

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：11301

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化(B)）（令和3（2021）採択分）

研究期間：2021～2023

課題番号：21KK0069

研究課題名（和文）スリランカにおける下水水質情報に基づいた下水管路劣化予測システムの開発

研究課題名（英文）Development of sewer pipe corrosion using wastewater quality information in Sri Lanka

研究代表者

佐野 大輔（Sano, Daisuke）

東北大学・工学研究科・教授

研究者番号：80550368

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 14,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、スリランカにおいて、微生物の起源を同定する手法である微生物起源解析の手法を応用し、下水管劣化箇所を推定するための新規手法を開発することを目指すものである。スリランカ及び日本国内の調査地点において下水サンプルの取得し、採取した下水から総DNAを抽出して、腐食した下水管路からの検出頻度が高い細菌種由来遺伝子の同定を行った。その結果、硫化水素を生成する嫌気性バイオフィルムの検出についてはDesulfobulbus属が、コンクリート腐食の検出についてはThiothrix属が適していると考えられ、腐食した下水管路の場所を示す遺伝子マーカーとして使用可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

水・衛生環境に係る単独の開発目標SDG「2030年までに全ての人々が清浄な水と改善されたサニテーション施設（トイレ）を利用可能にする」を根拠として、水関連インフラの発展途上国へ導入が促進されている。しかしながら、水関連インフラの導入に適切なアセットマネジメントが伴わなければ、将来に渡っての維持管理が滞り、2030年にSDG6を達成できたとしても、最終的に世界中の多くの地域で上下水道事業が破綻に至ってしまうことが懸念される。本研究で同定された遺伝子マーカーは、下水管路劣化を追跡することを可能にするものであり、適正なアセットマネジメントを行う上で強力なツールとなりうるものである。

研究成果の概要（英文）：This study aims to develop a novel method for estimating deteriorated sewer pipes in Sri Lanka by applying the Microbial Source Tracking (MST) technique, which identifies the origin of microorganisms. Sewage samples were collected from survey sites in Sri Lanka and Japan, and total DNA was extracted from the collected sewage to identify genes from bacterial species frequently detected in corroded sewer pipes. As a result, it was found that Desulfobulbus genus gene markers are suitable for detecting anaerobic biofilms that generate hydrogen sulfide, and Thiothrix genus gene markers are suitable for detecting concrete corrosion. These gene markers are suggested to be usable for indicating the locations of corroded sewer pipes.

研究分野：環境水質工学

キーワード：スリランカ 下水管路劣化予測 下水水質情報 微生物起源解析 土壌微生物

1. 研究開始当初の背景

水や大気中の病原体による感染症被害は、全世界で 564,000,000 障害調整生命年 (disability adjusted life years: DALYs) に達しており、これは全世界の疾病負担の約 25% を占めている¹⁾。2015 年 9 月の国連総会で採択された国際的な行動指針である SDGs では、水・衛生環境に係る単独の開発目標 SDG6 として、「2030 年までに全ての人々が清浄な水と改善されたサンテーション施設 (トイレ) を利用可能にする」ことが掲げられた。この SDG6 を根拠として、水関連インフラの発展途上国へ導入が促進されている。今後、適正に管理された水供給システムを利用可能な人口割合 (SDG6 の指標 6.1.1) や、適正に管理された汚水処理施設を利用可能な人口割合 (SDG6 の指標 6.2.1) に関するデータが引き続き整理されていくことになる。しかしながら、水関連インフラの導入に適正なアセットマネジメントが伴わなければ、将来に渡っての維持管理が滞り、2030 年に SDG6 を達成できたとしても、最終的に世界中の多くの地域で上下水道事業が破綻に至ってしまうことが懸念される。特に人口が密集する都市域での効率を重視して、水処理施設と管路網から成る集中型の水関連システムを途上国に導入した場合、稼働当初からのアセットマネジメントの適用は、その国の持続的な発展にとって著しく重要であると言える。

しかしながら、集中型の水関連インフラの場合、管路網が土中に埋まっているために、道路や橋梁などの社会インフラと比べて劣化レベルを目視で確認することが困難であることから、アセットマネジメントを適正に行うことがこれまで著しく困難であった。地中に埋設された下水管の交換に関する優先順位は、埋設されてからの経過年数と、管路網全体のごく一部を小型カメラにより検査した結果をもとに決定せざるを得ない状況である。集中型の水関連インフラにおいて、管路網の劣化を精度良く予測して適正なアセットマネジメントを行うことは、未だ実現されていない土木工学上の課題である。

