

令和 2 年 5 月 31 日現在

機関番号：82627

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K06972

研究課題名(和文) 船体付着生物の微量定量分析法開発による防汚性能評価法の研究

研究課題名(英文) Study on evaluation method for antifouling by development of micro quantitative analysis for organisms attached to ship

研究代表者

益田 晶子 (Masuda, Akiko)

国立研究開発法人海上・港湾・航空技術研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：10322679

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：船体生物付着を防ぐため、船体には防汚塗料が塗装されている。生物付着は細菌によるスライム層の形成を足がかりに、藻類・動物種の付着へと段階的に進むと予測されているが、初期スライム層は目視できず定量的評価は困難なため実証はされていなかった。本研究では、スライム層中のタンパク質に着目し、その絶対量を定量することで、塗装試験片の付着スライム層形成量の定量評価を行った。同時に、塗装試験片からの銅イオン(防汚剤)溶出速度を計測し、スライム付着量との相関を調べた。その結果、スライム層形成によって銅イオンの溶出が抑制されることが明らかになり、これが生物付着メカニズムの初期段階であることが明確になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

船体への生物付着メカニズムを明らかにするため、細菌付着によるスライム層の形成量を、スライム層中のタンパク質を定量することで初めて明らかにした。一方、生物付着を防ぐために船体に塗布されている防汚塗料からの防汚剤放出速度を計測し、塗装表面にスライム層が形成されることで、防汚剤の放出が抑制されることを明らかにした。この結果、スライム層形成を足がかりに藻類・動物種の付着が促進されることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Anti-fouling paint is applied to the hull to prevent the attachment of organisms to the hull. It is predicted that biofouling will gradually progress to the adhesion of algae and animal species based on the slime layer formation by bacteria. However, such adhesion mechanism has not been validated since slime layers are difficult to observe and quantify. In this study, we focused on the protein contained in the slime layer and quantified its absolute amount to evaluate the amount of the adhered slime layer formed on the painted test piece. At the same time, the elution rate of copper ions (antifouling agent) from the painted test piece was measured and the correlation with the amount of slime adhered was investigated. As a result, it was clarified that the elution of copper ions was suppressed by the slime layer adhesion, and it was found that the slime adhesion is the initial stage of the biofouling mechanism.

研究分野：環境分析化学

キーワード：防汚塗料 亜酸化銅 タンパク質 アミノ酸組成分析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

船体生物付着を防ぐための防汚塗料は、塗膜表面から徐々に亜酸化銅などの防汚剤が溶出する機構のものが主流である。そのため塗膜が付着生物で覆われると防汚性能が著しく低下する。一般に塗料の防汚性能評価は、実験室内あるいは実海域で塗装試験片の浸漬試験を一定期間行い、藻類(アオノリ、ワカメなど)、動物種(フジツボ、イガイなど)の付着度合いを目視あるいは分光学的に確認する方法などで行われている。実験室で動物種を用いた試験を行う場合、幼生から飼育を行い、同じ成長段階の個体を選別して試験に用いるが、その活動量を揃えることは容易ではない。また生物種による防汚剤への耐性の違いも考慮する必要がある。海域によっても存在する生物種は異なり、客観的でかつ世界共通の指標をどう定めるべきかの議論も始まっている。また生物付着のメカニズムも完全には解明されていない。これまで、汚損初期にバクテリアが付着し、スライム層を形成することで防汚剤溶出が阻害され、微小藻類の付着が生じ、さらに動物種が付着するものとされてきた。しかし、初期スライム層の定量的評価が困難だったことから、スライム層形成と生物付着の促進についての相関は明らかではなかった。

### 2. 研究の目的

船体生物付着による生物越境移動等の環境影響を防ぐため、船体には防汚塗料が塗装されている。生物付着はバクテリアによるスライム層の形成、微小藻類の付着、動物種の付着、と段階的に進み、特に初期のスライム層形成は防汚剤溶出を阻害し、さらなる生物付着を促進すると予測されている。しかしこれまで、初期スライム層は目視できず定量的評価は困難だった。本研究では、スライム層中のタンパク質に着目し、タンパク質の絶対量を定量することで、スライム層形成量の定量評価を行う。そのため、これまで構築してきた極微量タンパク質定量のための超高感度アミノ酸組成分析法を応用する。定量したスライム形成量と防汚剤の溶出速度の相関を明らかにすることで、生物付着メカニズムを解明する。

### 3. 研究の方法

水和分解型樹脂に、防汚剤として亜酸化銅を含む防汚塗料を使用し、亜酸化銅配合量を 0~40wt%と系統的に変えた塗装試験片を作成する。これを天然海水中に静置浸漬し、浸漬時間を変えることによりスライム付着量を調整する。スライムサンプリング方法を確立したのち、スライム層形成量の指標として、スライム中のタンパク質量をアミノ酸組成分析(AAA)法により定量する。また、スライムが付着した塗装試験片から亜酸化銅を人工海水中で溶出させ、質量分析法により溶出銅濃度を定量し銅溶出速度を算出する。浸漬時間すなわちスライム層形成量を変えた時の銅溶出速度を計測することで、スライム層形成量と防汚剤の溶出阻害の関係を定量化し、初期スライム付着が他の生物付着の足がかりとなるメカニズムを解明する。

