

真菌とバイオフィルム —文化財器物のバイオフィルム—

高橋 淳子 * 太田 利子 ** 久米田 裕子 *** 高鳥 美奈子 **** 土戸 哲明 ***** 高鳥 浩介 ****

Fungi and Biofilm: Cultural Properties of Fungal Biomatrix

Atsuko TAKAHASHI*, Toshiko OTA**, Yuko KUMEDA***, Minako TAKATORI****,
Tetsuaki TSUCHIDO***** and Kosuke TAKATORI****

[Abstract]

The study of biofilms and biomatrices has mainly focused on bacteria. However, fungi, including molds, are very different from bacteria with respect to growth pattern, morphology, physical structure, and biological characteristics. Therefore, fungal biofilm and biomatrix have never been included in biomatrix studies.

In this study, the biological problems of fungal biodeterioration and biodegradation based on the cultural properties were investigated. From fungal damage of cultural materials, macro- and micro-findings were investigated, observed, and evaluated regarding the fungal biofilm formation. The roles of growth phenomena and environmental factors on biofilm formation in fungi were examined. Based on these results, fungal biofilm and biomatrix were observed to be dependent on hydrophilic and hyphal fungi.

* 桐生大学短期大学部 (Junior College of Kiryu University, Japan)

** 相模女子大学栄養科学部 (Faculty of Nutritional Science, Sagami Women's University, Japan)

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

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

***** 大阪府立大学放射線研究センター (Radiation Research Center, Osaka Prefecture University, Japan)

要旨

バイオフィルム研究の多くは細菌を中心に議論されてきた。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、性状で大きく異なり、今までほとんどカビによるバイオフィルムが話題となることもなく、また研究の対象とされてこなかった。そこで文化財でのカビ被害に焦点を合わせ、器物でのカビ被害事例からカビに起因するバイオフィルムについてマクロ的およびミクロ的視点から観察すると、菌糸体によるバイオマトリックスが確認された。その発生現象、発生環境から、とりわけ菌糸体を主構成とするカビによるバイオフィルム形成が明らかとなった。

1 序論

微生物に起因するバイオフィルムの多くは、細菌が原因となって形成されるという議論がされてきた。バイオフィルムはもともと歯科領域での疾患原因菌として話題となり、歯周病のように難易な疾患はなぜ治癒しにくいから得られた結論が微生物による皮膜が治癒を妨げているものと推論され、その後微生物膜を構成する細胞や代謝物などが、微生物を保護することから被害や劣化が起こるものといわれてきた。こうした疾患や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ルムなども少なからず関与しているものと認識されるようになってきた。その後、細菌だけでなく他の微生物、とりわけカビでも発生様式をみているとカビ汚染経過とともにカビが微妙に周辺への影響を及ぼしていることも確認できるようになってきた。

そこで、文化財被害と関わるカビがどのようにマクロおよびミクロ的にバイオフィルムを形成しうるかいくつかの事例を基にまとめてみることにした。

2 文化財器物でバイオフィルム形成は起こるか

今までの経験から国内および国外での文化財器物にみるカビ被害は、さまざまであることがわかる。そのパターンを分類するとカビ被害は大きく2パターンに分けることができる(Fig. 1)。

1 パターンは、主に乾燥環境下でのカビ被害である。とりわけ代表的なカビ被害現象は、室内での発生であり、例えば、博物館、図書館、美術館、民俗資料館などのように一定乾燥環境下でのカビ被害である。このような事例では、乾燥に適したカビによって被害が起こることが多い。例えば、*Aspergillus*、*Eurotium*、*Wallemia* など好乾性カビによることが多い。このようなカビはどちらかというと多量の胞子を産生し、周辺に胞子を飛散させて、基質(器物)や空間の水分を利用して発生をすることが多い。

もう一つのパターンは、主に湿性環境下でのカビ被害である。つまり、屋外のように気候に影響をうけながらカビ被害を受ける例である。自然下での環境がこのパターンであるが、室内でも起こることがある。器物の水分が多く含んだまま収蔵されたり、温湿度差が生じることから結露のように極めて湿気を含んだ室内環境が起こる場合がある。近年文化財施設は気密性に限らず、器物が多量持ち込まれることから、空

