

課題名 5C-1101 解体現場のアスベストリスクに対応する特異的バイオプローブの創成と迅速検出への応用

課題代表者名 黒田 章夫（広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻教授）

研究実施期間 平成23～25年度

累計予算額 97,729千円（うち25年度32,089千円）  
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード アスベスト、解体現場、環境リスク、バイオテクノロジー、迅速検査

## 研究体制

(1) 解体現場のアスベストリスクに対応する特異的バイオプローブの創成と迅速検出への応用（広島大学）

## 研究概要

### 1. はじめに(研究背景等)

日本にはアスベストを含む建材が約4000万トンあるとされ、今後これらが使われた古い建物の解体のピークを迎える。その際、アスベストの飛散を現場で調べなければ、再び大きなアスベスト問題を引き起こす可能性があるとされている。現状の大気アスベスト検出の方法としては、大気を濾過したフィルターを透明化し、位相差顕微鏡により観察する方法が用いられている。しかし、この方法はアスベスト、非アスベスト繊維の判定は不可能なため、大気中の総繊維濃度が1本/L以上の場合、電子顕微鏡による判定を行うことが公定法となっている。しかしながら、電子顕微鏡で観察する場合には前処理等が煩雑である他、繊維一本ずつをエネルギー分散型X線解析装置で分析していくのは、非常に時間と根気のいる作業であり、解体現場でのアスベストリスクには対応できない。もはや日本のアスベスト発生源は、工場から、解体現場などの短期的に移動する現場に変わっており、その状況に対応して新たな検出法が必要となっている。すなわち、時間をかけて検査する定点観測では不十分であり、現場でのアスベスト迅速検出法の確立が急がれている。

### 2. 研究開発目的

研究代表者は細胞内タンパク質ライブラリーの中からアスベストに特異的に結合するタンパク質をスクリーニングし、このタンパク質を蛍光物質で修飾することにより、バイオプローブを作成した。この蛍光プローブを用い、フィルター上のアスベストを蛍光顕微鏡でとらえる方法(バイオ蛍光法)を開発した。染色の操作は簡単で、フィルターに数滴のバイオプローブを垂らすだけで前処理が完結する。このフィルターを蛍光顕微鏡で観察すると、アスベスト繊維が光って見えるため、約30ナノメートル幅の非常に微細なアスベスト繊維が、低倍率でも明瞭に観察できた。アスベストは蛇紋石系のアスベストであるクリソタイルと、他5種類が含まれる角閃石アスベストが存在する。アスベスト結合タンパク質のうち、DksAタンパク質はクリソタイルに特異的で、GatZタンパク質あるいはHNSタンパク質は角閃石系のアスベストに広く結合した。バイオ蛍光法は、位相差顕微鏡レベルの操作性である程度の確度でアスベストと判定できるので、現場での「迅速簡易検出法」として有望視されている(2010年6月改訂の環境省のアスベストモニタリングマニュアル第4版で紹介)。これらのアスベスト結合タンパク質を利用すれば、全種類のアスベストに対応できるが、残念ながらHNSとGatZがアスベスト以外のケイ酸アルミ繊維、ケイ酸カルシウム(ワラストナイト)、酸化チタンウイスキーとの交差が見られるという課題が残されていた。もしこの点が克服できれば、現場でアスベストと確定できる「迅速検出法」が確立できると考えられた。そこで、HNSとGatZのアスベストの結合に関与する領域を特定し、その他の無機繊維と結合する領域を取り除くことによって、アスベストに対する特異性が向上したバイオプローブを作成することを目的とした。また、実際のサンプルに対して、光・電子相関顕微鏡による蛍光繊維の分析を行うことによって、バイオプローブの特異性を検証することとした。

### 3. 研究開発の方法

アスベスト特異的バイオプローブの作成には次の方法を用いた。領域を分けた限定HNSタンパク質を発現させ

るために、プライマーを設計しPCRにて遺伝子の増幅を行った。精製した限定HNSタンパク質は、Cy3-Maleimide Reactive Dye (GE Healthcare社)を用いて蛍光標識を行った。ビオチン化HNSタンパク質及びビオチン化ペプチドについては、予めCy3蛍光体で修飾されたStreptavidin-Cy3、あるいはCF488Aで修飾されたStreptavidin-CF488A (Biotium社)と混合することによって蛍光標識を行った。

アスベストへの結合評価は、フィルターアッセイ法、チューブアッセイ法、遠心法、蛍光顕微鏡法によるアスベスト観察を用いて行った。フィルターアッセイ法では、メンブレンフィルター(MCE:ニトロセルロース)に塗布した標準繊維に対して、蛍光で修飾したHNSタンパク質を添加して反応させた後、蛍光顕微鏡を用いて観察を行ない蛍光の有無によりタンパク質が結合しているかどうか評価した。具体的には、アスベスト及びJFM標準繊維を塗布したメンブレンフィルターを吸収紙の上のせ、洗浄液[0.3Mリン酸緩衝液(pH8.0)、0.3M NaCl、0.5% Triton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム]を1滴滴下し、完全に吸収させた。次にHNSタンパク質(10nM HNS60-90-AviTag-Streptavin-Cy3複合体)を含む結合緩衝液[0.3Mリン酸緩衝液(pH8.0)、0.3M NaCl、0.5% Triton X-100]を2滴滴下し、完全に吸収させアスベストの染色を行った。洗浄液を1滴滴下し、さらに0.05Mのリン酸緩衝液(pH8.0)を4滴滴下して界面活性剤を取り除いた。このように処理を行ったフィルターをスライドガラスののせ、封入液をカバーガラスとフィルターの間に挟み込んで、蛍光観察を行った。

蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で同一の繊維を観察する際には、光・電子相関顕微鏡を用いて行った。標準試料を捕集したメンブレンフィルター、また実際の解体現場で採取したサンプルを吸収紙の上に乗せ、アスベスト蛍光試薬を用いて処理を行った。基本的にはフィルターアッセイ法に従って行ったが、最後に超純水4滴滴下し、余分な成分を完全に除去した。このように処理を行ったメンブレンフィルターを、カーボンテープを貼付けた試料台に固定し、ステージホルダーに装着した。ステージホルダーを蛍光顕微鏡(Axio Imager、カールツァイス社製)にセットし、ステージホルダー上のマーカー3点を登録しステージ・キャリブレーションを行った。約50~100視野を蛍光観察して、繊維状の物質が検出された視野についてCCDカメラで撮影を行ない画像および位置情報の取得を行った。USBメモリを使って蛍光顕微鏡で取得した画像及び位置情報を電子顕微鏡システムに入力した。次に、ステージホルダーを電子顕微鏡(SIGMA VP、カールツァイス社製)の試料室に移し、観察位置を蛍光顕微鏡と同期させるために、ステージホルダー上のマーカー3点を再度登録しステージ・キャリブレーションを行った。蛍光顕微鏡で観察された繊維状物質が何であるか調べるために、記録した位置情報を入力して、電子顕微鏡の観察視野を移動させた。繊維が確認されたらエネルギー分散型X線分光器(QUANTAX 200、ブルカー社製)にて元素分析を行った。

位相差蛍光顕微鏡法によるアスベスト検査では、大気を捕集したメンブレンフィルターの捕集面を上に向け、切断したフィルターに洗浄液を1滴滴下し、完全に吸収させた。続いて蛍光タンパク質を含む結合緩衝液を2滴、位置を変えながら滴下し、完全に吸収させた。再び洗浄液を1滴滴下し、続いて調整液を4滴滴下した。捕集面を上にしてスライドガラスに乗せて乾燥させた(80°Cのホットプレート上に15分間静置)。捕集面を上にしてアセトン蒸気をあてフィルターを透明化した。カバーガラスに封入液を1滴滴下し、空気が入らないように注意しながら、カバーガラスをフィルター片に被せてサンプルとした。サンプルを位相差蛍光顕微鏡にセットして観察した。

## 4. 結果及び考察

### (1) アスベスト特異的バイオプローブの創成

HNSタンパク質は137アミノ酸からなるタンパク質で、アスベスト以外に、ワラストナイト(ケイ酸カルシウム繊維)、ケイ酸アルミ繊維、酸化チタンウイスカー、炭化ケイ素繊維などの無機繊維と結合する。そこで、HNSのアスベストの結合に関与する領域を特定し、その他の無機繊維と結合する領域を取り除くことによって、アスベストへの結合特異性を向上させることとした。

HNSの立体構造からN末端領域とC末端領域の2つの領域に分割可能と予測できた。N末端領域(1-59番目のアミノ酸)とC末端領域(60-137番目のアミノ酸領域)を作る様に遺伝子を設計した。それらを、大腸菌を宿主とする発現ベクターに組み入れ、遺伝子の発現誘導を行った。それぞれの限定HNSタンパク質の精製を行ない、直接蛍光色素(Cy3)で修飾して結合性を調べた。その結果、C末端領域(HNS60-137)が角閃石系アスベストと結合することがわかった(図1、2)。さらに、HNS60-137は、ケイ酸アルミ繊維や酸化チタンウイスカーには結合しなくなったことから、予想通り、

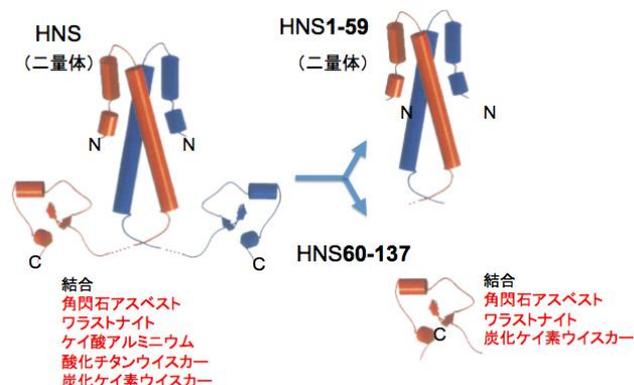


図1、HNSタンパク質の構造とアスベスト結合領域。HNSタンパク質をN末端領域(1-59)とC末端領域(60-137)に分割した。角閃石系アスベストの結合領域は、C末端領域にあることがわかった。

その他の無機繊維と結合する領域を取り除くことによって、アスベストへの結合特異性を向上させることができた。

HNS60-137をさらに限定して、角閃石アスベストに結合する領域を探った。具体的には、60-90番目までと、91-137番目の領域に分けた。その結果、60-90番目の限定HNSペプチドは、角閃石系アスベストと炭化ケイ素繊維には結合するが、ワラストナイトには結合しなくなることが分かった。すなわち、60-90番目までに限定することによって、さらにアスベストへの結合特異性を向上させることができたことになる。

限定HNS60-90を用いて特異性評価を行った結果、ほぼアスベスト特異的であることが分かった(表1)。現在のところ、アスベストと炭化ケイウイスキーとの区別は出来ていない。しかし、炭化ケイウイスキーは軍事用の特殊繊維で現場にはほとんど存在しないことから、この交差は無視できると考えられた。一方、DksAは炭化ケイ素ウイスキーにも結合する他は、ほぼクリソタイル特異的である(表1)。従って、DksAとHNS60-90の組み合わせで、アスベストに対する十分な特異性が得られたと考えられた。

次に60-90番目のペプチドのアスベスト結合領域のさらなる絞り込みを行った。まず、C末端側からの限定を行った。具体的には、87-90番目の4つのアミノ酸を欠失させた60-86番目のペプチド(HNS60-86-AviTag)を作製したところ、角閃石系アスベストへの結合性が消失した。この結果から、角閃石系アスベストへの結合には87-90番目のKAKR(リジン-アラニン-リジン-アルギニン)というペプチドが重要である事がわかった。次にN末端側からの欠失を行った。具体的には、63-90番目、75-90番目に限定したペプチドの作製を行った。その結果、63-90番目、75-90番目共に角閃石系アスベストへの結合性を有していた。最終的に、アスベストへの結合には、KSGTKAKR(リジン-セリン-グリシン-スレオニン-リジン-アラニン-リジン-アルギニン)というアミノ酸配列が重要であることがわかった。

さらに、アスベスト結合領域であるKSGTKAKRのアミノ酸配列について詳細な解析を行った。リジン(K)とアルギニン(R)は正電荷を有するアミノ酸である。リジンをすべてアルギニンに置換したペプチド(GGGSGGGSGGGSRSRSGTRARR)についてアスベストへの結合性を調べると、著しい結合力の低下がみられた。また、負電荷を有するアミノ酸EをKの近傍に配置したペプチド(GGGSGGGSGGGSKEEKEKR)についてもアスベストへの結合性を調べると、この場合も著しい結合力の低下がみられた。しかし、リジンの位置には比較的自由度があった。以上の結果から、アスベストの結合には同じ正電荷のアミノ酸でもアルギニンではなくリジンの方が重要であり、負電荷のグルタミン酸はアモサイトへの結合を低下させる効果があることがわかった。

アスベスト結合タンパク質の結合力を強化させることによって、より明瞭なアスベスト蛍光画像が期待できる。ストレプトアビジンは、4量体を形成するタンパク質である。従って4分子のビオチン化したタンパク質(ペプチド)がストレプトアビジンを介して繋がることになる(図3)。ストレプトアビジン複合体は1分子上に4カ所のアスベスト結合部位が存在することにより、分子全体の結合力は単体と比べて向上することが期待できた。そこで、単体であるHNS60-90-AviTagを直接Cy3蛍光物質で修飾したものと、4量体であるストレプトアビジン複合体(HNS60-90-AviTag-Streptavidin-Cy3)のアスベストに対する結合を蛍光顕微鏡で観察した。その結果、単体では蛍光がほとんど見えない濃度条件でも、ストレプトアビジン複合体は非常に明瞭な蛍光画像が得られるようになった。

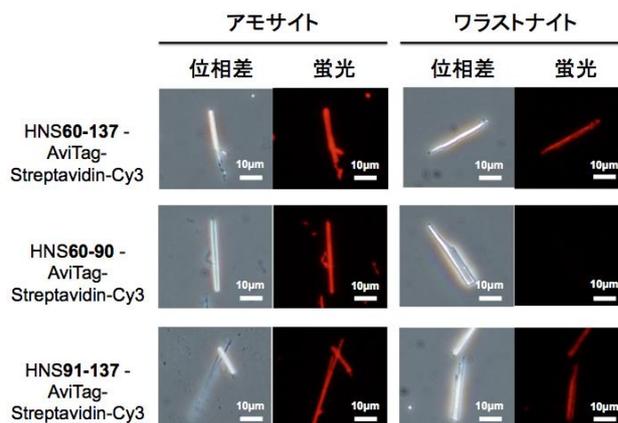


図2、限定HNSタンパク質の結合評価。蛍光標識した限定HNSタンパク質とアスベストを混合後、位相差顕微鏡(左)と蛍光顕微鏡(右)によって観察した。60-90番目の限定HNSタンパク質はワラストナイトには結合せず、アスベスト(アモサイト)に結合したので、アスベストへの特異性の向上がみられた。

表1、アスベスト結合特異性

|            | 繊維          | DksA | HNS | HNS60-90 |
|------------|-------------|------|-----|----------|
| アスベスト      | クリソタイル      | 結合   |     |          |
|            | クロソドライト     |      | 結合  | 結合       |
|            | アモサイト       |      | 結合  | 結合       |
|            | アンソフィライト    |      | 結合  | 結合       |
|            | トレモライト      |      | 結合  | 結合       |
|            | アクチノライト     |      | 結合  | 結合       |
| 非アスベスト     | グラスウール      |      |     |          |
|            | ロックウール      |      |     |          |
|            | 微細ガラス繊維     |      |     |          |
|            | 耐火性繊維(RF1)  |      |     |          |
|            | 耐火性繊維(RF2)  |      |     |          |
|            | ケイ酸アルミニウム繊維 |      | 結合  |          |
|            | チタン酸カリウム繊維  |      |     |          |
|            | 炭化ケイ素ウイスキー  | 結合   | 結合  | 結合       |
| 酸化チタンウイスキー |             | 結合   |     |          |
|            | ワラストナイト     |      | 結合  |          |

次にその結合力の違いを定量化するために、遠心法とスクヤッチャードプロット解析から、単体と4量体であるストレプトアビジン複合体の解離定数を比較した。その結果、単量体であるHNS60-90-AviTag-Cy3の解離定数は260 nMであるのに対し、4量体であるストレプトアビジン複合体 (HNS60-90-AviTag-Streptavidin-Cy3) の解離定数は1.0 nMと強固な結合を示した(図3)。すなわち、アスベストに対する結合力はペプチドを4量体化させることで約260倍向上した。これは、アスベスト表面とタンパク質の結合が複数箇所で行われることによって解離が起こりにくくなり、結合力が向上したためと考えられた。

## (2) 実サンプルを用いた検証(相関顕微鏡を用いた繊維の特異性の検証)

標準サンプルを用いて、特異性を検証した結果、十分な特異性が得られた。しかし本方法が公定法化されるためには、実際のサンプルではどこまで信頼性があるのか、起こるとすればどのような問題が起こりえるのかを把握する必要がある。すなわち、蛍光顕微鏡で見えている繊維が本当にアスベストであるのかの確証を得る必要がある。そのために、蛍光顕微鏡で観察した視野と同一の視野を電子顕微鏡で観察して、エネルギー分散型X線分光器(EDX)で分析して同定する必要がある。しかし、蛍光顕微鏡で観察された同じ繊維を電子顕微鏡で探し出すのは非常に困難な作業である。さらにアスベスト捕集に使用するニトロセルロースフィルターは繊維で構成されているため、その上にある繊維状物質は、電子顕微鏡の低倍率では背景と区別が付きにくく、広範囲の中から同一の繊維を探し出すことはほぼ不可能に近い。光電子相関顕微鏡は蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で試料ステージを共有する特殊な顕微鏡である。蛍光顕微鏡で観察した視野の位置情報を記録し、電子顕微鏡での観察に移した際に、同一の視野に自動で移動してくれる。

そこで、光・電子相関顕微鏡システムをリースにて導入し、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で同一繊維の観察及び分析を行った。まず標準サンプルのアモサイトを捕集したフィルターを、アスベスト蛍光試薬で処理した後、蛍光顕微鏡で観察した。蛍光を放つ繊維の画像及び位置情報の取得を行ない、次に試料台を電子顕微鏡に移した。位置情報を入力することで、同一視野、同一繊維を観察することができた(図4)。さらに、その繊維をエネルギー分散型X線分光器(EDX)で分析することにより、アモサイトであると同定できた。このように、標準繊維を用いて蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で同一繊維の観察及び分析するシステムを確立した。

このシステムを用いて、実際の解体工場のサンプルを用いてプローブの性能を検証した。フィルター34種類を用いて蛍光法を実施し、蛍光を示した繊維340本を電子顕微鏡で観察し、エネルギー分散型X線分析装置(EDX)で分析した。その結果、322本(角閃石262本、クリソタイル60本)がアスベストであることが分かった。すなわち蛍光法によるアスベスト判定における偽陽性率は約5%であることが分

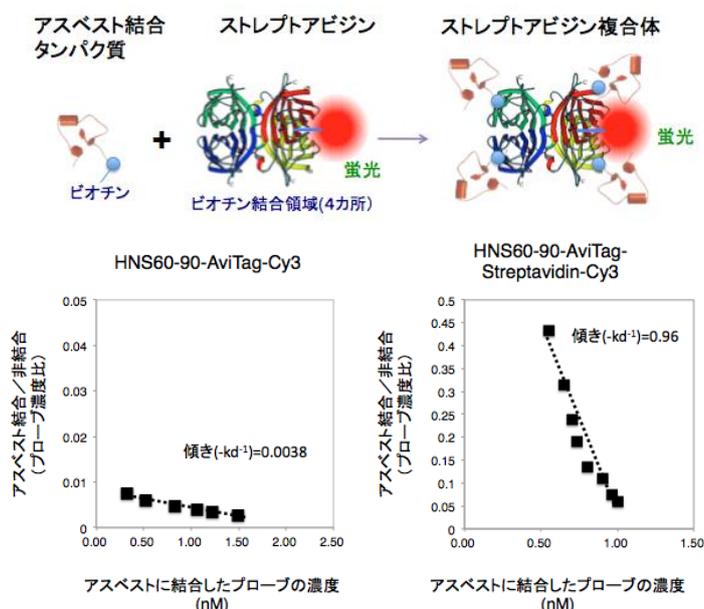


図3、アスベストに対する結合力を向上させる方法の概念図(上)と結合力評価(下)。スクヤッチャードプロットによって解離定数を求めた。4量体化することで結合力が約260倍向上した。

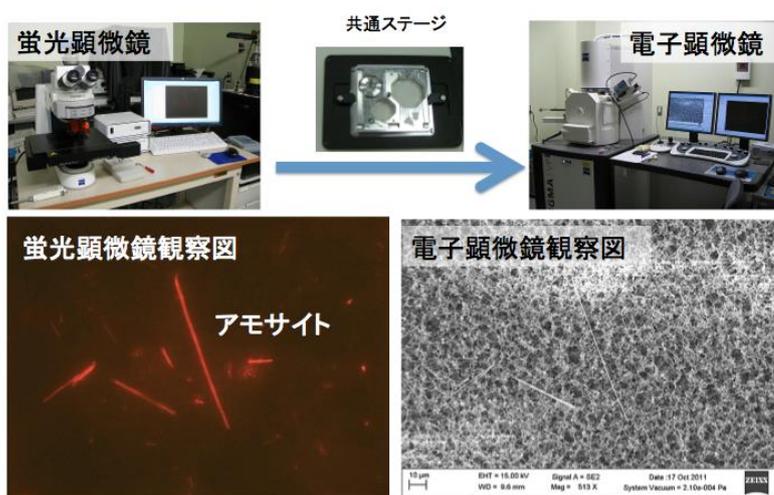


図4、光電子相関顕微鏡システム。蛍光を示すアスベストの位置を記録し、同じ位置の繊維を電子顕微鏡(SEM)で観察することができる。SEM-EDXで元素分析することでアスベストを確認することができる。観察図はアモサイト標準繊維を蛍光顕微鏡で観察した後、電子顕微鏡で同じ繊維を観察した結果である。

かった。

この確度は、迅速法としては、十分であると考えられるが、さらに蛍光を示しながらアスベストではないものを詳細に分析することによって、確度を100%に近づけるための改善方法を探った。分析の結果、アスベスト以外の繊維として、有機繊維6本、鉬物繊維 (Mg: Al: Si: Ca = 0.3: 0.4: 1: 0.5) 7本、ケイ酸アルミ (Al: Si = 0.7: 1) 2本、鉬物繊維 (Si) 1本、鉬物繊維 (Mg: Al: Si: Ca = 0.2: 0.4: 1: 0.2) 1本、鉬物繊維 (Na: Mg: Al: Si: K: Ca: Fe = 0.1: 0.3: 0.6: 1: 0.1: 0.1: 0.1) 1本、であることがわかった。有機繊維については、蛍光を呈する励起波長の特性が異なるため、自家蛍光 (蛍光プローブが結合して蛍光を持つものではなく、繊維自体が元来蛍光を持つもの) と考えられた。有機繊維の自家蛍光の特徴として、励起・蛍光波長の特性が、アスベストバイオプローブ標識に利用した Cy3やCF488Aと異なる。そこで、この特徴を使えば、有機繊維なのか、アスベスト蛍光プローブが結合したアスベストなのかの判定できると考えられた。具体的には、蛍光タンパク質 (CF488Aで修飾したアスベスト結合タンパク質) は、490nm付近に励起波長のシャープな吸収ピークがあるため、360nmや540nmの励起波長では励起されない (蛍光がない)。一方、自家蛍光を持つ有機繊維の場合、360nmや540nmでも励起されて蛍光があるので、見分けられた。

蛍光法によるアスベスト検出の感度については、これまでの研究結果から30ナノメートル幅の微細なクリソタイル繊維が検出できることが分っている。これは最も細いアスベストの単繊維と同等の太さである。このことから、蛍光法では微細なアスベスト繊維も見落とすことはないと考えられる。しかし一方で、様々な夾雑物がある実際の環境測定において、蛍光法がその性能を発揮できるかを確認する必要がある。そこで実際の解体現場やアスベスト除去作業現場において飛散しているものを用いて評価試験を行うために、アスベスト含有吹付け材を試料として使用することとした。これらの試料を粉碎後、水分散させメンブレンフィルター上に捕集して試料を作製した。この試料を電子顕微鏡観察及びEDXにより分析した結果、それぞれ繊維20本について、全てアスベストであった。次にこの試料を位相差で観察できた繊維365本の蛍光を調べた結果、358本に蛍光が見られた。実サンプルであるのでアスベスト以外のものが含まれていた可能性もある。従って、現状では偽陰性率が最大でも1.9%であると言える。

### (3) アスベスト迅速計測法の確立

位相差顕微鏡を用いたアスベスト検出法による数値が、長い間疫学的危険度の相関に使われてきたことから、今も基本的に位相差顕微鏡による数値が使われている。バイオ蛍光法は、位相差顕微鏡では検出できない微細なアスベスト繊維も検出できることから、検出されるアスベストの総数は、位相差顕微鏡によって検出される総数よりも多くなることが指摘されていた。それにより、従来の位相差顕微鏡・電子顕微鏡法によって取得された過去のデータと連続性がないのではないかと懸念が専門家から指摘された。バイオ蛍光法を広く一般化するために、如何に従来の位相差顕微鏡による計測、電子顕微鏡法による判定の基準を変えないようにアスベストを計測するかという技術的課題を乗り越える必要があった。

位相差顕微鏡は、蛍光ユニットを追加して、同一視野を位相差モード (透過型) と蛍光モード (落射型) で切り替えながら観察することが可能である。このモードの切り替えは光源と光路の切り替えだけなので、顕微鏡によってはレバー1つで簡単に切り替わる。確立した位相差蛍光法では、位相差モードで繊維を計測し、次に蛍光モードに切り替えて、その繊維がアスベストかどうかを判定する (図5)。すなわち、位相差顕微鏡で確認できた繊維のうち、蛍光を持つ繊維をアスベストとして計測するので、従来の位相差顕微鏡による計測、電子顕微鏡法による判定の数値を超えることはない。これにより、位相差顕微鏡の過去のデータとの連続性が担保され、基準が変わるのではないかと懸念が払拭された。さらに従来の電子顕微鏡では、位相差顕微鏡で見た繊維と同一の繊維を観察する (探す) ことが事実上不可能である一方で (光・電子相関顕微鏡では可能だが、高価のため一般普及は難しい)、位相差蛍光顕微鏡法は、同一の繊維を容易に確認できることは特筆すべき改良点である。

現在、『アスベスト・モニタリング・マニュアル 第4.0版』(環境省)による標準的な分析法では、まず位相差顕微

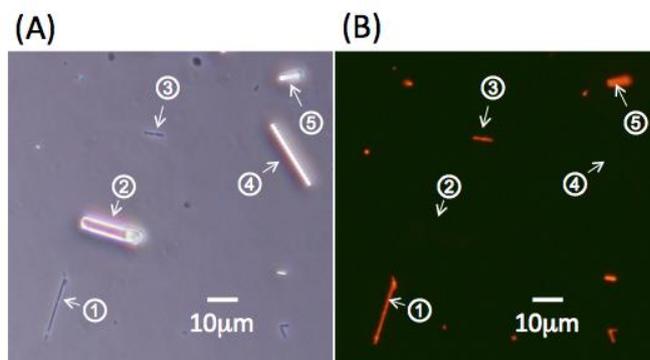


図5、位相差・蛍光顕微鏡法によるアスベスト計測。(A)は位相差顕微鏡画像。(B)は(A)の位相差顕微鏡画像と同一視野における蛍光顕微鏡画像を示す。位相差顕微鏡下で観察した繊維状の物質1, 3, 5において、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の結合を確認することができた。一方、位相差顕微鏡下で観察した繊維状の物質2および4においては、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の結合を確認することができなかった。この結果、繊維状の物質1, 3, 5は、アスベストであると判定し、繊維状の物質2および4は、アスベスト以外の繊維と判定できる。

鏡によって非アスベストを含む総繊維での繊維数濃度を測定し、1本/L以上の場合に、さらに電子顕微鏡とX線分析装置(EDX)を用い、アスベストの同定を行いながらアスベスト繊維数濃度を測定することとなっている。蛍光顕微鏡法は手順・操作が簡単なため従来法より迅速性に優れる方法である。しかし、得られた測定結果を従来の基準(疫学的データや、環境基準)と照合しながら評価するためには、従来法による測定結果との関係を把握することが必要である。そこで大気捕集フィルター・サンプルを分割し、同一捕集フィルターを両分析方法によって測定することによって、その相関性の検証を行った。実際の解体現場において捕集したサンプル(19サンプル)を用いて、それぞれの方法により計測した結果、相関係数0.87( $p < 0.01$ )と高い相関性を示した(図6)。電子顕微鏡法による測定を行わずとも、同程度の計測が可能な方法であることが確認できた。

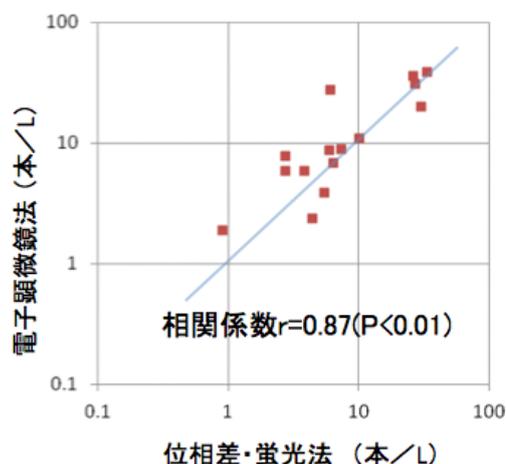


図6、公定法(電子顕微鏡法)と位相差・蛍光法によるアスベスト繊維数濃度測定結果の相関

## 5. 本研究により得られた主な成果

### (1) 科学的意義

バイオ蛍光法は、蛍光で修飾したアスベスト結合タンパク質によって、アスベストを蛍光で可視化する世界で初めての技術である。沢山の種類のタンパク質から無機物質に結合するタンパク質を選択し、蛍光で修飾することでバイオイメージングに応用した。バイオイメージングの世界を無機物質の検出に広げたことは、科学的に大きな意義がある(平成24年度文部科学大臣表彰科学技術賞受賞)。また、本研究開発によって、初めてアスベスト結合領域をペプチドレベルで特定し、特異性と結合性を実際の現場で利用できるレベルまで向上させることができた。実際、現場のサンプルを使って特異性を評価した結果、誤認識率は5%、偽陰性率2%以下でアスベストが問題なく検出できることが実証できた。遺伝子工学、タンパク質工学を駆使して、環境中のアスベスト検査に資するバイオプローブを作成できたことは意義深い。さらに、蛍光顕微鏡で観察できる微細クリソタイルの直径は、30-35nmであることがわかっている。ナノサイズの粒子は、通常の光学顕微鏡では見ることができないくらい小さいが、蛍光でラベルすれば、その存在は可視化できることを実証した。これによりバイオ蛍光法がアスベスト以外にも近年毒性が指摘されているナノ材料の簡便な可視化にも将来応用できる可能性を示したことは科学的に意義が大きい。

### (2) 環境政策への貢献

#### <行政が既に活用した成果>

バイオ蛍光法によるアスベスト迅速検出法は、環境省アスベストモニタリングマニュアル第4版に記載されている。本研究開発でより信頼性の高いアスベスト迅速計測法が確立できた。

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

アスベストはこれまでの曝露だけでも今後2030年前後までに約10万人の中皮腫発症を予想する文献も存在する(The New England Journal of Medicine, 353:1591-1603, 2005)。解体現場や瓦礫処理の際のさらなる曝露が重なれば、さらに数十年先までもアスベスト起因性のガン発症の問題を抱えることになる(解体現場のアスベストリスク)。アメリカでは、アスベストは懲罰的損害賠償の対象になるが、日本ではこの賠償はほとんど認められておらず、検査の動機付けにはなっていなかった。そこで2013年6月、石綿飛散防止強化へ向けて法改正が行われ、届け出がなくともアスベスト飛散の恐れがある場合に自治体が立ち入りできる様になった。しかし、現在の大気アスベスト検出の公定法は時間がかかること、提案されている偏光顕微鏡法は複雑な方法であり、且つ微細アスベスト等を見逃してしまう等の問題があり、立ち入り検査の際に利用できる簡易迅速検査法が確立されていなかった。

本方法は、暗視野の中でアスベスト繊維が特異的に光っているために、直ちに微細アスベストも検出できる等の利点がある(推進費の中間評価でS評価)。平成25年10月23日、第10回中央環境審議会石綿飛散防止専門委員会の資料中で、簡便で迅速な蛍光法の普及を期待する旨が記述されている。

民間の検査会社では、方法論が優れているだけでは技術の普及に至らない。特にアスベストなど社会的な問題が大きい場合には、公的な機関の積極的な評価や自治体・民間への周知が必要となる。

## 6. 研究成果の主な発表状況

### (1) 主な誌上発表

<査読付き論文>

- 1) T. Ishida, M. Alexandrov, T. Nishimura, K. Minakawa, R. Hirota, K. Sekiguchi, N. Kohyama, and A. Kuroda: Journal of Fluorescence, 22, 1, 357–363 (2012)  
“Evaluation of sensitivity of fluorescence-based asbestos detection by correlative microscopy”
- 2) T. Ishida, M. Alexandrov, T. Nishimura, K. Minakawa, R. Hirota, K. Sekiguchi, N. Kohyama, and A. Kuroda: PLoS ONE, 8(9):e76231 (2013)  
“Molecular engineering of a fluorescent bioprobe for sensitive and selective detection of amphibole asbestos”
- 3) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、Maxym Alexandrov: 作業環境、35(1), 57–62(2014)  
「蛍光顕微鏡法による大気アスベスト検査の有効性検証と位相差蛍光顕微鏡法への応用」

### (2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) A. Kuroda, T. Ishida, M. Alexandrov, T. Nishimura: Michael E. Beard Conference, Asbestos Laboratory Issues (ASTM, Florida), Jan. 31, 2013  
“Detection of Airborne Asbestos by Fluorescent-labeled protein probe and its Application to quick Monitoring”
- 2) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、M. Alexandrov、神山宣彦、関口潔: 日環協・環境セミナー, 2013年9月27日  
「蛍光顕微鏡による大気アスベスト繊維検出法の開発」

## 7. 研究者略歴

課題代表者: 黒田 章夫

大阪大学大学院工学研究科修了、博士(工学)、現在、広島大学大学院先端物質科学研究科教授

## 5C-1101 解体現場のアスベストリスクに対応する特異的バイオプローブの創成と迅速検出への応用

### (1) 解体現場のアスベストリスクに対応する特異的バイオプローブの創成と迅速検出への応用

広島大学

大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻

黒田 章夫

平成23～25年度累計予算額：97,729千円

(うち、平成25年度予算額：32,089千円)

予算額は、間接経費を含む。

#### [要旨]

現在のアスベスト検査の公定法は、最初に位相差顕微鏡により大気中の総繊維濃度を測定し、その濃度が1本/L以上の場合、電子顕微鏡下で繊維の一本一本に電子ビームを照射し、特性X線を分析することでアスベストを判定することになっている。この方法は高度な技能と時間がかかることから、解体現場でのアスベストリスクに対応することはできないとされている。一方、バイオ蛍光法とは対象の無機物質に特異的に結合するタンパク質あるいはペプチドを蛍光で修飾し、蛍光顕微鏡下で無機物質を可視化する技術である。バイオ蛍光法では、暗視野の中で繊維が光っているために、光の分解能よりもかなり小さい対象物でも（電子顕微鏡でしか見えなかった様な微細アスベストでも）、その存在が検出できる。また、特異的に光らせるために同時に物質の同定が行なえる。アスベスト結合タンパク質のうち、DksAタンパク質は蛇紋石アスベストであるクリソタイルに特異的である。HNSタンパク質はクロシドライトなど角閃石アスベストに広く結合するものの、アスベスト以外のケイ酸アルミ繊維、ワラストナイト、酸化チタンウイスキー等との交差が見られるという課題が残されていた。本研究では、HNSタンパク質のアスベストの結合に関与する領域を特定し、その他の無機繊維と結合する領域を取り除くことによって、アスベストに特異的なバイオプローブを作成することができた。また、ストレプトアビジンを使った4量体形成により、約260倍アスベストに対する結合力の向上したバイオプローブを開発することができた。このアスベスト特異的バイオプローブと実際の現場サンプルを用いて試験した結果、偽陽性率5%、偽陰性率2%以下でアスベストが検出できることが分かった。現在の電子顕微鏡を使う公定法が数日から約1週間必要であるのに対し、バイオ蛍光法はサンプリング後約1時間でアスベストが検出できる。本研究により、解体現場のアスベストリスクに対応できる迅速アスベスト計測法を確立することができた。

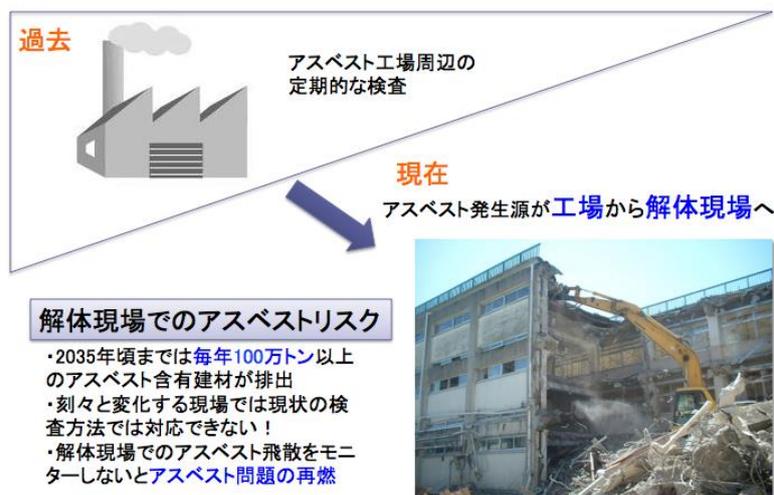
#### [キーワード]

アスベスト、迅速検出、解体現場、バイオプローブ、蛍光

## 1. はじめに

日本にはアスベストを含む建材が約4000万トンあるとされ、今後これらが使われた古い建物の解体のピークを迎える。その際、アスベストの飛散を現場で調べなければ、再び大きなアスベスト問題を引き起こす可能性があるとされている。現状の大気アスベスト検出の方法としては、大気を濾過したフィルターを透明化し、位相差顕微鏡により観察する方法が用いられている。しかし、この方法はアスベスト、非アスベスト

繊維の判定は不可能なため、大気中の総繊維濃度が1本/L以上の場合、電子顕微鏡による判定を行うことが公定法となっている。しかしながら、電子顕微鏡で観察する場合には前処理等が煩雑である他、繊維一本ずつをエネルギー分散型X線解析装置で分析していくのは、非常に時間と根気のいる作業であり、解体現場でのアスベストリスクには対応できない。もはや日本のアスベスト発生源は、工場から、解体現場などの短期的に移動する現場に変わっており、その状況に対応して新たな検出法が必要となっている。すなわち、時間をかけて検査する定点観測では不十分であり、現場でのアスベスト迅速検出法の確立が急がれている。



図(1)-1、解体現場でのアスベストリスク

## 2. 研究開発目的

研究代表者は細胞内タンパク質ライブラリーの中からアスベストに特異的に結合するタンパク質をスクリーニングし、このタンパク質を蛍光物質で修飾することにより、バイオプローブを作成した。この蛍光プローブを用い、フィルター上のアスベストを蛍光顕微鏡でとらえる方法（バイオ蛍光法）を開発した。染色の操作は簡単で、フィルターに数滴のバイオプローブを垂らすだけで前処理が完結する。このフィルターを蛍光顕微鏡で観察すると、アスベスト繊維が光って見えるため、約30ナノメートル幅の非常に微細なアスベスト繊維が、低倍率でも明瞭に観察できた。アスベストは蛇紋石系のアスベストであるクリソタイルと、他5種類が含まれる角閃石アスベストが存在する。アスベスト結合タンパク質のうち、DksAタンパク質はクリソタイルに特異的で、Gatzタンパク質あるいはHNSタンパク質は角閃石系のアスベストに広く結合した。バイオ蛍光法は、位相差顕微鏡レベルの操作性である程度の確度でアスベストと判定できるので、現場での「迅速簡易検出法」として有望視されている（2010年6月改訂の環境省のアスベストモニタリングマニュアル第4版で紹介）。これらのアスベスト結合タンパク質を利用すれば、全種類のアスベストに対応

できるが、残念ながらHNSとGatZがアスベスト以外のケイ酸アルミ繊維、ケイ酸カルシウム（ワラストナイト）、酸化チタンウイスキーとの交差が見られるという課題が残されていた。もしこの点が克服できれば、現場でアスベストと確定できる「迅速検出法」が確立できると考えられた。そこで、HNSとGatZのアスベストの結合に関与する領域を特定し、その他の無機繊維と結合する領域を取り除くことによって、アスベストに対する特異性が向上したバイオプローブを作成することを目的とした。また、実際のサンプルに対して、光・電子相関顕微鏡による蛍光繊維の分析を行うことによって、バイオプローブの特異性を検証することとした。

### 3. 研究開発方法

#### (1) アスベスト特異的バイオプローブの作成

##### 1) 領域を限定したHNSタンパク質（限定HNSタンパク質）の作製

HNSタンパク質の1-59番目までと、60-137番目の領域に分けた限定HNSタンパク質を発現させるために、プライマーの設計し遺伝子の増幅を行った。大腸菌K-12株のゲノムDNAを鋳型として、プライマー（P1、P2）を用いて1-59番目の領域を、プライマー（P3、P4）を用いて60-137番目の領域をコードする遺伝子をPCRにて増幅を行った。PCR反応は、KOD-plus Neo DNAポリメラーゼ（TOYOBO社）を用い、同社のプロトコールに従って行った。増幅した遺伝子をタンパク質発現用プラスミドpET21-b（Novagen社）のNdeI-BamHIサイトに組み、pETHNS1-59とpETHNS60-137を作製した。

ビオチンリガーゼは、特定の15アミノ酸の配列（AviTag）を認識し、その中のリジン残基にビオチンを結合させる。タンパク質発現用ベクターpET21-bにプライマー（P5、P6）を用いてインバースPCRを行うことで、pET21-bのHisTag配列の直前にAviTagの配列を挿入した（pET21b-AviTag）。インバースPCRは、KOD-plus Mutagenesis kit（TOYOBO社）を用い、同社のプロトコールに従って行った。大腸菌K-12株のゲノムDNAを鋳型として、プライマー（P3、P4）を用いて60-137番目の領域を、プライマー（P3、P7）を用いて60-90番目の領域を、プライマー（P4、P8）を用いて91-137番目の領域をコードする遺伝子をPCRにて増幅を行った。増幅した遺伝子を、pET21b-AviTagのNdeI-BamHIサイトに組み込み、

表(1)-1、プライマーの配列

pETHNS60-137-AviTag、

pETHNS60-90-AviTag、

pETHNS91-137-AviTagを作製した。

60-90番目の領域をさらに限定し

たHNSタンパク質の発現プラスミド

の作製はインバースPCRを用いて

作製した。具体的には、

pETHNS60-90-AviTagを鋳型にし

て、プライマー（P9、P10）を用

いてpETHNS60-86-AviTagを、プライ

マー（P11、P12）を用いて

pETHNS63-90-AviTagを、プライマ

ー（P12、P13）を用いて

| プライマー番号 | 配列  |
|---------|---|
| P1      | GAATTCATATGATGAGCGAAGCACTTAAAATTC                   |
| P2      | GGAGGATCCAACACTGCAGTTTACGAGTGCGC                    |
| P3      | CATATGCAATATCGCGAAATGCTGATC                         |
| P4      | GGATCCAACATTGCTTGATCAGGAAATCG                       |
| P5      | GCTCAGAAAATCGAATGGCACGAACACCACCACCACCACCCTGAACTA    |
| P6      | CTCGAAGATGTCGTTTCAGACCGCCACCCTCGAGTGGCGCCGAAGCTTGTC |
| P7      | GGATCCAACAACGTTTAGCTTTGGTGCC                        |
| P8      | CATATGGCTCAGCGTCCGGCAAAATATAG                       |
| P9      | TGTTTGGATCCGAATTCGAGCTCCG                           |
| P10     | GGTGCCAGATTTAACGGCAGCAAGG                           |
| P11     | GAAATGCTGATCGCTGACGGTATTG                           |
| P12     | CATATGTATATCTCCTTCTTAAAG                            |
| P13     | CTGCTGAATAGCCTTGCTGCCG                              |
| P14     | AAATCTGGCACCAAGCTAAACGTTG                           |

pETHNS75-90-AviTagを、プライマー（P12、P14）を用いてpETHNS83-90-AviTagを作製した。これらのプラスミドをビオチンリガーゼを発現する大腸菌BL21（DE3）pBirAcmに導入することによって、目的タンパク質にビオチンを導入した。

限定HNSタンパク質の発現には宿主として、大腸菌Rosetta（DE3）pLysSを用いた。具体的には、pETHNS1-59（または、pETHNS60-137）で形質転換した大腸菌Rosetta（DE3）pLysSをLB培地[10g/1 トリプトン、5g/1 酵母エキス、10g/1 NaCl]で37℃一晩培養し、200mlのLB培地に1%植菌した。600nmにおける濁度（OD600）が0.4~0.7になるまで37℃で培養後、IPTG[Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside（終濃度0.5mM）]を添加後、さらに28℃で4時間培養を行った。培養液を遠心分離することで集菌し、菌体ペレットを-80℃で保存した。

ビオチン化HNSタンパク質の発現には、宿主として大腸菌BL21（DE3）pBirAcmを用いた。pETHNS60-137-AviTag（または、pETHNS60-90-AviTag、pETHNS91-137-AviTag、pETHNS60-86-AviTag、pETHNS63-90-AviTag、pETHNS75-90-AviTag、pETHNS83-90-AviTag）で形質転換した大腸菌BL21（DE3）pBirAcmをLB培地で37℃一晩培養し、200mlのTYH培地[20g/1 トリプトン、10g/1 酵母エキス、11g/1 HEPES、5g/1 NaCl、1g/1 硫酸マグネシウム、0.5% グルコース、水酸化カリウムでpH7.2-7.4に調整]に1%植菌した。OD600が0.7になるまで37℃で培養後、IPTG（終濃度0.5mM）とD-ビオチン（終濃度100 μM）を添加後、さらに28℃で4時間培養を行った。培養液を遠心分離することで集菌し、菌体ペレットを-80℃で保存した。

タンパク質の精製の方法は、HNSタンパク質とビオチン化HNSタンパク質ともに、HisTagを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製を行った。-80℃で保存しておいた菌体ペレットに、10mlの緩衝液[0.05M Tris-HCl(pH8.3)、0.05M NaCl、10% glycerol]を加えて懸濁し、超音波により破碎した。得られた細胞破碎液をHisTrap FFカラム(GE Healthcare Bioscience社)に供し、C末端にヒスチジンを有するHNSタンパク質、ビオチン化HNSタンパク質を当該カラムに吸着させ、緩衝液[0.05M Tris-HCl(pH8.3)、0.05M NaCl、10% glycerol、0.5Mイミダゾール]で溶出させた。HNS83-90-AviTagタンパク質以外は発現及び精製に成功した。精製したタンパク質についてポリアクリルアミド電気泳動により精製度を確認したところ95%以上であった。

## 2) GatZタンパク質の解析

GatZタンパク質のアスベスト結合領域について解析するために、GatZタンパク質をトリプシンによって断片化し、どの領域がアスベストに結合するか

解析を行なった。具体的には、GatZタンパク質にトリプシンを加え、酵素処理を37℃で一晩行ない断片化した。次に、クロシドライトにGatZトリプシン消化物を添加して、20分間反応させた後、Wash液[25mM Tris-HCl(pH7.5)、300mM NaCl、0.5%Tween20]

表(1)-2、プライマーの配列

| プライマー番号 | 配列                                 |
|---------|------------------------------------|
| P15     | AAGCTAGCGGGATGCGGCGATGGAA          |
| P16     | TCGAATTCGCACAGCCGGCAGAACATATTCCT   |
| P17     | GCGCTAGCAITGGCACCGAAGTTCCG         |
| P18     | CCGAATTCGCACACACACGTGTTAACGCCTCTG  |
| P19     | TTGCTAGCGCACATCTACCGATTACCA        |
| P20     | CTGAATTCGCACAAAAGTGATCGCGGACTAATTC |
| P21     | TGGCTAGCGGTCCCGCATTAACCTTTGC       |
| P22     | CCGAATTCGCACAGCGATTTTCAGGGGCGATAAG |

で十分に洗浄し、未結合のペプチドを取り除いた。溶出液 [25mM piperidine buffer (pH12)] にてクロシドライトに結合しているペプチドを溶離し、得られたペプチドをMALDI-TOFMS (BiflexIV、ブルカー社製) により解析を行なった。

GatZタンパク質のアスベスト結合領域と推定された99-117、168-216、256-275、281-308番目の限定GatZタンパク質を発現させるために、プライマー (表1) を設計してPCR法による遺伝子の増幅を行った。GatZ遺伝子を鋳型として、プライマー (P15、P16) を用いて99-117番目の領域の増幅を行った。また、プライマー (P17、P18) を用いて168-216番目の領域を、プライマー (P19、P20) を用いて256-275番目の領域を、プライマー (P21、P22) を用いて281-308番目の領域の増幅をそれぞれ行った。PCR反応は、KOD-plus Neo DNAポリメラーゼを用い、同社のプロトコールに従って行った。増幅した遺伝子をpET21b-AviTag (Novagen社を改変) のNheI/EcoRIサイトに組み込み、pETGatZ99-117-AviTag、pETGatZ168-216-AviTag、pETGatZ256-275-AviTag、pETGatZ281-308-AviTagを作製した。これらのプラスミドをビオチンリガーゼを発現する大腸菌BL21 (DE3) pBirAcmに導入することによって、目的タンパク質にビオチンを導入した。

ビオチン化限定GatZタンパク質の発現と精製は、以下の様に行った。pETGatZ99-117-AviTag (または、pETGatZ168-216-AviTag、pETGatZ256-275-AviTag、pETGatZ281-308-AviTag、pET21b-AviTag) で形質転換した大腸菌BL21 (DE3) pBirAcmをLB培地で37℃一晚培養し、200mlのTYH培地に1%植菌した。OD600が0.6になるまで37℃で培養後、IPTG (終濃度0.5mM) とD-biotin (終濃度100 μ M) を添加後、各発現条件 (pETGatZ99-117-AviTagの場合37℃で3時間培養、pETGatZ168-216-AviTagとpET21b-AviTagの場合 28℃で3時間培養、pETGatZ256-275-AviTagとpETGatZ281-308-AviTagの場合 16℃で18時間培養) で行った。この培養液から得られた菌体を超音波破碎し、ビオチン化HNSタンパク質と同様の緩衝液条件でHisTrap HPカラム (GE Healthcare Bioscience社) を用いたアフィニティークロマトグラフィーに供して、部分精製標品を得た。

### 3) タンパク質の蛍光標識

精製した限定HNSタンパク質 (HNS1-59、HNS60-137) については、Cy3-Maleimide Reactive Dye (GE Healthcare社) を用いて蛍光標識を行った。標識反応は、同社のプロトコールに従って行ない、精製はHisGravitrappカラム (GE Healthcare社) を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製を行った。ビオチン化HNSタンパク質及びビオチン化ペプチドについては、予めCy3蛍光体で修飾されたStreptavidin-Cy3、あるいはCF488Aで修飾されたStreptavidin-CF488A (Biotium社) と混合することによって蛍光標識を行った。0.1M Tris-HCl (pH8.3) 緩衝液中で、Streptavidin-Cy3 (33.2pmol) に対して20倍量のビオチン化限定HNSタンパク質、あるいはビオチン化限定HNSペプチド (664pmol : HNS60-90-AviTag、HNS91-137-AviTag、HNS60-86-AviTag、HNS63-90-AviTag、HNS75-90-AviTag)、または化学合成したビオチン化ペプチドを添加して1時間静置してビオチン-ストレプトアビジン複合体 (HNS60-90-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体、HNS91-137-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体、HNS60-86-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体、HNS63-90-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体、HNS75-90-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体) を作製した。

ビオチン化限定GatZタンパク質、及びビオチン化ペプチドについては、予めCy3蛍光体で修飾されたストレプトアビジン (Streptavidin-Cy3)、あるいはCF488Aで修飾されたストレプトアビジン (Streptavidin-CF488A) (Biotium社) と混合することによって蛍光標識を行った。ビオチン

化されているタンパク質、あるいはペプチドは、ストレプトアビジンと自動的、かつ量論的（ストレプトアビジン1分子に4分子のビオチン化タンパク質、あるいはペプチド）に結合する。0.1M Tris-HCl (pH8.3) 緩衝液中で、Streptavidin-Cy3 (33.2pmol) に対して20倍量のビオチン化限定タンパク質、あるいは化学合成したビオチン化ペプチドを添加し、1時間静置してビオチン-ストレプトアビジン複合体を作製した。

結合力増強型（四量体化）蛍光プローブの作製は次の手順で行った。精製したビオチン化限定HNSタンパク質（HNS60-90）を、予めCy3蛍光体で修飾されたストレプトアビジン

（Streptavidin-Cy3）、あるいはCF488Aで修飾されたストレプトアビジン（Streptavidin-CF488A）（Biotium社）と混合した。ビオチン化されているタンパク質は、ストレプトアビジンと自動的、かつ量論的（ストレプトアビジン1分子に4分子のビオチン化タンパク質）に結合する。0.1M Tris-HCl (pH8.3) 緩衝液中で、Streptavidin-Cy3 (33.2pmol)、あるいはStreptavidin-CF488Aに対して20倍量のビオチン化限定タンパク質を添加し、1時間静置してビオチン-ストレプトアビジン複合体を作製した。これによりビオチン化HNSタンパク質は四量体として蛍光標識された。また蛍光増強のための標識は、複合体形成前の限定HNSタンパク質（HNS60-90）に対して、DyLight488-maleimide（Thermo scientific社）を用いて行った。標識反応は、同社のプロトコールに従って行ない、HisGravitrappカラム（GE Healthcare社）を用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製を行った。

#### 4) アスベストへの結合評価

チューブアッセイ法：1.5mlのエッペンチューブに0.5mlのリン酸緩衝液 [0.2M phosphate (pH7.0)、0.3M NaCl、0.5% Tween80] を添加後、25nM限定ビオチン化GatZタンパク質とStreptavidin-Cy3の複合体、もしくはビオチン化T7Tag-AviTagとStreptavidin-Cy3の複合体と、20 $\mu$ gのアモサイト [または20 $\mu$ gのクロシドライト (JAWE331)] を添加し1分間混合させた。アモサイト（またはクロシドライト）をスライドガラスの上のせ、さらにその上にカバーガラスをのせてプレパラートを作成し、蛍光顕微鏡にて観察を行った。蛍光観察は、チューブアッセイ法の観察方法に準じた。コントロールとして、GatZ-Cy3についても蛍光観察を行った。蛍光顕微鏡（落射蛍光顕微鏡 BX-60 オリンパス社製）にて観察を行った。蛍光観察には、U-MNGキューブ（ダイクロイックミラー：DM570、励起フィルター：BP-530-550、吸収フィルター：BA590）を用い、画像の取り込みに顕微鏡デジタルカメラDP-70（オリンパス社製）を使用した。対照としてワラストナイトやその他のJFM標準繊維を用いた。

フィルターアッセイ法：メンブレンフィルター（MCE:ニトロセルロース）に塗布した標準繊維に対して、HNSタンパク質を添加して反応させた後、蛍光顕微鏡を用いて観察を行ない蛍光の有無によりタンパク質が結合しているかどうか評価した。具体的には、アスベスト及びJFM標準繊維を塗布したメンブレンフィルターを吸収紙の上のせ、洗浄液 [0.3Mリン酸緩衝液 (pH8.0)、0.3M NaCl、0.5% Triton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム] を1滴滴下し、完全に吸収させた。次にHNSタンパク質（10nM: 具体的にはHNS60-90-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体）を含む結合緩衝液 [0.3Mリン酸緩衝液 (pH8.0)、0.3M NaCl、0.5% Triton X-100] を2滴滴下し、完全に吸収させアスベストの染色を行った。洗浄液を1滴滴下し、さらに0.05Mのリン酸緩衝液 (pH8.0) を4滴滴下して界面活性剤を取り除いた。このように処理を行ったフィルターをスライドガラスののせ、封

