

生きた植物試料中の軽元素を含む全元素動態観察

世良耕一郎¹、後藤祥子²、高橋千衣子²、齋藤義弘²

¹ 岩手医科大学医歯薬総合研究所高エネルギー医学研究部門（サイクロトロンセンター）
020-0603 岩手県滝沢市留が森 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
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

1 はじめに

NMCCにおける大気 PIXE 分析システムは 1997 年に設置され^{1,2)}、その後 10 年ほどは定性分析のみに使用されてきた。2007 年に、陽子ビームのエネルギーロスを考慮した X 線発生断面積の再計算、空気の吸収を含む検出効率等の物理量の測定を行い、真空 PIXE と同様な精度での定量分析が可能となり^{3,4)}、生きた植物の定量分析・元素動態観察などの研究^{5,6)}に応用可能となった。この開発により、正常な代謝を保った状態での、生きた植物中の元素濃度動態の観察が可能となり、アポトーシス機序に関連すると思われる興味深い元素濃度変化が観測された^{5,6)}。さらに 2013 年、科研費基盤 B により大気 PIXE システムに二台目の Si(Li)検出器を設置、さらに軽元素用検出器の先端に装着する「先端キャップ」の開発により、軽元素の感度を 2 桁改善し、大気 PIXE においても Al 以上の軽・重元素の同時定量分析が可能となった^{7,8)}。「生きた植物に対する定量分析法」の開発は、東南アジアにおける重金属汚染地域の農業を支援する目的で開始されたものである。投与された重金属の植物中動態と、その影響による他の元素動態変化に関する報告の第一報は、2011 年に行われた^{9,10)}。

この報告の中で、砒素投与に伴う Mn、Cu の興味深い動態変化が観測された^{9,10)}。これらの元素の濃度は、重金属投与を行わない条件下では殆ど変化を示しておらず、砒素など重元素投与に伴い顕著な変化を示したものである。この事実から、重元素負荷により、植物の代謝が影響を受け、それが他の元素動態に影響を与えたものと予想される。このような有害元素だけではなく、植物にとって本質的な P、K などの栄養素投与による代謝の活性化、それに伴う他の軽元素動態変化も予想され、その観点からも軽元素動態の観察は興味深い。

本研究においては、昨年開発された大気 PIXE における軽・重元素同時測定法を、竹本、木本、草本の多種植物に適用し、それらの葉中の軽元素動態を重元素動態とともに観察する。さらに窒素・リン酸・カリウムを配合した栄養剤投与による元素動態の変化も観測される。また、軽元素に対しては、低エネルギー X 線の葉中での自己吸収効果が分析値に与える影響も予想される。本法の軽元素に対する精度を確認するため、照射野を含む周囲の葉を切り取り、硝酸灰化法を適用することにより、本法と内部標準法の双方で得られた結果の比較も行う。自己吸収に対しては、必要があればその補正法の検討も行う。

2 実験

2.1 試料採取と Target 作成

竹本のみヤコザサ: *Sasa nipponica* と 4 種の木本類 (ヤマグワ: *Morus australis*, コナラ: *Quercus serrata* Murray, ガマズミ: *Viburnum dilatatum* Thunb, アオダモ: (*Fraxinus sieboldiana* Blume) は NMCC 敷地内の自然林の中で採取された。また 2 種の草本類 (ギシギシ: *Rumex japonicus* Houtt., ヒメジオン: *Erigeron annuus* (L.) Pers) は NMCC 横の草地において採取された。これらは根を含む周囲の土ごと採取され、数日間水を与えて水栽培を継続した。また以前に測定を行ったポトス: *Epipremnum aureum* (Engl.)^{5,6)} に関しては茎の途中でカットし、数週間以上水につけて根を十分にさせたものが用いられた。竹本、木本は茎の途中で切り、水中に数日間つけたものを使用した。これらの植物の葉中、葉脈を避けた一部が直径 5 mm の陽子ビームで照射された。また、水分は照射中十分に供給された。

本法の分析精度の確認のため、生きたままの分析終了後内部標準法による測定も行われた。葉の中の照射野を含む 10 mg 程度が切り取られ、105°C で数時間乾燥させた後秤量し、通常の硝酸灰化—内部標準法¹¹⁾ が適用され、指標元素の濃度測定が行われた。内部標準として 1000 ppm の In が添加され、真空 PIXE システムにより 500 μm Mylar 吸収体を用い測定が行われた。

