

1. 位相差・分散顕微鏡による石綿分析の有効性 (白石綿の特性と採取条件を基にした解析)

池澤正幸・邑岡和昭

キーワード：石綿（アスベスト）、白石綿（クリソタイル）、青石綿（クロシドライト）、分散染色法

要 旨

全国環境研会誌「第33巻第1号」に掲載予定の報文「位相差・分散顕微鏡による石綿分析の有効性」(以下「報文1」とする)の補足事項について紹介する。

始めに、屈折液1.68及び屈折液1.55を用いて、白石綿の色及び最小幅の分布を検討し、分散色を示すサイズは、少なくとも直接観察法で幅 $1.05\mu\text{m}$ 以上で白(白黒)色の白石綿であることが確認された。そして、浮遊石綿中の白石綿と青石綿を判別するためには、屈折液1.68を用いて、散乱光を示す繊維状粒子は白石綿として除外し、青石綿の分散色を示すか、その形状を確認できなくなった繊維状粒子は青石綿として分類できることがわかった。

また、採取条件の捕集空気量が増えるに従い、粒子の付着及び散乱光の影響が大きくなり、分散色の確認が困難になるため、室内の石綿除去現場における適切な捕集空気量は160L以下であることが示唆された。

1. はじめに

報文1では、直接観察法で計測して幅 $1.05\mu\text{m}$ 以上で白(白黒)色の青石綿は、分散染色法において分散色を示す可能性が非常に高いが、幅 $1.05\mu\text{m}$ 未満の青石綿は分散色を示さず、形状が確認できなくなることがわかった。そして、実際に浮遊していた青石綿は、直接観察時の最小幅の平均値が $0.90\mu\text{m}$ ($n=236$)であったため、分散染色法において分散色を示す石綿をほとんど確認できなかった。

ここでは、上記に係る浮遊石綿の採取条件の違いによる浮遊青石綿の捕そく率について考察する。ただし、浮遊石綿中には白石綿が含まれるおそれがあったため、分散染色用の屈折液における白石綿のサイズ及び色の特徴について写真計測法により解析し、浮遊石綿の中に含まれた白石綿を判別して青石綿のみの傾向を分析した方法についても併せて報告する。

2. 実験方法

位相差・分散顕微鏡には、Nikon製ECLIPSE80iを利用し、位相差顕微鏡の設定は「NCB11」をINにして位相差用対物レンズ(DLL40×/0.75)を

使用。分散顕微鏡の設定は「NCB11」をOUTにして分散用対物レンズ(D40×/0.75)を使用した。

2. 1 石綿試料

標準試料として用いた白石綿[クリソタイル標準試料(JAWE131)、(社)日本作業環境測定協会]の前処理は、白石綿を粉碎してふるい($425\mu\text{m}$)を通した後、無じん水と共にコニカルビーカー内に入れ、超音波処理を行った。次いで、マグネティックスターラーによりかくはんさせながら溶液を採取し、清拭したスライドグラス上に滴下して乾燥させた。

浮遊石綿は、昭和50年以前に施工された吹付け石綿(トムレックス)の除去現場(室内環境)から採取した。除去以前の石綿は天井材の表面に吹付けられており、表層に白石綿、下層に青石綿を含む二層で施工されていた。

浮遊石綿を採取した際の現場の状況は、白石綿がすでに除去された後であり、青石綿の除去作業中であった。前室と除去現場との間はシートで覆われ、除去現場に入ると高さ約2mの階段があり、その階段を上った入口近くの除去現場の天井は、足場から天井まで高さ約1m80cmで天井のコンク

リートが一部露出し、青石綿が薄く付着していた。また、負圧のため除去現場内へ空気が流れ、高湿度の条件であった。

第1回目の石綿の採取は、除去現場の出入り口の昇り階段で、サンプリングフォルダーを天井の方に上向きにしてメンブランフィルター（MILLIPORE製セルロース混合エステル、孔径 $0.8\mu\text{m}$ 、直径47mm）に吸引した（報文1の浮遊石綿は第1回目の試料を利用し、白石綿を除外した結果を示している）。

同様に、第2回目は階段を昇って約1mの範囲内にある平坦な除去現場で、サンプリングフォルダーを約10m離れた青石綿の除去作業の方に横向きにして実施した。

上記の採取したフィルターの採取条件を表1に示す。また、前処理はそれらのフィルターの採取面を下にしてスライドグラス上に置き、アセトン蒸着して透明化した後で低温灰化処理を行った。

