

海産微細藻類による数種の微量金属の生物濃縮へのPIXE 分析の適用

岩田吉弘、佐藤専、佐々木裕美子、伊藤亮、倉町宏治

秋田大学教育文化学部

010-8502 秋田市手形学園町1-1

1 序

海洋における化学元素の挙動に対する生物の影響が大きいことが明らかになってきた^{1,2)}。そして移動に対する定量的な記述や機構の解明がいま研究されはじめている。そのような研究に対する一つのアプローチは海水、海洋堆積物そして生物の多元素分析を含む。そして多くの研究の中で、様々な海洋生物の元素が定量され、分析結果はいくつかの成書に集積されている⁴⁾。藻類中の元素存在量は、海水から藻類が全ての栄養を直接海水から得ていることと、藻類が海洋における第一次生産者である点から大変興味深い。しかしながら、海産藻類中の一連の主要、少量および微量元素の定量に関する系統的な研究はほとんど行われていなかった。我々は、海産の大型藻類である *Laminaria religiosa* (ホソメコンブ) 中の35種類の元素存在量を放射能利用分析によって示した⁵⁾。しかしながら、海水から海藻への化学元素の移動に対する、濃縮係数を含む定量的な記述は行えなかった。大型海藻の生息域の海水に含まれる化学元素の存在量をその研究で示すことができなかつたためである。海水の微量分析は生物体に対するよりはるかに困難である。

一方、研究施設で自然を再現する別のアプローチがある。生物の種類や培養液の組成が人工環境中では明らかであり、それらは容易にコントロールできる。しかし、数グラムの分析試料が多元素同時定量に必要とされた。したがって分析試料を得るために大規模な培養装置が必要とされる。放射性同位体を利用する方法はこの問題の一つの解決法である。しかしながら生物濃縮に利用できる放射性同位体の種類が限られ、特別な施設が必要である。

粒子励起X線分光 (PIXE) は多元素分析に対する強力なツールである。2-3MeV のプロトン照射により最も高い感度を得られ⁶⁾、有機体の薄いフィルム状に含まれる、ほとんどの生体必須元素に対して、0.1-4ncm²の感度がある⁷⁾。ここでは1mg 以下の分析試料が多元素分析に必要とされる。PIXE はフィルム上にろ過された微細藻類の微量分析に適しているにもかかわらず、PIXE の微細藻類への適用の研究はわずかしかない⁸⁾。以前の研究で我々は単細胞緑藻類の *Nannochloropsis sp.* および珪藻類の *Phaeodactylum sp.* を栄養強化海水で培養した。PIXE はこれら藻類の多元素分析に適用され、亜鉛と鉛の生物濃縮が測定された^{9,10)}。

海水中の遷移元素の濃度はきわめて低く、そして栄養塩の存在量もしばしば乏しい。生物学や水産学で用いられるほとんど全ての培養液は藻類が良く育つように、豊かな栄養塩と生体必須元素を含んでいる。以前の我々の研究で用いた培養液は多量の栄養塩、たとえば0.17μMのFe³⁺と650μMのNO₃⁻を沿岸海水に添加して調製している。沿岸海水中の遷移元素の濃度は変動しやすく、そして海水中の遷移元素の濃度の決定

は容易ではない。本研究では、我々はキレート樹脂を用いて多種類の遷移金属を除去することで海水を精製し、そして標準溶液からの既知量の元素をその精製海水に加えた。生体必須元素の鉄と亜鉛および有毒なカドミウムの生物濃縮がこの新しい培養液中で検討された。

2 実験

2.1 装置と試薬

Fe^{3+} 、 Zn^{2+} および Cd^{2+} の標準溶液は、99.99+% 以上の純度を持つ高純度試薬を4M硝酸に溶解して調製した。標準溶液中の硝酸濃度は、最終的に Fe^{3+} に対して1.0M、 Zn^{2+} および Cd^{2+} に対して0.1M に調整した。他の化学試薬は特級、水はMilli-Q水を用いた。全てのガラス器具は120℃、2時間の乾熱滅菌を行った。全ての開放系での操作はUVランプおよび60%エタノールで消毒したクリーンベンチ内で行った。

