

高松塚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

□ 高松塚古墳壁画生物劣化にかかわる微生物調査報告 1－概要－

1. はじめに
2. 採用した微生物同定の手法
3. 高松塚古墳石室内外から収集したサンプルの概要
4. 高松塚古墳の菌類相について
 - 4-1. 石室内外の菌類相
 - 4-1-1. 石室内の菌類相の変化 (2004. 5～2006. 12)
 - 4-1-2. 石室内外の菌類相の比較 (2004. 5～2007. 5)
 - 4-2. 主要な菌類の正体 (アイデンティティ)
 - 4-2-1. フザリウム属
 - 4-2-2. トリコデルマ属
 - 4-2-3. アオカビ属
 - 4-2-4. 暗色系アクレモニウム属
5. 高松塚古墳のバクテリア相について
 - 5-1. 石室内のバクテリア相の変化 (2005. 9～2006. 10)
 - 5-2. 石室内外のバクテリア相の比較 (2005. 9～2007. 4)
6. 高松塚、キトラ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
 - 6-1. カビ
 - 6-2. 酵母
 - 6-3. バクテリア
7. 高松塚古墳石室内外の微生物群集解析
 - 7-1. バクテリア
 - 7-2. 菌類
8. 要約と展望

□ 高松塚古墳壁画生物劣化にかかわる微生物調査報告 2

－石室取り出し作業中に採取した試料の顕微鏡観察結果について－

1. 2007 年 5 月 10 日に西側石 3 南小口の上半部から採取した漆喰片試料 (試料 No. T7510-1:147 次 5 ALI 西側石南小口上半漆喰 (西 3-2 石間) 07510 の観察所見
2. 盗掘口カバー裏面の直接観察所見

□ 高松塚古墳壁画生物劣化にかかわる微生物調査報告 3

－仮設修理施設に搬入された天井石 3 および壁画面に由来する乾燥ゲルの観察所見－

1. 天井石 3 壁面に由来する乾燥ゲル (バイオフィルム) について
2. 高松塚古墳壁画面に由来する乾燥ゲルの走査型電子顕微鏡による観察所見

高松塚古墳壁画生物劣化にかかわる微生物調査報告 1

—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

高松塚古墳石室においては、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きており、目視調査、滅菌綿棒によるサンプリングや、常法による分離・培養・属レベルの同定などが行われてきた。しかし、2001年春に実施された高松塚古墳の取合部崩落止め工事以降、カビが取合部および石室内部に発生・拡大し、さらには石室壁面上にバイオフィルム（菌類とバクテリアの混生体）が出現するなど、微生物の種類や特徴、微小動物（ダニ、トビムシなど）や内部環境との関係も含め、その実体を究明することが必要となった。そのため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タ（微生物相、microbiota）解明を目的とし、2004年5月以降、2007年石室解体作業を経て、同年8月の床石取り出し終了まで適時石室内外の微生物調査（目視レベル）を行ない、その際従来とは異なるサンプル採取法や微生物分離法、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。本報告では採用した手法等も含め、現在までに得られた基礎データを報告する。

2. 採用した微生物同定の手法

文化財と微生物劣化とのかかわりを理解するには文化財の基質特性（たとえば高松塚古墳の場合、漆喰や壁石）、環境要因（栄養源、光、酸素、温度、水分、pHなど）、微生物の多様性（種類、生理的特性、生活環、ライフスタイル、生態、遺伝など）が基本となる。このような条件を考慮した上で、以下のような微生物同定の手法を採用した。それらの手法の概略を図1に示す。

(1) 培養可能な微生物については滅菌綿棒と湿室培養法を併用して採取、分離、培養を行ない、採取サンプルの光学顕微鏡・走査型電子顕微鏡（SEM）観察により主として培養、形態レベルのデータを取得した。そして選別した純粋分離株について核小サブユニット・リボソーム RNA（nSSU rRNA; バクテリア、菌類）、核大サブユニット・リボソーム RNA の D1/D2 領域（nLSU rRNA D1/D2; 菌類）、ITS 領域（一部の菌類）、伸長因子 1- α （elongation factor-1 alpha, EF-1 α ; 一部の菌類）、 β -tubulin（一部の菌類）の遺伝子塩基配列を決定し、近隣結合（neighbor-joining; NJ と略記）法、ベイズ（Bayes）法（菌類のみ）等で系統解析を行なった。種レベルの同定には得られた表現型・遺伝子型両形質データを統合的に解析する方法を用いた。

(2) 培養法によらない微生物（主としてバクテリア）の検出については、採取サンプルから混合 DNA を抽出し、これを用いた変性剤濃度勾配ゲル電気泳動法（Denaturing Gradient Gel Electrophoresis、DGGE と略記）を採用した。DGGE 法は現在、バクテリア（細菌）の群集解析に広く用いられている。

3. 高松塚古墳石室内外から収集したサンプルの概要

これまで高松塚古墳石室内外から微生物学的調査・研究用に採取したサンプルの概要を図 2 に示す。2004 年 5 月から 2007 年 8 月にまでに、壁画面に発生したカビのコロニーやゲル状物質等の綿棒採取サンプル、主に石室解体に伴って得られた土壌、漆喰片、植物の根など、総計 661 点のサンプルを採取した。

これまで採取したサンプルは採取した箇所別に大きく 3 つのカテゴリーに分けて以下の解析の供した；

- ①「石室内」～2004 年 5 月から 2006 年 12 月までの“閉鎖”環境下にあった石室内空間から採取した壁画面を含んだ壁面および床面等のサンプル。
- ②「石室外」～古墳周辺の竹藪等の土壌サンプルや墳丘部の発掘・石室解体作業に伴い採取されたサンプル（墳丘部の土壌、取合部近辺に土壌、壁石の裏面（壁画面の反対側で畦等の周辺土壌に接している面）、畦、床石下の床面土壌等を含む）。
- ③「壁石間」～主に 2007 年 4 月以降の石室解体作業に伴い採取された「石室内」と「石室外」の中間的なサンプル（壁石間の小口面、目地漆喰、盗掘口カバー等）。また、今回の報告では暫定的に 2006 年 11 月の塞ぎ石が取外しされるまでの“取合部”からの採取サンプルも含む。

以下、本文では「石室内」、「石室外」、「壁石間」と表記する。

採取したサンプル数は、膨大であり、一度には精密な分析はできないため、今回はそのなかでも各々の採取位置や採取時期とにらみあわせ、重要と考えられるサンプルを精選して調べた。

4. 高松塚古墳の菌類相について

4-1. 石室内外の菌類相

4-1-1. 石室内の菌類相の変化（2004. 5～2006. 12）

2004 年 5 月から 2006 年 12 月までの高松塚古墳石室内で採取したサンプル 105 点における菌類相（mycobiota）の変化を図 3 に示す。この期間では、フザリウム（*Fusarium*）、トリコデルマ（*Trichoderma*）、アオカビ（*Penicillium*）の 3 属が石室内における優占菌類群であった。2005 年 9 月の石室解体に伴う墳丘部の冷却開始以降、これまでの主要菌類群であったフザリウム、トリコデルマ両属は徐々に衰退し、これらに代わって、2006 年 5 月以降、飛鳥美人として知られる女子群像の“黒い染み”の原因カビ、すなわち暗色系アクレモニウム属[*Acremoium* (sect. *Gliomastix*)]がアオカビ属と共に石室内の優占菌類群として観察された。また、2001 年 12 月に石室内北壁と南壁面に発生した茶褐色の染み（色素）をだすカビ、シリンドロカルポン属（*Cylindrocarpus* ; TBT-1・TBT-2 の 2 株）（国宝高松塚古墳壁画恒久保存対策検討会（第 10 回）平成 19 年 11 月 30 日－資料 5「高松塚古墳の劣化の経緯と生物的要因について」より）は 2004 年から 2006 年の石室内の調査では検出されていないことから、2001 年の発生以降、衰退してしまった可能性が考えられた。

4-1-2. 石室内外の菌類相の比較 (2004. 5～2007. 5)

前項 4-1-1 で述べた“石室内 (2004.5～2006.12)”の菌類相のデータと“壁石間 (2004.5～2007.5) (2004.5～2006.7 までの取合部からの採取サンプルも含む)”、“石室外 (2006.7～2007.5)”からの採取サンプルから得られた菌類相を比較解析した。分離・培養作業は現在継続中であるので、現時点までに得られたデータの概要を図 4 に示す。その結果、石室内 105 点、壁石間 47 点、石室外のサンプル 70 点から分離された菌類相に違いが見られた。

石室内の優占菌類群であったアオカビ属、その中でも後述する *Penicillium* sp. 1 は石室内外いずれのサンプルにおいても共通する優占菌類として分離されたが、主に石室解体時の壁石間および取合部を含む石室外のサンプルでは *Penicillium* sp. 1 以外のアオカビ属のメンバーが多数分離される傾向が認められた。また、2004 年 5 月～2004 年 9 月の冷却前までの取合部からのサンプルから得られた菌類相は、限られたサンプル数での結果ではあるが、石室内のものとほぼ類似していた。一方、冷却以降、2006 年 5 月に取合部 (西側) に発生した“黒いカビ様の汚れ”の主要菌類であったオイドオデンドロン属 (*Oidiodendron*) (国宝高松塚古墳壁画恒久保存対策検討会 (第 6 回) 平成 18 年 6 月 29 日—資料 5-2「高松塚古墳における微生物被害への対応について」にて報告済) は 2007 年に石室内から僅かながらその発生が認められた以外は、石室内からの発生は認められていない。

石室解体時に採取した壁石間のサンプルでは、石室内では認められなかった暗色系アナモルフ菌類 (*Phialophora* sp. 等) が多数分離された。他方、石室内の壁面の黒い染みにかかわる暗色系アクレモニウム属の仲間は壁石間や石室外のサンプルからは分離例が少ないなどの結果が得られた。

なお、石室解体作業中に採取した漆喰片サンプル (147 次 5ALI 西側石 3 南小口上半漆喰 070510 = サンプル T7510-1) の光学顕微鏡・SEM による観察所見については別紙資料に詳述した。

4-2. 主要な菌類の正体 (アイデンティティ)

高松塚古墳石室内の汚染・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 (6-2. バイオフィルムの項参照)。

4-2-1. フザリウム属

これまで高松塚 (2004.5～9)・キトラ (2005.2～4) 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 (図 5)。キトラ 2 分離株は後者クレード内の *Fusarium oxysporum* species complex に帰属した。FSSC クレード内には 2001 年 12 月に石室内北壁壁面に発生した白色を呈するカビ (TBT-3 株) と 2002 年 10 月に石室内東壁青龍付近の黒い汚れの箇所から分離した白色を呈するカビ (TBT-4 株) の 2 菌株も含まれていることから、同クレード内の種は 2001 年のカビの大発生以降、石室内に定着している常在菌類である可能性が考えられた。*Haematonectria haematococca* / FSSC クレードに位置した分離株の多くは高松塚古墳の石室内壁面から分離されており、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。

4-2-2. トリコデルマ属

これまで高松塚 (2004.5)・キトラ (2005.2) 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 *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 (図 6)。2003 年 9 月に取合部の擬土部分に発生したカビ (TBT-5 株) と 2004 年 4 月に盗掘口上奥に発生したカビ (TBT-7 株) の 2 分離株は *Harzianum-Virens* クレードに含まれた。そのうち、高松塚古墳由来のすべての分離株が土壌からの分離例が多く知られる *Harzianum-Virens* クレードに位置した。トリコデルマ属の仲間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。

4-2-3. アオカビ属

高松塚・キトラ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 (高松塚 7 株、キトラ 6 株) について 28S、ITS 遺伝子の塩基配列を決定し、系統解析を行ったところ、同属 *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、図 7 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・形態学的形質の観察結果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、土壌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。

4-2-4. 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優占菌類として分離された暗色系アクレモニウム属 [*Acremonium* (sect. *Gliomastix*)] は“飛鳥美人”と呼ばれる女子群像付近の“黒い染み”の原因微生物であった (図 8)。高松塚古墳の石室内から主に分離された暗色系アクレモニウムは、形態および 28S 分子系統学的データ、表現型、遺伝子型両形質などから、キトラ古墳の主要な暗色系アクレモニウムの株とは 1 株を除き別種と考えられる。現在注意深く種レベルの同定を進めているので、ここでは *Acremonium* (sect. *Gliomastix*) spp. として表記する。暗色系アクレモニウム属は 2001 年に石室内壁面に発生したことが報告されている (国宝高松塚古墳壁画恒久保存対策検討会 (第 10 回) 平成 19 年 11 月 30 日—資料 5「高松塚古墳の劣化の経緯と生物的要因について」より) が、2006 年 5 月以降に発生した種類と同じであるかどうかは不明である。

5. 高松塚古墳のバクテリア相について

5-1. 石室内のバクテリア相の変化 (2005. 9~2006. 10)

高松塚古墳石室内壁面から 2005 年 9 月から 2006 年 10 月までに採取されたサンプル 50 点におけるバクテリア相（細菌相、bacteriobiota）の変化を図 9 に示す。調査開始当初の 2005 年 9 月および 2006 年 2 月のバクテリア相はファーミキューテス門（*Firmicutes*）およびアクチノバクテリア門（*Actinobacteria*）の割合が高いのに対し、2006 年 5 月以降プロテオバクテリア門（*Proteobacteria*）の割合が高かった。このことから、この間に何らかの環境要因（おそらく墳丘部の冷却の影響による）によりバクテリア相が変化したと考えられる。また、アルファプロテオバクテリア綱の *Ochrobactrum* 属は 2006 年 2 月以降、ガンマプロテオバクテリア綱の *Stenotrophomonas* 属は 5 月以降主要な分類群として分離されている。また、2006 年 7 月にベータプロテオバクテリア綱（*Betaproteobacteria*）の *Bordetella* 属が突出して多く分離されている。全ての時期に共通してファーミキューテス門“バチルス綱（*Bacilli*）”の *Bacillus thuringiensis* に近縁な分類群の分離頻度が最も高いことから、高松塚古墳石室壁面上におけるバクテリア相において、最も主要な種であると考えられる。

5-2. 石室内外のバクテリア相の比較 (2005. 9~2007. 4)

石室の解体作業開始前後の高松塚古墳を取り巻く環境における各サンプル採取箇所によるバクテリア相の違いを比較したグラフを図 10 に示す。壁石間のサンプルには、石室解体作業開始前の取合部からの 4 サンプル（2006 年 5 月の 3 サンプル、2006 年 7 月の 1 サンプル）および前室からの 1 サンプル（2006 年 7 月の 1 サンプル）を含む。石室内壁面上では石室解体作業開始前後で共にプロテオバクテリア門の割合が 5 割を超えているのに対し、石室内以外のサンプルである壁石間および石室外では、ファーミキューテス門およびアクチノバクテリア門の割合が 6 割に達する。その内訳を見ると、全ての採取箇所において *B. thuringiensis* に近縁な分類群が分離されているが、壁面以外から *B. thuringiensis* とは異なる *B. simplex* も多数分離された。石室内の主要な分類群であるガンマプロテオバクテリア綱の *Stenotrophomonas* 属およびアルファプロテオバクテリア綱の *Ochrobactrum* 属についても壁石間や石室外サンプルから多数分離されている。取合部および前室サンプルからは、プロテオバクテリア門については *Ochrobactrum* 属が取合部より分離されているのみであり、*B. thuringiensis* に近縁な分類群およびアクチノバクテリア門に属するバクテリアが主に分離されている。これらの主要なバクテリア 3 種の近縁種は広く土壌に生息しており、分離報告も多数あることから、石室外環境に生息していたこれらのバクテリアが何らかの要因に拠り石室内部へと運ばれ、石室内に定着したものと推定される。

