

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H04291

研究課題名(和文)アスベスト結合タンパク質と化学発光を用いたアスベスト検査の高度化研究

研究課題名(英文)Amplified luminescence proximity homogeneous assay for asbestos contamination

研究代表者

黒田 章夫(Kuroda, Akio)

広島大学・統合生命科学研究科(先)・教授

研究者番号：50205241

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：建材のアスベスト混入を検出するために、顕微鏡やX線回折を使った多くの方法が開発されてきた。しかし、これらの方法を多検体ハイスループット分析に利用することは困難であった。化学増幅型発光法(Alpha)による検出は、二つの異なるビーズが目的のターゲットに結合することに依存する。2つのビーズがターゲットに結合して近接する場合、一方のビーズからもう一方のビーズへのエネルギー移動が発生し、化学発光する。本研究では、アスベスト結合タンパク質を提示する二つのビーズを利用した検出技術がアスベストのハイスループット分析に利用できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

アスベストは、建材に広く使用された繊維状ケイ酸塩鉱物である。アスベスト繊維の吸入は肺に損傷を与え、胸膜中皮腫などの深刻な健康問題を引き起こすことが知られている。アスベスト建材を含む解体工事は年間約188万棟あるので、分析すべき建材数が膨大な数にのぼる。アスベストの迅速なハイスループット検出技術は国民の安全安心に資する。

研究成果の概要(英文)：A number of methods have been developed to assess asbestos contamination in construction materials using microscopy and X-ray diffraction. However, adaptation of these methods to high-throughput analysis has been difficult. Amplified luminescence proximity homogeneous assay (Alpha) technology relies on binding of two different beads to a target of interest. In case of the binding and the resulting proximity of the two beads, an energy transfer from one bead to the other takes place. This results in the production of a chemiluminescent signal. Here we developed two different beads that display asbestos binding proteins and demonstrated that this technology would be applicable to high-throughput analysis of asbestos.

研究分野：生物工学

キーワード：アスベスト アスベスト結合タンパク質 バイオアッセイ 化学発光 AlphaLISA

1. 研究開始当初の背景

アスベスト(石綿)とは、蛇紋石系および角せん石系の繊維状ケイ酸塩鉱物である。これらは耐久性などの特性に優れており、建材等に広く使用されてきた。しかし、その繊維は悪性中皮腫や肺がんを起こすことがわかり、ほとんどの先進国で使用が禁止されている。しかし、問題は解決したわけでない。日本には古い建物に約 4,000 万トンものアスベスト含有建材が残されており、解体の際のアスベスト飛散リスクが存在する(アスベストが使用された建築物の解体・改修は 2030 年頃まで増加の見込)。アスベスト含有建材の使用の有無に係る事前調査が不十分な事例が多く報告され、アスベスト対策強化が急務とされている。

アスベストを重量で 0.1% 含むものを「アスベスト含有建材」として解体工事の事前調査の対象となっている。建材中に存在するアスベストの検査は、粉碎した建材を大型の X 線回折装置に入れて回折のピークの高さによって判定している。しかし 0.1% の検出は感度限界値に近い。さらに、解体工事は年間約 188 万棟あるので、分析すべき建材数が膨大な数にのぼる。したがって、多検体に対応できる「混合しただけでアスベスト含有量を判定できる画期的なハイスループト手法」の開発が求められていた。

2. 研究の目的

本研究者らはアスベストに特異的に結合するタンパク質を見つけ出し、大気中に浮遊するアスベストを蛍光顕微鏡で検出するという新たな方法を開発した(図 1)。本方法では、大気捕集から検査まで 1 時間程度で終了できることから、現場でのアスベストの漏洩検査に対する迅速分析法として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。