2.2 海産微細藻類の培養

Nannochloropsis sp. と *Phaeodactylum sp.* は岩手県釜石市の岩手県海洋技術センターから得た。*Phaeodactylum sp.* の細胞の形は紡錘形で、長さは約20 μm 、幅は約6 μm であった。*Nannochloropsis sp.* は球形で直径2 - 4 μm であった。海水は岩手県釜石市の太平洋岸から採取し、0.5 μm のフィルターハウジングでろ過した。海水からの遷移金属の除去のためにキレート樹脂(Chelex-100、ドライメッシュ100-200、交換容量0.4 meq/mL、BIO-RAD製)を通した。樹脂はあらかじめ定沸点塩酸と水で洗浄した。カラムサイズは1.5 cm x 10 cm (エコノカラム、BIO-RAD製)で、樹脂の量は7.5 mLとし、海水のpHは1.0M水酸化ナトリウムで9.0に調整した。精製海水は流速5 mL/minのイオン交換クロマトグラフィーで調製した。最初の5L(pH<8.5)を捨て、その後の5Lを培養に使った。培養液は2種類の栄養塩、5種類の生体必須元素、3種類のビタミン、EDTA およびpH緩衝剤のHEPESを含むPES¹¹⁾を海水に添加して調製した。耐熱ねじ口ビン(500mL、DURAN)に200mLの海水と0.4mLのPESの保存溶液を加える。全体の体積の20%の水をさらに加える。水酸化ナトリウムあるいは塩酸を用いて、培養液のpHを7.8から8.0に調整した。使用直前に2気圧、120℃で2時間の加圧滅菌を行った。20mLの海産藻類の保存溶液を新しい培養液に移し、22.0℃、6000luxで静置培養した。細胞数は血球計算版と光学顕微鏡を用いて計数した。

2.3 海産藻類のPIXE分析

Fe^{3+} 、 Zn^{2+} および Cd^{2+} の標準溶液は、細胞約 2×10^8 cell/mL含む培養液に添加された。海産藻類はこの培養液中で22.0℃、6000luxの培養装置中でインキュベートされた。沈殿物が入らないように上澄みを別の容器でデカンテーションし、良く振り混ぜる。5から10mLの上澄みをニュークリポアポリカーボネートフィルター(25 mm、孔径1.0 μm)で吸引ろ過した。フィルター上の海産微細藻類は、2mLの水で洗浄された。フィルターごと風乾し、Mylar製のターゲットフレームにマウントした。このターゲットはNMCCサイクロトロンからの2.9MeVのプロトンビーム(2 mm径、電流値30 - 60 nA、電荷量20 - 60 μC)で照射された。発生するX線はSi(Li)半導体検出器で測定し、スペクトルは非線形最小自乗プログラム(SAPIX)で解析された^{12,13)}。

3 結果と考察

3.1 培養液の化学組成の選択と海産微細藻類の培養

Chelex-100は海水中の遷移元素の予備濃縮に一般的に用いられている^{14,15}。培養液の元素組成をTable 1に示す。以前の研究で用いてきた従来の培養液と同様に、PES-Hは精製海水に栄養塩と生体必須元素を添加することで調製した^{9,10}。PES-LはPES-Hで用いられた栄養塩と生体必須元素の10%量を精製海水に添加することで調製した。PES-L中の遷移元素の濃度レベルは海水よりまだ数10倍高いが、栄養塩は海水と同じレベルになった²。

Nannochloropsis と *Phaeodactylum* は22.0 °C、6000 luxの条件下のPES-H中でいずれも良く増殖し、保存溶液からPES-Hへ植え替え後、200時間以内でそれぞれ細胞数は、 4×10^6 cell/mL と 2×10^6 cell/mLになった。しかし、PES-L中では *Phaeodactylum*は増殖しなかった。*Nannochloropsis*の場合は、6000lux、400時間で約 2×10^6 cell/mL まで増殖した。したがって今後のPES-Lでの研究では、*Nannochloropsis*のみを用いることにした。

