

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：72703

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22710033

研究課題名(和文)より簡易・迅速な石綿分析手法の開発～アジア諸国での石綿被害を予防するために～

研究課題名(英文) Studies on Sample Storage in Dispersion Staining

研究代表者

飯田 裕貴子 (Iida, Yukiko)

公益財団法人労働科学研究所・研究部・研究員

研究者番号：10442568

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、アジア諸国において日本と同様の石綿分析を行うことを目的とし、数種類ある分析法のうち、設備的に最も簡便な位相差顕微鏡を用いた分散染色法の改良を目指した。従来の分散染色法は、標本温度25℃にて、粒子の形状および分散色から石綿の定性を行う。アジア諸国では、標本温度を管理することが難しい分析室も考えられる。そこで、浸液の温度変化に伴う屈折率の変化、分散色の変化について確認を行った。クリソタイル( $n_{D25} = 1.550$ の浸液)、アモサイト( $n_{D25} = 1.680$ の浸液)の標本では、標本の温度変化に伴って分散色も一定の変化を示すことが確認された。

研究成果の概要(英文)：Dispersion-staining-prepared samples were stored under condition temperature from 293K to 303K. The dispersion colour triggered by the asbestos fibre was examined, where the asbestos materials were chrysotile (Canada), amosite (South America), and crocidolite (South America). An immersion of  $n_{D298K} = 1.550$  was used for chrysotile, and the three separate immersions,  $n_{D298K} = 1.680$ ,  $1.690$ , and  $1.700$ , were used for both amosite and crocidolite. Dispersion-staining-color of samples which  $n_{D298K} = 1.550$  immersion was used for chrysotile were changed from violet-blue (temperature:293K) to violet-red (temperature:303K). Dispersion-staining-color of samples which  $n_{D298K} = 1.680$  immersions were used for amosite were changed from bluish-peach color(temperature:293K) to reddish-peach color (temperature:303K).

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学 ・ 環境影響評価・環境政策

キーワード：環境分析 岩石・鉱物・鉱床学 解析・評価 ナノ材料 石綿

## 1. 研究開始当初の背景

2004年に早稲田大学国際会議場で開かれた「世界アスベスト東京会議」において、日本は「アスベスト・リスクを根絶する為に国際的なイニシアティブを強調するとともに、緊急な行動を起こしていくことに同意する」と宣言を行った。

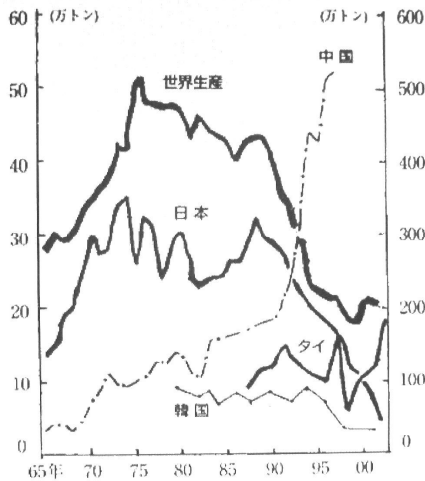


図1 石綿の世界生産量とアジア各国の消費量の推移

図1(書籍:アスベスト公害と癌発生より)に示すように、欧米諸国、日本での石綿の使用が禁止された後も、アジア諸国での石綿使用量は増え続けている。日本の石綿分析手法をアジア諸国に伝え、石綿被害を予防することが、本研究の目的である。

アジア諸国に日本の石綿分析手法を伝えるためには、分析機器の購入費、維持費がなるべく低コストであること、分析手法が簡易であること、また分析室などがない可能性もあり、場所を選ばずに分析が行えることが重要だと考える。

日本における石綿の定性分析を行う方法としては走査電子顕微鏡、透過電子顕微鏡、X線回折も挙げられるが、位相差・分散顕微鏡を用いる分散染色法(以下、分散染色法と記す)が最も安価で、簡易な器具で行える分析法である。しかも、分散染色法の分析器具類は、分析者が携帯して移動することができ、アジア諸国内を移動しながら分析を行う場合などに、便利である。

分散染色法の原理について説明する。石綿と石綿に近い屈折率の浸液を用いて、顕微鏡標本を作製する。顕微鏡の光源からの光が標本を通る時に、短い波長の光ほど屈折率が高く、長い波長ほど屈折率が低いいため、光の分散が起きる。位相差・分散顕微

