcAMPとが正の相関であり、PG合成促進はcAMPを介したシグナル伝達によるシクロオキシゲナーゼ合成の誘導によってもたらされることが知られている。シクロオキシゲナーゼには二つのアイソザイムが存在し、外的刺激がないときでも常時内在的に合成される内在性シクロオキシゲナーゼ(COX1)と、cAMP等の因子や各種刺激によって速やかに産生誘導されるもの(COX2)とがある。ラットCOX1およびCOX2のcDNA塩基配列よりそれぞれの5'及び3'プライマーオリゴヌクレオチドを合成し、RT-PCRにより遺伝子発現を調べた結果、飛行群では地上対照群に比較してCOX2遺伝子が2倍-10倍高く発現されていることがわかった(図4)。

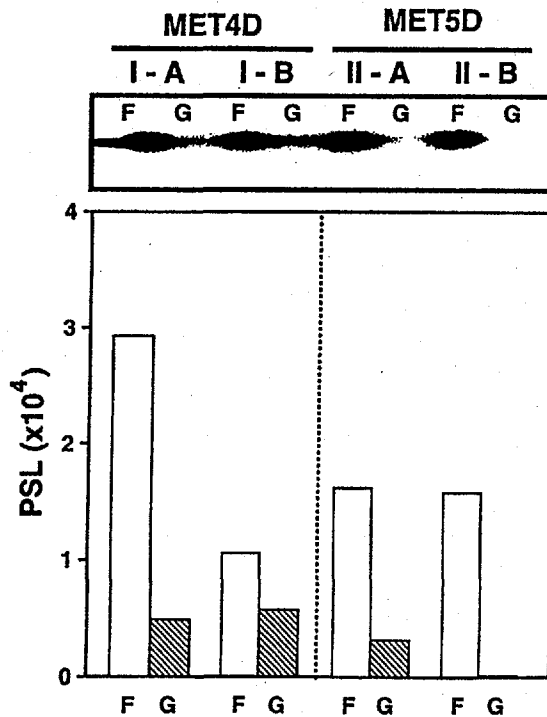


図4 定量的RT-PCRによるシクロオキシゲナーゼ-2遺伝子発現量の比較

またCOX1遺伝子についても飛行群のほうが地上対照群に比較して若干多く発現していた。以上により微小重力環境では骨芽細胞によるPGE2産生が著しく亢進し、その作用機序として、微小重力によりPG合成の律速酵素であるシクロオキシゲナーゼ(PGH合成酵素)-2の産生が誘導されたためと考えられる。

#### オステオカルシン

培養液中に含まれるオステオカルシン量を抗ラットオステオカルシン抗体を用いラジオイムノアッセイにより求め、細胞DNA量に対し標準化した。活性型ビタミンD3添加時では飛行群のオステオカルシン産生・分泌は軌道上4日目で平均154 pg/ $\mu$ g DNAであり、地

上対照群の平均 1418 pg/ $\mu$ g DNA に比し約 90 % も抑制された。軌道上 5 日目では飛行群の平均は 583 pg/ $\mu$ g DNA となり、地上対照群の 1037 pg/ $\mu$ g に比し抑制の割合は約 40 % となった(図 5)。

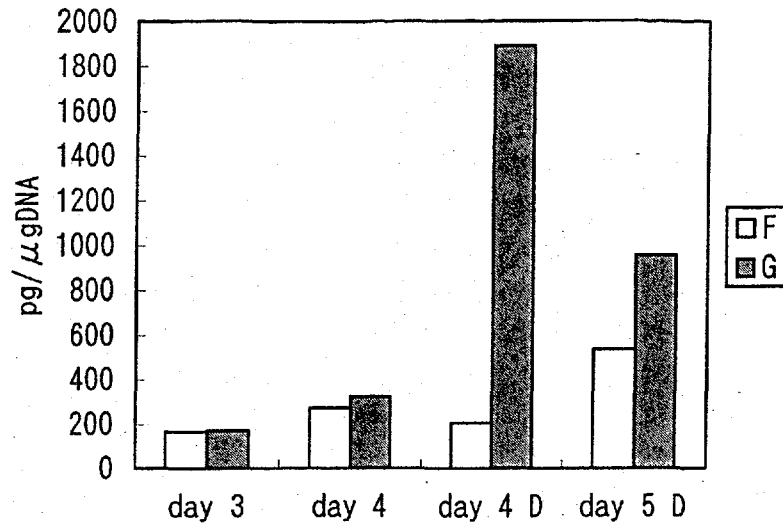


図 5 軌道上培養骨芽細胞のオステオカルシン合成・分泌  
 横軸：培地回収日(ミッション経過日数)、D：活性型ビタミン D 添加  
 F：飛行群 G：地上対照群

ラットオステオカルシンの cDNA 塩基配列より 5' 及び 3' プライマーオリゴヌクレオチドを合成し、RT-PCR により遺伝子発現を調べた結果、飛行群では地上対照群に比較してオステオカルシン遺伝子の発現が約 60% - 90% も抑制されることがわかった(図 6)。

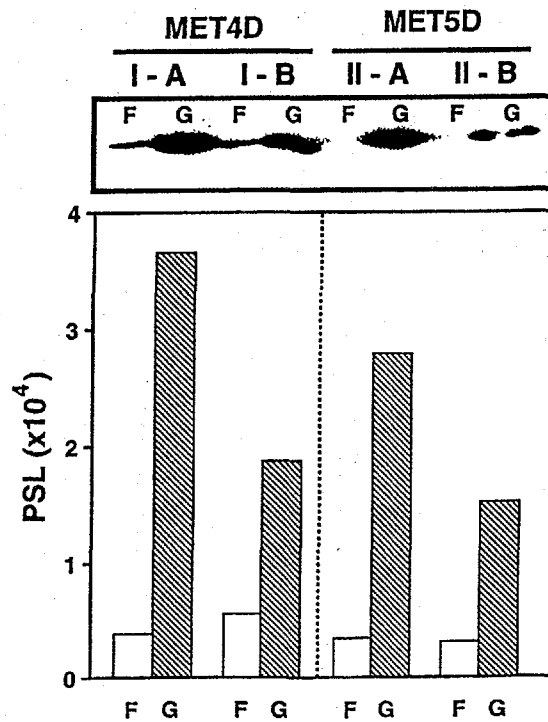


図 6 定量的 RT-PCR によるオステオカルシン遺伝子発現量の比較

以上により微小重力環境では骨芽細胞によるオステオカルシン産生が著しく低下し、その作用機序として、微小重力による同遺伝子の発現が抑制されたためであることがわかった。

### Transforming Growth Factor- $\beta$ 1 (TGF- $\beta$ 1)

培養液中では通常不活性型で存在するため抗体による認識が可能な活性型に変える必要がある。1 N 塩酸添加により活性型にしたのち中和し、通常の ELISA 法により培養液中の TGF- $\beta$ 1 を定量した。

活性型ビタミン D3 添加時では飛行群の TGF- $\beta$ 1 産生は軌道上 4 日目で平均 271 pg/ $\mu$ g DNA であり、地上対照群の平均 364 pg/ $\mu$ g DNA に比し約 26 % 抑制された。軌道上 5 日目では飛行群の平均は 45 pg/ $\mu$ g DNA であり、地上対照群の 274 pg/ $\mu$ g DNA に比し顕著に抑制された。ビタミン D3 非添加時では飛行群の平均は軌道上 4 日目で 181 pg/ $\mu$ g DNA であり、地上対照群の 360 pg/ $\mu$ g DNA に比し、約 50 % 抑制された。

### TGF- $\beta$ 2

培養液中の TGF- $\beta$ 2 は大部分が他のポリペプチドと複合体を形成し、不活性状態にあるため抗体に認識されない。そこで 1 M 酢酸含有液の状態にし、TGF- $\beta$ 2 を分離させたのち ELISA 法により吸光度測定後、定量した。

活性型ビタミン D3 添加時では、軌道上 4 日目の飛行群と地上対照群の間に TGF- $\beta$ 2 産生量の有意差はなかったが、軌道上 5 日目には飛行群の平均は 3.8 pg/ $\mu$ g DNA となり、地上対照群の 38 pg/ $\mu$ g DNA に比し、90 % もの TGF- $\beta$ 2 産生抑制現象が見られた。活性型ビタミン D3 非添加時では軌道上 4 日目の飛行群の TGF- $\beta$ 2 産生量の平均は 23 pg/ $\mu$ g DNA であり、地上対照群の 124 pg/ $\mu$ g DNA に比し、80 % 以上もの抑制となった(図 7)。

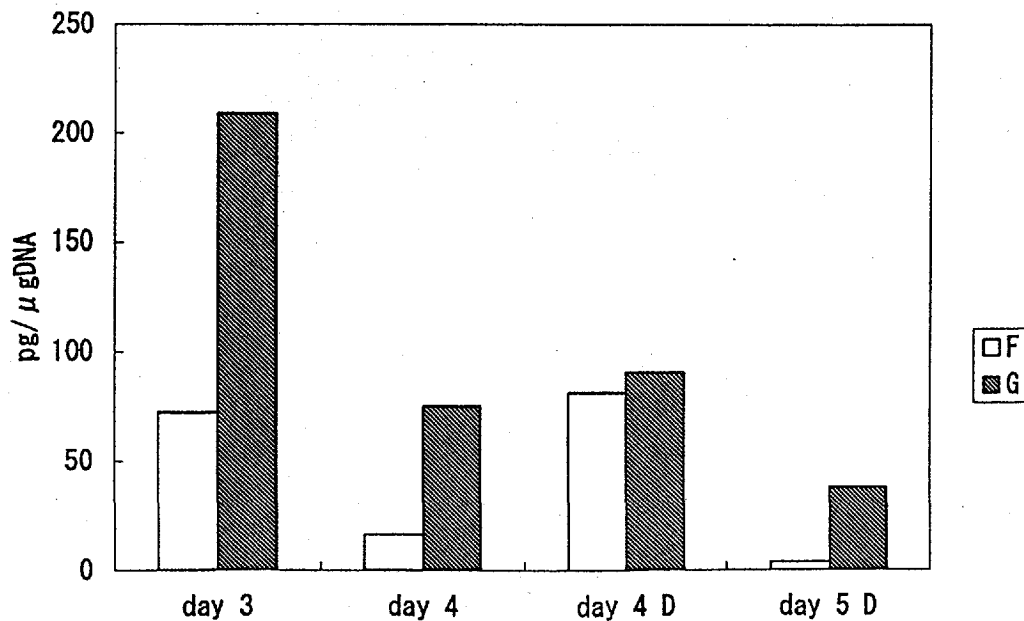


図 7 軌道上培養骨芽細胞の TGF- $\beta$ 2 合成・分泌  
横軸：培地回収日(ミッション経過日数)、D：活性型ビタミン D 添加  
F：飛行群 G：地上対照群

## インシュリン様増殖因子 IGF-I

IGF-IはIGF結合タンパクに強固に結合した状態で存在するため、IGF-Iの正確な定量を行うためには、酸-エタノールで分離させ冷却下沈殿により単離した状態でIGF-Iを回収し、抗ヒトIGF-I抗体を用いラジオイムノアッセイにより定量した。飛行群と地上対照群との間にはIGF-I産生量に有意な差は認められなかった。

## IGF-I結合タンパク(IGFBP)-3

IGFBP-3は直接ラジオイムノアッセイにより定量された。軌道上4日目までは飛行群、地上対照群ともにIGFBP-3量は検出限界(1 ng/ml)以下であった。軌道上5日目になると活性型ビタミンD3添加時において飛行群では平均30 ng/ $\mu$ g DNAのIGFBP-3産生が見られ、地上対照群の平均3.1 ng/ $\mu$ g DNAに対し約10倍の高い値を示した(図8)。

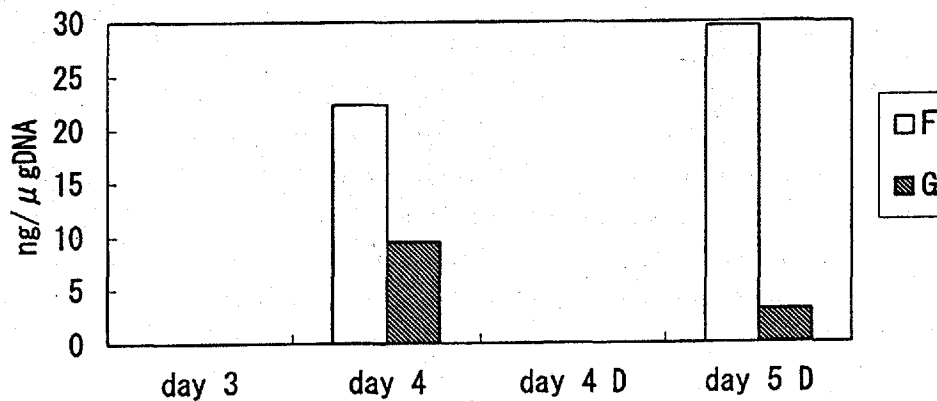


図8 軌道上培養骨芽細胞のIGFBP-3合成・分泌  
横軸：培地回収日(ミッション経過日数)、D：活性型ビタミンD添加  
F：飛行群 G：地上対照群

## 結論

飛行群、地上対照群ともにラット大腿骨由来、正常骨芽細胞の増殖は概ね良好であった。飛行群では地上対照群に比し、PGE2およびIGFBP-3の産生が亢進したのに対し、オステオカルシンおよびTGF- $\beta$ 1, 2の産生は逆に低下した。

PGE2は骨芽細胞が産生しオートクリン、パラクリンの作用することが報告されると同時に骨吸収促進作用を有することでも知られている。また骨吸収促進作用を示す副甲状腺ホルモンは骨芽細胞からIGFBP-3の産生・分泌を促進し、骨吸収促進後の骨代謝平衡維持に重要な役割を果たすともいわれている。さらにオステオカルシンは骨芽細胞により産生・分泌され、カルシウム沈着、骨形成に必須の骨基質タンパクである。TGF- $\beta$ は正常ラットの骨芽細胞に対し、その増殖を促進するとともに、コラーゲンの合成など、分化機能も促進するという骨形成には必須の分子であるが、その作用機序の詳細は解明されて

いない。

本研究により正常な骨形成および骨代謝に関与する骨芽細胞のもつ重要な機能が微小重力により影響を受けることが明確に示され、その作用点が明らかにされた。過去 20 年間不明であった宇宙での骨粗鬆症の原因を細胞レベルで解明したことは画期的なことと評価できる。

#### 参考文献

- 1) Schneider, V. S., Leblanc, A. D. and Taggart, L. C. Bone and Mineral Metabolism. In *Space Physiology and Medicine*, 3rd ed., ed. by A. E. Nicogossian et al., Lea & Febiger, Baltimore (1994). 327-333.
- 2) Horowitz, M. C. Cytokines and estrogen in bone: Anti-osteoporotic effects. *Science*. 260, 626-627 (1993).
- 3) Goode, A. W. and Rambaut, P. C. The skeleton in space. *Science*. 317, 204-205 (1985).
- 4) Maniopoulos, C., Melcher, A. H. and Sodek, J. Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cells Tissue Res*. 254, 317-330 (1988).
- 5) Stein, G. S., Lian, J. B. and Owen, T. A. Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation. *FASWEB J*. 4, 3111-3123 (1990).
- 6) Massague, J. The transforming growth factor- $\beta$  family. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 597-641 (1990).
- 7) Sporn, M. B. and Roberts, A. B. The transforming growth factor- $\beta$ s. In *Peptide Growth Factors and Their Receptors I*, ed. by M. B. Sporn and A. B. Roberts, Springer-Verlag, New York (1990). 419.
- 8) Unerwood, L. E. and Murphy, M. G. Radioimmunoassay of the somatomedins/insulin-like growth factors. In *Radioimmunoassay in Basic and Clinical Pharmacology*, ed. by C. Patrano and B. A. Peskar, Springer-Verlag, Berlin (1987). 561-574.
- 9) Daughaday, W. H., Mariz, I. K. and Blethen, S. L. Inhibition of access of basic somatomedin to membrane receptors and immunobinding sites. A comparison of radioreceptor and radioimmunological somatomedin in native and acid-ethanol extracted serum. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 51, 781-788 (1980).
- 10) Raisz, L. G., Pilbean, C. C., Klein-Nulend, Harrison, J. R. Prostaglandins and bone metabolism: Possible role in osteoporosis. In *Osteoporosis*, ed. by C. Chistiansen and K. Overgaard, Aalborg ApS, Denmark (1990). 253-258.
- 11) Rodan, S. B., Rodan G. A., Simmons, H. A., Walenga, R. W., Feinstein, M. B. and Raisz L. G. Bone resorptive factor produced by osteosarcoma cells with osteoblastic features is PGE<sub>2</sub>. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102, 1358-1365 (1981).
- 12) Akatsu, T., Takahashi, N., Debari, K., Morita, I., Murota, S., Nagata, N., Takatani, O. and Suda, T. Prostaglandins promote osteoclast-like cell formation by a mechanism involving cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in mouse bone marrow cultures. *J. Bone Miner. Res.* 4, 29-35 (1989).
- 13) Schmid, C., Schlapfer, I., Waldvogel, M., Zapf, J. and Froesch, E. R. Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates synthesis of insulin-like growth factor binding protein-3 in rat bone cells in vitro. *J. Bone Miner. Res.* 7, 1157-1163 (1992).
- 14) Bonewald, L. F. and Dallas, S. L. Role of active and latent transforming growth factor  $\beta$  in bone formation. *J. Cell. Biochem.* 55, 350-357 (1994).

## 外部発表

- 1) Kumei, Y., Whitson, P. A., Sato, A. and Cintron, N. M. Hypergravity signal transduction in HeLa cells with concomitant phosphorylation of proteins immunoprecipitated with anti-microtubule-associated protein antibodies. *Exp. Cell Res.* **192**, 492-497 (1991).
- 2) 桑井康宏. 高重力による培養細胞の増殖促進と遺伝子. *組織培養研究*. **11**, 77-81 (1992).
- 3) Hara, E. Subtractive cDNA cloning using oligo(dT)50-latex and PCR: Isolation of cDNA clones specific to undifferentiated human embryonal carcinoma cells. *Nucleic Acids Res.* **19**, 7097-7104 (1991).
- 4) 桑井康宏. 骨細胞の増殖・分化に及ぼす微小重力の影響. 第8回宇宙利用シンポジウム proceedings (1991). 154-156.
- 5) Kumei, Y. and Whitson, P. A. Signal Transduction and gene expression in HeLa cells at hypergravity. *17th International Symposium of Physiological Society, Barcelona* (1993).
- 6) 桑井康宏, 下川仁弥太, 片野尚子, 原 英二, 秋山英雄, 向井千秋, 長岡俊治, Whitson, P.A., Sams, C.F. 第12回宇宙利用シンポジウム proceedings (1995). 1-3.



## 宇宙空間における細胞性粘菌の分化 (SPORE)

代表研究者： 大西武雄\*<sup>1</sup>

共同研究者： 岡市協生\*<sup>2</sup>、松本英樹\*<sup>3</sup>

\*1 奈良県立医科大学、\*2 長崎大学 医学部、\*3 福井医科大学

Two strains of the slime mold *Dictyostelium discoideum*, a wild-type strain (NC4) and a radiation-sensitive mutant ( $\gamma$ s13), were used to investigate the effects of cosmic radiation and/or microgravity through the whole life span on cell morphology and cell differentiation. Dry spores of NC4 and  $\gamma$ s13 were placed in a slime mold cell culture kit with *Escherichia coli* cells. On the seventh day after launch, the growth condition of the amoebae that developed from the spores was checked and feeding was not detected. Therefore I investigated the growth condition of one control kit in the Biorack at KSC, and no growth of amoeba from the spores was evident. Since I could not complete the experiment, the experiment was terminated and the kit moved to a refrigerator. After this, I changed the purpose of the experiment to measure the effects of cosmic radiation on germination, cell growth and mutation frequency of the spores. All the spores of space sample and the controls of NC4 germinated, and the amoebae grew after the treatment. In  $\gamma$ s13, only the spores in one of the control samples germinated. We could not detect germination of spores in the space sample even after the germination treatment. There was no difference in the growth rate of amoebae between the space and control NC4 samples. The shapes of fruiting bodies formed by the amoebae were examined using spores sent into space or left on Earth as controls. There was no difference in abnormality of fruiting bodies between the space and the control NC4 samples. In addition, there was no difference between the mutation rate for the space sample and that of the control in NC4. From these results, it is suggested that cosmic environment may induce the depression of germination in  $\gamma$ s13 spores, but not in NC4 spores. In NC4, however, the cosmic environment is no effect on germination, cell growth, morphology and mutation frequency as compared as the ground control.

### 実験の目的、意義

宇宙空間での生命活動が現実化しつつある現在、宇宙空間で地上と同じような生命活動が営めるかどうかは、重要な問題である。例えば、受精から胎児の発生や成長の過程で、1個の受精卵から全身を構成するそれぞれの細胞への分化に、宇宙空間の微小重力や宇宙放射線が影響をもたらすのであろうか。この問題に対する基礎研究として、細胞性粘菌を用いてIML-2での実験を行った。

### 実験の方法と試料

#### 細胞性粘菌

細胞性粘菌は動物にも植物にも分類されている下等有核生物である。増殖時は大腸菌を



餌とし、光合成を行わず、アメーバの状態であり、あたかも動物のようである。しかし、餌を食べ尽くすと、それらアメーバは集合することにより、単細胞から多細胞の時代へと変身し、いくつものステージを経て最後には子実体となる。子実体の先には孢子嚢があり、その中に孢子が詰まっている。このように次の世代へは孢子で子孫を残すのはあたかも植物そのものである。したがって単細胞と多細胞また動物と植物といった進化から見ても極めて特徴のある生物であるといえる。しかもその染色体は4本であり、nの核相で生活できるので、さらにDNA損傷を修復できない放射線感受性株も樹立されており、放射線生物学の面からも極めて興味の大い生物でもある。今回用いた細胞性粘菌は放射線感受性株(ys13)とその野生株(NC4)の2種である。ys13のアメーバは、野生株NC4のアメーバに比べると、放射線に約100倍も感受性である。この孢子と乾燥した大腸菌をスペースシャトルで宇宙に持っていき、宇宙空間でリン酸バッファーを加えることにより孢子を発芽させ、増殖と分化のようすを観察する。

### 宇宙実験装置

実験装置は非常にコンパクトなものに、また、リン酸バッファーを加える操作もできるだけ搭乗員の作業時間の少ないものにした。図1は粘菌培養容器である。Aは上から見た図で、Bは横から見た図である。またCはリン酸バッファー液用注射筒である。まず、丸く切ったフィルター(a)をセットする。このフィルターに大腸菌が乾燥状態で付いている。上下に二箇所ある長方形の(b)部分にNC4とys13の孢子を染み込ませたパッドをセットする。プラスチックの枠(c)で上から押さえて、蓋をしてビスで留める。(d)部分には注射針が取り付けられていて、リン酸バッファー液用注射筒に突き刺してリン酸バッファーを注入する。(e)部分は注入時の空気抜き用の穴である。

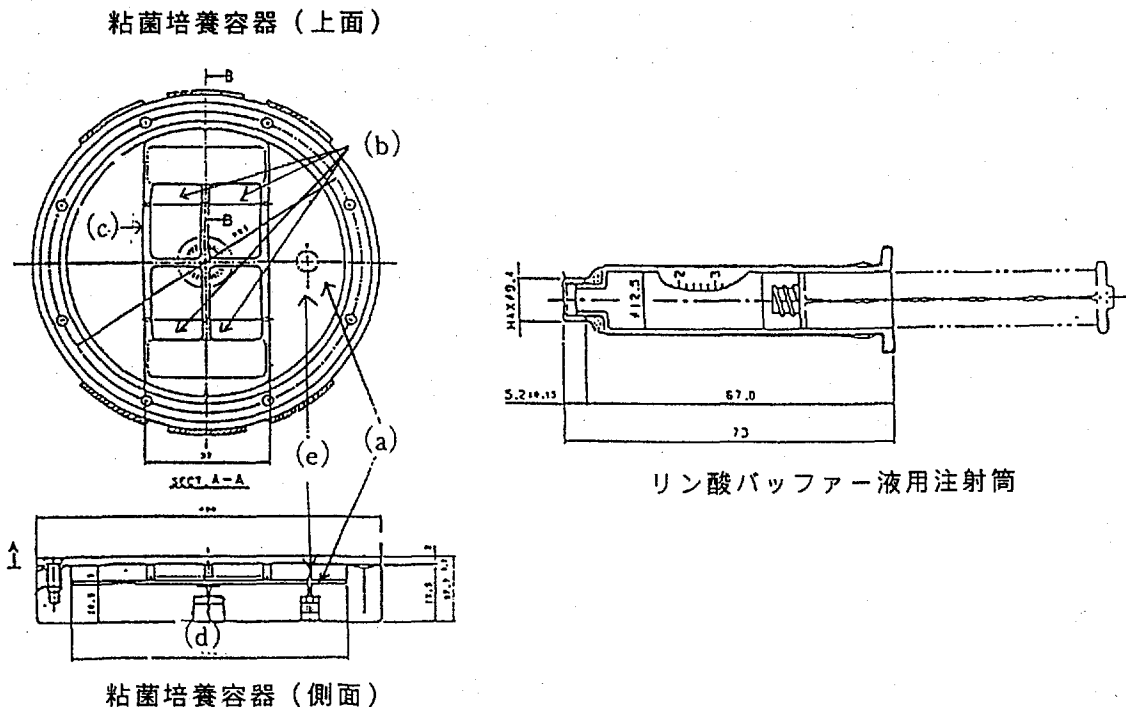


図1 細胞培養キット(細胞性粘菌培養用)

## 日本における予備実験

粘菌培養容器で最も効率良く実験できる系の確立。

- 1) リン酸バッファー液の液量  
培養容器が曇らないための最小のリン酸バッファー液の液量は、2.5 mlであった。
- 2) 大腸菌の濃度  
胞子が発芽して出てくるアメーバが一週間以内で、大腸菌を広い領域まで食べ、最大の子実体を作るのは、大腸菌が  $5 \times 10^{10}$  の濃度のときであった。
- 3) 胞子の保存温度  
胞子は、31 °Cで36時間まで保存しても正常に発芽した。

## ハンガーLにおける予備実験(1994年4月25日から5月13日まで)

日本から空輸した細胞性粘菌の胞子と大腸菌を用いて実験を行った。

### 実験

- 1) 細胞性粘菌の胞子と大腸菌はコンタミもなく生きた状態で輸送されていた。
- 2) 野生株(NC4)と放射線感受性株( $\gamma$ s13)の紫外線に対する生存率曲線をかいて株のチェックを行い、それぞれが正しい株であることを確認した。
- 3) それぞれの株で子実体を形成させ、正常な子実体を形成し、胞子ができることを確認した。しかし、室温が高いために(25 °C以上になる)子実体の形成はあまり良くはなかった。また、紫外線を照射したときに  $\gamma$ s13 で高率にダブルフルーツの奇形子実体が形成されることを確認した。(100 J/m<sup>2</sup>の紫外線で半数以上がダブルフルーツになった。)これも、室温が高いために成功率が低かった。(初めの1回はうまくいったが、後の2回は成功しなかった。)
- 4) ハンガーLで作った胞子と大腸菌を粘菌培養容器にセットし実験を行ったが、日本での予備実験のようによく成育せず、日本での半分以下(NC4で3 mm、 $\gamma$ s13で6 mm)で子実体もNC4は多数見られたものの、 $\gamma$ s13では3個という結果であった。

### 問題点

- 1) 室温が25 °C前後で、クリーンベンチ内は室温より2 °C程高く、時には28 °Cにも達し、22 ~ 23 °Cに最適温度を持つ細胞性粘菌には高温過ぎた。この為、クリーンベンチ内での作業により細胞性粘菌が死滅していたようである。特に、子実体を作るための操作は、非常に困難であった。
- 2) 細胞性粘菌を培養するインキュベーターの精度が悪く、10分程の間に上下1 °C程変

動を繰り返していた。この為、培養シャーレの蓋が曇り、胞子作製等に支障をきたした。

## 対策

- 1) 室温が高い点に関しては、操作を水中で行った。また、本番では低温室にグローブボックスを置いて、その中で操作ができるように手配した。
- 2) インキュベーターについても、本番ではより精度の高いものを使用できるように手配した。

## 飛行実験の結果

### サンプルの準備(1994年6月14日からシャトルの打上げまで)

#### 1) 大腸菌サンプルの作製

大腸菌サンプルの作製は、小型の液体振盪培養器で行った。この培養器は、一度に1リッターの培養しかできず、また、あまり強く振盪すると培養器内の液が飛沫となって培養容器にかかるため低い振盪数(250 rpm)でしか振盪できなかった。この為、本番用の大腸菌は、日本から輸送したものを使用することにした。

#### 2) 胞子サンプルの作製

使用した細胞性粘菌は、前回のハンガーLでの予備実験で使った NC4 と  $\gamma$ s13、今回新たに日本から輸送してきた NC4 と  $\gamma$ s13 である。

細胞性粘菌をエバラのインキュベーターで培養した。アメーバの増殖速度は NC4 と  $\gamma$ s13 共に十分速いものであった(2倍になるのに NC4 で約4時間、 $\gamma$ s13 で約6時間)。

紫外線による生存曲線を調べたところ、NC4 では正常な生存曲線が得られたが、 $\gamma$ s13 では室温が高い為か、紫外線を照射したものからは生き残ったアメーバが得られなかった。室温で 28 °C、インキュベーター内では 30 °C を越す場合もあった。実際の操作中には細胞性粘菌は 35 °C を越える温度にさらされることになると思われる。

そこで、35 °C での温度感受性を調べた。 $\gamma$ s13 のアメーバでは5分間の 35 °C 処理ですでに7割以下になり15分間処理では半数以下になっていた。NC4 のアメーバでは10分間の処理までは耐えるがそれ以上の熱処理により失活してゆく。一方、胞子では NC4 と  $\gamma$ s13 共に、25分間の熱処理に耐えた。子実体は、低温室に入れたグローブボックス中でアメーバをフィルターに広げ、その後 22 °C のインキュベーターに移し、2日間培養して作製した。アメーバに紫外線を照射して、奇形の子実体ができるかどうかを調べたところ、今回日本から輸送してきた  $\gamma$ s13 の奇形子実体の形成率が低かったが、他の株では期待通りの奇形形成率が得られた。

子実体から胞子を回収した。胞子を 4 °C で保存して何日間胞子の活性が持続できるかを調べた。胞子をリン酸バッファーに懸濁して N プレートに大腸菌と共に広げて発芽率を調べたところ、 $\gamma$ s13 では、3日目にすでに  $10^{-4}$  以下になっていた。NC4 では1週間の間高い発芽率を示した。胞子をリン酸バッファーに懸濁して大腸菌と共にそのまま 22 °C で振盪培養した場合は、 $\gamma$ s13 では5日間 4 °C で保存していたのものからはアメーバが生えてきたが、それ以上保存したものからはアメーバが出現しなかった。一方、NC4 では、9日間 4 °C で保存してあったものでもアメーバが生えてきた。

NC4の胞子は実験に使用できることが分かったので、今回日本より輸送してきた株より得た胞子サンプルをターンオーバーの当日に作製し使用することにした。

一方、ハンガーLで作った $\gamma$ s13の胞子の4°Cでの保存がきかないため、日本から別に輸送した胞子を用いて宇宙実験を行うことにした。この $\gamma$ s13は、日本で紫外線による生存率と奇形子実体の形成率を調べ、確かに $\gamma$ s13であることを確認してあった。

### 粘菌培養容器のセット

スペースシャトルが打上げられる前に、細胞性粘菌の胞子(NC4と $\gamma$ s13)と大腸菌を粘菌培養容器1個にセットし、リン酸バッファの入った注射筒を2本用意してNASDAに引き渡した。これらのセットはスペースシャトルに搭載され、1994年7月8日12時43分(米国東部夏時間)に打上げられた。

地上の対照実験用には、打上げ用のサンプル(A)と同時にセットした粘菌培養容器1個(B)と遅延用にセットした粘菌培養容器2個(C, D)の合計3個を用いることにした。

### 宇宙空間での実験

MET Day 02 / 13時45分に、宇宙空間でリン酸バッファが注入され22~23°Cで培養を始めた。地上では2時間遅れてリン酸バッファを注入しバイオラックに入れ22~23°Cで培養した。MET Day 07 / 13時38分に宇宙で観察したところ増殖がまったく行われていなかった。地上の対照実験でも増殖が認められなかった。MET Day 09に増殖と分化の様子をカムコーダで記録する予定であったが、予定を取り止め、MET Day 08 / 12時54分で冷蔵庫に移した。2時間後に、地上でもサンプルを冷蔵庫に移した。

### ハンガーLでの帰還後実験(シャトルが帰還した1994年7月23日から8月4日まで)

- 1) 宇宙に上がった粘菌培養容器1個(A)と、地上で対照実験を行った粘菌培養容器3個(B, C, D)のそれぞれから、NC4と $\gamma$ s13を別々に、胞子が付いているフィルター部分を切り取り、パッドと一緒に培養用のチューブに移し、リン酸バッファと大腸菌を加えて、22°Cで振盪培養した。結果は図2に示した。NC4では、宇宙に上がって帰ってきたサンプルと地上対照実験のサンプルすべてからアメーバが出現した(図2A)。一方、 $\gamma$ s13では地上対照実験用サンプルの3個の内の1個( $\gamma$ s13 D)からだけアメーバが出現した(図3A)。
- 2) NC4のサンプルで発芽しアメーバが出現したものでも、まだ胞子が残っていたので、発芽処理により残りの胞子からアメーバを出現させた。発芽処理は、胞子を0.4%のBrijに懸濁し、水中で5分処理した後、遠心により2回リン酸バッファで洗い、45°Cで30分間熱処理して行った。結果は図2Bおよび図3Bに示した。NC4では、宇宙に上がって帰ってきたサンプルと地上対照実験のサンプルすべてからアメーバが出現した(図2B)。一方、 $\gamma$ s13では地上対照実験用サンプルの3個の内の1個( $\gamma$ s13 D)からだけアメーバが出現した(図3B)。この結果は、発芽処理していない胞子からのアメーバの出現と一致する。

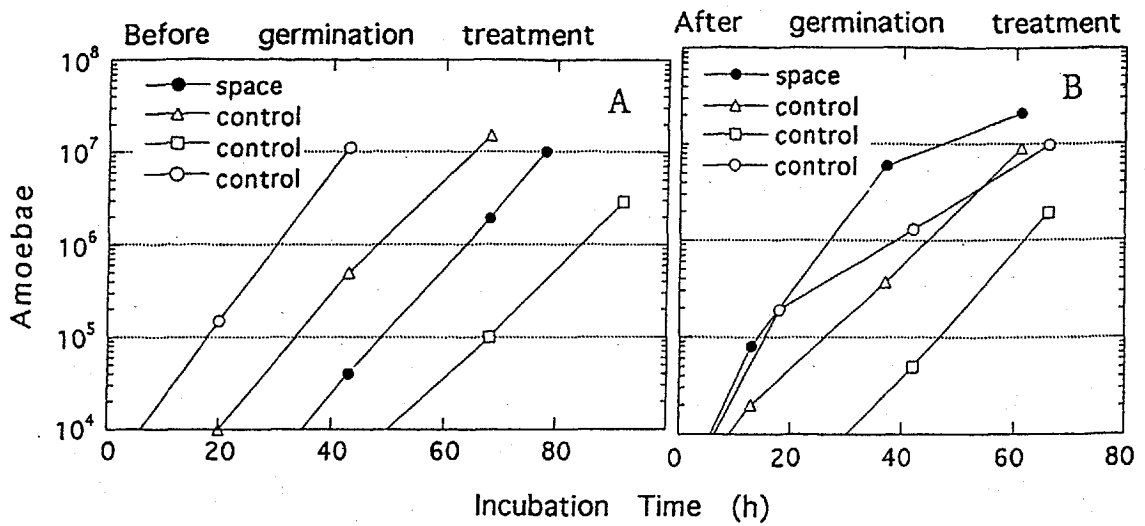


図 2 NC4 アメーバ増殖

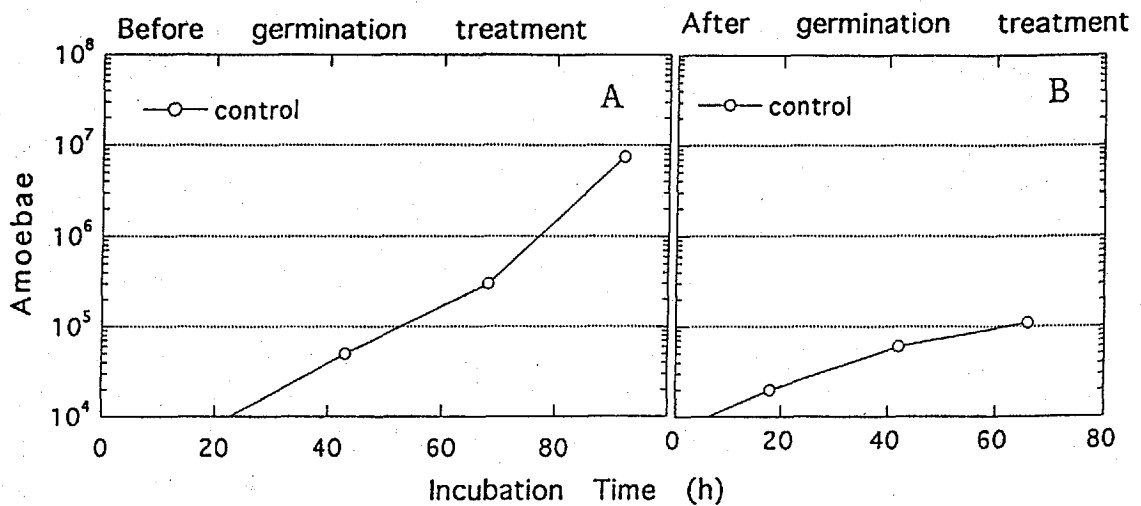


図 3  $\gamma 13$  アメーバ増殖

- 3) 出現した NC4 のアメーバの内、宇宙に上がったサンプルの NC4 A と、地上対照実験の NC4 B, NC4 C, NC4 D を一つにまとめた NC4 GT のふたつに分けて、アメーバのままプレート培地を広げて日本へ輸送した。 $\gamma 13$  D も同様にして日本へ輸送した。

## 解析と考察

### 日本での帰還後実験

#### 1) アメーバの増殖

宇宙に上がったサンプルの NC4 A と、地上対照実験を一つにまとめた NC4 GT、それに  $\gamma$ s13 D の増殖の様子を調べた(図4)。宇宙にあがったサンプルの NC4 A と、地上対照実験の NC4 GT とでは増殖速度に差はなかった。また、 $\gamma$ s13 D は確かに  $\gamma$ s13 株で、NC4 が混入したものではなかった。

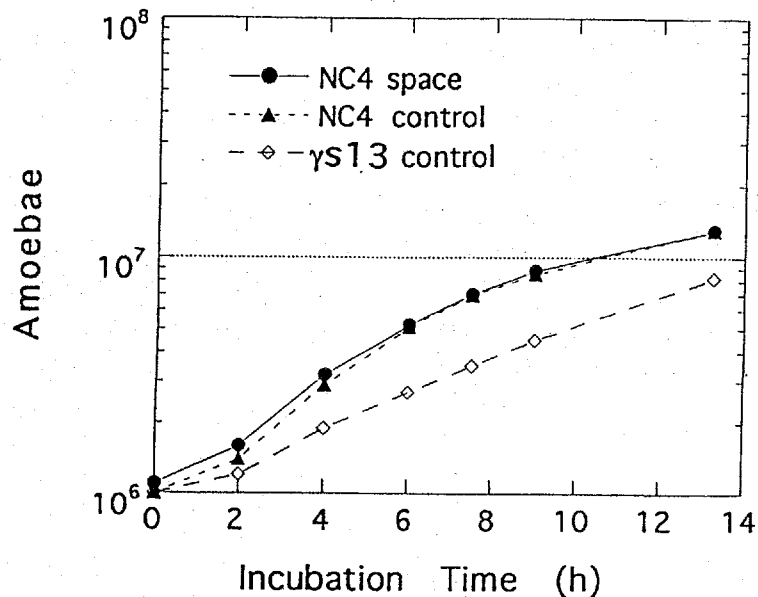


図4 アメーバ増殖速度

#### 2) 子実体の形成

宇宙に上がったサンプルの NC4 A と、地上対照実験を一つにまとめた NC4 GT、それに  $\gamma$ s13 D の子実体の形成を調べた。宇宙にあがった NC4 A に特に変異は認められず、地上対照実験の NC4 GT とのあいだに差はなかった。 $\gamma$ s13 D にも特に変異は認められなかった。

#### 3) 突然変異率の測定

宇宙に上がったサンプルの NC4 A と、地上対照実験を一つにまとめた NC4 GT、それに  $\gamma$ s13 D の突然変異率を調べた(表1)。突然変異率は3%のメタノールを含むN培地に  $10^7$  以上のアメーバと大腸菌を広げて、1週間以内に生えてきたメタノール耐性の突然変異体の数を調べるにより得た。NC4 A は  $1.3 \times 10^{-6}$ 、NC4 GT は  $1.5 \times 10^{-6}$  で宇宙に上がったサンプルと、地上対照実験のサンプルの間で特に差は認められなかった。なお、 $\gamma$ s13 D の突然変異率は、 $6.8 \times 10^{-7}$  であった。

表 1 突然変異誘発率

Strains	Samples	Mutation rate
NC4	Control	$1.5 \times 10^{-6}$
	Space	$1.3 \times 10^{-6}$
γs13	Control	$6.8 \times 10^{-7}$
	Space	—

#### 4) 宇宙放射線被曝線量の測定

宇宙放射線は X 線のような低 LET(線エネルギー付与)放射線、中性子や重粒子線のような高 LET 放射線からなっている。今回の宇宙実験では放射線感受性の γs13 を搭載することによって、野生型の NC4 に比して生物影響がおりやすい場合には、宇宙環境の微小重力の影響と考えるよりも、宇宙放射線の影響と考えればよいという想定のもとにおこなった。そこで宇宙放射線を測定するために細胞性粘菌の培養キットに放射線測定用フィルムを密着させた。したがって、バイオリックおよび冷蔵庫内での総被曝線量を求めたことになる。測定は 2 枚のフィルムによって行った。それらの測定結果は吸収線量で 1.08 mGy と 1.55 mGy、線量当量で 1.38 mSv と 2.31 mSv であった。

## 結論

今回は、残念ながら宇宙空間での細胞性粘菌の分化を観察することはできなかったが、宇宙空間に上がった胞子から発芽したアメーバの増殖、子実体形成、突然変異率の測定を行うことができた。その結果は、野生型 NC4 については地上対照群のものと差はなかった。つまり、今回のスペースシャトルでの飛行で、細胞性粘菌に遺伝的な変異を起こしたという証拠は見られなかった。しかし放射線感受性株である γs13 については、宇宙飛行した胞子からアメーバが発芽しなかった。それは宇宙放射線あるいは微小重力それともそれらの相互作用によるかもしれないが、KSCハンガー L の地上サンプルのうち発芽しなかったものもあったので、必ずしも宇宙環境によるとは言い難い。もし、次にチャンスがあるならばもう一度同じ実験を宇宙で行い、宇宙での細胞性粘菌の分化を調べたい。

なぜ本番の実験で細胞性粘菌が増殖しなかったのか。

考えられる可能性を以下に列挙した。

- 1) 使用した培養容器が、本番が初めての使用であった為、洗浄不十分等の理由で細胞性粘菌に有毒なものを含んでいた。
- 2) ハンガー L で用いたリン酸バッファの水が細胞性粘菌に適した良い水でなかった。(ミリ Q の水を使用したか、ときどきミリ Q の調子が良くないときがあった。)

## 参考文献

- 1) Okaichi, K., Kajitani, N., Nakajima, K., Nozu, K. and Ohnishi, T. DNA damage and its repair in *Dictyostelium discoideum* irradiated by a health lamp light (UV-B). *Photochem. Photobiol.* **50**, 69-74 (1989).
- 2) Ohnishi, T. Possible induction of abnormal differentiation in *Dictyostelium discoideum* by cosmic radiation and low gravity. *J. Space Tech. Sci.* **4**, 29-34 (1988).
- 3) Ohnishi, T. and Deering R. A. Mechanism of strand breakage of DNA in UV-irradiated *Dictyostelium discoideum*. *Coun. Sci. Res. Integr.* **7**, 15-18 (1988).
- 4) Ohnishi, T., Hazama, M. and Nozu, K. Abnormal differentiation in *Dictyostelium discoideum* by furofuramide, mitomycin C and methylmethanesulfonate. *Jpn. J. Genet.* **62**, 265-269 (1987).
- 5) Tano, K., Ohnishi, T., Sato, S. and Nozu, K. Characteristics of DNA repair of a UV-sensitive mutant (*radC*) of *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Gen. Genet.* **195**, 385-389 (1985).
- 6) Ohnishi, T., Hazama, M., Okaichi, K. and Nozu, K. Formation of non-viable spore of *Dictyostelium discoideum* by UV-irradiation and caffeine. *Photochem. Photobiol.* **36**, 355-358 (1982).
- 7) Ohnishi, T., Eimoto, H. and Okaichi, K. Enhancement of ultraviolet or N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine sensitivity of *Dictyostelium discoideum* by 3-aminobenzamide. *Photochem. Photobiol.* **35**, 515-519 (1982).
- 8) Nozu, K., Ohnishi, T. and Okaichi, K. Pyrimidine dimer formation and germination of UV-irradiated spores of *Dictyostelium discoideum*. *Photochem. Photobiol.* **35**, 587-589 (1982).
- 9) Ohnishi, T., Okaichi, K., Ohashi, Y. and Nozu, K. Effects of caffeine on DNA repair of UV-irradiated *Dictyostelium discoideum*. *Photochem. Photobiol.* **33**, 79-83 (1981).
- 10) Nozu, K., Ohnishi, T. and Okaichi, K. Viability of the spores formed after UV-irradiation in *Dictyostelium discoideum*. *Photochem. Photobiol.* **32**, 261-263 (1980).
- 11) Murata, Y. and Ohnishi, T. *Dictyostelium discoideum* fruiting bodies observed by scanning electron microscopy. *J. Bacteriol.* **141**, 956-958 (1980).
- 12) Ohnishi, T. and Nozu, K. Ultraviolet effects on killing, fruiting body formation and the spore of *Dictyostelium discoideum*. *Photochem. Photobiol.* **29**, 615-617 (1979).

## 外部発表

## 出版物

- 1) 岡市協生, 大西武雄. 宇宙空間における細胞性粘菌の分化. *宇宙生物科学*. **8**, 4-11 (1994).
- 2) 大西武雄. 宇宙空間での細胞性粘菌の細胞分化の研究. *宇宙生物科学*. **4**, 16-21 (1990).
- 3) 大西武雄. 細胞性粘菌の宇宙生物学への利用 —分化異常を指標として—. *放射線生物研究*. **24**, 97-104 (1989).
- 4) Ohnishi, T. Possible induction of abnormal differentiation in *Dictyostelium discoideum* by cosmic radiation and low gravity. *J. Space Tech. Sci.* **4**, 29-34 (1988).



学会発表

- 1) 大西武雄. 宇宙空間における遺伝子の発現(細胞性粘菌及びラットの癌抑制遺伝子). 第17回宇宙ステーション利用計画ワークショップ, 東京(1995).
- 2) 大西武雄. 第2回国際微小重力実験室(IML-2)の概要 宇宙空間における細胞性粘菌の分化. 日本宇宙生物科学会第8回大会, 奈良(1994). S-4.
- 3) 岡市協生, 大西武雄. 宇宙空間での細胞性粘菌の発生・分化. 京大・原子炉シンポジウム(1994).
- 4) 大西武雄. 宇宙空間での細胞性粘菌の分化. 宇宙基地利用シンポジウム, 京都(1994).
- 5) 大西武雄. 無重力状態での細胞性粘菌の分化. 宇宙生物学シンポジウム, 京都(1994).
- 6) 岡市協生, 大西武雄. 紫外線照射した細胞性粘菌の加重力環境での分化. 日本放射線影響学会第36回大会, 広島(1993).
- 7) 岡市協生, 井原 誠, 大西武雄. 紫外線照射した細胞性粘菌の加重力環境での分化. 日本宇宙生物科学会第7回大会, 東京(1993). 10.
- 8) 岡市協生; 森 俊雄, 大西武雄. 細胞性粘菌放射線感受性株の修復特性. 日本放射線影響学会第35回大会, 大津(1992). 2-A-11.
- 9) 大西武雄. 宇宙空間での細胞性粘菌の分化・増殖の研究. 第7回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1990). 224-226.
- 10) 大西武雄. 宇宙空間での細胞性粘菌の分化. 琵琶湖シンポジウム(1990).
- 11) 大西武雄, 岡市協生. 宇宙放射線による細胞性粘菌の分化異常. 第5回宇宙利用シンポジウム, 東京(1988).
- 12) 大西武雄. 細胞性粘菌の放射線による分化異常. 京大・原子炉シンポジウム(1985).

# Gravity and the Stability of the Differentiated State of Plant Somatic Embryos (PEMBSIS)

Principal Investigator: A. D. Krikorian \*<sup>1</sup>

Co-investigators: Stefania A. O'Connor \*<sup>1</sup> and R. P. Kann \*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> Department of Biochemistry and Cell Biology, State University of New York at Stony Brook

IML-2 carried an experiment to evaluate cell division and somatic embryo progression in space. Test materials comprised embryogenic cells of daylily (*Hemerocallis*), a system which has been well-characterized in this laboratory from a developmental cell biology, physiology and chromosome structure perspective. A modest test (sample size = two "petri dishes") on an earlier spaceflight (STS-57, J Mission) using the same system suggests that we are justified in using embryogenic cells of daylily as a model system for the study of space effects on cell division and development and chromosome structure in *in vitro* cultured cells in space. Cells with double nuclei and breaks were found in space samples but not in controls. Embryogenic initials are distributed on a membrane, placed on activated charcoal impregnated filter paper which is placed on a semi-solid nutrient medium held in place by a waffle-like support in a metal Petri-dish. Twelve dishes were flown in the IML-2 mission. Six dishes were designed to allow fixation in space. Half (3) were fixed on flight day 12. The other dishes served as controls. Flight samples showed chromosomal damage whereas ground controls did not. Furthermore, epidermal development of flight samples was considerably poorer than ground controls. Materials fixed in space were adequate for study but quality of fixation achieved in flight was poorer than that obtained post-flight. Nevertheless, the results show that perturbation is real and not an artifact of re-entry or post-flight adaptation etc. No 1-G controls were run in Space. Hence we speak not of the "effect of  $\mu$ -G on developing somatic embryos" but of the "effect of space flight factors". (Supported by NASA: NAGW-1529 and NAG100070.)

## OBJECTIVE

The immediate and narrowly focussed question being asked is :-  
Are mitosis and chromosome behavior in developing plant cells modified by the space environment?

## BACKGROUND

Research in microgravity provides the vehicle to pursue basic plant science research activities across a broad spectrum of species. It allows concentration on those near- and intermediate-term science questions and needs which are so crucial to the development of a

reliable data base.

Over the years, many investigators have addressed these needs from the perspective of thematic research. The long range planning activities have focussed especially on how one can use the unique characteristics of the space environment, especially microgravity, to increase our understanding of life and its processes, and to understand how gravity affects, and has shaped, life on Earth.

Various panels and working groups have asked: How can we use gravity, primarily microgravity, to answer questions about plant development or physiology? What are the experiments needed to understand the effects of gravity on plants?

The themes may be consolidated under three broad categories. (1) to understand the role of gravity in the control of development at the whole plant, organ and cellular levels; (2) to understand the role of gravity in regulating metabolic and cellular processes in plants; (3) to understand the mechanism(s) of gravity sensing and the transduction of this information. In each of these categories, the use of variable G to manipulate and understand the thresholds is an integral part of the experimentation.

Some attention has been given over the years to such questions as:--

- 1) What systems, organs, organelles, substances, developmental stages, etc. exhibit sensitivity to gravity?
- 2) What are the systems, organs, organelles, substances, developmental stages, etc. that sense gravity?
- 3) What are the hypotheses that should be proposed to understand this sensitivity?
- 4) What hypotheses concerning plant development and physiology can be tested by manipulating gravity in the microgravity range?
- 5) What research is required to test these hypotheses?
- 6) What ground-based studies should be initiated to improve and refine the proposed hypotheses?
- 7) What special spaceflight conditions, facilities and equipment are required to conduct the research to test these hypotheses?

How cells manage without gravity and how they change in the absence of gravity are basic questions which only prolonged life on a Space station will enable us to answer. We know from the experience acquired so far from investigations carried out on various kinds of Space vehicles and stations, profound physiological effects can and often do occur. We need to know more of the basic biochemistry and biophysics both of cells and of whole organisms in conditions of reduced gravity. The unique environment of Space affords plant scientists an unusual opportunity to carry out experiments in microgravity but some major challenges

must be faced before this can be done with confidence. Various laboratory activities that are routine on Earth, take on special significance and offer problems that need imaginative resolution before even a relatively simple experiment can be reliably executed on a Space Station. For example, scientists might wish to investigate whether adaptive or other changes which have occurred in the environment of Space are retained after return to Earth-normal conditions.

Gravitational plant biologists have, of course, given considerable thought to the kinds of changes in response that might result from exposing plants to  $\mu$ -G in the Space environment. There are a number of situations in which orientation with respect to 1-G are already known to alter the response. Gravitropism of organs, especially roots and shoots is well known, has been extensively studied and the role of specialized cells, or statocytes is known to be central to this phenomenon. Gravitaxis has been much less extensively studied. Similarly, gravimorphogenesis, such as the formation of reaction wood, the breaking of buds and its relationship to apical dominance, or the determination of position of organ emergence or even the determination of the type of organ or cell formed have been very inadequately studied.

In addition to these categories of inquiry, one can expect as yet unidentified situations where the "Earth normal" (1-G) condition is required--that is,  $\mu$ -G might be expected to eliminate a response, i.e. have a qualitative effect. These are essentially unidentified or unknown at present; indeed virtually all aspects of plant physiology and development are potential candidates. It will not be a trivial matter to disclose these situations and to validate them using rigorous scientific methods.

Last but not least are instances where  $\mu$ -G would be expected to alter a response, i.e. have a quantitative effect. For example, the extent and nature of lignification might be expected to be different in  $\mu$ -G because a system undergoing lignification would be less G-"loaded". Also in this category, and minimally understood at present, is the area of investigation which asks the question "What effect does  $\mu$ -G have on cells that are not specialized for G-sensing?" And, "What effect does  $\mu$ -G have on developmental, physiological and reproductive processes?" etc. (See Table 1 on the following page).

In my own work carried out at Stony Brook, pure science issues have been dealt with, but the thematic approach referred to above has also provided for an optimal progression of experiments aimed at defining and isolating various operational problems related to intermediate-term experiments on plant systems.

The more immediate work derives its impetus from two kinds of space flight findings made by us. The first is that when embryogenic somatic cells of carrot were exposed to a  $\mu$ -G environment in small petri dishes in a Soviet Biosatellite for nearly 3 weeks, the broad events of asexual embryogenesis occurred but the progression from one developmental stage to another was slowed down, specifically at the point where advanced embryonic forms with a distinct root and shoot pole was to have developed. Access, somewhat later, to roots of seedlings grown on US Shuttle missions as "mid-deck experiments" by scientists doing space investigations with objectives that did not directly require their using all available roots (and hence the "extra" roots might otherwise have been discarded), enabled me as a "guest investigator" to study the chromosomal status of roots of oats and sunflower. Evaluation or monitoring of karyological status was used as an indicator of general cell "health" and status of the plants.

Table 1 Some expected changes in plant response as a result of exposure to  $\mu$ -G in the Space environment. (From Krikorian, in press).

---

A. Situations in which orientation with respect to 1-G is already known to alter the response

gravitropism

- organs, especially roots and shoots
- specialized single cells, e.g. statocytes

gravitaxis

gravimorphogenesis

- formation of reaction wood
- bud break/apical dominance
- determination of position of organ emergence
- determination of the type of organ or cell formed

epinasty

- B. Unidentified situations where "Earth normal" (1-G) is required--that is,  $\mu$ -G might be expected to eliminate a response, i.e. have a qualitative effect
- unknown at present, "everything" is a potential candidate

- C. Situations where  $\mu$ -G would be expected to alter a response, i.e. have a quantitative effect

lignification?

- unknown at present, e.g. What effect does  $\mu$ -G have on cells that are not specialized for G-sensing?

What effect does  $\mu$ -G have on developmental, physiological and reproductive processes? etc.

---

Karyological disturbances including chromosome breakage, deletions and translocations were encountered, along with much-reduced levels of cell division in oats and sunflower but not in mung bean (*Vigna radiata*) where, however, level of cell division in root tips was still much reduced. These findings were interpreted as cell level indications of potentially substantive problems to be overcome before growth of plants in space could be reliably carried out.

Procedures were developed for a mid-deck locker experiment which would yield root tips for subsequent cytological examination, especially for metaphase chromosome aberration assay. Roots of a chromosomally well-characterized liliaceous monocotyledon (*Hemerocallis*, a garden daylily,  $2n = 22$ ), and a composite dicotyledon, *Haplopappus gracilis*, were initiated under aseptic conditions from rooted shoots which were trimmed on Earth less than one day prior to lift-off, i.e. at the latest possible moment. The two species were grown in NASA's Plant Growth Unit (PGU) equipped with an air exchange system (AES), a device that permitted mid-deck cabin air to be passed through a HEPA filter and then through the individual growth chambers (so-called plant growth chambers, PGCs) which in turn were inserted into the PGU. We have developed daylily as a model system capable of going from embryogenic cells to fully differentiated, clonal plants which can survive in the field, and have worked on it extensively. Along with the daylily, *Haplopappus gracilis* was

chosen because it, too, has well-characterized chromosomes--the lowest number among higher plants,  $2n = 4$  --and we have done a lot of work on it *in vitro*. Both systems offered additional advantages at the so-called operational level because plant materials can be well-managed, for instance they can be cloned, manipulated biologically in ways not possible with seedlings and grown in the low light--an environment which is characteristic of the PGU. Three distinct but clonal *Haplopappus* population types were used: (1) capitulum (flowering head)-derived tissue culture plantlets; (2) two lines of aseptic seedling clones initiated from pre-sterilized, germinated seeds, and (3) apex-derived tissue culture plantlets. These clonal *Haplopappus* populations were selected because of differences in gross morphology, growth rates, branching pattern, frequency of floral bud initiation and mode of root production (e.g. adventitious vs. regenerative direct). Since it has not yet been possible to achieve fixation in flight with materials from the plant growth chambers of the PGU, fixation (with colchicine for metaphase arrest) for chromosome studies was performed so as to study cells in their first division on Earth. Control fixations on both flight and "ground" materials were also performed with direct fixations as well to eliminate any potential role of an enhanced sensitivity response of  $\mu$ -G-exposed root meristems to colchicine--i.e. to avoid any sort of artifact. Briefly, the results showed that even though shoot growth and root production occurred, flight samples generally performed worse than ground controls and there were significant negative effects on chromosomes in both species. Dosimetry data, as in other US Shuttle missions, indicated that levels were low (order of 5 mrad/day) and thus well below those expected to have any effect on chromosome structure.

Roots of *Haplopappus* clones that were characteristically of the most mature phenotype (capitulum-origin) showed lower levels of damage when contrasted with those that were more immature, i.e. from trimmed (rootless at the initiation of the space experiment) seedling clones. The daylily showed chromosomal damage both in root tips and basal meristems (leaf base areas). The number of roots produced by daylily in the flight because of the flight duration was fewer than those produced by *Haplopappus* but we could look at daylily leaf base meristems to supplement root tip data (basal meristems are found primarily in the monocots). There were statistically significant ( $p < 0.01$ ) differences between each of the five flight PGCs. An especially interesting feature of that experiment was that each population of plantlets in PGC #3 showed much reduced levels of chromosomal damage. We have no way of knowing why this was so. In theory, PGC 3 should have been a replicate of PGC 4 and PGC 5. Because of hardware idiosyncrasies that need not be gone into here, we have hypothesized that there was an increased air flow in PGC 3 and that might have acted as counter-measure to the aberrations encountered. Specifically, the more drying brought about by increase water evaporation, the less damage. Because there is no way to simulate on Earth the  $\mu$ -G environment for longer than the briefest of periods, it would be essential to carry out a microgravity experiment in space to resolve that issue using a rather complicated, impractical protocol that one cannot envision being possible in these early stages of co-operative experimentation on MIR or the mid-deck of the Space Shuttle or even the Space lab.

I concluded some time ago that as a result of our flight experience, which has been both satisfying and frustrating, that experiments designed to be done in space in NASA's Plant Growth Unit, an apparatus originally designed to grow small seedlings for what is termed

"experiment-specific" (that is, not generic) purposes, are difficult to manage aseptically, a condition which I maintain is absolutely necessary to get unequivocal data, and is very labor-intensive to use even for ground based work. Moreover, some important environmental parameters such as air flow and water delivery, are, or at least were under the original design, impossible to measure, monitor, maintain and or even document with precision. This is recognized by NASA, of course, and the plan is to modify and incrementally improve the apparatus or to design new ones so as to minimize these problems for future experiments. But this will require considerable testing and validation before any new hardware is rendered and validated as reliable. Even then, one is still confronted with the problem of studying cellular mechanisms with an intact plant. The advantage of cell cultures is apparent. But this is dependent on demonstrating that cultures can be reliably dealt with in the context of a space experiment. This is not a trivial matter<sup>5)</sup>.

Totipotent cells cultures are able to provide all the advantages of a developing plant system. Cells taken from the various organs of the higher plant body can be nurtured and grown on nutrient media so as to elicit morphogenetic capacity and to stimulate cell divisions in such a way as to get structures that can make organized growing regions of shoot, root and even to yield an entire embryo, a so-called somatic embryo. Thus, one is not only working at the cellular level but also at the level of cells that are morphogenetically competent and able to express this competence provided the conditions are permissive.

We are trying to use aseptically cultured, embryogenic cells of the garden daylily (*Hemerocallis*) as a model for the study of development in higher plants both on earth and in the space environment (microgravity). The use of cells which can develop and pass through all stages of embryogenesis rather than seedlings or fully mature plants is preferred since the material is clonal, doesn't take up much room and it is considerably easier to achieve the kind of environmental control over the system necessary to separate direct from indirect effects of microgravity.

It will be apparent that the questions posed are broad and fundamental.

The immediate and narrowly focussed question being asked is :-

Are mitosis and chromosome behavior in developing plant cells modified by the space environment?

## METHODS

### Initiation and maintenance of embryogenic suspensions

Embryogenic suspensions of a diploid daylily clone (*Hemerocallis* cv. "Autumn Blaze") were derived from vegetative shoot apex using methods that have been outlined elsewhere<sup>6), 7), 11)</sup>. The process of generating the suspension originated in this case with an apex excised from a greenhouse grown plant on 3 November 1988, and placed in 50 ml of liquid medium in a 250 ml erlenmeyer flask and rotated on a horizontal shaker at ca 100 rpm. The initial nutrient medium consisted of Murashige and Skoog salts and "vitamins"<sup>13)</sup>, 100 µM iron EDTA<sup>14)</sup>, supplemented with coconut water 10 % v/v and 9 µM 2,4-D [2 mg/l], 560 µM inositol, and 87.6 mM sucrose adjusted to pH 4.5 with 1 N

KOH solution. Routine medium sterilization was by autoclaving for 20 minutes at 126 °C and 103 kPa. Cultures were grown in darkness at 22 °C and 40 % RH and the callus culture was reduced to a finely sievable suspension by 15 December 1989. Thereafter, cultures were maintained in the same medium except that kinetin 4.6 µM [1 mg/l] was used in place of coconut water and pH was lowered to 4.5. Serial subcultures were made at 3 week intervals in nipple culture flasks<sup>8)</sup> using material sieved through a number 60 screen (230 micrometer pore size) (Selector Tissue Sieves, E-C Apparatus, St. Petersburg, FL).

#### **Preparation of embryogenic cells and inoculation onto semi-solid medium in Flight-Qualified Petri Dish-type Chambers**

A highly responsive inoculum capable of yielding somatic embryos was obtained by passing the suspension sequentially through number 40, 60, 80, 100, 200 and 400 mesh sieves (380, 230, 190, 140, 74 and 37 µm pore size respectively) and washed with DS 5 a medium<sup>17)</sup>. Settled cells of the final 200 to 400 fraction were distributed by pipetting 0.20 ml aliquots onto each of four 3 cm long washed, single-thickness Spectrapor membrane strips (Fisher Scientific, Cat. No. 8 667B, size. 64 INF), placed on a 8.2 cm diameter circle of activated charcoal-impregnated filter paper (# 508, Schleicher and Schuell, Keene, NH). The charcoal paper rested on 75 ml of DS 5 a nutrient medium made semi-solid with 1.2 % w/v washed National Formulary grade agar<sup>16)</sup>.

#### **NASDA's Spaceflight-Qualified "Plant Cell Culture Chamber"**

The embryogenic daylily cells prepared and inoculated in this way were allowed to incubate in an anodized aluminum petri-dish type chamber made available by the National Aeronautics and Space Development Agency of Japan (NASDA). The bottom of the dish is outfitted with a honeycomb insert (secured in place by means of a spring) to prevent dislodging of the semi-solid substrate. There is Velcro on the dish by which attachment may be achieved. An opening which permits aseptic ventilation via a 25 mm diameter TF-450 Gelman filter (HT-450 Gelman No. 66221 actually used) is located in the lid. An O-ring lubricated with silicone lubricant ensures a good seal.

Plant Cell Fixation Chambers were utilized as well. These chambers allow fixative to be introduced into the dish.

A synchronous ground control was carried out in identical dishes; additional synchronous ground controls were performed using 100 x 15 mm presterilized plastic petri dishes containing a final volume of approximately 45 ml of medium. These plastic petri dishes were wrapped with a thin strip of Parafilm to secure the lid.

#### **Post-flight or Analysis after Recovery**

Chromosome analysis is carried out by examining materials fixed with the mitotic arresting agent (a so-called cytostatic) colchicine. These analyses rely mainly on squashes of randomly selected embryos pulled off their support surfaces in the petri dishes. Structure of chromosomes is determined.



## 1) Chromosome Methods

Relevant fractions of unorganized cell suspensions were collected by sieving through a filtering pan, rinsing with the DS 5 a basal medium (no sugar but with 560  $\mu$ M inositol and "vitamins"), and resuspending in 0.2 % w/v colchicine (Calbiochem-Behring) solution in  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  in water and allowing it to remain for about 3.5 hours at 4 °C in darkness in preparation for metaphase analysis. Somatic embryos at various stages of development and plantlets generated from them but maintained *in vitro* were handled in the same way. Samples were rinsed with BMS prior to fixation in cold absolute alcohol-glacial acetic acid (3:1, v/v) for a total of 3 changes and allowed to stand for 48-72 hours. Hydrolysis was done by 1 N HCl at 58-60 °C for 15-20 minutes. Staining was done by a modified Feulgen procedure for 1-2 hours, soaked in tap water from 15 minutes to overnight in a refrigerator to remove excess stain and squashed in acetocarmine<sup>10)</sup>. Photographs of chromosomes were made on a Zeiss Photoscope using Kodak Technical Pan film (TP 135). Counts of cells in division were carried out at using a 40 X lens and photographed under oil immersion. Five to ten representative cells at metaphase with well spread and favorably condensed chromosomes were selected for measurement and comparison within and between cultures. All measurements were made with a compass on 3340 X glossy photographic enlargements of the chromosomes that were mounted on millimeter graph paper. Long arm, short arm, total chromosome length and centromeric index measurements were used to construct idiograms. Relative length was determined by dividing the length of the total haploid genome times 100. The terminology used to describe chromosome morphology and type follows that of Levan et al. (1964). Controls consisted of karyotyped, diploid normal embryogenic suspensions and plantlets derived from them using the same regeneration methods.

## 2) Assessment of Embryogenic Response

Somatic embryo production was qualitatively scored at the end of the experiment after petri dish inoculation and at weekly intervals in the controls up to 4 weeks. A positive score for somatic embryogenesis consisted of recognition of various stages of somatic embryogenesis characteristic for daylily (cf. refs. 17 and 11). Germination of somatic embryos and rearing them to rooted plantlets *in vitro* was done by transferring randomly selected embryos of different stages of development to Schenk and Hildebrandt (1972) medium (hereafter referred to as BSH).

## Some Details of the Spaceflight Mission

Embryogenic cells of a diploid daylily clone (*Hemerocallis* cv. Autumn Blaze) grown in suspension culture on the basal salts of Murashige and Skoog supplemented with 3 % sucrose and 10 % v/v coconut water and 2 mg/l 2,4-D were sieved so as to obtain a 200-400 (74 to 37 micrometer size range) fraction. Test dishes were inoculated at the Stony Brook laboratory and taken in a reduced temperature cooler (12 °C) by commercial airline to Kennedy Space Center where they were maintained in a darkened incubator at 22 °C. "Late access loading" enabled the dishes, appropriately packed and cushioned, to be installed into a

mid-deck locker of the Shuttle orbiter some 13 hours before scheduled lift-off.

The IML-2 experiment was launched at 12:43 p.m. on July 8, 1994 (EDT); landing was 6:38 a.m. on July 23, 1994 (EDT), thus making it 14 days 17 hours and 55 minutes. The shuttle was STS-65 (Columbia). Orbital altitude was 300 km (circular orbit) at 28.5 degrees inclination.

The experiment was largely passive but also involved introduction of fixative into three of the dishes with buffered glutaraldehyde. That means that only half of the dishes that could accommodate fixation in space were fixed (three out of six); three out of the six that could have been fixed were not fixed. Six dishes that could not accommodate fixation remained fixed.

After recovery, materials were flown by commercial carrier to New York, taken to the Stony Brook laboratory and processed. The materials were photographed and fixed within nine hours of landing and we thus were able to catch cells well before their first division cycle could be completed on Earth.

## FLIGHT RESULTS

Adherence to lift-off and recovery schedules made this experiment relatively convenient to carry out.

We were able to demonstrate by means of this experiment that the embryogenic daylily system can provide a very useful model for the study of plant growth and development in space.

A major potential problem entailing the use of plant cells for plant space biology experimentation was obviated in this experiment. It is well known that plant cells grown in vitro offer special challenges to investigators due to their inherent nature. For example, the common procedure utilized by many investigators interested in animal and microbial cell is to purchase cell lines from commercial sources. Plant cell investigators do not have this option for a number of reasons and hence need always to initiate and grow their cells in their own laboratories. When plant cells are grown on a large scale, as for space biology experimentation, this creates logistical problems. These logistical problems involve need in many instances for highly specialized growing equipment and facilities, the long lead time needed to generate, select and maintain cell lines with known characteristics makes it impractical to set up operations at a place like Hangar L, Kennedy Space Center. Moreover, the very nature of plant cell cultures makes it necessary to have a certain amount of redundancy as to availability of cells in a particular physiological or morphological state for a given timeframe of experimentation. Given the realities of space flight and the potential uncertainty of time of lift-off etc. a host of potential difficulties emerge in connection with plant cell use. For the present, these are best dealt with by growing cells in the investigator's laboratory and setting up the experiment in the laboratory and then by one means or another, transporting the cells in a state of quiescence or arrest to the place of lift-off<sup>5)</sup>.

The IML-2 experiment gave us an opportunity to test this concept of preparing material in the P.I.'s laboratory and transporting it to Kennedy Space Center. Similarly, it deemed

useful to assess the possibility of processing material at Stony Brook after recovery, rather than at the landing or recovery site. This has the potential of enabling the investigator to be able to work in familiar surroundings with the option of being able to make on-site, even last minute decisions as to how to handle materials. Again, it would be very impractical to prepare for all eventualities at the recovery site, especially if the primary landing site was changed to the "secondary landing site". In these days of limited budgets, it makes it far more practical to have personnel accessible who may in fact not be "paid for" by the flight project. In short there are a number of valid reasons for seeking to work with plant cells in a form of "remote" scientific activities.

The experiment was a success from the perspective of being able to carry out the cell preparation and somatic embryo evaluation after recovery at Stony Brook. Thus the concept of carrying out a successful experiment via a "remote" science principal investigator was validated.

Fixation in Space using the Plant Cell Fixation Chambers was achieved. While the subjective evaluation of the fixation carried out in space indicates that the fixation is not as good as that carried out on earth using more sophisticated methods, it shows that fixation in space can be achieved with some degree of confidence provided adequate precautions are taken. This precautionary proviso is given here since we did not have adequate and timely access to the plant cell fixation chamber (i.e. the fixable metal petri dishes) with enough lead time to work out all details of the fixation. Moreover, there is considerable concern over the utilization of glutaraldehyde-based fixatives in the space environment for a variety of valid safety concerns.

Results of the examination of material fixed in space using a single glutaraldehyde fixative demonstrated that the cytological changes and chromosomal aberrations encountered by us in previous spaceflight missions are real. That is they are not apparently not due to various situations that might accompany re-entry. Since they are present in both ground fixed and space fixed material, then it seems justified that we "save ourselves" the immediate "bother" of becoming pre-occupied with space-based fixation. The results are essentially the same, although the earth-based fixations are more elegant, easier to interpret, and hence much easier to work with. The outcome of this is that one will have to resolve issues of cytological "elegance" and temper it against expediency and practicality as to what is more readily feasible in the space environment.

- 1) The responses included a substantial number of binucleate cells in flight samples. These binucleate cells are not uniformly present throughout individual somatic embryos that were scored but were present among normal, uninucleate cells. The ground control samples are uniformly uninucleate.
- 2) Since our methodology for karyotype analysis involves treatment of cells and somatic embryos with colchicine, we have been cautious to eliminate the possibility of an increased sensitivity of the flight-exposed cells to colchicine, leading to a doubling of the nuclei. We can effectively eliminate this interpretation since both flight and ground controls were fixed as well **without colchicine** and the presence of double nuclei in flight samples holds, whereas no ground controls ever showed double nuclei.

- 3) Serial sampling and examination of flight samples after recovery, beyond what we refer to as sampling 1 (i.e. the first sampling after recovery) indicates that the number of binucleate cells diminish in some samples but do not disappear in any. This could be interpreted as adaptation and it may be that plant cells adapt to space.
- 4) We are rearing some embryos into plantlets of both flight and controls to see the outcome. This information is too early to report despite the "final" nature of this report. Daylily simply takes several years to rear to maturity.
- 5) In addition to the condition of double nuclei, aberrations in chromosome structure such as breaks, micronuclei and microchromosomes have been encountered as well. See Table 2 for detailed results.

Table 2 Summary of scorings of daylily (lumped without regard to embryo stage from 542,086 unambiguous division figures in 231 individual somatic embryos.  
Note: some features may be present more than once in a given cell.

