

## 大気 PIXE による植物体中の元素濃度の定量化

### -カドミウム過剰ソルガムとマンガン欠乏ダイズの葉の元素含量-

河合成直<sup>1</sup>、太田裕貴<sup>1</sup>、茂泉翔平<sup>1</sup>、世良耕一郎<sup>2</sup>

<sup>1</sup>岩手大学農学部 020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-8

<sup>2</sup>岩手医大サイクロトロンセンター 020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢字留が森 348-1

### 1 はじめに

PIXE (Proton Induced X-Ray Emission) は粒子線励起 X 線分析法とも呼ばれ、加速器からのプロトンビームを試料に照射し、そこから放出される特性 X 線を半導体検出器で分析する手法である。非破壊で多元素を同時に ppm レベルの定量可能である。PIXE では加速されたプロトンビームは、通常  $10^{-6}$  Pa 程度の超高真空に維持された真空中にて利用されている。それに対し、大気 PIXE 法は、この陽子線を薄い隔壁を通過させることによって、大気中に取りだし PIXE 分析に使用する<sup>1)</sup>。従って、大気 PIXE 法を用いると生きたまま植物中の元素量を定量できる。この点は、灰化した植物試料を用いて行われる従来の真空 PIXE による定量法とは異なる。この方法を用いることにより従来とは違う新たな見解が得られることを期待し本研究を行った。本研究においては無標準法<sup>2)</sup>を基礎とし、生きた植物に対する無標準定量分析<sup>3,4,5)</sup>を行った。大気 PIXE に対する無標準法は既に毛髪試料<sup>6)</sup>、オイル試料<sup>7)</sup>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。

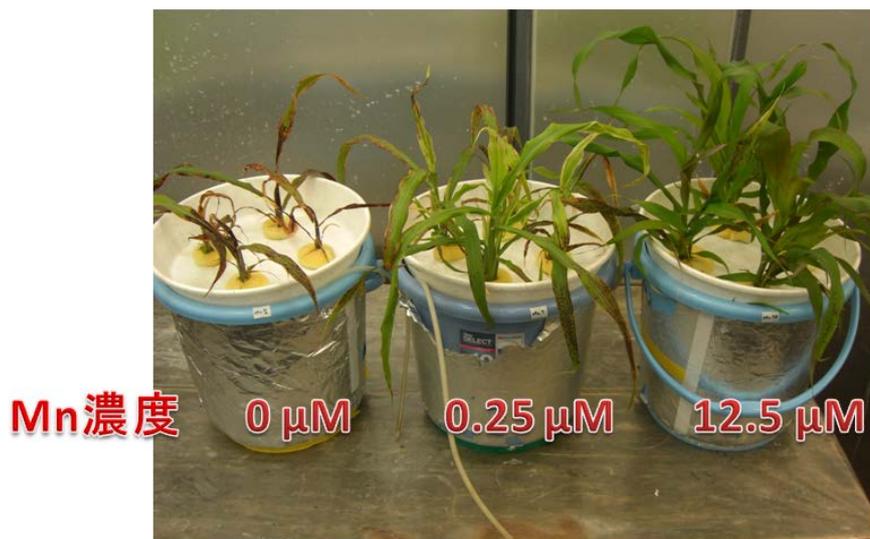


写真1 水耕培地の Mn 濃度を変えながら、2 μM のカドミウムで水耕栽培したソルガム

本実験においては、昨年の NMCC 共同研究発表会で報告した、カドミウム (Cd) 過剰症<sup>8)</sup> をマンガ  
ン (Mn) 施用により軽減できる現象 (写真 1) に注目し<sup>9)</sup>、引き続き植物における Cd と Mn の生理的関  
係を研究すべく、植物体を生きたまま大気 PIXE による分析に供試し、その元素含量の定量を試みた。  
また、それと同時に、この大気 PIXE において Mn が安定的に測定できる点に着目し、Mn 欠乏処理を  
行ったダイズとキュウリの葉を大気 PIXE により分析し、そのデータを検討した。Mn 欠乏は植物にお  
いて見られる欠乏症<sup>10)</sup> であり、Mn は光合成で機能する水の分解酵素の構成元素であり、Mn、Cu、Zn  
は光により発生する活性酸素を除去する酵素であるスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の成分で  
あることが知られている<sup>11)</sup>。

## 2 実験方法

### 2.1 植物の育成方法・期間

#### (1) 種子殺菌・育苗

ソルガム (*Sorghum bicolor* cv. Sudax、カネコ種苗) の種子を 2% さらし粉溶液にて 30 分間種子殺  
菌後、洗浄した。殺菌した種子を 23℃ の恒温器内に 24 時間静置した。また、ダイズ (品種: 雪音、雪  
印種苗) は種子殺菌せずパーライト上に播種し、岩手大学温室内で発芽させた。