本方法を建材アスベストにも応用することを考えた。アスベストに結合する蛍光タンパク質と建材を混合し、結合しない余分な蛍光を除いた蛍光量からアスベスト含有量を検査できるかどうか検討した。その結果、雑多な建材のなかにはアスベストの蛍光試薬と同色の自家蛍光(元々持っている蛍光)を示す夾雑物質が存在して偽陽性を生じる場合があった。蛍光顕微鏡を使えば、複数の波長で自家蛍光を見分けたり、粒子や繊維といった形状でも判定できたりするので問題ないが、顕微鏡操作が煩雑になり多検体には不向きである。本研究の目指す「混合しただけでアスベスト含有量を判定する」ためには、新たな手法を取り入れる必要があった。

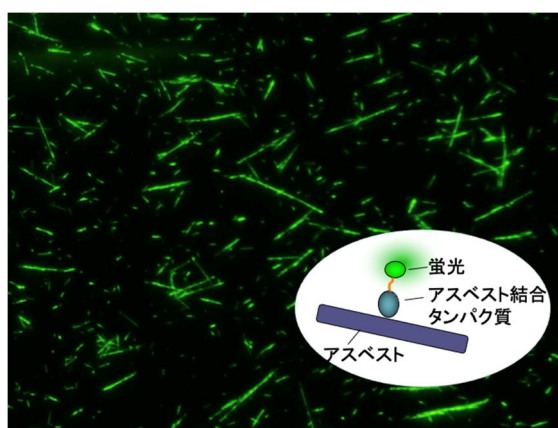


図 1、蛍光顕微鏡でアスベストを検出する技術

3. 研究の方法

(1) 化学発光によるアスベスト検出方法

蛍光は、励起光によって励起した電子が一部熱によってエネルギーが失われ、その後光となって放出されるものである。したがって、蛍光のエネルギーは励起光のエネルギーよりも一般的に小さくなるので、長波長側にシフトする(蛍光の波長は励起光の波長より長い)。一方、Ullman らによって確立された Alpha (Amplified luminescence proximity homogeneous assay) テクノロジーは、励起光(680nm)による一重項酸素発生用のビーズ(ドナービーズ)と、一重項酸素によって化学発光(520~620nm)する二種類のビーズ(アクセプタービーズ)を組み合わせることで、波長は短波長側にシフトする(680 570nm 付近)。このような短波長側にシフトする蛍光は自然界ではほとんど存在しないことから、自家蛍光と容易に区別できると考えられる。また、一重項酸素の寿命は極めて短いため、200nm 以内の近傍にあるアクセプタービーズのみを発光させる特徴がある。言い換えると、二つのビーズが同じものを認識した時のみ、短波長の光が発生する。したがって、発光に関与しないビーズを洗い流すなどの洗浄工程を必要としない検査が可能になると考えられた(図 2)。

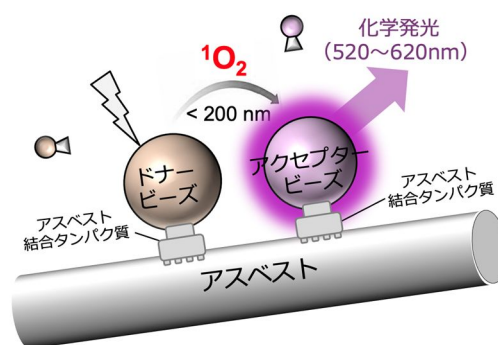


図 2、化学発光によるアスベスト検出。ビーズを洗い流すなどの洗浄工程を必要としないので、多検体を試験することが可能になる。

(2)アスベスト結合タンパク質の固定化ビーズの調製

蛇紋石アスベスト(クリソタイル)結合タンパク質である DksA を大腸菌内でビオチン化するために、PCR で増幅した *dksA* 遺伝子を pET21b-AviTag-HisTag に挿入し、DksA-AviTag(Biotin)-HisTag を発現するプラスミドを作製した。得られたプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)pBirA に形質転換した。クロラムフェニコール(30 µg/ml)とカルペニシリン(50 µg/ml)を含む LB 液体培地に植菌し、37 °C で振盪培養した。IPTG(0.5 mM)と Biotin(100 µM)を添加し、さらに 28 °C で 6 時間振盪培養した。その後大腸菌を回収して、ビオチン化した DksA タンパク質精製を行った。

