

微生物生態系による原子炉内物体の
腐食・変質に関する評価研究
(委託研究)

—令和2年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業—

Study of Corrosion and Degradation of the Objects
in the Nuclear Reactor by Microorganisms
(Contract Research)

- FY2020 Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource
Development Project -

福島研究開発部門 福島研究開発拠点 廃炉環境国際共同研究センター
慶應義塾

Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science,
Fukushima Research Institute, Sector of Fukushima Research and Development
Keio University

January 2022

Japan Atomic Energy Agency

日本原子力研究開発機構

本レポートは国立研究開発法人日本原子力研究開発機構が不定期に発行する成果報告書です。本レポートはクリエイティブ・コモンズ表示 4.0 国際 ライセンスの下に提供されています。本レポートの成果（データを含む）に著作権が発生しない場合でも、同ライセンスと同様の条件で利用してください。（<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.ja>）
なお、本レポートの全文は日本原子力研究開発機構ウェブサイト（<https://www.jaea.go.jp>）より発信されています。本レポートに関しては下記までお問合せください。

国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 JAEA イノベーションハブ 研究成果利活用課
〒319-1195 茨城県那珂郡東海村大字白方2番地4
電話 029-282-6387, Fax 029-282-5920, E-mail:ird-support@jaea.go.jp

This report is issued irregularly by Japan Atomic Energy Agency.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.en>).

Even if the results of this report (including data) are not copyrighted, they must be used under the same terms and conditions as CC-BY.

For inquiries regarding this report, please contact Institutional Repository and Utilization Section, JAEA Innovation Hub, Japan Atomic Energy Agency.

2-4 Shirakata, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-1195 Japan

Tel +81-29-282-6387, Fax +81-29-282-5920, E-mail:ird-support@jaea.go.jp

微生物生態系による原子炉内物体の腐食・変質に関する評価研究

(委託研究)

—令和2年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業—

日本原子力研究開発機構 福島研究開発部門 福島研究開発拠点
廃炉環境国際共同研究センター

慶應義塾

(2021年10月13日受理)

日本原子力研究開発機構（JAEA）廃炉環境国際共同研究センター（CLADS）では、令和2年度 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業（以下、「本事業」という）を実施している。

本事業は、東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所（1F）の廃炉等をはじめとした原子力分野の課題解決に貢献するため、国内外の英知を結集し、様々な分野の知見や経験を、従前の機関や分野の壁を越えて緊密に融合・連携させた基礎的・基盤的研究及び人材育成を推進することを目的としている。

平成30年度の新規採択課題から実施主体を文部科学省から JAEA に移行することで、JAEA とアカデミアとの連携を強化し、廃炉に資する中長期的な研究開発・人材育成をより安定的かつ継続的に実施する体制を構築した。

本研究は、研究課題のうち、令和元年度に採択された「微生物生態系による原子炉内物体の腐食・変質に関する評価研究」の令和元年度と令和2年度の研究成果について取りまとめたものである。本課題は令和2年度が最終年度となるため2年度分の成果を取りまとめた。

本研究の目的は、福島第一原子力発電所の廃炉プロセスに有用となる微生物に関係した知見を得ることにある。このため、同発電所やその敷地内外に生息する微生物群集の実態を明らかにする。1Fの敷地境界南（処理水タンク群の南）の表層土、発電所近くの海底土とその直上水、3 km 沖合の表層水等からサンプルを採取し、メタゲノム解析（微生物の培養を介せず、その DNA を直接解読することで、生息する微生物の情報を得ること）を実施した。その結果、現状で、1F 敷地周辺で検出される放射線量であれば、その高低にかかわらず、同じような環境を比較した場合、細菌叢の構造に大きな変化がないことが示唆された。また、1F 2号機のトールラス室に由来する環境 DNA の解析を行い、トールラス室では、チオ硫酸塩酸化細菌が主たる構成細菌として同定されると共に、幾つかの細菌種がバイオフィーム（微生物の集合体）を作っている可能性を示唆した。共同研究を行ったロシアのカザン大学の研究者は、日本で得られた配列データを情報学的に解析すると共に、ロシアの放射線による環境汚染に関してまとめた。これらの知見を総括し、1F の廃炉プロセスに有用となる提言をまとめた。

本報告書は、日本原子力研究開発機構の英知事業における委託業務として、慶應義塾が実施した成果を取りまとめたものである。

廃炉環境国際共同研究センター：〒979-1151 福島県双葉郡富岡町大字本岡字王塚 790-1

Study of Corrosion and Degradation of the Objects in the Nuclear Reactor by Microorganisms
(Contract Research)

— FY2020 Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project —

Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science,
Fukushima Research Institute, Sector of Fukushima Research and Development
Japan Atomic Energy Agency
Tomioka-machi, Futaba-gun, Fukushima-ken

Keio University

(Received October 13, 2021)

The Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science (CLADS), Japan Atomic Energy Agency (JAEA), had been conducting the Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project (hereafter referred to “the Project”) in FY2020.

The Project aims to contribute to solving problems in the nuclear energy field represented by the decommissioning of the Fukushima Daiichi Nuclear Power Station (1F), Tokyo Electric Power Company Holdings, Inc. (TEPCO). For this purpose, intelligence was collected from all over the world, and basic research and human resource development were promoted by closely integrating/collaborating knowledge and experiences in various fields beyond the barrier of conventional organizations and research fields.

The sponsor of the Project was moved from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology to JAEA since the newly adopted proposals in FY2018. On this occasion, JAEA constructed a new research system where JAEA-academia collaboration is reinforced and medium-to-long term research/development and human resource development contributing to the decommissioning are stably and consecutively implemented.

Among the adopted proposals in FY2019, this report summarizes the research results of the “Study of corrosion and degradation of the objects in the nuclear reactor by microorganisms” conducted in FY2019 and FY2020. Since the final year of this proposal was FY2020, the results for two fiscal years were summarized.

The purpose of the study is to obtain knowledge related to microorganisms that will be useful in the decommissioning process of 1F. Therefore, we clarified the current conditions of the microbial community inhabiting the power plant and its premises. Environmental samples were taken from several sites such as, topsoil from the south of the plant site boundary (south of the treated water tanks), seabed soil and its above water near the plant, surface water 3km offshore, and metagenomic analysis (which enables to obtain information on the inhabiting microorganisms by directly decoding its DNA without culturing) was carried out. The results showed that in the present condition, the radiation levels detected around the 1F suggests no major differences in the structure of the bacterial flora when comparing similar environments, regardless of the heights. From the analysis of the environmental DNA obtained from torus room of Unit 2 of 1F, thiosulfate-oxidizing bacterium was identified as the main constituent bacterium, and it was suggested that several bacterial species may form biofilms (biofilms are a collective of one or more types of microorganisms). Researchers at Kazan Federal University in Russia, who collaborated on the study, summarized the informatics analysis of the sequence data obtained in Japan and the environmental contamination caused by the radiation in Russia. These findings were integrated, and we summarized the proposals that will be useful for the decommissioning process of 1F.

Keywords: Environmental Microbiome, Metagenome Analysis, Bacteria, Microalga, Next Generation Sequencer (NGS), Soil, Seawater, Joint Research with Russia

This work was performed by Keio University under contract with Japan Atomic Energy Agency.

目次

1. 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業の概要	1
2. 平成 30 年度 採択課題	2
3. 令和元年度 採択課題	5
4. 令和 2 年度 採択課題	8
付録 成果報告書	11

Contents

1. Outline of Nuclear Energy Science & Technology and Human Resource Development Project	1
2. Accepted Proposal in FY2018.....	2
3. Accepted Proposal in FY2019.....	5
4. Accepted Proposal in FY2020.....	8
Appendix Result Report	11

This is a blank page.

1. 英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業の概要

文部科学省では、「東京電力(株)福島第一原子力発電所の廃止措置等研究開発の加速プラン(平成26年6月文部科学省)」等を踏まえ、平成27年度から「英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業」(以下、「本事業」という。)を立ち上げ、「戦略的原子力共同研究プログラム」、「廃炉加速化研究プログラム」及び「廃止措置研究・人材育成等強化プログラム」を推進している。

具体的には、国内外の英知を結集し、国内の原子力分野のみならず様々な分野の知見や経験を、機関や分野の壁を越え、国際共同研究も含めて緊密に融合・連携させることにより、原子力の課題解決に資する基礎的・基盤的研究や産学が連携した人材育成の取組を推進している。

一方、日本原子力研究開発機構(以下、「JAEA」という。)では、平成27年に廃炉国際共同研究センター(以下、「CLADS」という。現:廃炉環境国際共同研究センター)を組織し、「東京電力ホールディングス(株)福島第一原子力発電所の廃止措置等に向けた中長期ロードマップ」等を踏まえ、東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所廃炉(以下、「1F廃炉」という。)に係る研究開発を進めている。

また、平成29年4月にCLADSの中核拠点である「国際共同研究棟」の運用を開始したことを踏まえ、今後はCLADSを中核に、廃炉の現場ニーズを踏まえた国内外の大学、研究機関等との基礎的・基盤的な研究開発及び人材育成の取組を推進することにより、廃炉研究拠点の形成を目指すことが期待されている。

このため、本事業では平成30年度の新規採択課題から実施主体を文部科学省からJAEAに移行することで、JAEAとアカデミアとの連携を強化し、廃炉に資する中長期的な研究開発・人材育成をより安定的かつ継続的に実施する体制を構築することとし、従来のプログラムを、①共通基盤型原子力研究プログラム、②課題解決型廃炉研究プログラム、③国際協力型廃炉研究プログラム、④研究人材育成型廃炉研究プログラム(令和元年度より新設)に再編した。

2. 平成 30 年度 採択課題

平成 30 年度採択課題については以下のとおりである。

課題数：19 課題

共通基盤型原子力研究プログラム	11 課題（若手研究 6 課題、一般研究 5 課題）
課題解決型廃炉研究プログラム	6 課題
国際協力型廃炉研究プログラム	2 課題（日英共同研究）

平成 30 年度 採択課題一覧

共通基盤型原子力研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
被災地探査や原子力発電所建屋内情報収集のための半自律ロボットを用いたセマンティックサーベイマップ生成システムの開発	河野 仁	東京工芸大学
汚染土壌の減容を目的とした重液分離による放射性微粒子回収法の高度化	山崎 信哉	筑波大学
ラドンを代表としたアルファ核種の吸入による内部被ばくの横断的生体影響評価	片岡 隆浩	岡山大学
炉心溶融物の粘性及び表面張力同時測定技術の開発	大石 佑治	大阪大学
iPS 細胞由来組織細胞における放射線依存的突然変異計測系の確立	島田 幹男	東京工業大学
レーザー共鳴イオン化を用いた同位体存在度の低いストロンチウム 90 の迅速分析技術開発	岩田 圭弘	東京大学

共通基盤型原子力研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
放射性核種の長期安定化を指向した使用済みゼオライト焼結固化技術の開発	新井 剛	芝浦工業大学
燃料デブリ取り出しを容易にするゲル状充填材の開発	牟田 浩明	大阪大学
レーザー蛍光法を用いた燃料デブリ変質相の同定	斉藤 拓巳	東京大学
過酷炉心放射線環境における線量測定装置の開発	岡本 保	木更津工業 高等専門学校
レーザー加工により発生する微粒子の解析と核種同定手法の開発	長谷川 秀一	東京大学

課題解決型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
合金相を含む燃料デブリの安定性評価のための基盤研究	桐島 陽	東北大学
ガンマ線画像スペクトル分光法による高放射線場環境の画像化による定量的放射能分布解析法	谷森 達	京都大学
燃料デブリ取出し時における放射性核種飛散防止技術の開発	鈴木 俊一	東京大学
アルファダストの検出を目指した超高位置分解能イメージング装置の開発	黒澤 俊介	東北大学
ナノ粒子を用いた透明遮へい材の開発研究	渡邊 隆行	九州大学
先端計測技術の融合で実現する高耐放射線燃料デブリセンサーの研究開発	萩原 雅之	高エネルギー 加速器研究機構

国際協力型廃炉研究プログラム（日英共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
放射性微粒子の基礎物性解明による廃炉作業リスク低減への貢献	五十嵐 康人	茨城大学
放射線耐性の高い薄型 SiC 中性子検出器の開発	三澤 毅	京都大学

3. 令和元年度 採択課題

令和元年度採択課題については以下のとおりである。

課題数：19 課題

- 共通基盤型原子力研究プログラム 7 課題（若手研究 2 課題、一般研究 5 課題）
- 課題解決型廃炉研究プログラム 4 課題
- 国際協力型廃炉研究プログラム 4 課題（日英共同研究 2 課題、日露共同研究 2 課題）
- 研究人材育成型廃炉研究プログラム 4 課題

令和元年度 採択課題一覧

共通基盤型原子力研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
ウラニル錯体化学に基づくテーラーメイド型新規海水ウラン吸着材開発	鷹尾 康一朗	東京工業大学
動作不能からの復帰を可能とする多連結移動ロボットの半自律遠隔操作技術の確立	田中 基康	電気通信大学

共通基盤型原子力研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
一次元光ファイバ放射線センサを用いた原子炉建屋内放射線源分布計測	瓜谷 章	名古屋大学
低線量・低線量率放射線被ばくによる臓器別酸化ストレス状態の検討	鈴木 正敏	東北大学
単一微粒子質量分析法に基づくアルファ微粒子オンラインモニタリングに向けた基礎検討	豊嶋 厚史	大阪大学
幹細胞動態により放射線発がんを特徴付ける新たな評価系の構築	飯塚 大輔	量子科学技術 研究開発機構
耐放射線性ダイヤモンド半導体撮像素子の開発	梅沢 仁 (令和元年度まで) 大曲 新矢	産業技術総合 研究所

課題解決型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
Multi-Physics モデリングによる福島2・3号機ペDESTAL燃料デブリ深さ方向の性状同定	山路 哲史	早稲田大学
燃料デブリ取出しに伴い発生する廃棄物のフッ化技術を用いた分別方法の研究開発	渡邊 大輔	日立 GE ニュークリ ア・エナジー
アパタイトセラミックスによる ALPS 沈殿系廃棄物の安定固化技術の開発	竹下 健二	東京工業大学
拡張型スーパードラゴン多関節ロボットアームによる圧力容器内燃料デブリ調査への挑戦	高橋 秀治	東京工業大学

国際協力型廃炉研究プログラム（日英共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
高い流動性および陰イオン核種保持性を有するアルカリ刺激材料の探索と様々な放射性廃棄物の安全で効果的な固化	佐藤 努	北海道大学
再臨界前の中性子線増に即応可能な耐放射線 FPGA システムの開発	渡邊 実	静岡大学 (令和2年度 まで) 岡山大学

国際協力型廃炉研究プログラム（日露共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリ取出し臨界安全技術の高度化	小原 徹	東京工業大学
微生物生態系による原子炉内物体の腐食・変質に関する評価研究	金井 昭夫	慶應義塾

研究人材育成型廃炉研究プログラム

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリ取り出し時における炉内状況把握のための遠隔技術に関する研究人材育成	浅間 一	東京大学
化学計測技術とインフォマティクスを融合したデブリ性状把握手法の開発とタイアップ型人材育成	高貝 慶隆	福島大学
放射線・化学・生物的作用の複合効果による燃料デブリ劣化機構の解明	大貫 敏彦 (平成30年度まで) 竹下 健二	東京工業 大学
燃料デブリ分析のための超微量分析技術の開発	永井 康介	東北大学

4. 令和2年度 採択課題

令和2年度は、2つのプログラムにおいて、研究課題の採択を決定した。
公募の概要は以下のとおりである。

公募期間：令和2年3月17日～令和2年5月14日（課題解決型）
令和2年5月13日～令和2年7月15日（国際協力型）

課題数：10 課題

課題解決型廃炉研究プログラム 8 課題（若手研究2 課題、一般研究6 課題）
国際協力型廃炉研究プログラム 2 課題（日英共同研究）

これらの提案について、外部有識者から構成される審査委員会において、書面審査及び面接審査、日英共同研究については二国間の合同審査を実施し、採択候補課題を選定した。

その後、PD（プログラムディレクター）・PO（プログラムオフィサー）会議での審議を経て、採択課題を決定した。

令和2年度 採択課題一覧

課題解決型廃炉研究プログラム

【若手研究】

課題名	研究代表者	所属機関
燃料デブリにおける特性の経年変化と環境劣化割れの調査	楊 会龍	東京大学
健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断及び抑制技術の開発	岡本 章玄	物質・材料研究機構

課題解決型廃炉研究プログラム

【一般研究】

課題名	研究代表者	所属機関
遮蔽不要な臨界近接監視システム用ダイヤモンド中性子検出器の要素技術開発	田中 真伸	高エネルギー加速器研究機構
α / β / γ 線ラジオリシス影響下における格納容器系統内広域防食の実現：ナノバブルを用いた新規防食技術の開発	渡邊 豊	東北大学
β 、 γ 、X線同時解析による迅速・高感度放射性核種分析法の開発	篠原 宏文	日本分析センター
合理的な処分のための実機環境を考慮した汚染鉄筋コンクリート長期状態変化の定量評価	丸山 一平	東京大学
溶脱による変質を考慮した汚染コンクリート廃棄物の合理的処理・処分の検討	小崎 完	北海道大学
マイクロ波重畳 LIBS によるデブリ組成計測の高度化と同位体の直接計測への挑戦	池田 裕二	アイラボ

国際協力型廃炉研究プログラム（日英共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
革新的水質浄化剤の開発による環境問題低減化技術の開拓	浅尾 直樹	信州大学
無人航走体を用いた燃料デブリサンプルリターン技術の研究開発	鎌田 創	海上・港湾・航空技術研究所

本報告書は、以下の課題の令和元年度と令和 2 年度の研究成果を取りまとめたものである。本課題は令和 2 年度が最終年度となるため 2 年度分の成果を取りまとめている。

国際協力型廃炉研究プログラム（日露共同研究）

課題名	研究代表者	所属機関
微生物生態系による原子炉内物体の腐食・変質に関する評価研究	金井 昭夫	慶應義塾

研究成果を取りまとめた成果報告書を付録として添付する。

付録
成果報告書

This is a blank page.

令和 2 年度

日本原子力研究開発機構

英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業

微生物生態系による

原子炉内物体の腐食・変質に関する評価研究

(契約番号 R02I049)

成果報告書

令和 2 年 12 月

学校法人慶應義塾

本報告書は、国立研究開発法人日本原子力研究開発機構の「英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業」による委託業務として、学校法人慶應義塾が実施した「微生物生態系による原子炉内物体の腐食・変質に関する評価研究」の令和元年度から令和2年度の研究成果を取りまとめたものです。本課題は令和2年度が最終年度となるため2年分の成果を取りまとめています。

目次

概略	vii
1. はじめに	1
2. 業務計画	2
2.1 全体計画	2
3. 業務の実施内容及び成果	3
3.1 福島第一原発敷地内外に生息する微生物群集のメタゲノム解析	3
3.1.1 簡便かつ最新の方法を用いた微生物群集のメタゲノム解析法の確立	3
3.1.2 福島第一原発敷地内外の地下水や敷地内の土壌等のサンプリング (連携先：JAEA)	15
3.1.3 福島第一原発敷地内外に生息する微生物群集のメタゲノム解析	31
3.2 データベース構築	65
3.2.1 データベース構築 (再委託先：理化学研究所)	65
3.2.2 カザン大学との情報交換 (慶應義塾大学、再委託先：理化学研究所)	67
3.3 研究推進	72
3.3.1 国際会議 OPIC-LSSE2020	73
3.3.2 日露ワークショップ 2020	74
3.3.3 核燃料物質使用施設でのゲノム分析手法について	76
3.3.4 滞留水試料の入手と改善方法	79
4. 結言	83
参考文献	84
附属資料-1 用語解説	88
附属資料-2 微生物叢データ集 様々な環境でのメタゲノム解析結果	90

主たる執筆者リスト

事業代表者	学校法人慶應義塾慶應義塾大学	金井 昭夫
	学校法人慶應義塾慶應義塾大学	藁科 友朗
連携機関	国立研究開発法人日本原子力研究開発機構	駒 義和
	国立研究開発法人日本原子力研究開発機構 (福井大学附属国際原子力工学研究所)	西村 昭彦
	国立研究開発法人日本原子力研究開発機構	比内 浩
ロシア側	カザン連邦大学	Elena Shagimardanova

表一覧

表 3.1.1-1	慶應義塾大学先端生命科学研究所（山形県鶴岡市）環境サンプル……………	3
表 3.1.1-2	検討した環境サンプルからの DNA 調製キット……………	4
表 3.1.1-3	本研究に使用したプライマーのリスト……………	7
表 3.1.2-1	福島第一原発 2 号機原子炉建屋地階トーラス室にて採取された汚染水の性状データ……………	25
表 3.1.2-2	汚染水を孔径 10 μm フィルターによりろ過して得られた回収物の元素分析データ……………	26
表 3.1.2-3	福島メタゲノム解析 サンプルリスト まとめ (1/4) ……………	27
表 3.1.2-3	福島メタゲノム解析 サンプルリスト まとめ (2/4) ……………	28
表 3.1.2-3	福島メタゲノム解析 サンプルリスト まとめ (3/4) ……………	29
表 3.1.2-3	福島メタゲノム解析 サンプルリスト まとめ (4/4) ……………	30
表 3.1.3-1	塩基配列決定に使用したアンプリコンのまとめ（イルミナ社のシーケンサーによる）……………	33
表 3.1.3-2	環境微生物は未培養（難培養）なものが多い……………	47
表 3.1.3-3	トーラス室滞留水から得た環境 DNA の PCR 法による増幅……………	56
表 3.1.3-4	ONT 社ミナイオンによるトーラス室滞留水由来バクテリアの 16S rRNA の解析記録……………	57
表 3.1.3-5	アサインされたリード数の変化……………	58
表 3.3.3-1	核燃料物質使用施設において汚染水を分析する上での制約……………	77
表 3.3.4-1	様々な水環境から回収できた DNA 量の割合……………	79
表 3.3.4-2	微生物と微生物腐食に関するモニタリング手法……………	82

図一覧

図 1.1	本プロジェクトの研究体制	1
図 2.1-1	全体計画図	2
図 3.1.1-1	慶應義塾大学先端生命科学研究所（山形県鶴岡市）での環境サンプルの取得	3
図 3.1.1-2	慶應義塾大学先端生命科学研究所（山形県鶴岡市）環境サンプルからの DNA 調製とキットの検討	5
図 3.1.1-3	生物の三大ドメインの系統樹	6
図 3.1.1-4	慶應義塾大学（鶴岡市）環境サンプル DNA を用いた PCR 実験例	8
図 3.1.1-5	簡易 PCR システムのセットアップ	9
図 3.1.1-6	確立した実験プロトコール（1/4）	10
図 3.1.1-6	確立した実験プロトコール（2/4）	11
図 3.1.1-6	確立した実験プロトコール（3/4）	12
図 3.1.1-6	確立した実験プロトコール（4/4）	13
図 3.1.2-1	福島県及び隣接地の地質概略図	15
図 3.1.2-2	福島県石川町産の燐灰ウラン鉱石	16
図 3.1.2-3	福島第一原発建屋周辺の地層構造	16
図 3.1.2-4	小型冷凍庫と-40℃で凍結した土壌と河川水のサンプル	17
図 3.1.2-5	福島第一原発近隣のサンプリングポイント候補	18
図 3.1.2-6	関連地域候補地	19
図 3.1.2-7	土壌サンプリングポイント	19
図 3.1.2-8	表層水サンプリングポイント	20
図 3.1.2-9	海底土とその直上水のサンプリング	21
図 3.1.2-10	日立港でのサンプリングポイント	21
図 3.1.2-11	人形峠環境技術センターでの鉱水（淡水）の採取	22
図 3.1.2-12	和久観音鉱山跡の様子	22
図 3.1.2-13	和久観音鉱山跡における 2 回目（令和 2 年 8 月 6 日）のサンプリング箇所	24
図 3.1.2-14	減圧濾過による微生物サンプリングの様子	24
図 3.1.2-15	福島第一原発 原子炉建屋の構造	25
図 3.1.2-16	2 号機原子炉建屋地階トラス室にて採取された汚染水の外観	26
図 3.1.3-1	福島第一原発南森林土壌サンプルからの微生物ゲノム DNA の調製	31
図 3.1.3-2	福島第一原発近隣海洋の表層水からの微生物ゲノム DNA の調製	32
図 3.1.3-3	塩基配列決定に使用した福島環境微生物由来の PCR 産物	32
図 3.1.3-4	生物の階層的な分類	34
図 3.1.3-5	福島土壌由来 B1 サンプルを構成する生物ドメイン、門、綱	35
図 3.1.3-6	福島土壌、海水サンプルに由来するバクテリアの門レベルでの比較	37
図 3.1.3-7	福島土壌、海水サンプルに由来するバクテリアの綱レベルでの比較	38
図 3.1.3-8	福島土壌には CPR バクテリアが生息する	39
図 3.1.3-9	福島海洋の表層水由来 B7 サンプルを構成する生物ドメイン、門、綱	41

図 3.1.3-10	環境微生物叢の階層的なクラスタリング	42
図 3.1.3-11	福島土壌の放射線と微生物叢	44
図 3.1.3-12	本研究で解析した環境に見出された金属腐食や放射線耐性に関わる微生物	46
図 3.1.3-13	ONT 社ミナイオン (MinION) シークエンサーシステム	48
図 3.1.3-14	和久観音鉱山跡土壌からの環境 DNA と RNA 調製	51
図 3.1.3-15	サンプルのリード数と種の多様性の例	52
図 3.1.3-16	各環境に由来する微生物がもつ代謝経路 (KEGG データベースを利用) に基づいた主成分分析	54
図 3.1.3-17	PICRUSt2 を用いた各環境の機能的プロファイリング	54
図 3.1.3-18	2 号機原子炉建屋地階トーラス室にて採取された滞留水のろ過物	55
図 3.1.3-19	トーラス室由来微生物叢の解析 (門、綱、属レベル)	58
図 3.1.3-20	微生物叢の環境因子 (トピック) の割合に基づく環境の 2 次元マッピング	60
図 3.1.3-21	各環境におけるトピックの割合	61
図 3.1.3-22	福島土壌、海水サンプルに由来する真核生物 (微細藻類 18S rRNA プライマー) の門レベルでの比較	63
図 3.1.3-23	福島土壌、海水サンプルに由来する真核生物 (微細藻類 18S rRNA プライマー) の綱レベルでの比較	64
図 3.2.1-1	メタゲノムデータベース「MicrobeDB.jp」のフロントページ	65
図 3.2.1-2	国立遺伝学研究所が開発した微生物群集構造解析ウェブアプリケーション Latent Environment Allocation (LEA)	66
図 3.2.2-1	ロシア国内での放射能に係る関係する地区等のまとめ	70
図 3.3.1-1	OPIC-LSSE2020 のポスター	73
図 3.3.2-1	日露ワークショップ 2020 のプログラム	75
図 3.3.3-1	福島第一原発汚染水中のゲノム分析手順	76

略語一覧

CLADS	: Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science	(廃炉環境国際共同研究センター)
CPF	: Chemical Processing Facility	(高レベル放射性物質研究施設)
CPR	: Candidate Phyla Radiation	(放射状のバクテリア候補門)
DB	: Database	(データベース)
DNA	: Deoxyribonucleic Acid	(デオキシリボ核酸)
EtBr	: Ethidium Bromide	(臭化エチジウム)
JAEA	: Japan Atomic Energy Agency	(国立研究開発法人日本原子力研究開発機構)
NGS	: Next Generation Sequencer	(次世代シーケンサー)
ONT	: Oxford Nanopore Technologies	(オックスフォードナノポア テクノロジー社)
PCR	: Polymerase Chain Reaction	(ポリメラーゼ [DNA 合成酵素] 連鎖反応)
PCV	: Primary Containment Vessel	(原子炉格納容器)
RNA:	: Ribonucleic Acid	(リボ核酸)
rRNA	: Ribosomal RNA	(リボソーム RNA)

概略

① 研究の背景

東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所（以下、「福島第一原発」と略す。）を取り巻く環境状況の分析は、これまで主に物理化学的分析を中心としてきており、生物学的なアプローチは未だなされていないのが現状である。一方で、事故を起こしたスリーマイル島原子炉 2 号機の燃料棒除去作業において、炉内に藻類、菌類、酵母、細菌などの微生物が繁殖し、作業の妨げになったとの報告がなされている[1]。実際、線量率が毎時 180 Gy というような、人間が即死する高放射能環境下でも、一部の微生物は繁殖可能であり[2]、高放射能に繰り返し曝された微生物が放射能耐性を獲得することもある[3]。福島第一原発においても地下水の流入により侵入した微生物等が建屋内で生息し、その繁殖が燃料デブリや構造材の腐食・変性を促進している可能性を否定できない。例えば、東京電力ホールディングス株式会社は多核種除去設備入り口において、硫化水素の発生を確認し、硫酸塩還元菌との関係を議論している[4]。また、Ryu らは、模擬デブリの鉄イオン溶出実験を行い、微生物が鉄イオンの溶出を促進していることを明らかにしている[5]。

② 解決すべき課題

廃炉プロセスを効果的に進めるために、福島第一原発の内外に実際にどのような微生物が生息しているのかを、最新のゲノム科学の手法を用いて、明らかにする。

③ 本研究の目的

福島第一原発の炉内の環境に加え、周辺の土壌や海水などに生息する微生物を、メタゲノムの手法（微生物の培養を介することなく、環境サンプルから直接に、微生物叢に由来する環境 DNA を調製し、その塩基配列を決定・解析することで、生物種の同定を行い、特徴を明らかにすること）を用いて、性状解析することを主たる目的とする。令和元年度は、福島第一原発周辺の土壌や海水の環境サンプルを解析する。また、ロシア・カザン連邦大学（Kazan Federal University、以下、「カザン大学」と略す。）との共同研究を通して、得られた遺伝子の特徴を解析すると共に、チェルノブイリ原発事故やその廃炉に関する資料を集めることも副次的な目的とする。

④ 本研究の実施内容

本研究は、福島第一原発敷地内外に生息する微生物群集のメタゲノム解析を基軸として研究を進める。得られた情報をロシアのカザン大学と共に解析し、データベースとしてまとめる。またカザン大学とは、ロシアの廃炉研究における現状を調査し、まとめる。

福島第一原発敷地内外に生息する微生物群集のメタゲノム解析

1) 簡便かつ最新の方法を用いた微生物群集のメタゲノム解析法の確立

福島第一原発敷地内で、原子炉内の微生物群集サンプルから DNA や RNA のサンプルが調製でき、簡便かつ最新のメタゲノム解析を遂行できる手法を確立するため、遺伝子解析施設のある学校法人慶應義塾慶應義塾大学（以下、「慶應義塾大学」と略す。）の先端生命科学研究所（山形県鶴岡市）で、山形県の土壌や河川のサンプルを用いて、微生物に由来する核酸の効率的な調製法や正確な PCR 法（DNA 合成酵素連鎖反応による DNA 増幅法）の条件を決め、プロトコールを構築する。また、構築したプロトコールを国立研究開発法人日本原子力研究開発機構（以下、「JAEA」と略す。）の研究者に対し技術移転を行う。

2) 福島第一原発敷地内外の地下水や敷地内の土壌のサンプリング（連携先：JAEA）

福島第一原発敷地内外のサンプリングポイントを検討すると共に、敷地内に関してはサンプルの入手方法を検討する。また、これらの解析を進めるため、地元自治体や東京電力ホールディングス株式会社との調整を図る。決定したサンプリングポイントにおいて、微生物含有サンプルの採取を行い、放射能を測定する。

3) 福島第一原発敷地内外に生息する微生物群集のメタゲノム解析

上記 2) で取得した環境サンプルからゲノム DNA の調製を行う。調製した DNA に関して、以下の 2 つの方法にて微生物叢のメタゲノム解析を遂行する。(A) PCR 法によりリボソーム DNA 遺伝子を増幅し、その塩基配列の決定をする。決定した配列により、種の情報を取得する。(B) Nanopore シーケンサーにより、比較的長い DNA 断片の配列解析と、その断片の塩基配列情報を用いた生物種の情報学的な同定を行う。

データベース構築

1) データベースの構築（再委託先：国立研究開発法人理化学研究所（以下、「理化学研究所」と略す。）

本研究で得られるメタゲノム情報（遺伝子の配列）及び生息環境に関する各種物理・化学情報は、国立遺伝学研究所が開発・運用している微生物に関するデータベース「MicrobeDB.jp」に収録する。また、得られたデータの可視化及びサンプル間の比較、さらに、公開されている他の膨大な情報との比較などを可能とするためのアプリケーションを開発する。

2) カザン大学との情報交換（慶應義塾大学、再委託先：理化学研究所）

ロシア・カザン大学の微生物研究者と情報交換をしながら、お互いのデータに関して議論する。また、データベースで公開できるデータに関して取りまとめる。

⑤ 本研究の成果

福島第一原発敷地内外に生息する微生物群集のメタゲノム解析（成果）

1) 簡便かつ最新の方法を用いた微生物群集のメタゲノム解析法の確立

<< 令和元年度 >>

慶應義塾大学の先端生命科学研究所の土壌や河川のサンプルを用いて、市販の DNA 抽出キットの有効性を検討し、土壌と河川のサンプルそれぞれから環境の微生物に由来する DNA の調製が可能となった。また、同 DNA からバクテリアの 16S rRNA 遺伝子等を PCR 法にて増幅するためのプロトコールを完成させた。

<< 令和 2 年度 >>

令和元年度に決定した微生物群集の塩基配列（16S rRNA 遺伝子）をクラスタリングすることで微生物群集の構造解析を行った。また、茨城県東海村の JAEA 核燃料サイクル工学研究所の管理区域内で、簡便かつ最新のメタゲノム解析が遂行可能であるように、同研究所スタッフに上記の環境水からの DNA 調製法、PCR 法、DNA 塩基配列決定法などの技術移転を行った。

2) 福島第一原発敷地内外の地下水や敷地内の土壌のサンプリング（連携先：JAEA）

<< 令和元年度 >>

福島第一原発敷地内外において、敷地境界南（処理水タンク群の南）の表層土、3 km 沖合の表層水、福島第一原発近くの海底土とその直上水からサンプルを採取した。また関連する環境サンプルとして岡山県人形峠のウラン鉱床の湧き水や、福島県石川町和久観音のウラン鉱山跡近傍の土壌、日立港やその沖合の海水等の採取をした。また、東京電力ホールディングス株式会社との打合せを経て、保管してある福島第一原発原子炉建屋内の滞留水などの分

析に着手することで了解を得た。合わせて、管理区域内の分析準備を行った。

<< 令和2年度 >>

令和元年度に取得した機材の管理区域内整備を行うとともに、サンプリング時期における微生物群の変動を調べるために、福島第一原発敷地内外のサンプリングを続けた。また、福島第一原発建屋内部（トーラス室）からの微生物サンプル（滞留水）の取得を行った。各サンプリングポイントにおいて、温度、pH、放射線強度を測定した。得られた微生物の種類やその性状を文献情報等と比較して勘案することで、廃炉に関する微生物環境制御についての提言をまとめた。

3) 福島第一原発敷地内外に生息する微生物群集のメタゲノム解析

<< 令和元年度 >>

上記2)で取得した環境サンプルからゲノムDNAの調製を行った。調製したDNAに関して、以下の2つの方法にて微生物叢のメタゲノム解析を遂行した。(a) PCR法により、リボソームDNA遺伝子を増幅し、その塩基配列の決定をした。決定した配列により、主にバクテリアと微細藻類における生物群集を明らかにした。(b) 一部の環境ゲノムサンプルに対し Nanopore シーケンサーにより、比較的長いDNA断片の配列解析を行った。

<< 令和2年度 >>

令和元年度に引き続き、取得した環境サンプルからゲノムDNAの調製や全RNAの調製を行った。調製したDNAやRNAに関して、微生物叢のメタゲノム解析、ゲノム解析、トランスクリプトーム解析等を遂行した。その結果、現状で、福島第一原発敷地周辺で検出される放射線量であれば、その高低にかかわらず、同じような環境の細菌叢を比較した場合、細菌叢の構造に大きな変化がないことが示唆された。また、最近発表された、チェルノブイリで同定された微生物との比較解析、考察を行った。さらに、福島第一原発2号機のトーラス室に由来する環境DNAの解析の結果、トーラス室では、チオ硫酸塩酸化細菌が主たる構成要素として同定された。

データベース構築（成果）

1) データベースの構築（再委託先：理化学研究所）

<< 令和元年度 >>

本事業で解析されたシーケンスデータを統合データベース「MicrobeDB.jp」に登録することを検討し、本プロジェクト専用のプライベートデータベースを構築した。これにより、統合データベースシステムに付随する解析パイプラインで、本プロジェクト産出のデータ群のみならず公共データベースに収録されているデータとの比較解析が可能となった。

<< 令和2年度 >>

本研究で得られるメタゲノム情報（遺伝子の配列）及び生息環境に関する各種物理・化学情報は、令和元年度に引き続き国立遺伝学研究所が開発・運用している微生物に関するデータベース「MicrobeDB.jp」に収録した。また、得られたデータの可視化及びサンプル間の比較、さらに、公開されている他の膨大な情報との比較等を可能とするためのアプリケーションを改良した。

2) カザン大学との情報交換（慶應義塾大学、再委託先：理化学研究所）

<< 令和元年度 >>

令和元年12月にロシア側研究代表者の来日を受け、理化学研究所で会議を行った。ロシア側は日本の配列データを極限環境微生物の観点から解析することになった。また、ロシア語

で発表されたウクライナ国立研究所のチェルノブイリ原子炉関連の資料の英訳を相手方に依頼した。その結果、チェルノブイリ原子炉内における微生物腐食の兆候についての情報を得た。

<< 令和2年度 >>

ロシア・カザン大学の微生物研究者と遠隔システムや電子メールにて情報交換をしながら、お互いのデータに関して議論した。ロシア側は日本の配列データを情報学的に解析し、特に極限環境微生物学の観点からのコメントを行った。また、データベースで公開できるデータに関してとりまとめた。予定していたカザン大学への訪問は新型コロナウイルス感染症予防の観点から中止されたため、遠隔システムにて、日露の合同ワークショップを開催した。また、高放射線・嫌気環境にあった冥王代における微生物群集についての情報を収集し、福島第一原発内の微生物群集の理解に資した。

⑥ 研究推進

研究代表者の下で各研究項目間並びに東京電力ホールディングス株式会社や JAEA 廃炉環境国際共同研究センター（以下、「CLADS」と略す。）等との連携を密にして研究を進めた。また、打合せ及び企画調整会議等を複数回開催した。すなわち、キックオフミーティング（令和元年11月11日）、ロシア側の研究代表者の来日を受けての方針会議（令和元年12月11日）、東京電力ホールディングス株式会社との会合（令和元年8月23日、9月25日）、慶應義塾大学先端生命科学研究所での共同実験及び推進会議（令和2年2月11～13日）、国際ワークショップ（令和2年4月20日～24日、Online開催）、日露ワークショップ（令和2年8月10日、Online開催）、JAEA 核燃料サイクル工学研究所での共同実験（令和2年8月25日～27日）、原子炉のバクテリアに関する推進会議（令和2年10月14日）などを行った。さらに、他の英知事業採択者で微生物を研究対象にしているグループとの会合（令和2年11月12日）を持ち、将来の研究協力を確認した。

1. はじめに

本研究は、ゲノム解析に豊かな経験を持つ慶應義塾大学先端生命科学研究所の金井昭夫の研究グループが主体となってメタゲノム解析を行う。さらに、日本におけるメタゲノム解析のパイオニアである国立遺伝学研究所の黒川顕教授や高放射線耐性を持つ微生物の研究の第一人者である東洋大学の鳴海一成教授が、理化学研究所を通して参加している。この意味で、メタゲノム解析や高放射線環境における微生物群集の挙動の解析に関して、万全の態勢をとっている。また、ロシアで唯一の次世代シーケンサーセンターを擁するカザン大学が、ロシア側パートナーとして参加している。ロシアでは、チェルノブイリ事故に関して多くの研究が行われており、彼らを通して貴重な情報が手に入る可能性がある。さらに、本研究は、ゲノム科学者、微生物学者、天文学者、地球科学者、ロボット工学者、原子炉工学者の非常に広い分野からの超学際チームで遂行されるので、これまでの常識にこだわらない新規な発想を得る可能性がある（図 1.1 本プロジェクトの研究体制を参照）。

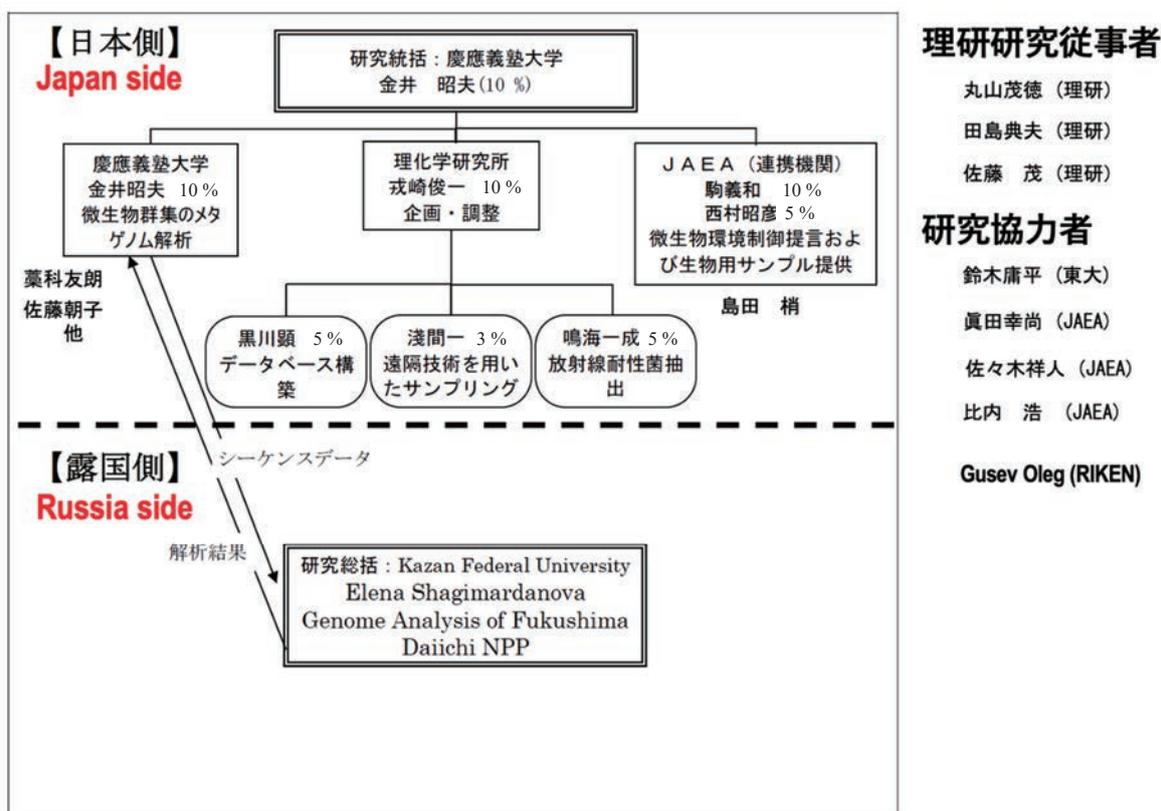


図 1.1 本プロジェクトの研究体制

これまでの廃炉研究は主に物理、化学、工学的な側面からのみ遂行されてきたが、本研究は最新のゲノム科学的な解析を通じて、微生物による腐食・変性の効果を考慮した上で、最も安全で効率的な炉内の滞留水環境安定化制御に関する指針を与える可能性がある。本研究を契機として、この側面での研究が評価され、具体的な成果として結実できるように考えている。

2. 業務計画

2.1 全体計画

本業務の全体計画図を図 2.1-1 に示す。



図 2.1-1 全体計画図

研究期間の約 14 ヶ月のうち、前半に低放射線量サンプル（福島第一原発近隣の敷地内土壌や海水、海底土等）を、後半に、福島第一原発建屋内の高放射線量サンプルを取り扱い、各々の微生物群集構造を明らかにする。解析は、日本（慶應義塾大学、理化学研究所、国立遺伝学研究所、JAEA 等）とロシア（カザン大学）の合同チームによって行い、その結果をデータベースに格納する。また、ロシア側にチェルノブイリ事故等に関する情報の収集を依頼する。

3. 業務の実施内容及び成果

3.1 福島第一原発敷地内外に生息する微生物群集のメタゲノム解析

3.1.1 簡便かつ最新の方法を用いた微生物群集のメタゲノム解析法の確立

<< 令和元年度 >>

① 慶應義塾大学先端生命科学研究所（山形県鶴岡市）での環境サンプルの取得

福島第一原発敷地内で、原子炉内の微生物群集サンプルから DNA が調製でき、簡便かつ最新のメタゲノム解析を遂行できる手法を確立する。この第一段階として、まず、慶應義塾大学先端生命科学研究所（山形県鶴岡市）の土壌や川水のサンプルを用いて、市販の DNA 抽出キットの有効性を検討した。サンプルの採取場所や日時等は表 3.1.1-1 に、採取場所の写真を図 3.1.1-1 にまとめている。

表 3.1.1-1 慶應義塾大学先端生命科学研究所（山形県鶴岡市）環境サンプル

分類	場所	採集日	コメント
土壌	山形県鶴岡市大宝寺日本国 403-1	令和元年 10月7日（月）	慶應義塾大学先端生命科学研究所裏山の川に面した土壌表面 1~2 cm（10 g 程度×6 袋）
川水	同上	令和元年 12月17日（火）	慶應義塾大学先端生命科学研究所裏の川水（16.5 °C pH: 7.4）



図 3.1.1-1 慶應義塾大学先端生命科学研究所（山形県鶴岡市）での環境サンプルの取得
(A) 土壌サンプル、(B) 川水サンプル

② 環境サンプルからの DNA 調製キットの検討と簡便なプロトコールの作成

慶應義塾大学 先端生命科学研究所近隣の土壌や川水を環境サンプルの資料例として、そこに生息する微生物の DNA を、培養を介さずに直接調製できる市販のキットを検討した。文献やカタログによる選別の後で、まず、土壌ではタカラバイオ株式会社（以下、「Takara」と略す。）の NucleoSpin Soil キットと株式会社ニッポンジーン（以下、「Nippon Gene」と略す。）の ISOIL キットをいくつかの条件で比較したが、基本的にどちらのキットでも環境由来のゲノム DNA の調製ができた（表 3.1.1-2 及び図 3.1.1-2）。一方で、ISOIL キットの方が、より高分子のゲノム DNA（20 キロベース以上）を再現性良く調製できたので、以後、全ての土壌サンプルで ISOIL キットを用いることにした。なお PCR 解析には、どのキットで取得した DNA も良い鋳型になることを確認している（後述）。次に環境水に由来する微生物のゲノム DNA を、本研究分野で信頼の厚い QIAGEN N. V.（以下、「QIAGEN」と略す。）の DNeasy Power Water キットを用いて検討した。この初段階として、環境水（川水）をミリポア社の 0.22 μm （あるいは 0.1 μm ）ポアの Durapore PVDF フィルターを通し、微生物群集をフィルター上にトラップした。DNeasy Power Water キットでは、環境 DNA は調製できるものの、サイズが 3~8 キロベースでスメア（ブロード）状になった。なお、環境水のフィルターからも ISOIL キットを用いてゲノム DNA の調製をすると、高分子のゲノム DNA が調製できたが、その収量は極めて悪かった。

表 3.1.1-2 検討した環境サンプルからの DNA 調製キット

対象	会社名	キット名	コメント
土壌	Takara	NucleoSpin Soil	ゲノム DNA を調製できるが、きれいな高分子のものは望めず、スメアを引く。
土壌	Nippon Gene	ISOIL	20 キロベース以上の長さのゲノム DNA が調製できる。
川水	QIAGEN	DNeasy Power Water	スメアを引くが川水などから、解析に十分な量のゲノム DNA が調製できる。



図 3.1.1-2 慶應義塾大学先端生命科学研究所（山形県鶴岡市）環境サンプルからの DNA 調製とキットの検討

- (A) 土壌からのゲノム DNA 調製の検討。Takara 社と Nippon Gene 社のキットを、付属の試薬（SL1、SL2 や Enhancer SX と明記）の有無や、サンプルの量などを変えて比較している。Nippon Gene 社の ISOIL のキットが高分子のゲノム DNA を調製できることが分かる。
- (B) 川水からのゲノム DNA の調製。2 種のポアサイズのろ紙を用いて微生物を集めたが、DNeasy Power Water キットでゲノム DNA は調製できるものの、サイズが 3~8 キロベースでスメア状になる。M は DNA の分子量マーカを示す。

③ 環境 DNA に対するアンプリコン解析

図 3.1.1-3 は、現在考えられている地球上に存在する生物種の系統樹である。環境に由来する微生物の解析はほとんどバクテリアを対象に行われているが、本研究ではその対象をバクテリアのみならず、アーキアや単細胞の真核生物（真菌類や藻）にも広げて解析することにした。環境に由来するどのような生物が、福島第一原発の原子炉内で増殖しているのか、どの生物種が廃炉のプロセスと関係があるか不明なために、まず、そこに存在すると思われる生物種のゲノム情報を網羅的に取得するためである。この目的のために生物種を同定するための PCR プライマー（人工的に合成した短い DNA、オリゴヌクレオチド）を複数種、文献調査により絞り込んだ（表 3.1.1-3）。

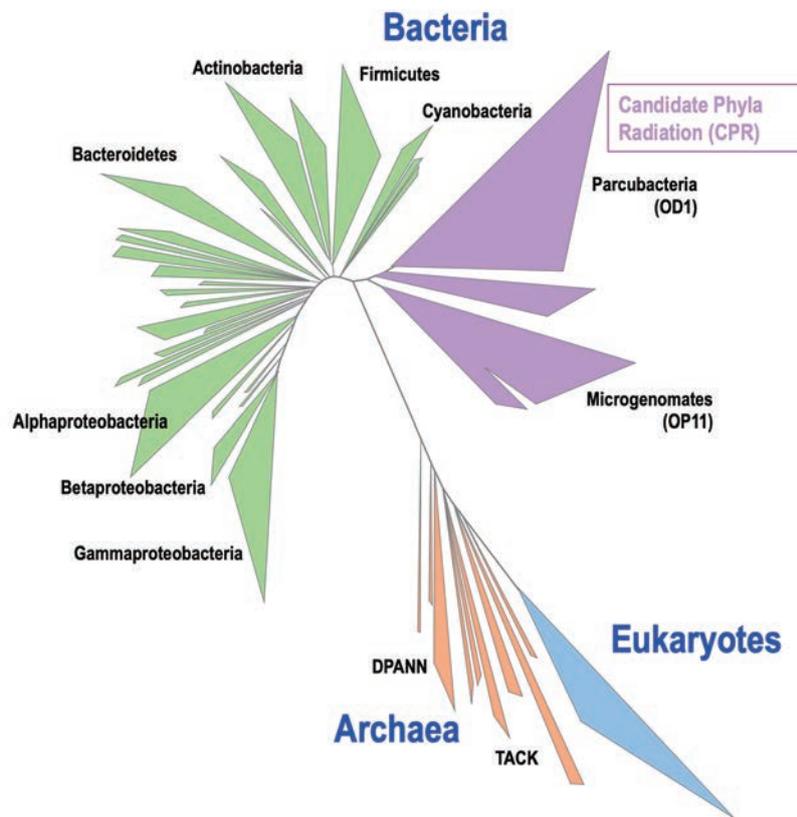


図 3.1.1-3 生物の三大ドメインの系統樹

生物の三大ドメインであるバクテリア（Bacteria; 真正細菌）、アーキア（Archaea; 古細菌）、及び真核生物（Eukaryotes）の系統樹。Candidate Phyla Radiation（CPR）バクテリアは近年、メタゲノム解析によって発見、提唱された、これまでのバクテリアと系統的に別群となるバクテリア群である。本図は、Hug らの図[6]を参考に作成した。

表 3.1.1-3 本研究に使用したプライマーのリスト

生物の ドメイン	プライマー 名称	環境	複製 領域	PCR 産 物 (ベース)	配列		コメント
					F (5'-3')	R (5'-3')	
バクテリア	341f & 785r	土壌	V3-V4	465	CCTACGGGN GGCWGCAG	GACTACHVG GGTATCTAAT CC	真菌と真核生物の擬似コミュニティの中で最も多くの OTU (配列グループ) 数が得られる[7]
	515F-Y & 926R	海水	V4-V5	412	GTGYCAGCM GCCGCGGTA A	CCGYCAATT YMTTTRAGT TT	モックコミュニティの細菌叢のより正確な推定値を示し、通常のプライマーでは見つけられない分類群の識別が可能[8]
	27F & 1492R		全長 16S rRNA	1506	AGAGTTTGAT CMTGGCTCA G	TACGGYTAC CTTGTTAYGA CTT	V3-V4 領域と比べて高い分類学解像度[9]
アーキア	SSU1ArF & SSU520R		V1-V4	519	TCCGGTTGAT CCYGCBRG	GCTACGRRY GYTTTARRC	アーキアで、最も多くの OTU 数が得られる (ショートリード) [10]
	340F & 806rB		V4-V5	467	CCCTAYGGG GYGCASCAG	GGACTACNV GGGTWTCTA AT	ショートリード [10]
真核生物	nu-SSU-1333-5 & nu-SSU-1647-3	菌類	V7-V8	348	CGATAACGA ACGAGACCT	AICCATTCAA TCGGTAIT	真菌特異的のセット [11]
	V8f & 1510r	微細藻類	V8-V9	372	ATAACAGGT CTGTGATGCC CT	CCTTCYGCA GGTTCACCTA C	藻類においてより多くの多様性の評価が可能[12]
	1389F & ITS4ngsUni	真核	V9-ITS2	984	TTGTACACAC CGCCC	CCTSCSCTTA NTDATATGC	真菌と真核生物の擬似コミュニティの中で最も多くの OTU 数が得られる[13]

図 3.1.1-4 を見ると、表 3.1.1-3 に示したプライマーのうち、バクテリアの部分的な 16S リボソーム RNA 遺伝子を増幅できるプライマーを用いた場合に、期待されるサイズの PCR 産物が増幅されている。また、その増幅の効率は、得られた DNA の性状（図 3.1.1-2 を参照）にあまり依存しておらず、プライマーの対象となる微生物の有無に依存すると考えられる。

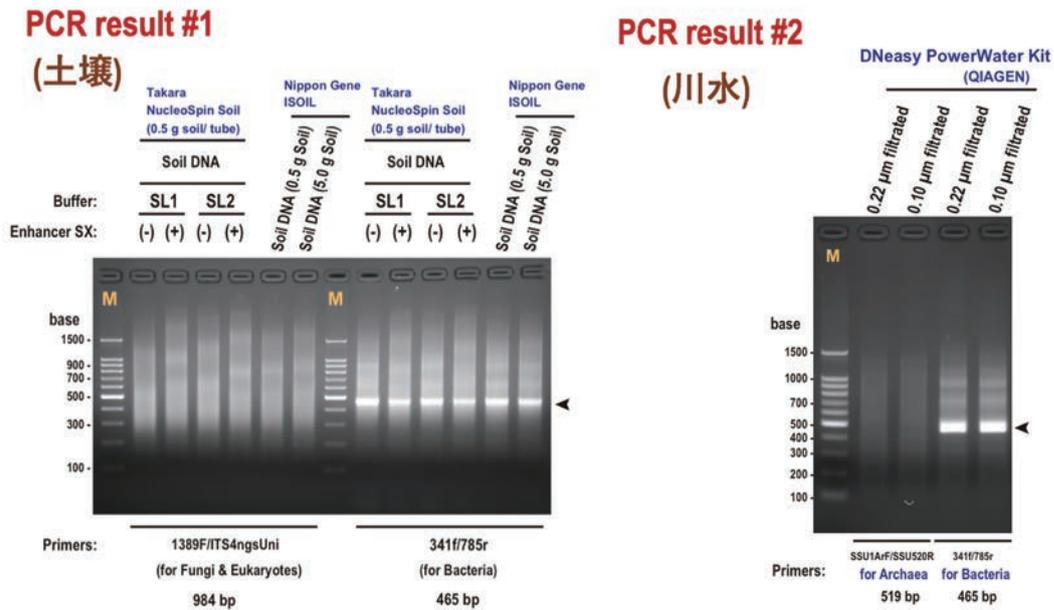


図 3.1.1-4 慶應義塾大学（鶴岡市）環境サンプル DNA を用いた PCR 実験例

慶應義塾大学の環境サンプルから調製したいずれの DNA（図 3.1.1-2 を参照）においても、バクテリア 16S リボソーム RNA 遺伝子に対する PCR 産物（465 ベース）は、差がなく増幅されていることが分かる。一方、土壌サンプルでは真核生物のカビ類の 18S リボソーム RNA 遺伝子が、川水ではアーキア（古細菌）の 16S リボソーム RNA が増幅されていないことも分かる。

④ 簡易 PCR システム

令和 2 年度に福島第一原発に由来する高放射線サンプルを管理区域内で取り扱うための準備として簡易型の PCR 装置を検討した。この PCR 装置 Qamp Mini (BiOptic Inc.) は、同時に解析できるサンプル数は 8 本と少ないが、手のひらサイズで、今回の目的にあっている。PCR 増幅も我々が通常行っている GeneAmp PCR System 9700 を用いた解析と遜色ない (図 3.1.1-5)。

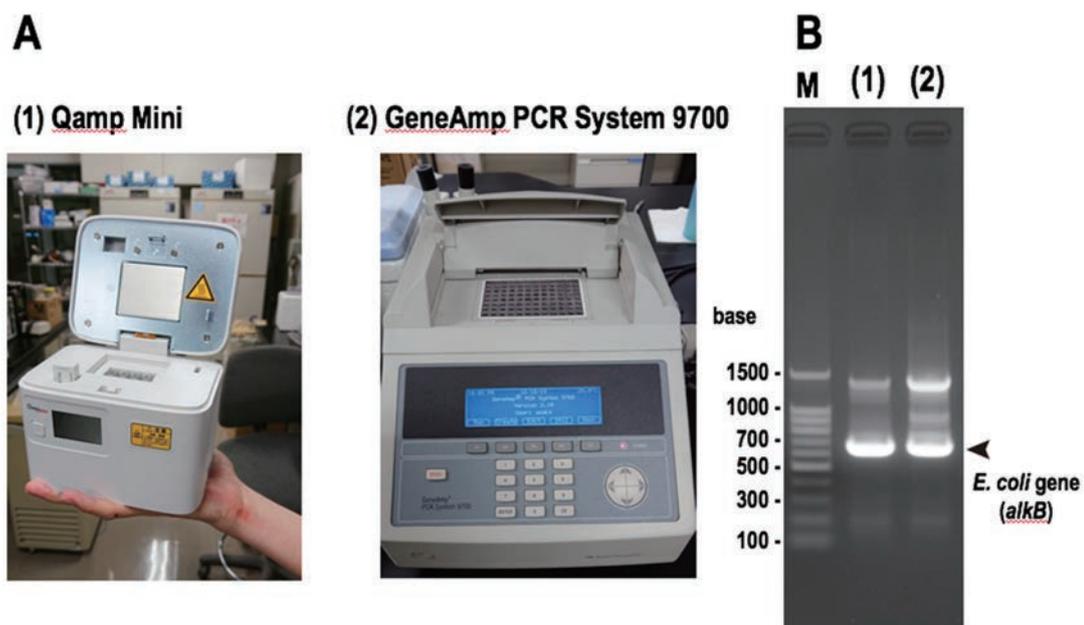


図 3.1.1-5 簡易 PCR システムのセットアップ

(A) PCR 装置 (1) Qamp Mini、(2) GeneAmp PCR System 9700

(B) PCR 増幅の例 1.0%アガロースゲル電気泳動 (EtBr 染色)。

(1)の簡易 PCR システムは、(2)の通常の PCR システムと変わることなく、大腸菌遺伝子 (*alkB*) を増幅できる。

⑤ 確立したプロトコール

上述した文献調査や実験検討を経て、確立した実験プロトコール 3 種を以下に示す。プロトコールは、

- 1) 土壌微生物ゲノム DNA の抽出
- 2) 環境水微生物ゲノム DNA の抽出
- 3) PCR 法による 16S リボソーム RNA 遺伝子の増幅 (簡易版)

である (図 3.1.1-6)。

プロトコール 1：土壌微生物ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA の抽出には ISOIL (Nippon Gene) キットを使用する。

サンプル (0.5 g の土壌を用いる場合)

注意点

- * 実験を行う際には、必ずマスクと手袋を着用し、フィルター付きチップを使用すること。
- * 実験で使用する 2 mL チューブは予めオートクレーブ滅菌しておくこと。