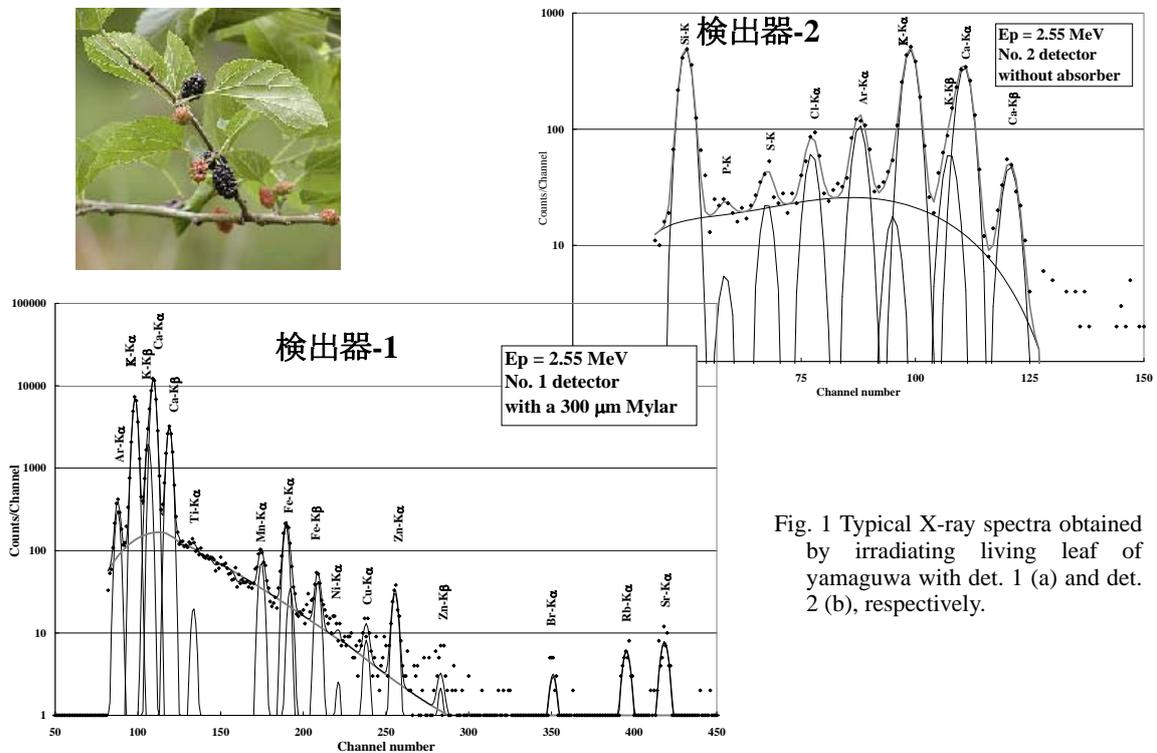


Fig. 1 Typical X-ray spectra obtained by irradiating living leaf of yamaguwa with det. 1 (a) and det. 2 (b), respectively.

2.2 照射・測定条件

NMCC の小型サイクロトロンから引き出された 2.90 MeV の陽子ビームは真空散乱槽に導かれる。真空 PIXE の場合、5 mmφ のグラファイト製コリメータを通過し整形されたビームは薄いターゲットを衝撃し、その後ファラデーカップにより集められ、電流値が測定される。ビーム電流は 50~100 nA、照射時間は 1 試料あたり 10 分ほどであった。発生した X 線は 2 検出器同時測定システム¹²⁾ により測定され、重元素用検出器の吸収体として 500 μm Mylar フィルムが用いられた。一方大気 PIXE 測定の場合は、真空散乱槽内のコリメータは取り除かれた。散乱槽を通過したビームは bending magnet により 45 度下方に曲げられ、5 mmφ のグラファイトコリメータ、7.5 μm の Kapton foil を通過した後、試料を照射する。Kapton と空気中のエネルギーロスにより、2.9 MeV の陽子は 2.55 MeV となる^{3,4)}。ビーム電流は植物のダメージを避け

る為 on target で 2 nA 以下に保たれ、5 分毎にデータ収集（測定時間 4 分 40 秒）が行われた。NMCC における真空・大気 PIXE システムのレイアウトは、参考文献 13 の図 1 参照のこと。

Fig.1-a, b) に、木本（ヤマグワ）の葉の典型的なスペクトルを示す。ここで a) は 300 μm Mylar 吸収体を用い大気検出器 1 で得られ、b) は大気検出器 2 に先端キャップ^{7, 8)}を装着し吸収体無しで得られたものである。本システムにより、Si から Rb、Sr までの広い範囲の元素の測定が可能であることが分かる。Fig.2- a, b) には、同条件で得られた野草（ギシギシ）の葉のスペクトルを示す。草本の場合、濃度が低いため Si のピークは観測されていないが、P や S などの軽元素のピークが明確に観測されている。

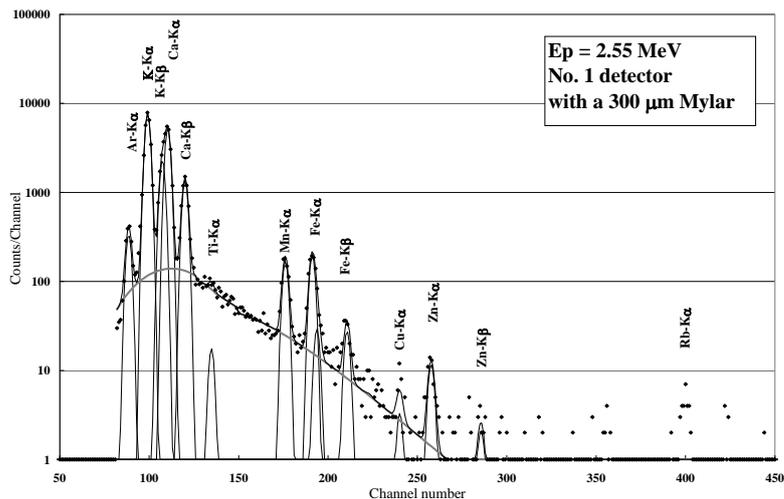


Fig. 2-a) Same as Fig. 1-a) but for Japanese dock.

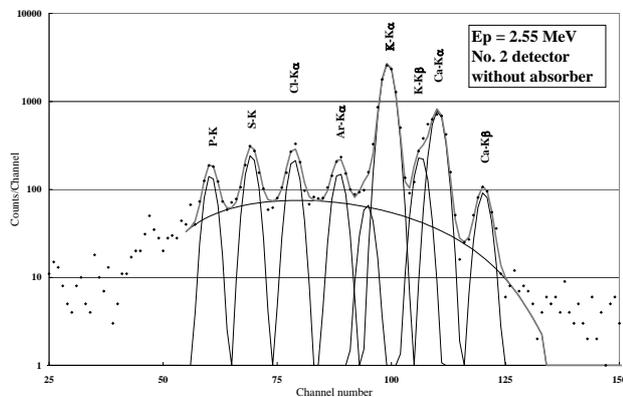


Fig. 2-b) Same as Fig. 2-a) but for the spectrum obtained with No. 2 detector without absorber.

