JAEA-Review
2023-031
DOI:10.11484/jaea-review-2023-031

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（委託研究）

－令和４年度　英知を結集した原子力科学技術・人材育成推進事業－

Development of Genetic and Electrochemical Diagnosis and Inhibition Technologies for Invisible Corrosion Caused by Microorganisms (Contract Research)
– FY2022 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
物質・材料研究機構

Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science,
Fukushima Research Institute, Sector of Fukushima Research and Development
National Institute for Materials Science

January 2024
Japan Atomic Energy Agency　日本原子力研究開発機構

JAEA-Review

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
〒 319-1112　茨城県那珂郡東海村大字村松 4 番地 49
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.
4-49 Muramatsu, Tokai-mura, Naka-gun, Ibaraki-ken 319-1112, Japan
E-mail: ird-support@jaea.go.jp

© Japan Atomic Energy Agency, 2024

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
（委託研究）
－令和 4 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

物質・材料研究機構

（2023 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 4 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、令和 2 年度に採択された研究課題のうち、「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」の令和 2 年度から令和 4 年度分の研究成果について取りまとめたものである。

本研究では、微生物が関与して誘起・加速する金属材料の腐食（微生物鉄腐食）に関して、加速検査試験片、オンサイト遺伝子検査などの革新的な診断技術を開発、1F で想定される微生物腐食の発生・進行条件の洗い出しを行い、水質や環境コントロールによって微生物腐食を防ぐ方法を提案することを目的とした。具体的な研究成果として、微生物腐食反応の加速技術を材料と細菌集積の 2 つの方向から実現し、採水によるオンサイト加速試験の要素技術開発を行なった。さらに、局所的に激しい腐食を行う細菌の単離に成功し、新しい微生物腐食の抑止技術へと繋がる成果が得られた。さらに、これらの成果の大部分は、春に博士課程に進学した 2 人の修士課程の学生によって達成されたもので有り、高い学際性を持つリーダー人材の育成に貢献した。

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、物質・材料研究機構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

JAEA-Review 2023-031

Development of Genetic and Electrochemical Diagnosis and Inhibition Technologies for Invisible Corrosion Caused by Microorganisms
(Contract Research)
－ FY2022 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

National Institute for Materials Science

(Received October 13, 2023)

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 FY2022.

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 FY2020, this report summarizes the research results of the "Development of genetic and electrochemical diagnosis and inhibition technologies for invisible corrosion caused by microorganisms" conducted from FY2020 to FY2022.

The present study aims to develop innovative diagnostic techniques such as accelerated test specimens and on-site genetic testing for microbially induced and accelerated corrosion of metallic materials (microbially influenced corrosion, MIC), and to identify the conditions that promote MIC at 1F for proposing methods to prevent MIC through water quality and environmental control.

Keywords: Microbially Influenced Corrosion, Iron Alloy, Extracellular Electron Transport, Sulfate-reducing Bacteria, On-site Diagnostic Technique

This work was performed by National Institute for Materials Science 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
5. 令和 3 年度 採択課題 10
6. 令和 4 年度 採択課題 12

付録　成果報告書 15

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
5. Accepted Proposal in FY2021 10
6. Accepted Proposal in FY2022 12

Appendix Result Report 15

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	山﨑 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	渡邉 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 (～R2.3.31) 大曲 新矢 (R2.4.1～)	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 号機ペデスタル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	渡邉 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 (～R3.6.30) 塚原 剛彦 (R3.7.1～)	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 (～R3.3.31) 岡山大学 (R3.4.1～)

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	淺間 一	東京大学
化学計測技術とインフォマティッ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 (～R2.3.31) 竹下 健二 (～R3.6.30) 塚原 剛彦 (R3.7.1～)	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 (～R4.7.31) 村上 健太 (R4.8.1～)	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	渡邉 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

5. 令和 3 年度 採択課題

令和 3 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 3 年 3 月 16 日～令和 3 年 5 月 17 日（課題解決型）
令和 3 年 4 月 13 日～令和 3 年 7 月 1 日（国際協力型 日英共同研究）
令和 3 年 7 月 12 日～令和 3 年 8 月 18 日（国際協力型 日露共同研究）

課題数：12 課題
課題解決型廃炉研究プログラム　8 課題
国際協力型廃炉研究プログラム　2 課題（日英）、2 課題（日露）

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・日露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）会議及びステアリングコミッティでの審議を経て、採択課題を決定した。

令和 3 年度 採択課題一覧

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
建屋応答モニタリングと損傷イメージング技術を活用したハイブリッド型の原子炉建屋長期健全性評価法の開発研究	前田 匡樹	東北大学
燃料デブリ周辺物質の分析結果に基づく模擬デブリの合成による実機デブリ形成メカニズムの解明と事故進展解析結果の検証によるデブリ特性データーベースの高度化	宇埜 正美	福井大学
ジオポリマー等による PCV 下部の止水・補修及び安定化に関する研究	鈴木 俊一	東京大学
世界初の同位体分析装置による少量燃料デブリの性状把握分析手法の確立	坂本 哲夫	工学院大学
アルファ微粒子の実測に向けた単一微粒子質量分析法の高度化	豊嶋 厚史	大阪大学

課題名	研究代表者	所属機関
連携計測による線源探査ロボットシステムの開発研究	人見 啓太朗	東北大学
中赤外レーザー分光によるトリチウム水連続モニタリング手法の開発	安原 亮	自然科学研究機構
福島原子力発電所事故由来の難固定核種の新規ハイブリッド固化への挑戦と合理的な処分概念の構築・安全評価	中瀬 正彦	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
福島第一原子力発電所の廃止措置における放射性エアロゾル制御及び除染に関する研究	Erkan Nejdet (～R4.1.31) 三輪 修一郎 (R4.2.1～)	東京大学
燃料デブリ取り出しのための機械式マニピュレータのナビゲーションおよび制御	淺間　一	東京大学

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
福島第一発電所 2、3 号機の事故進展シナリオに基づく FP・デブリ挙動の不確かさ低減と炉内汚染状況・デブリ性状の把握	小林 能直	東京工業大学
非接触測定法を用いた燃料デブリ臨界解析技術の高度化	小原　徹	東京工業大学

6.　令和４年度 採択課題

令和４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４年３月１日～令和４年５月６日（課題解決型）
　　令和４年４月７日～令和４年６月 16 日（国際協力型 日英共同研究）

課題数：８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）

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・日露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）会議及びステアリングコミッティでの審議を経て、採択課題を決定した。

令和４年度 採択課題一覧

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
革新的アルファダスト撮像装置と高線量率場モニタの実用化とその応用	黒澤　俊介	東北大学
３次元線量拡散予測法の確立とγ線透過率差を利用した構造体内調査法の開発	谷森　達	京都大学
α汚染可視化ハンドフットクロスモニタの要素技術開発	樋口　幹雄	北海道大学
高放射線耐性の低照度用太陽電池を利用した放射線場マッピング観測システム開発	奥野　泰希	京都大学
障害物等による劣悪環境下でも通信可能なパッシブ無線通信方式の開発	新井　宏之	横浜国立大学

課題名	研究代表者	所属機関
無線 UWB とカメラ画像分析を組合せたリアルタイム 3D 位置測位・組込システムの開発・評価	松下 光次郎	岐阜大学

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
耐放射線プロセッサを用いた組み込みシステムの開発	渡邊　実	岡山大学
マイクロ・ナノテクノロジーを利用したアルファ微粒子の溶解・凝集分散に及ぼすナノ界面現象の探求	塚原　剛彦	東京工業大学

本報告書は、以下の課題の令和 2 年度から令和 4 年度分の研究成果を取りまとめたものである。

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
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

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４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

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

（契約番号　R04I017）

成果報告書

令和５年３月

国立研究開発法人物質・材料研究機構

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、国立研究開発法人物質・材料研究機構が実施した「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」の令和 2 年度から令和 4 年度分の研究成果を取りまとめたものである。

目次

概略 viii

1.　はじめに 1-1

2.　業務計画 2-1
2.1　全体計画 2-1
2.2　実施体制 2-2
2.3　令和 4 年度の成果の目標及び業務の実施方法 2-3
2.3.1　急速かつ局所的電気微生物腐食の診断と抑止技術の開発 2-3
2.3.2　バイオマーカー遺伝子の探索及びオンサイト診断技術の開発
（再委託先：JAMSTEC） 2-3
2.3.3　1F 設備において微生物腐食リスクが高まる環境条件のスクリーニング
（再委託先：電中研） 2-4
2.3.4　1F 周辺環境の微生物の特徴の把握及び微生物腐食挙動の評価
（連携先：JAEA） 2-4
2.3.5　研究推進 2-4

3.　実施内容及び成果 3-1
3.1　急速かつ局所的電気微生物腐食の診断と抑止技術の開発
（令和 2 年度～令和 4 年度） 3-1
3.1.1　電気腐食細菌の濃縮技術を利用した鍵酵素群（バイオマーカー）の特定
（令和 2 年度～令和 4 年度） 3-1
3.1.2　オンサイトで電気腐食機構の有無を検査する投げ込み試験片の開発
（令和 2 年度～令和 4 年度） 3-4
3.1.3　培養株を用いた微生物腐食機構速度の各条件での評価と抑制対策法の確立
（令和 2 年度～令和 4 年度） 3-8
3.1.4　まとめ 3-11
参考文献 3-12
3.2　バイオマーカー遺伝子の探索及びオンサイト診断技術の開発
（令和 2 年度～令和 4 年度） 3-13
3.2.1　鉄腐食性メタン生成菌を用いた培養試験（令和 2 年度～令和 3 年度） 3-13
3.2.2　好気環境でのステンレス鋼の微生物腐食試験（令和 2 年度～令和 3 年度） 3-13
3.2.3　環境試料を用いた培養試験（令和 2 年度～令和 4 年度） 3-13
3.2.4　環境試料及び培養物の微生物群集構造解析（令和 2 年度～令和 4 年度） 3-15
3.2.5　オンサイト診断技術に役立つバイオマーカー遺伝子の探索
（令和 3 年度～令和 4 年度） 3-19
3.2.6　オンサイトでの微生物リスク診断技術の検討（令和 4 年度） 3-23
3.2.7　まとめ 3-26
参考文献 3-27
3.3　1F 設備において微生物腐食リスクが高まる環境条件のスクリーニング
（令和 2 年度～令和 4 年度） 3-28

3.3.1　設備環境を想定した環境条件下での腐食試験（令和 2 年度～令和 3 年度）..... 3-28
3.3.2　微生物腐食の評価及び微生物腐食リスクの高まる環境条件のスクリーニング
（令和 3 年度～令和 4 年度）..... 3-28
3.3.3 各培養条件における腐食速度の整理及び微生物腐食リスクが高まる条件の推定.. 3-48
3.3.4 まとめ..... 3-48
参考文献 3-49
3.4　1F 周辺環境の微生物の特徴の把握及び微生物腐食挙動の評価
（令和 2 年度～令和 4 年度）..... 3-50
3.4.1　1F 周辺環境の微生物の特徴の把握（令和 2 年度～令和 4 年度）..... 3-50
3.4.2　微生物腐食挙動の評価（令和 2 年度～令和 4 年度）..... 3-57
3.4.3　まとめ 3-65
参考文献 3-65
3.5　研究推進 3-66

4.　結言 4-1

用語の説明 5-1

執筆者リスト

事業代表者
国立研究開発法人物質・材料研究機構　高分子・バイオ材料研究センター
グループリーダー　岡本 章玄

再委託先
国立研究開発法人海洋研究開発機構　超先鋭研究開発部門
主任研究員　若井　暁

再委託先
一般財団法人電力中央研究所　サステナブルシステム研究本部
生物・環境化学研究部門　上席研究員　平野　伸一

連携先
国立研究開発法人日本原子力研究開発機構　福島研究開発部門
廃炉環境国際共同研究センター
放射性物質マネジメントディビジョン　材料・放射線研究グループ
グループリーダー　上野　文義
研究員　大谷　恭平

燃料デブリ研究ディビジョン　燃料デブリ取扱技術開発グループ
研究主幹　池田　篤史
研究副主幹　北垣　徹
研究員　土津田　雄馬

表一覧

表 3.2.3-1　4 種培養物のメタゲノム解析結果 .. 3-20
表 3.2.3-2　アノテーションされたマルチヘムタンパク質 .. 3-21
表 3.2.3-3　マルチヘムタンパク質のお互いの相同性（アミノ酸配列ベース） .. 3-21
表 3.2.3-4　トランスクリプトーム解析で検出された高発現遺伝子（トップ 10） .. 3-22
表 3.2.3-5　細胞外電子伝達に重要な遺伝子の発現レベル .. 3-22
表 3.2.4-1　ナノポアシーケンス結果 .. 3-25
表 3.3.2-1　原子炉建屋内を想定した培養条件 .. 3-29
表 3.3.2-2　高い微生物腐食活性が見られた培養条件 .. 3-48
表 3.4.1-1　脱窒菌（1 株目）の相同性検索結果 .. 3-55
表 3.4.1-2　脱窒菌（2 株目）の相同性検索結果 .. 3-56

図一覧

図 2.1-1	年度別全体計画	..	2-1
図 2.2-1	実施体制図	..	2-2
図 3.1.1-1	開発した磁気ナノ粒子（A）による電気細菌の濃縮方法（B）	..	3-1
図 3.1.1-2	透過型電子顕微鏡（TEM）で捉えた開発した磁気ナノ粒子と電気細菌の相互作用	..	3-2
図 3.1.1-3	開発した磁気ナノ粒子による電気細菌の濃縮前後と電気培養後の微生物群集構造	..	3-2
図 3.1.1-4	開発した磁気ナノ粒子による電気細菌の濃縮後にメタゲノム解析を行い、腐食バイオマーカーを探索したパイプラインと特定した遺伝子群	..	3-3
図 3.1.1-5	開発した磁気ナノ粒子（MNPs）による電気細菌の濃縮処理有無での鉄粉腐食速度の比較	..	3-4
図 3.1.2-1	炭素鋼（CS）への PAN をコーティングする手順	..	3-5
図 3.1.2-2	CS コーティング剤の効果	..	3-5
図 3.1.2-3	PAN-Cu コーティング後の炭素鋼表面分析結果	..	3-6
図 3.1.2-4	PAN-Cu コーティング炭素鋼の腐食後の表面分析結果	..	3-7
図 3.1.3-1	単離した NTE-D12 株の電顕像（A）と近縁種との電流生成の比較（B）	..	3-8
図 3.1.3-2	90 日培養後のボトル外観（a）IC-1 株培養　（b）非植菌区（negative control）	..	3-10
図 3.1.3-3	90 日培養後の重量減少	..	3-10
図 3.1.3-4	磁気特性試験	..	3-11
図 3.2.1-1	各培地で培養した時の腐食加速度	..	3-13
図 3.2.1-2	高温（50℃及び 70℃）での腐食試験	..	3-14
図 3.2.1-3	SUS316 電極試験片を用いた電位モニタリング培養	..	3-15
図 3.2.2-1	各培養物の微生物群集構造（門レベル）	..	3-16
図 3.2.2-2	環境サンプル微生物群集の α 多様性指数	..	3-17
図 3.2.2-3	環境試料及び培養物の β 多様性解析	..	3-18
図 3.2.2-4	環境試料の門レベルでの微生物群集構造	..	3-19
図 3.2.2-5	環境試料の属レベルでの微生物群集構造	..	3-19
図 3.2.4-1	環境試料から簡便に DNA を回収する方法	..	3-24
図 3.2.4-2	簡便法で回収した DNA 量の比較	..	3-24
図 3.2.4-3	ナノポアシーケンスの鎖長とクオリティの分布	..	3-26
図 3.3.2-1	pH 6.5 での腐食試験結果（a）重量減損量、(b）ガス組成	..	3-31
図 3.3.2-2	pH 7.0 での腐食試験結果（a）重量減損量、(b）ガス組成	..	3-32
図 3.3.2-3	培養条件に依る微生物による腐食促進活性の違い（a）T01 株、(b）T02 株	..	3-33
図 3.3.2-4	pH 7.5 での腐食試験結果（a）重量減損量、(b）ガス組成	..	3-33
図 3.3.2-5	T01 株培養後の炭素鋼腐食試験片（腐食生成物除去後）	..	3-35
図 3.3.2-6	T02 株培養後の炭素鋼腐食試験片（腐食生成物除去後）	..	3-36
図 3.3.2-7	炭素鋼試験片の表面計測（T02 株、pH 6.5、NaCl 20 mg/L）	..	3-37

図 3.3.2-8	炭素鋼試験片の表面計測（T02 株、pH 6.5、NaCl 20 mg/L）	..	3-37
図 3.3.2-9	炭素鋼試験片の表面計測（T02 株、pH 6.5、NaCl 10,000 mg/L）	...	3-38
図 3.3.2-10	T01 株による炭素鋼腐食の pH 依存性（a）重量減損量、(b）ガス組成	...	3-39
図 3.3.2-11	T02 株による炭素鋼腐食の pH 依存性（a）重量減損量、(b）ガス組成、(c）硫酸イオン濃度	...	3-40
図 3.3.2-12	非植菌区の試験後の炭素鋼表面（腐食生成物除去後）	...	3-41
図 3.3.2-13	T02 株腐食試験後の炭素鋼表面（腐食生成物除去後）	...	3-41
図 3.3.2-14	炭素鋼試験片の表面計測（pH 8.0、T02 株）	...	3-42
図 3.3.2-15	炭素鋼試験片の表面計測（pH 8.5、T02 株）	...	3-42
図 3.3.2-16	塗装炭素鋼試験片の試験後（a）T02 株試験区腐食生成物除去前、(b）T02 株試験区腐食生成物除去後、(c）非植菌区剥ぎ取り後、(d）T01 株試験区剥ぎ取り後、(e）T02 株試験区剥ぎ取り後	...	3-43
図 3.3.2-17	硝酸イオン存在下での炭素鋼腐食試験（a）炭素鋼重量減損量、(b）硝酸イオン濃度	...	3-44
図 3.3.2-18	T02 株による炭素鋼腐食の経時変化（a）炭素鋼重量減損量、(b）各試験期間後の炭素鋼試験片	...	3-45
図 3.3.2-19	T02 株による炭素鋼腐食の経時的な電位測定（a）電気化学セル、(b）非植菌区、(c）T02 株植菌区（繰り返し数 n=2)、(d)（c）赤点線枠内の拡大図	...	3-46
図 3.3.2-20	T02 株による炭素鋼腐食反応	...	3-46
図 3.3.2-21	T02 株の電極からの電子獲得（a）電流値変化、(b）電極上の SEM 観察像	...	3-47
図 3.4.1-1	富岡町内での環境サンプリング場所	...	3-50
図 3.4.1-2	環境サンプリング場所の写真	...	3-51
図 3.4.1-3	培養したサンプルの外観（28 日間培養）	...	3-51
図 3.4.1-4	いわき市常磐湯本温泉でのサンプリング状況の写真	...	3-52
図 3.4.1-5	大熊町坂下ダムでのサンプリング状況の写真	...	3-53
図 3.4.1-6	脱窒菌の培養の様子	...	3-54
図 3.4.2-1	試料調製装置	...	3-58
図 3.4.2-2	腐食影響の観察・分析・測定装置	...	3-59
図 3.4.2-3	硫酸還元菌による鉄腐食片表面の 2 次電子像	...	3-60
図 3.4.2-4	原子間力顕微鏡によるナノレベルの凹凸の観察	...	3-60
図 3.4.2-5	浸漬腐食試験中の試料外観	...	3-61
図 3.4.2-6	真空含浸装置	...	3-61
図 3.4.2-7	試料断面 FE-SEM 写真	...	3-62
図 3.4.2-8	切断後試料の断面観察結果	...	3-63
図 3.4.2-9	イオンミリング切断後試料の蛍光顕微鏡観察結果（NIMS にて実施）	...	3-64
図 3.4.2-10	機械切断及び機械研磨後試料の顕微鏡観察結果（NIMS にて実施）	..	3-64

略語一覧

AFM	Atomic Force Microscope	原子間力顕微鏡
CLADS	Collaborative Laboratories for Advanced Decommissioning Science	廃炉環境国際共同研究センター
電中研		一般財団法人 電力中央研究所
DDBJ	DNA Data Bank of Japan	日本 DNA データバンク
DFAST	DDBJ Fast Annotation and Submission Tool	DDBJ が提供するゲノムアノテーション及び登録ツール
EDS	Energy Dispersive X-ray Spectroscopy	エネルギー分散形 X 線分光器
JAEA	Japan Atomic Energy Agency	国立研究開発法人日本原子力研究開発機構
JAMSTEC	Japan Agency for Marine-Earth Science and Technology	国立研究開発法人海洋研究開発機構
OTU	Operational Taxonomic Unit	操作上分類単位
PCoA	Principal Coordinate Analysis	主座標分析
3D	Three Dimension	三次元
1F		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
東電		東京電力ホールディングス株式会社
SPB	Sodium Phosphate Buffer	リン酸緩衝液

概略

微生物が関与して誘起・加速する金属材料の腐食（微生物鉄腐食）は暗所や視認不可な場所で最大数十 mm / 年で進行し、突発的な石油パイプラインの破損を引き起こすなど、甚大な事故の原因となっている。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、「1F」という。）のストロンチウム処理水タンクにおいても、2018 年 10 月に環境中から混入した細菌に由来する硫化水素の発生が確認されたことから、健全性崩壊の新たなリスクとして懸念される。しかし、世界的にも微生物腐食のリスクは未だ定量されておらず、これを制御する技術は確立していない。

本研究では、我々が明らかにした腐食反応に重要な役割を演じる鍵酵素や腐食機構の新知見に基づき、加速検査試験片、オンサイト遺伝子検査などの革新的な診断技術を開発する。さらに、1F で想定される微生物腐食の発生・進行条件の洗い出しを行い、水質や環境コントロールによって微生物腐食を防ぐ方法を提案する。また、材料・微生物・電気化学を基盤とした研究拠点を発展的に形成し、現場技術者が使用可能な技術の開発、さらには高い学際性を持つリーダー人材の育成を目指してきた。令和 4 年度までの成果から 1F と関連する環境サンプルから見られる微生物による腐食反応の加速する材料・技術に開発や抑制条件の解明に成功した。さらに、1F と関連する環境サンプルから初となる、局所的に激しい腐食を行う硫酸還元細菌を含む新規性の高い微生物を複数単離することに成功しており、学術的にも研究が大きく進展した。また、筑波大学の修士課程の学生 2 名がこれらの成果において大きな役割を果たし、博士課程においても同研究を継続する予定である。このように、本研究によって、1F 廃炉に資する基礎研究、人材育成が達成されたと言えるであろう。

令和 2 年度成果報告書：
JAEA-Review 2021-059
https://doi.org/10.11484/jaea-review-2021-059

令和 3 年度成果報告書：
JAEA-Review 2022-045
https://doi.org/10.11484/jaea-review-2022-045

1.　はじめに

1F には様々な水を取り扱う設備や構造があり、場所によっては高レベルの放射性物質を含んでいる。廃炉作業を進める上で、このような汚染水の漏洩はあってはならない事故であるが、金属腐食によって突発的に生じ得るインシデントの 1 つである。この設備の健全性の崩壊の引き金になるリスクは長期的な廃炉作業が終了するまで付きまとうため、構造健全性を確認・確保したいというニーズに繋がっている。しかし、現状のガイドラインの中では、これまで多くの化学プラントやエネルギープラントで漏洩事故等を引き起こしてきた微生物による腐食（微生物腐食）に対して明記されていないのが現状である。

腐食の中でも最も診断やコントロールが難しい微生物腐食は、一度発生すると数十 ㎜ / 年といった急激な速度で局所的に鉄材料を腐食する事例がある。例えば、日常的に目視確認できない環境（石油パイプライン内部など）での微生物腐食は、これまで突発的かつ重大な事故を誘発した事例が多数報告されている。原子力関連設備においても例外ではなく、米国の原子力関連施設での微生物腐食が報告されており、1F においても地下水が流入している高放射線レベルの建屋内、汚染水や処理水を扱う設備、処理水の貯留タンクなど視認不可な環境に微生物が生息し、微生物腐食リスクがある。実際に、1F の処理水貯留タンクでの硫化水素発生も確認された。これは環境中の腐食微生物が集積されている確かな証拠であり、微生物腐食が建屋内で現実的な問題になりうることを明確に示している。しかしながら、1F においてのリスク評価、微生物腐食を低減させる有効な防止対策は共にその重要性すら認識されていない。

実は、原子力関連施設に限らず、現状の微生物腐食に対する知見の乏しさが、世界的な対応の遅れの本質的な原因である。一方で、近年、微生物が鉄表面から直接電子を引き抜いて能動的に腐食を促進する機構が明らかになった。この「電気腐食」は、古典的な生物由来硫化水素による受動的な腐食では説明できなかった局所的かつ急速な腐食を説明可能であるとして世界中で研究が進められている。我々は、世界に先駆けて電気腐食メカニズムを分子レベルで明らかにしており、得られている基礎的知見を用いて、現場での微生物腐食リスク予知・診断技術ならびに抑制技術を開発する。

これまで想定されてこなかった微生物を原因とする汚染水漏洩事故リスクの把握、1F 廃炉までの建屋及び汚染水貯蔵タンクの早急な健全性の評価は喫緊の課題であり、微生物腐食の防止による長期的視野での健全性を確保することが、漏洩事故等を回避しながら安全に廃炉を完了するために不可欠である。

上記のような背景から、本研究では、1F で想定される環境内での微生物腐食リスクを可視化し、環境コントロールにより微生物腐食リスクを低減させることで、汚染水漏洩をもたらす微生物による視認不可腐食のリスク診断ならびに抑制技術の開発を目指す。

達成目標：構造及び設備の健全性の確認と確保のために、本研究では 3 つの目標を立てる。

(1)　これまで想定されてこなかった汚染水漏洩事故リスクの把握

(2)　オンサイトで使用可能な腐食リスクを可視化する技術の確立

(3)　環境コントロールによる微生物腐食防止方法の確立

廃炉に向けて建屋及び構造物の健全性の確認と確保は、汚染物質の漏洩を防ぐために必須の要件である。加えて、東日本大震災以降増え続けている処理水については、近年その処分方法にも注目が集まっており、このような社会的注視の中でタンクからの腐食による漏洩は、廃炉プロセスの大きな弊害となり、絶対に防がなければならない事象の 1 つである。

2.　業務計画

2.1　全体計画

年度別全体計画を図 2.1-1 に示す。

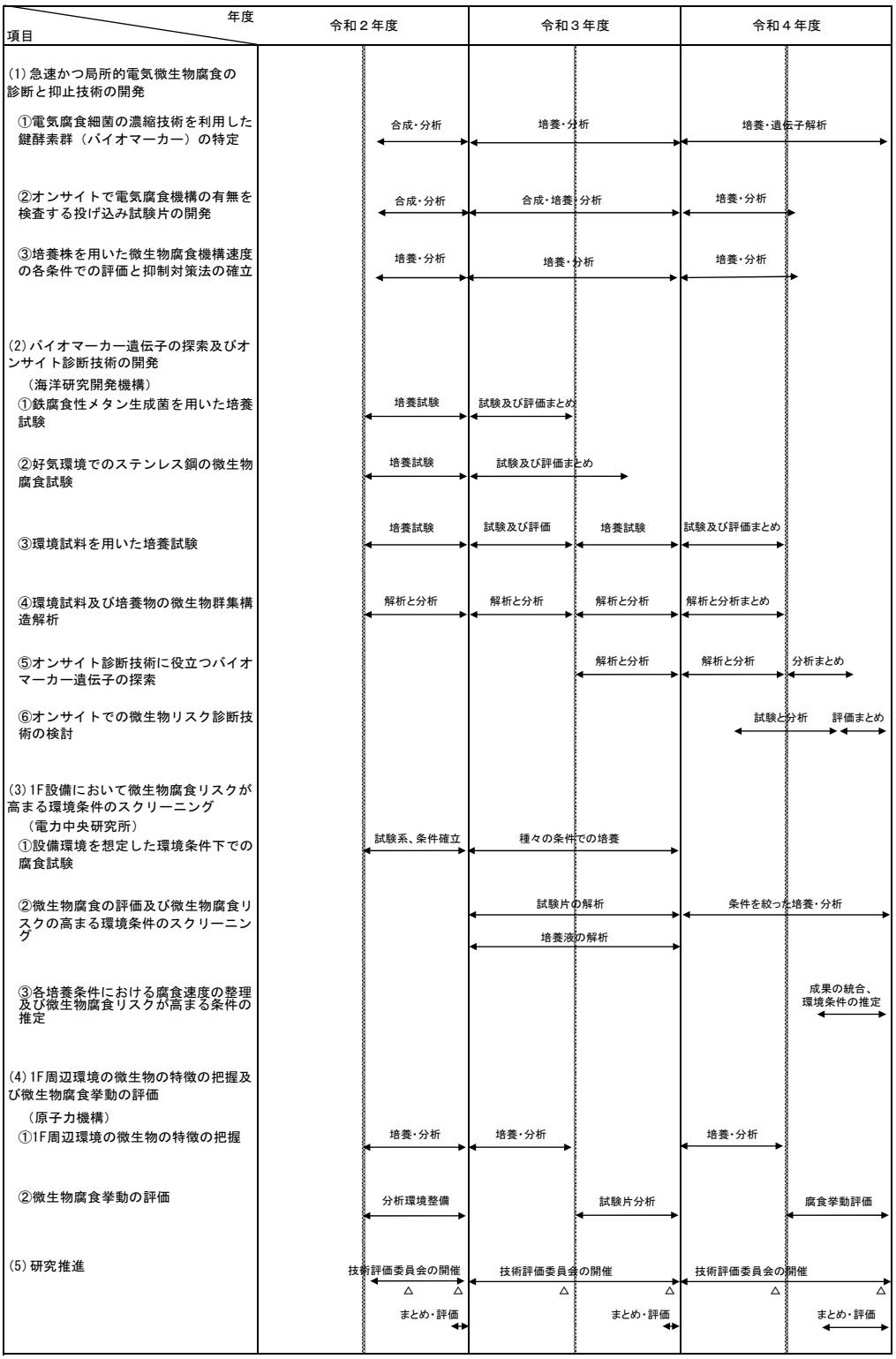


図 2.1-1　年度別全体計画

2.2　実施体制

実施体制を図 2.2-1 に示す。

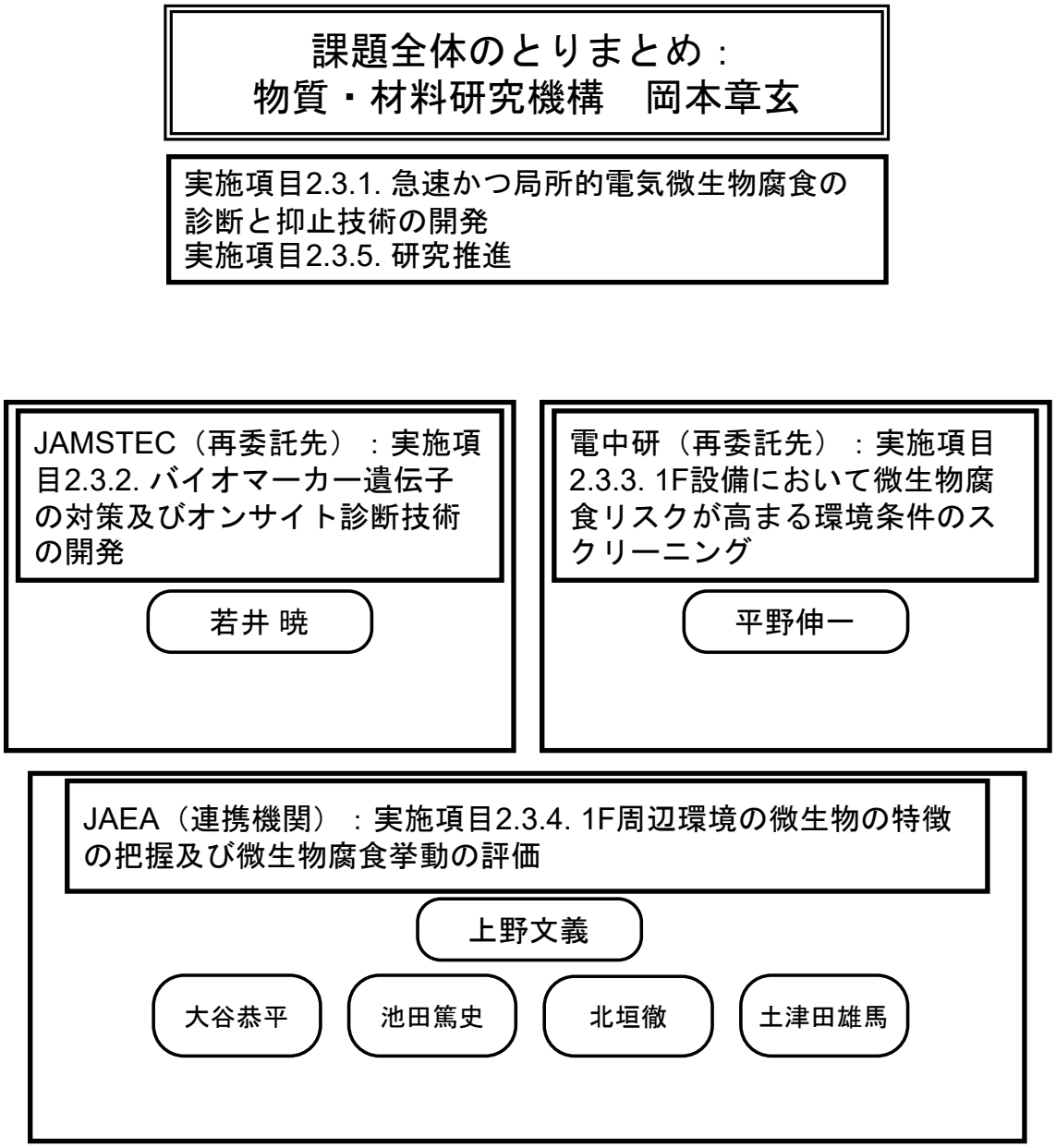


図 2.2-1　実施体制図

2.3　令和 4 年度の成果の目標及び業務の実施方法

2.3.1　急速かつ局所的電気微生物腐食の診断と抑止技術の開発

(1)　電気腐食細菌の濃縮技術を利用した鍵酵素群（バイオマーカー）の特定

令和 3 年度に引き続き、1F 周辺環境水を用いて鉄腐食実験及び電気腐食細菌濃縮を実施し、さらに得られたサンプルに対してメタゲノム解析を行い、電気腐食が進行するサンプルにおいてバイオマーカーとなるような膜酵素群遺伝子を探索する。実際に環境サンプルからバイオマーカー遺伝子が検出されるか検証を行う。

(2)　オンサイトで電気腐食機構の有無を検査する投げ込み試験片の開発

令和 3 年度に引き続き、電気腐食の速度を加速する材料の開発を行い、それぞれの材料について、腐食の速度を重量変化によって比較する。令和 3 年度までの検討において、合金では期待したほどの腐食促進効果が得られなかったため、今年度は合金以外の腐食の加速方法を検討する。

(3)　培養株を用いた微生物腐食機構速度の各条件での評価と抑制対策法の確立

令和 3 年度までの検討から、うまく腐食が進んだ条件を参考に腐食細菌を単離する実験を行い、高い腐食活性を持つ単離細菌の活性を抑える pH 範囲や 試薬条件を探索する。