表1 浮遊石綿の採取条件

	フィルター	捕集空気量[L]	吸引流量[L/min]	捕集時間[min]
第1回目	1	20	2	10
	2	40	4	10
	3	160	8	20
第2回目	4	240	8	30

2.2 直接観察法

前処理した石綿試料上に清拭したカバーグラスをかぶせ、その両端をテープで固定した後、位相差顕微鏡の設定で視野絞りノブを用いて観測視野を約 $300\mu\text{m}$ の外側まで絞り、繊維状粒子の石綿を計数し、その画像を保存した（画像A）。

2.3 分散染色法

カーギル標準屈折液1.68又は1.55を浸透させてから、分散顕微鏡の設定で直接観察法と同じ視野で石綿の分散色の有無を観察し、その画像を保存した（画像B）。

なお、石綿の分散色の観察には、視野絞りノブを用いて観測視野を約 $100\mu\text{m}$ の外側まで絞り、アナライザを併用して、屈折液1.68で橙色又はピンク色が一部でも確認された場合は青石綿の分散色。

同様に、屈折液1.55で橙色、赤紫色及び青色の場合は白石綿の分散色とした。

2.4 写真計測法

画像A及びB（ 1280×960 ピクセル）はA4サイズの写真用紙にカラー印刷し、その写真上の石綿をスケールルーペ（1目盛り 0.1mm ）で計測した。画像Aでは、繊維状粒子のサイズに該当するかどうかを判定し、石綿のサイズの大小によって影響を受ける石綿の色（白、白黒、黒）を観察した。

画像Bでは、写真に示された分散色の有無及び濃淡、又は散乱光の有無も観察した。分散色又は散乱光が認められた場合は、その範囲の最小幅を画像A及びBから求めた。一方、分散色や散乱光もなく、形状が確認できない場合は、画像Aの写真から最小幅を求めた。

なお、対物マイクロメータ（1目盛り $10\mu\text{m}$ ）の画像A及びBの1目盛りを計測した場合、約 7.6mm であったため、その値を換算係数として最小幅を決定した（小数点3桁目以降は切り捨て）。

3. 結果と考察

3.1 標準試料の白石綿

屈折液1.68及び屈折液1.55を用いて、白石綿の色及び最小幅の分布を検討する。

(1) 屈折液1.68における白石綿の特性

実施例として、図1に白石綿の画像A（直接観察法）及びB（分散染色法）を示す。始めに、位相差顕微鏡のアイピースグレイティクル（目盛り $3\mu\text{m}$ 及び $5\mu\text{m}$ ）で推定した場合、幅約 $1\mu\text{m}$ 、長さ約 $20\mu\text{m}$ であった。次に、写真計測法で計測した場合、画像Aでは幅 $0.78\sim 1.18\mu\text{m}$ 、長さ $19.07\mu\text{m}$ であり、その精度は良好であった。さらに、画像Bでは最小幅 $0.78\mu\text{m}$ であることを確認できたけれど、幅の太い部分は散乱光が強いため計測できなかった。

なお、標準試料の白石綿は、青石綿と比べて幅が不均一であり、細い部分ほど解像度が悪く、色合いが薄い場合が多いため、正確に幅を計測できていない可能性がある。

上記をふまえた屈折液1.68における写真計測法の結果は、表2及び図2に示す。分散染色法で繊維状粒子の白石綿は100本中91本（91%）が散乱

光を示し、最小幅の平均値は 0.88 ± 0.013 (mean \pm S.E) μm (標準偏差0.13, n=100)であった。また、直接観察法で計測された最小幅と比べると、分散染色法における最小幅の観測率は59~100%であった。

最小幅 $1.05 \mu\text{m}$ 未満で散乱光を示さなかった9本については、観測視野を約 $300 \mu\text{m}$ に絞って観察したため、散乱光を確認できなかった可能性が高い。例えば、図3の標準試料の白石綿を観察すると、画像Aでは最小幅 $0.92 \mu\text{m}$ であり、観測視野を約 $300 \mu\text{m}$ で観察した画像B1では、一部分のみ散乱光が確認され、最小幅 $0.78 \mu\text{m}$ と推定された。そして、観測視野を約 $100 \mu\text{m}$ にした画像B2では、解像度が高くなり、最小幅 $0.78 \mu\text{m}$ であることがわかった。

