短 報

石棉繊維計数に必要な電子顕微鏡の観察倍率

Visibility of Fine Asbestos Fibers in
Transmission Electron Microscopy
Analysis

Key words: asbestos fiber; chrysotile; visibility; magnification; transmission electron microscopy

生体ならびに環境中石綿の計数には、微細な繊維まで観察可能でかつ元素組成比が得られるエネルギー分散型X線分析装置を装着した透過型電子顕微鏡（透過型電顕）が用いられることが多いが、その観察倍率は報告者によって8,300倍¹⁾、10,000倍^{2,3)}、15,000倍⁴⁾、18,000倍⁵⁾、20,000倍⁶⁾、20,000~30,000倍⁷⁾と多様である。著者らは透過型電顕によって石綿を含む繊維の計数を行う場合、細い繊維の見落としが少なく、かつ計数に要する労力と時間を最小限にすることができる観察倍率を明らかにしておくことは実用上必要であると考え、そこで観察倍率を検討するための微細な繊維として最も細い石綿であるクリソタイル⁸⁾を用いて、透過型電顕の観察倍率とその観察繊維本数の関係について検討した。

実験方法

1. 装置：透過型電子顕微鏡 JEM-100CX 型（日本電機）、加速電圧：100 kV。
2. 電顕観察用標本の作製方法：日本石綿協会から入手したクリソタイルを 250 ml 共栓三角フラスコにごく少量入れて蒸留水 100 ml を加えた。超音波分散処理（0.02 W/ml, 2時間）後、その 1~10 ml を 200 ml 三角フラスコに分取して蒸留水 100 ml を加えた。ろ過直前に超音波分散処理（5分間）後、ニュークリポフィルター（孔径 0.2 μm , 直径 47 mm）で吸引ろ過した。フィルターに炭素蒸着後、その小片（約 4 mm 四方）を

炭素膜を張った電顕グリッドに載せ、クロロホルム蒸気でフィルターを溶解除去した。

3. 繊維観察方法：特定のグリッド網目を繰り返し観察するために電顕グリッド MAXTAFORM TYPE H-2（200 mesh, Cu 製）を使用した。特定の網目 1 個について 500 倍で計数後、20,000 倍まで倍率を順に上げて、各倍率で観察できた繊維を電顕付属の双眼顕微鏡（10 倍）を使用せずに計数した。各倍率における観察視野は電顕の蛍光板上の写真撮影部分（76×84 mm）とし、観察視野が重複しないように移動させて繊維を計数した。その際、観察視野に交差している繊維は視野の上側と右側で交差している繊維だけを、またグリッド格子に交差している繊維はすべて計数した。繊維本数の判定は石綿粉じん濃度測定要領⁹⁾にしたがった。繊維の計数は同一のグリッド網目について観察日を変えて 5 回繰り返した。繊維本数はフィルター 0.01 mm² 当たりの本数で表示し、平均値の差の検定は *t*-検定（片側検定）で行った。フィルター 0.01 mm² 当たり 100 本は 1 網目当たり 121 本に相当していた。繊維の直径は 20,000 倍で撮影後、さらに 5 倍引き伸ばした写真で計測した。

実験結果

今回使用したクリソタイルを 20,000 倍で観察した場合に最も細い単繊維の直径は 0.018 μm であり、写真を観察した限りでは新たな繊維を検出なかった。Table 1 は各倍率での観察繊維本数をまとめたものである。10,000 倍以下では観察繊維本数は倍率が高くなるとともに多くなっていた。14,000 倍および 10,000 倍での観察繊維本数は 20,000 倍のそれと比較していずれの試料でも有意差はなく、観察繊維本数もほぼ同じであった。8,000 倍以下での観察繊維本数はいずれの試料でも有意（*p* < 0.01）に少なかった。

考 察

クリソタイル単繊維の直径の最小値は原産地により異なる⁸⁾。今回使用したクリソタイルの最も細い単繊維の直径は 0.018 μm であった。Yada¹⁰⁾ によると 6 か所の

Table 1. Asbestos fibers counted at various magnifications (fibers/0.01 mm²).

