

〔報告〕 キトラ古墳から分離された細菌や酵母の 修復用高分子材料に対する資化性試験

木川 りか・佐野 千絵・喜友名 朝彦*・立里 臨*・杉山 純多*²・
早川 典子・川野邊 渉

1. はじめに

これまで高松塚古墳、キトラ古墳の壁画の剝落止めや強化処置などに使用されたことのある高分子材料には、パラロイドB72、HPC（ヒドロキシプロピルセルロース）、MC（メチルセルロース）などがある。これらの高分子材料についてカビの生育度試験は行ってきた¹⁻³⁾が、古墳などの高湿度環境でカビ以外に問題になる細菌や酵母などの生育可能性については、まだ十分にデータが揃っていないといえなかった。本報告では、キトラ古墳から分離された細菌や酵母の分離株を用いて、これらの微生物が修復処置に用いられる高分子材料を栄養源として生育する可能性があるかどうかを調査した。その結果、多くの細菌株が膠、フノリなどの天然材料だけでなく、HPC、MCなどの材料も資化する場合があることがわかったので、報告する。

2. 調査方法

2-1. 壁画の剝落止め、強化処置などに使用された高分子材料サンプル

今回の試験で用いた高分子材料の一覧を表1に示す。高松塚古墳の石室内で過去に使用されたパラロイドB72をはじめ、キトラ古墳の壁画の取り外し作業の際に使用されたHPC、MCについて検討した。また、膠、フノリは石室内で使用されたことはないが、日本の伝統的絵画の修復に用いられる材料で、かつこれまで実施したカビの生育度試験でカビが生育しやすかったこともあり、今回の試験でも生育度の比較のために試験に加えた。

2-2. 高分子材料を加えた培地の調製

各高分子材料の試料の濃縮溶液を用いて、細菌の資化性試験に適用される基準⁴⁾に基づき、高分子材料の最終濃度0.1%と0.5%になるように2段階の濃度でほかの炭素源をほとんど含まない液体培地へ添加し、その液体培地中でそれぞれの細菌や酵母が生育するかどうかを調査した。また、対照として、細菌、酵母が通常炭素源として生育するグルコース（0.1%、0.5%）を添加した培地も用意し、生育の度合を比較した。

高分子材料サンプルを液体培地に加えるに当たり、濃縮溶液を調整する際、ほとんどの材料は、滅菌水に1%程度の濃度で溶解、試験上で問題がなかったが、パラロイドB72は水に溶けないため、この樹脂のみはジメチルスルホキシド（DMSO）に5%濃度でとかし、この濃縮溶液を培地に1/50容、あるいは1/10容加えることで培地を調製した。ただし、パラロイドB72の場合は、後述するように、場合によっては基本培地にこの濃縮溶液を加えたのちに樹脂が一部液体培地中で析出する場合もあった（写真1）ため、培地中には目的の濃度の樹脂が溶けていない可能性が高い。ほかの材料では、このような問題はみられなかった。

* (株)テクノスルガ・ラボ *² (株)テクノスルガ・ラボ千葉分室

表 1. 試験に用いた高分子材料

No.	高分子材料名	備考
①	パラロイド B72 (アクリル樹脂) (Rohm & Haas 社) Lot. No. 20071109	パラロイド B52は昭和50年代に高松塚古墳壁画の剥落止めに使用されていた。
②	HPC Mw.100万 (ヒドロキシプロピルセルロース) (Aldrich 社) Batch #11331MA	2004年当時キトラ古墳の壁画の取り外し作業で使用されていたもの。
③	HPC Mw.100万 (ヒドロキシプロピルセルロース) (Aldrich 社) Batch #05131JH	キトラ古墳などで使用されてきたもの。
④	HPC H (ヒドロキシプロピルセルロース) (NISSO) 2010年時点で使用しているもの	2010年時点で作業に使用されていたもの。
⑤	MC 4,000cps (メチルセルロース) (Aldrich 社) Lot No. 01616CO	キトラ古墳などで使用されてきたもの。
⑥	MC 400cps (メチルセルロース) (Aldrich 社) Lot No. 14601TC	キトラ古墳などで使用されてきたもの。
⑦	三千本膠 (にかわ)	古墳石室内の作業では使用していない。 日本画で使用されるもの。
⑧	煮だしフノリ (混合)	古墳石室内の作業では使用していない。 抽出成分をシート状に固めたもの。
⑨	精製フノリ (混合)	古墳石室内の作業では使用していない。 抽出成分をシート状に固めたもの

