

アスベストを検出するための環境バイオテクノロジー

Environmental Biotechnology for the Detection of Asbestos

黒田 章夫*, 石田 丈典, 西村 智基, アレクサンドロフ・マクシム, 奥山 里美
AKIO KURODA, TAKENORI ISHIDA, TOMOKI NISHIMURA, MAXYM ALEXANDROV and SATOMI OKUYAMA

広島大学・大学院先端物質科学研究科 〒739-8530 広島県東広島市鏡山1-3-1

* TEL: 082-424-7758 FAX: 082-424-7047

* E-mail: akuroda @ hirosshima-u.ac.jp

Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530, Japan

キーワード: アスベスト, 石綿, アスベスト結合タンパク質, バイオアッセイ

Key words: asbestos, asbestos-binding protein, bioassay

(原稿受付 2011年10月13日/原稿受理 2011年10月29日)

1. はじめに

アスベストは、曝露を受けてから30年から40年後に被害が顕在化するので、「静かな時限爆弾」とも呼ばれる。2005年には、アスベスト工場で働いていた作業員のみならず、その周辺住民にも中皮腫が発生していたことが公表され、我々は底知れぬ恐怖を感じた。その後、アスベストの使用は全面禁止になったものの、問題は終わったわけではない。なぜならアスベストは過去膨大な量が輸入されていたため、アスベストを1%以上含む建材が約4,000万トンも古い建物に残されている¹⁾。これらアスベストを含む建物の解体の際にアスベストが飛散する可能性がある。また、2011年、東日本大震災が起こった後には、膨大な量の瓦礫が積み上げられた。その瓦礫からのアスベスト飛散も警戒すべきであろう。こういった現場でのアスベストのモニタリングを行わないと、再び大きな社会問題を引き起こすと考えられる。

一方、公定法とされるアスベスト検出法は、実はアスベスト発生源が主に工場である時代に作られた方法である。すなわち、大気中に浮遊するアスベストの検査では、まず大気を吸引することによって浮遊する物質をフィルター上に捕捉し、そのフィルターを透明化した後に、位相差顕微鏡を用いて繊維状物質を計数し、総繊維濃度を算出する。さらに総繊維濃度が1本/L以上の場合、繊維が実際にアスベストであるか否かを電子顕微鏡によって判定する²⁾。しかしながら、電子顕微鏡による判定は、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線解析装置で分析するという非常に時間と根気のいる作業であることから、迅速性が重要な解体現場でのアスベストリスクには対応できない。一週間程度で解体が終わるので、アスベストをまき散らした後に検査結果が出るという場合も少なくない。もはや日本のアスベスト発生源は、工場から、短期的に移動する解

体現場に変わっているので、迅速、簡便に検出できる方法の開発が急務であるとされている²⁾。

迅速、簡便な検査を考えた場合、バイオアッセイは一つの選択肢である。しかし、タンパク質同士の結合に選択性があることは言うまでもないが、タンパク質-固体表面の結合にどの程度の選択性があるか、またその選択性を引き出して利用するにはどのようにすればいいかに関しては未知の部分が多い。本稿では、発見したアスベスト結合タンパク質をどのように改良し、またどのように利用してバイオアッセイを確立したかについて述べたい。

2. アスベスト結合タンパク質

話は少し遡るが、我々は半導体バイオセンサーを作る目的で、単体シリコンの粒子に強力に結合するタンパク質を数種のバクテリアの破碎液より発見していた。このシリコン結合タンパク質(SBP)と目的タンパク質との融合タンパク質を作製することによって、任意のタンパク質を、活性を保ったままシリコン基板上に固定化することが可能である³⁾。そんな折、アスベストショックが日本列島を駆け抜けた。その際、アスベストもシリコンを含む化合物であることから、同様の方法でアスベストに結合するタンパク質が発見できるのではないかと発想した。最初にマウスの肺細胞をすりつぶし、そこに含まれるタンパク質とクリソタイル(アスベストの中で最も多用されたもの)を混合し、クリソタイルを遠心によって沈殿させた(図1)。界面活性剤や塩を含む緩衝液で洗浄後、なおもクリソタイルに結合しているタンパク質をSDS-ポリアクリルアミド電気泳動(SDS-PAGE)と質量分析により同定した。アクチンを含めいくつかのタンパク質がクリソタイルに結合することがわかった。同時に細菌の細胞内タンパク質にもクリソタイルと強く結

