

文化財とカビによるバイオフィルム

高鳥 浩介* 土戸 哲明** 久米田 裕子***

A Fungal Biofilm of Cultural Assets

Kosuke TAKATORI*, Tetsuaki TSUCHIDO** and Yuko KUMEDA***

[Abstract]

Studies on the biomatrix problem are mainly discussed regarding bacteria. Although fungi are one kind of microbe and contaminate several substrates in wet environments, they differ from other microbes in their growth pattern, ecological characteristics, biological figures and morphological findings. Therefore, fungi have never been studied and discussed on biofilm problems. According to our survey on cultural assets of stone, wood, plastics, rubber and textiles in wet environments, these materials are attacked and damaged and deteriorated by fungi. In this review, the fungal biofilm on cultural assets in cultural facilities is explained.

[要旨]

バイオフィルム問題や研究の多くは細菌で議論されてきている。同じ微生物であるカビを含めた真菌は、細菌に比べると発育様式、形状、性状で大きく異なる。そのため今までほとんどバイオフィルムとして議論や研究の対象とされてこなかった。しかし、湿性環境にみる文化財のカビによる被害をマクロ・ミクロで詳細に観察すると、その発生現象、発生環境、原因カビなどから少なくとも細菌で定義されているバイオフィルムと必ずしも同一ではないが、広義に解釈するとカビによるバイオフィルムも存在することが確認できた。

そこで本稿では文化財のカビ問題に焦点を合わせ、高温環境で起こりやすいカビ被害とバイオフィルムをまとめた。

1 はじめに

奈良県明日香村高松塚古墳はおよそ 1300 年前に築かれ、1972 年 3 月凝灰岩の切石で組まれた石室が発掘された。その石室内の漆喰に描かれた極彩色の壁画が発見されたことにより、1973 年古墳が国の特別史跡、1974 年石室に描かれた 4 面の壁画が国宝として指定を受けた。しかし、狭隘かつ高湿度の石室ではカビによる被害が進み、さらに壁画を含めた石室の劣化が問題視され続けてきた。こうした

* NPO 法人カビ相談センター (Center for Fungal Consultation, Japan)

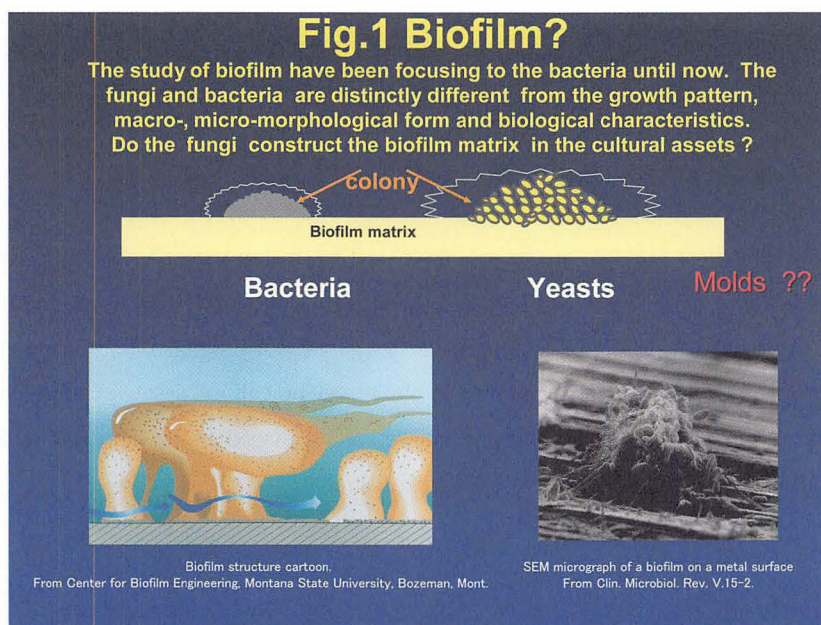
** 関西大学化学生命工学部

(Faculty of Chemistry, Materials and Bioengineering, Kansai University, Japan)

*** 大阪府立公衆衛生研究所 (Osaka Prefectural Institute of Public Health, Japan)

劣化は必ずしも生物だけで起こるわけではないが、生物による場合バイオフィームなども少なからず関与しているものと考えられる。

ところで、バイオフィームは主に細菌または酵母で実証され、多くの研究がなされてきた一方でカビはどうかとなると明確な解説がない (Fig. 1)。そこで、本稿では石室壁画でのカビ汚染によってみられた現象をミクロ・マクロ的視点からバイオフィームとのかかわりを中心にまとめてみた。



