

## 1 µg ほどの極微小生物試料に対する定量分析法

世良耕一郎<sup>1</sup>、後藤祥子<sup>2</sup>、高橋千衣子<sup>2</sup>、齊藤義弘<sup>2</sup>、木下今日子<sup>3</sup>、松政正俊<sup>4</sup>

<sup>1</sup> 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

<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  
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

<sup>3</sup> 岩手大学三陸復興機構  
020-8550 岩手県盛岡市上田三丁目 18-8

<sup>4</sup> 岩手医科大学教養共通センター生物学教室  
028-3694 岩手県矢巾町西徳田 2-1-1

### 1 はじめに

我々は無標準法<sup>1</sup>に基づき、蚊や小蠅などに対する定量分析法を開発し報告を行った<sup>2</sup>。開発の目的は、蚊が媒介する感染症の伝染を防ぐため蚊の生態を調べる必要が生じたからであり、千葉大学・国立感染症研究所との共同研究として開発が行われた。近年、蚊が媒介する感染症、特にコガタアカイエカが媒介する日本脳炎、ネッタイシマカ、ヒトスジシマカが媒介するデング熱、黄熱病、ハマダラカが媒介するマラリアなどの伝染が世界的な問題となっている<sup>3,4</sup>。事態の深刻化は、一つには地球温暖化により媒介者=conveyerである特定の蚊の生息域が大幅に広がりつつあること、それに加え、航空ルートの普及により conveyerのみならずウィルスや菌による感染者が、瞬時に世界的に移動可能な現在の社会環境にその原因がある。昨夏（2014年）、デング熱の国内感染が実に70年ぶりに確認されたニュースが話題になったことは記憶に新しい。デング熱の元々の conveyer はネッタイシマカであるが、日本では最も多く生息するヒトスジシマカはそれとほぼ同一の遺伝子を持ち、ウィルスが感染すれば pandemic = 大流行につながる恐れのあることは指摘されていた。我々はその2年ほど前から今日の事態を予測し、感染症の流行を防ぐためには conveyer である蚊の生態を調べる必要があると認識し、その分析法の開発を行ってきた。本法の開発により、一匹の蚊のみならず蚊の各部位：頭・胸・腹・脚・翅など 10 µg 程度の無調製試料の定量分析も可能となった<sup>2</sup>。本法は蚊がどこで羽化し、どの程度の領域を移動するかなど、蚊の生態調査に有力な手段となることが期待される。

一匹の蚊の重量は 1mg 程度であり、各部位ははるかに軽量である。特に1枚の翅の重量は 10 µg 以下と推測される。このような微小試料に対しては秤量が必要な内部標準法の適用は困難

であり、無標準法以外に定量分析可能な手段はない。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、微小な試料に対し感度を向上させるためにはバックリング膜を薄くする必要がある。バックリング膜からの連続 X 線収量が試料からのそれを圧倒するような状況下では、賞味の連続 X 線収量を求める際に大きな誤差を伴う恐れがある。我々は通常、4  $\mu\text{m}$  prolene フィルムをバックリング材として用いており、それは蚊などに対する無標準法<sup>2</sup>開発の際にも用いられた。上記の観点から、バックリング膜が薄いほど分析法の感度・精度が向上する。機械的にも熱的にも十分な強度のより薄いバックリング膜の開発が、極微小試料高感度・高精度定量分析のカギとなる。

本研究においては、クモの糸を含む糸状の細いバックリング材の使用が試行され、その有効性が検証された。細い糸状であっても微小試料に対してはそれを支持する十分な強度があり、ビームに照射される質量が膜状バックリングよりはるかに小さいため S/N 比が格段に向上し、分析の精度・感度が飛躍的に改善されることが期待される。

