

機関番号：54101

研究種目：基盤研究(B)一般

研究期間：2009～2011

課題番号：21360372

研究課題名(和文) 海洋菌バイオフィーム形成抑制を目的とした金属材料表面改質と抑制メカニズムの解明

研究課題名(英文) Metal Surface Modification to Moderate Marine Biofilm Formation And the Clarification of Moderation Mechanism

研究代表者

兼松秀行 (KANEMATSU HIDEYUKI)

研究者番号：10185952

研究成果の概要(和文)：

各種金属の海洋中におけるバイオフィーム形成挙動を伊勢湾岸の海洋浸漬により明らかにした。また、遺伝子解析の手法を用い、形成されたバイオフィーム中の細菌の種類を明らかにし、これらの大部分が培養できない細菌群からなること、その種類は材料の種類により異なること、そして微生物腐食がバイオフィームの幾何学形状により誘起される可能性が高いことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Biofilm formation behaviors were clarified for various metals in marine environments, when they were immersed into Ise Bay. And by using some gene analyses, the species of bacteria in biofilm formed on various specimens in the sea were clarified. We observed that most bacteria in the biofilms were non-culturable, that the species depended on the substrate materials and also that the microbial induced corrosion (MIC) occurred due to the geological change by the formation.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	5,900,000	1,770,000	7,670,000
2010 年度	4,600,000	1,380,000	5,980,000
2011 年度	3,300,000	990,000	4,290,000
年度			
年度			
総計	13,800,000	4,140,000	17,940,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：金属生産工学

キーワード：バイオフィーム、海洋浸漬、微生物腐食、生物付着、溶射

## 1. 研究開始当初の背景

腐食による構造材料劣化に対する補修、維持にかかる費用は先進国では GDP の数パーセントに及ぶ、大きな経済効果を持つ重要課題である。とりわけ 21 世紀のエネルギー問題を概観したとき、化石燃料、希少金属を含む各種資源の採掘のための諸設備、また原子力発電、風力発電などの各種発電設備等の構築が盛んに行われることが予想される。これらは海岸線沿いの陸地あるいは沖合において構築されるが、その使用環境において主とし

て金属材料からなる構造物は、塩化物をはじめとする無機物質、化合物、イオンなどの腐食因子によって引き起こされる局部腐食のみでなく、海洋生物、細菌の付着-バイオフィームの形成-微生物腐食-スライム生成による劣化を起こすことが実際にはかなり多いことがわかってきた。この対策を立てることは上記の理由から大きな経済効果を生み出し、また医療福祉分野、食品加工分野においても重要なポイントとなるバイオフィーム形成のメカニズム解明に役立ち、その波及効果は

基礎材料科学から産業界にまで広範囲に及ぶことが予想される。

この問題は国外においては、とりわけ海洋国の英国を中心として欧州において活発に研究されている。例えば生物付着・バイオフィーム形成による微生物腐食とその対策についての、英国ポーツマス大学の Sheelagh Campbell 博士が率いる研究グループは著名である。また米国においても海軍の研究所がリードして、世界的な業績を上げており、微生物腐食の著名な本を著した Brenda Little 博士とその共同研究者の活動が顕著であり、この二人の著名な研究者とそのグループは世界の第一線にあるといっても過言ではない。本申請者は 2008 年 7 月に神戸で開催された国際会議 ICMCF2008 (海洋腐食と付着に関する国際会議) に招待講演を依頼され、同時に招待講演を受けて来日した両博士と議論をする機会を得、我が国の研究の立ち後れ、とりわけ材料工学的なアプローチの弱さを痛感するに至った。材料の発展なくしてこの学際的な問題の根本的な解決はあり得ない。この点において重要な研究ニーズが金属材料工学において存在し、またその点に研究対象を振り向けていくことはアカデミックな意義のみでなく、国のインフラ整備にも関わる重要な問題であるといえる。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では、平成 21 年から 23 年の 3 年間の研究期間内において、(a)すでに 2007 年度に申請者が効果を確認したすずに加えて、抗菌性が弱いにもかかわらずバイオフィーム形成能を抑制する汎用元素をさらに見だし、(b)それらのバイオフィーム形成抑制のメカニズムを調べ、(c)それら各種元素を鉄鋼材料をはじめ各種海洋構造物に用いられる金属材料の表面に最適の形態で存在せしめる表面改質方法を研究室レベルで確立したいと考えた。この場合において、表面改質された金属材料がバイオフィーム形成を実際に抑制するかどうかの検討確認が必要であった。