表2 白石綿の分布 (屈折液1.68)

直接観察法		分散染色法	
最小幅 [μm]	色 (検体数)	散乱光 (本数)	最小幅の範囲 [μm]
0.65	黒(6)	なし(2)	-
		あり(4)	0.52-0.65*1
0.78	黒(34)	なし(7)	-
		あり(27)	0.52-0.78
0.92	黒(45)	あり(45)	0.52-0.78
1.05	黒(9)	あり(9)	0.65-0.78*1
1.18	黒(1)	あり(1)	0.92
	白黒(1)	あり(1)	0.92
1.31	黒(3)	あり(3)	0.78-0.92
	白黒(1)	あり(1)	0.92

(計100本)(計91本捕そく)

* 1 : 強い散乱光のため測定不可の1本除く

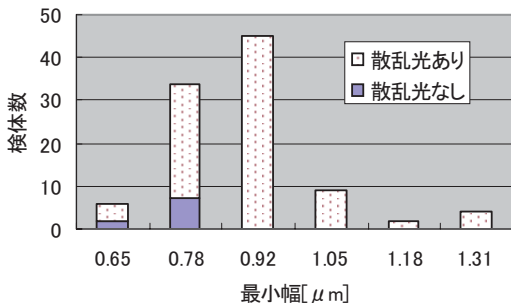


図2 白石綿の分布

(2) 屈折液1.55における白石綿の特性

実施例として、図4に白石綿(1本目)の画像A, B1(観測視野約 $300 \mu\text{m}$)及びB2(観測視野約 $100 \mu\text{m}$)を示す。ただし、白石綿は、細かい織

維が多く解像度が悪いいため、解像度の良好な局所的な部分の幅を計測し、分散色の有無を確認した。画像Aでは3点選択し、上部の幅の一部(白色)は $1.71 \mu\text{m}$ 、同じく、中間の幅の範囲(黒色)は $1.18 \sim 1.31 \mu\text{m}$ 、下部の幅の一部(白黒色)は $1.84 \mu\text{m}$ であった。画像B1では分散色を確認できず、画像B2では黒色の部分を除いて分散色を確認され、分散色を示す幅の一部(白色及び白黒色)は約 $1.05 \mu\text{m}$ であった。

白石綿が分散色を示すサイズについて検討した結果を表3に示す。直接観察法で幅 $1.05 \mu\text{m}$ 未満の白石綿は分散染色法において分散色を示さず、形状をまったく確認できなかった。分散色を示すサイズは、少なくとも直接観察法で幅 $1.05 \mu\text{m}$ 以上で白(白黒)色の白石綿であることが確認された。また、幅 $1.05 \mu\text{m}$ 以上で黒色の白石綿は分散色を示す可能性が低いこともわかった。

また、分散染色法では、直接観察法で計測された幅と比べて分散色を示す幅の観測率は57~80%であるため、正確に繊維状粒子のサイズを計測できなかった。

上記(1)の結果について再検討した場合、屈折液1.68で計測された100本中、最小幅に関わりなく、分散色を示す可能性の高い白(白黒)色で幅 $1.05 \mu\text{m}$ 以上の部分を有する白石綿は、計8本(8%)であったため、屈折液1.55では白石綿をほとんど捕そくできないことが推定された。

表3 白石綿の分散色を示す幅

白石綿 [本目]	直接観察法		分散染色法	
	色	幅[μm]	分散色	幅[μm]
1	白	1.71	赤紫	1.05
	黒	1.18-1.31	なし	-
	白黒	1.84	淡赤紫	1.05
2	白	1.18	橙	0.78
	黒	0.78-0.92	なし	-
3	白黒	1.31	青	1.05
	黒	1.18	青	0.92
4	白黒	1.31	橙	0.78
	黒	0.92-1.05	なし	-
5	白	1.31	青	1.05
	白黒	1.18	淡青	0.78
	黒	0.92-1.18	なし	-
6	白	1.18	橙	0.78
	白黒	1.05	淡橙	0.78
7	白	1.31	赤紫	0.92
	白黒	1.18	淡赤紫	0.78

3. 2 浮遊石綿の採取条件と分析結果（屈折液 1.68）

屈折液1.68及び1.55における白石綿の分析結果から浮遊石綿中の白石綿と青石綿を判別するためには、屈折液1.68を用いて、散乱光を示す繊維状粒子は白石綿として除外し、青石綿の分散色を示すか、その形状を確認できなくなった繊維状粒子は青石綿として分類できることがわかった。