手法

1. 滅菌した 2 mL チューブに 0.5 g の土壌サンプルを入れる。
2. 950 μ L の Lysis Solution HE 及び 50 μ L の Lysis Solution 20S を加え、チューブのふたをパラフィルムでシールしたら転倒混和で十分に混合する。
3. 10 分毎に転倒混和しながら 65 $^{\circ}$ C で 1 時間インキュベート (ローテーターで穏やかに回転させながらインキュベートしても良い)。
4. 12,000 \times g 室温で 1 分間遠心分離した後、上清 600 μ L を新しい 2 mL チューブに回収する。
5. Purification Solution を 400 μ L 加えて十分に混合する (濁る)。
6. 600 μ L のクロロホルムを加えて 15 秒間ボルテックスした後、12,000 \times g、室温で 15 分間遠心分離する。
7. 中間層を入れないように注意しながら水層 800 μ L を新しい 2 mL チューブに回収する。
8. Precipitation Solution (開封後 4 $^{\circ}$ C 保存) を 800 μ L 加えて十分に混合し、20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 15 分間遠心分離する。
9. 上清を捨て、1 mL の Wash Solution (開封後 4 $^{\circ}$ C 保存) を加えて数回転倒混和した後、20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 10 分間遠心分離する。
10. 上清を捨て、1 mL の 70%エタノール及び 2 μ L の Ethachinmate (開封後 4 $^{\circ}$ C 保存) を加え、ボルテックスミキサーを用いて攪拌した後、20,000 \times g、4 $^{\circ}$ C で 5 分間遠心分離する。
11. 上清を捨て、チューブを風乾した後、沈殿を 100 μ L の TE buffer (pH 8.0) に溶解する。サンプルは 4 $^{\circ}$ C にて保存する。
12. それぞれ 1 μ L を使用して、O.D.の測定 (A_{260} の他 A_{230} と A_{280} も測り、DNA の純度を確認しておくこと) と 0.8%アガロースゲル電気泳動で確認を行う。

図 3.1.1-6 確立した実験プロトコール (1/4)

プロトコール 2：環境水微生物ゲノム DNA の抽出

ゲノム DNA の抽出には DNeasy® PowerWater® (QIAGEN) キットを使用する。

サンプル (約 500 mL の環境水)

注意点

- * 実験を行う際には、必ずマスクと手袋を着用し、フィルター付きチップを使用すること。
- * Solution PW1 は予め 55 °C で 5~10 分間温めて沈殿を溶かしておき、使用中も 55 °C をキープしておくこと。
- * Solution PW3 に沈殿が見られる場合は 55 °C で 5~10 分間温めて沈殿を溶かす。
- * Solution PW4 は使用前にボトルを振って中の溶液を混ぜること。

手法

環境水のフィルターろ過：500 mL 分

1. 再利用可のフィルター用漏斗を使用する場合は、器具の上部を取り外し、0.22 µm のフィルター (Durapore 0.22 µm PVDF Membrane、47 mm、フィルターも滅菌しておく) を滅菌したピンセットでセットする。この時フィルターを折り曲げないこと。
2. ろ過装置をポンプに繋ぎ、大きな沈殿がある場合はガーゼなどで濾しながら 500 mL のサンプルをろ過し、微生物をフィルターにトラップする。

環境水からのゲノム DNA 抽出：DNeasy® PowerWater® Kit (QIAGEN)

3. 微生物をトラップさせたフィルターの両端をピンセットでつかみ、フィルターの表面がシリンダーの内側に来るように丸めながら 5 mL PowerWater DNA Bead Tube に入れる (すぐに使用しない場合は、シャーレに平らに張り付けて、-80 °C で保存する)。
4. 予め 55 °C で温めておいた Solution PW1 を 1 mL 加える。
5. サンプルに溶解しにくい組織が含まれる場合 (菌類・藻類など) は、Solution PW1 を加えた後、65 °C で 10 分間インキュベートする。
6. 5 mL PowerWater DNA Bead Tube を水平になるようにボルテックスアダプター (SI-H512 Horizontal 15mL Tube Holder; Scientific Industries, Inc.) に固定する。
 - * 固定する際には Tube の角度と中央からの距離を等しくセットするように気を付けること。テープなどでボルテックスに固定するのは懸濁の効率が悪くなるので避ける。

図 3.1.1-6 確立した実験プロトコール (2/4)

7. 最大速度で5分間ボルテックスした後（室温）、4,000×g 室温で1分間遠心分離する。
8. 1 mL のピペットチップをビーズの底に突っ込むように入れて上清を吸い、2mL Collection Tube に移す（600～650 μL 回収できる）。
9. 13,000×g、室温で1分間遠心分離。
10. ペレットを吸わないように注意しながら、上清を新しい 2mL Collection Tube に移す。
11. Solution IRS を 200 μL カラムに加えて軽くボルテックスで混ぜた後（白濁する）、2～8 °C（on ice）で5分間インキュベートする。
12. 13,000×g で1分間、室温にて遠心分離後、ペレットを吸わないように注意しながら上清を新しい 2mL Collection Tube に移す。
13. Solution PW3 を 650 μL カラムに加えて軽くボルテックスで混ぜる。
14. 混合液 650 μL を MB Spin Column に Load し、13,000×g で1分間、室温にて遠心分離後、flow-through を捨てる。
15. 14 のステップを混合液が無くなるまで繰り返す。
16. MB Spin Column Filter を新しい 2mL Collection Tube に移す。
17. 使用直前に振り混ぜた Solution PW4（Wash buffer）を 650 μL 加え、13,000×g で1分間、室温にて遠心分離する。
18. flow-through を捨て 650 μL の ethanol（Kit に付属）を加え 13,000×g で1分間、室温にて遠心分離する。
19. flow-through を捨てたら、ethanol を完全に取り除くため 13,000×g で2分間、室温にて遠心分離する。
20. MB Spin Column Filter を新しい 2 mL Collection Tube に移す。
21. Solution EB を 100 μL フィルターの中央に Load する。
* Solution EB の代わりに滅菌した D.W. や TE buffer を使用しても良い。
22. 13,000×g で1分間、室温にて遠心分離し、DNA を回収する。回収した DNA は 4 °C にて保存する。
23. DNA 溶液 1 μL を使用して、O.D. の測定（A₂₆₀ の他 A₂₃₀ と A₂₈₀ も測り、DNA の純度を確認しておくこと）と 0.8 % アガロースゲル電気泳動で確認を行う。

図 3.1.1-6 確立した実験プロトコール（3/4）

プロトコール 3 :

PCR 法による 16S リボソーム RNA 遺伝子の増幅 (簡易版)

PCR の増幅対象遺伝子

Bacteria 16SrRNA V3-V4 領域 (増幅サイズ 465 bp)

鋳型サンプル (環境ゲノム DNA : 5~30 ng/ 5 μL 程度)

プライマー

1. Forward (341f, 17 mer, 100 pmol/ μL)
2. Reverse (785r, 21 mer, 100 pmol/ μL)

PCR 反応

1 Tube あたり

PCR 反応条件

2×buffer for KOD FX Neo	25 μL			
2mM dNTP mix	10 μL	94 °C	2 min	
Template DNA	5 μL	98 °C	10 sec	} 35 cycles
Primer F (100 pmol)	1 μL	60 °C	30 sec	
Primer R (100 pmol)	1 μL	68 °C	60 sec	
KOD FX Neo DNA polymerase	1 μL	4 °C	soak	
D.W	7 μL			
Total	50 μL			

PCR 反応後の産物の 1.5 %アガロースゲル電気泳動による確認

マーカー : DM2100 DNA Ladder marker 5 μL を使用する。

サンプル :

PCR product 5 μL

TE buffer 4 μL

10×Dye 1 μL

を混合し、計 10 μL を泳動し、EtBr にて染色する。

残りの PCR 産物は -30 °C で保管し、塩基配列の決定に用いる。

図 3.1.1-6 確立した実験プロトコール (4/4)

<< 令和2年度 >>

① JAEA 核燃料サイクル工学研究所研究者へのゲノム解析手法の技術移転

茨城県東海村の JAEA 核燃料サイクル工学研究所の管理区域内で、簡便かつ最新のメタゲノム解析が遂行可能であるように、同研究所スタッフに上記の環境水からの DNA 調製法、PCR 法、DNA 塩基配列決定法などの技術移転を行った。

具体的には以下の (A) ~ (D) の各手法である。

- (A) 原子炉内（トーラス室）より得た液体サンプルからの環境 DNA の調製法
- (B) 上記 DNA サンプルの定量法とアガロースゲル電気泳動による確認
- (C) PCR による 16S rRNA 遺伝子の増幅と増幅された DNA 断片の精製法
- (D) Oxford Nanopore Technologies Ltd.（以下、「ONT 社」と略す。）ミナイオン (MinION) を用いた塩基配列の決定法

3.1.2 福島第一原発敷地内外の地下水や敷地内の土壌等のサンプリング（連携先：JAEA）

<< 令和元年度 >>

福島第一原発敷地内外のサンプリングポイントを検討すると共に、敷地内に関してはサンプルの入手方法を検討した。また、これらの解析を進めるため、地元自治体や東京電力ホールディングス株式会社との調整を図った。決定したサンプリングポイントにおいて、微生物含有サンプルの採取を行い、放射能を測定した。

福島第一原発敷地内外において、敷地境界南（処理水タンク群の南）の表層土、3 km 沖合の表層水、福島第一原発近くの海底土とその直上水からサンプルを採取した。また関連する環境サンプルとして岡山県人形峠のウラン鉱床の湧き水や、福島県石川町和久観音のウラン鉱山跡近傍の土壌、茨城県日立港やその沖合の環境サンプル等の採取をした。また、東京電力ホールディングス株式会社との打合せを経て、保管してある福島第一原発原子炉建屋内の滞留水などの分析に着手することで了解を得た。合わせて、管理区域内の分析準備を行った。

上記に関して、以下に述べる 4 項目について実施した具体的内容を示す。

① 福島第一原発敷地内外のサンプリングポイントの検討

福島第一原発内部には、地下水や雨水と共に、微生物が流入している。微生物分析のため福島第一原発内から滞留水を得る前準備として、周辺の地形・地質について調査した（図 3.1.2-1）[14]。福島第一原発の北側には前田川が流れ双葉海水浴場に注いでいる。環境省の推薦海水浴場 100 選の一つであったが事故後は警戒区域となり、立入り制限となった[15]。平成 25 年 5 月からは避難指示解除準備区域となり再び立入りが可能となった。ここから福島第一原発の敷地を挟んで 6 km 南側には熊川が流れ海に注ぐ。熊川河口には熊川鮭漁業協

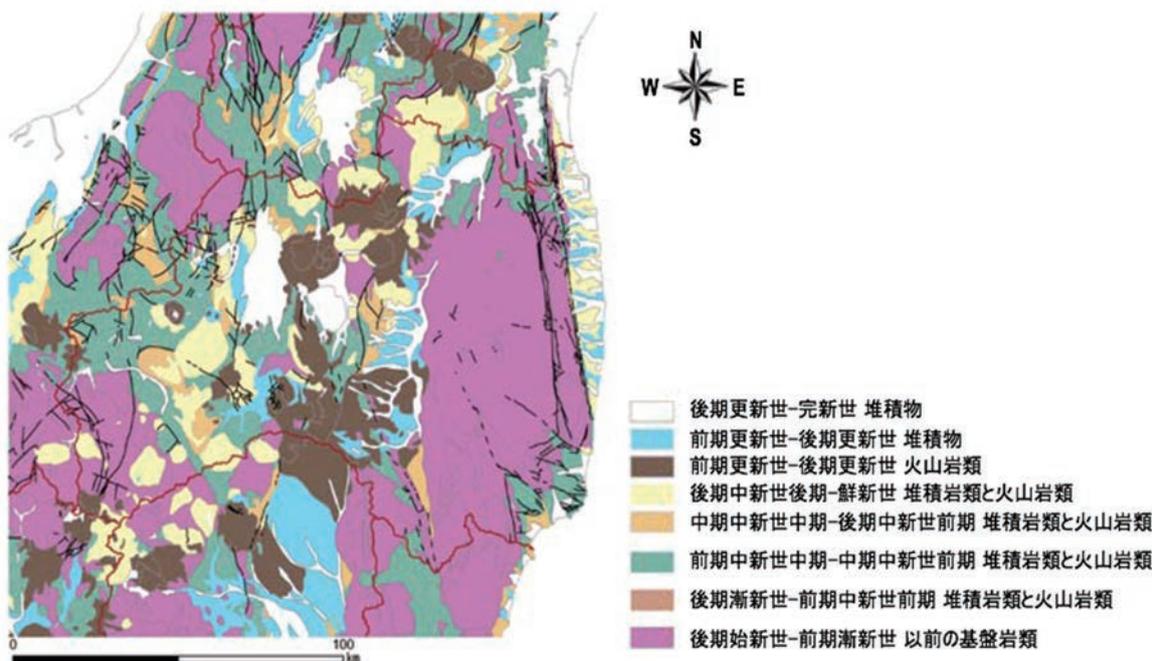


図 3.1.2-1 福島県及び隣接地の地質概略図

<https://tohoku-geo.ne.jp/information/daichi/img/53/03.pdf> を改変
（東北地質調査業協会より許諾を得て転載）

同組合があり、鮭の稚魚の放流が為されている[16]。これらの河川に南北を挟まれた福島第一原発敷地には地下水が押し寄せ、建屋の基礎の破孔部分より流入が続いている。

福島第一原発は太平洋と阿武隈山地に挟まれた浜通り地方の太平洋岸に位置する。この浜通り地方は、その中央部を南北に走る双葉断層によって阿武隈山地と隔てられている。ここには中生界と古第三系・新第三系、さらに更新世の海岸段丘や完新統が分布する。この双葉断層は宮城県岩沼市から福島県いわき市に至る全長約 100 km の活断層である。また、阿武隈山地南部の西縁には棚倉断層があり、茨城県常陸太田市と福島県棚倉町の間を北北西から南南東方向へ通る横ずれ断層である。

これらの断層帯は日本列島形成において多種多様な変成岩を生み出した。特に石川町周辺は、東部に御齊所・竹貫変成岩帯が、西部に花崗岩類が分布する[17]。中でもペグマタイト（巨晶花崗岩）からは我が国有数の巨大な「石英」「雲母」「長石」などの結晶を産出した。さらに、「サマルスキー石」「ジルコン」「電気石」他、ランタノイド、アクチノイド含有鉱石が産出する。特に、ウラン鉱物である燐灰ウラン鉱は有名であり（図 3.1.2-2）、後に岡山県と鳥取県の県境の人形峠に高品質のウラン鉱が発見されるまでは、当時では日本一の品質であり大規模な調査発掘が行われた。



図 3.1.2-2 福島県石川町産の燐灰ウラン鉱石（石川町歴史民俗資料館にて許可を得て撮影）

敷地内は、新第三系の富岡層が、敷地全域にわたって、海拔± 0 m～30 m 程度に分布する。その最上位の T3 部層は、主として塊状の砂質泥岩～泥岩からなり、上部から中粒砂岩層、泥質部、互層部（砂岩と泥岩の互層）、泥質部から構成される。富岡層は敷地の全域にわたりほぼ同じ層厚で分布し、南北方向ではほぼ水平に、東西方向では東側に 2° 程度傾斜している。表層近くに分布する中粒砂岩層は透水層である。なお、福島第一原発建屋東側の海底面は中粒砂岩で構成されている。中粒砂岩層の下は、数～10 m 程度の厚さで連続して分布し

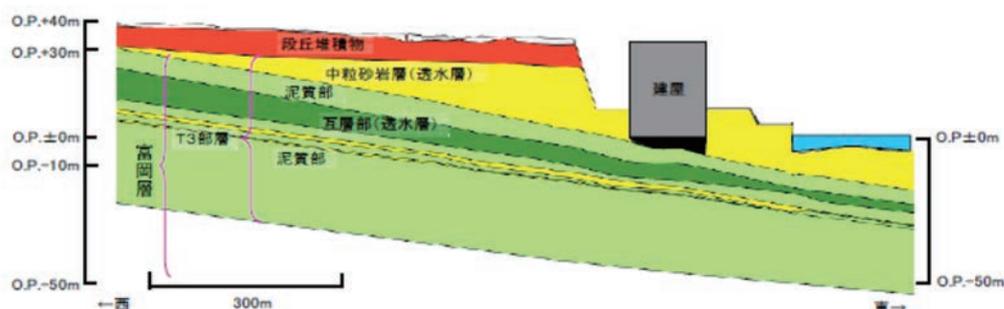


図 3.1.2-3 福島第一原発建屋周辺の地層構造

（出典：東京電力ホールディングス株式会社 東京電力汚染水処理対策委員会アーカイブ[18]）

ている泥質部により遮水されている。そして福島第一原発建屋の地下外周部は中粒砂岩層に接している（図 3.1.2-3）[18]。従って、建屋に流入する地下水は、段丘堆積物を通過した雨水が中粒砂岩層を通じて建屋の東側に押し寄せ、建屋の何処かにある破孔より流入していると思われる。

以上、福島第一原発周辺の地形・地質に関する検討を行い、建屋内に流入する地下水の起源と海洋への流出を考慮して、周辺からサンプリングポイントを決定した。また、炉内に残留する核燃料デブリの長期的な変質を考慮して、これに関連する地域をサンプリングポイントとして選んだ。

② 敷地内外からのサンプルの入手方法の検討

敷地内からのサンプルの入手方法については、これまで JAEA は福島第一原発において採取された滞留水等に含まれるイオン種の化学分析を実施してきた[19]。具体的には集中廃棄物処理建屋等の地下滞留水とその処理により得られる水を対象とした。核種は、H-3、C-14、Cl-36、Ca-41、Mn-54、Ni-59、Co-60、Ni-63、Se-79、Sr-90、Nb-94、Tc-99、Sb-125、I-129、Cs-137、Eu（-152、-154）、U（-233、-234、-235、-236、-238）、Np-237、Pu（-238、-239、-240、-241、-242）、Am（-241、-242m、-243）、Cm（-244、-245、-246）である。これらはデータ集として公表されている。

一方、敷地外については JAEA のこれまでの監視活動に協力を求めた。JAEA は福島第一原発事故直後より周辺環境の放射線量測定を実施してきた。福島第一原発周辺の環境放射線の監視は原子力規制委員会の実施義務でもあり、有人ヘリと無人ヘリを活用した空中ダストの線量測定を実施している。加えて、現場を観測員が徒歩で巡回監視しつつ環境放射線の測定を継続している。この 9 年間の計測の結果、事故直後と比較して一桁程度まで低下している[20][21]。

さらに、JAEA は海洋開発機構との連携により海洋ドローンの開発を進め、海洋での無人計測を実施している。これらの線量測定活動を発展的に延長する形をとりつつ、本事業での微生物サンプリングを通常業務に追加することを検討した。これにより福島第一原発敷地外からのサンプリング問題を解決することができた。また、敷地内についても、これまでの滞留水の核種分析の作業に、無理の無い形で微生物分析を付加することで対処した。

入手したサンプルの保全方法として JAEA 内に小型冷凍庫を設置した。図 3.1.2-4 はこの冷凍庫に一時保管した土壌と河川水の環境サンプルを示している。また、JAEA 内でも DNA の調製を可能とするために冷却遠心機も準備した（具体的な使用法は、図 3.1.1-6 プロトコール 2 を参照のこと）。



図 3.1.2-4 小型冷凍庫と -40 °C で凍結した土壌と河川水のサンプル

・微量高速冷却遠心機

株式会社トミー精工製 (KITAMAN-T24)

最高回転数 : 13,500 rpm

最大遠心加速度 : 17,730 G

最大容量 : 2 mL×24 本

温度設定範囲 : -9~-40 °C

・小型冷凍庫 (メディカルフリーザー)

福島工業株式会社製 (FMF-038F1)

温度調整範囲 : -40~-15 °C

内容量 : 38 リットル

③ サンプルングポイントの決定について

福島第一原発敷地周辺 (沖海洋、周辺土壌、地下水) に関するサンプルングポイントの候補地を図 3.1.2-5 に示す。

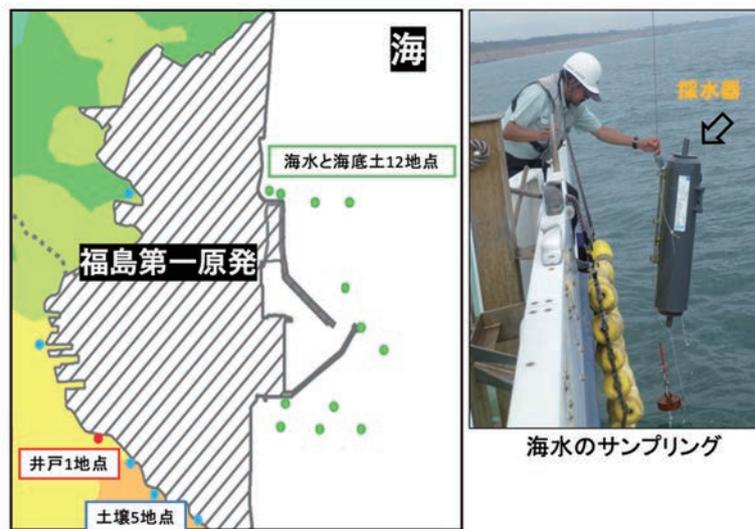


図 3.1.2-5 福島第一原発近隣のサンプルングポイント候補

加えて、関連地域としてウラン鉱山として図 3.1.2-6 の2ヵ所 (人形峠環境技術センター及び福島県石川町和久観音鉱山跡) を選んだ。福島第一原発格納容器内に落下している核燃料デブリは、それ自身の発熱を続け炉内の滞留水と供給されている冷却水の影響で徐々に変質している。炉内は高放射線のため水分子の乖離と窒素ラジカル等の生成が進行している。この炉内の環境下で、核燃料の二酸化ウランが化学的及び微生物的な変質を受けつつあるという検討の一助として、本事業では自然界に存在するウラン鉱石と微生物の関連を調査する。また海水の関連環境として日立港やその沖合の海水も採取した。



人形峠環境技術センター内夜次第2坑入口



福島県石川町和久観音鉦山跡第1鉦体坑道入口

図 3.1.2-6 関連地域候補地

- ④ 微生物含有サンプルの採取と放射線強度の測定
 ここではサンプリングの様子について記述する。

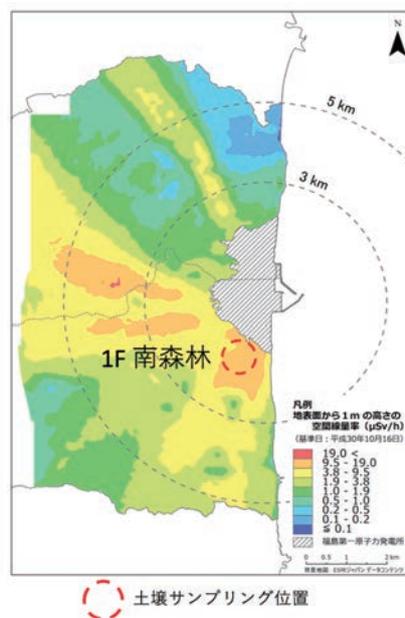


図 3.1.2-7 土壤サンプリングポイント

空間線量率マップ ([22]の図 3-3) に本研究のサンプリングポイントを示した。
 (背景地図は、ESRI ジャパン データ コンテンツ ((c) Esri Japan) を使用)

1) 福島第一原発敷地周辺からの土壤サンプリング

令和元年 11 月 18 日、図 3.1.2-7 に示した地点において深さ 13 cm の穴を設けて、その穴の側面から深度別に 3 ヶ所採取した（微生物叢が土壌の深さにより影響を受けることが知られているため）。地表面からの距離は、上から 0~2 cm、中程の位置 6~7 cm、穴の底

部 11～13 cm である（図 3.1.3-1）。加えて、穴から 100 cm 離れた位置の表面土壌を 3 カ所採取した（サンプリングの再現性に言及できる）。穴からの向きは、北西、北東、南東である。表面の付着物をよけて土壌を採取した（図 3.1.3-1）。採取した土壌は保冷剤入りのクーラーボックスに入れて、福島県三春町の JAEA まで運搬し、冷凍庫（- 20 °C）に入れ保管した。採取場所では電離箱を用いて、線量を測定した。地表から 5 cm の位置で 71 $\mu\text{Sv/h}$ であった。

2) 海洋からのサンプリング

福島第一原発近隣の海洋からのサンプリングは令和元年 12 月 19 日に表層水と海底土並びにその直上水の採取が行われた（図 3.1.2-8 及び図 3.1.2-9）。さらに、比較対象として令和 2 年 2 月 6 日に、日立港及びその沖合の海水の採取が行われた（図 3.1.2-10）。表層水の一部は現地にてフィルターを用いた集菌が行われ（図 3.1.1-6 プロトコール 2 を参照）、その他のサンプルは速やかに、冷蔵、または冷凍にて慶應義塾大学先端生命科学研究所に送付された。

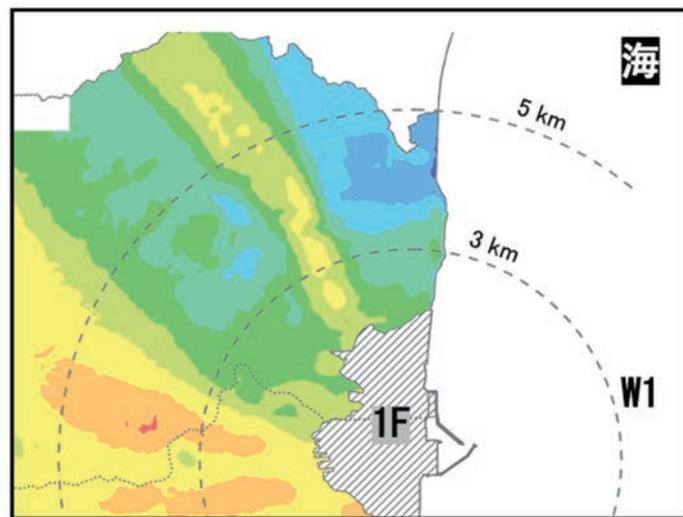


図 3.1.2-8 表層水サンプリングポイント

表層水のサンプリングポイント（W1）は福島第一原発から約 3 km の海上である。

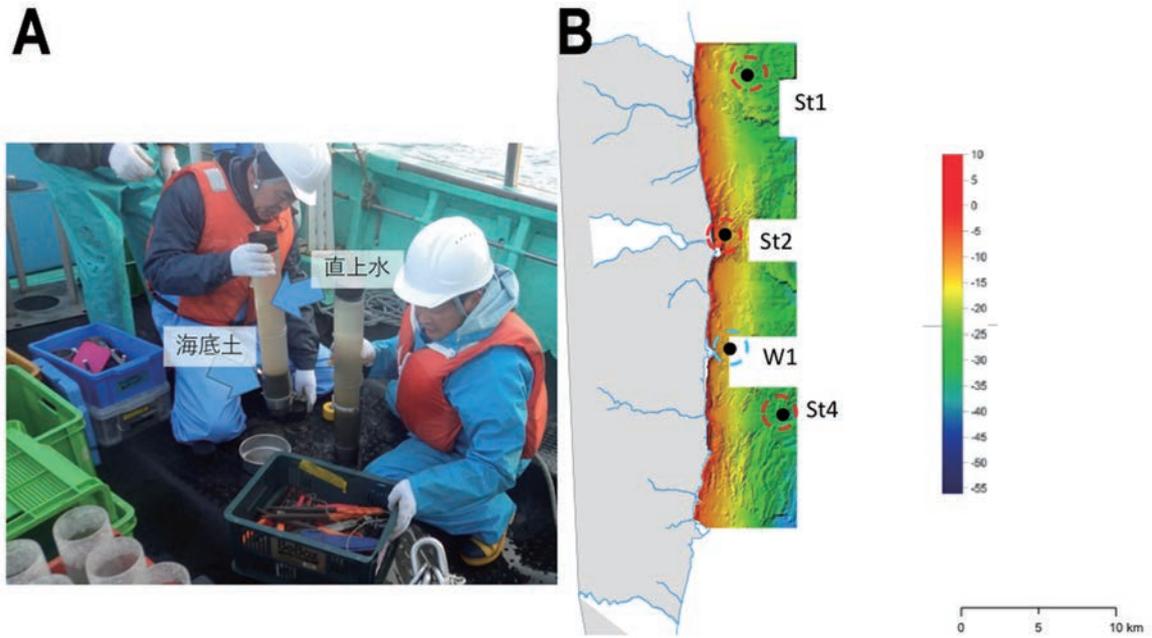


図 3.1.2-9 海底土とその直上水のサンプリング

- (A) 海底土と直上水のサンプリングの様子
- (B) St1、St2、St4 は海底土をサンプリングした地点
W1 は表層水（図 3.1.2-8 を参照）のサンプリングポイント



図 3.1.2-10 日立港でのサンプリングポイント

福島海洋の比較実験として用いるサンプル
(A) 日立港、(B) 日立港沖合

3) 関連地域（人形峠、和久観音鉾山跡）

さらに本事業の関連地域として、人形峠環境技術センター（図 3.1.2-11）及び福島県石川町和久観音鉾山跡（図 3.1.2-12）よりサンプリングを実施した。人形峠環境技術センターでは、見学坑道が整備されて内壁はコンクリート吹き付けとなっており、鉾床の一部が見学用に露出した状態である。坑道内の湧き水は土中に埋設されたヒューム管を通じて、坑道入り口の向かいにある集積槽に集められる。この集積槽には送水ポンプが設置されており、集積槽内の貯水量が一定量を超えると自動的に汲み上げられて外部の鉾床の堆積層の堆積場に散水される仕組みとなっている。すなわち、ウラン鉾床の中を通過してきた湧き水である。以下に、採取の様子を示す。採取後すぐに慶應義塾大学先端生命科学研究所に送付した。



集積槽と送水ポンプ

サンプル場所：送水ポンプ室
日時：令和2年1月15日 15:16



サンプル水の溶存酸素、pH、温度の測定

DO : 10.11 mg/L @ 11.1 °C
pH : 6.22 @ 14.3 °C

図 3.1.2-11 人形峠環境技術センターでの鉾水（淡水）の採取



図 3.1.2-12 和久観音鉾山跡の様子

また、石川町和久観音鉾山跡においては、歴史的文化財としての保存が施され坑道内の立入りは制限されている。このため坑道入り口の表土を採取した。坑道の入り口は小高い古墳状の丘の裾野にあり、周囲には棚田が広がる。坑道入り口から 30 m 程の場所には小川が流れる。表土と併せて小川の水も採取した。これらは持ち帰り、JAEA 原子力科学研究所にて、図 3.1.2-4 に示すように -40 °C で 10 日間の凍結保管の後、慶應義塾大学先端生命科学研究所に送付した。

<< 令和 2 年度 >>

令和元年度に得られた環境サンプルは、基本的に特定の季節のサンプルであり、その細菌叢は同じ環境に由来するとしても、季節や年によって変動する可能性が考えられた。本研究は実施期間が実質的に約 1 年間であり、上記の問題に研究期間を終えた後も対応することも考慮に入れ、継続した環境サンプルの取得に努めた。従って、年度末に取得したサンプルに関しては、その細菌叢解析までを本研究実施期間中の対象とはしていない。しかしながら、今後、学術論文を発表する時点において、細菌叢の解析結果を含む形で本プロジェクトに貢献できるものと判断した。まず、福島第一原発近隣の南森林の土壌サンプルを 4 種 [(i) 南 4_スギ 1、(ii) 南 4_スギ 2、(iii) 南 4_SUP_0 cm、(iv) 南 4_SUP_5 cm] を令和 2 年 11 月 5 日に採取した。これらの土壌の放射能は、Cs-137 の値が各々、(i) 8.5×10^5 Bq/kg、(ii) 3.3×10^6 Bq/kg、(iii) 1.7×10^6 Bq/kg、及び(iv) 4.0×10^4 Bq/kg である。また、サンプル(iii)と(iv)は同じ土壌の表面 (0 cm) と深度 5 cm のサンプルである。5 cm 深くなるだけで、放射能は、約 1/40 以下になることが分かる。

和久観音鉾山跡は、2 回目の採取日である令和 2 年 8 月 6 日の研究実施時点では、鉾内への立ち入りができなかったこともあり、その許可を得ることに若干の時間を要した。幸いなことに、同鉾山跡の管理にあたる福島県石川町や石川町民族資料館の担当者は非常に好意的で、令和 2 年 10 月 29 日には、同資料館スタッフの案内で鉾山内の土壌を採取することができた。続いて、岡山県人形峠の湧水を令和 2 年 11 月 6 日に、これも人形峠環境技術センターの好意により追加採取した。さらに、令和 2 年度は、本研究における第 3 番目のウラン鉾山として、岐阜県東濃鉾山の土壌や集積場からの流水サンプリングを、JAEA 東濃地科学センターの協力を受けて遂行した。東濃鉾山は岐阜県の土岐市と瑞浪市を東西に貫く月吉断層の一部である月吉鉾床に位置する。月吉断層の北側に美佐野鉾床が、また南側には定林寺鉾床及び大洞鉾床がある。東濃鉾山では、昭和 47 年よりウラン鉾床の形態や鉾石の分布状況を明らかにする目的で坑道を掘削し、岩盤中の物質移動に関する研究を実施してきた。現在ではウラン鉾床に関する研究は終了し、平成 28 年には施設の撤去とウラン鉾山坑道の閉鎖を行った。ここでは、鉾石の集積所から流出する湧き水に含まれるウラン濃度監視のためのサンプリングのみを実施している。令和 2 年 12 月 22 日、土岐市と瑞浪市に本事業の趣旨説明が行なわれ、サンプリングに関して了解が得られた。令和 2 年 12 月 24 日、鉾石集積所からの流出水を一時集めるための溜枳内からの採水を行った。これら関連地域でのサンプリングは主に JAEA によって行われ、JAEA へのサンプリング技術の移転が確立できた。また、同時に各サンプリング地での協力体制も確立することができた。

上記のサンプルに加え、本研究の最重要サンプルとして、福島第一原発 2 号機トーラス室滞留水 30 mL が、東京電力ホールディングス株式会社より提供された。

なお、令和 2 年度に取得したサンプルのうち、微生物叢解析結果を終了した和久観音鉾山跡の 2 回目 (令和 2 年 8 月 6 日)、及び人形峠鉾山の 2 回目 (令和 2 年 11 月 6 日) のサンプリングと、福島第一原発内トーラス室由来サンプルについてのみ以下にまとめる。

- ① 和久観音鉾山跡の追加サンプリング（場所の説明は 22 ページの「3）関連地域」を参照のこと）

図 3.1.2-13 に和久観音鉾山跡の 2 回目（令和 2 年 8 月 6 日）のサンプリング箇所を示す。

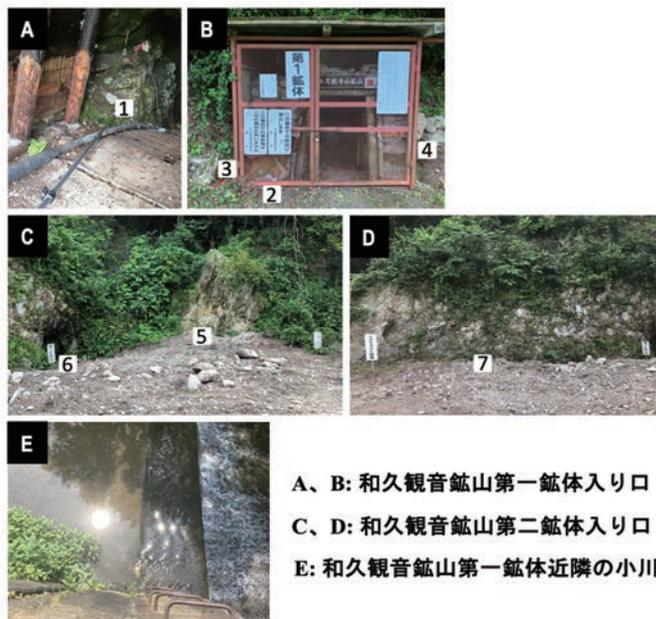


図 3.1.2-13 和久観音鉾山跡における 2 回目（令和 2 年 8 月 6 日）のサンプリング箇所

図中、土壌サンプル#1 から#7 まで、川水サンプルの採取場所を示す。

- ② 人形峠夜次坑道からの採水と濾過濃縮

令和元年度は坑道水の採水後に慶應義塾大学に冷蔵郵送し、ゲノム分析を行った。令和 2 年度は、大量の坑道水を冷蔵輸送するかわりに、現地での濾過を行い、より新鮮な微生物をフィルター上に濃縮することを試みた。現地のポンプ小屋で使用した機材を図 3.1.2-14 に示す。

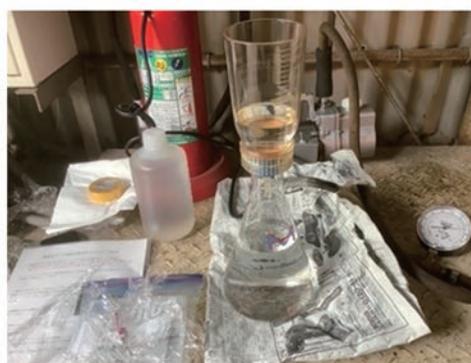


図 3.1.2-14 減圧濾過による微生物サンプリングの様子

採取日時は令和 2 年 11 月 6 日、場所は令和元年度と同じ

南 2 号坑の坑道水を集積するポンプ小屋で実施した。まずフィルターホルダを減圧濾過瓶に組み合わせ、ロータリーポンプで濾過瓶内を約 0.5 気圧となるように吸引した。フィルターは直径 47 mm、細孔径は 0.22 μm である。1 回の採取量は 800 mL とし、2 回濾過を行った。フィルターは白色から薄茶色に変色した。気温 9 $^{\circ}\text{C}$ 、水温 8.5 $^{\circ}\text{C}$ であった。溜水に含まれるウラン濃度は、約 2×10^4 Bq/mL (U-238) であり、これは 14 ppb に相当する。微生物を濾

過した 2 枚のフィルターをピンセットでシャーレに貼り付け、密封後に冷蔵宅急便で慶應義塾大学に郵送した。

③ 福島第一原発内トラス室由来サンプル

福島第一原発の 1 号機から 4 号機は東北地方太平洋沖地震に伴う事故により損壊し、現在、安全を確保しつつ廃止に向けた取り組みが進められている。1 号機から 3 号機は地震発生の当時に運転中であり、炉心燃料が損傷した。燃料を冷却するために外部から淡水と海水が注入され、燃料に含まれる放射性核種が水へと移行した。この汚染した水は原子炉建屋等の地下に滞留した。汚染水は高放射性であり、2 号機の汚染水上部における線量率は平成 26～27 年には 70 mSv/h であった[23]。汚染水は地下水や雨水の流入により増加するため、汚染水を抜き出し、化学的な処理を施して放射性核種を除去するシステムが確立された[24]。汚染水から回収した淡水は、燃料の冷却に循環再利用している。原子炉建屋と隣接する建屋に滞留する水の水位を下げる取り組みがなされ、2 号機に関しては、令和 2 年 10 月にはタービン建屋と廃棄物処理建屋の床面が露出するに至り、汚染水は原子炉建屋の地下に滞留するのみとなっている[25]。原子炉建屋の構造を図 3.1.2-15 に示す。2 号機原子炉建屋地階トラス室にて令和 2 年 2 月 13 日に採取された汚染水を分析に供した。

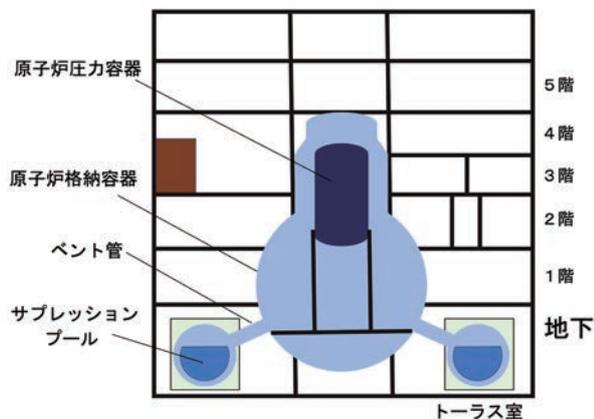


図 3.1.2-15 福島第一原発 原子炉建屋の構造

汚染水中に水中ポンプを下ろし、底部から約 1 m、約 0.3 m のそれぞれの位置にて汚染水（滞留水）が汲み上げられた。床にはスラッジが溜まっていたため、固形分を含む試料が得られた。汚染水の放射能及び塩化物イオン濃度に関するデータを表 3.1.2-1 に示す。主要な汚染核種である Cs-137 とともに線放出核種が検出された。また、塩化物イオン濃度は約 14,000 ppm と高く、海水の混入が示唆される。汚染水に含まれる固形分を孔径 10 μm フィルターによりろ過して得られた回収物の元素分析に関するデータを表 3.1.2-2 に示す。検出された Na、Mg と Ca は海水に含まれる成分であり、水中の高い塩化物イオン濃度に符合している。

表 3.1.2-1 福島第一原発 2 号機原子炉建屋地階トラス室にて採取された汚染水の性状データ

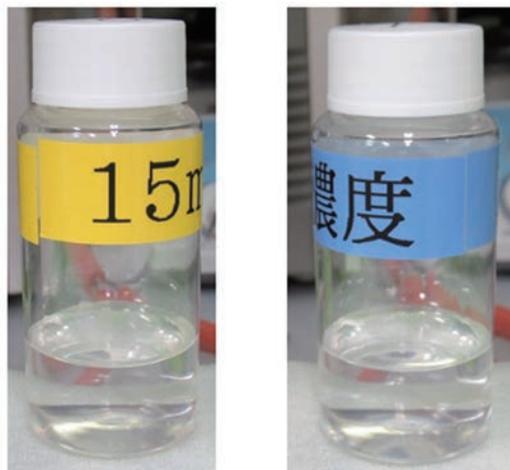
試料	全 α 濃度 (Bq/L)	Cs-137 (Bq/L)	塩化物イオン濃度 (ppm)	全 β (Bq/L)
底部から約 1.0 m	6.8×10^1	1.3×10^9	13,875	1.5×10^9
底部から約 0.3 m	7.9×10^1	1.3×10^9	13,875	1.6×10^9

表 3.1.2-2 汚染水を孔径 10 μm フィルターによりろ過して得られた回収物の元素分析データ

元素 *	濃度 (g/L)	組成 (%)
Na	1.3×10^{-1}	88.2
Mg	1.1×10^{-2}	7.3
Ca	5.4×10^{-3}	3.6
Fe	1.3×10^{-3}	0.8

*B、Al、Si、K、Ti、Mn、Zn、Sr は検出されなかった。

汚染水の試料は、令和 2 年 4 月 8 日に福島第一原発から茨城県に所在する施設（高レベル放射性物質研究施設）へと輸送された。このトラス室採取水は、滞留水の上層水（底部から約 1 m）と下層水（底部から約 0.3 m）として区別して保存されていたが、各々 15 mL 程度しかなく（図 3.1.2-16）、また、含まれる Cs-137 の値も全く同じであったことより、この 2 つを合わせた 30 mL を環境 DNA 調製の出発材料とした。それぞれの試料にはわずかな濁りが観察された。試料は、採取から後述する分析に至るまで室温にて保管された。



底部から約 1 m

底部から約 0.3 m

図 3.1.2-16 2号機原子炉建屋地階トラス室にて採取された汚染水の外観

以上の環境サンプルを含め、本研究で得られた全ての環境サンプルは表 3.1.2-3 にまとめている。

表 3.1.2-3 福島メタゲノム解析 サンプルリスト まとめ (1/4)

(A-1) 福島第一原発近隣の環境サンプル

分類	サンプル詳細	場所	採集日	コメント
土壌 (1回目)	表層土 1) 1 m 北西 (NW) 2) 1 m 北東 (NE) 3) 1 m 南東 (SE) 深度別 4) 上 (0~2 cm) 5) 中 (6~7 cm) 6) 下 (11~13 cm)	福島県双葉郡大熊町大字夫沢北台 37°24'59.3"N, 141°01'24.7"E	令和元年 11月18日(月)	福島第一原発敷地境界南(処理水タンク群の南)
海水	表層水 1) W1	1) W1 : 37°25'27.54"N, 141°3'11.255"E	令和元年 12月19日(木)	福島第一原発から3 km 沖合 電気伝導度 (EC) : 9.03 mS/cm @ 8.7 °C DO : 9.18 mg/L @ 10.0 °C pH : 8.2
海底	海底土 1) St1 2) St2 3) St4	1) St1 : 37°29'27.6"N, 141°2'58.9"E 2) St2 : 37°35'4.8"N, 141°3'57.5"E 3) St4 : 37°23'8.1"N, 141°5'30.5"E	令和元年 12月19日(木)	福島第一原発の近隣海域 1) St1 電気伝導度 (EC) : 11.60 mS/cm pH : 8.4 2) St2 電気伝導度 (EC) : 13.44 mS/cm pH : 8.5
海底	直上水 (海底土の上清) 1) St1 2) St2 (St4 は抜けたため無し)	同上	同上	
土壌 (2回目)	1) 南4_スギ1 2) 南4_スギ2 3) 南4_SUP_0cm 4) 南4_SUP_5cm	福島県双葉郡大熊町大字夫沢北台 37°24'59.3"N, 141°01'24.7"E	令和2年 11月05日(木)	福島第一原発敷地境界南(処理水タンク群の南) サンプル3)と4)は同じ土壌の深度が異なるサンプルである。

表 3.1.2-3 福島メタゲノム解析 サンプルリスト まとめ (2/4)

(A-2) 福島第一原発 2 号機トーラス室の滞留水

分類	サンプル詳細	場所	採集日	コメント
滞留水 (汚染水)	滞留水 (30 mL)	福島第一原発 2 号機、トーラス 室 福島県双葉郡大 熊町大字夫沢字 北原 22	令和 2 年 2 月 13 日 (木)	本サンプルは令和 2 年 2 月 13 日 に福島第一原発 2 号機トーラス 室よりサンプリングされたが、 DNA 調製を行った同年 8 月 23 日 まで、JAEA の核燃料サイクル 工学研究所に室温保管されてい た。 2 号機トーラス室採取水を混合 (上層水 15 mL+下層水 15 mL 合計 30 mL) pH : 7.42 酸化還元電位 : 420.2 mV 電気伝導率 : 4.68 S/m 塩化物イオン濃度 : 13,875 ppm Cs-137 : 1.3×10^6 Bq/mL

(B) 日立港環境サンプル

分類	サンプル詳細	場所	採集日	コメント
海水	茨城県日立港	茨城県日立港	令和 2 年 2 月 6 日 (木)	第 5 埠頭 気温 : 4 °C 海水温度 : 12.5 °C
海水	茨城県日立港 沖合	茨城県日立港沖 合 36°29' 66"N, 140°38' 805"E	令和 2 年 2 月 7 日 (金)	水温 : 13.04 °C 塩分 : 34.08 塩素量 : 18.87 % 密度 : 25.67

(C) 人形峠ウラン鉱山坑道内の環境サンプル

分類	サンプル詳細	場所	採集日	コメント
湧水 (1 回目)	人形峠湧水 1	岡山県苫田郡鏡 野町上齋原 1550	令和 2 年 1 月 15 日 (水)	人形峠環境技術センター見学 坑道内の送水ポンプ室 溶存酸素量 (DO) : 10.11 mg/L @ 11.1 °C pH : 6.22 @ 14.3 °C
湧水 (2 回目)	人形峠湧水 2	同上	令和 2 年 11 月 6 日 (金)	人形峠環境技術センター見学 坑道内の送水ポンプ室 水温 : 8.5 °C 溶存酸素量 (DO) : 3.34 mg/L (1 回目) pH : 6.10

表 3.1.2-3 福島メタゲノム解析 サンプルリスト まとめ (3/4)

(D) 和久観音鉱山跡の環境サンプル

分類	サンプル詳細	場所	採集日	コメント
土壌 (1回目)	表層土 1	福島県石川郡 石川町字和久	令和2年 3月17日(火)	第一鉱体入り口付近の土壌
川水 (1回目)	川水 1	同上	同上	近隣の川水
土壌 (2回目)	1) 表層土 #1 2) 表層土 #2 3) 表層土 #3 4) 表層土 #4 5) 表層土 #5 6) 表層土 #6 7) 表層土 #7	同上	令和2年 8月6日(木)	第一鉱体入り口付近の土壌 各サンプルの採取場所に関しては図 3.1.2-13 を参照されたい。
川水 (2回目)	川水 #8	同上	同上	近隣の川水
土壌 (3回目)	第一鉱体内 1) 土壌 1 2) 土壌 2 3) 土壌 3 第二鉱体 4) 土壌 4 5) 土壌 5 6) 土壌 6 7) 土壌 7	同上	令和2年 10月29日(木)	第一鉱体内 1) 黒雲母 2) 電気石の跡 3) 電気石 第二鉱体内 4) モナズ石 5) 電気石、白雲母、石英 6) 電気石 7) 電気石：α線が高い
湧水 (3回目)	第一鉱体内 湧水 1 第二鉱体 入り口 湧水 2	同上	同上	水温：12.8℃ 溶存酸素量 (DO) : 4.92 mg/L (1回目)、 4.13 mg/L (2回目) pH：7.10 (1回目)、 6.84 (2回目) 水温：13.6℃ 溶存酸素量 (DO) : 0.32 mg/L pH：6.83

表 3.1.2-3 福島メタゲノム解析 サンプルリスト まとめ (4/4)

(E) 東濃鉦山の環境サンプル

分類	サンプル詳細	場所	採集日	コメント
水	1) 集石所にある溜枡内の流水 2) 集石所にある溜枡内の泥水 3) 河川放流点上流の泥水 4) 河川放流点下流の泥水	岐阜県土岐市泉町河合 日本原子力研究開発機構東濃地科学センター 東濃鉦山	令和2年 12月24日 (木)	集石所にある溜枡内の流水サンプリング時 気温：4℃ 水温：11℃ 溶存酸素量 (DO) : 9.8 mg/L
土壌	1) 集石所の表層土 2) 集石所の表層から深度 10 cm の土	同上	令和2年 12月24日 (木)	

3.1.3 福島第一原発敷地内外に生息する微生物群集のメタゲノム解析

① 福島第一原発近隣の環境に生息する微生物からのゲノム DNA 調製

<< 令和元年度 >>

研究初年度（令和元年 11 月～令和 2 年 3 月）において、数多くの環境サンプルを収集し、その環境に生息する微生物に由来すると考えられるゲノム DNA を、目的とする解析に十分な質と量にて調製することができた。これは、令和元年 11 月～12 月にかけて、慶應義塾大学先端生命科学研究所のある山形県鶴岡市の土壌や川水サンプルで、条件検討を行って、プロトコールを完成させておいたことが大きい（3.1.1 項参照）。本項では、これらの環境サンプルの中から、福島第一原発南森林土壌サンプルと、同原発近隣海洋の表層水等を例として、(i) 同環境サンプルからのゲノム DNA 調製、(ii) 調製したゲノム DNA から、リボソーム RNA 遺伝子（バクテリアやアーキアでは 16S リボソーム RNA 遺伝子、真核生物では 18S リボソーム RNA 遺伝子）の PCR 法による増幅（アンプリコンの取得）に関して説明する。

図 3.1.3-1 と図 3.1.3-2 はそれぞれ、福島第一原発南森林土壌サンプルと、同原発近隣海洋の表層水サンプルから調製したゲノム DNA に関してまとめたものである。どちらの環境からも図 3.1.1-2 にて検討したのと同様のゲノム DNA が取得できていることが分かる。

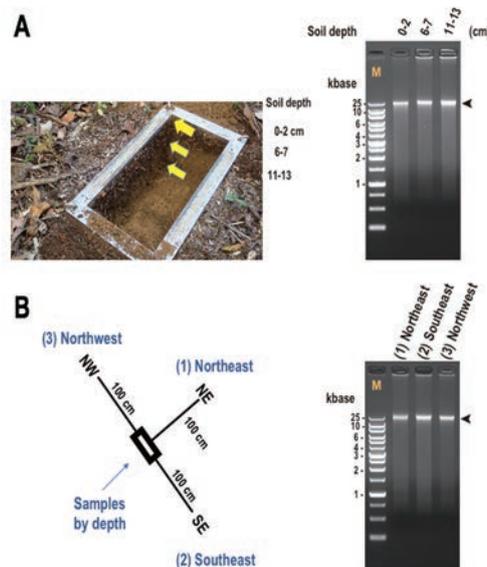


図 3.1.3-1 福島第一原発南森林土壌サンプルからの微生物ゲノム DNA の調製

土壌サンプルの取得場所に関しては、図 3.1.2-7 を参照されたい。

- (A) 3 段階の深さによるサンプリング（左図）と調製したゲノム DNA の 0.8%アガロース電気泳動（EtBr 染色）（右図）
 - (B) 深さによるサンプリング位置から、それぞれ北西、北東、南東に 100 cm の地点の土壌表面をサンプリング（左図）と調製したゲノム DNA の 0.8%アガロース電気泳動（EtBr 染色）（右図）
- ゲノム DNA の調製は ISOIL キットを用いた。

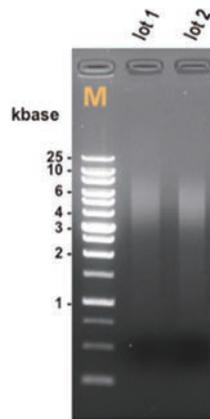


図 3.1.3-2 福島第一原発近隣海洋の表層水からの微生物ゲノム DNA の調製
 表層水のサンプリングポイントは福島第一原発から約 3 km の海上である（図 3.1.2-8 を参照）。DNeasy Power Water キット調製したゲノム DNA を 0.8 %アガロース電気泳動（EtBr 染色）にて解析した（lot 1、2 ともに 250 mL の海水を 0.22 μm のフィルターにトラップした）。

② 福島第一原発近隣の環境 DNA サンプルの PCR と塩基配列決定に使用した PCR 産物
 各 PCR 産物をアガロースゲルから切り出して精製後に 1.5 %アガロース電気泳動（EtBr 染色）にて解析した。Sample #にある B は細菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子に対する共通領域のプライマー（341f/785r）で、M は微細藻類（真核生物）の 18S リボソーム RNA 遺伝子対象としたプライマー（V8f/1510r）で、そして MB は海洋細菌の 16S リボソーム RNA 遺伝子を対象としたプライマー（515F-Y/926R）で増幅したものである。B1、M1、MB1：土壌（深さ 0~2 cm）、B2、M2、MB2：土壌（深さ 6~7 cm）、B3、M3、MB3：土壌（深さ 11~13 cm）、B4、M4：土壌表面（北西）、B5、M5：土壌表面（北東）、B6、M6：土壌表面（南東）、B7、M7、MB4：表層水（海水 W1）に由来する微生物のゲノム DNA を PCR 反応の鋳型に使用した（図 3.1.3-3）。

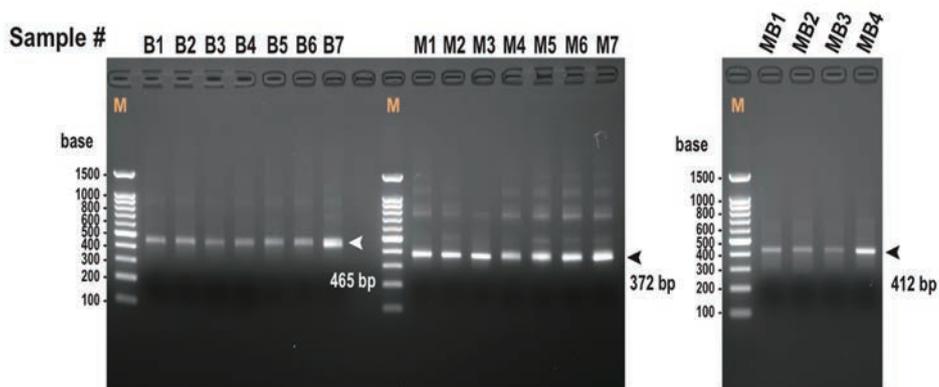


図 3.1.3-3 塩基配列決定に使用した福島環境微生物由来の PCR 産物

<< 令和2年度 >>

環境サンプルからの DNA の調製方法に関しては、令和2年度においても基本的に変更はない。一方で、福島第一原発2号機トラス室由来の滞留水 30 mL を出発材料とした場合は、絶対量が少なすぎて、電気泳動などによる通常の確認ができなかったために、これを割愛した。そして、直接に ONT 社ミナイオン (MinION) シークエンサーを茨城県東海村の JAEA 核燃料サイクル工学研究所の管理区域内に持ち込むことで塩基配列の決定を行った。その詳細は後述する。

③ 次世代シークエンサーによるアンプリコンシークエンスの解析

表 3.1.3-1 塩基配列決定に使用したアンプリコンのまとめ
(イルミナ株式会社のシークエンサーによる)

環境 (大分類)	環境詳細	16S/ 18S rRNA配列の解析結果					
		サンプル番号と塩基配列が決定されたリード数					
		B		MB		M	
土壌 (深度別)	福島1F南森林 (表層より0-2cm) (11/18/19)	B1	1,387,164	MB1	1,003,364	M1	1,239,791
土壌 (深度別)	福島1F南森林 (表層より6-7cm) (11/18/19)	B2	1,228,252	MB2	1,094,588	M2	1,171,676
土壌 (深度別)	福島1F南森林 (表層より11-13cm) (11/18/19)	B3	1,001,786	MB3	1,170,015	M3	1,230,509
土壌 (表層土)	福島1F南森林 (北西サンプル) (11/18/19)	B4	1,269,207			M4	1,156,947
土壌 (表層土)	福島1F南森林 (北東サンプル) (11/18/19)	B5	1,090,457			M5	1,537,205
土壌 (表層土)	福島1F南森林 (南東サンプル) (11/18/19)	B6	1,177,853			M6	1,158,583
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (03/17/20)	B16	2,396,328	MB13	2,023,104	M13	2,401,896
海底土	福島1F近海 海底土 (St1) (12/19/19)	B11	1,807,534	MB8	1,680,638		
海底土	福島1F近海 海底土 (St2) (12/19/19)	B12	1,817,894	MB9	1,754,072		
海底土	福島1F近海 海底土 (St4) (12/19/19)	B13	1,867,294	MB10	1,941,966		
海水 (表層水)	1Fより約3 kmの海水 (表層) (12/19/19)	B7	997,029	MB4	1,139,597	M7	1,113,465
海水 (表層水)	日立沖の海水 (02/07/20)	B8	1,853,564	MB5	1,920,936	M8	820,122
海水 (表層水)	日立港の海水 (02/06/20)	B9	2,407,794	MB6	1,838,788	M9	1,783,706
海水 (直上水)	上記海底土の直上水 (St1) (12/19/19)	B14	1,811,936	MB11	2,170,510	M11	2,158,202
海水 (直上水)	上記海底土の直上水 (St2) (12/19/19)	B15	1,937,300	MB12	2,073,658	M12	2,124,278
淡水 (鉱水)	人形峠鉱山の湧水 (01/15/20)	B10	2,226,522	MB7	1,799,840	M10	2,110,726
淡水 (川の水)	和久観音鉱山跡近くの川の水 (03/17/20)	B17	2,557,360	MB14	2,228,042	M14	2,089,396
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #1	B18	2,468,088			M15	2,707,706
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #2	B19	2,296,194			M16	2,115,820
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #3	B20	2,315,560			M17	2,403,022
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #4	B21	2,881,508			M18	1,951,412
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #5	B22	1,956,906			M19	2,110,016
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #6	B23	1,561,242			M20	2,256,544
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #7	B24	2,563,804			M21	2,017,002
淡水 (川の水)	和久観音鉱山跡近くの川の水 (08/06/20) #8	B25	2,577,484	MB15	2,433,248	M22	1,876,982
D6300	微生物叢標準コントロール	B26	2,024,778			M23	1,937,618

リード数はクオリティチェック (QC) 前ものを示している

<< 令和元年度及び令和2年度 >>

令和2年度に塩基配列の情報学的手法を詳細に検討し、令和元年度より良い解析方法が確立したため、本項では令和元年度のサンプルについても再解析を行い、その結果をまとめた。表 3.1.3-1 に塩基配列決定に使用したアンプリコンをまとめてある。PCR によって増幅した DNA のライブラリー調製及びシーケンシングは、株式会社ジーンベイ（以下、「ジーンベイ社」と略す。）に委託した。配列決定ライブラリーは、NEBNext Ultra II DNA Library Prep Kit for Illumina（New England Biolabs Inc.（以下、「NEB 社」と略す。）、England）を使用し、メーカーの推奨のプロトコールに従い調製され、ハイスループットシーケンサーNovaSeq（イルミナ株式会社）によって 250 bp のペアエンドシーケンシングが行われた。図 3.1.3-4 に示した全てのアンプリコンに対して、各 100 万リード以上の配列が FASTQ ファイル（次世代シーケンス解析で主に使用するファイルで、リードの塩基配列と各塩基のクオリティを記載したもの）形式で納品された。納品されたシーケンスリードには、アダプター配列（サンプルを識別するために合成された微生物由来ではない配列）や低品質のリードが含まれているので、微生物叢組成解析の前に、これを以下の手順で品質管理を行なった。はじめに、アダプター配列を含むリードと低品質のリード（平均シーケンシングエラーの割合が 1%以上）を除去した。続いて、メタゲノム解析パイプラインツールである QIIME2（Version 2019.10）を使用し、リードの先頭のプライマー配列とリードの末端の低品質配列のトリミングを行なった。イルミナ株式会社の NovaSeq シーケンサーでは、1 リードにつき最大 250 bp の配列が決定できるが、PCR によって増幅した微生物由来の配列（最大アンプリコンサイズは約 460 bp）はそれより長いために 1 つのリードで決定することができない。そのため、アンプリコンの両端から 250 bp をシーケンシングして、それぞれのリードで重なる配列（アンプリコンの中心部分の配列）をもとに、リードをマージして完全長のアンプリコンの配列を得た。続いて、QIIME2 内でシーケンサーのエラーを補正する DADA2 モデルを用いて、ノイズ除去を行ない、代表配列の決定を行った。

