

成層圏微生物採取実験 (Biopause プロジェクト) に関する 2017—2019 年大気球実験報告

三宅 範宗^{*1}, 大野 宗祐^{*1}, 石橋 高^{*1}, 河口 優子^{*1}, 奥平 修^{*1}, 前田 恵介^{*1}, 飯島 一征^{*2}, 梯 友哉^{*2},
山田 学^{*1}, 加藤 健一^{*3}, 山田 和彦^{*2}, 高橋 裕介^{*4}, 山岸 明彦^{*5}, 瀬川 高弘^{*6}, 野中 聡^{*2}, 福家 英之^{*2},
吉田 哲也^{*2}, 松井 孝典^{*1}

A report on the 2017-2019 balloon experiments of the stratospheric bioaerosol sampling (Biopause project)

MIYAKE Norimune^{*1}, OHNO Sohsuke^{*1}, ISHIBASHI Ko^{*1}, KAWAGUCHI Yuko^{*1}, OKUDAIRA Osamu^{*1},
MAEDA Keisuke^{*1}, IIJIMA Issei^{*2}, KAKEHASHI Yuya^{*2}, YAMADA Manabu^{*1}, KATO Kenichi^{*3},
YAMADA Kazuhiko^{*2}, TAKAHASHI Yusuke^{*4}, YAMAGISHI Akihiko^{*5}, SEGAWA Takahiro^{*6},
NONAKA Satoshi^{*2}, FUKU Hideyuki^{*2}, YOSHIDA Tetsuya^{*2}, MATSUI Takafumi^{*1}

ABSTRACT

The aim of Biopause project is to conduct a sequence of bioaerosol sampling in the stratosphere, in order to determine the location of “biopause”, the upper boundary of the biosphere. By using JAXA’s scientific balloons equipped with our newly developed world’s first descending inertial impactor-style sampling device, we managed to collect some stratospheric bioaerosols in 2016. For the next step, to understand a vertical distribution of those stratospheric bioaerosols, we conducted the simultaneous bioaerosol sampling at the same location different altitudes in 2017 and 2019. We also carried out the cultivation analysis to have a quantitative comparison between culturable and unculturable stratospheric microorganisms. The results of a successful experiment in 2019 show the collection of zero number of bioaerosols including unculturable stratospheric microorganisms, which indicates the number of microorganisms at that time and altitudes of sampling was below the detection limit of our experimental methods. In this paper, we report the results from both balloon experiments of the Biopause project in 2017 and 2019.

Keywords: biopause, stratospheric aerosol, balloon experiment, extremophile, bioaerosol

概要

Biopause プロジェクトでは、地球生命圏の上端 “biopause” を理解するために成層圏微生物の採取実験を行っている。我々が新規開発した世界初の降下式インパクター型試料採取装置を搭載した JAXA (宇宙航空研究開発機構) の大気球を用いた第一回目となる 2016 年度実験では、成層圏微粒子の採取に成功した。次のステップとして、成層圏微生物の鉛直分布を把握するため、同時同地点異高度における試料採取を 2017 年度、並びに 2019 年度大気球実験にて行った。また、成層圏における培養可能な微生物と非培養な微生物の比率を推定し先行研究との定量的な比較を行うため、培養法分析も同時に行った。実験が成功した 2019 年度実験の結果から、非培養性微生物を含めた成層圏由来の微生物は一切検出されず、実験時における採取高度では微生物の存在量が検出限界未満であったことが示された。本稿では、2017 年度と 2019 年度に JAXA 共同利用実験として実施された本プロジェクトの大気球実験の概要とその分析結果について報告する。

* 2020 年 12 月 1 日受付 (Received December 1, 2020)

^{*1} 千葉工業大学惑星探査研究センター (Planetary Exploration Research Center, Chiba Institute of Technology)

^{*2} 宇宙航空研究開発機構 (Japan Aerospace Exploration Agency)

^{*3} ステラ精密株式会社 (STELLA Precision Co., Ltd.)

^{*4} 北海道大学 (Hokkaido University)

^{*5} 東京薬科大学 (Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences)

^{*6} 山梨大学 (University of Yamanashi)

1. はじめに

我々千葉工業大学惑星探査研究センターを中心とした研究グループでは、成層圏由来の微生物採取実験を実施し、地球生命が上空の一体どこまで広がっているのか、そしてその生命圏に境界面が存在するのか、地球生命圏の上端“biopause”について理解することを目的としたBiopauseプロジェクトを進めている。

これまで中層大気（成層圏・中間圏）における微生物採取実験は世界で幾つも行われてきており、ロケット（Imshenestsky et al., 1976¹⁾）や高高度航空機（Griffin, 2005²⁾ ; 2008³⁾; Yang et al., 2008a⁵⁾）、大気球（Wainwright et al., 2003⁴⁾ ; Yang et al., 2008b⁶⁾）などの手法を用いて様々な微生物の存在が報告されてきた。多くの先行研究では、その微生物の特異性を理解するために、採取したサンプルを培養し、増殖株を同定するという分析法が採用されてきた。しかし、成層圏の生命分布を正確に見積もりbiopauseについて理解する為に不可欠となる、1) 成層圏微生物のエアロゾルとしての粒径の観測、2) 系統的に同じ場所の異なる高度での採取実験、3) 培養によるコロニー計測だけでなく難培養性微生物の存在も含めた計測、の3項目について、未だそれらが全て実施された例はない。そこで我々は、北海道大樹町にある大樹航空宇宙実験場にてJAXA（宇宙航空研究開発機構）の大気球を用いた成層圏微生物採取実験を実施し、分析には培養法に加えて難培養性微生物でも計測可能な核酸染色法を用いた蛍光顕微鏡観測と、SEM（走査型電子顕微鏡）によるエアロゾル粒子の形態観察を併せて行うこととした。また、気球実験では、地上で気球や採取装置外壁に付着した地表や対流圏の微生物が汚染源となる可能性も指摘されていることから、気球からペイロードが切り離され、採取装置が周囲からのコンタミネーション（異物混入）より速いスピードで降下している最中にサンプル採取が行える、世界初の降下式インパクター型試料採取装置を開発した。試料採取部1組の概略図を図1に示す。流体計算とJAXA惑星環境風洞実験（成層圏での降下状態に相当する 0.05 kPa、30 m/s）を使った粒子計測により、試料採取部1組における1 μm粒子の採取及び検出効率が約50 %であることが実証された（大野 ほか, 2017⁷⁾）。

本プロジェクトで初となる成層圏微生物採取実験が、降下式インパクター型試料採取装置を搭載したJAXA大気球実験（B16-02）により2016年6月に実施された。B16-02大気球実験では、高度27 kmから高度13 kmの間での試料採取が行われ、核酸染色法分析により成層圏由来の微生物である可能性が高い微粒子が21個確認され、成層圏微生物数密度の上限値が標準大気（1気圧、15°C）換算で 7×10^1 個/m³ であることが分かった（大野 ほか, 2017⁷⁾）。これにより難培養性微生物を含めた成層圏微生物数密度の上限値を世界で初めて推定することに成功した。この結果を踏まえて、次の2017年、並びに2019年に実施されたJAXA大気球実験（B17-02とB19-02）では、成層圏微生物の鉛直分布を把握するため、同時同地点異高度における試料採取を試みた。また、成層圏における培養可能な微生物と非培養な微生物の比率を推定し先行研究との定量的な比較を行うため、培養法分析も同時に行った。本稿では、2017年、並びに2019年に実施されたJAXA大気球実験（B17-02とB19-02）の概要と分析結果について報告する。