気環境の悪化を招くことが報告されている。その場合典型的なこのパターンが起これ、器物や建物に被害を及ぼす。このパターンでの被害カビは、どちらかという好湿性カビである。好湿性カビは、高湿度な環境下でのみ活発に活性化するタイプであり、いわゆるカビ被害を多くの人々が認識するケースである。代表カビは、*Cladosporium*、*Fusarium*、*Aureobasidium*、*Trichoderma*、*Rhizopus*、*Verticillium*、*Alternaria* などであり、その具体的事例は後述する。

ところで、この2パターンとバイオフィルムの関係をみると、後者のパターンがよりバイオマトリックス構成することを説明しやすい。なぜなら乾燥系ではカビ菌糸による発生は起こるが、主には多量の胞子発生に依存するといえる。一方、後者のパターンは湿性系で基質表面に多量の菌糸を伸ばし、それがさらに菌糸形成を促進しながら基質表面を這うように伸長していく菌糸形成像が一般的である。基質表面は湿性であり、より表面に菌糸が密着しやすい。その密着現象に生じて菌体外代謝物産生が促進され、最終的にはマトリックス形成につながっていくと推論される。

文化財器物でのカビによるバイオフィルム形成は、上記の理由で起こるといえる。では、文化財施設で果たしてこの解釈が成立するか改めて検証してみることにする。

3 今までに公開されてきた事例から — 温湿度変化とカビ発生

高松塚古墳の石室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。その後カビ被害を防止するための努力がなされてきた。

1975年3月頃：石室内でもっとも優先なカビとして *Doratomyces* や *Fusarium*、*Cladosporium*、*Mucor* など高湿系のカビが分離され、そのほか、*Trichoderma*、*Penicillium* なども若干認められたことが記載されている。

2004年10月以降：カビを含めた微生物調査から、いずれも共通して検出される種類は *Penicillium* 以外に、暗色系で高湿系のカビ *Acremonium*、*Fusarium*、*Trichoderma*、*Verticillium* などを分離したことが記されている。

この記録をみてわかることは、もともと土壌生息性の強い好湿性カビが主であり、おそらく器物表面をこれらのカビ菌糸が伸びていったものといえる。

また、ある大規模図書館の事例から検証していきたい。図書館自体は湿度50%台で温度20℃台にあった。この環境であればカビ発生はない。ところが、地下収蔵庫で冬期になると結露が生じることが多いとのことであった。現場を確認したところ、収蔵庫の一部で多量のカビが発生し、発生現場周辺の湿度は90%RH以上であり、明らかに高い湿度であった。つまり高湿のところだけ結露を生じており、明らかに黒色系のカビ(クロカビ *Cladosporium*)が確認された。採材して顕微鏡で確認したところ多量の菌糸像をみた。まさに菌糸のマトリックスともいえる像であった。

このような2事例にみるカビの発生は、菌糸体によるバイオマトリックス形成と理解する方が極めて確証しやすい。

4 細菌・酵母・カビの発育パターン

バイオフィルム形成が何によるか知るために、最も知られている細菌および酵母と、文化財施設で検出頻度の高いカビについてそれぞれの発育パターンをみる (Fig. 2)。

細菌は、二分裂により短時間で増殖する。だいたい分裂時間は、15~20分であるから数時間で多量の細胞数になる。

酵母は真菌に含まれる一生物であるが、多極出芽しながら増殖する。この出芽はだいたい30分であり、細菌同様に増殖パターンが進んでいくことから多量の細胞数になる。

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。このようなマイクロ像をみると、菌糸の集合体(集落)もバイオマトリックス構成するものといえる。カビがその発生過程や発育性状などから少なくとも、バイオフィルム形成に関与するカビがあるものと推測される。それがすでに紹介した菌糸形成型のパターンである。

5 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ながら眺めてみたい。

細菌は、増殖が進んでいくと細胞間に起こる一種の膜形成が著しく盛んとなり、粘性を帯びるようになる。この増殖パターンは酵母も同じで細胞表面が膜化するようになる。この状態がマクロでみるバイオフィルムである。

カビは、表面と内面で姿が違い、表面では、孢子を確認でき、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ルムである。つまり、カビのバイオフィルム様発生も自然界ではごく一般的に確認できることである(Fig. 3)。

また角度を変えて、カビの発育パターンをみってみる。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く姿をとるようになる(Fig. 4)。

6 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、発芽するようになる(Fig. 5)。つまりカビ孢子の発芽は、ものの上でないと発育できない。