浮遊石綿の採取条件と屈折液1.68における分散染色法の結果は表4に示す。各フィルターについて繊維状粒子が50本以上になるまで視野を移動させて計数し、また、計測に当たっては直接観察法で幅が1μm以上と推定された場合は分散染色法で観測視野を約100μmとし、幅1μm未満の黒色の繊維状粒子については観測視野を約300μmとして観測した。

第1回目の採取条件では、青石綿が3～14%捕そくされ、54～94%を見落としていた。全体として、散乱光を示す繊維状粒子を除くと、216本中20本（8.4%）が分散色を示した。最小幅を基にした写真計測法の結果については、報文1に詳しく記載しており、分散色を示さない原因として、粒子の付着及び散乱光の影響が確認された。

第2回目の採取条件では、青石綿が0～2%捕そくされ、92～98%を見落としていた。全体として、散乱光を示す繊維状粒子を除くと、147本中2本（1.3%）が分散色を示した。また、最小幅を基にした写真計測法の結果を表5及び図5に示す。散乱光を示す繊維状粒子を除く、浮遊青石綿の最小幅の平均値は0.89±0.015（mean±S.E）μm（標準偏差0.17, n=149）であった。

図6～9では、フィルター1～4で採取した青石綿の画像を示す。分散色を示す範囲から計測された画像A1の最小幅はいずれも1.31μm、色は白色であり、青石綿の分散色を確認した。

フィルター1及び2で観測視野を約300μmとした画像B1の青石綿は、橙色で最小幅0.65μm、フィルター3の画像B1は淡橙色で最小幅0.65μm、そして、フィルター4のB1では分散色の観測が困難となり、観測視野を約100μm近くまで絞らなければ、橙色で最小幅0.65μmを有する青石綿を確認できなかった。

フィルター1から3と4の違いは捕集空気量が

増えたことによって、分散色の確認を阻害する粒子の影響が大きくなったことを示した。つまり、第1回目の結果と同じく石綿が分散色を示さなくなった原因は、粒子の付着及び散乱光の影響であることが確認された。

以上の結果より、室内の石綿除去現場において、分散色を示す石綿が適切に捕そく可能な捕集空気量は、160L以下であることが示唆された。

表4 浮遊石綿の採取条件と分析結果

フィルター	直接観察法		分散染色法		
	繊維状粒子数 (視野数)	分散色あり (捕そく率)	分散色なし (捕そく率)	散乱光あり (捕そく率)	
第1 回目	1	50本(30)	7本(14)	27本(54)	16本(32)
	2	51本(32)	3本(5)	44本(86)	4本(7)
	3	53本(10)	6本(11)	46本(86)	1本(1)
		57本(9)	2本(3)	54本(94)	1本(1)
		50本(10)	2本(4)	45本(90)	3本(6)
合計	261本 (91視野)	20本(7%)	216本 (82%)	25本(9%)	
第2 回目	4	50本(7)	1本(2)	48本(96)	1本(2)
		53本(7)	1本(1)	52本(98)	0本(0)
		51本(6)	0本(0)	47本(92)	4本(7)
	合計	154本 (20視野)	2本(1%)	147本 (95%)	5本(3%)

表5 フィルター4の浮遊青石綿

直接観察法		分散染色法	
最小幅 [μm]	色 (検体数)	分散色 (本数)	最小幅 [μm]
0.65	黒(14)	なし(14)	-
0.78	黒(53)	なし(53)	-
0.92	黒(53)	なし(53)	-
	白黒(1)	なし(1)	-
1.05	黒(14)	なし(14)	-
	白黒(2)	なし(2)	-
1.18	白黒(4)	なし(4)	-
	白(2)	なし(2)	-
1.31	白(5)	なし(4)	-
		橙(1)	0.65
2.10	白(1)	ピンク(1)	0.92