本開発のもう一つの目的は、本法を微小海洋生物の定量分析に供することである。3.11 大津波により、三陸沿岸の海洋生態系はほぼ崩壊した。豊かで多様な海洋生態系を育ててきた多くの干潟も消滅、汽水域の生態系はいったん壊滅し、現在回復途上である。我々は、津波が汽水域や陸地に運び上げた海底へのドロ中重金属の海洋生態系への影響、被災者の健康への影響など幅広い調査研究を行ってきた<sup>5,6,7</sup>。特に海洋食物連鎖中、ドロ中の重元素が食物連鎖のどこにどの程度潜んでいるかの確認は、今後の生態系再生に関する重要な情報をもたらすものである。

我々は特に微小甲殻類に注目した。その中でもオキアミ (opossum shrimp) の一種である学名 *Neomysis* とエビ (squilla shrimp) の一種である *Crangon* に注目し、その系統的採取と分析を行った。海洋生態系において前者は「生食食物連鎖」だけではなく「腐食食物連鎖」にも関与するなど、鍵を握る中心的生物である。植物性プランクトンを食し、ウバウオ目やカレイ目の魚に食されるなど、生食食物連鎖の中で重要な役割を果たすだけではなく、海底に沈む生物の死骸、排泄物などの有機物を食するため、それらを分解するバクテリアとともに腐食食物連鎖の重要な担い手となっている。一方 *Crangon* は肉食であり、また大きな魚類の餌となるなど生食食物連鎖にのみ関与する。深海生物と表在性生物間の食物連鎖の仲介者として働き、生食食物連鎖の中心的な存在である。これらの微小甲殻類の系統的な分析結果により、海洋食物連鎖中の重元素動態に関し、詳細な情報を得ることが可能となる。

さらにこれら微小甲殻類の成長に伴う変化を観測することには意味がある。これらの微小甲殻類は同様な形体を保ちながら数  $\mu\text{g}$  程度から数百  $\text{mg}$  まで成長し、何に対し被食者となるのか・何に対し捕食者となるのか、食物連鎖の中での役割も成長に応じ変化する。これらの生物の成長過程を通し、同じ分析法を応用できればデータの信頼性が増す。無標準法であれば、数 100  $\mu\text{g}$  以下の試料には無調製のままビームで照射し、それ以上の大きさのものであれば粉末・均一化した後、同様な手法で定量分析を行うことにより、10 万倍に成長するこれら甲殻類の分析を一貫した方法で行い得るものと期待される。またどちらの場合もマウント量は微少であるため、細い糸状のバックリングに付着させ、高感度・高精度分析を行うことが可能であると期待される。

無標準法の開発に際し、内部標準法<sup>8</sup>との比較が必要であったが、それは均一化した粉末試料を用い行われた。また、種々の生物試料への有効性を検証するため、小さいダニ、アブラムシ、植物の種など陸上生物への応用も試みられた。また、種々のバックリングを用いた無標準法の有効性が検証され、同法の精度・再現性の確認が行われた。

## 2 実験

### 2.1 試料採取と Target 作成

小さなダニは、NMCC 敷地内のコンクリート上で採取された。ダニの名称は「タカラダニ (*Erythraeidae*)」であり、出現する季節が限定され岩手では 6 月のみ観察され梅雨に入ると姿

を消す。地面に顔を近づけないと見えないほどの大きさであり、鮮やかな赤色であるため何とか識別できる。大きいもので 10  $\mu\text{g}$  以上、小さなものは 1  $\mu\text{g}$  程度と推定される。傷つけないように空気で飛ばしビニール袋に捕集し、そのまま乾燥させて試料とした。アブラムシ (*Aphidae*) は盛岡市内の一般住居内で観葉植物についていたものを採取し、インパチェンス (*Impatiens walleriana*) の種は店で購入した。海洋生物はアマモ (植物) の群生する海域で網を用い採取されたが、アマモも海洋食物連鎖・生態系維持には重要な役割を果たしている。三陸では 3.11 津波で根こそぎ流され壊滅し、種から生えた株がようやく生育し群生し始めたところである。海洋生物は凍結乾燥され、数日間保存された後仕分けされ、PIXE 分析に供せられた。