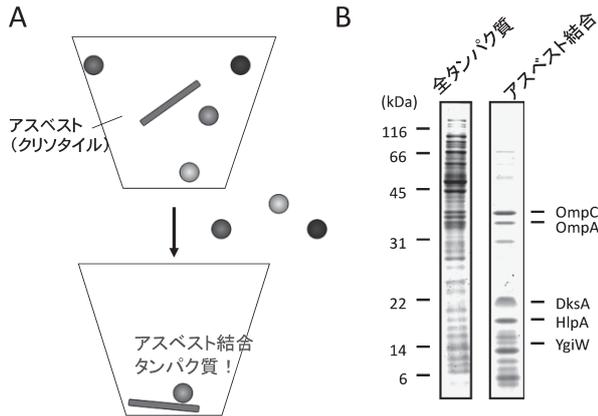


図1. アスベスト結合タンパク質の探索。(A) 細胞内の全タンパク質抽出液にアスベスト(クリソタイル)を投入し、遠心分離にてアスベストを回収する。アスベスト結合タンパク質はアスベストと結合しているので同時に沈殿する。(B) 大腸菌の全タンパク質(左)とアスベストに結合したタンパク質(右)のSDS-ポリアクリルアミド電気泳動図。DksAなど複数のタンパク質にアスベスト結合能力がある。

表1. アスベスト結合タンパク質の結合特異性
HNS₆₀₋₉₀とは、HNSタンパク質のアミノ酸配列60-90に限定したタンパク質を示す。

	繊維の種類	DksA	HNS60-90
アスベスト繊維	クリソタイル	+	-
	クロシドライト	-	+
	アモサイト	-	+
	アンソフィライト	-	+
	トレモライト	-	+
	アクチノライト	-	+
アスベスト以外の繊維	ガラスウール	-	-
	微細ガラス繊維	-	-
	ロックウール	-	-
	耐火性繊維(RF1:セラミック, 非晶質)	-	-
	耐火性繊維(RF2:セラミック, 非晶質)	-	-
	ケイ酸アルミ繊維(RF3:セラミック, 非晶質)	-	-
	チタン酸カリウムウイスカー	-	+/-
	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	-	-	

合するもの(DksA)があることがわかった⁴⁾。無機繊維と有機繊維を使って結合の結合特異性を調べた結果、DksAはほぼクリソタイルに特異的に結合することがわかった(表1)。

一方、アスベストには蛇紋石に属するクリソタイルの他、角閃石に属するアクチノライト、アモサイト、アンソフィライト、クロシドライト、トレモライトが存在する。角閃石アスベストに結合するタンパク質もすぐに見つかったが、残念ながらどれも特異性が十分でないことが明らかとなった。例えば、角閃石アスベストに結合するGatZ⁵⁾、HNSタンパク質(大腸菌ヒストン様タンパ

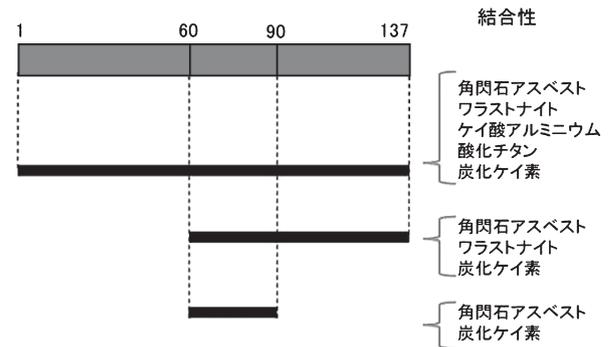


図2. 角閃石アスベスト結合タンパク質(HNS)のアスベスト結合に関与するドメイン。HNSは、137個のアミノ酸からなるタンパク質である。アミノ酸配列(60-137)に限定することによって、結合する繊維の種類が少なくなる。さらにアミノ酸配列(60-90)では、アスベストと炭化ケイ素繊維のみ結合するので、アスベスト結合ドメインは60-90に存在すると考えられる。