2 バイオフィームとカビに関する背景：高松塚古墳石室環境とカビ問題

古墳石室内はおよそ 1300 年間時間が停止したかのような世界であった。それが発見と同時にカビとさらに他の微生物による被害を受け、壁画の劣化が留まることなく進行してきたのは何故であるかを考えるとき、高湿な地中空間に一体何が起こったのかを無視するわけにはいかない。石室は、奥行き 266cm、幅 104cm、高さ 113cm である。東西壁各 3 枚、天井 4 枚、床 3 枚、南北壁各 1 枚で石室を構築している。漆喰に描かれた壁画は北壁中央には玄武、東壁には北から女子群像、青龍と日輪、男子群像が、西壁には北から女子群像（飛鳥美人）、白虎と月像、男子群像が、そして天井には星宿図が描かれている。

発見当初石室内の温度は、約 17℃前後であり、1980 年代の半ばまでは、高くても 17℃台を維持してきた。このように石室内温度が低かったこともあり、発掘後から修復処置中の 1985 年頃まではカビ発生を抑えることができたと報告されている。

2000 年頃になると温度が 19℃を超えることがあり、カビが発育しやすい環境となって、カビが広がったと考えられている。

2001 年にカビの発生が急速に進んできたと考えられ、2005 年秋からその緊急対策として低温維持を行ってきた。その後しばらくカビの発生はみられなかったが、*Penicillium* や黒色系のカビがときおり発生し、壁画にまで及ぶことが確認されてきた。

壁画面にカビが発見されたのは、当時の記録からみると発掘から 3 年経過してである。当時の記録を

もとに要約した。

1975年3月頃：石室内でもっとも優先している *Doratomyces* sp. や *Fusarium* sp.、*Cladosporium* sp.、*Mucor* sp. などが分離され、そのほか、*Trichoderma* sp.、*Penicillium* sp. なども若干認められた。

1980年2月：石室内に *Doratomyces* sp. が広い範囲にわたって発生した。

1980年11月、1981年6月：青龍、白虎、玄武、中央天井石から *Doratomyces* sp. と *Streptomyces* sp. が分離され、高松塚古墳の壁画面は両菌種が優先していた。

1986年7月：これまで石室で優位の *Doratomyces* sp. から *Aspergillus* sp.、*Trichoderma* sp. などのほか、放線菌が、微生物分布をとるようになった。

その後、記録としては著しいカビ発生がなく微生物については、望ましい「均衡」が保たれていた状況にあった。

石室では、ほぼ同種のカビが検出され、主要のカビは、*Penicillium* sp. であった。その他、*Aspergillus* sp.、*Fusarium* sp.、*Trichoderma* sp. 等が若干認められた。

2001年3月：取合部の石室外表面および墳丘盛り土部分に多量のカビ発生が確認された。主要カビは、*Penicillium* sp.、*Aspergillus* sp.、*Fusarium* sp. などであった。石室内で例年検出されるものと同様のものが多かったが、石室内の調査では検出されていない *Cladosporium* sp. などもみられた。

2001年4月：発生量は3月よりは少なかったが、取合部にカビの再発生がみられた。2001年12月：石室内、壁面の複数の場所で顕著なカビの発生が確認された。取合部、石室内部の両方から、*Cylindrocarpon* sp.、暗色系 *Acremonium* が見出された。

その後しばらくカビ発生が沈静化する傾向にあった。

2004年2月頃：再び発生がみられた。取合部や石室では、*Penicillium* sp.、*Fusarium* sp.、*Trichoderma* sp. などが主要であった。

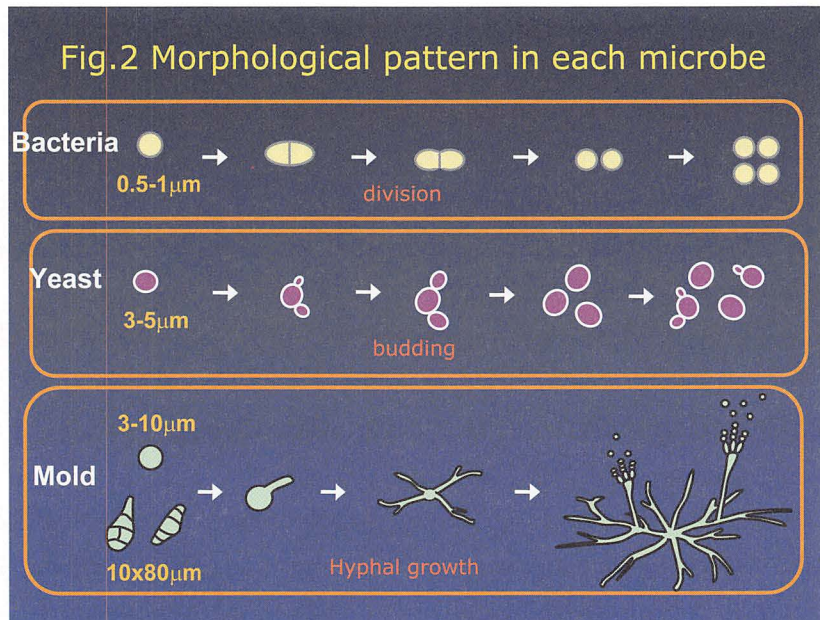
2004年10月以降：カビを含めた微生物調査を行ったが、いずれも共通して検出される種類は同じであった。カビでは *Penicillium* がすでに常在化し、また暗色系 *Acremonium*、*Fusarium*、*Trichoderma*、*Verticillium* などが見出された。