## 3. 研究の方法

本研究では、平成 21 年度から平成 23 年度の 3 年間に渡ってバイオフィーム形成抑制能を持つ汎用元素の探索・メカニズム検討・金属材料表面の改質とその評価を行った。基本的には、初年度である平成 21 年度に、これまで行ってきたバイオフィーム形成抑制能の試験結果を踏まえ、同様の作用を示す汎用元素を探索し、同時にその抑制機構の検討を行った。

平成 22 年度には、平成 21 年度の実験結果に基づいて、本格的な表面改質実験を行った。平成 23 年度には、改質された金属材料のバイオフィーム抑制機能を実験室レベルで調査し、実環境中においても検討を行った。具

体的には、以下の計画・体制により測定、製作・評価を推進した。

### (1) バイオフィーム抑制金属元素の探索

バルク金属材料および表面に薄膜を形成させた試料を用いて、次の手順で *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudoalteromonas carageenovara* のバイオフィーム形成抑制能と抗菌性を評価した。普通ブイヨンで 308K, 64.8ks 培養した上記細菌を、2 倍希釈普通ブイヨンに懸濁し  $10^3$ /ml の菌液を調製した。24 穴マイクロプレートのウェルに菌液を 2ml 入れ、めっき鋼板 (10x10mm) を菌液の中に浸漬するように立てかけた後、308K, 86.4ks 静置培養した。ウェル中の菌液を除去後、めっき鋼板を 2ml の 150mM NaCl を含む 10mM リン酸緩衝液 (pH7.4, PBS) で軽く 0.2% クリスタルバイオレット溶液 (1ml) に 3.6ks 浸してバイオフィームを形成する菌体を染色した。次にめっき鋼板を新しい 24 穴マイクロプレートに移し、鋼板表面に付いている非特異的なクリスタルバイオレットを 1ml の PBS で洗い流す。これを 5 回繰り返した後、95% エタノールを 1ml 加えてバイオフィームからクリスタルバイオレットを溶出させた。さらに 96 穴平底マイクロプレートに溶出液 100 $\mu$ l を移し、マイクロプレートリーダー (BIO-RAD, Model 550) を用いてクリスタルバイオレットの吸収 ( $A_{570}$ ) を測定した。また、マイクロプレートリーダーによって菌液の濁度 (655nm) を測定し、菌液の濁度と菌数の関係から培養した菌液の菌数を内挿して求めた。570nm での吸収が小さい試料ほど、バイオフィーム形成を抑制することができるため、この手法によって各種材料のバイオフィーム形成抑制能を評価することができ、汎用金属の中で新しいバイオフィーム形成抑制能を有する元素を特定することができた。

### (2) バイオフィーム形成メカニズムと微生物腐食メカニズム検討

上記の試験に用いた各種材料、表面処理鋼板を海洋環境に浸漬し、バイオフィームを形成させた。その後バイオフィームを形成している微生物の群集をクローンライブラリー法を用いて同定した。クローンライブラリー法は、微生物そのものを培養せずに直接サンプルから DNA を抽出してその微生物の群集を解析するものであり、培養できない微生物にも適応できる。バイオフィームを形成している微生物群集の大半は培養できない微生物で構成されているので、金属の種類の変化がどのように微生物の群集に変化を与え、その結果様々なバイオフィームを形成するかを解析するには、クローンライブラリー法による解析が必須であり、その結果により、その現場でのバイオフィーム制御が可能になる。一口にバイオフィームといっても、見た目こそ似ているが、その構成微生物は異なる