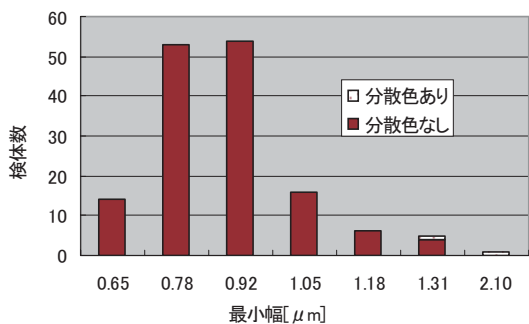


図5 フィルター4の浮遊青石綿

4. おわりに

分散染色法では、直接観察法と比べて石綿の正確なサイズを計測できず、また、分散色を示す石綿のサイズは1.05 μm以上であった。そして、青

石綿と比べて白石綿はサイズが小さい場合が多く、白石綿は分散色を確認できない可能性が高いことが示唆された。

また、捕集空気量が増えるほど、粒子の付着及び散乱光の影響が大きくなり、分散色の確認が困難になるため、石綿の含有の有無を判定できない場合があった。

その他、分散染色法による建材中の石綿分析においても粒子の影響は懸念される。そのため、粒子の影響を減らすために、試料作製段階からスライドガラス上に滴下した試料にさらに無じん水を加えて、試料の面積を広げることも場合によっては必要と考えられる。

