

津波による水損文化財の緊急避難措置としての低酸素濃度処理法の評価(Ⅱ) —紙製文化財に対する好気性糸状菌の活動抑制効果について—

杉山智昭

Key Words 水損文化財 (Water-soaked cultural properties)、低酸素濃度処理 (Anoxia treatment)、紙製文化財 (Paper-based assets) 糸状菌 (Filamentous fungi)、ATP (アデノシン三リン酸: Adenosine triphosphate)、AMP (アデノシン一リン酸: Adenosine monophosphate)

1 はじめに

東日本大震災においては、多種多様な素材からなる大量の文化財が津波によって被害を受けた。これらの水損文化財の中でも、特に文書・典籍、美術作品などの紙製の資料については、糸状菌による変・褪色および繊維分解による劣化が発生した場合、その修復には技術・コスト面から大きな困難が伴う。さらに、好気性生物である糸状菌は生育条件が整った場合、嫌気性生物である細菌や酵母類と比較し、効率の良いエネルギー代謝により短期間で急速に分裂し、被害を拡大させる可能性がある。特に糸状菌の生育に適した高温多湿な期間を有する日本では、微生物劣化に対して脆弱な水損紙製文化財を早急に選別(トリアージ)し安定化処理⁽¹⁾を効率的に行う必要がある。しかし、人員、処理設備、設備を稼働させるエネルギー供給の問題から、大量に発生した水損紙製文化財を短期間で安定化処理にけることは、現実問題として非常に困難である。したがって、水損紙製文化財の好気性糸状菌による急速な微生物劣化の拡大を抑止し、資料価値の毀損や情報の

喪失を最小限にとどめるため、安定化処理に至る前段階の緊急避難措置の確立が課題となっている。

前報⁽²⁾において、筆者は被災した文化財の糸状菌による劣化を遅延・抑止する緊急避難措置としての低酸素濃度処理の有効性に関し、寒天平板培地を用いた培養試験をととして、いくつかの基礎的な検討を行った。その結果、1) 低酸素濃度処理が糸状菌の発育抑制に対して即効性を有する優れた緊急避難措置であること、2) 比較的安価で汎用性が高く、繰り返し使用可能なプラスチック容器によっても資料の低酸素濃度処理が可能であることが示唆された。そこで本研究では、これらの結果をふまえ、水損紙製文化財の緊急避難措置としての低酸素濃度処理法の評価を行うため、プラスチック容器を用いた低酸素濃度処理を試み、紙製文化財に対する好気性糸状菌の活動抑制効果について、より実地に近い形で検証を行った。



写真1 津波による水損を受けた紙製文化財 (2011年)

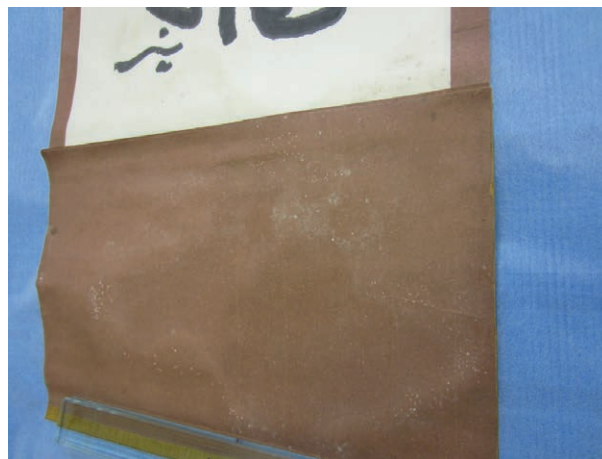


写真2 水損紙製文化財に発生した糸状菌 (2011年)