っていると考えられることから、その現場のバイオフィルムを構成している微生物の解析は、その制御に必須である。

また同様に形成された上記試料のバイオフィルムの構造解析を低真空 SEM により観察した。

### (3) 表面改質

これらの結果を踏まえて、鉄鋼材料表面に電気めっき等により各種の金属元素を薄膜として形成させ、これらの金属を海洋環境中や冷却水系など、貧栄養環境中に浸漬し、バイオフィルム形成並びに生物付着挙動を観察した。

## 4. 研究成果

### (1) バイオフィルム抑制金属元素の探索

バイオフィルムを形成しやすいと言われている緑膿菌の培地中に各種金属材料を浸漬し、取り出してクリスタルバイオレットで染色し、これをエタノールで溶出して、その溶液の吸収をプレートリーダーを用いて 570nm で測定後、SS400 の吸収を 100% として各種金属表面におけるバイオフィルム量を百分率で評価した。結果を図 1 に示す。抗菌性を発現することで知られる Cu, Ag は強い抗菌性を示し、バイオフィルム形成を抑制するといえるが、全体的に見たとき、いわゆる抗菌性元素がバイオフィルム抑制能が高いとはいえないように思われる。一方において、著者らが別の抗菌試験によって抗菌性が認められないと結論づけたはずが、図 1 においてバイオフィルムを形成しにくいということも起こった。抗菌性を示す金属元素が材料表面に存在すれば、細菌の吸着を防ぐことができるため、ある程度バイオフィルムの形成を抑制することは確かであろうが、バイオフィルム形成能にはもう少し別の何かしらの機構が作用しているようである。

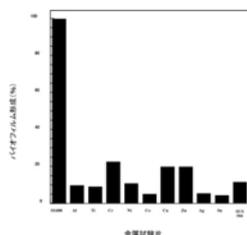


図1各種金属表面において形成されたバイオフィルムの成長

### (2) (2) バイオフィルム形成メカニズムと微生物腐食メカニズム検討

伊勢湾岸に鉄鋼材料を初め各種非鉄金属材料を一定期間浸漬し、表面の付着生成物をかき取って集め、遺伝子解析を行い、付着細菌の大部分が培養不可能な細菌からなること、硫酸還元菌が認められるもののマイナーな存在であること、また付着細菌の種類が浸漬された金属材料の種類によって変化することなどを確かめた。図 2 にこのときの方法を模式的に示す。

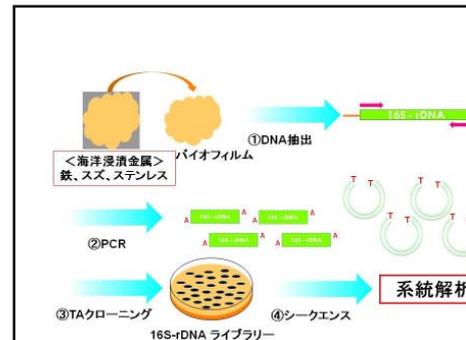


図2 遺伝子解析の手法

時間の制約から限定的にいくつかの材料に迫って検討結果を得たのみであったが、鉄上とすず上において形成されるバイオフィルム中の細菌が異なること、それぞれの資料上の細菌自体も時間の経過とともに変化していくこと等が明らかとなった。これらの細菌は培養不可能な細菌であることが大きな特徴であった。この意味するところは、微生物腐食には硫酸還元菌といった特定の微生物ではなく、むしろ培養不可能な多数の細菌により形成されるバイオフィルムが関与している可能性が高いということである。

以上の検討結果から微生物腐食のメカニズムとして以下の仮説をたてた。鉄鋼材料あるいはその他非鉄材料は水溶液或いは湿潤環境中において大なり小なりイオン化している。これら金属イオンとの上記生体システムによる結合性の差によって、選択的に細菌群が集合しクオラムセンシングにより EPS を排出してバイオフィルムを形成する。その形成の程度、状況は集まる細菌の種類と運動性によって大きく異なることであろう。程度の差こそあれ、バイオフィルムが形成されると、酸素濃淡電池が形成され、バイオフィルムが厚く成長している部分は金属の溶解反応（アノード反応）が起こり、一方バイオフィルムの薄い部分は溶存酸素の還元（カソード反

