

スマートバイオセンシングによるアスベスト検出

Asbestos Detection by Smart Biosensing

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

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@hiroshima-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, スマートバイオセンシング

Key words: asbestos, asbestos-binding protein, bioassay, smart biosensing

(原稿受付 2016 年 2 月 1 日/原稿受理 2016 年 2 月 8 日)

1. はじめに

我が国では 2006 年, アスベスト (石綿) の製造・輸入・使用が全面禁止されたが, アスベストの問題が終わった訳ではない。これまでのアスベスト曝露による影響だけでも, 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文献もある¹⁾。さらに日本にはアスベストを 1%以上含む建材が約 4,000 万トン残されているとされ²⁾, 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, アスベストを放置すると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, 将来の同様の行為を抑止する目的で, 実際の賠償に上乗せして支払いを命じる賠償のことをいう。日本ではこの賠償は認められていないことからどうしても問題が先送りされる傾向があること, また, アスベストの検査は電子顕微鏡による分析まで含めると非常にコストがかかることから, 特に民間レベルのアスベスト検査は普及しているとは言い難い。実際, 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た。そこで, 大気汚染防止法の一部を改正する法律が平成 25 年 6 月に公布された。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書面で説明することが義務付けられるようになった。

現在, 飛散アスベスト検査の公定法では, 空気中に浮遊するアスベストを捕集したフィルターを用い, 位相差顕微鏡と電子顕微鏡で検出する。電子顕微鏡では, 繊維の一本一本に電子線を照射し, 元素分析をすることでアスベストであるかどうかを判定することになっている (アスベストの代替繊維などがあるため)³⁾。しかし, 一

回の検査で数百本の繊維の元素分析を行う場合などは非常に時間とコストがかかる。また, 電子顕微鏡を有する分析機関がアスベストの飛散現場と離れていることが多いため, 輸送等を含めると検査に一週間近くかかることがあり, 日常的なモニタリング方法とはなり得ない。アスベスト飛散防止には, 公定法とは別に, 迅速で簡便なアスベスト検出方法が必要とされている³⁾。

著者らは, 自然界のタンパク質や人工的なペプチドライブラリーから無機物質 (固体) に特異的に結合するものを見つけ出し, さらに特異性を高める様な改変技術を駆使して, 無機物質に対して選択的なプローブの開発を行ってきた。その一つとして, アスベストに特異的に結合するタンパク質を作りだした⁴⁻⁶⁾。このタンパク質を蛍光物質で修飾したものを使い, フィルター上のアスベストを染色することで, アスベストを蛍光顕微鏡で検出する方法 (バイオ蛍光法) を開発した。染色の操作は簡単で, フィルター上に数滴の蛍光タンパク質溶液を垂らすだけで前処理が完結する。

この方法では電子顕微鏡と X 線分析装置による元素分析を行わずにアスベストを特定できるため, 迅速な検査方法となった。しかし, 蛍光顕微鏡は主にバイオ分野の研究室用に開発されてきたものであるため, 過酷な解体現場での検査を考えた場合, 現場に持ち運べる様な蛍光顕微鏡の開発が必要であった。そこで, iPad のカメラに光路を接続してモニターとする携帯型の蛍光顕微鏡を開発した。アスベストが映し出された画像は iPad の通信機能により, 離れた分析室でもリアルタイムで観察することができる。その結果, 分析室から熟練者による手助けや指南により, 非熟練者でも現場での分析が可能になった。我々は小型タブレットやスマートフォンを用いてのバイオ検査をスマートバイオセンシングと名付けている。本稿では, アスベストバイオプローブの作製とスマートバイオセンシングによるアスベスト検査について述べたい。

表 1. アスベスト結合タンパク質の結合特異性

	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, 結晶質)	-	-
	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	-	-

