

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：82620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K01097

研究課題名（和文）博物館IPMへのATP拭き取り検査活用に向けた基礎的な研究

研究課題名（英文）Research on application of ATP surface test in museum IPM

研究代表者

間渕 創（Mabuchi, Hajime）

独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・保存科学研究センター・保存科学研究センター付

研究者番号：80601195

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：近年、博物館等では生物被害対策のための調査方法として、従来食品衛生分野などで利用されてきたATP拭き取り検査が取り入れられ始めている。本研究では、ATP拭き取り検査による博物館等の保存環境におけるカビの活性評価について、その判断の目安となる単位面積当たりのATP発光量の範囲を明らかにした。これにより博物館IPMにおいてATP拭き取り検査を活用していくうえでの基礎的な知見を得ることができ、より適切なカビ被害への対策を選択できるようになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年取り入れられている博物館IPMによるカビ対策では、化学薬剤による一律の除菌・殺菌ではなく、カビの活性や状況に応じた、より博物館資料等への負荷が少ない対処方法を検討するが、現状では、カビ活性の評価は測定者の経験によるところが大きい。本研究では、博物館環境で検出された種々のカビについて、ATP拭き取り検査によるカビの活性を評価する単位面積当たりのATP発光量の目安を明らかにした。これによりカビの活性を客観的に判断することができるようになり、文化財や環境への負荷が少ない、より適切なカビの対処方法を選択することが可能となる。

研究成果の概要（英文）：ATP surface test is recently adopted for survey of fungal control in museums. In this study, the evaluation of mold biological activity using ATP surface test in museum environments were investigated, and approximate range of fluorescence intensity were defined. This study provides a fundamental information for the use of ATP surface test for museum IPM, and enables to select adequate treatment method for each fungal occurrences.

研究分野：保存環境学

キーワード：博物館 カビ ATP拭き取り検査 博物館IPM

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

博物館等での資料保存において微生物、主にカビによる被害の防止は重要な項目の一つである。博物館 IPM(Integrated Pest Management: 総合的有害生物管理)においては、展示資料や収蔵庫・展示室の設備などにおいてカビ様の汚損が見られた場合、それがカビか否か、カビであった場合には新しく発生したものか、過去に発生したカビ痕なのかによって対処が異なる。汚損がカビ集落で且つ活性が高く、今後被害が拡大・拡散する恐れがある場合には、すみやかな隔離とともにエタノールや酸化エチレン等による殺菌処置を要する。汚損がカビによるものではない場合や、カビであった場合でも死滅している場合や活性が低いと判断される場合には、資料への影響が少ないドライクリーニングと温湿度管理のみで十分な場合がある。

従来、資料表面や収蔵環境の微生物汚染度の評価や殺菌処置の効果判定に培地接種法が用いられてきたが、近年では ATP 拭き取り検査が導入されるようになってきた。これまで博物館等での ATP 拭き取り検査の活用については、微生物判定、汚染分布調査などについての研究があるが¹⁾、収蔵庫等での環境において微生物汚染度評価が可能であることを示すにとどまっている。ATP 拭き取り検査によるカビ集落の判定や活性は測定者の経験によって判断されているのが現状であり、客観的な評価のための基準が求められている。

2. 研究の目的

本研究では、博物館 IPM への ATP 拭き取り検査の活用に向けた基礎的な知見として、博物館環境に存在するカビ集落の判定や活性を ATP 拭き取り検査によりどの程度把握できるかについて検討するとともに、カビに対する適切な処置を選択するための客観的な目安を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

博物館等で採取されたカビ()について、遺伝子解析による既知近縁種を確認したうえで()培地上で培養しながら定期的に ATP 拭き取り検査を行い、集落の ATP 発光量の経時的な変化を測定した()。ATP 発光量の変化から集落の活性を評価できるかの検証を行い、博物館等における ATP 拭き取り検査においてカビ集落の活性が低いと判断できる ATP 発光量の目安を検討した。

供試菌について：博物館内の諸環境には多くの菌種のカビが存在し、また細胞当たりの ATP 含有量は微生物によって異なり、 10^{-18} mol/cell(細菌)～ 10^{-15} mol/cell(酵母・カビ)とされている^{2,3)}。このため実験には博物館等において採取される多種のカビをそれぞれ供試する必要がある。複数の博物館収蔵庫で採取したカビについて PDA、25℃ 暗所で分離培養し供試菌とした。また災害時に外部から博物館へ持ち込まれる資料も想定し、水損紙資料に発生したカビについても同様に供試した。

既知近縁種の推定について：遺伝子解析(rDNA 5.8S ITS 領域、プライマー-ITS5/ITS4⁴⁾、相同性検索(BLAST⁵⁾検索、NCBI/DBJ)及び近隣接合法⁶⁾による系統解析(MEGA X⁷⁾)により既知近縁種の推定を行った。なお形態観察や生理・生化学的性状試験は行っていない。

ATP 発光量の経時的な変化の測定：微生物の培養過程、特に単細胞の細菌の培養において、その増殖速度の違いをもとに、増殖相(growth phase)としてその活性を評価することがある⁸⁾。増殖相は生菌数が増えない遅滞期(lag phase)、急激に増殖する対数期(log phase)、増殖と死滅が平衡し見かけ上生菌数が一定となる静止期(stationary phase)、死滅が増殖を上回り生菌数が減少する死滅期(death phase)に分類される。本研究では、多細胞の糸状菌を主とした供試菌の PDA 上での集落について、定期的な ATP 拭き取り検査により、単位面積当たりの ATP 発光量から増殖相の変遷を検出できるかを確認するとともに、遅滞期から静止期までを活性が高い、生菌数が自然減少する死滅期を活性が低いと規定してカビ集落の活性を評価し、本実験で供試したいずれの菌種であっても集落が死滅期にあると判断できる発光量を求めた。供試菌を PDA 上で前培養(preculture)したのち改めて PDA 平面培地に接種し、これらを 25℃ 暗所で最大 239 日間保管しながら、定期的に専用スワブによる ATP 拭き取り検査を行った。ATP 拭き取り検査は 3M 社製 Clean-Trace NG Luminometer / UXL100 を用いた。ATP 発光量(RLU)をサンプリング面積(cm^2)で除し、単位面積当たりの発光量(RLU/ cm^2)を算出した。

4. 研究成果

博物館環境で採取されたカビと既知近縁種について：(1)博物館 A_収蔵庫等エアコン吹出し口に発生したカビから *Penicillium spinulosum* 等 2 種、(2)博物館 B_収蔵庫壁面に発生したカビから *Aspergillus versicolor* 等 3 種、(3)博物館 C_収蔵資料表面に発生したカビから

Aspergillus penicillioides, *Aspergillus glabripes* 等 7 種、(4) 博物館 D_ 収蔵庫で使用されていた掃除機のダストバッグ内塵埃から *Alternaria alternata*, *Chaetomium globosum*, *Penicillium chrysogenum* 等 12 種、(5) 寺院から搬入された木彫像に蓄積した塵埃から *Penicillium decumbens*, *Penicillium thomii* 等 7 種、(6) 水損紙資料に発生したカビから *Fusarium solani*, *Cladosporium cladosporioides*, *Mucor circinelloides* 等 19 種、計 50 菌種が検出された。このうち既知近縁種が推定された 49 菌株をカビ集落の活性評価における供試菌とした。

カビ集落の活性評価について：菌種によって増殖曲線(growth curve)の形状に違いが見られ、遅滞期、対数期、静止期については明確に判別できないものがあったが、ATP 発光量が減少に転じる死滅期については見て取ることができ(図 1)、また再現性も確認できた(図 2)。すべての供試菌をまとめて示した図 3 から、培養初期から対数期、静止期(図中)の単位面積当たりの ATP 発光量は $2.0 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^7$ RLU/cm² の範囲、死滅期(図中)は $1.6 \times 10^2 \sim 9.9 \times 10^6$ RLU/cm² の範囲となった。(ブランク値:平均 16 RLU、バックグラウンド値(PDA 培地表面):155 ~ 310 RLU/cm²、ATP 発光量測定誤差:平均 1.9%、最大 18% (N=5))

本実験結果から、実際の博物館等の収蔵庫、展示室や資料表面でカビ様の汚損等が見られ、その汚損について ATP 拭き取り検査を行った場合、大まかな目安として 10^4 RLU/cm² 以上であれば、活性が高く今後被害が拡大・拡散する可能性があるとして評価でき、隔離や殺菌処置を要すると判断できる。また 10^3 RLU/cm² のオーダーであれば活性が低い、 10^2 RLU/cm² 以下で死滅または、汚損はカビによるものではない可能性が高いと評価できることになり、クリーニングや温湿度管理を中心とした処置をとる判断ができる。これにより、博物館 IPM において ATP 拭き取り検査を活用するにあたってのカビ活性の客観的な評価のための目安を明らかにすることができた。

