

成層圏における微生物採取実験 Biopause プロジェクト

大野宗祐、三宅範宗、奥平修、石橋高、前田恵介、河口優子、山田学、松井孝典(千葉工大惑星探査研)、山岸明彦(東薬大)、飯嶋一征、梯友哉、山田和彦、野中聡、福家英之、吉田哲也(JAXA)、瀬川高弘(山梨大)、高橋裕介(北大)、加藤健一(ステラ精密)

1. 研究の背景

地球生命圏の上端(我々は biopause と名付けている)は、地球生命圏が宇宙に向けて開いているのか閉じているのかを理解する鍵である。しかし、この biopause がどこにあり、どのように決まっているのか、よく分かっていない。biopause について理解することは、生命が天体間を移動しうるかどうかという panspermia 仮説を検証するために必須であり、宇宙における生命の普遍性や分布を理解するための重要な手がかりとなる。

地球大気の最下層である対流圏(高度約 10km 以下)は鉛直方向によくかき混ぜられており、対流圏内には生物が普遍的に存在することが知られている。一方、すぐその上の成層圏(高度約 10km~50km)は、低温低圧な上に非常に乾燥しており紫外線も強い、という生命の生存には非常に厳しい環境であることが知られている。そのため、まずは成層圏生物圏の全体像を理解する事が、Biopause を理解する為に必要であると考えられる。

成層圏生物の観測例は、数多く存在している。古くは 1936 年から、大気球あるいはロケットを用いた成層圏での微生物サンプリングが行われ、成層圏にも生命が存在しているということが報告されている(総説 Yang et al. 2009a)。中層大気は地球生物圏の上端にあたり、明確な境界面の有無やそれを決定するメカニズム、さらには地球生物圏が宇宙に向かって閉じているのか開いているのかを理解する上で重要な鍵となる。

ところがここで問題となるのが、どのような状態で微生物が成層圏に存在しているかがよくわかっていないことである。成層圏で採取された微生物は紫外線等の耐性が高いとはいえ、一個体が単独で浮遊している場合には短時間で死滅してしまうはずである。そのため、微生物の生存の観点からは、成層圏の微生物は数個体以上が凝集体として集まっている、もしくは数 μm 以上のサイズの岩石の塵の内部に付着している等、紫外線から何らかの形で遮蔽されているはずである。しかし、微生物の凝集体でも岩石の塵でも大きさが数 μm 以上の粒子は、ストークス沈降を考えると終端速度が大きい

ため成層圏にとどまることが出来るのは短時間に限られてしまう。数 μm 以上の粒子が中層大気中にとどまるためには、微生物を上空へ持ち上げる何らかのメカニズムが働く必要があるが、これは未だ確認されていない。この矛盾を解き、生物の地球からの流出/地球への流入のフラックスに制約を加えるためには、中層大気中の微生物の形態・サイズ分布と高度分布を測定し、難培養性微生物を含めた動態を理解する必要がある。

2. 本研究の目的

そこで本研究では、中層大気中の微生物の形態と高度分布を観測することを目的とし、大気球を用いた中層大気中の微生物採取実験を行うこととし、これまで大気球実験を実施してきた。採取した試料は、蛍光顕微鏡/SEM による観察、直接 DNA 分析、培養の 3 種類の方法で多角的に分析し、成層圏中の浮遊微生物の種類と物理状態を把握することを目指している。

2016 年度に行った第1回実験では、開発中のインパクター式の微生物採取装置を用いたパラシュートによる降下時に試料採取の実証試験を行うとともに、蛍光顕微鏡と SEM 観察の分析手法を確立することができた(Ohno et al., 2018)。また、成層圏の難培養性微生物数密度に関する世界初の観測結果を得た。しかし、第 2 回実験では採取部内部への浸水のため成層圏試料の分析を行うことができなかった。

2019 年度には、異なる高度での微生物採取と多角分析を目標とした第 3 回目の実験を行った。上空で採取装置は必要な動作を行い、装置の回収、その後の試料初期処理も問題なく実施された。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 年度実験当日の北海道上空において、本実験で採取を行った成

層圏下部の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、搭載した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(Miyake et al., 2020, submitted)。

これまで3回の大気球実験の経験と結果を踏まえ、プロジェクトの第4回目の気球実験となる2021年度の実験では、確実にbiopauseを観測することを目指す。本実験では、同時同地点異高度における微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測を成層圏だけでなく上部対流圏まで網羅して行う。それにより、1フライトでbiopauseよりも上の高度での微生物数密度と下の高度での微生物数密度を両方観測し、その時期その地点で明確にbiopauseの位置を観測的に決定する。また、biopause直下の微生物の種類と物理状態を観測することで、biopauseがその高度に存在する理由の理解に繋げることを目指す。

