

大気 PIXE による生きた植物試料に対する無標準定量分析法の開発

世良耕一郎¹、後藤祥子²、高橋千衣子²、齋藤義弘²

¹ 岩手医科大学サイクロトロンセンター
〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

² 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
〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

1 はじめに

我々はこの15年、アジア諸国における有害元素による広域的汚染問題の調査研究に加わってきた¹⁻⁴⁾。前年に報告を行ったように、Bangladeshにおいては農業用水の多くがヒ素により汚染されており⁵⁾、その状況は多くの東・東南アジア諸国において同様なものと推測される。現在食の安全を保つため、バンコクのFAO(国連農業食料機構)など複数の機関により、農作物の可食部中の有害元素濃度を軽減するための技術開発が行われており、農耕法の改善や品種改良などが試みられている。それらの研究において、農作物中の特定元素の輸送機構を直接観測することは強力な手段となり得るが、現在のところそれを実行する方法はない。

本研究においては、無標準法⁶⁾を基礎とし生きた植物に対する定量分析法の開発が試みられる。生きたまま・正常な代謝を維持しながらの定量分析は、大気PIXEにおける無標準法以外には難しいものと考えられる。大気PIXEに対する無標準法は、既に毛髪試料⁷⁾・オイル試料⁸⁾・油脂食品試料⁹⁾などに対して開発が行われ、実試料の測定にも応用されている。無標準法の基礎となる連続X線は大気PIXEの場合空気からも発生するが、その成分の差し引きはAr-K X線の収量で規格化しblankスペクトルを差し引くことにより正確に行うことができる^{7,8)}。

しかし生きた植物試料の定量分析法においては、他のいくつかの要因が考慮されなければならない。測定のために陽子線による照射が行われるが、その間植物が正常な代謝を継続しているかどうかの確認が必要である。当然ビーム照射に伴うダメージが予想されるが、照射部の水分が一定に保たれていればそれは正常な代謝維持の一つの目安となる。照射ダメージにより照射部における水分が枯渇していけば、無標準法の基礎となる連続X線の収量に影響が出、定量分析の基礎が崩れることになる。そのためには、主に水分から発生する連続X線収量を連続モニターする必要がある。またビーム電流は、植物細胞に破壊的影響を与えない程度に調整しなければならない。正常な代謝・生命活動が維持できているか否かの判断のためには、水分以外にも生命活動に必要なカリウムなどの主元素の動向を観察することも必要となる。

本研究の目的は以下に要約される。① 大気PIXEにおいて、無標準法を基礎に生きた植物に対する定量分析法を確立する。② 生命活動・正常な代謝を維持しながら測定を行うための、照射・測定条件を確立する。③ 各元素濃度の照射開始からの時間変化がどの程度の精度・時間分

解能で観測可能か見極める。④ 特定元素濃度に時間変化が観測された場合、その意味に関する考察を行う。

2 実験方法

2.1 生きた植物の採取と照射条件

いずれも NMCC・滝沢研究所敷地内に生育していた4種類の野草(クローバー:*Trifolium repense*、オオバコ:*Plantago asiatica*、チドメグサ:*Hydrocotyle sibthorpioides*、西洋タンポポ:*Taraxacum officinale*)が、周辺の土ごと根を傷つけずに採取された。それらには一定期間充分に水を与え、安定した生育状況が保たれていることを確認したのち実験に供された。生きた植物との対比のため、摘んだ葉も採取された。さらに、元素がより動きやすいと期待される水栽培の状況下で観測を行うため、ポトス (pothos : *Epipremnum aureum*) の茎を7~8枚の葉がついたまま切り取り、十分に長い根が生えるまで数週間栽培したものも実験に供された。

最終的な目的である農作物への応用の可能性を確認するため、4種の野菜の葉(野沢菜:*Brassica rapa*、ツルムラサキ:*Basella abba*、ホウレンソウ:*Spicacia oleracea*、セリ:*Oeranyhe javanica*)が測定に用いられた。これらに関しては、根付きのセリ以外は摘んだ葉に対し測定が行われた。

Fig. 1の写真は、水栽培のポトス試料に対する照射条件を示す。照射される葉は、照射箇所が動かないように試料支持台上に固定され、根付のものに対しては根を水あるいは土中に保ち、水分が根から十分に供給される条件下で照射が行われた。ビームの照射角度・X線の測定角度はいずれも上方45度である。測定は2~4分毎に行われ、900~6500分の間の元素濃度変化が観測された。短時間毎の測定の意味は、元素濃度の速い変化を観測するためと、常に水分が一定に保たれ正常な代謝が行われていることを随時確認するためである。

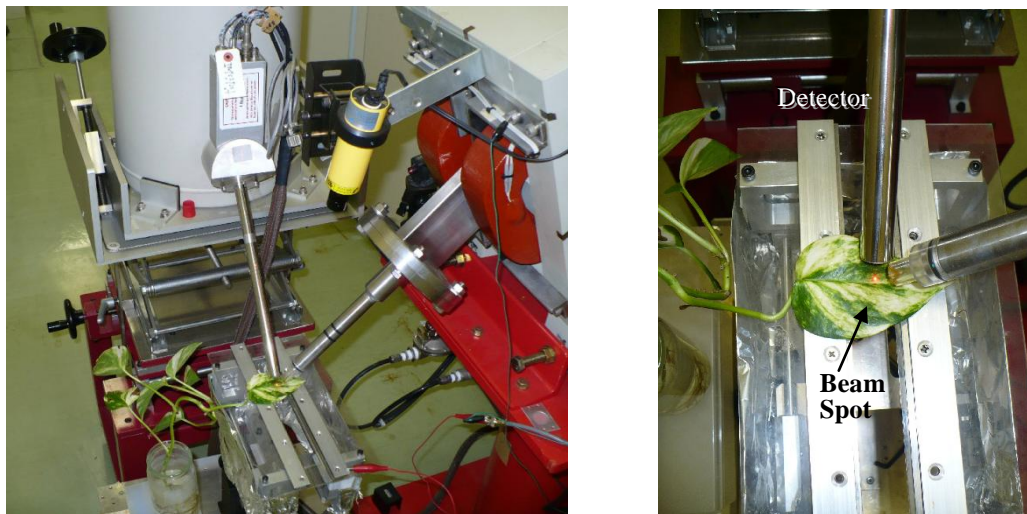


Fig. 1 Photographs showing irradiating conditions of living plants in in-air PIXE

