

〔報告〕 Foxing から分離された真菌ならびに foxing 要因菌の色と蛍光スペクトルに関する考察

吉川也志保*・吉田 直人・木川 りか

1. はじめに

紙に発生する褐色斑はフォクシング (foxing) と総称され、紙製文化財の代表的な劣化現象のひとつである。これまで、鉄、樹脂、真菌等に由来する foxing が報告されているように、その起因は一元的ではない。また、真菌起因の foxing に限定したとしても、大別して、菌体 (菌糸・孢子) 由来の着色と代謝物由来の着色のように、発生時に様々な構成要素がある点を前報で指摘した¹⁾。また、前回の実験結果から、代謝物による着色部位は紫外光あるいは近紫外光の照射により蛍光を発することが確認された¹⁾。また、発生時には肉眼による自然光の観察で着色が顕著でなかった場合でも、後に褐色に変化する可能性があることが推察される¹⁾。

本稿では、真菌に起因する foxing を考察するにあたり、その構成成分により励起光を照射した際の蛍光色が異なる点に着目した。蛍光色の違いが foxing 要因菌の判別の一助となりうるかを検証する基礎研究として、前報¹⁾にて foxing 部位から分離された真菌である *Aspergillus penicilloides* (菌株 FS-A 1 とする) と *Aspergillus versicolor* (菌株 FS-A 2 とする)、ならびに foxing の要因菌²⁾ とされる *Eurotium herbariorum* を紙に摂取した部位に紫外光を照射した際の蛍光スペクトルの検出から得られた知見を述べる。

2. Foxing からの真菌の分離と蛍光

2-1. Foxing 部位の蛍光

前報¹⁾にて、紙の褐色部位にブラックライト (Topcon 製 PU-2, 波長域 250nm~400nm) を照射すると、自然光で褐色に見える部位より広い範囲で、明黄色の蛍光が見られることが明らかになった (写真1)。



写真1 フォクシング部位 (左) ブラックライトを照射したフォクシング部位 (右)

2-2. 真菌分離

試料の褐色斑から複数の培地を用いて真菌の分離を試みたところ、DG18培地上で *A. penicilloides* (菌株 FS-A 1) および *A. versicolor* (菌株 FS-A 2) が近接して分離された (写真2)。培地上で両者の接する部分において黄色の色素生産が著しかった点から2種類の真菌

が生育上何らかの相互作用を及ぼして、色素の生産が活発になる可能性に着目した。

E. herbariorum と *A. penicilloides* はすでに foxing 要因菌として報告されているが²⁾、これまで *A. versicolor* の foxing へ及ぼす影響に関する報告はみられなかった。

今回、分離された *A. penicilloides* (菌株 FS-A 1) の菌体 (菌糸・孢子) は無色で、その代謝物は黄色を呈すが³⁾、DG18培地では色素生産があまり活発ではない。*A. versicolor* は緑色の孢子を形成し、一般的に色素生産が活発であることで知られる。

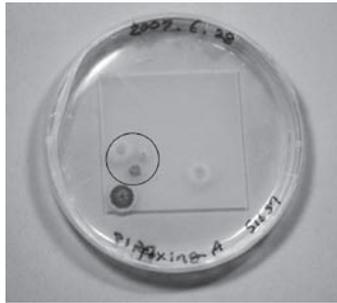


写真2 褐色斑上に近接して発生した2種類の真菌

3. 紙への真菌接種

3-1. 真菌の接種方法

滅菌したろ紙 (Watman. No. 1) に、試験紙の上に直径 6 mm の穴を 5 ヶ所開けた滅菌済の紙を重ね、穴の部分に真菌を接種した。

使用菌株は、上記で分離された *A. penicilloides* (菌株 FS-A 1), *A. versicolor* (菌株 FS-A 2) (写真 3), 先行研究において foxing 要因菌²⁾ とされる *Eurotium herbariorum* (菌株 JCM3891) である。上記 3 種を単種で接種した試料とともに、*A. penicilloides* (菌株 FS-A 1) と *A. versicolor* (菌株 FS-A 2) の 2 種を混合接種した試料を作成した。これらの試料を、Aw0.85 に調整したデシケータ (滅菌済) 内に設置し、室温 25℃ の暗所で培養した。

