

〔報告〕 虎塚古墳石室の扉石表面に形成したバイオフィルムの微生物群集構造解析とその制御

佐藤 嘉則・木川 りか*・犬塚 将英・森井 順之・矢島 國雄**

1. はじめに

藻類、地衣類、菌類や細菌類のように固体表面に付着して生育する生物群は、屋外にある遺跡や石造文化財などの表面にしばしば群落を形成する。こうした生物群が群落を形成すると、その種類によっては物理的・化学的風化作用を促進し、表面構造の変化を引き起こす場合がある¹⁾。一般的には、大きな遺跡や石造文化財の表面に微生物等が群落を形成したとしても、その細胞の小ささ故に構造全体に与える影響は微小であると考えられ、群落の形成がすぐに遺跡や石造文化財の崩壊を招くような甚大な被害に繋がるとは考えにくい。しかしながら、遺跡や石造文化財の中には、非常に繊細で脆弱な文様（浮き彫り、線刻など）や制作当時の加工痕（ノミ痕、朱線など）、あるいは表面にごく僅かな量の顔料（彩色）を有するものもあり、構造全体の崩壊とは結びつかなくとも、表面材料の微細な損失が時としてその文化財の持つ本質的な価値を不可逆的に損なう場合がある。公開・活用に視点を向けると、こうした生物群の表面での繁茂は、色、文様、文字情報などの表面に局在する文化的価値を人々が認識することを妨げる存在となるので、直接的に物理的・化学的風化を促進していなくとも本来認識できるはずの文化的価値を認識し難くするという意味において、広義の生物劣化として位置付けられる。

茨城県ひたちなか市にある虎塚古墳では、保存公開施設内に石室を構成していた石材の一部である凝灰岩の扉石（閉塞石）が置かれ保存公開されている。この扉石はこれまで春と秋の年2回の一般公開後に微生物抑制のための処置として、石材表面に防黴剤（JEI-120、日本文化財環境研究所）が散布されてきた。しかし、平成23（2011）年11月の点検時には扉石の下部を中心に粘性のある暗色の微生物バイオフィルム様物質（以下、暗色粘性物質と表記する）とその最表面にカビ様の菌集落が分布している状況が確認された。扉石表面で微生物が旺盛な発育をしている状況は、表面に制作当時の加工痕を残す石材の劣化が懸念される。さらに、一般公開時に石材表面の鑑賞を妨げるだけでなく、見学をする人々への潜在的な健康被害も懸念される。そこで、本研究では扉石表面に生息する微生物群集を分子生物学的手法によって明らかにし、紫外線照射と物理的除去によって石材表面の生物制御を実施したので、その調査研究について報告する。

2. 虎塚古墳の公開保存施設と管理の経緯

虎塚古墳は茨城県ひたちなか市（旧勝田市）中根にある前方後円墳であり、横穴式石室内に白色下地層のうえにベンガラで描かれた彩色壁画を有する装飾古墳である²⁾。昭和52（1977）年2月に制定された虎塚古墳壁画保存の基本方針では、保存にあたっては公開を前提とすることが明記されており、それに基づいて公開を前提とした保存施設設置の基本構想が策定され、昭和55（1980）年に公開保存施設が竣工している（図1）^{3, 4)}。公開保存管理施設は、横穴式石室の