### 4. 研究成果

#### (1) 塗装試験片へのスライム層形成条件の解明

防汚剤を含まない塗装試験片を 1L の天然海水中に静置浸漬し、その浸漬容器を恒温水槽につけ、25℃一定で攪拌しながら浸漬試験を行った。12 時間ごとに 6900lm の LED 照明を点灯させ、天然海水は 4 日ごとに交換し、スライム層形成条件を明らかにした。浸漬後 4 日目から顕著にスライム付着量が増加し、5 日目以降は、ほぼ一定値となった。浸漬を 10 日以降 18 日まで続けたが付着量は減少した。これは、バクテリアが本実験条件では長期生育できないためと考えられた。さらに、防汚剤として亜酸化銅を配合した塗装試験片を用い、天然海水中で動的養生後に同様の静置浸漬試験を行って付着物を定量した。浸漬 0 時間においても、亜酸化銅の有無で付着量が大きく異なり、亜酸化銅を含む試験片では防汚効果が認められた。また、亜酸化銅を含む試験片で

静置浸漬を続けたが、10日目までほとんど付着量の増加は見られなかった。これらの結果から、タンパク質付着量の亜酸化銅濃度依存性を調べるためには、45日間の動的養生後、72時間の静置浸漬を行うこととした。

#### (2) スライム層中のタンパク質量法の確立

複数のサンプリング方法を検討した結果、5mm幅のテフロン板で表面を短冊状に5cm(5mm X 50mm範囲)剥離する方法が最適であるとわかった。この方法で静置浸漬前に試験片の3カ所からサンプリングを行い、サンプル中のタンパク質量をそれぞれアミノ酸組成分析によって定量した。サンプリングしたタンパク質は全量を酸加水分解し、その1/1000を分析した。短冊表面あたりのタンパク質量で比較すると、亜酸化銅を配合していない塗装試験片の場合、約3マイクログラムの付着量があったが、40wt%亜酸化銅を配合した塗料の場合、約0.5マイクログラムの付着量のみであり、防汚効果を付着タンパク質量から示すことができた。このような付着量の違いは、目視からは判断できず、分析することによって明らかにできた。

#### (3) スライム付着塗装試験片からの防汚剤溶出量定量法の確立

塗膜からの亜酸化銅溶出量を調べるため、一様な流れ場の人工海水中に塗装試験片を置く溶出試験装置を用いた。回流によってスライム層の剥離が起らず、スライム層を保持したまま溶出試験を行っているか確認するため、溶出試験を行わない試験片と、溶出試験後の試験片の付着タンパク質量を定量し比較した。その結果、流速0.4m/secでは、付着物の剥離が生じないことがわかった。この流速で回流時間を振って銅イオンの溶出濃度を原子吸光法で定量し、溶出速度を算出したところ、回流1時間後と2時間後では、ほとんど溶出速度は変わらず定常状態になっていることがわかった。そこで、回流前のバックグラウンド、回流5分後、1時間後の溶出溶液をサンプリングし、銅の溶出速度を算出することにした。

#### (4) スライム層形成と防汚効果の相関

亜酸化銅濃度を0.5,10,20,40wt%で系統的に変えた塗装試験片について、動的養生後の付着タンパク質量を定量したところ、防汚剤濃度が増えるにつれ、タンパク質量は減少した。一方、動的養生後に72h静置浸漬した塗装試験片は、いずれの防汚剤濃度でも付着タンパク質量が増加した。この結果は、運航中はスライムが付着しなくても停泊によって付着することを示唆している。

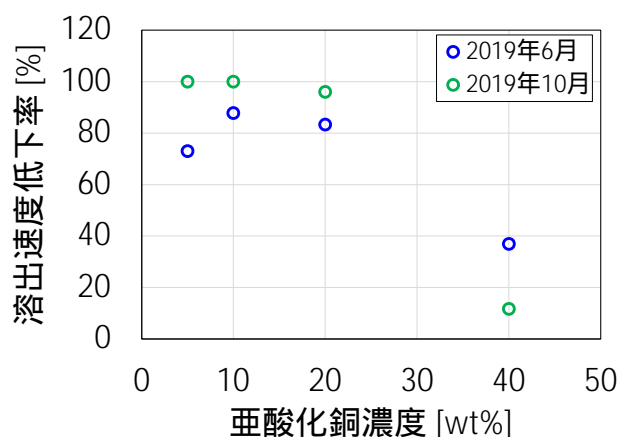


図1. 静置浸漬時のスライム付着による銅イオン溶出速度低下率

る。また、静置浸漬によって付着タンパク質量が増加すると、銅の溶出速度が減少することが明らかになった。図1に、静置浸漬による銅イオンの溶出速度低下率の亜酸化銅濃度依存性を示した。亜酸化銅濃度が少ないほど付着タンパク質量が多く、溶出速度の低下も顕著だった。このように、スライム層付着によって防汚剤である銅イオンの溶出が抑制されることが明らかになり、これが生物付着メカニズムの初期段階であることが明確になった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 益田晶子、堂前直、安藤裕友
2. 発表標題 アミノ酸分析法を用いた船体付着生物の定量
3. 学会等名 日本アミノ酸学会第12回学術大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 益田晶子、安藤裕友、堂前直
2. 発表標題 船体付着生物の微量定量分析法開発と防汚塗料の防汚性能評価
3. 学会等名 第89回日本マリンエンジニアリング学会学術講演会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 付着物の定量分析による防汚性能評価方法及び防汚性能評価システム	発明者 益田晶子、堂前直	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2017-065200	出願年 2017年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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	堂前 直  (Dohmae Naoshi)  (00321787)	国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・ユニットリーダー   (82401)	
研究分担者	安藤 裕友  (Ando Hirotomo)  (70462869)	国立研究開発法人海上・港湾・航空技術研究所・その他部局等・研究員   (82627)	