さらに汚染の代表的なカビであるクロカビ *Cladosporium* の初期発育を追ってみた。発芽現象は6から10時間になって始まる。発芽が次第と激しくなり、多方に菌糸を伸ばし始め、半日でもまだはっきり孢子形態を確認できるが、さらに時間がたつと今度は形態がはっきりせず菌糸状となってしまう。図では24時間像で菌糸のマトリックスを確認できる (Fig. 6)。

1) カビのオートリシス (Autolysis : 自己融解)

カビの発育時間とともに起こる現象としてオートリシス (Autolysis) がある。カビは時間をかけながら孢子から発芽した菌糸を伸長する。環境が整っていると、数日で菌糸から孢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になっているか興味もたれる。特に、プラトーに達した後の形態変化がどのように推移するかである。カビの発生していくまでの形態変化は、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ようになる。ところがプラトーに達した後、よくおこる現象に、菌糸によるこのオートリシスがある。カビ事故を起こす代表的な *Penicillium* が、そのよい例である。1カ月もしないうちに菌糸による自己融解が起こる。その機序をイラストでまとめた (Fig. 7)。

2) 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. 8)。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。

7 性質を異にするカビ

環境と性質で最も関係するのは湿度である。屋外では高湿低温になりやすい。その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生を開始したり制止したりする。ここでは湿度の変化をみる。多くのカビは高湿性である。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。カビがバイオフィルム形成するとなると同じく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菌糸形成性が強く高湿性である (Fig. 9)。

カビの多くは、一般に 20~30°C が適温であり、20°C 以下になると発育が弱くなることが多い。いずれにしても温度もまたカビ発育に影響を及ぼしている。例えば好湿性カビである *Verticillium* というカビがあり、そのカビを 3 温度域で発育する姿を追うとコロニーが大きく変化する (Fig. 10)。

結論から言うと、低温になると菌糸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。

8 バイオフィルム形成カビ

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ことによる。そして粘着性ポリマーなどの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であるか。カビは菌糸体のマトリックスにより菌苔 (Fungal mat) を形成することから、結論として広義の意味でバイオフィルムを形成するといえる (Fig. 11, 12)。

1) *Fusarium* のバイオマトリックス

発生頻度のやや高い *Fusarium* を分離して、これを紙の上で培養し表面上での菌糸の広がりを確認したところ、明らかに菌糸体によるバイオマトリックスを形成していることを確認した (Fig. 13)。このように明らかな膜構造を示すことからこれも、バイオフィルムとみなすことができる。

2) カビの発育による菌体外物質の産生

細菌が増殖する過程で多糖体などのような物質を産生して強固な膜構造を形成する。これがバイオフィルムである。さて、カビではこうした現象が確認されないのであろうか。こうした疑問から、身近に生息するカビ *Geotrichum* と *Aureobasidium* を検証してみた。ともに高湿性カビである。*Geotrichum* では、菌糸構造から孢子構造の細胞となる周辺で薄い膜状物質が形成されていることがわかった (Fig. 14)。同じく *Aureobasidium* でも、菌体周辺に薄い膜構造が確認される (Fig. 15)。このように今回の検証から発育過程ですでに菌体周辺で薄い膜状物質を産生しており、これがのちのバイオマトリックスを形成するものと推測された (Fig. 16)。

9 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は、細菌であることは知られている。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が酵母では報告されているが、カビによるバイオフィルムは科学的に証明されているか整理してみたい。今まで確認されたカビ被害の検証から、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。とりわけ高湿環境に分布する菌糸体形成カビ (Fig. 17) の菌糸が、縦横に組み込まれることによる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。カビの多くは高湿環境で発育するように、今回の対象としたカビもその特性を有す種である。

カビもバイオフィルムを形成することを高湿かつ菌糸体形成カビで確認することができた。

参考文献

- (1) 高鳥浩介 (2007) 文部科学時報 No. 1576, pp. 52-53.
- (2) 高鳥浩介 (2007) 防菌防黴誌 35, pp. 655-666.
- (3) <http://www.erc.montana.edu/CBEssentials-SW/bf-basics-99/default.htm>,
A Friendly Guide to Biofilm Basics & the CBE
- (4) http://www.edstrom.co.jp/resources/water_biofilm.htm, バイオフィルムBiofilm
- (5) Erna M. Kojic and Rabih O. Darouiche, *Candida Infections of Medical Devices*, *Clinical Microbiology Reviews* (2004) 17(2), pp. 255-267.
- (6) http://www.edstrom.com/Resources.cfm?doc_id=23, An Introduction to Biofilms.
- (7) Rodney M. Donlan (2002) *Emerging Infect. Diseases* 8: pp. 881-890.
- (8) 古畑勝則 (2006) 衛生微生物講座 微生物を知ろう 第3回微生物の生活 空間 バイオフィルム
三井農林ニュース

