

# 〔報告〕 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

吉川 也志保・木川 りか・関 正純\*

## 1. はじめに

微生物による被害は、文化財の基質を脆弱化させ美観を損なうものである。紙製文化財に発生する真菌に関しても、菌種、栄養条件、環境条件により、赤、桃、紫、黄色、褐色、黒色など、多様な汚損がみられ、その除去方法に関する研究<sup>1)</sup>も多く見られる。なかでも、紙に発生する褐色斑は、総称して foxing (フォクシング) と呼ばれ、紙製文化財の劣化の代表的な症例のひとつである。その発生に関しては、1980年代、新井の研究によって、foxing の真菌による形成メカニズム<sup>2)</sup>が、飛躍的に注目を集めるようになった。現在、foxing には微生物起因および、それ以前に提唱されていた鉄起因、樹脂起因といった主に3種類の要因が報告されている<sup>3)</sup>。また、真菌に起因する foxing の中でも、孢子・菌糸といった菌体に起因する着色および代謝物に起因する着色、紙の成分との相互作用による着色など、様々な構成要素が考えられる。本報告では、昭和初期の和紙にみられた褐色斑および分離された真菌の菌体および代謝物の観察により得られた知見について述べる。

## 2. 調査の経緯および供試紙について

本稿で調査対象とした紙試料は、宮内庁書陵部から提供された装丁紙である。正確な生産年は定かではないが、昭和13年頃の資料整理に際して、和本の改装にあたり表紙裏に用いられた紙であることから、それ以前に購入されていたことを鑑みて昭和初期に抄紙された和紙であるとされている。平成17年ごろに、これらの紙に淡褐色の変色部位が発見されたことから、資料本体への影響を防ぐため、昭和13年までに付けられた装丁は直ちに切り除かれ、資料本体は再び改装された。このとき取り除かれた装丁紙の表紙裏にみられる淡褐色部位が微生物起因であるか否かの判定を依頼されたことが本調査の端緒となった。

この供試された紙群は、同じ材質、同じ抄紙方法で、同時期に製造され、少なくとも約70年は同一の収蔵環境で保管されていたという特質を持つため、単一試料からは特定が困難な事象の解明に役立つものと考えられる。本稿では、この供試紙群を試料 FS と呼ぶこととする。

## 3. 紫外線照射による蛍光の観察

foxing に365nm 付近の紫外線を照射すると蛍光が励起される事象はすでに報告されており、新井は foxing の起因が微生物であるかどうかを判別する一手法として紫外線の照射による蛍光が有効であると述べている<sup>4)</sup>。ただし、いわゆる foxing の中でも、樹脂起因と考えられるものは、紫外線照射で蛍光を発することはないとされており<sup>3)</sup>、また、紙に着色を引き起こす微生物の中でも、紫外線照射で蛍光がみられないものもあるため、資料 FS に見られる淡褐色の部位に、紫外線ランプ (NEC ライティング製5W11, 主波長365nm) を照射して観察した。なお、撮影に際しては、デジタルカメラ (パナソニック製 Lumix, DMC-FX30) を使用した。

その結果、供試紙4点 (試料 FS1, 試料 FS2, 試料 FS3, 試料 FS4)、蛍光灯下で撮影された画像との比較からも明らかのように、黄色の蛍光が褐色部位と一致した範囲でみられ、さら