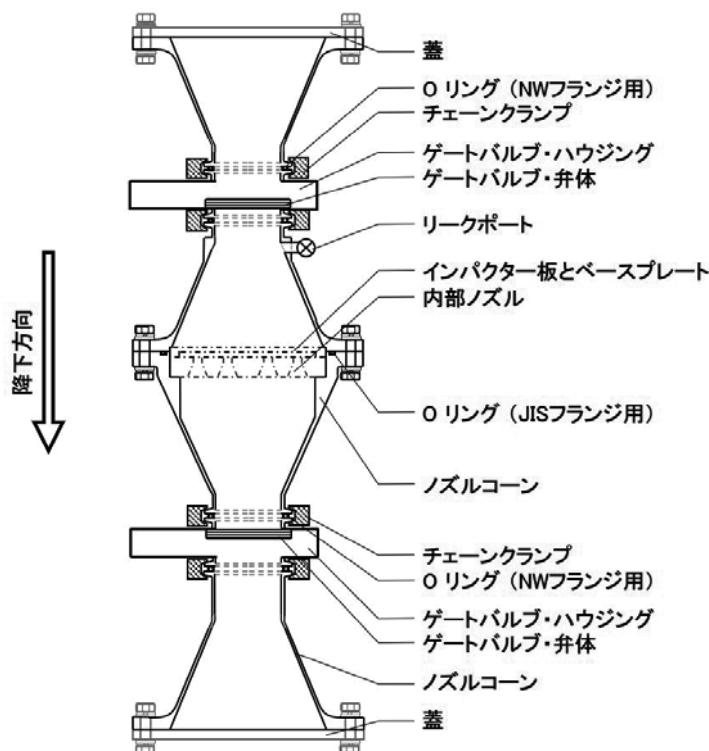


図1. 降下式インパクト型試料採取部（1組）の概略図

2. B17-02 大気球実験

2.1. 概要

2017年度のB17-02大気球実験では、成層圏微生物の高度分布を計測するための試料採取と培養法分析のための試料採取を同時に実施するため、それに向けた実験装置一式の準備を行った（図2）。降下式インパクト型試料採取部（Sampler, S; Control, C）は計5組を搭載した。その内訳は、高度分布観測用に3組（S1上端、S2中間、S3下端）、培養法分析用に1組（S4; 上端から下端までトータルで採取する）、コントロール用に1組（C1; 採取用と同じ準備や分析を行うが、成層圏では採取せず、準備や分析時でのコンタミネーション（異物混入）の有無を判断する）である。試料採取部の洗浄滅菌手順の詳細は次項に述べる。また試料採取部とほぼ同じ内部構造をもつ流量計1組（F1; 採取部内の流速を測定し、内部を流れる大気量を推定する）も搭載した。

前回のB16-02大気球実験では、ゴンドラスペース等の制約のため、採取部すべてに保温・温調を施せなかったことを踏まえて、本実験では全ゲートバルブに温調を加え、また6組すべての採取部に保温用スタイロフォームのカバーが設置できるスペースのあるゴンドラを製作した。増量された採取部に合わせて、制御部、バッテリー、ゲートバルブ開閉用高圧ガスタンクを更新し、JAXA大気球実験システム側の装置一式と合わせてゴンドラへ搭載した。B16-02大気球実験と同様に、降下中のコンタミネーションを軽減するため、採取部の下の先端ノズルコーンがゴンドラの下部に突き出るように設置した。

また、前回、装置の採取可否を確認するためのエアロゾル粒子観測に用いられたモリブデン製のインパクト板は、断面に微細なキズや砥粒等が残留しておりSEM観察に不向きだったため、本実験では、断面にスムーズな鏡面加工及び精密洗浄を施したニッケル製インパクト板に変更した。微生物の高度分布計測や培養法分析に用いられるスライドガラスのインパクト板は、採取効率を割り出した風洞実験（大野 ほか, 2017⁷⁾）に使ったものと同等のものであり、微粒子の採取効率性に変更はない。

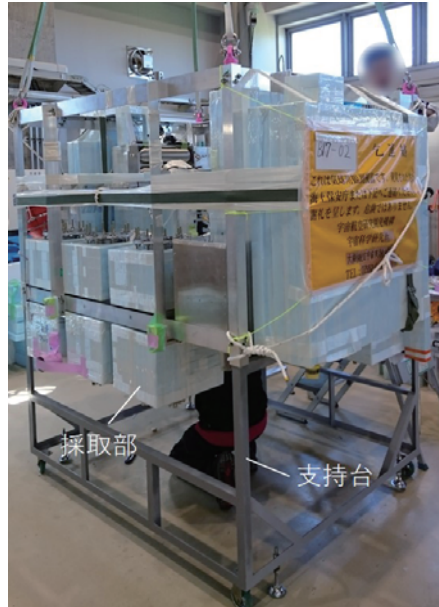


図2. B17-02実験装置一式を搭載したゴンドラの写真。写真では、ゴンドラは支持台の上に乗っているが、放球直前に取り外される。左側にゴンドラ下部から突き出た3組のスタイロフォームに覆われた採取部があり、更に右奥にもう3組ある。

2.2. 試料採取部の洗浄滅菌手法

B17-02大気球実験で用いられた採取部は、千葉工業大学惑星探査研究センター生命分析ラボ内にて洗浄滅菌及び組立作業を行った。その手順を以下に述べる。

- (1)採取部に使用される各部品：ゲートバルブ (Fujiseiki EX-63KF-XO) のハウジングと弁体、外側のノズルコーン、内部のノズル部、スライドガラスのインパクター板とベースプレート、内気圧リリース用ポート、蓋、チェーンクランプ (EVAC NW63 30.151.563)、Oリング (三菱電線工業 1294-70 青)、ネジやナットやワッシャーなど、をそれぞれ別々のオートクレーブバッグに収容した。
- (2)部品の表面に付いている油と微粒子を除去するため、溶媒洗剤 (Kaijo Co.) のソノクレン 277e (油分削除) とソノクレン 201 (バフカス削除) を部品の入ったオートクレーブバッグに交互に入れ、それぞれ 20 分ずつ超音波洗浄を行った。各溶媒洗浄の後には純水を使って 20 分間の超音波での濯ぎを行った。また各洗浄過程で、オートクレーブバッグ内の相互汚染を防ぐために、毎回オートクレーブバッグは交換した。
- (3)溶媒洗浄が終了した部品をオートクレーブバッグに入れたまま恒温槽に入れ、温度 120°C で 480 分間の乾燥を行った。
- (4)次に、部品に付着している微生物の滅菌を行うため、エタノール (99.5%; Wako) を使って 20 分間の超音波洗浄を行い、その後、純水を使って 20 分間の濯ぎを行った。
- (5)部品の入ったオートクレーブバッグを恒温槽に入れ、温度 120°C で 480 分間の乾熱滅菌を行った。それぞれ乾熱滅菌が終了した部品は、外気に触れないようにオートクレーブバッグの封を輪ゴムで閉じ、組立時までラボ内で保管した。
- (6)洗浄滅菌済みのスライドガラス数枚を使って、本実験と同じ染色法並びに培養法による分析を行い、コンタミネーションが無いことを事前に確認した。
- (7)最後に、ラボ内にある紫外線滅菌されたクリーンベンチ内で、洗浄滅菌済み部品をそれぞれオートクレーブバッグから取り出し組立を行った。組立終わった採取装置は、ゴンドラに搭載された状態のまま、放球当日まで上下の先端ノズルコーンを蓋で密閉したまま保管した。