2 材料と方法

(1) 糸状菌汚染紙試料の作製

徳島県産の楮繊維を用いて紙漉きを行い、楮紙を作成した。得られた楮紙を3×3 cmのサイズに裁断し、クリーンベンチ内で表裏各20分間、殺菌灯によりUVを照射したものを基本分析試料とした。津波による水損資料からは *Penicillium* 属、*Stachybotrys* 属、*Aspergillus* 属など様々な糸状菌種が検出されることが明らかとなっているが⁽³⁾、その菌叢は発生地域の様々な環境要因によって大きく変動することも予測される。したがって本研究においては標準化の観点から日本工業規格 JIS Z2911:2010 かび抵抗性試験に規定される *Aspergillus niger* (NBRC 105649)、*Chaetomium globosum* (NBRC 6347)、*Cladosporium cladosporioides* (NBRC 6348)、*Penicillium citrinum* (NBRC 6352)、*Rhizopus oryzae* (NBRC 31005) の5種を用いて糸状菌汚染紙試料を作製した。あらかじめPDA平板培地に培養しておいた供試菌5種の各培養面から胞子を5白金耳採取し、それぞれ滅菌済みの湿潤溶液 (0.005 % スルホコハク酸ジオクチルナトリウム溶液 (W/V)) に加え振とう・分散した後、滅菌ガーゼにて濾過し、単一胞子懸濁液を調製した。この単一胞子懸濁液を10 mL ずつとり、混合して混合胞子懸濁液を調製した。調製した混合胞子懸濁液 500 μ L を基本分析試料の表面に添加し、糸状菌汚染紙試料とした。なお、糸状菌汚染紙試料についてはあらかじめ14日間の前培養を実施したものについても試験を行った。

(2) プラスチック製汎用コンテナを使用した低酸素濃度処理法

前報⁽²⁾と同様、4 mm厚のポリプロピレン製のコンテナ (内寸: 38×60×14.5 cm) の枠上部にシリコンシーラント (8051N、F☆☆☆☆: セメダイン株式会社) を塗布し、ポリプロピレン製の蓋を密着させたものを封入容器とした。容器内には ϕ 60×15 mm のプラスチックシャーレに

入れた糸状菌汚染試料 (側面のシールなし)、空気容積に基づく規定量の脱酸素剤 (RP剤Kタイプ: 三菱ガス化学㈱)、酸素インジケータ (三菱ガス化学㈱)、温湿度記録計 (計測: 20分間隔) および高湿度調整用の蒸留水300 mL を同封した。この封入容器をコントロール容器 (脱酸素剤なし) とともに23 $^{\circ}$ Cの環境下に設置し、30日間培養した。

(3) 糸状菌の活動評価

1) 表面観察

30日が経過したプラスチック製汎用コンテナをそれぞれ開封し、シャーレに入れたままの状態でご試料表面上の菌糸発育状態を肉眼および実体顕微鏡を用いて観察した。糸状菌の活動評価は試料全表面に菌糸の発育が認められない (−)、菌糸発育面積は全面積の50 % 以下 (+)、菌糸発育面積は全面積の50 % 以上 (++) の3段階で行った。

2) ATP+AMP拭き取り検査

表面観察を行った後、各試料のシャーレの蓋を開け、ただちに全表面をふき取り清浄度検査キット (ルシパックPen/ キッコーマンバイオケミファ株式会社) を用いて楮繊維を取り込まないよう穏やかにふき取り、分析用試料を採取した。分析用試料のATP+AMPの発光量 (RLU: Relative Light Unit) をルミノメーター (ルミテスター PD-30、キッコーマンバイオケミファ株式会社) で測定し、糸状菌の活動評価を行った。

3 結果および考察

1) 培養環境

培養期間終了後、プラスチック製汎用コンテナを開封し、同封したインジケータを観察した結果、コンテナ容器内の酸素濃度が0.1 % 以下に達していたことが確認された。これは前報⁽²⁾と同様に低酸素濃度空間を安定して創出する上で、プラスチック製汎用コンテナの使用が有効であることを示すものである。また、コンテナ容器内