\*高知県立紙産業技術センター

に褐色部位の領域よりも、紫外線を照射した際に蛍光を発している領域の方が広範囲であることが確認できた（写真1：口絵参照）。

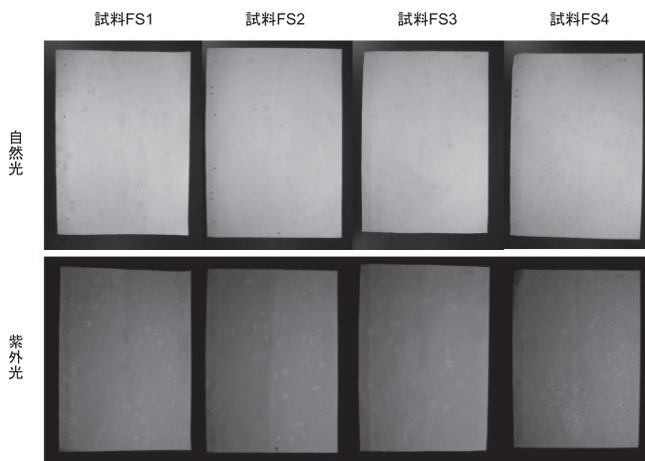


写真1 試料FSの自然光写真と紫外光写真

## 4. 真菌の分離

試料FSにみられる褐色斑が微生物起因であるかどうかの判定および要因菌の同定のため、供試紙FSからの真菌の分離を試みた。

### 4-1. 分離方法

供試紙（試料FS-0）で褐色部位が含まれる部分を5cm四方に計9枚切り取り、DG18培地（好乾性真菌用）、MA40培地（好稠性真菌用）、MA培地（一般真菌用）それぞれ水分活性の異なる培地上で経過を観察した。

### 4-2. 分離結果

培養期間3週間で、生育した主要菌種は、DG18培地の *Aspergillus* sp., MA40培地の *Eurotium* sp. および *Aspergillus* sp., MA培地の *Cladosporium* sp. だった。

MA培地は、上記3種類の培地の中で最も水分活性の高い培地である。今回、MA培地上で生育した *Cladosporium* sp. は、菌糸および胞子が緑色から黒色を呈するため別名クロカビと呼ばれ、空中で最も多い真菌であり住環境汚染の原因菌のひとつとして知られているが、乾燥や高温で死滅しやすく、一般的に通常の保管環境にある紙の表面に生育することはない。また、MA培地上における *Cladosporium* sp. のコロニーの形成は、褐色部位とは一致していなかった。

今回の試験でコロニー形成部位と褐色部位との明確な一致がみられ、かつ代謝物の色素生産が最も盛んだったのは、DG18培地上で生育した2種類の *Aspergillus* sp. であり、これらを分離培養し、それぞれを菌株FS-A1および菌株FS-A2とした。菌株FS-A1の菌糸および胞子は白色から淡い黄色（写真2）で、淡黄色の代謝物を生成し、菌株FS-A2は白色の菌糸と緑色の胞子を形成し、明黄色の代謝物を生成した。両者を同定したところ、菌株FS-A1は *Aspergillus penicilloides*、菌株FS-A2は *Aspergillus versicolor* であることがわかった。

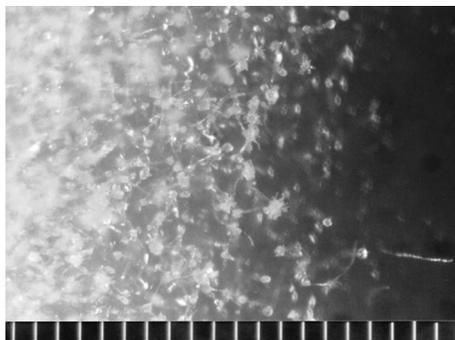


写真2 DG18培地上の試料FSから生育した *Aspergillus penicilloides* の分生子 (1目盛: 5 μm, 実体顕微鏡写真)

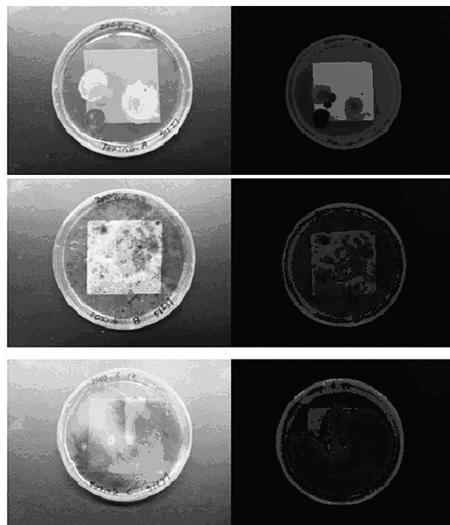


写真3 試料FS上に生育した真菌 (上段より DG18培地, MA40培地, MA培地, 左: 自然光, 右: 紫外光)