	Flight Fixed (Direct) [%]	Flight (Unfixed in Space but Direct Fixed on Earth) [%]	Ground Control (Direct Fixation)	Ground Control (Colchicine Fixation)
dividing cells	1.4	1.8	6.1	6.5
micronuclei	6.1	4.2	-	-
double nuclei	4.3	4.7	-	-
bridges	2.0	1.6	-	-
breaks	3.6	4.2	-	-
severe fractures	1.8	3.0	-	-
"ring" chromosomes	0.3	1.0	-	-

## DISCUSSION

There are many as yet unanswered questions about plant cell development in microgravity. We know, of course, that all development entails an orderly progression of cellular events both in terms of time and geometry (dimensional space). Work done by us on Soviet Kosmos 782 and 1129 biosatellites using morphogenetically competent carrot cells which could undergo somatic embryo formation showed that while the broad events of asexual embryogenesis could occur, the transition from one stage to another was slowed down. The system used for the Kosmos experiments involved the generation of embryogenic cells, their induction on Earth to produce proembryos, and their subsequent

exposure to space conditions to evaluate their capability of expressing their capacity to form later stage somatic embryos. The fidelity of the developmental pathway of cells to proembryos to later stages of embryogeny could thus be scored. Similarly, the broad temporal aspects could be traced. The experimental design had its limitations however--especially insofar as the temporal aspects were concerned. There was no onboard fixation; neither was a 1 G centrifuge available on the 1129 flight. Moreover, we had at that time no capability of performing karyotype analysis on carrot since the chromosomes are so small.

Table 3 shows that the same kind of results were obtained with daylily during the IML-2 flight. The percentage of embryogenic initials that advanced in space was less than that achieved on earth. Furthermore, the level of epidermal fidelity was much reduced in the flight samples. This suggests that the Kosmos results were, in fact, more reliable than might have been supposed. (I never felt completely comfortable with the Kosmos results since there was a substantial lag between preparation of cells and lift-off, and because we had minimal control over the disposition of the materials once they left our hands in Moscow.

Table 3 Summary of scorings of daylily somatic embryos developed in space (with regard to embryo stage and development of epidermal "finish") from 1,000 individual somatic embryos. Figure in brackets following values for "stage" indicate the level of development of the epidermal "finish" (i.e. integrity of the epidermal layer). Note that space grown embryos do not have as good a finish as those that are generated on earth. This means that the cells that make up the epidermis have not stabilized and are perturbed by some spaceflight-associated factor.

	Flight Fixed (Direct) [%];	Flight (Unfixed in Space but Direct Fixed on Earth) [%]	Ground Control (Direct Fixation)	Ground Control (Colchicine Fixation)
Stage 1	221 [15]	165 [13]	101 [37]	97 [42]
Stage 2	327 [22]	401 [20]	226 [53]	200 [55]
Stage 3	400 [48]	403 [43]	331 [85]	359 [87]
Stage 4	52 [53]	31 [51]	342 [93]	344 [90]

Since that period when our knowledge of plant development in space was virtually non-existent, other pieces of information have emerged. A particularly interesting feature of plant growth in space that we have encountered involves varying manifestations of perturbation(s) to the cell division process. Modifications in cell division, detected at the level of the chromosomes--ranging from slight to extreme--have been found in a number of instances. But whereas most species examined have shown the perturbations, all test specimens have not. This has raised questions in our mind as to whether mechanisms of information transfer or signalling through the various parts of the cell occurs normally in space. We have wondered, for instance, whether the chromosomal or cell division changes we have observed are the outcome of indirect effects that are manifested only if a certain

constellation of parameters or conditions are fulfilled. These conditions could, for instance, be brought about by subtle interactions between cell surfaces or among any of the special features of the space environment such as altered metabolic gas levels or modified water relations. We have also wondered whether small aseptically cultured, developing cell units might respond differently from "whole plants" or if there are thresholds of sensitivity in terms of both G level and time, i.e. is there a finite period of cell division disturbance prior to an adaption to the low G or space environment? Obviously, cells must be able to divide normally and to partition their genetic information (via chromosomes) with high fidelity if sustained and efficient plant growth is to occur in space. In short, plant cells need to get their signals straight and to process them accurately.

Alterations in the karyology of somatic embryos developed in space clearly occurred in the IML-2 mission somatic embryos.

It is becoming increasingly apparent that the results are real. Centrifuge 1-G controls will have to be run to ascertain whether the effects are due to  $\mu$ -G or due to spaceflight related factors.

The following questions emerge:-

**Q:** Are any of the chromosome effects noted attributable to radiation damage?

**A:** Radiation dosimetry data obtained in the past by radiation specialists on our behalf from passive radiation detectors (thermoluminescent detectors) flown in the actual flight package have been interpreted as representing levels "typical" of the level expected for shuttle flights of the duration and orbital characteristics of the mission flown. The same is true of other missions using plants studied by Krikorian and his group. The levels encountered (which are on the order of 10 mrad tissue absorbed dose or dose rate of 10 mrad/day) would not seem sufficient to account for the degree of chromosomal damage observed.

Specific information from the IML-2 data are not yet available to us in digested form.

**Q:** Might there be synergism between microgravity and radiation?

**A:** It has been suggested by some investigators that there may be synergism. However, unless there is major synergism between microgravity and rather low levels of radiation, it seems unlikely that radiation alone is responsible for the chromosome effects encountered. The only way to be certain though is to use shielding, and to re-run the experiments.

**Q:** Have any plants flown in space and showing chromosomal and cell division perturbations and damage been grown to maturity after recovery?

**A:** The daylily material from the IML-2 flight needs to be "grown out" and reared to maturity. But material from earlier flight shows that there is a correlation between what the plants "look like" (so-called phenotype) after they are grown out and the extent of initial damage experienced at the somatic embryo stages.

**Q:** Is it not true that cells with damaged chromosomes will die and be deleted from the "pool" of cells that divide (and hence one might raise the question whether this is all

interesting but academic and hence really a moot point)?

**A:** Yes, indeed cells showing extreme damage will die. Gross chromosome aberrations themselves are probably unimportant since the majority are removed by so-called diplontic selection (that is during meiosis in sexual reproduction). But there is very strong evidence that most agents or conditions that increase chromosome aberrations also increase frequency of point mutations. I would doubt seriously that this does not occur in flight-grown specimens though we have not yet analyzed for that in a detailed way since the species we have been concerned with so far are not the best ones to pursue that point. All the indications are that a mutational event(s) occur in the space material.

**Q:** What is the cause of the observed imperfections in the cell division process?

**A:** At this juncture we are not certain of the cause or causes of the anomalies although we are quite certain that they are real and not artifacts of analysis. Hormonal perturbations, failure or imperfections in processing of various "communicative" signals between cells, and modifications to plant cell water relations are all candidate "causes". The level of cytological perturbations encountered have varied considerably from flight to flight, ranging to severe to quite modest. This suggests that subtle, and apparently un- or under-appreciated factors have not been taken fully into account from flight experiment to flight experiment. A major variable that has existed in the experimentation thus far is level of development, species and duration of spaceflight exposure. Steps are being taken to test these systematically and with increased appreciation of TOTAL control.

The "bottom line" is that plants can tolerate and even accumulate chromosome aberrations; less severe chromosome aberrations or modifications to the genome such as variation in number of chromosomes, translocations and inversions etc. are totally tolerated and passed on.

The question arises as to whether the changes observed are representative of a sort of space adaptation. The changes may represent modifications to enable survival. Alternatively, the basis of the damage in the first place may be due to DNA repair mechanisms are adversely affected in space.

[So far, Krikorian refers to the changes are being brought about by space flight factors, not microgravity. Centrifuge controls need to be done in space and thus far this has not been possible!]

## CONCLUSIONS

- 1) The IML-2 experiment, while a modest experiment, shows real promise in enabling us to extend our earlier findings on atypical nuclear and chromosome behavior in space-grown plant materials.
- 2) We believe we can demonstrate convincingly through tests of this sort that cultured, embryogenic cells can serve as models for the study of development in higher plants in

space environments and in microgravity. This means it will be considerably easier to achieve the kind of control over the system necessary to separate direct from indirect effects and thus enable us to move towards resolving the still many outstanding questions. We hope that some of these can be resolved in future flights

The level and fidelity of division achievable in higher plant cells on Earth, even when they are randomly oriented and the effects of G are neutralized by means of rotating clinostats, is not sustained in their counterparts during or immediately after Space flight. Karyological changes in root cells of Shuttle grown oats, mung bean and sunflower, daylily (*Hemerocallis*) and *Haplopappus gracilis* have been encountered in seedlings and aseptic tissue cultured propagules. Significant chromosomal damage (between 3 and 30 %) that alters subsequent cell division potential perforce leads to reconfigured cell division centers. Less extreme karyotype changes (deletions and translocations) modify genetic make-up and continued development. Declining cell division and chromosomal damage and mitotic disturbances are not explainable on the basis of radiation dosimetry data. The apparent malfunctioning of spindles and phragmoplasts (future cell wall sites) in these same cells suggests a perturbation in the interdependence of differentiated microtubule configurations in mitosis. Clearly, Space flight can significantly affect level of cell division and chromosome partitioning in plant cells. Whether this is a manifestation of altered signal processing or is a "stress" response to reduced gravity remains to be tested. Since plant cells undergo virtually no movement during development and the plane of cell division and subsequent enlargement determine morphology, modification in either should have important consequences for plant development during protracted exposure to Space.

Clearly more experimentation is in order to resolve outstanding issues.

## REFERENCES

- 1) Albrecht-Buehler, G. Possible mechanisms of indirect gravity sensing by cells. *ASGSB (the American Society for Gravitational and Space Biology) Bulletin*. 4 (2), 25-34 (1991).
- 2) D'Amato, F., Bennici, A., Cionini, P. G., Baroncelli, S. and Lupi, M. C. Nuclear fragmentation followed by mitosis as mechanism for wide chromosome number variation in tissue cultures: Its implications for plant regeneration. In *Plant Cell Cultures: Results and Perspectives*, ed. by F. Sala, B. Parisi and R. Cella, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam (1980). 67-72.
- 3) Fitter, M. S. and Krikorian, A. D. Variation among plants regenerated from protoplasts of a diploid daylily. In *Progress and Prospects in Forest and Crop Biotechnology* ed. by F. Valentine, Springer-Verlag, New York and Berlin (1988). 242-256.
- 4) Krikorian, A. D. Mitotic disturbances in space-grown higher plant systems: Significance for understanding developmental, metabolic state-specific and stage-specific mechanisms and sensitivity to effects of the space environment. *Fifth Annual Space Radiation Health Investigator's Workshop*, Houston TX (April 27-28, 1994). Abstracts, 10-12.
- 5) Krikorian, A. D. Strategies for 'minimal growth maintenance' of cell cultures: A



- perspective on management for extended duration experimentation in the microgravity environment of a Space Station. *Botanical Review*. In press (1996).
- 6) Krikorian, A. D. and Kann, R. P. Plantlet production from morphogenetically competent cell suspensions of daylily. *Annals of Botany*. 47, 679-686 (1981).
  - 7) Krikorian, A. D., Kann, R. P. and Fitter Corbin, M. S. Daylily. In *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 5, ed. by P. V. Ammirato, D. A. Evans, W. R. Sharp and Y. P. S. Bajaj, McGraw-Hill Publishing Company, New York (1990). 375-412.
  - 8) Krikorian, A. D., Kann, R. P., O'Connor, S. A., Fitter, M. S., Cronauer, S. S. and Smith, D. L. The range of morphogenetic responsiveness in aseptically cultured daylily tissues and cells. In *Progress and Prospects in Forest and Crop Biotechnology* ed. by F. Valentine, Springer-Verlag, New York and Berlin (1986). 82-98.
  - 9) Krikorian, A. D., Kann, R. P. and O'Connor. An experiment to probe spaceflight effects on cell division in embryogenic plant cells. *ASGSB (the American Society for Gravitational and Space Biology) Bulletin*. 8 (1), 10 (1994). (Abstract).
  - 10) Krikorian, A. D., O'Connor, S. A. and Fitter, M. S. Chromosome number variation and karyotype stability in cultures and culture-derived plants. In *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1, ed. by D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato and Y. Yamada, Macmillan Publishing, New York (1983). 541-581.
  - 11) Krikorian, A. D., Kann, R. P. and Smith D. L. Somatic embryogenesis in daylily (*Hemerocallis*). In *Biotechnology in agriculture and forestry*, Vol. 31, *Somatic embryogenesis and synthetic seed II* ed. by Y. P. S. Bajaj, Springer-Verlag, Berlin and New York (1995). 285-293.
  - 12) Lee, M. and Phillips, R. M. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 39, 413-437 (1988).
  - 13) Murashige, T. and Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15, 473-497 (1962).
  - 14) Singh, M. and Krikorian, A. D. Chelated iron in culture media. *Annals of Botany*. 46, 807-809 (1980).
  - 15) Smith, D. L. and Krikorian, A. D. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. *American Journal of Botany*. 76, 1832-1843 (1989).
  - 16) Smith D. L. and Krikorian, A. D. Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: External pH control over morphogenesis. *American Journal of Botany*. 77, 1634-1647 (1990).
  - 17) Smith, D. L. and Krikorian, A. D. Growth and maintenance of an embryogenic cell culture of daylily (*Hemerocallis*) on hormone-free medium. *Annals of Botany (London)*. 67, 443-449 (1991).
  - 18) Krikorian, A. D. Embryogenic plant cells in microgravity. *ASGSB (the American Society for Gravitational and Space Biology) Bulletin*. 4 (2), 65-72 (1991).
  - 19) Krikorian, A. D. and Steward, F. C. The morphogenetic responses of cultured totipotent cells of carrot (*Daucus carota* var. *carota*) at zero gravity. *Science*. 200, 67-68 (1978).
  - 20) Krikorian, A. D. and Levine, H. G. Development and growth in Space. Chapter 8. In *Plant Physiology: A Treatise*, Vol. X, series ed. by F. C. Steward, and volume ed. by R. G. S. Bidwell, Academic Press, Orlando (1991). 491-555.

## 電気泳動による線虫 *C.elegans* の染色体 DNA の分離 (CHROMOSOME)

代表研究者： 小林英三郎\*<sup>1</sup>

共同研究者： 石井直明\*<sup>2</sup>、広川 健\*<sup>3</sup>、長岡俊治\*<sup>4</sup>

\*<sup>1</sup> 城西大学 理学部、\*<sup>2</sup> 東海大学 医学部、\*<sup>3</sup> 広島大学 工学部、\*<sup>4</sup> 宇宙開発事業団

Free flow electrophoresis of a nematode *C. elegans* DNA was carried out using a Free Flow Electrophoresis Unit (FFEU) on the spacelab of a space shuttle flight STS65/Colombia. The electrophoresis experiment were performed by payload specialists under microgravity. During the experiment, the house keeping data of the FFEU and the electrophoretic migration profiles by a UV detector were down-linked and monitored at POCC (Payload Operations Control Center) of MSFC (Marshall Space Flight Center, Alabama) according to the real-time down-link system. Separation profiles of migration markers observed as the three dimensional electropherogram (3DEP) were very stable in comparison with that obtained on the ground, indicating that disturbance of electrophoretic migration caused by thermal convection did not occur under microgravity. Furthermore, the 3DEP made it possible to assess the separation behavior of the samples and then to request the necessary sample fractions to be collected by payload specialists. Post-flight analyses of the component DNA of the fractionated samples revealed that the DNAs were separated effectively into two peaks: one of them contained seven folds of a DNA component estimated by a *sod-4* gene probe against an *unc-6* probe on linkage group III and X, respectively, after the amplification by the PCR method. The others were the same in that ratio. These results suggested that this separation technique was suitable for separating biological macromolecules such as DNAs, and the separation efficiency of the FFE under microgravity environment was very high.

### 実験の目的、意義

無坦体電気泳動 (FFE: Free Flow Electrophoresis) は、分離槽に充填物を使わずに電気泳動を行うので、低分子物質はもとよりタンパク質、核酸などのような高分子をはじめ、超分子や細胞顆粒などの巨大サイズの物質の分離には特に有用である。<sup>1)</sup> 近年、生体情報物質である DNA の単離は分子生物学の重要な技術になり急速に発展しており、解析対象の DNA 断片は 1M base pair を超えている。これら巨大 DNA の分離には Pulse Field Gel Electrophoresis により分離することが試みられているが<sup>2)</sup>、ゲル坦体を用いた電気泳動ではゲルマトリックスの空間サイズに限界があるので、染色体および染色体 DNA などの粒子や巨大分子を分離すること、および DNA 再構成実験や DNA 配列実験に必要な十分な量を得ることは困難である。一方、FFE は CFFE (Continuous Free Flow Electrophoresis) と呼ばれ、電気泳動原理に基づく分離方法の中で、大量処理にはもっとも適した方法である。<sup>3)</sup> 我々はこの FFE の pH 勾配を形成する分離原理 IEF (Isoelectric Focusing)<sup>4)</sup> を用い、染色体 DNA の巨大断片の大量分離を目的としている。地上では pH 勾配を形成させるため高電圧を与えると、分離槽内で起こる熱対流は避けることが出来ず、低電圧では長時間の泳動を余儀なくされる。これに対し微小重力環境下では熱対流がないので高電圧での電気泳動が可能で効果的な電

気泳動分離が期待出来る。

FFEでの分離試料として線虫(*Chaenorhabditis elegans*: *C. elegans*)染色体DNAを選んだ。線虫 *C. elegans* は動物の基本体制である生殖機能、神経系、筋肉、消化器官などを有し、細胞系統樹が完成している。<sup>5, 6)</sup> この虫は雌雄同体が基本であるが、一方、X染色体不分離により雄が出現するため両者の掛け合わせにより遺伝的解析ができ、また雌雄同体からは劣性突然変異体が分離してくるため遺伝子地図の作成が容易である。*C. elegans* の染色体は雌雄同体で5AA+XOであり、また半数体DNA含量は100 Mbでヒトの1/30であるので、ヒューマングノム計画に先駆け、完全なDNA配列を決める適切な候補となるべき生体でもある。<sup>7)</sup> さらに *C. elegans* の遺伝子の多くは広範囲にわたり哺乳類の遺伝子と類似していることも、この生物を先駆候補として取り上げる理由である。FFEによりDNAを分離する技術は、真核生物の完全なDNA配列決定および機能の解明に大きく貢献することになる。

宇宙で行う生命科学の実験は生物あるいは生体試料を地上に持ち帰り分析することが多い。宇宙での実験機会が少ないことを考慮すると、オンボードアナリシスにより得た結果を即座に解析し、そのプロジェクトの行われている間に研究の展開をはかることが必要である。さらに実施が間近い宇宙ステーションでの研究においても、その期間が長いことから、オンボードアナリシスでの結果を踏まえて研究の効率的な展開をはかる必要がある。FFE装置は微小重力環境を利用する効率の高い分離装置となるばかりではなく、オンボードアナリシスに対応できる生体試料の分離・分析の”キー・システム”として機能することが期待できる。

## 実験の方法と試料

### 無坦体電気泳動装置 (FFEU: Free Flow Electrophoresis Unit)

今回の計画で使用したFFEU装置は宇宙開発事業団が開発し、三菱重工業神戸造船所で製作されたもので、主な仕様を次に示す。

FFEUタイプ	泳動槽内寸法	供給電力	分画本数
FM (Flight Model)	100 × 60 × 4.0	600 V × 100 mA	60
BBM (Bread Board Model)	100 × 60 × 1.0	600 V × 100 mA	60

FFEU/FMは電気泳動槽厚を4 mmとし、電気泳動槽器壁で生じる電気浸透流を軽減すること、および電気泳動分離緩衝液の層流を安定にすることを目的に、無坦体電気泳動原理の理想に近づく装置として設計されている。しかしながらこの装置を地上で使用するとジュール熱発生による熱対流が大きく、効果的な分離実験を行う電圧での電気泳動を行うことが出来ない。地上で行う電気泳動最適条件を検討するための基礎実験には電気泳動槽厚が1 mmの熱勾配が小さいBBMを用いた。またFMは飛行実験搭載実機であるが、電気泳動実験計画の最終検討および飛行後実験にも使用した。

### 3D エレクトロフェログラム (3DEP: Three Dimensional Electropherogram)

FFEU装置は電気泳動槽下部に電極間方向と平行に512チャンネルの吸光度モニター(254 nm)を装備しているので、電気泳動分離挙動を10秒置きに観測することができる。FFEUから発生する信号はFFEUサブユニットのディスプレイ上で、X軸をモニターチャン

ネル方向(分取ポート番号5から55に対応)、およびY軸を吸光度としたエレクトロフェログラムとして表示されるが、10秒置きにリフレッシュされるので連続した電気泳動の状態変化を観察することは困難であった。

この問題を解決し、電気泳動状態をより詳細に解析するために新たに3DEPプログラムを開発した。<sup>9)</sup> このプログラムはFFEUサブユニットに用いられたX軸、Y軸に加え10秒ごとのエレクトロフェログラムをZ軸(時間軸)とした3次元グラフで表わしたエレクトロフェログラム(3DEP)を表示するものである。無加電および加電状態のサンプルの流下安定性を初めとし電気泳動状態の過渡現象、サンプルの分離状況など時間的変化をもとに電気泳動を的確に判断することができる。3DEPはFFEU/FMおよびFFEU/BBMを使用した地上実験で検証し、飛行実験時のPOCC(Payload Operations Control Center)において、スペースシャトルからダウンリンクされるデータをリアルタイムで受信し3DEPに表示する速度を維持できるものとした。プログラムはノート型パーソナルコンピュータ NEC/98 Note nx/c上で実行し、これをFAM(FFEU Absorption Monitor)として用いた。ダウンリンク・データサンプリングから3DEP表示までは1.8秒とデータ間隔10秒以内に納まり、余剰時間でデータのハードコピーを得ることができるなど、今回の目的に十分適合するものとした。さらにこのシステムは小型なポータビリティが高いコンピュータであり、プログラムもMS-DOS上で作成してあるので、他の支援ソフトともデータの互換性が高く、オンボードアナリシスに対応するものである。

#### 宇宙実験用DNAサンプルおよび泳動緩衝液の調製

今回のスペースシャトルの飛行計画は13日間と長期にわたるので、全ての装置、器具、および溶液は無菌的扱いをし、さらに溶液は気泡および溶存気体の除去を行った。

線虫のDNAは0.5g(wet wt.)の成虫をProtease K、phenol/chloroform、RNaseで順次処理し、エタノール沈殿を行いTE緩衝液に溶解した。電気泳動用DNAサンプルにはマーカーであるアデノシンとNADPをそれぞれ5mM加えた。DNAの終末濃度は、33.3 $\mu\text{g/ml}$ に調製し、pHは6.05、電気伝導率は440 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ であった。DNAサンプル溶液3mlを脱気後サンプルカセットに充填し、2本を宇宙実験用とした。分離回収用のセパレーションチューブ30本には、DNase阻害剤である10mM EDTAを0.5mlずつ充填した。電気泳動分離用緩衝液は0.01% HPMCおよび0.3% ampholite(Pharmalite 2.5-5)からなり、pHは3.87、電気伝導率は87 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ であった。この溶液1.5Lをデガッサーで脱気した後メンブランフィルターを通しバッファタンクに充填した。サンプルカセット、セパレーションチューブおよびバッファタンクはスペースシャトル発射17時間前に搭載した。

#### DNAの検出と分析

無担体電気泳動に用いるDNAサンプルは低濃度であり、分離されたものは通常の方法では検出が困難であるのでPCR(polymerase chain reaction)法を用いた。DNA組成を評価するため2種類のDNAプローブであるリンケージグループIIIの*sod-4* gene(Cu, Zn-superoxide dismutase)およびリンケージグループXの*unc-6* gene(*netrin*)<sup>9, 10)</sup>を使用した。DNAサンプル450 $\mu\text{l}$ をエタノール沈殿で濃縮後、20 $\mu\text{l}$ のTE緩衝液に溶解した。この溶液の2 $\mu\text{l}$ を30 $\mu\text{l}$ のPCR反応溶液を用いThermal Sequencer(TSR300; IWAKI, Funabashi, Japan)で増幅した。PCR生成物は水平ゲル電気泳動装置(Mupid-2, Cosmo-Bio, Tokyo, Japan; gel size: 52 $\times$ 62mm)を用い1.5%のagarose gel(H14 agarose gel; Takara, Shiga, Japan)で泳動を行った。このゲルをエ

チジウムプロマイドで染色後、蛍光発色像を撮影(665 Positive/Negative film; Polaroid)した。ネガティブフィルムを ULTRO-SCAN 2202 Laser Densitometer (LKB Co. Ltd.)で走査し、参照サンプル DNA との濃度比から PCR 生成物の DNA 量を推定した。

## 電気泳動

無担体電気泳動装置を用いた分離原理には ZE (Zone electrophoresis)、FSF (Field step focusing)、ITP (Isotachopheresis) および IEF (Isoelectric focusing) の各方法があるが、今回は IEF の原理に基づく分離法を用い染色体 DNA の分離を目的とした。

無担体電気泳動装置 VAP11 を使用し、両性電解質の混合物であるキャリアーアンフォライトによる pH 勾配形成能を調べたところキャリアーアンフォライト濃度は 0.3 % が妥当であると判断した。この条件を用い、FFEU/BBM による DNA の分離実験を行ったが、電気泳動槽および検出器周辺に気泡が滞留し、泳動緩衝液の流れが定常的にならないことが判明した。これは電気泳動槽の壁の溶媒への濡れ性が悪いためと判断し、界面活性作用がある HPMC (Hydroxypropylmethyl cellulose) を 0.01 % 使用し濡れ性の改善を行った。また HPMC は電気浸透流を低減するので FFEU/FM を用いる飛行実験でも使用することにした。

## FFEU/FM 利用実験地上予備実験

IML-2 計画で実施する飛行実験では FFEU 分取ポート数 60 に対し、搭載される冷凍庫に収納制限があり、持ち帰ることができる分取容器は 30 分取ポートに相当する 30 本である。地上実験と飛行実験では電気泳動分離挙動が異なることが予測されるので、持ち帰る分画を FFEU の吸光度データダウンリンクデータで判断する必要がある。FFEU の検出器感度は低いのでマーカーとして NADP (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) およびアデノシンを用い DNA の泳動挙動を判断した。

一方、飛行実験はクルータイムが限られているので DNA の電気泳動実験は約 80 分となった。緩衝液流下速度は 3 cm/min およびサンプル流速 2.5 cm/min に固定し、泳動電圧は 200 V および 300 V の 2 条件で予備実験を行った結果から、より分離状態が良好な電圧条件を選ぶことにした。実験 1 ではサンプルを最初に無加電の条件で流下し、その後泳動電圧 200 V、無加電条件、および泳動電圧 300 V の条件で順次電圧条件を変え泳動電圧に依存する分離挙動を判断することにした。実験 2 では実験 1 で選択した分離状態が良好な泳動電圧で加電し、槽内が温度平衡になった後サンプルを流下し電気泳動を行い分離状態を確認する事、実験 3 では予備実験である実験 2 と同じ条件で電気泳動を行い 3DEP でのマーカーの泳動挙動から DNA が含まれる分取ポート 30 箇所を選び回収する計画をたてた。(図 1)

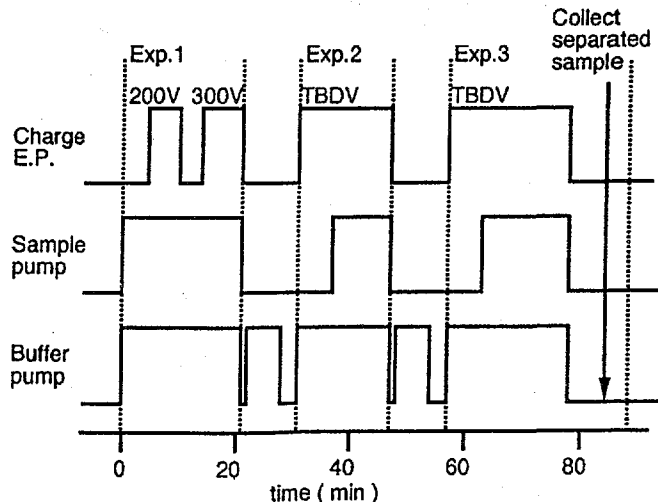


図 1 Schematic operation of the separation of *C.elegans* DNA by FFEU on spacelab. TBD V in experiment 2 and 3 should be determined after judging the electrophoretic behavior of the experiment number 1.

この実験計画は FFEU/BBM を用いその一部を検証した後、FFEU/FM を用い地上実験として検証した。実験 1 の電気泳動電圧の条件検討(図 1 Exp.1)の結果を図 2 に示す。無加電では比較的安定した流下状態を示すが 100 秒後に電気泳動電圧を 200 V とすると NADP は

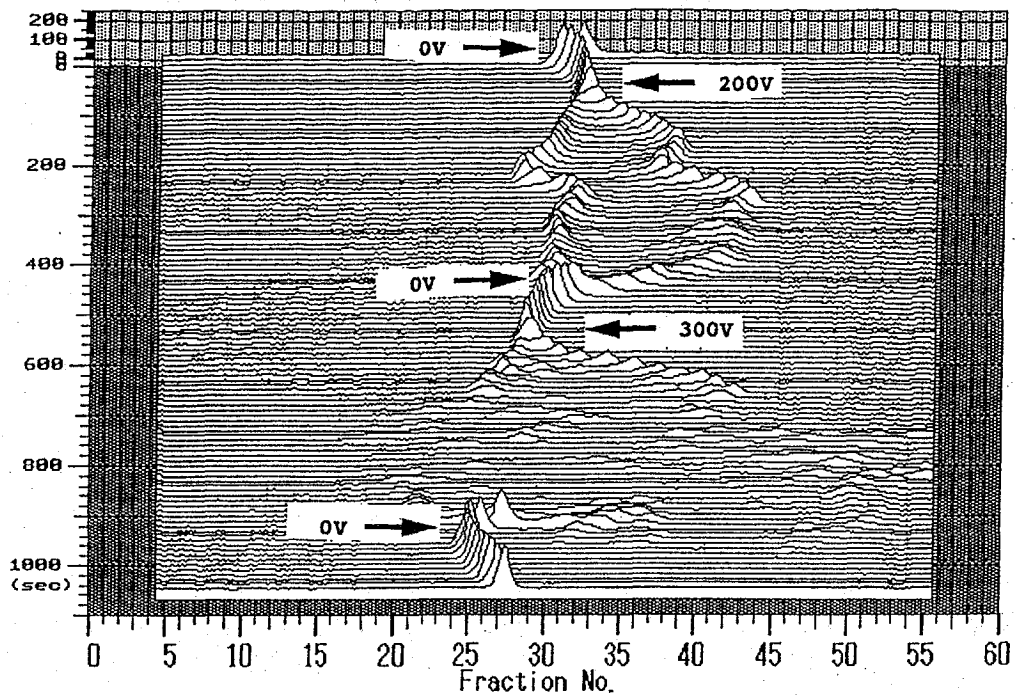


図 2 3DEP of DNA sample by FFEU on the ground. Electrophoresis was carried out on buffer flow rate 3 cm/min and sample flow rate 2.5 cm/min and migration voltage was changed at 200 V and 300 V indicated in the figure, respectively. The DNA sample contained *C. elegans* DNA and also contained 10 mM of adenosine and 10 mM of NADP as markers. The buffer for electrophoresis consisted of 0.01 % HPMC and 0.3 % ampholite (Pharmalite 2.5-5).

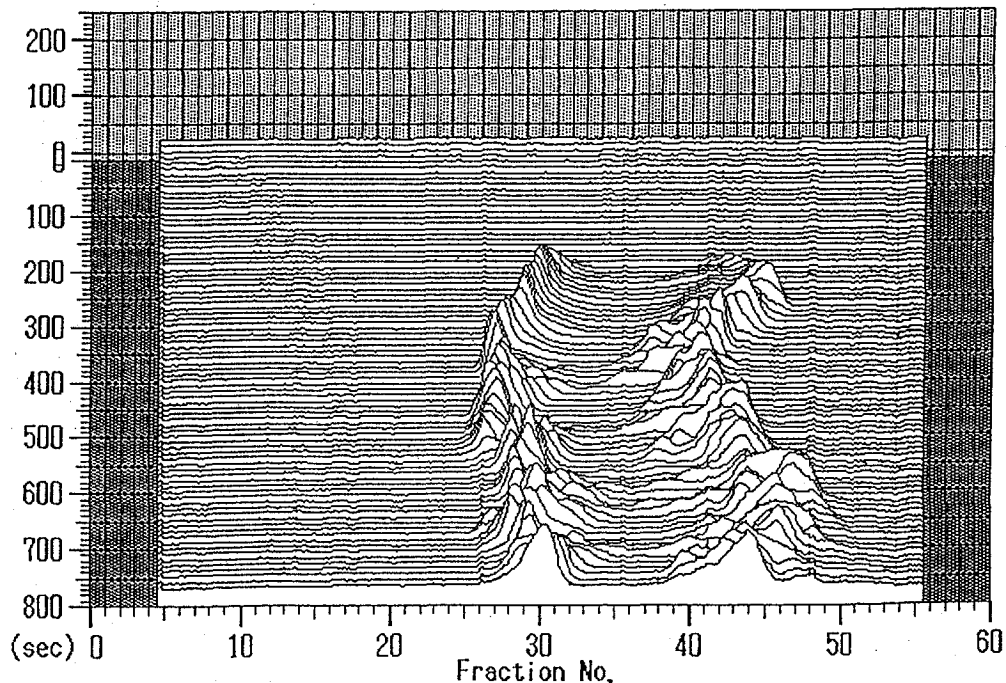


図 3 3DEP of DNA sample by FFEU on the ground. Electrophoresis was carried out on buffer flow rate 3 cm/min and sample flow rate 2.5 cm/min and migration voltage was 200 V. Other experimental conditions are the same as described in the legend to Figure 2.

陽極に移動し、アデノシンは殆ど移動せず約 90 秒後に定常状態が見られたがその後 200 秒間はやや平行移動する現象が見られた。400 秒後に通電を停止すると NADP およびアデノシンの両ピークは中央に戻り、再度 300 V に加電すると 200 V の場合と同様にマーカーピークは両極に向かって移動するが、全体にピークの形状は乱れ泳動挙動は明確ではなくなった。実験 2 は 200 V で 6 分間加電し電気泳動分離槽を熱的平衡とした後にサンプルを流下した。(図 3) NADP およびアデノシンの両マーカーの吸収が広がり全体が不安定であった。これらの泳動状態が不安定であるのは熱対流によるものと思われるが、飛行実験では微小重力下であり熱対流がないので実験 1 の 300 V の条件でもより安定した電気泳動的分離が行われると期待できる。実験 3 は実験 2 と同じ条件で電気泳動を行いブランジャーポンプが最大量を引ききるまでの時間である 21 分後に泳動を終了した。この泳動パターンは実験 2 と同様であり、マーカーの泳動挙動から DNA は最大でも分取ポート番号 25 から 54 までの範囲内に泳動していると考えられるのでこれを採取し、 $-40^{\circ}\text{C}$  で保存した。またサンプルインジェクションポートの確認のため無加電で実験を行いメインピークが 33 番であることを確認した。このサンプルも分画したサンプルと同様に保存し、実験の方法と試料に述べた PCR 法により増幅し DNA の検出を行った。実験 3 で得られたものは 39 番が最大値を与えたが、46 および 47 番にも若干の DNA が検出され、また無加電実験で得られたサンプルは 33 番に DNA を検出した。

これらの結果から今回の電気泳動実験で採取すべき DNA 分画は 2 つのマーカーに挟まれた部分を回収すればよいことになり、持ち帰ることが出来るセパレーションチューブの本数 30 本に収まる。飛行実験ではリアルタイムでダウンリンクされるデータの 3DEP からマーカーの電気泳動挙動を判断し、回収すべき番号を要求出来る事になった。

ここで実施した FFEU/FM 利用実験に基づき飛行実験の最終計画を決定した。

## 飛行実験の結果

### 実験装置の修理に基づく飛行実験の計画変更

今回の飛行実験で大幅に実験計画の変更を余儀なくする装置の不具合が起きた。FFEU 本体の熱交換を行うスペースラブとの間に配管された冷却水循環系である。本体の立ち上げは温度制限が設けられているので、冷却水の循環がなく全てが停止した。圧力計などをモニターした結果から冷却水中に気泡が入っていることが予想されたのでこれを除去するため軌道上で修理 IFM (In-Flight Maintenance) が行なわれた。配管をはずすことは水がスペースラブ全体へ飛散する危険性もあり作業は注意深く進められ長い時間が必要となった。IFM を 6 回試み修理は成功し、電気泳動実験が可能となったが、クルータイムおよびフリードリフトを確保するため電気泳動実験は後日行うことになった。実験時間は大幅に減少したので、3 回行う電気泳動実験(図 1)は分離サンプルを回収する実験(図 1 の Exp. 3)1 回のみ縮小された。

### 電気泳動実験

DNA の電気泳動実験は MET (Mission Elapsed Time) 09/14:30 に再開した。図 1 に示す Exp. 3 の TBD V となっている電圧を 200 V とし、分離サンプルの回収をおこなう電気泳動実験を行った。実験終了までの 1770 sec 間の、バッファーおよびサンプルポンプ作動を示す電

流値および電気泳動電圧とその電流値を図4に示す。計画ではバッファを送り出すと共に加電する予定であったが230 sec遅れている。500 secで電気泳動バッファを送り出し、730 secで200 Vを加電した。電流値は9 mA程度から徐々に上昇を続け、1500 secで約12 mAに達した。この間サンプルは900 sec(加電後170 sec)に注入開始し、電気泳動終了まで流し続けた。POCCにおいてダウンリンク・データサンプリングされたUVモニター信号を3DEPに展開し(図5)、軌道上で行われている電気泳動実験のマーカの分離挙動を判断した。後述するように電気泳動槽内に気泡が滞留していたことが考えられるが、Fr.5~15の範囲に、2つのピークの安定した泳動状態が見られた。これらのピークはマーカ

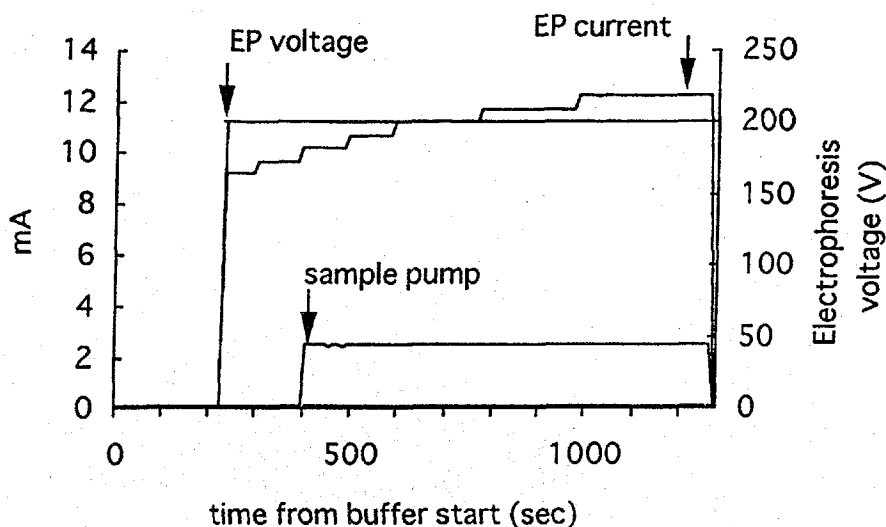


図4 The monitoring of the FFEU operations. X axis is expressed in sec from the buffer pump started. EP voltage and EP current show V and mA of the circuit on the electrophoresis. The arrow of sample pump means the loading time of the DNA sample.

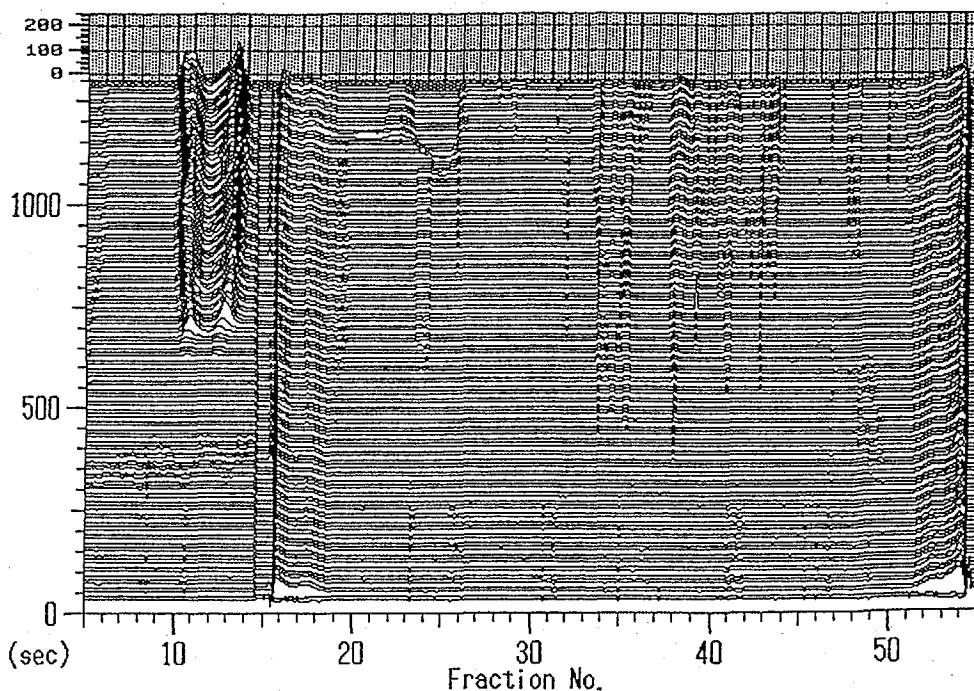


図5 The 3DEP of the DNA sample on the spacelab. The experimental conditions are the same of the figure 3.



によるものであり、この高さと同面積の変動は小さく半値巾も 1 mm と効果的な泳動が行われた。さらに DNA も地上実験と同様にこれらマーカーの間に泳動したと考えられるので、3DEP での見かけの分画中央番号である Fr.12 および理論的分画中央番号である Fr.30 をはさむ分画番号 Fr.22 ~ 50 の計 30 本をセパレーションチューブに分取し、帰還するまでの間、冷凍庫 (-20 °C) に保存した。

#### 電気泳動実験分画サンプルの DNA 分析

電気泳動で分離したサンプルの回収は手順どおり行われたが、30 本のセパレーションチューブの溶液量は大きくばらついた。(図 6) 一部溶液が失われているなど分離したサン

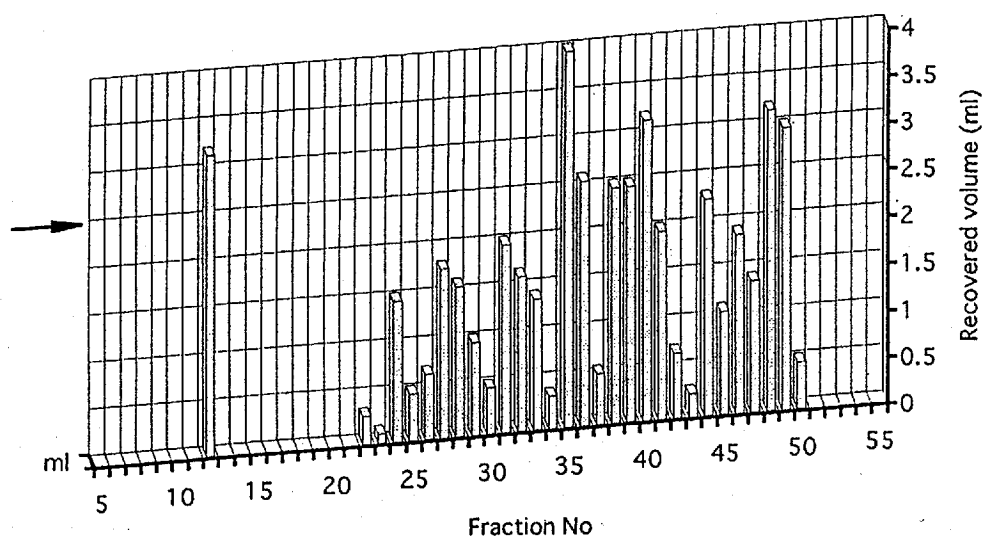


図 6 Recovered volume of separated sample after the chromosome DNA experiment on the spacelab. An arrow indicates a desired volume.

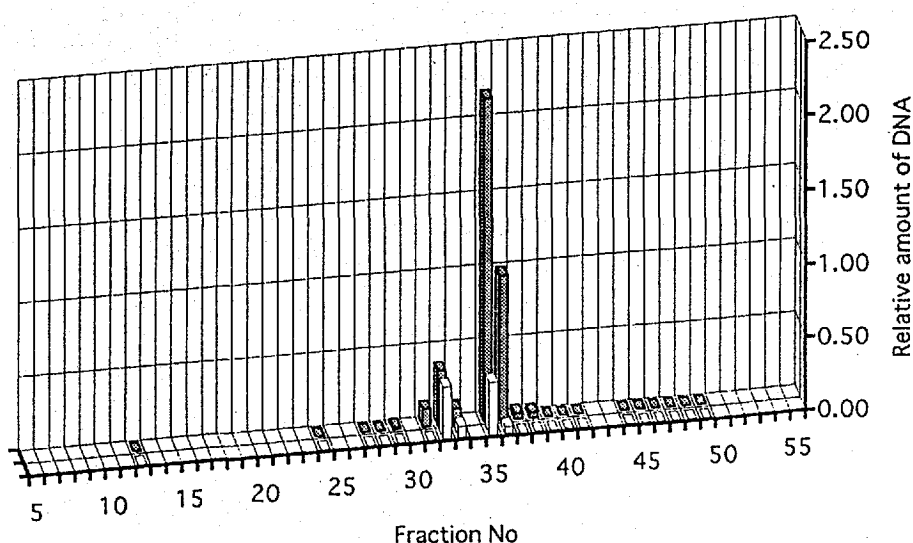


図 7 Relative DNA contents in the fractionated samples by the electrophoresis on the spacelab. The amounts of DNA are estimated by the densitometry of the photograph of the gel resulting the products of PCR. The DNA samples are analyzed by using PCR method with the two probes: backs are a *sod-4* gene and fronts an *unc-6* gene, respectively. All the data are normalized to those values of the control samples.

ブルの回収操作にあるいは装置の機能に不明な点もあるが、溶液量 1.0 ml 以上のものを選び PCR 法による DNA の分析を行った。プローブ遺伝子として *sod-4* および *unc-6* gene を用い検出した DNA 量を図 7 に示す。DNA 含量が最大のもは Fr.35 であり *sod-4* gene により検出されたものは *unc-6* で検出されたものの 7 倍の結果を得た。これに対し第 2 番目の含量を持つ Fr.32 はそれぞれのプローブ遺伝子による検出量はほぼ等しい結果を得た。DNA 成分は電気泳動分離槽中の 3 mm の間隔で泳動分離され、これら 2 つの異なる種類の DNA 成分を含む分画に分離したと推定できる。また、マーカーとして使用したアデノシンおよび NADP はそれぞれ Fr.28 と Fr.38 にピークを持つ 10 mm の間隔で検出できた。従って、気泡混入のため分離槽の実効空間が小さくなってはいたが、効果的な分離が行われたと考えられる。

## 解析と考察

### 気泡の滞留

今回の実験で最大の障害は冷却水循環系に気泡が入っていたことであつたが、気泡除去作業にともない新たな問題が生じた。飛行電気泳動実験結果でも指摘したが、電気泳動槽内に気泡が滞留していたことが考えられる。本実験の後で行われた pituitary および antibody の実験においてもここで述べた現象が見られたので、3DEP で観測された異常な吸収は泳動サンプルによるものではなく、電気泳動槽内の気泡の界面による光の屈折現象がモニターの信号として現れたと考えられる。これらの異常性を比較した吸光度モニターのリファレンス信号を図 8 に示す。

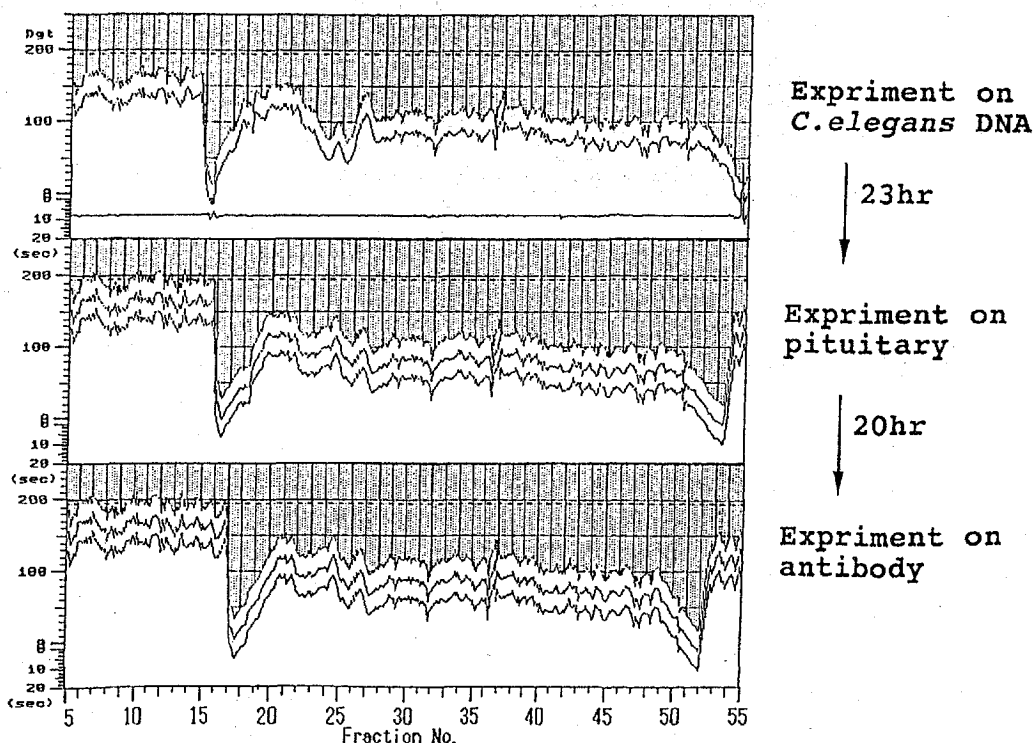


図 8 Transmittance changes of UV monitor of FFEU during the experiments of CHROMOSOME, PITUITARY and ANTIBODY on the spacelab.

コロンビア号が帰還した直後に KSC で、装置と使用溶液の重量計測、および UV モニターを使用した電気泳動槽内の気泡界面位置から推定する 2 つの方法により気泡の体積を計算したところ、共に約 12 ml の気体が電気泳動槽内に存在していたと推定できた。この体積の気体が飛行実験で Fr.17 ~ 18 と Fr.45 ~ 52 の位置に気泡の界面をつくったと考えられる。スペースシャトルより回収した FFEU/FM を宇宙開発事業団宇宙実験棟に搬送し、気体混入のシュミレーションを行った。FFEU/FM のサンプリングポートにサンプル採取ジグを取り付けたほかは全て飛行実験で用いたものと同じものを使用し同じ条件で実験を行った。FFEU/FM 本体を泳動槽が水平になるよう設置し、約 12 ml の空気をサンプルインジェクションポートより注入した。UV モニター上に気泡が移動するよう水平位置を微調節しながら吸光度データを測定した 3DEP を図 9 に示す。図の谷になっている位置は気泡の界面であり、スペースシャトルで行った実験結果と同様な 3DEP を得た。このパターンは僅かな振動でも変化し、地上ではその位置を安定にする事は難しいが、微小重力下ではかなり安定しており、図 8 に示したように数十時間同じ位置に滞留していた。

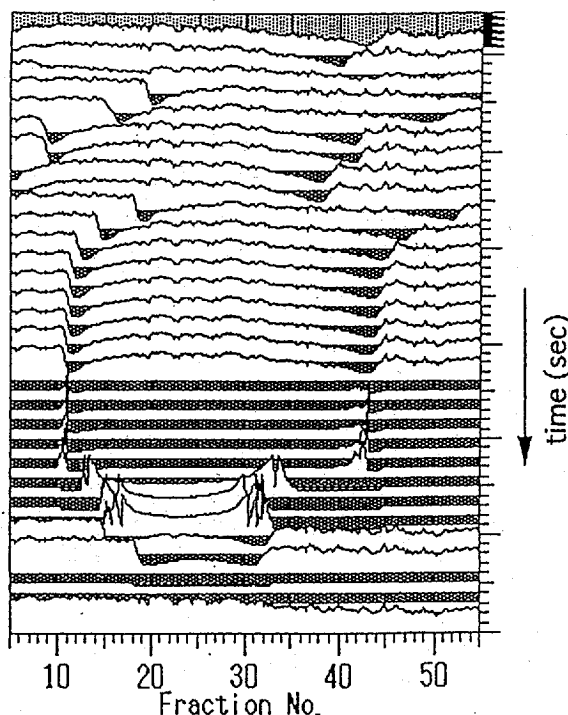


図 9 Transmittance changes of UV monitor of FFEU on the simulation experiments of the bubble.

電気泳動槽に気泡が滞留していたことが今回の電気泳動実験の障害であることが明らかになった。IFM の作業はバッファリザーバーと電気泳動槽を結合しているクイックディスクコネクタを外す必要があり、再度結合したとき気体が少量づつ混入し、結果として 12 ml の気泡が混入したことを地上で再検証してある。しかしながら、12 ml の気体が電気泳動分離槽厚 4 mm の間隙に真円の気泡を作ると直径は約 60 mm となり、電気泳動分離槽の幅全てを覆うことになる。これに対し、混入した気体は検出器の箇所、気泡の直径が 40 mm (体積 5 ml) から最大でも 50 mm (体積 8 ml) であると 3DEP から判断できるので、気泡は真円の形状とはなっていないかまたは検出器の箇所以外にも気泡が滞留していた可能性もある。

## 地上実験との比較

FFEU/FM を用いた地上実験(図 3)と宇宙の微小重力下で行われた今回の実験を比較する。地上では、移動度が小さいアデノシンは泳動槽のほぼ中央(サンプルインジェクションポートの理論的溶出位置)である Fr.30 に、また移動度が大きい NADP は Fr.45 付近にそれぞれ泳動されている。この場合、ピークの形状は電気泳動が進行していく間に大きく変化し一定の形状を保たないばかりでなくこれらのピークは蛇行しており、熱対流の影響を大きく受けていることが分かる。

これに対して、飛行実験では電気泳動槽内に気泡が滞留していたが、Fr.5～15 の範囲では安定した2つのピークの泳動状態が見られた。先に述べたようにこの実験では無荷電でのサンプルの移動状態を観測できなかったが、PITUITARY および ANTIBODY での無荷電でのサンプルの移動状態を確認する実験結果から Fr.12 がその位置であることが判明した。Fr.5～15 範囲での電場が安定していると考えれば、この2つのピークはマーカーであり、Fr.10 および Fr.13 はそれぞれ NADP およびアデノシンである。

微小重力下でのマーカーの泳動挙動(図 5、Fr.5～15)および地上でのマーカーの泳動挙動(図 3、Fr.27～47)の電気泳動状態をより詳細に比較した 3DEP を図 10 に示す。この図の最前面に示したエレクトロフェログラムは図中のそれぞれの泳動状態の吸光度を平均し示したものであり、分取容器に回収されるサンプルの吸光度に相当する。ここでは各電気泳動の 200 sec のみを比較してあるが、微小重力下でのピークの半値幅はフラクション 1 本即ち 1 mm に相当し、サンプルインジェクションポートの管径が 0.5 mm であることを考え合わせると拡散も少なく、当初の予測どおり微小重力下では熱対流の影響はほとんどないと見積られる。気泡が電気泳動槽に混入して実効的な電気泳動の場が狭くなっていたにもかかわらず、本サンプルは今回の電気泳動の条件で明確な DNA 成分の分離がされたと推定できる。

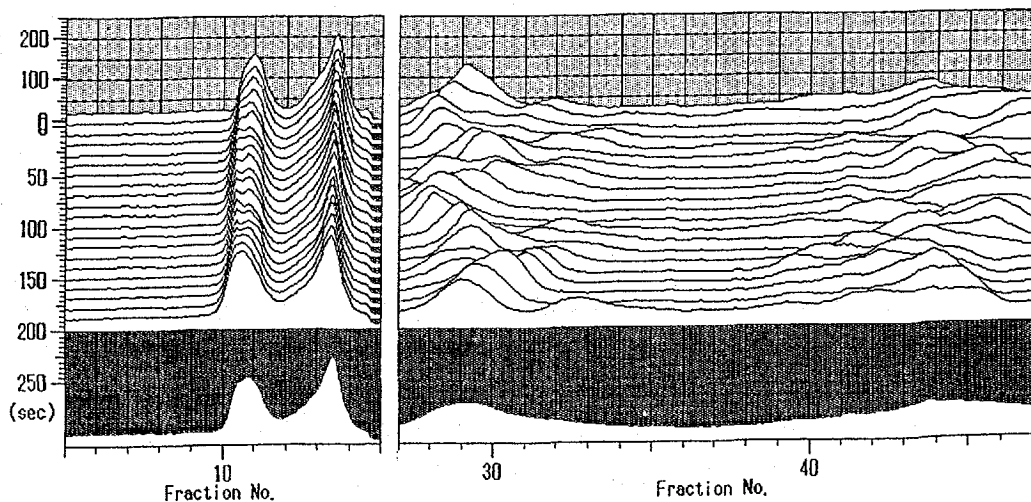


図 10 Comparison of electrophoresis of the DNA sample by FFEU on the spacelab and on the ground. The left side figure is expanded around fraction No.10 of Figure 5, on the spacelab, experiment and the right side from fraction No.30 to 40 of Figure 3, on the ground.

## おわりに

微小重力環境で FFEU を使用し、*C. elegans* の DNA 混合物から 2 種類の DNA の効果的な分離を行うことが出来たが、今回の計画が全て成功したとは言い難い。気泡が電気泳動分離槽に滞留したことおよび実験時間が短縮され電気泳動条件の比較が出来なかったことである。さらに回収サンプルが予定量より少なく、ここで示したプローブ遺伝子以外のプローブ遺伝子による DNA の分析、マーカーサンプルの回収率の測定、分画サンプルの電気伝導率の測定および pH 勾配形成状態を調べることが出来なかったことである。

しかしながら宇宙環境での電気泳動状態を地上でリアルタイムで観測し、分離すべきサンプルをリアルタイムで要求できたこと、気泡が滞留し限定された電気泳動の場ではあったが熱対流の影響を受けず電気泳動を行うことが出来たこと、および地上と宇宙での全ての実験過程でサンプルへの汚染が少なかったことなどであるが、これらの実験結果と実験の作業手順の成果は、今後宇宙での電気泳動による分離の研究を推進すると考えている。

今回の計画で最大の難関は気泡の混入から始まった。電気泳動装置冷却水に気泡が発生した原因は明らかでないが、電気泳動分離槽への気泡混入はインフラメンテナンス (IFM) の際起きたことが強く推定される。微小重力環境で気泡を取り扱うことは非常に困難でありその除去方法は確立されていない。生命科学では生物を生育することや生化学物質を分離分析する際には常に水溶液を使用するので、微小重力下での液体の移動に伴い混入あるいは発生する気泡の除去方法などの対応技術を早急に取り纏める必要がある。また生命科学で多用されるプラスチック器具などを含めた機材の生物試料適合性や表面処理方法など微小重力環境における表面張力の効果をさらに十分考慮した宇宙実験用機器の設計が必要である。

スペースラブでの実験に際して、IFM による装置の修復が出来なければ全ての実験機会が失われるところであった。IFM を成功させた Mr. Hieb と Mr. Halsell に、また実験手順を大幅に変更したにもかかわらず確かな実験操作を行ってくれた Dr. Thomas と Dr. Chiao の諸氏およびスペースシャトルのクルーに、また IFM の実施を強く支援してくれた NASA の関係者に深く感謝します。なお、この研究の一部は宇宙科学研究所宇宙基地利用基礎実験費で賄われている。

## 参考文献

- 1) Hannig, K. and Heidlich, Hans-G. *Free-Flow Electrophoresis: An Important Preparative and Analytical Technique for Biology, Biochemistry and Diagnostics*, GIT VERLAG, Darmstadt (1990).
- 2) Clifton, M. J. and Sanchez, V. *Chromatography (Tokyo)*. 16, 1-6 (1995).
- 3) Rickwood, D. and Hames, B. D. *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids: A practical approach, Second Edition*, IRL Press Limited, Oxford, New York, Tokyo (1990).
- 4) Vesterberg, O. *Acta Chem. Scand.* 23, 2653-2660 (1969).
- 5) Brenner, S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77, 71-94 (1974).
- 6) Sulston, J. In *The nematode Caenorhabditis elegans*, ed. by W.B. Wood, Cold Spring Harbor Laboratory (1988). 123-155.
- 7) Wilson, R. et al. *Nature*. 368, 32-38 (1994)
- 8) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. IML-2 登載 FFEU の BBM を用いた電気泳動一第 2

次国際微小重力実験室計画 (IML-2) の地上基礎実験 - 第9回宇宙利用シンポジウム  
プロシーディング (1992). 151-154.

- 9) Ishii, N., Wadsworth, W. G., Stern, B. D., Culotti, J. G. and Hedgecock, E. M. *Neuron*. 9, 873-881 (1992).
- 10) Serafini, T., Kennedy, T. E., Galko, M. J., Mirzayan, C., Jessell, T. M. and Tessier-Lavigne, M. *Cell*. 78, 409-424 (1994).

#### 外部発表

- 1) 小林英三郎, 石井直明. 電気泳動による線虫の染色体の分離. 第7回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1990). 403-408.
- 2) 高島宗彦, 小林英三郎, 石井直明, 奥山典生. 無担体電気泳動による線虫の染色体の分離. 第10回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集 (1990). 49-50.
- 3) 小林英三郎, 石井直明. 電気泳動による線虫の染色体の分離. 平成2年度宇宙基地利用基礎実験費研究成果報告書 (1991. 4). 221-225.
- 4) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. 無担体電気泳動装置による染色体 DNA の分離と検出 - 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) の地上実験. 第8回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1991). 124-127.
- 5) 小林英三郎, 松田 徹, 松野 巖, 石井直明. 無担体電気泳動における DNA の分離挙動. 第11回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集 (1991). 61-62.
- 6) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. 電気泳動による線虫の染色体 DNA の分離. 平成3年度宇宙基地利用基礎実験費研究成果報告書 (1992. 4). 185-188.
- 7) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. IML-2 登載 FFEU の BBM を用いた電気泳動 - 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) の地上基礎実験 - 第9回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1992). 151-154.
- 8) 小林英三郎, 藤倉裕一, 目黒和良, 石井直明. 無担体電気泳動による DNA の分離 3. 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) 登載 FFEU の BBM を用いた電気泳動. 第12回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集 (1992). 69-70.
- 9) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. 電気泳動による線虫の染色体 DNA の分離. 平成4年度宇宙基地利用基礎実験費研究成果報告書 (1993. 4). 263-266.
- 10) 小林英三郎, 山本顕吾, 石井直明, 広川 健, 長岡俊治. IML-2 登載 FFEU の FM を用いた電気泳動 - 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) の地上基礎実験 - 第10回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1993). 45-48.
- 11) 小林英三郎, 郷間 尚, 稲垣宗彰, 石井直明, 長岡俊治. 無担体電気泳動による DNA の分離 4. 第2次国際微小重力実験室計画 (IML-2) 搭載 FFEU の FM を用いた電気泳動. 第13回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集 (1993). 89-90.
- 12) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. 電気泳動による線虫の染色体 DNA の分離. 平成5年度宇宙基地利用基礎実験費研究成果報告書 (1994. 4). 367-370.
- 13) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. STS65 / コロンビアでの無担体電気泳動による線虫 DNA の分離実験. 第11回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1994). 17-20.
- 14) 小林英三郎, 山本顕吾, 安田佳代, 石井直明, 長岡俊治. 無担体電気泳動による DNA の分離 5. スペースシャトル - コロンビアでの電気泳動. 第14回キャピラリー電気泳動シンポジウム予稿集 (1994). 97-98.

- 15) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健. 電気泳動による線虫染色体 DNA の分離. 平成 5 年度宇宙基地利用基礎実験費研究成果報告書 (1995. 4). 347-354.
- 16) 小林英三郎, 石井直明, 広川 健, 長岡俊治. IML-2 における無坦体電気泳動による分離実験 - 飛行後解析 -. 第 12 回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1995). 138-141.

# 微小重力環境における高密度動物細胞培養液の分離精製実験 (ANTIBODY)

代表研究者： 奥沢 務\*<sup>1</sup>  
 共同研究者： 坪内邦良\*<sup>1</sup>、浜野亘男\*<sup>2</sup>、馬場研二\*<sup>3</sup>、  
 芳賀良一\*<sup>3</sup>、石川孝一\*<sup>2</sup>

\*<sup>1</sup> 日立製作所 機械研究所(現在 電力・電機開発本部)、  
 \*<sup>2</sup> 日立製作所 宇宙技術推進本部、\*<sup>3</sup> 日立製作所 日立研究所

Our sample was cell culturing liquid containing of cells, cell-produced antibody and culture medium. Space electrophoresis is expected to promote separation resolution remarkably due to absence of gravity. In order to evaluate microgravity effect on electrophoretic separation, we took part in the IML-2. In spite of several malfunctions, our experiment was carried out and revealed as follows. Cells cultured in space produced double the amount of antibody secreted by those on earth. In addition, space electrophoresis, as far as electrophoresis could occur despite bubble existence, was found to give much stabler performance than that on earth.