*九州国立博物館 **明治大学

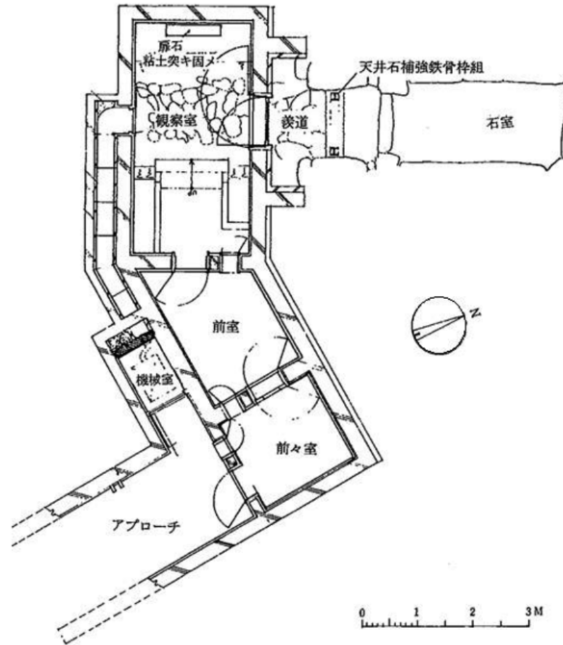


図1 虎塚古墳の公開保存施設の平面図²⁾



図2 暗色粘性物質が付着した扉石 (2011.11撮影)

開口部に設けられており、ペアガラス入りのエアータイトサッシの観察窓とその外部にステンレス製の扉の2重扉によって石室と空間を隔てたところに観察室を設け、屋外の入口部に向かって前室、前々室の合計3室から成る。各部屋の室境は断熱材を使用したステンレス製の扉によって区切られている。前々室、前室および観察室の入口付近はコンクリート製の床面であり、観察室の中央から奥は埋没する墓道の敷石を保護するために粘土系土質材料が敷かれている。調査の対象とした石室構成石材のひとつである凝灰岩の扉石は表面に加工痕を残しており、

観察室内に全体の1/3程度が粘土に埋められた状態で公開・保存されている(図2)。観察室の温湿度は、一般公開等の開放期間を除いて温度12~20℃, 相対湿度90~100%で推移している⁵⁾。

3. 扉石の表面に分布する微生物群集構造解析

3-1. 試料の採取とクローンライブラリ解析

暗色粘性物質は2011年11月14日に虎塚古墳観察室内にある扉石上部表面から採取した。試料は、あらかじめ滅菌したスパチュラにて石材表面を傷つけないよう暗色粘性物質のみを慎重に採取し、ガラスバイアルに保存して低温下(10℃以下)で持ち帰り、その後実験に供する2011年12月まで-30℃にて冷凍保存した。

微生物群集構造の解析手法として、本研究ではクローンライブラリ解析を採用した。本解析は、対象試料に含まれている複数の微生物種に由来する遺伝子(DNA)を個々に大腸菌に組み込むことによって、それぞれのDNA断片を分けて解析する方法である。すなわち、対象試料から直接抽出したDNAを鋳型としたポリメラーゼ連鎖反応(PCR)を行い、増幅された複数の微生物種に由来するPCR産物をベクターと呼ばれる遺伝子組み換え用の核酸分子にひとつひとつ組み込み(ライゲーション)、それを大腸菌に導入する形質転換を行い、形質転換した大腸菌(クローン)のコロニーを選抜して複数集めたクローンライブラリを作成する。そして各クローンからベクターに挿入されたDNA領域の塩基配列を決定し、それを基に近縁な微生物種を推定することで、微生物群集構造を明らかにする手法である。

具体的には、暗色粘性物質を一定量秤取し、Extrap Soil DNA Kit Plus Ver.2(日鉄環境エンジニアリング)を用いて、常法に従ってDNAを抽出した後、これを鋳型DNAとして、細菌を標的とした16S rRNA遺伝子および菌類を標的とした5.8S rRNA遺伝子塩基配列とその前後にある内部転写スペーサー領域(Internal Transcribed Spacer region, 以下ITS領域と略記)のPCR増幅を行った。PCR増幅は、16S rRNA遺伝子については、27fプライマー⁶⁾(5'-AGAGTTTGATC[A/C]TGGCTCAG-3')とBac1392Rプライマー⁷⁾(5'-ACGGGCGGTGTGTAC-3')を使用して、95℃で30秒間保持した後、25サイクルを95℃で15秒間、50℃で20秒間、72℃で50秒間の反応条件で行った。ITS領域については、ITS1fプライマー⁸⁾(5'-GTAACAAGGT[T/C]TCCGT-3')とITS1R⁹⁾プライマー(5'-CGTTCTTCATCGATG-3')を使用して、95℃で4分間保持した後、94℃で30秒間、55℃で60秒間、72℃で1分間を35サイクル後に、72℃で10分間の反応条件で行った。各PCR増幅産物はDNAベクターに組み込んで組換えDNAを作成し宿主である大腸菌へ導入して形質転換後に、目的のDNA断片を組み込んだクローンを選出して、特定のDNA断片を単離した。細菌および菌類でそれぞれ96クローンを選抜し、導入されたDNA断片の塩基配列解析を実施した。解読したDNA塩基配列は公共のデータベースと照合して相同性検索(BLAST検索)を行い、クローン毎に近縁な微生物種を予測した。なお、系統解析の詳細は先の報告⁹⁾に従って行ったため、そちらを参照されたい。

