短 報

異なった電子顕微鏡標本作製法の
石綿繊維の元素組成への影響Effects of Different Preparation Methods
for Electron Microscopy on Elemental
Compositions of Asbestos Fibers

Key words: asbestos; elemental composition; preparation method

生体試料に含まれる石綿繊維を電子顕微鏡（電顕）で分析するには、共存する物質をできるだけ除去して石綿繊維を残す前処理が必要である。前処理には湿式灰化法や低温灰化法など多くの方法が試みられている¹⁾。著者らは、先にヒトの肺組織中石綿繊維の電顕観察用標本を Gylseth らの低温灰化法²⁾と同時に、一部の試料については Smith らの湿式灰化法³⁾でも作製し、KEVEX 7000-Q 形エネルギー分散型 X 線分析システム付 H-800 形電子顕微鏡（分析電顕）により繊維の元素組成分析を行った。その結果、著者らがクリソタイルと判定した石綿繊維の元素組成（平均値±標準偏差）は前者（7例： $n=63$ ）では Mg $36\pm11\%$, Si $60\pm11\%$, Fe $4\pm5\%$ であったのに対して後者（3例： $n=36$ ）では Mg $43\pm8\%$, Si $55\pm8\%$, Fe $2\pm4\%$ であり、Mg および Si の値は有意（ $p<0.05$ ）に異なっていた。クリソタイルは酸性条件では繊維から Mg が溶出することが知られており^{4,5)}、次亜塩素酸ナトリウム（NaClO）によっても Mg と Si の割合が変化するという報告⁶⁾もある。また、石綿繊維の元素組成と発ガン性に関連して Mg 含有率の低いクリソタイルでは発ガン性が低下するという報告^{7,8)}もあるので、生体組織中に存在する石綿繊維の元素組成を変化させずに把握することは重要である。しかし、実際の前処理に即した条件での石綿繊維の元素組成の変化については著者らの知る限りでは報告がない。そこで生体試料の電顕標本作製時の前処理でよく用いられる酸やアルカリならびにその使用条件が、現在工業的に使用され、一般環境や生体組織からも検出される石綿繊維3種類（クリソタイル、クロンドライト、アモサイト）の元素組成に及ぼす影響について検討した。

実 験

1. 装置：KEVEX 7000-Q 型エネルギー分散型 X 線分析システム付 H-800 型電子顕微鏡
2. 処理条件の選定：酸とアルカリの種類と濃度は、現在比較的によく使用されている前処理方法から選んだ。

アルカリ溶液としては NaClO⁹⁾ と 40% 水酸化カリウム (KOH)⁹⁾、酸溶液としては濃塩酸 (12 N)¹⁰⁾ と希塩酸 (0.5 N)²⁾ を用いた。対照実験は蒸留水で行った。放置時間は低温灰化法での灰化物の懸濁ろ過に要する時間ならびに湿式灰化法での分解時間を考慮して 30 分間と 48 時間とした。

3. 試薬：クリソタイル、クロンドライトおよびアモサイトは日本石綿協会より入手したものを使用した。NaClO は有効塩素約 10% のものを、KOH ならびに塩酸は特級試薬（片山化学）を使用した。

4. 操作：共栓付 200 ml 三角フラスコに石綿繊維約 0.5 mg、酸またはアルカリを 100 ml 添加して室温で 5 分間超音波分散した。30 分間または 48 時間室温で放置した後、再度室温で 5 分間超音波分散してニュークリポアフィルター（孔径 0.2 μm , 直径 47 mm, 野村マイクロサイエンス）で吸引ろ過した。フィルターを炭素蒸着後、電顕用グリッド (200 mesh, Ni 製, VECO 社) 上に載せ、クロロホルム蒸気で薄膜化した。石綿繊維の元素組成は 1 試料当たり 20 本について求めた。

5. 検定方法：各元素の占める百分率の平均値の差を t -検定によって検定した。

結 果

Table 1 にクリソタイル、Table 2 にクロンドライト、Table 3 にアモサイトを蒸留水、NaClO、40% KOH、12 N 塩酸ならびに 0.5 N 塩酸に 30 分間または 48 時間放置した時の元素組成の変化を示した。

クリソタイルの元素組成は 12 N ならびに 0.5 N 塩酸では 30 分間放置で既に有意な変化を生じた。蒸留水や NaClO、KOH では 48 時間放置後でも有意な変化は見られなかった。クロンドライトならびにアモサイトの元素組成はいずれの条件でも有意な変化を示さなかった。また電顕像の肉眼観察ではいずれの種類の石綿繊維にも前処理によると思われる形状の変化は見られなかった。

分析した繊維の直径はクリソタイル $0.20\pm0.18\ \mu\text{m}$ ($n=200$)、クロンドライト $0.26\pm0.18\ \mu\text{m}$ ($n=200$)、アモサイト $0.28\pm0.20\ \mu\text{m}$ ($n=200$) であった。12 N 塩酸に 48 時間放置したクリソタイルの元素組成は、直径 $0.1\ \mu\text{m}$ をこえる繊維 ($n=12: 0.27\pm0.16\ \mu\text{m}$) では Mg $29\pm7\%$, Si $69\pm7\%$, Fe $3\pm2\%$ なのに対して、直径 $0.1\ \mu\text{m}$ 以下の繊維 ($n=8: 0.07\pm0.03\ \mu\text{m}$) では Mg $21\pm8\%$, Si $75\pm7\%$, Fe $5\pm1\%$ で、細い繊維のほうが Mg の減少が大きかった。しかし対照実験では直径による元素組成の違いは見られなかった。クロンドライトとアモサイトの元素組成は直径に関係なくほぼ一定であった。

考 察

Gylseth らの方法は、生体試料を乾燥・低温灰化後、10% エチルアルコールを含む 0.5 N 塩酸で灰化物を懸濁分散させ、吸引ろ過を行っている。Smith らの方法は、NaClO で生体試料中の有機物を分解し、クロロホルムと 50% エチルアルコールによるタール分等の抽出除去後に得られた残渣を再び 95% エチルアルコールで懸濁分散させ、吸引ろ過を行っている。今回の実験結果では、クリソタイルの元素組成は NaClO, KOH および蒸留水による処理条件では有意な変化を示さず、塩酸性条件での処理によってその元素組成が有意に変化していたので、冒頭に述べた 2つの方法での元素組成の違いは Gylseth らの方法で使われている 0.5 N 塩酸に起因すると考えられた。

生体内に存在するクリソタイルの Mg 含有率は一般に低いことが報告されている^{4,11)}が、電顕標本作製時に酸性条件を使用するとクリソタイルの Mg 含有率がさらに低下する。分析電顕による石綿繊維の同定は繊維の形状と元素組成に基づいて行うので、Mg 含有率の低下したクリソタイルは繊維状または棒状でかつ類似の元素組成を示すタルク (Mg : 39%, Si : 61%)¹²⁾ やセピオライト (Mg : 37%, Si : 63%)¹²⁾ との区別が一層難しくなる。一方、クロンドライトならびにアモサイトの元素組成は、今回の実験結果では電顕標本作製時に通常用いられる前処理条件では有意な変化を示さなかった。

したがって石綿繊維の分析するための電顕標本作製時の前処理では酸性条件を避けて行うのが望ましいと考えられる。

文 献

- 1) Hans Weill, ed. Occupational lung diseases : research approaches and methods. New York : Marcel Dekker Inc, 1981 : 199-206.
- 2) Gylseth B, Mow G, Wannag A. Fibre type and concentration in the lungs of workers in an asbestos cement factory. *Br J Ind Med* 1983; 40 : 375-379.
- 3) Smith MJ, Nayler B. A method for extracting ferruginous bodies from sputum and pulmonary tissue. *Am J Clin Pathol* 1972; 58 : 250-254.
- 4) Kohyama N, Kawai K, Aita S, et al. Quantitative chemical analysis of chrysotile fibrils in rat lung tissue by analytical electron microscopy. *Ind Health* 1977; 15 : 159-171.
- 5) Seshan K. How are the physical and chemical

Table 1. Composition of chrysotile treated with acidic and alkaline solutions (% : mean±standard deviation).