2.3.2　バイオマーカー遺伝子の探索及びオンサイト診断技術の開発

（再委託先： 国立研究開発法人海洋研究開発機構（以下、「JAMSTEC」という。）

(1)　環境試料を用いた培養試験

令和 3 年度に引き続き、1F 周辺の環境サンプル（河川水や土壌）を用いて、ラボベースでの腐食再現実験を実施する。腐食再現試験には、既に多くの腐食性微生物の培養方法として確立されている嫌気培養を実施するとともに、好気的な環境での電位モニタリング培養を実施する。嫌気条件での腐食特性の解析は、溶出金属イオン濃度の分析や気相のガス分析により行い、好気条件での腐食性は電位の挙動から判断する。

(2)　環境試料及び培養物の微生物群集構造解析

令和 3 年度に引き続き、培養実験に使用するサンプルから DNA を抽出し、どのような微生物が存在しているのか、次世代シーケンス解析を用いてその微生物群集構造を網羅的に明らかにする。また、培養後の微生物群集構造についても、随時解析を実施し、腐食能と微生物群集構造の相関についてまとめる。

(3)　オンサイト診断技術に役立つバイオマーカー遺伝子の探索

実施項目（1）の培養物に対してメタゲノム及びメタトランスクリプトーム解析を実施し、金属腐食性を示す培養物における腐食遺伝子類似配列の探索と、腐食性培養物とそうでない培養物の比較解析から、腐食サンプルで高い発現を示す新規な腐食遺伝子を探索する。

(4)　オンサイトでの微生物リスク診断技術の検討

1F 周辺の環境サンプル（河川水や土壌）や実施項目(3)の培養物を用いて、簡便に DNA を抽出する方法（高速遠心分離や PCR などの特殊な装置を使用しない方法）を検討する。DNA 抽出後に、ナノポアシーケンサ（第三世代シーケンサ）を用いてメタゲノム解析を実施し、環境微生物由来の DNA 情報の取得を行う。同時に、従来の方法でも DNA を抽出し、同様にメタゲノム解析を実施することで、簡便法の抽出効率や回収 DNA 品質の

評価を行う。また、得られたメタゲノム情報から実施項目（3）や既知の腐食性微生物由来遺伝子情報の探索を行う。

2.3.3　1F 設備において微生物腐食リスクが高まる環境条件のスクリーニング
（再委託先：一般財団法人電力中央研究所（以下、「電中研」という。）

（1）　微生物腐食の評価及び微生物腐食リスクの高まる環境条件のスクリーニング

令和 3 年度に得られた成果をもとに、微生物腐食リスクが高まる条件近傍に焦点を絞り込み、細かく条件を設定した腐食試験を実施する。それにより、微生物腐食が高まる環境条件（閾値）を明確化するための情報を取得する。また、特に腐食が顕著に促進される条件が見つかった場合には電気化学的な手法を適用し、腐食プロセスの詳細解析を行い、モニタリングのための指標を得ることを試みる。

（2）　各培養条件における腐食速度の整理及び微生物腐食リスクが高まる条件の推定

最終年度において、これまでの腐食試験で得られた成果及び他機関の成果を統合し、微生物腐食リスクが高まる環境条件について情報を整備し、設備点検・管理に利用可能な環境条件の提示を試みる。

2.3.4　1F 周辺環境の微生物の特徴の把握及び微生物腐食挙動の評価
（連携先： 国立研究開発法人日本原子力研究開発機構（以下、「JAEA」という。）

（1）　1F 周辺環境の微生物の特徴の把握

1F 周辺環境に生息する特徴的な微生物の中で材料腐食の観点から重要な微生物を同定するため、培養した微生物の種類を遺伝子レベルで分析する。遺伝子解析については、JAMSTEC 等で実施する。

（2）微生物腐食挙動の評価

材料表面における微生物腐食挙動及びその機構を評価するため、微生物腐食試験後の試験片の表面形状や局部腐食部位について、形状測定及び金属組織との関係などの特徴的な腐食挙動を調べ、微生物による腐食挙動を評価する。

2.3.5　研究推進

研究代表者の下で各研究項目間ならびに廃炉環境国際共同研究センター（CLADS）等との連携を密にして、研究を進める。また、研究実施計画を推進するための打合せや会議等を開催する。

3.　実施内容及び成果

3.1　急速かつ局所的電気微生物腐食の診断と抑止技術の開発（令和 2 年度～令和 4 年度）

3.1.1　電気腐食細菌の濃縮技術を利用した鍵酵素群（バイオマーカー）の特定（令和 2 年度～令和 4 年度）

(1)　令和 3 年度までの概要

令和 2 年度までに開発した磁性ナノ粒子材料が、モデル電気細菌と選択的に相互作用することを顕微鏡や電気化学実験から確認した（図 3.1.1-1、図 3.1.1-2）。令和 3 年度では、福島から採取してきた土壌サンプルに対して本手法を適用した結果、電気細菌が集積されることを示す結果が得られた。土壌サンプルを LB 培地で培養した後、細菌分画に対してポリマー重合反応・磁気回収を行い、得られた磁気ナノ粒子から細菌を分離して、16S rRNA 解析を行った。濃縮後 1、2 と土壌サンプルを比較すると、電気細菌として知られている *Enterobacteriaceae* 属と *Enterobacterales* 属細菌の割合がそれぞれ 3 倍、200 倍と大幅に増加した。さらに、この磁気ナノ粒子によって集積された細菌群による電流生成を 30・C の LB 培地中、+0.2 V vs Ag/AgCl KCl sat. の条件で測定すると直ちに電流値が立ち上がり 10 時間程度で 250 nA 程度の電流が観測された。一方で、集積前のサンプルの場合には、電流値はすぐに減衰し、その後上昇はしなかった。*Enterobacteriaceae* 属と *Enterobacterales* 属細菌に関しては（濃縮後 1、2）電流生成を行った後に電極表面からも再現性よく検出され（電気培養後 1、2、3）（図 3.1.1-3）、電流生成を担っていたことが考えられる。以上の結果から、本手法によって電気細菌が培養操作なしで濃縮できることが示された。

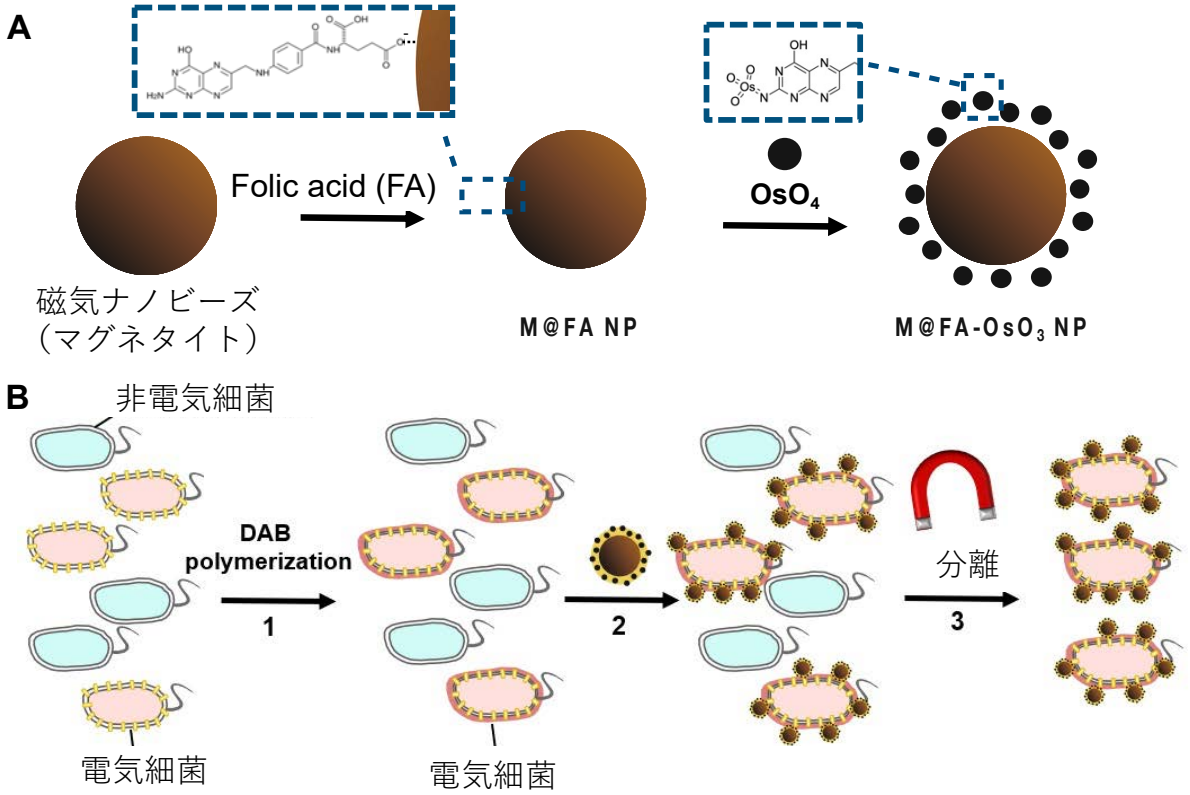


図 3.1.1-1　開発した磁気ナノ粒子（A）による電気細菌の濃縮方法（B）

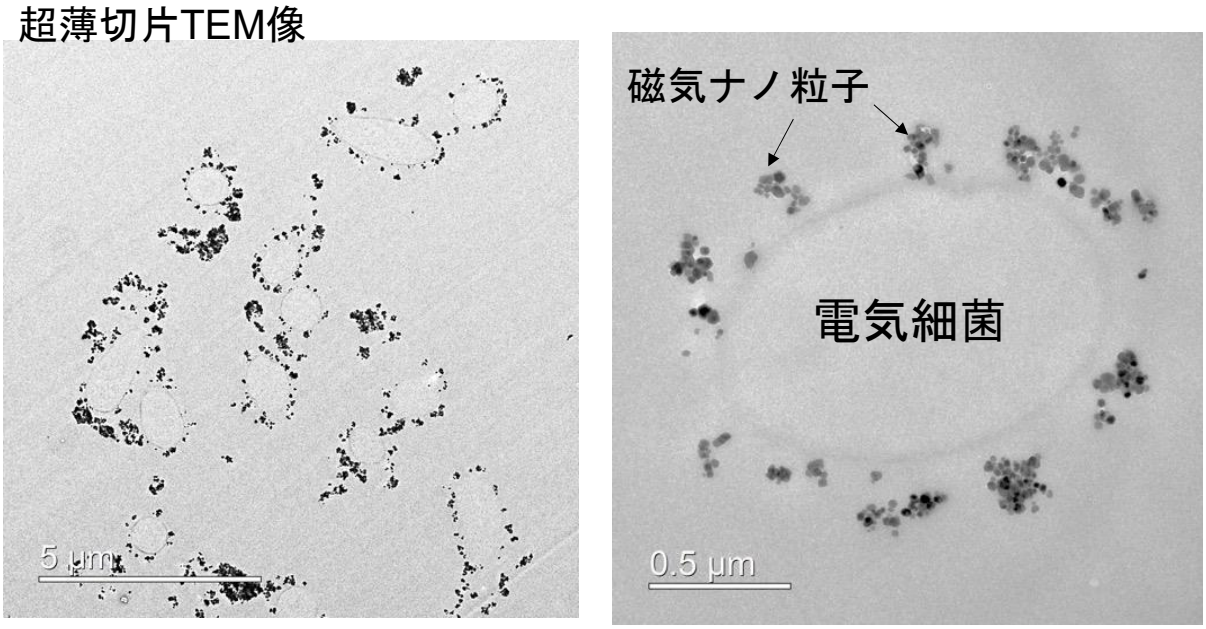


図 3.1.1-2　透過型電子顕微鏡（TEM）で捉えた開発した磁気ナノ粒子と電気細菌の相互作用

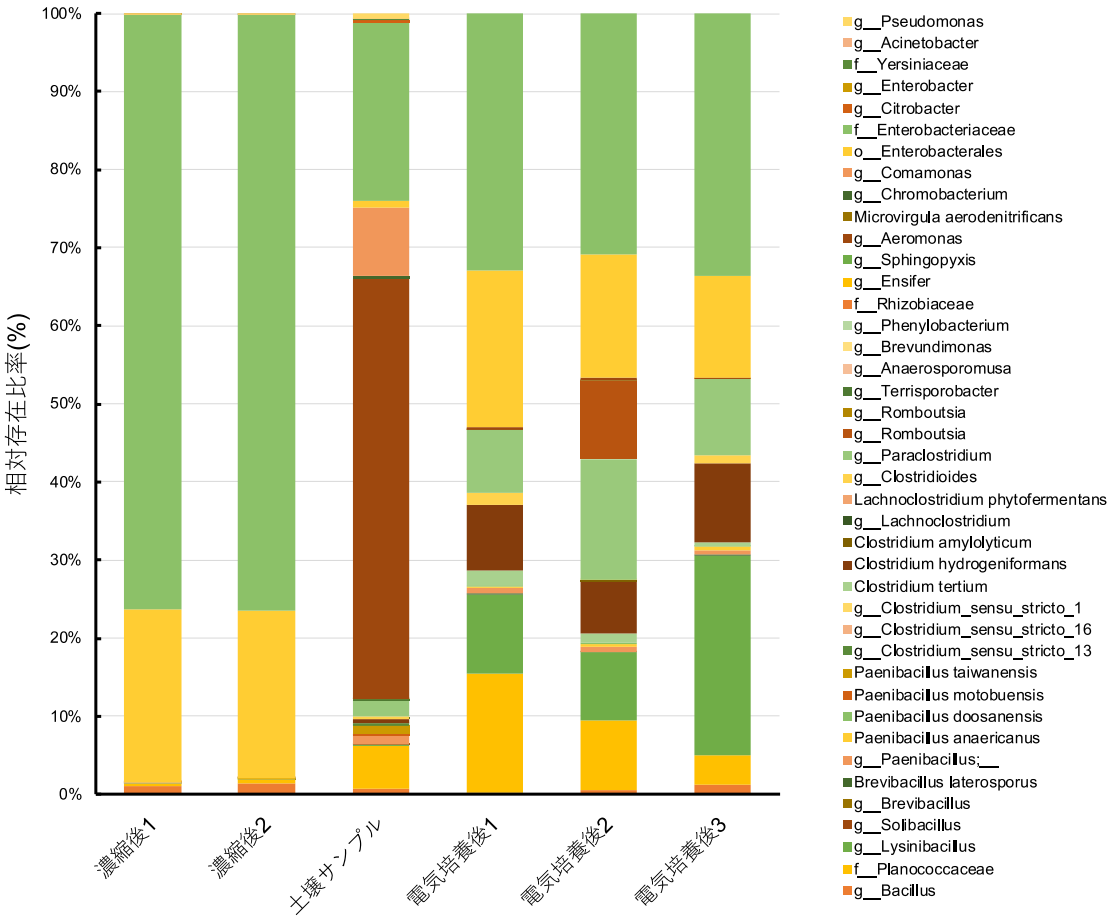


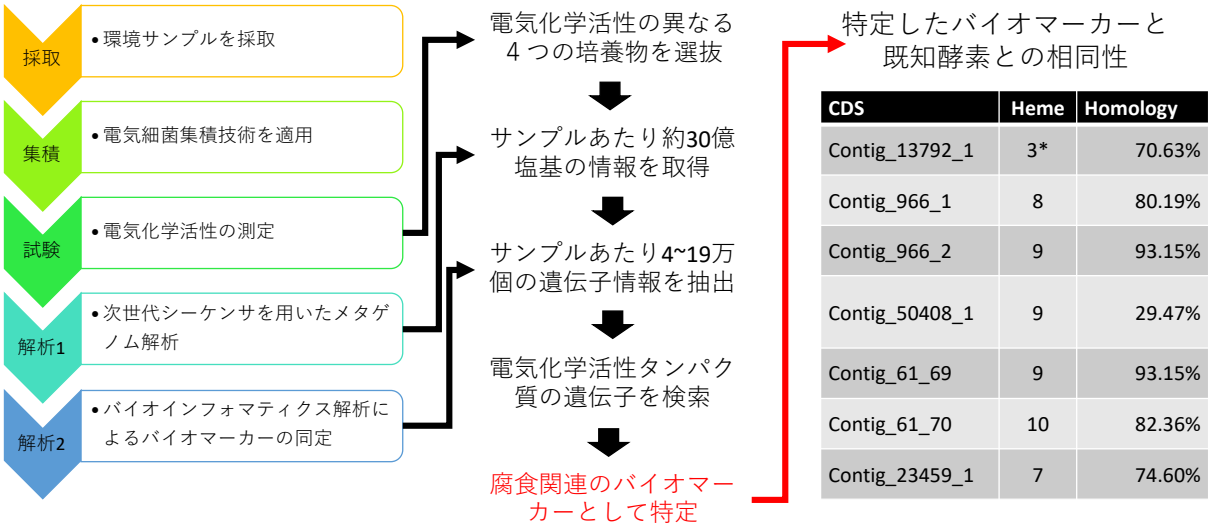
図 3.1.1-3　開発した磁気ナノ粒子による電気細菌の濃縮前後と
電気培養後の微生物群集構造

(2) 令和 4 年度実施内容及び成果

令和 3 年度に濃縮した電気細菌サンプルから電気化学活性の異なる 4 つの培養物を選抜し、JAMSTEC の協力によってサンプルあたり 30 億塩基程度の情報を取得、遺伝子情報を抽出し、ヘムモチーフを複数有する遺伝子をバイオマーカーとして特定した(図 3.1.1-4)。これまでに、メタゲノミクス解析されている福島の環境サンプルからこれらの遺伝子が検出されることを確認した。以上から、図 3.1.1-4 に示すように、環境サンプルの電気細菌の濃縮からメタゲノムまでのパイプラインを完成させた。

そこで、次にこのパイプラインを電気鉄腐食細菌の濃縮に応用した。土壌サンプルから電気細菌を磁気ナノ粒子を用いて濃縮した上で、まず電極から電子を引く抜く能力を磁気ナノビーズによる濃縮有無で比較した。電子源となる有機物は入れずに、硫酸塩を電子アクセプターとして添加した条件で定電位アンペロメトリー測定を行ったところ、ITO 電極から電子を引き抜く際に生じる電流は、滅菌処理をしたものでは観測されなかったが、磁気ナノビーズを用いて濃縮した試料においては 2 日後から電流値の上昇が見られ、4 日目には磁気ナノビーズ未処理試料に比べて 2 倍の電流値を示した。さらに、走査電子顕微鏡によって確認した電極上の細胞数も、濃縮済みの試料では未処理試料と比べて 2 倍であった。これらの結果は、磁気ビーズによる濃縮法は電子の引き抜き機能を持つ電気細菌も培養なしで効率的に濃縮することができることを示している。

次に、磁気ナノビーズで濃縮された試料を鉄粉を含む培養瓶に加えて、鉄腐食効率を向上させるかどうかを評価した。目視で確認できる鉄腐食は黒色の硫化鉄生成が 6 日目から発生した（図 3.1.1-5)。一方、濃縮方法を用いない培養試料では、顕著な色の変化は観察されなかった。32 日間の培養後に測定された鉄の質量減少は、濃縮処理された培養試料において、当該方法を用いない試料の約 2 倍であった（図 3.1.1-5)。核酸を各サンプルから抽出し 16s rRNA 菌叢解析を行うことによって、特定の腐食が加速された系において、特定の硫酸還元細菌が濃縮されることを確認した。以上は、電気化学測定の結果と合わせると、本方法が電気鉄腐食細菌を濃縮していることを示している。



CDS	Heme	Homology
Contig_13792_1	3*	70.63%
Contig_966_1	8	80.19%
Contig_966_2	9	93.15%
Contig_50408_1	9	29.47%
Contig_61_69	9	93.15%
Contig_61_70	10	82.36%
Contig_23459_1	7	74.60%

図 3.1.1-4 開発した磁気ナノ粒子による電気細菌の濃縮後にメタゲノム解析を行い、腐食バイオマーカーを探索したパイプラインと特定した遺伝子群

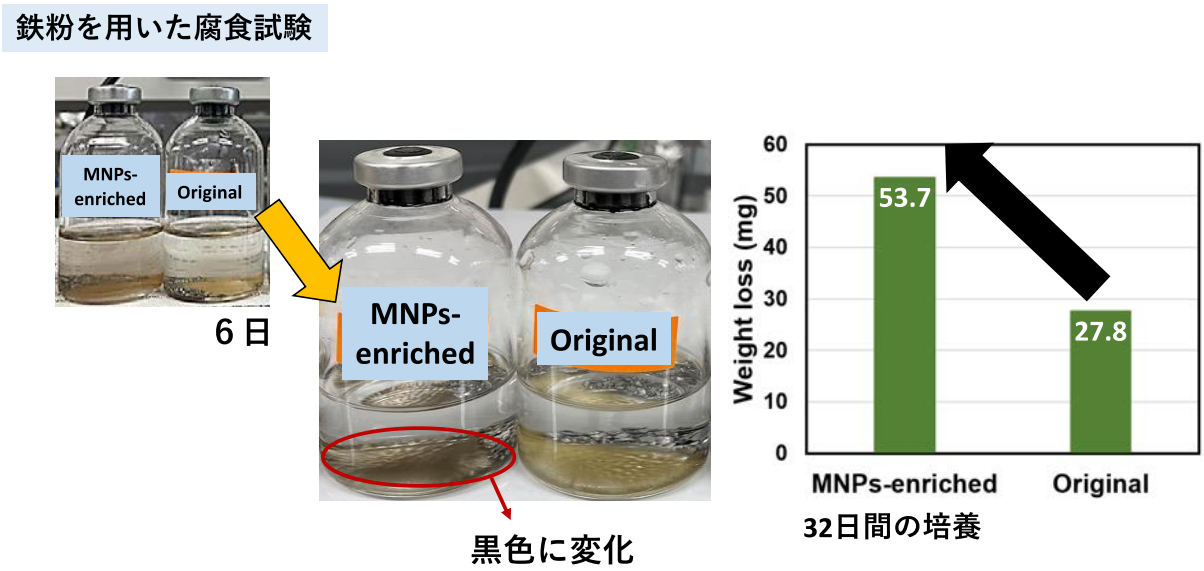


図 3.1.1-5　開発した磁気ナノ粒子（MNPs）による電気細菌の濃縮処理有無での鉄粉腐食速度の比較

3.1.2　オンサイトで電気腐食機構の有無を検査する投げ込み試験片の開発
（令和 2 年度～令和 4 年度）

(1)　令和 3 年度までの概要

鉄合金が微生物腐食される場合には、生成物である硫化物である黒サビの組成が硫化鉄から変化することが期待される。そこで、電気導電性が増加する硫化物を生成する金属との合金を作ることで、加速試験片の開発を行った。令和2年度には概念実証のためCu、Bi、Zn、Mo、Sbといった金属を10%程度溶解させた鉄合金を作製し、それぞれの合金について電気腐食を行う培養細菌株を用いて腐食の速度を重量変化によって比較した。すると、電気導電性の増減に伴って腐食速度が変化した。そこで、令和3年度は、さらに炭素鋼表面に形成される硫化鉄層の導電性を高める工夫を行った。具体的には、高濃度金属イオン含有コーティング剤を開発した。3種の高分子材料を用いて炭素鋼表面をコーティングしたところpolyaniline（PAN）で特に腐食速度が加速された。ここで、コーティングは、アニリン溶液に炭素鋼を浸漬しアニリンを表面吸着させた後、$NH_4S_2O_8$を添加することで炭素鋼表面においてアニリン分子の重合・被覆を行わせている（図3.1.2-1）。次に、硫化物状態で高い導電性を有するCu、Mo、Niを含有した状態の効果を比較した。金属ドープは、PAN被覆炭素鋼を各金属イオンが含まれる水溶液に1時間浸漬することで行った。図3.1.2-2Aに示す黒、赤のバーがそれぞれ菌の無有に対応している。Cu、Mo、Niにおいて無菌状態に比べて大きく腐食速度が増加していることがわかる。差分を取って微生物の寄与を絶対値で示した図を図3.1.2-2Bに示す。これらの結果は、金属イオンを炭素鋼表面に高濃度ドープすることで、有用な加速試験片の開発が可能であることを示唆している。

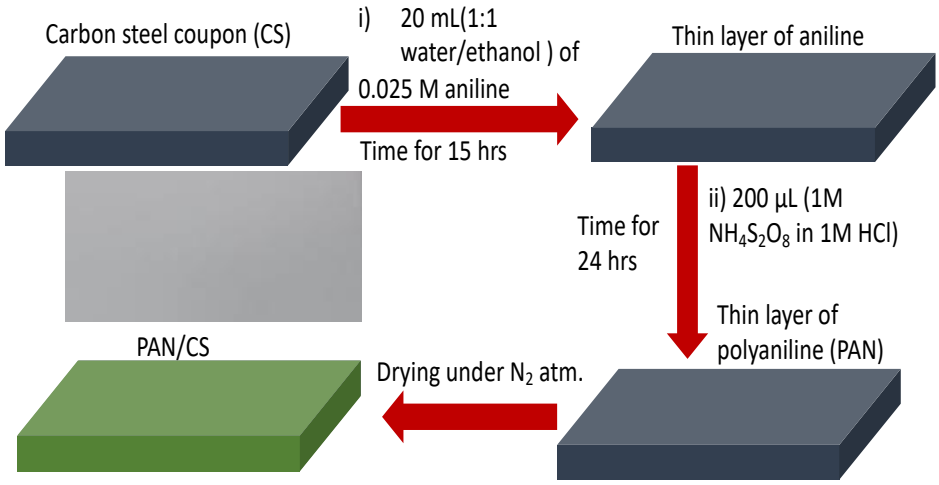


図3.1.2-1　炭素鋼（CS）へのPANをコーティングする手順

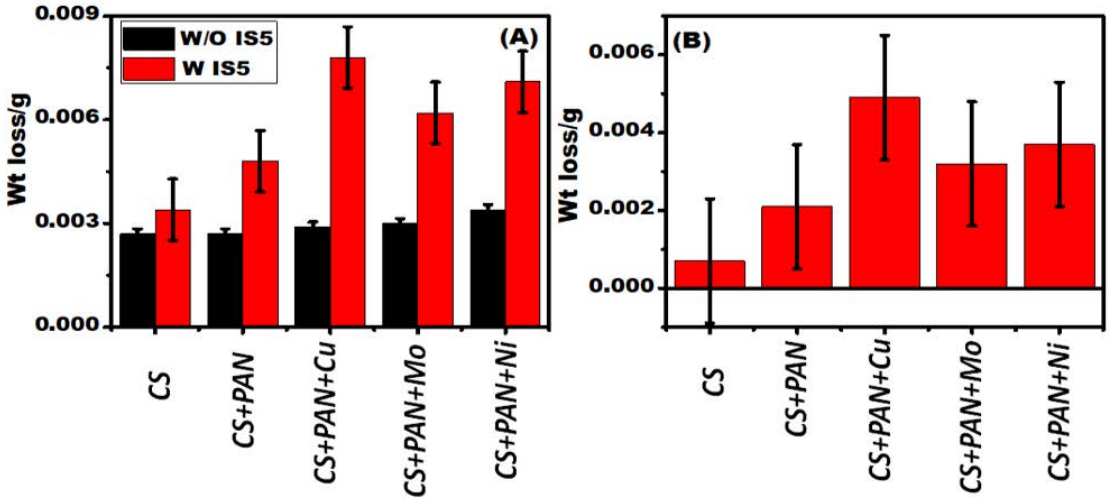


図3.1.2-2　CSコーティング剤の効果　エラーバーは標準誤差（n = 2）

(2)　令和４年度実施内容及び成果

合金では期待したほどの腐食促進効果が得られなかったため、令和 3 年度から合金以外の腐食の加速方法を検討してきた。その結果、上述したように令和３年度の検討から、炭素鋼の腐食速度が最大で８倍にまで増加する PAN-Cu コーティング材の開発に成功した。その原因としては、導電性の高い CuS が不動態層を形成していることが考えられる。本年度は、実際に腐食速度が上がっている際に、ドープした Cu が硫化物として表面に局在しているか、表面解析と電気化学解析で検証を行った。昨年度と同様に腐食実験を行い、それぞれの材料で、腐食の速度を重量変化によって比較し、PNA- Cu コーティング材における高い鉄腐食速度を確認した。図 3.1.2-3 は、炭素鋼に PAN-Cu をコーティングした材料の走査電子顕微鏡画像と元素マッピングを示す。平滑な炭素鋼の表面に針状の材料が載っており、Cu 元素が針状の材料内に局在している。一方、PAN を構成する C や N は均一に分布していることがわかる。この材料に対してモデル鉄腐食細菌を用いて腐食実験を行うと電極表面の様子は大

きく変化する。表面のほとんどが瘤のような形状を持つ物質に覆われて、その隙間から材料表面や細菌の様な形状が見られる。瘤の形状は、二種類あり表面を覆っている数 μm の小さいものの上にさらに数十 μm の層が覆い被さっている。図 3.1.2-4 の顕微画像と元素マッピングを見ると、上半分に多い数 μm の瘤の部分は S が局在しており、Cu や Fe も同じ場所に存在することがわかる。一方で画像の下半分を占める層には、Cu や Fe よりかは酸素や炭素が多く酸化物層であることが推測される。これらは、Cu や Fe が含まれる硫化物層が材料表面に微生物腐食によって形成されていることを示している。さらに、腐食電位の測定を行うと−100 mV 程度のシフトが観測された。以上の結果は、表面状態が大きく変化し、Cu 硫化物が析出し、その結果腐食速度が増大していることを示している。

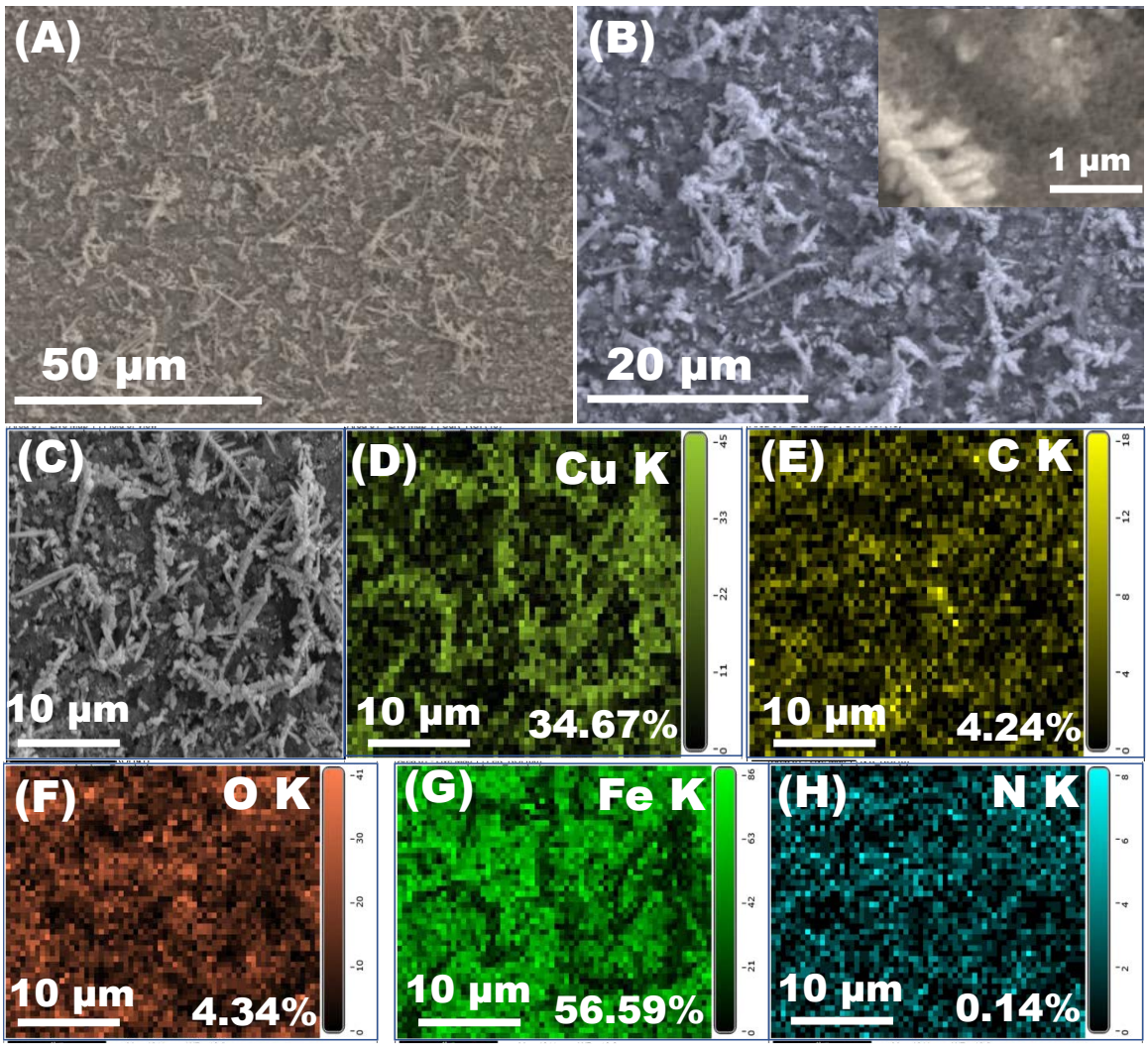
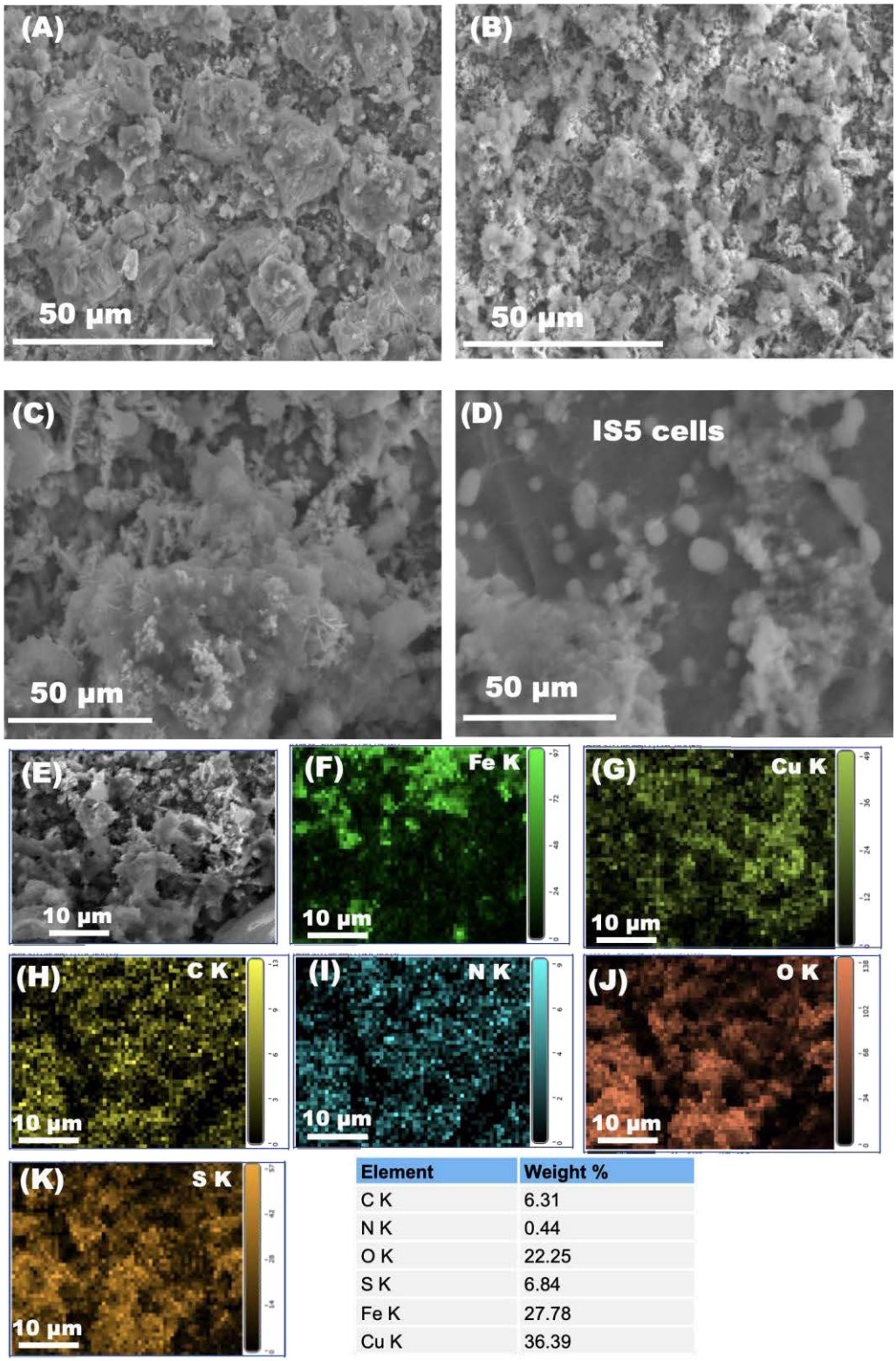


