

高松塚古墳石室内外環境の細菌調査報告

東京大学名誉教授、テクノスルガ・ラボ

杉山 純多

東京文化財研究所 木川 りか・佐野 千絵

供試試料

高松塚古墳より採取した種々の試料のうち、細菌（バクテリア）の分離に供した試料を、試料採取時期および試料位置カテゴリ別に分類し表 1 に示す。

表 1. 高松塚古墳から採取した試料のうち、細菌の分離に供した採取時期別の試料数.

試料採取 年月	出来事	試料採取箇所の位置カテゴリ					計
		石室内	取合部	壁石間	石室外	墳丘部	
2004.5-9	冷却前	—	—	—	—	—	—
2005.9	冷却直後	8	—	—	—	—	8
2006.2-12	冷却後安定期	42	4	—	1	2	49
2007.1-9	石室解体	14	8	21	16	—	59
2008.2-12 2009.2	墳丘部発掘	—	—	—	—	11	11
計		64	12	21	17	13	127

—：採取試料がないことを意味する。

方法

高松塚古墳石室内外の様々な採取試料より、塗沫平板法により細菌の分離を行なった。培地は Nutrient agar をもちい、30℃、好気条件下にて 3~7 日間培養を行なった。塗沫平板法により認められたコロニーを、同一条件にて純化・培養し、細菌株を得た。純化された細菌株は、目視観察（コロニー形態、コロニー色調、コロニー粘稠性、細胞形態、グラム染色性、芽胞形成の有無、滑走運動性）によりグルーピングを行なった。目視観察によるグルーピングは、それぞれの試料採取時期で得られた菌株毎に、都度行なった。

得られた細菌株の菌種推定には、16S rDNA に基づく相同性検索および分子系統解析により行なった。16S rDNA の解析に供する菌株は、試料採取時期毎に、目視観察によるグルーピングの結果を基に、都度代表的な菌株を選定し、解析に供した。16S rDNA 塩基配列が同一である菌株同士は、互いの同一の帰属分類群に推定した。また、目視観察による

グルーピングの結果、同一グループに含まれた菌株は、互いに同一の帰属分類群とした。なお、相同性検索は BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) パラメーターをもちい、分子系統解析は、近隣結合法により行なった。

結果および考察(表 2 参照)

高松塚古墳石室内の細菌相の変化 (2005. 9~2007. 4)

高松塚古墳石室内から採取した、2005 年 9 月から 2007 年 4 月までの計 64 点の採取試料より計 183 株を得た。冷却開始直後 (2005 年 9 月) の細菌相は、ファーミキューテス門 (*Firmicutes*) の *Bacillus* 属 (*B. thuringiensis* に近縁) の割合が高かった。冷却後安定期 (2006 年 2 月から 10 月) においては、冷却開始直後で高い割合をしめした *Bacillus* 属に加え、アルファプロテオバクテリア綱 (*Alphaproteobacteria*) の *Ochrobactrum* 属、ベータプロテオバクテリア綱 (*Betaproteobacteria*) の *Bordetella* 属およびガンマプロテオバクテリア綱 (*Gammaproteobacteria*) の *Stenotrophomonas* 属の割合が突出して多く分離された。これらは、石室内の冷却の安定に伴う環境の変化により、細菌相が変化したものと考えられる。一方、解体開始時 (2007.4) には、環境の変化により、*Bordetella* 属および *Stenotrophomonas* 属の割合が減少したことが認められる。なお、何れの試料採取時期においても、ファーミキューテス門の *Bacillus* 属 (*B. thuringiensis* に近縁) の分離頻度が最も高く、高松塚古墳石室壁画面上における細菌相において、最も主要な種であると考えられる。

高松塚古墳石室内外の細菌相の比較 (2005. 9~2007. 8)

高松塚古墳を取り巻く、各試料位置カテゴリーの内、石室内で主要な分類群であった *Bacillus* 属 (*B. thuringiensis* に近縁)、*Ochrobactrum* 属および *Stenotrophomonas* 属は、何れも壁石間、取合部、石室外からも分離されている。このことから、これらの種は、石室外の環境から石室内に侵入し、その環境に適応したものと考えられる。しかし、石室内で主要であった *Bordetella* 属は、他の環境からはほとんど分離されていない。

