

# PIXE 法による秋田白神山地産地衣の多元素分析 —環境モニタリングの指標生物としての地衣類の有用性—

岩田吉弘

秋田大学教育文化学部  
010-8502 秋田市手形学園町 1-1

## 1 はじめに

土壌が重金属を含有し、植物が生育しにくい環境でも、リュウブやシダの一種のヘビノネコザが生育し、鉱山師はこのような植物の分布を鉱脈発見の手がかりにしていた。現在では生物種の分布による環境評価の代表として、水生昆虫を指標生物に用いる方法がある。一方、近年、生物のいくつかが特定の金属元素や有機化合物等を生物濃縮することが明らかになってきた<sup>1,2)</sup>。これを環境モニタリングに応用する方法として、沿岸海域に広く分布するムラサキイガイ中の重金属やPCB等の有機化合物を測定する方法が研究されている<sup>3,4)</sup>。

本研究でとりあげる地衣類は、亜硫酸ガス等に敏感な種があることや、比較的人目につきやすいため、大気環境の指標生物に用いる研究が行われている<sup>5,6)</sup>。また、固着性で寿命が長く、南極を含め世界の陸域に分布していることから、蘚苔類とともに環境モニタリングの生物に用いる方法が提案され検討されている<sup>7)</sup>。

生物濃縮を用いて環境モニタリングをおこなう場合、通常の生体試料分析で必要とされる試料調製法および分析法の感度および精度のほか、化学物質の生体内分布と濃縮係数の見積もり、濃縮経路の解明など生物濃縮に関する基礎的検討が不可欠である<sup>7)</sup>。地衣類についてもコバルト<sup>8)</sup>およびヒ素<sup>9,10)</sup>についての検討が始められている。

本研究で用いる微量元素分析法の粒子励起 X 線分光法 (Particle Induced X-ray Emission、以下 PIXE 分析法) は、サイクロトロンなどの加速器からの陽子などの荷電粒子を試料に照射し、発生する特性 X 線のエネルギーから元素を同定し強度から定量をおこなう、高感度多元素分析が可能な機器分析法である。1970 年代から開発と応用が進められ、現在では生体試料や大気中浮遊粉じん等環境試料の代表的な分析法となっている<sup>11)</sup>。特に、数 mg とした微量試料に対する高感度分析や、マイクロビームによる PIXE 分析法では、数 mm 角の範囲を  $\mu\text{m}$  以下の分解能で元素分布図できる。本研究では、PIXE 分析法を白神山地産の地衣中の少量および微量元素の定量分析に適用し、試料調製法、分析感度および精度の検討をおこなうとともに、元素組成の特徴と環境モニタリング生物としての地衣類の有用性について考察したので報告する。

## 2 実験

### 2.1 分析用地衣試料の調製

地衣は、1983 年および 1993 年に白神山地で採取され、風乾後、標本室内に室温で保存された 5 種を用いた (表 1)。この乾燥標本から、その一部 (約 200 mg) を採取し、めのう乳鉢で粉碎し、さらにプランクトンネット用のナイロンメッシュでふるい分けし、粒径 60  $\mu\text{m}$  以下の部分を分析用地衣試料とした。

### 2.2 PIXE 分析用の照射試料の調製

非イオン性界面活性剤の Triton X-100 (和光純薬) は、純水で希釈し、2%水溶液として用いた。バインダーのポリビニルアルコール(PVA)の 0.5%水溶液は、PVA を 10%含有する凍結切片作成用包埋剤 (ティシューテック、サクラファインテックジャパン) を純水で 20 倍に希釈して調製した。

分析用地衣試料 (2-3 mg) をガラス製バイアル (容量 5 ml) に分取し精秤後、0.4 ml の 2% Triton X-100 水溶液を加え振り混ぜ、さらに 1.6 ml の 0.5% PVA 水溶液を加え、振り混ぜてけん濁させた。アスピレーターに接続した吸引ろ過器に Nuclepore® ポリカーボネートフィルター (Whatman、直径 25 mm、孔径 10  $\mu\text{m}$ ) をセットし、けん濁液を加え、吸引ろ過した。地衣試料を付着させたフィルターはそのまま風乾し、PIXE 照射用ターゲットホルダーに装着した (図 1)。

