

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 22 日現在

機関番号：32503

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26506020

研究課題名(和文) 大気球を用いた成層圏微生物採取実験

研究課題名(英文) Bioaerosol sampling at the stratosphere using scientific balloons

研究代表者

大野 宗祐 (OHNO, Sohuke)

千葉工業大学・惑星探査研究センター・上席研究員

研究者番号：80432631

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 300,000円

研究成果の概要(和文)：2016年度に大気球実験を行い、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を採取することに成功した。これは技術実証として重要であり、今後の成層圏微生物採取実験の基盤となるものである。

また、本実験の結果より、難培養性微生物も含めた成層圏微生物数密度の上限値を推定した。難培養性微生物は自然界の微生物の大半を占め、成層圏微生物の寿命や動態を理解する上で不可欠な情報を有し、生物圏界面 biopauseの検出と理解という大目標達成へ向けて中核となる観測対象である。過去の成層圏微生物の観測は培養できる微生物のみに限定されており、本研究が成層圏の難培養性微生物に関する世界初の観測結果である。

研究成果の概要(英文)：We carried out a scientific project named “Biopause” using JAXA’s scientific balloons in order to grasp the dynamics of biological flux in the stratosphere, i.e. the lower middle atmosphere, comprehensively. Our first balloon experiment was conducted on June 8, 2016 and collected aerosol particles in the stratosphere using a newly developed descending inertial impactor. We estimated the number density of the stratospheric microbes including the unculturable ones for the first time in the world. In this paper, we summarize of the balloon experiment and the initial results of the sample analysis.

研究分野：地球惑星科学

キーワード：アストロバイオロジー 惑星科学 成層圏 極限環境微生物 気球実験 インパクター エアロゾル バイオエアロゾル

## 1. 研究開始当初の背景

地球生命圏の上端 biopause(生物圏界面)あるいは地球/地球外間の生命の流入/脱出の有無は、生命の普遍性や起源、進化、分布を理解する上で非常に重要である。明確な生物圏界面の有無、或いはそれを決定しているメカニズムの理解は、地球/地球外間の生命の流入/脱出の有無を理解するための基盤となる。その為の最も直接的な鍵は地球中層大気での生物分布にある。

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おり(総説 Yang et al. 2009a)、中層大気、特に成層圏に微生物が存在していることがわかってきている。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 $\mu\text{m}$ 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 $\mu\text{m}$ 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。この矛盾を解き、生物の地球からの流出/地球への流入のフラックスに制約を加えるためには、中層大気中の微生物の形態・サイズ分布と高度分布を測定し、難培養性微生物を含めた動態を理解する必要がある。

ところが、多くの先行研究では、採取した微生物をまず培養するという分析手順が採用されている。そのため、採取された微生物の状態を観察することが困難であった。培養法では、一個体が単独で浮遊しているのか凝集体でも塵に付着しているのかの区別は難しい。また、難培養性微生物や死んだ微生物も検出できない。一方高度分布に関しても、これまでに報告されている中層大気中の微生物の高度分布は、ロケット、気球、飛行機実験などの異なる手法、異なる場所、異なる時期に得られたデータをコンパイルしたものである。同じ手法で系統的に同じ場所における異なる高度の微生物分布を調べた例は存在しない。そのため、それぞれの手法のバイアスや誤差、水平方向の数密度の違い、季節変動などの影響を受けてしまい、鉛直方向の輸送メカニズムや中層大気での滞留時間

等を定量的に評価することが出来ない。

## 2. 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集実験を行うこととした。また、採取した試料を、蛍光顕微鏡/SEMにより観察し、成層圏浮遊微生物の物理状態を調査する。

本研究の研究期間内に行った(2016年)第1回目の大気球実験では、開発中のインパクト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を目的とした。また、成層圏の難培養性微生物数密度に関する情報が得られれば、世界初の観測結果である。

## 3. 研究の方法

まず、風洞試験/数値計算に基づき、成層圏微生物採取装置の概念検討、原理実証試験、最適化、試験を行った。それを用い、大気球を用いた成層圏微生物採取実験を行った。採取試料は顕微鏡を用い分析を行った。

