

## 特集

# 特集「真菌を分離する！」 文化財編・食品編

株式会社テクノスルガ・ラボ 技術部菌類グループリーダー

喜友名 朝彦

### 1. はじめに

私達の身の回りには多くの文化財や食品が存在していますが、文化財は文化的な生活、食品は日常的な食生活で欠かせないものです。一般的に、文化財と食品を保存する過程で生じる劣化には様々な生物（生物劣化）が関与しています。本稿では真菌を対象とした調査方法、特に、「真菌を分離する」方法について、概説します。

### 2. 文化財や食品試料の直接顕微鏡観察（直接鏡検法）

文化財や食品試料から真菌を分離する際に、試料の全てあるいは一部を直接顕微鏡で観察することは、汚染菌を特定する上で重要です<sup>1,2)</sup>。

まず、肉眼や実体顕微鏡（ルーペ等も可）で試料上の真菌の汚染部位（コロニー色調や表面性状など）を観察します。さらに、対象箇所の一部からプレパラートを作製して光学顕微鏡で観察します。その際、分類群を同定する上で特徴的な形態が観察された場合、真菌の種類がある程度推定でき、分離培養操作を行う上で役立ちます（図 1）。プレパラートを作製するには、針やメスで対象箇所を掻き取る方法や、セロハンテープを用いて対象箇所に直接貼付けて採取し、封入液を滴下したスライドガラス上にカバーガラスの代わりに貼付けて簡易的に作製する方法があります。プレパラート標本作製の封入液には、ラクトフェノール液および染色剤添加のラ

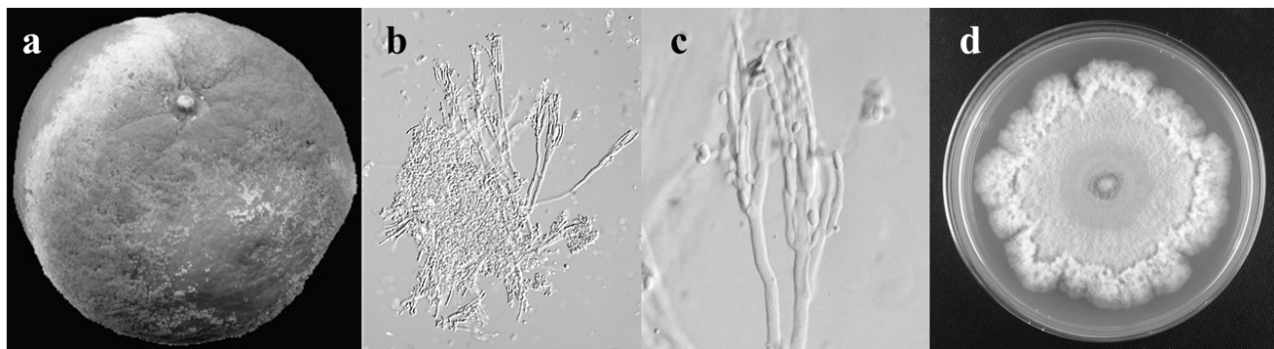


図 1. 直接鏡検法の一例

a: アオカビが生えたミカン、b-c: ミカン表面の一部から作製したプレパラート観察像、d: PDA 培地上のコロニー像

クトフェノール・コットンブルー液などがよく用いられます。

### 3. 文化財

文化財とは、広義では、人類の文化的な活動によって創り出された文化的価値を有する有形・無形の文化的な所産と定義されています<sup>3)</sup>。これらの文化財は石、木、紙など様々な材質から構成されており、さらに、文化財がおかれる環境も、博物館等の屋内環境、直接日光や雨水等の影響を受ける屋外環境、古墳等の土中埋蔵環境まで様々です<sup>3)</sup>。文化財に関しては本誌「かびと生活」の第12巻1号(2019)、特集「文化財保存と被害・修復」にも特集されているので併せて参考願います。

文化財という性質上、文化財から真菌を分離する際、試料の採取方法は特に重要です。直接サンプリングによる文化財への負担は最小限にして最大の情報を得るためには、好湿性・好乾性・好酸性などカビの生育条件をよく理解し、調査対象文化財の置かれた空間の環境条件を把握し、その条件下での文化財への汚染菌を想定して調査手法を組み立てていく必要があります<sup>4,5)</sup>。

文化財試料からの真菌分離用試料の主な採取方法を表1に示します。文化財からの真菌分離は文化財への影響を最小限にすべく、非破壊的に滅菌済綿棒等で表面を拭き取って寒天平板培地表面へ直接塗抹する方法が広く使用され<sup>4,7)</sup>、国宝高松塚古墳壁画の生物劣化調査時には壁画表面からの真菌分離にはこの方法が採用されていました<sup>2)</sup>。一方で、文化財試料の一部が既に剥離、碎片化、あるいは一部を切り取ることが可能な場合、滅菌済の針やメス、ピンセットなどで固形物として試料を採取し、直接接種法や湿室培養法で真菌の分離培養を行う場合があります<sup>2,7)</sup>。また、文化財の周辺環境中の真菌分離法として、寒天平板培地のシャーレの蓋を外して一定時間放置する落下菌測定法や、エアースンプラーを使用して一定量の空気を吸引する浮遊菌測定法が用いられています<sup>6,7)</sup>。

