

〔報文〕 キトラ古墳のバイオフィルムから分離されたバクテリア・菌類に対するケーソンCG相当品（抗菌剤）の効果

木川 りか・佐野 千絵・立里 臨*・
喜友名 朝彦*・小出 知己*・杉山 純多**

1. はじめに

キトラ古墳では、2004年の発掘の後、漆喰壁画の取り出し・保護作業が進められている。しかし、相対湿度がほぼ100%の石室内環境では、カビやバクテリアなどの微生物が発生し¹⁾、2005年からは、多種類のバクテリアとカビ・酵母などの菌類の混在する粘ちようなゲル状の物質、バイオフィルムが壁面に発生する事態となった^{1,2)}。このバイオフィルムは、十二支寅、朱雀などの重要な壁画部分にも発生した^{1,2)}。また、天井部に最近発生した穴¹⁾からは、酢酸菌の一種である*Gluconacetobacter* sp. が分離されるなど、漆喰の劣化に関与すると思われるバクテリアもみつがっている。さらに、2006年8月ごろから、南壁の朱雀の絵の上に白い粒状のゲル状物質が顕著に発生した。ゲル状の物質が、絵画を汚損していく深刻な事態が懸念されたため、絵を保護するまでの間、絵画の上にも抗菌剤を使用する必要性がでてきた。

そこで、取り外し・保護作業が行なわれるまでの間、このような多種類の微生物の繁殖を抑える薬剤の検討を行なう必要があった。今回、広い抗菌スペクトラムを有する抗菌剤として、ケーソンCG相当品³⁾の有効性を調べた結果、バイオフィルムを構成する主要なバクテリアや酢酸菌に高い抗菌効果を示す結果を得た。さらに、古墳から採取されたバイオフィルムそのものの試料を用いて、その有効性を検討したので報告する。

2. キトラ古墳石室からの分離株を用いた試験

まず、キトラ古墳に発生しているバイオフィルムに主に含まれるバクテリアと菌類の分離株、さらに、キトラ古墳の天井の穴から分離された酢酸菌の分離株を用い、抗菌剤（ケーソンCG相当品）の各菌種（いずれもキトラ古墳分離株）に対する効果を検証した。今回の試験に用いた株を表1に示す。

抗菌剤の選択にあたっては、予め、キトラ古墳の石室のバイオフィルムなどから主要に分離

表1 試験に使用した分離株.

菌株名	分離源
<i>Gluconacetobacter</i> sp. (K5929-2-1b)	石室内、西寄り天井 漆喰にあいた穴③ No. 4 中身の黒色物質
<i>Rhizobium radiobacter</i> (K5902-3-1b)	石室内、北壁 濃緑色のしみ
<i>Sphingobium</i> sp. (K5902-1-1b)	石室内、北壁
<i>Bacillus thuringiensis</i> (K5916-1-2b)	石室内、南壁朱雀
<i>Trichoderma</i> sp. (K5916-7-3m)	石室内、北壁玄武下
<i>Penicillium</i> sp. (K5916-7-1m)	石室内、北壁玄武下
Yeast-④ (K5916-7-4y)	石室内、北壁玄武下

* (株)テクノスルガ, ** (株)テクノスルガ 東京事務所

されるバクテリアなどの種類を調べて、「特別史跡キトラ古墳の保存・活用等に関する調査研究委員会」のワーキンググループ委員である古田太郎博士に助言をいただいた結果、広い範囲のバクテリア等に抗菌作用をもつケーソンCG相当品を選択した。

2-1. 方法

2-1-1. 試験液の調整

ケーソンCG相当品原液(ろ過滅菌済)(有効成分約1.4%)の希釈は70%イソプロパノール(ろ過滅菌済)および滅菌水で行ない、「0, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000」の5段階希釈系列液を調整して試験に供した。また、ポジティブコントロールとして5倍希釈10%塩化ベンザルコニウム、ネガティブコントロールとして滅菌水および70%イソプロパノールを用いた。

2-1-2. 試験菌株

キトラ古墳石室内サンプルからの分離株(2005年9月以降採取)のうち、すでに遺伝子解析を行なった細菌4菌種(*Gluconacetobacter* sp., *Rhizobium radiobacter*, *Sphingobium* sp., *Bacillus thuringiensis*), カビ2菌種(*Trichoderma* sp., *Penicillium* sp.) および酵母1菌種の計7菌種(表1)を用いた。

