

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 24 日現在

機関番号：80101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23701016

研究課題名(和文)文化財公開施設等における汎用的な高精度微生物汚染評価システムの構築に関する研究

研究課題名(英文) Studies on versatile and highly sensitive methods for evaluating microbial contamination in museums and cultural facilities.

研究代表者

杉山 智昭 (Sugiyama, Tomoaki)

北海道開拓記念館・学芸部・学芸員

研究者番号：90446310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円、(間接経費) 540,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、文化財公開施設等において、施設の新旧や設備の充実度、予算規模にかかわらず導入しやすい汎用的な高精度微生物汚染度評価システムの構築を目的として、各種の検討を行った。その結果、1) 比較的簡易な分子生物学的手法を適用することで、文化財および文化財収蔵環境に発生する微生物を高感度で検出できること、2) 文化財収蔵環境において殺菌、殺虫目的で使用される燻蒸剤、殺菌剤、防虫剤などの残留が検出感度に大きな影響を及ぼさないこと、3) 環境の温度湿度モニタリングと分子生物学的手法による微生物モニタリングを総合的に解釈することにより、有害微生物の初期侵入および汚染範囲を客観的に把握できることが示された。

研究成果の概要(英文)：Versatile and highly sensitive methods for evaluating microbial contamination in museums and cultural facilities are necessary for constructing the appropriate pest management system which arrest biodegradations and prevent the expansion of damages to cultural properties. In this study, a series of tests were employed to monitor the initial fungal growth and define the contaminated area. The results of this study showed that a relatively simple genetic method could detect a small amount of target fungal genomic DNA, and there was almost no undesirable influence on the amplification of templates by chemical agents derived from fumigants, an alcoholic sterilization material, fungicides and insecticides against pests. Furthermore, it was strongly suggested that efficiency of this molecular method would be enhanced by a temperature and a relative humidity data. Thus, this comprehensive monitoring system could contribute to the preventive conservation strategy for cultural properties.

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：文化財科学

キーワード：文化財 微生物汚染 IPM

1. 研究開始当初の背景

(1) 文化財の予防的保存体制の整備

ペストコントロール薬剤に頼り切ることなく、文化財公開施設等において予防保存の概念にもとづいた効果的な総合的有害生物管理 (IPM) 体制を整備するためには、日常的なモニタリングによる有害生物の早期発見、早期対処の実践が必須とされる。

しかし、獣害や虫害に関しては徹底した日常点検によって比較的、その発生・拡大の兆候をつかみやすいが、カビなどの微生物については通常、その「初期侵入」や「汚染の範囲・進行度」を正確に把握することが容易ではない。

(2) 微生物汚染のモニタリングの現状

従来、文化財やその収蔵環境において微生物汚染が疑われる場合、微生物の分離・同定 (確認) 作業や空中浮遊菌測定などが実施されるが、これらの調査には微生物の同定や、分離培養・分析操作に関連した専門的な知識と一定の設備 (滅菌、培養などに関わる) が必要とされる。また、多数の調査ポイントを設定することについても、労力・コスト面から限界がある。一方、国内・国外ともに食品・医療・公衆衛生分野などを中心に、様々な微生物検出法、汚染評価法が考案されており、義務付けられた法定検査などにおいて広く利用されている例も数多く存在している。

しかしながら、人命などに危急の影響が及ばないと見なされがちな分野 (文化財および文化財収蔵環境を含む) では一部の施設や国宝級の文化財を除き、微生物汚染に対する客観的な評価作業に対する意識は高いとは言えず、研究は基礎の段階にとどまっているのが実情である。

近年、カビの遺伝子同定サービスをメニューとして掲げている企業も存在しているが、高額な機器を使用し、分析調査には専門的な知識や操作技術が必要となるため、未だ1検査あたりの費用がかさみ、小規模な文化財公開施設等において、専門的な知識を有さない職員がルーチンとして広範囲の汚染評価を実施するには適していない。

