

キトラ古墳微生物調査報告

東京大学名誉教授 杉山 純多
東京文化財研究所 木川 りか・佐野 千絵

I. キトラ古墳における微生物調査の概要

1. はじめに
2. キトラ古墳から収集したサンプルの概要
3. キトラ古墳の菌類相について
 - 3-1. 石室内外の菌類相 (2004. 6~2007. 9)
 - 3-2. 主要な菌類の正体 (アイデンティティ)
 - 3-2-1. フザリウム属
 - 3-2-2. トリコデルマ属
 - 3-2-3. アオカビ属
 - 3-2-4. 暗色系アクレモニウム属
 - 3-2-5. フィアロセファラ属
 - 3-2-6. ブルゴア属
4. キトラ古墳のバクテリア相について
 - 4-1. 石室内外のバクテリア相 (2005. 9~2007. 7)
5. キトラ・高松塚両古墳石室内壁のバイオフィルムのマイクロビオータの比較
 - 5-1. カビ
 - 5-2. 酵母
 - 5-3. バクテリア
6. まとめ

II. キトラ古墳石室内 4 サンプル (2007 年 9 月採取) に関する観察所見

I. キトラ古墳における微生物調査の概要

東京大学名誉教授 杉山 純多
東京文化財研究所 木川 りか・佐野 千絵

1. はじめに

キトラ古墳では 2004 年 1 月末から開始された石室内の調査、発掘、壁画の取り出し・保護作業に伴い、2004 年 3 月以降、石室入り口（小前室）や石室内にカビなどの微生物の継続的な発生が起きている。しかし、2005 年夏以降には、バクテリアを主体としたねばねばしたゲル状物質（バイオフィーム：菌類とバクテリアの混生体）が壁面を覆うように発生するなど、石室内の微生物の多様性は徐々に増している傾向が認められている。発掘以来、文化庁と東京文化財研究所の担当者によって定期的に微生物調査が実施されているが、我々は 2004 年 6 月以降、微生物の十分な特徴づけ、系統分類学的な同定やマイクロビオータ（微生物相、microbiota）解明を目的とし、適時石室内の微生物調査（目視レベル）とサンプル採取を行ない、同時に、定期点検の採取サンプルも加えて、微生物の分離・培養を行ない、遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析等も取り入れて、個々の微生物の特徴づけと種レベルの同定を行なってきた。本報告では採取サンプルの概要等も含め、現在までに得られた基礎データを報告する。なお、キトラ古墳内の微生物調査（同定作業）の概要は「国宝高松塚古墳恒久的な対策検討会第 11 回 資料 5、11 頁、図 1」を参照願いたい。同検討会は以下、「高松塚古墳検討会」と略記する。

2. キトラ古墳石室内外から収集したサンプルの概要

これまでキトラ古墳石室内外から微生物学的調査・研究用に 2004 年 6 月から 2007 年 9 月にまでに、石室内から 118 点、小前室（石室入り口附近含む）25 点、前室・準備室等 5 点、外（墳丘部の林および外気）3 点、総計 151 点のサンプルを収集してきた。この中、136 点のサンプルから下記に述べる微生物分離を行った。

これまで収集してきたサンプルはその基質に基づき、次のように大きく 6 種類にグループングできる（図 1）；主に壁画面から綿棒等で採取したサンプル（綿状・針状・黒粒・黒シミなど微生物のコロニー）108 点、同じく壁画面上に発生したゲル状物質（バイオフィーム）33 点、乾燥ゲル 2 点、石室内流入土などの土壌サンプル 12 点、培養平板 11 点、空中菌サンプル 18 点。

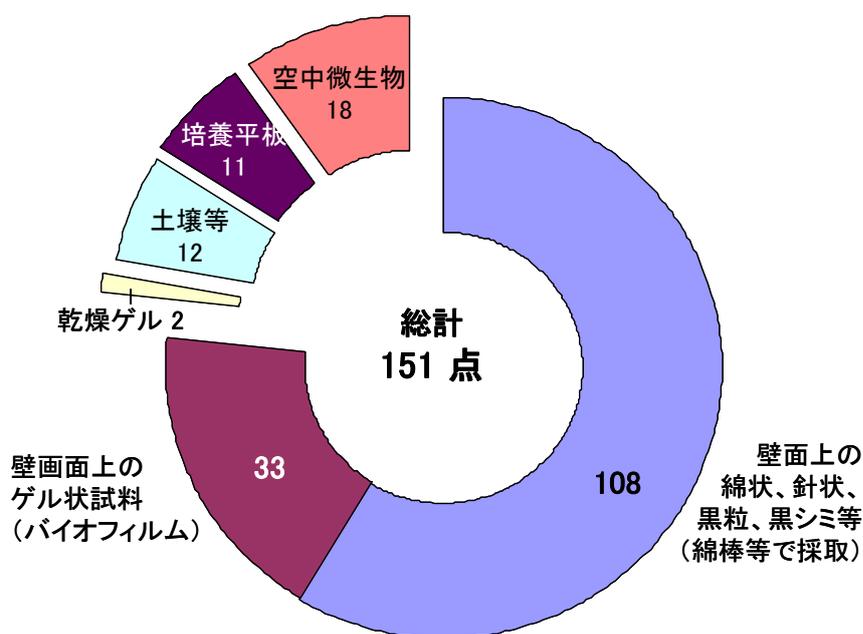


図 1. キトラ古墳から採取された微生物分析用サンプル 151 点の種類別に見た内訳 (2004 年 6 月~2007 年 9 月).