カビによる被害が起こっている事実と他の被害を生じる起因がないか採取試料から実体顕微鏡などで観察した。これは培養によっても確認されたことだが、汚染を受けている試料は、必ずしも乾燥系ではなく、湿っぽい、つまりゲル化したような状況も確認された。そこでゲル化している部分と暗色になっている部分からの試料を採材してもらい、詳しく観察した。高松塚古墳壁面で何が起こっていたかである。ゲル化部位および暗色部位の培養などにより、細菌、酵母、カビがそれぞれから大量に分離された。

3 細菌・酵母・カビの発育パターン

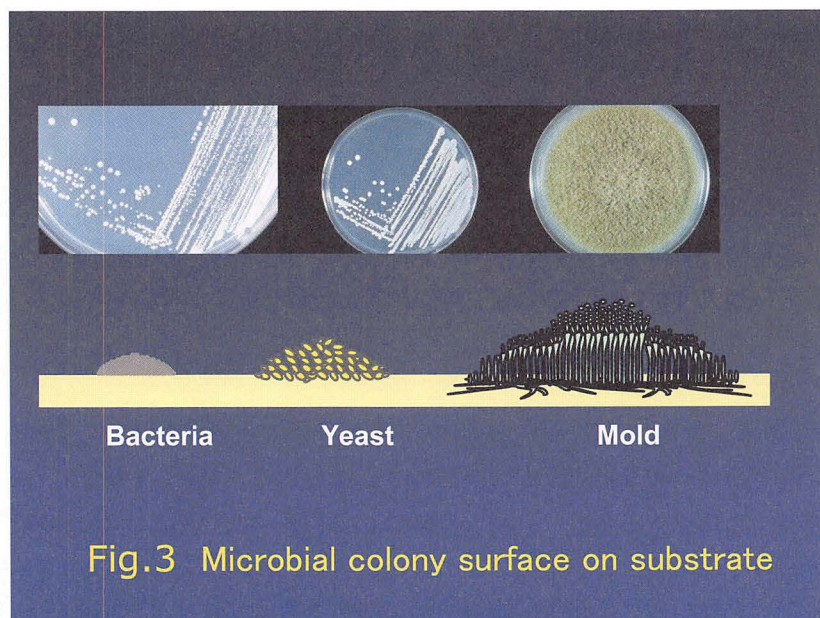
高松塚古墳石室内でのバイオフィルム形成が何によるかを知るために、最も知られている細菌と検出頻度の高いカビ酵母のそれぞれの発育パターンを確認しておく必要がある。そこでイラストでそれぞれの発育パターンを図示した (Fig. 2)。細菌は、二分裂により、真菌である酵母は、多極出芽で、いずれも短時間で増殖する。一方、カビは非常に複雑で菌糸伸長から孢子形成と形態的には多様である。どうもこのようなミクロ像をみていると、菌糸の集合体 (集落) もバイオフィルムといえる。カビの発生過