3.2 PIXEを用いる微細藻類の多元素分析

PES-HおよびPES-L中で培養した微細藻類のPIXE分析の結果をTable 2に示す。微細藻類中の12元素が定量できた。これらの元素は生物体を構成したり必須である典型的な無機元素である。ナトリウムと塩素は分析結果に再現性が得られなかったのでリストしていない。Na⁺とCl⁻は海水から藻類表面に付着しており、洗浄過程でよく取り除けなかったようだ。この多元素分析は、5-10mLの培養液中の藻類を約15分照射することで成し遂げられた。このようにPIXEでは微量の分析試料と短い分析時間で分析できることがわかった。藻類の含まれていない培養液、10mLのPES-Lをろ過し、フィルターをPIXE分析した。鉄のみがブランク値として 42 ± 8 μg/g (n=3) 検出されたが、これは藻類の分析結果からして無視できた。

アルミニウム、クロムおよびニッケルは培養液に添加していないが、精製していない海水から調製したPESで培養した*Nannochloropsis*から検出された。精製海水からのPES-Lを用いるとこれら元素はPIXEでは検出できなくなった。PESとPES-Hで培養した*Nannochloropsis*では、マンガンを除くとその元素組成には大きな違いが見られなかった。これまでの我々の研究でも微細藻類中のマンガンの定量値は大きな変動幅を持っていた。これはマンガン化学種の

Table 1. Nutritive and essential elements added to the culture solutions

	Culture solution		Seawater	
	PES-H	PES-L	CASS-4*	Ref. 2
BO ₃ ³⁻ (μM)	73	7.3	nd**	420
NO ₃ ⁻ (μM)	650	65	nd**	0 - 45
PO ₄ ³⁻ (μM)	26	2.6	nd**	0 - 3.2
Mn ²⁺ (nM)	2900	290	51	0.2 - 3
Fe ³⁺ (nM)	1700	170	13	0.1 - 2.5
Co ²⁺ (nM)	67	6.7	0.44	0.01 - 0.1
Zn ²⁺ (nM)	310	31	5.8	0.05 - 9
EDTA (μM)	12	1.2	-	-
HEPES (nM)	650	65	-	-

* Nearshore Seawater Reference Material for Trace Metals, National Research Council Canada

** No data

Table 2. PIXE analysis for marine micro-algae cultured by several culture solutions (μg/g)

	Nannochloropsis sp.		Phaeodactylum sp.
	PES-L (n=3)	PES (n=1)*	PES-H (n=3)
Mg	17000 ± 1000	11000	49000 ± 3700
Al	N.D.	1500	N.D.
Si	6800 ± 500	3500	14000 ± 1000
P	4000 ± 400	4800	11000 ± 1000
S	4700 ± 400	6300	8700 ± 700
K	6100 ± 200	3900	3900 ± 400
Ca	600 ± 60	580	1400 ± 200
Cr	N.D.	25	80 ± 9
Mn	400 ± 20	70	860 ± 30
Fe	1400 ± 250	770	2700 ± 100
Ni	N.D.	N.D.	30 ± 3
Cu	N.D.	4.2	N.D.
Zn	90 ± 6	130	23 ± 3
Sr	N.D.	4.6	N.D.
Cell / ml	204x10 ⁴	307x10 ⁴	182x10 ⁴

* Conventional PES used in Ref. 10.

酸化あるいは還元反応が起こっているからだと思われる。*Phaeodactylum*中の元素存在量はほとんどの元素で*Nannochloropsis*より大きい結果が得られた。

3.4 亜鉛の濃縮係数の測定

亜鉛はほとんど全ての生物の必須元素であることと、その毒性があまり高くない点で、生物の研究では興味を持たれる。さらに、2価のイオンが唯一安定で、pH7.8から8.0の領域で弱い加水分解しか起こさないの、化学的な取扱いが容易である。以前の研究では、精製していない海水から調製したPES中で培養した*Nannochloropsis*の亜鉛に対する濃縮係数を報告した。本研究では、PES-Hで培養した*Phaeodactylum*ならびにPES-Lで培養した*Nannochloropsis*の亜鉛に対する濃縮係数を調べた。これらの藻類は22.0、6000luxの培養装置中でインキュベートした。