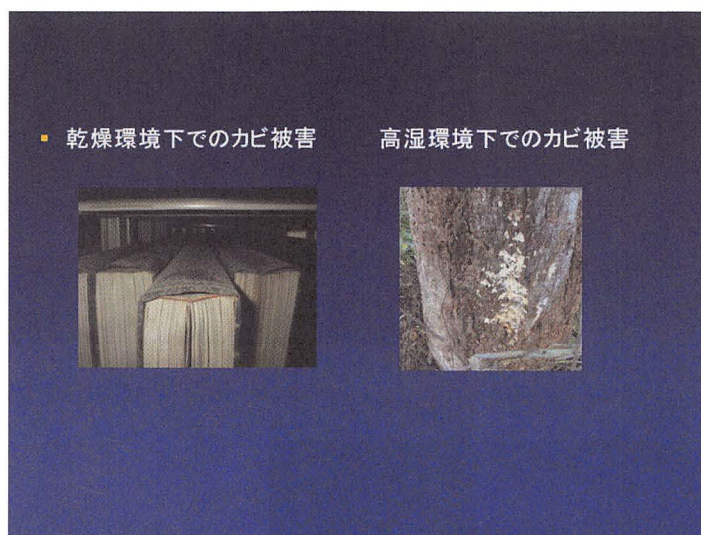


Fig. 1 文化財器物に被害を及ぼすカビの分類

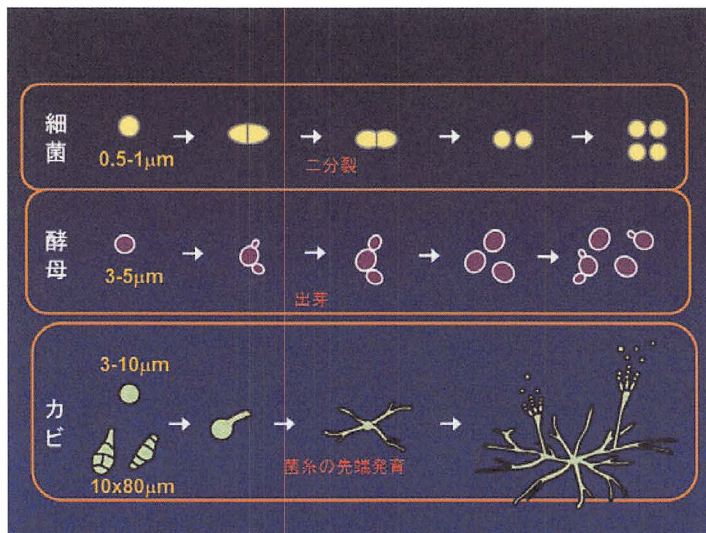


Fig. 2 細菌、酵母およびカビの発育パターン

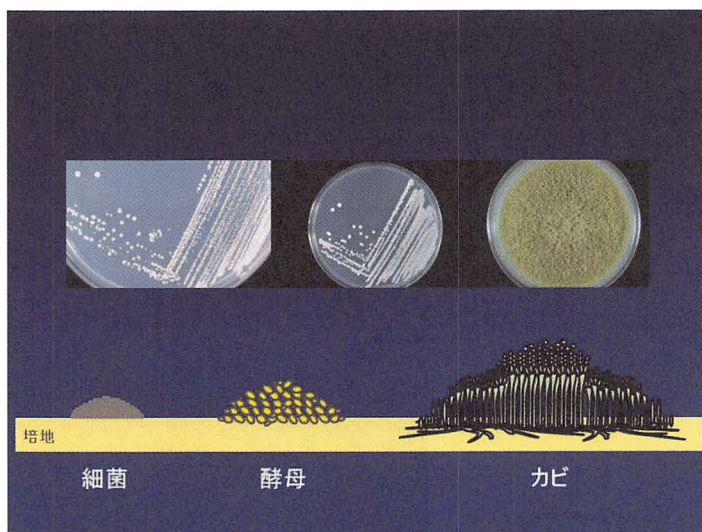


Fig. 3 細菌、酵母およびカビのコロニー形成

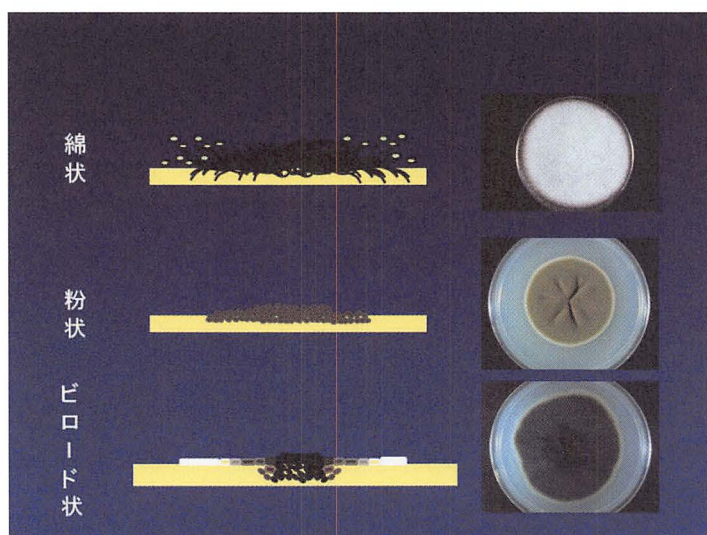