## 実験の目的、意義

本実験テーマの泳動試料の構成成分を表1に示す。試料は細胞と培地の懸濁液で、細胞(図1)はSTK1と呼ばれる。この細胞株は、免疫の反応である抗原-抗体反応に欠かすことができないモノクローナル抗体の1種である免疫グロブリンG(IgG)を産生する。現在このIgGは、癌の治療薬及び診断薬として最も期待が持たれている。この細胞の場合、通常の培養フラスコで培養すると細胞濃度が約 $2 \times 10^6$ 個/cm<sup>3</sup>で飽和する。このときのIgGの産生濃度は5~20 µg/cm<sup>3</sup>程度となる。この生産性を向上させるため新方式のバイオリアクタが開発<sup>1)</sup>され、細胞濃度で $4 \times 10^7$ 個/cm<sup>3</sup>、IgG濃度で100~500 µg/cm<sup>3</sup>が達成されている。しかし、現状の分離精製プロセスは、数段からなる濾過過程、液体クロマトグラフィでの最終的精製過程及び濃縮過程よりなっており非常に複雑である。このため、

表1 泳動試料の構成成分

細胞	細胞(STK1) ↓合成・分泌
	免疫グロブリン(IgG) ↑ 癌の診断薬及び治療薬として期待
培地	ダルベッコ変成イーグル培地
	ヘベス
	カナマイシン
	新生子牛血清
	炭酸水素ナトリウム
	ブドウ糖

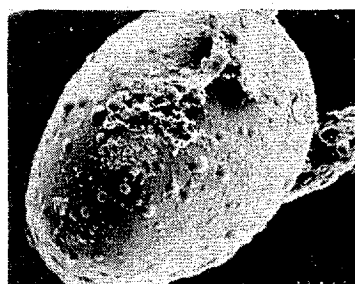


図1 細胞(STK1)



分離能および分離量にも限界があるので、高密度細胞培養プロセスの発達とともに分離精製プロセスが全製薬プロセスの問題点となりつつある。この解決策の一つとして期待されているのが、微小重力環境における連続無担体電気泳動法の適用である。この方法の原理的実現性を検証することがIML-2に応募した目的である。

## 実験の方法と試料

### 実験概要<sup>2~8)</sup>

実験概要を図2に示す。すなわち、細胞培養キット(CCK)の細胞培養容器を使用して恒温恒湿槽(TEI)に入れ、6日間軌道上で細胞を培養

し、その後細胞培養懸濁液を宇宙用電気泳動槽(FFEU/FM)に直接注入し分離する。泳動分離された試料は、 $-20^{\circ}\text{C}$ の冷凍庫に8日間保存される。着陸後、速やかに地上の冷凍庫に移され、その後実験研究者のところに輸送される。この分取試料を分析することによって有用物質(IgG)の純度、収率に関するデータを把握することができる。

電気泳動槽内部は薄い矩形断面の流路となっており、上部から導電性を有する緩衝液を導入して安定した液膜流れを形成する。この流れに試料液を連続的に注入し緩衝液とともに流下させる間に流れと直交する方向に電界を加えると、電気泳動現象によって試料液中の帯電性粒子は電界方向へ荷電量に応じた力を受けて移動する。実際には、試料液中の帯電性粒子が緩衝液の流れに運ばれて流下する速度と電界方向への泳動移動速度との合成ベクトル方向に偏向するため、図2のように泳動槽内では同一の泳動移動度の粒子群は带状となって流下する。泳動槽下端には60チャンネルの分取部が設けられておりこの分取チャンネルに試料中の各成分毎に分離したものを得ることができる。

泳動槽内の電界は、槽の両側端にある電極間に直流電圧を加えて作るため緩衝液中にイオン電流が流れジュール熱が発生する。このジュール熱によって槽内に液温分布が形成されると、熱対流が発生して層流状の液膜流れが乱れ定常的な泳動分離が困難となる。このため、地上用の無担体連続電気泳動装置では、この熱対流を防止するために槽内流路厚さを1 mm以下に抑える必要

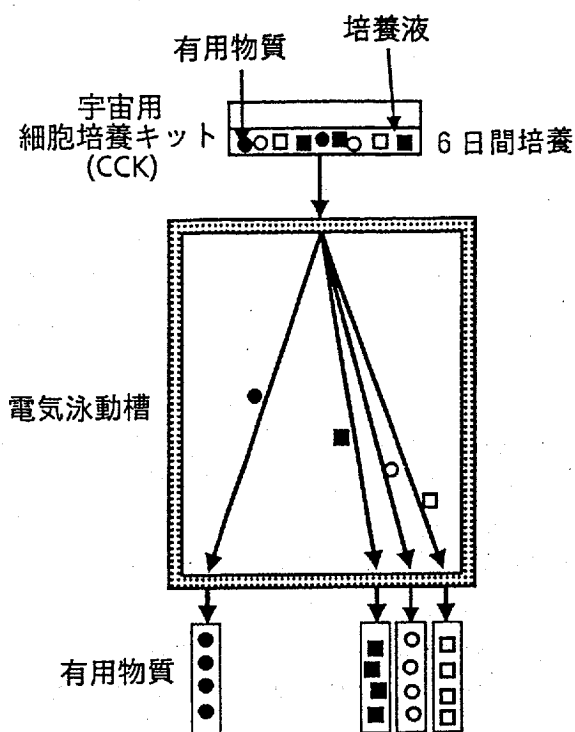


図2 軌道上実験の概要

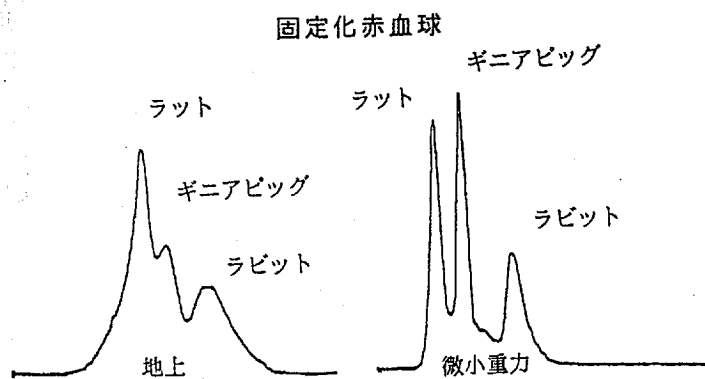


図3 微小重力における泳動分離例

がある。

宇宙空間のような微小重力下で電気泳動を行う利点の一つは、この熱対流による槽内の乱れがなくなるので、分解能が向上するとともに、試料の耐熱許容範囲内であれば槽厚を厚くすることができ、処理能力の向上を達成することができる点にある。さらに、試料と溶液の比重差に基づく問題、例えば一般に緩衝液より重い細胞等が試料の場合、地上では沈降を防ぐために蔗糖などを用いて緩衝液の比重を調整するが、動物細胞等の場合はさらに緩衝液の浸透圧も蔗糖などを用いて調整しなければならないため緩衝液の調製が難しくなる。これら熱対流、沈降及び浮上のような比重差に基づいて起こる問題は、無重力環境下では解決されることになるので、泳動試料の種類や濃度の選定がより自由となり、泳動分離能及び精製処理能力の大幅な改善につながると期待される。宇宙泳動実験の一例として、図3には K. Hannig らが行ったロケット実験結果<sup>7)</sup>を示す。微小重力環境下でラット、ギニアビッグ及びラビットの固定化赤血球の混合液を泳動分離したものであるが地上の対照実験のものより微小重力環境の方が分離度合いが鋭くなっていることがわかる。

また、このテーマでは微小重力環境で細胞培養に関し次の効果も期待される。図4には FMPT (First Material Processing Test)で三井製薬の菅沼らが行った細胞培養の実験結果<sup>9)</sup>を示す。図は免疫グロブリン M を分泌する細胞を宇宙で培養した結果と地上対照実験結果を示しているが、地上に比べて約2倍の産生量が微小重力環境で得られることが判明した。従来から浮遊性細胞は微小重力環境で産生量が増加し、反対に付着性細胞は減少すると言われている。本実験の細胞も浮遊性であるので、この菅沼らの結果より本実験の細胞培養でも産生量の増加が期待される。これら泳動分離と細胞培養の二つの効果が加算されるものと本実験では期待されていた。

泳動分離の第一次分析は 254 nm の紫外線の試料検出器を使って行なわれるが、これだけでは分離されたものを特定することはできない。このため、二次分析を行う必要がある。細胞は血球計算盤で細胞濃度を求め、たん白質は抗原-抗体反応を利用して分析する。なお、宇宙実験では細胞を保存できる -80°C の冷凍庫が搭載されていないので、細胞の評価は顕微鏡写真のみとなった。細胞培養実験の評価は、主として顕微鏡による増加状況把握と上記の抗原-抗体反応を利用して求めた。

泳動性能を向上させるには緩衝液と試料との導電率比が重要と言われている。また、緩衝液の pH 値と試料の pI 値(マウスの IgG の場合、5~7 と推定される)の差が大きいほど試料の泳動速度が大きくなる。この最適条件を探索するため、成分が

#### 緩衝液と泳動条件の検討<sup>9), 10)</sup>

泳動性能を向上させるには緩衝液と試料との導電率比が重要と言われている。また、緩衝液の pH 値と試料の pI 値(マウスの IgG の場合、5~7 と推定される)の差が大きいほど試料の泳動速度が大きくなる。この最適条件を探索するため、成分が

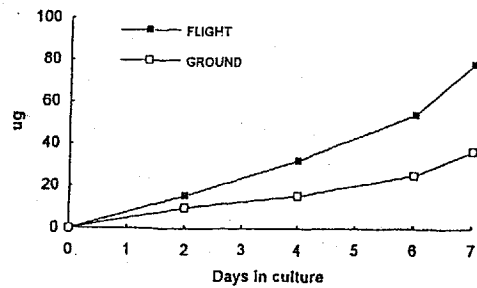


図4 微小重力における細胞培養例

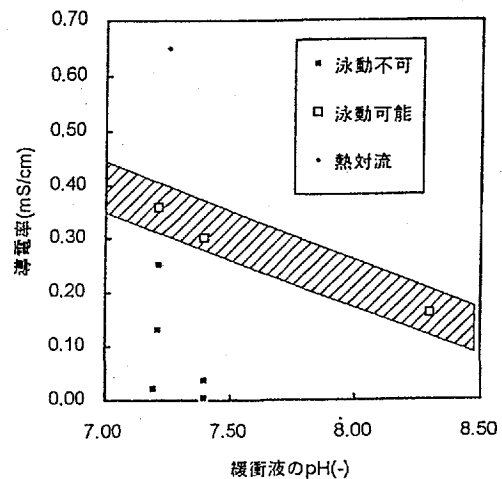


図5 緩衝液の導電率-pHの泳動可能範囲

異なる6種類の緩衝液と本実験の緩衝液であるトリエタノールアミンアセテート (TEA) 水溶液について、導電率と pH を変えて分離実験を行った。その結果が図5である。図のハッチングの部分泳動可能であった範囲を示す。実験では、TEA 水溶液 pH 8.5 以上では蛋白質が凝集して固まり試料注入口を塞ぐことが分かったので、緩衝液は TEA

水溶液 pH 8.3 とした。ここで、泳動可能範囲より上の部分は、電流値が高いため熱対流の影響を受けて乱れた可能性があり、微小重力環境では泳動可能となる可能性もあるので「熱対流で泳動不可」と表示した。

図6、図7は泳動条件設定のため地上用泳動槽 (FFEU/BBM) を利用して行った予備実験結果の一例を示す。緩衝液は TEA 水溶液 pH 8.3 で図6に試料検出器の出力経過を図7に二次分析結果を示す。これらの結果から細胞と IgG との分離を確認するとともに緩衝液の妥当性と泳動条件の適性を把握した。また、試料中の細胞を除去した試料を用いて実機である FFEU/FM により予備実験を行い図8に示す試料検出器の出力を得た。FM でも IgG の泳動移動することを確認できた。ただし、泳動時間を長くしたり電圧を上げると熱対流が発生し試料分離が困難となった。これら FFEU/BBM と FFEU/FM の予備実験結果を総合して泳動条件としては試料注入速度及び緩衝液流速を 3 ~ 4 cm/min、泳動電圧を 150 ~ 200 V とした。

### CCK 性能把握とレイトアクセス対応の細胞培養条件の検討

CCK は通常使用されている市販の培養フラスコとは違い、ガス透過膜を用いて密閉構造としているため、CCK の細胞培養性能を調べた。その結果を図9に示す。通

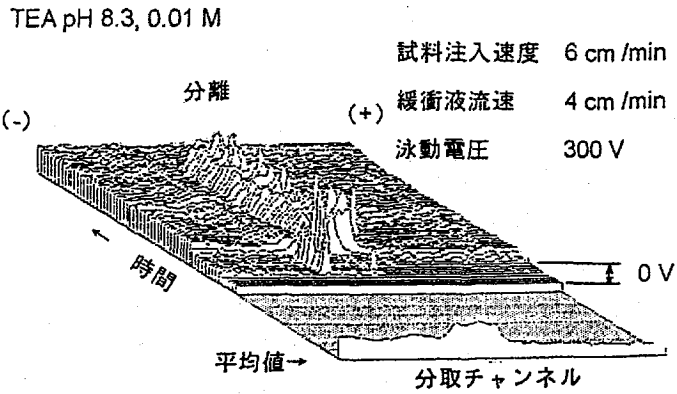


図6 試料検出器の出力結果 (地上用電気泳動装置; FFEU/BBM)

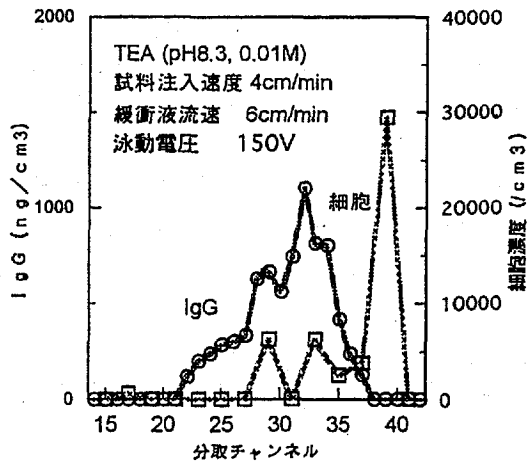


図7 二次分析結果

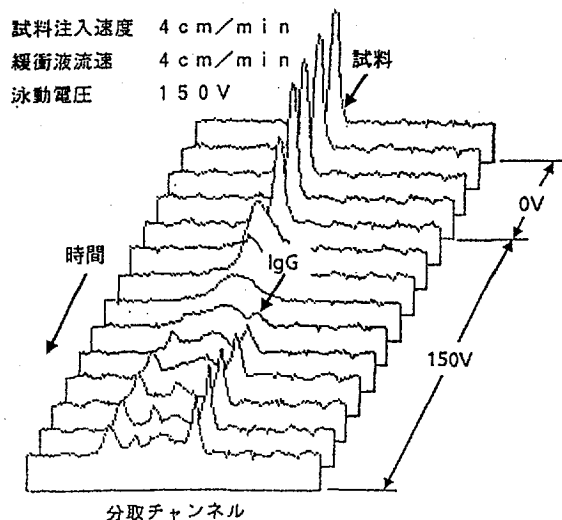


図8 試料検出器の出力結果 (宇宙用電気泳動装置; FFEU/FM)

常の培養フラスコで細胞が10倍に増殖するのに2~3日なのに対し、CCKでは4~5日と約2倍の日数がかかるが培養上問題なく培養できることがわかった。

この培養の時間的特性を把握したことで細胞培養の準備は完了したと考えていたが、宇宙実験特有の問題が発生した。すなわち、細胞試料の場合、打上げ前にミッドデッキロッカーに収納され、打上げ後インキュベータに移される。このインキュベータに移されるまで細胞にとってなんの保護もない環境に置かれる。本実験の細胞は、この環境を模擬した培養試験の結果、この1日を生き延びることができないことが判明した。このため、東京医科歯科大学の桑井先生のアドバイスに従って培地成分のうちの2成分の分量を変えた5種類の培地を用いて培養実験を行った。この実験検討により細胞が生き延びられる培地を発見することができた。この改良培地を使用し、しかも細胞が泳動されるまでに置かれる環境を模擬した実験を行い初期細胞濃度と最終細胞濃度との関係を検討した。実験では、最初の一日目温度25℃、炭酸ガス濃度0%、湿度40~50%の環境に放置し、2日目から温度37℃、炭酸ガス濃度5%、湿度90%以上であるインキュベータに入れて5日間培養した。図10はその結果で初期細胞濃度 $5 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ 個/cm<sup>3</sup>の範囲では約6日後に2倍程度に、そして $2.5 \times 10^5$ 個/cm<sup>3</sup>では4倍程度増殖することが確認できた。最初からインキュベータに入れた場合は4日間で10倍に増殖しているの、それと比べると最初の一日のダメージの大きいことが分かる。これらの実験結果及び泳動までの日数が6日となったため、7日目に最高濃度 $2.0 \times 10^6$ 個/cm<sup>3</sup>近くとなるように初期細胞濃度を $5 \times 10^5$ 個/cm<sup>3</sup>とすることとした。

打上げ1ヶ月まえに支給された6個の飛行実験用CCKで細胞培養の試験を行い、その健全性を検討した結果を図11に示す。この結果、すべてのCCKは細胞に悪影響がないことを確認した。図12は、日

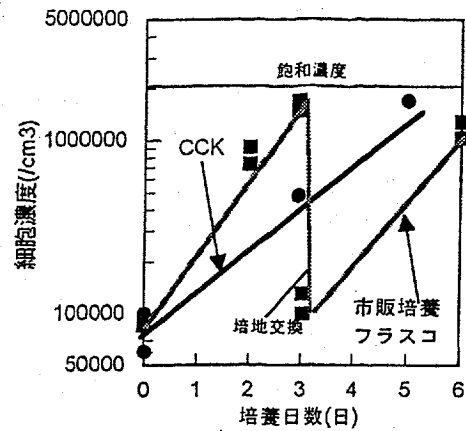


図9 細胞培養キット(CCK)培養性能

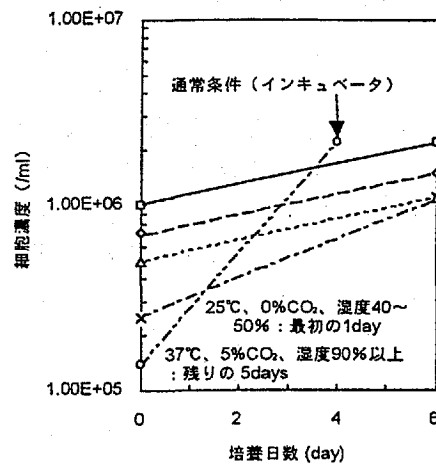


図10 打上げ環境模擬の細胞培養実験

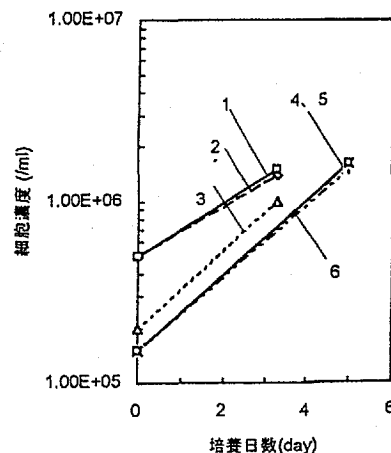


図11 細胞培養キット(CCK)の健全性チェック

本から NASA ケネディ宇宙センターへ凍結して輸送し、その細胞を解凍して打上げまで培養したときの細胞生存率の経過で、10日で生存率が安定になり16日から生存率の変動も小さくなっており最高の条件で細胞が調製されたことを示している。

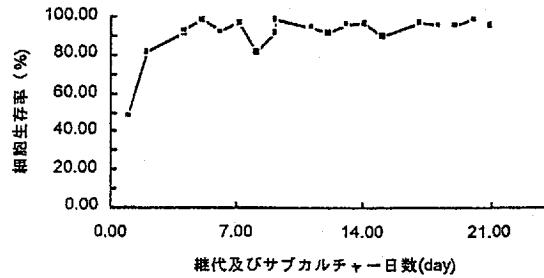


図 12 供試細胞の生存率の推移

### 飛行実験の結果

表 2 に実験のスケジュールを示す。当社の実験は、(a) 試料の引き渡し、(b) 試料の培養、(c) 試料の泳動分離、(d) 試料の冷蔵保存及び (e) 分取試料の冷凍保存の順にハッチングしたバーで示したスケジュールで行われた。当初、白抜きのバーで示したスケジュールで行われる予定であったが、FFEU/FM の冷却システムの不具合により電気泳動システムとして起動できない状態が生じた。この原因は、冷却水系統に残留した気泡によって冷却水ポンプが空回りし、冷却水圧力が規定値に達しなかったためである。修復作業が予想以上長引き、当社の試料の実験ができるようになるまでに約 5 日間かかった。培養を継続すると、細胞が増え過ぎて死滅し、その影響で IgG も消滅する恐れがあったため、非常措置として予定にない冷蔵保存(5℃)を 5 日間行った。このため、細胞の大半が死滅するなど、かなりの影響を受けた。この事故により、予備泳動実験が不可能になり、1 回の本泳動実験のみの実施となった。また、修復作業の影響で今度は泳動槽内に気泡が混入し、このため有効な泳動範囲がかなり狭くなるなどの影響を受けたものの、泳動分離状況を試料検出器で把握することができたので、部分的ではあるが所期の目的を達成することができた。

表 2 実験スケジュール

項目	月日	7/7	7/8	7/9	7/10	7/11	7/12	7/13	7/14	7/15	7/16	7/17	7/18	7/19	7/20	7/21	7/22	7/23	7/24		
メインスケジュール			↓ 打ち上げ ↓														↓ 着陸 ↓				
試料(細胞培養液)の引き渡し		□	☒														□		☒		
試料の培養(恒温恒湿槽内)			▬		▬		▬		▬		▬		▬		▬		▬		▬		
試料の冷蔵保存								▬		▬		▬		▬		▬		▬		▬	
試料の泳動分離									□							☒					
分取試料の冷凍保存								▬		▬		▬		▬		▬		▬		▬	

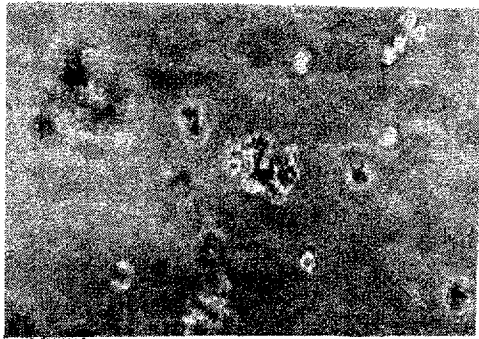


図 13 泳動前細胞(軌道上)

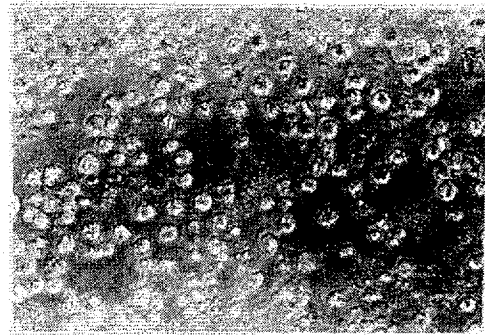


図 14 泳動前細胞(地上対照)

### 泳動前の細胞の状況

図 13 は、MET Day 11 (7月 19日)に軌道上で撮影の顕微鏡写真である。この焦点ぼけの原因は、微小重力環境では CCK 細胞培養容器内での細胞の浮遊と振動のためと報告されている。しかし、細胞が形を保って存在しているのは少なくとも確認できる。図 14 は、地上対照の顕微鏡写真でこちらも細胞の形を保持しているものが多いものの、その間に細胞が崩壊したと考えられる微小な粒が見られる。この地上対照の細胞は細胞濃度  $1.9 \times 10^6 / \text{cm}^3$  で生存率 15% であった。これらのことと後で述べる細胞分泌物の量から細胞は軌道上でも泳動試料として存在していたと考える。

### 飛行中泳動実験の状況と結果

図 15 は、泳動実験の開始前に試料検出器に出力された紫外線の発光度分布で、本来であれば端から端まで光度は 0.7 ~ 0.8 となる。しかし、16チャンネルから 53チャンネルの光では低い値が出ている。これは、この部分に水よりも光を吸収しない物質、すなわち気体の存在する可能性を示していた。着陸後の調査で気泡の存在が確認された。この気泡は、図 16 のように泳動槽内に存在し緩衝液の流れを狭い範囲に押し込んだと推定している。

図 17 は分取容器に分取された

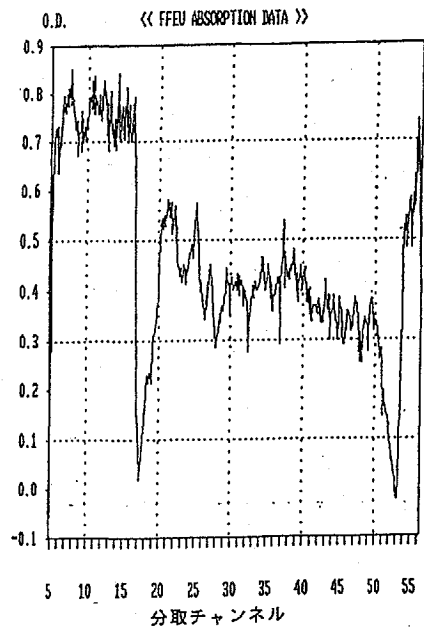


図 15 試料検出器の参照データ

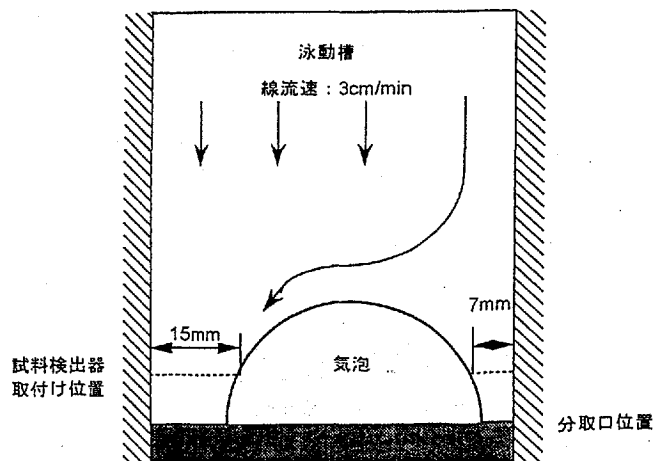


図 16 泳動槽内状況の推定図

試料の量を調べたものである。規定値(2.5 cm<sup>3</sup>)以上のものもあるが、ほとんどは本来入るべき液体の分量に達していない。又、泳動実験が始まってから気泡の存在に気付いたものの確信のない状況で分取容器を付けるべきチャンネルを決めたので泳動試料を取り損なった面もあり二次分析ではなにも検出できなかった。検出できたのは多量に確保できた泳動前の試料である細胞培養液のみであった。

図 18 は、泳動実験を始める前に試料検出器のバックグラウンドを引いた吸光度の出力状態である。17チャンネル及び53チャンネル付近

には+-のピークが現われており、これはバックグラウンドを引いても気体と液体との界面では光の反射・吸収の不連続性が著しいため現われたものであり、着陸後の装置の飛行後解析で確認された。図 19 は、泳動電圧 150 V、試料流速 3 cm/min、緩衝液流 3 cm/min のときの試料検出器出力であり、気泡のない17チャンネル以下に注目すると少なくとも3つのピークが見られる。採取量不足のため二次分析ができなかったたので断定はできないが、10チャンネル付近が死細胞の残骸、12チャンネル付近が細胞で、15チャンネル付近がIgGと推定する。

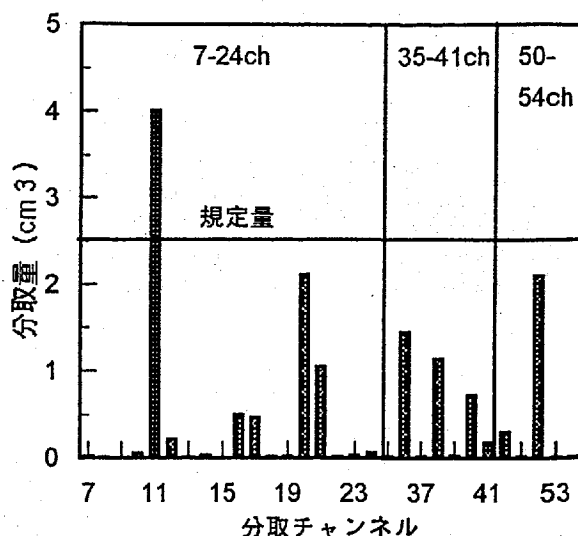


図 17 分取容器の分取状況

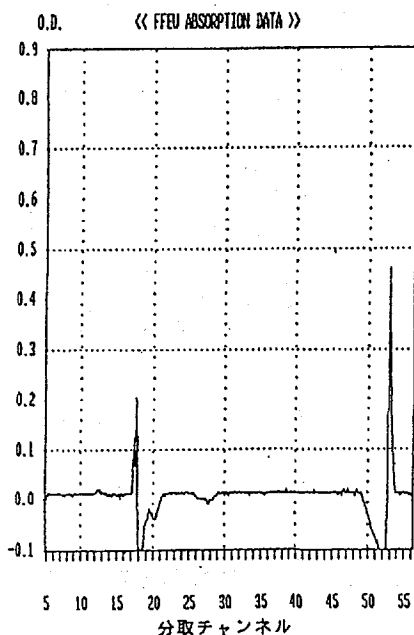


図 18 泳動前の試料検出器出力

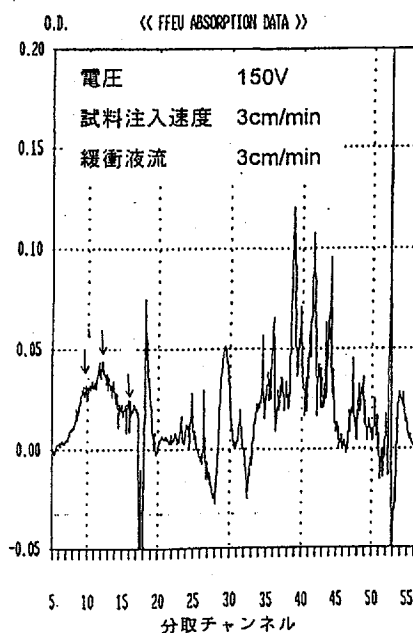


図 19 泳動中の試料検出器出力

図 20 は本泳動実験の後に行うことができた追加実験の結果を加えたもので、電圧を変えた場合の泳動状況調べた結果を示す。電圧 0 V では試料が 12 と 13 チャンネルの間に試料のピークが現れているのが、150 V では 3 つに分離し、200, 300 V では昇圧とともにピークが小さくなっている。これは、電圧とともに泳動距離が大きくなり、分離された試料が 5 ~ 17 チャンネルより外側へ移動したものと推定する。

一方、気泡が存在する 17 ~ 53 チャンネルを見ると電圧の上昇とともに吸光度が増加しており、この理由は、ジュール熱の増加により気泡界面から気泡内への蒸発量が増えるので、泳動槽の冷却壁面で水蒸気が凝縮して形成された水滴が大きくなり、吸光度が上昇したと考えるが、詳細は不明である。

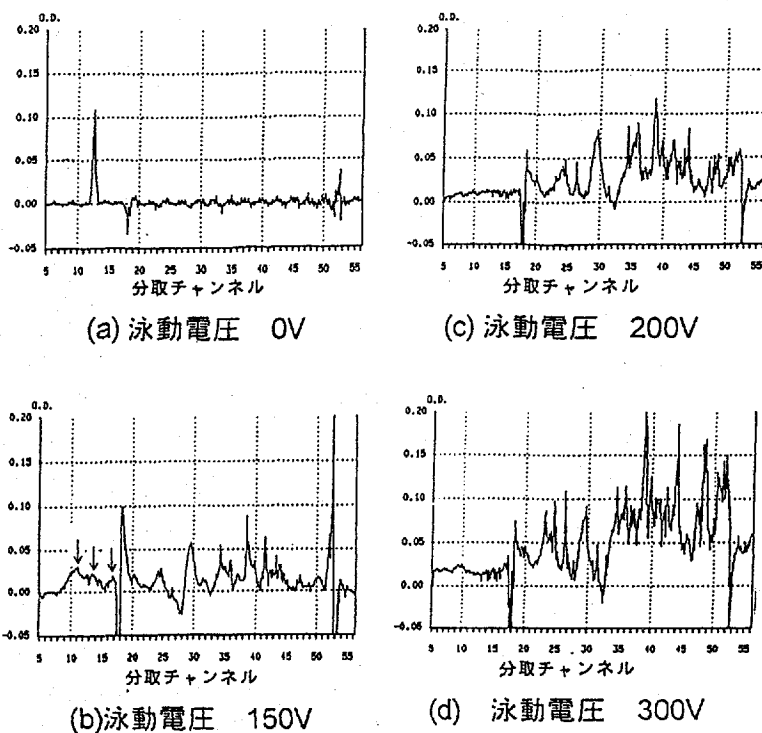


図 20 泳動電圧の泳動状況への影響

### 解析と考察

図 21 は、微小重力環境で培養された細胞と地上対照実験で培養された細胞が分泌した IgG の量を分析し対比したものを示す。地上で培養されたもののほぼ 2 倍の IgG を宇宙で培養されたものは分泌している。菅沼らとは異なる細胞であるが同じ結果を確認している。

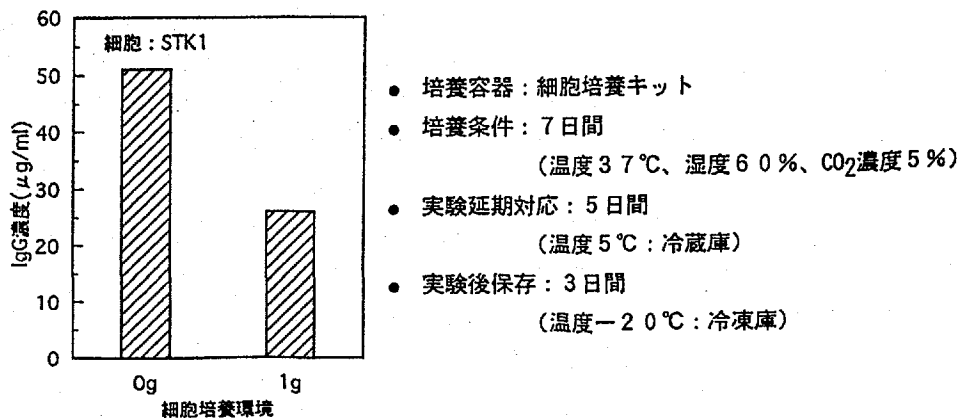


図 21 微小重力環境の細胞産生への影響



試料流速及び緩衝液流速：3 cm/min

有効泳動範囲：0～17チャンネル（地上は、0～60チャンネル）

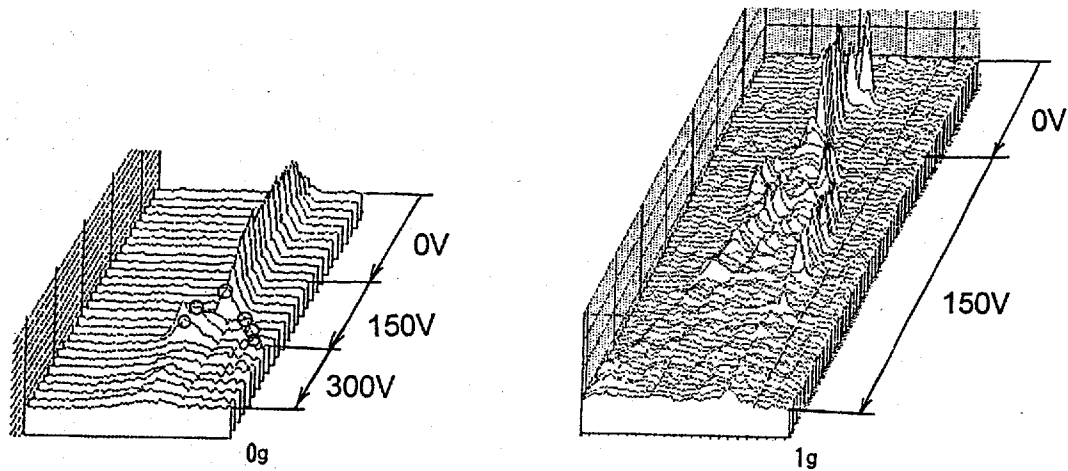


図 22 微小重力環境と地上との泳動分離状況の比較  
(試料検出器の出力結果)

これは、細胞の種類が異なるものの浮遊性細胞として同じメカニズムで有用物質を産生しているためと考える。浮遊性細胞といっても培養液よりも比重が若干大きいため地上では培養フラスコの底に密集して沈んでいるので、栄養分や酸素等を取り込める環境は細胞の上の環境のみであるのに対し、微小重力環境では3次的に分散できたので全方向の環境が対象となるためと推察するが詳細は不明であり今後のメカニズムの解明が期待される。このメカニズム如何によっては、当社の開発したバイオリアクタ技術と組み合わせることにより約40倍の細胞分泌物を得ることも可能性があると考えられる。

図 22 は、試料検出器の出力の時間変化を比較したもので左図は、飛行中実験の結果を泳動が行われた0～17チャンネルに注目して抽出したものであり、右図は、地上で予備試験として FFEU/FM を使って行われたときのものを示す。但し、地上の実験では試料は細胞を除去した培養液であり、本 FM は、地上では熱対流が発生するため泳動できる範囲が限られているが泳動槽の作動性確認のため泳動実験が行われた。このため、地上の出力は、泳動電圧 0 V でも泳動槽の冷却に起因すると考えられる部分的密度流で、最初のうちは、試料のピークが左右に振れている。泳動電圧が印加された状態では、熱対流の原因となる加熱が行われるため緩衝液の温度が徐々に上昇する。緩衝液温度が上昇すると、緩衝液の導電率が高くなるためさらに電流が増え加熱量が増え緩衝液の温度が上がるという循環になり部分的な熱対流の影響がでる。これに対応する試料のピークは、右方向に泳動しながら左右上下に振れている。しかし、泳動槽の形状、寸法、緩衝液の熱流体的物性より決まる臨界温度を越えると全面的に熱対流が発生し試料のピークは、拡散し最終的に消滅している。これに対し左図は、泳動槽内に混入した気泡の影響で泳動場が狭められ、しかも流れ場としては非対称形になるという悪い状況にも拘わらず、泳動電圧 0 V のときの試

料のピークは、高さ、位置ともかなり安定しており、微小重力の効果が出ている。又、図 23 は、図 22 の左図を前から見たもので泳動電圧 0 V のときの試料注入の安定性が分かる。また、見にくいので○印で示すが泳動電圧 150 V のとき IgG と考えられるピークが右に、細胞の崩壊した後の破片と考えられるピークが左に泳動している。しかし、この後の泳動電圧 300 V への昇圧で IgG と考えられるピークはさらに右に移動しこの泳動場の外に出た。又、細胞の崩壊した後の破片と考えられるピークはさらに左に泳動し、正常な泳動ができない電極の影響域(電極から 5 mm ~ 10 mm)に入り拡散したものと考える。これらから、地上と比べると熱対流がないお陰で分離能が著しく向上できることが示唆される。今後のさらなる宇宙泳動実験の継続を期待する。

試料流速及び緩衝液流速 : 3 cm/min

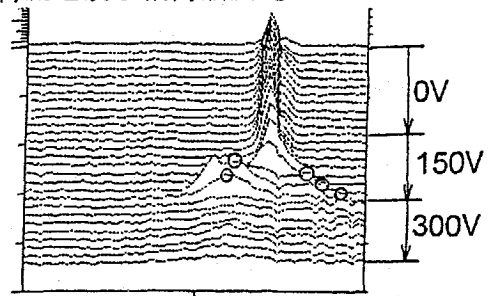


図 23 微小重力環境の泳動分離状況  
(図 22 の左図の正面から見た図)

## 結論

分離精製性能の向上を期待される宇宙用電気泳動実験で有用物質を分泌する細胞培養液を泳動分離する実験を行った。シャトルの打上げ後、地上対照実験を行いながら軌道上泳動実験に参加するとともに持ち帰った試料を分析し、次のことを明かにした。

- 1) 泳動槽の内部に気泡が存在していたものの、気泡の存在しない部分では局所的に泳動分離が生じており、この領域で泳動分離が行われたことが試料検出器により把握できた。この泳動が行われた範囲では、試料が熱対流の影響を受けないため地上実験結果と比較して試料の泳動場での安定性が著しく高いのを確認できた。これは、間接的ながら泳動分離が著しく向上するのを示していると考えられる。
- 2) 凍結保存した状態で日本から NASA ケネディ宇宙センターに運んで解凍して培養を行った細胞は、培養開始後約 1 週間で増殖速度が通常の数値に回復し、16 日目で細胞生存率が 90 % 以上に達して安定することを確認した。
- 3) 打上げ後、6 日培養された細胞は予定と異なり、その後泳動まで冷蔵庫に 5 日間保存された。この宇宙と同じ条件で地上対照実験で培養された細胞は、細胞濃度  $1.9 \times 10^6$  (/cm<sup>3</sup>) で生存率 15 % であった。顕微鏡写真を見る範囲では、宇宙でも細胞の形状を保ち泳動可能な状態であったと考える。分析の結果、宇宙で培養した細胞は、地上で培養した地上対照実験細胞の約 2 倍の IgG を分泌していることが分かった。これらから、宇宙での培養と電気泳動を組み合わせることにより薬品の生産量を大きく向上できるものと考えられるので、さらに宇宙実験でそれぞれの分野で詳細なデータの蓄積が国際協力のもと行われることを期待する。

## 参考文献

- 1) Hitachi, Ltd. System for Culturing Animal Cells in High Concentration. *JETRO*. 88-10-004-254 (October 1988).
- 2) 三上定夫. バイオセパレーション, CMC (1985).
- 3) 青木幸一郎. 最新電気泳動法, 広川書店 (1978).
- 4) Hannig, K. et al. *Free-flow Electrophoresis*, GIT Verlag (1990).
- 5) McDonnell Douglas. *Feasibility of Commercial Space Manufacturing (Production of Pharmaceuticals) Final Report Vol. 2*, NASA-CR-161325 (1978).
- 6) Hannig, K. et al. Eine Neuentwicklungen der Traegerfreien Kontinuierlichen Electrophorese. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Physiol. Chemie.* 338, 211-227.
- 7) Hannig, K. et al. Free-flow electrophoresis under microgravity: Evidence for enhanced resolution of cell separation. *Electrophoresis.* 11, 601-604 (1990).
- 8) 宇宙開発事業団. 宇宙開発事業団技術報告, ふわっと '92 宇宙実験成果報告 ライフサイエンス編 (1994).
- 9) Perrin, D. D. et al. *Buffers for pH and Metal Ion Control*, Chapman and Hall (1974).
- 10) Rhodes, P. H. et al. Electrohydrodynamic Distortion of Sample Streams in Continuous Flow Electrophoresis. *Journal of Colloid and Science.* Vol. 129.

## 外部発表

- 1) Okusawa, T., Kojima, Y., Tsubouchi, K., Hamano, N. and Takagi, Y. Investigation on Electrophoretic Separation of Cell Culturing Suspension for IML-2. *Proceeding of 18th International Symposium on Space Technology and Science*, Kagoshima (1992). 2229-2234.
- 2) 奥沢 務, 芳賀良一, 坪内邦良, 浜野亘男, 高木勇輔. 第二回国際微小重力実験室での泳動分離のための地上予備検討. 第37回宇宙科学技術連合講演会講演集 (1993).
- 3) Okusawa, T., Tsubouchi, K., Haga, R., Kanakubo, T., Takagi, Y. and Hamano, N. Preliminary Terrestrial Investigation on Electrophoretic Separation for IML-2. *19th International Symposium on Space Technology and Science* (1994). 94-h-22.
- 4) 奥沢 務, 坪内邦良, 芳賀良一, 石川孝一, 長岡俊治, 加藤充康. 動物細胞培養液の泳動分離実験. 日本機械学会第72期通常総会講演会先端技術フォーラム15「IML-2からの機械技術者の教訓」(1995).

# Electrophoretic Separation of Cells and Particles from Rat Pituitary (PITUITARY)

Principal Investigator: W. C. Hymer\*<sup>1</sup>

Co-investigators: T. Salada\*<sup>1</sup>, R. Cenci\*<sup>1</sup>, K. Krishnan\*<sup>1</sup>, G. Seaman\*<sup>2</sup>  
and S. Nagaoka\*<sup>3</sup>

\*1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, The Pennsylvania State University,

\*2 Emerald Diagnostics, \*3 National Space Development Agency of Japan

In this report we describe the results of a continuous flow electrophoresis (CFE) experiment done on STS-65 in which we tested the idea that intracellular growth hormone (GH) particles contained in a cell lysate prepared from cultured rat anterior pituitary cells in microgravity might have different electrophoretic mobilities from those in a synchronous ground control cell lysate. Collectively, the results suggested that CFE processing in microgravity was better than on earth; more sample could be processed/time (6x) and more variant forms of GH molecules could be resolved as well. We had also hoped to do a pituitary cell CFE experiment, but failure of the hardware required that the actual cell electrophoresis trials be done on earth shortly after Shuttle landing. Data from these experiments showed that spaceflown cells were more electrophoretically mobile than ground control cells, thereby offering evidence for the idea that exposure of cultured cells to microgravity can change their net surface charge--especially when the cells are fed. Collectively, the results from this pituitary cell experiment document the advantage of using coupled cell culture and CFE techniques in the microgravity environment.

## INTRODUCTION

Even though continuous flow electrophoresis (CFE) was first introduced about 35 years ago<sup>1) 2)</sup>, it is only quite recently that there has been renewed interest in this technology<sup>3) 4)</sup>. As pointed out by Roman and Brown "...the tremendous growth of biotechnology over the past decade has necessitated the development of purification methods for isolating a single compound from a complex biological matrix"<sup>3)</sup>. The CFE process has attracted interest because it is continuous, does not use organic solvents, and avoids the use of support media (e.g. gels).

A number of studies indicate that the CFE process may also be quite useful for applications requiring cell separation. In fact, a recent book summarizes its theoretical basis in addition to providing a description of results from many laboratories using this technology for the separation of diverse cell types such as subpopulations of mammalian lymphocytes and human cancer cells<sup>5)</sup>.

Distortions of the sample stream occur during CFE processing; these are hydrodynamic,

electrodynamic and electrohydrodynamic in character. Some are limited by gravity. It is therefore not surprising that the theoretical advantages of doing CFE processing in microgravity have been tested in spaceflight experiments dating back to 1982. This history has been reviewed by Morrison<sup>6)</sup>. Perhaps the best evidence for enhanced resolution of separated cells by CFE in low gravity was obtained using fixed red blood cells from 3 different species during a 5 minute suborbital rocket flight<sup>7)</sup>.

Our laboratory has applied electrophoresis technology to the separation of rat pituitary cells and their subcellular constituents<sup>8) 9)</sup>. In 1983 we attempted a CFE experiment in microgravity<sup>10)</sup>. Increased bandsread of the recovered cells suggested enhanced resolution of the different hormone containing cell types, but poor recoveries and biological contamination did not establish this point definitively. The availability of Japanese cell culture kits (CCK) and the NASDA free flow electrophoresis unit (FFEU) during the 14 day IML-2 mission allowed us to design a CFE trial that was coupled to pituitary cells in the CCK. Although problems with the FFEU were encountered during spaceflight operations (see Discussion) sufficient data were collected which continue to support the idea that CFE processing in microgravity is advantageous. This report describes those data.

## MATERIALS AND METHODS

In its original design, two continuous flow electrophoresis (CFE) trials were to have been done in microgravity. One used a freshly prepared rat pituitary cell lysate; the other used enzymatically dispersed rat pituitary cells. Both samples were to have been prepared for CFE processing in microgravity using the cell culture kits (CCK's) described in the companion report<sup>11)</sup>; however, because of technical problems with the CFE hardware, only the cell lysate CFE experiment was actually attempted in microgravity. The procedures which were followed in this trial are outlined in Fig. 1. Pituitary cells ( $4 \times 10^7$ ) in each of 2

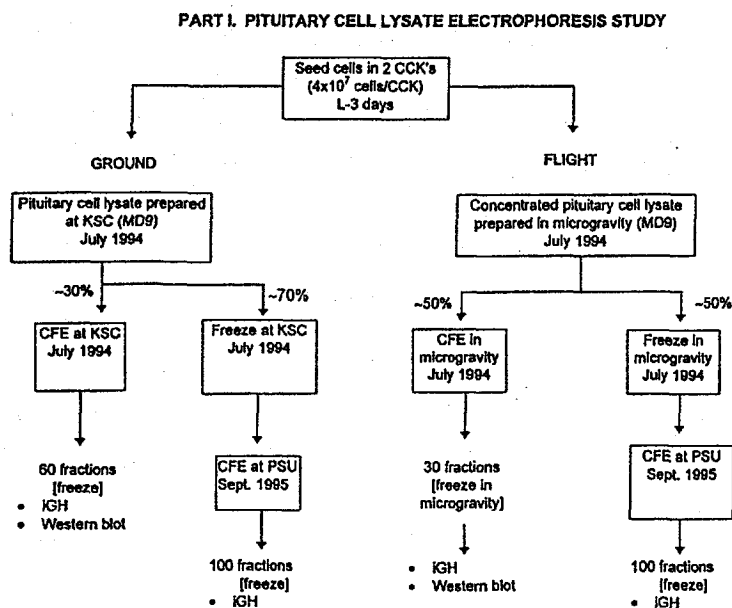


Fig. 1 Experimental design and timing of operations involving CFE of pituitary cell lysate. See Materials and Methods for details.

PART II. PITUITARY CELL ELECTROPHORETIC STUDY

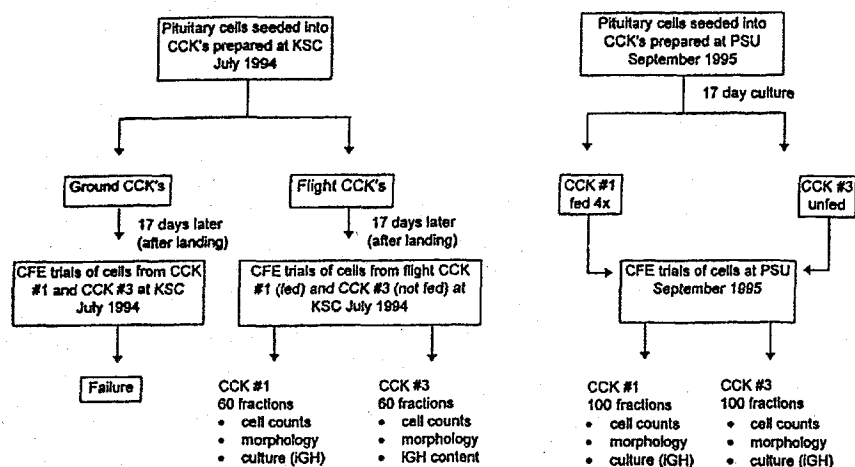


Fig. 2 Experimental design and timing of operations involving CFE of pituitary cells after microgravity exposure. Cells from flight CCK #1 and #3 were processed at Kennedy Space Center within 8 hrs. of Shuttle landing using a device (identified as device #2 in Table 1) made for this experiment by Mitsubishi Heavy Industries, LTD. This device malfunctioned after processing of cells from both flight CCK's; accordingly, an asynchronous ground control experiment was done later using another CFE device (identified as device #1 in Table 1).

CCK's were prepared at L-3 days exactly as described for the cell culture portion of this experiment<sup>11)</sup>. Cells in these two CCK's were not fed prior to preparation of the cell lysate on mission day 9. As shown in Fig. 1, only (50 % of each ground and flight lysate was actually used for processing in the July, 1994 experiment; the remainder were processed by CFE at Penn State later.

The procedures which were followed in the cell electrophoresis study are outlined in Fig. 2. After Shuttle landing cells were removed from CCK #1 (fed 4x in microgravity) and from CCK #3 (not fed during the 14 days in microgravity)<sup>11)</sup> using our routine trypsinization procedures<sup>12)</sup>. Cell viabilities at this point averaged 93 and 90 % for CCK #3 and #1 respectively. Sufficient cells were obtained after CFE processing of the cells from CCK #1 to do a 6 day culture with the separated cells; this was not possible for those from CCK #3 because cell numbers were insufficient.

### Cell Lysis.

On mission day 9, cell culture medium was removed and the cells in the CCK were washed briefly (~1.5 min) with 15 ml distilled water; this step diluted any residual serum containing medium that had been left behind which would, in turn, discourage cell lysis. Cell lysis was accomplished using H<sub>2</sub>O containing 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub> and soybean trypsin inhibitor (1 µg/ml). The ZnCl<sub>2</sub> was included to maintain integrity of nuclei and hormone-containing secretory granules<sup>13) 14)</sup>. Lysis, monitored microscopically, was complete after ~10 min. This diluted lysate was then concentrated to ~3 ml by (1) drawing the lysate out of the CCK into a syringe containing 20 mg DNase (Type I), solubilized, and

then reinjected back into the CCK, and (2) then drawn from the CCK into a concentrating device containing 1 ml of 10x electrophoresis buffer and consisted of a Spectra pore 7 dialysis membrane (10,000 MW) surrounded by polyethylene glycol 60 (60,000 MW).

## CFE.

The carrier buffer consisted of 5 mM HEPES, 30 mM glycine, 0.2 mM potassium acetate, 0.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.03 mM CaCl<sub>2</sub>, 220 mM glycerol, 44 mM sucrose, 0.2 mM ZnCl<sub>2</sub>. Its conductivity and osmolarity was 260  $\mu$ S and 300 mOSM respectively. Results from several preflight CFE trials indicated that this buffer was superior to several others in terms of maintaining cell viability (>80 % over 17 days).

Three different CFE devices were used in carrying out this experiment. Two have been described in previous publications<sup>10) 15)</sup>; the third was designed to serve as the ground control unit when synchronous flight and ground processing was done. See Table 1 for operating details and specific sample applications.

## Post CFE Analysis.

Procedures involving cell preparation, GH immunoassay, HPLC gel filtration and ion exchange chromatography, immunocytochemistry and cell culture were as described previously<sup>16) 17)</sup>. Western blotting was done on 5-15 % gradient gels under non-reducing conditions as in previous reports<sup>14)</sup>.

Table 1 CFE operating conditions used in this study

Sample	Sample in space or ground	Process in space or ground	FFE Device +	Field strength	Carrier buffer rate ++	Sample rate	% recovery *	Fig #	
Lysate	ground	ground	2	25 v/cm	5 ml / min	0.2 ml / hr	228	4	
Lysate	ground	ground	2	25 v/cm	3 ml/min	0.15 ml/hr	73	6B	
Lysate	flight	flight	3	25 v/cm	7 ml/min	2 ml/hr	17	5,6A	
Lysate	ground	ground	1	15 v/cm	18 ml/min	2.7 ml/hr	34	6C	
Lysate	flight	ground	1	15 v/cm	18 ml/min	2.7 ml/hr	32	6C	
Cells	ground (no media change)	ground	2	25 v/cm	5 ml/min	0.15 ml/hr	54	11 (top)	
Cells	ground (no media change)	ground	2	25 v/cm	5 ml/min	0.15 ml/hr	34	11 (middle)	
Cells	ground (no media change)	ground	2	25 v/cm	5 ml/min	0.15 ml/hr	34	11 (bottom)	
Cells	flight (4x media change)	ground	2	25 v/cm	3 ml/min	0.15 ml/hr	18	12	
Cells	flight (no media change)	ground	2	25 v/cm	3 ml/min	0.15 ml/hr	37	12	
Cells	ground (4x media change)	ground	1	15 v/cm	18 ml/min	2.7 ml/hr	11	12	
Cells	ground (no media change)	ground	1	15 v/cm	18 ml/min	2.7 ml/hr	16	12	
								Chamber dimensions	
+ FFE Device:		#1 1.5 mm Continuous Flow Electrophoresis Device (Hymer et al. 1987)					120 cm x 8.2 cm x 1.8 mm		
		#2 Japanese 1.0 mm ground Free Flow Electrophoresis Unit					10 cm x 6 cm x 1 mm		
		#3 Japanese 4 mm flight Free Flow Electrophoresis Unit (Akiba et al. 1994)					10 cm x 6 cm x 4 mm		
++ Carrier Buffer Formulation:		5 mM HEPES, 30 mM Glycine, 0.2 mM Potassium Acetate, 0.3 mM MgCl <sub>2</sub> , 0.03 mM CaCl <sub>2</sub> , 220 mM Glycerol, 44 mM Sucrose, 0.2 mM ZnCl <sub>2</sub>							
* either GH or total cells									

## RESULTS

The ultrastructure of a rat pituitary cell lysate as well as enzymatically dispersed rat pituitary cells after a 9 day culture is shown in Fig. 3. These micrographs represent the type of samples that were used in this microgravity continuous flow electrophoresis (CFE) experiment.

### Lysate Processing (Earth).

A typical CFE distribution profile of GH particles contained in a freshly prepared lysate from an eight day pituitary cell culture shows a dominant anodal GH peak; a small cathodal GH peak and immunopositive material which did not migrate in the field (Fig. 4). This pattern is similar to others using freshly prepared rat anterior pituitary homogenates<sup>9)</sup>.

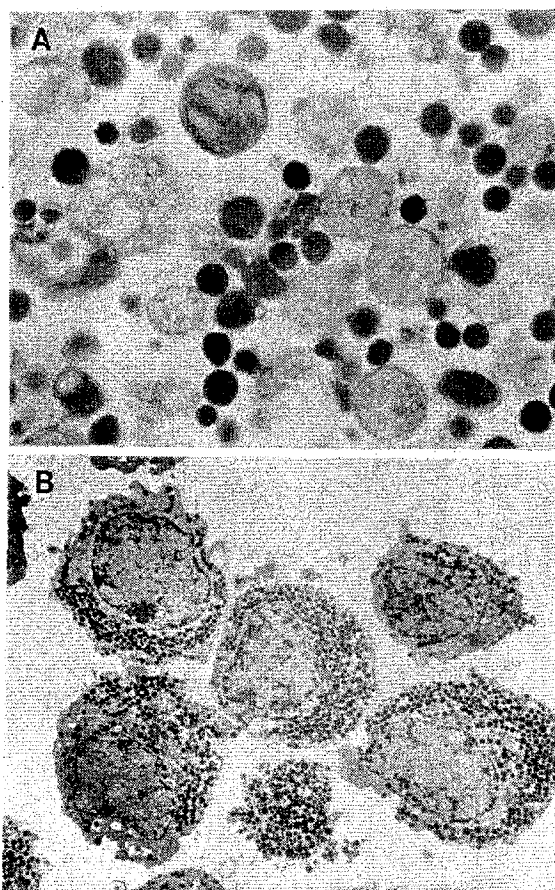


Fig. 3 Electron micrographs of a rat anterior pituitary cell lysate (top) and enzymatically dispersed rat pituitary cells that had been in culture for 9 days (bottom). The culture medium was identical to that used in microgravity<sup>20)</sup> and was not changed during the 9 days. Hormone containing secretory granules are prominent. These samples are representative of the types of samples that were subjected to CFE in microgravity (lysate) or after microgravity exposure (cells).

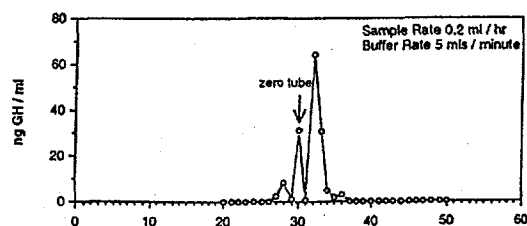


Fig. 4 Representative ground-based CFE distribution profile of GH particles prepared from rat pituitary cells in culture (CCK) for 8 days prior lysis and CFE. See also Table 1. The zero tube identified in this and subsequent figures represents the elution position of the material when no electric field is applied.



## Lysate Processing (Microgravity).

A concentrated pituitary cell lysate was prepared in space from unfed cells on mission day 9 following the procedure described in Methods. CFE processing of this lysate was done according to the experimental design shown in Fig. 1. The down-linked OD 280 profile collected midway through the 21 minute processing trial (Fig. 5A) showed a complex structure which suggested widespread distribution of protein throughout the separation chamber. This pattern was stable during the entire run. Only 30 of 60 possible fractions could be collected at the end of this trial; those selected are indicated in Fig. 5B. On return to earth, only a few of these 30 fractions contained the expected volume (i.e. 2.5 ml), a fact which implies that air bubbles in the separation chamber may have blocked some of the outlets (see Discussion). The concentration of GH in the flight lysate was ~20% greater than that in the synchronous ground control preparation (cf. Fig. 6 A,B), a result which is entirely consistent with the finding that there were greater amounts of GH released into the 9 day culture medium prior to lysate preparation (see companion report, Fig. 4B). After CFE processing in microgravity, 9 of 30 fractions contained detectable GH; after synchronous

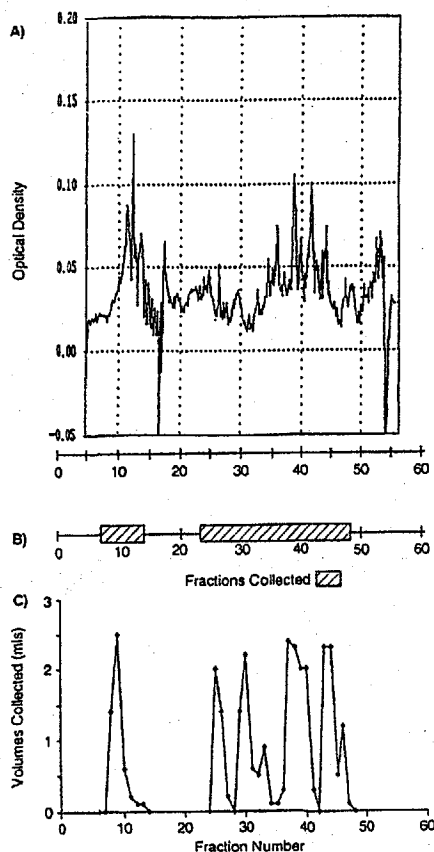


Fig. 5 (A) OD 280 profile of lysate material being processed by CFE in microgravity. This profile was down linked from space ~10 minutes into the CFE trial. (B) Fractions chosen for collection in microgravity after the 21 minute lysate CFE run had been completed. (C) Volumes collected in each of the 30 fractions after Shuttle return. Incomplete tube filling is attributed to bubbles in the separation chamber (see Discussion).

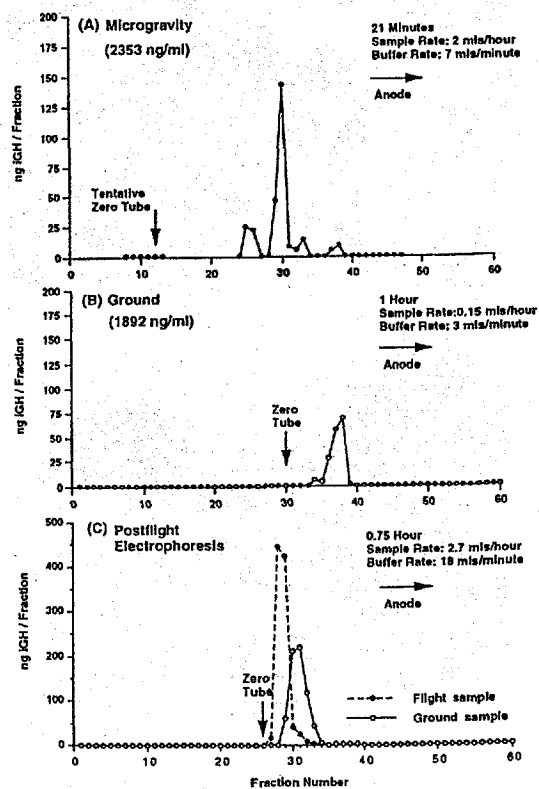


Fig. 6 Mobility profiles of GH containing material in lysate after CFE processing in microgravity (A) or on earth (B). As shown in Fig. 1, some of the initial sample from A and B was frozen and later electrophoresed (C) (see Table 1).

ground processing, only 5 of 60 fractions contained detectable GH (Fig. 6A vs. B). Three GH peaks were found after flight processing, but only one was present in the ground trial. Note that the zero outlet tube (i.e. the position where material emerges from the chamber when no field is applied) is identified as "tentative" in Fig. 6A (see Discussion). When frozen aliquots of these same concentrated lysates were subsequently processed on earth, the distribution profiles of GH were essentially identical (Fig. 6C).

In order to determine if there were any differences in apparent molecular weight of GH variants that might be contained in these fractions, Western blots were prepared on those fractions containing sufficient GH. The complex profile of GH variants that emerges when SDS-PAGE is used under non-reducing conditions is reasonably well documented<sup>18)</sup>; their complexity from both the ground and flight CFE fractions is therefore not unexpected (Fig. 7). Densitometry of these same blots revealed that there were some differences in GH variants between these fractions; those from flight were the most obvious (Fig. 8, shaded areas). These differences were in GH molecular weight regions (based on the mobilities of pre-stained molecular weight protein standards shown in Fig. 7) identified at the top of Fig. 8.

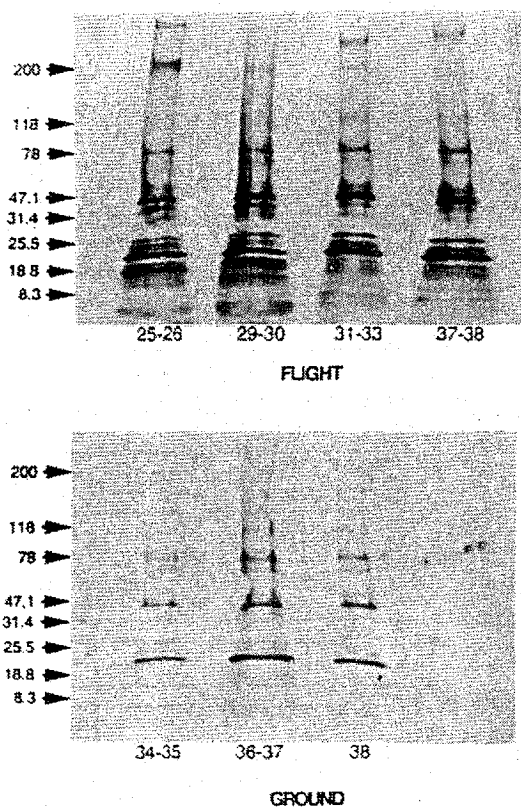


Fig. 7 Western blots of GH molecules contained in different CFE fractions after cell lysate processing; flight (top) or ground (bottom). See Fig. 6 for mobility profiles of GH fractions from which these blots were prepared. SDS-PAGE in 4-15% gradient gels under non-reducing conditions reveal large numbers of GH variants attributed to aggregation, cleavage, glycosylation, etc.<sup>14) 18)</sup> Markers show positions of co-migrating pre-stained molecular weight standards.

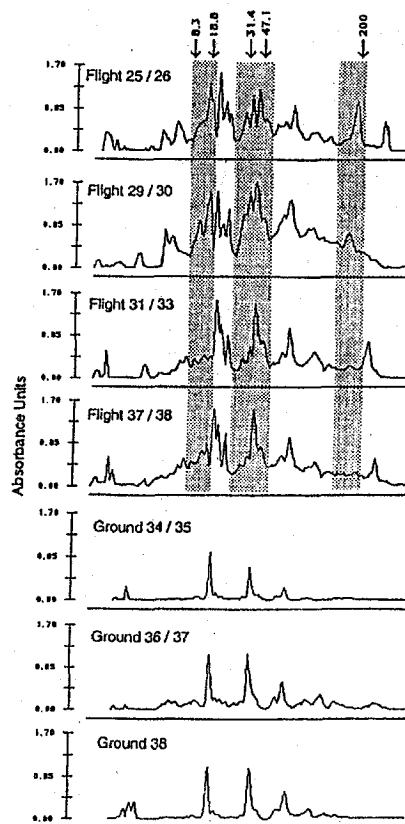


Fig. 8 Optical density tracings of GH Western blots shown in Fig. 7. Highest molecular weight material is at far right. Shaded areas show positions where changes in GH forms in the different CFE fractions from the flight trial are most apparent. Molecular weight markers are identified at the top.

Small (0.1 ml) aliquots of these lysate fractions obtained after CFE were also fractionated by HPLC gel filtration or anion exchange chromatography to obtain information concerning separation of general pituitary protein. Shown in Fig. 9 are the OD 280 gel filtration profiles of pH10 solubilized material that was contained in (1) the original lysates before CFE (Fig. 9A; molecular weight standards are shown in insert); (2) the fractions making up the GH peak after CFE processing of the synchronous ground control lysate (Fig. 9B) and (3) the fractions making up the three GH peaks after CFE processing in microgravity (Fig. 9C; also shown is another area which did not contain GH, viz. fractions 8-12). While the general protein profiles of the starting lysates were similar, there was a tendency for the flights sample to contain more high molecular weight material ( $> \sim 29,000$ ) (Fig. 9A). Differences in OD 280 patterns between fractions from the ground lysates were very minor (Fig. 9B); those from the flight lysates were also relatively minor (Fig. 9C). For example, material emerging from the column at  $\sim 40$  minutes (an elution time similar to the ribonuclease standard) was less in fractions 37-38 than fractions 8-12. The reason(s) for the absence of OD 280 material in CFE fractions eluting between 15 and 35 minutes, material that was present in the starting preparation, is unknown; it may reflect differential susceptibility to proteolysis.

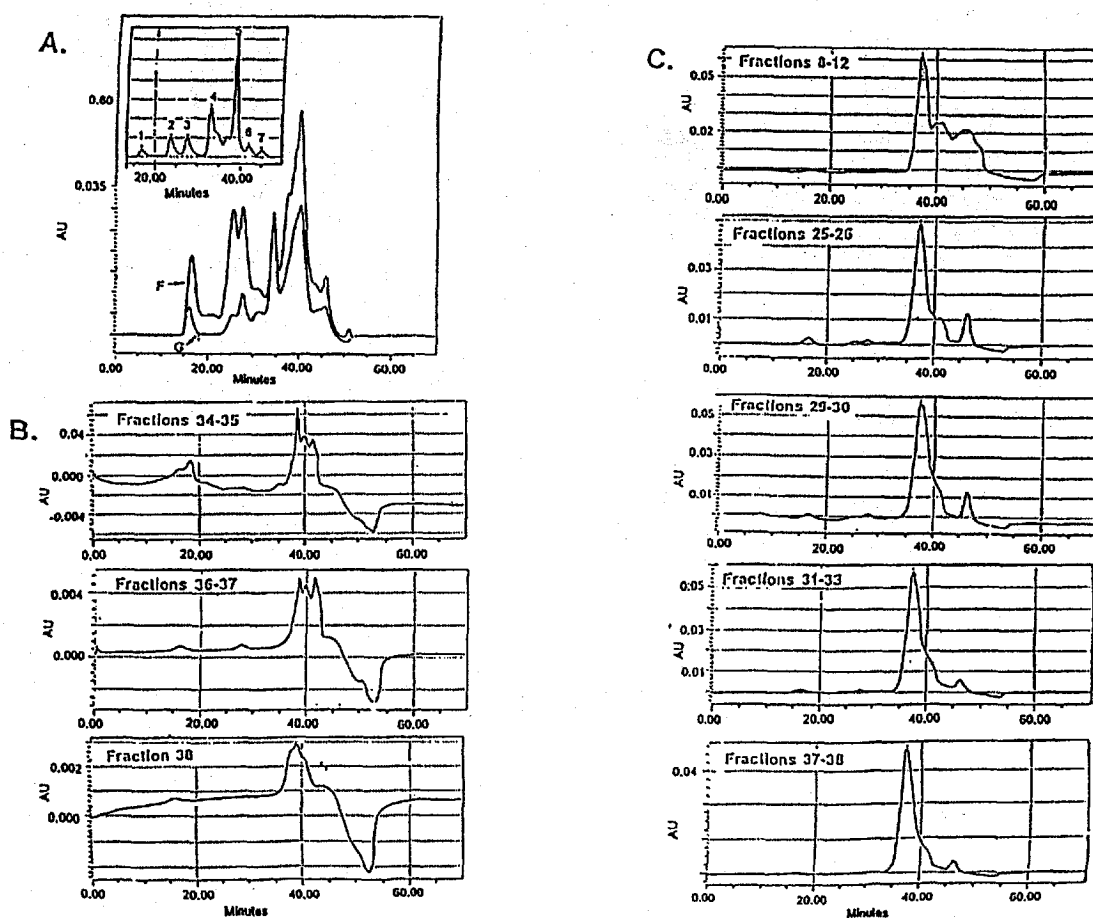


Fig. 9 Gel filtration profiles (OD 280) of pH 10 solubilized material that was contained in (A) the original lysate before CFE (B) fractions making up the GH peak after CFE processing on earth or (C) in microgravity. Protein standards, identified in insert to panel A, were (1) blue dextran,  $2 \times 10^6$ ; (2)  $\beta$ -amylase,  $2 \times 10^5$ ; (3) BSA,  $66 \times 10^3$ ; (4) carbonic anhydrase,  $29 \times 10^3$ ; (5) ribonuclease,  $13.6 \times 10^3$ ; (6) aprotinin,  $6.5 \times 10^3$  and (7) vasopressin,  $1 \times 10^3$ .

Because anion exchange chromatography of cell culture media collected from fed cells in this experiment had shown some interesting results (see Ref. 11, Fig. 9), we also fractionated the CFE lysate material from the CFE flight fractions containing GH by anion exchange HPLC. Only very small amounts of flight material processed due to insufficient sample volume.; the ground samples were not done. The general OD 280 profile of the proteins from the intracellular lysate (Fig. 10) was similar to those proteins contained in the culture medium (Fig. 9, top in Ref. 11) in that a large protein peak eluted from the column ~2 minutes before the salt gradient began followed by major protein peak eluting between 15-20 minutes. As before, minor differences in the OD 280 patterns infers that some protein separation was occurring during CFE processing in microgravity.

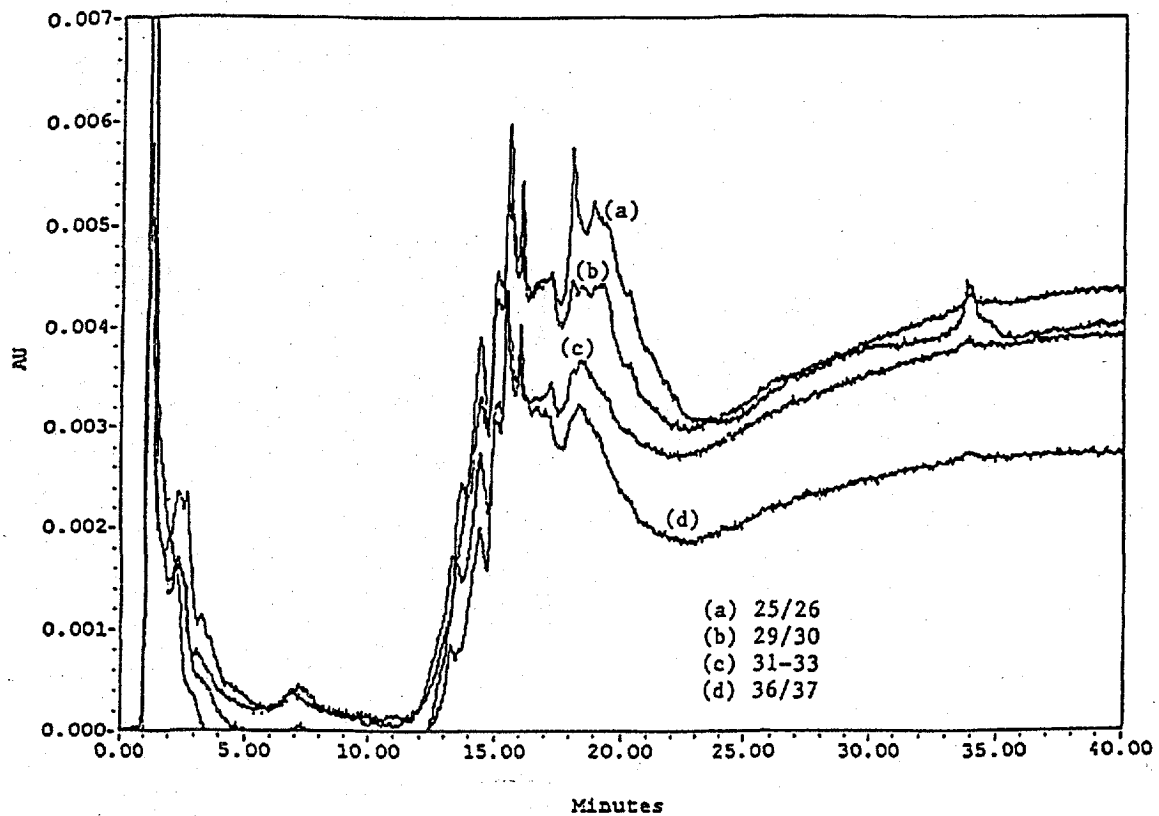


Fig. 10 Anion exchange profiles (OD 280) of pH10 solubilized material that was in GH-containing fractions after CFE processing in microgravity. Flight fractions in Fig. 6 are identified in this figure as a-d.

### Cell Processing (Earth).

The electrophoretic mobility profiles of unfed primary rat anterior pituitary cells that had been in culture for 8 days are shown in Fig. 11 (3 expts.). These trials were designed to mimic the cell processing trial that had been originally planned on day 8 for the IML-2 experiments. They show considerable variability. However, it seems clear from these preflight trials that a majority of the cultured, unfed pituitary cells exhibit anodal mobility under these electrophoresis conditions (Fig. 11, bottom panel) while some show no or even cathodal migration.

## Cell Processing (Microgravity).

Due to the technical problems with the flight electrophoresis hardware (see Discussion), it was not possible to carry out the cell electrophoresis trial as planned and the single microgravity CFE trial that was done (as planned) used pituitary cell lysate (Fig. 6). This made two cell culture kits available after Shuttle landing; we therefore tested the effect of microgravity exposure on the electrophoretic mobility of cells that had been in the culture for 17 days. In one case (CCK #1) the cells had been fed four times, in the other (CCK #3) the cells were kept in their original seeding medium. A detailed morphological description of the cells in these two CCK's is given in the companion report<sup>11)</sup>. The mobility profiles of cells trypsinized from these two CCK's and electrophoresed within 8 hrs. of Shuttle landing showed that fed cells had greater anodal mobility than unfed cells (Fig. 12, top two panels). This was not true when asynchronous ground control cells, cultured for 17 days, were electrophoresed (Fig. 12, bottom panels).

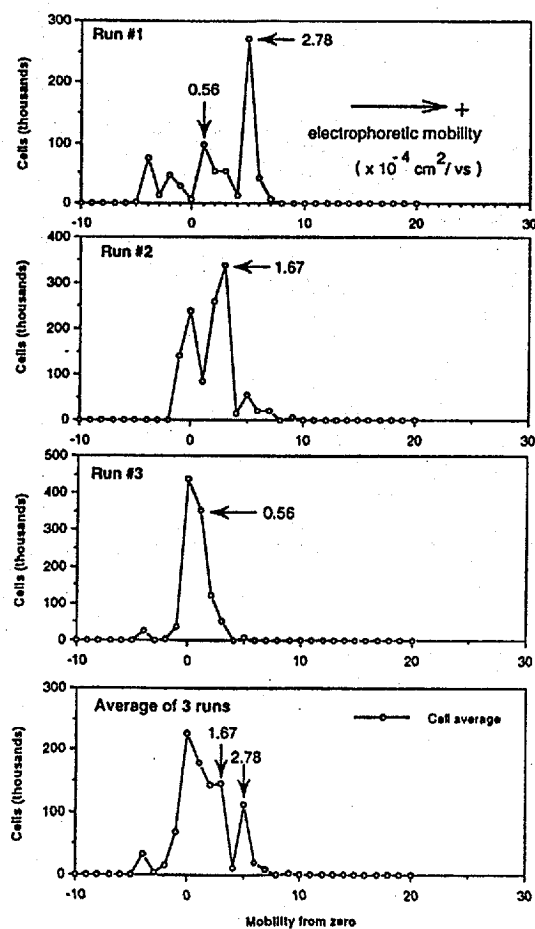


Fig. 11 Electrophoretic mobility profiles of unfed rat anterior pituitary cells that had been in culture for 8 days. (n=3 expts; the average is shown in the bottom panel). Actual electrophoretic mobility units of cell peaks, expressed as  $10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/vs, are identified in this and the next figure.

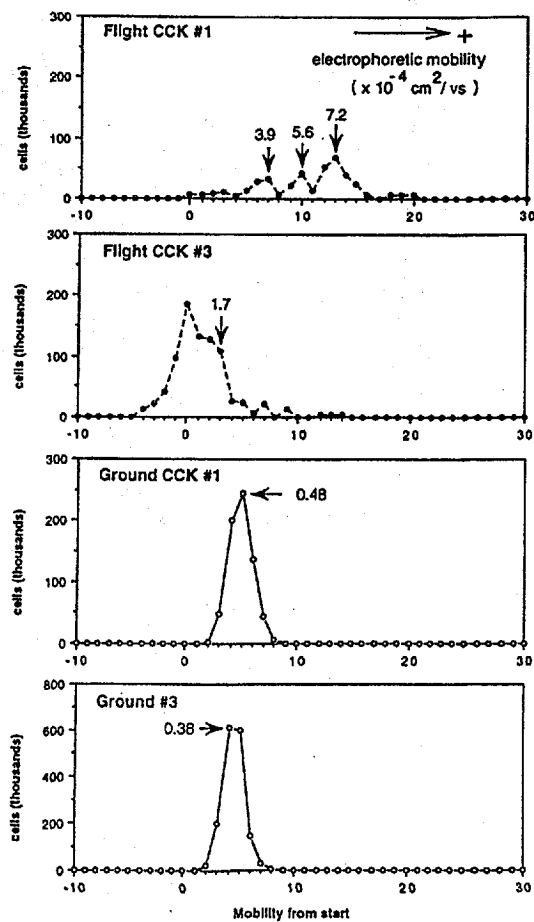


Fig. 12 Cell mobility profiles after trypsinization from flight and ground CCK's. CCK #1--cells fed 4x in microgravity; CCK #3--cells not fed (see Fig. 2 and Table 1 for additional details).

Cells from flight and ground CCK #1, after CFE, were cultured for 6 days to determine if the separated cells released GH and if the CFE process enriched GH producing cells. The data in Fig. 13 establish (1) that microgravity-exposed fed cells released (5x more hormone than corresponding ground controls (reason unknown); (2) that hormone producing cells exposed to space showed greater bandspread than the corresponding ground controls; and (3) that high producer cells after spaceflight tended to be among the most mobile (e.g. those in fractions 14-18).

Because cells were limiting from flight CCK #3 (see Materials and Methods), post CFE culture was not done. However, their intracellular GH concentrations mirrored the general cell profile, a result that was generally similar to the ground sample (Fig. 14). It is important to indicate that the average electrophoretic mobility distribution profiles of unfed cells in the preflight trials (Fig. 11, bottom panel) and those from unfed flight cells (Fig. 14, top panel) are similar. These profiles add support to the concept that there may be specific microgravity- feeding interactions which affect cell electrophoretic mobility.

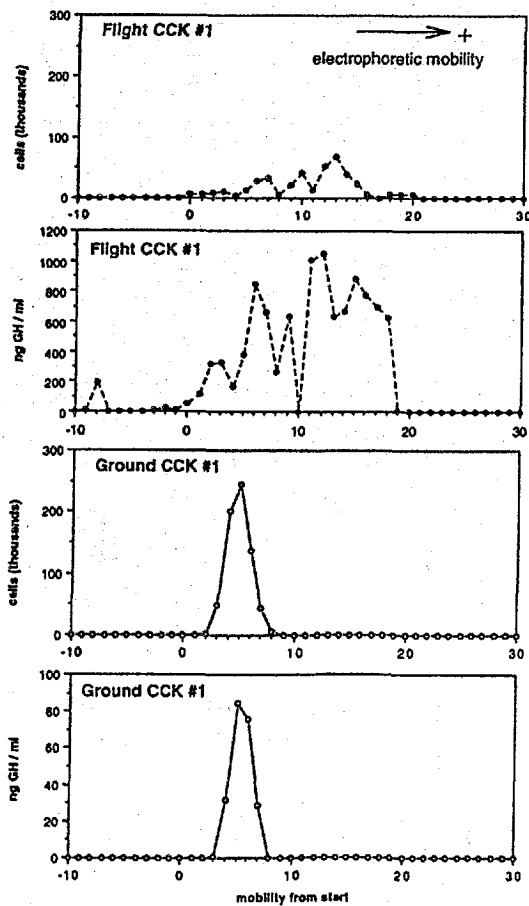


Fig. 13 GH released from cells contained in different CFE fractions after six days in culture. Cells were fed 4x in microgravity on earth; all of the cells in each fraction were placed into the culture well. See Fig. 2 and Table 1 for additional details.