上記の状況から、微生物汚染に対する現場サイドに立った有効なモニタリングシステムの確立は文化財の予防的保存体制を整備していく上で喫緊の課題となっている。

2. 研究の目的

本研究は、文化財公開施設等において、施設の新旧や設備の充実度、予算規模にかかわらず導入しやすい汎用的な高精度微生物汚染度評価システムの構築を目指し、文化財の予防的保存体制の整備に資することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 文化財表面および収蔵空間に発生する微生物種の基礎調査

文化財の表面や展示・収蔵環境などに発生する微生物を LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法によって一律に検出するため、過去の文献・資料の調査を行い、文化財とその周辺環境に出現する主要な種のリストアップを行った。

NCBI (National Center of Biotechnology Information) などの公開 DNA データベースから上記微生物種の DNA 配列情報を入手し、汚染を引き起こす微生物の一律検出に有効と考えられる標的 DNA 領域候補の選定を行った。

文化財公開施設等において、微生物汚染が疑われる文化財、および東日本大震災によって発生した水損資料からの表面拭き取り試料やダストから分離された微生物、空中浮遊菌測定調査を通じて分離された微生物について顕微鏡観察および DNA マイクロアレイ (GENOGATE/東洋製罐株式会社) を用いた調査を実施した。

(2) 文化財を劣化させる微生物の簡易検出条件の探索

公開 DNA データベースから入手した情報をもとに、標的 DNA 領域 (ITS、rDNA) 候補に対するプライマーセットを設計した。

文化財の汚染源となる複数種の微生物 (糸状菌) の DNA を用いて、LAMP 法による増幅反応を実施し、最適な反応条件を探索するとともに、プライマーのスクリーニングを行った。

(3) ペストコントロール薬剤が微生物検出に及ぼす影響 (安定性) の評価

文化財収蔵環境において殺菌、殺虫目的で使用される燻蒸剤、殺菌剤、防虫剤の残留が微生物の検出に及ぼす影響の調査を行うため、JIS Z 2911:2010 (かび抵抗性試験方法) に規定される 5 種の標準株 (*Aspergillus niger* (NBRC 105649)、*Chaetomium globosum* (NBRC 6347)、*Cladosporium cladosporioides* (NBRC 6348)、*Penicillium citrinum* (NBRC 6352)、*Rhizopus oryzae* (NBRC 31005)) を用いた微生物汚染試料を実験的に調製し薬剤共存下での検出が可能であるかについて検証を行った。

(4) 微生物汚染評価システムの有効性に関する検証

微生物汚染が発生した場合において、後に実施された殺菌処理や環境改善の効果が本研究で検討したシステムによって、客観的に評価可能であるかについて検証するため、微生物汚染試料に対して薬剤を用いたふき取り処理を行った後、LAMP 法による汚染評価を実施し、引き続いて各試料における微生物の処理後再発生率を調査した。

供試菌

JIS Z 2911:2010 に規定される 5 種の標準株を試験に用いた。

微生物汚染試料の調製

滅菌済みのメンブレンフィルター（孔径 0.2 μm 、直径 47mm）をシャーレ内の GP 液体培地に 1 回浸し、余分の培地を除去したものを基本分析試料とした。この試料に対して標準株 5 種の混合孢子懸濁液を調整し、そのうち 800 μl を表面に添加し微生物汚染試料とした。この試料について温度 25 ± 5 、湿度 95~99% の条件下で 1~2 週間、湿式培養を行った。

微生物汚染試料に対する処理菌糸が広がった培養終了後の試料を取出し、以下の 4 パターンの処理を実施した。

- 不織布による表面ふき取り
- 70%エタノール処理と不織布による表面ふき取り
- 塩化ベンザルコニウム含有（0.1~3%）文化財用ワイパーによる表面ふき取り
- 酸化エチレン製剤で燻蒸した後の不織布による表面ふき取り

なお、表面ふき取り操作は a) から c) については取出し直後のものと、取出し後一旦乾燥させたものの 2 種類、d) については乾燥させたもののみに対して実施した。また、上記と同処理を行った別シリーズの試料を再度、液体培地に浸した後、シャーレ内で培養し 2 週間以内の再発生率（処理後再発生率）を調査した。

