

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 28 日現在

機関番号：82622

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24700934

研究課題名(和文) エライザ法を用いた膠着材同定の実現のための検討

研究課題名(英文) Identification of binding media in cultural heritage using ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

研究代表者

高嶋 美穂 (TAKASHIMA, Miho)

独立行政法人国立美術館国立西洋美術館・学芸課・研究補佐員

研究者番号：80443159

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：美術作品に用いられる膠着材のうち、蛋白質(動物・魚膠、鶏卵、ミルクカゼイン)や植物ガムを検出・同定することを目的として、抗原抗体反応を使ったELISA(酵素結合免疫吸着法)による分析を検討した。各抗体による蛋白質や植物ガムの検出限界は0.1～50 ng/100 μ Lと高感度であり、美術品からごく微量の試料しか採取せずに分析できるという点が、この方法の最大のメリットである。自作サンプルの分析、次いでパーミヤーンなどの石窟群(5-8世紀後半)から採取した壁画試料を分析し、動物・魚膠、卵白、ミルクカゼイン、植物ガムを検出した。

研究成果の概要(英文)：The immunological technique, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) was modified upon several series of lab tests used to identify proteinaceous materials (i.e. animal glue, fish glue, egg and milk casein) and plant gums in binding media and adhesives on used in works of art. The detection limit of this assay is extremely low at about 0.1 ng - 50 ng/100 μ L, for the proteinaceous materials and plant gums. This sensitivity is the biggest advantage of method which allows us to use minimal amount of sample from the works of art. Many samples from naturally aged easel replica paintings were tested using ELISA, and actual further, wall painting samples from Bamiyan Buddhist caves (from the 5th century to the late 8th century) were analyzed, which successfully revealed the presence of animal glue (and/or fish glue), egg white, milk casein and plant gums.

研究分野：保存科学

キーワード：ELISA エライザ 展色剤 膠着剤 蛋白質 植物ガム パーミヤーン 抗体

1. 研究開始当初の背景

美術作品中の膠着材(こうちゃくざい)の分析は GC/MS (ガスクロマトグラフ/質量分析計)、HPLC (高速液体クロマトグラフ)、FT-IR (フーリエ変換赤外分光分析) などによる分析が主流だが、作品から採取できるサンプルが微量であること、膠着材が混合物だと同定が困難になること、経年により有機物である膠着材が劣化していること、そもそもごく限られた機関でしかこういった大型の分析機器を保持していないことなど問題は多く、日本国内ではほとんど膠着材の分析は行われていない。本研究では膠着剤分析のための新しい手段として、ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay : エライザ、酵素結合免疫吸着法) を用いた美術作品の分析を検討した。ELISA の最大の利点は、数種類の蛋白質や植物ガムの混合物(たとえば、卵と動物膠とアラビアガムの混合物)であっても一度の分析で個々の物質を同時に検出・同定できると考えられること、第2に、特別な分析機器を必要とせずにピペット、マイクロプレート、プレートリーダーなどわずかな実験器具があれば実施できることである。本研究を始めた時点において、美術作品の分析に ELISA を用いた例は世界的にも数例で、日本国内ではおそらくゼロであった。

2. 研究の目的

美術作品に用いられる膠着材のうち、蛋白質(動物・魚膠、鶏卵、ミルクカゼイン)や植物ガムを検出・同定することを目的として、抗原抗体反応を使った ELISA による分析を検討する。ELISA での最適な分析条件、操作手法を定め、自作サンプルを用いて経年あるいは顔料との相互作用が分析精度に与える影響を探るとともに、実際の作品に使用されている膠着剤の分析を試み、ELISA の有用性と限界を探る。

2. 研究の方法

本研究では非競合の間接 ELISA (直接吸着

法)を用いた。ELISA の操作は GCI (米国・ゲッティ保存研究所)のプロトコールをもとにして検討し、洗浄手順やブロッキング溶液、抗体の種類・濃度の一部を変更した。以下に操作手順を簡単に記す。使用抗体は表1のとおり。

