

課題名 5-1401 バイオ蛍光法によるアスベスト検出技術の実用化とナノ材料動態追跡ツールへの応用

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26～27年度

累計予算額 43,319千円（うち平成27年度：21,104千円）

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、迅速検出、蛍光、バイオプローブ、ナノ材料

研究体制

(1) バイオ蛍光法によるアスベスト検出技術の実用化とナノ材料動態追跡ツールへの応用（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。これまでも解体工事に対する規制があったが、アスベストが飛散する事例や、アスベスト使用の有無の事前調査が不十分である事例が多く見られ、さらに平成23年に発生した東日本大震災の被災地でアスベストの飛散事例が確認され問題となった。そこで、大気汚染防止法の一部を改正する法律案が平成25年3月に閣議決定され、同年6月21日に公布された。この改正により、解体等工事の受注者は、建材中のアスベスト使用の有無について事前に調査をし、調査結果と届出事項を発注者に書面で説明する事が義務付けられることとなった。しかしながら、現場でのアスベスト飛散のモニタリングに対応する技術は未だ確立されておらず、申請者らが開発したバイオ蛍光法の実証と普及が求められている（平成25年第10回中央環境審議会大気・騒音振動部会石綿飛散防止専門委員会資料）。

また、ナノ材料は、医療・産業など様々な分野において技術開発・製品化が進められている。しかし、生細胞にナノ材料を添加すると、細胞内部にナノ材料が取り込まれる事例が報告されており、人体や生体に対する影響が心配されている。実際、カーボンナノチューブはアスベストに似た構造を持つことから、同様に肺ガンなどを誘発する危険性が高いことが分かってきた。安全・安心社会の構築のために、ナノ材料の動態解析のツール開発が急務となっている。

2. 研究開発目的

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。これまでにアスベスト結合タンパク質によるアスベストの可視化において、約30nmのクリソタイル単繊維も簡易な蛍光顕微鏡で観察できることがわかった。すなわち、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なもの）、その存在が検出できるという蛍光顕微鏡の長所が発揮されている。また、顕微鏡下で形態を観察するのみならず、特異的に光らせるために、物質の同定が同時に行なえるという利点がある。一方、現在のアスベスト検査の公定法は、最終的に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できないとされている。本研究では、空気中に飛散するアスベストの検出法として開発したバイオ蛍光法を公定法とするために、現在の公定法である電子顕微鏡法との相関データを蓄積し、普及させるために役立てることを目的とする。さらに、現場では簡易に建材中のアスベストを判定する方法の開発が求められていることから、バイオ蛍光法を建材用に適応できる様に改良を行う。また、バイオ蛍光法を生体影響が懸念されているナノ材料の蛍光可視化に応用するために、酸化チタンや酸化亜鉛、カーボンナノチューブ、銀ナノ粒子などの無機材料に結合するペプチドの取得を行なう。これらナノ材料に結合する蛍光バイオプローブを開発し、動態解析のツールとすることを目的とする。

3. 研究開発の方法

バイオ蛍光法と公定法（電子顕微鏡法）による測定結果の比較については、実際の解体現場で捕集された大気サンプルを用いて測定を行った。バイオ蛍光法では、位相差蛍光法及び蛍光法の二通りの分析方法により測

定を行った。両手法において共通する蛍光プローブは、シリコンバイオ社から発売されている蛍光タンパク質(限定HNSタンパク質を蛍光物質[CF488A]で修飾されたストレプトアビジン上に提示させたもの)を用いた。フィルター上のアスベスの蛍光染色(前処理)については、シリコンバイオ社のマニュアルに従い、以下の様に行った。大気を捕集した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(1滴は約40 μ l)滴下し、完全に吸収させた(図1)。続いて蛍光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、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。蛍光法用には、この段階のフィルターをスライドガラスに乗せてグリセロールで封入し、サンプルとした。蛍光顕微鏡(Axio Imager、カールツァイス社、あるいはLumascope、Etaluma社)にサンプルをセットし、アスベスト繊維(幅3 μ m未満、長さ5 μ m以上、アスペクト比3以上)を計測した(蛍光法)。

位相差蛍光法用には、フィルターの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 $^{\circ}$ 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(図1)。サンプルを位相差蛍光顕微鏡(Primostar、カールツァイス社、あるいはBX60、オリンパス社)にセットして位相差モードで繊維(幅3 μ m未満、長さ5 μ m以上、アスペクト比3以上)を計測した。さらに、蛍光モードに切り替え、各繊維の蛍光の有無によってアスベストかどうかを判定した(位相差蛍光法)。

電子顕微鏡法によるアスベスト計測については、フィールドエミッション式走査型電子顕微鏡を用いて、『アスベストモニタリングマニュアル4.0版』(環境省)記載の方法に従った。

バイオ蛍光法を利用したアスベスト建材の分析については、アスベスト結合タンパク質としてHNS60-90、及び、改変型TmAFPタンパク質(野生型TmAFPの第37~61番目の中で、第39、41、51、53番目のスレオニン残基をリシンに置換し、第56番目のリシンをグリシンに置換したもの)を用いた。Cy3またはCF488で標識されたストレプトアビジンをアスベスト結合タンパク質に付加し蛍光プローブを作製した。粉碎したアスベスト含有建材(1~10mg)をマイクロチューブに量り取り、7%のギ酸200 μ Lを加え、5分間攪拌した(ギ酸処理無しの場合は、このステップを省いた)。小型卓上遠心機で遠心し(2,000g、3分)、上清を捨てた。次に1Nの水酸化ナトリウム水溶液を加え、同様の操作を行った。さらに精製水、緩衝液(0.3Mリン酸緩衝液[pH8.0]、0.3M NaCl、1%デオキシコール酸ナトリウム、0.5% Triton X-100)を用いて同様に処理を行った。続いて、アスベスト結合プローブ(HNS60-90-Cy3、又は、改変型TmAFP-Streptavidin-Cy3[10nM]、あるいは改変型TmAFP-Streptavidin-CF488A[30 nM])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)を加え、5分間攪拌した。小型卓上遠心機で遠心し(2,000g、3分)、上清を捨てた。さらに洗浄緩衝液(0.3Mリン酸緩衝液[pH8.0]、0.3M NaCl、1%デオキシコール酸ナトリウム、0.5% Triton X-100)を用いて同様の処理を行い、余分な蛍光試薬が残らないよう洗浄した。再度50 μ lの緩衝液を加え分散させた後、スライドガラス上に1滴滴下し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

ナノ材料結合ペプチドの探索については、以下の様に行った。大腸菌(*Escherichia coli* MG1655)破碎液をタンパク質ライブラリーとし、チューブ中で銀粒子と混合し、洗浄後、なおも銀粒子に結合するタンパク質をTricine-SDSゲル電気泳動により解析し、得られたタンパク質をゲルから切り出して、MALDI-TOF質量分析によって銀ナノ粒子結合タンパク質の同定を行った。取得した銀結合タンパク質をCy3-maleimide monoreactive dye(GE Healthcare社)により蛍光修飾し、銀ナノ粒子結合蛍光プローブを作製した。また、報告されている無機材料(酸化チタン、酸化亜鉛、銀)結合ペプチドのアミノ酸配列をもとに、ビオチン標識したペプチドの合成を行なった(Eurofins Genomics社)。カーボンナノチューブ結合ペプチドについては、Mastoparan-X(アミノ酸配列: INWKGIAAMAKKLL、アミノ酸は一文字表記で記述)を用い、このペプチドをビオチンで修飾したもの(Biotin-Mastoparan-X)を合成した。さらにこれらのビオチンで標識された無機材料結合ペプチドを、Cy3蛍光体あるいは、Brilliant Blue 515で修飾されたストレプトアビジンと混合することによって蛍光標識を行ない、無機材料結合蛍光プローブを作製した。

蛍光バイオプローブによるナノ粒子の観察については、チューブ中でナノ粒子(カーボンナノ粒子、酸化チタンナノ粒子、酸化亜鉛ナノ粒子、銀ナノ粒子)と蛍光プローブを反応させ、この混合液をスライドガラスの上に乗せ、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。蛍光顕微鏡による蛍光観察には、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:

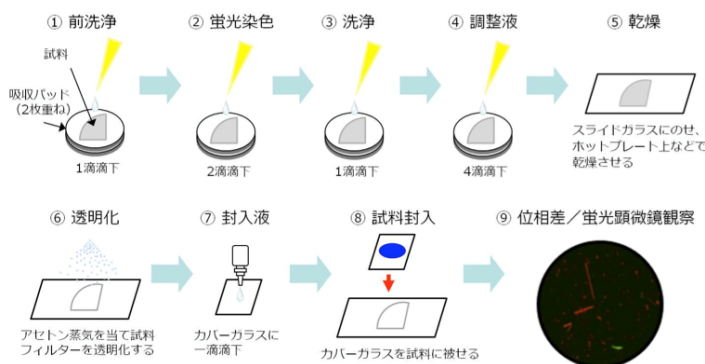


図1、位相差蛍光法の前処理

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)を使用した。また、蛍光検出されたナノ粒子の粒径を知るため、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡間でステージ上の位置情報を同期させ同一視野を再現できる光電子相関顕微鏡(カールツァイス社)を用いた。観察用試料は、チューブ中でナノ粒子に蛍光プローブを結合させた後、フィルターに固定化し作製した。作製した試料を蛍光顕微鏡で観察し、検出された同一のナノ粒子を電子顕微鏡で特定して、そのサイズを測定した。

4. 結果及び考察

1) バイオ蛍光法と公定法(電子顕微鏡法)の比較

現在、アスベスト検査の公定法は、まず位相差顕微鏡によって非アスベストを含む総繊維での繊維数濃度を測定し、大気1リットルあたり繊維1本以上(1本/L)の場合、電子顕微鏡とX線分析による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(『アスベストモニタリングマニュアル第4.0版』、環境省)。位相差蛍光法は同様にまず位相差モードで総繊維を計測し、次に蛍光モードに切り替えてアスベストかどうかを判定する方法である(1サンプル約1時間で分析)。バイオ蛍光法を普及させるために、位相差蛍光法と、現在の公定法である電子顕微鏡法との相関データを蓄積し、有効性を検証した(図2)。実際の大气捕集フィルター64種類(リアルタイムモニターのバックアップフィルター14種類を含む)について位相差蛍光法による測定(図2上)と、公定法(電子顕微鏡法)による測定(図2下)を実施した。合計

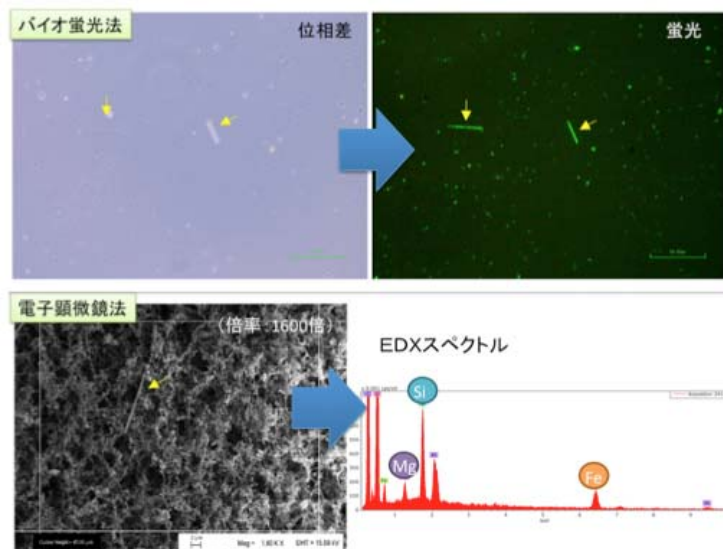


図2、バイオ蛍光法(位相差蛍光法)による観察画像(上)と電子顕微鏡法(SEM)による観察像及びEDXスペクトル(下)。

64サンプルについて比較した結果、両方法による測定は非常に高い相関性を示すことが分かった(相関係数 $r=0.87$) (図3左)。これまでアスベスト濃度と疫学的データとの相関は、位相差顕微鏡による計測によって行われてきたため、アメリカでは、位相差顕微鏡で計測した総繊維数に、電子顕微鏡で判定したアスベストの割合(総繊維中のアスベストの割合)をかけて補正したものが用いられる。位相差蛍光法と補正された電子顕微鏡法のアスベスト濃度は、よりよく相関することがわかった(相関係数 $r=0.97$) (図3右)。

アスベスト濃度を確定させる手順として、『アスベストモニタリングマニュアル第4.0版』(環境省)では、電子顕微鏡法による検査の際、位相差顕微鏡を意識して、幅 $0.2\mu\text{m}$ 以上の繊維のみを計数対象とすることになっている。一方、バイオ蛍光法では、電子顕微鏡でしか見えないような幅 30nm のクリソタイルの単繊維でも、蛍光顕微鏡下で観察可能になることが分かっている。そこでサンプル中に微細なクリソタイル繊維が多く存在する場合、位相差顕微鏡法をベースとした計測法による結果と比較すると、バイオ蛍光法では感度がより高いために結果が高くなることが考えられた。そこで、実際の解体現場から採取した試料36種(リアルタイムモニターのバックアップフィル

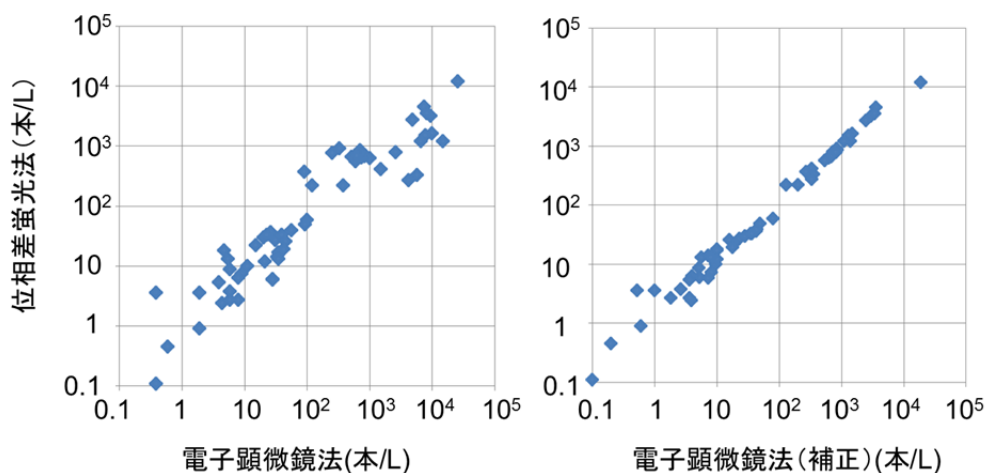


図3、位相差蛍光法と公定法(電子顕微鏡法)によるアスベスト分析の比較(左)。位相差顕微鏡法で得られた数値で補正したものと比較した(右)。

ター20種を含む)を用いて、蛍光法と電子顕微鏡法による計測結果の比較を行い、測定法の違いによる影響を調べた。36種のサンプルについて事前の資料調査から判明した使用アスベストの種類は、クリソタイル(19)、アモサイト(6)、クロシドライト(11)であった。また、蛍光法による測定の実施については現場での検査を想定して、可搬性に優れた小型蛍光顕微鏡(Lumascope、Etaluma社)を用いて行った。結果を検証したところ両方法による計測結果は、非常に相関性が高いことが分かった($r=0.995$) (図4)。図3と図4のサンプルは同一ではないので正確には比較できないが、蛍光法と電子顕微鏡法の相関は、位相差蛍光法との比較を上回る結果であった。元来、位相差顕微鏡と電子顕微鏡では検出感度が異なるために、位相差顕微鏡により検出繊維を制限する位相差蛍光法よりも、電子顕微鏡法との測定結果に近くなるのかもしれないと考えられた。

電子顕微鏡は、X線分析装置を付けると1000万円以上の価格となる(アスベスト検査会社に電子顕微鏡による検査を依頼すると一回数十万円必要となる)。一方、蛍光法は消耗品として一回数千円の経費が必要となるが、蛍光顕微鏡は100万円以下でも購入できるため、初期投資が少なく広く普及が期待できる(図5)。特に、アスベストの使用の有無が不明な解体現場、不十分な事前調査で「アスベスト無し」とみなされている疑いのある現場、また災害などで資料調査が困難な事態において、迅速にアスベスト濃度を測る必要がある場合、蛍光法による検査が有力な選択肢となると考えられた。

2) 解体現場でのアスベスト検査のためのバイオ蛍光法の改良

建材中に存在するアスベストの分析方法は、偏光顕微鏡法や位相差分散顕微鏡法などが知られている。偏光顕微鏡法では、ステージを回転させ偏光板を抜き差しするなどの複雑な操作が必要になる。また、位相差分散顕微鏡法では、複数の浸液を用いた試料の調製が必要で、さらに感度があまり良くないため細い繊維の判定ができないなどの問題があった。バイオ蛍光法は、簡便で高感度な検出方法である。そこで、バイオ蛍光法を建材中に存在するアスベストの検出に応用するために検討を行なった。

建材中に存在する浮遊する巨大な粒子を減らすために、ギ酸処理の工程を加えることが有効と考えられた。しかし、ギ酸処理を行うと、従来型のアスベスト結合タンパク質の結合量が大幅に下がってしまう問題があった。ギ酸処理後、NaOH処理と水洗浄の工程を加える事で、結合量の低下はある程度抑えられることが分かったが、処理工程が増え複雑になる問題が残った。そこで、別途アスベスト結合タンパク質として開発されていた改変型TmAFPタンパク質(改変型TmAFP)を利用することとした。TmAFPタンパク質は、不凍タンパク質として知られ、氷の表面に結合して、氷の結晶の成長を抑制するタンパク質である。平行な β シートからなる平面性の高い領域をもつ分子で、 β シートの両端にあるスレオニン残基が、氷の表面の酸素原子と相互作用

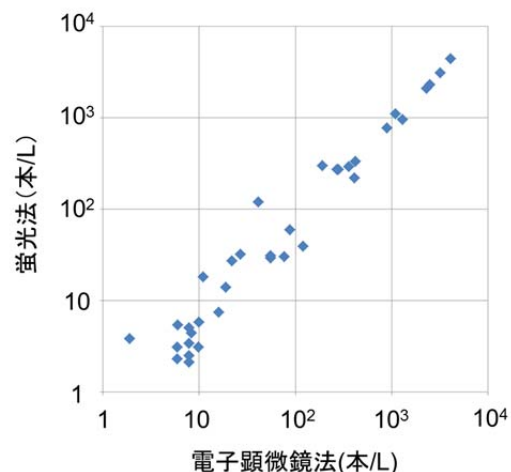


図4、蛍光法と公定法(電子顕微鏡法)によるアスベスト分析の比較



図5、蛍光法によるアスベスト検査の普及を目指し、アスベスト計測講習会を4回行った(平成26年6月4日、平成26年10月8日、平成27年5月27日、平成27年11月18日、計4回、約40名の参加、環境省環境調査研修所にて)。

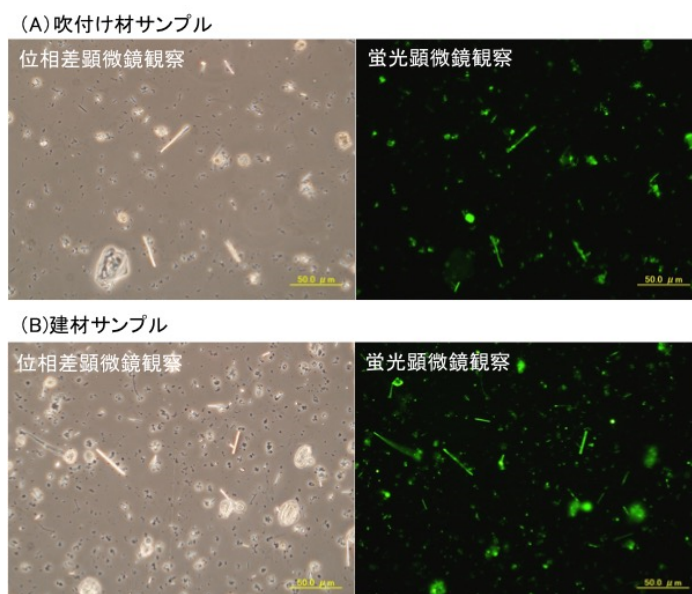


図6、吹付け材(A)と建材(B)に含まれる角閃石系アスベストの蛍光検出。

することにより氷と強く結合する。このTmAFPの持つ特徴的な平面性の高い構造は、氷の表面だけでなく、様々な無機固体表面に結合する分子骨格として利用できると考えられる。改変型TmAFPは、野生型TmAFPの第37～61番目の中で、第39、41、51、53番目のスレオニン残基をリシンに置換し、第56番目のリシンをグリシンに置換したもので、アスベストに強く結合する。この改変型TmAFPを用いて、実際の建材サンプル中(12.3%のクロシドライトを含む吹付け材、及び3.3%のアモサイトを含む建材)のアスベストの検出を行なった。具体的にはギ酸処理後に蛍光標識した改変型TmAFPを結合させ、洗浄後、処理したサンプルを蛍光顕微鏡で観察した。その結果、吹付け材及び建材サンプルの両方とも、角閃石系アスベストだと思われる繊維に、強い蛍光が観察された(図6)。以上の結果から、改変型TmAFPを用いることで、バイオ蛍光法を建材中の角閃石系アスベストにも応用できることがわかった。また、すでに開発しているDksAを用いれば、クリソタイル(蛇紋石系アスベスト)が検出できる。以上、建材のギ酸処理からプローブ結合まで10分で終了するアスベスト迅速検査法が開発できた。

