

キトラ古墳の微生物等の状況について

1. 壁面のバイオフィルムについて

2005年8月ごろから壁面のバイオフィルム（バクテリアと菌類の混合物で、主にバクテリアの産生するゲル状物質に覆われたもの）が顕著に発達しはじめたため（写真1,2）、同年9月以降、可能なところは除去し、また除去が不可能なところにはバイオフィルムを形成する菌（グラム陰性菌など）に有効な薬剤として昨年の検討会資料のなかで提案のあった抗菌剤（ケーソンCG相当品*）の使用を検討してきた。

キトラ古墳から分離された主なバクテリア等に対するこの抗菌剤の効果を調べたところ、きわめて高い抗菌効果があることがわかった（資料9-2）。場合に応じて、絵のない箇所にはケーソンCG相当品の使用を検討し、バイオフィルムの抑制に有効であることを確認した。

2006年8月ごろから、朱雀の絵の上に、さらに白い粒状のゲル状物質が顕著に発生した（写真3,4）。杉山純多検討会委員の観察によると、「この白色ゲル状のものは、多種類の菌類、バクテリアの混生体（バイオフィルム）と判断される」とのことであった。

この白色粒状のゲル状試料を8月11日に朱雀の近傍3箇所より採取し、抗菌剤（ケーソンCG相当品）の効果を調査した（資料9-3）。その結果、10倍希釈溶液でバイオフィルム原因微生物の生育抑制に有効と考えられたので、2006年8月25日、白粒部分をケーソンCG相当品（10倍水溶液）にて処置した。さらに10月27日、白粒部分に対し、周囲も含んで面的に処置した。

2. 漆喰の穴、および天井の漆喰の侵食について

2005年9月ごろから漆喰に穴が目立ってきた。とくに、天井部の顕著な穴2箇所（写真5）からは酢酸菌（*Gluconacetobacter* sp.）が分離されており、穴の生成に微生物の関与が強く示唆されている。この酢酸菌の分離株を使ってケーソンCG相当品の効果を試験したところ、有効に生育抑制できることを確認した（資料9-2）。その後、抗菌剤ケーソンCG相当品を注入したところは、あまり穴の生成が進行していないように見受けられる。

そのほか、天井部で漆喰の侵食がみられる箇所があり、この部分に対しても、今後処置を検討している。

3. 黒い菌類の発生について（主に天井部）

2006 年 4 月末から天井に黒い菌類（担子菌類）が発生した（写真 6）。この菌は、強固な菌核様構造体を作るため、点検の際、この菌類を発見した場合は、蒸留水を含ませた筆で除去し、その後、99.5%エタノールで発生箇所を殺菌処理している（資料 9-4, 9-5）。

4. その他

4-1. 今後の薬剤処置、使い分けの方針について

古墳から分離された菌株への薬剤効果試験をもとに、カビやバクテリアに対しての殺菌処置の方針と薬剤の使い分けを再度整理した（資料 9-6）。

4-2. 墳丘への防水シート追加施工、小前室結露対策について

微生物活動抑制のためには、突発的な水の侵入と日常的な水への対策が必要である。

前者への対応として、防水シートの張られていない墳頂部から保護施設にかけて、遮水シートを延伸した（10 月 20 日）。後者への対策として、冬季 11 月～3 月にかけて結露水が常時、天井石直上～侵入口上に落下するのを散らす目的で、小前室天井北側奥のコンクリートむき出しの部分に、ポリシロキサン樹脂に土壌を混ぜた擬土を薄くつけ、天井石への結露水の落下を防ぐ対策を取った（1 回目：10 月 18-19 日、2 回目：25-26 日）。

4-3. 施設に対する除菌清掃について

微生物汚損への管理として、本年度より前室、通路の手の届く範囲の高さまでの除菌清掃（塩化ベンザルコニウム 1000ppm 使用）を、2 ヶ月に 1 度の割合で行っている。前室、通路の高所部分については、11 月中に除菌清掃の予定である。

＊ ケーソン C G 相当品： アモルデン F S-14D（大和化学工業株式会社）

有効成分 5-クロロ-2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン、2-メチル-4-イソチアゾリン-3-オン） 原液には、それぞれの成分がおよそ 1.0-1.3%、0.30-0.42%含まれる。

＜2005 年 8 月-9 月のバイオフィルムの様子＞



写真1 2005 年 8 月 19 日の寅（左）および 2005 年 9 月のクリーニング後の寅（右、
撮影日：2005 年 10 月 13 日）



写真2. 左：2005 年 9 月 2 日朱雀部分の様子 右：2005 年 9 月 29 日 朱雀の上のゲ
ル状の汚れ（滅菌水で膨潤させて動かしたところ） および尾羽の上の穴
この部分は、漆喰が脆弱なためバイオフィルムが除去できない。

＜2006 年 8 月のバイオフィルムの様子＞



写真 3 2006 年 8 月 4 日の朱雀の様子



写真 4 2006 年 8 月 25 日の朱雀の様子

(この後、白粒部分をケーソン C G 相当品 10 倍希釈溶液で処置)