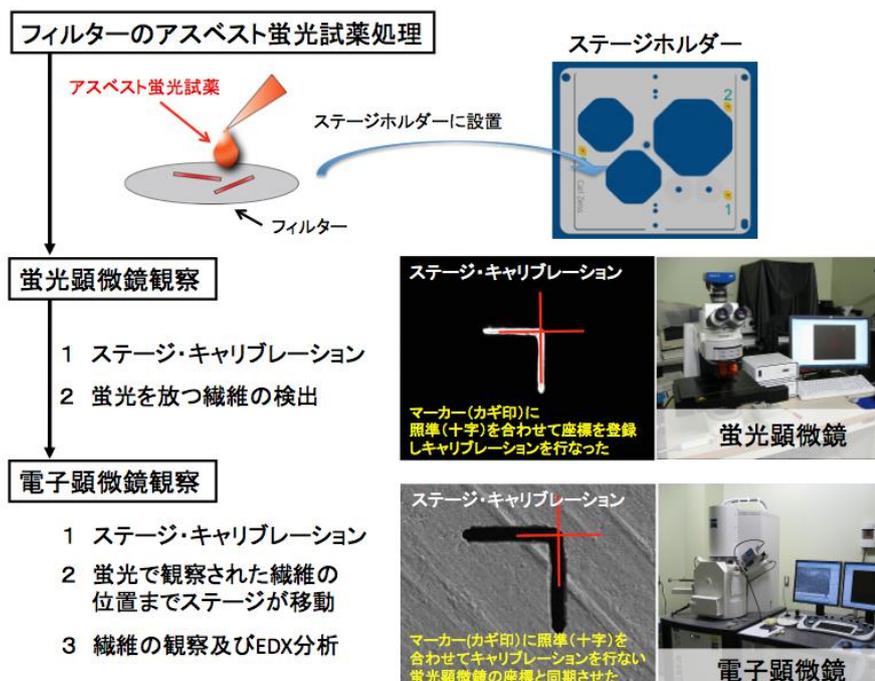
入液をカバーガラスとフィルターの間に挟み込んで、同様に蛍光観察を行った。

遠心法：単量体HNS60-90-AviTag-Cy3、またはHNS60-90-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体を、それぞれ45nM～540nMまたは1nM～20nMとなるように0.5mlのリン酸緩衝液中に添加し、さらに50 $\mu$ gのアモサイトを添加して10分間混合した。14,000rpm（約10,000 g）で5分間遠心操作を行った後、上清を取り除き未結合のタンパク質を取り除いた。さらに0.5mlのリン酸緩衝液を添加してよく混合し、同様に遠心して上清を取り除く操作（洗浄操作）を合計3回行った。最後に、0.5mlの溶出液 [0.1M Tris-HCl(pH8.0)、1%SDS] を加え、95 $^{\circ}$ C、5分間加熱処理を行なうことで、アモサイトに結合している蛍光タンパク質を溶出させた。14,000rpmで10分遠心操作を行った後、溶出された蛍光タンパク質の量を、分光蛍光光度計FP-6500（日本分光社）で測定することにより算出した。各タンパク質濃度におけるアスベストへの結合量から、スキッチャードプロット解析を行い、解離定数を算出した。

蛍光顕微鏡法によるアスベスト観察：粒子を捕集したメンブレンフィルター（MCE：ニトロセルロース）を吸収紙の上に乗せ、洗浄液 [0.3Mリン酸緩衝液 (pH8.0)、0.3M NaCl、0.5% Triton X-100、1% デオキシコール酸ナトリウム] を1滴滴下し、完全に吸収させた。次に蛍光標識したHNSタンパク質を含む結合緩衝液 [0.3Mリン酸緩衝液 (pH8.0)、0.3M NaCl、0.5% Triton X-100] を2滴滴下し、完全に吸収させアスベストの染色を行った。洗浄液を1滴滴下し、さらに0.05Mのリン酸緩衝液 (pH8.0) を4滴滴下して界面活性剤を取り除いた。このように処理を行ったフィルターをスライドガラスに乗せ、封入液をカバーガラスとフィルターの間に挟み込んで、蛍光顕微鏡により観察を行った。

## (2) 光・電子相関顕微鏡を用いた同一繊維の観察方法

標準試料を捕集したメンブレンフィルター、また実際の解体現場で採取したサンプルを吸収紙の上に乗せ、アスベスト蛍光試薬を用いて処理を行った。基本的にはフィルターアッセイ法に従って行ったが、最後に超純水4滴滴下し、余分な成分を完全に取り除いた。このように処理を行ったメンブレンフィルターを、カーボンテープを貼付けた試料台に固定し、ステージホルダーに装着した。ステージホル



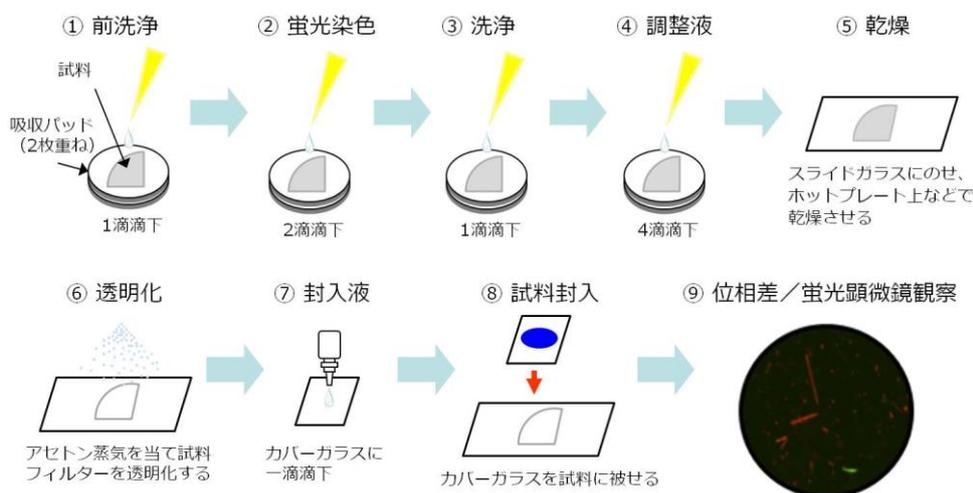
図(1)-2、光・電子相関顕微鏡を用いた同一繊維の観察手順

ダーを蛍光顕微鏡（Axio Imager、カールツァイス社製）にセットし、ステージホルダー上のマーカ3点を登録しステージ・キャリブレーションを行った（図(1)-2）。約50～100視野を蛍光観察して、繊維状の物質が検出された視野についてCCDカメラで撮影を行ない画像および位置情報の取得を行った。USBメモリを使って蛍光顕微鏡で取得した画像及び位置情報を電子顕微鏡システムに入力した。次に、ステージホルダーを電子顕微鏡（SIGMA VP、カールツァイス社製）の試料室に移し、観察位置を蛍光顕微鏡と同期させるために、ステージホルダー上のマーカ3点を再度登録しステージ・キャリブレーションを行った（図(1)-2）。蛍光顕微鏡で観察された繊維状物質が何であるか調べるために、記録した位置情報を入力して、電子顕微鏡の観察視野を移動させた。繊維が確認されたらエネルギー分散型X線分光器（QUANTAX 200、ブルカー社製）にて元素分析を行った。

### （3） バイオ蛍光法によるアスベスト迅速計測法の確立

#### 1） 位相差蛍光顕微鏡法によるアスベスト検査

大気を捕集したメンブランフィルターの捕集面を上に向け、切断したフィルターに洗浄液を1滴滴下し、完全に吸収させた（図(1)-3）。続いて蛍光タンパク質を含む結合緩衝液



図(1)-3、位相差顕微鏡法の前処理手順

[0.3Mリン酸

緩衝液(pH8.0)、0.3M NaCl、0.5% Triton X-100]を2滴、位置を変えながら滴下し、完全に吸収させた。再び洗浄液を1滴滴下し、続いて調整液を4滴滴下した。捕集面を上にしてスライドガラスに乗せて乾燥させた（80℃のホットプレート上に15分間静置）。捕集面を上にしてアセトン蒸気をあてフィルターを透明化した。カバーガラスに封入液を1滴滴下し、空気が入らないように注意しながら、カバーガラスをフィルター片に被せてサンプルとした（図(1)-3）。サンプルを位相差蛍光顕微鏡にセットして観察した。

#### 2） 公定法（電子顕微鏡法）によるアスベスト検査との比較

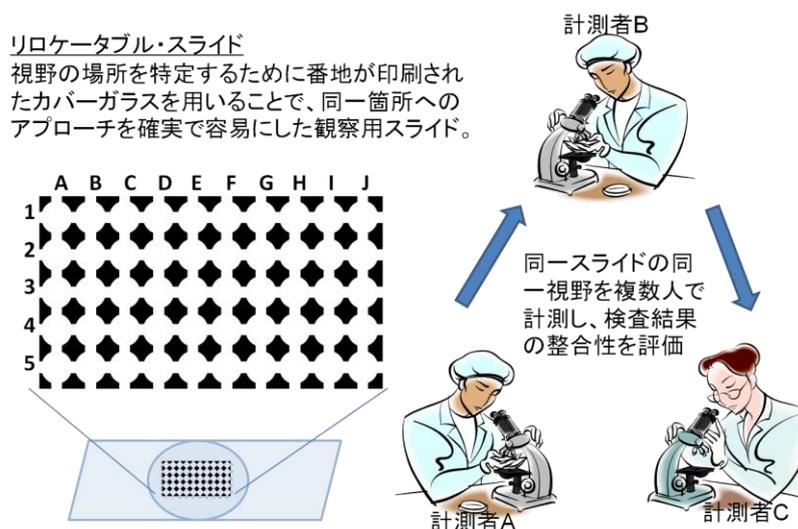
電子顕微鏡及びX線分析装置（EDX）によるアスベスト検査は、次の手順により行った。分析試料となるメンブランフィルターをカッターを用いて切断し、カーボンテープを貼った試料台の上に固定した。イオンスパッタリング装置（JFC-1600、日本電子社製）を用いて、フィルター表面

に白金蒸着を施し、フィールドエミッション式走査型電子顕微鏡（SIGMA VP、カールツァイス社製）により観察を行った。繊維の計数に当たっては、観察倍率1600倍、加速電圧15kVに固定し、モニター画面内に方形枠（観察範囲 $60\mu\text{m} \times 45\mu\text{m}$ に相当）を表示させ、その内側を1視野とした。600視野にわたって観察を行い、繊維が観察された場合には、当該繊維のみの成分を正確に分析するため適宜倍率を10000倍程度まで上げて、EDX（QUANTAX 200、ブルカー社製）により元素分析を行った。繊維計数のルール及び繊維数濃度の算出は、『アスベストモニタリングマニュアル第4版』（環境省）記載の方法で行った。

PM2.5の捕集には、インパクター式分流装置（Impact Sampler、SKC社製）を用いた。PM2.5捕集後は、粗粒子捕集用のフィルターホルダーに付け替え、比較サンプルとして粗粒子を含む浮遊物質も捕集した。いずれのサンプルも大気サンプリング用ポンプ（AIP-105、柴田科学社製）により10L/分の流量で、1時間吸引（計600L）を行った。また補助具を使った迅速測定法用のサンプルについては、大気吸引にミニポンプ（MP-2N、柴田科学社製）を用い、1.8L/分の流量で16分40秒（計30L）吸引を行うことで捕集した。

### 3) リロケータブルスライドを利用した複数者間による同一視野観察方法

アスベスト蛍光染色済みのメンブレンフィルター試料をスライドガラスの上に載せ、リロケータブルスライド作製用のカバーガラスを、印字された文字が反転するように被せ、観察試料とした。位相差蛍光顕微鏡の倍率を400倍（対物x40、接眼x10）とし、アイピースグレイテイクルの直径 $300\mu\text{m}$ の円をリロケータブルスライドの視野の



図(1)-4、リロケータブル・スライドによるクロスチェック試験

円に合わせて観察を行った。左上視野A1から観察し、視野毎に結果を視野記録紙に記載しながら順に視野を移動し、50視野（A1～J5）の観察を行った。1機関において観察の終了したサンプルは順次別機関に郵送され、別の測定者が視野枠に従って同一条件で観察を行った（図(1)-4）。

顕微鏡用モニター（Digital Sight、ニコン社製）を、LED型位相差・蛍光顕微鏡（Primostar、カールツァイス社製）に接続し、位相差モード、蛍光モードにおいてそれぞれ最適な観察像が得られるよう露出・ゲインの調整を行い、観察モード設定に登録した。また繊維の長さを計測するための測定ツールのキャリブレーションを行った。位相差・蛍光顕微鏡法観察では、観察するモード（位相差／蛍光）の切り換えに合わせて、登録したプリセットモードを切り換えながらアス

ベストの観察を行った。

また、3Dプリンターによる補助具の作製を行った。3D CADソフト(Inventor Fusion 2013 R1、Autodesk社製)を用いて設計を行った後、3Dプリンター(Scoovo C170、Open Cube社製)に設計データを入力した。3Dプリンターの制御ソフト上で設計ファイルをプリンター制御用データファイル(Gコードファイル)に変換し、印刷を実行させた。3Dプリンターは、加熱溶解したポリ乳酸フィラメントを積層(積層ピッチ $0.1\mu\text{m}$ )し、設計物を造形した。

#### (4) アスベストの発光検出(アスベスト結合領域を持つ発光酵素の作成と検出)

HNSタンパク質の60-90番目の領域(HNS60-90)と高輝度ルシフェラーゼNanoLucを融合させたタンパク(HNS60-90-NanoLuc-AviTag)の作製を行なった。まず、この融合タンパク質を発現させるプラスミドの作製を行なった。プラスミドpNL1.1[NLuc](プロメガ社)を鋳型として、プライマー(GGAGTCGACATGGTCTTCACACTCGAAGATTCGとGGAGCGGCCGCCAGAATGCGTTCGCACAGC)を用いてNanoLucをコードする遺伝子をPCRにて増幅を行った。PCR反応は、KOD-plus Neo DNAポリメラーゼ(TOYOBO社)を用い、同社のプロトコールに従って行った。増幅した遺伝子を、昨年度作製したHNS60-90-AviTagを発現するプラスミドpETHNS60-90-AviTagのSalI-NotIサイトに組み、pETHNS60-90-NanoLuc-AviTagを作製した。

ビオチン化HNSタンパク質の発現には、宿主として大腸菌BL21(DE3) pBirAcmを用いた。pETHNS60-90-NanoLuc-AviTagで形質転換した大腸菌BL21(DE3) pBirAcmをLB培地で $37^{\circ}\text{C}$ 一晩培養し、200mlのTYH培地[20g/l トリプトン、10g/l 酵母エキス、11g/l HEPES、5g/l NaCl、1g/l 硫酸マグネシウム、0.5% グルコース、水酸化カリウムでpH7.2-7.4に調整]に1%植菌した。OD600が0.7になるまで $37^{\circ}\text{C}$ で培養後、IPTG(終濃度0.5mM)とD-ビオチン(終濃度 $100\mu\text{M}$ )を添加後、さらに $18^{\circ}\text{C}$ で21時間培養を行なった。培養液を遠心分離することで集菌し、菌体ペレットを $-80^{\circ}\text{C}$ で保存した。タンパク質の精製の方法は、HisTagを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって精製を行った。 $-80^{\circ}\text{C}$ で保存しておいた菌体ペレットに、10mlの緩衝液[0.05M Tris-HCl(pH8.3)、0.05M NaCl、10% glycerol]を加えて懸濁し、超音波により破碎した。得られた細胞破碎液をHisTrap FFカラム(GE Healthcare Bioscience社)に供し、C末端にヒスチジンを有するHNS60-90-NanoLuc-AviTagを当該カラムに吸着させ、緩衝液[0.05M Tris-HCl(pH8.3)、0.05M NaCl、10% glycerol、0.5Mイミダゾール]で溶出させた。精製したタンパク質についてポリアクリルアミド電気泳動により精製度を確認したところ95%以上であった。

アスベストの発光検出は以下の様に行なった。1.5mlのエッペンチューブ内で、アスベスト(アモサイト)とHNS60-90-NanoLuc融合タンパク質を反応させた後、顕微鏡を用いて発光の観察を行なった。具体的には、1.5mlのエッペンチューブに0.5mlのリン酸緩衝液[0.3M phosphate(pH8.0)、0.3M NaCl、0.5% Tween80]を添加後、HNS60-90-NanoLuc融合タンパク質(20nM:具体的にはHNS60-90-NanoLuc-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体)と、 $100\mu\text{g}$ のアモサイト(JAWE231)を添加し10分間混合させた。同じリン酸緩衝液で3回洗浄を行った後、 $100\mu\text{l}$ のリン酸緩衝液に再懸濁した。そのアモサイト懸濁液 $10\mu\text{l}$ と発光基質溶液 $10\mu\text{l}$ [Nano-Glo Luciferase assay Substrate(Furimazine)の5倍希釈液]を混合して、スライドガラスの上にのせ、さらにその上にカバーガラスを載せて封入した。作製したサンプルを顕微鏡(BX-51 オリンパス社製)にて観察し、発光を電子増幅デジタルCCDカメラ(iXON+、ANDOR社製)にて撮影した。

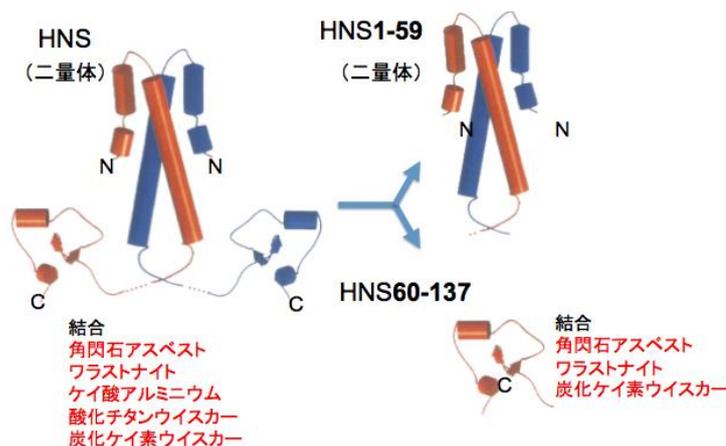
## 4. 結果及び考察

### (1) アスベスト特異的バイオプローブの創成

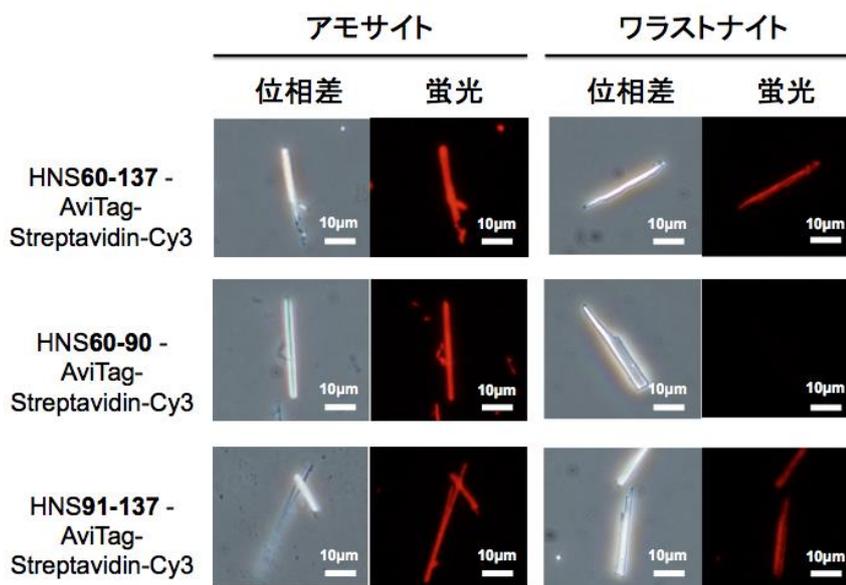
#### 1) 限定HNSタンパク質によるアスベスト特異的バイオプローブの創成

HNSタンパク質は137アミノ酸からなるタンパク質で、アスベスト以外に、ワラストナイト（ケイ酸カルシウム繊維）、ケイ酸アルミ繊維、酸化チタンウイスキー、炭化ケイ素繊維などの無機繊維と結合する。そこで、HNSのアスベストの結合に関する領域を特定し、その他の無機繊維と結合する領域を取り除くことによって、アスベストへの結合特異性を向上させた。

HNSの立体構造からN末端領域とC末端領域の2つの領域に分割可能と予測できた。N末端領域（1-59番目のアミノ酸）とC末端領域（60-137番目のアミノ酸領域）を作る様に遺伝子を設計した。それらを、大腸菌を宿主とする発現ベクターに組み入れ、遺伝子の発現誘導をおこなった（pETHNS1-59、pETHNS60-137）。それぞれの限定HNSタンパク質の精製を行ない、直接蛍光色素（Cy3）で修飾して結合性を調べた。その結果、C末端領域（HNS60-137）が角閃石系アスベストと結合することがわかった（図(1)-5、6）。さらに、HNS60-137は、ケイ酸アルミ繊維や酸化チタンウイスキーには結合し



図(1)-5、HNSタンパク質の構造（リボンモデル）。HNSタンパク質をN末端領域とC末端領域に分割した。角閃石系アスベストの結合領域は、C末端領域にあることがわかった。



図(1)-6、限定HNSタンパク質の結合評価。蛍光標識した限定HNSタンパク質とアスベストを混合後、位相差顕微鏡（左）と蛍光顕微鏡（右）によって観察した。60-90番目の限定HNSタンパク質はワラストナイトには結合せず、アスベスト（アモサイト）に結合したので、アスベストへの特異性の向上がみられた。

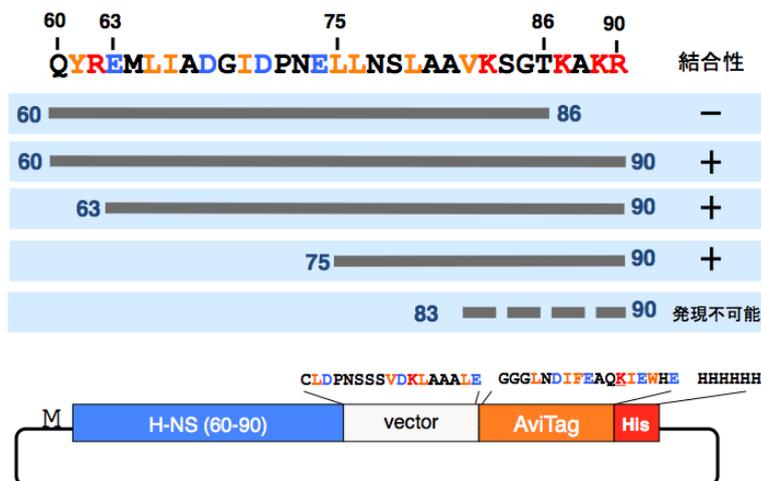
なくなったことから、予想通り、その他の無機繊維と結合する領域を取り除くことによって、アスベストへの結合特異性を向上させることができた。

HNS60-137をさらに限定して、角閃石アスベストに結合する領域を探った。具体的には、60-90番目までと、91-137番目の領域に分けた。得られた限定HNSタンパク質、あるいは限定HNSペプチド（通常分子量5,000以上のものをタンパク質、分子量5,000以下のものをペプチドと呼ぶので、60-90番目までのものはペプチドと呼ぶ）を予め蛍光色素(Cy3)で標識されたストレプトアビジン (Streptavidin-Cy3) と混合した。HNS60-90とHNS91-137は大腸菌内でビオチン化されているため、ストレプトアビジンと自動的、かつ量論的（ストレプトアビジン1分子に4分子のビオチン化タンパク質、あるいはペプチド）に結合する。HNS60-90（60-90番目の限定HNSペプチド）とStreptavidin-Cy3の複合体（HNS60-90-AviTag-Streptavidin-Cy3）、及びHNS91-137（91-137番目の限定HNSタンパク質）とStreptavidin-Cy3の複合体

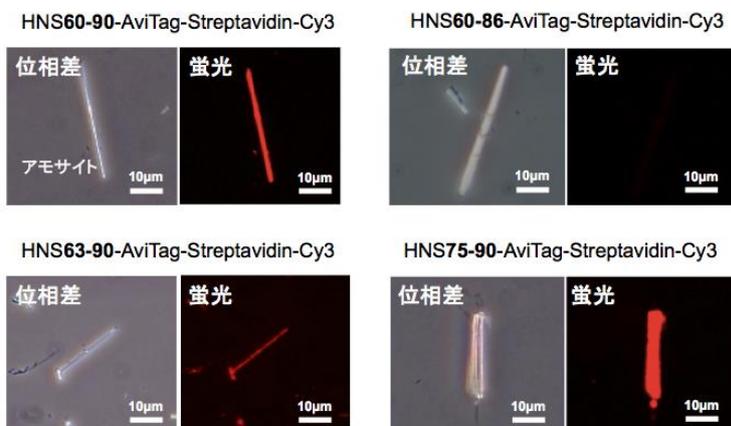
（HNS91-137-AviTag-Streptavidin-Cy3）を用いて、角閃石系アスベスト（アモサイト）とワラストナイトに対する結合を調べた（図(1)-6）。その結果、60-90番目の限定HNSペプチドは、角閃石系アスベストと炭化ケイ素繊維には結合するが、ワラストナイトには結合しなくなることが分かった。すなわち、60-90番目までに限定することによって、さらにアスベストへの結合特異性を向上させることができたことになる。

次に60-90番目のペプチドのアスベスト結合領域のさらなる絞り込みを行った。まず、C末端側からの限定を行った。具体的には、87-90番目の4つのアミノ酸を欠失させた60-86番目のペプチド

（HNS60-86-AviTag）を作製したところ、角閃石系アスベストへの結合性が消失した（図



図(1)-7、アスベスト結合領域の解析。60-90番目のペプチドの配列を一文字アミノ酸表記で表す。正電荷を持つアミノ酸を赤で、負電荷を持つアミノ酸を青字で示す。疎水性アミノ酸をオレンジで、その他を黒字で示す。アスベスト（アモサイト）への結合性を右欄に示す。下は限定HNSペプチドを発現するプラスミドの構造図。



図(1)-8、限定HNSタンパク質のアスベスト結合評価。位相差顕微鏡（左）と蛍光顕微鏡（右）によって観察した。

(1)-7、8)。この結果から、角閃石系アスベストへの結合には87-90番目のKAKR（リジン-アラニン-リジン-アルギニン）というペプチドが重要である事がわかった。次にN末端側からの欠失を行った。具体的には、63-90番目、75-90番目、83-90番目に限定したペプチド

(HNS63-90-AviTag、HNS75-90-AviTag、HNS83-90-AviTag)の作製を行った。残念ながらHNS83-90-AviTagに関しては、大腸菌内でのペプチドの発現がみられなかったため

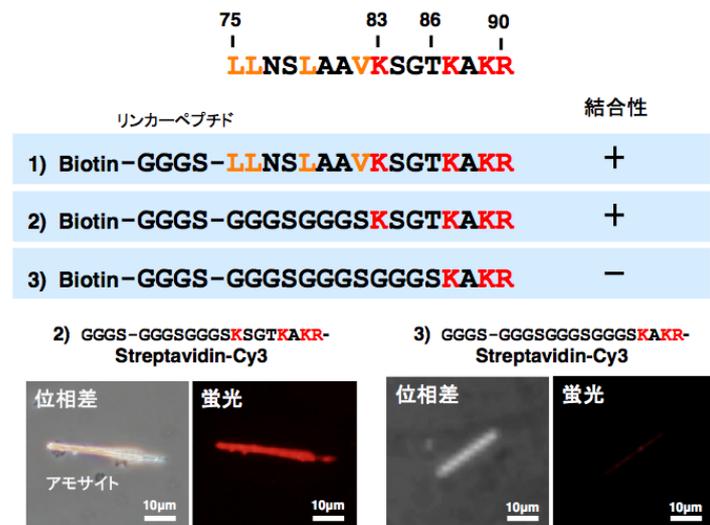
取得できなかった（大腸菌の中で小さいペプチドは分解され易いので、分解されてしまっていると考えられる）。精製できたHNS63-90-AviTag、HNS75-90-AviTagについて角閃石系アスベストへの結合について調べた。その結果、HNS63-90-AviTag、HNS75-90-AviTag共に角閃石系アスベストへの結合性を有していた（図(1)-7、8）。以上の結果から、角閃石系アスベストへの結合領域は75-90番目の領域に存在することがわかり、さらにKAKRという正電荷に富んだアミノ酸領域が重要であることがわかった。

限定HNS60-90を用いて特異性評価を行った結果、ほぼアスベスト特異的であることが分かった（表(1)-3）。現在のところ、アスベストと炭化ケイウイスカーとの区別は出来ていない。しかし、炭化ケイウイスカーは軍事用の特殊繊維で現場にはほとんど存在しないことから、この交差は無視できると考えられた。従って、DksAとHNS60-90の組み合わせで、十分な特異性が得られたと考えている。

HNSタンパク質の75-90番目からさらにアスベスト結合領域を限定するためには、大腸菌の発現系は使えないので、ペプチドを化学合成することとした。化学合成したペプチドと蛍光色素(Cy3)で標識されたストレプトアビジンを結合させるため、ペプチドのN末端にビオチンを導入した。また、ペプチドを限定してさらに小さくした場合、ペプチドのアスベスト結合領域がストレプトアビジンの立体障害で機能できない可能性が考えら

表(1)-3、アスベスト結合特異性

|         | 繊維          | DksA | HNS | HNS60-90 |
|---------|-------------|------|-----|----------|
| アスベスト   | クリソタイル      | 結合   |     |          |
|         | クロシドライト     |      | 結合  | 結合       |
|         | アモサイト       |      | 結合  | 結合       |
|         | アンソフィライト    |      | 結合  | 結合       |
|         | トレモライト      |      | 結合  | 結合       |
|         | アクチノライト     |      | 結合  | 結合       |
| 非アスベスト  | グラスウール      |      |     |          |
|         | ロックウール      |      |     |          |
|         | 微細ガラス繊維     |      |     |          |
|         | 耐火性繊維(RF1)  |      |     |          |
|         | 耐火性繊維(RF2)  |      |     |          |
|         | ケイ酸アルミニウム繊維 |      | 結合  |          |
|         | チタン酸カリウム繊維  |      |     |          |
|         | 炭化ケイ素ウイスカー  | 結合   | 結合  | 結合       |
|         | 酸化チタンウイスカー  |      | 結合  |          |
| ワラストナイト |             | 結合   |     |          |



図(1)-9、75-90番目のアスベスト結合領域の解析I。化学合成したペプチドを用いた。

れたので、欠失させる代わりにGGGSリンカー（アスベストには結合しない）で置き換えることでアスベスト結合領域を絞り込んだ（図(1)-9）。75～82番目の領域をGGGSリンカーに置き換えたペプチド（GGGS $\text{GGGSGGGSKSGTKAKR}$ ）を合成してアスベストへの結合性を調べたところ、結合力を有していた（図(1)-9）。さらに83～86番目の領域もGGGSのリンカーに置き換えたペプチド

（GGGS $\text{GGGSGGGSKAKR}$ ）に関しては著しい結合力の低下がみられた（図(1)-9）。以上の結果から、角閃石アスベストの結合には、KAKRだけでは不十分でKSGTKAKR（リジン—セリン—グリシン—スレオニン—リジン—アラニン—リジン—アルギニン）というアミノ酸配列が重要であることがわかった。

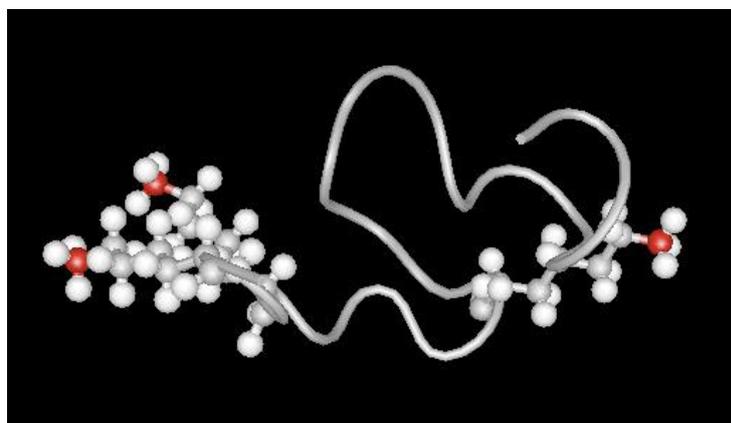
さらに、アスベスト結合領域であるKSGTKAKRのアミノ酸配列について詳細な解析を行った。リジン（K）とアルギニン（R）は正電荷を有するアミノ酸である。リジンをすべてアルギニンに置換したペプチド（GGGS $\text{GGGSGGSRSGTRARR}$ ）についてアスベストへの結合性を調べると、著しい結合力の低下がみられた（図(1)-10）。また、負電荷を有するアミノ酸EをKの近傍に配置したペプチド（GGGS $\text{GGGSGGSKEEKEKR}$ ）についてもアスベストへの結合性を調べると、この場合も著しい結合力の低下がみられた（図(1)-10）。しかし、リジンの位置には比較的自由度があった（図(1)-10）。以上の結果から、アスベストの結合には同じ正電荷のアミノ酸でもアルギニンではなくリジンの方が重要であり、負電荷のグルタミン酸はアモサイトへの結合を低下させる効果があることがわかった。

次にペプチドの構造予測ソフト（QUARK）を用い、KSGTKAKRの構造予測を行った（図(1)-11）。その結果、リジンが同一平面上に広がる構造を取り得ることがわかり、アスベストとの結合に関与することが考えられた。

アスベスト結合ペプチド（GGGS $\text{GGGSGGSKSGTKAKR}$ ）を用いて結合特異性を評価した結果、炭化ケイ素ウイスキーを除



図(1)-10、83-90番目のアスベスト結合領域の解析II。化学合成したペプチドを用いた。

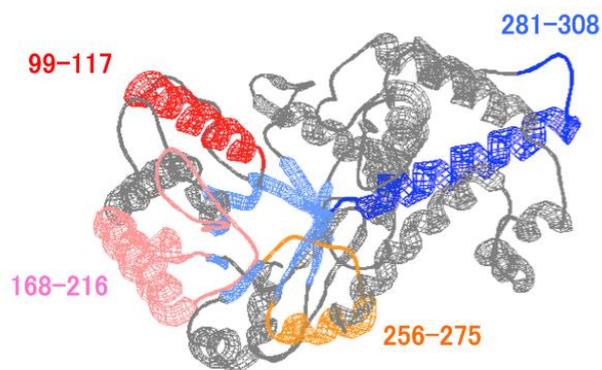


図(1)-11、アスベスト結合ペプチド(GGGS) $_3$ KSGTKAKRのモデル。リジンの側鎖をボール形式で示す。正電荷に関わるリジン側鎖の窒素原子を赤く示す。

き、アスベストに特異的であることが分かった。しかし、このペプチドは角閃石アスベストであるアモサイトへの結合力は元のタンパク質と大差ないものの、同じく角閃石アスベストであるクロシドライトへの結合力が減少しており、アスベストプローブとして使いにくいことが分かった。同様にHNS60-90も炭化ケイ素ウイスキーを除き、アスベスト特異的であった（表(1)-3）。またHNS60-90はクロシドライトへの結合力も十分保持されていたので、実際使用するプローブとしては、HNS60-90を利用することとした。現在のところ、アスベストと炭化ケイウイスキーとの区別は出来ていない。しかし、炭化ケイウイスキーは軍事用の特殊繊維で現場にはほとんど存在しないことから、日本の解体現場では事実上無視できると考えられた。一方、DksAは炭化ケイウイスキーにも結合する他は、ほぼクリソタイル特異的である（表(1)-3）。従って、DksAとHNS60-90の組み合わせで、アスベストに対する十分な特異性が得られたと考えている（標準アスベストを用いた場合の蛍光画像を資料集33-35に掲載）。

## 2) GatZタンパク質のアスベスト結合領域の解析

GatZタンパク質は、アスベスト以外に、ワラストナイト（ケイ酸カルシウム繊維）、ケイ酸アルミ繊維、炭化ケイ素繊維、微細ガラス繊維などの無機繊維と結合する。そこでGatZについても、HNSと同様に断片化することで、アスベストへの結合特異性を向上させることにした。GatZは420アミノ酸からなるタンパク質で、疎水性の高い領域を親水性の高い領域が取り囲むTIMバレル構造を有しており、疎水性領域を複数含むことから全領域をカバーするよう分割して可溶性発現し、結合評価することは困難だと思われた。そこでまず、MALDI-TOFMS解析によりGatZのアスベスト結合部位を同定し、その中からアスベストとの結合に関



図(1)-12、限定GatZタンパク質。99-117番目のアミノ酸（赤色）、168-216番目のアミノ酸（桃色）、256-275番目のアミノ酸（橙色）、281-308番目のアミノ酸（青色）を発現領域として選定した。

与していると考えられるタンパク質の表面部分に存在する部位について、タンパク質の発現と結合評価を行うことにした。クロシドライトに結合したGatZトリプシン消化ペプチドをMALDI-TOFMSにより解析した結果、GatZのアミノ酸配列の40-65、106-115、162-198、252-308、351-357番目にあたる領域のペプチドであることが分かった。これらの領域は、GatZタンパク質の立体構造上で、図12に示す領域に位置し、全ての結合領域はタンパク質表面上に露出する部位を有していた。また、幾つかの結合領域には、タンパク質内部に位置する疎水性の高い領域（図(1)-12水色）が含まれていた。以上のことから本実験では、アスベスト結合領域の可溶性発現とタンパク質安定性を意図して、同定した結合領域からタンパク質表面に露出していない部分を除外し、結合領域を含むヘリックス構造を発現することとし、限定GatZタンパク質（99-117番目のアミノ酸（赤色）、168-216番目のアミノ酸（桃色）、256-275番目のアミノ酸（橙色）、281-308番目のアミノ酸（青色））

を選定して、遺伝子を設計した。なお40-65番目のアミノ酸については、疎水性に富むため可溶性発現が困難と予測されたことから候補から外し、351-357番目の領域は短すぎるためタンパク質発現が困難と予想されたことから候補から外した。

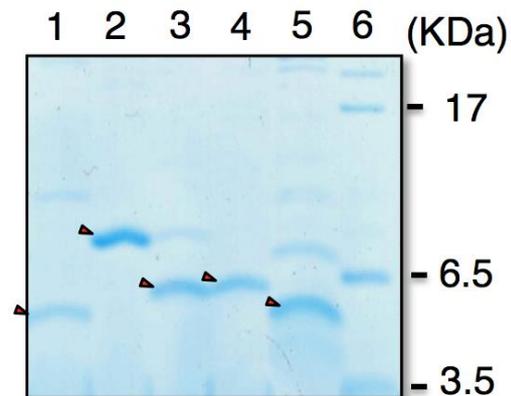
設計した遺伝子を、大腸菌を宿主とする発現ベクターに組み入れ、遺伝子の発現誘導をおこなった (pETGatZ99-117-AviTag、pETGatZ168-216-AviTag、pETGatZ256-275-AviTag、pETGatZ281-308-AviTag)。それぞれのビオチン化限定GatZタンパク質の精製を行ない、得られた部分精製標品 (図(1)-13) とStreptavidin-Cy3を反応させ、ビオチン-ストレプトアビジン複合体

(GatZ99-117-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体、GatZ168-216-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体、GatZ256-275-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体、GatZ281-308-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体、T7Tag-AviTag-Streptavidin-Cy3複合体) を調製した。これらの複合体とGatZ-Cy3を用いて、角閃石系アスベストとの結合性を評価した結果、各ビオチン化限定GatZタンパク質は、アスベストに対して結合性を有していたが、その結合性は弱く微細なアスベスト繊維、特にクロシドライトの検出は困難であった (表(1)-4)。

以上の結果から、全長GatZタンパク質のアスベスト結合能は、結合性の弱い複数の限定GatZタンパク質の総和であり、個々の限定GatZタンパク質はアスベスト検出プローブに適さないこと、断片化による特異性の向上が見込めないことがわかった。

### 3) アスベストに対する結合力を強化したタンパク質の創成

アスベスト結合タンパク質の結合力を強化させることによって、より明瞭なアスベスト蛍光画像が期待できる。すでに上述した様にストレプトアビジンは、4量体を形成するタンパク質である。従って4分子のビオチン化したタンパク質 (ペプチド) がストレプトアビジンを介して繋がることになる (図(1)-14)。ストレプトアビジン複合体は1分子上に4カ所のアスベスト結合部位が存在することにより、分子全体の結合力は単体と比べて向上することが期待できた。そこで、単体で



図(1)-13、ビオチン化限定GatZタンパク質の精製。

1: GatZ99-117-AviTag、2: GatZ168-216-AviTag、3: GatZ256-275-AviTag、4: GatZ281-308-AviTag、5: T7Tag-AviTag、6: 分子量マーカー

表(1)-4、ビオチン化限定GatZタンパク質のアスベスト結合性

| プローブ                                | アモサイト | クロシドライト |
|-------------------------------------|-------|---------|
| T7Tag-AviTag                        | -     | -       |
| GatZ99-117-AviTag-Streptavidin-Cy3  | +     | +/-     |
| GatZ168-216-AviTag-Streptavidin-Cy3 | +/-   | +/-     |
| GatZ256-275-AviTag-Streptavidin-Cy3 | +/-   | +/-     |
| GatZ281-308-AviTag-Streptavidin-Cy3 | +     | +/-     |
| GatZ-Cy3                            | +     | +       |

あるHNS60-90-AviTagを直接Cy3蛍光物質で修飾したものと、4量体であるストレプトアビジン複合体（HNS60-90-AviTag-Streptavidin-Cy3）のアスベストに対する結合を蛍光顕微鏡で観察した。

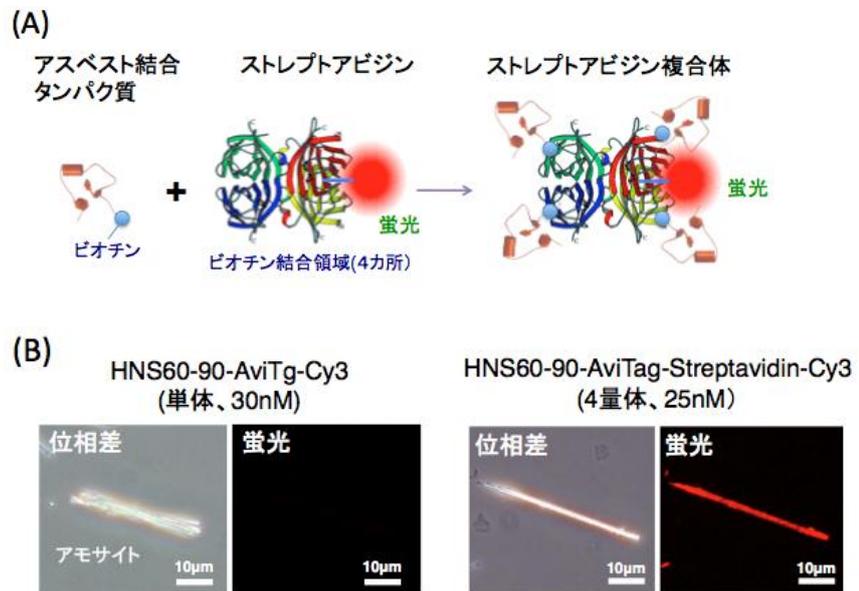
その結果、単体では蛍光がほとんど見えない濃度条件でも、ストレプトアビジン複合体は非常に明瞭な蛍光画像が得られるようになった(図(1)-14)。

次にその結合力の違いを定量化するために、遠心法とスキッチャードプロット解析から、単体と4量体であるストレプトアビジン複合体の解離定数を比較した。その結果、単量体であるHNS60-90-AviTag-Cy3の解離定数は260 nMであるのに対し、4量体であるストレプトアビジン複合体

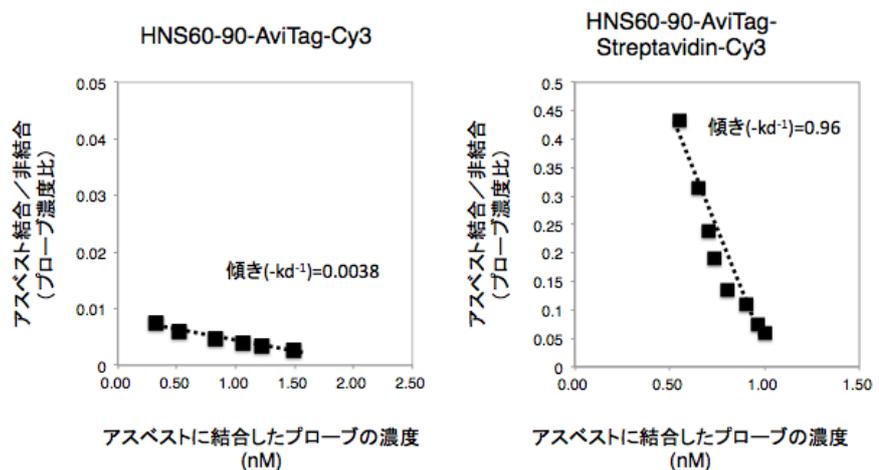
(HNS60-90-AviTag-Streptavidin-Cy3)の解離定数は1.0 nMと強固な結合を示した(図(1)-15)。すなわち、アスベストに対する結合力はペプチドを4量体化させることで約260倍向上した。これは、アスベスト表面とタンパク質の結合が複数箇所で行われることによって解離が起きにくくなり、結合力が向上したと考えられた。

#### 4) アスベストバイオプローブの蛍光強度の強化と生産方法の確立

アスベスト結合タンパク質にビオチンを付加し、ストレプトアビジン（ビオチンの結合サイト

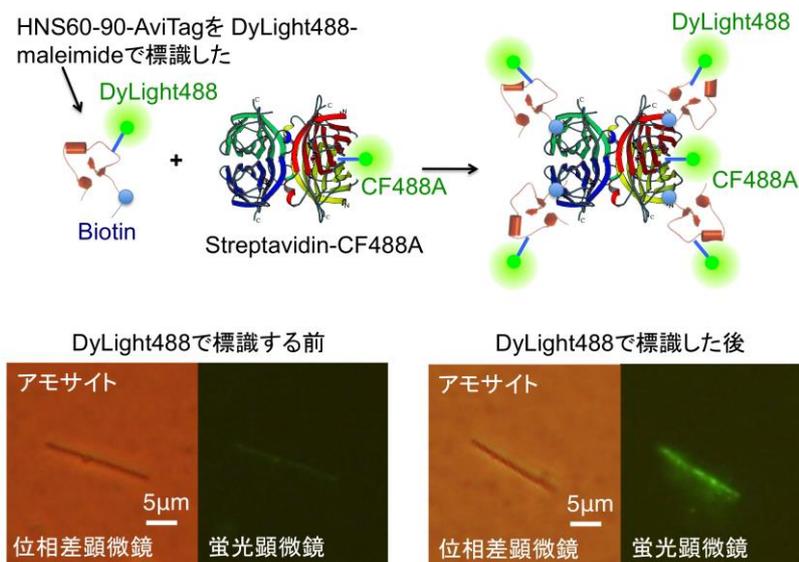


図(1)-14、(A)アスベストに対する結合力を向上させる方法の概念図。(B)単体と4量体の結合力の差を蛍光強度で示した。



図(1)-15、単体と複合体（4量体）の結合力評価。スキッチャードプロットによって解離定数を求めた。傾きは解離定数(Kd)の逆数分の-1となる。

が4カ所存在する)と混合することで、4分子を同一分子上につなげ、アスベストに対する結合力が飛躍的に向上したプローブを作製した。この結合力の強化によって、アスベストの蛍光画像がより明瞭に観察できるようになった。しかしながら、細いアスベスト繊維については、蛍光で観察すると見えづらく、蛍光強度を改善する必要があった。そこで、蛍光強度をあげる試みを行なった。これまで、ストレプトアビジンのみを蛍光標識し



図(1)-16、蛍光分子の標識数の増加による蛍光強度の改善

ており、アスベスト結合タンパク質の方は蛍光標識していなかった。そこで、アスベスト結合タンパク質の方にも蛍光標識を行なう事で、標識量が増加すれば蛍光強度が増加するのではないかと考えた。具体的には、アスベスト結合タンパク質のC末端に存在するシステインに、マレイミド反応基を介して、蛍光色素DyLight488を標識した。この新たに蛍光標識したアスベスト結合タンパク質とストレプトアビジンを混合する事で、蛍光分子の数が増加したプローブを作製した(図(1)-16)。DyLight488で標識する前と、標識した後のプローブを使って、アスベストを蛍光染色し比較を行なった。具体的には、これらのプローブを用いてフィルター上に塗布したアスベスト(アモサイト)を、位相差蛍光顕微鏡法のプロトコールに従って蛍光染色を行ない、位相差顕微鏡と蛍光表顕微鏡で観察した。観察結果を図(1)-16に示す。標識する前と比べ、標識した後のの方が、細いアスベスト繊維でも蛍光が明るくなっており観察しやすくなることが分かった。このようにタンパク質に対する蛍光分子の数を調節する事で、蛍光観察するのに十分な蛍光強度を得られる事が分かった。これを最適なバイオプローブとした。

ビオチン化HNSタンパク質の発現には、宿主として大腸菌を一晩培養し、IPTG(終濃度0.5mM)とD-ビオチン(終濃度100 $\mu$ M)を添加後、さらに18 $^{\circ}$ Cで21時間培養を行なった。HNSタンパク質の精製はHisTagを用いたアフィニティークロマトグラフィーによって行った。精製したタンパク質についてポリアクリルアミド電気泳動により精製度を確認したところ95%以上であったので、これを生産方法とした。

## (2) 実サンプルを用いた検証(相関顕微鏡を用いた繊維の特異性の検証)

### 1) 光・電子相関顕微鏡を用いたバイオ蛍光法の特異性の検証

標準サンプルを用いて、特異性を検証した結果、十分な特異性が得られたと考えている。しかし本方法が公定法化されるためには、実際のサンプルではどこまで信頼性があるのか、起こると

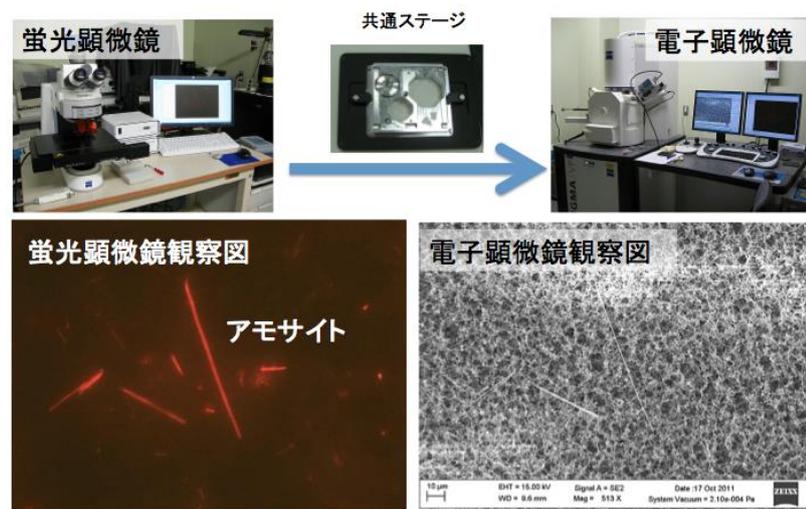
すればどのような問題が  
起こりえるのかを把握す  
る必要がある。すなわち、  
蛍光顕微鏡で見えている  
繊維が本当にアスベスト  
であるのかの確証を得る  
必要がある。そのために、  
蛍光顕微鏡で観察した視  
野と同一の視野を電子顕  
微鏡で観察して、エネルギ  
ー分散形X線分光器(EDX)  
で分析して同定する必要  
がある。しかし、蛍光顕微  
鏡で観察された同じ繊維  
を電子顕微鏡で探し出す  
のは非常に困難な作業で  
ある。さらにアスベスト捕  
集に使用するニトロセル  
ロースフィルターは繊維

で構成されているため、その上にある繊維状物質は、電子顕微鏡の低倍率では背景と区別が付きにくく、広範囲の中から同一の繊維を探し出すことはほぼ不可能に近い。光電子相関顕微鏡は蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で試料ステージを共有する特殊な顕微鏡である。蛍光顕微鏡で観察した視野の位置情報を記録し、電子顕微鏡で観察に移した際に、同一の視野に自動で移動してくれる。

そこで、光・電子相関顕微鏡システムをリースにて導入し、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で同一繊維の観察及び分析を行った。まず標準サンプルのアモサイトを捕集したフィルターを、アスベスト蛍光試薬で処理した後、蛍光顕微鏡で観察した。蛍光を放つ繊維の画像及び位置情報の取得を行ない、次に試料台を電子顕微鏡に移した。位置情報を入力することで、同一視野、同一繊維を観察することができた(図(1)-17)。さらに、その繊維をエネルギー分散型X線分光器(EDX)で分析することにより、アモサイトであると同定できた。このように、標準繊維を用いて蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で同一繊維の観察及び分析するシステムを確立した。

このシステムを用いて、実際の解体工事のサンプルを用いてプローブの性能を検証した(資料集36-95に掲載)。フィルター34種類を用いて蛍光法を実施し、蛍光を示した繊維340本を電子顕微鏡で観察し、エネルギー分散型X線分析装置(EDX)で分析した。その結果、322本(角閃石262本、クリソタイル60本)がアスベストであることが分かった。すなわち蛍光法によるアスベスト判定における偽陽性率は約5%であることが分かった。

この確度は、迅速法としては、十分であると考えられるが、さらに蛍光を示しながらアスベストではないものを詳細に分析することによって、確度を100%に近づけるための改善方法を探った。分析の結果、アスベスト以外の繊維として、有機繊維6本、鈹物繊維(Mg: Al: Si: Ca = 0.3: 0.4: 1: 0.5) 7本、ケイ酸アルミ(Al: Si = 0.7: 1) 2本、鈹物繊維(Si) 1本、鈹物繊維(Mg: Al: Si:



図(1)-17、光電子相関顕微鏡システム。蛍光を示すアスベストの位置を記録し、同じ位置の繊維を電子顕微鏡(SEM)で観察することができる。SEM-EDXで元素分析することでアスベストを確認することができる。観察図はアモサイト標準繊維を蛍光顕微鏡で観察した後、電子顕微鏡で同じ繊維を観察した結果である。

Ca = 0.2 : 0.4 : 1 : 0.2)

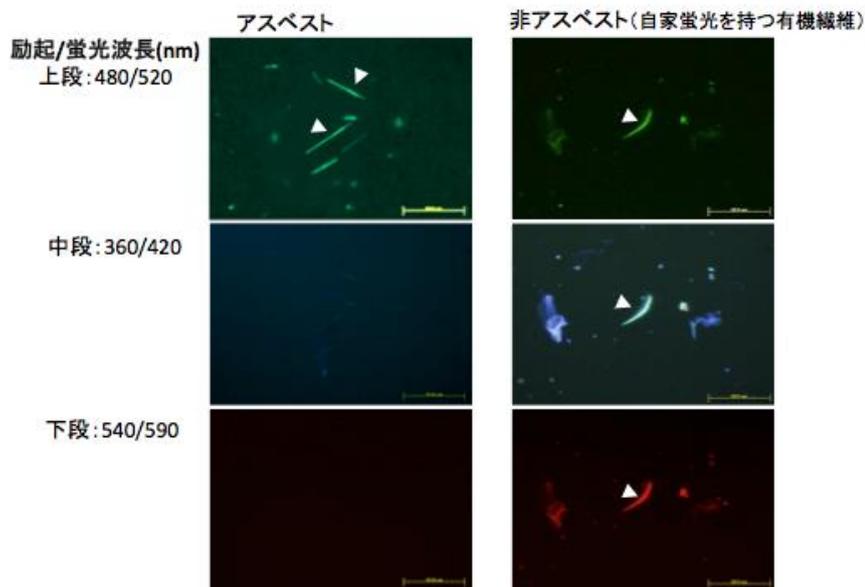
1本、鉱物繊維 (Na : Mg : Al : Si : K : Ca : Fe = 0.1 : 0.3 : 0.6 : 1 : 0.1 : 0.1 : 0.1) 1本、であることがわかった。有機繊維については、蛍光を呈する励起波長の特徴が異なるため、自家蛍光（蛍光プローブが結合して蛍光を持つものではなく、繊維自体が元来蛍光を持つもの）と考えられた。有機繊維の自家蛍光の特徴として、励起・蛍光波長の特徴が、アスベストバイオプローブ標識に利用したCy3やCF488A

と異なる。そこで、この特徴を使えば、有機繊維なのか、アスベスト蛍光プローブが結合したアスベストなのか判定できると考えられた。具体的には、蛍光タンパク質（CF488Aで修飾したアスベスト結合タンパク質）は、490nm付近に励起波長のシャープな吸収ピークがあるため、360nmや540nmの励起波長では励起されない（蛍光がない）。一方、自家蛍光を持つ有機繊維の場合、360nmや540nmでも励起されて蛍光があるので、見分けられた（図(1)-18）。

また、鉱物繊維についてはアスベストの代替であるロックウール様の組成を示している。ただし、ロックウールやケイ酸アルミについては、プローブは結合しないことが分かっているので、表面が何らかの修飾を受けて、アスベスト結合ペプチドが結合している可能性が考えられる。ロックウールであれば、酸によって溶解するので、捕集フィルターを酸処理することによって、擬陽性が回避できると考えている。