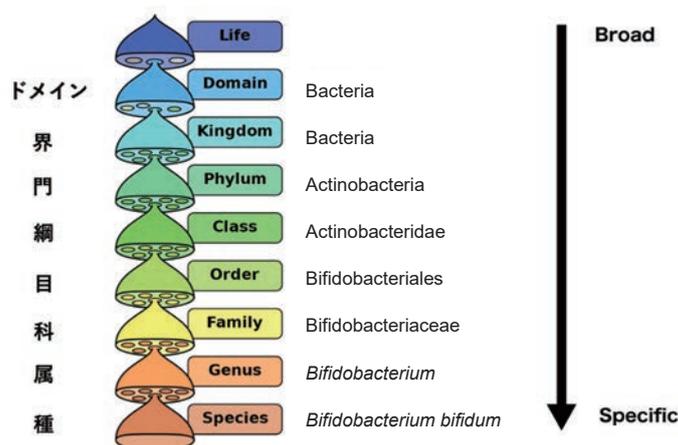


図 3.1.3-4 生物の階層的な分類

ドメイン、界、門、綱、目、科、属、種と階層が下がるにつれて、分類はより限定されたものになる。種として *B. bifidum* を例に示している。

得られた代表配列がどの微生物由来であるかを解析するために、以下の手順で分類した。代表配列と類似性の高い配列を検索するために、代表配列を問い合わせ配列として、SILVA

138 SSU データベース[26]にある 16S/18S リボソーム RNA データベースに対して、BLASTN プログラム (Version : 2.9.0) による配列類似性検索 (E-value のカットオフ値は 1×10^{-5}) を行った。SILVA 138 SSU データベースでは、配列のアノテーションの記述が統一されておらず、それぞれの分類階級 (ドメイン・門・綱・目・科・属) ごとで正しく集計するために、データベースのアノテーションを修正した。代表配列とデータベースの配列一致度 (%) が 97 % 以上のものを、ヒットしたデータベースの微生物であると定義した。それぞれのサンプルを各レベル (ドメイン・門・綱・目・科・属) で集計し、Python の seaborn (Version : 0.9.0) パッケージを用いて積み上げ棒グラフを描画した。

微生物叢の詳細を説明する前に、生物の階層的な分類方法に関して確認しておきたい。図 3.1.3-4 は生物の階層的な分類である界、門、綱、目、科、属、種に関して示したものである。最上階のドメインは研究者や対象とする生物の種類によっては、界 (キングダム) と呼ぶこともあるが、本報告書では、図 3.1.1-3 にも示した通り、バクテリア (真正細菌)、アーキア (古細菌) 及び真核生物より構成されるドメインとしたい。ここで、上段の分類群ほど多様な生物種を含み、階層が下がるにつれて、より限定されたものになる。微生物叢のアンプリコンに依存したメタゲノム解析では、解析結果が特定の種に落ちることはまれなので、その多様性を比較する時には、門、綱、目のレベルで比較するのが一般的である。

B1 サンプル、すなわち、福島第一原発の南森林土壌 (深さ 0~2 cm) に由来する環境ゲノムをバクテリアの 16S リボソーム RNA 遺伝子の共通プライマーで PCR 増幅したアンプリコンを解析した例について説明したい (図 3.1.3-5)。

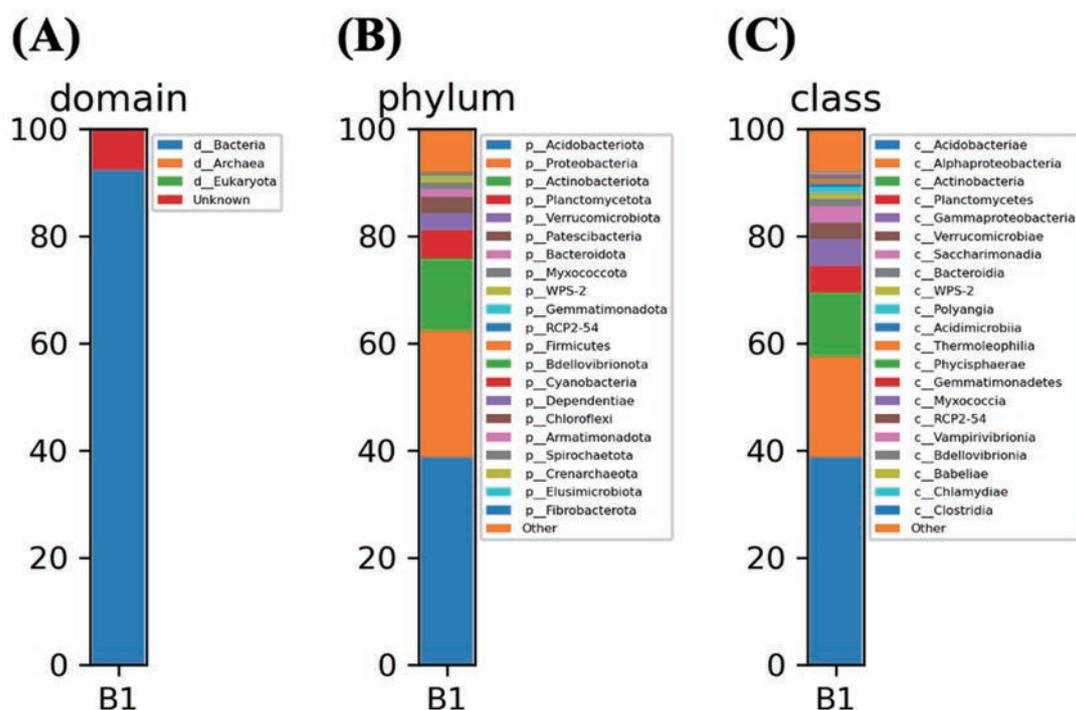


図 3.1.3-5 福島土壌由来 B1 サンプルを構成する生物ドメイン、門、綱

福島第一原発南森林の土壌 (深さ 0~2 cm) に由来するゲノムをバクテリアの 16S リボソーム RNA 遺伝子の共通プライマーで PCR 増幅し (B1 サンプル)、その塩基配列を決定した。配列のアノテーションをドメイン、門、綱レベルで集計した。サンプルの詳細は図 3.1.3-3 を参照。

まず、ドメインレベルでは、配列のほとんどがバクテリアであることが分かり、このプライマーがバクテリアの 16S リボソーム RNA の配列を優先的に増幅させていることが支持される (B7 サンプルではアーキアも多少増える、後述)。次に、門や綱レベルで集計したグラフでは、このバクテリアが一種類ではなくて多様な生物群により構成されていることが明らかになる。一方で、上位 5 群の門や綱に属する微生物が全体の約 80 % を占めていることも分かる。例えば綱レベルでは、Acidobacteriae (青)、Alphaproteobacteria (オレンジ)、Actinobacteria (緑)、Planctomycetes (赤)、Gammaproteobacteria (紫) の 5 つの綱が主要な微生物叢を形成することになる。ここで、各々に属する微生物種はよく解析されているものもあるが、今回決定した塩基配列のアノテーションの詳細を見てみると、例えば Alphaproteobacteria に属する配列の一つは、Bacteria; Proteobacteria; Alphaproteobacteria; Rhizobiales; Beijerinckiaceae; Roseiarcus; uncultured bacterium と登録されており、この微生物は未培養のよく解析されていない微生物と似ているとしか言及できない。従って、土壤の微生物叢の全容は本解析だけでは厳しいことを意味しており、微生物叢の割合の解析に加えて、そこに存在する主要な微生物のゲノム全体を再構成していくような研究が必要になっていく (この方向性を持つのが、後述する、ONT 社 ミナイオン (MinION) シークエンサーを用いた研究である)。また、今回、非常に面白いのは、第 7 位の Saccharimonadia は近年になってから、その存在がはっきりと提唱された極小バクテリアに属する CPR バクテリア (図 3.1.1-3) の一種であることである。

サンプリングを行った環境によって微生物叢がどのように異なるかを明らかにするために、B1 サンプルで行ったような解析を、B2~B7 のサンプルにおいても実行し、結果を門レベル (図 3.1.3-6) と綱レベル (図 3.1.3-7) にて比較してみた。まず、門、綱いずれのレベルにおいても、同じ南森林土壌の表層 (極めて近くの違うサンプルロット; 地表から 5 cm の空間線量率が 71 $\mu\text{Sv/h}$ である) を解析した B4、B5、B6 は、その微生物叢の割合のパターンが極めてよく似ていることが分かる。すなわち、本解析による解析の再現性が極めて良いことを支持している。実際、ポジティブコントロールである不活性化処理を行った 10 種類の微生物菌体の混合物 (Microbial Community Standard D6300、ZYMO RESEARCH 社) を用いた本手法の検討 (微生物叢データ集: 様々な環境でのメタゲノム解析結果 B26 及び M23) から、本解析が高い信頼性を持って微生物叢の実態を反映していることが明らかである。土壤サンプルから最も多く検出された門は Proteobacteria であり全サンプルの平均値の 29.6 % を構成している。Proteobacteria は表層土壌 (B4、B5、B6) サンプルにおける割合が高く、表層土壌の平均割合は 37.5 % であるが、深度別 (B1、B2、B3) に採集したサンプルの平均割合は 22.4 % であり、地表から深い土壌になるにつれて、Proteobacteria 割合が低くなる傾向が見られた。表層土 (B4、B5、B6) における Proteobacteria の綱レベルのプロファイル (図 3.1.3-7) を見ると、光合成細菌を多く含む Alphaproteobacteria の割合が高く、全体の 27.9 % を占める。Acidobacteriota 門 (図 3.1.3-6) についても土壤サンプルから豊富に検出され、表層土壌の平均割合は 17.0 % であるが、深度別に採集したサンプルの平均割合は 36.5 % であり、地表から深い土壌になるにつれて Acidobacteriota の割合が高くなる傾向が見られた。さらに、大きく土壌 (B1~B6) と海洋 (B7) で異なることも明らかである (海洋サンプルに関しては後述する)。微生物叢の割合のパターンが変わるのは、その環境の酸素濃度、温度、pH、栄養など様々な原因と関係しているので [27][28]、この原因を探る場合には慎重でなくてはならない。特に、本研究では、放射線という環境要因がさらに加わることになる。この問題を見越して、コントロールとなる、ウラン鉱床のある人形峠や和久観音鉱山跡の環境サンプルを入手している。

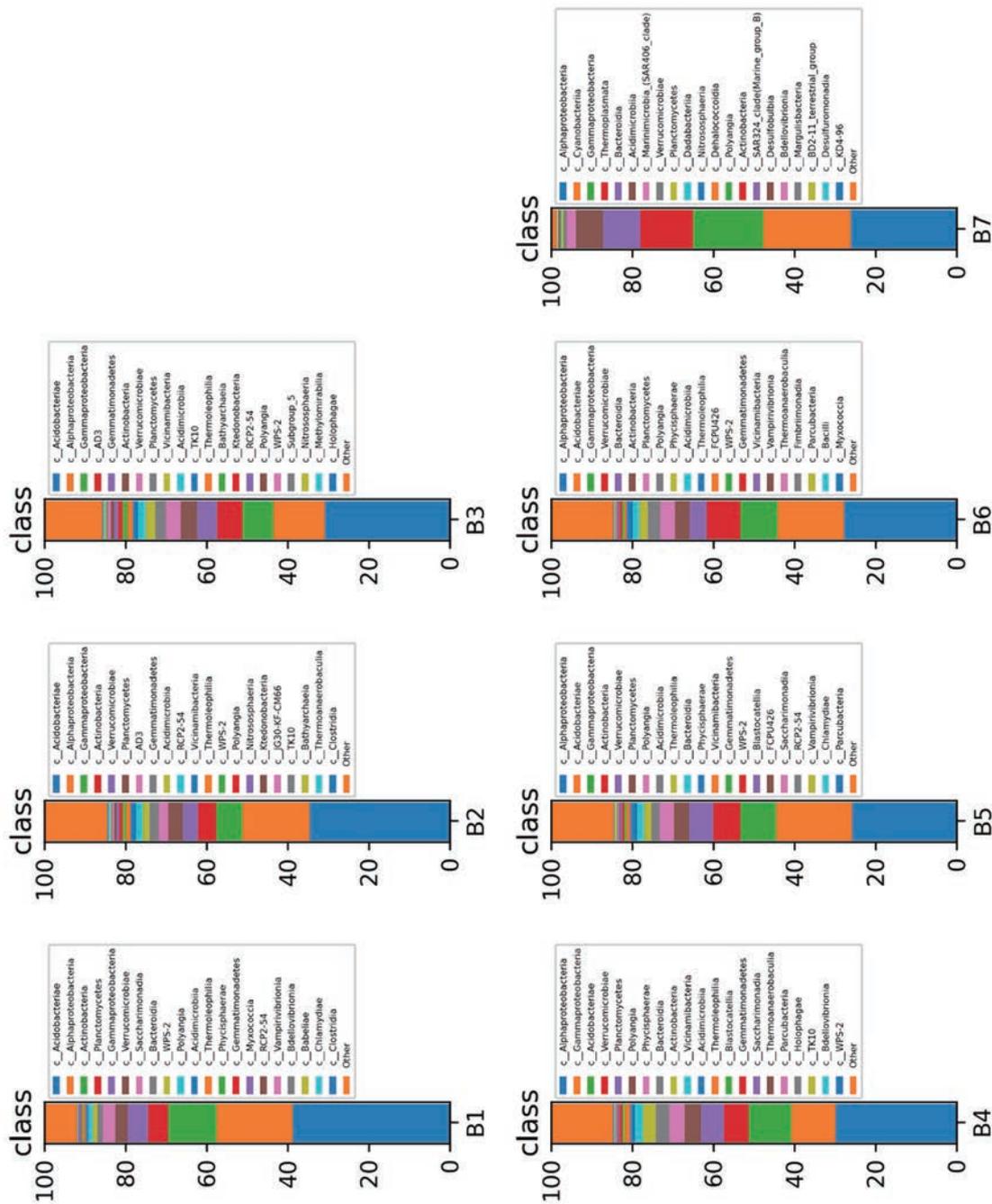


図 3.1.3-7 福島土壌、海水サンプルに由来するバクテリアの綱レベルでの比較
B1～B7 サンプルの詳細は図 3.1.3-3 を参照。

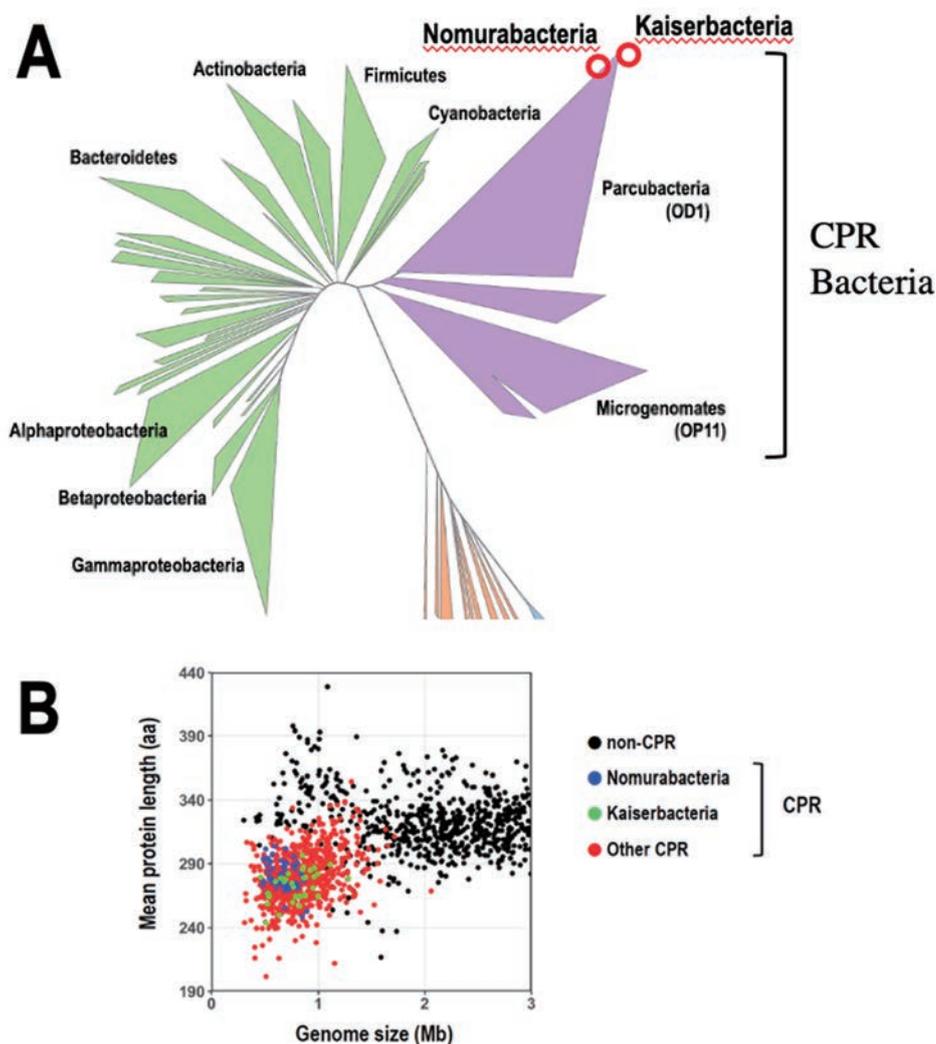


図 3.1.3-8 福島土壌には CPR バクテリアが生息する

- (A) 福島土壌で見出された CPR バクテリア 2 種の系統樹上での位置。系統樹は[6]を参照。
 (B) 福島土壌で見出された CPR バクテリアと同種は小さなゲノム (0.5~1.0 メガベース) を持つ。

さて、CPR バクテリア (図 3.1.1-3) に関して、少し補足して説明しておきたい。地球上の生物は大きくバクテリア、アーキア、そして真核生物の 3 つのドメインに分けられることは前述した通りであるが、図 3.1.1-3 に明らかなように、バクテリアは、これまでによく知られた、Proteobacteria や Firmicutes、Actinobacteria などを含む系統関係と、新しく提唱された CPR バクテリアの系統関係に大きく二分されていることが分かる。CPR のクレードには門レベルに相当するグループが数十個含まれると推定されており、その中でも、Parcubacteria と Microgenomates と呼ばれる 2 つの大きなグループが存在し、CPR 内の候補門の半分以上はこのいずれかに属する[29]。

今回の解析で B1 の綱レベル第 7 位の *Saccharimonadia* に加えて、B4 から B6 の表層サンプルに *Parcubacteria* が検出されている。*Parcubacteria* に関して、その詳細を解析してみたところ、*Nomurabacteria* と *Kaiserbacteria* と命名された 2 種からなることが分かった。しかも、その系統学上の位置は、CPR の末端に位置しており (図 3.1.3-8A) [30]、微生物の進化を考える上で興味深い研究対象であることが明らかになった。さらに、これら 2 つの CPR バクテリアと同種のゲノム解析から、この 2 種のグループのゲノムサイズは 0.5~1.0 メガベースと極めて小さく (図 3.1.3-8B)、これらのゲノムを再構成できれば、最小ゲノム微生物がどんな遺伝子を有するかという問題に対しても、良い研究材料を提供することになるだろう。これは地球史における冥王代に、いかに生命が誕生したかという問題につながる可能性を秘めているのである。

バクテリアのメタゲノム解析のうち、海洋の表層水 (B7 サンプル) 由来の微生物に関して説明したい。まず、海洋のサンプルからドメインレベルでは 80%強がバクテリアを、20%弱がアーキアの 16S リボソーム RNA 遺伝子を増幅させたことが分かる (図 3.1.3-9)。同じ表層水の環境ゲノムを使うと真核生物である微細藻類の 18S リボソーム RNA 遺伝子の PCR 増幅が検出されること (図 3.1.3-10 及び図 3.1.3-11) より、341f/785r は原核生物に特異的なプライマーといえるだろう。一方で、アーキアに特化したプライマー 2 種 (表 3.1.1-3) を用いた時には、表層水の環境ゲノムからの PCR はスメアを引き、期待されたサイズの PCR 産物のバンドは極めて希薄なバンドであった。バクテリアのゲノム配列が多すぎるために、アーキアの PCR を競合的に阻害しているのかもしれない。B7 の微生物叢の割合が土壌のそれと大きく異なるのは、*Cyanobacteria* (綱レベル第 2 位、オレンジ色、図 3.1.3-9) や *Thermoplasmata* (綱レベル第 4 位、赤、図 3.1.3-9) の割合が多いことである。また、*Dadabacteriia* (綱レベル第 10 位、水色、図 3.1.3-9) は、本研究では海洋にしか見出されないため、このようなバクテリア候補の詳細を調べる必要があるだろう。なお、海洋性バクテリアの 16S リボソーム RNA 遺伝子を検出できる PCR プライマー (表 3.1.1-3) においても、明確なアンプリコンを取得できた (微生物叢データ集 1、MB のシリーズ)。一方で、そのプロファイルの多くがバクテリア (B のシリーズ) と酷似しているため本稿では MB シリーズは微生物叢データ集でのプロファイルの報告に留めたい。

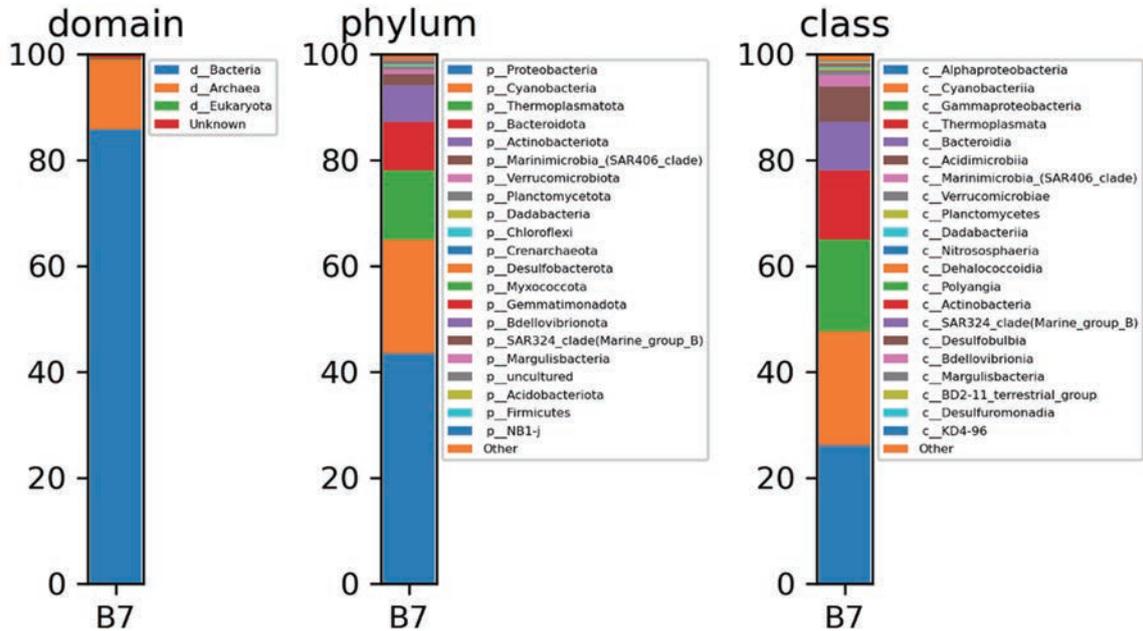


図 3.1.3-9 福島海洋の表層水由来 B7 サンプルを構成する生物ドメイン、門、綱

B7 サンプル（福島海洋表層水）に由来するゲノムをバクテリアの 16S リボソーム RNA 遺伝子の共通プライマーで PCR 増幅し、その塩基配列を決定した。配列のアノテーションをドメイン、門、綱レベルで集計した。サンプルの詳細は図 3.1.3-3 を参照。

④ 環境と微生物叢

ここまでの微生物叢の解析は主として特定の環境だけに注目したものであり、微生物叢が見出された環境と環境を比較するような視点ではなかった。本項では、階層的クラスタリングを用いた環境（微生物叢）の比較と、特に福島土壌のバクテリアに関して Hoyos-Hernandez らにより最近発表されたデータ[31]との比較考察に関してまとめた。

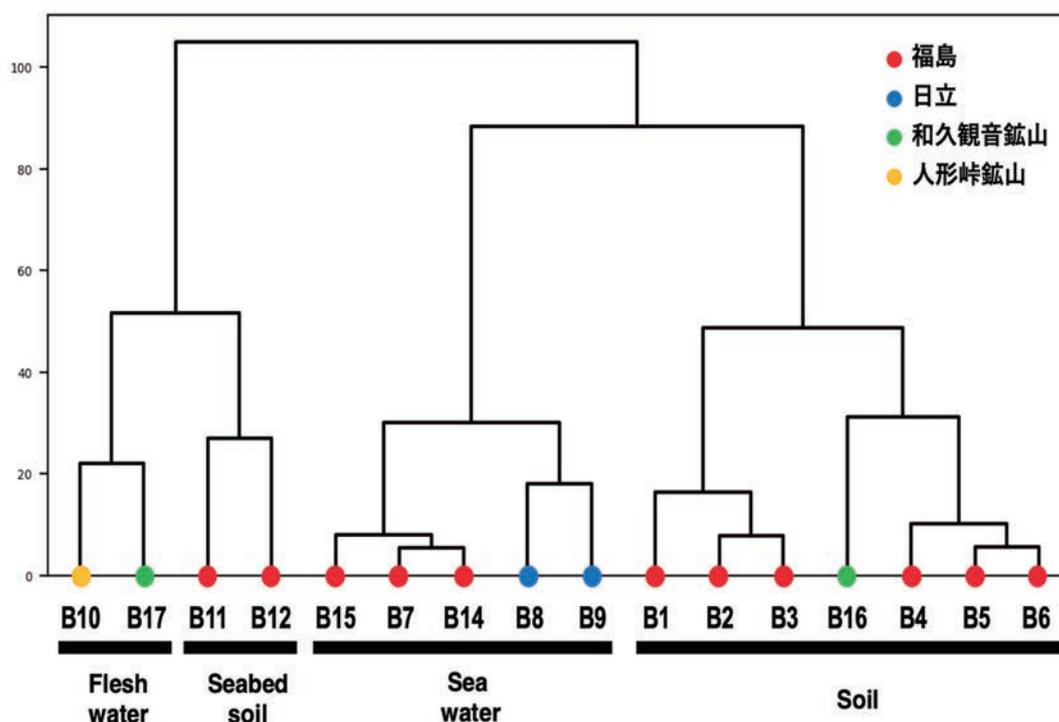


図 3.1.3-10 環境微生物叢の階層的なクラスタリング

各環境に由来する微生物叢をワード法（Ward's method）によりクラスタリングした。この結果、似た環境が集まることがわかる。反対に考えると同じような環境に存在する微生物叢は似ていることが分かる。ここでは、淡水、海底土、海水、土壌がクラスタリングされ、近くに集まっている。

図 3.1.3-10 は、各環境から得られた細菌叢をその類似度に従ってクラスタリングした結果である。この結果、環境は明確に、淡水（Flesh water）、海底土（Seabed soil）、海水（Sea water）、土壌（Soil）に分かれている。また、同じ海水でも、福島由来の海水と日立港の海水が、同じ土壌でも、南森林土壌の深さによるものと表層土が区別される。このことは、微生物叢を知れば、その環境がどのようなものであるかを明らかにできるということに他ならない。なお、ここでは、人形峠の淡水（鉱水）は和久観音鉱山跡の川水（淡水）と同じクラスターに分離されたが、共同研究者であるロシア側の科学者の主成分分析や、後述する MinION シークエンサーを用いた全長の 16S rRNA を用いた細菌叢の 2 次元プロファイルでは、より海水に近い環境であることが示唆されている。

次に、放射線の強さと微生物叢との関係を、我々の福島南森林の表層土サンプル（福島第一原発の 1 号機から約 1 km：表面から 5 cm で 71 μ Sv/h）の細菌叢の結果と、令和元年にフ

ランスの研究者により発表されたデータ[31]で福島汚染土壌（ $0.75\sim 1.0\ \mu\text{Sv/h}$ ）として解析された細菌叢の結果とを比較した（図 3.1.3-11）。フランスのグループが解析した土壌の放射能は、我々のそれと比較した場合、約 $1/50\sim 1/100$ となる。ところが細菌叢をみると、我々の結果（サンプル B4 と B5）が、分類が明確でないものを集めた Others カテゴリーが 20% 近くあることに留意しても、フランスのグループとの共通の細菌が多いことに気づく（図 3.1.3-11 下段、我々の網レベルでの細菌叢の割合は比較のために、フランスのグループのそれと同じ順番になるように並べ替えてある）。すなわち、両方の土壌で、*Thermoleophilia*、*Gammaproteobacteria*、*Planctomycetes*、*Acidimicrobiia*、*Acidobacteriae*、*Alphaproteobacteria*、*Actinobacteria* などが、その全体に対する割合もほぼ一致して共通して検出されていたのがわかる。このことは、今回、測定された放射線、小さく見積もっても $0.75\sim 70\ \mu\text{Sv/h}$ の範囲であれば、その放射線量にかかわらず、微生物叢の大まかな構造に変化は見られないことを示唆している。どうやらこの程度の放射線量は微生物にとって、ほとんど問題とならない量のようなものである。実際、Shuryak らの報告[2]によれば、よく知られている大腸菌に $36\ \text{Gy/h}$ の放射線（ γ 線）を当てても、その増殖はそれほど阻害されなかった。これは真核生物の酵母菌などでも同様である。もちろん、放射線耐性菌として知られている *Deinococcus radiodurans* では $94\ \text{Gy/h}$ でも生き残るものがいた。X 線や γ 線の場合は $1\ \text{Gy}=1\ \text{Sv}$ として、 α 線では $1\ \text{Gy}=20\ \text{Sv}$ として考えてみても、 $70\ \mu\text{Sv/h}$ の土壌はせいぜい $3.5\sim 70\ \mu\text{Gy/h}$ で、大腸菌が耐えられる放射線量の $1/500\sim 1/10,000$ の値でしかないのである。すなわち、今回の結果は基本的な微生物が持っている一般的な性状を反映した結果と考えられる。一方、細菌叢の全体が変わらないからといって、その中の微生物に特殊なものがごく僅かもないということではない。調べた環境に特に金属腐食や放射線耐性菌がいるのか否かに関しては後述する。

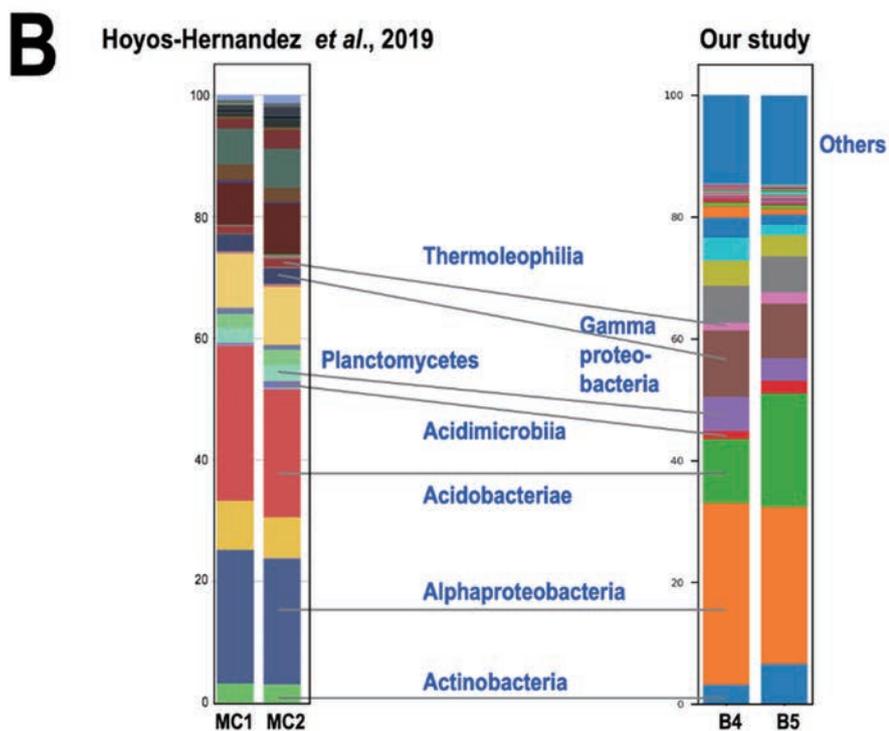
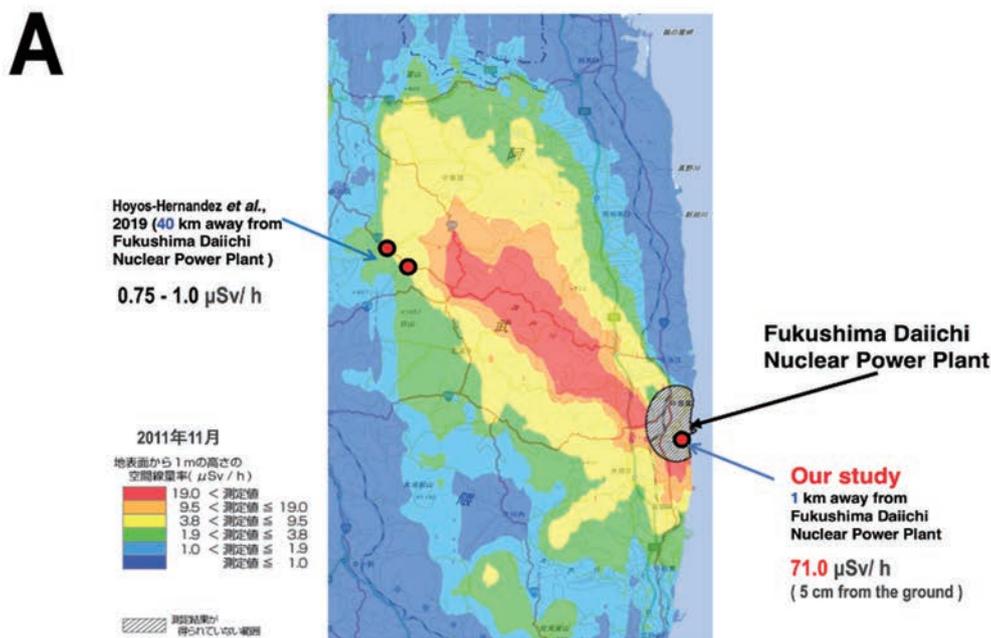


図 3.1.3-11 福島土壌の放射線と微生物叢

- (A) 土壌のサンプリングの箇所。本研究でサンプリングを実施した南森林は福島第一原発から 1 km に存在する。一方で、参考にした Hoyos-Hernandez らの研究[7]は同原子力発電所より 40 km 離れており、かつ放射能も 1/50~1/100 である。地図は放射線量等分布マップ 拡大サイト／出典：地理院地図 (<https://ramap.jmc.or.jp/map/>) を改変して掲載。
- (B) Hoyos-Hernandez らとのデータ[31]と本研究の微生物叢の比較。詳細は本文を参照のこと。

⑤ 金属腐食や放射線耐性に関与するバクテリア

平成 30 年 2 月に東京電力ホールディングス株式会社により WEB サイト上で、福島第一原発 2 号機の原子炉格納容器内部の写真が公開された[32]。これを見ると、金属部分の表面に赤褐色の部分が観察され、腐食があるように思える。一般的に金属腐食には微生物の関与も疑われるが、福島第一原発格納容器における微生物の調査は系統的に行われてはいない。微生物による金属腐食は微生物腐食 (Microbiologically Influenced Corrosion : MIC) と呼ばれる。微生物が金属表面に付着すると、多糖類やタンパク質からなる細胞外高分子物質を放出し、バイオフィームと呼ばれる微生物の集合体を形成する。ここで、バイオフィームは金属腐食における関与が報告されている[33]。MIC に関連する微生物にはいくつか報告がある[33][34]。代表的なものとしては、嫌気条件で硫化水素を生成する *Desulfovibrio* 属や *Desulfuromonas* 属といった硫黄還元細菌や、鉄を酸化 (Fe^{2+} から Fe^{3+}) する *Leptothrix* 属や *Gallionella* 属が知られている[35]。また、強い放射線の存在下でも増殖できるような微生物も存在する。放射線は直接 DNA 分子に当たり切断を引き起こすのに加え、細胞中に存在する水分子に放射線が当たり生成されるラジカルによっても DNA に損傷が起こる。2 本鎖 DNA 分子の切断が起こると、多くのバクテリアは増殖することができないが、放射線耐性菌として知られている *Deinococcus radiodurans* や *Rubrobacter radiotolerans* などのバクテリアは、7,000 Gy を超えるような放射線にも耐えることができる。前者は高い DNA 修復能力を有する[36]がため、後者はバクテリオルベリンという色素 (カロテノイド) を合成し、これが、ラジカル及びそのラジカルより生成する活性酸素種に対して高い除去活性を有しているという報告[37]がある。

さて、福島関連土壌の中にこれらのバクテリアは存在したのだろうか？サンプル中の金属腐食関連細菌及び放射線耐性菌の割合を探索するために、先行研究で報告されているこれらの性状を有した菌が含まれる属の割合を求めた。図 3.1.3-12 のヒートマップは、100 万リードあたりの各々の属に含まれる細菌のリード数を示している。まず、微生物関連腐食細菌と知られているバクテリアは、福島第一原発周辺の土壌 (B1~B6) と水系サンプル (B7、B11、B12、B14、B15) には極めて低い割合でしか見出されなかった。最も多く検出された細菌は鉄・マンガンの酸化細菌として知られる *Leptothrix* 属であったが、それでも全体のリードの 0.2 %以下であった。福島県以外の地域も含めると、人形峠の鉱水 (B10) では、全体の 3.3%程度が鉄・マンガンの酸化細菌として知られる *Gallionella* 属に分類され、微生物関連腐食バクテリアの最も高いサンプルとなった。また、放射線耐性菌の割合についても同様に探索したところ、いずれのサンプルからも全体のリード数に占める割合は、0.1 %以下であった。その一方で、培養の条件を整えば、細菌は一昼夜のうちに 100 万倍に増えることも可能であることに留意する必要がある。すなわち、定期的なモニターが欠かせない事になる。

メタゲノムにおけるアンプリコン解析のみから、任意の環境にいる微生物に関して種のレベルで同定できることは決して多くない。それにはいくつかの理由がある。例えば、イルミナシークエンサー解析による 16S rRNA の部分配列 (450 bp 程度) だけでは、バクテリア種の多様性に対応できていると言い難い。16S rRNA (1.5 kb 程度) の全長配列を解析できる ONT 社ミニイオン (MinION) シークエンサーを用いても、その塩基配列の正確性は今のところ 90 %強なので、種の違いを区別する rRNA の類似性の閾値である 97 %以上を持って議論できない。もとより rRNA が 100 %一致していても、異なった微生物種のゲノムがあることはメタゲノム解析ではよくある話である。さらに最も根源的な問題は、メタゲノムで配列決定される微生物の大半が、完全長配列はもとより、培養すら難しい未培養や難培養性のものであるためである。すなわち、バクテリアでも、アーキアでも、単細胞の真核生物でも、

我々人類が明確に区別できているのは、全体のうち、ごく一部であるからである。表 3.1.3-2 は福島南森林の土壌で得られた微生物叢を構成するバクテリアの代表配列が Blast を介して、どの種の配列に一番ヒットするかを解析し、そのリード数を数えたものである。Taxonomy（ここでは、種の分類を指す）のカラムに uncultured bacterium（未培養のバクテリア）と記載されるものが多いことが分かるだろう。従って、メタゲノム解析（特にアンプリコン解析）は、現状では、微生物の大まかな（綱や目レベルくらいまでの）分類プロファイルとすることが出来るだろう。それでも、そこから得られる知見は様々なものがあるし、そのためにもアンプリコン以外のメタゲノム解析法が開発されてきたわけである。具体的には次節以降で解説したい。

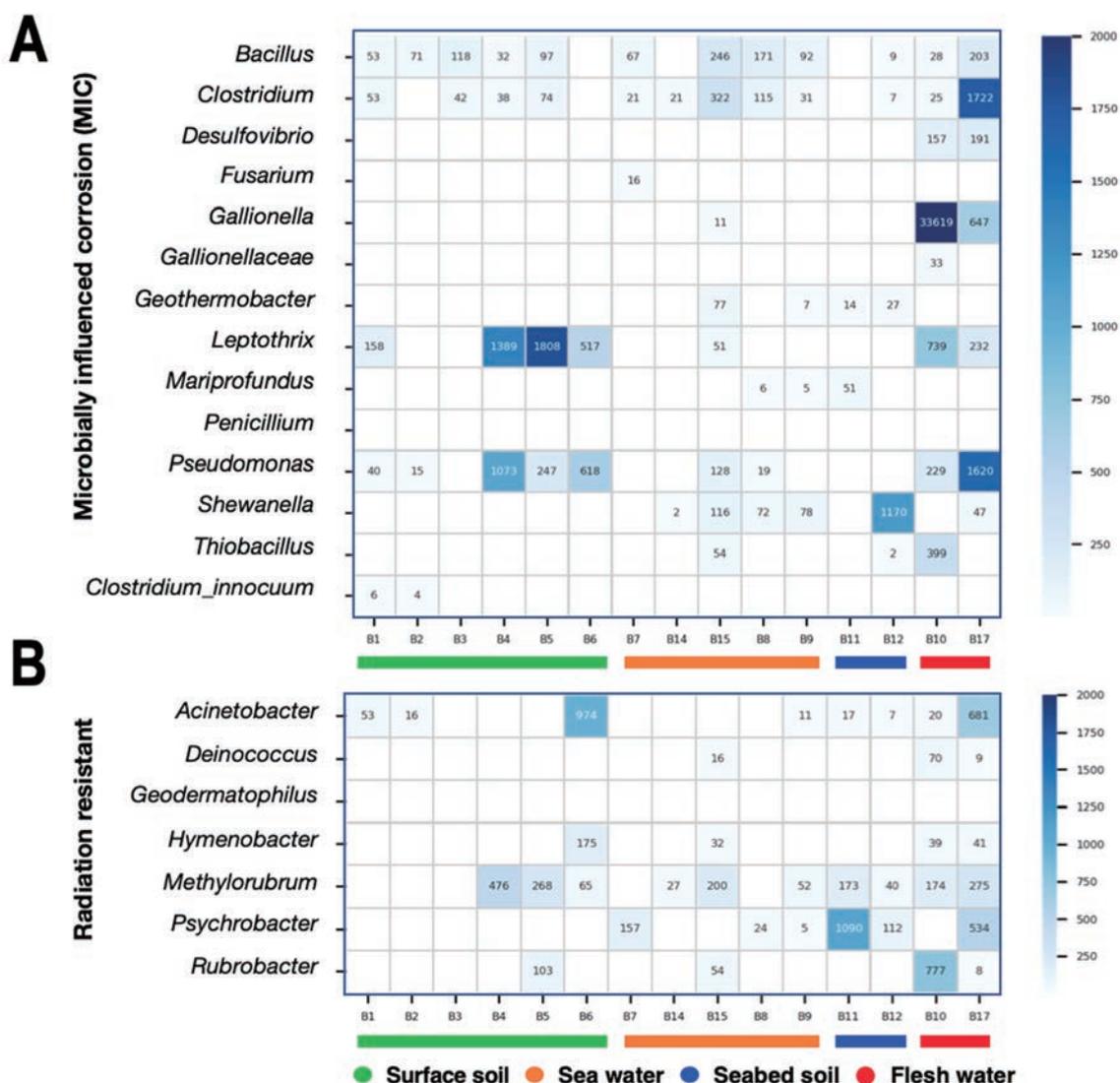


図 3.1.3-12 本研究で解析した環境に見出された金属腐食や放射線耐性に関わる微生物

(A) 金属腐食に関連する細菌とその 16S rRNA 配列のリード数

(B) 放射線耐性に関連する細菌とその 16S rRNA 配列のリード数（100 万リードあたりの数を示す）

表 3.1.3-2 環境微生物は未培養（難培養）なものが多い

Taxonomy	B4	B5	B6	B1	B2	B3
s_uncultured_bacterium	8055	14943	13725	43129	62716	45027
s_uncultured_bacterium	2659	12834	5732	41803	13152	10159
s_uncultured_Acidobacteria	5875	13608	6830	31723	10965	7778
s_uncultured_bacterium	6409	12461	11415	38974	3440	1960
s_uncultured_bacterium	5222	4588	5125	12388	21558	17782
s_uncultured_bacterium	4254	6086	3197	4027	20405	16676
s_uncultured_Acidobacteria	1381	1933	2780	3296	27647	17317
s_uncultured_bacterium	5045	4797	5685	2798	18872	14254
s_uncultured_bacterium	4050	3917	5789	3352	13512	16917
s_uncultured_bacterium	1316	3554	2826	36785	1007	298
s_metagenome	6718	6860	10547	11052	3270	2979
s_uncultured_bacterium	6383	5281	6346	5689	6949	5357
s_uncultured_bacterium	5658	3841	3755	3402	9376	9121
s_Bradyrhizobium_sp.	11044	4783	4245	2862	4606	4673
s_uncultured_bacterium	14627	5732	7443	1615	848	389
s_uncultured_Acidobacteria	1179	3660	1406	22133	782	232
s_uncultured_bacterium	85	136	53	122	6917	20609
s_uncultured_bacterium	7435	5948	7319	5030	1521	591
s_uncultured_Acidobacteria	3190	5643	4702	8848	2252	2804
s_uncultured_bacterium	716	455	1249	229	6907	17639

⑥ MinION シークエンサー

上記までの 16S rRNA アンプリコンを用いた解析は微生物叢の分布や割合の解析には効果を発揮するが、同定された種が既知で、そのゲノムが完全長の塩基配列を決定されていなければ、具体的にどのような遺伝子を有しているゲノムなのかを断定することはできない。ここで、メタゲノム解析の結果として推定、同定される微生物種の多くは、未培養や難培養性であり、完全長ゲノムは期待できないことが多い。そこで、得られた環境ゲノム全体の塩基配列を決定することで、この中にどのような遺伝子が存在しているのかを明らかにしていく手法がある。また、可能であれば、決定したゲノム断片をコンピュータ上で繋ぎあわせて、再構成ゲノムを構築できれば、該当する環境にどのような微生物が適応しているのかより明確に示すことができると考えられる。この目的に都合が良いのが、ONT 社ミナイオン (MinION) シークエンサーシステムである (図 3.1.3-13)。このシークエンサーは小型でありながら、数キロベースから 100 キロベース程度までの長鎖 DNA を大量に解析できるからである。また、小型であることから管理区域内に生息する微生物のゲノムシーケンスにも役立つと判断された。



図 3.1.3-13 ONT 社ミナイオン (MinION) シークエンサーシステム

極めて小型の次世代シークエンサーである。他の次世代シークエンサーに比較して、塩基配列決定の精度 (90 %程度) で劣るものの、手のひらに乗るような小型であることから、放射線管理区域など大型の機器を持ち込めない施設での塩基配列の決定には有効である。また、長鎖 DNA (数キロから数百キロが可能) の塩基配列決定や RNA の塩基配列を直接に決定できるなどの利点もある。

⑦ 環境 DNA のショットガン解析、ロングリード解析と環境 RNA の解析

⑤で言及したが、16S rRNA のプロファイルだけではどうしても、その環境に生息する微生物の具体的な遺伝子情報やゲノム情報を掴むのに限りがある。そこで、本項では、アンプリコン以外の解析に関してまとめておきたい。本研究期間中に実施し、結果が得られたのは次なる3項目 (A) イルミナシークエンサーを用いた土壌由来環境ゲノム DNA のショットガン解析、(B) MinION シークエンサーによる土壌由来環境ゲノム DNA の長鎖塩基配列解析、及び (C) 土壌由来環境 RNA の調製と塩基配列解析である。得られたデータは全て、共同研究を行なっている国立遺伝学研究所やカザン大学の研究者と共有した。

(A) イルミナシークエンサーを用いた土壌由来環境ゲノム DNA のショットガン解析

サンプルとして用いたのは、福島南森林由来の環境ゲノム DNA 3 種 (表層土サンプル NW、NE、及び SE、表 3.1.2-3 A-1 参照)、及び和久観音鉾山跡土壌由来の環境ゲノム DNA (表層土サンプル令和 2 年 3 月 17 日のサンプル、表 3.1.2-3 D 参照) である。DNA のロットはアンプリコン解析をしたものと同じである。塩基配列の決定は環境ゲノム DNA を送付することによりジーンベイ社を介して Novogene Co., Ltd.にて行われた。具体的には、平均 350 塩基に分断された DNA フラグメントの塩基配列をイルミナ社の NovaSeq-6000 シークエンサーを用いて、ペアエンド (PE) にて 250 塩基ずつ決定した。その結果、福島南森林由来の環境ゲノム NW が約 4,083 万リード、NE が約 2,530 万リード、SE が約 3,087 万リード、そして和久観音鉾山跡土壌由来の環境ゲノム DNA では約 4,121 万リードの配列を得ることができた。この塩基配列は将来的に、後述する長鎖塩基配列解析 (ロングリード解析) の結果と合わせ、環境由来のゲノムを (部分的に) 再構築したり、様々な遺伝子の存在を明らかにしたりすることに利用できる。実際、令和 2 年度に採択された英知事業「健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断及び抑制技術の開発」の岡本章玄代表 (国立研究開発法人物質・材料研究機構) と共同で、彼らの興味ある微生物遺伝子の探索を行っている。

(B) MinION シークエンサーによる土壌由来環境ゲノム DNA の長鎖塩基配列解析

令和元年度のパイロットテスト (令和元年度成果報告書に詳細な手法を記載) では福島南森林由来の環境ゲノム DNA (表層土サンプル NW) を用いたミニオンシークエンサーのセットアップに関して記載してあるが、令和 2 年度に、和久観音鉾山跡土壌由来の環境ゲノム DNA (表層土サンプル令和 2 年 3 月 17 日のサンプル、表 3.1.2-3 D 参照) を用いて、現状においてより高分子、長鎖の環境ゲノム DNA の塩基配列の決定を行った。

シーケンシングライブラリーの作成は、Ligation Sequencing Kit (ONT 社製、SQK-LSK109) を用いて、ONT 社から提供されたプロトコール (Version : GDE_9063_v109_revT_14Aug2019) に従って調製した。まず、環境ゲノム DNA を Agencourt AMPure XP ビーズにより精製後、NEBNext® Companion Module for Oxford Nanopore Technologies® Ligation Sequencing (NEB 社製 : E7180S) を用いて、DNA の末端処理とシーケンシングアダプターのライゲーションを行った。塩基配列の決定は、MinION (ONT 社製、MIN-101B) とフローセル (FLO-MIN106) を用いて行った。MinKNOW (Version 3.6.3) の実行及び Basecalling は MinIT を用いた。スタートから 48 時間 05 分後にシーケンシングを停止した。その結果、全 114 万のリード数 (Estimated Bases : 4.51 Gb) が得られ、リードサイズの平均が 7.81 kb であった。中には 70 kb を超えるような配列も出ていた。一方で、塩基配

列の読み取れた平均サイズが 7 kb 代ということは、本研究で採用した ISOIL キットで調製した環境ゲノム DNA が、アガロースゲル電気泳動上では 20 kb を超えている（例えば、図 3.1.3-1）ことを考えると、まだまだ手法の改良の余地があると思われた。

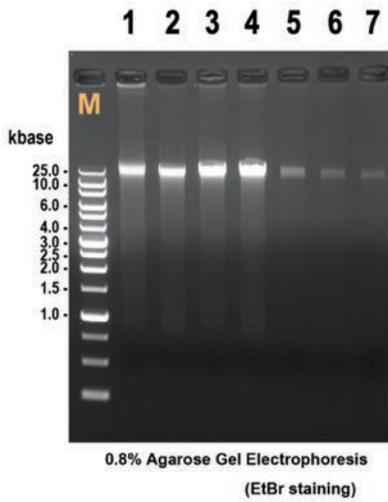
なお、福島南森林土壌（NW）に由来する環境ゲノム DNA の長鎖塩基配列解析を行うために、国立遺伝学研究所が有している PacBio シークエンサーによる解析を試みた。このシークエンサーは最大リード長 40 kb、平均リード長 10 kb 以上のシーケンスが可能であり、塩基配列決定の精度が極めて高い。しかしながら、ライブラリー構築の過程でゲノム DNA の断片化が激しく、塩基配列を得るに至らなかった（黒川顕教授私信）。環境 DNA（褐色である）に混在している様々な物質がライブラリー構築に対し、阻害的に働いている可能性が残った。

(C) 土壌由来環境 RNA の調製と塩基配列解析

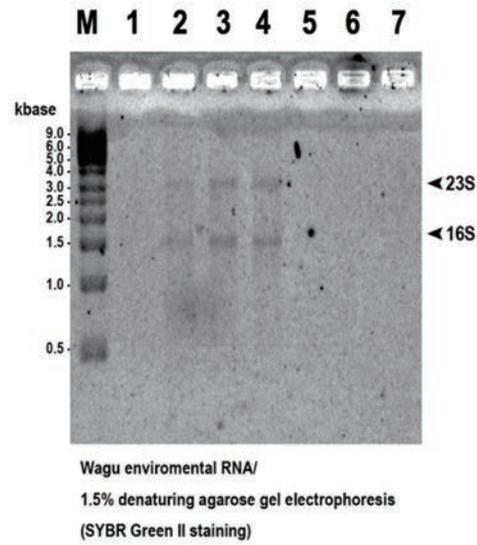
MinION シークエンサーの登場が衝撃的であったのは、そのコンパクトなサイズや簡便性、ロングリードシーケンスが可能であったことばかりではない。調製した RNA のダイレクトな塩基配列の決定が可能となったからでもある。RNA には様々な塩基の化学修飾が存在することが知られ、RNA 塩基配列の決定のために DNA に変換すること（逆転写、cDNA の合成）が困難な場合があった。本節では、環境 RNA のダイレクトシーケンスの準備として、まず、環境由来の RNA 調製の検討を行った。また、RNA 由来の配列がどのような細菌叢に対応するのかを明らかにする初段階として、本研究期間中に確立できたバーコードを利用した 16S rRNA 遺伝子の増幅法を用いた MinION シークエンスを遂行した。このため、環境 RNA を逆転写酵素により cDNA としたものをを用いた。こうすることで RNA の量に依存した（実際の土壌中で転写が起き増殖が活発である）微生物叢が明らかにできるからである。もちろん、この結果は将来に逆転写を介さないダイレクトな RNA シークエンスの結果（PCR も介さない）と比べることで更に有用な情報が得られるはずである。

図 3.1.3-14 は、和久観音鉾山跡土壌からの環境 DNA と RNA 調製について比較した結果である。サンプル#1 から#7 までは異なる土壌サンプルを示しており、サンプル#1～#4 が和久観音鉾山跡第一鉾体入り口の比較的土の成分が多いもの、サンプル#5～#7 が第二鉾体入り口の比較的砂利のような成分が多いものになる（図 3.1.2-13 参照）。結果を見て明らかのように、環境 DNA 量が多く取得できている土壌サンプル#1～#4 に対して、土壌サンプル#5～#7 は、その取得 DNA の量が一桁から二桁少ないことが明らかである。このことは環境ゲノム DNA が多く取れる環境は、環境 RNA も多く取れることを示している。環境 RNA を cDNA にした後、16S rRNA 領域を PCR 増幅して、その塩基配列を MinION で決定した（ランの時間は 25 時間）。サンプルは和久観音鉾山跡土壌#2 と#3 の 2 種を用いたが、前者からは約 20 万リードを、後者からは約 25 万リードを得ることができた。さらに、#3 の塩基配列から想定される門レベルの解析では、Proteobacteria、Acidobacteriota、及び Actinobacteriota など環境ゲノム DNA の解析（微生物叢データ集 B20）と類似した細菌叢が見出されるが、DNA レベルと RNA レベルでの差に関しては今後の詳細な比較解析を待たねばならない。

(A) 環境DNAの調製



(B) 環境RNAの調製



	Soil	DNA Conc.	Total amount of DNA
1:	5 g	10 ng/ μ l	5 μ g/ 500 μ l
2:	5 g	190 ng/ μ l	95 μ g/ 500 μ l
3:	5 g	230 ng/ μ l	115 μ g/ 500 μ l
4:	5 g	200 ng/ μ l	100 μ g/ 500 μ l
5:	5 g	3.0 ng/ μ l	1.5 μ g/ 500 μ l
6:	5 g	6.0 ng/ μ l	3.0 μ g/ 500 μ l
7:	5 g	3.3 ng/ μ l	1.7 μ g/ 500 μ l

	Soil	RNA Conc.	Total amount of RNA
1:	0.5 g	46.8 ng/ μ l	1.4 μ g/ 30 μ l
2:	0.5 g	169 ng/ μ l	5.1 μ g/ 30 μ l
3:	0.5 g	233 ng/ μ l	7.0 μ g/ 30 μ l
4:	0.5 g	173 ng/ μ l	5.2 μ g/ 30 μ l
5:	0.5 g	3.5 ng/ μ l	0.11 μ g/ 30 μ l
6:	0.5 g	2.4 ng/ μ l	0.072 μ g/ 30 μ l
7:	0.5 g	0.8 ng/ μ l	0.024 μ g/ 30 μ l

図 3.1.3-14 和久観音鉦山跡土壌からの環境 DNA と RNA 調製

(A) 環境 DNA と (B) 環境 RNA は和久観音鉦山跡の土壌 (#1 から #7、図 3.1.2-13 参照) より調製した。環境 DNA の調製には Nippon Gene 社の ISOIL キットを、環境 RNA の調製には、同 ISOIL for RNA キットを使用した。DNA が多く取得できている土壌からは RNA も多く取得できていることがわかる。23S、16S はバクテリアの rRNA の位置である。

⑧ ロシアの研究グループ（カザン大学）による福島関連データの情報解析

ロシア側ではロシア沿ヴォルガ連邦管区タタールスタン共和国の首都カザンにあるカザン大学の Elena Shagimardanova 博士と Nurislam Shaykhtudinov 氏（修士号あり）により、共有した福島関連環境微生物の塩基配列に関して、情報学的な観点から研究が遂行された。その結果、日本側の結果を支持するような細菌叢の分布などが得られたが、特にデータの信頼性、再現性に関する統計学的に提言をしてくれた。また、日本側ではトピック解析として行なったものを、別の方法（パスウェイデータベース等を用いた機能プロファイリング）で行なってくれた。これらの結果に関して、以下に記す。

ロシア側から本メタゲノム解析に対する有効な提言のまとめ

(A) Despite high coverage rarefaction curves is flatten to approximately to 100000 reads per samples. We suggest to decrease coverage of future samples to 100000 reads. Because even new ASV or OTU that can arise from such high coverage of that samples are eliminated during filtering steps (図 3.1.3-15).

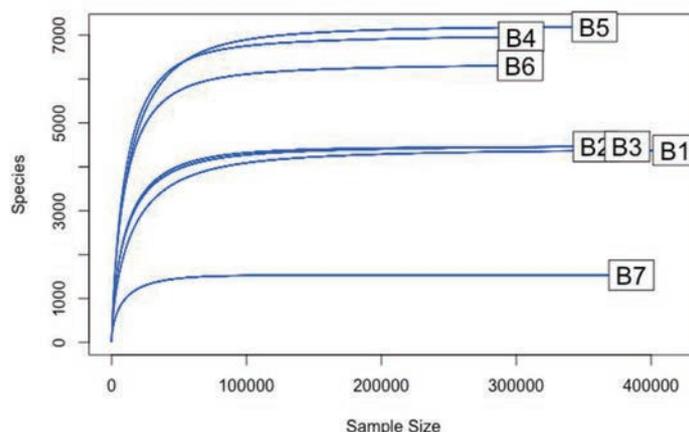


図 3.1.3-15 サンプルのリード数と種の多様性の例

B1～B7 は福島土壌及び海水に由来するサンプル（極めて低頻度のものは除いている）である。どの環境でも 10 万リードに達する前に新しい種数は頭打ちになる。他のプライマーを用いた（M や MB）でもこの傾向は変わらない。

(B) In this dataset we have only one technical replica per sample. It will be better to have from 3 to 5 technical replicas per sample, because we can't be sure that taxonomy that we found in samples are not due to contamination. That's why also it will be better to add mock community to sequencing run. accessible information about collection sites. accessible information about collection sites.