3-2. クローンライブラリ解析結果

細菌を対象とした解析では、80クローンから塩基配列を解読した。BLAST検索により特定された近縁細菌の種類は35属であり、*Chryseolinea*属に近縁な塩基配列(全クローンの13.8%)、*Methylococcoides*属(8.8%)、*Sphingomonas*属(8.8%)、*Dongia*属(7.5%)、*Dehalococcoides*属(7.5%)の出現頻度が高く主要な構成種であると考えられた。クローンの出現頻度が最も高かった*Chryseolinea*属は2013年に*Bacteroidetes*門*Cytophagia*綱*Cytophagales*目に属する新属新種として提唱された細菌群であり¹⁰⁾、最も相同性が高い配列は*Chryseolinea serpens*

strain RYG(NR_108511)であった(相同性93.9%-94.2%)。*Chryseolinea serpens* strain RYGは、ドイツの土壌から分離された好気性の従属栄養細菌でメタン資化性菌 *Methylocapsa aurea* の集積培養系から共存菌として分離されている¹⁰⁾。興味深いことに、次いで出現頻度の高いクローンとの近縁種は *Verrucomicrobia* 門に属する独立栄養性のメタン資化性 *Methylacidiphilum* 属菌¹¹⁾であった。しかし、クローンの塩基配列との相同性は極めて低いため(82.4%-82.6%)、新属新種である可能性が高く、異なる代謝機能を有した細菌群である可能性がある。長期間の薬剤処理を受けた石材表面に形成される細菌群集は主要な菌種が既知の種と異なる新規の種が多く、代謝機能を推定することが困難であった。さらに詳細な解析を行うためには、分離培養を検討する必要がある。