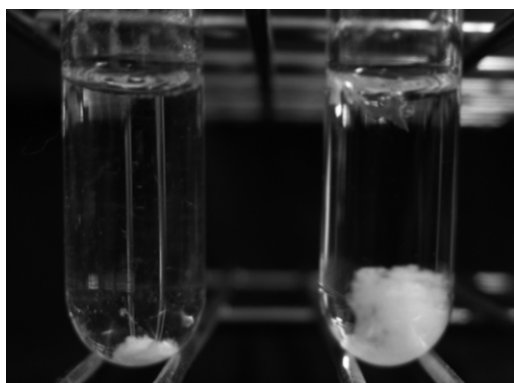


写真 1 パラロイド B72の濃縮溶液を添加したのちの Bacto Yeast Nitrogen Base 液体培地の例 (左: 0.1%, 右: 0.5%)

各種高分子材料の濃縮溶液調製濃度の検討結果を表 2 に示す。

2-3. 細菌・酵母供試菌株と試験方法

供試菌株一覧を表 3 に示す。キトラ古墳の漆喰の一部の劣化に重大な影響を与えたと推測される酢酸菌 *Gluconacetobacter* sp.をはじめとして、これまでキトラ古墳石室内、特に壁面上のバイオフィームから分離された細菌 8 菌株、酵母 4 菌株 (一部、高松塚古墳分離株を含む) を

表2 各高分子材料の濃縮溶液調製濃度の検討結果

No.	樹脂等試料名	溶媒	希釈濃度			
			0.5%	1%	5%	10%
①	パラロイド B72 (アクリル樹脂)	滅菌水	—	×	—	—
		90%エタノール	—	—	×	×
		DMSO	—	—	○	×
②	HPC Mw.100万 Batch #11331MA	滅菌水	—	○	—	—
③	HPC Mw.100万 Batch #05131JH	滅菌水	○	△	—	×
④	HPC H	滅菌水	—	○	△	—
⑤	MC 4,000cps	滅菌水	—	○	—	—
⑥	MC 400cps	滅菌水	—	○	—	—
⑦	三千本膠	滅菌水	—	○	—	—

DMSO：ジメチルスルホキシド

○：完全に溶解，△：半溶解（完全に溶解せず，やや不透明な状態），

×：不溶（溶解せず），—：未実施

用いた。また、参考としてバイオフィーム形成に関わるとされる代表的な細菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) および酵母 (*Candida albicans*) を試験に供した。

細菌は、nutrient agar (Oxoid, Hampshire, England) において、30°C で24時間前培養を行い、資化性試験の基礎培地としては、M70液体培地⁴⁾(組成の詳細は添付資料1に示す)を用い、30°C で1週間培養した。また、酵母は Yeast extract-malt extract agar (YM agar) で28°C で3日間前培養を行い、資化性試験の基礎培地としては、Bacto Yeast Nitrogen base (Becton Dickinson, MD, USA) を用い、25°C で4週間培養を行った。

