

## 位相差・分散顕微鏡による石綿分析の有効性\*

池澤正幸\*\*・邑岡和昭\*\*

キーワード ①石綿(アスベスト) ②青石綿(クロシドライト) ③分散染色法

### 要 旨

位相差・分散顕微鏡により、分散色を示す石綿のサイズを明らかにすることで公定法の有効性を検証するため、直接法と間接法を用いて比較検討を行った。

直接法では、スライドガラス上で乾燥させた石綿にカバーガラスをかぶせ、位相差顕微鏡で石綿のサイズを直接計測する方法(以下「直接観察法」という)。次いで直接観察後のカバーガラス内に屈折液を浸透させた後、直接観察時と同じ視野における石綿のサイズの測定および分散色の有無を分散顕微鏡にて観測した。

間接法では、直接法で観察された石綿のサイズを詳しく計測するために、直接法による観察時に保存した石綿の画像をA4サイズの写真用紙にカラー印刷し、スケールルーペでその写真上の石綿のサイズを調べて顕微鏡内で計測するサイズに換算した(以下「写真計測法」という)。

その結果、直接観察法では幅1 $\mu\text{m}$ 未満の細い石綿を観察することができたが、石綿が分散色を示すサイズは幅1 $\mu\text{m}$ 以上であり、浮遊石綿の分散色をほとんど確認することができなかった。

### 1. 目 的

建材中に含まれる石綿の分析方法の一つとしては、石綿の屈折率に近い屈折液を用いて位相差・分散顕微鏡により石綿に特有の分散色を観察する、いわゆる分散染色法<sup>1)</sup>があり、公定法に採用されている。また参考法として、平成19年5月から大気環境中の浮遊石綿の濃度を定量する方法<sup>2)</sup>にも利用されるようになった。

しかし、分散染色法ではサイズの小さい石綿の分散色は確認できないことがあるため、その原因を明らかにするとともに建材中および大気環境中の石綿のサイズをどれだけ捕そくできるのかを検証する必要がある。

ここでは、位相差・分散顕微鏡による石綿分析の有効性を調べるために、分散染色法で石綿が分散色を示す最小のサイズを調べ、計測可能な石綿のサイズの範囲について知見を得たので報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 位相差・分散顕微鏡：Nikon 製 ECLIPSE80i 〔株ニコン製〕

位相差用または分散用対物レンズは、倍率40倍で開口数0.75を用いた。また、接眼レンズは倍率10倍を用い、その一方にはアイピースグレイティクルを装着した。

\*Analytical Validity of Asbestos by Dispersion Staining Polarized Microscopy

\*\*Masayuki IKEZAWA, Kazuaki MURAOKA(高知県環境研究センター)Kochi Prefectural Environmental Research Center

## 2.2 位相差・分散顕微鏡の設定

- (1) 光路切替レバーはBINO。ただし写真撮影時はPHOTO。
- (2) 透過照明(緑色の照明スイッチ)はOFF。ただし写真撮影時はON。
- (3) 調光ボリュームは光量を最大にした。
- (4) 光量調整用フィルターの「ND 8」と「ND 32」はOFF。
- (5) 視野絞りノブを用いて観察視野をアイピースグレイティクルの直径 $300\mu\text{m}$ もしくは $100\mu\text{m}$ の外側まで絞った。
- (6) 位相差顕微鏡の設定は「NCB11」をINにし、位相差用(DLL40×)対物レンズを使用。
- (7) 分散顕微鏡の設定は「NCB11」をOUTにし、分散用(D40×)対物レンズを使用。

## 2.3 石綿試料

標準試料には、青石綿 [クロシドライト標準試料(JAWE331), (社)日本作業環境測定協会] を用いた。また、浮遊する石綿のサイズ分布を調べるために、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)から採取した浮遊青石綿を使用した。

それらの石綿試料は、位相差・分散顕微鏡で観察する前に次に示す前処理を行った。

### (1) 標準試料の前処理

標準試料は粉碎してふるい( $425\mu\text{m}$ )を通した後、青石綿約3mg, 無じん水約60gをコニカルビーカー内に入れ、超音波処理を30分間行った。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試料を約 $15\mu\text{l}$ 採取し、清拭したスライドガラス上に滴下して、ホットプレート(約 $50^\circ\text{C}$ )上で乾燥させた。