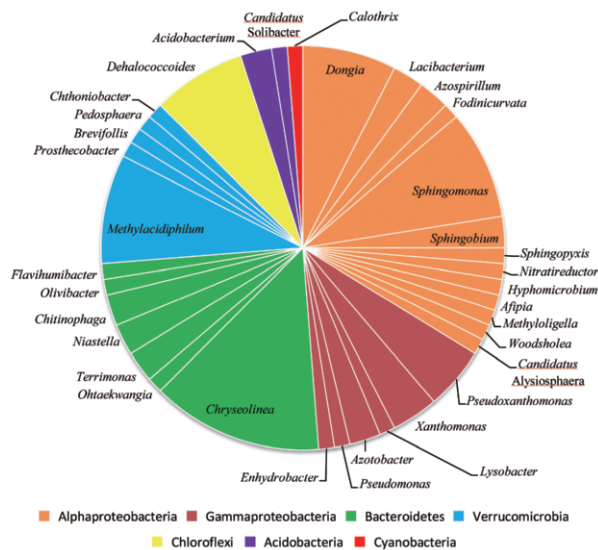


図3 クローンライブラリ解析による暗色粘性物質の細菌群集構造

菌類(カビ)を対象とした解析では、95クローンで塩基配列情報を得た。BLAST 検索により特定された近縁種は4属に集約され、*Exophiala* 属に近縁な塩基配列(全クローンの約95%)と *Cladophialophora* 属に近縁な塩基配列(約7%)の出現頻度が高く主要な構成種であると考えられた。*Exophiala* 属と *Cladophialophora* 属はキトラ古墳の石室内からも分離されており、古墳などにある石材表面を生息環境として好む性質にあることが示唆されている¹²⁾。*Exophiala* 属に近縁な塩基配列を種レベルまで調べると、すべてのクローンが *Exophiala* sp. LX M8-6 (Accession No. HE605222) と高い相同性(98.8-100%)を示した。従って、*Exophiala* sp. LX M8-6 に近縁なほぼ単一種の菌類によって扉石の表面の菌類が構成されていたと考えられる。*Exophiala* sp. LX M8-6はフランス・ラスコー洞窟の雄牛の間の壁画面に出現していた黒変部位から採取された試料から分離された菌株である¹³⁾。ラスコー洞窟では2001年に *Fusarium solani* の大規模な発生を受け、その後3年間の防黴剤の散布が行われていたが、最初の投薬から4か月後から黒変部位が出現し始めて、2007年になると黒変部位が拡大し、最も大きな微生物被害となったため、2008年から黒変部位の殺菌のため再び防黴剤散布が行われた。それでも黒変部位の制御が出来ず、物理的な除去方法が行われている¹³⁾。*Exophiala* sp. LX M8-6の集積と薬剤処理の因果関係については明らかになっていないが、本菌が薬剤に対して幅広い耐性を有しているのであれば、古墳や洞窟環境にある壁画等の現地保存を考える上で貴重な情報である

ため今後のさらなる調査研究が望まれる。

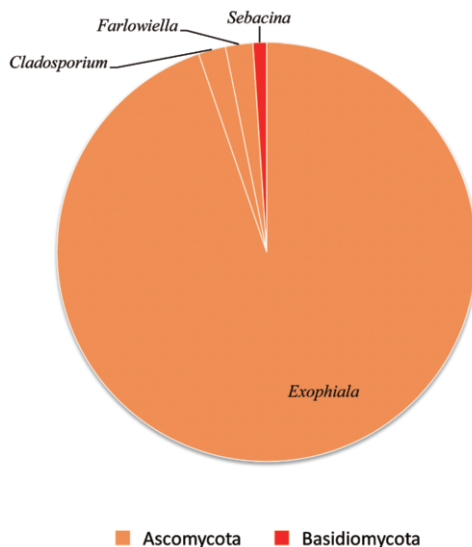


図4 クローンライブラリ解析による暗色粘性物質の菌類群集構造

4. 扉石の暗色粘性物質の制御

4-1. 扉石の紫外線照射殺菌と暗色粘性物質の呼吸量測定

菌類の群集構造解析で検出された *Exophiala* 属には、人に対して病原性を示す *Exophiala dermatitidis* が含まれている。最も近縁であった *Exophiala* sp. LX M8-6あるいは最も近縁な既知種 *Exophiala angulospora* からは、病原性に関する報告はない。しかし、*Exophiala* 属が扉石表面で旺盛な発育をしている状況は、表面に制作当時の加工痕を残す石材への生物劣化が懸念されるだけでなく、一般公開時に見学をする人々の健康被害への潜在的な悪影響が懸念されたため、扉石の殺菌処理について検討が行われた。これまで扉石の殺菌処理は防黴剤 (JEI-120) の散布によって行われてきたが、菌の発生を抑制出来ていない状況であった。この要因として、使用当初は有効であった防黴剤も長期の繰り返しの使用によって薬剤耐性を持つ菌群が選択されて集積された可能性、あるいは防黴剤に含まれる成分が微生物の栄養源となった可能性などが想定された。

微生物群集構造解析からは、細菌では一部メタン資化性 *Methylophilum* 属菌を除いて大部分が従属栄養性の細菌であり、菌類においても従属栄養性の *Exophiala* 属が大部分を占めていたため、有機物を含有する殺菌剤の使用は避け、紫外線照射による殺菌処理を選択した⁵⁾。具体的には、水中用紫外線殺菌灯 (UV-10D, 有限会社カルバ) を用い、扉石の背面から10本、全面から2本の合計12本によって波長領域が200~280 nmにある紫外線 (UV-C) を照射した後、水洗して死菌体の除去を行う方法とした。なお、この条件で1 m離れた地点の紫外線強度は29 $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ であり、予め行った *Exophiala* 属分離株の紫外線照射殺菌試験(高鳥ら, 未発表)によって十分に殺菌される照射条件とした。照射は2回行い、1回目は15.5時間の照射、2回目は20.5時間の照射を行った⁵⁾。