## 2) 偽陰性の評価

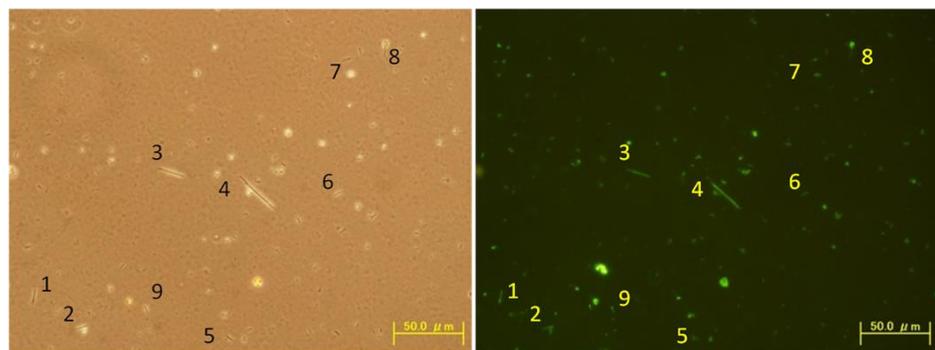
蛍光法によるアスベスト検出の感度については、これまでの研究結果から30ナノメートル幅の微細なクリソタイル繊維が検出できることが分っている。これは最も細いアスベストの単繊維と同等の太さである。このことから、蛍光法では微細なアスベスト繊維も見落とすことはないと考えられる。しかし一方で、様々な夾雑物がある実際の環境測定において、蛍光法がその性能を発揮できるかを確認する必要がある。そこで実際の解体現場やアスベスト除去作業現場において飛散しているものを用いて評価試験を行うために、アスベスト含有吹付け材を試料として使用することとした。また、偽陰性の可能性を直接的に評価するためには、アスベスト繊維の存在と、そ



図(1)-18、波長切り替えによるアスベスト判定。アスベスト結合タンパク質の蛍光の励起波長域は480nm付近であるが、自家蛍光を持つ非アスベストの蛍光は、360nmの短い波長であっても、540nmの長い波長であっても励起され、蛍光が観察される。

の同一の繊維について蛍光プローブの反応の有無を確認する必要がある。位相差・蛍光顕微鏡法は、顕微鏡の光路切り換えレバーで観察モードを位相差／蛍光と切り換えるだけであるので、視野を替えずに同一の繊維を両方の観察法で交互に見ることができる分析方法である。従って、繊維状物質が全てアスベストである場合、位相差モードで観察された繊維の蛍光性の有

|          | 試料①        |      | 試料②          |      | 試料③         |      |
|----------|------------|------|--------------|------|-------------|------|
|          | 使用石綿:アモサイト |      | 使用石綿:クロシドライト |      | 使用石綿:クリソタイル |      |
|          | 位相差        | 蛍光   | 位相差          | 蛍光   | 位相差         | 蛍光   |
| 検出本数(本)  | 119        | 115  | 124          | 123  | 122         | 120  |
| 検出本数比(%) |            | 96.6 |              | 99.2 |             | 98.4 |



図(1)-19、偽陰性確認試験結果(上)と試料①の同視野における位相差及び蛍光観察像(下)。番号の場所に繊維が確認された。位相差モードで観察された繊維365本のうち、358本が蛍光モードで検出された(偽陰性率1.9%以下)。

無を確認することによって、蛍光法の偽陰性について調べることができる。試料であるアスベスト含有吹付け材は、協力機関である環境調査会社(九電産業株式会社)より入手した。使用した3種類の試料のアスベスト含有率は、X線回折分析装置(XRD)による分析では、それぞれアモサイト12.5%、クロシドライト49.3%、クリソタイル10.6%であった。これらの試料を粉碎後、水分散させメンブレンフィルター上に捕集して試料を作製した。この試料を電子顕微鏡観察及びEDXにより分析した結果、それぞれ繊維20本について、全てアスベストであった。次にこの試料を位相差・蛍光顕微鏡法で分析した結果、365繊維中、358繊維をアスベストと判定することができた(図(1)-19)。実サンプルであるのでアスベスト以外のものが含まれていた可能性もある。従って、現状では偽陰性率が最大でも1.9%であると言える。

### (3) アスベスト迅速計測法の確立

#### 1) 位相差蛍光法によるアスベスト検査

位相差顕微鏡を用いたアスベスト検出法による数値が、長い間疫学的危険度の相関に使われてきたことから、今も基本的に位相差顕微鏡による数値が使われている。バイオ蛍光法は、位相差顕微鏡では検出できない微細なアスベスト繊維も検出できることから、検出されるアスベストの総数は、位相差顕微鏡によって検出される総数よりも多くなることが指摘されていた(“見えすぎ問題”と仮称)。それにより、従来の位相差顕微鏡・電子顕微鏡法によって取得された過去のデータと連続性がないのではないかといった懸念が専門家から指摘された。バイオ蛍光法を広く一般化するために、如何に従来の位相差顕微鏡による計測、電子顕微鏡法による判定の基準を変

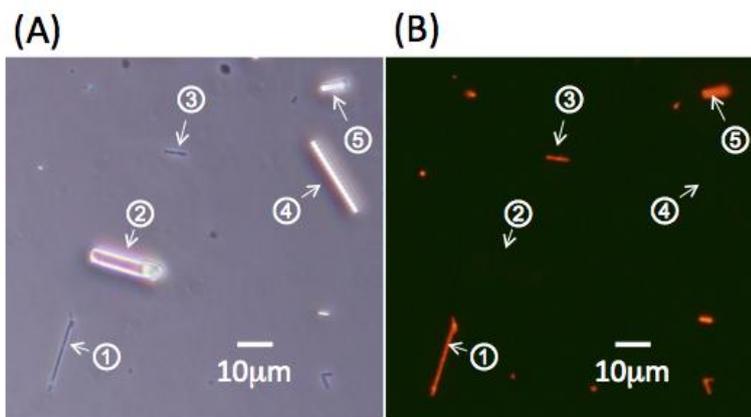
えないようにアスベストを計測するかという技術的課題を乗り越える必要があった。

位相差顕微鏡は、蛍光ユニットを追加して、同一視野を位相差モード（透過型）と蛍光モード（落射型）で切り替えながら観察することが可能である。このモードの切り替えは光源と光路の切り替えだけなので、顕微鏡によってはレバー1つで簡単に切り替わる。まず、位相差モードで繊維を計測し、次に蛍光モードに切り替えて、その繊維がアスベストかどうかを判定することで、“見えすぎ問題”が解決できた（図(1)-20）。すなわち、位相差顕微鏡で確認できた繊維のうち、蛍光を持つ繊維をアスベストとして計測するので、従来の位相差顕微鏡による計測、

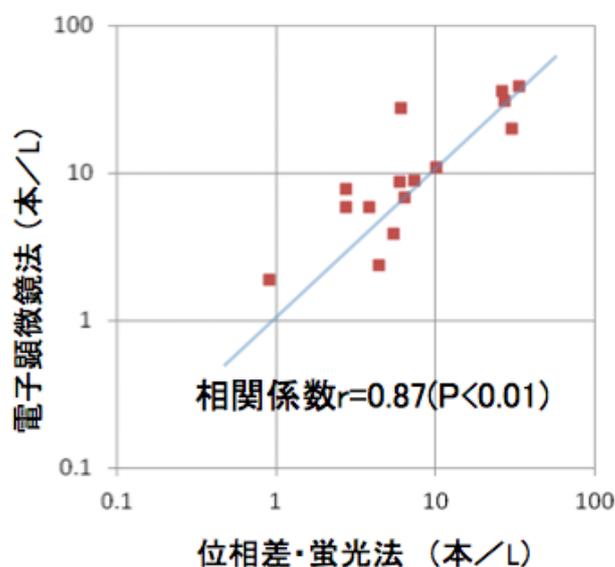
電子顕微鏡法による判定の数値を超えることはない。これにより、位相差顕微鏡の過去のデータとの連続性が担保され、基準が変わるのではないかとといった危惧が払拭できた。さらに従来の電子顕微鏡では、位相差顕微鏡で見た繊維と同一の繊維を観察する（探す）ことが事実上不可能である一方で（光・電子相関顕微鏡では可能だが、高価のため一般普及は難しい）、位相差蛍光顕微鏡法は、同一の繊維を容易に確認できることは特筆すべき改良点である。

## 2) バイオ蛍光法と公定法（電子顕微鏡法）との相関

現在、『アスベスト・モニタリング・マニュアル 第4.0版』（環境省）による標準的な分析法では、まず位相差顕微鏡によって非アスベストを含む総繊維



図(1)-20、位相差・蛍光顕微鏡法によるアスベスト計測。(A)は位相差顕微鏡画像。(B)は(A)の位相差顕微鏡画像と同一視野における蛍光顕微鏡画像を示す。位相差顕微鏡下で観察した繊維状の物質1, 3, 5において、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の結合を確認することができた。一方、位相差顕微鏡下で観察した繊維状の物質2および4においては、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の結合を確認することができなかった。この結果、繊維状の物質1, 3, 5は、アスベストであると判定し、繊維状の物質2および4は、アスベスト以外の繊維と判定できる。

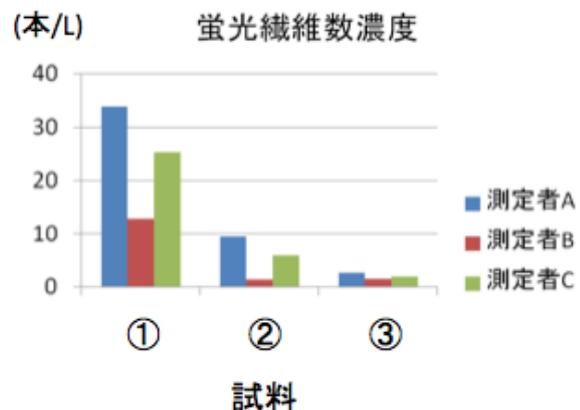


図(1)-21、公定法（電子顕微鏡法）と位相差・蛍光法によるアスベスト繊維数濃度測定結果の相関

での繊維数濃度を測定し、1本/L以上の場合に、さらに電子顕微鏡とX線分析装置（EDX）を用い、アスベストの同定を行いながらアスベスト繊維数濃度を測定することとなっている。蛍光顕微鏡法は手順・操作が簡単なため従来法より迅速性に優れる方法である。しかし、得られた測定結果を従来の基準（疫学的データや、環境基準）と照合しながら評価するためには、従来法による測定結果との関係を把握することが必要である。そこで大気捕集フィルター・サンプルを分割し、同一捕集フィルターを両分析方法によって測定することによって、その相関性の検証を行った。実際の解体現場において捕集したサンプル（19サンプル）を用いて、それぞれの方法により計測した結果、相関係数0.87（ $p < 0.01$ ）と高い相関性を示した（図(1)-21）。電子顕微鏡法による測定を行わずとも、同程度の計測が可能な方法であることが確認できた。

### 3) 測定者の教育、誤差最小化

大気中アスベストの測定は、人が顕微鏡で観察しながら複雑な計測ルールに従って微細な繊維の一本一本を数えるという作業によって行われる。そのため、測定者の習熟度の違いによって測定結果に大きなバラつきが出ることが知られている。蛍光顕微鏡法はコントラストの高い蛍光顕微鏡を用いることによって、判定の容易さと識別性を向上させることが可能な方法である。操作手順自体は簡便であるので特別な訓練は不要であると考えられるが、この方法を普及させるに当たって、初心者から熟練者までがスムーズに計測を実施するために必要な措置や改良点を検討するために、環境省の実施した「解体現場における迅速な測定方法に関する調査」に参加した。この調査では、リロケータブルスライドを用いることにより、複数の測定者による同一サンプル同一視野での計測結果が比較された。リロケータブルスライドとは、カバーガラスに視野位置を示す番地が印刷されており、一旦顕微鏡ステージから外し異なる顕微鏡装置へ移動させた場合でも、同一の視野を再び観察することが可能なサンプルスライドである。試料は実際の解体現場の大気捕集サンプル3種類を使用した。3機関の3人の測定者がこれらの試料の同一の視野（それぞれにつき50視野）について位相差・蛍光顕微鏡法による計測を行い、その結果を比較した。測定者A及びCによる測定では比較的近い数値を得ることができたが、特に試料①、②において測定者Bのアスベスト計測値が低かった（図(1)-22）。その要因としては、位相差観察においては明るい背景中にある繊維を観察することになるが、蛍光法ではアスベスト繊維以外の背景全体が暗い。そのため位相差／蛍光を切り換えた際に視野全体の光量が大きく変化し、目の順応が追い付かず、蛍光でのアスベスト計測値を下げってしまったことが考えられた。対策の一つには、位相差モードでの光量の調節や慣れによる改善があげられる。さらに、測定者の個人的な視力の差による影響を受けにくいモニター式顕微



図(1)-22、リロケータブルスライドを用いた同一試料の測定結果比較

た「解体現場における迅速な測定方法に関する調査」に参加した。この調査では、リロケータブルスライドを用いることにより、複数の測定者による同一サンプル同一視野での計測結果が比較された。リロケータブルスライドとは、カバーガラスに視野位置を示す番地が印刷されており、一旦顕微鏡ステージから外し異なる顕微鏡装置へ移動させた場合でも、同一の視野を再び観察することが可能なサンプルスライドである。試料は実際の解体現場の大気捕集サンプル3種類を使用した。3機関の3人の測定者がこれらの試料の同一の視野（それぞれにつき50視野）について位相差・蛍光顕微鏡法による計測を行い、その結果を比較した。測定者A及びCによる測定では比較的近い数値を得ることができたが、特に試料①、②において測定者Bのアスベスト計測値が低かった（図(1)-22）。その要因としては、位相差観察においては明るい背景中にある繊維を観察することになるが、蛍光法ではアスベスト繊維以外の背景全体が暗い。そのため位相差／蛍光を切り換えた際に視野全体の光量が大きく変化し、目の順応が追い付かず、蛍光でのアスベスト計測値を下げってしまったことが考えられた。対策の一つには、位相差モードでの光量の調節や慣れによる改善があげられる。さらに、測定者の個人的な視力の差による影響を受けにくいモニター式顕微

鏡を利用することが有効であると考えられた（「流通可能な安価なアスベスト計測システム」の項、参照）。また、現在、日本で使用されている位相差対物レンズは背景が明るく、観察対象物が暗いダークコントラスト方式のものであるが、蛍光法の観察像に近いブライントラスト（背景が暗く、観察対象物が明るい）の位相差用対物レンズの使用も考えられた。

#### 4) 蛍光法のための補助具の開発

蛍光法をより簡便で利用しやすい形態にするための補助具を設計し、3Dプリンターにより作製した（図(1)-23）。蛍光法の通常のサンプル処理手順では、サンプリング後にホルダーからフィルターを取り出し、1/4サイズのフィルター片を切り出し、蛍光染色を行った後、スライドガラス上に移して、顕微鏡観察を行う必要があった。これら一連の手順においては、薄く小さなフィルター片をピンセットで扱う作業を伴うため、特に実験環境の整っていない解現場などで検査を実施する場合、サンプルの落下事故などが発生する可能性が考え

られた。そのため、サンプリング後のホルダーに直接、試薬を滴下するためのホルダーキャップを考案した。また同時に、サンプリング時の有効ろ過面積を1/6程度に縮小する設計とし、サンプリング時間の短縮も図った。さらに、サンプリングホルダーに使用されている円形の支持ディスクに乗せたまま、サンプルを顕微鏡の観察ステージにマウントできるパーツを作製した。その結果作業手順を簡略でより安全なものとすることができた。これらを利用することにより、1/6のサンプリング時間（約10-20分）でより簡便にアスベストの迅速検査を実施することが可能となった。

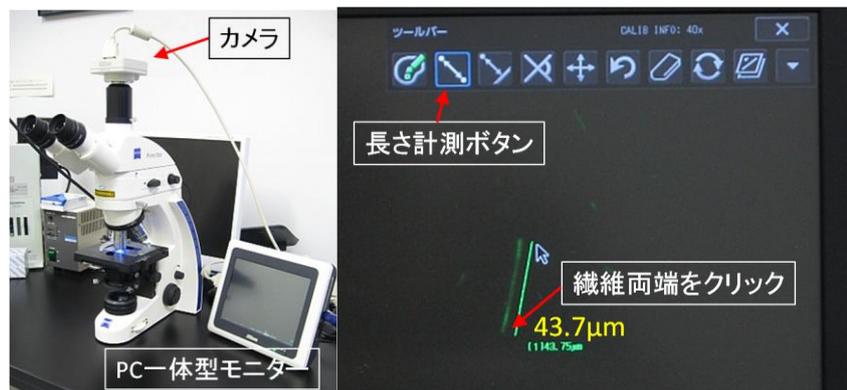
#### 5) 位相差蛍光顕微鏡と顕微鏡用モニター

従来の蛍光顕微鏡は蛍光用励起光源として超高圧水銀ランプを使用したものが主流であったが、近年LEDを利用したものも開発されており、消費電力が低くバッテリーによる運用が可能であり、またコンパクトで携帯性が高いことから現場へ持ち込むことも可能である。なかでも位相差/蛍光観察の切り換えがレバー1つで可能なPrimostar（カールツァイス社製）は、位相差/蛍光法を実施する上で非常に適したモデルであると言える。また、顕微鏡用モニターは、目への負担を軽減することが可能であると同時に、顕微鏡観察初心者でも利用することがより容易になる。小型で安価な顕微鏡用モニターシステムとしてDigital Sight DS-Fi2/L3（ニコン社製）がある（図(1)-24）。



図(1)-23、作製した蛍光法用の補助具（白い造形物）。

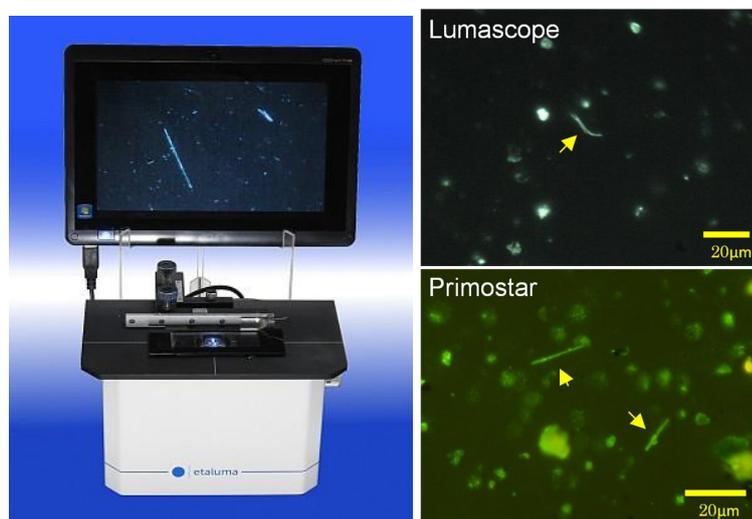
このシステムは小型のモニター部にカメラ制御用のソフトが組み込まれており、PCが不要であり、携帯性も高い。また観察、撮影の他、繊維の端点を指定して繊維長を計測するツールも装備されている。PrimostarとDigital Sightの組み合わせを利用して実際のサンプルを観察したところ、蛍光染色したアスベストの観察が可能なが確認できた。位相差／蛍光法で計測を行う場合、露光時間やゲインのパラメータをプリセットで設定すれば感度調整を簡単に行うことが可能であった。普及型のモデルとしては安価であることも重要である。従来の高性能な蛍光顕微鏡とCCDカメラのシステムと比較して、半分程度の価格で導入することが可能であり、現実性の高い組み合わせであると考えられた。



図(1)-24、LED型蛍光顕微鏡Primostar i-LEDと顕微鏡用モニターDigital Sight(左)、及びDigital Sightでのアスベスト観察像(右)。長さ計測ボタンを押し、繊維両端をクリックすると長さを計測できる。

## 6) 携帯型小型蛍光顕微鏡

前述のようにLED型顕微鏡は、従来型のものに比べて小型化されているが、さらに、目による観察のための光学系（接眼レンズ及び接眼鏡筒部）を持たず、モニターによる観察を前提とした顕微鏡も存在する。その中には、非常に小型・軽量に作られており、より携帯性の高い機種がある。Lumascop (Etaluma社製) は、顕微鏡単体では重量が2.6kgと非常に軽量の蛍光顕微鏡である(図(1)-25)。Lumascop及び前述のPrimostarを用いて、解体現場での大気捕集フィルター(13種類)について、蛍光法による計測を行った結果、検出繊維数は



図(1)-25、モニター式小型蛍光顕微鏡Lumascop外観(左)とLumascop及びPrimostarによる観察像の比較(右)。小型でも明瞭にアスベストの観察が可能。

図(1)-25、モニター式小型蛍光顕微鏡Lumascop外観(左)とLumascop及びPrimostarによる観察像の比較(右)。小型でも明瞭にアスベストの観察が可能。

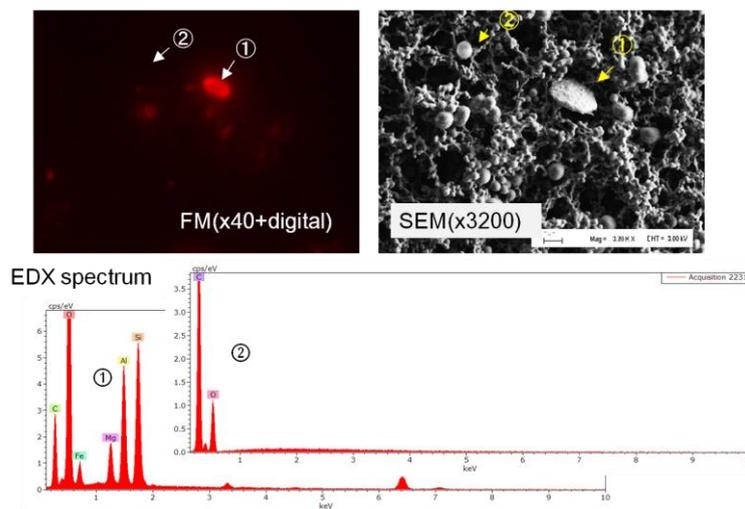
ほぼ変わらず、どちらの顕微鏡を利用しても同等の結果が得られることがわかった。ただし、Lumascopには位相差観察装置が装備されていないため、蛍光法による計測のみを行うより迅速な測定用のモデルとして利用することを想定している。現場での迅速な測定に際しての利便性を考慮すると、携帯性の高い顕微鏡には大きな利用価値があると考えられる。これにより、利用者の目的に合わせて、位相差／蛍光顕微鏡法用のモデル、蛍光法専用のより小型なモデルの二通りを提供することが可能となった。

## 7) バイオ蛍光法の一般大気分析への応用

バイオ蛍光法は、アスベスト解現場における迅速な計測法としての利用に留まらず、広く一般大気中のアスベスト計測、またプローブを他の物質に対して結合特性を持つものに変更すれば、他の検出対象についても応用可能な技術である。これらへの応用の可能性を検討するために、解現場以外の一般大気環境として道路交差点脇にてサンプリングを行い、蛍光法によるアスベスト計測を行った。また、PM2.5を捕集したフィルターについても、蛍光顕微鏡による観察及び電子顕微鏡による分析を行った。

交差点サンプルのアスベスト計測については、後述する補助具（「蛍光法のための補助具の開発」の項、参照）を用い短時間サンプリングでの計測を試みた。今回の計測では、15分程度の短時間サンプリングで、アスベスト繊維数濃度は検出下限値（0.49本/L）以下という判定を得ることができた。かつてはブレーキライニングなどにアスベストが利用されていたため、交通量の多い道路沿いではアスベストが浮遊している可能性がある。短時間サンプリングと迅速な蛍光法を組み合わせることにより、測定点と測定頻度を増やし、全国でより綿密にアスベストの飛散状況をモニターすることが可能となる。

またアスベスト以外の物質にも広く結合するプローブ（GGGS3-K8-SA-Cy3）を用いて、PM2.5及び粗粒子を捕集したフィルターに対し光・電子相関顕微鏡による分析を行った。PM2.5を捕集したフィルター上には蛍光試薬と反応する粒子が見られ、EDXで分析したところ鉱物由来の粒子であると判明した。また別のフィルター上には蛍光を示す粒子と共に蛍光を示さない（蛍光試薬が結合しない）粒子がSEMにより観察された。蛍光を示す粒子は先ほど同様鉱物由来のものであったが、蛍光を示さなかった粒子は金属元素を含まない有機物であった（図(1)-26）。つまり、この



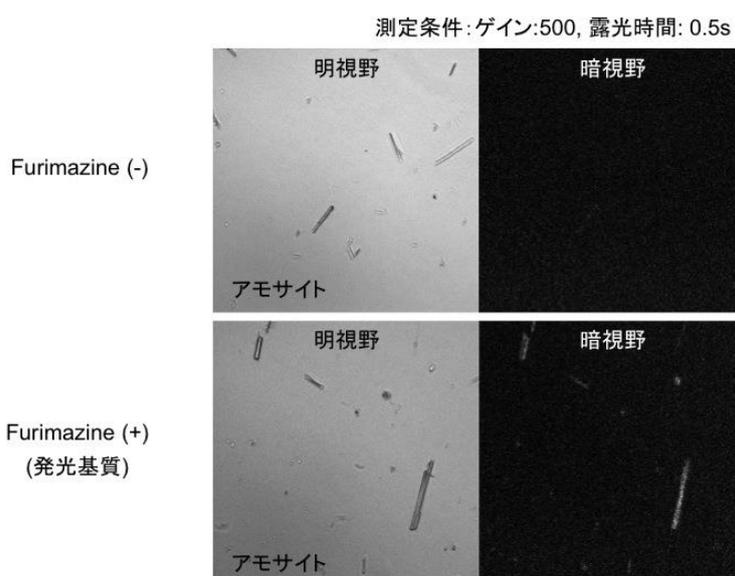
図(1)-26、粒子状物質を捕集したフィルターの光・電子相関顕微鏡による観察像及びEDXスペクトル。①の鉱物由来と考えられる粒子については蛍光で観察されたが、②の有機物については蛍光は見られなかった。

プローブを利用した場合、ある種の有機物に対しては反応しない性質があることが分った。このことからプローブの特性をより詳細に検討し設計することにより、例えばPM2.5の中でも特に発癌性や変異原性が指摘されている多環芳香族炭化水素と毒性の低い自然由来の無機物との成分種別によるクラス分けなどに利用できる可能性が示唆された。

## 8) アスベストの発光検出技術の検討

課題としては予定していなかったが、もしアスベストが蛍光ではなくて、発光で検出できれば、さらに高感度になる可能性があったので、検討した。また、これまで開発してきた蛍光法は、簡便に検出できるというメリットをもつ反面、自家蛍光を有する物質と区別することが難しかった。自家蛍光は、どの励起波長でも蛍光を発する特徴から、UV励起を使って自家蛍光であるかどうか判定できることがこれまでの研究で分かっている。しかし、この判定では複数の励起波長を使える機種が必要となる。発光は、発

光基質が酸化される過程で光が生じ、ルシフェラーゼという酵素がこの反応を触媒している。蛍光は外部から光(励起光)が必要であるが(この励起光が自家蛍光を持つ物質を光らせてしまう)、一方で発光は外部からの光が必要ない(発光基質とルシフェラーゼがあれば発光する)ことから、自家蛍光を持つ物質があっても光らないためバックグラウンドの低い検出法である。近年の技術の発展により、高輝度のルシフェラーゼと高感度CCDカメラを用いることにより、発光を顕微鏡で観察することが可能となってきた。そこで、これらの技術を利用して、アスベストを発光で検出する事を試みた。まず、高輝度ルシフェラーゼとしてNanoLucを使用することにした(このNanoLucは、Furimazineという発光基質と反応して光を生じる。ホタルルシフェラーゼと比較して100~150倍活性が高いことが知られている)。この高輝度ルシフェラーゼ NanoLucにアスベスト結合タンパク質を融合したタンパク質(HNS60-90-NanoLuc-AviTag)を作製した。この融合タンパク質を、これまでと同様にストレプトアビジンと結合させて4量体にして結合力を強化したプローブを調製し、アスベストに結合させ、顕微鏡で観察を行なった。観察には、高感度CCDカメラであるEM-CCD(ixON+, ANDOR社製)を使用した(図(1)-27)。発光基質を添加したサンプルでは、アスベストが発光している様子を観察することができた。一方、発光基質を添加しなかった場合は、発光は検出されなかったため、検出された発光はNanoLuc由来のものであると確認できた。しかしながら、細かいアスベスト繊維については、発光が弱く検出が難しいことが分かった。



図(1)-27、アスベストの発光検出。発光基質であるFurimazineを入れた場合に、アモサイトが発光した(暗視野)。

## 5. 本研究により得られた成果

### (1) 科学的意義

バイオ蛍光法は、蛍光で修飾したアスベスト結合タンパク質によって、アスベストを蛍光で可視化する世界で初めての技術である。沢山の種類のタンパク質から無機物質に結合するタンパク質を選択し、蛍光で修飾することでバイオイメージングに応用した。バイオイメージングの世界を無機物質の検出に広げたことは、科学的に大きな意義がある（平成24年度文部科学大臣表彰科学技術賞受賞）。また、本研究開発によって、初めてアスベスト結合領域をペプチドレベルで特定し、特異性と結合性を実際の現場で利用できるレベルまで向上させることができた。実際、現場のサンプルを使って特異性を評価した結果、誤認識率は5%、偽陰性率2%以下でアスベストが問題なく検出できることが実証できた。遺伝子工学、タンパク質工学を駆使して、環境中のアスベスト検査に資するバイオプローブを作成できたことは意義深い。さらに、蛍光顕微鏡で観察できる微細クリソタイルの直径は、30-35nmであることがわかっている。ナノサイズの粒子は、通常の光学顕微鏡では見ることはできないくらい小さいが、蛍光でラベルすれば、その存在は可視化できることを実証した。これによりバイオ蛍光法がアスベスト以外にも近年毒性が指摘されているナノ材料の簡便な可視化にも将来応用できる可能性を示したことは科学的に意義が大きい。

### (2) 環境政策への貢献

#### <行政が既に活用した成果>

バイオ蛍光法によるアスベスト迅速検出法は、環境省アスベストモニタリングマニュアル第4版に記載されている。本研究開発でより信頼性の高いアスベスト迅速計測法が確立できた。

#### <行政が活用することが見込まれる成果>

アスベストはこれまでの曝露だけでも今後2030年前後までに約10万人の中皮腫発症を予想する文献も存在する(The New England Journal of Medicine, 353:1591-1603, 2005)。解体現場や瓦礫処理の際のさらなる曝露が重なれば、さらに数十年先までもアスベスト起因性のガン発症の問題を抱えることになる（解体現場のアスベストリスク）。アメリカでは、アスベストは懲罰的損害賠償の対象になるが、日本ではこの賠償はほとんど認められておらず、検査の動機付けにはなっていなかった。そこで2013年6月、石綿飛散防止強化へ向けて法改正が行われ、届け出がなくともアスベスト飛散の恐れがある場合に自治体が立ち入りできる様になった。しかし、現在の大気アスベスト検出の公定法は時間がかかること、提案されている偏光顕微鏡法は複雑な方法であり、且つ微細アスベスト等を見逃してしまう等の問題があり、立ち入り検査の際に利用できる簡易迅速検査法が確立されていなかった。

本方法は、暗視野の中でアスベスト繊維が特異的に光っているために、直ちに微細アスベストも検出できる等の利点がある（推進費の中間評価でS評価）。平成25年10月23日、第10回中央環境審議会石綿飛散防止専門委員会の資料中で、簡便で迅速な蛍光法の普及を期待する旨が記

述されている。

民間の検査会社では、方法論が優れているだけでは技術の普及に至らない。特にアスベストなど社会的な問題が大きい場合には、公的な機関の積極的な評価や自治体・民間への周知が必要となる。

## 6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

## 7. 研究成果の発表状況

### (1) 誌上発表

#### <論文(査読あり)>

- 1) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、アレクサンドロフ・マキシム、奥山里美：Journal of Environmental Biotechnology, 11, 17-21 (2011)  
「アスベストを検出するための環境バイオテクノロジー」
- 2) 黒田章夫、石田丈典：光学、41(1), 28-32 (2012)  
「蛍光顕微鏡を用いた大気中アスベスト検出」
- 3) T. Ishida, M. Alexandrov, T. Nishimura, K. Minakawa, R. Hirota, K. Sekiguchi, N. Kohyama, and A. Kuroda: Journal of Fluorescence, 22, 1, 357-363 (2012)  
“Evaluation of sensitivity of fluorescence-based asbestos detection by correlative microscopy”
- 4) T. Ishida, M. Alexandrov, T. Nishimura, K. Minakawa, R. Hirota, K. Sekiguchi, N. Kohyama, and A. Kuroda: PLoS ONE, 8(9):e76231 (2013)  
“Molecular engineering of a fluorescent bioprobe for sensitive and selective detection of amphibole asbestos”
- 5) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、Maxym Alexandrov：作業環境、35(1), 57-62(2014)  
「蛍光顕微鏡法による大気アスベスト検査の有効性検証と位相差蛍光顕微鏡法への応用」

#### <その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 黒田章夫、石田丈典：ナノ融合による先進バイオデバイス(シーエムシー出版) 249-257 (2011)  
「ナノ分子デザインによるアスベストバイオプローブの作成」
- 2) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、Maxym Alexandrov、奥山里美、神山宣彦：日本労働衛生工学会妙録集、34-35 (2012)「蛍光顕微鏡法によって実際の大气サンプルのアスベスト繊維を判定した場合の確度の検証」
- 3) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、Maxym Alexandrov、市田越子、青木功介、河崎哲男、神山宣彦：日本労働衛生工学会妙録集、62-63 (2013)  
「蛍光顕微鏡法によるアスベスト検査と自動化ソフトウェアの開発」
- 4) 黒田章夫：日本工業出版「検査技術」18(9), 44-48 (2013)

「蛍光タンパク質でアスベストを簡単に検出」

5) 黒田章夫：産業と環境、42(6)，81-84 (2013)

「現場で簡便に利用できるアスベスト計測技術の開発」

6) 黒田章夫、石田丈典、マクシムアレクサンドロフ、西村智基：バイオインダストリー、30(6)，54-61 (2013) 「バイオ技術によるアスベスト蛍光検出技術の開発」

## (2) 口頭発表 (学会等)

1) 黒田章夫：環境バイオテクノロジー学会 (2011)

「バイオによるアスベスト迅速検出」

2) A. Kuroda, T. Ishida, M. Alexandrov, T. Nishimura: National Environmental Monitoring Conference (2011)

“Detection of Airborne Asbestos by Fluorescent-labeled protein probe and its Application to quick Monitoring”

3) T. Ishida, M. Alexandrov, A. Kuroda: National Environmental Monitoring Conference (2011)

“Fluorescence Microscopy-Based Method for Selective Detection of Asbestos”

4) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、神山宣彦：日本労働衛生工学会 (2011)

「位相差蛍光顕微鏡法によるアスベスト検査」

5) 黒田章夫：新技術説明会 (大阪工業会議所)，2011年9月11日

「バイオ技術を駆使したアスベストの検出技術」

6) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、Maxym Alexandrov、奥山里美、神山宣彦：日本労働衛生工学会、2012年11月14日

「蛍光顕微鏡法によって実際の大気サンプルのアスベスト繊維を判定した場合の確度の検証」

7) A. Kuroda, T. Ishida, M. Alexandrov, T. Nishimura: Michael E. Beard Conference, Asbestos Laboratory Issues (ASTM, Florida), Jan. 31, 2013

“Detection of Airborne Asbestos by Fluorescent-labeled protein probe and its Application to quick Monitoring”

8) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、M. Alexandrov、神山宣彦、関口潔：日環協・環境セミナー、2013年9月27日

「蛍光顕微鏡による大気アスベスト繊維検出法の開発」

9) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、Maxym Alexandrov、市田越子、青木功介、河崎哲男、神山宣彦：日本労働衛生工学会、2013年11月14日

「蛍光顕微鏡法によるアスベスト検査と自動化ソフトウェアの開発」

## (3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

## (4) シンポジウム、セミナー等の開催 (主催のもの)

- 1) 「蛍光顕微鏡法によるアスベスト計測」講習会（平成23年10月6日、カールツァイスマイクロコピー（株）東京本社、対象：アスベスト計測の従事者10名）
- 2) 「アスベストをバイオテクノロジーで観る」講義（平成23年10月28日、広島大学、対象：広島大学附属福山中学校生30名）
- 3) 「蛍光顕微鏡法によるアスベスト計測」講習会（平成23年12月2日、カールツァイスマイクロコピー（株）東京本社、対象：アスベスト計測の従事者10名）
- 4) 「バイオテクノロジーでアスベストを観る」出前講義（平成23年12月16日、久留米高専専攻科物質工学専攻、対象：5年生及び専攻科学生18名）
- 5) 「蛍光顕微鏡法によるアスベスト計測」講習会（平成24年3月2日、カールツァイスマイクロコピー（株）大阪支社、対象：アスベスト計測の従事者13名）
- 6) 広島大学公開講座、「バイオでアスベストを検出する」、2012年9月1日、広島大学エクステンションセンター、観客40名
- 7) 広島大学公開講座、「バイオでアスベストを検出する」、2013年8月31日、広島県民文化センター、観客50名

#### （5）マスコミ等への公表・報道等

- 1) 中国新聞（2012年4月11日、27面）アスベスト検出技術開発で文部科学大臣表彰、コピーを巻末に添付。
- 2) 毎日新聞（2012年6月21日、広島版、21面）アスベスト検査技術「バイオ蛍光法」従来より検査迅速に、コピーを巻末に添付。
- 3) 中国新聞（2013年4月1日、17面）アスベスト簡単に測定、コピーを巻末に添付。

#### （6）その他

黒田章夫、石田丈典、2012年4月9日、平成24年度文部科学大臣表彰科学技術賞（開発部門）、「バイオ蛍光法によるアスベスト検出技術の開発」

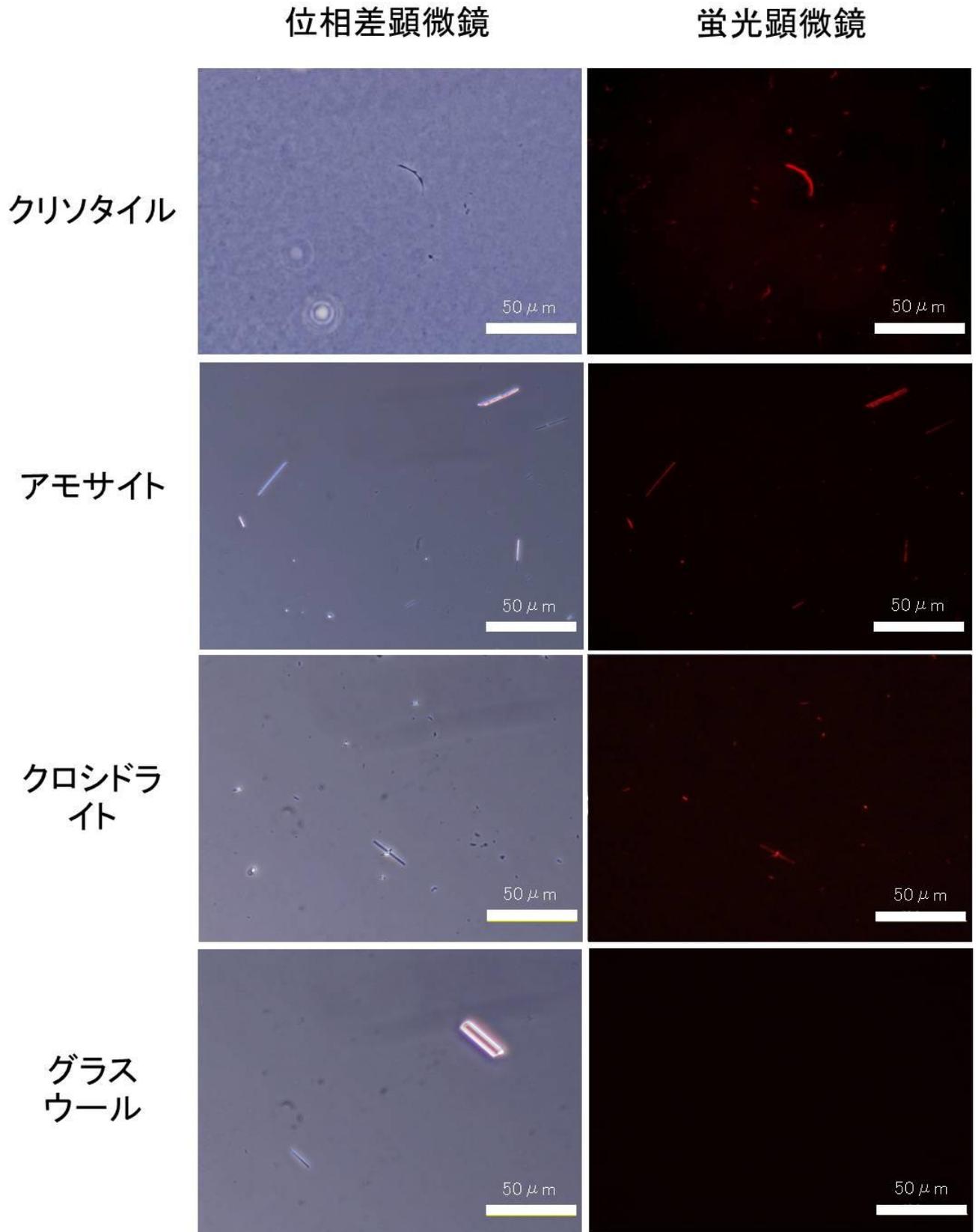
## 8. 引用文献

特に記載すべき事項はない。

## 資料集

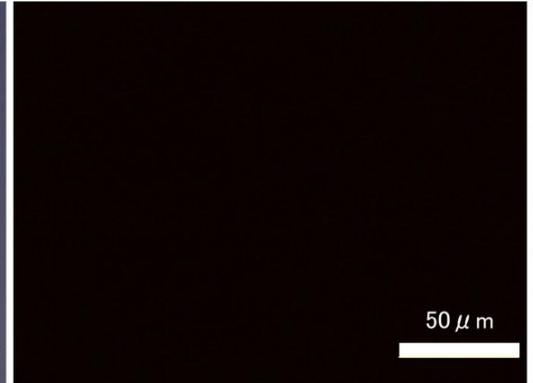
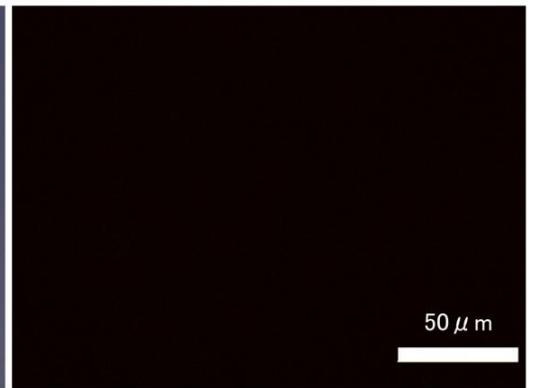
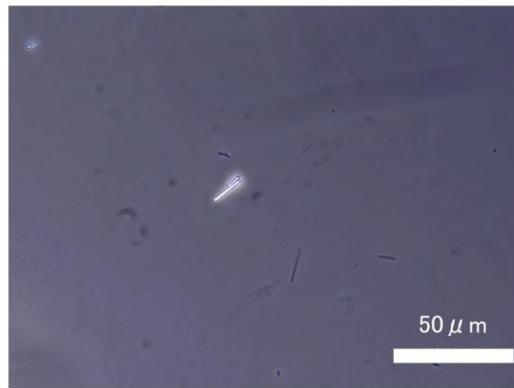
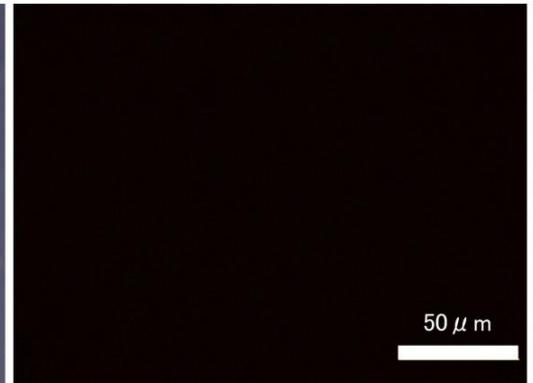
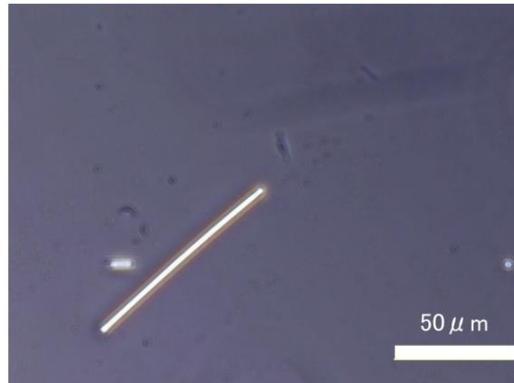
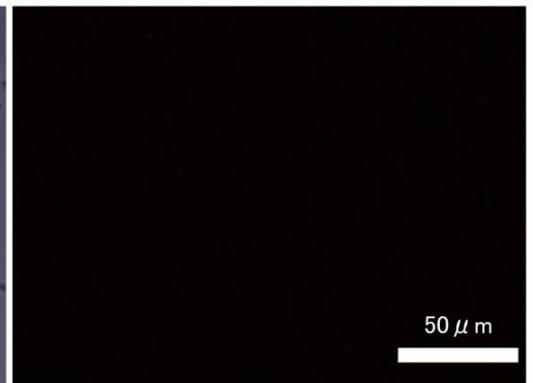
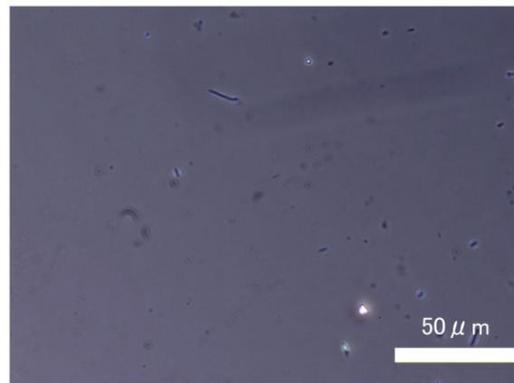
- I. アスベスト結合バイオプローブの繊維状標準物質との反応性
  
- II. 解体現場大気サンプルを用いた蛍光バイオプローブによるアスベスト検出例、及び電子顕微鏡による同一繊維の確定分析画像

## 資料 I. アスベスト結合バイオプローブの繊維状標準物質との反応性



## 位相差顕微鏡

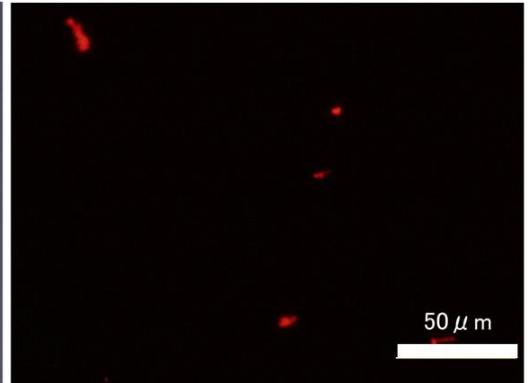
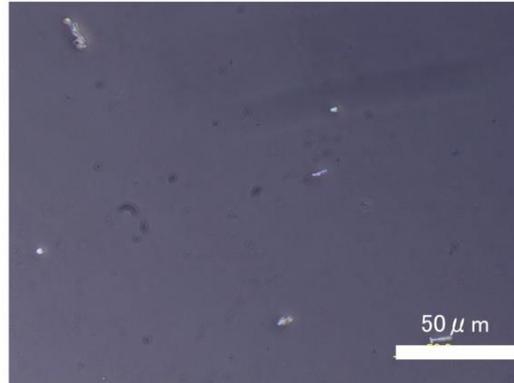
## 蛍光顕微鏡

ロック  
ウール微細ガラス  
繊維耐火性織  
維(RF1)チタン酸  
カリウム

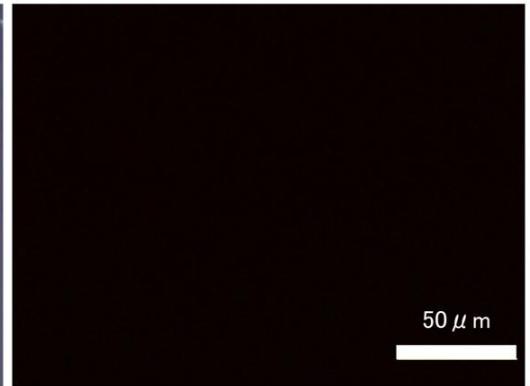
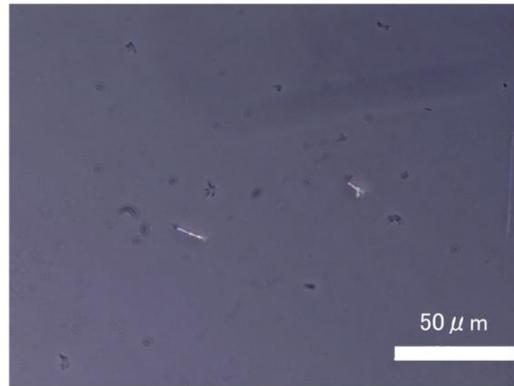
位相差顕微鏡

蛍光顕微鏡

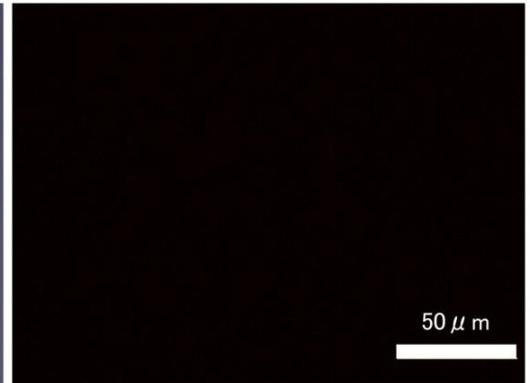
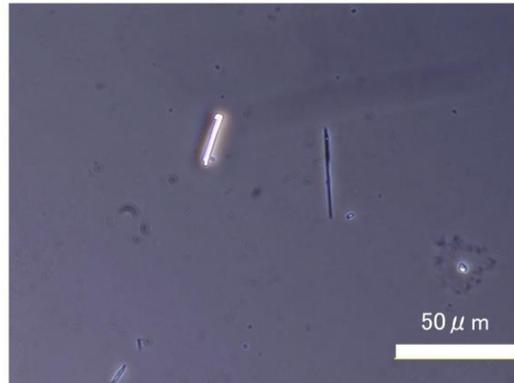
炭化ケイ  
素ウイス  
カー



酸化チタン  
ウイスカー



ワラスト  
ナイト

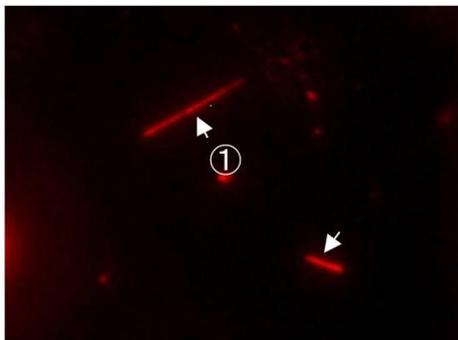


資料Ⅱ．解体現場大気サンプルを用いた蛍光バイオプローブによるアスベスト検出例、及び電子顕微鏡による同一繊維の確定分析画像

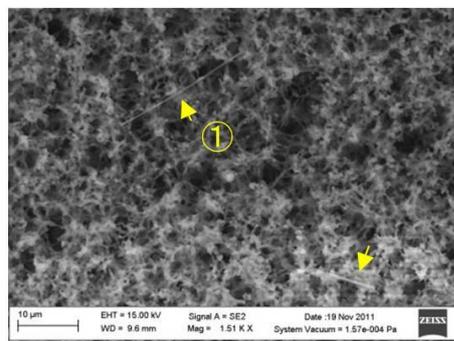
試料 ; No. 01 解体現場

#F001

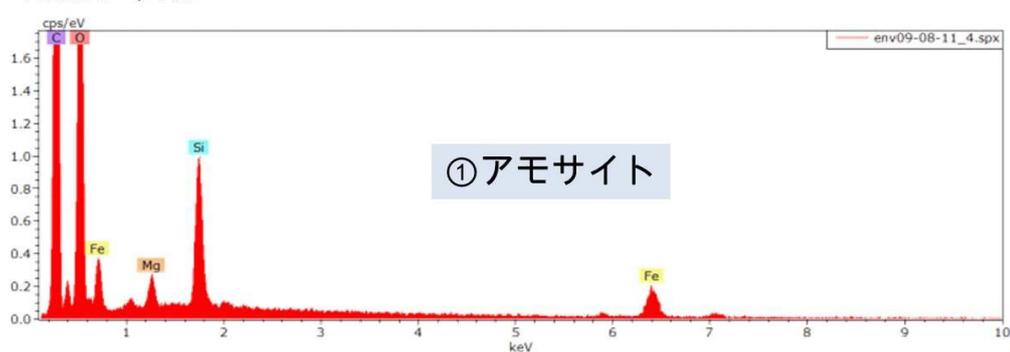
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1510倍)



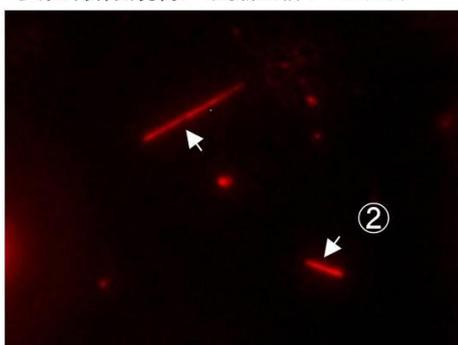
EDXスペクトル



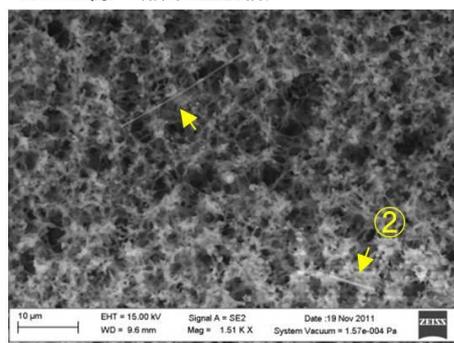
試料 ; No. 01 解体現場

#F002

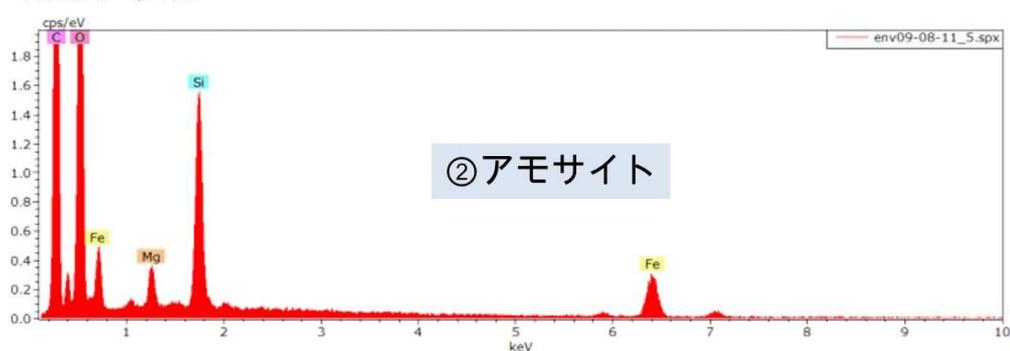
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1510倍)



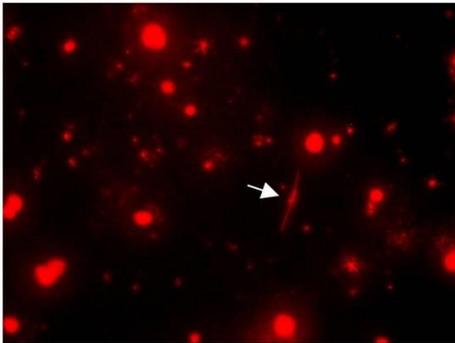
EDXスペクトル



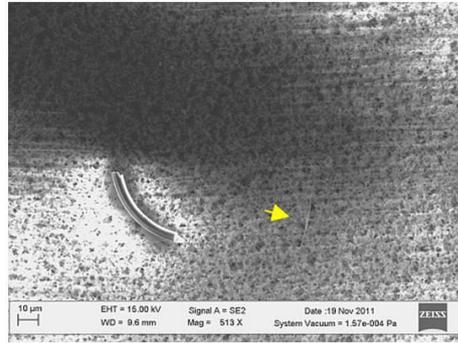
試料 ; No. 01 解体現場

#F003

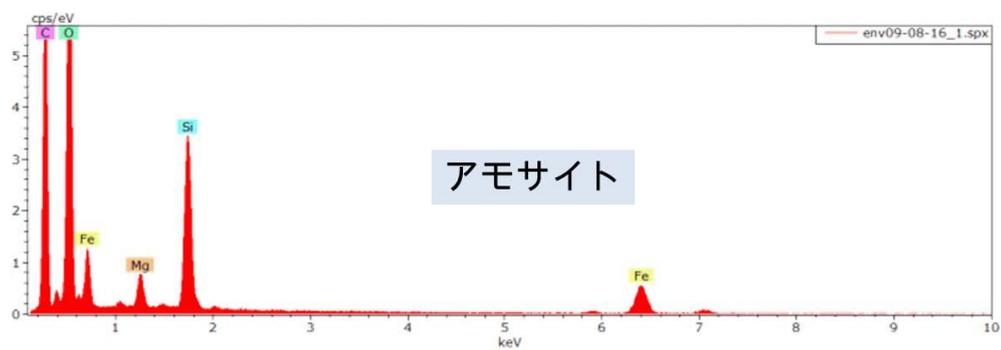
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