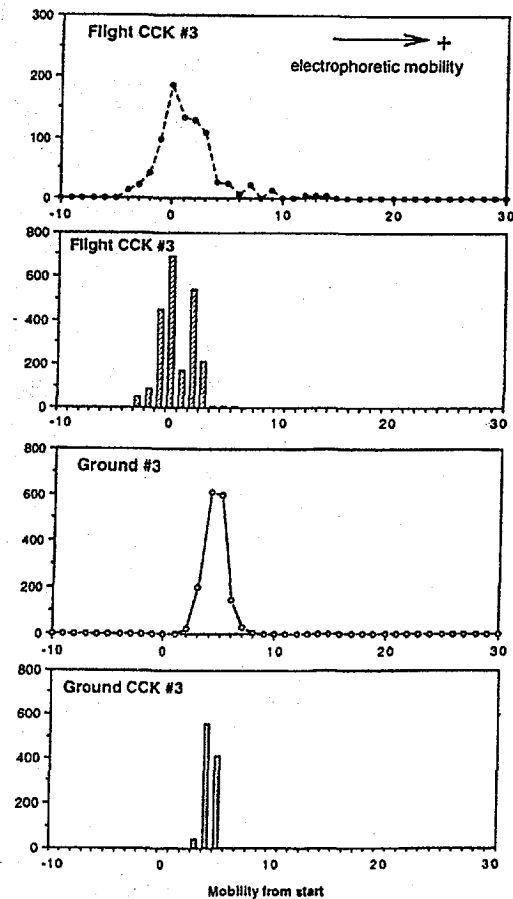


Fig. 14 Intracellular GH contained in different CFE fractions prepared from cells originally contained in CCK #3 (unfed for 17 days; see Fig. 2 and Table 1 for additional details).

The morphologies of GH cells prepared from ground and flight CCK's before and after CFE processing (Fig. 15) revealed the presence of intact cells which were typical of those seen in other studies.

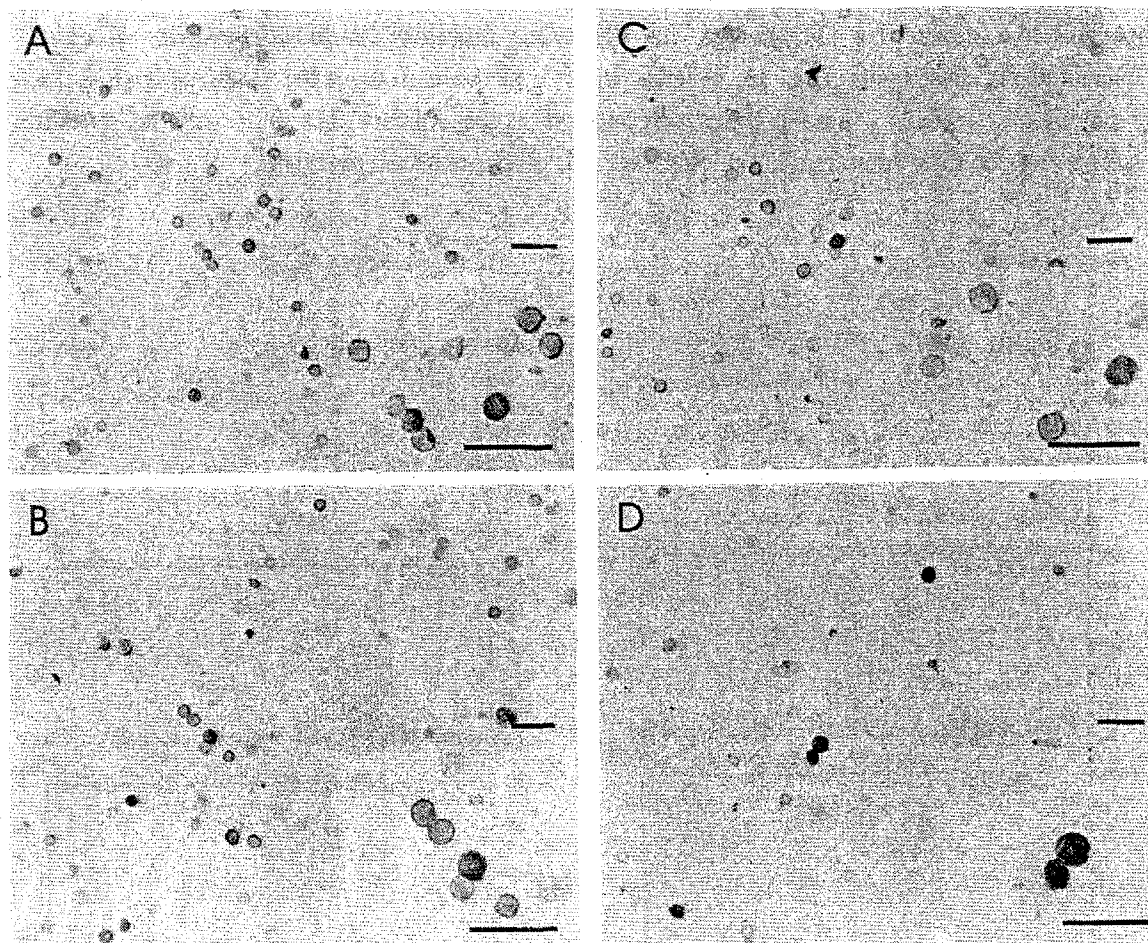


Fig. 15 Photomicrographs of cells recovered from flight CCK #1 and flight CCK #3 before and after electrophoresis postflight processing at Kennedy Spaceflight Center. These cells were removed from the CCK's which had been fed 4x (CCK #1) or not fed (CCK #3) during the course of the 14 day microgravity experiment. Cell removal by trypsinization, electrophoresis by CFE and staining by GH immunohistochemistry was done as described in Methods of this and the companion paper<sup>11)</sup>. Cells with dark cytoplasm are GH cells. Inserts are higher magnifications; all micron bars are 100  $\mu$ m. Sample identification: (A) CCK #1 (fed) cells before CFE fractionation; (B) CCK #1 (fed) cells after CFE fractionation contained in fraction #11 (see Fig. 13); (C) CCK #3 (unfed) cells before CFE fractionation; (D) CCK #3 (unfed) cells after CFE fractionation (see Fig. 14). Cells in B produced high amounts of GH during the 6 day culture after CFE (Fig. 13).

## DISCUSSION

The original objective of this experiment was to determine if microgravity exposure affected the electrophoretic mobility of either cultured rat pituitary GH cells or intracellular GH-containing particles. Our previous experiments which documented microgravity specific changes in GH cells from either spaceflown rats<sup>17) 19)</sup> or spaceflown cells themselves<sup>16) 20)</sup> established the underlying rationale for this objective; i.e. that CFE technology might aid in helping to define mechanisms of gravisensing in the GH cell. Additional secondary objectives emerged automatically; viz. (1) demonstration of CFE processing advantages in microgravity and (2) demonstration of ancillary methods required for these CFE operations (e.g. preparation of fresh solutions, trypsinization, cell lysis).

Even though three different CFE devices were used in this experiment, all utilize essentially the same technology; viz. separation in rectangular chambers using the same low ionic strength buffer. As shown in Table 1, cell recoveries averaged 29 % although there was considerable variability. This average compares favorably with that reported for a previous space CFE experiment using rat pituitary cells (20 %<sup>10)</sup>). The low recovery from the flight lysate trial may be due to the fact that only one half of the fractions were collected and many had low volumes.

Even though all of the original objectives of this experiment could not be met, new results were obtained. For example, evidence for a CFE processing advantage in microgravity is indicated by (1) increased throughput (the flight sample was 5.6x more concentrated than the ground); (2) greater bandspread of GH containing particles in the lysate sample (Fig. 6) and (3) better discrimination of some GH variants within different CFE fractions (Fig. 8). Since this same microgravity sample did not show a mobility difference when it was processed at earth gravity (Fig. 6), we conclude that microgravity exposure has little effect on the net surface charge of intracellular GH-containing particles. The idea that microgravity may effect net cell surface charge, depending upon the cell culture conditions (Fig. 12), is to our knowledge entirely new. Our companion report showed that the frequency of cell feeding in low gravity affected the cell morphology as well as the quantity and quality of certain hormones<sup>11)</sup>. We speculate that the greater mobility of the fed cells may reflect more hormone on their surfaces resulting from increased local concentration gradients caused by lack of microconvection in microgravity. The early report of St. John et al.<sup>21)</sup> which established the presence of hormone on the surface of rat pituitary cells supports the basic mechanism underlying this idea. Cell surface hormone could result from the exocytosis process; its implication to cell function is unknown. However, we have speculated that cell surface hormone could be recycled back to the golgi zone (together with secretory granule membrane) to provide a seed site for the formation of a new granule<sup>17)</sup>.

Bauer, in his thoughtful discussion concerning the significance of cell electrophoretic mobility<sup>22)</sup>, raises a number of points that are relevant to our current data set. He points out that most mammalian cells have a narrow mobility range ( $0.5-3.5 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/vs) even though several different types of electrophoresis devices have been used under very different conditions of analysis. Bauer also reviews the literature which attempts to relate the electrophoretic mobility value of the cell to its functional state. He concludes that electrophoretic cell mobility may relate to (1) the state of cell differentiation (but not strictly



so); (2) "switching" as the cell changes from one physiological state to another or (3) ligand binding to its receptor (e.g. such as in the case when a monokine binds to a lymphocyte subclass). The electrophoretic values of cells processed by CFE in this study are identified in Figs. 11 and 12. Note that for all trials except the one using cells from flight CCK #1 (Fig. 12, top panel) the EPM's are within the narrow range identified by Bauer. However, a majority of the cells which had been fed in microgravity had mobilities  $>3.5 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/vs; e.g. cell peaks with EPM's of  $5.6$  and  $7.2 \times 10^{-4}$  cm<sup>2</sup>/vs are identified in Fig. 12. Because high mobility cell populations were not found in flight CCK #3, the data support the idea that feeding pituitary cells in microgravity alters their net surface charge. Whether this reflects a gravisensing mechanism, or is the result of one, is unknown.

How might our new microgravity data relate to our previous spaceflight experiment<sup>10)</sup> and those of others that have been reviewed by Bauer<sup>22)</sup>? First, an earlier 1983 study from our laboratory showed that GH cells could be enriched by either density gradient electrophoresis or continuous flow electrophoresis, even through measurements of cell mobilities by two analytical methods (microscopic electrophoresis and laser tracking electrophoresis) revealed little difference between unpurified rat anterior pituitary cell suspensions and GH cell enriched suspensions<sup>8)</sup>. At that time we suggested that a microgravity experiment could help to establish whether or not the higher mobility of GH cells seen in ground-based CFE was truly attributable to a difference in their net surface charge or merely attributable to an artifact caused by fallback in one of the GH cell subpopulations having high density ( $\rho > 1.071$  g/cm<sup>3</sup>). In fact, evidence for the former explanation was obtained in a 1983 spaceflight experiment which showed that anodal regions of the cell distribution profile contained more GH/cell and that there were 3x more GH cells in these fractions than in those of the slowest moving cells<sup>10)</sup>. It is important to note that this earlier microgravity experiment was done by placing freshly prepared cells into a sealed conical tube at Cape Kennedy prior to launch. These cells were kept in a triethanolamine based buffer, low ionic strength buffer until the time of CFE processing in microgravity; only after collection were they exposed to buffers that were more physiologically compatible. Obviously the cell processing environment in our most recent IML-2 experiment was much more physiologically favorable; i.e. cells were maintained in a serum-bicarbonate containing Hepes buffered medium<sup>11)</sup> for their entire microgravity exposure before CFE processing and culture at KSC. The data in Figs. 11 and 12 not only establish that high mobility GH producing cells were recovered from flight (but not ground) CCK #1, but also that a microgravity-feeding interactive effect occurred which apparently affects not only hormone output but cell surface charge as well.

What set of conditions might result in microgravity/feeding/hormone release/net surface charge changes of the type seen in this IML-2 experiment? Is the companion report we speculated that autocrine/paracrine interactions play a large role in pituitary cell gravisensing<sup>11)</sup>. We suggest that the microgravity-specific cell feeding interactions in the FSH/ACTH cells found in the cell culture portion of this IML-2 experiment might affect the electrophoretic mobility profile of a GH cell subpopulation by exposing these cells to a different hormonal environment.

What consequence, if any, a change in cell surface charge might have on the quantity or quality of different hormones released from the pituitary gland of the intact organism

obviously requires further study. Nevertheless, this IML-2 experiment showed that the rat pituitary cell system lends itself well to microgravity experimentation involving the coupled technologies of cell culture and continuous flow electrophoresis.

## ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by NASA grant #NAG8-953. The lysate/CFE trial was done by Dr. Leroy Chiao and Dr. Donald A. Thomas. We acknowledge the superb and often heroic work done by the entire payload specialist crew of STS-65 in making this electrophoresis experiment happen.

## REFERENCES

- 1) Barrolier, V., Watzke, E., Gibian, H. *Z. Naturforschung.* **13B**, 754 (1958).
- 2) Hannig, K. *Anal. Chem.* **181**, 244 (1961).
- 3) Roman, M., Brown, P. Free-flow electrophoresis. *Anal. Chem.* **66**(2), 86A-94A (1994).
- 4) Dalens, F., Roux-de Balmann, H., Sanchez, V. Improved operating conditions for preparative separation of proteins by continuous flow zone electrophoresis. *Bioseparation.* **5**, 127-139 (1995).
- 5) Bauer, J. *Cell electrophoresis*, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1994).
- 6) Morrison, D. Cell electrophoresis in microgravity: past and future. In *Cell electrophoresis*, ed. by J. Bauer, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1994). 283-313.
- 7) Hannig, K., Kowalski, M., Klöck, G., Zimmerman, U., Mang, V. Free-flow electrophoresis under microgravity: Evidence for enhanced resolution of cell separation. *Electrophoresis.* **11**, 600-604 (1990).
- 8) Plank, L., Hymer, W., Kunze, E., Marks, G., Lanham, J. and Todd, P. A study of cell electrophoresis as a means of purifying growth hormone secreting cells. *J. Biochem. and Biophys. Methods.* **8**, 275-289 (1983).
- 9) Hayes, D., Exton, C., Salada, T., Shellenberger, K., Waddle, J. and Hymer, W. Separation of rat pituitary secretory granules by continuous flow electrophoresis. *Electrophoresis.* **11**, 976-978 (1990).
- 10) Hymer, W., Barlow, G., Blaisdell, S., Cleveland, C., Farrington, M., Feldmeier, M., Grindeland, R., Hatfield, J., Lanham, J., Lewis, M., Morrison, D., Olack, B., Richman, D., Rose, J., Scharp, D., Snyder, R., Swanson, C., Todd, P. and Wilfinger, W. Continuous flow electrophoresis separation of proteins and cells from mammalian tissues. *Cell Biophysics.* **10**, 61-85 (1987).
- 11) Hymer, W., Grindeland, R., Salada, T., Cenci, R., Krishnan, K., Mukai, C. and Nagaoka, S. Feeding frequency affects cultured rat pituitary cells in low gravity. *Biotechnology.* In submission.
- 12) Hymer, W. and Hatfield, J. Purification of cells from the anterior pituitary. In *Methods and Enzymology*, ed. by Colowick and Kaplan, Academic Press (1983).

257-287.

- 13) Hymer, W. and Kuff, E. Isolation of nuclei from mammalian tissues through the use of Triton X-100. *J. Histochem. Cytochem.* **12**, 359-363 (1964).
- 14) Farrington, M. and Hymer, W. Growth hormone aggregates in the rat adenohypophysis. *Endocrinology.* **126**, 1630-1638 (1990).
- 15) Akiba, T., Nishi, A., Takaoki, M., Nagaoka, S., Tomita, F. Electrophoretic free mobility and viability of microbial cells: a preliminary study in preparation for space experiments. *Applied & Theoretical Electrophoresis.* **4**(2), 65-69 (1994).
- 16) Hymer, W., Grindeland, R., Salada, T., Nye, P., Grossman, E. and Lane, P. Experimental modification of rat pituitary growth hormone cell function during and after spaceflight. *J. Appl. Physiol.* In press (1995).
- 17) Hymer, W., Grindeland, R., Krasnov, I., Victorov, I., Motter, K., Mukherjee, P., Shellenberger, K. and Vasques, M. Effects of spaceflight on rat pituitary cell function. *J. Appl. Physiol.* **73**(2), 151S-157S (1992).
- 18) Lewis, U. Growth Hormone: What is it and what does it do. *Trends Endocrinol. Metab.* **3**, 117-121 (1992).
- 19) Grindeland, R., Hymer, W., Farrington, M., Fast, T., Hayes, C., Motter, K., Patil, L. and Vasques, M. Changes in pituitary growth hormone cells prepared from rats flown on SpaceLab 3. *Am. J. Physiol.* **252**, 209-215 (1987).
- 20) Hymer, W., Salada, T., Avery, L. and Grindeland, R. Experimental modification of rat pituitary prolactin cell function during and after spaceflight. *J. Appl. Physiol.* In press (1995).
- 21) St. John, P. Anti-prolactin cell-surface immunoreactivity identifies a subpopulation of lactotrophs from the rat anterior pituitary. *Endocrinology.* **119**(6), 2783-2795 (1986).
- 22) Bauer, J. The negative surface charge density of cells and their actual state of differentiation or activation. In *Cell Electrophoresis* ed. by J. Bauer, CRC Press, Inc., Boca Raton, FL (1994). 267-280.

# 宇宙船内における重粒子線による線量計測とその生物効果実験 (RADIATION)

## 重粒子線による線量計測

代表研究者： 道家忠義<sup>\*1</sup>

共同研究者： 菊池 順<sup>\*1</sup>、林 孝義<sup>\*1</sup>、長谷部信行<sup>\*2</sup>、

Gautam D. Badhwar<sup>\*3</sup>、長岡俊治<sup>\*4</sup>、加藤充康<sup>\*4</sup>

<sup>\*1</sup> 早稲田大学 理工学総合研究センター、<sup>\*2</sup> 愛媛大学 教養部、<sup>\*3</sup> NASA Johnson Space Center、

<sup>\*4</sup> 宇宙開発事業団 筑波宇宙センター

The space radiation dosimetry measurements have been made on board the Space Shuttle STS-65 (IML-2; inclination 28.5°, altitude 300 km). In these measurements, three kinds of detectors were used; a newly developed silicon detector telescope (active detector) called "Real time Radiation Monitoring Device (RRMD)" and conventional passive detectors of TLDs and CR-39 track detectors. Using RRMD, the first attempt of real time monitoring of space radiation has been achieved successfully for continuous 251.3 hr. The RRMD results indicate that a clear enhancement of the number of trapped particles is seen at the South Atlantic Anomaly (SAA) without clear enhancement of dose equivalent, while some daily periodic enhancements of dose equivalent due to high LET particles are seen at the smaller geomagnetic cutoff regions for galactic cosmic ray particles (GCRs), which are main contribution to dose equivalent in this low altitude mission (300 km). Also, the rates of dose equivalents obtained by TLDs and CR-39 ranged from 146.9 to 165.2  $\mu\text{Sv/day}$  and the average quality factors from 1.45 to 1.57 depending on the locations and directions inside the Space-Lab at the mission of 28.5° × 300 km. The LET distributions obtained by RRMD and CR-39, are in good agreement in the region of 15 to 200 keV/ $\mu\text{m}$  and difference of these distributions in the region of LET < 15 keV/ $\mu\text{m}$  and LET > 200 keV/ $\mu\text{m}$  can be explained by considering characteristics of CR-39 track formation, especially for the low LET tracks.

### 実験の目的、意義

これまで宇宙放射線の線量計測は、主にプラスチックなどのパッシブな固体飛跡検出器で行われてきた。しかし、この方法の最大の欠点は、宇宙船の地上帰還後にしか、その線量計測を行うことができない、という点にある。この種の計測方法では、飛行中に突然発生する大型の太陽フレアに対する防護という点において全く無力である。このため、本実験では、将来、乗組員に対して警報及び予報を発することができるように、アクティブな検出器を用いて、世界で初めて実時間で宇宙重粒子線の線量計測を試みることを目的にしている。また、このような測定結果によって校正されたプラスチック検出器(CR-39)と熱ルミネッセンス線量計との組合せて、シャトル内での線量計測がなされた。

## 実験の方法

### 計測の概略

IML-2における放射線モニター装置(RRMD: Real Time Radiation Monitoring Device)の実験は、1994年7月8日にNASAケネディ宇宙センター(KSC)から打上げられたスペース・シャトル(飛行番号 STS-65)内で行われ、線量当量の推定に必要な観測データがNASAマーシャル宇宙飛行センター(MSFC)に送付され、直ちに解析されて、粒子の観測器への入射の様相、計数率と線量当量の時間変化やLET (Linear Energy Transfer)-分布が、実時間でQL (Quick Look)によって示された。STS-65は、傾斜角 28.5°、高度約 300km の円軌道を 14.68 日間に渡って飛行し、初期のデータ送付の欠損の件を除けば計 251.3 時間にわたる連続観測に成功した。ここに、この RRMD の結果と共に、同時に搭載された TLD(熱蛍光線量計)と CR-39 (ジエチレングリコールビスアリルカーボネート樹脂) による線量計測がなされた結果について報告したい。

### 搭載された機器: RRMD, TLD 及び CR-39

#### 1) RRMD について

初めに、RRMD の構造とその動作原理について簡単に説明したい。図 1 に RRMD の検出部の断面を示す。

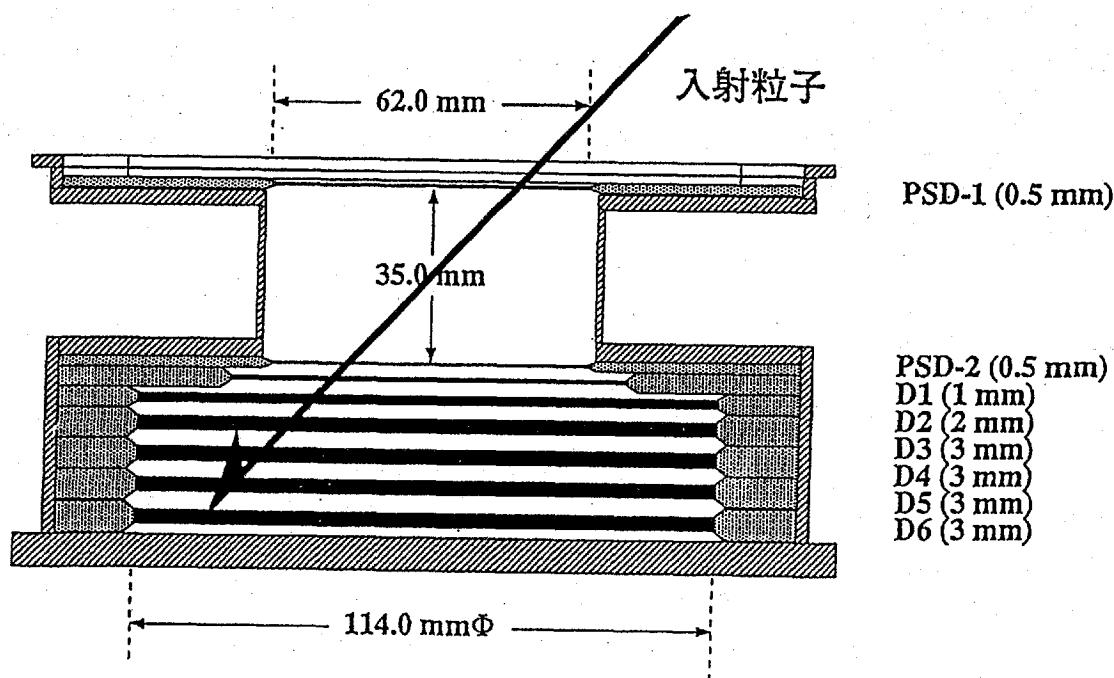


図 1 放射線モニター装置検出器の断面図

図から分かるように、検出部は、上部に置かれた 500  $\mu\text{m}$  の厚さの 2 枚の 2 次元位置検出器と、その下部に置かれた 6 枚の 1 mm から 3 mm の厚さを持つ普通のシリコン検出器とから成る。入射粒子が上部の 2 枚の位置検出器を通過すると、その通過位置から粒子の

入射角が決定される。このような個々の粒子の入射角とそれらによる検出器への付与エネルギーとから各検出器における垂直入射の場合のエネルギー損失の分布が得られる。これは、そのまま、シリコン検出器での LET-分布を与えることになる。しかし、実際上は、上部の2ヶの位置検出器の同時計数信号でトリガーしているため、下から入射して来る粒子で上部の位置検出器に達しないものは除かれる。幸い、位置検出器の厚さは  $500\ \mu\text{m}$  と薄いため、以上の方法で得られた LET-分布には、下から入射する粒子の寄与は後に示すように極めて少ないので、2番目の2次元位置検出器の LET-分布で本物の LET-分布を近似できる。このような理由で、今後は、2番目の2次元位置検出器での LET-分布を代表的なものと考えた。

## 2) 線量計測用パッケージ(TLDs と CR-39)

図2は、検出器テレスコープと共にその電子回路系が収められているディテクター・ユニットの外観図である。

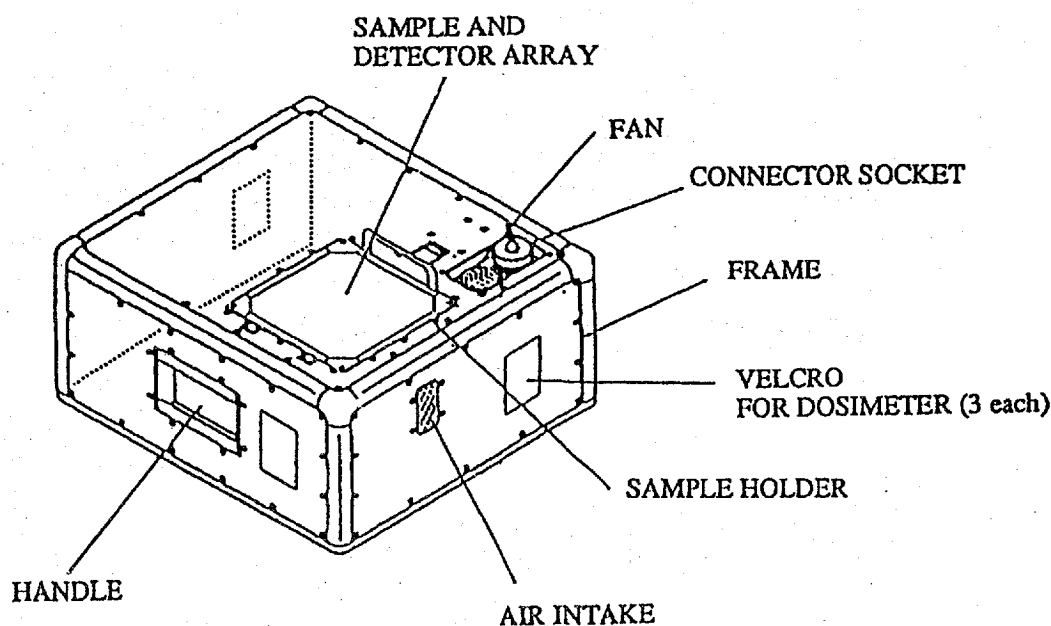


図2 放射線モニター装置ディテクター・ユニットの外観図

検出器テレスコープは生物試料(サンプルホルダー)の直下に上向きに取り付けられている。生物試料の厚さは  $1.0\ \text{g}/\text{cm}^2$  程度で、その生物試料の上下には CR-39 の板がそれぞれ一枚ずつ収められている ( $125\ \text{mm} \times 125\ \text{mm} \times 1.2\ \text{mm}$ )。また、ディテクター・ユニットの検出器テレスコープが収められている部分の側壁には線量計測用のパッケージが2ヶ (No.2, No.3) 取り付けられている。図3はこれらのパッケージの内部を上部から眺めたもので、TLD (MSO-S:18, LiF-6: 9, LiF-7: 9) が収められており、その上下に厚さ  $1\ \text{mm}$  の CR-39 の板が置かれている。さらに同じパッケージがあと2ヶ (No.1, No.4) Biorack インキュベータ内と PEMBSIS 実験のラック収納庫に収められている。これら飛翔用のパッケージの外、同じものが4ヶコントロール用として用意され、飛翔期間を除いて同一の経路をたどって運ばれた。このディテクター・ユニットは移動可能で、スペースシャトルの飛翔中にその向きや位置を変えることができる。図4に、初め予定されていた向き及び位置の変化の順

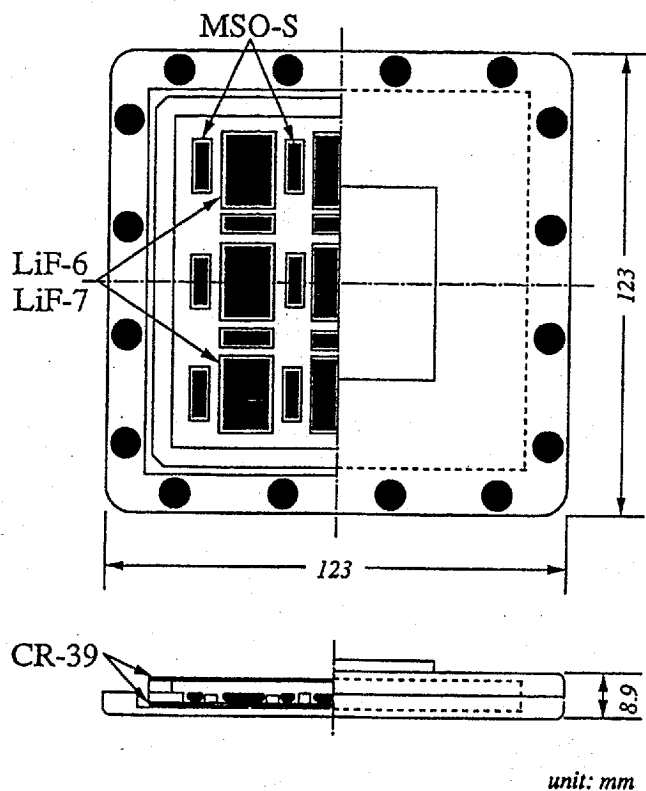


図3 線量計測用パッケージ

を示す。しかし、初めの1日半は、思わぬ結線事故のためにデータが下りてこず、実時間のデータ取得はできなかった。しかし、データ取得ができるようになってからは測定は順調に進み251.3時間にわたって連続観測が行えた。このような時間短縮と室内の温度上昇によるPosition 3における観測の一時中止の結果、実際の場合の向き、位置の変化及び観測期間は、表1のようになった。

地上予備実験

本実験は、測定器の準備以外、特別な地上予備実験は必要とされていないので行ってない。ただし、飛行後、線量計測の開始直前にセンサー部からの出力パルスの波高の直線性と検出器のノイズレベルの測定を行い、飛行前の特性を保っていることを確認した。

Detector Position	Position sw	Direction sw
Position 1 (1st Direction)	4	2
Position 1 (2nd Direction)	4	2
Position 2	4	1
Position 3	3	2
Position 4	3	1

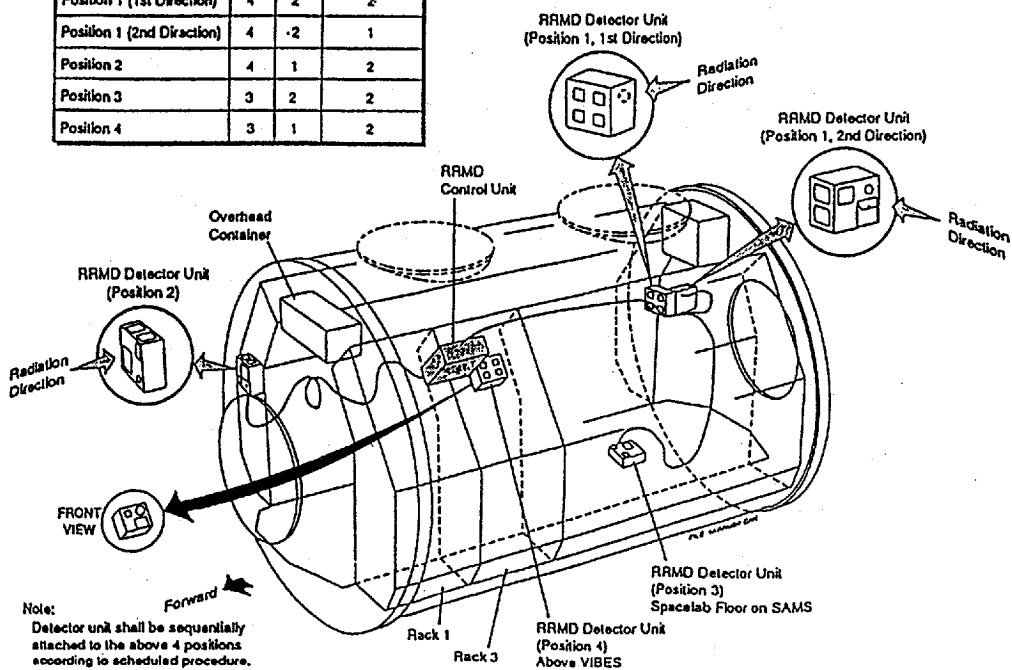


図4 スペースラブ内の線量計測の場所(初期の予定)

## 飛行実験の結果

表1 スペースラブ内の観測場所及び観測時間

Location	Position & Direction
No. 1	Position 1 & 1st Direction (7/10, 18:00 ~ 7/13, 22:49) 3840 min
No. 2	Position 1 & 2nd Direction (7/13, 22:49 ~ 7/16, 9:19) 2872 min
No. 3	Position 2 (7/16, 9:19 ~ 7/18, 14:03) 2552 min
No. 4	Position 1 & 2nd Direction (7/18, 14:03 ~ 7/19, 10:42) 992 min
No. 5	Position 3 (7/19, 10:42 ~ 7/21, 5:33) 2160 min

### RRMDの連続観測結果

スペース・シャトル内での LET-分布と線量量の実時間での観測は、MSFCで行われ、あらかじめ用意されていた QL (Quick Look)用のソフトを用いてなされた。その QLは、次のような4パターンから成っている。

- 1) 個々の入射粒子の検出器テレスコープへの入射位置と方向を示す図とともに、その通過の際、個々の検出器に付与されたエネルギーを生体組織の LET に変換したものを示し、その粒子が完全に突き抜ける場合(すなわち相対論的速度領域にある場合)にはそれがどの元素に相当するかが分かるような表示を行った。図5はその典型的な1例である。

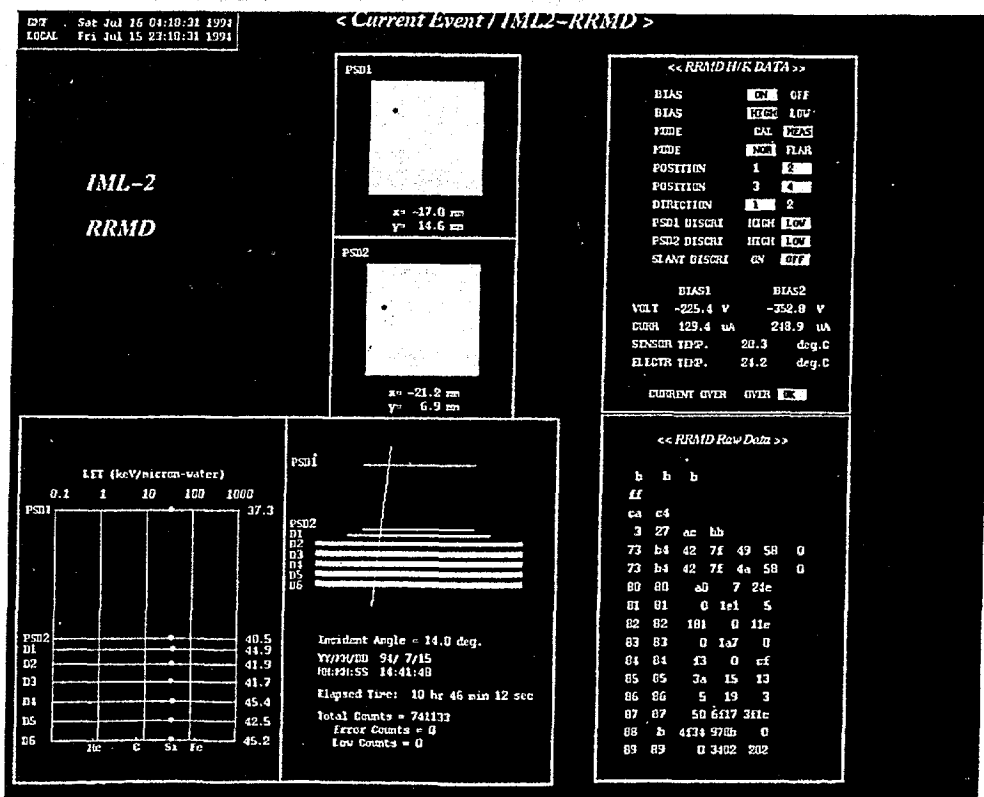


図5 実時間モニター用 Quick Lock (QL)スクリーンの一つの例(テキスト参照)



また、RRMDの現在位置や検出器内の温度及び検出器に対する印加電圧、漏洩電流等も合わせて表示した。

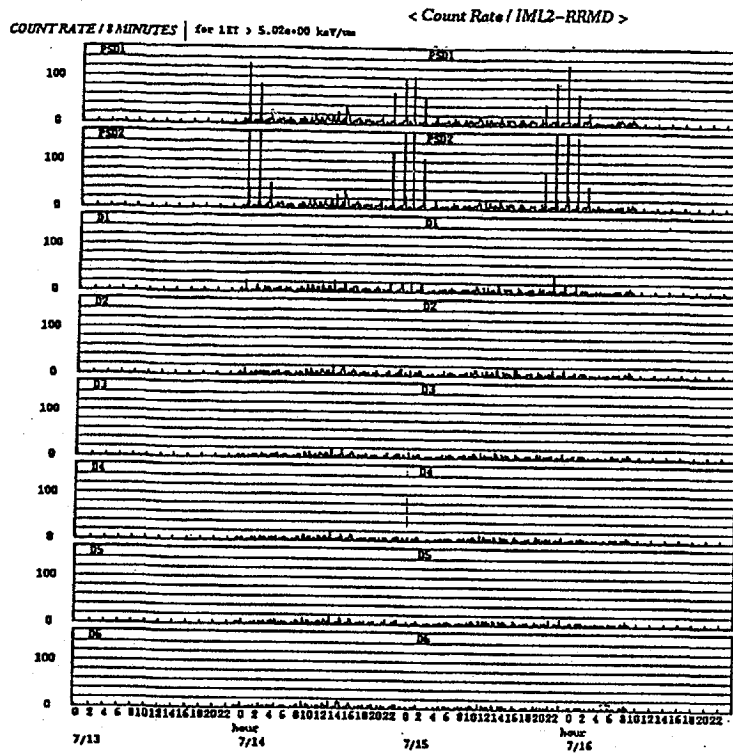


図6 Position 1, 2nd Directionの8ヶの検出器での粒子計数率の時間変化(実時間計測)

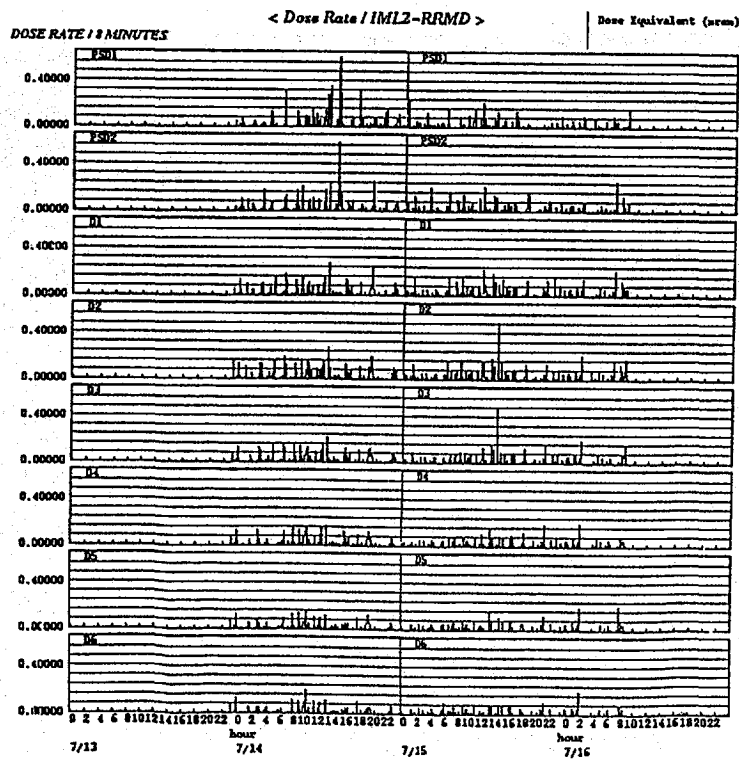


図7 図6と同様の条件における、線量当量率の時間変化(実時間計測)

- 2) 上部に置かれた2ヶの2次元位置検出器からの同時計数信号でトリガーされた各検出

器の計数率の時間変化が示された。その1例として、Position 1, 2nd Directionの場合を図6に示す。この表示での特長あるパターンは、2次元位置検出器で、シャトルがBrazil Anomalyの近辺を通過する際の計数率の増加で、期待されるごとくそれらはシャトルの回周周期(90分)で現れ、これらのピーク群も1日の周期で現れては消える。このような変化は、位置検出器以外のものでは観測されなかった。このことは、Brazil Anomaly通過の影響は、低エネルギー粒子に限られることを意味している。

- 3) 次に、線量当量率の時間変化が示された。図7はPosition 1, 2nd Directionでのその観測結果である。これから分かるように、位置検出器で現れた計数率のピーク群は、ここでは全く観測されなかった。このことは、Brazil Anomalyでの地磁気捕捉粒子の線量当量への影響は極めて少ないことを意味している。むしろ、ほぼ、1日周期で線量当量率の増減が観測された。これは、シャトルの地球回周の際の、銀河粒子線に対する地磁気のcut-off rigidityの変化によるものである。前述のように測定された値は、後方から入射して、トップに置かれた2次元位置検出器を通過せず途中の検出器で停止した粒子の寄与は含まないため、その分に対する補正を必要とする。図8に全観測位置で測定されたシリコン検出器の厚さに対する検出器それぞれの線量当量の変化を示す。明らかに、線量当量が、検出器の厚さと共に減少して行くが、これは後方からの入射粒子の寄与が取り入れられていないことによる。しかし、上部の検出器では、ほとんど、変化はなくこの付近の値が、得られた線量当量として最も妥当なものを見出すことができよう。最上の位置検出器はそこに入射して停止した粒子の寄与を含まないので、ここでは、2番目の

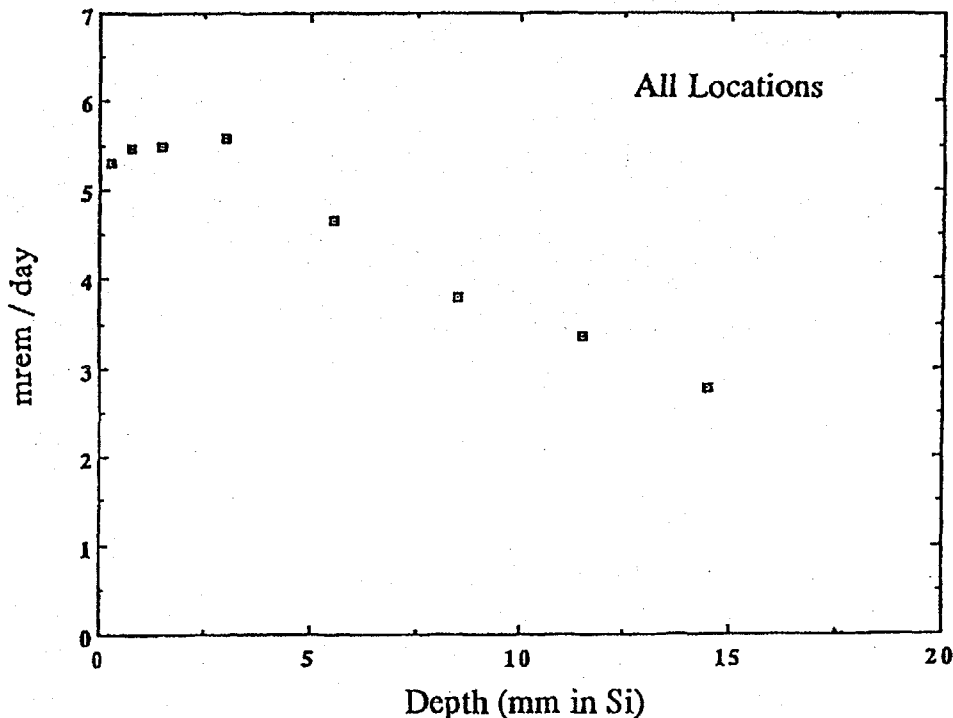


図8 シリコン検出器の厚さに対する線量当量率の変化

位置検出器の線量当量の値を、他と比較すべき標準値として取り扱う事にする。表2は、それぞれのPositionで得られた2番目の位置検出器での吸収線量率、線量当量率及びそれら両者の比である実効線質係数(EQF: Effective Quality Factor)である。

表2 各々の観測場所での吸収線量率、線量当量率及び実効線質係数

Location	Absorbed dose ( $\mu\text{Gy/day}$ )	Dose equivalent ( $\mu\text{Sv/day}$ )	Quality factor (average)
No. 1	6.8	61.0 (62.3)	8.97 (9.16)
No. 2	7.5	54.0 (55.1)	7.20 (7.35)
No. 3	7.1	60.8 (61.6)	8.56 (8.68)
No. 4	6.5	41.7 (41.8)	6.42 (6.43)
No. 5	5.1	38.4 (38.6)	7.53 (7.57)
All Locations	6.7	53.9 (54.8)	8.04 (8.18)

これらの値はすべての粒子で突き抜けたものと仮定して得られているが、中には、2番目の位置検出器で停止してしまったものもある。それらに対しては補正をする必要がある。( )内は補正の結果を示している。その影響は、これらの観測では、ほぼ2%程度と推定される。各観測点における  $\text{LET} > 5 \text{ keV}/\mu\text{m}$  に対する1日当たりの平均の線量当量は  $38.6 \sim 62.3 \mu\text{Sv/day}$  であった。

- 4) 最後の表示は、図9に示すようなLETの積分及び微分スペクトルである。両スペクトルの下限はいずれも  $5 \text{ keV}/\mu\text{m}$  で、これは電氣的雑音のレベルによって決る。この下限は、 $3.5 \text{ keV}/\mu\text{m}$  程度まで下げられるが、時々電氣的雑音レベルの増加があるためこの閾値を使用した。宇宙船の内部に置かれた場合を除き、図から見られるように、微分スペクトラムでは、相対論的速度領域にあるOやFe粒子の通過に起因する急峻な立ち上がり部分やピークがみられる。また、積分スペクトルでもそれに対応する処に明確な折れ曲がりが見られる。これらは始めから宇宙粒子線の寄与として期待されていたものである。

#### TLDの測定結果

TLDとしては、今回も、MSO-SとLiF-6とLiF-7とが使用された。ただし、LiFの場合は、その感度を増すために量を増やし、円形板状のもの(10 mm $\phi$ 、 $t = 0.5 \text{ mm}$ )を使用した。その結果、確かに感度の上昇は確認され、地表に置かれたコントロールとシャトルに搭載されたものとは有意な差が見られたが、それぞれのばらつきが大きく、その差は、同じCo-60のガンマ線源で校正したMSO-Sの場合の半分以下であった。このような違いは、それぞれの低エネルギー領域での感度の差を考慮しても説明は困難である。むしろ、LiFは加圧や取扱い上生れる歪み等に敏感なので、MSO-Sのようにガラスのカプセルに封じる必要があるのかもしれない。このような理由で、ここでは、LiF線量計の結果は除き、MSO-Sの結果のみを表3, 4に示す。表3はコントロールとして、飛翔用のものを同経路で打ち上げ場に運ばれ、飛翔時はそのまま地表に置かれたもの(4パッケージ)で、その線

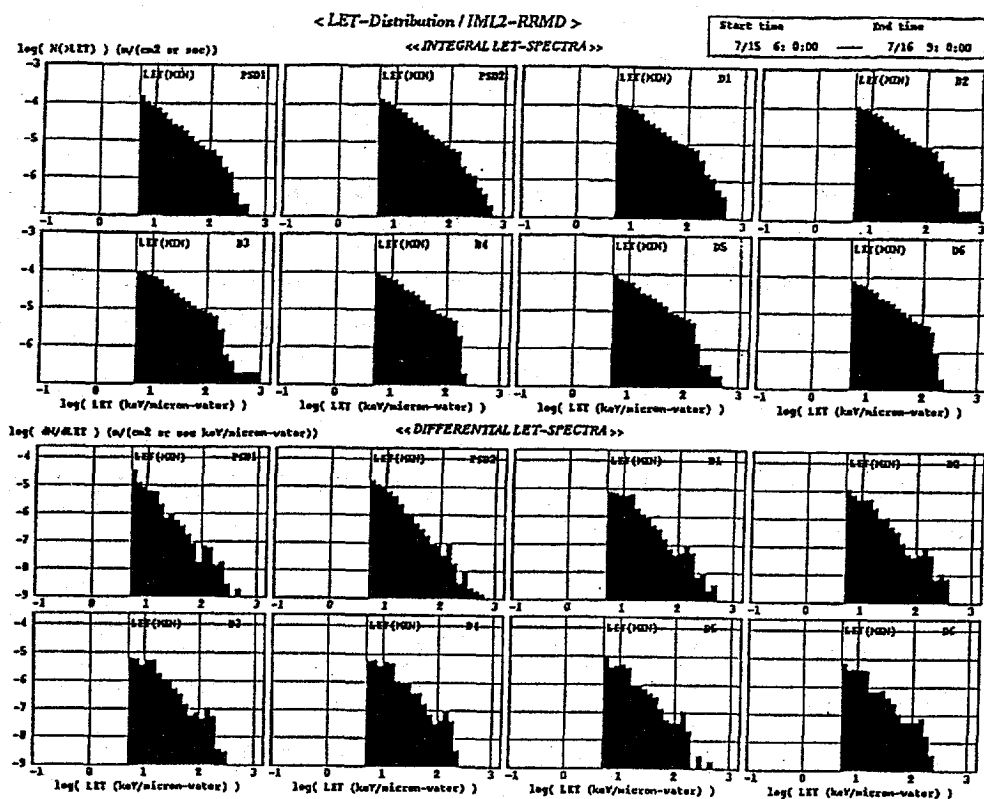


図 9 Position 1, 2nd Direction の積分、微分 LET-スペクトル

表 3 コントロール用パッケージにおける吸収線量

Package No.	6	7	8	9	Average of all
Average absorbed dose ( $\mu\text{Gy}$ )	187.6	195.9	197.8	192.6	193.5
Standard deviation ( $\mu\text{Gy}$ )	+16.0	+ 6.5	+19.0	+11.7	+14.6

量は平均  $193.5 \pm 14.6 \mu\text{Gy}$  であった。この値は飛翔したそれぞれからバックグラウンドとして、差し引かれた。飛翔時に地表で被爆したバックグラウンドは飛翔中のものから差し引かれるべきものではないが、その誤差は多くとも  $40 \mu\text{Gy}$  以下であり、多くとも 3% の寄与にすぎないので無視することにした。表 4 で、パッケージ No.1 と No.4 は Biorack インキュベータ内と PEMBSIS 実験のラック収納庫内の植物細胞培養容器近傍に取り付けられ、No.2 と No.3 は RRMD のディテクター・ユニットの側壁に取り付けられた。それぞれのパッケージにおける飛翔中の平均の吸収線量率は  $91.4 \sim 110.6 \mu\text{Gy/day}$  でいずれも 10% の範囲に入っており場所による差は少ない。また、これらは FMPT (First Material Processing Test) の場合のほぼ 2/3 である<sup>1)</sup>。

表 4 TLD (MSO-S) 及び CR-39 で得られたパッケージ毎の吸収線量率と両者の組合せによって得られた線量当量率

Package No.	1	2	3	4
TLDs(MSO):				
Absorbed dose ( $\mu\text{Gy}$ )	1534.8	1720.2	1816.6	1702.3
Standard deviation ( $\mu\text{Gy}$ )	+35.6	+34.0	+73.7	+86.0
Average dose ( $\mu\text{Gy}$ ) in flight	1341.3 +39.7	1526.7 +37.0	1623.1 +75.1	1508.8 +87.2
Average dose rate ( $\mu\text{Gy/day}$ ) in flight*	91.4 +2.7	104.0 +2.5	110.6 +5.1	102.8 +5.9
CR-39:				
Average dose rate ( $\mu\text{Gy/day}$ )**	5.9	6.1	8.2	7.7
Average dose equivalent rate ( $\mu\text{Sv/day}$ )***	59.1	57.6	59.6	60.4
Total:				
Average dose rate ( $\mu\text{Gy/day}$ )	93.7	106.4	113.8	105.8
Average dose equivalent rate ( $\mu\text{Sv/day}$ )	146.9	157.8	165.2	158.5
Average quality factor	1.57	1.48	1.45	1.50

\* Assumed that the real flight time was 14.68 days.

\*\* These values have been multiplied by a ratio 1.18 of data by RRMD and CR-39 (see text).

\*\*\* These values have been multiplied by a ratio 1.27 of data by RRMD and CR-39 (see text).

CR-39 プラスチック板による  
LET-分布の測定

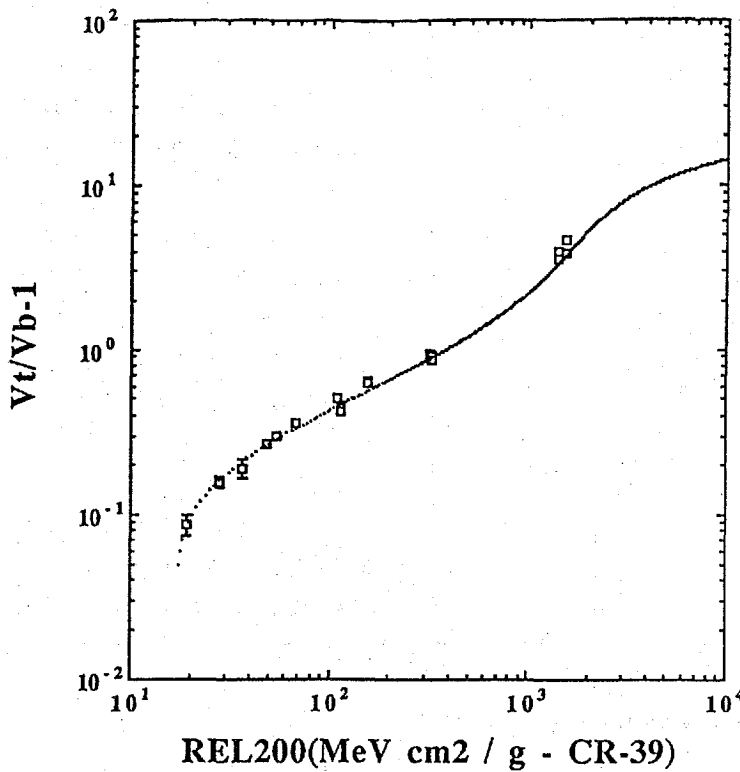


図 10 CR-39 の感度校正曲線

今回も、FMPTの時と同じCR-39プラスチック板(99.5 mm × 99.5 mm × 1 mm)が使用された。そのエッチングは、70 °Cの7N NaOH溶液で30時間行なわれた。その条件下の校正曲線を図10に示し、これを使用して得られたそれぞれのLET-分布を図11にまとめた。これからLET-分布は場所により大きな変化はないことが分かる。

解析と考察

CR-39から得られるLET-分布と Rossi Counter 法から得られたものに間にかかなりの差が存在することは以前から知られている<sup>1)</sup>。そこでRRMDで得られた結果とCR-39との結果の比較を行なった。図12は、RRMDの直上のCR-39から得られたLET-分布とRRMDの結果との比較である。15 keV/μm から200 keV/μm のLETの範囲では両者の結果が良く一致している。15 keV/μm 以下では、Appendixに示すように、表面での飛跡生成感度の劣化のため<sup>2)</sup>、正確なフルエンスを得るためには深い入射角で入射した粒子に対する補正が必要となる。200 keV/μm 以上の高LET粒子に対しては飛程が短いため数え落としがある可能性があるがその全体に対する寄与は少ないのでここではそれを無視することとする。

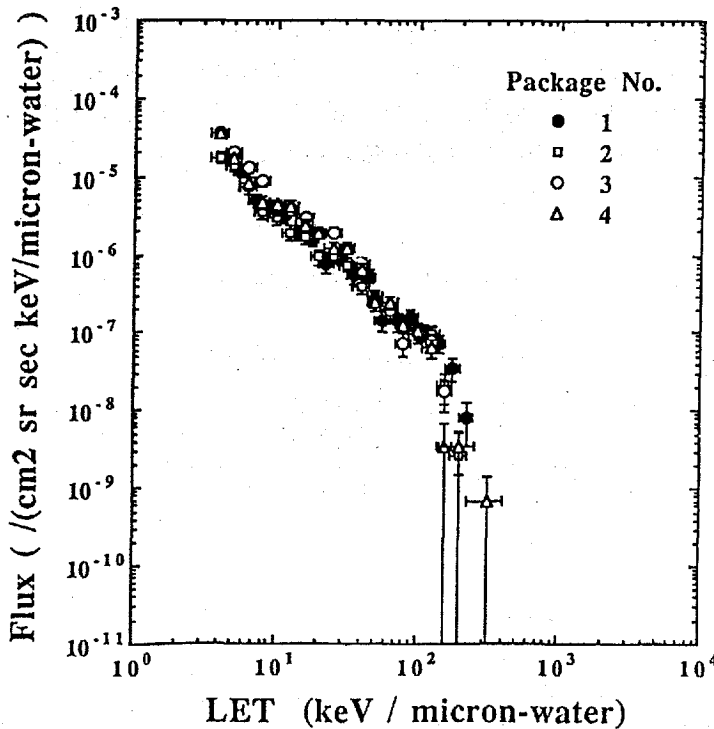


図 11 CR-39 によって得られた LET-分布曲線

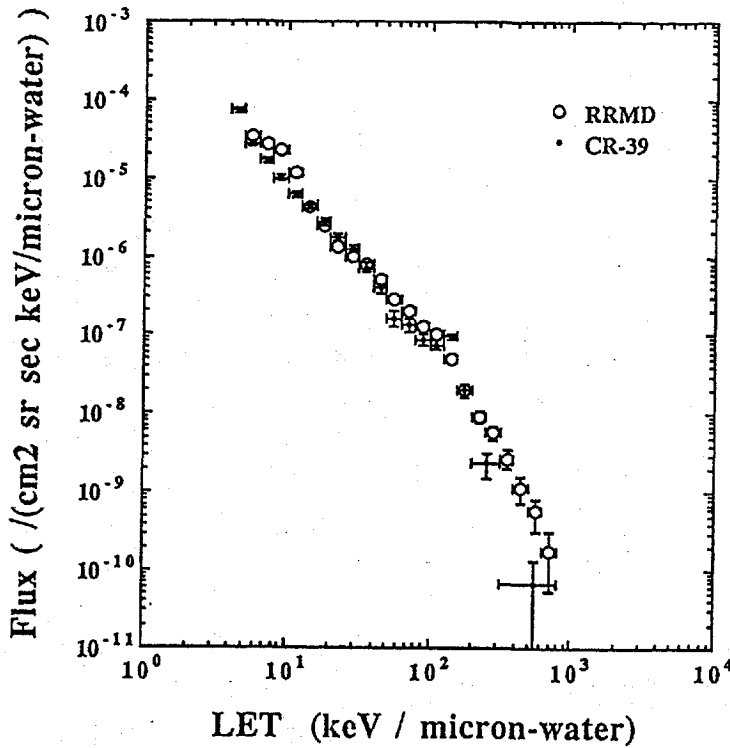


図 12 RRMDとCR-39によって得られた LET-分布曲線の比較

HRM (High Rate Multiplexer)の故障によるデータの損失以外は、ほぼ当初に予定されていた通りに実行され、成功した。RRMDとCR-39によるLET-スペクトラムは図12に見られるように、低、高LET粒子の一部を除いて良い一致を示した。結果としてシャトル内で146.9 ~ 165.2  $\mu\text{Sv/day}$ の線量当量率、1.45 ~ 1.57の実効線質係数が得られた。

表 5 RRMDとCR-39によって得られた吸収線量と線量当量の比較

	LET Range [keV/ $\mu\text{m}$ ]	Absorbed Dose Rate [ $\mu\text{Gy/day}$ ]	Dose Equi. Rate [ $\mu\text{Sv/day}$ ]
RRMD	> 5.0	6.7	54.8
RRMD	> 3.5*	8.0	56.7
CR-39	> 3.5	6.8	44.7
Ratio of RRMD/CR-39		1.18	1.27

\* Data have been corrected from the values for LET > 5.0 keV/ $\mu\text{m}$  using the extrapolation of LET distribution down to 3.5 keV/ $\mu\text{m}$ .

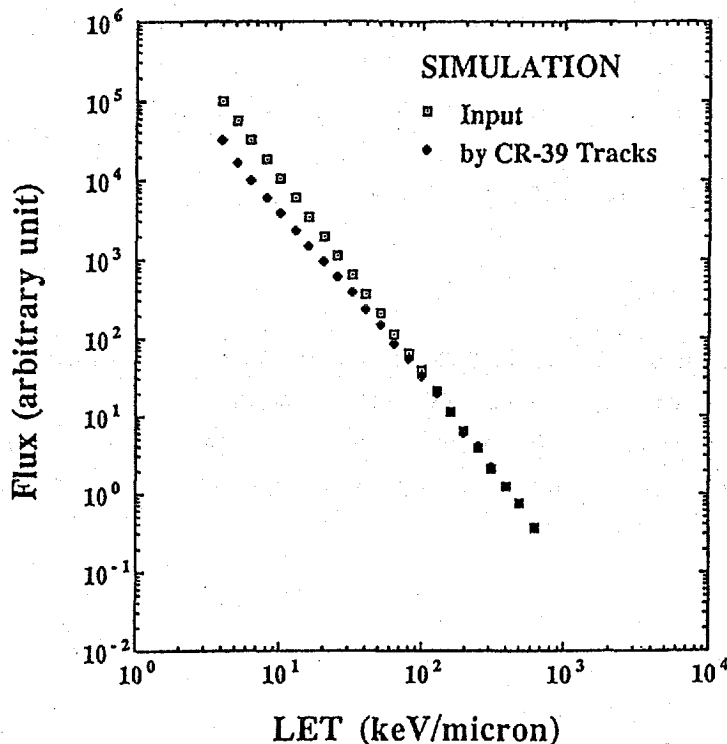
低LET-領域での補正は、幸い、CR-39から得られたLET-分布にほとんど差がないことからRRMDの結果を正しいとして両者の吸収線量や線量当量の比(表5参照)を、それぞれのCR-39から得られた値に乗ずることによってなされた。その結果を、FMPTの時に使用した方法<sup>1)</sup>を用いTLDsの結果と組み合わせて、線量当量と実効線質係数を求めたものを表4の下部(Total)に示す。結果として、シャトル飛翔間の被曝線量当量率は146.9 ~ 165.2  $\mu\text{Sv/day}$ 、実効線質係数は1.45 ~ 1.57となった。

### 結論

本文に述べたように、リアルタイム線量計測の全体のオペレーションは、初期の

## 付録

LETが15 keV/ $\mu\text{m}$ 以下の領域では、エッチングされたCR-39プラスチック板表面のエッチ・ピットの形状(楕円)が入射角の増加と共に崩れてくることは昔から知られている<sup>2)</sup>。このようなエッチ・ピットの楕円形状の変形のためLETはより小さく推定される。この傾向は、現在使用されているCR-39でなく、古いアンタイ・オキシダントの入っていないCR-39を使用した宇宙線の観測結果(それはあらゆる入射方向の粒子を含む)を用いて再現することができる。図A-1は、その一例で、入力したLET-分布( $\square$ )に対し、以上の感度



の劣化を考慮すると◆程度のフルエンスの減少を来すことになる。現在のCR-39の感度はこの古い物よりも良いので、この差(3.5 keV/ $\mu\text{m}$ でほぼ2~3倍)はむしろ大き過ぎであると考えられる。実際には図12程度の差となり、従って、CR-39で得られる線量当量の値は、全体としてRRMDを基準に取った場合の2~3割減が妥当な処であると考えた。真の補正を行うためには、現在のCR-39で、色々な角度で入射した場合のエッチ・ピットの形状を調べ正確な補正係数を求める必要がある。

図 A-1 古いCR-39を使用した時の入射角度依存性補正

## 参考文献

- 1) Doke, T., Hayashi, T., Nagaoka, S., Ogura, K. and Takeuchi, R. Estimation of Dose Equivalent in STS-47 by a Combination of TLDs and CR-39. *Radiation Measurements*. 24, 75-82 (1995).
- 2) Hayashi, T. and Doke, T. Characteristics of Plastic CR-39 for Detection of Relativistic CosmicRay Heavy Nuclei. *Nucl. Instr. & Meth.* 174, 349-355 (1980).



## 外部発表

### 講演、学会発表

- 1) 道家忠義、林 孝義、菊池 順、長谷部信行、Badhwar, Gautam. IML-2実験におけるRRMDの測定結果. 第11回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1994). 1-4.
- 2) 道家忠義、林 孝義、加藤充康、長岡俊治、小倉紘一、竹内竜一. IML-2におけるCR-39による宇宙放射線のLET-分布の測定. 第42回応用物理学関係連合講演会, 東海大学(1995).
- 3) 道家忠義、林 孝義、菊池 順、長谷部信行、長岡俊治、加藤充康、Badhwar, Gautam. IML-2(スペースラブ STS-65)による宇宙放射線のLET-分布のリアルタイム測定. 第42回応用物理学関係連合講演会, 東海大学(1995).
- 4) Doke, T., Kikuchi, J., Hayashi, T., Takeuchi, R., Hasebe, N., Ogura, K., Nagaoka, S., Kato, M. and Badhwar, Gautam D. Measurement of LET Distribution and Dose Equivalent on Board the Space Shuttle STS-65 (IML-2). *Proceedings of the Twelfth Space Utilization Symposium* (1995). 114-118.

### 論文

- 1) Doke, T., Hayashi, T., Kikuchi, J., Hasebe, N., Nagaoka, S., Kato, M. and Badhwar, G. D. Real Time Measurement of LET Distributions in the IML-2 Space Lab (STS-65). *Nucl. Instr. & Meth.* In press.
- 2) Hayashi, T., Doke, T., Kikuchi, J., Takeuchi, R., Hasebe, N., Ogura, K., Nagaoka, S., Kato, M. and Badhwar, G. D. Measurement of LET Distribution and Dose Equivalent on board the Space Shuttle STS-65 (IML-2). submitted to *Nucl. Instr. & Meth.*

# 宇宙船内における重粒子線による線量計測とその生物効果実験 (RADIATION)

## *D. radiodurans* の DNA 修復能に対する微小重力の影響

共同研究者： 渡辺 宏\*<sup>1</sup>、小林泰彦\*<sup>1</sup>、菊地正博\*<sup>1</sup>、原田和樹\*<sup>2</sup>、長岡俊治\*<sup>3</sup>

\*1 日本原子力研究所 高崎研究所、\*2 PL 学園女子短期大学、\*3 宇宙開発事業団 宇宙実験グループ

Effect of Microgravity on DNA repair system was examined on the IML-2 mission (STS-65, July 8-23, 1994) using extremely radioresistant bacterium *Deinococcus radiodurans* so that influence of cosmic radiation can be neglected. Cells were lyophilized and exposed to <sup>60</sup>Co  $\gamma$ -rays with doses up to 12 kGy before the space flight. Almost at the end of the mission, the cells were mixed on board with liquid nutrient medium to activate the repair process, then incubated at room temperature of the spacelab for 11 hrs to allow the repair of the radiation-induced DNA damages. Afterwards the cells were stored at 4 °C until landing. The survival of the cells activated in space increased significantly compared with the ground controls, suggesting that DNA repair system of this bacterium was enhanced under microgravity.