程や発育性状などから少なくとも、バイオフィーム形成に関与するカビがあるものと推測される。

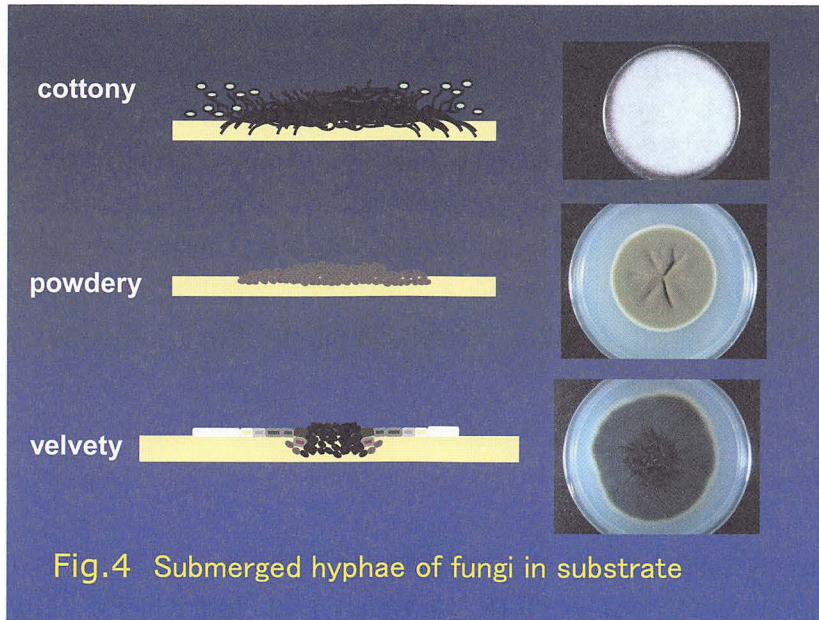


4 細菌・酵母・カビのコロニー比較

そこで、さらにマクロによるそれぞれの微生物コロニーを比較してみた。細菌は一種の膜形成が盛んで酵母も同じ傾向がある。カビは、表面と内面で姿が違い、表面では、胞子を確認でき、内面では、糸状構造が密に形成される。この密な糸状構造がここでいうバイオフィームである。そうなるとカビのバイオフィームも自然界ではごく一般的に確認できるものである (Fig. 3)。

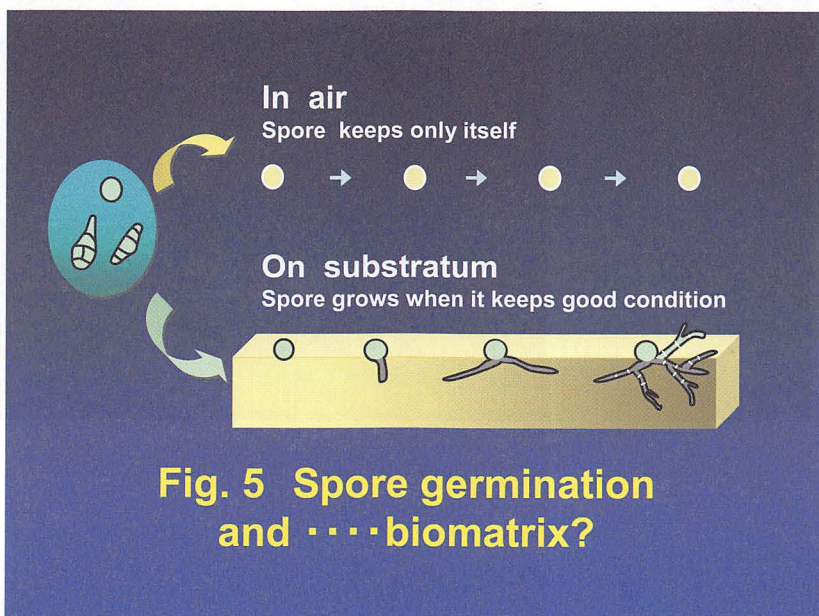


また角度を変えて、カビの発育パターンをみてみる。カビには3種のパターンがあり、綿状、粉状、ビロード状などであるが、このいずれもものの中にカビが入ることになる。そこに根を張って、しっかりと膜状になり、横へ横へと長く広がっている (Fig. 4)。



5 自然界でのカビの形態

自然界ではカビは基本的には孢子である。孢子が空中に漂いながら飛んでいる。この状態ではどのような条件が入っても孢子発芽は見られない。そこで湿った土壌や木材などについた場合、それはどうなるか。確実に発芽するようになる (Fig. 5)。つまり、カビ孢子の発芽は何らかのものの上でないと発育できない。