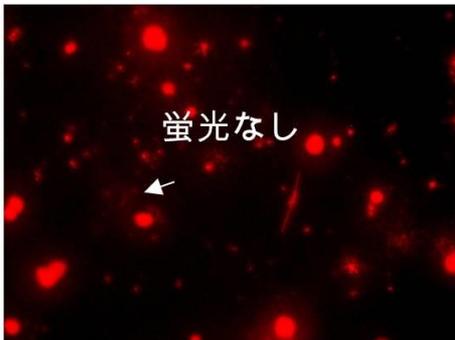
EDXスペクトル



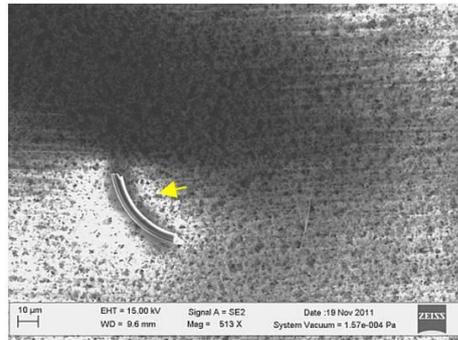
試料 ; No. 01 解体現場

#F004

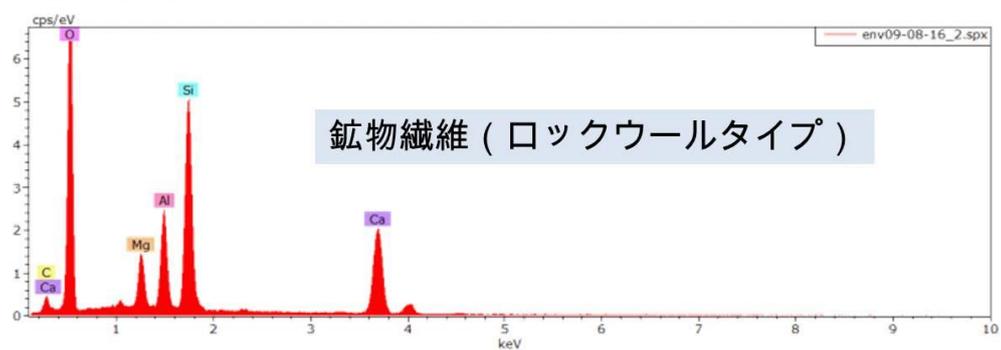
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



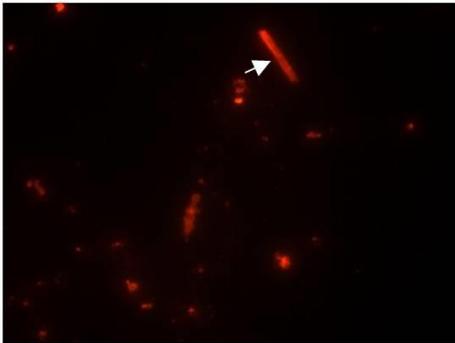
EDXスペクトル



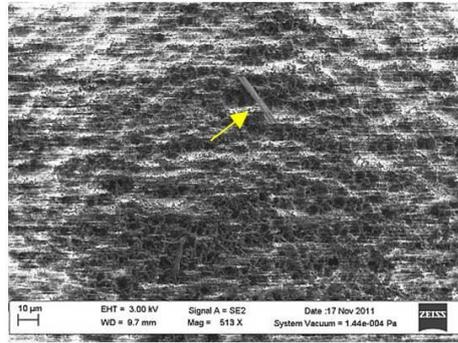
試料 ; No. 02 解体現場

#F005

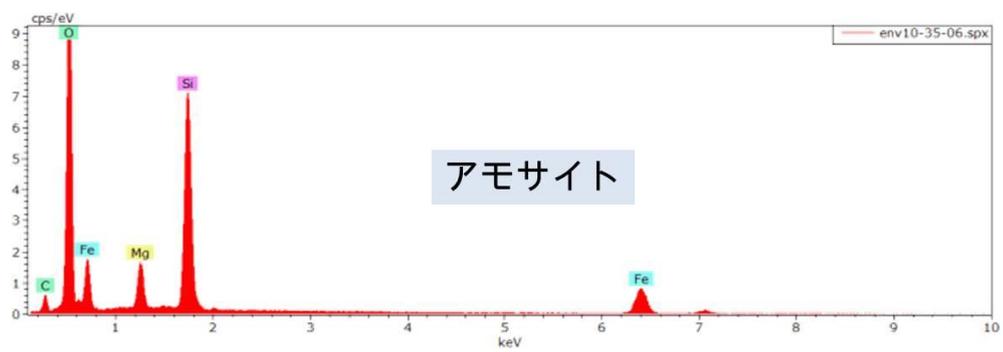
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



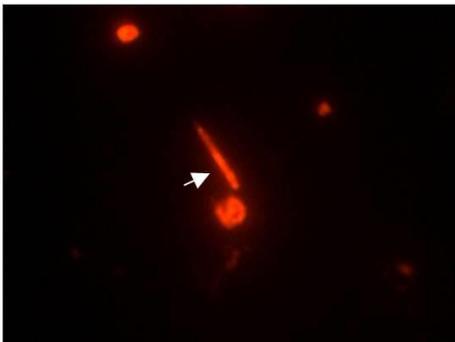
EDXスペクトル



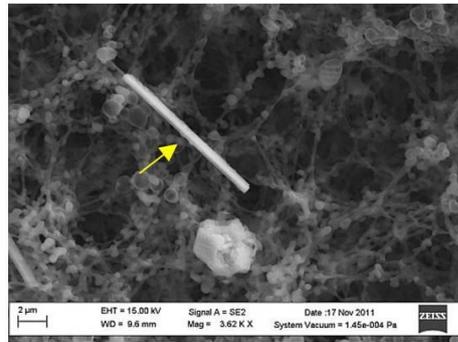
試料 ; No. 02 解体現場

#F006

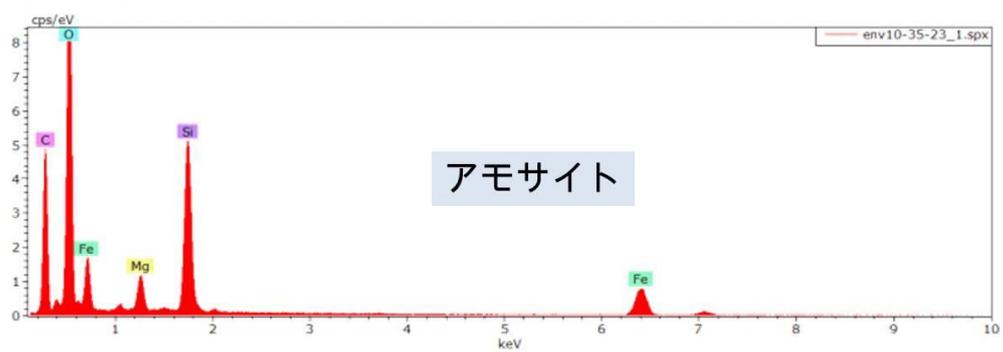
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:3620倍)



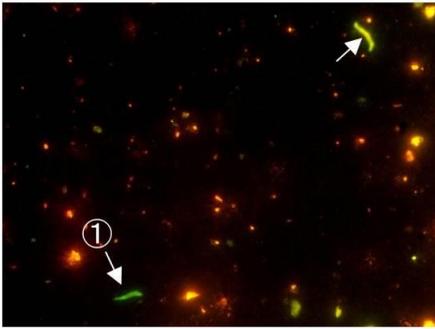
EDXスペクトル



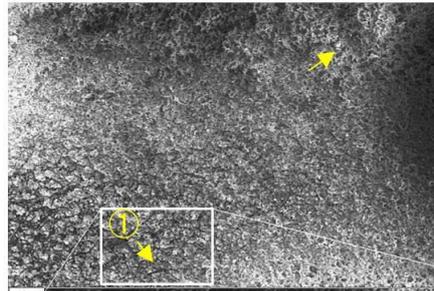
試料 ; No. 03 解体現場

#F007

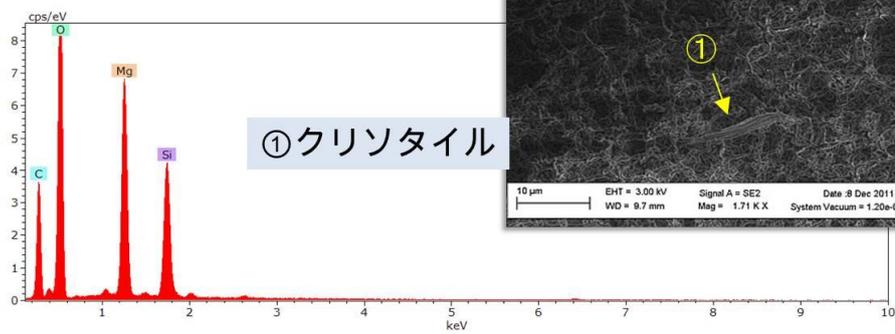
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



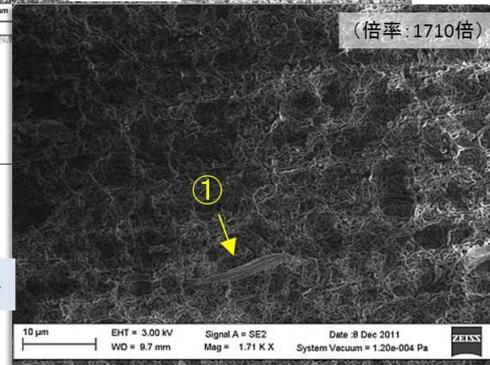
SEM像 (倍率: 434倍)



EDXスペクトル



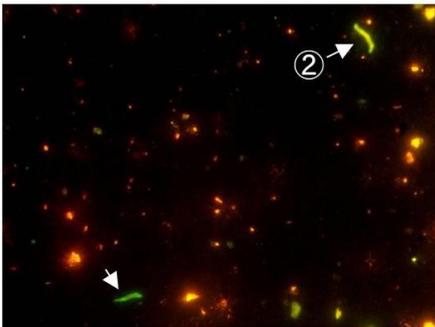
(倍率: 1710倍)



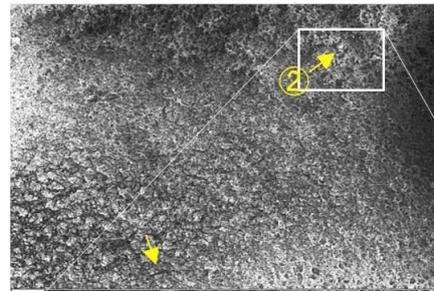
試料 ; No. 03 解体現場

#F008

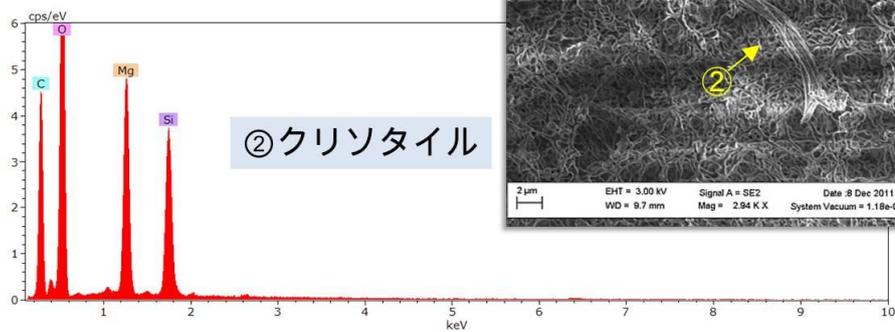
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



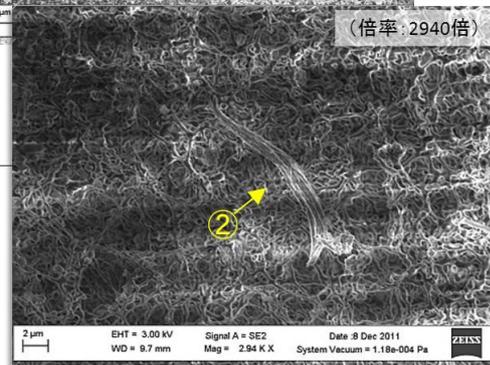
SEM像 (倍率: 434倍)



EDXスペクトル



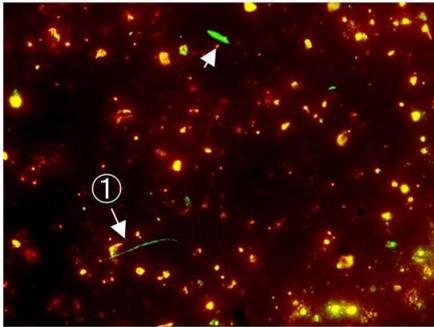
(倍率: 2940倍)



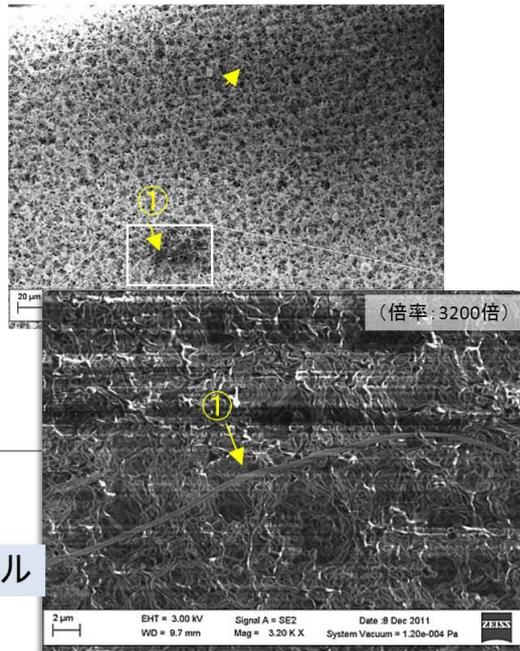
試料 ; No. 03 解体現場

#F009

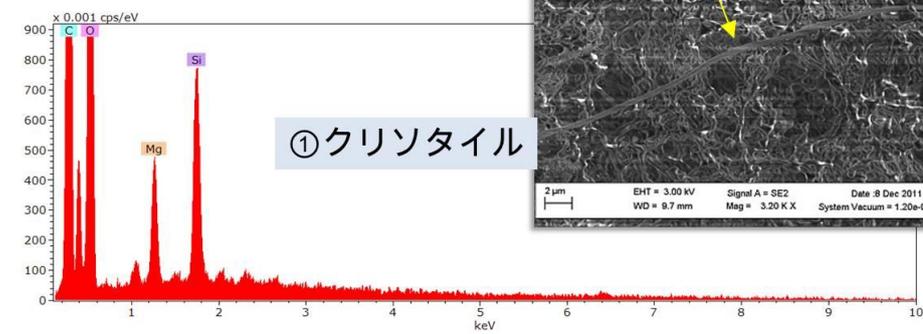
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 492倍)



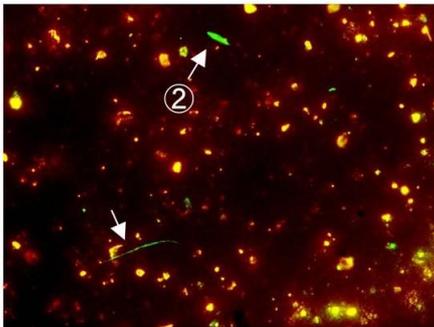
EDXスペクトル



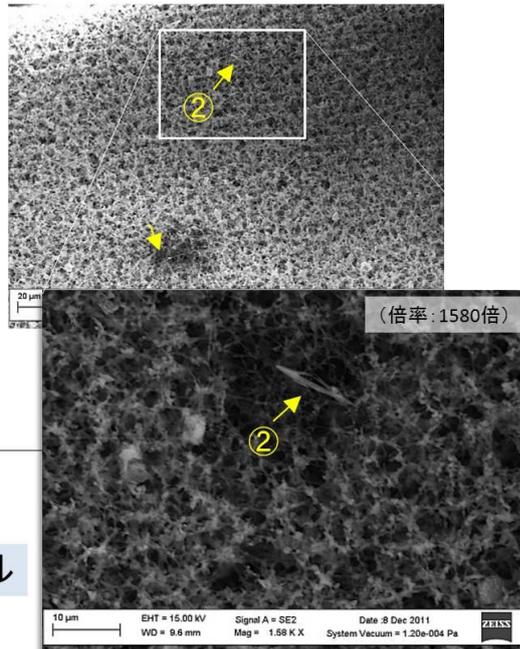
試料 ; No. 03 解体現場

#F010

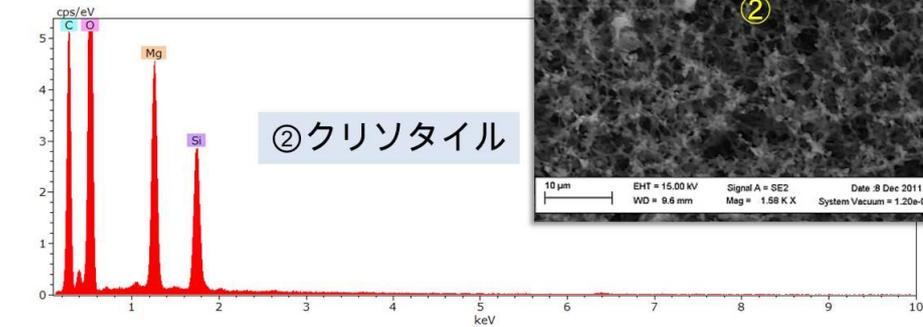
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 492倍)



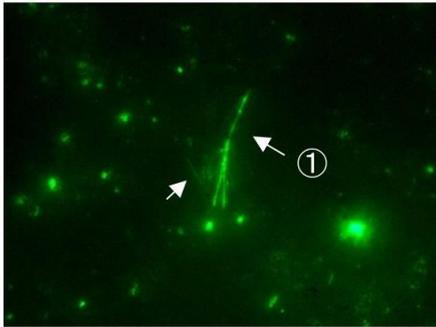
EDXスペクトル



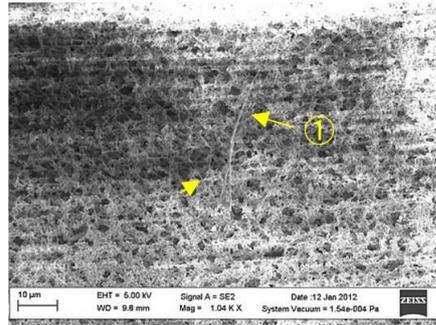
試料 ; No. 04 解体現場

#F011

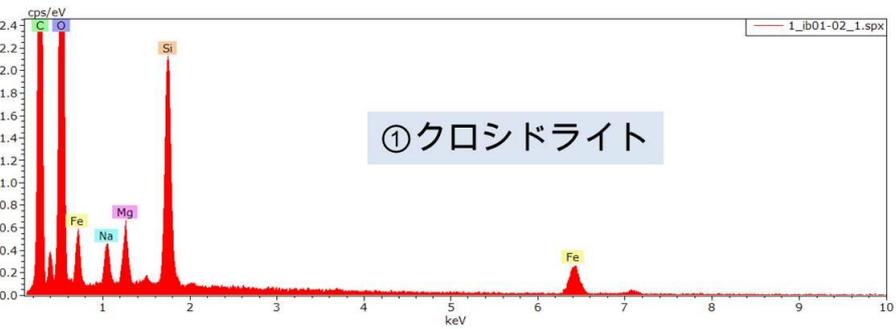
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1040倍)



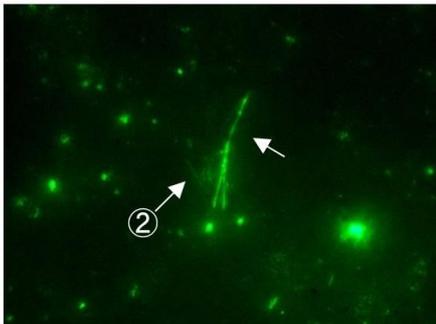
EDXスペクトル



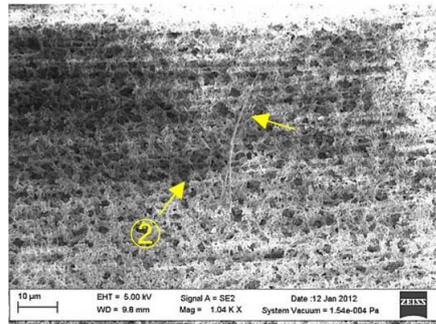
試料 ; No. 04 解体現場

#F012

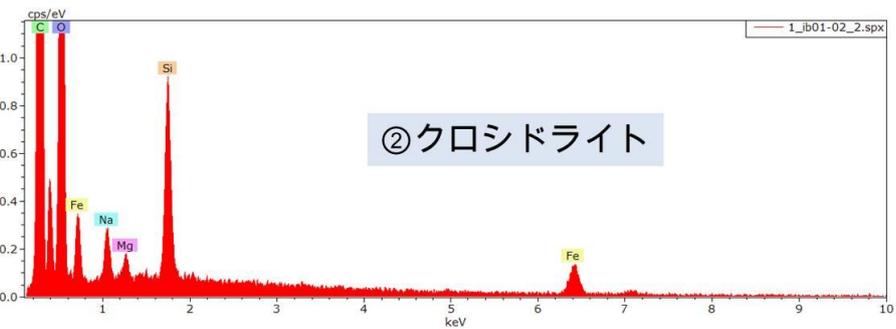
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1040倍)



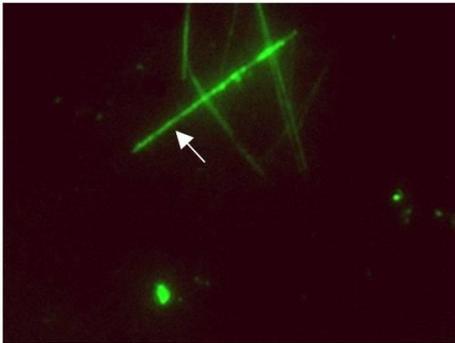
EDXスペクトル



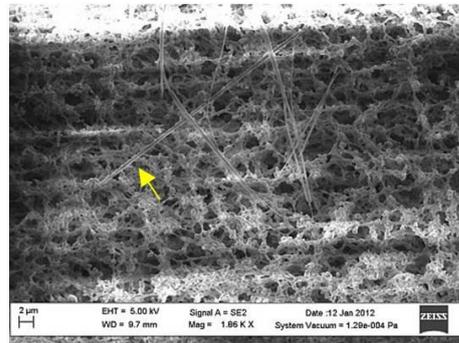
試料 ; No. 04 解体現場

#F013

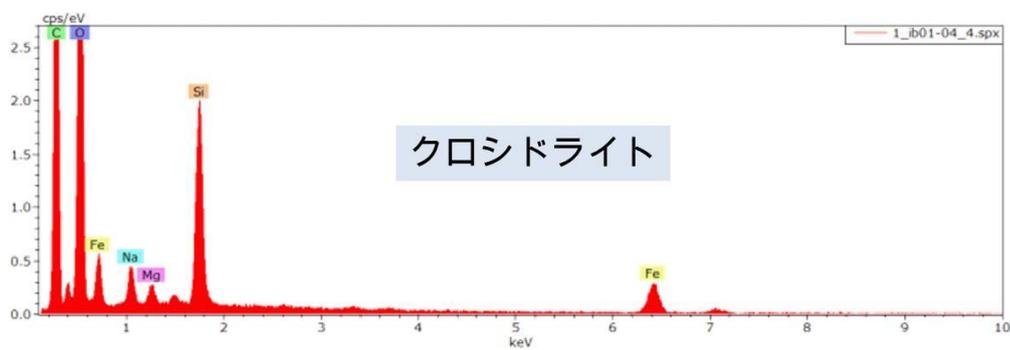
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1860倍)



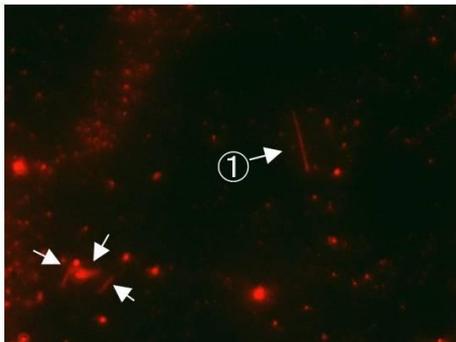
EDXスペクトル



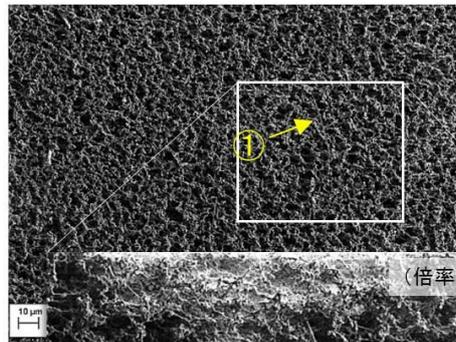
試料 ; No. 05 解体現場

#F014

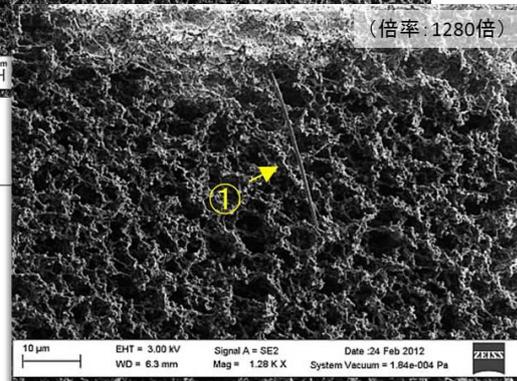
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



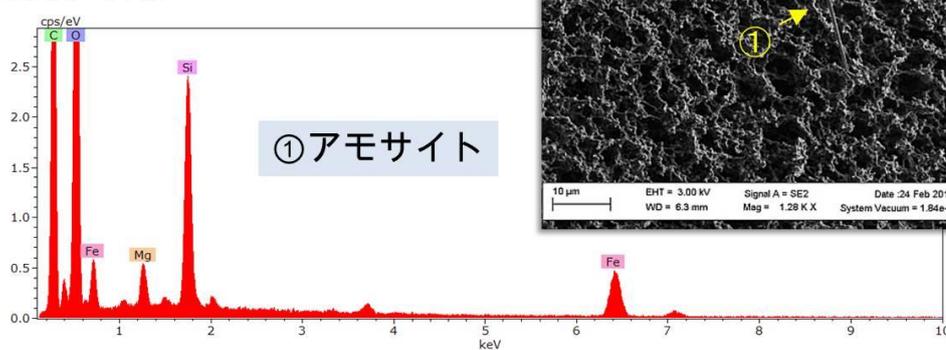
SEM像 (倍率:513倍)



(倍率:1280倍)



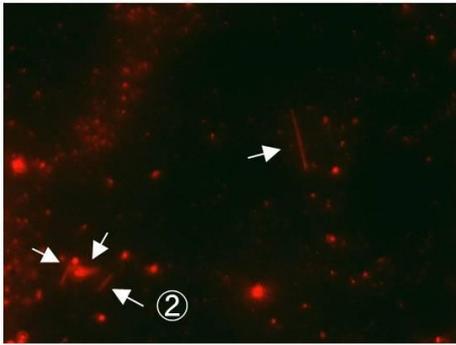
EDXスペクトル



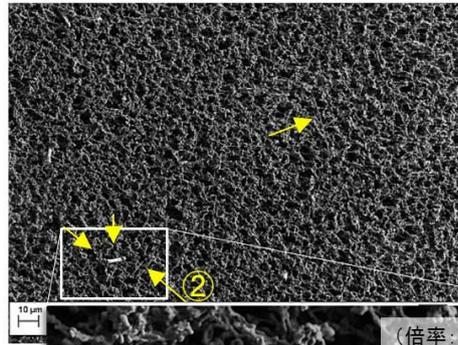
試料 ; No. 05 解体現場

#F015

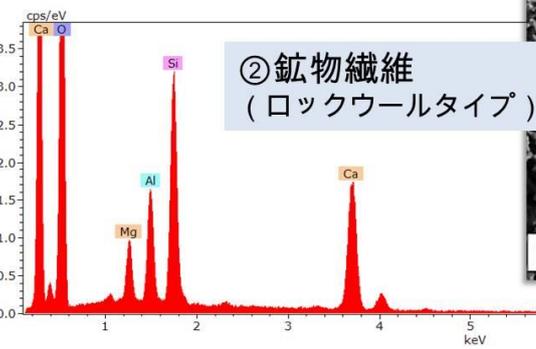
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



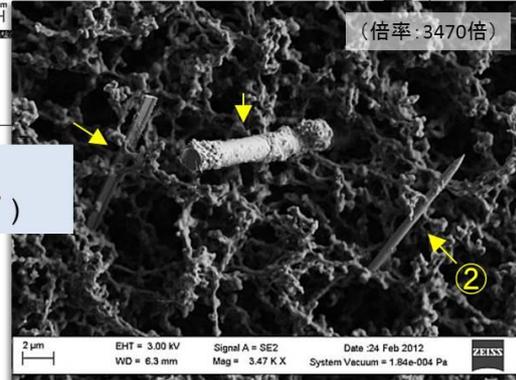
SEM像 (倍率: 513倍)



EDXスペクトル



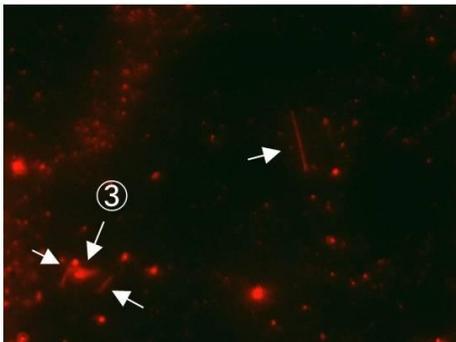
(倍率: 3470倍)



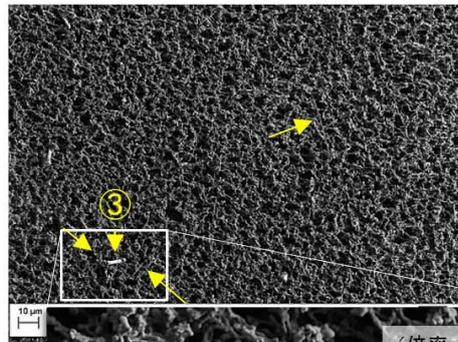
試料 ; No. 05 解体現場

#F016

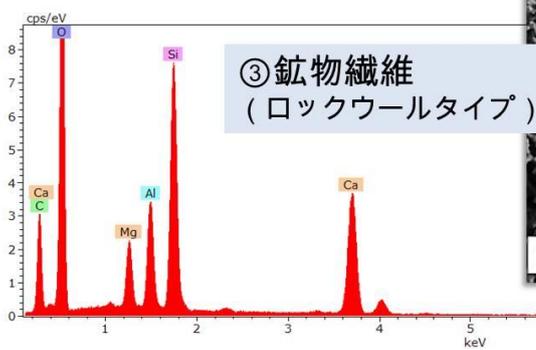
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



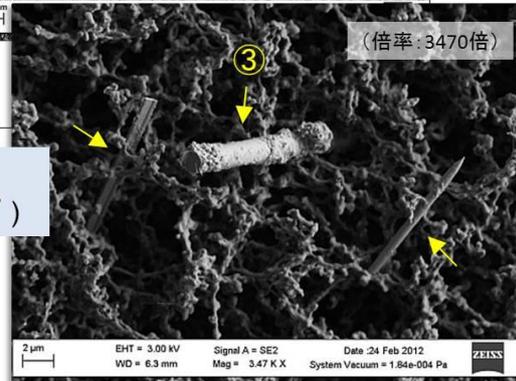
SEM像 (倍率: 513倍)



EDXスペクトル



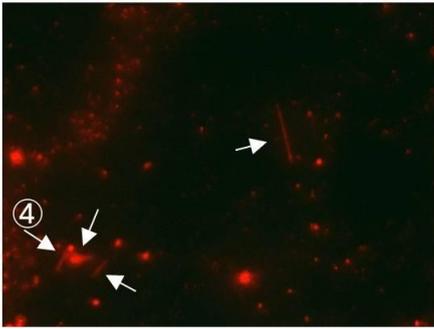
(倍率: 3470倍)



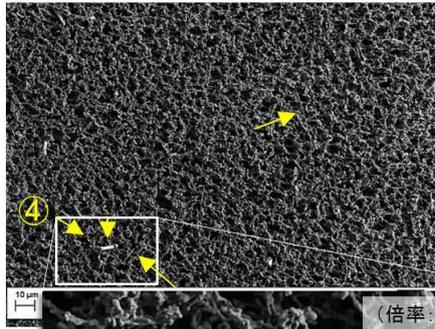
試料 ; No. 05 解体現場

#F017

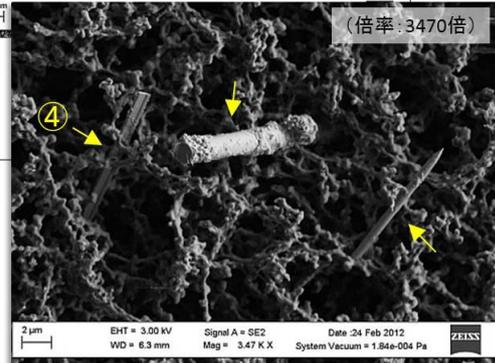
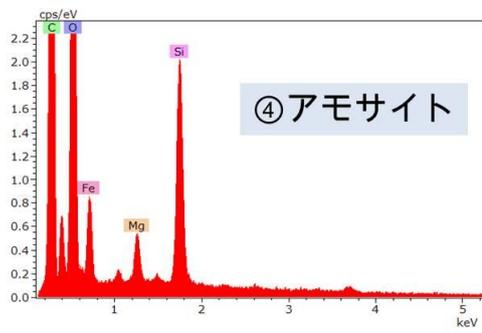
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



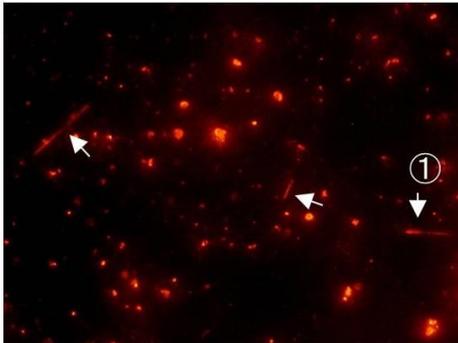
EDXスペクトル



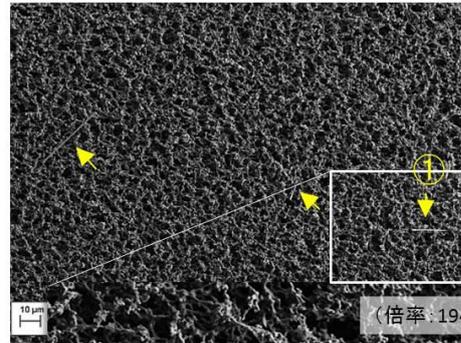
試料 ; No. 05 解体現場

#F018

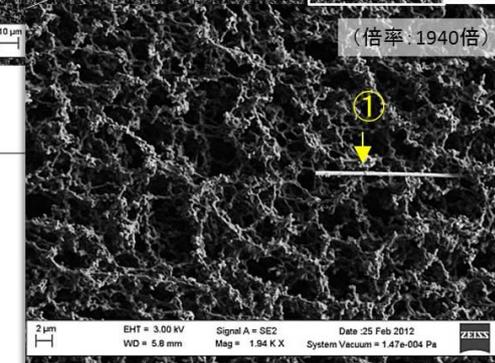
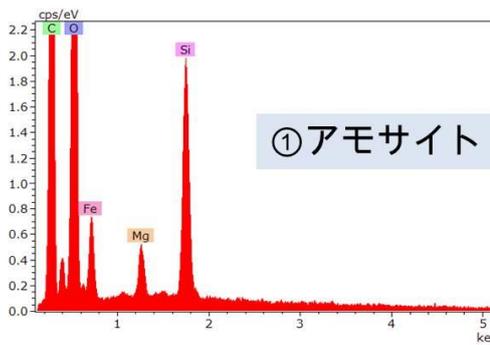
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



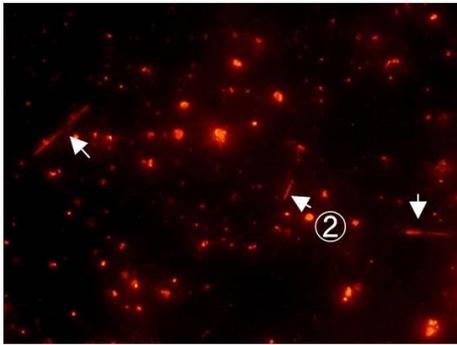
EDXスペクトル



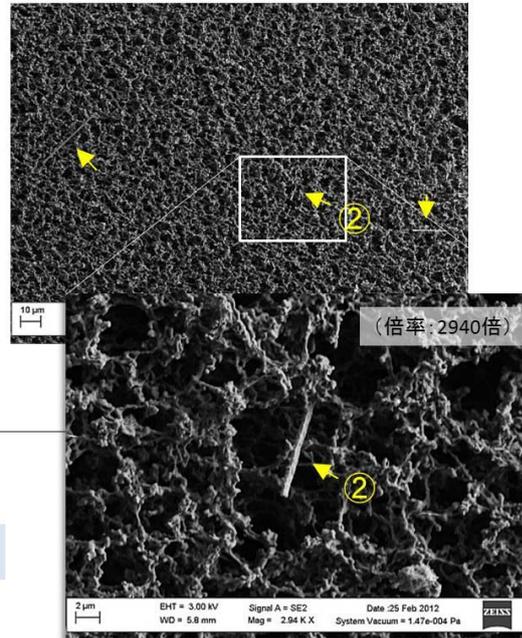
試料 ; No. 05 解体現場

#F019

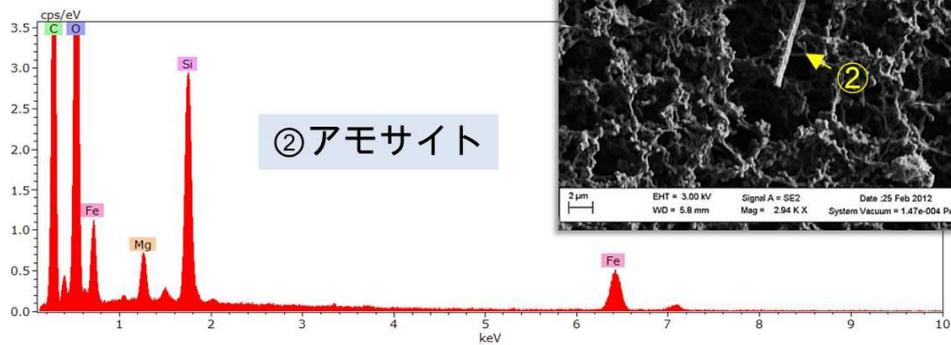
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



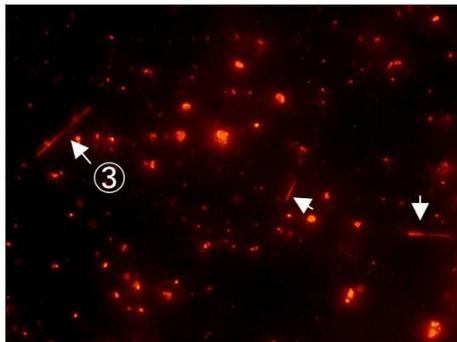
EDXスペクトル



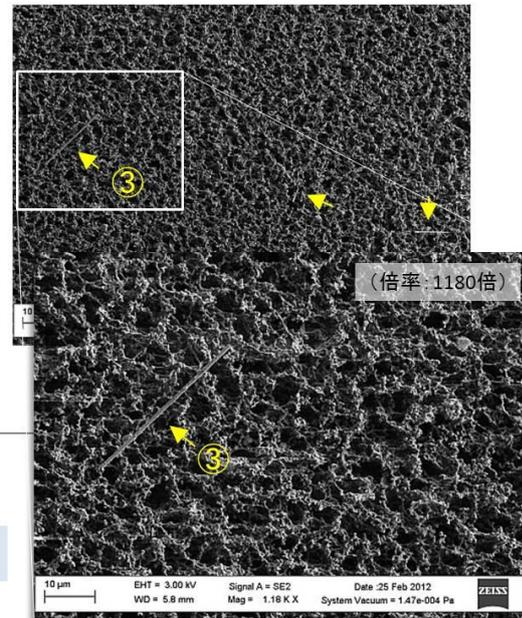
試料 ; No. 05 解体現場

#F020

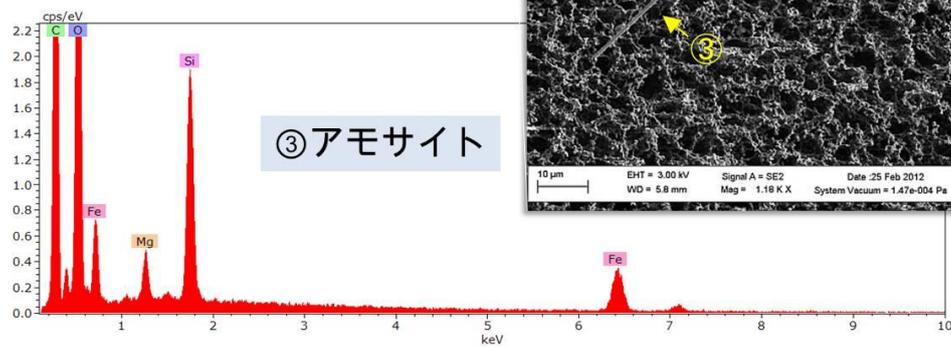
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



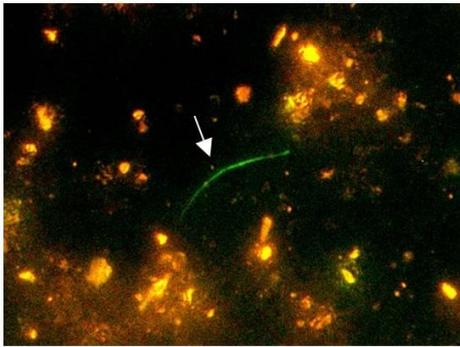
EDXスペクトル



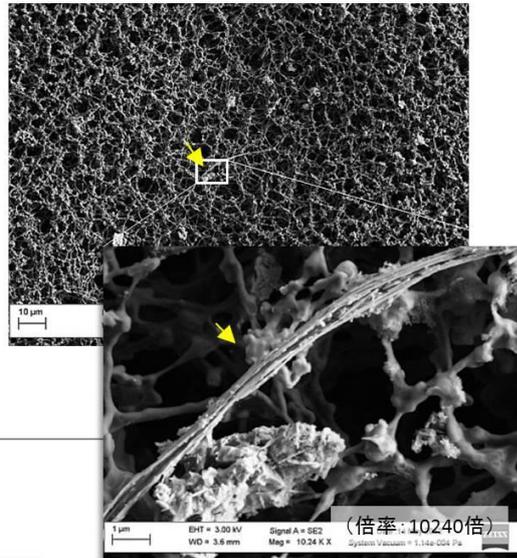
試料 ; No. 06 解体現場

#F021

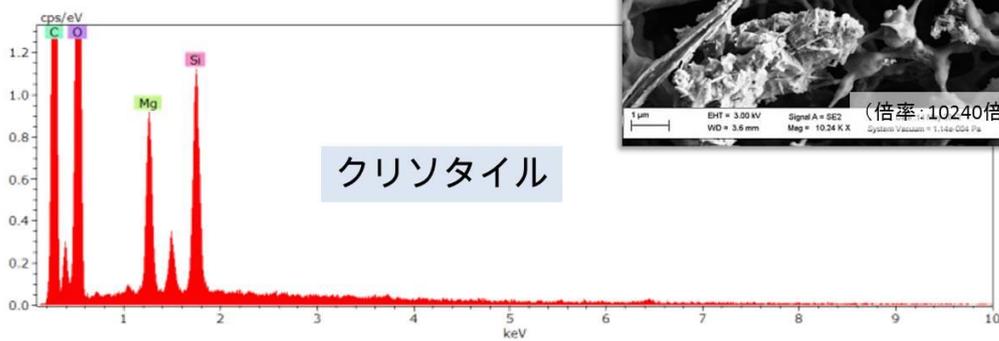
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 686倍)



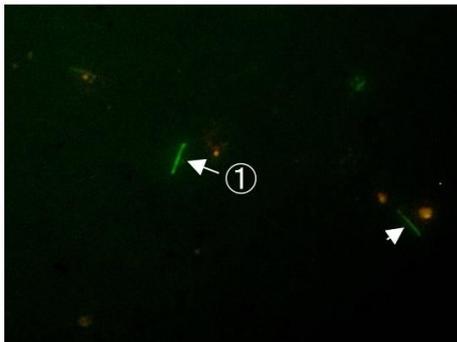
EDXスペクトル



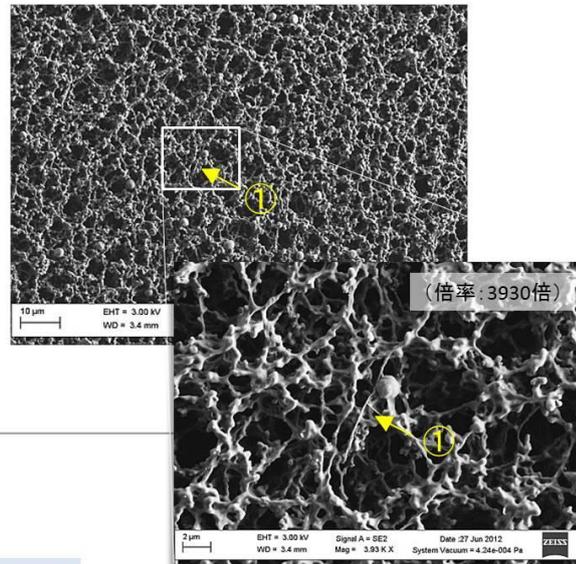
試料 ; No. 07 解体現場

#F022

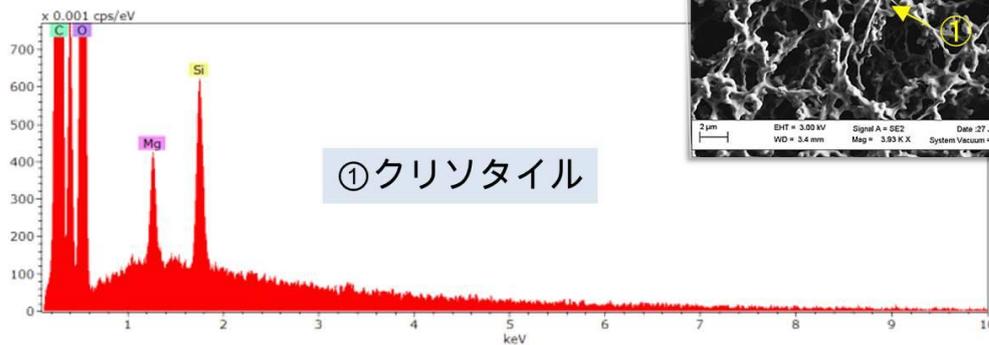
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 997倍)



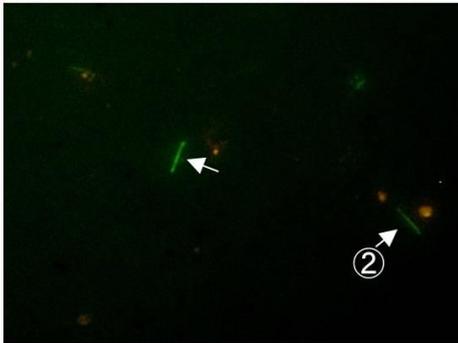
EDXスペクトル



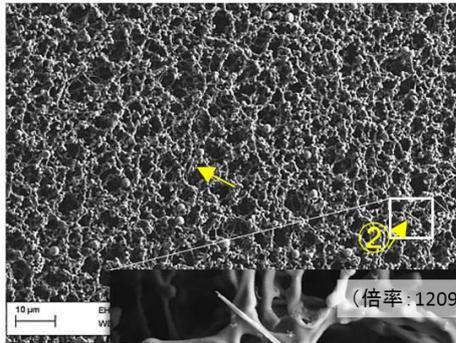
試料 ; No. 07 解体現場

#F023

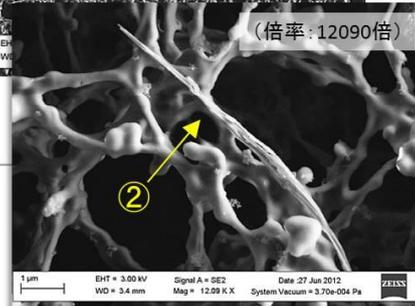
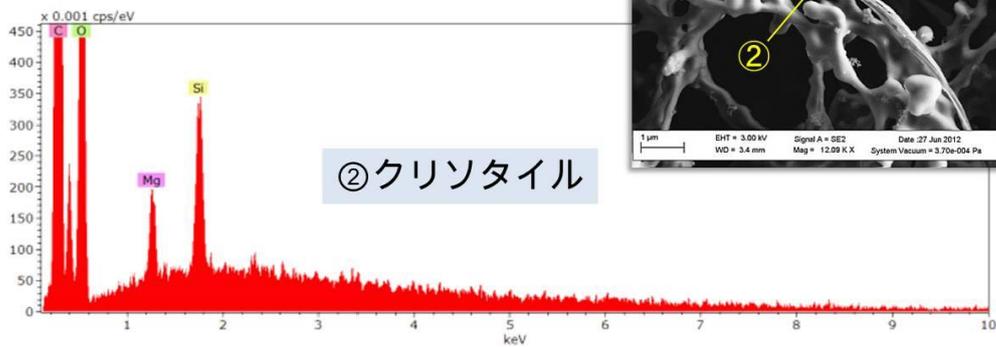
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 997倍)



EDXスペクトル



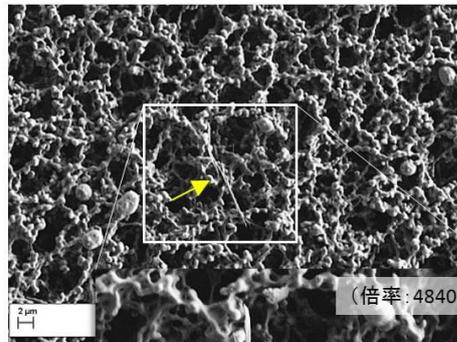
試料 ; No. 07 解体現場

#F024

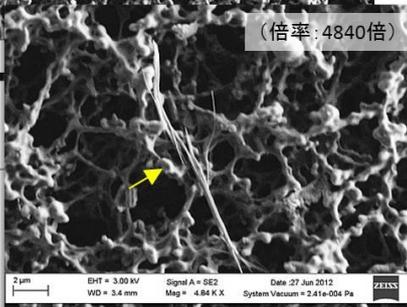
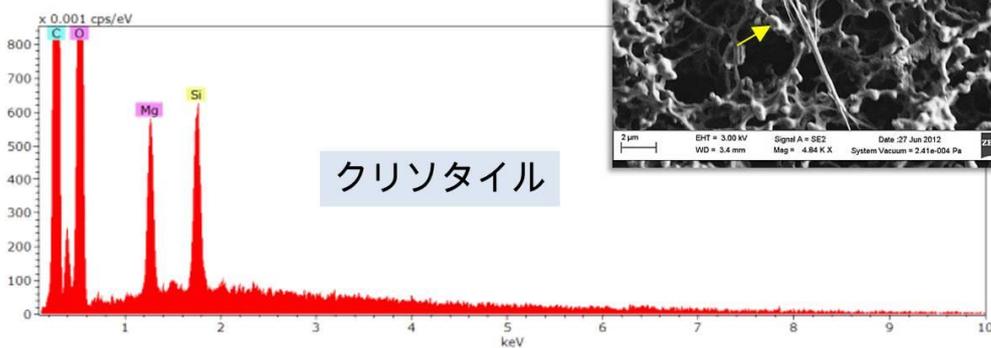
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1940倍)



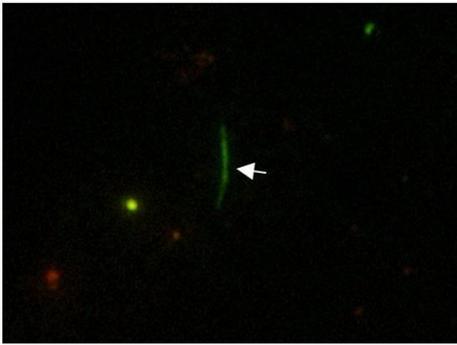
EDXスペクトル



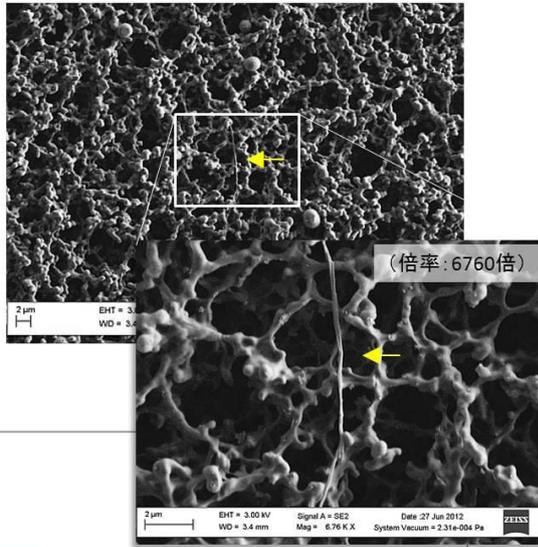
試料 ; No. 07 解体現場

#F025

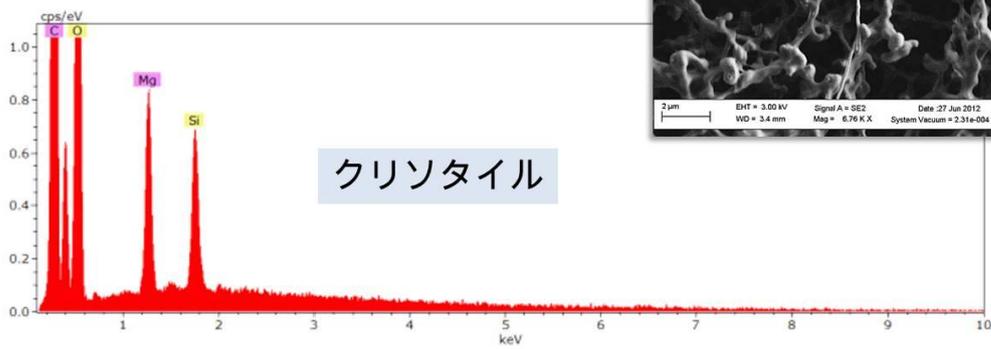
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1860倍)



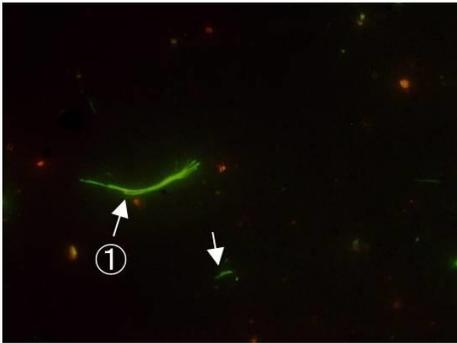
EDXスペクトル



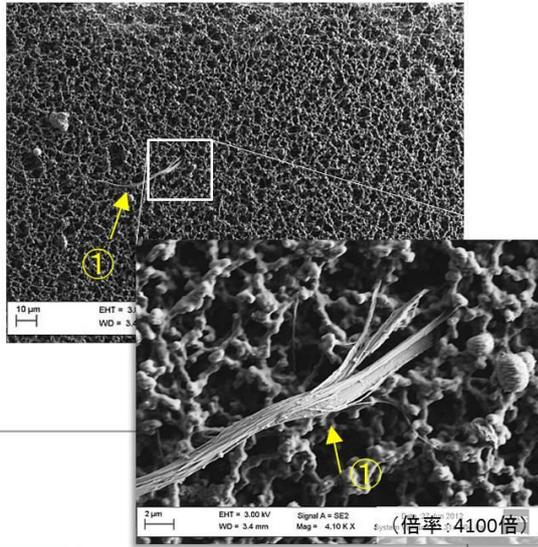
試料 ; No. 07 解体現場

#F026

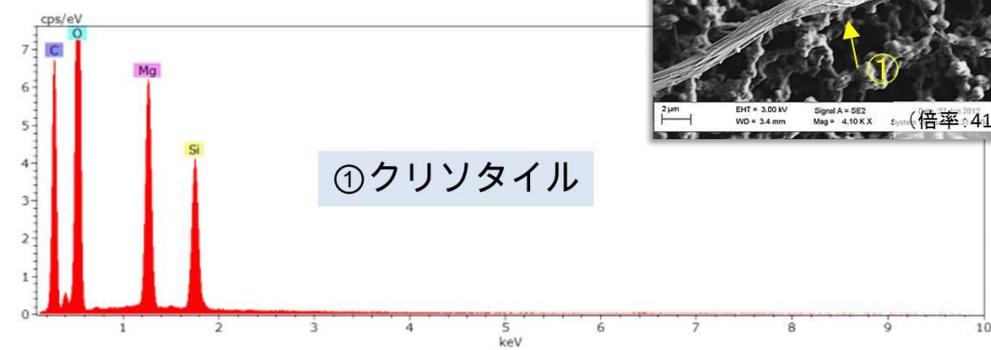
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 513倍)