3. キトラ古墳の菌類相について

3-1. 石室内外の菌類相 (2004.6~2007.9)

2004 年 6 月から 2007 年 9 月までのキトラ古墳石室内サンプル 105 点、小前室 25 点、前室・準備室等 5 点、外気 (外気の空中微生物) 1 点の計 136 サンプルからの菌類分離作業の結果、約 60 種類 (未同定菌種含む) 計 534 株が得られた。得られた菌類分離株について石室内外の採取箇所別の主に属レベルによる分離結果を表 1 にまとめた。これまでのキトラ古墳微生物調査で得られた石室内外のサンプル数には偏りがあるため、表 1 に示す結果をそのまま比較することはできない。しかし、これまで得られたサンプルにおける構成菌類群はほぼ共通していた。また、キトラ古墳内ではアオカビ (*Penicillium*; 特に、*Penicillium* sp. 1 (詳細については後述))、明色系アクレモニウム (*Acremonium*; 特に、*Acremonium* sp. 1 (cf. *strictum*))、フザリウム (*Fusarium*)、トリコデルマ (*Trichoderma*) の 4 属が石室内における優占菌類群であった。

キトラ (2004.6~2006.12)・高松塚 (2004.5~2006.12) 両古墳石室内の菌類相の比較を表 2 にまとめた。表 2 に示す通り、キトラ古墳ではアオカビ、明色系アクレモニウム、トリコデルマの 3 属および酵母が主要菌類群として分離された。一方、高松塚古墳ではアオカビ、フザリウム、グリオクラディウム (*Gliocladium*)、トリコデルマの 4 属および酵母が分離されるなど、その構成種には共通性が認められるものの、相違が認められた。

表 1. キトラ古墳から分離された菌類のサンプリング箇所別（石室内、小前室、前室・準備室等、外気空中微生物）に見た出現状況（2004.6～2007.9）*。

	石室内	小前室	前室・準備室等	外気	計
<i>Penicillium</i> sp. 1	52	4	5	1	62
<i>Penicillium</i> spp.	60	12	17		89
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) spp.	9	3			12
<i>Acremonium</i> sp. 1 (<i>A. cf. strictum</i>)	29	1			30
<i>Acremonium</i> spp.	23	3	1		27
<i>Fusarium</i> spp.	18	11			29
<i>Trichoderma</i> spp.	26	18			44
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	3	1			4
<i>Gliocladium</i> spp.	17	1			18
<i>Cladosporium</i> spp.	15	2	5		22
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	6				6
<i>Verticillium</i> spp.	6				6
<i>Phialocephala cf. phycomyces</i>	7	2			9
<i>Phialocephala</i> spp.	2				2
<i>Burgoa</i> sp. (ana. <i>Sistotrema</i>)**	15				15
<i>Ophiostoma</i> sp.	3				3
Bionectriaceae group	2	1			3
<i>Alternaria</i> sp.				1	1
<i>Arthrinium</i> sp.				1	1
<i>Arthrobotrys</i> sp.	3				2
<i>Aspergillus</i> spp.	1	3	3		7
<i>Dactylaria</i> sp.	2				2
<i>Phialophora</i> sp.	1				1
<i>Phoma</i> sp.	1				1
<i>Sporothrix</i> sp.	1	1			2
<i>Scytalidium</i> -like sp.			1		1
<i>Zygosporium masonii</i>	1				1
Yeasts spp.	44	9	3		56
Unidentified spp.	61	4	8	3	76
分離株数(計)	408	76	43	6	533
分離作業サンプル数	105	25	5	1	136

* 表中の数値は分離株数を示す。

** *Burgoa* は担子菌類 *Sistotrema* のアナモルフ属。

表 2. キトラ古墳石室内（2004.6～2006.12）と高松塚古墳石室内（2004.5～2006.12）
における菌類相の比較*.

	高松塚古墳 (2004.5-2006.12)	キトラ古墳 (2004.6-2006.12)
<i>Penicillium</i> sp. 1	76	46
<i>Penicillium</i> spp.	45	57
<i>Fusarium</i> spp.	48	18
<i>Trichoderma</i> spp.	22	24
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) spp.	33	8
<i>Acremonium</i> spp.	4	22
<i>Gliocladium</i> spp.	30	13
<i>Cladosporium</i> spp.	9	12
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	9	5
<i>Arthrobotrys</i> sp.	3	3
<i>Aspergillus</i> spp.	3	1
<i>Verticillium</i> sp.	3	5
<i>Phialocephala phycomyces</i>	1	5
<i>Monocillium</i> -like sp.	1	-
<i>Oidiodendron</i> sp.	1	-
<i>Phialocephala</i> sp. (<i>P.</i> cf. <i>humicola</i>)	3	-
<i>Rhinochrysiella</i> -like sp.	1	-
<i>Sporotrichum</i> sp.	6	-
<i>Acremonium</i> sp. 1 (<i>A.</i> cf. <i>strictum</i>)	-	26
Bionectriaceae group	-	2
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	-	4
<i>Dactylaria</i> sp.	-	2
<i>Sporothrix</i> sp.	-	1
<i>Zygosporium masonii</i>	-	1
<i>Ophiostoma</i> sp.	-	1
<i>Burgoa</i> sp. (ana. <i>Sistotrema</i>)**	-	5
Unidentified spp.	50	47
Yeasts spp.	78	38
分離株数(計)	426	346
サンプル数	90	84

* 表中の数値は分離株数を示す。

** *Burgoa* は担子菌類 *Sistotrema* のアナモルフ属。

3-2. 主要な菌類の正体（アイデンティティ）

キトラ古墳石室内の汚染・劣化にかかわる主要なカビのそれぞれの正体（アイデンティティ）について簡単に述べる。なお、酵母については後述する（5-2. バイオフィルムの項参照）。

3-2-1. フザリウム属

これまでキトラ（2005.2~4）・高松塚（2004.5~9）両古墳の石室内外から分離されたフザリウム属（*Fusarium*）24株の EF-1 α 遺伝子を用いた分子系統解析の結果、分離株は大きく *Haematonectria haematococca* / *Fusarium solani* species complex (FSSC) クレード（単系統群, clade）と *Gibberella* クレードに収容された（「高松塚古墳検討会第11回 資料5、13頁、図5」参照）。キトラ古墳内小前室からの2分離株は後者クレード内の *Fusarium oxysporum* species complex に帰属した。*F. oxysporum* species complex クレードに位置する菌類群はキトラ古墳の小前室内の土壌表面に紫色のコロニーを形成していたサンプルからのみ分離されており、高松塚古墳からは分離されていない。このことはキトラ古墳小前室内が土壁で覆われ、かつ、植物の腐朽根等が認められるなど、周辺の土壌環境に直に接していることと関係があるのではないかと考えられる。一方、*Haematonectria haematococca* / FSSC クレードにはキトラ・高松塚両古墳分離株が含まれていた。両古墳分離株は同クレード内で系統的（遺伝的）に離れているものの同一種であると考えられた。また、同クレードに含まれる分離株の多くはキトラ・高松塚両古墳の石室内壁面から分離されていることから、壁画劣化の主要な菌類の一つと考えられた。また、同クレード内の分離株はフランスのラスコー洞窟から分離（2002、2004~2005年）、同定された FSSC LSP1-LSP3（J. Dupont et al. 2007. *Mycologia* **99**: 526-533）と分子系統学的に近縁性が示唆されたことから、両壁画・壁面の生物劣化を考察する上で興味深い一群である。FSSC は土壌環境から普通に分離される土壌菌類の仲間であることから、石室周囲の土壌から石室内部へ侵入してきた可能性が考えられるが、この一群にはヒトの臨床分離株（clinical isolates）が含まれることが最近報告されているので、今後の課題として両者をさらに深く比較分析したいと考えている。