2. アスベストバイオプローブの創成

ペプチドアダプターとは、抗体のようにある特定の標的分子の表面構造を認識して結合するペプチド分子のことで、ファージディスプレイ法（ファージの外殻タンパク質にランダムなアミノ酸配列を提示させ、そのライブラリーから、特定の標的に結合する配列を提示するファージを選択する手法）等によって選択される⁷⁾。無機材料を標的にしたペプチドアダプターの取得は、進化分子工学が生まれた比較的早い段階から報告されていたが、2000年に化合物半導体材料であるガリウムヒ素を標的にしたペプチドアダプターが創られて以降⁸⁾、ナノテクノロジーブームもあいまって、にわかに注目を集めることとなった。これまでに金⁹⁾をはじめ20種類以上の様々な無機物に対するペプチドアダプターが選択されている。ただしこの方法に関して幾つか限界があるとされている。例えば、標的物質に結合したファージを解離させて大腸菌に感染させる際にファージの粒子が壊れないような条件でなければならないということである。それは、解離しないほど結合能が高いペプチドを提示したバクテリオファージはこの段階で選択からこぼれてしまうことを意味している。

そこで、我々は細胞内に存在する様々なタンパク質をペプチドライブラリーと見立て、細胞抽出液に対象の無機物質を添加して、結合するタンパク質を無機物質とともに沈殿させることで、結合タンパク質（ペプチド）を得ることにした。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、遠心によって沈殿させた。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合するもの（DksA）があることがわかった⁴⁾。大気に飛散する可能

性のある無機繊維と有機繊維を使って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、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（1-59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。角閃石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⁶⁾（表1）。残念ながら本バイオプローブは角閃石アスベストの他に、炭化ケイ素ウイスカーなどに結合するため、100%の判定とはなっていない。しかし炭化ケイ素ウイスカーは主に軍用で特殊な繊維であることから、日本では稀にしか存在しない。従って本試薬の特異性は、迅速法として十分であると考えられた。

3. 蛍光顕微鏡によるアスベスト検出

大気中に浮遊するアスベストは、ニトロセルロース

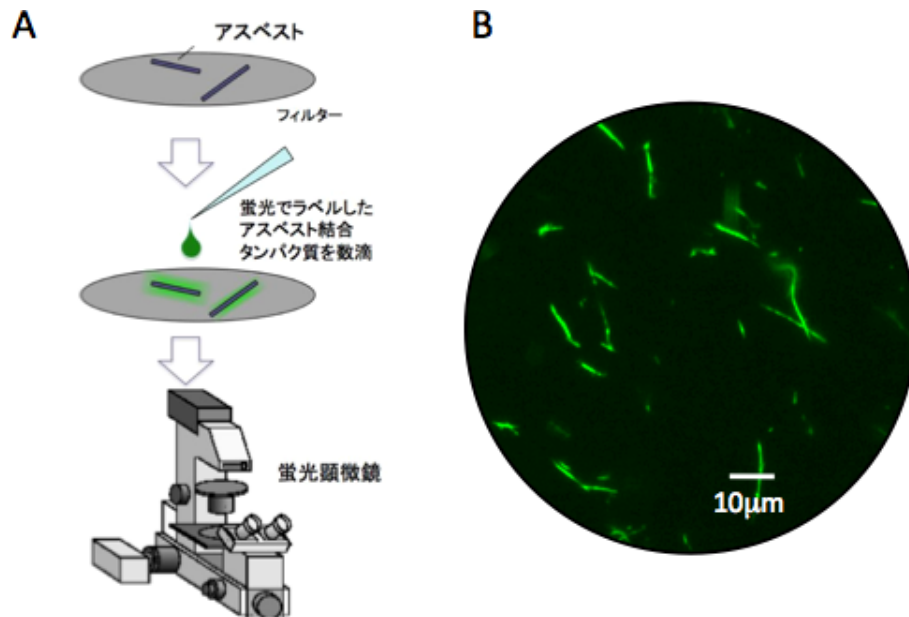


図1. バイオ蛍光法による大気中アスベスト検出。(A) 大気を通してアスベストを捕集したフィルターに、蛍光で修飾したアスベスト結合タンパク質を滴下し、蛍光顕微鏡で観察する（数分の作業）。(B) アスベスト（クリソタイル）の蛍光画像。