試料 100~200 µg をマイクロチューブにとり 0.1% (w/v) (以下、%表示はすべて w/v とする) になるように溶出液 (Elution Buffer : EB)*1) を添加して室温で 2~3 日放置。EB に 100 mM 炭酸水素ナトリウム溶液を添加して 5 倍に希釈する。この溶液を 4 通りの希釈率で 96 ウェルのマイクロプレートに加える。ブロッキング*2)。1次抗体(表1)を添加。酵素標識 2次抗体(表1)を添加。基質を加え標識酵素と反応させる。

20~30 分後にマイクロプレートリーダーで主波長 405 nm、副波長 630 nm の吸光度を測定。 、 の操作前には PBS による予備洗浄、続いて 2 分×5 回の本洗浄を行う。注) 上記分量は 6 種類の抗体を使用する場合であって、何種類の抗体を使用するかによって分量はかわる。

*1) 5 mL の 1M Tris-HCl、1 mL の 0.5M EDTA、180 g の尿素、25 mL の 20% SDS にイオン交換水を入れて 500 mL にし、塩酸を使用して pH7.4 に調整。

*2) Sea Block™ blocking buffer (#JIM13 以外) および BSA (ウシ血清アルブミン)(#JIM13) を使用。

表1 使用した抗体

目的検出物	1次抗体(希釈率)	2次抗体(希釈率)
卵白	Ovalbumin #ab1225(1600)	Rabbit IgG #AP132A(500)
卵黄	Phosvitin(D-5) #sc-46681(500)	Mouse IgG #AP124A(500)
動物膠(ヤギ以外)	Collagen #ab19811(400)	Goat IgG #ab6742(500)
動物膠(ウサギ以外)	Collagen #ab34710(200)	Rabbit IgG #AP132A(500)
カゼイン	Casein #bs-0813R(400)	Rabbit IgG #AP132A(500)
植物ガム(アラビアガム、果樹ガム等)	Arabinogalactan #JIM13(50)	Rat IgM #A110-100AP(500)
トラガカントガム	Gum Tragacanth #MAC265(50)	Rat IgG #A8438(500)

#sc-46681, #JIM13, #MAC265 はモノクローナル、他はポリクローナル

3. 研究成果

(1) ELISA の分析法・判定法の検討

試料は1抗体につき4重測定(4とおりの希釈率で測定)を行い、4ウェルのうち3ウェル以上が陽性の場合、その試料には抗原が含まれると判断した。ウェルの陽性/陰性の判定は、抗体ごとに4つのブランクウェルを設け、ブランクの吸光度の平均値+3SDをCut-off値(閾値)とした。もとのGCI法と比較して、PBSでの洗浄について予備洗浄を加えて洗浄回数も増やしたこと、一部の抗体の濃度を下げたこと、ブロッキング溶液を変更したことによりブランクの値そのものとばらつきが低減され、結果の再現性が改善された。

また、GCI法ではCut-off値は実験ごと抗体ごとに設けず $OD_{405} = 0.3$ と設定しているが、本実験では実験ごと抗体ごとに求めた。基質(pNPP)を加えてから吸光度を測定するまでの時間についても検討し、20-30分後と定めた。

(2) 各抗体の検出限界と反応性

抗原の検出限界は抗体により異なるが、 $0.1 \sim 50 \text{ ng}/100 \mu\text{L}$ である。膠には動物由来、魚由来のものがあり原材料動物種は多岐にわたるが、今回用いた2種の抗型コラーゲン抗体ではウサギ、ウシ、ブタ、ヒツジ、サーモン、チョウザメ由来の型コラーゲンを検出できることを確認している。また、選択した抗アタピノガラクタン抗体#JIM13ではアラビアガム以外に、桃膠(杏、セイヨウスモモ、モモなどサクラ属の植物の樹液を原料とする)、没薬、ガッチガム、タマリンドなどの植物ガムが検出できることを確認した。しかしこの抗体ではグアーガム、ローカストビーンガム、トラガカントガムは検出できない。このうち、トラガカントガム用には別の抗体#MAC265を用いた。