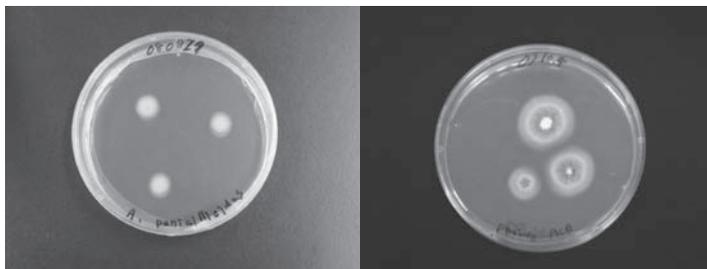


写真3 左から *Aspergillus penicilloides*, *Aspergillus versicolor* (DG18培地)

3-2. 経過と目視観察

真菌を接種し Aw0.85 の環境においた試験紙を、培養開始から 4 ヶ月後に観察したところ以下のような結果が得られた (写真 4, 5 : 口絵参照)。

A. penicilloides (菌株 FS-A 1) : 接種した部位は淡い黄色を呈し、ブラックライト照射により黄色の蛍光を発した。分生子および孢子は無色もしくは淡黄色で、菌体自体は褐色ではな

く、蛍光顕微鏡で観察した際にも菌糸や胞子といった菌体の蛍光は確認されなかった。一方、この菌株の代謝物は淡黄色を呈し、紙に現れた接種部位の蛍光は前報¹⁾で指摘したように代謝物に起因すると考えられる。

A. versicolor (菌株 FS-A 2) : 目視では接種した部位に変色は確認できなかった。分生子および胞子は、無色もしくは白色で、胞子は緑色を呈するが、紙の上では殆ど胞子は生産されていなかった。ブラックライトにより接種部位は白色に光った。

A. penicilloides (菌株 FS-A 1) と *A. versicolor* (菌株 FS-A 1) の混合接種 : *A. penicilloides* または *A. versicolor* を単種で接種した試料に比して、混合接種した試料の方が濃い色に変色する傾向がみられた。ブラックライトを照射すると黄色蛍光を呈した。

E. herbariorum (菌株 JCM3891) : 接種した部位は褐色を呈した。ブラックライトを照射すると、全体的に橙色を呈したが、部分的には黄色に見えるところもあった。褐色の菌糸および黄色の子嚢果が生育した。



写真4 真菌を接種したろ紙 (左より *A. Penicilloide* と *A. Versicolor* の混合接種, *A. penicilloide*, *A. Versicolor*; *E. herbariorum* 白色光で撮影)

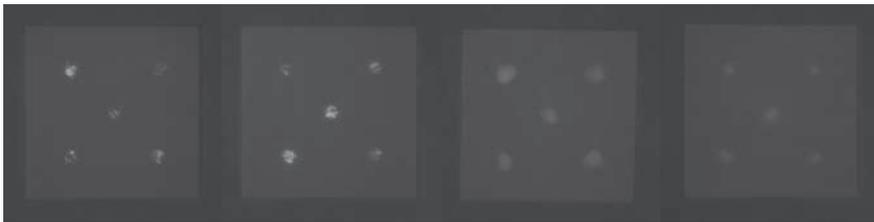


写真5 真菌を接種したろ紙 (左より *A. penicilloide* と *A. Versicolor* の混合接種, *A. penicilloide*, *A. Versicolor*; *E. herbariorum* ブラックライトを照射して撮影)

A. versicolor のみの場合は、一般的に培地上での色素生産量が多い種であるにもかかわらず、上記の条件では紙に着色を起こすことはなかった。一方、この2種を紙に混合接種した場合は、色素の生産が増す傾向がみられた。今回供試された foxing においては、*A. penicilloides* と *A. versicolor* が共生し、色素がより活発に生産された可能性がある。

また、*E. herbariorum* は、菌糸が褐色を呈することから、接種部位に生育した場合も同様に褐色を呈すのだが、*A. penicilloides* が要因となっている場合は、菌糸自体は無色～白色であり、緑色の胞子を持つ *A. versicolor* も紙の上では殆ど胞子を生産していなかったため、菌体の色素というよりも、代謝物の色素が紙に着色していると考えられる。

4. 蛍光のスペクトル測定

ブラックライトを照射した際に、真菌を紙に接種した部位でみられる蛍光の色調は菌種によって異なる。しかし、資料に発生した foxing の蛍光を判定する場合、目視では菌体自体の色や、ブラックライトに含まれる近紫外光の青系の光に影響され、蛍光の色調を判断するにあたって主観による差異が生じる可能性がある。このため、蛍光スペクトル測定を行った。