Treatment Time	Distilled Water (Reference Standard)	Sodium Hypochlorite	Potassium Hydroxide (40%)	Hydrochloric Acid (12 N)	Hydrochloric Acid (0.5 N)
30 min	Na Si Fe	50 ± 3 46 ± 3 9 ± 1	51 ± 3 47 ± 3 5 ± 1	51 ± 3 47 ± 3 5 ± 1	36 ± 7 ^a 56 ± 7 ^a 3 ± 1
48 h	Na Si Fe	50 ± 3 47 ± 3 9 ± 1	51 ± 4 49 ± 4 2 ± 1	51 ± 4 47 ± 4 2 ± 1	25 ± 8 ^{a,MC} 71 ± 8 ^{a,MC} 3 ± 1

* : p < 0.01. A : Water VS 12N HCl, B : Water VS 0.5N HCl, C : 30 min VS 48 h

Table 2. Composition of crocidolite treated with acidic and alkaline solutions (% : mean±standard deviation).

Treatment Time	Distilled Water (Reference Standard)	Sodium Hypochlorite	Potassium Hydroxide (40%)	Hydrochloric Acid (12 N)	Hydrochloric Acid (0.5 N)
30 min	Na Si Fe	8 ± 1 47 ± 2 45 ± 1	7 ± 1 47 ± 2 46 ± 2	8 ± 2 47 ± 2 44 ± 3	8 ± 1 47 ± 1 45 ± 1
48 h	Na Si Fe	7 ± 2 48 ± 2 45 ± 2	7 ± 1 48 ± 2 46 ± 2	8 ± 2 48 ± 2 46 ± 3	7 ± 1 48 ± 1 46 ± 2

Table 3. Composition of amosite treated with acidic and alkaline solutions (% : mean±standard deviation).

Treatment Time	Distilled Water (Reference Standard)	Sodium Hypochlorite	Potassium Hydroxide (40%)	Hydrochloric Acid (12 N)	Hydrochloric Acid (0.5 N)
30 min	Na Si Fe	5 ± 1 45 ± 1 46 ± 1	5 ± 1 45 ± 1 47 ± 2	5 ± 2 45 ± 2 46 ± 3	5 ± 1 45 ± 1 47 ± 2
48 h	Na Si Fe	5 ± 1 45 ± 1 47 ± 1	5 ± 1 45 ± 1 47 ± 1	5 ± 1 45 ± 1 46 ± 1	5 ± 1 45 ± 1 47 ± 1

properties of chrysotile asbestos altered by a 10-year residence in water and up to 5 days in simulated stomach acid? *Environ Health Perspect* 1983; 53 : 143-148.

- 6) Warnock ML, Prescott BT, Kuwahara TJ. Numbers and types of asbestos fibers in subjects with pleural plaques. *Am Assoc Pathol* 1982; 109 : 37-46.
- 7) Morgan A, Davis P, Wagner JC, et al. The biological effects of magnesium-leached chrysotile asbestos. *Br J Exp Pathol* 1977; 58 : 465-473.
- 8) Monchaux G, Bignon J, Jaurand MC, et al. Mesotheliomas in rats following inoculation with acid-leached chrysotile asbestos and other mineral fibers. *Carcinogenesis* 1981; 2 : 229-236.
- 9) Ashcroft T, Heppleston AG. The optical and electron microscopic determination of pulmonary asbestos fiber concentration and its relation to the human pathological reaction. *J Clin Pathol* 1973; 26 : 224-234.
- 10) Guest L. The recovery of dust from formalin-fixed pneumoconiotic lungs : a comparison of the methods used at S.M.R.E. *Ann Occup Hyg* 1976; 19 : 37-47.
- 11) Langer AM. Chemical characterization of asbestos body cores by electron microprobe analysis. *J Histochem Cytochem* 1972; 20 : 723-734.
- 12) 須藤談話会, 編, 土をみつめる—粘土鉱物の世界—. 東京 : 三共出版, 1986 : 206-207.

酒井 潔*, 久永直見**, 竹内康浩**

* 名古屋市衛生研究所

** 名古屋大学医学部衛生学教室

Kiyoshi SAKAI*, Naomi HIRANAGA**

and Yasuhiro TAKEUCHI**

* Nagoya City Health Research Institute, 1-11, Hagi-yama-cho, Mizuho-ku, Nagoya, 467 Japan

** Department of Hygiene, Nagoya University School of Medicine

昭和 62 年 1 月 17 日受付

通信先 : 酒井あて, Reprint requests to K. Sakai