陸上の微小な虫・種は乾熱滅菌機を用い 105°C で数時間乾燥後、秤量された。海水が付着している海洋生物は蒸留水で数回洗われ、同様に 105°C で乾燥された。

これらの微小生物の重量は、最も大きいインパチェンスの種で 0.5 mg ほど、アブラムシが 50~100  $\mu\text{g}$ 、最も小さいタカラダニで 1~10  $\mu\text{g}$  ほどである。一方採取された海洋微小甲殻類は、小さなもので 20  $\mu\text{g}$  ほど、大きく成長したものは 100 mg をはるかに超えていた。これらの中で数 mg 以下のものはそのままバックリング膜に貼りつけられ、無標準法のターゲットとした。これらに対しては糸状のバックリングが用いられたが、これらはもともと粘性があり、微小な生物試料はその上に容易に固定できた。糸状バックリング材の詳細に関しては後述する。

一方 10 mg 以上の試料については、メノウ乳鉢中で粉碎し微細粉末状とした。その中の数  $\mu\text{g}$  ほどを糸状バックリング上に付着させ、無標準法のターゲットとした。残りの粉末試料は、「硝酸灰化 - 内部標準法」<sup>8</sup>により処理され、その結果を用い無標準法の開発、無標準法の精度の確認が行われた。粘性の無い 1 mm 幅 1.5  $\mu\text{m}$  厚 Mylar を用いた場合は、試料の固定のため 1% コロジオン溶液を 2  $\mu\text{L}$  ほどバックリング上に滴下した。

## 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、2 組の Q-magnet、steering magnet で調整され、X-Y slit を通り真空散乱槽に導かれる。散乱槽内の 6 mm  $\phi$  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として測定される。ビーム電流は 50~70 nA、照射時間は 1 試料あたり 4~8 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<sup>9</sup>により測定され、重元素用 Si(Li)検出器 (NO.1) の吸収体として 300  $\mu\text{m}$  Mylar フィルムが用いられた。一方軽元素用 Si(Li)検出器の前には 1.5 mm  $\phi$  のグラファイト製コリメータが装着され、計数率が調整された。詳細については参考文献 9 を参照されたい。

## 2.3 薄いバックリングの開発

Fig. 1 には、4 種のバックリングからの X 線スペクトルを比較して示す。これらの収量は、積分された電流値 (クーロン数) で規格化されている。これらの中で「液体絆創膏 (Liquid Plaster)」は外傷の手当てに用いられ薬店で容易に手に入れることができる。接着剤とこの液体絆創膏は、ピペットチップの先で糸状に引き伸ばし、ホルダーの孔に渡し、粘性が失われないうちに試料を付着させ用いる。接着剤に関しては複数のものが試されたが、液体絆創膏がそれらよりも細く調製可能であることが分る。通常用いている 4  $\mu\text{m}$  厚 prolene フィルムとこの液体絆創膏を比べると、20 倍ほど実質的な厚みの違いがあることが確認された。この液体絆創膏は容易に極細のものを調製でき、粘性があるため試料を固定しやすく十分な強度も有するが、図に見られるように Ca、Fe などの不純物を持つ。不純物濃度が一定していればその差引きは可能であるが、微小試料の場合はそれが分析結果に影響を与えることが考えられるため、今回は採用を見送った。他メーカーのものなど、不純物の少ない製品を探す価値がある素材と言える。