Fig. 1に*Phaeodactylum*中の亜鉛濃度の時間依存性を示した。インキュベート開始時に、0.01あるいは0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Zn^{2+} が 182×10^4 cell/mLの*Phaeodactylum*を含むPES-Hに添加された。PES-Hには、調製時に0.02 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (310 nM)の Zn^{2+} があらかじめ添加されている。PES-Hで培養した*Phaeodactylum*にはもともと乾燥重量あたり、23 $\mu\text{g}/\text{g}$ の亜鉛が含まれているため、縦軸は*Phaeodactylum*中の亜鉛の増加量を示している。 Zn^{2+} の添加後、藻類中の亜鉛含有量は1時間以内に上昇し、その後緩やかな増加を示した。亜鉛の生物濃縮は1時間以内でほぼ平衡に達していることがわかる。

PES-Hに添加した Zn^{2+} に対する、10時間インキュベートした*Phaeodactylum*中の亜鉛濃度の関係をFig.2に示す。培養液中の Zn^{2+} が、0.01から1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ へ増加するにつれ、比例して藻類中の亜鉛濃度が大きくなっている。Fig. 1とFig.2の結果から、この条件では Zn^{2+} の溶液相と生物相との間での分配比が一定になっていることがわかる。PES-Hで培養した*Phaeodactylum*の亜鉛に対する濃縮係数は、乾燥重量あたり 10200 ± 300 mL/g (n=7)と求められた。

インキュベート開始時に、0.01あるいは0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Zn^{2+} が 204×10^4 cell/mLの*Nannochloropsis*を含むPES-Lに添加された。*Nannochloropsis*中の亜鉛濃度は1から12時間のインキュベートの間、一定となった。インキュベート中の*Nannochloropsis*に含まれる亜鉛濃度は、0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Zn^{2+} 添加量に対して、乾燥重量あたり 40 ± 20 $\mu\text{g}/\text{g}$ (n=5)、0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の Zn^{2+} に対して 1100 ± 180 $\mu\text{g}/\text{g}$ (n=5)とそれぞれ求められた。*Nannochloropsis*に含まれる亜鉛濃度は、PES-Lに添加する Zn^{2+} が0.01から0.50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と増加するに従って、比例して増加

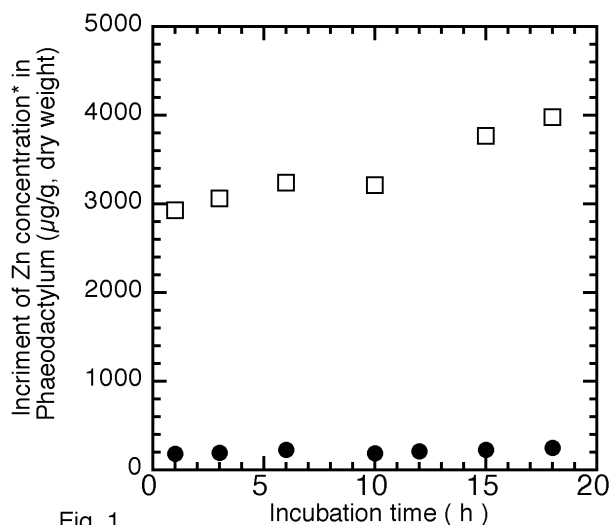


Fig. 1 Time dependence of increment of zinc concentration in *Phaeodactylum* sp. cultured in PES-H

●0.01 $\mu\text{g}/\text{mL}$, □0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of Zn^{2+} was added to PES-H

Number of *Phaeodactylum*: 182×10^4 cell / mL
*Zinc in *Phaeodactylum* sp. before the incubation was 23 ± 3 $\mu\text{g}/\text{g}$.

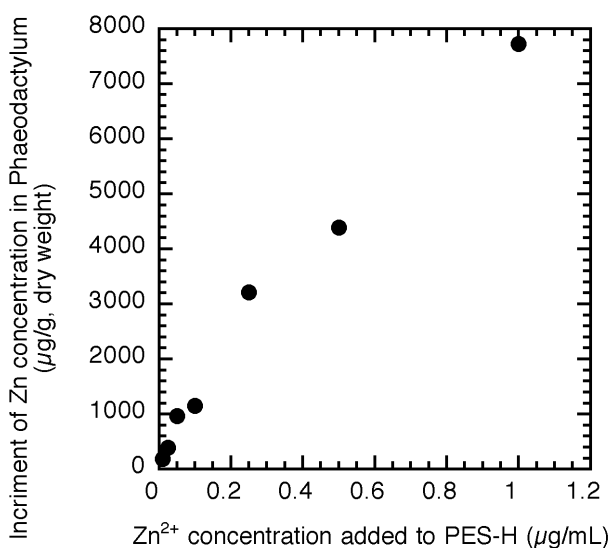


Fig. 2 Dependence of zinc in *Phaeodactylum* sp. on Zn^{2+} concentration added to PES-H