3. 結果と考察

細菌の試験結果を表4に、酵母の試験結果を表5に示す。

試験は2010年、2011年の2度にわたって同じ菌株を用いて実施し、それら2回の結果を併記した。結果は、グルコースを加えた陽性コントロールの結果と比較し、目視により判定した。細菌の中には、天然材料の膠、フノリを加えた場合のみならず、HPC、MCを加えた場合にも生育し、これらの材料を資化するものもあることがわかった。なお、キトラ古墳の漆喰の一部の劣化に重大な影響を与えたと推測される酢酸菌 *Gluconacetobacter* sp.については、HPC、MCなどの高分子を資化することはなかった。2011年に実施した2回目の試験において、培養前の各高分子材料を含む液体培地の様子を写真2に、一例として *Bacillus thuringiensis* の菌株について3週間培養した後の各液体培地中での生育の様子を写真3に示した。

今回供試した樹脂の中でパラロイド B72を加えた培地では、今回調査したいずれの細菌、酵母株も生育しなかったが、この樹脂の場合は各液体基礎培地に添加した際に完全に溶解せず、白色の塊が残存する場合もあった(写真1、写真2)ため、今回の液体培地を用いた方法では、資化性を正確に試験できていない可能性もある。また、パラロイド B72のみ、濃縮溶液を DMSO

表3 供試菌株リスト

菌種名	菌株番号	分離源
細菌		
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1	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
<i>Stenotrophomonas</i> sp. (<i>S. rhizophila</i> に近縁)	K5916-3-1b	石室内 南壁朱雀上のカビ
<i>Stenotrophomonas</i> sp. (<i>S. rhizophila</i> に近縁)	K6613-3b	石室内 南壁 朱雀尾羽中央 (絵の上) 白色 塩状塊
<i>Bacillus thuringiensis</i>	K5916-1-2b	石室内 南壁朱雀 (ゲル状)
<i>Bacillus simplex</i>	K6203-10-3b	石室内 西壁下方ゲル上の塊多数 (高松塚のものに酷似)
<i>Microbacterium</i> sp. (<i>M. foliorum</i> に近縁)	K6303-8-2b	石室内 南壁朱雀
<i>Rhizobium</i> sp. (<i>R. radiobacter</i> に近縁)	K6303-8-4b	石室内 南壁朱雀
<i>Sphingobium</i> sp.	K5916-2-2b	石室内 南壁朱雀突起物
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JCM 5962 ^T	不明
酵母		
<i>Candida tumulicola</i>	T 6517-9-5 ^T	石室内 東壁右女子足元下ゲル状部分 No.④
<i>Candida</i> sp. (<i>Candida olivae</i> に近縁)	K5916-7-4y	石室内 北壁玄武下
<i>Pichia guilliermondii</i>	K7724-2-2	石室内 天井赤い着色ゲル
<i>Myxozyma monticola</i>	K8617-6-6	石室内 南壁朱雀取外し跡付近石材上の赤色080617
<i>Candida albicans</i>	JCM 1542 ^T	皮膚の患部

T: 基準株

表4 キトラ古墳石室内からの細菌分離株の各高分子材料に対する資化性試験結果

樹脂等試料名 および 培地添加 濃度 (%)	①		②		③		④		⑤		⑥		⑦		⑧		⑨		コントロール		
	パラロイド B72	HPC Mw.100万 Batch# 11331MA	HPC Mw.100万 Batch# 05131JH	HPC H	MC 4,000cps	MC 4,000cps	MC 4,000cps	MC 4,000cps	三千木膠	煮だしフノリ (混合)	精製フノリ (混合)	グルコース	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	
<i>Gluconacetobacter</i> sp. 1 K5929-2-1b	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+w/+	+w/+
<i>Stenotrophomonas</i> sp. K5916-3-1b	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>Stenotrophomonas</i> sp. K6613-3b	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>Bacillus thuringiensis</i> K5916-1-2b	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>Bacillus simplex</i> K6203-10-3b	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>Microbacterium</i> sp. K6303-8-2b	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>Rhizobium</i> sp. K6303-8-4b	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>Sphingobium</i> sp. K5916-2-2b	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> JCM 5962 ^T	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+	+/+

+ : 資化性あり, +w : 弱い資化性, - : 資化性なし
 30℃で培養, 1週間後の結果を示す。表中の結果は、「2010年実施試験結果/2011年実施試験結果」として2回の試験結果のデータを併記。

表5 キトラ古墳石室内からの酵母分離株の各高分子材料に対する資化性試験結果

菌種名 菌株番号	樹脂等試料名 および 培地添加 濃度 (%)	①		②		③		④		⑤		⑥		⑦		⑧		⑨		コントロール				
		0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	0.1	0.5	
<i>Candida lamulicola</i> T6517-9-5 [†]		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+w	-/+w	+w/w	+w/w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w
<i>Candida</i> aff. <i>oliva</i> K5916-7-4y		-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+w	-/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w
<i>Fichia guilliermondii</i> K7724-2-2		-/-	-/-	-/-	+w/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+w	-/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w
<i>Myxozyma monticola</i> K8617-6-6		-/-	-/-	-/-	+w/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+w	-/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w
<i>Candida albicans</i> JCM 1542 [†]		-/+w	-/-	-/-	+w/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/-	-/+w	-/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w	+w/+w

+ : 資化性あり, +w : 弱い資化性, - : 資化性なし
25°Cで培養, 4週間後の結果を示す。表中の結果は, 「2010年実施試験結果/ 2011年実施試験結果」として2回の試験結果のデータを併記。

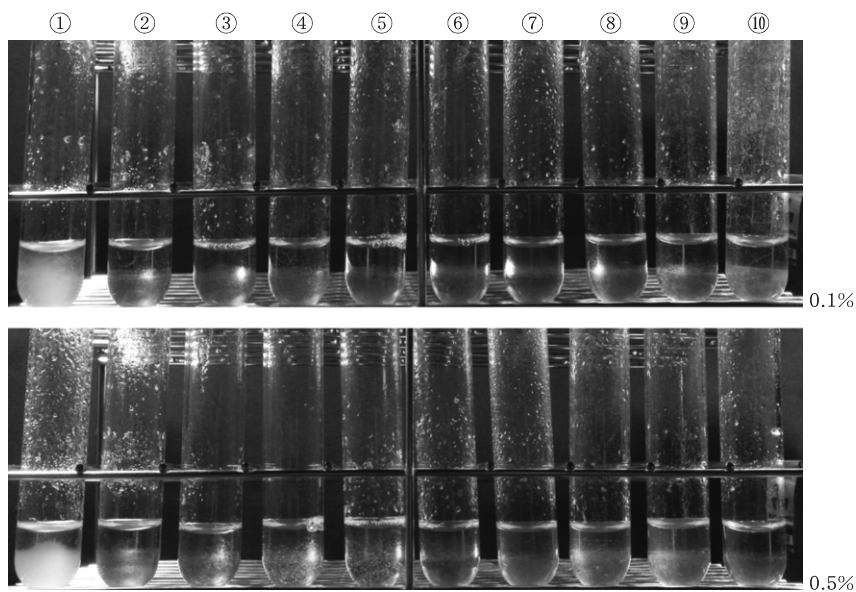


写真2 各高分子材料を含む液体培地の様子（培養前）

写真の上段：濃度0.1%，下段：濃度0.5%

左から，①パラロイドB72，②HPC Mw100万（2004），③HPC Mw100万，④HPC H，⑤MC 4000 cps，⑥MC 400cps，⑦三千本膠，⑧煮出しフノリ，⑨精製フノリ，⑩コントロール グルコース