表 1 分析に用いた地衣一覧(標本提供 秋田大学教育文化学部教授 井上正鉄)

試料番号	学名	採取地
採取日	和名	着生基物 [標高/m]
22368	<i>Anaptychia isidiza</i> Kurok.	岳岱(秋田県藤里町)
14, Sept. 1993	トゲヒメゲジゲジゴケ	ブナ [-]
22484	<i>Anzia japonica</i> (Tuck.) Müll.Arg.	岳岱(秋田県藤里町)
14, Sept. 1993	サボテンアンチゴケ	ナナカマド [590-620]
22579	<i>Parmelia fertilis</i> Müll.Arg.	二ツ森(秋田県藤里町)
17, Sept. 1993	トゲナシカラクサゴケ	イタヤカエデ(枯木) [970]
22903	<i>Ramalina conduplicans</i> Vain.	粕毛川・赤石川源流(秋田・青森県)
1-3, July 1983	カラタチゴケ	ブナ [800]
23680	<i>Bryocaulon divergens</i> (Ach.) Kärnefelt	小岳山頂部(秋田県藤里町)
19, July 1993	クリイロトゲキノリ	岩 [980-1040]

## 2.2 PIXE 分析

PIXE 分析用の照射試料は、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サイクロトロンからの 3MeV の陽子ビーム (電流値: 10 から 30 nA) を照射した。軽-中元素 (Na-Zn) の定量では、ビーム径 2 mm で約 5 分照射し、重元素 (Zn-Pb) の定量では、ビーム径 6 mm で約 20 分照射した。照射電荷量はファラデーカップで計測し、測定した X 線スペクトルの解析は PIXE 解析用最小自乗フィッティングプログラム (SAPIX) で行った。

## 3 結果と考察

### 3.1 試料調製法

地衣類は、菌類と藻類の共生体であり、その組織は複雑であり、組織によって元素含有量が異なることが予想される。このような分析試料の場合は、一般的に分析対象試料の一定量を均質化し、分析試料に供することが一般的である。PIXE 分析法は、陽子による特性 X 線の発生断面積が電子あるいは X 線のそれに比べて 2-5 桁大きいいため EPMA や XRF よりも高感度分析が可能である。一方、加速エネルギー 3 MeV 程度の陽子ビームの照射試料中での飛程は数十  $\mu\text{m}$  にすぎない。このため、今回は、めのう乳鉢を用いて均質化し、ナイロンメッシュと Nuclepore® ポリカーボネートフィルターをもちいて、粒度 10-60  $\mu\text{m}$  の部分を分析用地衣試料とした。なお、このように組織が複雑な地衣類もマイクロビームによる PIXE 分析法で、元素分布図を作成できることが示されており<sup>8-10)</sup>、今後白神産の地衣にも応用したい。

PIXE 分析用の照射試料では、分析試料をフィルム上に質量厚み 1 mg/cm<sup>2</sup> 程度に均一に塗布し薄膜試料とすると感度の向上が期待される<sup>11)</sup>。生体試料を環境モニタリングに用いる場合は、分析試料が多数個となるため、なるべく簡便な方法で試料調製を実施することが望まれる。そこで本研究では簡単なる過操作のみで薄膜試料を調製する方法を用いた。生体試料の乾燥粉末をそのまま水に懸濁しようとする「ダマ」になりやすい。そこで、タンパク質の可溶化に効果のあるに非イオン性界面活性剤の Triton X-100 の 2% 水溶液に分析

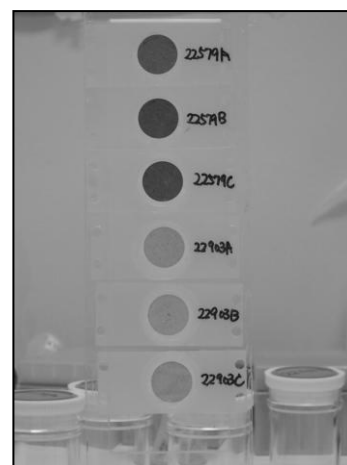


図 1 PIXE 分析法用の照射試料  
試料番号 22579 および 22903 各 3 枚

用地衣試料を加え、懸濁させた。また、ろ過後にフィルターはそのまま乾燥させると、分析用地衣試料が剥離しやすい。このため、化学糊の原料の一種である PVA の 0.5% 水溶液を懸濁液に加えた後、ろ過した。このような一連の操作で調製した 2 種類の地衣各 3 枚の PIXE 分析法用の照射試料を図 1 に示したが、均一性良く分析用地衣試料がフィルターに付着している様子が分かる。これは、3.2 で示す定量結果の再現性の良さにも表れている。なお、色の濃さの違いは付着させた分析用地衣試料の違いによるものである。