6. 高松塚、キトラ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。高松塚古墳から採取されたバイオフィルムについて、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて表面、裏面、断面の微細構造を観察した。その画像ならびに所見（別報）に示されているように、縦横に走るカビの菌糸や孢子塊（おそらく分生子）、バクテリアの細胞塊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から得られたデータと対比して、カビ、酵母、バクテリア別に述べる。

6-1. カビ

高松塚古墳石室内の壁画面に発生したゲル状サンプル（バイオフィルム）35 点（2004.7～2006.12）とキトラ古墳石室内の壁画面に発生したゲル状サンプル34 点（2005.9～2007.9）における菌類相の比較を行った（図 11）。また、2005 年 9 月 16 日に高松塚古墳石室内西壁白虎前肢下に発生したゲル状サンプルの光学顕微鏡観察像の一例を併せて図11に示した。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、一方、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。

6-2. 酵母

高松塚・キトラ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（図 12）。それぞれのバイオフィルムより比較的高頻度で分離された高松塚古墳の2新種およびキトラ古墳新種1は、いずれも *Candida membranifaciens* クレードに位置づけられた。このクレードは、昆虫からの分離報告例が多く、これらのバイオフィルムに由来する高松塚、キトラ古墳分離株もまた、昆虫を介して石室内に持ち込まれた可能性が示唆された。高松塚古墳分離のこれら1新種はともに、消毒薬として以前に使用されていたエチルアルコール（エタノール）を資化する一方で、イソプロピルアルコール（イソプロパノール）は資化しないことから、酵母の増殖という視点に限れば、エチルアルコールよりイソプロピルアルコールの方が消毒薬として優れている可能性がある。また、両新種ともに真正菌糸を形成する酵母であることから、これらの菌糸がバイオフィルムの基礎構造の一部となっている可能性がある。これらの新種には、分離源の古墳（tumulus）および高松塚に因み、それぞれの種形容語を *tumulicola*（古墳の住人という意味）、*takamatsuzukensis* と命名し、原著論文として投稿した。

6-3. 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）の分子系統学的位置の違いを比較解析した。その16S rDNA（SSU rRNA 遺伝子）に基づく分子系統樹を図 13 に示す。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。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、ベータプロテオバクテリア綱

（*Betaproteobacteria*）は高松塚古墳からのみ分離されており、キトラ古墳からは全く分離されなかった。アルファプロテオバクテリア綱では高松塚古墳に比べキトラ古墳の方が多様性に富んでいる。また、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。一方、*Bacillus* 属、*Rhizobium* 属、*Streptomyces* 属などの土壌からの分離報告の多い分類群は両古墳に共通している。これらのことから、古墳石室を取り巻く周辺環境よ

り、何らかの要因により石室内部に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。

7. 高松塚古墳石室内外の微生物群集解析

DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 法は近年、微生物（とくにバクテリア）の群集解析に適用され、高い検出率と高感度の群集解析の手法の一つとして評価されている。そこで、高松塚の石室内外からの採取サンプルについて、同法を用いてこれまで得られたデータの一部をバクテリアと菌類に分けて示す。

7-1. バクテリア

石室内外より採取したサンプルの DGGE (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis) 解析より得られた塩基配列をもとに分類群の推定を行ない、石室内外におけるそれらの割合を求め、大まかなバクテリア構成分類群をグラフに示した (図 14 左)。また、検出された優占種の中でも主要な分類群 (属レベル) を同図の下部に示した。石室内では、アルファプロテオバクテリア (綱)、ベータプロテオバクテリア綱、ガンマプロテオバクテリア綱およびシアノバクテリア門 (*Cyanobacteria*) に由来するバクテリアの存在が認められたのに対し、石室外では検出されたアクチノバクテリア綱、ファームキューテス門、バクテロイデテス門 (*Bacteroidetes*) に由来するバクテリアが認められないなど、石室内外では、優占するバクテリア分類群の構成に違いが認められた。一方、アルファプロテオバクテリア綱に由来するバクテリアは石室内外の両サンプルに共通して優占していることが確認され、特に *Ochrobactrum* 属などの根圏バクテリアが主要な優占種として検出された。図 14 右には、石室内外より採取されたサンプル由来の DGGE プロファイルを示す。石室内外のサンプルから *Ochrobactrum* 属バクテリア (黄色矢印) が検出された。また、石室内 (東壁) より *Stenotrophomonas* 属 (緑色矢印) が検出された。これらのバクテリアは分離培養法でも検出されていることから、異なる検出法 (分離法と DGGE 法) の結果に一致が認められた。このことから、石室内外には、広く *Ochrobactrum* 属バクテリアが優占していると考えられる。他方、石室内部には、*Stenotrophomonas* 属バクテリアが優占していると考えられた。

図 15 は *Ochrobactrum* 属を含む根粒菌の仲間、リゾビアーレス目 (order *Rhizobiales*) に帰属する分離株および DGGE によって得られた塩基配列を用いた系統樹を示した。分離培養法では石室解体前の壁画壁石などから多数の *Ochrobactrum* 属バクテリアが分離された。同じく壁画壁石のサンプルからの抽出 DNA を用いて行った DGGE でも *Ochrobactrum* 属や *Sinorhizobium* 属と一致する配列が得られた。加えて、DGGE で得られた配列は分離株とも完全に一致しており、DGGE 法の結果は分離法の結果を支持していた。このことから、分離された *Ochrobactrum* 属バクテリアはサンプル中の優占分類群の一つであると考えられる。*Ochrobactrum* 属バクテリアは根圏バクテリアとして知られ、土壌中から普通に分離される土壌バクテリアの仲間といえるが、石室内外 (石室内、石室外、壁石間) および石室解体後の壁画面の各サンプルから *Ochrobactrum* 属バクテリアが多数検出されていることから、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。

7-2. 菌類

菌類をターゲットにした DGGE 解析は、現段階ではまだ開発途上にあるため、以下は中間報告的な結果として報告する。

菌類をターゲットにした DGGE 解析を行った結果の概要を図 16 に示す。図 16 の左側は 18S (nSSU rRNA 遺伝子) の部分塩基配列を用いた DGGE プロファイルを示している。各サンプルから得られたバンドのうち、矢印のバンドの塩基配列を決定し、BLAST 検索を行った。その結果、子囊菌類、担子菌類、ツボカビ類が検索されたが、接合菌類は検索されなかった (同図右側参照)。それらのうち、子囊菌類が約 85% と高い割合であった。子囊菌類の中でもエウロチウム目 (order Eurotiales)、ボタンタケ目 (order Hypocreales)、カエトチリウム目 (order Chaetothyriales) が高い割合を示していた。特に、エウロチウム目、ボタンタケ目は、純粋分離培養法による分離株 (たとえばアオカビ属、アクレモニウム属、フザリウム属) でも高い割合を示していることから、両者のデータは一致している。

8. 要約と展望

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研究の方向性を以下に記す。

8-1. 高松塚古墳石室内のミクロビオータの属レベルの変化

2004 年 5 月～2006 年 2 月の調査で、主要な菌類は、フザリウム (*Fusarium*)、トリコデルマ (*Trichoderma*)、アオカビ (*Penicillium*) の 3 属であった。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。それに対して、石室解体に伴う冷却管始動 (2005 年 9 月) 以降、フザリウム、トリコデルマ両属は徐々に衰退し、暗色系アクレモニウム属 [*Acremoium* (sect. *Gliomastix*)] とその座を交代した。

バクテリアについては、ファーミキューテス門の *Bacillus* sp. (aff. *thuringiensis*) が最優占種として分離され、アルファプロテオバクテリア綱の *Ochrobactrum* 属、ガンマプロテオバクテリア綱の *Stenotrophomonas* 属がついで多かった。バクテリア相 (細菌相) の構成分類群でも墳丘部の冷却の影響によると考えられる変化が認められた。

8-2. 高松塚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、高松塚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

高松塚 (2004.5～9)・キトラ (2005.2～4) 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。FSSC クレードに位置した分離株の多くは高松塚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

これまで高松塚（2004.5）・キトラ（2005.2）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。大半の分離株が土壌からの分離例が多く知られる *Harzianum-Virens* クレードに位置した。トリコデルマ属の仲間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

高松塚・キトラ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（高松塚 7 株、キトラ 6 株）について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 5 月以降、高松塚古墳石室内の優占菌類として分離された暗色系アクレモニウム属 [*Acremonium* (sect. *Gliomastix*)] は“飛鳥美人”と呼ばれる女子群像付近の“黒い染み”の原因微生物であった。高松塚古墳の石室内から主に分離された暗色系アクレモニウムは、形態および 28S 分子系統学的データ、表現型、遺伝子型両形質などから、キトラ古墳の主要な暗色系アクレモニウムの株とは 1 株を除き別種と考えられる。現在注意深く種レベルの同定を進めている。

8-3. バイオフィルム

高松塚、キトラ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。また、走査型電子顕微鏡観察から、それらの微生物細胞や菌類菌糸は漆喰内に深く侵入している可能性が示された。

8-4. 石室内外のマイクロビオータの比較

古墳石室内外のマイクロビオータの種属構成を調べるのに有効と考えられる DGGE 法を適用したところ、石室内外のバクテリア構成分類群については、石室内外で優占するバクテリア分類群の構成に違いがあることが示唆された。

今後は採取サンプルから必要に応じて微生物分離作業を続行し、また DGGE 法による微生物群集解析も使える場合には適用して、石室内壁面・取合部、壁石間、周辺土壌などについて、生息場所と微生物種との関係を今後より詳細に明らかにしていきたい。

また、現在、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を開始している。

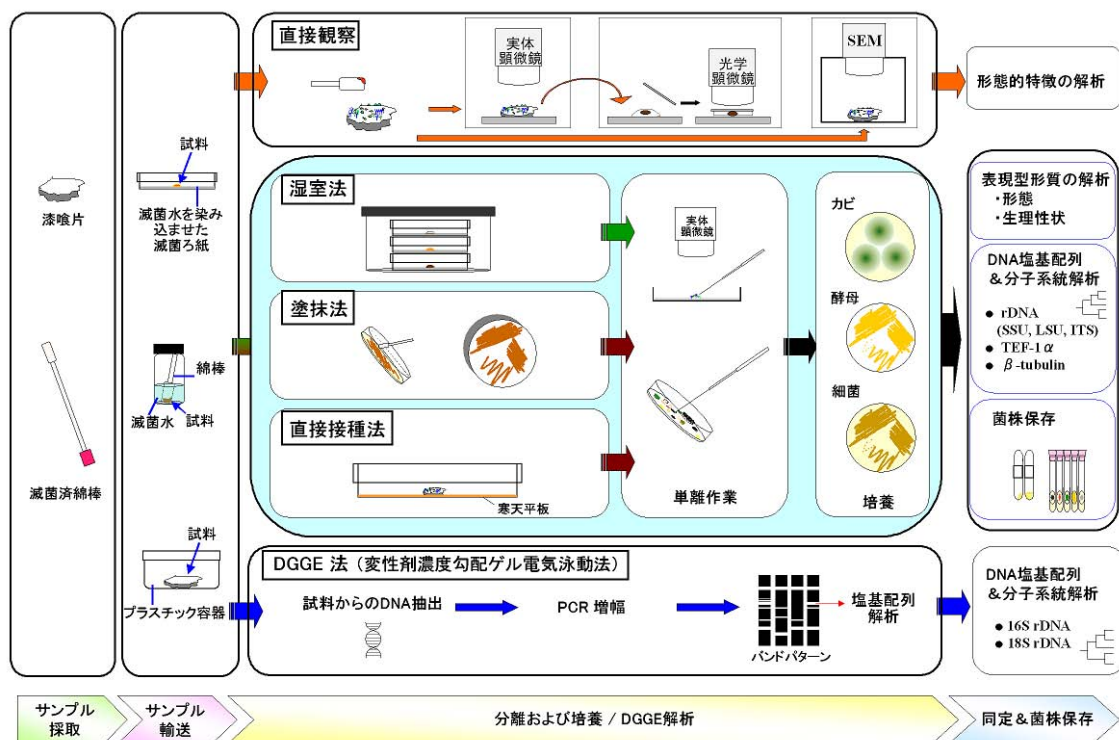


図 1. 微生物同定手法の概略

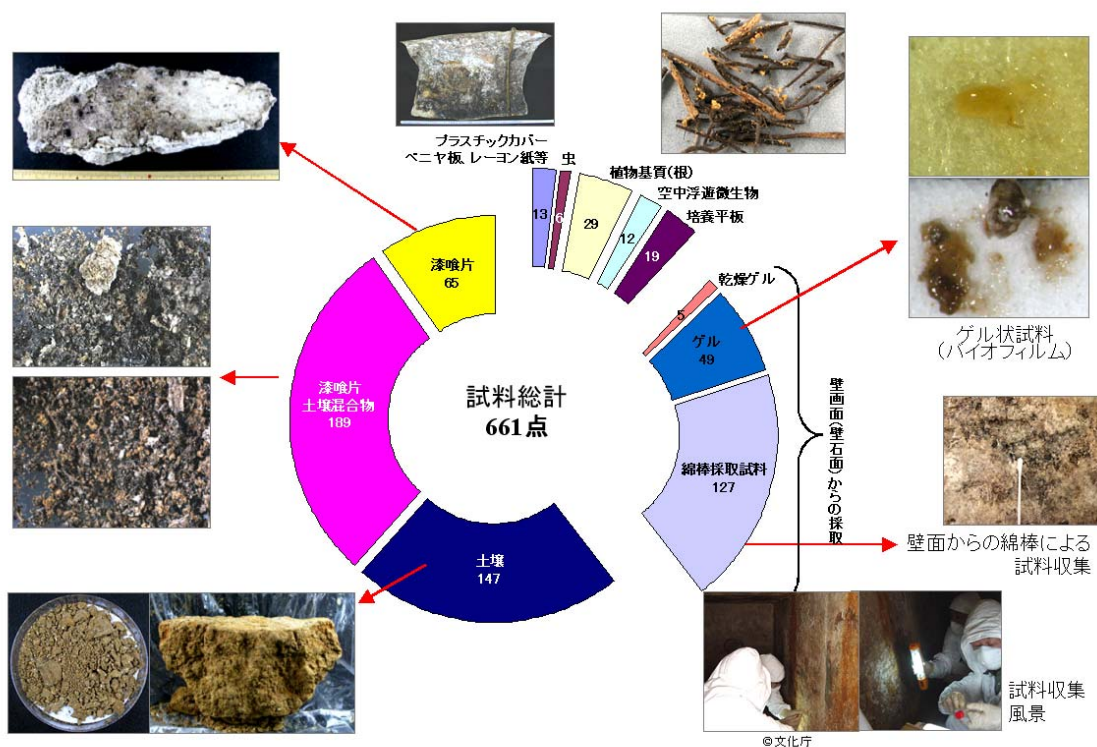


図 2. 高松塚古墳石室内外から収集したサンプルの概要 (2004.5~2007.8)