鏡内で、石綿と浸液の屈折率が合致した波長の光(以下、適合波長と記す)だけが分散することなく直進する。適合波長は位相差・分散顕微鏡内でカットされ、カットされなかった光(適合波長の補色)が分散色として観察される。分散色から石綿の屈折率が分かり、また同時に石綿の形状を観察することが出来る。

これまで、分散染色法における浸液の温度とクリソタイルの分散色に関する研究を行ってきた。この研究結果より、標本の温度変化に伴って、分散染色法で作製した石綿標本の分散色も変化する場合があることを確認した。従来の分散染色法では、屈折率の異なる浸液を使用して、石綿の分散色を確認していた。本研究で考える、より簡易な分析法は、分散染色法で作製した標本の温度を変化させることで石綿の分散色を変化させ、1枚の標本のみで石綿の識別を行う方法である。

## 2. 研究の目的

本研究では、分散染色法で使用する浸液の温度を変化させることに伴って、浸液の屈折率も変化することに着目した。既に行った研究の結果より、クリソタイル(標準試料JAWE-111とカナダ産)標本は浸液の温度が25から±5程度の変動で、明確に分散色に変化していた。標本の温度が下がると分散色が青色に近づき、逆に温度が上がると赤色に近づく傾向があった。また、アジア諸国にて、分散染色法で分析を行う場合、次の問題点が考えられる。分析室に空調がなく、日本よりも気温が高い為、室温25での分析は難しい。気温、湿度が日本よりも高く、分散染色法で作製した石綿標本の分散色が、早く変化する可能性がある。

標本の温度を25に保つよりも、標本の温度を測る方が分析者には簡易な方法だと考えられる。そこで本研究では、分散染色法で使用する浸液の温度と、石綿の分散色の関係について検討を行った。本研究は、分散染色法で作製した標本の温度を変化させるという点が、これまででない手法であり、独創的である。従来法では1つの分析対象試料に対して複数の標本の作製、分析が必要とされているが、本研究の手法が確立されれば、1つの分析対象試料に対して1枚の標本の作製、分析で対応でき、分析作業は現在よりも簡易化・迅速化すると考えられる。また、日本とは異なる気温・湿度

のアジア諸国においても、分散染色法で作製した標本の保存を行う環境条件と、観察する石綿標本の温度と分散色の関係を明らかにすることで、日本と同様の精度で分析が行えると考えられる。

アジア諸国において、日本で開発された、より簡易・迅速な石綿の分析手法を普及させることによって、石綿取り扱い場所で石綿の空气中濃度、発生源が把握出来るようになる。アジア諸国における石綿被害の予防は、日本で起きた石綿被害をアジアでは起こさないという、日本の国際的なイニシアティブであり、世界アスベスト東京会議での宣言にも適うと考える。

### 3. 研究の方法

#### 装置および実験方法

非接触で試料の温度が測定出来る放射温度計を使用して、顕微鏡標本の温度を測定、および分散染色法に用いる浸液の温度による屈折率の変化、分散色について検討を行った。

#### 1. 顕微鏡への放射温度計の設置

放射温度計を、顕微鏡のステージに乗せた標本の斜め上に設置し、標本の表面の温度を測定した。実験器具等の位置関係を、図6に示した。放射温度計と標本との照射角度は垂直から30度、照射距離は3cmで固定した。

#### 2. 顕微鏡の鏡筒部へのカメラの設置

顕微鏡 (ECLIPSE E600、Nikon) に顕微鏡用デジタルカメラアダプター (NY2000S2、MICRONET) を用いてデジタルカメラ (CAMEDIA C-3040Z、OLYMPUS) を接続した。デジタルカメラの撮影モードは、標準的顕微鏡撮影モードのCAMEDIA C-3040Z用に設定した。

#### 3. 標本の温度調節

顕微鏡ステージの裏側に、耐熱性テープで板状タイプのセラミックヒーターを2つ取り付けた。実験器具等の位置関係を図8に示した。セラミックヒーターは、アルミナや窒化珪素のセラミックスに発熱体を内蔵した物を使用した。ステージの真下にターレットコンデンサがあるため、ヒーターからのコードはステージの上へ出し、変圧器 (SD-1310、松永製作所) を通して100V電源につないだ。