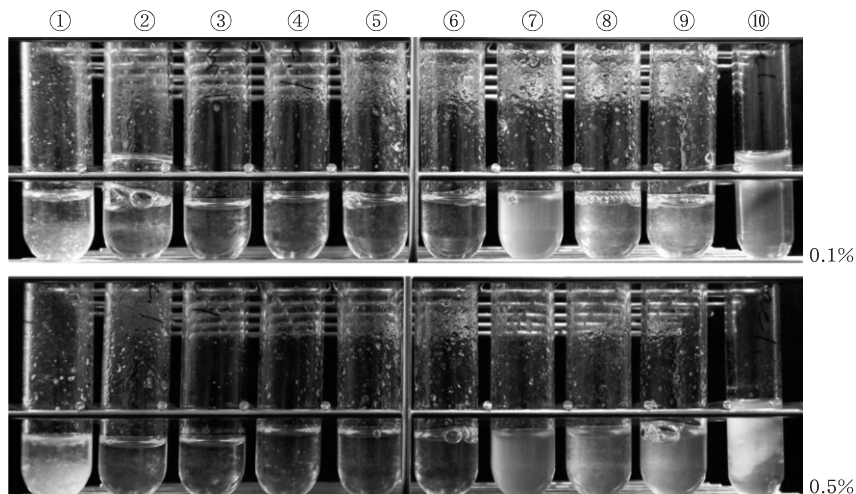


写真3 *Bacillus thuringiensis* K5916-1-2b の培養結果（培養2回目，3週間後）

写真の上段：濃度0.1%，下段：濃度0.5%

左から，①パラロイドB72，②HPC Mw100万（2004），③HPC Mw100万，④HPC H，⑤MC 4000 cps，⑥MC 400cps，⑦三千本膠，⑧煮出しフノリ，⑨精製フノリ，⑩コントロール グルコース

で調整したため、少量ではあるがDMSOを加えたことで菌株の生育に影響を及ぼした可能性についても考慮する必要がある。ただしDMSOを加えた影響については、細菌および酵母の一般的な増殖培地 (Nutrient agar/broth, YM broth/agar) にDMSOを0.1%, 0.5%, 1.0%の濃度になるように添加して、細菌、酵母の各3株を接種し、培養観察したところ、問題なく生育が認められたことから、今回の試験にDMSOの影響はないと判断される。

高分子量のHPC (Mw.100万)、高分子量のMC (4,000cps) については、同様に実施したカビの生育度をみる試験では比較的カビが生育しにくいという結果が得られていた¹⁻³⁾が、湿度が高い現場ではHPCやMCなどの材料にも生物被害が起きたという報告もある^{5,6)}。キトラ古墳の壁画の場合には、これらの高分子材料は取り外し作業の際に使用されるもので、永久に高湿度の石室内におかれるという前提のものではない。しかし、一時的に使用されるものであったとしても、細菌、酵母なども問題になる高湿度環境においては、あらゆる微生物に対して耐性があるような材料という観点を考慮すると、壁画などに適用する材料の選択は、非常に難しいことがわかる。

参考文献

- 1) 木川りか, 早川典子, 山本記子, 川野邊渉, 佐野千絵, 青木繁夫: 遺跡等で使用する樹脂のカビへの抵抗性について「保存科学」44, 149-156. (2005)
- 2) 早川典子, 中右恵理子, 木川りか, 沖本明子, 川野邊渉: 絵画表面に用いる修復材料の基礎的研究 —壁画修復を中心に—「文化財保存修復学会誌」53, 1-19. (2008)
- 3) 木川りか, 佐野千絵, 高鳥浩介, 喜友名朝彦, 杉山純多, 安部倫子, 中右恵理子, 坪倉早智子, 早川典子, 川野邊渉, 石崎武志: 高松塚古墳石室内・取合部および養生等で使用された樹脂等材料のかび抵抗性試験「保存科学」49, 61-71. (2010)
- 4) 坂崎利一, 吉崎悦郎, 三木寛二: 新 細菌倍地学口座 一下I— (第二版), 近代出版 (1995)
- 5) Karbowska-Berent, J. : Microbiodeterioration of Mural Paintings: A Review. In: R. J. Koestler, V. Koestler, A. E. Charola, F. E. Nieto-Fernandez, ed. *Art, Biology, and Conservation: Biodeterioration of Works of Art*. The Metropolitan Museum of Art, New York, pp. 266-301. (2003)
- 6) Peterson, K., Heyn, C. H. & Krumbein, W. E. : Degradation of Synthetic Consolidants Used in Mural Paintings Restoration by Microorganisms. In: A. Heritage, eds. *Conserving the Painted Past, Developing Approaches to Wall Painting Conservation, Proceedings of Journees d'Etudes de la S. F. I. I. C.*, Dijon, pp. 47-58. (1993)