そこで本研究では、これまでにない全く新しいアイデアに基づいて管路網の劣化予測モデルを構築することを目指した。本研究で採用する手法は、微生物起源追跡手法 (microbial source tracking: MST) である。MST は、水環境中における糞便汚染を追跡する手法として開発され、発展してきた²⁾。技術的な基礎は微生物ゲノムの配列多様性にあり、動物糞便由来微生物と土壌由来微生物を区別することができるのみならず、ヒト由来、家畜由来 (ウシ、ブタ、ニワトリ等) 及び野生動物由来 (シカ、カモ等) の微生物を区別することが可能である。土壌由来微生物よりも糞便由来微生物の方が病原性が高い場合が多いので、微生物による水環境汚染が検知された場合、その微生物の発生源を MST により調べることで、その水の利用 (飲料原水やレクリエーション水) における感染リスクを評価することが可能となる。

本研究は、この MST の特長を逆手に取ったものである。ヒト糞便由来の微生物が優占する下水の中で、下水管の腐食箇所を増殖する可能性のある土壌に由来する微生物量を測定することで、腐食箇所を特定するアプローチを確立することを試みた。

2. 研究の目的

本研究は、MST 的アプローチにより、埋設された下水道管渠の劣化状態を簡便に評価するための方法論を開発することを目的とした。

3. 研究の方法

本国際共同研究では、研究フィールドとしてスリランカに着目した。スリランカ国内で下水管により下水処理場と繋がれた環境にある人口は全体の 3% であるが³⁾、そのうち 95% が最も都市化が進んでいる Colombo に存在する。残りの 5% は Kurunegala 及び Kandy に設置されており、Kurunegala の集中型下水処理システムは 2019 年に稼働が開始され、Kandy では現在試験運転中の状況にある。これらのことは、下水管路網の規模はまだ小さいものの、下水管路網の経年劣化が観察しうる Colombo と、真新しい下水管路網を保持する Kurunegala 及び Kandy が存在することから、本研究が提案する MST を用いた下水管網劣化予測モデルの構築に適した状況にあることを示している。本研究により下水中の土壌由来遺伝子マーカー同定プロトコルが確立すれば、先進国・途上国問わず適用可能な技術として報告することが可能である。下水のサンプリングは 2023 年度に行なった。同時に、コンセプトの実証のため、日本国内での下水のサンプリングを行った。2021 年 9 月、12 月および 2022 年 10 月から 12 月にかけて採取された、調査区域内のポンプ場 A、B、C から下水サンプルを入手した (各 10 サンプル)

得られた下水サンプルに関し、遠心分離した沈殿物から総 DNA 抽出を行った。抽出物に対し 16s rRNA の V4 領域をターゲットとした PCR を行い、電気泳動にて増幅を確認したサンプルについて、MiSeq (イルミナ) を用いたアンプリコンシーケンス解析を行った。その後、次世代シーケンシングによって得られたデータに対し、メタゲノム解析パイプライン Qiime2 による解析を行った。配列データから得られた分類データをデータベースに照合し、各サンプルに含まれる微生物遺伝子の種類と相対的な検出割合を明らかにした。また、サンプルの微生物組成データを元にクラスタリングを行なった。

さらに、日本国内の調査対象区域について、下水道台帳に基づく基本情報及テレビカメラ調査

結果を入手した。データはGIS (=地理情報システム)と紐付けされており、これを別途入手したサンプルA、B及びCのポンプ場の集水範囲(エリア)の情報と組み合わせることで、ポンプ場ごとの比較を行った。点検はマンホール間を結ぶ区間ごとに行われ、区間内の各管の腐食が進行している順にa、b、cの3段階評価が与えられる。区間ごとの腐食レベルの評価を行うため、それぞれの評価を得た管本数に重み付けを施した“腐食スコア”を算出した(1)。

$$\text{"スコア"} = \frac{1.0 \times (\text{"a 管本数"}) + 0.7 \times (\text{"b 管本数"}) + 0.3 \times (\text{"c 管本数"})}{\text{"区間管本数"}} \quad (1)$$

管路の点検は2004年から2019年まで行われたものであり、年度の異なるスコアを直接比較するのは不適切であることから、建設年度からの経過年数を考慮する必要がある。そこで、腐食スコア0.3未満を「生存」状態と定義し、コンクリート管、ヒューム管、鉄筋コンクリート管を対象としたワイブル劣化ハザードモデルを用いて、式(2)に示す経過年数yによる生存確率関数を算定した。

$$S(y) = \exp(-\exp(\beta) \times y^\alpha) \quad (2)$$

さらに生存確率関数に対し、各エリア内のヒューム管、コンクリート管、鉄筋コンクリート管の経過年数データを入力し、エリア全体の生存確率と推定故障スパン数及びそれを各ポンプ場の平均圧送量(m³h⁻¹)で除した値を算出し、これらをエリアの腐食レベルの指標とした。