さらに、現場で蛍光法をより迅速に実施するためには、携帯型の蛍光顕微鏡が必要である。3Dプリンターによる試作器の製作や、WiFi機能付きカメラ(DSC-QX100、ソニー社)、タブレットPC(iPad-mini2、アップル社)などの家庭用機器を利用した試作器の製作を通して、検討した。その中で、iPad-miniを利用すると非常に使いやすく、安価で高性能な蛍光顕微鏡が開発可能であることが分かった。そこで、iPad-miniを利用した試作器をさらに改良し、現場への携行性と使用感を高めたモデルの試作を行った。その結果、箱型ボディー内部に光学系(レンズ20倍、開口数0.4、LED励起光470nm、蛍光フィルター510nm)を収納し、片手で持てるキャリングハンドルを装備し、モバイルバッテリーで動作可能なiPad蛍光顕微鏡が完成した(図7)。天板にiPadを載せることで、iPadの背面内蔵カメラを光路に接続すると、ディスプレイ上の表示倍率において約300倍、iPadの表示拡大機能を使えば約1,000倍で観察を行うことができた。理論上の分解能は $0.7\mu\text{m}$ であった。完成した顕微鏡でアスベストの蛍光観察を行ったところ、iPadの画面上で明瞭に観察することが可能であった。また、iPadの通信機能を使って、離れた検査室に画像をリアルタイムで送ることができた。これによって、現場に熟練者がいなくとも、検査室に送る事で、判定のサポートができると考えられた。あるいは、ホストコンピュータで解析して、自動で結果をレポートすることも可能と考えられた。バイオ蛍光法によるアスベスト測定実施のために有力な顕微鏡として利用できると考えられた。



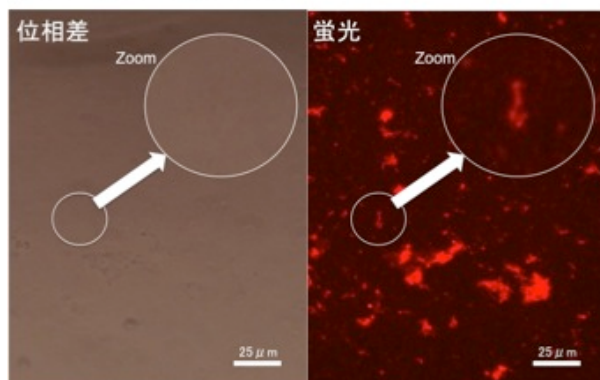
図7、開発した携帯型蛍光顕微鏡。

3) ナノ材料に結合する蛍光バイオプローブの開発と蛍光検出への応用

カーボンナノチューブ(CNT)は、グラフェンシートが単層または多層で繊維状になった物質で、他ではみられない特殊な物性をもつことから、エレクトロニクス分野をはじめさまざまな分野で応用されている。しかし、CNTは、繊維状の形状を持ちアスベストと同じように、悪性中皮腫を引き起こす事が報告された。現在、CNTの観察には電子顕微鏡が用いられており、日常的にCNTの飛散をモニタリングする方法は確立されていない。一方、バイオ蛍光法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。ナノマテリアルは、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。そこで、CNTの検出にバイオ蛍光法を応用すれば、手間のかかる電子顕微鏡と比べ、はるかに簡便にCNTを検出できると考えられた。

CNTは非常に疎水性が高いことが知られている。細胞膜も同様に疎水性が高いので、細胞膜に結合するペプチドなら、CNTにも結合するのではないかと考え検討を行なった。細胞膜結合ペプチドとして、哺乳類の細胞膜に結合する事がわかっているMastoparan-X(14アミノ酸から成るペプチド)を用いた。このペプチドをビオチン化し、Cy3で標識されたストレプトアビジン(Streptavidin-Cy3)と混合して蛍光標識し、蛍光検出プローブ(Mastoparan-X-Streptavidin-Cy3)を作製した。この蛍光検出プローブが、CNTに結合するか確認を行なうために、まず多層カーボンナノチューブ(MWCNT)への結合を観察した。このMWCNTの直径は約140nmという大きさのため、位相差顕微鏡でも観察することができた。蛍光検出プローブとMWCNTをチューブ中で混合し蛍光顕微鏡で観察を行なったところ、MWCNTが蛍光で光っている様子が観察された。この事から、細胞膜結合ペプチドはCNTに結合できることが分かった。次に、単層カーボンナノチューブ(SWCNT)を蛍光検出プローブによって検出できるか検討を行なった。その結果、金属型と半導体型の両方のSWCNTを蛍光顕微鏡で検出することができた(図8)。SWCNTの場合、直径が約1.5nmと非常に細いため、位相差顕微鏡では見えないのに対し、蛍光顕微鏡では蛍光で可視化できていた(図8)。

(A)金属型SWCNT



(B)半導体型SWCNT

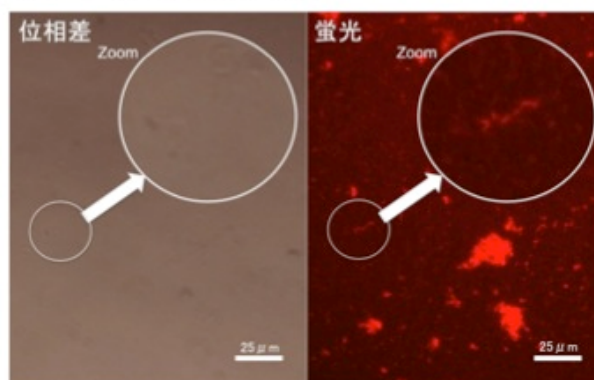
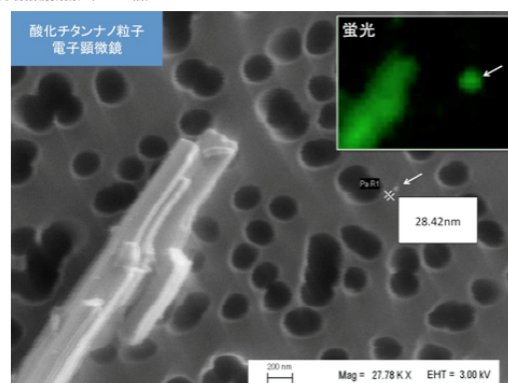


図8、単層カーボンナノチューブ (SWCNT) の蛍光顕微鏡観察結果。金属型 (A) と半導体型 (B) の両方のSWCNTを蛍光で可視化することができた。

カーボンナノチューブと同様に、ナノ材料は、100nm以下の非常に小さいサイズを持つことから、バルク材料にはない特性を有しており医薬品や化粧品などの製品に使用されている。しかし、一方で吸引による生体影響への懸念がされている。酸化チタンでは、発がん性があることが報告されており、また銀のナノ粒子は神経毒性が報告されている。酸化亜鉛ナノ粒子は、毒性は低いが一時的な肺の炎症作用を持つことが報告されている。ナノ粒子を管理するためには、測定法が必要となるが、ナノ粒子は通常の光学顕微鏡では見えないことから観察や測定を電子顕微鏡に依存しており、簡便な測定法は未だ確立されていない。そこで、これらのナノ粒子を、蛍光で簡便に検出する技術の開発を行った。すでに、ビオチンで標識したペプチドを蛍光標識されたストレプトアビジンの1分子上に4つ提示させたプローブは、単一のペプチドに比べ飛躍的に結合力を向上することを見出している。この技術が無機材料結合ペプチドに応用することを試みた。ナノ粒子に結合するペプチドには、すでに報告されている無機材料結合ペプチドを利用した。例えば、酸化チタン結合ペプチドでは、結合ペプチドの配列 (RKLPDAPGMHTW) の後にGGGSGGGGのリンカー配列を付加し、C末端にビオチンを修飾したペプチドを作製した。このペプチドとCy3で標識されたストレプトアビジンを混合することで、酸化チタン検出用蛍光プローブを作製した。また、酸化亜鉛と銀のナノ粒子の可視化にも同様にビオチン標識ペプチドを合成し、検出用蛍光プローブを作製した。作製した蛍光プローブを用いて、まず、酸化チタンのナノ粒子の蛍光検出を行なった。酸化チタン検出用蛍光プローブと酸化チタンナノ粒子とをチューブ中で反応させた後、位相差と蛍光顕微鏡で観察を行なった。位相差顕微鏡では、粒子の形態はほとんど観察できないのに対し、蛍光顕微鏡では酸化チタンのナノ粒子を可視化することができた。同様に、酸化亜鉛ナノ粒子と銀ナノ粒子についても蛍光検出を行なったところ、位相差顕微鏡では、粒子の形態はほとんど観察できないのに対し、蛍光顕微鏡では酸化亜鉛ナノ粒子と銀ナノ粒子をそれぞれ可視化することができた。さらに、高輝度蛍光色素Brilliant Blue 515を用いて作製した蛍光プローブで染色した酸化チタン粒子について、光電子相関顕微鏡を使って蛍光ナノ粒子の粒径を測定したところ、約28nmであった(図9A)。これは、酸化チタンナノ粒子の単粒子を観察できた結果であると考えている。さらに、蛍光画像と電子顕微鏡画像を重ねあわせると、ナノ粒子の蛍光が電子顕微鏡の粒子サイズより大きく観察されたが、両者はよく一致した(図9B)。光学顕微鏡の分解能は250nm程度である

(A) 電子顕微鏡観察 (27780 倍)



(B) 電子顕微鏡観察画像と蛍光顕微鏡画像の重ねあわせ



図9、高輝度蛍光色素を用いて検出できた酸化チタンナノ粒子の電子顕微鏡観察結果。マーカー(蛍光標識したアスベスト)の位置からナノ粒子の位置を推測し、拡大していくと約28000倍の倍率ではっきりと28nmのナノ粒子であることがわかった (A)。電子顕微鏡と蛍光顕微鏡の観察を重ね合せた結果、両者がよく一致している様子がわかる (B)。

ので(回折限界)、蛍光は実際のナノ粒子よりも大きく観察されたと考えられる。蛍光法では、分解能の限界でナノサイズの正確な計測はできないものの、ナノ粒子を簡便に検出することが可能であることが分かった。

さらにアスベスト結合タンパク質と同様の手法を用いて、新たに銀ナノ粒子に結合するタンパク質の探索を行った。大腸菌の中には、約4,000種類のタンパク質が存在する(タンパク質ライブラリー)。このタンパク質ライブラリーの中から銀に結合するタンパク質を探した(図10)。MALDI-TOF質量分析によってタンパク質の解析を行なったところ、45 kDa付近のものはelongation factor Tu (EF-Tu)、21.5 kDa付近のものはTranscription elongation factor (GreA)であると同定することができた。同定されたEF-Tu及びGreAについて結合能の評価を行うために、それぞれのタンパク質の発現と精製を行なった。精製したEF-Tu、GreAタンパク質をCy3で蛍光標識し、蛍光検出プローブを作製した。作製したEF-Tu-Cy3、GreA-Cy3を終濃度50 nM、銀ナノ材料を終濃度200 pg/mlとなるように10 mM Tris-HCl (pH7.5)条件下で混合し、蛍光顕微鏡により観察を行なった。その結果、EF-Tu-Cy3とGreA-Cy3のどちらでも、位相差顕微鏡では見えない銀ナノ粒子を蛍光可視化できることが分かった。

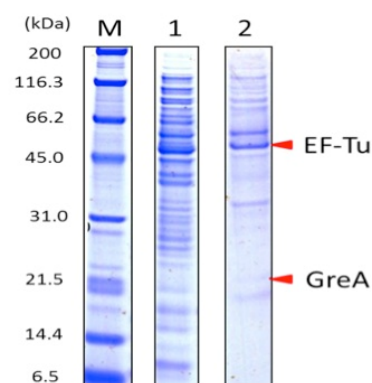


図10、銀結合タンパク質の電気泳動

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。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。バイオ蛍光法では、これまで電子顕微鏡でしか見えなかった微細なアスベスト繊維が「低倍率」で見えることが分かった。また、環境ナノ粒子や工業用ナノ材料の観察には透過型電子顕微鏡や原子間力顕微鏡などが用いられているが、これらの方法は装置自体が非常に高価であるうえ、高倍率の観察であるため時間がかかる。バイオ蛍光法は、広い視野でも電子顕微鏡なみの感度と位相差顕微鏡なみの手軽さで見えるため、現場などの日常的なアスベストやナノ材料の検出法として有望である。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

平成26年環境省水大気環境局大気環境課による「建築物の解体等に関わる石綿飛散防止マニュアル」にバイオ蛍光法が記載され(p.146)、石綿飛散防止に貢献した。環境対策への技術的進歩が評価され、平成28年度「環境賞」(環境大臣賞)が内定している。

<行政が活用することが見込まれる成果>

解体現場等が我が国におけるアスベスト繊維の主要な発生源であることに鑑み、公定法とは別に新たな迅速計測法が求められている(環境省アスベストモニタリングマニュアル第4版)。しかしながら、現場でのアスベスト飛散のモニタリングに対応する技術は未だ確立されておらず、バイオ蛍光法の実証と普及が求められている(第10回中央環境審議会大気・騒音振動部会石綿飛散防止専門委員会、資料1、p.6)。バイオ蛍光法は、平成25年6月21日に改正された大気汚染防止法(アスベストのモニタリングを強化)への対応に貢献できる。

一方、近年技術開発が進んでいるナノ材料については、環境中への放出による人の健康や環境への影響が懸念されているが、生体・環境毒性評価に関する試験手法の確立、環境・生体中の動態等に関する知見の集積、ナノサイズの粒子の特性を踏まえた環境リスクの評価方法の確立等が課題となっている。特にナノ材料による環境影響防止に向けた検討の基盤として、一般環境中及び生体内におけるナノ材料の動態解析ツールの開発が不可欠とされている。バイオ蛍光法はナノ材料の検出にも応用可能であり、リスク管理・評価手法の高度化を図る行政ニーズに貢献する。

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) M. Alexandrov, E. Ichida, T. Nishimura, K. Aoki, T. Ishida, R. Hirota, T. Ikeda, T. Kawasaki, A. Kuroda: Environ Monit Assess, 187, 4166-4167 (2015)

“Development of an Automated Asbestos Counting Software Based on Fluorescence Microscopy”

- 2) A. Kuroda, M. Alexandrov, T. Nishimura, T. Ishida: *Biotechnology Journal*, in press (2016)
“Rapid On-site Detection of Airborne Asbestos Fibers and Potentially Hazardous Nano Materials Using Fluorescence Microscopy-based Biosensing”
- 3) 黒田章夫、石田文典、西村智基、M. Alexandrov、市田越子、青木功介、松田俊寛、河崎哲男、関口 潔: *作業環境*, 36(2)、53-58 (2015)
「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」

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) 黒田章夫、石田文典、西村智基、M. Alexandrov、神山宣彦: 日本労働衛生工学会、2014年11月14日
「蛍光顕微鏡法によるアスベスト分析とその利用について」
- 2) A. Kuroda: The Francis Crick Institute Seminar, United Kingdom, May 5, 2015
“Design of Protein Interface to Inorganic Materials and Its Application to Nanomaterial-monitoring”
- 3) 黒田章夫: 第14回国際バイオテクノロジー展アカデミックフォーラム、2015年5月14日
「アスベスト蛍光染色用バイオプローブ開発」
- 4) 黒田章夫: 第67回日本生物工学会、2015年5月28日
「アスベストバイオプローブ開発とスマートバイオセンシングへの展開」
- 5) 石田 文典、池田 文、廣田 隆一、黒田 章夫: 第67回日本生物工学会、2015年5月28日
「カーボンナノチューブ結合ペプチドを用いた蛍光検出技術の開発」
- 6) 黒田章夫、石田文典、土井奨平、西村智基、Maxym Alexandrov、神山宣彦: 日本労働衛生工学会、2015年10月21日
「ナノマテリアルの蛍光検出技術開発」

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

5-1401 バイオ蛍光法によるアスベスト検出技術の実用化とナノ材料動態追跡ツールへの応用

(1) バイオ蛍光法によるアスベスト検出技術の実用化とナノ材料動態追跡ツールへの応用に関する研究

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26～27年度累計予算額：43,319千円（うち平成27年度：21,104千円）

予算額は、間接経費を含む。

[要旨]

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。これまでにアスベスト結合タンパク質によるアスベストの可視化において、約30nmのクリソタイル単繊維も簡易な蛍光顕微鏡で観察できることがわかっている。すなわち、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なものも）、その存在が検出できるという蛍光顕微鏡の長所が発揮されている。また、顕微鏡下で形態を観察するのみならず、特異的に光らせるために同時に物質の同定が行なえるという利点がある。一方、現在のアスベスト検査の公定法は、最終的に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。本研究では、空気中に飛散するアスベストの検出法として開発したバイオ蛍光法を公定法として普及させるために、現在の公定法である電子顕微鏡法との関連データを取得した。実際の大气捕集フィルター64サンプルについて比較した結果、バイオ蛍光法と電子顕微鏡法による測定は非常に高い相関性を示すことが分かった（相関係数 $r=0.87$ ）。さらに、バイオ蛍光法を現場で簡便に行うための携帯型蛍光顕微鏡の開発に成功した。また、バイオ蛍光法を生体影響が懸念されているナノ材料の可視化に応用するために、酸化チタンや酸化亜鉛、カーボンナノチューブ、銀ナノ粒子に結合するペプチドの取得を行った。これらナノ材料に結合する蛍光バイオプローブを開発し、蛍光で可視化することに成功した。

[キーワード]

アスベスト、迅速検出、蛍光、バイオプローブ、ナノ材料

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。これまでも解体工事に対する規制があったが、アスベストが飛散する事例や、アスベスト使用の有無の事前調査が不十分である事例が多く見られ、さらに平成23年に発生し

た東日本大震災の被災地でアスベストの飛散事例が確認され問題となった。そこで、大気汚染防止法の一部を改正する法律案が平成25年3月に閣議決定され、同年6月21日に公布された。この改正により、解体等工事の受注者は、建材中のアスベスト使用の有無について事前に調査をし、調査結果と届出事項を発注者に書面で説明する事が義務付けられることとなった。しかしながら、現場でのアスベスト飛散のモニタリングに対応する技術は未だ確立されておらず、申請者らが開発したバイオ蛍光法の実証と普及が求められている（平成25年第10回中央環境審議会大気・騒音振動部会石綿飛散防止専門委員会資料）。

また、ナノ材料は、医療・産業など様々な分野において技術開発・製品化が進められている。しかし、生細胞にナノ材料を添加すると、細胞内部にナノ材料が取り込まれる事例が報告されており、人体や生体に対する影響が心配されている。実際、カーボンナノチューブはアスベストに似た構造を持つことから、同様に肺ガンなどを誘発する危険性が高いことが分かってきた。安全・安心社会の構築のために、ナノ材料の動態解析のツール開発が急務となっている。

2. 研究開発目的

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。これまでにアスベスト結合タンパク質によるアスベストの可視化において、約30nmのクリソタイル単繊維も簡易な蛍光顕微鏡で観察できることがわかった。すなわち、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なもの）、その存在が検出できるという蛍光顕微鏡の長所が発揮されている。また、顕微鏡下で形態を観察するのみならず、特異的に光らせるために同時に物質の同定が行なえるという利点がある。一方、現在のアスベスト検査の公定法は、最終的に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。本研究では、空気中に飛散するアスベストの検出法として開発したバイオ蛍光法を公定法とするために、現在の公定法である電子顕微鏡法との相関データを蓄積し、普及させるために役立てることを目的とする。さらに、現場では簡易に建材中のアスベストを判定する方法の開発が求められており、バイオ蛍光法を建材用に改良を行う。また、バイオ蛍光法を生体影響が懸念されているナノ材料の蛍光可視化に応用するために、酸化チタンや酸化亜鉛、カーボンナノチューブ、銀ナノ粒子などの無機材料に結合するペプチドの取得を行なう。これらナノ材料に結合する蛍光バイオプローブを開発し、動態解析のツールとすることを目的とする。

3. 研究開発方法

(1) バイオ蛍光法と公定法によるアスベスト検査結果の比較

1) アスベスト捕集フィルターの調製

解体現場の捕集フィルターに関しては、環境リサーチ株式会社と株式会社環境管理センターから入手した。通常のサンプリングポンプにより捕集したサンプルの他、自動繊維状粒子測定装置（リアルタイムモニター）（DAECOM-S、アエモテック社）に内蔵するバックアップフィルターも利用した。現場での捕集場所としては、敷地境界、また高濃度サンプルについてはセキュリティ