3-2-2. トリコデルマ属

これまでキトラ（2005.2）・高松塚（2004.5）両古墳の石室内外から分離されたトリコデルマ属（*Trichoderma*）18株の EF-1 α 遺伝子を用いた分子系統解析の結果、大きく土壌からの分離例が多く知られている *Harzianum-Virens* クレード、*Viride* クレードおよびセルラーゼ生産種（たとえば *T. reesei*）を含む *Trichoderma* 属 *Longibrachiatum* 節に分かれた（「高松塚古墳検討会第11回 資料5、13頁、図6」参照）。*Harzianum-Virens* クレードにはキトラ・高松塚両古墳の石室内外（キトラの小前室、高松塚の取合部含む）の分離株が共通して含まれており、両古墳石室内の壁画劣化に関与している可能性が考えられた。一方、*Viride* クレードに位置した4菌株はキトラ古墳石室内の流入土および小前室の土壌サンプルから分離されたのみで、高松塚古墳では分離されていない。同じく、*Trichoderma* 属 *Longibrachiatum* 節の1株もキトラ古墳内の小前室からのみ分離されていることから、両クレードの仲間は *Harzianum-Virens* クレードのそれらに比べて壁画劣化に関与している可能性が低いと考えられた。トリコデルマ属は土壌環境から普通に分離される土壌菌類の仲間であることから、石室周囲の土壌から何らかの手段によっ

て石室内部へ侵入してきた可能性が考えられる。

3-2-3. アオカビ属

キトラ・高松塚古墳の石室内外のサンプルから分離された菌類の中でアオカビ属 (*Penicillium*) は主要なカビの一つである。そこで、分離株数キトラ・高松塚両古墳サンプルのアオカビ属の中で、最も多く分離された *Penicillium* sp. 1 の中から代表分離株 13 株 (キトラ 6 株、高松塚 7 株) 選び、それらの 28S rDNA、ITS 遺伝子の塩基配列を決定し、系統解析を行ったところ、*Penicillium* 属 *Roqueforti* 節に帰属することがわかった。さらに β -tubulin 遺伝子による分子系統解析を行った結果、「高松塚古墳検討会第 11 回 資料 5、14 頁、図 7」参照の分子系統樹で示しているとおりアオカビ属 *Roqueforti* 節 (本節にはブルーチーズ製造にかかわる *P. roqueforti* が含まれる) に帰属する *P. paneum* とクレード (単系統群) を形成した。更に *Penicillium* sp. 1 の培養的・形態学的形質および分子系統学的データの統合的解析から、*Penicillium* sp. 1 は *P. paneum* Frisvad と同定した。*P. paneum* はカビに汚染されたライ麦パン等、食品からの分離報告例が知られ、土壤環境からの報告例はほとんど皆無である。今回のように文化財の生物劣化と関係づけた古墳環境サンプルからの分離報告は今回が初めてとなる。

3-2-4. 暗色系アクレモニウム属

2006 年 5 月以降、高松塚古墳石室内の壁面に“黒い染み”の原因微生物とされた暗色形アクレモニウム属 [*Acremoium* (sect. *Gliomastix*)] の発生が目立ち始めた時期と前後して、キトラ古墳石室内壁面でも黒カビの発生が目立ち始めていた。キトラ古墳石室内においては、2006 年 3 月以降、2006 年 3 月に東壁の黒色とげ状サンプル、同年 6 月天井部の黒いカビ様の汚れサンプル、同年 10 月北壁と南壁の黒い粉状・スス状、2007 年 5 月北壁東側上方の黒スス状サンプルから暗色系アクレモニウム属が分離された。キトラ古墳石室内から分離された暗色系アクレモニウム属は表現型 (形態) および遺伝子型 (28S rDNA 塩基配列データ) 両形質から、高松塚古墳石室内の分離株とは異なる数種類 (または複数の系統) から構成され、その多様性が検出された (「高松塚古墳検討会第 11 回 資料 5、14 頁、図 8」参照)。

3-2-5. フィアロセファラ属

2004 年 9 月に小前室に突き出した石室天井石の表面に大量の針状のカビが発生した。このカビについて形態観察および 28S rDNA 塩基配列に基づく分子系統学的解析の結果、フィアロセファラ属 (*Phialocephala*) の 1 種だと同定できた (「特別史跡キトラ古墳の保存・活用等に関する調査研究委員会 (第 8 回)」資料 5 参照)。

3-2-6. ブルゴア属

2006 年 4 月に石室内天井部の天文図附近に大量の“黒色カビ (黒粒)” の発生が認められた。このカビについて形態観察および 28S rDNA 塩基配列に基づく分子系統学的解析の結果、担子菌門アンズタケ分岐群 (Cantharelloid clade) のアナモルフ菌類であるブルゴア属 (*Burgoa*) の 1 種と同定した。詳細については「特別史跡キトラ古墳の保存・活用等に関する調査研究委

員会（第9回）」資料6-4を参照のこと。

4. キトラ古墳のバクテリア相について（2005.9～2007.1）

キトラ古墳石室内（一部盗掘口を含む）より、2005年9月から2007年1月までに採取されたサンプル43点（細菌未分離サンプルを除く）におけるバクテリア相（細菌相、bacteriobiota）を表3に示す。キトラ古墳全体のバクテリア相はプロテオバクテリア門、アクチノバクテリア門（*Actinobacteria*）、バクテロイデテス門（*Bacteroidetes*）およびファーミキューテス門（*Firmicutes*）など非常に多様性に富んでいる。これらバクテリア相の中でも、アルファプロテオバクテリア綱（*Alphaproteobacteria*）に属する *Rhizobium* sp. (aff. *radiobacter*) およびガンマプロテオバクテリア綱（*Gammaproteobacteria*）に属する *Stenotrophomonas* sp. 1 (aff. *rhizophila*) が非常に高い分離頻度を示しており、これらがキトラ古墳における優占細菌群であると言える。バイオフィームに限った場合においても、これらの分類群は分離頻度が高い。その他では、バイオフィームからのみ分離された分類群としてアルファプロテオバクテリア綱のリゾビアル目（*Rhizobiales*）と、スフィンゴモナダシー科（*Sphingomonadaceae*）、ファーミキューテス門のバチルス属（*Bacillus*）などが挙げられる。