#### 4-3. 紫外線照射による観察

培地上で生育した真菌および紙に紫外線を照射した際に、供試紙FSと同様の蛍光を発するかを確認するため、紫外線ランプ (NEC ライティング; 5W1, 主波長365nm) を照射したところ、MA培地で生育した真菌およびMA40培地で生育した真菌からは目視で確認できる蛍光は殆どみられなかった一方で、DG18培地上の *Aspergillus penicilloides* のコロニーおよびコロニー周辺で、明黄色の蛍光がみられた (写真3: 口絵参照)。このことは、*Aspergillus penicilloides* の代謝物が紙に浸潤して蛍光を発している可能性を示している。

### 5. 分離菌株を用いた foxing 再現実験

人為的 foxing の再現実験に関する先行研究<sup>4)</sup>では、foxing を含む紙片の抽出液から薄層クロマトグラフィーで検出された16種類のアミノ酸から、紙に含まれる糖と真菌を構成するアミノ酸との反応に着目し、それらの成分を組み合わせた調合液を紙にスポットした部位で褐色斑が形成された点、また、調合液のスポットに紫外線照射で蛍光が認められた点を報告している。本稿では、試料FSから分離された菌株を紙に接種する手法で foxing の再現実験を試みた。

#### 5-1. 実験方法

使用菌株は、試料FSから分離された2種類の *Aspergillus* の菌株および新井が foxing 形成要因糸状菌とした *Eurotium herbariorum* を選んだ (表1)。真菌を接種する試験紙には、ろ紙 (Watman) および楮紙を用いた (表2)。

試験に際して、他の雑菌による汚染を防ぐために試験紙及び使用機器の滅菌処理を行った。7 × 4 cm に切り取った紙を1枚ずつアルミホイルで包み、121℃ 10分設定のオートクレーブ (TOMY HIGH-PRESSURE Steamester Rilizer 13S-305, トミー精工社製) で滅菌し、その後40℃ 3時間設定の乾熱滅菌器 (MOV-212S, 三洋電機社製) で乾燥させる方法を取った。

表1 使用菌株

菌株名	菌種
FS-A1	<i>Aspergillus penicilloides</i>
FS-A2	<i>Aspergillus versicolor</i>
JCM3891	<i>Eurotium herbariorum</i>

表2 試験紙

試験紙名	紙種
W	ろ紙 (Watman)
K1	木灰煮熟楮
K2	苛性ソーダ煮熟楮

滅菌綿棒を用いて釣菌し、試験紙の上に直径6 mmの穴を6カ所開けた滅菌済の紙を重ね、穴の部分に接種した。滅菌処理を施したデシケーターの内部を塩化カリウム飽和溶液でAw(水分活性: Water Activity) 0.84に調整した。このデシケーター内に、真菌を接種した試験紙を設置し、室温25℃の暗所で経過を観察した。

### 5-2. 結果および紫外線照射による観察

真菌を接種しAw 0.84の環境においた試験紙を、培養開始から2ヵ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:口絵参照)。

FS-A1を接種した部位は、ろ紙の場合、黄色から淡褐色を呈するが、K1およびK2の楮紙は、殆ど目視で確認できる変色はみられなかった。しかし、FS-A1を接種した部位には、紫外線を照射すると黄色の蛍光を発することが確認された。FS-A2は、いずれの紙の上でも殆ど生育せず、紫外線で蛍光を発することもなかった。ただし、興味深いことに、FS-A1とFS-A2を混合接種したところ、代謝物の生産がより活発になり、紫外線照射時には明黄色の蛍光が見られた。このことから、FS-A2はFS-A1と共存することで相互作用を及ぼし、色素生産に何らかの影響を与えている可能性もある。