<穴について>



写真 5. 2005 年 9 月 29 日 天井の穴（直径およそ 1 cm）の例

<天井部の黒色菌類について>

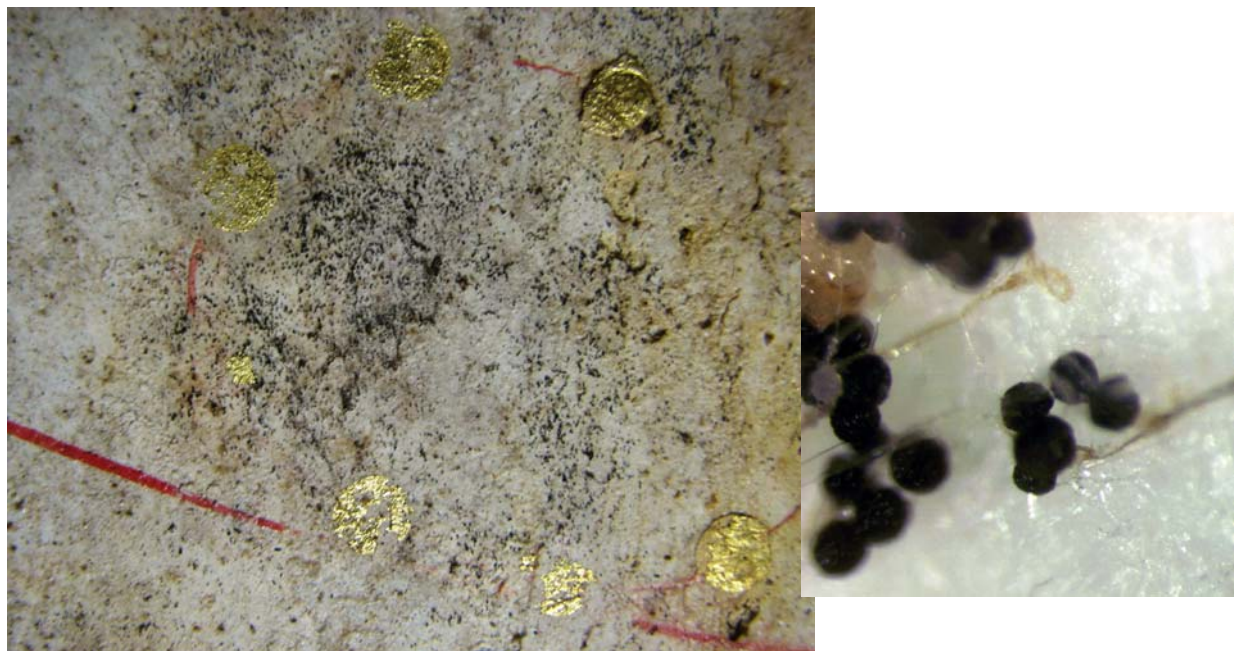


写真 6. 2006 年 4 月 28 日 天井の黒い粒状の担子菌およびその一部の拡大写真

ケーソンCG相当品の抗菌性試験（１）

検体情報

[illegible]

目的

防腐剤「ケーソン CG」の各菌種（キトラ古墳分離株）に対する効果を検証します。

方法

1. 試験液の調整

ケーソン CG（ろ過滅菌済）（有効成分約 1.4%）の希釈は 70%イソプロパノール（ろ過滅菌済）および滅菌水で行ない、「0、1/10、1/100、1/1000、1/10000」の 5 段階希釈系列液を調整して試験に供しました。また、ポジティブコントロールとして 5 倍希釈 10%塩化ベンザルコニウム、ネガティブコントロールとして滅菌水を用いました。

2. 試験菌株

キトラ古墳石室内サンプル（2005 年 9 月採取）からの分離株のうち、遺伝子解析の終了している細菌 4 菌種、カビ 2 菌種、酵母 1 菌種の計 7 菌種を用いました。

（細菌） *Gluconacetobacter* sp. (SIID3994-18-1b)
Rhizobium radiobacter (SIID3994-15b)
Sphingobium sp. (SIID3994-11-1b)
Bacillus thuringiensis (SIID3994-01-2b)

（カビ） *Trichoderma* sp. (K5916-7-3)
Penicillium sp. (K5916-7-1)

（酵母） Yeast④ (K5916-7-4)

3. 結果の判定

試験液の抗菌性の評価判定はケーソン CG 等を投与した穴周辺の菌の生育状況（阻止帯の形成具合）から評価を行ないました。

考察

抗菌性試験の結果、細菌 4 菌種に対し、ケーソン CG の抗菌性効果は高く、1000 倍希釈まで高い抗菌性が認められました。そのことからケーソン CG が細菌に対して高い抗菌性を示すことが考えられます。

カビ *Penicillium* sp. 1 および酵母 Yeast-④に対しては 100 倍希釈まで高い抗菌性が認められました。一方、カビ *Trichoderma* sp. に対しては 10 倍希釈濃度で弱い抗菌性が認められましたが、その効果は低いものと考えられます。そのため、カビ *Trichoderma* sp. のような生育の速い菌種に対しては希釈をせずに原液のまま使用の方がある程度の抗菌性効果が見込まれると考えられます。

表 1. ケーソン CG の各菌種に対する抗菌性試験結果.

	ケーソン CG						イソプロパノール※	コントロール	
	原液	希釈液	1/10	1/100	1/1000	1/10000		ベンザルコニウム	滅菌水※
<i>Gluconacetobacter</i> sp. (SIID3994-18-1b) SIID4324-02	++	イソプロパノール	++	++	++	+	—	++	—
		水	++	++	++	+			
<i>Rhizobium radiobacter</i> (SIID3994-15b) SIID4324-03	++	イソプロパノール	++	++	++	—	—	++	—
		水	++	++	++	—			
<i>Sphingobium</i> sp. (SIID3994-11-1b) SIID4324-04	++	イソプロパノール	++	++	++	—	—	++	—
		水	++	++	++	—			
<i>Bacillus thuringiensis</i> (SIID3994-01-2b) SIID4324-05	++	イソプロパノール	++	++	++	—	—	++	—
		水	++	++	++	—			
<i>Trichoderma</i> sp. (K5916-7-3) SIID4324-06	+	イソプロパノール	+	—	—	—	—	++	—
		水	+	—	—	—			
<i>Penicillium</i> sp. (K5916-7-1) SIID4324-07	++	イソプロパノール	++	++	—	—	—	+	—
		水	++	++	—	—			
Yeast-④ (K5916-7-4) SIID4324-08	++	イソプロパノール	++	++	+	—	—	++	—
		水	++	++	+	—			

++ 抗菌性あり；
 + 弱い抗菌性；
 — 抗菌性なし

※ イソプロパノールおよび滅菌水の試験結果において周囲のベンザルコニウムおよびケーソン CG 溶液の影響で抗菌性がある結果となったが、イソプロパノールおよび滅菌水はネガティブコントロールに相当すると考えられるため、抗菌性評価は「—」と表記した。

ケーソンCG相当品の抗菌性試験（2）

検体情報

[illegible]