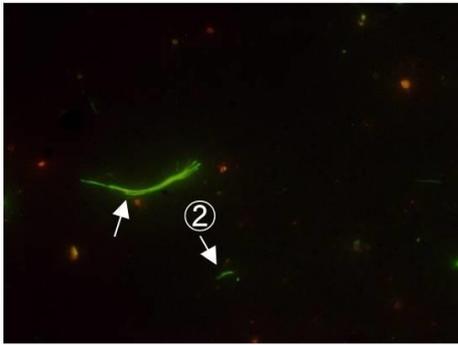
EDXスペクトル



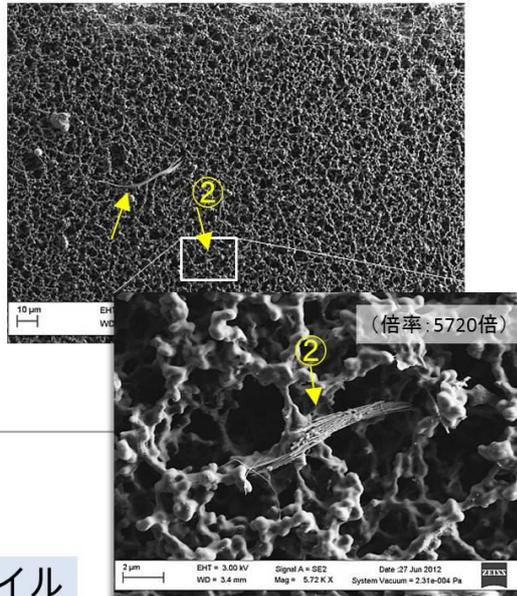
試料 ; No. 07 解体現場

#F027

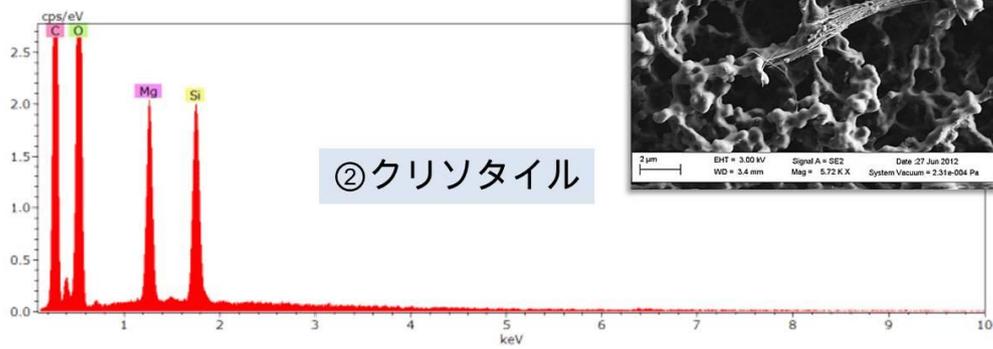
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



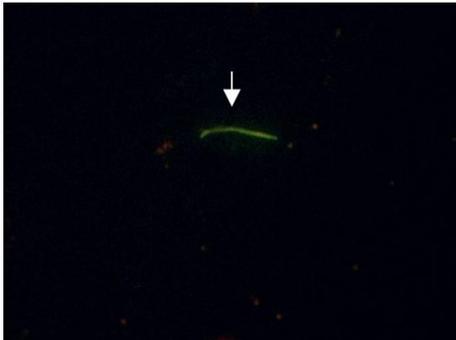
EDXスペクトル



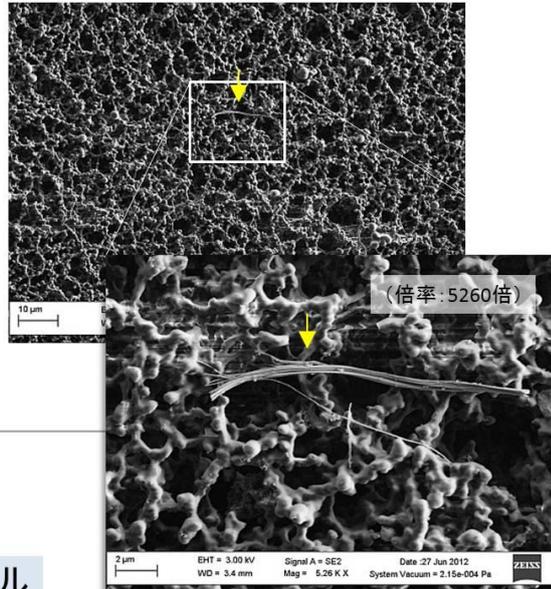
試料 ; No. 07 解体現場

#F028

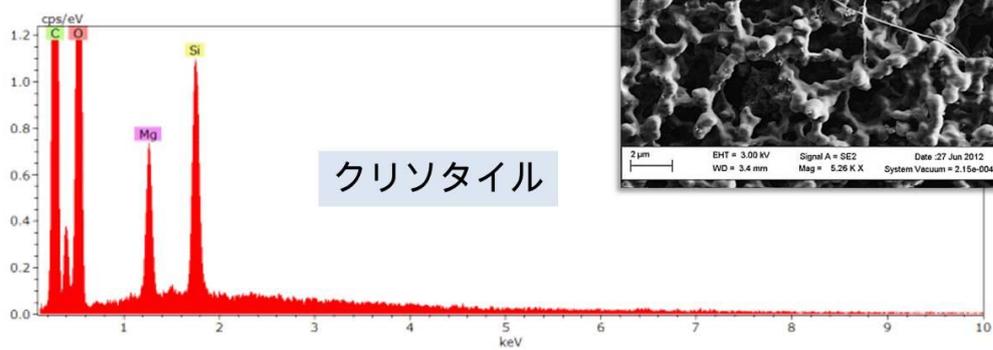
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:997倍)



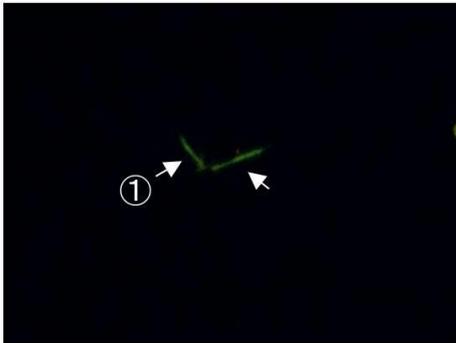
EDXスペクトル



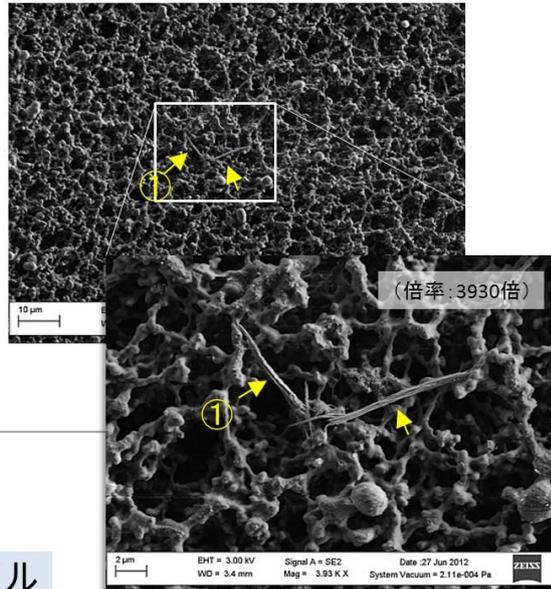
試料 ; No. 07 解体現場

#F029

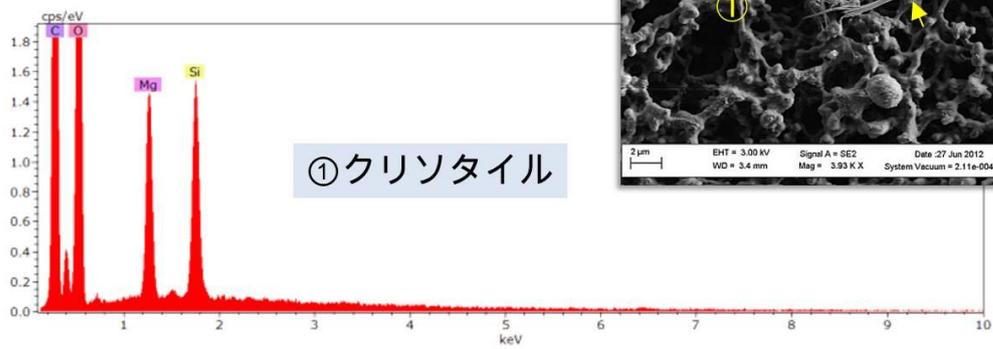
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:997倍)



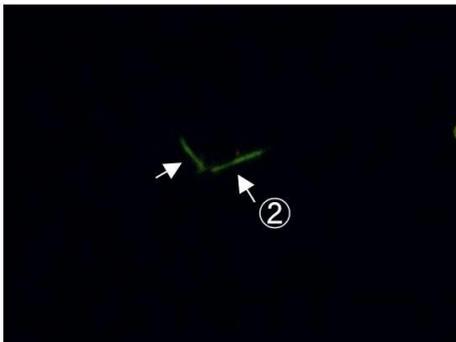
EDXスペクトル



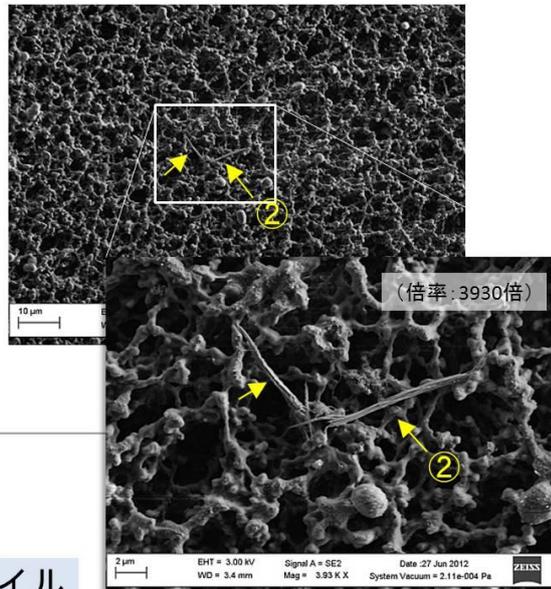
試料 ; No. 07 解体現場

#F030

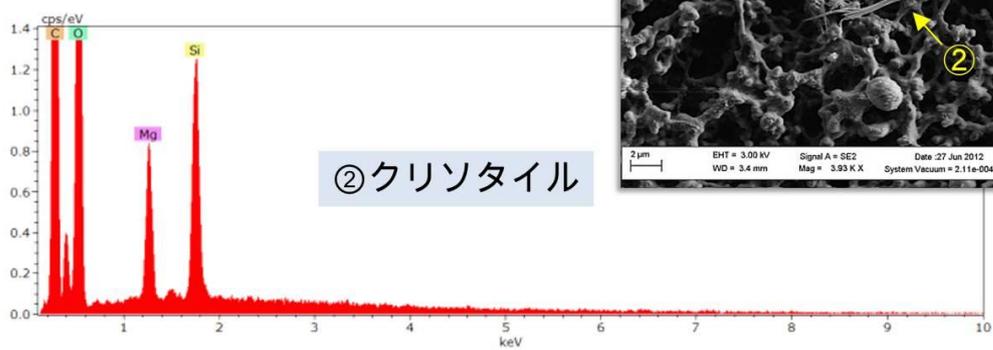
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:997倍)



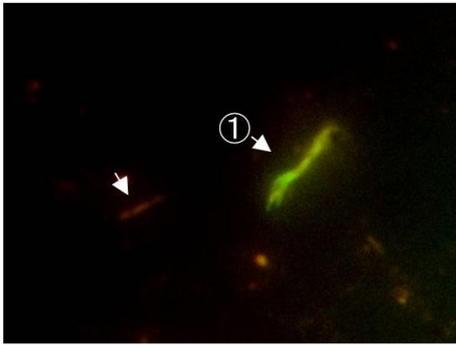
EDXスペクトル



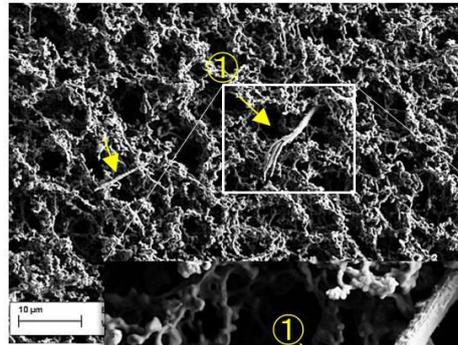
試料 ; No. 08 解体現場

#F031

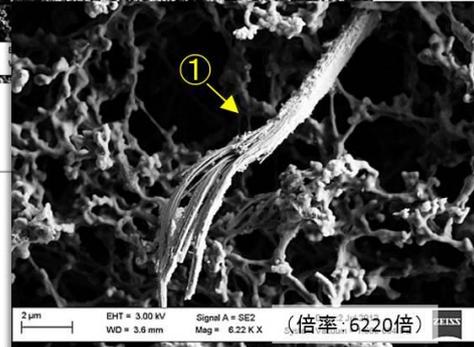
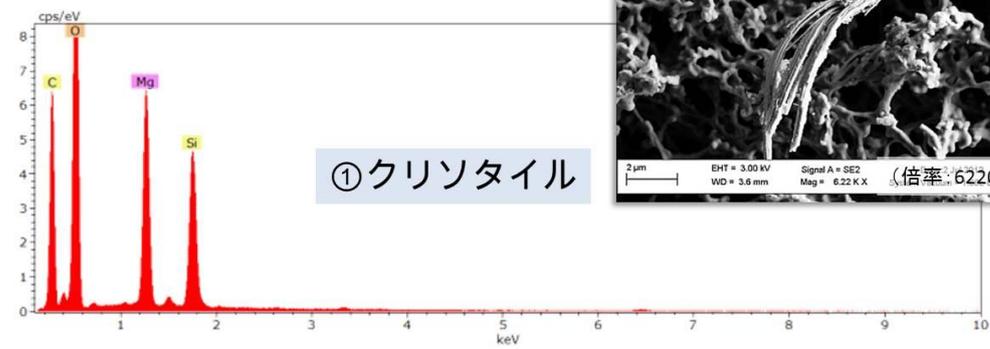
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1580倍)



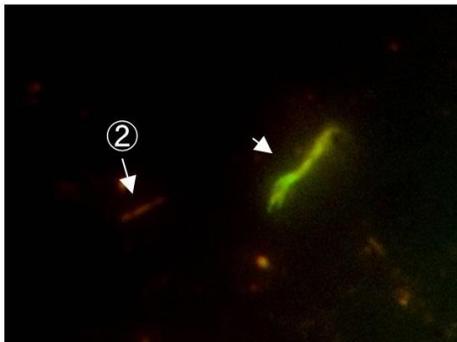
EDXスペクトル



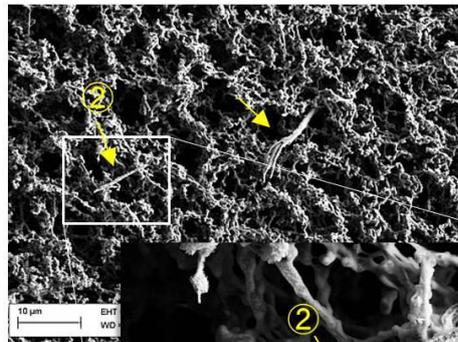
試料 ; No. 08 解体現場

#F032

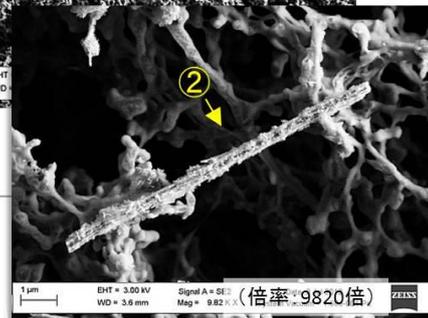
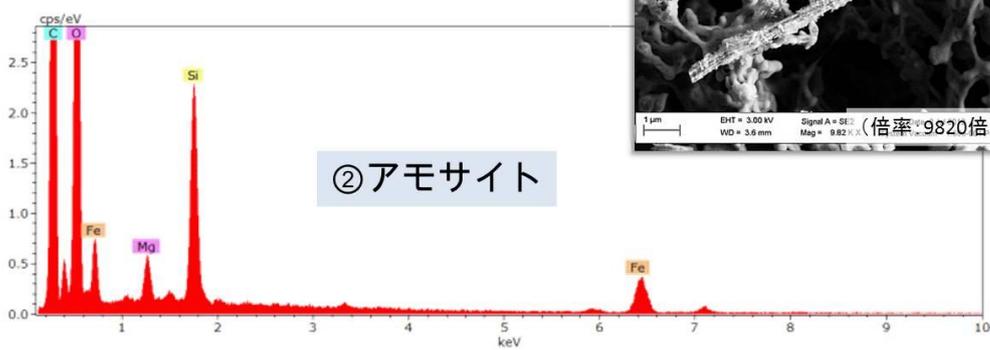
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1580倍)



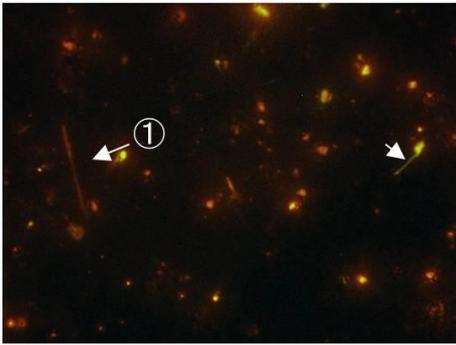
EDXスペクトル



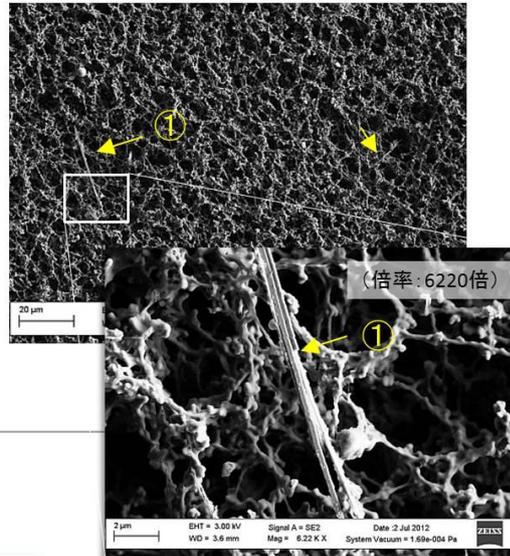
試料 ; No. 08 解体現場

#F033

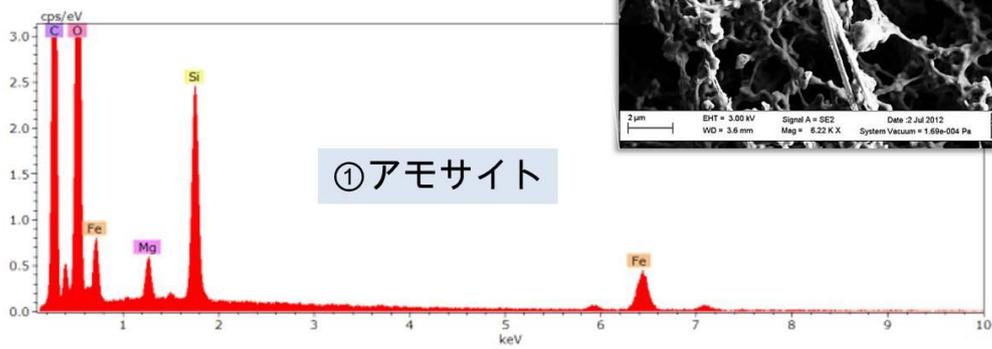
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 686倍)



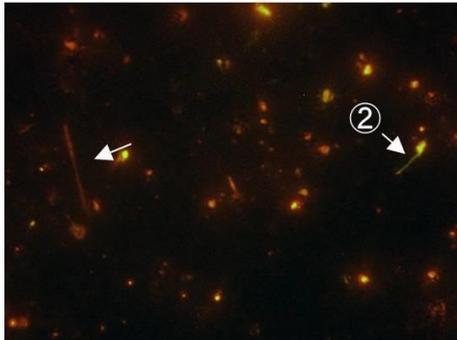
EDXスペクトル



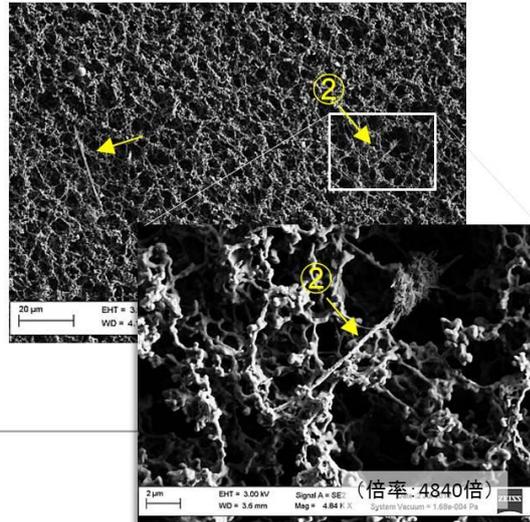
試料 ; No. 08 解体現場

#F034

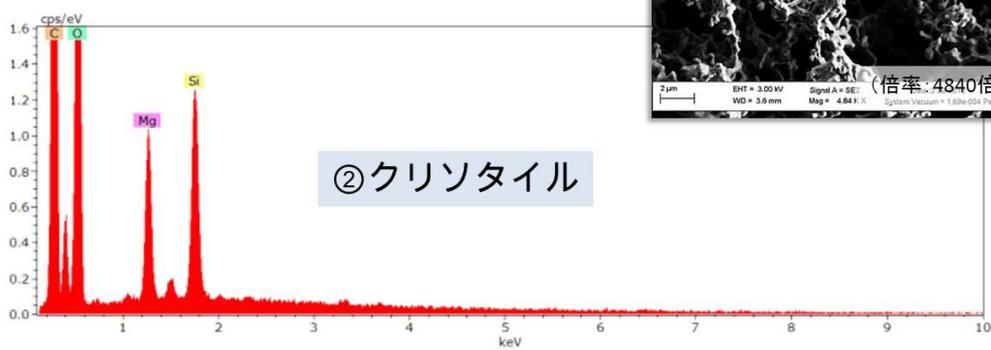
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 686倍)



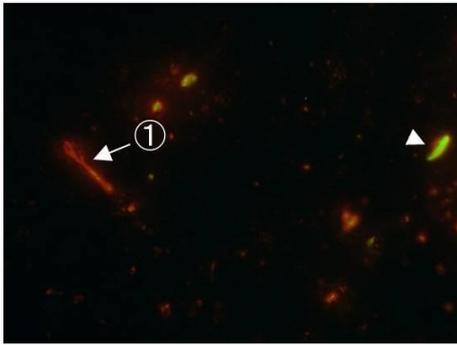
EDXスペクトル



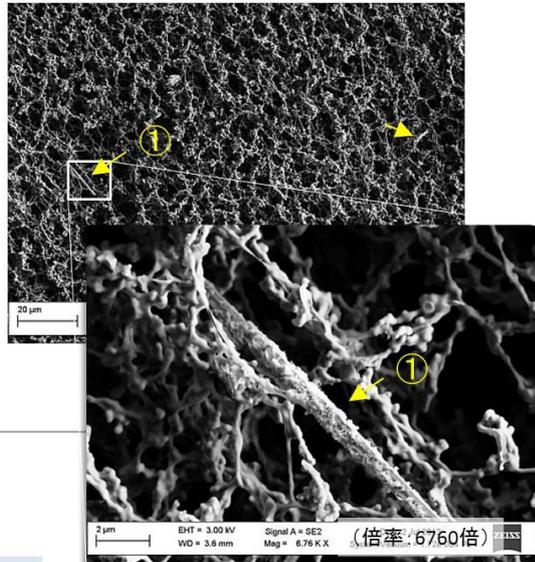
試料 ; No. 08 解体現場

#F035

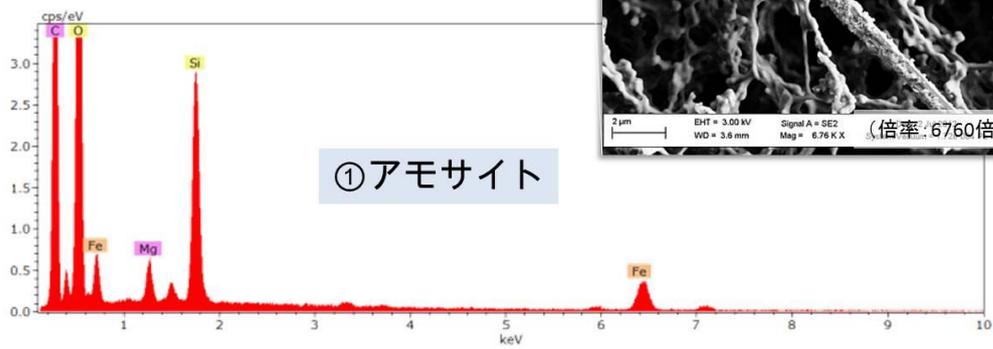
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:745倍)



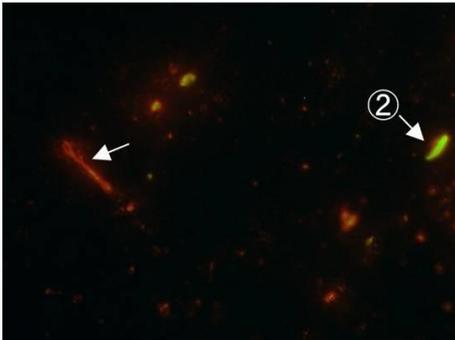
EDXスペクトル



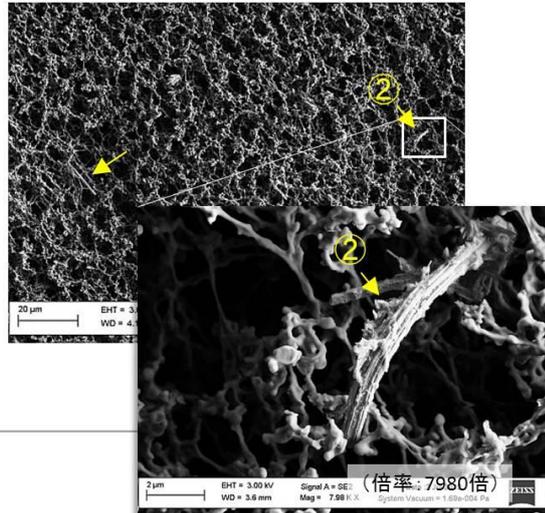
試料 ; No. 08 解体現場

#F036

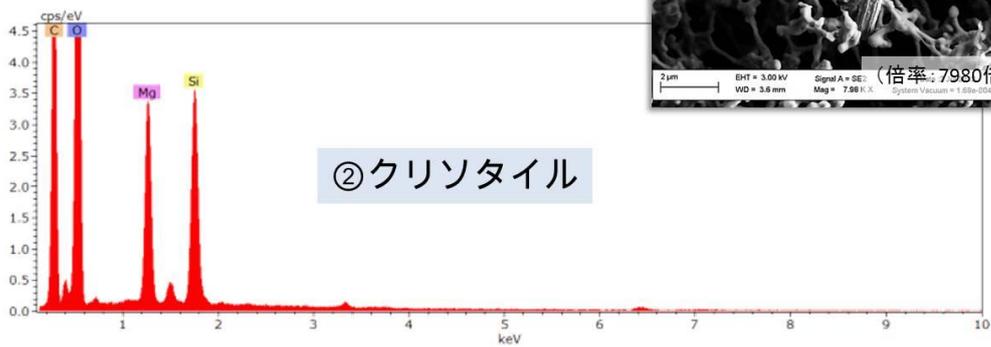
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:745倍)



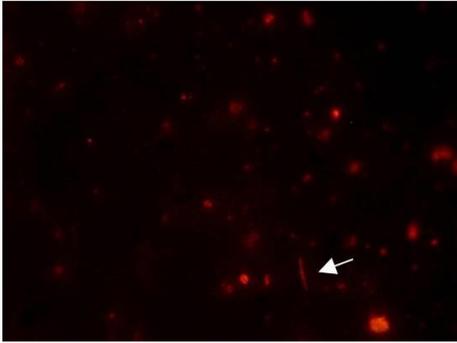
EDXスペクトル



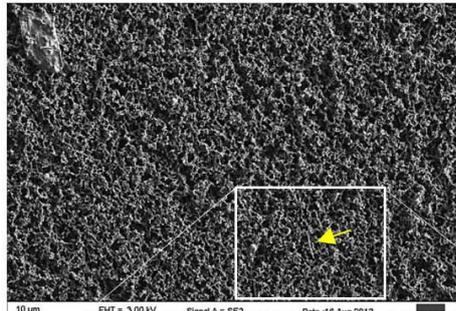
試料 ; No. 09 解体現場

#F037

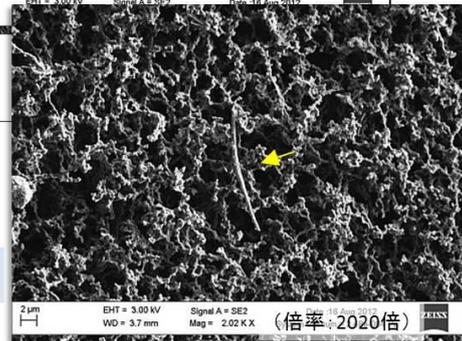
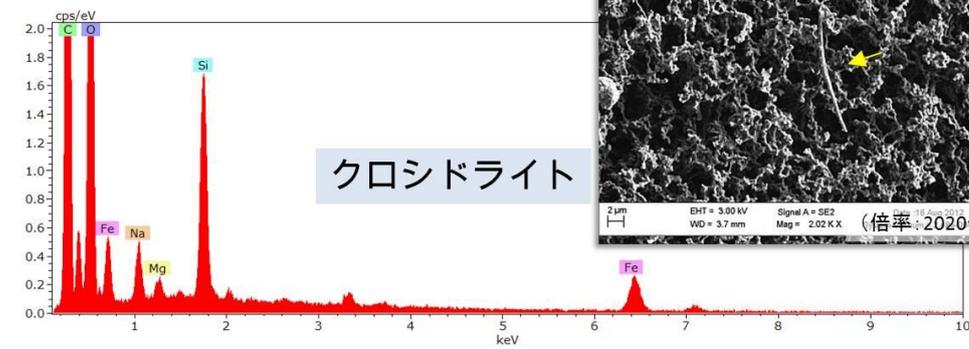
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



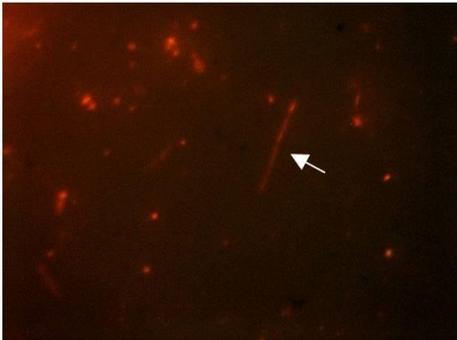
EDXスペクトル



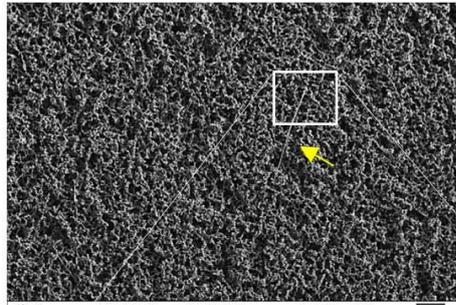
試料 ; No. 09 解体現場

#F038

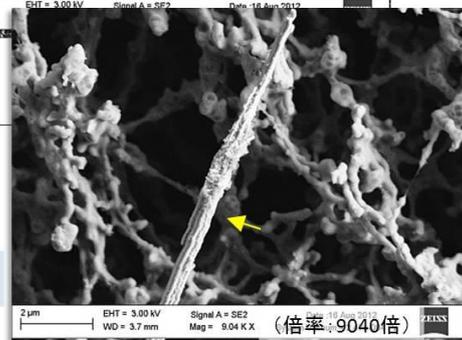
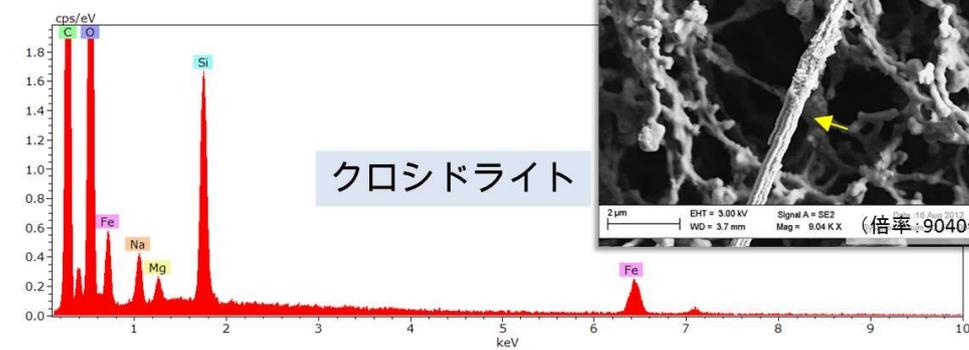
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



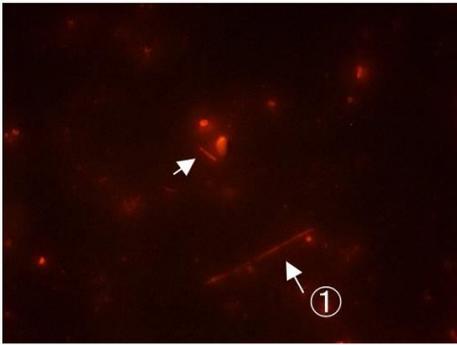
EDXスペクトル



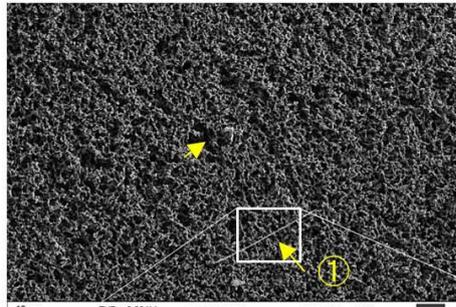
試料 ; No. 10 解体現場

#F039

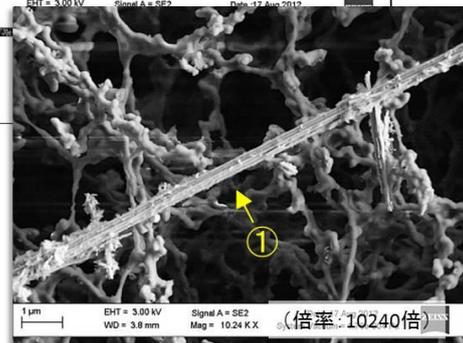
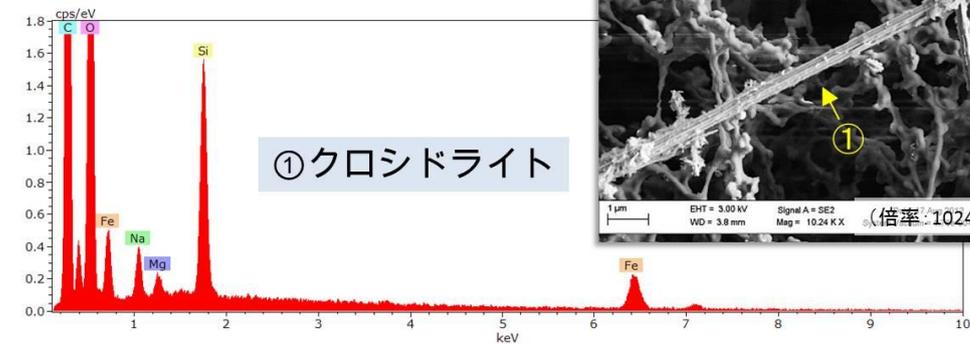
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



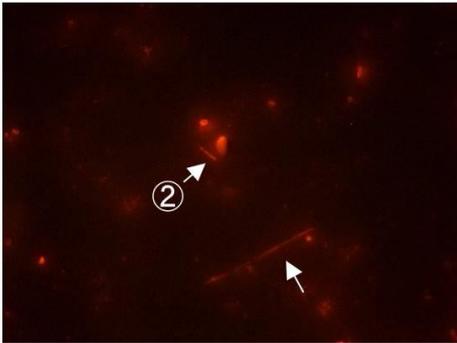
EDXスペクトル



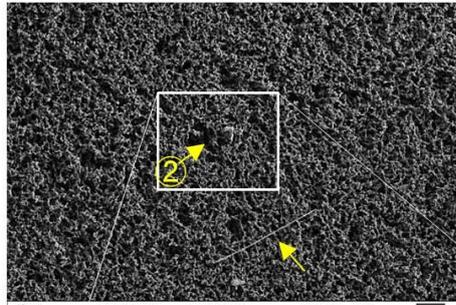
試料 ; No. 10 解体現場

#F040

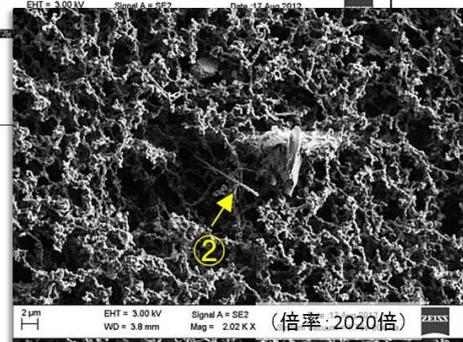
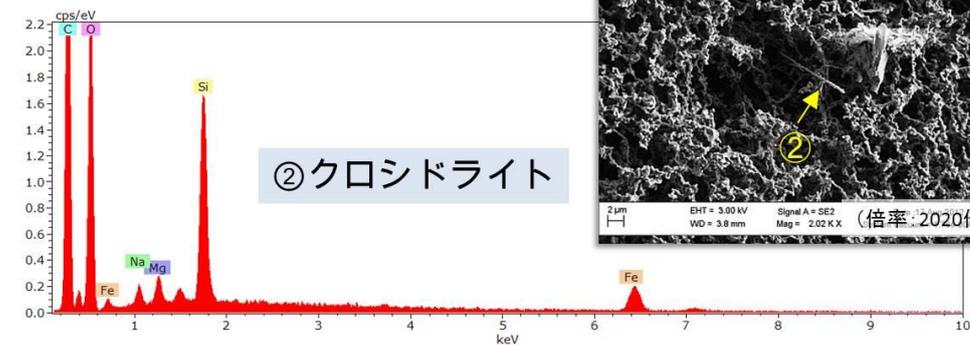
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



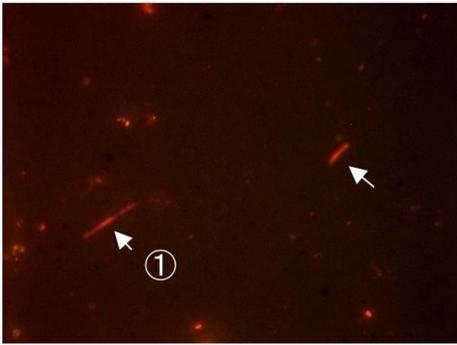
EDXスペクトル



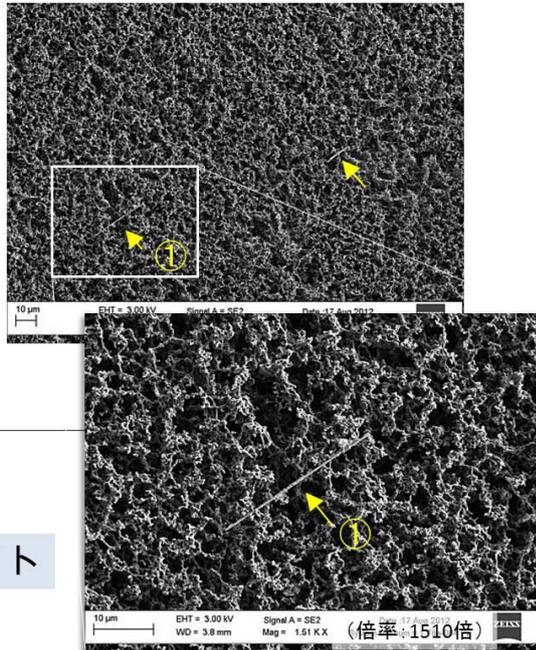
試料 ; No. 10 解体現場

#F041

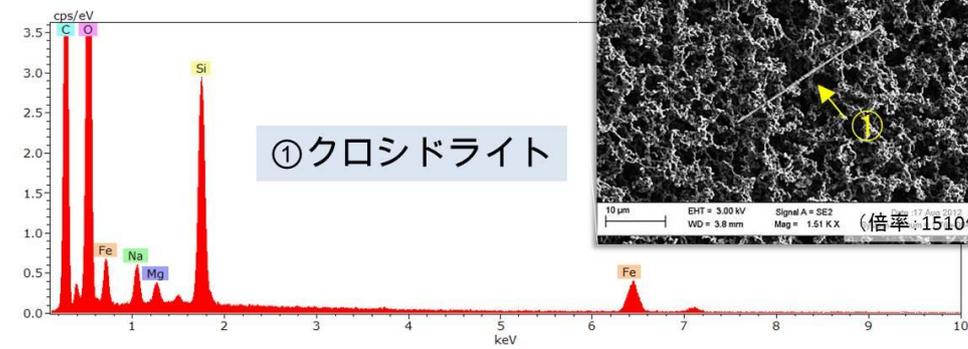
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



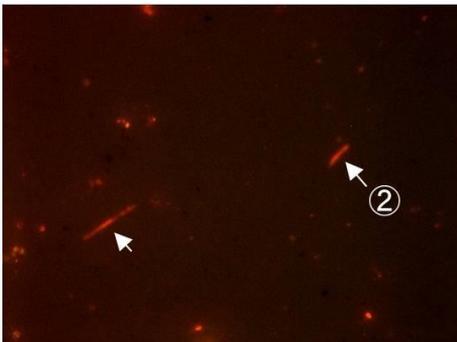
EDXスペクトル



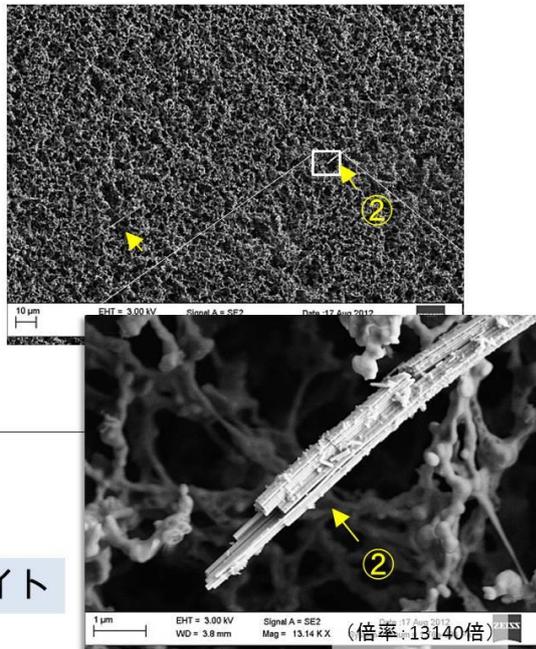
試料 ; No. 10 解体現場

#F042

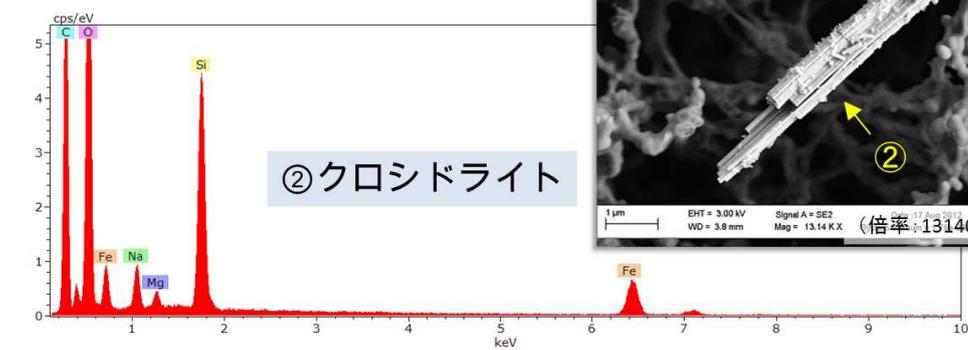
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



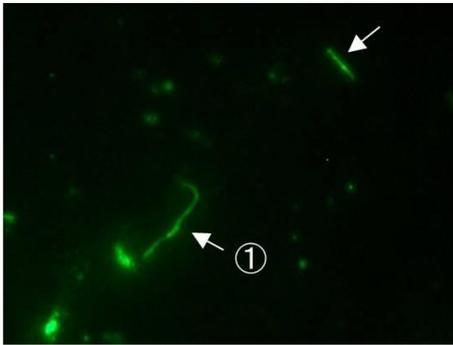
EDXスペクトル



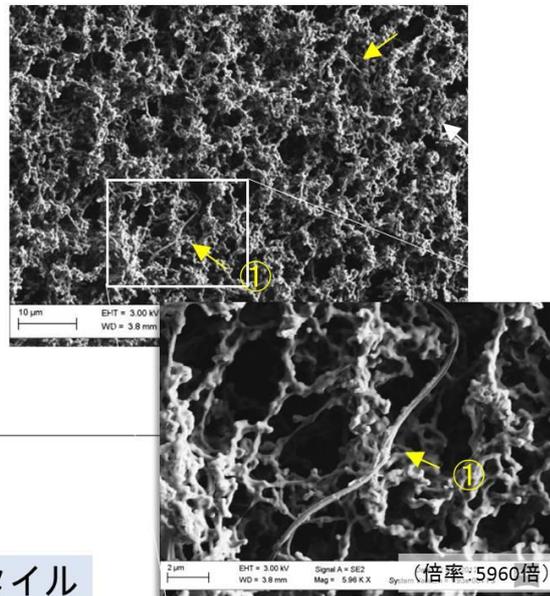
試料 ; No. 11 解体現場

#F043

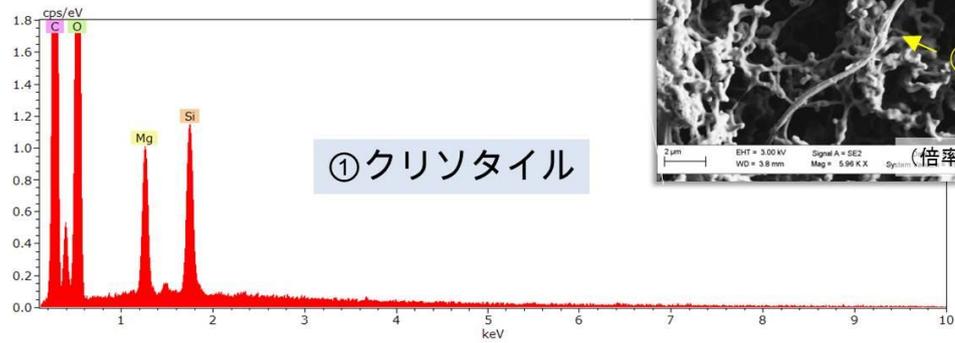
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1450倍)



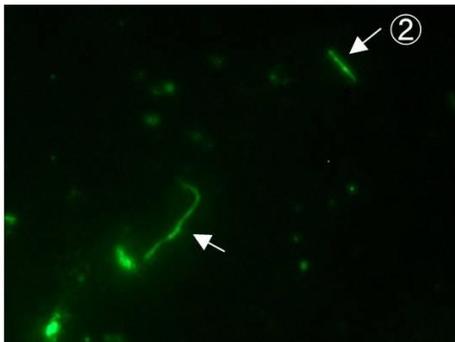
EDXスペクトル



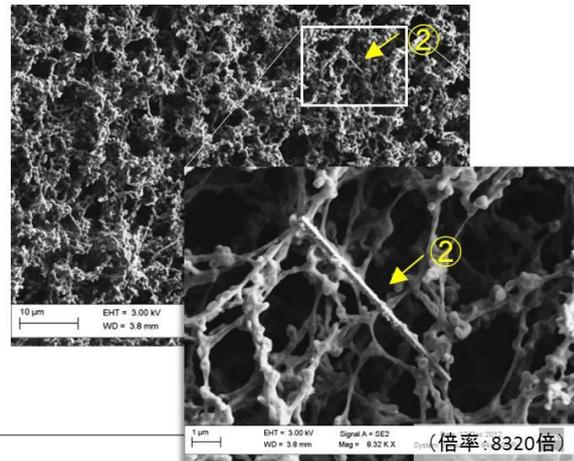
試料 ; No. 11 解体現場

#F044

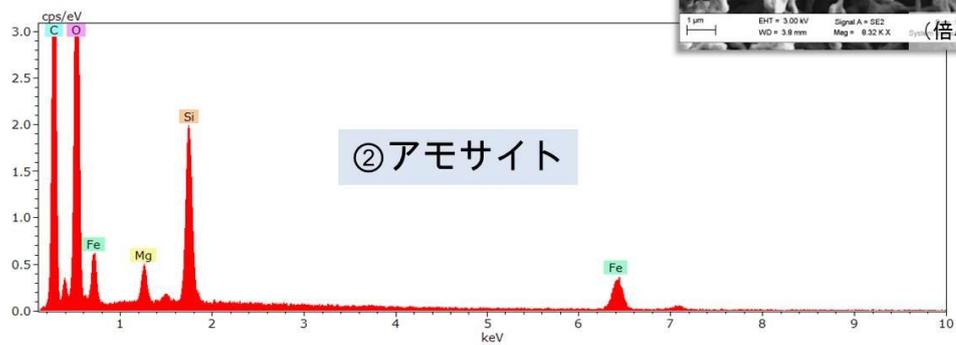
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1450倍)



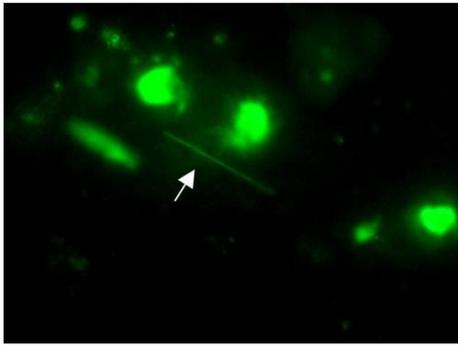
EDXスペクトル



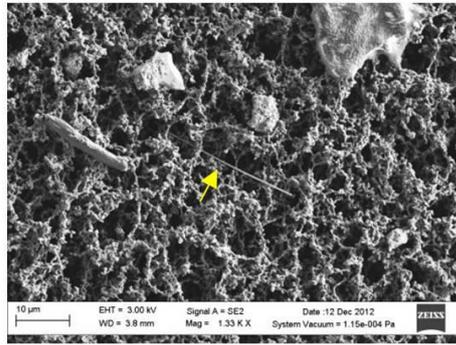
試料 ; No.12 解体現場

#F045

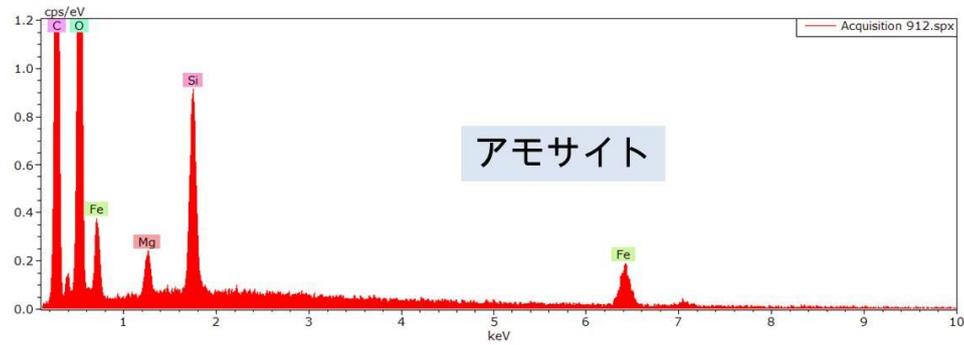
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1330倍)



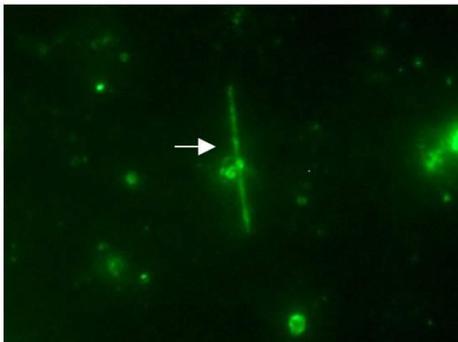
EDXスペクトル



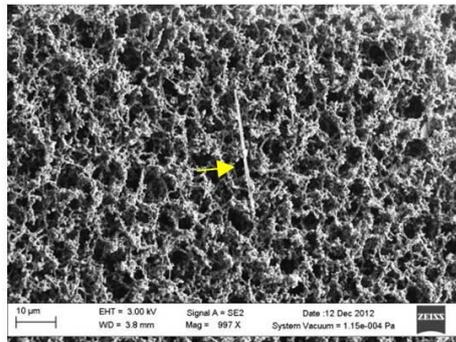
試料 ; No. 12 解体現場

#F046

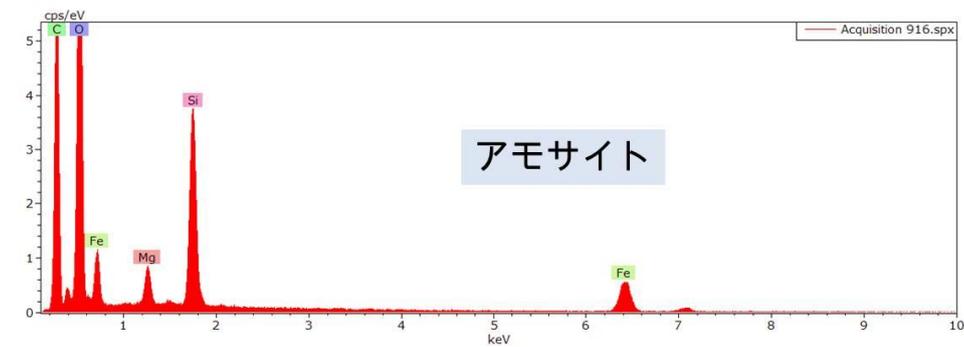
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:997倍)



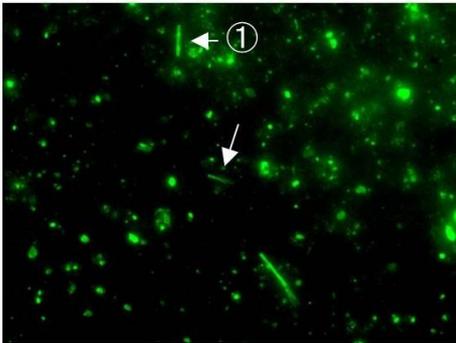
EDXスペクトル



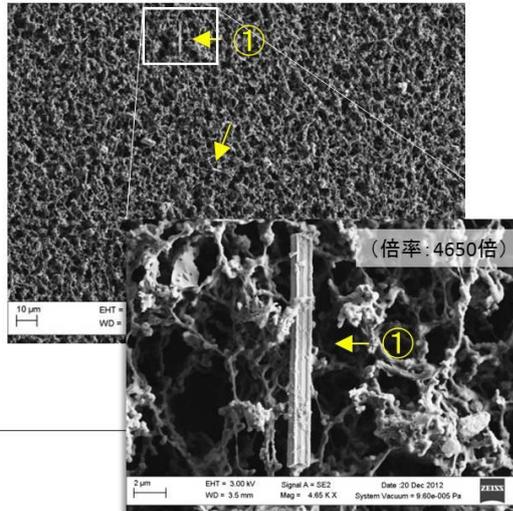
試料 ; No. 13 解体現場

#F047

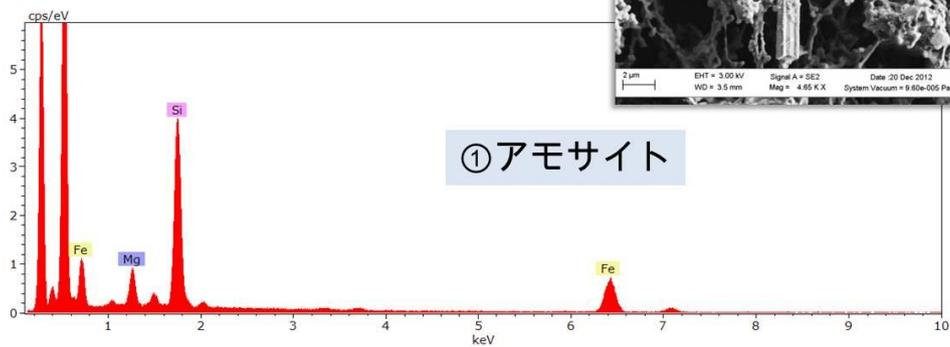
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