表 3. キトラ古墳石室内から分離されたバクテリアの各分離株の推定分類群とその分離頻度。

サンプルNo.	総分離株数	K5916										K5902		K5929			K6117			K6120				
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	1	5	7	8	9	1	2	3	1	2	3	4	
		南壁			西壁		北壁			東壁	北面	閉塞石	北壁	北壁	西寄り天井			天井	北壁	石室内				
		朱雀			北寄り		玄武下			南寄り			濃緑	濃緑色しみ	漆喰穴②	漆喰穴③	漆喰穴④	黒色の穴	玄外し	土壌				
	ゲル状	突起物	カビ	緑のカビ	白いゲル	緑のカビ	濃緑ゲル状	泥の上	レーヨン紙	粘性物	ろ紙上	粘状	黒色物質	黒色物質	黒色物質		白綿状カビ	東壁南寄	東壁北寄	南壁朱雀下	流入土	流入土	流入土	
Alphaproteobacteria	37																							
Rhizobiales	24																							
<i>Rhizobium</i> sp. (aff. * radiobacter)	19		●	●	●	●	●	●	●	●	●	●												
<i>Bosea</i> sp.	2																							
<i>Phyllobacterium</i> sp. (aff. myrsinacearum)	1																							
<i>Rhizobiaceae</i> bacterium	1																							
<i>Rhizobiales</i> bacterium	1																							
Rhodospirillales	6																							
<i>Gluconacetobacter</i> sp.	3													●	●	●								
<i>Inquilinus</i> sp.	1																							
<i>Acetobacteraceae</i> bacterium	2																							
Sphingomonadales	7																							
<i>Sphingobium</i> sp. 1	2		●								●													
<i>Sphingobium</i> sp. 2	1											●												
<i>Novosphingobium</i> sp. 1	2	●	●																					
<i>Novosphingobium</i> sp. 2 (aff. subarcticum)	1										●													
<i>Sphingomonadaceae</i> bacterium	1																							
Gammaproteobacteria	19																							
Xanthomonadales	19																							
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 1 (aff. rhizophila)	15			●	●			●			●													
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 2 (aff. maltophila)	1																							
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. (aff. mexicana)	3										●													
Actinobacteria	15																							
Micrococciinae	10																							
<i>Microbacteriaceae</i> bacterium	3																	●	●	●				
<i>Leifsonia</i> sp. (aff. shinshuensis)	1																							
<i>Microbacterium</i> sp. (aff. foliorum)	3																							
<i>Promicromonospora</i> sp. (aff. sukumoe)	3																							
Streptomyces	5																							
<i>Streptomyces</i> sp. 1	4				●																			
<i>Streptomyces</i> sp. 2	1																							
Bacteroidetes	10																							
Sphingobacteria	5																							
<i>Pseudosphingobacterium</i> sp. 1 (aff. domesticum)	3										●													
<i>Pseudosphingobacterium</i> sp. 2 (aff. domesticum)	2																							
Flavobacteria	5																							
<i>Chryseobacterium</i> sp.	5			●		●	●	●	●															
Firmicutes	14																							
<i>Bacillus</i> sp. 1 (aff. thuringiensis)	1	●																						
<i>Bacillus</i> sp. 2 (aff. altitudinis)	5																				●	●	●	
<i>Bacillus</i> sp. 3 (aff. simplex)	6																							
<i>Bacillus</i> sp. 4	1																							
<i>Bacillus</i> sp. 5	1																							
分離株数(計)	95	2	3	3	3	2	2	3	2	3	4	3	1	1	2	1	1	1	2	1	1	1	1	

5. キトラ、高松塚両古墳石室内壁のバイオフィルムのマイクロビオータの比較

石室内壁面上のゲル状物質、すなわちバイオフィルム (biofilm) は壁画汚染を考える上で重要である。キトラ古墳から採取されたゲル状サンプル (バイオフィルム) について、光学顕微鏡観察の結果、菌類 (カビ、酵母) の菌糸や孢子塊 (おそらく分生子)、バクテリアの細胞が混在している状態が明瞭に観察された。そこで、ここではキトラのバイオフィルムサンプルと高松塚古墳から得られたデータとを対比して、カビ、酵母、バクテリア別に述べる。

5-1. カビ

キトラ古墳石室内の壁画面に発生したバイオフィルムサンプル33点 (2005.9~2007.9) と高松塚古墳石室内の壁画面に発生した35点 (2004.7~2006.12) における菌類相の比較を表3にまとめた。キトラ古墳ではアオカビ、明色系アクレモニウムの2属および酵母が主要菌類群として分離された。一方、高松塚古墳ではアオカビ、フザリウム、グリオクラディウム (*Gliocladium*) 3属および酵母が分離されるなど、その構成種には相違が認められた (表4 参照)。

表4. キトラ・高松塚両古墳石室内壁に発生したバイオフィルムの菌類相の比較*。

	高松塚古墳 (2004/7-2006/12)	キトラ古墳 (2005/9-2007/9)
<i>Penicillium</i> sp. 1	35	19
<i>Penicillium</i> spp.	15	12
<i>Fusarium</i> spp.	23	4
<i>Gliocladium</i> spp.	15	6
<i>Acremonium</i> (sect. <i>Gliomastix</i>) spp.	6	1
<i>Cladosporium</i> sp.	5	8
<i>Paecilomyces lilacinus</i>	5	5
<i>Arthrotrys</i> sp.	2	3
<i>Phialocephala</i> spp.	2	7
<i>Aspergillus</i> spp.	1	—
<i>Monocillium</i> -like sp.	1	—
<i>Rhinocladiella</i> -like sp.	1	—
<i>Acremonium</i> sp. 1 (A. cf. <i>strcitum</i>)	—	9
<i>Acremonium</i> spp.	—	16
<i>Trichoderma</i> spp.	—	9
<i>Cylindrocarpon</i> sp.	—	2
<i>Ophiostoma</i> sp.	—	2
<i>Phialophora</i> sp.	—	1
<i>Phoma</i> sp.	—	1
<i>Verticillium</i> sp.	—	1
<i>Zygosporium masonii</i>	—	1
<i>Burgoa</i> sp. (anam. of <i>Sistotrema</i>)	—	1
Unidentified hyphomycetes spp.	25	35
Yeasts spp.	28	26
総分離株数	172	169
サンプル数	35	32

