

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：82620

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24501261

研究課題名(和文) インド・アジャンター石窟壁画消失メカニズムの解明に向けた微生物生態学的調査

研究課題名(英文) Microbial ecological approaches to elucidate the degradation mechanism of the murals in Ajanta Caves, India

研究代表者

佐藤 嘉則 (Yoshinori, Sato)

独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：50466645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：インド共和国にあるアジャンター石窟寺院には貴重な壁画群が存在する。しかし、石窟内部で広く確認される黒色物質が、壁画上に粘着して土壁そのものを溶解して壁画を消失させるという深刻な被害をもたらしており大きな問題となっている。本研究では、現地から採取した黒色物質の微生物および理化学的解析から、黒色物質は微生物バイオフィームであり、黒色物質のある土壁ではセルロース量が減少していること、などが明らかとなった。かつて石窟内にいたコウモリの糞尿による水分や有機物の供給が微生物バイオフィームの基となり、バイオフィーム内の微生物がスサを分解して壁画の剥落(消失)が引き起こされていたのではないかと考えられた。

研究成果の概要(英文)：The Ajanta caves are located in the northern part of Maharashtra state, India, where there are beautiful and valuable mural paintings. One of the serious problems for conservation of the paintings is that the black substances (BS) spread on the paintings and degrade the paintings together with the under layer (mud plaster). This study aims to elucidate the mechanism of the degradation of the mural paintings which is caused by BS. Based on microbial and physicochemical analyses, it is revealed that the BS collected from the deteriorating murals were consisted of microbial biofilms and that content of plant fibers in the deteriorating mud plasters under the BS were lower than that of the robust mud plasters. From these result, it is considered that BS, being exactly microbial biofilms, were made from bat's urine and excrement, and plant fiber (cellulose)-degrading microbes in the biofilm seem to be responsible for the degradation of mud plasters which support the mural paintings.

研究分野：文化財保存科学

キーワード：微生物劣化 壁画保存 インド・アジャンター石窟 バイオフィーム 黒色付着物質

1. 研究開始当初の背景

(1) 石窟壁画の劣化と黒色付着物質

インド共和国マハラシュトラ州北部に位置する仏教石窟寺院の一つであるアジャンター石窟寺院は、紀元前2世紀から後6世紀の間に描かれた壮麗な壁画群を有し、歴史学、美術史学などをはじめ多分野において世界的な注目を集めている。しかし、これらの壁画群は、経年による物理化学的な要因、地震やサイクロンなどの災害要因、過去の修復作業による人的要因、生物的要因など多くの要因が複合的に重なり劣化を受けている。そのなかでも、石窟内部で広く確認され、コウモリの排泄物に起因するとされている黒色物質は、壁画上に粘着して、壁画が描かれている土壁そのものを溶解して消失させるという深刻な被害をもたらすことで大きな問題となっている(図1)。



図1 黒色付着物質による壁画の消失

(2) 黒色付着物質の予備的観察

予備的な実験で、アジャンター石窟壁画から採取された黒色付着物質を光学顕微鏡にて直接観察したところ、膨大な数の微生物群が確認された。これは、黒色付着物質が微生物バイオフィームと同一であり、壁画の消失は微生物に起因した生物劣化であることを示唆している。バイオフィームとは、ある基質に付着した微生物が細胞外に多糖類などを分泌することで形成される粘性のある微生物集合体(菌膜)であり、紫外線や乾燥などの環境変化や化学物質からの細菌群集の保護、物質運搬経路の役割を果たす構造体である。また、バイオフィームでは、微生物の生息密度の高い閉鎖的な環境が形成され、恒常性が保たれるため、非常に微生物活性が高くなることでも知られている。このことは、アジャンター石窟壁画表面のような温湿度変化の激しい環境において黒色付着物質が安定して存在し、壁画を損失していつている現象を裏付けるものと考えられる。どのような微生物群によってバイオフィームが形成され、どのようなメカニズムで壁画が消失しているかを明らかにすることは、今後の壁画の保存のために適正な処置方法を構築するためにも必須な作業であり、急務であると考えられる。

(3) 黒色バイオフィームと壁画消失のメカニズム

黒色バイオフィームの起源としては、コウモリの排泄物が考えられる。アジャンター石窟内にかつて生息していた大量のコウモリによって糞や尿などの排泄物が壁画を含む壁面に供給された。一般的なコウモリの糞には、昆虫の原表皮(キチン、タンパク質)の未消化分が80%を占め、窒素化合物(アンモニアと硝酸)が10%、リン酸が7%、残りは鉄や硫黄などの微量金属化合物で構成され、尿では70%が尿素で構成されているといわれる。これらの物質が微生物のエネルギー源や炭素・窒素源となって代謝されながら、黒色バイオフィームを形成していったものと考えられる。黒色バイオフィームによる壁画層の消失メカニズムとして、微生物の代謝産物である酸が壁画の土壁の主成分である炭酸カルシウムと反応して溶解・消失していることを仮説として想定している。コウモリの排泄物に含まれる物質から微生物が酸生成をしていると仮定すると、次の3つの微生物群が酸生成に関わっているのではないかと推察される(図2)。