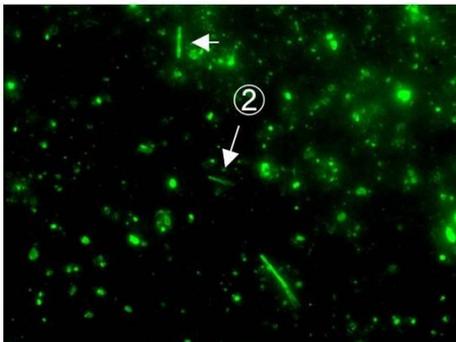
EDXスペクトル



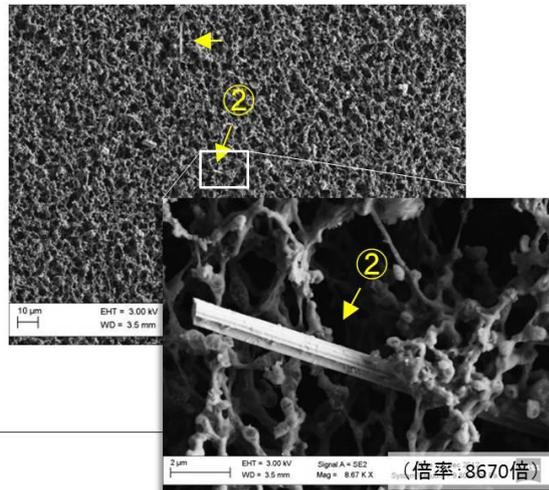
試料 ; No.13 解体現場

#F048

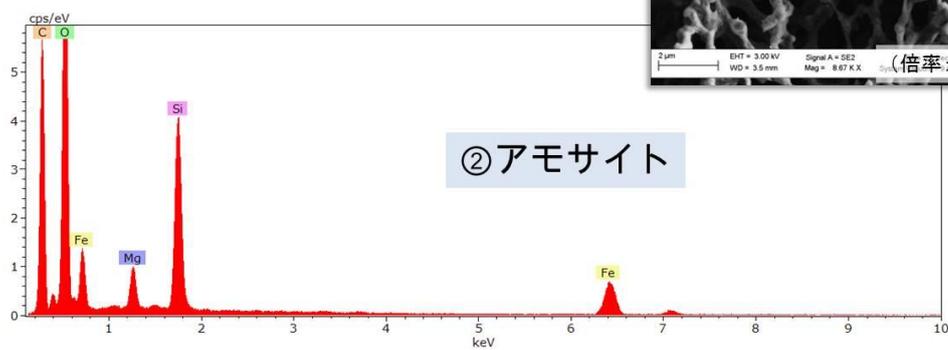
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



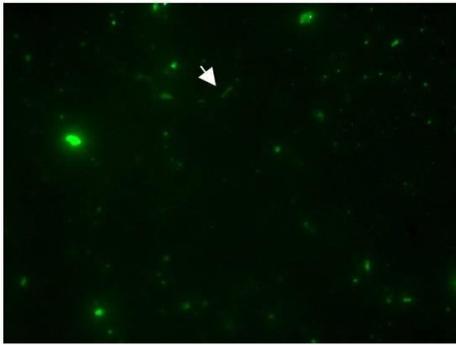
EDXスペクトル



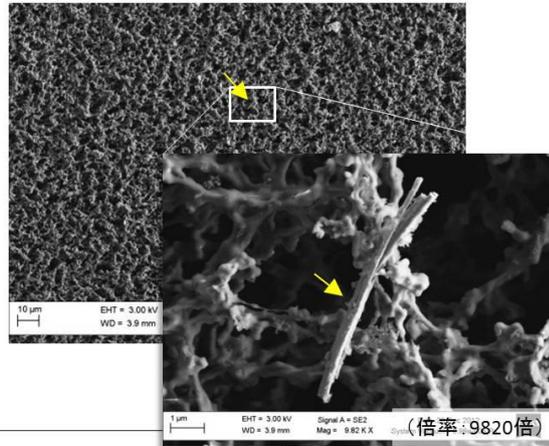
試料 ; No. 14 解体現場

#F049

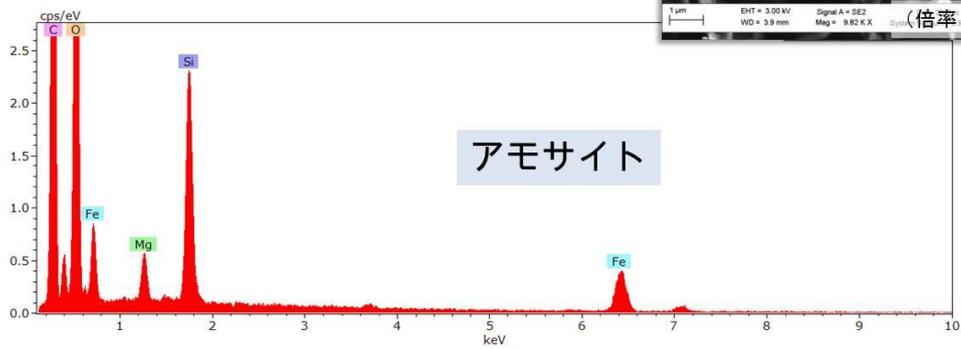
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:534倍)



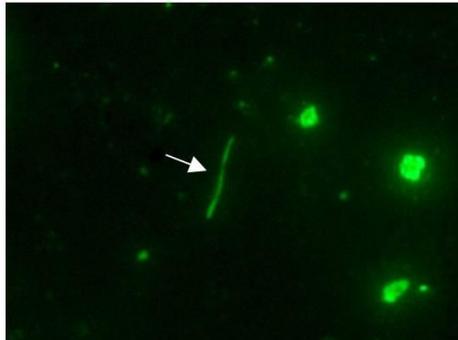
EDXスペクトル



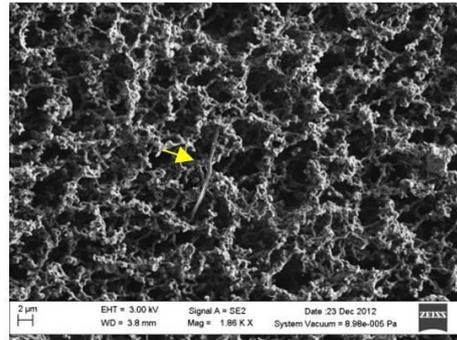
試料 ; No. 14 解体現場

#F050

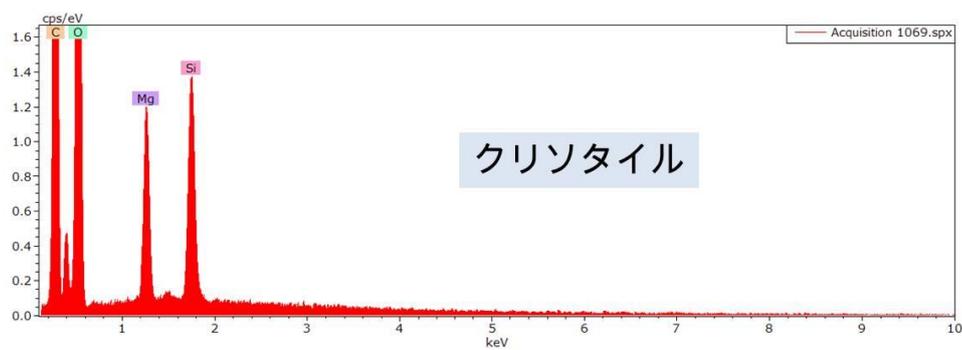
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1860倍)



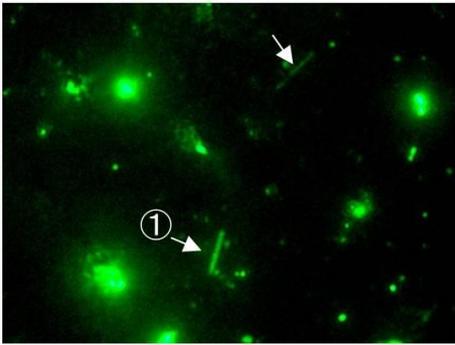
EDXスペクトル



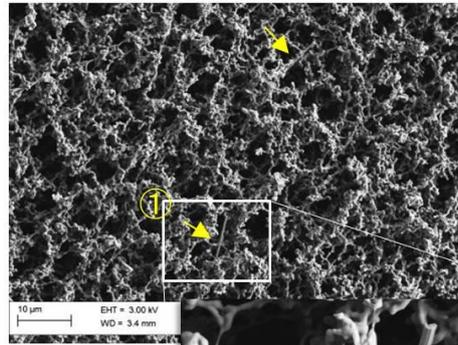
試料 ; No. 15 解体現場

#F051

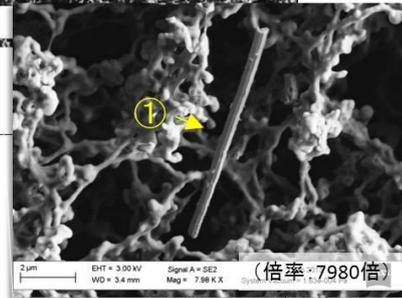
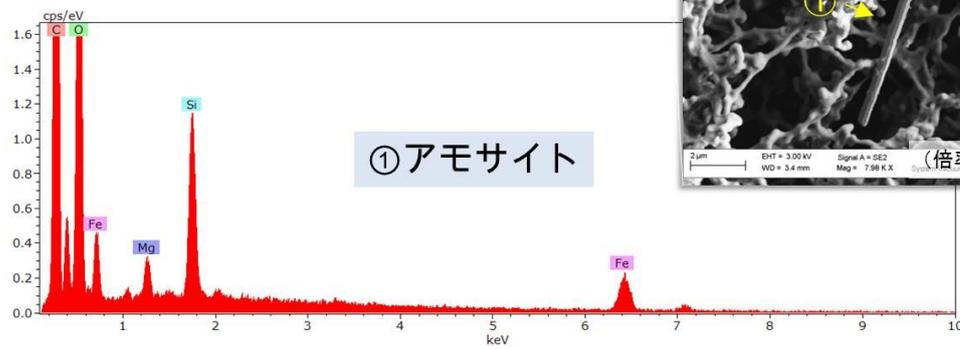
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1330倍)



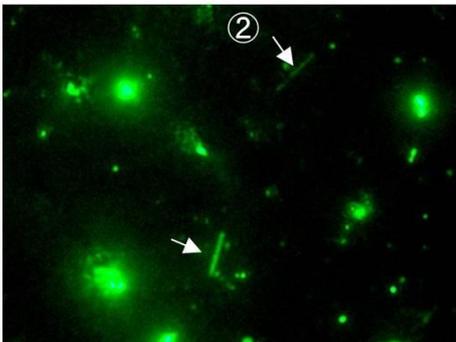
EDXスペクトル



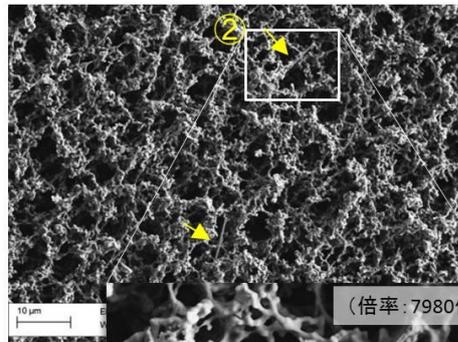
試料 ; No. 15 解体現場

#F052

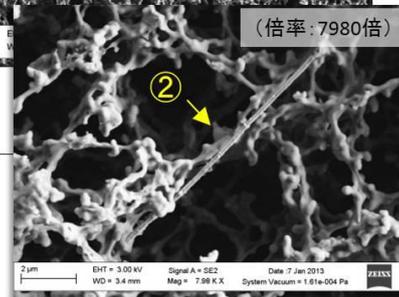
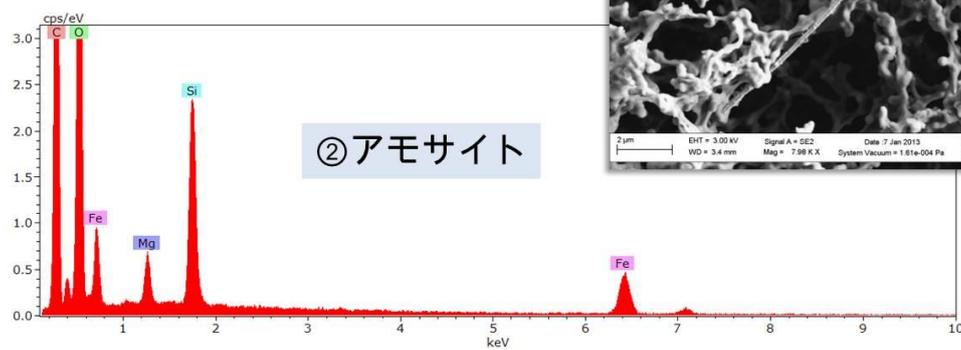
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1330倍)



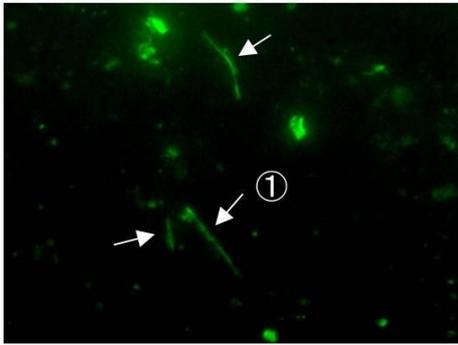
EDXスペクトル



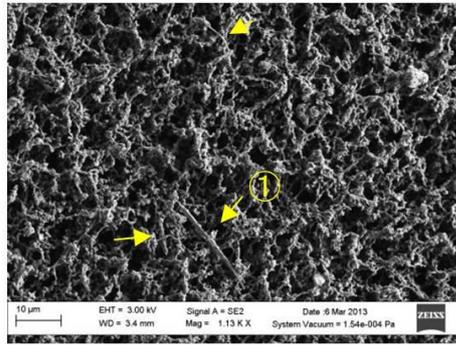
試料 ; No. 16 解体現場

#F053

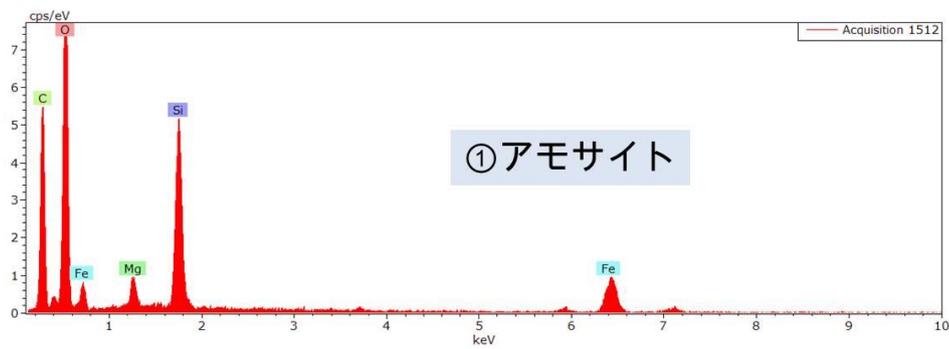
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1130倍)



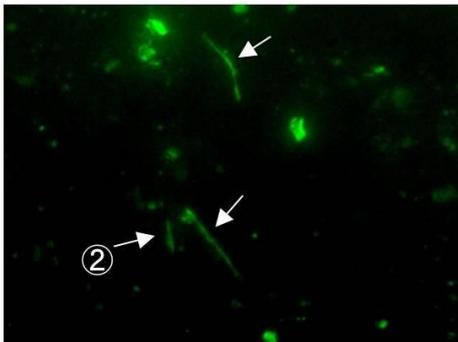
EDXスペクトル



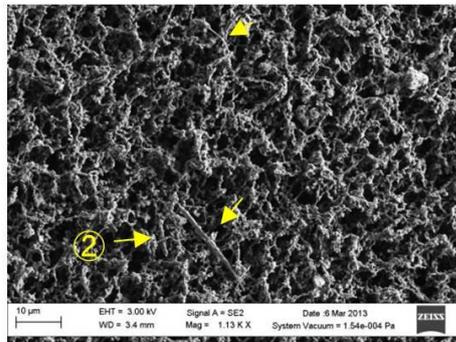
試料 ; No.16 解体現場

#F054

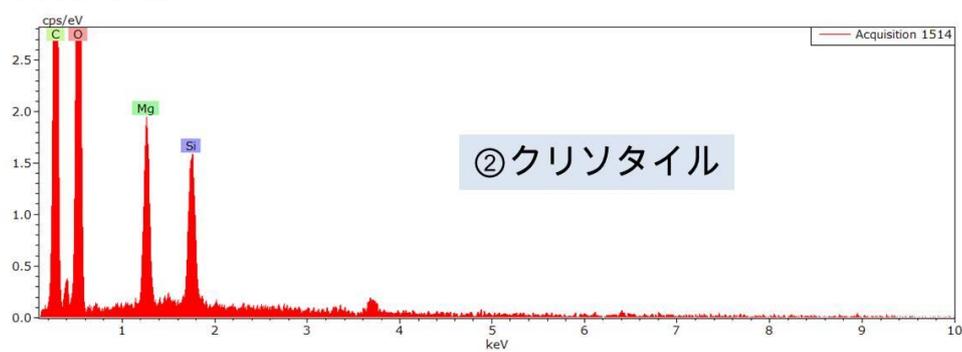
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1130倍)



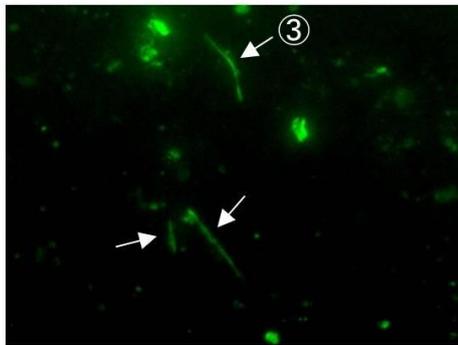
EDXスペクトル



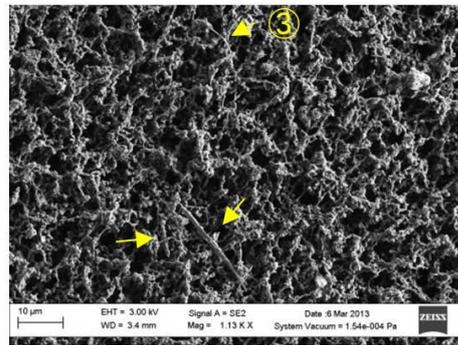
試料 ; No. 16 解体現場

#F055

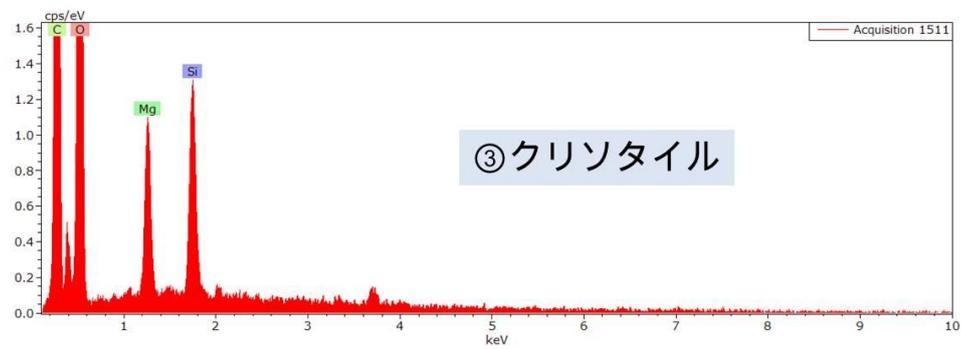
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1130倍)



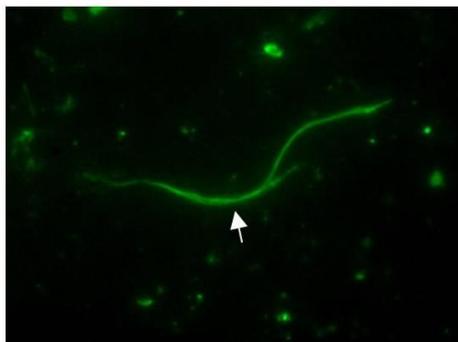
EDXスペクトル



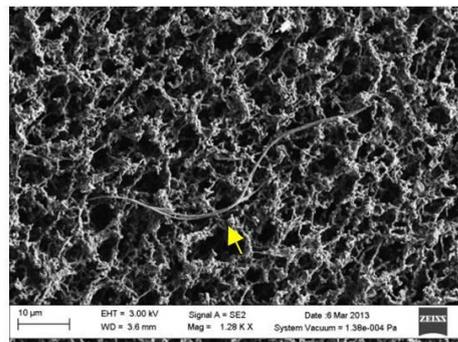
試料 ; No. 17 解体現場

#F056

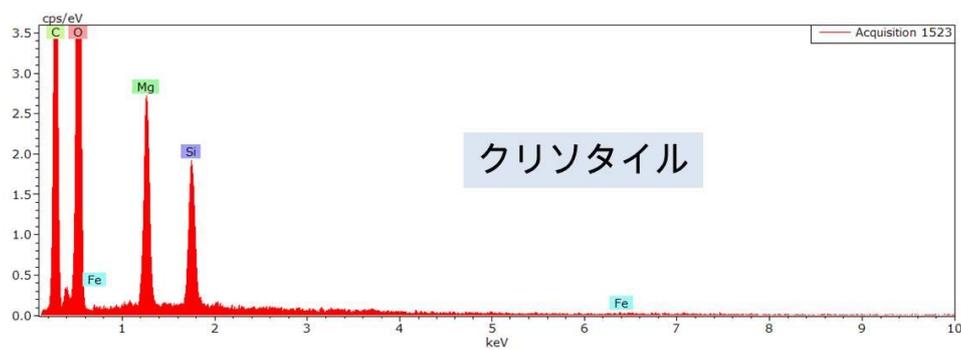
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1280倍)



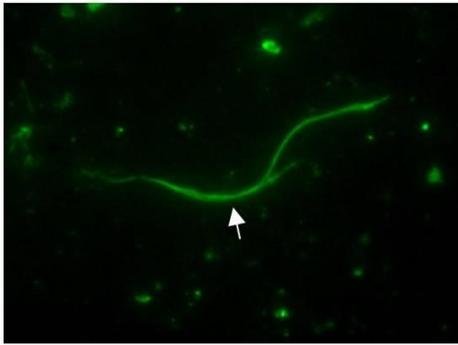
EDXスペクトル



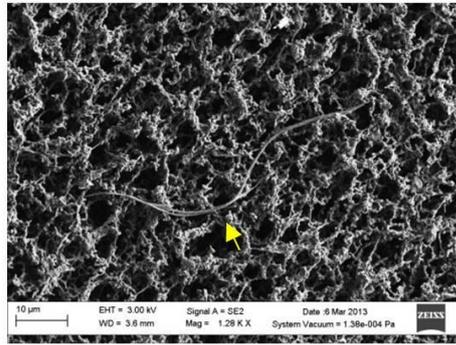
試料 ; No. 17 解体現場

#F057

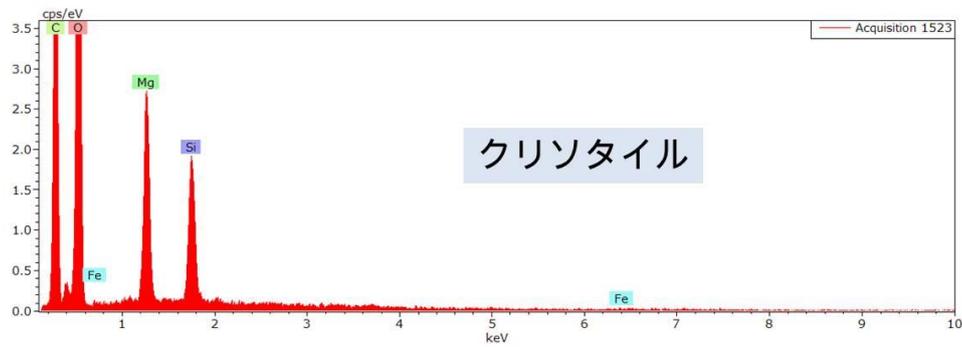
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1280倍)



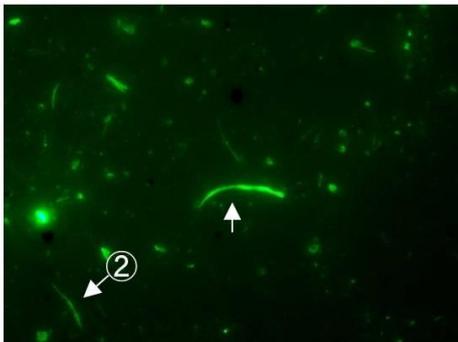
EDXスペクトル



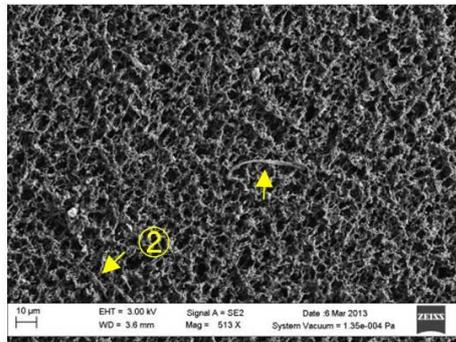
試料 ; No. 17 解体現場

#F058

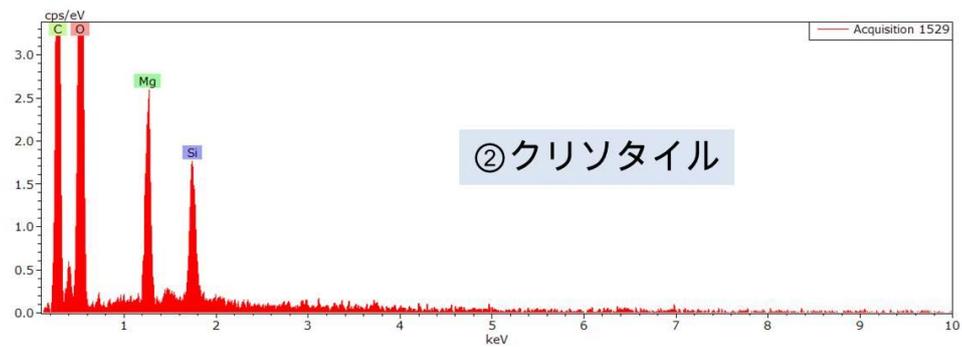
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



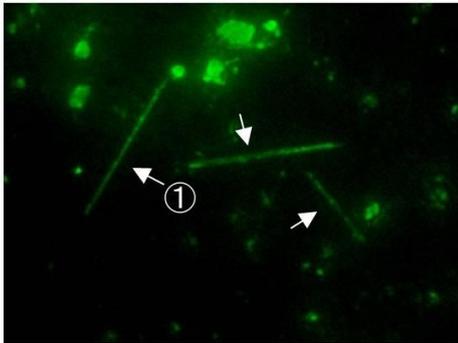
EDXスペクトル



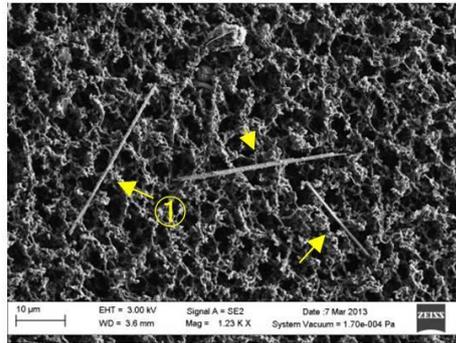
試料 ; No. 18 解体現場

#F059

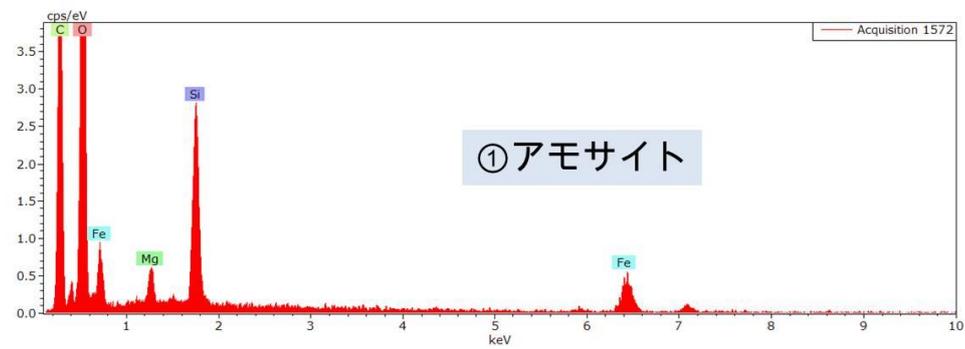
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1230倍)



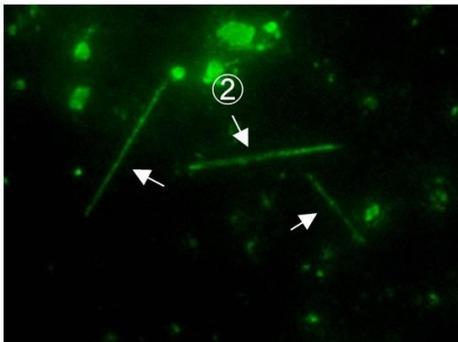
EDXスペクトル



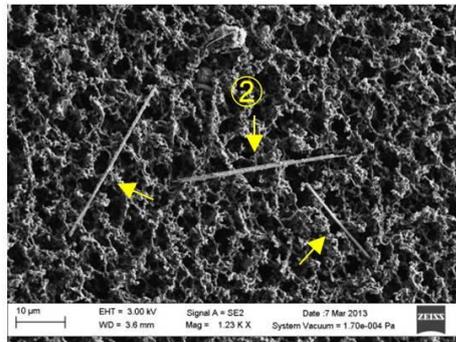
試料 ; No. 18 解体現場

#F060

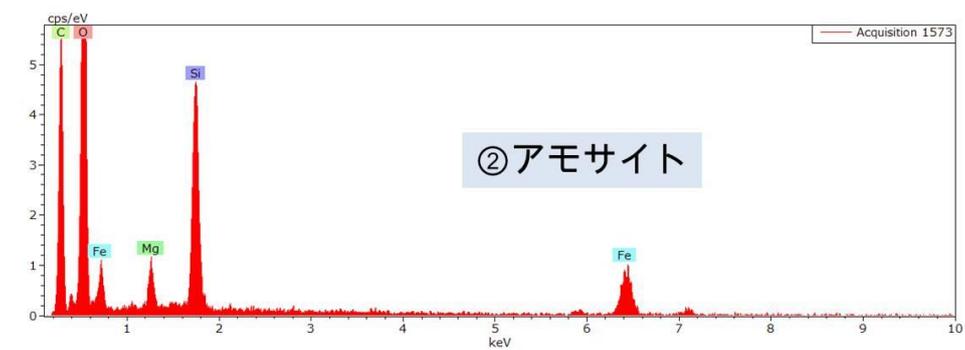
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1230倍)



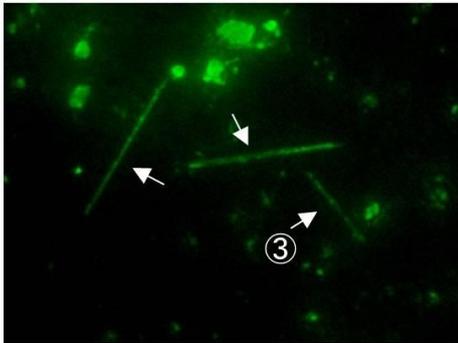
EDXスペクトル



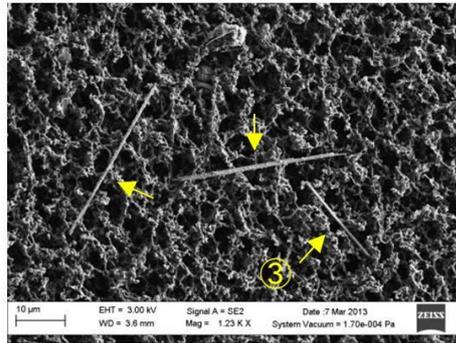
試料 ; No. 18 解体現場

#F061

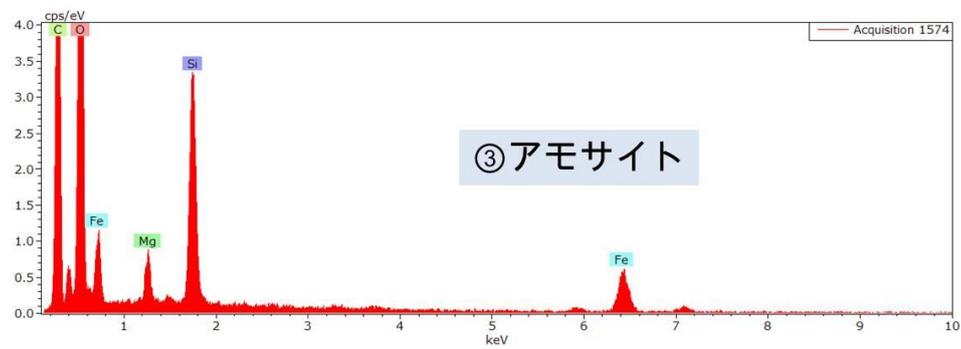
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1230倍)



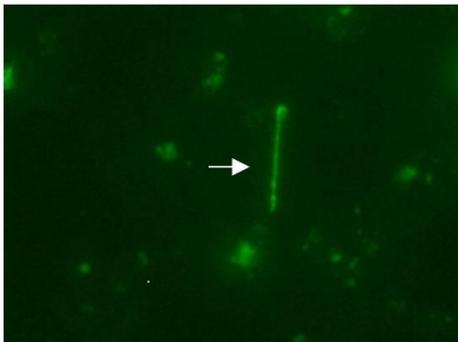
EDXスペクトル



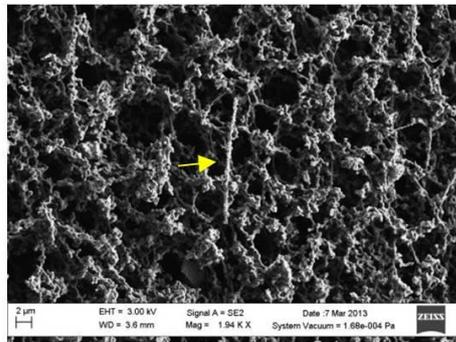
試料 ; No. 18 解体現場

#F062

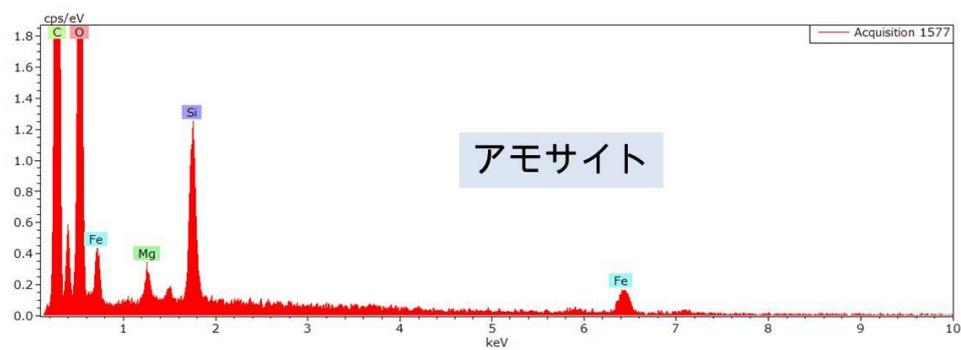
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1940倍)



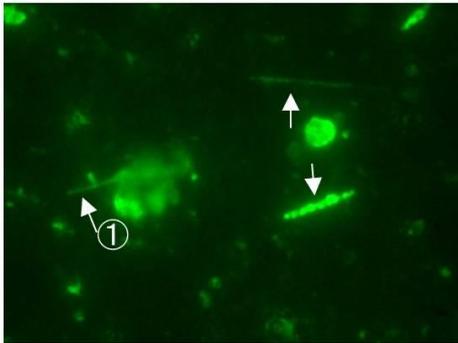
EDXスペクトル



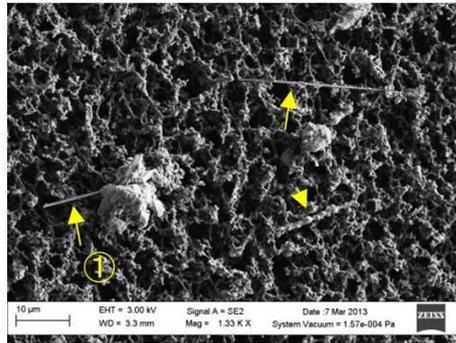
試料 ; No. 19 解体現場

#F063

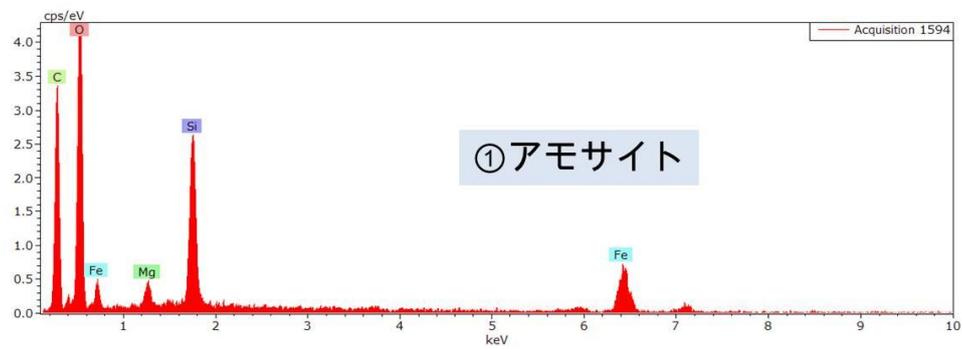
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1330倍)



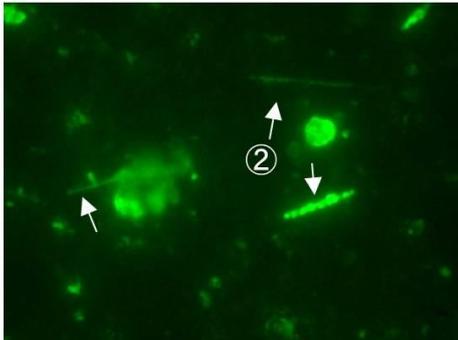
EDXスペクトル



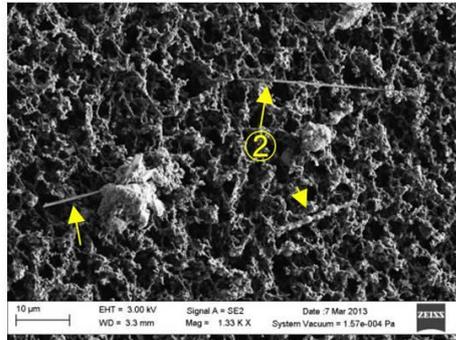
試料 ; No.19 解体現場

#F064

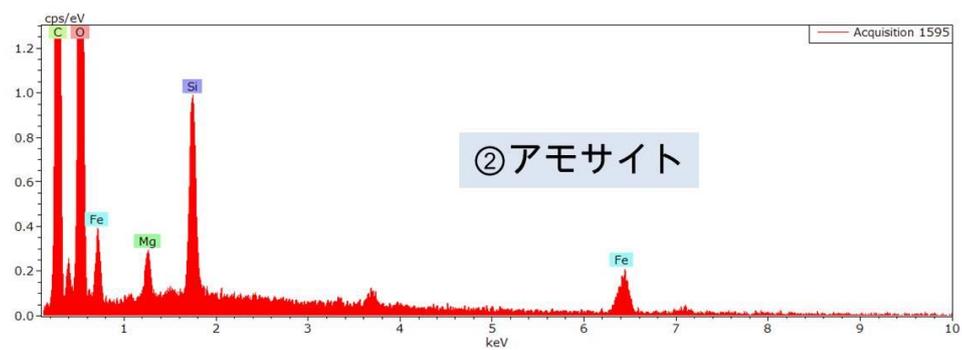
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1330倍)



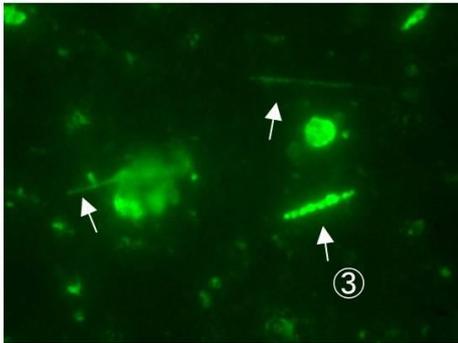
EDXスペクトル



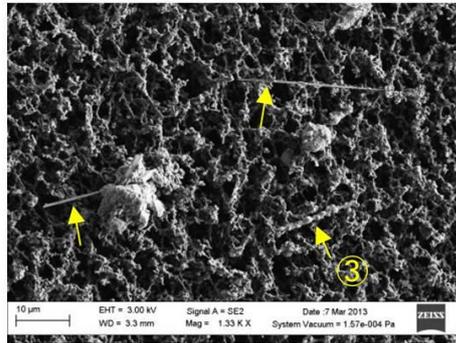
試料 ; No. 19 解体現場

#F065

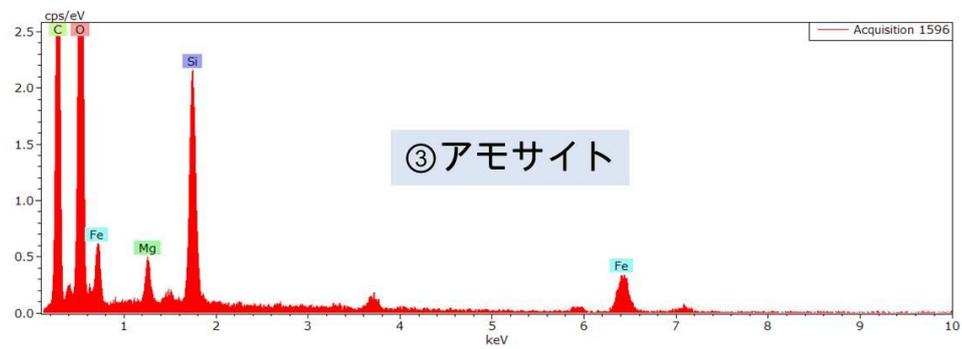
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1330倍)



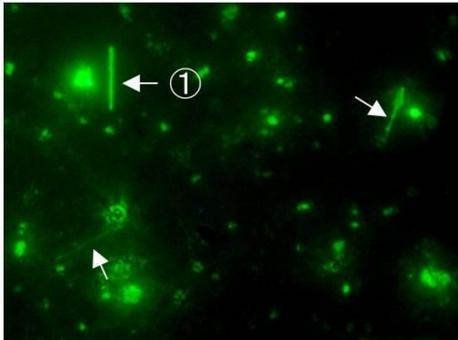
EDXスペクトル



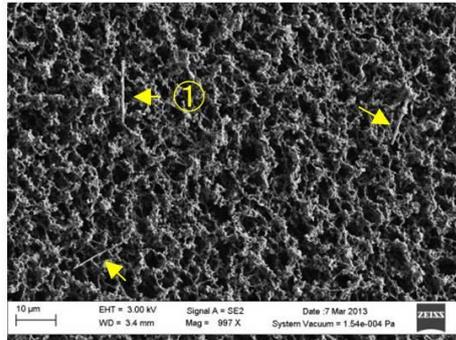
試料 ; No. 19 解体現場

#F066

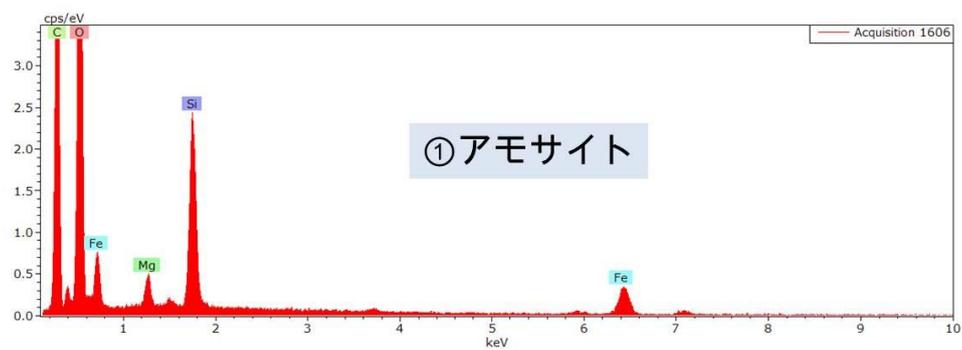
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:997倍)



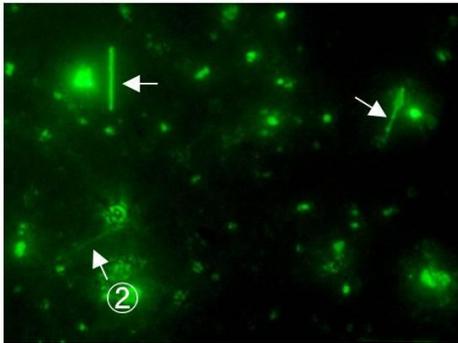
EDXスペクトル



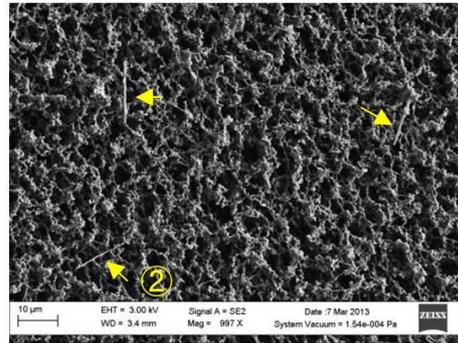
試料 ; No. 19 解体現場

#F067

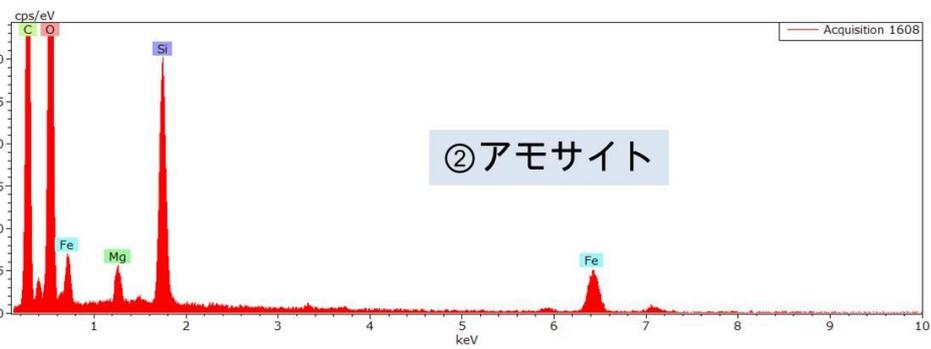
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:997倍)



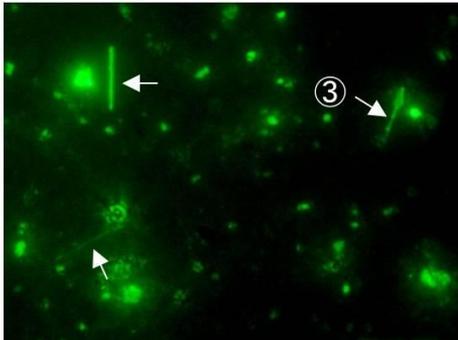
EDXスペクトル



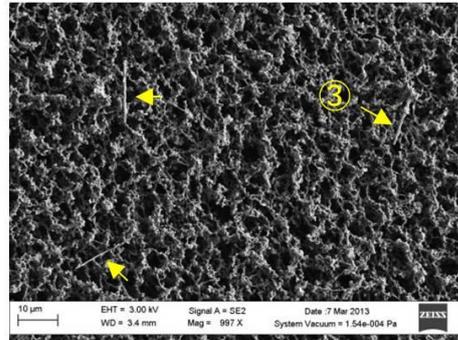
試料 ; No.19 解体現場

#F068

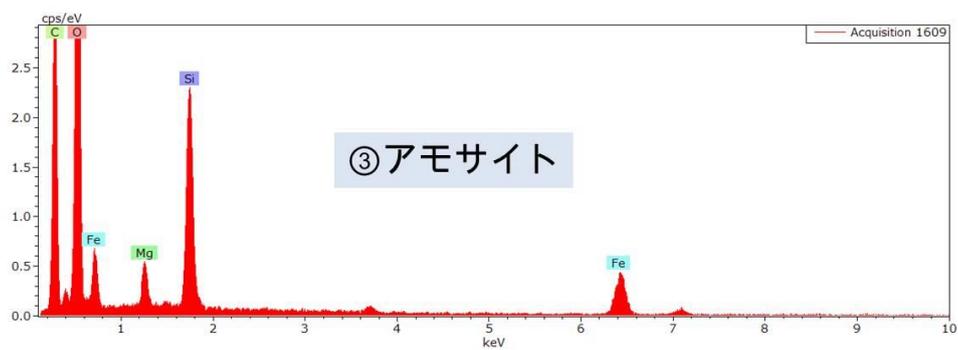
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:997倍)



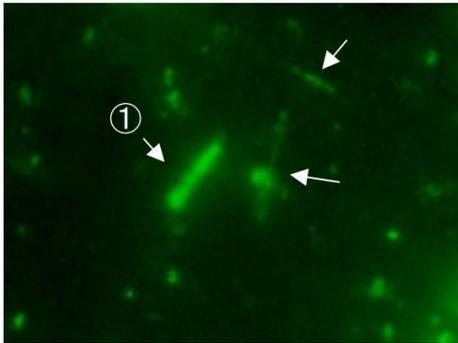
EDXスペクトル



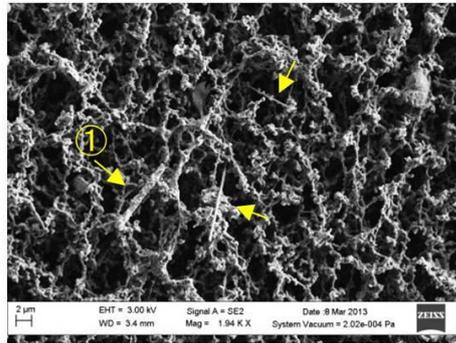
試料 ; No. 20 解体現場

#F069

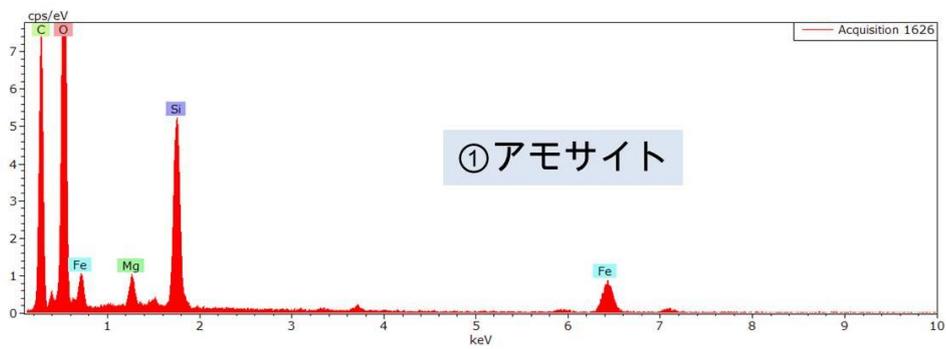
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1940倍)



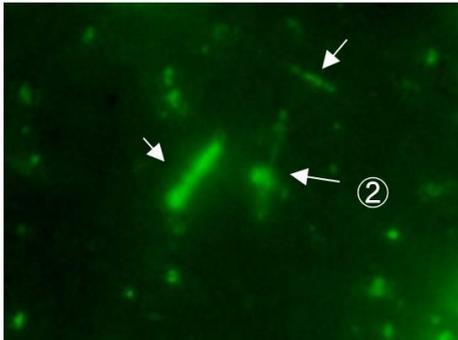
EDXスペクトル



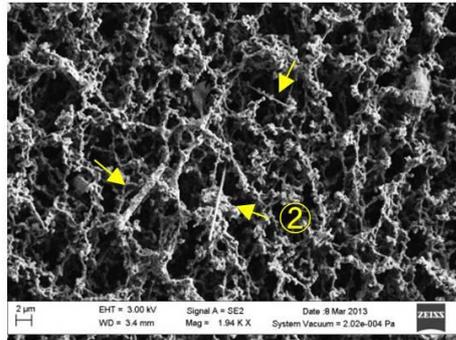
試料 ; No. 20 解体現場

#F070

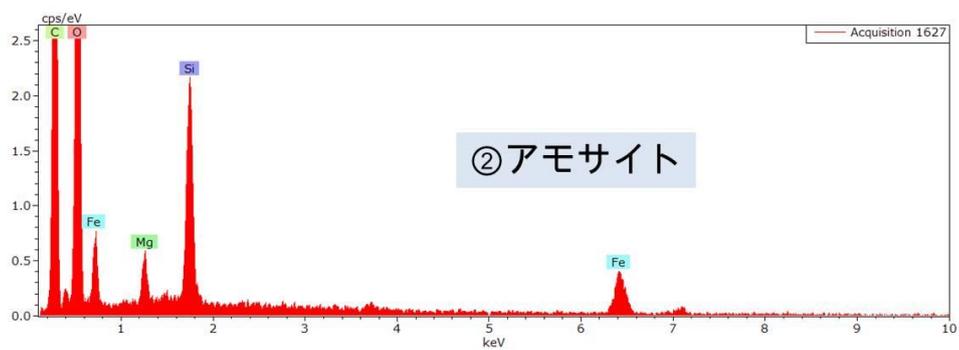
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1940倍)



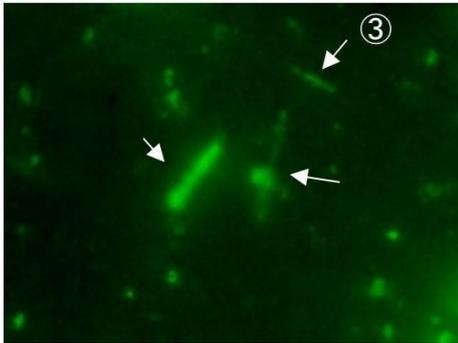
EDXスペクトル



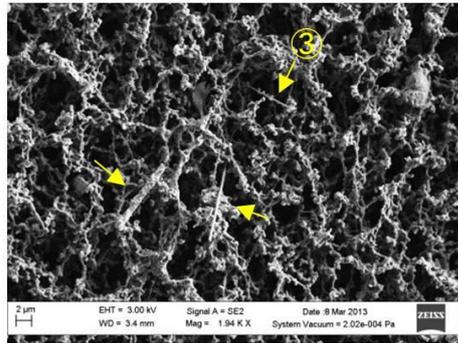
試料 ; No. 20 解体現場

#F071

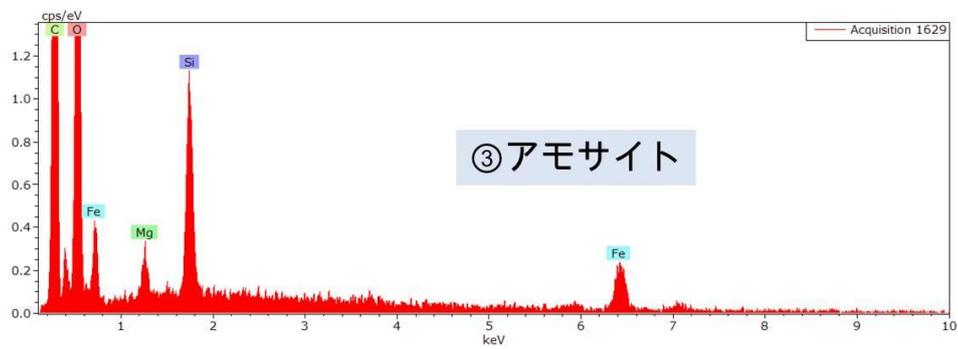
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1940倍)



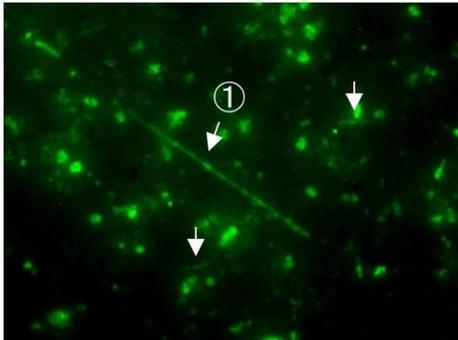
EDXスペクトル



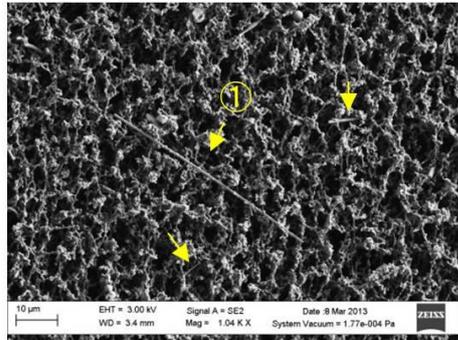
試料 ; No. 20 解体現場

#F072

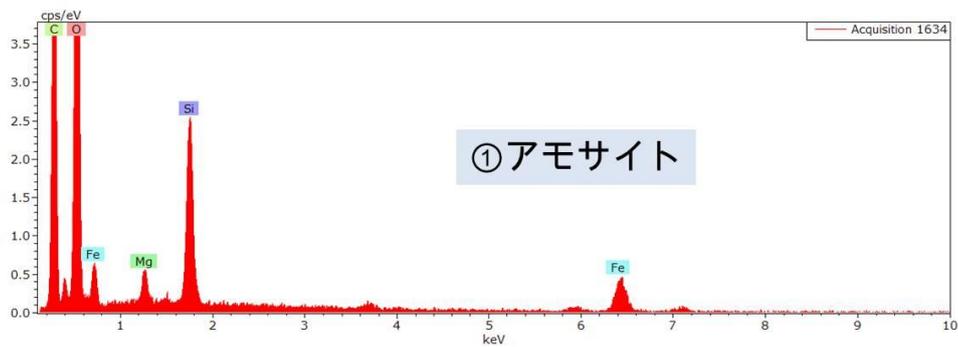
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1040倍)