4-1. 測定方法

測定は、同軸光ファイバーによって励起光照射と蛍光検出が可能な超高感度分光光度計（日本分光製 MCPD-7000）によって行った。主な測定条件は下記のとおりである。

光源：大塚電子製キセノン光源C 4251（HORIBA 製モノクロメーター H-10UV によって励起波長を選択）

送受光：石英製 Y 字型同軸光ファイバーを使用

励起光照射径：約 3 mm

励起波長：450nm

測定波長：480～750nm（測定 5 回の平均値）

露光時間：100msec

測定部位：ろ紙（Control 5カ所），真菌を接種した部位（5カ所）

4-2. 測定結果と考察

標準試料として用いた何も接種していないろ紙（Control）の測定値は、5カ所とも殆ど同一の値を示した。このため、図中においては、ほぼ単一の曲線のように見える（図1,2,3）。

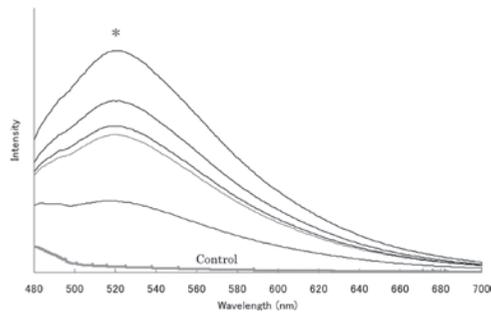


図1 *A. penicilloides*（菌株 FS-A1）をろ紙に接種した部位の蛍光スペクトル（図中の*は極大の位置を示す）

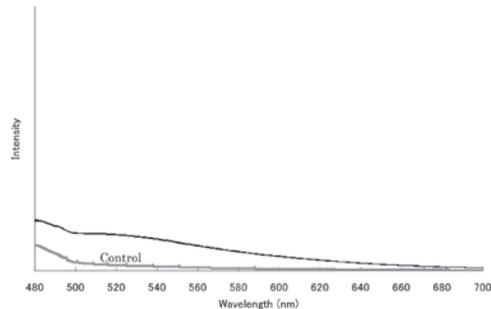


図2 *A. versicolor*（菌株 FS-A2）をろ紙に接種した部位の蛍光スペクトル

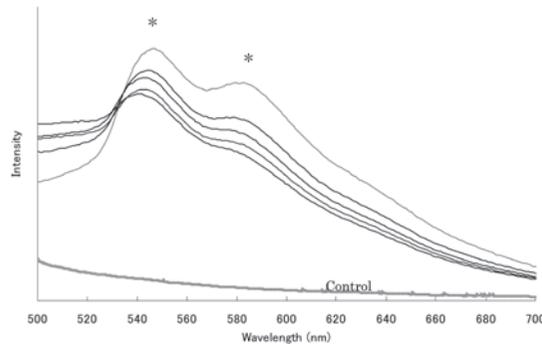


図3 *E. herbariorum* (菌株 JCM3891) をろ紙に接種した部位の蛍光スペクトル (図中の*は極大の位置を示す)

A. penicilloides を接種した部位からは、525nm 付近を極大とするブロードな発光帯が検出された (図1)。525nm 付近の波長は緑色を示す。目視では、ブラックライトの青い光に影響され、明るい黄色に見える部位も、撮影した写真からその部位だけを抽出すると緑色であったことがわかる。*A. versicolor* を接種した部位には、際立った極大は認められなかった (図2)。

E. herbariorum の場合は、540~550nm 付近と590nm 付近の2つの極大を持つ幅広い発光帯が検出された (図3)。*E. herbariorum* を接種した部位に、2種類のピークが検出された理由には以下の原因が考えられる。主波長405nm 励起の蛍光顕微鏡 (HB-10101AF, Nikon) による観察で、子嚢果の外郭にあたる子嚢殻が黄色、内部の胞子が青~緑色、菌糸が赤色に発光しているのが確認された (写真6:口絵参照)。子嚢果が成熟すると黄色の子嚢殻が裂けて、中から青緑の蛍光を発する胞子が出る。したがって、黄色に対応する590nm 付近の光が子嚢殻の蛍光、青緑に対応する540nm 付近の光が胞子の蛍光に対応していると考えられる。また、目視による観察で *E. herbariorum* を接種した部位の蛍光の色調が時間の経過とともに変化して見えることがあるが、このことも子嚢果の成熟過程に起因すると推察される。