2-1-3. 試験手順

試験は長方形の角型シャーレを用い、各シャーレにおける培地の厚さは一定とした。菌の植菌は培地と混釈する方法、すなわち、あらかじめ液体培養した各菌種の培養液をシャーレに滴下し、固化直前の培地をシャーレに流し込み、均一になるようにゆっくりと混釈する方法で行なった。混釈寒天培地が固化後、コルクローラーで培地に直径9mmの穴を12箇所開けた。各穴に図1に示す配置で試験液を100 μ lずつ投与した。

また、カビ2菌種については混釈法とは別に固化した寒天平板培地表面に孢子液を塗抹する方法でも試験平板を作製し、混釈法と同様に試験を行なった。

なお、試験の再現性を考慮するため、1菌種当たり2セットを作成した。

2-1-4. 培養条件

細菌については、nutrient agar (Oxoid, Hampshire, England) (NT)を培地に用い、培養温度30 $^{\circ}$ Cで、48時間、好気条件下で培養した。

カビ・酵母については、ポテトデキストロース寒天培地「ダイゴ」(日本製菓、東京)(PDA)

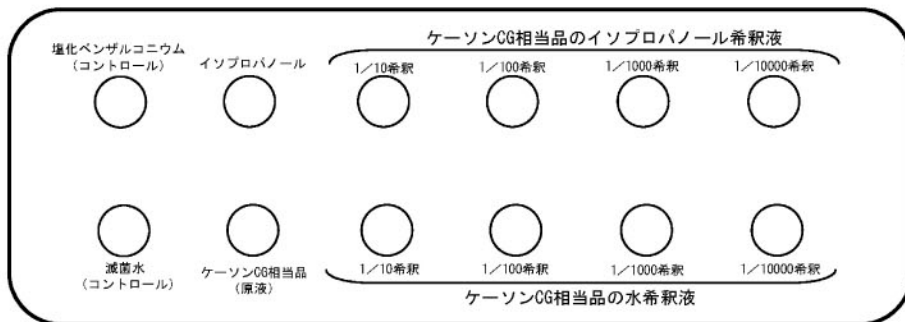


図1 各系列および各種コントロール等の配置.

を培地に用い、培養温度25℃で、7日間、好気条件下で培養した。

2-1-5. 結果の判定

試験液の抗菌性の評価判定はケーソンCG相当品等を投与した穴周辺の菌の生育状況（阻止円の形成具合）から評価を行なった。図2に、その判定基準を示す。

2-2. 結果と考察

各検体の試験結果を図3～図9に示し、試験結果を表2にまとめた。

抗菌性試験の結果、キトラ古墳の細菌分離株4菌種に対し、ケーソンCG相当品の抗菌性効果は高く、1000倍希釈まで高い抗菌性が認められた(図3～6, 表2)。一般にケーソンCG相当品は、

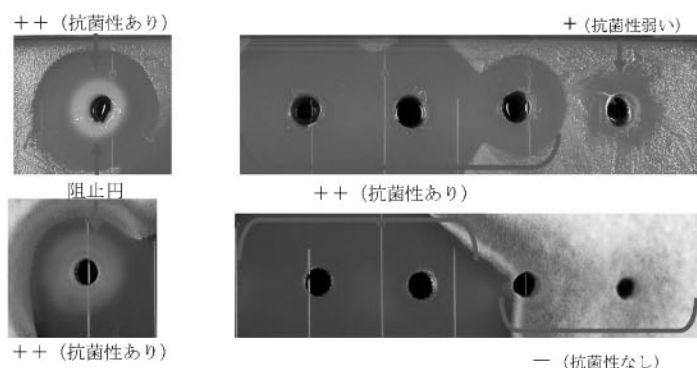


図2 抗菌性の判定基準：陽性コントロールを投与した穴周辺に形成された阻止円の直径を元に抗菌性の評価基準とした。

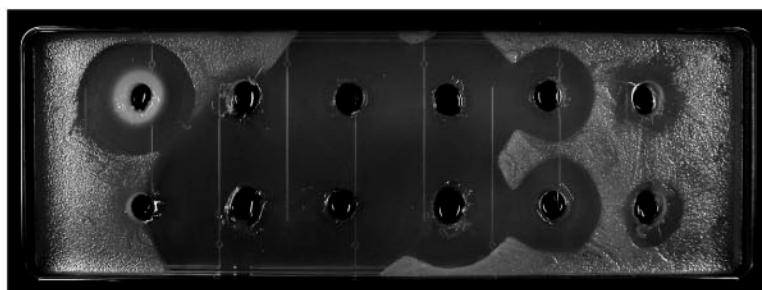


図3 *Gluconacetobacter* sp. (K5929-2-1b) (30℃, 2日間培養).