LAMP 法による汚染状況の判定

各微生物汚染試料に対して DNA 抽出操作を行い、糸状菌由来の（残存）DNA が増幅されるか否か LAMP 法によって判定した。

（5）微生物汚染評価システムの運用に関する検討

環境の温度・湿度データと LAMP 法による汚染評価の統合的解釈について検討を行った。

4. 研究成果

（1）文献調査、あるいは文化財公開施設内各所における落下菌調査によって得られた菌株、東日本大震災によって発生した水損資料からの表面拭き取り試料やダストから分離された菌株等につき、分離培養、光学顕微鏡による観察、DNA マイクロアレイを用いた同定作業を行った結果、文化財の表面や展示・収蔵環境に発生する微生物の傾向・発生頻度を把握することができた。

その中で比較的、温度・湿度環境が安定している博物館施設内において DNA マイクロアレイ検査により *Aspergillus* 属、*Penicillium* 属、*Cladosporium* 属、*Stachybotrys* 属などの複数の菌種が検出される例も確認された（図 1）。

したがって、文化財公開施設等における微生物活動状況のモニタリングは IPM に則った予防保存体制を整備する上で重要な要素と考えられる。

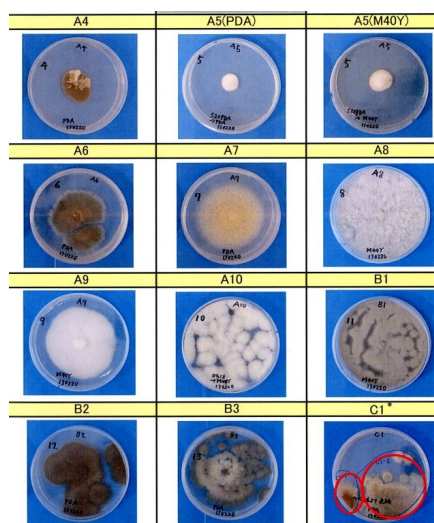


図 1 博物館収蔵庫における落下菌の調査例

（2）得られた微生物（糸状菌）の情報をもとに、NCBI の公開 DNA データベースより DNA 配列情報を入手し、標的 DNA 領域（ITS、rDNA）に対する数種のプライマーセットをソフトウェア上で設計した。設計したプライマーセットを実際の LAMP 反応に供し、スクリーニングを行った結果、文化財およびその周辺環境において発生頻度の高い菌種のゲノム DNA を効率的に増幅可能なものを選別することができた。さらに、反応の至適条件について検討を行った結果、汚染原因となる微生物の DNA 増幅について目視確認（濁度観察）が可能となった。小規模な文化財公開施設等において、専門的な知識を有さない職員がルーチンワークとして微生物汚染評価を実施する場合、その手法に関しては簡便性と明確な結果判断基準が求められる。本研究で検討した検出系は、分子生物学的手法に特有な高い精度に加え、操作の簡便性、明確な判断基準を備えていることから、文化財公開施設における微生物環境調査ツールとして現場での応用が可能と考えられる。また、本検出系は従来の微生物汚染評価法と比較し、特別な機器を要さず実施可能であることから、中小規模の施設における導入についても障壁が低いものと考えられる。

（3）文化財や文化財収蔵環境において使用される蒸散性薬剤（ピレスロイド、ナフタレンなど）殺菌剤（エタノールなど）燻蒸剤（燻蒸直後の資料から微量に漏出する酸化エチレンなど）の残留が汚染原因となる微生物の検出に及ぼす影響の調査を行った結果、各種薬剤と共存下にある微生物汚染試料から抽出した溶液を鋳型として用いた場合においても、標的菌の DNA が増幅されることが明らかとなった。この結果は、ATP 測定による微生物汚染評価法が文化財用の殺菌剤により影響を受けることと比較し、本手法の微生物汚染検出能力の安定性を示すものと考えられる。