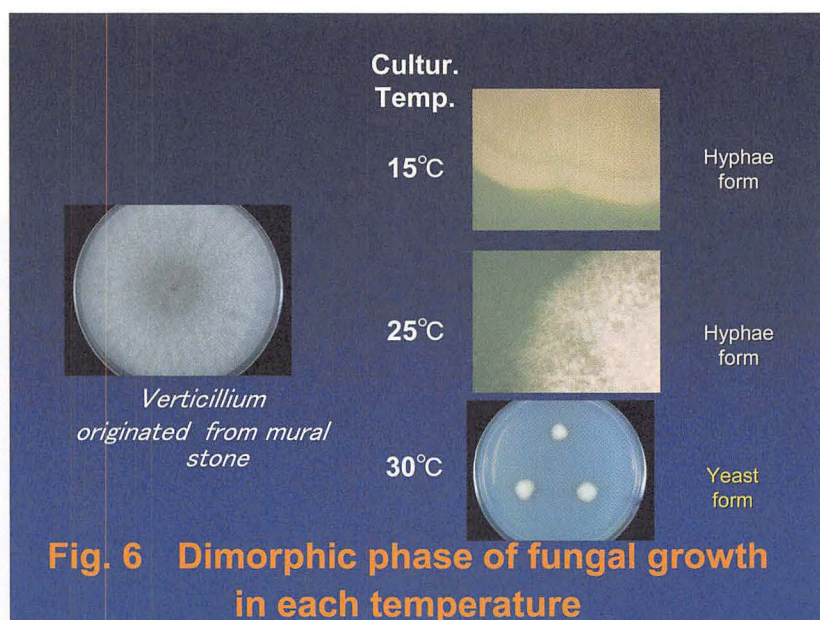


6 カビの Autolysis

カビの発育時間とともに起こる現象として Autolysis がある。カビは時間をかけながら胞子から発芽した菌糸が伸長する。環境が整っていると、数日で菌糸から胞子を産生するようになる。通常カビの発育のプラトーは1～2週間程度であろうから、その前後がどのようなになっているかが興味深いところである。特にプラトーに達した後の形態である。カビの形態は複雑である。複雑だからこそ子孫をうまく継代しながら生き延びていく。ところがプラトーに達した後、よくおこる現象に菌糸による Autolysis がある。文化財施設で経験した例として高松塚古墳石室で代表的な *Penicillium* がまさにそれである。1カ月もしないうちに菌糸による自己融解が起こり、菌糸体の証明が難しくなることを実験的に確認した。Autolysis が進んだ後、汚染部には何らかの菌体成分が残存することになる。これは推測であるが、菌糸体の成分が有機物として残り、その後に発生する微生物に対して何らかの汚染を助長することが考えられる。この推測は今後実証していく必要があり、間接的にカビのバイオフィームと関係があるものと考えている。

7 カビの二形成

さらに菌体の集合的な変化もみられる。これは置かれた環境が著しく影響しており、低温や高温また養分などさまざまである。もちろんカビ自体の細胞変化もある。環境で起きる二形成が多く温度、湿度や栄養分による。こうした外的な要因で二形成がおこり、菌糸体形成であったり、酵母用集落であったりする (Fig. 6)。今回分離したカビの中にもこうした酵母様なカビが確認された。



8 発育・汚染過程で生物学的性質を異にするカビとバイオフィルム

環境と性質で最も関係するのは湿度である。特に高湿が急激な変化によって不規則な湿度状態になるとカビは発育を始めたり、制止したりする。多くのカビは高湿性である。石室で見つかるカビのほとんどは高湿性である。ところが中には好乾性を至適とするようなカビもある。バイオフィルムは、細菌のように湿性な環境で起こる。カビは、仮定としてバイオフィルム形成するならば、従来から知られている細菌のように湿性状態の方が形成しやすい。石室で見つかった主なカビは高湿性である。中には *Penicillium* のように中湿性とする場合もあるが、もともと *Penicillium* は高湿性、中湿性を兼ね備えているカビでもあり、石室でも十分に発生するカビである。

カビの多くは、一般に 20～30℃が適温であり、20℃以下になると発育が弱くなるとされ、今回の検証からも温度がカビの発育に影響を及ぼしていることが分かった。低温下での発育性を検証したところ、各温度間で以下の発育差を認めた。17℃→15℃：やや緩慢な発育差、15℃→10℃：明瞭な発育差、10℃→5℃：極めて明瞭な発育差を認めた。