Fig. 4 カビの発育パターン

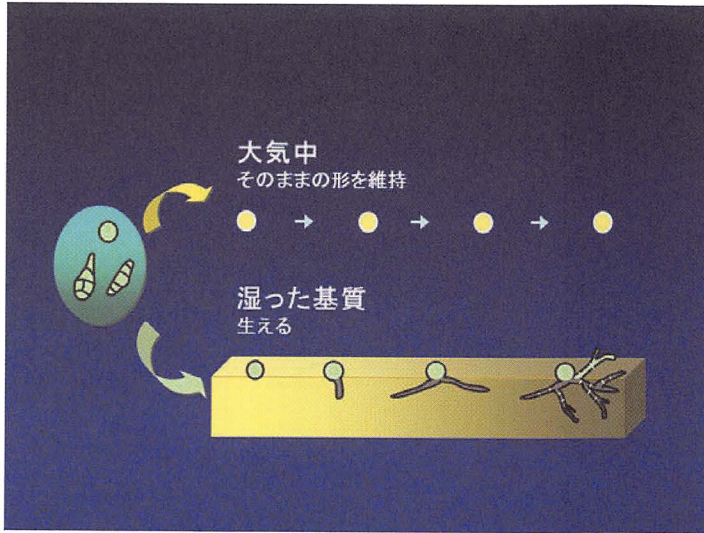


Fig. 5 細菌 カビは器物の表面で発生する

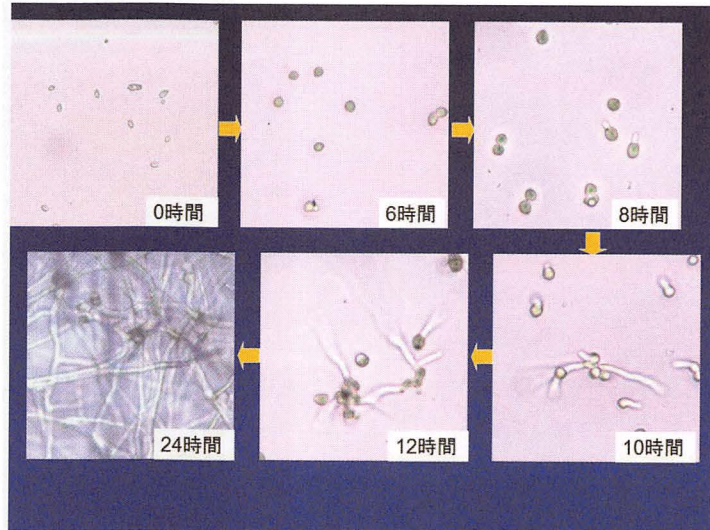


Fig. 6 *Cladosporium* の初期発育

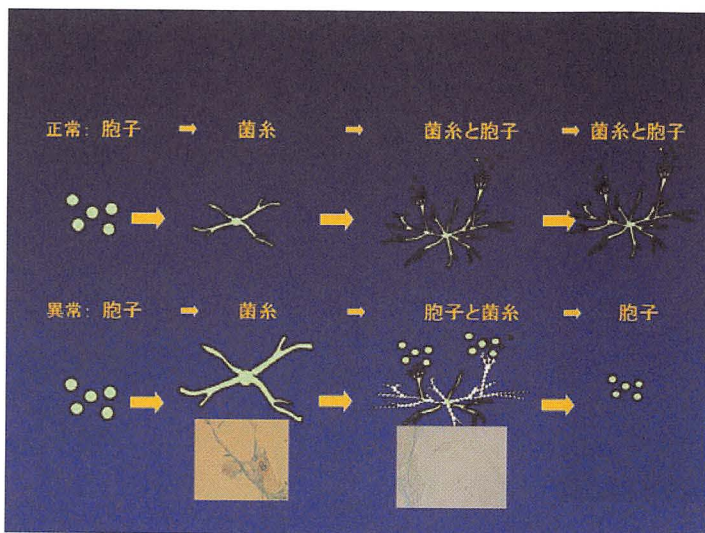


Fig. 7 カビの発育 (上: 正常なカビ 下: カビによる自己融解)