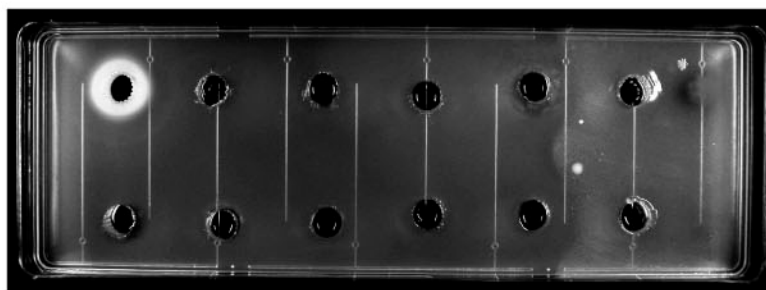


図4 *Rhizobium radiobacter* (K5902-3-1b) (30℃, 2日間培養).



図5 *Sphingobium* sp. (K5902-1-1b) (30°C, 2日間培養).

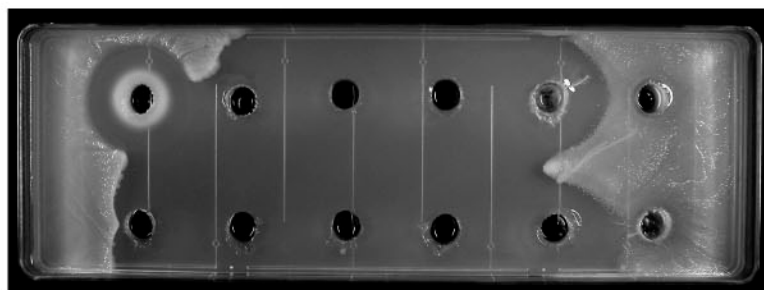


図6 *Bacillus thuringiensis* (K5916-1-2b) (30°C, 2日間培養).

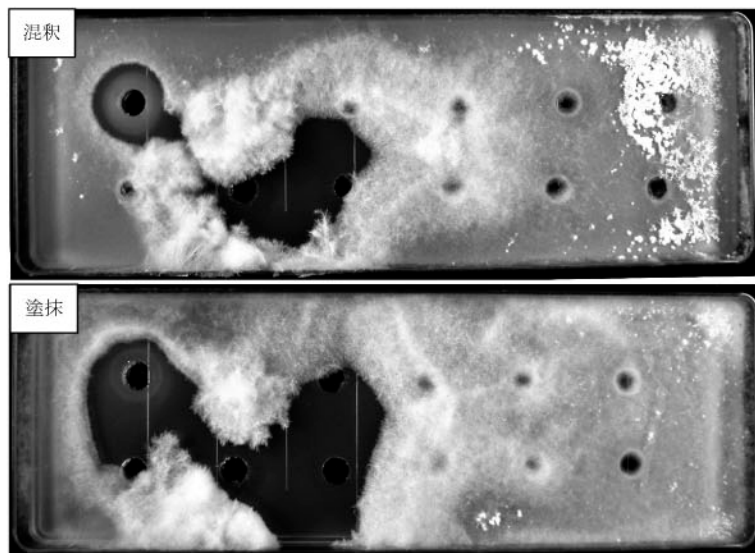


図7 *Trichoderma* sp. (K5916-7-3m) (25°C, 7日間培養).

グラム陰性菌には非常に効果が高いことが知られていたが、今回、調べたグラム陽性菌 (*Bacillus thuringiensis*) に対しても、ケーソンCG相当品は高い抗菌性を示すことがわかった (図6)。

カビについては、*Penicillium* sp. および酵母Yeast-④に対してケーソンCG相当品は100倍希釈では高い抗菌性が認められた (図8, 図9, 表2)。一方、カビ *Trichoderma* sp. に対しては10倍希釈濃度で弱い抗菌性が認められたが、その効果は低いものと考えられる (図7, 表2)。そのため、*Trichoderma* sp. のような生育の速いカビの菌種に対しては、希釈をせずに原液のま