ルーム内ダーティゾーン、あるいは除去作業場内に吸引口（フィルター）を設置して行った。発塵サンプルについては、アスベストが含まれている代表的な建材（ロックウール吹き付け材、石膏ボード、ケイカル板、スレート板）を使用し、アスベスト標準試料（クリソタイル：JAWE111、アモサイト：JAWE231、クロシドライト：JAWE331）を混合して作製した。具体的には上記建材試料をハンマーで粉砕し、目開き500 μm のふるいを通させたものを原試料とした。作製した原試料とアスベスト標準試料をシャーレに移しとり、よく攪拌して飛散用試料とした。作製した飛散用試料を25 ϕ の円筒に入れて図1の要領で試料を飛散させ、メンブランフィルター（A080X047A、アドバンテック東洋社）にて採取し、アスベスト捕集フィルターを作製した。フィルターへの捕集については、外部への漏れがないようにチャンバー内で行った。併せて、アスベスト不含建材をコントロールとして同様にフィルターに採取し、分析用試料を作製した。

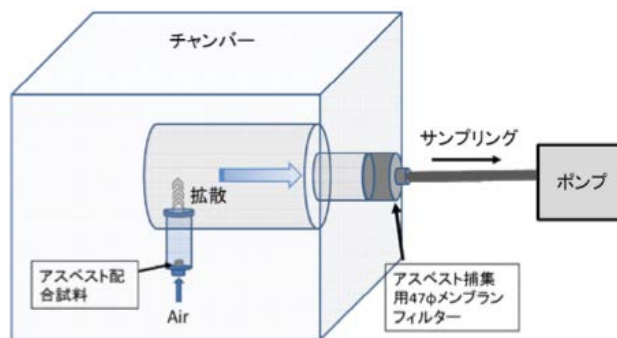


図1、建材からのフィルター捕集サンプル作製法

2) バイオ蛍光法によるアスベスト検査（蛍光法、位相差蛍光法）

大気浮遊アスベスト検査のためのバイオ蛍光法には、染色したフィルターを直接観察する蛍光法と、染色したフィルターを透明化し位相差顕微鏡でも観察できる様にした位相差蛍光法が存在する。蛍光法は、「簡便・高感度」という特長をより生かした定性的な方法であり、位相差蛍光法は従来の位相差顕微鏡法による計測と検出基準を合わせた定量的な方法になる。両手法に共通するアスベストを蛍光で観察するためのタンパク質は、シリコンバイオ社から発売されている蛍光タンパク質（限定HNSタンパク質を蛍光物質 [CF488A] で修飾されたストレプトアビジン上に提示させたもの）を用いた。フィルター上のアスベストの蛍光染色（前処理）は、シリコンバイオ社のマニュアルに従い、以下の様に行った。大気を捕集した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（1滴は約40 μl ）滴下し、完全に吸収させた（図2）。続いて蛍光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、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。蛍光法用には、この段階のフィルターをスライドグラスに乗せてグリセロールで封入し、サンプルとした。蛍光顕微鏡（Axio Imager、カールツァイス社、あるいはLumascope、Etaluma社）にサンプルをセットし、アスベスト繊維（幅3 μm 未満、長さ5 μm 以上、アスペクト比3以上）を計測した（蛍光法）。

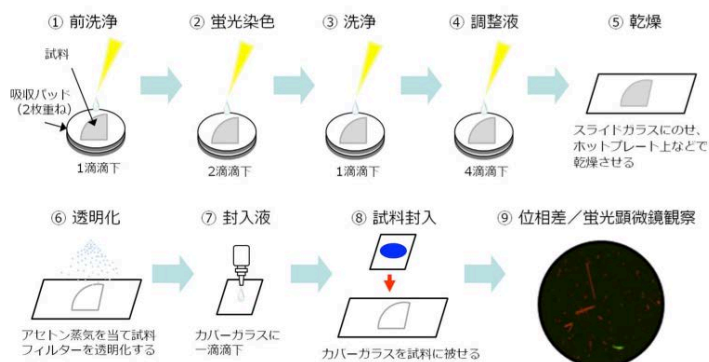


図2、位相差蛍光法の前処理

位相差蛍光法用には、フィルターの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2）。サンプルを位相差蛍光顕微鏡（Primostar、カールツァイス社、あるいはBX60、オリンパス社）にセットして位相差モードで繊維（幅3μm未満、長さ5μm以上、アスペクト比3以上）を計測した。さらに、蛍光モードに切り替え、各繊維の蛍光の有無によってアスベストかどうかを判定した（位相差蛍光法）。

3) 電子顕微鏡法によるアスベスト検査（公定法）

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レンフィルターを、カッターを用いて切断し、カーボンペーストあるいはカーボンテープにより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）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により観察を行った（表1）。繊維の計数に当たっては、観察倍率1500倍程度、加速電圧15kVに固定し、モニター画面上の方形枠内を1視野とした。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10,000倍程度まで上げて、エネルギー分散型X線分光法（EDX）による元素分析装置によりアスベストか否かの分析を行った。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4.0版』（環境省）記載の方法で行った。

表1、使用した電子顕微鏡

	機種名	種類	メーカー	観察倍率	視野面積	EDX装置
①	Sigma VP	電界放出型SEM	カール・ツァイス	1600倍	0.0027mm ²	Quantax200、ブルカー社
②	JSM-7600F	電界放出型SEM	日本電子	1500倍	0.00456mm ²	JED-2300、日本電子社

4) 位相差偏光法によるアスベスト検査

試験に使用する位相差偏光顕微鏡（BX51、オリンパス社）を適切な状態になるよう調整し、倍率を400倍（対物レンズ×40、接眼レンズ×10）とした。スライドの計数方法は、アイピースグレイティクルの直径300μmの円をリロケータブルスライドの指定視野の円に合わせ、『アスベストモニタリングマニュアル第4.0版』（環境省）による位相差偏光顕微鏡法に従った。

(2) 解体現場での迅速検査のためのバイオ蛍光法の改良

1) バイオ蛍光法を利用した建材中のアスベスト検出

模擬建材サンプルとして、10mgのロックウールと0.1mgのアモサイトを混合したものを調製した。実際の建材サンプルは、12.3%のクロシドライトを含む吹付け材と3.3%のアモサイトを含む建材を用いた。これらの粉碎したアスベスト含有建材1~10mgをマイクロチューブに量り取った。7%のギ酸200μLを加え、5分間攪拌した（ギ酸処理なしの場合は、このステップを省いた）。小型卓上遠心機で遠心し（2,000g、3分）、上清を捨てた。次に1Nの水酸化ナトリウム水溶液を加え、同様の操作を行った。さらに精製水、緩衝液（0.3Mリン酸緩衝液 [pH8.0]、0.3M NaCl、1%デオキ

シコール酸ナトリウム、0.5% Triton X-100) を用いて同様に処理を行った。続いて、アスベスト結合プローブ (HNS60-90-Cy3、及び改変型TmAFP-Streptavidin-Cy3[野生型TmAFPの第37~61番目の中で、第39、41、51、53番目のスレオニン残基をリシンに置換し、第56番目のリシンをグリシンに置換し、Streptavidin-Cy3で修飾したもの]) 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) を加え、5分間攪拌した。小型卓上遠心機で遠心し (2,000g、3分)、上清を捨てた。さらに洗浄緩衝液 (0.3Mリン酸緩衝液 [pH8.0]、0.3M NaCl、1%デオキシシコール酸ナトリウム、0.5% Triton X-100) を用いて同様の処理を行い、余分な蛍光試薬が残らないよう洗浄した。再度50 μ lの緩衝液を加え分散させた後、スライドガラス上に1滴滴下し、蛍光顕微鏡で観察を行った。

2) 携帯型蛍光顕微鏡の開発

3D CADソフト (Inventor Fusion 2013 R1、Autodesk社) を用いて、同軸落射蛍光顕微鏡の光路を持つ小型顕微鏡用の部材を設計した。3Dプリンター (OBJET30 Pro、Stratasys社) に設計データを入力し、造形を行った。作製したパーツにレンズや励起光/蛍光用分光フィルター、ミラーなどの光学部品を取り付け、顕微鏡として組み立てた。観察・撮影用カメラとして、組み込み用CCDカメラや家庭用デジタルカメラ、スマートフォンやタブレットPCの内蔵CMOSカメラなどを用いモニター上に蛍光画像を表示させ観察を行った。また安定的に供給可能なモデルとするために、市販部品を用いた試作品の製作を行った。

(3) ナノ材料結合ペプチドの探索と蛍光バイオプローブ開発

1) カーボンナノチューブ結合ペプチドの蛍光標識

カーボンナノチューブ結合ペプチドとして、Mastoparan-X (アミノ酸配列: INWKGIAAMAKLL、アミノ酸は一文字表記で記述) を用い、このペプチドをビオチンで修飾したもの

(Biotin-Mastoparan-X) を合成した。ビオチンで標識されたペプチドを、Cy3蛍光体で修飾されたストレプトアビジン (Streptavidin-Cy3) と混合することによって蛍光標識を行なった。ビオチンで標識されたペプチドは、ストレプトアビジンと自動的、かつ量論的に (ストレプトアビジン1分子に4分子のビオチン化ペプチドが提示され) 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Biotin-MastoparanX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 (Matoparan-X-Streptavidin-CY3) を作製した。

2) 無機材料 (酸化チタン、酸化亜鉛、銀) 結合ペプチドの合成

報告されている無機材料 (酸化チタン、酸化亜鉛、銀) 結合ペプチドのアミノ酸配列をもとに、ビオチン標識したペプチドの合成を行なった (Eurofins Genomics社)。酸化チタンに結合ペプチドとしてRKLDPAPGMHTW (各アミノ酸配列は一文字表記)、酸化亜鉛に結合するペプチドとしてEAHVMHKVAPRP、銀に結合ペプチドとしてIRPAIHIIPIISHを用いることにした。これら無機材料結合ペプチドのC末端側にリンカー配列 (GGGSGGS) を付加し、さらにその末端にビオチンを結合させた。

3) 無機材料結合ペプチドの蛍光標識

ビオチンで標識されたペプチドを、蛍光色素で修飾されたストレプトアビジン

(Streptavidin-Cy3またはBB515、BD Bioscience社) と混合することによって蛍光標識を行なった。ストレプトアビジン1分子に4分子のビオチン化ペプチドが結合する。これにより、無機材料結合ペプチドを蛍光標識できると同時に、ペプチド単体よりも飛躍的に結合力を向上させたプローブを作製できる。具体的には、0.1M Tris-HCl (pH8.3) 緩衝液中に、蛍光標識されたストレプトアビジン (約30pmol) に対して20倍量のビオチン標識無機材料ペプチドを添加し、1時間静置して無機材料結合ペプチドと蛍光標識ストレプトアビジン複合体を作製した。

4) 銀ナノ粒子結合タンパク質の取得

生体影響が懸念されるナノマテリアルの1つである銀ナノ粒子に結合するタンパク質を取得するため、大腸菌 (*Escherichia coli* MG1655) のタンパク質ライブラリーを用いてスクリーニングを行なった。大腸菌をLB培地200 mlに1%植菌し、28 °Cで6 時間振盪培養した。培養液を遠心分離 (2,300g, 15min, 4°C) することで集菌し、菌体ペレットを10mlのTris-Sucrose (25mM Tris-HCl [pH7.5], 30g/l スクロース) に再懸濁した。その後、-80°Cで保存した。氷上で解凍後、2.5mg/mlのLysozymeを終濃度が250 μ g/mlとなるように添加し、氷上で30分静置した後、さらに37°Cで5分湯煎することで溶菌処理した。10,000 unitのDNase (Roche Diagnostics社) と10mg/mlのRNaseを破碎液の液量3mlに対して10 μ lの割合で加え、さらに200mM MgCl₂を2mMとなるように添加した。粘性が取れるまで氷上で2時間振盪し、Digital Sonifier S-250D (Branson Ultrasonics Corporation社) を用いて2分間超音波破碎 (1s ON / 1s OFF, Amplitude 20%) することで粘性を完全に除去した。この破碎液を遠心分離 (20,000g, 15min, 4°C) した後、上清をさらに超遠心 (150,000g, 2h) することでリボソームタンパク質を除去した。作製した大腸菌破碎液は分注し、使用時まで -80°Cに保存した。

作製した大腸菌破碎液 (タンパク質ライブラリー) と銀粒子を混合し、結合するタンパク質のスクリーニングを行なった。銀粉末 (粒径1 μ m, 99 %, 和光純薬工業社) 3 mgに結合緩衝液 (0.1 M Tris-HCl [pH7.5], 0.5% Tween20, 1M NaCl) 1 mlを添加し、遠心分離 (2,300g, 3min) した後、上清を除去して銀粒子溶液を調製した。大腸菌破碎液をタンパク質の濃度が0.5mg/mlになるように結合緩衝液で希釈し、その1mlを銀粒子溶液に加えた。4°Cで30分攪拌することでタンパクを銀粒子に結合させた。遠心分離 (2,300g, 3min) することで上清を除去した。同様に1mlの結合緩衝液を加え、遠心を3回繰り返すことで洗浄を行なった。SDS電気泳動サンプル緩衝液 (2倍濃度) 50 μ lを沈殿に添加し、加熱処理 (100°C, 5min) することで銀粉末に結合するタンパクを溶出した。遠心分離 (2,300g, 3min) を行った後、得られたタンパク質をTricine-SDSゲル電気泳動により解析を行った。SDS-PAGE解析の結果、得られたタンパク質をゲルから切り出して、MALDI-TOF質量分析による銀ナノ粒子結合タンパク質の同定を行った。

5) 銀ナノ粒子結合タンパク質の発現及び精製

スクリーニングにより得られた銀ナノ粒子結合タンパク質を発現及び精製するために、これらのタンパク質を発現するプラスミドの作製を行なった。まず、これらのタンパク質をコードする遺伝子を、設計したプライマーを用いて増幅を行なった。大腸菌のEF-Tuタンパク質をコードする遺伝子 (*tufB*) は、大腸菌K-12株のゲノムDNAを鋳型として、プライマー (表2、P1、P2) を用いてPCRにて増幅し取得した。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-EcoRI*サイトに組み込み、pET-tufBを作製した。大腸菌のGreAタンパク質をコードする遺伝子は、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PCRにて増幅し取得した。増幅した遺伝子をタンパク質発現用プラスミドpET21-AviTagの*NdeI-XhoI*サイトに組み込み、pET-GreA-AviTagを作製した。

作製したプラスミドを*E. coli* BL21 (DE3)に形質転換し、コロニーを取得した。得られたコロニーを0.5%グルコースを含む2×YT-A培地5mlに植菌し、37℃一晚培養した。その後同培地5mlに新しく1%植菌し、37℃で振盪培養を行なった。OD600が0.6となったらIPTG[Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside]が終濃度0.5mMとなるように添加し、pET-tufB導入株は15℃で2時間、28℃で8時間振盪培養を行なった。一方、pET-GreA-AviTag導入株は37℃で3時間及び28℃で8時間、15℃で24時間振盪培養を行うことでタンパク質の発現を行なった。培養終了後、遠心分離(9, 100g、4℃、10min)を行うことで集菌し、菌体ペレットを-80℃で保存した。氷上で解凍後、Hisタグ精製結合緩衝液(6.19g/l Na₂HPO₄、1.07g/l NaH₂PO₄・2H₂O、10%グリセロール、4mM イミダゾール)1mlに再懸濁した。超音波破砕機(Digital Sonifier S-250D、Branson Ultrasonics Corporation社)(条件1s ON / 1s OFF、Amplitude 10%)を使用し、1分間超音波破砕処理することで菌体を破砕した。その後His Spin Trap(GEヘルスケア)を用いてHisタグアフィニティー精製を行なった。アフィニティーカラム保存液を遠心分離(100g、1min)することで除去し、同様の遠心分離でHisタグ精製結合緩衝液600μlをカラムに通すことで平衡化した。次に遠心分離(10,000g、4℃、10min)で獲得した破砕液上清1mlを2回に分けてカラムに通し、Hisタグ精製洗浄緩衝液(4.95g/l Na₂HPO₄、0.87g/l NaH₂PO₄・2H₂O、1M NaCl、8%グリセロール、3.2mM イミダゾール)600μlを通すことで洗浄した。その後、Hisタグ精製溶出緩衝液(6.19g/l Na₂HPO₄、1.07g/l NaH₂PO₄・2H₂O、50mM NaCl、10%グリセロール、500mM イミダゾール)200μlをカラムに加えて1min静置し、遠心分離(100g、4℃、1min)で回収することでタンパク質精製液を獲得した。回収の操作は2回行なった。タンパク質の精製の確認はBio-rad protein assay (Bio-rad社)を用いたタンパク定量、及びSDSゲル電気泳動で確認した。

表2、プライマー配列

プライマー番号	配列
P1	GCCCATATGTCTAAAGAAAAGTTTGA
P2	TAAGAATTCATGCTCAGAACTTTTGCTACA
P3	GACGCCATATGCAAGCTATTCCGATGACCTTAC
P4	CGCAGCTCGAGGCACAGGTATTCCACCTTAATACT

6) 銀ナノ粒子結合タンパク質の蛍光標識

取得した銀結合タンパク質を蛍光修飾することでナノ粒子検出の蛍光プローブを作製した。蛍光修飾はCy3-maleimide monoreactive dye (GE Healthcare社)を用いて行なった。銀結合タンパク質(279μg/ml EF-Tu, 367μg/ml GreA)溶液200μl、0.5M HEPES Buffer(pH7.4) 250μl、Mili-Q水5μl、Cy3-maleimide Dye 25μlを混合し、室温で2時間静置した。但し、30分ごとに攪拌した。反応後、Hisタグ精製溶出緩衝液10mlを加えることで希釈し、His Spin Trapを用いたHisタグアフィニティー精製を行うことで未反応の蛍光色素を取り除いた。取得したタンパク質は552nmの吸光度測定及びBio-rad protein assayを用いたタンパク定量を行うことでラベル率を評価した。

(4) 蛍光バイオプローブによるナノ粒子の観察

1) バイオ蛍光法によるカーボンナノチューブの観察

カーボンナノチューブとして、多層カーボンナノチューブ (MWCNT、直径：～140nm) と金属型または半導体型単層カーボンナノチューブ (SWCNT、直径：～1.5nm) の3種類を用いた。MWCNTの懸濁液は、10%のデオキシコール酸溶液に1mg/mlとなるように調製した。金属型または半導体型のSWCNTの懸濁液は、0.1%のSDS溶液に0.1mg/mlとなるように調製した。1.5mlのエッペンチューブに、25nMの蛍光標識されたMastoparan-X-Streptavidin-Cy3溶液50 μ lと、2 μ lの1mg/mlのMWCNT懸濁液を混合し、1分攪拌した。この混合液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。また、1.5mlのエッペンチューブに、200nMの蛍光標識されたMastoparan-X-Streptavidin-Cy3溶液10 μ lと、10 μ lの5 μ g/mlの金属型または半導体型のSWCNT懸濁液を混合し、1分攪拌した。この混合液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) を使用した。

2) バイオ蛍光法によるナノ粒子の観察

作製した蛍光プローブをそれぞれのナノ粒子と結合させ、位相差顕微鏡、蛍光顕微鏡で観察することで機能評価を行なった。ナノ粒子として、酸化チタンナノ粒子はTitanium(IV) oxide (mixture of rutile and anatase、平均粒子径150nm、Aldrich社) を、銀ナノ粒子はSilver (dispersion、一次粒子径<21 nm) を用いた。酸化チタンナノ粒子を検出するためのプローブは、HNS-Cy3を用いた。このプローブの調製は、以前報告した論文 (Ishida et al. PLoS ONE, 8[9]:e76231 [2013]) 記載の方法により行なった。作製したHNS-Cy3、EF-Tu-Cy3、GreA-Cy3を10mM Tris-HCl(pH7.5)で100nMに希釈した。同時に酸化チタンナノ粒子も同緩衝液で2.7 μ g/mlに、銀粒子を400pg/mlに希釈し、10 μ lずつ混合することで結合させた。2分攪拌後、蛍光顕微鏡にて観察を行なった。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) を使用した。

ナノ粒子として、酸化チタンナノ粒子、酸化亜鉛ナノ粒子、銀ナノ粒子を用いた。酸化チタンナノ粒子は、シグマ社製の酸化チタンナノ粒子水分散液 (製品番号：700347-25G、1.3g/ml) を用い、超純水で1.3mg/mlまで希釈した。酸化亜鉛ナノ粒子は、シグマ社製の酸化亜鉛ナノ粒子水分散液 (製品番号：721077-100G、1.7g/ml) を用い、超純水で1.7mg/mlまで希釈した。銀ナノ粒子は、シグマ社製の銀ナノ粒子水分散液 (製品番号：730815-25ML、0.02mg/ml) を用いた。