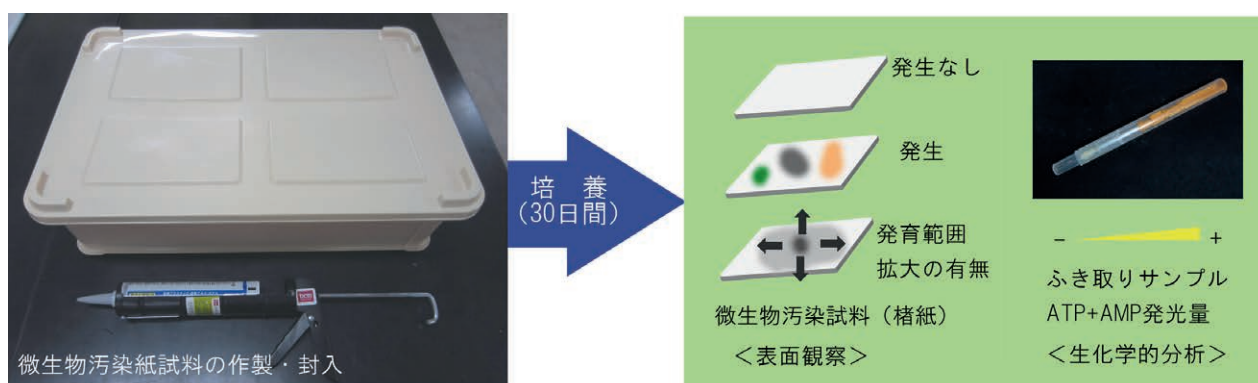


図1 プラスチック製汎用コンテナを使用した低酸素濃度処理による糸状菌の活動評価

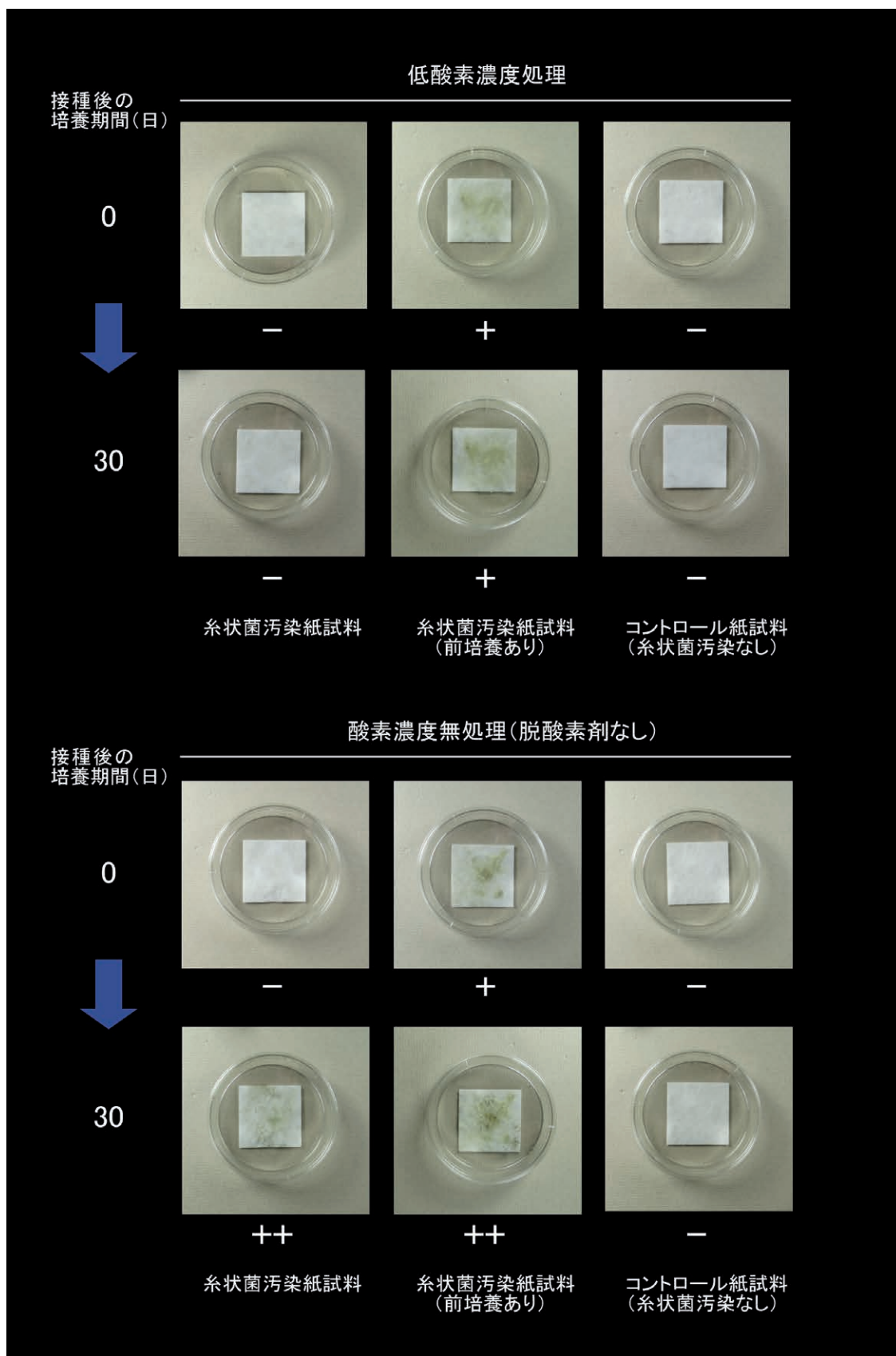


図2 プラスチック製汎用コンテナを使用した低酸素濃度処理が紙試料表面の菌糸発育へ及ぼす影響

上段：脱酸素剤あり 下段：脱酸素剤なし

凡例) —：菌糸の発育が認められない +：菌糸発育面積は全面積の50%以下

++：菌糸発育面積は全面積の50%以上

注) 糸状菌汚染：Aspergillus niger, Chaetomium globosum, Cladosporium cladosporioides, Penicillium citrinum, Rhizopus oryzae 胞子混合液使用

の温湿度については、平均値で23.4℃（標準偏差=0.3）、97.6%RH（標準偏差=0.6）となっており、培養期間中、糸状菌の生育に適した条件が安定して創出されていたことが確認された。

2) 表面観察

肉眼にて低酸素濃度処理を実施した供試試料表面を観察した結果、混合孢子懸濁液を添加した微生物汚染紙試料については、孢子が含まれていない湿潤溶液のみを添加したコントロール紙試料と同じく、培養前と培養終了後において試料表面に変化は認められなかった。また、実体顕微鏡を用いた観察では微生物汚染紙試料に添加した孢子の発芽および菌糸の発育は観察されなかった（写真3）。低酸素濃度空間への配置前に14日間の前培養を実施し、表面観察の項で定義した基準で（+）に該当する糸状菌汚染紙試料については、肉眼および