2.3. 結果

6月23日午前4時47分頃、我々の実験装置を乗せた大気球は大樹航空宇宙実験場から放球された(図3)。気球は約2時間25分かけて高度27 kmまで上昇し、その後、上昇時に周囲大気にまき散らされた地上の微生物によるコンタミネーションを避ける為、やや上昇を続けながらも約38分間の水平飛行を行った。午前6時50分頃、我々の実験装置は気球から切り離され、高度28.4 kmからパラシュートによる降下が始まった。降下中に、予定通りS1(高度20.1 km~26.2 km)、S2(高度16.2 km~20.1 km)、S3(高度13.2 km~16.2 km)、S4(高度13.2 km~26.2 km)による試料採取を行った。そして降下開始から約30分後に海面へ着水した。大気球の飛翔プロファイルを図4に示す。

実験装置の回収後に、搭載された制御部内のセンサー出力値や採取部上端の録画記録を分析した結果、採取部上下に取り付けてあるゲートバルブは正常に開閉していたことが確認された。また、制御部や採取部に取り付けてある圧力計・温度計のログファイルから異常値は見当たらず、上空では実験装置は正常に動作したことが確認された。

回収後に実験装置から取り外された採取部は、念入りに外部を水道水で洗浄し、次亜塩素酸ナトリウム(ピューラックス®の200倍希釈液)で殺菌した後、大樹航空宇宙実験場管制塔内の専用作業スペースへ移した。作業スペースに予め設置し紫外線滅菌されたクリーンベンチ内で、採取部5組(S1、S2、S3、S4、C1)の内気圧リーク用ポートにフィルター(Minisart®、孔径0.22 μm)を取り付けてからリーク作業を行った。その際、成層圏で試料採取を行ったS1、S2、S3、S4の内部は負圧の状態であったことが確認された。その後、採取部を密閉したまま大樹町郵便局から千葉工大へ冷凍輸送し、放球実験から2日後の6月25日に千葉工大惑星探査研究センター生命分析ラボにあるクリーンベンチ内で開封作業を行った。その結果、全採取部内部への浸水が確認された(図5)。浸水した影響はゲートバルブの弁体から採取試料にまで及んでおり、その後の採取試料の分析が不可能となった。



図3. B17-02大気球実験の放球写真

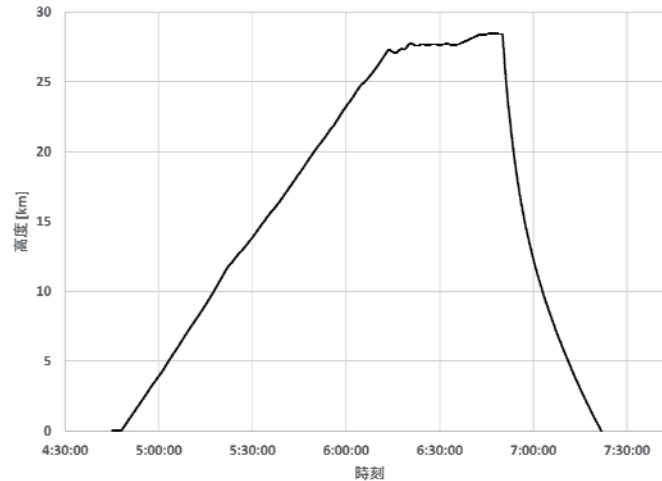


図4. B17-02大気球実験の高度プロファイル

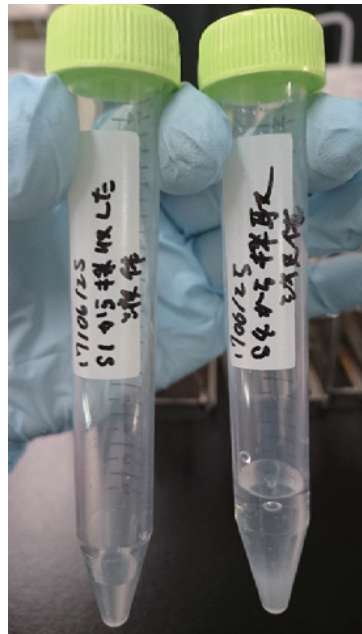


図5. 浸水した試料採取部内部から抽出された液体の例 (S1とS4)

2.4. 浸水原因の究明と対策

試料採取部内部への浸水の原因を究明し対策を立てる為に、データ解析と各種の事後試験を行った。その結果、悪条件がそろった場合には、着水時のゲートバルブ弁体からの浸水、もしくは着水後にJISフランジからの浸水が起りうる事が判明した為、それぞれについて対策を行うこととした（採取部概略は図1を参照のこと）。詳細を以下で述べる。

まず、採取装置の構成から、本実験の採取部への浸水源の可能性は、ゲートバルブの弁体のOリング、NWフランジのOリング、採取部コーンのJISフランジのOリング、内圧リーク用ポート、の計4カ所であることが示唆される。この4カ所のうち、内圧リーク用ポートは耐低温性能がスペック上保証されており、実験装置回収後に緩み等も全くなかったため、浸水原因である可能性は非常に低い。念のため製造業者に装置設計図面と耐低温性能について再確認したが、問題が無いことが分かった。採取部5組全てが浸水していることから、ネジやバルブの締め忘れなどの単純な人為的ミスの可能性も非常に低い。

また、当日のログから、放球をしてから着水直前に制御部電源を切るまで、ゲートバルブの温調は想定通り行われ、ゲートバルブの温度はOリング（フッ素化シリコーンゴム；三菱電線工業1294-70

青)の保証温度内に収まっていたことが分かった。さらに、ゲートバルブの駆動用空気の漏れ等は観測されておらず、おそらく最後までゲートバルブを閉じる側に駆動圧がかかった状態で着水したと考えられる。回収後に採取部リーク弁を開けた際、成層圏で試料採取を行った採取部4組(S1、S2、S3、S4)の内側は負圧の状態が保たれていた。これは、採取部の密閉状態が破れたのは非常に短時間であったか、もしくはごく微量のリーク量であったことを示唆する。考えられるのは、装置の着水時、その後実験場までの輸送時、実験場から千葉工大への輸送時の3つのプロセスである。

上記を踏まえ、最初の試験として、ゲートバルブ単体の水漏れ試験を行った。駆動用空気圧の無い状態で、ゲートバルブの片側に水を貯め、トラック輸送を模擬した振動やハンマーでの打撃衝撃等を与えたが、水漏れは見られなかった。ゲートバルブの製造業者(フジテクノロジー社)とも打合せを行ったところ、保証対象外ではあるものの、輸送の振動で簡単に漏れるとは考えにくいとのことであった。輸送時のゲートバルブからの浸水の可能性は低いと考えられるが、輸送時の浸水の可能性を完全に排除する為、気球実験を行う北海道大樹町から分析を行う千葉工大への輸送は、運送業者による空輸ではなく、PIチームメンバーが運転するレンタカーによる陸路・海路の輸送を行うこととした。

