

〔報告〕 博物館等における ATP 拭き取り検査による カビ集落の活性評価について

間 潤 創・佐藤 嘉則

1. はじめに

博物館等での資料保存において微生物、主にカビによる被害の防止は重要な項目の一つである。博物館 IPM (Integrated Pest Management: 総合的有害生物管理) においては、展示資料や収蔵庫・展示室の設備などにおいてカビ様の汚損が見られた場合、それがカビか否か、カビであった場合には新しく発生したものか、過去に発生したカビ痕なのかによって対処が異なる。汚損がカビ集落で且つ活性が高く、今後被害が拡大・拡散する恐れがある場合には、すみやかな隔離とともにエタノールや酸化エチレン等による殺菌処置を要する。汚損がカビによるものではない場合や、カビであった場合でも死滅していたり活性が低いと判断される場合には、資料への影響が少ないドライクリーニングと温湿度管理のみで十分な場合がある。

従来、資料表面や収蔵環境の微生物汚染度の評価や殺菌処置の効果判定に培地接種法が用いられてきたが、近年では ATP 拭き取り検査が導入されるようになってきた。これまで博物館等での ATP 拭き取り検査の活用については、微生物判定、汚染分布調査などについての研究があるが¹⁾、収蔵庫等での環境において相対的な微生物汚染度評価が可能であることを示すにとどまっている。ATP 拭き取り検査によるカビ集落の判定や活性を評価する基準はなく、測定者の経験によって判断されているのが現状である。

そこで本研究では、博物館 IPM への ATP 拭き取り検査の活用に向け、博物館環境に存在するカビ集落の活性がどの程度把握できるかについて検証するとともに、活性が低いと評価できる目安を検討した。

2. 実験

博物館等で採取されたカビを培地上で培養しながら、定期的に ATP 拭き取り検査を行い、集落の ATP 発光量の経時的な変化を測定した。ATP 発光量の変化から集落の活性を評価できるかの検証を行い、博物館等における ATP 拭き取り検査においてカビ集落の活性が低いと判断できる ATP 発光量の目安を検討した。

2-1. 供試菌について

博物館内の諸環境には多くの菌種のカビが存在し、また細胞当たりの ATP 含有量は微生物によって異なり、 10^{-18} mol/cell (細菌)~ 10^{-15} mol/cell (酵母・カビ) とされている^{2,3)}。このため実験には博物館等において採取される多種のカビをそれぞれ供試する必要がある。複数の博物館収蔵庫で採取したカビを PDA (アテクト社製 CP 加ポテトデキストロース培地) を用い、約 25℃ 暗所で分離培養し供試菌とした。また災害時に外部から博物館へ持ち込まれる資料も想定し、水損紙資料に発生したカビについても同様に供試した。採取した場所と状況について表 1 に示す。

供試菌は遺伝子解析 (rDNA 5.8S ITS 領域, プライマー ITS5/ITS4⁴⁾、株式会社マクロジェ

ン・ジャパン委託), 相同性検索 (BLAST⁵⁾ 検索, NCBI/DDBJ) 及び近隣接合法⁶⁾ による系統解析 (MEGA X⁷⁾) により既知近縁種の推定を行った。なお形態観察や生理・生化学的性状試験は行っていない。

2-2. 単位面積当たりの ATP 発光量の測定

微生物の培養過程, 特に単細胞の細菌の培養において, その増殖速度の違いをもとに, 増殖相 (growth phase) としてその活性を評価することがある⁸⁾。増殖相は生菌数が増えない遅滞期 (lag phase), 急激に増殖する対数期 (log phase), 増殖と死滅が平衡し見かけ上生菌数が一定となる静止期 (stationary phase), 死滅が増殖を上回り生菌数が減少する死滅期 (death phase) に分類される。本研究では, 多細胞の糸状菌を主とした供試菌の PDA 上での集落について, 定期的な ATP 拭き取り検査により, 単位面積当たりの ATP 発光量から増殖相の変遷を検出できるかを確認するとともに, 遅滞期から静止期までを活性が高い, 生菌数が自然減少する死滅期を活性が低いと規定してカビ集落の活性を評価し, 本実験で供試したいずれの菌種であっても集落が死滅期にあると判断できる発光量を求めた。