#### (2) 播種・育苗

ソルガムは岩手大学人工気象室(明期 14 時間、17℃、暗期 10 時間、10℃)での水耕栽培で本培養に用  
い Cd 処理を開始した。15 L の平底容器に 1 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液を 12 L 入れ、塩素消毒したネットを溶液  
面の高さに合わせ固定し、この上に播種した。播種後、バケツにアルミホイルを被せ遮光し、約 2 日後  
に外した。1.2 葉期まで育苗した後、1/2 濃度の Hoagland & Arnon No.2 水耕培地<sup>12)</sup> (pH 5.5) に移植  
し 1 週間生育させた。

#### (3) 本培養

実験における Cd の濃度は 2 μM とした。以下の 3 つの実験区を設けた。① Mn 通常区 (0.25 μM Mn)  
② Mn 通常+Cd 区 (0.25 μM Mn, 2 μM Cd) ③ Mn 過剰+Cd 区 (12.5 μM Mn, 2 μM Cd)。この時、上  
記の 1 mM CaCl<sub>2</sub> 溶液において 1 週間、1/5 濃度の Hoagland & Arnon No.2 培地で 1 週間、1/2 濃度の  
Hoagland & Arnon No.2 培地で 2 週間栽培した後、Cd 処理を開始した。

ダイズについては、パーライトで播種した後、第 2 葉がほぼ展開した時点で、上記の 1/2 濃度の  
Hoagland & Arnon No.2 培地 (pH 5.5) を基本培地とし、微量元素である Mn を除いた培地 (-Mn 区)  
と除かない培地 (+Mn 区) に移植し、2 週間程度生育させた。

### 2.2 元素分析

#### (1) 元素量測定用試料の採取

試験開始後、ソルガムは Cd 処理後、約 3 週間目に、ダイズについては移植後約 2 週間後に 1 L のペ  
ットボトルに上記の培地を入れ、植物を 1 個体ずつ移植し、日本アイソトープ協会滝沢研究所へ運搬し  
た。

#### (2) 元素含量の測定<sup>3,4,5)</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 (NMCC) で大気 PIXE の分析を行った。プ  
ロトンビームの照射時間は 15 分とした。写真 2 に大気 PIXE の分析の様子を示した。実験においては、  
ソルガムにおいては上位葉、中位葉、下位葉を選び、さらに下位葉に見られるネクロシス部分の分析を  
行った。また、ダイズにおいては上位葉と下位葉に分けて分析を行った。植物においては葉の位置が上  
位ほど新しい葉である。この葉齢の違いによる元素含量の違いに注目した。

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、根を水中に保ち、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。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 2.45 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 線の収量により常時確認された。PIXE で得られるデータに基づき、新鮮重当りの元素量の定量値の算出を行った。また、本実験においては、各実験区すべて 1 連で行われた。

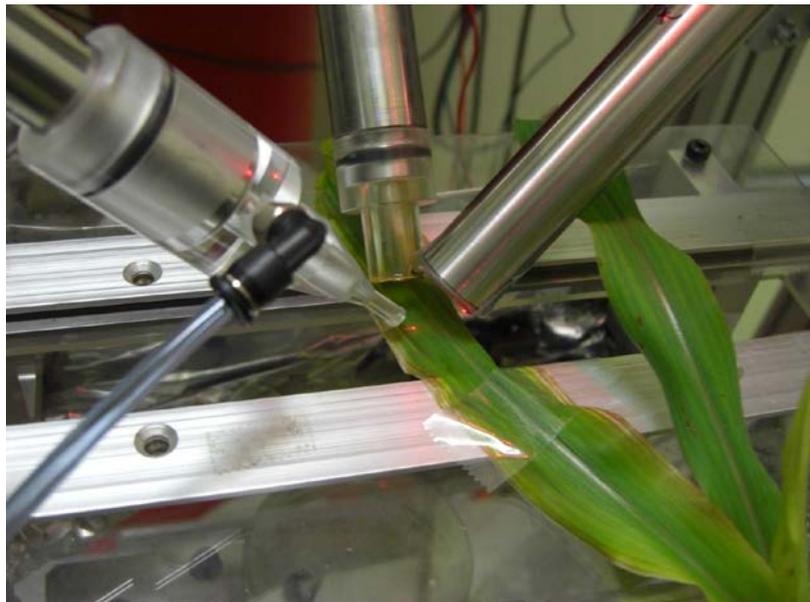


写真2 大気 PIXE 分析におけるプロトン照射部位の植物(ソルガム)の様子

### 3 結果及び考察

#### 3.1 水耕培地で Mn 濃度を変えて Cd 処理したソルガムの元素含量

##### (1) 植物の生育

視覚的症状として、ソルガムについては、① Mn 通常区 (0.25 μM Mn) は正常に生育しており、② Mn 通常+Cd 区 (0.25 μM Mn, 2 μM Cd) には、葉辺枯れ(黄化:クロロシス、褐変:ネクロシス)などのカドミウムによる害作用が見られた。③ Mn 過剰+Cd 区 (12.5 μM Mn, 2 μM Cd)においてはその症状がやや軽減されているように見受けられた。ソルガムは、2 μM Cd という植物生育にとってはかなり高い Cd 濃度で 2 週間生育できることから、Cd 害に比較的耐性をもっていることが分かる。

##### (2) 植物体(葉)の元素含量

図 1 にソルガムの Mn 濃度(μg/g FW)を示した。Mn 濃度は、Mn 通常区と Mn 通常+Cd 区において、下位葉>中位葉>上位葉の順で高かった。また、Mn 過剰区において、中位葉>下位葉>上位葉の順で高かった。また、下位葉のネクロシス部で Mn 含量が高いことが示された。葉の壊死した部分に Mn の集積が見られるのか、または、水が無くなったために高い含量として測定されるのかは明らかではないこのネクロシスを示す部分の定量値については、今後検討の余地がある。

図 2 にソルガムの Fe 濃度中位葉の Fe 濃度は、いずれの試験区でも差が無かった。一般に Fe 濃度は下位葉において高かった。下位葉 Fe 濃度は、Mn 通常区と Mn 過剰+Cd 区に比べ、Mn 通常+Cd 区で

高かった。従って、下位葉 Fe 濃度は Cd 処理により増加し、Cd 処理条件下では根圏の Mn 過剰により減少したと考えられた。

図 3 にソルガムの Zn 濃度を示した。上位葉と中位葉の Zn 濃度は、Mn 過剰+Cd 区に比べ Mn 通常+Cd 区で高かった。下位葉 Zn 濃度は、Mn 通常区と Mn 過剰+Cd 区に比べ Mn 通常+Cd 区で特に低かった。従って、Cd 処理条件下で、培地 Mn 濃度の増加は下位葉から中位葉及び上位葉への Zn の移行を抑えた可能性があると考えられた。また、Mn 通常+Cd 区の下位葉ネクロシス部 Zn 濃度は、Mn 過剰+Cd 区に比べ著しく高かった。

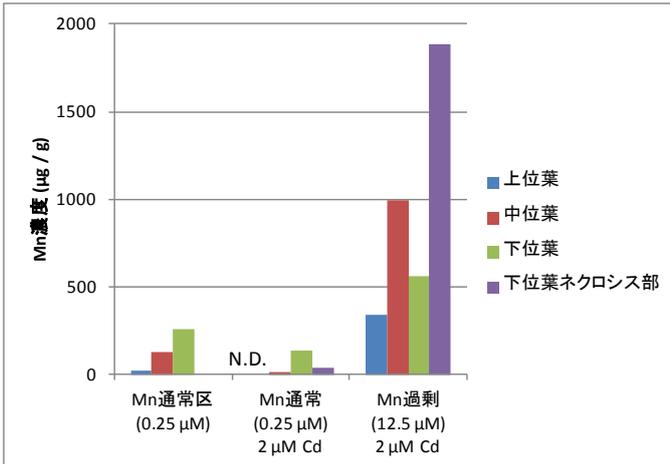


図 1 ソルガムの Mn 濃度 (µg/g FW)

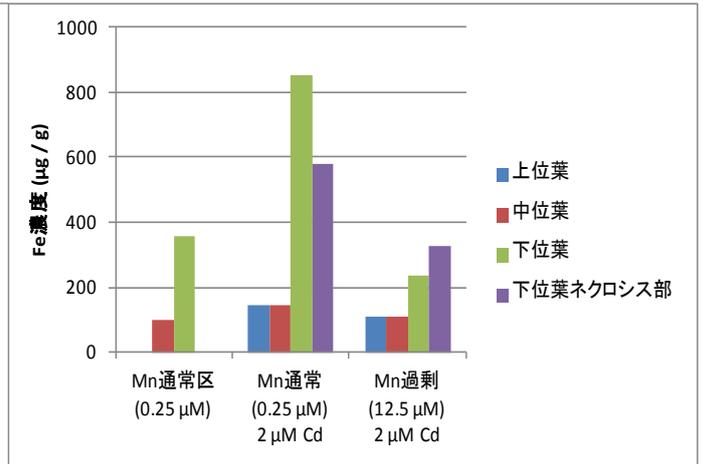


図 2 ソルガムの Fe 濃度 (µg/g FW)

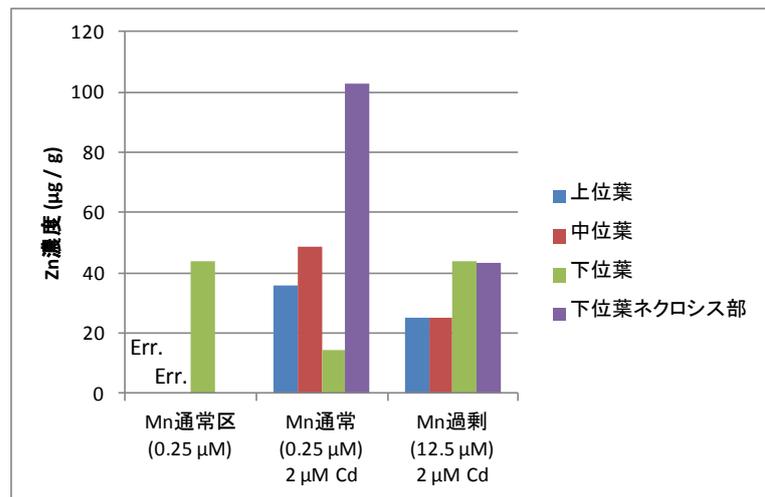


図 3 ソルガムの Zn 濃度 (µg/g FW)

図4にS濃度を示した。Sの濃度は実験区の違い、または、葉の部位の違いによる差は無かった。ただ、ネクロシス部分のS濃度が非常に高いことが示された。このことの真偽、及び、生理的意義については今後検討を要する。図5にCl濃度を示した。Cl濃度は、Mn通常区とMn通常+Cd区において、下位葉>中位葉>上位葉の順で高かった。また、Mn過剰区において、中位葉>下位葉>上位葉の順で高かった。この傾向はMn濃度と同様であった。図6にP濃度を示した。P濃度はどの試験区においても、また、葉の部位の違いによっても大きな違いは無かった。このことはPが比較的、栄養状態の影響を受けにくく、また、移行し易いため、新葉から古葉まで同程度の濃度で存在することを示していた。また、P濃度もネクロシス部で濃度が高いことが示された。

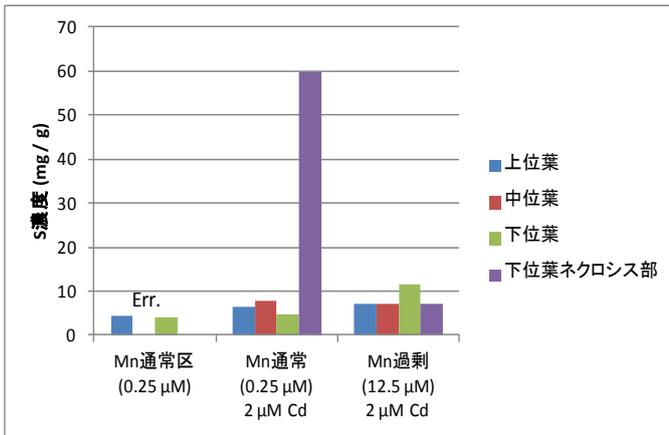


図4 ソルガムのS濃度 (mg/g FW)

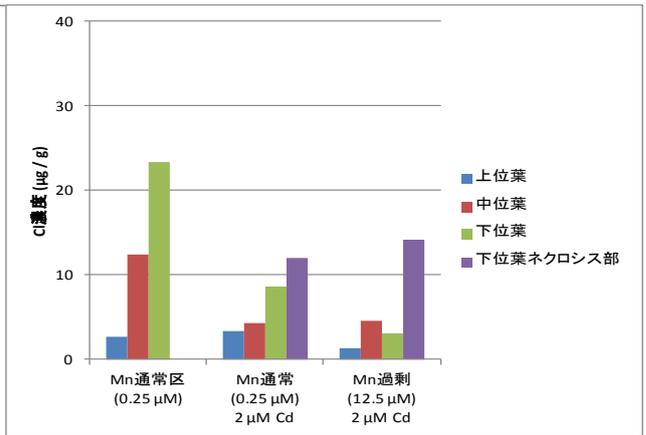


図5 ソルガムのCl濃度 (μg/g FW)

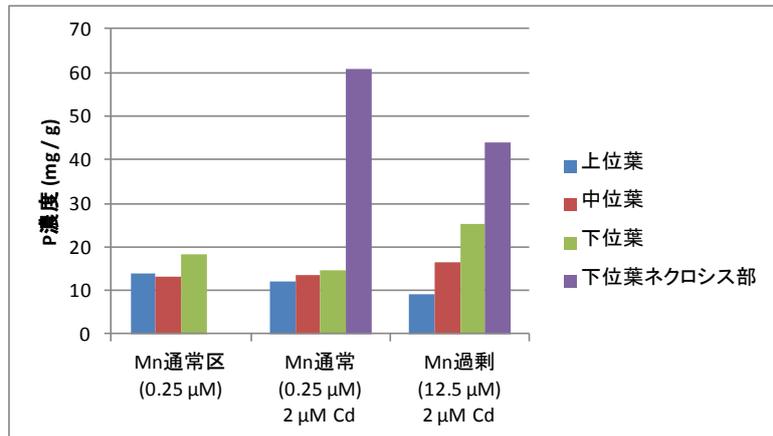


図6 ソルガムのP濃度 (mg/g FW)

### 3.2 Mn 欠乏処理した水耕培地で生育したダイズの元素含量

#### (1) 植物の生育

また、ダイズについては、マンガン欠乏区 (-Mn 区) においても、マンガン欠如処理にも関わらず視覚的には明確なマンガン欠乏症状は見られなかった。

#### (2) ダイズ植物体(葉)の元素含量

図 7 と図 8 に正常植物 (+Mn) と Mn 欠乏植物 (-Mn) の多量必須元素である Ca 濃度と K 濃度を示した。Ca は植物体内を移行しにくい元素であることが知られており、古い葉である下位葉に Ca 含量が高く、新しい葉である上位葉に低いことは Ca の難移動性の表れであると考えられる。また、K は植物体内を移行し易い元素であることが知られており、上位葉と下位葉の濃度の差が小さかった。

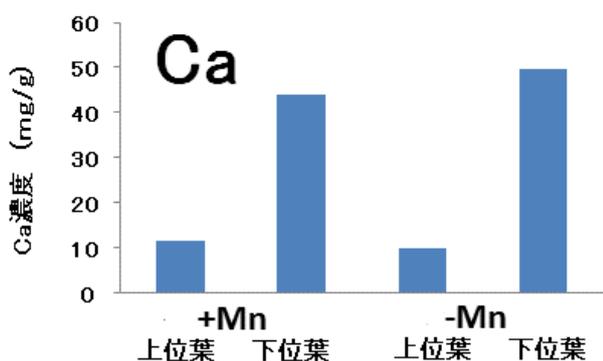


図 7 ダイズの Ca 濃度 (mg/g FW)

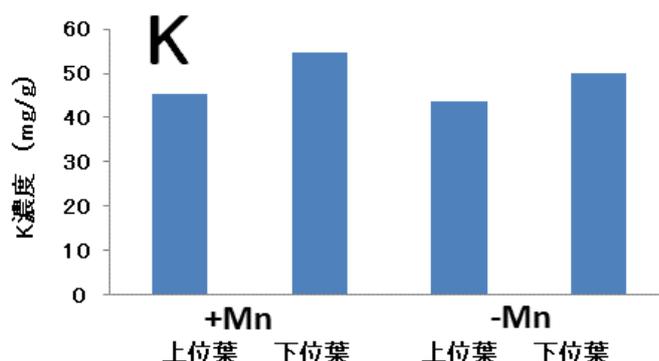


図 8 ダイズの K 濃度 (mg/g FW)

図 9 から図 12 に植物の微量必須金属元素である Mn、Cu、Fe、Zn の濃度を示した。微量必須金属元素は必ずしも移行し易い元素ではないが、Mn (図 9)、Zn (図 10)、Cu (図 12) はいずれも新しい葉である上位葉で濃度が高く、古い葉である下位葉で濃度が低かった。これは上記の Ca とは逆の結果であった。このことは代謝が活発であり光合成が盛んな新葉にこれらの元素の濃度が高いことを示している。しかし、Fe のみは逆の傾向を示していた。Fe は地殻の構成元素で 4 番目に多い元素であり、土の約 5% が Fe であると言われている。故に、自然環境で生育する植物の葉には土埃の Fe が吸着しており、その Fe が植物の Fe 濃度を上昇させている可能性がある。本植物は温室で栽培したものであるが、その可能性はあると思われる。故に、この Fe 濃度についてのみは必ずしも植物体の濃度と判断するのは早計であるかもしれない。Fe 濃度を扱った過去の論文においては、元素含量測定に際し、葉を界面活性剤で洗浄するなどの前処理が必要であることが述べられている<sup>13)</sup>。

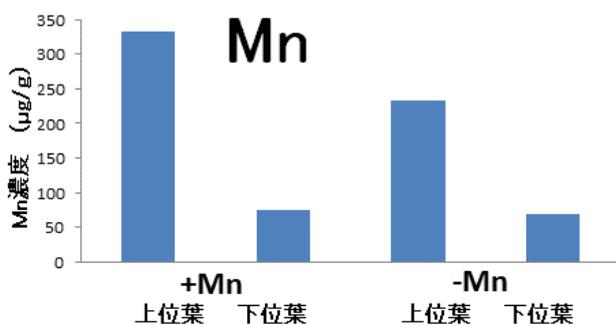


図 9 ダイズの Mn 濃度 (µg/g FW)

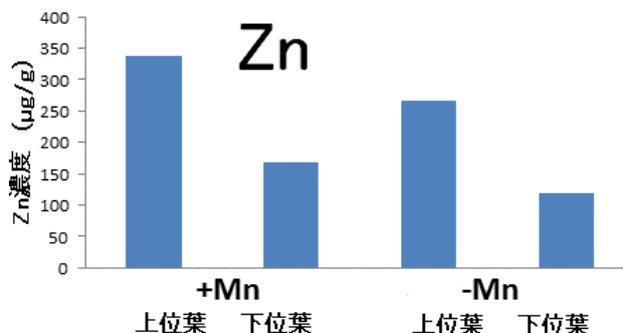


図 10 ダイズの Zn 濃度 (µg/g FW)

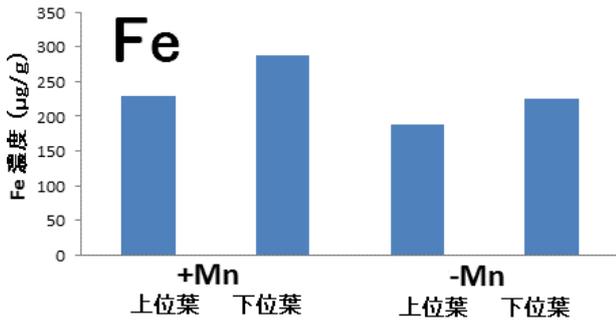


図 11 ダイズの Fe 濃度 (µg/g FW)

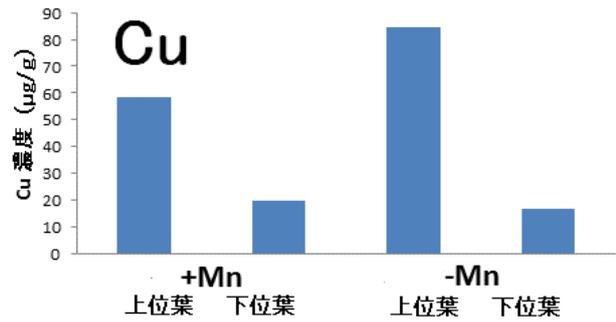


図 12 ダイズの Cu 濃度 (µg/g FW)

陰イオンとして挙動する元素 P、S、Cl の元素含量を図 13-15 に示した。多量元素である P(図 13)については明瞭な傾向は見られなかった。しかし、Mn 欠乏区の上位葉においては P 濃度の低下がみられる。光合成の活性低下に起因して、組織内で P の需要が低下した結果である可能性がある。また、S については Mn 欠乏植物において正常植物と比べ含量が低い傾向がみられるが、葉の位置と関連した違いは見られなかった。また、Cl (図 15) は上位葉においていずれもデータが得られなかった。これは、新しい葉 (上位葉) において Cl 含量が低いことを示していると思われるが、これほど明瞭な差があることは知られておらず、今後、検討する必要がある。これら陰イオンの濃度の傾向についての再現性を今後検討する必要がある。

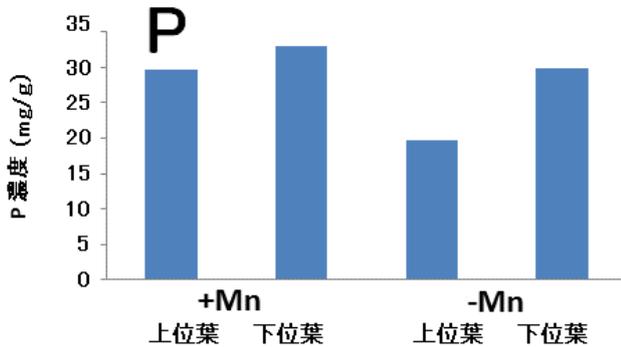


図 13 ダイズの P 濃度 (mg/g FW)

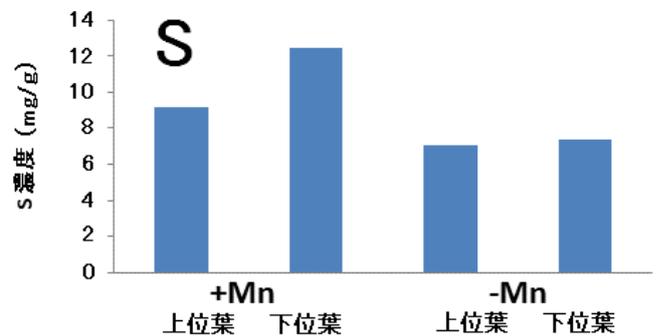


図 14 ダイズの S 濃度 (mg/g FW)

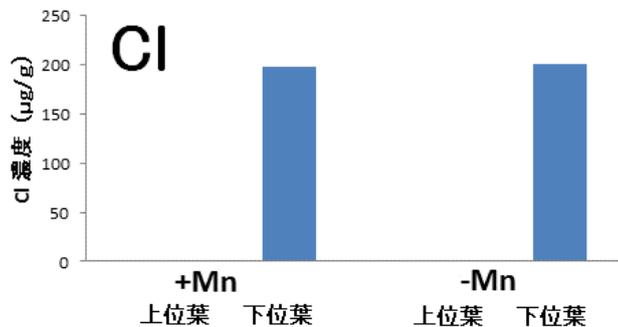


図 15 ダイズの Cl 濃度 (µg/g FW)

## 4 結論

本研究において以下の点が示された。

- ・植物を非破壊で、生きたままの状態で測定できる点が本方法の最大の特徴である。今後は1連のデータではなく連数を取って、統計処理できるデータとする必要がある。
- ・本研究では生物学的に一般に知られている知見とほぼ同様の知見が得られていると思われたがClなどの結果については、さらに検討する必要がある。
- ・Cd過剰の研究として行われた分析であったが、大気PIXEにおいてCdは測定できなかった。この点が本研究としては残念であったが、現状ではCdの測定は難しい。
- ・Mn、Cl、Fe、P、S、K、Caなどは安定して測定できたが、Znは採用できない数値が多かった。
- ・P、Cl、Sなど陰イオンで存在する元素の測定が比較的容易であることが本方法の特性のひとつであり、研究上利用していく価値があると思われる。
- ・現段階では測定できる元素に制限があると思われ、それを考慮して実験を行う必要がある。大気PIXE法により安定して測定できる元素に焦点を当てた実験ならば、植物科学的見地において有意義なデータが得られる可能性がある。

## 参考文献

- 1) 石井聡(2002) マイクロビームを用いた大気照射PIXEへの取り組み  
(<http://www.tech.tsukuba.ac.jp/2002/abstract/21ishii.pdf>)
- 2) Sera K., Futatsugawa S., Matsuda K., Miura Y. (1996) Standard-free method of quantitative analysis for bio-samples. *Int'l. J. PIXE* **6** (3) (4): 467-481.
- 3) 世良耕一郎・寺崎一典・佐々木敏秋・後藤祥子・齋藤義弘・伊藤じゅん・ニッ川章二 (2007) 大気PIXEにおける物理的定量法の開発, NMCC共同利用研究成果報文集, 14, 213-221.  
([http://www.jrias.or.jp/report/pdf/2006\\_2007\\_j1.2.21.pdf](http://www.jrias.or.jp/report/pdf/2006_2007_j1.2.21.pdf))
- 4) 世良耕一郎・寺崎一典・佐々木敏秋・後藤祥子・齋藤義弘・伊藤じゅん (2007) 大気PIXEにおける無標準法の開発, NMCC共同利用研究成果報文集, 14, 222-230.  
([http://www.jrias.or.jp/report/pdf/2006\\_2007\\_j1.2.22.pdf](http://www.jrias.or.jp/report/pdf/2006_2007_j1.2.22.pdf))
- 5) 世良耕一郎・後藤祥子・高橋千衣子・齋藤義弘 (2010) 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, 17, 69-80.  
([http://www.jrias.or.jp/report/pdf/2010\\_1.2.03.pdf](http://www.jrias.or.jp/report/pdf/2010_1.2.03.pdf))
- 6) Sera K., Terasaki K., Itoh J., Saitoh Y., Sakurai S. (2008) Standard-free method for hair samples in in-air PIXE. *Int'l. J. PIXE* **18**: 1-2, 21-30.
- 7) Sera K., Goto S., Takahashi C., Saitoh Y. (2010) Quantitative analysis of untreated oil samples in in-air PIXE. *Int'l. J. PIXE* **20**: 3-4, 77-84.
- 8) 米山忠克 (2008) 植物によるカドミウムとヒ素の集積と人への摂取, 農と環境と健康に及ぼすカドミウムとヒ素の影響, 陽 捷行編著, 45-78, 養賢堂, ISBN978-4-8425-0440-7.
- 9) 太田裕貴・河合成直・工藤洋晃・後藤祥子・世良耕一郎 (2011) 水耕栽培したソルガムのカドミウム吸収に対するマンガンの効果, NMCC共同利用研究成果報文集, 18, 117-127.
- 10) 渡部和彦 (2002) マンガンの欠乏と過剰症, 原色 野菜の要素欠乏・過剰症 障害・診断・対策, 渡部和彦著, 31-34 93-98, 農文協, ISBN4-540-02199-0.
- 11) 長谷川功 (2010) 微量要素の獲得と機能 マンガン, 新植物栄養・肥料学, 米山忠克他著, 154-155, 朝倉書店, ISBN978-4-254-43108-7.

- 12) Hewitt, E.J. Smith, T.A. (1975) Experimental methods for the investigation of plant nutrients., Plant Mineral Nutrition (E.J. Hewitt and T.A. Smith eds), The English Universities Press Ltd., London, 30-52.
- 13) Wallace, A., Jones J. B. JR. (1993) Sample preparation and determination of iron in biological materials., Iron chelation in plants and soil microorganisms (L.L. Barton and B.C. Heming eds), Academic press, Inc., CA, 447-463.

## Measurement of elements in plants by in-air PIXE — Concentrations of elements in leaves of cadmium-toxic sorghum and manganese deficient soybean —

Y. Ohta<sup>1</sup>, S. Moizumi<sup>1</sup>, S. Kawai<sup>1</sup> and K. Sera<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Agriculture, Iwate University  
3-18-8 Ueda Morioka 020-8550 Japan

<sup>2</sup>Cyclotron Research Center, Iwate Medical University  
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

### Abstract

We measured the concentrations of leaves of sorghum (*Sorghum bicolor* cv. Sudax) and soybean (*Glycine max* cv. Yukine) by using In-air PIXE. In the experiment with sorghum, the following treatments for the plant growth were conducted with hydroponical media of half strength of Hoagland and Arnon No.2 medium; 1. Normal (0.25  $\mu\text{M}$  Mn), 2. normal Mn + Cd toxic (0.25  $\mu\text{M}$  Mn, 2  $\mu\text{M}$  Cd), 3. excess Mn + Cd toxic (12.5  $\mu\text{M}$  Mn, 2  $\mu\text{M}$  Cd). Sorghum was grown in the growth chamber with the regime 14 hours day 17 degree C and 10 hours night 10 degree C. Plants were treated with Cd for 3 weeks and applied to in-air PIXE analysis. Soybean was also grown in green house. Soybean was germinated in perlite in the seed box. When the 2<sup>nd</sup> leaves were developed, the seedlings were transferred to the pot filled with Hoagland and Arnon No.2 medium with or without Mn. The plants were grown for 2 weeks and applied to in-air PIXE analysis. The concentration of Mn was higher in the order lower leaves > middle leaves > upper leaves in Normal and Normal Mn+Cd toxic treatment. It was higher in the order middle leaves > lower leaves > upper leaves in excess Mn + Cd toxic treatment. Necrotic leaves showed higher Mn concentration. In soybean, the concentrations of Mn, Zn and Cu were higher in upper leaves than that of lower leaves. The concentration of Cl in soybean was higher in lower leaves but data of upper leaves of Cl concentration was not obtained.

The most advantageous feature of in-air PIXE is that elements in intact plant tissues can be measured without analytical pre-treatments. In these experiments, the biological data similar to known information in the past were obtained. But the data about Cl needed to be more examined in the future. The 1<sup>st</sup> experiment by using sorghum was conducted to investigate the Cd toxicity in plants. Measurement of Cd concentration in the plant, however, was not possible. Development of methodology is needed for the measurement of Cd. The analysis gave us reliable data of the concentrations of the elements such as Mn, Cl, Fe, P, S, K, and Ca. The data of Zn, however, was not always obtained. One of the features of in-air PIXE was the fact that measurement of anions, such

as P, Cl, S, and cations could be obtained simultaneously. The method of in-air PIXE is considered to be valuable for the investigation and needs to be more developed for scientific analysis in the future. At present, there is a restriction in the species of measurable elements. Experiments need to be conducted taking the restriction of elements into account. If experiments with in-air PIXE will be conducted considering the species of applicable elements to the method and focusing on the specific elements, valuable data in plant bio-science will be obtained.