3. 観測の具体的な方法

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

採取・着水・回収後、試料採取装置は密閉したまま大樹実験場へ漁船で輸送する。その状態では採取装置内圧は成層圏圧力となっておりコンタミのリスクがある為、外壁

を洗浄後大樹実験場内のクリーンベンチ内に持ち込み、採取装置にフィルターを通した外気を導入し内圧を外気圧に戻す。その後クリーンベンチ内で試料採取板を取り外し、一部の試料採取板は蛍光色素で染色後密閉し、蛍光顕微鏡を用いて観察する。SEM用の試料採取板は金蒸着し、SEMを用いて観察する。また、培養用の試料は試料採取板から培地に移し培養する。

4. 2016年度大気球実験

平成28年度実験では、実験装置一式を搭載した大気球は6月8日早朝に大樹航空宇宙実験場から放球された。気球に搭載された実験装置は高度28kmまで上昇し、気球を切り離し、その後パラシュートによる降下中に試料採取を行った。試料採取部の入口・出口のゲートバルブは予定通り動作し、高度27kmから高度13kmまでの成層圏微生物試料採取に成功した。

蛍光顕微鏡で観察した結果、放球前にゴンドラ側面に塗布した蛍光ビーズは全く確認されなかった。これは、ゴンドラに付着した地上微生物のコンタミがなかったことを示す。また、合計で21個の微生物を検出した。これは、標準大気(1気圧15°C)換算で 7×10^1 個/m³の微生物数密度に相当する。この微生物数密度は、難培養性微生物を含めた成層圏微生物数密度の上限値である。なぜなら、コントロール試料が失われてしまった為平成28年度実験採取された試料が全て成層圏由来であると断定することは不可能であるが、コンタミの比率によらず、成層圏微生物数密度が上記の数密度を超えることはない為である。

一方、SEM観察の結果、エアロゾルをインパクター式採取装置で採取した場合に特有の「サテライト構造」を持つ微粒子を多数発見した。加速されインパクター板に衝突した柔らかい微粒子(硫酸エアロゾル等)以外はサテライト構造を持たないので、この構造は成層圏で確かに微粒子を捕集できた証拠である。

平成28年度実験の成果をまとめると以下の2点である。

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

5. 2017年度大気球実験

平成28年度の第1回実験の成果を踏まえ、平成29年度のJAXA共同利用実験として、第2回の大気球実験を

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

第1回実験と同様に、実験装置は高度28kmまで上昇し、気球を切り離れた後パラシュートによる降下中に試料採取を行った。予定通り高度27kmから高度13kmまでの成層圏微生物試料採取が行われたことを、実験装置に搭載した採取部モニタリングカメラにて確認した。しかし、成層圏微生物試料を取り出すため、密閉されたまま輸送された試料採取部を千葉工大にて分解したところ、採取部内部へ浸水していることが判った。蛍光顕微鏡観察、SEM観察とも第1回実験と同様の手法にて、千葉工大惑星探査研究センターにて行った。蛍光顕微鏡観察では微生物、SEM観察では成層圏エアロゾルの検出を目指したが、見つけることは出来なかった。これは、浸水時に採取板に水がかかったため、付着していた微生物や成層圏エアロゾルが洗い流されてしまったためであると考えられる。

6. 2018年度実験

平成30年度実験では、浸水の対策を完全に行った上で、第2回実験の科学目標を再度目指した。低温低圧実験時間試験や感度試験等の必要な試験を全て行い、採取装置、生物分析の準備、実験体制を全実験グループの中で最初に全て整え、大樹航空宇宙実験場にて気象条件等が整うまで待機したものの、平成30年度は大気球実験が可能な条件が整わず、実験実施は見送りとなった。

7. 2019年度実験

それを踏まえ、2019年度の第3回目実験では、1)同時同地点異高度における成層圏微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測、2)蛍光顕微鏡による微生物検出と培養法との比較、3)第1回実験で未達成であったコントロール試料の回収と分析、4)実験的な試料採取部内大気流量測定手法確立、の4点を目標として、TARFにて大気球実験を行った(Miyake et al., 2020)。

2019年7月6日、我々の実験装置を乗せた大気球はTARFから放球された。気球は約1時間30分かけて高度27.6 kmまで上昇し、その後気球切り離し後の降下中に、

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。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うこととした(Miyake et al., 2020)。

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(Miyake et al., 2020)。また、採取部内の大気流量を計測する装置は正常に動作し、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(Miyake et al., 2020)。

2019年度実験で目標とした上記4つの項目に関しては以下のように総括できる。

項目1)の「同時同地点異高度における成層圏微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測」:一部分のみ未達成。難培養微生物を含む数密度の観測については成功した。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を示すことが出来た。成層圏内で採取・観測を成功させ、その高度での微生物数密度が非常に低いことを示すことがbiopauseの観測的決定の為の最重要項目であり、これはプロジェクトの大目標に大きく近づく成果である。