図 3.1.2-3　PAN-Cu コーティング後の炭素鋼表面分析結果



Element	Weight %
C K	6.31
N K	0.44
O K	22.25
S K	6.84
Fe K	27.78
Cu K	36.39

図 3.1.2-4 PAN-Cu コーティング炭素鋼の腐食後の表面分析結果

3.1.3　培養株を用いた微生物腐食機構速度の各条件での評価と抑制対策法の確立
（令和 2 年度～令和 4 年度）

(1) 令和 3 年度までの概要

令和 2 年度、1F 周辺環境に生息する微生物を同定するため、1F サイト周辺の表層水・地下水や河川水の環境サンプリングを行った。独自のハイスループット電気化学系を用いてサンプリングされた土壌試料中から新種の可能性が高い微生物を単離した（図 3.1.3-1A）。30 ℃、200 mV vs Ag/AgCl、嫌気条件（窒素 99%、水素 1%）で、電流値の増加は R2A 培地（Reasoner's 2A 培地を 100 倍希釈）からのみ観測された。好気条件で R2A 寒天培地を用いて培養するとシングルコロニーが取れ、16S rRNA 解析を行うと近縁種として *Cellulomonas algicola* strain NBRC112905、*C. fimi* strain NBRC15513、*C. biazotea* strain NBRC12680 が特定された。相同性はそれぞれ 97.9、97.5、97.5%であり、これらの近縁種との比較実験からも新種の可能性が極めて高く、新種提唱の論文を準備中である。単離された株は、暫定的に *Cellulomonas Sp.* NTE-D12 と名付け、JAMSTEC との共同研究により全ゲノム決定も行った。

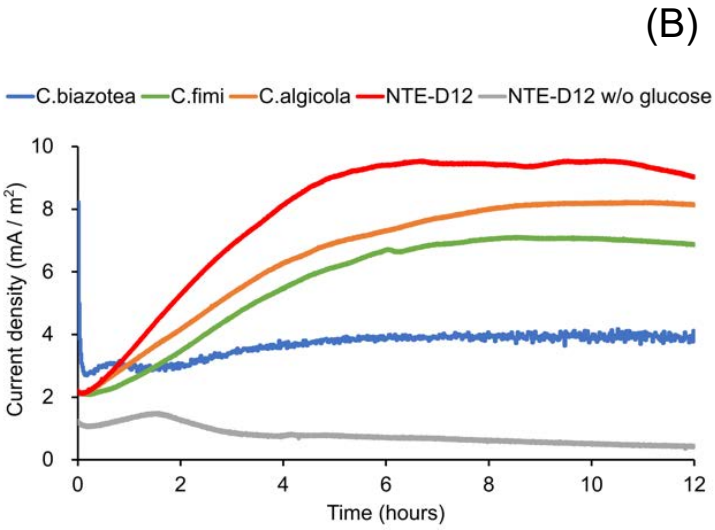


図 3.1.3-1　単離した NTE-D12 株の電顕像（A）と近縁種との電流生成の比較（B）

(2)　令和 4 年度実施内容及び成果

令和 3 年度までの検討から、うまく腐食が進んだ条件を参考に腐食細菌を単離する実験を行い、高い腐食活性を持つ単離細菌の活性を抑える pH 範囲や試薬条件を探索した。*Cellulomonas Sp.* NTE-D12 に関しては、49 種類の炭化水素系の基質に関して資化性を検討し、グルコースに対して最も高い活性を示した。pH は中性付近が至適であることを確認できており、これは近縁種の性質ともよく一致した。

さらに、本年度は新しい性質を持つ鉄腐食細菌株を単離することに成功した。鉄腐食試験用培地として改変した NBRC927 medium を用意した。本培地は NBRC927 培地を、Iron granule (1-2 mm) の代わりに炭素鋼 (SPCC, 10×10×2 mm) を加え、還元剤である l-cysteine HCl を加えずに作製したものである。本培地は炭素源を bicarbonate($NaHCO_3$)のみ、電子源を炭素鋼に含まれる Fe^0 のみに制限している。初めに鉄腐食試験用培地 20 ml に、福島県富岡町 CLADS 国際共同研究棟付近の病院地下で採取された赤い鉄腐食を含む地下水サンプルを 0.2 ml 加え、30 ℃、30 日間静置培養した。培養後の鉄板表面に局在する電気微生物腐食(Electrically microbially influenced corrosion: EMIC) を引き起こす細菌を優先的に培養対象とするため、腐食部分を薬さじで掻き取り、10^{-2}、10^{-4}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} に段階希釈してさらに 40 日間静置培養した。10^{-2} ～ 10^{-7} 希釈培養サンプルでは黒い腐食が確認され、10^{-8} 培養サンプルは確認されなかった。10^{-7} サンプルはサンガーシーケンスで解析された配列はシングルピークを形成し、単一種で集積されていることを示した。このことは 10^{-7} 培地に、電気微生物腐食を引き起こす単一の微生物種のみが集積されたことを示唆した。本株は IC-1 株と命名した。NCBI BLAST を用いた既知種データベースとの 16S rRNA 遺伝子配列相同性比較より、類縁種は *Solidesulfovibrio aerotolerans*, *Solidesulfovibrio magneticus* であり、相同性はそれぞれ 99.16%、98.82%であることを明らかとした。これまで、これらの細菌が電気微生物腐食を引き起こすことは報告されていない。*Solidesulfovibrio* 属細菌は 2020 年に *Desulfovibrio* 属クレードから再分類された偏性嫌気性の硫酸還元菌 (SRB) である[1-1]。EMIC を引き起こす SRB である *Desulfovibrio ferrophilus* IS-5 株及び IS-4 株は還元剤を加えた厳密な嫌気条件下でのみ増殖可能である[1-2]。一方で、IC-1 株は還元剤を加えておらず、厳密な嫌気条件下でない培養液で鉄腐食が観察された。類縁種である *S. aerotolerans*、*S. magneticus* は酸素の透過性を持ち[1-3]、特に *S. magneticus* は酸素を最終電子受容体とすることで増殖することが報告されており[1-4]、本株も同様の性質を持つために、厳密な嫌気条件下ではなくとも生育できたと示唆される。したがって、本株は非厳密嫌気条件下でも EMIC を引き起こす初めての SRB であることが示唆された。

鉄腐食試験は、前述した鉄腐食試験用培地 18 ml に IC-1 株を 2 ml を加え、30 ℃で 90 日間培養した。ネガティブコントロールとして非植菌区を同条件で培養した。培養後に重量を損失した鉄板の周辺腐食物は 2M HCl と 0.7 M ヘキサメチレンジアミン混合液に浸すことで除去した。培養前の鉄板と、腐食物を除去した培養後の鉄板の質量を測定し、その差をネガティブコントロールと比較した。DSMZ896 medium で 15 日間培養した IC-1 株の培養瓶壁面に、ネオジム磁石を張りつけ、一晩培養後の吸着を確認することで、培養株の磁気特性を確認した。DSMZ896 培地は磁性細菌である *S. magneticus* 細胞内に磁性粒子を形成したことが報告された培地であり[1-5]、類縁種である IC-1 株も同培地で磁性粒子を形成する可能性がある。

IC-1 株の培養液及び炭素鋼は非植菌区のネガティブコントロールと比較して大部分が黒変していた (図 3.1.3-2)。これは IC-1 株が硫酸ナトリウム最終電子受容体として用い、硫酸塩還元により硫化水素を発生し、それが鉄と反応し硫化鉄を形成したためと考えられる。IC-1 培養後の炭素鋼はネガティブコントロールと比較してわずかに大きく重量減少していた(図 3.1.3-3)。

本株が炭素鋼に含まれる鉄を唯一の電子源として培養され、重量減少が生じたことは本株がEMIC を引き起こす硫酸還元菌であることを強く示唆した。本株はこれまで報告されたEMIC SRBと比較するとその重量減少量は極めて小さかったが、それらは acetate を炭素源として培養しており[1-6]、bicarbonate を炭素源とした今回の培養条件とは異なるため、炭素源としてacetate を用いることで結果が大きく異なる可能性がある。本系は、現在の培養条件では、増殖までに要する時間が 3 週間程度と長く、各種条件の検討を行うには、より適した培養条件の探索が必要である。今後は本株を acetate で培養した場合の増殖可否や、その他の基質を影響を検討し、より速く増殖が進む条件の特定を目指す。その後、炭素源として用いることが明らかとなった場合は同様の培地を用いて重量減少量を比較する。また、IC-1 株の電気化学的活性を有するかどうか調査するために電気化学的測定を行う。

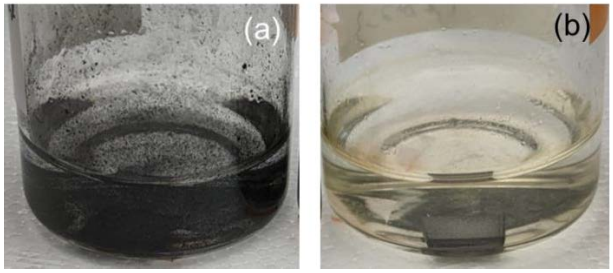


図 3.1.3-2 90 日培養後のボトル外観（a） IC-1 株培養 （b）非植菌区（negative control）

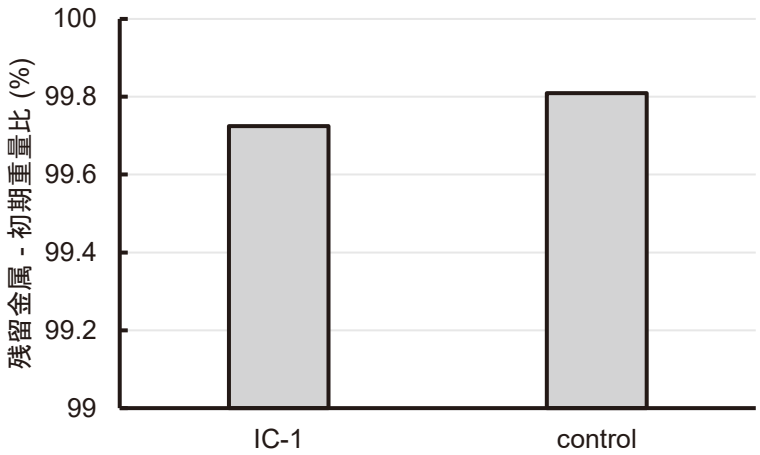


図 3.1.3-3 90 日培養後の重量減少
IC-1 植菌区と非植菌区の初期重量と培養後の残留重量比を示している。

IC-1 株は磁性細菌である *S. magneticus* と類縁種であることから磁性粒子を形成する可能性がある。*S. magneticus* の培養に用いられている DSMZ896 培地で 15 日培養したところ、IC-1 培養液に黒色の粒子が確認された（図 3.1.3-4a）。本培養液にネオジム磁石を付着させたところ、培養液の一部にネオジム磁石への吸着が確認された（図 3.1.3-4b）。このことは IC-1 株が細胞外もしくは細胞内のいずれかで磁性粒子を形成したことを示した。仮に本株が細胞内で磁性粒子を形成している場合、磁気走性を利用して環境中で電子源となる鉄に近づくという、新たな EMIC 戦略の可

能性が示唆される。今後は磁気走性を Sakaguchi らの手法[1-7]で確認することや本株の細胞内の磁性粒子形成を TEM で観察することで、本株の磁性粒子形成の有無を明らかとする。

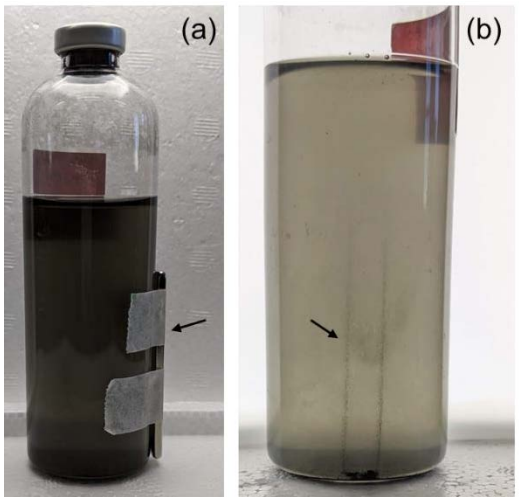


図 3.1.3-4 磁気特性試験
(a) IC-1 株の DSMZ896 培地での培養瓶。矢印は付着したネオジム磁石を示す。 (b) ネオジム磁石除去後の培養瓶。矢印はネオジム磁石を外した痕跡に、磁鉄鉱の吸着がされていることを示している。

3.1.4 まとめ

令和2年度は、電気腐食細菌の濃縮技術を利用した鍵酵素群（バイオマーカー）の特定においては、電気腐食細菌を濃縮する材料を合成、分離した菌をタンパク質量で定量することで、細菌量の上限や、粒子量と分離効率の関係に関して分析を進めた。オンサイトで電気腐食機構の有無を検査する投げ込み試験片の開発においては、Cu、Bi、Zn、Mo、Sbといった金属を10%程度溶解させた鉄合金を作製し、それぞれの合金について、まず電気腐食を行う培養細菌株を用いて腐食の速度を重量変化によって比較する実験を完了した。培養株を用いた微生物腐食機構速度の各条件での評価と抑制対策法の確立においては、1F 周辺環境サンプル9種類を回収して実験室に持ち帰り、電気化学実験に用いることができる培地5種類を用いて、土壌サンプルから電気細菌の存在を示す電流値を観測出来る条件を明らかにすることができた。

令和 3 年度は、電気腐食細菌の濃縮技術を利用した鍵酵素群（バイオマーカー）の特定においては、モデル培養株を用いて電気細菌の濃縮する際の磁性ナノ粒子に対する洗浄条件等の最適化を行い、環境細菌叢に対しての効果を実証することに成功した。電気細菌を簡便かつ短時間に濃縮できることは、該当分野において利用されていた電気培養方法に比べて 700 倍の時間短縮を実現するものであり、革新的な成果と言える。また、オンサイトで電気腐食機構の有無を検査する投げ込み試験片の開発においては、Cu、Bi、Zn、Mo、Sb といった金属が共存する場合に腐食速度に与える影響を検証し、腐食を 10 倍程度加速させる表面コーティング剤の開発に成功した。培養株を用いた微生物腐食機構速度の各条件での評価と抑制対策法の確立においては、1F 周辺環境サンプルから新種の可能性が高い *Cellulomonas* 属株を単離し、電気化学実験によって電気細菌であることを検証した。

令和 4 年度は、開発した磁性ナノ粒子材料を用いて、環境中から電気細菌を濃縮、鉄腐食速

度が加速されることを確認した。DNA を各サンプルから抽出し、菌叢解析によって、腐食が加速された系において、特定の細菌が濃縮されることを確認した。また、メタゲノミクス解析によって磁性ナノ粒子材料で濃縮された細菌においてバイオマーカー候補遺伝子を探索し、これまでに得られている環境サンプルのデータにそれらが見られるか検証した。鉄材料表面に硫化物になった際に導電性が高まることが期待されるコーティング材を開発し、モデル電気腐食細菌を用いた実験を行うと炭素鋼の腐食速度が最大で 8 倍にまで増加した。電気化学解析を行い、腐食が加速される機構に関して検討した。モデル細菌の存在下において腐食電位が負にシフトすることから、電子の引き抜き反応が加速されたことが示唆された。電気化学系で単離した電気細菌に関しては、中性付近、グルコース資化反応が速いことが示された。また、環境中の鉄腐食水から、CO_2 を唯一の炭素源、鉄を唯一の電子源とした培地を用いて段階希釈法により硫酸塩還元菌を単離した。BLAST 検索を行ったところ、類縁種に磁性細菌を持つことから、本株は腐食能だけでなく磁性を持つ可能性があると考えられた。そこでネオジム磁石への吸着試験を行ったところ、培養沈殿物の一部が磁石への吸着が観察され、電気細菌でありながら磁性細菌の特徴を持つ初めての細菌であることが示唆された。環境中においてこのような磁性細菌が鉄腐食を進めているのであれば、磁石を使ってダイレクトに細菌を濃縮できる新しいリスク診断技術開発の展開が開ける。今後、現状の培養条件では増殖が遅いため、より適した培養条件の探索や磁性粒子が生成される条件を詰めることで、環境中における鉄腐食との関連を調べる。

総合して、EMIC の加速を材料と細菌集積の 2 つの角度から実現し、採水によるオンサイト加速試験の要素技術が完成した。さらに、これらの技術は、分子生物学的なオンサイトリスク評価法を実現するバイオマーカーの特定を加速する側面を有しており、1F における EMIC リスク診断技術の基盤を構築することに成功したと言える。さらに、これらの成果の大部分は、春に博士課程に進学した 2 人の修士課程の学生によって達成されたものであり、本研究は人材育成においても大きな成果を挙げたと言える。

参考文献

[1-1] Waite, D.W. et al. Proposal to reclassify the proteobacterial classes *Deltaproteobacteria* and *Oligoflexia*, and the phylum *Thermodesulfobacteria* into four phyla reflecting major functional capabilities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 70, pp. 5972-6016 (2020).

[1-2] Kato, S. Microbial extracellular electron transfer and its relevance to iron corrosion. *Microbial Biotechnology* 9, pp. 141-148 (2016).

[1-3] Mogensen, G.L., Kjeldsen, K.U. & Ingvorsen, K. *Desulfovibrio aerotolerans* sp. nov., an oxygen tolerant sulphate-reducing bacterium isolated from activated sludge. *Anaerobe* 11, pp. 339-349 (2005).

[1-4] Lefevre, C.T. et al. Growth of magnetotactic sulfate-reducing bacteria in oxygen concentration gradient medium. *Environ. Microbiol. Rep.* 8, pp. 1003-1015 (2016).

[1-5] Pósfai, M. et al. Properties of intracellular magnetite crystals produced by Desulfovibrio magneticus strain RS-1. *Earth and Planetary Science Letters* 249, pp. 444-455 (2006).

[1-6] Enning, D. et al. Marine sulfate-reducing bacteria cause serious corrosion of iron under electroconductive biogenic mineral crust. *Environ. Microbiol.* 14, pp. 1772-1787 (2012).

[1-7] Sakaguchi, T., Burgess, J.G., Matsunaga, T. Magnetite formation by a sulphate-reducing bacterium. *Nature* 365, pp. 47-49 (1993).

3.2　バイオマーカー遺伝子の探索及びオンサイト診断技術の開発（令和 2 年度～令和 4 年度）

3.2.1　鉄腐食性メタン生成菌を用いた培養試験（令和 2 年度～令和 3 年度）

鉄腐食性メタン生成菌による腐食を想定した場合、アルカリ性・低塩・低温に維持管理することで本菌による腐食は最低限に抑えることができるだろう。また、夏場は屋外タンク等の環境水の温度が上昇することが予想されるため、温度管理が難しい環境では、アルカリ環境を維持することが腐食低減に効率である。

3.2.2　好気環境でのステンレス鋼の微生物腐食試験（令和 2 年度～令和 3 年度）

ステンレス鋼の不働態被覆の破壊に寄与する塩化物イオン濃度が 1000ppm を超えると腐食発生リスクが著しく上昇すると考えられる。塩化物イオン濃度は 200ppm 以下に制御すると共に、微生物の栄養塩が供給される環境では特に注意が必要であり、塩化物イオン濃度の制御が難しい環境に環境水が連続的に流入する場合には、積極的な殺菌処理が必要であると提言する。

3.2.3　環境試料を用いた培養試験（令和 2 年度～令和 4 年度）

(1) 令和 3 年度までの概要

1F 周辺の環境サンプル（河川水や土壌）を用いて、ラボベースでの腐食再現実験を実施した。17 種類の環境試料を 4 種類の培養条件で培養した結果、無菌環境で進む無生物的な腐食反応と比較して有意に腐食を加速させる培養物の取得に成功している（図 3.2.1-1）。

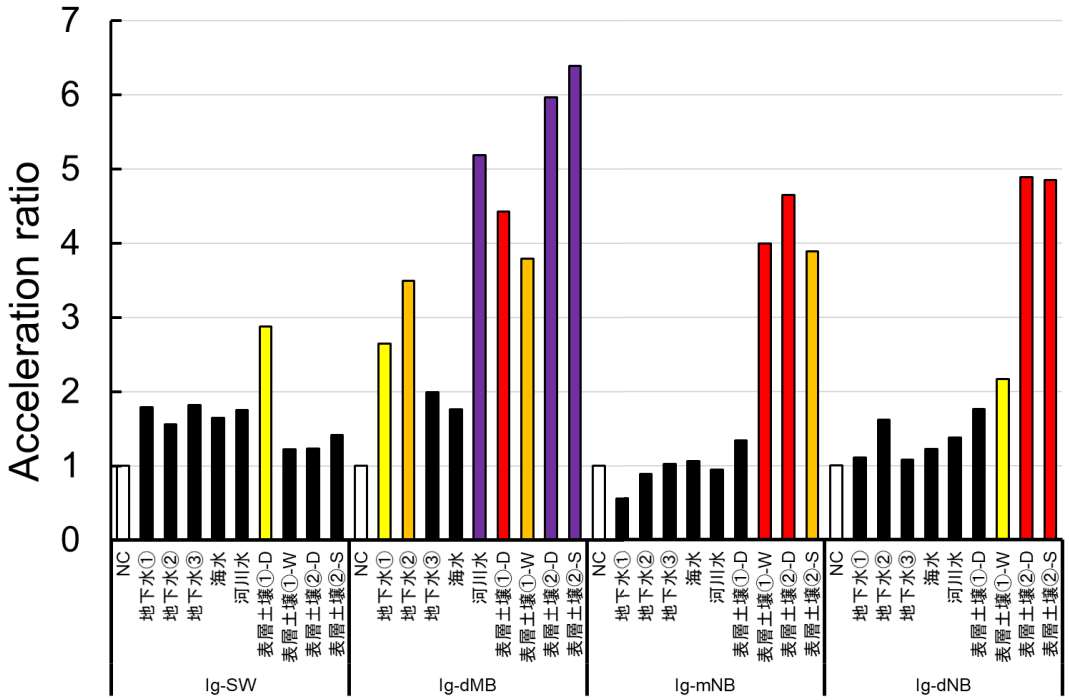


図 3.2.1-1　各培地で培養した時の腐食加速度（文献[2-1]より転載）

(2)　令和 4 年度実施内容及び成果

1F では損傷を受けた建屋内に環境水が流入している環境にあり、環境サンプルに潜在的に含まれる腐食性微生物のリスクを完全に排除することが難しく、また、腐食性の微

生物の全容は明らかになっておらず、環境中の微生物群集構造解析だけでは微生物腐食のリスクを可視化することは現状難しい。そこで、本項目では、1F 周辺の環境サンプル（河川水や土壌）を用いて、ラボベースでの腐食再現実験を実施する。腐食再現試験には、既に多くの腐食性微生物の培養方法として確立されている嫌気培養を実施するとともに、好気的な環境での電位モニタリング培養を実施する。嫌気条件での腐食特性の解析は、溶出金属イオン濃度の分析や気相のガス分析により行い、好気条件での腐食性は電位の挙動から判断する。

単一の培地で培養可能な微生物種は限られている反面、個々の微生物種に最適化された培地は 1,000 種類以上存在するため網羅的に培養することは難しい。一方で、最適化された培地は栄養塩濃度が自然環境ではありえないほどの高濃度で設定されていることが多く、実際に腐食が懸念される環境とは大きく異なることから、本実験では有機物フリーあるいは希薄な栄養塩存在下、金属鉄顆粒と培養することで加速的な鉄溶解が起こるかどうかを検討した。

新たに取得した環境水サンプル（4 種：河川、北台、夫沢、病院脇湧水）を接種した嫌気培養において、加速的な鉄の溶出は確認できなかった。また、これまで 30 ℃での培養のみを実施してきたが、50 ℃及び 70 ℃の高温での培養試験を実施した結果、50 ℃において Ig-dNB 及び Ig-dMB 培地を用いた場合に、約 100 μmol のメタン生成が確認された（図 3.2.1-2）。他の培養物においては水素発生が見られるが、これらの培養物のみ水素の蓄積は見られなかった。水素発生が 2 電子還元反応、メタン生成が 8 電子還元反応であることから、それぞれの反応に使用された電子等量を算出して、無菌区と比較を行ったところ、いずれも無菌区と同レベルであり、ケミカルに発生した水素をメタン生成に使用したものと推定した。また、鉄の溶解量についても、無菌区と有菌区で同等であった。したがって、50 ℃において微生物活動は確認されるものの、今回の培養試験では微生物に反応による腐食の加速は起こっていないと結論付けた。

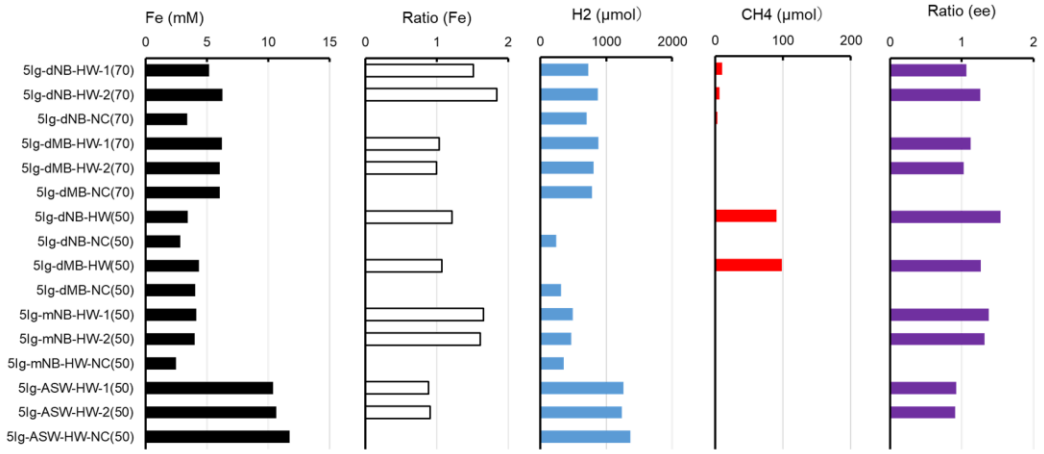


図 3.2.1-2　高温（50℃及び 70℃）での腐食試験

他方、上記 4 種環境水を用いて好気的な培養試験を実施した。浸漬直後から徐々に電位の上昇が見られ、河川水では約 0.3 V（vs Ag/AgCl）、北台では約 0.4V まで電位が上昇した（図 3.2.1-3）。しかしながら、試験片電極表面には特に腐食孔等の形成は観察されなかった。培養試験終了後に、使用した銀・塩化銀電極と未使用の銀・塩化銀電極の電位差を調べたところ、電位の貴化が見られた電極は大きく電位がシフトしてしまって

いることが確認された。したがって、培養初期に見られた電位の貴化現象は、銀・塩化銀電極側に生じた電位シフトが主原因であると考えられる。一方で、北台や病院脇湧水において、培養期間途中に見られる電位の急激な低下とその後の回復反応が見られており、不働態皮膜の破壊と再生が起こっていた可能性が考えられる。速やかに不働態皮膜の再生が生じたため、腐食の発展は起こらなかったが不働態皮膜の破壊は存在するのではないかと考えられる。

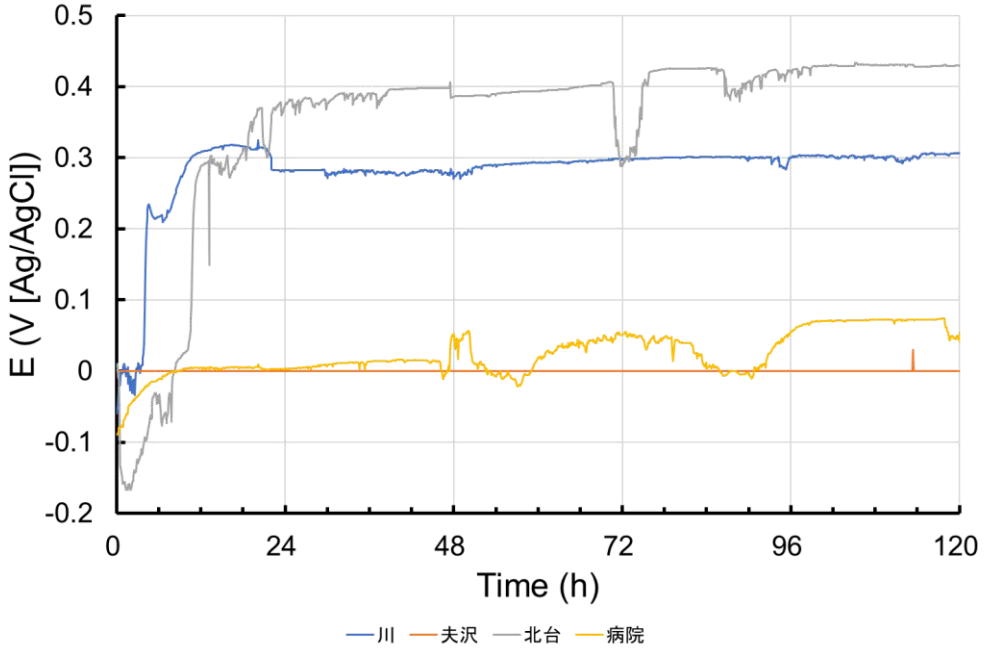


図 3.2.1-3　SUS316 電極試験片を用いた電位モニタリング培養

令和 2 年度から実施している培養試験を総合すると、令和 2 年度に取得した土壌サンプルで見られた 6 倍以上の加速が最大であった。また、相対的に見て土壌試料を接種源とした培養物において比較的高い腐食活性が確認されており、土壌環境を通過してきた水中の微生物や建屋内に流入する環境水中の土壌粒子に付着して持ち込まれる微生物が、1F に侵入してくる腐食性微生物の起源に成り得ると考えられる。

3.2.4　環境試料及び培養物の微生物群集構造解析（令和 2 年度～令和 4 年度）

(1)　令和 3 年度までの概要

1F 周辺環境から入手したサンプルとラボベースでの培養物の微生物群集の情報を得ることを目的として、原核生物が普遍的に持っている 16S rRNA 遺伝子を標的とした次世代シーケンス解析を実施した。17 環境サンプル及び 32 培養サンプルの解析を実施し、環境サンプルにおいて 2,485 操作上分類単位（OTU: Operational taxonomy unit）を確認し、多様な微生物を環境から入手できていることを示し、高い腐食活性を持つ培養物において硫酸塩還元細菌やメタン生成菌が集積していることを明らかにしている（図 3.2.2-1）。

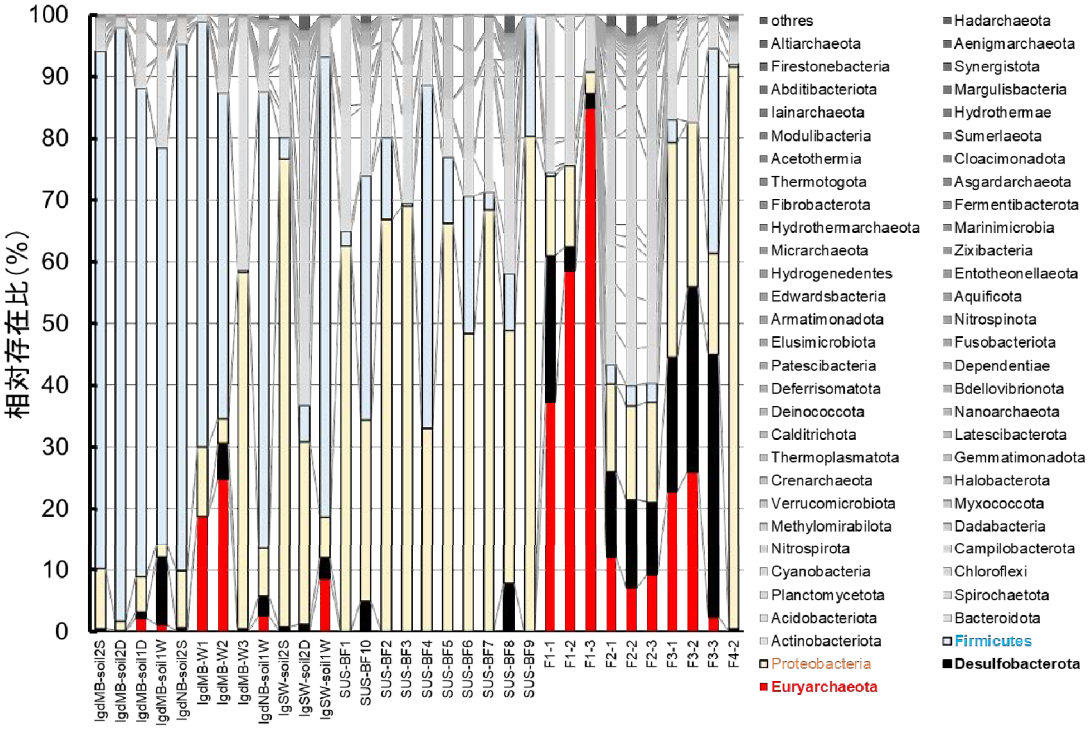


図 3.2.2-1　各培養物の微生物群集構造（門レベル）（文献[2-2]より転載）

(2)　令和 4 年度実施内容及び成果

培養実験は培養可能な微生物の能力を知る方法としては有効であるが、培養可能な微生物は限られており環境中に潜在的に存在する微生物群集の情報を得るためには遺伝子解析が有効である。本実験では、1F 周辺環境から入手したサンプル中の微生物群集とラボベースでの培養実験で腐食能の有無を調べている培養物の微生物群集の情報を得ることを目的としている。微生物群集構造の解析には、原核生物が普遍的に持っている 16S rRNA 遺伝子を標的とし、次世代シーケンサを用いたアンプリコンシーケンシングにより実施した。

令和 4 年度に新たに採取した 4 種水環境サンプル及び土壌環境中に埋設しておいたステンレス鋼試験片及び付着土壌から DNA を抽出した。水試料は、孔径 0.22 μm のメンブレンフィルターでろ過をして微生物を集積し、このメンブレンフィルターから DNA を抽出した。