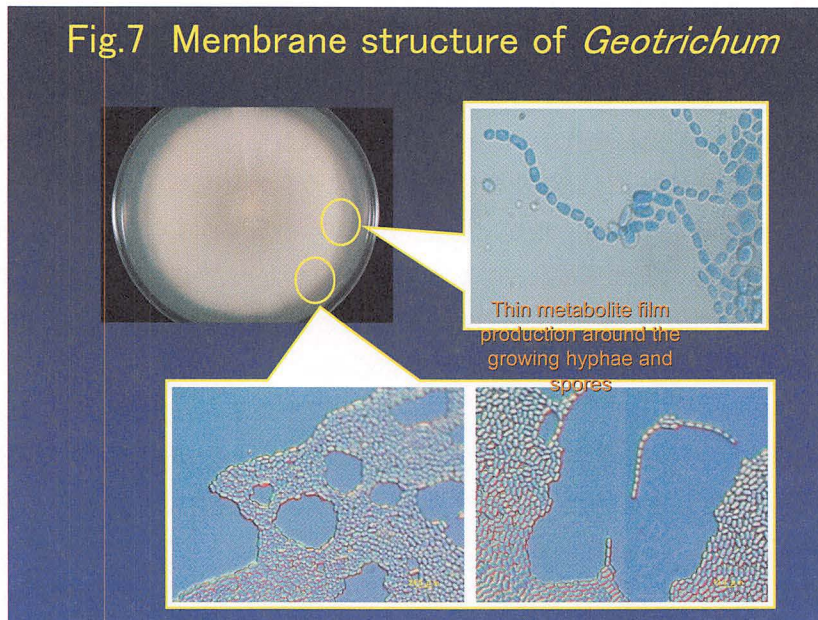
このように低温でのカビの発育にはときとして大きな変化が起こることがある。Fig. 6 は *Verticillium* の各温度下での発育像である。結論から言うと低温になるとカビ的な発育でなく酵母的な像を呈するようになる。つまり菌糸的でなく湿っぽい酵母様になって増えていく。そのため高湿で低温なところではジメジメしたゲル化が起こる可能性がある。これがバイオフィルムとして機能するのではないだろうかと推察している。

9 バイオフィルム

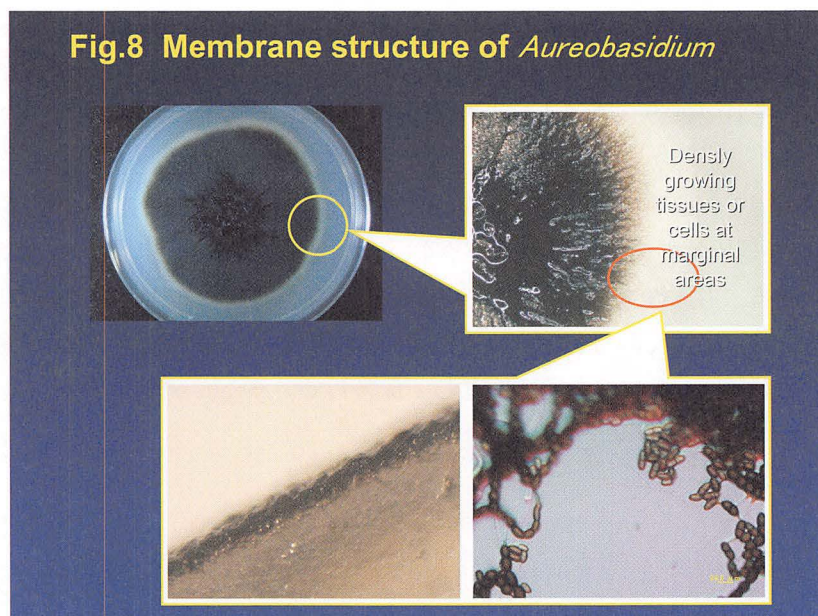
そこでバイオフィルムについて再確認しておく必要がある。細菌のバイオフィルム形成様式は、酵母と同様に細胞の増殖によりそこに細胞集団が密に形成する。そして粘性な多糖体物質などを産生してマトリックスを作る。それではカビはどうかであるが、結論的には広義の意味でバイオフィルムを形成するといえる。

ここに自然環境下で普遍的なカビの *Geotrichum* と *Aureobasidium* を培養した時の姿を紹介する。

Geotrichum は湿性環境や乳肉環境で汚染しやすいカビであるが、培養により、菌糸体が孢子化するようになる、いわゆる二形成微生物である。その培養した集落の辺縁をよく見るとカビの形態と酵母の形態が確認される。さらによくみると細胞周辺に薄い膜様構造が確認され、あたかも細胞を守っている像がみられる。それが細胞としてでなく組織として保護している姿に見える (Fig. 7)。