### 4. 食品

食品には野菜や果物などの生鮮食品、乾物・漬物・缶詰などの加工食品など、様々な種類があり、それぞれの食品生産(栽培、収穫、貯蔵、加工、等)の各工程において関わりのある真菌

表1. 文化財試料からの真菌分離用試料採取方法の概要(文献5、6、7をもとに作成)

手法の区分	使用道具(滅菌済)	主な対象
非破壊的手法 Nondestructive methods	綿棒*	壁画等の表面など (バイオフィルム含む)
	粘着テープ (スタンプ培地)	ガラス容器、紙類、建築資材など
破壊的手法 Destructive methods	針、外科用メス、 ピンセットなど	木材や石材等の固形物 厚めの基質、古色/古錆など (バイオフィルムなど)

※ 表面拭き取り法で使用した綿棒は分離培養操作に供するまで滅菌生理食塩水に浸した状態で、乾燥させないように注意が必要です。

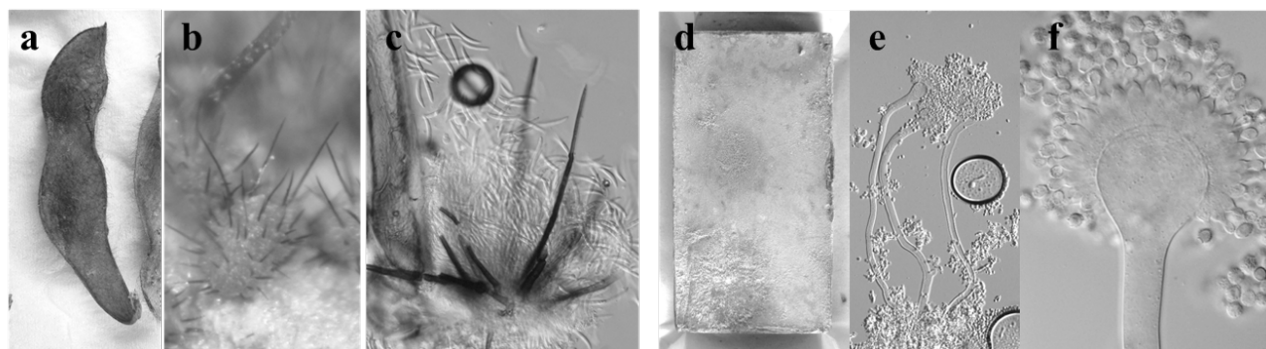


図 2. 食品のカビ汚染例

a-c: 枝豆上に生えたコレトトリカム属、d-f: チョコレート上に生えた好乾性アスペルギルス属の 1 種 (c、e、f プレパラート観察像)

の種類は変化します。例えば、植物である農作物の場合、栽培生育中は植物へ感染するフザリウム *Fusarium* やコレトトリカム *Colletotrichum* (図 2. a-c) などの植物病原菌類が多く出現し、作物の抵抗力が低下するとアスペルギルス *Aspergillus* やペニシリウム *Penicillium*、収穫・貯蔵された作物の貯蔵期間の経過に伴い、作物の水分含量が低下すると、中湿性・好乾性真菌 (好乾性アスペルギルスやユーロチウム *Eurotium* など) (図 2. d-f) の出現が増えてきます<sup>8)</sup>。このように、カビの発育は、作物等の種類に関係なく、食品成分 (栄養分)、水分活性、pH、液体/固体のような食品特有の物理化学的性質や、温度、酸素分圧などの食品の保存条件に大きく影響を受けます<sup>1,8,9)</sup>。そのため、食品から真菌を分離する場合、対象試料の性質およびそれが置かれている環境に応じて、分離方法や培地の選択が必要です。

食品からの真菌分離法は主に直接接種法、希釈平板法および温室培養法が用いられています (図 3)<sup>1)</sup>。食品の種類や分離作業の目的に応じて、試料を直接分離に供する場合と、表面洗浄などの前処理を行う場合があります。特に、食品内部の汚染菌の分離には次亜塩素酸ナトリウムお

よび 70%エタノールで化学的に表面殺菌後、滅菌水で十分にすすぎ、滅菌ろ紙上で試料を乾燥後、分離培地に接種します (図 3)<sup>1)</sup>。液体試料の場合は直接希釈平板法あるいはメンブランフィルター法を使用する場合があります。希釈平板法で分離を行う場合、前処理を施した試料を粉碎後、ストマッカー内で希釈液と混和してから分離作業を行います。

## 5. 文化財や食品からの真菌分離用培地

文化財や食品から真菌を分離する際には、様々な培地が使用されています (表 2)。分離の対象となる試料の種類や周辺環境に応じて、好湿性真菌用と好乾性真菌用のいずれかの培地を選択、あるいは複数種類の培地を併用することが必要です。

## 6. おわりに

真菌 (菌類) は自然界の中のあらゆる環境中に生息し、その中の一部の種類が文化財や食品環境など人間生活と深い関わりを持っています。文化財や食品の場合、真菌は生物劣化の原因、汚染・変敗、カビ毒産生など、様々な側面から調査・研究が行われてきました。文化財や食品