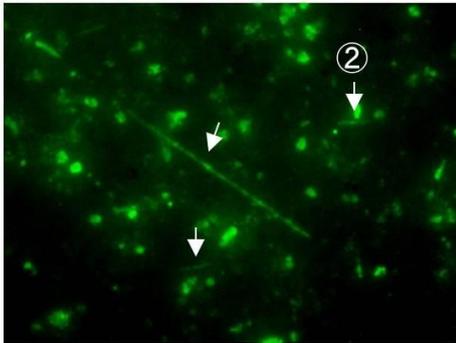
EDXスペクトル



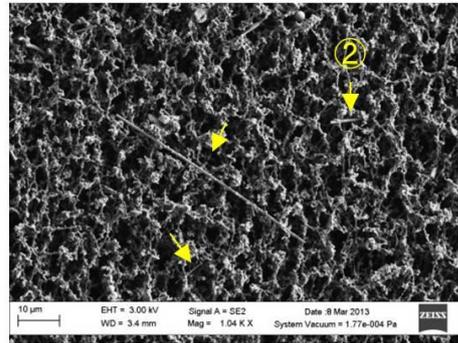
試料 ; No. 20 解体現場

#F073

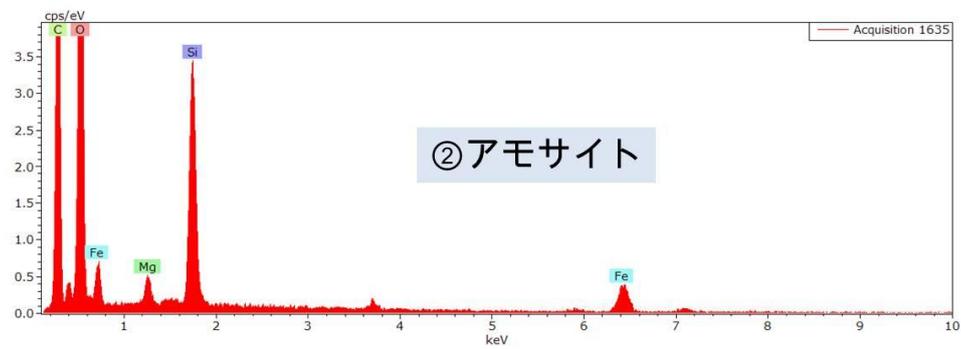
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1040倍)



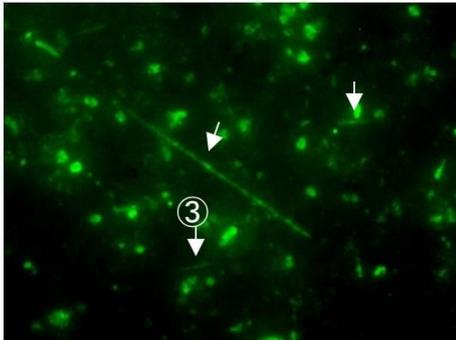
EDXスペクトル



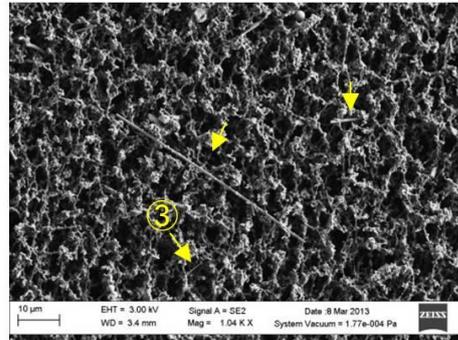
試料 ; No. 20 解体現場

#F074

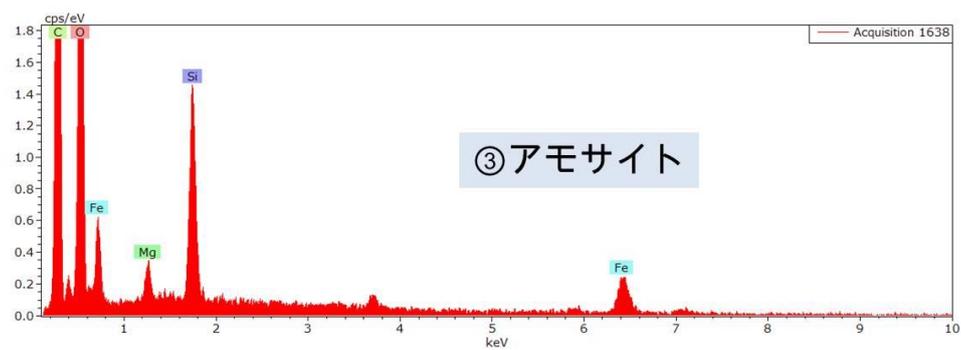
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1040倍)



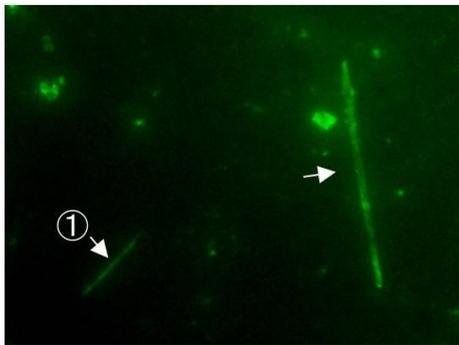
EDXスペクトル



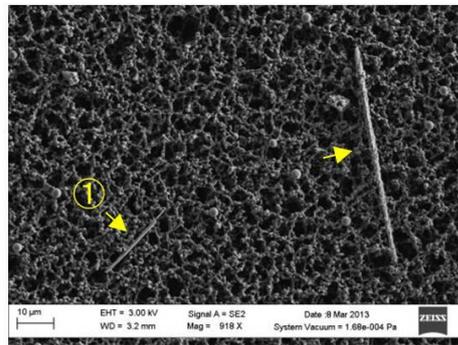
試料 ; No. 21 解体現場

#F075

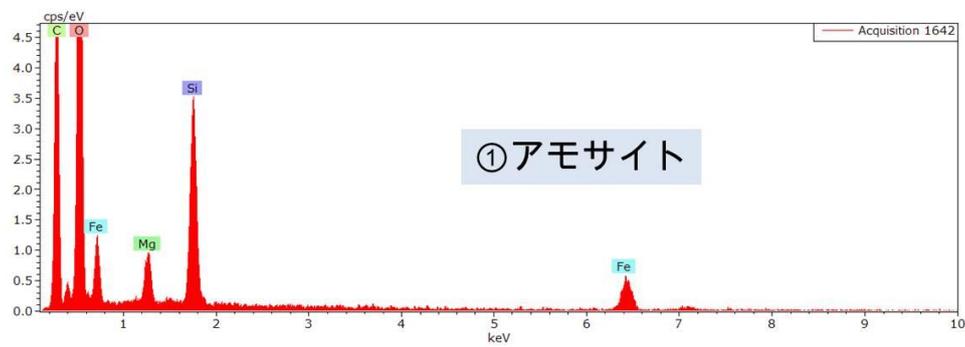
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 918倍)



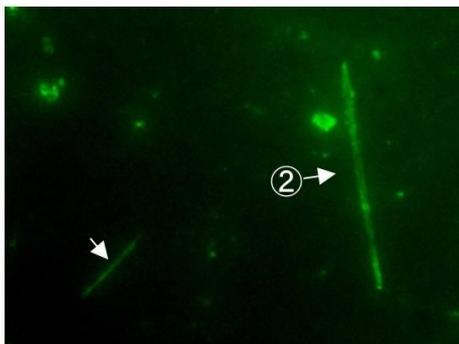
EDXスペクトル



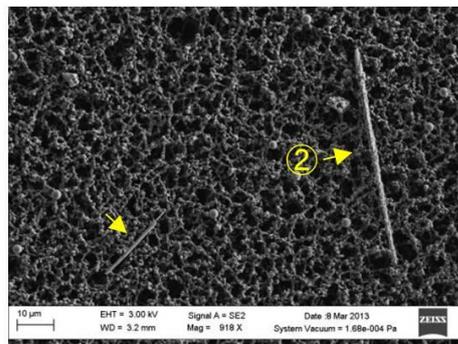
試料 ; No. 21 解体現場

#F076

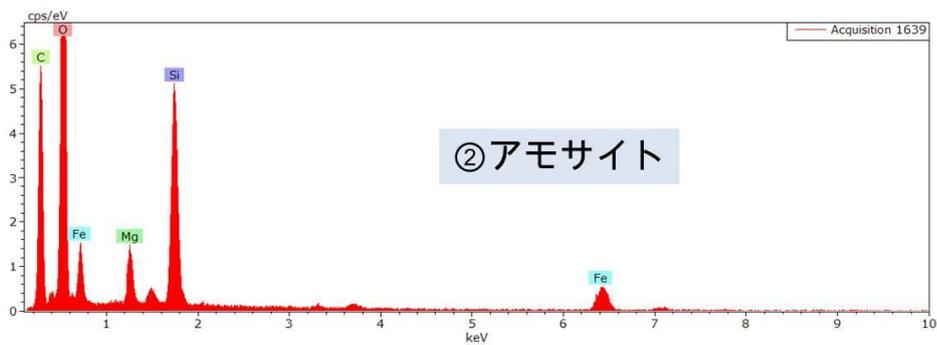
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 918倍)



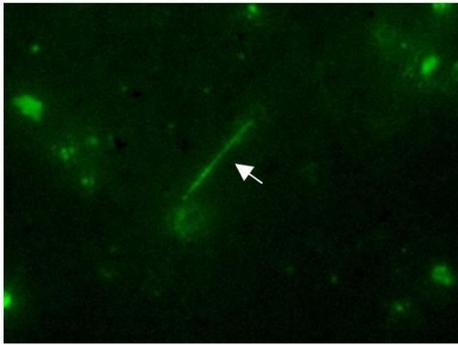
EDXスペクトル



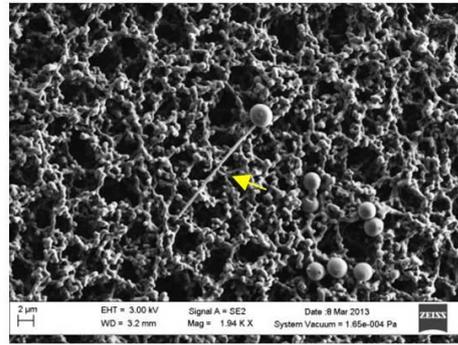
試料 ; No. 21 解体現場

#F077

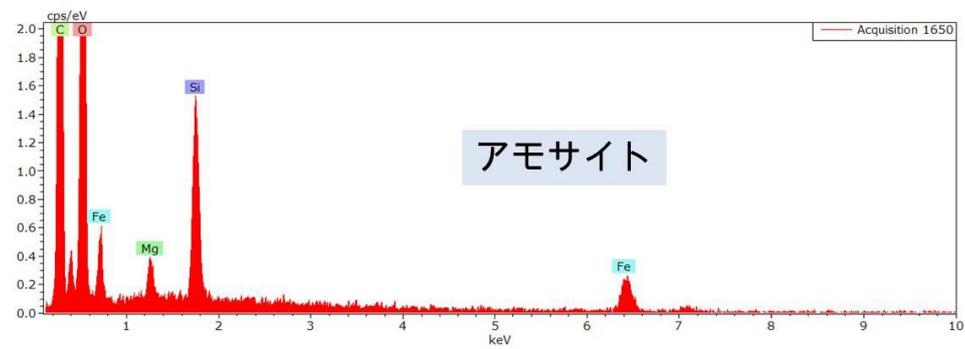
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1940倍)



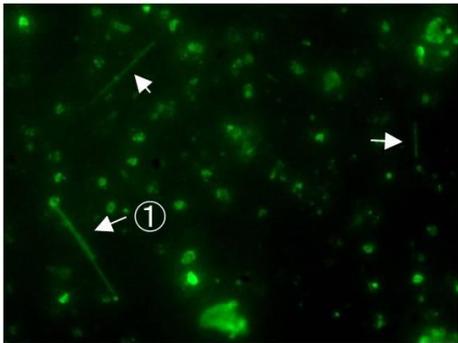
EDXスペクトル



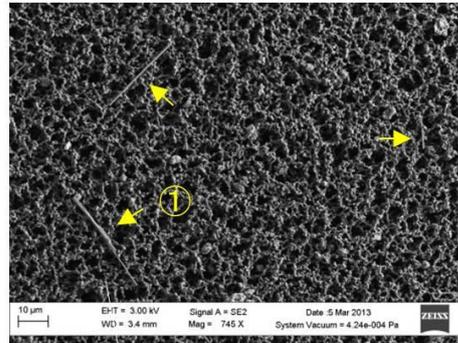
試料 ; No.22 解体現場

#F078

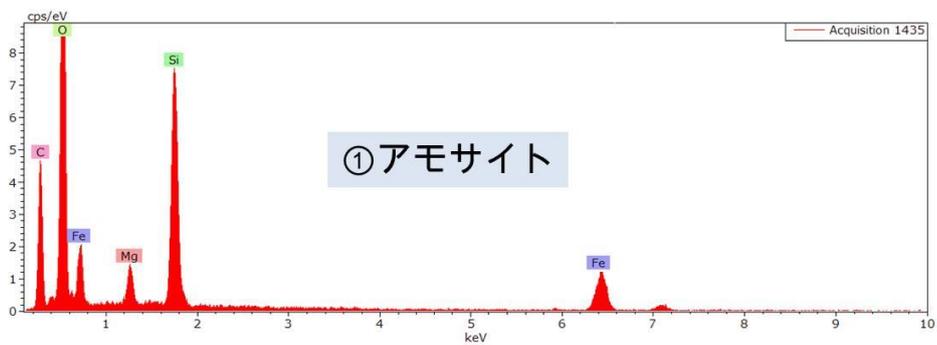
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:745倍)



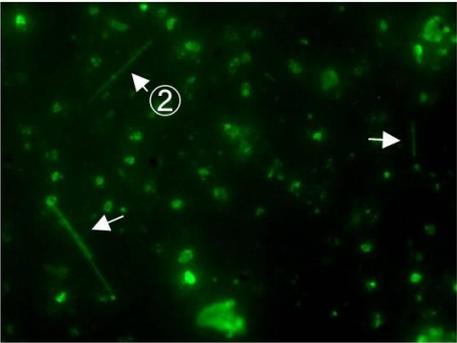
EDXスペクトル



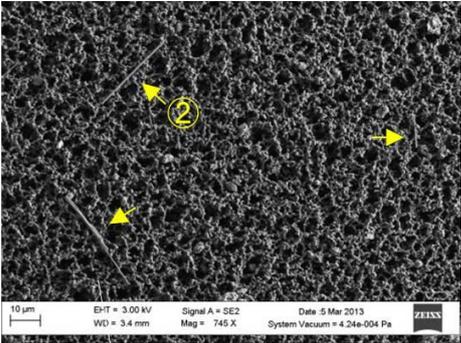
試料 ; No.22 解体現場

#F079

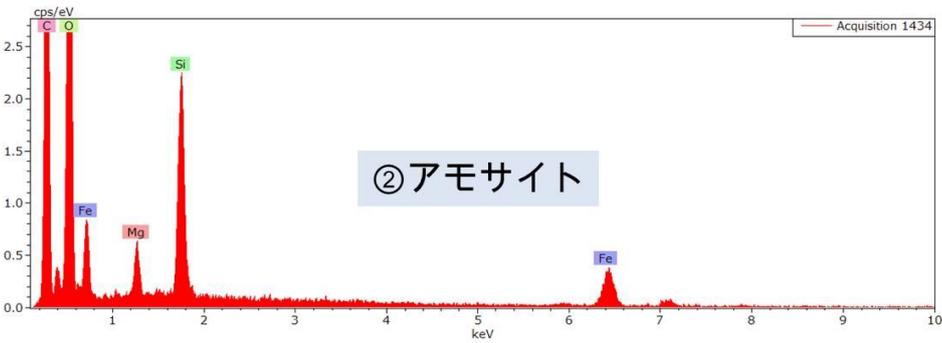
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 745倍)



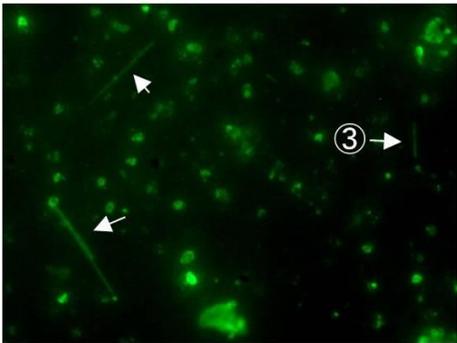
EDXスペクトル



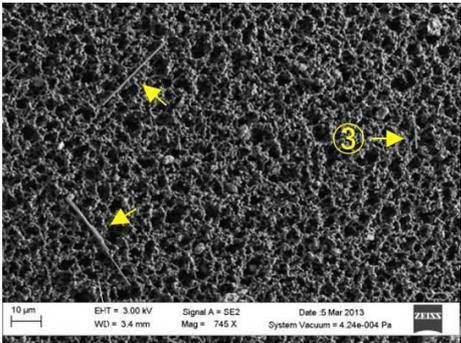
試料 ; No. 22 解体現場

#F080

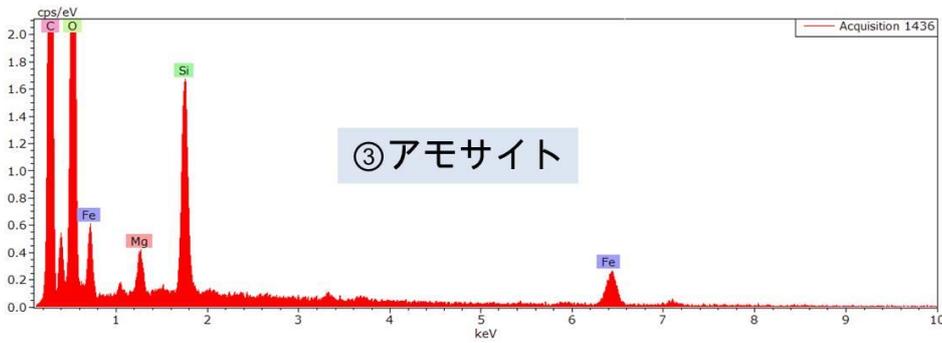
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 745倍)



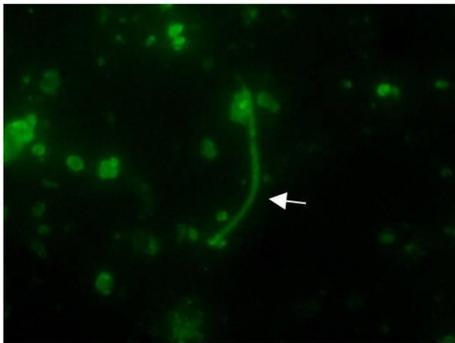
EDXスペクトル



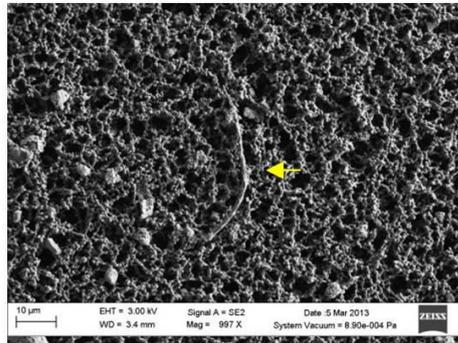
試料 ; No. 22 解体現場

#F081

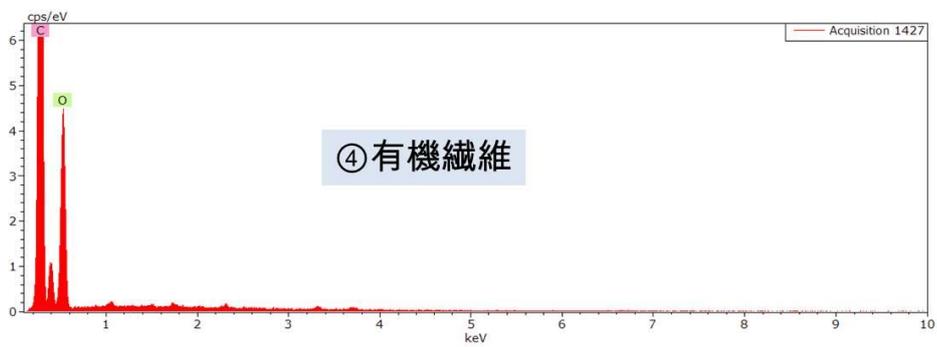
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 997倍)



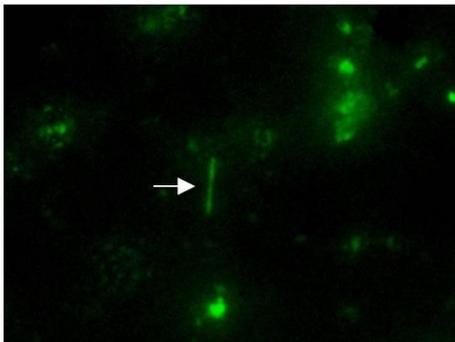
EDXスペクトル



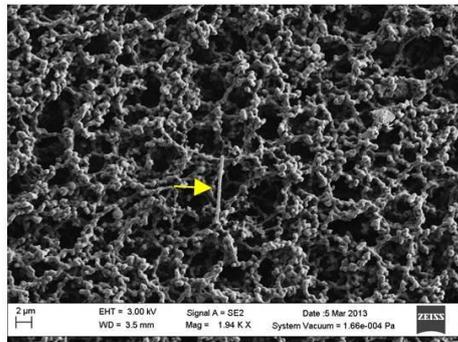
試料 ; No. 23 解体現場

#F082

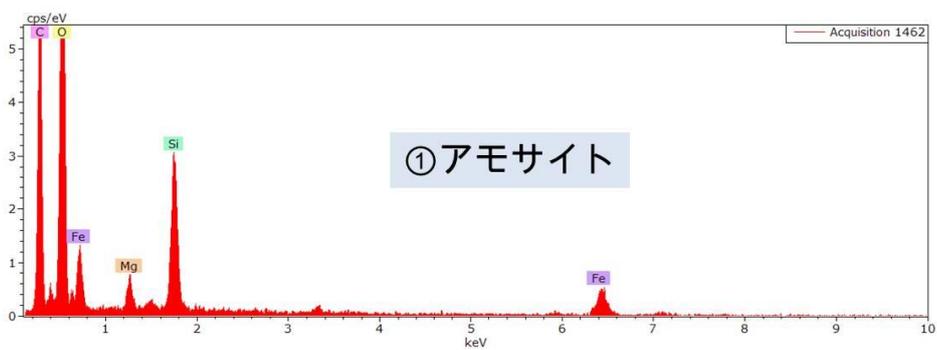
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1940倍)



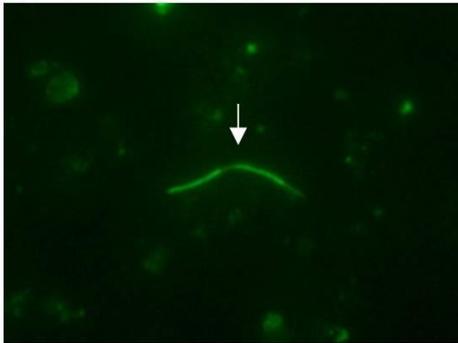
EDXスペクトル



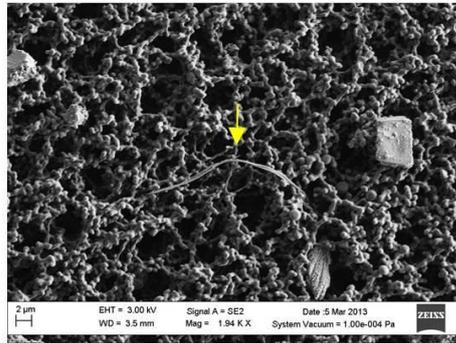
試料 ; No.23 解体現場

#F083

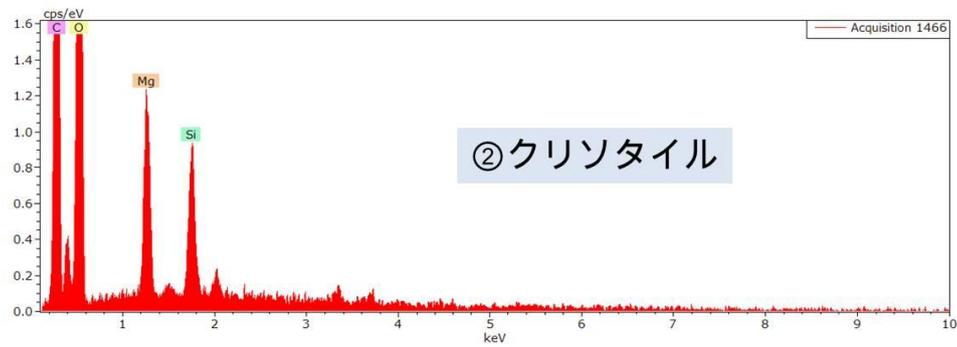
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1940倍)



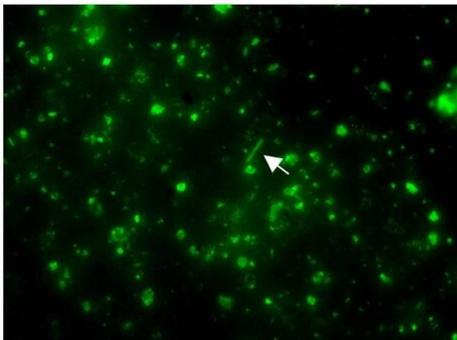
EDXスペクトル



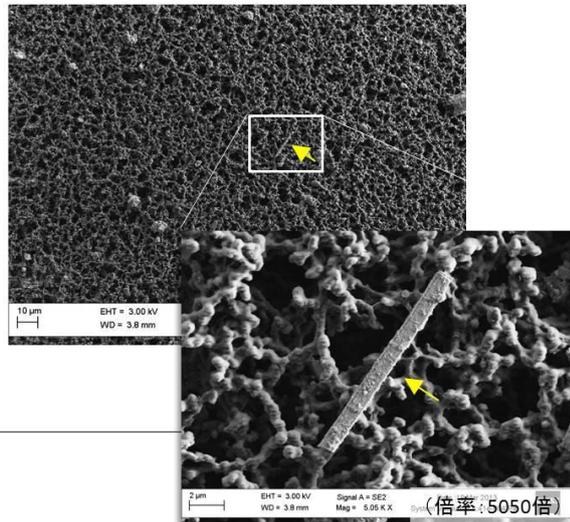
試料 ; No. 24 解体現場

#F084

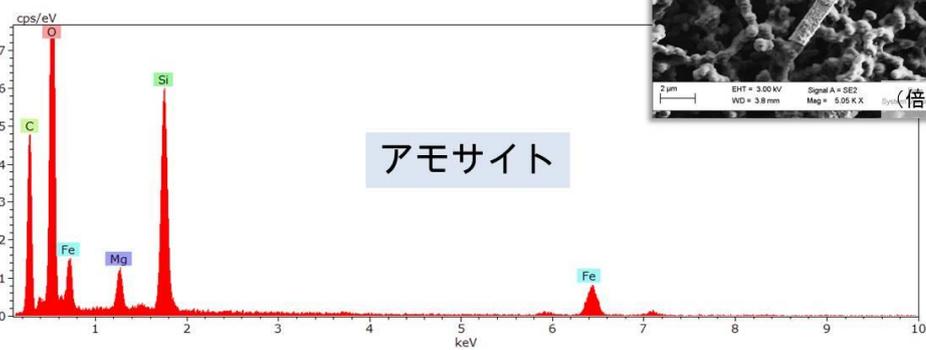
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



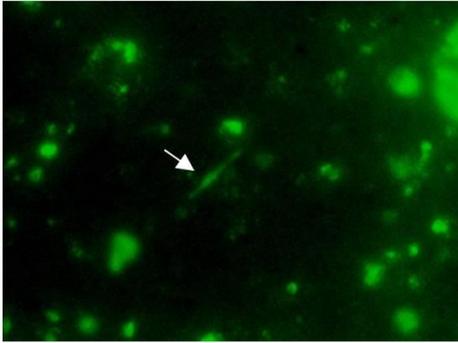
EDXスペクトル



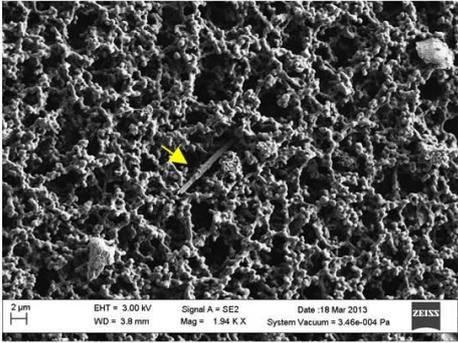
試料 ; No. 24 解体現場

#F085

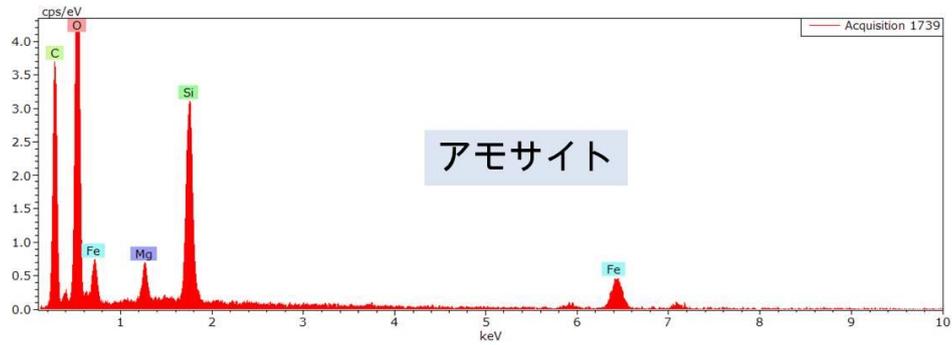
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1940倍)



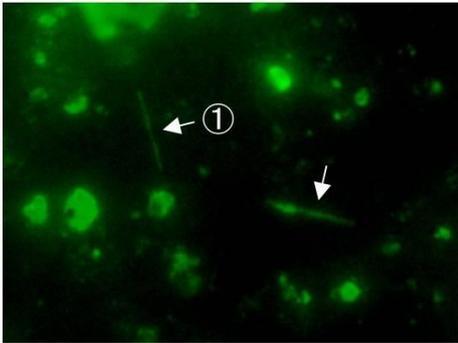
EDXスペクトル



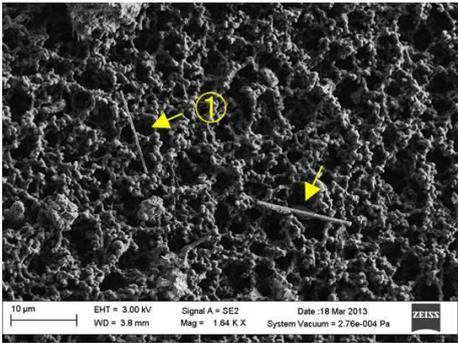
試料 ; No. 25 解体現場

#F086

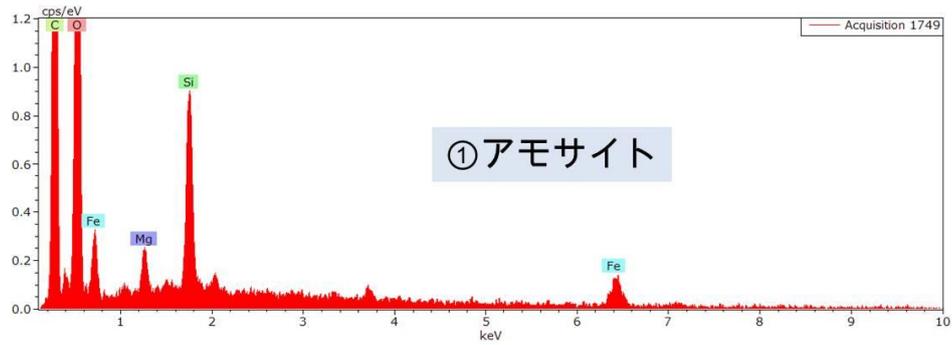
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1640倍)



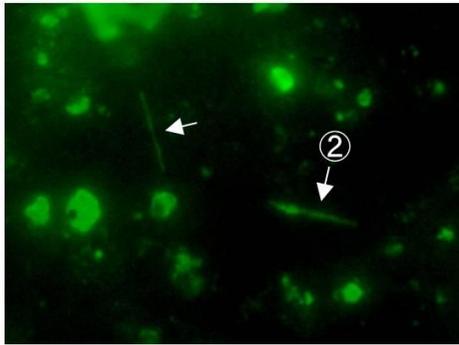
EDXスペクトル



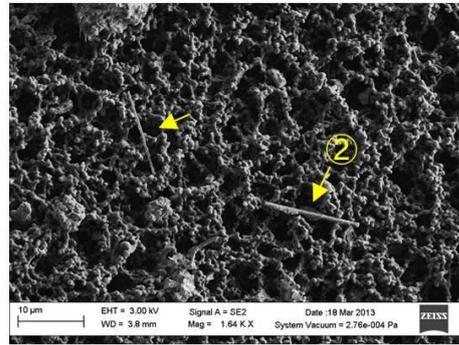
試料 ; No. 25 解体現場

#F087

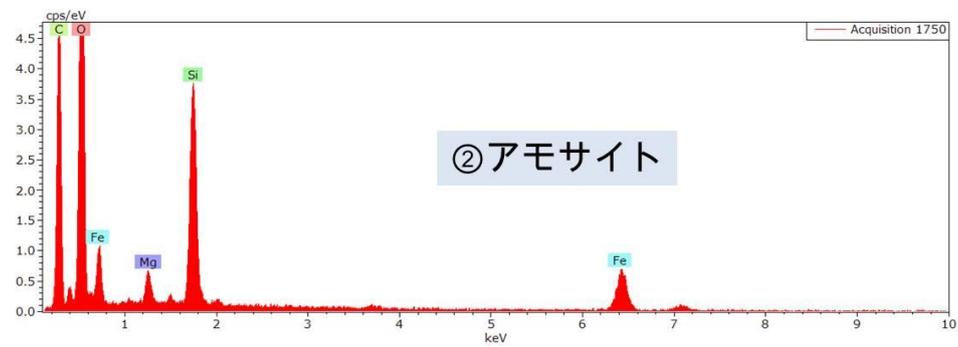
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1640倍)



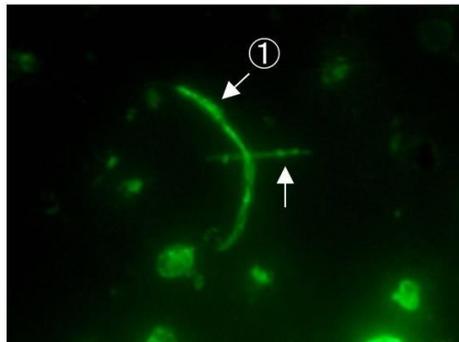
EDXスペクトル



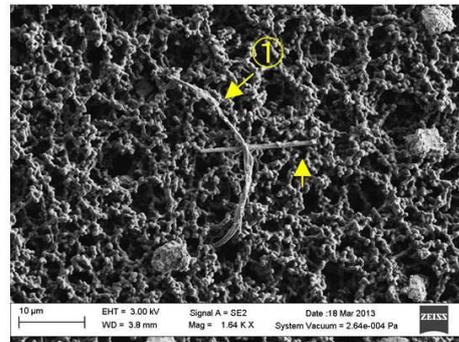
試料 ; No. 25 解体現場

#F088

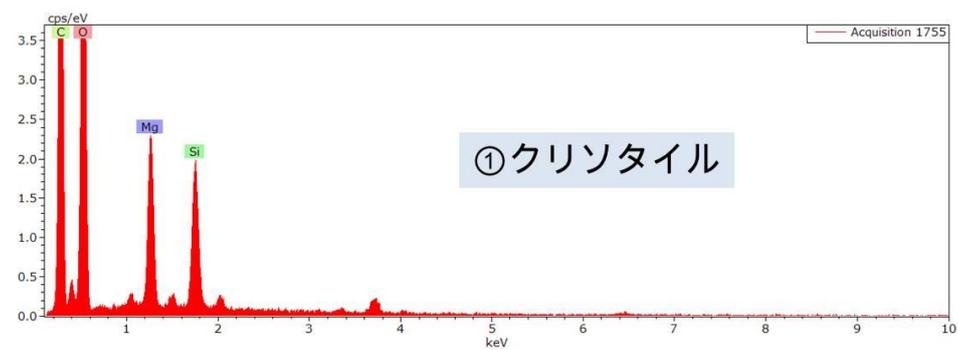
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1640倍)



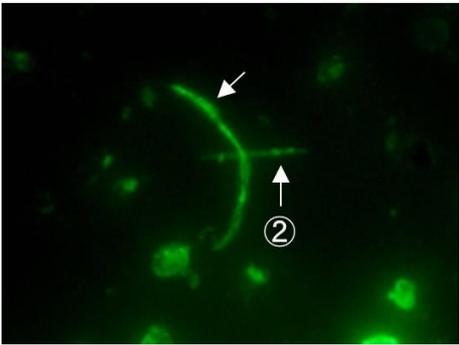
EDXスペクトル



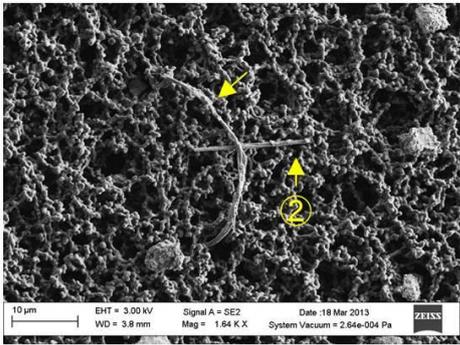
試料 ; No. 25 解体現場

#F089

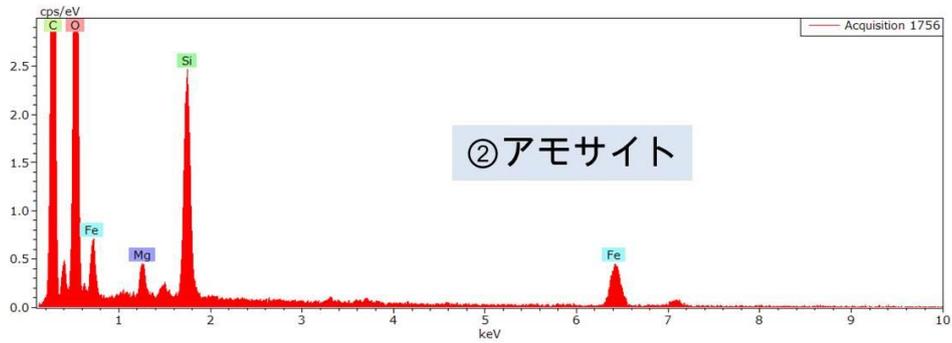
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1640倍)



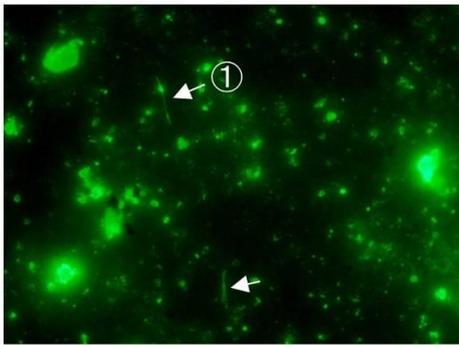
EDXスペクトル



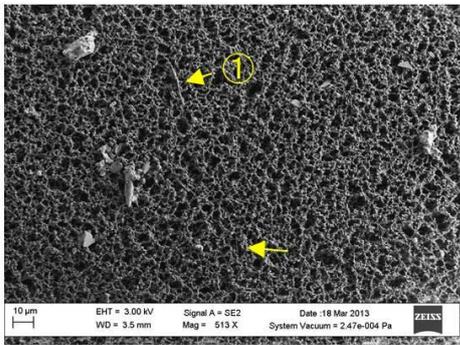
試料 ; No. 26 解体現場

#F090

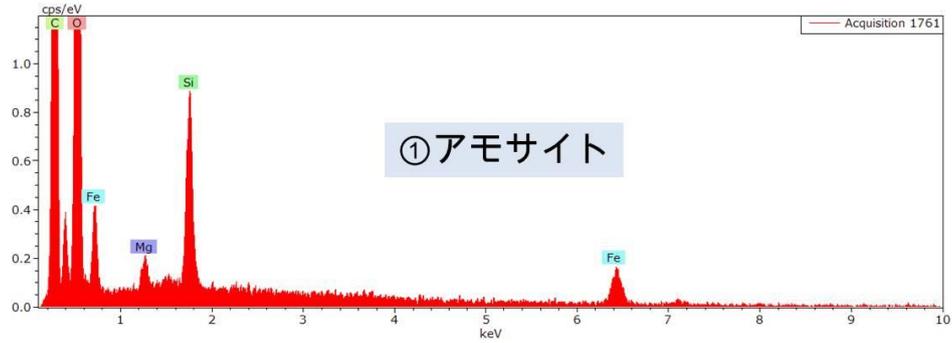
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



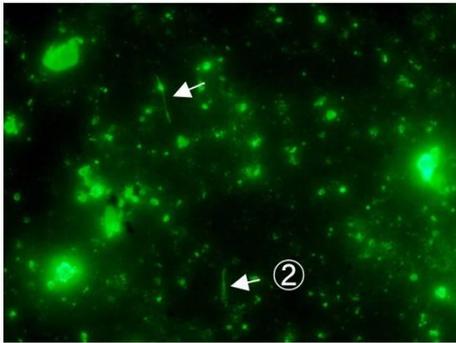
EDXスペクトル



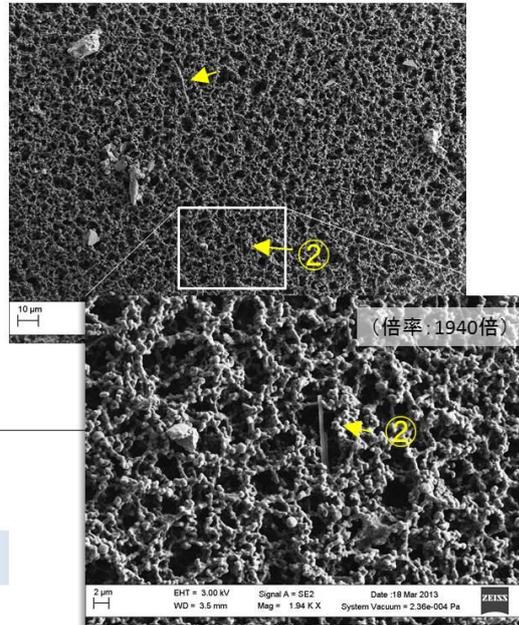
試料 ; No. 26 解体現場

#F091

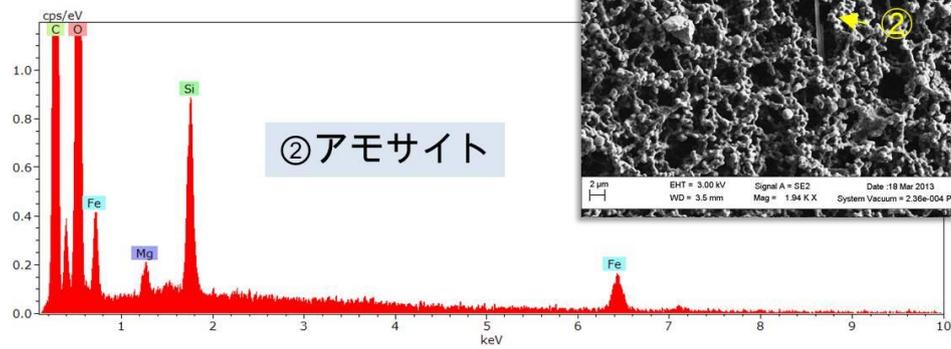
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 513倍)



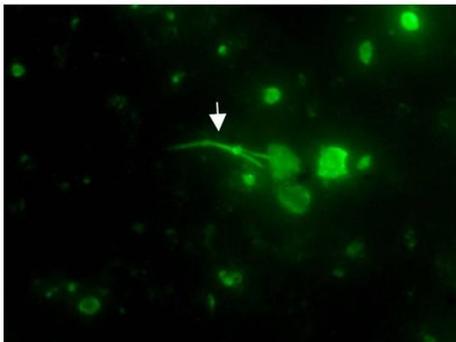
EDXスペクトル



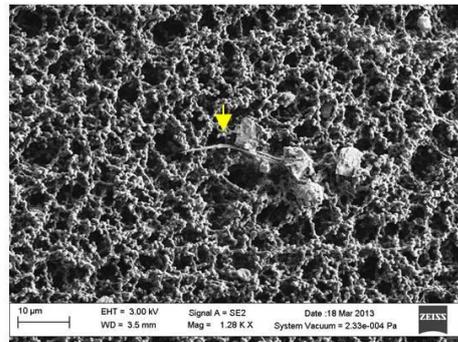
試料 ; No. 26 解体現場

#F092

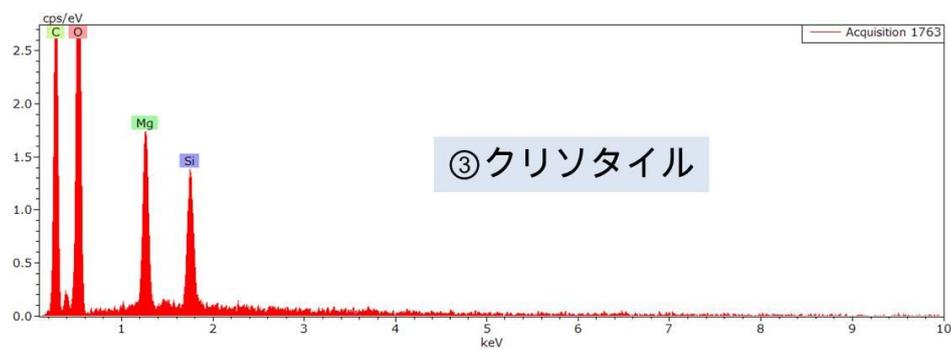
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1280倍)



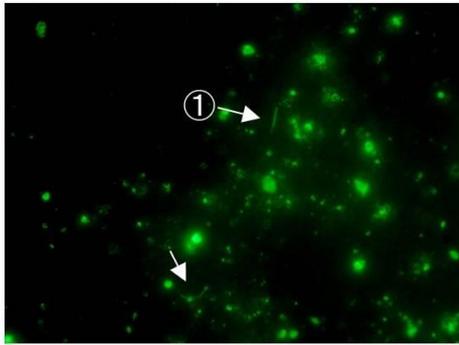
EDXスペクトル



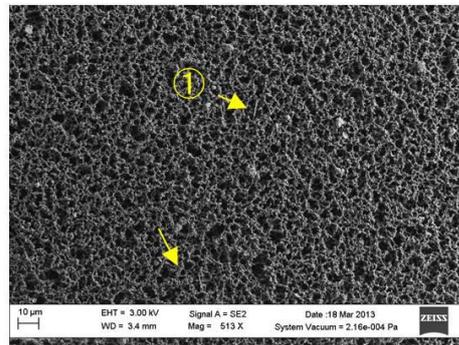
試料 ; No. 27 解体現場

#F093

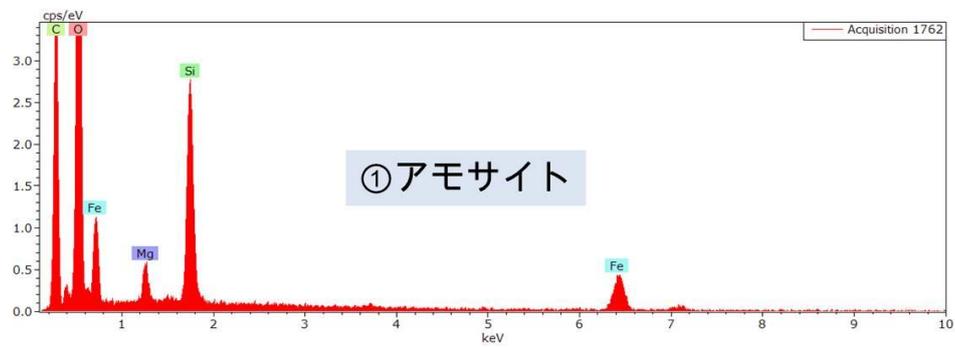
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 513倍)



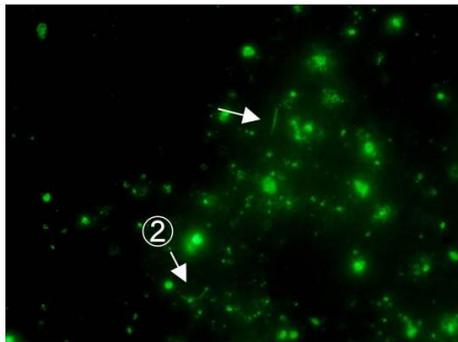
EDXスペクトル



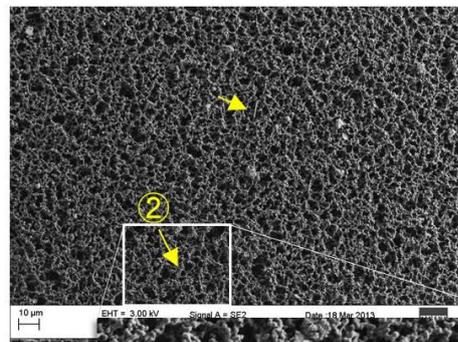
試料 ; No. 27 解体現場

#F094

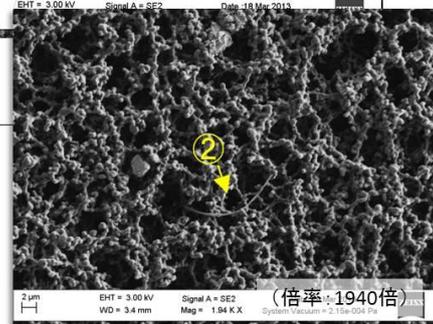
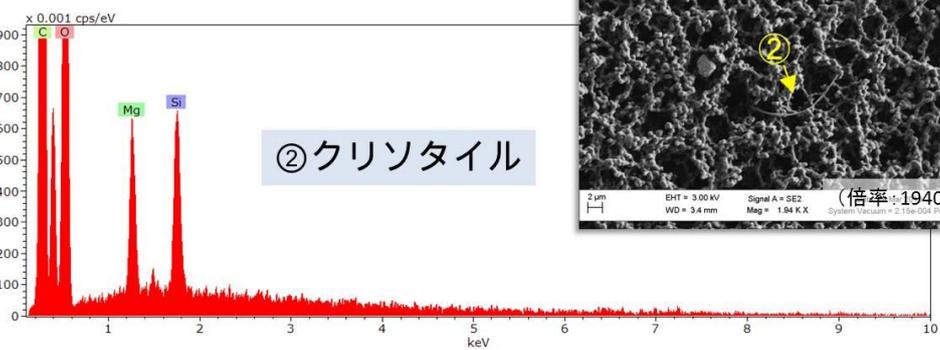
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 513倍)



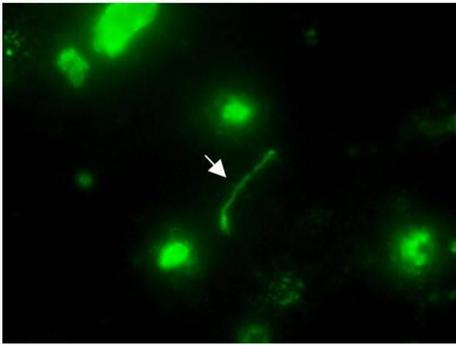
EDXスペクトル



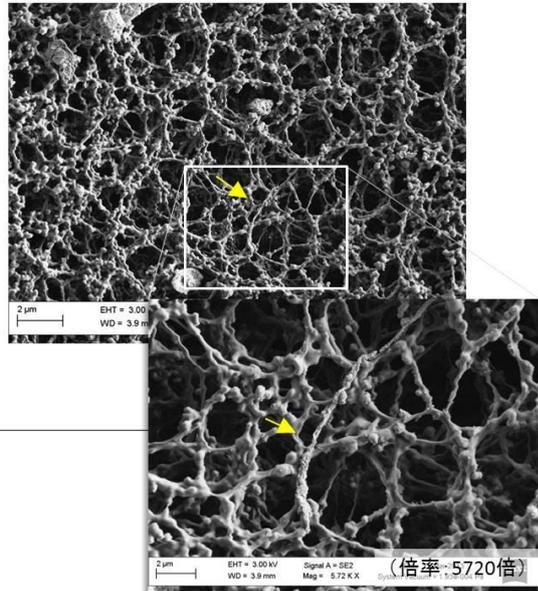
試料 ; No. 27 解体現場

#F095

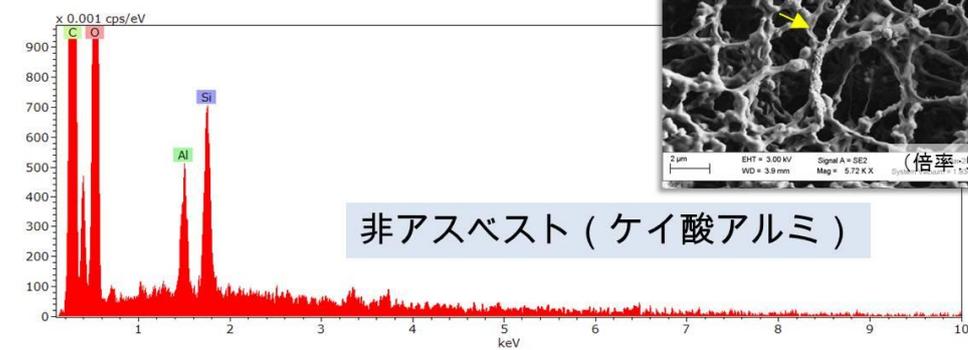
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1940倍)



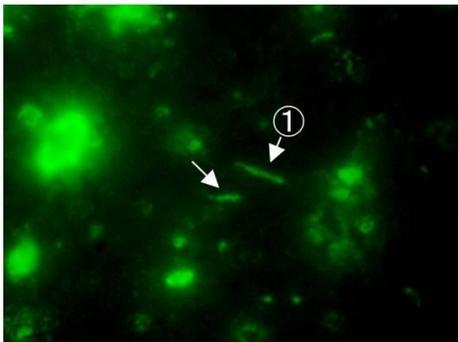
EDXスペクトル



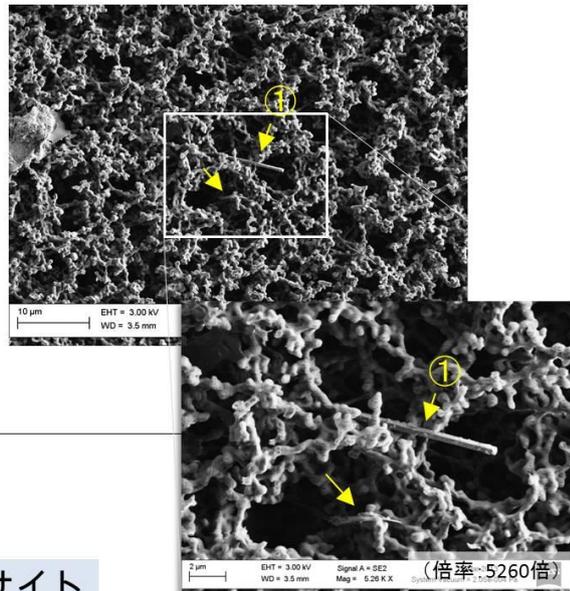
試料 ; No. 28 解体現場

#F096

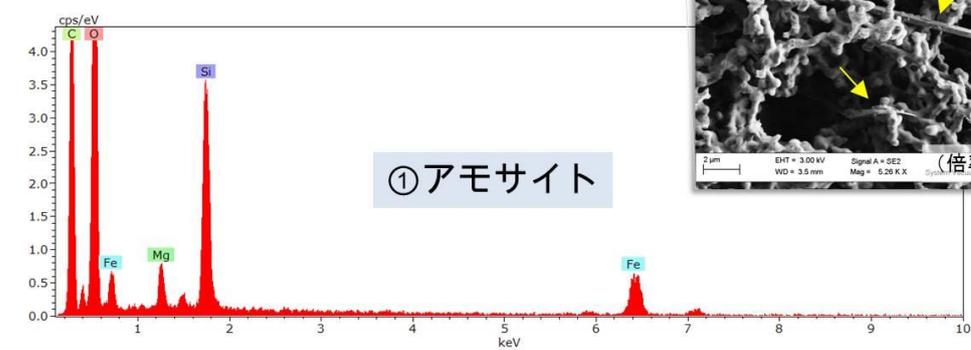
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1790倍)