すべての供試菌は暗所約 25℃ で 2 週間, PDA 上で前培養 (preculture) したのち, 改めて PDA 平面培地に接種し, 1 菌株につき計 15 個の巨大集落を作成した。これらを暗所約 25℃ で最大 239 日間保管しながら, 定期的に 1 集落ずつ専用スワブによる ATP 拭き取り検査を行った。ATP 拭き取り検査は 3M 社製 Clean-Trace NG Luminometer / UXL100 を用いた。測定は 1 点につき 5 回行い平均値を ATP 発光量 (RLU) とし, サンプル面積 (cm²) で除し単位面積当たりの発光量 (RLU/cm²) を算出した。なおサンプル面積は測定ごとに計測し概ね 0.1~0.2 cm² 程度であった。実験は 2 回に分けて行い, 1 回目は 30 菌株について 239 日までに 10 回, 2 回目は 33 菌株について 147 日までに 9 回の測定を行った (1 回目と 2 回目で供試菌に重複あり)。なお当初は用意した 15 回分の集落について測定を計画していたが, 諸般の都合から 9~10 回までとなった。

3. 結果と考察

3-1. 博物館環境で採取されたカビ

系統分析により推定された既知近縁種と相同性について表 1 に示す。49 菌株について既知近縁種が推定され, これらをカビ集落の活性評価における供試菌とした。なお 1 菌株については Blast 検索において相同性の弱い (89% 以下) ものしか該当しなかったため未同定株 (Fungal sp.) とした。

分離培養には主に高湿性菌の培養に用いる PDA を用いたことから, 好乾性菌用の培地を使用した場合には異なる菌種が分離培養される可能性もあるが, 今回の採取においては *Penicillium penicrioides* をはじめとした好乾性, 耐乾性とされる菌種も検出されており, ある程度は博物館環境に存在する菌種を幅広く採取しているものと考えられる。

3-2. カビ集落の活性評価

使用した ATP 拭き取り検査機器とスワブについて, 何も拭き取らない状態でのブランク値は平均 16 RLU 程度, 何も接種していない PDA 培地表面を拭き取ったバックグラウンド値は 155~310 RLU/cm² 程度であった。1 点 5 回の供試菌集落の測定において, ATP 発光量 (RLU) の測定誤差は平均で測定値の約 1.9% 程度, 最大で 18% 程度であった。また培地上の集落のサンプリング部位について, 予備実験においては集落の中心部と周辺部で ATP 発光量に差は見

表 1 供試菌の採取状況と推定された既知近縁種

	Identified species	Accession numbers	Percent Identity
(1)博物館 A 収蔵庫等エアコン吹出し口に発生したカビ	<i>Penicillium spinulosum</i>	HQ608085	98.68%
	<i>Toxicocladosporium strelitziae</i>	KM816684	100.00%
(2)博物館 B 収蔵庫壁面に発生したカビ	<i>Aspergillus versicolor</i>	MK680178	99.33%
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	MN069559	99.50%
	<i>Penicillium corylophilum</i>	MK450687	99.35%
(3)博物館 C 収蔵資料表面に発生したカビ	<i>Aspergillus glabripes</i>	KY087614	99.83%
	<i>Aspergillus penicillioides</i>	GU017496	99.69%
	<i>Aspergillus versicolor</i>	MT102847	100.00%
	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>	FR733837	99.82%
	<i>Fomitopsis pinicola</i>	KC844852	99.27%
	<i>Parengyodontium album</i>	MN592962	100.00%
	Fungal sp.		
(4)博物館 D 収蔵庫で使用されていた掃除機の ダストバッグ内塵埃から分離	<i>Alternaria alternata</i>	KY788023	99.04%
	<i>Aspergillus niger</i>	NR 111348	100.00%
	<i>Aspergillus penicillioides</i>	MH864329	99.68%
	<i>Aspergillus sydowii</i>	MK224836	99.33%
	<i>Cephalotheca foveolata</i>	KT385713	98.42%
	<i>Chaetomium globosum</i>	KM268670	99.66%
	<i>Cladosporium parahalotolerans</i>	MK910064	99.13%
	<i>Cystobasidium slooffiae</i>	AF444589	99.15%
	<i>Penicillium chrysogenum</i>	MT133788	99.82%
	<i>Perenniporia subtephropora</i>	JN048763	99.51%
	<i>Pestalotiopsis knightiae</i>	KM199310	99.67%
	<i>Toxicocladosporium irritans</i>	LN834442	99.47%
(5)寺院から博物館 D へ搬入された 木彫像に蓄積した塵埃から分離	<i>Aspergillus australensis</i>	MH857398	99.01%
	<i>Byssochlamys spectabilis</i>	KR909186	99.50%
	<i>Chaetomium gangligerum</i>	MN562086	98.51%
	<i>Coniochaeta boothii</i>	NR 159776	97.31%
	<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	MK910054	99.67%
	<i>Penicillium decumbens</i>	MK267667	98.84%
	<i>Penicillium thomii</i>	MK910061	99.00%
(6)水損紙資料に発生したカビ	<i>Alternaria alternata</i>	MN944587	99.83%
	<i>Aspergillus unguis</i>	MK224839	99.33%
	<i>Aspergillus versicolor</i>	MK680178	99.83%
	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	MH865207	99.64%
	<i>Cladosporium halotolerans</i>	KP701958	99.47%
	<i>Fusarium solani</i>	JN006817	99.83%
	<i>Lecanicillium aphanocladii</i>	KC574075	100.00%
	<i>Mucor circinelloides</i>	KY434114	99.17%
	<i>Penicillium brevicompactum</i>	MH047201	98.69%
	<i>Penicillium citreosulfuratum</i>	MK910054	99.35%
	<i>Penicillium crustosum</i>	LT558920	98.52%
	<i>Penicillium daleae</i>	NR 111503	99.82%
	<i>Penicillium glabrum</i>	MH854598	99.82%
	<i>Penicillium granulatum</i>	MN493047	99.19%
	<i>Penicillium paneum</i>	MN511352	100.00%
	<i>Penicillium rubens</i>	MN493046	99.83%
	<i>Penicillium sumatraense</i>	HM595500	100.00%
	<i>Penicillium westlingii</i>	MH864316	100.00%
	<i>Trichoderma capillare</i>	KT862523	99.53%