ク質)は、ケイ酸アルミ繊維、酸化チタン繊維、ワラストナイト(ケイ酸カルシウム繊維)、炭化ケイ素繊維などの無機繊維と結合してしまう。そこで、HNSの結合特異性を向上させるために、アスベストの結合に関与する領域を限定し、その他の領域を取り除くことで非特異結合を減少させることができるのではないかと考えた。HNSは137アミノ酸からなるタンパク質である。HNSをN末端ドメイン(1-57番目のアミノ酸領域)とC末端ドメイン(60-137番目のアミノ酸領域)の二つの領域に分割したタンパク質を作製し結合性を調べた(図2)。角閃石系アスベストに対して、N末端ドメインは結合が全く認められなかったが、C末端ドメインは結合が認められたことから、C末端ドメインが角閃石系アスベストの結合に重要であることがわかった。さらに、60-90番目のアミノ酸領域に結合領域を限定することで特異性の高いバイオプローブを作り出すことに成功した(表1)。

3. アスベスト結合タンパク質を利用したアスベスト検出法

クリソタイルと強く結合するDksAとアルカリホスファターゼとを遺伝子操作により融合させ、「アスベスト検出酵素」を作製した(図3)。この検出酵素が試料中のアスベストと接触することにより、アスベストに結合し、アルカリホスファターゼの反応を利用してアスベストを検出することができる。アルカリホスファターゼの発色基質であるBCIP/NBTを用い、発色を肉眼で観察することによってアスベストの有無を判定する方法を試みた。粉碎した建材試料をチューブ内でアスベスト検出酵素と混合する。アスベストが含まれなければ、酵素は遠心操作の後、除去される。もしアスベストがあれば、酵素がアスベストに結合するので、遠心操作で共に沈殿する。そこに酵素の基質であるBCIP/NBTを添加すれば、青色を呈するのでアスベストの有無が判定できる。ロックウールは、アスベストの代替物質として吹き付け材などに使用されている人造繊維で、アスベスト検

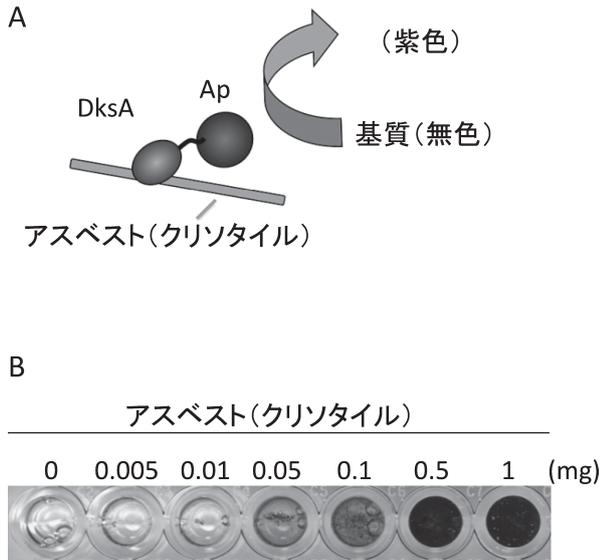


図3. アスベスト検出酵素の構築
A. アスベスト検出酵素は、クリソタイルに結合するDksAとアルカリホスファターゼ（Ap）を遺伝子操作で融合したもの。**B.** アスベストが存在すれば、アルカリホスファターゼ活性で検出できる。

査の際、光学顕微鏡による観察において、アスベストと誤認されることもある。従って、簡便にロックウールとアスベストの識別ができることは、アスベスト検出技術として重要である。そこでロックウールに適当量（重量比0.1%～5%）のクリソタイルを混合させた試料を調製した。クリソタイルを1%添加した試料では基質添加後すぐに発色が見られ、0.1%の試料でも30分程度の反応で発色が見られた⁴⁾。これはX線回折装置を使った分析と同等レベルの検出能力である。また本方法に必要な機材は卓上型の簡素な遠心機程度であり、現場でも実施可能な簡便な検出方法となりうると考えられる。

蛇紋石は、全てその化学成分が $Mg_6Si_4O_{10}(OH)_8$ という化学式で表すことができる鉱物で、繊維状のクリソタイル以外に、板状結晶として産出するアンチゴライト（板温石、葉蛇紋石）とリザルダイトがある。アンチゴライトやリザルダイトは繊維状ではないのでアスベストではない。蛇紋岩は断裂帯や沈込み帯などのプレート境界部に大量に出現するので、日本の至るところに分布している。また、蛇紋岩はマグネシウムを多く含むので、溶性リン肥料原料や鉄精錬用溶剤などに使用されてきた。しかし、蛇紋岩中のクリソタイルは、X線回折で見分けがつかないため、現在では、蛇紋岩の利用が自粛されているようである。アスベスト検出酵素を使って、クリソタイル、アンチゴライト、リザルダイトを試験した結果、クリソタイルのみに反応することがわかった。X線では見分けられないものを、なぜDksAが見分けられるのかが興味深い。クリソタイルは、シリカの4面体シートが内側に、マグネシウムのシートが外側になり、筒状構造を形成する。一方アンチゴライトは同じシリカのシートとマグネシウムのシートからなるが、周期（35–50 Å）的に繰り返した板構造を作る。すなわち、クリソタイルの最表面はマグネシウムのシートで、アンチゴ