フィルターを用いて捕集する。そのフィルター上に、アスベスト結合タンパク質を蛍光物質で修飾したバイオプローブを数滴垂らした後、緩衝液で余分な蛍光プローブを洗い流す数分の作業で前処理は完成する（図1）。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ははっきり観察できた。同一繊維を蛍光顕微鏡と電子顕微鏡で観察した結果、蛍光顕微鏡で検出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¹⁰⁾。蛍光顕微鏡も光学顕微鏡であるので、当然回折限界による分解能の上限（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。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直径の単繊維のクリソタイルでも、その存在が検出できる。また、バイオ蛍光法は、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良いという迅速性に優れた方法と言える。実際、電子顕微鏡によるX線分析を含むアスベスト検査の公定法では、数日から1週間を要する。一方、バイオ蛍光法では、大気捕集フィルターがあれば、約1時間でアスベストが計測できる。これまで無機物イオンを抗体で捉える方法はあったが、無機結晶（固体）の分析にバイオテクノロジーが利用されることはなかった。バイオ蛍光法は、世界で類を見ない独創的な技術と言える。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³⁾。

実際の大气捕集フィルター30種類についてバイオ蛍光法による測定と、公定法（電子顕微鏡法）による測定を実施して比較した。その結果、両方法による測定結果は非常に高い相関性を示すことが分かった（図2）。しかし、蛍光を示す繊維を電子顕微鏡で詳しく検討した結果、偽陽性が約5%程度見られることが分かってきた。

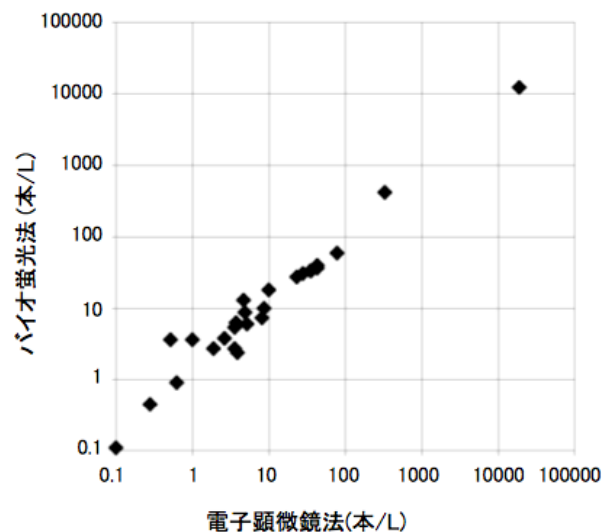


図2. バイオ蛍光法と公定法である電子顕微鏡法の相関。本データは位相差顕微鏡で計測した総繊維に対して、バイオ蛍光法と電子顕微鏡法によるアスベスト繊維数の割合を乗じたものを比較した。

今後さらにバイオプローブを改良し、特異性を向上させたいと考えている。

4. アスベスト検出ソフトウェア開発

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、100視野にわたって数えることとなっている（200本に達すればその時点で終了）。繊維がカーブしている場合、カーブに沿って真の長さをはかって判定するなど、計測に時間がかかる。また、実際の計測時には、アスベスト繊維に粒子が付着している

場合や、枝分かれしているような場合があり、それぞれ計測上のルールに従って判定しなければならない。バイオ蛍光法により、アスベストが特異的に計測できる様になってきたものの、アスベスト計測マニュアルに従って計測しなければならないことから、その計測にはトレーニングが必要となっている。また、計測能力にはどうしても個人差があるので、計測者間のバラツキが生じている。この問題は、画像解析による自動計測ソフトウェアを開発して利用することで改善できると考えられた。

インソテック株式会社の画像解析ソフトウェアによって、長さ $5\ \mu\text{m}$ 以上、幅 $3\ \mu\text{m}$ 未満、アスペクト比 3 以上の直線状の繊維は非常に良く計測できた。しかし、初期のプログラムでは、曲がった繊維の場合、その繊維を囲む長方形の長さとして幅で計測されたため、実際よりも長さが短く、幅が広く計測されていた。そこで繊維の周囲