### 3.2 PIXE 分析法の分析感度および精度

5 種の地衣試料に対する各 3 回の PIXE 分析の結果を平均、標準偏差および相対標準偏差を表 2 に示す。

表2 粒子励起 X 線分光法による白神山地産地衣類中の少量および微量元素分析

元素	定量結果 [平均値±標準偏差(μg/g n=3) 相対標準偏差(%)]										文献値	
	22368 トゲヒメゲジ ゲジゴケ		22484 サボテンアンチ ゴケ		22579 トゲナンカラ クサゴケ		22903 カラタチゴケ		23680 クイロトゲ キノリ		IAEA-336 <sup>12)</sup>	Bowen <sup>13)</sup>
Na	294±24	8	288±150	52	375±125	33	240±53	64	332±46	14	-	1000-40000
Mg	466±48	10	484±95	20	804±205	26	134±59	44	230±57	25	-	170-1000
Al	3470±530	15	3490±134	4	3670±240	7	1570±80	5	2830±260	9	680*	20-6000
Si	13000±2000	15	10700±630	6	1090±600	5	4870±290	6	9770±1070	11	-	-
P	349±76	22	322±23	7	409±31	8	337±42	12	273±34	13	610*	74
S	764±46	6	631±70	11	641±126	20	874±27	3	631±105	17	-	700-1500
Cl	133±44	33	369±2	1	457±93	20	(10, 17, 56)		154±39	25	1900*	-
K	1330±220	16	1060±60	6	1230±60	5	468±17	4	845±49	6	1840**	600-8500
Ca	2900±280	10	11600±950	8	5220±550	10	1731±102	6	664±18	3	-	260-18000
Ti	242±26	11	249±59	24	248±22	9	112±3	3	212±28	13	-	-
V	(ND, 16, 7.6)		(14, 41, ND)		(ND, ND, ND)		(ND, ND, ND)		(ND, ND, ND)		1.47*	0.3-4.8
Cr	(9.3, 3.7, 2.5)		(7.3, 9.7, 4.5)		(7.4, 9.3, 7.2)		(ND, 3.7, 0.8)		(5.0, ND, 10.3)		1.06*	0.6-7.3
Mn	215±34	16	76.9±6.4	8	345±167	5	31.6±3.5	11	25.1±5.0	20	63**	3-190
Fe	2370±390	17	2240±134	6	2500±146	6	965±37	4	1960±60	3	430**	40-5200
Ni	(3.5, 4.5, ND)		(ND, ND, 4.1)		(3.0, ND, 2.6)		(2.8, 4.9, 2.5)		(2.4, 4.4, 1.2)		-	1.5-3.8
Cu	9.6±2.8	29	13.0±1.6	12	13.2±5.0	38	8.0±1.5	19	7.2±0.3	5	3.6**	9-24
Zn	43.7±4.6	11	46.5±3.5	7.5	94.7±6.2	7	41.6±6.7	16	26.0±3.5	14	30.4**	20-60
Ga	(1.1, ND, 1.3)		(0.9, 1.4, 1.8)		(1, 1.4, 0)		(ND, 0.4, 0.9)		(1.5, 1.1, 0.9)		-	2.2
Se	(ND, 1.1, 1.0)		(ND, ND, 0.9)		(1.7, 1.1, 1.4)		(ND, 0.5, ND)		(ND, 0.7, ND)		0.22**	-
As	(ND, 3.0, ND)		(ND, ND, 3.3)		(ND, ND, ND)		(ND, 0.4, 0.9)		(2.3, ND, 0.7)		0.63**	-
Br	20.7±3.7	18	21.9±4.2	19	42.1±0.7	2	5.8±2.0	35	11.1±2.5	22	12.9**	-
Rb	14.6±1.6	11	7.4±2.3	31	7.3±2.0	27	3.4±0.3	8	2.9±0.5	18	1.76*	2.4-25
Sr	21.0±2.5	12	37.4±4.9	13	38.4±2.5	6	6.5±1.3	20	8.9±0.8	8	9.3**	0.8-250
Zr	10.2±2.1	21	9.0±1.9	21	12.4±2.6	21	4.8±1.1	22	7.3±1.7	24	-	10
Hg	69.0±9.0	13	26.1±2.4	9	121±9	7	4.5±1.4	30	86.7±1.0	1	0.20**	0.34
Pb	42.7±5.8	14	51.4±6	12	52.4±3.6	7	31.5±6.1	19	42.2±8.4	20	4.9*	1-78