* 表中の数値は分離株数を示す。

5-2. 酵母

キトラ・高松塚両古墳の石室内壁石面に発生したバイオフィルムより分離した酵母の種類は、両古墳間で異なった（高松塚古墳検討会第11回資料5、16頁、図12参照）。キトラ古墳のバイオフィルムより比較的高頻度で分離された酵母は、キトラ古墳新種1および *Pichia guilliermondii* であり、高松塚古墳のバイオフィルムより比較的高頻度で分離された酵母は、子囊菌系酵母の *Candida tumulicola*, *Candida takamatsuzukensis*, *Pichia membranifaciens* などである。キトラ古墳のバイオフィルムから比較的高頻度で分離されたキトラ古墳新種1は、これまでに昆虫からの分離報告例が多い *Candida membranifaciens* クレードに位置づけられた。

5-3. バクテリア

高松塚・キトラ両古墳の石室内壁面のバイオフィルムから分離されたバクテリア（2005.9～2007.4の採取サンプルから分離）の16S rDNA（SSU rRNA 遺伝子）に基づく分子系統学的位置の違いを比較解析した（高松塚古墳検討会第11回資料5、16頁、図13参照）。両古墳壁面上に発生したバイオフィルムの構成分類群を比較すると、両古墳共に多様性に富んでいることが分かる。しかし、それぞれにおいて構成する分類群には明確な違いが認められた。特徴的な分類群としては、ガンマプロテオバクテリア綱に属する *Stenotrophomonas* 属では、高松塚古墳は *S. maltophilia* に、キトラ古墳は *S. rhizophila* に近縁な分類群が分離された。また、ファーミキューテス門に属する *Bacillus* 属では、*B. thuringiensis* に近縁な分類群が共通して分離されたが、キトラ古墳では *B. simplex* に近縁な分類群が特徴的に分離されており、同一の属内においても構成する分類群に違いが認められた。また、アルファプロテオバクテリア綱においてキトラ古墳の方が多様性に富んでいるが、ベータプロテオバクテリア綱（*Betaproteobacteria*）はキトラ古墳からは全く分離されておらず、高松塚古墳からのみであった。なお、バイオフィルムから分離された両古墳における主要分類群は、バイオフィルム以外からも分離されている。また、両古墳に共通している *Bacillus* 属、*Rhizobium* 属、*Streptomyces* 属などは土壌等からの分離報告の多い分類群である。これらのことから、何らかの要因により両古墳石室を取り巻く周辺環境から、石室内部へと運ばれたバクテリアが壁面上にてバイオフィルムを形成したと考えられ、石室内環境の違いがその構成分類群に影響を及ぼしたものと推察される。

6. まとめ

現時点までに得られた諸データの分析結果の要約と今後の調査・研究の方向性の一端を以下に記す。

6-1. キトラ古墳石室内のマイクロビオータ

2004年6月～2007年9月の調査で、主要な菌類は、アオカビ（*Penicillium*；特に、*Penicillium* sp. 1（詳細については後述））、明色系アクレモニウム（*Acremonium*；特に、*Acremonium* sp. 1（cf. *strictum*））、フザリウム（*Fusarium*）、トリコデルマ（*Trichoderma*）の4属が石室内における優占菌類群であった。いずれも大量の分生子（無性胞子の一種）を生じる、子囊菌門の明色系ア

ナモルフ菌類の仲間である。その一方で、高松塚古墳石室内では認められていない暗色系のカビ、フィアロセファラ属 (*Phialocephala*) やブルゴア属 (*Burgoa*) などの発生が認められた。

細菌については、プロテオバクテリア門、アクチノバクテリア門 (*Actinobacteria*)、バクテロイデテス門 (*Bacteroidetes*) およびファーミキューテス門 (*Firmicutes*) など非常に多様性に富んでいた。これらの中でも、特に、アルファプロテオバクテリア綱 (*Alphaproteobacteria*) に属する *Rhizobium* sp. (aff. *radiobacter*) およびガンマプロテオバクテリア綱 (*Gammaproteobacteria*) に属する *Stenotrophomonas* sp. 1 (aff. *rhizophila*) が非常に高い分離頻度を示しており、これらがキトラ古墳石室内における優占細菌群であると言える。

6.2. キトラ古墳石室内の壁面劣化にかかわる主要な微生物

2004 年以降、キトラ古墳から分離された主要な菌類については、以下のことがわかった。

フザリウム属

キトラ (2005.2~4)・高松塚 (2004.5~9) 両古墳の石室内外から分離されたフザリウム属 (*Fusarium*) 24 株の EF-1 α 遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析の結果、分離株は大きく *Haematonectria haematococca* / *Fusarium solani* species complex (FSSC) クレード (単系統群, clade) と *Gibberella* クレードに収容された。キトラ古墳 2 分離株は後者クレード内の *Fusarium oxysporum* species complex に帰属した。*F. oxysporum* species complex クレードに位置する菌群はキトラ古墳の小前室内の土壌表面に紫色のコロニーを形成していたサンプルからのみ分離されており、高松塚古墳からは分離されていない。FSSC クレードに位置した分離株の多くはキトラ・高松塚両古墳の石室内壁面から分離されており、壁面劣化の主要な菌類の一つと考えられる。また、同クレード内の分離株はフランスのラスコー洞窟から分離 (2002、2004~2005 年)、同定された FSSC LSP1-LSP3 と分子系統学的に近縁性が示唆された。FSSC は土壌環境から普通に分離される土壌菌類の仲間であることから、石室周囲の土壌から石室内部へ侵入してきた可能性が考えられるが、この一群にはヒトの臨床分離株 (clinical isolates) が含まれることが最近報告されているので、さらに検討したい。