一方、2019年度実験において成層圏微生物は一切検出されなかった為、その形状を観測することはできなかった。これは、先行研究で示唆されていたよりも実験当日の成層圏微生物数密度が低かったことが原因であり、実験手順の不具合ではない。微生物数密度がより高いと考えられる対流圏での採取を合わせて行う等の手段をとり、biopauseの総合的な理解に必要な撮像を行うための実験手法を着実に確立していくことが今後の課題である。

項目2)の「蛍光顕微鏡による微生物検出と培養法との比較」:達成。実験手順としては全て予定通り実施することが出来た。その結果、蛍光顕微鏡と培養法どちらでも微生物は検出されないという結果を得た。実験手法は確立

でき目標を達成できた。これは意味のある成果だが、主に培養法で行われてきた先行研究と比較する為に必要な「成層圏微生物のうち培養法で検出できる比率」は今回得られなかった。これは項目1)後半と同様に実験手順の不具合ではないが、今後の実験で再度目指したい。

項目3)の「第1回実験で未達成であったコントロール試料の回収と分析」:未達成ながら本来の目的は達成。本項目に関しては、過去実験と比較して顕著な前進をすることができたが、上空での誤動作の為、実験手法として完全に確立させるところまでは至らなかった。本実験のコントロール用採取部 C1 は、本来なら他の採取部と準備・分析共に同じ手順で行うが、フライト中常に密閉状態を保つという想定であった。ところが、成層圏の一部高度で採取部上側のゲートバルブのみ半開になるという誤動作が発生したため、C1 は厳密な意味でのネガティブコントロールとは言えなくなった。次回実験に向けゲートバルブ誤動作防止のための対策を実施予定である。

ただし、上下バルブが同時に全開となる採取用採取部と違い、成層圏大気が C1 の下から上に通じ抜ける状態にはならなかった。そのため、C1 は降下型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(Miyake et al., 2020)。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、2019 年度実験の準備・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。準備・分析時のコンタミネーションを正しく評価しその影響を受けない実験手法を確立することは、本プロジェクトの信頼性の根幹をなすものである。それが確立できたことは、2019 年度実験の信頼性のみならず、将来的な展望の礎としても非常に重要な成果である。

項目4)の「実験的な試料採取部内大気流量測定手法確立」:ほぼ成功。今回搭載した採取部内を流れた大気の流量を計測する装置は想定通り動作し、想定と大きな矛盾のないデータを得ることが出来た。今後、採取を行う採取部側のバルブの誤動作の影響の評価を行うとともに、実験設備不調のため事前の風洞実験で一部採取できなかったデータをとることで、最終的に流量計測手順を確立できる見込みである。

2019 年度実験の成果をまとめると以下の通りである。

1) 一部装置に不具合はあったが、成層圏での微粒子

採取と回収資料の分析に成功

- 2) コンタミネーションの影響の無い実験手順を確立
- 3) 試料内部流量計測装置によるデータ取得に成功
- 4) 実験当日の北海道上空において、成層圏の高度 12.8km から 26.5km の間における微生物数密度は難培養性のもも含めて非常に低く、本研究の検出限界以下であることを示した

7. 2021 年度実験の目的と準備状況

プロジェクトの第 4 回目の気球実験となる 2021 年度の実験では、確実に biopause を観測することを目指す。本実験では、同時同地点異高度における微生物の形状と難培養微生物を含む数密度の観測を成層圏だけでなく上部対流圏まで網羅して行う。それにより、1フライトで biopause よりも上の高度での微生物数密度と下の高度での微生物数密度を両方観測し、その時期その地点で明確に biopause の位置を観測的に決定する。また、biopause 直下の微生物の種類と物理状態を観測することで、biopause がその高度に存在する理由の理解に繋げることを目指す。

実験装置ゴンドラ等の設計はほぼ踏襲するため、今年度中に実験準備を完了できる。流量計測手法(プローブ等)も、測定精度向上のため改良する予定であるが、制御基板やその容器は 2019 年度実験の設計を踏襲する予定であり、大気球実験システムとの通信やノイズレベルは大きく変わらないことを想定している。ゲートバルブのオーバーホールなど、外注する部分は遅くとも 1 月までに揃う予定となっている。その後、制御系・PI 側地上系の動作試験や実機を用いた分析試験まで 2020 年度中に準備が完了するようスケジュールを組み、2021 年度春に大樹実験場にて大気球実験を行う前提で準備を行う。

一方、2019 年度実験では、放球当日試験中と上空でゲートバルブの誤動作が発生した。これは、圧縮空気制御のゲートバルブの開側に残圧が残ってしまったことが原因であり、それを防ぐための配管構造の変更を行う。それに伴い、圧縮空気制御用の電磁弁を入れる与圧容器を製作中である。また、2019 年度実験では TARG での試験中に使用したバッテリーのセルの不具合が発生した。それを受け、2021 年度実験では充電可能な別のバッテリーの使用を予定している。低温・衝撃に関してはスペック上問題がなく低圧下での使用に関しても事前試験を行い問題がないことを確認した。