### (2) 浮遊青石綿の前処理

室内環境中の浮遊青石綿はメンブランフィルター(MILLIPORE製セルロース混合エステル)に吸引採取後、その採取面を下にしてスライドガラス上に置き、アセトン蒸着して透明化した試料を低温灰化装置(Yanaco製 PLASMA ASHER LTA-104)で灰化处理(出力80W, 酸素流量 $80\text{ml}/\text{min}$ , 5h)した。

## 2.4 直接観察法

前処理した石綿試料上に清拭したカバーガラスをかぶせ、その両端をテープで固定した後、位相

差顕微鏡の設定で長さ $5\mu\text{m}$ 以上、幅 $3\mu\text{m}$ 未満およびアスペクト比3以上の繊維状粒子の青石綿を選択し、顕微鏡の位置(X軸・Y軸)を記録して、その画像を保存した(画像A)。

## 2.5 分散染色法

直接観察法で観察した試料のカバーガラスにはりつけたテープをはずし、カバーガラスのすき間にカーギル標準屈折液 $1.6800\pm 0.0002$ (以下「屈折液1.68」という)を十分に浸透させてから、直接観察法で観察した位置(X軸・Y軸)と同じ視野に移動し、分散顕微鏡の設定で石綿の分散色の有無を観察して、その画像を保存した(画像B)。

石綿の分散色の観察にはアナライザを併用し、屈折液1.68で橙色またはピンク色が確認された場合に青石綿と判定した<sup>3)</sup>。

## 2.6 写真計測法

顕微鏡内で計測可能な最小目盛り $3\mu\text{m}$ より細かい石綿のサイズ分布の計測は写真計測法によった。

青石綿の分散色が認められた場合は「分散色あり」と判断し、スケールルーペ(1目盛り $0.1\text{mm}$ )を用いて、画像AおよびB( $1280\times 960$ ピクセル)の写真から分散色に該当する範囲の最小幅をそれぞれ求めた。

一方、青石綿の分散色が認められなかった場合は「分散色なし」とし、画像Aの写真から最小幅を求めた。ただし、最小幅を求めるにあたっては、できるだけ解像度が高く粒子の付着が確認されない部分を選択するよう考慮した。

なお、基準の尺度とした対物マイクロメータ(1目盛り $10\mu\text{m}$ )は、画像AおよびBの写真の両方において1目盛りの平均値が約 $7.6\text{mm}$ (画像Aの標準偏差0.089, 画像Bの標準偏差0.069,  $n=34$ )であったので、その値を換算係数として石綿の最小幅を求めた(小数点3桁目以降は切り捨て)。

その他画像Aの写真に示された石綿の色(白, 白黒, 黒)と画像Bの写真に示された分散色の濃淡の違いも観察して分類した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 標準試料の青石綿

図1に標準試料の青石綿の画像A(直接観察法)

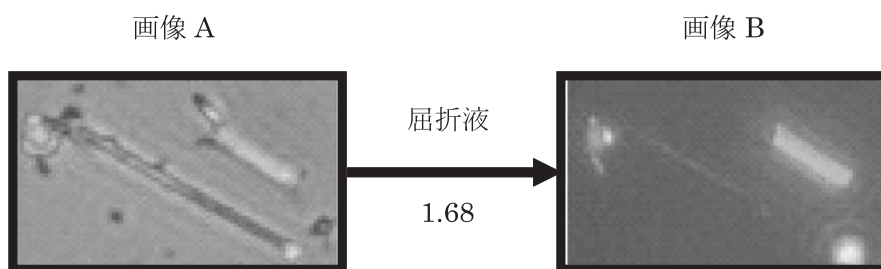


図1 標準試料の青石綿の画像 A および B

および B(分散染色法)を示す。画像 A では白色の青石綿(幅 $2.63\mu\text{m}$ )と、上部が白黒色(最小幅 $1.05\mu\text{m}$ )で下部が黒色(幅 $1.05\mu\text{m}$ )の青石綿の計 2 本が確認された。写真計測法では前者は解像度が悪く最小幅がわからないため計数せず、計数可能であった後者の白黒色の青石綿は画像 B より最小幅 $0.53\mu\text{m}$ の淡橙色とした。

写真計測法の結果は表 1 と図 2 に示す。分散色を示した繊維状粒子の青石綿は、100本中58本(58%)であり、最小幅の平均値は $1.04\pm 0.019$  (mean $\pm$ S.E) $\mu\text{m}$ (標準偏差 $0.19$ ,  $n=100$ )であった。