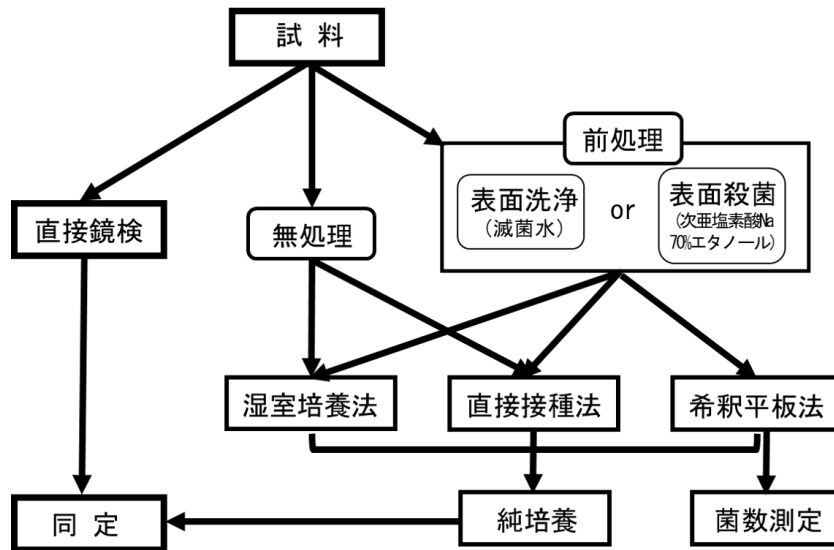


図 3. 食品からの真菌分離操作手順 (文献 1 を改変して作成)

表 2. 文化財や食品からの真菌分離に用いられる主な培地\* (組成は文献 9 より)

培地名称 (略称)	対象	組成 (g/L)
ポテト・デキストロース寒天培地 (PDA)	好湿性	ジャガイモ 200 g グルコース 20 g 寒天 20 g (市販品あり)
麦芽エキス寒天培地 (MEA)	好湿性	麦芽エキス 20 g ペプトン 1 g グルコース 20 g 寒天 20 g
ジクロラン・グリセリン 18 寒天培地 (DG-18)	好乾性/好稠性	グルコース 10 g ペプトン 5 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1 g MgSO <sub>4</sub> ・7H <sub>2</sub> O 0.5 g 寒天 15 g グリセリン 220 g 0.2% ジクロラン液 1 mL (市販品あり)
40% スクロース・麦芽エキス・酵母エキス寒天培地 (M40Y)	好乾性/好稠性	麦芽エキス 20 g 酵母エキス 5 g スクロース 400 g 寒天 20 g

\* 真菌用培地には細菌の生育抑制のためにクロラムフェニコール (50 ~ 100 mg/L) など抗生物質を添加する場合があります。また、ケカジなどの生育の速い真菌の生育を抑制し、生育が比較的遅い真菌を分離するために、ローズベンガル (20 ~ 50 mg/L) やジクロラン (2 mg/L) を添加することがあります。

に関係する真菌に関しては多くの参考書がありますが、本稿で紹介した方法および参考文献がこれらの真菌を調べる際の一助になれば幸いです。

文化財や食品分野では悪者扱いされることが多いですが、普段、顕微鏡を通して彼らと接していると彼らの姿に魅了され、親近感を持ってしまうのは私だけではないかと思えます。ヒトと真菌は同じ生き物（真核生物）の仲間として、正面から向きあい、真菌の生き様を観察することで、良くも悪くも彼らの性格がおのずと見えてくるはずです。そうすることでお互いに共存共栄できる道を探っていきたいと考えています。

#### 参考文献

- 1) Samson R.A., Houbraken J. *et al.* (2019) Food and Indoor Fungi Second edition. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute, Utrecht.
- 2) Sugiyama J., Kiyuna T. *et al.* (2017) Polyphasic insights into the microbiomes of the Takamatsuzuka Tumulus and Kitora Tumulus. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 63(2), 63–113.
- 3) 東京文化財研究所 編集 (2011) 文化財の保存環境、中央公論美術出版、東京.
- 4) 佐野千絵 (2007) 文化財の微生物被害と調査手法—保存科学 1号～45号—、保存科学、46、255–268.
- 5) Allsopp D., Seal K. *et al.* (2004) Introduction to Biodeterioration Second Edition. Cambridge University Press, Cambridge.
- 6) Caneva G., Pia M. *et al.* (2008) Plant Biology for Cultural Heritage — Biodeterioration and Conservation. The Getty Conservation Institute, Los Angeles.
- 7) Pinzari F., Montanari M. *et al.* (2010) Analytical protocols for the assessment of biological damage in historical documents. *Coalition* 19, 6–13.
- 8) カビ相談センター 監修、高鳥浩介・久米田裕子 編集 (2013) カビのはなし—ミクロな隣人のサイエンス、朝倉書店、東京.
- 9) 宇田川俊一 編集 (2004) 食品のカビ汚染と危害、幸書房、東京.