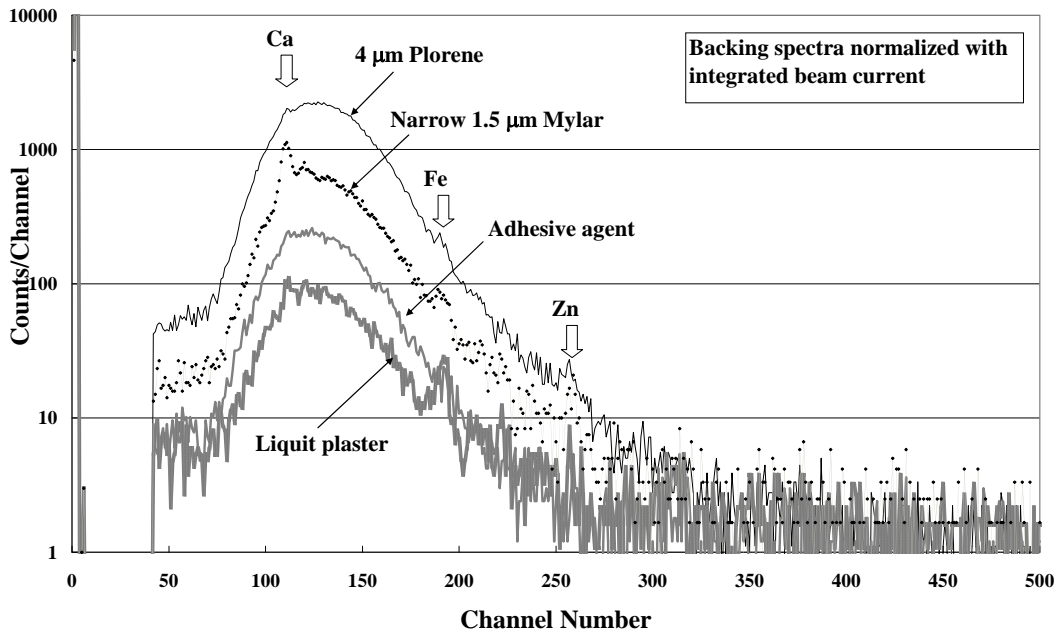


Fig. 1 Comparisons of X-ray spectra obtained by irradiating four kinds of backing materials, where their yields were normalized with integrated beam currents. Only an adhesive agent has almost no impurities.

一方本来粘着性を持たないproleneやMylarフィルムの場合には、試料の固定のためコロジオンなどの接着剤を用いる必要があり、その接着剤からも連続X線は発生する。1%コロジオンの数 $\mu\text{L}$ の滴下であっても、試料が極微量である場合はそれが無標準法の精度に影響を与える。しかも1.5  $\mu\text{m}$  Mylarの場合にはCa、Znなどの不純物が多いため、本研究の目的にはそぐわないバック材と最終的に判断した。機械的・熱的強度が充分でさらに薄く不純物の少ない膜の探索もきわめて重要な要素であり、今後の課題である。

このような試行錯誤の結果、ようやく不純物を殆ど含まない接着剤 (Oasis; Japan) を探し出した。これは液体絆創膏ほどではないが十分に細い糸状に調製可能で、もちろん粘着性も持っており、強度も機械的・熱的に充分である。

蚊の脚1本を2種類のバック材の上に固定し得たスペクトルをFig. 2 - a)、b)に示す。通常用いている4  $\mu\text{m}$  proleneでは、10  $\mu\text{g}$ 以下の試料の場合バック材から発生する連続X線が試料からのそれを大きく上回り、分析の精度・感度が悪くなることが確認されているが、1 mm巾に切られた1.5 $\mu\text{m}$  Mylarの場合にも同様であることが分る。この場合試料は100  $\mu\text{g}$ 以上であるが、試料固定に用いたコロジオンからの連続X線の寄与が大きく有用なバック材ではないと判断した。上述のように液体絆創膏が最も細く製可能だが、不純物を含むため今回の分析には用いず、不純物の少ない接着剤を用いることにした。Fig. 2-b)にそのスペクトルを示す。図から明確に確認できるが、試料からの連続X線収量は大きくバック材からのそれを上回り、しかも不純物も少なく、高感度・高精度の分析が可能であると期待される。