UV-C 照射処理によって暗色粘性物質中の微生物が殺菌されたかどうかを簡易に確認するために、扉石の同一地点の処理前後で暗色粘性物質の二酸化炭素 (CO_2) 生成速度 (呼吸速度) を

測定した。試料は滅菌したスパチュラで採取し、一定量を秤取した後、すみやかに密閉容器に加え、容器内のCO₂濃度の変化をハンディタイプCO₂計(GM70, VAISALA)にて測定した。室温で15~30分間静置し、増加したCO₂濃度を計測した。その後試料の絶乾重量(試料の絶乾重量0.37~0.86 g)を求め、1分間当たり1 g乾重量の呼吸速度として算出した。なお、採取可能な試料量が限られていたため、各処理につき1連での測定とした。

扉石から採取した試料で1回目のUV-C照射(15.5時間照射)後の呼吸速度が、同じ箇所から照射前に採取した試料の呼吸速度を上回った(図5)。この原因について、UV-C照射による殺菌処置によって死滅した菌体が、生残した微生物の栄養源となり呼吸速度が上がるという部分殺菌効果による現象と考えられた。2回目のUV-C照射(20.5時間照射)後の呼吸速度は、処理前よりもわずかに減少した(図5)。2回目のUV-C照射後の石材表面では暗色粘性物質の乾燥が非常に進んでおり、UV-C照射の効果よりも照射に伴う乾燥化の結果として呼吸速度が低下したと推察される。2回のUV-C照射後に扉石表面を水洗し、暗色粘性物質に含まれる死菌体を除去した後、残存した暗色粘性物質の呼吸速度を測定したところ、どの試料よりも呼吸速度が高くなった。これは水分供給と部分殺菌効果による呼吸速度の増加であると考えられた。これらのことから、扉石に付着した暗色粘性物質にはUV-C照射による殺菌効果は限定的であると考えられた。

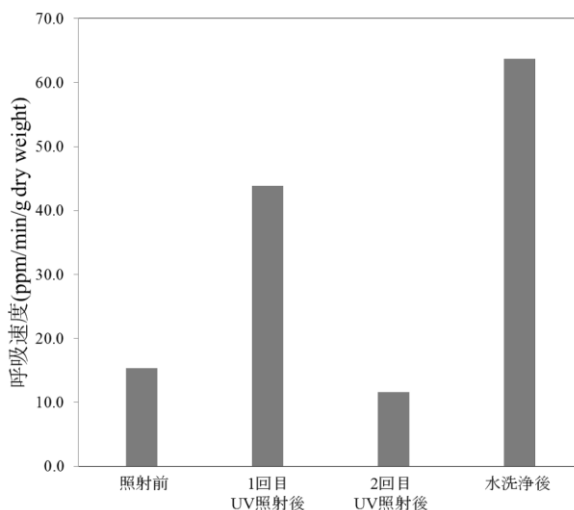


図5 扉石の紫外線照射殺菌前後の暗色粘性物質の呼吸速度変化

4-2. 暗色粘性物質の物理的除去

UV-C照射による扉石の殺菌処理の結果を受けて、扉石の暗色粘性物質の除去は手作業による物理的な除去方法が選択された。これは、毛の柔らかいブラシやプラスチック製のヘラを用いて目視で確認しながら、扉石に損傷を与えないように暗色粘性物質のみを丁寧に取り除く作業であり、これまでに2013, 2014, 2015年の3度の除去作業が実施され、大部分の暗色粘性物質が除去された(図6)。なお、物理的な除去法では扉石表面に存在する暗色粘性物質の総量は減少するが殺菌効果は全く期待できないため、仮に暗色粘性物質に病原菌が含まれるなど殺菌処理が求められる状況になった場合、物理的な除去方法以外の手法も必要になると考えられる。