直接観察法では最小幅 $0.65\mu\text{m}$ まで計測され、 $0.92\mu\text{m}$ 以下の細い青石綿は黒色であり、分散染色法において分散色はなく、その形状も確認されなかった。

一方、直接観察法では最小幅 $1.05\mu\text{m}$ より大きくなるほど青石綿は白色となり、分散染色法では分散色が確認され分散色を示す青石綿の発色率も高く、色合いが濃くなる場合が多かった。そして、最小幅 $1.05\mu\text{m}$ 以上で黒色または白黒色の青石綿においては分散色を示さない場合があった。

また、分散染色法では、直接観察時の最小幅と、比べた最小幅の観測率が39~61%と低くなるため、分散染色法では繊維状粒子に該当するかどうかの正確なサイズを判別できないことが示された。

その他、図 3 の画像 A1~3 で同じ最小幅 $1.31\mu\text{m}$ を持つ白色の青石綿の場合、画像 B1 で淡橙色、画像 B2 で橙色、画像 B3 でやや濃い橙色で分散色の濃淡の違いがあり、分散色の見えやすさも異なることがわかった。

表 1 写真計測法の結果

直接観察法		分散染色法		発色率 [%]
最小幅 [ $\mu\text{m}$ ]	色(本数)	分散色(本数)	最小幅の範囲 [ $\mu\text{m}$ ]	
0.65	黒(5)	なし(5)	—	0
0.78	黒(17)	なし(17)	—	0
0.92	黒(16)	なし(16)	—	0
1.05	黒(5)	なし(2) 淡橙(3)	— 0.52-0.65	83
	白黒(10)	なし(1) 淡橙(9)	— 0.52-0.65	
	白(3)	淡橙(2) 橙(1)	0.52 0.52	
1.18	白黒(9)	なし(1) 淡橙(8)	— 0.52-0.65	96
	白(23)	淡橙(7) 橙(16)	0.52-0.65 0.52-0.65	
1.31	白黒(1)	淡橙(1)	0.65	100
	白(11)	淡橙(3) 橙(8)	0.52-0.78 0.65	

(計100) (計58)

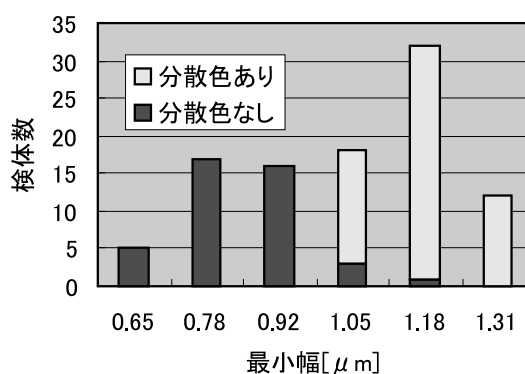


図2 最小幅と分散色の有無

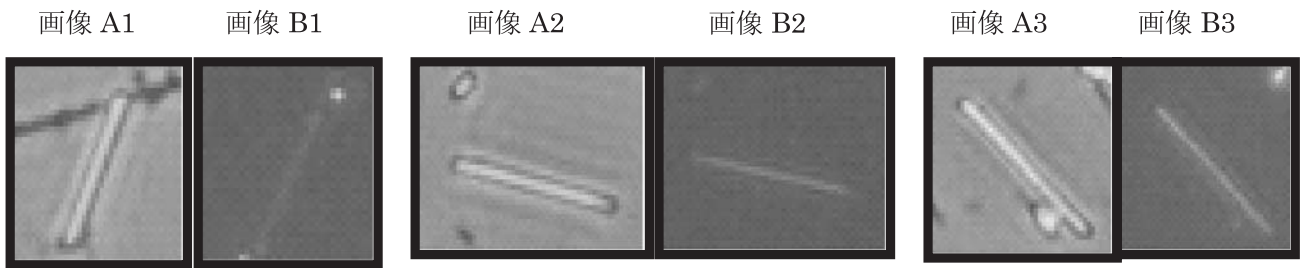


図3 分散色の濃淡の違い

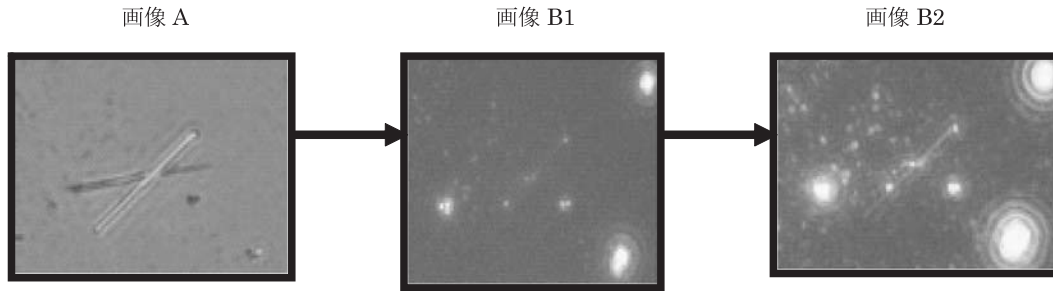


図4 画像 A および B(視野約300 $\mu\text{m}$ と100 $\mu\text{m}$ )