3 生きた植物に対する無標準法

生きた植物に対する無標準法は 2011 年に、カリウム (K) を指標元素として完成された^{5, 6)}。無標準法は試料から発生する連続 X 線収量に対する指標元素のピーク面積の比から指標元素濃度を求めるものであるが、大気 PIXE の場合、連続 X 線は試料ばかりではなく空気からも発生するため、その差引を行う必要がある。それは空気からの連続 X 線収量に比例する Ar-K α ピーク収量により規格化し行うことができる。生きた植物に対する無標準法の詳細は、参考文献 5、6 を参照されたい。一方軽元素に対する高感度測定法は 2011 年に開発され、報告が行われた^{7, 8)}。本研究においてはこれら二つの方法が結合され、軽元素から重元素までの定量分析・動態観察が

可能となった。そのため特に軽元素に対する精度の確認が求められる。

Fig.3- a, b, c) には、本法で求められた竹本・木本類の葉中の元素濃度が、内部標準法の結果と比較されている。図から確認できるように、両法で求められた Si から Ca までの軽元素濃度は互いに良く一致しており、そのことから生きた葉中の低エネルギーX線の自己吸収効果は、これら軽元素に対してもさほど大きくは無いことが確認された。

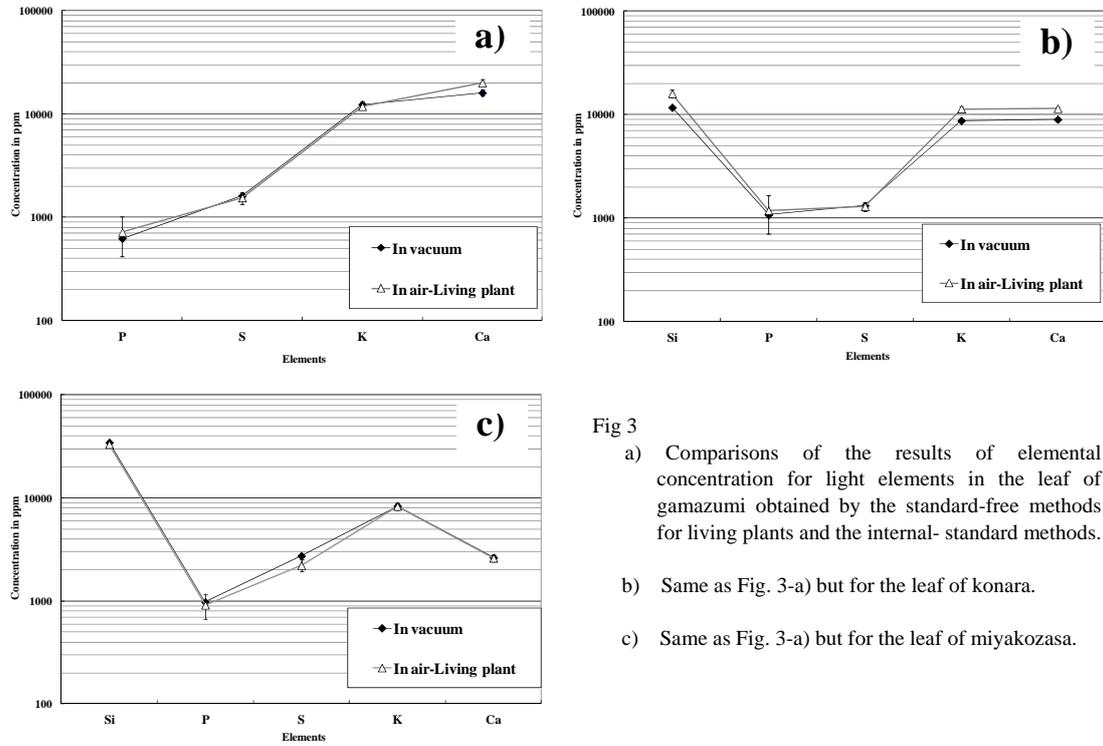


Fig 3
 a) Comparisons of the results of elemental concentration for light elements in the leaf of gamazumi obtained by the standard-free methods for living plants and the internal- standard methods.
 b) Same as Fig. 3-a) but for the leaf of konara.
 c) Same as Fig. 3-a) but for the leaf of miyakozasa.

Fig.4- a, b,) には、Fig.3 と同様な比較が 2 種の野草（ギンギシ、ヒメジオン）に対して示されている。草本の場合も、両法で求められた軽元素濃度は互いに良く一致していることが確認できる。両法で使用された試料は全く同一ではないことを考えると、本法の精度は軽元素に対しても満足すべきであることが確認できたと言える。

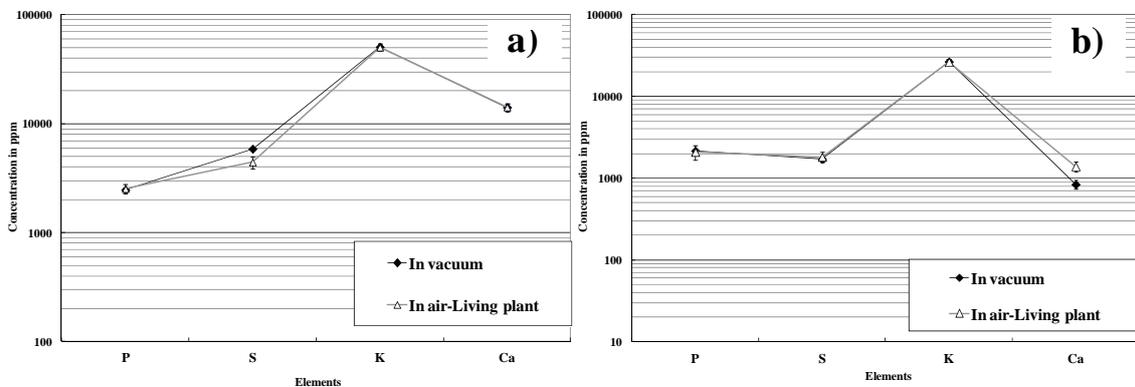


Fig 4-a) Same as Fig. 3-a) but for the leaf of wild herbage (Japanese dock).
 b) Same as Fig. 4-a) but for the leaf of daisy fleabane.

4 結果

Fig.5 には、ミヤコザサの葉中の軽元素を含む元素濃度の時間変化を示す。測定は5分おき（測定時間4分40秒、データ転送時間20秒）に行われ、照射開始から2時間にわたる元素濃度変化が観測された。この図から見られるように、Si、K、Ca、Mg、Zn、Cuなどの多くの元素がほぼ一定から僅かな上昇を示し、一方PとSは顕著な上昇を示している。Fig.6にはFig.5と同様な元素濃度変化を、木本のヤマグワの葉に対して示す。この場合もほぼ同じ傾向が観察されるが、PとSの上昇はミヤコザサと比べると顕著ではない。

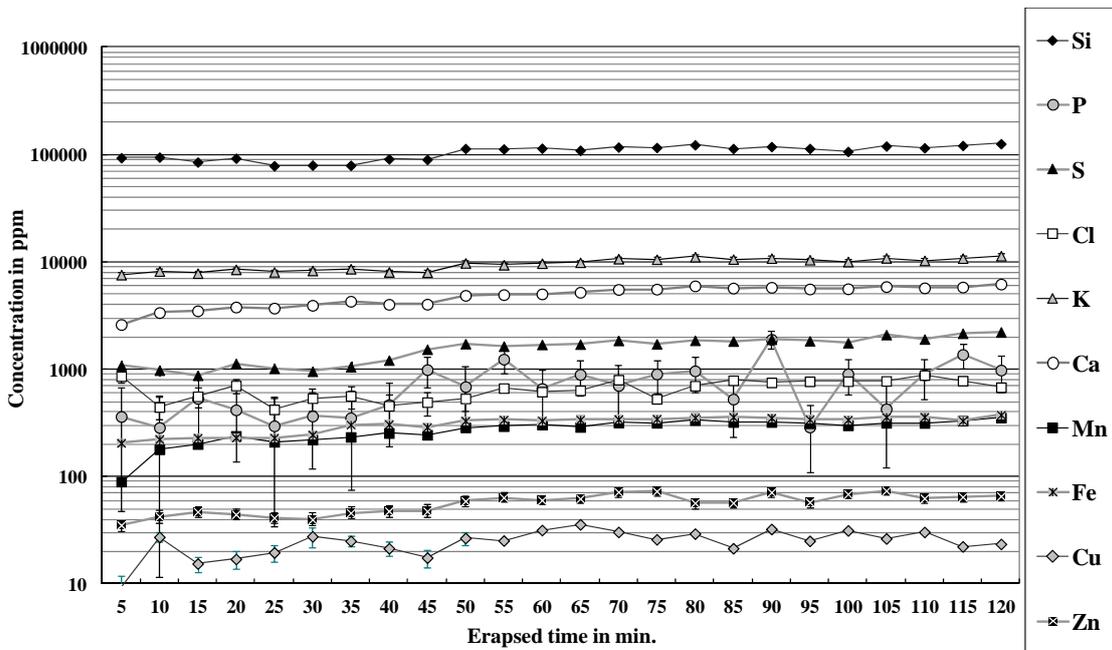


Fig 5 Changes of concentration of principal ten elements with elapsed time obtained by irradiating the leaf of living miyakozasa growing in water.

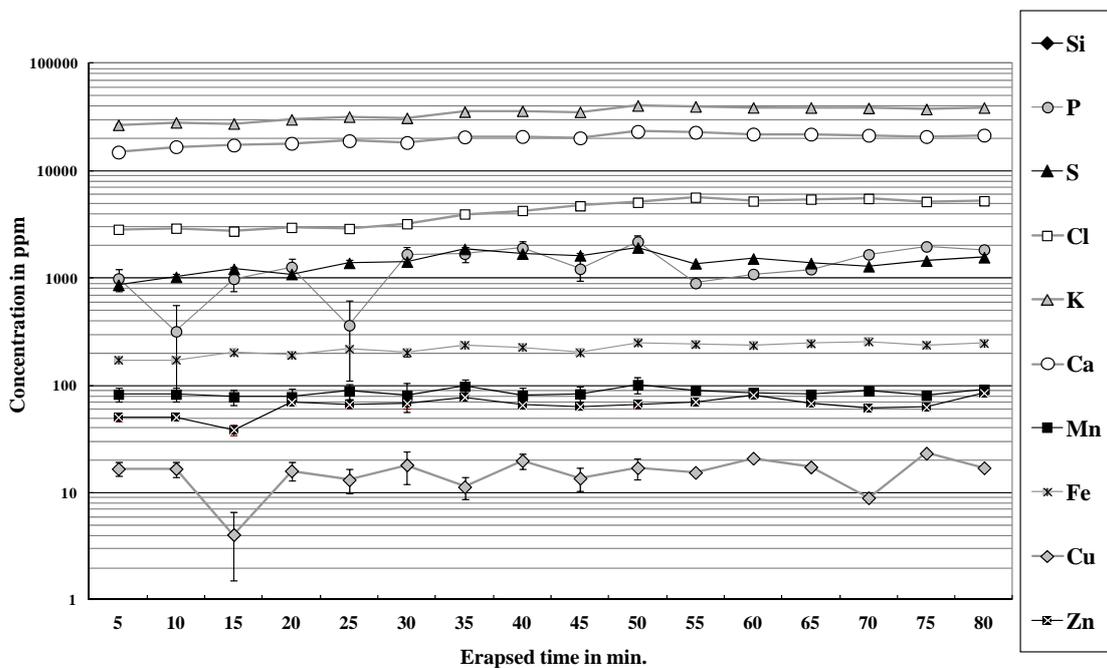


Fig 6 Same as Fig. 5 but for yamaguwa.

Fig.7 には草本類のアオダモの葉中の元素濃度変化を示すが、この場合、照射・測定開始と同時に Hyponex (窒素・リン酸・カリウムの三大栄養素配合) が与えられている。図から明らかなように、P の顕著な上昇と僅かな K の上昇が観察されている。注目すべきは、Hyponex の中に含まれていない S が、P とほぼ同様な顕著な上昇を示していることである。Fig.8 にはコナラに対し Fig.7 と同様に Hyponex を投与した後の元素濃度変化を示す。図から明らかなように P が急激な上昇を示し、増加幅はおよそ一桁程度にもなっている。ガマズミに対し同様な観察を行った結果を Fig.9 に示す。この場合、P と S の上昇はアオダモと比べ顕著ではない。しかし他の竹本・木本類ではほぼ変化の無かった Si が明確な変化を示している。Si 濃度は照射開始後 15 分ほどで急激に上昇し、高値を 40 分間ほど持続した後、急激に減少し当初の値に近づいている。