備考

Bacillus thuringiensis (SIID3994-01-2b: キトラ古墳 石室内、南壁朱雀の分離株)は対照コントロールとして試験。

目的

防腐剤「ケーソン CG」の各検体に対する効果を検証します。

方法

試験液の調整

ケーソン CG（ろ過滅菌済：有効成分約 1.4%）の希釈は 70%イソプロパノール（ろ過滅菌済）で行ない、「0、1/10、1/100、1/1000、1/10000」の 5 段階希釈系列液を調整して試験に供しました。また、ポジティブコントロールとして 5 倍希釈 10%塩化ベンザルコニウム、対照コントロールとして *Bacillus thuringiensis* (SIID3994-01-2b：キトラ古墳 石室内、南壁朱雀の分離株)、ネガティブコントロールとして 70%イソプロパノールを用いました。

結果の判定

試験液の抗菌性の評価判定はケーソン CG 等を投与した穴周辺の菌の生育状況（阻止帯の形成具合）から評価を行ないました。

結果

各検体の試験結果を表1にまとめました。

表 1. ケーソンに対する抗菌性試験の結果

	<i>Bacillus thuringiensis</i>	060811 ゲル朱雀 中央泥の上 (SIID4714-01)	060811 ゲル朱雀 尾羽根上から 3 枚目下 (SIID4714-02)	060811 ゲル朱雀 尾羽根上 (SIID4714-03)
10% 塩化ベンザル コニウム (5 倍希釈液)	++	++	++	++
イソプロパノール	—	—	—	—
ケーソン原液	+++++	++++++	+++++	+++++
ケーソン 10 倍希釈	+++	+++++	+++	+++
ケーソン 100 倍希釈	++	+++	++	+
ケーソン 1000 希釈	+	++	+	+
ケーソン 10000 倍希釈	—	+	—	+

考察

抗菌性試験の結果、各検体に対するケーソン CG の抗菌性効果は高く、1000 倍希釈まで高い抗菌性が認められました。このことから、ケーソン CG が細菌に対して高い抗菌性を示すことが考えられます。しかし、培養 72 時間後、100 倍～1000 倍希釈の菌阻止円内に散在的なコロニー形成が認められたことから、当該希釈濃度では一時的な抑制作用しかないと考えられます。よって、ケーソン CG による滅菌は、10 倍程度の希釈倍率が適当であると推定されます。

キトラ古墳石室天井の天文図に発生した“黒色カビ（黒粒）”の同定所見

杉山 純多

2006 年 4 月キトラ古墳石室天井の天文図に発生した“黒色カビ（黒粒）”（図 1）の正体を明らかにするために、東京文化財研究所から送付されたサンプル 4 点（4 月 21 日、5 月 2 日採取）を供試して、いろいろな角度から調べた結果を報告する。

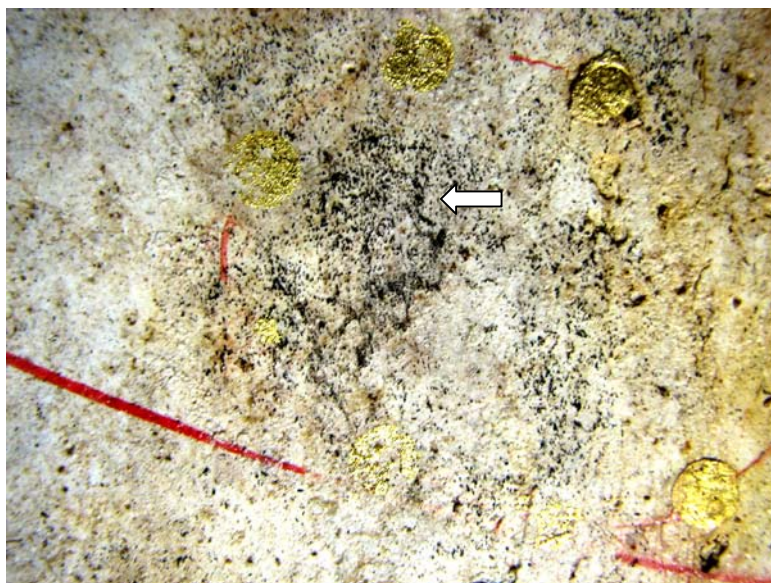


図 1. キトラ古墳の石室天井の天文図に発生した“黒色カビ（黒粒）”（矢印）
（写真提供：東京文化財研究所）

1. 材料と方法

以下の 4 サンプルについて調べた（表 1）。各試料には採取日をもとにしたサンプル No. をつけた（K6421、K6502）。以下、そのサンプル No. の略記号を使用する。

表 1. キトラ古墳“黒色カビ（黒粒）”サンプル

サンプル No.	採取日	採取位置（その他）
K6421-1	2006/04/21	キトラ古墳 石室内 東壁、日月上の黒い粒々（→図 2）
K6502-2	2006/05/02	キトラ古墳 石室内 尾宿&赤道の境の黒い粒々
K6502-3	2006/05/02	30%エタノールを染み込ませた筆で漆喰面の汚れを除去し、その筆を紙で拭った時の紙上の残渣 1
K6502-4	2006/05/02	筆洗いに使用した 30%エタノールの中に浸っていたもの

なお、現地で採取した試料は、試料が乾燥しないようにシャーレ内に用意した滅菌水を染み込ませた滅菌ろ紙上に載せて、湿室状態に保った状態で実験室に郵送された（図 2a）。常法に従って当該サンプル（図 2b）から分離・培養、形態観察および分子系統解析に供試した。