次に、試料採取部一式の水中への投下試験を行い(図6)、着水時に浸水しうる箇所と浸水が起こる条件を制約することが出来た。組み上げた試料採取部をクレーンで吊るし、貯水した水槽中に投下し、試料採取部内への浸水の有無を調べた。まず、実際の気球実験の着水時になるべく近い条件(秒速7m、ゲートバルブ駆動圧有り、採取部を水面に垂直な方向にして投下)にて水中に投下した(ラン1)が、試料採取部内への浸水は全く起こらなかった。さらに、採取部を水面と鉛直な方向にしたまま、秒速9mでの水中投下(ラン2)、ゲートバルブ駆動圧無しでの投下(ラン3)、水中への投下後にトラック輸送を模擬した振動を与える試験(ラン4)を行ったが、やはり浸水は起こらなかった。一方、ゲートバルブ駆動圧を掛けないまま試料採取部を水面と平行な向きにして水中へ投下したところ、試料採取部内部への浸水が見られた(ラン5)。その後、ゲートバルブ駆動圧を掛けた上で、それ以外は浸水したラン5と全く同じ条件で水中へ投下したところ、今度は全く浸水が起こらなかった(ラン6)。ラン5とラン6で条件が異なる点はゲートバルブ駆動圧だけである事と、浸水したラン5でゲートバルブ弁体のズレが目視で確認できたことから、ラン5での浸水はゲートバルブ弁体からのものであることが示唆される。さらに、採取部内部を真空に引き負圧にした状態での投下試験(ラン7, 8)、採取部全体を低温にした状態での投下試験(ラン9, 10)を行ったが、採取部内への浸水は起こらなかった。試験結果をまとめると、一つ目に、もし着水時に浸水が起こるとするとゲートバルブ弁体からである可能性が高いこと、二つ目に、ゲートバルブ駆動圧が掛かっていない状態で採取部が水面と水平に近い角度で着水した場合にのみ浸水が起こりうることを、が判明した。

そこで次実験への対策として、ゲートバルブ駆動用空気の配管の構造を変更し、万一漏れや電磁弁誤動作が有っても、着水時にゲートバルブ閉側に必ず空気圧が掛かり、開側に圧が掛からないようにすることとした。新たに電磁弁を搭載し、ゲートバルブ開閉用の高圧空気と電磁弁を入れる与圧容器内の余剰空気を排出できる構造に変更した。また、ゲートバルブ開閉用の他にもう一つガスタンクを搭載し、ゲートバルブ閉側に着水時に必ず圧が掛かるようにした(図7)。また、気球実験の際に採取部内の密閉が保たれていたことを確認するために、実験装置回収後に採取部内圧を測定することとした。

一方で、密閉した採取部を長時間(数時間から数日間)完全に水没させ浸水の状況を調べる試験を行った(図8)。その結果、採取部内部が負圧の状態でも長時間水没させると少量の浸水が発生することが分かった。その後、内部負圧の採取部の一部のみ長時間水没させる試験を繰り返した結果、この場合の浸水箇所は採取部コーンのJISフランジのOリングであることが分かった。採取部内のインパクター板ベースプレートと採取部コーンの内壁がわずかに干渉していた為、干渉が起こらないようベースプレートを薄くした。その上でOリングに真空グリスを塗布することで、内部負圧状態でも数日間水没させても浸水が起こらないことを確認した。合計3組の採取部を用いて同様の試験を行ったが全て浸水は起こらないことが確認出来た為、次実験の際は浸水対策として同様にJISフランジのOリングに真空グリスを塗布することとした。



図6. 採取部の水中投下試験の様子。実際の気球実験で用いる保温材を取り付けた採取部をクレーンで吊り、フックを用いて水を貯めた水槽へ自由落下させ、着水衝撃を模擬する。着水速度が実際の気球実験と同じ7 m/sの場合（ラン1）では高度2.5 mから、着水速度が実際の気球実験より大きい9 m/sの場合（ラン2～10）では高度4 mから、それぞれ投下した。

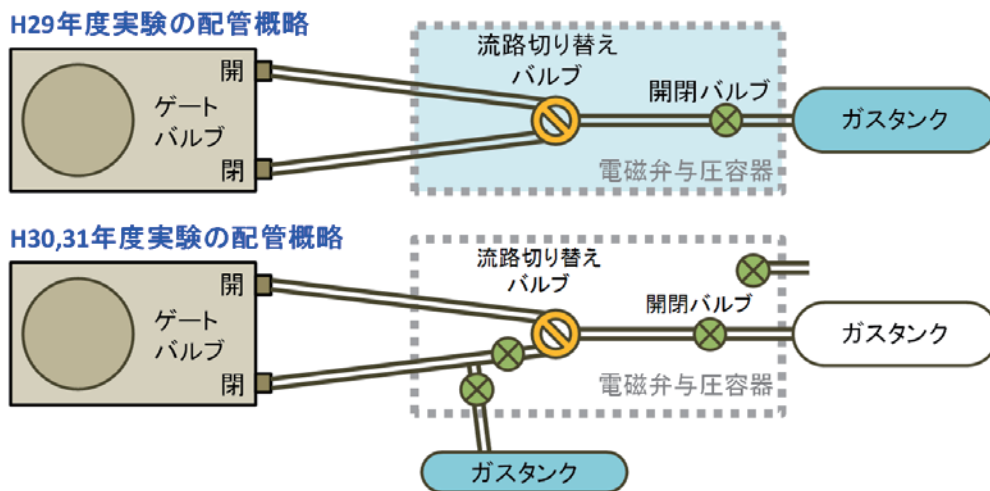


図7. B17-02実験用（上）とB18-07、B19-02実験用（下）のゲートバルブ駆動用空気圧配管の模式図



図8. 採取部水没試験の様子

2.5. B17-02 まとめ

2017年度のB17-02大気球実験では、成層圏微生物の鉛直分布を把握するため、同時同地点異高度における試料採取を行える装置の放球を行った。採取装置は、降下中に予定通りの高度で開閉が行われ、そして無事に回収された。しかし、分析の際に、全採取部内部への浸水が確認され、その影響が採取試料にまで及んでいたことから、その後の分析が不可能となった。

本実験で発生した浸水の原因究明が急務であるため、同採取部による水中投下試験及び水没試験を行った。その結果、浸水が起き得る条件を見出すことが出来た。これを踏まえて、総合的な対策を立案し、その対策を施した採取部への同条件下での浸水が確実に起こらないことを確認した。

3. B19-02 大気球実験

3.1. 概要

2018年度に実施予定だったB18-07大気球実験では、前年度（B17-02）と同じ試料採取部5組（S1、S2、S3、S4、C1）を搭載した実験装置一式に、項目2.4に記載した浸水対策を施した改定版を準備した。我々の実験グループは全実験グループの中で最初に実験準備を完了し待機したが、実験期間を通じて大気球実験に必要な気象条件が全く整わず、放球を断念せざるを得なかった。

それを踏まえ、2019年度のB19-02大気球実験では、前年度の未使用の実験装置一式を継承する形で準備を行った。ただし試料採取部5組に関しては、再度洗浄滅菌が必要との判断から、項目2.2に記載した手順に則り洗浄滅菌を行なった。ただ、採取部が全くの未使用ということもあり、最初の溶媒洗剤を使用した超音波洗浄だけは、最も重要なゲートバルブとインパクター板（スライドガラス）にのみ行い、他は熱水（70～80℃）での洗浄に留めた。備考として、前回まで使っていたカイジョー（株）の溶媒洗剤（ソノクレン277eとソノクレン201）が廃番となってしまったため、カイジョー（株）が推薦する類似溶媒のテクニクリーン200EF（Fuchioka Co.）とバフカスクリーナー（Harp Co.）を使用した。その後のアルコール洗浄や乾熱滅菌並びに組立は前回（項目2.2）と同様に行い、実験本番まで上下の先端ノズルコーンを蓋で密閉したまま保管した。採取実験後の分析手順の詳細は次項に述べる。