ライトはシリカとマグネシウムのシートの繰り返しである。この構造の違いを認識するには、DksAが少なくとも繰り返し周期よりも広い表面を認識しているものと考えられる。

4. 蛍光顕微鏡によるアスベスト検出

大気中のアスベストの検出は、前述した様にフィルター上に捕捉したものを位相差顕微鏡で検出し、さらにアスベストであるか否かを電子顕微鏡によって判定する方法が用いられている。そこで、この方法を簡便にするために、表1に示すアスベスト結合タンパク質を蛍光修飾してバイオプローブを作製し、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を開発した（蛍光顕微鏡法）^{5,6)}。前処理は、大気を捕集したフィルターに数滴の蛍光バイオプローブを垂らした後、緩衝液を同様に数滴垂らして余分な蛍光プローブを洗い流す数分の作業で完成する（図4）。このフィルターをスライドガラスに移して蛍光顕微鏡で観察する。その結果、位相差顕微鏡では非常に見えにくい繊維も蛍光で観察できた。同一繊維を蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で比較した結果、蛍光顕微鏡で観察できる微細クリソタイルの直径は、30–35 nmであることがわかった⁶⁾。蛍光顕微鏡も光学顕微鏡であるので、当然光学的な解像度の限界（200–250 nm）が存在する。従って、実際には30–35 nmの直径のクリソタイル繊維の正確な幅が検出できているわけではない（太く観察される）。しかし、暗視野の中で光っているために、分解能よりもかなり小さい対象物でも、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。蛍光顕微鏡法は、蛍光で見えている繊維がほぼアスベストであるため、電子顕微鏡による判定をする必要がなく、繊維を数えるだけでいいという迅速性に優れた方法と言える。また、蛍光顕微鏡法は単繊維のクリソタイルが検出できるので、微細アスベストも見逃すことがない。この方法は、平成22年6月、環境省アスベストモニタリングマニュアル第4版に掲載された²⁾。

しかし、アスベスト検出の場合、従来から疫学的なデータを積み重ねた基準となる方法（位相差顕微鏡）とどのような相関があるのか、どう連続性を担保するかというのが問題となる。すなわち、蛍光顕微鏡法は、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、蛍光顕微鏡法によって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おそれがあった。蛍光顕微鏡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。

位相差顕微鏡に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。位相差モードで繊維が確認できれば、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。この方法では、まず位相差顕微鏡で計測するので、位相差顕微鏡による

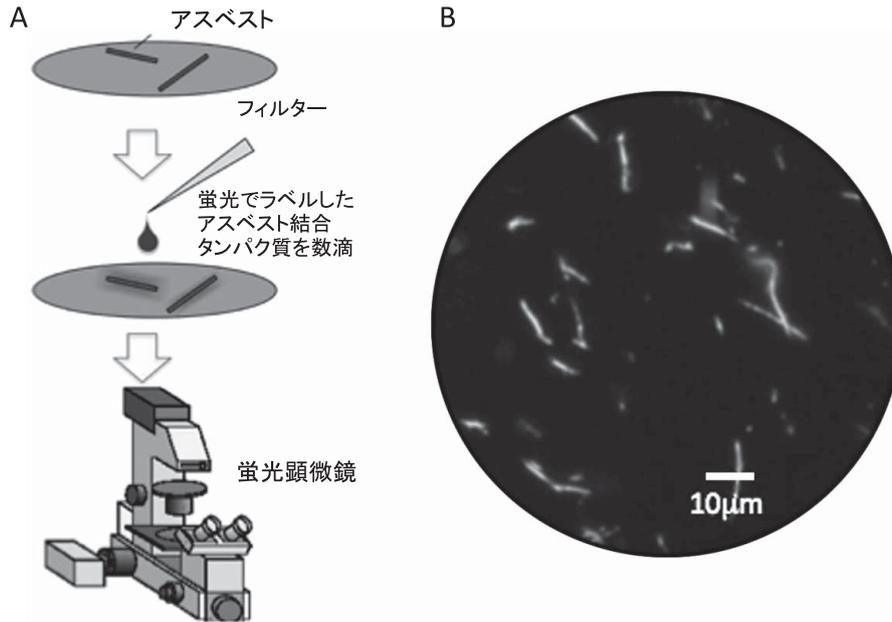


図4. 蛍光顕微鏡法による大気中アスベスト検出。(A) 大気を通してアスベストを捕集したフィルターに、蛍光で修飾したアスベスト結合タンパク質を滴下し、蛍光顕微鏡で観察する（数分の作業）。(B) アスベスト（クリソタイル）の蛍光画像。