### (1) 採集装置の概念

本研究の気球実験では、気球で成層圏(高度25km~35km程度)まで上昇した後、気球からゴンドラを切り離し、パラシュートで降下しながら、成層圏中に浮遊する微生物を採集する。実験の概略図を図1に示す。降下中に採集することにより、気球をはじめとする実験装置外壁に付着していた微生物(地上で気球に付着したもの)によるコンタミネーションを防ぐことができる。

採集装置は、地上での微粒子採集に用いられているインパクト式採集装置をベースとして開発を行った。地上用として用いられているインパクト式採集装置は、大気をポンプで能動的に吸引し、粒子をインパクションプレートに衝突させて採集する。一方、我々は装置の降下により大気を受動的に装置内に取り込み、微生物をインパクションプレート上に採集する。気球実験用のインパクト式採集装置の概念図を図2に示す。円筒状の筒の内部にノズルとインパクションプレートを設置する。装置下部から取り込まれた大気はインパクションプレートを避けるように流れるが、含まれる微粒子はインパクションプレートに衝突し付着する。細胞を持つ微生物の大きさは約 $1\mu\text{m}$ 程度よりも大きいことが知られており、本気球実験ではサイズ $1\mu\text{m}$ 以上の微生物の採集を目指す。捕獲することが出来る粒子の下限サイズはストークス数により決まる。

採集機構部の入口と出口にはゲートバルブが設置されており、指定したタイミングにより開閉を行い、目的とする高度での採集を行う。

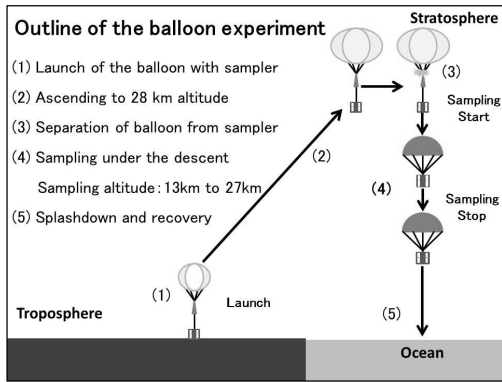


図 1. 気球実験の概略図

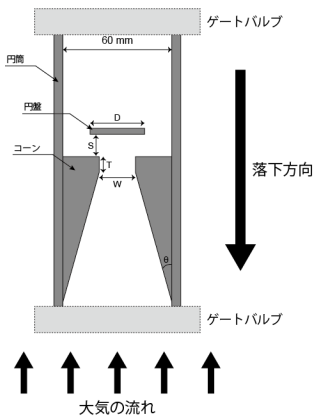


図 2. インパクター式採集装置の概念図

(2) 第 1 次風洞実験

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

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

実験は、宇宙航空研究開発機構(JAXA)の惑星環境風洞で行った。大気の流れを知るために、装置の出入り口やノズルのスロート部の静圧を測定した。また、風洞内で採取装置模型の上流側に蛍光ビーズ(サイズ  $1\mu\text{m}$ 、 $5\mu\text{m}$ )の放出機構を設置し、成層圏内でのパラシュートによる降下状態に相当する  $0.05\text{kPa} \cdot 30\text{m/s}$  における、模型を用いた微粒子捕集の実証実験を行った。蛍光ビーズを用いたのは、採集の可否や採集個数の確認を蛍光顕微鏡で行うためである。

風洞実験の結果、装置内の流量が最狭部の

断面積に依存することが示された。また、蛍光ビーズ粒子の捕集実証に成功した。捕集された蛍光ビーズ粒子の蛍光顕微鏡画像を図 3 に示す。これにより、受動的インパクター型試料採取装置で成層圏を浮遊する微生物相当サイズの微粒子を確かに捕集できることが実証できた。



図 3. 風洞実験で捕集された蛍光ビーズの蛍光顕微鏡画像

(3) 数値計算(流体計算、粒子計算)