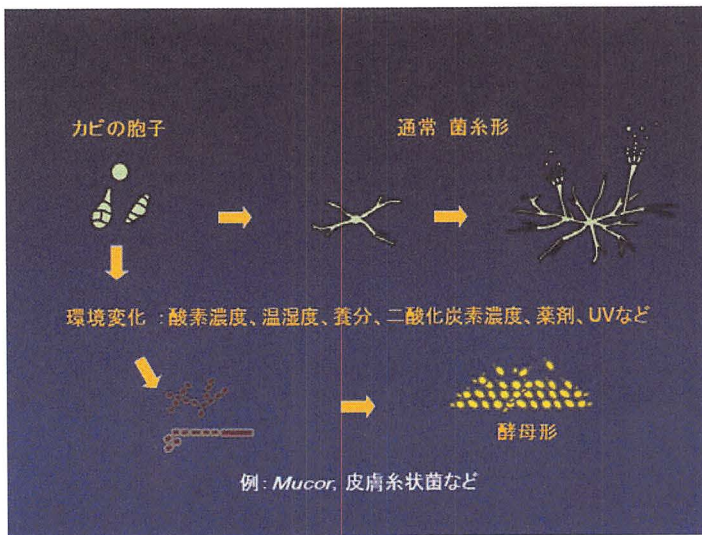


Fig. 8 カビの二形成

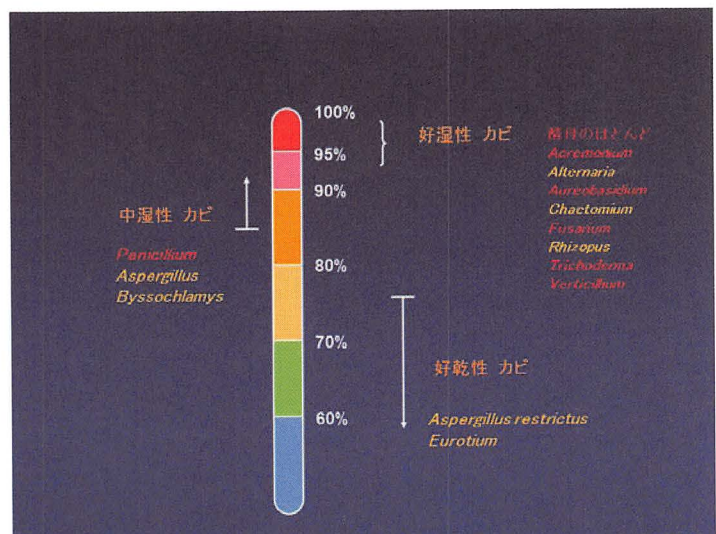


Fig. 9 カビと湿度の関係

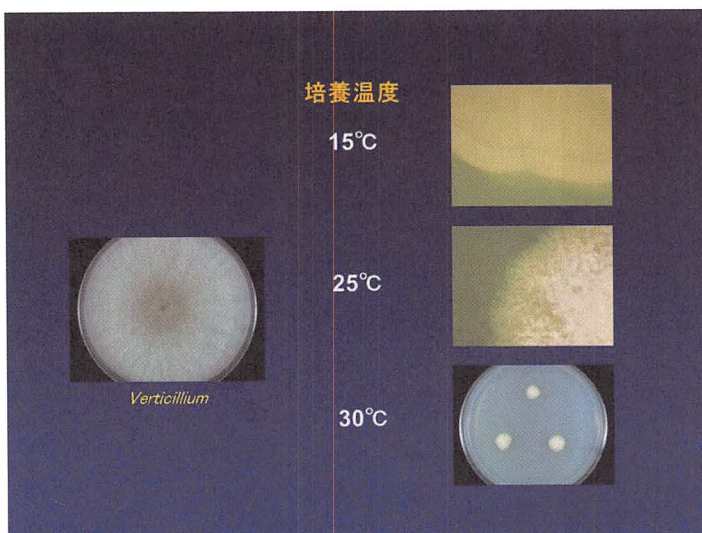


Fig. 10 温度環境変化で大きくコロニー形状が変わる

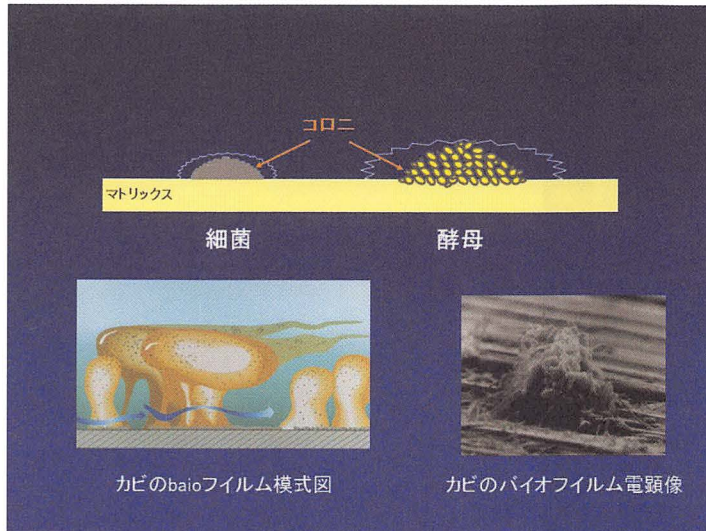