ステンレス鋼に付着した土壌試料は、ステンレス鋼を 30 mL の SPB（0.8% NaCl、50 mM リン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.0）中に浸漬して軽く転倒混和し、試験片を取り出した後の残存物を遠心分離（10,000×g、10 min）により回収した。試験片表面の付着微生物は、付着土壌回収後の試験片を滅菌綿棒で拭き取ることで回収した。回収土壌及び綿棒の頭をビーズ破砕用チューブに移し取り、DNA 抽出を実施した。DNA 抽出には、ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit（Zymo Research 社）を用いて、取り扱い説明書に従い微生物由来の DNA を抽出した。また、培養実験の培養物からも同キットを用いて DNA 抽出を実施した。

抽出した DNA を鋳型にして細菌とアーキアの 16S rRNA 遺伝子を標的とした U530F/U907R プライマー[2-3] を用いた PCR により遺伝子断片を増幅した。これらの PCR 断片にサンプル識別用のインデックス配列を付与し、次世代シーケンサ MiSeq（Ilumina 社）を用いてシーケンシングを行った。得られた fastq ファイルを用いて

QIIME2 パイプライン[2-4] により、OTU の系統解析、α 多様性解析、β 多様性解析を実施した。

これまでに採取した全環境サンプルの解析結果を集約し、2,877 種の OTU を検出した。環境サンプルの α 多様性解析の結果を図 3.2.2-2 に示す。

α 多様性はサンプル内の種の多様性を表す指標であり、ここでは Chao1 [2-5] と Shannon index[2-6]について示す。Chao1 は観測種数をベースとして希少種に重みを付けた値であり、比較的観測種数に近い値となっており、また、土壌試料においては高い数値となっており、地下水①や温泉水では極めて小さい値となっている。すなわち、土壌試料では種の多様性が高く、地下水①や温泉水では種の多様性が低いことを示している。Shannon index はサンプル全体に対する種の割合に基づいて計算される値であり、Chao1 と同様に、土壌試料で種の多様性が高く、水試料で中間程度、地下水①と温泉水で低い値となっている。1F において外部環境から建屋内に微生物が持ち込まれる場合、地下水として流入してくるため、土壌粒子を含んだ地下水が建屋等に流れ込んでいる場合、多様性に富んだ環境微生物が建屋環境に持ち込まれていることになり、より多くの微生物種に対する腐食の可能性を考える必要があるだろう。

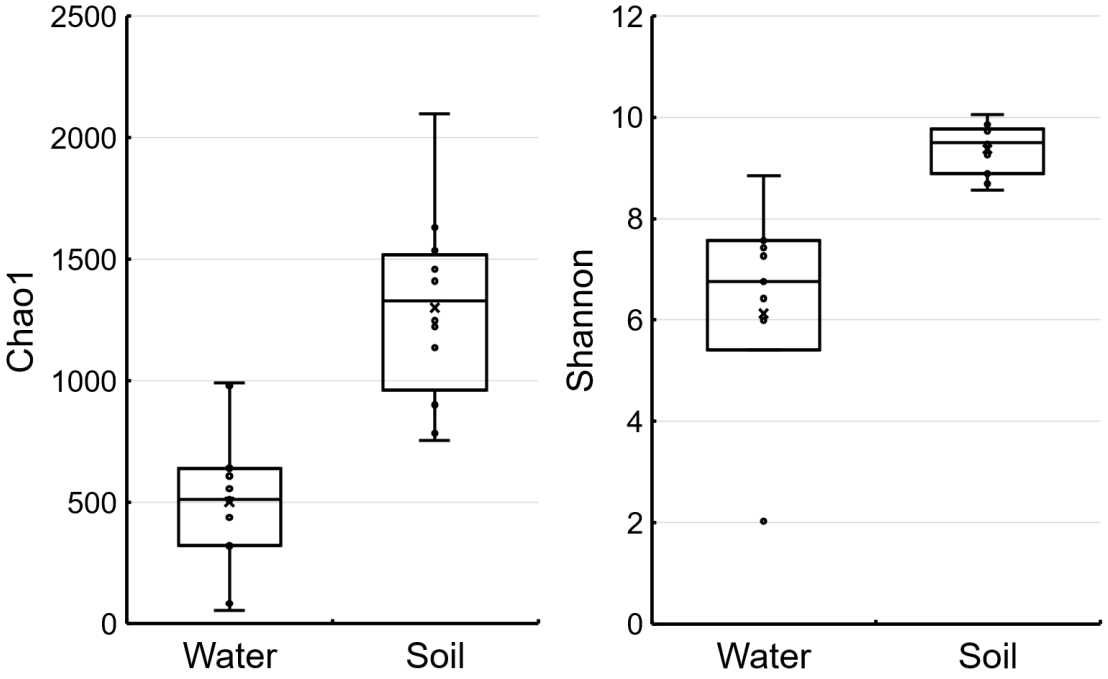


図 3.2.2-2　環境サンプル微生物群集の α 多様性指数

β 多様性解析の結果、土壌試料と水試料のクラスターはお互いに分離しており、かつ、いずれにおいてもプロットが分散される傾向にあり、サンプル間でも多様性の高い環境試料を用いて実験をしていることが証明された（図 3.2.2-3）。加えて、培養物や令和 4 年度に回収した埋設試験片上の微生物群集構造解析のデータを含めた結果、培養物は土壌環境試料のクラスターから外れて水環境試料の位置に広がり、埋設試験片上微生物は、土壌環境試料クラスターの近くで小さなクラスターを形成した。培養試料では、Nutrient Broth や Marine Broth といった栄養塩を含む培地を通常培養の 1/10 濃度で添加しており、微生物が有機物を利用することでその群集構造を大きく変えたと考えられる。同様に、水環境試料を用いた培養試験においても、水環境試料から外れてクラス

ターを形成しており、栄養塩の影響が出ていると考えられる。他方、好気環境での培養物（AirCul）については、水試料や土壌試料を用いた培養物からズレる形でクラスターが形成されており、培養環境の違いによって同一環境試料でも微生物群集構造が大きく変化することが明らかになった。

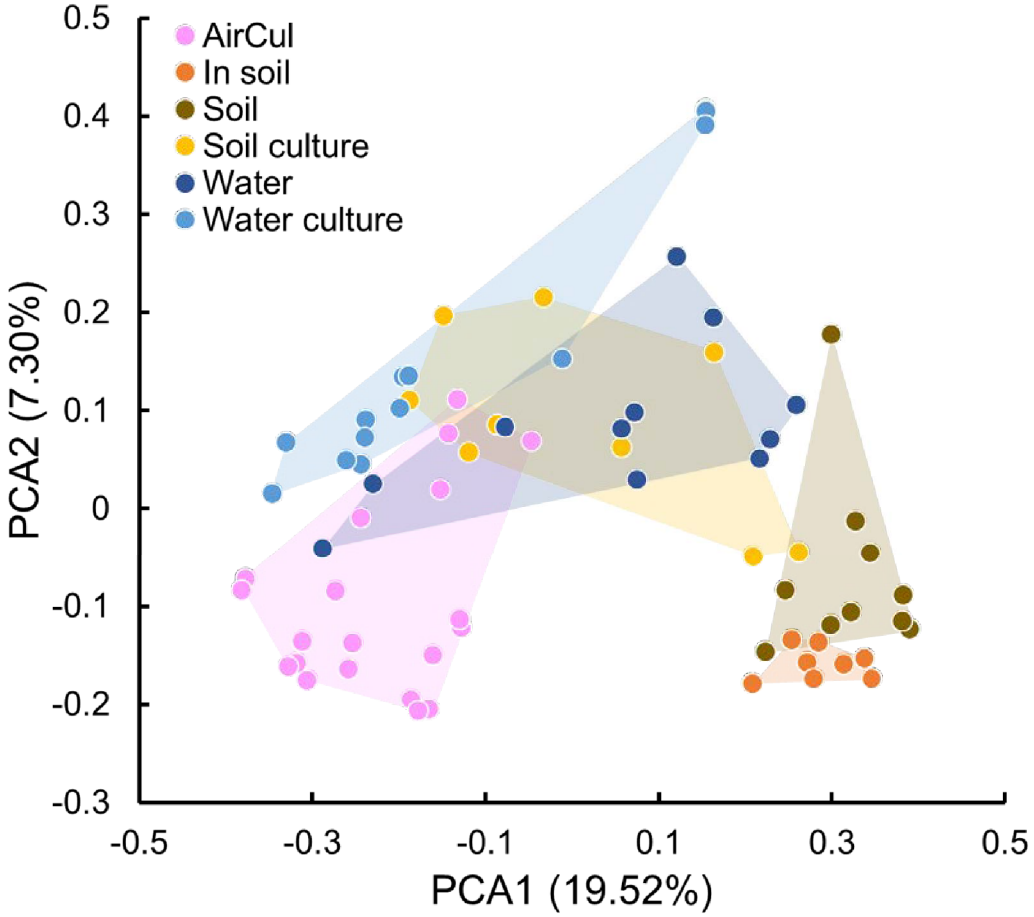


図 3.2.2-3　環境試料及び培養物の β 多様性解析

また、詳細な微生物群集構造を調べた結果、令和 4 年度に回収した病院脇湧水は、硫酸塩還元細菌の代表的な門である *Desulfobacterota* 門が他の環境サンプルよりも顕著に高かった（20.5%、図 3.2.2-4）。属レベルまで解像度を上げて解析した結果、硫酸塩還元細菌（*Desulfovibrio* 属、*Geotalea* 属、*Citrifermentans* 属、*Thermodesulfovibrionia* 綱細菌）や鉄酸化細菌・鉄還元細菌（*Rodoferax* 属、*Sideroxydans* 属、*Geobacteraceae* 科細菌、*Geobacter* 属、*Gallionella* 属、*Mariprofundas* 属、*Ferritrophicum* 属）などの微生物が顕著に多く存在し、その存在比の合計は微生物群集構造全体の 40%を超えていた（図 3.2.2-5）。他の環境サンプルでは、これらの微生物の相対存在比は 10%未満であり、当該環境水が他に比べてかなり異質な状態にあることがわかる。令和 4 年度に回収した病院脇湧水には、鉄さびによる赤茶けた不溶物が著量混入しており、採水環境が腐食環境にあったと考えられる。

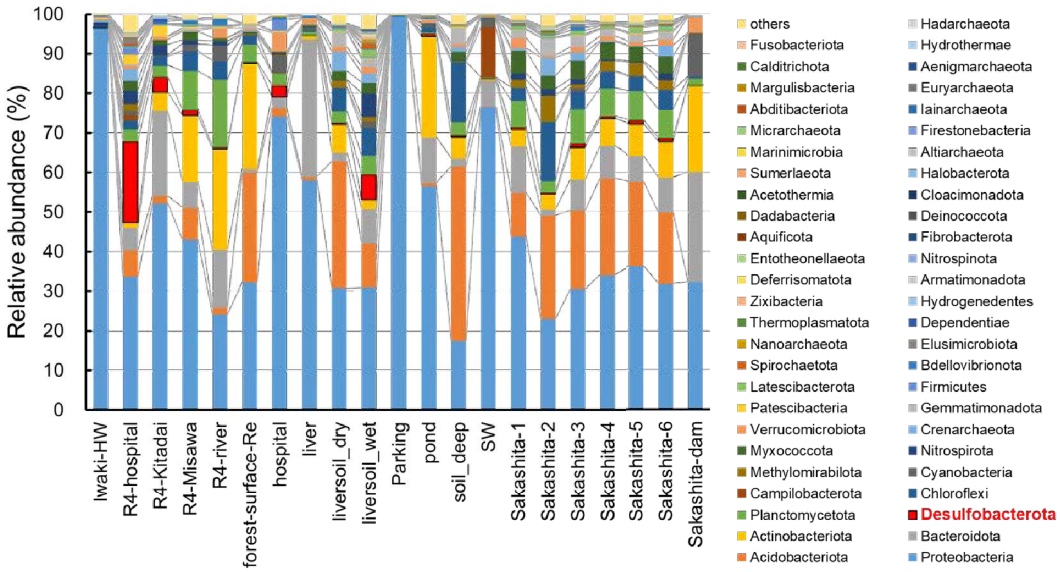


図 3.2.2-4　環境試料の門レベルでの微生物群集構造

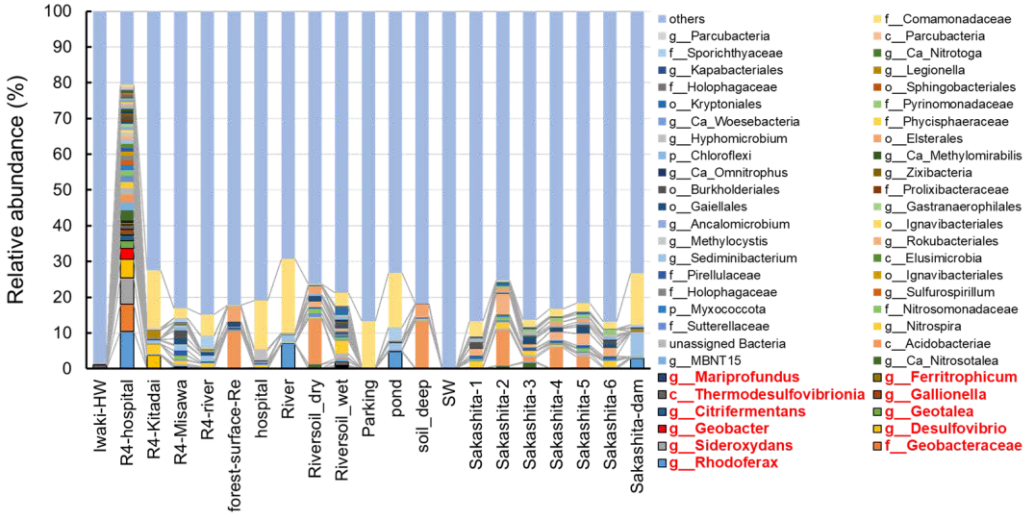


図 3.2.2-5　環境試料の属レベルでの微生物群集構造

3.2.5　オンサイト診断技術に役立つバイオマーカー遺伝子の探索（令和 3 年度～令和 4 年度）

(1)　令和 3 年度までの概要

国立研究開発法人物質・材料研究機構（以下、「NIMS」という。）において純粋分離された電気化学活性を持つ新規 *Cellulomonas* sp. 株について、全ゲノム解析を実施し、環状構造を持つ 3,684,286 塩基対からなるゲノムと 5,386 塩基対から成るプラスミドの全配列を決定した。推定された 3,450 個の遺伝子中に外膜マルチヘムタンパク質が検出されず、本菌が外膜マルチヘムタンパク質を介さないフラビン経由の細胞外電子伝達能を持っていると推定された。フラビン系細胞外電子伝達システムのバイオマーカーの探索に好適な微生物株が得られた。

(2)　令和 4 年度実施内容及び成果

3.2.2 で実施した微生物群集構造解析は、その環境や当該培養物中の微生物群集構造に関する情報を網羅的に得るためには適しているが、その腐食活性に対する生体分子の情報が含まれていない。そこで、腐食活性に関与する既知の遺伝子情報や新規の遺伝子情報をバイオマーカーとして抜き出すために、メタゲノム及びメタトランスクリプトーム解析を実施した。

NIMS において開発された 4 種の培養物（NIMS-ele-1、NIMS-Ele-D4、NIMS-Ele-F42 及び NIMS-Ele-E7）についてメタゲノム解析を実施した。培養物から ZymoBIOMICS DNA/RNA Miniprep Kit（Zymo Research 社）を用いてメタゲノム解析用に DNA を抽出した。得られた DNA を MiSeq により解析し、合計 266,193,650 塩基を決定した（表 3.2.3-1）。SPAdes [2-7]を用いて de novo assemble を実施し、25,342～144,616 本の遺伝子断片を構築し、Prodigal [2-8]を用いた遺伝子予測からタンパク質をコードする 430,580 個の推定遺伝子情報を取得した（表 3.2.3-1）。

表 3.2.3-1　4 種培養物のメタゲノム解析結果

	NIMS-Ele-1 (8,664,640 reads)		NIMS-Ele-D4 (8,592,256 reads)		NIMS-Ele-F42 (7,435,830 reads)		NIMS-Ele-E7 (8,641,013 reads)	
	All	>1 kbp	All	>1 kbp	All	>1 kbp	All	>1 kbp
# of Contig	25,342	3,729	65,224	9,556	71,013	8,635	144,616	16,744
Min length	56	1,000	56	1,000	56	1,000	56	1,000
Mean length	1,058	4,827	966	4,389	874	1,091	790	3,882
Max length	561,382	561,382	645,619	645,619	439,544	439,544	725,928	725,928
Sum of length	26,815,037	18,001,247	63,036,452	41,941,451	62,084,129	38,952,701	114,258,032	65,001,207
# of protein	42,084		98,120		98,254		192,122	
Multiheme (>2)	27		14		45		59	
Multiheme (>7)	(1)*		0		3		3	
Activity	(1st enrichment)		High		Middle		Low	

* ヘム結合モチーフが 3 つしかないが相同タンパク質との関係から 7 つ以上のヘムモチーフがあると推定されるもの

この中から、タンパク質あたり 2 個以上のヘム結合モチーフ（Cys-Xxx-Xxx-Cys-His 配列）を持つヘムタンパク質を 145 個、タンパク質あたり 7 個以上のヘム結合モチーフを持つマルチヘムタンパク質を 7 個見出した。最もヘム含有数が多いものでは 10 個のヘム結合モチーフが見られ、本遺伝子の推定アミノ酸配列は、*Aeromonas aquatica* の OmcA/MtrC family decaheme c-type cytochrome と 82.36%の相同性を示した（表 3.2.3-2）。この他に、*Aeromonas aquatica* の DmsE family decaheme c-type cytochrome と相同性の高いものも見られたが、*Clostridium* sp. の hypothetical protein と高い相同性を持つ 7 つのヘムモチーフを持つ遺伝子や、*Hemibagrus wyckioides* の hypothetical protein と高い相同性を持つ 9 つのヘムモチーフを持つ遺伝子も見つかった（表 3.2.3-2）。検出されたマルチヘムタンパク質と既知のマルチヘムタンパク質の相互の相同性解析を実施した結果、3 つのグループに分かれることが明らかになった（表 3.2.3-3）。NIMS-Ele-E7 Contig_61_69 と NIMS-Ele-F42 Contig_966_2 は DmsE 型であり、この 2 つの hypothetical protein は、全長が 100 アミノ酸以下と小さいタンパク質であり、NIMS-Ele-1 Contig_13792_1、NIMS-Ele-E7 Contig_61_70 及び NIMS-Ele-F42 Contig_966_1 は MtrC 型であった。一方で、NIMS-Ele-E7 Contig_23459_1 と NIMS-Ele-F42 Contig_50408_1 は、既知のマルチヘムタンパク

質と高い相同性は示さず、お互いにも相同性を示さなかった。この二つの推定タンパク質は、短い全長タンパク質に対して 7 つ及び 9 つのモチーフが近接しており、実際のタンパク質構造上ではヘム結合を支持できない可能性もある。今後、これらの新規配列の生理的な機能の解明を進める必要がある。

表 3.2.3-2　アノテーションされたマルチヘムタンパク質

Cultures	CDS	Heme	Prediction	Homology	Accession No.
NIMS-Ele-1	Contig_13792_1	3*	OmcA/MtrC family decaheme c-type cytochrome [*Aeromonas aquatica*]	70.63%	WP_033131997.1
NIMS-Ele-F42	Contig_966_1	8	OmcA/MtrC family decaheme c-type cytochrome [*Aeromonas aquatica*]	80.19%	WP_033131997.1
	Contig_966_2	9	DmsE family decaheme c-type cytochrome [*Aeromonas aquatica*]	93.15%	WP_033131996.1
	Contig_50408_1	9	hypothetical protein KOW79_010465 [*Hemibagrus wyckioides*]*	29.47%	KAG7327064.1
NIMS-Ele-E7	Contig_61_69	9	DmsE family decaheme c-type cytochrome [*Aeromonas aquatica*]	93.15%	WP_033131996.1
	Contig_61_70	10	OmcA/MtrC family decaheme c-type cytochrome [*Aeromonas aquatica*]	82.36%	WP_033131997.1
	Contig_23459_1	7	TPA: hypothetical protein [*Clostridium* sp.]	74.60%	HAR86988.1

表 3.2.3-3　マルチヘムタンパク質のお互いの相同性（アミノ酸配列ベース）

		1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	NIMS-Ele-E7-Contig_61_69_DmsE									
2	NIMS-Ele-F42-Contig_966_2_DmsE	100								
3	WP_033131996_DmsE	93.1	93.1							
4	WP_033131997_MtrC	14.6	14.6	14.3						
5	NIMS-Ele-1-Contig_13792_1_MtrC	14.8	14.8	14.8	67.1					
6	NIMS-Ele-E7-Contig_61_70_MtrC	13.2	13.2	12.9	81.3	99.3				
7	NIMS-Ele-F42-Contig_966_1_MtrC	14.9	14.9	14.9	78.6	99.3	99.8			
8	NIMS-Ele-E7-Contig_23459_1_hypo	0	0	0	0	0	0	0		
9	KAG7327064_hypo	0	0	0	11.4	0	11.9	11.9	14.7	
10	NIMS-Ele-F42-Contig_50408_1_hypo	0	0	0	0	0	0	0	22.4	26.9

また、電気化学培養サンプルについてトランスクリプトーム解析を実施した。LB（Luria-Bertani）培地中で培養した 2 つのコントロール培養液（NIMS-CG-1 及び NIMS-CG-3）と 96-well 電気化学培養を実施した 2 つの培養物（NIMS-1-2-2 及び NIMS-4-20-5）から RNA を抽出し、MiSeq により解析を実施した。遺伝子発現情報を取得し、高度に発現している遺伝子を特定した（表 3.2.3-4）。高発現遺伝子群において細胞外電子伝達に見られる遺伝子が見られなかったため、細胞外電子伝達において重要な DmsE、OmcA、MtrC の 3 つの遺伝子の発現状況を調べた結果、培養条件に依存することなく低レベルで発現していた（表 3.2.3-5）。細胞外電子伝達において重要な外膜マルチヘムタンパク質は、生合成され

たポルフィリン環に鉄が錯体を形成したヘム分子を多数保持するため、細胞外電子伝達が必要になったタイミングで発現誘導を行うと生体へのエネルギーや代謝フローの負荷が高くなるため、構成的に発現している可能性が考えられる。

表 3.2.3-4　トランスクリプトーム解析で検出された高発現遺伝子（トップ 10）

NIMS-CG-1		NIMS-CG-3		NIMS-1-2-2		NIMS-4-20-5	
Name	TPM	Name	TPM	Name	TPM	Name	TPM
raiA	9056	pspA	14422	raiA	5439	ahpC	9721
pspA	8787	rmf	6406	IS5-like element ISSod6 family transposase	3806	rplA	6507
H-NS histone family protein	3797	flagellin	6091	IS5-like element ISSod6 family transposase	3775	hypothetical protein	6498
IS5-like element ISSod6 family transposase	3604	secG	5399	IS5 family transposase	3775	DUF2061 domain-containing protein	6220
IS5 family transposase	3604	raiA	5082	IS5-like element ISSod6 family transposase	3744	raiA	5545
IS5-like element ISSod6 family transposase	3440	hypothetical protein	4845	IS5 family transposase	3712	sodB	4714
membrane protein	3391	ferrous iron transport protein A	4252	IS630 family transposase	3216	dpsA	4248
IS5 family transposase	3359	pspB	4252	rmf	3077	rmf	3250
DUF3820 family protein	3257	hypothetical protein	4242	IS5 family transposase	3026	rpmJ	3018
IS5-like element ISSod6 family transposase	3195	IS5-like element ISSod6 family transposase	4183	hypothetical protein	2935	rplJ	2651

表 3.2.3-5　細胞外電子伝達に重要な遺伝子の発現レベル

Name	TPM			
	NIMS-CG-1	NIMS-CG-3	NIMS-1-2-2	NIMS-4-20-5
DmsE family decaheme c-type cytochrome	518	945	197	150
DmsE family decaheme c-type cytochrome	0	238	174	36
DmsE family decaheme c-type cytochrome	130	0	297	18
OmcA/MtrC family decaheme c-type cytochrome	245	199	166	111
omcA	0	514	214	272
mtrC	370	56	399	495

3.2.6　オンサイトでの微生物リスク診断技術の検討（令和 4 年度）

(1)　令和 3 年度までの概要

新規の項目であり、令和 3 年度までに得られている結果はない。

(2)　令和 4 年度実施内容及び成果

培養に依存しない分子生物学的な手法による解析は、培養困難な微生物の情報を得たり、バイオマーカーによる診断技術を可能にしたりするが、既報の解析方法では、サンプル調製が難しく、次世代シーケンス解析に高額な装置を使用する必要がある。技術的な専門性と高額な機器の使用は、技術の汎用性を低下させており、現場レベルで使える解析技術として実装することが困難である。したがって、本研究項目では、分子生物学的な解析手法に使用可能な品質を保持しながら、簡便に解析できる方法の開発を目指した。

1F 周辺の環境サンプル（河川水や土壌）や培養物を用いて、簡便に DNA を抽出する方法（高速遠心分離や PCR などの特殊な装置を使用しない方法）を検討した。水試料中の微生物細胞の回収方法として、遠心分離を用いて細胞を沈殿して回収する技術や吸引ろ過器とメンブレンフィルターを用いて微生物細胞をトラップする方法があるが、これらの装置類を使わずにろ過が可能な Sterivex Filter Unit（Millipore）を使用した。ルアーロックタイプの 50 mL シリンジを用いて環境水試料を採取し、シリンジに Sterivex Filter Unit を装着して、水を押し出すことで Sterivex Filter Unit のフィルター上に微生物細胞をトラップさせた。この時、水の清浄度に応じて 50～500 mL を通水する。水を完全に吐き出した後で、ピペットを用いて 1 mL の 2×DNA/RNA Shield を Sterivex Filter Unit 中に入れる（フィルターを通過させない）。手で激しく攪拌した後に液を回収し、磁性ビーズを用いて DNA を精製・回収した（図 3.2.4-1）。本法を用いて環境水を処理した時、1.31 ng/μL の DNA が回収された（図 3.2.4-2）。回収残渣中に未溶解細胞由来の未回収 DNA が残っている可能性を考えて、回収残渣を-80 ℃と室温で、3 回凍結融解を繰り返し、同様の手法により DNA 抽出を実施した結果、0.09 ng/μL の DNA が回収された（図 3.2.4-2）。凍結融解後の DNA 回収量はごく微量であるため、回収した溶液中の細胞からの DNA 抽出は問題なく行えていると考えられる。一方で、液を回収した後の Sterivex Filter Unit のフィルター表面を観察すると着色が残っていたため、フィルター表面から細胞が回収されていない可能性を考えた。そこで、Sterivex Filter Unit 内に細胞破砕用のガラスビーズを添加しておき、そこに水を通水して、同様に DNA 回収実験を実施した結果、8.34 ng/μL の DNA が回収された（図 3.2.4-2）。回収量として約 6 倍上昇しており、また、回収処理後のフィルター表面の着色も解消されていたことから、フィルター表面に残存していた微生物細胞を回収することで、DNA の回収量が増加したと考えられる。ガラスビーズなしの場合と同様に、凍結融解処理を行った二次回収を実施したが、回収量は少なく、凍結融解処理は不要であると結論付けた。

次に、土壌試料からの DNA 抽出を検討した。土壌試料約 0.5 g を 5 mL 容チューブに取り、1 mL の 2×DNA/RNA Shield を添加して、手で激しく攪拌した。攪拌後、1 mL の滅菌水を添加して、0.22 μm 孔径のフィルターユニットを用いてろ過し、このろ液に対して水サンプルと同様に DNA 回収を実施した（図 3.2.4-1）。土壌試料においては、2×DNA/RNA Shield を入れた後で、凍結融解を実施したサンプルと実施していないサンプルを用意して、回収量を比較した。凍結融解をした場合の DNA 回収量は 2.42 ng/μL であり、凍結融解していない場合は、1.20 ng/μL であった（図 3.2.4-2）。凍結融解を実施した方が、約

2 倍高濃度の DNA が回収できているが、大きく違わないため、現場レベルでは凍結融解は必要ないと結論付けた。

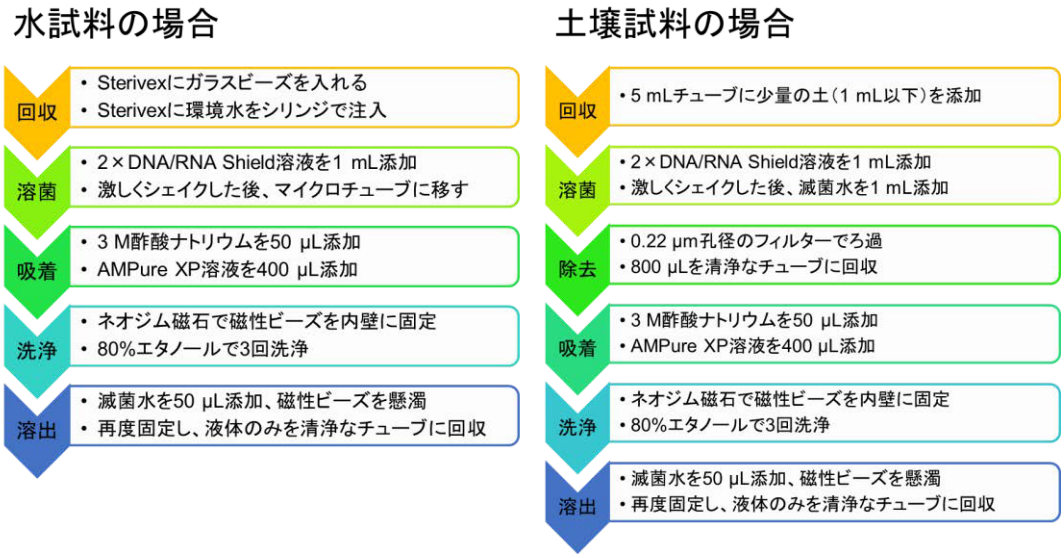


図 3.2.4-1　環境試料から簡便に DNA を回収する方法

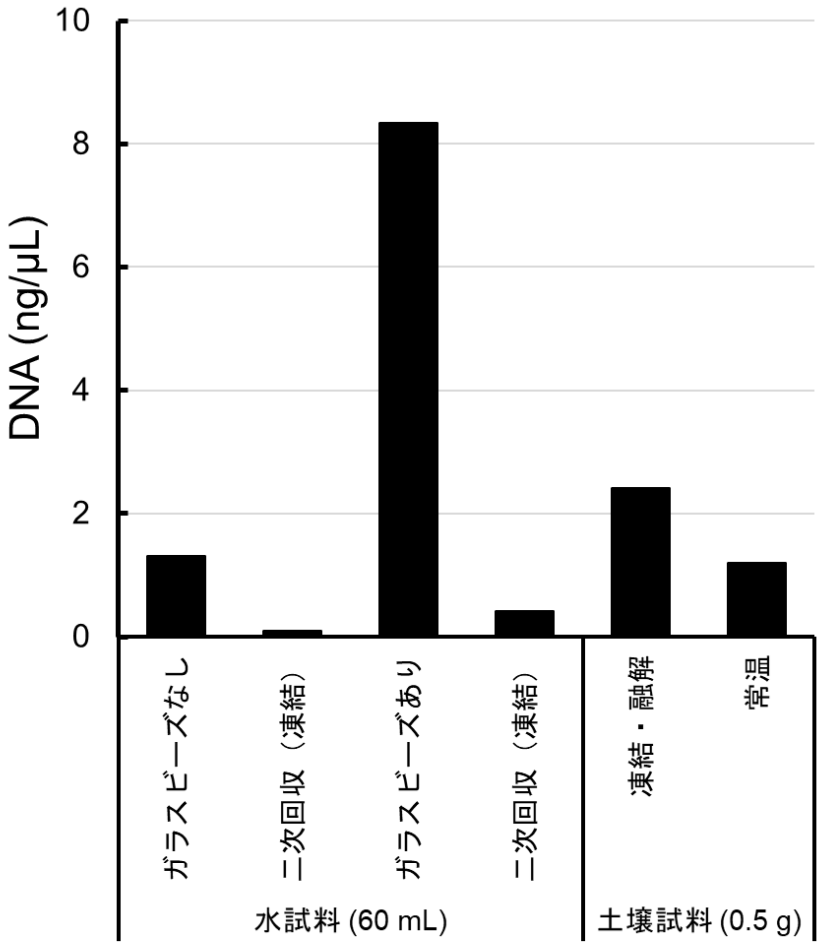


図 3.2.4-2　簡便法で回収した DNA 量の比較

次に、回収した DNA を用いて、ナノポアシーケンサによるメタゲノム解析を実施した。ナノポアシーケンスは、Field Sequencing kit SQK-LRK001（Oxfordnanopore）を用いて、プロトコールに従い実施した。しかしながら、簡便法で回収した DNA は、DNA 溶液としてのクオリティが低く、ナノポアシーケンサでの解析結果に影響することがわかった。48 時間のシーケンスに対して、18,284 本のリードが読み込まれたが、クオリティフィルタをパスしたものは 268 本に留まった。NanoPlot[2-9]を用いたリードの解析結果より、クオリティフィルタをパスした配列の合計鎖長は 319,189 塩基であり、高いクオリティ（>Q10）を持つ配列は 5 つのみであった（表 3.2.4-1、図 3.2.4-3）。高いクオリティを持つ長い配列が存在しないため、機能遺伝子の探索を実施することができなかった。

ナノポアシーケンサでの解析を実施するためには、DNA 溶液から夾雑物を取り除く精製ステップを加える必要があるだろう。一方で、メタゲノム解析を実施するには不十分であるが、PCR 反応を実施するには十分量の DNA が得られているため、ハンディタイプの定量 PCR 等を用いれば簡便法で用いた DNA から特定のバイオマーカー遺伝子を定量的に検出することは可能と考えられる。

表 3.2.4-1　ナノポアシーケンス結果

	All	Pass
Number of reads	18,284	268
Total bases	19,044,240	319,189
Mean read length	1,042	1,191
Length (quality score) of top 5 longest reads		
1	115,146 (3.2)	24,268 (7.4)
2	69,258 (3.1)	15,965 (9.4)
3	66,819 (2.8)	15,772 (9.0)
4	65,868 (3.1)	13,915 (9.3)
5	51,813 (3.2)	13,718 (9.4)
Mean read quality	3.3	8.1
Number of reads above quality cutoffs		
>Q5	693	268
>Q7	268	268
>Q10	5	5

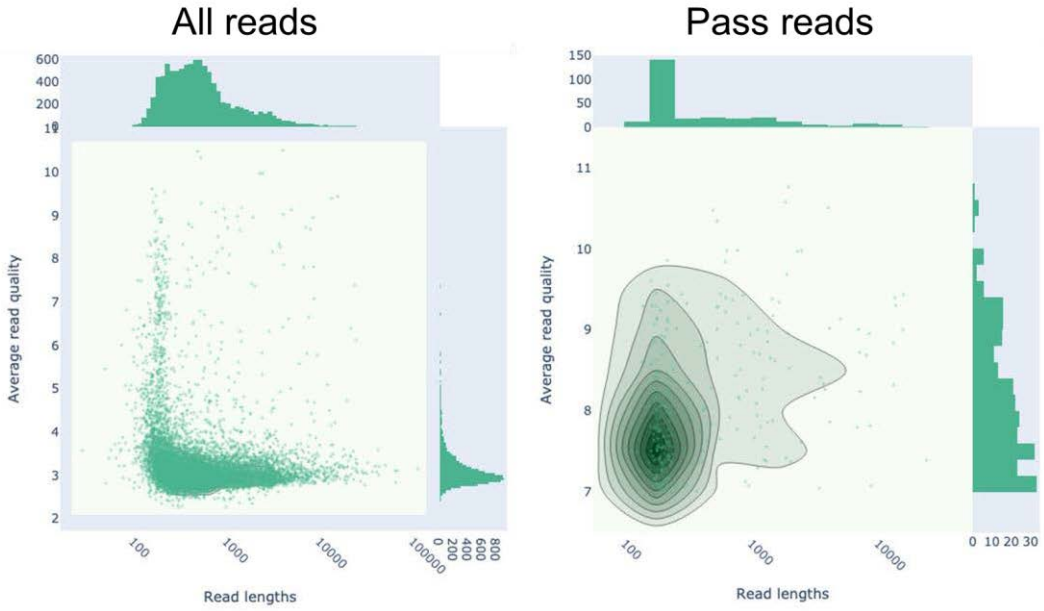


図 3.2.4-3　ナノポアシーケンスの鎖長とクオリティの分布

3.2.7　まとめ

令和 2 年度は、鉄腐食性メタン生成菌が腐食を誘導する条件について塩濃度と pH の観点で明らかにし、好気環境でのステンレス鋼の微生物腐食についても電位貴化と腐食発生について微生物と塩濃度の観点からの情報を得た。さらに、環境試料を用いた培養試験において、明らかに加速された腐食を示す培養物を得た。特に、土壌試料由来の培養物において無菌区に比べて 6 倍以上鉄溶出速度が加速されており、1F 周辺環境試料においても腐食性微生物が存在していることを明らかにした。

令和 3 年度は、バイオマーカー遺伝子の特定のために重要な 1F 環境で起こり得る微生物腐食に対して情報を獲得するとともに、1F 周辺環境試料から腐食性微生物を培養し、バイオマーカー遺伝子候補の探索を進めた。既知の腐食性微生物が 1F で想定される環境内でどのような腐食活性を示すか検討を行い、鉄腐食性メタン生成菌による腐食では pH をアルカリにコントロールすることが有効であり、好気的な環境でのステンレス鋼腐食では塩化物イオン濃度のコントロールが重要であることが示された。また、1F 周辺環境の様々な環境試料を用いて培養及び遺伝子解析実験を実施し、1F 建屋に浸入する地下水を想定した場合、非常に多様性に富む微生物が持ち込まれている可能性を示唆し、その中には高い腐食活性をもつものも示唆された。

令和 4 年度は、環境サンプルをさらに増やし、培養試験及び微生物群集構造解析を実施して、潜在的な微生物腐食のリスクについての検証を行った。新たに得られたサンプルにおいて特に腐食活性が高い微生物培養液は得られなかったが、環境微生物に対する分子生物的な情報をさらに重厚に積み上げることができた。また、これまでに得られている微生物培養液のメタゲノム解析から、電気化学的な腐食反応に寄与する複数のバイオマーカー遺伝子を特定することに成功した。加えて、実環境でも実施可能な簡便な DNA 抽出方法を確立し、オンサイトでのバイオマーカー検査に必要な要素技術の開発に成功した。

総合して、既知腐食性微生物の腐食活性を低減可能な物理化学的なパラメーターを洗い出し、1F 周辺環境微生物の情報を重厚に取得し、環境由来腐食性微生物の獲得、ならびに、メタゲノム解析によるバイオマーカーの特定、オンサイト解析方法の要素技術を開発し、1F を

想定した環境制御による微生物腐食に対する防食方法の提言と分子生物学的な診断技術の基盤を構築することに成功したと言える。

参考文献

[2-1] 廃炉環境国際共同研究センター, 物質・材料研究機構, 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, JAEA-Review, 2021-059, 2022. 71p. DOI:10.11484/jaea-review-2021-059.

