

P-2. 木酢液の木材防腐効果に関する組織学的研究

国立文化財研究所保存科学室〔韓国〕

○鄭 美和、崔 貞恩、洪 鎮英、金 英熙、趙 昶旭

研究発表要旨

有害生物防除のための殺生物質である木酢液の木材適用性に関する研究は重要である。本研究では、人工的な保存処理剤の代わりに、天然物由来である木酢液を用いた木材保存処理剤開発の可能性を木酢液処理後の木材防腐効果を通して検討した。

1. はじめに

有機質の材料で構成された文化財は、展示環境及び外部環境に晒されることによって、直接および間接的な被害が引き起される。これは文化財の美的・歴史的な価値を損失させるだけではなく、形態及び構造的変化をもたらす。特に、生物学的な劣化の原因である菌類による有機質文化財の損傷は、被害が深刻である。外部において被害が見られる時には、内部においては既にかかなりの被害が進行した状況であり、薬品を利用した消毒や薫蒸方法などを通じて一時的な救済策は講ずることができるものの、適切な条件が与えられることにより再発する危険性がある。今までの菌類の防除は、化学薬剤に依存されてきた。多くの化学薬品使用にもかかわらず、外部からの絶え間ない菌類の流入が起こることで、文化財に対する深刻な汚染及び損傷、さらには、人間の健康と安全にも深刻な問題を引き起こしている。したがって、新たな保存処理剤の原料として、従来の化学薬品に比べて環境負荷が少なく、人体への有害性も少ない天然物質から探索することが望ましい。

そこで、本研究では、天然物である木酢液からの抽出物と分画物の抗菌活性の測定および木材に木酢液を処理し、強制腐朽後の木材腐朽程度と木材組織観察し、木酢液の有機質文化財保存処理剤としての可能性を明らかにすることを目的とした。

2. 材料と実験方法

2.1 木酢液

木酢液は（株）樹村林産で製作され、rotary vacuum condenser (EYELA, Japan) で濃縮し、Crude 状態で作った。この抽出物をdichloromethane (以下MC)、ethyl acetate (以下EA)、n-butanol (以下BuOH) の順で分画した。分画物も同じ方法を用いて濃縮を行った。この中で最も抗菌効果が優れていたMC分画物を本研究に使用した (Table 1)。

2.2 抗菌活性

表面汚染菌に対する抗菌活性は paper disc agar diffusion methodによって評価した。孢子数を 3×10^6 で合わせたPDA mediaの中央に、抽出物を50ul (0.1g/ml) ずつ吸収させたpaper disc (Advantec, 8mm) を乗せて28°Cで培養する。4 - 5日後 disc 周りに生成されるclear zone (mm) を測定した。

木材腐朽菌に対する抗菌活性は、0.1g/ml濃度で paper disc soaking method により評価した。培養期間中、抽出物を含んだ paper discの上で成長した菌糸の直径比較を通じて、菌糸生長抑制率 (Hyphal Growth Inhibition Ratio, HGIR) を次の式によって算出した。これらの実験は3回繰り返した。

$$\text{菌糸生長抑制率 (\%)} = (Dc - Dt) / Dc \times 100$$

Dc = diameter of grown hypha in control、Dt = diameter of grown hypha in treatment

抗菌活性の評価実験に用いた微生物種を以下に述べる。

表面汚染菌は*Cladosporium cladosporioides* H1 (以下H1)、*Aspergillus sydowii* H2 (以下H2)、*Penicillium citreonigrum* H3 (以下H3)、*Penicillium toxicarium* H4 (以下H4)、*Penicillium corylophilu* H5 (以下H5)、*Aspergillus versicolor* H6 (以下H6)、*Acremonium alternatum* H7 (以下H7) であり、これらは有機質文化財から分離した微生物である。木材腐朽菌は*Pleurotus ostreatus* (KACC 50356)、*Schizophyllum commune* (KACC 43 373)、*Ganoderma lucidum* (KACC 42231)、*Trametes versicolor*、*Tyromyces palustris*である。