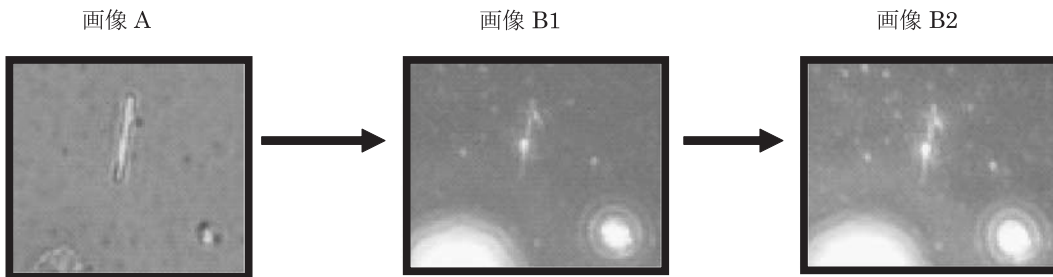


図5 画像 A および B(視野約300 $\mu\text{m}$ と100 $\mu\text{m}$ )

表2 写真計測法の精度

顕微鏡内観測		写真計測法	
幅 [ $\mu\text{m}$ ]	長さ [ $\mu\text{m}$ ]	最小幅 [ $\mu\text{m}$ ]	長さ [ $\mu\text{m}$ ]
< 1	5	0.78	5.92
< 1	5	0.78	5.00
< 1	6	0.78	6.57
< 1	6	0.65	6.31
< 1	約7	0.78	7.23
< 1	約7	0.65	7.50
約1	9	1.05	8.94
< 1	12	0.65	12.76
< 1	15	0.92	15.52
約1	約17	1.05	16.05
約1	25	1.05	26.31
< 1	38	0.78	38.15

### 3.2 浮遊青石綿

始めに表2では、写真計測法の精度について確かめた結果を示す。直接観察法における顕微鏡内観測では、接眼レンズに付いたアイピースグレイテイクル(目盛り3 $\mu\text{m}$ および5 $\mu\text{m}$ )を用いて浮遊青石綿の幅と長さを記録し、その中から写真計測法にて付着粒子が少なく直線性および解像度の高い浮遊青石綿を12本選択して最小幅と長さを記録して比較した場合、その精度は良好であった。

また分散染色法で分散色を確認する場合には、視野絞りノブによって視野を約100 $\mu\text{m}$ の外側まで絞ることが必要であることがわかった。図4画像Aの白色の青石綿は、約300 $\mu\text{m}$ の外側まで視野を絞った場合(画像B1)、その分散色はほとんど確認できなかった。しかし約100 $\mu\text{m}$ の外側まで視野を絞った場合(画像B2)、青石綿の全体の分散色が明瞭に確認できた。

さらに、**図5**画像Aに示す最小幅 $1.05\mu\text{m}$ の青石綿は、画像B1で最小幅 $0.78\mu\text{m}$ (観測率74%)、画像B2で最小幅 $0.92\mu\text{m}$ (観測率87%)となり、

表3 写真計測法の結果

直接観察法		分散染色法		発色率 [%]
最小幅 [ $\mu\text{m}$ ]	色(本数)	分散色(本数)	最小幅の範囲 [ $\mu\text{m}$ ]	
0.65	黒(25)	なし(25)	—	0
0.78	黒(85)	なし(85)	—	0
0.92	黒(77), 白黒(1)	なし(78)	—	0
1.05	黒(12)	なし(12)	—	31
	白黒(3)	なし(2) 淡橙(1)	0.65	
	白(7)	なし(1) 淡橙(3) 橙(3)	0.65 0.65-0.92	
1.18	黒(2)	なし(2)	—	30
	白黒(6)	なし(6)	—	
	白(5)	なし(1) 淡橙(2) 橙(2)	0.65 0.65-0.78	
1.31	白(7)	なし(2) 淡橙(3) 橙(2)	— 0.65 0.65	71
1.71	白(4)	なし(2) 橙(2)	— 0.65-0.78	50
1.84	白(1)	橙(1)	0.65	100
1.97	白(1)	淡橙(1)	0.92	100
(計236)		(計20)		