トリコデルマ属

これまでキトラ (2005.2)・高松塚 (2004.5) 両古墳の石室内外から分離されたトリコデルマ属 (*Trichoderma*) 18 株の EF-1 α 遺伝子塩基配列に基づく分子系統解析の結果、大きく *Harzianum-Virens* クレード、*Viride* クレードおよびセルラーゼ生産種を含む *Trichoderma* 属 *Longibrachiatum* 節に分かれた。*Harzianum-Virens* クレードにはキトラ・高松塚両古墳の石室内外 (キトラの小前室、高松塚の取合部含む) の分離株が共通して含まれており、両古墳石室内の壁面劣化に関係している可能性が考えられた。一方、*Viride* クレードに位置した 4 菌株はキトラ古墳石室内の流入土および小前室の土壌サンプルから分離されたのみで、高松塚古墳では分離されていない。トリコデルマ属は土壌環境から普通に分離される土壌菌類の仲間であることから、石室周囲の土壌から何らかの手段によって石室内部へ侵入してきた可能性が考えられ

る。

アオカビ属

キトラ・高松塚両古墳サンプルのアオカビ属 (*Penicillium*) の中で、最も多く分離された *Penicillium* sp. 1 について代表分離株 13 株 (キトラ 6 株、高松塚 7 株) について複数遺伝子の塩基配列に基づく系統解析を行ったところ、アオカビ属 *Roqueforti* 節 (本節にはブルーチーズ製造にかかわる *P. roqueforti* が含まれる) に帰属する *P. paneum* とクレード (単系統群) を形成した。更に *Penicillium* sp. 1 の培養的・形態学的形質の観察結果から *Penicillium* sp. 1 は *P. paneum* Frisvad と同定した。*P. paneum* はカビに汚染されたライ麦パン等、食品からの分離報告例が知られ、土壌環境からの報告例はほとんど皆無である。

暗色系アクレモニウム属

2006 年 3 月以降、キトラ古墳石室内で認められた暗色系アクレモニウム属 *Acremonium* (sect. *Gliomastix*) は高松塚古墳石室内分離株とは形態および分子系統学的に異なる種類であり、複数種から構成されていることが判明した。

フィアロセファラ属

2004 年 9 月に小前室に突き出した石室天井石の表面に大量の針状のカビが発生した。このカビについて形態観察および 28S rDNA 塩基配列に基づく分子系統学的解析の結果、フィアロセファラ属 (*Phialocephala*) の 1 種と同定した。

ブルゴア属

2006 年 4 月に石室内天井部の天文図附近に大量の“黒色カビ (黒粒)” が出現した。このカビについて形態観察および 28S rDNA 塩基配列に基づく分子系統学的解析の結果、担子菌系統のアナモルフ菌類のブルゴア属 (*Burgoa*) の 1 種と同定した。

6-3. バイオフィルム

キトラ・高松塚両古墳石室内の壁面上に発生したいわゆるゲル状物質はバイオフィルムであり、バクテリア、カビ、酵母の混生体で、その主要な構成分類群を明らかにした。

現在、暗色系アクレモニウム属、フィアロセファラ属、ブルゴア属の分離株について、注意深く種レベルの同定を進めている。また、キトラ・高松塚両古墳のカビ・酵母・バクテリアの代表分離株については、生理的特性を調べる一環として、酸の生成について調査・研究を開始している。

キトラ古墳石室内から 2007 年 9 月に新たに採取された 4 サンプルに関する観察所見

東京大学名誉教授 杉山 純多
東京文化財研究所 木川 りか・佐野 千絵

2007 年 9 月にキトラ古墳石室内から新たに採取された 4 サンプルについての観察を行った。観察したサンプルデータおよび各サンプルの顕微鏡観察結果を表 1 および図 1～図 4 にまとめる。

表 1. 供試サンプルならびに観察結果の要約一覧.

サンプル採取日	サンプル番号	サンプル名	観察結果	顕微鏡観察像
2007 年 9 月 5 日	K7905-1	天井「ち」天井からぶらぶらとぶら下がっている白い菌糸の塊 070905	“白色の菌糸塊”中に <i>Trichoderma</i> 属の輪生した分生子柄および緑色に着色した球形～垂球形の分生子の形成が認められた。この白色菌糸塊（束）は主に <i>Trichoderma</i> 属カビによるものだと考えられた。	図 1
2007 年 9 月 5 日	K7905-2	床「し」緑色に大発生したカビ 070905	“緑色塊”は主に <i>Penicillium</i> 属の菌糸および分生子が塊となって構成されていた。その中でわずかながら <i>Penicillium</i> 属とは異なる茶褐色の菌糸の存在が確認された。	図 2
2007 年 9 月 6 日	K7906-1	北壁「し」レーヨン紙上の黄色い粒粒（ゲル状）070906	“黄色の粒（オレンジ色）”は主に一部組織化した菌類の細胞あるいは菌糸の塊であり、その形状からボタタケ目（ <i>Hypocreales</i> ）の菌種の子嚢果（子嚢殻）に類似していると考えられた（2006 年 12 月 8 日に北壁面上から採取したオレンジ粒々*（試料 No. K61208-1）に類似している）。さらにオレンジ色の粒表面には別のカビの菌糸や暗色形 <i>Acremonium</i> （sect. <i>Gliomastix</i> ）sp.の分生子が付着したと思われる状態が観察された。	図 3
2007 年 9 月 6 日	K7906-2	西壁南側「む」泥上の白い突起物 070906	“白い突起物”は白色の菌糸が束状になったものであり、その中には <i>Verticillium</i> 属様の輪生した分生子柄および紡錘形の分生子の形成が認められた。また、白色菌糸束の端に付着していたと思われる茶褐色のゲル状塊の中には微小動物の体片（ダニと推定される）および菌類・バクテリアの細胞が混生している状態が認められた。	図 4

* 「特別史跡キトラ古墳の保存・活用等に関する調査研究委員会（第 11 回）」（平成 19 年 3 月 23 日開催）配布資料資料 4「特別史跡キトラ古墳に関する環境状況について」内（5 頁目）「キトラ古墳石室内微生物調査（平成 18 年 12 月および平成 19 年 1 月）杉山純多」で報告済（表 1 および図 1 参照）。