図6 暗色粘性物質の物理的な除去作業後の扉石（2015.3撮影）

5. おわりに

屋外にある遺跡や石造文化財などの表面に生物群が繁茂しているとき、その生物群がそこで生育するために必要な環境因子（光，温度，湿度，有機物，無機塩類など）が不足なく揃っていることを意味している。表面における生物群集の制御を考えるとき、一般的に薬剤による処理や物理的な除去などが選択されるが、生物群の生育を支える環境因子を制御した後で処置を行わない限り、処置後に一定の期間を経て同様の生物群が再発生する可能性が高い。再発生の期間が短期間になると処置回数を増やさなければならなくなるが、度重なる処置は却って劣化を助長する危険性を孕んでいる。また、薬剤による処置は、屋内環境に比べて生物種が多様である屋外環境においては薬剤に耐性を有する生物種を集積させやすく次第に薬剤による制御効果が弱まる場合や薬剤自体が有機物として微生物の栄養源になる場合がある。このようなことを鑑みると、表面に着生した生物群集を制御しようとするとき、まずはそこに生息する生物群集を同定し、その生物種の既知情報をもとに生育に必要な環境因子を推定し、その環境因子を制御し得る新たな環境管理体制を構築した上で、その生物群を薬剤による処理や物理的な除去によって取り除くといったスキームが理想的であると考えている。

虎塚古墳の扉石で発生した暗色粘性物質は、菌類の群集構造解析の結果から従属栄養性の *Exophiala* 属が大部分を占めており、詳細に解析すると *Exophiala* sp. LX M8-6と高い相同性を示すことが明らかとなった。ラスコー洞窟で *Fusarium solani* の大規模発生の処置のために薬剤が散布されたが、本菌はその後に出現した黒変部位から採取された菌株であり、薬剤耐性を有する可能性と考えられることから、それまで石材表面に散布されてきた防黴剤への耐性を有し、薬剤処理の選択圧の中で優勢となった可能性がある。この仮説は *Exophiala* 属菌を分離して防黴剤への耐性能を確認しなければ立証することはできないが、ラスコー洞窟壁画や虎塚古墳扉石の事例からも有機物の安定的な供給源となる可能性が高い定期的な薬剤散布については、薬剤耐性菌の集積など微生物調査を定期的実施し、状況を正確に把握することが理想である。虎塚古墳の扉石に対しては薬剤散布から手作業による物理的な除去方法へと方針転換が図られたが、長期的に従属栄養生物の栄養源を枯渇させていくという意味においても微生物制御に有効であると考えている。一方で、度重なる物理的な除去は、表面に制作当時の加工痕

を残す石材の劣化を助長する可能性があるため、その道具や方法、頻度については今後も慎重に議論を行っていく必要がある。

謝辞

現地調査および本研究をまとめるにあたり、多大なるご協力を賜りました公益財団法人ひたちなか市生活・文化・スポーツ公社の稲田健一氏、ひたちなか市教育委員会の千葉美恵子氏、栗田昌幸氏、海野美信氏に深く感謝申し上げます。紫外線照射試験に際し、有益なご助言を賜りましたNPO法人カビ相談センターの高鳥浩介氏、一般財団法人環境文化創造研究所の川越和四氏、東京文化財研究所の朽津信明氏に感謝申し上げます。本研究は、JSPS 科研費 23300326「茨城県ひたちなか市虎塚壁画古墳の保存に関する総合的研究」（研究代表者：矢島國雄）および16K01186「虎塚古墳壁画の材質と保存環境に関する研究」（研究代表者：犬塚将英）の助成を受けたものです。記して感謝申し上げます。