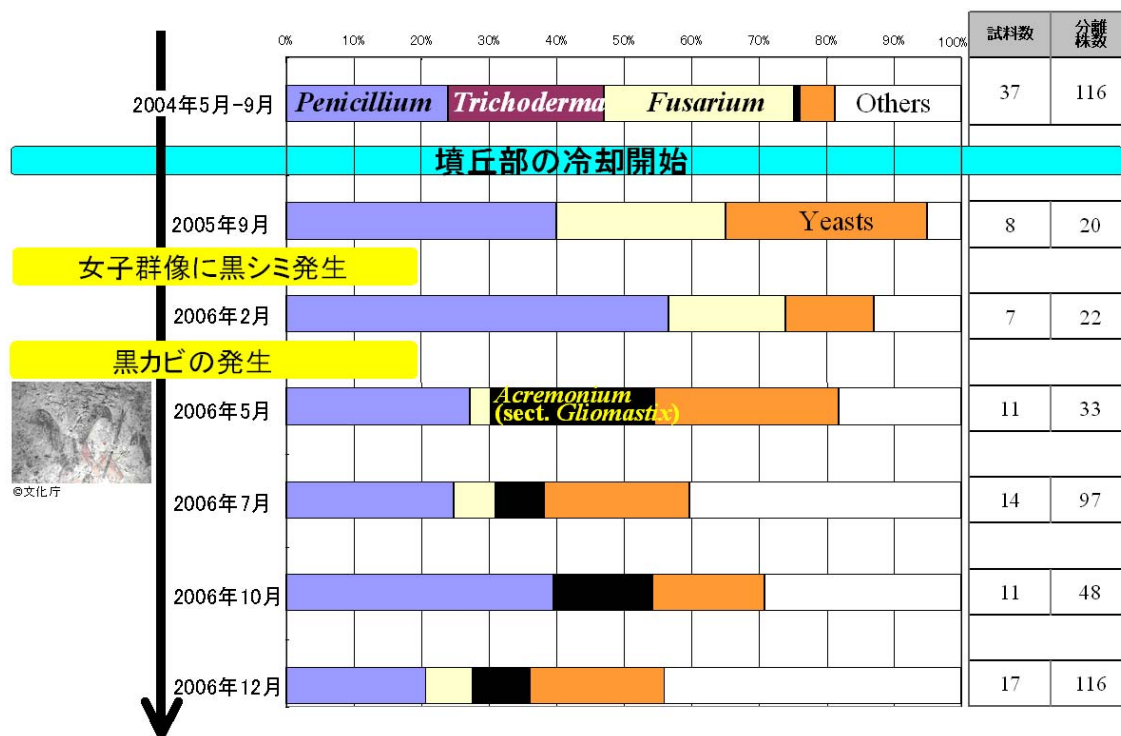


図 3. 高松塚古墳石室内の菌類相の変化（2004.5～2006.12）

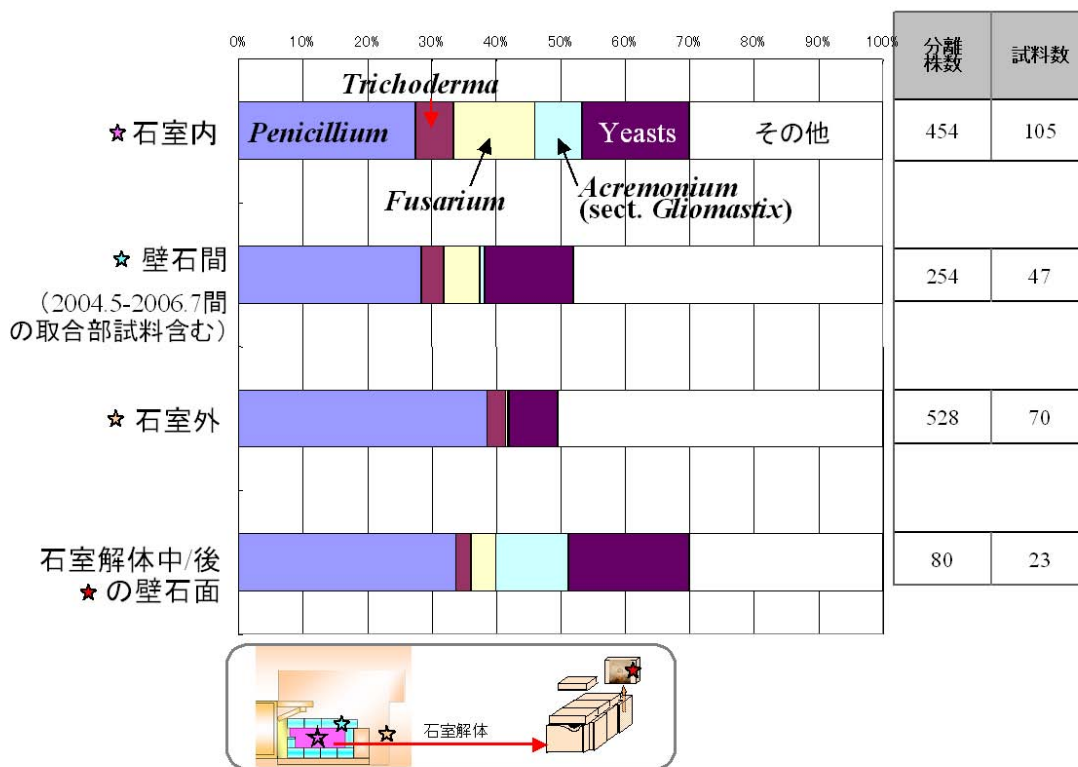


図 4. 高松塚古墳石室内外の菌類相の比較（2004.5～2007.5）

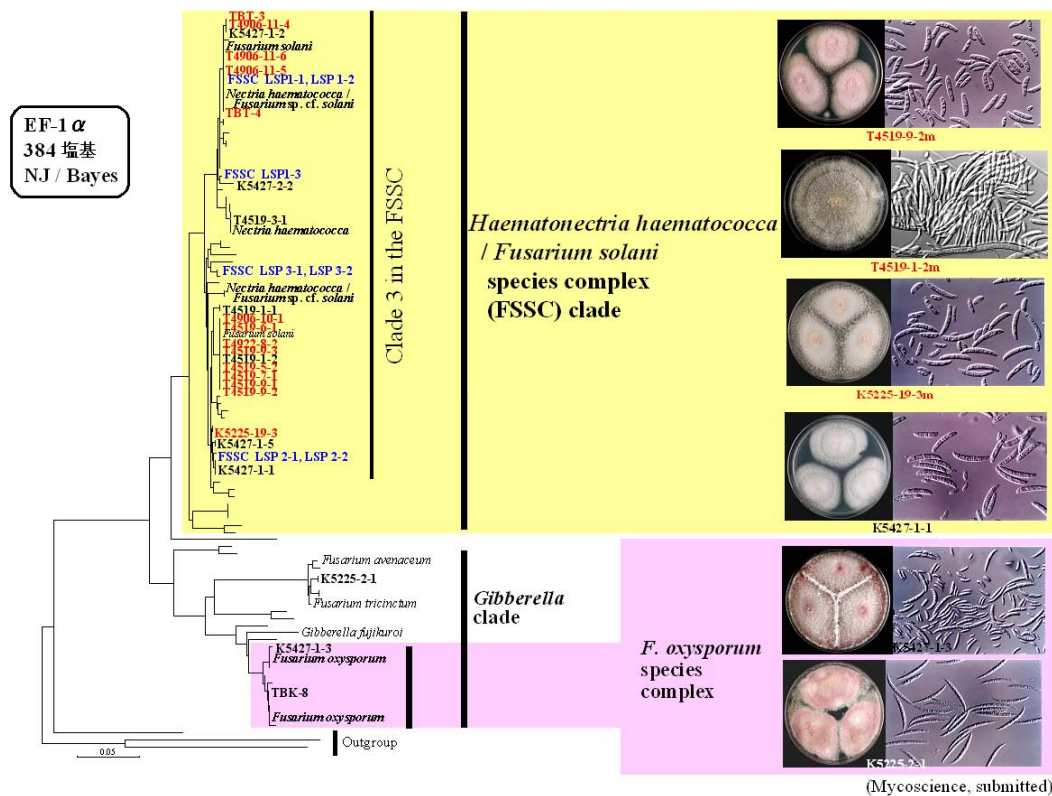


図 5. 高松塚・キトラ両古墳の石室内外から分離されたフザリウム属 (*Fusarium*) 24 株の EF-1 α 遺伝子を用いた分子系統樹 (Mycoscience, submitted). 菌株番号の略号: T 高松塚古墳分離株; K キトラ古墳分離株; LSP1-LSP-3 ラスコー洞窟 (フランス) から分離された *Fusarium solani* species complex (FSSC) 内の 3 系統種 (J. Dupont *et al.* 2007). 目盛り (図左下) = 0.05 塩基置換/サイト.
* 赤文字: 石室内からの分離株、黒文字: 取合部や小前室などの石室外からの分離株。

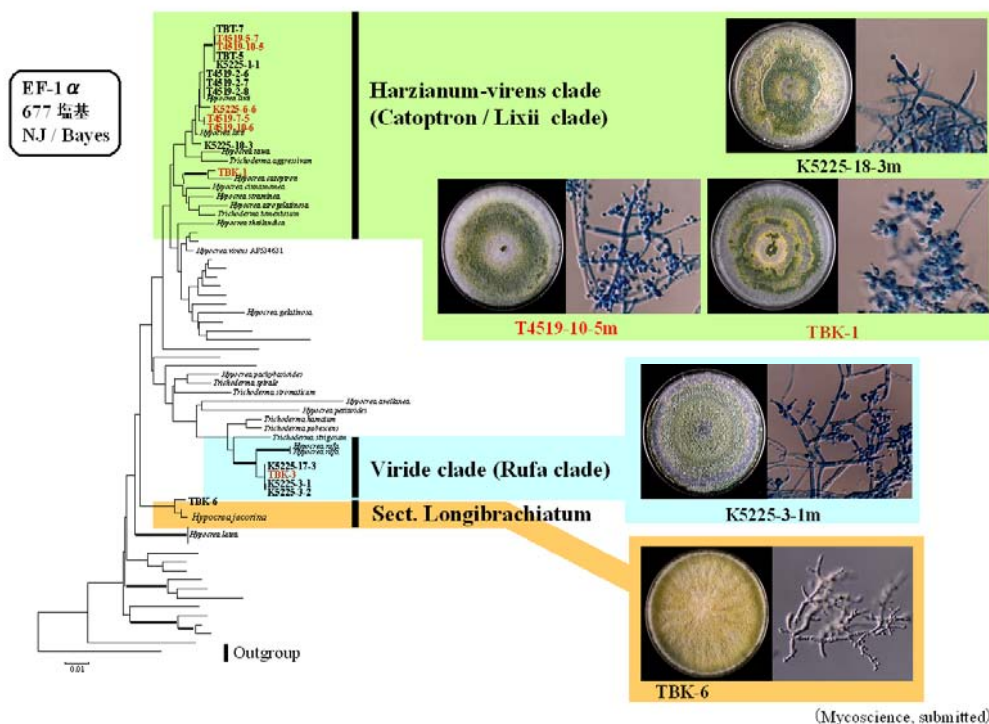


図 6. 高松塚・キトラ両古墳の石室内外から分離されたトリコデルマ属 (*Trichoderma*) 18 株の EF-1 α 遺伝子を用いた分子系統樹 (Mycoscience, submitted). 目盛り (図左下) = 0.01 塩基置換/サイト

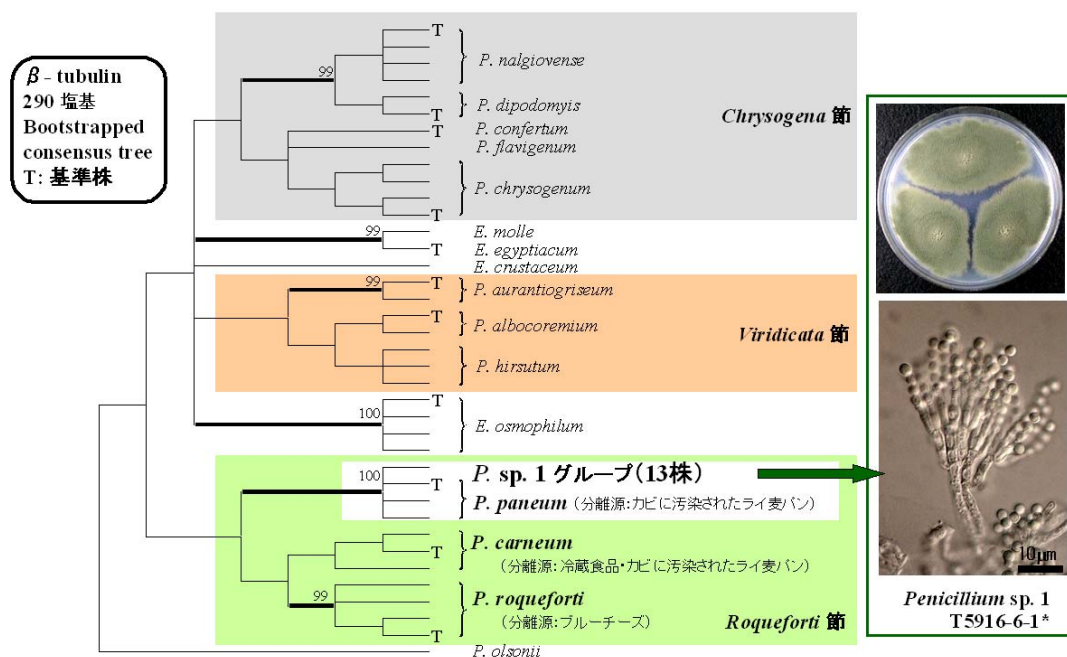


図 7. 高松塚・キトラ両古墳の石室内外から分離されたアオカビ属 (*Penicillium*) 13 株の β -tubulin 遺伝子を用いたブーツトラップ・コンセンサス系統樹。枝上の数字は 1000 回のサンプリングのブーツトラップ値 (%) (系統樹の統計的信頼度を示す指標、95%以上でその枝は統計的に有意とみなす、95%以下省略)。*石室内東壁女子群像下ゲル状サンプル (2005 年 9 月 16 日採取) からの分離株