Magnification	Sample No.1	Sample No.2	Sample No.3	Sample No.4	Sample No.5
20,000	396 ± 4 (100)	101 ± 2 (100)	84.6 ± 2.1 (100)	27.3 ± 0.9 (100)	14.0 ± 0.5 (100)
14,000	398 ± 5 (101)	102 ± 2 (101)	83.4 ± 1.4 (97)	26.4 ± 0.9 (97)	13.2 ± 1.0 (94)
10,000	394 ± 5 (99)	102 ± 1 (101)	83.3 ± 1.5 (97)	26.9 ± 0.8 (99)	13.7 ± 1.0 (98)
8,000	369 ± 9 (93)**	86.6 ± 1.6 (86)**	79.0 ± 2.1 (92)*	24.1 ± 1.2 (88)**	10.7 ± 1.4 (76)**
6,700	285 ± 12 (72)**	71.9 ± 2.5 (71)**	54.8 ± 3.3 (64)**	20.3 ± 2.0 (75)**	8.6 ± 1.3 (61)**
5,000	195 ± 8 (49)**	42.5 ± 4.0 (42)**	32.0 ± 1.9 (38)**	12.2 ± 2.1 (45)**	7.3 ± 1.2 (52)**
2,700	103 ± 5 (26)**	28.6 ± 3.5 (28)**	19.0 ± 1.9 (22)**	6.4 ± 1.0 (24)**	3.1 ± 0.6 (22)**
1,000	28.6 ± 1.9 (7)**	5.6 ± 1.0 (6)**	2.8 ± 0.4 (3)**	2.0 ± 0.4 (7)**	1.0 ± 0.3 (7)**
500	8.9 ± 1.2 (2)**	3.1 ± 0.3 (3)**	1.5 ± 0.3 (2)**	1.5 ± 0.3 (5)**	0.2 ± 0.3 (1)**

1) Mean ± standard deviation (N = 5). The value in parentheses indicates the percentage of fiber counts at the respective magnification to those at 20,000.

2) **p* < 0.01, ***p* < 0.001 (one-sided test), compared to fiber counts at a magnification of 20,000.

原産地のクリソタイルで直径が $0.018 \mu\text{m}$ 未満の単繊維の割合は平均 2% (0~5.7%) であった。Marcoli ら³⁾ は 10,000 倍で直径 $0.01 \mu\text{m}$ の繊維が観察可能であったとしている。倍率が低いほどグリッド網目 1 個を観察するのに必要な視野数が少なくなるので、多数の試料を観察する場合にはなるべく低倍率での繊維観察が望ましい。今回の観察条件では 10,000 倍と 14,000 倍で観察された繊維の本数は 20,000 倍との間に有意差がなく、20,000 倍に対する 10,000 倍での観察本数の割合は 97~101% であった。したがってフィルターが十分かつ均一に透明化された電顕標本で、繊維密度が 400 本/ 0.01mm^2 以下の場合、直径 $0.018 \mu\text{m}$ 未満の繊維が見落とされることを許容すれば、観察倍率は 10,000 倍を基本とすることが実用的と考えられた。ただし、実際の空気または生体試料から作製した電顕標本で、繊維以外の併存物などのためにフィルターの透明化が不十分あるいは不均一な場合には、適宜高倍率で観察することが必要と考えられた。

文 献

- 1) Rogers AJ. Determination of mineral fibre in human lung tissue by light microscopy and transmission electron microscopy. *Ann Occup Hyg* 1984; 28: 1-12.
- 2) Case BW, Sebastien P. Environmental and occupational exposure to chrysotile asbestos: a comparative microanalytic study. *Arch Environ Health* 1987; 42: 185-191.
- 3) Marcoli A, Menichini E, Paoletti L. A comparison of light microscopy and transmission electron microscopy results in the evaluation of the occupational exposure to airborne chrysotile fibres. *Ann Occup Hyg* 1984; 28: 321-331.
- 4) Dodson RF, Garcia JGN, O'Sullivan M, et al. The usefulness of bronchoalveolar lavage in identifying past occupational exposure to asbestos: a light and electron microscopy study. *Am J Ind Med* 1991; 19: 619-628.
- 5) Churg A, Wood P. Observations on the distribution of asbestos fibers in human lungs. *Environ Res* 1983; 31: 374-380.
- 6) Gibbs AR, Griffiths DM, Pooley FD, Jones JSP. Comparison of fibre types and site distributions in lung tissues of paraoccupational and occupational cases of malignant mesothelioma. *Br J Ind Med* 1990; 47: 621-626.
- 7) 神山宣彦. 大気中の微小アスベスト粒子の電子顕微鏡による定量(3). 昭和 58 年度環境保全研究成果集. 1983; 103-1-15.
- 8) Chisholm JE. Transmission electron microscopy of asbestos. In: Chissick SS, Derricott R, eds. *Asbestos*, vol 2. Properties, applications, and hazards. Chichester: A Wiley-Interscience Publication, 1983: 85-167.
- 9) 日本石綿協会. 石綿粉じん濃度測定要領. 東京: 日本石綿協会, 1984: 17-20.
- 10) Yada K. Study of microstructure of chrysotile asbestos by high resolution electron microscopy. *Acta Cryst* 1971; A27: 659-664.

酒井 潔*, 久永直見**, 児嶋昭徳*, 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,** Akinori KOJIMA* and Yasuhiro TAKEUCHI**

* Nagoya City Public Health Research Institute, 1-11 Hagiya-cho, Mizuho-ku, Nagoya, 467 Japan

** Department of Hygiene, Nagoya University School of Medicine

平成 4 年 2 月 26 日受付

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