られなかったが、本実験では中心付近をサンプリング位置とした。

PDA 上で培養した供試菌の経時的な単位面積当たりの ATP 発光量の推移について、特徴的な一部の菌種について図 1 に示す。菌種によって増殖曲線 (growth curve) の形状に違いが見られ、遅滞期、対数期、静止期については明確に判別できないものがあるが、ATP 発光量が減少に転じる死滅期については見て取ることができた。また同種と推定された供試菌株を比較したところ、概ね同様の増殖曲線が見られていることから、実験の再現性が確認できた (図 2)。これらの結果から、本実験方法により増殖相の変遷について観察できることが分かった。

すべての供試菌について一つの図にプロットしたものを図 3 に示す。培養初期から対数期、静止期 (図中●) の単位面積当たりの ATP 発光量は $2.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^7$ RLU/cm² の範囲、死滅期 (図中○) は $1.6 \times 10^2 \sim 9.9 \times 10^6$ RLU/cm² の範囲であった。

以上の結果から供試菌の PDA 上での集落について、培養初期～静止期の発光量の範囲から、概ね 10^4 RLU/cm² 以上の時は活性が高い可能性があると評価できる。また死滅期の発光量範囲のうち、培養初期～静止期の発光量の下限である 2.0×10^4 RLU/cm² 以下であれば、いずれの菌種であっても死滅期にあるといえ、概ね 10^3 RLU/cm² のオーダーであれば活性が低いと評価できる。またバックグラウンド値から本実験条件においては 10^2 RLU/cm² 以下の場合は集落がほぼ死滅していると判断できる。

3-3. 本実験によるカビ活性評価の留意点について

本研究は限られた博物館環境で採取された菌株の集落を対象として実験を行っているため、博物館環境の菌叢と大きく異なる環境 (例えばカビ以外の微生物が多く存在する環境など) での測定については必ずしも当てはまらない可能性がある。本実験結果はあくまで“博物館環境でのカビ集落活性評価の目安”として考える必要がある。また今回の実験ではバックグラウンドとなる PDA 培地の発光量が十分に低かったが、博物館等の実際の測定においては、資料を構成する材料そのものや塵埃等による影響も考えられるため対照の測定が必要となる。なお ATP 拭き取り検査で用いる機器やスワブの種類によっては、同じ測定条件であっても発光量が異なる可能性もあり、現在継続して検討中である。