#### 4. 標本の作製

少量のクリソタイルを清しきしたスライドガラスに乗せ、 $n_D^{25} = 1.550$  の浸液 (カーギル社製) を滴下した。ピンセットの先端で浸液と十分に混合、分散し、その上にカバーガラスを被せて標本を作製した。同様に、アモサイトとクロシドライトは  $n_D^{25} = 1.680$  および  $n_D^{25} = 1.700$  の浸液を使用して、それぞれ2種類の標本を作製した。

#### 5. 標本の温度調整および写真撮影

顕微鏡のステージに標本を乗せ、接眼レンズの倍率を10倍、対物レンズの倍率も10倍にし、合わせて顕微鏡の倍率100倍で測定を行った。顕微鏡の光源はフォトライトに設定した。デジタルカメラの液晶画面を見ながら顕微鏡の微動ハンドルを動かし、写真のピントを合わせた。撮影後、顕微鏡の視野は動かさずに、セラミックヒーターの電圧のみを0V~約25Vの範囲で、2.5V刻みに上げていった。室温は約20の実験室で、電圧を約2.5V上げると、標本の温度は約1上昇した。標本の温度は約20~30の範囲で、約1刻みに撮影を行った。放射温度計で標本の温度を測定し、温度が安定してから、再び顕微鏡視野の撮影を行った。クリソタイルは標準試料JAWE-111と、カナダ産が2種類、ジンバブエ産、ソ連産、ブラジル産、南アフリカ産の計7種類を撮影した。アモサイトとクロシドライトは、1種ずつ撮影した。

### 4. 研究成果

分散染色法に使用する浸液の温度と屈折率との関係

約15~35の範囲で約5刻みに3回ずつ屈折率を測定を行った。その結果は、3回とも同じ値を示した。測定の結果を、図13 ( $n_D^{25} = 1.550$ )、図14 ( $n_D^{25} = 1.680$ )、図15 ( $n_D^{25} = 1.700$ ) に示した。どの浸液も、温度が10上昇すると屈折率は約0.005低くなった。浸液の、温度の変化に伴う屈折率の変化は、浸液の製造会社であるカーギル社からの報告と一致していた。

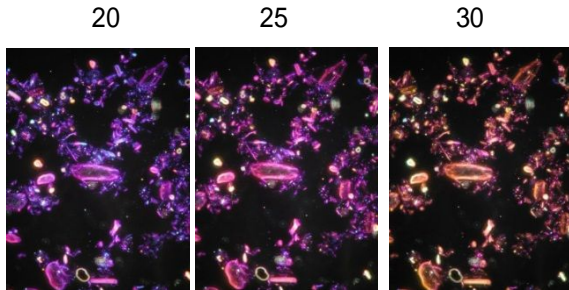
標本の温度と分散色の関係

1. 標本の温度を変えて撮影した同一の顕微鏡視野の写真

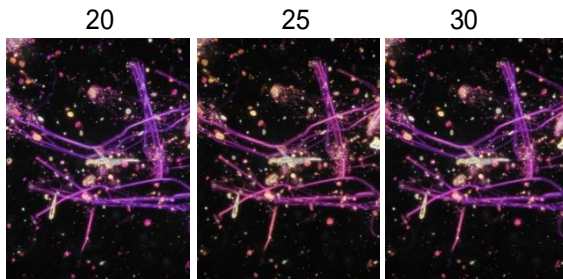
標本の温度は約20~30の範囲で、約1刻みに撮影を行った。標本の温度が約20、約25、約30の写真のみを以下に

示した。 $n_D^{25} = 1.550$  の浸液を使用して作成したクリソタイルの標本では、分散色は約 25 度では赤紫色、25 度を中心に温度が下がるほど青色が、温度が上がるほど赤色が強くなっていた。 $n_D^{25} = 1.680$  の浸液を使用して作成したアモサイトの標本では、25 度では桃色、25 度を中心に温度が下がるほど青色が、温度が上がるほど赤色が強くなっていた。 $n_D^{25} = 1.700$  の浸液を使用して作成したアモサイトの標本、また、 $n_D^{25} = 1.680$ 、 $1.700$  の浸液を使用して作成したクロシドライトの標本においては、分散色の変化は見られなかった。