B19-02大気球実験では、試料採取部内を流れる大気流量を推定するための流量計F1に加え、装置外部の流速を計測するためにゴンドラ外部に直筒状のF2を設置した（図9）。それぞれ内部には熱式風速計（KANOMAX, model 0962-00）を設置し、専用回路6332Dを通してデータを記録した。この熱式風速計は、温度 t 速度 v の流体中に置いた温度 T の熱線の放熱量が \sqrt{v} と $(T-t)$ におおよそ比例することを利用したものである。本製品は大気圧付近での使用を前提としており、原理的には気圧に反比例するものの、十分な確認試験を行える環境がないことから、F2の値が落下速度に比例するとみなし、F1とF2の比からF1内部の流速を推定する。先立ってF2の筒内外の流速比を風洞実験により求めた。設備の都合により、常圧のデータに限られてしまったが、その比は風速10～30 m/s において0.83～0.89であること、筒の傾きが20度以下ならばその影響は小さいことが分かった。なお、設備が利用できるようになり次第、低圧環境での試験を実施する予定である。

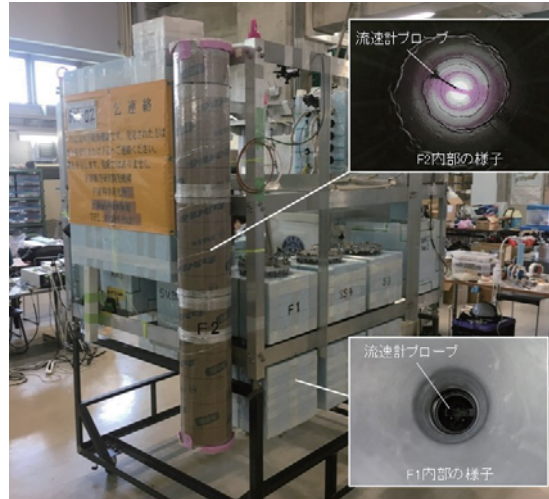


図9. B19-02大気球実験で使用したゴンドラに搭載された流速計F1とF2の内部に設置した流速計プローブの写真。

3.2. 結果

3.2.1. 実験装置の飛翔プロファイル及び作動データ

7月6日午前4時5分頃、我々の実験装置を乗せた大気球は大樹航空宇宙実験場から放球された（図10）。気球は約1時間30分かけて高度27.6 kmまで上昇し、その後約10分間の水平飛行を行った。午前5時45分頃、我々の実験装置は気球から切り離され、高度27.7 kmからパラシュートによる降下が始まった。降下中に、予定通りS1（高度20 km～26.5 km）、S2（高度16.5 km～20 km）、S3（高度12.8 km～16.5 km）、S4（高度12.8 km～26.5 km）による試料採取が行われた。しかし、S1とS4とC1（閉じたままのコントロール）において、一部想定外の動作が確認された。詳細は後に述べるが、よってS2とS3だけが開閉予定高度間のみでの試料採取となった。そして降下開始から約35分後に海面へ着水した。大気球の飛翔プロファイルを図11に示す。

実験装置の回収後に、制御部内のセンサー出力値等を分析した結果、S2とS3の採取部上下に取り付けてあるゲートバルブは正常に開閉していたことが確認された。だがS1では、想定通りに高度約20.6 kmでゲートバルブが閉じた後、高度17.0～20.1 kmの間、採取部上側のゲートバルブが半開、下側のゲートバルブが全開となり、さらに高度13.9～15.9 kmの間、下側のゲートバルブが半開となった。ここで半開とは、テレメトリによって確認されたゲートバルブのステータスで、開いているが全開にはなっていない状態を示す。どれくらい開いていたかは確認できていない。S4では、ゲートバルブが全開であるはずの高度13.9～15.4 kmにおいて上側のゲートバルブが半開状態となった。C1では、ゲートバルブは一度も開かないはずだが、高度11.4～18.5 kmにおいて上側ゲートバルブが半開となった。

実験装置から取り外された採取部は、実験場にて念入りに外部を水道水で洗浄し、次亜塩素酸ナトリウム（ピューラックス®の200倍希釈液）で殺菌した後、大樹航空宇宙実験場管制塔内の専用作業スペースへ移した。作業スペースに予め設置し紫外線滅菌されたクリーンベンチ内で、各採取部の内気圧リーク用ポートにフィルター（Minisart®、孔径0.22 μm）を取り付けてからリーク作業を行った。リーク作業は、常にパーティクルカウンター（KANOMAX, model 3889）でクリーンベンチ内の粒子数を計測しながら、粒径1 μm以上の微粒子がカウントされていない時に行った。また同じポートに圧力センサー（MEAS, PRESS XDCR US341-000005-3.5BA）も取り付け、採取部内気圧を測定しながら行った。その結果、リーク前のS1（内圧19.4 kPa、高度約12 km相当）、S2（内圧12.8 kPa、高度約14.5 km相当）、S3（内圧21.1 kPa、高度約11.5 km相当）、S4（内圧92.7 kPa、ほぼ地上大気圧）、C1（内圧27.8 kPa、高度約10.9 km相当）という内気圧データを得た。S4以外のデータは、制御部内のセンサー出力値の結果と誤差の範囲内でほぼ一致しており、採取部が最後に閉じられてから着水および回収されるまで、リーク等がなかったことが確認された。しかしS4の場合、センサーログでは最後に高度13.9 kmで閉じているにも関わらず、回収後には内圧がほぼ地上大気圧に戻っていたこ

とから、何処かでリークがあった模様と考えられる。

リーク作業が終わった採取部は、ゲートバルブの閉側に再度圧力を掛けながら作業スペース内に保管した。翌7月7日にゲートバルブへの圧力を維持したまま車で千葉工大まで輸送し、そのまま惑星探査研究センター生命分析ラボにて保管した。