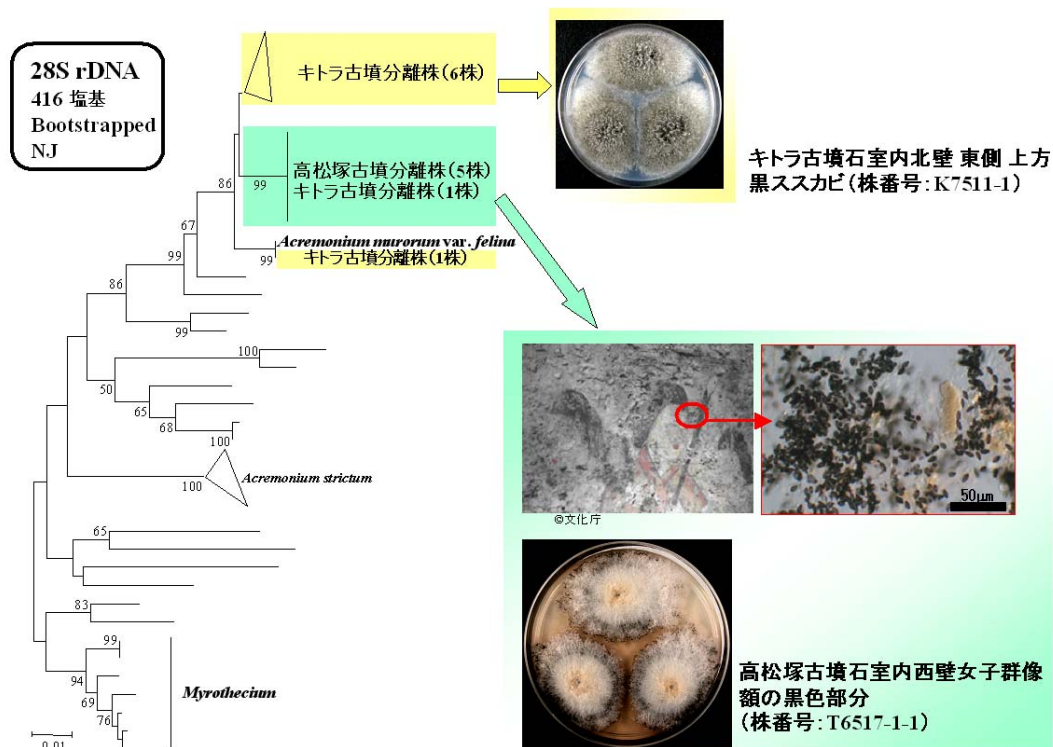


図 8. 高松塚・キトラ両古墳の石室内から分離された暗色系アクレモニウム属 [*Acremonium* (sect. *Gliomastix*)] 13 株の 28S rDNA 部分塩基配列を用いた分子系統樹。目盛り (図左下) = 0.01 塩基置換/サイト

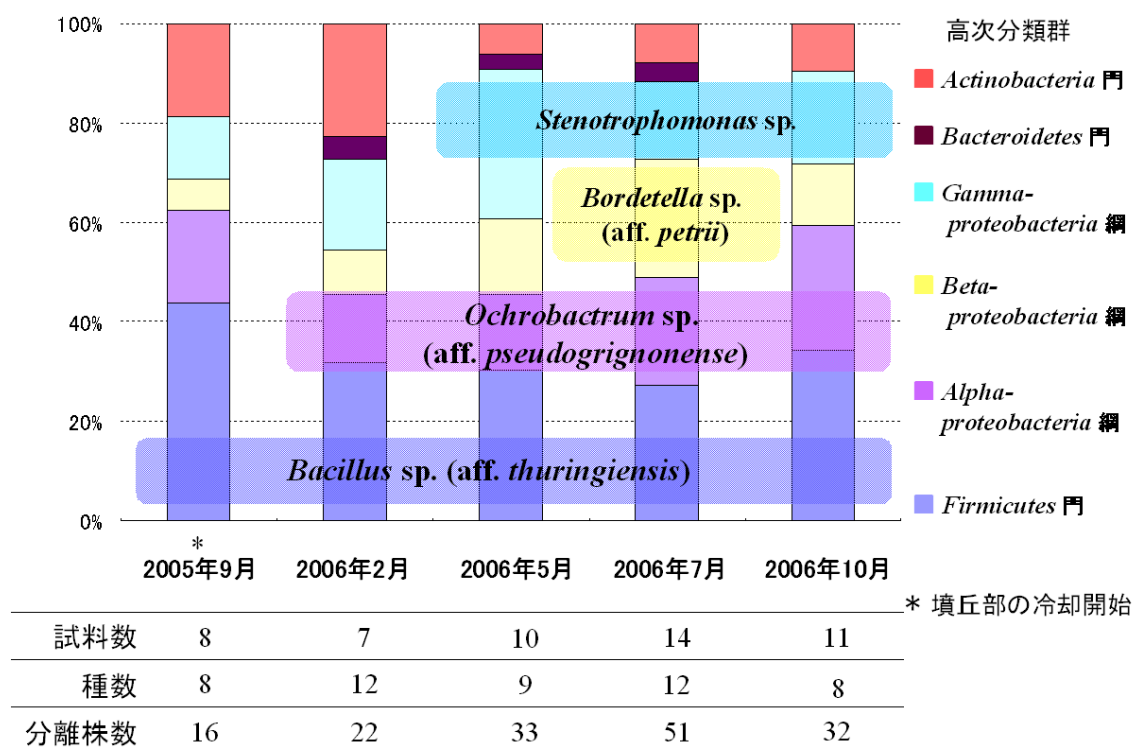


図 9. 高松塚古墳石室内のバクテリア相の変化 (2005.9～2006.10)

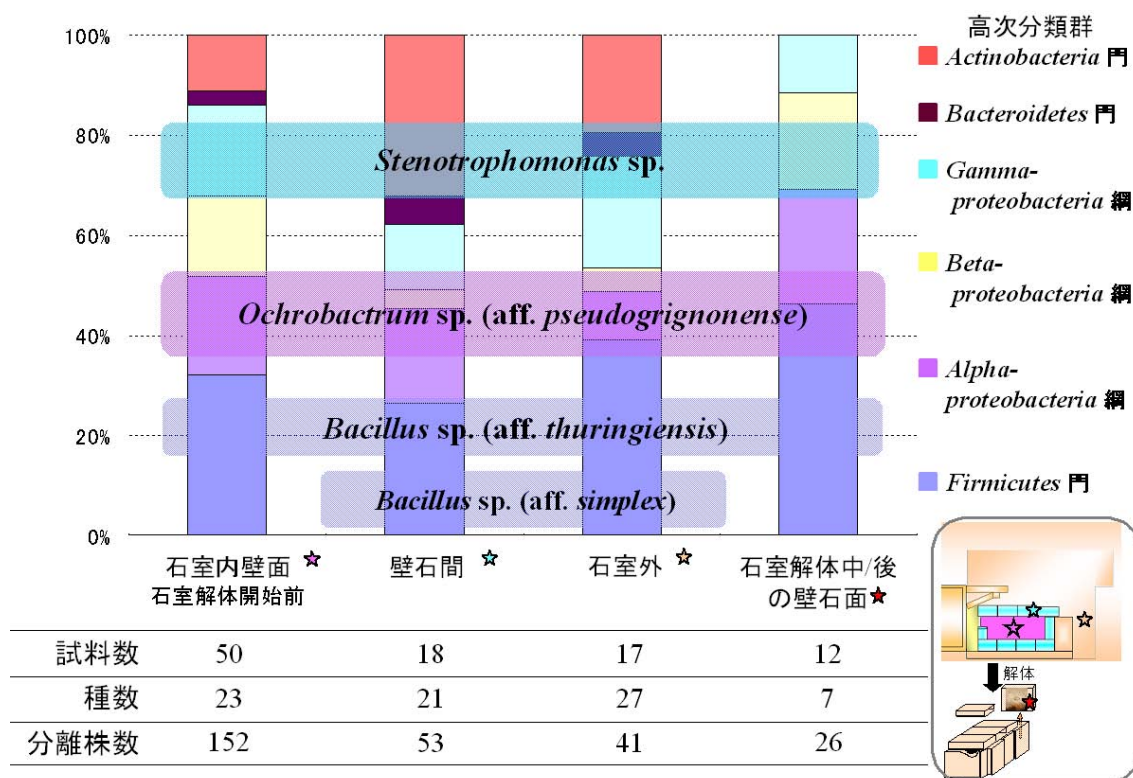


図 10. 高松塚古墳石室内外のバクテリア相の比較 (2005.9～2007.4)

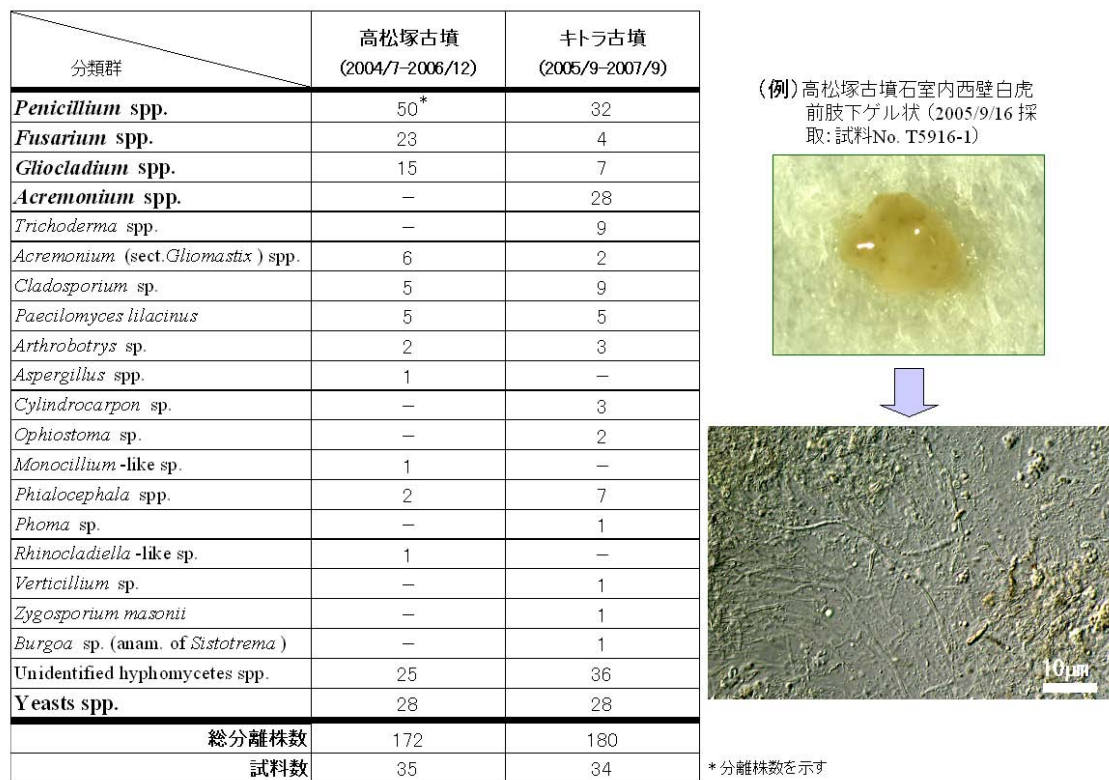


図 11. 高松塚・キトラ両古墳石室内壁面に発生したゲル状試料（バイオフィーム）の菌類相の比較
（高松塚古墳：2004.7～2006.12、キトラ古墳：2005.9～2007.9）