風洞実験で測定できるのは離散的箇所での静圧のみであるため、装置内全体の流れ場を知るために、流体計算を行い、風洞実験結果との比較を行った。

得られた結果(各圧力測定点の圧力)は、風洞実験の結果と良く一致した。流体計算では風洞実験における流れ場を良く再現していると言える。計算結果を見ると、今回調べた範囲においては、ノズルのスロート部断面積が流れのボトルネックとなっており、インパクションプレートの面積はあまり影響がないことがわかった。また、流れに対する迎角があっても装置内の流量は低下しない(むしろやや増加する)という結果も得られた。

流体計算の結果を基に、微粒子が大気と一緒に採取装置内に取り込まれた場合に、試料採取板上に捕集される確率を、粒子計算を行い見積もった。スロート最狭部の直径が  $8\text{mm}$  の場合、単独で浮遊している最小サイズの微生物の大きさに相当する直径  $1\mu\text{m}$  の粒子が、約 50% の確率で捕集されることが分かった。スロート最狭部の直径を  $8\text{mm}$  より大きくすると装置内を素通りして採取できない微生物の割合が増えてしまうが、スロート最狭部の直径を  $8\text{mm}$  より小さくすると装置内を通り抜ける大気量が減少してしまう。本実験では、装置内に導入された微生物の採取効率と大気流量の兼ね合いから、 $1$  ミクロン粒子の採取確率が約 50% となるスロート最狭部直径  $8\text{mm}$  で装置の設計を行うこととした。

(4) 第 2 次風洞実験

第 1 次風洞実験の結果と、流体計算、粒子計算の結果を基に製作した試料採取装置実機を用いて、風洞を用いた微粒子試料採取の実証試験を行った。JAXA の惑星環境風洞に試料採取装置を設置し、第 1 次風洞実験と同様に採取装置実機の上流側に蛍光ビーズ(サ

イズ 1 $\mu$ m、5 $\mu$ m)の放出機構を設置し、成層圏内でのパラシュートによる降下状態に相当する 0.05kPa・30m/s における、微粒子捕集の実証実験を行った。その結果、採取装置実機を用いた蛍光ビーズ採取に成功した。数値計算の結果予測される流量・採取効率と誤差の範囲で一致した為、そのまま採取部内部構造を変えず、大気球実験を行うこととした。

#### (5) 制御部の開発

微生物採集装置の開発と並行して、装置の制御部の検討・開発を行った。本採集装置は、気球のゴンドラに搭載されて成層圏まで上昇した後、ロープカッターにより気球から切り離され、ゴンドラごと落下する最中に、成層圏中の微生物の採集を行う。本装置の制御は、地上からの直接コマンドに加え圧力計とタイマーを用いたシーケンス制御により行われる。製作した制御部基板、ラズベリーパイ等は気密容器に収め、大気圧の空気で密封する。また、あまり低温にならないようヒーターと温度計による温度制御を行う。ロープカッターによる切り離しの信号によりシーケンサーが作動し、以降指定したタイミングでゲートバルブの開閉を行う。ゲートバルブはエア駆動式で、電磁弁により圧縮空気を制御して開閉を行う。制御部封入用密閉容器は、製作者に依頼し陽圧負圧とも耐圧性能を確認した。装置一式の写真を図4に示す。



図4. ゴンドラに装着された実験装置一式

## 4. 研究成果

### (1) 大気球実験

実験装置一式を搭載した大気球は平成 28 年 6 月 8 日早朝に宇宙航空研究開発機構の大樹航空宇宙実験場から放球された。放球の様子を図5に示す。実験装置を搭載した大気球は、予定通り高度 28.5 km まで上昇した。次に、上昇時に周囲大気にまき散らされた地上微生物による汚染を避ける為、約 30 分の水平飛行を行った。その後、気球を切り離し、パラシュートによる降下中に試料採取を行った。試料採取装置の入口・出口のゲートバルブは予定通り動作し、高度 27 km から高度 13 km の間で試料採取を行った。採取開始時にゲートバルブを開く際は直接コマンド送