2.3 木材試片

木材は韓国の木造文化財の建築物中で76%以上を占めるアカマツ (*Pinus densiflora*) の辺材を選択した。木酢液処理によるアカマツ辺材試片の抗菌効果を評価するため、10x10x10 (mm³) の大きさで切断して木材試片で作った。アカマツ試片を121°Cに30分間滅菌した後、様々な濃度 (0.001、0.005、0.01、0.03、0.05、0.08、0.10、0.15、0.20、0.25、0.30g/ml) のMC分画物を100kPaで1時間含浸させた。以後、一週間室温にて乾燥させた後、強制腐朽させた。

2.4 強制腐朽試験の方法

ASTM (American Society for Testing Materials) により定められた方法によって、soil block testを行った。腐葉土と砂を3:1で混合した後、70%の含水率になるように蒸留水を添加した培養ビンに121°Cに30分間高圧滅菌した。培養ビンの中に供試菌を接種した白華feeder strip (110x15x10 mm³) を入れた後3週間28°C、70%RHで培養させる。供試した菌は*Trametes versicolor* (白色腐朽菌) および *Tyromyces Palustirs* (褐色腐朽菌) である。3週間後、準備したアカマツ辺材試片を白華feeder stripの上に置いて同様の条件で強制腐朽させた (Figure 1)。



Figure 1. ASTM method

2.5 重量減少率測定

3、6、9週の間、強制腐朽木片の重量減少率 (%) を測定するために採取した試料は、60°Cで72時間乾燥した後、次の式によって重量減少率 (%) を算出した。この実験は、3回繰り返した。

$$\text{重量減少率 (\%)} = (\text{健全材乾重量} - \text{腐朽材乾重量}) / \text{健全材乾重量} \times 100$$

2.6 SEM観察

3、6、9週の間、強制腐朽木片を10x7x7 (mm³) の小片にし、2% glutaraldehyde (以下GA) + 2% paraformaldehyde (以下PA) 固定液 (in 0.05M cacodylate buffer, pH 7.2) で4時間固定した後cacodylate bufferで30分間ずつ2回洗浄し、エチルアルコール (30、50、70、95、100%) で脱水した。100%エチルアルコール:キシレン=1:1の溶液で2時間、キシレン中に2時間浸漬した後、Paraffinで包埋した。この木片の観察する断面 (横断面、放射断面) をsliding microtomeで表面を滑らかに仕上げた後、キシレンでParaffinを取り除いた。木片を100%エチルアルコール:キシレン=1:1の溶液で2時間浸漬し、100%エチルアルコールで脱水した。gold coatingした後走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope: Hitachi S-2400 SEM) を使って観察した。

3. 結果

3.1 木酢液の抗菌活性

木酢液の抽出物及び分画物の0.1g/mlの濃度における抗菌活性の結果をTable 1に示す。MCとEAに比べて、抽出物とBuOHでは抗菌活性が弱くなった。木材腐朽菌に対してはEAで菌の成長を99.9%抑制し、表面汚染菌では菌の種類によってMCとEAの抗菌活性が少し異なっていた。しかし、全体的にMC分画物で様々な微生物を抑制する効果が優れていると判断された。木酢液の抗菌活性の結果から、抽出物及び分画物の中で最も抗菌効果が優れていたMC分画物を本研究に使用した。

Table 1. Antifungal activities of wood vinegar against mold(A) and decay fungi(B)