無機材料ペプチドの蛍光プローブをTris緩衝液(10mM、pH7.4)で40nMに希釈した。酸化チタンナノ粒子では、9 μ lの酸化チタン検出用蛍光プローブ溶液(40nM)に、1 μ lの酸化チタンナノ粒子(1.3mg/ml)を混合した。酸化亜鉛ナノ粒子では、10 μ lの酸化亜鉛検出用蛍光プローブ溶液(40nM)に、10 μ lの酸化亜鉛ナノ粒子(1.7mg/ml)を混合した。銀ナノ粒子では、10 μ lの銀検出用蛍光プローブ溶液(40nM)に、10 μ lの銀ナノ粒子(0.02mg/ml)を混合した。混合を1分間行うことで、ナノ粒子に蛍光プローブを結合させた。この混合液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、蛍光顕微鏡で観察した。

3) 光電子相関顕微鏡を用いたナノ粒子の観察

蛍光検出されたナノ粒子の粒径を知るため蛍光顕微鏡と同視野を電子顕微鏡で測定できる光・電子相関顕微鏡（カールツァイス社）を用いて観察した。チューブ中でナノ粒子に蛍光プローブを結合させた後、フィルターに固定化し、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で観察することで、蛍光で検出されたナノ粒子のサイズを電子顕微鏡で測定した。具体的には、以下の方法（①～④）で行なった。

①ポリリジン固定化フィルターの作製

蛍光染色したナノ粒子をフィルターに固定化するために、フィルターに正電荷を持つポリリジンを固定化した。具体的には、Isopore™ Membrane Filters、0.2μm GTPP(アイソポア)上に0.01% L-ポリリジン溶液 600μlを滴下し、10分静置した。フィルター上のL-ポリリジン溶液をマイクロピペットで吸い取り、蒸留水600μlをフィルターに滴下、吸い取りを2回繰り返すことで定着していないL-ポリリジンを除去した。その後、完全に乾かすことでL-ポリリジン固定化フィルターを作製した。

②蛍光染色したナノ粒子のフィルターへの固定化

蛍光染色したナノ粒子溶液を、超純水で1,000倍希釈し、そのうちの0.1mlを上記ポリリジンフィルターに滴下して固定化した。100μlの超純水で2回洗浄した。

③マーカーの作製とフィルターへの固定化

ナノ粒子の位置をより正確に把握するために、蛍光標識したアスベストをマーカーとして用いた。10μlのアモサイト懸濁液(10mg/ml)を200μlの蛍光標識したアスベスト結合タンパク質(HNS60-90-Streptavidin-CF488A、50nM)に添加して、10分間混合した。結合後、250μlの超純水で洗浄を行ない、最終的に100μlの超純水で再懸濁した。マーカーとして蛍光染色したアモサイトを使う場合には、蛍光染色したアモサイト懸濁液を上記ポリリジンフィルターに滴下して固定化した。100μlの超純水で1回洗浄した。

④蛍光染色したナノ粒子固定化フィルターの相関顕微鏡での観察

蛍光染色したナノ粒子固定化フィルターを、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。まず蛍光観察して、蛍光を発したナノ粒子（または、マーカーを入れた場合は、蛍光を発したアモサイト繊維）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)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粒子について、記録した位置情報を入力して、電子顕微鏡で蛍光粒子の観察を行なった。

4. 結果及び考察

(1) バイオ蛍光法と公定法（電子顕微鏡法）の比較

1) 位相差蛍光法と電子顕微鏡法（公定法）の比較

現在、アスベスト検査の公定法は、まず位相差顕微鏡によって非アスベストを含む総繊維での繊維数濃度を測定し、大気1リットルあたり繊維1本以上（1本/L）の場合、電子顕微鏡とX線分析による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（『アスベストモニタリングマニュアル第4.0版』、環境省）。位相差蛍光法は同様にまず位相差モードで総繊維を計測し、次に蛍光モードに切り替えてアスベストかどうかを判定する方法である（1サンプル約1時間で分析）。バイオ蛍光法を普及させるために、位相差蛍光法と、現在の公定法である電子顕微鏡法との相関データを蓄

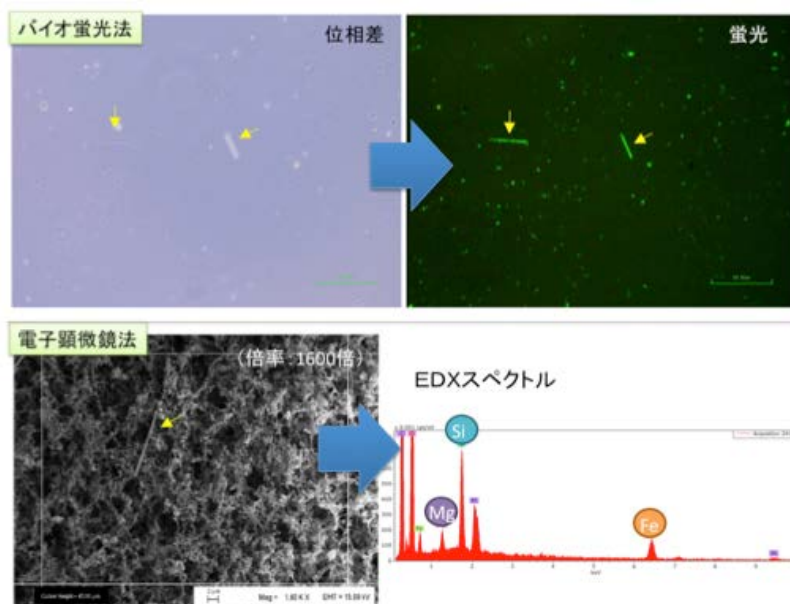


図3、バイオ蛍光法（位相差蛍光法）による観察画像（上）と電子顕微鏡法（SEM）による観察像及びEDXスペクトル（下）。バイオ蛍光法では、まず位相差モードで繊維を観察する。次いで蛍光モードに切り替えて、蛍光の有無を確認することで、アスベストかどうかを判定する。電子顕微鏡法では、繊維に電子線を当て元素分析を行ってアスベストかどうかを判定する。

積し、有効性を検証した（図3）。実際の大气捕集フィルター64種類（リアルタイムモニターのバックアップフィルター14種類を含む）について位相差蛍光法による測定（図3上）と、公定法（電子顕微鏡法）による測定（図3下）を実施した。合計64サンプルについて比較した結果、両方法による測定は非常に高い相関性を示すことが分かった（相関係数 $r=0.87$ ）（図4左）。これまでアスベスト濃度と疫学的データとの相関は、位相差顕微鏡による計測によって行われてきたため、アメリカでは、位相差顕微鏡で計測した総繊維数に、電子顕微鏡で判定したアスベストの割合（総繊維中のアスベストの割合）をかけて補正したものが用いられる。位相差蛍光法と補正された電子顕微鏡法のアスベスト濃度は、よりよく相関することがわかった（相関係数 $r=0.97$ ）（図4右）。

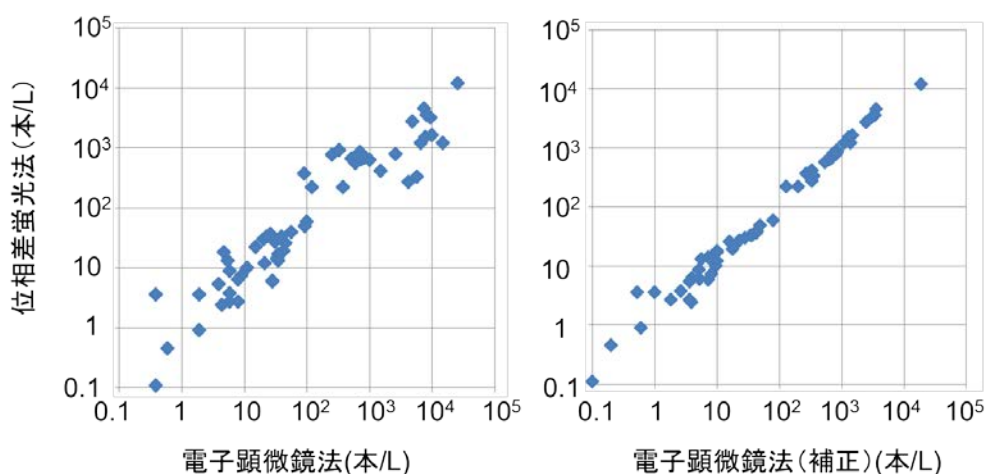


図4、位相差蛍光法と公定法（電子顕微鏡法）によるアスベスト分析の比較（左）。位相差顕微鏡法で得られた数値で補正したものと比較した（右）。

2) 蛍光法と電子顕微鏡法（公定法）の比較

アスベスト濃度を確定させる手順として、『アスベストモニタリングマニュアル第4.0版』（環境省）では、電子顕微鏡法による検査の際、位相差顕微鏡を意識して、幅 $0.2\mu\text{m}$ 以上の繊維のみを計数対象とすることになっている。一方、バイオ蛍光法では、電子顕微鏡でしか見えないような幅 30nm のクリソタイルの単繊維でも、蛍光顕微鏡下で観察可能になることが分かっている。そこでサンプル中に微細なクリソタイル繊維が多く存在する場合、位相差顕微鏡法をベースとした計測法による結果と比較すると、バイオ蛍光法では感度がより高いために結果が高く出ることが考えられた。そこで、実際の解体現場から採取した試料36種（リアルタイムモニターのバックアップフィルター20種を含む）を用いて、蛍光法と電子顕微鏡法による計測結果の比較を行い、測定法の違いによる影響を調べた。36種のサンプルについて事前の資料調査から判明した使用アスベストの種類は、クリソタイル（19）、アモサイト（6）、クロシドライト（11）であった。また、蛍光法による測定の実施については現場での検査を想定して、可搬性に優れた小型蛍光顕微鏡（Lumascop、Etaluma社）を用いて行った。結果を検証したところ両方法による計測結果は、非常に相関性が高いことが分かった（ $r=0.995$ ）（図5）。図4と図5のサンプルは同一ではないので正確には比較できないが、蛍光法と電子顕微鏡法の相関は、位相差蛍光法との比較を上回る結果であった。元来、位相差顕微鏡と電子顕微鏡では検出感度が異なるために、位相差顕微鏡により検出繊維を制限する位相差蛍光法よりも、電子顕微鏡法との測定結果に近くなるのかもしれないと考えられた。

電子顕微鏡は、X線分析装置を付けると1000万円以上の価格となる（アスベスト検査会社に電子顕微鏡による検査を依頼すると一回数十万円必要となる）。一方、蛍光法は消耗品として一回数千円の経費が必要となるが、蛍光顕微鏡は100万円以下でも購入できるため、初期投資が少なく広く普及が期待できる（図6）。特に、アスベストの使用の有無が不明な解体現場、不十分な事前調査で「アスベスト無し」とみなされている疑いのある現場、また災害などで資料調査が困難な事態において、迅速にアスベスト濃度を測る必要がある場合、蛍光法による検査が有力な選択肢となると考えられた。

3) 位相差偏光法と位相差蛍光法の比較

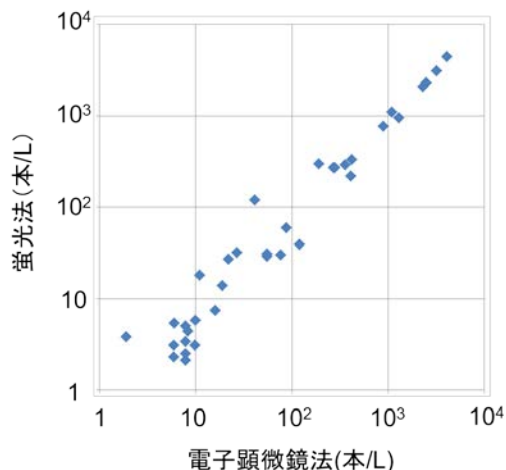


図5、蛍光法と公定法（電子顕微鏡法）によるアスベスト分析の比較



図6、蛍光法によるアスベスト検査の普及を目指し、アスベスト計測講習会を4回行った（平成26年6月4日、平成26年10月8日、平成27年5月27日、平成27年11月18日、計4回、約40名の参加、環境省環境調査研修所にて）。

偏光顕微鏡法（以下、偏光法）は、鉱物が偏光に対し特有の光学的性質を示すことを利用し、その特徴からアスベストの含有の有無を調べる方法である。偏光法は建材のアスベスト分析法として普及している。しかし空气中に飛散するアスベストは微細であることから偏光法では検出できないことも懸念されている。そこで空气中に飛散するアスベストの検出法として開発したバイオ蛍光法と偏光法の両方法で計測を行い、その特徴を明らかにすることとした。代表的なアスベスト含有建材（ロックウール、吹き付け材、石膏ボード、ケイカル板、スレート板）からフィルター捕集サンプルを作製し、リロケータブルスライ

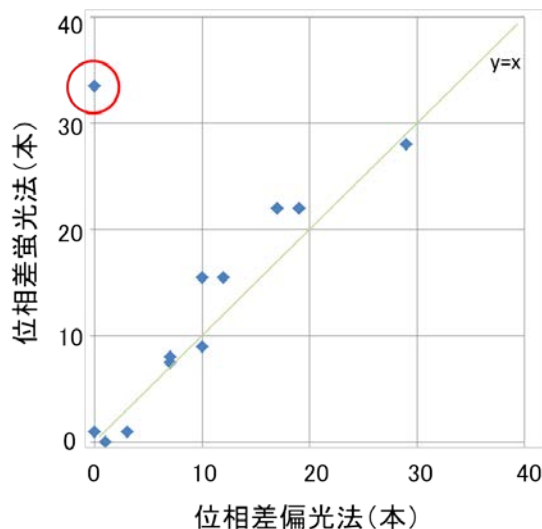


図7、位相差蛍光法と位相差偏光法による測定の相関

ドを用いて、同一サンプルの同一視野について計測し、両方法による判定性の比較を行った。その結果、両方法でのアスベストの判定性は非常に一致率が高いことが分かった（図7）。しかし、クリソタイル繊維を含む石膏ボード粉砕サンプルにおいては偏光顕微鏡では判定ができなかったと考えられる場合が見られた

（図7中に赤丸で囲んだサンプル）。実際、微細クリソタイルは、偏光顕微鏡で観察しにくいことが分かった（図8）。また、偏光顕微鏡法ではステージの回転や、偏光板の抜き差しなど複雑な操作が必要であるが、位相差蛍光法ではレバーの切り替えによる単純な操作で、位相差モードと蛍光モードの切り替えが可能である。より単純な操作で、かつ微細な繊維まで判定可能な位相差蛍光法が大気飛散アスベストの迅速法としては有利であると考えられる。

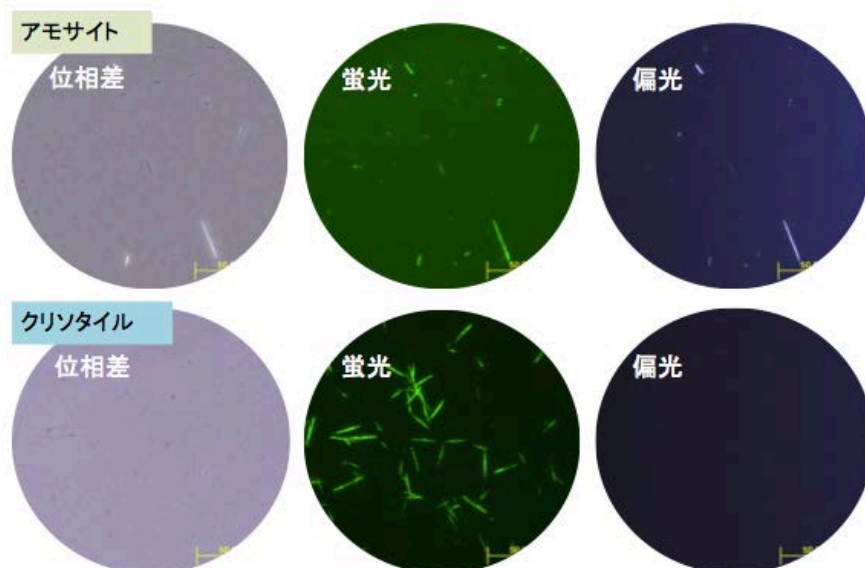


図8、バイオ蛍光法と偏光顕微鏡法の比較。微細クリソタイルは偏光法で見落とされる可能性がある。

（2）解体現場でのアスベスト検査のためのバイオ蛍光法の改良

1）建材中のアスベスト検出法の開発

建材中に存在するアスベストの分析手法は、偏光顕微鏡法や位相差分散顕微鏡法などが知られている。偏光顕微鏡法では、ステージを回転させ偏光板を抜き差しするなどの複雑な操作が必要

になる。また、位相差分散顕微鏡法では、複数の浸液を用いた試料の調製が必要で、さらに感度があまり良くないため細い繊維の判定ができないなどの問題があった。バイオ蛍光法は、簡便で高感度な検出方法である。そこで、バイオ蛍光法を建材中に存在するアスベストの検出に応用するために検討を行った。

建材中に存在する浮遊する巨大な粒子を減らすために、ギ酸処理の工程を加えることが有効と考え

られた。しかし、ギ酸処理を行うと、従来型のアスベスト結合タンパク質の結合量が大幅に下がってしまう問題があった。ギ酸処理後、NaOH処理と水洗浄の工程を加える事で、結合量の低下はある程度抑えられることが分かったが、処理工程が増え複雑になる問題が残った。そこで、別途アスベスト結合タンパク質として開発されていた改変型TmAFPタンパク質（改変型TmAFP）を利用することとした。TmAFPタンパク質は、不凍タンパク質として知られ、氷の表面に結合して、氷の結晶の成長を抑制するタンパク質である。平行な β シートからなる平面性の高い領域をもつ分子で、 β シートの両端にあるスレオニン残基が、氷の表面の酸素原子と相互作用することにより氷と強く結合する。このTmAFPの持つ特徴的な平面性の高い構造は、氷の表面だけでなく、様々な無機固体表面に結合する分子骨格として利用できると考えられる。改変型TmAFPは、野生型TmAFPの第37～61番目の中で、第39、41、51、53番目のスレオニン残基をリシンに置換し、第56番目のリシンをグリシンに置換したもので、アスベストに強く結合する。この改変型TmAFPを用いて建材中のアスベストの検出を行なった。模擬建材サンプルとして、10 mgのロックウールと0.1 mgの角閃石系アスベスト（アモサイト）を混合したものを作製した。従来型HNSタンパク質は、ギ酸処理により角閃石系アスベストへの結合が低下し、蛍光が大幅に低下することが分かった（図9左）。一方で、今回新しく調製した蛍光標識した改変型TmAFPは、ギ酸処理有無にかかわらず角閃石系アスベストに結合し、強い蛍光を観察できることが分かった（図9右）。ロックウール繊維は、ギ酸処理により溶解され、細かい粒子状になった様子が位相差顕微鏡で観察された。従来型HNSタンパク質は、ギ酸処理により発生した細かい粒子に非特異的に吸着されてしまい、その結果、角閃石系アスベ

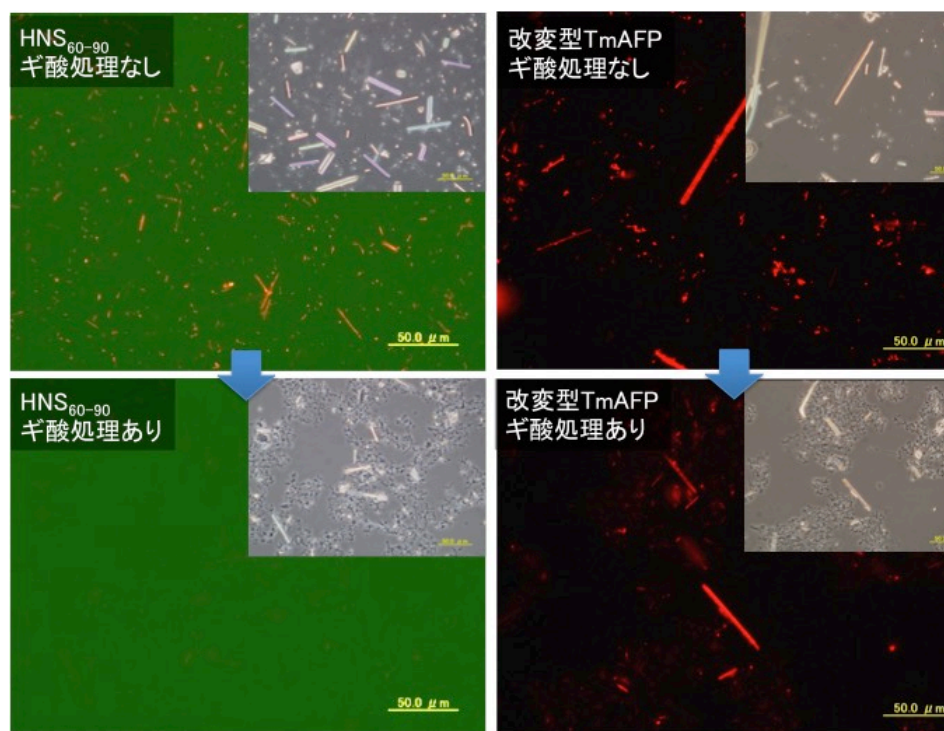


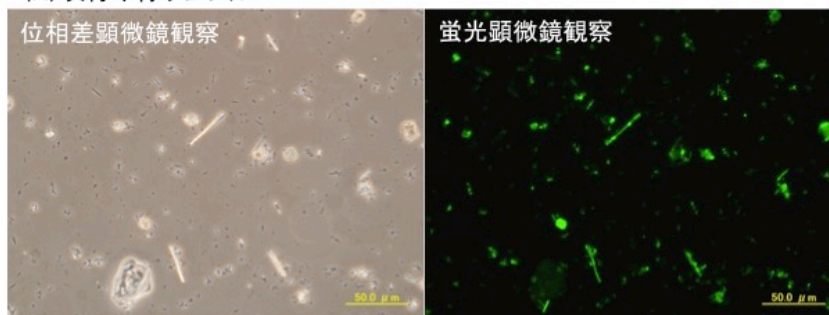
図9、HNSタンパク質と改変型TmAFPの角閃石系アスベストへの結合に対するギ酸処理の影響。従来のHNSタンパク質では、ギ酸処理によりアスベストへの結合量が大幅に低下した（左図）。一方で、改変型TmAFPではギ酸処理してもほとんど低下しなかった（右図）。