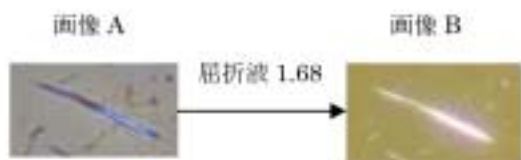


図1 白石綿の散乱光

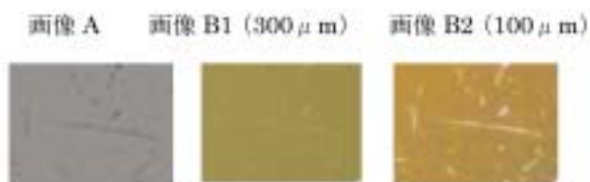


図3 白石綿の散乱光

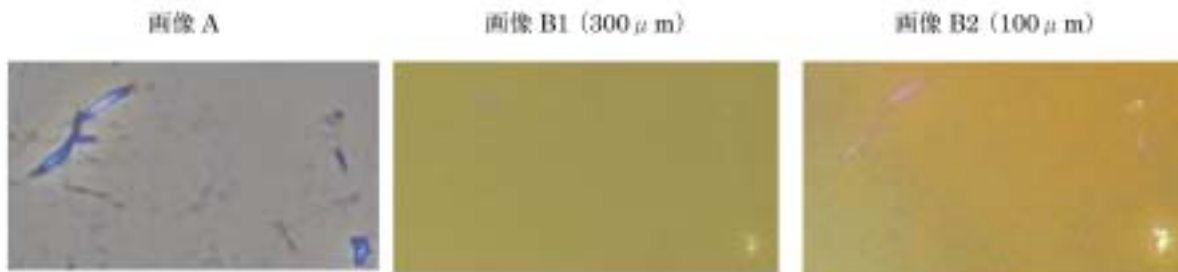


図4 白石綿（1本目）の分散色

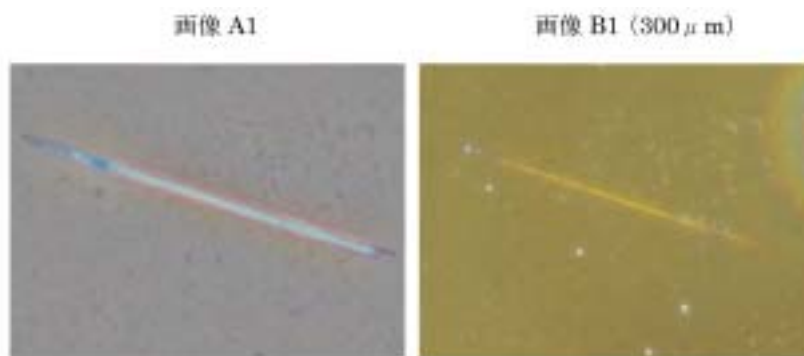


図6 青石綿の分散色（フィルター1）

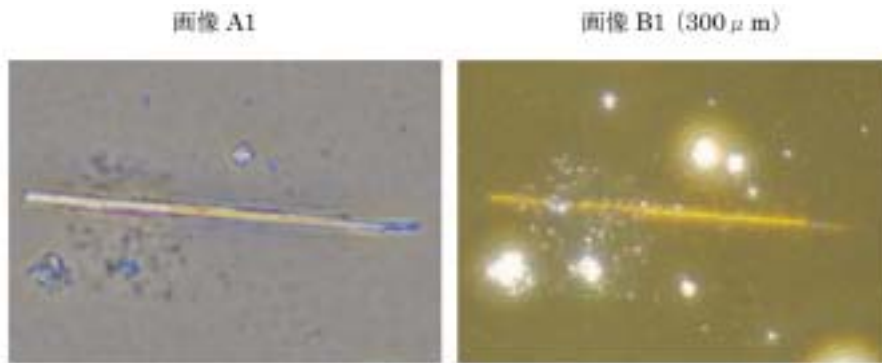


図7 青石綿の分散色（フィルター2）

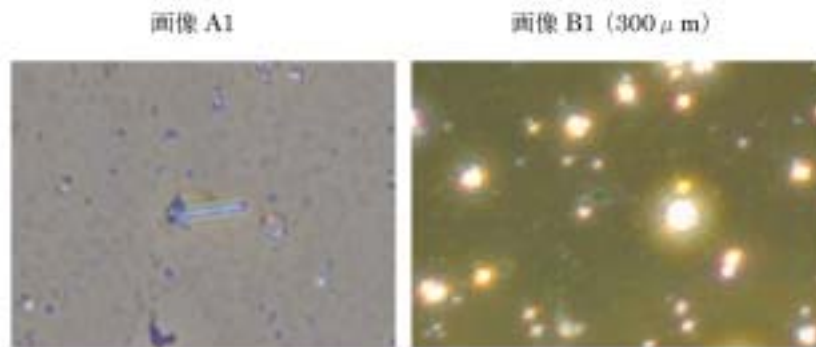


図8 青石綿の分散色（フィルター3）

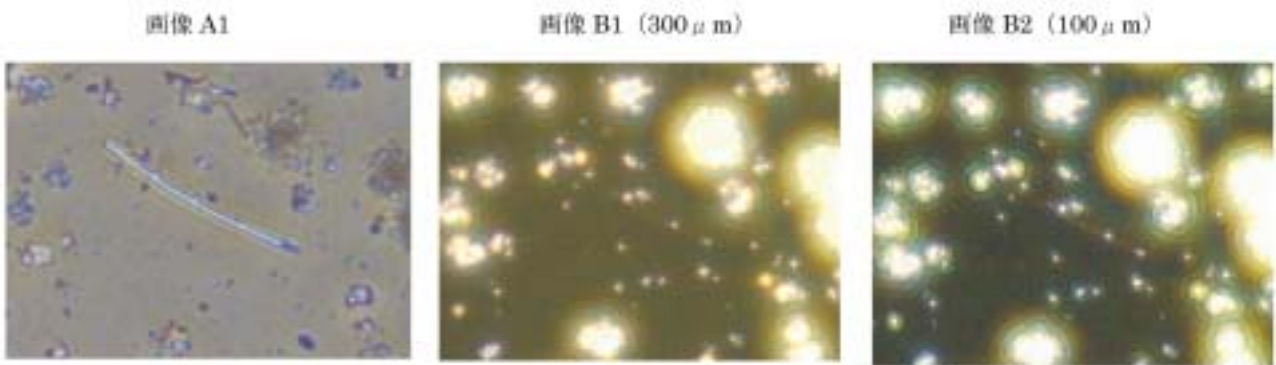


図9 青石綿の分散色（フィルター4）

5. 参考資料

- 1) 環境省水・大気環境局大気環境課：アスベストモニタリングマニュアル（第3版），2007
- 2) 財団法人規格協会：建材製品中のアスベスト含有率測定方法（JIS A1481），2006
- 3) 池澤正幸，武市佳子，山村貞雄：石綿分析のための光学顕微鏡法，高知県環境研究センター所報，22，15-22，2005
- 4) 池澤正幸，邑岡和昭：位相差・分散顕微鏡に

- よる石綿分析の有効性，第34回環境保全・公害防止研究発表会講演要旨集，2007
- 5) 高知県環境研究センターホームページ，第34回環境保全・公害防止研究発表会での発表スライド及び要旨，
<http://www.pref.kochi.jp/~kankyou/research/kankoubutu.html>

(資料)