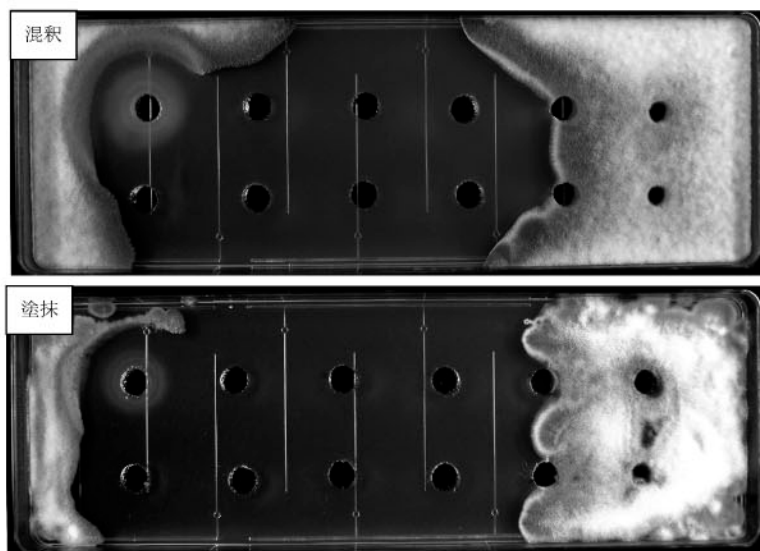


図8 *Penicillium* sp. (K5916-7-1m) (25°C, 7日間培養).

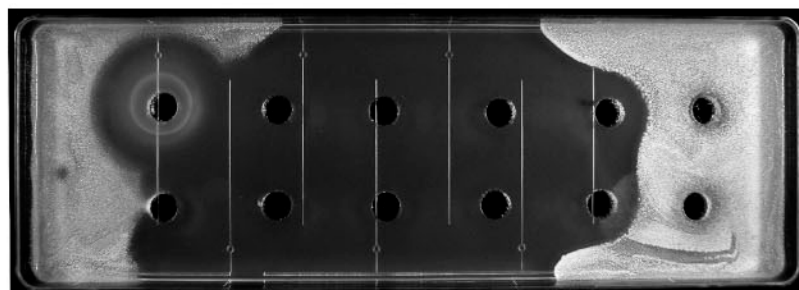


図9 Yeast-④ (K5916-7-4y) (25°C, 7日間培養).

表2 ケーソンCG相当品の各菌種に対する抗菌性試験結果.

	ケーソンCG相当品						イソプロパノール*	コントロール	
	原液	希釈液	1/10	1/100	1/1000	1/10000		10% 塩化ベンザルコニウム	滅菌水*
(細菌類)									
<i>Gluconacetobacter</i> sp. (K5929-2-1b)	++	イソプロパノール	++	++	++	+	-	++	-
		水	++	++	++	+			
<i>Rhizobium radiobacter</i> (K5902-3-1b)	++	イソプロパノール	++	++	++	-	-	++	-
		水	++	++	++	-			
<i>Sphingobium</i> sp. (K5902-1-1b)	++	イソプロパノール	++	++	++	-	-	++	-
		水	++	++	++	-			
<i>Bacillus thuringiensis</i> (K5916-1-2b)	++	イソプロパノール	++	++	++	-	-	++	-
		水	++	++	++	-			
(カビ)									
<i>Trichoderma</i> sp. (K5916-7-3m)	+	イソプロパノール	+	-	-	-	-	++	-
		水	+	-	-	-			
<i>Penicillium</i> sp. (K5916-7-1m)	++	イソプロパノール	++	++	-	-	-	+	-
		水	++	++	-	-			
(酵母)									
Yeast-④ (K5916-7-4y)	++	イソプロパノール	++	++	+	-	-	++	-
		水	++	++	+	-			

++ 抗菌性あり； + 弱い抗菌性； - 抗菌性なし

イソプロパノールおよび滅菌水の試験結果において周囲のベンザルコニウムおよびケーソンCG溶液の影響で抗菌性がある結果となったが、イソプロパノールおよび滅菌水はネガティブコントロールに相当すると考えられるため、抗菌性評価は「-」と表記した。

ま使用する方が、ある程度の抗菌性効果が見込まれると考えられる。

また、ケーソンCG相当品を、イソプロパノールと滅菌水にそれぞれ希釈した場合を比較すると、抗菌性にほとんど差が認められなかった。このことから、ケーソンCG相当品を希釈する液体は、現場の状況に応じてイソプロパノールと水の使いわけが可能であると考えられる。

3. キトラ古墳石室のバイオフィームそのものを用いた試験

以上の試験結果より、キトラ古墳に2005年9月以降に発生しているバイオフィームに含まれる主要なバクテリアやカビなどの菌株や、天井の穴から分離した酢酸菌の菌株に対するケーソンCG相当品の効果が明らかになった。

この結果をふまえ、場合に応じて、キトラ古墳の絵のない箇所にてケーソンCG相当品の使用を検討したところ、バイオフィームの抑制に有効である感触を得ている。

しかし、2006年8月ごろから、南壁、朱雀の絵の上に、さらに白い粒状のゲル状物質が顕著に発生した(図10)。観察の結果、この白色ゲル状物質は、多種類の菌類やバクテリアの混生体(バイオフィーム)と判断された。それまでは、ケーソンCG相当品などの抗菌剤の使用は絵画のないところ限定してきたが、朱雀を取り出すまでの間に、このようなゲルによる絵画の汚損が顕著に進まないよう、絵画の面にも抗菌剤の使用を検討する必要がでてきた。