ND: 定量下限以下、-: データなし、\*\* : Recommended Value、\* : Information Value

0.1~数%のレベルで含有される微量元素のケイ素、カリウム、カルシウム、鉄から、~10 mg/g のレベルで含有される微量元素の銅、ルビジウム、ジルコニウムなど 26 元素の定量が可能であった。塩素、バナジウム、クロム、ニッケル、ガリウム、セレン、ヒ素では、定量下限以下となったり、3 回の相対標準偏差が 70% 以上と再現性が低い場合があり、括弧書きで 3 枚の定量結果を併記した。ND は定量下限以下を表す。バナジウム、ガリウム、セレンおよびヒ素の場合は、含有量が数 μg/g と PIXE 分析法の定量下限に近いと、ND であったり、再現性が低かったと考えられる。一方、クロムは、~10 μg/g のレベルで含有されており、定量下限を上回っているが再現性が低い。これは、クロムが PIXE 分析法用の照射試料に不均一に分布しているこ

とが示唆される。地衣に取り込まれたクロム以外に、表面にクロムを含む岩石由来の粒子が付着したため、元素分布が不均一になったものと考えられる。一般的に岩石にはクロムは生体試料に比べ数十倍多く含有されている<sup>1,13)</sup>。塩素の場合は、ナトリウムとともに水に可溶性の塩で分析用地衣試料に含有されると予想される。ナトリウムの場合も相対標準偏差が14 - 64%で再現性の低い結果が得られている。これら元素はPIXE分析用の照射試料調製の際、その一部が溶解することで損失し、その量にばらつきがあったためと考えられる。表2の文献値と比較しても今回の定量値が全般に小さいことから示唆される。マグネシウム、カリウム、臭素およびルビジウムも可溶性の塩を含むと予想されるが、相対標準偏差はそれぞれ4 - 16%、10 - 44%、18 - 35%および8 - 33%と比較的再現性良く定量できた。その他の少量及び微量元素の14元素の定量における相対標準偏差は3 - 20%と良好で、精度が高かった。水銀は有毒元素として環境での挙動が注目されている一方、揮発性が高いため精度の高い分析が難しい元素の一つである。今回のPIXE分析では、含有量の低い22903カラタチゴケを除き、1-13%の相対標準偏差で定量でき、本法が白神山地産地衣体中の重金属の化学分析として有効であることが示された。

### 3.3 白神山地産地衣の元素組成の特徴と環境モニタリング生物としての有用性

ヒ素、水銀および鉛は環境モニタリングで注目される有害元素である。表2には、今回の定量値とともに、国際原子力機関が配布している化学分析用標準物質「IAEA-336 Trace and Minor Elements in Lichen」中の少量および微量元素<sup>12)</sup>とH. J. M. Bowenによってまとめられた地衣類の代表的な元素含有量<sup>13)</sup>を示した。IAEA-336は、ポルトガルの汚染源から離れた2カ所で採取された*Evernia prunastri* (L.) Ach. (ツノマタゴケ)で、着生基物は灌木の*Cistus ladanifer*あるいは*Quercus*類(コナラ類)である。今回の分析結果とIAEA-336と比較すると、白神産地衣類には、水銀は20-600倍、鉛は6-11倍含有されている。Bowenの値はやや古い分析値であるが、これと比較しても、白神産地衣類には水銀が高濃度で、鉛も含有量が大いだと判断される。また、5種の地衣類の含有量は、鉛については30 - 50 µg/g程度とサンプル間の差は小さいが、水銀については5 - 121 µg/gと大きく異なっている。白神山地とその周辺にはこれら重金属の発生源はなく、地球化学図<sup>14)</sup>を参照しても、白神山地の地表の基盤岩にこれらの重金属が多いわけでもない。水銀については、例えば地衣類を用いたイタリアのトスカナ地域のモニタリングでは0.013 - 0.46 µg/g<sup>15)</sup>、廃止鉱山周辺でのモニタリングでは、0.07 - 0.24 µg/g<sup>16)</sup>が報告されている。ただし前者は地衣試料中の揮発性の水銀を原子吸光法、後者は地衣試料をあらかじめ硝酸分解し、原子吸光法で分析をおこなっており、本研究と試料調製法、分析法が異なっている。本研究は萌芽的取り組みであり、分析数も限られている。今後、地衣類の種、採取地、採取時期の範囲を広げ、元素含有量の特徴を明らかにするとともに、他の分析法による定量を試みるなど、さらに信頼性の高いデータを集積したい。