JCM3891の接種部位は、ろ紙および褐色斑を生じており、目視では確認し難いが、紫外線照射によって、橙色の蛍光を発していた。

したがって、*Aspergillus penicilloides* (菌株FS-A2)は、菌体および孢子自体は褐色を呈さないが(写真5:口絵参照)その代謝物は蛍光を発し、*Eurotium herbariorum*は褐色の菌糸を形成することが確認された(写真6:口絵参照)。

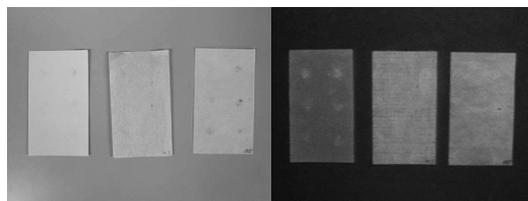
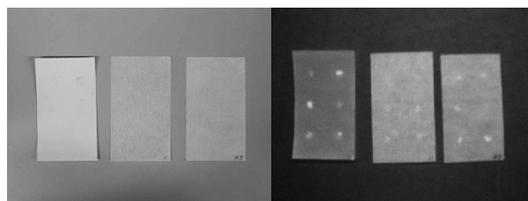
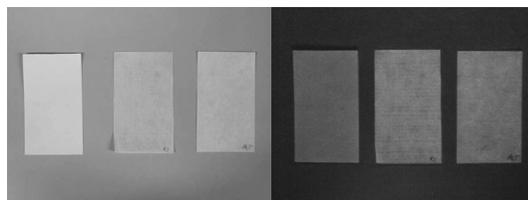
4-1 *Eurotium herbariorum* (菌株JCM3891)4-2 *Aspergillus penicilloides* (今回分離した菌株FS-A1)4-3 *Aspergillus versicolor* (今回分離した菌株FS-A2)

写真4 異なる紙(左からW, K1, K2)に真菌を接種した時の生育状況と紫外光による蛍光(左:自然光, 右:紫外光)

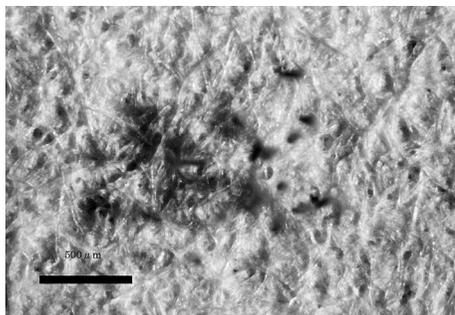


写真5 ろ紙上で生育した *Aspergillus penicilloides* (菌株 FS-A1)

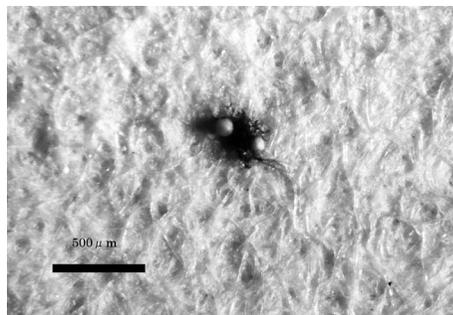


写真6 ろ紙上で生育した *Eurotium herbariorum* (菌株 JCM3891)

## 6. 考察

今回、供試紙にみられた褐色斑の発生状況ならびに紫外線照射時にみられる蛍光の観察ならびに、褐色部位から分離された *Aspergillus penicilloides* (菌株 FS-A1) が、すでに新井が「foxing 要因糸状菌」として報告している *Aspergillus penicilloides* (菌株 KF-84-13-2など)<sup>5)</sup> と同一菌種であることから判断して、紙試料 FS にみられる褐色斑は微生物に起因する foxing である可能性が高いと考えられる。

また、紫外線照射時に紙試料 FS にみられた蛍光を発する領域が、自然光で見られる褐色斑の領域よりも広範囲である点、そして菌株 FS-A1 を用いた foxing の再現実験の結果では、2 カ月間の培養では接種点に紫外線照射時の蛍光が認められる一方で、明瞭な褐色斑を形成することなかった点を鑑みると、菌種および条件によっては、菌体および代謝物が発生当初から褐色ではなかった可能性も考えられる。