2.2 ビーム及び測定条件

島津製作所小型サイクロトロンより引き出された2.9 MeVの陽子ビームは、2組の三連Q magnet, steering magnetなどで調整され、真空散乱槽に導入される。ビームはさらにbending magnetにより45度下方に偏向され、5 mmφのgraphite collimatorにより成形され7.5 μm Kapton (Polyimide) foilを通して大気中に導出される。Kapton foilと空気によるenergy lossのため、試料表面におけるビームエネルギーは2.45 MeVとなる。大気PIXEにおけるビーム電流は最大3.5 nAであるが、本研究においては、ビームによる植物細胞の損傷を抑えるため、常に2 nA以下に保たれた。ビ

ーム電流の安定度は、空気から発生する Ar-K α X 線の収量により常時確認された。真空・大気 PIXE 測定システムを含むビームコースの layout は、参考文献 10 の図 1、2 に示されている。

発生した X 線は、Si(Li) (PGT LS10138HT; resolution = 137 eV at 5.98 keV) 検出器により測定される。本研究においては、X 線の吸収など不確定要素の多い塩素以下の軽元素の測定は行わず、常に 300 μ m Mylar film が X 線吸収体として用いられた。試料から検出器窓までの距離は 1 cm に固定された。Fig. 2 に典型的な葉試料(タンポポ)の大気 PIXE スペクトルを示す。Blank spectrum は、他の照射・測定条件を固定し試料を取り除いて得られたものである。図にみられるように多くの元素からの特性 X 線が観測され、空気から発生する Ar の X 線の寄与は比較的少ない。

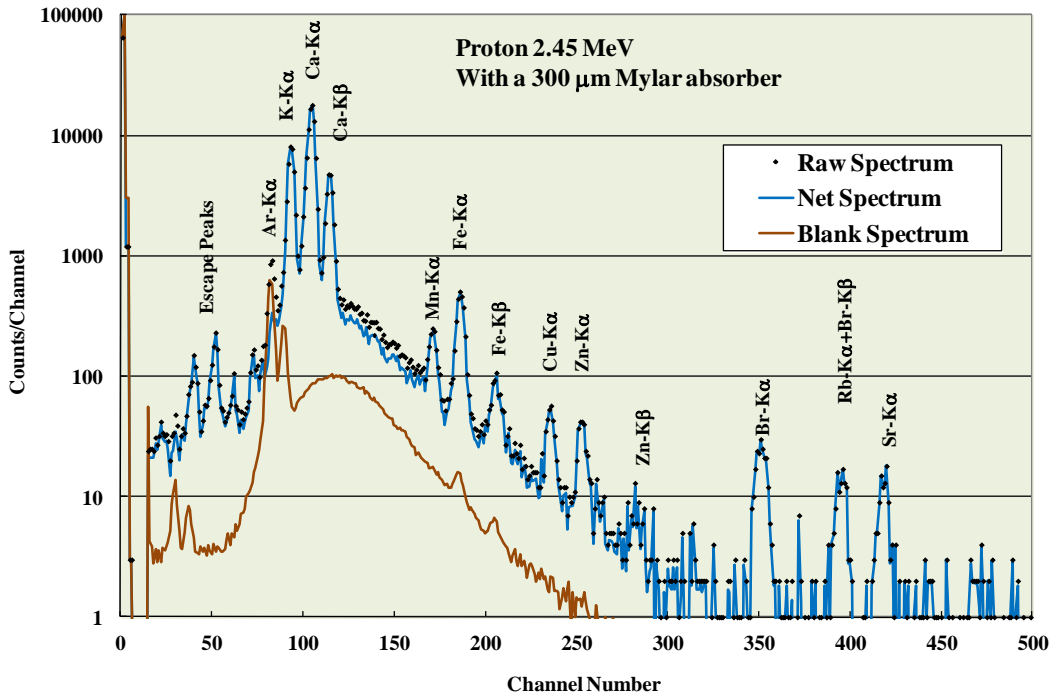


Fig. 2 Typical in-air spectrum of a living plant (dandelion) obtained with a 300 μ m Mylar absorber (indicated as a raw spectrum). Result for blank-spectrum subtraction is also shown in the spectrum.

2.3 生きた植物試料に対する無標準法

本法は数種の野草の葉を使い、指標元素としては植物中に安定して存在する K (potassium) が選ばれ開発された。真空 PIXE における無標準法と異なる点は、大気中の場合連続 X 線が試料のみならず空気からも発生する点である。無標準法は試料から発生する連続 X 線収量を用いるため、空気から発生する成分の差引が行われなければならない。Fig. 2 には大気 PIXE における無標準法の手順も示されている。図に示される blank spectrum 中の空気から発生する Ar-K α X 線と連続 X 線収量は、共にビーム電流に比例していると考えられるため、試料以外から発生する連続 X 線の差引は Ar-K α X 線収量により規格化を行うことにより正確に行えるものと期待される。図中には、空気からの X 線が差引かれた後の Net spectrum も示されているが、この spectrum 中の連続 X 線は、試料のみから発生したものと考えるが良い。

続く Fig. 3 には、4.5~5.5 keV の連続 X 線収量で規格化された上記 4 種の野草の葉のスペクトルが示されている。この図から、連続 X 線のエネルギー分布は試料の種類に依らずほぼ一定であることが確認できる。このことにより、この領域における連続 X 線収量に対する指標元素 K の X 線収量の比 R_S を取ることにより、真空 PIXE と同様な無標準法が適用可能であることが分かる。Fig. 4 には採用される連続 X 線領域が示されており、4 種の試料に対する R_S の値が求めら

れる。一方、試料中の K 濃度は内部標準法により求められる。大気 PIXE で照射を行った葉試料の照射野を含む直径 1 cm ほどの葉の部分の切り取られ、硝酸灰化法¹¹⁾により試料調製が行われ、内部標準としては 5000 ppm の In が添加された。通常の植物試料に対しては 1000 ppm の In が用いられるが、この場合試料の重量が少なく In 標準液の pipetting 精度を考慮し多めの In が添加された。

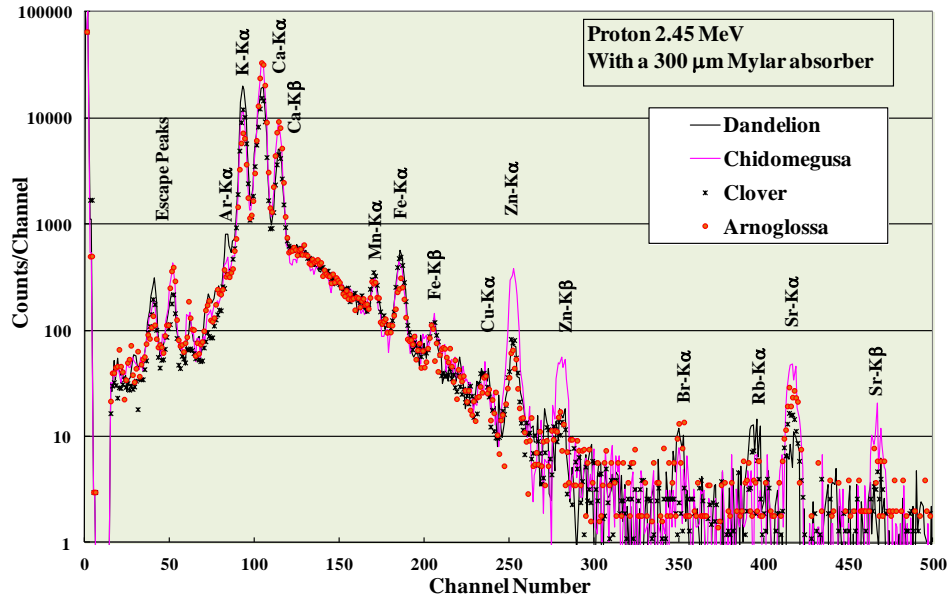


Fig. 3 Net X-ray spectra of four kinds of wild plants normalized by the yields of continuous X-rays in the energy region between 4.5 and 5.5 keV.

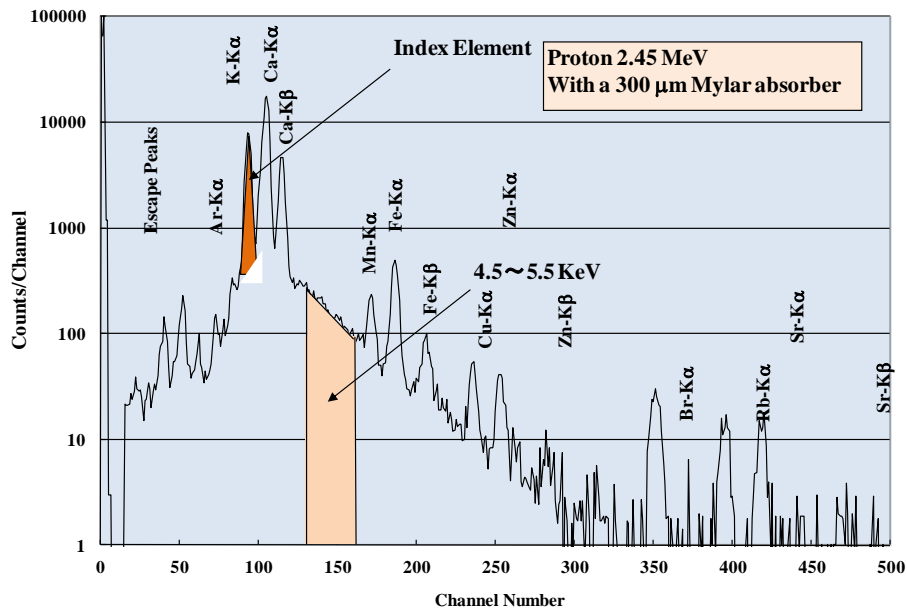
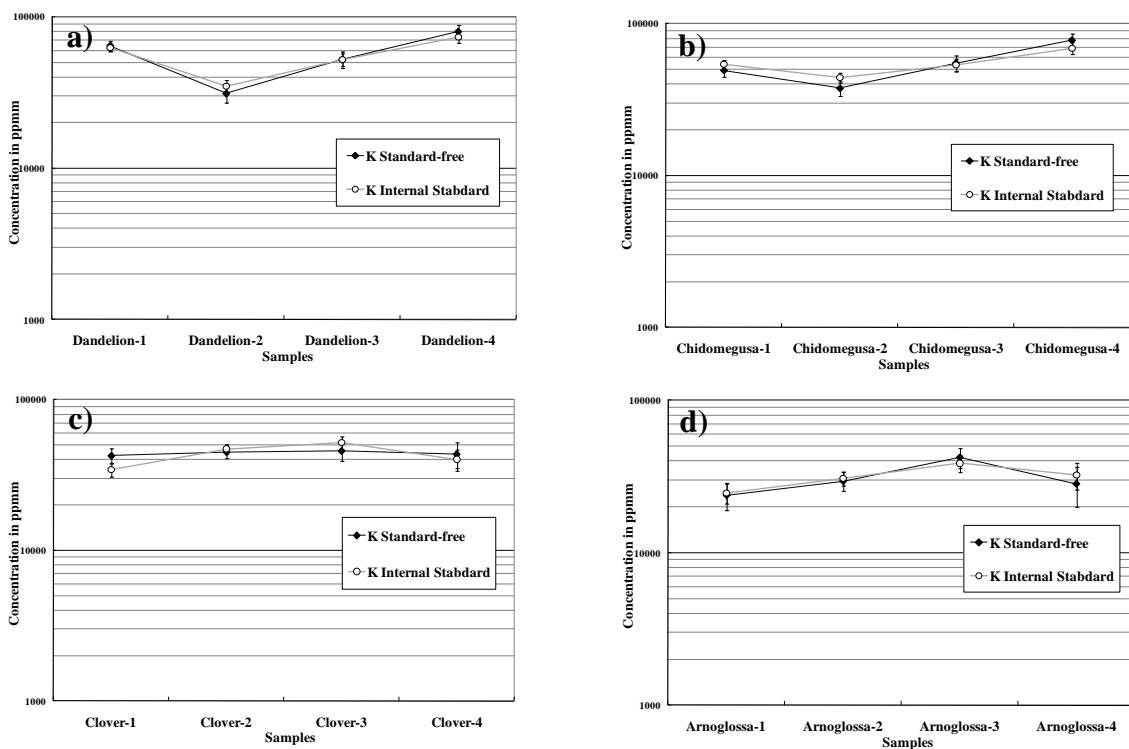


Fig. 4 Energy region for taking the yield of continuous X-rays. Potassium concentration is determined using the conversion coefficient and the ratio of the potassium peak yield to that of continuous X-rays in this region.

4種のそれぞれの野草に対し、4枚の異なる葉に対して無標準・内部標準法による測定が行われ、試料数は16、測定回数は計32回となった。これら16試料に対する両法の結果を比較することにより、指標元素濃度を求めるための変換係数が決定された。その手順は参考文献6に記載した真空PIXEに対するものと同様である。

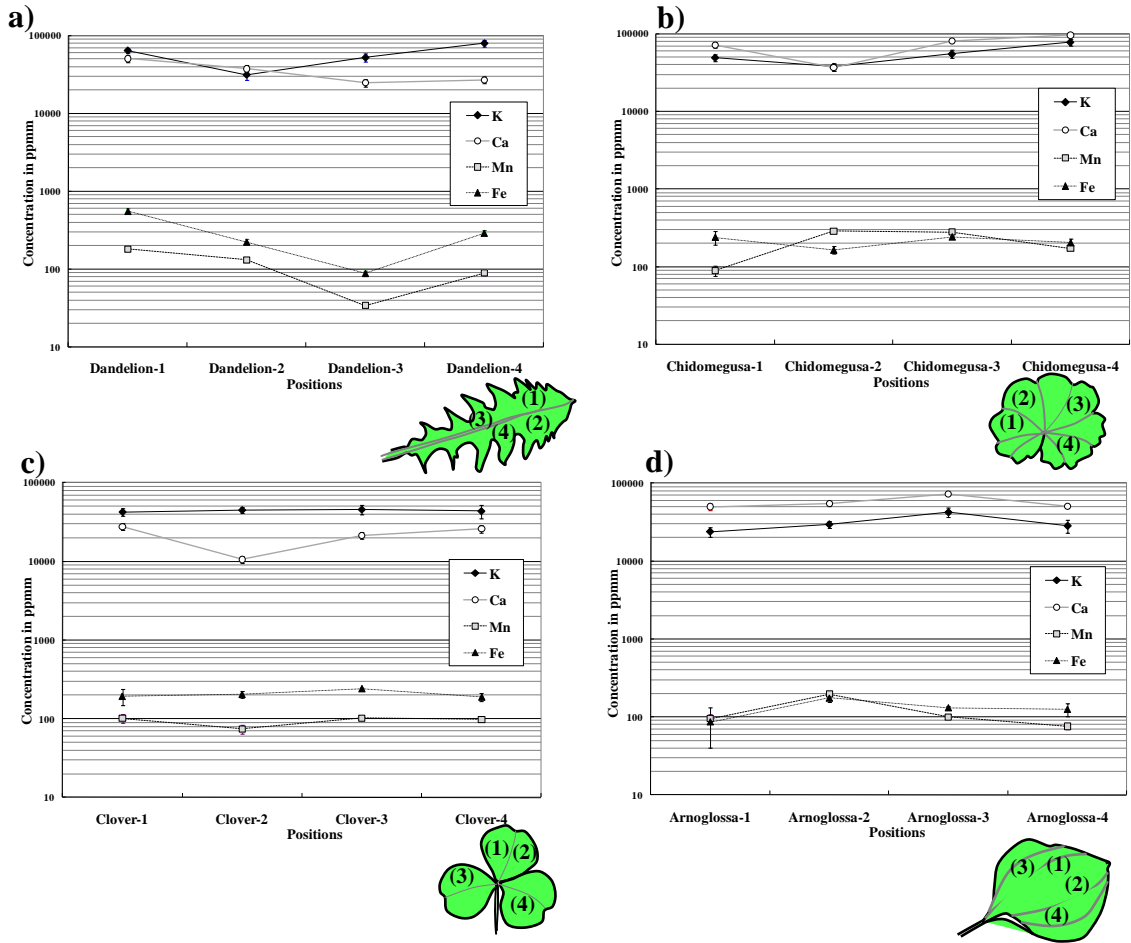
Figs. 5 a-d)には、4種の野草の葉試料に対する無標準法と内部標準法の結果を比較して示す。照射箇所によりK濃度が著しく変化すると無標準法の精度もその影響を受けてしまうが、これらの図から分かるように葉・個体の違いによるK濃度変化は比較的小さく、Kを指標元素として選択したことの妥当性が確認できた。両法における結果はほぼ一致し、両法において正確に同じ場所のみが測定されてはいない事実を考えると、無標準法の精度は満足すべきものであることが確認できる。殆どの結果が実験誤差の範囲内で互いに一致しているが、これらの実験誤差は(Kの場合、ピーク収量の統計誤差は2%以下であるため)主に検出効率と吸収体・空気・試料中でのX線吸収の値に由来する。



Figs. 5 a) Comparison of the results of potassium concentration in four dandelion samples obtained by the present method and by the internal-standard method.
b, c d) Same as Fig. 5 a) but for b) chidomegusa, c) clover and d) arnoglossa, respectively.

3 結果と議論

最初に、同一の葉内における元素濃度の変化が調べられた。Figs. 6 a-d)には、4種の野草に対するK, Ca, Mn, Feの結果を示す。これらの元素は、野草の種類に依らず比較的多量に葉中に存在することが確認されている。葉中の照射箇所は、図の右下に描画されている。これらの結果から、多くの元素は同一の葉の中においても測定位置による依存性を強く示すが、K濃度のみは比較的安定していることが分かる。このことからKを指標元素とした妥当性が示された。



Figs. 6 a) Comparison of the concentration of four elements in a dandelion leaf for different irradiating positions. b, c d) Same as Fig. 6 a) but for b) chidomegusa, c) clover and d) arnoglossa, respectively. Irradiating positions are illustrated in the lower right hand corner of each graph.

Fig. 7には照射開始からの連続 X 線収量変化を示す。連続 X 線の大半は葉中の水分から放出され、ビーム照射により照射部分が枯渇していけば連続 X 線収量が減少していくことになるため、これはほぼオオバコ葉中の水分濃度変化に対応しているものと思われる。この場合摘んだ葉に対して照射が行われたため、照射部分への水分補給は葉の周囲の部分からのみ行われる。この結果から、十分に水分が照射部に供給できない条件下においては、照射開始直後から水分が減少し始め 32 分の照射時間の間減少し続けることが分かる。

それに対し Fig. 8には、同様な観測を水栽培のポトス葉に対して行った結果を示す。ビーム電流などの照射条件は同一である。図から、2 時間にも及ぶ照射時間中葉中の水分はほぼ一定に保たれていることが分かる。Fig. 7 から、水分の供給が充分に行われない条件下では照射部の水分が減少を続けることが確認されており、Fig. 8 の結果は、少なくとも水分補給という観点からは 2 時間もの照射時間にわたり正常な代謝が保持されていることを示している。

一方 Fig. 9には、土栽培のオオバコに対し同様な測定を行った結果を示す。図中には主要 4 元素に対する濃度変化も示されているが、この濃度値は本研究の方法で求められたものである。連続 X 線収量、K と Zn 濃度は、30 分の照射時間中ほぼ一定に保たれており、正常な代謝が保たれていることを示している。だが詳しく観察すると、Fe と Ca が特徴的な振舞いを示していることが分かる。Fe は照射開始後上昇し、約 8 分ほどで最大値を迎え、その後ゆっくりと元の値に戻っていく。それに対し Ca は、照射後上昇を続け 30 分経過後もさらに上昇を示す。

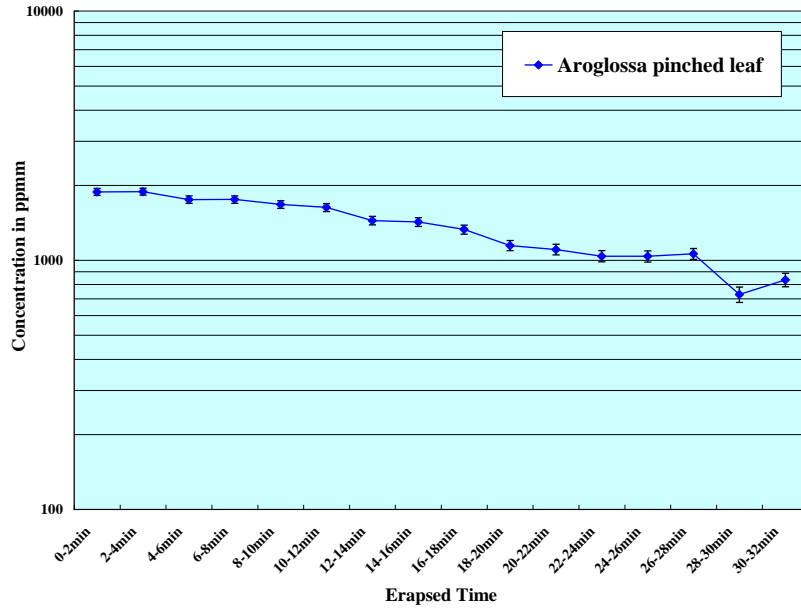


Fig. 7 Changes of the yields of continuous X-rays in the region between 4.5 and 5.5 keV with erased time obtained by irradiating pinched leaf of arnoglossa.

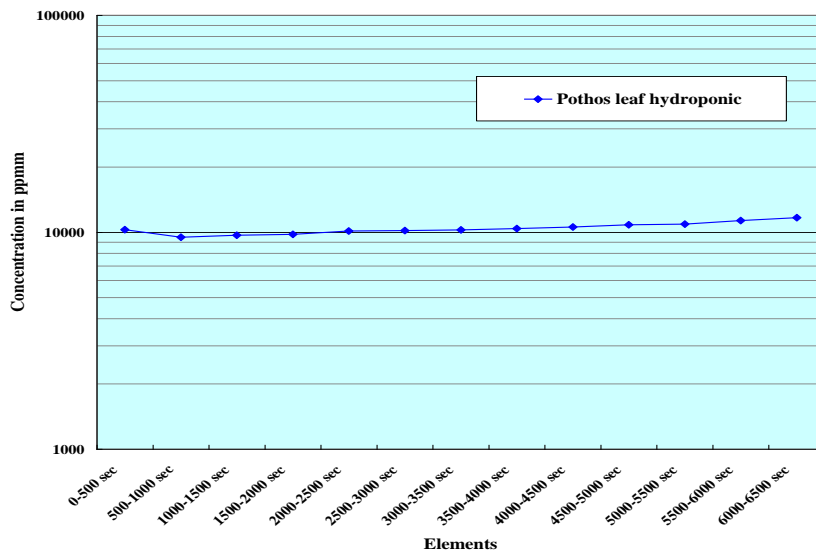


Fig. 8 Same as Fig. 7 but for a leaf of living pothos growing by hydroponics.

Fig. 10には、水栽培のポトス葉に対し同様な観察を15分間にわたり行った結果を示す。Fig.9の土栽培と比較し導管液がより動きやすく、水分や元素の供給・移動が円滑に行われる条件であると期待される。図中には上記4元素に加えK、Cuの濃度変化も示されているが、FeはFig.9の場合と同様に照射後上昇し、約8分でピークを迎えその後初期値に戻っていくという全く同様な振舞いを示している。Caに関しては上昇開始がやや遅いものの、その後の上昇は急激で濃度は初期値の3倍近くに達している。Fig.9同様、Mnも変化幅は小さいがCaと同様の振舞いを見せており、この点もFig.9の場合と共通している。植物、葉、照射位置を変え何度観測を行ってもほぼ同様な結果が再現されることが確認できた。Ca濃度は2時間もの照射時間の間上昇を続け、最終的に初期値の4倍近くまで濃度が上昇する。

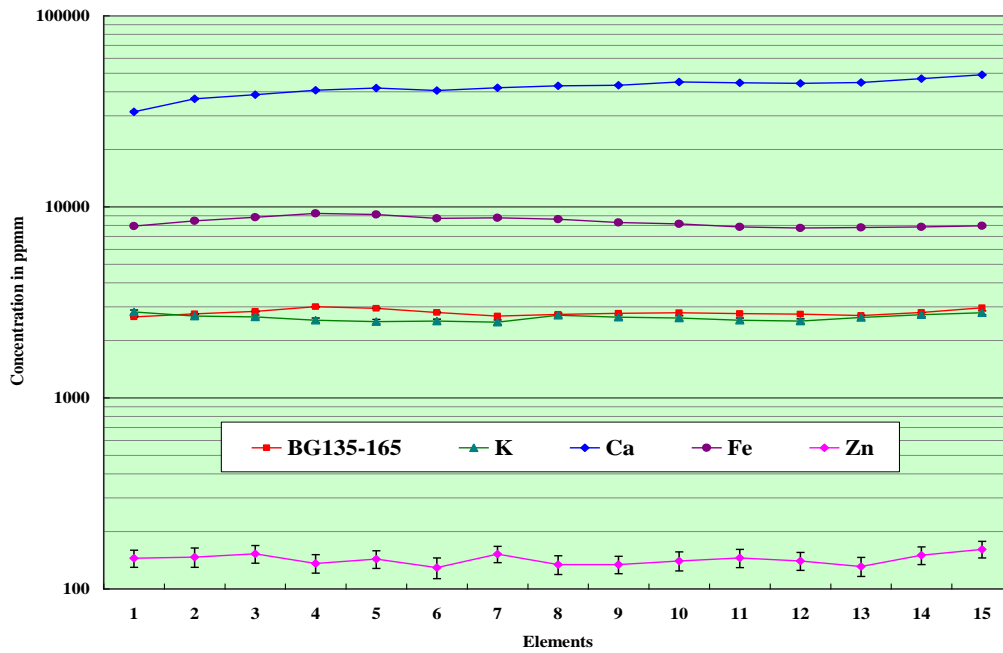


Fig. 9 Changes of the yields of continuous X-rays and concentration of principal four elements with erased time obtained by irradiating living arnoglossa growing on soil. For the yields of continuous X-rays, the axis of ordinate is in arbitrary units, while elemental concentration (ppm) is obtained by the present method.

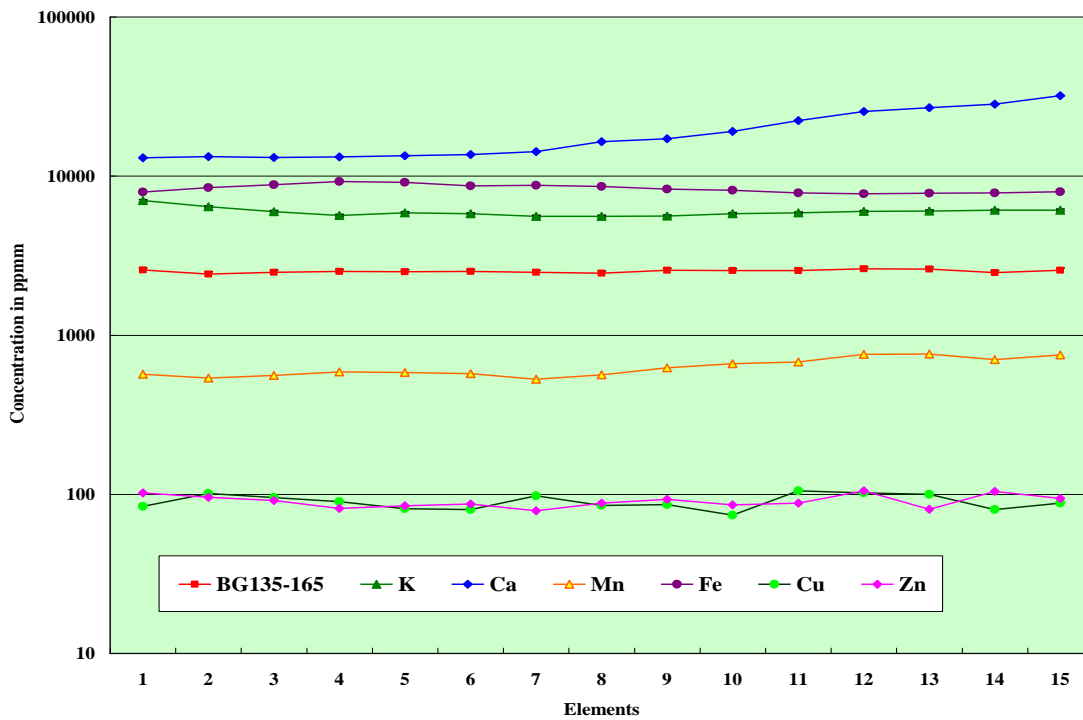
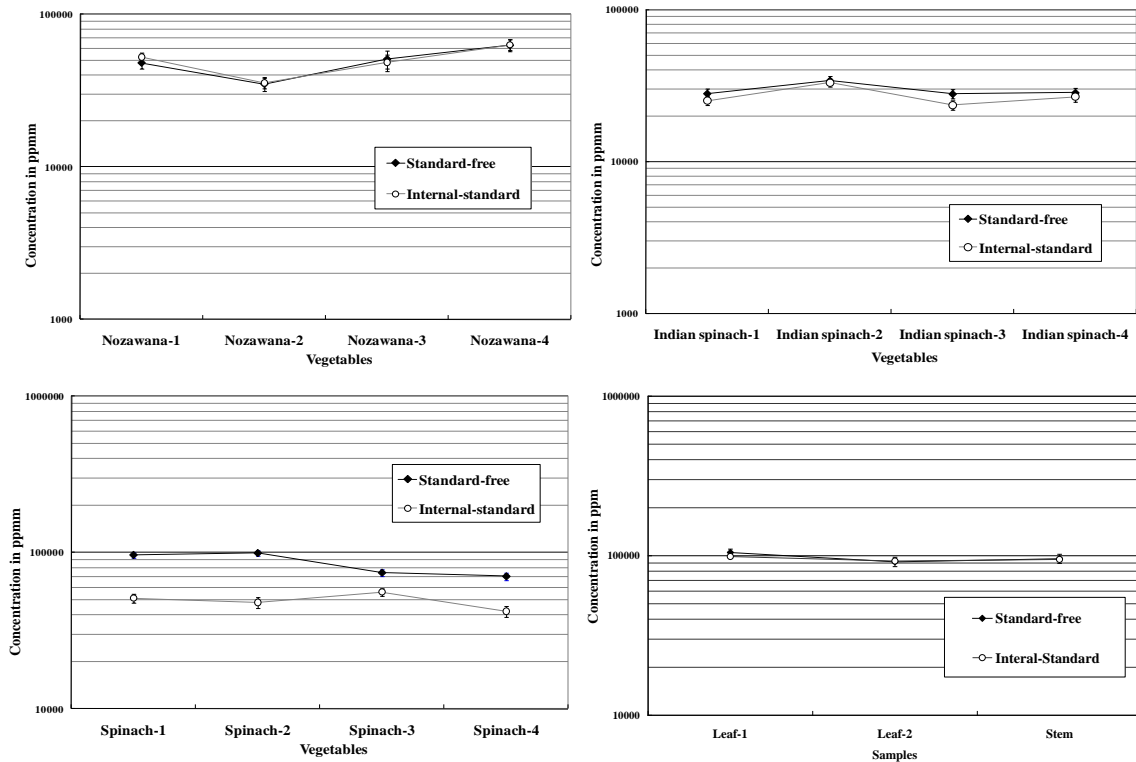


Fig. 10 Same as Fig. 9 but for a leaf of living pothos growing by hydroponics. Changes of concentration of manganese and copper are also shown in the figure.

これらの元素濃度変化は apoptosis の機構に対応しているものと推測される。ビーム電流はほぼ粒子線治療の場合と同様であり、ビームエネルギーに関しても、治療時には飛程終端近くのブ

ラッグピークを利用するため、腫瘍部では本実験の条件と同程度になるものと思われる。そのため apoptosis が生じやすい条件下での照射となる。Fe はミトコンドリアで生成される cytochrome-C の主成分でありその動きに対応していることが予想され、カルシウムは照射により Ca channel が開き細胞内に導入されるものと思われる¹²⁾。しかし apoptosis との関連に関して断定的な結論を述べるには、さらに系統的な観測がなされなければならない、近い将来の研究によりその関連性を明らかにしていきたい。

Figs. 11 には、Figs. 5 と同様の両法による比較を野菜に対して行った結果を示す。これらの野菜 (a : 野沢菜、b : ツルムラサキ、c : ホウレンソウ、d : セリ) はいずれも岩手県産で市販されているものである。セリに関しては根付で販売されており、一定期間水中で栽培し生きたままの照射が行われているが、他の野菜は切り取った葉に対して比較が行われた。Fig. 11- a) を見ると、両法の値は良く一致しているが、b) においては本無標準法の結果は系統的に若干高めの値を示しており、c) においてはそれが顕著な傾向として見られる。一方 d) の水栽培中のセリの場合は良く一致している。a-c) においては葉もしくは茎が切り取られ、代謝に伴う水分などの補給は充分に行われていない。しかし a) の場合野沢菜の葉は非常に大きく (約 20×40 cm)、照射時間も約 5 分と短いため照射部への水分の補給は葉中の他の部分から行われていることが予想される。ツルムラサキ(b) の場合、葉は小さいが太い茎を持ち、水分は茎からある程度供給されると期待される。それに対し、c) ホウレンソウの場合は大きく厚い葉も太い茎ももたず、水分の供給能力が低いため照射部の枯渇が生じ易い。d) の水栽培の場合に両者の値が良く一致していることから、野草に対し確立された「生きた植物に対する無標準法」は、(導管液からの補給が充分に行いうる条件下においては) 野菜にもそのまま適用可能であると期待される。



Figs. 11 a) Comparison of the results of potassium concentration in a leaf of nozawana obtained by the present method and by the internal-standard method, where pinched leaves were analyzed.
 b, c) Same as Fig. 11 a) but for b) Indian spinach and c) spinach.
 d) Same as Fig. 11 a) but for Japanese parsley, which was analyzed while keeping it alive.

本法は基本的に生きた動物試料にも適用可能である。その場合、開創した状態で特定の臓器に僅かなビームを照射し、生きたままの状態で元素動態を観察可能であると推測される。その手法が確立されれば、apoptosis のメカニズム解明に貴重な情報を与えるものと期待され、今後その可能性も探っていきたい。もう一つの方向として、本来の目的である有害元素の農作物中の動態を観察するため、特定元素を植物に投与しその後の植物中での動態観察を行う。それは現時点(2011年10月)において第一報が完成しているが¹³⁾、現在査読中であるためその報告は次巻の報文集において行うこととする。