キーワード: 古墳 (tumulus); 生物劣化 (biodeterioration); HPC (hydroxy propyl cellulose); MC (methyl cellulose); パラロイド B72 (Paraloid B72); 菌類 (fungi); カビ (molds); 酵母 (yeasts); バクテリア (bacteria)

<添付資料1>

M70培地組成

(炭素源利用試験培地；坂崎利一他，新細菌培地学講座，下I，第二版，近代出版 1995)

1， 2， 3を無菌的に混ぜ合わせる。

1. 基礎培地

硫酸アンモニウム	2 g
塩化ナトリウム	10g
ゲランガム	2 g
精製水	400ml
pH7.0-7.2に調製。121°C/15min	

2. 二価金属塩液

CaCl ₂ · 2H ₂ O	14.7mg
MgSO ₄ · 7H ₂ O	123mg
精製水	100ml
pH7.0-7.2に調製。121°C/15min	

3. リン酸塩液

KH ₂ PO ₄	680mg
K ₂ HPO ₄	2.610mg
金属塩溶液*	10ml
精製水	400ml
pH7.0-7.2に調製。121°C/15min	

※金属塩液

FeSO ₄ · 7H ₂ O	55.6mg
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	28.7mg
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3mg
CuSO ₄ · 5H ₂ O	2.5mg
Co(NO ₃) · 6H ₂ O	3 mg
ホウ酸	6.2mg
リン酸	960mg
精製水	1000ml

混合割合：

1. 基礎培地	400ml
2. 二価金属塩液	100ml
3. リン酸塩液	400ml
4. 超純水	100ml

Microbial Growth Tests with Consolidants of Mural Paintings: A Case Study of Bacterial and Yeast Strains Isolated from Kitora Tumulus

Rika KIGAWA, Chie SANO, Tomohiko KIYUNA*, Nozomi TAZATO*,
Junta SUGIYAMA*², Noriko HAYAKAWA and Wataru KAWANOBE

Microbial contamination on consolidants of mural paintings is a serious problem. Growth tests of fungal strains isolated from Takamatsuzuka and Kitora Tumulus on resins used for consolidation of mural paintings have been performed before, spraying fungal spores on pure layers of such resins.

But growth tests with bacterial or yeast strains could not be designed in the same way as they usually need higher water content. This time, growth of such bacterial and yeast strains was investigated in minimal liquid media which contain each of the consolidants as a major carbon source.

As a result, some bacterial strains such as *Sphingobium* sp., *Rhizobium* sp., *Microbacterium* sp., *Bacillus thuringiensis*, and *Stenotrophomonas* sp. isolated from Kitora Tumulus and *Pseudomonas aeruginosa* as a control strain, were able to grow in media containing HPC (hydroxyl propyl cellulose) or MC (methyl cellulose) as a major carbon source. But *Gluconacetobacter* sp., which was thought to have been involved in severe plaster deterioration in Kitora Tumulus, could not grow in media containing HPC or MC as a single carbon source. Most of the yeast strains tested were not able to grow in media with HPC or MC, either. All the tested microbial species, on the other hand, could grow well in media containing animal glue or *funori*.

*TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd.

²TechnoSuruga Laboratory Co., Ltd., Chiba Office