そこで、南壁の白色粒状のゲル状試料を2006年8月11日に朱雀の近傍3箇所より採取し、これらのゲル状物質そのものに対する抗菌剤(ケーソンCG相当品)の効果を調査した。

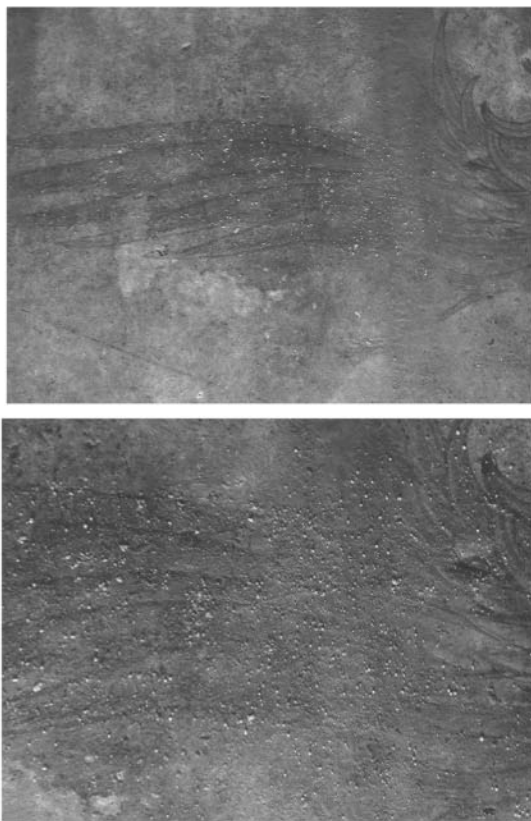


図10 朱雀の上の白いゲルの様子 上:2006年8月4日 下:2006年8月25日

3-1. 方法

3-1-1. 試験液の調整

ケーソンCG相当品（ろ過滅菌済：有効成分約1.4%）の希釈は70%イソプロパノール（ろ過滅菌済）で行ない、「0, 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000」の5段階希釈系列液を調整して試験に供した。また、ポジティブコントロールとして5倍希釈10%塩化ベンザルコニウム、ネガティブコントロールとして70%イソプロパノールを用いた。

3-1-2. 試験試料（バイオフィルム）

今回の試験に用いたバイオフィルム（ゲル）の試料一覧を表3に示す。いずれも、2006年8月以降に朱雀上に出現した、白色のゲル状物質である。なお、対照コントロールとして *Bacillus thuringiensis* (K5916-1-2b:2005年9月16日, キトラ古墳 石室内, 南壁朱雀の分離株) を用いた。

3-1-3. 試験手順

試験は長方形の角型シャーレを用い、各シャーレにおける培地の厚さを一定とした。菌の植菌は、表面塗抹方法で行なった。寒天培地が固化後、コルクボーラーで培地に直径9mmの穴を7箇所開けた。各穴に図11に示す配置で試験液を100 μ lずつ投与した。なお、試験の再現性を考慮するため、1検体当たり2セットを作成した。

3-1-4. 培養条件

試験培地にnutrient agar (Oxoid, Hampshire, England) (NT)を用い、培養温度30 $^{\circ}$ C, 好気条件下で培養した。培養24時間後と72時間後に結果を観察した。

表3 試験に用いたバイオフィルム（ゲル）等の試料.

試料名	試料採取位置
a. 060811 朱雀ゲル 中央泥の上	石室内, 南壁朱雀
b. 060811 朱雀ゲル 尾羽根上から3枚目下	石室内, 南壁朱雀付近
c. 060811 朱雀ゲル 尾羽根上	石室内, 南壁朱雀
<i>Bacillus thuringiensis</i> [※]	石室内, 南壁朱雀

※ *Bacillus thuringiensis* (K5916-1-2b:2005年9月16日キトラ古墳 石室内, 南壁朱雀からの分離株) は、対照コントロールとして使用。

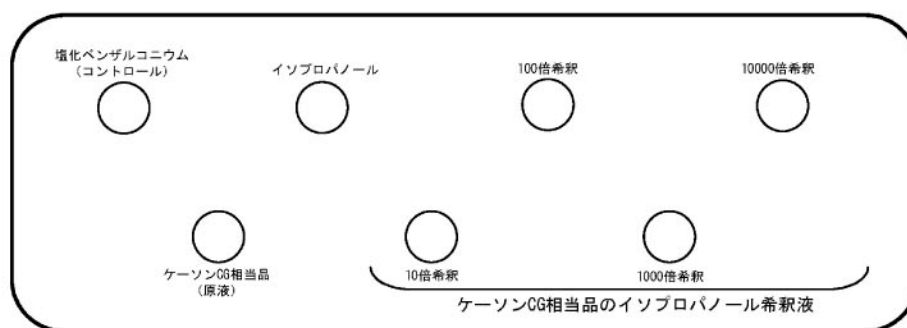


図11 希釈系列および各種コントロール等の配置.