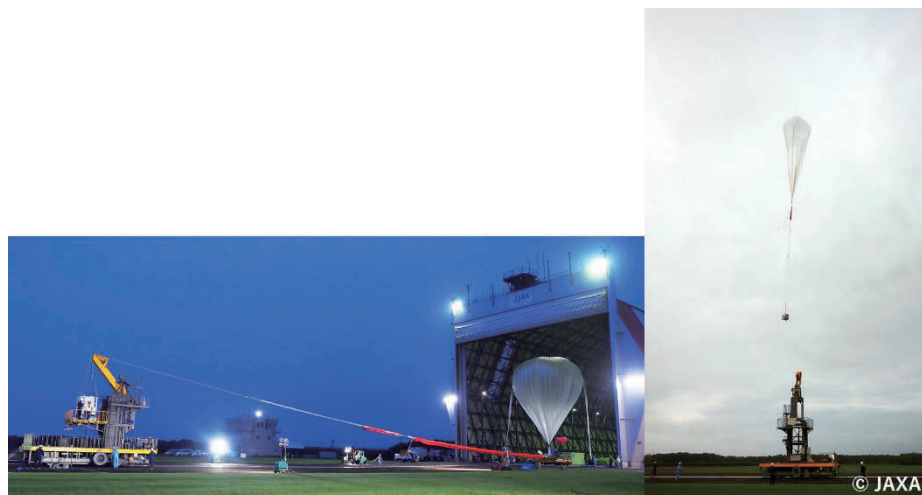


図10. B19-02大気球実験の放球写真

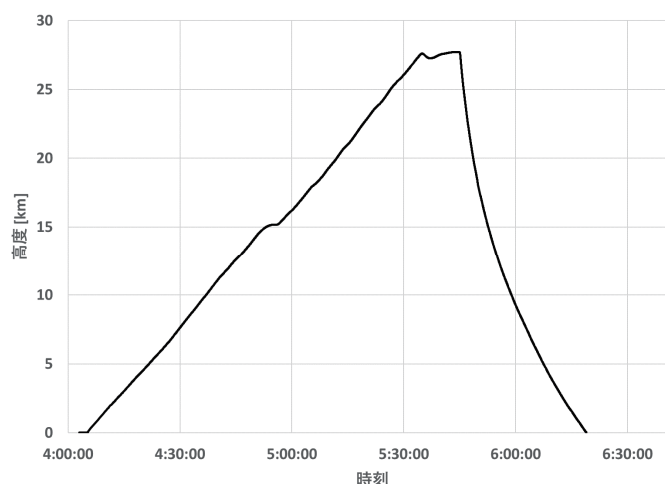


図11. B19-02大気球実験の高度プロファイル

3.2.2. 試料サンプルの分析手順及びその結果

放球日から4日後の7月10日、惑星探査研究センター生命分析ラボに設置されたクリーンベンチ内にて採取部4組（S1、S2、S3、C1）の開封作業及び分析用事前処理を行った。2017年度実験で発生した採取部内への浸水は、本実験では一切観測されなかった。培養法分析に使う予定だったS4がリークしてしまった為、S4の培養法分析は行うことが出来なかった。その為、急遽、他の採取部4組からインパクター板のスライドガラス3枚ずつを培養法分析に使うこととした。

まず、核酸染色法分析とSEM観察の手順を以下に述べる。

- (1)初めに、クリーンベンチ内で試料採取部の開封作業を行い、内部のインパクター板ベースプレートを取り外した。採取部搬入時にクリーンベンチのドアを大きく開ける際、外部から微粒子が流入する可能性がある為、搬入後、採取部を開封する前に、ドアを3 cmほど開けた状態でへパ(HEPA, High Efficiency Particulate Air) を起動したまま約30分間クリーンベンチ内を紫外線照射した。またクリーンベンチ内奥にパーティクルカウンター (KANOMAX, model 3889) を設置し、粒径 1 μm

以上の微粒子がカウントされていない事を確認してから開封作業を行った。

- (2)インパクト板ベースプレートからアウター（大、1枚の表面積が約 7.5 cm²）とインナー（小、1枚の表面積が約 4.25 cm²）スライドガラスを取り外し、dH₂O（Millipore water for Molecular Biology）で 1000 倍希釈された核酸染色溶液（Lonza Sybr[®] Green I nucleic acid stain; excitation at 494 nm, emission at 520 nm）をアウターに 10 μl、インナーに 6 μl 注入し、その上にカバーガラスを被せ、端周りを透明マニキュアで密封した。試料の取り外しから染色作業過程を通して、作業時のネガティブコントロール用（C2）に未使用のスライドガラスをクリーンベンチ内で約 108 分間暴露し、その C2 も同様に染色を行った。また、最後に暴露を行わなかった未使用のスライドガラスのみの染色も行った。染色された試料は、アルミ容器に保管し、翌日観測を行った。観測には、正立蛍光顕微鏡（Nikon Eclipse Ni, GFP filter[®]）の 400 から 600 倍率で観測を行い、NIS-Elements BR ソフトウェアを使用して解析を行った。
- (3)インパクト板ベースプレートからニッケル箔を取り外し、マグネトロスパッタ装置（Vacuum Device, MSP-mini）を使って金蒸着した。試料の取り外し作業過程を通して、作業時のネガティブコントロール用（C2）に未使用のニッケル箔をクリーンベンチ内で約 40 分間暴露し、その C2 も同様に金蒸着を行った。暴露を行わなかった未使用のニッケル箔のみの金蒸着も行った。金蒸着されたニッケル箔は、惑星探査研究センター物質分析室にある SEM（JEOL）を使用して分析を行った。

次に、培地作製と培養法分析の手順を以下に述べる。

- (1)まず実験前に培地作製を行った。寒天培地には、mTGE medium（1% Bacto tryptone, 0.6% beef extract, 0.2% glucose）と 1.5% Agar powder と dH₂O（Millipore water for Molecular Biology）を混ぜて、それをオートクレーブ（120℃で 20 分間）滅菌した後に、約 20 ml ずつシャーレに注ぎ固まらした。液体培地には、mTGE medium（1% Bacto tryptone, 0.6% beef extract, 0.2% glucose, Bacto）と dH₂O（Millipore water for Molecular Biology）を混ぜて、それをオートクレーブ（120℃で 20 分間）滅菌した後に、約 15 ml ずつ広口遠心チューブに注いだ。作製した培地それぞれ数個を使い、30℃の恒温槽内で 8 週間のインキュベーションを行った結果、コンタミネーションによるコロニー形成は認められなかったことから、使用可能な培地であることを確認し、残りは冷蔵にて保存した。
- (2)採取実験後には、染色法分析の手順（1）で述べた通り、採取部の開封と、内部にあるインパクト板ベースプレートの取り外しを行った。
- (3)取り出されたインパクト板ベースプレートからスライドガラスを取り外し、予め上に 10 mM potassium phosphate buffer（PB: pH 7.0）を 10 μl 添加した mTGE 寒天培地の上に、そのスライドガラスの採取した面が培地に接するように置き、スライドガラスの採取面に何らかの微生物があれば、それが培地に付着できるようにした。もし今回の培養条件（mTGE 培地、30℃）で増殖可能な微生物が寒天培地の上に付着することが出来れば、それらのコロニーが形成され、計測が可能となる。
- (4)次に、寒天培地の上に乗せたスライドガラスを取り出し、液体培地が入った広口遠心チューブに、スライドガラスの全面が浸かるように入れた。今回の培養条件で増殖可能な微生物が、寒天培地に付着できずスライドガラスの採取面に残留していた場合、それらの微生物の培養を液体培地で試みる。
- (5)(3)と(4)ではピンセットを使用し、使用後には必ず先端をバーナーで焼いた。また、試料の取り外しから培地へ移す作業過程を通して、作業時のネガティブコントロール用（C2）に未使用のスライドガラスをクリーンベンチ内で約 70 分間暴露し、他と同様に寒天培地と液体培地へ移した。
- (6)シャーレのフタについている水滴を滅菌ガーゼで拭き取り、シャーレと遠心チューブを透明テープでしっかりとシールした。

(7)最後に、液体培地を恒温槽内のシェーカーに乗せ、シャーレと共に30℃で3カ月間インキュベーションを行った。その期間、培地の写真記録を定期的に撮った。

前述の手順に則り培養を行った結果、S3の開封時にクリーンベンチ内で暴露したネガティブコントロール用スライドガラス(C2)3枚のうち1枚からコンタミネーションが確認されただけで(図12)、他のS1、S2、S3、C1から取り外したスライドガラスからは、寒天培地と液体培地共に増殖された微生物は発見できなかった。また、核酸染色による蛍光顕微鏡観測を行った結果、S1、S2、S3、C1並びにC2からも微生物の存在は確認できなかった。本来、微生物の細胞内にある核酸が染色色素(Sybr® Green I)と結合することで、約494 nmの波長域での励起により、約520 nmの波長域で発光が行われ、それを蛍光顕微鏡観察で確認できるはずなのだが、その波長域での発光は一切見受けられなかった。これは、採取試料には核酸を持つ細胞が存在していなかったことを示す。また、培養では検出不可能な難培養性微生物の核酸にも結合されることから、本実験において、成層圏での採取試料からは難培養性も含めた微生物は採取されなかったことが確認された。備考として、採取実験や分析作業時のネガティブコントロールなどに一切使用していない洗浄滅菌済み未使用のスライドガラスのみの分析も同様に行った結果、微生物は検出されなかった。