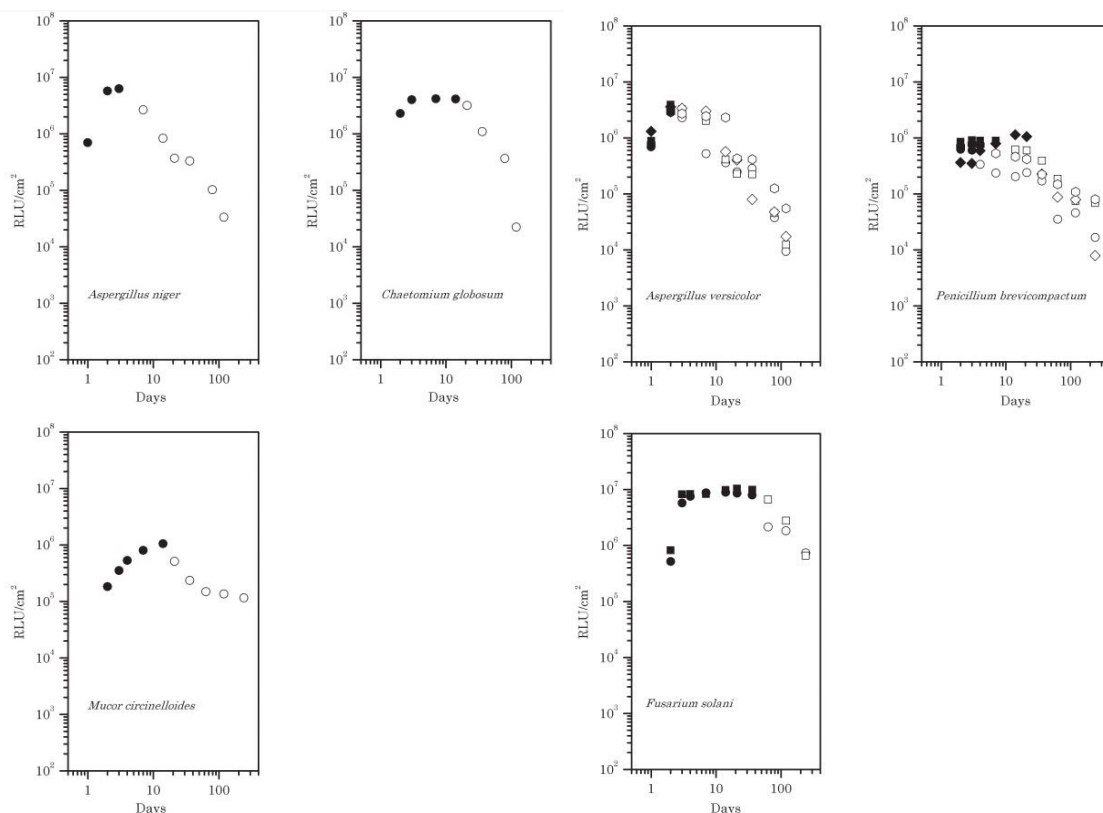


図 1 供試菌(一部)の単位面積当たりの ATP 発光量の推移
培養初期から静止期までを黒点、ATP 発光量が減少に転じる死滅期を白点で示す。

図 2 同一菌種の単位面積当たりの ATP 発光量の推移の比較
培養初期から静止期までを黒点、ATP 発光量が減少に転じる死滅期を白点で示す。

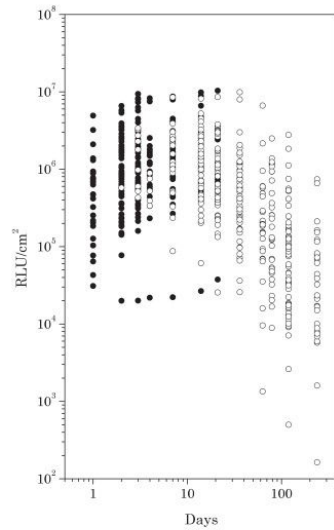


図3 すべての供試菌の単位面積当たりの ATP 発光量の推移
培養初期から静止期までを黒点、ATP 発光量が減少に転じる死滅期を白点で示す。

[参考文献]

- 1) 間瀬創、佐野千絵：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、1-12(2010)
- 2) 山崎省二編『環境微生物の測定と評価』、オーム社(2001)
- 3) 伊藤武、ATP・迅速検査研究会監修『新しい衛生管理法 ATP ふき取り検査』、鶏卵肉情報センター(2009)
- 4) White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J.: Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: PCR Protocols: a guide to methods and applications. (Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J., eds). Academic Press, New York, USA: 315-322(1990)
- 5) Altschul, S.F., Madden, T.F., Schaeffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.: Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. Nucleic Acids Research, 25, 3389-3402(1997)
- 6) Saitou N., Nei M.: The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology and Evolution 4, 406-425(1987)
- 7) Sudhir Kumar, Glen Stecher, Michael Li, Christina Knyaz, Koichiro Tamura: MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Across Computing Platforms. Molecular Biology and Evolution, 35(6):1547-1549(2018)
- 8) M. T. Mdigan, J. M. Marinko, and J. Parker『ブロック微生物学 (室伏きみ子、関啓子監訳)』、オーム社(2003)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 間淵創・佐藤嘉則	4. 巻 60
2. 論文標題 博物館等におけるATP拭き取り検査によるカビ集落の活性評価について	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 保存科学	6. 最初と最後の頁 41-49
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 間淵創・佐藤嘉則
2. 発表標題 博物館等におけるATP拭き取り検査 - カビ集落の活性評価と機器の特徴について -
3. 学会等名 文化財保存修復学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------