応) が起こり, これらの Redox 反応をもとに金属材料の腐食が起こる. 現時点ではこのモデルは完全に証明されておらず, 従来から言われている SRB など特殊な細菌の代謝反応による腐食メカニズムと同様, もちろん多くの有力な根拠を有するが, すべての現象を説明し尽くしていないという点において, 未だ仮説の一つに過ぎない. このほかにも例えば過酸化水素の形成による腐食モデルも提唱されており, このモデルでは微生物腐食における大きな特徴である電位貴化 (ennoblement: 微生物腐食が起こる場合は常に自然電位が腐食の進行とともに貴に変化する現象を伴うが, その正しい説明が未だなされていない.) をうまく説明できるという特徴を有している. こうした様々なモデルと今回提唱したモデルのいずれが正しいのか, あるいはそれらが複合的に関与しており, 時と場合によっていずれかが主体的なものになるのか, といった問題は今後の検討に待たなければならない.

### (3)表面改質

クロム, ニッケル, すず, 銅, 亜鉛, アルミに生むなどを鉄鋼材料表面に各種表面処理法により形成させ, 海洋浸漬, 実験室的な暴露試験により, そのバイオフィーム形成能抑制効果の違いを調べた. 表面処理法としては, 電気めっき, 溶融亜鉛めっき, 溶射等を行った. すべての手法において, 亜鉛, 亜鉛-アルミニウム合金膜, アルミニウム膜は生物付着が起こりにくく, バイオフィームの形成も抑制された. クロム, ニッケルについては, 鉄そのものが存在するときに比べてバイオフィーム抑制効果が現れたが, 他の金属に比べると抑制効果は今ひとつであった. 表面改質法としては, 電気めっきは膜厚が薄く長期暴露になる環境下では適さない. 溶射法あるいは亜鉛, アルミニウムに限っては, 溶融浸漬めっきが有効である.

表面改質法としては, 素地が鉄鋼材料の場合, 鉄の水溶液への溶解を止めるコーティングが, バイオフィーム抑制のために最も重要である. そのためには膜厚, 膜の質 (欠陥の少ない膜), 素地との電位差などが重要なポイントとなると思われる.

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者, 研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件)

生貝初, 黒田大介, 兼松秀行, 小川亜希子, 南部智憲, バイオフィームによる鉄鋼材料表面の形態変化. 材料とプロセス (CAMP-ISIJ), 2009. **22**: p. 1228-1230.

兼松秀行, 黒田大介, 生貝初, 小川亜希子, 山本智代, 微生物腐食を想定した数種の酸のなかでの各種鉄鋼材料表面の電気化学挙

動. 材料とプロセス (CAMP-ISIJ), 2009. **22**: p. 1231-1232.

Hideyuki Kanematsu, Hajime Ikigai, Daisuke Kuroda, Michiko Yoshitake and Shinjiro Yagyu, *Tin-Cobalt Alloy Film Formation through Heat Treatment and Its Antibacterial Property*. Journal of the Japan Society for Heat Treatment, 2009. **49** (Special Issue): p. 284-287.

兼松秀行, 生貝初, 黒田大介, 吉武道子, 柳生進二郎, 小川亜希子, 熱処理合金化めっき法によるすず-パラジウム合金皮膜の形成プロセスと皮膜の抗菌性発現. 熱処理, 2009. **49** (5): p. 274-278.

Hideyuki Kanematsu, Hajime Ikigai, Sheelagh A. Campbell and Iwona B Beech, *Sn-Ag Alloy Plating Films Mitigating Biofilm Formation*. Sur/Fin 2009, 2009.

黒田大介, 生貝初, 兼松秀行, 小川亜希子, 鉄鋼材料表面がバイオフィーム形成におよぼす影響. 材料とプロセス (CAMP-ISIJ), 2009. **22**: p. 1226-1227.

Maseda Hideaki et al. Mutational upregulation of a resistance-nodulation-cell division-type multidrug efflux pump, SdeAB, upon exposure to a biocide, cetylpyridinium chloride, and antibiotic resistance in *Serratia marcescens*. Antimicrob Agents Chemother. 2009, **53**, 5230-5235

横山誠二, 兼松秀行, 黒田大介, 小川亜希子, 生貝初, 高橋利幸, 鉄鋼スラグの海洋浸漬によるバイオフィーム形成. CAMP-ISIJ, 2010. **23**: p. 670-671.