した。PES-Lで培養した *Nannochloropsis* の垂鉛に対する濃縮係数は、乾燥重量あたり 3400 ± 1200 mL/g ($n=6$) と求められた。この値は栄養塩が豊かなPES-Hで培養した *Phaeodactylum* と、従来法で調製したPESで培養した *Nannochloropsis* の場合 (9000 ± 500 mL/g)¹⁰⁾ と比べて、約70% 減少している。この理由ははっきりしないが、より海洋に近い元素組成のPES-L で求めた濃縮係数の値が重要であろう。

3.5 PES-Lで培養した藻類による鉄の濃縮係数の測定

H. J. Martinらは、いくつかの海域での低い鉄存在量が植物プランクトンの増殖を制限していることを指摘し¹⁶⁾、このため数多くの藻類と鉄に関する研究が行われている²⁾。鉄はこのように生物濃縮では興味を持たれるが、培養液中での化学的な取扱いは容易ではない。2価の鉄、 Fe^{2+} はすぐさま3価の鉄、 Fe^{3+} に変化し、海水中では加水分解を起こしている。PES-Lの調製でも0.01 $\mu\text{g/mL}$ (0.77 μM) の Fe^{3+} に対して1.2 μM のEDTAが、 Fe^{3+} あるいは他の遷移金属イオンの加水分解を防ぐために添加されている。EDTAは、鉄の保存溶液に Fe^{3+} の2倍当量加えられ、この混合物は一晩放置された。EDTAと0.028から0.28 $\mu\text{g/mL}$ (0.5-5.0 μM)の Fe^{3+} が 156×10^4 cell/mLの *Nannochloropsis*を含むPES-Lに添加された。

Fig.3は *Nannochloropsis* 中の鉄濃度の時間依存性を示す。0.028, 0.14 および0.25 $\mu\text{g/mL}$ の Fe^{3+} がPES-Lに加えられた。PES-Lには、調製時に Fe^{3+} があらかじめ添加されており、PES-L で培養した *Nannochloropsis* にはもともと乾燥重量あたり、1200 $\mu\text{g/g}$ の鉄が含まれている。このため縦軸は *Nannochloropsis* 中の鉄の増加量を示している。 Fe^{3+} の添加後、藻類中の鉄濃度は増加し、6時間以降で一定となり、平均値はそれぞれ 1700 ± 100 $\mu\text{g/g}$ (0.028 $\mu\text{g/mL}$ Fe^{3+})、 3400 ± 200 $\mu\text{g/g}$ (0.14 $\mu\text{g/mL}$) および 6100 ± 300 $\mu\text{g/g}$ (0.25 $\mu\text{g/mL}$) となった。

Fig.4 に PES-L に添加した Fe^{3+} の濃度に対する *Nannochloropsis* 中の鉄濃度の関係を示した。藻類中の鉄濃度は、PES-Lに加える Fe^{3+} の濃度 (0.028-0.28 $\mu\text{g/mL}$) に比例して増加した。鉄に対する *Nannochloropsis* の濃縮係数は乾燥重量あたり、 18000 ± 2000 mL/g ($n=6$) と求められた。

3.6 カドミウムの濃縮係数の測定

カドミウムはほとんど全ての生物に対して有毒な元素であることが知られており、日本の環境省では人の健康の保護に関する環境基準では、カドミウムは0.01 $\mu\text{g/mL}$ あるいはそれ以下としている。一方、PIXEにおけるカドミウムの感度は、3 MeV のプロトンによる K殻の電離断面積が、例えば垂鉛の $161 \times 10^{-24} \text{cm}^2$ のに対してカドミウムが $2.36 \times 10^{-24} \text{cm}^2$ と小さいために、感度が良くない。この低感度を克服するために、やや高濃度のカドミウム、0.10、0.50、1.0および5.0 $\mu\text{g/mL}$ を *Nannochloropsis* 190×10^4 cell/mL を含むPES-Lに添加した。これらは10時間インキュベートした後、PIXEに供された。藻類中のカドミウムは Cd^{2+} の添加量が1.0