実体顕微鏡を用いた表面観察によって培養期間前後で変化は確認されなかった。発育が速い*Rhizopus*属の糸状菌については酸素濃度0.1%の条件下において、遅延傾向は認められるものの、継続した発育活動を示すことが報告されている⁽⁴⁾。前報⁽²⁾においてもPDA平板培地に接種した*R. oryze*の初期菌糸伸長を酸素濃度が0.1%以下に到達する72時間までは完全に抑制することはできなかった。しかし、本研究において接種培養基として実際の紙資料を使用した場合、*R. oryze*の孢子発芽、前培養にて活動中の菌糸の継続した発育は観察されなかった。この結果は菌の培養に至適化された培地と紙資料間での利用可能な栄養源の差異に起因するものと推測され、実際に緊急避難措置として使用する際の本低酸素濃度処理法の有効性を示すものと考えられる。さらに本研究においては、発育中の菌糸が低酸素濃度

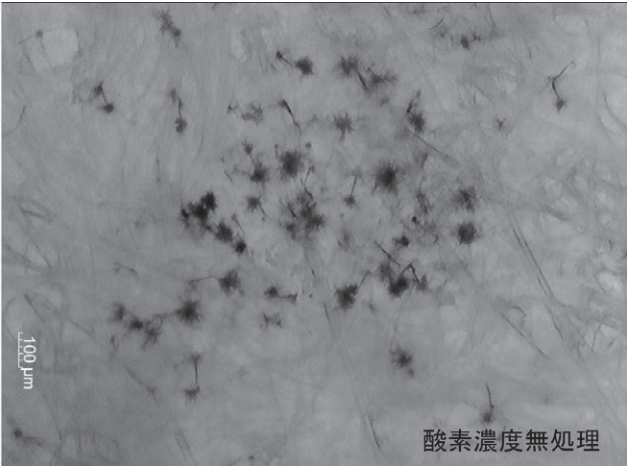


写真3 糸状菌汚染紙試料表面の実体顕微鏡観察画像

表1 プラスチック製汎用コンテナを使用した紙試料に対する脱酸素処理の糸状菌抑制効果

脱酸素剤	供試試料	30日培養後	
		菌糸の発育	RLU※(9 cm ²)
有	糸状菌汚染紙試料	—	75
	糸状菌汚染紙試料(前培養あり)	+	600
	コントロール紙試料(糸状菌汚染なし)	—	66
無	糸状菌汚染紙試料	++	4200
	糸状菌汚染紙試料(前培養あり)	++	6465
	コントロール紙試料(糸状菌汚染なし)	—	87