Fig. 11 カビのバイオフィルムとは？

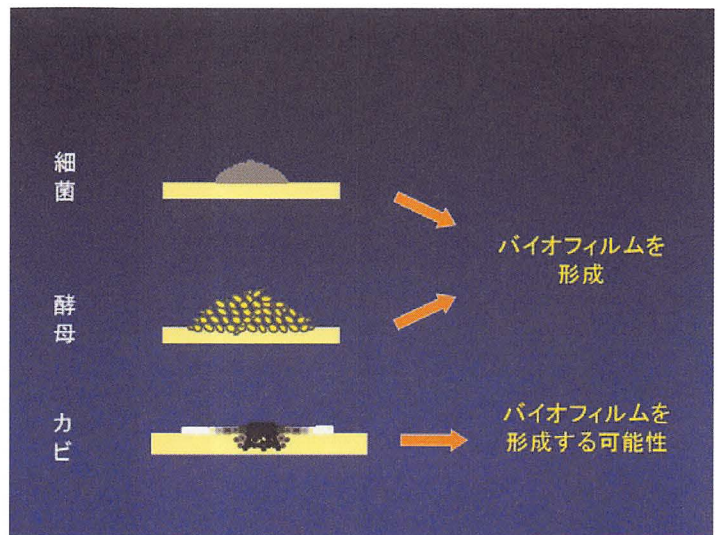


Fig. 12 微生物によるバイオフィルム

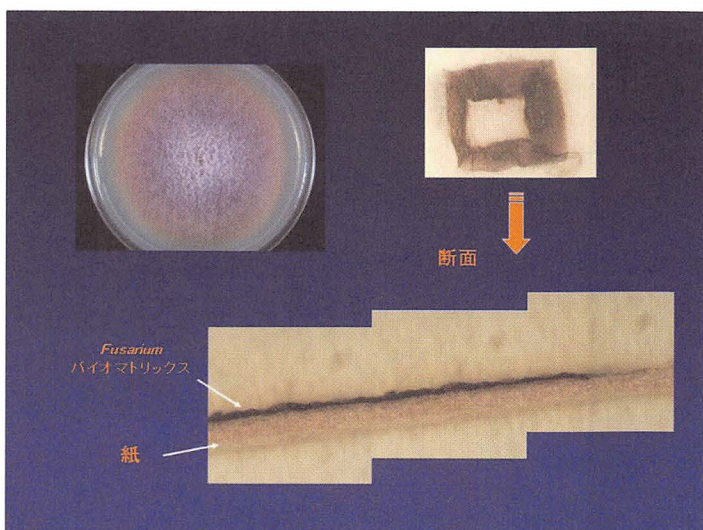


Fig. 13 *Fusarium* のバイオマトリックス

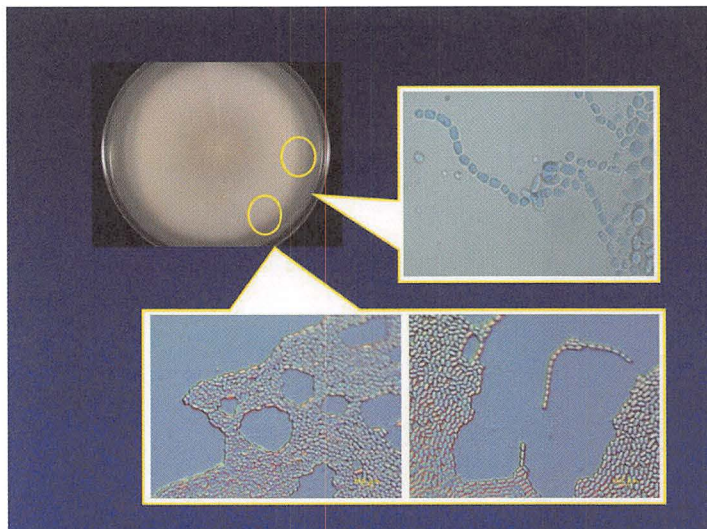


Fig. 14 *Geotrichum* のバイオフィルム