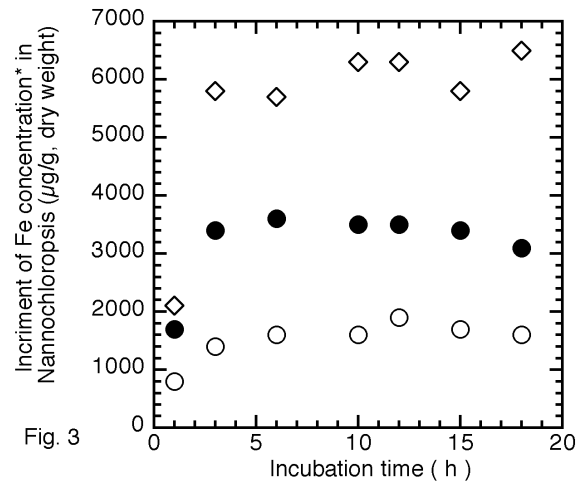


Fig. 3

Time dependence of increment of iron concentration in *Nannochloropsis* sp. cultured in PES-L

○0.028 $\mu\text{g/mL}$, ●0.14 $\mu\text{g/mL}$, ◇0.25 $\mu\text{g/mL}$
 Number of *Nannochloropsis*: 156×10^4 cell / mL
 *Iron in *Nannochloropsis* sp. before the incubation was 1200 $\mu\text{g/g}$

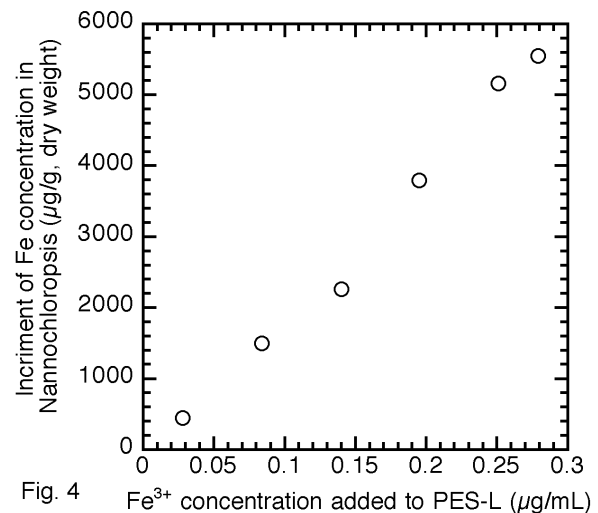


Fig. 4

Dependence of iron in *Nannochloropsis* sp. on Fe^{3+} concentration added to PES-L

および5.0 µg/mL の場合のみ定量でき、定量結果はそれぞれ、400 µg/gおよび1500 µg/gとなった。インキュベーション中にCd²⁺の毒性のため、藻類の細胞数は152x10⁴ cell/mL (1.0 µg/mL Cd²⁺) および 101x10⁴ cell/mL (5.0 µg/mL Cd²⁺)に減少した。それぞれの条件での濃縮係数は、400 mL/gと300 mL/gとなり、*Nannochloropsis* によるカドミウムの濃縮係数が平均350 mL/gと求められた。

3.7 海産微細藻類によるいくつかの微量金属の濃縮係数

Table.3 にこれまででもとめた *Nannochloropsis* および *Phaeodactylum* によるいくつかの微量金属の濃縮係数をまとめた。これらの環境科学にとって重要ないくつかの定数が、これまでの研究で得られ、そして我々はPIXE がこのような生物濃縮の研究に対して大変強力な分析方法であることを示した。*Phaeodactylum* による微量金属濃縮 (Zn および Pb) は、*Nannochloropsis* より大きかった。*Nannochloropsis* の微量金属に対する親和性の序列は Fe³⁺ > Zn²⁺ > Pb²⁺ > Cd²⁺であった。酸素を配位原子とする有機あるいは無機配位子、例えばクエン酸イオンや水酸化物イオンの場合、これら金属イオンに対する親和性の序列は Fe³⁺ > Pb²⁺ > Zn²⁺ = Cd²⁺ あるいは Fe³⁺ > Pb²⁺ > Zn²⁺ > Cd²⁺であり、単純には *Nannochloropsis* の序列と一致しない。これらの配位子が Zn²⁺よりも Pb²⁺に対して親和性があるが、*Nannochloropsis* は Pb²⁺や Cd²⁺よりはむしろ Zn²⁺ を濃縮する。これは Fe³⁺や Zn²⁺ が生体必須である一方、Pb²⁺ and Cd²⁺ が藻類に対して有毒である点で、大変興味深い。