A.	H1	H2	H3	H4	H5	H6	H7
Crude	10.0	-	-	-	-	-	-
MC	23.0	29.0	10.5	9.0	-	20.0	16.0
EA	20.0	15.0	11.0	10.0	-	11.0	14.0
BuOH	9.0	-	-	-	-	-	-

clear zone(mm), - : no activity

B.	<i>P. ostearatus</i>	<i>S. commune</i>	<i>G. lucidum</i>	<i>T. versicolor</i>	<i>T. palustris</i>
Crude	32.0	00.0	99.9	18.2	21.0
MC	99.9	57.7	99.9	99.9	16.0
EA	99.9	99.9	99.9	99.9	99.9
BuOH	99.9	34.1	99.9	70.0	20.0

菌糸抑制率 (%)

3.2 重量減少率 (%) 測定

強制腐朽期間中、対照群で利用した100%エチルアルコール（以下EtOH）とともにすべての濃度の分画物を処理した木材試片の重量減少率(%)は60℃に72時間乾燥させた後、腐朽前と後の重量を測定して算出した。その結果、白色腐朽菌である*T. versicolor*による強制腐朽をさせた時、抽出物の濃度が増加するにしたがって、重量減少率が減少したが、大きな差はみられなかった。しかしながら、強制腐朽期間が長くなるにしたがって、2倍以上の重量減少がみられた。褐色腐朽菌である*T. palustris*を強制腐朽させた時には、木材に処理した抽出物の濃度が増加するにしたがって、重量減少率が徐々に減少し、培養期間が長くなると、低い濃度では2倍以上の重量減少がみられたが、高濃度で処理した試片では3%程度の違いであった。処理濃度が増加するにしたがって、木材腐朽菌の成長は抑制された。対照群と比べた時、白色腐朽菌と褐色腐朽菌において、それぞれ最大30%、60%の重量減少を抑制させたことは、分画物の腐朽菌に対する抵抗性の高さを示している。

3.3 木材試片の外観形態観察

木材の腐朽は腐朽された木材に現われた色相および状態によって、褐色腐朽菌と白色腐朽菌、そして軟腐朽(soft-rot)に分類される。本実験ではアカマツに対する褐色腐朽及び白色腐朽を強制的に進行させて現われた外観的变化を観察した。正常材とは違い褐色腐朽されたアカマツは、その見かけが暗褐色またはさび色を現わした。したがって、アカマツ(針葉樹材)に被害を与えやすい褐色腐朽菌の被害を被った木造文化財の建築物は腐朽被害がなく、完全なことのように見える時が多い危険があったと思われた。9週目の褐色腐朽材は、白色腐朽材よりも脆くなっていた(Figure 2)。アカマツの白色腐朽は褐色腐朽とは違い、木材全体が白色の腐朽菌で覆われて、腐朽が進行していることを容易に把握することができた(Figure 3)。褐色腐朽材は腐朽初期段階では木材の色相の変化は目立たないが、白色腐朽材は初期段階から色相の変化が著しく現われた。

木酢液の処理による褐色腐朽菌と白色腐朽菌の成長に対する影響を調べた結果、処理濃度が高くなるにしたがって、外観的な腐朽が阻止されるということが明らかになった。



Figure 2. 木酢液処理9週目の褐色腐朽
(左: EtOH処理、右: MC 0.25g/mlの木酢液処理)



Figure 3. 木酢液処理9週目の白色腐朽
(左: EtOH処理、右: MC 0.25g/mlの木酢液処理)

3.4 木酢液処理に関するアカマツの腐朽状態

木材に侵入した菌糸は木材細胞壁を直ちに分解しなかった。3週目は木材試片の外部に腐朽がみられたが、内部には菌糸の侵入がみられなかった。腐朽菌は、栄養分が容易に得られる放射組織に侵入し、壁孔や細胞壁を分解した。横断面相において、樹脂道内および細胞壁内腔に菌糸が侵入する様子が観察され、放射断面では放射組織の分野壁孔を介した菌糸の侵入がみられた。また、菌糸が壁孔を通過する時には、菌糸のサイズが細長く変化することが観察された (Figure 4、5)。9週目は木材試片の内部まで菌糸が侵入し、外部には分解が進行した細胞壁が観察された。3週目においても観察されたような樹脂道、壁孔及び放射組織での菌糸の侵入と破壊が、より進行しているのが観察された。