最後にSEM観察においては、B16-02大気球実験と同様に、インパクト式で採取されたエアロゾル特有のサテライト構造を持つ微粒子(大野 ほか, 2017⁷⁾)を多数発見した。これにより、本実験装置で成層圏(高度12.8 kmから高度26.5 km)において微粒子が採取出来たにも関わらず、顕微鏡観察で観察された微生物は確認できず、上記の培養条件で増殖可能な微生物は培養できなかった、ことが実証された。

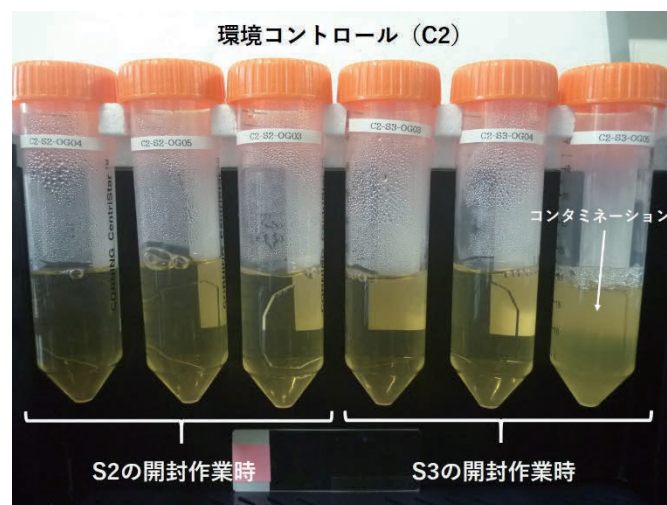


図12. 試料採取部(S2とS3)の開封時にクリーンベンチ内で暴露した6枚のブランクガラス(C2)を液体培地に入れて培養した写真記録(3日目)。S3の3枚のうち1枚からコンタミネーションによる白濁が確認された。

3.2.3. 流量計測の結果

流量計(F1とF2)で得られた、採取装置が動作している期間の推定流速値を図13に示す。流量計に使用した熱式風速計(KANOMAX, model 0962-00)は、温度補償はするものの1気圧5℃以上での使用を前提としたものであって、特に気圧の影響を補正しなければ実際の流速とはならない。しかし、事前試験に利用できる設備では部分的な較正試験しか行えず、また低温での温度補償の確認もできない。そこで同じ気圧、同じ気温下にある2つの風速計の出力の比を利用して流速を推定した。まずゴンドラ外部の直筒(F2)内の流速 V_{F2} は降下速度にほぼ比例し、降下速度に風洞実験から求めた0.86(ただし暫定値)を乗じたものとした。これにF1とF2の出力値の比を乗じたものをF1の推定流速 V_{F1} とした。参考までにGPSデータから得られた降下速度(鉛直速度)を図14に示す。傾斜計のデータから、この期間中の流量計の傾きは5度以内であった。この推定流速を用いて各採取装置の流量を求めると、表1のようになる。ただし、今回S1とS4には一時的にゲートバルブ半開状態(誤作動)が生

じており、その影響を推定することは困難なため、これら誤作動がなかったものと仮定して計算した。加えて風洞実験による確認が一部未実施であることから、これらは暫定的な推定値であることに注意されたい。

先行研究の一例として、気球に搭載したポンプ式試料採取装置を用いた実験では、高度12 kmから35 kmへ上昇中に約0.35 m³ STP (Standard Temperature and Pressure, 0°C and 100 kPa) の大気量を採取している (Yang et al., 2008b)。本実験における流量計測の結果により、暫定的ではあるものの、降下式インパクター型試料採取装置においても先行研究と同等の大気量が採取できることが推定された。

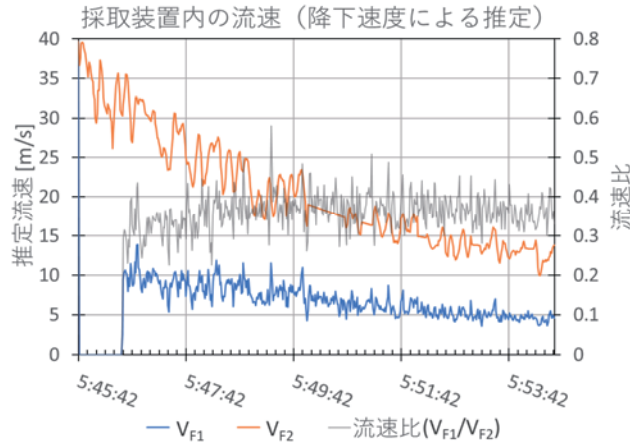


図13. B19-02大気球実験における推定流速のグラフ。V_{F1}は採取装置 (F1) 内の流速、V_{F2}は装置外部筒 (F2) 内の流速を表す。

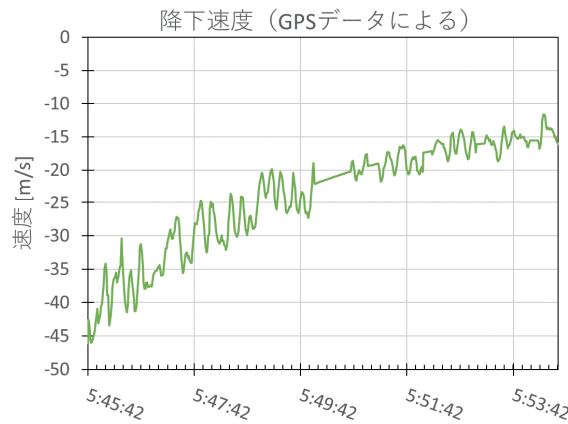


図14. B19-02大気球実験においての採取装置のGPSデータによる降下速度を表したグラフ

表1. 各採取装置内の推定流量 (STP; Standard Temperature and Pressure, 0°C and 100 kPa)。S1とS4のゲートバルブ誤作動の影響は含まれていない。暫定値であることに注意。

採取装置	流量 (STP)
S1	0.14 m ³ (0.176kg)
S2	0.27 m ³ (0.356kg)
S3	0.45 m ³ (0.583kg)
S4	0.88 m ³ (1.143kg)

3.3. コンタミネーションについての考察

本実験において、採取が行われた試料採取部への準備・分析時のコンタミネーション（異物混入）は検出限界以下であったと言える。

採取部C1は、ネガティブコントロールとして、本来なら他の採取部同様、準備・分析共に同じ手順で行うが、成層圏ではゲートバルブを開かない予定であった（項目2.1）。これにより、成層圏由来の微生物は検出されないはずの採取部であり、もしそこで、何らかの微生物が検出された場合、それは準備・分析時にコンタミネーションが発生していたことを示すことが出来る。また、成層圏でゲートバルブを開いた他の採取部と比較することにより、成層圏で採取された微生物とそれ以外のコンタミネーションを区別することが可能である。

しかし、本実験において、C1に不具合が生じ（項目3.2.1）、成層圏で上ゲートバルブが半開になってしまった結果、C1で成層圏由来の微生物が絶対に検出されない状態が維持された、とは言えなくなった。そのため上記に記載したネガティブコントロールとして厳密な意味では言えなくなった。けれども、他の採取部のように降下中に上下のゲートバルブが開いたのと違い、C1では上のゲートバルブのみが半開となっただけであり、採取部の下部からの流入は無く、降下式採取装置としては機能し得なかったため、成層圏微生物が捕獲される可能性は限りなく低いと言える。そのことから、C1は実質的にはネガティブコントロール相当の状態が保たれていたと考えられる。

その上で、成層圏でのみ開閉動作が行われたS1-S3及び上記のC1の4採取部全てから微生物が全く検出されなかったことから、上記に記載した準備・分析時のコンタミネーションは検出限界以下であったと言える。