(C) In order to determine the effect of soil chemical parameters on the functional potential of microbial communities and taxonomic structure, we need next information about samples sites: pH, Cesium-137 (Cs-137) K bq Kg⁻¹; Cesium-134 (Cs-134) K bq Kg⁻¹; total organic carbon (TOC) mg g⁻¹ or any accessible information about collection sites.

以上を簡単にまとめると以下のようになる。

- (A) 今回の研究では各環境サンプルに対して 100 万リード配列を決定したが、統計的には 10 万リードで十分である。
- (B) 同じ環境のサンプルに関して、3 から 5 回の配列解析（繰り返しの実験）を実施した方が良い。
- (C) 環境とそこの生息する微生物の影響に目を向けるのであれば、各環境サンプルに対して物理、化学的な指標も（統一して）提供されるべきである。

この指摘は科学的に極めて正当かつ的確なものであるが、実質 1 年間で福島関連の貴重なサンプルや関連環境のサンプルを処理しなければならなかったために、本研究では、基本的に 1 環境で同じ解析は 1 回であった。しかしながら、前述したように B4、B5、B6 は、ほぼ同じ箇所の土壌からサンプリングされ、この 3 サンプルが同様の細菌叢プロファイルを示したことに加え、ポジティブコントロールとして解析した既知のバクテリアの Mix セットが期待通りのプロファイルを示したことで、本研究のデータは信用できるものと考えている。また、環境のサンプリングに複数のチームが関わったことやサンプルの種類も土壌、川水、海水、海底土、鉱山の湧水など多様であったために、必ずしも同じ条件で pH や放射能が測定できなかった点は反省すべきである。

福島関連土壌の機能的プロファイリング

日本側の研究グループは微生物叢の解析に、前述の階層的なクラスタリング（図 3.1.3-10）や、本研究に分担者として参加している国立遺伝学研究所の黒川顕教授らが開発した微生物群集構造解析のウェブアプリケーションである Latent Environment Allocation (LEA) [38]を用いた（後述）。一方で、ロシア側の研究グループは主成分解析や、遺伝子ファミリーや代謝パスウェイを 16S rRNA のアンプリコン配列から予測するソフトウェアである PICRUST2[39]を用いて、同じ問題に対処した。ロシア側の行なった主成分分析の結果例を図 3.1.3-16 に示す。主成分分析は同じグループを見つけるのには良いが、その主成分の内容が明確でないことが多いので、今回の目的には明確な結果を提示しているとは言い難いが、人形峠のサンプルが他と大きく異なることはここでも支持されている。また、図 3.1.3-17 は各環境の機能的プロファイリングができる PICRUST2 というソフトを用いた解析結果である。ここでは、DNA の修復や、メタン代謝など特定の経路に関わるような微生物に環境に偏りがあるかを示しているが、現状では、候補止まりで、このような解析を複合的に用いて、最終的には実験検証で結論づける必要があるだろう。

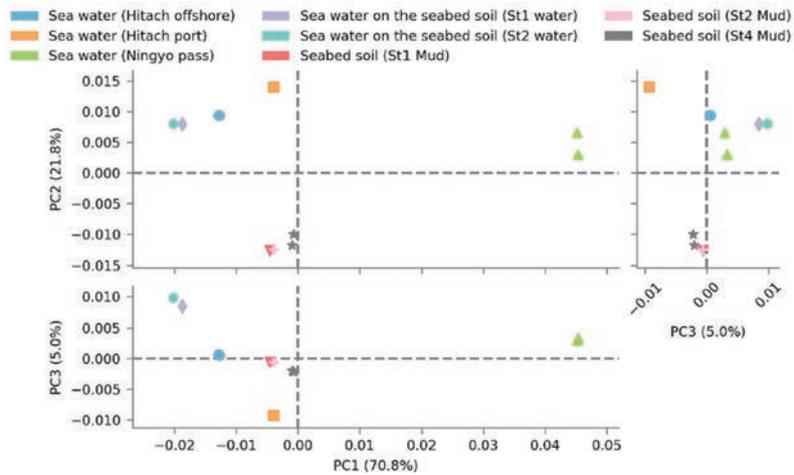


図 3.1.3-16 各環境に由来する微生物がもつ代謝経路（KEGG データベースを利用）に基づいた主成分分析

人形峠の鉱水サンプルが他のサンプルと大きく異なることがわかる。

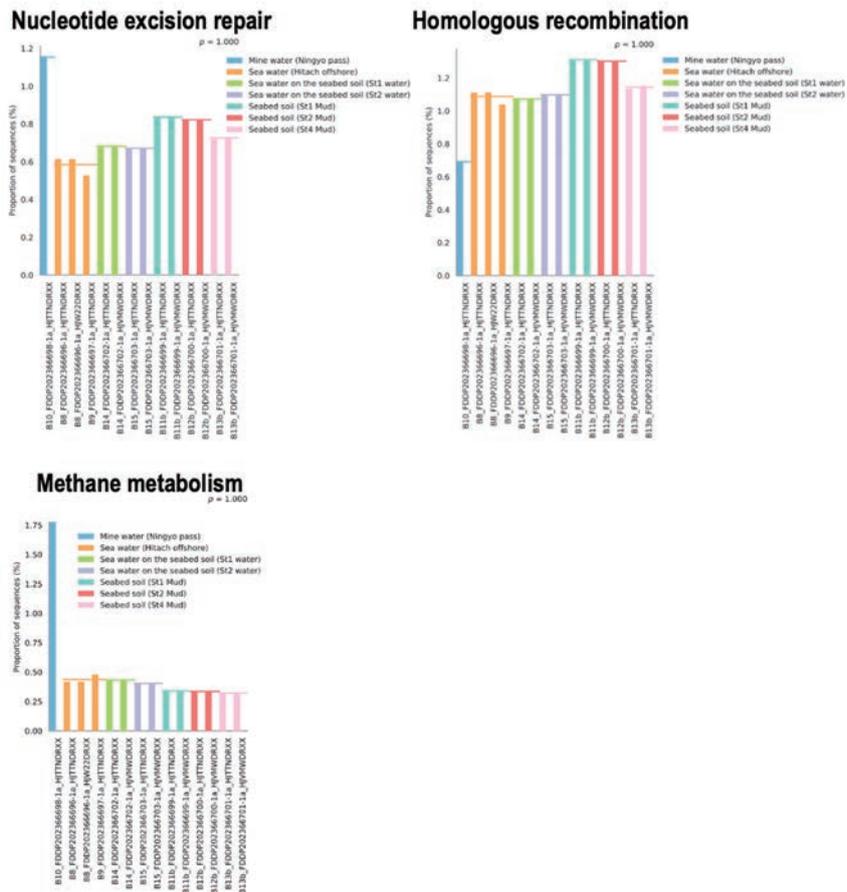


図 3.1.3-17 PICRUSt2 を用いた各環境の機能的プロファイリング

任意の環境に由来する 16S rRNA のアンプリコン情報から、特定の代謝経路や制御（DNA の修復過程の経路であるヌクレオチド除去修復や相同的組換え、あるいはメタン代謝など）との相関を（他の環境と比べて）解析できる。例えば、人形峠ではメタン代謝に関わる菌が他の環境と比べて多いことが示唆される。

⑨ MinION シークエンサーを用いたトラス室滞留水由来微生物の解析

福島第一原発 2 号機トラス室に由来する滞留水（汚染水）（表 3.1.2-1 参照）は、令和 2 年 2 月 13 日に採取された。1.3×10⁶（Bq/mL）の放射能があり、サンプル採取から DNA 抽出実験までの間は、ガラス瓶に密封し、室温で保管されていた。本サンプルを用いた実験は令和 2 年 8 月 23 日に、核燃料サイクル工学研究所内にある高レベル放射性物質研究施設（以下、「CPF」と略す。）の施設内にて行われた。滞留水中の微生物の DNA 抽出、DNA 増幅（PCR）、PCR 産物の精製、DNA 配列読取り（シーケンス）等の作業を放射線管理区域内のフードにて行った。試料量（使用できる滞留水の絶対量、そこに期待される微生物の DNA 量）が少ないこと、フード内にて主たる作業を完結すること、放射性廃棄物発生を抑制するためフード内に搬入する機器を最小限とすることが必要であり、プロトコールに以下の変更を加えて作業を実施した。

- 滞留水の液量が限られるために、通常では対象試料でろ過器を共洗いするところを、純水で洗浄した。
- ろ過後にフィルター上の放射エネルギーを抑えるため、洗浄工程を追加した。ろ過捕集した微生物への影響を最小限とするために、リン酸緩衝生理食塩水（1×PBS）を用いた。
- フード内でろ過器及びポンプとその他の機器を入れ替える操作に時間を要するため、ろ過とそれ以降の工程を行うフードを使い分けた。
- 遠心器をフード内に搬入できる小型のものとする必要があり、要求最大遠心力は 13,000×g であるが、最大 12,300×g の遠心器を用いた。また、遠心器の大きさの制限で Bead Tube（DNeasy Power Water 付属のもの）を使用できないため、ボルテックスで振盪した後に、溶液を抜き出し、2 mL Tube に入れ替えて行った。
- 回収される DNA 量を多くするため、フィルターを 2 分割してそれぞれ処理した後に、得られた液を 1 つの MB Spin Column（DNeasy Power Water 付属のもの）で DNA を吸着させ、溶離回収した。
- 小型かつ高性能な次世代シーケンサー（MinION）を適用した。

純水で洗浄したろ過器にオートクレーブをかけたフィルター（Durapore 0.22 μm、PVDF メンブラン、GVWP04700）をセットし、滞留水の全量（30 mL）をろ過した。ろ過の際は滞留水による被ばくを低減するため鉛の遮蔽を施した。捕集したろ過物の外観を図 3.1.3-18 に示す。オートクレーブをかけたフィルターは、ろ過後に一部茶色に変色していたため、ろ過物は明瞭ではないが、固形分が捕集されたものと推察された。フィルターの表面線量率は 100 μSv/h（γ）であった。

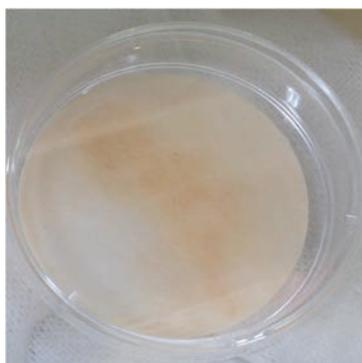


図 3.1.3-18 2 号機原子炉建屋地階トラス室にて採取された滞留水のろ過物

DNA 抽出には、QIAGEN 製の PowerWater Kit を用い、最終的に DNA 抽出液 100 μL を得た。このうち、10 μL を用いて Qubit4 (Thermo Fisher Scientific K.K.社製) で濃度測定した結果、約 0.09 ng/ μL であり、極めて少ないながら環境 DNA の調製ができたと判断した。抽出された DNA 濃度が薄かったため、当初予定していた環境ゲノム DNA、10 ng、50 ng、100 ng のタイトレーションをとって PCR 法にて 16S rRNA のアンプリコンに対応する DNA ライブラリーは構築出来ないと考え、液量で 15 μL (1.34 ng DNA) \times 2 本、3 μL (0.27 ng DNA)、1 μL (0.09 ng DNA) の 3 段階のタイトレーションを取り PCR を行った。この理由は、DNA 増幅において、環境から DNA を抽出した場合、混入物質が PCR を阻害する可能性があるため、サンプル由来の DNA 採取量を桁が変わる程度で変化させ、DNA 増幅の良いロットをシーケンスするためである。PCR は 16S Barcoding Kit (SQK-RAB204、ONT 製) を用いて、メーカー推奨の試薬及びプロトコールに従って実行したが、得られた環境ゲノム DNA が少なかったため、PCR のサイクル回数を 25 回から 30 回に変更した。なお増幅される 16S rRNA はイルミナのシーケンサーを用いた時と異なりほぼ全長の 1.5 kb になる。

表 3.1.3-3 トーラス室滞留水から得た環境 DNA の PCR 法による増幅

No.	鋳型として用いた DNA 量 *1	PCR 及び精製後の DNA 量 *2
a	1.34 ng DNA (15 μL)	9.48 ng DNA (0.948 ng/ μL)
b	1.34 ng DNA (15 μL)	9.62 ng DNA (0.962 ng/ μL)
c	0.27 ng DNA (3 μL)	1.06 ng DNA (0.106 ng/ μL)
d	0.09 ng DNA (1 μL)	2.54 ng DNA (0.254 ng/ μL)

*1 : () 内は試料体積、*2 : () 内は DNA 濃度

PCR と増幅した DNA の精製の結果、1.34 ng の環境ゲノム DNA を鋳型に用いた場合に (表 3.1.3-3、#b)、最も多くの PCR 増幅された産物が定量 (0.962 ng/ μL) できたので、このロットのライブラリー 8.7 ng 相当を用いて、MinION (ONT 製) をプラットフォームとして、フローセル (FLO-MINI106) にてシーケンスを約 28 時間行い、最終的に 267 万配列を得た (表 3.1.3-4)。また、決定された DNA 配列のサイズ分布から、増幅された DNA は、PCR で増幅が期待される約 1.5 kb (16S rRNA のサイズ) のものであることが確認できた。

MinION の制御は MinIT (ONT 製) を用いた。ベースコール (シーケンサーの波形データを塩基配列に変換する処理) 及びバーコードによる分類は MinIT デバイス内の MinKnow によって行われた。得られた配列は以下の手順で品質管理を行なった。はじめに、アダプターを除去するため Porechop (Version 0.2.4) を用いた。リードの端にあるアダプター配列はトリミングされ、リードの中央にアダプター配列がある場合、それはキメラとして扱われ、除去した。続いて、Nanofilt (Version 0.2.4) を用いて、平均 Q-value 10 以下 (エラー率 10 %) のリード及び、1200 bp 以下と 1800 bp 以上のリードを除去した (バクテリアの 16S rRNA のサイズを規定している)。その後、クオリティや長さの分布を調べるために、NanoStat (Version 1.1.2) を用いて解析した。それぞれのリードを分類するために、代表配列を問い合わせ配列として、SILVA138 SSU データベース[26]の 16S/18S リボソーム RNA データベースに対して BLASTN プログラム (Version : 2.9.0) による配列類似性検索 (E-value のカットオフ値は 1×10^{-5}) を行った。微生物代表配列とデータベースの配列一致度 (%) が

85 %以上のものを、ヒットしたデータベースの微生物であると定義した。

表 3.1.3-4 ONT 社ミナイオンによるトーラス室滞留水由来細菌の
16S rRNA の解析記録

Run Info	
Experiment Name	20200826
Sample ID	20200826
Run ID	1d39cc63-ad8e-4c20-9951-844102711001
Flow Cell Id	FAO07581
Start Time	August 26, 02:02
Run Length	1d 3h 49m
Run Summary	
Reads Generated	2.67 M
Bases Generated	3.93 Gb
Estimated Bases	4.06 Gb

267 万個の 16S rRNA の塩基配列がシーケンスされ、その配列の総和は約 4 ギガベースであることを示している。大腸菌のゲノムは約 4 メガベースなので、これは、大腸菌ゲノム 1,000 個分の長さが得られたことになる。

得られた 2.67 M reads の配列のうち、目的のバーコードに分類され、クオリティコントロール後の配列は 1.03 M reads であった (表 3.1.3-5)。QC 後のデータを、配列類似性検索によって、割り当て、綱や属レベルで分類した結果を図 3.1.3-19 に示した。トーラス室滞留水から同定された微生物のうち、門レベルでアノテーションできたもののほとんど (95 %以上) が Proteobacteria であり、他の門の割合は極めて低い。Proteobacteria を構成するのは、綱レベルを見ると Alphaproteobacteria (相対存在量 60 %) と Gammaproteobacteria (相対存在量 37 %) であることが明らかである。Gammaproteobacteria には属レベルで、チオ硫酸塩を酸化する *Limnobacter* 属 (相対存在量 28 %) が含まれ、本サンプルから最も多く検出された微生物となった。同様に、Alphaproteobacteria では、*Brevirhabdus* 属 (相対存在量 14 %)、*Nisaea* 属 (相対存在量 9.7 %)、*Magnetospira* 属 (相対存在量 7.8 %) が多くの割合を占めた。

表 3.1.3-5 アサインされたリード数の変化

処理内容	リード数	%
RAW Reads	2,050,516	100.0
QC	1,026,901	50.1
blast i85	1,002,229	48.9
blast i90	649,149	31.7
blast i95	1,777	0.1

塩基配列のクオリティコントロール後に配列数は半減した。配列類似性検索（Blast 解析）によって分類した結果、既知のデータベースとの類似度が、85 %以上のものは 48.9 %であり、QC 後のほとんどのリードが分類されたことになる。類似度が 90 %以上の配列はシークエンスされた全体のリードの 31.7 %で、95 %以上の配列は極めて少なかった。

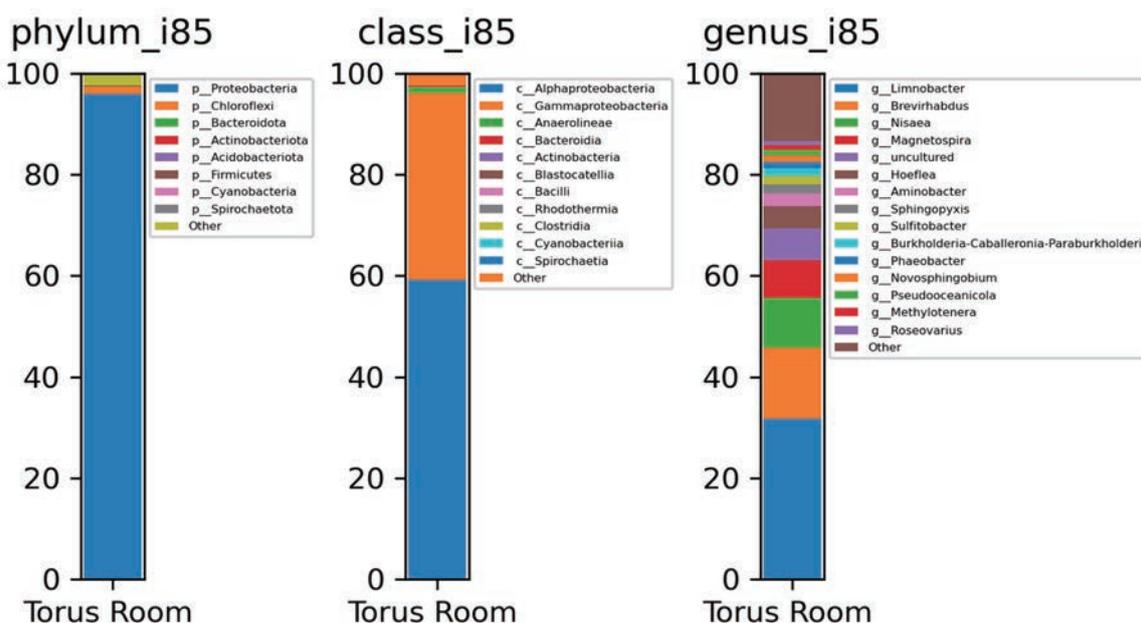


図 3.1.3-19 トーラス室由来微生物叢の解析（門、綱、属レベル）

門レベル（左図）、綱レベル（真ん中の図）と属レベル（右図）での微生物叢を示す。MinION シークエンサーのエラー率を考慮して、既知のデータベースとの類似度が 85 %以上で最も類似度の高い生物種をその配列のアノテーションとした。

トーラス室滞留水から最も多く検出された *Limnobacter* 属のうち、最も Blast で高いスコアを出した種が *Limnobacter thiooxidans* であり[40]、これは、チオ硫酸塩酸化細菌として知られている。また、*Magnetospira* 属の中にもチオ硫酸を電子供与体として化学独立栄養増殖を行う種が報告されている[41]ことから、滞留水にチオ硫酸塩が存在し、それを利用することで、これらのバクテリアが増殖している可能性がある。さて、原子炉 2 号機の炉心下部の制御棒

駆動機構と中性子線量計測系等には、電気配線ケーブルが接続されており、ケーブルの被覆材料としてゴム・プラスチック類が多用されている。ここで、ゴムの架橋化のため加硫されている硫黄は、放射線により生成する過酸化水素により酸化され、チオ硫酸に変化する可能性もあるだろう。この真偽に関しては更なる実験が必要なことに疑いはないが、このような推論は今のところ微生物の解析のみから可能となったものである。また、*Limnobacter thiooxidans* は酸素の補給がない海水中の炭素鋼表面上でも増殖が確認され、金属腐食に関係するバクテリアと報告されている[42]ことから、原子炉内においても腐食を促進している可能性も浮上した。さらに、同バクテリアは、フランスの放射線核種貯蔵プール内の水からも、その存在が報告されており[43]、放射性物質が混入した滞留水内で増殖できる可能性もある。この意味で、*Limnobacter* 属に放射線耐性能があるか否かは今後の問題として重要になるだろう。一方、上位 4 綱を構成する塩基配列から種を想定した場合、*Limnobacter thiooxidans*、*Brevirhabdus pacifica*[44]、*Nisaea* sp.[45]、及び *Magnetospira* sp.[41]であることが推定された。これらのバクテリアの生育温度は 44 °C 以下であり、高温耐性の報告はない。従って、トラス室中の滞留水の温度は 44 °C を越えていないことが、微生物叢の観点から示唆された。この事実は、原子炉内の環境を物理、化学的な方法以外で初めて推定したこととなり、定期的な微生物叢のモニターが、原子炉内で著しい変化などが起きていないことを知るために効果的な手段となる可能性に繋がると判断された。

トラス室滞留水から得られたバクテリア叢が、どのような環境微生物叢と似ているのかを正確に解析するために、これまでイルミナシークエンサーで解析してきた、福島南森林の表層土、福島第一原発近隣 3 km の表層水、海底土、直上水、和久観音鉦山跡の土壌、和久観音鉦山跡近隣の川水（淡水）、及び人形峠鉦山の鉦水（淡水）などの環境ゲノム DNA を用いて、16S rRNA の全長にわたる塩基配列を MinION シークエンサーで決定した。決定されたリード数は、約 38 万リードから 200 万リードを超えるものまであり、十分な数と判断された。そこで、微生物群集の系統構成を可視化するツール VITCOMIC2 と、公共データベースと比較する LEA を用いて、その全体像を俯瞰したところ、以下のことが明らかになった（図 3.1.3-20、図 3.1.3-21）。(i) 福島第一原発周辺の土壌・海水・海底土や川水は、公共データベースのサンプルと比較して、採集された環境と同様の潜在的環境因子（トピック）に類似していた。(ii) 一方で、トラス室滞留水については、トピックの割合に基づく 2 次元マッピングでは、海洋環境の微生物群集の近くにマッピングされた。約 50 % 以上のリードが海水の環境でよく検出される微生物であり（Topic 11 と Topic 63）、残りの 35 % がバイオフィーム由来トピック（Topic 46）、13 % が淡水のスラッジ（汚泥）のトピック（Topic 56）であった。(iii) 興味深いことに、人形峠ウラン鉦床の鉦水（淡水）でも 60 % 以上が海水環境のトピック（Topic 11、Topic 34、Topic 70）で構成されていた。これらの結果は、トラス室から得た汚染水サンプルは、原子炉の冷却に注入された海水と共に流入し、滞留している可能性がある。トラス水の物理、化学的な測定から、その pH、酸化還元電位、電気伝導率、塩化物イオン濃度などの分析結果は、海水に類似しているとの報告があり（表 3.1.2-1）、本解析結果を支持するものである。また、リードの 35 % がバイオフィーム由来トピック、13 % は淡水のスラッジ（汚泥）のトピックで構成されていることから、トラス室内部でバクテリアが増殖し、バイオフィームが形成されている可能性がある。このバイオフィームのおかげで、強い放射線の中でも生存できる可能性もある。このような推定ができるのも、本解析がかなり多くの塩基配列やそれに付随する環境の情報をうまく使えてい

るからである。その一方で、これらの解析はあくまで情報学的な推定に過ぎないことも事実である。すなわち、微生物叢と環境との関係性は半定量的である。本当の意味での環境微生物の解析は、該当環境に存在する少なくとも主たる菌種を同定した上で、その菌を用いた再構成環境を構築し、実験的に検証することが求められるだろう。

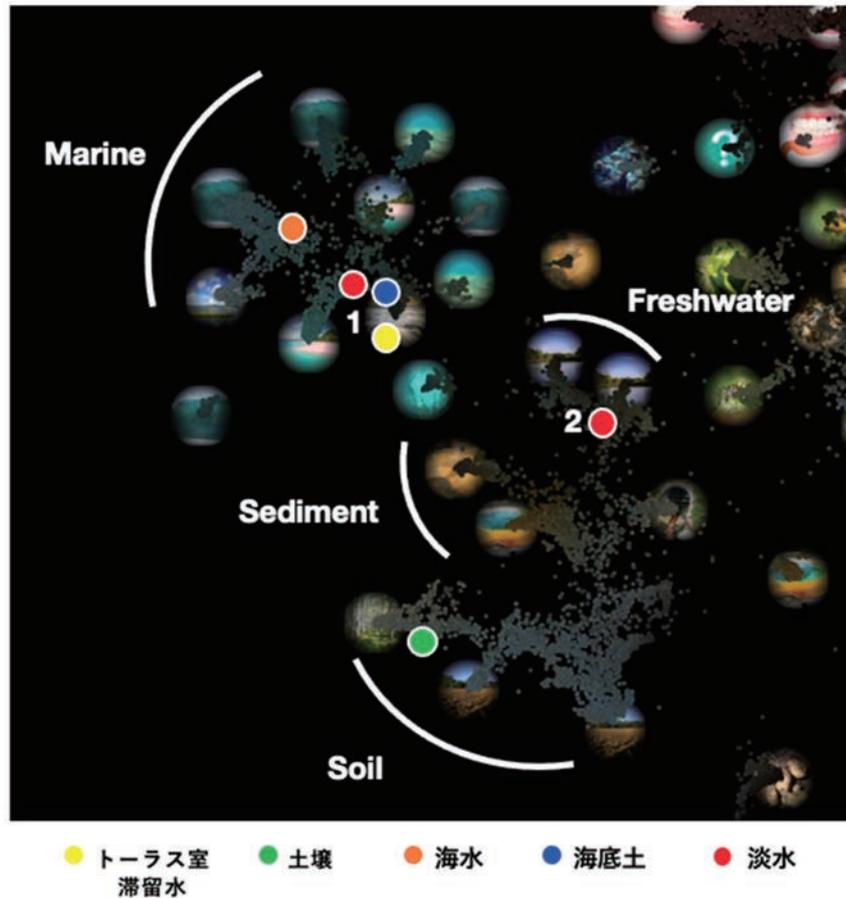


図 3.1.3-20 微生物叢の環境因子（トピック）の割合に基づく環境の2次元マッピング

トーラス室滞留水に由来する微生物（黄）は、海底土に生息する微生物に近いことがわかる（図 3.1.3-21 も参照のこと）。淡水（赤）は#1 が人形峠の鉱山の由来の鉱水を、#2 が和久観音鉱山跡近くの川水を示している。

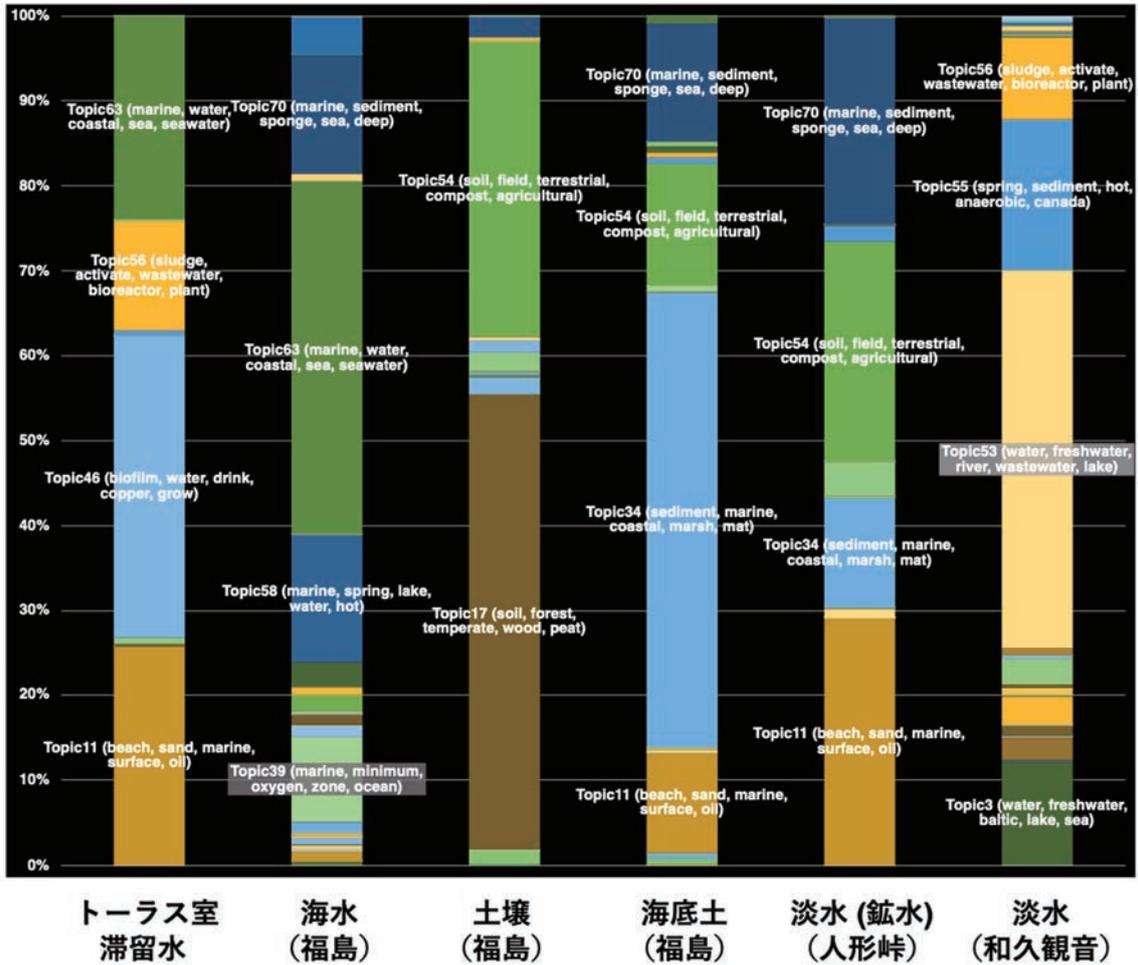


図 3.1.3-21 各環境におけるトピックの割合

各環境サンプルから同定された微生物は 70 のトピックに分類され、この図ではその混合比を示している。トーラス室滞留水は、例えば Topic 63 に示されるように海水由来で、Topic 46 に示されるようにバイオフィーム（微生物の集合体）を形成しているような様相が示されている。詳細は本文を参照。

⑩ 真核生物のプライマーによるメタゲノム解析

真核生物では微細藻類と菌類の 18S リボソーム RNA 遺伝子を検出できる PCR プライマー（表 3.1.1-3）を用いて B1～B7 までと同じ環境 DNA を調べたが、期待されるアンプリコンのサイズに明確なバンドを得たのは微細藻類のプライマー（微細藻類に適しているが、実際は様々な真核生物の 18S rRNA が増える）であり（図 3.1.3-10 及び図 3.1.3-11）、そのアンプリコンを M と命名した（図 3.1.3-3 及び微生物叢データ集）。このアンプリコンもバクテリアの時と同様にイルミナシークエンサーを用いて塩基配列の決定を行った。まずドメインレベルでの真核生物叢の解析結果に関して述べる（図 3.1.3-22 上段）。福島南森林土壌では、土壌が 0～2cm の深さのサンプル（M1）で 80 %弱が、6～7 cm のサンプル（M2）になると 90 %弱が真核生物由来とアノテーションされる。一方、表層土のサンプル（M4 や M5）では 60 %弱となり不明のものが増えてくる。すなわち、サンプリング時の土壌の深さに呼応して真核生物としての同定数が高くなる。これは、おそらく土壌中にはこれまで真核生物としてデータベースに登録されたものがある程度多いのであるが、表層土では、塩基配列の決定までされた真核生物が少なく、まだまだ色々な真核生物がいるということを示唆している。ここは、現実問題として、分類の詳細が明確になっていないと言った方が良い。現在広く受け入れられている分類体系として、国際原生生物学会（ISOP）による分類体系が存在する[46]が、全く、新しい分類体系が発表されている。それでも、門や綱レベルまで階層を下げた微生物叢を解析する（図 3.1.3-22 下段及び図 3.1.3-23）といくつか分かってくることがある。まず、M4 と M5 は極めて近くの南森林土壌の表層土を解析したものであるが、門レベルでも綱レベルでもその微生物叢はある程度似ていることがわかる。これはバクテリアの細菌叢が酷似していた点とは少し異なる。例えば、線形動物と類線形動物が存在する Nematozoa は M4 では 8 位であるが M5 では 2 位になる。おそらく 1 mm 程度の微生物は土のサンプリング時に差が大きく、バクテリアの時ほど平均化していないためであろう。この意味で、放射線に対する環境のモニターならバクテリアを対象とした方が明確で、再現性の良いデータを取れるだろう。また、海水のサンプル（M7）は土壌のサンプルと大きくその微生物叢が異なる。すなわち、綱レベルで 1 位から 3 位を占める Maxillopoda（甲殻類顎脚綱）、Anopla（ヒモムシ綱）、Syndiniales（渦鞭藻綱）などは、土壌で上位にくることはない。

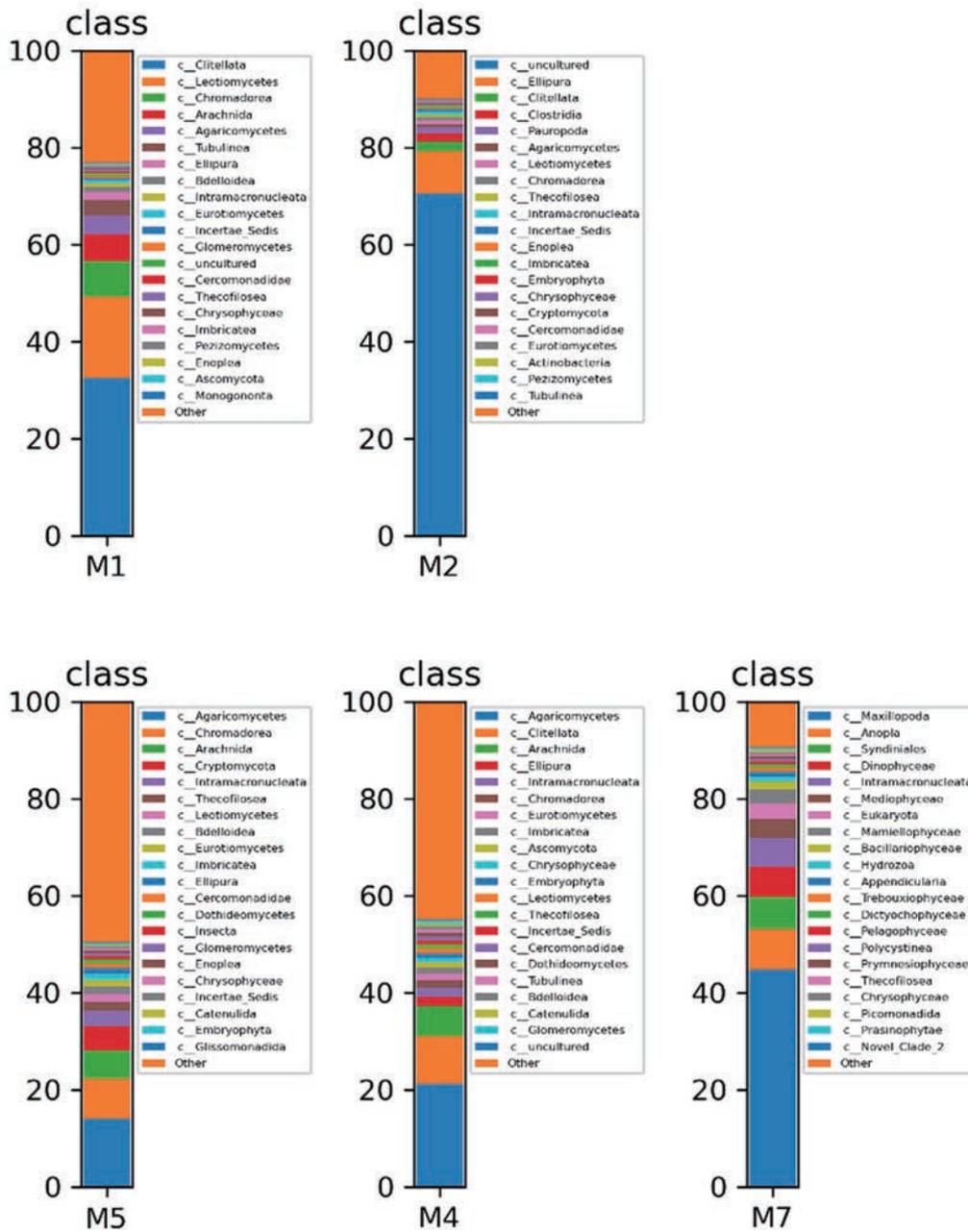


図 3.1.3-23 福島土壌、海水サンプルに由来する真核生物 (微細藻類 18S rRNA プライマー) の網レベルでの比較

M1、M2、M4、M5 及び M7 サンプルの詳細は図 3.1.3-3 を参照。

3.2 データベース構築

3.2.1 データベース構築（再委託先：理化学研究所）

<< 令和元年度 >>

本研究で得られるメタゲノム情報（遺伝子の配列）及び生息環境に関する各種物理・化学情報は、国立遺伝学研究所が開発・運用している微生物に関するデータベース「MicrobeDB.jp」[47]に登録する。このため、本プロジェクト専用のプライベートデータベースを構築した。これにより、統合データベースシステムに付随する解析パイプラインで、本プロジェクト産出のデータ群のみならず公共データベースに収録されているデータとの比較解析が可能となった。



図 3.2.1-1 メタゲノムデータベース「MicrobeDB.jp」のフロントページ
(<https://microbedb.jp/>)

微生物統合 DB「MicrobeDB.jp」とは、バクテリアゲノム 30 万株、オーソログ遺伝子 38 万種類、メタゲノム 160 万サンプルを収録し、微生物に関するデータを系統・遺伝子・環境の 3 つの軸に沿って整理・統合したデータベースである。系統、遺伝子、環境の各情報がリンクしているので、遺伝子と環境の関係性を容易に抽出することが可能である（図 3.2.1-1）。

<< 令和2年度 >>

令和2年度においても微生物統合DB「MicrobeDB.jp」の本プロジェクト専用のプライベートデータベースに、ロシア側と共有した全ての塩基配列データ（微生物叢データ集を参照）を格納した。このデータは論文発表までは、外部に公開されないが、論文発表後逐次公開予定である。また、微生物統合DBと共に国立遺伝学研究所の黒川顕教授らによって開発された微生物群集構造解析ウェブアプリケーション Latent Environment Allocation (LEA) [38] (図 3.2.1-2) を用いて、本研究で得られた福島第一原発トラス室由来微生物叢の環境解析が可能になった (図 3.1.3-20)。本アプリケーションは MicrobeDB.jp に登録された数万の微生物群集構造データを用いた機械学習によって、「環境」の概念を自動的に抽出でき、「環境」の概念と数万サンプルを同時に可視化、環境間のつながりや構造のパターンを明らかにできる。

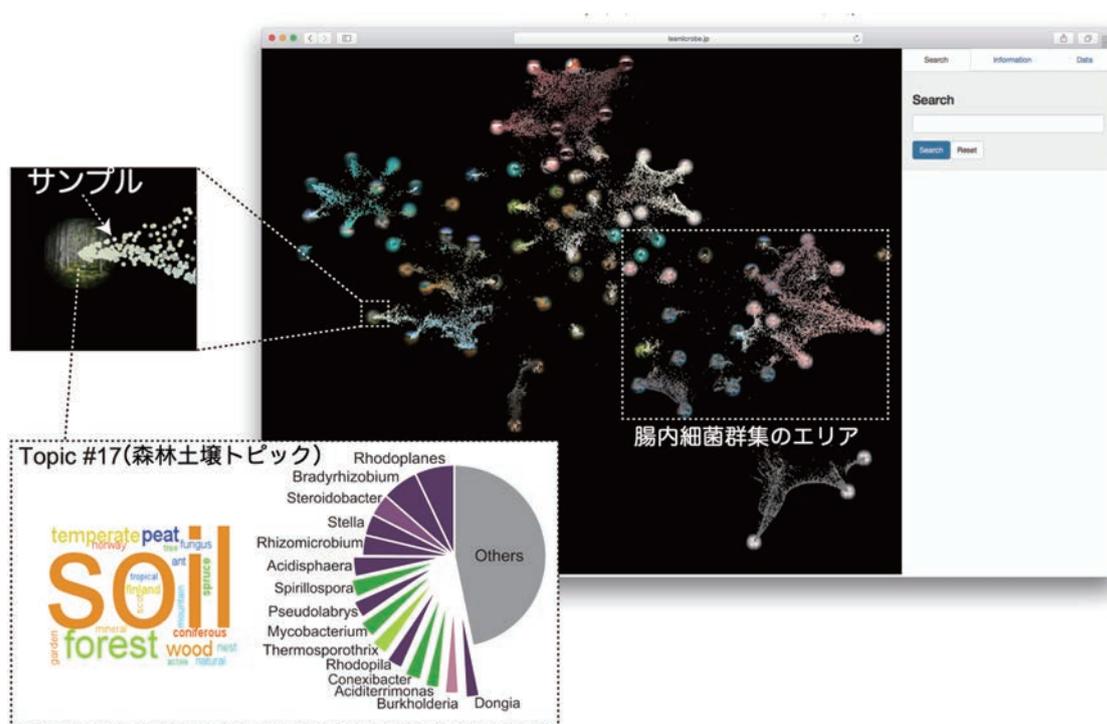


図 3.2.1-2 国立遺伝学研究所が開発した微生物群集構造解析ウェブアプリケーション Latent Environment Allocation (LEA) (国立遺伝学研究所より許諾を得て転載)

本図 (右上) には、3 万以上のサンプルをトピックパターンの類似性に基づきプロットしている。小さい点はサンプルを表しており、比較的大きな円が環境を表すトピックを表す。拡大図は、このうち Topic 17 (森林土壌トピック) であり、そこで検出される微生物の割合が分かる。図中の他の領域に腸内細菌のエリアを示してあるが、このように目的としたサンプルがどのような環境に属するものかを図示できる。図 3.1.3-20 も参照のこと。

3.2.2 カザン大学との情報交換（慶應義塾大学、再委託先：理化学研究所）

<< 令和元年度 >>

令和元年 8 月頃から、カザン大学の微生物研究者である Elena Shagimardanova 博士（ロシア側研究代表者）や、理化学研究所研究員の Gusev Oleg 博士（カザン大学を兼任）と遠隔システムや電子メールにて情報交換をしながら、本プロジェクトの研究方針やお互いのデータに関して議論を続けている。

令和元年 12 月には、ロシア側研究代表者の来日を受け、理化学研究所で会議を行った。ロシア側の研究期間が令和 2 年 9 月末までなので、基本的には、日本側で得られた微生物ゲノムのデータを、様々な耐性遺伝子の観点から情報科学的に解析したいとの提案があった（ロシア側の専門分野である比較ゲノム解析を行う）。また、ロシア語で発表されたウクライナ国立研究所のチェルノブイリ原子炉関連の資料の英訳を頂いた。その結果、チェルノブイリ原子炉内における微生物腐食の兆候についての情報を得た。Oleg Gusev 博士によれば、ロシア国内では、チェルノブイリのケースまでの災害はなかったにしろ、15 ヶ所以上の放射線等による環境汚染があるとのことであった（令和 2 年度参照）。さらに、現状のプロジェクトがうまくいくようならば、ロシア政府は、このような汚染環境に由来する微生物のゲノム解析を推進していく可能性があるとのことであった。これは、令和 2 年以降のプロジェクトの共同申請に発展する可能性がある。これを受け、今回の共同プロジェクト結果をロシア国内でアピールするためにも、ロシアにてワークショップを開催したらどうかとの提案がなされ、令和 2 年の 8 月に予定されたが、新型コロナウイルス感染症の世界的な蔓延を受け、計画は頓挫している。状況を見て、今後の方針を決めたい。

日本側が決定した福島第一原発環境に由来する微生物のメタゲノムデータは、既にその一部を、インターネットを介して共有している。

ロシア側より得たチェルノブイリ関連論文の簡易英訳

- ・ 論文名：Electron microscopic studies in solving problems of environmental safety of the Chernobyl Nuclear Power Plant sarcophagus (Shelter Structure) and the Chernobyl Exclusion Zone
- ・ 著者：Ключников, А. А., Рыбалка, В. Б., Петелин, Г. И., Канцева, И. Н., Зимин, Ю. А., Сероиннович, Б. Б., Краснов, А., (Kljuchnikov A. A., Rybalka V. B., Petelin G. I. et al.)
- ・ 雑誌情報：- Chomobyl, 2006. - 28 p. - (Prepr. / National Academy of Sciences of Ukraine. Institute for safety problems of nuclear power plants; 06-2).

Introduction

The main directions of using electron microscopy and microprobe element analysis in solving problems of environmental safety of the Shelter Structure are monitoring the post-accident condition of fuel-containing materials of the Shelter Structure and in radionuclide-contaminated soils, as well as the study of aerosols formed in the premises of the Shelter Structure. The main purpose of using electron microscopy is to study the factors that cause changes in the physical and chemical characteristics of particles, containing radionuclides, in order to develop practical solutions that can improve the radiation and environmental safety of the Shelter Structure and the contaminated Chernobyl territories. Electron microscopy allows visual monitoring of the state of the materials at the micro level, determining changes in the properties and dynamics of transformation of materials containing radionuclides during experiments, including monitoring the effects of the environment on fuel-containing and other radiation-hazardous materials.

1. Electron microscopic studies of smears from the wall surfaces of the interior of the Shelter Structure. Biotic corrosion of irradiated nuclear fuel

Smears from the walls of the Shelter Structure collected in 2003 were used for the study. Samples were divided into heavy and light fractions by decantation (elutriation) method. The bulk of the heavy fraction was consisted of organic particles, which was confirmed by the results of x-ray microprobe analysis. The light fraction was a light fibrous small flakes and contained a large number of fuel particles, firmly bound by organic matter. Analysis of the light fraction was conducted, using high vacuum annealing. As a result, it was found that the large part of cesium-137 is fitted inside a material of organic origin. During high vacuum annealing, ^{137}Cs evaporates together with organic matter. The analysis of fuel particles showed that they were in organic "capsules" before annealing.

Analysis of the surface state of microparticles of irradiated nuclear fuel

Surface soil samples from the Red forest collected in 1993 and 1998 were compared. The fuel particles had no noticeable signs of corrosion damage in the 1993 samples. The fuel particles of the 1998 samples had a highly corroded surface in the form of irregular cavities. Probably, the corrosion was caused by deposition of particles in the soil rich in organic matter for a long period of time, hence this type of corrosion is due to bacterial activity. This type of corrosion was not observed in particles that were stored in sterile conditions for several years.

Summary

- In the studied samples the size of fuel particles was within 1-100 microns, which corresponds to the grain size of irradiated non-oxidized fuel. The main source of radioactivity is ^{137}Cs transported by aerosol.
- Almost all of aerosol ^{137}Cs is in organic material, the fuel particles are coated with organic matter of biotic origin. This indicates active microbiological processes occurring on surfaces inside the Shelter Structure.
- A trace of biotic corrosion on the surface of irradiated nuclear fuel was detected.

2. Electron microscopic studies of radioactive aerosols in the Shelter Structure

The dissolution of fuel-containing materials due to the activity of microorganisms can generate new compounds of radionuclides together with organic matter, which are potentially more mobile and more dangerous for environment. Based on the obtained experimental data, it was shown the relationship between the biotic factor and aerosols of the Shelter Structure. Bacteria of the genus *Rhodococcus* that can selectively accumulate cesium ions were found in samples of the Shelter Structure. Inclusion of spores of this microorganism in the aerosol of the "Shelter" may give the impression of a submicron fraction of irradiated nuclear fuel in aerosols and may lead to a reassessment of the danger of the radiation factor.

Uranium dioxide particles were found to be 4-10 microns in size. The bulk was made up of organic particles: spores, bacteria, and organic residues. Most of the mineral particles had a matrix of calcium or silicium. Some fuel-containing particles had a matrix of uranium oxide or had local inclusions of uranium in the matrix.

Summary

- The investigated aerosol samples of the Shelter Structure contained a large number of particles consisting of organic matter. A significant number of these particles were identified as microbial cells and spores.
- Usage of cascade impactors for aerosol analysis for improving the methodological approach produces more accurately assess the possibility of overestimating the radiation hazard of aerosols in the Shelter Structure. It also can show the actual biological danger of pathogenic spores penetration that cultivated under high radiation conditions into the respiratory organs of people is not taken into account.

The obtained data show the relevance of revising approaches to aerosol analysis, taking into consideration the presence of the biotic factor.

- The combination of electron microscopy with using cascade impactors for efficient separation of aerosol particles into size fractions allows for a deeper interpretation of the results.

3. Electron microscopic studies of "hot" particles of nuclear fuel of the Chernobyl Nuclear Power Plant and a retrospective assessment of breakdown at the reactor #4

The scenario of breakdown process in the reactor of the 4th block of the Chernobyl Nuclear Power Plant was clarified based on the study of fuel microparticles released by the explosion.

Conclusion

The following results were obtained using electron microscopy:

- A part of irradiated nuclear fuel was bound by biotic mucus inside the premises of the Shelter Structure;
- Cesium-137 was found to be inside the contamination of walls in the premises of the Shelter Structure, binding by organic matter of biotic origin;
- Irradiated nuclear fuel had corrosion by the biotic action;
- Spores of microorganisms containing radioactive cesium that is associated with organic matter were found in aerosol of the Shelter Structure;
- The scenario of breakdown of the 4th reactor in the Chernobyl Nuclear Power Plant was clarified based on the study of fuel microparticles released by the explosion.

<< 令和2年度 >>

チェルノブイリ原子力発電所事故のデータの詳細や土壌サンプル等を、本英知事業での共同研究者を介してロシア側から得ることは、チェルノブイリ原子力発電所がロシア国内ではなく、平成3年のソビエト連邦の崩壊に伴い独立したウクライナにあるために困難であった。その一方で、ロシア側は、チェルノブイリ原子力発電所事故と同等か、それ以上の放射能による環境汚染がロシア国内にまだ多くあり[48]、このような場所の環境汚染の対策、防止、または、環境のモニターとしての微生物叢の解析に非常に高い関心を国として有しているとのことであった。このような議論を踏まえて、ロシア国内の放射能汚染の箇所について具体的な Map を送られ、将来の共同研究を打診された。

ロシア国内で放射線汚染が問題となっている地区に関して

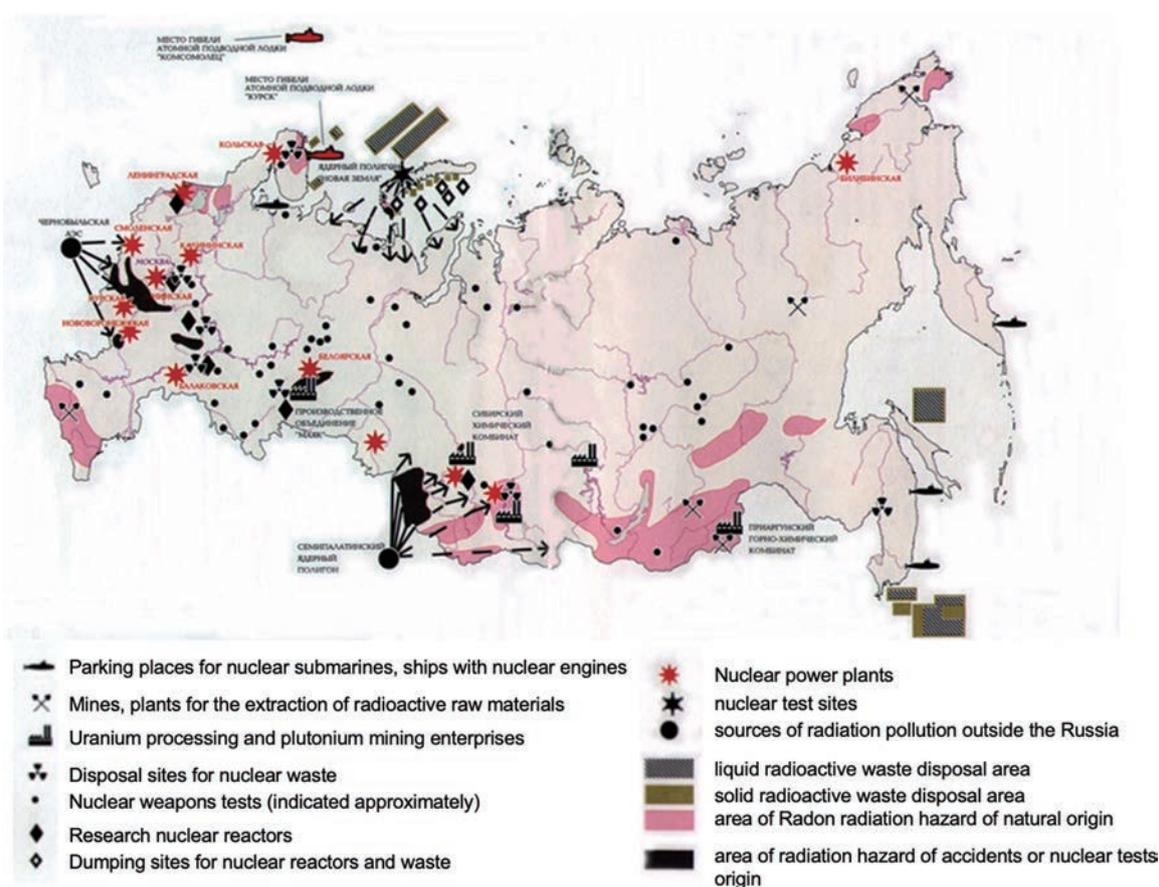


図 3.2.2-1 ロシア国内での放射能に関係する地区等のまとめ

(出典[48] : <https://pronedra.ru/chto-mozhno-uvidet-na-karte-radioaktivnogo-zagryazneniya-rossii-468319.html>)

本図の説明はもともとロシア語であったが、共同研究者により英訳された。詳細は本文を参照。

図 3.2.2-1 はロシア国内での放射能に関係する地区等に関してまとめた模式図である。ロシア側は特に黒で表示された領域に強い興味を持っている。この領域はロシア国外からの影響を含む、放射線による環境汚染が問題となる地域である。国外からの影響を含むと記載した

が、それは、例えば、昭和 61 年のチェルノブイリの事故のケース等である。これは、前述のように、チェルノブイリ原子力発電所が平成 3 年のソビエト連邦の崩壊に伴い独立したウクライナにあるために、国外からのと記されることになった。しかしながら、その影響は事故から 30 年が経過した現代においても、ロシア国内で、具体的に憂慮されるべきこととして示されている。またこの中には、昭和 32 年のウラルでの原子力発電所事故や、数百回の核実験に使用されたとされるセミパラチンスク核実験場（現カザフスタン）も含まれている。また、地図によれば、ほとんどの原子力発電所（赤い太陽のマーク）が、国の境界（海の近くなども含む）に存在していることが分かる。黒丸で示された数多くの核実験の場所に加え、原子力潜水艦も示されていることも興味深い。さらに、カザフスタンやモンゴルとの境界などには自然環境でのラドンガスによる内部被曝が高い環境もピンクで示されている。

特に核実験場のような領域は、我々のサンプルでは、閉山後にも貴重な文化遺産として保存されている和久観音鉱山跡や、或いは人形峠鉱山や東濃鉱山など閉山後も周辺環境の線量が入念に監視されているウラン鉱山の環境を遥かに超える高線量地域である。すなわち、今回の日露の英知事業はロシア国にとっては推進すべき環境汚染防止に関する良い糸口となったように思われる。今回の成果を踏まえて、日本国として今後、ロシア側とどのような協力ができるかを問われることにもなるだろう。

3.3 研究推進

<< 令和元年度 >>

研究代表者の下で各研究項目間並びに東京電力ホールディングス株式会社や CLADS 等との連携を密にして研究を進めた。また、打合せについては、キックオフ会議（令和元年 11 月 11 日）を、企画調整会議としては、東京電力ホールディングス株式会社との意見交換会議（令和元年 8 月 23 日、9 月 25 日）を実施した。さらに、ゲノム分析手法の JAEA への技術移転を目的として、核燃料サイクル工学研究所内の管理区域内の整備を検討し、慶應義塾大学先端生命科学研究所において、JAEA－慶應義塾大学の共同実験及び研究方針会議（令和 2 年 2 月 11 日～13 日）を行った。また、ロシア側の研究代表者の来日を受けての研究方針会議（令和元年 12 月 11 日）も行った。

<< 令和 2 年度 >>

令和元年度に引き続き日露双方の研究代表者の下で、東京電力ホールディングス株式会社や CLADS 等との連携を密にして研究を進めた。令和 2 年度は、当初は日本からロシアへの訪問を予定したが、コロナ禍が全世界的に拡大する兆候を見せ始めた時点で訪問の中止を決定した。代替として、次節以降で述べる国際会議やワークショップを Online にて開催した。具体的には、国際会議 OPIC-LSSE2020 における国際ワークショップ（令和 2 年 4 月 20 日～24 日、Online 開催）と日露ワークショップ（令和 2 年 8 月 10 日、Online 開催）である。また、JAEA 核燃料サイクル工学研究所での共同実験（令和 2 年 8 月 25 日～27 日）、原子炉のバクテリア研究に関する推進会議（令和 2 年 10 月 14 日）などを行った。

さらに、他の英知事業採択者で微生物を研究対象にしているグループとの会合（第 1 回燃料デブリ（微生物）情報連絡会、令和 2 年 11 月 12 日開催）を持ち、将来の研究協力を確認した。これは、JAEA 東京事務所に英知事業の研究としては 3 つのグループが集まり、未発表のデータも含め議論を行なった。

第 1 回燃料デブリ（微生物）情報連絡会参加者（敬称略）

- 研究メンバー：（慶應義塾大学関係）金井、駒、西村
（東京工業大学関係）竹下、大貫
（物質・材料研究機構関係）岡本、若井、平野
- ファシリテーター：（CLADS）深澤 JAEA プログラムオフィサー（J-PO）
- 事務局（CLADS）：鷲谷、菖蒲

会議では、我々のグループが原子炉内の微生物同定を成功させたばかりであったので、その情報を提供すると共に、特に、岡本章玄代表（採択テーマ：健全性崩壊をもたらす微生物による視認不可腐食の分子生物・電気化学的診断及び抑制技術の開発）は、令和元年度に我々と類似の研究方針を提案していたこともあって、後日、我々が確立した環境 DNA の調製プロトコルを共有するとともに、彼らが研究対象にしている微生物や遺伝子を、我々が同定した微生物の中に探索するという協力体制を敷いた。

ロシア側とは、彼らの研究実施期間が日本よりさらに短く（令和 2 年 10 月終了）、ロシア独自の研究を立ち上げるというより、我々が出したメタゲノム解析の結果に関して情報科学的に解析するという共同研究体制で本プロジェクトは実施された。その結果、研究の具体的な方向性について、有用なフィードバックをもたらしてくれた（3.1.3 項⑧）。一方、彼らのゲノム解析のレベルはまだまだ厳しく、彼らにとって、この英知事業での共同研究体験は非常に良い

ものになったようである。実際、ロシアの問題点であるロシア国内外の放射線汚染地域（3.2.2項参照）の共同研究に非常に積極的であった。

3.3.1 国際会議 OPIC-LSSE2020

本事業の調整と推進のため、令和2年度の研究の進展紹介と内外からの知見の集約を行うことを目的として OPIC-LSSE2020 (<https://lsse.opicon.jp/>) のセッションとの共同企画を実施した（図 3.3.1-1）。

基調講演者は2名であり、1名は東工大学名誉教授・丸山茂徳氏である。発表内容は、長年のマグマ対流と地殻運動に関する研究と冥王代からの微生物進化に関して発表が行われた。続いて、本事業代表者の慶應義塾大学教授・金井昭夫氏より、本報告書の3.1節で記述されている内容を含めた微生物のゲノム解析の概要と最近の動向について、専門分野の異なる理工系出身者に向けての講義が行われた。