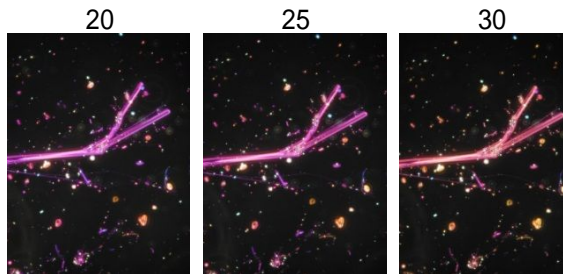
クリソタイル (日本作業環境測定協会 標準試料)、浸液  $n_D^{25} = 1.550$



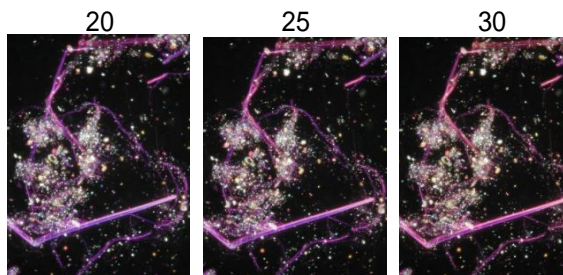
クリソタイル (ブラジル産 4T)、浸液  $n_D^{25} = 1.550$



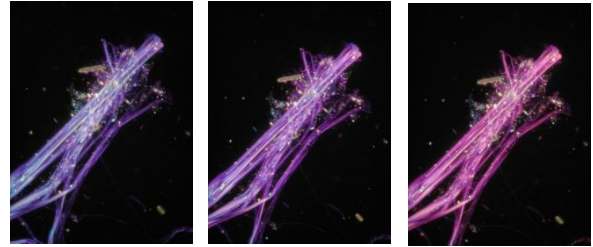
クリソタイル (ソ連産 M60-4)、浸液  $n_D^{25} = 1.550$



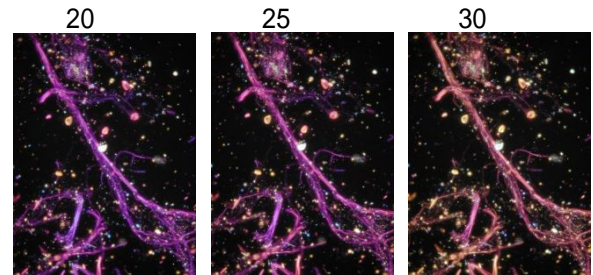
クリソタイル (ジンバブエ産 RGT)、浸液  $n_D^{25} = 1.550$