4. おわりに

本実験結果から、実際の博物館等の収蔵庫、展示室や資料表面でカビ様の汚損等が見られ、その汚損について ATP 拭き取り検査を行った場合、大まかな目安として 10^4 RLU/cm² 以上であれば、活性が高く今後被害が拡大・拡散する可能性があり、 10^3 RLU/cm² のオーダーであれば活性が低い、 10^2 RLU/cm² 以下で死滅または、汚損はカビによるものではない可能性が高いと評価できることになる。なお活性が低いと判断された場合には緊急的な薬剤処理等が必要とはならないが、カビ集落は増殖速度よりも死滅速度が速い状態であるものの、すべての細胞が死滅しているわけではなく、条件が整えば再度増殖する能力があるため、ドライクリーニング、温湿度管理、他の作品との隔離により、大規模発生や拡散のリスク低減を図る必要がある。

なお本研究は博物館環境におけるカビ集落についての活性評価を目的としており、目視で集落が確認できない場合の清浄度調査等については、実際の博物館環境等での測定・分析・評価の事例を増やし、帰納的にその ATP 発光量範囲の目安を設定していく必要がある。この点について今後も引き続き研究を続けていきたい。

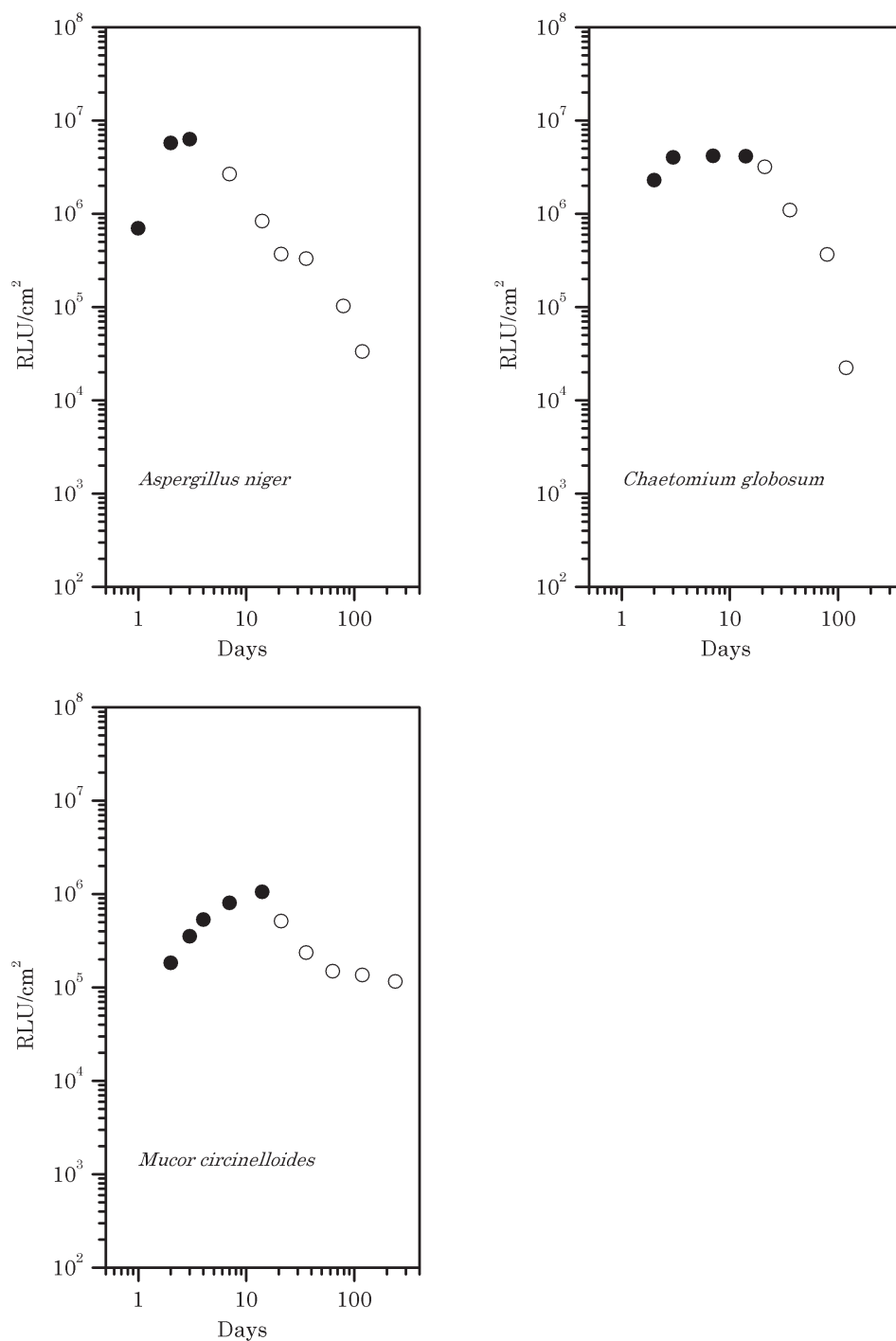


図1 供試菌（一部）の単位面積当たりの ATP 発光量の推移
培養初期から静止期までを黒点、ATP 発光量が減少に転じる死滅期を白点で示す。

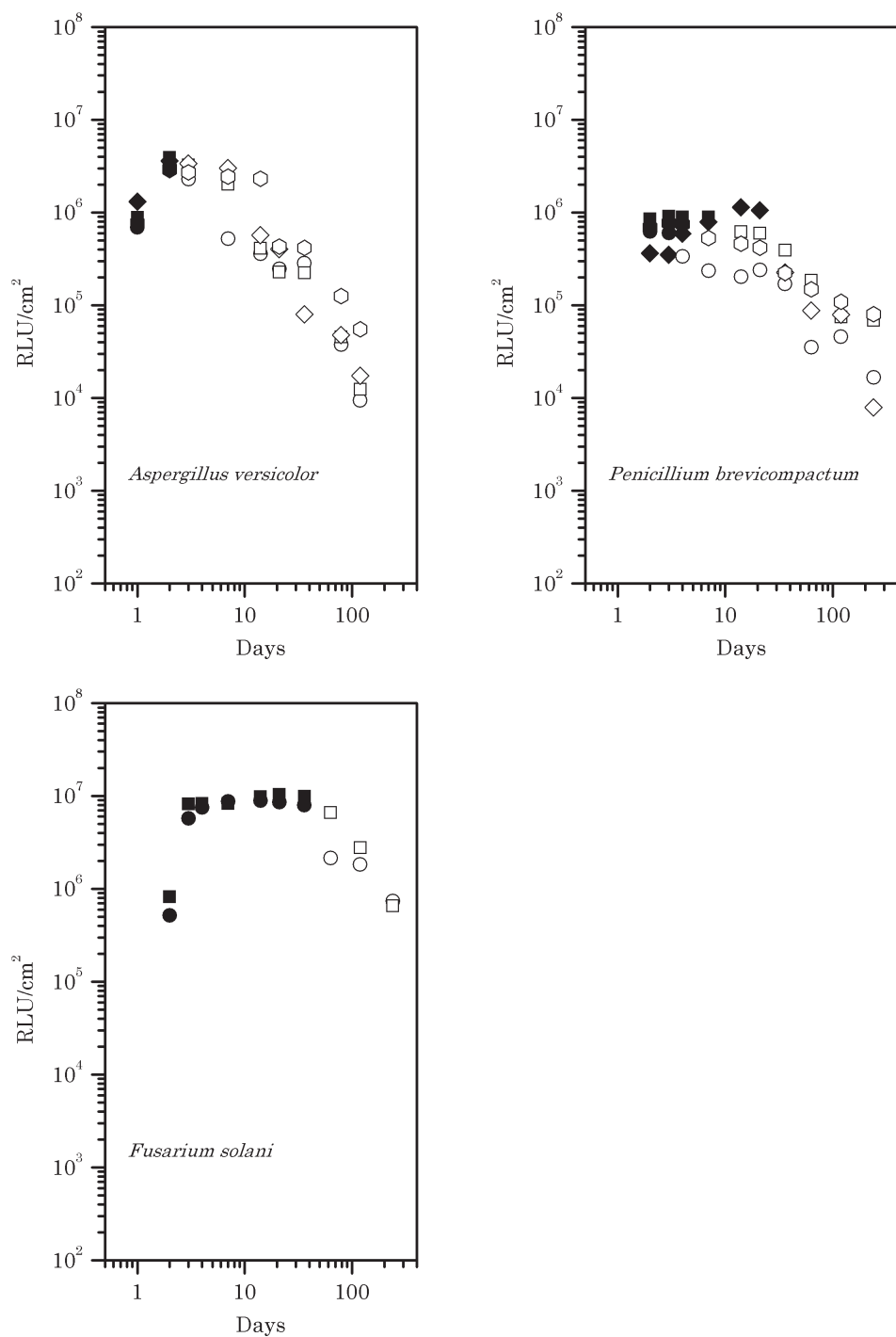


図2 同一菌種の単位面積当たりの ATP 発光量の推移の比較
培養初期から静止期までを黒点, ATP 発光量が減少に転じる死滅期を白点で示す。

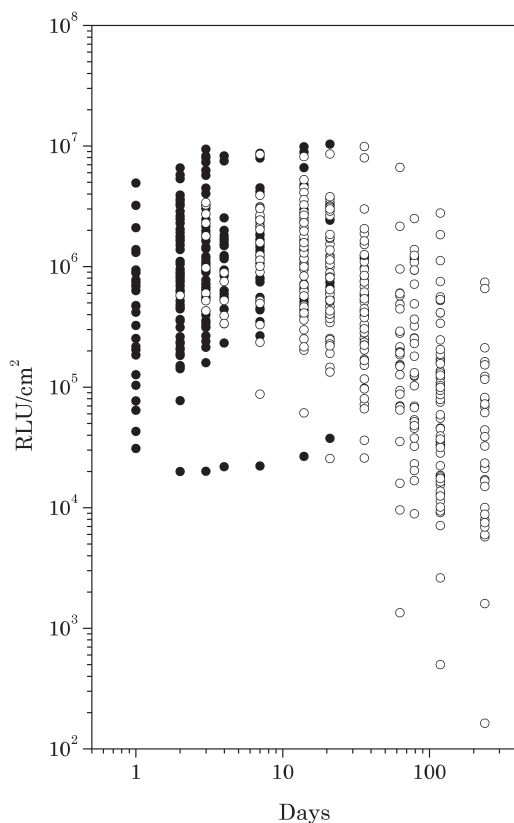


図3 すべての供試菌の単位面積当たりの ATP 発光量の推移
培養初期から静止期までを黒点, ATP 発光量が減少に転じる死滅期を白点で示す。

謝辞

本研究は, 平成30年度～平成32年度 科学研究費助成事業 (学術研究助成基金助成金) 基盤研究(C) (一般)「博物館 IPM への ATP 拭き取り検査活用に向けた基礎的な研究」(課題番号: 18K01097) による成果の一部である。また供試菌採取の一部については三重県総合博物館研究協力者制度により実施している。

参考文献