3.4. ゲートバルブの不具合と対策

本実験で使用された採取部（S1、S2、S3、S4）はそれぞれ指定された高度区間でのみ外気圧トリガによりゲートバルブの開閉が行われ、その間に試料の採取を行う。ネガティブコントロール用であるC1はフライト中に一度も開かない想定のものであった。S1-S4では、その外気圧トリガによりほぼ想定された高度においてゲートバルブの開閉コマンドが自動発行されて、ゲートバルブの開閉が行われた。しかし、S1とS4とC1において、一部想定外の動作が確認された（項目3.2.1）。

この不具合の原因として考えられるのは、想定外に小さい差圧によりゲートバルブが動作してしまったということである。ゲートバルブはエア駆動式で、開側と閉側の印加圧力差により動作するが、地上試験においては差圧が1気圧以下で動作することはなかった。装置の構成上、ゲートバルブ非動作時の差圧を常に完全にゼロにすることは難しいが、1気圧以上になることはないので、ゲートバルブは動作しないはずである。しかし、フライトログで圧力を確認したところ、1気圧よりも小さい圧力差であるにも関わらずゲートバルブが動作しているように見える。その原因は現在調査中であるが、地上試験時とは異なる何かしらの環境要因により摩擦係数が小さくなるといったことが考えられる。

この不具合への対策としては、ゲートバルブの非動作時の差圧をなるべく生じさせない工夫を講じると共に、ゲートバルブが閉じた後に閉側に圧力を印加してロックするといったことが挙げられる。B19-02大気球実験においても、すべての採取装置の動作完了後、海への着水による採取装置への海水侵入対策として、着水前に全採取装置の閉側に圧力を印加して閉ロックをかけていたが、次実験では、採取装置個別に各高度での試料採取完了後すぐにロックをかけることを検討している。

3.5. B19-02 まとめ

2019年度のB19-02大気球実験では、2017年度実験での浸水対策を施した実験装置を準備し、同時同地点異高度における試料採取を行った。上空で動作する予定の採取部（S1、S2、S3、S4）の4組は全て、降下中に予定通りの高度で動作し成層圏での試料採取を実施した。しかし、上記のうちのS1、S4とネガティブコントロール用採取部C1では成層圏内で予定外の動作が確認された。また、培養分析用のS4はリークにより試料が失われてしまった為、他の採取部の試料を少し分けて培養分析を行った。

染色法並びに培養法分析の結果、難培養性微生物を含めた成層圏由来の微生物は一切検出されなかった。また、本実験の準備・分析時のコンタミネーションも検出限界未満であった。一方で、SEM観察の結果、多数の成層圏由来の微粒子を発見することができ、採取装置としては問題なく動作したことが確認された。このことから、2019年7月6日の北海道上空において、本実験で採取を行った高度域では微生物の存在量は非常に小さく、本実験の検出限界未満であったことが示された。また、2016年度実験（B16-02）で観測した、成層圏由来の微生物である可能性が高い微粒子21個という値は、コンタミネーションの可能性も含めた上限値であるのに対し、本実験においては、ほぼ同じ体積を取って0個という値であったことから、今回はコンタミネーションも含めた成層圏微生物数密度の上限値が検出限界未満であったことが示された。

また、本実験から搭載したF1+F2コンビネーションによる流量計は正常に動作し、採取装置が動作している高度・期間での流量計測に成功した。その結果、先行研究と比べて申し分のない大気量が採取できたことが推定された。

最後に、本実験で生じたゲートバルブの不具合について、原因究明を進めるとともに、その対策を立案した。

4. まとめ

2017年度実験（B17-02）と2019年度実験（B19-02）では、成層圏微生物の鉛直分布を把握するため、同時同地点異高度における試料採取を行ったが、実験が部分的に成功したB19-02での染色法並びに培養法分析の結果、高度12.8 kmから高度26.5 kmの間で難培養性微生物を含めた成層圏由来の微生物は一切検出されなかった。一方で、SEM観察によりサテライト構造を持つエアロゾル微粒子の採取が多数確認されたことから、採取方法には問題がなかったと考えられる。2016年度実験において同高度から成層圏由来の可能性のある微生物が多数検出できたにも関わらず今回検出できなかった理由としては、前回検出されたものは全てコンタミネーションであった、或いは、時期による対流圏界面高度の変動等によってbiopause高度が違うことが影響し、2019年度実験時の採取高度では微生物の存在量が検出限界未満であった、等が考えられる。

それを踏まえて、今後の実験では、成層圏だけでなく対流圏上部も含めた微生物の高度分布の観測を試みる予定である。更に、染色法分析による極微粒子の観測にも限界がある為、違うアプローチとして、シングルセルゲノム解析の可能性を並行して検討する。もし、シングルセルゲノム解析が直接行えるインパクト機構を開発することが出来れば、成層圏由来の難培養性微生物の特異性をゲノムレベルで解析可能となる。

謝辞

本大気球実験は、大学共同利用実験としてJAXAの提供する大気球による飛翔機会を利用して行われました。試料採取装置は、ステラ精密株式会社、株式会社ジェック東理社、株式会社フジ・テクノロジー、千葉工業大学工作センターのご協力のもと作製されました。また、本研究は、JSPS科研費と大学共同利用機関法人自然科学研究機構アストロバイオロジーセンターの助成を受け実施されました。JAXAの皆様をはじめ実験に協力して下さった皆様、装置製作、試料分析にご協力頂いた皆様に感謝いたします。

参考文献

- (1) Imshenetsky, A.A., Lysenko, S.V., Kazakov, G.A. and Ramkova, N.V. On micro-organisms of the stratosphere, *Life Sci. Space Res.*, 14, (1976) 359-362.
- (2) Griffin, D.W. Terrestrial microorganisms at an altitude of 20,000 m in Earth's atmosphere, *Aerobiologia*, 20, (2005) 135-140.
- (3) Griffin, D.W. Non-spore forming eubacteria isolated at an altitude of 20,000 m in Earth's atmosphere: extended incubation periods needed for culture-based assays. *Aerobiologia*, 24, (2008) 19-25.

- (4) Wainwright, M., Wickramasinghe, N.C., Narlikar, J.V. and Rajaratnam, P. Microorganisms cultured from stratospheric air samples obtained at 41 km, FEMS Microbiol. Lett., 218, (2003) 161-165.
- (5) Yang, Y., Itahshi, S., Yokobori, S. and Yamagishi, UV-resistant bacteria isolated from upper troposphere and lower stratosphere, Biol. Sci. Space, 22, (2008a) 18-25.
- (6) Yang, Y., Yokobori, S., Kawaguchi, J., Yamagami, T., Iijima, I., Izutsu, N., Fuke, H., Saitoh, Y., Matsuzaka, Y., Namiki, M., Ohta, S., Toriumi, M., Yamada, K., Seo, M. and Yamagishi, A. Investigation of cultivable microorganisms in the stratosphere collected by using a balloon in 2005, JAXA Research and Development Report, JAXA-RR-08-001, (2008b) 35-42.
- (7) 大野宗祐, 石橋高, 三宅範宗, 河口優子, 梯友哉, 奥平修, 山田学, 山田和彦, 高橋裕介, 原田大樹, 山岸明彦, 瀬川高弘, 野中聡, 石川裕子, 所源亮, 山内一也, 小林正規, 福家英之, 吉田哲也, 松井孝典. B16-02大気球実験報告：成層圏における微生物捕獲実験Biopause, JAXA Research and Development Report, JAXA-RR-17-007, (2017) 15-23. doi/10.20637/JAXA-RR-17-007/0002.