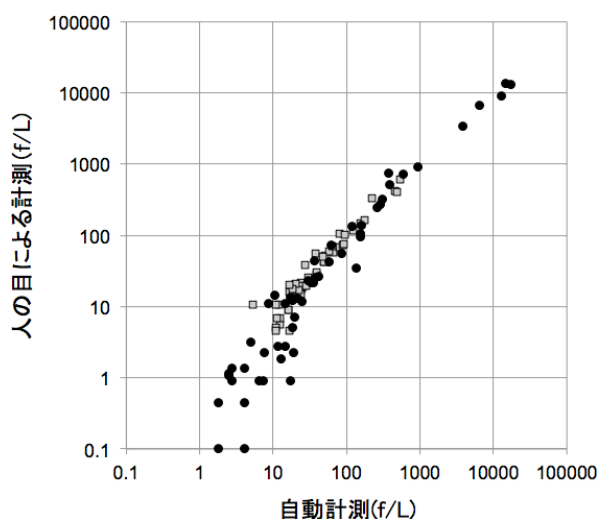


図 3. 自動計測ソフトウェアによる自動計測値と人の目による計測値の比較。灰色の四角は標準アスベストとアスベスト以外の繊維を混合した人工サンプル、塗りつぶした丸は実サンプル及び建材の発塵サンプルを示す。

長を計測するアルゴリズムを導入することによって、曲がった繊維においても周囲にそった繊維長が計測できた。この値は人の目による計測とよく一致した。粒子が重なった繊維の場合、蛍光が断絶し、見かけ上複数の繊維に計測されることがあった。そこで、複数の繊維が近接して延長線上にある場合、つなげて一本の繊維として認識するアルゴリズムを導入することでこの問題を解決した。

解体現場のサンプルと標準繊維による人工サンプルを用いて性能評価試験を行った。アスベスト自動計測ソフトウェアによる計測結果と、完全に人の目による計測（マニュアル計測）の結果を比較した結果、非常に高い相関関係（ $r=0.99$ ）が得られた（図 3）。特に 20 繊維/L 以上の濃度範囲において、解体現場のサンプルと人工サンプルに関わらず高い相関が得られた。しかし、20 繊維/L 以下の濃度では、相関係数が低下した（ $r=0.63$ ）。通常バイオ蛍光法では、アスベストのみが染色されるため、位相差顕微鏡に較べて粒子が少なくみえる。しかしながら、粒子にも自家蛍光を持つものや、非特異的な結合する場合には蛍光染色される。この粒子が、アスベスト繊維に較べて多ければ、誤認識が多くなるので、20 繊維/L 以下の濃度では、相関係数が低下したと考えられた。アスベスト自動計測ソフトウェアは低濃度のアスベストの場合にはマニュアルで修正する必要があるものの、基本的に画像を取得して自動解析を行うだけなので、非熟練者でも簡単にアスベストを計測できる様になっている¹¹⁾。

5. スマートバイオセンシングと今後の展望

大気捕集フィルターに、アスベスト結合タンパク質を蛍光物質で修飾したものをふりかけると、蛍光顕微鏡下でアスベストが光って見える。バイオ蛍光法は元素分析をせずにアスベストを特定できる。また、アスベスト自動計測ソフトウェアを利用することで、非熟練者でも簡単に利用できる様になっている。しかし、本方法を普及



図 4. 携帯型蛍光顕微鏡。Z 軸の調整は iPad 横のつまみで調整する。X、Y 軸の調整はボックス下のつまみで調整する。画面上の倍率は約 300 倍で、iPad の画面の拡大により約 1,000 倍まで拡大できる。携帯型蛍光顕微鏡を利用している様子は、シリコンバイオ社のホームページで公開されている（<http://www.siliconbio.co.jp>）。

させるにはもう一つ課題があった。それは、分析装置である蛍光顕微鏡は主にバイオ研究用に開発されてきたものであるため、解体現場に持ち込める様な正立型の落射蛍光顕微鏡がなかったことである。解体現場での検査を普及させる場合、どうしても携帯型の蛍光顕微鏡の開発が必要であった。