### 実験の目的、意義

人間が長期間宇宙で活動する際には、宇宙環境の様々な要因の中でも特に宇宙放射線被曝と微小重力のもたらすリスクを評価しておく必要がある。軌道上でさらされる宇宙線の中には地上の自然放射線には存在しないような非常に高エネルギーの銀河宇宙線成分が含まれており、その人体への影響は加速器を用いた重粒子線照射実験によってある程度推定することが可能だが、その実験結果を実際の宇宙活動におけるリスク評価に適用する際には、生物が本来有している DNA 損傷修復能力が微小重力環境によってどう影響されるかを知っておかなければならない。この観点から、これまでも人工衛星や有人宇宙船を用いた生物実験が行われたきたが、これまでに用いられた実験材料はいずれも宇宙線に少なからず感受性である一方で、個々の実験試料の宇宙線被曝量を必ずしも正確に把握することができなかつたために宇宙線と微小重力の影響を区別して解析することが困難であり、依然として明確な結論は得られていない。そこで、極めて高い放射線抵抗性を有する細菌 *Deinococcus radiodurans* を用いて、放射線損傷 DNA の修復に及ぼす微小重力の影響を調べることを目的とした実験を行なった。この放射線抵抗性細菌を凍結乾燥して生理的に休眠状態にした上で大量の  $\gamma$  線 (2 ~ 12 kGy) を地上で予め照射してからスペースシャトルに搭載し、微小重力の下で培養液を加えることによって初めて照射による DNA 損傷の修復反応を開始させ、試料回収後に生存率を測定する。この方法によれば、宇宙線の影響は予め地上で照射した  $\gamma$  線よりもはるかに低い線量に過ぎないために無視でき、またこの細菌の、凍結乾燥状態では照射損傷の修復機能が停止したままで長期間安定に保存できるという性質を活かして、修復反応の結果を宇宙と地上とで厳密に比較することが可能となる。

## 実験の方法と試料

### 実験方法

微小重力の影響を調べるには、それ以外の宇宙環境要因(一時的な加重力、振動、光、ガス、温度、宇宙放射線など)に対して耐性でなければならない。*D. radiodurans*の放射線耐性野生株は、乾燥状態でも懸濁状態でもその生存に加重力、振動、光などは影響を与えないし、無酸素の懸濁状態でも数10時間は影響がない。至適生育温度は30℃であるが、4℃以下でも生存できる。放射線に対しては極めて耐性で、6 kGyまでの $\gamma$ 線照射で生存率は変化しないし、銀河宇宙線のような高LET放射線に対して $\gamma$ 線と同程度の耐性を持っている<sup>1)</sup>。本細菌は、放射線で生じるDNA2本鎖切断を効率よく修復でき、この修復には、照射後に誘導合成される蛋白質が重要な役割を担っていることが分かっている<sup>2)</sup>。また、この細菌は、DNA損傷の修復が完了するまで細胞分裂を開始しないという特徴があり、かつ修復系蛋白質の誘導と修復反応に長時間かかるため、その間に起こる反応に対する微小重力の影響を観察しやすい材料である。

以上の特徴を利用して、本実験では次のような実験方法を採用した。あらかじめ $\gamma$ 線で一定線量照射した乾燥細胞を宇宙の微小重力環境下で培養液と混合し、これによって修復反応を開始させて一定時間DNAの修復を行わせた後、低温に移して修復反応を停止させ、その状態で地上に回収して生存率を調べると同時に、地上でも宇宙と同一の操作を行い、両者の生存率を比較することによって、修復反応に与える微小重力の影響を解析するというものである。

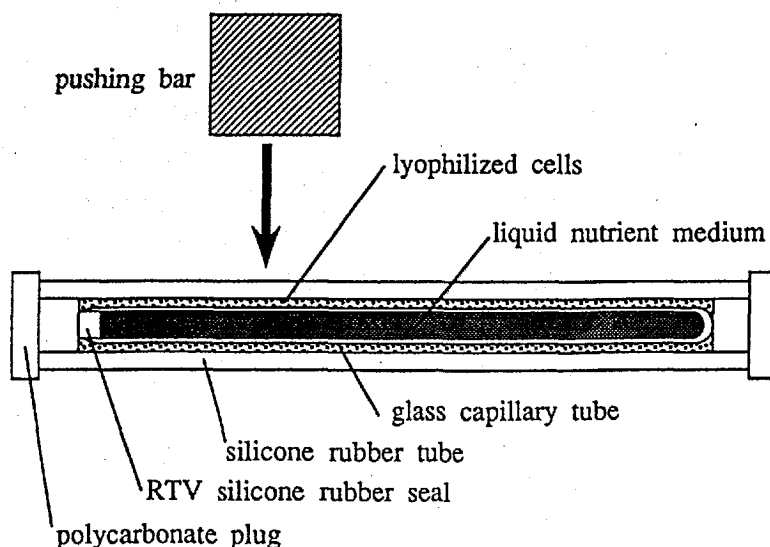


図1 シリコンチューブ内にパッケージングした放射線抵抗性細菌 *D. radiodurans* の凍結乾燥細胞と液体培地

## サンプルの安全性に関する検討

スペースシャトル内の試料に関しては、気密性、耐振性、難燃性などが要求されるため、シリコンチューブをサンプル容器として使用した(図 1)。開口部はポリカーボネート栓で封じ、更にシリコンゴムで密封した。フライト試料はチューブを更にポリプロピレンフィルム製の袋に入れて密封し、ポリカーボネート製容器(RRMD BIO-SPECIMEN BOX、図 2)内に一列に並べてテフロンテープで固定した上で RRMD 上に固定するための金属製容器(RRMD SAMPLE HOLDER、図 3)に固定した。

## ペイロードクルーの操作性の検討

できるだけ簡単な操作で確実に乾燥細胞と培養液を混和できる方法として、細胞をゼラチンを含むリン酸緩衝液に懸濁し、長さ 40 mm、内径 3 mm のシリコンチューブ内で凍結乾燥し、そこへ滅菌済みの培養液を封入した細いガラス管を挿入し、シリコンチューブの両端をポリカーボネート製プラグで密栓した(図 1)。これらのシリコンチューブを 1 本ずつポリプロピレンフィルムで密封したうえで浅い箱型のポリカーボネート製容器(RRMD BIO-SPECIMEN BOX、図 2)に一列に並べ、スペースシャトル内でクルーがシリコンチューブを外から棒(RRMD SAMPLE PUSH BAR、図 2)で抑えて液体培地が封入されたガラス管を押し割って乾燥細胞と液体培地を混和する方法を採用した。割りやすいようにポリカーボネート製容器内に溝をつけること、また通常の操作では破損せず、押し割る時に容易に割れるようなガラス管の肉厚を選択することなどの工夫を行った。クルーの実験教育訓練において試し割りを行ったが、うまく割れる人と割れない人がいたため、実際のフライト試料では、ガラス管に小さな傷をあらかじめ入れておいて、確実に割れるようにした。

## RRMD へのセットアップ方法

RRMD SAMPLE HOLDER の容積は  $12 \times 12 \times 1 \text{ cm}^3$  であり、その半分を宇宙線検出用生物試料とし、残りの半分を本実験に使用することとしたため、この容積内に装填できる試料は 17 本となった。シリコンチューブを一列に配置したのち、テフロンテープで固定した。またホルダーの上下に貼られたトラックディテクター CR-39 の上板は、ガラスチューブを押し割る時のために、一部を切り欠いたものを用いた。RRMD SAMPLE HOLDER は、スペースシャトル打ち上げ時は別のところに収納されており、軌道上で RRMD による計測を開始する際に RRMD のディテクターユニットの外側に取り付けられた(図 4)。

## 乾燥細胞の調製

実験に使用する乾燥細胞は、実験室で調製後、国内輸送、NASA への輸送、保管も含めて室温で数ヶ月は安定でなければならない。ゼラチンの存在下で凍結乾燥することによって安定な試料が調製できるが、その濃度を検討した結果、液体培地を封入したガラス管を挿入するときの操作性と、低い吸湿性ことから 2.6 % が最適な濃度であることが分かった。この条件で調製された乾燥細胞は安定であり、 $\gamma$ 線照射後長期間保存しても生存曲線に変化が見られない。

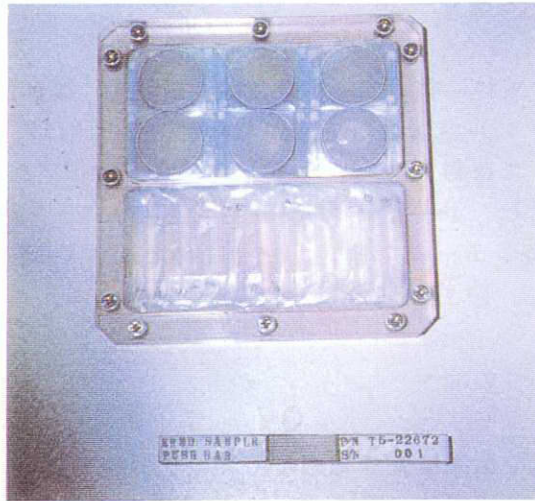


図 2 シリコンチューブ 17 本を一行に下半分に並べた RRMD BIO-SPECIMEN BOX 及びガラス管を押し割るための RRMD SAMPLE PUSH BAR



図 3 RRMD SAMPLE HOLDER に収納された BIO-SPECIMEN BOX とフライト試料

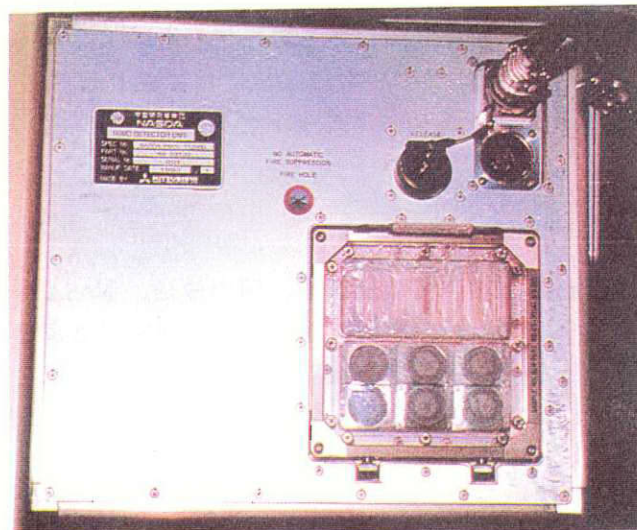


図 4 軌道上で RRMD のディテクターユニットに取り付けられた RRMD SAMPLE HOLDER

## 宇宙で行う培養実験の検討

スペースシャトル内の室温は 25 °C 前後と考えられる。そこで、 $\gamma$  線照射後の DNA 2 本鎖切断の修復に必要な時間の照射線量の依存性と、また温度の影響を検討した。その結果、線量が大きくなるほど修復時間は長くなり、10 kGy 照射、30 °C では、6 時間であった。また温度が低くなるほど長くなり、30 °C に比べて 25 °C では約 30 % から 90 % 増大した。従って、10 kGy、25 °C では少なくとも 8 時間以上で 11 時間程度まで培養する必要があると推定される。実際の宇宙実験では、クルーの実験スケジュールなども考慮して、11 時間程度培養することとした。

## 飛行実験の結果

### 実験方法及び経過

実験用試料は、サンプルホルダーに収容するものと同一なものを 10 セット同時に調製し、その 1 セットをスペースシャトルに搭載した。1 セットの中には、17 本のシリコンチューブ(図 1、2)が装着されており、非照射、2、4、6、7、8、10、12 kGy 照射試料各 2 本に加えて、4 kGy 照射試料 1 本を追加した。

打上げ後、スペースシャトルから送られてくる 2 系統の室内温度の情報をもとに、地上対照実験を Hangar L の実験室で行った。地上の 1 セットは、2 系統のスペースシャトル実験室の平均温度を用いて、1 日遅れで追従しながら保温された。また、細胞と培養液の混合操作の開始、培養の終了などのシャトルからの情報を確認、記録すると共に、それと同様の操作を地上対照試料についても行った。

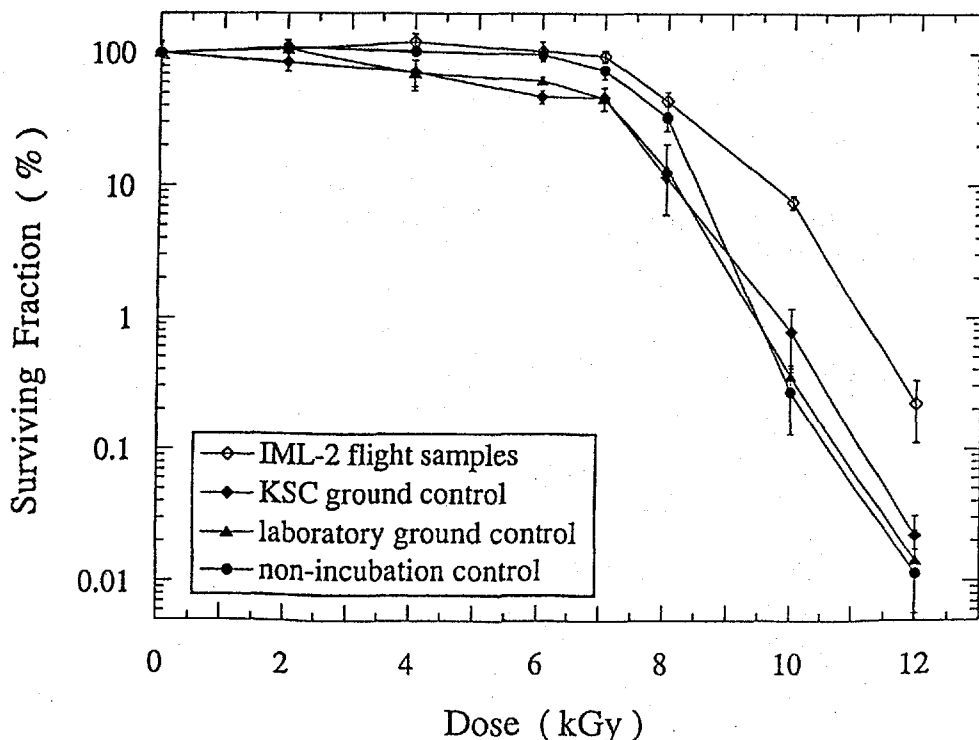


図 5 予め地上で  $\gamma$  線照射した線量に対するフライト試料及び地上対照試料の生存曲線

シャトル内の温度は 22 °C ~ 26 °C まで変化したが、試料の搭載されている環境は大体 24 °C であった。実際の宇宙試料の温度履歴は、打上げ後、乾燥状態で約 24 °C に 12 日間放置された後、フライト最終日の 1 日前に混合操作が行われ、24 °C で 11 時間インキュベートされた。着陸が 1 日延期されたため、インキュベート終了後 KSC 帰還までの 2 日と 5 時間及び帰還後試料の引き渡しまでの 3 時間は 10 °C 以下の冷蔵庫に保管された。引き渡された試料は直ちに -85 °C に冷凍され、日本に輸送された。地上対照試料もフライト試料と同様の経過で冷蔵・冷凍処理を行なった。

## 解析と考察

宇宙から回収した試料 (flight sample) と、Hangar L で行った地上対照試料 (KSC ground control) 及び培養液混合後の 11 時間を 24 °C 恒温で処理した試料 (laboratory ground control) の 3 点について、その生菌数の計測を行い、各線量での生存率を求めた。なおフライト試料のデータは、2 本の異なるシリコンチューブから得られた結果の平均値を示している。結果を図 5 に示す。図には培養液混合後直ちに生菌数を計測した場合の結果 (non-incubated, non-refrigerated, non-frozen control) も示されている。図から明らかなように、7 kGy までの線量では、地上対照試料で幾分生存率が低下する傾向が見られるもののほとんどフライト試料と生存率に違いはない。しかし、8 kGy 以上、特に 10 kGy では、フライト試料での生存率は地上対照試料よりも 1 桁以上大きく、明らかに生存率が上昇した。

なお、非照射試料では 11 時間培養とその後の冷蔵、冷凍処理によって幾分生菌数の低下が見られたが、フライト試料と地上対照試料の間には差が見られなかった (図 6)。このことは非照射フライト試料において、微小重力が細胞数の増加や減少になんら影響を与えなかったことを示すものである。

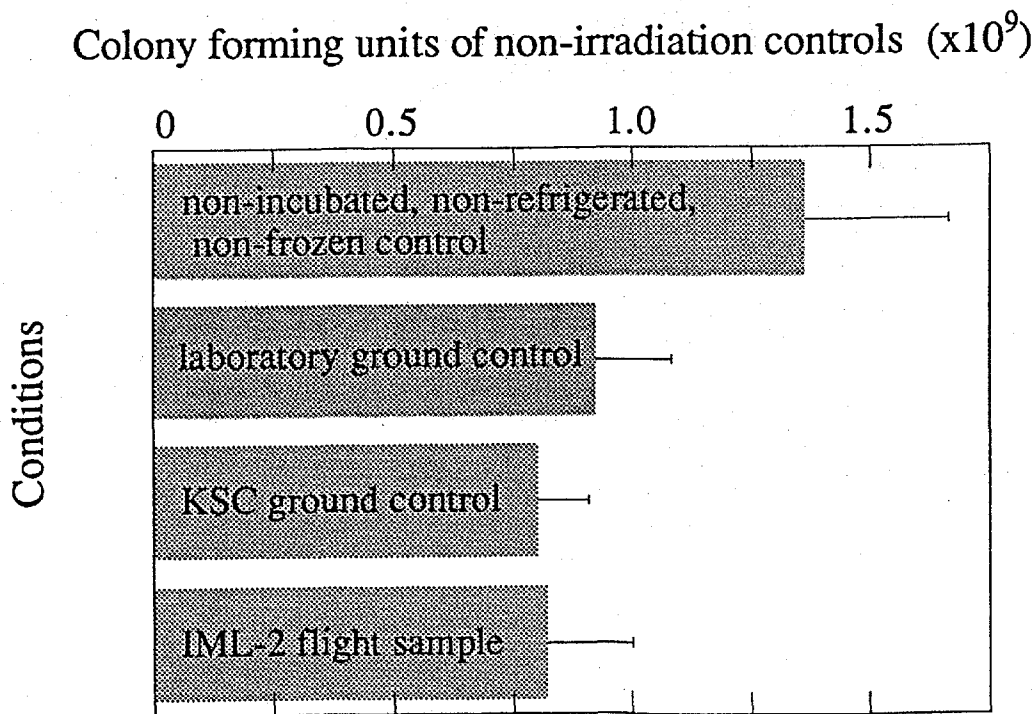


図 6 実験に用いたシリコンチューブ 1 本当たりの *D. radiodurans* の非照射試料の生菌数

## 結論

結論として、*D. radiodurans* における放射線損傷 DNA の修復、特に 2 本鎖切断の修復は微小重力の宇宙環境では地上よりも効率よく起こると考えられる。

これまで、放射線損傷の修復と微小重力との相互作用については幾つかの研究が行われてきた。フライト前に 1600 Gy 照射した酵母菌 (*Saccharomyces ellipsoides*) などの生存<sup>3)</sup>や、フライト中に Sr-85 の 514 keV の  $\gamma$  線で 17 Gy 照射した大腸菌 (*E. coli*) やサルモネラ菌 (*S. typhimurium*) などを使ってファージ誘導への影響が調べられたが<sup>4)</sup>、いずれも相互作用は観察されていない。また、IML-1 での酵母菌の実験では微小重力が抑制的に働くという報告もある<sup>5)</sup>。しかし、高等な植物や昆虫などでは、宇宙環境が放射線と相乗的に作用するという報告があり、宇宙環境条件下では修復系がうまく働かないのであろうと考えられている。本実験で得られた結論は、これまで得られている結果と対立するものであるが、DNA 2 本鎖切断の修復に関する情報はこれまでも報告されていないので、全く新しい成果であると考えられる。従来の実験系は、銀河宇宙線のような高 LET 放射線に対して感受性の高い生物系であって、純粹に微小重力の影響を反映しにくいことが考えられる。

## 参考文献

- 1) Kobayashi, Y., Shimizu, T., Tanaka, A., Kikuchi, M., Taucher-Scholz, G. and Watanabe, H. Survival of dry cells of *Deinococcus radiodurans* after heavy ion irradiation. *TIARA Annual Report*. **3**, 35-37 (1993).
- 2) Kitayama, S. and Matsuyama, A. Possibility of the repair of double strand scissions in *Micrococcus radiodurans* DNA caused by gamma-rays. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **33**, 418-422 (1968).
- 3) Grigoriev, Yu. G., Benevolensky, V.P., Druzhinin, Yu. P., Shidarov, Yu. I., Korogodin, V. I., Nevzgodina, L. V., Miller, A. T. and Trasaphin, L. S. Influence of Cosmos 368 space flight conditions on radiation effects in yeasts, hydrogen bacteria and seeds of lettuce and pea. *Life Sci. Space Res.* **10**, 113-118 (1972).
- 4) Saunder, J. F. *The Experiments of Biosatellite II*, NASA SP-204 (1971).
- 5) Pross, H.-D., Kost, M. and Kiefer, J. Repair of radiation induced genetic damage under microgravity. *Adv. Space Res.* **14**, 125-130 (1994).

## 外部発表

- 1) 小林泰彦, 渡辺 宏, 原田和樹, 長岡俊治. *D. radiodurans* の DNA 損傷修復能への微小重力環境の影響. 第 11 回宇宙利用シンポジウムプロシーディング (1994). 5-7.
- 2) 渡辺 宏. *Deinococcus radiodurans* の DNA 修復に対する微小重力の影響. 第 2 回宇宙放射線影響と防護に関するワークショップ, つくば (1994).
- 3) 小林泰彦, 菊地正博, 渡辺 宏, 原田和樹, 長岡俊治. 微小重力は放射線照射した細胞の回復を促進する. 1995 年度日本農芸化学会大会, 札幌 (1995).
- 4) Kobayashi, Y., Watanabe, H., Harada, K. and Nagaoka, S. Enhanced DNA repair under microgravity. *10th International Congress of Radiation Research*, Würzburg (1995).





# 宇宙船内における重粒子線による線量計測とその生物効果実験 (RADIATION) 宇宙天気予報とは

共同研究者： 富田二三彦\*1

\*1 通信総合研究所 平磯宇宙環境センター 宇宙環境研究室

In the 21st century, it is expected that manned space activity and space utilization will make further progress. However, space is a harsh environment: almost a vacuum bathed with radiation and penetrated by streams of energetic particles. These particles and interplanetary disturbances are hazardous to space equipment, astronauts, etc. This is why the Communications Research Laboratory decided to start the Space Weather Forecast Program of Japan. This program is realized by the accumulation of knowledge on basic physical processes governing the space environment, and is expected to play a significant role in the protection of human health in space and reliable operation of space equipment.

In this investigation, we tentatively operated the space weather information/warning system, and have been analyzing the space environment (solar and geomagnetic activities) during the shuttle flight. The exchange of RRMD data and the space weather information were performed by the computer network and the facsimile every few days, and was useful for the ground operation of the radiation observation. The radiation data is now being analyzed and tentative results show stationary particle penetration around the South Atlantic Anomaly.

## 実験の目的、意義

宇宙を飛び交う高エネルギー粒子線(放射線粒子)やX線に長時間人体がさらされれば皮膚ガンや遺伝子損傷など放射線被曝の危険があり、衛星搭載機器は誤動作や急速な劣化等の悪影響を受けることが知られている。特に、大きな太陽フレア(太陽面爆発)が発生した場合や、太陽風中の擾乱に起因する地磁気の擾乱によって放射線帯の構造が変化したりすると、人体への直接の危険や様々な宇宙機器への悪影響は増大する。よって、宇宙環境を安全に利用していくためには宇宙環境の変動を予測すること(宇宙天気予報)が必要となる。この宇宙天気予報システムの研究開発プロジェクトにより、現在、通信総合研究所平磯宇宙環境センターでは、地磁気擾乱や太陽フレアの発生などの予測に関する研究を進めるため、地磁気活動や太陽活動の観測システムの開発と観測を行うとともに、国際的なコンピュータネットワークを通じて最新の宇宙環境観測データをリアルタイム(または準リアルタイム)で入手できるようになっている(図1)。

今回の宇宙実験では、このようにして集められた太陽や宇宙環境に関する様々な観測データと、実際にスペースシャトルから得られた放射線環境に関するデータを総合的に解析することにより、太陽活動や太陽地球間の宇宙環境がシャトル軌道上の放射線環境にどのように影響を及ぼしているかを調べることを目的とする。このような周回軌道上のデータと他の宇宙環境データを比較解析する実験の積み重ねにより、太陽活動などの宇宙環境変動が地球近傍の宇宙空間にどのような影響を及ぼすかが把握できる。

更に、西暦 2000 年頃に計画されている国際宇宙ステーション(JEM)計画においては低高度高軌道傾斜角の軌道において長期間有人宇宙活動が行われる。よって、今回のような実験、特にリアルタイムベースでの情報交換は宇宙ステーションにおける安全な有人宇宙活動にも役立つ。即ち、地上のオペレータは常に最新の宇宙環境情報に通じていることにより適切でしかも安全な宇宙環境利用計画を策定することが可能になる。一方、突然放射線粒子の侵入が観測された場合には即座にその原因究明が図られ、宇宙での作業計画変更など適切な対応が可能になる。

今後は、様々な宇宙環境の変動をモデル化してシミュレートする手法(アルゴリズム)を開発することにより、最終的には、太陽活動や太陽地球間の各種観測パラメータにより、地球近傍各所の宇宙環境の変動を予測することも可能になるであろう。

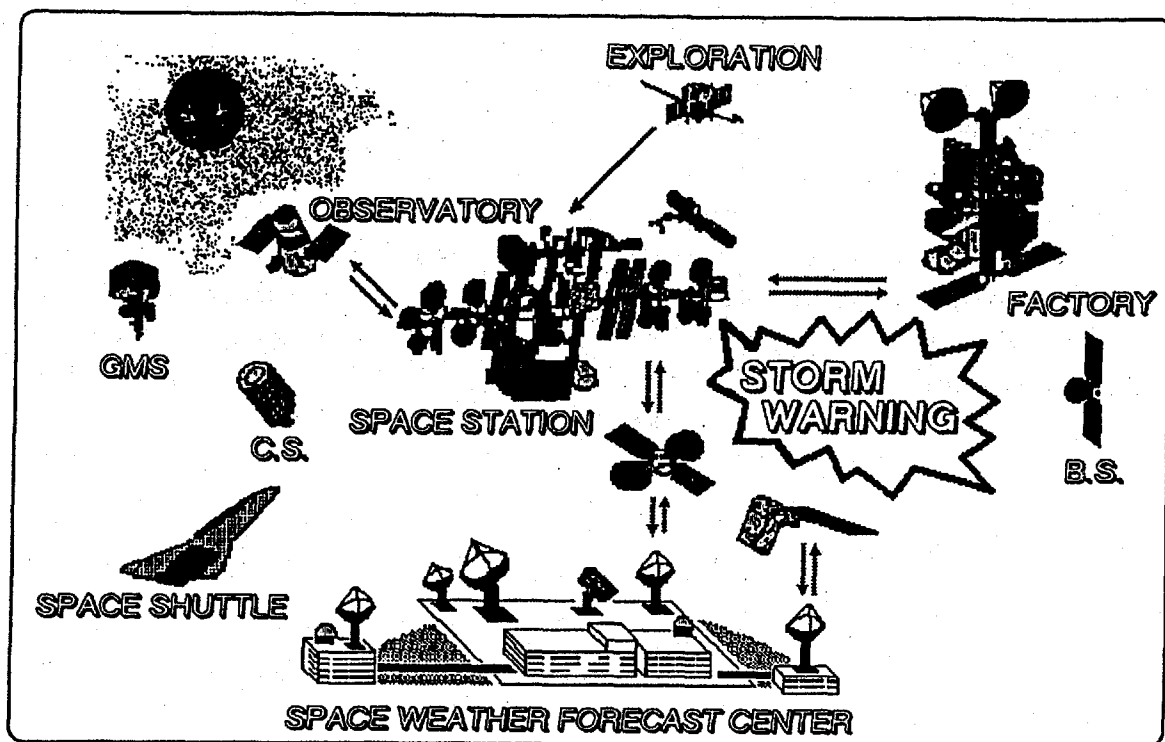


図1 宇宙天気予報システムの運用概念図

## 実験の方法

- 1) 将来の宇宙天気予報システム構築のため、データの入手から現況や予測の情報提供まで、できるだけリアルタイムに近い形で情報を交換するための実験を行う。具体的には、軌道上のリアルタイムの観測データをその他の宇宙環境観測データと併せて解析することにより宇宙環境の現況を把握して予測を行い、その結果を地上の実験者などに即座に伝える実験を行う。
- 2) 軌道上で観測された放射線量の変動を、その他の宇宙環境に関する観測データとともに総合的に解析し、その因果関係に関して研究を行う。具体的に利用する観測データは、光学及び電波による太陽観測データ(地上データ及び衛星データ)、静止軌道上の粒子・磁場データ、地磁気活動に関するデータなどである。

## 飛行実験の結果

上述の実験方法に従い、RRMDデータの一部がQL (Quick Look)のプロット図及びデジタルデータにより随時米国から日本(平磯センター)へPIのコメントと共に提供された。プロット図及びコメントはファクシミリにより、またデジタルデータはコンピュータネットワーク(EMAIL)により送付された。これに対し、平磯側からは宇宙環境全体の状況を、観測データプロット図及び文章によりファクシミリを利用して米国へ送付した。日米では昼夜の関係がちょうど逆転しているため、情報の解析と交換が効率よく行われた。特に、後述の14日の粒子データの解析に関しては頻りに情報交換を行い、即時的なデータ解釈に役立った。

なお今回の共同実験に備えたわけではないが、平磯宇宙環境センターは1988年より独自に「宇宙天気予報システムの研究開発」を行っており、その中で国内・国外とのコンピュータネットワークによる観測データの収集・配布システムの開発、太陽観測施設の開発などを行ってきている。特にネットワークに関しては、WWWサーバなどを通じて最新の観測データが参照できる環境が開発されていたし、また太陽観測に関しては、現在までの太陽活動状況がリアルタイム(または準リアルタイム)でモニターできるようになっていたため、今回の実験実施にあたっては大いにその威力を発揮した。

## 解析と考察

1995年夏の時点では未だ全てのデータ解析は完了していない。今後更に詳細なデータ解析を行うため、衛星による太陽地球間環境(太陽風)観測データ、及び可能な限り他の周回軌道衛星による磁場や粒子の観測データも入手して比較検討する計画であるが、これまでに調査した実験期間7月10日～22日及びその数日以前からの宇宙環境の概要を報告する。

## 太陽活動

この期間、太陽活動は静穏な状態が続いた。7月19日の時点で太陽面には5つの活動域があり、その中で面積最大は、北東にある#7757であったが、特に活動は起こしていない。解析期間中の主な(Cクラス以上の)フレア活動は表1のとおりである。

表1 実験期間中の主な太陽活動

月日	時刻(UT)	X線/光学	領域	電波バースト
7/7	0956	M1.3 /1N	7746	2, 3, 4
7/8	0537	C1.0 /SF	7749	
7/12	0915	C6.0 /1N	7746	2
7/14	0844	C1.9 /SF	7746	3
7/14	1955	C2.3 /SF	?	3, 5
7/15	0714	C1.1 /SF	?	
7/15	1713	C1.1 /SF	7754	
7/16	0251	C1.4	?	?
7/18	1330	C3.2 /SF	7758	2, 3, 4, 5

## 静止軌道上の放射線環境

上述のような太陽活動状況のため、プロトン現象は全く発生していない。図2に見られるように、静止軌道上の高エネルギー電子の分布は、後述の地磁気活動と関連して16日後半から23日頃までレベルが上昇しているのが、静止軌道上の衛星には機器誤動作への注意が必要であったが、低高度へは何も影響がなかったと考えられる。

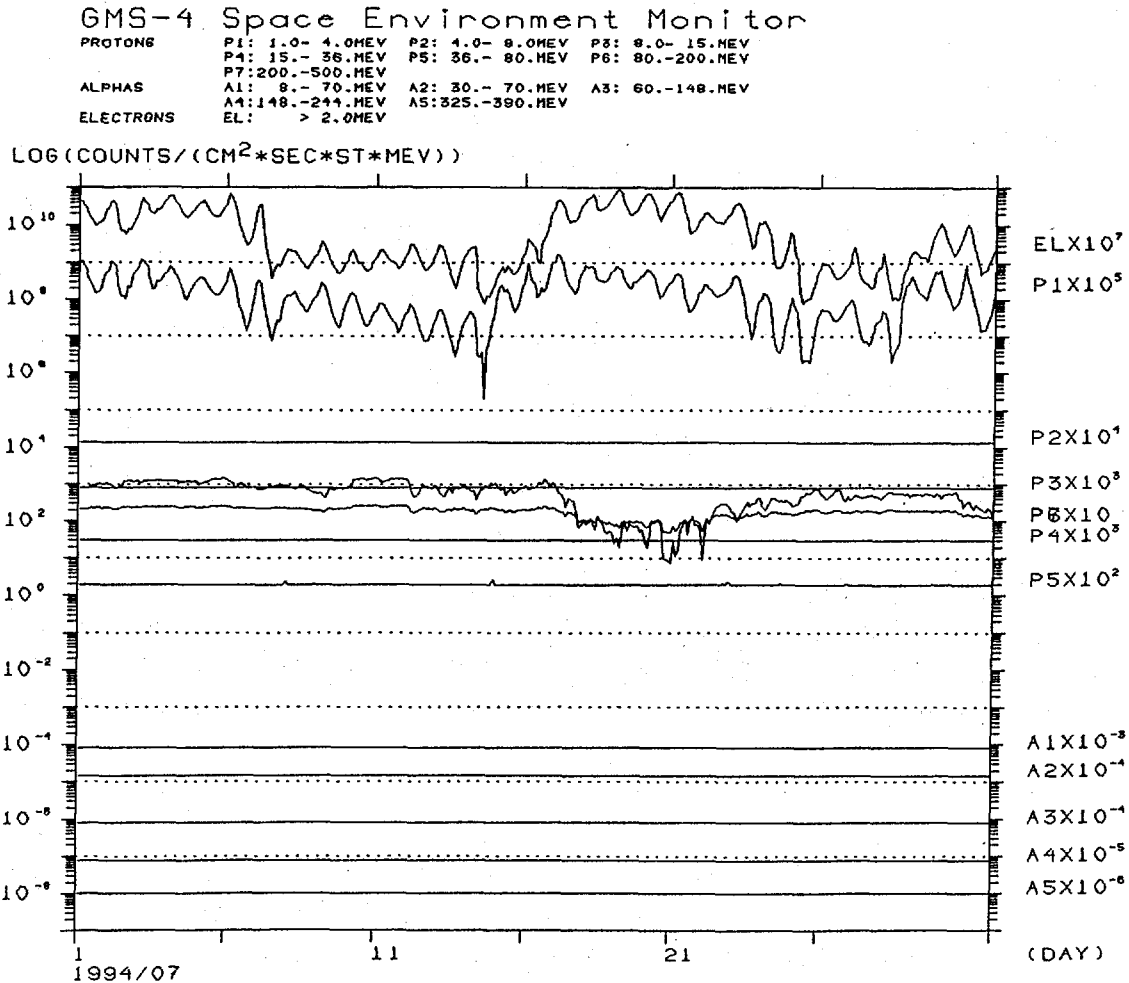


図2 日本の気象衛星(GMS)搭載のSEM (Space Environment Monitor)による静止軌道上の高エネルギー粒子環境。(データは気象庁提供)

## 地磁気活動

地上の地磁気データサマ리를図3に示す。前半は極めて静穏であったが、14日10時UT頃から最大50 nT程度の擾乱が始まっている。この擾乱は12日に太陽の子午線を通過(CMP)したコロナホールによるものである。擾乱は14日前半から始まり、実験終了頃まで続いたが、その後は静穏な状態となっている。

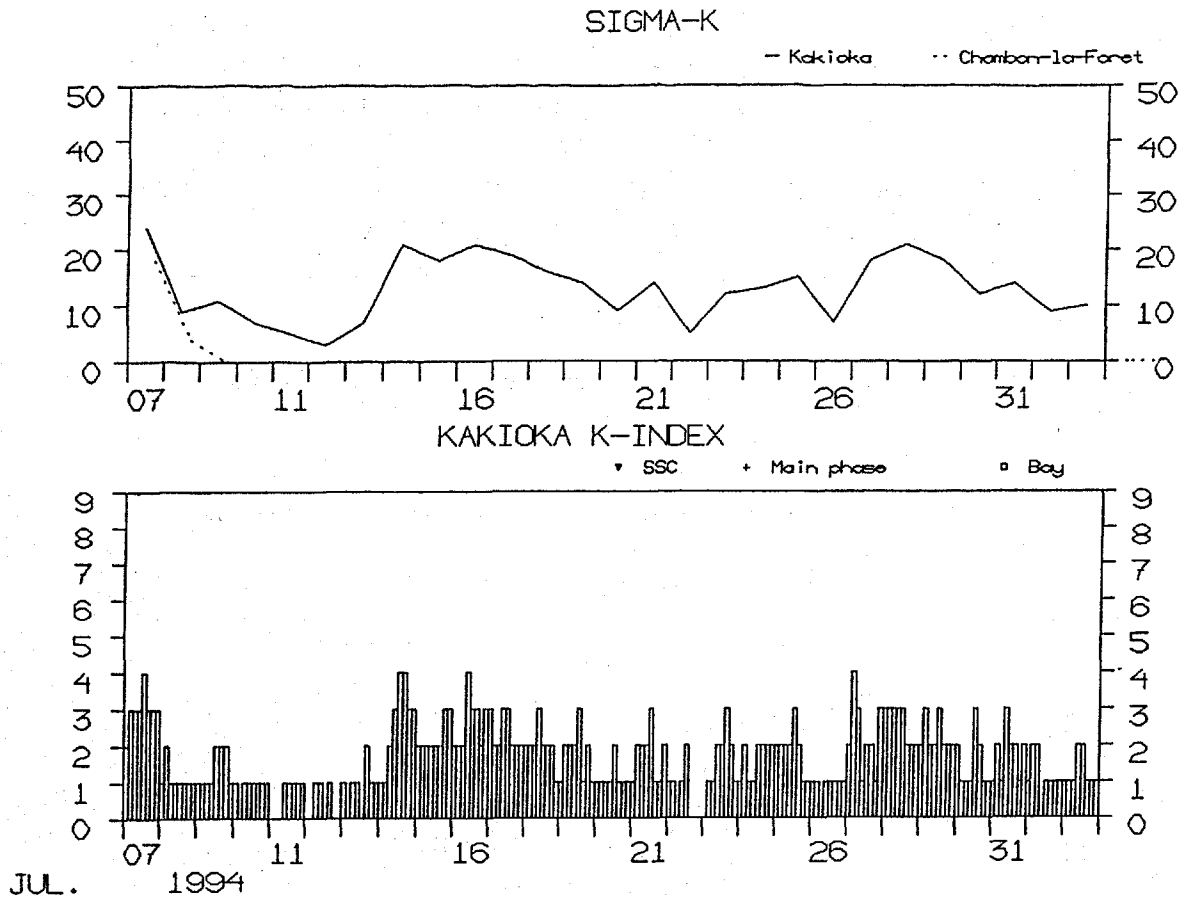


図3 地磁気活動の状況(データ提供は気象庁柿岡地磁気観測所、表示は平磯宇宙環境センター)

## 結論

今回の実験では、シャトル内部での比較的重粒子の計測が行われた。低高度でしかも低軌道傾斜角の軌道に、生物や機器に大きな影響を及ぼす高 LET 放射線がどのように存在するのか空間的及び時間的な変動が調べられた。現在は約 11 年の太陽活動が極小に近い時期であり(図 4 参照)、しかも実験期間中にも大きな太陽活動が見られなかったことから、概ね静穏時の放射線帯粒子(特に SAA: South Atlantic Anomaly)と銀河宇宙線による放射線が計測された(図 5 参照)。例外として 14 日 14 時頃の粒子観測(図 6)があるが、これまでの解析では、これはフレアによるものとは考えられない。今のところ、ちょうどその頃始まった地磁気擾乱の影響で放射線帯の粒子が若干もれこんだか、または、たまたま銀河宇宙線が入射しやすくなったのではないか(高エネルギーチャンネルには何も見えないのでちょっとあり得ないか)と考えられる。理由として、同日 14 時以前の(若干でも)考慮すべきフレアは C1.9/SF (#7746)であるが、これはその他のフレアと比較して、付随する電波バーストなど特に太陽面での高エネルギー現象を示唆するものではなく、静止軌道でも SEP (Solar Energetic Particle)は観測されていない。ただし、今回の計測装置は GOES 衛星や GMS 衛星の SEM (Space Environment Monitor: 放射線計測装置)に比較してかなり高感度なので、SEM で計測されていないことは絶対条件ではない。SEM の低エネルギーレンジや、地上の磁場

のデータにもあるように、14日前半からコロナホールによる地磁気擾乱が始まっているので、この影響で放射線帯粒子(高 LET 成分)が銀河宇宙線がシャトル高度にまで侵入したというのが、今のところ最も真実に近いと思われる。今後も、他の衛星による観測データを入手するなどして更に詳しい解析を続けるが、今回のような現象が真実とすると、低高度低軌道傾斜角の軌道付近にも(JEMのような高軌道傾斜角ではより強いであろう)、ありふれた規模の地磁気嵐により放射線粒子が侵入することになるので、太陽フレア粒子の他にも地磁気嵐の予測、特に開始時期や規模の予測がこれから重要になってくると考えられる。

### SESC Prediction of Smoothed Sunspot Number Based on July 1995 observed data

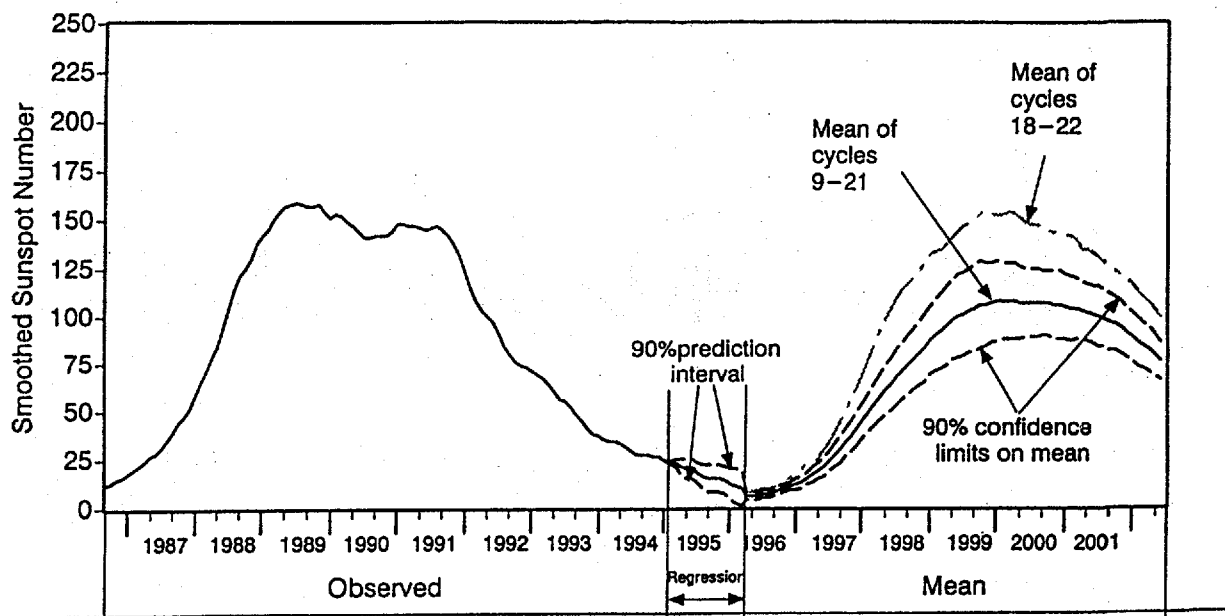


図4 今第22太陽活動周期の相対黒点数及びその予測<sup>1)</sup>

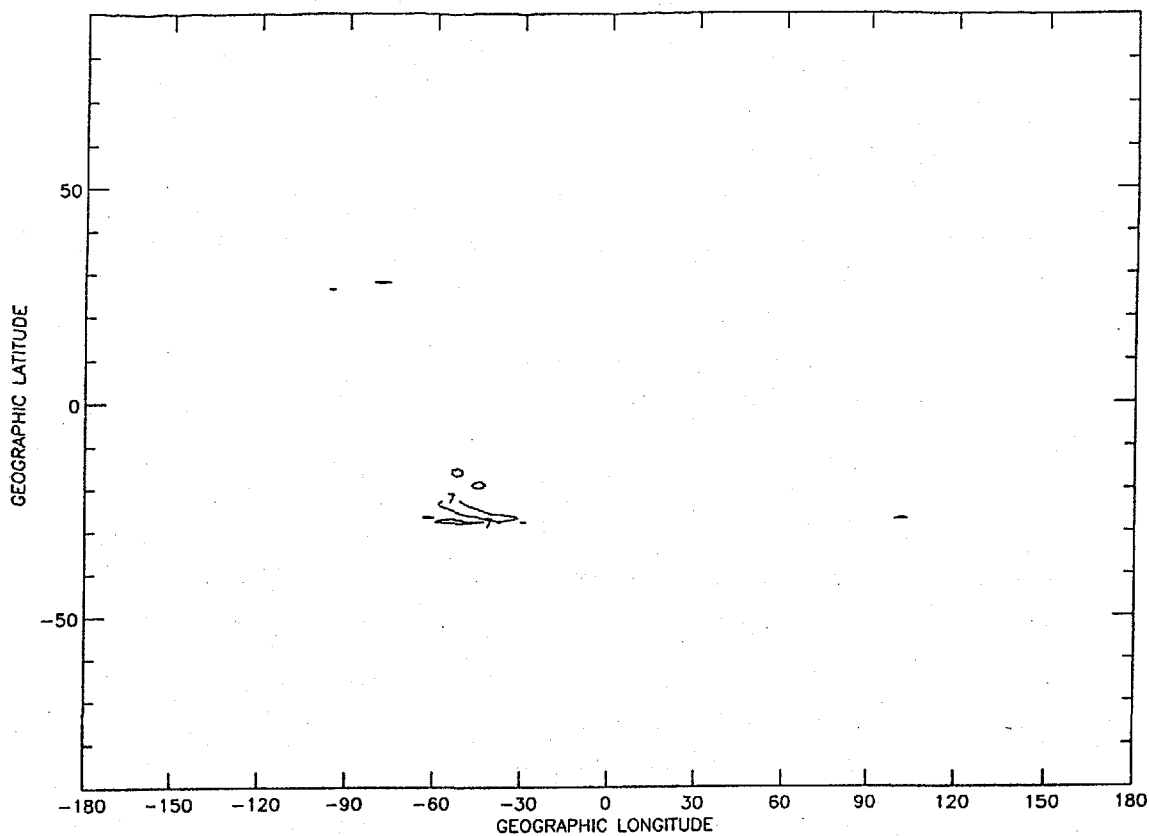


図 5 1994年7月12日 12:00UT - 24:00UT に PSD1 検出器のカウント数 (LET > 5.02 eV/μm) が 7 を越えた領域を等高線で示す。

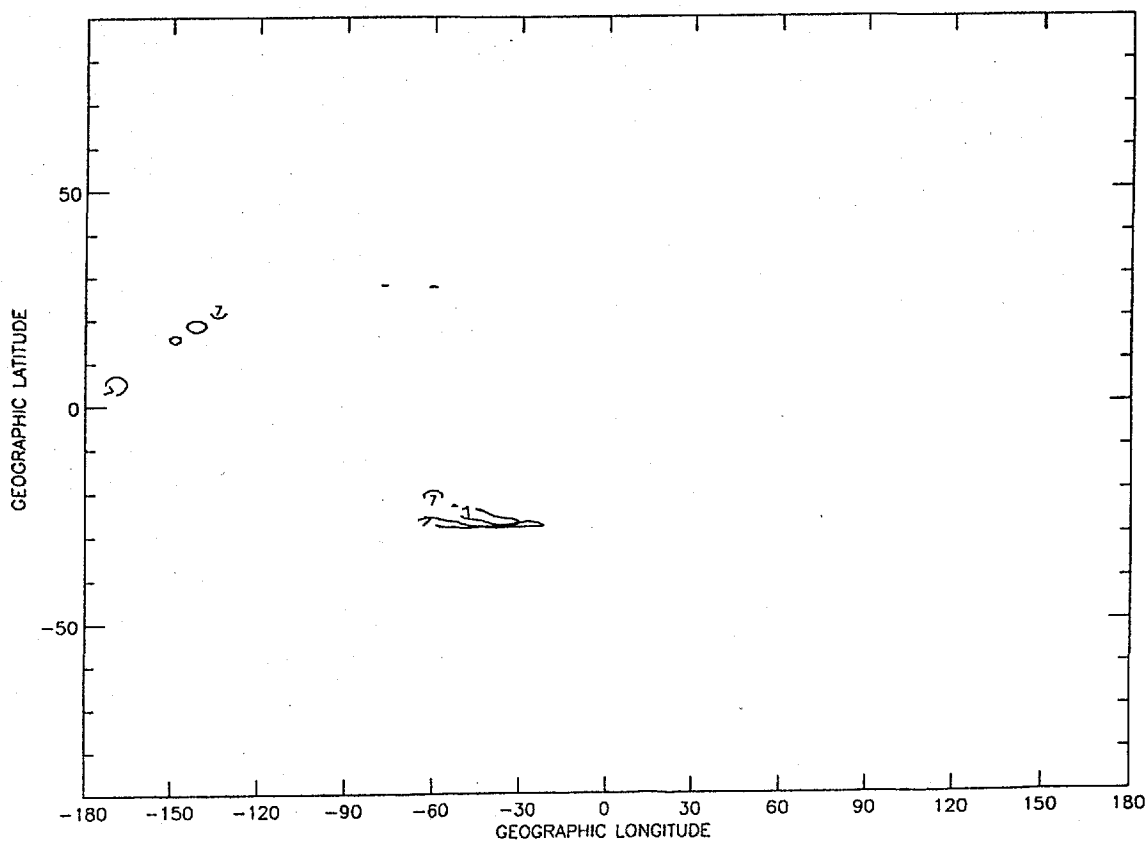


図 6 1994年7月14日 12:00UT - 24:00UT について、条件は図 4 と同じ。



## 参考

今回の実験実施及びデータ解析では下記のシステム、及びデータを利用した。

- 1) 郵政省通信総合研究所平磯宇宙環境センターの観測データ及び宇宙環境情報システム
- 2) 米国商務省海洋大気庁宇宙環境サービスセンターの宇宙環境情報システム
- 3) 静止軌道等の粒子観測データ(GMS/気象庁、GOES/米国商務省海洋大気庁、ETS/宇宙開発事業団(参照予定))
- 4) 地磁気データ(気象庁柿岡地磁気観測所)
- 5) Dst データ(京都大学理学部地磁気世界資料センター)

## 参考文献

- 1) Preliminary Report and Forecast of Solar Geophysical Data, NOAA/SESC, US Dept. of Commerce.
- 2) Solar-Geophysical Data comprehensive reports, NOAA/SESC, US Dept. of Commerce.

## 外部発表

- 1) 第17回宇宙ステーション利用計画ワークショップ (Jan. 1995).
- 2) 地球電磁気地球惑星圏学会 1995年秋の講演会 (Oct. 1995). (データの一部を紹介予定)
- 3) 日本宇宙生物科学会 (Oct. 1995). (データの一部を紹介予定)
- 4) 第6回 STEP シンポジウム (Nov. 1995)
- 5) Solar Terrestrial Prediction Workshop (Jan. 1996). (日本にて発表予定)

# 宇宙船内における重粒子線による線量計測とその生物効果実験 (RADIATION) 大腸菌細胞とプラスミド DNA について

共同研究者： 長岡俊治\*<sup>1</sup>、原田和樹\*<sup>2</sup>、帯屋有里乃\*<sup>2</sup>、中野立央\*<sup>2</sup>、  
小林泰彦\*<sup>3</sup>、渡辺 宏\*<sup>3</sup>、大西武雄\*<sup>4</sup>

\*1 宇宙開発事業団 宇宙実験グループ、\*2 PL 学園女子短期大学 植物研究所、  
\*3 日本原子力研究所 高崎研究所、\*4 奈良県立医科大学

We participated in a space experiment conducted during the 2nd International Microgravity Laboratory Mission (IML-2) project. This study was designed to investigate the effect of high LET (linear energy transfer) cosmic radiations on living organisms by loading the "Realtime Radiation Monitoring Device (RRMD)" and "Radiation Dosimeter" with biological samples, and performing post-flight analysis. As one of preparing procedure of biological samples, we performed the preliminary experiment on earth using *Escherichia coli* irradiated with ultraviolet (UV) light. After preparing the biological samples, which were dried *E. coli* DNA repair-deficient mutants and the shuttle vector plasmid pZ189 DNA, we placed them in the Dosimeters and in the RRMD, which was a Biospecimen Box sandwiched between "Harzlas" plastic radiation detectors. These were then loaded into the Space Shuttle "Columbia" while the identical box and Dosimeters were let at the NASA John F. Kennedy Space Center (KSC) as a control on earth. "Columbia (flight No. STS-65)" was launched from KSC in Florida, USA on July 9, 1994, and landing site was the same place as launch. Mission duration was 14 days. After the return of "Columbia" to earth, we studied the following two subjects; (1) the lethality and mutagenicity of high LET cosmic radiation on *E. coli* mutants, and (2) the relation between high LET cosmic radiations and the mutation of pZ189 DNA. For *E. coli* KMBL3835 (wild type), KY383 (*lexA*<sup>-</sup>), KY385 (*recA*<sup>-</sup>) and KY386 (*uvrA*<sup>-</sup>), there was little difference between the cell viabilities of the space samples and those of the ground samples. Likewise, there was little difference between space and ground in the ratios of mutation frequency of the *E. coli* mutants. Furthermore, the survival and mutation frequency of *supF* gene of pZ189 DNA space samples did not differ from those of the ground samples.

## 実験の目的、意義

大腸菌 (*Escherichia coli*) の野生型細胞と損傷を起こした遺伝子 DNA を修復できない細胞 (DNA 修復能欠損突然変異株…ミュータント) やプラスミド DNA を用いて、高エネルギー宇宙放射線の生物影響を、細胞致死と突然変異誘発率で調べ、更に、突然変異が生じた際の DNA 上の分子レベルの変化を、塩基配列で調べる。

## 実験の方法と試料

### 実験試料

宇宙放射線の生物影響を調べるには、放射線に弱い複数種の細胞を、宇宙放射線環境下に曝して差を見る事が一つの方法である。放射線が生物に及ぼす影響のターゲットが主に生物細胞内の核酸である事が既に知られている事から、比較する生物同士が同じ親細胞から派生した突然変異細胞群であり、その違いが、核酸の中でも DNA に起こった損傷の修復のさまざまなステップを欠いている細胞群は良い実験材料となる。そういう意味で、大腸菌は生物の中で最も遺伝情報が調べられており、また、損傷 DNA を修復する遺伝情報が欠損している突然変異細胞の種類が豊富であるため、今回の使用となった。なお、用いた細胞は表 1 に示した通り、大腸菌 11 種類であった。また、大腸菌との比較として、放射線高抵抗性細菌ダイノコッカス・ラディオデュランス (*Deinococcus radiodurans*) 細胞を 2 種類、更には、宇宙放射線で起こる突然変異が、DNA 上の特異的な領域で起こるかどうか(特異的なスペクトラムを持つかどうかという事で、その領域をホットスポットと呼ぶ)を調べるために、シャトルベクタープラスミド pZ189 DNA を用いた。

RRMD	Radiation Dosimeters
<i>Escherichia coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
H/r30R ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber)	H/r30R ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber)
Hs30R ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber, <i>uvrA</i> <sup>-</sup> )	Hs30R ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber, <i>uvrA</i> <sup>-</sup> )
NG30 ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber, <i>recA</i> <sup>-</sup> )	NG30 ( <i>argF</i> <sup>-</sup> amber, <i>recA</i> <sup>-</sup> )
KMBL3835 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> )	KMBL3835 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> )
KY383 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>lexA3</i> <sup>-</sup> )	KY383 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>lexA3</i> <sup>-</sup> )
KY385 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>recA56</i> <sup>-</sup> )	KY385 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>recA56</i> <sup>-</sup> )
KY386 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>uvrA6</i> <sup>-</sup> )	KY386 ( <i>trpE9777</i> <sup>-</sup> , <i>uvrA6</i> <sup>-</sup> )
<i>pol</i> <sup>12</sup> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> and <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )	<i>pol</i> <sup>12</sup> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> and <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )
<i>polA107</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )	<i>polA107</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )
<i>polA1</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )	<i>polA1</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )
<i>resA1</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )	<i>resA1</i> ( <i>pol</i> <sup>+</sup> , 5'→3' <i>exo</i> <sup>+</sup> and 3'→5' <i>exo</i> <sup>+</sup> , <i>recA</i> <sup>ts</sup> )
Shuttle Vector Plasmid DNA	Shuttle Vector Plasmid DNA
pZ189	pZ189
<i>Deinococcus radiodurans</i>	<i>Deinococcus radiodurans</i>
MR <sub>1</sub> (wild type)	MR <sub>1</sub> (wild type)
<i>rec30</i> ( <i>recA</i> <sup>-</sup> )	<i>rec30</i> ( <i>recA</i> <sup>-</sup> )
freeze-dried MR <sub>1</sub> cells beforehand irradiated with radiation + liquid medium in silicone tubes	

表 1 スペースシャトル「コロンビア号」のスペースラブ内に搭載された放射線モニター装置(RRMD)とドシメーターに装填した生物サンプルのリスト

### 実験方法

これらの生物材料を、乾燥状態にしてスペースシャトルに搭載したが、その方法は、既に、第 1 次材料実験(FMPT)で実施した方法を基本とした<sup>1, 2)</sup>。すなわち、対数増殖期後期で培養を停止した細胞培養液に、等容量の 20%ゼラチン(Difco Bacto-gelatin)液を加えて良く混和した後、滅菌した孔径 0.45 μm のメンブレンフィルター(Advantec)上に 0.4 ml ずつ載せた。その後、充分量のシリカゲルが入ったデシケーター内で、真空ポンプを用いて減圧しながら、細胞の乾燥を行った。乾燥終了後、メンブレンフィルター上でゼラチンに包埋された乾燥細胞は、コンタミ(まわりからの雑菌混入)防止のため、ポリプロピレン・パツ

グに封入して、乾燥細胞サンプル(試料)を完成した。プラスミド DNA の乾燥サンプル調製法は、ペーパーディスクの上にバッファーで溶解した DNA を載せて、シリカゲル存在下で自然乾燥させた。

これら、生物乾燥サンプルを、RRMD のバイオスペシメン・ボックス(Biospecimen Box)(図 1)とドシメーター(Dosimeter)に装填した。

シャトル帰還後は、乾燥サンプルの中でも、ここで報告する大腸菌細胞に関しては、0.8 ml の滅菌生理食塩水(最終濃度 0.2 %  $\text{MgSO}_4$  を含む)で復水し、その細胞液を適当に希釈した後、プイヨンプレートに塗抹して 24 時間後に出現したコロニーを計数して生存率を測定した。また、突然変異誘発率の測定は、細胞液をそのまま 2 枚のデービスプレートに塗抹して 48 時間後に栄養要求性突然変異から復帰して出現したコロニー数を平均して、生菌数との割合で計算した<sup>3)</sup>。



図 1 生物サンプルを装填したバイオスペシメン・ボックス  
(左：地上サンプル、右：宇宙サンプル)

プラスミド DNA のホットスポット検索には次の方法を用いた<sup>4)</sup>。pZ189 DNA は、全長約 5.5 kbp で、pBR327 の複製起点や SV40 の領域を持っており、更に、約 150 bp の大腸菌サブレッサー tRNA 遺伝子(*supF*)領域を持っている事で特徴づけられる(図 2)。pZ189DNA の生存率は、SOS 誘導を行った野生型大腸菌 KY40 と DNA 修復能欠損株 KY46(*uvrA*<sup>-</sup>)にプラスミドを導入した後のアンピシリン耐性コロニーの出現率と定義した。突然変異誘発率の測定は、pZ189 DNA を導入した大腸菌をアンピシリン存在下で培養して *supF* 上の突然変異を固定し、その後アルカリ法で pZ189 DNA を抽出して、MBM7070 / pKY241 に導入しナリジキシン酸・アンピシリン・クロラムフェニコール含有プレートを用いて *supF* 上の突然変異の第一次選択を行う。その原理を図 2 に示したが、プラスミド pKY241 はアンバー突然変異を持つナリジキシン酸感受性の遺伝子 *gyrA* を持ち、導入した pZ189 DNA の *supF* 遺伝子が突然変異を起こして不活性であればナリジキシン酸存在下でコロニーを形成する。次に、X-gal・IPTG とアンピシリンを加えたプレート並びにアンピシリン含有マッコンキープレートで白いコロニーを形成する事で突然変異の再確認を行う。突然変異の解析は、得られた各クローンからアルカリ・PGE 法で pZ189 DNA を抽出・精製し、ジデオキシ法に

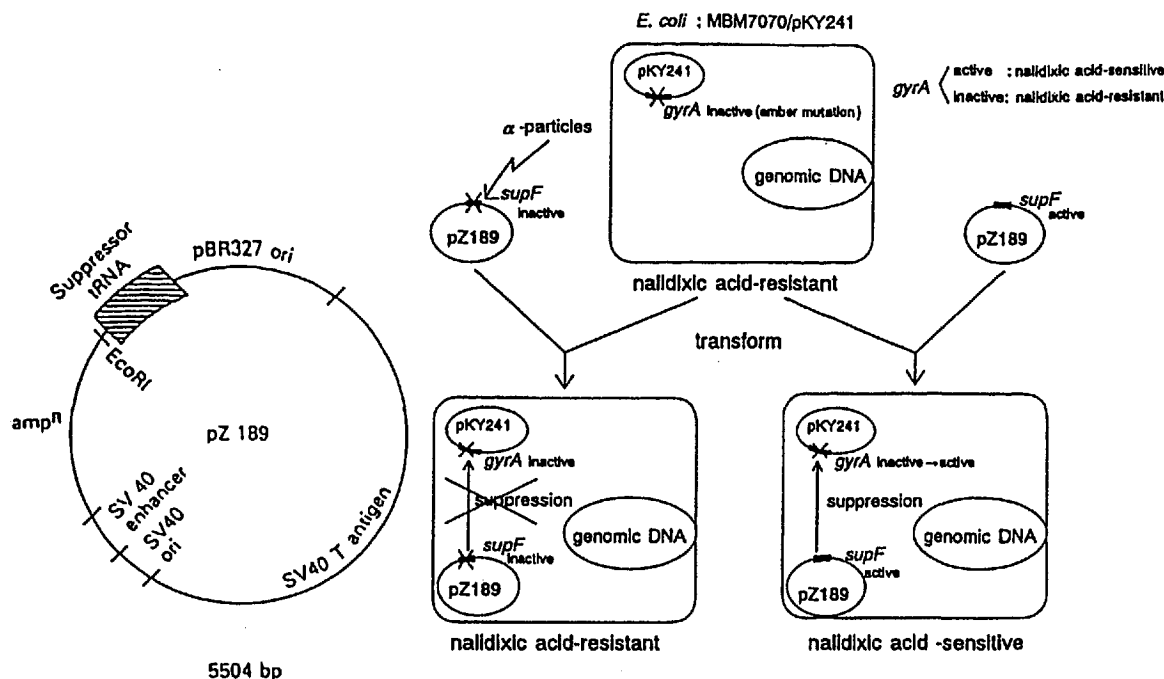


図2 シャトルベクタープラスミド pZ189 DNA の遺伝子構造と突然変異アッセイ原理図

より *supF* の塩基配列を決定する。

ペイロードクルーには、1993年1月にレクチャーを中心とした訓練を行った。

### 紫外線照射実験

地上部予備実験として、宇宙実験で使用した大腸菌細胞の紫外線感受性を調べた。大腸菌野生型細胞 (KMBL3835 株) とその突然変異細胞群である KY383 株 (*lexA*<sup>-</sup>)、KY385 株 (*recA*<sup>-</sup>)、KY386 株 (*uvrA*<sup>-</sup>) の場合には、KMBL3835 株、KY383 株、KY386 株、KY385 株の順に感受性が大きくなり、KY385 株では D<sub>10</sub> 値 (細胞が 90% 死滅するのに必要な線量) は約 2 J/m<sup>2</sup> となった。突然変異誘発率では、KY386 株が 5 J/m<sup>2</sup> で  $1.28 \times 10^{-6}$  と高い変異率を示した<sup>3)</sup>。同様に、別の大腸菌野生型細胞 (H/r30R) とその突然変異細胞群である Hs30R 株 (*uvrA*<sup>-</sup>)、NG30 株 (*recA*<sup>-</sup>) の場合には、H/r30R 株、Hs30R 株、NG30 株の順に感受性が大きくなり、NG30 株ではわずか 0.5 J/m<sup>2</sup> で生菌数が減少し、また、突然変異誘発率は、Hs30R 株が 5 J/m<sup>2</sup> で  $6 \times 10^{-4}$  という最も高い値を示した。これらの結果から、宇宙放射線の致死と突然変異誘発率を測定する系としては、これら大腸菌細胞は適していると判断した。

### サンプルの安全性に関する検討

三菱重工業(株)高砂研究所で実施した振動試験、オフガス試験のいずれもクリアしたが、減圧試験ではサンプル内の空気が膨張して、バイオスペースメン・ボックスの上下をはさんでいたハーツラス (CR-39 プラスチック板) が破損した。そこで、バイオスペースメン・ボックスに装填する乾燥細胞サンプル数を減らし、最終的に総数は 90 サンプルとした。

## 飛行実験の結果

日本から KSC までのサンプルの往復輸送は、常に冷蔵状態でいった。

宇宙実験は、RRMD にセットした 1 つのバイオスペースメン・ボックス(サンプル総数 90)とドシメーター 4 枚(サンプル総数 144)で実施された。ドシメーターのうちの 2 枚は RRMD に取り付けてあり、残り 2 枚は粘菌培養容器と植物細胞培養容器に取り付けてあった。生物サンプルは、飛行期間中、スペースラブ内で宇宙放射線に曝露される環境下に継続しておかれたが、バイオスペースメン・ボックスと 2 枚のドシメーターは、RRMD センサーと共にラブ内を移動した。飛行期間以外は、生物サンプルは冷蔵で保管された。

地上部対照実験としては温度状況を追尾し、KSC ハンガー L(ライフサイエンス実験支援施設)内でインキュベーター(コンビトロン社製)を用いて、シャトル打上げから約 1 日遅れで実施した。

## 解析と考察

実験の最終結果は、まず図 3 に示したが、バイオスペースメン・ボックス内の大腸菌 KMBL3835 株、KY383 株、KY385 株、KY386 株のいずれも、宇宙と地上の間では、生存数と突然変異誘発率に差がなかったと判断した。図からは KY383 株の突然変異誘発率が宇宙サンプルの方で上昇している様に見えるが、誤差の範囲と思われる。また、図中のポイントは平均値、バーは標準偏差を示した。一方、ドシメーター内も同様に、KMBL3835 株、KY383 株、KY385 株、KY386 株のいずれも、宇宙と地上の間では、生存数と突然変異誘発率に差は見られなかった(図 4)。また、H/r30R 株シリーズの大腸菌細胞でも同様の結果が得られた。

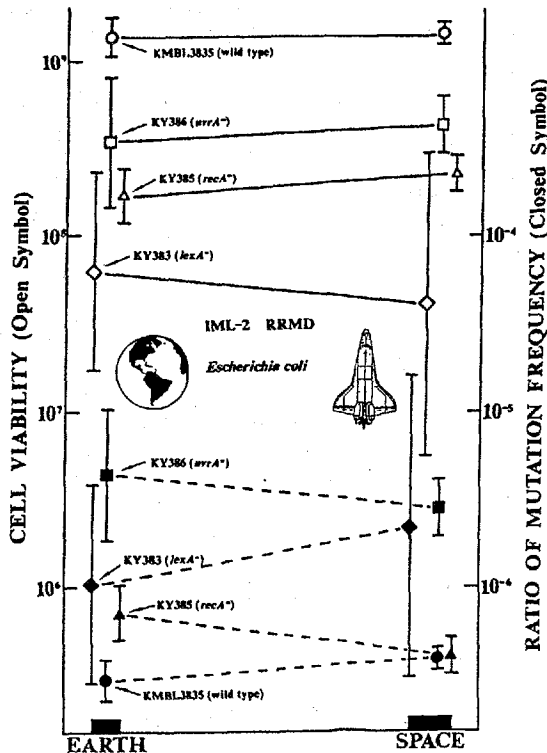


図 3 宇宙と地上の放射線モニター装置内での大腸菌 DNA 修復能欠損株の生菌数と突然変異誘発率の比較

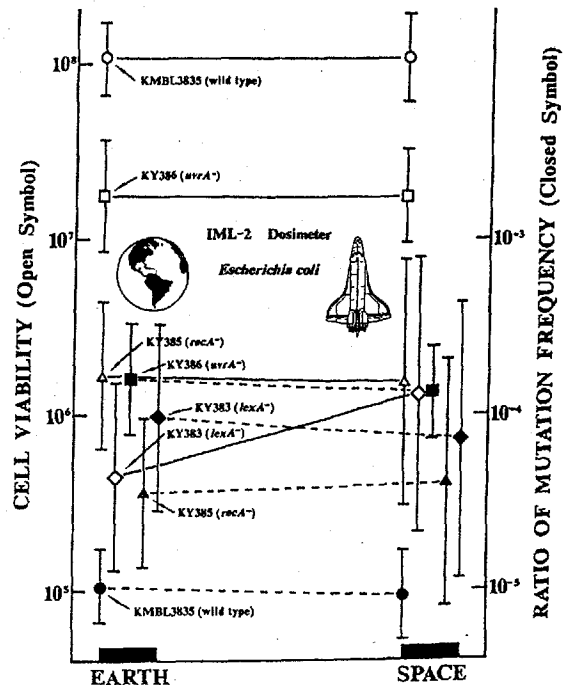


図 4 宇宙と地上のドシメーター内での大腸菌 DNA 修復能欠損株の生菌数の比較

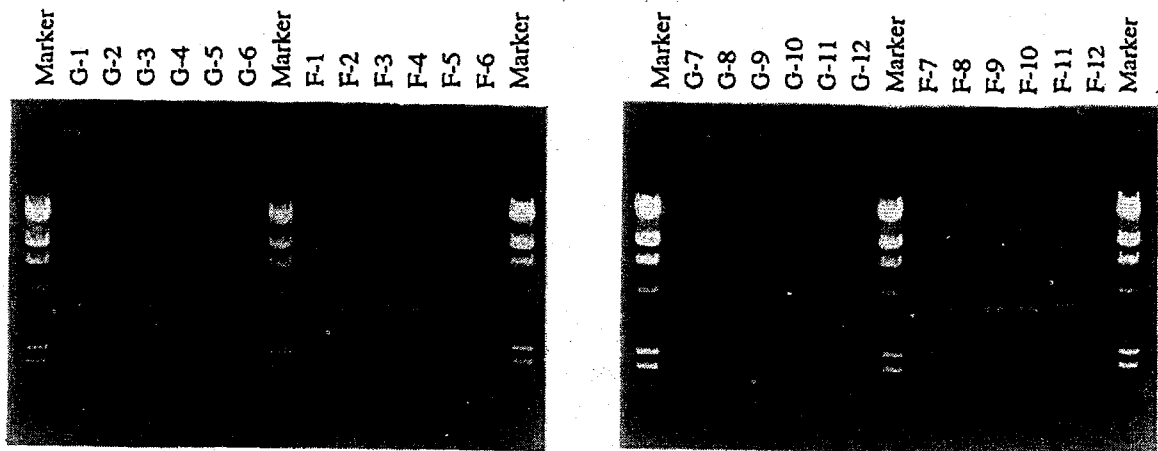


図5 宇宙と地上の放射線モニター装置内シャトルベクタープラスミド pZ189 DNA サンプルの電気泳動バンド・パターンと比較(記号Fは宇宙サンプル、記号Gは地上対照サンプルを示し、番号は放射線モニター装置内の位置を示す)

さて、シャトルベクタープラスミド pZ189 DNA のバイオスペースメン・ボックス内の宇宙と地上サンプルを、シャトル帰還後受け取って、KSCハンガーL内で直ちに電気泳動実験を行った(図5)。図5からも判る様に、宇宙サンプルにも地上サンプルにも閉環状 DNA(ccDNA) と開環状 DNA(ocDNA) のバンドは明確に出現したが、宇宙と地上に違いは認められなかった。この事から、DNA 鎖切断の様なドラスティックな損傷が DNA 上に起こらなかったと思われるが、日本で解析を行ったところ、コロニー出現率によるプラスミド生存率にも宇宙と地上で差は認められなかった。また、突然変異誘発率も差は出なかったので(図6)、ホットスポットの検出までは至らなかった。

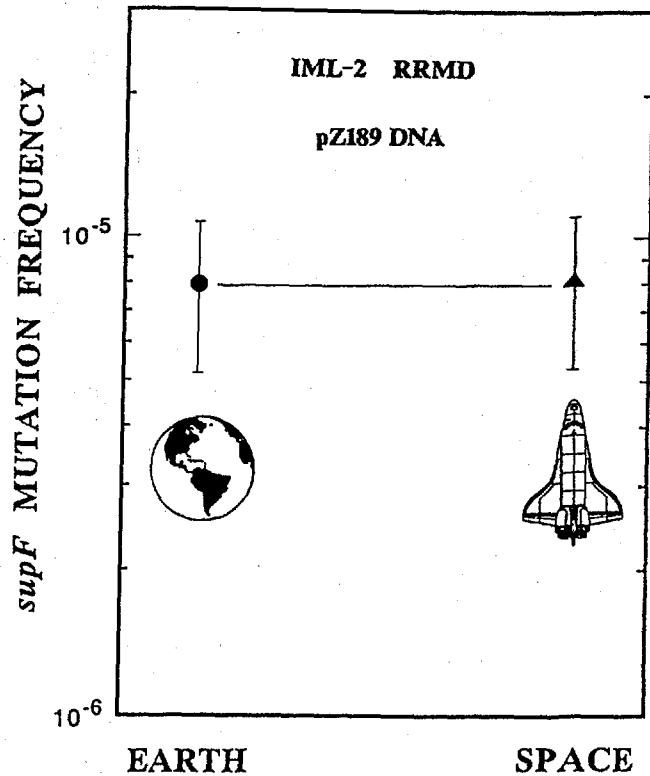


図6 宇宙と地上の放射線モニター装置内でのシャトルベクタープラスミド pZ189 DNA の突然変異誘発率の比較

### 結論

今回の宇宙飛行期間に関して、今まで解析した範囲内では、宇宙放射線の生物影響は検出できなかった。しかし、この事が、宇宙放射線の生物影響がなかった事にはならず、未解析の遺伝子の中に影響を受けたものが存在するかもしれないが、それは、今後の宇宙実験の課題である。

## 参考文献

- 1) 長岡俊治, 道家忠義, 林 孝義, 小倉紘一, 山田博章, 高橋 旦, 谷田貝文夫, 石川雅紀, 隆島史夫, 田ノ岡宏, 大西武雄, 原田和樹. 宇宙放射線の生物影響の検討と宇宙飛行士の放射線防御対策の開発 L-11. 宇宙開発事業団技術報告, ふわっと '92 宇宙実験成果報告. 1, 361-388 (1994).
- 2) 原田和樹, 木村理花, 中野立央, 大西武雄, 長岡俊治. 第一次材料実験(SL-J / FMPT)での宇宙放射線による大腸菌 DNA 修復能欠損突然変異株の致死と突然変異. 第10回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1993). 18-21.
- 3) Obiyo, Y. and Harada, K. Preparation of *Escherichia coli* cells for Space Shuttle experiment "IML-2 project". *PL G. W. J. C. Bull.* 21, 1-7 (1994).
- 4) Nakano, T., Okaichi, K., Harada, K., Matsumoto, H., Kimura, R., Yamamoto, K., Akasaka, S. and Ohnishi, T. Mutations of a shuttle vector plasmid, pZ189, in *Escherichia coli* induced by boron neutron captured beam (BNCB) containing  $\alpha$ -particles. *Mutation Res., DNA Repair.* 336, 153-159 (1995).

## 外部発表

- 1) 原田和樹, 木村理花, 中野立央, 渡辺 宏, 長岡俊治. 宇宙実験における粒子線生物影響測定材料としての *Deinococcus radiodurans*. 日本放射線影響学会第36回大会講演要旨集(1993). 303.
- 2) 原田和樹, 木村理花, 中野立央, 帯屋有里乃, 渡辺 宏, 長岡俊治. スペースシャトル宇宙実験「IML-2」で使用予定の *Deinococcus radiodurans* 乾燥細胞における重イオンビームの影響. 日本農芸化学会誌. 68, 272 (1994).
- 3) 原田和樹, 小林泰彦, 渡辺 宏, 中野立央, 帯屋有里乃, 原田香子, 大西武雄, 長岡俊治. 第2次国際微小重力実験室計画(IML-2)で宇宙放射線モニタリング装置に搭載する生物試料調製法. 日本放射線影響学会第37回大会講演要旨集(1994). 352.
- 4) 原田和樹, 中野立央, 帯屋有里乃, 原田香子, 小林泰彦, 渡辺 宏, 今村正浩, 大西武雄, 長岡俊治. IML-2でRRMDに搭載した原核細胞 *Deinococcus radiodurans* の地上部予備実験結果. 宇宙生物学. 8, 202-203 (1994).
- 5) 帯屋有里乃, 中野立央, 原田和樹, 大西武雄, 長岡俊治. スペースシャトル宇宙実験で宇宙放射線の生物影響測定に用いた微生物細胞. 日本防菌防黴学会第22回年次大会要旨集(1995). 35.





## 多元系化合物半導体融液の均一分散・混合化 (MARANGONI)

代表研究者： 平田 彰<sup>\*1</sup>

共同研究者： 今石宣之<sup>\*2</sup>、熊川征司<sup>\*3</sup>、早川泰弘<sup>\*3</sup>、岡野泰則<sup>\*4</sup>、  
大坂敏明<sup>\*1</sup>、橘 正人<sup>\*1</sup>、西澤伸一<sup>\*1</sup>

<sup>\*1</sup> 早稲田大学 理工学部、<sup>\*2</sup> 九州大学 機能物質科学研究所、  
<sup>\*3</sup> 静岡大学 電子工学研究所、<sup>\*4</sup> 静岡大学 工学部

In order to develop a new technique for uniform mixing of the compound semiconductors utilizing Marangoni convection due to the concentration difference on the free interface, and to clarify the real Marangoni convection induced by concentration gradient, to obtain counter molecular diffusivity of molten compound semiconductors, and to compare mixing by Marangoni convection with that by molecular diffusion only, 6 type of samples composed of In-Sb (M-1, D-1) and In-GaSb-Sb (M-2, M-3, M-3', D-2) were melted and cooled rapidly under normal and microgravity. In case of In-Sb system, for space grown samples, M-1 samples was almost sphere, and both M-1 and D-1 were mixed because of long dissolution time. On the other hand, D-1 samples grown on the ground, In concentration increased downward because of gravity segregation. It was confirmed that the crystal with uniform concentration distribution can be obtained under microgravity conditions. In case of In-GaSb-Sb system, for space grown samples, M samples became round although they were not complete sphere. The shape of Sb side was more shrunk compared with that of the In side. The concentration distribution in the crystal was almost uniform. On the other hand, the concentration distribution of D-2 samples grown in space was not uniform and diffusion process was on the way. It was pointed out that the utilization of Marangoni convection due to the concentration difference is very useful for the mixing of multicomponent compound semiconductor.