3-1-5. 結果の判定

試験液の抗菌性の評価判定はケーソンCG相当品等を投与した穴周辺の菌の生育状況（阻止円の形成具合）から評価を行なった。その判定基準は図2により、2項の実験に同じである。

3-2. 結果と考察

培養24時間後の観察の結果、各バイオフィルム検体に対するケーソンCG相当品の抗菌性効果は高く、1000倍希釈まで高い抗菌性が認められた（図12～15）。このことから、ケーソンCG相当品はこれらバイオフィルムを構成する細菌に対して高い抗菌性をもつと考えられる。

しかし、さらに培養を継続して72時間後に観察すると、100倍～1000倍希釈の菌阻止円内に散在的なコロニー形成が認められた（図16～18）。このことから、当該希釈濃度では一時的な抑制作用しかないと考えられる。したがって、ケーソンCG相当品によって効果的にバイオフィルムの増殖を抑えるためには、10倍程度の希釈倍率で使用するのが適当であると推測された。

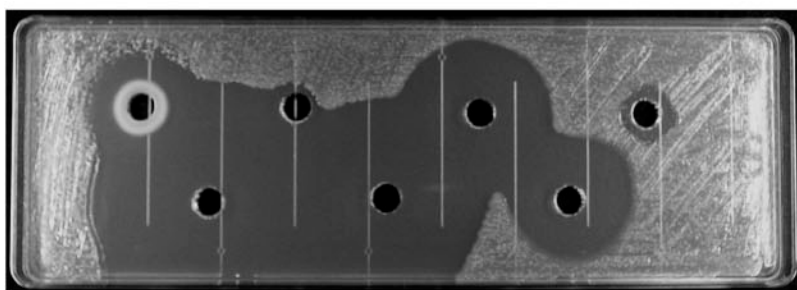


図12 a. 朱雀ゲル 中央泥の上 (30°C, 24時間培養).

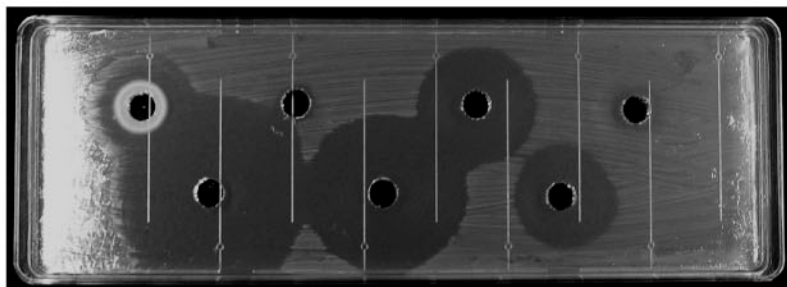


図13 b. 朱雀ゲル 尾羽上から3枚目下 (30°C, 24時間培養).

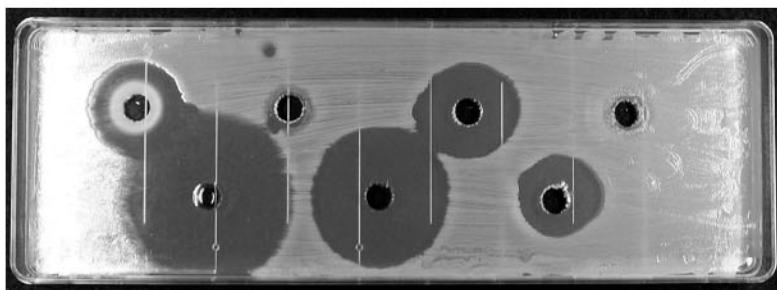


図14 c. 朱雀ゲル 尾羽上 (30°C, 24時間培養).