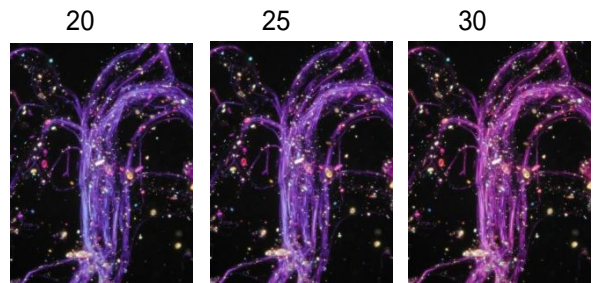
クリソタイル (カナダ産)、浸液  $n_D^{25} = 1.550$



クリソタイル (カナダ産 BL-4T-500)、浸液  $n_D^{25} = 1.550$



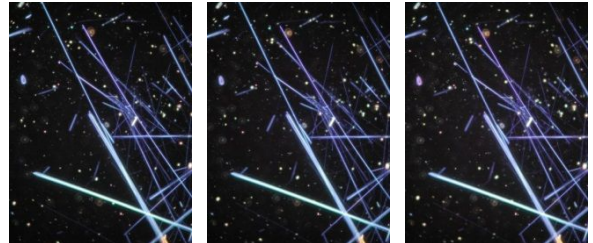
クリソタイル (南アフリカ産)、浸液  $n_D^{25} = 1.550$



アモサイト、浸液  $n_D^{25} = 1.680$

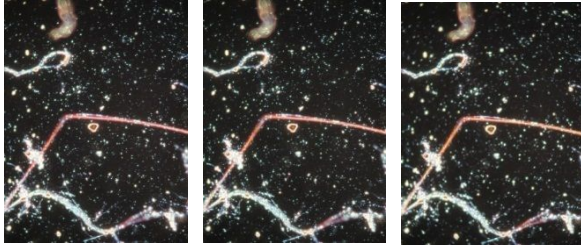


アモサイト、浸液  $n_D^{25} = 1.700$



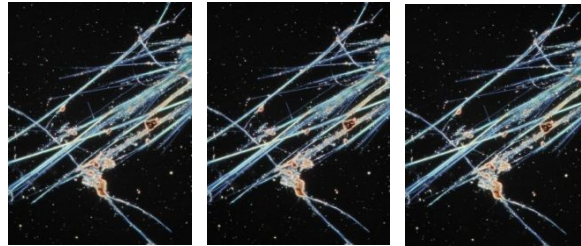
クロシドライト、浸液  $n_0^{25} = 1.680$

20 25 30



クロシドライト、浸液  $n_0^{25} = 1.700$

20 25 30



## 2. 分散色より適合波長を導く方法

デジタルカメラで撮影した写真のデータを、パソコンに保存した。パソコンの画面上で石綿の粒子を1つ選び、粒子の分散色のRGB値、また国際照明委員会(CIE)のxy色度図上で相当する座標をパソコン画面上で求めた。1つの粒子上で5点選び、5点のRGB値、座標の平均値を算出した。RGBは一般に、加法混色を表現するのに使われる。RGBは、それぞれ赤(red) 緑(green) 青(blue)の頭文字である。光の三原色であり、数値を増すごとに白に近づく。反対に、数値を減らすごとに黒くなる。コンピュータのモニターで用いられるのも、このRGBである。xy色度図は、色度座標のxとyにより色相と彩度を表示したもので、色度図の中心に向かうほど彩度が低くなる。色度図の端に向かうほど彩度が高くなる。分散色を、RGB値またxy色度図上で相当する座標に変換するソフトは、成蹊大学理工学部エレクトロメカニクス学科の窪田悟教授より提供された色度計測ソフトRGBreaderを使用した。

以下のRGB図に標本の温度が約20~30でのクリソタイル(標準試料JAWE-111)の分散色を示した。分散色の座標から、 $(x, y) = (0.33, 0.33)$ の位置を通して直線を引くと、分散色の補色の波長が得られる。分散色は白色光から補色を引いた色であるから、分散色の補色の波長は、対物レンズの光源絞りマスクによって遮蔽される光の波長(以下は適合波長と記す)だと考えられる。クリソタイル(標準試料

JAWE-111) における適合波長は、標本の温度が20~30に変化することに伴い、約570nm~約505nmに変化していた。これは、標本の温度が20~30が変わることによって、 $n_0^{25} = 1.550$ の浸液の屈折率が1.552~1.548に変化したためであると考えられる。

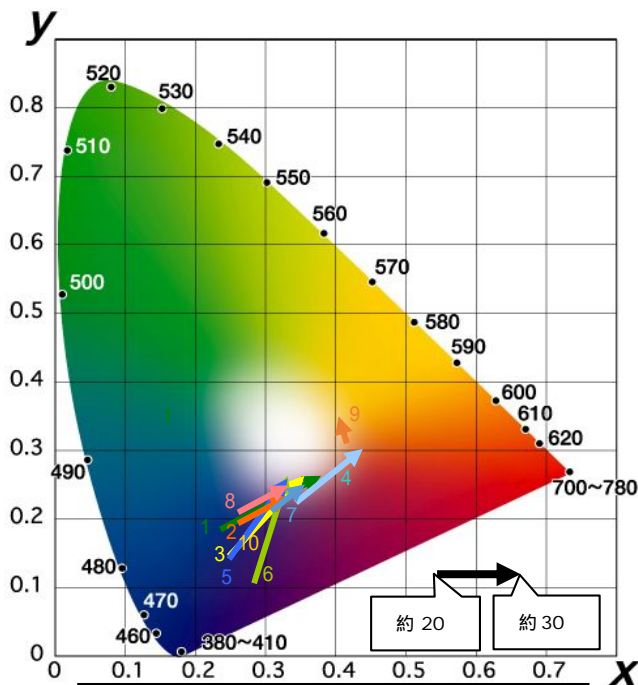
本実験のようにして適合波長を求める方法は、撮影条件と顕微鏡の調整条件を同一にしていれば、誰が顕微鏡視野の記録を撮っても、同じ適合波長が得られる。本手法は、適合波長と浸液の屈折率を縦軸と横軸にする分散曲線の作成などに有益であると考える。