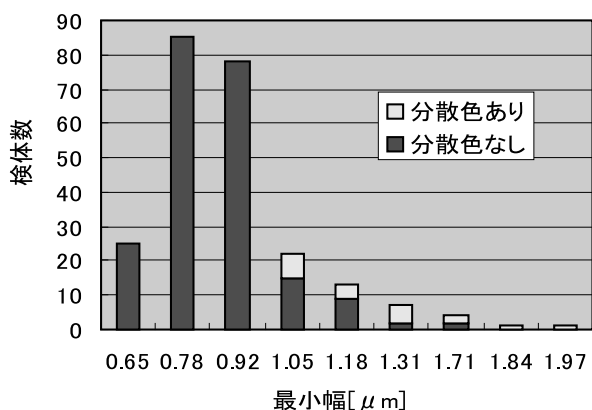


図6 最小幅と分散色の有無

解像度および観測率の改善が見られた。

**表3**および**図6**では、上記を踏まえた写真計測法の結果を示す。分散色を示した浮遊青石綿は、236本中20本(8.4%)であり、最小幅の平均値は、 $0.90\pm 0.013$ (mean $\pm$ S.E.) $\mu\text{m}$ (標準偏差0.20, n=236)。分散染色法で観察できた最小幅の割合は、直接観察時の最小幅と比べると、観測率35~87%であった。なお、分散染色時に分散色とは異なる散乱光を示した25本はその結果から除外した。

標準試料の青石綿と同様に、直接観察法では最小幅 $0.65\mu\text{m}$ まで計測され、 $0.92\mu\text{m}$ 以下の細かい青石綿は黒色であり、分散染色法において分散色はなく、その形状も確認されなかった。

一方、直接観察法では最小幅 $1.05\mu\text{m}$ より大きくなるほど青石綿は白色となり、分散染色法において分散色が確認されたが、標準試料より発色率が低かった。また、最小幅 $1.05\mu\text{m}$ 以上で白色の青石綿において、分散色を示さない場合が見られた。

分散色を観察できない原因として、**図7**では、画像A1~2で最小幅 $1.31\mu\text{m}$ の白色の青石綿を観察した場合、画像B1~2において粒子の付着による影響と、粒子による強い散乱光(ハロ)の影響によって分散色が確認できないことがわかった。これは、**表3**の最小幅 $1.71\mu\text{m}$ で分散色を示さなかった2本の青石綿についても同様の影響が確認された。なお、青石綿があるかどうか分からない場合は、分散染色時に分散用対物レンズを位相差用対物レンズに切り替えて位相差観察(画像B2)を行うと青石綿の形状を確認できる場合が多かった<sup>3)</sup>。

その他、分散色の観察が困難になる要因として分散色の濃淡の違い以外に、**図8**では画像A1~3で最小幅 $1.05\mu\text{m}$ の白色の青石綿を観察した場合、画像B1~3のように分散色の配色の違いによって分散色の見えやすさが異なることがわかった。とくに明るい黄みを帯びた橙色(画像B3の下部)は分散色を確認しやすいが、暗く赤みを帯びた橙色(画像B2)は確認が困難であった。