### 実験の目的・意義

近年の電子産業の発展にともない、デバイス材料用単結晶の高品質化が強く求められている。宇宙の微小重力環境下においては、密度差により生じる重力対流および沈降がほとんど起こらないため、融液から材料を作製する際に密度の異なる成分元素やドーパント元素が不均一に凝固することがなく、高品質な化合物半導体単結晶、あるいは合金等の材料が作製できると期待される。そのためには、融液成分の均一分散化を達成する必要がある。分子拡散のみによって融液を完全に混合するにはかなりの長時間が必要であり、時間や電力、スペース等の限られたスペースシャトル、宇宙基地内では、完全に均一化した高品質な材料の作製は難しい。

本テーマでは、融液自由界面上の濃度差により発生するマランゴニ対流(界面張力差駆動流)を有効活用することにより、密度の異なるいくつかの元素からなる多元系化合物半導体融液の完全混合手法を確立することを目的として、全く重力対流の無い条件下で濃度差により発生する真のマランゴニ対流を明らかにし、化合物半導体融液の相互拡散係数



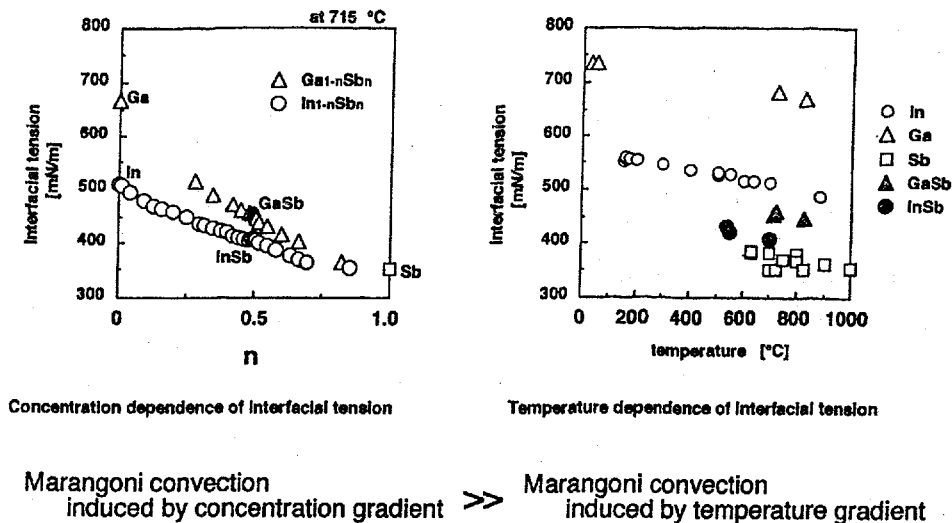


Fig.2 Interfacial Tension (In-Ga-Sb System)

微小重力環境下で凝固した試料は、回収後、各試料における結晶の形状、濃度分布、結晶粒界の大きさ・分布等様々な角度からの評価を行い、地上実験結果、数値解析結果と比較検討することにより、微小重力下での相互拡散係数、分子拡散による混合プロセス、濃度差マランゴニ対流の現象機構を明らかにし、さらに濃度差マランゴニ対流を活用した多元系融液成分の均一分散・混合化手法について提言が可能である。

#### フライト試料作製

マランゴニ対流に関する実験を行う上で、試料表面および試料内部の清浄性が極めて重要となる。例えば、FMPT (First Material Processing Test)における実験においても、化合物半導体単結晶を成長させた際に、自由界面上の酸化膜によりマランゴニ対流が抑制された結果が報告されている。この観点から、マランゴニ対流に関する実験を行う際には、特に試料および雰囲気からの酸素除去が重要となる。そのため、試料表面上の酸化物をエッチング等により化学的に除去する手法が用いられる。しかし、試料表面上の酸化物除去のみでは不十分である。例えば、地上において試料内部に酸素が含有される場合、試料熔融時に融液内部で生成された酸化物は、その密度が純粋融液よりも概して小さいため、融液内部を浮上し、やがては自由界面上に滞積し、界面汚染現象の要因となる酸化膜を生成し、マランゴニ対流を抑制する。そのため、試料前処理として、試料内部および表面上の酸素を充分に取り除く必要がある。本実験においては、バルク試料をカーボンるつぼを用いて長時間還元雰囲気下で熔融し、バルク中の酸素を除去した後、真空あるいは不活性ガス雰囲気下において化学エッチング・超純水エッチング処理を施し、試料表面上に滞積した酸化膜層を除去している。本処理により、今回の試料ではオージェ分光法で測定した結果、各種試料において表面酸化膜層厚みは1~2原子層厚みに抑えられている。

## 分子拡散定数の測定

図3に分子拡散による分散混合プロセスの一例として、地上においてキャピラリー管を使用して行った分子拡散による In-Sb 系での分散混合実験結果を示す。図3は、750°Cで3分間加熱した後の In の濃度分布を EPMA (Electron Probe Microanalysis) により実測した結果である。ここで得られた濃度分布を1次元純拡散モデルの数値解析結果と比較することにより各成分の相互拡散係数を求めた。その結果を表1に示す。

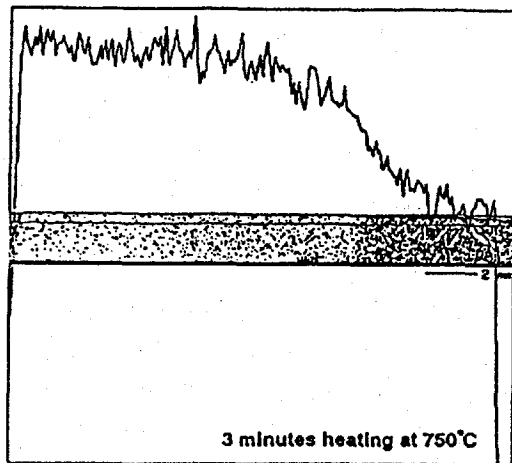


Fig.3 In Concentration in In-Sb System mixed by Molecular Diffusion Only (1-g Experiment)

Table 1 Diffusion Coefficient on the Ground

In-Sb	$1 \sim 3 \times 10^{-4}$	[cm <sup>2</sup> /s]
GaSb-Sb	$2 \sim 5 \times 10^{-5}$	[cm <sup>2</sup> /s]
GaSb-In	$1 \sim 1.7 \times 10^{-4}$	[cm <sup>2</sup> /s]

## 数値シミュレーション

図4に分子拡散のみによる分散混合プロセスに関する数値解析結果として、各組成の濃度分布の時間変化の一例を示す。本数値解析結果より、分子拡散のみにより分散混合プロセスを行う場合、均一分散混合には少なくとも数1000秒という長時間が必要であることがわかる。図5に濃度差マランゴニ対流と分子拡散により分散混合プロセスを行う場合の数値解析結果の一例として In-GaSb 系での速度ベクトルおよび流関数の時間変化を示す。図5において、左は流関数の時間変化を、右は速度ベクトルの時間変化を示している。図5の数値解析においては、試料形状は円柱のまま変形しないものとし、円筒座標系により数値解析を行っている。本系においては、自由界面上の界面張力差(In > GaSb)に基づき、溶融後の初期段階において自由界面上を GaSb から In(図5において、自由界面上を上部から下部)に向かって数10 cm/s という極めて速いマランゴニ対流が誘起され、分散混合プロセスが進んでいく。また、時間経過とともに、自由界面上に濃度分布の反転が起こり、マランゴニ対流もその駆動力が反転し、流れ方向が逆転する(図5において、下部から上部)。この振動過程を繰り返しながら、融液内の均一分散混合化が促進され、濃度の均一化とともにマランゴニ対流の絶対値は減少し、完全に均一混合が達成された後、マランゴニ対流も停止し、均一混合状態が保持される。濃度差マランゴニ対流により分散混合プロセスを

行う場合には、数 10 秒で均一分散混合が達成され、分子拡散のみによる分散混合プロセスと比較して、極めて短時間で効率的に多元系融液の分散混合が行われることがわかった。

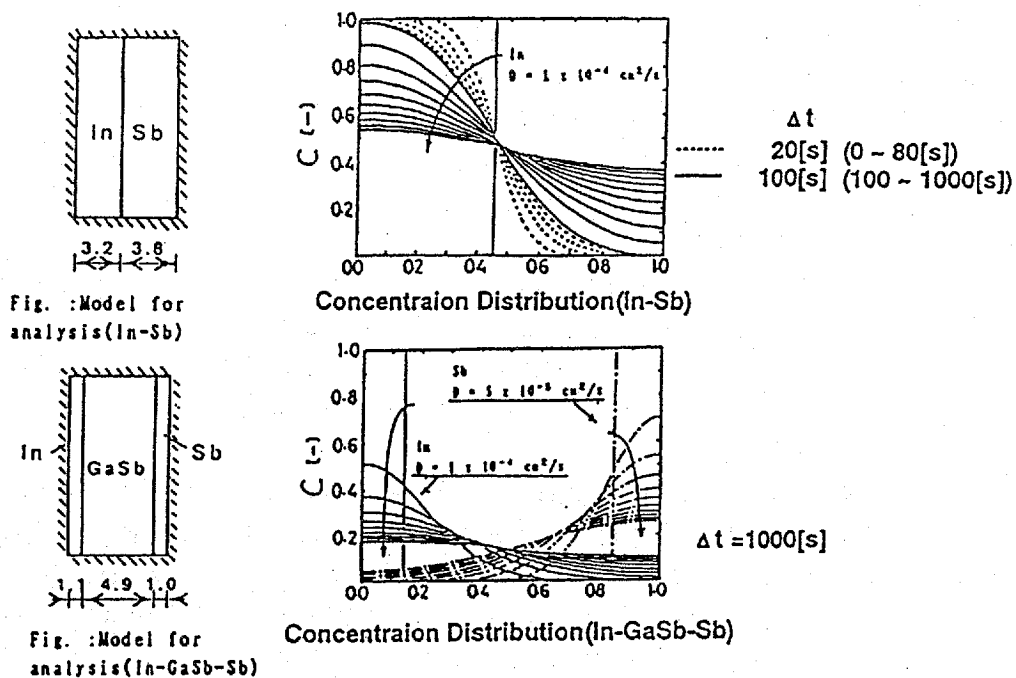


Fig.4 Concentration Distribution ( Numerical Simulation )

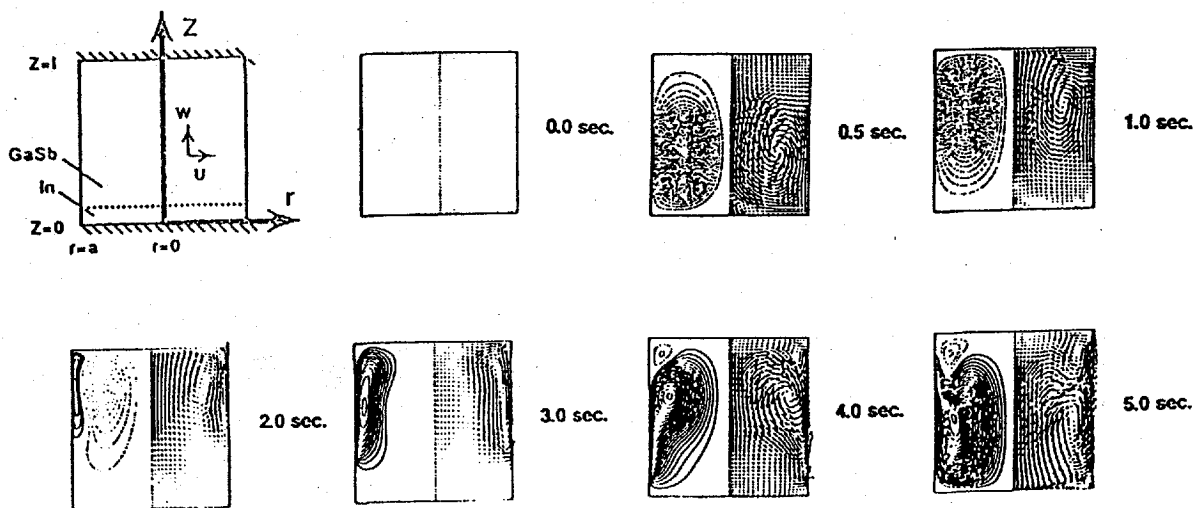


Fig.5 Velocity and Stream Function at Various Time ( Numerical Simulation / Cylindrical Model )

## 飛行実験の結果

### 凝固試料外観形状

図6にフライト時の温度プロファイルを示す。計画した使用部推定温度プロファイルに対して、試料カートリッジ基部では昇温速度も遅く、最高到達温度 731 °C、最高到達温度維持時間 1 分といずれも低く、短かった。これは、アンブル内に封入した He ガスによる対流伝熱効果が予想値より小さかったためと考えられる。

図7に回収されたアンブルを通しての凝固試料の X 線撮影像を示す。回収されたアンブルは Ta カートリッジの切断前後に X 線撮影を行い、カートリッジ切断にともなう凝固試料の破損は無いことを確認した。凝固後の試料形状は、以下の通りである。

- 1) M1 試料：球状に凝固しており、自由界面を有した状態で溶融・凝固プロセスが行われたことが確認された。また、表面上に幾つかの突出物が観察された。これは、凝固過程において、初めに InSb が球外側から凝固し、引き続き内部が凝固するときに固化膨張のため一部分が外殻を突き破って出てきたものと考えられる。
- 2) M2、M3、M3' 試料：M2 試料は初期 In 側(図 7E)で滑らかな半球面を、初期 Sb 側(図 7B)で小さな半球面を形成している。また初期 Sb 側には、融液の突出と思われる突起部が多数存在した。この様に、両端部が半球面を呈しているのは、微小重力下で自由表面を有した状態で凝固が行われたためである。In 単体融液と Sb 単体融液とを比較したとき、In 単体融液の方が界面張力は大きいことから、本来ならば、In 側がより小さい球面状を呈すると予想される。しかし、宇宙での凝固試料の外観は、Sb 側の方がより小さい球面状を呈している。これは、以下のように考えられる。In が溶解したのち、

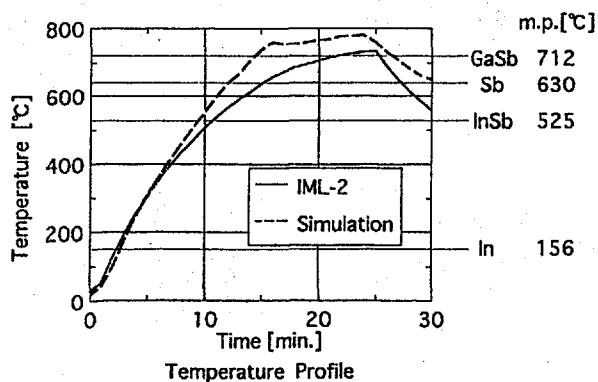


Fig.6 Temperature Profile of IML-2 Flight Experiment



Fig.7 X-ray Photograph of Flight Sample

In 溶媒中へ GaSb の融解が起こる。そのため、In 融液部分は、GaSb 上に極めて良く濡れていく状況を呈する。一方、Sb は融点が高く、融解後の溶融時間が短かったこと、また Sb 溶媒に対する GaSb の溶解度が小さいため、小さな球面になったものと考えられる。また、凝固後の外観形状からは、初期 GaSb 原料は融解せずに残っているように見受けられる。M3、M3' 試料に関しても、同様の結果が見られる。また、M2 と比較して M3 及び M3' が球形に近いことは、後者の初期 GaSb 量が少なく、相対的に In、Sb 融液へ溶解した GaSb の割合が多かったためと考えられる。

- 3) D1、D2 試料：D1 試料は、BN りつぼの外側まで、凝固試料がはみ出していた。これは、以下のように考えられる。まず、In、Sb が溶融、液化膨張を呈する。溶融混合時に InSb 融液が形成される際、InSb 融液の密度は、In、Sb 各々の単体融液の密度より小さいので、溶融混合により、さらに体積は増加する。引き続き凝固過程に移行した際、InSb は固化膨張を呈するため、さらに体積は増加する。これらの過程を考慮すると、最終凝固体積は、初期試料体積に対して約 1.2 倍となり、微小重力下で凝固した試料のはみ出し体積とほぼ一致した。このことから、D1 試料に関しては、溶融凝固時に自由表面は生じなかったものと考えられる。D2 試料は円柱状の BN りつぼ、さらにカーボンパネを利用した BN 円盤状のふたを使用して、自由表面の無い条件下で溶融凝固を行った。実験終了後、回収試料を BN りつぼから取り出す際には、極端に大きな力は必要ではなかった。このことは、溶融試料と BN りつぼとの濡れ性が、良くなかったことを示している。

#### 凝固試料濃度分布

##### 1) 2 元系

図 8 に凝固試料の切断面の研磨後の光学顕微鏡写真を示す。また図 9 に研磨面の濃度分布に関して、EDS による測定結果を示す。ここで EDS においては  $1.2 \times 1.5 \text{ mm}^2$  の領域の平均組成を測定した。微小重力下で凝固した試料は、マランゴニ対流の有無に関わらず(自由界面の有無に関わらず)どちらの試料も、ほぼ均一な濃度分布となっていることが分かる。これは、In の融点が  $156^\circ\text{C}$  であり、実験の最高到達温度と比較して非常に低く、In 溶融後に、In 溶媒中に Sb が溶解し、結果的に総合溶融時間が長かったためと考えられる。一方、地上で凝固した試料は、D1 試料は凝固試料の上部では Sb の組成比が高く、下部では In の組成比が高くなっている。これは、溶融前の初期状態を反映していると考えられる。地上実験においは、重力効果による混合を抑えるため、比重の大きい In 元素を下部に、比重の小さい Sb 元素を上部となるように配置し、溶融凝固実験を行った。その結果、重力偏析の影響により、比重の大きい In は下部に残り、比重の小さい Sb は上部に残ったものと考えられる。M1 試料は、D1 試料と比較して均一に混合しているが、試料上部に観察された突起物部分で Sb の組成比が高くなっていることがわかる。これは、以下のように考えられる。まず、溶融時に、マランゴニ対流、自然対流、拡散により、混合プロセスが進行する。次に試料外側から凝固が進行する。その時、内部では In の組成比が大きい領域から凝固が進行していく。最後に残された Sb の組成比が大きい領域は、凝固時の固化膨張を緩和することができず、凝固に伴い、るつぼ壁面の影響のない試料上部に向かって突出する。



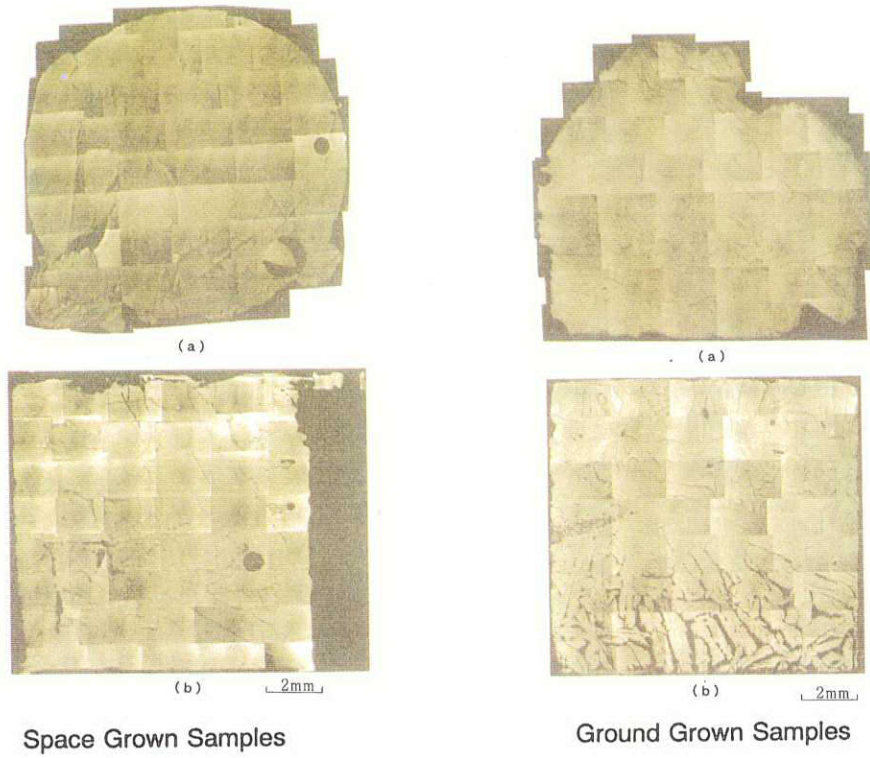


Fig.8 Morphologies of the Samples  
 a: M-1      b: D-1

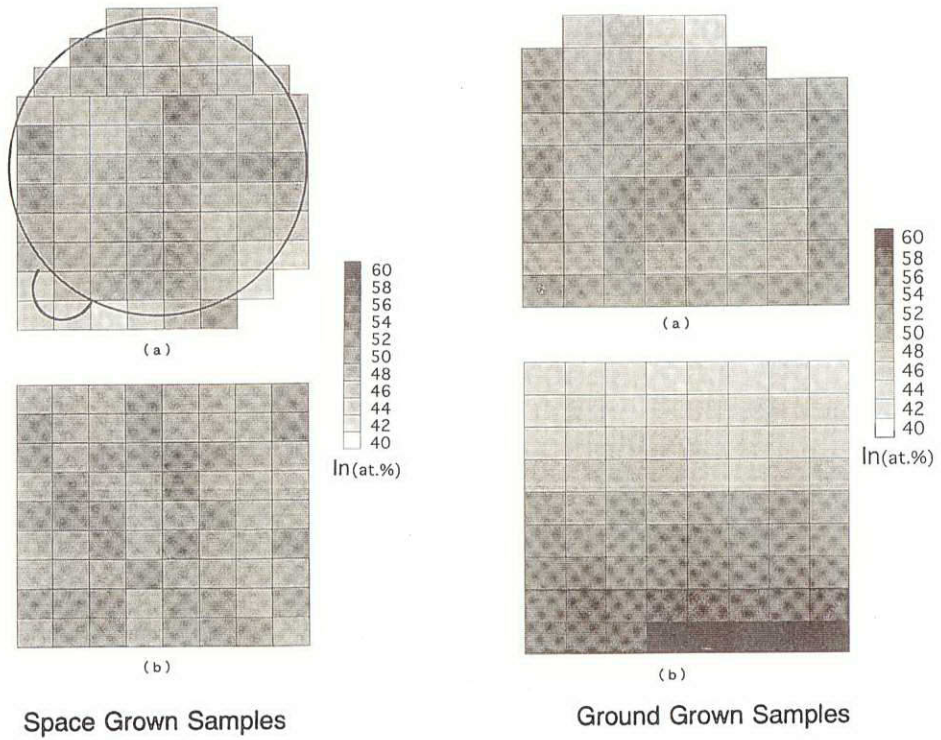


Fig.9 Concentration Distribution  
 a: M-1      b: D-1

2) 3元系

図10にD2試料の外観の濃度分布をEDSにより測定した結果を示す。EDS測定は、前述と同様である。図10より、Inの組成比は、初期In側から12mmの領域では平均52at%と高く、初期Sb側6mmでは約30at%と低かった。一方、Sbの組成比は逆に、初期Sb側6mmでは平均63at%と高く、初期In側では10at%と非常に低かった。Gaの組成比に関しては、両端で少ない分布となっていた。溶融前の試料組成、In = 15 at%、Ga = 35 at%、Sb = 50 at%と比較すると、凝固試料の外観部においては、Inの組成比が非常に高く、逆にGaの組成比が非常に少ない。これは以下のように考えられる。まず、156°CでInが融解する。その際、In単体は液化膨張を呈する。試料は横からカーボンバネで押さえられているため、膨張したIn融液は、BNるつぼとGaSb、Sb原料との隙間を浸透していったと思われる。同様に、Sbが融解する過程においても、液化膨張したSb融液がBNるつぼとGaSb材料との隙間を浸透していったと考えられる。試料外観部において、Sbの組成比が高い領域が6mmであり、初期Sb厚さ2.76mmと比較して大きいのはこのためと考えられる。図11にD2試料中心軸上における濃度分布を示す。初期In側から16mmの広い領域において、Ga組成比の高い針状結晶がIn組成比の高い母材結晶中に散在していた。また、初期Sb側2mmの領域でもIn成分は検出されている。この領域では、Sb単体、GaSb、及びInSbが共存する混合相の様子を呈していた。図11より、In元素がSb側方向に拡散していることがわかる。一方、Sb元素もIn側方向に拡散しているが、Sbの融点が高く、融液となっていた時間がInに比べ短かったため、結果的に拡散長も短かったことがわかる。M2試料に関しては、凝固後のIn成分は、中央部のGaSb部分、さらに初期Sb側にも分布しており、マランゴニ対流の効果により分散混合過程が進んでいたことがわかった。なお、引き続き解析中である。

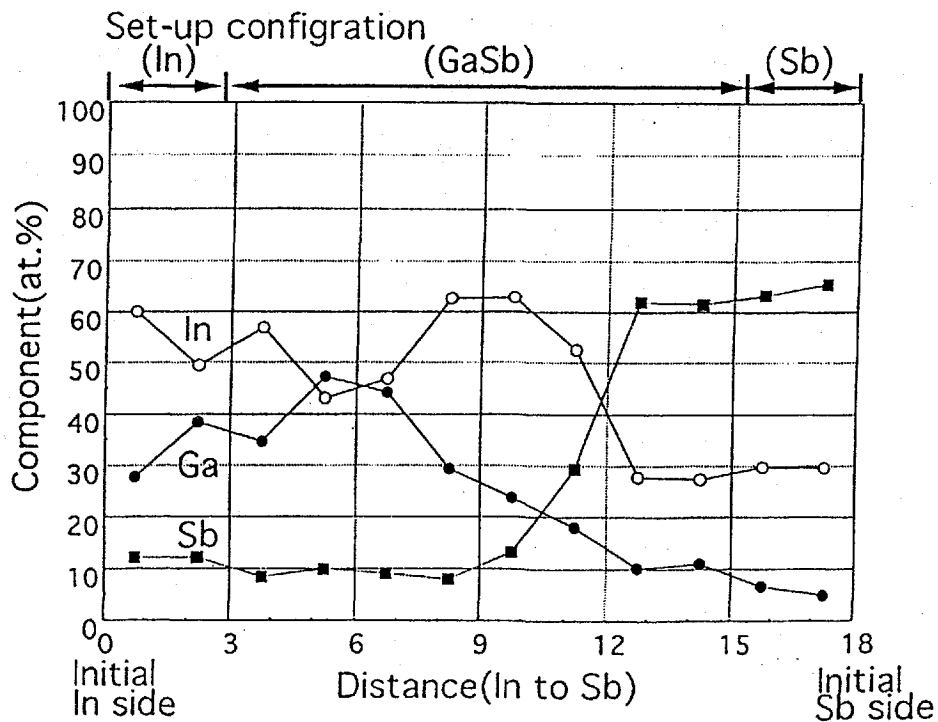


Fig.10 Concentraion Distribution at the Surface of D-2 Space Grown Sample

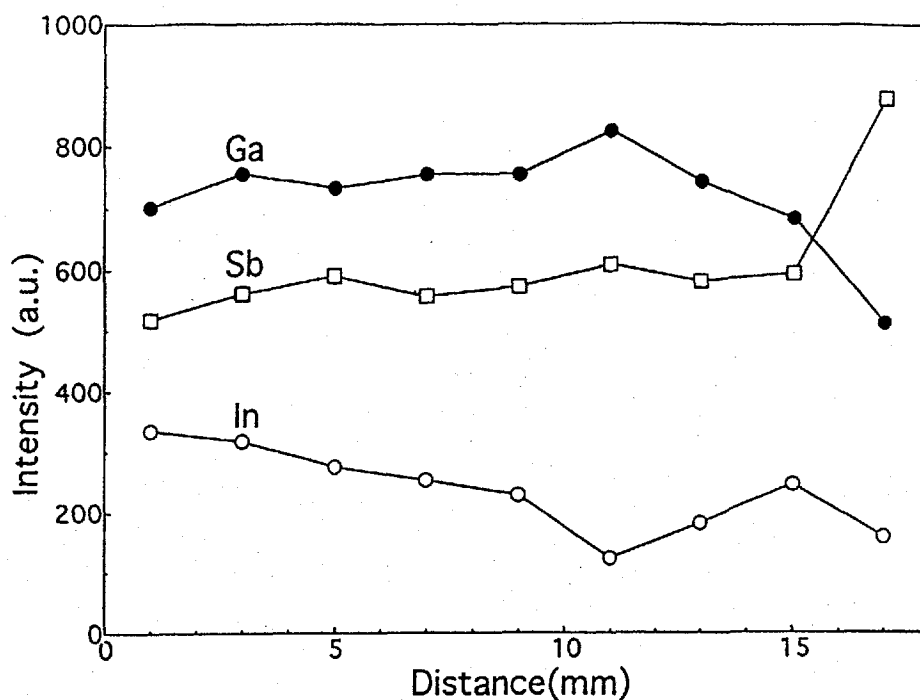


Fig.11 Concentraion Distribution at the Center in the Cut Surface of D-2 Space Grown Sample

## 結論

微小重力環境下において In-Sb 及び In-GaSb-Sb 試料を用いて、自由界面を有しマランゴニ対流及び分子拡散、及び自由界面が存在せず分子拡散のみにより分散混合プロセスが進行する条件下において、溶融凝固実験を行った。その結果、2元系試料(InSb系)においては、M 試料、D 試料ともに凝固後の濃度分布は比較的均一であり、これは低融点の In の溶融と同時に Sb の溶解が始まり、重力による偏析が無い状態で長く保持されたため、固液反応が十分に進行した結果であると考えられる。一方、地上で凝固した試料においては、重力偏析等の影響により濃度の分布が存在した。この結果から、微小重力下において比重の異なる成分の均一化が可能であることが検証できた。また、3元系試料(In-Ga-Sb系)においては、M 試料の中心軸上では、In、Ga、Sb ともにほぼ均一に混合していた。一方、D 試料においては、中央部の GaSb を挟んで、分子拡散により In、Sb が相互に拡散していたが、その混合速度は極めて遅かった。これらの結果から、濃度差マランゴニ対流を活用した場合は、分子拡散のみの場合に比べ混合プロセスが著しく進行し、微小重力下では濃度差マランゴニ対流を活用した均一分散・混合化が極めて有効であることが示された。

## 外部発表

### 論文、Proceeding

- 1) 興津和彦, 早川泰弘, 山口十六夫, 熊川征司, 平田 彰, 大坂敏明, 橘 正人, 今石宣之, 岡野泰則. 数値解析による微小重力下 InGaSb 混晶成長過程. 第9回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1992). 68-70.
- 2) 平田 彰, 大坂敏明, 橘 正人, 西澤伸一, 今石宣之, 熊川征司, 早川泰弘, 岡野泰則. 多元系化合物半導体融液の均一分散混合に関する基礎的研究. 第9回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1992). 71-74.
- 3) 早川泰弘, 興津和彦, 山口十六夫, 熊川征司, 平田 彰, 橘 正人, 今石宣之. In-Ga-Sb 融液の均一分散混合の地上実験(1). 第10回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1993). 159-162.
- 4) Okitsu, K., Hayakawa, Y., Yamaguchi, T., Kumagawa, M., Hirata, A., Tachibana, M. and Imaishi, N. Preliminary Experiment on the Earth for InGaSb Growth under Microgravity and Numerical Analysis of Nucleus Generation. *The 3rd IUMRS International Conference on Advanced Materials, Tokyo (1993)*.
- 5) 興津和彦, 早川泰弘, 山口十六夫, 熊川征司, 岡野泰則, 酒井 奨, 平田 彰, 西澤伸一, 藤原省悟, 今石宣之, 依田真一, 大井田俊彦. 微小重力下における In-Sb の分散混合実験. 第12回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1995). 239-242.
- 6) 興津和彦, 早川泰弘, 山口十六夫, 熊川征司, 岡野泰則, 酒井 奨, 平田 彰, 西澤伸一, 藤原省悟, 今石宣之, 依田真一, 大井田俊彦. 微小重力下における In-GaSb-Sb の分散混合実験. 第12回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1995). 243-246.

### 研究会及び学術講演発表

- 1) 安廣祥一, 今石宣之, 平田 彰. 濃度差マランゴニ対流による混合促進. 化学工学会熊本大会(1994).
- 2) 興津和彦, 早川泰弘, 山口十六夫, 熊川征司, 平田 彰, 大坂敏明, 橘 正人, 今石宣之, 岡野泰則. 微小重力下での InGaSb 結晶成長の数値解析. 第23回結晶成長国内会議, NCCG-23 (1992). 28aB7.
- 3) Hirata, A., Imaishi, N., Kumagawa, M., Hayakawa, Y., Osaka, T., Okano, Y., Tachibana, M. and Nishizawa, S. Mixing of Melt of Multicomponent Compound Semiconductor. *15th Space Station Utilization Workshop, Materials Science Subgroup Meeting (1992)*.
- 4) 興津和彦, 早川泰弘, 平田 彰, 今石宣之, 大坂敏明, 宗田孝之, 橘 正人, 西澤伸一, 岡野泰則, 山口十六夫, 熊川征司. 多元系化合物半導体融液の均一分散混合の地上実験(I). 第40回応用物理学関係連合講演会(1993). 1aZD3.
- 5) 平田 彰, 大坂敏明, 宗田孝之, 橘 正人, 西澤伸一, 今石宣之, 熊川征司, 早川泰弘, 岡野泰則. 多元系化合物半導体融液の均一分散混合に関する地上予備実験. 第10回宇宙利用シンポジウム, 東京, (1993).
- 6) 興津和彦, 早川泰弘, 平田 彰, 今石宣之, 橘 正人, 山口十六夫, 熊川征司. 多元系化合物半導体融液の均一分散混合の地上実験(II). 第54回応用物理学学会学術講演会(1993). 28aZQ7.
- 7) 興津和彦, 早川泰弘, 平田 彰, 今石宣之, 橘 正人, 山口十六夫, 熊川征司.

- In-Ga-Sb 溶液中の結晶核発生の数値解析. 第 54 回応用物理学会学術講演会 (1993). 28aZQ8.
- 8) 興津和彦, 早川泰弘, 平田 彰, 今石宣之, 橘 正人, 山口十六夫, 熊川征司. 多元系化合物半導体融液の均一分散混合の地上実験(III)-凝固過程の影響-. 第 41 回応用物理学関係連合講演会 (1994). 28pZ15.
  - 9) 興津和彦, 早川泰弘, 平田 彰, 今石宣之, 橘 正人, 岡野泰則, 山口十六夫, 熊川征司. In-Ga-Sb 融液の均一分散混合の地上実験. 第 25 回結晶成長国内会議, NCCG-25(1994). 20aA7.
  - 10) 興津和彦, 早川泰弘, 平田 彰, 今石宣之, 岡野泰則, 山口十六夫, 熊川征司. In-Ga-Sb 融液中の針状結晶の形状と成長. 第 55 回応用物理学会学術講演会 (1994). 20pME11.
  - 11) 興津和彦, 早川泰弘, 岡野泰則, 山口十六夫, 熊川征司, 平田 彰, 橘 正人, 今石宣之. In-Ga-Sb 融液の均一分散混合の地上実験. 化学工学会第 27 回秋季大会 (1994). V201.
  - 12) 平田 彰, 西澤伸一, 熊川征司, 早川泰弘, 岡野泰則, 今石宣之, 依田真一, 大井田俊彦. 多元系化合物半導体融液の均一分散混合化. 第 72 期日本機械学会通常総会 (1995).
  - 13) 平田 彰, 西澤伸一, 熊川征司, 早川泰弘, 岡野泰則, 今石宣之, 依田真一, 大井田俊彦. マランゴニ対流による InGaSb 融液の均一分散混合. 第 11 回宇宙ステーション講演会 (1995).
  - 14) 酒井 奨, 岡野泰則, 興津和彦, 早川泰弘, 山口十六夫, 熊川征司, 平田 彰, 西澤伸一, 藤原省悟, 今石宣之, 依田真一, 大井田俊彦. 微小重力環境下(IML-2)における融液混合実験(I). 第 56 回応用物理学会学術講演会 (1995).
  - 15) 興津和彦, 早川泰弘, 山口十六夫, 酒井 奨, 岡野泰則, 平田 彰, 西澤伸一, 藤原省悟, 今石宣之, 依田真一, 大井田俊彦, 熊川征司. 微小重力環境下(IML-2)における融液混合実験(II). 第 56 回応用物理学会学術講演会 (1995).
  - 16) 興津和彦, 早川泰弘, 山口十六夫, 酒井 奨, 岡野泰則, 平田 彰, 西澤伸一, 藤原省悟, 今石宣之, 依田真一, 大井田俊彦, 熊川征司. 微小重力環境下(IML-2)における融液混合実験(III). 第 56 回応用物理学会学術講演会 (1995).

# 微小重力下における TiAl 系金属間化合物の組織制御とその機械的性質 (INTERMETALLICS)

代表研究者： 佐藤 彰\*<sup>1</sup>

共同研究者： 竹山雅夫\*<sup>2</sup>

\*1 金属材料技術研究所 組織制御研究部、\*2 東京工業大学 工学部

Microstructure evolution of the alloys based on TiAl with and without TiB<sub>2</sub> particles solidified under microgravity have been investigated. The binary alloy exhibits a columnar grain structure from the outer surface to the center of the specimen, whereas the alloy with TiB<sub>2</sub> particles shows a large equiaxed grain structure. The cavities caused by solidification shrinkage are enclosed in the middle of the specimen solidified under microgravity. The TiB<sub>2</sub> particles are uniformly distributed in the alloy solidified under microgravity whereas they are segregated at the bottom of the specimen under normal gravity. These particles act as nucleation sites of not only the primary phase for liquid/solid phase transformation but also the solid phase precipitation for solid/solid phase transformation. However, the roll of the particles in the nucleation site is sensitive to the size and distribution morphology. These results lead to the conclusion that the microgravity environment is effective in producing uniform microstructure both macroscopically and microscopically.

## 実験目的・意義

TiAl 金属間化合物は軽量・高比強度な耐熱構造用材料としてその航空機用エンジンや自動車用ターボチャージャーなど厳しい環境下で使用される飛翔体や回転体部品への実用化が期待されている。しかし、この化合物をベースにした材料の機械的性質は組織に強く依存するため、目的に応じた材料特性を発現させるためには組織をいかに制御するかが重要となる<sup>1)~3)</sup>。ここで、化学量論組成近傍の Ti-Al 2 元系状態図を図 1 に示す。TiAl 化合物 ( $\gamma$  相) は、Ti-50at.%Al よりも Al 濃度が多い側にその単相領域を有し、その結晶構造は、図 2a に示すように、Al 原子面と Ti 原子面が交互に積み重なった規則的な面心正方晶 (L1<sub>0</sub> 型構造、軸比  $c/a = 1.02$ ) である。一方、Al 濃度が化学量論組成よりも低い場合には、1400 K 以上の温度では hcp 構造を有する不規則な  $\alpha$ -Ti 相と平衡し、それ以下の温度では、図 2b に示すように、 $\alpha$  相が規則化した DO<sub>19</sub> 型構造の Ti<sub>3</sub>Al ( $\alpha_2$  相) と平衡する。これまでの研究では  $\gamma$  単相合金よりも  $\alpha_2$  相を若干含む組成の合金で比較的優れた強度特性を示すことが明らかとなっている。

TiAl 化合物基合金を高温において高強度化する方法には、従来の Ni 基超合金などに用いられている手法と同様、一方向凝固あるいは単結晶化がある。この場合には液相/固相変態を利用してその結晶方位および組織を制御する。化学量論組成よりわずかに Ti-rich 側の組成をもつ合金 (例えば Ti-48at.%Al) を溶製するとその凝固経路は図 1 の波線で示すように冷却中に  $\beta \rightarrow \alpha$  変態および  $\alpha \rightarrow \gamma$  変態が生じる。すなわち、まず bcc 構造をもつ  $\beta$ -Ti 相が液相から晶出し、包晶反応によって  $\alpha$  単相となり、その後冷却中に  $\gamma$  相が析出して  $\alpha + \gamma$  2 相となるが、さらに温度が下がると  $\alpha$  相の規則化が生じて最終的には  $\alpha_2 + \gamma$  2 相組織と

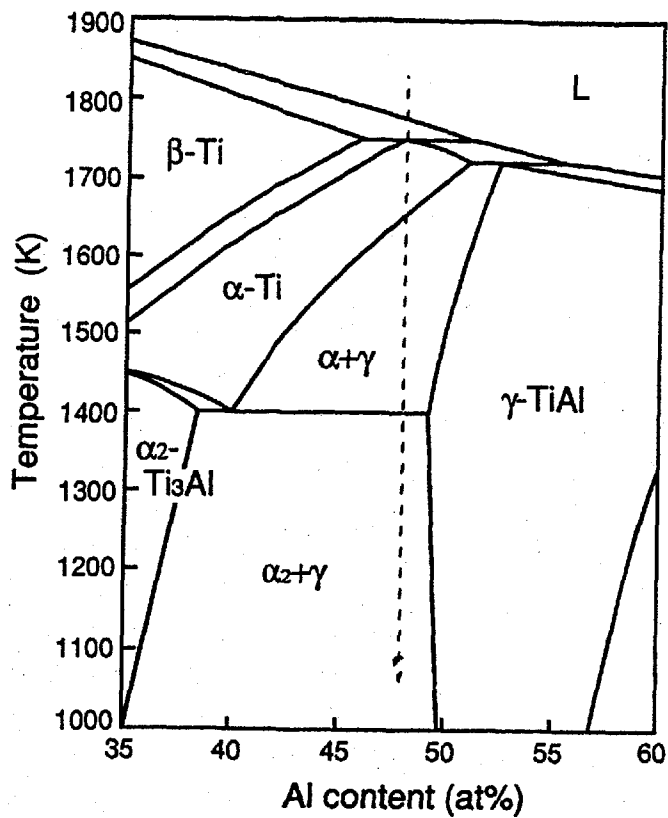
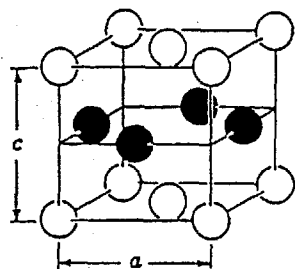


図1 化学量論組成近傍のTi-Al 2元系状態図  
(波線は本研究で用いた合金の凝固経路を示す)

(a) L1<sub>0</sub>



(b) D0<sub>19</sub>

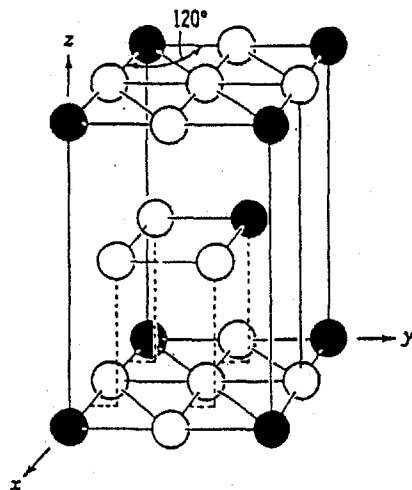


図2  $\gamma$ -TiAl (a)および  $\alpha_2$ -Ti<sub>3</sub>Al (b)化合物相の結晶構造

なる： $L \rightarrow L + \beta \rightarrow \alpha \rightarrow \alpha + \gamma \rightarrow \alpha_2 + \gamma$ 。このような液相/固相変態や固相/固相変態を利用することが TiAl 化合物基合金の組織制御には非常に重要である<sup>1), 4)</sup>。

TiAl 基合金をさらに高強度化する方法の一つとして異質物粒子を合金中に分散させる粒子分散強化法がある<sup>5)</sup>が、この場合、粒子を均一に分散させることは地上では非常に難しく、特に、溶融・凝固法を用いて一方向凝固させ且つ比重の異なる異質物粒子を材料母相中に均一に分散させることはほとんど不可能に近い。

ところが、無重力環境では、熱対流がほとんど無いこと、また、液相中で比重の異なる物質が分離しにくいことなど、地上とは異なる現象が起きる。したがって、これらの現象を利用して材料を微小重力環境下で溶融・凝固させれば、上述した液相/固相変態および固相/固相変態を通して全く新しい組織が得られ、材料特性の向上に結びつく組織制御技術に発展する可能性がある。

本実験では Ti-rich 側の組成をもつ TiAl 基 2 元合金(密度  $3.8 \text{ g/cm}^3$ )とこれに  $\text{TiB}_2$  セラミック粒子(密度  $4.5 \text{ g/cm}^3$ )を添加した 2 種類の材料を微小重力環境下および 1G 下で溶融・凝固させ、得られる組織を解析して、(1) 結晶粒形態に及ぼす熱対流の影響、(2) 粒子分散形態に及ぼす重力の影響および (3) 微小重力下での凝固及び相変態に及ぼす分散粒子の役割、という 3 つの現象について検討し、微小重力環境が材料の組織制御をするうえでどのような役割を果たし、また、利用できるか否かについて検討することを目的とする。また、合わせて機械的性質も調べ、組織と特性との関係についても検討する。

## 実験の方法と試料

供試材は Ti-48at.%Al およびこれに  $\text{TiB}_2$  粒子を 5 vol.% 添加した 2 種類である。TiAl 2 元系合金は、プラズマアークによって溶製した合金を回転電極法(PREP 法)を用いて合金粉末とし、この粉末を直径 50 mm、長さ 100 mm のステンレス管に充填して、管内を真空排気して密閉した後、 $1200^\circ\text{C}$ 、98 MPa の条件で HIP (Hot Isostatic Press) 処理を行って作製した。この合金粉末の粒径は  $150 \mu\text{m}$  以下である。また、TiAl/ $\text{TiB}_2$  複合材は、同様の手法で作成した TiAl 粉末と粉末粒径約数  $\mu\text{m}$  の  $\text{TiB}_2$  粉末を均一に混合した後、同一の HIP 処理を行って作製した。得られた HIP 材から直径 18 mm、長さ 25 mm の試験片を採取した。なお、試験片表面は機械的研磨により鏡面仕上げをした。

これらの試料の溶融・凝固試験は加圧機構を持った高温加圧型加熱炉(LIF)を用いて行った。ここで、TiAl および TiAl/ $\text{TiB}_2$  試料は、図 3 に示すように、それぞれ 2 個づつを内径 18 mm(外径 25 mm)長さ約 170 mm の一体型中密度カルシア( $\text{CaO}$ )製のつぼに入れ、各試料は  $\text{CaO}$  板で仕切った。このつぼを Ta 製の LIF 用サンプルカートリッジに挿入し、加熱・冷却した。その温度プロファイルは、 $\gamma$ -TiAl 相および  $\text{TiB}_2$  粒子の融点がそれぞれ約  $1480^\circ\text{C}$  および  $3000^\circ\text{C}$  であることを考慮して、図 4 に示すように、 $\gamma$  相のみが溶融し  $\text{TiB}_2$  粒子は溶湯中でも安定に存在する温度域となる  $1530^\circ\text{C}$  まで室温から  $20^\circ\text{C}/\text{min}$  で加熱し、2 分間保持後、 $10^\circ\text{C}/\text{min}$  で  $1430^\circ\text{C}$  まで冷却し、そこで約 10 min 保持後、炉内に He ガスを注入して急冷するように設定した。また、冷却時の凝固収縮を抑制する目的で、試料が半溶融状態( $1470 \sim 1490^\circ\text{C}$ )から完全に凝固する温度域( $1460 \sim 1470^\circ\text{C}$ )まで加圧できるように凝固開始から約 7 分間加圧を行った。なお、宇宙実験の場合は約 30 分間炉と宇宙を繋ぐバルブを開けて炉内を排気し、地上対照実験の場合はサンプルカートリッジを縦位置に装填して真空度  $10^{-4}$  torr レベルで排気した後、加熱・冷却を行った。試料の温度の測定には W-Re 熱電対を用いた。



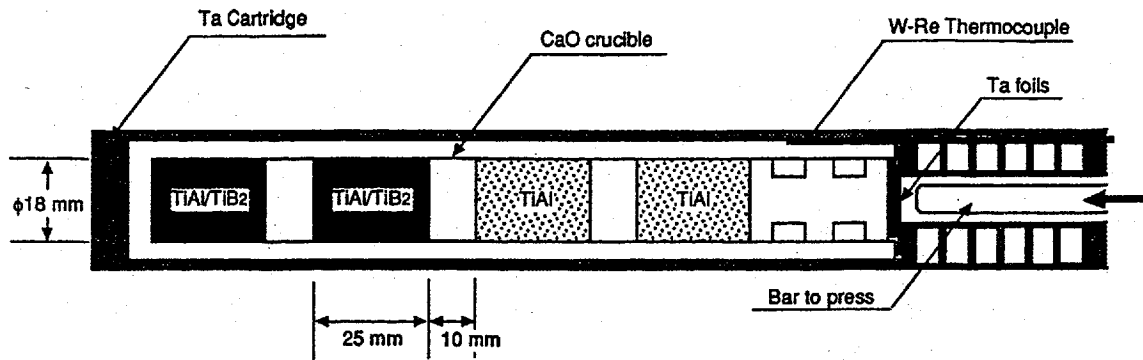


図3 LIFに装填したカートリッジ内の試料の概観

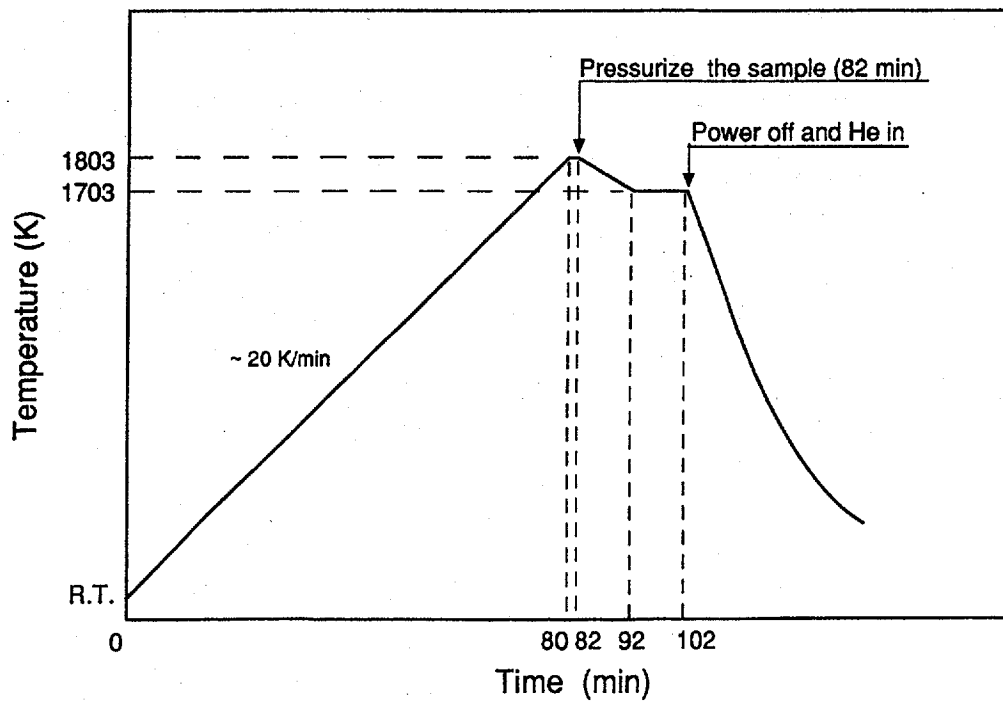


図4 溶融・凝固実験の理想的な温度プロファイル

組織観察は光学顕微鏡を用い、硬さ試験はピッカース硬度計を用いて荷重 10 kgf、保持時間 30 s で行った。

## 実験結果

### 温度プロファイル

微小重力下で溶融・凝固試験して得られた TiAl の融点近傍の温度プロファイルを地上実験で得られた結果とともに図 5 に示す。地上実験では図 4 で想定した通り、約 80 分で 1530 °C に達し、その後 10 °C/min で冷却が行われている。ところが、 $\mu$ G 下の実験では、地上実験に比べて 1530 °C に達するのが約 5 分間速く、その分試料が溶融状態にある時間が長い。

### 組織

#### 1) 供試材および 1G 下での溶融凝固組織

供試合金の試験前及び地上実験後の光学顕微鏡組織を図 6 に示す。Ti-48at.%Al 2 元系合金の As-HIPed 材の組織は、a に示すように粒径約 100  $\mu$ m の  $\gamma$  単相粒とその粒内に細かい  $\alpha_2$  相が分散した混相粒からなる組織を呈する。この粒径はほぼ粉末粒径に等しい。TiB<sub>2</sub> を含む複合材の as-HIPed 材の組織も、b に示すように、ほぼ a と同様であるが、TiB<sub>2</sub> 粒子は主に母相の粒界上、すなわち母合金粉末どうしの界面に存在する。これらの試料を 1G 下で溶融・凝固させると、2 元系合金では結晶粒は大きく成長し、各々の粒内は微細な層状(ラメラ)組織を示す(図 6c)。一方、複合材の母相もラメラ組織を示すが、TiB<sub>2</sub> 粒子はラメラ方位のことなる旧  $\alpha$  粒界およびその粒内ともに認められる。また、TiB<sub>2</sub> 粒子は明らかに試料底部に偏って存在する(図 6d)。

#### 2) $\mu$ G 下で溶融凝固した試料のマクロ組織

図 7 に  $\mu$ G 実験後にるつぼから取り出した試料の外観を示す。図 7a と b に示す TiB<sub>2</sub> 粒子を含む合金および c の TiAl 2 元系合金の形状は、外表面に若干量の空泡は認められるが、溶融前とほとんど変化ない。しかし、最も加圧ピストンに近い位置にある 2 元合金(d) では約半分が損失している。なお、試料表面はいずれの試料も金属光沢を呈していた。

次に、この  $\mu$ G 下で溶融凝固した TiAl および TiAl/TiB<sub>2</sub> 合金(それぞれ図 7c と a に相当)を半分に切断した試料内部のマクロ組織を 1G 下で得られた試料の組織と合わせて図 8 に示す。TiAl 2 元系合金の場合、地上で溶融凝固した試料は上方部(右側)に空洞が存在するのに対し(図 8c)、 $\mu$ G 下で溶融凝固した試料では中心部分に巨大な空泡が認められる(図 8a)。また、いずれの試料もるつぼ壁側から中心部分に向かって柱状粒が形成されている。一方、TiB<sub>2</sub> 粒子を含む合金の場合においても空洞が認められ、1G 下の試料においては 2 元系の場合と同様に上方部(右側)に存在するのに対し(図 8d)、 $\mu$ G 下では比較的小さな空洞が試料内部に点在している(図 8b)。また、この合金の結晶粒形態は重力の有無によらず等軸粒組織となり、明らかに 2 元系の場合に比べて小さい。

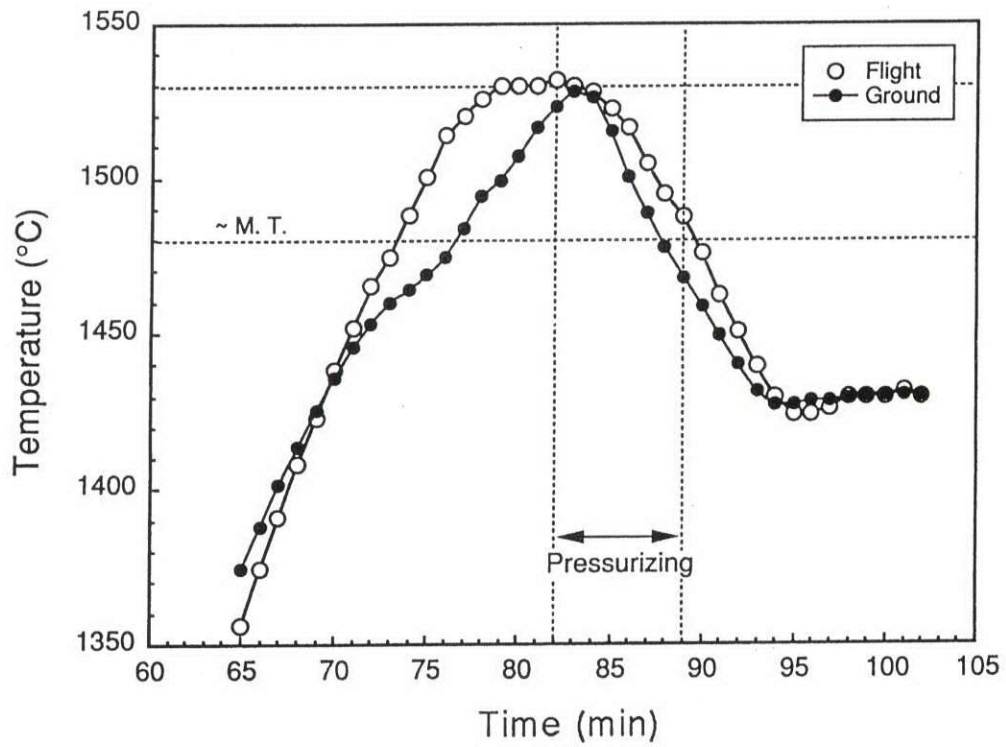


図5 微小重力下および1G下で溶融・凝固したTiAl合金の融点近傍の温度プロファイル

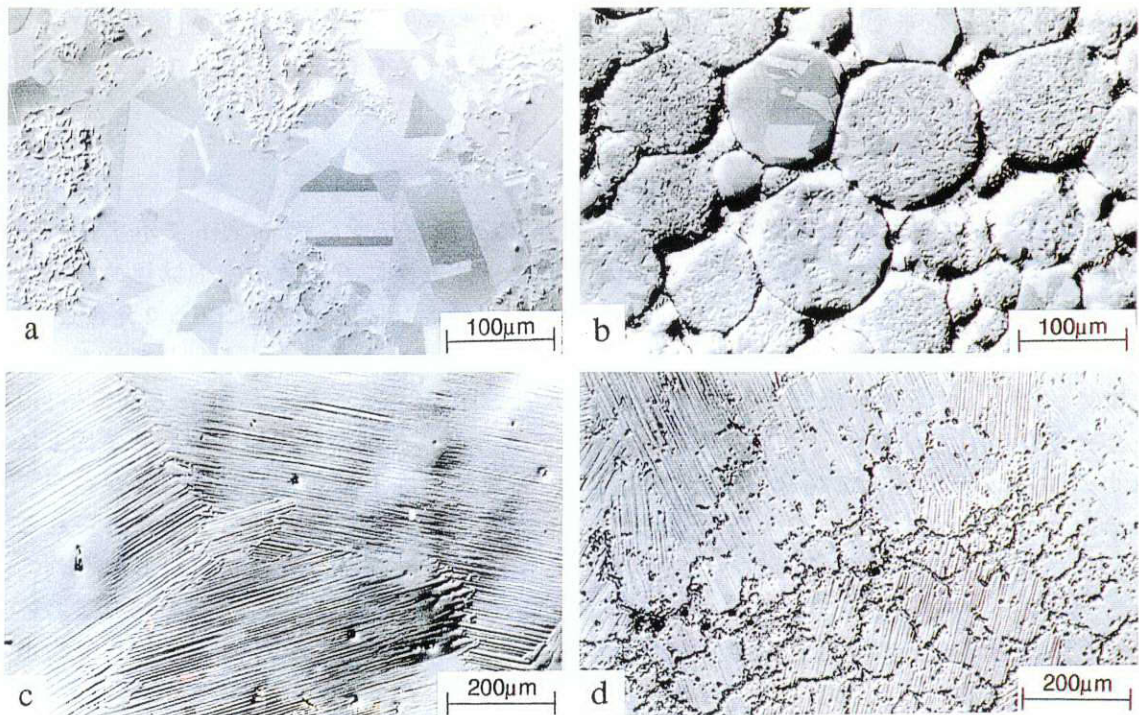


図6 Ti-48at.% Al ((a)、(c)) およびこれにTiB<sub>2</sub>粒子を5vol.%添加した合金 ((b)、(d)) の溶融前 ((a)、(b)) および1G下で溶融後 ((c)、(d)) の光学顕微鏡組織

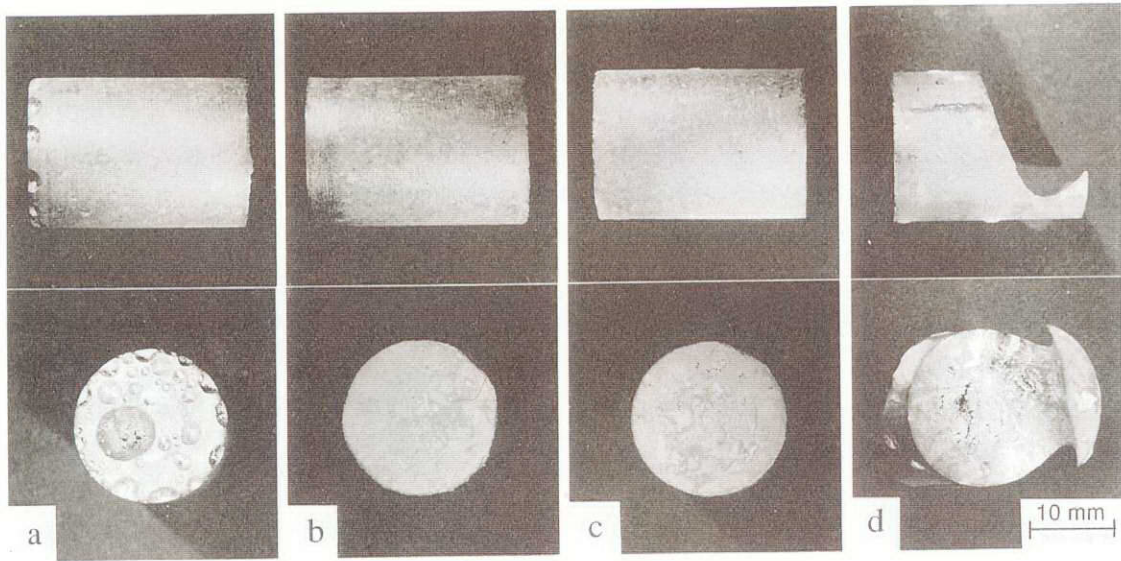


図7 微小重力下で溶融・凝固試験を行ったTi-48at.% Al ((c)、(d)) および TiAl/TiB<sub>2</sub> ((a)、(b)) 合金のマクロ組織

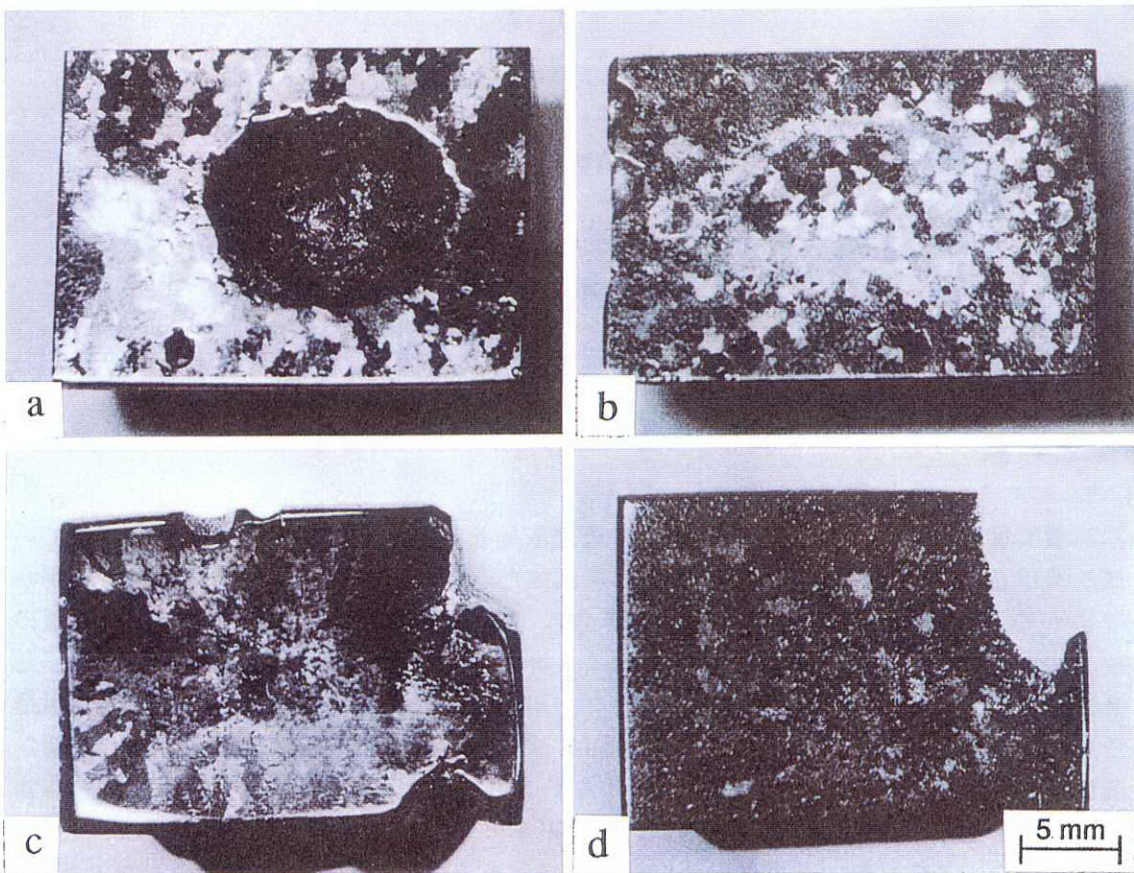


図8 微小重力下 ((a)、(b)) および 1G 下 ((c)、(d)) で溶融・凝固試験したTi-48at.% Al ((a)、(c)) および TiAl/TiB<sub>2</sub> ((b)、(d)) 合金の試料内部のマクロ組織

### 3) $\mu\text{G}$ 下で溶融凝固した試料のマイクロ組織

図9に微小重力下で溶融・凝固した2元系および  $\text{TiB}_2$  粒子を含む合金の試料外部表面近傍の光学顕微鏡写真を示す。2元系合金では大きな柱状粒がらつぼ壁面から試料内部へ向かって成長し、その粒内は層状(ラメラ)組織を示す(図9a)。一方、 $\text{TiB}_2$  粒子を含む合金ではbに示すように柱状粒は認められず、粒径約  $200\ \mu\text{m}$  の等軸ラメラ粒が観察される。また、その粒子の分散形態は、地上実験で観察されたように比重差により偏在する傾向は顕著に認められず、ラメラ粒内にも微細に分布するが、大半は互いに合体して帯状に存在している(図9b)。なお、ラメラの方向は  $\text{TiB}_2$  粒子の帯を境にして必ずしも変化していない。

次に、両合金の粒界近傍の組織を図10に示す。2元系合金では層状組織が互いに交錯したジグザグな粒界が観察される(図10a)。これに対し、 $\text{TiB}_2$  粒子を含む合金では、粒内に存在する  $\text{TiB}_2$  粒子の回りでラメラ方向が変化することはなく、また、粒界を覆うように塊状の粒子が観察される(図10b)。

### 硬さ試験結果

両合金の溶融・凝固後の試料端面近傍(地上実験では試料下方部に相当)の硬さ結果を表1に示す。 $\text{TiAl}$  2元系合金は  $\mu\text{G}$  下および  $1\text{G}$  下ともに硬さに大きな違いは認められない。 $\text{TiAl/TiB}_2$  合金の硬さはいずれの重力下においても2元系合金に比べて大きく増加するが、 $\mu\text{G}$  下での試料に比べて  $1\text{G}$  下での試料の方が明らかに硬い。

表1  $\mu\text{G}$  および  $1\text{G}$  下で溶融・凝固した  $\text{TiAl}$  合金のビッカース硬さ ( $\text{kgf/mm}^2$ )

Gravity	TiAl	TiAl/TiB <sub>2</sub>
$\mu\text{G}$	236	273
$1\text{G}$	230	290

### 解析と考察

本実験では試料を溶融した後、凝固時に凝固収縮を抑制する目的で LIF に装備されている加圧機構を利用して試料を加圧することを試みた。しかし、図7のマクロ組織から明らかのように、ピストンに最も近い試料の半分以上が損失した。また、 $\text{CaO}$  製の押し板の位置は移動していなかったことから、フライト実験では凝固時の試料加圧ができなかったことが判明した。これは、図5に示すように、地上実験に比べ約5分早く目標温度に到達したために溶融状態が長く保持され、その間に試料がらつぼと押し板のわずかな透き間から漏洩して加圧ピストンの正常作動を妨げたためと推察される。試料の漏洩は主に図7dの2元合金で生じたことは明らかであるが、図7cの試料中心部にも大きな空洞が観察されることから、この試料からも試料仕切板の透き間を通じて漏洩したことは明らかである。なお、これらの試料は両方とも2元系合金であるため、両試料の混合によって生じる解析上の問題はない。

ところで、本実験で用いた合金は  $1\text{G}$  および  $\mu\text{G}$  いずれの場合においても溶融後にラメ

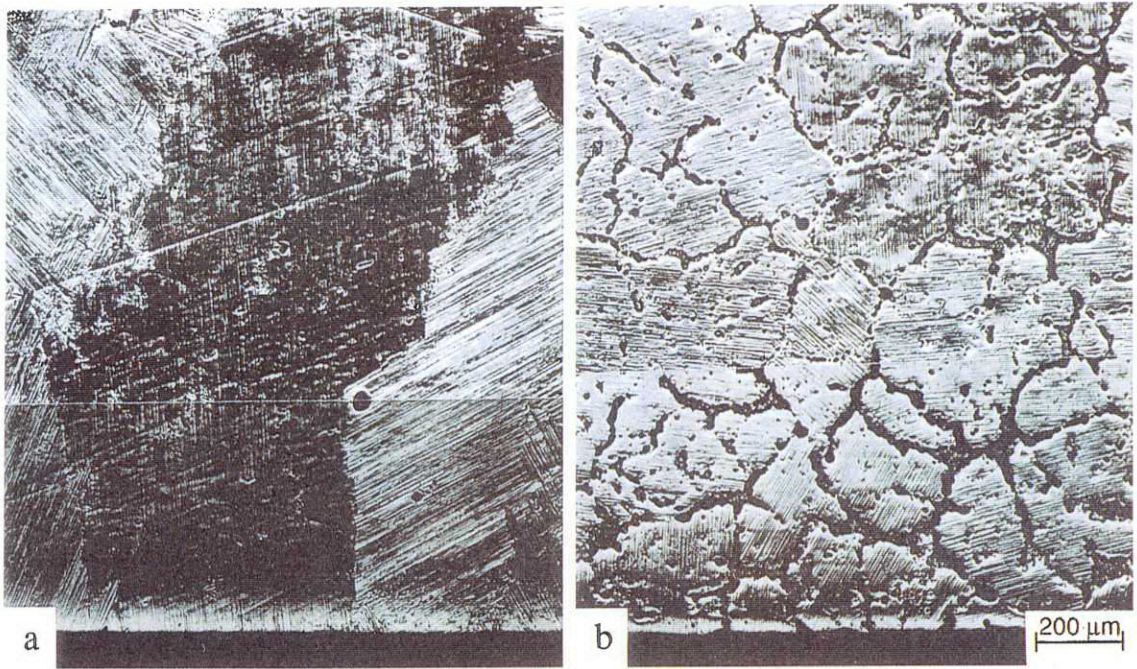


図9 微小重力下で溶融・凝固した Ti-48at.% Al (a) と TiAl/TiB<sub>2</sub> (b) 合金の試料表面近傍の光学顕微鏡組織

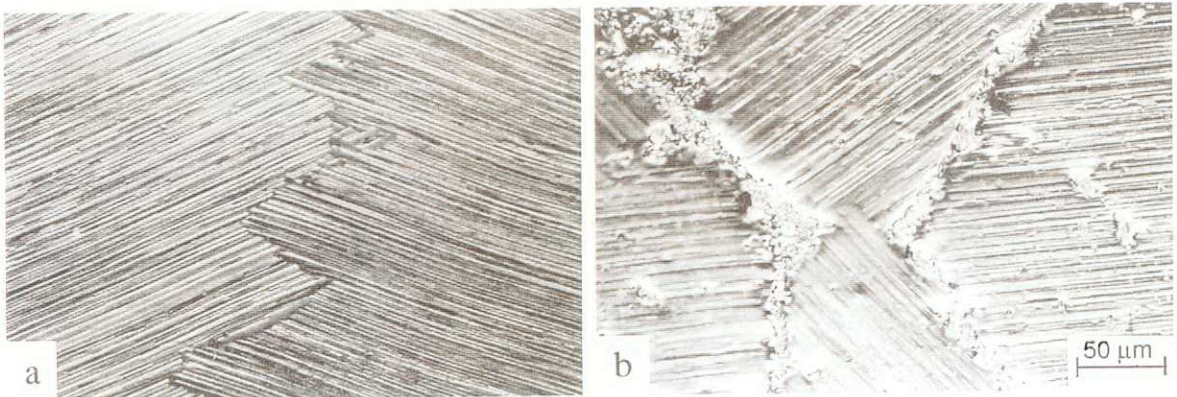


図10 微小重力下で溶融・凝固した Ti-48at.% Al (a) と TiAl/TiB<sub>2</sub> (b) 合金の粒界近傍の光学顕微鏡組織

ラ組織が形成される。これは図1に示すように凝固冷却過程における $\alpha \rightarrow \gamma$ 変態に起因し、その際に両相の最密原子面及び最密原子方向が互いに平行となる特定の結晶方位関係、 $(0001)_\alpha // \{111\}_\gamma$ 、 $\langle 1210 \rangle_\alpha // \langle 110 \rangle_\gamma$ 、が成立し<sup>6), 7)</sup>、 $\gamma$ 相の析出に対する $\alpha$ 相の晶へき面(六方晶の底面)が一つしか存在しないためである。凝固・冷却中にこのような組織を形成する試料について、その組織形成に及ぼす重力の影響を検討する。

### 結晶粒形態に及ぼす熱対流の影響

通常、金属をるつぼ中で熔融し、その後比較的ゆっくり凝固させるとるつぼ表面から固相(初晶)が核生成しデンドライト(樹枝)状に成長する。熱対流によって液相が攪拌される場合にはデンドライト成長先端が遊離して、それが新たな固相の成長核となりうる。一方、微小重力環境下では熱対流による液相の攪拌が低減されるためにデンドライト状に成長した初晶は充分大きく成長でき、1G下で得られた試料に比べてより大きな結晶粒形態を示すことが予想される。しかし、図8から明らかなように、2元系およびTiB<sub>2</sub>粒子を含む合金とも、重力の大小による結晶粒形態に大きな変化は認められず、2元系ではるつぼ壁から試料内部へと大きな柱状粒が成長し、一方、TiAl/TiB<sub>2</sub>合金では等軸粒が試料全面に認められる。このことから、本実験範囲内では凝固組織の形成に対して熱対流の影響はほとんど無いことが明らかである。なお、液相から固相へ変態する際の体積収縮によって形成される空泡位置には明らかに重力の影響が現われ、1G下では試料上方部(図8cの右側)に偏在するのに対し、微小重力環境下では試料のほぼ中心部に取り込まれる。

### 粒子分散形態に及ぼす重力の影響

本実験では粉末冶金法を用いて融点がTiAlの2倍以上のTiB<sub>2</sub>粒子を粒径約150 $\mu$ mのTiAl粉末粒界状に均一に分散した状態を初期組織(図6b)として、これを1Gおよび $\mu$ G下で熔融・凝固させた。その結果、試験前にはラメラ組織を示していない母相TiAlが、試験後はいずれの重力下においてもラメラ組織となることから、TiAlは明らかに熔融し、1G下では比重の大きいTiB<sub>2</sub>粒子が液相中を沈降して試料下方部に偏在することはその部分の硬さが高い値を示すことから明らかである(図6dおよび表1)。一方、微小重力下ではTiB<sub>2</sub>粒子の偏在は認められず、若干粒子どうしが合体して塊状にはなるが、初期組織とほぼ同様に網目状に存在する(図8b)。

### 微小重力下での凝固及び相変態に及ぼす分散粒子の役割

$\mu$ G下で熔融・凝固したTiAl 2元合金とTiAl/TiB<sub>2</sub>粒子分散合金のマクロ組織を比較するとTiB<sub>2</sub>粒子の存在によって明らかに凝固組織は変化し、前者は柱状粒、一方、後者は等軸粒を示す。2元系合金ではるつぼ壁を核として晶出した初晶相が、冷却にともない壁面から内部へと成長するため、一方、TiAl/TiB<sub>2</sub>合金では溶湯中に存在するTiB<sub>2</sub>粒子も核生成サイトとして働くという不均質核生成が生じていることは明らかである。ところが、もし液相中に存在する全てのTiB<sub>2</sub>粒子が凝固の際の初晶の核として働くとするならば、得られる結晶粒は非常に微細になるはずであるが、図6bに示すように、実際の結晶粒径は約1000 $\mu$ mと大きい。ここで、図1に示すように、本合金の初晶はbcc構造を有する $\beta$ -Ti相であり、この $\beta$ 相がhcp構造の $\alpha$ -Ti相に固相変態する。この際に両相は互いの最密面どうしが平衡となる方位関係、 $\{110\}_\beta // (0001)_\alpha$ 、を持ち、 $\alpha$ 相の析出に対する $\beta$ 相の晶へき

面は6種類存在する<sup>1)</sup>。したがって、液相/固相変態によって晶出した $\beta$ 相粒はその後の $\alpha$ 相への変態によって6つのコロニに分割される。さらに温度が低下すると、この $\alpha$ 相内に $\gamma$ 相が析出してラメラ組織が形成されるため、ラメラの方位に着目して組織を詳細に観察すると $\alpha$ コロニの大きさは容易に推定される。図9および図10に示すように、ラメラの方位が変化したところがコロニ粒界であり、このコロニの大きさは図6bのマクロ組織の粒径と比べると明らかに数分の1になっている。このラメラの方位は $TiB_2$ 粒子が網目状に連なって存在するところでは変化するが、 $TiB_2$ 粒子が凝集して単独あるいは分断されているところでは変化していない(図9b)。したがって、 $TiB_2$ 粒子が液相中で互いに凝集・連結して比較的大きな塊状の形態になった場合には、 $L \rightarrow \beta$ 変態における初晶の核生成場として働き、さらに $\beta \rightarrow \alpha$ 変態における $\alpha$ 相の析出場としての役割も果たすと推察される。なお、上述した $TiB_2$ 粒子の効果は1G下で溶融・凝固した場合も同様であるが、前節で述べたように $TiB_2$ 粒子の分散は不均一になるため、一見マクロ的には同様に見える組織もラメラ方位等微細組織まで詳細に調べると、試料下方部ではラメラコロニが多数観察されるのに対して試料の上方部ではそのコロニが大き(図6d)く、明らかに $\mu G$ 下でのものに比べて不均一である。

以上、本実験で最も顕著に現われた組織形成に及ぼす重力の効果は粒子の分散形態に対して最も顕著に現れ、その他マクロ的な組織に対しては微小重力環境であるがゆえの効果は比較的小さい。また、 $TiB_2$ 粒子は液相/固相変態および固相/固相変態の核生成場として効果的であり、その効果は分散形態に強く依存することから、形成される微細組織も地上溶製材に比べて均一になる。以上のことから、微小重力環境は、例えば一方向凝固法により柱状粒を有し且つ粒内に $TiB_2$ 粒子を均一微細に分散させたフルメラ組織を持つような優れた構造用材料を創製する環境であることが示唆される。

## 結論

$TiAl$  2元系合金およびこれに $TiB_2$ 粒子を添加した合金を用いて微小重力環境下で溶融・凝固し、組織形成に及ぼす重力の影響について検討した結果、以下に示す結論を得た：

- 1) 凝固時に形成される組織は重力の有無によらずいずれも2元系合金では柱状粒組織、一方、 $TiB_2$ 粒子を含む合金では等軸粒組織となり、凝固組織の形成に及ぼす熱対流の影響はほとんど認められない。
- 2) 凝固収縮によって形成される空洞は、地上溶製材では試料の上方部に偏在するのに対し、微小重力溶製材では試料中心部に取り込まれる。
- 3)  $TiB_2$ 粒子の分散形態は、地上では不均一になるが、微小重力環境下では均一に存在する。
- 4)  $TiB_2$ 粒子は液相/固相変態および固相/固相変態の核生成場として働くが、その効果は分散形態に強く依存する。

本実験で用いた $TiAl$ 合金粉末は(株)神戸製鋼所、また、フライト試料を溶融するための $CaO$ るつぼは(株)カルシードの協力を得て作製されたものであり、謝意を表します。



## 参考文献

- 1) 竹山雅夫, 菊池 實. *熱処理*. 34, 179 (1994).
- 2) Takeyama, M. *Mater. Sci. Eng.* A152, 269 (1992).
- 3) Kim, Y. W. *JOM*. 41, 24 (1989).
- 4) Takeyama, M., Hirano, T. and Tsujimoto, T. *Proc. Intl. Symp. Intermetallic Compounds*, ed. by O. Izumi, JIM (1991). 507.
- 5) Westwood, A. R. C. *Metall. Trans. A*. 19A, 749 (1988).
- 6) Blackburn, M. J. *Science, Technology and Application of Titanium*, ed. by R. T. Jaffee and N. E. Promisel, Pergamon Press, London (1970). 633.
- 7) 山辺容子, 菊池 實. *日本金属学会会報*. 30, 37 (1991).