黒田大介, 鎌倉渚, 小松真也, 生貝初, 兼松秀行, 小川亜希子, 海洋環境下における種々の金属材料への海洋生物付着. CAMP-ISIJ, 2010. **23**: p. 666-667.

間世田英明, 生貝初, 黒田大介, 小川亜希子, 兼松秀行, 伊勢湾岸における鉄鋼材料海洋浸漬と付着微生物の遺伝子解析. CAMP-ISIJ, 2010. **23**: p. 668-669.

鎌倉渚, 黒田大介, 生貝初, 兼松秀行, 小川亜希子, 冷却水系統における種々の金属材料へのバイオフィーム形成. CAMP-ISIJ, 2010. **23**: p. 672-673.

平井信充, 金田貴文, 田中敏宏, 山本智代, 勝村信哉, 兼松秀行, 鉄鋼材料の微生物腐食におけるバイオフィーム中の EPS の効果の基礎的検討. CAMP-ISIJ, 2010. **23**: p. 674-675.

生貝初, 黒田大介, 兼松秀行, 小川亜希子, 緑膿菌バイオフィームによる鉄鋼材料表面の腐食作用. CAMP-ISIJ, 2010. **23**: p. 679-680.

Nobumitsu Hirai, Toshihiro Tanaka, Hideyuki Kanematsu and Chiyo Yamamoto.

*Fundamental study on the effect of EPS in biofilms on microbial influential corrosion.* in *Materials Science and Technology (MS&T) 2010*. 2010. Houston, Texas, USA: 2010 MS&T' 10.

兼松秀行, 生貝初, 黒田大介, 金属材料表面への微生物付着とそれが引き起こす工学的問題について. 高温学会誌, 2011. **37**(1): p. 17-24.

兼松秀行, 生体指標の鉄鋼材料プロセスへの応用とその方向性. 材料とプロセス, 2011. **24**: p. 89-90.

砂田聡, 後藤拓人, 兼松秀行, 富山湾海水中における汎用鋼およびステンレス鋼の腐食挙動. 材料とプロセス, 2011. **24**: p. 95-97.

鈴木聡, 兼松秀行, 実用金属材料の抗菌化技術, in 日本鉄鋼協会材料の組織と特性部会「バイオフィーム及び微生物が材料におよぼす影響」研究会成果報告書, 佐藤嘉洋, Editor 2011, 日本鉄鋼協会: 東京. p. 77-82.

生貝初, 兼松秀行, 黒田大介, 金属材料による細菌の増殖制御. 軽金属, 2011. **61**(4): p. 160-166.

兼松秀行, 生貝初, 黒田大介, バイオフィームと金属材料. 防錆管理, 2011. **55**: p. 369-377.

生貝初, 兼松秀行, 材料が発現する抗菌性のメカニズムと抗感染性. バイオマテリアル, 2011. **29**(4): p. 232-239.

Kento Yoshida, Hideyuki Kanematsu, Daisuke Kuroda, Hajime Ikigai, Takeshi Kogo and Seiji Yokoyama *Biofouling of Cr-Nickel Spray Coated Films on Steel Surfaces*. Journal of Physics: Conference Series, Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011 (AP-IRC 2011), 2012. **352**, 1-6 DOI: 10.1088/1742-6596/352/1/012031.

T. Kougo, D. Kuroda, H. Ikegai and H. Kanematsu *Biofouling of various metal oxides in marine environment*. Journal of Physics: Conference Series, Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011 (AP-IRC2011), 2012. **352**, 1-5 DOI: 10.1088/1742-6596/352/1/012048.

黒田大介, 鎌倉渚, 伊藤日出生, 生貝初, 兼松秀行, 開放型循環式冷却塔の冷却水槽に浸漬した金属材料への微生物付着. 鉄と鋼, 2012. **98**(4): p. 109-116.