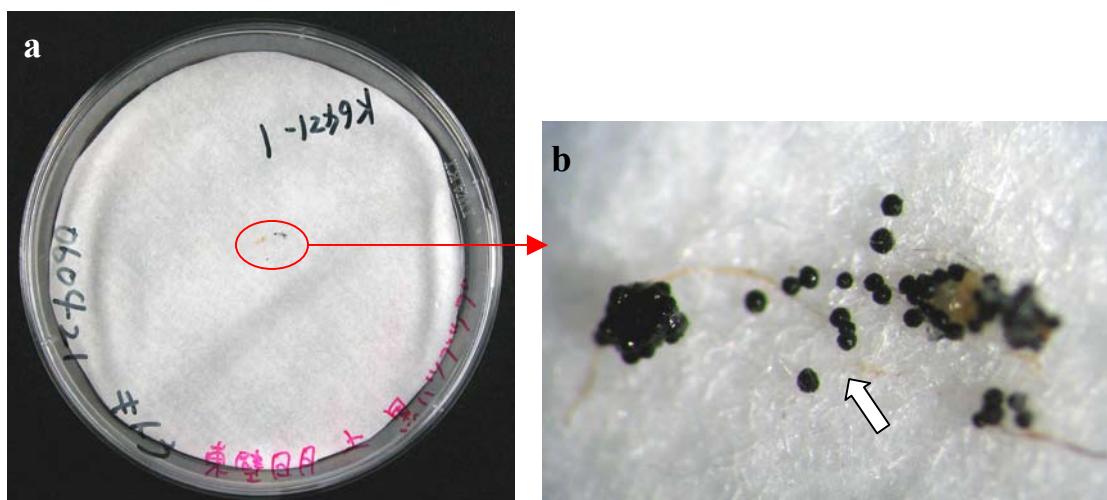


図 2. K6421-1 の“黒色カビ（黒粒）”サンプルの入ったシャーレ（a）およびサンプルの拡大像（b：矢印）

2. 結果と考察

（1）培養性状

培養 3 日目を経過する頃から、培地表面あるいは培地中に暗褐色～黒褐色の“菌核”様構造体が認められ、培養 1 週間後にはコロニー中心部に多数密集し、その集合体が肉眼で判別できるほどまでになった（図 3）。

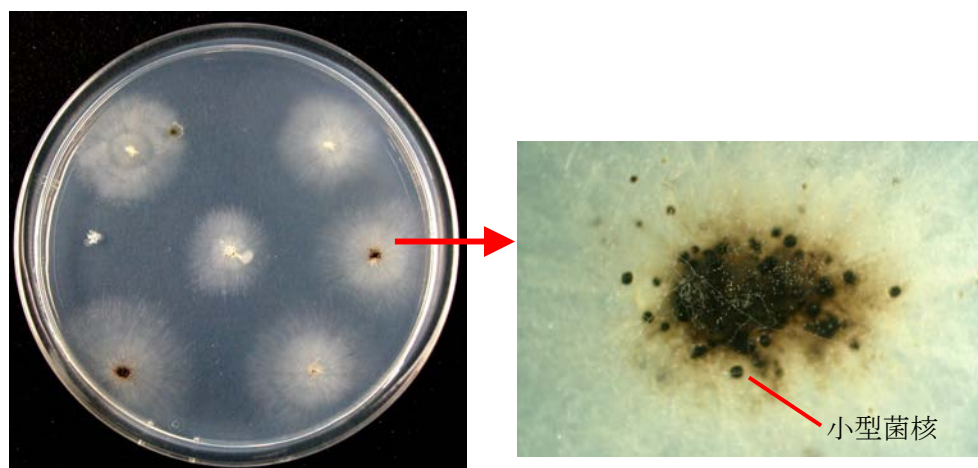


図 3. K6421-1 の培養性状および培地上に形成された小型菌核（25℃、1 週間）

K6421-1、K6502-2 および K6502-3 の 3 試料については同様な培養性状が認められた。一方、K6502-4 についてはコロニー成長が認められなかった。すなわち、すでに死滅していたものと思われる。

(2) 形態観察

各試料の“黒粒”を実体・光学顕微鏡下で形態観察の結果、“菌核”様構造体が観察された。さらに“黒粒”の切片像を作製し、観察した結果、“黒粒”周縁には外層を欠き、菌核 (sclerotia) の様に組織化しておらず、不定形の小胞状細胞の集合体であり、小型菌核 (bulbil) と考えられた (図 4)。この型の小型菌核は担子菌系統のアナモルフ菌類 *Burgoa* 属に見られる。

つぎに分離培養株を常法に従って観察した結果、菌糸には隔壁があり、隔壁上にかすがい連結 (clamp connection、図 5)、ならびに菌糸塊を認めた。このかすがい連結は担子菌類の形態的特徴である。



図 4. “黒粒” サンプル (K6502-3) の光学顕微鏡観察像：外部形態



図 5. 分離培養株 (K6421-1) に観察されたかすがい連結 (1 週間培養)
(写真中央付近)

(3) 分子系統解析

複数の遺伝子塩基配列に基づいて分子系統解析を行った結果、当該分離株 (K6421-1、K6502-2 の 2 株) は担子菌門の“アンズタケ型”クレード内の *Sistotrema* 属に含まれた。

(4) 考察

サンプル (“黒粒”) ならびにその分離培養株の表現形質ならびに遺伝形質について比較検討した結果、両形質とも“黒粒”は担子菌門の *Sistotrema* 属 (*Burgoa* 属のテレオモルフ、有性時代) の 1 種の小型菌核であると結論づけられた。現在のところテレオモルフが観察されていないため、分類学的にはアナモルフ菌類 *Burgoa* sp. の小型菌核と同定しておく。種レベルの同定には、さらに詳細な証拠標本 (voucher) や分離株との比較検討が必要である。

2006 年 4 月キトラ古墳の天井の黒い菌類についての所見

国立医薬品食品衛生研究所 高鳥浩介

菌体について：

写真より判断し、これまで発生してきた菌とは異なり、かなりしっかりした組織を形成する菌のようです。おそらく短期間で菌糸を伸張させながら、黒い組織の殻を形成してくるのでしょう。おそらく、はじめは褐色で、次第に黒くなって堅い殻を構成するものと思います。

対応について：

殻を形成するような菌です。黒い殻はできるだけ早期に、物理的に根気よく除去することが必要だと思われます。

採取された菌体を70％エタノール液に入れ、30、45、60、90、120秒後にその菌体の一部を培地に接種したところ、その後発育を認めませんでした。したがって、エタノールで殺菌することができます。対応としては、物理的に取り除いたあと、高濃度のエタノールで殺菌すると良いでしょう。

薬剤処置、使い分けについての現在の方針について

高鳥検討会委員、および杉山検討会委員らのご協力により、古墳のカビやバクテリアに対する薬剤の効果試験を実施してきた。その結果をもとに、現時点におけるカビやバクテリアに対しての殺菌処置の方針を再度整理した。

- ・古墳のカビはアルコールに強くなっているものがあるため、薄まると効果がない。使用するなら高濃度で使用する（エタノールなら、99.5%のものを使用）。

- ・カビには、イソプロパノールよりも、エタノールのほうが効果が高い。

- ・イソプロパノールは、一般的にバクテリアには効果があるが、カビへの効果はあまり高いとは言えない。

- ・ホルマリンは、1%では効果がない場合がある。3%～5%くらいで使用するほうが良い。

- ・ケーソンCG相当品は、バイオフィルムの原因となるバクテリアを抑える効果は非常に高い。しかし、アルカリ性では安定性が悪くなる。

以上のことを考慮し、

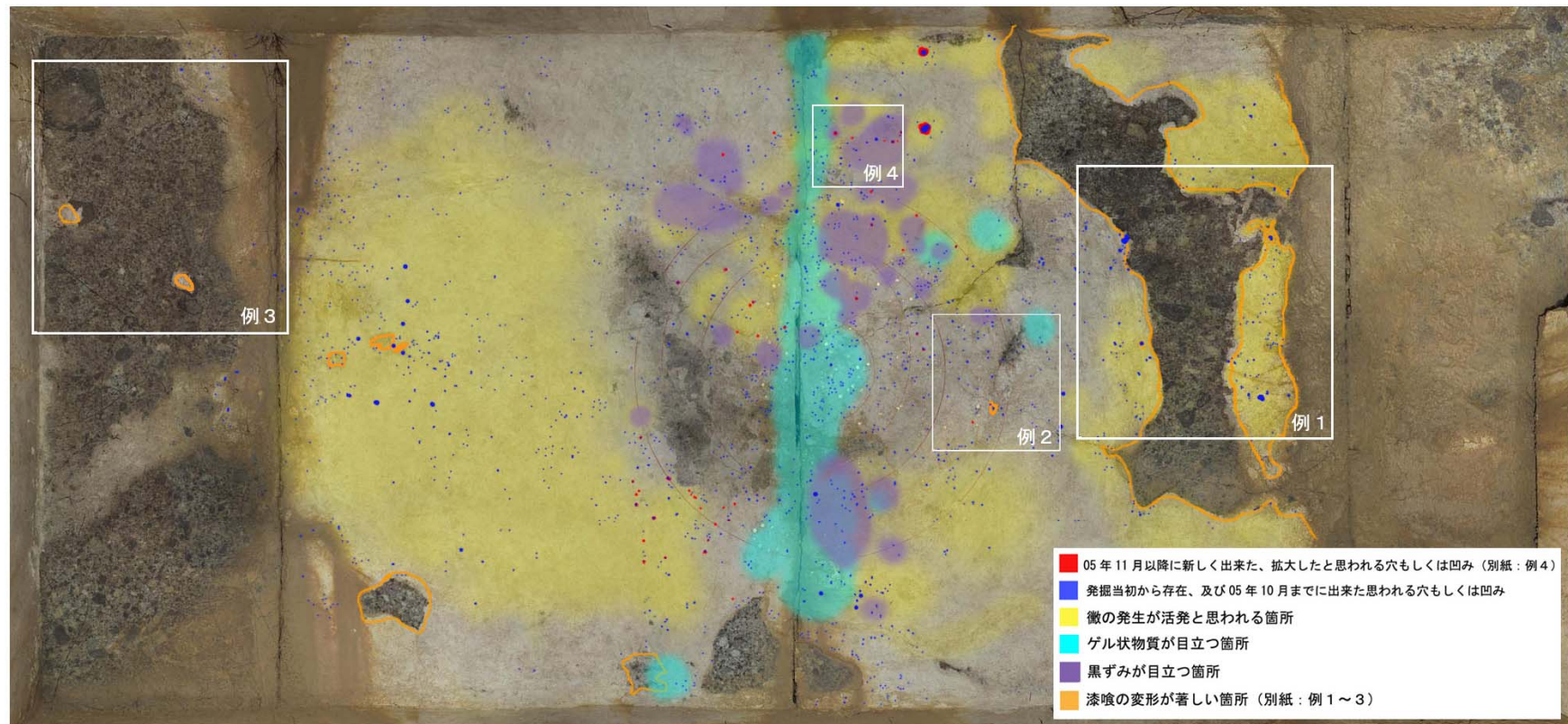
(1) 通常のカビの白い菌糸などが発生しているときは、99.5%エタノールで殺菌する。

(2) 天井の黒い粒状のカビのように、菌核様の強固な構造をつくるものは、薬剤が効きにくいので、できる限り、物理的に除去したあと、残った菌糸部分を 99.5%エタノールで殺菌する。

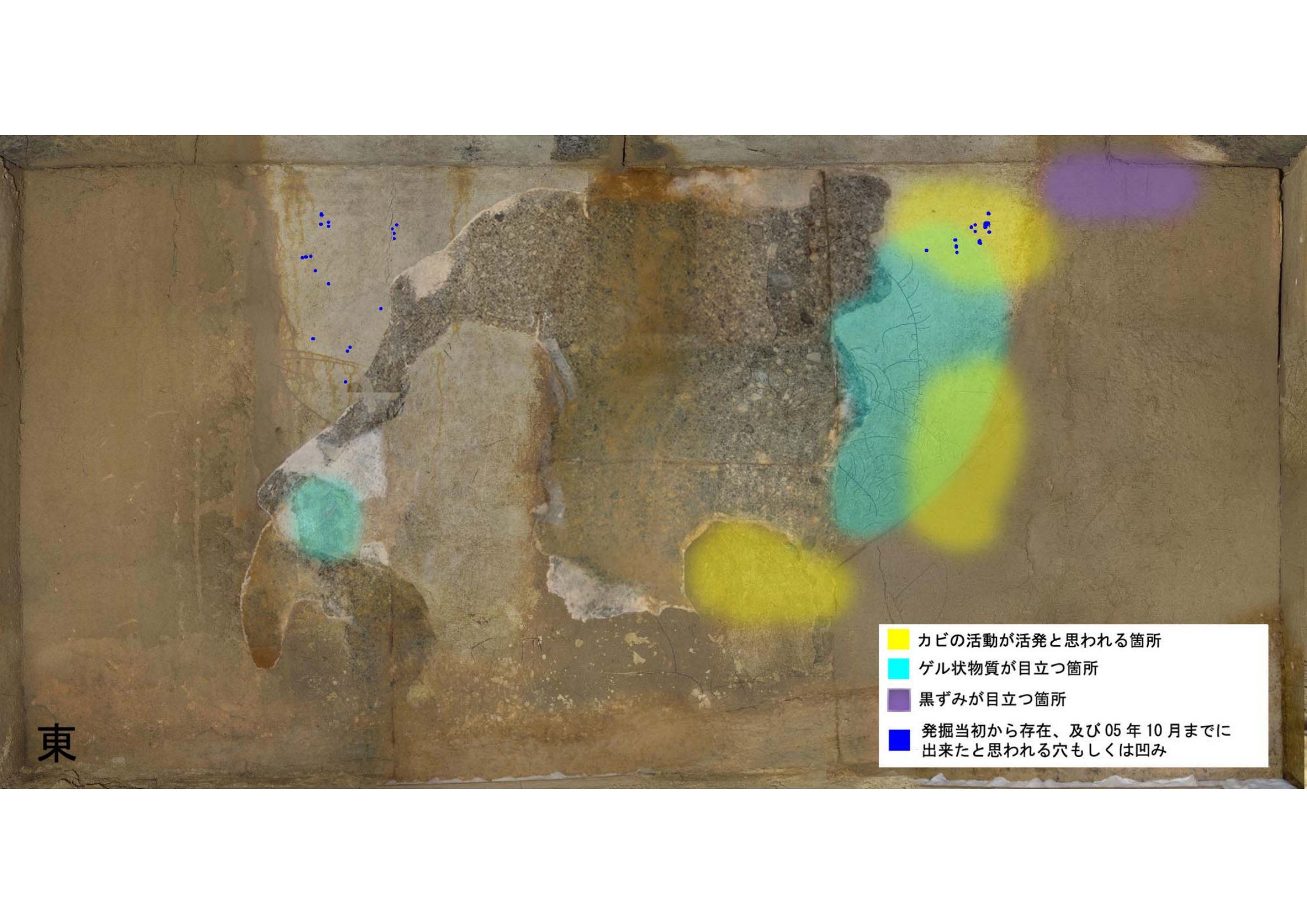
(3) 除去しにくいカビの場合は、絵のないところについては、3%～5%ホルマリンと 99.5%エタノールを、カビの強さによって使い分ける。

(4) バイオフィルム（バクテリアと菌類の混合物、バクテリアのゲル状の代謝物により保護されている）については、薬剤がききにくい。除去できるならば、そのほうが望ましいが、無理はできない。ケーソンCG相当品は、抗菌性試験の結果、バイオフィルムの原因となるバクテリアに高い抗菌性をもっているため、バイオフィルムの拡大を抑制する効果がある。必要と判断される場合には、10倍希釈のものを適宜使用する。