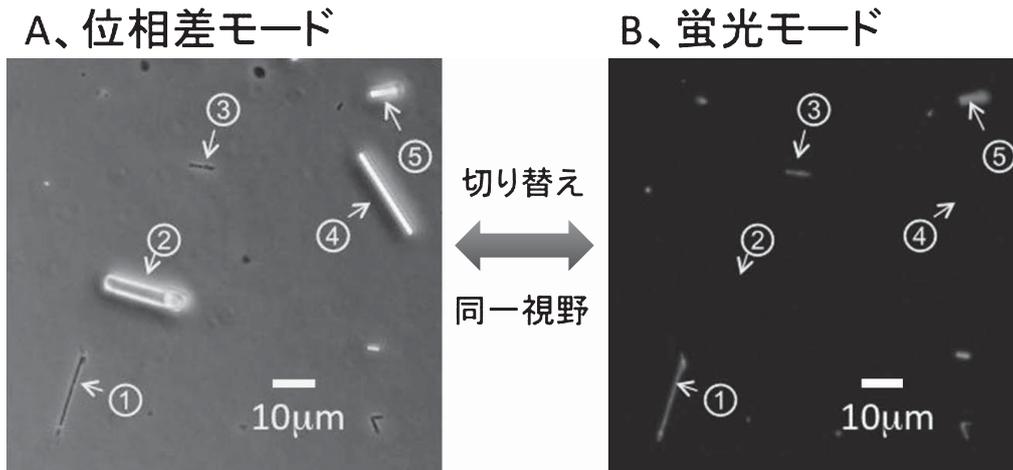


図5. 位相差・蛍光顕微鏡法によるアスベスト計測。(A) は位相差顕微鏡画像。(B) は (A) の位相差顕微鏡画像と同一視野における蛍光顕微鏡画像を示す。位相差顕微鏡下で観察した繊維状の物質 1, 3, 5 において、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の結合を確認することができた。一方、繊維状の物質 2 および 4 においては、蛍光顕微鏡下で蛍光タンパク質の結合が見られなかった。この結果、繊維状の物質 1, 3, 5 は、アスベストであると判定し、繊維状の物質 2 および 4 は、アスベスト以外の繊維（アスベスト代替繊維のロックウールなど）と判定できる。

総繊維数の数値を超えることはない。しかし、位相差モードで観察するためには、フィルターをアセトンで透明化する必要があるが、その際蛍光タンパク質が見えなくなるという問題があった。そこで、バイオプローブの蛍光の種類と強度を工夫し、透明化処理の際に消えないようにした。その結果、位相差モードで確認した繊維を、蛍光モードに切り替えることによって、アスベストか、非アスベストかを判定する位相差・蛍光顕微鏡法が確立できた（図5）。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できるので、従来の「位相差顕微鏡による計測と何らかの方法によるアスベスト判定」の計測コンセプトを変えるもので

はない。従来との違いは、判定が電子顕微鏡による X 線分析（原子組成による）か、タンパク質による結合選択性を利用する（表面の原子組成や分子状態による）かだけである。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、疫学的な基準が変わるのではないかといった危惧が払拭できた。さらに電子顕微鏡では、位相差顕微鏡で見た繊維と同一の繊維を探して観察することは非常に困難であるが、位相差・蛍光顕微鏡法では、同一の繊維を観察できるので（しかも迅速に）、従来法に比べて格段の進歩であると考えている。

5. 今後の課題

蛍光顕微鏡法では、蛍光の存在の有無で、迅速にアスベストと判定できる。しかしながら、例外的に炭化ケイ素ウイスキーなどに結合するため、現状では100%の判定とはなっていない。今後さらにバイオプローブの特異性を上げることができれば、公定法として電子顕微鏡による判定と置き換えることができるのではないかと考えられる。そのためにも、実際の現場のサンプルにおいて、結合する物質がアスベスト以外にないかどうかを今後調べていく必要がある。