- 1) 間瀬創、佐野千絵: 文化財公開施設等における ATP 拭き取り検査の活用について、保存科学、49、1-12 (2010)
- 2) 山崎省二編『環境微生物の測定と評価』、オーム社 (2001)
- 3) 伊藤武、ATP・迅速検査研究会監修『新しい衛生管理法 ATP ふき取り検査』、鶏卵肉情報センター (2009)
- 4) White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., eds). Academic Press, New York, USA: 315-322 (1990)

- 5) Altschul, S.F., Madden, T.F., Schaeffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25, 3389-3402 (1997)
- 6) Saitou N., Nei M.: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425 (1987)
- 7) Sudhir Kumar, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, Koichiro Tamura: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6): 1547-1549 (2018)
- 8) M. T. Mdigan, J. M. Marinko, and J. Parker 『ブロック微生物学 (室伏きみ子、関啓子監訳)』、オーム社 (2003)

キーワード: ATP 拭き取り検査 (ATP rapid hygiene monitoring); 博物館 (Museum); カビ集落 (Mold colony); カビ活性 (Biological activity of mold); IPM (Integrated Pest Management)

Evaluation of the Activity of Mold Colonies in Museums Using ATP Rapid Hygiene Monitoring

MABUCHI Hajime and SATO Yoshinori

The prevention of mold outbreaks is one of the most important matters in museums. When mold-like stains are found on the surface of cultural properties or walls of storage rooms, the measures to be taken differ depending on whether the stains are mold or not, and if they are mold, whether they are newly developed or mold traces that occurred in the past.

In this study, we investigated the range of intensity of ATP luminescence, which corresponds to low mold biological activity, using ATP rapid hygiene monitoring. The changes of ATP luminescence from 63 mold strains collected from museums were measured by periodic ATP rapid hygiene monitoring, while they were incubated on PDA for 147 to 239 days.

The luminescence intensity reflected growth curves of the tested mold colonies, and the range of luminescence intensity of the death phase was evaluated. Based on the data of the experiments, ATP luminescence levels higher than 10^4 RLU/cm² can be evaluated as high in mold activity, those in the order of 10^3 RLU/cm² can be evaluated as low activity, and those below 10^2 RLU/cm² indicate the sample is not active mold or it is not mold.