JAEAの眞田幸尚グループリーダーは、福島第一原発の事故以降、周辺に放出された放射性物質による環境放射能レベルの推移の測定結果について報告を行った。その測定活動の発展として、周辺土壌及び海洋水のサンプル採取を実施した。また、JAEAの西村昭彦研究主幹からは、3.1.2項で記述したウラン鉱山からのサンプル取得について報告を行った。さらに、理化学研究所のOleg Gusev 研究員からは、微生物の形態を損傷する事無く走査型電子顕微鏡により撮影する技術について報告が行われた。また、東京大学准教授・鈴木庸平氏からは、アクチノイドイオンを体内に捕集する微生物についての報告が行われた。

上記に加えて JAEA の西村昭彦研究主幹より、連携重点領域共同研究[49]として、本事業を今後3年間にわたり発展させる試みとして、研究テーマ「廃止措置のリスク要因低下手法に関する研究」が承認された。

本連携重点研究の意義は、異なる分野の専門家が知恵を出し合うことで、長期化する廃止措置の潜在的リスク要因を低下できる具体的な手法を提案することにある。研究テーマとして8つの小テーマを含む。今回の OPIC-LSSE2020 では、8テーマの中で以下の3つのテーマに関して、議論が行われた。

- ・テーマ3 ウラン鉱床に生息する微生物分析と核燃料デブリからのアクチノイド捕集
- ・テーマ4 炉内の温熱風乾燥と赤外線ライト・レーザー・マイクロ波等の補助加熱
- ・テーマ6 Microbial morphology observation using a scanning electron microscope



図 3.3.1-1 OPIC-LSSE2020 のポスター（許諾を得て掲載）

3.3.2 日露ワークショップ 2020

開催は 10 月 8 日、タイトルは「高放射線環境下における微生物に関するロシアと日本の二国間会議」である。図 3.3.2-1 にプログラムを示す。本会議の進行は、ロシア側は Elena Shagimardanova 代表が、日本側は金井昭夫代表が務めた。

東洋大学の鳴海教授からは、高放射線環境下における微生物の生態について、長年の研究成果であるディノコッカス種を中心とした総括がなされた。カザン大学の Gogoleva 氏からは、旧石器時代の洞窟の微生物群集のメタ分類学的分析と題して、ウラル山脈南西にある Kapova 洞窟をとりあげ、採取したサンプルの走査電子顕微鏡観察とメタゲノム解析が報告された。JAEA 側の活動とりまとめの駒ディビジョン長からは、福島第一原発建屋内及びトラス室の滞留水中に含まれるアクチノイドと核分裂生成物 (FP) についての化学分析結果が報告された。更に All-Russia Institute for Agricultural Microbiology (ARRIAM) の Evgeny Andronov 氏からは、土壌中の微生物に関する研究の総括の視点から、その示唆する観点と誤りがちな点と解決策が提示された。続いて、慶應義塾大学大学院の藁科友郎氏と金井昭夫代表から、高放射線下の微生物叢の分析と題して、福島第一原発周囲の環境から採取されたサンプルのメタゲノム解析が報告された。この結果は本報告書の他章でその詳細を述べた (報告書目次を参照されたい)。これを受けてカザン大学の Nurislam Shaihtudinov 氏からは、チェルノブイリ原子力発電所を中心とした微生物ゲノム分析結果が報告され、福島第一原発との関係も取り上げられた。最後に、理化学研究所の戒崎主任研究員から、太古代の微生物が地殻内部からの間欠泉より地表に吹き上げられることで、天然原子炉における高放射線環境での生命誕生の仮説が述べられた。

Russian-Japanese bilateral conference on Microbiomes in high radiation environments

Kazan-Tokyo (10.08.2020)

10:00-16:00	— Introduction: Elena Shagimardanova/Akio Kanai
10:05-16:05	— Issay Narumi (Toyo University): Radiation resistant microbes
10:35-16:35	— Natalia Gogoleva (KFU, RAS): Metataxonomical analysis of microbial community in Paleolithic era cave
11:05-17:05	— Yoshikazu Koma (JAEA): Contaminated water under reactor buildings of Fukushima Daiichi Nuclear Power Station
11:35-17:35	— Evgeny Andronov (ARRIAM): Soil microbimics: hints, pitfalls, solutions
12:05-18:05	— Tomoro Warashina and Akio Kanai (Keio University): Microbial community analysis of high-radiation environments, Fukushima Daiichi Nuclear Power Plant and the surrounding areas
12:35-18:35	— Nurislam Shaihutdinov (KFU): Microbiome analysis of radiation contaminated areas
13:05-19:05	— Toshikazu Ebisuzaki (RIKEN): Nuclear Geyser model for the origin of the life
13:35-19:35	— Discussions

ロシア 日本
側時間 側時間

図 3.3.2-1 日露ワークショップ 2020 のプログラム

新型コロナウイルス感染症の関係で Online にて実施された。日本側が午後 4 時から、ロシア側が午前 10 時からの開催となった。

3.3.3 核燃料物質使用施設でのゲノム分析手法について

<< 令和元年度 >>

福島第一原発内の放射性核種による汚染物は「核燃料物質によって汚染されたもの」として核燃料物質使用施設において取り扱う必要がある。実際、令和2年度のゲノム分析の作業は、JAEA 核燃料サイクル工学研究所に所在する CPF で実施した。CPF は使用済み核燃料からウランやプルトニウム等の核燃料物質を分離回収する試験を行う施設であり、生物実験の実績がほとんどない。そこで、令和元年度時点では、ゲノム分析の準備として、核燃料物質使用施設に適合する分析手法を検討した。検討にあたっては、汚染水試料の性状に関わる制約、管理区域内における作業上の制約を考慮し、以下にまとめた。

ゲノム分析は、図 3.3.3-1 に示すように、汚染水から環境 DNA を抽出し、塩基配列の決定までを実施する計画である。抽出した DNA は、これを直接に ONT 社 ミナイオン (MinION) シーケンサーにかけると共に、PCR 法にて 16S リボソーム RNA 遺伝子 (アンプリコン) を増幅して、同上のシーケンサーにかける 2 つの手順を検討した。ここで、DNA 抽出の後に、分光光度計により DNA 濃度を測定し、また、アガロースゲル電気泳動によりバンドを確認する。

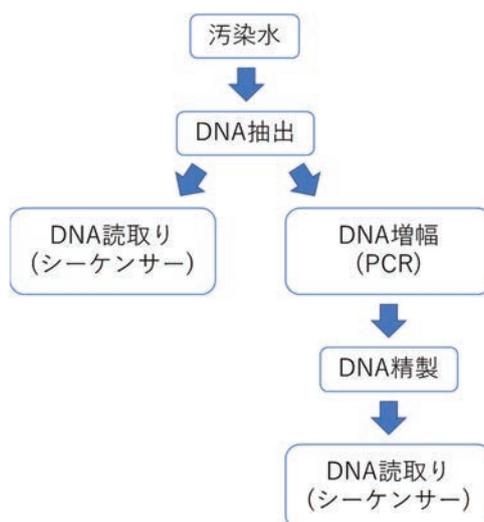


図 3.3.3-1 福島第一原発汚染水中のゲノム分析手順

ゲノム分析の対象である汚染水の性状と核燃料物質使用施設にて放射性物質を取り扱う管理区域での作業上の制約を考慮して手順を検討した。表 3.3.3-1 に制約する条件をまとめた。

1号機から4号機では、損傷した燃料(燃料デブリ)を冷却するために汚染水の処理と再利用が行われている。³Hを含む淡水が逆浸透膜法により得られ、これが燃料デブリ等と接触して冷却する際に、放射性核種が水へと移行する。汚染水は、原子炉建屋からタービン建屋を経て集中廃棄物処理建屋に送られ、化学処理がなされる。この過程で、水には様々な化学物質が溶け込む。水の流れは一様ではなく、建屋の中で滞留する水が存在するとみられる。DNA分析の観点からは、線量率が高い領域で滞留する水が注目される。

汚染水試料の採取にあたっては、高線量率の環境での作業を要し、作業を事業者に依存する制約がある。事業者は管理のために汚染水を採取しているので、これを利用することが期待される。汚染水の試料を使用施設に輸送する際には、核燃料物質として輸送する必要から時間を要する。以上のことから、本研究では、固体廃棄物の性状把握を目的として分析に供

し、残った試料を利用することとした。ここで、試料が常温にて保管されていること、試料の量がごく少ない（10 mL のオーダー）ことに注意しなければならない。

分析を行う使用施設では、解放された実験台上での作業ができず、フード（ドラフトチャンパー）内で試料を取り扱う必要がある。フード作業は使用面積が限られており、また、被ばく低減のために短時間での操作を計画しなければならない。分析に用いた資材は放射性廃棄物となり、管理区域内で保管管理するため、分析資材の小型化や最小化が求められる。CPF は硝酸溶液系の取り扱う設計のため、腐食防止の観点から塩酸等を使用できない。また、発がん性の薬品も代替品を探すこととなる。

このような制約を前提として管理区域内における作業上の制約を考慮し、分析操作手順や資材を検討した。

表 3.3.3-1 核燃料物質使用施設において汚染水を分析する上での制約

項目		制約
汚染水の入手	サンプリング	事業者（東京電力ホールディングス株式会社）による。
	輸送	核燃料物質としての輸送のために時間を要する。
汚染水の性状	サンプル量	試料量が少なく 10 mL のオーダーに限られる。
	保管状態	常温にて長期間保管されている。
施設管理区域	作業場所	狭いフード内にて試料を取り扱う。
	資材の節約	放射性廃棄物の発生を抑制するため、資材を最小限にとどめる。
	試薬	腐食性（塩酸等）、発がん性のある試薬は使用できない。

<< 令和 2 年度 >>

令和 2 年度は実際にトーラス室由来の滞留水サンプルを得て、そのメタゲノム解析を実施することができた。その詳細は 3.1.2 のサンプリングの項、3.1.3 のメタゲノム解析の項で、詳細にまとめている。結果、令和元年度に図 3.3.3-1 「福島第一原発汚染水中のゲノム分析手順」で予定した通りの分析を行うことができた。

令和元年度に図 3.3.3-1 で福島第一原発汚染水中のゲノム分析手順について解説したが、手法が大まかに完成した今、そのタイムスケールを以下に述べたい。滞留水サンプルなどは、既に準備されているものとする。

- (A) 滞留水の濾過フィルターへのトラップと環境ゲノム DNA の抽出、定量：1 日（朝から夕方まで）
- (B) 得られた環境ゲノム DNA からバクテリア 16S rRNA 領域の PCR 法による増幅と精製：半日（朝から午後まで）

- (C) PCR産物のMinIONシーケンサーによる塩基配列の決定：1～2日（夕方から翌日の夕方、あるいは翌々日の朝方まで。シーケンサーの稼働時に付き添うことは必要ない）。
- (D) 得られた塩基配列の情報科学的な解析：数日～数週間（膨大なゲノム解析データなのでこれを処理するのにも、他のサンプルと比較解析するのにも多くの時間を要する）。

3.3.4 滞留水試料の入手と改善方法

<< 令和元年度 >>

JAEA は廃炉・汚染水対策事業にもとづいて汚染水の分析を実施している。汚染水としては、建屋地下の滞留水、水処理設備の工程水などがあり、CPF には分析後に残った汚染水の試料を保管している。これら試料から有望と考えられるものを選び、分析に供する予定をたてた（令和2年度にこの方針に従って研究が実施された）。

<< 令和2年度 >>

微生物環境制御の提言まとめ

本研究で実施したトーラス室に由来する汚染水（滞留水）の性状とサンプリング（3.1.2 項①）及びメタゲノム解析の結果と考察（3.1.3 項⑨）をもとにして、廃炉を促進する対策を検討、提案する。

i) 汚染水（滞留水）中の微生物の特徴

事故から約9年後に採取、分析した汚染水は、海水を含んでいる可能性が高く、これは初期の組成を保ったまま滞留していたことを示唆する。また、Si、Al や Fe を成分とする固形分がともに採取されたことから、コンクリートや鉄といった構造材料との相互作用が生じる環境であったと考えられる。後述するように、東京電力ホールディングス株式会社は微生物が材料等に与える影響を抑制するための対策を講じている。このような環境のもとで、汚染水から回収された DNA 量は約 0.3 ng/mL（原水）であった。表 3.3.4-1 に水の試料から回収した DNA 量を比較して示すように、汚染水の DNA 濃度は他の淡水や海水試料と比べると下限の値を呈し、2 号機トーラス室において、微生物の増殖は効果的に抑制されていたと考えられる。

表 3.3.4-1 様々な水環境から回収できた DNA 量の割合

試料	試料量 (mL)	DNA 量 (ng)	試料の DNA 濃度 (ng/mL)
淡水（慶應大学先端生命科学研究所（山形）川の水）	265	1700	6.5
海水（福島第一原発から 3 km の表層水）	250	710	2.8
海水（日立港）	250	420～510	1.7～2.0
海水（日立沖合）	250	85～240	0.34～0.96
福島第一原発汚染水（滞留水）	30	9	0.3

微生物の集団（群集）としての特徴は、図 3.1.3-20 に 2 次元マッピングの結果を示したように、海水に関連する微生物群集が主体であり、分析した汚染水の性状と整合している。また、微生物群集としては、バイオフィームと淡水のスラッジ（汚泥）とみられるものが共存しており、トーラス室内でバイオフィームが形成されている可能性があり、細菌が集合して生育していく状況も考える必要がある。

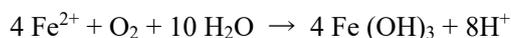
検出された微生物を個々に見ると *Proteobacteria* (プロテオバクテリア) が 95%以上と支配的であった。すなわち、汚染水の環境は、自然環境と比較して極端に微生物の多様性がなく、特定の性質の微生物が生育できる状況にあると考えられる。最も多く検出されたバクテリアは *Limnobacter thiooxidans* であり、これはチオ硫酸塩酸化細菌と報告されている[26]。酸素補給のない海水中の炭素鋼表面での増殖が確認され[40]、また、 ^{60}Co 線源プールや研究炉燃料プール内の水から同定されたことが報告されており[42]、放射線耐性があり腐食を促進している可能性がある。また、他に *Magnetospira* sp. が検出されており、この中にはチオ硫酸を電子供与体として化学独立栄養増殖を行う種が報告されている[43]。

今回行った分析、解析により上記のような知見が得られたが、試料点数は 1 であり、複数の試料を同じ手法により解析し、確認していくことがこの知見を有効にするために必須となる。

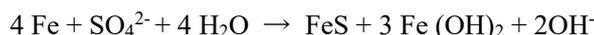
ii) 微生物による汚染水周辺環境への影響

昭和 54 年に発生した米国スリーマイル島原子力発電所の事故では、水にミドリムシや糸状藻類が発生し、水中の視認性が低下し、作業を妨げることとなった。殺生物剤の使用が検討され、3 種の化合物 (NaOCl、ヒドラジン、過酸化水素) を比較した結果、過酸化水素が適用され[41]、増殖していた生物は成功裏に抑制された。一方で、微生物に起因する材料の腐食は認められなかった。旧ソ連 (現ウクライナ) のチェルノブイリ原子力発電所において昭和 61 年に発生した事故では、燃料は溶岩状燃料含有物質 (lava-like fuel-containing materials ; LFCM) となり広い範囲に再分布した[50]。微生物に関しては、環境中を拡散した放射性物質が影響を受けた可能性が考えられている[51]。核燃料物質や放射性核種を高濃度に含む物質である、使用済燃料、ガラス固化体、合成岩石固化体 (シンロック SYNROC) は微生物による直接作用はないと考えられている[52]。これらのことを踏まえ、ここでは、2 号機原子炉建屋の汚染水に検出された微生物 DNA が少量であったことも念頭に、主要な構造材料である鉄とコンクリートに着目して微生物による影響を考える。原子炉内の微生物やその代謝が全て正確に明らかとなったわけではないので、潜在的な問題としての考察となることに留意されたい。

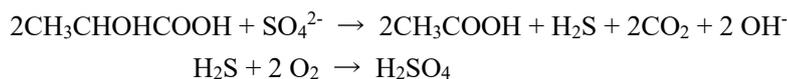
ここで、鉄の腐食に関係するバクテリアに関してまとめたい。鉄酸化細菌は以下の反応により Fe^{2+} イオンを酸化し、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の沈着をもたらす[53]。



海水を含有する汚染水には、硫酸イオンが含まれる。硫酸塩還元バクテリアは、酸素のない状況下においても、次の反応により鉄の腐食に関係する[53]。



コンクリートの劣化に関しては下水道における機構を参考にして考える。下水道管の水及び汚泥と接触する領域には嫌気性の硫酸塩還元バクテリアが生息しており、有機物 (乳酸等) と硫酸イオンから硫化水素 H_2S が生成する[54]。硫化水素は常温で気体であるので、気相部へと移行していく。気相部に硫黄酸化バクテリアが存在すると硫酸を生じ、コンクリートを劣化させる[55]。



海水は陰イオン種として塩化物イオンとともに硫酸イオンを含むので、微生物に硫黄が供給される環境であり、鉄やコンクリートの腐食に対して微生物が寄与しうるものと考えられる。従って、汚染水中に検出された微生物が上述の反応に関与する可能性は、安全を確保する上で考慮されるべきである。

iii) 汚染水環境による微生物への影響

原子炉及びその周辺の環境のうち、汚染水を中心に微生物への影響を考える。原子炉建屋の地下に滞留している汚染水は、複数の種類の水が注入されたことから、初期の汚染水は、化学物質とともに微生物群集を含んでいたものと考えられる。

事故後、損傷した燃料を冷却するために、防火水槽の淡水が優先して供給され、その後、海水に切り替えられた。3号機の外側に位置する逆洗弁ピットに流れ込んだ海水が優先して使われた後、物揚場から海水を汲み上げて供給された[56]。また、地下水が原子炉建屋に流入しており、対策が講じられて量は減じられてはいるが、現在でも一日あたり約120 m³が流入している[57]。さらに、汚染水の処理設備が設置、稼働してから、逆浸透膜により回収された淡水（³Hを含む）が注入されている。これらの結果として、防火水槽の淡水、並びに海水に含まれていた化学物質と微生物群集が混合し、これに放射性核種が移行して汚染水が形成されたものと想定される。

微生物に起因する材料の腐食を抑制するために、福島第一原発では水の冷却、脱酸素、塩分除去、微生物の殺菌が講じられている[58][59][60]。原子炉内に注入される水は、窒素を用いて溶存酸素濃度を低下するとともに、原子炉格納容器（以下、「PCV」と略す。）及びRPVの雰囲気窒素に置換することにより、水への酸素の溶解を低減している。また、ヒドラジンの注入が採用、適用されている。ヒドラジン（N₂H₄）は次の反応により酸素を消費するとともに、微生物の繁殖を抑制に効果がある。



すなわち、汚染水の特徴として、溶存酸素濃度が低く抑えられているとともに、ヒドラジンが添加されていることが挙げられる。

iv) 微生物を抑制する環境と対策

福島第一原発では上述のように微生物の対策が講じられており、その結果として、PCV内部の調査において微生物による水の濁りは認められず、一定の効果が得られていることが判明している[61][62][63]。また、我々が行った分析において、汚染水から回収されたDNA量は海水に比べて少なく、微生物の繁殖が抑えられていることが示唆されている。

燃料デブリの取り出しは2号機を初号機と定めて取り組みが本格化している[64][65]。燃料デブリを取り出す作業においてはPCVの内部環境が変化することが想定され、汚染水中の環境も影響を受ける。現在、汚染水中で微生物の繁殖が抑制されていることから、このような環境の維持が望まれるが、状態の変化を余儀なくされる場合にはその検出が必要となる。すなわち、汚染水中の微生物のモニタリングを継続して行うことが重要である。微生物腐食に係るモニタリングには、表3.3.4-2に示すように微生物と微生物腐食を対象とした手法が用いられる[66]。

表 3.3.4-2 微生物と微生物腐食に関するモニタリング手法 ([66]より一部引用)

対象	手法
微生物	細菌試験（一般細菌、従属栄養細菌、大腸菌）（JIS K 0101） 生物試験（細菌類、藻類、原生動物）（JIS K 0101） ディップスライド式簡易菌数測定 ATP 法 通水差圧測定
微生物腐食	腐食電位測定 短絡電流測定 交流インピーダンス法 電気化学ノイズ解析 バイオフィーム成長検出

材料腐食に対する微生物の寄与を調べる上で、腐食モニタリングは材料を電気化学的な方法などで測定するものであり、原子炉建屋内部での実施が困難である。また、微生物モニタリングは、生活環境に存在する細菌を光学的に観察する手法が中心であり、好気性細菌が抑制され、数密度が低いと考えられる条件への適用は難しい。低酸素や高放射線場といった特殊な環境に適用しうる新しい方法が必要であり、近年発展してきたメタゲノム解析は、この目的に有望な技術であると考えられる。これらの事象を全て鑑みた結果として、汚染水中の微生物環境のモニタリングに関するデータの拡充と手法の確立を提案する。

データの拡充に関しては、分析点数が現在のところ 1 点に限られるため、場所による違い（2 号機の他の地点、他の号機、下流側の建屋など）を考慮しつつ、定期的に分析データを収集することが重要である。

また、分析データを収集、管理する標準的な方法の確立が重要である。本研究で実施した手法は、DNA 解析に関する妥当な方法であると考えられ、標準的な方法として整備することが望まれる。ここで、整備すべき方法には、DNA 抽出、PCR やシーケンシングといった実験室での操作とともに、収集した DNA データを解析する手法、得られたデータの処理、保存方法を含む。正確な分析データを得る上では、採取した試料を速やかに分析する、あるいは、分析試料を初期の状態のまま保存することが重要であり、分析試料のろ過と冷蔵の処理を 福島第一原発現場にて行うことが望ましく、現場での効率的かつ負担の小さい試料採取手順を考えたい。

なお、福島第一原発に由来する汚染水試料の使用に関して東京電力ホールディングス株式会社にご協力頂いた。福島第一原発周辺環境に関しては、CLADS の佐々木祥人研究副主幹、及び眞田幸尚グループリーダーによる長年の環境放射能測定の実績が基盤となり、微生物サンプル採取に発展したものである。実際の採取においては、さらに多くの方々にご協力頂いた。関連地域として、和久観音鉾山跡でのサンプリングやウラン鉾山の写真撮影及び鉾山関連報告書に関して、福島県石川町の歴史民俗資料館及び石川町教育委員会のご協力を得た。鉾山跡入坑に際しては、鈴木正博氏及び小針良仁氏にご案内頂いた。また、人形峠ウラン鉾山の坑道湧き水の採取に関しては、人形峠環境技術センターの木原義之所長、森本靖之施設管理課長、福島繁環境技術開発課マネージャー及び課室員のご協力を得た。さらに、東濃鉾山からの湧き水と土壌の採取に関しては、東濃地科学センターの小出馨副所長、鶴田忠彦研究主幹、青木克憲主査らのご協力を得た。ここに深く感謝の意を表する。

4. 結言

令和元年の秋に本申請研究が採択されたときには、実質 1 年間の研究期間のうちに、福島第一原発原子炉の中で生育しているような微生物に行き着けるかどうか不安なところも多かった。しかしながら、東京電力ホールディングス株式会社のご理解に加え、各研究グループの支援（特に JAEA の皆様）や共同研究先であるロシア・カザン大学の研究者からのフィードバックもあって、福島第一原発 2 号機のトーラス室に由来するバクテリア叢を明らかにすることができた。また、他の環境サンプルについても、JAEA の全面的な協力を得て精力的に行われ、土壌、湧き水、海水、海底土等のそれぞれのサンプルから、成功裏に環境ゲノム DNA を調製できた。PCR 解析は、バクテリアのみならず、アーキアや単細胞の真核生物までを含めて、その多様性の一端を明らかにしているが、配列解析（ゲノムの再構成や比較ゲノム解析を含む）とその解釈には、まだ多くの時間が必要となるだろう。さらに、本研究過程で、バクテリアのメタゲノム解析による環境モニターは、原子炉の金属腐食に対する提言に留まるものでなく、より大きな応用につながる実感ができた。実際、令和 3 年の段階で、少なくとも 2 つの英知プロジェクトは微生物の観点からの廃炉研究が、我々とは異なる他の観点を持って採択され、進行中である。また、この 1 年間の間に、JAEA の中にも放射線環境と微生物を扱う研究者に少なからず出会うことができた。この方向性は世界的に見ても（ロシアの積極性から見ても）明らかである。

その一方、多くの研究者が行き詰まるのは、原子炉に由来するサンプルがなかなか手に入らないことであり、そのサンプルは管理区域内でのみ実験可能であるという限定要因が存在することである。そこで、筆者（金井）は、JAEA の研究所の中で微生物研究に従事している（していた）研究者を集め、新しい微生物研究部門を開設したらどうだろうかと考えるようになった。また、原子炉滞留水、近くの土壌、海水、などの定期的な環境モニターに物理、化学的な分析ばかりでなく、生物学的（微生物学的）なモニターを入れるのも良いと考える。実際、生物学的な解析のみから考察された事象も本申請書内で議論できた。また、このような微生物学研究部門が存在していれば、ここを窓口として、東京電力ホールディングス株式会社との滞留水サンプルの使用の交渉やそのデータの有効活用も、スムーズにいくと思われる。反対に考えれば、個々の研究グループが個別に東京電力ホールディングス株式会社と交渉しているようでは、英知事業をはじめとした期限のついた研究プロジェクトで研究が走り出すまでに、損失する時間が多すぎると考えられる。これは、もちろん東京電力ホールディングス株式会社や JAEA の運営、研究方針が先行し、一大学の教員が決めることではない。また、ロシアとの共同研究は先方からの依頼もあり、本英知プロジェクトが終了した後でも、継続予定である。

この報告書が遠くない未来に、読んでいただいた皆様のお役にたてば幸いである。

参考文献

- [1] Hofstetter, K. J., and Ausmus, B. S., The Identification and Control of Microorganisms at Three Mile Island Unit 2, *Nuclear Technology*, vol. 87, no. 4, 1989, pp. 837-844.
- [2] Shuryak, I., Matrosova, V. Y., Gaidamakova, E. K., Tkavc, R., Grichenko, O., Klimenkova, P., Volpe, R. P., and Daly, M. J., Microbial Cells can Cooperate to Resist High-level Chronic Ionizing Radiation, *PLoS One*, vol. 12, no. 12, 2017, e0189261.
- [3] Davies, R., and Sinskey, A. J., Radiation-Resistant Mutants of *Salmonella Typhimurium* LT2: Development and Characterization, *Journal of Bacteriology*, vol. 113, no.1, 1973, pp. 133-144.
- [4] 東京電力ホールディングス株式会社, 硫化水素検出に伴う溶接型タンクの内面点検結果及び今後のタンク計画について,
<https://www.tepco.co.jp/decommission/progress/watertreatment/images/200206.pdf> (参照: 令和2年10月1日) .
- [5] Ryu, J. et al., A Laboratory Investigation of Microbial Degradation of Simulant Fuel Debris by Oxidizing Microorganisms, FDR2019-1069, Presentation at International Topical Workshop on Fukushima Decommissioning Research, May 24-26, 2019, J-Village, Naraha, Fukushima, Japan.
- [6] Hug, L. A. et al., A New View of the Tree of Life, *Nature Microbiology*, vol. 1, 2016, Article 16048.
- [7] Thijs, S. et al., Comparative Evaluation of Four Bacteria-specific Primer Pairs for 16S rRNA Gene Surveys, *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, 2017, Article 494.
- [8] Parada, A. E. et al., Every Base Matters: Assessing Small Subunit rRNA Primers for Marine Microbiomes with Mock Communities, Time Series and Global Field Samples, *Environmental Microbiology*, vol. 18, no. 5, 2016, pp. 1403-1414.
- [9] Johnson, J. S. et al., Evaluation of 16S rRNA Gene Sequencing for Species and Strain-level Microbiome Analysis, *Nature Communications*, vol. 10, no. 1, 2019, pp. 1-11.
- [10] Bahram, M. et al., Newly Designed 16S rRNA Metabarcoding Primers Amplify Diverse and Novel Archaeal Taxa from the Environment, *Environmental Microbiology Reports*, vol. 11, no. 4, 2019, pp. 487-495.
- [11] Banos, S. et al., A Comprehensive Fungi-specific 18S rRNA Gene Sequence Primer Toolkit Suited for Diverse Research Issues and Sequencing Platforms, *BMC Microbiology*, vol. 18, no. 1, 2018, pp. 1-15.
- [12] Bradley, I. M. et al., Design and Evaluation of Illumina MiSeq-compatible, 18S rRNA gene-specific primers for improved characterization of mixed Phototrophic Communities, *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 82, no. 9, 2016, pp. 5878-5891.
- [13] Tedersoo, L. et al., PacBio Metabarcoding of Fungi and Other Eukaryotes: Errors, Biases and Perspectives, *New Phytologist*, vol. 217, no. 3, 2018, pp. 1370-1385.
- [14] 蟹澤聰史, 相田優, 福島県の地質, 大地, vol. 53, 2013, pp. 3-26.
- [15] 双葉郡未来会議, 2015 9 20 双葉町郡山海岸 (双葉海水浴場) ,
https://www.youtube.com/watch?v=4_6YQPhXK8g (参照: 令和2年10月1日) .
- [16] 福島県双葉郡大熊町役場, 熊川でサケ採捕,
<https://www.town.okuma.fukushima.jp/soshiki/somu/9647.html> (参照: 令和2年10月1日) .
- [17] 福島県石川郡石川町立歴史民俗資料館, 石川地方の鉱物紹介,
<https://www.town.ishikawa.fukushima.jp/admin/material/04.html> (参照: 令和2年10月1日) .
- [18] 東京電力株式会社, 福島第一原子力発電所周辺の地質・地下水および解析,
https://www.tepco.co.jp/nu/fukushima-np/roadmap/images/c130823_05-j.pdf (参照: 令和2年10月1日) .

- [19] 浅見誠, 高島容子, 明道栄人, 飛田剛志, 小林究, 早川美彩他, 東京電力福島第一原子力発電所において採取された汚染水及び瓦礫等の分析データ集, JAEA-Data/Code 2017-001, 2017, 78p.
- [20] Sanada, Y. et al., Evaluation of Ecological Half-life of Dose Rate Based on Airborne Radiation Monitoring Following the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant Accident, *J. Environ. Radioact.*, vol. 192, 2018, pp. 417-425.
- [21] Mikami, S. et al., The Deposition Densities of Radiocesium and the Air Dose Rates in Undisturbed Fields Around the Fukushima Dai-ichi Nuclear Power Plant; Their Temporal Changes for Five Years after the Accident, *J. Environ. Radioact.*, vol. 210, 2019, Article 105941.
- [22] 福島マップ事業対応部門横断グループ, 平成30年度東京電力株式会社福島第一原子力発電所事故に伴う放射性物質の分布データの集約(受託研究), JAEA-Technology 2019-019, 2020, 135p.
- [23] 東京電力株式会社, 建屋内の空間線量率について, 2015年5月8日. <https://www.tepco.co.jp/nu/fukushima-np/fl/surveymap/images/fl-sv3-20150508-j.pdf> (参照: 令和2年10月1日).
- [24] 東京電力ホールディングス株式会社, 建屋滞留水処理等の進捗状況について, https://www.tepco.co.jp/decommission/information/committee/evaluation_review/pdf/2020/evaluation_review_2020121404.pdf (参照: 令和2年12月20日).
- [25] 原子力規制委員会(東京電力ホールディングス株式会社), α 核種除去に向けた検討状況のご報告, <https://www2.nsr.go.jp/data/000334861.pdf> (参照: 令和2年10月30日).
- [26] The SILVA database project, Release information: SILVA 138 SSU, <https://www.arb-silva.de/documentation/release-138/> (参照: 令和2年12月1日).
- [27] Nishiyama, E., Higashi, K., Mori, H., Suda, K., Nakamura, H., Omori, S., Maruyama, S., Hongoh, Y., and Kurokawa, K., The Relationship Between Microbial Community Structures and Environmental Parameters Revealed by Metagenomic Analysis of Hot Spring Water in the Kirishima Area, Japan, *Front Bioeng Biotechnol.*, vol. 6, 2018, Article 202.
- [28] Kim, M., Cho, A., Lim, H. S., Hong, S. G., Kim, J. H., Lee, J., Choi, T., Ahn, T. S., and Kim, O. S., Highly Heterogeneous Soil Bacterial Communities Around Terra Nova Bay of Northern Victoria Land, Antarctica, *PLOS ONE*, vol. 10, no. 3, 2015, e0119966.
- [29] 鶴巻萌, 齋藤元文, 丸山茂徳, 金井昭夫, 生命の起源研究におけるCPRバクテリアの重要性, 地学雑誌 *Journal of Geography*, vol. 129, no. 6, 2020, pp. 881-898.
- [30] Brown, C. T., Hug, L. A., Thomas, B. C., Sharon, I., Castelle, C. J., Singh, A., Wilkins, M. J., Wrighton, K. C., Williams, K. H., and Banfield, J. F., Usual Biology Across a Group Comprising More Than 15 % of Domain Bacteria, *Nature*, vol. 523, no. 7559, 2015, pp. 208-211.
- [31] Hoyos-Hernandez, C., Courbert, C., Simonucci, C., David, S., Vogel, T. M., and Larose, C., Community Structure and Functional Genes in Radionuclide Contaminated Soils in Chernobyl and Fukushima, *FEMS Microbiol Lett.*, vol. 366, no. 21, 2019, fnz180.
- [32] 東京電力ホールディングス株式会社, 福島第一原子力発電所2号機原子炉格納容器内部調査実施結果, https://www.tepco.co.jp/decommission/common/images/progress/retrieval/unit2_meeting_20180201.pdf (参照: 令和2年12月1日).
- [33] 天谷尚, 金属材料表面への微生物の付着と微生物腐食(MIC), *高温学会誌*, vol. 35, no. 3, 2009, pp. 111-117.
- [34] 小川亜希子, 微生物が関わる金属腐食, *生物工学会誌*, vol. 95, no. 10, 2017, pp. 608-611.
- [35] Kip, N., and van Veen, J. A., The Dual Role of Microbes in Corrosion, *ISME J.*, vol. 9, no. 3, 2015, pp. 542-551.

- [36] Krisko, A., and Radman, M., Biology of Extreme Radiation Resistance: the Way of *Deinococcus Radiodurans*, *Cold Spring Harb Perspect Biol.*, vol. 5, no. 7, 2013, a012765.
- [37] 八波利恵, 極限環境微生物が合成するカロテノイド:バクテリオルベリン, *生物工学会誌*, vol. 90, no. 11, 2012, p. 738.
- [38] Higashi, K., Suzuki, S., Kurosawa, S., Mori, H., and Kurokawa, K., Latent Environment Allocation of Microbial Community Data, *PLOS Comput Biol.*, vol. 14, no. 6, 2018, e1006143.
- [39] Douglas, G. M., Maffei, V. J., Zaneveld, J. R., Yurgel, S. N., Brown, J. R. Taylor, C. M., Huttenhower, C., and Langille, M. G. I., PICRUSt2 for Prediction of Metagenome Functions, *Nat. Biotechnol.*, vol. 38, no. 6, 2020, pp. 685-688.
- [40] Spring, S., Kämpfer, P., and Schleifer, K. H., *Limnobacter Thiooxidans* gen. nov., sp. nov., a Novel Thiosulfate-oxidizing Bacterium Isolated from Freshwater Lake Sediment, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 51, no. 4, 2001, pp. 1463-1470.
- [41] Williams, T. J., Lefèvre, C. T., Zhao, W., Beveridge, T. J., and Bazylinski, D. A., *Magnetospira thiophila* gen. nov., sp. nov., a Marine Magnetotactic Bacterium that Represents a Novel Lineage within the Rhodospirillaceae (Alphaproteobacteria), *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 2, no. 10, 2012, pp. 2443-2450.
- [42] Procópio, L., Microbial Community Profiles Grown on 1020 Carbon Steel Surfaces in Seawater-Isolated Microcosm, *Annals of Microbiology*, vol. 70, no. 13, 2020, pp. 1-11.
- [43] Hayoun, K., Pible, O., Petit, P., Allain, F., Jouffret, V., Culotta, K. et al., Proteotyping Environmental Microorganisms by Phylopeptidomics: Case Study Screening Water from a Radioactive Material Storage Pool, *Microorganisms*, vol. 8, no. 10, 2020, p. 1525.
- [44] Wu, Y.-H., Xu, L., Zhou, P., Wang, C.-S., Oren, A., and Xu, X.-W., *Brevirhabdus Pacifica* gen. nov., sp. nov., Isolated from Deep-sea Sediment in a Hydrothermal Vent Field, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 65, no. 10, 2015, pp. 3645-3651.
- [45] Urios, L., Michotey, V., Intertaglia, L., Lesongeur, F., and Lebaron, P., *Nisaea Denitrificans* gen. nov., sp. nov. and *Nisaea nitritireducens* sp. nov., Two Novel Members of the Class Alphaproteobacteria from the Mediterranean Sea, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol. 58, no. 10, 2008, pp. 2336-2341.
- [46] 矢崎裕規, 島野智, 真核生物の高次分類体系の改訂— Adl et al. (2019) について—, *タクサ:日本動物分類学会誌*, vol. 48, 2020, pp. 71-83.
- [47] 国立研究開発法人科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター, *MicrobeDB.jp*, <https://microbedb.jp/> (参照:令和2年10月1日) .
- [48] Mordasova, I., Что можно увидеть на карте радиоактивного загрязнения России?, <https://pronedra.ru/chto-mozhno-uidet-na-karte-radioaktivnogo-zagryazneniya-rossii-468319.html> (参照:令和2年10月25日) .
- [49] 国立研究開発法人日本原子力研究開発機構研究連携成果展開部, 「連携重点研究」令和3年度開始課題の公募について (ご案内), https://tenkai.jaea.go.jp/agreement/link/link_06.html (参照:令和2年10月25日) .
- [50] Hofstetter, K., and Ausmus, B., The Identification and Control of Microorganisms at Three Mile Island Unit 2, *Nuclear Technology*, vol. 87, no. 4, 1989, pp. 837-844.
- [51] 佐藤一男, 安藤正樹, 平野雅司, 明比道夫, 藤井晴雄, 石川秀高, 長瀧重信, 山下俊一, 杉浦紳之, 松原純子, チェルノブイリ事故から 15 年: 私たちが学んだこと, *日本原子力学会誌*, vol. 44, no. 2, 2002, pp. 154-201.
- [52] Krasnov, V., Localisation of Radioactive Materials and Reactor Core 4 Ch NPP - System for Dust Suppression of Radioactive Aerosols, [https://www.iae.or.jp/great_east_japan_earthquake/jyosen/pdf/Tokyo\(Feb_3rd\)/13_Krasnov/Krasnov_STCU_English.pdf](https://www.iae.or.jp/great_east_japan_earthquake/jyosen/pdf/Tokyo(Feb_3rd)/13_Krasnov/Krasnov_STCU_English.pdf) (参照:令和2年10月25日) .

- [53] 大貫敏彦, 地層処分における微生物の影響—研究の現状と今後の課題—、原子力バックエンド研究, vol. 9, no. 1, 2002, pp. 35-42.
- [54] Emerson, D., Fleming, E. J., and McBeth, J. M., Iron-oxidizing Bacteria: an Environmental and Genomic Perspective, *Annu Rev Microbiol.*, vol. 64, 2010, pp. 561-583.
- [55] 中原東郎, 佐々木英次, 神田幸雄, 梅野秀夫, 海洋性硫酸塩還元細菌による硫化水素生成, *日本農芸化学会誌*, vol. 52, no. 9, 1978, pp. 365-371.
- [56] 米倉重州夫, 化学的浸食環境下のコンクリート構造物の長寿命化に関する研究, https://www.cgr.mlit.go.jp/ctc/tech_dev/kouryu/kadai20.htm (参照: 令和2年3月1日) .
- [57] 東京電力福島原子力発電所における事故調査・検証委員会 (2012), 政府事故調 報告書, 中間報告書.
- [58] 東京電力ホールディングス株式会社, 【資料 3-5】 循環注水冷却, https://www.tepco.co.jp/decommission/information/committee/roadmap_progress/pdf/2020/d201224_10-j.pdf (参照: 令和2年12月25日) .
- [59] 鈴木俊一, 福島第一原子力発電所の廃止措置における材料技術の役割, *まてりあ*, vol. 56, no. 3, 2017, pp. 140-144.
- [60] 原信義, 福島第一原子力廃炉への腐食防食学会の取り組み, *日本原子力学会誌*, vol. 59, no. 4, 2017, pp. 223-224.
- [61] Fukaya, Y., Hirasaki, T., Kumagai, K., Tatsuoka, T., Takamori, K., and Suzuki, S., Corrosion Mitigation Activities Performed after the Fukushima Daiichi Accident, *CORROSION*, vol. 74, no. 5, 2018, pp. 577-587.
- [62] 東京電力ホールディングス株式会社, 1号機 PCV 内部調査について, https://www.tepco.co.jp/decommission/common/images/progress/retrieval/unit1_meeting_20170330.pdf (参照: 令和2年3月1日) .
- [63] 東京電力ホールディングス株式会社, 2号機原子炉格納容器内部調査について, https://www.tepco.co.jp/decommission/information/committee/local_reconciliation/pdf/2018/1180206_05-j.pdf (参照: 令和2年3月1日) .
- [64] 経済産業省 (東京電力ホールディングス株式会社) , 3号機原子炉格納容器内部調査について (速報まとめ) , <https://www.meti.go.jp/earthquake/nuclear/decommissioning/committee/osensuitaisakuteam/2017/07/3-03-04.pdf> (参照: 令和2年3月1日) .
- [65] 原子力損害賠償・廃炉等支援機構, 東京電力ホールディングス株式会社福島第一原子力発電所の廃炉のための技術戦略プラン 2020, https://www.dd.ndf.go.jp/files/user/pdf/strategic-plan/book/20201006_SP2020FT.pdf (参照: 令和2年3月1日) .
- [66] 腐食防食協会, エンジニアのための微生物腐食入門, 丸善出版, 2004.

用語解説

PCR 法

Polymerase Chain Reaction 法（ポリメラーゼ連鎖反応法）。酵素学的に DNA を増幅する方法。

リボソーム RNA (rRNA) 遺伝子

遺伝情報の翻訳に関わるリボソームは細胞内のタンパク質合成装置であるが、リボソーム RNA とリボソームタンパク質によって構成されている。特にリボソーム RNA 遺伝子は、どんな生物種においても保存されているために、この塩基配列を比較することで生物種の分類が可能になる。生物種の分類には、原核生物では 16S、真核生物では 18S のリボソーム RNA 遺伝子が使用されることが多い。

電気泳動による DNA の分離と解析

アガロース（寒天の主成分）やポリアクリルアミドゲルを使用した電気泳動を行えば、核酸である DNA をその分子のサイズに従って分離することができる。電気泳動時に、分子量が既知のマーカーDNA を泳動することによって、目的とする DNA 分子の大きなサイズが分かる。多くの場合、泳動した DNA を臭化エチジウム (EtBr) で染色し、紫外線を当てることで検出する。

ゲノムのシーケンス

固有の生物種が有する遺伝子の総体であるゲノム DNA の塩基配列を決定すること。これにより、その生物種の同定やその生物種がどんな遺伝子を有するかが分かる。ゲノム全ての塩基配列を決めた場合、これを完全長ゲノムという。

次世代シーケンサー (NGS)

Next Generation Sequencer (NGS) は遺伝子の塩基配列を大量かつ高速に読み出せる装置のこと。イルミナ社の NGS は、ランダムに切断された数千万~数億の DNA 断片の塩基配列を同時並行的に決定することができる。

ミニオン (MinION) シーケンサー

ナノポア (Nanopore) はナノスケールの穴を意味する。DNA をこのナノポアに通す時に塩基による違いを電流の変化として捉えることで、塩基配列を決定できる。ONT 社による塩基配列の決定装置を Nanopore シーケンサーと呼ぶが、これは非常にコンパクトで場所をとらず、他の NGS と比較して、長く読めるのが特徴である。

メタゲノム解析

環境サンプル中の微生物群集のゲノム DNA を培養に依存することなく網羅的に解析する手法のこと。例えば、環境サンプルから調製したゲノム DNA に対してリボソーム RNA 遺伝子の部分的な配列を PCR 法により増幅し、その塩基配列を決定することで、種の同定ができる。

アンプリコンメタゲノム解析

微生物叢から得た DNA に関して、上記の系統マーカー遺伝子（リボソーム RNA 遺伝子）などを PCR 法で増幅したもの（アンプリコン）を指標としてメタゲノム解析をおこなう手法のこと。

ショットガンメタゲノム解析

環境サンプルから調製した DNA を適当な長さに分断した後に NGS による網羅的な塩基配列の決定をおこない、その配列をコンピュータ上でつなげたり、データベースに登録された配列と比較したりする手法のこと。その環境に生息する微生物の同定や、存在している遺伝子が明らかにできる。

OTU (Operational Taxonomic Unit)

細菌のメタゲノムのシーケンスデータ（特に 16S rRNA 遺伝子の配列）を解析する時に、まず、数多くの配列をシーケンスの類似したグループに分けるが、そのグループのこと（単位）。塩基配列の類似度が 97 % の場合、各 OTU は進化的にはほぼ同一の菌種から構成されると考えられる。

ウォード法 (Ward's method)

階層的なクラスタリング手法（データ間の類似度にもとづいて、データをグループ分けする手法）の一つ。分散が最小になるようにクラスタリングする。本稿では微生物叢の類似しているものが同じグループとされる。

This is a blank page.

微生物叢データ集：
様々な環境でのメタゲノム解析結果
(illuminaシーケンサー解析)

- B : バクテリアの16S rRNA (部分) にて解析
- MB : 海洋性バクテリアの16S rRNA (部分) にて解析
- M : 微細藻類 (真核生物) の 18S rRNA (部分) にて解析

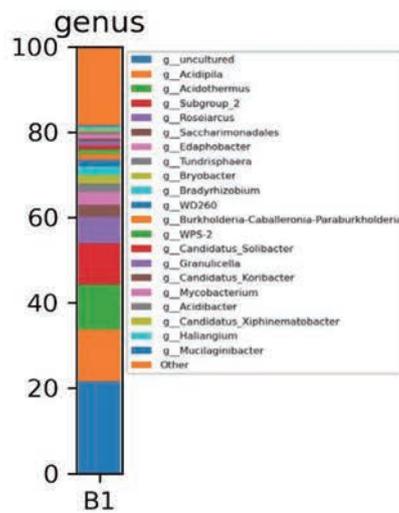
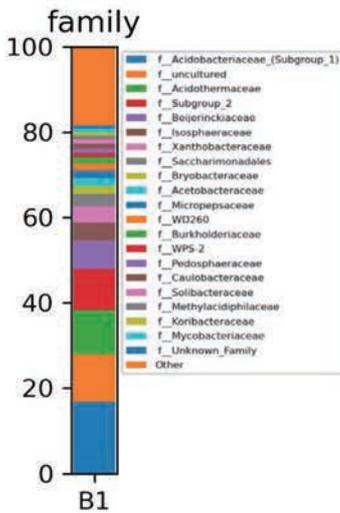
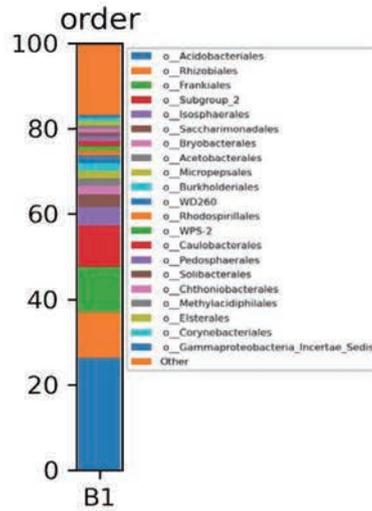
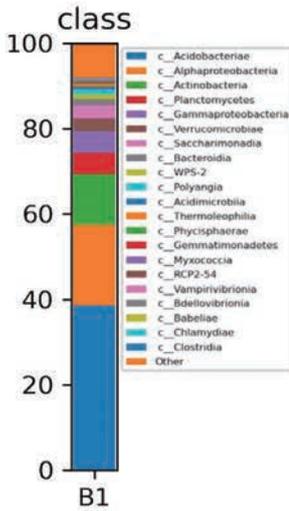
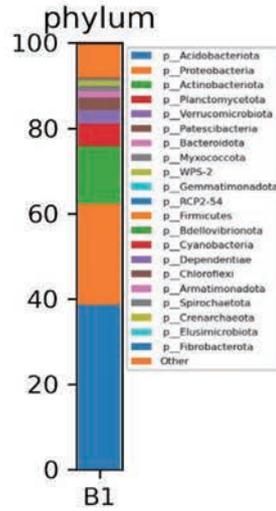
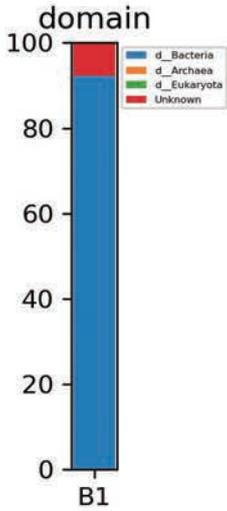
This is a blank page.

用いた環境サンプルと塩基配列が決定されたリード数のまとめ

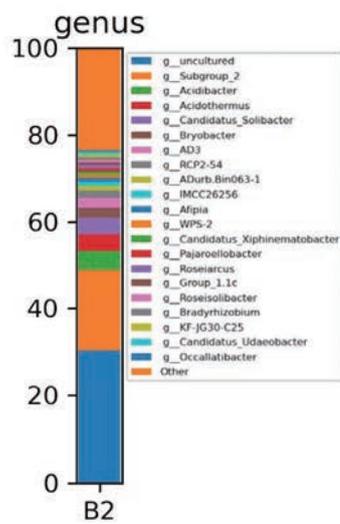
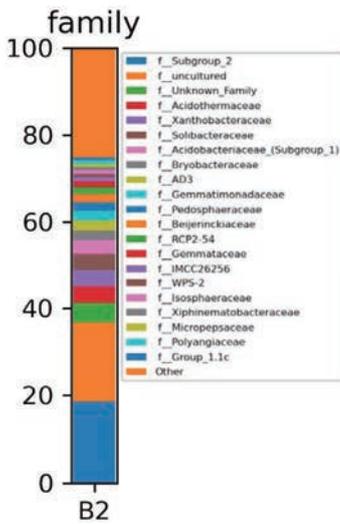
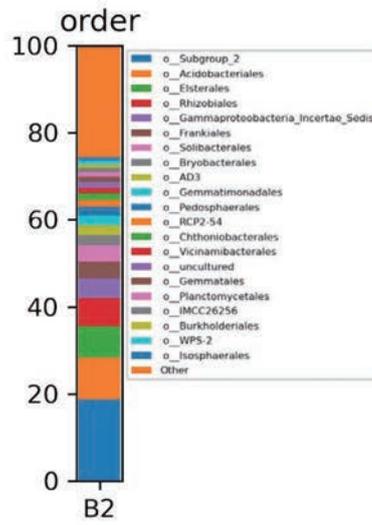
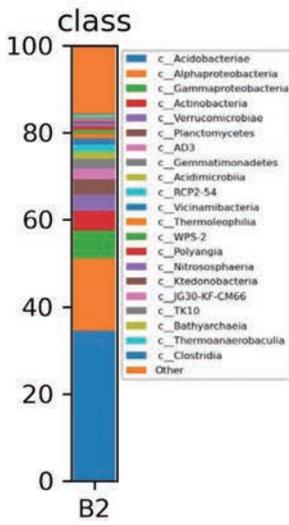
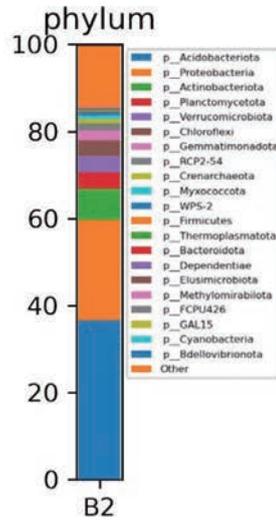
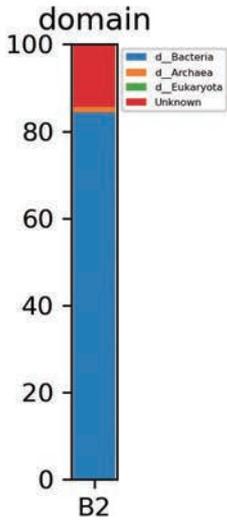
環境 (大分類)	環境詳細	16S/ 18S rRNA配列の解析結果					
		サンプル番号と塩基配列が決定されたリード数					
		B		MB		M	
土壌 (深度別)	福島1F南森林 (表層より0-2cm) (11/18/19)	B1	1,387,164	MB1	1,003,364	M1	1,239,791
土壌 (深度別)	福島1F南森林 (表層より6-7cm) (11/18/19)	B2	1,228,252	MB2	1,094,588	M2	1,171,676
土壌 (深度別)	福島1F南森林 (表層より11-13cm) (11/18/19)	B3	1,001,786	MB3	1,170,015	M3	1,230,509
土壌 (表層土)	福島1F南森林 (北西サンプル) (11/18/19)	B4	1,269,207			M4	1,156,947
土壌 (表層土)	福島1F南森林 (北東サンプル) (11/18/19)	B5	1,090,457			M5	1,537,205
土壌 (表層土)	福島1F南森林 (南東サンプル) (11/18/19)	B6	1,177,853			M6	1,158,583
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (03/17/20)	B16	2,396,328	MB13	2,023,104	M13	2,401,896
海底土	福島1F近海 海底土 (St1) (12/19/19)	B11	1,807,534	MB8	1,680,638		
海底土	福島1F近海 海底土 (St2) (12/19/19)	B12	1,817,894	MB9	1,754,072		
海底土	福島1F近海 海底土 (St4) (12/19/19)	B13	1,867,294	MB10	1,941,966		
海水 (表層水)	1Fより約3 kmの海水 (表層) (12/19/19)	B7	997,029	MB4	1,139,597	M7	1,113,465
海水 (表層水)	日立沖の海水 (02/07/20)	B8	1,853,564	MB5	1,920,936	M8	820,122
海水 (表層水)	日立港の海水 (02/06/20)	B9	2,407,794	MB6	1,838,788	M9	1,783,706
海水 (直上水)	上記海底土の直上水 (St1) (12/19/19)	B14	1,811,936	MB11	2,170,510	M11	2,158,202
海水 (直上水)	上記海底土の直上水 (St2) (12/19/19)	B15	1,937,300	MB12	2,073,658	M12	2,124,278
淡水 (鉱水)	人形峠鉱山の湧水 (01/15/20)	B10	2,226,522	MB7	1,799,840	M10	2,110,726
淡水 (川の水)	和久観音鉱山跡近くの川の水 (03/17/20)	B17	2,557,360	MB14	2,228,042	M14	2,089,396
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #1	B18	2,468,088			M15	2,707,706
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #2	B19	2,296,194			M16	2,115,820
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #3	B20	2,315,560			M17	2,403,022
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #4	B21	2,881,508			M18	1,951,412
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #5	B22	1,956,906			M19	2,110,016
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #6	B23	1,561,242			M20	2,256,544
土壌 (表層土)	和久観音鉱山跡第一鉱体入り口 (08/06/20) #7	B24	2,563,804			M21	2,017,002
淡水 (川の水)	和久観音鉱山跡近くの川の水 (08/06/20) #8	B25	2,577,484	MB15	2,433,248	M22	1,876,982
D6300	微生物叢標準コントロール	B26	2,024,778			M23	1,937,618

リード数はクオリティチェック (QC) 前ものを示している

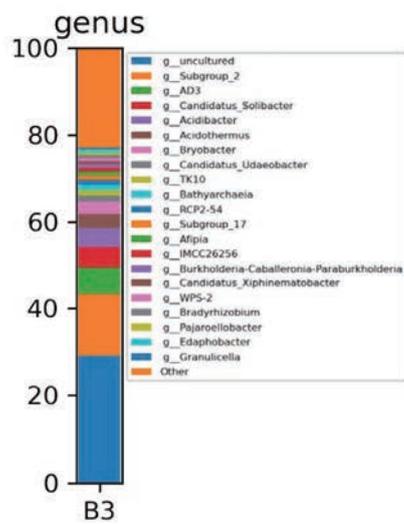
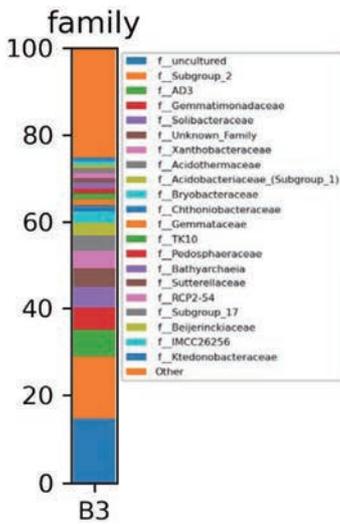
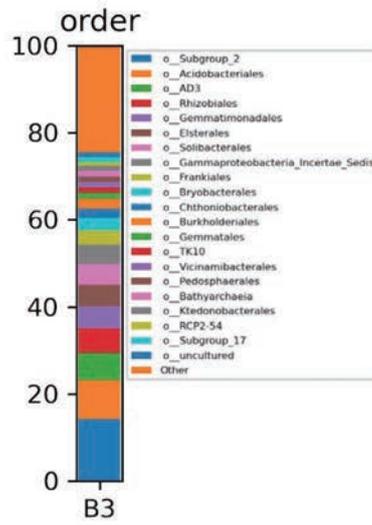
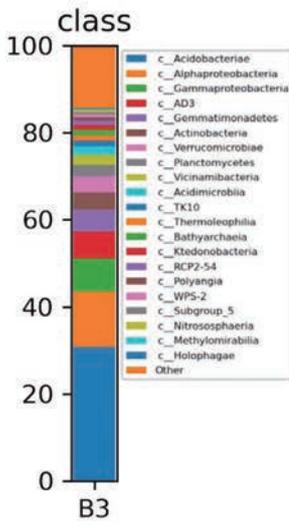
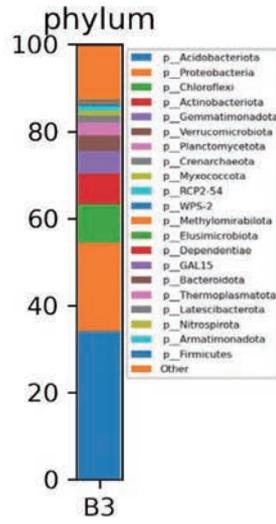
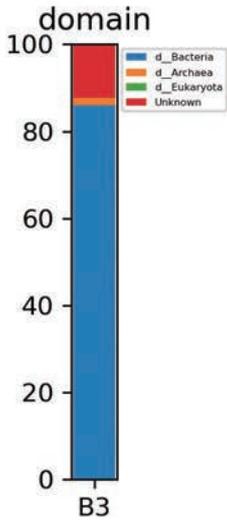
B1



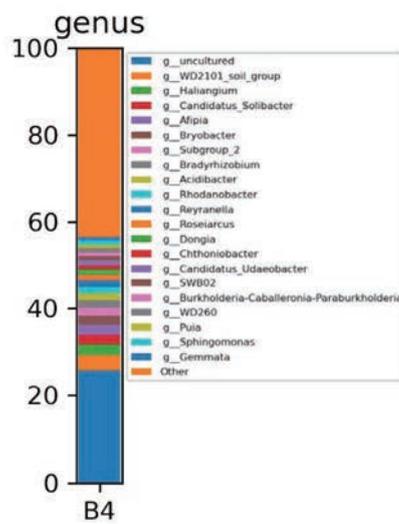
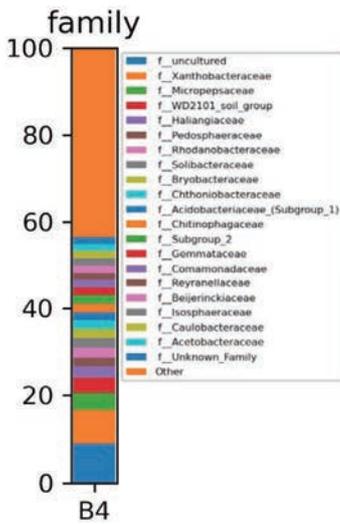
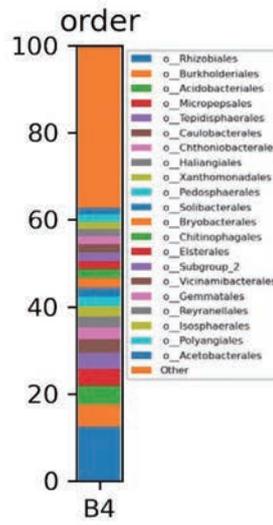
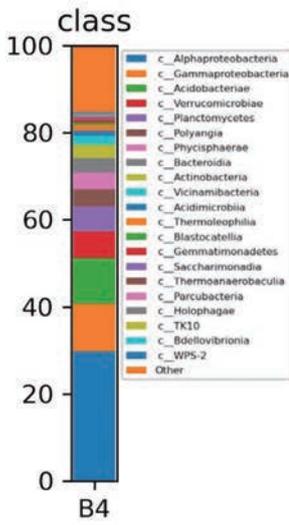
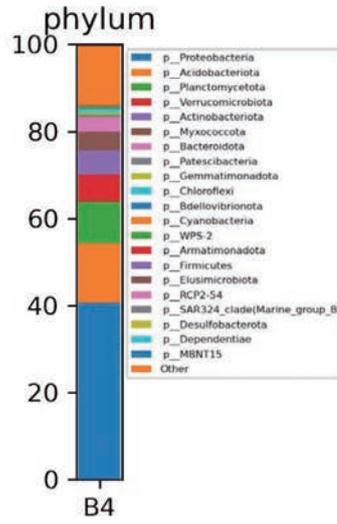
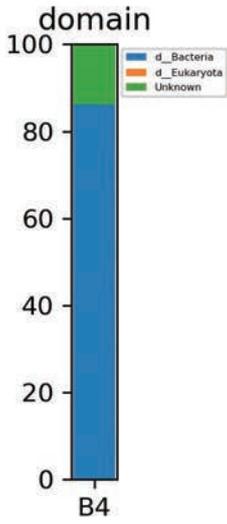
B2