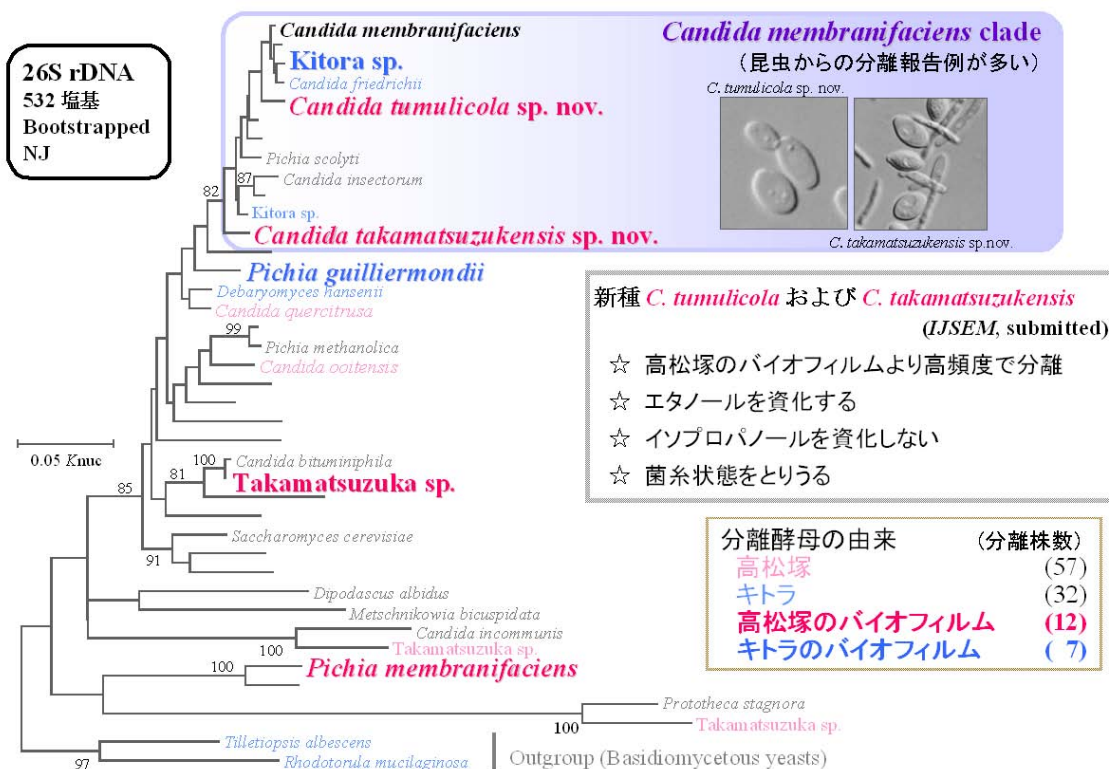


図 12. 高松塚・キトラ両古墳石室内壁のバイオフィームを構成する酵母相
（高松塚古墳：2005.9～2006.12、キトラ古墳：2005.9～2006.2）

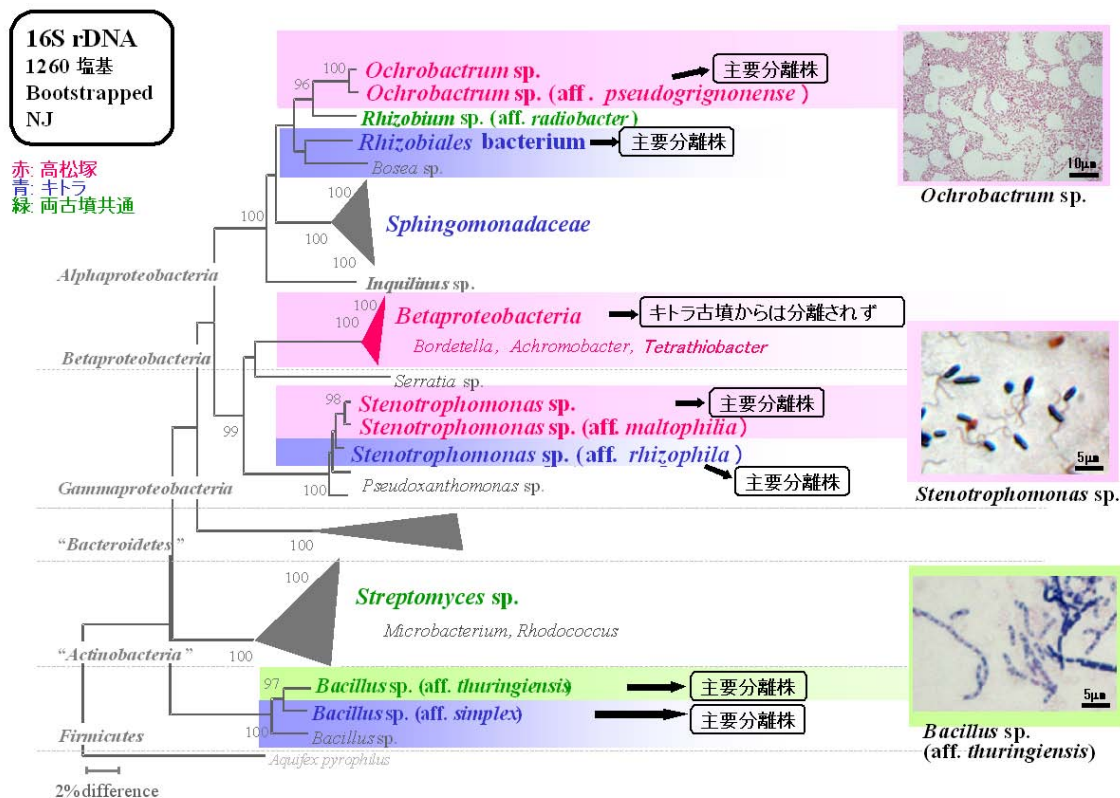


図 13. 高松塚・キトラ両古墳内におけるバイオフィルムを構成するバクテリア相の比較 (2005.5～2007.4). 高松塚、キトラ両古墳それぞれの分類群を赤および青文字で、両古墳に共通の分類群を緑文字で示す。

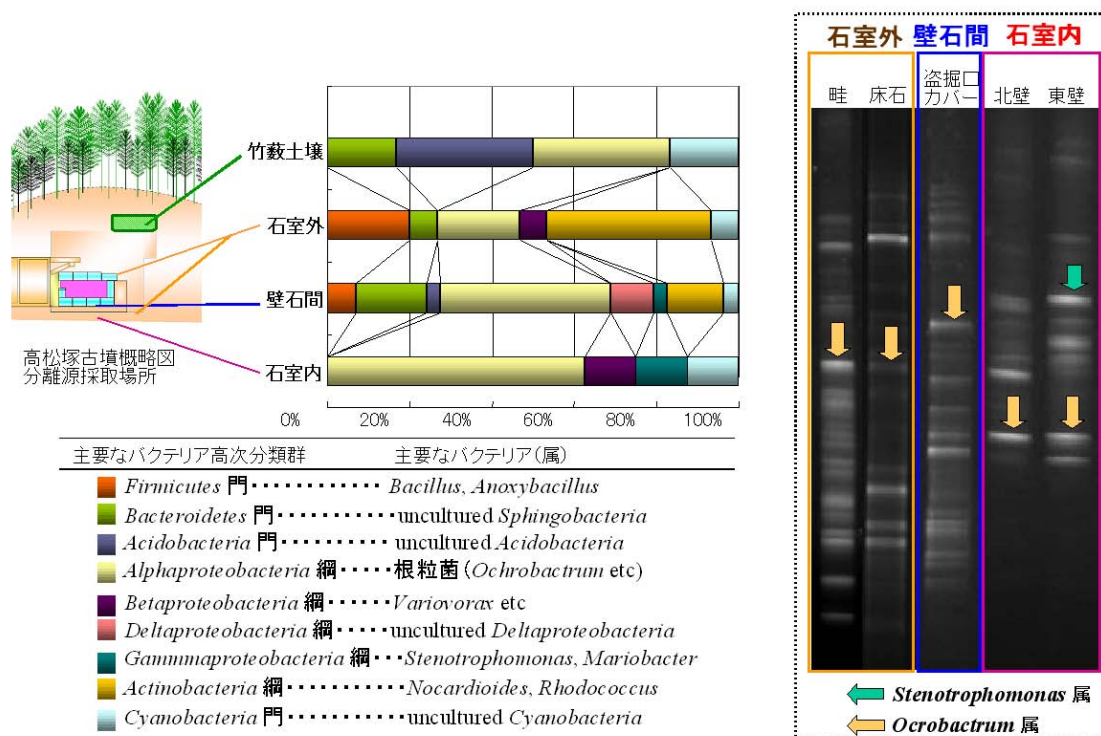


図 14. 高松塚古墳石室内外のマイクロバイオータの比較 (バクテリア). (左) 高松塚古墳石室内外のバクテリアの群集解析: DGGE 解析より求めた石室内外のサンプルにおけるバクテリアの構成. (右) 高松塚古墳石室内外のバクテリア群集解析の DGGE プロファイル.

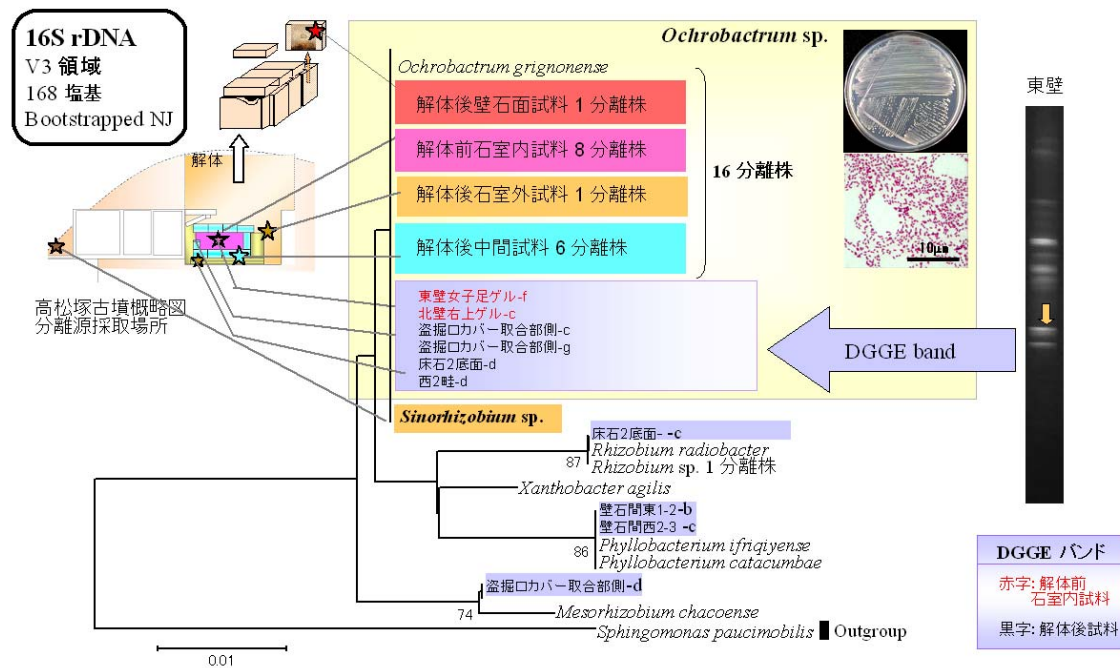


図 15. DGGE 法および分離培養法によって検出された *Rhizobiales* 目細菌の 16S rDNA 塩基配列に基づく分子系統的位置. 詳細は本文参照. 図中、枝の下の数字はブーツストラップ値 (%) を示す. 目盛り (図左下) = 0.01 塩基置換/サイト

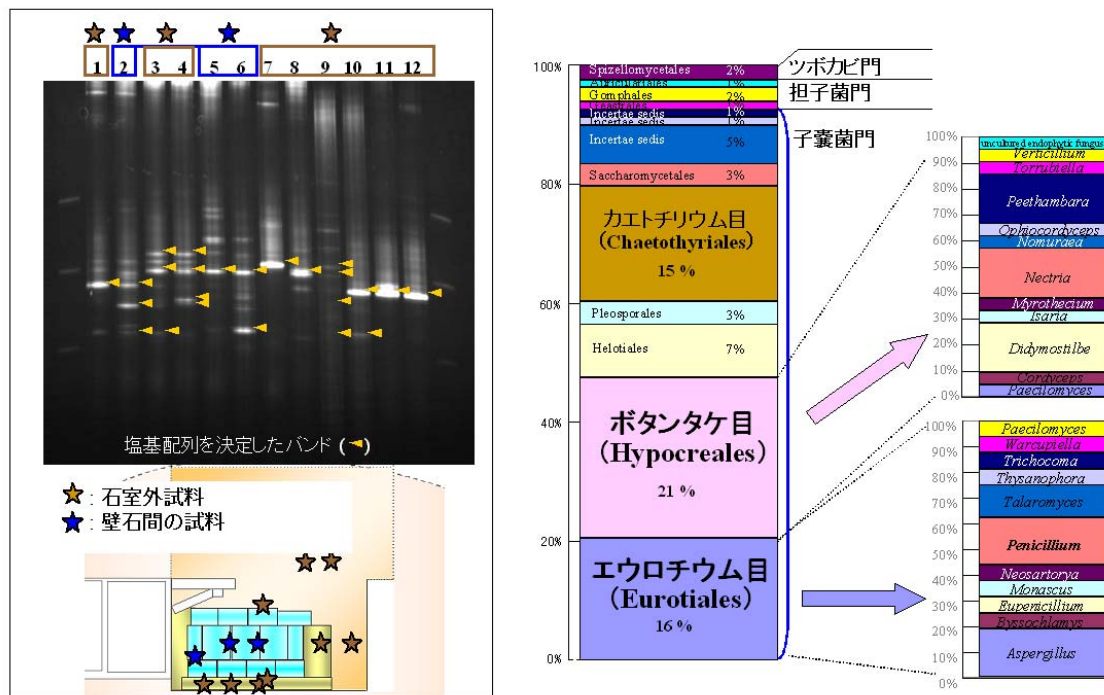


図 16. 高松塚古墳石室内外のマイクロビオータの比較 (菌類).

(左) 高松塚古墳石室内外の菌類の群集解析: 18S (nSSU rRNA 遺伝子) の部分塩基配列を用いた DGGE プロファイル. (右) BLAST 検索結果

高松塚古墳壁画生物劣化にかかわる微生物調査報告 2 －石室取り出し作業中に採取した試料の顕微鏡観察結果について－

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

石室解体が始まった 2007 年 4 月以降、石室を構成する壁石面、壁石間の小口面や目地漆喰、石室周辺の畦面から主に漆喰片や漆喰土壌片（漆喰碎片や土壌等の混合物）、土壌、植物基質から成る総計 434 点の試料を採取してきた。これらの試料全てを対象に肉眼レベルならびに実体顕微鏡による観察を行い、記録を取ると同時に、試料の一部から光学顕微鏡観察用にプレパラートを作製して、高倍率下での顕微鏡観察を行った。その結果、大多数の試料中には多数の微生物（菌類・バクテリア）の細胞やダニ等の微小動物の遺骸等が混生状態になっているのが確認された。特に、壁石間の小口面から採取した黒褐色に着色した漆喰片や土壌等の混合物は他試料に比べ湿り気が高く、表面がややゲル状になっていることが多く、微生物細胞やダニ等の微小動物が比較的多く含まれる傾向が認められた。

これまで観察した試料の中で、漆喰片ならびに盗掘口カバー裏面の観察所見を下記に記す。

1. 2007 年 5 月 10 日に西側石 3 南小口の上半部から採取した漆喰片試料（試料 No. T7510-1 : 147 次 5ALI 西側石南小口上半漆喰（西 3-2 石間）070510）の観察所見

1-1. 壁石間漆喰片の肉眼、実体顕微鏡および光学顕微鏡による観察所見

採取した漆喰片を観察した結果、漆喰片のサイズは約 17.5×6.5×1.8 cm で、表面が黒～黒褐色や灰褐色に着色し、暗色系のカビを中心とした菌類ならびにバクテリアなどの細胞やダニ等の微小動物の遺骸等が混生している状態が観察された。漆喰片試料の全体像（図 1）、試料表面の実体顕微鏡下での観察像（図 2）および試料表面から作成したプレパラートの光学顕微鏡下での観察像（図 3）を下記に示す。