ストレプトアビジンがコーティングされた Alpha アクセプターおよびドナービーズは PerkinElmer で購入した。5 mg/ml のビーズを 5 nM に希釈したビオチン化 DksA を混合し、ビーズに固定した。また、同様の方法で、角閃石アスベスト結合タンパク質である HNS タンパク質を各ビーズに固定した。

(3)化学発光によるアスベストの検出

標準のクリソタイルとタルク中にクリソタイルを混合したもの、ロックウール中にクリソタイルを混合したもの、ロックウール中に角閃石アスベストであるクロシドライトを混合したものを調製した。96 ウェルプレートに、アスベストサンプル 10µl、ビオチン 5µl、リン酸緩衝液 15µl、アクセプターおよびドナービーズ 10µl を混合し、EnSight マルチモードプレートリーダーによって測定した。

(4)発色法によるアスベストの検出

黒田らの報告 (Biotechnol. Bioeng. 99, 285, 2008) に従った。DksA とアルカリホスファターゼの融合タンパク質(DksA-AP)とアスベスト試料を混合した。遠心分離後、DksA-AP の溶液をマイクロピペットで除去した。洗浄液を加えてよく懸濁し、遠心分離後、洗浄液をマイクロピペットで完全に除去した。この洗浄操作を 3 回くり返した後、アルカリホスファターゼの基質溶液を加えてよく混和し、室温で 10 分間反応させた。

4. 研究成果

(1) Alpha 化学発光によるアスベスト検出方法の確立

DksA は、クリソタイル(アスベストの中で最も多用されたもの)に結合するタンパク質である。ビオチン化した DksA を作成し、ストレプトアビジンがコーティングされたアクセプターおよびドナービーズと混合することでビーズ表面に DksA を固定した。

結合条件を検討した結果、DksA をアフィニティリガンドとした Alpha 法によって、1 µg (0.1 mg/ml) のクリソタイルを検出することができた(図 3A)。

タルク(和名:滑石)は層状鉱物であり、化粧品・医薬品やベビーパウダーなどの原料として利用されている。タルクの堆積物には、クリソタイルや角閃石などのアスベスト鉱物、およびその他の鉱物繊維が含まれる場合があり、消費者へ渡る可能性がある。実際、いくつかの国でアスベスト汚染タルク含有製品を回収する事件が起きている。そこで、タルク中に含有する 0.1% のクリソタイルを検出するための条件検討を行った。サンプル量を増せば、一定程度発光量が増加し、感度の向上が期待された。しかし一方で、タルクによる光の遮蔽が起こり、発光量が低下した。サンプル量を最適化した結果、タルク中においても 0.1% のクリソタイルを検出することができた(図 3B)。また、代表的なアスベストの代替品であるロックウール中にアスベストを各重