(3) レプリカサンプルの分析

複層絵画レプリカサンプル

胡粉もしくは石膏+三千本膠の地塗りの上に、顔料は同じで異なる展色材(卵黄、卵白、ア

ラビアゴム、リンシード、サンシクンドリンシード)から成る彩色層を塗布したレプリカサンプル(約4.5年経年。ベニヤ板の上に作成)を分析した。顔料はアズライト、ラピスラズリ、スマルトである。試料は地塗りごと彩色層を採取するようにし、採取量は $100 \sim 500 \mu\text{g}$ で、EB(溶出液)を添加して0.01%にした。(地塗りまで採取するために多めに採取した。このあと炭酸水素ナトリウムで希釈するので、マイクロプレートのウェル中での濃度は $0.0001 \sim 0.001\%$)。使用した抗体は、表1の抗カゼイン、抗トラガカントガム以外の6抗体である。その結果、各試料に含まれる展色材はほぼ正しく同定できたが、抗ホスピチン抗体による彩色層中の卵黄の検出ができず、また、彩色層がサンシクンドリンシードの場合にも地塗りの膠の検出が困難なケースがあった。これらの試料はEBに溶解しにくいことが一因と考えられる。

単層絵画レプリカサンプル(牛皮膠+顔料)10%膠水に6種類の顔料(イエローオーカー(Fe_2O_3)、テルベルト(カリウム、鉄、アルミニウムを含むケイ酸塩鉱物)、アズライト(塩基性炭酸銅 $2\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$)、ヴァーミリオン(硫化水銀 HgS)、マラカイト($2\text{CuCO}_3 \cdot \text{Cu}(\text{OH})_2$)、鉛白(塩基性炭酸鉛 $2\text{PbCO}_3 \cdot \text{Pb}(\text{OH})_2$))をそれぞれ添加してシャーレに流し、約7年半経年させた試料を分析した。顔料と膠水の割合は1:10(重量比)。抗体は表1の2種の抗型コラーゲン抗体(#ab19811、#ab34710)を使用した。その結果、ヴァーミリオンあるいはアズライトを添加した膠に対する#ab19811の反応は他より悪くなり、EB中濃度0.0005%で検出限界以下となることがわかった。他の膠試料はこの濃度では陽性であった。#ab34710ではすべての膠試料が陽性になった。

単層絵画レプリカサンプル(鶏卵+顔料)市販の鶏卵の卵白と卵黄それぞれに4種の顔料(イエローオーカー、テルベルト、アズラ

イト、ヴァーミリオン)を添加したものをガラスプレートに塗布し室内で3.5~4年経年させた試料を分析した。顔料と卵白の割合はおおよそ0.5g:1ml、顔料と卵黄は1g:1ml。卵白に顔料を添加した試料は、抗オプアルブミン抗体でEB中濃度0.0005%まで検出できたが、卵黄に顔料を添加した試料は抗ホスピチン抗体で0.01%濃度までしか検出できなかった。卵黄の試料はEBに溶解しにくいことが一因と考えられる。

(4) パーミヤーンなどの仏教壁画からの採取試料の分析(表2)

パーミヤーン、フォーラーディー、カクラク石窟群の壁画試料(5~8世紀後半)を用いて分析を行った。分析にあたっては、以前にGCIで行ったGC/MSでの分析結果(アミノ酸、脂肪酸の同定)をもとに、蛋白質や多糖類が含まれる可能性が高い試料、すなわちアミノ酸が検出された試料(脂肪酸は、検出されたもの/されなかったもの両方を含む)

アミノ酸は未分析もしくは検出されていず、脂肪酸も検出されなかった試料25点を選択し、30サンプルを分析した(同一試料から、分析対象とする破片をかえて2回分析した試料が5点あるので30サンプルとなっている)。うち13点がGC/MS分析と同試料。その他はGC/MS分析に使用した試料とは別試料だが、GC/MSにかけた試料と同じ石窟内の壁画から採取したものであり膠着剤は同じと考えられる。

試料は複層で、基本的には土壁(支持体)下塗り層、目止め層、彩色層となっているが、試料は微小で機械的に分離が困難であったため層を分離せずに分析した。よって、すべての層(あるいは一部の複数の層)が含まれている。試料採取量は500µg~1mgで、EBを添加して0.1%とした。抗体は、表1の抗ホスピチン抗体以外の6種を使用した。