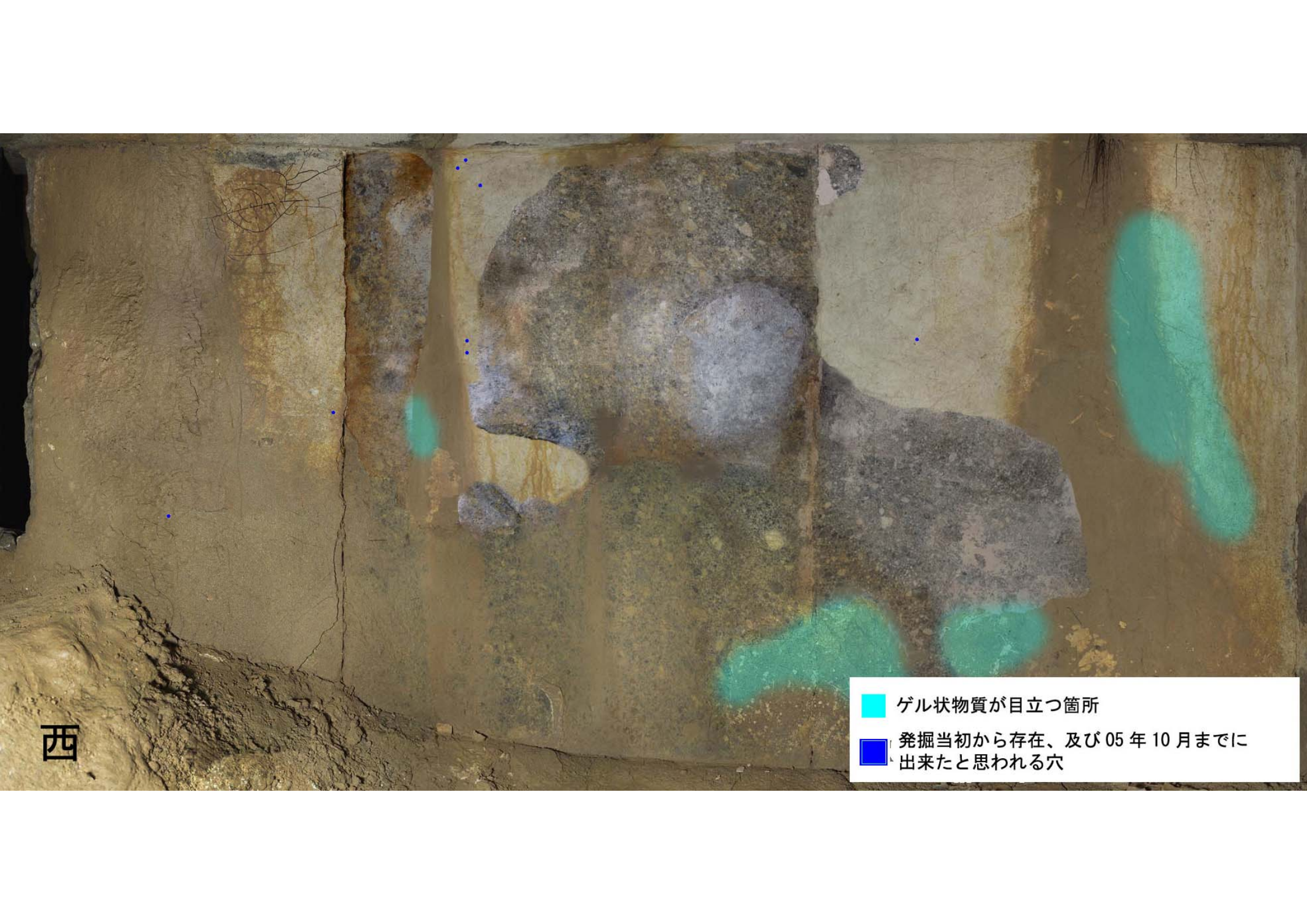
資料 9 - 7

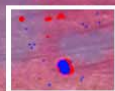
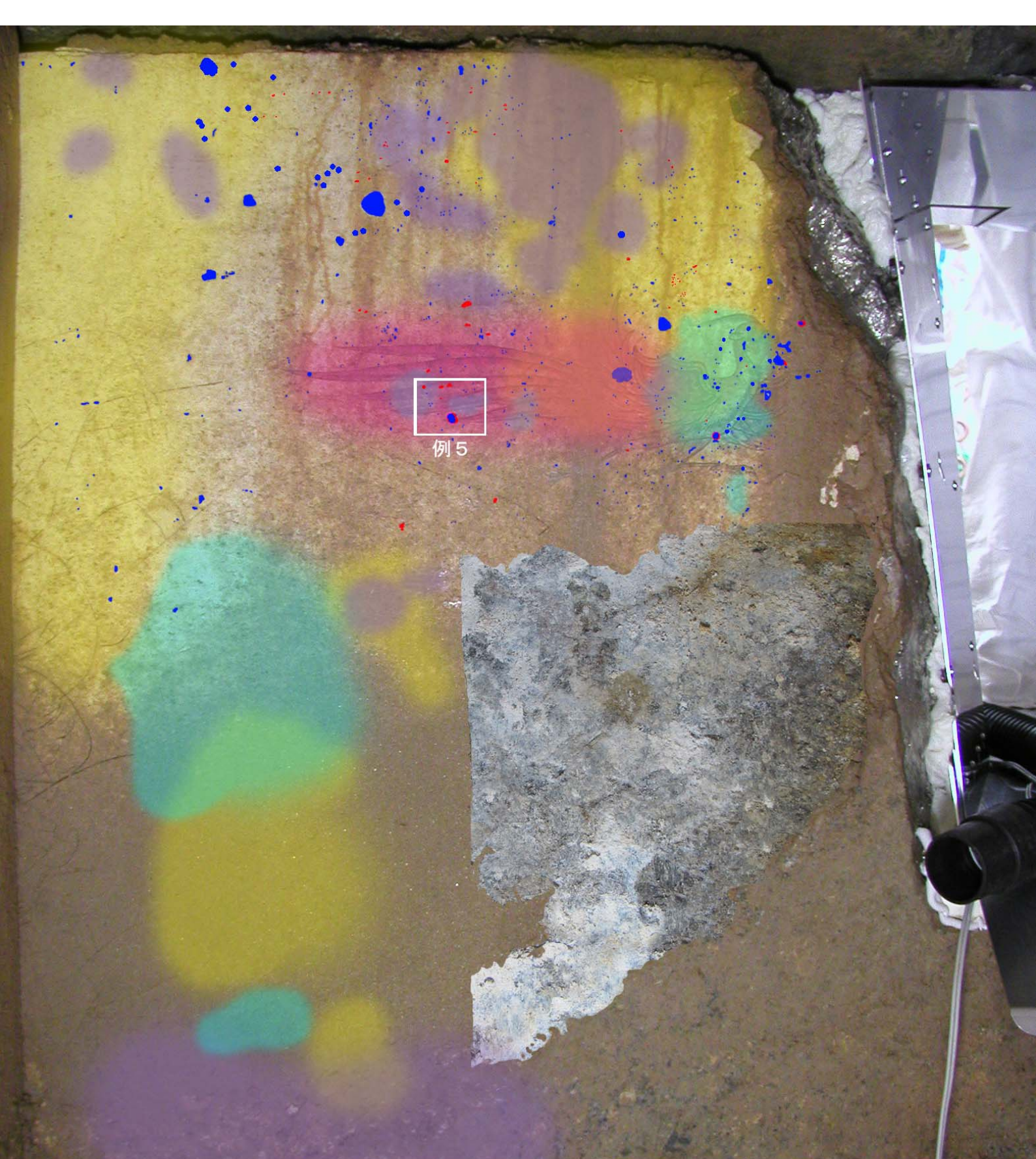


東

- 
- カビの活動が活発と思われる箇所
 - ゲル状物質が目立つ箇所
 - 黒ずみが目立つ箇所
 - 発掘当初から存在、及び05年10月までに出来たと思われる穴もしくは凹み