## 3. 分散色の解析

以下に、標本の温度が約20~30での産地別クリソタイルの分散色を色度図上に示した。産地別クリソタイルの分散色を見比べたところ、ソ連産以外の標準試料JAWE 111、カナダ・ケベック、カナダB/LT-500、南アフリカ、ソ連M-6-40、ジンバブエR+G/T、ブラジル4Tについては、彩度の違いはあるが、ほぼ同じ色相に位置していた。ソ連産クリソタイルの分散色は、他のクリソタイルよりも赤味が強かった。カナダ産クリソタイルの標本の温度30での分散色よりも、ソ連産のクリソタイルの標本の温度20での分散色の方が、赤味が強かった。

どの産地のクリソタイルも、標本の温度が高くなるに伴って、分散色は反時計回りに変化していき赤味が増した。これは、標本の温度が20~30に変化することに伴い、浸液の屈折率が約1.552~約1.548に変化したので、適合波長が短波長側に变化したためだと考えられる。

以下に、標本の温度が約20~30でのアモサイト、クロシドライトの分散色を色度図上に示した。アモサイトについても、標本の温度が高くなるに伴って、分散色は色度図上を反時計回りに变化した。これは、標本の温度が約20~30に変化することに伴い、 $n_0^{25} = 1.680$ の浸液の屈折率は約1.682~約1.678に変化し、 $n_0^{25} = 1.700$ の浸液の屈折率も約1.702~約1.698に変化したので、適合波長が短波長側に变化したためだと考えられる。クロシドライトについては、クリソタイルやアモサイトに比べると、温度による分散色の変化が少なかった。



クリソタイル	
1. JAWE 111	2. カナダ
3. 南アフリカ	4. ソ連
5. ジンバブエ	6. ブラジル
アモサイト	
7. $n_D^{25} = 1.680$	8. $n_D^{25} = 1.700$
クロシドライト	
9. $n_D^{25} = 1.680$	10. $n_D^{25} = 1.700$

従来の分散染色法では標本の温度を 25 一定にして粒子の形状と分散色を観察し、石綿の種類を判定している。アジア諸国にて、分散染色法で石綿の分析を行う場合、分析室に空調がない場合があり、日本よりも気温が高い為、室温 25 での分析は難しい。標本の温度を 25 に保つよりも、標本の温度を測る方が分析者には簡易な方法だと考えられる。そこで本研究では、分散染色法で使用する浸液の温度と、石綿の分散色の関係について検討を行った。結果より、本研究で用いた石綿に関しては、分散色も標本の温度変化に伴って一定の変化を示すことが確認された。本研究は、分散染色法で作製した標本の温度を変化させるという点が、これまでにない手法であり、独創的である。従来法では 1 つの分析対象

試料に対して複数の標本の作製、分析が必要とされているが、本研究の手法が確立されれば、1 つの分析対象試料に対して 1 枚の標本の作製、分析で対応でき、分析作業は現在よりも簡易化・迅速化すると考えられる。

### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

中村憲司、宮田亮介、飯田裕貴子、村田克、名古屋俊士、篠原也寸志、位相差・分散顕微鏡の石綿繊維視認性の評価と改善、作業環境、査読有、2 巻、2014、77-82

飯田裕貴子、中村憲司、村田克、名古屋俊士、木村菊二、より簡易・迅速な石綿分析手法の開発～アジア諸国での石綿被害を予防するために～、査読無、産業衛生学会誌 2011:53(臨時増刊号):420.(ポスター、5 月 18 日) .

〔学会発表〕(計 3 件)

中村憲司、飯田裕貴子、村田克、名古屋俊士、篠原也寸志、位相差・分散顕微鏡法における位相差顕微鏡法に対する石綿計数値減少の定量的評価 第 52 回日本労働衛生工学会 (2012.11.14 福岡) .

中村憲司、飯田裕貴子、村田克、名古屋俊士、篠原也寸志、菅野誠一郎、位相差顕微鏡法と分散染色法の結像原理の違いによる石綿計数への影響 第 51 回日本労働衛生工学会 (2011.11 栃木)

飯田裕貴子、中村憲司、村田克、名古屋俊士、木村菊二、分散染色法で作製したクリソタイル、アモサイト、クロシドライト標本の保存条件に関する研究 第 83 回日本産業衛生学会 (2010.5 福井)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.isl.or.jp/156-research/researchgroup/diversity/diversity-m/223-2012-12-11-10-36-56.html>

### 6 . 研究組織

(1) 研究代表者

飯田裕貴子 (YUKIKO IIDA)

公益財団法人 労働科学研究所

・研究部・研究員

研究者番号：10442568