過酷な現場で使える携帯型の蛍光顕微鏡の条件としては、頑丈であることが求められる。そのため、励起光の青色 LED、励起フィルター、ダイクロイックミラー、蛍光フィルターから構成される蛍光顕微鏡の光路は露出せず、一つの箱に入れ込んだ。また、明るい野外での使用を考えると、通常の蛍光顕微鏡では遮光の環境が必要になる。そこで、iPad のカメラと光路を直接接続して iPad モニターに映し出すことにより、外部環境の明るさは気にしなくともよくなった (図 4)。この携帯型の蛍光顕微鏡は、0.7 μm の分解能で解析でき、十分にアスベストを検出することができた。また、アスベストが映し出された画像は iPad の通信機能により、離れた分析室でもリアルタイムで観察することができる。IoT (モノのインターネット) とは、世の中に存在する様々なモノに通信機能を持たせ、インターネットに接続したり相互に通信することにより、自動認識や自動制御、遠隔計測などを行うことである。この蛍光顕微鏡を使えば、離れた分析室から熟練者による手助けや指南により、非熟練者でも現場での分析が可能になった。まさに、本蛍光顕微鏡は、IoT 蛍光顕微鏡と言えるかもしれない。

IoT 蛍光顕微鏡に触発されて、現在スマートフォンをベースに蛍光顕微鏡の開発も行っている。小さいことが使いやすさにどう影響するかは今後検討する必要があるが、携帯性は大きく向上すると考えている。さらに、蛍光検出だけでなく、エレクトロニクス分野の研究者とも協同し、スマートフォンをプラットフォームとする様々なバイオセンサーの開発に着手している。今やスマートフォンやタブレットを含む小型通信機器は世界で 65 億台にも及び、持ち運び可能なバイオセンサーのインフラとして最もポテンシャルを持つと言える。我々は小型タブレットやスマートフォンによるバイオ検査をスマートバイオセンシングと名付け、広島大学に研究拠点を設置している (<http://sbcs.hiroshima-u.ac.jp>)。我々の身の回りの環境や自身の生体情報を感知する持ち運び可能で、さらにはウェアラブル (身につけることが可能) なバイオセンサーの発展へと繋げて行きたいと考えている。

謝 辞

東洋大学の神山宣彦教授には、様々なアドバイスを頂きながら蛍光法を開発した。蛍光法の開発には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する研究を環境省の環境研究総合推進費 (5-1401) 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、株式会社インテックと共同で開発した。また、(有) シリコンバイオと株式会社オプトサイエンス社の協力のもと、現場に持ち運べる蛍光顕微鏡を開発した。

文 献

- 1) Robinson, B.W.S. and R.A. Lake. 2005. Advances in Malignant Mesothelioma. *N. Engl. J. Med.* 353: 1591–1603.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 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. Molecular engineering of a fluorescent bioprobe for sensitive and selective detection of amphibole asbestos. 2013. *PLoS ONE*. 8(9): e76231.
- 7) Smith, G.P. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228: 1315–1317.
- 8) Whaley, S.R., D.S. English, E.L. Hu, P.F. Barbara, and A.M. Belcher. 2000. Selection of peptides with semiconductor binding specificity for directed nanocrystal assembly. *Nature* 405: 665–668.
- 9) Brown, S. 1997. Metal-recognition by repeating polypeptides. *Nature Biotechnol.* 15: 269–272.
- 10) Ishida, T., M. Alexandrov, T. Nishimura, K. Minakawa, R. Hirota, K. Sekiguchi, N. Kohyama, and A. Kuroda. 2012. Evaluation of sensitivity of fluorescence-based asbestos detection by correlative microscopy. *J. Fluoresc.* 22: 357–363.
- 11) Alexandrov, M., E. Ichida, T. Nishimura, K. Aoki, T. Ishida, R. Hirota, T. Ikeda, T. Kawasaki, and A. Kuroda. 2015. Development of an automated asbestos counting software based on fluorescence microscopy. *Environ. Monit. Assess.* 187: 4166.