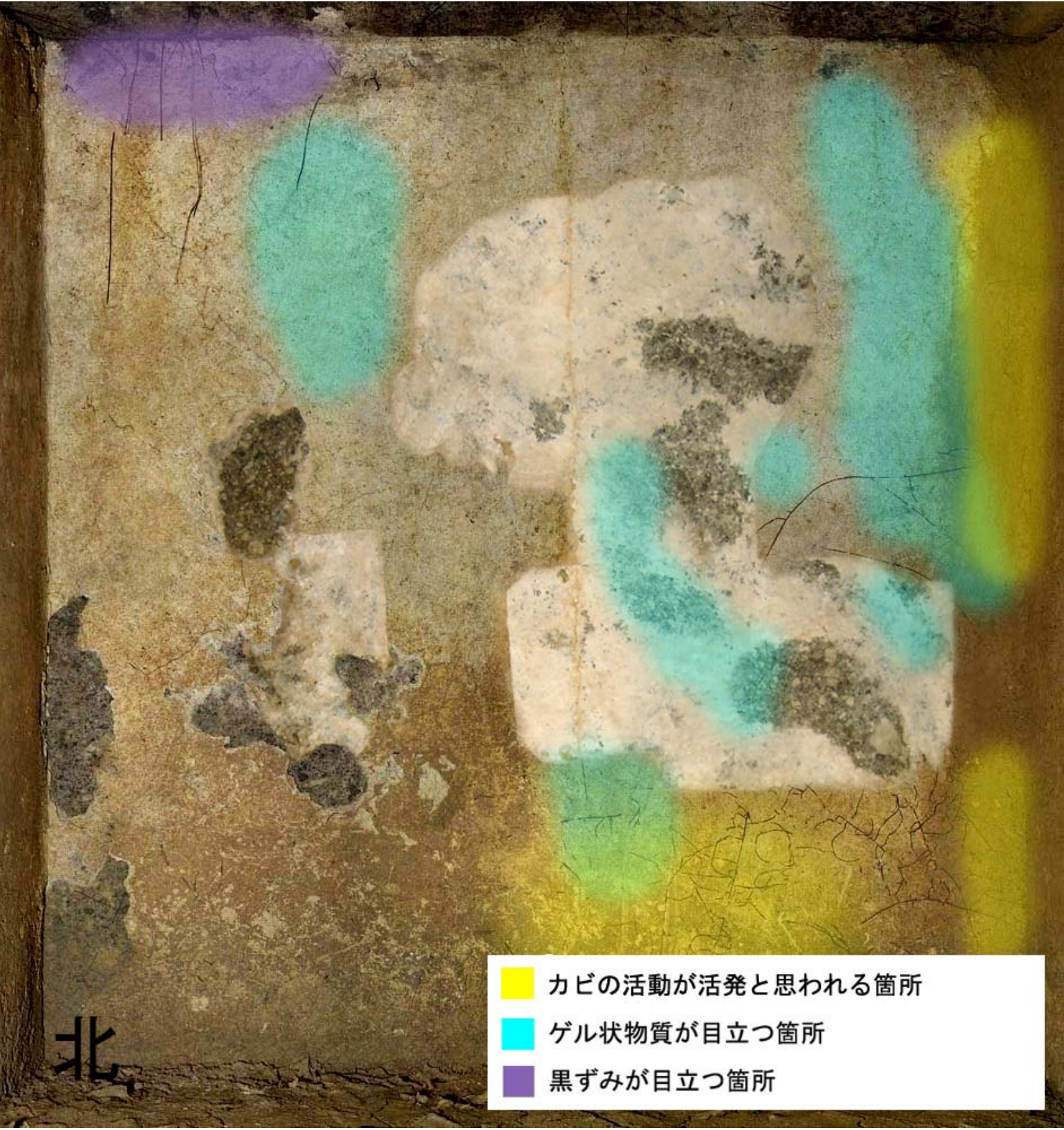
西

- 
- The photograph shows a cross-section of an archaeological site. The ground is composed of various layers of soil and rock. Several areas are highlighted with green and blue markers. A large, irregularly shaped area in the center is highlighted in green. To its right, a vertical, elongated area is also highlighted in green. Below the central green area, there are two smaller, roughly circular areas highlighted in green. On the left side of the image, there are several small blue dots. A legend in the bottom right corner explains the meaning of these markers.
- ゲル状物質が目立つ箇所
 - 発掘当初から存在、及び 05 年 10 月までに出来たと思われる穴



例5

- 05 年 11 月以降に新しく出来た、拡大したと思われる穴もしくは凹み
(別紙：例5)
- 発掘当初から存在、及び 05 年 10 月までに出来たと思われる穴もしくは凹み
- 黴の発生が活発と思われる箇所
- ゲル状物質が目立つ箇所
- 黒ずみが目立つ箇所
- 白い粒上の物質が発生している箇所



- カビの活動が活発と思われる箇所
- ゲル状物質が目立つ箇所
- 黒ずみが目立つ箇所

北

天井の漆喰の変形が著しい箇所

(例1)



2004 年 4 月 20 日



2006 年 9 月 1 日

(例2)



2004 年 4 月 20 日



2006 年 9 月 1 日

(例3)



2004 年 4 月 20 日



2006 年 9 月 1 日

天井・月像の穴もしくは凹み

(例4)



2004 年 6 月 3 日



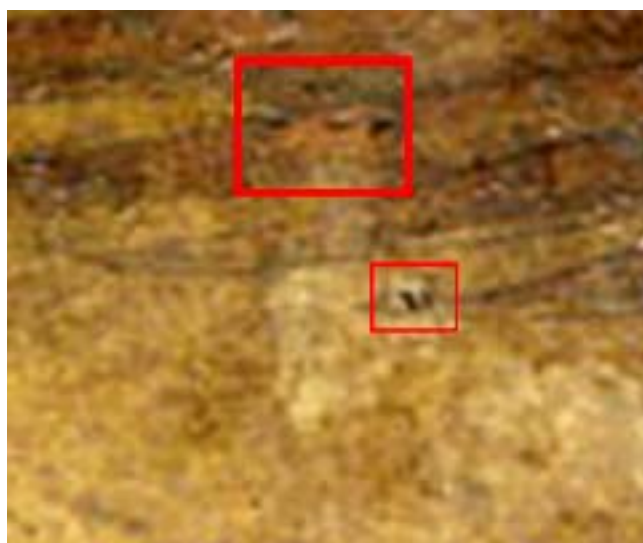
2006 年 5 月 2 日

南壁・朱雀尾羽の穴もしくは凹み

(例5)



2005 年 6 月 10 日



2006 年 8 月 25 日