我々は最初の段階でクモの糸を試みた。最初に行ったクモの糸の測定においては、バック材の実質的な厚さは液体絆創膏の1/10以下であり、しかも殆ど不純物を含まず、粘着性を持つため接着剤の使用が不要であり、しかも機械的強度が十分に強く熱にも強いことが確認されたためである。しかしその後の何回かの採取においては、Si、Al、Feなど土埃由来と思われる不純物の付着が観測され、微小試料の分析には適さないことが分った。巣を作った直後には不純物の付着はないが、徐々に空気中のダストが付着して行くためと思われる。室内でクモを飼育し、清浄な空気の中で巣を張らせるなどの措置により解決可能な問題ではあるが、今回の研究

にはその余裕が無く使用を断念した。だが良い状態で採取可能であれば、クモの糸が最良のバックキング材となる可能性が高いと考えている。

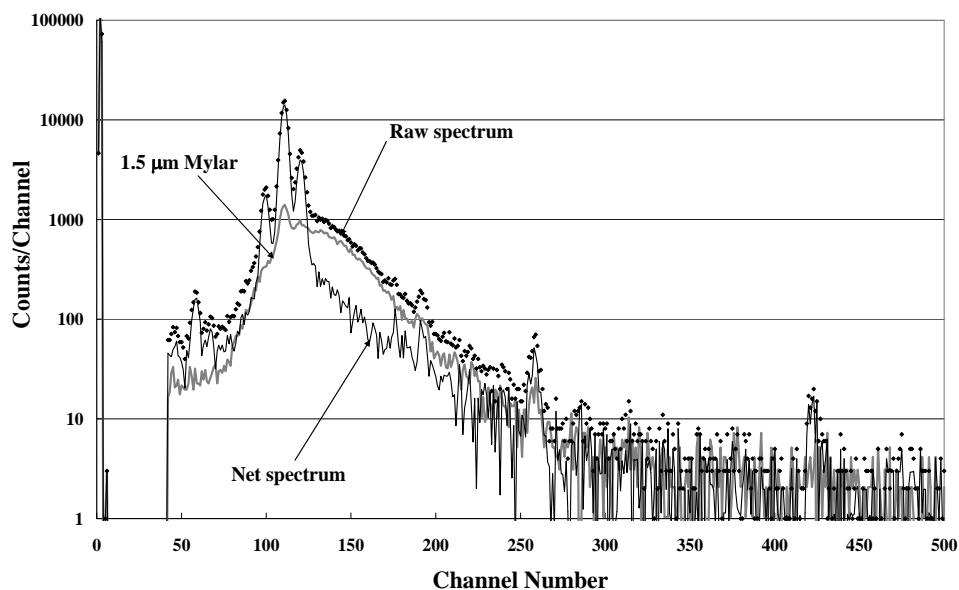


Fig. 2-a) Spectrum obtained by irradiating one leg of mosquito on a 1 mm-wide 1.5 μm-thick Mylar backing.

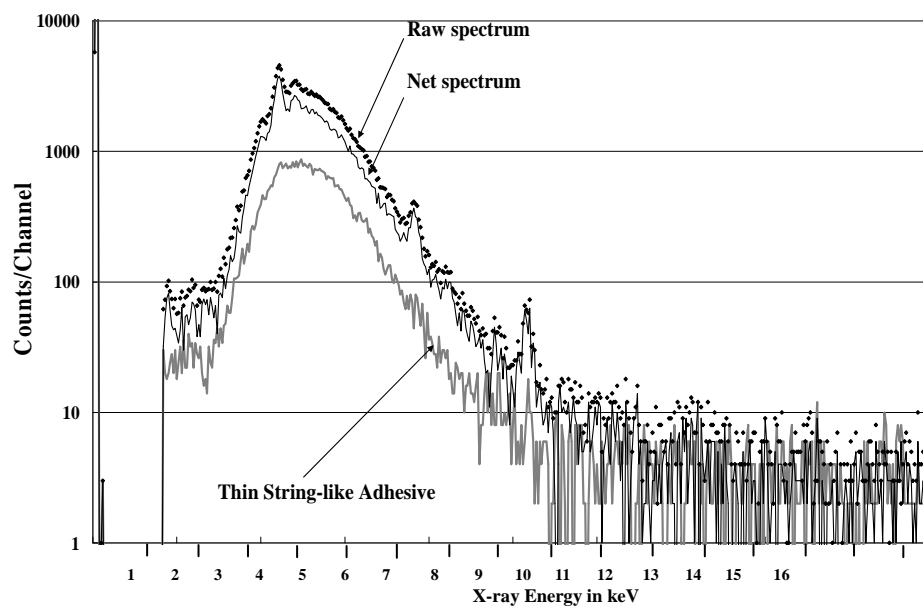


Fig. 2-b) Same spectrum but for one leg of mosquito on a thin string-like adhesive

### 3 微小甲殻類に対する無標準法の開発

陸上の虫、種などに対する無標準法は以前の報告と同一である<sup>2</sup>。その精度は、秤量可能な量の試料に対し酸灰化 - 内部標準法を適用、無標準法の結果と比べることにより確認された。本研究においては、新たに小さいエビ・アミなどの甲殻類に対する無標準法が開発された。甲殻類はCa、Srなどを多量に含む殻で覆われており、無調製のまま測定した場合、それら重元素中の高速軌道電子の寄与により二次電子制動放射線の形状が通常の生物試料とは大きく異なる<sup>10</sup>。その

ため連続X線収量を得るX線領域、指標元素、変換係数ともに変更する必要があった。まずX線領域を検討した。陸上の小生物に関しては4.3~5.7 keVの領域が採られていたが、甲殻類に対してはやや狭めの4.8~5.7 keVの領域とした。巨大なCa-K $\alpha$ ラインの存在が連続X線の形状に与える影響を減少させるためである。一方陸上の生物に対しては、通常指標元素としてK(カリウム)が用いられていた。カリウムは、陸上生物中に高濃度安定して存在するためである。しかし甲殻類においてはその濃度は比較的low、Caピークの応答関数のため正確な測定が難しい場合も多い。そのためCaが新たに指標元素として指定された。指標元素ピーク収量の連続X線収量に対する比から指標元素濃度を求めるための変換係数も、これらの変更に合わせて新たに決定された。以上の甲殻類に対する無標準開発の手順はFig. 3に示されているが、詳細は無標準法のオリジナル文献(1)を参照されたい。

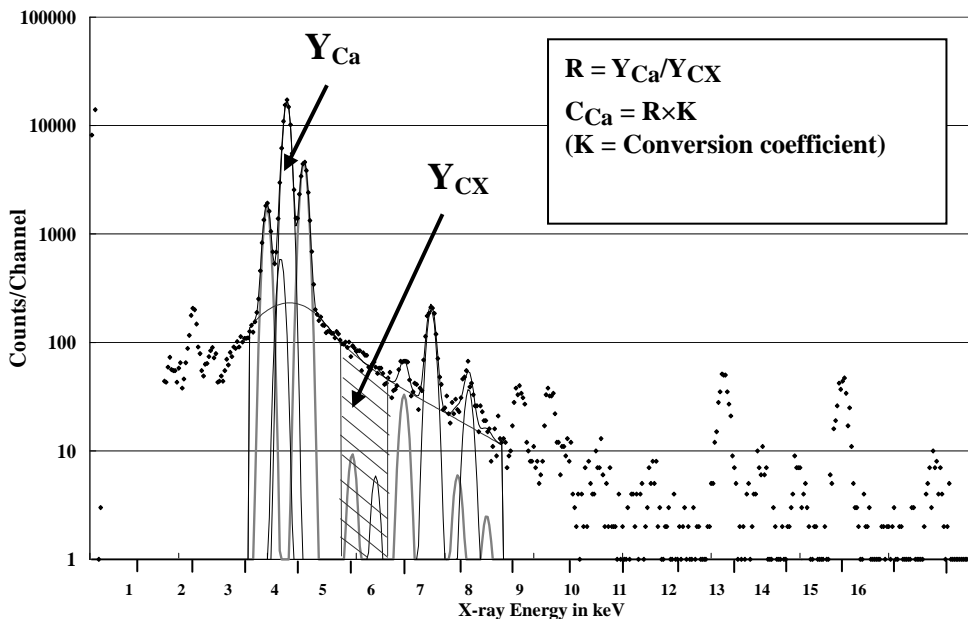


Fig 3. Procedure of the standard-free method for small marine organisms belonging Crustacea