〔学会発表〕(計6件)

鎌倉渚, 黒田大介, 生貝初, 兼松秀行, Ni フリーステンレス鋼の微生物腐食に関する基礎的研究, 日本金属学会・日本鉄鋼協会東海支部第19回学生による材料フォーラム, 豊橋サイエンスコア, 2009年11月13日

Hideyuki Kanematsu, Biofilm and Metallic

Materials, Seminar in Northern New York Section of American Chemical Society, Clarkson University, June 19, 2009

Daisuke Kuroda, Hajime Ikigai, Hideyuki Kanematsu, Akiko Ogawa, Difference between Antibacterial effect and Inhibition Capability against Biofilm Formation by Surface Coatings. Processing and Fabrication of Advanced Materials - PFAM XVIII, Tohoku University, Dec.13, 2009

Kanematsu Hideyuiki, Aiko Ogawa, Seiji Yokoyama, Toshiyuki Takahashi, Hajime Ikigai and Daisuke Kuroda. *Biofouling on EAF Stainless Steel Oxidizing Slag in Marine Environment*. in *The 15th International Congress on Marine Corrosion and Fouling. 2010*. 2010. The Sage Gateshead, UK: New Castle University Yasuyuki Miyano, Hideyuki Kanematsu, Nobumitsu Hirai, Takeyuki Hirai and Osamu Kamiya. *The Study of Biofilm Formation and the Electrochemical Behavior of Some Metals*. in *The 15th International Congress on Marine Corrosion and Fouling. 2010*. 2010. The Sage Gateshead, UK: The New Castle University.

Kanematsu Hideyuiki, Hajime Ikigai, Daisuke Kuroda and Aiko Ogawa. *Biofouling of Chromium and Nickel Based Materials in Marine Environment*. in *Proceeding of the 15th International Congress on Marine Corrosion and Fouling. 2010*. The Sage Gateshead, United Kingdom: New Castle University.

〔図書〕(計2件)

兼松秀行, 生貝初, 黒田大介, 吉武道子, 柳生進二郎, 間世田英明, 飯村兼一ら, 安心・安全・信頼のための抗菌材料2010, 千葉県: 米田出版.

福崎智司, 兼松秀行, 伊藤日出生, 化学洗浄の理論と実際2011, 千葉 日本: 米田出版.

〔産業財産権〕

○取得状況 (計2件)

名称: 抗菌性を有するSn-Cu合金薄膜形成品の製造方法およびこれによって製造された抗菌性を有するSn-Cu合金薄膜形成品

発明者: 兼松秀行, 生貝初, 江崎尚和, 沖猛雄  
権利者: 独立行政法人国立高等専門学校機構  
種類:

番号: 2005-171670

取得年月日: 平成24.5.15

国内外の別: 国内

名称：抗菌性物品とその抗菌性薄膜の作製方法。

発明者：吉武道子, 兼松秀行, 生貝初

権利者：立行政法人物質・材料研究機構, 独立行政法人国立高等専門学校機構

種類：特許

番号：現在整理中

取得年月日：平成 24. 6. 1

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://www1.mint.or.jp/~reihidek/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴鹿工業高等専門学校・材料工学科・教授

兼松 秀行 (KANEMATSU HIDEYUKI)

研究者番号：10185952

### (2) 研究分担者

生貝 初 (IKIGAI HAJIME)

鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・教授

研究者番号：60184389

黒田 大介 (KURODA DAISUKE)

鈴鹿工業高等専門学校・材料工学科・准教授

研究者番号：70343879

吉武 道子 (YOSHITAKE MICHIKO)

物質・材料研究機構・MANA ナノエレクトロニクス材料ユニット・主席研究員

研究者番号：70343837

柳生 進二郎 (YAGYU SHINJIRO)

物質・材料研究機構・MANA ナノエレクトロニクス材料ユニット・研究員

研究者番号：20343874

間世田 英明 (MASEDA HIDEAKI)

徳島大学ソシオテクのサイエンス研究部・准教授

研究者番号：10272220

飯村 兼一 (IIMURA KENICHI)

宇都宮大学大学院工学研究科・准教授

研究者番号：10272220