一方、墳丘部 1 (2006) からは、ファーミキューテス門の *Bacillus* 属に加え、ガンマプロテオバクテリア綱、アクチノバクテリア綱 (*Actinobacteria*) など、多様な分類群が分離された。しかし、石室内の試料位置カテゴリーからも分離されている分類群は、*Bacillus* 属 (*B. thuringiensis* に近縁) および *Bordetella* 属のみであった。墳丘部 2 (2008.8~2009.2) からは、ファーミキューテス門の *Bacillus* 属が主要な分離株であった。また、同じファーミキューテス門の中でも *Lysinibacillus* 属、*Brevibacillus* 属、*Penibacillus* 属なども分離され、一部、アクチノバクテリア綱の *Nocardia* 属、*Streptomyces* 属が分離されたが、これらは、石室内、壁石間、取合部の試料カテゴリーからは分離されていない。何れの分類群も、土壌からの分離例の多い菌群である。これら分離株の中で、高頻度で分離された分類群は、*Bacillus* 属であり、特に、*B. thuringiensis* に近縁な菌株と *B. simplex* に近縁な菌株であった。石室内の主要分類群のうち、*B. thuringiensis* に近縁な菌株のみが、墳丘部からも高頻度で分離されている。一方、石室内の主要分類群であった *Ochrobactrum* 属、*Stenotrophomonas* 属は、墳丘部からは分離されていない。ただし、墳丘部の試料については、採取の段階でかなり土が乾燥していたため、より水分の多い環境を好む微生物は分離の段階ではあまり得られてこなかった可能性もあることを十分考慮する必要がある。

Bacillus 属では、*B. thuringiensis* に近縁な種が石室内で最優先種であったが、壁石間、石室外の試料からは同じ *Bacillus* 属の中でも *B. simplex* に近縁な分類群の分離の割合が高かった。この *B. simplex* に近縁な分類群は、石室周辺環境に多く存在するものの、石室内の環境には適応できなかった可能性が考えられる。

高松塚古墳壁面上バイオフィームからの細菌分離株の比較 (2005. 5~2007. 4)

高松塚古墳壁面上のバイオフィームから分離された菌株の 16S rDNA に基づく分子系統樹を図 1 に示す。バイオフィームから分離された菌株は、非常に多様な分類群に亘って多様性に富むことがわかる。