**謝辞** 本研究にあたり貴重な白神産地衣類の標本を提供していただくとともに地衣類についての情報を教授下さった井上正鉄先生に感謝いたします。PIXE分析の実施にご協力いただいた岩手医科大学サイクロロンセンター世良耕一郎教授ならびに日本アイソトープ協会のスタッフに感謝します。

#### 文献

- 1) 今井弘、「生体関連元素の化学」培風館、1997
- 2) C. Baird, *Environmental Chemistry*, 2nd. ed., W. H. Freeman and Co., 1999.
- 3) H. H. White, *Concepts in Marine Pollution Measurements*. A Maryland Sea Grant Publication, 1984.
- 4) 山口友加他、地球化学、34(2000)41-57
- 5) M. E. Conti and G. Cecchetti, *Environmental Pollution* 114(2001)471-492
- 6) 大村嘉人他、大気環境学会誌、43(2008)47-54
- 7) K. Szczepaniak and M. Biziuk, *Environmental Research* 93(2003)221-230
- 8) T. Ohnuki, et.al., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 210(2003)407-411
- 9) T. Ohnuki, et.al., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 190(2002)477-481
- 10) T. Mrak, et.al., *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B* 260(2007)245-253

- 11) 岩田吉弘、ぶんせき(1994)612-618
- 12) International Atomic Energy Agency (IAEA) Reference Material, IAEA-336 Trace and Minor Elements in Lichen, Reference Sheet (1994)
- 13) H. J. M. Bowen, *Environmental Chemistry of the Elements*. Academic Press, 1979.
- 14) 産業技術総合研究所地質調査総合センター、「日本の地球化学図」、  
<http://riodb02.ibase.aist.go.jp/geochemmap/index.htm>
- 15) R. Scerbo, et. al., *The Science of Total Environment* 241(1999)91-106
- 16) R. Bargagli, et. al., *Environmental Pollution* 116(2002)279-287

**Multi-element analysis of PIXE for lichen samples from  
Shirakami-Sanchi, Akita  
-Utilities of lichens as bioindicators of environmental monitoring-**

Yoshihiro Iwata

Department of Chemistry, Faculty of Education and Human Studies, Akita University  
1-1 Gakuen-Machi, Tegata, Akita 010-8502, Japan

**Abstract**

Utilities of lichens as bioindicators of environmental monitoring were examined by PIXE analysis. Several lichens sampled from Shirakami-Sanchi, Akita. They were dried by air and milled by an agate mortar. Powdered lichens were sifted and suspended into water containing Triton X-100 as a surface-active agent and polyvinylalcohol as a binder agent. The suspensions were filtered on Nuclepore Track-Etch Membrane (pore size : 10  $\mu$ m) and the membrane targets were bombarded by 3 MeV Proton from NMCC cyclotron. 5 Kinds of lichen were analyzed by PIXE and concentration for 26 elements were determined by PIXE analysis. Determined elements were major, minor and trace elements in biological materials and contained several essential elements such as Fe, Zn and Cu. And also this PIXE analysis could measure some toxic elements, Hg and Pb. Relative standard deviation for each lichen sample from 3 analytical targets were 1-13% for traces of Hg and Pb. It was shown that the uniformity of the target was excellent. The sample preparation for lichens is simple and this PIXE analysis is able to measure so handily multi-elements, that it is useful for the environmental evaluation by lichens.