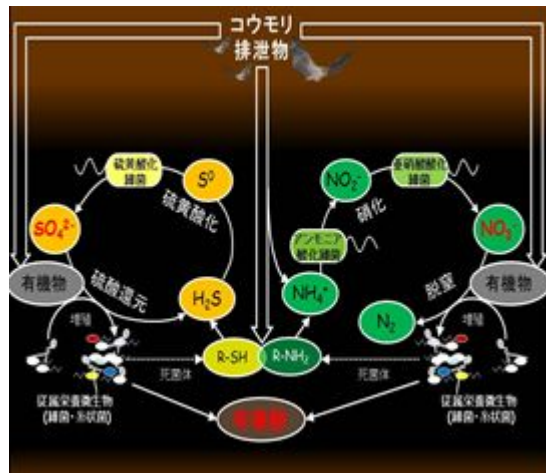


図2 黒色バイオフィームによる酸生成の仮想図

従属栄養微生物群による有機酸

有機物の代謝によって増殖する微生物群で、細菌・糸状菌などが含まれる。有機物を代謝する際に副産物として様々な有機酸を生成する。

硝化細菌による硝酸(NO₃)

アンモニア(NH₄⁺)を亜硝酸(NO₂⁻)に酸化するアンモニア酸化細菌と、亜硝酸を硝酸に酸化する亜硝酸酸化細菌があり、酸化によって得たエネルギーで増殖する独立栄養細菌である。2種類の代謝様式をもつ別の菌群によってアンモニアから硝酸が生成する。

硫酸化細菌による硫酸(SO₄²⁻)

硫黄化合物{硫化水素(H₂S)や元素硫黄(S⁰)}を酸化することで増殖のエネルギーを得る独立栄養細菌であり、代謝産物として硫酸を生成する。

2. 研究の目的

本研究は、アジャンター石窟壁画を消失させている黒色付着物質に対して、微生物群集構造を解明して、構成する菌群の代謝様式や生理学的性質から壁画消失のメカニズムを明らかにすることを目的とする。この成果は、喫緊の課題であるアジャンター石窟壁画において、今後の適正な処置方法を構築するために必要な情報をもたらすことが期待される。

3. 研究の方法

(1) 黒色バイオフィームの生物物理化学的解析

黒色バイオフィームの物理化学的性質として、pH、含水率、無機化合物の組成および含量（特にアンモニア、亜硝酸、硝酸、硫酸、硫酸）、有機化合物の組成および含量（特に全有機炭素含量、全窒素含量）、全菌数、生菌数、死菌数、細菌量、糸状菌量、微生物呼吸活性、各種有機物資化性についての定量的な測定から黒色バイオフィームの生物物理化学的特性を明らかにする。

(2) 非培養法を用いた黒色バイオフィームの微生物群集構造解析

黒色バイオフィームから直接、遺伝子を抽出して、構成する微生物群を遺伝子情報から明らかにする。具体的な手法としては、クローンライブラリ解析、末端制限酵素断片プロファイリング解析によって黒色付着物質を形成している細菌および糸状菌の全微生物構成種を明らかにする。

(3) 培養法を用いた黒色バイオフィームからの微生物分離とその生理生態学的解析

(2)の解析によって得られた情報から、劣化に関わると推定される菌群について分離培養を試み、微生物種の系統学的な解析と劣化に関わる生理学的な性質の特定を行う。特に、硝化細菌、硫酸細菌、有機酸生成糸状菌および細菌については、定量的な評価も行う。

(4) 壁画消失に係る原因微生物群の特定と劣化メカニズムの解析

(1) (2) (3)の解析で得られた知見をもとに黒色バイオフィームがどのような生物物理化学的性質を持ち、どのような微生物群で構成され、どのようにして壁画を消失させているかの劣化メカニズムを解明して、現場での有効な対応策に役立てる。

4. 研究成果

研究成果として、1) 現地調査での観察結果、2) 現地から採集した壁画の支持層である土壁や土壁上の黒色物質の微生物および物理化学的解析、からいくつかの知見を得た。まず、現地調査では、黒色物質の分布はかつてコウモリが生息していたとされる位置と一致していたことがヒアリング等から明ら

かとなった。また、壁画層下地の土壁では、現在でも土壁の構造を保つために加えられているスサ（藁や植物残差、種子など）が分解されずに残存しているが、劣化が進行している黒色物質の付近では周囲よりスサの分解が進行していることが観察された。

現地から採取した試料の微生物および理化学的解析を行った。試料はより劣化の状態の異なる部位から採取し、黒色部位、茶色部位、白色部位、劣化の受けていない土壁部位の4種類を採取した。土壁試料は、水分含量が低く、乾土重あたりの全炭素、全窒素は劣化の進んだ土壁が高く、C/N比は低い、という特徴が認められた（表1）。また、土壁のセルロース含量の測定を行ったところ、土壁内に含まれるセルロース量は劣化の進んでいる土壁で有意に減少することが確認され、スサ（植物残差）の分解に伴い土壁の剥落が引き起こされていたことが示唆された。