また、アスベストの毒性は、長さや太さに依存するため、アスベストモニタリングマニュアルでは長さ5 μm 以上、幅（直径）3 μm 未満で、かつ長さとの比（アスペクト比）が3以上の繊維を数えることとなっている。現状では、接眼レンズにはめ込んだアイピースグレイティクルの目盛を利用して、人の目によって判定している。人の目による判定では、アスペクト比を計測しながら検出するのは大変な労力を必要とするだけでなく、計測者による差が生じている。株式会社インテックと共同で開発中のソフトは、長さ5ミクロン以上、アスペクト比3以上の繊維を数秒で自動検出する。これを利用すれば、アイピースグレイティクルを利用した目視による判定に慣れていない人でも解体現場でのリアルタイムなアスベスト計測ができると考えている。今後は、蛍光画像の解析結果をもとに位相差顕微鏡による観察測定を支援できるような機能を開発することも考えられる。

最近迅速法として、位相差顕微鏡での計測と偏光顕微鏡での判定を組み合わせた方法が提案されている。偏光顕微鏡はステージを回転させて、消光する角度によってアスベストを判定する方法である。ステージを回転させるため、複数の繊維がある場合には位置関係を把握することが大変となる。また観察画像を撮影する際には、そのままでは回転中に繊維が視野から外れることがあるため、繊維を視野の中心に移動させるといった手間がかかる。蛍光顕微鏡法は、視野を回転・移動させることなく判定できるので、その分簡易で時間が短縮される。さらにソフトウェアを搭載したものでは、アスベスト計測に慣れていない人でも楽に計測できるので、特にアスベスト飛散可能性がある現場での計測に利用して頂きたいと考えている。

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が予測されている⁷⁾。解体現場や瓦礫処理の際のさらなる曝露が重なれば、今後

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。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。懲罰的損害賠償とは、加害者の行為が強い非難に値すると認められる場合に、裁判所または陪審の裁量により、加害者に制裁を加えて将来の同様の行為を抑止する目的で、実際の損害の補填としての賠償に加えて上乗せして支払うことを命じられる賠償のことをいう。日本ではこの賠償はほとんど認められておらず、しかもアスベストの検査は電子顕微鏡まで含めると非常にコストがかかるので、民間レベルのアスベスト検査はそれほど普及しているとは言い難い。アスベスト問題の再燃を防ぎ、我々の命を守るためには、簡易迅速検査法と懲罰的損害賠償をセットにすることが、重要なのではないだろうか。

謝 辞

蛍光法の開発には東洋大学の神山宣彦教授に様々なアドバイスを頂いた。また、科学技術振興機構先端計測分析技術・機器開発プログラムの助成を受けた。現在、解体現場での実用化に関して環境省の環境研究総合推進費(C-1101)により実施している。また、アスベストの自動計測ソフトウェアは、科学技術振興機構の研究成果展開事業により開発中である。

文 献

- 1) 日本石綿協会. 2003. 石綿含有建築材料廃棄物量の予測量調査結果報告書, p. 15.
- 2) 環境省アスベストモニタリングマニュアル第4.0版. 2010. 環境省.
- 3) Taniguchi, K., K. Nomura, Y. Hata, T. Nishimura, Y. Asami, and A. Kuroda. 2007. The Si-tag for immobilizing proteins on a silica surface. *Biotech. Bioengi.* 96: 1023–1029.
- 4) Kuroda, A., T. Nishimura, T. Ishida, R. Hirota, and K. Nomura. 2008. Detection of chrysotile asbestos by using a chrysotile-binding protein. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 285–289.
- 5) Ishida, T., M. Alexandrov, T. Nishimura, K. Minakawa, R. Hirota, K. Sekiguchi, N. Kohyama, and A. Kuroda. 2010. Selective detection of airborne asbestos fibers using protein-based fluorescent probes. *Environ. Sci. Technol.* 44: 755–759.
- 6) Ishida, T., M. Alexandrov, T. Nishimura, K. Minakawa, R. Hirota, K. Sekiguchi, N. Kohyama, and A. Kuroda. 2010. Evaluation of sensitivity of fluorescence-based asbestos detection by correlative microscopy. *J. Fluoresc.* in press.
- 7) Robinson, B.W.S. and R.A. Lake. 2005. Advances in Malignant Mesothelioma. *N. Engl. J. Med.* 353: 1591–1603.