微生物によるコンクリート腐食は、下水中の嫌気性バイオフィルム中での硫酸塩還元細菌(SRB)による硫酸塩からの硫化物の生成、液相から気相への硫化水素ガスの拡散から始まる。硫化水素は構造物の気相部壁面の結露水や間隙水中へ溶け込み、硫酸化細菌(SOB)等の活動によりpHの低下と硫酸生成が起こり、硫酸とコンクリート中の成分との反応により組織の損傷に至ることが知られている⁴⁾。従って、文献より腐食進行に寄与するとされる細菌、及び多くのSRBを含む*Desulfobacterota*門などから複数の候補を設定し、ポンプ場の流入区域ごとの検出割合を比較した。

4. 研究成果

4.1. 管路データの解析

生存曲線(図1)及び経過年数から算出された指標(表1)から、エリアBの腐食が最も進行していることが示された。

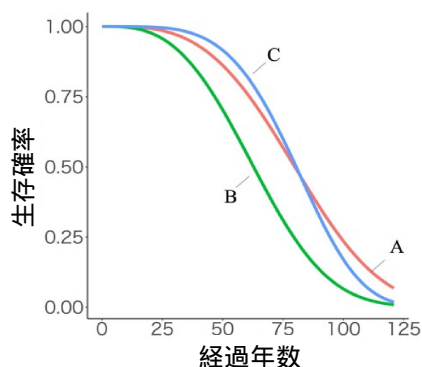


図1. 各エリアの生存曲線

表1 生存曲線から算出された腐食レベル

	A	B	C
平均経過年数	54	46	41
コンクリート管スパン数	678	2084	9192
平均生存確率	81%	73%	95%
推定故障スパン数	130	572	449
故障スパン ÷ 平均圧送量	1.1	2.3	0.2

4.2. 管路データの解析遺伝子マーカーの探索

図2に、各エリアの微生物検出割合の分布を示した。管路データの解析結果から、遺伝子マ-

カーとしてはエリア B での検出割合が高いものが有力であるといえる。候補の SOB のうち、*Thiothrix* 属がこれに当てはまる。*Thiothrix* 属は、コンクリート腐食の進行に伴う微生物叢の変化において最初に出現する SOB として報告されており⁵⁾、初期段階の腐食を特定する遺伝子マーカーとして利用できる可能性がある。SRB では、*Desulfobulbus* 属、*Desulfomicrobium* 属、*Desulforegula* 属がエリア B での検出割合平均値が高かった。これらは下水中の嫌気性バイオフィルムを構成する SRB として報告されており⁶⁾、検出サンプル数の少ない *Desulforegula* 属を除く *Desulfobulbus* 属、*Desulfomicrobium* 属は硫化水素の生成を指し示す遺伝子マーカーとしての利用可能性が高いと考えられる。

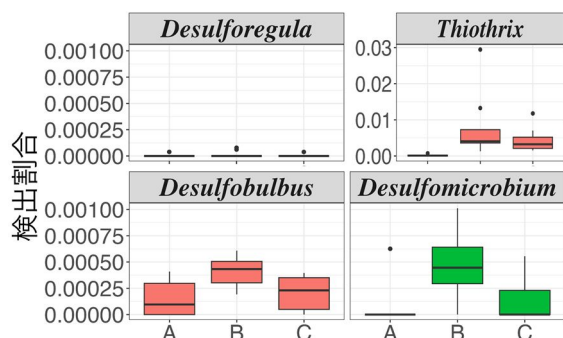


図2 . 各エリアでの微生物検出割合の分布 .

NGS におけるリード数の大小関係は、サンプルに含まれる遺伝子の濃度の大小関係に対応しており、濃度は腐食した管を通過した下水が占める割合が関係していると考えられる。本研究ではその割合は故障スパン÷平均圧送量を反映するものとして、遺伝子マーカーの検出割合は $C < A < B$ となると考えられていたが、いずれの遺伝子マーカーも $A < C < B$ となっており、腐食レベルの指標の中ではエリア内の推定故障スパン数を反映する結果となった。遺伝子マーカー3属の検出割合データに対しクラスタリング分類を行ったところ、エリア A は完全に分類したものの、B と C を判別することはできなかったことから (図3)、C の微生物組成は劣化の進んでいる B のものに近いことがわかる。原因として、エリア内の人口の偏りが考えられる。3つのうち最も広く水量の多い C だが、経過年数が長く腐食が進行していると推測される管の分布する地域と、人口が密集している地域の重なりが見られた。汚水排出量は人口に比例するため、腐食レベルの高い管路を通過した下水の占める割合が、エリア内の人口が一樣に分布していると仮定した場合よりも高く、遺伝子マーカーの検出割合が A よりも高くなった可能性がある。今後は、ポンプ場ではなく特定のマンホールからサンプルを採取し、より狭い範囲の下水を対象として遺伝子マーカーの検証を行う必要がある。

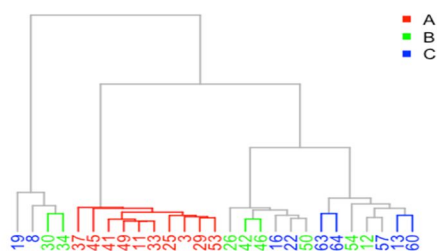


図3 . 遺伝子マーカーを用いたクラスタリング結果 .