図 1. 高松塚古墳 147 次 5ALI 西側石 3 南小口上半漆喰 070510（試料 No. T7510-1）試料全体像。

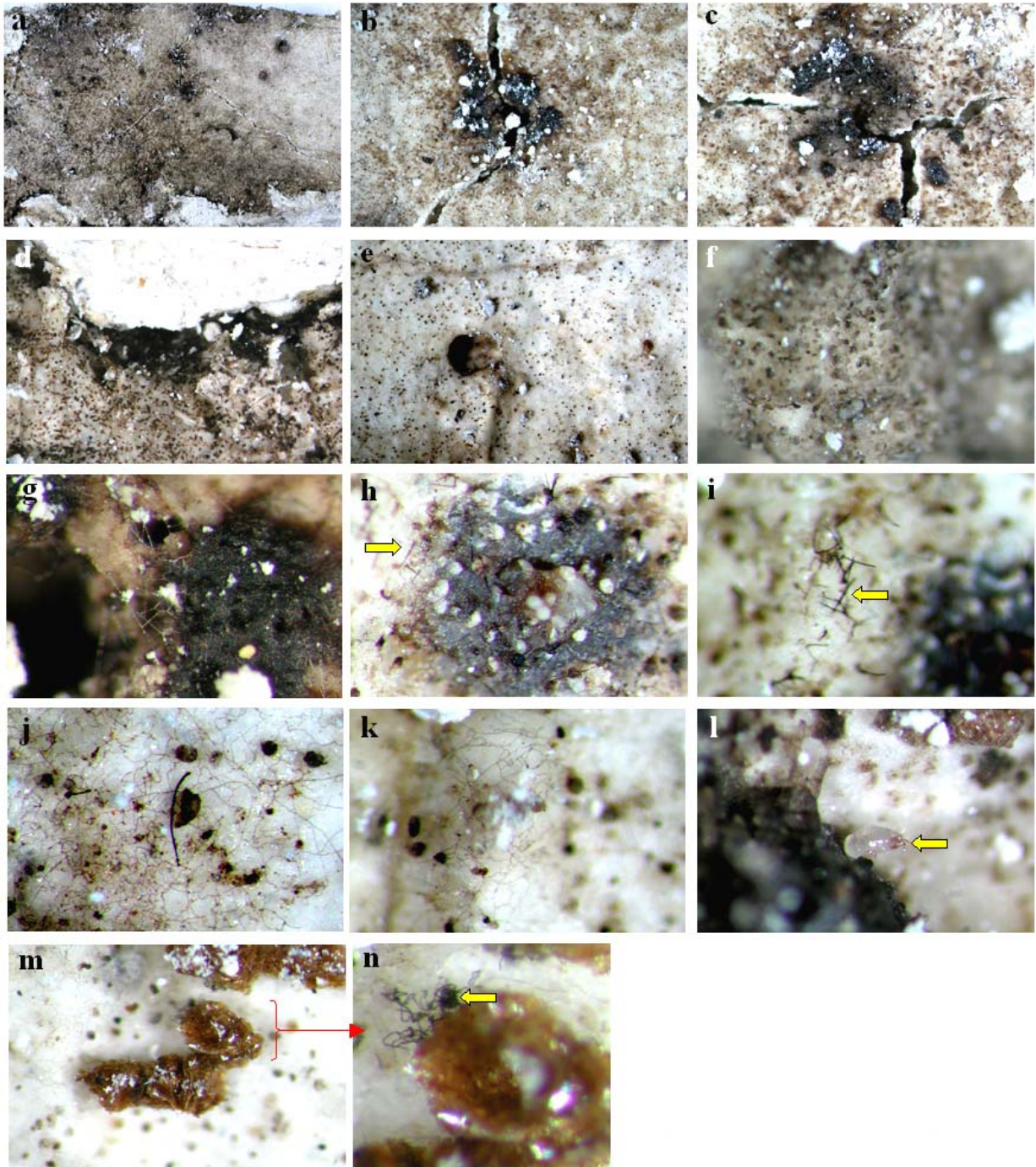


図 2. T7510-1 試料の実体顕微鏡観察像：漆喰片（白～白灰色）表面には黒～黒褐色～灰褐色に着色し、ダニ等の微小動物による食痕あるいは排泄物と考えられる粒状～不定形の塊（図 3-a～h）が多数散在する状態、多数のひび割れ（図 3-a～d）や小孔が認められる（図 3-e）．試料観察時に生きたダニ 1 個体（図 3-l 矢印）やその他の虫の死骸が認められる（図 3-m, n）．暗色系アナモルフ菌類（不完全菌類）の暗褐色の分生子柄が散生（図 3-h, i 矢印）し、暗褐色の菌糸が漆喰表面にへばりついている状態（図 3-j, k）や暗色系の *Acremonium* (sect. *Gliomastix*) sp. の分生子塊（図 3-n 矢印）が認められる．

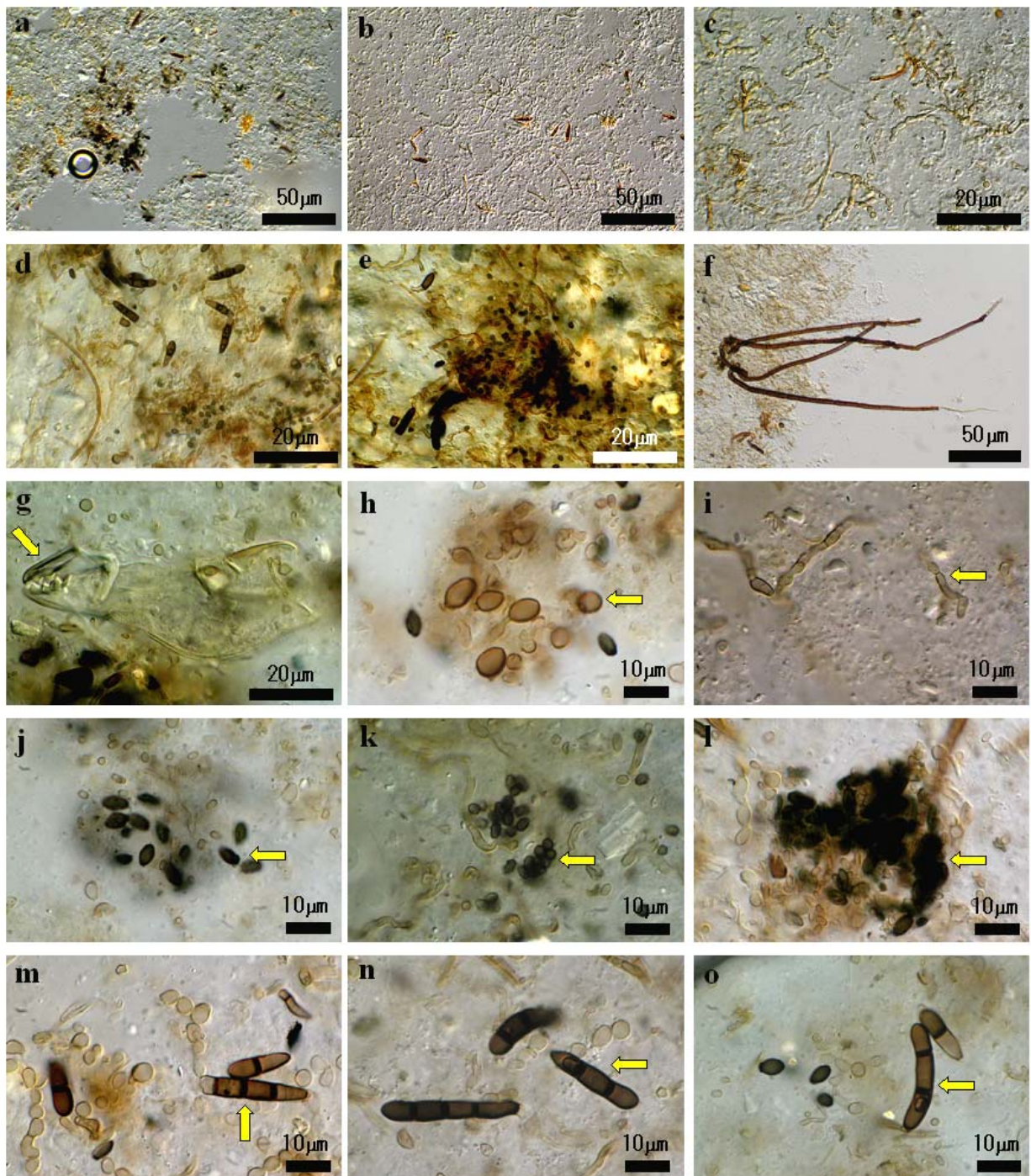


図 3. T7510-1 試料の光学顕微鏡観察像：試料表面には菌類およびバクテリアからなる混生体（バイオフィルム）（図 4-a～e）、多数の暗色系アナモルフ菌類の分生子柄や胞子（または分生子）（図 4-f, h～o）、そして、それらの微生物の細胞に混じって微小動物の体の一部（図 4-g 矢印）が観察された．

1-2. 壁石間漆喰片の走査型電子顕微鏡（SEM）による観察所見

壁石間の漆喰片（147 次 5AL1 西側石 3 南小口上半漆喰（西 3-2 石間の漆喰小片：T7510-1）2007/05/10 採取）について、矢口行雄教授（東京農業大学・電子顕微鏡室）の協力を得て、走査型電子顕微鏡（SEM）を用いてその微細構造を詳細に観察した。表面、断面の微細構造を調べた結果、内部に侵入した菌糸やバクテリア細胞の混生状態が観察された（図 4）。

観察は当該 SEM 試料を白金パラジウム（Pt-Pd）のイオンスパッタコーティング（E200、日立製作所製）した後、直ちに走査型電子顕微鏡（日立製作所製、S-4000：以下 SEM と略記）により 5.0 kV 下で観察しながら、記録として残すべき画像を撮影した。

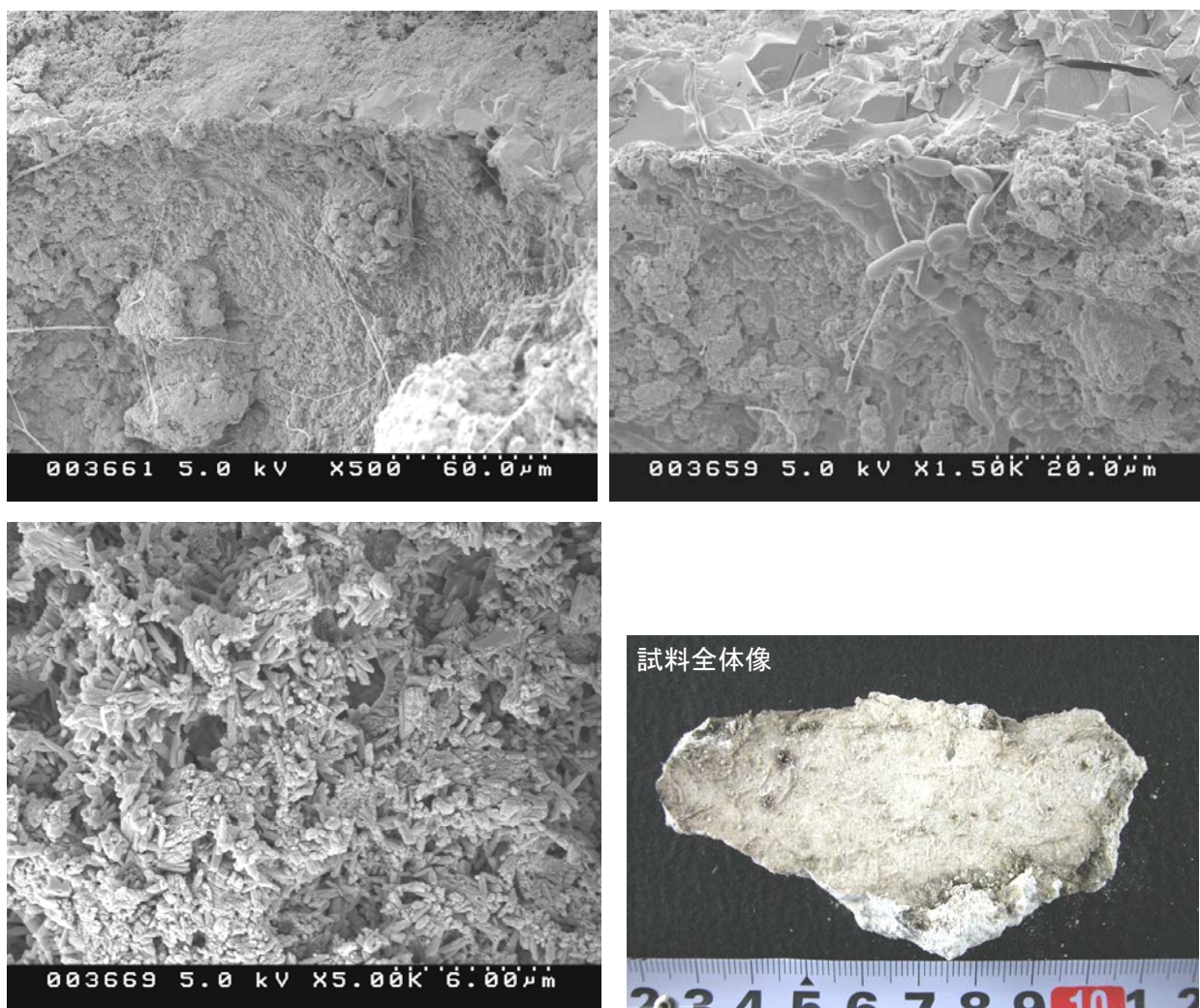


図 4. SEM-2：漆喰片の断面、表層に観察されたカビの菌糸や孢子（Film Nos. 003661、003659）. 漆喰表層下の状態および微生物細胞様の塊（Film No. 003669）.

2. 盗掘口カバー裏面の直接観察所見

石室入口の閉塞石表面に 1976 年 6 月 4 日に設置された盗掘口カバーが 2007 年 5 月 21 日に取外しされた。盗掘口カバーの裏面を観察した結果、取り付け時に全面に塗られたスズ箔が一部剥がれ落ちていたが、石室側のスズ箔の表面は黒色～黒褐色に変色していた。変色の度合いは石室側でもっともひどく、取合部側では元のスズ箔が残っているほど、変色の度合いは低かった。取合部側と石室側の数箇所（主に黒色～黒褐色に着色した箇所を中心に）からプレパラートを作成、光学顕微鏡観察した結果、特に、石室側の試料で暗色系のカビを中心とした菌類ならびにバクテリアなどの細胞やダニ等の微小動物の遺骸等が非常に多く混生している状態が観察された。取外しされた盗掘口カバーの全体像を図 5 に、顕微鏡観察像を図 6 に示す。

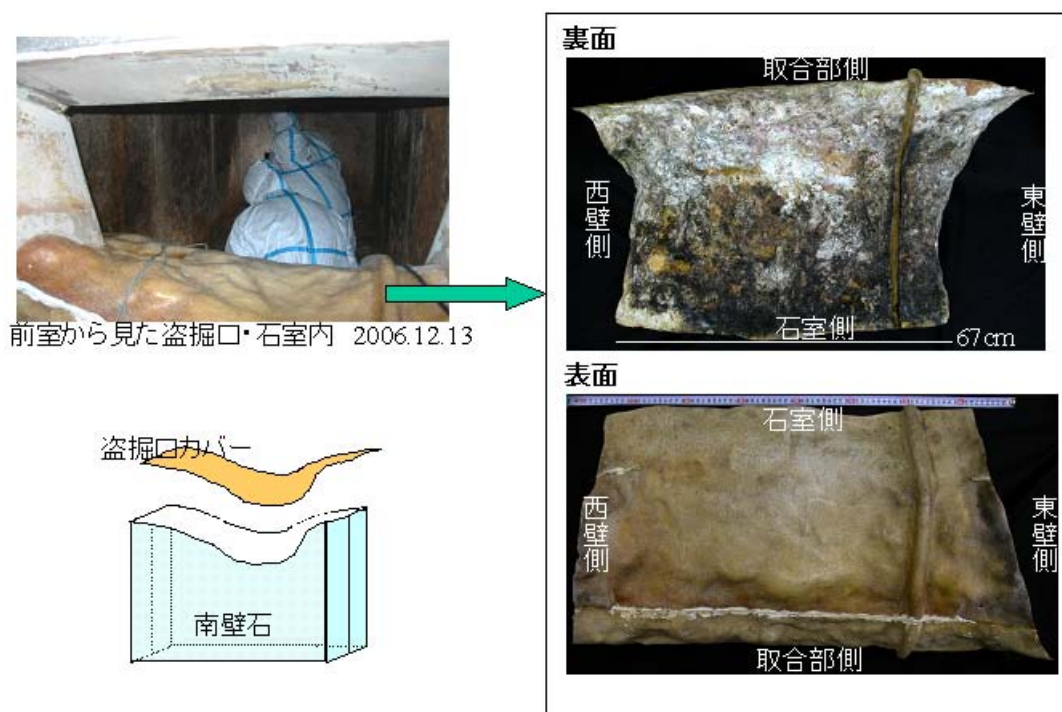


図 5. 高松塚古墳石室入口の盗掘口の様子および取外しされたプラスチックカバーの全体像（試料 No. T7521-8）.