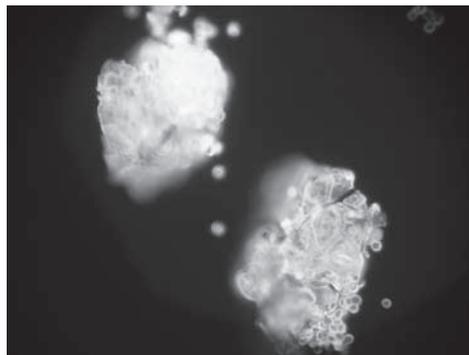


写真6 *E. herbariorum* (菌株 JCM3891) 子嚢果の蛍光顕微鏡写真 (主波長405nm 励起)

4. まとめ

真菌起因の foxing には、大別して菌体由来の着色と代謝物由来の着色があると考えられ、前者は発生時より褐色を呈するが、代謝物由来の場合は、経年とともに褐変する可能性がある。現在は褐色ではないが、将来的に褐色に変化する危険性のある部位を判別するための簡易な方

法として、ブラックライトを用いた目視の蛍光観察が挙げられる。ブラックライトを照射し目視で観察すると、*A. penicilloides*（菌株 FS-A 1）を接種した部位は黄色に光り、*E. herbariorum*（菌株 JCM3891）を接種した部位は全体的には橙色、部分的に黄色が混ざったように見えるなど、菌株により異なる色調を呈した。しかし、目視による色調の微妙な差異を客観的な指標とすることは困難である。そこで、450nm の励起光照射による蛍光スペクトル測定を行ったところ、紙に接種した *A. penicilloides* の場合は代謝物由来、*E. herbariorum* の場合は菌体由来と考えられる（子嚢果、胞子等）由来の蛍光波長を検出することができた。したがって、上記2種については、蛍光スペクトル測定が異なる真菌における特有の蛍光を判別する一助となりうる可能性があると考えられる。

今回の測定では、人為的に真菌を培養したろ紙を用いて測定を行ったが、今後、実際の資料に発生したフォクシングの起因の判別等への応用を検討している。

謝辞

本報告にあたり有益なご助言をくださいました宮内庁書陵部・中村一紀先生に深謝いたします。

引用文献

- 1) 吉川也志保, 関正純, 木川りか: 昭和初期和紙の褐色斑からの真菌分離および蛍光に関する報告, 保存科学, 48, 199-206 (2008)
- 2) 新井英夫: 紙質類文化財の保存に関する微生物学的研究 (第5報) Foxing から分離した糸状菌の生理的・形態学的性質, foxing 形成機構および防除対策について, 保存科学, 26, 48-49 (1987)

キーワード: フォクシング (foxing); 真菌 (fungi); 紙 (paper); 蛍光 (fluorescence)

Consideration on the Color and Fluorescence Spectrum of Fungi Isolated from Foxing and Fungi Causing Foxing

Yashiho KIKKAWA*, Naoto YOSHIDA and Rika KIGAWA

Fungi are one of the main causes of foxing on paper. We observed that the color of foxing area is derived from the fungal body color or the color of their metabolites. We observed also that fluorescence of foxing points caused by ultraviolet (UV) excitation shows different colors depending on this kind of composition.

Aspergillus penicilloides and *Eurotium herbariorum* are considered as main species of fungal foxing. We isolated *A. penicilloides* (FS-A1) and *A. versicolor* (FS-A2) from foxing area on paper. We cultured these three species on paper under 85%RH. Comparing the areas where we spotted spores of each species, we discovered that *A. versicolor* (FS-A2) itself could hardly grow and it did not show any color on paper, but when *A. versicolor* (FS-A2) was mixed with *A. penicilloides* (FS-A1), it showed stronger color.

Observation with the black light, *A. penicilloides* (FS-A1) had yellow and *E. herbariorum* (JCM3891) had orange and partially yellow fluorescence. However, since observation of colors with human eyes is influenced by blue light contained in the black light, these observed colors may not to be a specific description.

Therefore, we tried spectrum measurements by excitation light irradiation of 450 nm. We detected particularly different broad peaks of fluorescence, 525nm from the secreted metabolites of *A. penicilloides* (FS-A1), 540nm from spores and 590nm from *ascocarps* of *E. herbariorum* (JCM3891) on paper.

* Research Fellow(PD), Japan Society for the Promotion of Science