ストへ結合する量が大幅に低下したと考えられる。一方で、改変型TmAFPは従来のHNSタンパク質よりも特異性が高いため、ギ酸処理により発生した細かい粒子に非特異的に吸着されず、角閃石系アスベストへ結合する量がほとんど低下しなかったと考えられる。

次に、実際の建材サンプルを用いて評価を行なった。具体的には、12.3%のクロシドライトを含む吹付け材と3.3%のアモサイトを含む建材を用いた。上記と同様に、ギ酸処理後に蛍光標識した改変型TmAFPを結合させた。洗浄後、処理したサンプルを蛍光顕微鏡で観察を行なった。その結果、吹付け材及

び建材サンプルの両方とも、角閃石系アスベストだと思われる繊維に、強い蛍光が観察された(図10)。以上の結果から、改変型TmAFPを用いることで、バイオ蛍光法を建材中の角閃石系アスベストにも応用できることがわかった。また、すでに開発しているDksAを用いれば、クリソタイル(蛇紋石系アスベスト)が検出できる。以上、建材のギ酸処理からプローブ結合まで10分で終了するアスベスト迅速検査法が開発できた。

(A)吹付け材サンプル



(B)建材サンプル

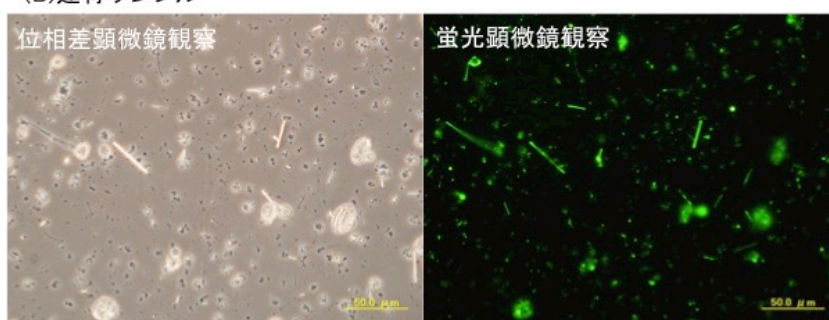


図10、吹付け材 (A) と建材 (B) に含まれる角閃石系アスベストの蛍光検出。

2) 現場での計測が可能な小型蛍光顕微鏡の開

現場で蛍光法をより迅速に実施するためには、携帯型の蛍光顕微鏡が必要である。3Dプリンターによる試作器の製作や、WiFi機能付きカメラ

(DSC-QX100、ソニー社)、タブレットPC(iPad-mini2、アップル社)などの家庭用機器を利用した試作器の製作を試みた(図11)。その中で、iPad-mini2を利用すると非常に使いやすく、安価で高性能な蛍光顕微鏡

タブレット利用型試作機



図11、WiFi機能つきカメラを利用した小型蛍光顕微鏡の試作

が開発可能であることが分かった。そこで、iPad-miniを利用した試作器をさらに改良し、現場への携行性と使用感を高めたモデルの試作を行った。その結果、箱型ボディー内部に光学系（レンズ20倍、開口数0.4、LED励起光470nm、蛍光フィルター510nm）を収納し、片手で持てるキャリングハンドルを装備し、モバイルバッテリーで動作可能なiPad蛍光顕微鏡が完成した（図12）。天板にiPadを載せることで、iPadの背面内蔵カメラを光路に接続すると、ディスプレイ上の表示倍率において約300倍、iPadの表示拡大機能を使えば約1,000倍で観察を行うことができた。理論上の分解能は $0.7\mu\text{m}$ であった。完成した顕微鏡でアスベストの蛍光観察を行ったところ、iPadの画面上で明瞭に観察することが可能であった。また、iPadの通信機能を使って、離れた検査室に画像をリアルタイムで送ることができた（図13）。これによって、現場に熟練者がいなくとも、検査室に送る事で、判定のサポートができると考えられた。あるいは、ホストコンピュータで解析して、自動で結果をレポートすることも可能と考えられた。バイオ蛍光法によるアスベスト測定実施のために有力な顕微鏡として利用できると考えられた。



図12、開発した携帯型蛍光顕微鏡。

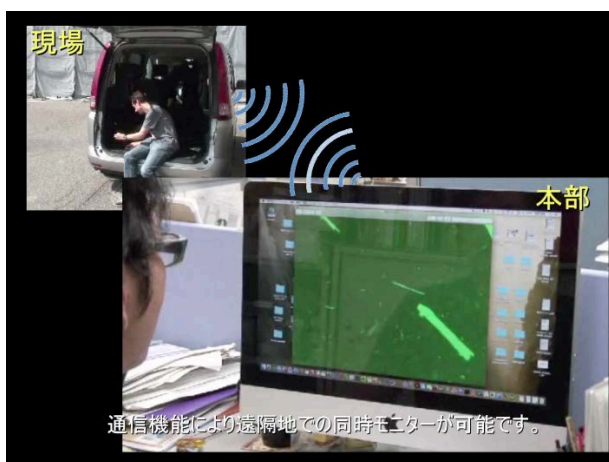


図13、遠隔地でのサポート。iPadの通信機能を利用して、リアルタイムに遠隔地で同一画像を見ることが出来る。

（3）ナノ材料に結合する蛍光バイオプローブの開発と蛍光検出への応用

1) カーボンナノチューブの蛍光検出

カーボンナノチューブ (CNT) は、グラフェンシートが単層または多層で繊維状になった物質で、他ではみられない特殊な物性をもつことから、エレクトロニクス分野をはじめさまざまな分野で応用されている。しかし、CNTは、繊維状の形状を持ちアスベストと同じように、悪性中皮腫を引き起こす事が報告された。現在、CNTの観察には電子顕微鏡が用いられており、日常的にCNTの飛散をモニタリングする方法は確立されていない。バイオ蛍光法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。ナノマテリアルは、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。そこで、CNTの検出にバイオ蛍光法を応用すれば、手間のかかる電子顕微鏡と比べ、はるかに簡便にCNTを検出できると考えられた。

CNTは非常に疎水性が高いことが知られている。細胞膜も同様に疎水性が高いので、細胞膜に結合するペプチドなら、CNTにも結合するのではないかと考え検討を行なった。細胞膜結合ペプチド

として、哺乳類の細胞膜に結合する事がわかっているMatoparan-X (14アミノ酸から成るペプチド) を用いた。このペプチドをビオチン化し、Cy3で標識されたストレプトアビジン (Streptavidin-Cy3) と混合して蛍光標識し、蛍光検出プローブ

(Mastoparan-X-Streptavidin-Cy3) を作製した。この蛍光検出プローブが、CNTに結合するか確認を行なうために、まず多層カーボンナノチューブ (MWCNT) への結合を観察した。このMWCNTの直径は約140nmという大きさのため、位相差顕微鏡でも観察することができた。蛍

光検出プローブとMWCNTをチューブ中で混合し蛍光顕微鏡で観察を行なったところ、MWCNTが蛍光で光っている様子が観察された (図14)。この事から、細胞膜結合ペプチドはCNTに結合できることが分かった。次に、単層カーボンナノチューブ (SWCNT) を蛍光検出プローブによって検出できるか検討を行なった。その結果、金属型と半導体型の両方のSWCNTを蛍光顕微鏡で検出することができた (図15)。SWCNTの場合、直径が約1.5nmと非常に細いため、位相差顕微鏡では見えないのに対し、蛍光顕微鏡では蛍光で可視化できていた (図15)。

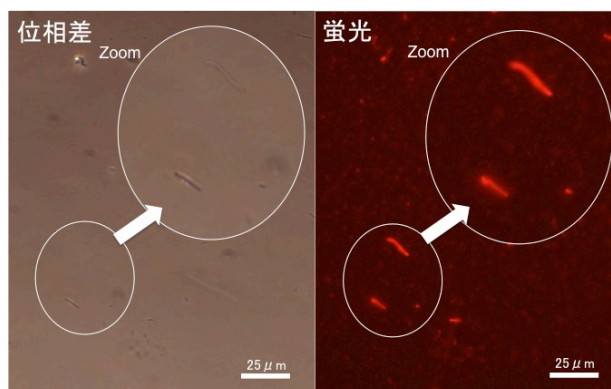
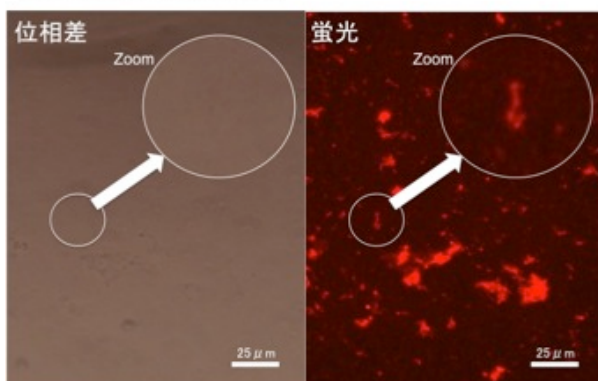


図14、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の蛍光顕微鏡観察

(A) 金属型SWCNT



(B) 半導体型SWCNT

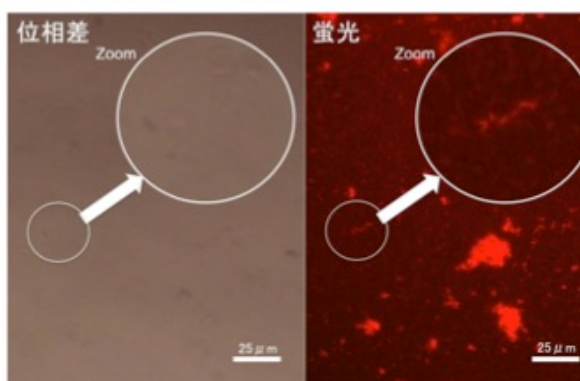


図15、単層カーボンナノチューブ (SWCNT) の蛍光顕微鏡観察結果。金属型 (A) と半導体型 (B) の両方のSWCNTを蛍光で可視化することができた。

2) ナノ粒子 (酸化チタン、酸化亜鉛、銀) の蛍光検出

ナノ材料は、100 nm以下の非常に小さいサイズを持つことから、バルク材料にはない特性を有しており医薬品や化粧品などの製品に使用されている。しかし、一方で吸引による生体影響への懸

表3、無機材料と結合ペプチド

材料	結合ペプチド	文献
酸化チタン (TiO ₂)	RKLPDAPGMHTW	Sano et al., Langmuir (2005) 21, 3090-3095
酸化亜鉛 (ZnO)	EAHVMHKVAPRP	Umetsu et al. Adv. Mater. (2005) 17, 2571-2575
銀 (Ag)	IRPAIHIPISH	Naiki et al., Adv. Funct. Mater. (2004) 14, 25-30

念がされている。酸化チタンでは、発がん性があることが報告されており、また銀のナノ粒子は、神経毒性が報告されている。酸化亜鉛ナノ粒子は、毒性は低いが一時的な肺の炎症作用を持つことが報告されている。ナノ粒子を管理するためには、測定法が必要となるが、ナノ粒子は通常の光学顕微鏡では見えないことから観察や測定を電子顕微鏡に依存しており、簡便な測定法は未だ確立されていない。そこで、これらのナノ粒子を、蛍光で簡便に検出する技術の開発を行なった。

本研究室では、ビオチンで標識したペプチドを蛍光標識されたストレプトアビジンの1分子上に4つ提示させたプローブは、単一のペプチドに比べ飛躍的に結合力を向上することを見出している。

この技術は無機材料結合ペプチドに応用することを試みた。ナノ粒子に結合するペプチドには、すでに報告されている無機材料結合ペプチドを利用した(表3)。例えば、酸化チタン結合ペプチドでは、結合ペプチドの配列(RKLPDAPGMHTW)の後にGGGSGGGSのリンカー配列を付加し、C末端にビオチンを修飾したペプチドを作製した。このペプチドとCy3で標識されたストレプトアビジンを混合することで、酸化チタン検出用蛍光プローブを作製した。また、酸化亜鉛と銀の可視化にも同様にビオチン標識ペプチドを合成し、検出用蛍光プローブを作製した。

まず、酸化チタンのナノ粒子の蛍光検出を行なった。酸化チタン検出用蛍光プローブと酸化チタンナノ粒子とをチューブ中で反応させた後、位相差と蛍光顕微鏡で観察を行なった。位相差顕微鏡では、粒子の形態はほとんど観察できないのに対し、蛍光顕微鏡では酸化チタンのナノ粒子を可視化することができた(図16A)。同様に、酸化亜鉛ナノ粒子と銀ナノ粒子についても蛍光検出を行なったところ、位相差顕微鏡では、粒子の形態はほとんど観察できないのに対し、蛍光顕微鏡では酸化亜鉛ナノ粒子と銀ナノ粒子をそれぞれ可視化することができた(図16B、C)。

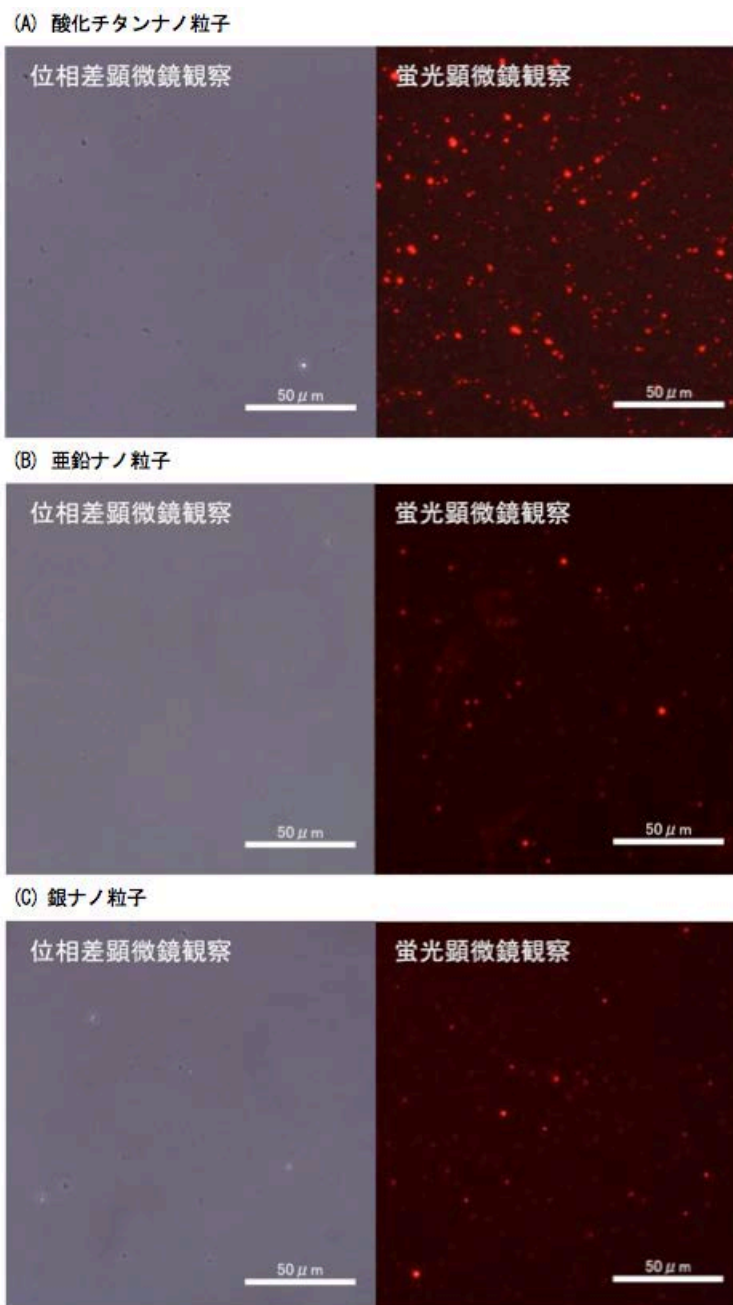
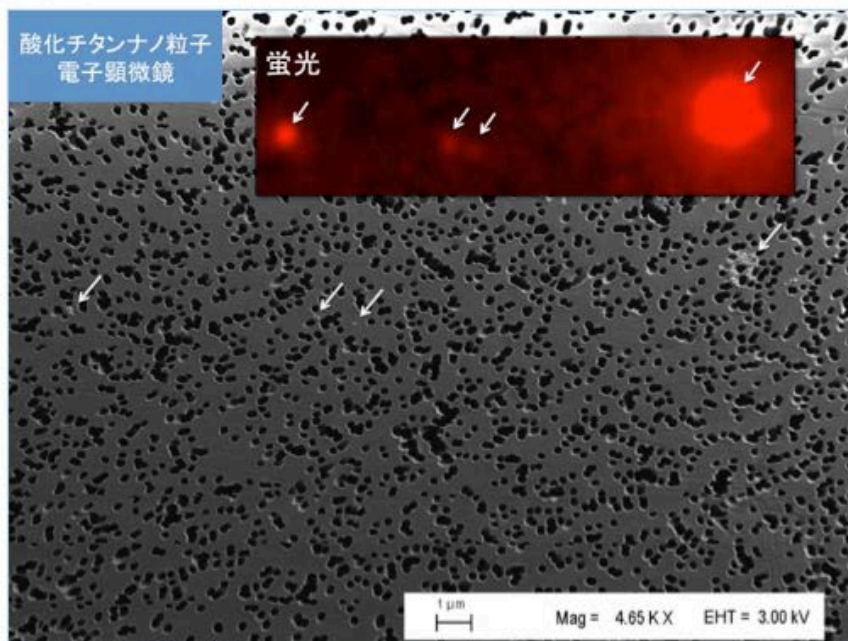


図16、酸化チタンナノ粒子(A)、酸化亜鉛ナノ粒子(B)、銀ナノ粒子(C)の位相差及び蛍光顕微鏡の観察結果

以上の結果から、どのナノ粒子も蛍光で可視化することに成功したが、どの程度の大きさのナノ粒子を検出できているのかは分からなかった。そこで、蛍光で検出されたナノ粒子の粒子径を調べるために、光電子相関顕微鏡を用いた検討を行なった。この顕微鏡は、蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で共通した試料台を用いて位置情報を共有することで、蛍光で観察した同じ視野を、電子顕

(A) 電子顕微鏡観察 (4650 倍)



(B) 電子顕微鏡観察 (17600 倍)

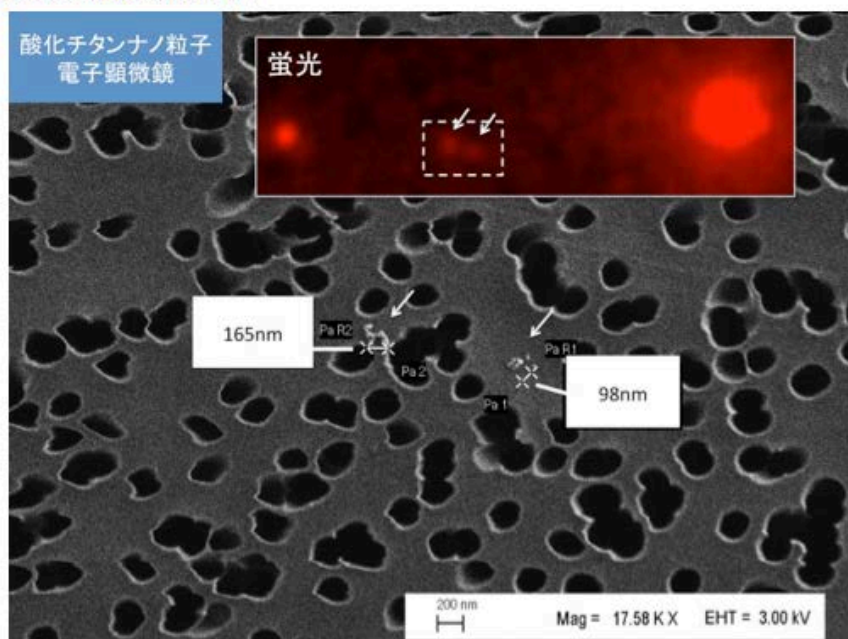


図17、蛍光検出できた酸化チタンナノ粒子の電子顕微鏡観察結果。蛍光顕微鏡（400倍）とほぼ同じ位置に酸化チタンナノ粒子が確認できた（A）。ナノ粒子の位置を推測し、拡大していくと約17,600倍の倍率ではっきりとナノ粒子を観察する事ができ、165nm、98nmのナノ粒子であることが分かった（B）。