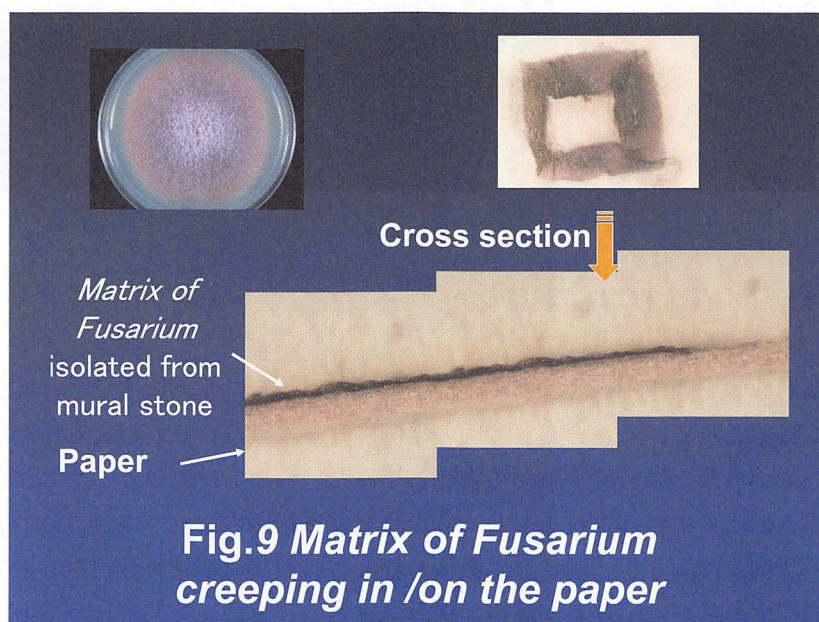


さらに *Aureobasidium* は湿性環境にみる代表的なカビであるが、やはり酵母としての構造もとることが知られている。同様に細胞や組織をみると *Geotrichum* と尾内膜様構造が確認される。もっともこのカビは俗名が黒色酵母様菌といわれ、酵母形態が主になるカビである。集落の周縁に薄い膜がみられ細胞や組織を保護しており、汚染基質上で表面に沿って菌糸体が伸長している (Fig. 8)。

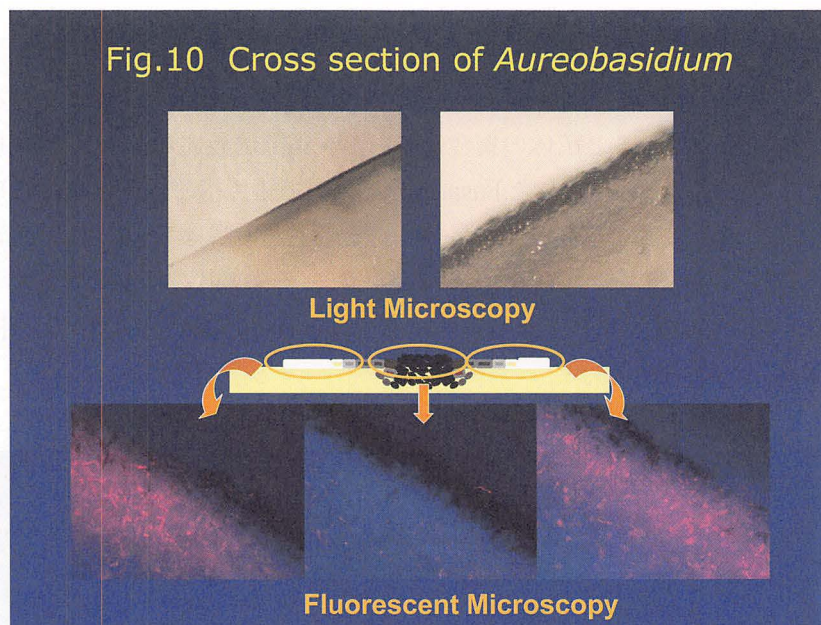


10 紙とバイオフィルム

具体的には高松塚壁画でのカビ被害部分をみると暗色部分が多い。この部分をよくみると明らかに膜構造をしている。実体顕微鏡でみると菌体の集合体であり、実際培養するとカビが検出され、Fusarium が検出された。そこで古墳から分離された Fusarium を用いて紙片への侵襲性を検討した。紙標本とした理由は、湿気の高い場合に紙でのカビ被害が多く、その主要カビは Fusarium、Aureobasidium などの好湿性カビであるからである。紙への汚染をみるために、その紙片の断面をながめると Fusarium 菌糸が網目状になり表面を這うように拡大化していく像がみられる。この菌糸像は密な構造を取りながらマトリックス形成していく (Fig. 9)。