1. 写真計測法の精度について

1. 1 対物マイクロメータ

対物マイクロメータ〔株ニコン製〕の1目盛りは $10\mu\text{m}$ と規定されているため、写真計測法でその精度を確認する。

位相差及び分散顕微鏡の設定で、接眼レンズ内のアイピースグレイテイクル（1目盛り $3\mu\text{m}$ 及び $5\mu\text{m}$ ）を用いて、対物マイクロメータに示された各線の中心部分を基準に、線と線の間を1目盛りとして計測したところ、約 $10\mu\text{m}$ であることが確認できた。

次に、それらの顕微鏡の設定で対物マイクロメータの目盛りを写真撮影した。JPEGファイルで保存したその画像の幅と高さは、それぞれ1280ピクセルと960ピクセルであった。その画像は何も処理せずにプリンタ〔EPSON PX-G 930, セイコーエプソン(株)製〕を用いてA4サイズの写真用紙〔デジカメ写真用紙光沢, コクヨ(株)製〕でカラー印刷をした。

その用紙には、対物マイクロメータの各線が端から端まで計35個印刷されており、各線の中心部分をペンで印をつけて目安とした後、線と線の間を1目盛りとしてスケールルーペ（1目盛り 0.1mm , 倍率7倍の精密ドッキングスケールルーペ, 株エッセンバツハ光学ジャパン製）で計34目盛りを測定した。

なお、スケールルーペの精度については、直尺シルバー〔1目盛り 0.5mm , 長さの許容差 $150\text{mm}\pm 0.15\text{mm}$, シンワ測定(株)製〕で計測し、ばらつきがないことを確認して使用した。

その結果、写真計測法における対物マイクロメータの1目盛りの平均値は、位相差顕微鏡で 7.6 ± 0.015 (mean \pm S.E) mm (n=34, 標準偏差0.089), 分散顕微鏡で 7.6 ± 0.012 (mean \pm S.E) mm (n=34, 標準偏差0.069) であり、位相差・分散顕微鏡で観察される対物マイクロメータの1目盛り $10\mu\text{m}$ は、写真計測法で 7.6mm に相当するため、それらの値を換算係数として利用することにした。

1. 2 位相差・分散顕微鏡で観察した大きさと写真計測法との比較

位相差・分散顕微鏡で観察される対物マイクロ

メータの1目盛り $10\mu\text{m}$ と、写真計測法で得られた 7.6mm を基準にした換算係数を実際に利用して、その精度を確かめる。

対物マイクロメータの各線の幅は、位相差・分散顕微鏡の設定で観察した場合、どちらも約 $3\mu\text{m}$ の幅をもち、その線は計35本であった。それらの線について写真計測法を用いて検討し、換算係数を利用することで、幅約 $3\mu\text{m}$ の精度を満たすかどうかを調べる（小数点3桁目以降は切り捨て）。

写真計測法で求めた線の幅の平均値を換算係数により求めたところ、位相差顕微鏡で 3.26 ± 0.013 (mean \pm S.E) μm (n=35, 標準偏差0.080), 分散顕微鏡で 2.63 ± 0.014 (mean \pm S.E) μm (n=35, 標準偏差0.086) の大きさであったことから、顕微鏡内で観察された幅約 $3\mu\text{m}$ の大きさを満たす精度が写真計測法にあった。また、位相差顕微鏡の平均値と比べると分散顕微鏡での観測率は80%であった。

ただし、分散顕微鏡で計測した線の幅は、黄色に発色した部分のみであり、黄色の周囲にみられた黒色の輪郭部分は除外した。参考までに、黒色の部分を含めた線の幅を求めた場合、 3.57 ± 0.012 (mean \pm S.E) μm (n=35, 標準偏差0.073) であり、観測率109%であった。

1. 3 写真計測法の検出限界について

HSE/NPL検出限界試験用スライドを写真計測法で観察して検出限界を調べる。

そのスライドに示されたグループ1（幅 $1.08\mu\text{m}$ ）から7（幅 $0.25\mu\text{m}$ ）で分類された7つのグループのうち、位相差顕微鏡で確認できたのはグループ5（幅 $0.44\mu\text{m}$ ）までが限界であった。

写真計測法では、写真用紙に印刷されたグループ5（幅 $0.44\mu\text{m}$ ）までは目視にて確認できたことから、位相差顕微鏡と同等の検出限界があることがわかった。

ただし、スケールルーペで写真用紙に印刷された各グループの線を観察した場合、線の幅は不均一で、線の輪郭は非常にうすく、グループ1においても正確に線の幅は計測できなかった。