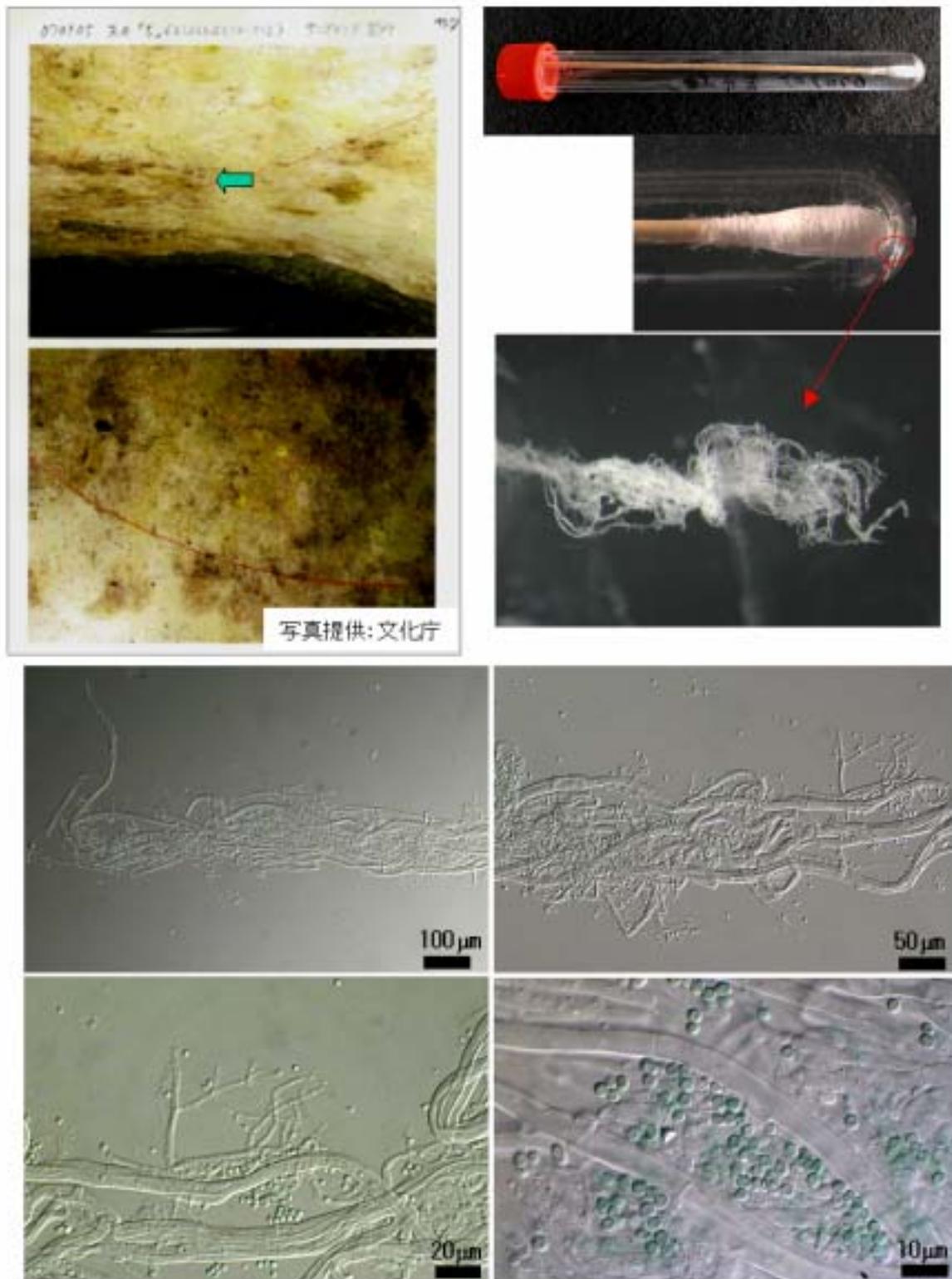


図1. キトラ古墳石室内 天井「ち」天井からぶらぶらとぶら下がっている白い菌糸の塊(070905) (K7905-1)のサンプル採取箇所(左上)、サンプル全体像(右上)および光学顕微鏡観察像(下)。