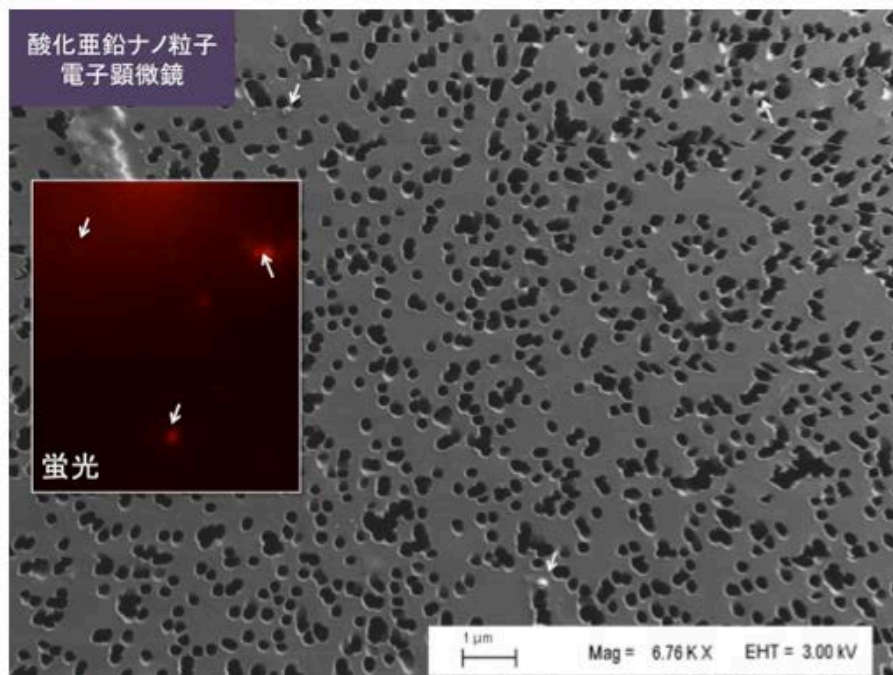
微鏡でも観察することができる。まず、蛍光染色した酸化チタンナノ粒子をフィルター上に固定化し、蛍光顕微鏡で観察後、電子顕微鏡で同じ視野を観察した(図17)。蛍光とほぼ同じ位置に酸化チタンナノ粒子が確認できたが、電子顕微鏡画像(倍率4,650倍)では、粒子が見えづらく、蛍光画像の方が観察しやすいことが分かった(図17A)。電子顕微鏡での倍率を約17,600倍まで上げて観察すると、ナノ粒子をはっきりと観察することができた(図17B)。これらの粒子サイズを測定した結果、165 nmと98 nmであることが分かった(図17B)。

次に、酸化亜鉛ナノ粒子について同様な検討を行なった。蛍光とほぼ同じ位置に酸化亜鉛ナノ粒子が確認できた(図18A)。さらに、電子顕微鏡での倍率を約8,600倍まで上げて観察すると、ナノ粒子をはっきりと観察することができ、粒子のサイズを測定した結果、168 nmと218 nmであることが分かった(図18B)。次に、銀ナノ粒子について検討を行なった。蛍光とほぼ同じ位置に銀ナノ粒子が確認できた(図19A)。さらに、電子顕微鏡での倍率を約11,000倍まで上げて観察すると、ナノ粒子をはっきりと観察することができた。この粒子サイズを測定した結果、190 nmであることが分かった(図19B)。

以上の結果から、3種類のナノ粒子は、いずれも100 nm~200 nm程度の大きさであった。ナノ粒子の一次粒子は100 nm以下なので、蛍光で観察できた粒子は、いくつかの粒子が集まったものであると推測される。そこで、一次粒子を検出するためさらに検討を行なった。具体的には、高輝度蛍光色素であるBrilliant Blue 515が標識されたストレプトアビジンを利用することで検出感度を向上させることができるのではないかと考え検討を行なった。この蛍光色素(Brilliant Blue 515)は、最も一般的な蛍光色素であるFluoresceinの約7倍の蛍光強度を持つことが知られている。酸化チタン結合ペプチドとBrilliant Blue 515で標識されたストレプトアビジンを利用して、高輝度の酸化チタン検出用蛍光プローブを作製した。この高輝度蛍光プローブで、酸化チタンナノ粒子を蛍光染色し、光電子相関顕微鏡で解析を行なった。上記の光電子相関顕微鏡で評価した際、ナノ粒子を光電子相関顕微鏡で見つけ出すことが非常に困難であった。具体的には、蛍光で観察した視野(400倍)の位置情報の誤差は、電子顕微鏡でナノ粒子を観察する際(数万倍)には非常に大きくなり、電子顕微鏡でナノ粒子の位置を特定するのは容易ではなかった。そこで、あらかじめ蛍光で染色したアスベスト繊維をマーカーとして用いて、マーカーの位置情報からナノ粒子の位置を特定することで、複数の視野でナノ粒子の位置を特定し観察を行えるようにした。上記の蛍光染色した酸化チタンナノ粒子を固定したフィルターに、蛍光で染色したアスベスト繊維をマーカーとして固定化した。このように調製したサンプルを蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で観察を行なった(図20)。電子顕微鏡で、マーカーであるアスベスト繊維は観察しやすいが、一方でナノ粒子は非常に見つけにくい様子が分かる(図20A)。マーカーの位置から、これによりナノ粒子の位置の特定も容易にできた。電子顕微鏡で観察された酸化チタンナノ粒子のサイズを測定したところ、約44 nmであることが分かった(図20B)。使用した酸化チタンの一次粒子のサイズが21 nm程度あることから、これは一次粒子ではないと推測された。そこで、さらに別の視野を観察したところ、サイズが約28 nmの酸化チタンナノ粒子を観察することができた(図21A)。これは、酸化チタンナノ粒子の単粒子を観察できたと考えている。さらに、蛍光画像と電子顕微鏡画像を重ねあわせると、両者がよく一致した(図21B)。ナノ粒子の蛍光が電子顕微鏡の粒子サイズより大きく観察された。光学顕微鏡の分解能は250 nm程度であるので(回折限界)、蛍光は実際のナノ粒子よりも大きく観察されたと考えられる。蛍光法では、分解能の限界でナノサイズの正確な計測

は出来ないものの、ナノ粒子を簡便に検出することが可能であることが分かった。

(A) 電子顕微鏡観察 (6760 倍)



(B) 電子顕微鏡観察 (8670 倍)

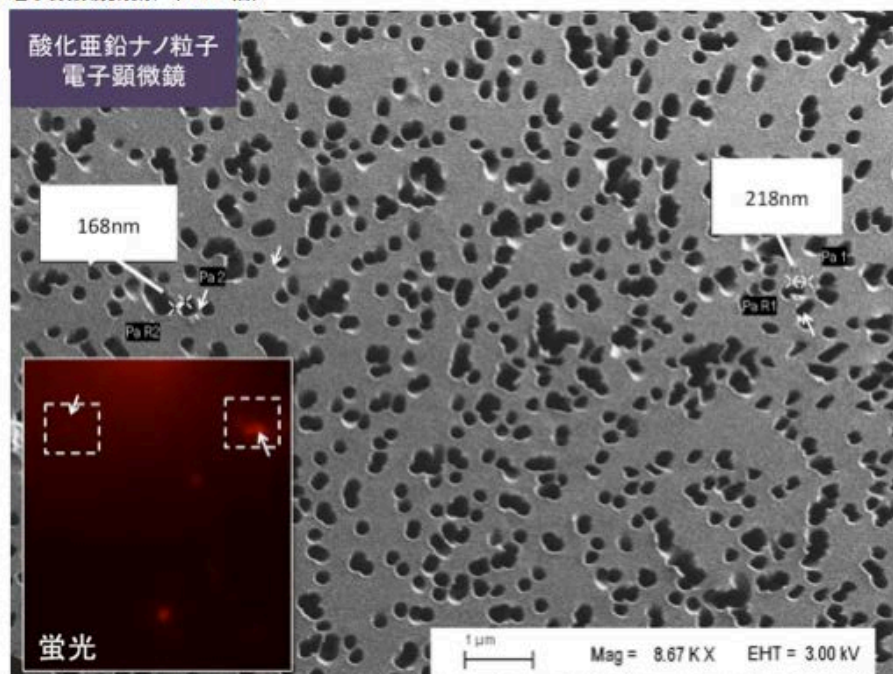
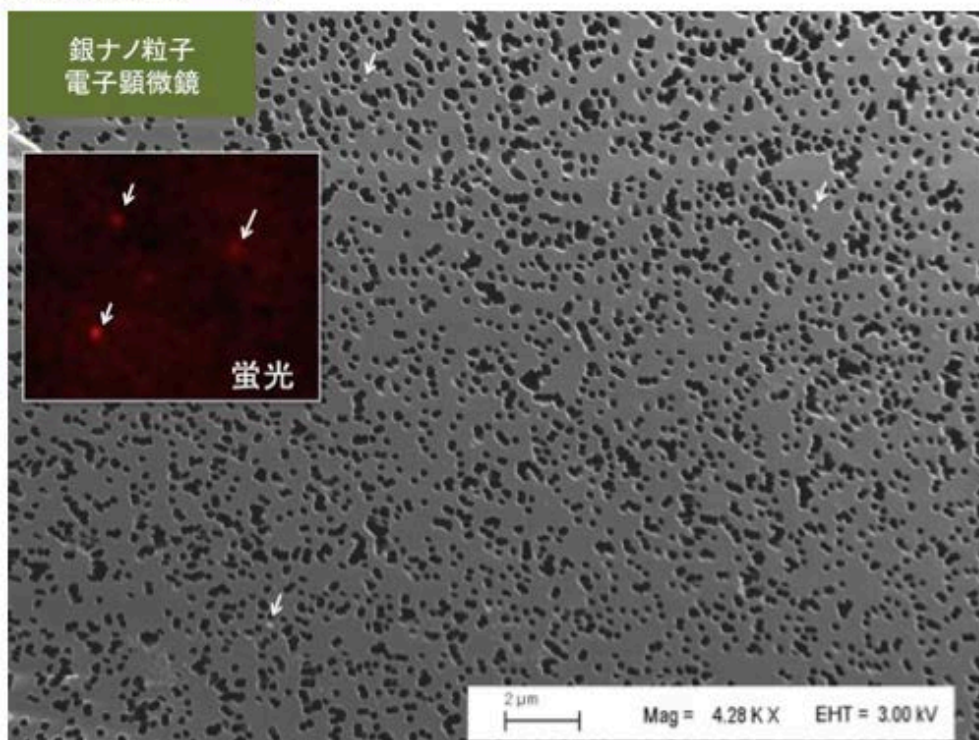


図18、蛍光検出できた酸化亜鉛ナノ粒子の電子顕微鏡観察結果。蛍光顕微鏡（400倍）とほぼ同じ位置に酸化亜鉛ナノ粒子が確認できた（A）。ナノ粒子の位置を推測し、拡大していくとはっきりとナノ粒子を観察する事ができ、168nm、218nmのナノ粒子であることが分かった（B）。

(A) 電子顕微鏡観察 (4280 倍)



(B) 電子顕微鏡観察 (11130 倍)

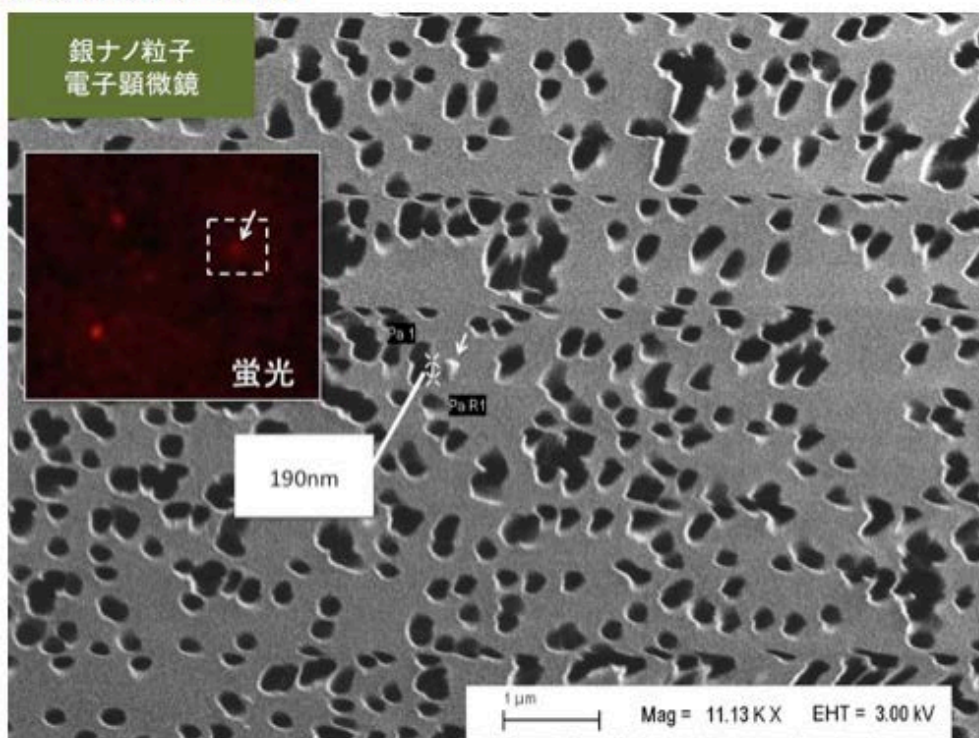
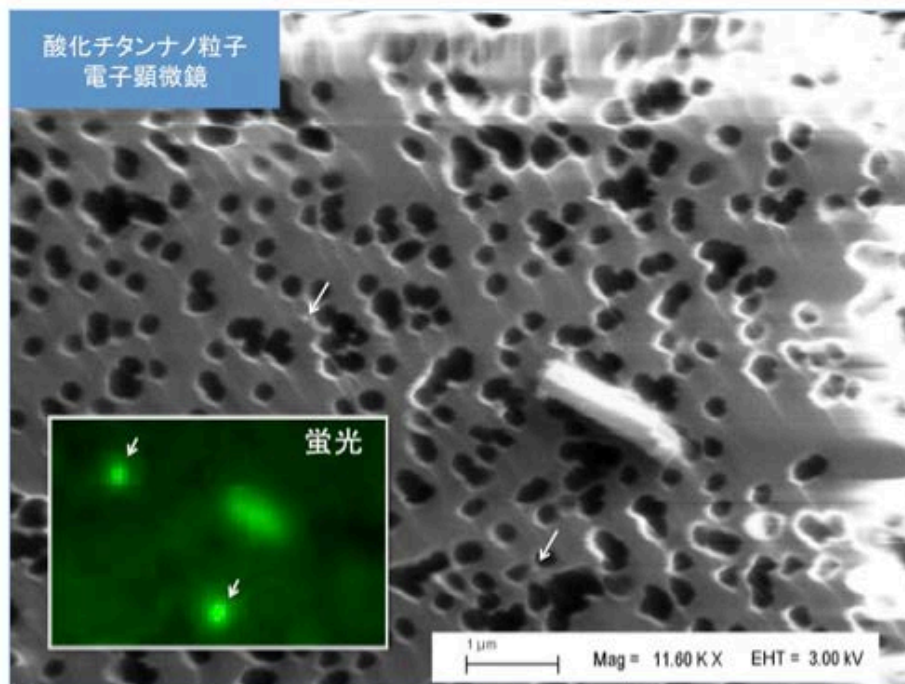


図19、蛍光検出できた銀ナノ粒子の電子顕微鏡観察結果。蛍光顕微鏡（400倍）とほぼ同じ位置に酸化チタンナノ粒子が確認できた（A）。ナノ粒子の位置を推測し、拡大していくと約11000倍の倍率ではっきりとナノ粒子を観察する事ができ、190nmのナノ粒子であることが分かった（B）。

(A) 電子顕微鏡観察 (11600倍)



(B) 電子顕微鏡観察 (28960倍)

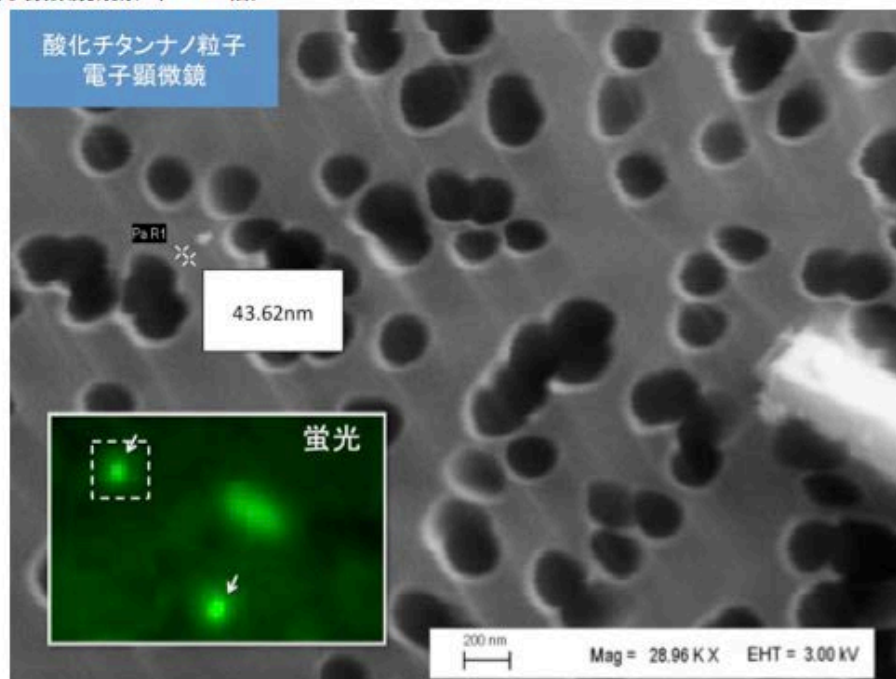
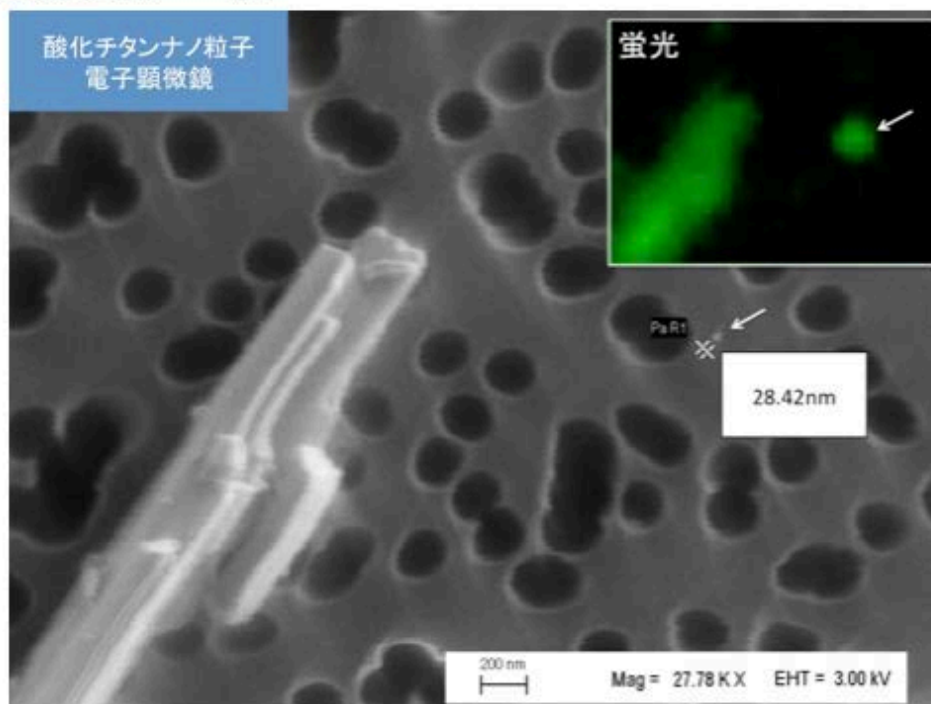