表2. 各試料位置カテゴリからの細菌分離株の分布

試料位置カテゴリ	石室内					壁石間	取合部	石室外	墳丘部	
	合計	冷却開始直後	冷却後安定期	石室解体時	墳丘部1				墳丘部2	
	2005.9 - 2007.4	2005.9	2006.2 - 2006.10	2007.4	2007.4 - 2007.8				2006.5 - 2007.5	2006.7 - 2007.8
試料採取時期	2005.9 - 2007.4	2005.9	2006.2 - 2006.10	2007.4	2007.4 - 2007.8	2006.5 - 2007.5	2006.7 - 2007.8	2006.7	2008.8 - 2009.2	
試料数	65	8	43	14	21	12	17	2	11	
Firmicutes 門										
Bacillaceae 科										
<i>Bacillus</i> sp. 1 (B. aff.* <i>thuringiensis</i>)	63	7	42	14	11	6	4	2	7	
<i>Bacillus</i> sp. 2 (B. aff. <i>idriensis</i>)							1			
<i>Bacillus</i> sp. 3 (B. aff. <i>oshimensis</i>)								1		
<i>Bacillus</i> sp. 4 (B. aff. <i>gibsonii</i>)								1		
<i>Bacillus</i> sp. 5 (B. aff. <i>marisflavi</i>)								1		
<i>Bacillus</i> sp. 6 (B. aff. <i>simplex</i>)					12	1	7		4	
<i>Bacillus</i> sp. 7 (B. aff. <i>alitudinis</i>)							1			
<i>Bacillus</i> sp. 8 (B. <i>amyloliquefaciens</i> に近縁)									4	
<i>Bacillus</i> sp. 9 (B. <i>cereus</i> に近縁)									1	
<i>Bacillus</i> sp. 10 (B. aff. <i>weihenstephanensis</i> or B. aff. <i>mycoides</i>)									1	
<i>Lysinibacillus</i> sp.									2	
Paenibacillaceae 科										
<i>Brevibacillus</i> sp. (B. aff. <i>reuszeri</i>)									2	
<i>Paenibacillus</i> sp. 1 (P. <i>alvei</i> に近縁)							1		3	
<i>Paenibacillus</i> sp. 2 (P. <i>lautus</i> に近縁)									1	
Alphaproteobacteria 綱										
Rhizobiales 目										
<i>Ochrobactrum</i> sp. 1	2	2								
<i>Ochrobactrum</i> sp. 2 (O. aff. <i>rhizosphaerae</i>)	33		26	7	5	1	1			
<i>Ensifer</i> sp. (E. aff. <i>adhaerens</i>)									1	
<i>Devosia</i> sp. 1 (D. <i>neptuniae</i> に近縁)					2					
<i>Devosia</i> sp. 2 (D. <i>neptuniae</i> に近縁)					2					
<i>Mesorhizobium</i> sp.							1			
<i>Phyllobacterium</i> sp. 1 (P. aff. <i>ifriqiense</i>)					1		1			
<i>Phyllobacterium</i> sp. 2 (P. <i>mysinacearum</i> に近縁)					1					
<i>Rhizobium</i> sp. (R. aff. <i>radiobacter</i>)	1		1							
Sphingomonadaceae 科										
<i>Sphingobium</i> sp. (S. <i>yanoikuyae</i> に近縁)	1	1								
<i>Sphingopyxis</i> sp.					1		1			
Betaproteobacteria 綱										
Alcaligenaceae 科										
<i>Bordetella</i> sp. 1 (B. <i>petrii</i> に近縁)	12		12						1	
<i>Bordetella</i> sp. 2 (B. <i>petrii</i> に近縁)	6		6		1					
<i>Achromobacter</i> sp. (A. aff. <i>spanius</i>)	5	1	3	1	1					
<i>Cupriavidus</i> sp. (C. aff. <i>necator</i>)							1			
<i>Tetrathobacter</i> sp. (T. aff. <i>kashmirensis</i>)	6		2	4	2	1	1			
Gammaproteobacteria 綱										
Xanthomonadaceae 科										
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 1 (新種)	23	1	20	2	3	2	2			
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 2 (S. aff. <i>maltophilia</i>)	2		2							
<i>Stenotrophomonas</i> sp. 3 (S. aff. <i>maltophilia</i>)						1				
<i>Pseudoxanthomonas</i> sp. (P. <i>spadix</i> に近縁)	2	1	1							
Xanthomonadaceae bacterium	3		3		2		1			
Enterobacteriaceae 科										
<i>Enterobacter</i> sp.									1	
Enterobacteriaceae bacterium						1				
<i>Serratia</i> sp. 1 (S. aff. <i>grimesii</i>)						2				
<i>Serratia</i> sp. 2 (S. aff. <i>quinivorans</i>)	1			1						
<i>Serratia</i> sp. 3 (S. aff. <i>ficaria</i>)							1			
Pseudomonadaceae 科										
<i>Pseudomonas</i> sp. 1 (P. <i>nitroreducens</i> に近縁)									1	
<i>Pseudomonas</i> sp. 2 (P. <i>libanensis</i> に近縁)	1			1						
<i>Pseudomonas</i> sp. 3 (P. aff. <i>chlororaphis</i>)					1					
Actinobacteria 綱										
Micrococccineae 亜科										
<i>Agromyces</i> sp. (A. <i>ramosus</i> に近縁)	1		1							
<i>Cellulomonas</i> sp. (C. aff. <i>hominis</i>)									1	
Micrococccineae bacterium								2		
<i>Arthrobacter</i> sp. 1 (A. aff. <i>defluvi</i>)								1		
<i>Arthrobacter</i> sp. 2 (A. aff. <i>oxydans</i>)								2		
<i>Curtobacterium</i> sp. (C. aff. <i>citreum</i>)								1		
<i>Microbacterium</i> sp. 1 (M. aff. <i>xylanilyticum</i>)	1	1								
<i>Microbacterium</i> sp. 2 (M. aff. <i>resistens</i>)	3	2	1							
<i>Microbacterium</i> sp. 3 (M. <i>profundi</i> に近縁)	2		2		3					
<i>Microbacterium</i> sp. 4 (B. aff. <i>paraoxydans</i>)						1				
<i>Microbacterium</i> sp. 5						1			1	
<i>Microbacterium</i> sp. 6					5					
<i>Microbacterium</i> sp. 7					1					
<i>Micrococcus</i> sp. (M. aff. <i>luteus</i>)							1			
Promicromonosporaceae bacterium	1		1							
<i>Promicromonospora</i> sp. 1 (P. <i>vindobonensis</i> に近縁)						1				
<i>Promicromonospora</i> sp. 2 (P. aff. <i>sukumoe</i>)					2	1				
<i>Promicromonospora</i> sp. 3					1					
Propionibacterineae 亜科										
<i>Pimelobacter</i> sp. (P. aff. <i>simplex</i>)					1					
Corynebacterineae 亜科										
<i>Nocardia</i> sp. (N. aff. <i>nova</i>)									3	
<i>Rhodococcus</i> sp. 1 (R. aff. <i>qingshengii</i>)	5		5			2	1			
<i>Rhodococcus</i> sp. 2 (R. <i>wratislaviensis</i> に近縁)					1		3			
Pseudonocardia 科										
<i>Amveolatopsis</i> sp. (A. <i>saalfeldensis</i> に近縁)							3			
Streptomyces 属										
<i>Streptomyces</i> sp. 1	4		4		10		3			
<i>Streptomyces</i> sp. 2					1					
<i>Streptomyces</i> sp. 3									1	
<i>Streptomyces</i> sp. 4									1	
Bacteroidetes 門										
Sphingobacteriaceae 科										
<i>Olivibacter</i> sp. (O. aff. <i>soji</i>)	3		3		5	1	1			
Sphingobacteriaceae bacterium					2					
Flavobacteriaceae 科										
<i>Chryseobacterium</i> sp. 1	1		1		1					
<i>Chryseobacterium</i> sp. 2									1	
総分離株数	182	16	136	30	78	22	42	12	30 (1)	

*: affinityの略.