[2-2] 廃炉環境国際共同研究センター, 物質・材料研究機構, 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, JAEA-Review, 2022-045, 2022. 82p. DOI:10.11484/jaea-review-2022-045.

[2-3] Caporaso, J. G., et al., Ultra-high-throughput Microbial Community Analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq Platforms. ISME J., 6, 2012, pp. 1621-1624.

[2-4] Bolyen, E, et al., Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. Nature Biotechnol., 37, 2019, pp. 852-857.

[2-5] Chao, A., Nonparametric estimation of the number of classes in a population, Scand. J. Stat., 11, 1984, pp.265-270.

[2-6] Shannon, C. E., A mathematical theory of communication, Bell. Sys. Tech. J., 27, 1948, 623-656.

[2-7] Prjibelski, A., et al., Using SPAdes De Novo Assembler. Curr Protoc Bioinformatics. 70, 2020, e102.

[2-8] Hyatt, D., et al., Prodigal: prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. BMC Bioinformatics, 11, 2010, 119.

[2-9] De Coster W. et al., NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. Bioinformatics. 34, 2018, pp.2666-2669.

3.3　1F 設備において微生物腐食リスクが高まる環境条件のスクリーニング（令和 2 年度～令和 4 年度）

3.3.1　設備環境を想定した環境条件下での腐食試験（令和 2 年度～令和 3 年度）

(1)　令和 3 年度までの概要

①　腐食試験における培養条件の選定

令和 2 年度には、1F 設備（処理水タンク底部、格納容器トーラス部、使用済燃料プール等）における微生物腐食リスクを評価するための試験系確立に向けて、東京電力ホールディングス株式会社（以下、「東電」という。）ホームページなど公知情報から情報収集を行った。微生物腐食試験の条件設定に必要なパラメーター（培地組成、塩素濃度、pH、温度、溶存酸素量、材料等）の情報を抽出し、1F の設備が晒されうる環境条件の範囲を Sr 処理水タンク：pH 7.1～8.4、Cl^- 濃度 500～2,600 ppm、SO_4^{2-} 濃度 54～450 ppm、ALPS 処理水タンク：pH 8.4～8.9、Cl^- 濃度 2,700～4,800 ppm、SO_4^{2-} 濃度 290～6,000 ppm、格納容器：号機により地下水（淡水）～ 海水の条件と整理した。本情報をもとに微生物腐食試験に用いる試験条件の選定を行った。

②　微生物試料の取得及び実験条件の確立

令和 2 年度には、既存の腐食活性が報告されている微生物のうち硫酸還元菌 4 株、メタン菌 1 株を選定し、密閉できるバイアル瓶内において嫌気環境下での炭素鋼腐食試験を実施し、使用した試験系により微生物腐食活性を評価可能であることを確認した。また、腐食試験に用いる微生物源として 1F サイト周辺より地下水 2 試料、河川水 1 試料、海水 1 試料を取得した。これら試料を植菌源として、種々の栄養条件下において鉄顆粒を用いた腐食試験を開始し、一部の培養条件において非植菌区と比較して腐食促進が観察された。

令和 3 年度には、1F 周辺の水試料に含まれる微生物による微生物腐食の可能性を検証することを目的として、採水試料を用いた炭素鋼の室内暴露試験を 6 か月間実施し、炭素鋼と地下水試料の接触によりメタン菌や硫酸還元菌による微生物腐食が生じる可能性が提示された。また、地下水試料から腐食反応を担う微生物として、増殖のためのエネルギーとして炭素鋼から電子を獲得することで腐食を引き起こすメタン菌 T01 株、硫酸還元菌 T02 株を単離した。T01 株の電気化学的解析から、T01 株が固相から電子を獲得する能力を有することが検証された[3-1]。1F 設備環境のような栄養源が少ない環境においては、炭素鋼をエネルギー源とする T01 株や T02 株のような微生物が地下水とともに流入した結果、腐食を引き起こす可能性があることを示した。加えて、これら単離株及び令和 2 年度に取得した腐食活性をもつ微生物群集を用いて、Sr 処理水タンクの環境を想定した培養条件下での炭素鋼腐食試験を行った結果、一部の条件において微生物の増殖と腐食生成物の発生が観察された。

3.3.2　微生物腐食の評価及び微生物腐食リスクの高まる環境条件のスクリーニング（令和 3 年度～令和 4 年度）

(1)　令和 3 年度までの概要

①　試験片材料表面の観察、腐食速度の評価

令和 3 年度には、3.3.2-②において実施した腐食試験の終了後に回収した試験片を酸洗浄し、重量測定を行うことで腐食の進行度合いを評価した。重量測定後の試験片は SEM 及び 3D 形状測定機を用いて表面の形状変化を観察し、腐食形態（全面腐食、局部腐食、腐食深さ）を評価した。T01 株は NaCl を含まない淡水環境において非植菌区の約 15 倍の平均腐食速度

0.36 mm / 年を示し、既報の腐食性メタン菌よりも高い腐食活性を示した。T02 株は炭素鋼の重量減損量から算出される腐食速度としては非植菌区と 1.7 倍程度の差であったが、炭素鋼表面観察の結果、局所的な腐食を引き起こしており、腐食が深い箇所の計測結果から局部的な腐食速度は 0.37 mm / 年と算出された。Sr 処理水タンクの環境を想定した条件下においては、pH が腐食活性に及ぼす影響が大きく、T01 株においては pH 7.0 から pH 8.0 に変わるだけで重量減損量を指標とした腐食活性は 1/10 に低減した。環境条件の制御により、腐食活性を抑制可能であると考えられる。ただし、T02 株については試験片の重量減損量からは腐食活性が低いと考えられた pH 8.5 の培養条件においても局部的な腐食を示した。

② 培養液の分析及び腐食に関与した微生物反応の推定

令和 3 年度には、当年度に実施した腐食試験試料の気相部と培養液の機器分析による含有成分の定量を行い、高い腐食活性を示した試料においてはメタンガスの生成や硫酸イオンの減少が検出された。メタン菌によるメタン生成反応や硫酸還元菌による硫酸イオン還元反応の腐食への関与が示唆された。また、1F 周辺の水試料を用いて行った室内暴露試験について試験後の試料に含まれる微生物の量及び種類について遺伝子を指標として解析することで、もともと水試料に含まれている微生物の種類からの変化を解析した。その結果、腐食活性が見られた試料においてはメタン菌 *Methanobacterium* 腐や硫酸還元菌 *Desulfovibrio* 属が増殖しており、これらの微生物の腐食反応への関与を推定した。1F 周辺の地下水の一部には腐食を引き起こす微生物が含まれており、鉄材料と接触することで腐食を引き起こすリスクが存在することが推定された。

(2) 令和 4 年度実施内容及び結果

令和 4 年度には、1F 周辺より採取した水試料に含まれる微生物の腐食活性を評価し、リスクの高まる環境条件のスクリーニングを行うために、令和 3 年度に地下水より単離した腐食性メタン菌 T01 株と腐食性硫酸還元菌 T02 株を用いた以下の試験を行った。①原子炉建屋の水質を想定した条件での腐食試験、②詳細な pH 条件を設定した腐食試験、③現場環境を想定した塗装試験片に対する腐食試験を行った。加えて、幅広い環境条件で局部腐食を引き起こす T02 株について、④ゲノム情報に基づいた特性解析、⑤電気化学的な解析を行った。

① 原子炉建屋想定条件下での腐食活性

令和 2 年度に公開情報をもとに推定した原子炉建屋滞留水の水質情報[3-2]をもとに令和 4 年度は培養条件を設定し、腐食試験を実施した。培養条件としては有機物を含まない無機塩培地[3-1]をベースとして、4 つの pH 条件 (pH 6.5、7.0、7.5) において、微生物の増殖・活性に影響を及ぼす Cl^-、SO_4^{2-} 濃度条件について表 3.3.2-1 に示す 5 条件を設定した。

表 3.3.2-1 原子炉建屋内を想定した培養条件

	条件①	条件②	条件③	条件④	条件⑤
NaCl 濃度（mg/L）	20	200	2,000	10,000	20,000
Na_2SO_4 濃度（mg/L）	60	60	60	60	60

培養試験は、50 mL バイアル瓶を用い、別途オートクレーブ滅菌した各条件の無機塩培 30 mL 及び炭素鋼試験片（SS400、0.8 cm 角）を添加、ブチルゴム栓で密栓し、気相部分を

混合ガス（N_2 ： CO_2 = 8 ： 2）で置換した。気相置換後、T01 株、T02 株の前培養液を 1 mL 植菌し、培養を開始した（繰り返し数 n=3）。培養は 30 ℃に設定した恒温機において 2 か月間、静置にて行った。また、同様の試験条件において植菌しない非植菌区を対照として設定した（繰り返し数 n = 3）。2 か月間の培養後、炭素鋼試験片を取り出し、表面に付着した腐食生成物を ISO8407（2021/01）に準拠し、20 g/L Sb_2O_3、50 g $SnCl_2$ を含む HCl 溶液で除去、洗浄した。洗浄後の炭素鋼試験片の重量を測定し、試験開始前の重量との差分として重量減損量を算出した。また、腐食活性を評価するために、気相成分、培養液成分（硫酸イオン）の測定を行った。気相については、あらかじめ高純度窒素ガスにて置換しておいたブチルゴム栓付バイアル瓶（容量 10 mL）に、密閉瓶からガスタイトシリンジを用いてヘッドスペースガス（2 mL）を採取後、ガスクロマトグラフ（TCD 検出器搭載 Varian Inc 製 CP4900）によって H_2 、CO_2 、CH_4 の測定を行った。硫酸イオン濃度の測定はイオンクロマトグラフ ICS-1500（日本ダイオネクス株式会社）、陰イオン用カラム AS11-HC（日本ダイオネクス株式会社）を用いることで行った。

pH 6.5 において実施した腐食試験の結果を図 3.3.2-1 に示す。T01 株は低 NaCl 濃度の培養条件①、②において高い重量減損量を示し（条件①において平均腐食速度：0.41 mm / 年、非植菌区の 19.7 倍、条件②において平均腐食速度：0.59 mm / 年、非植菌区の 24.3 倍）、顕著に炭素鋼の腐食を促進することが示された。その一方、NaCl 濃度の上昇に伴って重量減損量が低下する傾向を示した。特に、条件②と条件③の間で大きな腐食活性の低下が見られ、NaCl 濃度 200 mg/L と 2,000 mg/L の間で大きく微生物活性が低下することが推定された。メタン発生量は重量減損量と同様の傾向を示し、条件①、②が高く、NaCl 濃度の上昇に伴って傾向が見られた。条件④、⑤ではメタン発生は検出されなかった。炭素鋼の腐食に伴い放出された電子を還元力としたメタン生成反応と相関していると考えられる。T02 株による重量減損量は、条件①、②において大きく（条件①において平均腐食速度：0.15 mm / 年、非植菌区の 7.3 倍、条件②において平均腐食速度：0.15 mm / 年、非植菌区の 6.3 倍）、条件④、⑤において低下する傾向が見られたが、T01 株の試験区において見られた低下ほど大きな差異では無かった。硫酸イオン濃度が 60 mg/L と低いことから硫酸還元活性は低く抑えられたことが推察された。

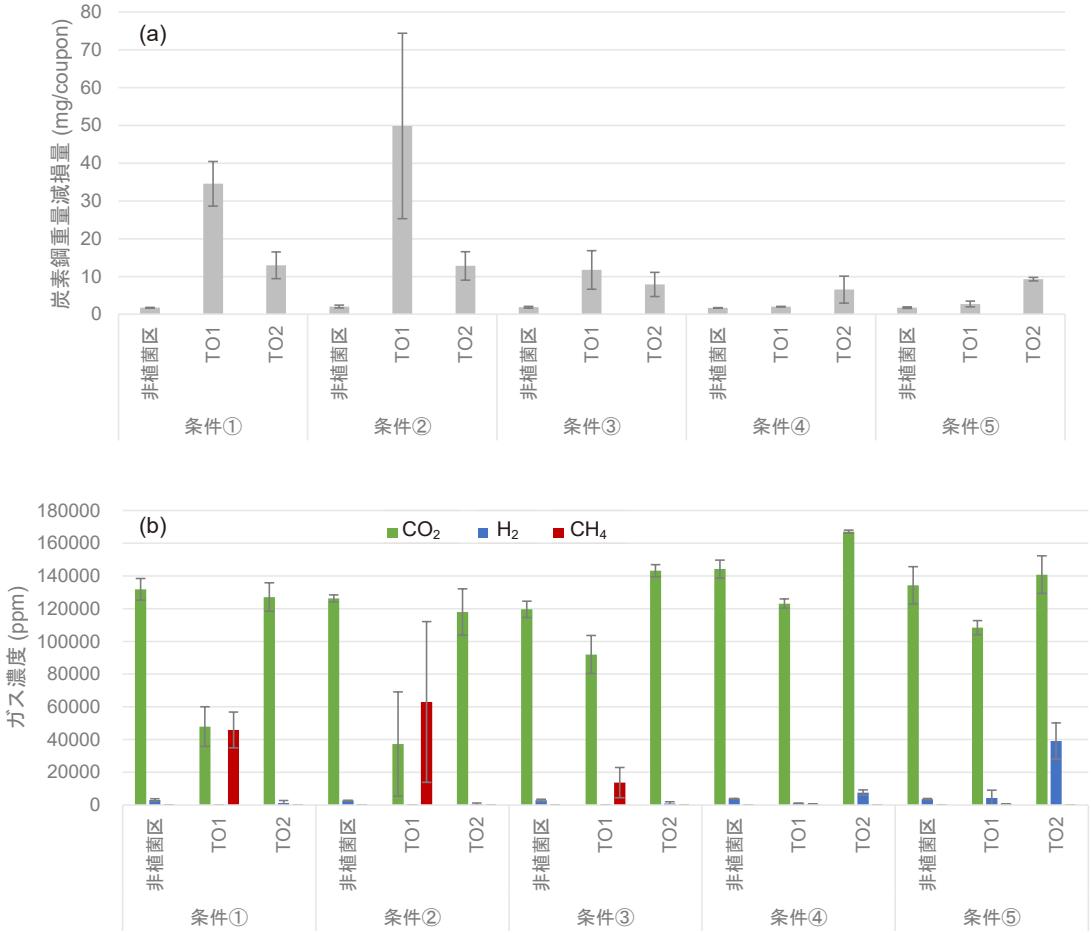


図 3.3.2-1 pH 6.5 での腐食試験結果（a）重量減損量、(b) ガス組成

pH 7.0 において実施した腐食試験の結果を図 3.3.2-2 に示す。T01 株による重量減損量は条件①、②、③において高い活性が維持された（条件①：非植菌区の 11 倍、条件②：非植菌区の 11.8 倍、条件③：非植菌区の 9.5 倍）。さらに高い NaCl 濃度である条件④、⑤においては顕著に重量減損量が低下し、T01 株による腐食活性の低下が示唆された。また、メタン生成量についても同様の傾向が見られ、条件①、②、③ではほぼ同程度のメタン発生量であったの対して、条件④、⑤ではメタンの発生は検出されなかった。前述の pH 6.5 の試験条件下においては活性が低下する濃度が NaCl 濃度 200 mg/L ～ 2,000 mg/L の間に存在したが、pH 7.0 の試験条件においては NaCl 濃度 2,000 mg/L ～ 10,000 mg/L の間にシフトした。T02 株による重量減損量は条件①～③においては非植菌区と同程度であったのに対して、条件④において高い値を示した（非植菌区の 3.1 倍）。

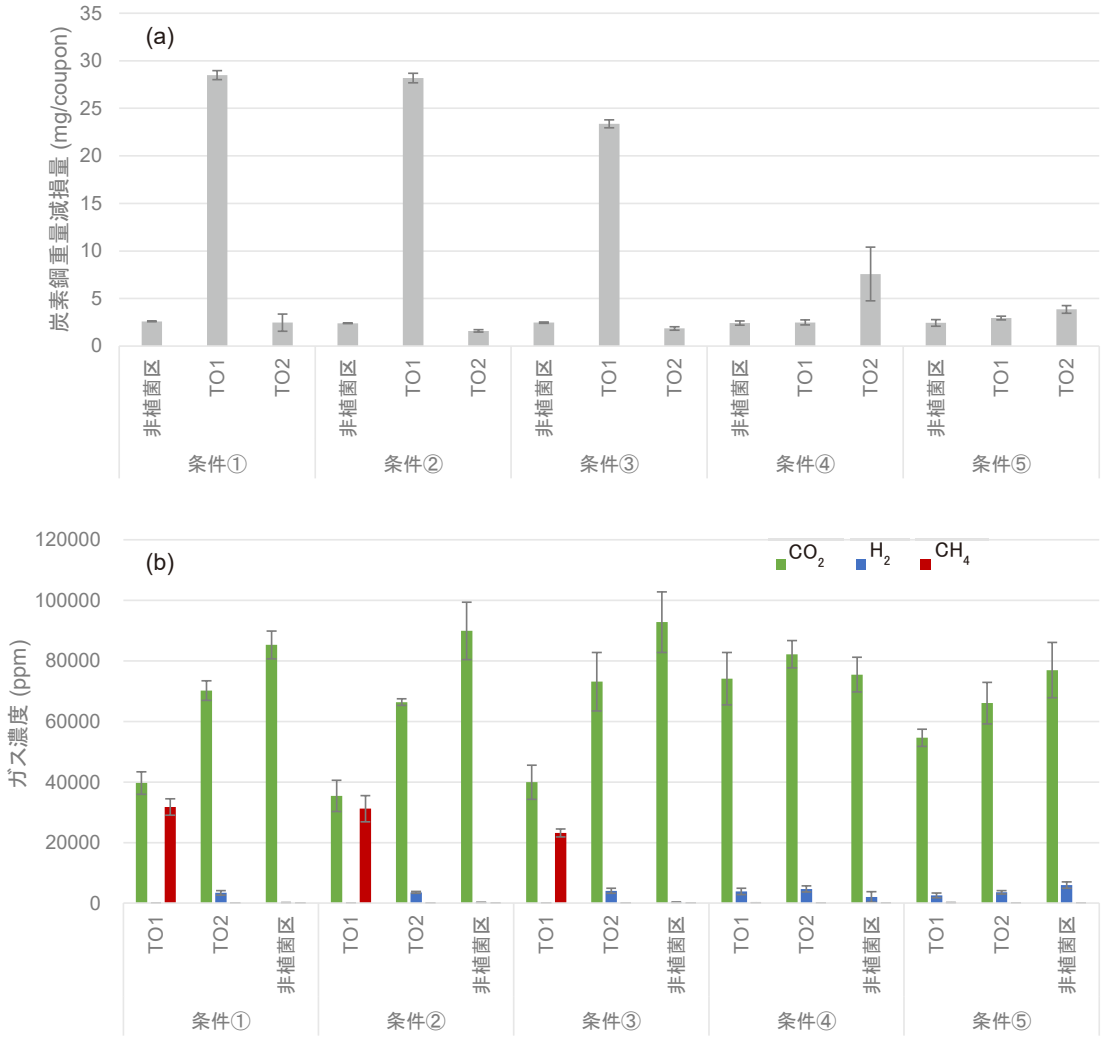


図 3.3.2-2 pH 7.0 での腐食試験結果（a）重量減損量、(b) ガス組成

pH 7.5 において、T01 株は培養条件②において最も高い重量減損量を示し（平均腐食速度：0.57 mm / 年、非植菌区の 26.9 倍）、NaCl 濃度の異なる条件①と③では条件②と比べて重量減損量が下がるものの、非植菌区に対して高い腐食促進が確認された（条件①において非植菌区の 14.9 倍、条件③において非植菌区の 28 倍）。これらの条件においてはメタンの生産が検出された。T01 株による重量減損量は条件④と条件⑤では大きく低下し、非植菌区に対して変化は確認されず（非植菌区の 0.85 倍 ～ 1.2 倍）、メタンの発生も検出されなかった。T02 株植菌区においては非植菌区と重量減損量が変わらず、顕著な腐食促進は見られなかった（非植菌区の 0.76 倍 ～ 1.0 倍）。

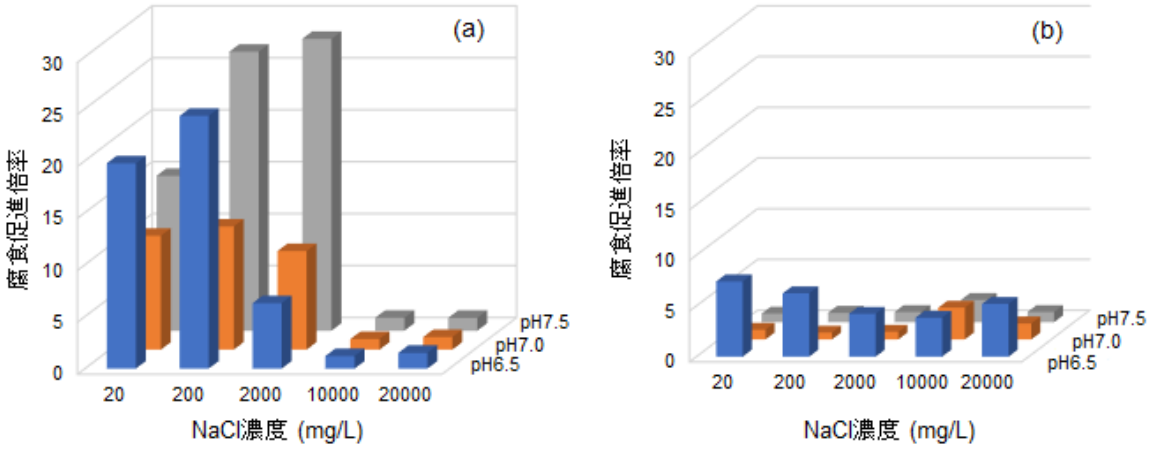


図 3.3.2-3 培養条件に依る微生物による腐食促進活性の違い（a）T01 株、（b）T02 株

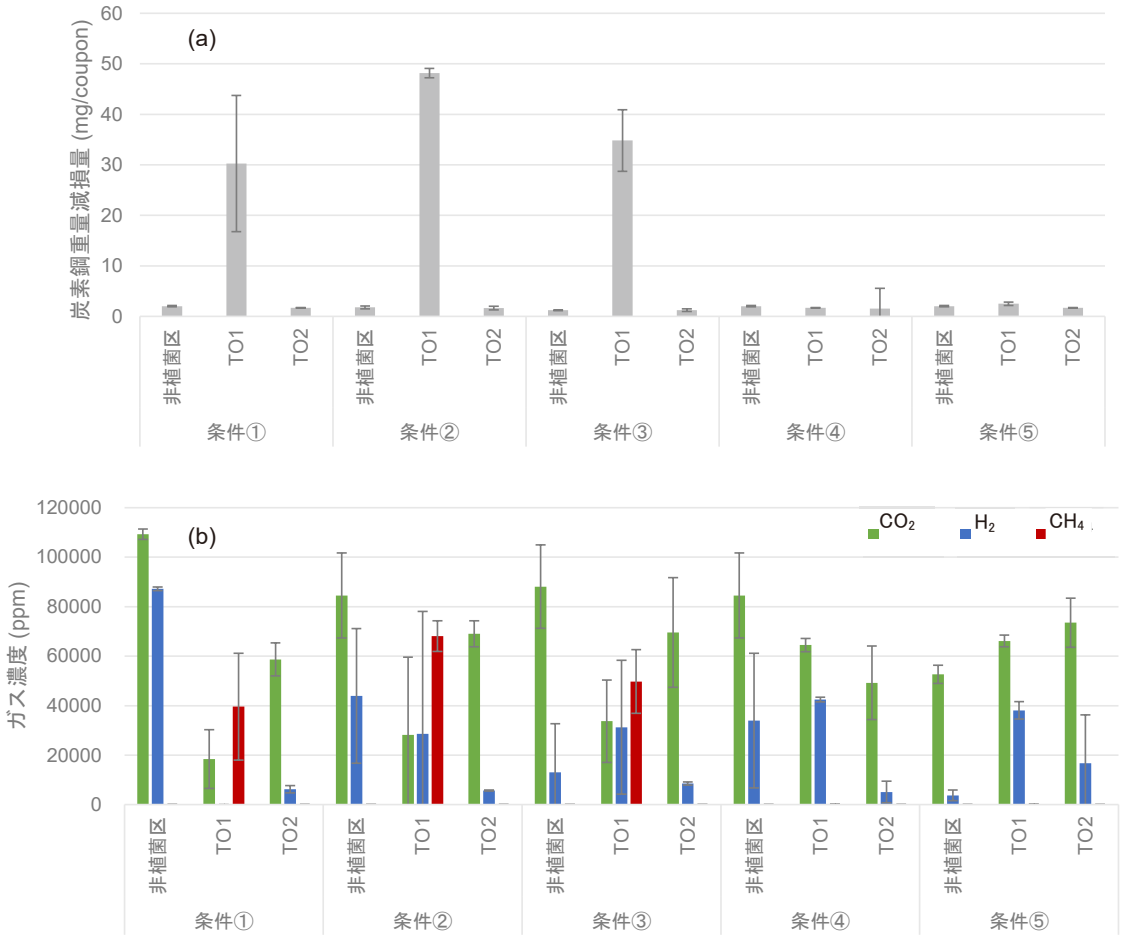


図 3.3.2-4 pH 7.5 での腐食試験結果（a）重量減損量、（b）ガス組成

本研究で対象とした植菌源（腐食性メタン菌 T01 株、腐食性硫酸還元菌 T02 株）ごとに、各培養条件下での腐食活性を非植菌区に対する腐食促進の倍率として整理した(図 3.3.2-3)。

T01 株の腐食活性は原子炉建屋内で想定された pH 6.5～pH 7.5 の範囲においては pH よりも NaCl 濃度が腐食活性に影響が大きいことが示された。T01 株は NaCl 濃度 20 mg/L ～ 2,000mg/L においては高い腐食促進倍率を示したのに対して、10,000 mg/L においてはいずれの pH 条件においても活性が大幅に低下した。特に pH 7.5 においては、NaCl 濃度 2,000 mg/L においても低濃度側に対して活性が下がることなく、非植菌区の 30 倍以上の腐食促進倍率を示したのに対して、10,000 mg/L において腐食促進効果は見られなくなった（図 3.3.2-4)。

一方、T02 株においては、T01 株よりも非植菌区に対して腐食促進活性を示す pH 範囲は狭く、pH 6.5 の条件と pH 7.0 の NaCl 濃度 10,000 mg/L と 20,000 mg/L に限られた。高い pH ほど活性が低下する傾向が見られたが、NaCl 濃度条件については T01 株で見られたように特定の濃度以上で活性が無くなるという現象は観察されなかった。

T01 株、T02 株の各培養条件下での腐食形態の比較のため酸洗浄後の炭素鋼試験片の写真を示す（図 3.3.2-5、図 3.3.2-6)。その結果、T01 株培養試料の試験片では図 3.3.2-4a で腐食促進活性が高かった試料においては凹凸が表面全体に広がっており、全面腐食の進行が肉眼でも観察された。NaCl 濃度 10,000 mg/L 以上の条件においては、試験開始時から存在する研磨痕が表面に残ったままであり、腐食が抑制されていることが確認された。

T02 株培養試料では重量減損量が多かった pH 6.5 条件において円形で局部的な腐食の進行が観察され、局部的な減肉は NaCl 濃度の増加に伴って見られなくなった。一方で、重量減損量からは腐食促進が見られなかった pH 7.0 の低 NaCl 濃度領域においても円形の局部的な減肉が観察された。T02 株の培養試験区においては局部的な腐食が観察されたため、ワンショット 3D 形状測定機（VR-3000、キーエンス社）にて炭素鋼試験片の表面観察を行い、腐食深さの計測を行った（図 3.3.2-7、図 3.3.2-8、図 3.3.2-9)。pH 6.5、NaCl 20 mg/L の条件において、最も深い減肉が見られ、その深さは 92.19 μm であった。腐食深さから算出した局部腐食速度は 0.55 mm / 年であり、重量減損量（図 3.3.2-2）から算出した平均腐食速度は 0.15 mm / 年と比較して顕著に高い値を示し、T02 株による腐食速度は局部腐食速度として評価するのが適正と考えられた。同一 pH 条件（pH 6.5）において最も深い箇所の深さは NaCl 濃度が高まるにつれて、92.19、64.1、17.11 μm と低下し、NaCl 濃度の影響を受け、10,000 mg/L 以上の濃度では腐食活性が低下することが明らかとなった。pH 7.0 においては NaCl 濃度 2,000 mg/L 以上で減肉の低下が見られた。pH 7.5 においては低 NaCl 濃度においても局部的な深い減肉は見られなかった。平均腐食速度で評価した場合においては T02 株の腐食に及ぼす NaCl 濃度の影響は大きくないように見られたが、局部腐食の視点で整理した場合には T01 株同様に NaCl 濃度の影響を受けることが明らかとなった。

NaCl (mg)	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
20			
200			
2,000			
10,000			
20,000			

図 3.3.2-5 T01 株培養後の炭素鋼腐食試験片（腐食生成物除去後）

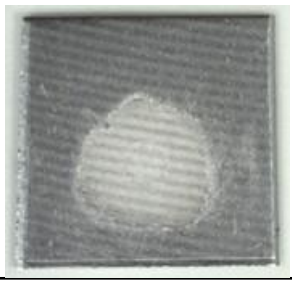
NaCl (mg)	pH 6.5	pH 7.0	pH 7.5
20			
200			
2,000			
10,000			
20,000			