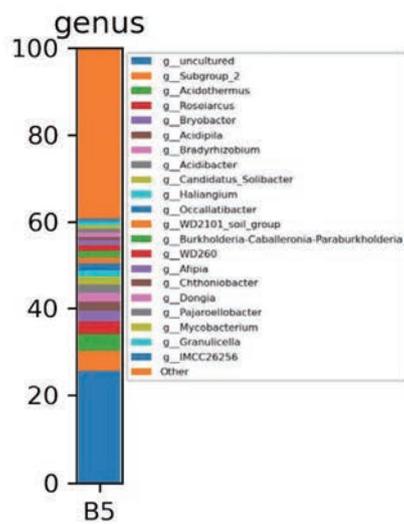
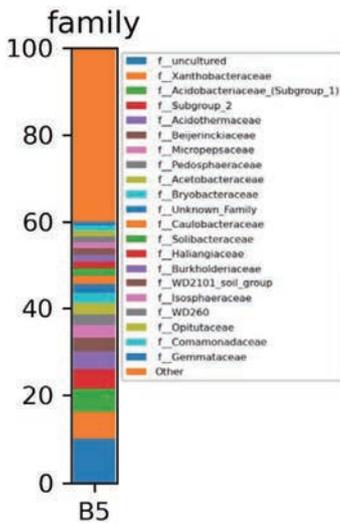
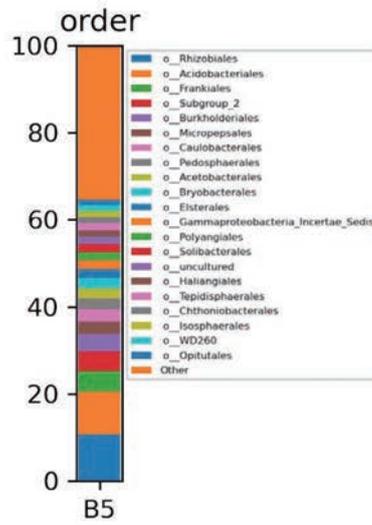
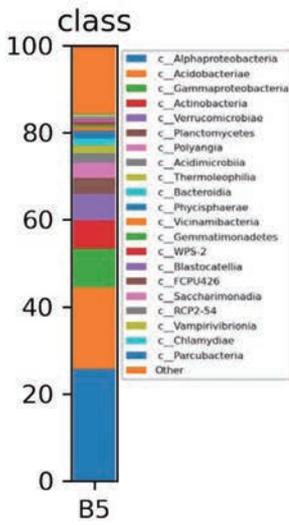
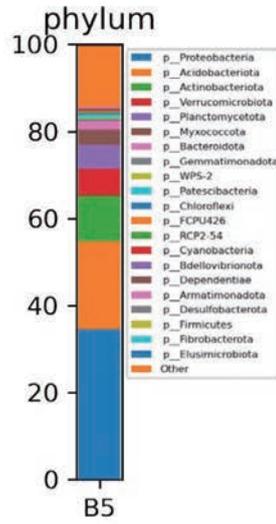
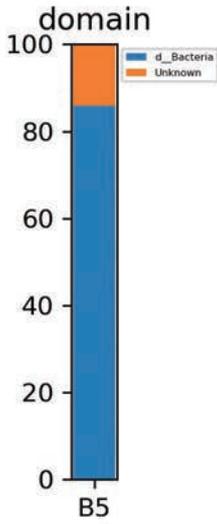
B3



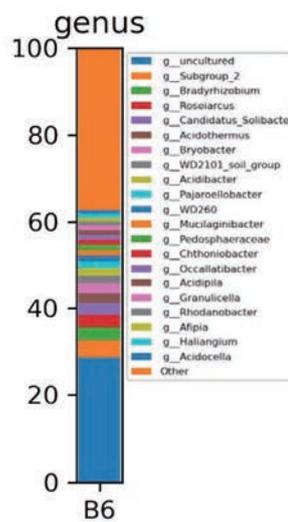
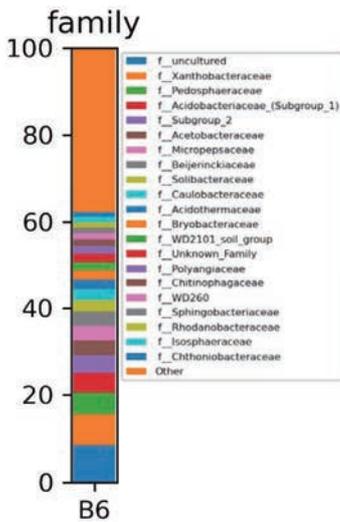
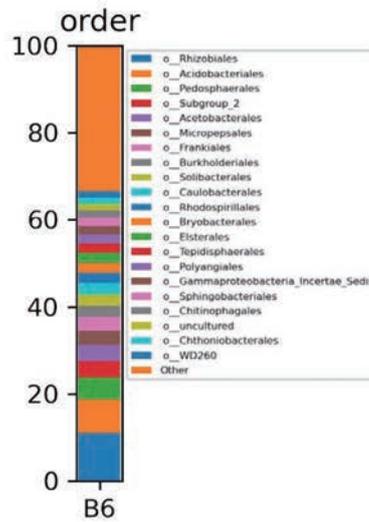
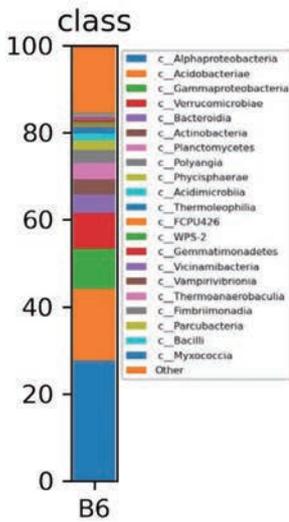
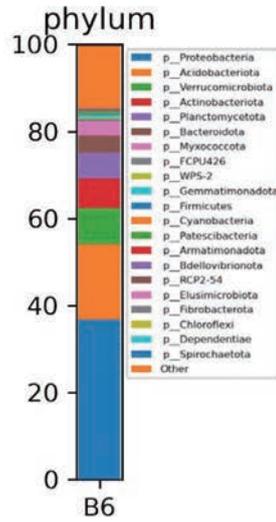
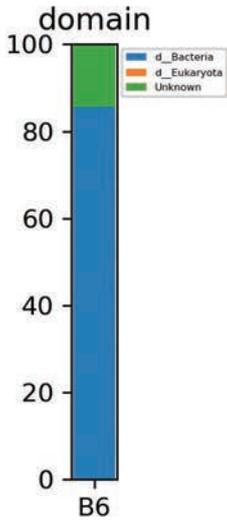
B4



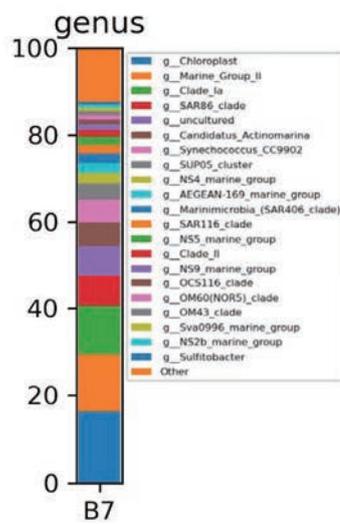
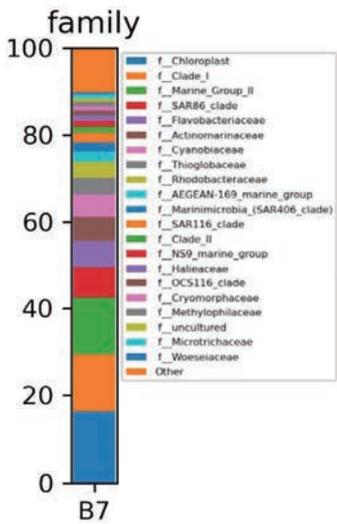
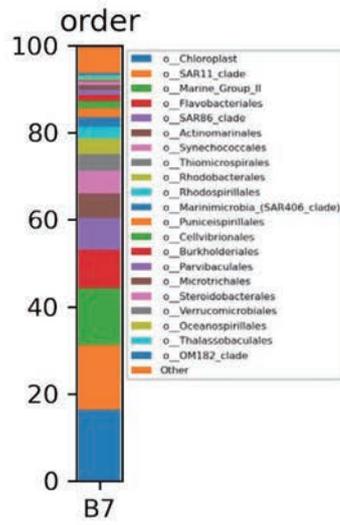
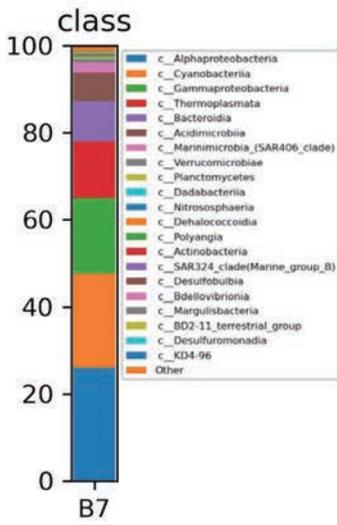
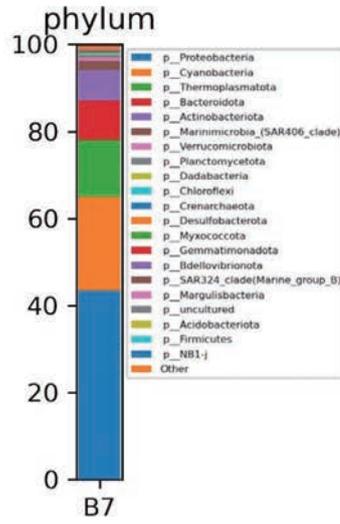
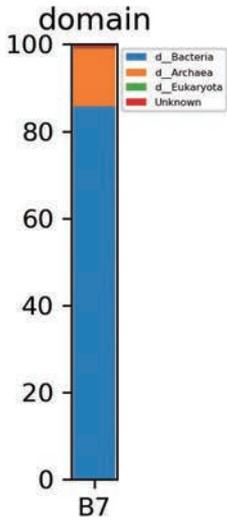
B5



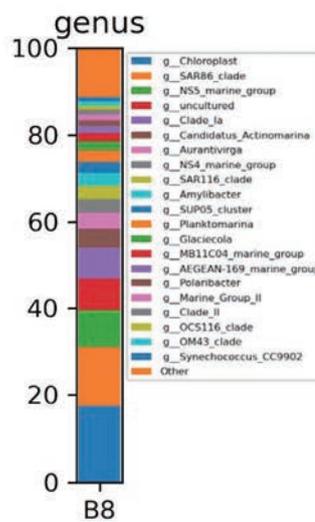
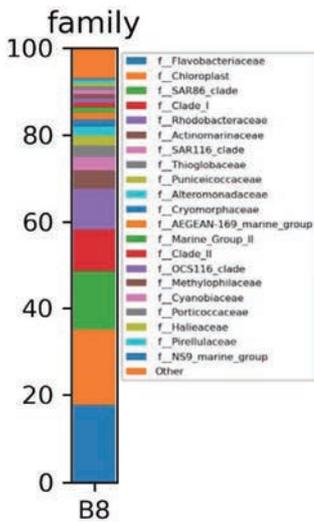
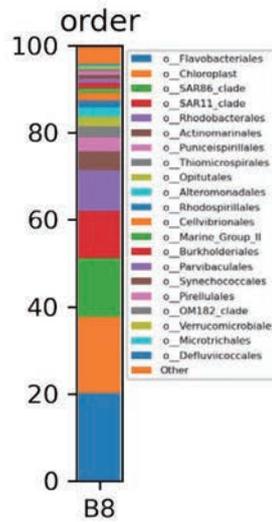
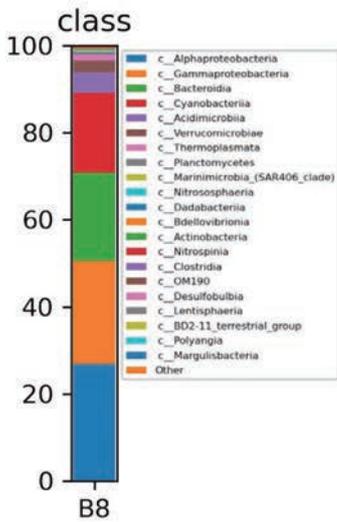
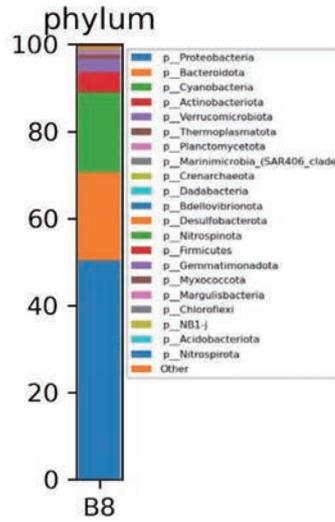
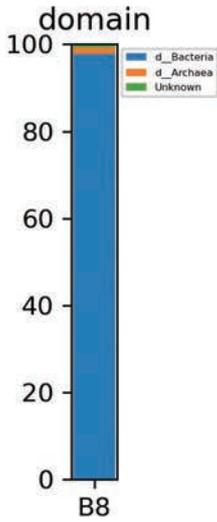
B6



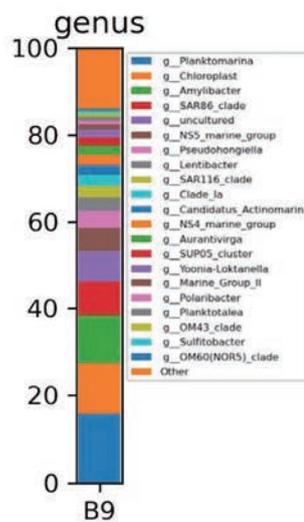
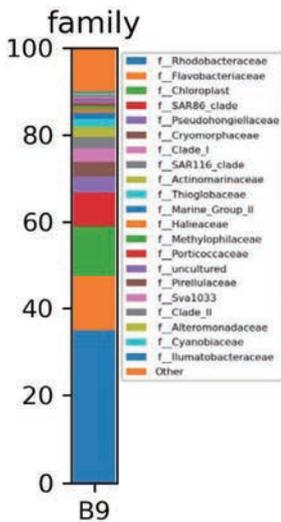
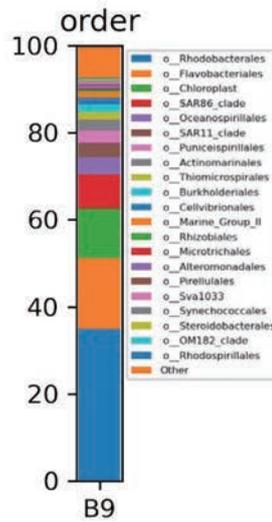
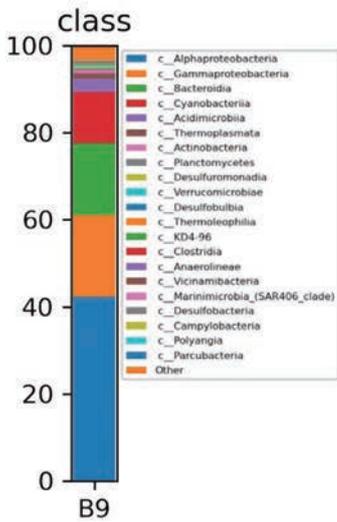
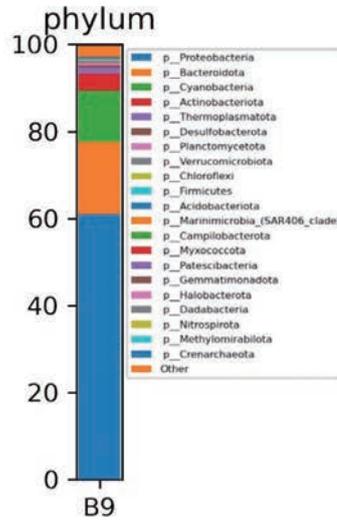
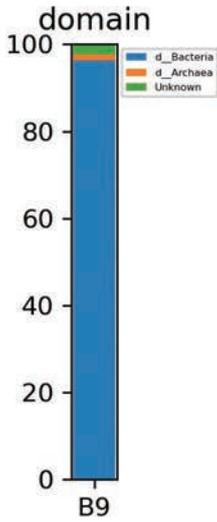
B7



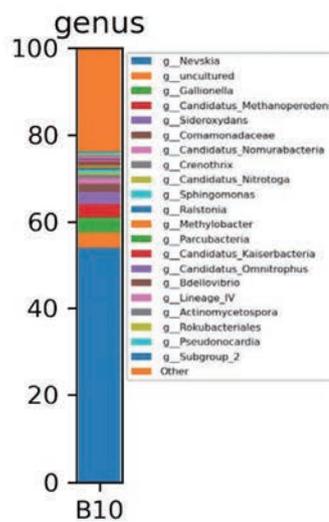
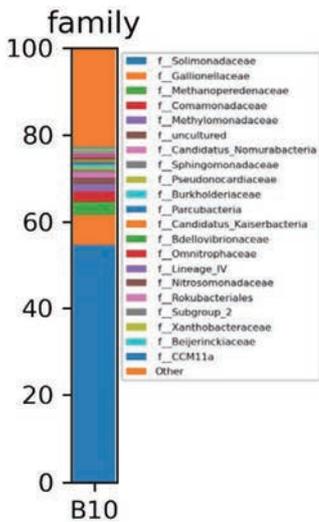
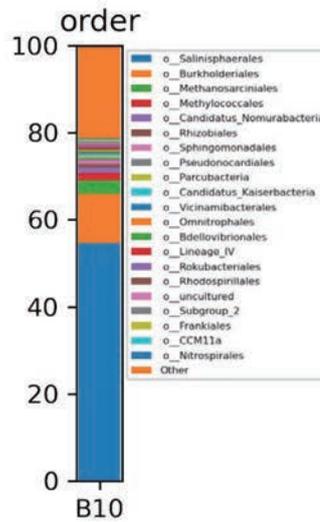
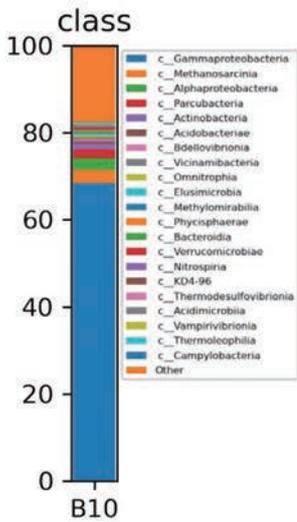
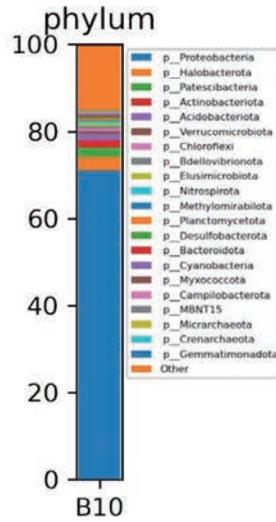
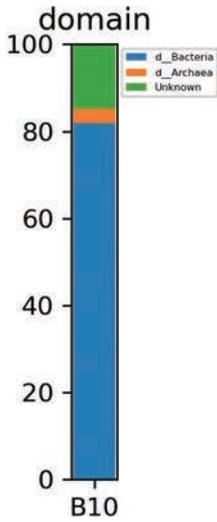
B8



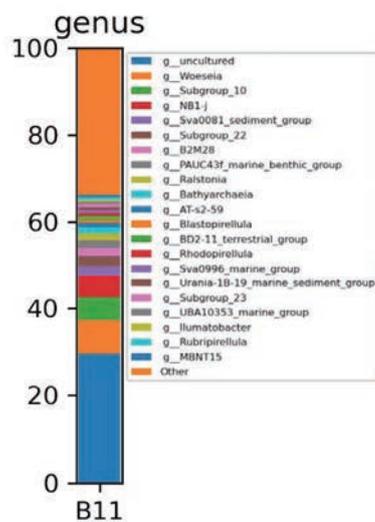
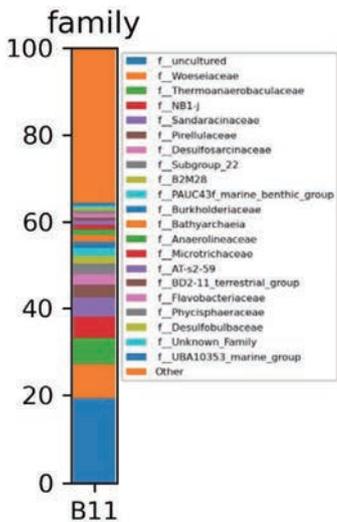
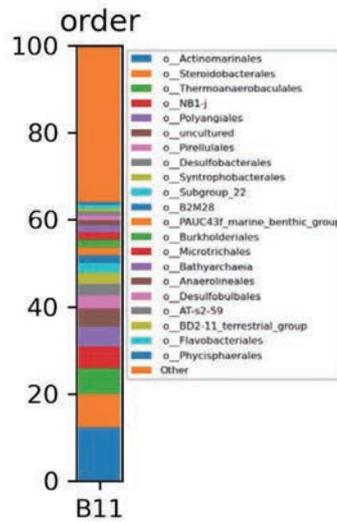
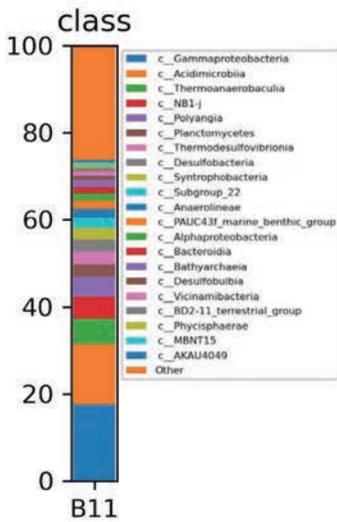
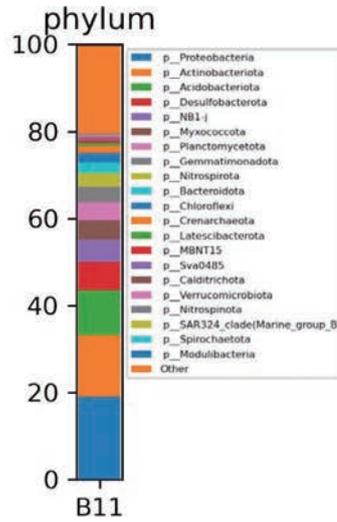
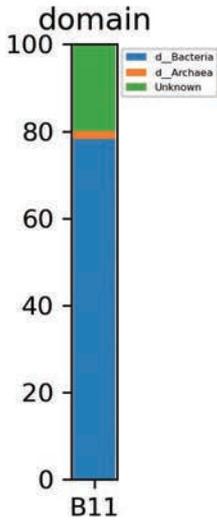
B9



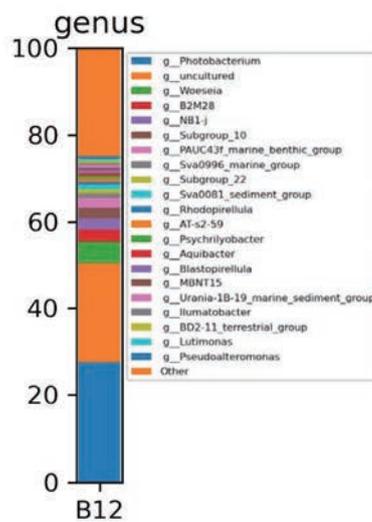
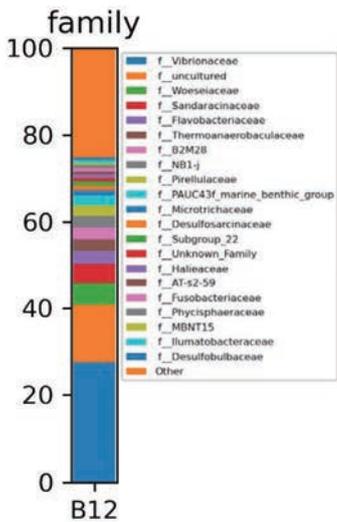
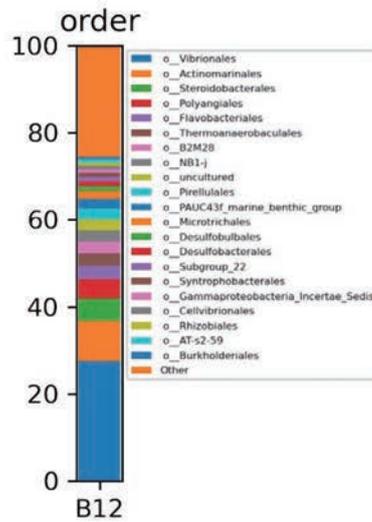
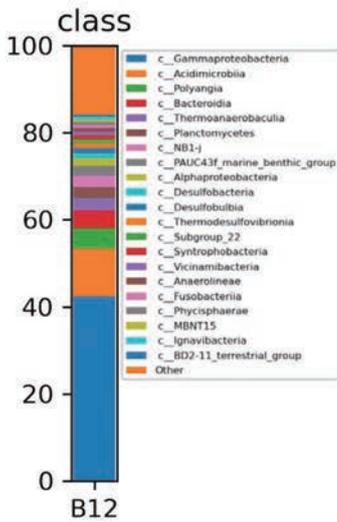
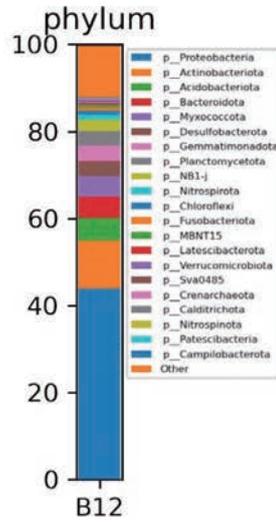
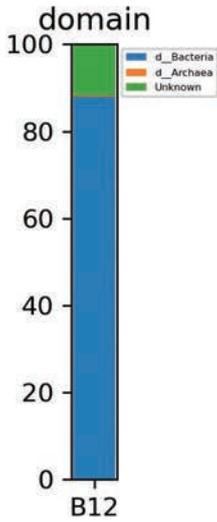
B10



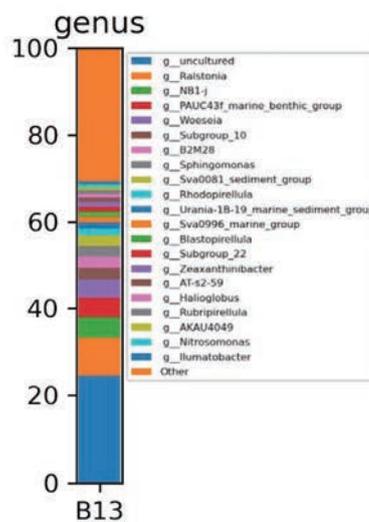
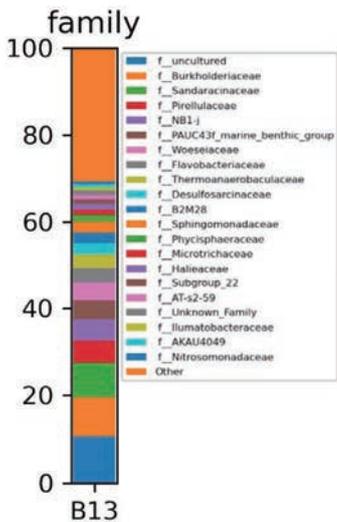
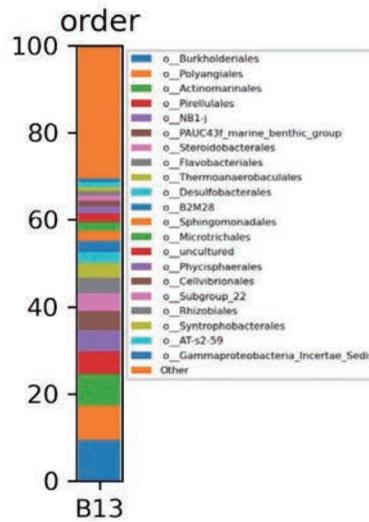
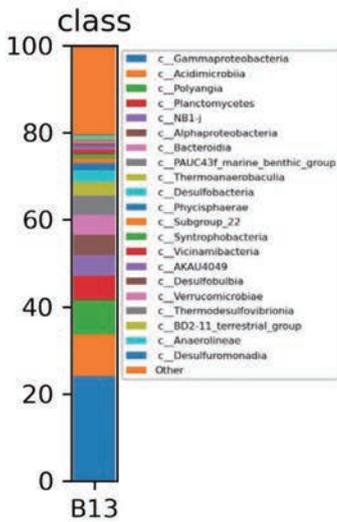
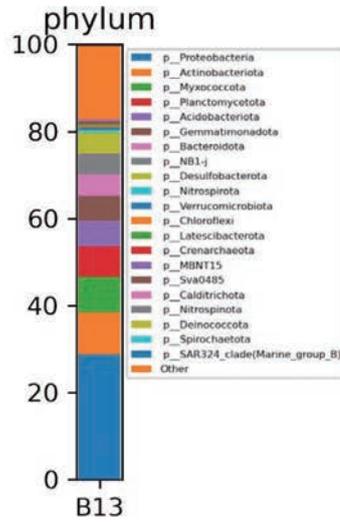
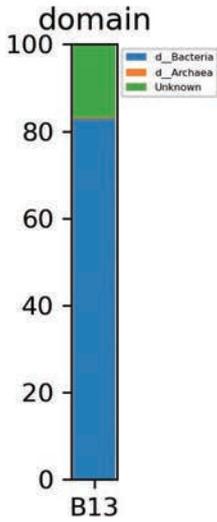
B11



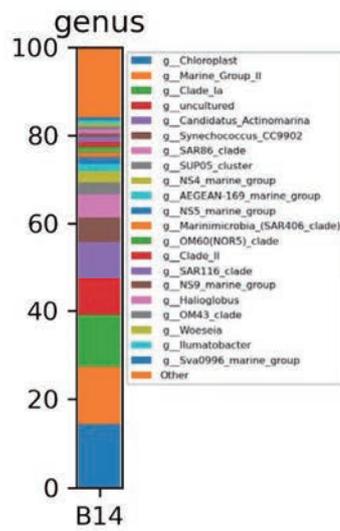
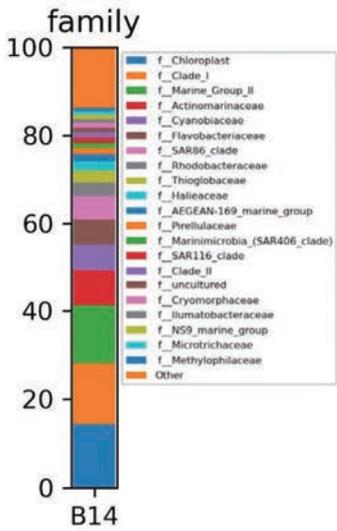
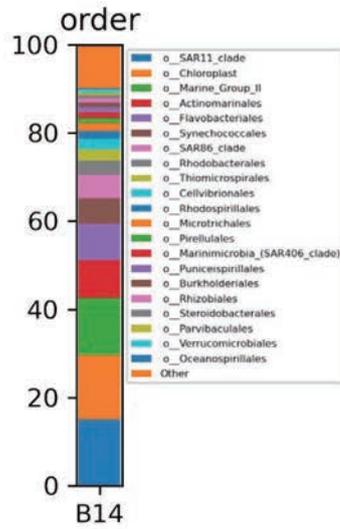
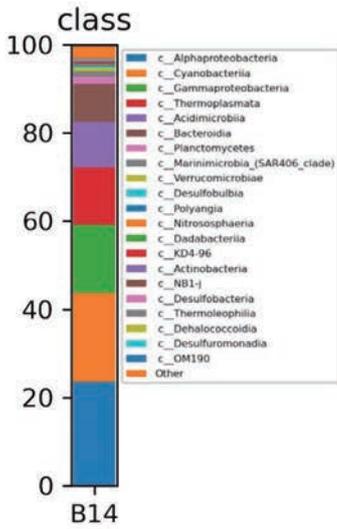
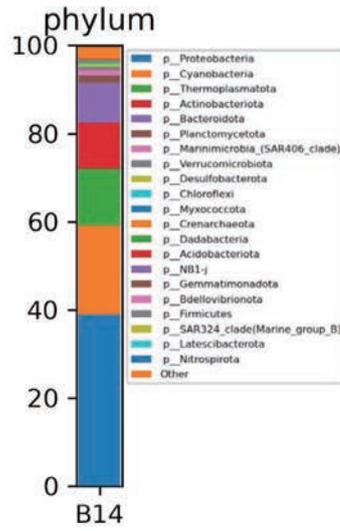
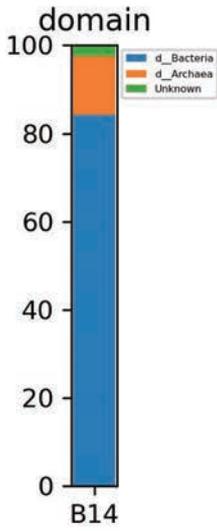
B12



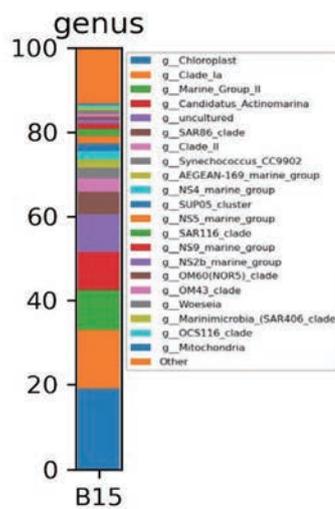
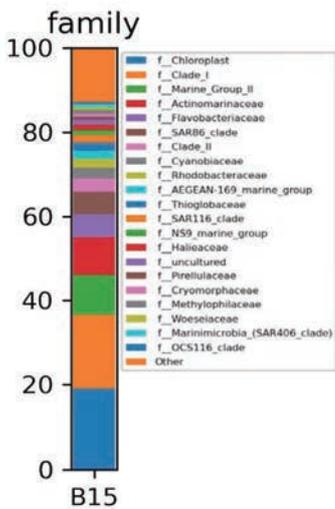
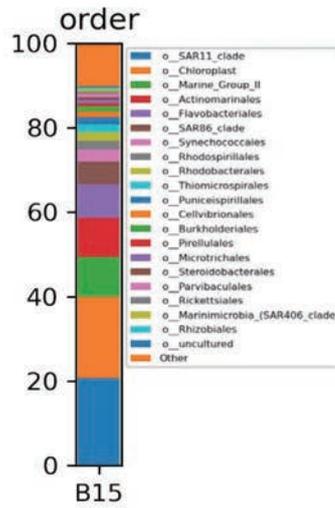
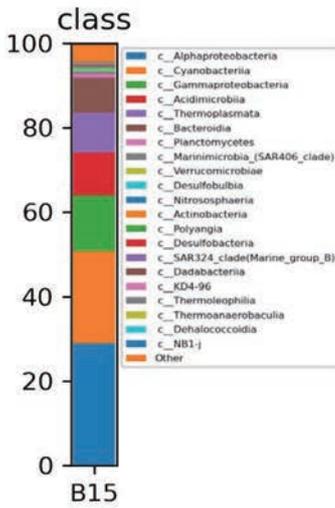
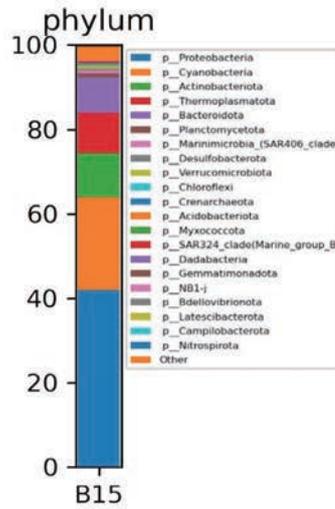
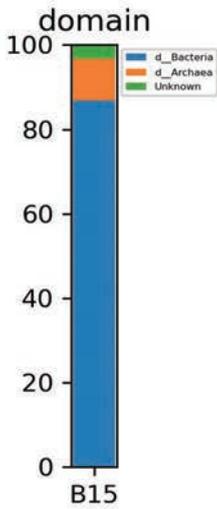
B13



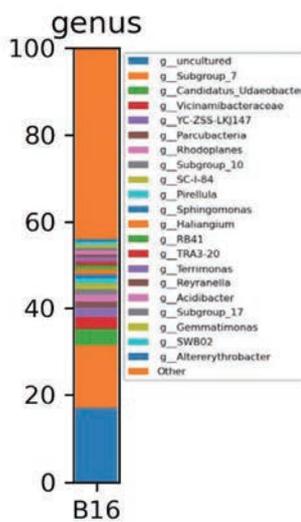
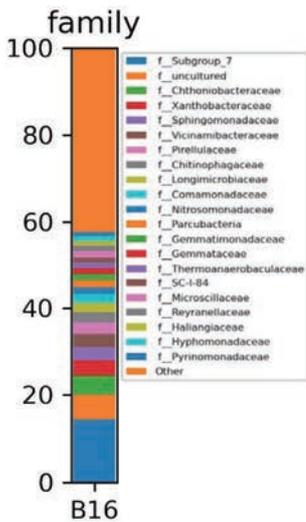
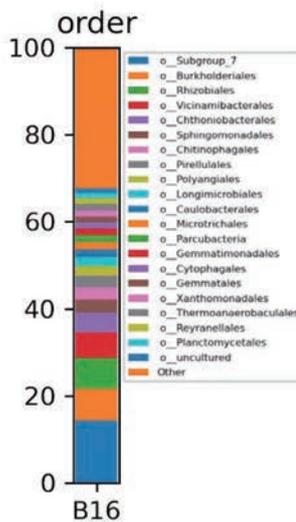
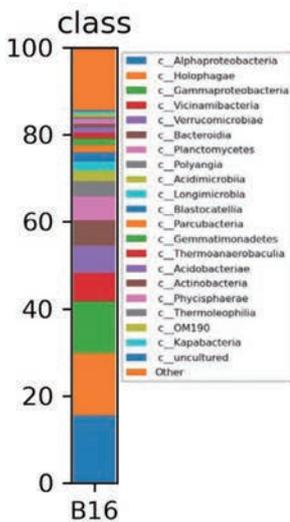
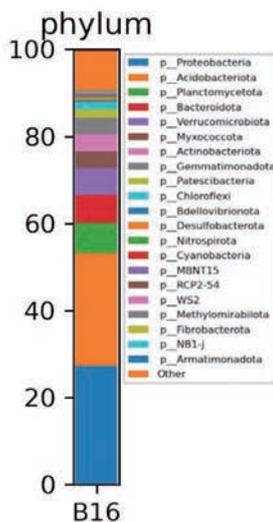
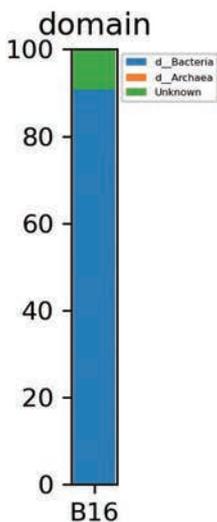
B14



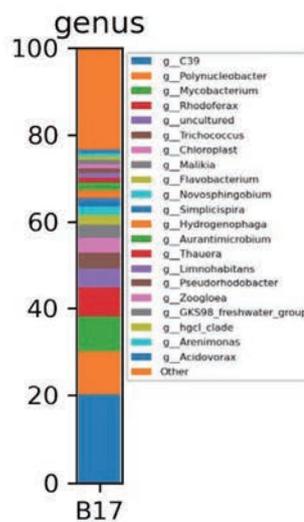
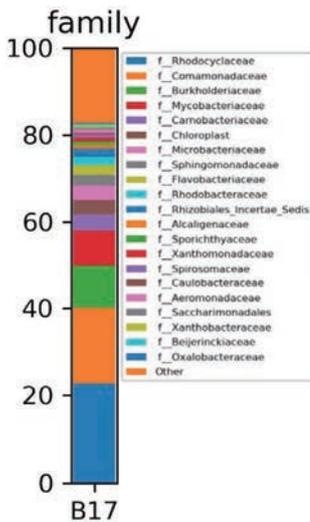
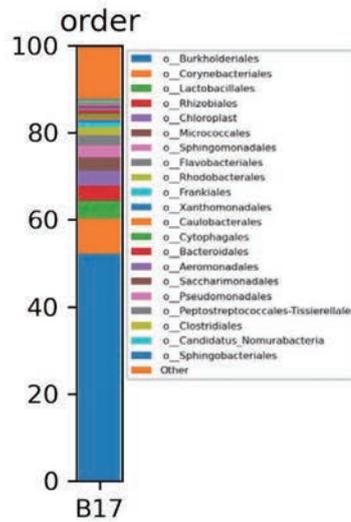
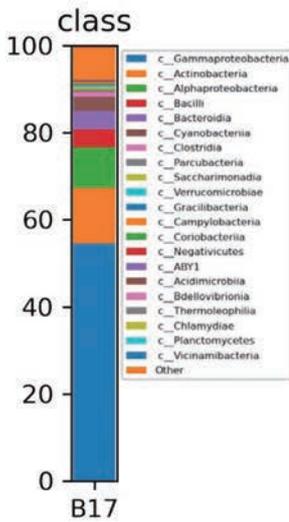
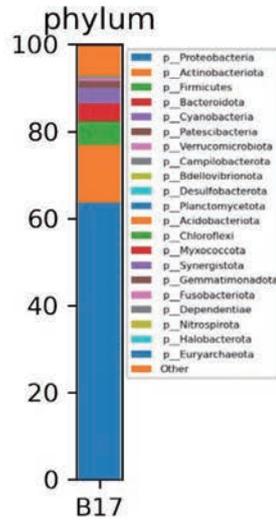
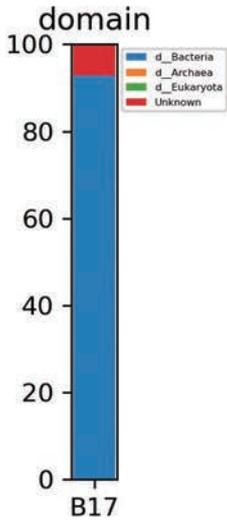
B15



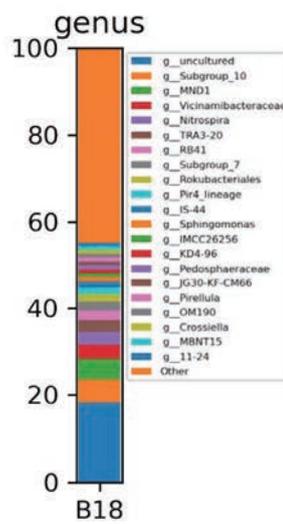
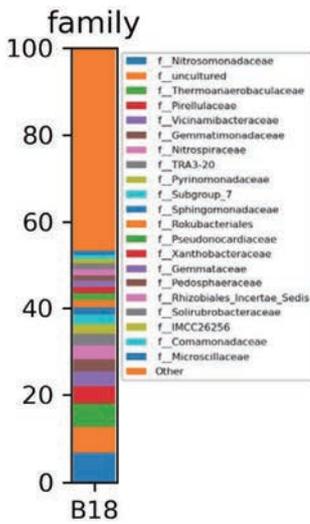
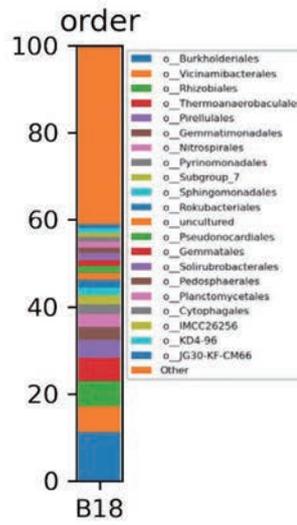
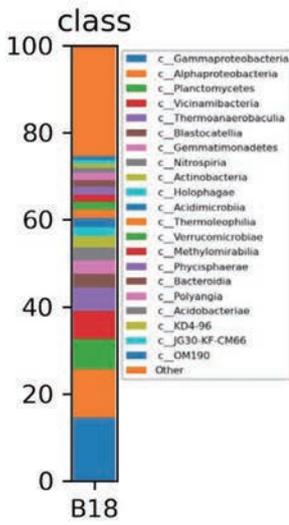
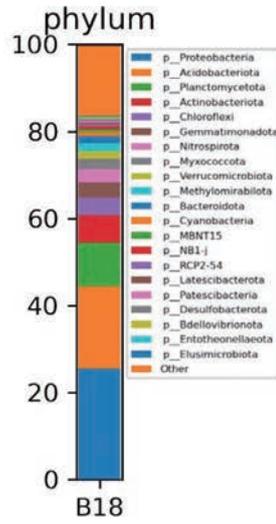
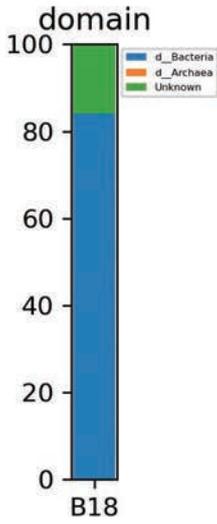
B16



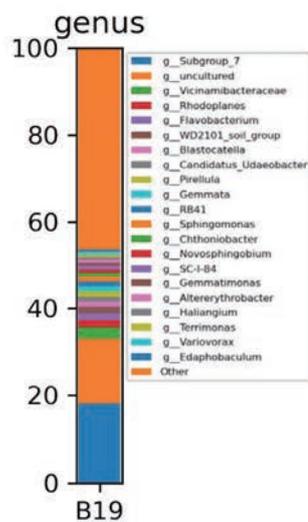
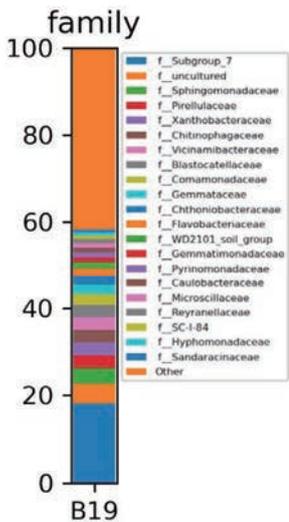
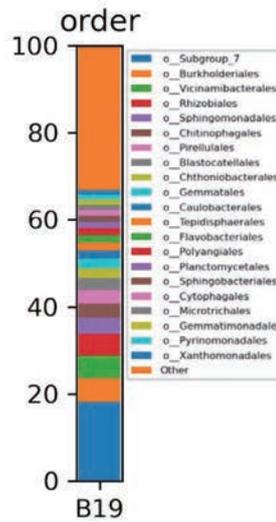
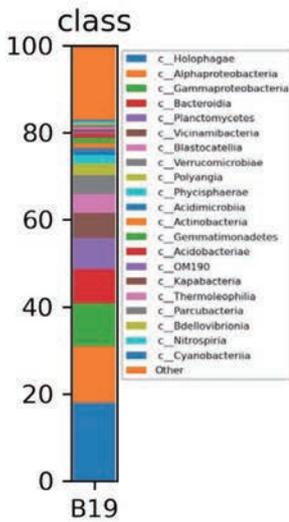
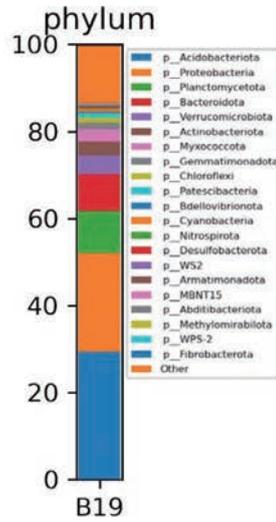
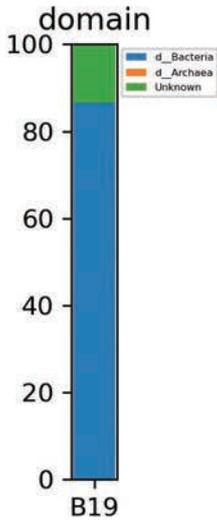
B17



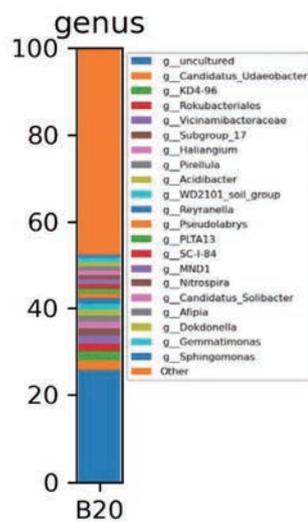
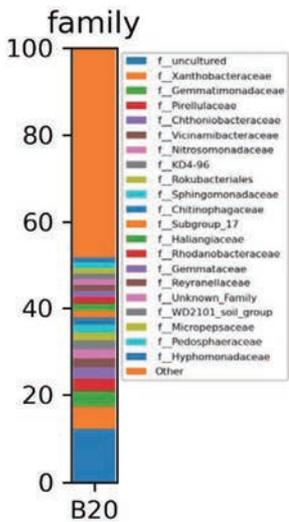
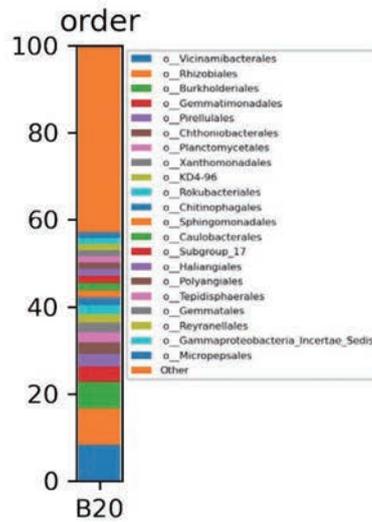
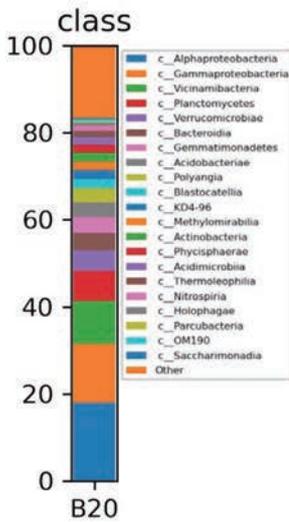
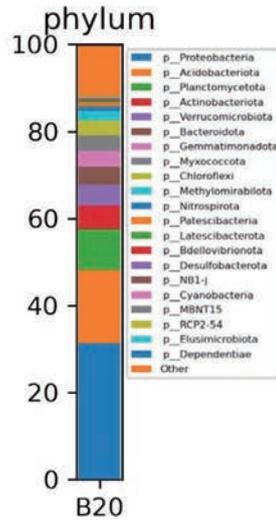
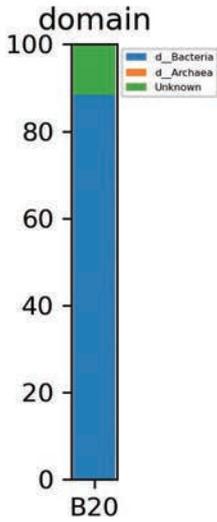
B18



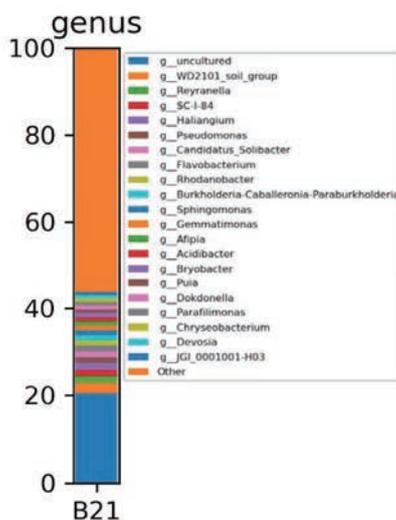
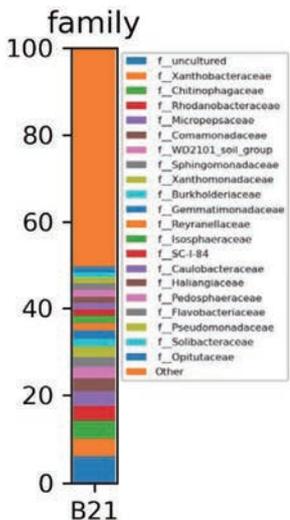
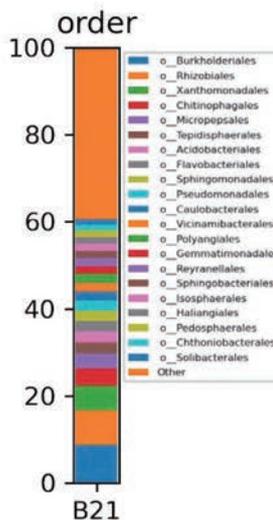
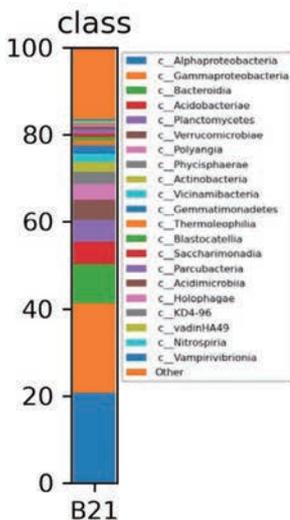
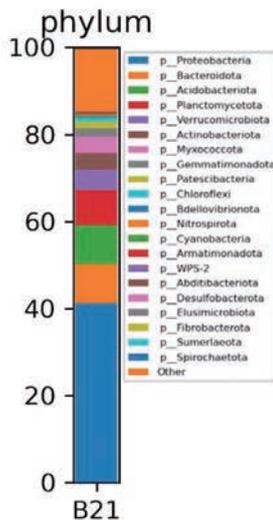
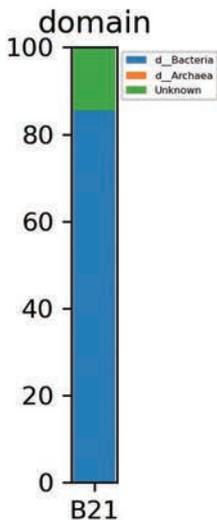
B19



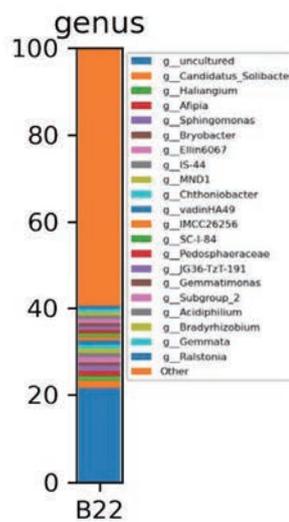
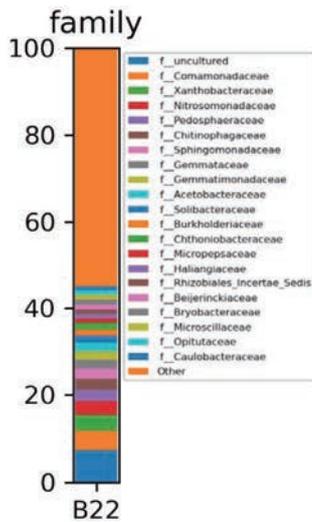
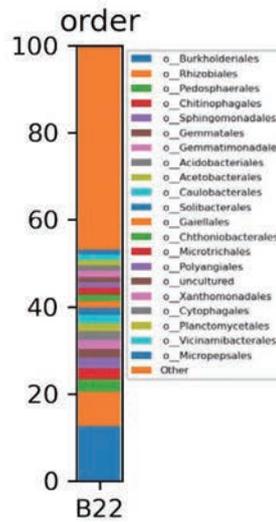
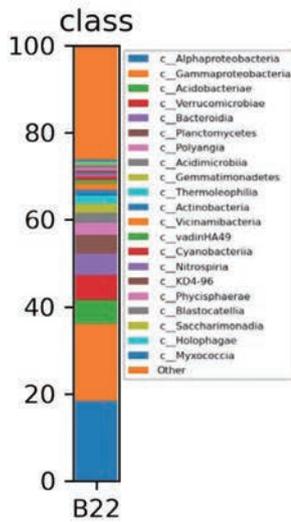
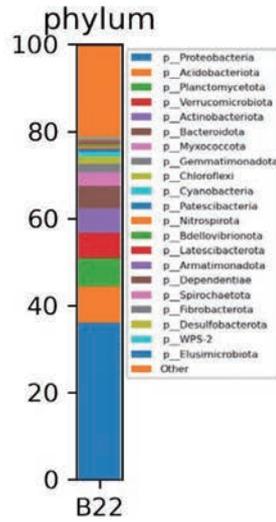
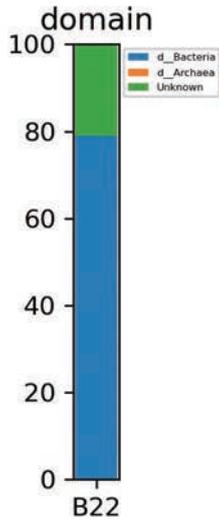
B20



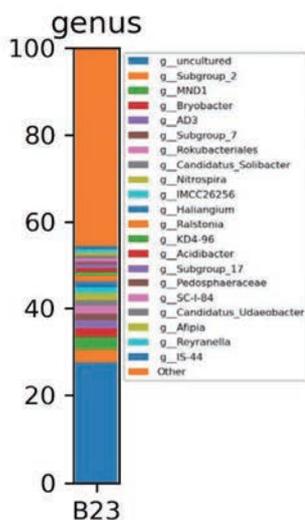
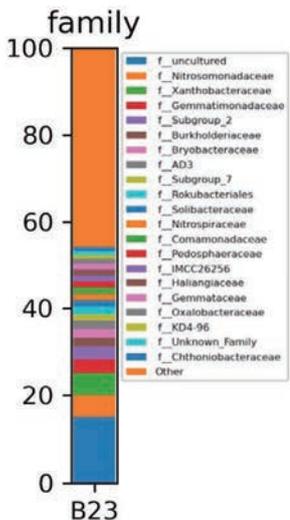
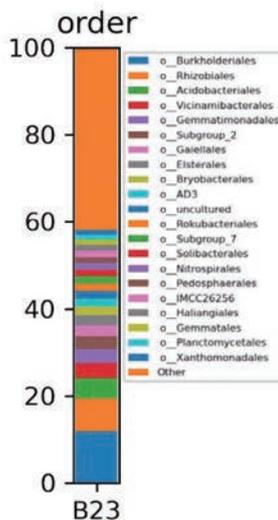
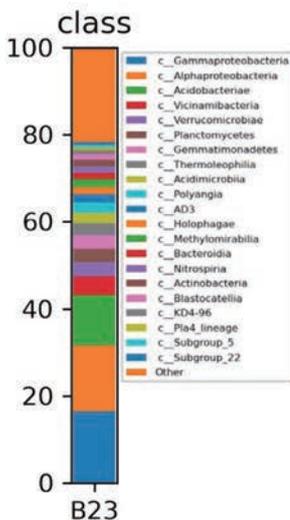
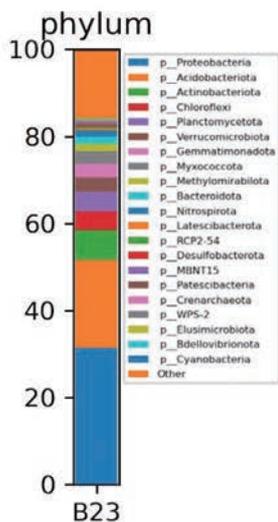
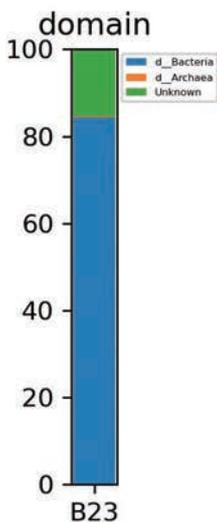
B21