続いて、スリランカで採取した下水サンプルについて、上記の遺伝子マーカーが検出可能かを検証した。日本で得られたサンプルと同様に、遠心分離した沈殿物から総 DNA 抽出を行い、抽出物に対し 16s rRNA の V4 領域をターゲットとした PCR を行った。電気泳動にて増幅を確認したサンプルについて、MiSeq (イルミナ) を用いたアンプリコンシーケンス解析を行った。その後、次世代シーケンシングによって得られたデータに対し、メタゲノム解析パイプライン Qiime2 による解析を行った。配列データから得られた分類データをデータベースに照合し、各サンプルに含まれる *Thiothrix* 属、*Desulfobulbus* 属、*Desulfomicrobium* 属、*Desulfovibrio* 属の相対的な検出割合を算出した。

結果として、*Thiothrix* 属の出現割合は、他の3属と明確な差が存在することが明らかとなった (図4)。上述したように、*Thiothrix* 属はコンクリート腐食の進行に伴う微生物叢の変化において最初に出現する SOB として報告されており、一方 *Desulfobulbus* 属などは下水中の嫌気性バイオフィルムを構成する SRB として知られている。それぞれ下水管路内の状況を知る上で有用と

考えられるが、量的な側面を考えると、硫化水素を生成する嫌気性バイオフィルムの検出については *Desulfobulbus* 属遺伝子マーカーが、コンクリート腐食の検出については *Thiothrix* 属遺伝子マーカーが適していると考えられる。

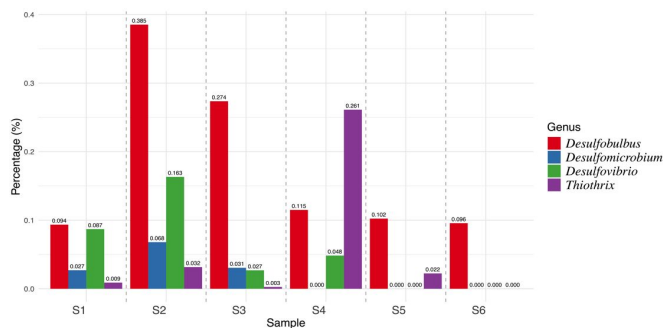


図4 . 遺伝子マーカーを用いたクラスタリング結果 .

結論

スリランカの下水管路において、硫化水素を生成する嫌気性バイオフィルムの検出については *Desulfobulbus* 属遺伝子マーカーが、コンクリート腐食の検出については *Thiothrix* 属遺伝子マーカーが適していることを示唆する結果を得た。

参考文献

- 1) GBD 2016 Risk Factors Collaborators, 2017. Lancet, 390, 1345-1422.
- 2) Shenhav et al., 2019. Nature Methods, 16, 627-632.
- 3) National Water Supply & Drainage Board, 2013.
- 4) Grengg et al., 2015. Microbiologically induced concrete corrosion: A case study from a combined sewer network. Cement and Concrete Research, 77, 16-25.
- 5) Okabe et al., 2007. Succession of sulfur-oxidizing bacteria in the microbial community on corroding concrete in sewer systems. Applied and environmental microbiology, 73(3), 971-980.
- 6) Sun et al., 2014. Stratified microbial structure and activity in sulfide-and methane-producing anaerobic sewer biofilms. Applied and environmental microbiology, 80(22), 7042-7052.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 三浦耀平、水谷大二郎、佐野大輔	4. 巻 65(2)
2. 論文標題 上下水道管路の劣化予測手法総説	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 用水と廃水	6. 最初と最後の頁 47-62
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 三浦耀平、水谷大二郎、佐野大輔	4. 巻 65(3)
2. 論文標題 上下水道管路のモニタリング技術総説	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 用水と廃水	6. 最初と最後の頁 47-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 渡部寛生、水谷大二郎、佐野大輔
2. 発表標題 下水管路の劣化診断用遺伝子マーカーの同定
3. 学会等名 第57回日本水環境学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	水谷 大二郎 (Mizutani Daijiro) (30813414)	東北大学・工学研究科・助教 (11301)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	Amarasiri Mohan (Amarasiri Mohan) (50815537)	北里大学・医療衛生学部・講師 (32607)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関