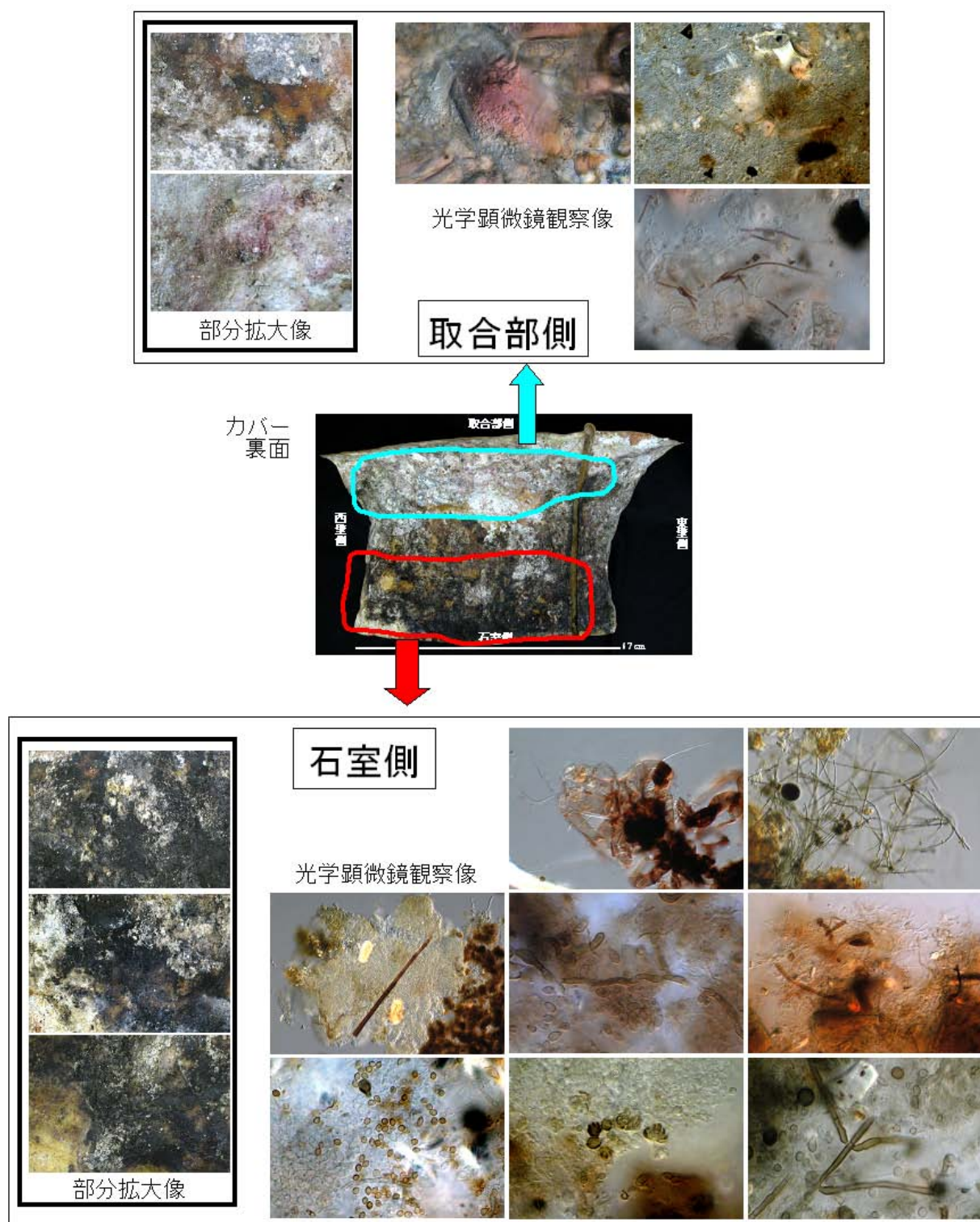


図 6. 高松塚古墳石室入口の盗掘口に設置されたプラスチックカバー裏面の取合部側と石室側の部分拡大像と光学顕微鏡観察像（試料 No. T7521-8）.

高松塚古墳壁画生物劣化にかかわる微生物調査報告 3
－仮設修理施設に搬入された天井石 3 および壁画面に由来する乾燥ゲルの観察所見－

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

1. 天井石 3 壁面に由来する乾燥ゲル（バイオフィルム）について

仮設修理施設に搬入された天井石 3 の表面に乾燥したバイオフィルムと考えられる茶褐色の乾燥物があり（図 1）、それを取り除いて得た乾燥物試料を実体顕微鏡下で観察した結果、表面に茶褐色～黒褐色の塊が多数付着している様子が観察された。その外観から、微生物（主に暗色系の菌類(カビ)の菌体）の塊またはダニ等の微小動物の食痕、排泄物である可能性が考えられた。乾燥ゲルの光学顕微鏡観察像を図 2 に示す。



図 1. 高松塚古墳 天井石 3 壁面南西隅 茶褐色の乾燥物 070622（試料 No. T7622-9）.

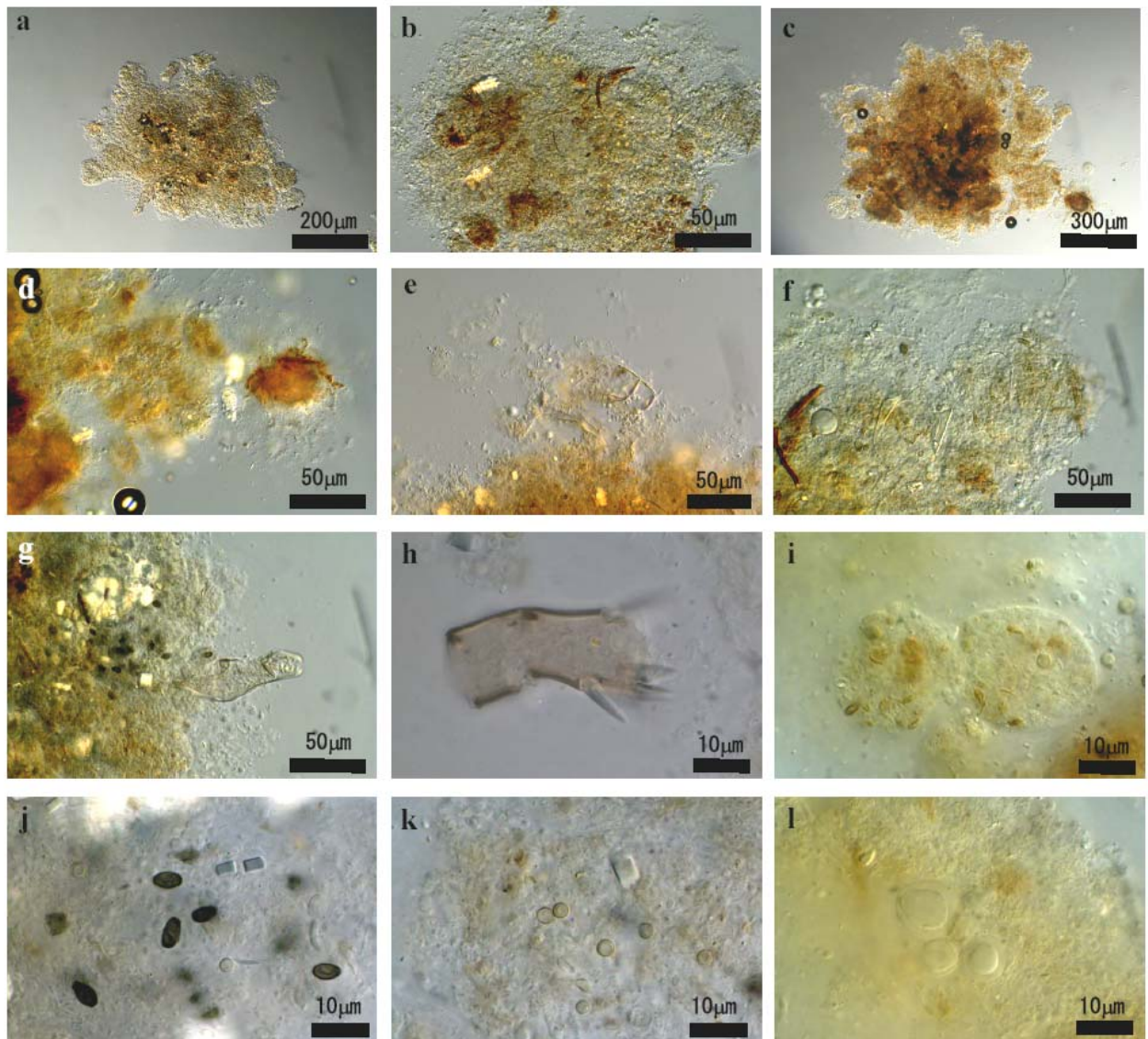


図 2. 高松塚古墳 天井石 3 壁面南西隅に由来する茶褐色の乾燥物（乾燥ゲル）の光学顕微鏡観察像（試料 No. T7622-9）：菌類やバクテリアの細胞（図 2-a-d, g, j-l）およびダニ等の体片、食痕・排泄物の塊（図 2-e-f, h-i）等の混生体が認められる。

2. 高松塚古墳壁画面に由来する乾燥ゲル（バイオフィルム）の走査型電子顕微鏡による観察所見

石室内壁画面のいわゆるゲル状部分（バイオフィルム）の生物学的、構造的特性を明らかにする一環として、矢口行雄教授（東京農業大学・電子顕微鏡室）の協力を得て、東壁・西壁女子群像付近に由来する乾燥ゲル試料について走査型電子顕微鏡（SEM）を用いてその微細構造を詳細に観察した。その結果について、下記にまとめる。

2-1. 試料ならびに方法

下記の試料から 走査型電子顕微鏡観察用のサンプルを調整した（表 1）。

表 1. 走査型電子顕微鏡観察に使用した乾燥ゲル試料一覧。

試料番号	試料の内容・採取位置ほか
SEM-4-1*	西壁女子群像、右から二人目の帯左下の「黒い染み」、2007/07/25 仮設修理施設にて（図 3 参照）
SEM-4-2*	西壁女子群像、最右翼の女子の右帯付近の「黒い染み」、2007/07/25 同上（図 3 参照）
SEM-5*	東壁女子群像、最右翼の女子の右下の「黒い染み」の一部、2007/08/07 同上（図 4 参照）
SEM-6*	東壁女子群像、最右翼の女子の右下の「黒い染み」全体、2007/08/07 同上（図 4 参照）

* 各試料の包装はポリエステル紙が使われた。

観察は、当該 SEM 試料を白金パラジウム（Pt-Pd）のイオンスパッタコーティング（E200、日立製作所製）した後、直ちに走査型電子顕微鏡（日立製作所製、S-4000）により 5.0 kV 下で観察しながら、記録として残すべき画像を撮影した。

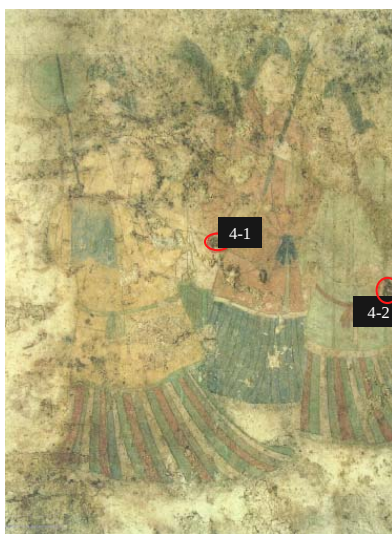


図 3. SEM-4-1 と 4-2 で観察した乾燥ゲルの由来箇所（西壁女子群像）。



図 4. SEM-5 および 6 で観察した乾燥ゲルの由来箇所（東壁女子群像）。

2-2. 観察結果と考察

以下に観察結果の概要と考察を記す。

(1) SEM-4-1（西壁女子群像、右から二人目の帯左下の「黒い染み」試料）の観察像

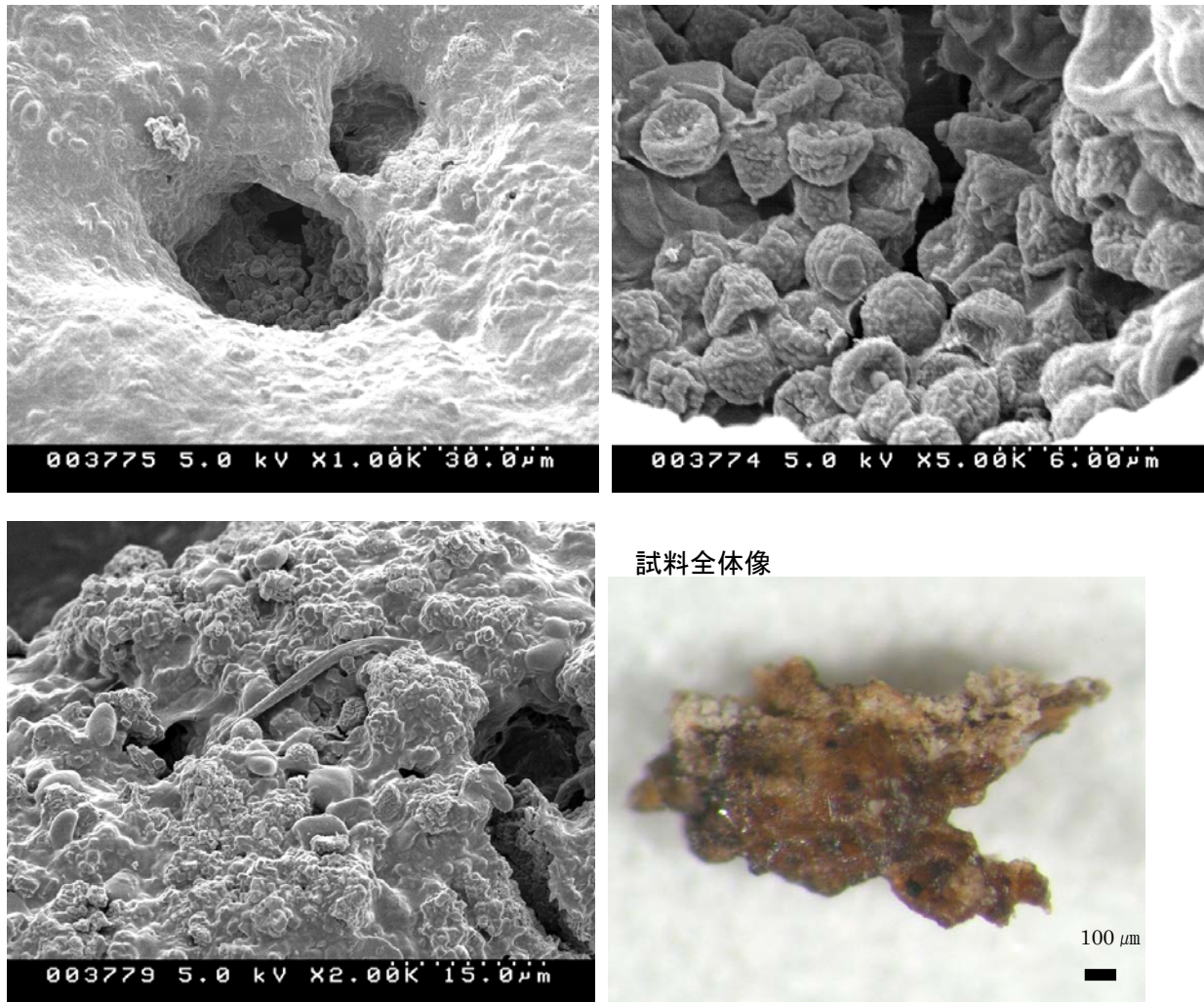


図 5. SEM-4-1: 乾燥ゲル試料の表面、小穴に孢子様のものが詰まっている (Film Nos. 003775、003774)。
同裏面の状態、微生物の細胞や孢子らしきものが認められる (Film No. 003779)。