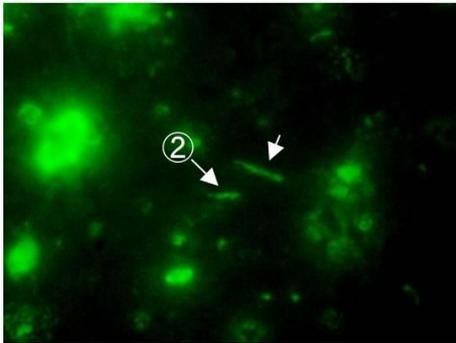
EDXスペクトル



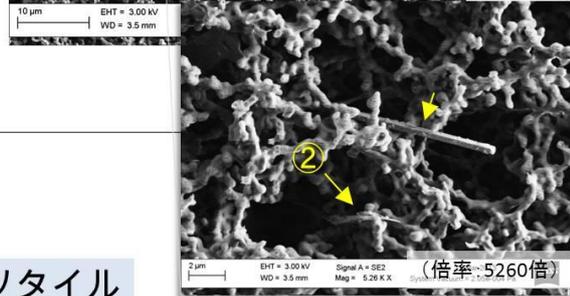
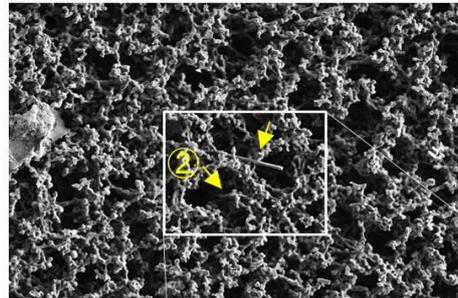
試料 ; No. 28 解体現場

#F097

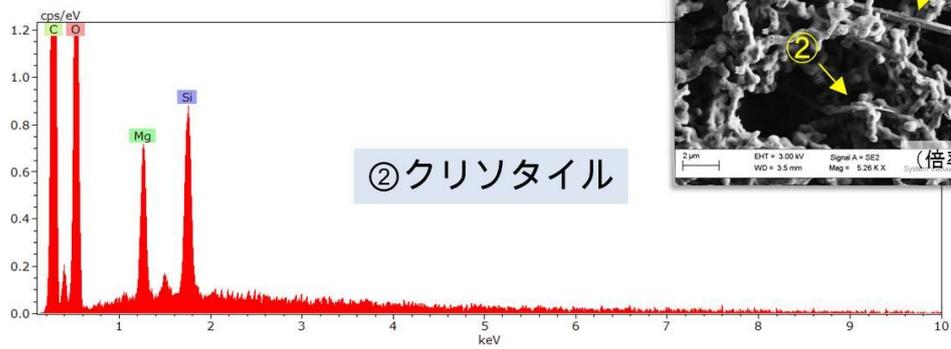
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1790倍)



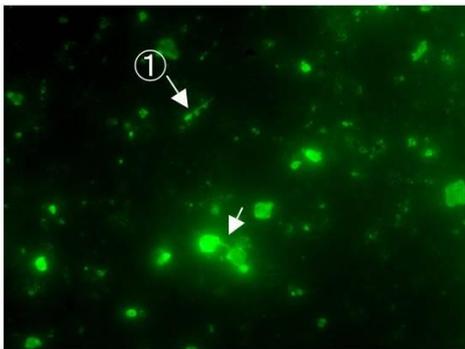
EDXスペクトル



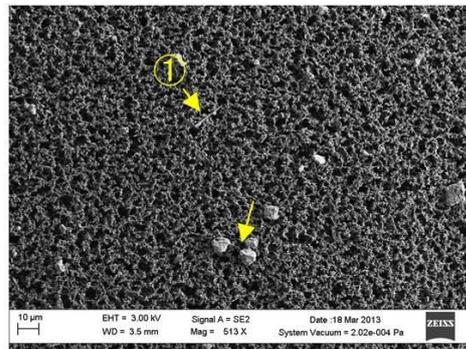
試料 ; No. 28 解体現場

#F098

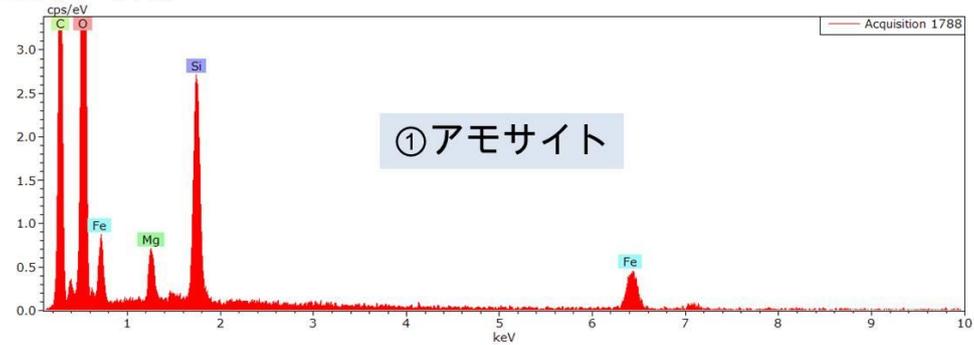
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



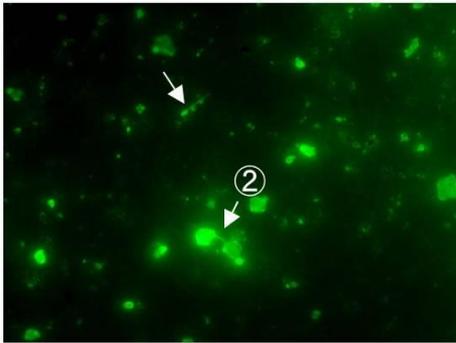
EDXスペクトル



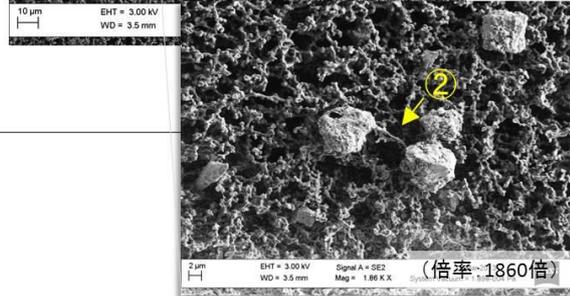
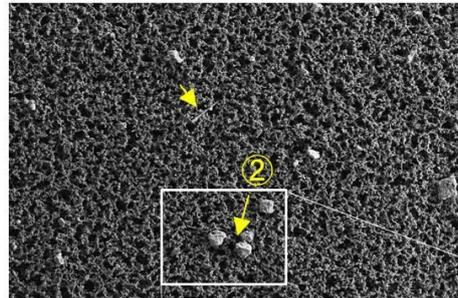
試料 ; No.28 解体現場

#F099

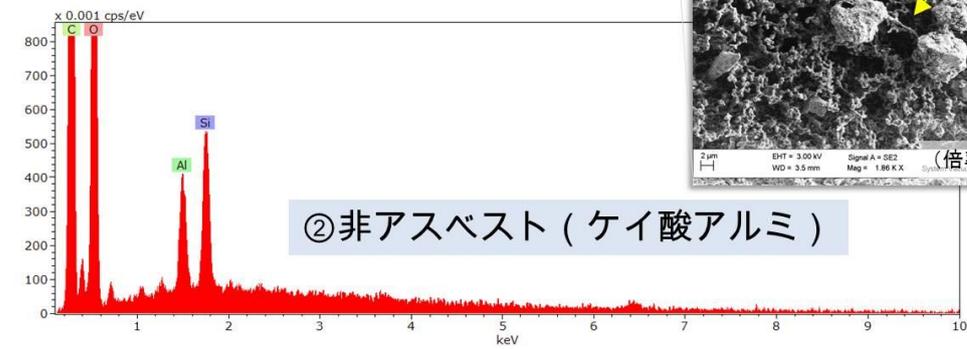
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:513倍)



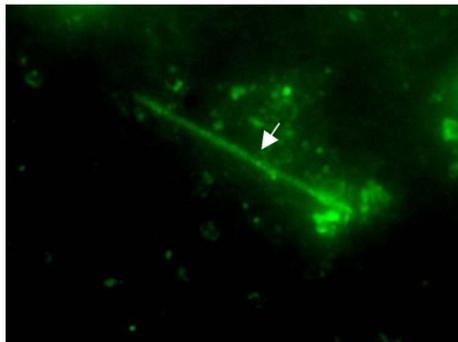
EDXスペクトル



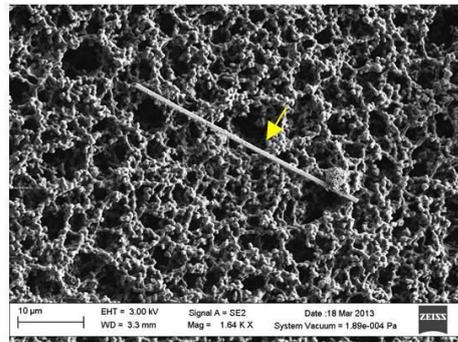
試料 ; No.29 解体現場

#F100

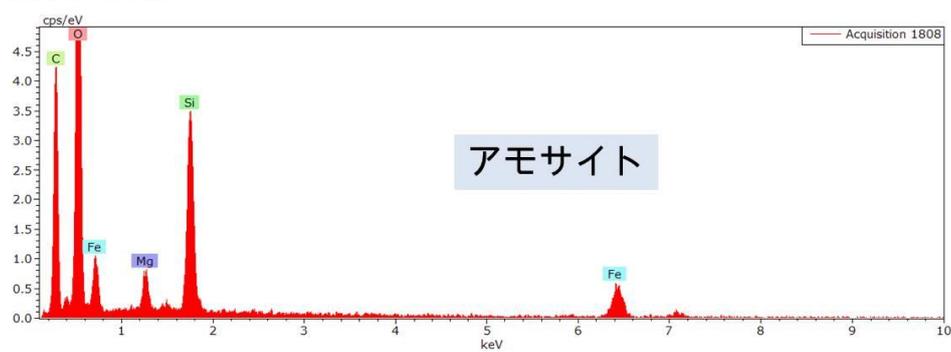
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1640倍)



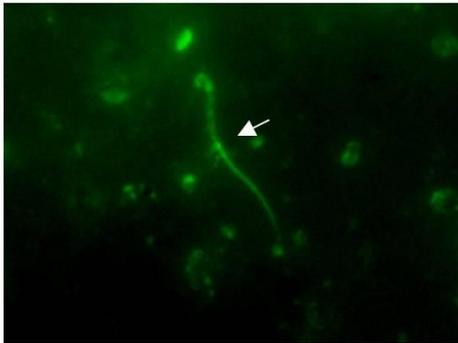
EDXスペクトル



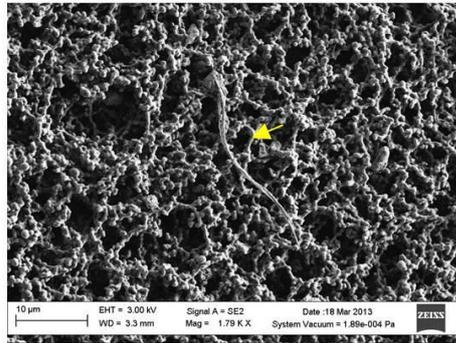
試料 ; No. 29 解体現場

#F101

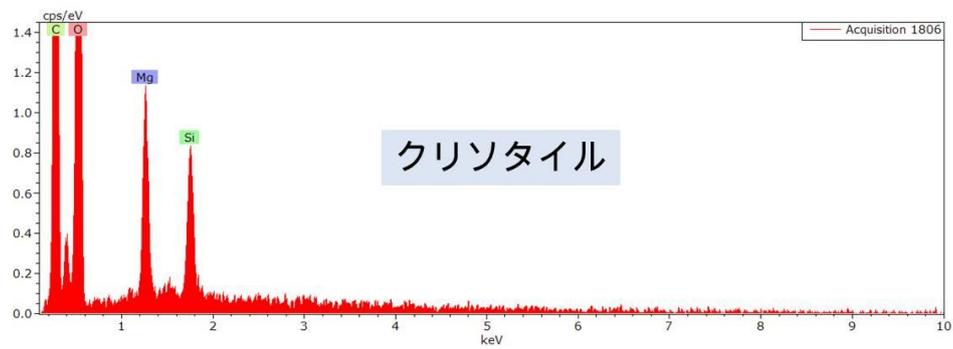
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1790倍)



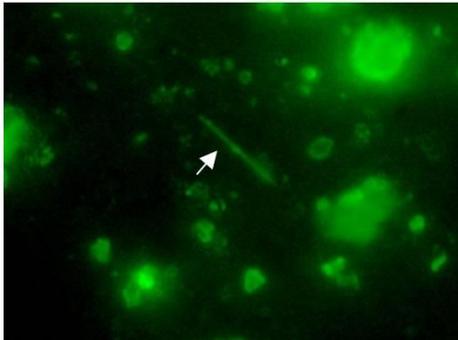
EDXスペクトル



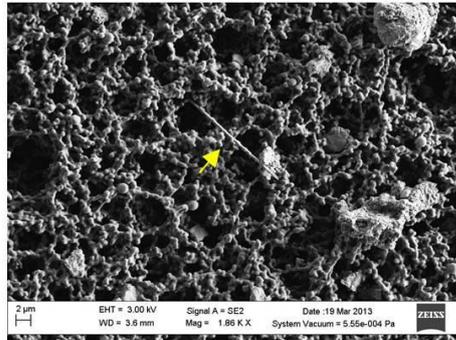
試料 ; No. 30 解体現場

#F102

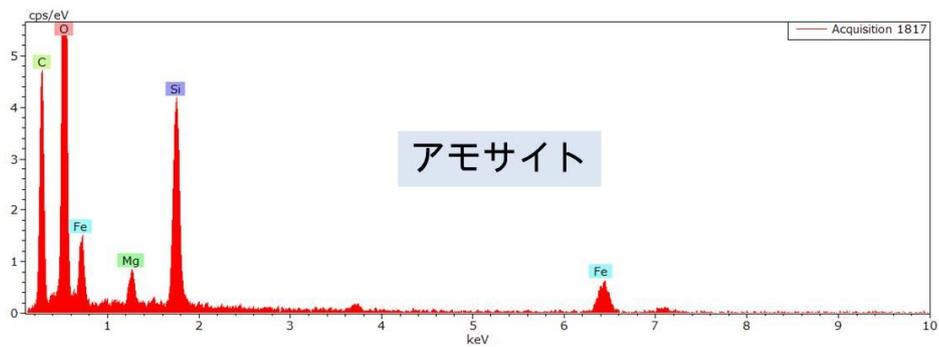
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1860倍)



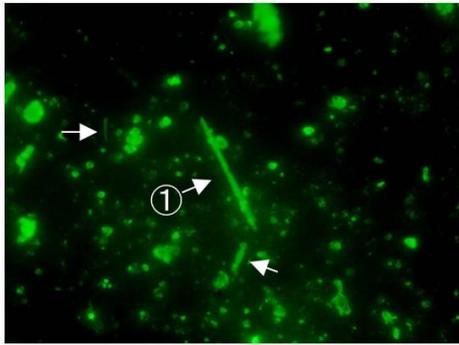
EDXスペクトル



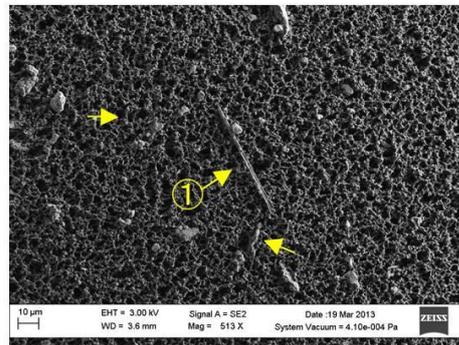
試料 ; No. 30 解体現場

#F103

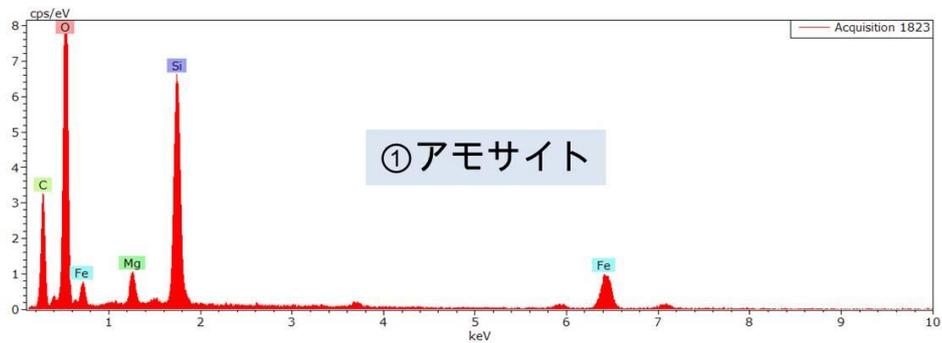
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 513倍)



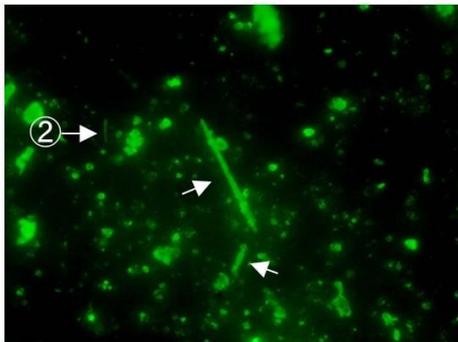
EDXスペクトル



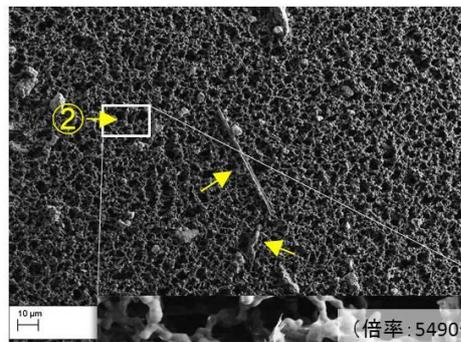
試料 ; No. 30 解体現場

#F104

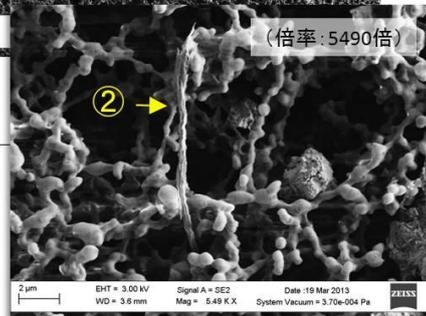
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



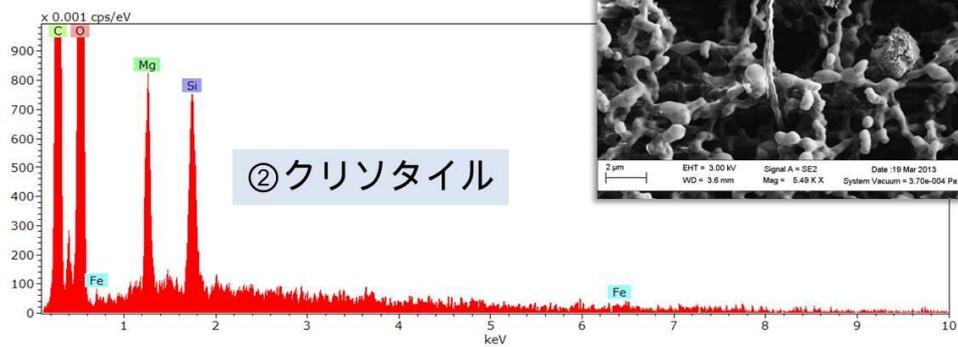
SEM像 (倍率: 513倍)



(倍率: 5490倍)



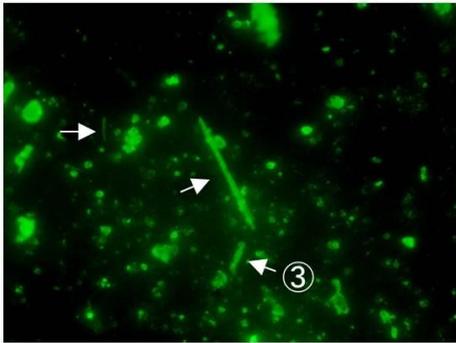
EDXスペクトル



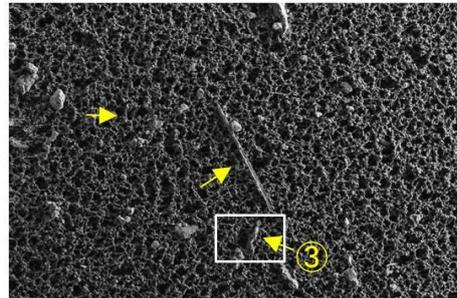
試料 ; No. 30 解体現場

#F105

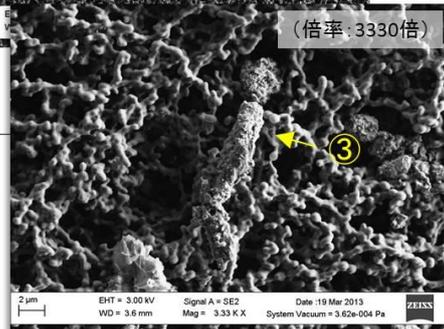
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



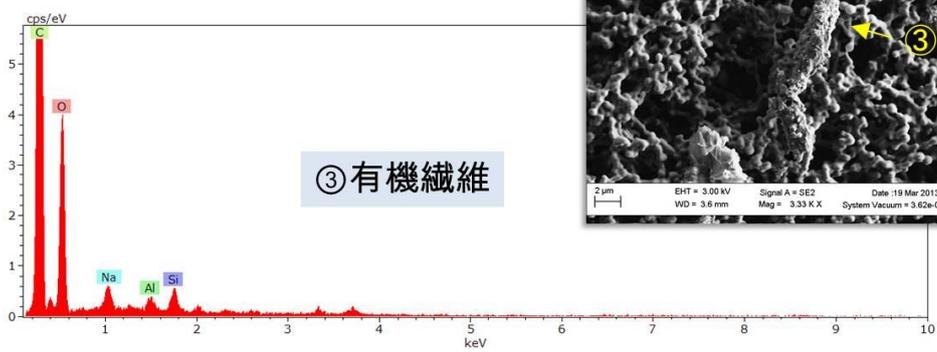
SEM像 (倍率:513倍)



(倍率:3330倍)



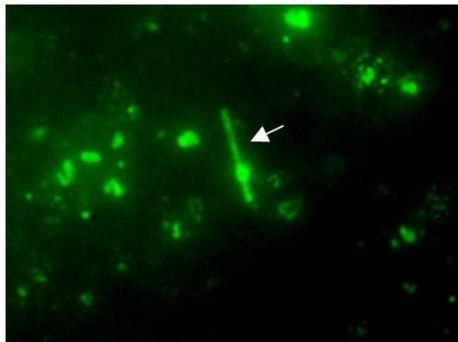
EDXスペクトル



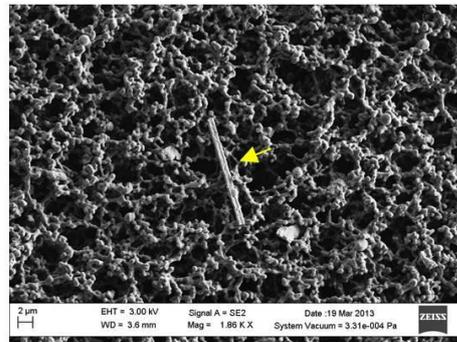
試料 ; No. 31 解体現場

#F106

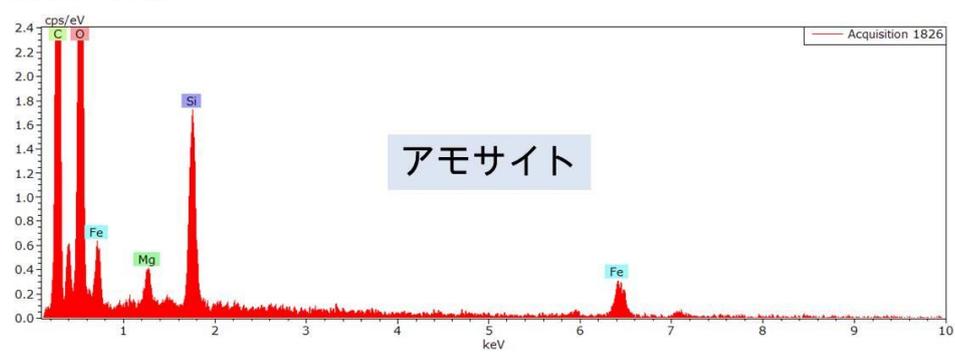
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1860倍)



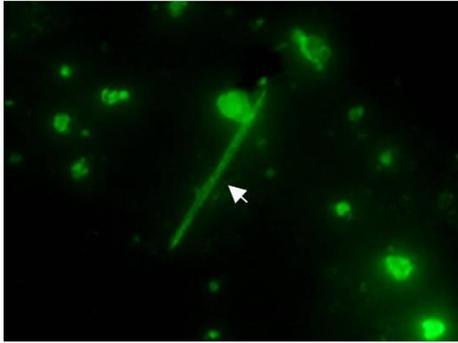
EDXスペクトル



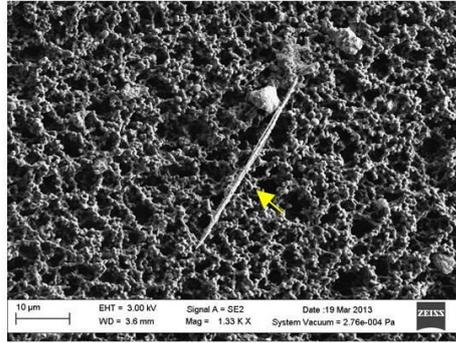
試料 ; No.31 解体現場

#F107

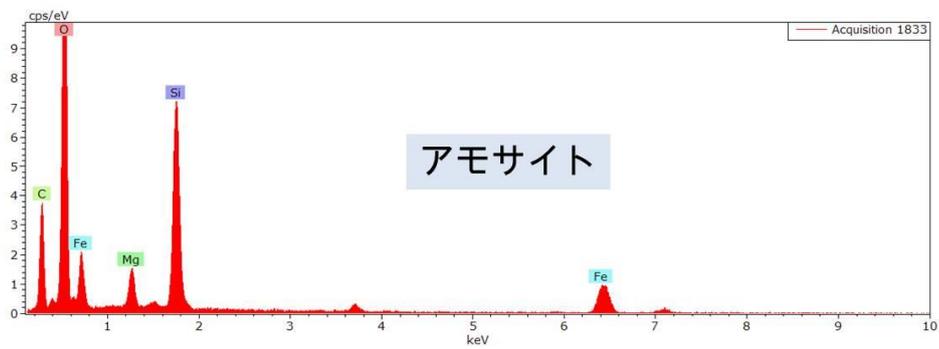
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1330倍)



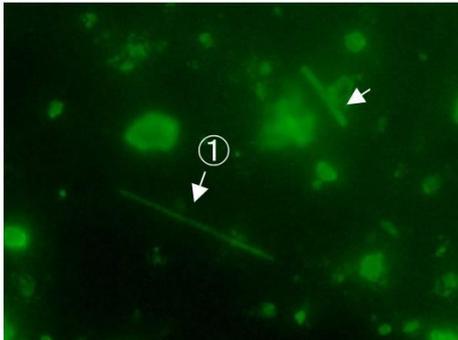
EDXスペクトル



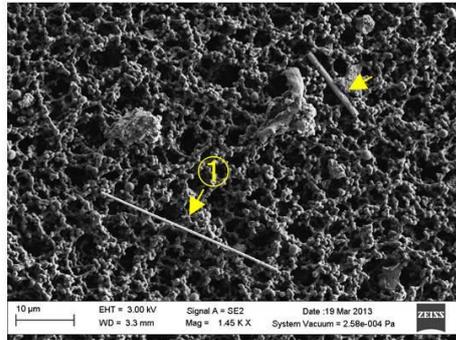
試料 ; No. 32 解体現場

#F108

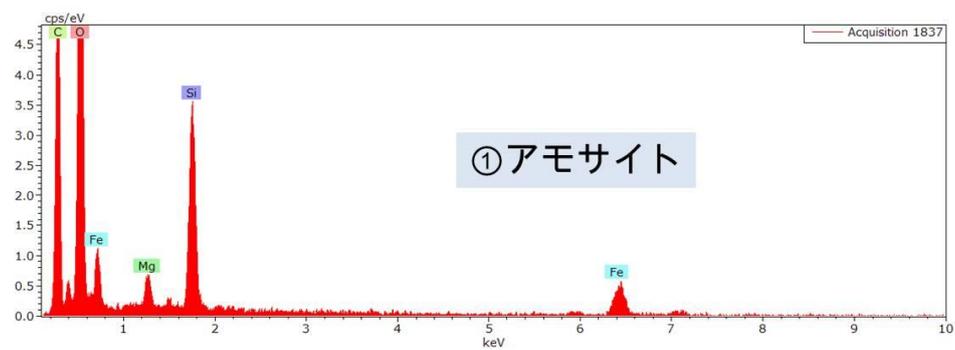
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1450倍)



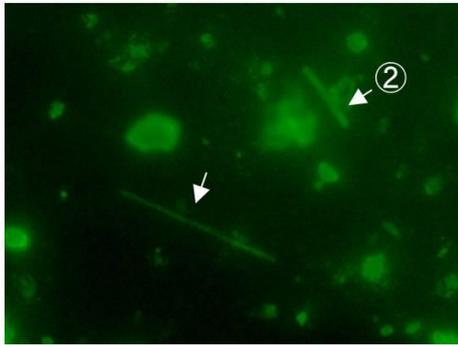
EDXスペクトル



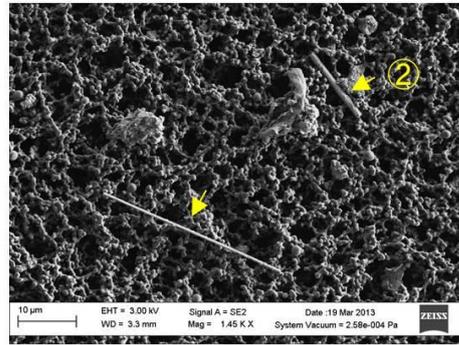
試料 ; No. 32 解体現場

#F109

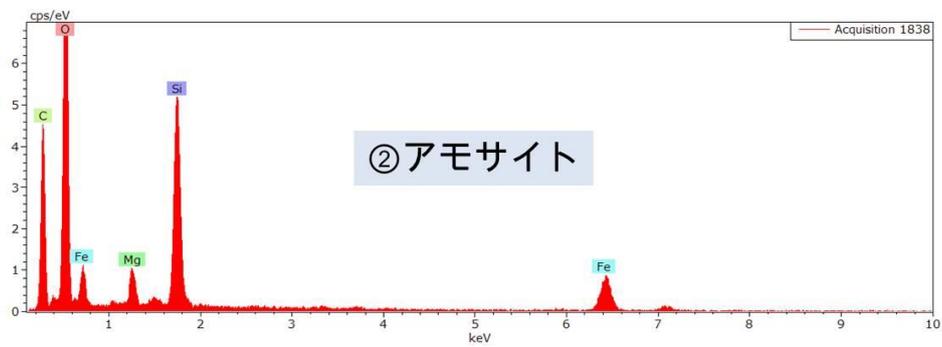
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1450倍)



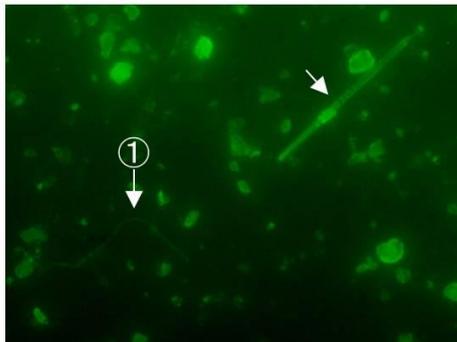
EDXスペクトル



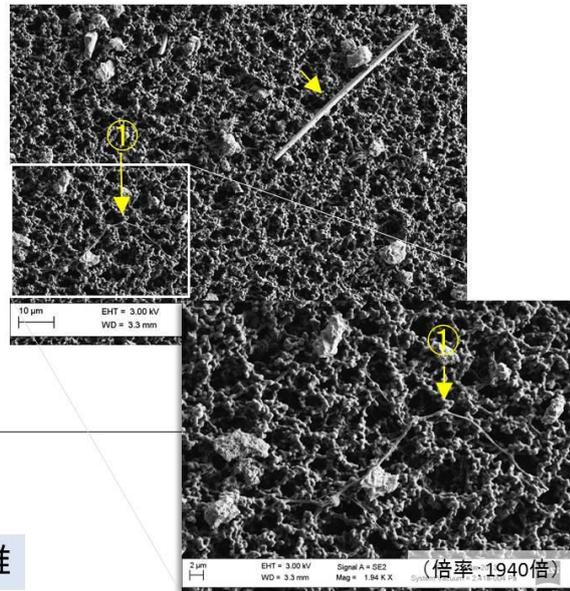
試料 ; No.32 解体現場

#F110

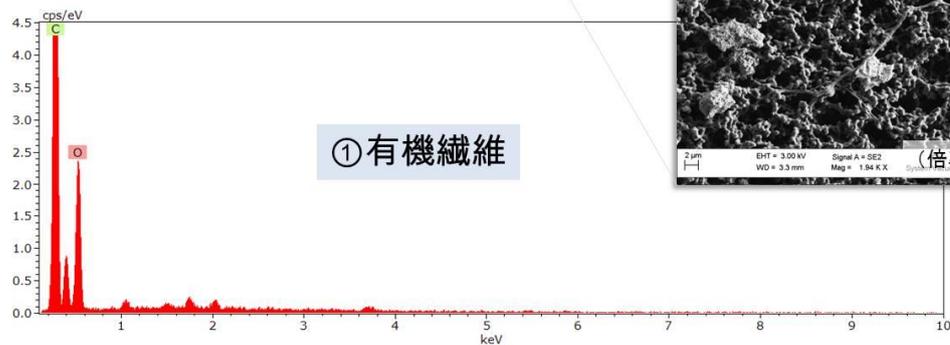
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:880倍)



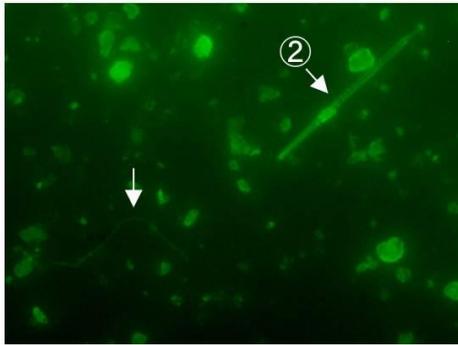
EDXスペクトル



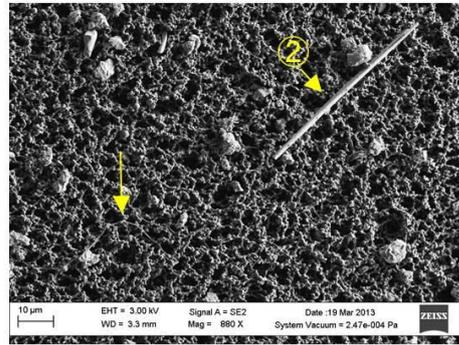
試料 ; No. 32 解体現場

#F111

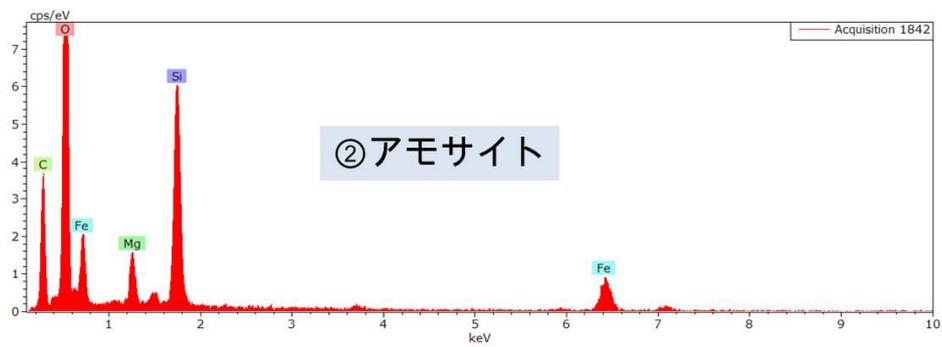
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 880倍)



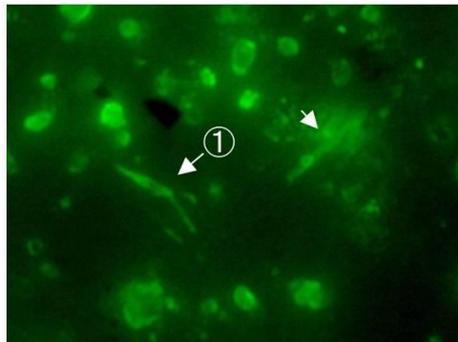
EDXスペクトル



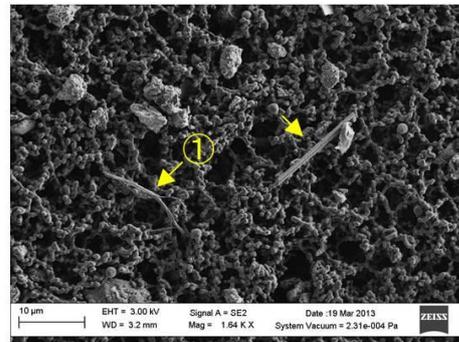
試料 ; No.33 解体現場

#F112

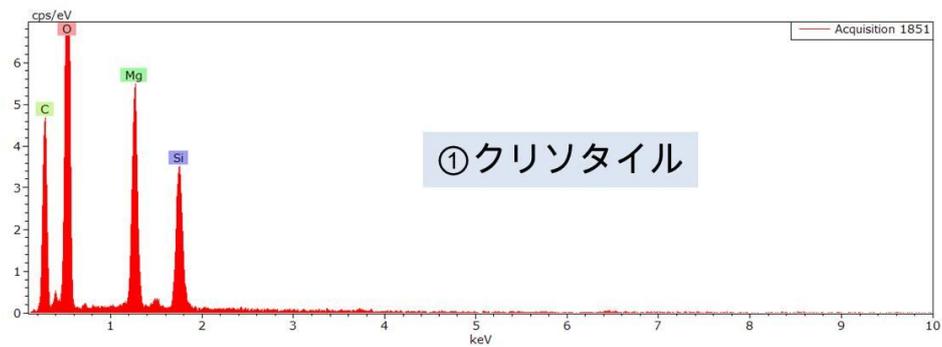
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率: 1640倍)



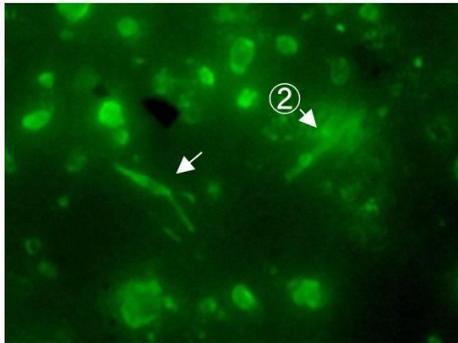
EDXスペクトル



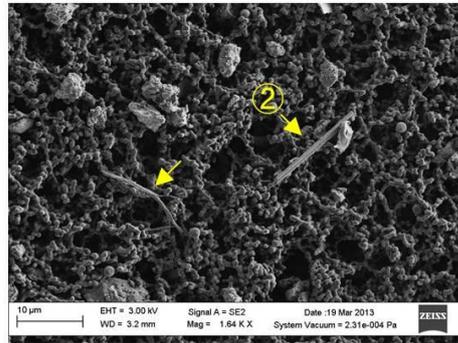
試料 ; No. 33 解体現場

#F113

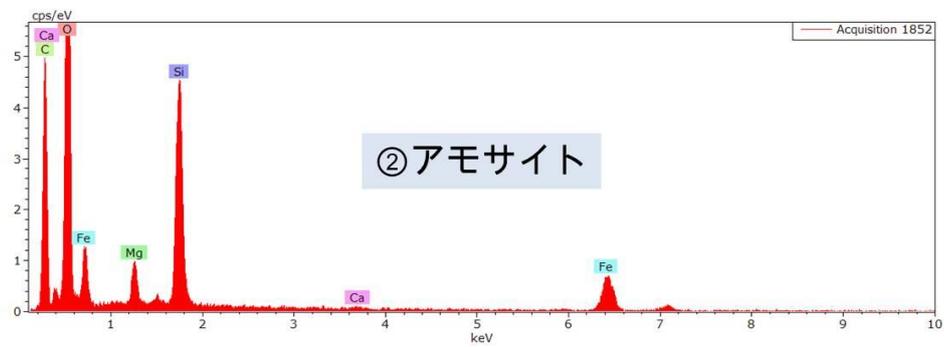
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1640倍)



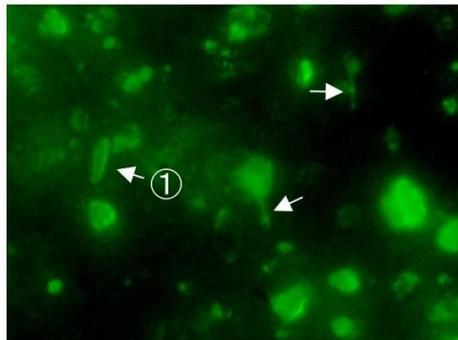
EDXスペクトル



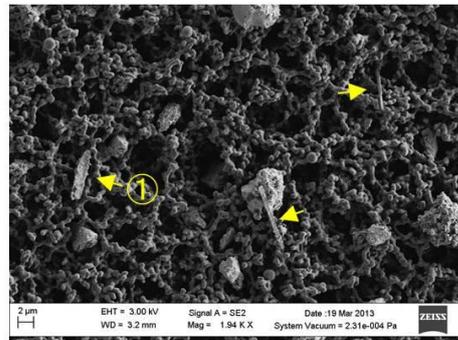
試料 ; No. 33 解体現場

#F114

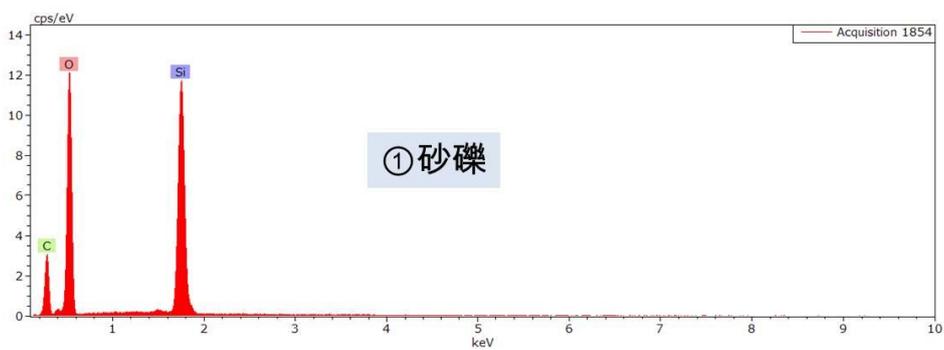
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1940倍)



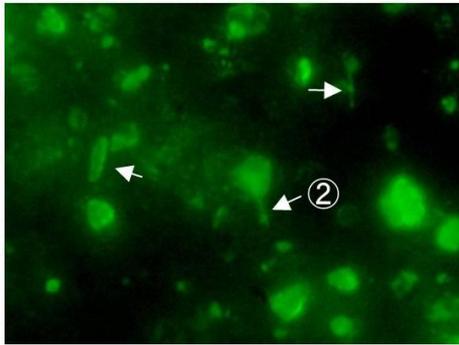
EDXスペクトル



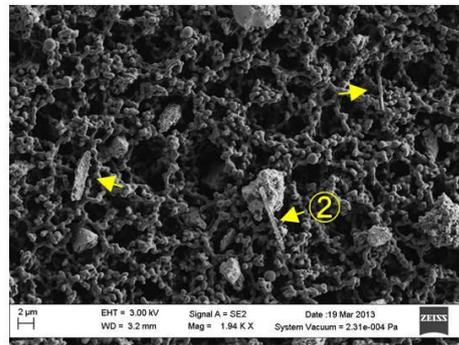
試料 ; No. 33 解体現場

#F115

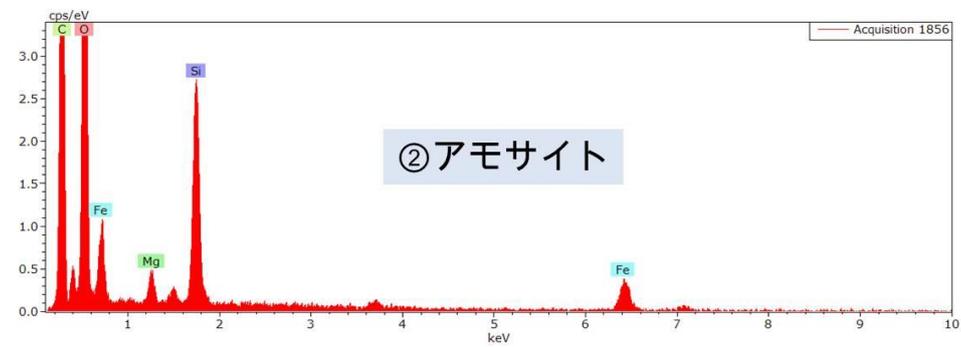
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1940倍)



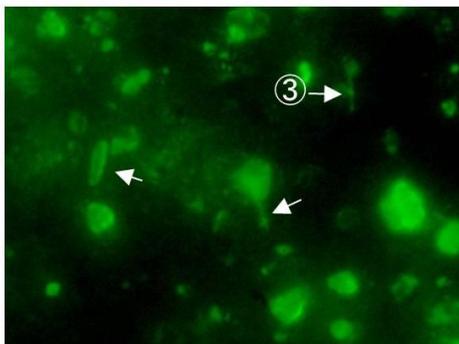
EDXスペクトル



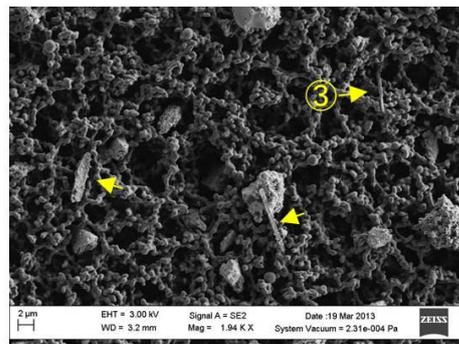
試料 ; No. 33 解体現場

#F116

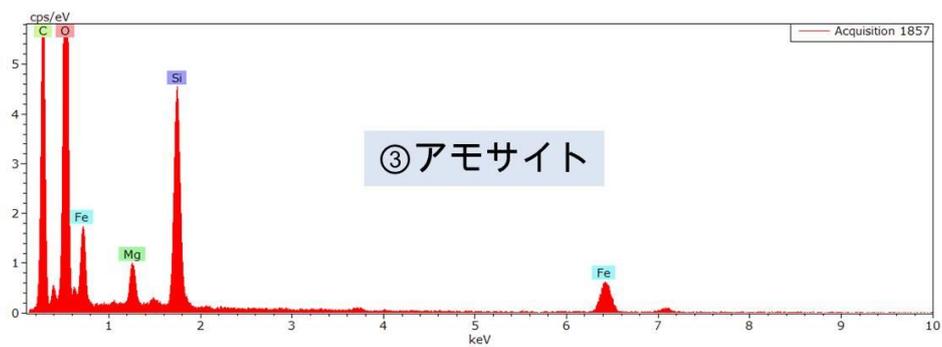
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1940倍)



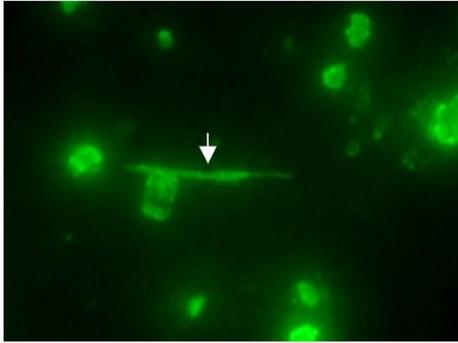
EDXスペクトル



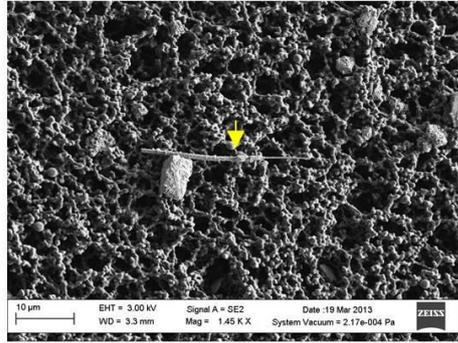
試料 ; No.34 解体現場

#F117

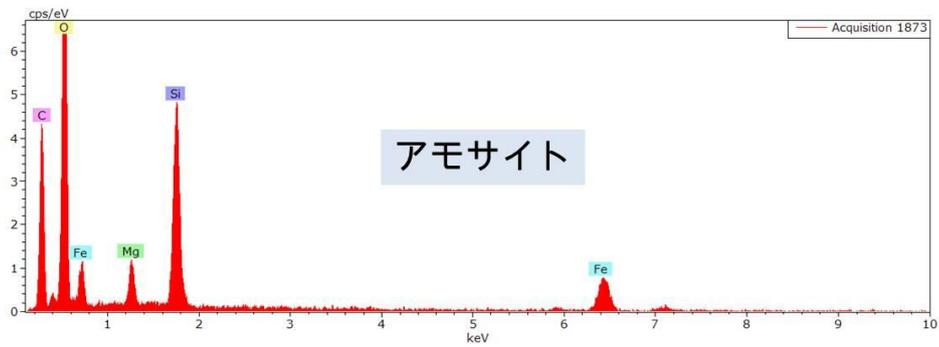
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1450倍)



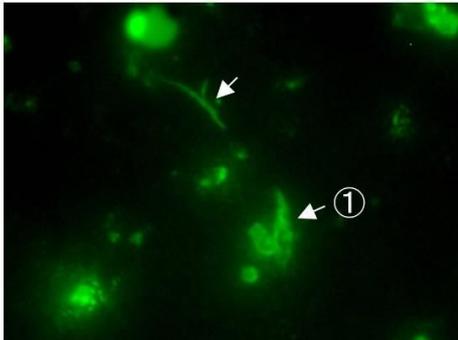
EDXスペクトル



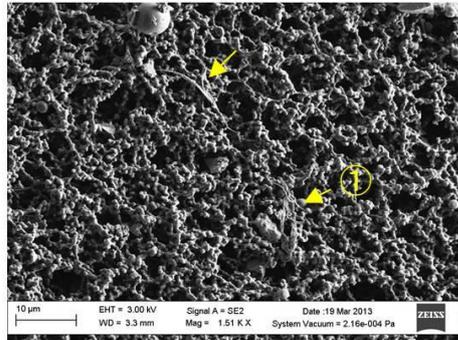
試料 ; No. 34 解体現場

#F118

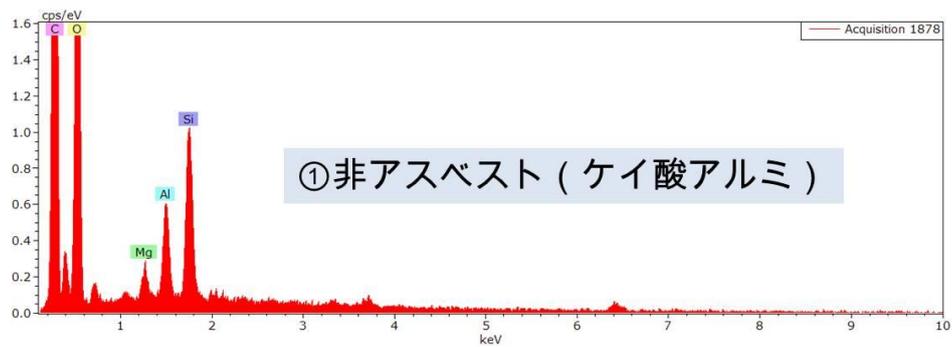
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1510倍)



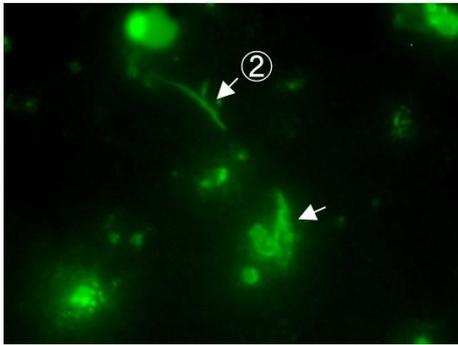
EDXスペクトル



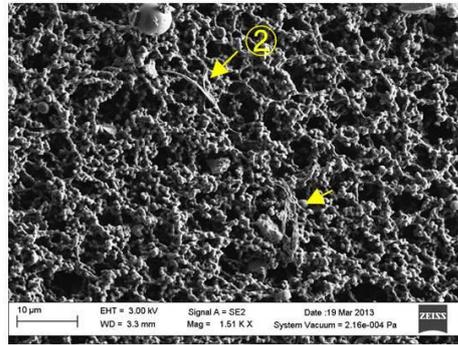
試料 ; No. 34 解体現場

#F119

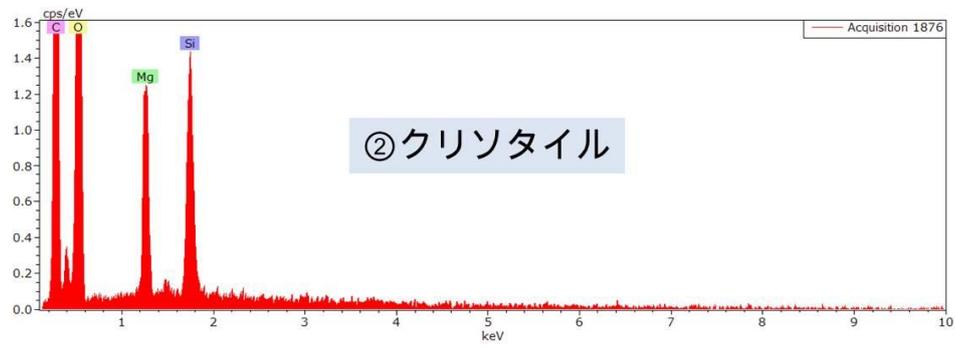
蛍光顕微鏡像 (対物40倍+デジタル)



SEM像 (倍率:1510倍)



EDXスペクトル



## **Development and application of specific bioprobes for rapid asbestos detection to reduce asbestos risk at demolition sites**

Principal Investigator: Akio KURODA

Institution: Hiroshima University, Graduate School of Advanced  
Sciences of Matter  
1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima, Hiroshima  
739-8530, JAPAN  
Tel: +81-82-424-7758 / Fax: +81-82-424-7047  
E-mail: akuroda@hiroshima-u.ac.jp

[Abstract]

Key Words: Asbestos, Rapid detection, Demolition site, Bioprobe, Fluorescence

Current officially approved method for the detection of asbestos in air relies on a combination of two microscopy techniques. First, phase-contrast microscopy is used to count fibers collected on membrane filters during air sampling. If the calculated fiber load is above 1 fiber/L, each fiber needs to be examined under electron microscope using energy-dispersive X-ray spectroscopy in order to distinguish asbestos from non-asbestos fibers. Since this analysis is time-consuming and requires highly skilled operators as well as bulky equipment, it is not suitable for on-site asbestos testing. An emerging alternative to such techniques is the biofluorescence method, which relies on fluorescently labeled proteins or peptides that can selectively bind to specific inorganic materials, making it possible to visualize and detect these materials under fluorescence microscope. With biofluorescence method, even fibers that are below the resolution of the light microscope could be visualized due to fluorescence light they emit against the dark background. Moreover, the detection is generally quite specific due to highly selective binding of biomolecules to their targets. One of the discovered asbestos-binding proteins, DksA selectively binds to chrysotile asbestos in the serpentine mineral group. HNS is specific to amphibole asbestos, but has a somewhat lower specificity, also binding to aluminium silicate fibers, wollastonite and titanium oxide whiskers. In this study, we determined the amino acid sequence of the HNS protein fragment that is responsible for binding to asbestos, and developed a highly specific asbestos probe by removing other fragments of this protein that contribute to non-specific binding to other non-asbestos inorganic fibers. We also achieved a 260-fold increase in the binding affinity of the probe by multiple display of asbestos-binding fragment on streptavidin. Our tests of the developed probe using various fibers found in the air samples from demolition sites indicated high specificity and sensitivity (less than 5% false positive rate and less than 2% false negative

rate). While the currently approved method that relies on the combination of phase-contrast and electron microscopy generally requires several days to obtain results, the biofluorescence method developed here can provide results within an hour following air sampling. Our research has thus established and verified a rapid, on-site analytical method for asbestos risk management at demolition sites.