Table. 3 Summary of concentration factors for several trace metals by marine microalgae (mL / g, dry weight)

<i>Nannochloropsis</i> sp.		<i>Phaeodactylum</i> sp.	
Fe	18000 ± 2000 [Fe ³⁺]: 0.028 - 0.28 µg / mL in PES-L		
Zn	9000 ± 500* [Zn ²⁺]: 0.05 - 1.0 µg / mL in PES 3400 ± 1200 [Zn ²⁺]: 0.01 - 0.50 µg / mL in PES-L	Zn	10200 ± 300 [Zn ²⁺]: 0.01 - 1.0 µg / mL in PES-H
Cd	350 [Cd ²⁺]: 1.0 and 4.0 µg / mL in PES-L		
Pb	1100 ± 100** [Pb ²⁺]: 0.025 - 0.25 µg / mL in PES	Pb	13000 ± 3000** [Pb ²⁺]: 0.01 - 0.50 µg / mL in PES
Incubate: 10 h * Ref. 10, ** Ref. 9.			

*

私たちは岩手県水産技術センターとそのスタッフの協力を感謝します。この研究は日本アイソトープ協会 仁科記念サイクロトロンセンターの共同利用研究で行われました。

参考文献

1. W. S. BROECKER, Chemical Oceanography, Harcourt Brace Jovanvich Inc., 1974.
2. F. J. MILLERO, Chemical Oceanography 2nd ed., CRC press. 1996.
3. H. J. BOWEN, Environmental Chemistry of the Elements, Academic Press, 1979.
4. R. ELALER, Trace Metals Concentrations in Marine Organisms, Pergamon Press, 1982.
5. Y. IWATA, N. SUZUKI, J. Radioanal. Nucl. Chem., 233 (1998) 121.
6. S. A. E. JOHANSSON, T. B. JOHANSSON, Nucl. Instr. Meth., 137 (1976) 473
7. Y. IWATA, T. FUJIWARA, N. SUZUKI, Intern. J. PIXE, 2 (1992) 381.
8. J. D. MACARTHUR, G. R. PALMER, K. BUDD, W. E. HEKMAN, B. E. NICHOL, J. R. CASEY, Uncle. Instr. Meth., B10/11, (1985)653
9. Y. IWATA, M. SUZUKI, Intern. J. PIXE, 10 (2000) 27.
10. Y. IWATA, J. Radioanal. Nucl. Chem., 249 (2001) 343.

11. L. PROVASOLI, Proceeding of US - Japan Conference, Cultures and Collection of Algae, ed. by A. WATANABE, A. HATTORI, p63, Japan Society of Plant Physiology (1968).
12. K. SERA, T. YANAGISAWA, H. TSUNODA, S. FUTATSUGAWA, S. HATAKEYAMA, Y. SAITOU, S. SUZUKI, H. ORIHARA, Intern. J. PIXE, 3 (1993)325.
13. K. SERA, S. FUTATSUGAWA, Nucl. Instr. Meth., B 109/110 (1996) 99.
14. J. P. RILEY, D. TAYLOR, Anal. Chim. Acta, 40 (1968) 479.
15. K. W. BRULAND, R. P. FRANKS, G. A. KNAUER, J. H. MARTIN, Anal. Chim. Acta, 105 (1979) 233.
16. J. H. MARTIN, FITZWATER, Nature, 331 (1989) 341.
17. The Ministry of the Environment, Government of Japan, Environmental Quality Standards for Water Pollutants, <http://www.env.go.jp/en/lar/regulation/wp.html>
18. S.A.E. JOHANSSON, J. L. CAMPBELL, PIXE: A Novel Technique for Elemental Analysis, John Wiley & Sons (1988).