その結果、30サンプルのうち17点で卵白(全卵か卵黄の可能性もあり)、ミルクカゼ

イン、動物(魚)膠、植物ガムを検出した。これらの試料は、これまでに行ったGC/MSやSR-µFTIRによる分析により、ごく一部の試料において動物(魚)膠や卵黄が存在する可能性や多糖類の存在(多糖類は試料調整が良好でなく、GC/MSでは2試料で検出できたのみ)が指摘されてきたが、今回のELISA分析により、多数の試料において初めて蛋白質の種類まで同定でき、さらに植物ガムの存在も確認できた。これらの結果については別の分析法でも確認する必要があるが、ミルクカゼインと植物ガム(トラガカントではない)の検出例が多かったことが特徴としてあげられる。今回検出した蛋白質や植物ガムがどの層に含まれるのかはまだ不明だが、いずれにしても今回のELISAの結果により、パーミヤーンなどの壁画は乾性油、蛋白質、植物ガムの層を重ねた複雑な重層構造をしていることが改めて確認できた。

(これらの試料は東京文化財研究所がユネスコ事業の一環としてアフガニスタン情報文化省の許可のもと採取した試料である)

表2 壁画試料の分析結果(一部抜粋)

Sample	Cave	ELISA 結果	アミノ酸	脂肪酸
BMM094	C(a)	植物ガム	×	×
BMM096	C(a)	植物ガム、カゼイン	×	×
BMM210	C(a)	カゼイン、卵白、動物(魚)膠	×	×
BMM209*	C(b)	カゼイン	未	×
BMM082	F(c)	植物ガム、カゼイン		×
BMM191*	EGB	カゼイン、動物膠		×
BMM129	J(b)	カゼイン		×
BMM113*	J(c)	カゼイン	未	×
BMM115	J(c)	植物ガム、カゼイン	未	×
BMM120*	J(d)	植物ガム、カゼイン		×
BMM169*	J(f)	植物ガム、カゼイン、動物膠		×
BMM137	K3	カゼイン		×
BMM203*	L	カゼイン、植物ガム		oil
FDM019	Fo14	卵白		×
FDM003*	Fo15	卵白		×
KAK05	KAK4 4	カゼイン		oil

*はGC/MSと同試料。BMM:パーミヤーン、FDM:フォーラーディー、KAK:カクラク。oil:乾性油を同定。アミノ酸と脂肪酸の分析はGC/MSによる(谷口陽子, 中央)

ジア・パーミヤーン仏教壁画の分析(1): シンクロトロン放射光を用いた μ FTIR, μ XRF/ μ XRD 分析, 国立歴史民俗博物館研究報告, 第 177 集, 2012a. 谷口陽子, 中央アジア・パーミヤーン仏教壁画の分析(2): GC/MS, ELISA 法による有機物質の同定, 国立歴史民俗博物館研究報告, 第 177 集, 2012b.)

本研究において、5~8 世紀後半のパーミヤーンなどの壁画から採取した試料にて蛋白質や植物ガムが検出できたことは、ELISA による分析が経年した試料にもある程度有効であることを示している。今後は、より経年させた自作レプリカサンプルの分析および、実試料の分析を通して ELISA の精度を探っていく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

1. 高嶋美穂、ELISA (酵素結合免疫吸着法) を用いた文化財中の膠着剤の検出、日本文化財科学会、2016/6/4、奈良大学(奈良県・奈良市)。

2. 高嶋美穂、ELISA (エライザ) 法による美術作品中の蛋白質および植物ガムの同定、文化財保存修復学会、2015/6/27、京都工芸繊維大学(京都府・京都市)

3. 高嶋美穂、エライザ法を用いた美術品における展色材の同定の試み、文化財保存修復学会、2014/6/8、明治大学(東京都・千代田区)

[図書](計 1 件)

1. Miho Takashima: ELISA testing for organic binding media of Üzümlü Wall paintings, Scientific Studies on Conservation for Üzümlü Church and its Wall Paintings in Cappadocia, Turkey. Vol. 1, Yoko Taniguchi (ed.), University of Tsukuba, 2015, 総ページ数 175 (pp. 96-102).

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高嶋 美穂 (TAKASHIMA, Miho)
独立行政法人国立美術館国立西洋美術館・学芸課・研究補佐員

研究者番号: 80443159

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: