

## 生きた植物試料に対する無標準定量分析法を用いた植物内元素変動の観察

世良耕一郎<sup>1</sup>、寺崎一典<sup>1</sup>、佐々木敏秋<sup>1</sup>、後藤祥子<sup>2</sup>、高橋千衣子<sup>2</sup>、齋藤義弘<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 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

<sup>2</sup> 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

昨年報告を行った「生きた植物試料に対する無標準法<sup>1,2)</sup>」は、大気において生命活動を保った状態での植物内元素濃度変動観察を可能とすることが示された。水分を反映する制動放射 X 線の収量とともに、多くの元素が 30 分以上の照射時間の間一定濃度を保つのに対し、鉄、カルシウムはアポトシスの機構に対応するものと思われる興味深い変動を示すことが確認された。この変動は多種の植物に対し共通であり、再現性があることも確認された。

一方本法開発の当初の目的は、有害元素に汚染された農業用水から農作物への重元素の取り込み・及び植物内での動態を観察することにあった。我々は、アジア諸国におけるヒ素・水銀・フッ素などによる広域的環境汚染問題に関する多くの調査研究に参加してきた<sup>3-6)</sup>。例えばバングラデッシュにおいては、井戸水に起因する汚染が環境全体に拡大し農業用水などが汚染されている<sup>7,8)</sup>。その汚染された水から取り込まれた有害元素の、可食部への輸送を定量的・経時的に観測することは、現在アジア各国で行われている農作物中の有害元素濃度を低減させるための試み（農耕法の開発や品種改良など）の一助になり得るものと期待される。現在アジアにおける有害元素による環境汚染は深刻化し、中毒患者数は一説には 2 億人とも言われている。この問題解決のためには、有害元素の総摂取量を見積もること、そのために個々の食品中の有害元素濃度を把握、食生活を考慮した総合摂取量を算定し、リスクマネジメントを行う必要がある。我々は科研費基盤研究(B)を取得し、バングラデッシュ、モンゴルにおける食品・水・毛髪の実験分析や住民への聞き取り調査などを行い、その結果をリスク管理に結びつけるための研究を進めている。さらに同研究の目的の一つとして、農作物中の重元素変動を調べるための技術開発も計画され、本法の開発はその主旨に沿うものである。

本研究においては、種々の植物に対し複数の方法で数種の重元素が水溶液として投与され、その元素濃度の植物内での時間変動が観測される。投与された重元素以外にも、重元素負荷の影響で他の元素濃度が変動することも予想され、その経時変動も詳細に調べられる。

## 2 実験方法

### 2.1 植物と重元素の投与

いずれも NMCC 敷地内に生育していた 4 種類の野草 (オオバコ : *Plantago asiatica*、ゲンノショウコ : *Geranium thunbergii*、キツネノマゴ : *Justicia procumbens* L.、ヤマゴボウ : *Phytolacca americana* L.) が、周辺の土ごと根を傷つけずに採取された。後二者に対しては重金属を含む水溶液中で茎をカットする形で重元素 (Ga、As) の投与を行った。前二者は根を傷つけずに土ごと採取し、一定期間水を与え安定した生育状況を保った後、水の吸い上げを良くするため 1 日ほど水分を与えない状態で実験に供された。投与は水溶液 (Br、Ge) を根の生えた土に注ぐ形で行われた。植物の種類、照射時の生育状態、水溶液とその投与方法などをまとめて Table 1 に示す。

Table 1. Plants, their growing conditions and given solutions.

Plants	Growing conditions	Given solutions
<b>Arnoglossa</b> ( <i>Plantago asiatica</i> ) Leaf and seed	Normal (on Soil)	1) KBr water solution (Br 1000 ppm)
<b>Gennnoshouko</b> ( <i>Geranium thunbergii</i> )	Normal (on Soil)	1) KBr water solution (Br 1000 ppm) 2) GeO <sub>2</sub> water solution (300 ppm)
<b>Kitsunenomago</b> ( <i>Justicia procumbens</i> L.)	Cut in the water solution	As <sub>2</sub> O <sub>3</sub> in NaCl water solution (50 ppm)
<b>Pokeweed</b> ( <i>Phytolacca</i> , L.)	Cut in the water solution	Ga (NO <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> in 1 mol/L HNO <sub>3</sub> solution (300 ppm)

### 2.2 照射・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 2.55 MeV となる<sup>9)</sup>。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 1.5 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-Kα X 線の収量により確認された。真空・大気 PIXE 測定システムを含むビームコースの layout を Fig. 1 に示す。

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 200 μm 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 に固定されたため、低エネルギー X 線の空気による吸収の条件は同一であり、それは検出器の検出効率に組み込まれた<sup>9)</sup>。水溶液中で茎が切断されたヤマゴボウに対しては、切断面から 16.5 cm 上方の葉、葉茎との付け根から 1cm のポイントが照射された。ゲンノショウコに対しては、葉茎の付け根から 1cm の部分が照射されたが、それは地面から 9.5cm の距離 (KBr 投与の場合) と 7.3 cm の距離 (Ge 溶液投与の場合) に相当するポイントであった。オオバコの場合、地面から 5.5 cm 離れた葉茎の付け根から 2.5cm の葉上のポイントが照射された。オオバコは葉茎とともに花・種の茎も有しており、土の表面から 10.3 cm 離れた種の部分に対しても照射が行われた。また、照射中の代謝を活性化させるため、ライトが点灯された。

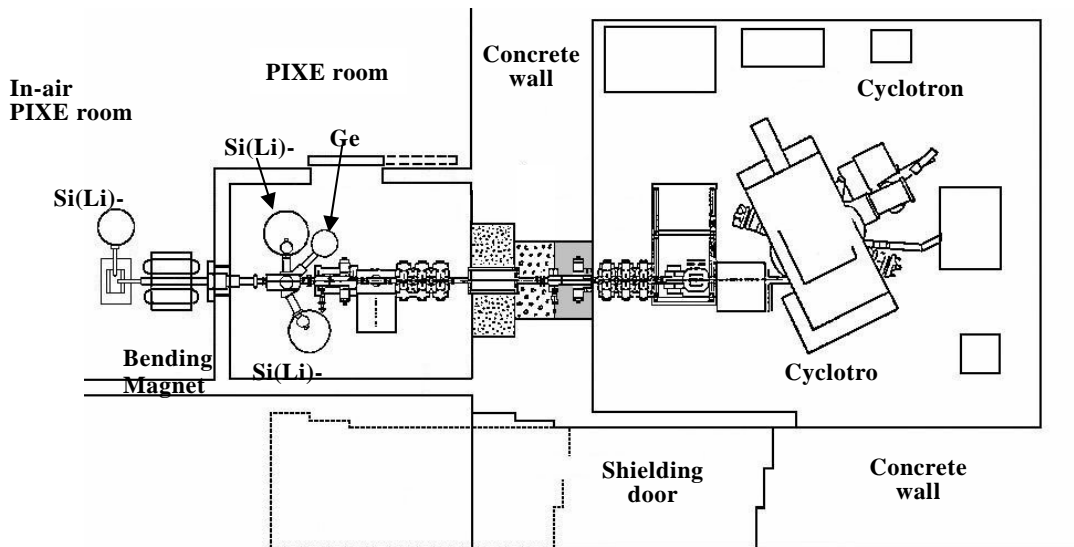


Fig. 1 Layout of the beam transport system.

与えられた溶液は、KBr 水溶液 (Br = 1000 ppm)、GeO<sub>2</sub> 水溶液 (Ge = 300 ppm)、1 mol/L の HNO<sub>3</sub> 中の Ga(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub> 溶液 (Ga = 300 ppm)、食塩水中の As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> 溶液 (As: 50 ppm) であり、植物との対応は Table 1 に記す。投与した溶液量はいずれも 200 mL である。これよりも低い濃度の溶液においても植物中の投与元素が観測可能であることは確認されているが、投与元素ピークの統計精度を高めるため、またより速い元素動態観測のために、本研究においては高めの濃度を用いた。

Fig. 2 に典型的な生きた植物のスペクトルを示す。図はゲンノショウコに Br 溶液が投与され、投与・照射開始後 20 分・75 分が経過した時点で 4 分半の測定で得られたスペクトルであり、後者には前者には見られなかった Br のピークが明確に観測されている。また、図にみられるように多くの元素からの特性 X 線が感度良く観測され、空気から発生する Ar の X 線は比較的少ない。

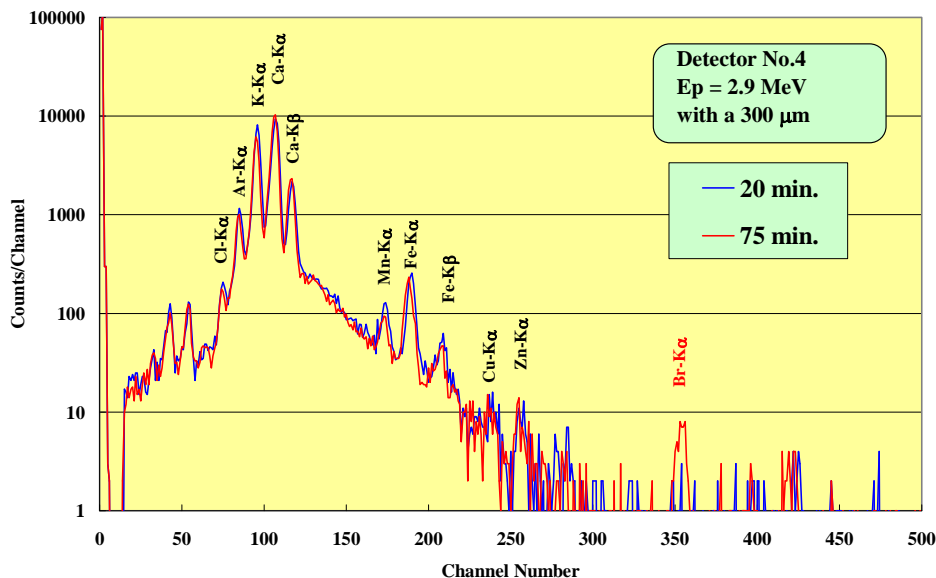


Fig. 2 Typical in-air spectrum of a living plant (GennoShouko) obtained with a 300 μm Mylar absorber, where the spectra corresponding to 20 and 75 minutes elapsed time after starting irradiation are shown in blue and red lines, respectively. Bromine solution was supplied at the same time of starting irradiation.

### 2.3 生きた植物試料に対する無標準法

無標準法(Standard-free method)は試料中の軽元素マトリクスから放出される連続 X 線の収量を基準にとり、内部標準を加えない試料に対して定量分析を行う方法である<sup>10)</sup>。しかし大気 PIXE の場合連続 X 線は試料だけではなく空気からも発生するため、その寄与を差し引く必要がある。我々は、Ar-KX 線収量で規格化を行い差し引くことにより、大気中での無標準法を完成させた<sup>11,12)</sup>。また、生きた植物に対する無標準法は、数種の植物に対し連続 X 線収量に対する指標元素 K-K $\alpha$  ピークの収量比と内部標準法により求めた K 濃度を比較することにより開発された。詳細は参考文献 1、2 に記す。

## 3 結果と議論

Fig. 3 に、ヤマゴボウに 300 ppm Ga 溶液を投与した後の Ga を含む主要 5 元素の葉における変化を示す。投与は、溶液中で茎を水切りする方法で行われ、それと同時に照射・測定が開始された。K、Ca、Fe の 3 元素は投与・照射開始後徐々に濃度を増加させている。昨年報告を行った重金属溶液投与を行わない場合、Ca は照射時間中上昇を続け、Fe が照射後 8 分後に濃度を上昇させるがすぐに元の値に戻り、K を含む多くの元素は照射中ほぼ一定を保つ振舞いを見せたのに対し<sup>1,2)</sup>、本研究の場合、重元素投与と負荷により他元素動態にも少なからず影響を与えていることが分かる。Ga 濃度は照射・投与開始後 30 分で上昇を見せ、その後 50 分間にわたって上昇を続け、ほぼ 100 ppm に達することが確認できた。

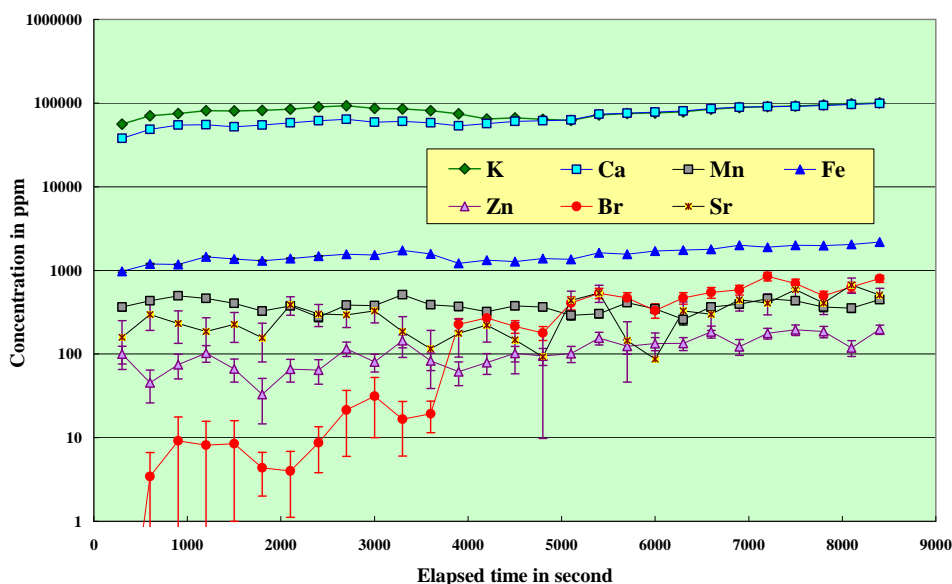


Fig. 3 Variation of elemental concentration of five elements in the leaf of pokeweed with elapsed time after starting irradiation. Gallium solution was supplied at the same time of starting irradiation.

Fig. 4 には Br 溶液が投与された後の、ゲンノショウコ葉中の 5 分ごとの元素濃度変化を示す。投与は、1000 ppm の Br 溶液を、ポットに移植して数日間経過したゲンノショウコの土壤に散布する形で行われた。吸収を良くするため、照射前 1 日間水の投与を行っていない。この場合も、投与と同時に陽子ビームによる照射が開始されている。40 分までは Br の顕著な上昇は観測されないが、その後 20 分間にわたり緩やかな、しかし確実な上昇を見せている。60 分経過後急激な上昇が観測され、20 ppm 程度から 300 ppm にまでその濃度を増加させた後、緩やかな上昇を続け、140 分経過後には 850 ppm に達している。

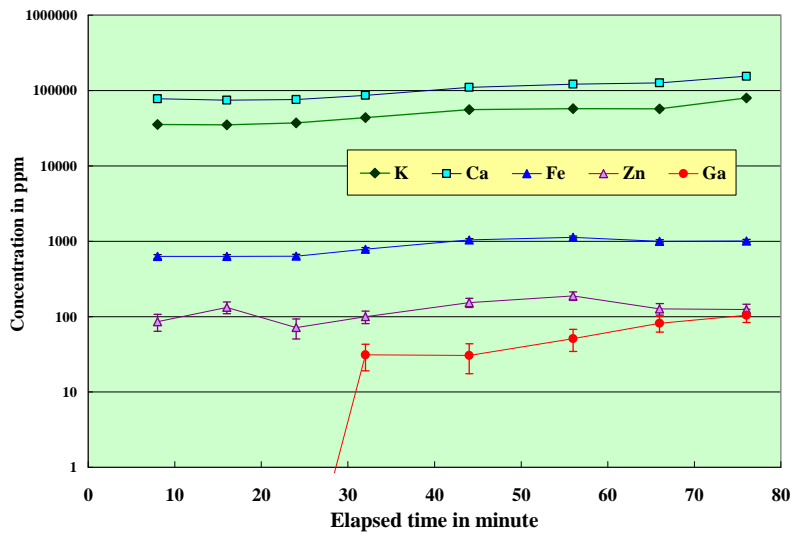


Fig. 4 Variation of elemental concentration of seven elements in the leaf of gennoshouko, where bromine solution (1000 ppm) was supplied to the soil at the same time of starting irradiation

Fig. 5 にはゲンノショウコ葉中の元素濃度変化を示すが、この場合、ほぼ同様な条件で 300 ppm の Ge 溶液が投与されている。K 濃度は 4500 秒の照射時間の間ほぼ一定値を示し、このことは正常な代謝が持続されていることを示す。Ge 濃度は 30 分間、検出限界以下で観測されていないが、その後急激な上昇を見せた後緩やかな上昇に転じ、4500 秒 (75 分) 後には 250 ppm に達する。

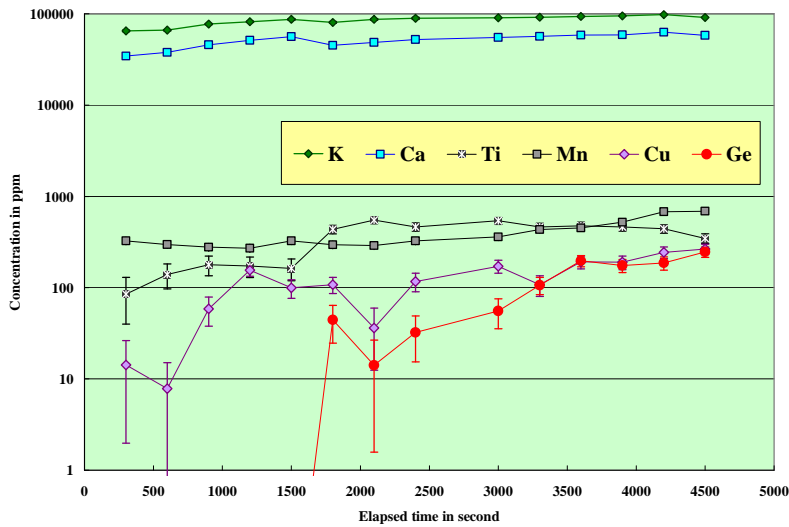


Fig. 5 Variation of six elements in gennoshouko, where germanium solution (300 ppm) was supplied to the soil.

Fig. 6 には、Fig. 4 の場合と同様の Br 溶液をオオバコに投与した場合の葉中の元素濃度変化を示す。溶液と投与条件はゲンノショウコに対するものと同様である。ゲンノショウコと比べ Br 濃度上昇の応答が早く、10~25 分の間に急上昇することが確認された。その後も確実に上昇を続け、最終的には 2900 ppm にも達する。一方他のいくつかの元素 (Ti, Mn, Fe, Cu など) は Br の上昇に連動するように上昇を続けるが、この振舞は Fig. 4 のゲンノショウコの場合、明確には観測されなかった。これが Br 溶液負荷による影響なのか apoptosis のメカニズムに対応したものなのかの判断は難しい。しかし昨年報告を行ったように<sup>1,2)</sup>、重元素供給なしの場合の元素濃度変化は Ca, Fe, Mn 以外には見られず、Fe, Mn の変化も

大きなものではなかったことを考えると、重元素溶液負荷の影響が大きいものと思われる。また、上記他元素の変動、同一条件下投与における Br 濃度の差異から考え、植物種による依存性が大きいことも確認できた。

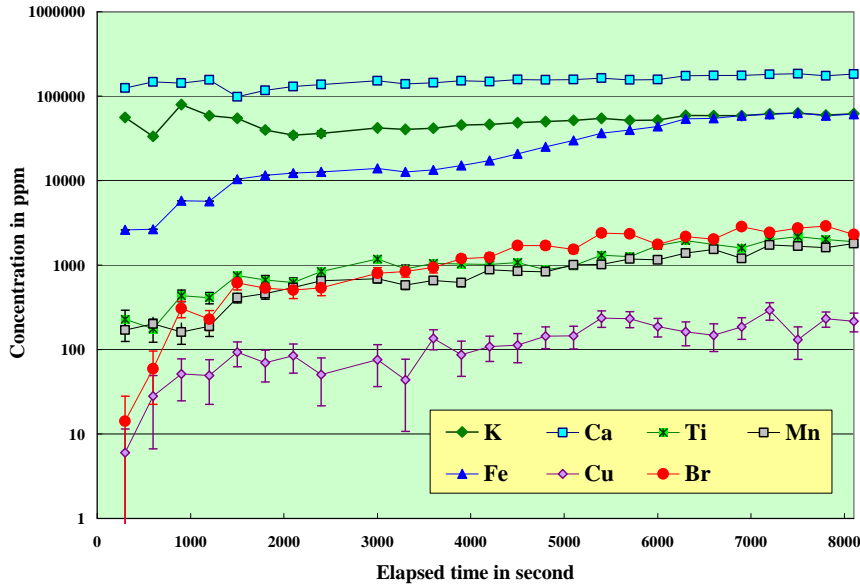


Fig. 6 Same as Fig. 4 but for seven elements in the leaf of arnoglossa.

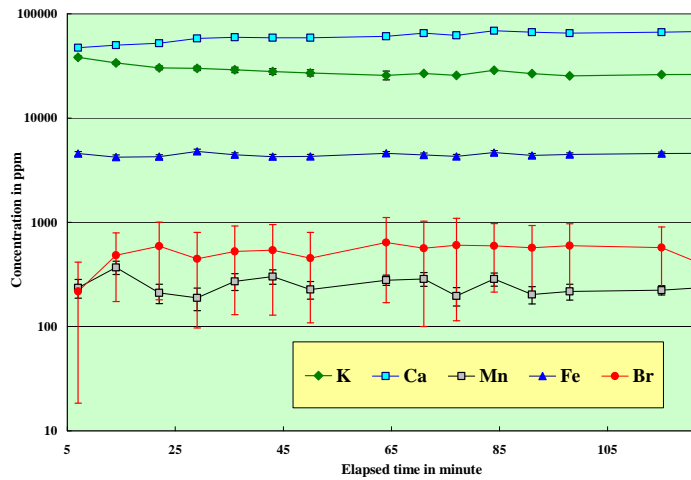


Fig. 7 Same as Fig. 4 but for five elements in the seeds of arnoglossa.

オオバコは葉茎の他に花・種のための茎を有する。そのため同一条件下で種の部分にビームを当て、元素濃度変化を調べた。その結果を Fig. 7 に示す。Br の上昇開始は一見早いようにも見えるが、実験誤差 (主にピーク収量の統計精度) から考えると有意な上昇とは言えない。照射開始後 Ca が僅かに上昇、K が僅かに減少傾向を見せている他は元素濃度変化が殆ど観測されず、葉と比べると代謝の活性度及び重元素負荷に対する反応が低いことがわかる。

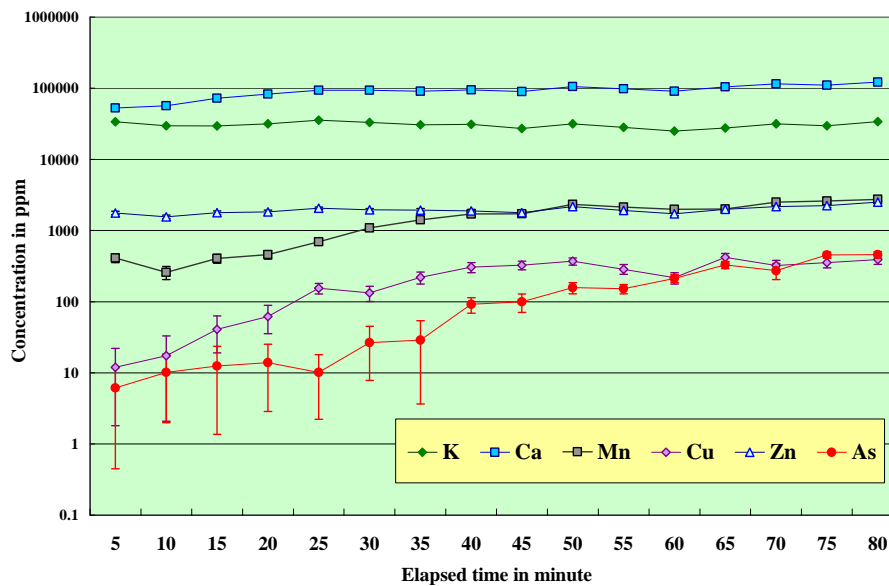


Fig. 8 Variation of elemental concentration of six elements in kitsunenomago, where arsenic solution (50 ppm) was absorbed through cut section of the stem.

本研究の本来の目的は、農作物中の有害元素の動態を観察することにある。そのため As 溶液をキツネノマゴに投与した結果が Fig. 8 に示されている。As の毒性のため高濃度の溶液投与はできないが、短時間の動態観察のためにはある程度の濃度が必要となる。そのため 50 ppm のヒ素溶液が供給された。さらに最も吸収が良いと思われる、茎を溶液中で水切りする形での投与が行われた。投与・照射開始後 30 分までは統計精度も悪く、有意な上昇は観測されなかったが、その後確実な上昇を示し 50 分間にわたり上昇を続け、400 ppm ほどになったところで飽和状態になったかのように見える。ヒ素濃度変化と共に Mn、Cu が上昇を見せているが、これらの上昇は As の上昇よりも早く始まることから、As 負荷の影響よりも apoptosis のメカニズムに呼応したものである可能性が否定できない。昨年報告を行なった重元素無負荷の場合の Mn の上昇と同様な振舞いにも見えるからである<sup>1,2)</sup>。

これらの結果から、本法は植物中の重元素動態観察に効果的であることが確認できた。今後、農作物中の有害元素動態、特に可食部までの移行を観察する研究に応用していきたい。そのためには重元素濃度を下げ、数分毎の変化ではなくさらに長時間にわたる変化の観察が必要となる。そのためのポット栽培などの実験条件を整備したいと考えている。なお、本稿の内容は、参考文献 13 に報告されている。

#### 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、植物中の重元素動態の観察に応用可能であることが確認された。
2. 本法は異なる植物、多種の重元素に対して有効であることが確認された。
3. 本法は異なる重元素投与方法に対しても有効であった。
4. 本法は、重元素汚染地域における農作物の安全な栽培方法の研究に応用可能と期待される。
5. 投与元素以外の元素濃度の、apoptosis あるいは重元素負荷に対応した興味深い時間変化が観測された。またその振舞いは、植物種により特徴があることも確認された。

## 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、補助金により大気 PIXE 装置の改良が可能となった。また施設の運営に関して、共同利用の円滑な運営のため日々努力されている日本アイソトープ協会 NMCC 及び岩手医科大学サイクロ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、本研究のような方法論開発を促し有効に利用して頂いている利用者の皆様方に感謝いたします。

## 参考文献

1. K. Sera, S. Goto, C. Takahashi and Y. Saitoh, "Standard-Free Method for Living Plants in In-Air PIXE"., *Int'l Journal of PIXE*, Vol.21-1,2, 13-23 (2011)
2. 世良耕一郎、後藤祥子、高橋千衣子、齋藤義弘、"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" NMCC 共同利用研究成果報文集 第 17 巻, 69-80 (2011)
3. 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)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. K. Sera, Md, Shafiqul Islam, T. Takatsuji, T. Nakamura, S. Goto, C. Takahashi and Y. Saitoh., Investigative Studies on Water Contamination in Bangladesh. – Preliminary Treatment of Water Samples at the Sampling Site.-, *Int'l Journal of PIXE*, Vol..20-3,4, 119-126 (2010)
8. Md. Shafiqul Islam, J. Khandakar, T. Takatsuji, T. Nakamura, and K. Sera, "Influence of Demographic Factors on Arsenic Accumulation in Human Population Cases of Two Arsenic Affected Villages in Bangladesh.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.22-1-2, 131-137 (2012)
9. K. Sera, K. Terasaki, J. Itoh, Y. Saitoh, and S. Futatsugawa, "Physical Quantitative Analysis in In-Air PIXE." *Int'l Journal of PIXE*, Vol.17 -1,2, 1-10 (2007)
10. 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)
11. 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)
12. 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)
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.", *Int'l Journal of PIXE* Vol.22-1-2, 149-155, (2012)



## Movement of heavy elements in plants by means of a standard-free method for living plants in in-air PIXE

K. Sera<sup>1</sup>, K. Terasaki<sup>1</sup>, T. Sasaki<sup>1</sup>, S. Goto<sup>2</sup>, C. Takahashi<sup>2</sup> and Y. Saitoh<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

<sup>2</sup>Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

### **Abstract**

The method, which was developed by our group, enables us to perform quantitative analysis of living plants. It has been applied to investigate the transport of heavy elements such as germanium, gallium, bromine and arsenic in plants. These heavy elements are transported to the leaf through vascular vessel, and changes of their concentration with elapsed time after absorption could be clearly observed. It was confirmed that the movement depends on elements, on the manner of absorption and on the states of plant growth. In addition to the movement of supplied elements, some elements in the plant show interesting changes in response to proton irradiation. It was found that the method is quite effective for examining elemental movement in living plants.