信により操作し、採取終了時にゲートバルブを閉じる際は搭載した圧力計によるトリガーで動作させた。その後実験装置一式は回収船によって回収され、密閉されたまま大樹航空宇宙実験場へと輸送された。

採取装置回収後、制御部のログの解析を行った。試料採取部や制御部内等の温度履歴から、ヒーター能力と保温剤が十分であり、想定していた通りの温調が行われていたことを確認した。また、圧力計の履歴から、試料採取部の入口・出口ゲートバルブの動力用ガスタンクやガス配管に漏れが無かったことを確認した。



図5: 大気球実験(放球の様子)

### (2) 採取試料の分析結果

試料採取部は、大樹航空宇宙実験場格納庫内の専用作業スペース内部に設置されたクリーンベンチにて分解され、蛍光顕微鏡観察用試料は蛍光色素を添加した後カバーガラスを用い密閉した。また、SEM 観察用試料は、クリーンベンチ内にて表面を金蒸着し、密閉容器に保存した。試料は千葉工業大学惑星探査研究センターに持ち帰り、それぞれ蛍光顕微鏡と SEM を用い観察した。

蛍光顕微鏡で観察した結果、合計で 21 個の微生物を検出した。図6に蛍光顕微鏡観察で検出された微生物の画像の一例を示す。21 個という微生物数は、標準大気(1気圧 15 )換算で  $7 \times 10^1$  個/m<sup>3</sup> 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ので平成 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、混入の比率によらず、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。また、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混入がなかったことを示す。

一方、SEM 観察の結果、エアロゾルをインパクト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。加速されインパクト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。現在までに採取板のごく一部しか観察できていないが、46 個のサテライト構造を持つ粒子を発見した。図 7 に SEM 画像の一例を示す。

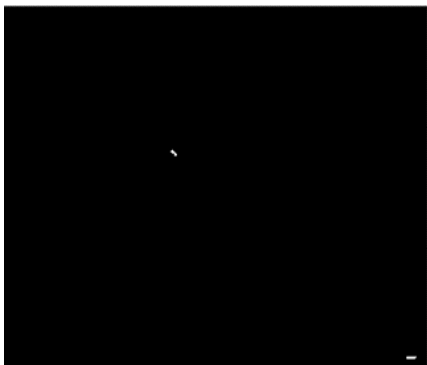


図 6 . 採取試料の蛍光顕微鏡写真画像

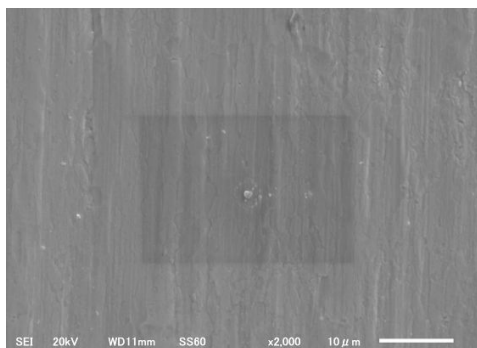


図 7 . 採取試料の SEM 画像の一例。中央に見えるのが、サテライト構造を持つ成層圏エアロゾル粒子。

### (3) 結果のまとめ

これまでに、新規開発した降下式インパクト型試料採取装置で、成層圏微粒子を採取することに成功した。前述のように、サテライト構造を持つエアロゾル粒子の確認により、確かに成層圏にて微生物試料の採取に成功したことが示された。また、採取装置を搭載したゴンドラの側面に塗布した蛍光ビーズの混入が無かったことから、試料採取中の地上微生物の混入を防止するという降下式インパクト型試料採取装置の最大の長所が実証された。気球実験用の降下式インパクト型の微粒子採取装置による実験は前例がなく、技術実証として重要であるとともに、今後成層圏微生物採取実験を継続していく上での基盤となるものである。