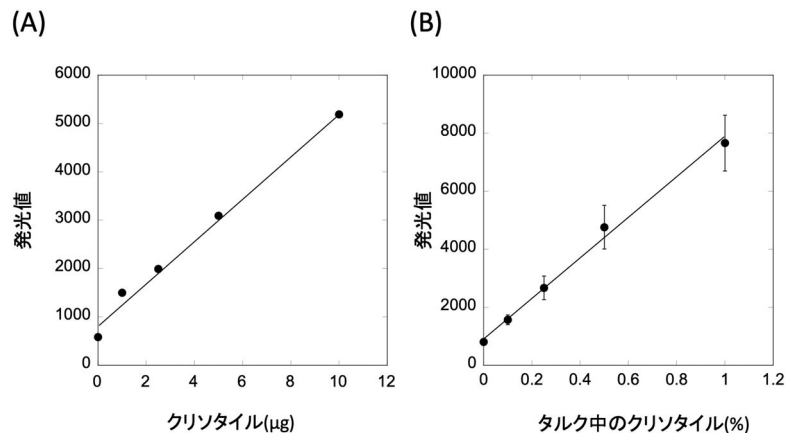


図 3、Alpha 法による蛇紋石アスベスト(クリソタイル)の検出。(A)は標準のクリソタイルの検出、(B)はタルク中に含まれるクリソタイルの検出を示す。

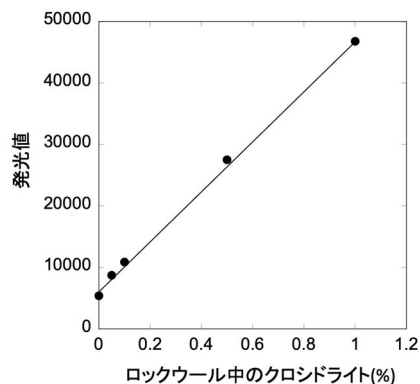


図 4、Alpha 法による角閃石アスベスト(クロシドライト)の検出。

量比で混合したものをを用い検査を行ったところ、同様に0.1%の感度で検出できることが分かった。

一方、HNS タンパク質は、クロシドライトなどの角閃石アスベストに結合する。ドナービーズとアクセプタービーズに提示するタンパク質を HNS タンパク質に代えた結果、ロックウール中の0.1%クロシドライトを検出することができた(図4)。Alpha 化学発光によるアスベスト検出方法は、混合しただけでアスベスト含有量を判定する方法であると考えられた。

(2)アスベスト結合タンパク質を用いた蛇紋岩中のクリソタイルの検出

蛇紋岩は日本各地に分布し、その中にはアスベストであるクリソタイルの細脈もしばしばみられる。我が国では、アスベストを得るための蛇紋岩の採掘は現在行われていないが、砂利石や骨材等として使用するための採石が行われている。これらの蛇紋岩を粉砕したものの中には、左官用のモルタル混和材やセメント建材の製造におけるアスベスト代替物として販売されているものがあり、これら多くは非アスベストの製品として販売されている。しかしながら、現在最も広く行われている X 線を用いた分析法では、蛇紋石 ($Mg_6Si_4O_{10}(OH)_8$) であるクリソタイル(アスベスト)とアンチゴライト及びリザルタイト(いずれも非アスベスト)がほぼ同じ位置にピークを持つため、クリソタイルが入っているにも関わらず、アンチゴライトと同定されて「非アスベスト」として流通している場合が報告されている。そのため左官用モルタル混和材中のクリソタイル量は微分熱重量分析法(DTG 法)による脱水温度の違いから求めることになった(平成16年7月の厚生労働省通達)。しかしながら DTG 法はクリソタイルが5%以上含まれていないと、判別できないことが知られている。

そこで DksA がクリソタイル(アスベスト)とアンチゴライト及びリザルタイトを見分けられるかどうかを試験した。ロックウールを主な母材とし、クリソタイル、アンチゴライト、リザルタイトを砕いたもの(顕微鏡で粒子は同程度になることを確認)を10%含量で混合した試料を作成した。発色試験を行った結果、クリソタイルのみに発色が見られた(図5A)。さらに、クリソタイルの含量を下げた結果、1%程度でも検出可能であることが分かった(図5B)。これはDTG法を上回る感度である。

次に実際の蛇紋石試料(アンチゴライトを主成分とするもの、クリソタイルを主成分とするもの)を粉砕し、発色試験を行った。アンチゴライト主成分とするものは発色しないが、クリソタイルを主成分とするもの(クリソタイル30%、アンチゴライト8%)には明らかな発色が見られた。またアンチゴライト主成分とするもの(アンチゴライト21%)にも僅かに発色が見られた。図5の結果からは、発色が見られないはずである。そこで、このアンチゴライト主成分とするものを位相差分散顕微鏡によって確認したところ、クリソタイルの混入が確認できた。この試料についてDTG法ではクリソタイルの含有は認められなかったことからDksAを用いた方法はDTG法を上回る感度であると言える。さらに、リザルタイトに関しても、わずかに発色する場合があった。電子顕微鏡によって観察したところ、鉱物繊維(おそらくクリソタイル)が存在することが判明した(図6)。