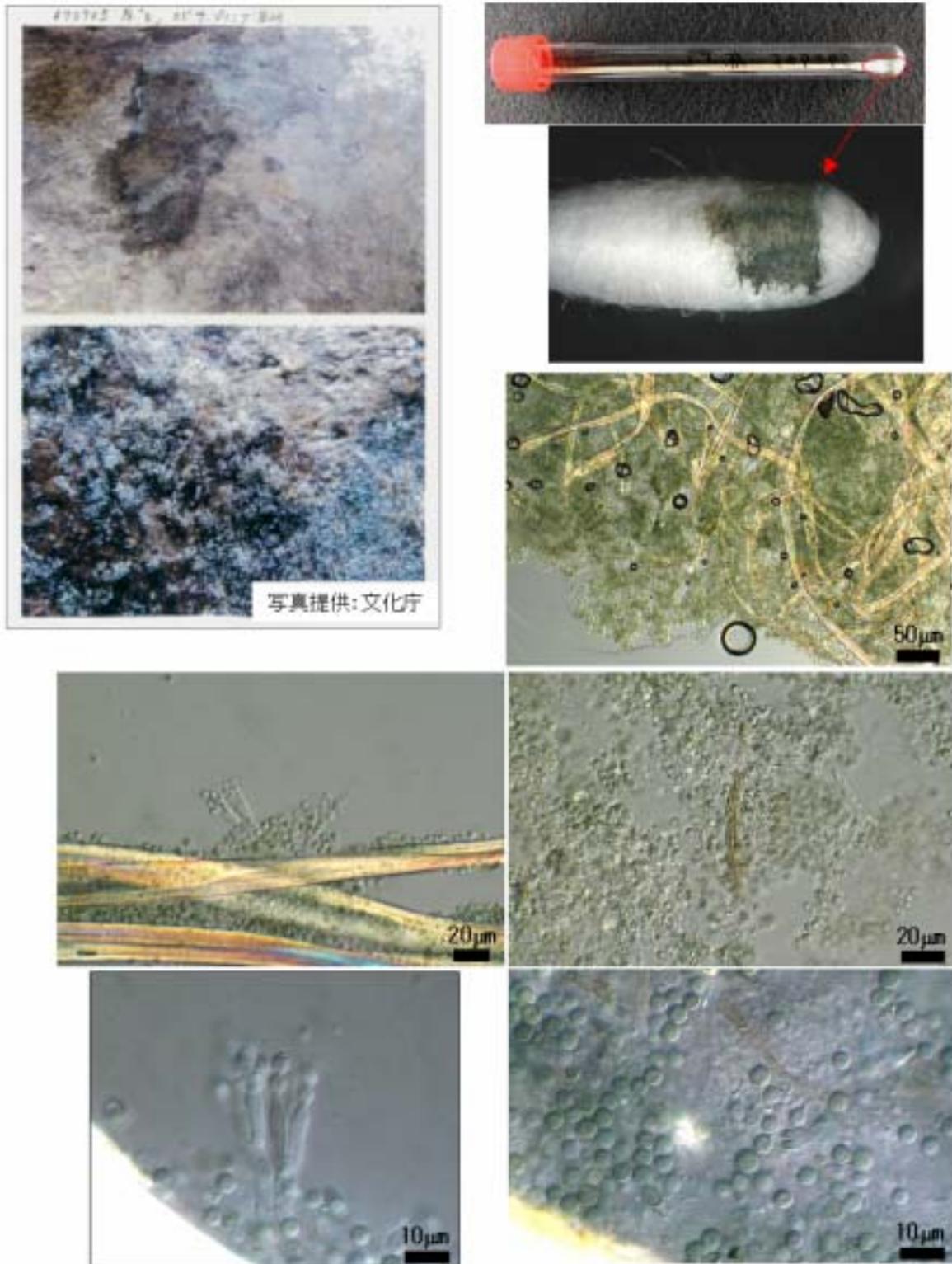


図2. キトラ古墳石室内 床「し」緑色に大発生したカビ(070905)(K7905-2)のサンプル採取箇所(左上)、サンプル全体像(右上)および光学顕微鏡観察像(下)。

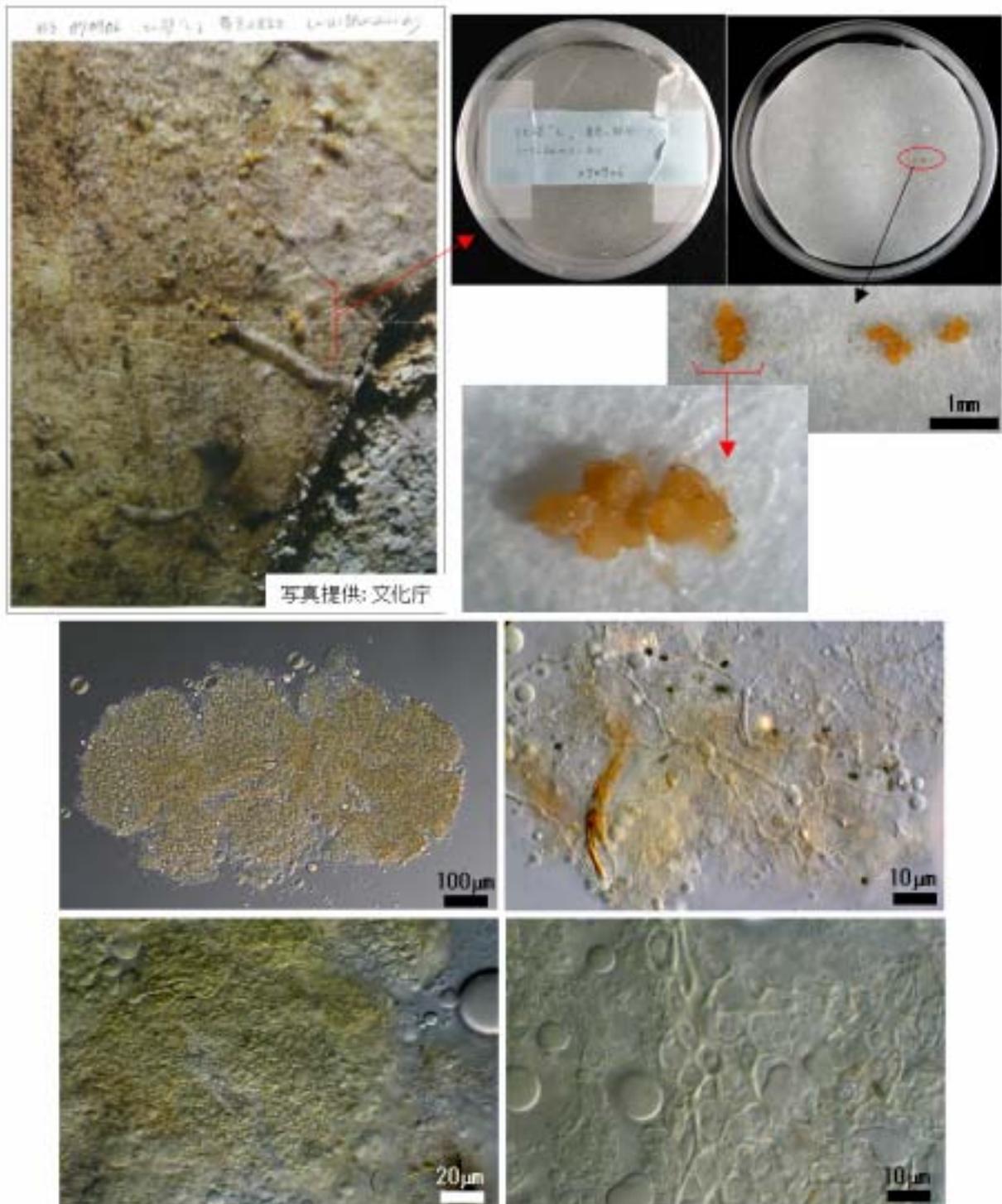


図3. キトラ古墳石室内 北壁「し」レーヨン紙の上の黄色い粒粒(ゲル状)(070906)(K7906-1)のサンプル採取箇所(左上)、サンプル全体像(右上)および光学顕微鏡観察像(下)。



図4. キトラ古墳石室内 西壁南側「む」泥上の白い突起物(070906)(K7906-2)のサンプル採取箇所(左上)、サンプル全体像(右上)および光学顕微鏡観察像(下)。