また、難培養性微生物も含めた成層圏微生物数密度の上限値を推定することに成功し

た。難培養性微生物は自然界の微生物の大半を占めるだけでなく、成層圏微生物の寿命や動態などを理解する上で不可欠な情報を有しており、生物圏界面 biopause の検出と理解という大目標達成へ向けて中核となる観測対象である。これまでの成層圏微生物の観測は培養法に依存しており対象が培養できる微生物のみに限定されていたため、本研究が成層圏の難培養性微生物に関する世界初の観測結果である。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 9 件)

大野宗祐, レーザー生成高速飛翔体による隕石衝突蒸発実験と白亜紀末の生物大量絶滅、「パワーレーザーで探る宇宙物理」特集号、レーザー研究 = The review of laser engineering : レーザー学会誌 44(9), 608-612, 2016-09、レーザー学会、査読有

大野宗祐, 石橋高, 三宅範宗, 河口優子, 梯友哉, 奥平修, 山田学, 山岸明彦, 山田和彦, 高橋裕介, 原田大樹, 野中聡, 瀬川高弘, 福家英之, 吉田哲也, 石川裕子, 山内一也, 所源亮, 小林正規, 松井孝典、成層圏微生物採取実験 Biopause : 2016 年度実験報告と今後の展望、Balloon Symposium: 2016 Conference Paper、査読無

火星環境模擬チャンバーを用いた探査機器の耐環境試験、千秋 博紀, 大野 宗祐, 乙部 直人, 山本 真行, 仲吉 信人, はしもと じょーじ, 梅谷 和弘, 池原 光介, 藤津 裕亮、千葉工業大学研究報告, 63,69-74 (2016-01-01)、査読無

Cho, Yuichiro, Seiji Sugita, Shingo Kameda, Yayoi N. Miura, Ko Ishibashi, Sohsoke Ohno, Shunichi Kamata, Tomoko Arai, Tomokatsu Morota, Noriyuki Namiki, Takafumi Matsui, 2014. High-precision potassium measurements using laser-induced breakdown spectroscopy under high vacuum conditions for in situ K-Ar dating of planetary surfaces. Spectrochimica Acta Part B Atomic Spectroscopy 02/2015; 106., 査読有

成層圏における微生物捕獲実験 : biopause プロジェクト、大野, 宗祐; 石橋, 高; 三宅, 範宗; 山田, 学; 小林, 正規; 松井, 孝典; 河口, 優子; 山岸, 明彦; 仁田原, 翔太; 山田, 和彦; 野中, 聡; 瀬川, 高弘; 近藤, 伸二; 高橋, 裕介; 原田, 大樹; 石川, 裕子; 所源, 亮; 山内, 一也; 梯, 友哉; 福家, 英之; 吉田, 哲也; JAXA 大気球実験グループ、Balloon Symposium: 2015 Conference Paper、査読無

Ohno, S., T. Kadono, K. Kurosawa, T. Hamura, T. Sakaiya, K. Shigemori, Y. Hironaka, T. Sano, T. Watari, K. Otani, T. Matsui, and S. Sugita, Production of sulphate-rich vapour during the Chicxulub impact and implications for ocean

acidification, Nature Geoscience, 7, 279-282 (2014). 査読有

S. Ohno, K Ishibashi, T Sekine, K Kurosawa, T Kobayashi, S Sugita and T Matsui, Gas recovery experiments to determine the degree of shock-induced devolatilization of calcite, Journal of Physics: Conference Series Volume 500 Part 6. 2014. 査読有

大野宗祐, 天体衝突が引き起こす環境変動と大量絶滅, 日本生態学会誌, 特集「白亜紀末の大量絶滅事変に残る謎」 2014. 査読有  
Ishibashi, K., S. Ohno, S. Sugita, T. Kadono, and T. Matsui, Oxidation of carbon compounds by silica-derived oxygen within impact-induced vapor plumes, Earth, Planets and Space, 2014. 査読有

〔学会発表〕(計 26 件)

大野宗祐, Biopause プロジェクト: 大気球を用いた微生物採取実験、生命の起源及び進化学会シンポジウム、2017年3月30日、九州工業大学飯塚キャンパス(福岡県飯塚市)