アスベスト結合タンパク質はX線回折では判別が難しいクリソタイル(アスベスト)とアンチゴライト及びリザルタイト(いずれも非アスベスト)の区別がつくことが分かった。アスベスト結合タンパク質を使った分析法は特異性が高いアスベストの分析方法で、さらにAlpha化学発光と組み合わせれば、多検体化(ハイスルーブットな分析)が可能であることがわかった。

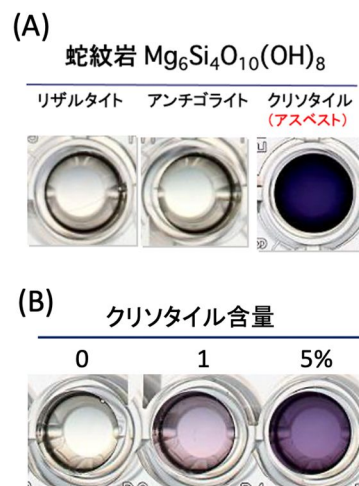


図5、DksA タンパク質はX線で見分けのつかないクリソタイル(アスベスト)とアンチゴライト及びリザルタイトを区別できることが分かった。



図6、電子顕微鏡によるリザルタイトの観察。繊維状のクリソタイルがわずかに混入していることが判明した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kuroda Akio	4. 巻 43
2. 論文標題 Recent progress and perspectives on the mechanisms underlying Asbestos toxicity	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Genes and Environment	6. 最初と最後の頁 46
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s41021-021-00215-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Cai Changjie, Nishimura Tomoki, Hwang Jooyeon, Hu Xiao-Ming, Kuroda Akio	4. 巻 21
2. 論文標題 Asbestos Detection with Fluorescence Microscopy Images and Deep Learning	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sensors	6. 最初と最後の頁 4582 ~ 4582
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/s21134582	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 黒田章夫	4. 巻 39
2. 論文標題 鉱物にアフィニティーのあるタンパク質の利用	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 バイオインダストリー	6. 最初と最後の頁 2-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 黒田章夫、石田丈典、西村智基	4. 巻 31
2. 論文標題 大気アスベストを迅速検査するための蛍光顕微鏡法の開発と自動化の試み	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 廃棄物資源循環学会誌	6. 最初と最後の頁 345-351
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 黒田章夫、西村智基、石田文典	4. 巻 7
2. 論文標題 携帯型蛍光顕微鏡によるアスベスト検査とその精度検証	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 繊維状物質研究	6. 最初と最後の頁 56-60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒田章夫
2. 発表標題 界面ペプチドとスマートバイオセンシング
3. 学会等名 BioJapan2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 黒田章夫
2. 発表標題 バイオ技術を活用したアスベスト検査の実用化研究
3. 学会等名 環境バイオテクノロジー学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 黒田章夫
2. 発表標題 世界初、アスベストを光らせて検出する装置の紹介
3. 学会等名 文部科学省「情報ひろばラウンジ」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 西村智基、石田丈典、黒田章夫、関口潔
2. 発表標題 携帯型蛍光顕微鏡によるアスベスト検査 ~現場利用について~
3. 学会等名 第7回日本繊維状物質研究研究学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 白石智之、石田丈典、池田丈、廣田隆一、舟橋久景、黒田章夫
2. 発表標題 ファージディスプレイ法によるアスベスト結合ペプチドの開発と探索
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

アスベスト結合タンパク質とアスベスト検査 https://home.hiroshima-u.ac.jp/akuroda/pg67.html

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------