図20、高輝度蛍光色素を用いて検出できた酸化チタンナノ粒子の電子顕微鏡観察結果。マーカーであるアスベスト繊維は観察しやすいが、一方でナノ粒子は非常に見えにくい (A)。マーカー（蛍光標識したアスベスト）の位置からナノ粒子の位置を推測し、拡大していくと約29000倍の倍率ではっきりとナノ粒子を観察する事ができ、44nmのナノ粒子であることがわかった (B)。

(A) 電子顕微鏡観察 (27780 倍)



(B) 電子顕微鏡観察画像と蛍光顕微鏡画像の重ねあわせ

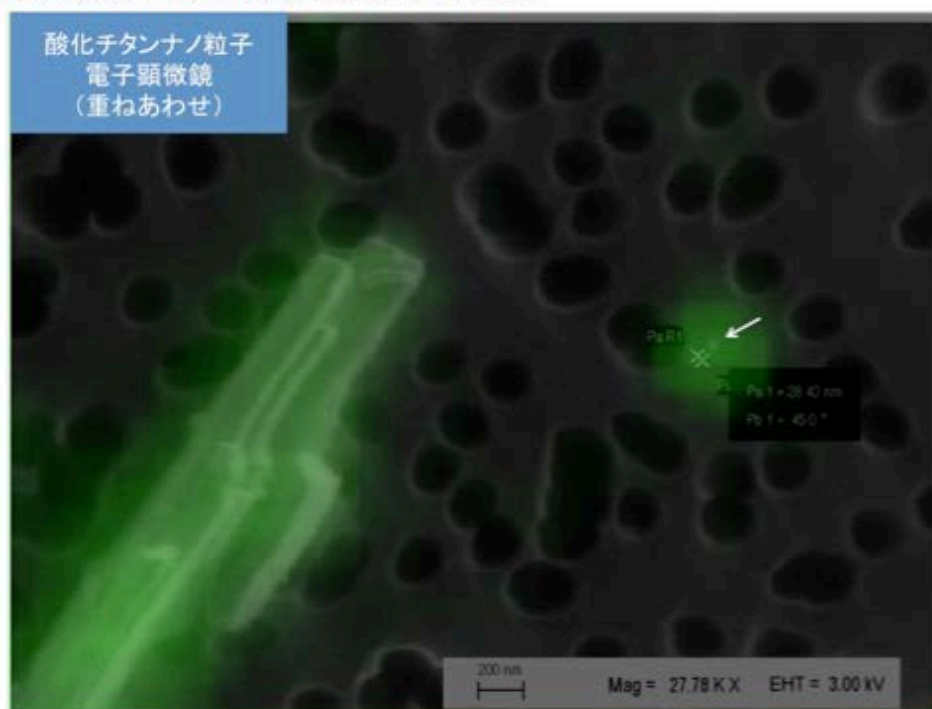


図21、高輝度蛍光色素を用いて検出できた酸化チタンナノ粒子の電子顕微鏡観察結果。マーカー（蛍光標識したアスベスト）の位置からナノ粒子の位置を推測し、拡大していくと約28000倍の倍率ではっきりとナノ粒子を観察する事ができ、28nmのナノ粒子であることがわかった（A）。電子顕微鏡と蛍光顕微鏡の観察を重ね合せた結果、両者がよく一致している様子がわかる（B）。

3) 銀ナノ粒子結合タンパク質の探索と蛍光検出

さらにアスベスト結合タンパク質と同様の手法を用いて、新たに銀ナノ粒子に結合するタンパク質の探索を行った。大腸菌の中には、約4,000種類のタンパク質が存在する（タンパク質ライブラリー）。このタンパク質ライブラリーの中から銀に結合するタンパク質を探した(図22)。MALDI-TOF質量分析によってタンパク質の解析を行なったところ、45 kDa付近のものはelongation factor Tu (EF-Tu)、21.5 kDa付近のものはTranscription elongation factor (GreA)であると同定することができた。

同定されたEF-Tu及びGreAについて結合能の評価を行うために、それぞれのタンパク質の発現と精製を行なった。EF-Tuタンパク質の発現にはpET-tufBベクターを用い、GreAタンパク質の発現にはpET-GreA-AviTagを用いた。これらのプラスミドを大腸菌BL21(DE3)に導入することでタンパク質発現を行ない、

HisTagを用いたアフィニティクロマトグラフィーによりタンパク質を精製した。その結果、全ての発現条件で、タンパク質の可溶性で発現しており精製する事ができた。その中でもEF-Tuは15℃培養、GreAは37℃培養の条件で発現及び精製したサンプルの純度が高かったため、これらの精製タンパク質を用いて蛍光標識を行なった。

精製したEF-Tu、GreAタンパク質をCy3で蛍光標識し、蛍光検出プローブを作製した。蛍光標識率（タンパク質に結合する蛍光分子のモル数を全タンパク質のモル数で割ったもの）は、EF-Tu-Cy3は0.79、

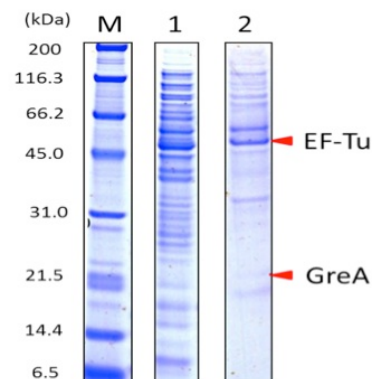
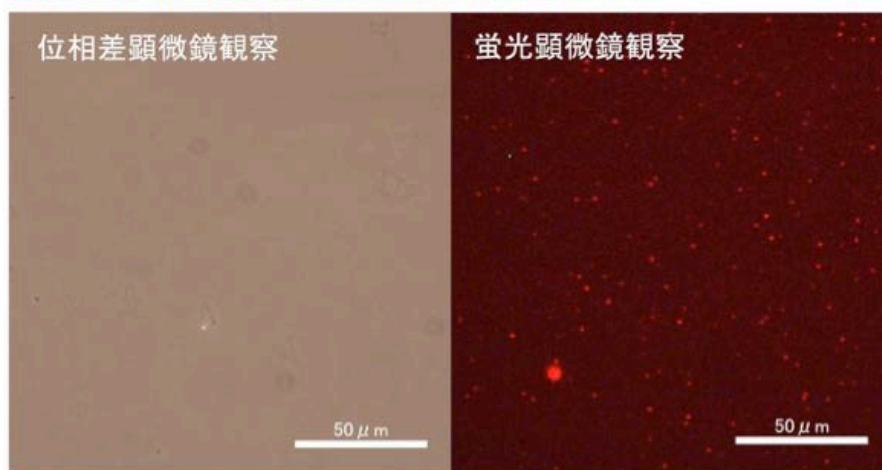


図22、銀結合タンパク質の電気泳動

(A) EF-Tu-Cy3 を用いた銀ナノ粒子の蛍光顕微鏡観察



(B) Gre-A-Cy3 を用いた銀ナノ粒子の蛍光顕微鏡観察

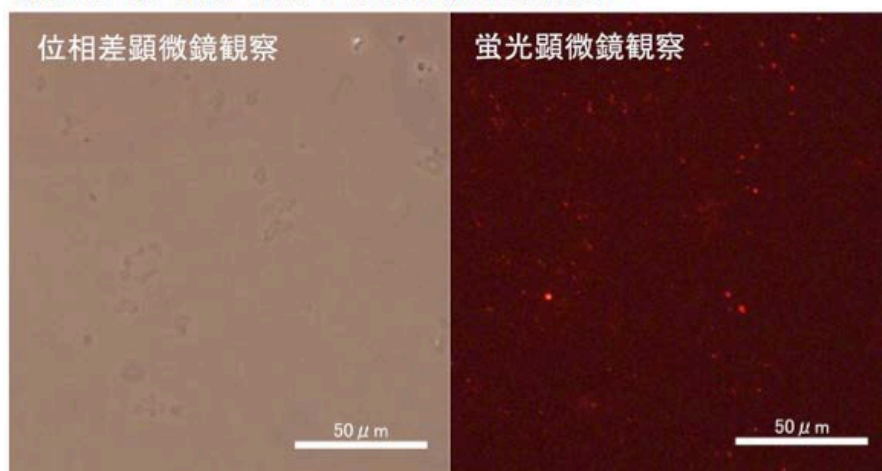


図23、EF-Tu-Cy3 (A) と Gre-A-Cy3 (B) を用いた銀ナノ粒子の蛍光顕微鏡観察結果。

GreA-Cy3は0.59であった。作製したEF-Tu-Cy3, GreA-Cy3を終濃度50 nM、銀ナノ材料を終濃度200 pg/mlとなるように10 mM Tris-HCl (pH7.5)条件下で混合し、蛍光顕微鏡により観察を行った。その結果、EF-Tu-Cy3とGreA-Cy3のどちらでも、位相差顕微鏡では見えない銀ナノ粒子を蛍光可視化できることが分かった(図23)。

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。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。バイオ蛍光法では、これまで電子顕微鏡でしか見えなかった微細なアスベスト繊維が「低倍率」で見えることが分かった。また、環境ナノ粒子や工業用ナノ材料の観察には透過型電子顕微鏡や原子間力顕微鏡などが用いられているが、これらの方法は装置自体が非常に高価であるうえ、高倍率の観察であるため時間がかかる。バイオ蛍光法は、広い視野でも電子顕微鏡なみの感度と位相差顕微鏡なみの手軽さで見えるため、現場などの日常的なアスベストやナノ材料の検出法として有望である。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

平成26年環境省水大気環境局大気環境課による「建築物の解体等に関わる石綿飛散防止マニュアル」にバイオ蛍光法が記載され (p. 146)、石綿飛散防止に貢献した。

<行政が活用することが見込まれる成果>

解体現場等が我が国におけるアスベスト繊維の主要な発生源であることに鑑み、公定法とは別に新たな迅速計測法が求められている (環境省アスベストモニタリングマニュアル第4版)。しかしながら、現場でのアスベスト飛散のモニタリングに対応する技術は未だ確立されておらず、バイオ蛍光法の実証と普及が求められている (第10回中央環境審議会大気・騒音振動部会石綿飛散防止専門委員会、資料1、p. 6)。バイオ蛍光法は、平成25年6月21日に改正された大気汚染防止法 (アスベストのモニタリングを強化) への対応に貢献できる。

一方、近年技術開発が進んでいるナノ材料については、環境中への放出による人の健康や環境への影響が懸念されているが、生体・環境毒性評価に関する試験手法の確立、環境・生体中の動態等に関する知見の集積、ナノサイズの粒子の特性を踏まえた環境リスクの評価方法の確立等が課題となっている。特にナノ材料による環境影響防止に向けた検討の基盤として、一般環境中及び生体内におけるナノ材料の動態解析ツールの開発が不可欠とされている。バイオ蛍光法はナノ材料の検出にも応用可能であり、リスク管理・評価手法の高度化を図る行政ニーズに貢献する。

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) M. Alexandrov, E. Ichida, T. Nishimura, K. Aoki, T. Ishida, R. Hirota, T. Ikeda, T. Kawasaki, A. Kuroda: Environ Monit Assess, 187, 4166-4167 (2015)
“Development of an automated asbestos counting software based on fluorescence microscopy”
- 2) A. Kuroda, M. Alexandrov, T. Nishimura, T. Ishida: Biotechnology Journal, in press (2016)
“Rapid on-site detection of airborne asbestos fibers and potentially hazardous nano materials using fluorescence microscopy-based biosensing”
- 3) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、M. Alexandrov、市田越子、青木功介、松田俊寛、河崎哲男、関口 潔：作業環境、36(2)、53-58 (2015)
「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」

<その他誌上発表(査読なし)>

- 1) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、アレキサンドロフマキシム：化学工業、65(7)、524-531(2014)
「バイオ技術を駆使したアスベストの検出技術」
- 2) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、アレクサンドロフ・マクシム：環境バイオテクノロジー学会誌、印刷中
「スマートバイオセンシングによるアスベスト検出」
- 3) 黒田章夫：建築設備と配管工事、印刷中
「アスベスト検知装置」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) 黒田章夫、石田丈典、西村智基、M. Alexandrov、神山宣彦：日本労働衛生工学会、2014年11月14日
「蛍光顕微鏡法によるアスベスト分析とその利用について」
- 2) A. Kuroda: The Francis Crick Institute Seminar, United Kingdom, May 5, 2015
“Design of protein interface to inorganic materials and its application to nanomaterial-monitoring”
- 3) 黒田章夫：第14回国際バイオテクノロジー展アカデミックフォーラム、2015年5月14日
「アスベスト蛍光染色用バイオプローブ開発」
- 4) 黒田章夫：第67回日本生物工学会、2015年5月28日
「アスベストバイオプローブ開発とスマートバイオセンシングへの展開」
- 5) 石田 丈典、池田 丈、廣田 隆一、黒田 章夫：第67回日本生物工学会、2015年5月28日
「カーボンナノチューブ結合ペプチドを用いた蛍光検出技術の開発」
- 6) 黒田章夫、石田丈典、土井奨平、西村智基、Maxym Alexandrov、神山宣彦：日本労働衛生工学会、2015年10月21日、「ナノマテリアルの蛍光検出技術開発」

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない

(4) 「国民との科学・技術対話」の実施

- 1) 環境省環境調査研修所セミナー、「蛍光顕微鏡法によるアスベスト繊維の検出の原理」、
(主催：環境省環境調査研修所(所沢市)、平成26年6月4日、受講者10名)
- 2) 広島大学公開講座、「バイオでアスベストを検出する」(主催：広島大学、平成26年8月30日、広島県民文化センター、観客60名)にて講演
- 3) 環境省環境調査研修所セミナー、「蛍光顕微鏡法によるアスベスト繊維の検出の原理」、
(主催：環境省環境調査研修所(所沢市)、平成26年10月8日、受講者10名)
- 4) 環境省環境調査研修所セミナー、「蛍光顕微鏡法によるアスベスト繊維の検出の原理」、
(主催：環境省環境調査研修所(所沢市)、平成27年5月27日、受講者10名)
- 5) 広島大学公開講座、「バイオでアスベストを検出する」(主催：広島大学、平成26年8月30日、広島県民文化センター、観客100名)にて講演
- 6) 研究100連発、「バイオ蛍光法で観る！世界」(主催：科学技術振興機構、日本科学未来館、平成27年11月14日、観客約60名)にて講演
- 7) 環境省環境調査研修所セミナー、「蛍光顕微鏡法によるアスベスト繊維の検出の原理」、
(主催：環境省環境調査研修所(所沢市)、平成27年11月18日、受講者10名)

(5) マスコミ等への公表・報道等

- 1) 日本経済新聞(2016年1月25日、全国版、13頁)

(6) その他

- 1) 平成28年度、「環境賞」環境大臣賞、
「携帯型蛍光顕微鏡による微細アスベスト迅速検査法の開発」

8. 引用文献

特に記載すべき事項はない

Practical Application of Biofluorescence Method to Asbestos Detection and Nanomaterial Visualization and Tracking

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, Fluorescence, Bioprobe, Nanomaterials

Biofluorescence method is an analytical method that uses fluorescently labelled proteins or peptides specifically binding to target inorganic materials in order to visualize them under fluorescence microscopy. Using asbestos-binding protein, we found that single asbestos fibrils with a diameter of approximately 30 nm could be observed under fluorescence microscope. Asbestos fibers that are stained using biofluorescence method glow against the dark background, making it possible to visualize even those fibers that are thinner than the resolution limit of optical microscopy (and could be previously observed only using electron microscopy). A notable advantage of biofluorescence method is that by observing the fibers under fluorescence microscope, it is possible to simultaneously confirm if they are asbestos by the presence of fluorescent staining. On the other hand, when using the official method of asbestos analysis, elemental composition of each fiber has to be individually analyzed using specific X-rays emitted under electron beam. Since this method requires highly skilled analysts and is extremely time-consuming, it is considered unsuitable for asbestos risk monitoring at demolition sites. In order to obtain official approval for the application of biofluorescence method to the analysis of airborne asbestos fibers and to facilitate its practical use, this research seeks to accumulate data on statistical correlation between the test results obtained by biofluorescence method and the currently approved (electron microscopy-based) method. Our data for 64 field samples demonstrated high correlation between the test results by biofluorescence method and the officially approved (electron microscopy-based) method ($r=0.87$). We also succeeded in developing a portable fluorescence microscope for use in rapid on-site testing by biofluorescence method. Seeking to promote wider use of biofluorescence method beyond asbestos analysis, we have obtained binding peptides for titanium and zinc oxides, carbon nanotubes and silver nanoparticles, and developed

fluorescent bioprobes that bind to these potentially toxic nanomaterials. All of the target materials were successfully visualized under fluorescence microscopy, expanding the application of biofluorescence method to detection and tracking of toxic nanomaterials.

資料集

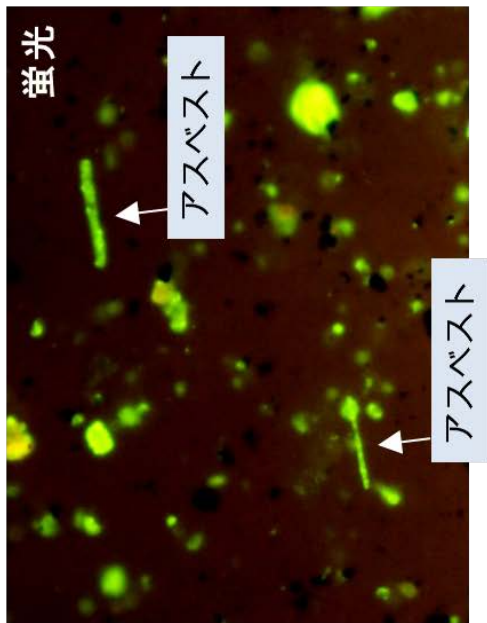
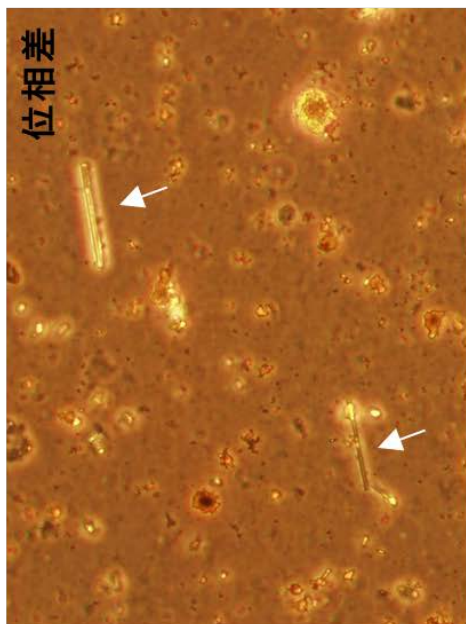
解体現場大気サンプルを用い、蛍光法（位相差蛍光法）と公定法（電子顕微鏡法）で計測したアスベスト濃度の比較を行った（図3、図4）。本資料集では、その際の位相差画像と蛍光画像、電子顕微鏡の画像とEDX分析を行った結果を掲載している。位相差蛍光法では、位相差顕微鏡で観察した繊維が蛍光を持つ場合には、アスベストと判定した。ただし、ロックウールなどは、繊維の回りに薄く蛍光を持つものが存在するので、その場合は「蛍光なし」と判定した。また、蛍光粒子が繊維の回りに付着している様な場合も「蛍光なし」と判定した。

試料 ; No. 01 解体現場

アスベスト測定結果 (位相差蛍光法 : 36本/L、電子顕微鏡法 : 26本/L)

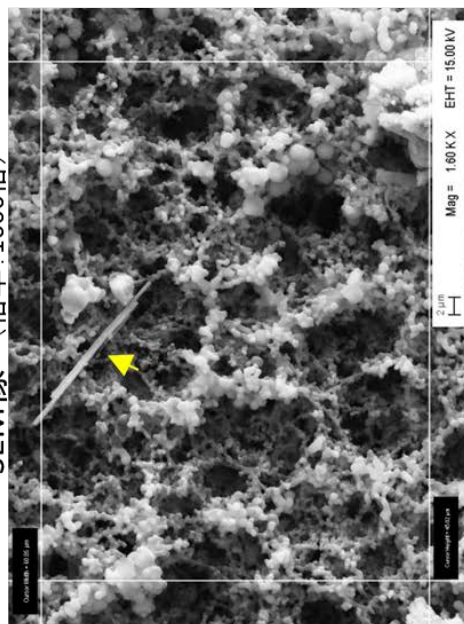
#F001

位相差蛍光法 (対物40倍+デジタル)

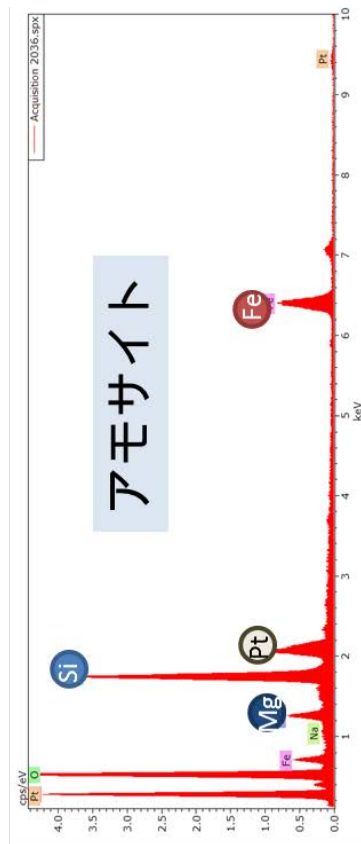


電子顕微鏡法

SEM像 (倍率:1600倍)