図 3.3.2-6 T02 株培養後の炭素鋼腐食試験片（腐食生成物除去後）

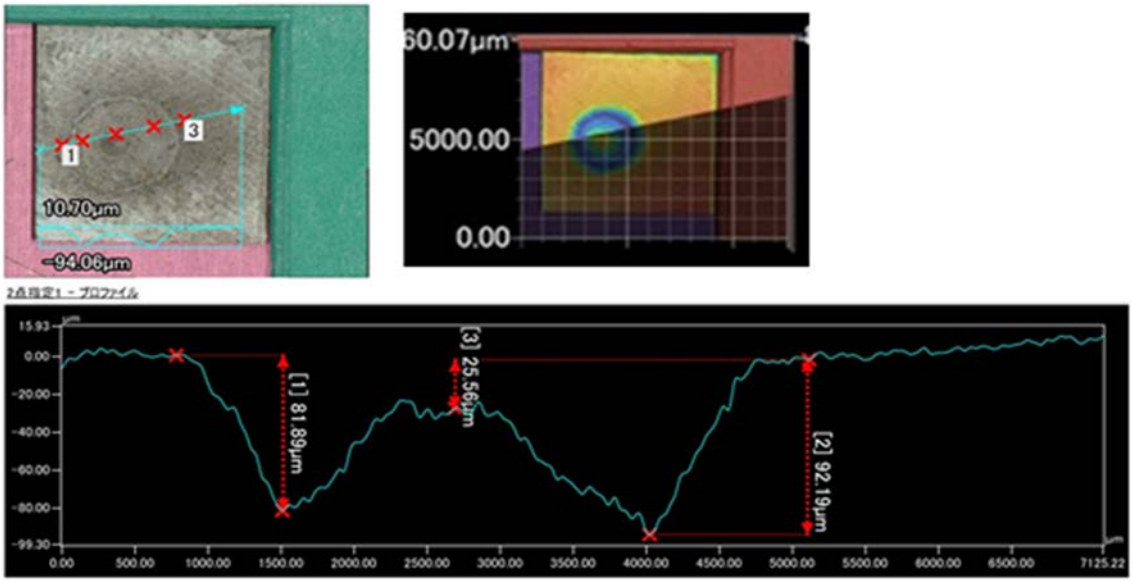


図 3.3.2-7 炭素鋼試験片の表面計測（T02 株、pH 6.5、NaCl 20 mg/L）

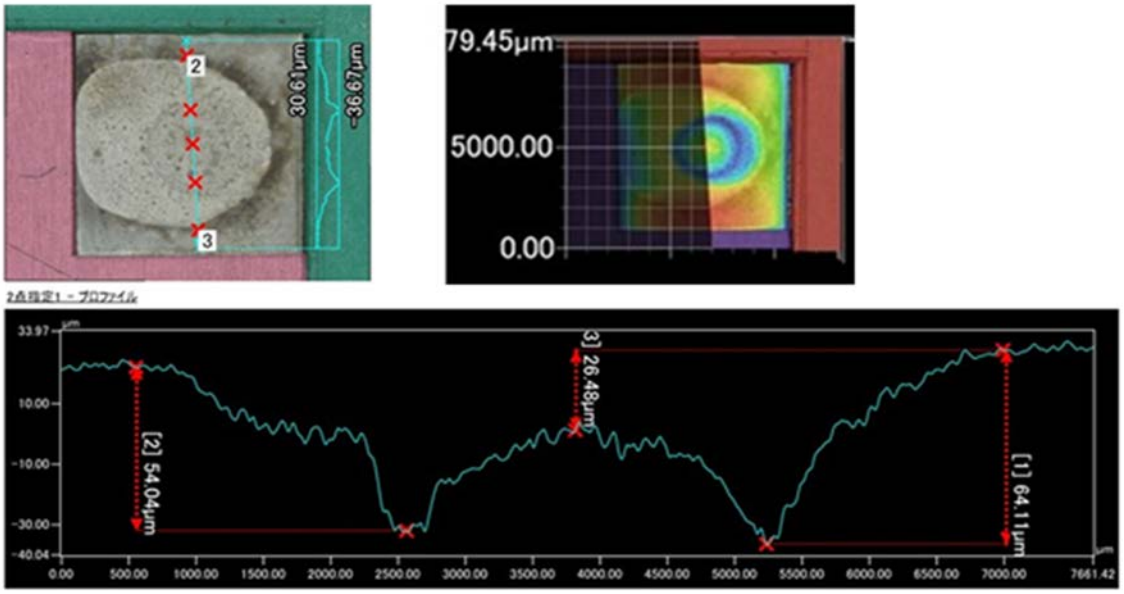


図 3.3.2-8 炭素鋼試験片の表面計測（T02 株、pH 6.5、NaCl 20 mg/L）

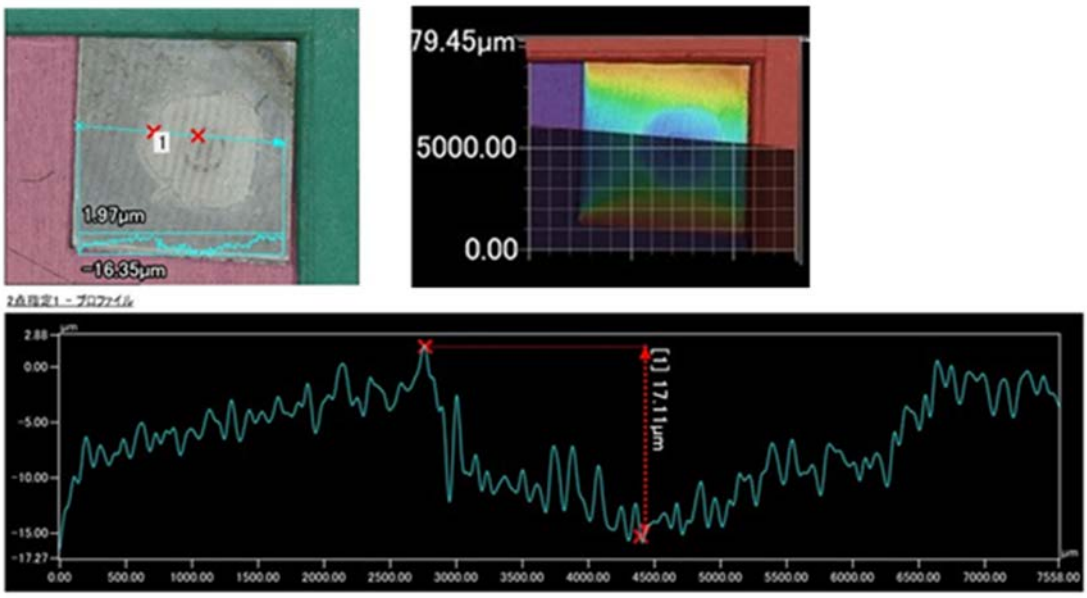


図 3.3.2-9 炭素鋼試験片の表面計測（T02 株、pH 6.5、NaCl 10,000 mg/L）

② pH を詳細に設定した条件下での腐食活性の評価

令和 3 年度までの結果を受け、pH が T01 株、T02 株の腐食活性を制御する重要な環境条件であることが推定されたため、異なる pH 条件での腐食活性の比較を試みた。無機塩培地（T01 株用 NaCl 濃度 200 mg/L、T02 株用 Na_2SO_4 4 g/L、NaCl 濃度 20 mg/L）の pH を 5.0、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5 にそれぞれ調整し、T01 株、T02 株を植菌源とした炭素鋼試験片の腐食試験を行った。T01 株植菌区では、pH 6.0 ～ pH 7.5 の範囲において重量減損量 40 ～ 50 mg の高い腐食活性を示し、pH 5.0、pH 7.5 では活性が低下する傾向が見られた（図 3.3.2-10）。また、pH 8.0 以上では非植菌区と比較して重量減損量に差異は見られなかった。メタン生成についても同様の傾向であり、腐食活性と相関したメタン生成が確認された。一方で、高い pH 条件下において非植菌区の CO_2 濃度が低く、メタン菌 T01 株が増殖に利用する CO_2 量の不足が活性低下につながっている可能性も考えられた。T02 株植菌区においては、pH が低い条件において重量減損量が増加する傾向が見られ、pH 5.0 においても最も高い重量減損量を示した（図 3.3.2-11）。腐食性硫酸還元菌は pH 6.0 条件では pH 7.0 条件での T02 株による腐食活性として約 15 倍高い活性を示した。非植菌区においては全 pH 条件で水素が検出された一方で、T02 株植菌区では水素の検出は見られず、T02 株による消費が推定された。重量減損量の増加が見られていない高 pH 条件においても微生物活性が残存していると考えられる。pH 5.0 の条件において T02 株による硫酸イオンの減少量は最も大きく、高い硫酸還元活性を示した。その他の pH 条件では硫酸還元活性に大きな差は見られず、pH 8.5 においても硫酸還元活性が検出された。

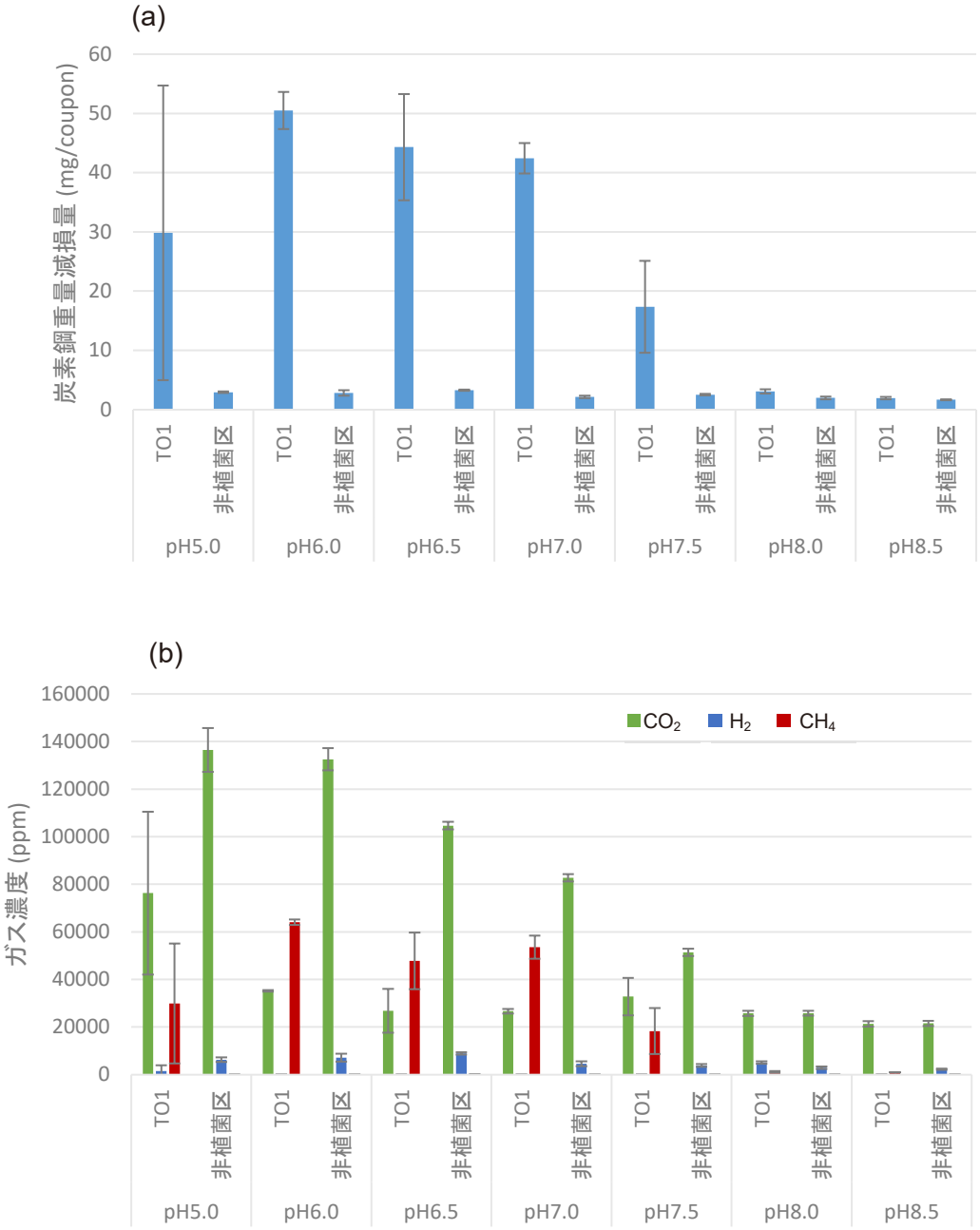


図 3.3.2-10 T01 株による炭素鋼腐食の pH 依存性 （a）重量減損量、(b）ガス組成

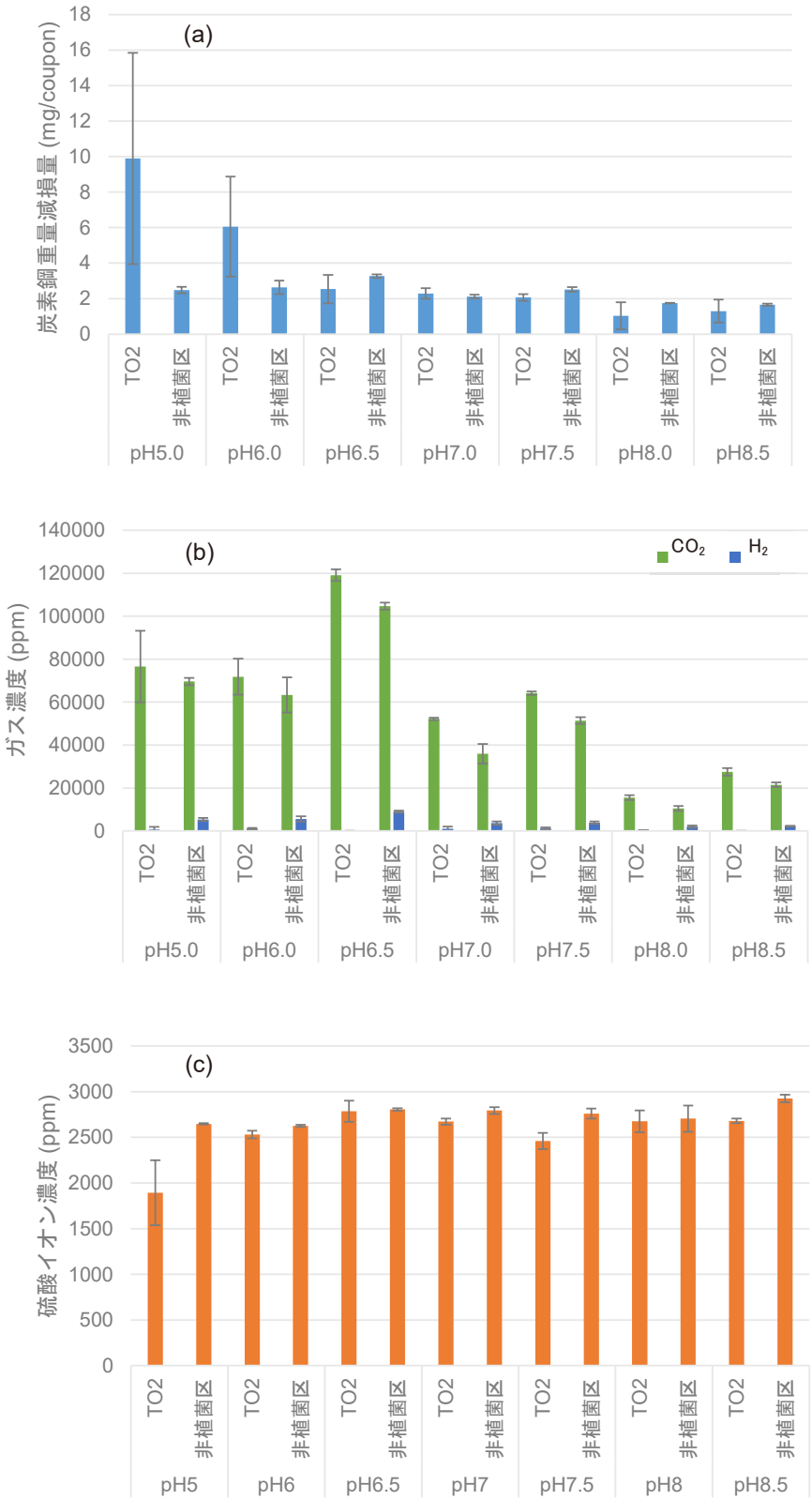


図 3. 3. 2-11 T02 株による炭素鋼腐食の pH 依存性 （a）重量減損量、（b）ガス組成、（c）硫酸イオン濃度

酸洗浄後の炭素鋼試験片の表面について観察を行った。いずれの環境においても非植菌区においては表面に研磨痕が残っており、腐食は見られていない（図 3.3.2-12）。T01 株は図 3.3.2-5 に見られるように腐食形態としては全面腐食であった。T02 株においては pH に応答して腐食形態の変化が見られた（図 3.3.2-13）。重量減損量が大きかった pH 5.0、pH 6.0 においては全面的な腐食が見られた。それに対して、重量減損量では顕著な腐食が見られなかった pH 6.5～pH 7.5 においても、局部的な円状の腐食が観察された。さらに pH が高い pH 8.0、pH 8.5 においては微小な局部腐食に腐食形態が変化した。それらの腐食深さはそれぞれ 20 μm、10 μm 程度であった（図 3.3.2-14、図 3.3.2-15）。pH 8.5 においても腐食孔が見られたため、腐食活性を抑制できる pH 範囲の推定を目的として pH 9.0 での試験を追加実施したところ、重量減損、表面観察からも腐食は観察されなかった（図 3.3.2-13）。

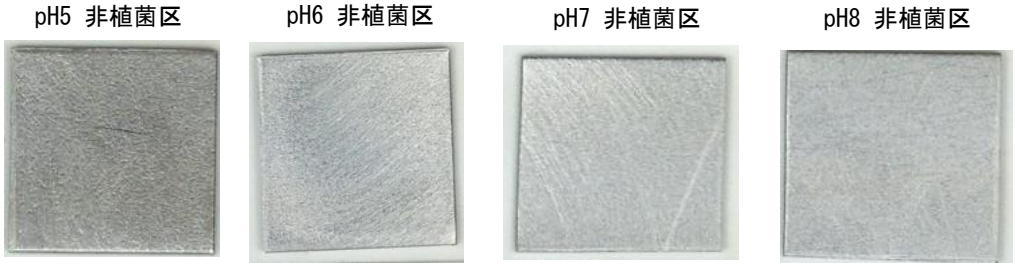


図 3.3.2-12 非植菌区の試験後の炭素鋼表面（腐食生成物除去後）

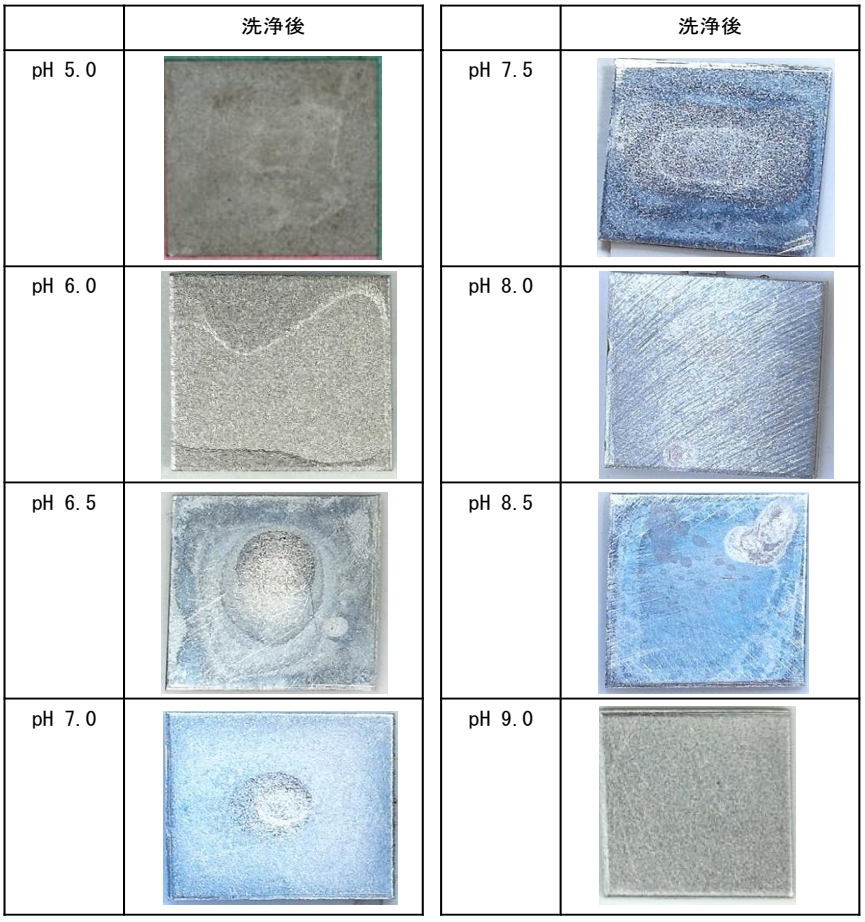


図 3.3.2-13 T02 株腐食試験後の炭素鋼表面（腐食生成物除去後）

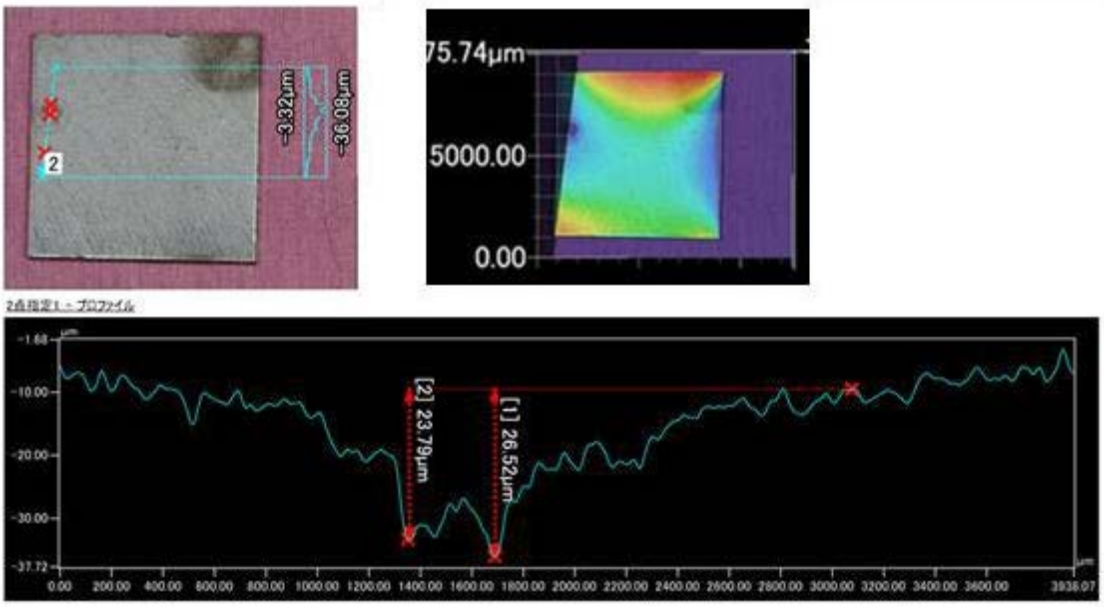


図 3.3.2-14 炭素鋼試験片の表面計測（pH 8.0、T02 株）

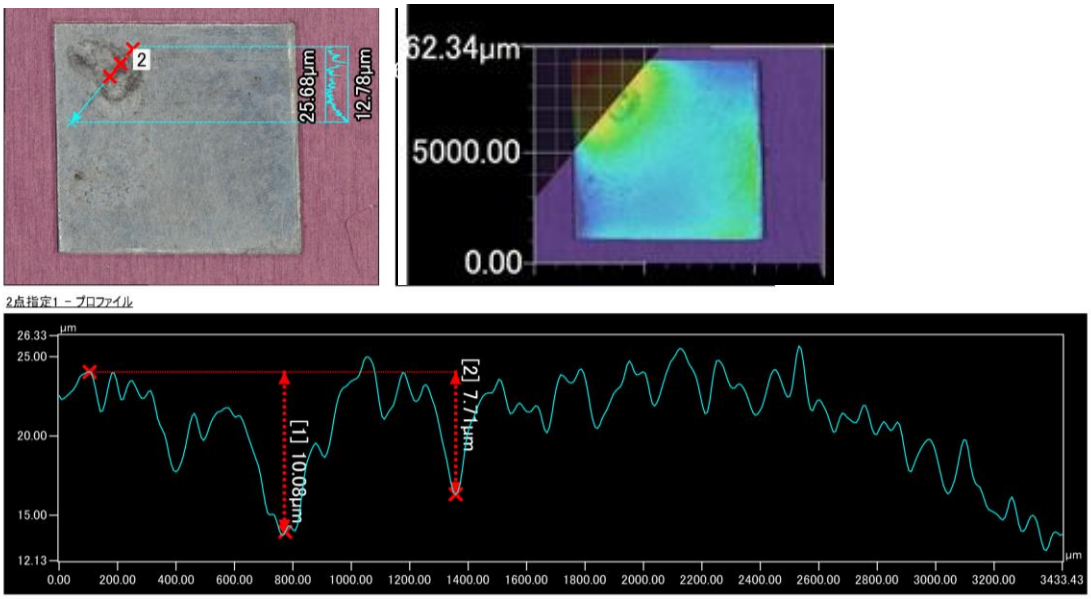


図 3.3.2-15 炭素鋼試験片の表面計測（pH 8.5、T02 株）

③　塗装試験片を用いた腐食活性の評価

1F において 2018 年 10 月に Sr 処理水タンク内において硫化水素の発生が見られ、硫酸還元菌が検出された[3-3]。Sr 処理水タンクの内面は塗装が施されており、塗装が健全な箇所において腐食は生じないが、タンク底面部には建設時に付いたと推定されるかき傷の周辺では塗装剥がれ箇所（腐食箇所）が確認されている。この腐食に関しては黒色の硫化鉄被膜が付着していなかったことから硫酸還元菌の影響はないと判断されている。

本試験においては、タンク内環境を想定し、かき傷のような塗装損傷部を施した試験片を用いることで腐食性メタン菌、硫酸還元菌による腐食進行の可能性評価を行った。炭素鋼板（SS400、0.8 cm×2 cm）をエポキシ樹脂錆止め塗料（大日本塗料製 エポオール）に浸漬することで、塗装を施した。塗装を施した試験片に対して塗料の付着性試験（JIS K 5600）を参考に碁盤の目状の塗装損傷部を加工した。加工を施した塗装試験片をバイアル瓶にて無機塩培地（pH 7.0）に浸漬し、密閉、気相置換（N_2 / CO_2 = 8 : 2）後、T01 株、T02 株を植菌することで腐食試験を開始した。腐食試験を 1 年間行った結果、T02 株培養試料において塗装損傷部に錆こぶが観察された（図 3.3.2-16a）。錆こぶを酸により除去した後、塗装は内部より盛り上がっている状態にあった（図 3.3.2-16b）。さらに JIS K 5600 に示されているセロハンテープを用いた剥ぎ取り試験を行ったところ、加工部全面が剥ぎ取られ、塗装下においても腐食が進行し、塗装が剥離状態にあったことが推定された（図 3.3.2-16e）。このような腐食の進行及び塗装剥がれは非植菌区や T01 株を培養した試験区においては観察されなかった（図 3.3.2-16c, d）。T01 株は塗装を施していない炭素鋼試験片に対しては高い腐食促進活性を示したが、塗装損傷面積が小さい場合には、その面積を超えて腐食が進展することはないと考えられた。一方、T02 株のような硫酸還元菌では塗装損傷部に隣接する塗装下にも腐食が拡大し、腐食が進展する可能性があるため、注視すべき対象と考えられた。

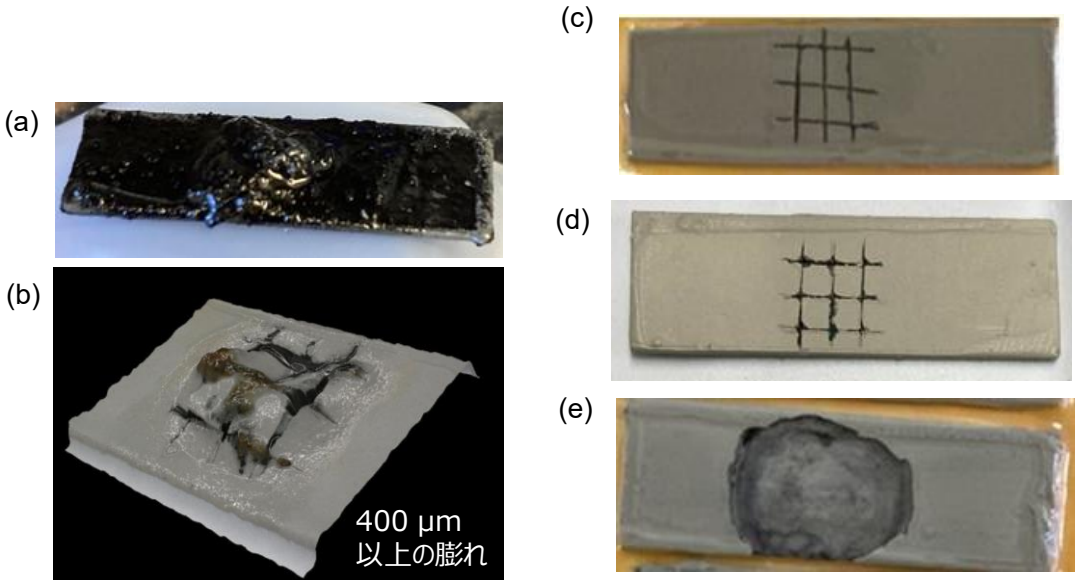


図 3.3.2-16 塗装炭素鋼試験片の試験後（a）T02 株試験区腐食生成物除去前、(b) T02 株試験区腐食生成物除去後、(c) 非植菌区剥ぎ取り後、(d) T01 株試験区剥ぎ取り後、(e) T02 株試験区剥ぎ取り後

④　TO2 株の特性を把握するためのゲノム解析

腐食性硫酸還元菌 TO2 株の微生物分類学上の同定を行うため、培養液からゲノム DNA を DNeasy PowerSoil Pro Kit（QIAGEN 社）を用いて抽出した。抽出したゲノム DNA を試料として SMRTbell Express Template Prep Kit 20（PacBio）を用いたライブラリー調製を行い、Sequel Ile（PacBio）を用いてシーケンス解析を行った。SMRT Link （v.11.0.0.146107）を用いて、シーケンシングで得られた配列からアダプター配列を除去し、サブリードを形成した。そのサブリードをアライメントしたコンセンサス配列（CCS）を作成した後、1 リードあたりの平均品質値が 20 未満の CCS リードを除去し、HiFi リードとした。高品質の HiFi リードを Flye（v. 2.91-b1780）を用いてアセンブルし、アセンブルされたゲノム配列から Prokka（v. 1.14.5）を用いて遺伝子の予測を行った。TO2 株のゲノム全長は 5,381,958 bp、GC 含量は 51.7%であり、5113 のコーディング領域を含んでいた。ゲノム全体の Average Nucleotide Identity を指標とした結果、TO2 株は *Citrobacter freundii* NBRC12681 と 98.3535%の高い同一性を示した。そこで、本研究で単離した腐食性メタン菌を *Citrobacter* sp. TO2 株と命名した。既往の腐食性硫酸還元菌としては *Desulfovibrio* が良く知られているが、TO2 株は異なる分類群に属する微生物であった。*Desulfovibrio* は偏性嫌気性菌であるのに対して *Citrobacter* は通性嫌気性菌であり、酸素がある環境下でも増殖が可能である。*Citrobacter* による硫酸還元活性及び腐食活性はこれまでにも報告されているが[3-4、3-5]、鉄から電子を獲得することで腐食を引き起こす EMIC（Electric-MIC）活性は報告されておらず、TO2 株が初めての事例である。ゲノム解析の結果、TO2 株のゲノム上には硫酸還元反応に関与する遺伝子以外にも硝酸還元反応に関与する遺伝子（nitrate reductase 11 個）が存在することが明らかとなった。このことは、TO2 株が硫酸イオンだけでなく、硝酸イオンを電子受容体として増殖することができることを示唆する。そこで、無機塩培地（Na_2SO_4 の代わりに $NaNO_3$ を 4 g/L 含有）を用い、前述と同様の手順にて嫌気環境下での炭素鋼腐食試験を行った。1 か月間の試験を行った後、試験片の重量減損量を評価した。その結果、非植菌区に対して 2 倍程度の減損量が見られ、硝酸イオンが存在する嫌気環境においても腐食が進行することが確認された（図 3.3.2-17）。現在 1F 炉内は窒素充填されており、気相ラジオリシスにより硝酸が生成し、冷却水に溶け込むと考えられていることから、TO2 株の硝酸還元能は注視すべき特性と考えられた。

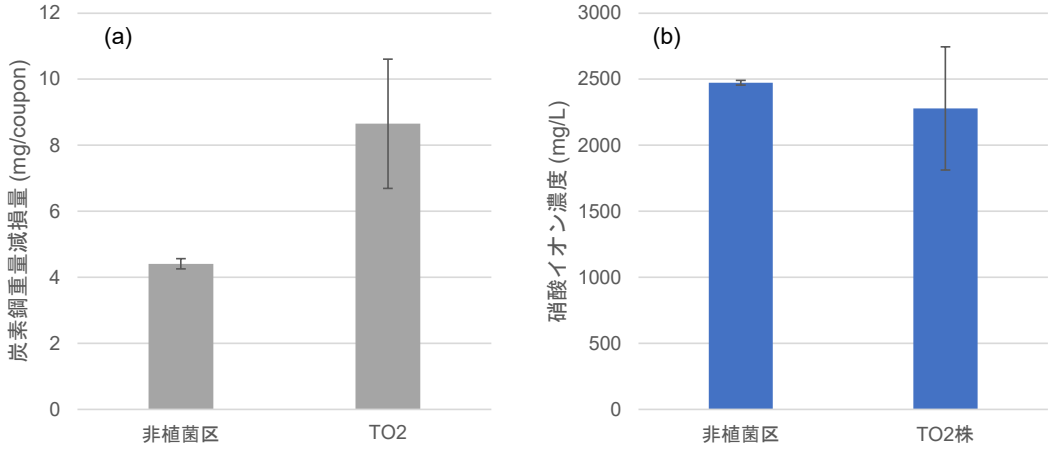


図 3.3.2-17 硝酸イオン存在下での炭素鋼腐食試験（a）炭素鋼重量減損量、（b）硝酸イオン濃度

⑤ 電気化学的手法を用いた腐食過程のモニタリング

これまでの結果より、腐食性硫酸還元菌 T02 株がより注意を払うべき対象として考えられたため、電気化学的手法による T02 株の腐食過程の解析を行うことで、腐食進展をモニタリングするための指標を得ることを試みた。電気化学的解析を行う前に、まず、経時的な腐食挙動の変化の解析を行った。無機塩培地 30 mL に炭素鋼試験片（SS400、0.8 cm 角）を浸漬した 15 本のバイアル瓶を用意し、T02 株を植菌することで腐食試験を開始した。培養開始後 9 日目、21 日目、35 日目、63 日目にバイアル瓶を 3 本ずつ開封し、炭素鋼試験片を回収し、培養後の重量減損量を計測した。対照として非植菌区の試験を同様に実施した。各サンプリングのタイミングの計測値を取りまとめ、経時変化として示した （図 3.3.2-18a)。植菌区において、培養 21 日後から非植菌区に対して重量減損量が増加する傾向が見られた。炭素鋼表面は培養 9 日目から黒色の硫化鉄と想定される腐食生成物が形成されており、酸洗浄により腐食生成物を除去した後は中央部に色の変化が見られ、T02 株による腐食が進行していることが推定された（図 3.3.2-18b)。9 日目の試験片では減肉は見られなかったが、35 日目以降に試験片中央部に明確な円状の減肉が観察された。時間経過に伴って、初期に見られた円の内側で同心円状により深い減肉が生じる腐食の進展が観察された。