#### 4. まとめ

分散染色法の問題点として幅 $1\mu\text{m}$ 未満の石綿

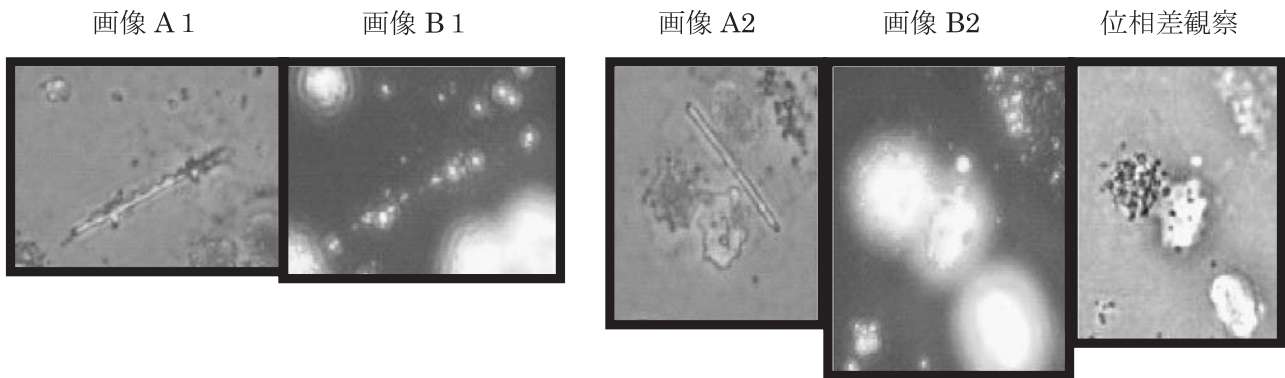


図7 分散色を観察できない例

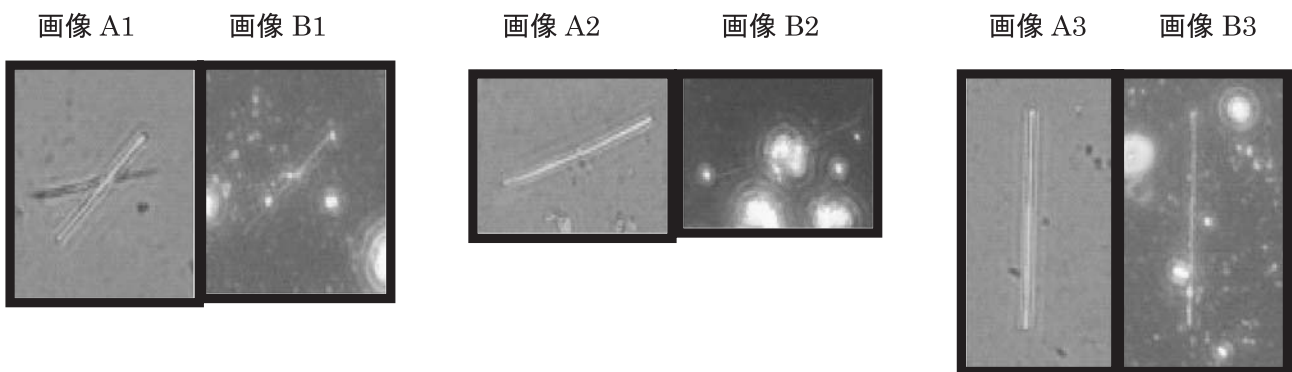


図8 分散色の配色の違い

は分散色を示さないこと、また、直接観察法と比べると最小幅の観測率が35～87%と低くなるため、繊維状粒子の正確なサイズが判断できないことがわかった。分散色を示す標準試料の青石綿を計数できた割合は58%、浮遊青石綿では8.4%であった。

また、幅1 $\mu\text{m}$ 以上の石綿は分散色を示す可能性が高いことがわかった。そして分散色を観察できない原因として、粒子の付着および散乱光の影響が確認された。さらに、分散色を見えにくくする要因として分散色の濃淡及び配色の違いがあることが示された。

石綿の定性ができない直接観察法の利点としては、幅0.65 $\mu\text{m}$ 以上の石綿を計数できるだけでなく分散染色法では計数できなかった91.6%の浮遊青石綿も観測することができた。また、直接観察時に繊維状粒子のサイズと色から分散色を示すかどうかとも推測可能である。

その他、室内環境中の浮遊青石綿を採取したメンブランフィルターをエネルギー分散型X線分析装置の付いた走査型電子顕微鏡(日立走査型電

子顕微鏡S-3400N)で観測した場合、最小幅0.65 $\mu\text{m}$ 以上1.05 $\mu\text{m}$ 未満の繊維状粒子7本中7本が青石綿、最小幅1.05 $\mu\text{m}$ 以上の繊維状粒子4本中4本が青石綿であることを確認した。

また、青石綿の屈折率とは異なるカーギル標準屈折液1.5500 $\pm$ 0005を用いて、最小幅0.65 $\mu\text{m}$ 以上1.05 $\mu\text{m}$ 未満の黒色の青石綿を分散染色法で観測した場合、青石綿は散乱光を示すため確認できる場合が多く、直接観察時のサイズと同じ観測率100%で計測できる場合があることがわかった。

(本内容のカラー図をご入用の方は、当センターまでご連絡ください)

#### 一文 献

- 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

(平成19年11月8日，第34回環境保全・公害防止研究発表会にて発表)