凡例) 図2参照
※: Relative light unit

ストレスに曝された際に想定される色素などの特別な代謝物の生産は観察されなかった(図2:上段)。脱酸素剤を封入しない酸素濃度無処理条件においては、肉眼および実体顕微鏡で微生物汚染紙試料表面を観察した結果、培養前に全表面に菌糸の発育が認められない(一)状態であった紙試料表面に菌糸発育面積が全面積の50%以上(++)と判定される菌糸の発育が認められた。14日間の前培養を実施し、コンテナ内での培養前に表面観察評価基準で(+)に該当する糸状菌汚染紙試料については、培養期間後に菌糸発育面積が全面積の50%以上(++)と判定される菌糸発育の進行が確認された(図2:下段)。

3) ATP+AMPふき取り検査

水損紙製文化財について、その表面に糸状菌の菌糸が発生している場合、その生命活動の有無、生理活性の状態に関する情報を得ることは、緊急避難措置の効果を評価する上で重要である^{(5),(6)}。本研究では、あらゆる生物種のエネルギー保存と供給に関与しているATP(アデノシン三リン酸)とAMP(アデノシン一リン酸)を指標とするATP+AMPふき取り検査を実施し、各供試試料表面(9 cm²)のふき取りから得られた分析用試料の発光量:RLU(Relative light unit)値をもとに、糸状菌の活動に関する情報を入手した(表1)。その結果、低酸素濃度処理を実施した条件において孢子を含まないコントロール紙試料の発光量測定値が66 RLUであることから、75 RLUという値が示された糸状菌汚染紙試料上の孢子については処理期間中、活動停止状態にあったものと考えられる。14日間の前培養を実施した糸状菌汚染紙試料については600 RLUという、前培養なしの糸状菌汚染紙試料、コントロール紙試料と比較して高い数値が得られている。また、酸素濃度無処理条件においては、コントロール紙試料の87 RLUに対して糸状菌汚染紙試料が4200 RLU(48倍)、14日間の前培養を実施した糸状菌汚染紙試料については6465 RLU(74倍)という数値が得られている。このRLU値の大幅な上昇は、培養期間中に供試菌の孢子発芽とその後の菌糸発育あるいは前培養から継続する菌糸発育の進行により菌糸(生体)量が増加し、それに伴って試料表面上に存在するATPとAMP総量も増加したためと考えられ、試料表面の外観観察と一致する傾向を示すことが明らかとなった。さらに14日間の前培養を実施した糸状菌汚染紙試料について低酸素濃度処理条件・無処理条件での培養後のRLUを比較すると、低酸素濃度処理条件が無処理条件の約1/11となることが示された。この結果は、プラスチック製汎用コンテナによる低酸素濃度処理を実施することで、常温下で好気性糸状菌の活動を大幅に抑制・停止可能であることを示唆

する。

本研究結果はプラスチック製汎用コンテナを使用した脱酸素処理法が糸状菌の孢子に表面が汚染された状態、あるいはすでに糸状菌の活動が活性化している状態の水損紙製文化財に対する迅速かつ有効な緊急避難措置となることを実証的に支持するものである。一方、低酸素条件下での緊急避難措置期間中においては、好気性の糸状菌と比較して緩慢ではあるが嫌気性の細菌や酵母類による劣化の進行が予測される。今後は、好気性糸状菌による劣化と嫌気性生物による劣化の影響を総合的に比較・評価しつつ、本処理方法の適切な運用期間、(安定化処理に至るまでの猶予時間)等について検討する必要がある。また、本処理方法については、木材や繊維、樹脂、石材、金属など他の素材に対する糸状菌活動の抑制効果も十分期待できるが、実際の適用にあたってはさらなる検証を要する。