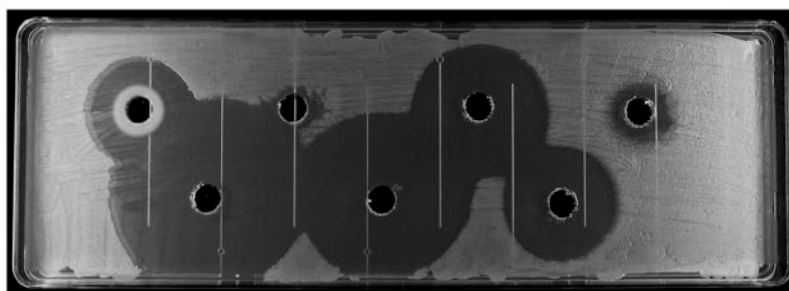


図15 *Bacillus thuringiensis* (K5916-1-2b) (30°C, 24時間培養).

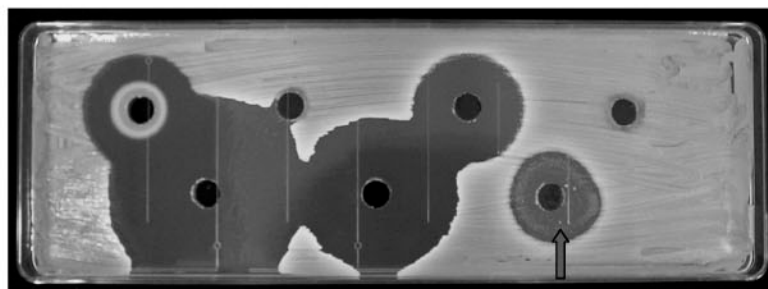


図16 b. 朱雀ゲル 尾羽上から3枚目下 (30°C, 72時間培養): 阻止円の中に散在的なコロニー形成が認められる (矢印).

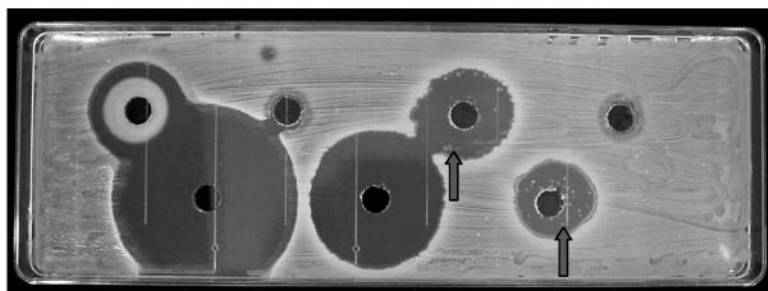


図17 c. 朱雀ゲル 尾羽上 (30°C, 72時間培養): 阻止円の中に散在的に少量のコロニー形成が認められる (矢印).

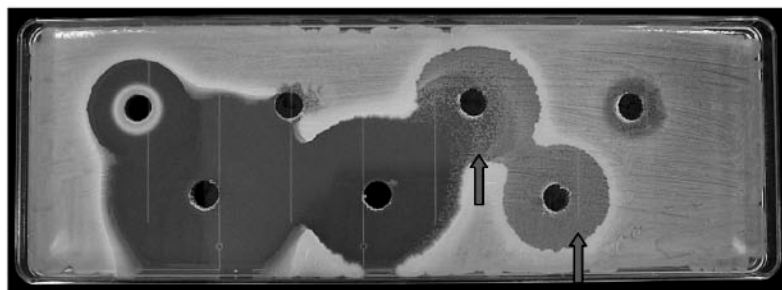


図18 *Bacillus thuringiensis* (K5916-1-2b) (30°C, 72時間培養): 阻止円の中に散在的なコロニー形成が認められる (矢印).

表4 ケーソンCG相当品に対する抗菌性試験の結果.

試料名	10%塩化ベンザルコニウム (5倍希釈液)	イソプロパノール	ケーソンCG相当品 [※]				
			原液	1/10	1/100	1/1000	1/10000
a. 060811 朱雀ゲル 中央泥の上	++	-	+++++	+++++	+++	++	+
b. 060811 朱雀ゲル 尾羽根上から3枚目下	++	-	+++++	++++	++	+	-
c. 060811 朱雀ゲル 尾羽根上	++	-	++++	++++	+	+	+
<i>Bacillus thuringiensis</i> (K5916-1-2b)	++	-	++++	++++	++	+	-

++++以上 強い抗菌性あり； ++ 抗菌性あり； + 抗菌性弱い； - 抗菌性なし

※ケーソンCG相当品は70%イソプロパノールで希釈系列を調整

以上の結果をまとめたものを表4に示す。

4. まとめ

キトラ古墳石室では、2005年8月ごろから壁面のバイオフィルムが顕著に発達しはじめたため、同年9月以降、可能なところは除去し^{1, 2)}、また除去が不可能なところにはバイオフィルムを形成する菌(グラム陰性菌など)に有効な薬剤として検討会でも提案のあった抗菌剤(ケーソンCG相当品)の使用を検討してきた。