(4) 微生物汚染評価システムの実地での有効性について検証するため、実験的に作成した微生物汚染試料に対して各種の処理を行い、LAMP 法にて調査したところ、不織布によるふき取りのみの処理では乾燥前および後のいずれの試料においても標的菌 DNA が検出され、乾燥後の試料については処理後再発生率が 40%となり、高い数値を示すことが明らかとなった。この結果は、微生物汚染の発生後、可能なかぎり早急なクリーニングの実施が菌体の試料への固着を低減するとともに、後の再発生を抑止する上で重要であることを示唆するものと考えられる。

70%エタノールと塩化ベンザルコニウムを含有する文化財用ワイパーによる表面ふき取りについては、全条件において標的菌 DNA が検出限界以下となり、処理後再発生率も 0%となった。これは今回試みた LAMP 分析が汚染試料に対して実施された処理の効果を客観的に検証可能であることを示したものと考えられる。

酸化エチレン製剤燻蒸後のふき取りに関しては、処理後も標的菌 DNA が 40%の割合で検出されたが、処理後再発生率は 0%であることが明らかとなった。この結果は生理活性を失った微生物由来の残存汚染の分布を知る上で LAMP 法を用いた検査系が利用できることを示唆する。

上記の結果から微生物汚染が発生した場合において、後に実施された殺菌処理や環境改善の効果が本研究で検討したシステムによって、客観的に評価可能であることが明らかとなった。

表 1 微生物汚染試料に対する処理法と LAMP 分析による処理効果の検証

処 理 方 法	乾燥前微生物汚染試料		乾燥後微生物汚染試料	
	DNA検出率 (%)	再発生率 (%)	DNA検出率 (%)	再発生率 (%)
不織布ふき取り (乾拭き)	20	0	40	40
70%エタノール処理 + 不織布ふき取り	0	0	0	0
文化財用ワイパー ふき取り (0.1 ~ 3%塩化ベン ザルコニウム)	0	0	0	0
酸化エチレン燻蒸 + 不織布ふき取り	-	-	40	0

(5) 空調機器の故障や、機器能力を越えた気象環境の変動による短期的な湿度上昇が発生した場合、予防的保存の観点からは、現時点における微生物の活動状況を正確に把握し、適切な対処をとることが重要となる。本研究で検討された微生物汚染評価システムは、異常状態から環境が回復した際、あるいは異常状態が継続している任意の時点において環境清浄度の客観的確認を可能とす

るため、温度・湿度計によって記録されるデータと組み合わせて運用することにより、強固な IPM 体制の確立に大きく寄与できるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Tomoaki Sugiyama,

Decay inspection of historical wooden architectures by genetic analysis、Microbial Biodeterioration of Cultural Property、査読有、2013、125-133

[学会発表](計6件)

Tomoaki Sugiyama、Yukio Kobayashi、Junichi Uoshima、Evaluation of the anoxia treatment as the emergency measure for cultural properties affected by Tsunami、2013 international symposium on conservation of cultural heritage in East Asia、2013年9月5日、6日、慶州市

杉山 智昭、小林 幸雄、魚島純一、被災現場における緊急避難措置としての脱酸素処理法の評価() 文化財保存修復学会第35回大会、2013年7月20日、東北大学百周年記念会館

杉山 智昭、微生物汚染領域の高精度判定による処理・環境改善効果の検証、日本文化財科学会第30回大会、2013年7月6日、弘前大学

杉山 智昭、遺伝子解析による歴史的木造建築物の腐朽調査、第36回文化財の保存および修復に関する国際研究集会、2012年12月6日、東京国立博物館

杉山 智昭、小林 幸雄、魚島純一、被災現場における緊急避難措置としての脱酸素処理法の評価、文化財保存修復学会第34回大会、2012年6月30日、日本大学理学部百周年記念館

杉山 智昭、小林 幸雄、糸状菌の防除・発生抑制効果確認に関するモニタリング技術についての検討、文化財保存修復学会第33回大会、2011年6月5日、奈良県新公会堂

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杉山 智昭 (SUGIYAMA TOMOAKI)

北海道開拓記念館・学芸部・学芸員

研究者番号： 90446310