# Liquid Phase Sintering in a Microgravity Environment (SINTERING)

Principal Investigator: Randall M. German \*<sup>1</sup>

Co-investigator: Ronald G. Iacocca \*<sup>1</sup>

\*<sup>1</sup> P/M Lab, The Pennsylvania State University

Tungsten-nickel-iron alloys flown aboard the space shuttle *Columbia* were liquid phase sintered under microgravity conditions. These alloys were selected for several reasons. First, a significant amount of work has been published on these materials. Second, the ease of processing and the idealized microstructure eliminates many second phase formation that occurs in more complex systems. Third, these alloys are used in industrial applications such as armor, penetrators, radiation containment, and cladding for corrosive environments. Lastly, the liquid and solid phases in this system has a density difference of almost 9 g/cm<sup>3</sup>. Thus, any gravitational effects will be exaggerated compared to other liquid-phase sintering systems. The composition of the samples ranged from 78 wt.% to 98 wt.% tungsten in 5 wt.% increments, with the remainder being nickel and iron in a 7 to 3 ratio. The samples were sintered for 1, 15, and 120 minutes at a temperature of 1500 °C. In the absence of gravity, microstructural features were created that have never before been seen in tungsten heavy alloys. This paper presents some of the anomalous microstructural features and possible explanations for their formation.

## OBJECTIVES

The goals of this flight experiment have significant impact in several different scientific and engineering areas. In the liquid phase sintering of powdered metal components, when a density difference exists between the solid and liquid phase, several undesirable phenomenon occur. First, the solid phase settles to the bottom of the component, leaving a liquid-rich area at the top. This segregation produces anisotropic mechanical properties along the height of the sample. Second, due to the excess liquid that is present, the part will undergo non-uniform dimensional change. This imposes a severe physical barrier on the composition and size components to be used in advance materials applications. In the absence of gravity, it is possible to study the underlying principles behind these two phenomenon.

These experiments were also designed to provide a fundamental understanding in the microstructural development of liquid phase sintered materials. This includes the study of grain growth mechanisms, the role of coalescence in microstructural evolution, the role of volume fraction in a  $\mu g$  environment, as well as mathematical modeling of these concepts. Thus, the experiment was designed to solve processing problems and to provide fundamental insight into the liquid phase sintering behavior of tungsten heavy alloys.

## BACKGROUND

Five different alloy compositions were selected for liquid phase sintering under microgravity conditions. The specimen preparation for this flight has been described in detail elsewhere<sup>1)</sup>; however, it is beneficial to reiterate some of key aspects. Sample containment in these experiments is crucial, especially because large volume fractions of liquid form in the lower tungsten content alloys. Each of the samples, which is a cylinder 10 mm in diameter and 10 mm in height, is placed in its own alumina crucible. The crucibles are then stacked such that the bottom of one crucible becomes the top for the one immediately beneath it. The top crucible has an alumina lid. The stack of crucibles is then placed in a boron nitride crucible, which is then sealed in three tantalum containment cans. This cartridge is then directly loaded into the Large Isothermal Furnace (LIF). At each containment stage, the appropriate outermost container was evacuated to prevent expansion of entrapped gas and possible rupture of the cartridge. Figure 1 shows a schematic of the samples and crucibles in the tantalum cans.

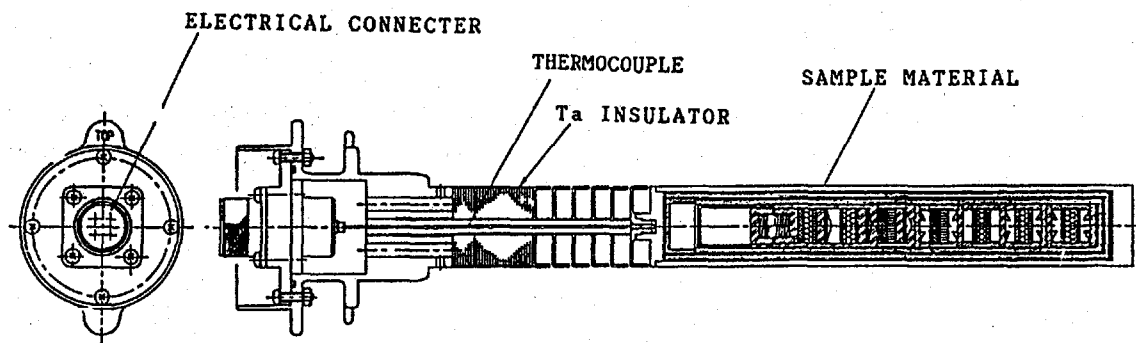


Fig. 1 Schematic of sample encapsulation

Most of the samples were pre-sintered at 1400 °C to provide adequate strength for machining to final dimension, and to withstand the intense vibrations created at take-off. This temperature is well below the liquid formation temperature for this system. However, there were two additional samples containing 93 wt.% that received different pre-flight processing: one was placed in the cartridge in the green state, while the other was sintered at 1500 °C for 1 minute. Thus, there were three samples having the same composition with different pre-flight processing: green, pre-sintered at 1400 °C for 1 hour, and liquid-phase sintered at 1500 °C for 1 minute.

## METHODS

During the flight, no data was obtained on the samples themselves. Sensors were used to measure extrinsic variables including temperature and time at temperature. After flight, the sample cartridges were flown to Japan for examination and dissection. The three sets of samples were then hand carried to the Pennsylvania State University.

Extreme caution was taken at every stage to insure that the samples were not damaged,

and that proper identification was maintained at all times. Each set of seven samples remained sealed in the inner-most layer of tantalum, which contained the boron nitride crucible and the individual alumina crucibles. To extract the samples, one end of the tantalum tube was cut off with an abrasive rotary tool. The boron nitride crucible was carefully extracted, and the samples were removed and labeled. A photographic record of each sample was taken before the samples were examined in any way to insure exact sample identification at every point in the subsequent analysis

Prior to any destructive evaluation, the physical dimensions of each sample were obtained using a coordinate measuring machine. These data were used to develop a mathematical model on densification and shape distortion.

The physical density of the samples was obtained using both a helium pycnometer and water immersion. After all of the necessary physical data was collected, the samples were hand carried to the Lewis Research Center, where the samples were readied for metallurgical examination using traditional sectioning, mounting, and polishing techniques. Care was taken at all times to monitor the position of the sample within the alumina crucible, *i.e.* to keep track of the "top" and "bottom" of the sample with respect to the crucible. Only half of the sample was prepared, while the other half was archived for further study and experimentation.

After a scratch-free polish was obtained, it was decided that a traditional etching process using a solution such as Murakami's reagent would not produce sufficient contrast between the tungsten grains and the W-Ni-Fe matrix for quantitative microstructural analysis. Thus, the samples were interference layered by sputtering platinum on the surface of the sample in an oxygen containing environment. The deposited layer then consists of  $PtO_x^{21}$ . The color contrast between the matrix and tungsten grains is then a function of the layer thickness and the partial pressure of oxygen during sputtering. The specimen can then be viewed using traditional bright-field optical microscopy.

## FLIGHT RESULTS

Every sample contains microstructural anomalies that have never before been observed in samples sintered under equivalent terrestrial conditions. The frequency and magnitude of these anomalies is larger in samples containing lower volume fractions of tungsten. Therefore, this report will focus on the observations in two samples consisting of 78 wt.% tungsten: one was sintered for 1 minute and the other for 120 minutes.

### 78 wt.% Tungsten, 120 minutes

If processed under terrestrial conditions, the extended sintering time and low volume fraction of solid would cause the solid and liquid phases to segregate. This does not occur in microgravity. Under terrestrial conditions however, a persistent liquid system would normally sinter to 100 per cent of the theoretical density, thereby eliminating all pores. However, because no buoyancy forces exist in microgravity, gas pores are a stable and become a stable, discrete phase within the microstructure.

The lack of gravity has also produced anomalous pore morphologies, as shown in Figure 2. Two oddities are worth noting in this micrograph. First, the pore has a distorted shape which connects adjacent tungsten grains. Second, the liquid appears to have intruded into the pore.

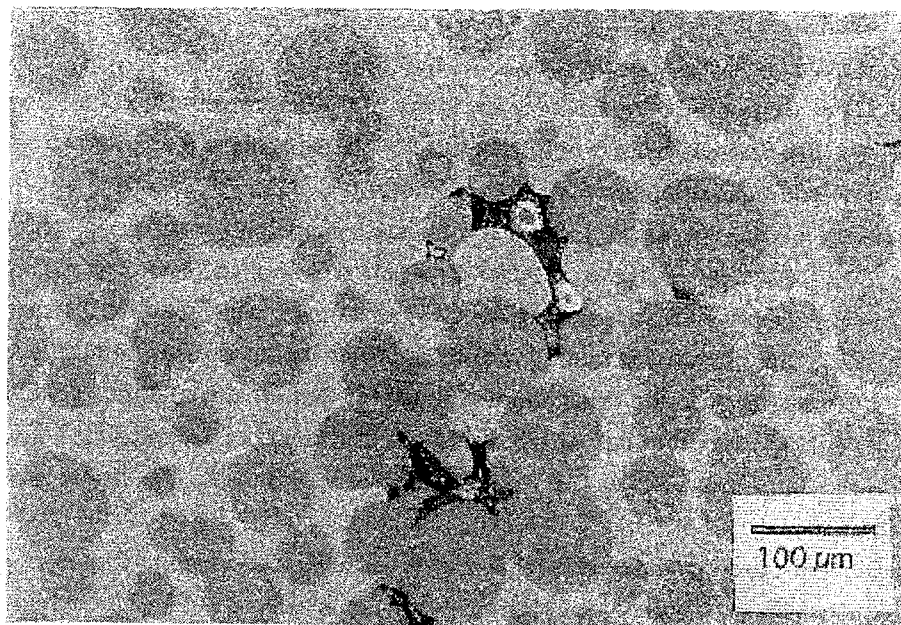


Fig. 2 Anomalous pore morphology for a 78 wt. % sample sintered for 120 minutes

The micrograph in Figure 3 shows another unusual pore morphology. The pore resembles a chevron mark. The bottom edge of the pore has a curved interface where it intersects a tungsten grain, yet the top edge appears to follow a "V" configuration. This shape in no way represents a minimum energy configuration for a vapor-solid interface.

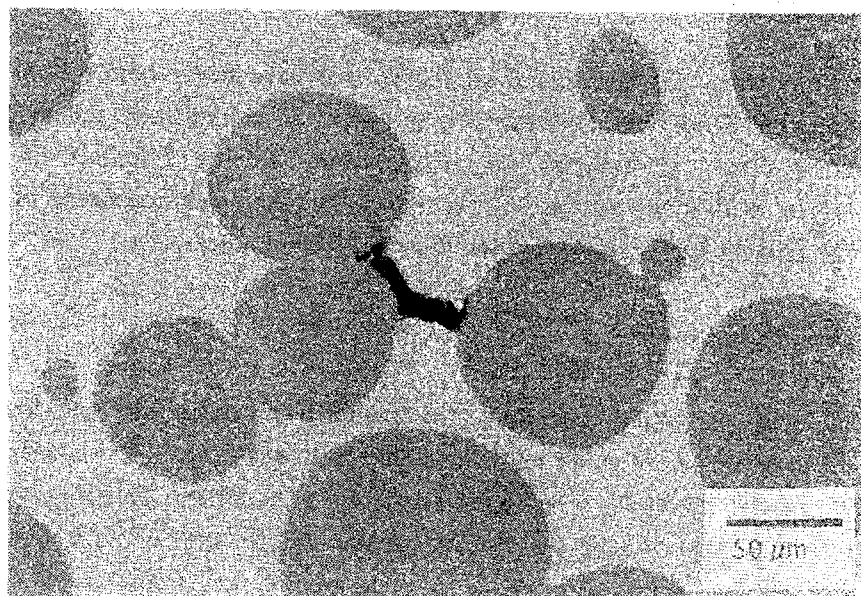


Fig. 3 V-shaped for in 78 wt. % sample sintered for 120 minutes

Figure 4 shows one of the most unusual pore morphologies observed in this sample. It appears as though the pore is effectively pinned at both ends by tungsten grains. Due to the lack of gravity, there is insufficient buoyancy to allow the pore to float to the top of the compact. These two constraints have produced a dog bone-shaped pore.

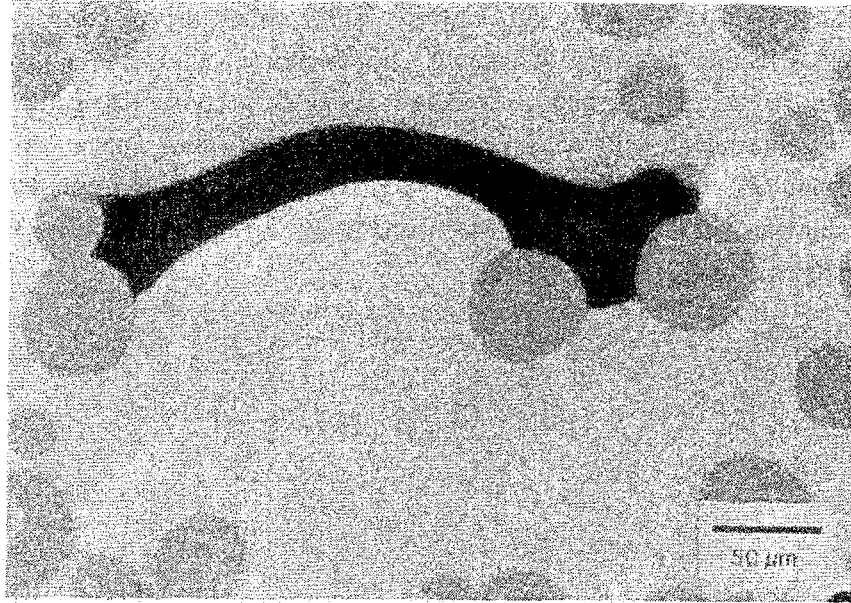


Fig. 4 Dog bone-shaped pore

Figure 5 shows a different phenomenon that is widespread in this sample. In a terrestrial environment, grain growth can occur in a LPS material by grain coalescence and subsequent solid state diffusion, solution reprecipitation or a combination of these mechanisms. The microstructure in Figure 5 shows finger-like protrusions of tungsten in an irregularly-shaped pore space. This morphology is representative of solid phase growth from a vapor such as encountered in the growth of whiskers; however, in this microstructure, pores are stable phases in the microstructure. Thus, there is opportunity for solid-vapor transport.

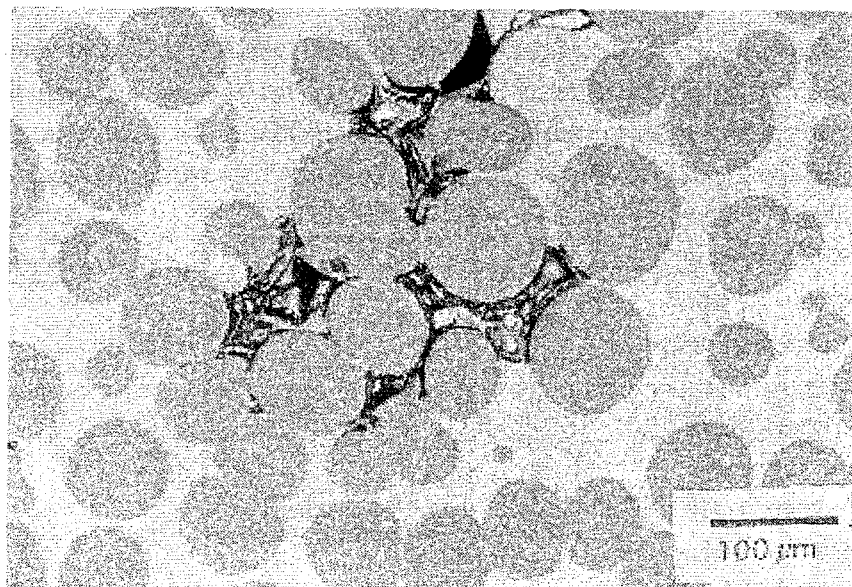


Fig. 5 Anomalous tungsten grain shapes possibly caused by vapor phase transport

In examining the edge of the sample, another unexpected observation was made, as shown in Figure 6. The liquid has formed an undulating finger-like interface. In some locations, it almost assumes a sinusoidal wave form, yet in others, this periodicity is interrupted by random, irregular eruptions. This microstructural feature does not appear to be the result of an interaction between the liquid and the solid tungsten particles. It appears to be isolated completely within the liquid. Likewise, it is not the result of the liquid interaction with the alumina crucible as these features appear only on free surfaces where the sample had no interaction with the crucible. These undulations appear in the samples sintered for 1 and 15 minutes as well, and the height of the protrusions appear to be the same size. This intimates this feature is not associated with time dependent mass transport, but occurs soon after the liquid phase appears.

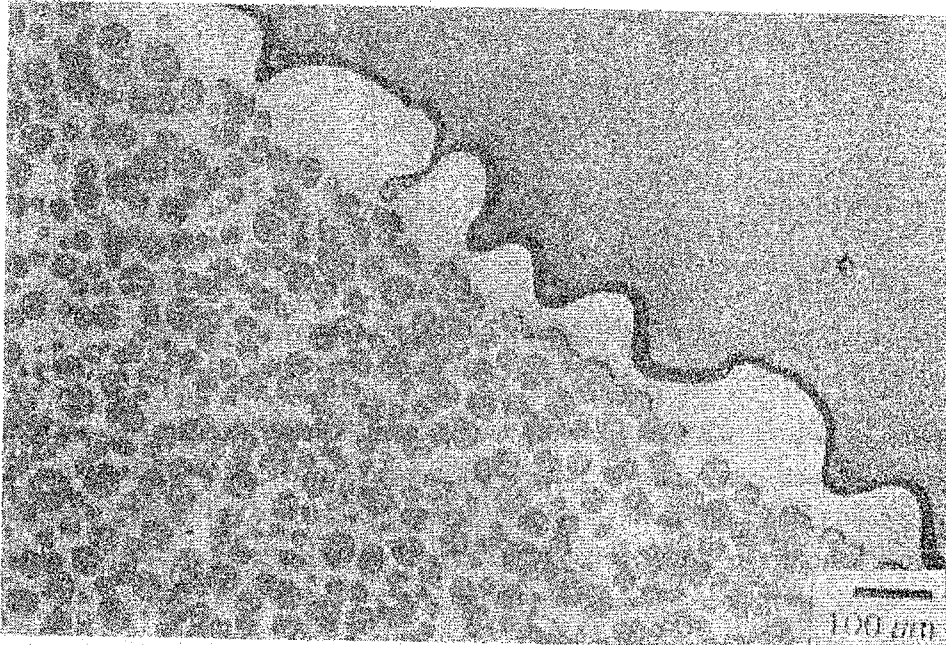


Fig. 6 Finger-like protrusions of liquid phase at sample edge

Figure 7 indicates where these features are located physically on the sample. These liquid intrusions are more concentrated on the "top" of the sample, although they can be found on the free surfaces nearest the bottom of the crucible. The demarcation of top and bottom has little significance to this observation except that it provides the orientation of the sample within the crucible. It is not related to the orientation of the samples with respect to Earth's gravitational field. To maintain proper orbit, the shuttle and the Large Isothermal Furnace (LIF) used to process the samples were oriented in a non-standard position.

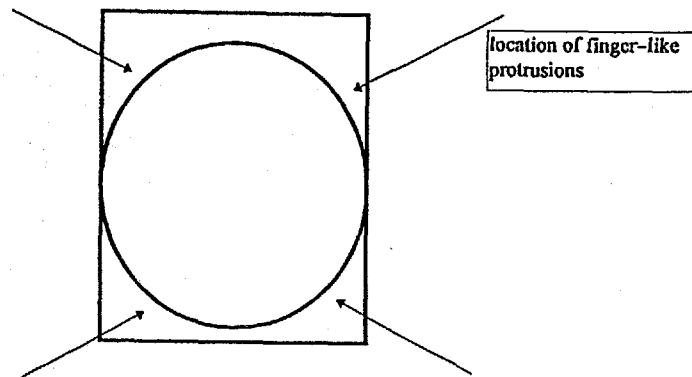


Fig. 7 Schematic showing where finger-like protrusions occurred on the samples

During the liquid phase formation in the sintering of each set of samples, the *Columbia* was in a period of free drift; therefore, there was no firing of the shuttle's engines to maintain its position in orbit. This was necessary to insure that there would be no net forces acting on the samples due to acceleration of the shuttle. Based on these facts, it seems that these undulations are equilibrium microstructural features which are stable in a microgravity environment. The cause of their formation is unknown.

#### 78 wt.% Tungsten, 1 Minute

This sample shows many of the same microstructural anomalies described above. There is a high volume fraction of large gas pores in the microstructure as shown in Figure 8. Their spherical or nearly spherical shape provides a clear indication these voids are gas-filled. Figure 9 shows an ideal example of such a void. Referring back to Figure 8, two adjacent pores are about to coalesce.

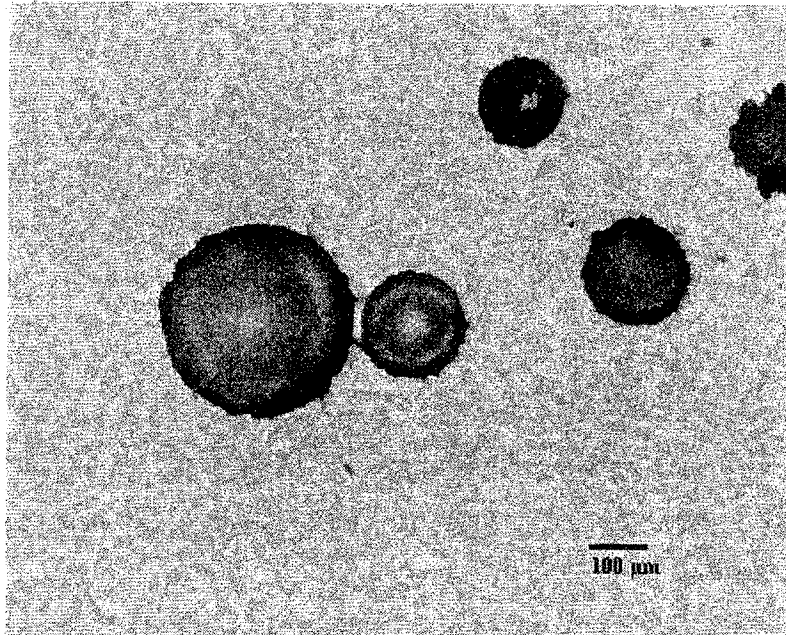


Fig. 8 Low-magnification view of 78 wt. % sample sintered for 1 minute at 1500 °C. Note the abundance of gas filled pores and the pore coalescence event.

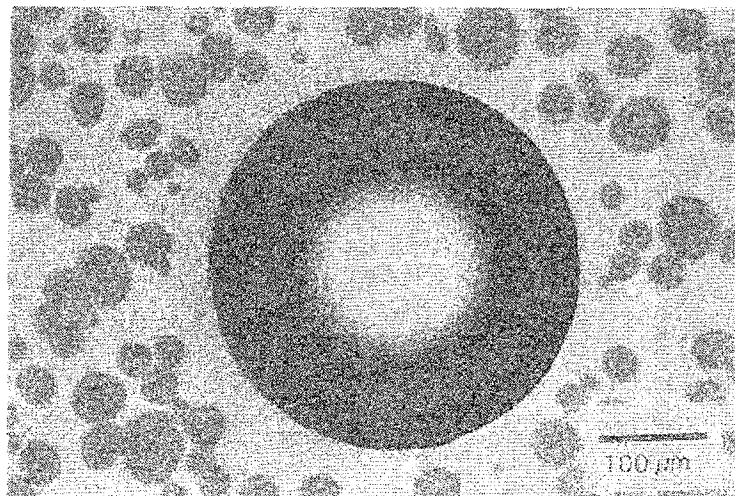


Fig. 9 Spherical gas-filled pore



Figure 10 is an example of a wide spread phenomenon that occurred in this sample. Shown here is an interior pore. Notice the irregular "shoreline" around the pore. Rather than being a smooth interface, there are jagged protrusions and jetties. The same irregular features occur at the edge of the sample where the solid-liquid interface interacts with the ambient environment within the crucible, as shown in Figure 11. The liquid has receded from the edge of the sample. This is the opposite of the features observed in Figure 6 where the liquid "fingers" protruded beyond the tungsten grains. These microstructural features are not consistent with Earth-based solid-liquid interactions. At a solid-liquid-vapor interface, the liquid should form a meniscus between adjacent tungsten grains.

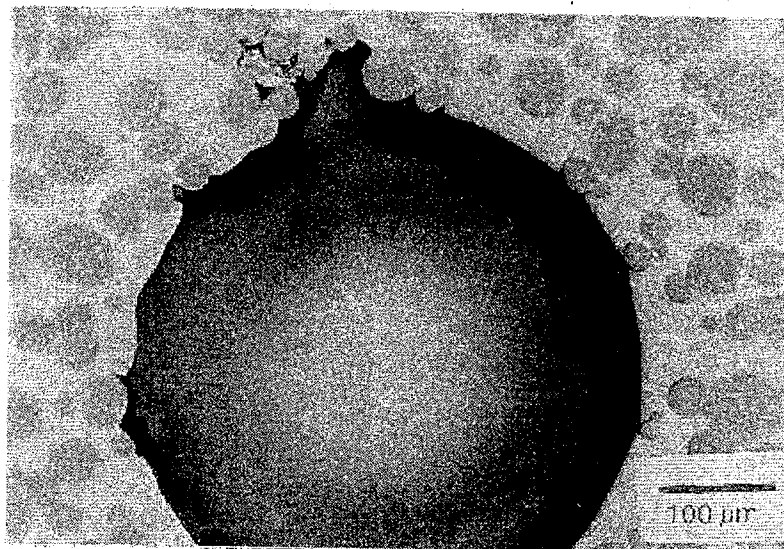


Fig. 10 Micrograph showing irregular solid-liquid-vapor interface

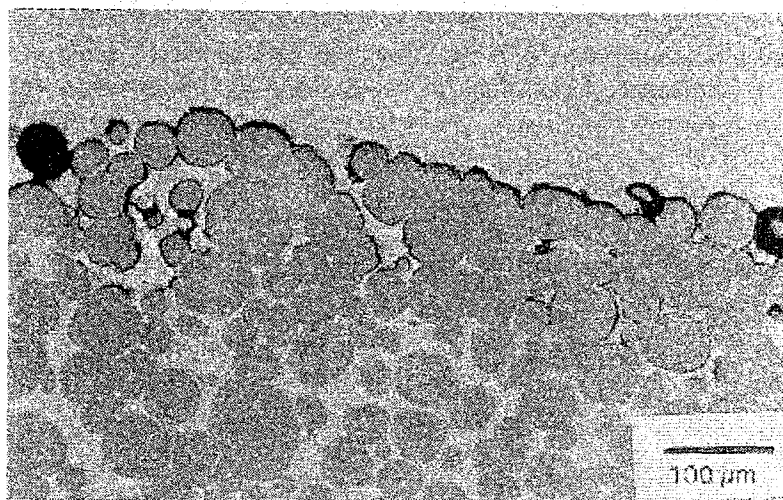


Fig. 11 Recession of liquid from sample edge

Figure 12 shows a pore having a triangular shape. Again, this morphology is unstable in a terrestrial environment. In a two dimensional cross-section, it appears as though the pore completely isolated in the matrix of tungsten-nickel-iron; that is, there is no tungsten grains pinning the pore. The structure beneath the pore or in the immediate vicinity is not visible.

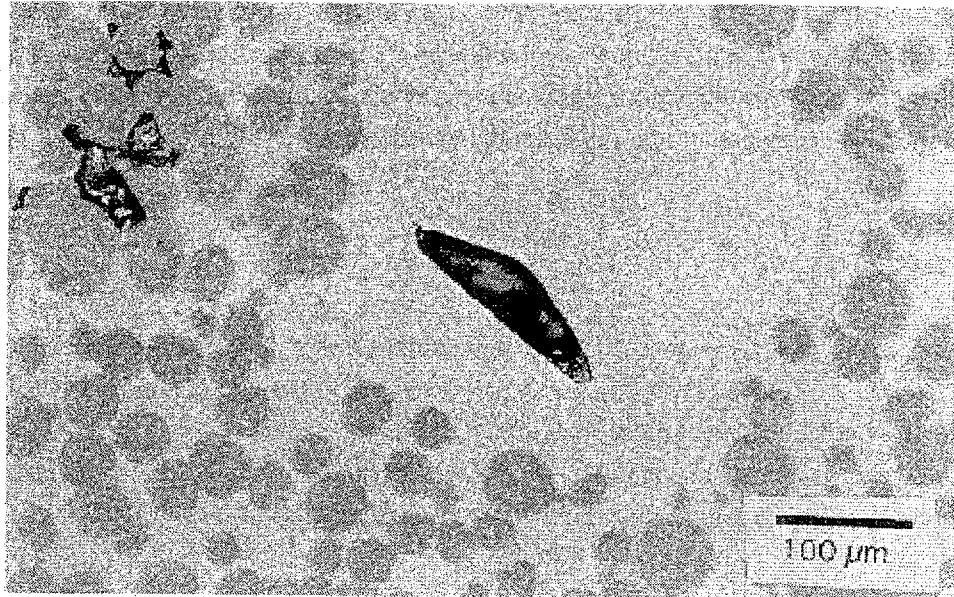


Fig. 12 Triangular pore in the 78 wt. % sample sintered for 1 minute at 1500 °C

## CONCLUSIONS

The microgravity environment present during the sintering of these samples has had a drastic impact on their microstructural development. Features are present which have never been seen before, despite the fact that tungsten-nickel-iron heavy alloys are well characterized metallurgically. New scientific explanations are needed to describe the formation of the aforementioned anomalies; however, specific observations can be made about the microstructures presented here. First, gas-filled pores appear to be a stable, discrete phase in microgravity liquid-phase sintered materials. These pores undergo coalescence as they become very large compared to the scale of the microstructure.

The lack of gravity has also produced very unusual pore morphologies. Pore shape is probably influenced by attachment to tungsten grains. In the next several months, work will begin on reconstructing the three-dimensional microstructure of these samples.

At the edge of the sample where there is no constraint exerted by the crucible, liquid protrusions were observed on the sample sintered for 120 minutes. In terrestrial conditions, these protrusions would not exist, rather there would be a meniscus between grains produced by the capillary force of the wetting liquid. The lack of periodic structure in these structures creates additional questions. Had the structure been periodic, it could have been described as a columnar solidification front created by constitutional undercooling.

Clearly, there are some very unusual features in these microstructures. It will be some time before all of these features are adequately described by fundamentals of powder metallurgy and solidification.

The data obtained from this shuttle flight opens the doors to many unanswered questions. The next immediate step is to dissect the samples layer by layer using a micromilling instrument, and then to electronically reconstruct the microstructure using image analysis equipment. This should provide an absolute picture of the microgravity microstructures. Additionally, it may be possible to fly additional samples on an upcoming shuttle flight that will provide information on the effect of surface energy, solid content, etc. on microstructural development in a microgravity environment.

## REFERENCES

- 1) Iacocca, R. G. and German, R. M. Experimental Design for Liquid Phase Sintering in Microgravity. *Advances in Powder Metallurgy and Particulate Materials, volume 2*, Metal Powder Industries Federation (1993). 181-194.
- 2) Brindley, W. J. and Leonhardt, T. A. Metallographic Techniques for Evaluation of Thermal Barrier Coatings. *Materials Characterization*. 24, 93-101 (1990).

## PUBLICATIONS

- 1) German, R. M. Microstructure of the Gravitationally Settled Region in a Liquid Phase Sintered Dilute Tungsten Heavy Alloy. *Metallurgical and Materials Transactions*. 26A, 279-288 (1995).
- 2) German, R. M., Space Study of Gravitational Role in Liquid Phase Sintering. *Industrial Heating*. 62, 52-54.(1995):
- 3) Raman, R. and German, R. M. A Mathematical Model for Gravity-Induced Distortion During Liquid Phase Sintering. *Metallurgical and Materials Transactions*. 26A, 653-659 (1995).
- 4) Liu, Y., Heaney, D. F., and German, R. M. Gravitational Effects on Solid Grain Packing in Liquid Phase Sintering. *Tungsten and Refractory Metals*, ed. by A. Bose and R. J. Dowding, Metal Powder Industries Federation, Princeton, NJ (1995). 121-128.
- 5) Liu, Y., Heaney, D. F., and German, R. M. Gravity Induced Solid Grain Packing During Liquid Phase Sintering. *Acta Metallurgica et Materialia*. 43, 1587-1592 (1995).
- 6) German, R. M., Iacocca, R. G., Johnson, J. L., Liu, Y., and Upadhyaya, A. Liquid-Phase Sintering Under Microgravity Conditions. *Journal of Metals*. 47, 46-48 (1995).
- 7) Liu, Y., Iacocca, R., Johnson, J. L., German, R. M., and Kohara, S. Microstructural Anomalies in a W-Ni Alloy Liquid Phase Sintered under Microgravity Conditions. *Metallurgical and Materials Transactions*. 26A, 2485-2486 (1995).
- 8) Heaney, D. F., German, R. M., and Ahn, I. S. The Gravitational Effects on Low Solid Volume Fraction Liquid Phase Sintering. *Journal of Materials Science*. In press.

- 9) German, R. M. Grain Agglomeration in Solid-Liquid Mixtures Under Microgravity Conditions. *Metallurgical and Materials Transactions*. In press.
- 10) Liu, Y. and German, R. M. Contact Angle and Solid-Liquid-Vapor Equilibrium. *Acta Metallurgica et Materialia*. In press.
- 11) Johnson, J. L. and German, R. M. Theoretical Modeling of Densification During Activated Solid-State Sintering. *Metallurgical and Materials Transactions*. In press.
- 12) German, R. M. and Liu, Y. Grain Agglomeration in Liquid Phase Sintering. *Journal of Materials Synthesis and Processing*. Under review.

# 自然対流と拡散に対する重力加速度揺らぎ ( $g$ ジッタ) の影響 (CONVECTION)

代表研究者： 東 久雄<sup>\*1</sup>

共同研究者： 大西 充<sup>\*1</sup>、吉原正一<sup>\*1</sup>、土井隆雄<sup>\*2</sup>、  
大井田俊彦<sup>\*2</sup>、石川正道<sup>\*3</sup>、亀井信一<sup>\*3</sup>

\*1 航空宇宙技術研究所、 \*2 宇宙開発事業団、 \*3 三菱総合研究所

The experiments of CDU of VIBES were conducted as scheduled. The first one was executed while running the VIBES system and the second without running the system.  $G$ -jitter acceleration was measured by two sets of tri-axial accelerometers on board the VIBES and the CDU.

Diffusion of  $\text{OH}^-$  was measured by color of phenolphthalein by using the fact that phenolphthalein turns color between pH 8 and pH 10. Measured diffusion showed a more than 20 % faster rate compared to theoretically calculated one. This means that the apparent diffusion coefficient of  $\text{OH}^-$  was  $D^* \sim 2D$  in the first experiment and  $D^* \sim 3D$  in the second, where  $D$  is diffusion coefficient of  $\text{OH}^-$ .

Measured  $g$ -jitter by the accelerometer on-board the CDU showed a stronger  $g$ -jitter level in the second experiment than that in the first. This corresponds that the diffusion in the second was larger than that in the first. This suggests that there exist some convection in the liquid due to  $g$ -jitter.

With regards to measuring natural convection due to residual gravity, this failed because we could not obtain clear distribution of color. The measured flow from the distribution of color, however, was opposite to that predicted.

## 実験の目的、意義

スペースシャトルや宇宙ステーション内は、完全な無重力状態ではなく、空気抵抗や重心位置からのずれによりわずかではあるが定常的な重力が残っている(残留重力)。また、船内での人間の活動や種類の機械の作動などによる振動があることが知られている(重力ゆらぎ)。これらの微小重力は、それがいかに微小であろうとも、流れを新たに発生させたり、拡散に影響をおよぼすのではないかと考えられる。そのため、それらの影響を知ることが、材料プロセッシングなどの流体を扱う分野では極めて大切なことである。

残留重力は  $10^{-8} g_0$  のレベルと考えられ、流れに温度勾配があると一方向への流れをわずかに起こす。重力ゆらぎは  $10^{-2} \sim 10^{-4} g_0$  のレベルで広い範囲の周波数で振動しているもので、その影響は明らかではない。

本実験の目的は

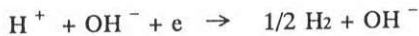
- 1) 重力揺らぎおよび残留重力が拡散に及ぼす影響の測定
- 2) 拡散の観測を通して重力揺らぎおよび残留重力による対流を知ることである。

## 実験の方法と試料

### 実験方法

実験では微小重力の影響を実際に観察し、定量的に測定するために、図1のような実験容器を用いる。内寸が約縦7cm、横8cm、幅2cmの直方体の容器に水、NaCl (0.02 mol/l)、EtOH (7.0 %)及び Phenolphthalein 0.0035 % ( $1.1 \times 10^{-4}$  mol/l)を入れ、容器上面を加熱(70°C)し、液体に温度勾配をつける。この温度勾配により、重力加速度があると流れが起きる。容器内に陽極(プラス極)の銀板と陰極(マイナス極)のパラジウム線(0.3 mmφ, 15 cm) その半分は2 mm 毎に絶縁皮膜でシールドされている)を設け、通電することにより、陰極パラジウム線に近くの水素イオン濃度(pH)を変化させて染料を発色させるのである。この発色部分の移動の様子により拡散、流れの様子を知ることができる。

陰極近傍のイオンの反応を以下に示す。



従って  $\text{OH}^-$  の存在が pH を変え染料を発色させるので、色の移動、拡散は  $\text{OH}^-$  の移動、拡散を表している。陽極には塩素ガス、陰極には水素ガスが発生するが、この実験装置ではそれらはそれぞれ銀とパラジウムにより吸収され、実験を妨げる気泡の発生を防いでいる。

上記実験容器は図2に示される制振装置(VIBES)の制振機構(VIB)の中にセットされる。VIBESは図3a, bのような振動伝達特性を持っている。防振機構が働いている場合は、外から与えられた振動は低周波では振幅は増大し、高周波では減衰して実験容器に伝わる(図3a)。防振機構を機械的にロックし、働かせない場合は、60数Hzに増幅のピークがあ

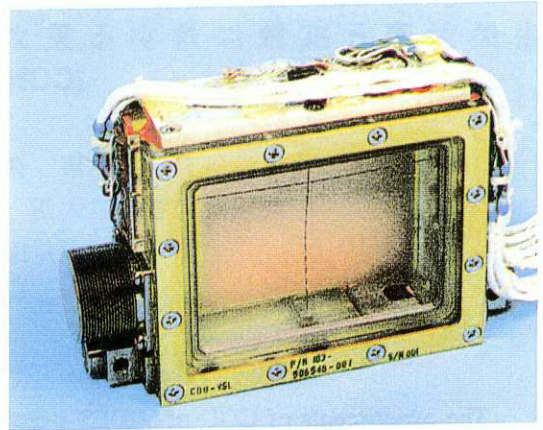


図1 実験セル(CDU)

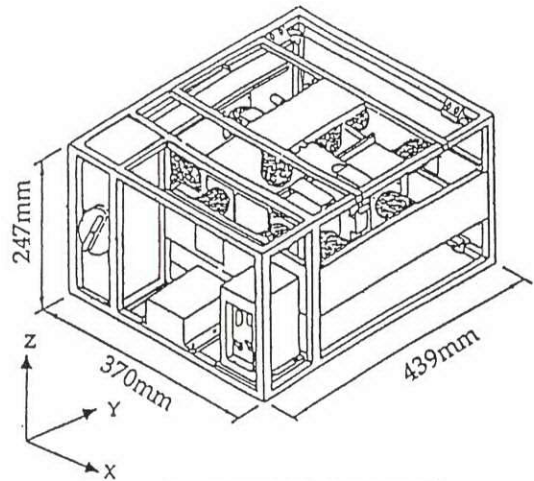


図2 制振実験装置(VIBES)

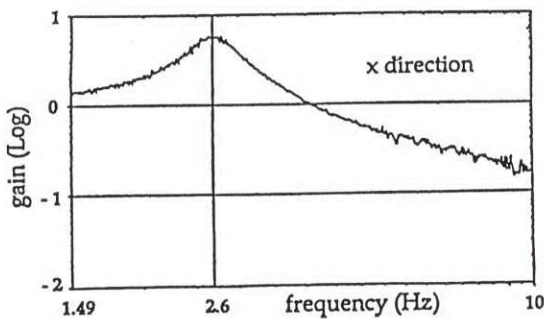


図3a VIBESの振動伝達特性  
(作動させたとき)

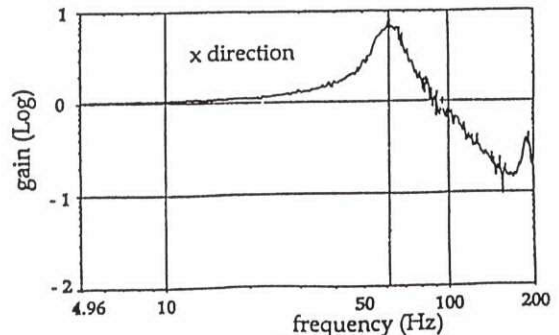


図3b VIBESの振動伝達特性  
(固定させたとき)

る(図 3b)。実験は制振装置を作動させた場合と作動させない場合の 2 回行われた。振動周波数の拡散への影響の違いを知るためである。制振装置の外部と内部には三軸の加速度計がセットされ、実験中の重力加速度が計測された。

次に重力揺らぎがないとして、色の拡散を予測する。ある物質の濃度を  $c$  として通常拡散は以下の拡散方程式で表される。

$$\partial c / \partial t = D \Delta c$$

この拡散方程式の三次元の解は

$$c(r, t) = \frac{M}{8(\pi Dt)^{3/2}} \exp(-r^2 / 4Dt)$$

で与えられる。

フェノールフタレインは pH 8.0 ~ 10.0 で発色することが知られている。通電した電気量と  $\text{OH}^-$  濃度、pH の関係は以下のものである。

陰極近傍の  $\text{OH}^-$  の総量は

$$\begin{aligned} 5 \text{ mA} \times 5 \text{ sec} &= 0.025 \text{ C} \\ &= 2.6 \times 10^{-7} \text{ F} \cdot \text{mol} \\ & \quad (\text{F} = 9.64846 \times 10^4 \text{ C mol}^{-1}) \end{aligned}$$

陰極の長さを考慮して

$$\begin{aligned} M &= 2.6 \times 10^{-7} \times \frac{0.2 \text{ cm}}{7.5 \text{ cm}} \text{ F} \cdot \text{mol} \\ [\text{OH}^-] &= c \times 10^3 + 10^{-7} \text{ l}^{-1}, \quad [\text{H}^+] = \frac{10^{-14}}{[\text{OH}^-]} \\ \text{pH} &= -\log[\text{H}^+] \end{aligned}$$

$\text{OH}^-$  の拡散係数を  $D = 5.23 \times 10^{-5} \text{ cm}^2/\text{s}$  として<sup>1)</sup>、これらの式から、重力揺らぎがないとした実験条件の場合に予測される  $\text{OH}^-$  の密度分布変化及び pH の分布変化は図 4a, 4b (0 ~ 60 秒)、図 4c, 4d (100 ~ 1500 秒) のようになる。

#### フェノールフタレイン発色、沈降試験

実験容器でフェノールフタレインを発色させ試験条件を詰めた。その際、その色の沈降速度を測定した(図 11a)。発色したフェノールフタレインの沈降速度は  $0.5 \text{ cm/min}$  ( $8 \cdot 10^{-3} \text{ cm/sec}$ ) であることが分かった(図 11b)。このことは、フェノールフタレインの発色領域は密度が水よりも大きいことを示唆している。その発色領域を半径  $R$  の球として、沈降力 = Stokes の抵抗力 から密度と半径の関係を求める。図 11c に密度差と半径との関係を示すが、密度差は  $1/1000 \sim 1/10000$  のオーダーと推測される。

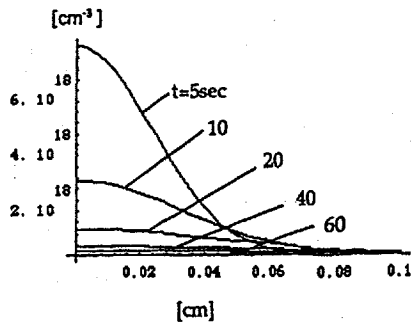


図 4a 予想される OH<sup>-</sup> の密度分布変化

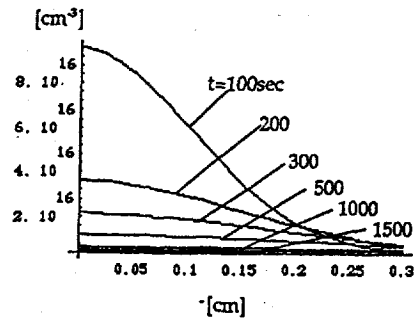


図 4c 予想される OH<sup>-</sup> の密度分布変化

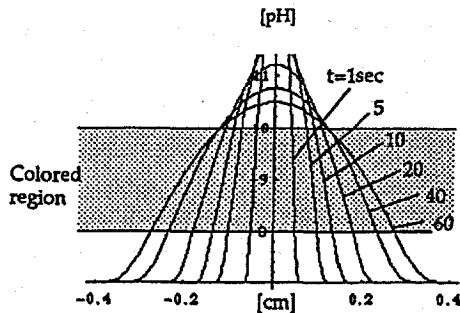


図 4b 予想される pH の分布変化と発色領域

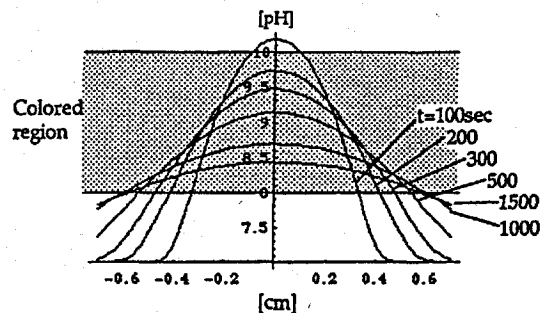


図 4d 予想される pH の分布変化と発色領域

## 染料長期安定試験

試料を実験容器に充填後、スペースシャトルでの実験まで3カ月以上の保存期間があり、フェノールフタレインの発色能力の劣化が予想されたため、長期安定性試験を行った。試料液の組成は水にフェノールフタレイン、塩、アルコールを加えるが、最も発色能力の低下が少ない割合を長期試験で決定した。即ち NaCl 0.02 mol/l, フェノールフタレイン  $1.1 \times 10^{-4}$  mol/l, Ethanol 7% である。しかし発色性能の劣化は避け難く、透過率で3倍になるほど、発色は薄くなった。

## 飛行実験の結果

宇宙実験は以下のように行われた。

### 第一回(1994年7月11日) VIBES 作動(ケース1)

実験容器の壁を加熱し、徐々に温度勾配をつけ、5分おきに電流をカソード、アノード間に5秒間通電し、発色させ、その動きを観察した。  
実験時間約25分。

### 第二回(1994年7月12日) VIBES 作動させず(ケース2)

実験手順は同様

特記すべきことは、ビデオカメラ映像で左上隅(加熱部壁と反対側)に(半径14mmの)気



泡の 1/8 程度 (1437 mm<sup>3</sup>, 全容量の 1.3 %) が存在した。また第二回の実験時、微細な気泡が多数発生し、(おそらく)壁に付着しているのが発見された。

### 加速度揺らぎの計測結果

搭載された加速度計の計測結果をケース 1 およびケース 2 について図 5a、図 5b の上図に示す。参考に NASA の SAMS のケース 1、ケース 2 と同時刻のデータを図 7a に示す。どれも途中で 10 分位振動レベルが大きくなるのが観られる。ケース 2 において、振動のレベルが大きくなっているのが、目立つ。

### 拡散測定結果

ビデオカメラで撮影された結果の一例を図 8 に示す。カメラは CDU の一部分のみを写している。カソード線の周りに白く(実際は赤紫色)見えているのが、拡散しているフェノールフタレインの色である。左上に気泡が混入している。

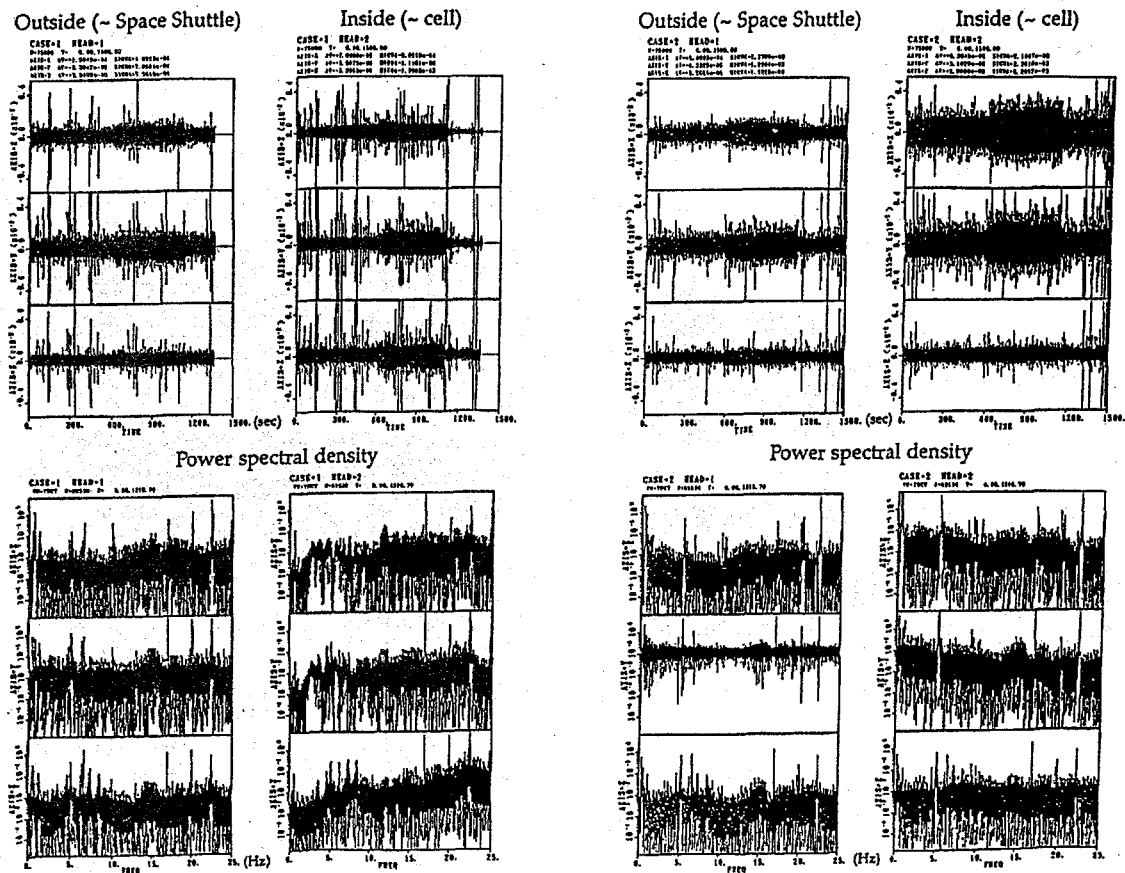


図 5a 計測された重力加速度(50 Sample/sec)とそのパワースペクトル(ケース 1)

図 5b 計測された重力加速度(50 Sample/sec)とそのパワースペクトル(ケース 2)

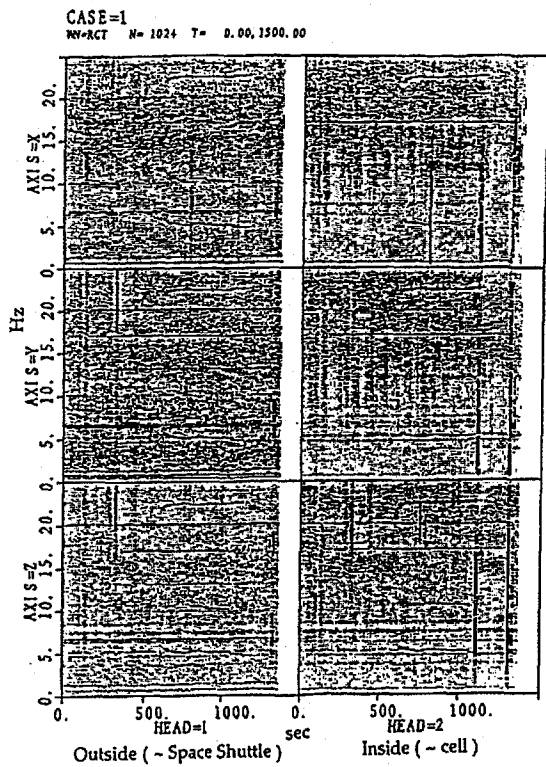


図 6a 計測された重力加速度の時間一周波数とそのパワースペクトル(ケース 1)

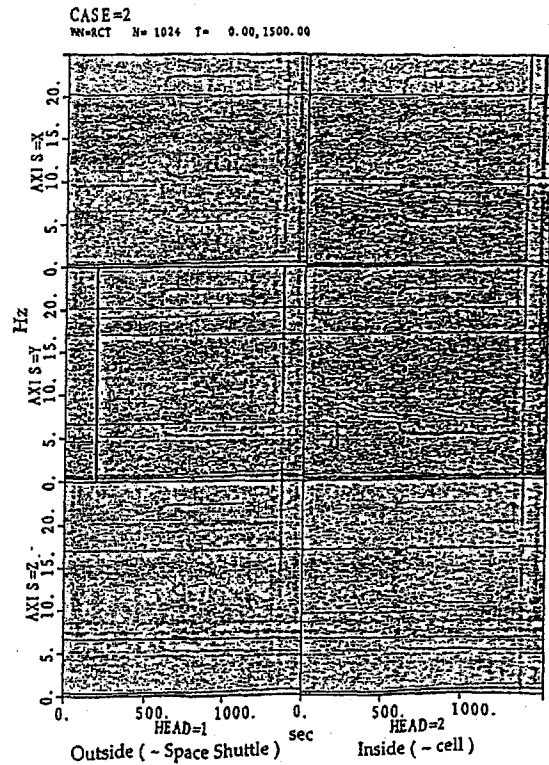


図 6b 計測された重力加速度の時間一周波数とそのパワースペクトル(ケース 2)

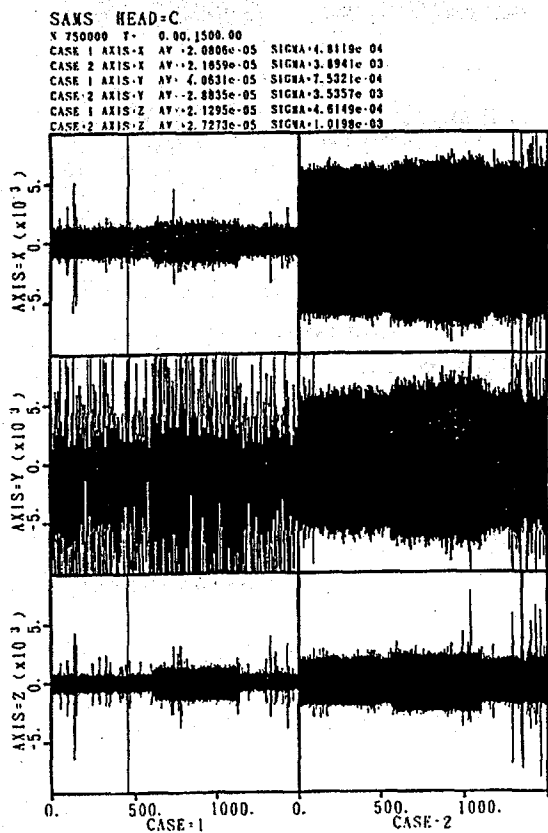


図 7a NASA SAMS の重力加速度データ (500 Samples/sec)

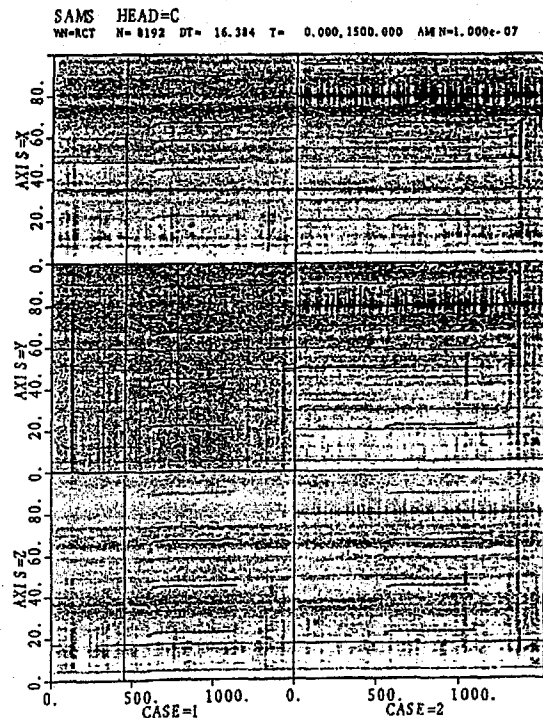


図 7b NASA SAMS の時間一周波数-パワースペクトルの関係

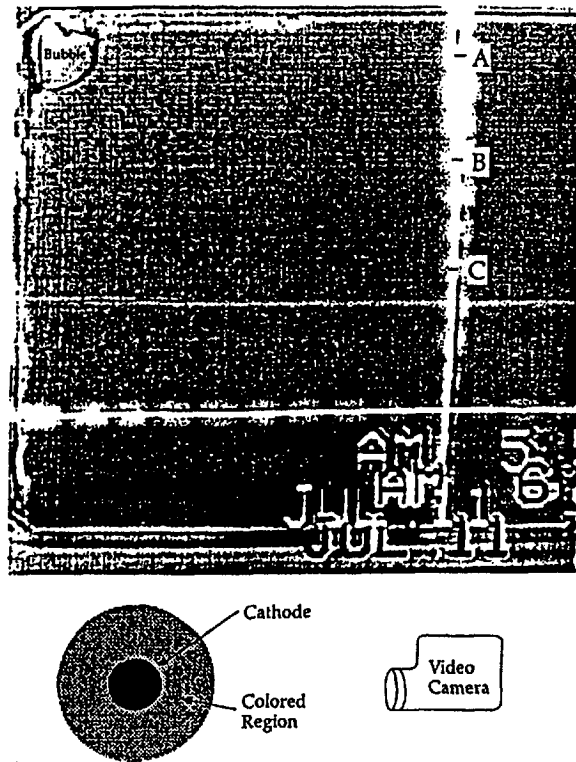


図 8 実験セルのビデオ画像

## 解析と考察

### 加速度揺らぎ解析

図 5a、図 5b 下図に全実験時間の加速度揺らぎを周波数解析した結果を示す。制振装置が作動しているケース 1 で低周波数のパワースペクトルムが減少し(増大するはず)、高周波数で僅かだが増大している(減少するはず)のは奇妙である。図 6a、図 6b にパワースペクトルを色の濃さで表した、時間一周波数ースペクトルム ダイアグラムを示す。図 7b に図 7a (NASA, SAMS データ)の時間一周波数ースペクトルム ダイアグラムを示す。80 Hz に強い振動があることが分かる。この振動が図 3b に示される振動伝達特性により、制振機構を機械的にロックした場合(ケース 2)に内側が大きく振動する原因である。

### 拡散結果解析

ケース 1 およびケース 2 についての染料の拡散の実験結果を時間経過に従って(0~60 秒)図 9a, b に示す。染料の色は極めて薄かったので、画像処理を行い、色を強調した。0 秒での色をベースにして、色の変化を表してある。図 9 の縦軸は色の濃さを表しているが、中心部はカソード線があるので意味は無く、また色の濃さは積分されたものである(図 8 参照)。従って分布の端が最も重要で意味を持っている。

染料は時間の経過とともに拡散していくのが観察されるが、その程度は場所によって異なっているのが分かる。A, B 点では色の拡散はほぼ同じであるが、C 点については、色の拡散が極めて大きいように見える。しかしやや明快さを欠いているので断定できない。

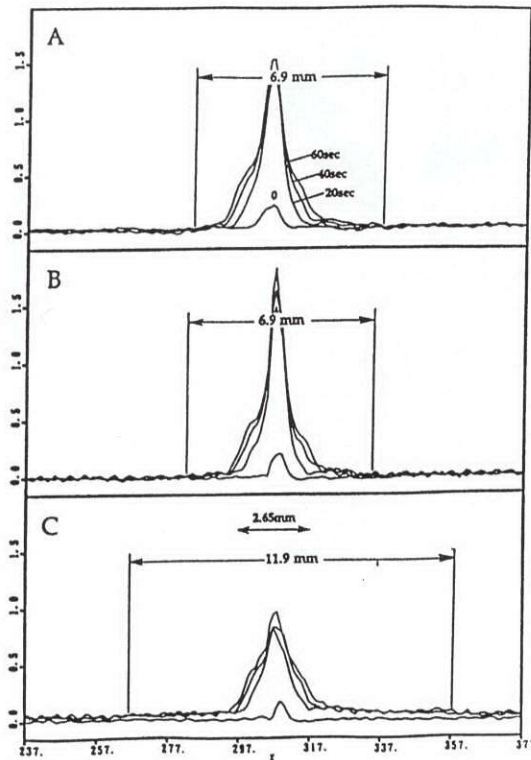


図 9a 測定された色の分布変化(ケース 1)、  
0 ~ 60 秒

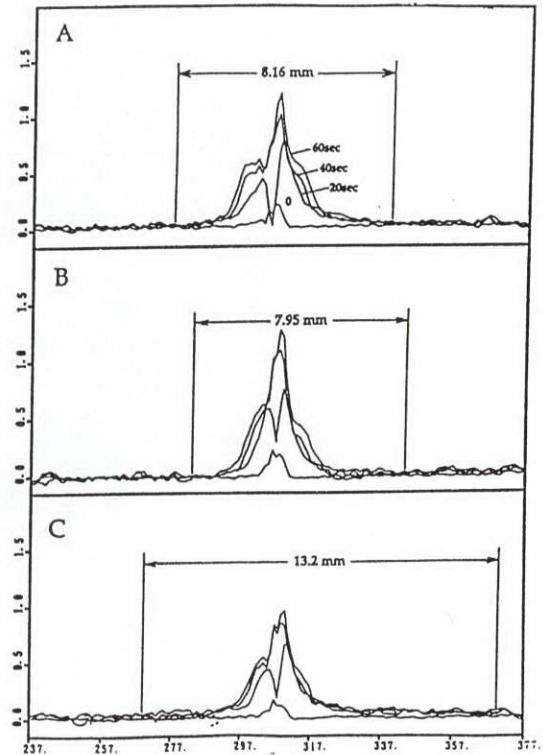


図 9b 測定された色の分布変化(ケース 2)、  
0 ~ 60 秒

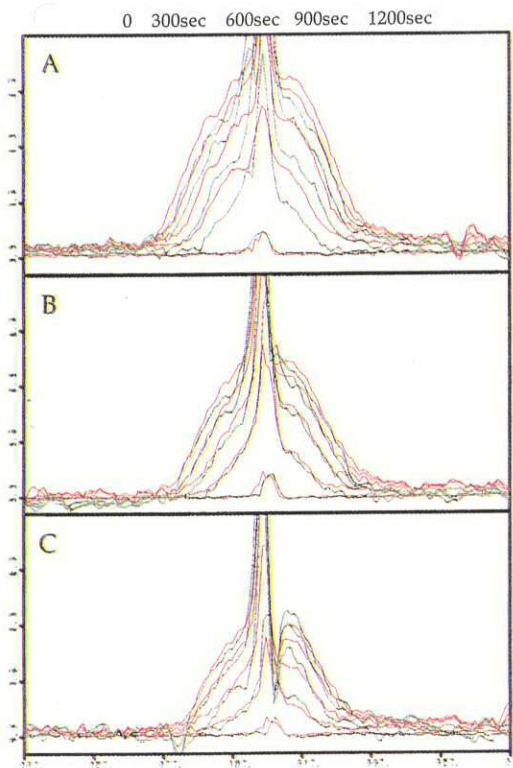


図 9c 測定された色の分布変化(ケース 1 :  
緑、ケース 2 : 赤)、0 ~ 1200 秒

図 4b に示された重力揺らぎの無い場合に予想される色の拡散の幅は 60 秒間で 5.53 mm であるから、A、B 地点ではケース 1 の場合が 1.25 倍、ケース 2 の場合が 1.45 倍である。このことは、ケース 1 では、見かけの拡散係数  $D^* \doteq 2D$ 、ケース 2 では  $D^* \doteq 3D$  ということの意味する(計算はここには示さない)。C 点では  $D^* \doteq 18 \sim 20D$  ということになるが、発色領域の境界が不明確なので、断定することはできず、参考に留める。これらの事実は、液体内部に対流が起こっていることを示唆している。また  $g$  ジッタの大きかったケース 2 の方が見かけの拡散が大きいことを示している。0 秒から 60 秒迄なので、以下に述べる温度勾配による流れの影響は殆どないと考えられる。

図 9c にケース 1、ケース 2 について、0 秒、300 秒、600 秒、900 秒、1200 秒の色の濃さの変化の様子を示す。この場合は A 地点においてケース 1 とケース 2 の差が最も大きく、ケース 2 の方が拡散が速いことが分かる。

## 対流検討

容器の液体内に対流があると考えられるが、温度勾配がある時と無い時に分けて考える。温度勾配が無いときの対流の要因は 1) 水の圧縮性による流れ、2) 容器の回転による流れ、3) 水と密度の異なる流体の振動 が考えられる。

- 1) 水の圧縮率は  $4 \cdot 10^{-5}$  と極めて小さいが、念のため  $g$  ジッタによる圧縮による流れを計算した。 $g \sim 10^{-2} g_0$ 、周波数 200 Hz として空気で計算した速度分布と渦度を図 10a, b に示す。水の圧縮性、密度を考慮し、流体の速度は最大  $3 \cdot 10^{-4}$  cm/sec 程度と考えられる。無視できない速度である。

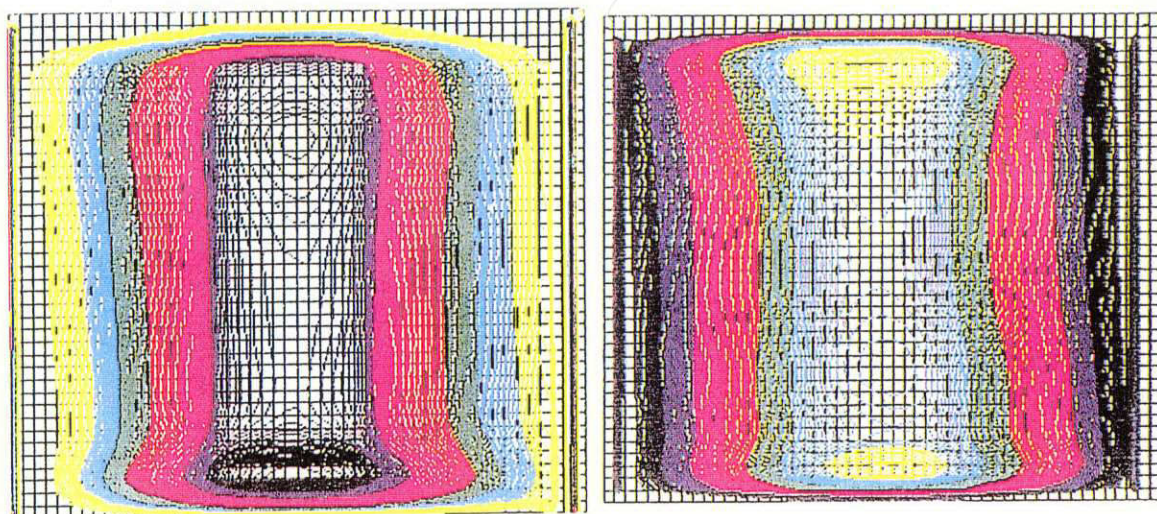


図 10a 水の圧縮性を考慮した速度分布 (Max  $3 \times 10^{-4}$  cm/s)  
( $g \sim 10^{-2} g_0$ 、 $f = 200$  Hz で空気で計算)

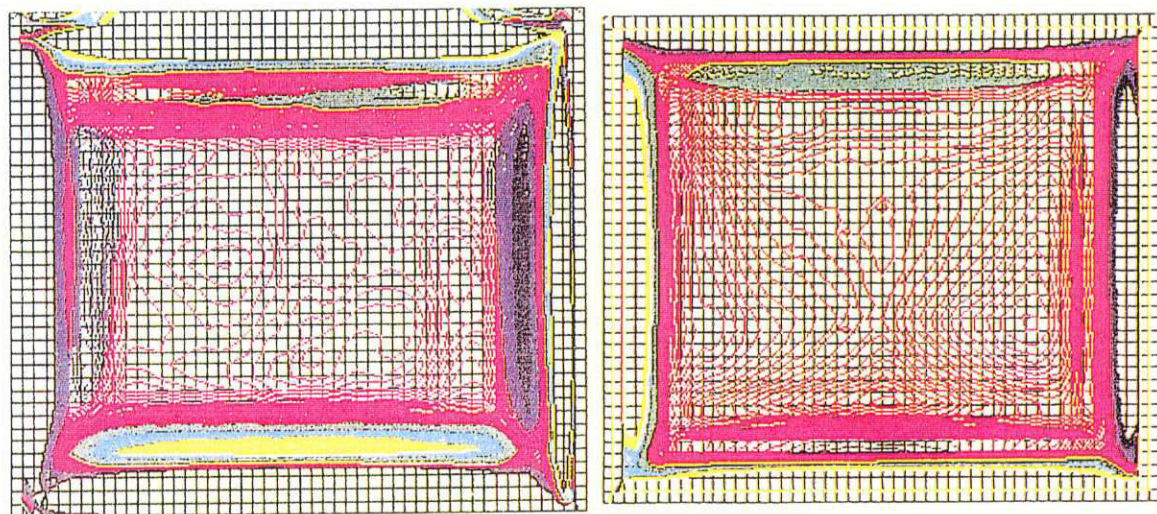


図 10b 渦度分布

- 2) 容器が振動により僅かでも回転し、振動すると容器壁周辺に流れが生ずる。壁 ( $y = 0$ ) の速度を  $u = U \cos \omega t$  とすると、液体内の流れ速度は  $u = U e^{-ky} \cos(\omega t - ky)$  となる。ここで  $k = (\omega/2\nu)^{1/2}$  である。いま  $\delta = 1/k = (2\nu/\omega)^{1/2}$  とおくと、 $\delta$  は振幅が  $1/e$  倍に減衰する距離を表す。因みに、 $\nu = 0.01$  cst であり、 $f = 1$  Hz であれば  $\delta = 0.056$  cm,  $f = 0.1$  Hz

であれば  $\delta = 0.18.. \text{ cm}$ ,  $f = 0.01 \text{ Hz}$  であれば  $\delta = 0.56.. \text{ cm}$  である。  $\delta$  で  $1/e = 0.367$ ,  $2\delta$  で  $0.135$ ,  $5\delta$  で  $0.0067$ ,  $10\delta$  で  $4.5 \cdot 10^{-5}$ ,  $20\delta$  で  $2 \cdot 10^{-9}$  程度の減衰となる。一方、加速度を  $10^{-2} g_0$  とすると、容器壁の最高速度  $U$  は  $f = 10 \text{ Hz}$  で  $0.318 \text{ cm/sec}$ ,  $f = 1 \text{ Hz}$  でおよそ  $3.18 \text{ cm/sec}$ ,  $f = 0.1 \text{ Hz}$  で  $31.8 \text{ cm/sec}$ ,  $f = 0.01 \text{ Hz}$  で  $318 \text{ cm/sec}$  となる。  $f = 0.1 \text{ Hz}$ ,  $f = 0.01 \text{ Hz}$  についてはジェルの支え等があり非現実的なので、  $f = 1 \text{ Hz}$  を例に取ると、壁より  $0.056 \text{ cm}$  で  $1.16 \text{ cm/sec}$ ,  $0.28 \text{ cm}$  で  $0.02 \text{ cm/sec}$ ,  $0.56 \text{ cm}$  で  $1.2 \cdot 10^{-4} \text{ cm/sec}$ ,  $1.12 \text{ cm}$  で  $6.5 \cdot 10^{-9} \text{ cm/sec}$  程度の速度を持つ。