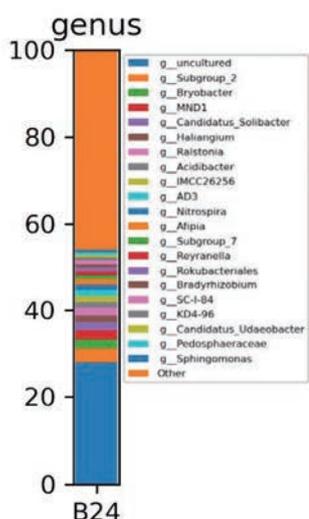
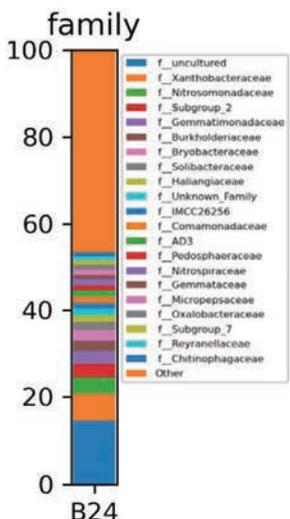
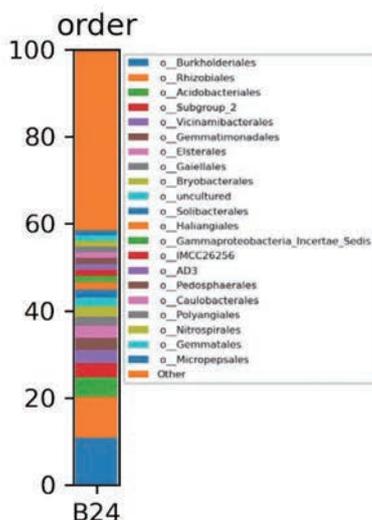
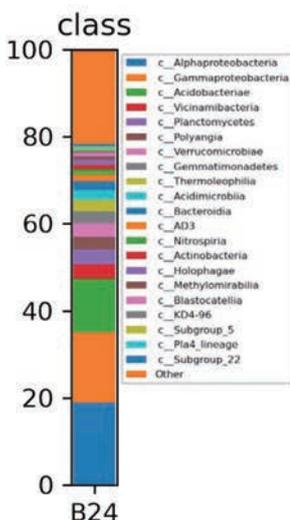
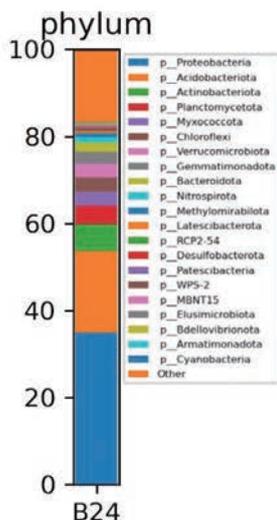
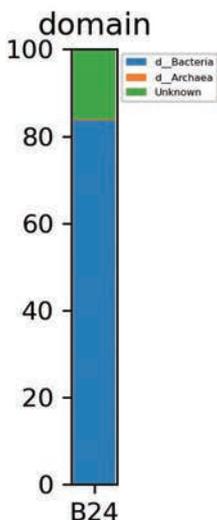
B22



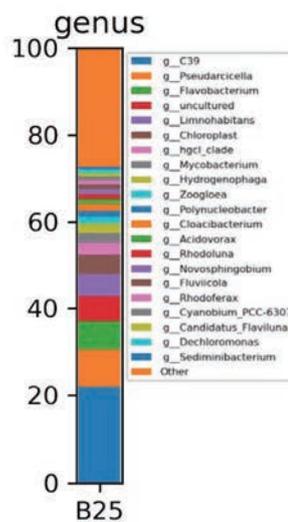
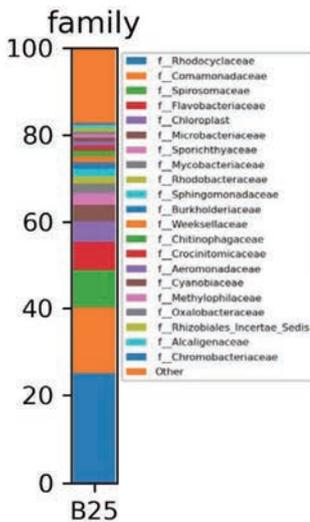
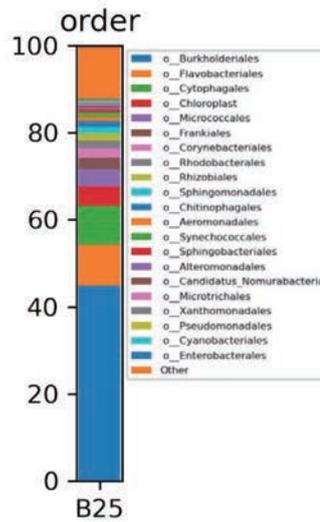
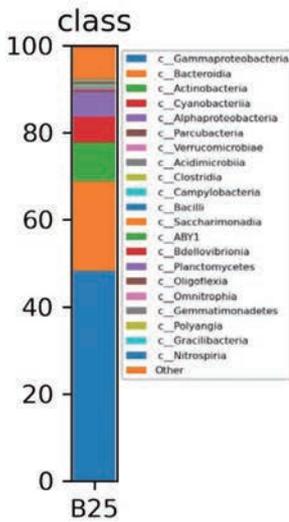
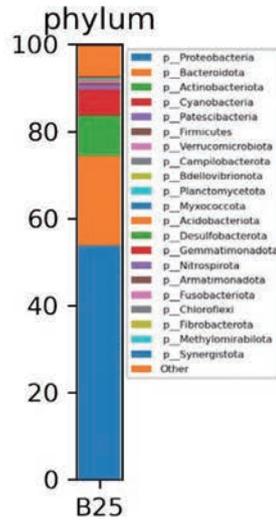
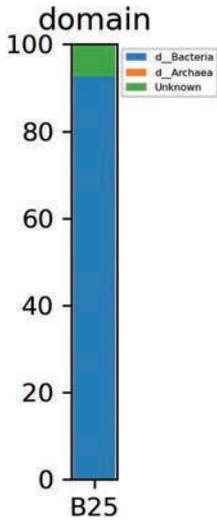
B23



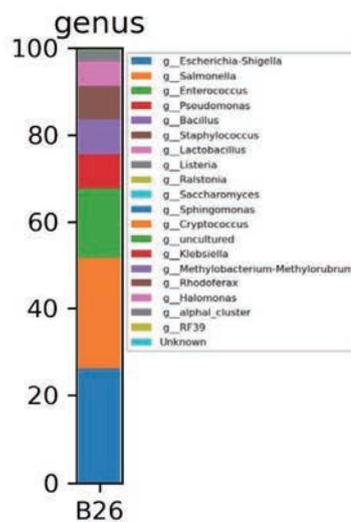
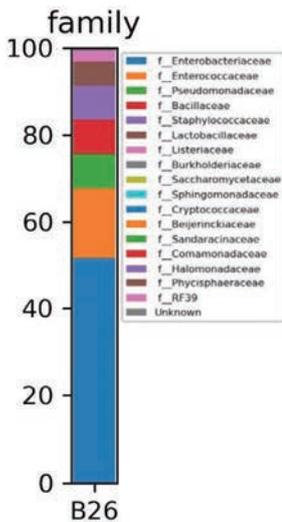
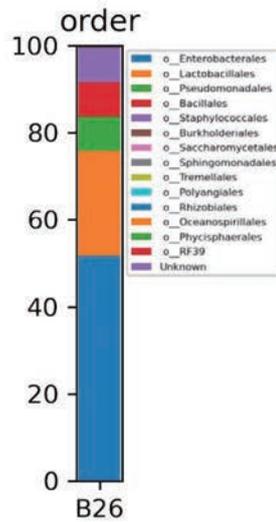
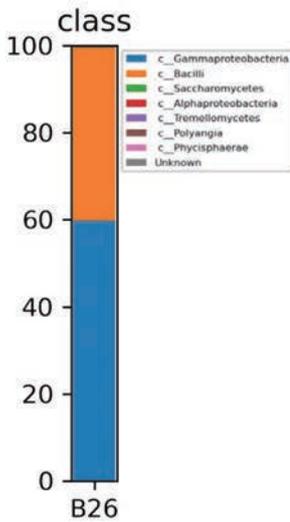
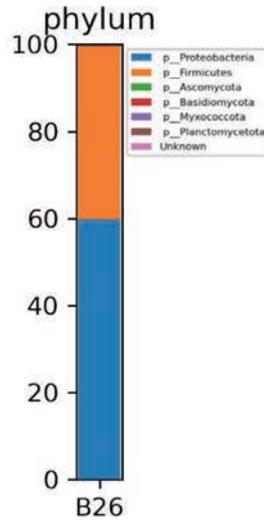
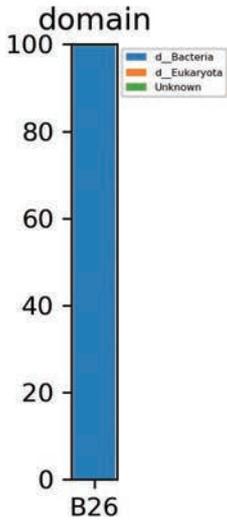
B24



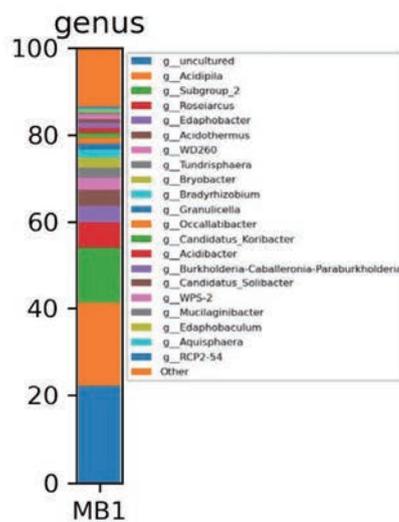
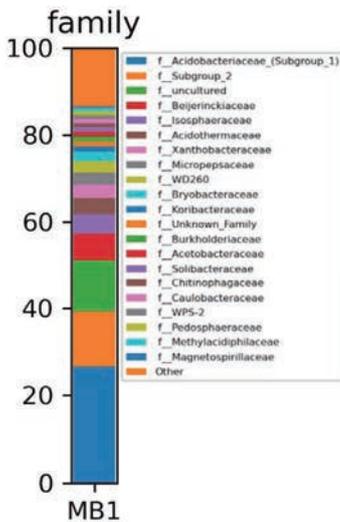
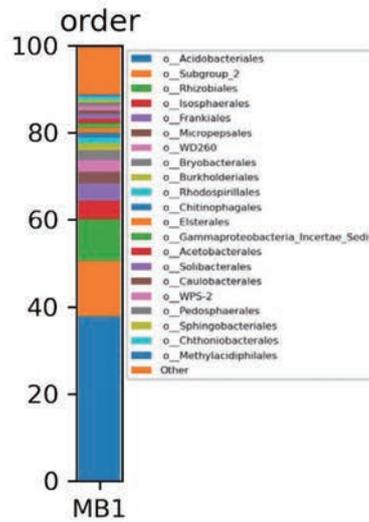
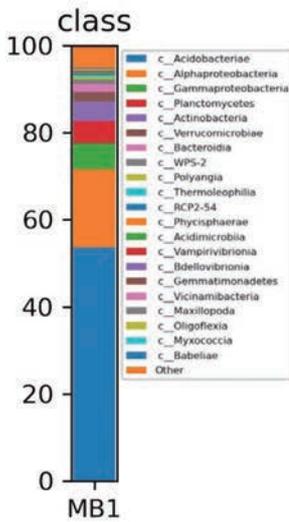
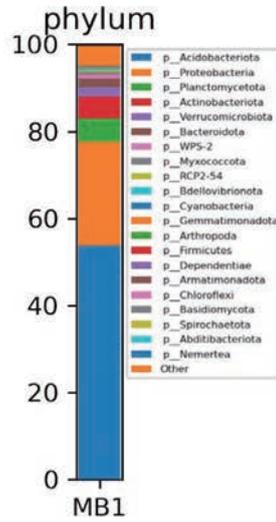
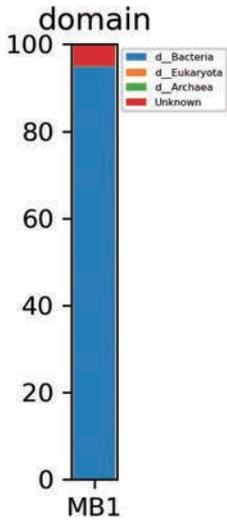
B25



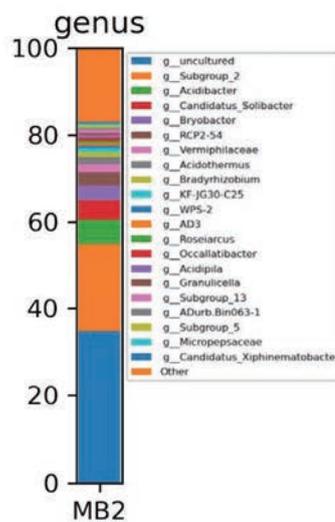
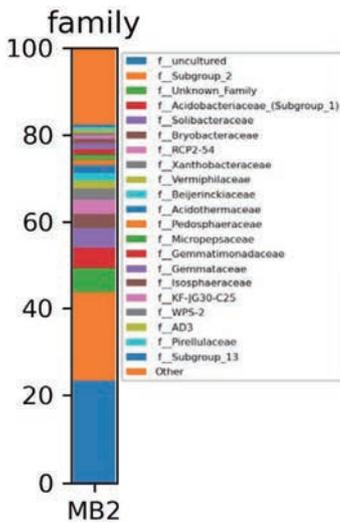
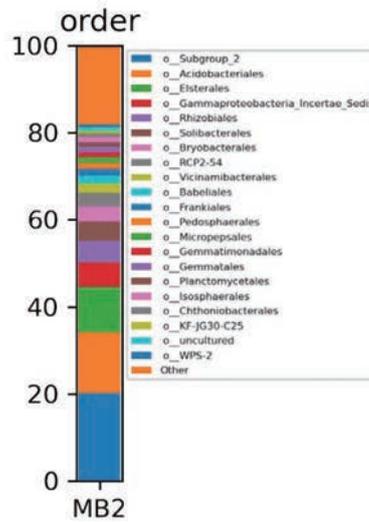
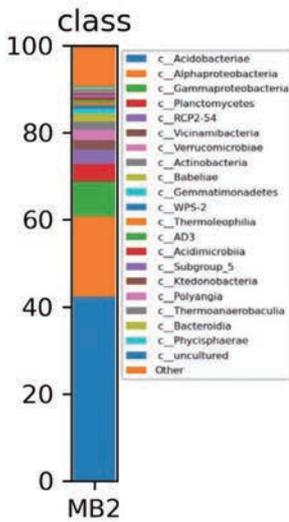
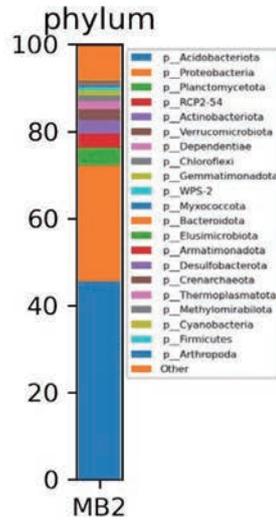
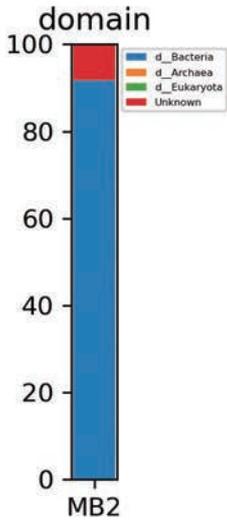
B26



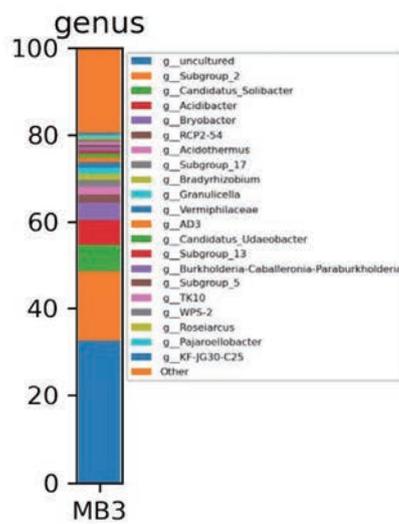
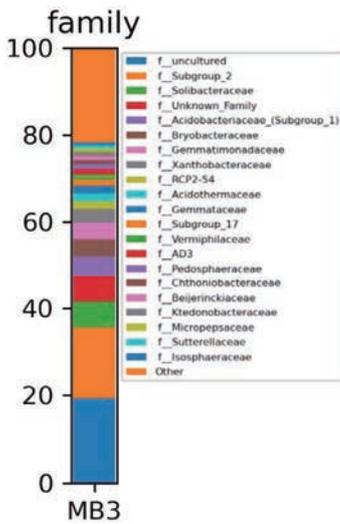
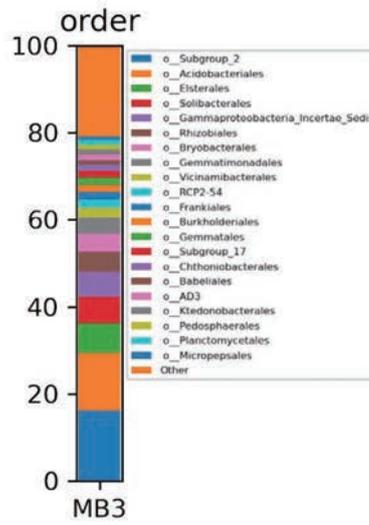
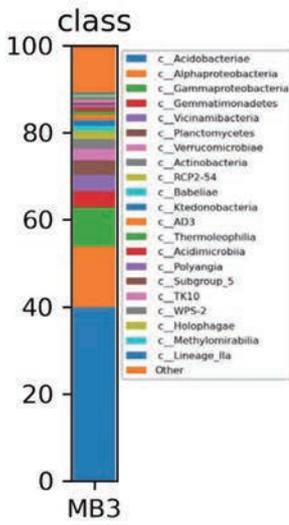
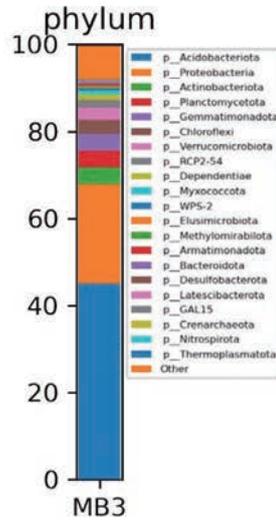
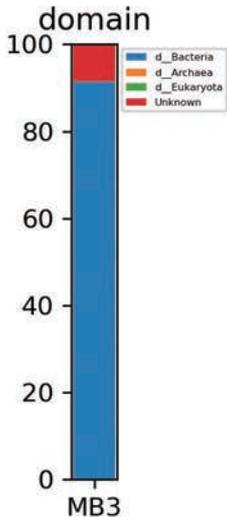
MB1



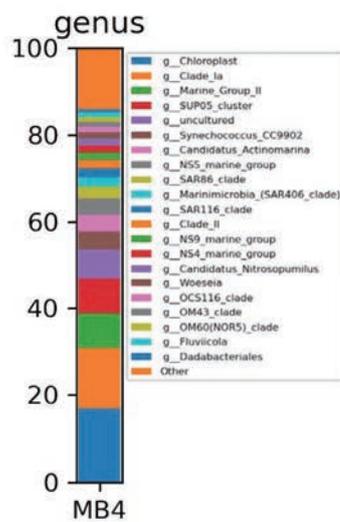
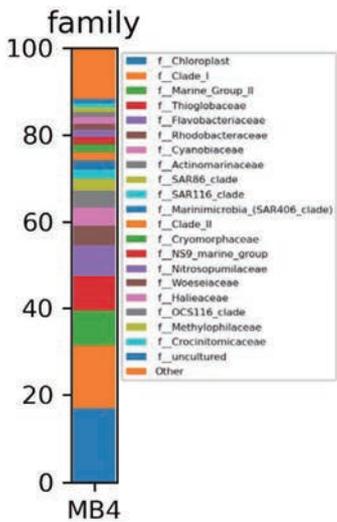
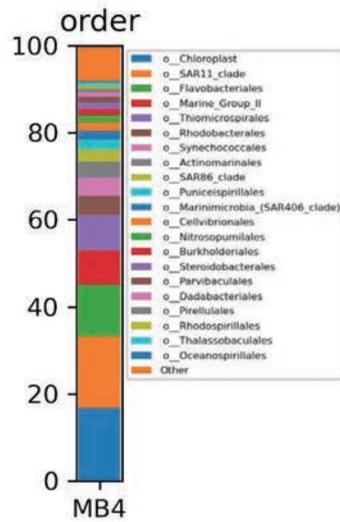
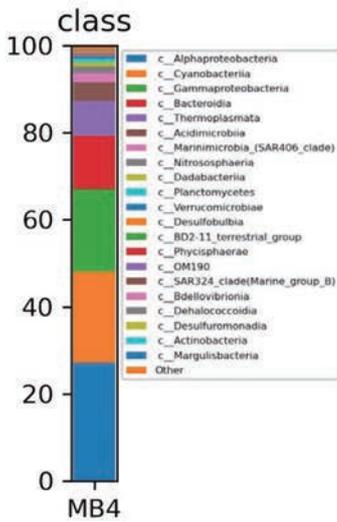
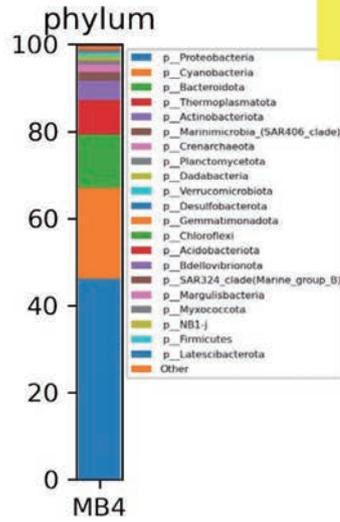
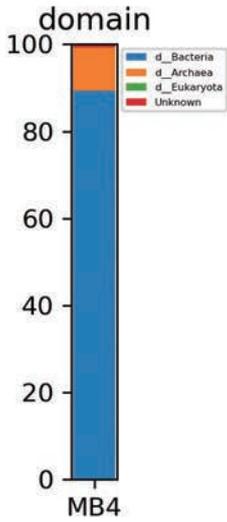
MB2



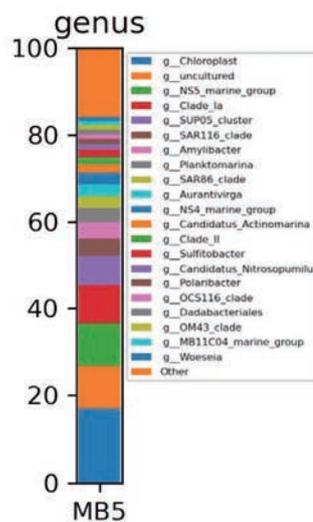
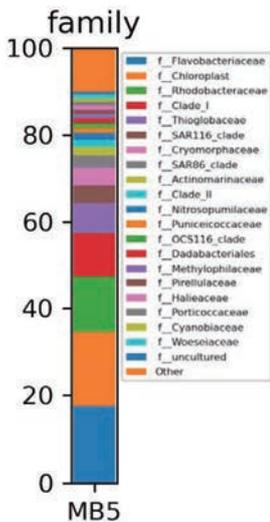
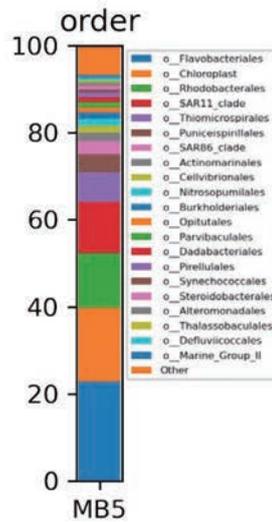
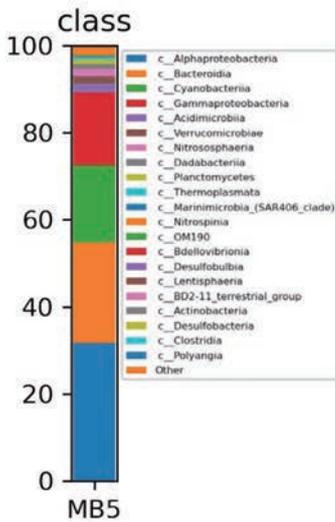
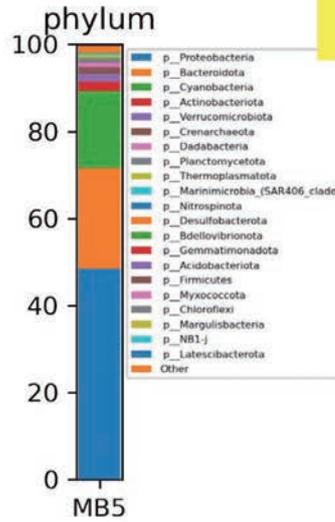
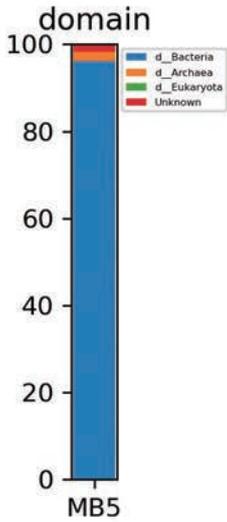
MB3



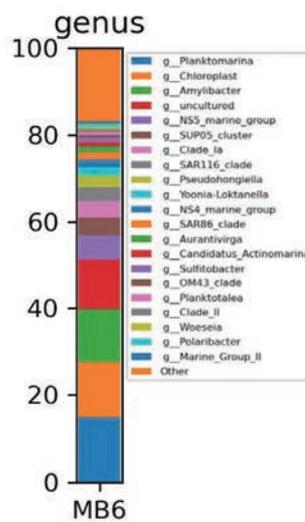
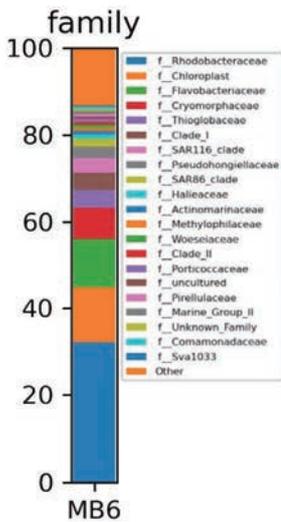
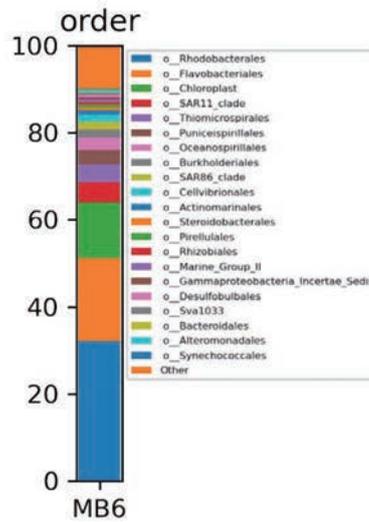
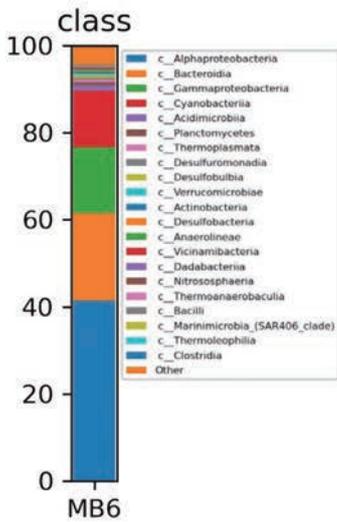
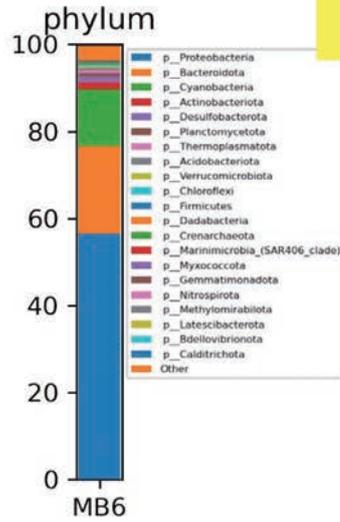
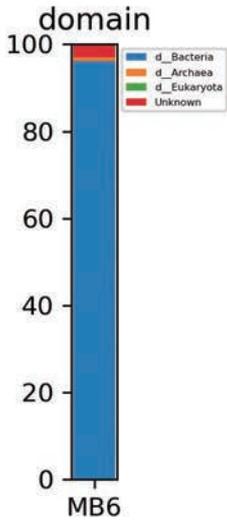
MB4



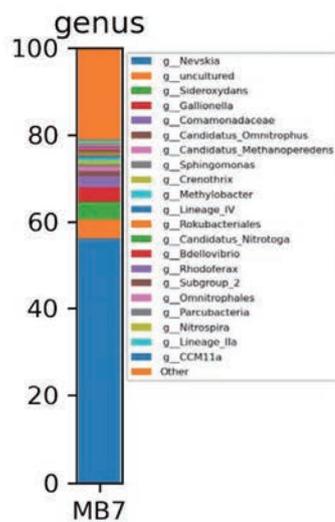
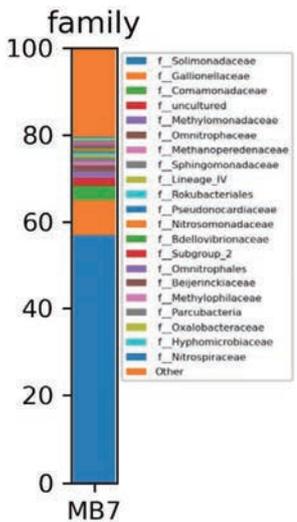
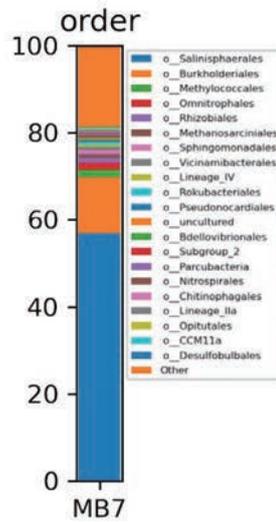
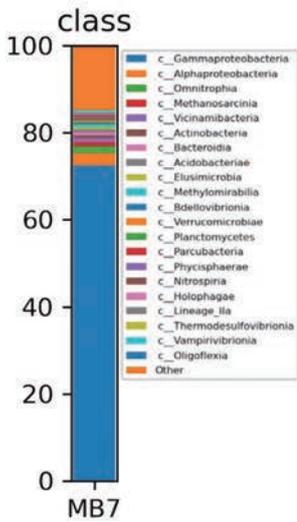
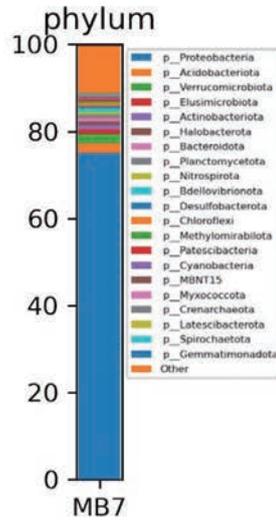
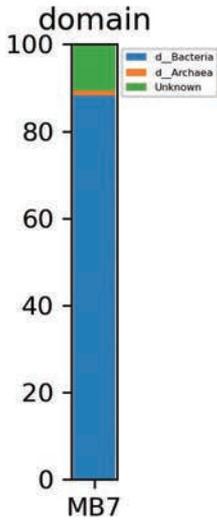
MB5



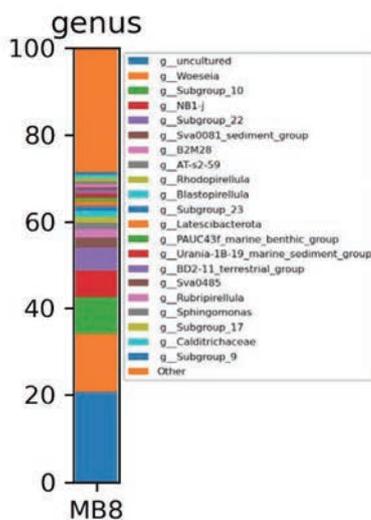
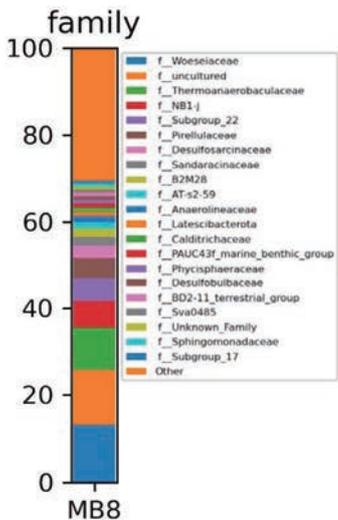
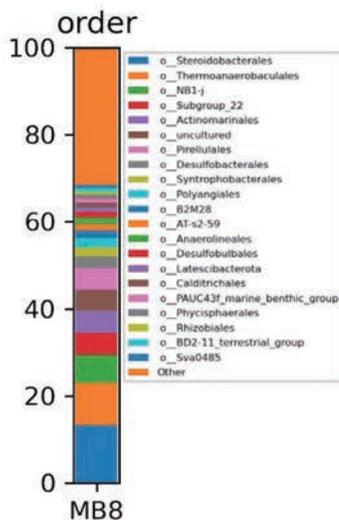
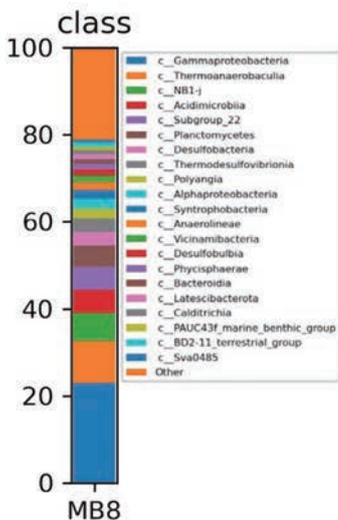
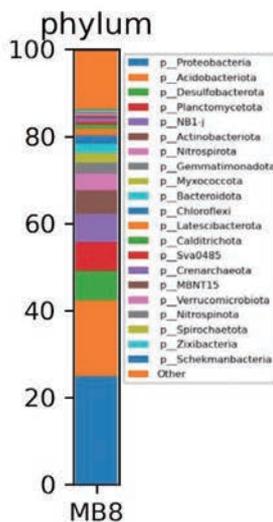
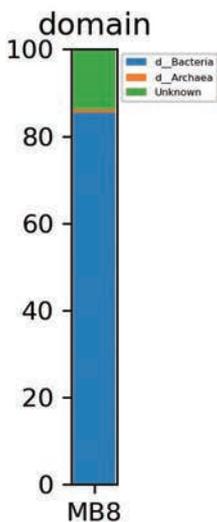
MB6



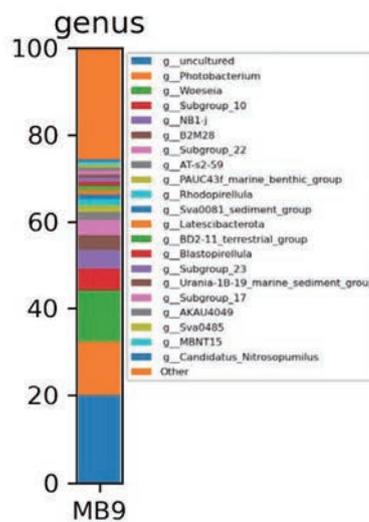
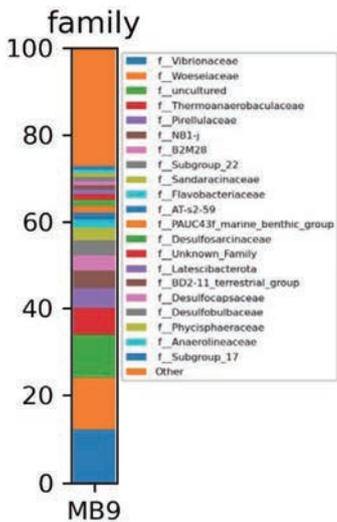
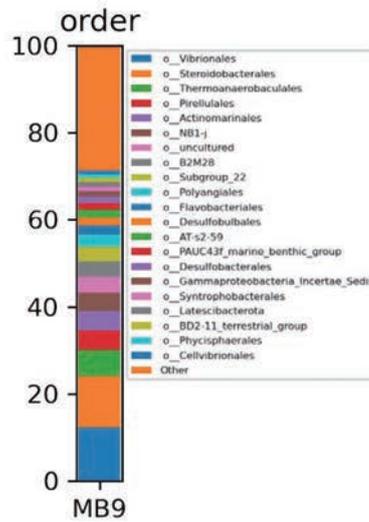
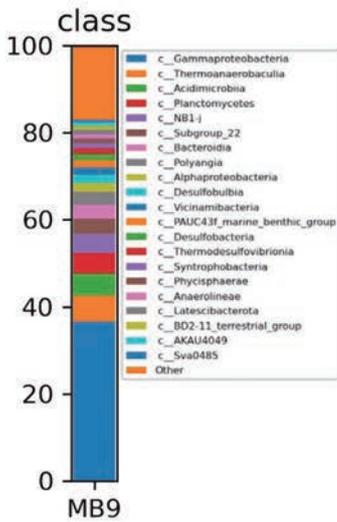
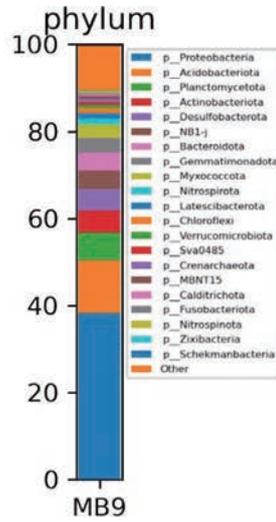
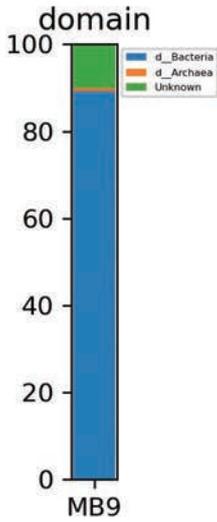
MB7



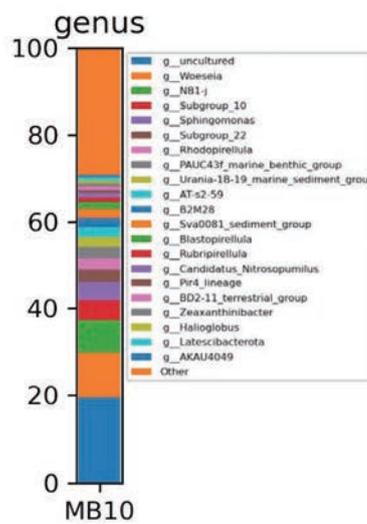
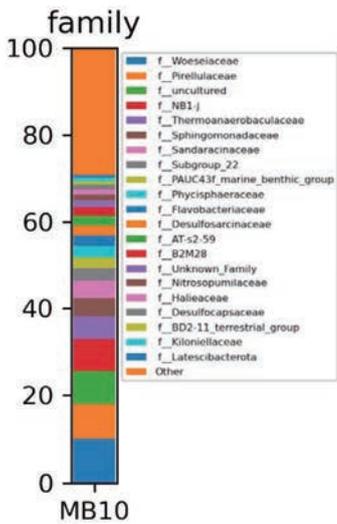
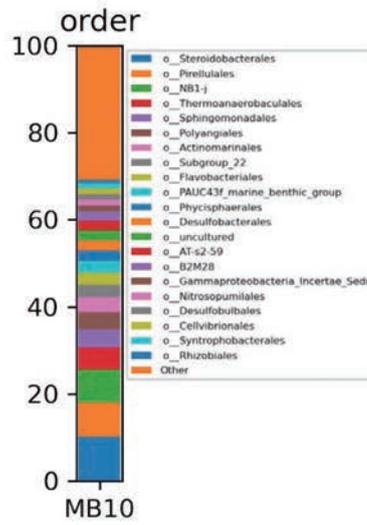
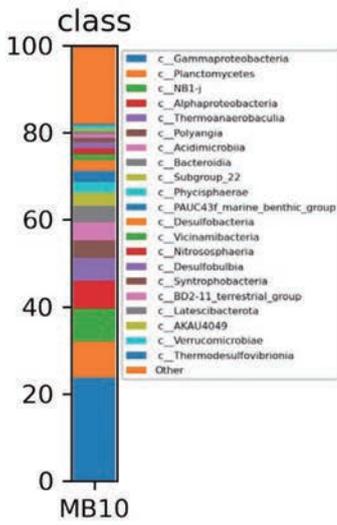
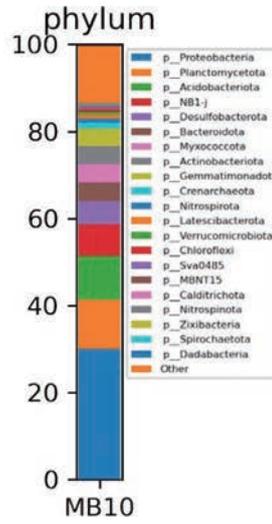
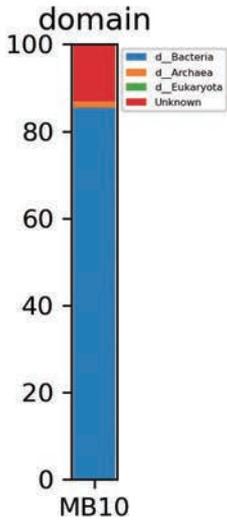
MB8



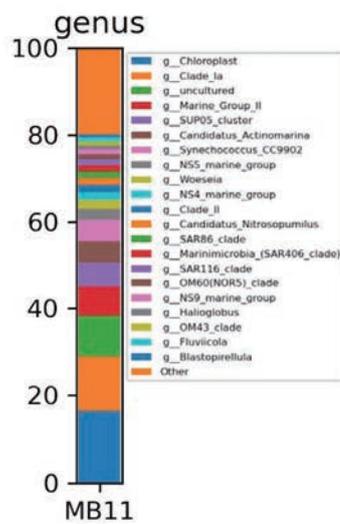
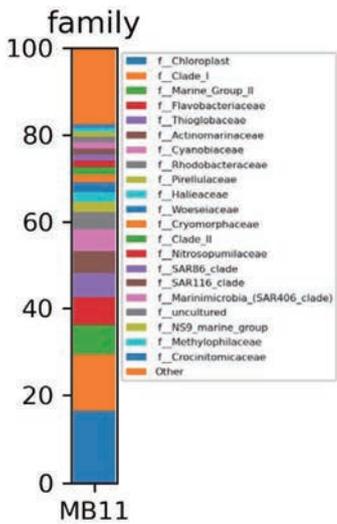
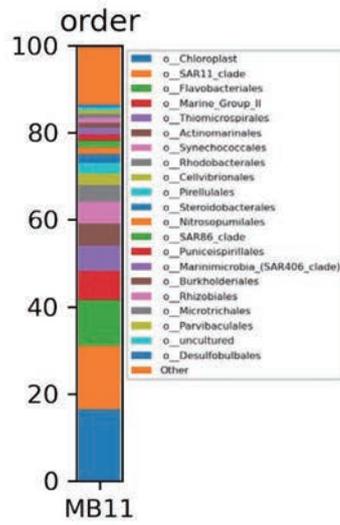
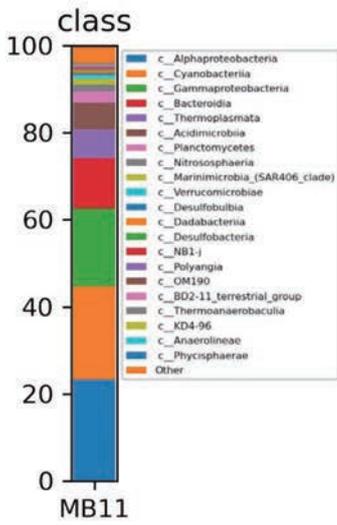
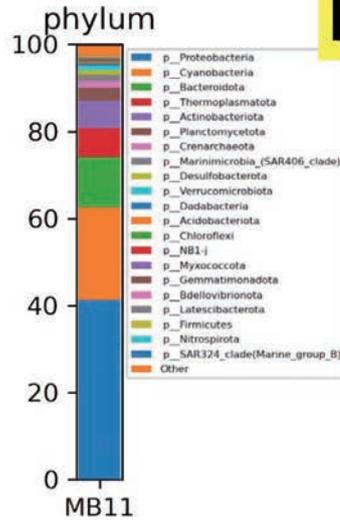
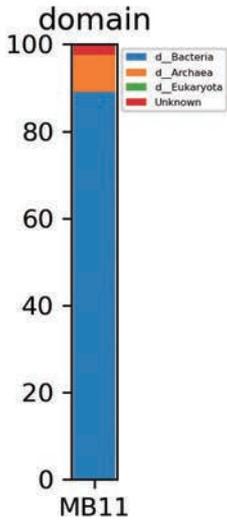
MB9



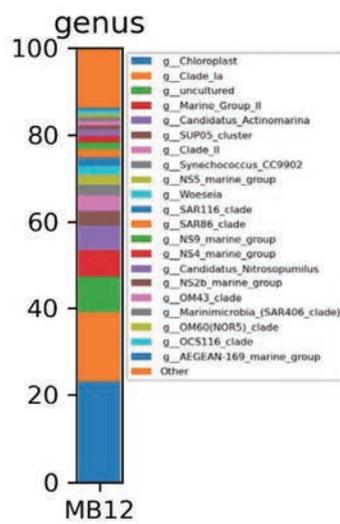
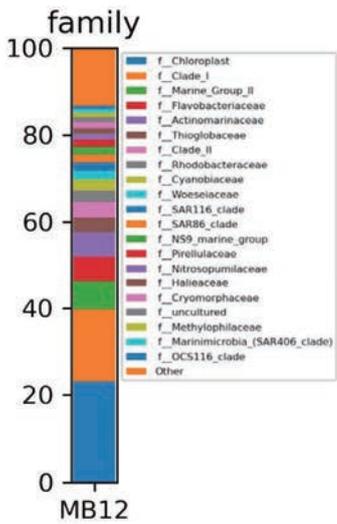
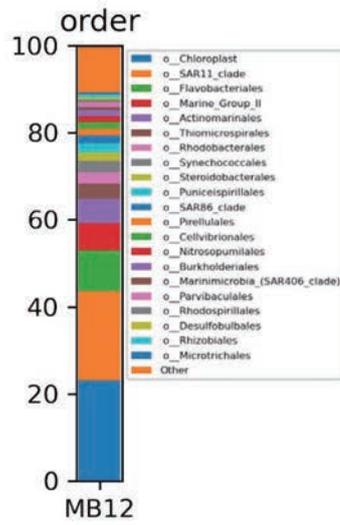
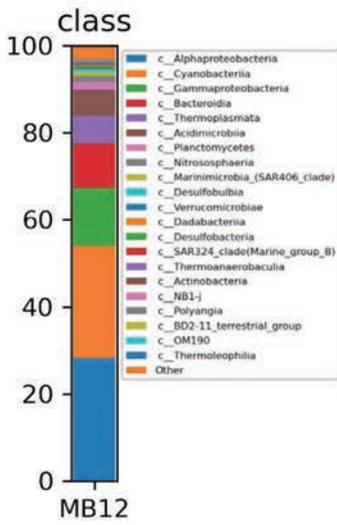
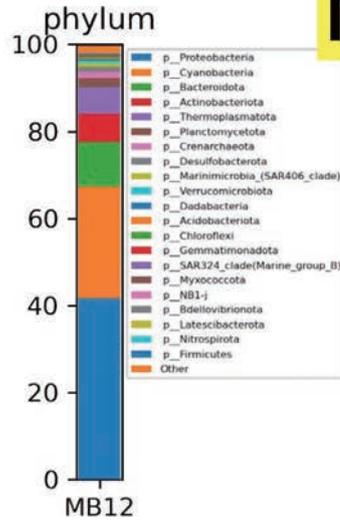
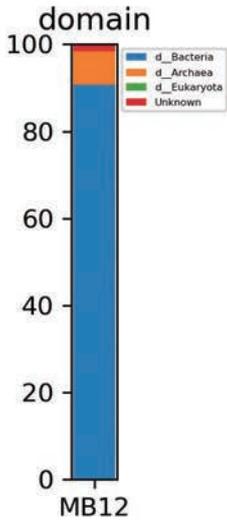
MB10



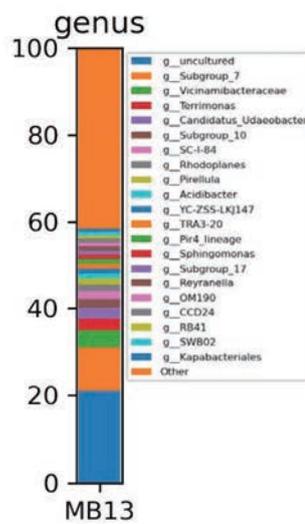
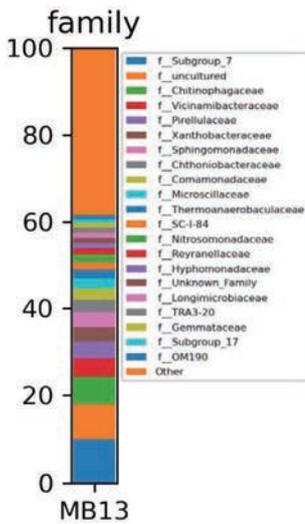
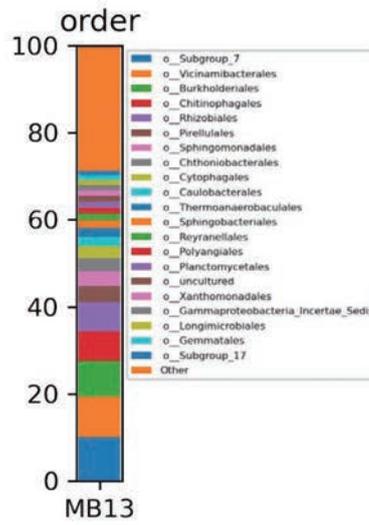
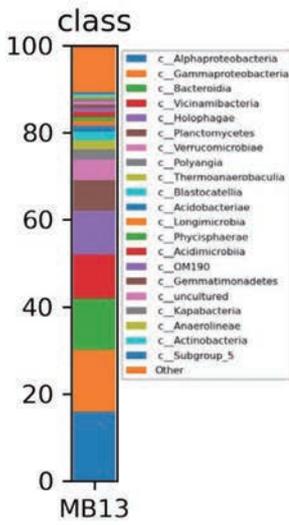
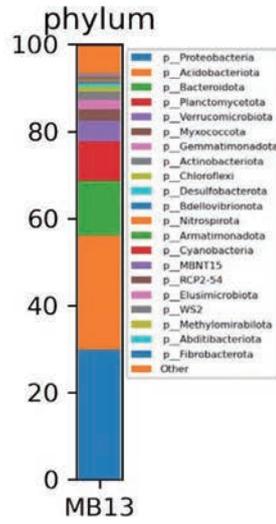
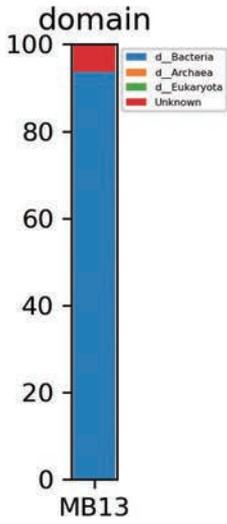
MB11



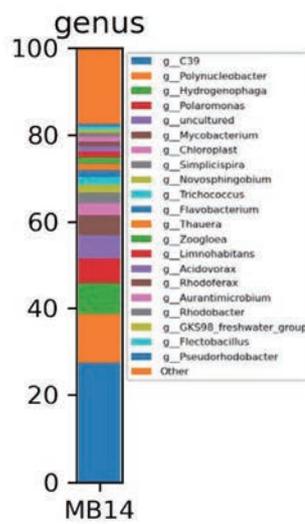
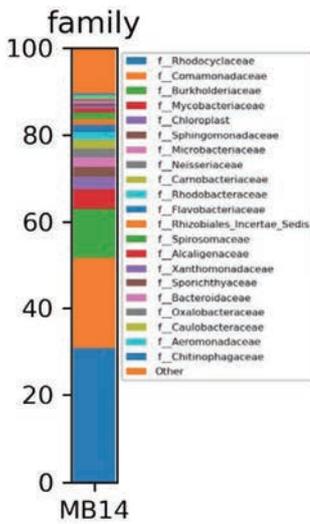
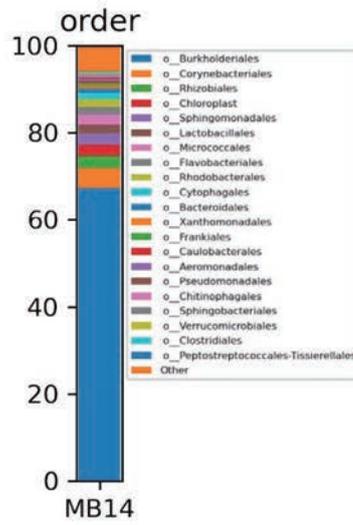
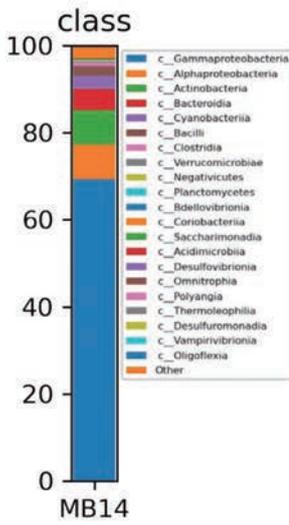
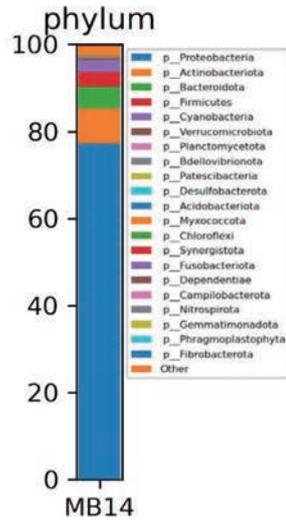
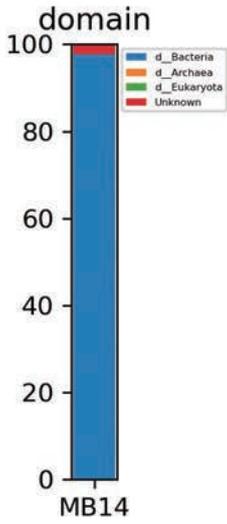
MB12



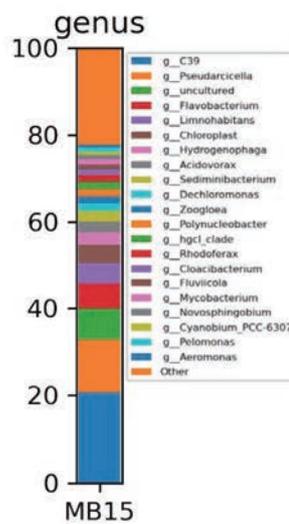
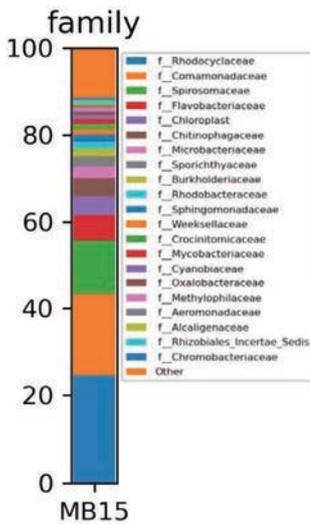
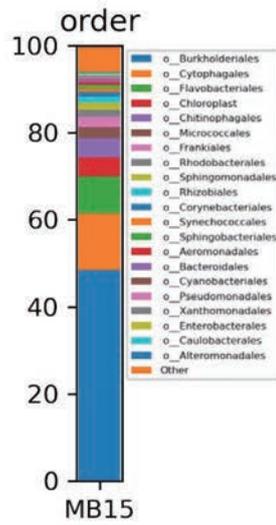
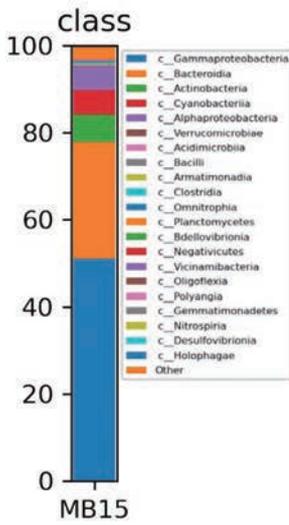
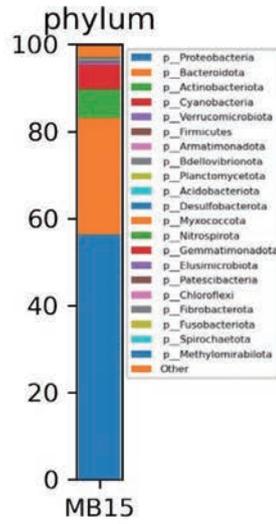
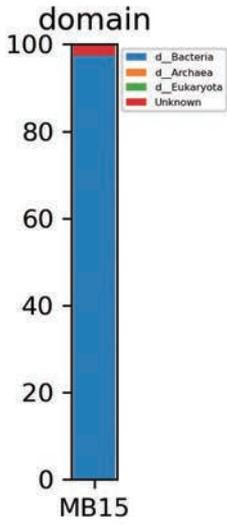
MB13



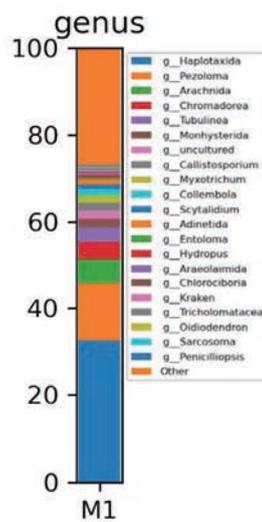
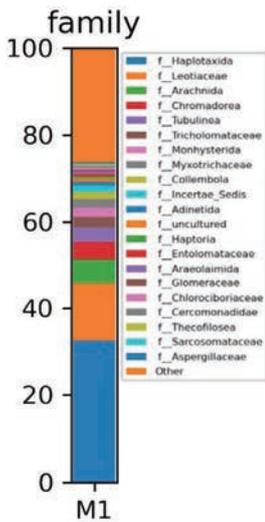
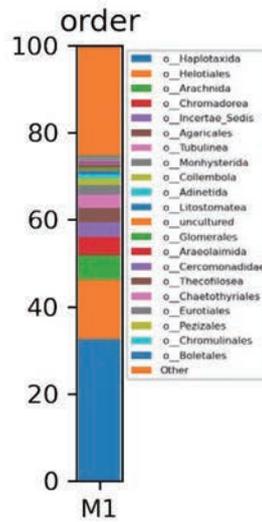
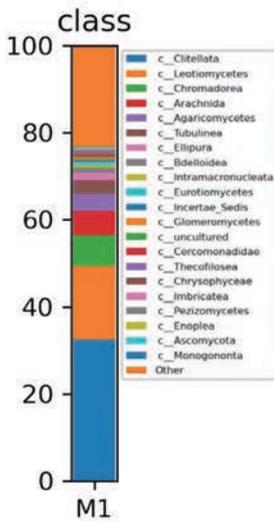
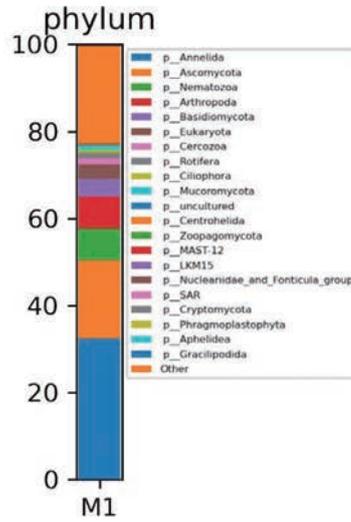
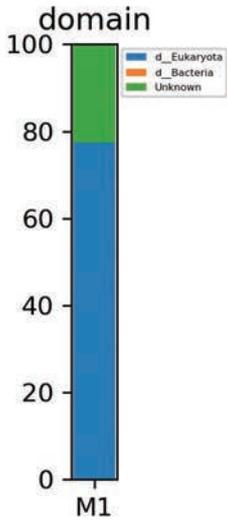
MB14