S. Ohno 他, THE BIOPAUSE PROJECT: BALLOON EXPERIMENTS FOR SAMPLING STRATOSPHERIC BIOAEROSOL, 48th Lunar and Planetary Science Conference, 2017年3月23日、ヒューストン(アメリカ合衆国)

大野宗祐 他, 成層圏微生物の高度分布観測の為に捕集・分析手法の開発: Biopause プロジェクト、宇宙における生命シンポジウム、2017年3月6日、一橋大学一橋講堂(東京都千代田区)

大野宗祐 他, 大気球による成層圏微生物採取実験: Biopause プロジェクト、バイオエアロゾルシンポジウム、2017年2月20日、金沢大学(石川県金沢市)

大野宗祐 他, 成層圏微生物採取実験 Biopause: 2016年度実験報告と今後の展望、大気球シンポジウム 2016年11月1-2日、宇宙航空研究開発機構相模原キャンパス(神奈川県相模原市)

大野宗祐 他, 大気球による成層圏微生物採取実験 Biopause: (1) 2016年度実験の概要と初期成果、アストロバイオロジーネットワーク 2016年年会、2016年9月23日、東北大学(宮城県仙台市)

大野宗祐 他, 大気球を用いた成層圏微生物採取実験: Biopause プロジェクト、第60回宇宙科学技術連合講演会、2016年9月6日、函館ドーム(北海道函館市)

Sohsuke Ohno 他, Impact-Induced Winter Caused by Sulfuric Acid Aerosol Made from the K/Pg Bolide, Goldschmidt Conference, 2016年6月29日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

大野宗祐 他, 衝突蒸気雲の再凝縮物に関する実験的研究 レーザー研シンポジウム 2016年4月25日、大阪大学(大阪府吹田市)

Sohsuke Ohno, A balloon experiment for stratospheric bioaerosol sampling, 8th

Astrobiology Workshop, 2015年11月27日, ELSI/Tokyo Tech(東京都目黒区)

大野宗祐 他, JAXA 大気球実験グループ、成層圏における微生物捕獲実験: biopause プロジェクト、大気球シンポジウム 2015年11月5-6日、宇宙航空研究開発機構相模原キャンパス(神奈川県相模原市)

S. Ohno 他, Impact-driven Ocean Acidification as a Mechanism of Cretaceous-Palaeogene Mass Extinctions, CLE2015 (invited), 2015年4月24日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

S. Ohno 他, IMPACT-INDUCED MELT DROPLETS CREATED BY HYPERVELOCITY IMPACT EXPERIMENTS USING A LASER GUN, LPSC2015, 2015年3月19日、ヒューストン(アメリカ合衆国)

Sohsuke Ohno 他, Impact-driven ocean acidification as a mechanism of Cretaceous-Palaeogene mass extinctions, The 1st Conference on Laser Energetics - Laser Astrophysics -2015 (invited), 2015年1月12日、東海大学高輪キャンパス(東京都港区)

S. Ohno 他, Impact-driven Ocean Acidification as a Mechanism of Cretaceous-Palaeogene Mass Extinction, AGU2014, 2014年12月17日、サンフランシスコ(アメリカ合衆国)

大野宗祐 他, 成層圏における微生物捕獲実験、大気球シンポジウム、2014年11月6日~7日、宇宙航空研究開発機構相模原キャンパス(神奈川県相模原市)

S. Ohno 他, Impact-driven Ocean Acidification as a Mechanism of Cretaceous-Palaeogene Mass Extinctions, AOGS 2014, 2014年7月31日、ロイトン札幌ホテル(北海道札幌市)

S. Ohno 他, Impact-driven Ocean Acidification as a Mechanism of Cretaceous-Palaeogene Mass Extinctions, Goldschmidt2014. 2014年6月11日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

他 8 件

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

大野宗祐 (OHNO, Sohsuke)

千葉工業大学・惑星探査研究センター・上席研究員

研究者番号: 80432631

### (2) 研究分担者

瀬川高弘 (SEGAWA, Takahiro)

山梨大学・総合研究部・助教

研究者番号: 90425835