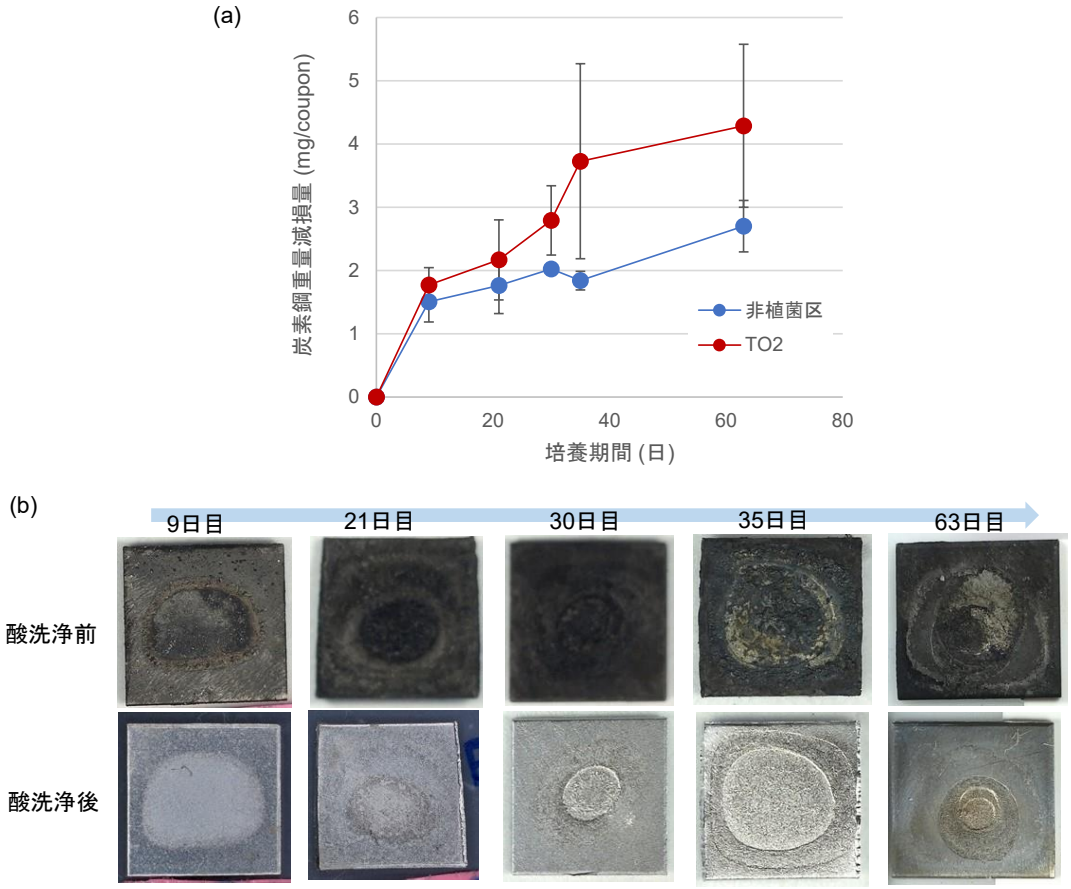


図 3.3.2-18 T02 株による炭素鋼腐食の経時変化（a）炭素鋼重量減損量、（b）各試験期間後の炭素鋼試験片

T02 株の腐食過程における電気化学的特性を計測するために図 3.3.2-19 に示す電気化学セルを作製した（図 3.3.2-19a）。本電気化学セルにおいて作用極は炭素鋼、対極は炭素板とした。電気化学セルに無機培地（pH 6.0, NaCl 200 mg）250 mL を充填し、嫌気雰囲気下（N_2 / CO_2 = 8 ： 2）において、30 ℃で培養を行いながら連続的に電位（OCP）の計測を行った。その結果、非植菌区においては緩やかに電位が低下し、-0.65 V 程度で安定したのに対して、T02 株植菌区では培養開始後電位が急低下した後、培養 5 日目から電位の上昇が観察された（図 3.3.2-19b, c, d）。図 3.3.2-18 の結果より、培養 9 日目には腐食進行が始まっていることから、電位上昇のタイミングと腐食進展のタイミングは整合的である。よって、本結果は電位を腐食進行のモニタリング指標とできる可能性を示唆している。これまでにカソード反応の増大が電位上昇に寄与することが報告されており[3-6]、本試験で見られた電位上昇は T02 株が炭素鋼から電子を引き抜く反応（カソード反応）を捉えていると推定された（図 3.3.2-20）。現場環境に炭素鋼板等の投げ込み試験片を投入し、電位を計測することで微生物腐食リスクをモニタリングできる可能性が考えられる。

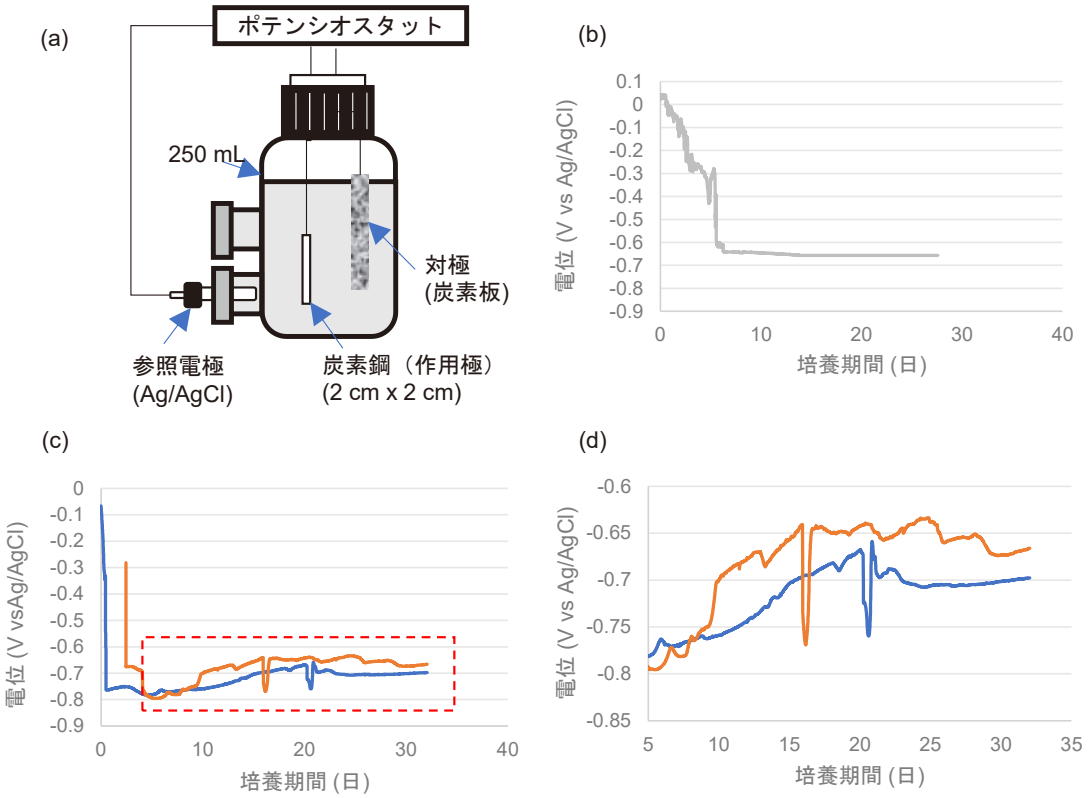


図 3.3.2-19 T02 株による炭素鋼腐食の経時的な電位測定（a）電気化学セル、（b）非植菌区、（c）T02 株植菌区（繰り返し数 n=2）、（d）（c）赤点線枠内の拡大図

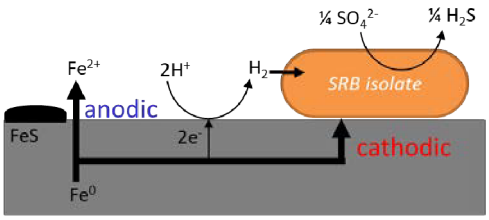


図 3.3.2-20 T02 株による炭素鋼腐食反応

この電子を引き抜くメカニズムを理解し、関与する遺伝子類を特定することは、腐食診断のためのバイオマーカー開発につながる。そこで、TO2 株が外部から電子を獲得するメカニズムについて知見を得るために、NIMS との連携のもと、TO2 株細胞を対象とした電気化学的解析を行った。まず、ITO 電極を作用極とした電気化学セルを使用し、作用極から TO2 株細胞への電流の流れを計測することを試みた。TO2 株を鉄粒とともに 9 日間の前培養を行った。培養瓶ごと 2 分間 超音波洗浄機に供することで鉄粒から TO2 株を引き剥がした後に、鉄粒以外の上清を回収し、遠心分離後、電解液へ再懸濁させることで植菌液を調製した。TO2 株の電子受容体として 20 mM の硫酸イオンを含む培地もしくは含まない培地を充填した電気化学セルにおいて ITO 電極に－0.4 V（SHE）の電位を印加し、電流値が安定したところで植菌液を添加し、電流の挙動を評価した。その結果、硫酸イオン有りの試験区においては硫酸イオン無しの試験区に対して還元電流の増加が検出され、電極から菌体へ、硫酸還元反応のための電子の流れが発生していることが推定された（図 3.3.2-21）。試験後の ITO 電極表面の SEM 観察を行ったところ、菌体の付着が観察され、電極と接触することで菌体が電子を受け取っていると考えられた。試験後の菌体が付着した ITO 電極に対して、Cyclic voltammetry 解析を行った結果、－0.38 V（vs SHE）近傍において酸化還元ピークが検出された。これまでに、EMIC 活性を有する硫酸還元菌においてはマルチヘム型シトクロムが固相からの電子引き抜きに関与することが報告されており、分極抵抗解析から-0.4 V（vs SHE）に還元ピークを持つことが示唆されている[3-7、3-8]。この電位は今回の解析結果において得られた酸化還元ピークと類似しており、同様の酵素類が TO2 株の細胞外からの電子獲得に寄与していることが考えられる。一方、TO2 株同様に固相から電子を引き抜くことで増殖する腐食性メタン菌 TO1 株は、昨年度の結果より-0.62 V(vs SHE)に酸化還元ピークを有することが分かっており[3-1]、TO2 株とは異なる酵素の細胞外からの電子引き抜きへの寄与をこれまでに推定している。

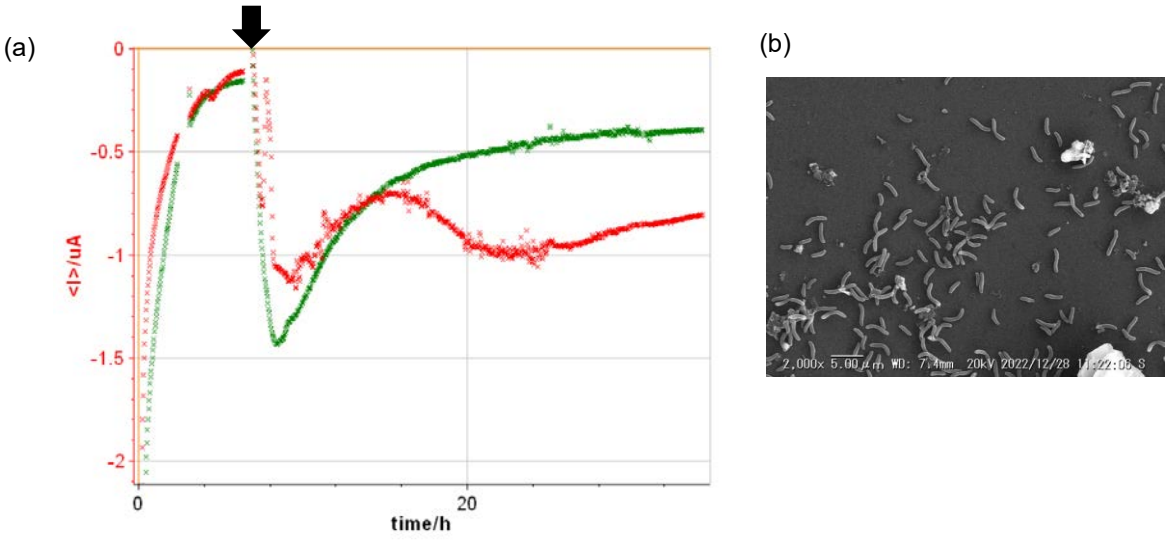


図 3.3.2-21 TO2 株の電極からの電子獲得（a）電流値変化、（b）電極上の SEM 観察像

3.3.3　各培養条件における腐食速度の整理及び微生物腐食リスクが高まる条件の推定

研究期間中（令和 2 年度～令和 4 年度）に各機関によって実施された 1F 周辺の環境サンプルもしくは環境サンプルより単離された腐食性微生物を用いた腐食試験のうち、高い微生物腐食活性（腐食速度として非植菌区の 3 倍以上）を示した結果を整理した（表 3.3.2-2）。その結果、微生物腐食活性が高まる環境条件として、地下水など水環境由来の微生物については有機物の濃度が低い貧栄養、弱酸性～中性、低塩濃度（NaCl 10 g/L 未満）の環境、土壌環境由来の微生物については有機物を豊富に含む中性環境が挙げられた。これらの条件から外れた水質環境であれば微生物腐食リスクは低いと考える。設備点検・管理においては水環境の pH、塩濃度を計測し、微生物腐食リスクを評価するとともに、汚染水処理・処理水放出の運用状況を踏まえて対策を最適化してくことが必要である。

表 3.3.2-2 高い微生物腐食活性が見られた培養条件

対象	培地	栄養条件（有機物）	pH	塩濃度	報告書該当部
地下水から単離した *Cellulomonas* sp. NTE-D12	R2A培地 10倍、100倍希釈	貧栄養	7.2	淡水 (NaCl添加無し)	R3年度3.1
地下水	無機塩培地	栄養無し	7	淡水 (NaCl添加無し)	R3年度3.3
地下水から単離した 腐食性メタン菌TO1	無機塩培地	栄養無し	6.0～7.0	NaCl 10 g/L未満	R3, 4年度3.3
地下水から単離した 腐食性硫酸還元菌TO2	無機塩培地	栄養無し	5.0～6.0*	NaCl 10 g/L未満	R3, 4年度3.3
表層土壌	Marine Broth 2216 10倍希釈	栄養有り	7.6	NaCl 1.9 g/L	R2年度3.2
	Nutrient Broth 10倍希釈	栄養有り	7.5	淡水 (NaCl 0.6 g/L)	R2年度3.2
	Nutrient Broth 1000倍希釈	貧栄養	7.5	淡水 (NaCl 0.006 g/L)	R2年度3.2

*: pH7.0～8.5 以上においても局部腐食は見られる。

3.3.4　まとめ

1F 周辺の水試料に含まれる微生物による微生物腐食の可能性を検証することを目的として、1F 周辺地下水より令和 3 年度単離した腐食性微生物（メタン菌 T01 株、硫酸還元菌 T02 株）を用いた腐食試験を実施した。試験条件としては原子炉建屋内の水環境を想定した条件にて試験を行った結果、想定される狭い pH 範囲（pH 6.5～7.5）では 10 g/L 以上の NaCl 濃度において両株とも腐食活性が低下する傾向が見られた。また、令和 3 年度の試験結果から pH が腐食活性に影響することが示唆されたため、培養条件として pH 5.0～8.5 の範囲で設定し、腐食試験を実施した。重量減損量をもとに腐食活性を評価した結果、腐食性メタン菌 T01 株は pH 6.0～7.0 で高い活性を示し、pH 8.0 以上では腐食活性は抑制された。重量減損から評価した結果、腐食性硫酸還元菌 T02 株は pH 5.0～6.0 で高い腐食活性を示し、pH 6.5～8.5 では非植菌区と差異がなかったものの、局部腐食が観察された。pH 9.0 では微小な局部腐食も観察されなかった。本研究において実施した 1F 設備環境のような栄養源が少ない環境条件においても最大腐食速度として T01 株は 0.59 mm / 年、T02 株は 0.55 mm/ 年の高い速度を示した。富岡町内の地下水、湧水池で採取した腐食性の高い T01 株や T02 株は 1F の地下水にも存在する可能性があるため、地下水に接触する 1F 建屋地下構造物や地下水を含有する処理水タンク等を腐食する可能性がある。ただし、これらの微生物による腐食活性は水質条件（pH や NaCl 濃度）によ

り大きく変動することが明らかとなった。また、微生物腐食のモニタリングの観点から、電気化学的計測を行った結果、T02 株の腐食の進行に伴った培養液電位の上昇が見られ、腐食性硫酸還元菌の腐食モニタリングの指標として培養液電位を使用できる可能性が見出された。腐食活性を電位変動として評価する本手法と、他機関が開発するバイオマーカー診断を組み合わせることにより 1F の微生物腐食診断のための基礎概念検証はできたと考える。

今後、より 1F に近い環境の地下水や、建屋内に流入する地下水に含まれる微生物の評価により、精度の高い微生物腐食リスクの評価及び対策検討が可能となると考える。

参考文献

[3-1] Hirano, S. et al., Novel *Methanobacterium* Strain Induces Severe Corrosion by Retrieving Electrons from Fe^0 under a Freshwater Environment, Microorganisms., vol.10, 2022, 270, DOI:10.3390/microorganisms10020270.

[3-2] 廃炉環境国際共同研究センター, 物質・材料研究機構, 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, JAEA-Review, 2021-059, 2022, 71 p., DOI:10.11484/jaea-review-2021-059.

[3-3] 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の計画について, 2019 年 4 月 25 日.

[3-4] Shahryari, Z. et al., Effect of sulfate reducing *Citrobacter* sp. strain on the corrosion behavior of API X70 microalloyed pipeline steel, Materials Chemistry and Physics., vol.236, 2019, 121799, DOI: 10.1016/j.matchemphys.2019.121799.

[3-5] Liu, H. et al., Microbiological corrosion acceleration of N80 steel in shale gas field produced water containing *Citrobacter amalonaticus* at 60 °C, Bioelectrochemistry., vol.148, 2022, 108253, DOI: 10.1016/j.bioelechem.2022.108253.

[3-6] Liengen, T. et al., Understanding Biocorrosion: Fundamentals and Applications, 2014, ISBN: 9781782421207.

[3-7] Deng, X. et al., Electron Extraction from an Extracellular Electrode by *Desulfovibrio ferrophilus* Strain IS5 Without Using Hydrogen as an Electron Carrier, Electrochemistry., vol83, 2015, pp.529-531, DOI: 10.5796/electrochemistry.83.529.

[3-8] Deng, X. et al., Multi-heme cytochromes provide a pathway for survival in energy-limited environment, Science Advance., vol.4, 2018, eaao5682, DOI: 10.1126/sciadv.aao5682.

3.4　1F 周辺環境の微生物の特徴の把握及び微生物腐食挙動の評価（令和 2 年度～令和 4 年度）

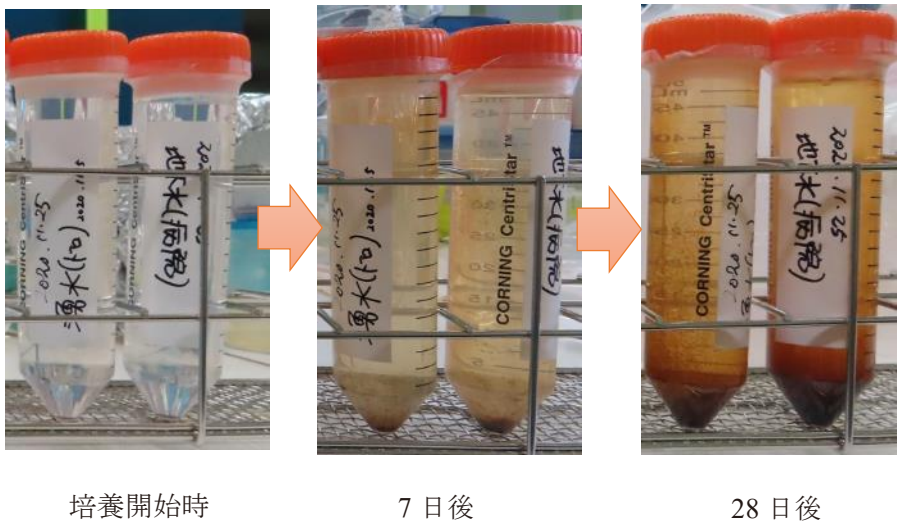
3.4.1　1F 周辺環境の微生物の特徴の把握（令和 2 年度～令和 4 年度）

(1)　令和 3 年度までの概要

令和 2 年度には、1F 周辺環境に生息する微生物を同定するため、1F サイト周辺の表層水・地下水や河川水の環境サンプリングを行った。サンプリングした場所及び写真を図 3.4.1-1 及び図 3.4.1-2 にそれぞれ示す。計 7 か所からサンプリングした。

図 3.4.1-1　富岡町内での環境サンプリング場所（文献[4-1]より転載）
［国土地理院地理院地図 電子国土 Web　https://maps.gsi.go.jp/#15/37.335173/141.011302/&base=std&ls=std&disp=1&vs=c1g1j0h0k0l0u0t0z0r0s0m0f1&d=m にサンプリング場所を追記して作成］

図 3.4.1-2　環境サンプリング場所の写真（文献[4-1]より転載）



培養開始時　　7 日後　　28 日後

図 3.4.1-3　培養したサンプルの外観（28 日間培養）（文献[4-1]より転載）

サンプリングされた水試料中に存在する微好気性の鉄酸化細菌を取り扱うこととし、以下の培地の組成を編成した。(Modified Wolfe's Mineral Medium：NH_4Cl 1.0 g/L、$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.4 g/L、$CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.1 g/L、$NaHCO_3$ 1.68 g/L、Na_2SiO_3 0.05 g/L、K_2HPO_4 0.05 g/L、KH_2PO_4 0.05 g/L (pH 6.5)) この培地に鉄源として 2.0 g/L の鉄粉を湿熱滅菌 (121 ℃、15 min) したものを添加し鉄酸化細菌培養用培地とした。上記の培地を用い

て環境試料由来微生物を培養したところ、図 3.4.1-3 のような変化が観察された。本試験で生成した茶褐色の鉄酸化物の大部分は微生物の代謝由来であると推察される。

令和 3 年度には、1F 周辺環境に生息する特徴的な微生物を同定するため、令和 2 年度に培養した微生物の種類を分析した。また、1F サイト周辺の環境サンプリングを追加して行い微生物を培養した。

令和 2 年度に富岡町の病院敷地外の湧水から採取した地下水サンプルから微生物を培養した。現在炉内は窒素充填されているが、十分な酸素があると、燃料デブリからの放射線の影響により窒素と酸素から硝酸が生成し、冷却水中に溶け込むと考えられる。硝酸イオンを還元する脱窒菌は、硝酸イオンの還元と同時に鉄の酸化腐食を生じる。また、硝酸イオンの還元により生成する亜硝酸は、UO_2 の酸化、溶解を促進する。1F 周辺環境での脱窒菌の生息状況を把握するため、富岡町病院脇から採取した地下水を、窒素源を硝酸イオンのみとした 2 種類の液体培地（M9 最小培地の NH_4Cl: 1g/L を KNO_3: 1.59 g/L に変更した液体培地、または Czapek 培地）を用いて 30 ℃にて培養した。これより、細菌が残ることを確認したため、これらは硝酸イオンを分解する脱窒菌であり、1F 周辺環境においても脱窒菌は生息することがわかった。

令和 3 年度の 1F サイト周辺の表層水・地下水や河川水の環境サンプリングは、令和 3 年 11 月 8 日（月）にいわき市の常磐湯本温泉、令和 3 年 11 月 9 日（火）に大熊町坂下ダムにて行った。サンプリングした場所の写真を図 3.4.1-4 及び図 3.4.1-5 にそれぞれ示す。

図 3.4.1-4　いわき市常磐湯本温泉でのサンプリング状況の写真（文献[4-2]より転載）

図 3.4.1-5　大熊町坂下ダムでのサンプリング状況の写真（文献[4-2]より転載）

(2)　令和 4 年度実施内容及び成果

現在 1F 炉内は窒素充填されており、今後の取り出し作業等により酸素が混入すると、放射線の影響により冷却水中において窒素と酸素から硝酸イオン（NO^{3-}）が生成する可能性がある。硝酸イオンの還元によって生成する亜硝酸イオン（NO^{2-}）は、鉄（Fe）の腐食や核燃料（UO_2）の溶解を促進させることが知られている。亜硝酸イオンは一般的な系であれば生成量は限られるが、硝酸イオンを還元する脱窒菌が存在する場合は生成が促進される。このため、脱窒菌がどの程度普遍的に存在するか、また、どの様な脱窒菌が一般的に存在するのかを調査するため、福島県富岡町の病院脇から滲み出る地下水を採取し、脱窒菌の培養、遺伝子解析による種判別解析を実施した。

脱窒菌の培養、分離のための培地としては、窒素源を硝酸イオンのみとするツァペックドックスブロス（ベクトン・ディッキンソン製）を用いて、好気的環境下、30 ℃で培養を行うことで、硝酸イオンを分解して窒素源を取り込むことができる脱窒菌のみが生存できる環境とした。上記培地成分を用いて液体培地を調整後、採取した地下水を滴下し、微生物の増殖後に新たな液体培地に植え継ぐ作業を複数回繰り返した後、同培地成分を用いて作成した寒天培地を用いて脱窒菌 4 株を分離した。培養中の様子を図 3.4.1-6 に示す。分離後の脱窒菌を株式会社テクノスルガ・ラボに送付し、16SrDNA-Full 解析を行い、解析結果を国際塩基配列データベースを用いて相同性（BLAST）検索を行うことで種判別を行った。種判別解析の結果を表 3.4.1-1、表 3.4.1-2 に示す。本結果から、完全に一致する微生物種は見つからなかったが、*Scandinavium goeteborgense*（腸内細菌科）、*Enterobactor* 属（グラム陰性、通性嫌気性）の 2 種と近縁の種であることがわかった。

以上より、脱窒菌は地下水中に普遍的に存在すると思われること、脱窒菌と言っても多様な種が存在すると思われることがわかった。

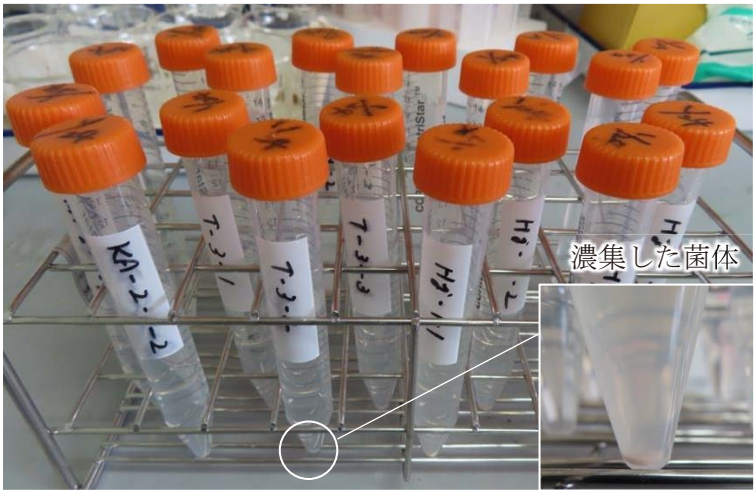


図 3.4.1-6　脱窒菌の培養の様子

表 3.4.1-1 脱窒菌（1 株目）の相同性検索結果

登録名	株名	Accession No.	相同率
Scandinavium goeteborgense	CCUG 66741	CP054058	1465/1467 (99.9%)
Scandinavium goeteborgense	CCUG 66741	MK558235	1464/1467 (99.8%)
uncultured bacterium	-	AB291626	1462/1464 (99.9%)
Enterobacter sp.	r302	MK934361	1460/1464 (99.7%)
Enterobacteriaceae bacterium	CF01Ent-1	AJ489826	1459/1467 (99.5%)
uncultured Klebsiella sp.	-	KX456253	1454/1467 (99.1%)
Enterobacter asburiae	FDAARGOS_1056	CP066278	1452/1467 (99.0%)
Buttiauxella agrestis	DSM 9389	AP023184	1451/1467 (98.9%)
Leclercia adecarboxylata	R25	CP035382	1451/1467 (98.9%)
Enterobacter wuhouensis	WCHEs120002	MK567957	1453/1467 (99.0%)
Enterobacter roggenkampii	Colony143	CP080039	1453/1467 (99.0%)
Citrobacter pasteurii	FDAARGOS 1424	CP077262	1451/1467 (98.9%)
Enterobacter roggenkampii	ED5	CP058253	1453/1467 (99.0%)
uncultured bacterium	-	DQ068917	1453/1467 (99.0%)
Enterobacter roggenkampii	Colony373	CP083253	1452/1467 (99.0%)
Enterobacter sp.	RsN-1	AB673456	1453/1467 (99.0%)
Klebsiella aerogenes	STP856.1	MT827114	1452/1467 (99.0%)
Enterobacter sp.	DBM-Z1	MT321481	1452/1467 (99.0%)
Enterobacter roggenkampii	ECY546	CP032916	1452/1467 (99.0%)
Enterobacter sp.	N18-03635	CP034769	1452/1467 (99.0%)
Enterobacter asburiae	ENIPBJ-CG1	CP014993	1452/1467 (99.0%)
Enterobacter roggenkampii	F1057	CP086201	1452/1467 (99.0%)
Enterobacter roggenkampii	Colony354	CP080038	1452/1467 (99.0%)
Pantoea sp.	y2	GQ395336	1450/1467 (98.8%)
endophytic bacterium	HB02	FJ205659	1452/1467 (99.0%)
uncultured bacterium	-	DQ068919	1452/1467 (99.0%)
Enterobacter sp.	H263	MH669333	1451/1467 (98.9%)
Enterobacter sp.	HaEc1	MH084944	1451/1467 (98.9%)
Enterobacter roggenkampii	FDAARGOS 1430	CP077407	1451/1467 (98.9%)
Enterobacter cancerogenus	UPC1	LR881936	1451/1467 (98.9%)

表 3.4.1-2 脱窒菌（2 株目）の相同性検索結果

登録名	株名	Accession No.	相同率
Pantoea sp.	SO10	CP040095	1464/1465 (99.9%)
uncultured bacterium	-	LT595787	1464/1465 (99.9%)
Enterobacter sp.	5112	JX566614	1464/1465 (99.9%)
bacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	FKOK20-03	LC594392	1464/1465 (99.9%)
bacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	CHBA20-03	LC594107	1464/1465 (99.9%)
Enterobacter ludwigii	K9	EF175735	1464/1465 (99.9%)
uncultured bacterium	-	LT595813	1463/1465 (99.9%)
uncultured bacterium	-	LT595757	1463/1465 (99.9%)
Enterobacter ludwigii	Cl-24	KC178598	1463/1465 (99.9%)
bacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	TKSK20-01	LC594401	1463/1465 (99.9%)
bacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	CKSI20-01	LC594116	1463/1465 (99.9%)
bacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	CHBA20-02	LC594098	1463/1465 (99.9%)
Enterobacter ludwigii	H350	MH669300	1461/1463 (99.9%)
Pantoea sp.	GNH-R4	MT012251	1463/1465 (99.9%)
uncultured bacterium	-	LT595842	1462/1465 (99.8%)
uncultured bacterium	-	LT595783	1462/1465 (99.8%)
bacterium	1-3	DQ163938	1462/1465 (99.8%)
Enterobacteriaceae bacterium X2/SB29	X2/SB29	LC007868	1460/1462 (99.9%)
gamma proteobacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	KMMT13-01	LC589994	1460/1462 (99.9%)
gamma proteobacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	TSKB13-02	LC589993	1460/1462 (99.9%)
gamma proteobacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	TSKB13-01	LC589992	1460/1462 (99.9%)
gamma proteobacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	CKSI13-02	LC589991	1460/1462 (99.9%)
gamma proteobacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	CKSI13-01	LC589990	1460/1462 (99.9%)
gamma proteobacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	TCHG13-02	LC590002	1459/1462 (99.8%)
gamma proteobacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	TCHG13-01	LC590001	1459/1462 (99.8%)
gamma proteobacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	KGSM13-02	LC590000	1459/1462 (99.8%)
gamma proteobacterium symbiont of Megymenum gracilicorne	MYZK13-02	LC589998	1459/1462 (99.8%)
Enterobacter sp.	H297	MH669343	1460/1464 (99.7%)
uncultured bacterium	-	LT595764	1460/1465 (99.7%)
uncultured Pantoea sp.	-	KC820068	1460/1465 (99.7%)

3.4.2　微生物腐食挙動の評価（令和 2 年度～令和 4 年度）

(1) 令和 3 年度までの概要

令和 2 年度には、微生物による材料表面での腐食の影響をミクロレベル及びナノレベルで評価するため、材料表面の最適な測定・分析手法を検討・選定し、分析・測定環境を整備した。

腐食試験後、観察・分析までの手順を検討し、次のような手法を選定した。

（ⅰ） 腐食試験後の試料表面に付着した微生物あるいは腐食生成物の様相を観察して腐食が発生したと考えられる場所を推測し、腐食の状況を調べる対象部位を絞り込む。

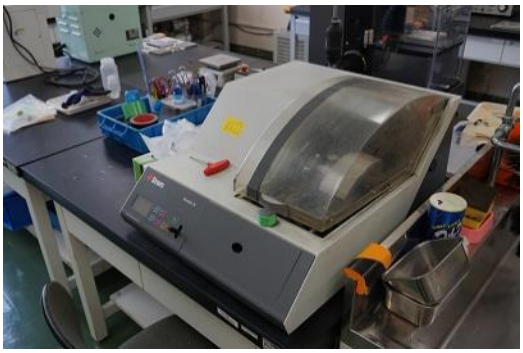
（ⅱ） 絞り込んだ部位の表面付着物（微生物あるいは腐食生成物）を酸溶液で除去し、試料表面や断面の観察・分析のために切断・研磨等の試料調製を行う。

（ⅲ） 調製した試料を用い、FE-SEM を用いた表面・断面の観察や EDS を用いた元素分析を行って、腐食の状況を把握する。

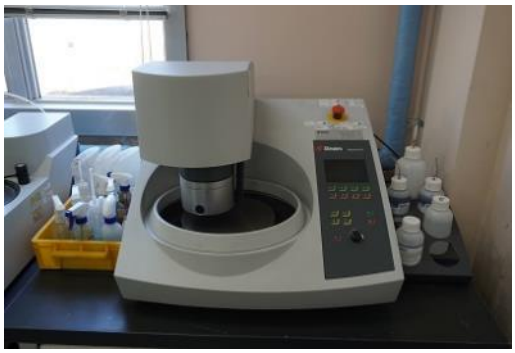
（ⅳ） ワンショット 3D 形状測定機を用いたマイクロレベルの凹凸観察・測定、AFM を用いたナノレベルの凹凸観察・測定等を行って、腐食の進展を定量的に把握する。

上記の手順で微生物腐食挙動を分析･測定し評価するために必要な装置等を整備した。これらの装置は既に JAEA が所有しているものである。

試料調製には図 3.4.2-1(a) 切断機及び図 3.4.2-1 (b)自動研磨機のほか、マイクロレベル以下の精密研磨には図 3.4.2-1 (c) イオンミリングを用いる。上記にて調整した試料は、光学顕微鏡や図 3.4.2-2(a) の FE-SEM を用いて表面観察や FE-SEM に付属する EDS を用いて元素分析を行う。腐食進行の状況を定量化するための減肉や局部腐食深さまたは腐食減肉の分布の測定として、マイクロレベルの場合は図 3.4.2-2(b) ワンショット 3D 形状測定機、ナノレベルの場合は図 3.4.2-2 (c)の AFM を用いる。



(a) 切断機



(b) 自動研磨機

(c) イオンミリング

図 3.4.2-1 試料調製装置（文献[4-1]より転載）

(a) 電解放出型走査電子顕微鏡（FE-SEM）

(b) ワンショット 3D 形状測定機

(c) 原子間力顕微鏡（AFM）

図 3.4.2-2　腐食影響の観察・分析・測定装置（文献[4-1]より転載）

以上の手順や装置を用いて腐食の状況を把握し、微生物や腐食生成物と腐食との関係を調べ、また腐食の進展を可能な限り定量化して腐食速度を求めることにより、微生物による腐食の影響を評価することが可能となる。

令和 3 年度には、微生物による材料表面での腐食の影響をミクロレベル及びナノレベルで評価するため、微生物腐食試験後の試験片の表面形状や局部腐食部位について、令和 2 年度に選定した分析手法及び整備された環境を用いて、材料表面の状態・形状をミクロレベル及びナノレベルで測定した。

硫酸還元菌を用いて鉄腐食試験片の腐食試験を行い、97%エタノール中で超音波洗浄した腐食片の表面観察を実施した。図 3.4.2-3 に示すように、目視ではマクロな楕円状の凹みを確認し、FE-SEM を用いた 2 次電子像では、局部的な腐食はなく、表面は比較的均質であることを確認した。また、原子間力顕微鏡を用いて表面のナノレベルの凹凸の観察を実施した。図 3.4.2-4 に観察結果の例を示す。この結果、金属の結晶粒によると思われる凹凸が数マイクロメートル程度あることを確認したが、一般的に金属表面で確認できる構造であり、局部的な腐食は観察されず、特異的な構造は認められなかった。