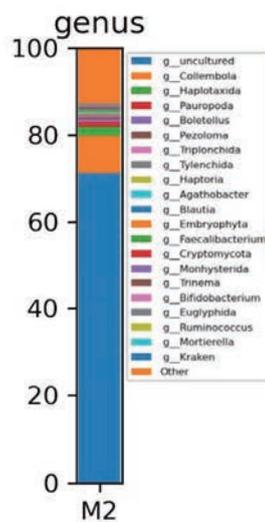
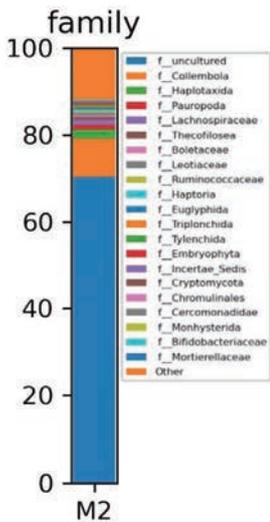
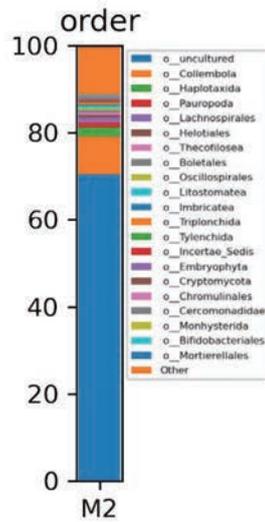
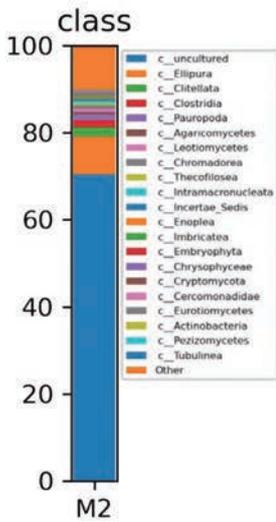
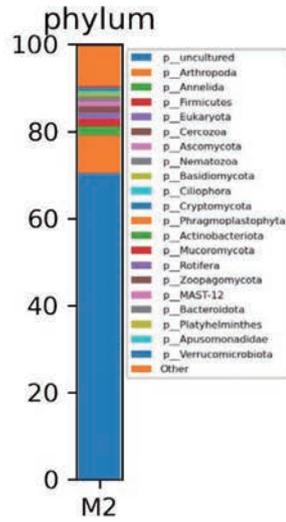
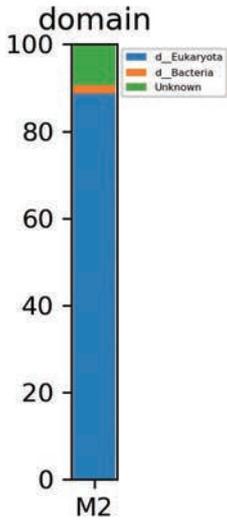
MB15



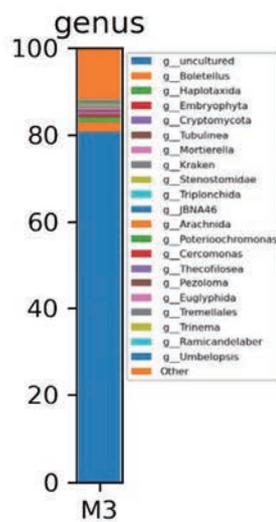
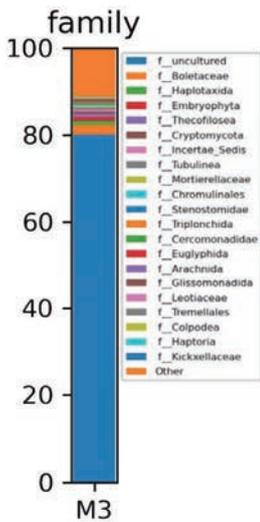
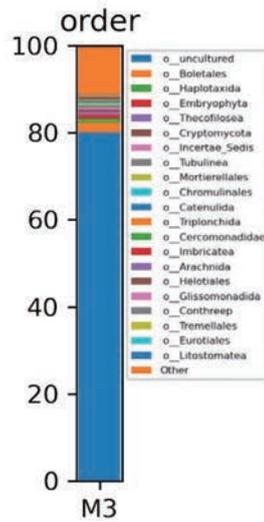
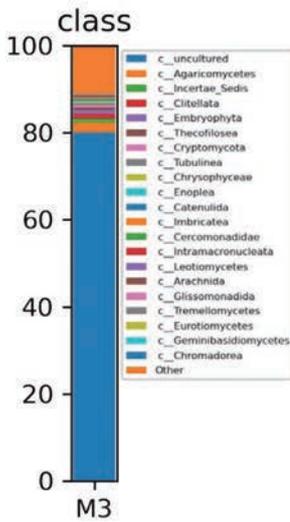
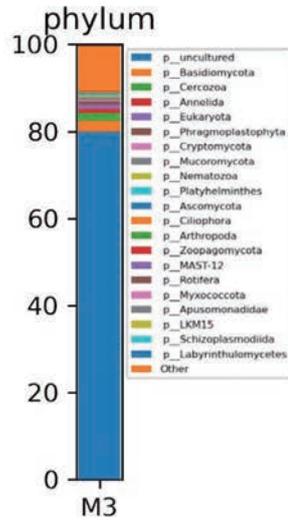
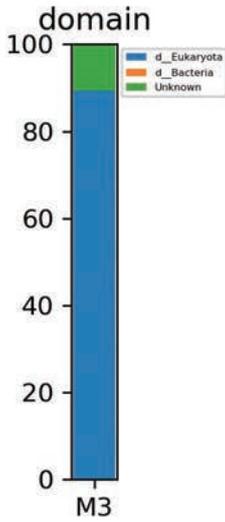
M1



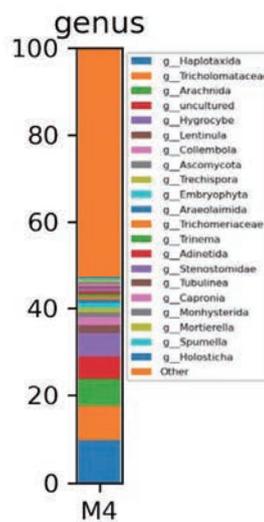
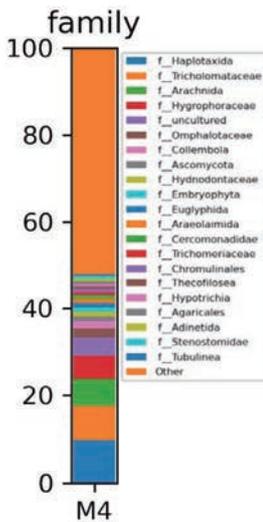
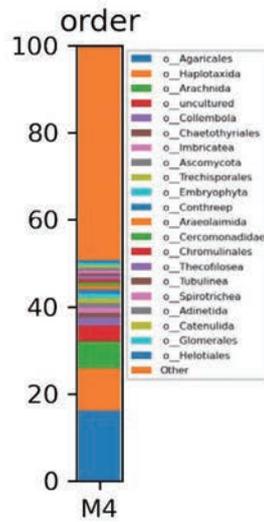
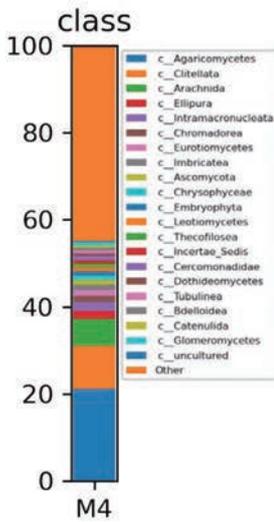
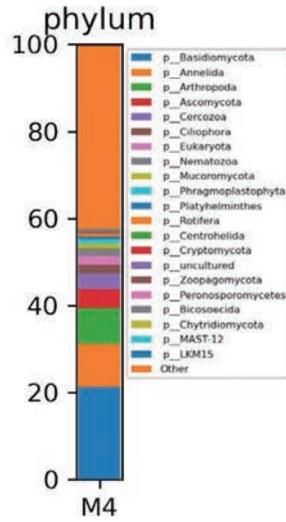
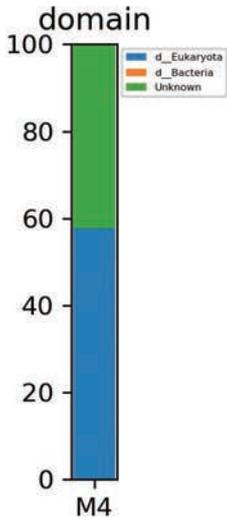
M2



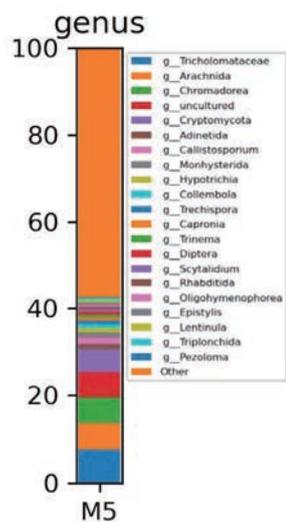
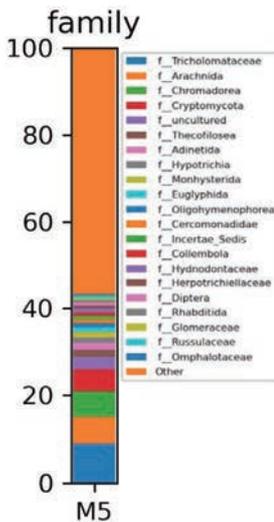
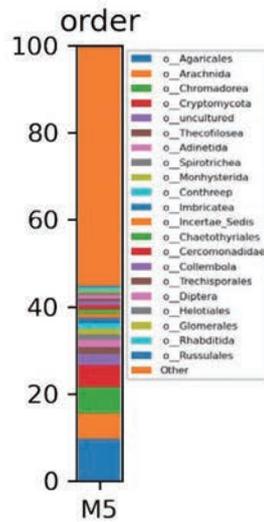
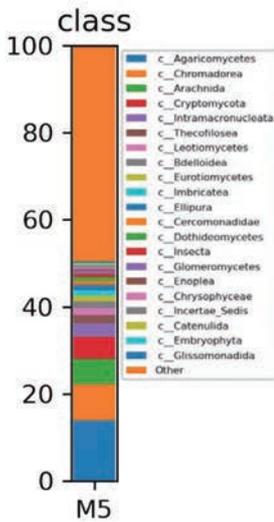
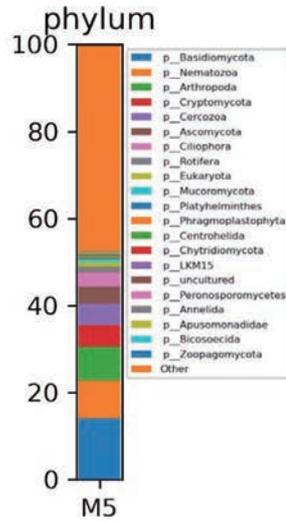
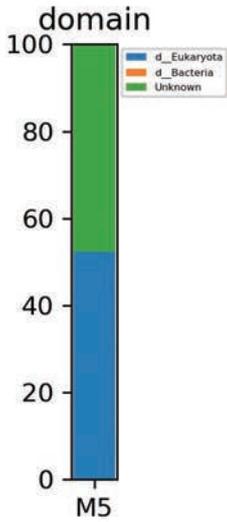
M3



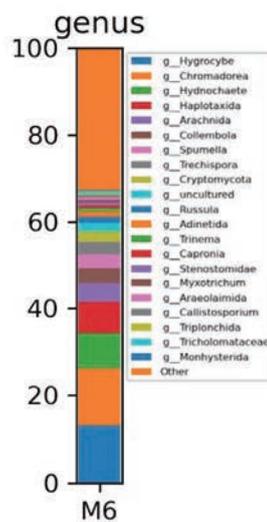
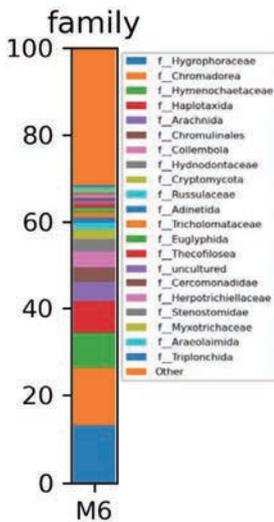
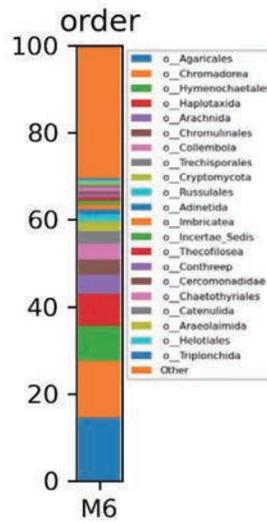
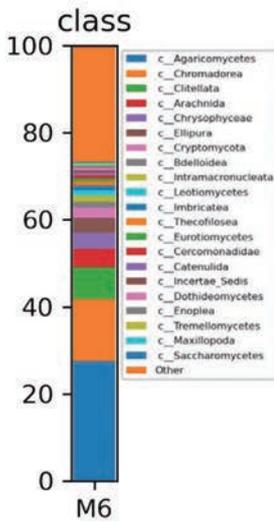
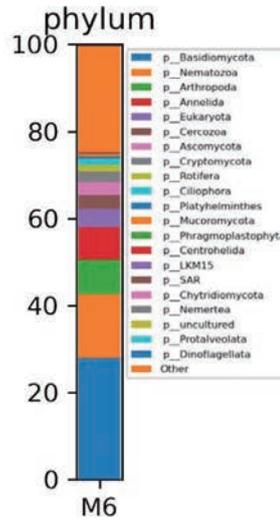
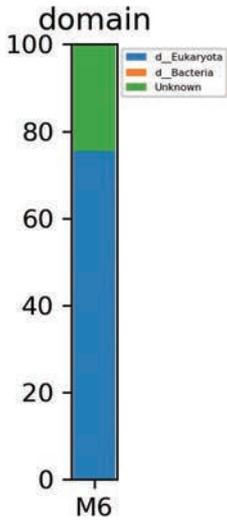
M4

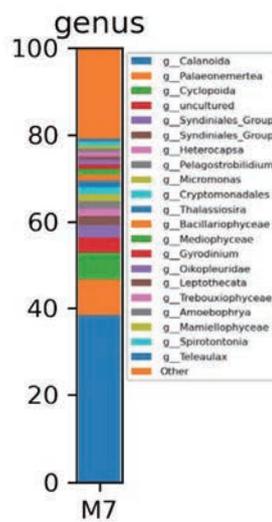
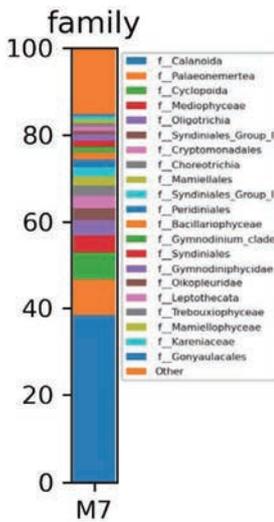
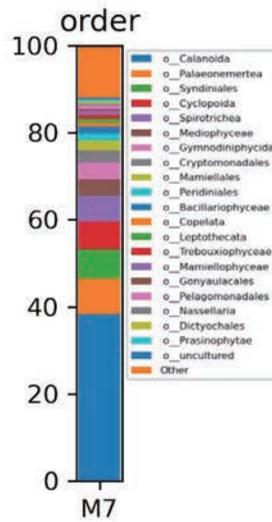
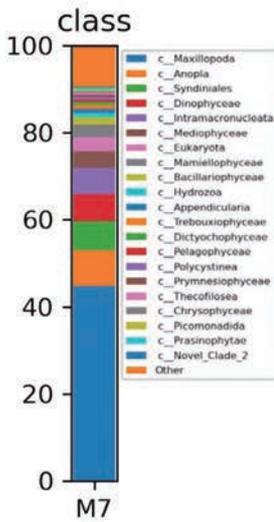
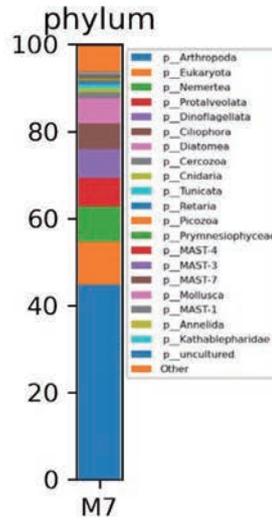
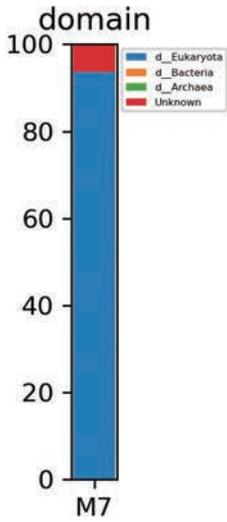


M5

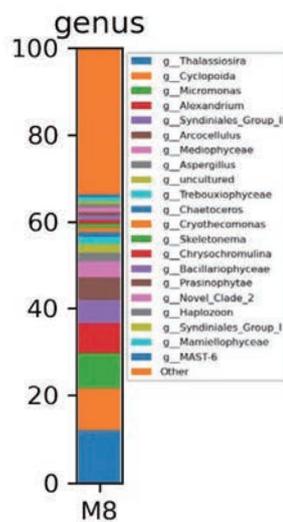
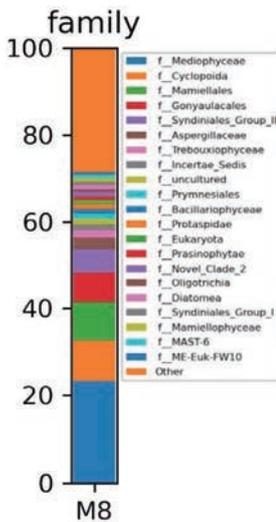
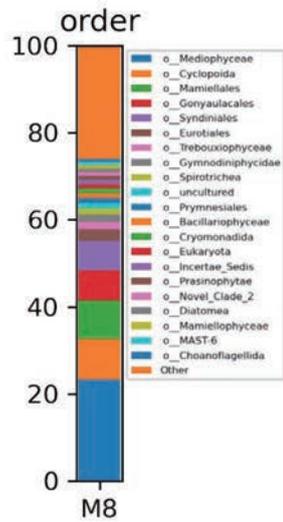
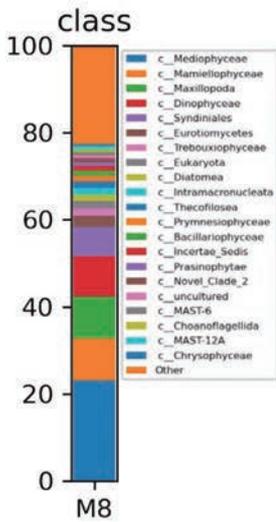
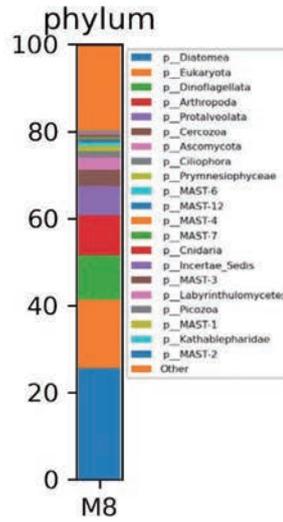
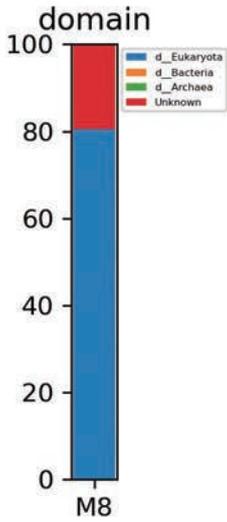


M6

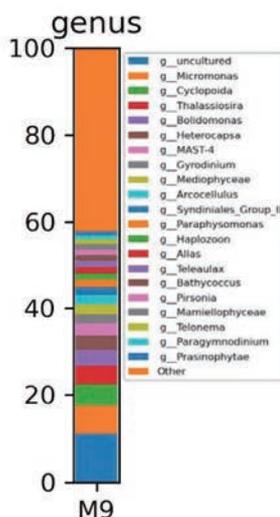
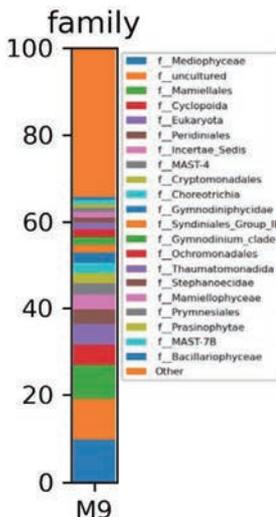
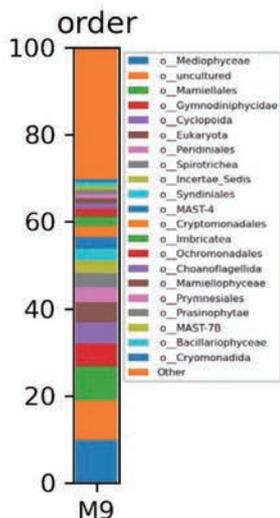
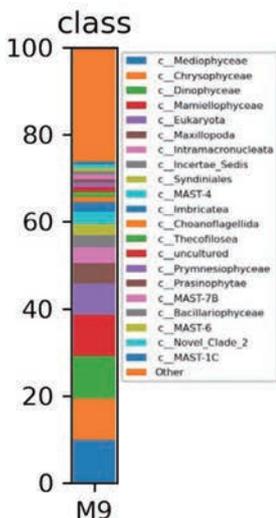
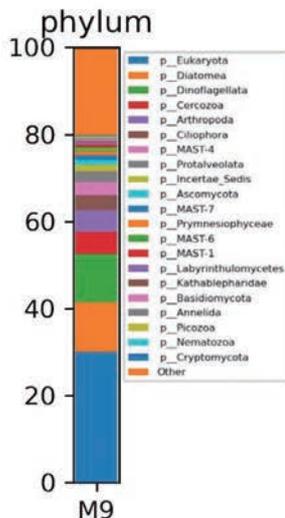
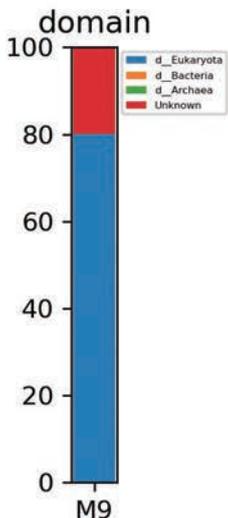




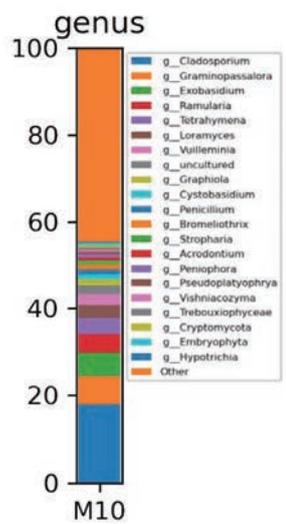
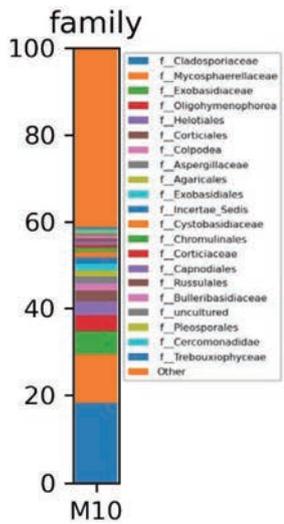
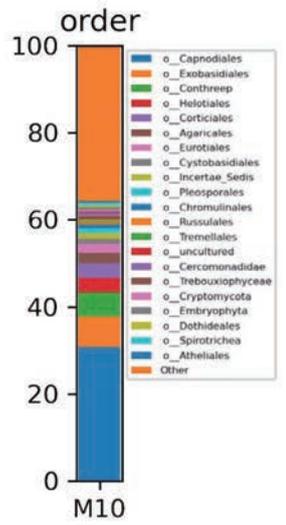
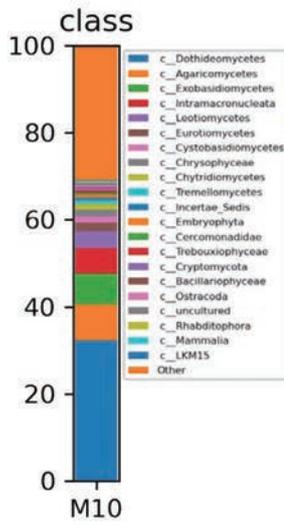
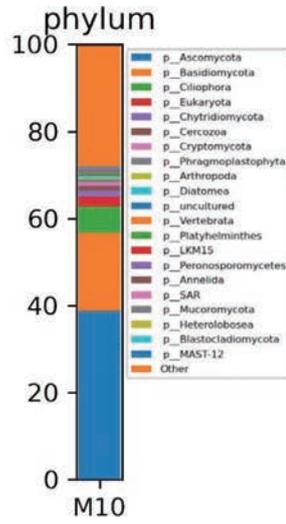
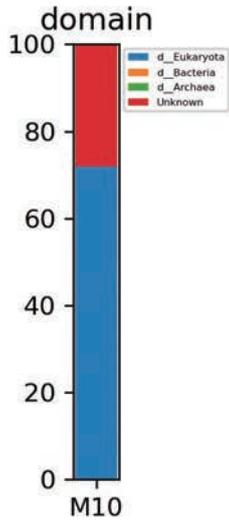
M8

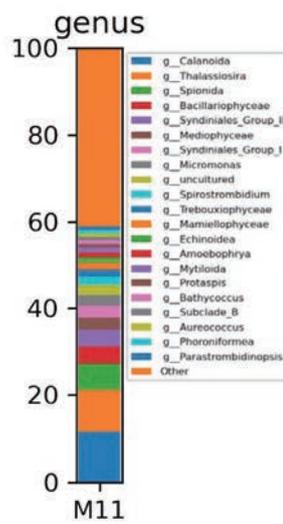
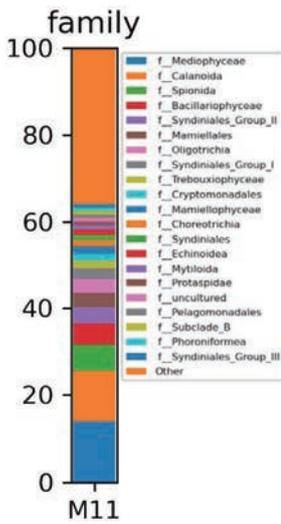
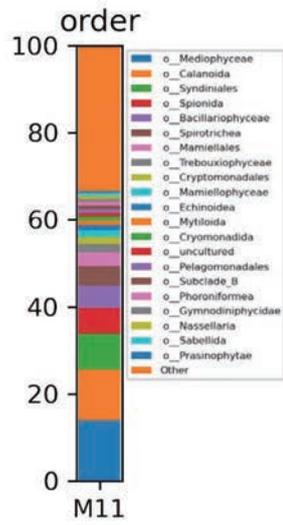
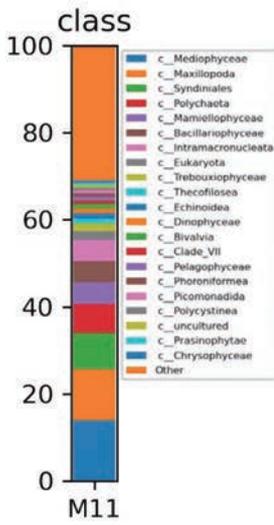
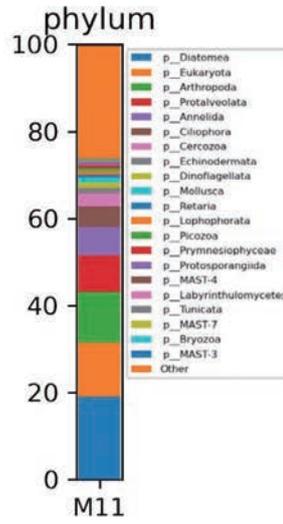
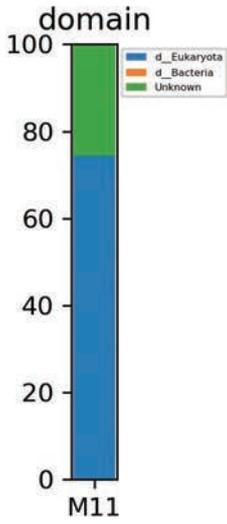


M9

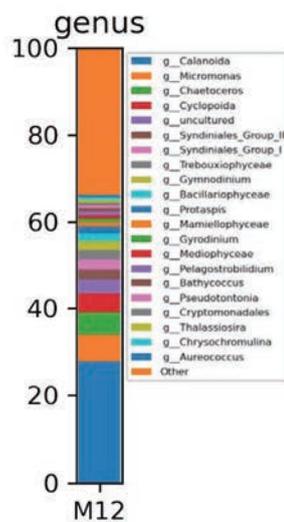
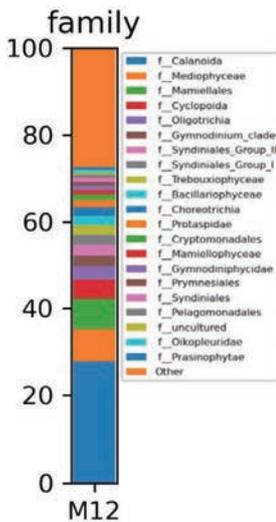
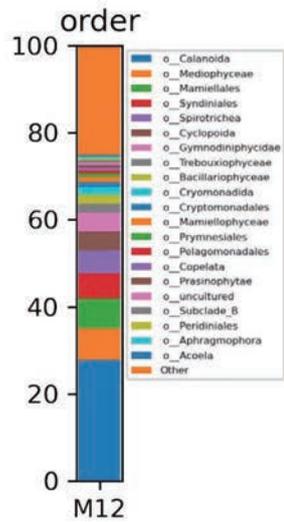
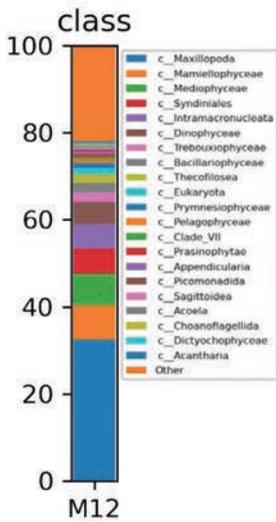
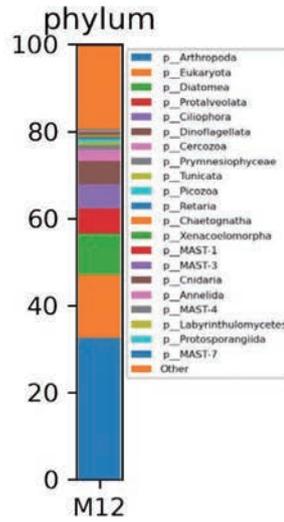
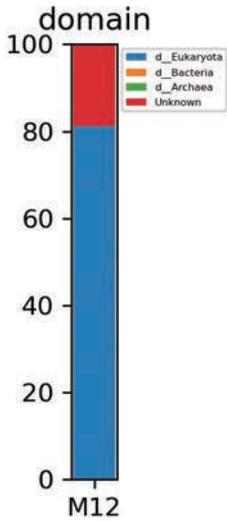


M10

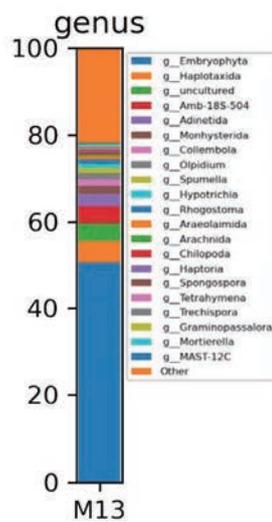
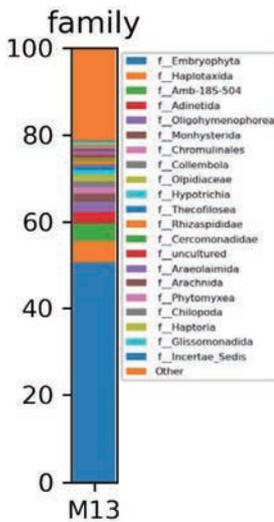
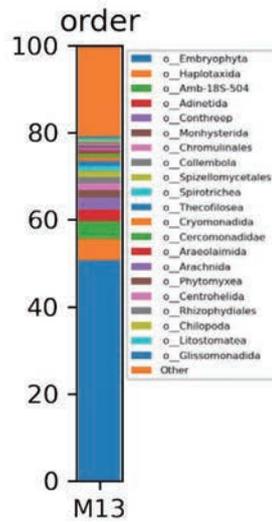
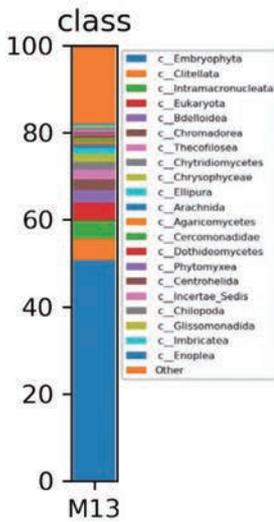
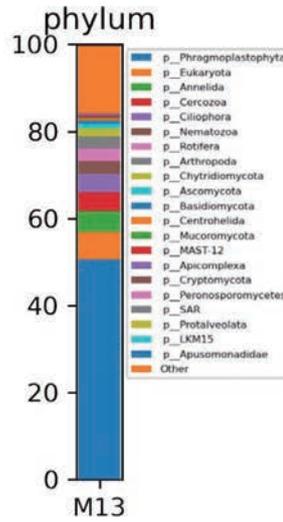
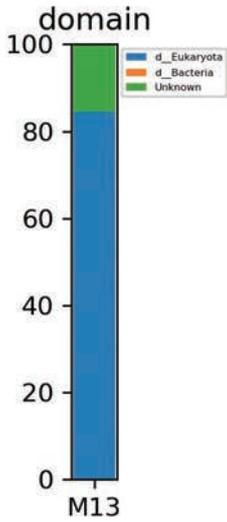




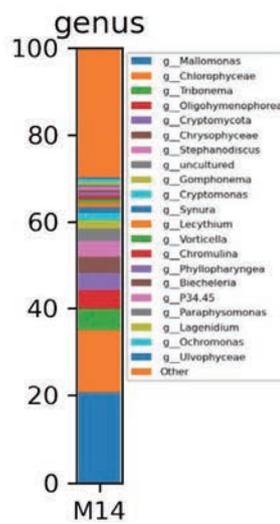
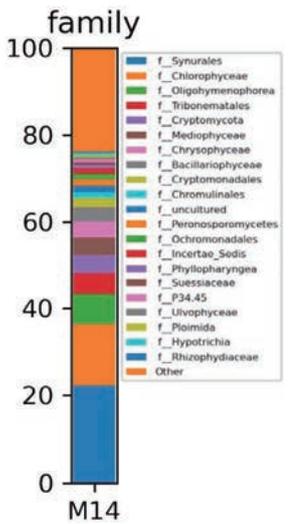
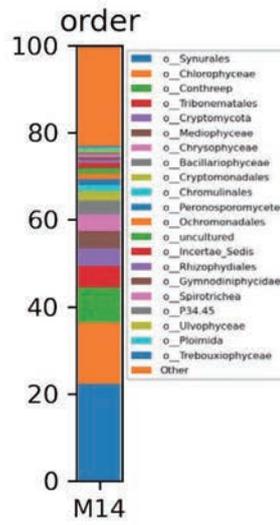
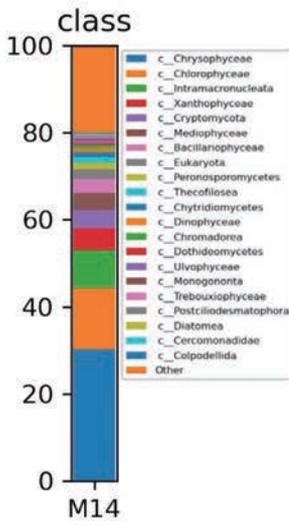
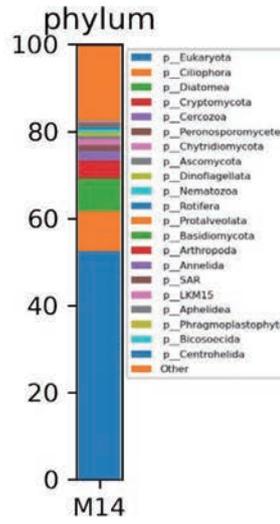
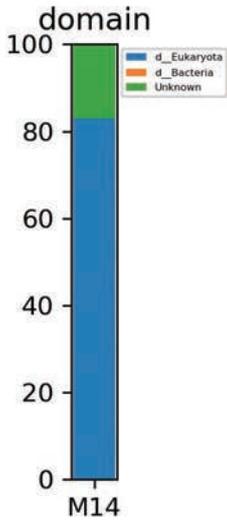
M12



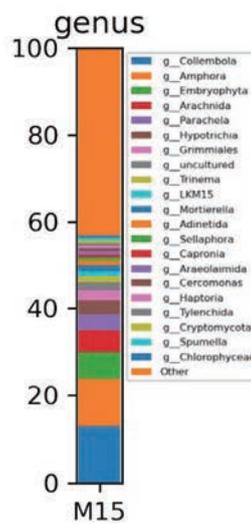
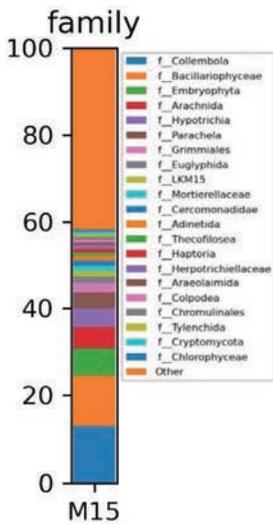
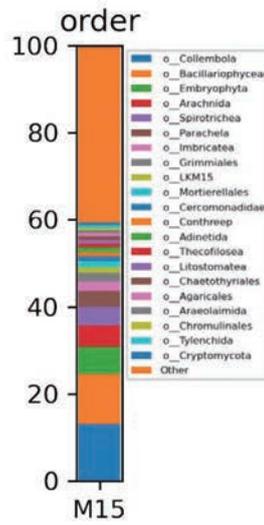
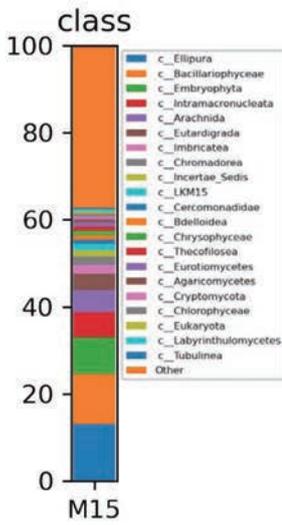
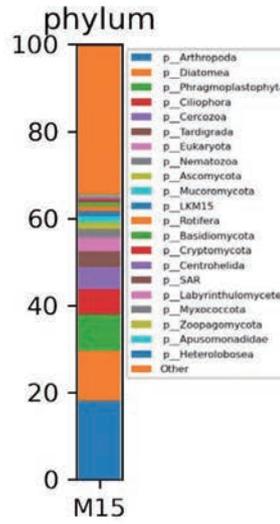
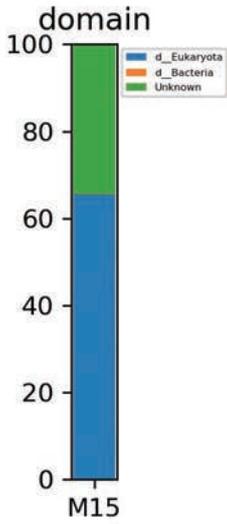
M13



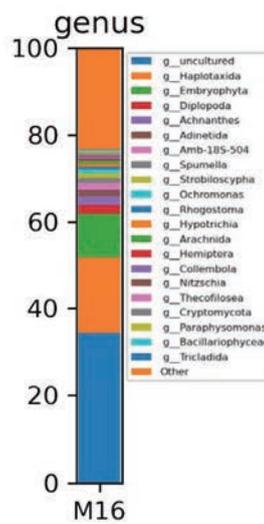
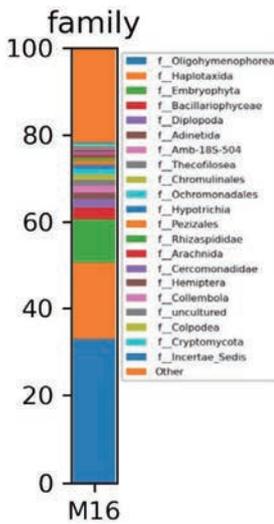
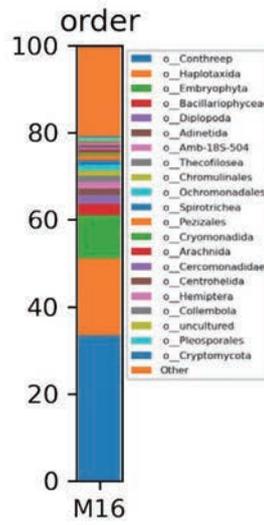
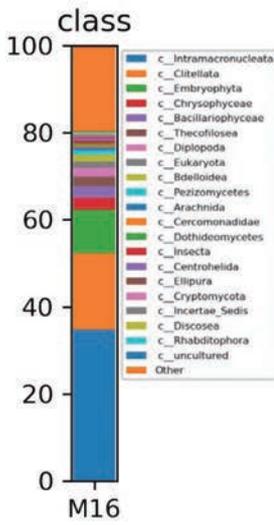
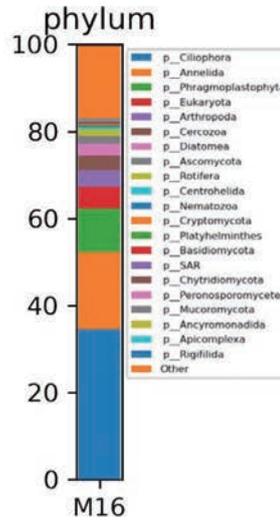
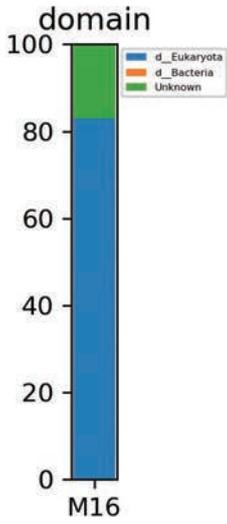
M14



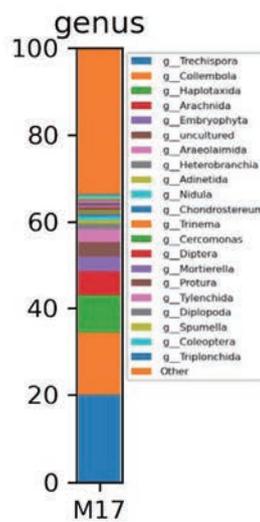
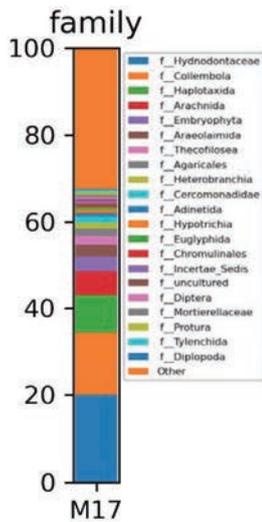
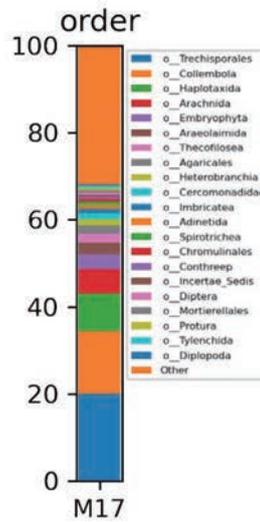
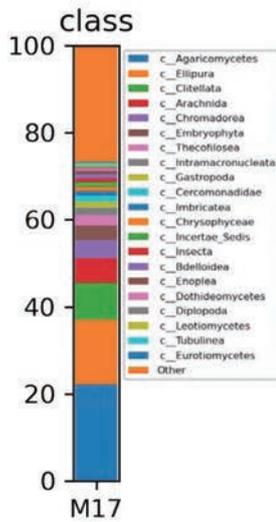
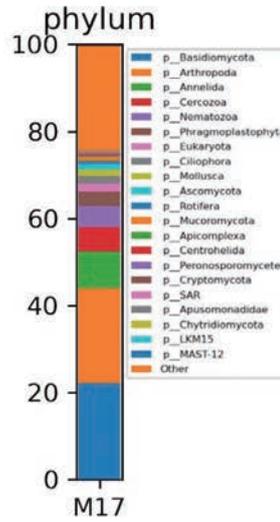
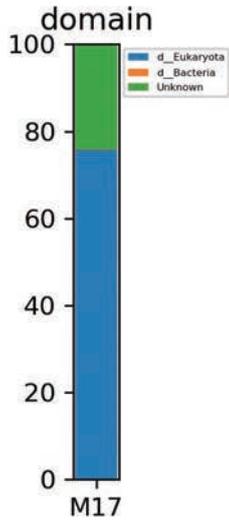
M15



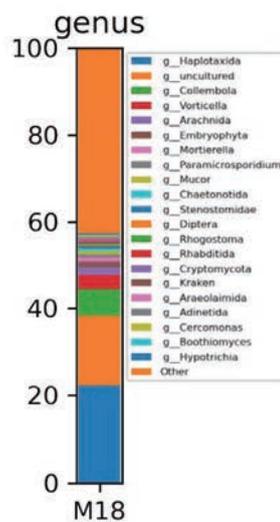
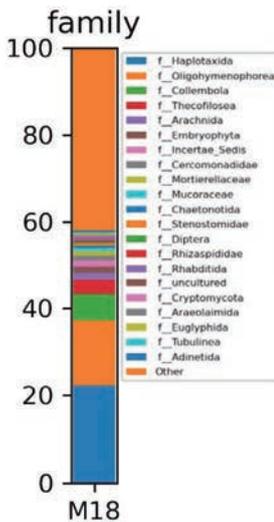
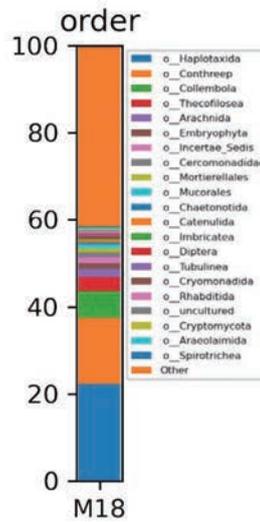
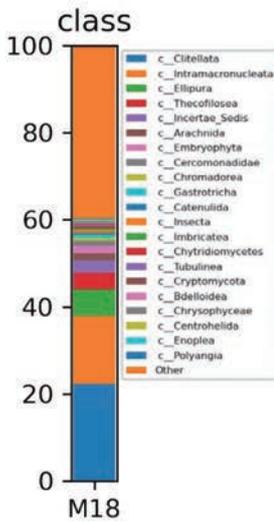
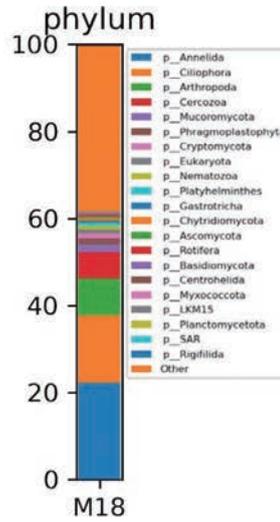
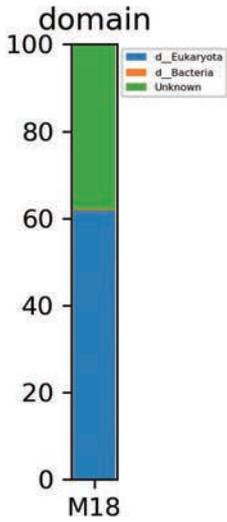
M16



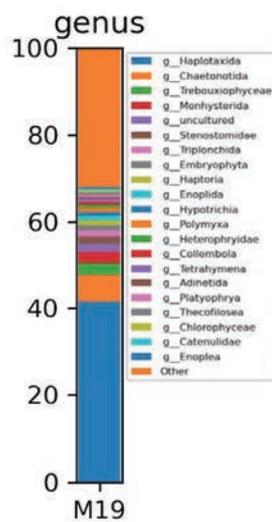
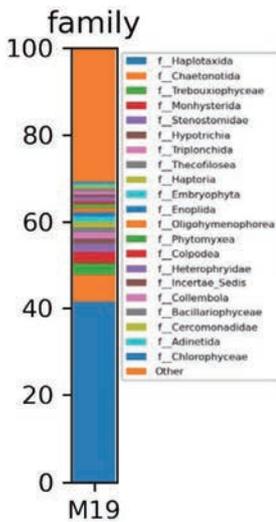
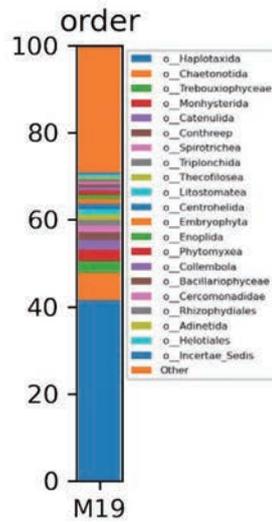
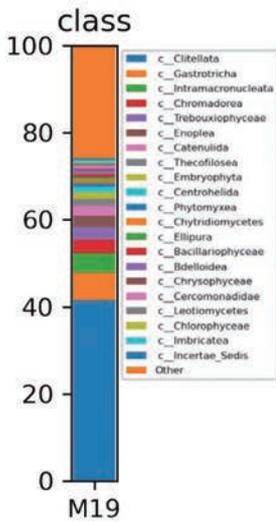
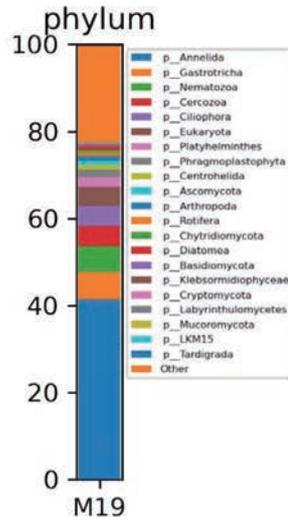
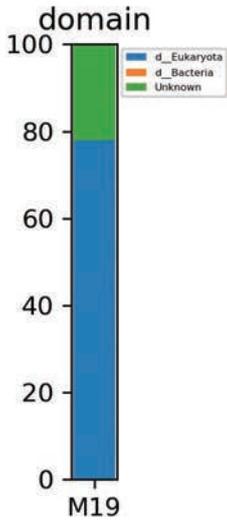
M17



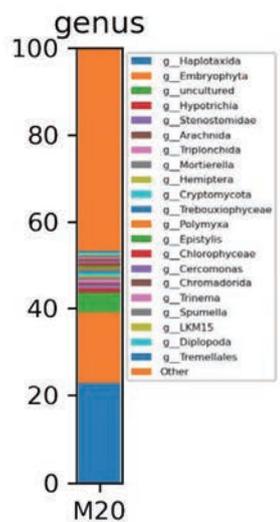
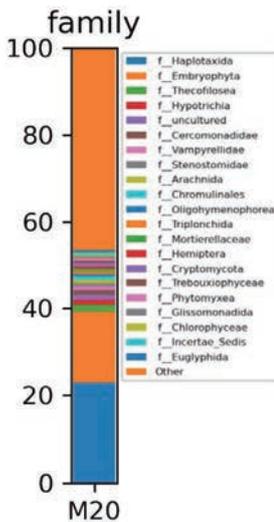
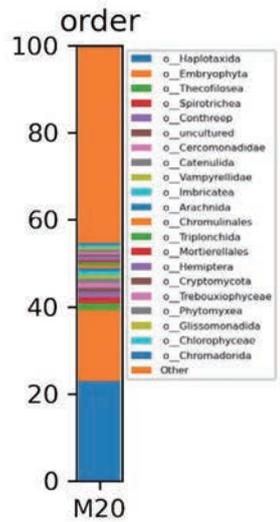
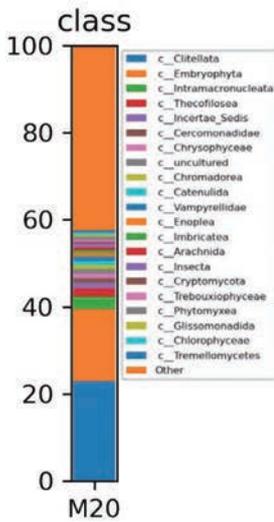
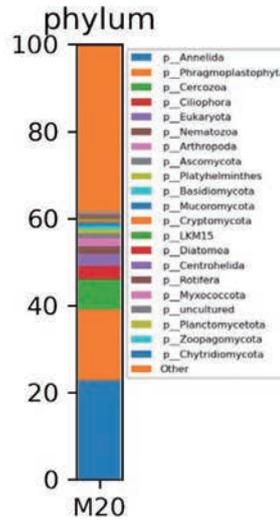
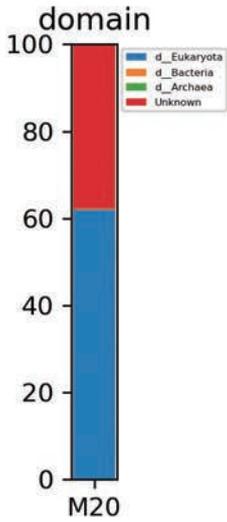
M18



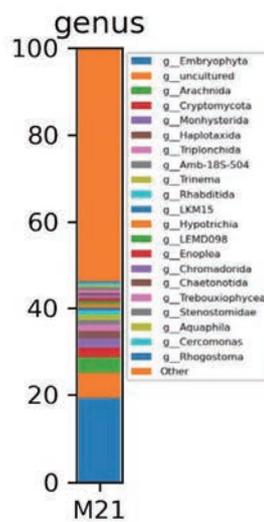
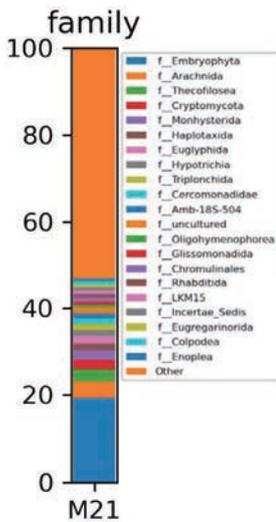
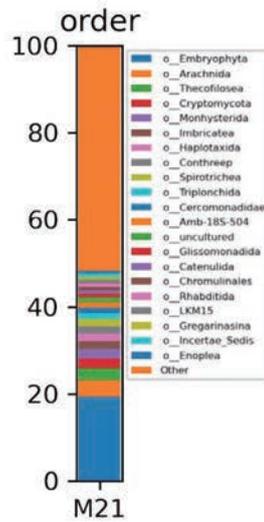
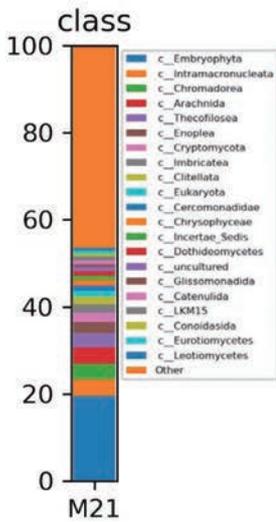
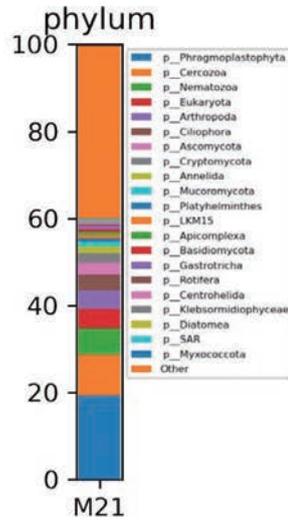
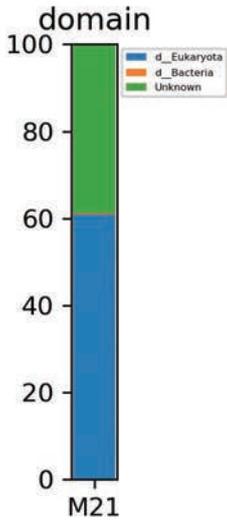
M19



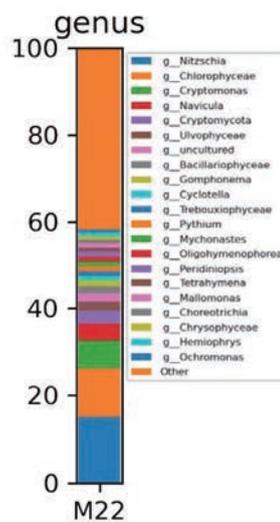
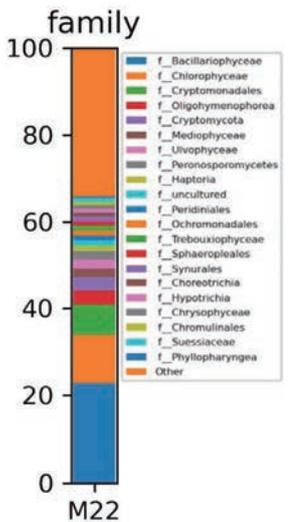
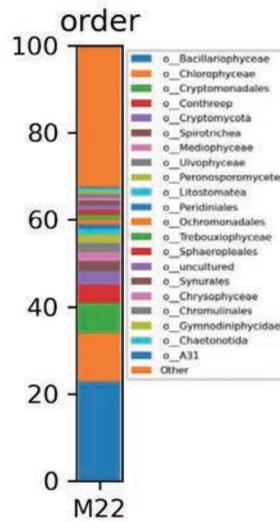
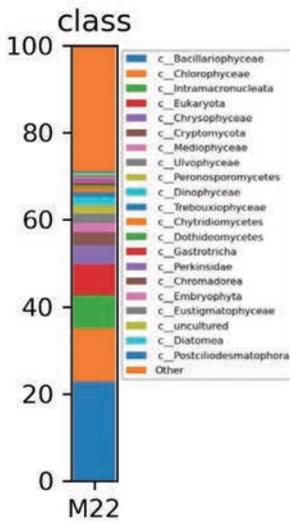
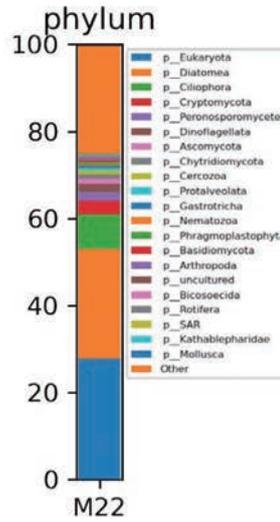
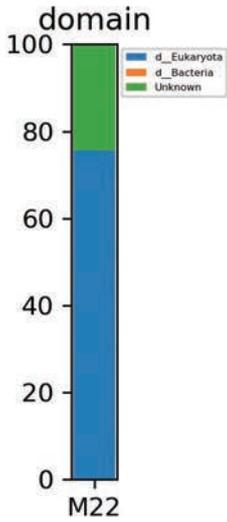
M20



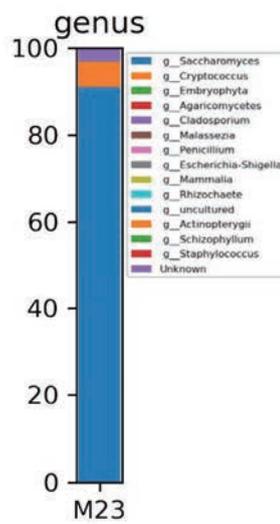
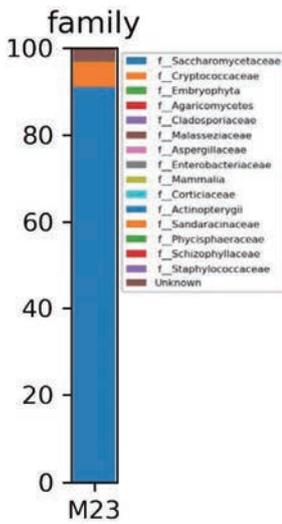
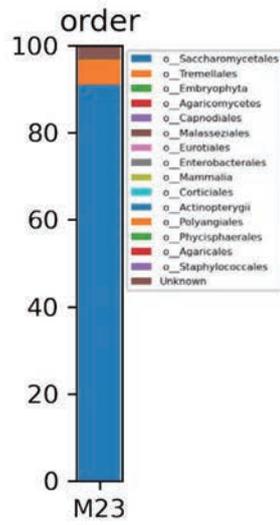
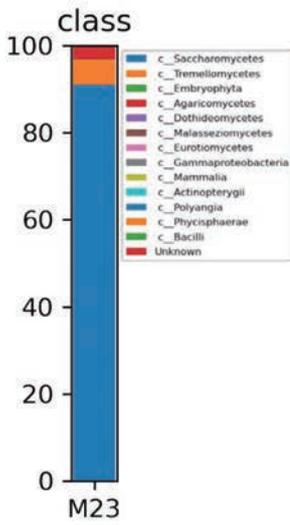
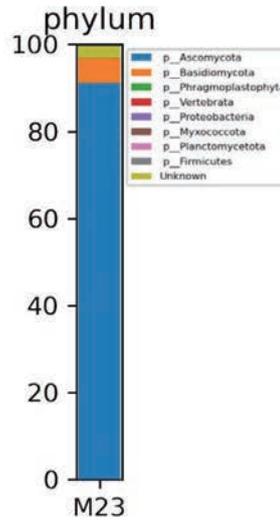
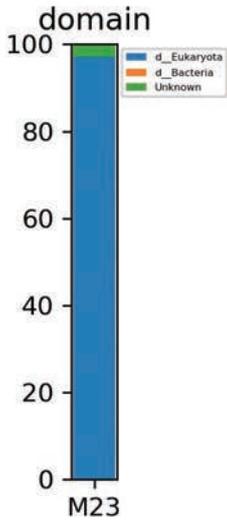
M21



M22



M23



This is a blank page.