細胞壁の分解様式は腐朽菌によって異なっていたが、腐朽期間が長くなるほど細胞壁の破壊が進行され、木酢液の処理濃度が高くなるにしたがって、木材腐朽が抑制されている様子が観察された。木酢液の処理は、菌糸の侵入を100%阻止することはできなかったが、木酢液が持つ腐朽の進行を阻害する効果を明らかにすることができた。

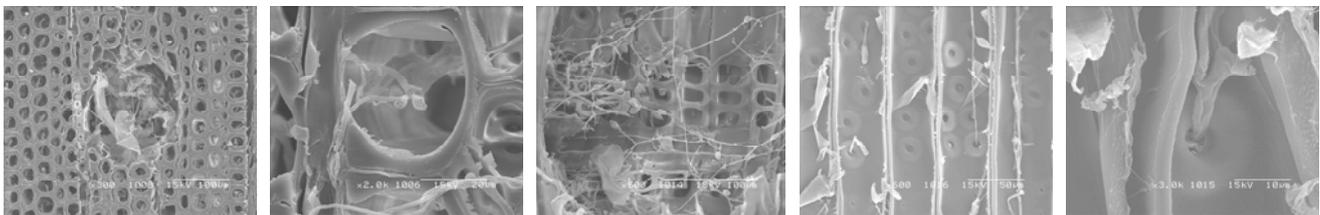


Figure 4. MC 0.05g/mlの木酢液処理後の菌糸侵入による腐朽状態 (3週目)

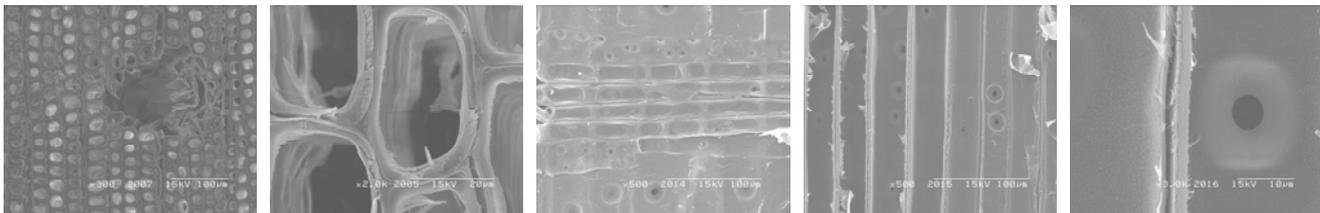


Figure 5. MC 0.25g/mlの木酢液処理による菌糸侵入の阻害された状態 (3週目)

4. 考察

本実験の結果は強制腐朽であるため、実際の木造文化財建築物における腐朽についてすべて説明できるとは言い切れないが、木酢液の抗菌活性、特にアカマツの木造文化財である建築物で発生する褐色腐朽菌と白色腐朽菌に対する抗菌効果があり、腐朽によるアカマツ組織の破壊の進行を抑制することを明らかにできた。

したがって、天然物である木酢液のMC分画物の成分は、アカマツで作られた木材建築物に損傷を起こす褐色腐朽菌と白色腐朽菌に対する抗菌活性を持つことから、木材文化財の保存処理剤として使用できる可能性があるといえる。

今後、木酢液分画物の成分分析および文化財材質及び環境、人間に対する安全性評価を行う予定である。さらに、有機質文化財の劣化源である様々な微生物に対する適用性評価も行うことで、保存処理剤としての開発を進める。

5. 謝辞

本研究は、文化財庁国立文化財研究所の支援により、保存修復技術開発研究(R&D) 事業である文化財保存のための天然殺生物の開発研究の一環として行われた。この場を借りて感謝致します。