参考文献

- 1) May E.: Stone Biodeterioration, pp221-288, *In* Mitchell, R., McNamara C. (Eds.), Cultural Heritage Microbiology: Fundamental Studies in Conservation Science, ASM press, Washington, DC (2010)
- 2) 勝田市史：別編 I 虎塚古墳、勝田市 (1978)
- 3) 史跡虎塚古墳保存整備報告書、勝田市教育委員会 (1981)
- 4) 史跡 虎塚古墳、勝田市教育委員会 (1985)
- 5) 矢島國雄編、科学研究費補助金研究成果報告書『虎塚古墳の保存科学的研究』（2014）
- 6) Marchesi, JR., Sato, T., Weightman, AJ., Martin, TA., Fry, JC., Hiom, SJ. and William, GW.: Design and evaluation of useful bacterium-specific PCR primers that amplify genes coding for bacterial 16S rRNA, *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 795-799. (1998)
- 7) Ritalahti, KM., Amos, BK., Sung, Y., Wu, Q., Koenigsberg, SS. and Löffler, FE.: Quantitative PCR targeting 16S rRNA and reductive dehalogenase genes simultaneously monitors multiple Dehalococcoides strains, *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 2765-2774. (2006)
- 8) The Japanese Pharmacopoeia 15th edition: Rapid Identification of Microorganisms Based on Molecular Biological Method, The MHLW Ministerial Notification No.285, 1741-1742. (2006)
- 9) Sato, Y., Ohta, H., Yamagishi, T., Guo, Y., Nishizawa, T., Rahman, MH., Kuroda, H., Kato, T., Saito, M., Yoshinaga, I., Inubushi, K. and Suwa, Y.: Detection of Anammox activity and 16 S rRNA genes in ravine paddy field soil, *Microbes and Environments*, 27, 316-319. (2012)
- 10) Kim, JJ., Alkawally, M., Brady, AL., Rijpstra, WIC., Damsté, JSS., Dunfield, PF.: *Chryseolinea serpens* gen. nov., sp. nov., a member of the phylum *Bacteroidetes* isolated from soil, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63, 654-660. (2013)
- 11) Op den Camp, HJM., Islam, T., Stott, MB., Harhangi, HR., Hynes, A., Schouten, S., S. M. Jetten, SM., Birkeland, NK., Pol, A., Dunfield, PF.: Environmental, genomic and taxonomic perspectives on methanotrophic *Verrucomicrobia*. *Environmental Microbiology Reports*, 1, 293-306. (2009)
- 12) 木川りか、喜友名朝彦、立里臨、佐藤嘉則、佐野千絵、杉山純多：キトラ古墳の微生物調査報告

(2012年～2013年) および2004年から2013年までの微生物調査結果概要、保存科学、54、83-109 (2015)

- 13) Martin-Sanchez, P.M., Nováková, A., Bastian, F., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C.: Use of biocides for the control of fungal outbreaks in subterranean environments: The case of the Lascaux Cave in France. *Environmental Science and Technology*, 46, 3762-3770. (2012)

キーワード：虎塚古墳 (Torazuka Tumulus)；扉石 (door stone)；付着微生物 (surface colonized microbes)；クローンライブラリ解析 (clone library analysis)；紫外線照射 (UV irradiation)

Analysis for and Treatment of the Surface Colonizing Microbes on the Door Stone of the Torazuka Tumulus

Yoshinori SATO, Rika KIGAWA*, Masahide INUZUKA,
Masayuki MORII and Kunio YAJIMA**

A processing trace left on the door stone of the Torazuka Tumulus at the time it was made is conserved in the exhibition facility built inside the burial mound of the tumulus. Although a periodic fungicidal treatment had been performed, the surface of the door stone was recently covered with microbial biofilms and fungal mycelium. Microbial colonization may cause not only biodeterioration of valuable stone surface but also disturbance of appreciation for viewers. For these reasons, culture-independent analysis was performed to reveal microbial communities in the biofilm. Furthermore, the respiration rate was measured before and after UV irradiation to assess the effect of the biofilm sterilization.

From the result of culture-independent analysis, it was found that the DNA in the biofilm contained bacterial sequences related to those of *Chryseolinea* sp. (14%) and *Methylacidiphilum* sp.(9%) and fungal sequences related to those of *Exophiala* sp. (95%) and *Cladophialophora* sp. (7%). It was found that UV irradiation treatment had almost no effect on the biofilm sterilization because the respiration rate was increased after the treatment.

Physical removal by manual labor was eventually chosen for removing the biofilm on the door stone. It was an effective method for decreasing the biofilm directly and for microbiological control in the long term by depleting the source of nutrition for heterotrophic microbes. On the other hand, repeated physical treatment has possibilities for artificial deterioration of the surface of the door stone. It will therefore be necessary to argue studiously about the tool, method, and frequency.