表1 試料の理化学性

Sample name	Moisture content (%)	Total-C (%)	Total-N (%)	C/N ratio	Loss on ignition (%)
C2-L-EP	<0.1	1.2	0.08	16	4.7
C2-L-BLK	1.4	4.1	1.2	3	13.3
C2-L-BRN	1.3	2.5	0.99	3	9.1
C2-L-WHT	1.1	3.3	2.4	1	15.4
C2-R-EP	0.4	1.5	0.08	16	5.7
C2-R-BLK	1.3	4.5	1.3	4	11.7
C2-R-BRN	1.9	2.2	0.89	2	10.6
C2-R-WHT	1.1	2.7	1.3	2	10.9

採取した試料の光学顕微鏡観察では、黒色部位と茶色部位で比較的多くの微生物群が確認された。これは、黒色部位および茶色部位には微生物バイオフィームが付着している状態であることを示しており、土壁の分解は微生物に起因した生物劣化であることが示唆された。劣化状態の異なる各試料からDNAを抽出してパイロシーケンシング解析による細菌および糸状菌の群集構造解析を行ったところ、劣化が進行している部位や進行していない部位でも、細菌種としては、*Lactobacillus* 属菌、*Enhydrobacter* 属菌、*Bacillus* 属菌などが共通して認められた。菌類も同様に、劣化が進行している部位や進行していない部位から採られた試料でも *Beauveria* 属菌が優占することが多かった。

これらの菌群の生理生化学的な性状解析を実施するために微生物の分離を試みた。細菌の分離には NB（肉エキス）寒天培地、DNB（希釈 NB）培地を用い、糸状菌の分離にはローズベンガル培地、コーンミール培地、ポテトデキストロース培地および DG18 培地を用いた。また、セルロース分解菌のバイオマス調べる為、Dubos 培地による MPN（最確値）法による菌数計数も試みた。しかし、いずれの培地、培養条件でも菌集落（コロニー）を

得ることが出来なかった。そこで、ATP 測定法による微生物量の推定を行ったが、有意な ATP が検出されなかった。これらのことから、採取した試料中の微生物は、採取時点で死滅していたと考えられた。石窟内の土壁試料は含水率が 0.1 以下～1.4%であり、乾季には極度に乾燥していると考えられ、微生物の生育が困難な環境である。また、劣化の起きていない土壁中には数千年経っているにもかかわらず未だにスサが残存していることなどからも、通常的环境条件では土壁の劣化は進行しないと考えられた。そして劣化が起こるのは、かつてコウモリが生息していた時の排泄物による影響が大きいと考えられた。

調査地点の土壁のバイオフィームは、現在は死滅しており劣化は進行していないと考えられたが、かつてはコウモリの排泄物による水分や窒素源の供給によって活発な微生物活動が起こり、バイオフィームが形成され、土壁中セルロース分（スサ）が分解され、それが土壁の剥落、さらには土壁の上にある壁画の消失につながっていたのではないかと考えられた。つまり、劣化機構としては、研究開始当初想定された有機酸や無機酸等による土壁の溶解とそれに伴う壁画の喪失が主な劣化機構でなく、土壁中のスサの分解に伴う壁画の喪失が主たる要因であることが示唆された。乾燥が進み、スサが多く含まれて C/N 比が高い難分解の土壁に、水分、窒素源となる尿が供給されたために、微生物に因るスサの分解が加速したことが、壁画消失の主要因であると推定した。現在もコウモリが生息する他の石窟で、劣化の進む土壁からセルロース分解能を有する微生物等の分離と性状解析などによって、この仮説の検証が進められることを今後期待したい。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

佐藤嘉則、木川りか、喜友名朝彦、立里臨、西島美由紀、杉山純多、非培養法によるキトラ古墳の細菌調査、保存科学、査読有、52、2013、1-10

貴田啓子、早川典子、佐藤嘉則、大河原典子、和田朋子、五十嵐圭日子、木川りか、川野邊渉、壁画修復処置に用いる接着材料への酵素の影響、保存科学、査読有、52、2013、11-26

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 2 件)

島津美子、アジャンター壁画の保存修復に関する調査研究 第 2 窟、第 9 窟壁画の保存修復と自然科学調査 (2009 年～2011 年)、2014、162、東京文化財研究所・インド考古局

Yoshiko Shimadzu , Indo-Japan research project for conservation of Ajanta paintings-conservation and scientific investigation of the paintings of Ajanta Cave 2 and 9 (2009-2011), 2015, 174 , National Research Institute for Cultural Properties, Tokyo/Archaeological Survey of India

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 嘉則 (SATO, Yoshinori)

独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・その他の部局等・研究員

研究者番号 : 5 0 4 6 6 6 4 5

(2) 研究分担者

島津 美子 (SHIMADZU, Yoshiko)

国立歴史民俗博物館・大学共同利用機関等の部局等・助教

研究者番号 : 1 0 5 2 3 7 5 6

木川 りか (KIGAWA, Rika)

独立行政法人国立文化財機構東京文化財研究所・その他の部局等・その他

研究者番号 : 4 0 2 6 1 1 1 9