今回、キトラ古墳のバイオフィルムから分離された主なバクテリア等に対して、ケーソンCG相当品の効果を調べたところ、この抗菌剤が、きわめて高い抗菌効果をもつことがわかった。また、2005年9月に天井部の漆喰の穴2箇所から分離された酢酸菌についても、ケーソンCG相当品がその生育を有効に抑制することを確認した。そこで、キトラ古墳現地で、場合に応じて、絵のない箇所にケーソンCG相当品の使用を検討し、バイオフィルムや穴の生成の抑制に有効である感触を得た²⁾。

さらに、2006年8月11日に朱雀の近傍3箇所より白色粒状のゲル状試料を採取し、抗菌剤(ケーソンCG相当品)の効果を検証した。その結果、10倍希釈溶液でバイオフィルム原因微生物の生育抑制に有効と考えられる結果が得られた。

この試験結果を受け、2006年8月25日²⁾、および2006年9月22日、白粒部分をケーソンCG相当品(10倍水溶液)にて処置したところ、このゲル部分の増殖は抑制されており、2006年12月現在、ゲル状物質によるこの箇所の被害の進行はみられていない。

謝辞

薬剤の選定に際しまして適切なお助言をいただき、試験に使用するケーソンCG相当品をご供与いただきました。「特別史跡キトラ古墳の保存・活用等に関する調査研究委員会ワーキンググループ委員」、サラヤバイオケミカル研究所取締役の古田太郎博士に感謝申し上げます。また、キトラ古墳の微生物対策全般について、貴重なご意見をいただきました「特別史跡キトラ古墳の保存・活用等に関する調査研究委員会委員」、国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部長の高鳥浩介博士に感謝申し上げます。

注) ケーソンCG相当品： アモルデン FS-14D（大和化学工業株式会社）

有効成分 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン，2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン
原液には，それぞれの成分がおよそ1.0-1.3%，0.30-0.42%含まれる。

参考文献

- 1) 木川りか，間渕創，佐野千絵，三浦定俊：キトラ古墳における菌類等生物調査報告（2），保存科学，45，93-105（2006）
- 2) 「特別史跡キトラ古墳の保存・活用等に関する調査研究委員会」（第9回）資料6，キトラ古墳の微生物等の状況について，文化庁（2006）

キーワード：キトラ古墳(Kitora tumulus)；微生物(microorganisms)；カビ(molds)；
バクテリア(bacteria)；抗菌剤(antibiotics)；バイオフィルム(biofilm)

The Effect of a Biocide (Kathon CG) on Bacteria and Fungi Isolated from Biofilms on the Plaster Paintings of Kitora Tumulus and Its Direct Effect on the Biofilms

Rika KIGAWA, Chie SANO, Nozomi TAZATO^{*}, Tomohiko KIYUNA^{*},
Tomomi KOIDE^{*} and Junta SUGIYAMA^{**}

Excavation of Kitora Tumulus started at the end of January 2004, and it was decided to relocate the thin plaster paintings and to restore them in a safe environment. In the course of restoration works, viscous gel increased to form “biofilm” on the plaster walls in the summer of 2005.

The biofilm was a mixture of bacteria and fungi. The biofilm was removed, where it was possible, with a low concentration of hydrogen peroxide solution in 2005. But this could not be applied to places where plaster was very fragile, for example on the south wall which had a very precious painting of a phoenix.

It is very important to relocate the mural paintings as soon as possible, but relocating very fragile plaster paintings is an extremely difficult work. Such work can only be performed with well designed methods based on sufficient survey of the conditions of the plaster walls that require much time for planning and testing.

Meanwhile, alternative ways to control such biofilm that affect fragile plaster paintings are also necessary. Therefore, we tested the efficacy of Kathon CG, a biocide based on two isothiazolones, on bacterial, mold and yeast strains which had been mainly isolated from biofilms of the Kitora Tumulus. The results showed that the biocide was highly effective to bacterial strains which we tested (*Gluconacetobacter* sp., *Rhizobium radiobacter*, *Sphingobium* sp., and *Bacillus thuringiensis*). Regarding molds, *Penicillium* sp., was efficiently controlled by the biocide, but the fast growing mold, *Trichoderma* sp. was difficult to control unless very high concentration of the biocide was applied.

We also examined the effect on the gel samples themselves which had been sampled from the biofilm on the phoenix painting in the summer of 2006. The result showed that the growth of the biofilm was effectively inhibited by Kathon CG.

Based on these results, we applied Kathon CG aqueous solution to the places where damage by the biofilm seemed significant in the summer and in the fall of 2006. Now, after months from the treatments, further growth of the biofilm seems to be inhibited.