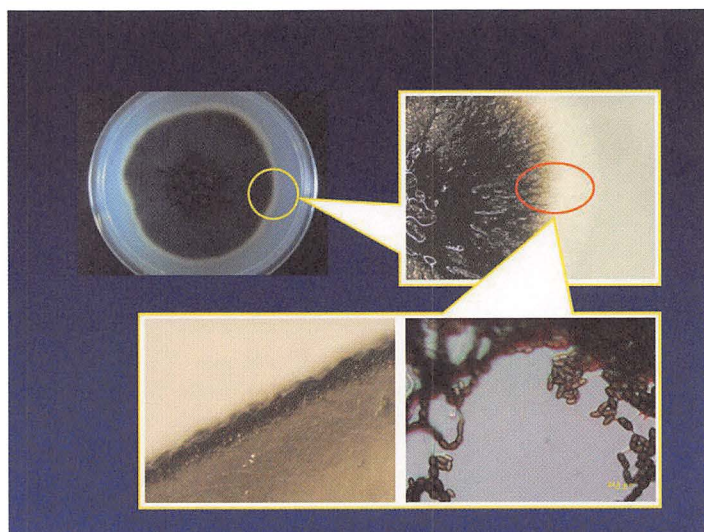


Fig. 15 *Aureobasidium* のバイオフィルム

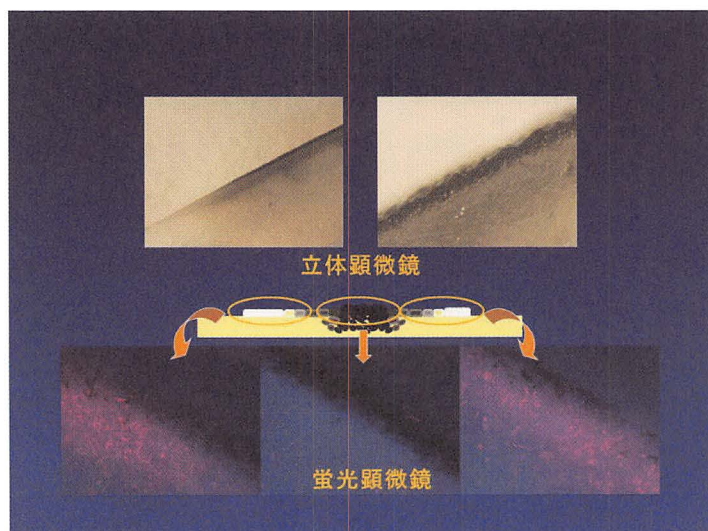


Fig. 16 *Aureobasidium* の断面



Fig. 17 高湿環境下に多い菌糸体形成カビ

本研究は、「文部科学省私立大学戦略的基盤形成支援事業（平成25年度～平成29年度）」によって行われた。