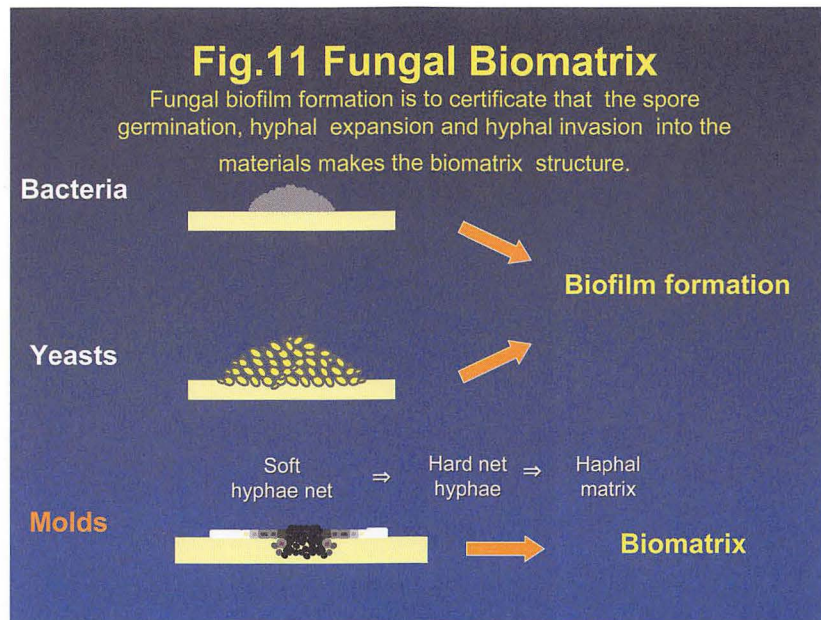
同じく石壁から見つかった黒色塊微生物の Aureobasidium について検討した。湿っぽく黒色になるカビの代表であり、試験は湿性環境で紙片を用いた。ここではカビ汚染させたのち、断面を光学顕微鏡と蛍光顕微鏡下で観察した。観察はカビ汚染中心部と周辺部で行い、中心部では強くマトリックス形成している一方、周辺部では弱いながら菌糸の密生が始まっている姿を観察できる (Fig. 10)。このように中心部に限らず周辺部でもすでに菌糸の網目構造が進行し、確実にマトリックス形成している像を確認できた。



11 カビのバイオフィルムは果たしてあるのか

バイオフィルム形成の原因微生物のほとんどが細菌である。また細菌によるバイオフィルム形成機序や細菌種も詳しく特定されている。一方、今回の事例にみるようなカビが果たしてバイオフィルム形成にどの程度関与しているか、過去の文献から調査してみた。酵母ではあるが、カビによるバイオフィルムについては、以下のように整理されるであろう。今まで高松塚古墳石室で確認されたカビ被害の検証として黒色部分の詳細な検証から、明らかに菌体で構成された膜様構造物が確認されている。カビは細菌と異なり菌糸形成である。この菌糸が縦横に組み込まれることによりバイオマトリックスが形成される。つまり、菌糸体構造は明らかに糸状構造でバイオマトリックスを形成し、さらに発育の過程で菌体周辺に菌体外物質を産生しながら膜化を進めていることが確認された。カビの多くは高温性であり今回の対象としたカビもその特性を有す種である。

文化財施設での湿性環境では、細菌および酵母のバイオフィルム形成に限らず、カビによっても孢子から幼弱菌糸形成、さらに緻密な網目構造へと進んでバイオマトリックス形成されることが実証できた (Fig. 11)。



謝辞

本研究は、「文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（平成 20 年度～平成 24 年度）」によって行われた。

参考文献

- 1 国宝高松塚古墳壁画恒久保存対策検討会（第 4 回）資料（2005）文化庁
- 2 国宝高松塚古墳壁画恒久保存対策検討会（第 5 回）資料（2005）文化庁
- 3 国宝高松塚古墳壁画恒久保存対策検討会（第 6 回）資料 5-2（2006）文化庁
- 4 国宝高松塚古墳壁画恒久保存対策検討会（第 7 回）資料 4（2006）文化庁
- 5 高松塚古墳取合部天井の崩落止め工事及び石室西壁の損傷事故に関する調査委員会報告書（2006）文化庁
- 6 木川りか、佐野千絵、石崎武志、三浦定俊（2007）保存科学 46, 209-220
- 7 木川りか（2007）文化庁月報 No.461, 14-15
- 8 高鳥浩介（2007）文部科学時報 No.1576, 52-53
- 9 高松塚古墳壁画恒久保存対策プロジェクトチーム（2007）文化庁月報 No.466, 4-11
- 10 高鳥浩介（2007）防菌防黴誌 35, 655-666
- 11 木川りか、佐野千絵、喜友名朝彦、立里臨、杉山純多（2009）保存科学, 49, 231-238