4 まとめ

水損紙製文化財の緊急避難措置としての低酸素濃度処理法の評価を行うため、プラスチック製汎用コンテナを用いた低酸素濃度処理を試み、紙製文化財に対する糸状菌の活動抑制効果について、より実地に近い形で検証を行ったところ以下の項目が明らかとなった。

- 1) 糸状菌の混合孢子懸濁液を添加した楮紙試料についてプラスチック製汎用コンテナを用いた低酸素濃度処理を実施した結果、23℃で30日培養を行った後でも紙試料表面に孢子の発芽は認められなかった。
- 2) 糸状菌の混合孢子懸濁液を添加し前培養を行った楮紙試料についてプラスチック製汎用コンテナを用いた低酸素濃度処理を実施した結果、生育速度の速い菌種(*Rhizopus*属)についても、その後の継続的な菌糸発育を抑止可能であることが示された。
- 3) ATP+AMPふき取り検査により、楮紙試料表面における糸状菌の活動に関する情報を入手した結果、プラスチック製汎用コンテナを用いた低酸素濃度処理によって孢子発芽、菌糸発育が大幅に抑止されることの生化学的な裏付けが得られた。

謝辞

本研究の一部はJSPS科研費KAKENHI 23701016若手研究(B)「文化財公開施設等における汎用的な高精度微生物汚染評価システムの構築に関する研究(研究代表者:杉山智昭)」の一環として実施したものである。ここに記して謝意を表す。

引用文献

- (1) 赤沼英男・鈴木まほろ編 2014. 安定化処理 ―大津波被災文化財保存修復技術連携プロジェクト ―, 津波により被災した文化財の保存修復技術の構築と専門機関の連携に関するプロジェクト実行委員会.
- (2) 杉山智昭 2016. 津波による水損文化財の緊急避難措置としての低酸素濃度処理法の評価 ―糸状菌の活動抑制に対する効果的運用について―, 北海道博物館研究紀要 1: 19-24.
- (3) Y. Sato, M. Aoki, R. Kigawa 2014. Microbial deterioration of tsunami-affected paper-based object: A case study, *International Biodeterioration and Biodegradation* 88: 142-149.
- (4) 柳井昭二・石谷孝佑・小城年久 1980. 糸状菌の生育におよぼす酸素濃度の影響について, *日本食品工業学会誌* 27(1): 20-23.
- (5) 間瀬創・木川りか・佐野千絵 2010. 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: 1-11.
- (6) 内田優花・佐野千絵・赤沼英男 2017. 津波被災紙資料におけるATP+AMP拭き取り検査の活用, *保存科学* 56: 113-120.
- (7) 高鳥浩介 監修 2002. かび検査マニュアルカラー図鑑, 株式会社テクノシステム.

Evaluation of the Anoxia Treatment as the Emergency Measure for Cultural Properties Affected by Tsunami (II):

Inhibitory Effect against the Filamentous Fungi Growth on Paper-based Cultural Properties

Tomoaki SUGIYAMA

The earthquake and related disasters produced a large number of damaged cultural properties. Among them, water-soaked paper-based cultural properties affected by Tsunami had especially needed first aid activities which avoid the irreversible biodeterioration caused by aerobic filamentous fungi. In present study, the anoxia treatment using generic polypropylene container was conducted to evaluate the inhibitory effects against the filamentous fungi growth on paper-based cultural properties. The results are as follows:

- 1) Mulberry paper samples containing mixed spore suspensions of filamentous fungi (*Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citrinum*, *Rhizopus oryzae*: JIS Z2911 : 2010) showed that there were no germinations of

spores on the surface of paper samples for thirty days by the anoxia treatment using generic polypropylene container.

- 2) Pre-cultured test fungi on mulberry paper samples revealed that the anoxia condition in container could inhibit growth of mycelia immediately, even if rapidly-growing species of fungi (genus *Rhizopus*) was existed. Furthermore, it was showed that inhibitory effect against the filamentous fungi growth continued at least for thirty days.
- 3) Surface monitoring using ATP (Adenosine triphosphate) + AMP (Adenosine monophosphate) bioluminescence tests indicated that filamentous fungi activities on the mulberry paper samples were strictly decreased or inactivated by the anoxia treatment with generic polypropylene container.