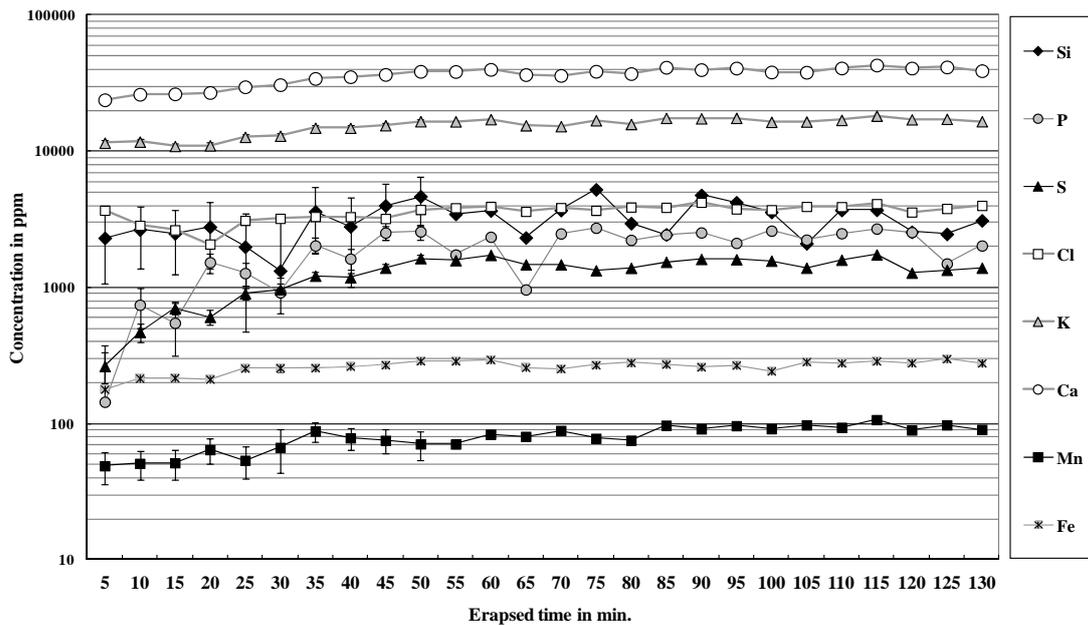


Fig 7 Same as Fig. 5 but for Japanese Flowering Ash.

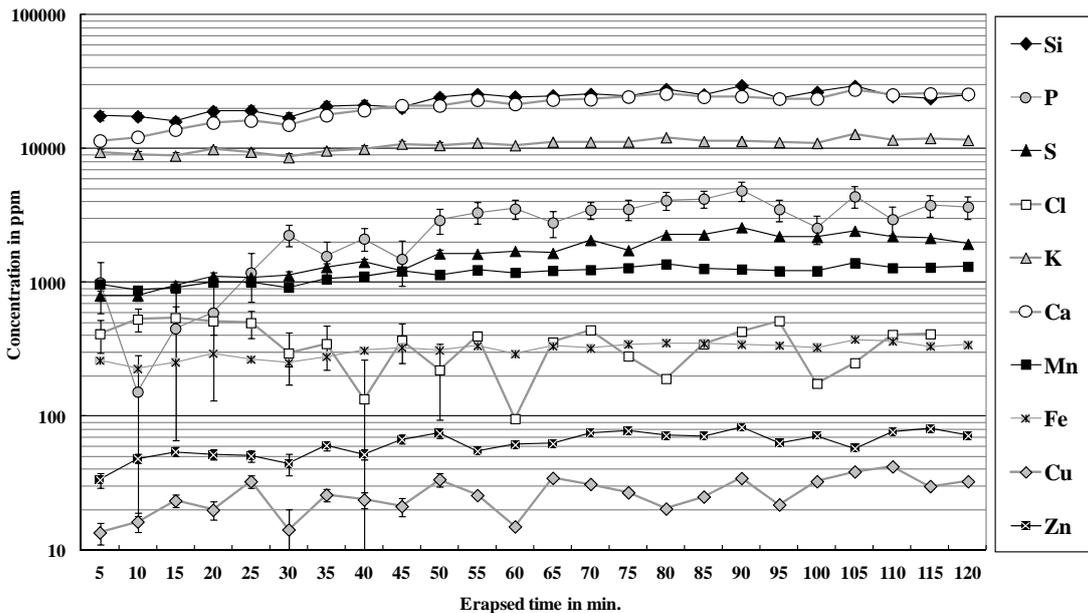


Fig 8 Same as Fig. 5 but for konara.

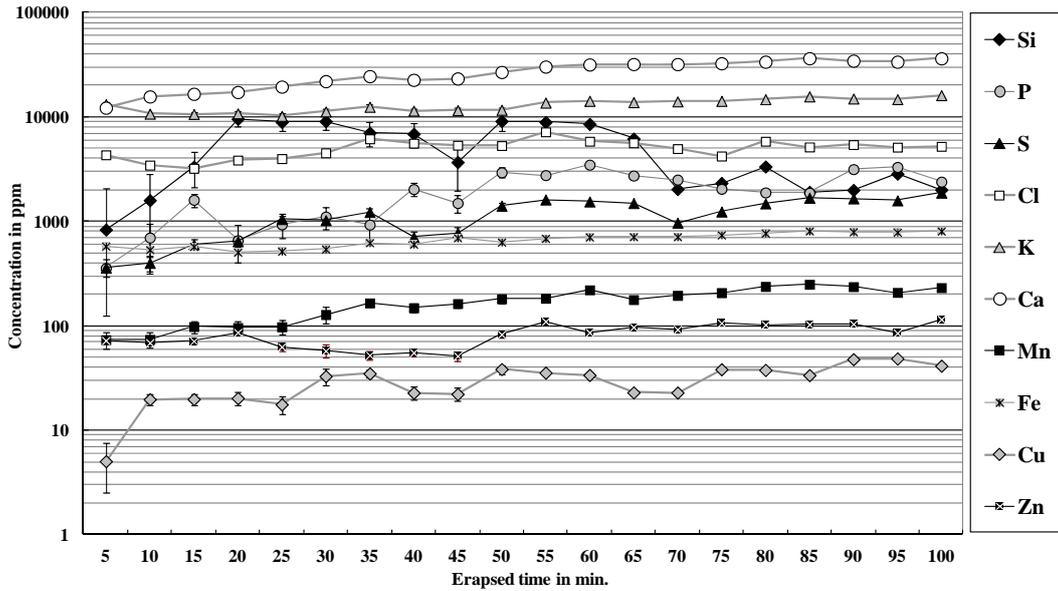


Fig 9 Same as Fig. 5 but for gamazumi.

Fig.10 にはギシギシの葉に対し同様な元素濃度変化を示す。Hyponex の投与は同一の条件で行われた。図に示されるように、元素濃度変化は木本類と比べて著しく顕著であった。Ca の上昇は照射開始後 70 分間持続し、この振舞は以前ポトスの葉で見られた変化と酷似している。この振舞は、アポトーシスの機構と関連しているものと推測される^{5,6)}。Ca と同じ二価である Mn、Zn、Fe も明白な上昇を示しているが、特に Mn と Zn は SOD の活性中心であり、その活性化に關係して動いている可能性がある。同じく SOD の活性に關係すると言われる Cu も、変化が大きい。一方、Hyponex 中に含まれ投与されている K に関しては、開始後 70 分間は上昇を示すが、その後一定値に近づいている。K は植物にとって重要な元素であるが、必要な分取り込んだ後はそれ以上吸収しないことを示唆している。また同じく投与されている P の上昇と、それに伴う S の上昇も、木本類の振舞と同様に明確に観測されている。

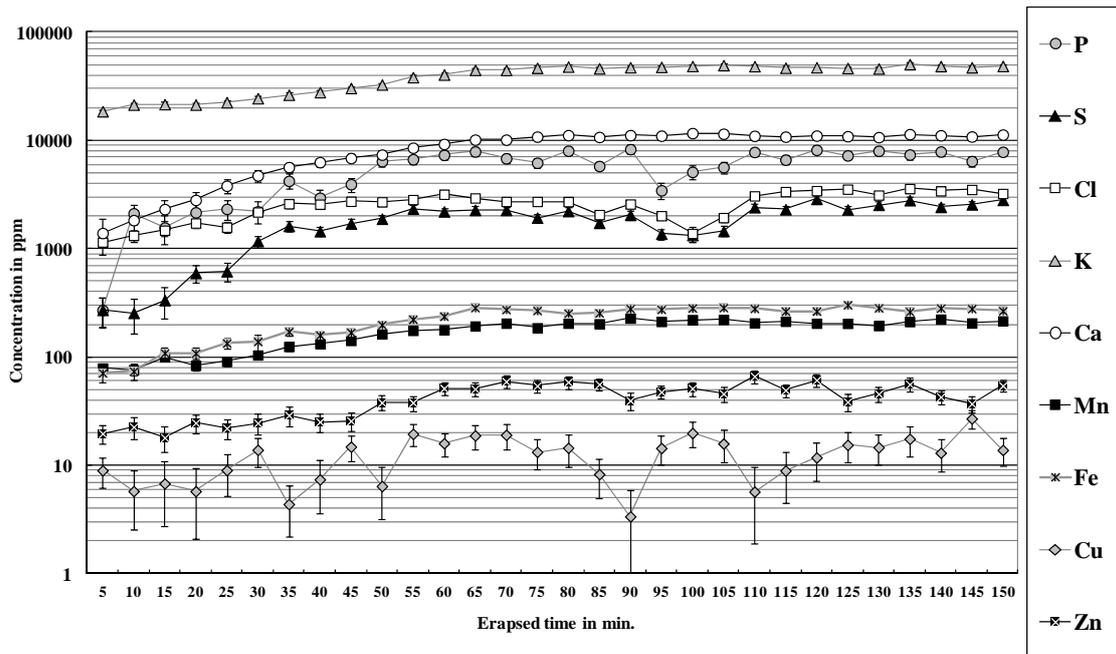


Fig 10 Same as Fig. 5 but for a wild herbage (Japanese dock).

Fig.11 には、Fig.10 と同様の条件で Hyponex を投与した後の時間変化をヒメジオンに対して示す。図から見られるように、ほぼギシギシの場合と同様な傾向が見られ、カリウムの上昇は照射開始後 85 分間ほど続いている。参考文献 5、6 において無負荷の場合の動態観察を行ったポトスの葉に、同様の条件で Hyponex を投与した場合の時間変化を Fig.12 に示す。このポトスは、数ヶ月間水栽培を続け水以外のものは与えていなかった。図に明確に示されるように、多くの元素が急激な変化を示している。以前の報告で急激な上昇を示した Ca に関しては、ほぼ同様な振舞が再現されているが、上昇幅は以前の 4 倍から 10 倍ほどに増大している。一方、以前の報告では極めて緩やかな変化のみを示した Mn が、Ca とほぼ同様の急激な上昇を見せ、やはり増加幅は一桁を超えている。また前の報告でほぼ一定を保っていた Cu と Zn も明確な変動を示している。これらの元素は、照射後のフリーラジカルの発生に伴う SOD 活性に関与すると言われており、栄養剤投与によりその活性が促された可能性を示唆する結果となった。一方、K (カリウム) は栄養剤の中に含まれているが、殆ど上昇傾向を見せず、むしろ照射開始後 70 分後にはいったん減少傾向を見せ、150 分後には再び上昇しほぼもとの値に戻っている。この測定からも、投与された必須元素であっても、十分に植物内に存在する場合にはそれ以上取り込まないという傾向が再確認されたと言える。一時的な減少の意味は不明だが、非常に興味深いのは Cl が K とほぼ同様な変化を見せていることである。この事実は、植物の導管液の中でこれらに元素が KCl の化学系で連動して移動していることを示している。一方、投与された P の上昇は顕著であり、前例と同様 S もそれと連動して上昇しているかのように見える。

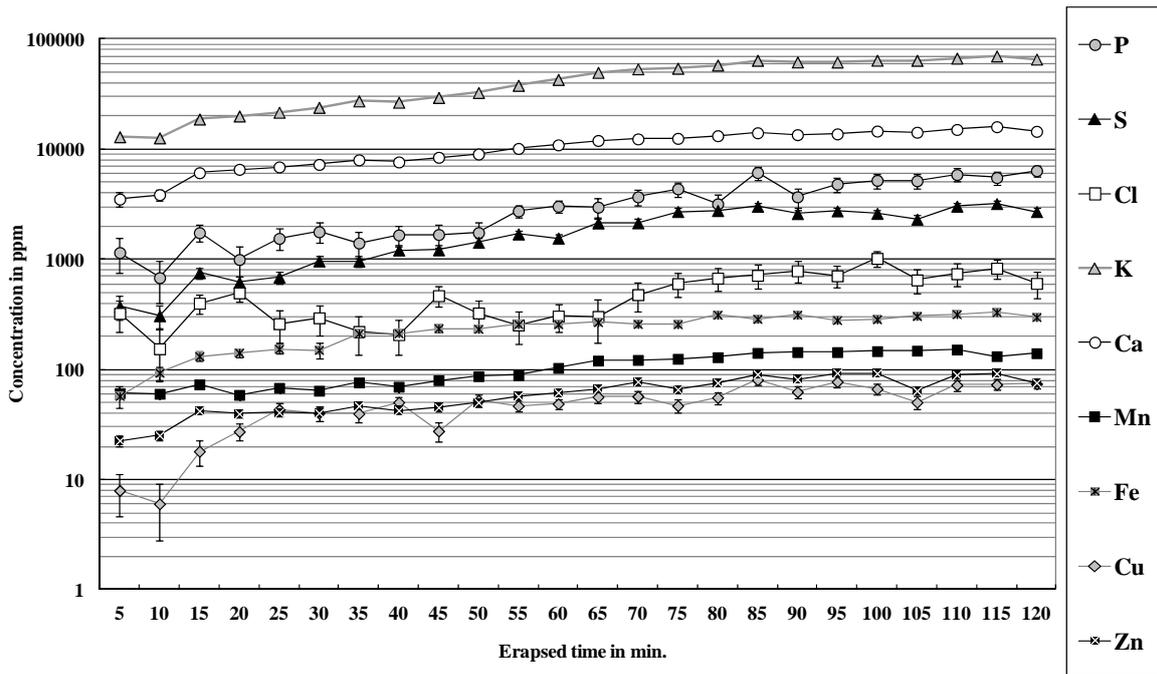


Fig 11 Same as Fig. 5 but for eastern daisy fleabane.

5 議論

Fig.3、4に見られるように、「生きた植物に対する無標準法」は、軽元素にも有効であることが確認された。軽元素分析の結果、葉中の Si 濃度は竹本・木本で高く、草本では低いことが分かった。また Si までの軽元素に対し、葉中の X 線に対しては自己吸収の補正なしでも良い分析結果を与えることが示された。

栄養剤を投与しない場合、多くの元素が上昇傾向を示した。これは、陽子ビーム照射により葉中の代謝機能が変化を受けていることを示唆している。また、その変化は竹本・木本よりも草本類に顕著であることも確認された。Ca 濃度の上昇は草本類、特に栄養剤投与後のポトスの葉で顕著であり、その振舞はアポトーシスの機構と関連していることが予想された^{5, 6)}。さらに栄養剤投与を行わない場合僅かな変化のみを示した Mn の上昇は際立っており、ほぼ Ca と同等の急激な上昇を示した。Mn は SOD の活性中心であることが知られており、栄養剤投与により酵素活性が促進された可能性が示唆される。K と Cl がほぼ同様な時間変化を示したことは、以前に報告を行ったヒゲ試料分析による短期間体内元素濃度変化においても観測されており¹⁴⁾、その場合 Na も同じ振舞を示していた。大気 PIXE システムで分析可能なのは Al までであり Na は測定不能だが、ヒトの体内においてはこれら 3 元素が NaCl、KCl の化学形で体液内で連動して動くことが示唆された。今回の結果から、植物の導管液の中でも K と Cl が KCl の形で動いていることが示唆された。

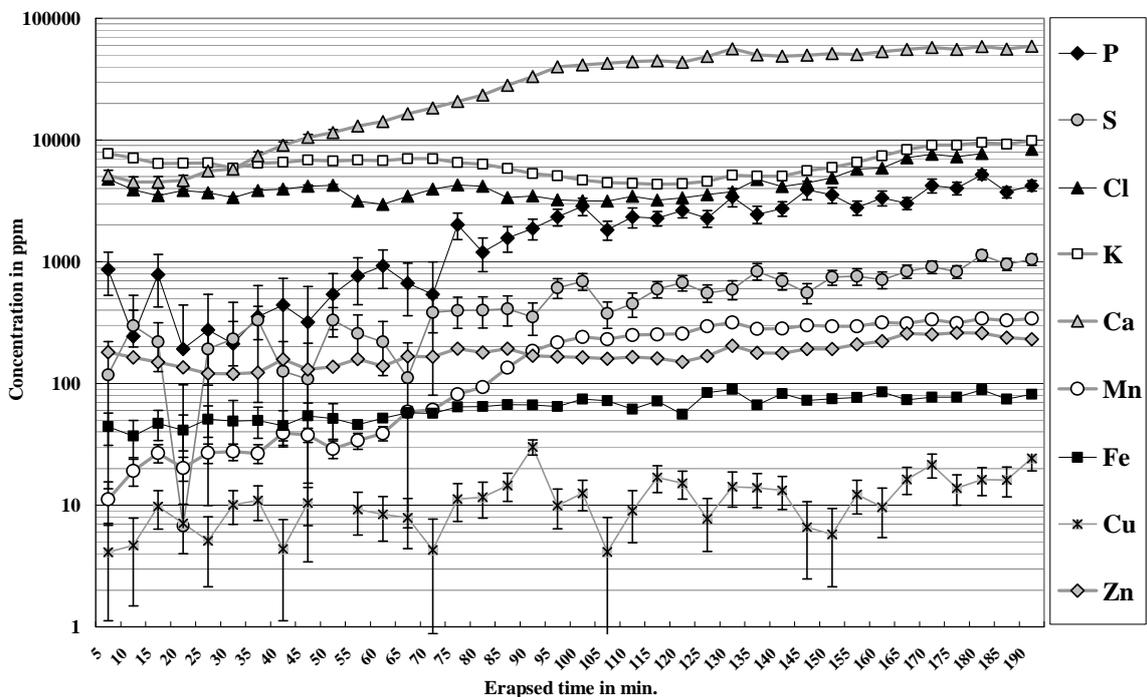


Fig 12 Same as Fig. 5 but for eastern daisy fleabane.

栄養剤を投与した場合、その中に含まれる P は植物の葉中で大幅に上昇する傾向を示したが、栄養剤の中に積極的に含まれない S もほぼ同様の上昇傾向を示した。Fig.13 に、投与した栄養剤の分析結果を示す。S は確かに存在するが、P や K と比べその濃度は二桁以上低く、葉中の急激な上昇はそれだけでは説明できず、植物の代謝の変化によるものと推測される。

結論として、本法は植物の環境の変化による代謝への影響を観察するのに有効な手法であることが確認できた。今後はさらに系統的に、植物の代謝の環境変化による影響を調べていきたいと考えている。

以上の報告の内容は参考文献 15 に投稿され受理されている。

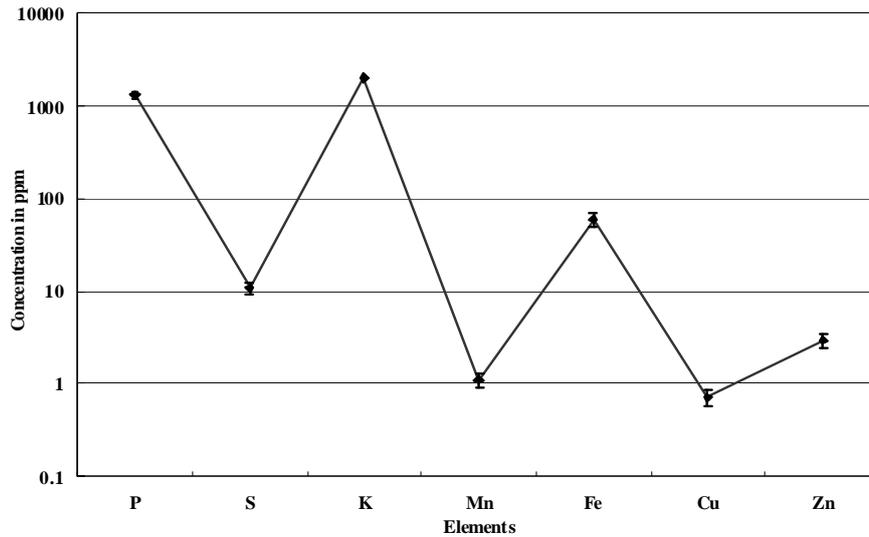


Fig 13 Elemental concentration in the manure solution supplied to the plants..

謝辞

本研究は、科研費基盤 (B) 研究補助金により推進されました。また、共同利用の運営に携わる他の岩手医科大学サイクロトロンセンター、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スタッフの方々に謝意を表します。

参考文献

1. ニツ川章二、畠山智、斎藤義弘、世良耕一郎、“NMCC における大気中 PIXE 装置”、NMCC 共同利用研究成果報文集, 第四巻, 110-119 (1996)
2. S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, and K. Sera, “In-Air PIXE System at NMCC.”, *Int'l Journal of PIXE* Vol. 7-3,4, 171-177 (1997)
3. 世良耕一郎、後藤祥子、齋藤義弘、寺崎一典、佐々木敏秋、伊藤じゅん、ニツ川章二、“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 第十四巻, 213-221 (2008)
4. 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)
5. 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)
6. 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)
7. 世良耕一郎、後藤祥子、高橋千衣子、齋藤義弘、“大気 PIXE における 2 検出器同時測定システムを用いた定量分析 一軽元素に対する感度改善のための装置開発”、NMCC 共同利用研究成果報文集, 第 19 巻, 206-218 (2012)
8. Quantitative Analysis with a Two-Detector Measuring System In In-Air PIXE. - Design to Improve Detection Sensitivity at Low Energies - : Sera, K., Goto, S., Takahashi, C., and Saitoh, Y.: *Int'l Journal of PIXE* (査読有), Vol.23-1, 2, 55-67, (2013)
9. 世良耕一郎、寺崎一典、佐々木敏秋、後藤祥子、高橋千衣子、齋藤義弘、“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”、NMCC 共同利用研究成果報文集, 第 18 巻, 108-116 (2012)

10. 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)
11. S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitou, Y. and K. Sera, "Present Status of NMCC and Sample Preparation Method of Bio-Samples.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. 3- 4, 319-328 (1993)
12. K. Sera, T. Yanagisawa. H, Tsunoda, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, S. Suzuki, and H. Orihara, "Bio-PIXE at the Takizawa Facility. (Bio-PIXE with a Baby Cyclotron).", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. 2-3, 325-330 (1992)
13. 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)
14. K. Sera, T. Sasaki, J. Itoh, and Y. Saitoh, "Studies on Daily Changes of Elemental Concentration in Beard Samples by Means of the Standard-free Method.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.16 -3,4, 169-182 (2006)
15. K. Sera, S. Goto, C. Takahashi, and Y. Saitoh, "Movement of Light Elements in Living Plants Measured by Means of a Standard-free Method in In-Air PIXE. ", *Int'l Journal of PIXE*, in press (2014)

Movement of light elements in living plants measured by means of a standard-free method in in-air PIXE

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

¹Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

²Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

Abstract

The two methods, which enable us to observe changes in concentration of heavy elements in living plants and to perform quantitative analysis of all elements heavier than aluminum in in-air PIXE with two detectors, simultaneously, were successfully applied to studies on movement of light elements in plants. It was found that light elements including silicone, phosphorus and sulfur in leaves of living plants can be quantitatively analyzed. Accuracy of the method for light elements could be confirmed by comparing the results with those obtained by an internal-standard method. It was also confirmed that changes in elemental concentration with elapsed time after starting irradiation could be observed for silicone, phosphorus, sulfur and chlorine together with heavier elements at the same time. Interesting changes in elemental concentration with elapsed time were observed for phosphorus and sulfur together with heavier elements such as potassium, calcium and manganese. Moreover, quite interesting changes of concentration of some light elements were clearly observed after supplying water-soluble manure containing phosphorus acid and potassium to the plant.