3) フェノールフタレインを地上で発色させた際、  $0.5 \text{ cm/min}$  の速度で落下することから、フェノールフタレインの発色領域は水より僅かであろうが重いと考えられる。地上実験(図 11a)でのフェノールフタレインの落下速度(図 11b)から、フェノールフタレイン発色域の膜の厚みを  $0.3 \sim 1 \text{ mm}$  と考えて、密度差は  $0.002 \sim 0.0002 \text{ g/cm}^3$  程度と推測される。この発色域を球形として、この液体が  $g$  ジッタ ( $10^{-2} g_0 \sim 10 \text{ cm/sec}^2$ ) によって振動する速度を、半径、振動数をパラメータとして図 11d に示す。およそ  $10^{-4} \text{ cm/sec}$  の速度を持つことが分かる。この発色領域の振動が拡散に大きな影響を与えると思われる。発色領域の周りの流れは図 11e のように推測されるが、流れの詳細は現在不明である。

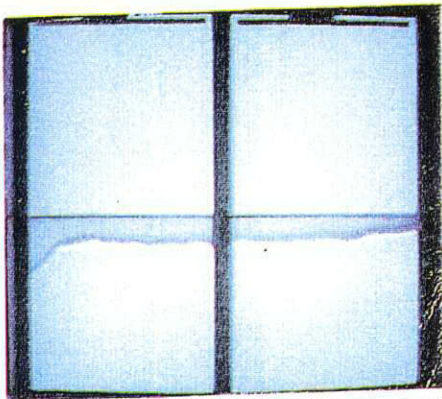


図 11a 発色フェノールフタレインの落下の様子

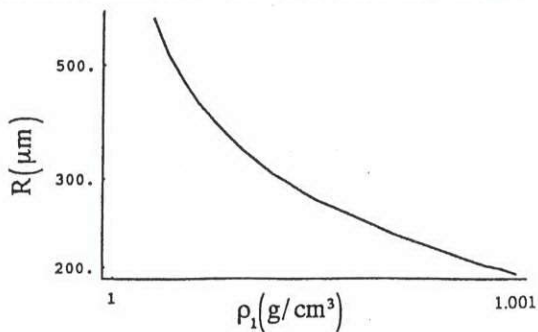


図 11c 密度塊の直径、密度の関係

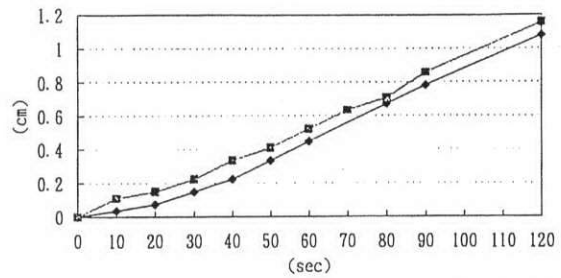


図 11b 発色フェノールフタレインの落下速度

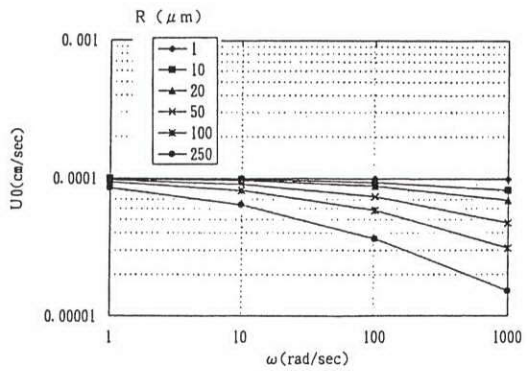


図 11d  $g$  ジッタ ( $10^{-2} g_0$ ) による粒子の速度

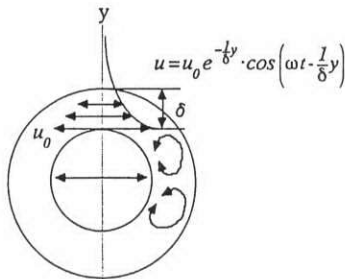


図 11e 発色領域周りの流れ

$$\delta = \sqrt{\frac{2\nu}{\omega}} \text{ cm} \quad \eta = 0.010 \text{ g/cm sec}$$

$\omega = 2\pi$	$\delta = 0.56 \text{ mm}$
$20\pi$	$0.17 \text{ mm}$
$100\pi$	$0.08 \text{ mm}$
$200\pi$	$0.05 \text{ mm}$

温度分布および流れのコンピュータ・シミュレーション

実験が始まると同時に一つの側壁を加熱した。容器の側壁に設置した熱電対により、測定した液体内の温度分布の時間変化を図 12a に示す。A, B 地点は温度勾配の付いてない方に位置する。この温度勾配により大きな対流が起こる。それは以下にコンピュータ・シミュレーションで示す。酸解離定数  $K_w$  の温度による変化は水の場合、 $25^\circ\text{C}$  で  $1.008 \cdot 10^{-14}$ 、 $30^\circ\text{C}$  で  $1.469 \cdot 10^{-14}$  それぞれ pH は  $\text{pH} = -\log 1.004 \cdot 10^{-7} = 7$ 、 $\text{pH} = -\log 1.469 \cdot 10^{-7} = 6.83$  であり、温度の変化による pH の変化は小さい。

容器の一方の壁を加熱して、その壁と平行な方向に重力加速度揺らぎ  $10^{-3} g_0$  が働いている場合について、重力加速度揺らぎの振動数が異なる場合についてシミュレーションを行った。0.5 Hz と 2 Hz および 10 Hz の場合について 150 秒、450 秒、1500 秒後についてその速度分布を求めた。その結果を図 12b に示す。加熱面と反対側で加速度を  $10^{-3} g_0$  として振動流の最大速度は 0.2 Hz で  $5 \cdot 10^{-4} \text{ cm/sec}$ 、2 Hz で  $1 \cdot 10^{-4} \text{ cm/sec}$  程度である。

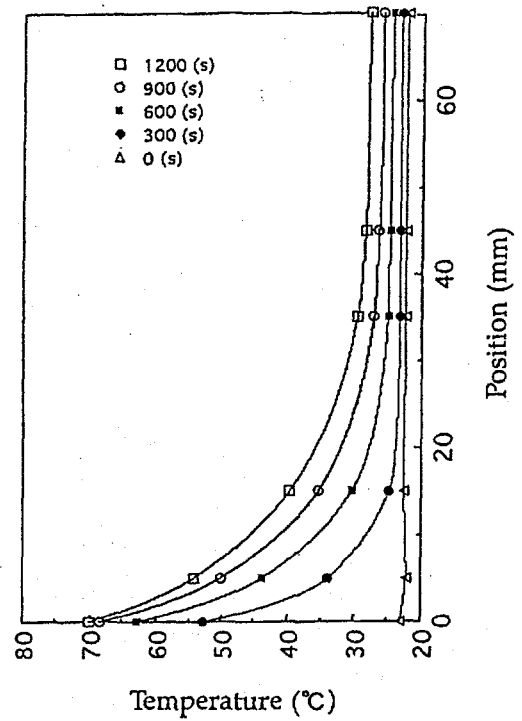


図 12a 実験セル内の温度分布変化

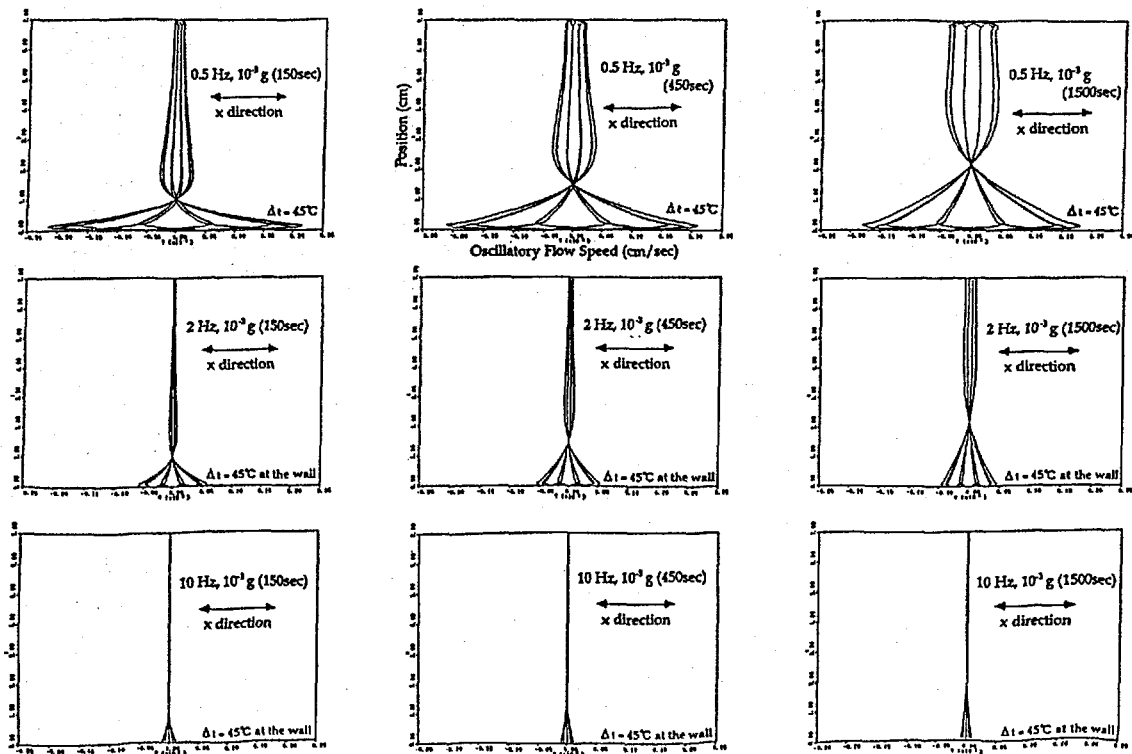


図 12b 温度分布がある場合の重力揺らぎによる振動流 (コンピュータ・シミュレーション)

## 結論

- 1) 拡散の増大が観測された。防振装置を用いたケース1では見かけの拡散係数  $D^*$  は  $D^* \approx 2D$ , 防振装置を作動させないケース2では  $D^* \approx 3D$ であった。ケース2の方が測定された重力揺らぎは大きく、見かけの拡散  $D^*$  の増大と対応している。
- 2) 液体内に僅かではあるが、なんらかの対流が発生していると考えられる。その原因は幾つか考えられるが、現時点で断定的なことは言えない。
- 3) 長時間(300 ~ 1200秒間、温度勾配による流体の振動が起こっている)でもケース2の方が拡散が速いことが観察された。

## 参考文献

- 1) アトキンス. 物理化学(第2版), 上下, 東京化学同人.
- 2) Walter, H. W. (Editor). *Fluid Sciences and Material Sciences in Space*, Springer-Verlag.
- 3) Otto, G. H. and Froberg, G. *Droplet Dissolution Kinetics in the Miscibility Gap of Ga-Hg: Comparison of Microgravity Results with a Computer Simulation*, ESA SP-256 (Feb. 1987).
- 4) 福中康博氏(京都大学)の助言および諸文献

## 外部発表

- 1) 東久雄, 吉原正一, 大西充. 重力揺らぎの対流、拡散への影響. 第9回宇宙ステーション講演会(Apr. 1993).
- 2) 吉原正一, 大西充, 東久雄, 川原弘靖, 土井隆雄. 重力変動下での流体の挙動—IML-2予備実験—. 日本マイクロ重力応用学会誌. 11, 212 (1994). (JASMAC-10 Abstract)
- 3) Doi, T., Prakash, A., Azuma, H., Yoshihara, S. and Kawahara, H. Oscillatory Convection Induced by G-jitter in a Horizontal Liquid Layer. *33rd Aerospace Sciences Meeting and Exhibit*, Reno, NV (Jan. 1995).
- 4) 東久雄, 大西充, 吉原正一, 土井隆雄, 大井田俊彦, 石川正道, 亀井信一. IML-2実験の予備検討結果. 第10回宇宙ステーション講演会(Apr. 1995).
- 5) Azuma, H., Ohnishi, M., Yoshihara, S., Doi, T., Ooida, T., Ishikawa, M. and Kamei, S. Preliminary Result from IML-2 Experiment on Influence of G-jitter on Diffusion. *Ninth European Symposium, Gravity Dependent Phenomena in Physical Sciences*, Berlin (May 1995).
- 6) 東久雄, 大西充, 吉原正一, 土井隆雄, 大井田俊彦, 石川正道, 亀井信一, 小俣美歌, 白石篤史. IML-2実験から観た宇宙実験環境. 第12回宇宙利用シンポジウムプロシーディング(1995). 223-226.
- 7) 東久雄, 大西充, 吉原正一, 土井隆雄, 大井田俊彦, 石川正道, 亀井信一. 重力揺らぎの拡散への影響. 日本マイクロ重力応用学会第11回学術講演会(Nov. 1995).
- 8) Azuma, H., Ohnishi, M., Yoshihara, S., Doi, T., Ooida, T., Ishikawa, M. and Kamei, S. Influence of g-jitter on Diffusion-Experimental Result from IML-2. *20th ISTS*, Gifu (May 1996). (予定)



## 微小重力下での熱駆動流の研究 (CAPILLARY)

代表研究者： 古川正夫\*<sup>1</sup>

共同研究者： 二俣亮介\*<sup>1</sup>、大井田俊彦\*<sup>2</sup>、宮崎芳郎\*<sup>3</sup>、山崎 力\*<sup>3</sup>

\*<sup>1</sup> 宇宙開発事業団 システム技術研究部、\*<sup>2</sup> 宇宙開発事業団 宇宙実験グループ、\*<sup>3</sup> (株)東芝

Details of thermally driven flow experiments, performed last July as a mission of IML-2 (Second International Microgravity Laboratory), are reported mainly from an engineering viewpoint. Described in this connection is a thermal accumulator model, named TDFU (Thermally Driven Flow Unit); which was designed and fabricated for the experiments. A way of liquid transfer in TDFU is depicted in the figure for comprehension of operational principles. Hardware design specifications, the process of experiments, and imposed vibrational conditions are stated and then are summarized in the tables. Photographs including some critical scenes are presented to demonstrate that liquid/vapor phase separation, liquid positioning, and liquid transfer were satisfactorily done in TDFU aboard space shuttle. Experimental results show that the observed liquid travel distance was such as theoretically estimated and that the measured vessel temperatures were similar to predicted ones. A conclusion of technical importance is thus drawn that thermally driven flows are instrumental in fluid management under microgravities. Also presented are numerical results of simulation analyses of fluid behaviors in a TDFU vessel in preflight experiments aboard the airplane.

### 実験の目的、意義

熱駆動流とは、濡れ面/液膜の加熱/冷却によって生じた蒸発/凝縮蒸気流のことで、容器内で気液が分離された(液面が存在する)状態では、この蒸気流に起因する圧力増減によって液面を変化させることができる。このような原理/機能は、熱管理、環境制御、エネルギー供給、化学工業等のシステムにおいて有用で、小型軽量のアキュムレータ、可動部のない流熱制御機器(サーマル・ポンプ、サーマル・ダイオード等)の開発がこれにより可能となる。さて、将来宇宙機用熱管理システムとしては、重量軽減/電力低減の観点から、単相流体ループ(顕熱利用、従来技術)ではなく二相流体ループ(潜熱利用、新規技術)が採用される見込みである。この場合、アキュムレータは、単なるサプライ・リザーバではなく調圧器(設定温度に対応した飽和蒸気圧となるようにループ圧損も補償して印加圧力を制御する)として動作させるので、システム上のクリティカル要素となる。そしてどのような方式を採用するにしても、調圧機能は液高を変化させることに基づいている。作動方法には機械式(開発済)と熱式(開発中)とがあるが、重量/容積/信頼性の点で、宇宙用アキュムレータとしては熱式の方が優れている。IML-2で実験した熱駆動流実験ユニット(TDFU)は、二相流体ループ用熱式アキュムレータの原理モデルで、その実験目的は、微小重力下での気液分離/液保持および発生熱駆動流による液面の上下移動を観測・確認し、熱式アキュムレータの成立性を実証することにある。

## 実験の方法と装置

図1は、TDFUの動作概念図であり、加熱側ベッセルから冷却側ベッセルに液が蒸気圧差(熱駆動)により移動する様子を示している。図2はTDFUの断面図である。各ベッセルはヴェイバ・スペースとティバード・コア(4つのコアより構成)とからなり、両ベッセルは連結されており、約10 cm<sup>3</sup>の蒸留水が作動流体として封入されている。加熱/冷却用ペルチエ素子は、図2に示されているようにヴェイバ・スペースの背面に取付けられている。TDFUは、ハードウェアとしては二つのパッケージより構成されており、図3に示したような外観を有する。

表1は、TDFUの主要仕様をまとめたものであり、大きさ、重量、加熱/冷却能力、ヴェイバ・スペース容積、最大液充填量、ティバード・コア・ファクタが記載されている。TDFUの供試体部分の大きさは、幅140 mm、高さ92 mm、奥行28 mmである。最も重要な設計パラメータは、 $\theta/W^2$ で定義されたティバード・コア・ファクタである。ここで $\theta$ はティバード角(rad)、 $W$ はコア幅(mm)であり、液保持上/液移動上妥当な $\theta/W^2$ 値の範囲が表1に示されている。最適なコア形状は、試作した5種類の $\theta/W^2$ 値の異なるコアに対して航空機上で気液分離/液保持実験を行い、その結果が最良なるものをベースとして決定した。

## 飛行実験の結果

熱駆動流に及ぼす振動の影響を調べるため、TDFU全体をVIBES内に設置して実験を実施した。図4は、IML-2における熱駆動流実験のコンフィギュレーションであり、制振状態では3 Hz以上の高周波振動が遮断される。

本実験で最初に得られたリアル・タイム・ビデオ画像は、全液がベッセル2に

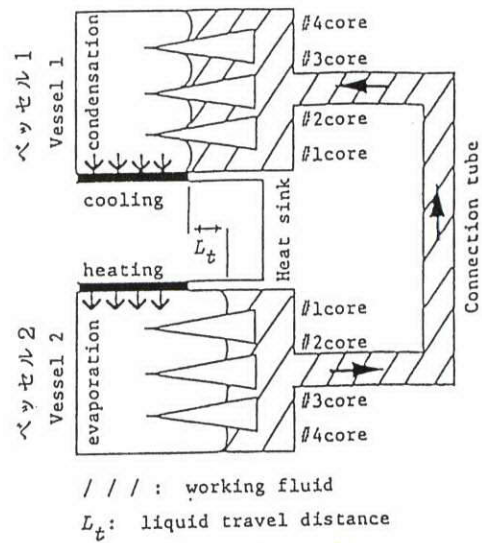


図1 TDFUの動作概念

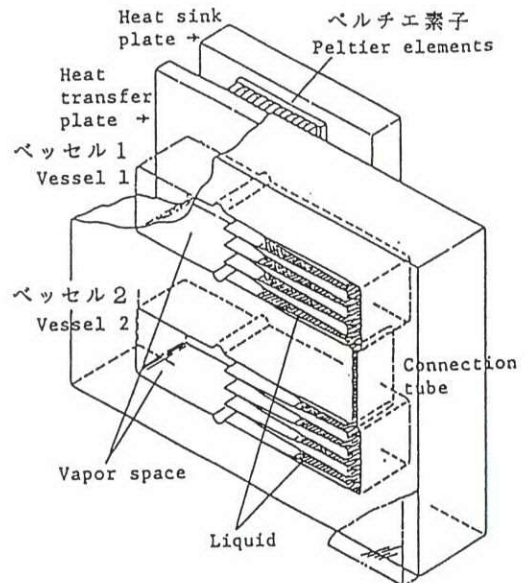


図2 TDFUの断面

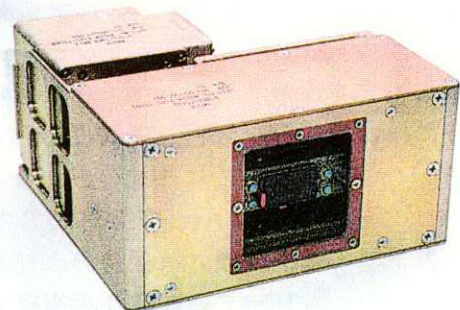


図3 TDFUの外観

集まっていてベッセル 1 には液がないというシーンであった。そのため、ベッセル 2 をまず加熱することにした。実験はケース 1、2 を MET 3 に、そしてケース 3 を MET 11 に実施した。ケース 1 では、非制振状態で 10 分間ベッセル 2 を加熱(ベッセル 1 を冷却)した。ケース 2 では、制振状態で 11 分間ベッセル 2 を加熱(ベッセル 1 を冷却)し、引き続き 7 分間ベッセル 1 を加熱(ベッセル 2 を冷却)した。ケース 3 では、非制振状態でケース 2 と同様なモードの加熱/冷却を 20 分間、10 分間行った。表 2 は実験実施のサマリである。

ケース 1~3 のいずれの実験においても、概要にすでに記したように、

表 1 TDFU の主要設計仕様

大きさ：主パッケージが 200mm×100mm×85mm 供試体が 140mm×92mm×28mm
重量：主パッケージが 2.0kg
ペルチェ素子：加熱 3.85W, 冷却 1.28W
蒸気空間：24cm <sup>3</sup>
最大封入液量：20cm <sup>3</sup>
ティバード・コア・ファクタ：0.0011rad/mm <sup>2</sup> ~0.014rad/mm <sup>2</sup>

表 2 実験結果のサマリ

	ケース 1	ケース 2	ケース 3
日	MET 3	MET 3	MET 11
時	15:29	17:07	23:15
制振	オフ	オン	オフ
ラン 1	2 加熱 / 1 冷却 10 分間	2 加熱 / 1 冷却 11 分間	2 加熱 / 1 冷却 20 分間
ラン 2	— —	1 加熱 / 2 冷却 7 分間	1 加熱 / 2 冷却 10 分間
バッテリー	0.31A·h	0.96A·h	0.82A·h

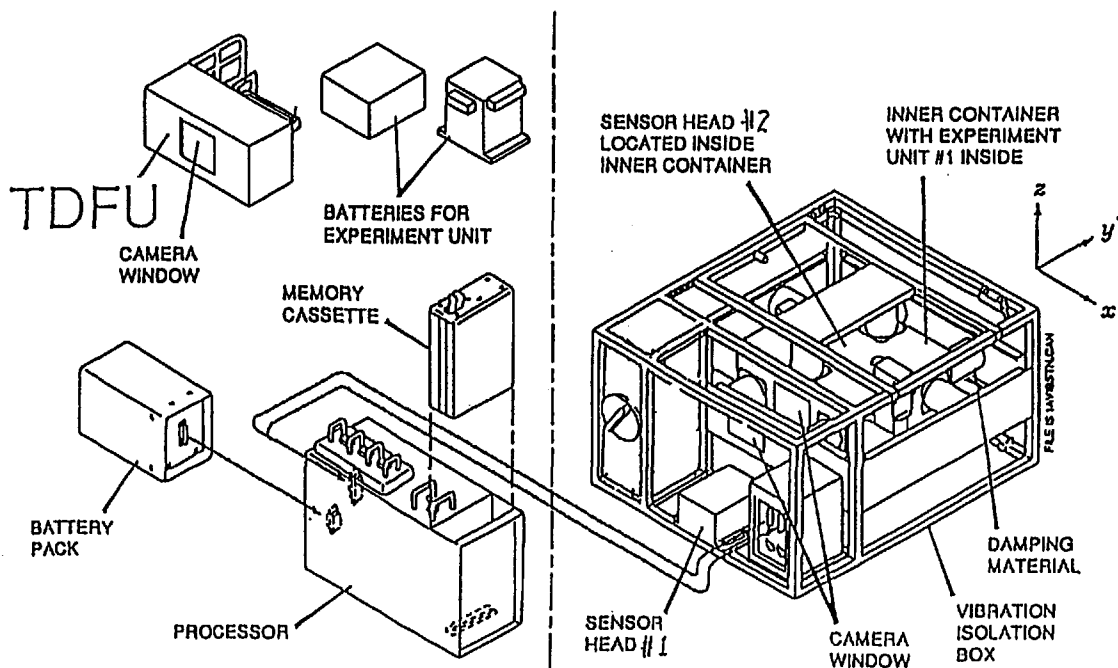


図 4 熱駆動流実験のコンフィギュレーション

(1) 気液分離、(2) コア内液保持、(3) 加熱側ベッセルから冷却側ベッセルの液移動の3機能の視覚確認ができた。図5は、ケース1で得られたリアル・タイム・ビデオ画像で、熱駆動によるベッセル間液移動の実証例である。図5に示されているように、ケース1ではベッセル1の第1コア(最内側)には液が到達しなかった。これはコア最狭部と連結間との間にバブルがトラップされたためであり、この状況はケース2でも同様であった。このバブルはケース3の実験で放逐され、最終的に各ベッセル内の液高はほぼ等しくなった。

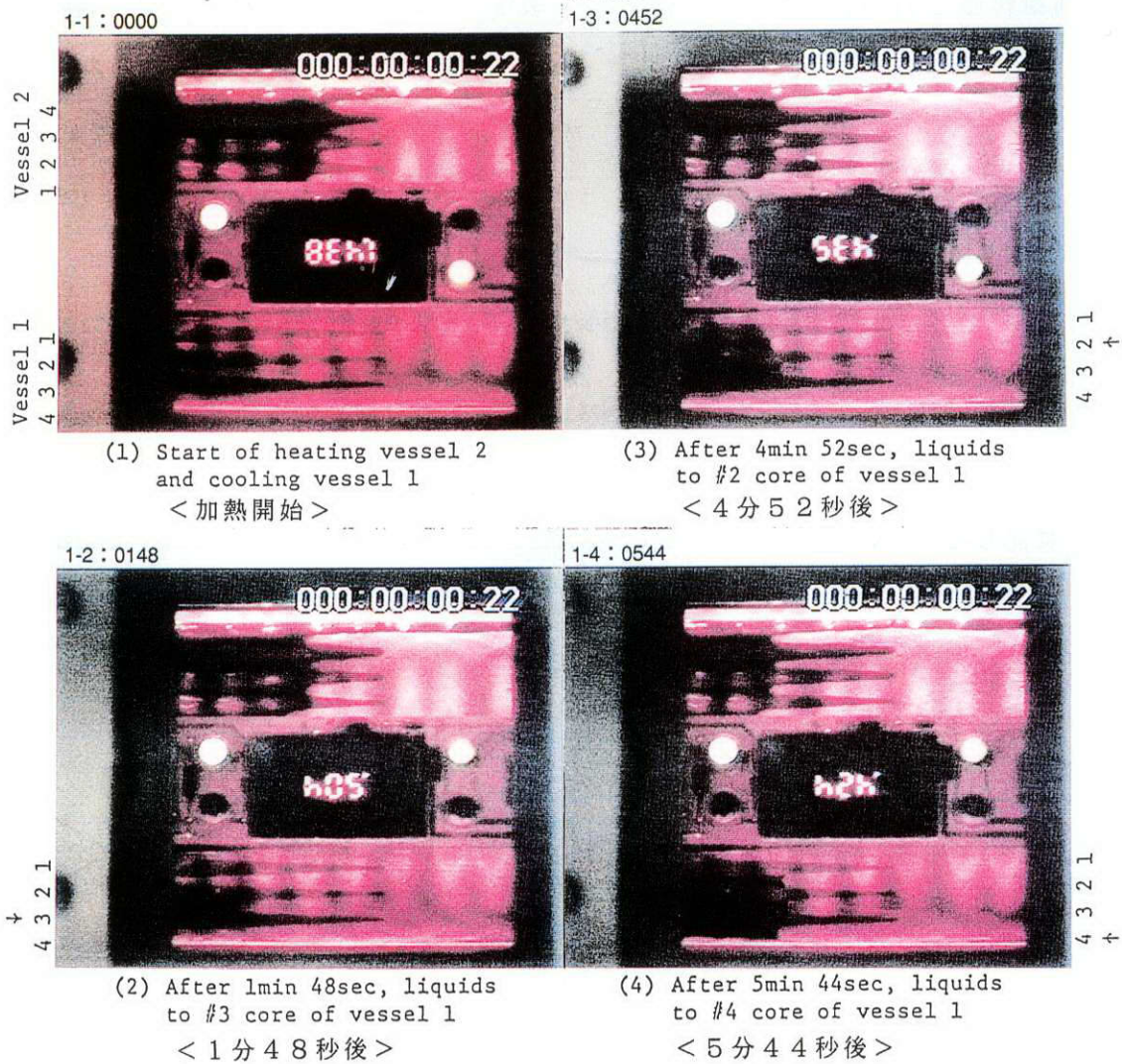


図5 ケース1の熱駆動流実験におけるビデオ画像

液移動距離  $L$  は、ダルトンの分圧の法則と液量保存の関係とから算定できる。この算定値に及ぼす影響が最大の因子は、侵入ガス量  $P_g$  であり、その量は液充填からの経過日数  $t_e$  に依存する。図 6 は  $t_e$  に対して  $P_g$  を、 $P_g$  に対して  $L$  をプロットしたものである。図中の曲線 #1、2 は  $L$  対  $P_g$  の、曲線 #3、4 は  $P_g$  対  $t_e$  の関係を表している。パラメータは、曲線 #1、2 では液充填量、曲線 #3、4 ではガス侵入に対する補修の有無である。本実験では  $t_e$  は 60 日であるので、図 6 の曲線 #3、4 から  $P_g$  は 40 torr ~ 110 torr と見積もられる。 $P_g$  を 70 torr として曲線 #1、2 から  $L$  を見積ると、 $L$  は約 30 mm となる。この値は、ケース 1 ~ 3 の実験で観測した液移動量とほぼ一致する。

図 7a ~ c は、ケース 1 ~ 3 の実験におけるベッセル温度の実測値(実線)と予測値(点線)とをプロットしたものである。予測温度は、節点数 30 の熱数学モデルをもとに計算した値であり、実測温度と類似の変化をしている。このことは TDFU が熱的に正常に動作したことを示している。表 3 は本実験中の振動環境のサマリであり、実験は  $10^{-4}g$  のレベルで実施されたことを示している。バッテリー容量については、初期充電量が 2.69 A·hr、全放電量が 2.09 A·hr で、残りが 0.60 A·hr であった。以上により、原理面だけでなく、熱/機械/電気設計の点からも熱式調圧器の成立性が実証された。

## 解析と考察

### 概要

IML-2 で実施する熱駆動流装置(TDFU)の軌道上実証実験の運用手順等に反映するため、微小重力環境での TDFU 内部の液分布・自由表面形状に関する知見を得ることを目的とし、非圧縮流れ解析用のコンピュータ・コードを使用して、流体挙動シミュレーション解析を実施した。特に、今回は軌道上実験の成功に不可欠なコア部の液体保持能力に主眼を置いて解析を行った。

今回のシミュレーション結果により、微小重力環境では表面張力の影響のみならず、壁面固着力に相当する力の影響も付加するなどの新たな解析手法が必要であることが解った。

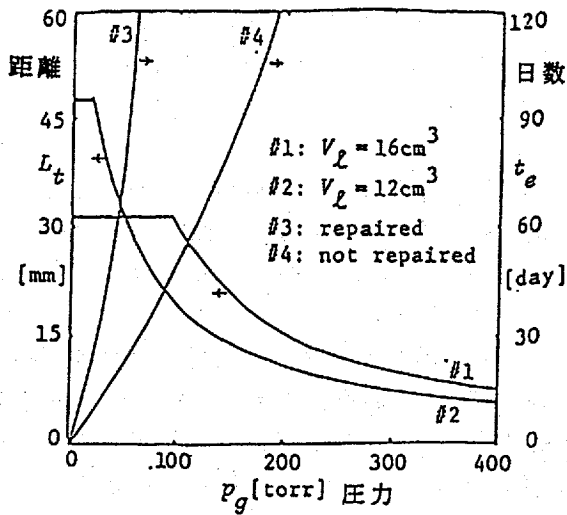
本解析では、壁面固着力をモデル化することで、微小重力環境での液体挙動の現象をある程度は説明することができたが、その壁面固着力の定量化については検討が必要である。

### 解析対象

平成 2 年度に航空機による TDFU のコア部での液体捕捉能力の評価試験を実施した。

このときの試験方法は、まず、 $1g$  環境で供試体コア部分を逆重力方向に向けて設置し、液体を無コア部分に集めておく。その後、パラボリックフライトを行い、微小重力環境に移行させる。そして、微小重力環境やその前後における流体挙動をビデオで録画し、コア部での液体捕捉状況を評価した。この試験において、微小重力環境へ移行と同時に液体がコア部へ移動し始め、数秒の後に、液体の大部分がコア部に集められる現象が確認されている。

今回は、この現象(コア部の液体捕捉能力)に着目し、微小重力環境でのコア部の液体捕捉状況(航空機微小重力実験におけるビデオ映像)の数値シミュレーションを試みた。



$L_t$ : liquid travel distance  
 $t_e$ : time elapsed since liquid charge  
 $p_g$ : soaked noncondensable gas inventory  
 $V_L$ : charged liquid inventory

図6 予備液移動距離

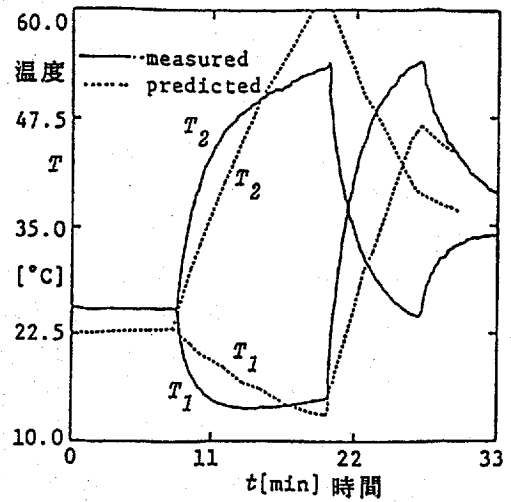


図7b ケース2におけるベッセル温度

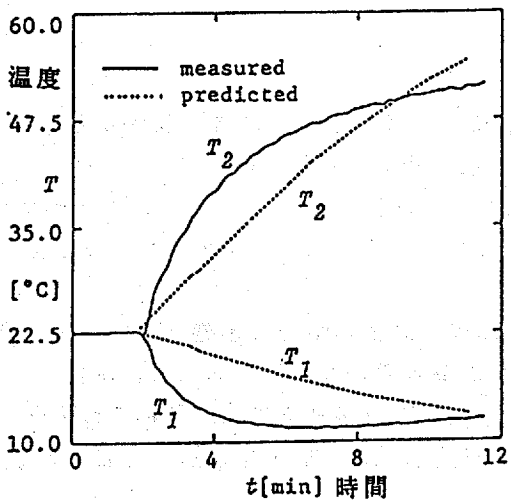


図7a ケース1におけるベッセル温度

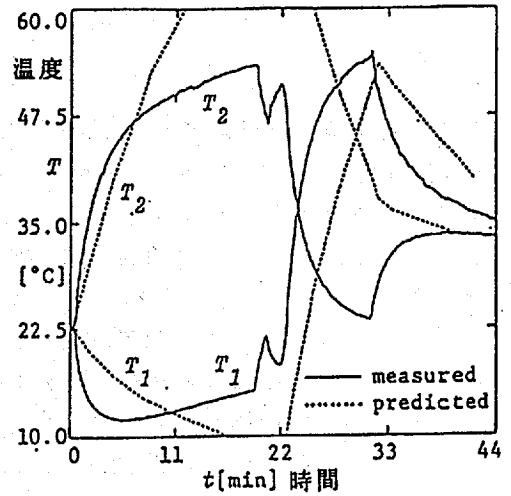


図7c ケース3におけるベッセル温度

表3 振動環境のサマリ

	x-axis	y-axis	z-axis
Case 1: sensor 1	±5.43	±6.48	±3.47
sensor 2	±10.2	±10.4	±4.08
Case 2: sensor 1	±3.93	±5.44	±3.27
sensor 2	±4.32	±5.21	±4.69

x-, y-, z-axis: along the width, the depth, the height

expressed in  $10^{-4}g$

## 流体挙動解析コード

本プログラムは、VOF法 (Volume-of-fluid : 流体の体積率) を用いた自由表面を持つ2次元非圧縮流れを解析するプログラムである。以下に基礎方程式を示す。

### 質量保存式

$$\frac{\delta \rho}{\delta t} + \frac{\delta u}{\delta x} + \frac{\delta v}{\delta y} = 0 \quad (1)$$

### 運動量保存式

$$\frac{\delta u}{\delta t} + u \frac{\delta u}{\delta x} + v \frac{\delta u}{\delta y} = -\frac{1}{\rho} \frac{\delta p}{\delta x} + \nu \frac{\delta^2 u}{\delta x^2} + \frac{\delta^2 u}{\delta y^2} + f_x \quad (2)$$

$$\frac{\delta v}{\delta t} + u \frac{\delta v}{\delta x} + v \frac{\delta v}{\delta y} = -\frac{1}{\rho} \frac{\delta p}{\delta y} + \nu \frac{\delta^2 v}{\delta x^2} + \frac{\delta^2 v}{\delta y^2} + g + f_y \quad (3)$$

### 体積率の移流方程式

$$\frac{\delta F}{\delta t} + u \frac{\delta F}{\delta x} + v \frac{\delta F}{\delta y} = 0 \quad (4)$$

ここで、変数の意味は以下のとおりである。

- u : x 方向流速 (m/s)
- v : y 方向流速 (m/s)
- p : 圧力 (N/m<sup>2</sup>)
- ρ : 密度 (kg/m<sup>3</sup>)
- ν : 動粘性係数 (m<sup>2</sup>/s)
- g : 重力加速度 (m/s<sup>2</sup>)
- f<sub>x</sub> : x 方向外力による加速度 (m/s<sup>2</sup>)
- f<sub>y</sub> : y 方向外力による加速度 (m/s<sup>2</sup>)
- F : 流体体積率 (m/s<sup>2</sup>)

なお、流体体積率 F は 0 と 1 の間の値をとり、F = 1 の時セルは液体で満たされており、F = 0 の時は液体が存在しない気体セルとみなす。それら以外の時は表面セルである。

また、本プログラムは斜めの境界を取り扱う FAVOR法 (Fractional Area / Volume Obstacle Representation) が組み込まれている。図 8 の流体占有率 θ<sub>f</sub> と流体通過率 A<sub>x</sub>、A<sub>y</sub> を用いて、例えば質量保存式 (1) を書き直すと

$$\frac{\delta (\theta_f p)}{\delta t} + \frac{\delta (A_x u)}{\delta x} + \frac{\delta (A_y v)}{\delta y} = 0 \quad (5)$$

となる。他の保存式も同様である。

式(1)あるいは式(5)に現れる左辺第一項すなわち密度の時間微分項は非圧縮とする時は0となって不必要となるが、以下のように簡単な修正で圧縮性の効果を組み込むことができる。

$$\begin{aligned} \frac{\delta p}{\delta t} &= \frac{\delta p}{\delta p} \cdot \frac{\delta p}{\delta t} \\ &= \frac{1}{\rho C^2} \cdot \frac{\delta p}{\delta t} \quad (6) \end{aligned}$$

ここでCは音速である。非圧縮では圧力波は無限大の速度で伝わるが、上式のような修正(限定圧縮性)により圧力波が音速で伝わることを疑似的に表すことができる。この改良により、計算速度が飛躍的に向上し、結果も非圧縮による計算結果と変わらないことを確認した。

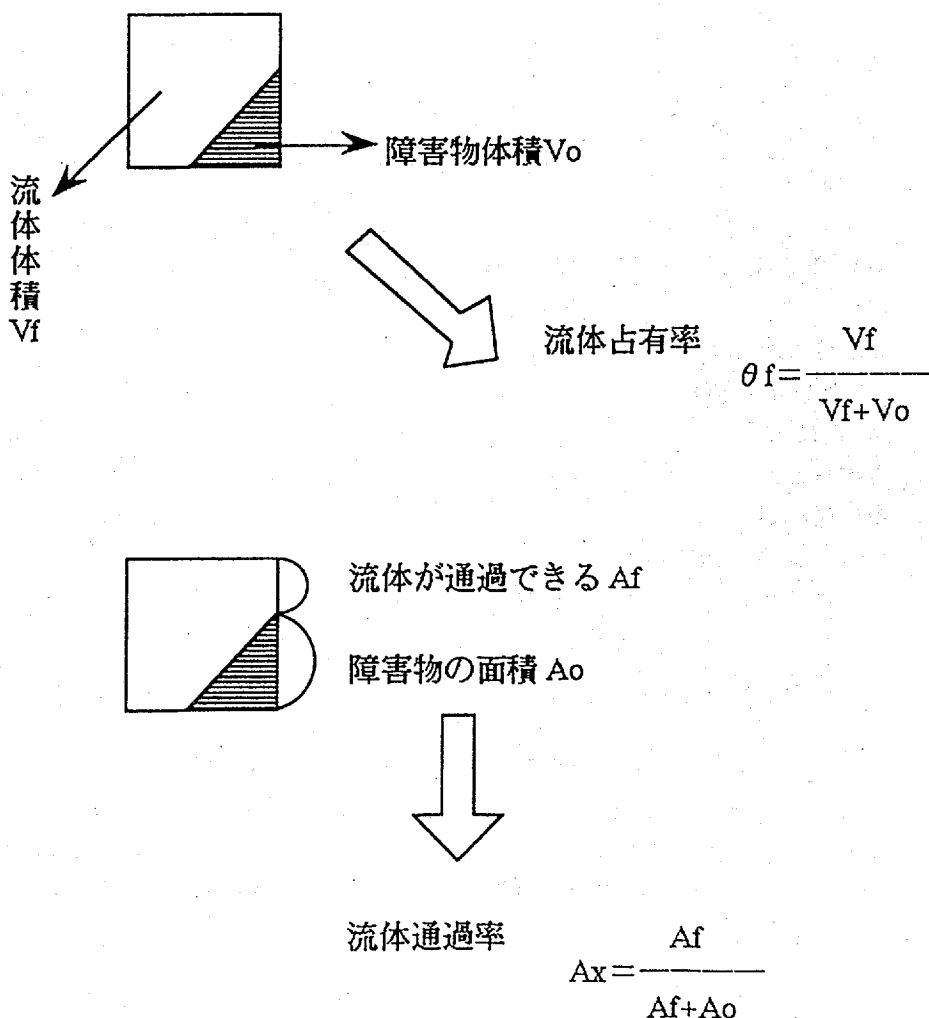


図8 流体占有率と流体通過率



## 物理モデル

微小重力環境での流体挙動については以下の物理モデルが重要であることが予想される。

- ・表面張力
- ・接触角
- ・毛細管現象
- ・壁面固着力

以下に、これらのモデル化について、コードでの取り扱いを中心に述べる。

### 1) 表面張力

図9に示すように、実際の水面の形状は階段状として模擬することになる。ここで、左側の図にあるベクトルが表面張力による力である。図中のベクトルのx軸とのなす角を $\beta_E \beta_W$ とした時、WとEではさまれた液体部分にかかる表面張力による力を圧力(すなわち鉛直方向)に換算すると、

$$\Delta P = -\sigma(\sin \beta_E - \sin \beta_W) / \Delta x \quad (7)$$

となる。ここで $\sigma$ は表面張力を表わし、本解析では一貫して72.0 dyn/cmを使用した。

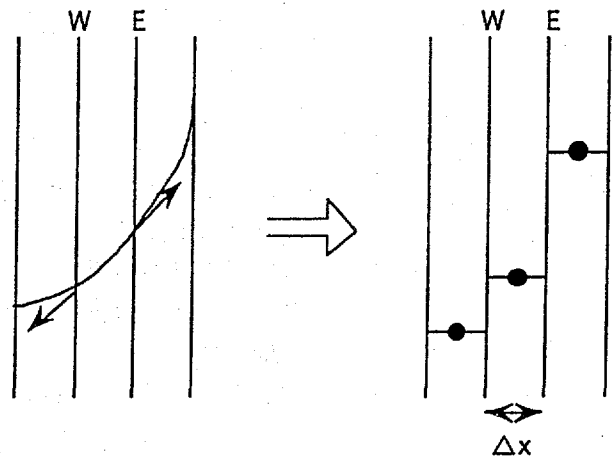


図9 表面張力の取り扱い

### 2) 接触角

接触角は、図10の固体と液体の接触面から液体と気体の接触面への角度で、これを $\theta$ とした。コード上は接触角は表面形状の境界条件として用いている。すなわち、例えば図9のE側が固体と接触している時、式(7)の $\sin \beta_E$ を $\cos \theta$ に置き換える。

接触角は図11のような力のつり合いにより決定されるので、重力加速度が変化すれば当然変化するが、本解析では固定した値(10度)を用いた。前述したように、コード内では $\sin \beta_E$ を $\cos \theta$ として用いているので、 $\cos 10^\circ$ から $\cos 0^\circ$ の変動は2%以下であり影響が少ないと判断した。

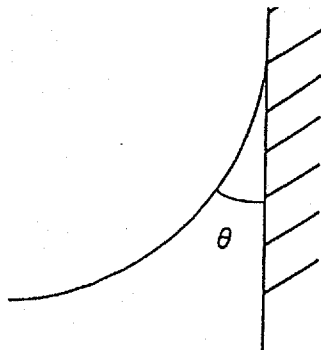


図10 接触角

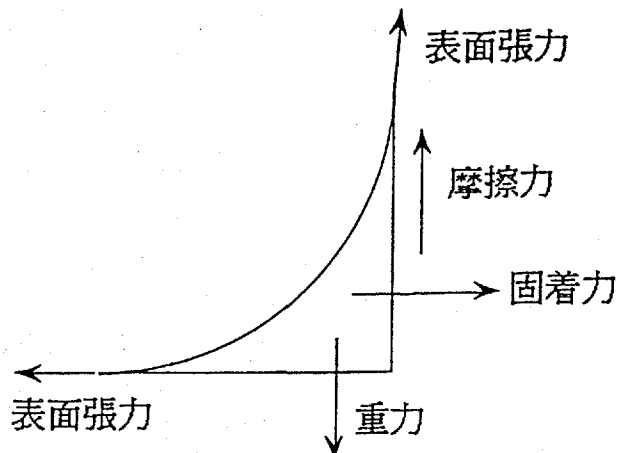


図11 接触角を決める力の釣合

### 3) 毛細管現象

図 12 の上昇する高さを  $h$  として鉛直方向の力のつり合いを考えると

$$\sigma \cdot 2\pi R \cdot \cos \theta = \rho g h \cdot \pi R^2 \quad (8)$$

となる。左辺が表面張力による力の鉛直成分、右辺が上昇分の液体の質量である。この式から分かるように、重力加速度が小さくなっていくと管内部の液体は加速度を持った上昇流となる。コード内では表面張力と接触角が考慮されているので、毛細管現象は特にモデル化していない。

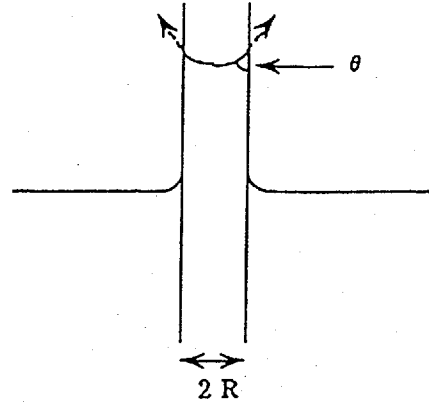


図 12 毛細管現象

### 4) 壁面固着力

ここでは、流体表面分子と固体表面分子との凝集力に着目し、それを『壁面固着力』としてモデル化した。

表面張力は、流体表面での流体分子間の凝集力によるもので、微小重力環境になると顕著に影響が現れてくる。よって、微小重力環境では、この壁面固着力も表面張力と同様に、具現化されてくるものであると仮定した。

今回の解析では、表面形状の壁側の境界条件として接触角を用いているので、壁面固着力は陰にモデル化されていることになる。しかしながら、図 9 および式 (7) に示したように表面張力はコード内で圧力に換算して用いているため、表面形状の認識によっては壁面固着力の向きや大きさが曖昧になってしまう。例えば、図 13 の右側の認識では境界とはみなされず固着力そのものが考慮されないし、左側の認識では壁に平行な成分のみとなってしまう。従って、これらを補正するために次式で壁面固着力を定義した。

$$F_x = -C (\delta \theta f / \delta x) \quad (9)$$

$$F_y = -C (\delta \theta f / \delta y) \quad (10)$$

ただし、 $F_x$ 、 $F_y$  は  $x$  方向、 $y$  方向の壁面固着力、 $\theta$  は流体占有率、 $C$  は比例定数である。

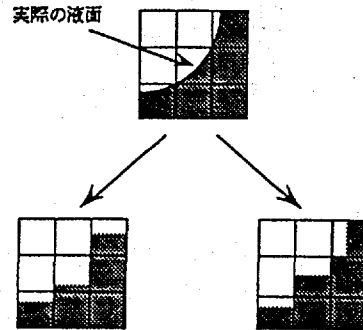


図 13 液面形状の取り扱い

## 解析結果

表面張力や壁面固着力の感度解析を目的として、まず単純な体系による解析を行い、次に、その結果を実際の TDFU の形状に適用して解析を行った。

### 1) 単純な体系による解析結果

以下の 3 種類の解析を実施した。

ケース A …… 壁面固着力を  $\theta$  とした表面張力のみによる解析

ケース B …… 障害物のない体系での壁面固着力のパラメーター解析

ケース C …… 壁面固着力を固定して障害物を変えた解析

全解析に共通する条件は



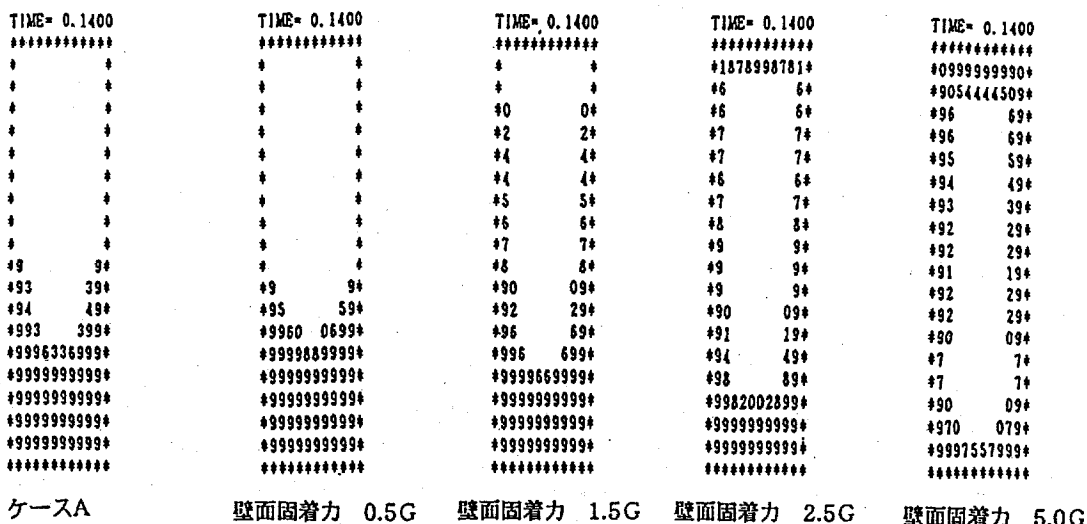


図 16 ケース A と ケース B の 比較

次に、ケース B の結果を図 16 に示す。この図は、ケース A(表面張力のみ)の 0.14 秒後の結果と壁面固着力を重力換算で 0.5 g、1.5 g、2.5 g、5.0 g と変えていった結果とをまとめたものである。

図 16 によると、壁面固着力を強くしていくと、その力の向きが流れと垂直な方向であるにもかかわらず、液の上昇量は増えていることが分かる。特に壁面固着力を 5.0 g としたケースは現象をよく説明している。5.0 g という値自体は不自然であるが、この原因として単位系の問題が考えられる。すなわち、もともと本コードは MKS 単位系で作られているが、本解析で使用した単位系は CGS 系で、さらに長さの単位には mm を使用している。従って、重力加速度は  $9.8 \times 10^3$  という大きな値であり、この値が急激に (0.01 秒間) 0 になるわけである。初期の圧力分布も当然この重力加速度をもとに決められており、流体を駆動させるためにはこの圧力に打ち勝つだけの大きな値が必要となる。本解析のような小さな体系で速い現象を取り扱う場合は何らかの無次元化が必要となるが、今回の解析では物理現象自体に未知な部分が多いこともあり、定量的な解析は困難である。よって、以降の解析では、定性的な解析にとどめることとし、壁面固着力の値も現象が顕著に把握できる値として、便宜的に 5.0 g を使用することとした。

最後に、ケース C の結果を図 17 ~ 図 18 に示す。図 17 は障害物が初期液面よりも上の部分にあり、図 18 は障害物の部分に初期液面を設定した場合である。いずれの場合も障害物のまわりに流体が集まっており、定性的ではあるが、TDFU のコア部が液の保持能力を持つと判断できる。

## 2) 実際形状での解析結果

前節で得られた知見をもとに、実際の TDFU の形状で解析を実施した。解析ケースは縦置きと横置きの 2 ケースである。シミュレーション時間は縦置きが 0.15 秒、横置きが 0.1 秒、初期水面位置は縦置きの場合は 25 mm、横置きの場合は 5 mm である。また、縦置きと横置きのメッシュ図をそれぞれ図 19 と図 21 に示す。メッシュ(縦置き)は、高さ方向はメッシュ幅 1 mm の等分割、横方向は 0.7 mm と 0.8 mm の組合せとなっている。

図 20 に縦置きケースのシミュレーション結果(0.15 秒後)を、図 22 に横置きケースのシ



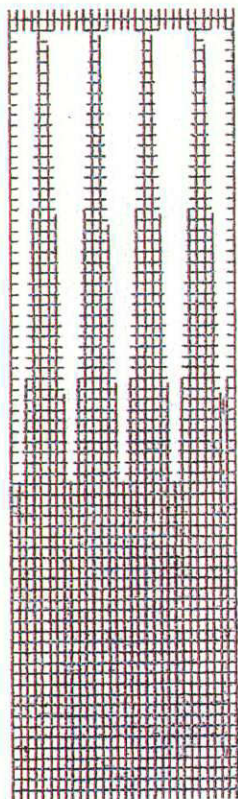


図 19 メッシュ図(縦置き)

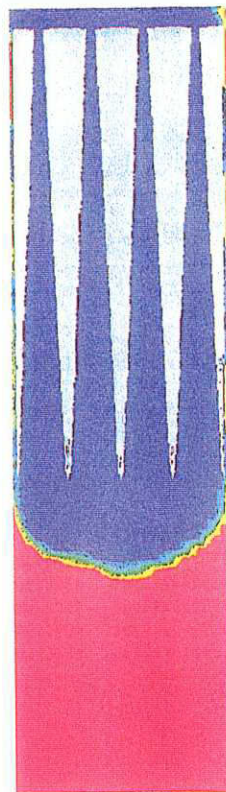


図 20 解析結果(縦置き : 0.15 秒後)

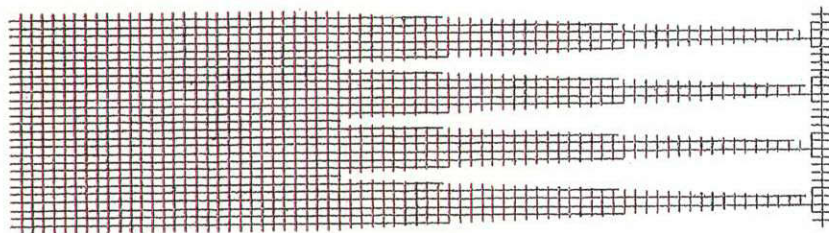


図 21 メッシュ図(横置き)

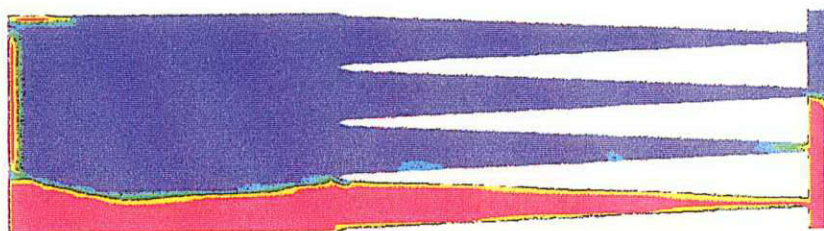


図 22 解析結果(横置き : 0.10 秒後)

ミュレーション結果(0.1秒後)をそれぞれ示す。これらの結果から流体がコア部に集まっていって傾向があることは分かるものの、これらは航空機実験のビデオを再現しているとは言い難い。この原因の一つとして、単純な体系と比較してメッシュが多くなったため、壁面固着力の影響を及ぼす範囲の全体に対する割合が小さくなったことがある。(壁面固着力は壁に接したセルのみに働く)従って、壁近傍の流体は上昇するための駆動力を直ちに得るが、壁から離れた流体は駆動力を得るのに時間を要する。(粘性による拡散のスピード)しかも、前述したように単位系の問題があり、初期圧力に打ち勝つための駆動力は数値的に大きな値が必要である。

参考として、壁から離れた流体に壁からの距離に反比例するような駆動力を与えて解析した例を図 23(縦置き)と図 24(横置き)に示す。これらの解析結果が示すように、現状の解析手法では、何らかの駆動力を強制的に付加させないと、航空機微小重力実験で取得したビデオ映像のような現象は再現できない。

## 結論

IML-2では、打上げ後3日目にケース1および2の実験が、11日目にケース3の実験が実施された。いずれのケースにおいても制振の有無にかかわらず、熱式調圧器として必要な(1)気液分離、(2)コア内液保持、(3)ベッセル間液移動の基本3機能が実証された。液移動距離の目測値は約30mmで、この値は予測値とほぼ一致した。また、ベッセル壁温の計測値も予測値とトレンドにおいて大略一致した。なお、ケース1および2において、ベッセル1の第1コア(最内側)に捕捉されていたバブルはケース3の実験開始後約20分で放逐され、ベッセルごと全コアの液高がほぼ均一になった。

ベッセル内液挙動の事前把握のために実施した液体挙動シミュレーション解析の結果、表面張力だけでは、航空機微小重力実験での流体挙動の説明はできないことが分かった。しかし、今回は、微小重力環境では『表面張力』と同様に無視できない(具現化する)力として、『壁面固着力』をモデル化することにより、TDFUのコア部が液保持能力を持つことを定性的に確認した。ただし、壁面固着力は壁に接した1セルのみに、壁に垂直な方向だけ与えている。これらの手法の妥当性および壁面固着力の定量化については検討を要する。また、液体がちぎれないための数値解法上の工夫及び無次元化も今後の課題である。

熱駆動流実験が上述のように所期の目的を達成して終了したので、二相流体ループ用熱式調圧器の成立性が微小重力下で実証されたと結論できる。

## 外部発表

- 1) Furukawa, M., Miyazaki, Y., and Yamazaki, T. Thermally Driven Flow Experiments Aboard Space Shuttle. *30th AIAA Thermophysics Conference*, San Diego, CA (June 19-22, 1995). AIAA 95-2069.

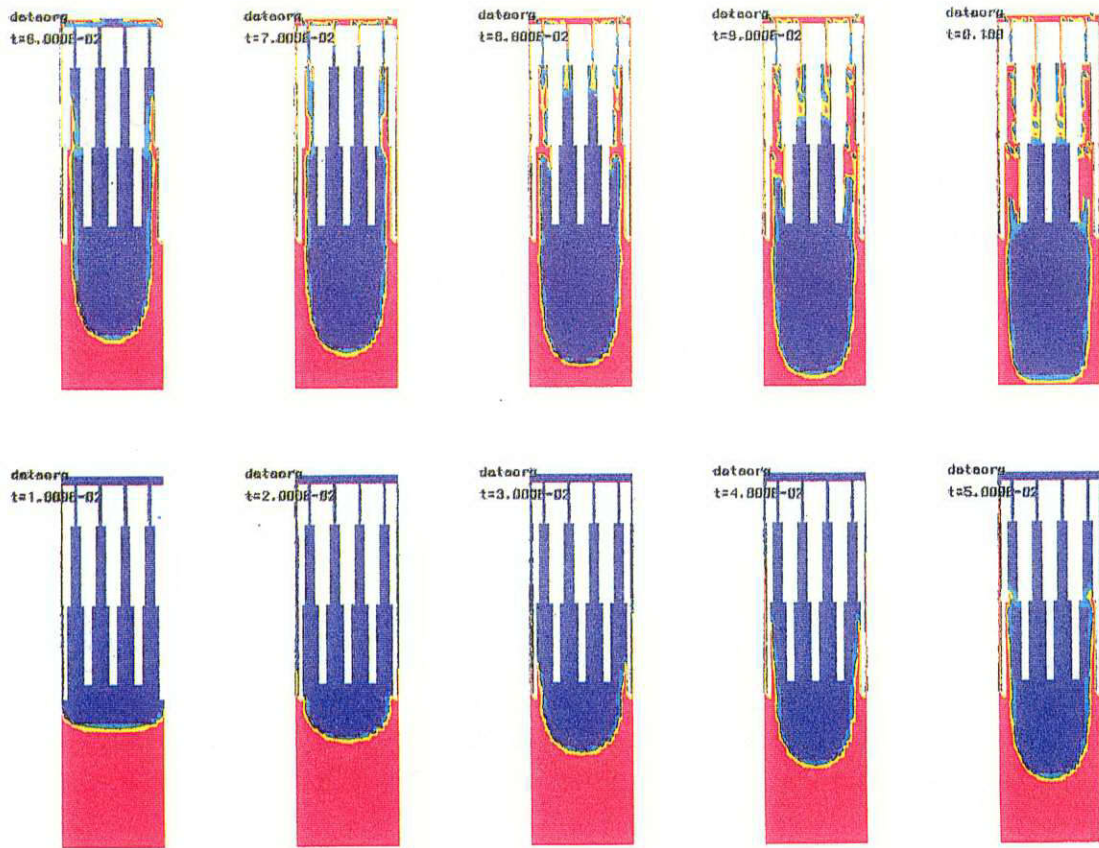


図4.5.10 駆動力を与えた流体挙動（縦置き）

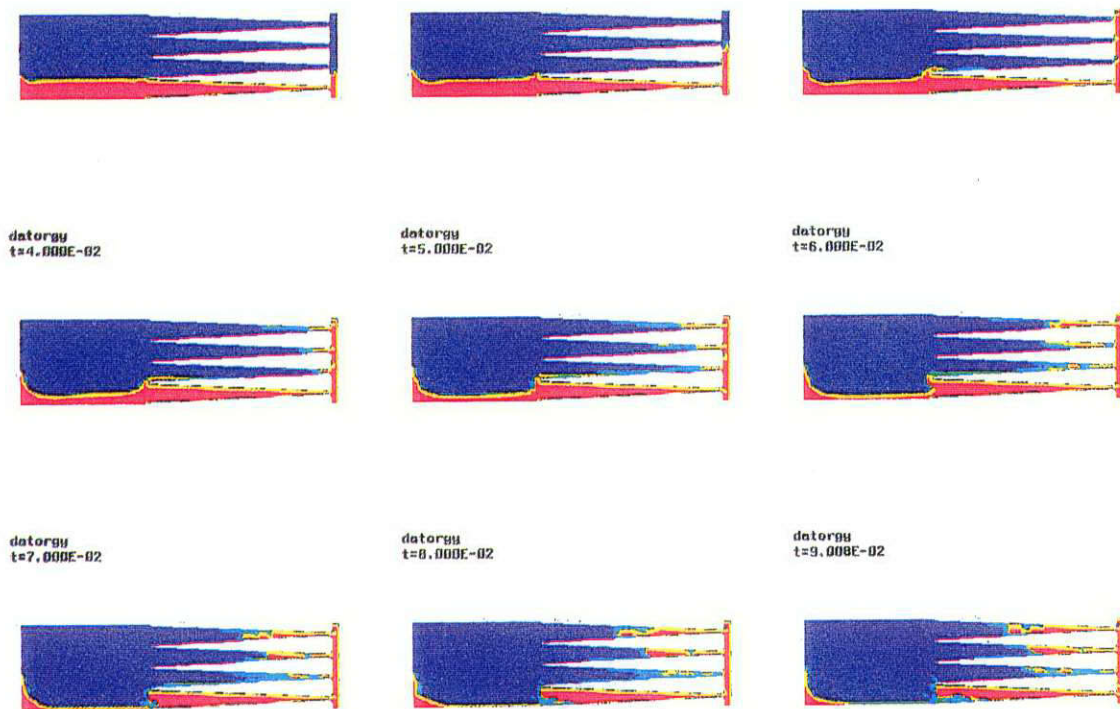


図4.5.11 駆動力を与えた流体挙動（横置き）



# 付録



## 付録 略語表

略語	英文	日本語訳
3DEP	Three Dimensional Electropherogram	3D エレクトロフェログラム
A/G	Air-to-Ground	空対地
AAEU	Aquatic Animal Experiment Unit	水棲生物飼育装置
ADP	Acceptance Data Package	受領データパッケージ
AFDU	AP/FP Driving Unit	アクアリウムパッケージ/ フィッシュパッケージ駆動用 GSE
AME	Acceleration Measurement Equipment	加速度計測装置
AOS	Acquisition of Signal	信号捕捉
AP	Aquarium Package	アクアリウムパッケージ
BBM	Bread Board Model	要素試作モデル
BM	Biological Microscop	生物顕微鏡
CCK	Cell Culture Kit	細胞培養キット
CDR	Critical Design Review	詳細設計審査
CDU	Convection Diffusion Unit	対流拡散実験ユニット
CELSS	Controlled Ecological Support Systems	閉鎖環境系/制御型生態系生命維持システム
CFU	Colony Forming Unit	コロニー形成単位
CI	Co-Investigator	共同研究者
CNES	Centre National d'Études Spatiales	フランス国立宇宙研究センター
CPS	Cadre PI Simulation	カードレ PI シミュレーション
CRIM	Commercial Refrigeration / Incubation Module	冷蔵庫
CS	Cadre Simulation	カードレシミュレーション
CSA	Canadian Space Agency	カナダ宇宙機関
CVA	Concurrent Verification Activity	シミュレータ事前確認作業
D/L	Downlink	ダウンリンク
DARA	Deutsche Agentur für Raumfahrtangelegenheiten GmbH	ドイツ宇宙機関
DFRC	Dryden Flight Research Center	ドライデン飛行研究センター
DIU	Data Interface Unit	データインターフェイスユニット
DLR	Deutsche Forschungsanstalt für Luft- und Raumfahrt	ドイツ航空宇宙研究所
DNA	Deoxyribonucleic Acid	デオキシリボ核酸
DR	Double Rack	(スペースラブの実験装置用の)ダブルラック
EDS	Energy Dispersed X-ray Spectrometry	エネルギー分散 X 線分光法
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic Acid	エチレンジアミン四酢酸
EGSE	Electrical Ground Support Equipment	電氣的地上支援装置
EL	Electroluminescent	電気蛍光発光
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay	酵素免疫測定法
EM	Engineering Model	エンジニアリングモデル
EMA	Experiment Monitoring Area	実験モニタリングエリア
EPDB	Experiment Power Distribution Box	実験用電力分配装置
EPMA	Electron Probe Microanalysis	電子プローブマイクロアナリシス
EPSP	Experiment Power Switching Panel	実験用電力切換えパネル
EQF	Effective Quality Factor	実効線質係数

略語	英文	日本語訳
ESA	European Space Agency	欧州宇宙機関
FAM	FFEU Absorption Monitor	FFEU 吸光度処理装置
FFE	Free Flow Electrophoresis	無担体電気泳動
FFEU	Free Flow Electrophoresis Unit	電気泳動装置
FMPT	First Material Processing Test	第一次材料実験
FO	Functional Objective	機能目的
FOR	Flight Operation Review	飛行運用審査
FP	Fish Package	フィッシュパッケージ
FRR	Flight Readiness Review	飛行準備完了審査
FRZ	Freezer	冷凍庫
FTA	Fault Tree Analysis	故障の木解析
GFRP	Glass Fiber Reinforced Plastic	ガラス繊維強化プラスチック
GHe	Gas Helium	ヘリウムガス
GMT	Greenwich Mean Time	グリニッジ平均時
GOR	Ground Operation Review	地上運用審査
GSE	Ground Support Equipment	地上支援設備
GSU	Gas Supply Unit	ガス供給装置
H/C	Handy Carrier	ハンディキャリア
H/W	Hardware	装置
hCG	Human chorionic gonadotropin	ヒト絨毛性性腺刺激ホルモン
HIP	Hot Isostatic Press	熱間等静圧圧縮成形
HPLC	High Performance Liquid Chromatography	高速液体クロマトグラフィー
HRDM	High Rate Demultiplexer	高レートデマルチプレクサー
HRM	High Rate Multiplexer	高レートマルチプレクサー
ICT	Integrated Compatibility Test	統合適合試験
IFM	In-Flight Maintenance	軌道上メンテナンス
IML	International Microgravity Laboratory	国際微小重力実験室
IPL	Integrated-Payload	総合ペイロード
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranoside	イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシド
IVT	Interface Verification Test	インターフェース検証試験
IWG	Investigators Working Group	代表研究者会議
JAERI	Japan Atomic Energy Research Institute	日本原子力研究所
JEM	Japan Experiment Module	宇宙ステーション取付型実験モジュール
JIS	Joint Integrated Simulation	ジョイントインテグレートッドシミュレーション
JSC	Lyndon B. Johnson Space Center	ジョンソン飛行センター
KSC	John F. Kennedy Space Center	ケネディ宇宙センター
LC-39	Launch Complex-39	39 番射場(KSC)
LED	Light-emitting Diode	発光ダイオード
LET	Liner Energy Transfer	線エネルギー付与
LIF	Large Isothermal Furnace	高温加圧型電気炉
LIF-MP	Large Isothermal Furnace - Material Processing Unit	高温加圧型電気炉本体

略語	英文	日本語訳
LIFCE-DIU	Large Isothermal Furnace Control Equipment - Data Interface Unit	高温加圧型電気炉制御装置 データインターフェイスユニット
LIFCE-EXP	Large Isothermal Furnace Control Equipment - Experiment Control Unit	高温加圧型電気炉制御装置実験部
LOS	Loss of Signal	信号消失
LRR	Launch Readiness Review	打ち上げ準備完了審査
LSFF	Life Science Support Facility	ライフサイエンス支援施設
M.T.	Melting Temperature	熔融温度
MCC	Mission Control Center	ミッションコントロールセンター
MD	Mission Elapsed Time Day	ミッション経過時間(日)
MET	Mission Elapsed Time	ミッション経過時間
MHI	Mitsubishi Heavy Industries, LTD.	三菱重工株式会社
ML	Middeck Locker	ミッドデッキロッカー
MPE	Mission Peculiar Equipment	ミッション特別装置
MS	Mission Specialist	ミッションスペシャリスト
MSFC	George C. Marshall Space Flight Center	マーシャル宇宙飛行センター
MSL-1	Material Science Lab 1	マテリアル・サイエンス・ラボ 1
MST	Mission Sequence Test	ミッションシーケンステスト
MTU	Master Time Unit	マスタータイムユニット
MVAK	Spacelab Module Vertical Access Kit	スペースラブモジュール パーティカルアクセスキット
N/A	Not Applicable	適用せず
NASA	National Aeronautics and Space Administration	米国航空宇宙局
NASDA	National Space Development Agency of Japan	宇宙開発事業団
NEC	NEC Co.	日本電気株式会社
NLS	NASDA-Life Science	NASDA ライフサイエンス系
O&C ビル	Operations & Checkout Building	整備点検棟
OD	Optical Density	光学密度
OHC	Over Head Container	オーバーヘッドコンテナ
OPF	Orbiter Processing Facility	オービター整備棟
ORB	Orbiter	オービター
PAO	Public Affairs Office	広報局
PC	Payload Commander	ペイロードコマンダー = 搭乗実験責任者
PCTC	Payload Crew Training Complex	ペイロードクルー訓練施設
PDB	Power Distribution Box	電力分配装置
PDR	Preliminary Design Review	基本設計審査
PET	Polyethylene terephthalate	ポリエチレンテレフタレート
PFLS	Portable Fish Life Support	ポータブルフィッシュライフサポート
PG	Prostaglandin	プロスタグランジン
PI	Principal Investigator	代表研究者
POCC	Payload Operation Control Center	ペイロード運用管制センター

略語	英文	日本語訳
PS	Payload Specialist	ペイロードスペシャリスト = 搭乗科学技術者
PSD	Position Sensitive Detector	位置検出器
QD	Quick Disconnect	着脱コネクタ
QF	Quality Factor	実効線質係数
QL	Quick Look	即時画像モニター
R.T.	Room Temperature	室温
RAU	Remote Acquisition Unit	遠隔データ取得装置
RAUI	Remote Acquisition Unit, Interface	遠隔データ取得装置インターフェース
REF	Refrigerator	冷蔵庫
RNA	Ribonucleic Acid	リボ核酸
RR	Replanning Request	リプランニングリクエスト
RR	Requirement Review	要求審査
RRMD	Realtime Radiation Monitoring Device	放射線モニター装置
RSC	Rack Stowage Container	ラックストウェージコンテナ
SAMS	Space Acceleration Measurement System	加速度計(NASA 装置)
SAR	Simulator Acceptance Review	シミュレータ受け入れ検査
SAS	Space Adaptation Syndrome	宇宙順応症候群
SEM	Scanning Electron Microscope	走査型電子顕微鏡
SL-J	Spacelab-Japan	スペースラブJ
SOD	Superoxide Dismutase	スーパーオキシドジスムターゼ
SR	Safety Review	安全性審査(スペースラブの実験装置用の)
SR	Single Rack	シングルラック
STAR	Simulator Training Acceptance Review	シミュレータ受け入れ審査
STS	Space Transportation System	宇宙往還システム
SUS	Stainless Steel	ステンレス鋼(JIS 規格 材料記号)
T/O	Turn Over	引き渡し
TBD	To Be Determined	未定
TDFU	Thermally Driven Flow Unit	熱駆動流実験ユニット
TEI	Thermoelectric Incubator	恒温恒湿槽
TLD	Thermo Luminescent Detector	熱蛍光線量計
tRNA	Transfer Ribonucleic Acid	転移 RNA
UV	Ultraviolet	紫外線
VAB	Vehicle Assembly Building	シャトル組立棟
VAP	Valve Access Panel	バルブアクセスパネル
VAS	Video Analog Switch	ビデオアナログスイッチ
VIB	Vibration Isolation Box	(制振実験装置の)防振機構
VIBES	Vibration Isolation Box Experiment System	制振実験装置
VVP	Vacuum Vent Panel	真空排気パネル
X-gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactoside	5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド
$\alpha$ MEM	$\alpha$ Minimum Essential Medium	$\alpha$ MEM 培地

宇宙開発事業団技術報告 NASDA-TMR-960004

---

発行日 1996年3月15日

編集・発行 宇宙開発事業団

〒105-60

東京都港区浜松町2丁目4番1号

世界貿易センタービル22階

TEL 03-5470-4111 (代表)

---

© 1996 NASDA

無断複写、転載を禁ずる

<本資料に関するお問い合わせ先>

宇宙開発事業団調査国際部技術情報課

TEL 03-5470-4276 ~ 4279