4 まとめ

以上の事柄は以下のように要約することができる。

1. 生きた植物に対する大気 PIXE における無標準定量分析法が開発され、ビーム照射条件・測定条件が確立された。
2. カリウム=K が指標元素に指定され、4種の野草を用いて変換係数が決定された。本法により求められた元素濃度は、野草や農作物において従来の内部標準法により求められた値と良く一致し、本法の精度・有用性が確認された。
3. 照射中、照射部における水分と K 濃度が一定に保たれることが初めて確認された。一方、導管液からの供給が充分に行えない摘んだ葉の場合、水分が照射により枯渇し、結果として元素濃度が高く見積もられることが確認された。
4. いくつかの元素濃度 (Ca、Mn、Fe など) が照射中興味深い変化を示すことが確認され、その apoptosis 発生機構との関連性が示唆された。

謝辞

本法は科学研究費基盤 B における主題の一部として開発が行われた。分担者である産業技術総合研究所主任研究員：村尾智先生、長崎大学環境科学部：中村剛先生及び研究室の方々には本研究への有益な助言を頂きました。ここに感謝します。また共同利用の円滑な運営のため日々努力されている NMCC 及び岩手医科大学サイクロトロンセンターのスタッフの方々に謝意を表します。最後に NMCC の全国共同利用をアクティブに利用され成果を上げ、我々に刺激を与えることにより、本研究のような方法論開発の原動力を与えて下さっている利用者の皆様方に感謝いたします。

参考文献

1. M. A. Habib, S. Miono, K. Sera and S. Futatsugawa, "PIXE Analysis of Hair in Arsenic Pollution, Bangladesh.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.12, No.1,2 19-34 (2002)
2. S. Murao, E. Daisa, K. Sera, V. Maglambayan and S. Futatsugawa, "PIXE Measurement of Human Hairs from a Small-scale Mining Site of the Philippines.", *Nucl. Instr. Meth. B* 168-173 (2002)
3. S. Murao, B. Tumenbayar, K. Sera, S. Futatsugawa and T. Waza,, "Finding of High Level Arsenic for Mongolian Villagers" *Int'l Journal of PIXE*, Vol.14-3,4, 125-132 (2004)
4. E. Clemente, K. Sera, S. Futatsugawa and S. Murao, "PIXE Analysis of Hair Samples from Artisanal Mining Communities in the Acupan Region, Benguet" Philippines.", *Nucl. Instr. Meth.*, B219-220, 161-165 (2004)
5. K. Sera, MD. Shafiqul Islam, T. Nakamura, S. Goto, C. Takahashi and Y. Saitoh, "Studies on Water Contamination in Bangladesh. - Primary Treatment of Water Samples at the Sampling Site.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.20-3, 4 119-126 (2010)
世良耕一郎, MD. Shafiqul Islam, 高辻俊宏, 中村 剛, 後藤祥子, 高橋千衣子, 齋藤義弘, 「Bangladesh における水系汚染と食のリスク評価」、NMCC 共同利用研究成果報文集、第 16 巻 187-196 (2009)
6. K. Sera, S. Futatsugawa, K. Matsuda and Y. Miura, "Standard-free method of quantitative analysis for bio-samples", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.6, No.3, 4 467-481 (1996)

7. K. Sera, K. Terasaki, J. Itoh, Y. Saitoh and S. Sakurai, "Standard-Free Method for Hair Samples in In-Air PIXE.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.18 -1,2 21-30 (2008)
8. K. Sera, S. Goto, C. Takahashi and Y. Saitoh, "Quantitative Analysis of Untreated Oil Samples in In-air PIXE", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.20-3, 4 77-84 (2010)
9. S. Goto, C. Takahashi and Y. Saitoh, S. Murao and K.Sera, "Sample Preparation for PIXE Analysis of Fatty Foods.", Submitted to *Int'l Journal of PIXE* (2011)
10. K. Sera, T. Sasaki, J. Itoh, Y. Saitoh and S. Futatsugawa, "Simultaneous Measurement of Two Different Targets by Means of Vacuum and In-Air PIXE.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.18-1,2 1-12 (2008)
11. S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitou and K. Sera, " Present Status of NMCC and Sample Preparation Method of Bio-Samples.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. 3 , No.4 319-328 (1993)
12. S. Harada, Y. Tamakawa, K. Ishii, A. Tanaka, T. Satoh, S. Matsuyama, H. Yamazaki, Y. Komori, T. Kamaiya, K. Arakawa, M. Saitoh, M. Oikawa and K. Sera, "The Kinetics of Fe and Ca for the Development of Radiation-Induced Apoptosis by Micro- PIXE Imaging.", *Nucl. Instr. Meth.*, B210, 383-387 (2003)
13. K. Sera, K. Terasaki, T. Sasaki, S. Goto, C. Takahashi and Y. Saitoh, "Movement of Heavy Elements in Plants by Means of a Standard-free Method for Living Plants in In-Air PIXE.", submitted to *Int'l Journal of*

Standard-free method for living plants in in-air PIXE

K. Sera¹, S. Goto², C. Takahashi² and Y. Saitoh²

¹Cyclotron Research Center, Iwate Medical University,
Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

²Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association,
348-58 Tomegamori, Takizawa 020-0173, Japan

Abstract

A standard-free method for living plants in in-air PIXE has been developed in order to clarify mechanism of elemental transportation and movement in farm products. The components of the continuous X-rays originated from air and a backing film can be exactly subtracted using a blank spectrum after normalization by the yields of Ar K α X-rays. It is found by observing the yield of continuous X-rays with passage of time that water content is continuously decreasing during irradiation with a proton beam in a case of pinched leaves. Contrary, it is kept almost constant during irradiation for the living plants to which water is continuously provided through the roots. Stability of the yield of continuous X-rays is a required condition for a standard-free method, which makes use of the yield of continuous X-rays mainly emitted from water content. It is confirmed that potassium concentration shows no large position dependence on a leaf, and it keeps almost constant during irradiation, which also indicates that regular metabolism is going on. As potassium is always contained in all kinds of plants in large amount, we designated it as an index element. As a result, it is found that the potassium concentration obtained by the present standard-free method shows quite consistent values with those obtained by the internal-standard method. The present method is confirmed to be quite useful for investigating movement not only of toxic elements but also of essential elements reflecting metabolism in plants.

Keywords : PIXE, Living plant, Standard-free, In-Air, Toxic element, Quantitative analysis