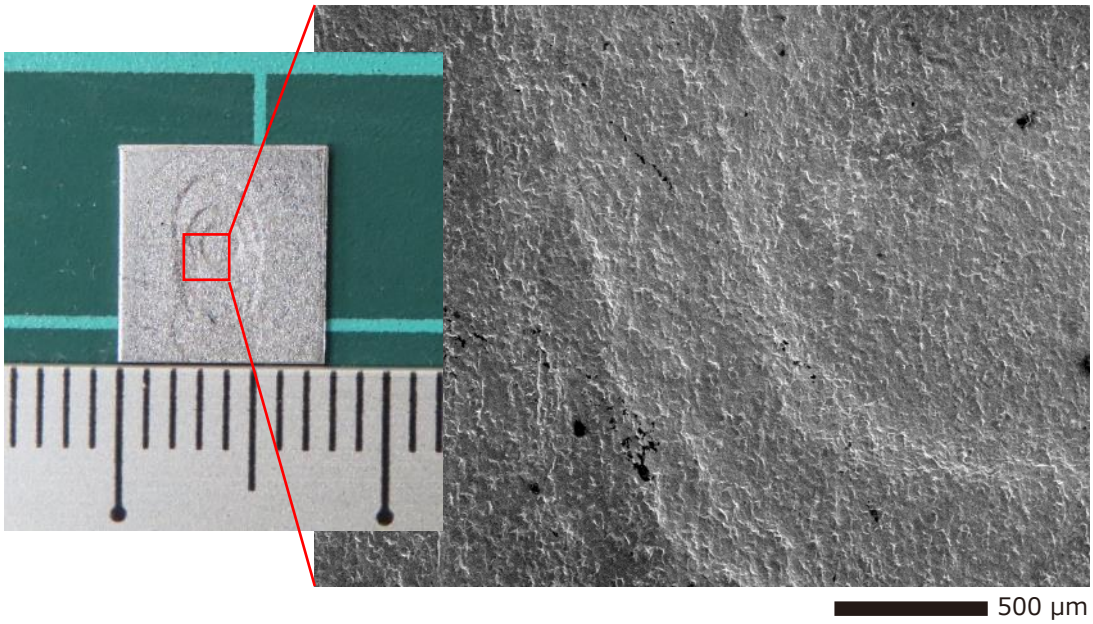


図 3.4.2-3 硫酸還元菌による鉄腐食片表面の 2 次電子像（文献[4-2]より転載）

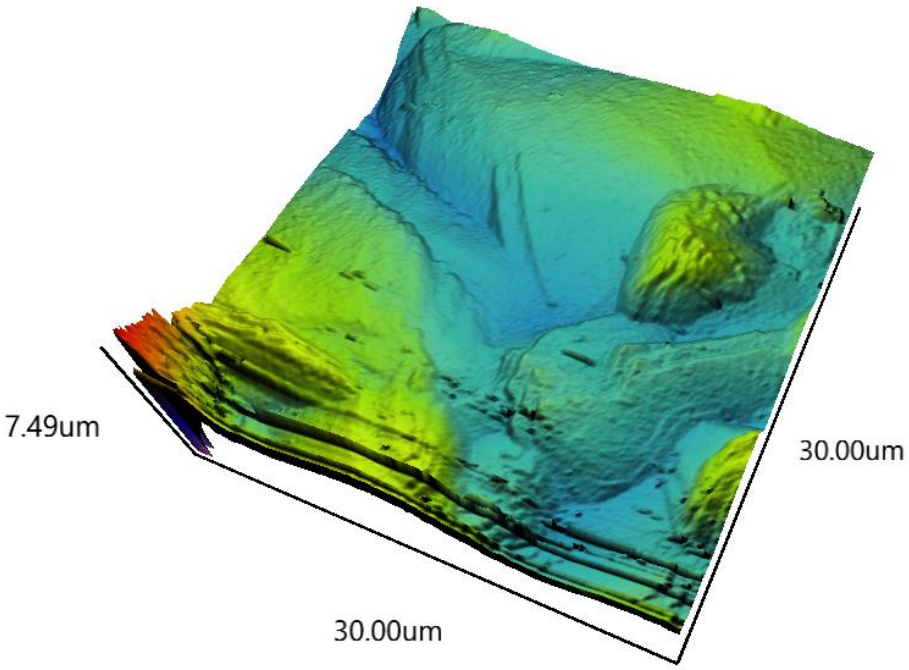


図 3.4.2-4 原子間力顕微鏡によるナノレベルの凹凸の観察（文献[4-2]より転載）

当初計画に追加して、腐食生成物が付着したまま試料断面を観察する手法を開発し、試料断面の FE-SEM 観察により微生物腐食によって形成した腐食生成物が付着した炭素鋼の断面観察が可能であることを確認した。

検討した手順を以下に示す。

(a) 微生物を培養した溶液中に炭素鋼を浸漬し、図 3.4.2-5 のように 1 か月以上浸漬腐食試験を実施した。
(b) 腐食試験後の試料を腐食生成物が付着したままエタノール中に 48 時間以上浸漬し、腐食生成物中の水分をエタノールで置換した。
(c) 試料をエタノール中から取り出して真空デシケーター中で 24 時間以上乾燥させた。
(d) 乾燥後の試料をテフロンモールドにセットした後、図 3.4.2-6 に示す真空含浸装置を用いて真空中で生体固定用樹脂（テクノビット 8100）をテフロンモールドに注いだ。樹脂を注ぎ終わった直後に真空含浸装置を大気開放することで、腐食生成物中に十分に樹脂を含浸した。
(e) 48 時間以上放置して十分に樹脂を固化させた。
(f) 十分に固化した樹脂ごと試料をモールドから取り出し、観察に適したサイズにファインカッターを用いて切断した。
(g) SiC 研磨紙を用いて断面部を面出し研磨した後、柔らかい腐食生成物に機械的な破壊が起こらないようにイオンミリングを用いた研磨を実施した。
(h) 研磨後に FE-SEM を用いて断面を観察した。

図 3.4.2-5 浸漬腐食試験中の試料外観（文献[4-2]より転載）

図 3.4.2-6　真空含浸装置（文献[4-2]より転載）

図 3.4.2-7 に上述した方法によって観察した腐食生成物が付着した試料断面の FE-SEM 写真を示す。炭素鋼と樹脂の間には固定化されたさび層を観察することができ、上述した方法によって鉄さび層中に樹脂が良く含浸されていることがわかる。また鉄さびは外側の空隙を含んだ層と内側の密な層に分かれており、内側の密な層は EDS の分析によって FeS であることがわかった。外側の空隙を含んだ層は空隙内に耐熱性の低い樹脂が存在しており、EDS 分析に必要な高電圧の電子ビームで崩壊してしまうため元素分析が困難であった。FE-SEM による断面観察、分析用の試料を作製する際には耐熱性のある樹脂の使用が望ましいと考えられる。

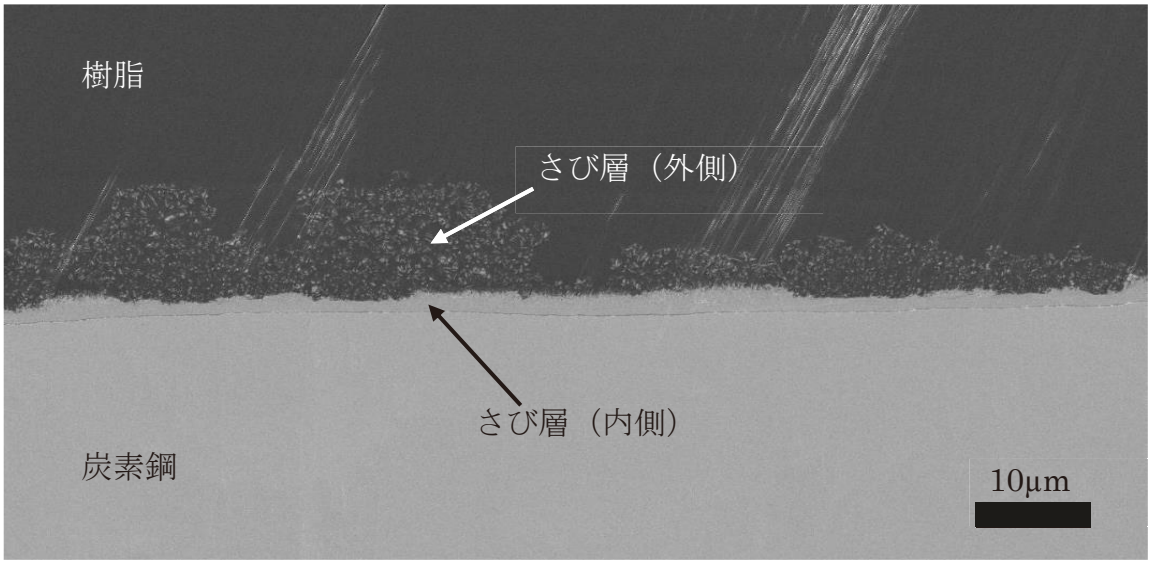


図 3.4.2-7　試料断面 FE-SEM 写真（文献[4-2]より転載）

(2) 令和 4 年度実施内容及び成果

今回実施した微生物の培養による鉄鋼材料の腐食試験では、放射性物質の保持性能維持の観点で最も懸念されるような孔食等の局部腐食は見られなかった。しかし、1F 周辺環境から採取されたサンプルに含まれる微生物を用いて培養し腐食試験を行った結果、図 3.4.2-3 に示すような緩やかな凹状の腐食減肉が見られた。

この結果から、微生物による腐食挙動の評価として、材料表面の腐食部位と微生物の分布状態の関係に着目し、観察手法の開発を行い、微生物腐食挙動の評価に資することとした。

令和 3 年度までに、検討した手順を元に試行錯誤を行い、材料表面における微生物腐食挙動の観察手法を開発した。その手順は以下のとおりである。

(a)　試験片（炭素鋼）表面に微生物を培養し試料を作製
(b)　培養した試料をエタノールに浸して脱水
(c)　試験片を乾燥させた後、真空含浸装置内で樹脂を用いて樹脂埋め
(d)　固定した樹脂ごと試験片を切断・機械研磨後、SEM にて断面を観察[注 1]
(e)　微生物を染色し蛍光顕微鏡にて断面を観察[注 2]

[注 1] イオンミリングを行うと、微生物の蛍光観察に悪影響があることがわかったため、機械研磨により断面調製することとした。
[注 2] 微生物の染色処理は試料調製前に行うことも可能である。

図 3.4.2-8 に 3 か月浸漬後試料の断面を EDS 分析した結果を示す。断面には細長い形状の腐食生成物や密な腐食生成物等が見られた。EDS 分析の結果、図に示すように、細長い形状の腐食生成物は C、S、Fe を主成分とするものであること、密な腐食生成物は O、P、Fe を主成分とするもの、その他の腐食生成物は O、S、Fe を主成分とするものであることがわかった。

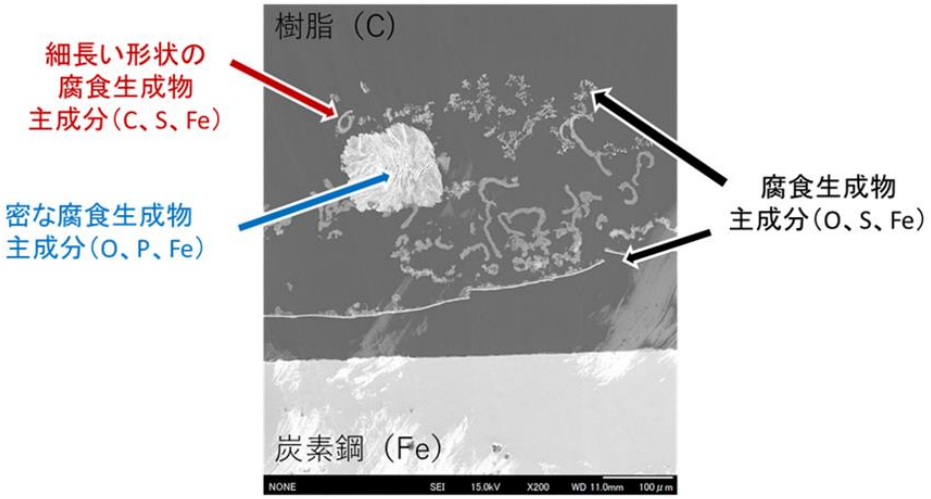


図 3.4.2-8　切断後試料の断面観察結果

イオンミリングにより切断を行った試料の蛍光顕微鏡を用いた断面観察結果を図 3.4.2-9 に示す。断面観察は NIMS にて実施された。観察の結果、腐食生成物の断面に微生物の存在を示す蛍光を観察できたが、イオンミリングにより腐食生成物を損傷することが判明した。そこで次に、機械切断と機械研磨により断面調製した試料を新たに調製し、改めて断面観察を行った。その結果を図 3.4.2-10 に示す。断面観察は NIMS にて実施された。観察の結果、鋼材表面に微生物の存在を示唆する蛍光を観察できた。

以上により、微生物による腐食後の試料の表面に付着した腐食生成物と鋼材を同時に切断し断面を観察するとともに、腐食生成物中の微生物の存在を確認する手法を開発することができた。確認された微生物が腐食にどのように寄与しているかを確認することは今後の課題となるが、従来不可能であった腐食発生部位の微生物の存在を確認することにより、微生物腐食挙動の評価が可能になると期待できる。

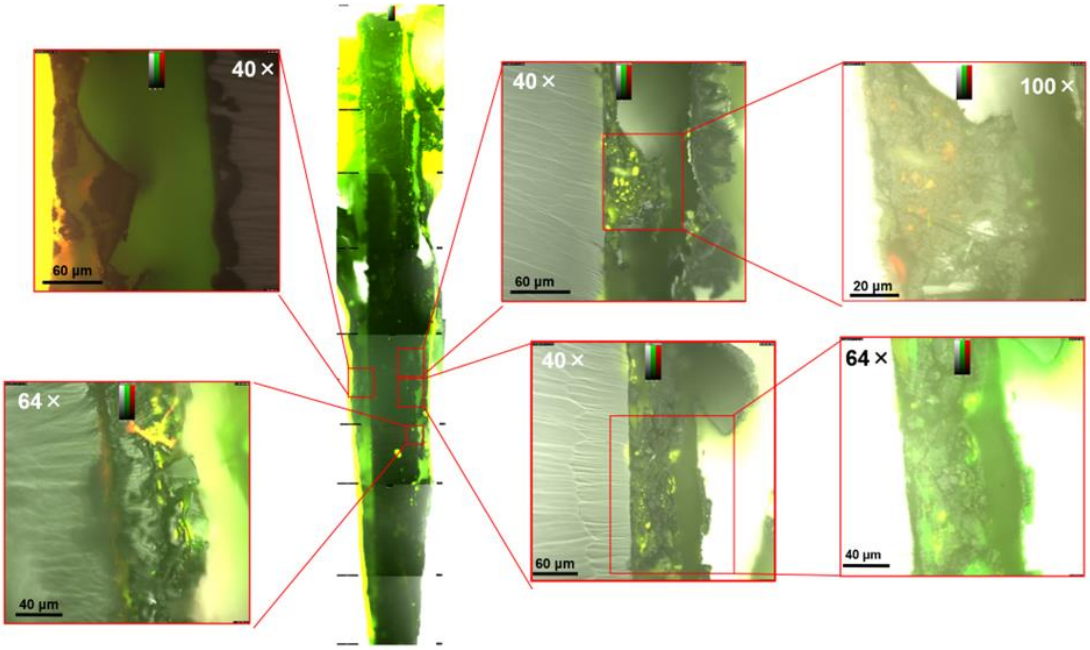


図 3.4.2-9　イオンミリング切断後試料の蛍光顕微鏡観察結果（NIMS にて実施）

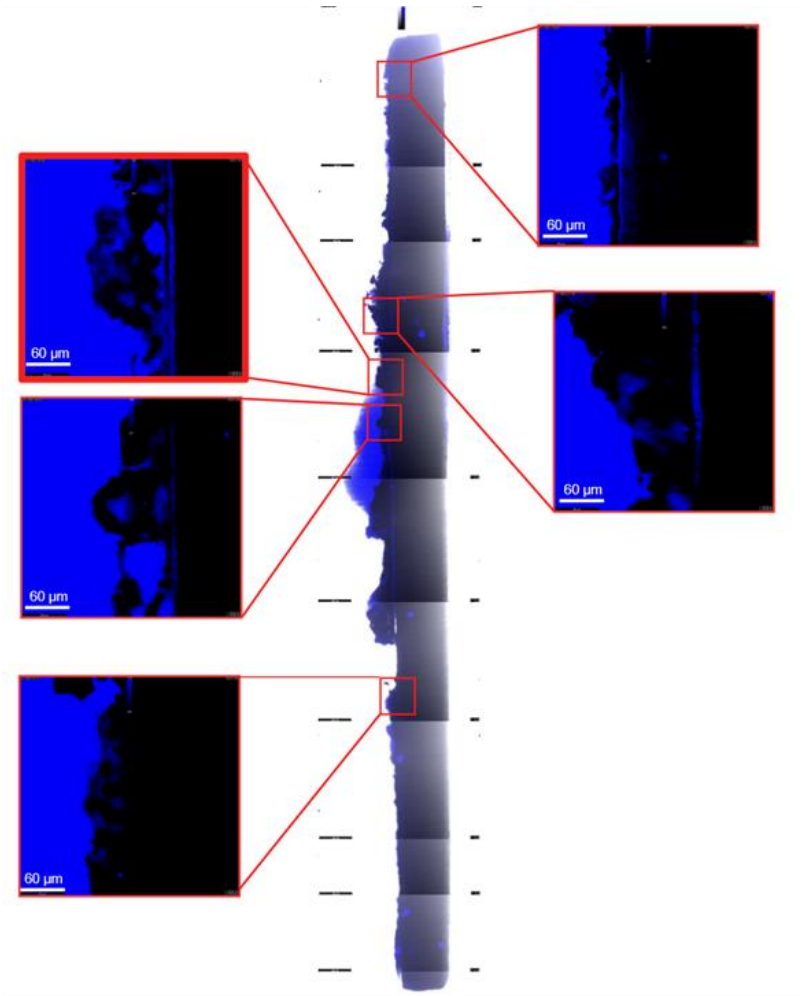


図 3.4.2-10　機械切断及び機械研磨後試料の顕微鏡観察結果（NIMS にて実施）

3.4.3　まとめ

令和 2 年度は、1F 周辺環境に生息する微生物を同定するため、1F サイト周辺の表層水・地下水や河川水の計 7 か所の環境サンプリングを行い、4 機関に持ち帰って培養試験に供した。このうち JAEA では、サンプリングされた水試料中に存在する微生物を培養するため、中性付近の pH で活動する微好気性の鉄酸化細菌を取り扱うこととし、Modified Wolfe's Mineral Medium に鉄源として 2.0 g/L の鉄粉を添加して鉄酸化細菌培養用培地を選定、環境試料由来微生物の培養を始めることができた。また、微生物による材料表面での腐食の影響をマイクロレベル及びナノレベルで評価するため、材料表面を当該スケールで測定・分析するために最適な手法を検討・選定し、分析・測定環境の整備を計画通り進めることができた。

令和 3 年度は、PCV 内の環境中で生成する可能性がある硝酸イオンを還元する脱窒菌に着目し、1F 周辺環境中での生息状況を確認する培養試験を行い、1F 周辺環境においても脱窒菌は生息することがわかった。また、硫酸還元菌を用いて鉄腐食試験片の腐食状況の観察を行い、局部腐食等の兆候を示す特異的な構造は認められないことを確認した。さらに、当初計画に追加して、腐食生成物が付着したまま試料断面を観察する手法を開発し、試料断面の FE-SEM 観察により微生物腐食によって形成した腐食生成物が付着した炭素鋼の断面観察が可能であることを確認した。

令和 4 年度は、1F 周辺環境に生息する特徴的な微生物の中で材料腐食の観点から重要な微生物として脱窒菌に着目し、福島県富岡町の病院脇から滲み出る地下水を採取し、脱窒菌の培養、遺伝子解析による種判別解析を実施した。脱窒菌 4 株を分離し、分離後の脱窒菌の遺伝子解析を行って国際塩基配列データベースを用いて種判別を行った結果、完全に一致する微生物種は見つからなかったが、*Scandinavium goeteborgense*（腸内細菌科）、*Enterobactor* 属（グラム陰性、通性嫌気性）の 2 種と近縁の種であることがわかった。以上より、脱窒菌は地下水中に普遍的に存在すると思われること、脱窒菌と言っても多様な種が存在すると思われることがわかった。

材料表面における微生物腐食挙動及びその機構を評価するため、微生物腐食試験後の試験片の表面形状や局部腐食部位について、形状測定及び金属組織との関係などの特徴的な腐食挙動を調べ、微生物による腐食挙動を評価した。令和 3 年度までに、検討した手順を元に試行錯誤を行い、材料表面における微生物腐食挙動の観察手法を開発した。この手法を用いて、微生物腐食試験片の断面の光学顕微鏡観察と電子顕微鏡観察を可能とし、C、S、Fe を主成分とする細長い形状の腐食生成物、O、P、Fe を主成分とする密な腐食生成物等が検出された。

参考文献

[4-1] 廃炉環境国際共同研究センター, 物質・材料研究機構, 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, JAEA-Review, 2021-059, 2022, 71p. DOI:10.11484/jaea-review-2021-059.

[4-2] 廃炉環境国際共同研究センター, 物質・材料研究機構, 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, JAEA-Review, 2022-045, 2022, 82p. DOI:10.11484/jaea-review-2022-045.

3.5　研究推進

研究代表者の下で各研究項目間ならびに廃炉環境国際共同研究センター（CLADS）等との連携を密にして、研究を進めた。また、研究実施計画を推進するための打合せや会議等を開催した。

・打合せ会議（1 回目）
開催日：令和 3 年 6 月 29 日（火）
参加者：(以下敬称略)
NIMS 岡本
JAMSTEC　若井
電中研 平野
JAEA　山本、池田、上野、大谷
場所：オンライン
内容：各機関における研究の進捗状況と本プロジェクトにおける目標の共有

・打合せ会議（2 回目）
開催日：令和 3 年 11 月 8 日（月）－ 9 日（火）
参加者：
NIMS 岡本
JAMSTEC　若井
電中研 平野
JAEA　池田、上野
場所：いわき
内容：環境サンプリングと進捗状況の確認と令和 4 年度研究計画の確認

4. 結言

本研究は、研究課題のうち、令和 2 年度に採択された「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」の令和 2 年度から令和 4 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 4 年度が最終年度となるため 3 年度分の成果を取りまとめた。本研究は、計画に沿って順調に研究計画が行われた。特に、激しい鉄腐食を行う微生物を濃縮する技術が開発され、1F と関連する環境サンプルから局所的かつ急激な微生物による腐食反応を進行させる単離株が得られたことは特筆すべき成果である。2.1 全体計画の表における令和 3 年度の計画に対して、それぞれの項目でどう達成されたかを以下に具体的に示す。

項目（1）の急速かつ局所的電気微生物腐食の診断と抑止技術の開発では、令和 4 年度は、開発した磁性ナノ粒子材料を用いて、環境中から電気細菌を濃縮、鉄腐食速度が加速されることを確認した。DNA を各サンプルから抽出し、菌叢解析によって、腐食が加速された系において、特定の細菌が濃縮されることを確認した。また、メタゲノミクス解析によって磁性ナノ粒子材料で濃縮された細菌においてバイオマーカー候補遺伝子を探索し、これまでに得られている環境サンプルのデータにそれらが見られるか検証した。鉄材料表面に硫化物になった際に導電性が高まることが期待されるコーティング材を開発し、モデル電気腐食細菌を用いた実験を行うと炭素鋼の腐食速度が最大で 8 倍にまで増加した。電気化学解析を行い、腐食が加速される機構に関して検討した。モデル細菌の存在下において腐食電位が負にシフトすることから、電子の引き抜き反応が加速されたことが示唆された。以上から、現場診断を採水から行うために必要な要素技術の開発という、本研究項目の目標は達成されたと言える。また、抑止技術に関しては、他の機関との連携の中で達成されており、報告書上では他機関の成果として記載した。本研究では、さらに当初予想していなかった新しい技術シーズも生み出されている。環境中の鉄腐食水から、CO_2 を唯一の炭素源、鉄を唯一の電子源とした培地を用いて段階希釈法により硫酸塩還元菌を単離した。BLAST 検索を行ったところ、類縁種に磁性細菌を持つことから、本株は腐食能だけでなく磁性を持つ可能性があると考えられた。そこでネオジム磁石への吸着試験を行ったところ、培養沈殿物の一部が磁石への吸着が観察され、電気細菌でありながら磁性細菌の特徴を持つ初めての細菌であることが示唆された。環境中においてこのような磁性細菌が鉄腐食を進めているのであれば、磁石を使ってダイレクトに細菌を濃縮できる新しいリスク診断技術開発の展開が開ける。今後、培養条件の探索や磁性粒子が生成される条件を詰めることで、環境中における鉄腐食との関連を調べる。

項目（2）のバイオマーカー遺伝子の探索及びオンサイト診断技術の開発では、(1) 1F 環境での腐食リスクになる微生物バイオマーカー遺伝子の特定と（2）オンサイトでの実施可能な遺伝子診断方法の確立を研究目標として実施した。既知腐食性微生物の腐食活性を低減可能な物理化学的なパラメーターを洗い出し、1F 周辺環境微生物の情報を重厚に取得し、環境由来腐食性微生物の獲得、ならびに、メタゲノム解析によるバイオマーカーの特定に成功し、当初の研究目標の一つを達成した。加えて、オンサイト解析方法の要素技術として環境試料から簡便は DNA 抽出を開発し、既存のハンディタイプ型遺伝子解析装置と本課題で特定したバイオマーカー検出を組み合わせることで(2)の目標も達成した。これらの結果に基づき、1F を想定した環境制御による微生物腐食に対する防食方法の提言（例えば pH コントロール）と分子生物学的な診断技術の基盤を構築することに成功し、目標を上回る成果を挙げたと言える。今後の課題として、オンサイト解析方法の要素技術をさらにブラッシュアップすることで、実環境を対象とした迅速かつ高精度の解析技術とする必要性がある。

項目（3）の 1F 周辺の水試料に含まれる微生物による微生物腐食の可能性を検証することを目的として、1F 周辺地下水より腐食性微生物を探索し、メタン菌 T01 株、硫酸還元菌 T02 株を単離した。これらの腐食微生物を用い、1F 設備環境を想定した条件での腐食試験を実施した。その結果、1F 設備環境のような微生物の栄養源が少ない環境条件においても最大腐食速度として T01 株は 0.59 mm / 年、T02 株は 0.55 mm/ 年の高い速度を示した。富岡町内の地下水、湧水池で採取した腐食性の高い T01 株や T02 株は 1F の地下水にも存在する可能性があるため、地下水に接触する 1F 建屋地下構造物や地下水を含有する処理水タンク等を腐食する可能性がある。詳細に環境条件（水質）を設定した腐食試験から、これらの腐食微生物が高い活性を示す（=1F 環境において微生物腐食リスクの高まる）環境条件（pH、NaCl 濃度）には範囲があることが明らかとなった。これらの結果から、一般的な水質計測項目である pH や NaCl 濃度の範囲を、微生物腐食リスクに対する効率的かつ合理的な設備点検・管理のための指針として提示した。本結果は、環境条件からの微生物腐食リスクの推定や水質制御による腐食抑制の可能性を示唆している。加えて、電気化学的な解析から、微生物腐食モニタリングの指標として培養液電位を使用できる可能性が見出された。他機関が開発するバイオマーカー診断を組み合わせることにより 1F の微生物腐食診断のための基礎概念検証はできたと考える。今後、より 1F に近い環境の地下水や、建屋内に流入する地下水に含まれる微生物の評価により、精度の高い微生物腐食リスクの評価及び制御手法の有効性検証が可能となると考える。

項目（4）の 1F 周辺環境の微生物の特徴の把握及び微生物腐食挙動の評価では、1F サイト周辺の表層水・地下水や河川水等を採取・培養し 1F 環境及び周辺環境に生息する特徴的な微生物の中で材料腐食の観点から重要な微生物として脱窒菌に着目し、脱窒菌 4 株を分離し、分離後の脱窒菌の遺伝子解析を行って国際塩基配列データベースを用いて種判別を行った結果、完全に一致する微生物種は見つからなかったが、*Scandinavium goeteborgense*（腸内細菌科）、*Enterobactor* 属（グラム陰性、通性嫌気性）の 2 種と近縁の種であることがわかった。以上より、脱窒菌は地下水中に普遍的に存在すると思われること、脱窒菌と言っても多様な種が存在すると思われることがわかった。これにより、1F 環境及び周辺環境に生息しうる微生物の特性及び腐食の特徴を把握した。

材料表面における微生物腐食挙動及びその機構を評価するため、微生物腐食試験後の試験片の表面形状や局部腐食部位について、形状測定及び金属組織との関係などの特徴的な腐食挙動を調べ、微生物による腐食挙動を評価した。令和 3 年度までに、検討した手順を元に試行錯誤を行い、材料表面における微生物腐食挙動の観察手法を開発した。この手法を用いて、微生物腐食試験片の断面の光学顕微鏡観察と電子顕微鏡観察を可能とし、C、S、Fe を主成分とする細長い形状の腐食生成物、O、P、Fe を主成分とする密な腐食生成物等が検出された。 以上により、微生物による腐食挙動を試験片の解析により解析する手法を開発し、評価することができた。開発した観察手法により確認された微生物が腐食にどのように寄与しているかを確認することは今後の課題である。

総合して、EMIC の加速を材料と細菌集積の 2 つの角度から実現し、採水によるオンサイト加速試験の要素技術が完成した。さらに、これらの技術は、分子生物学的なオンサイトリスク評価法を実現するバイオマーカーの特定を加速する側面を有しており、1F における EMIC リスク診断技術の基盤を構築することに成功したと言える。さらに、これらの成果の大部分は、春に博士課程に進学した 2 人の修士課程の学生によって達成されたものであり、本研究は人材育成においても大きな成果を挙げたと言える。

用語の説明

電気腐食：細胞外に存在する鉄や硫化鉄などの電子ドナーから電子を取り出し、生命活動を行う際のエネルギー源として用いる電気細菌が引き起こす鉄腐食。

多核シトクロム膜酵素：細菌の細胞膜に存在し、電子を細胞膜の内外へと動かす電気導線のように働くタンパク質。内部に数十個並ぶヘム反応中心が電子キャリアーとして働く。

ナノワイヤー：外膜シトクロムを持つ直径の 20 nm 程度のワイヤーであり、これを用いて細菌から離れた鉄からも電子を引き抜くと考えられている。

DAB ポリマー：シトクロム酵素を電顕観察用に染色するために使われるポリマー。本研究では、外膜シトクロムを持つ電気腐食細菌を環境サンプルから濃縮するために用いる。

バイオマーカー：特定の微生物のみが持つ情報。例えば、微生物腐食を引き起こす微生物のみが持っている酵素（タンパク質）など。

電位貴化：電位の上昇のこと。耐食性のあるステンレス鋼では、その表面に不働態皮膜と呼ばれる緻密な酸化層が存在し、金属の溶出を防いでおり、環境中に酸化性物質があった場合には電位の上昇が生じる。電位が隙間腐食発生電位や孔食発生電位を超えて上昇した場合には、不働態皮膜が破壊されて腐食が生じる。

電位卑化：電位の下降のこと。特に、電位貴化を起こしたステンレス鋼材で急激な電位の卑化が生じた場合には、不働態皮膜の破壊による腐食の発生として捉えることができる。

次世代シーケンス：21 世紀初頭に普及しはじめた新しい核酸塩基配列解析方法であり、超並列型ショートリード解析と呼ばれるように、100～300 塩基対程度の短い塩基配列を同時進行で大量に解析することで、一度の解析で 100 億塩基対を超える情報を得ることができる手法。この手法を用いる装置を次世代シーケンサと呼ぶ。

ナノポアシーケンサ：微小な孔（ポア）を核酸塩基が通過する際に生じる電気信号を用いて塩基配列を決定することができる解析装置。次世代シーケンサが超並列型ショートリード解析であるのに対して、ナノポアシーケンサは並列型ロングリード解析が可能であり、長い核酸分子を解析できる。加えて、MinION という装置はハンディタイプのナノポアシーケンサであり、ノートパソコンに接続することで野外調査にも利用可能。

メタゲノム：一生物の持つ全遺伝情報をゲノムと呼び、メタゲノムとは一試料中に存在する複数の生物のゲノム情報を差す。例えば、腐食環境の微生物のメタゲノム解析を実施することで、どのような微生物が存在しているかだけでなく、それらの微生物の持つ遺伝子の種類についても情報を得ることができる。

メタトランスクリプトーム：一生物がある一時点で実際に活動させている遺伝子の種類と量の情報をトランスクリプトームと言い、メタトランスクリプトームとは、複数の生物種から成る集団がある一時点で実際に活動させている遺伝子の種類と量の情報のこと。例えば、一種の微生物は数千の遺伝子を持っているが、その全てが常に活動状態にあるわけではなく、特定条件でのみ活動する遺伝子も多々ある。したがって、腐食環境と非腐食環境の比較解析によって、腐食時に活動している遺伝子の特定が可能。

16S rRNA 遺伝子：全ての細菌が持っている遺伝子の一つで、タンパク質合成装置を構成する必須遺伝子であり、全世界共通のデータベース上にこの遺伝子情報が集約されており、系統分類的な微生物同定に使うことのできる遺伝子。

アンプリコンシーケンス：次世代シーケンスの手法の一つで、メタゲノム解析と異なりある特定の遺伝子領域だけを増幅させて解析する手法。16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスによって、ある環境中に存在する微生物の種構成を解析することが可能。

QIIME2（微生物群集構造解析パイプライン）：16S rRNA 遺伝子のアンプリコンシーケンスを実施すると、大量の塩基配列データが得られるが、それを 1 つずつ人間の手で解析することは情報量的に不可能であり、塩基配列データから微生物群集構造及び微生物多様性に関する情報をアウトプットするまでの解析を可能にしたソフトウェアの集合体。世界中の多くの微生物生態学研究者が使用している。

微生物群集構造解析：環境中には様々な微生物が混在しており、それらを網羅的に全て培養することができないので、微生物が共通して持っている遺伝子を標的としてその遺伝子配列を決定してどのような微生物がどれくらいの割合で存在しているかを解析する方法。

プライマー：核酸分子の部分配列を増幅させる技術である PCR において使用される 20 塩基程度からなる一本鎖のオリゴヌクレオチド。増やしたい遺伝子領域の両端に対応した塩基配列を持たせることで、挟み込んだ遺伝子領域を増幅することができる。

PCR：DNA は四種類のヌクレオチド（塩基部分が異なる）がリン酸時エステル結合により鎖状に長くつながったポリマー構造をしており、このような非常に長い生体高分子の一部を特異的に増幅する方法。耐熱性ポリメラーゼと呼ばれる酵素とプライマーを用いて連続的に反応させることで特定領域の増幅が可能。ポリメラーゼを連続的に反応させることから PCR と呼ばれる。

（培養）基質：微生物培養において培地成分の中でもエネルギーや炭素源として使われるものを基質と呼ぶ。例えば、グルコースなどの糖はエネルギー源や炭素源になり得るが、一部の微生物が使える鉄や硫黄といった無機物の基質はエネルギー源にしかならず、生体を構成する炭素は別から供給する必要がある。

オートクレーブ：微生物実験で頻繁に使用される高圧蒸気滅菌機のこと。一部の好熱性微生物や芽胞（微生物の卵のようなもの）を形成する微生物は煮沸では滅菌することができないので、121 ℃で 20 分程度処理することで滅菌ができる。

（菌の）植え継ぎ：微生物細胞は永久的には存在せず、時間とともに溶菌（細胞膜が劣化して中身が漏れ出した状態）して死んでしまうので、実験等で継続的に微生物を使用する場合には、培養物の一部を新鮮な培地に接種して、再度培養することで培養物を維持する。

This is a blank page.