## 7. まとめ

上記の結果から、微生物起因である foxing の由来にも大別して以下のような場合があると推測される。

- ①菌体（菌糸・孢子）が生育時から褐色を呈している
- ②菌体は褐色を呈していないが、菌体あるいは代謝物が経年により褐色に変化する

したがって、真菌の発生以降、その跡が変色を引き起こす過程で褐色を呈するのは、アミノ・カルボニル反応の一種であるメイラード反応だと指摘されているが<sup>6)</sup>、今後は、真菌発生の予防だけでなく、発生した真菌の痕跡が褐変する諸条件を解明することで、真菌発生後の変色を予防する対策を視野に入れて検討していきたい。

本稿では、供試紙 FS に見られる褐色斑の特質を中心にまとめることを目的としたことから、ここで分離された菌株を用いた foxing の再現実験を行うにあたり、材質・製造法の異なる複数の和紙を使用した比較を試みた結果については触れることができなかった。その詳細については別途報告する予定である。また、紙の構成成分は、真菌代謝物の生成に影響を及ぼす栄養条件にあたるため、供試紙の材質分析を含めて今後の課題としたい。

### 謝辞

本報告にあたって試料を提供くださり、大変貴重なご助言も頂きました宮内庁書陵部中村一

紀先生に深謝申し上げます。記して感謝いたします。

#### 引用文献

- 1) Szczepanowska, H., : Lovett, C. M., 'A Study of the Removal and Preservation of Fungal Stains on Paper', Journal of the American Institute for Conservation, Vol. 31, Number 2, Article 1, 147-160 (1992)
- 2) Arai, H., : 'On The foxing-Causing Fungi (Microbiological Studies on the conservation of Paper and related cultural properties, Part 6)' ICOM Committee for Conservation, 8th Triennial Meeting, Sydney, 1165-1167 (1987)
- 3) 新井英夫：第2章 紙質上における微生物の増殖と代謝及び foxing の防除対策, 文化財の生物劣化とその防除に関する研究, 筑波大学博士論文, pp.16-23 (1990)
- 4) 新井英夫, 松村典孝, 村北宏之：紙質類文化財の保存に関する微生物学的研究 (第9報) 人為的 foxing の誘起, 保存科学, 29, 25-34 (1990)
- 5) 新井英夫：紙質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)
- 6) 新井英夫：紙質文化財の保存に関する微生物学的研究 (第8報) Foxing 部位の構成成分について, 保存科学, 28, 7-15 (1989)

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

## Isolation of Fungi from Foxing Paper which Shows Brown Spots in Fluorescent Areas by Black Light

Yashiho KIKKAWA, Rika KIGAWA and Masazumi SEKI\*

Microbiological deterioration is one of the major causes of the foxing formation. We observed the fluorescence of foxing spots on a series of Japanese paper made in the early Showa period. Brown spots were coincident with fluoresce spots, but the area of fluoresce spots were bigger than that of brown spots under irradiation of black light.

We isolated *Aspergillus penicilloides* from the foxing spot with DG18 plates, and inoculated the fungal strain on sterilized paper (Watman and Japanese *kozo* paper). *Aspergillus penicilloides*, which has colorless hyphae, non-brown spores and non-brown metabolite was grown on these paper in 25°C and Aw 0.85 in two months. These spots fluoresced under the irradiation of black light but were not brown. These facts may show that these foxing spots were not brown at the early stage of the growth of the fungi. On the other hand, *Eurotium herbariorum*, considered as one of fungi which cause foxing, makes brown hyphae and yellow ascocarps in the same conditions. It is necessary to clarify the conditions that make browning reaction with non-brown fungal body and metabolite of *Aspergillus penicilloides*.

---

\* Research Center of Paper Industry and Technique, Kochi prefecture