EDXスペクトル

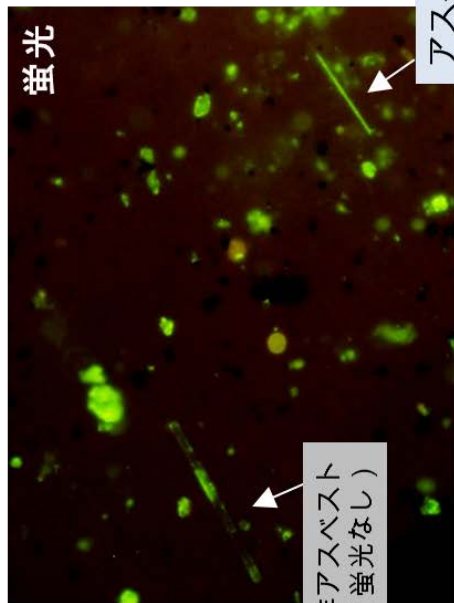
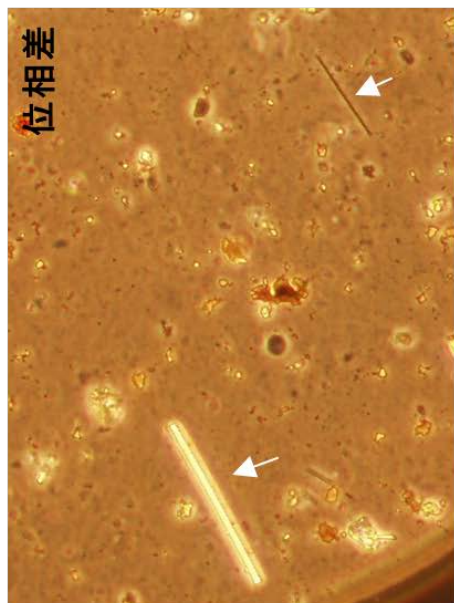


試料 ; No. 01 解体現場

アスベスト測定結果 (位相差蛍光法 : 36本/L、電子顕微鏡法 : 26本/L)

#F002

位相差蛍光法 (対物40倍+デジタル)

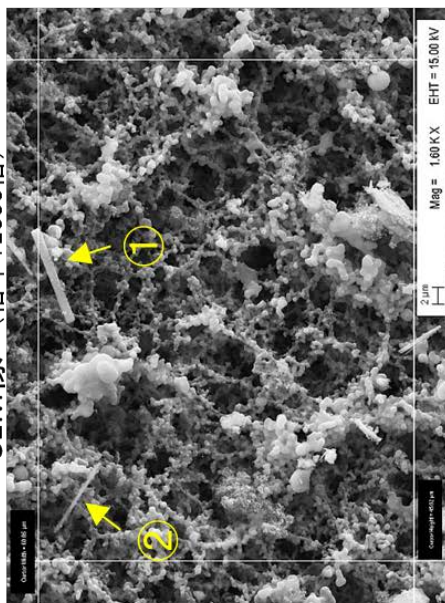


非アスベスト (蛍光なし)

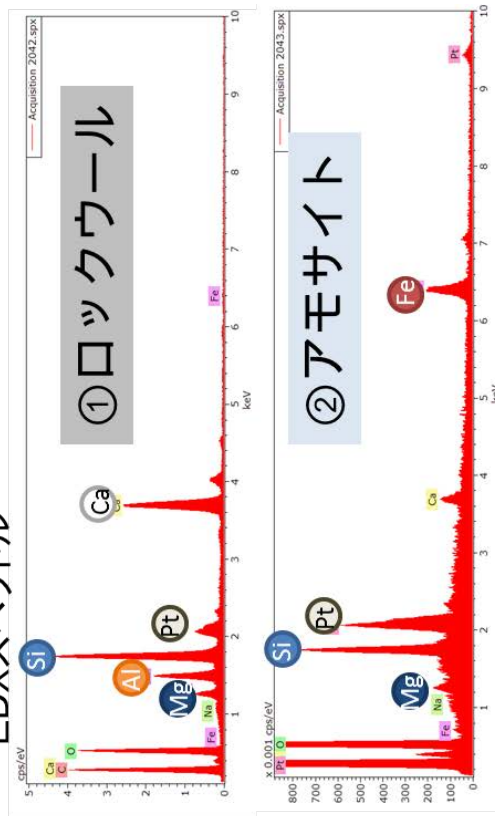
アスベスト

電子顕微鏡法

SEM像 (倍率:1600倍)



EDXスペクトル

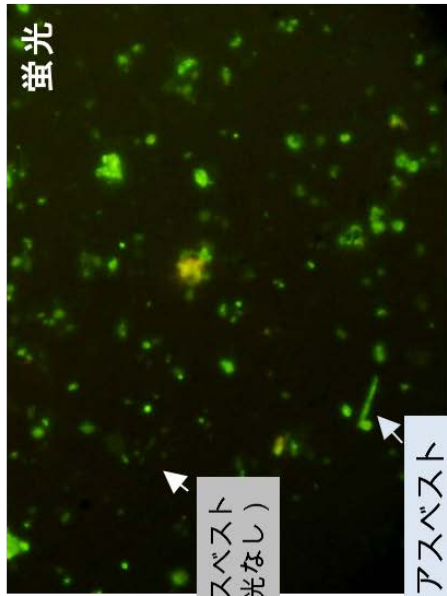
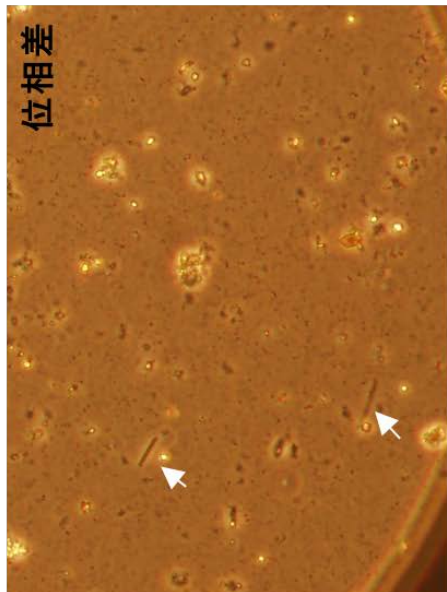


#F003

アスベスト測定結果 (位相差蛍光法 : 8.7本/L、電子顕微鏡法 : 5.9本/L)

試料 ; No. 02 解体現場

位相差蛍光法 (対物40倍+デジタル)

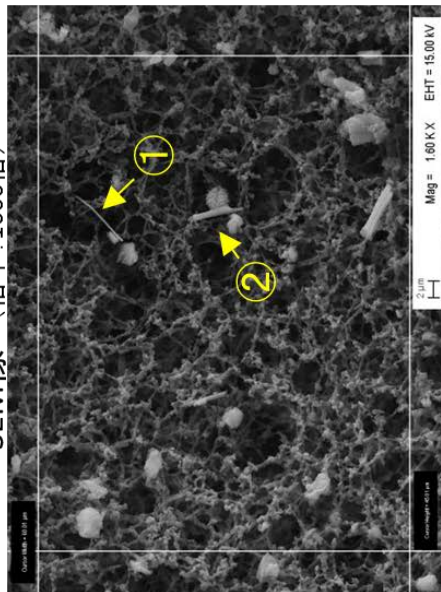


非アスベスト (蛍光なし)

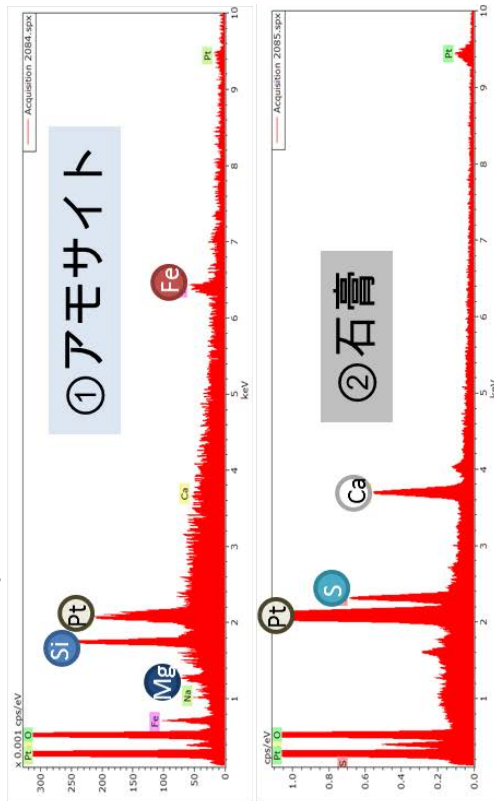
アスベスト

電子顕微鏡法

SEM像 (倍率: 1,600倍)



EDXスペクトル

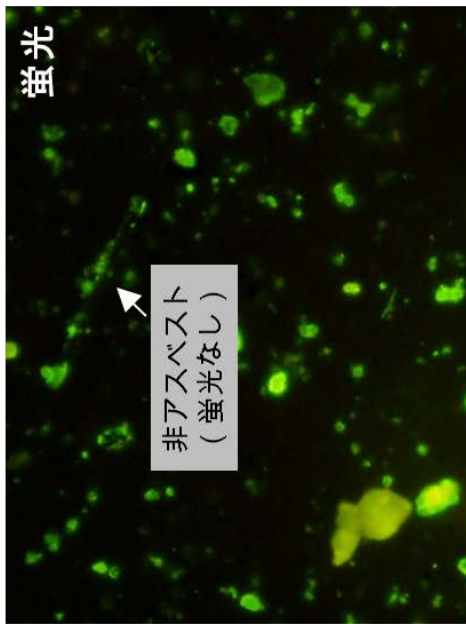
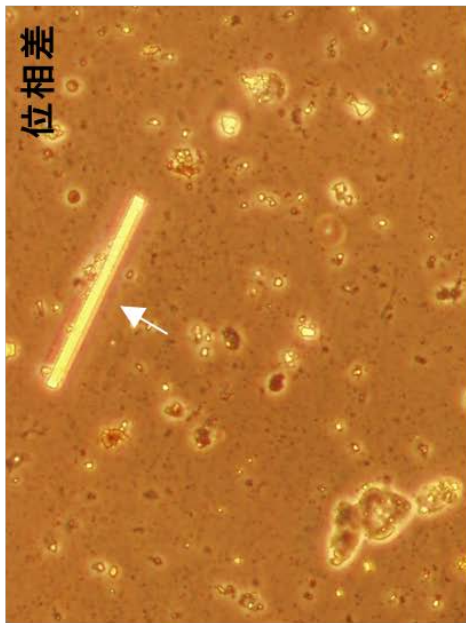


試料 ; No. 02 解体现場

アスベスト測定結果 (位相差蛍光法 : 8.7本/L、電子顕微鏡法 : 5.9本/L)

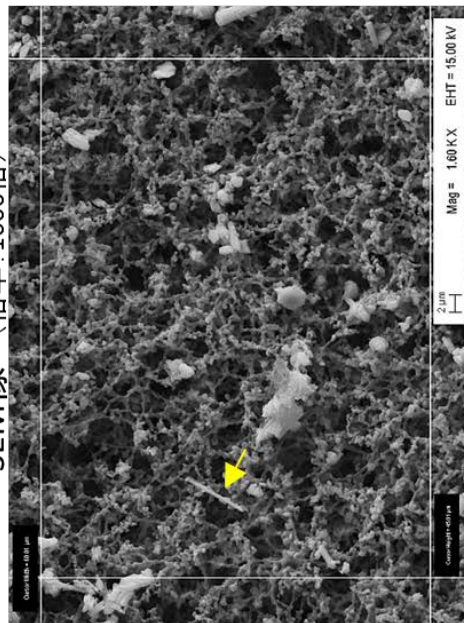
#F004

位相差蛍光法 (対物40倍+デジタル)



電子顕微鏡法

SEM像 (倍率:1600倍)



EDXスペクトル

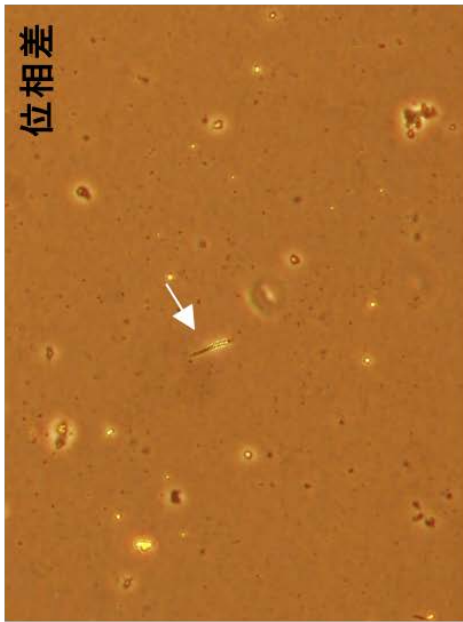


試料 ; No. 03 解体現場

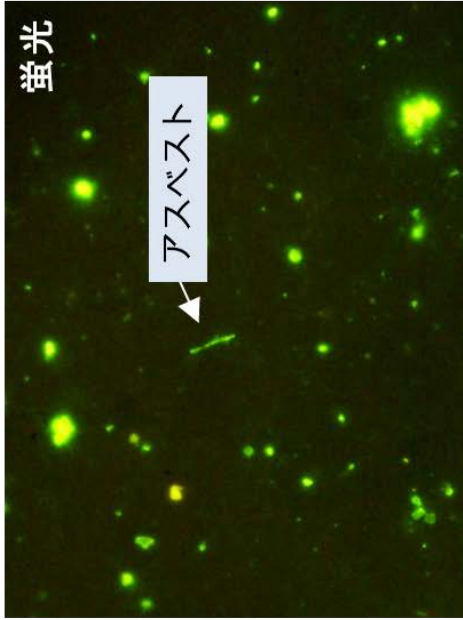
アスベスト測定結果 (位相差蛍光法 : 2.4本/L、電子顕微鏡法 : 4.4本/L)

#F005

位相差蛍光法 (対物40倍+デジタル)



位相差

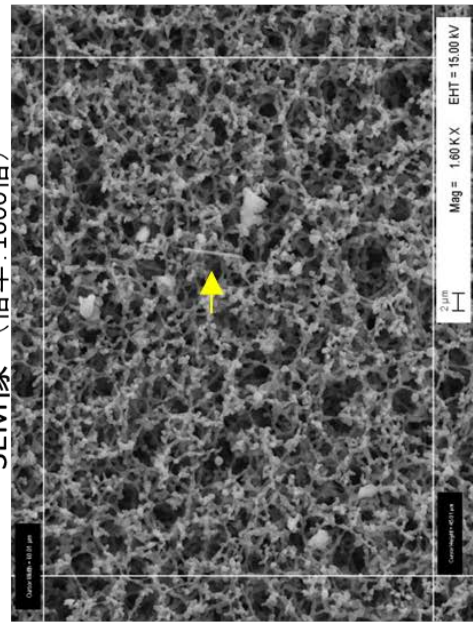


蛍光

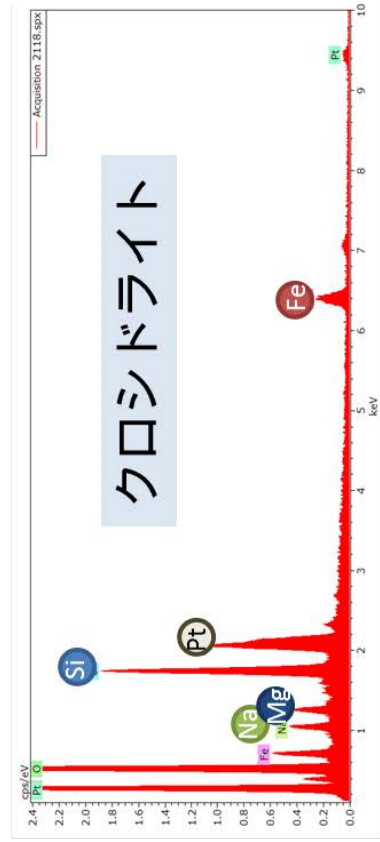
アスベスト

電子顕微鏡法

SEM像 (倍率:1600倍)



EDXスペクトル

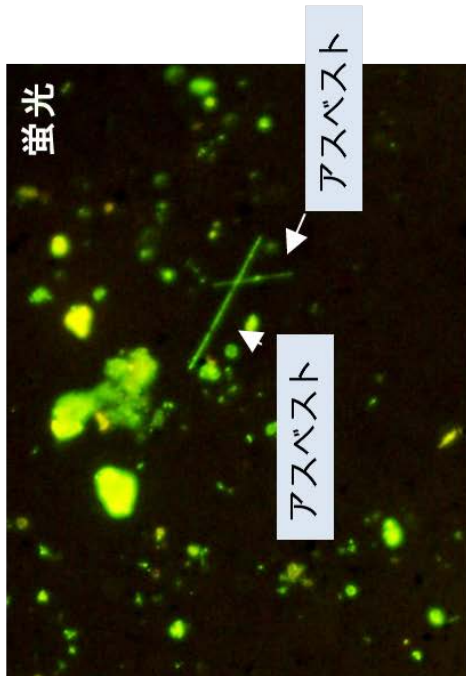
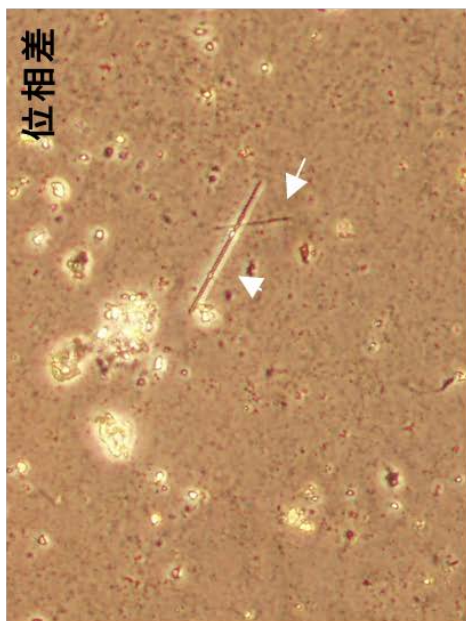


#F006

アスベスト測定結果 (位相差蛍光法 : 27本/L、電子顕微鏡法 : 31本/L)

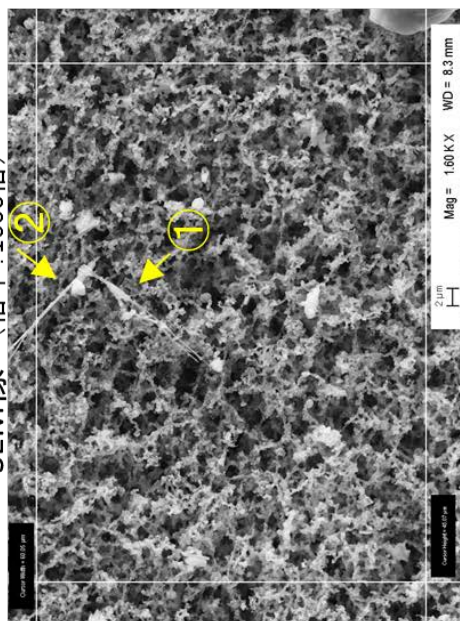
試料 ; No. 04 解体現場

位相差蛍光法 (対物40倍+デジタル)

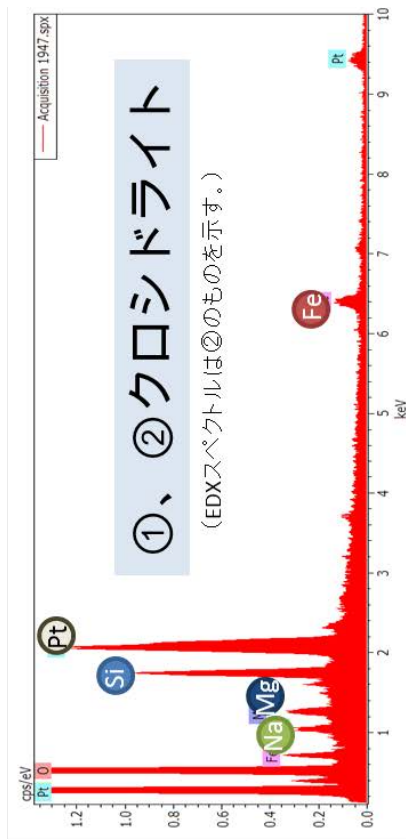


電子顕微鏡法

SEM像 (倍率:1600倍)



EDXスペクトル



Acquisition 1947.spx