(2) SEM-4-2 (西壁女子群像、最右翼の女子の右帯付近の「黒い染み」試料) の観察像

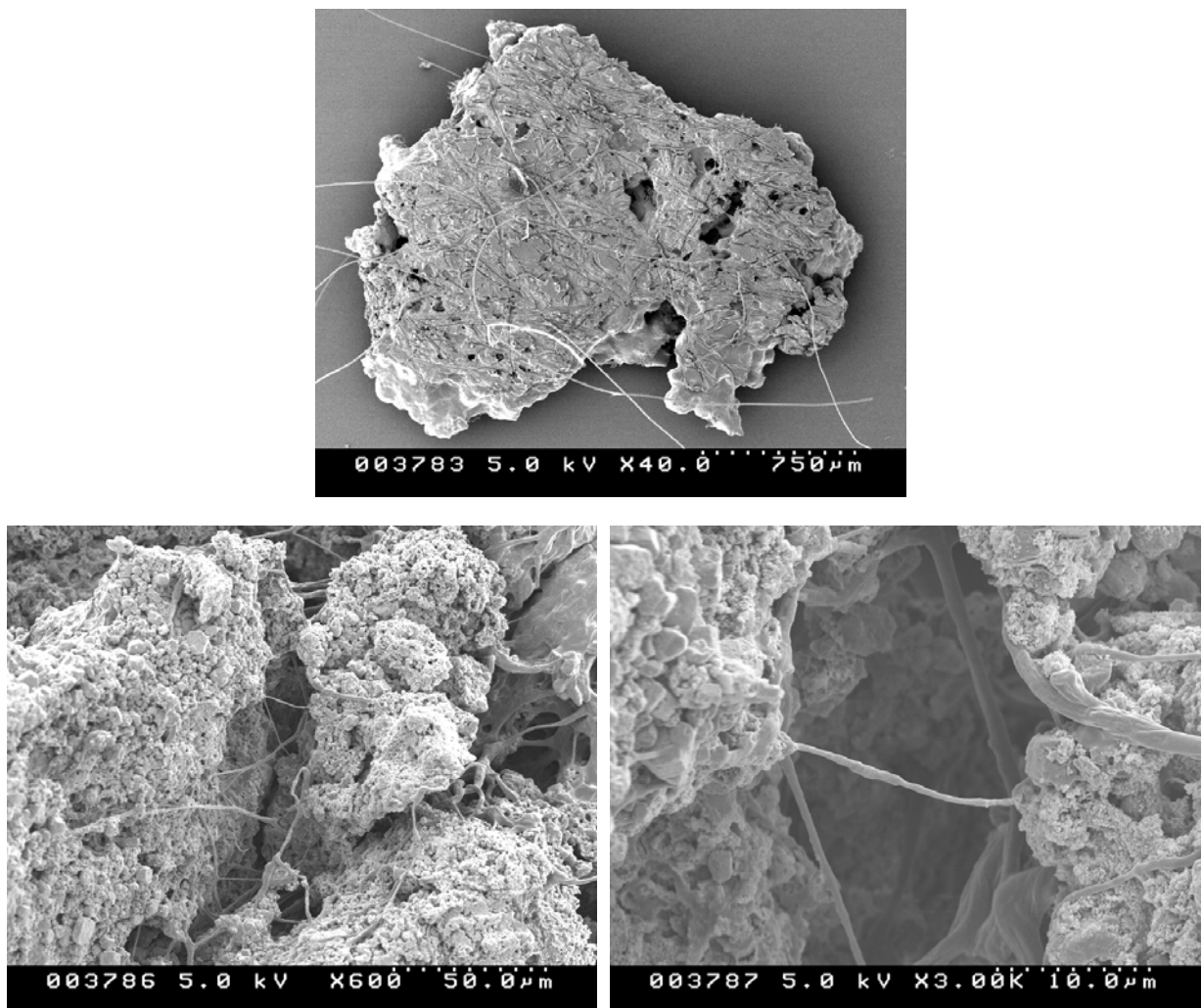
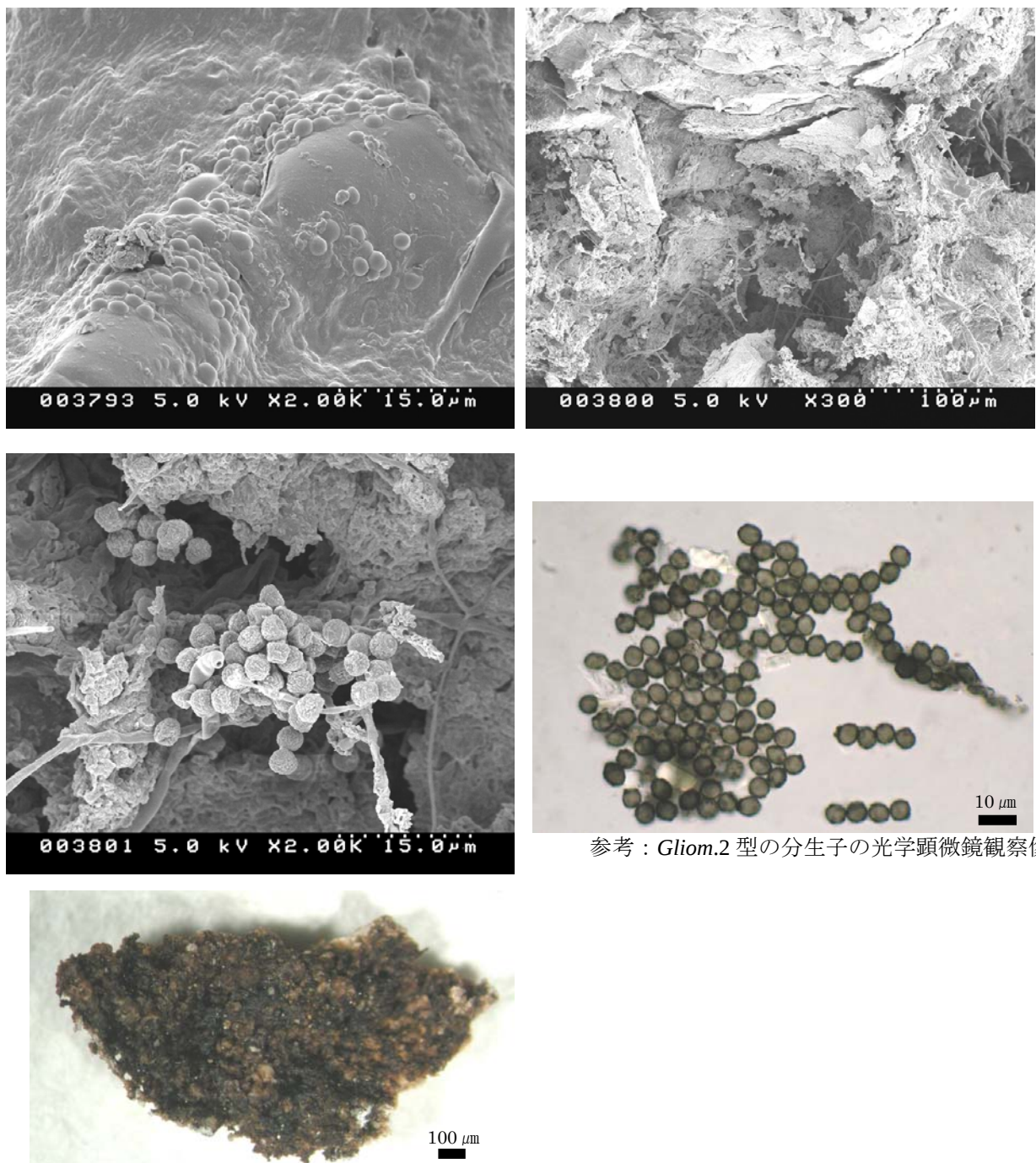


図 6. SEM-4-2 : ゲル試料表面の状態 (Film No. 003783) と拡大写真. ゲル試料裏面の状態、菌糸が多数認められる (Film Nos. 003786、003787).

(3) SEM-5 (東壁女子群像、最右翼の女子の右下の「黒い染み」の一部分の試料) の観察像



参考：Gliom.2 型の分生子の光学顕微鏡観察像

図 7. SEM-5：ゲル試料表面の状態、微生物細胞や孢子らしきものが多数認められる (Film No. 003793)。ゲル試料断面の状態 (Film No. 003800)、同拡大写真、カビの孢子 (暗色系 *Acremonium* (sect. *Gliomastix*) sp., *Gliom.2* 型と推測される) が多数認められる (Film No. 003801)。(暗色系の *Acremonium* (sect. *Gliomastix*) sp. の *Gliom. 2* 型分生子の光学顕微鏡像は試料 No. T7417-1: 東側 3 女子群像 北左下 衣すそ下付近 の「黒い染み」試料から分離した菌株より)。

(4) SEM-5 (東壁女子群像 最右翼の女子の右下の「黒い染み」全体をほぼカバーする試料) の観察像

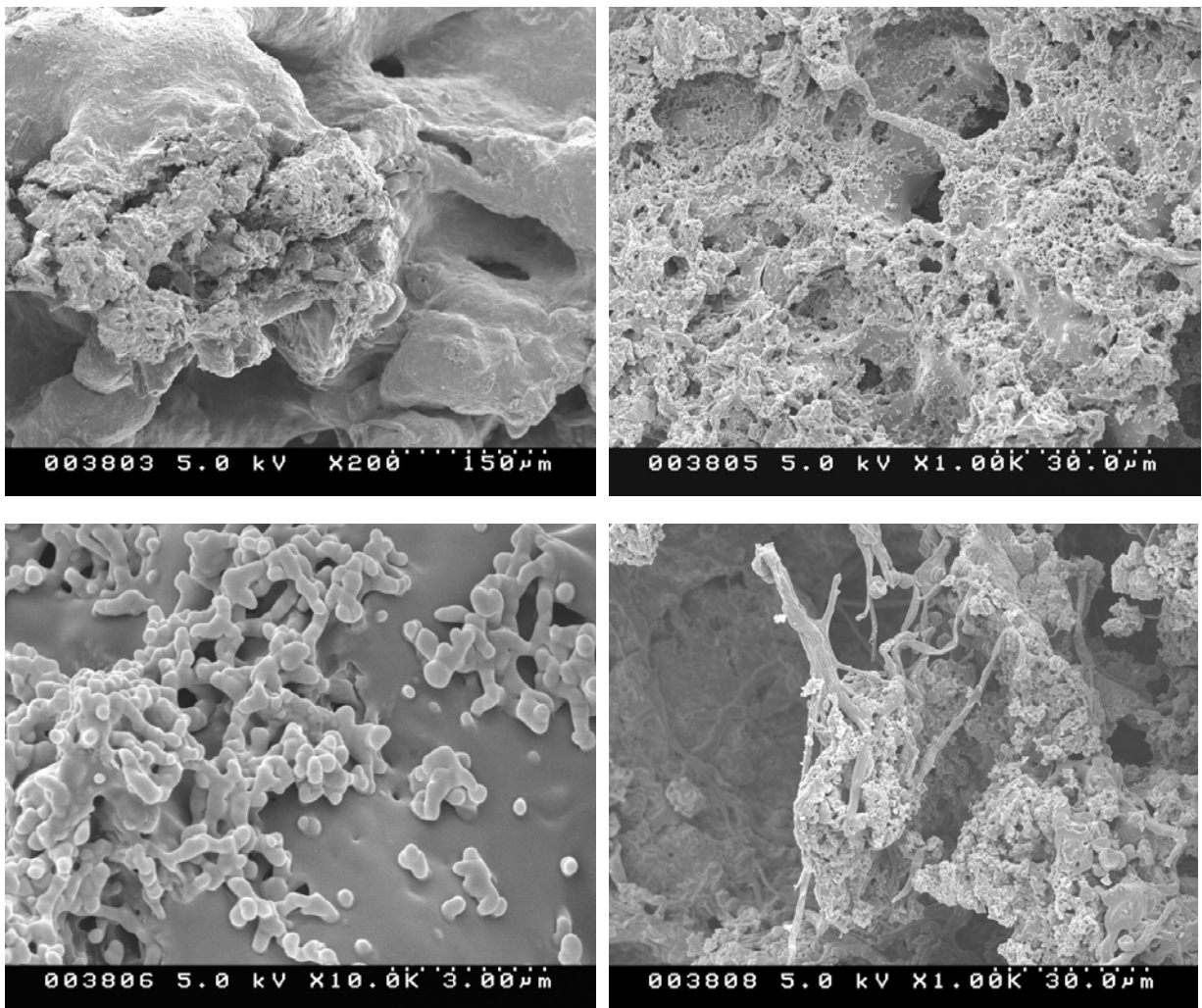


図 8. SEM-6 : ゲル試料表面の状態. 微生物細胞らしき塊が認められる (Film No. 003803). ゲル試料裏面の状態 (Film No. 003805)、同拡大写真、バクテリア細胞らしき塊 (Film No. 003806). 同、菌糸とバクテリア細胞の混生状態となっている (Film No. 003808).

2-3. まとめ

石室壁画面（東・西両女子群像付近）に生じたゲル状試料（バイオフィルム）試料（乾燥した状態）について走査型電子顕微鏡で表面、裏面、断面の微細構造を調べた。その結果、内部に侵入した菌糸やバクテリア細胞の混生状態が観察された。東・西両女子群像のいわゆる「黒い染み」の乾燥ゲル試料を観察した結果、その表層はゲルが固化し、クレーター状の小穴内部に微生物細胞や菌類胞子らしきものが観察された。ゲル試料の裏面の観察から、下層部分はバクテリアの細胞と菌類の菌糸や胞子が混生状態にあったことが裏付けられた。