甲殻類に対する変換係数の決定は、*Neomysis* 3個体、*Crangon* 5個体から作成された23枚のターゲットを用い行われた。いずれも10 mg以上の比較的大きい個体であり、内部標準法との比較のために、メノウ乳鉢内で8個体別々に粉末状試料に調製したものをを用いた。無標準法のターゲットは、粉末化された試料の少量を糸状の接着剤バックギン上につ着させ、各個体に対し2~3枚作製した。残りの大部分の粉末は秤量された後、硝酸灰化 - 内部標準法<sup>8)</sup>により処理され、内部標準として1000 ppmのInが加えられた。内部標準法のターゲットは、通常の4  $\mu$ m prolene膜上に灰化溶液を5  $\mu$ Lほど滴下乾燥させ作製された。

変換係数は、これら8個体の甲殻類 (*Neomysis* : 3、*Crangon* : 5) 中の内部標準法で得られたCa濃度と、無調製ターゲットの照射で得られた指標元素ピーク収量の連続X線収量に対する比の平均値を比較することにより決定された。その比較はFig. 4に示されているが、誤差棒は無標準法に対しては数枚のターゲットの結果の標準偏差を示し、内部標準法に対しては実験誤差を示している。図に見られるように、両法で得られた値は多くの試料に対し標準偏差・実験誤差の範囲で一致している。

このようにして得られた変換係数の微小個体に対する有効性を確認するため、数10  $\mu$ g以下の*Neomysis*が数十個体集められ、メノウ乳鉢内でまとめて均一化された。上記と同様の手順で、

複数の無調製ターゲットと内部標準を加えたターゲットを、同じ水域で採取された複数のグループにおいてそれぞれ準備した。両法で求めたCa濃度を比較したところ、いずれのグループにおいても両法の結果は良く一致し、小型の個体に対しては本法が有効であることが確認された。

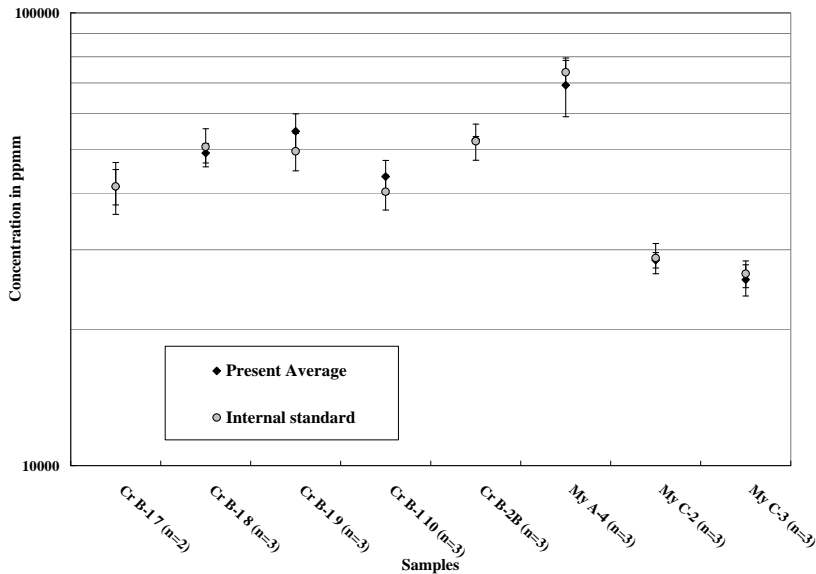


Fig. 4 Comparisons of the calcium concentrations for eight untreated ocean lives obtained by the standard-free method and those obtained by the internal-standard method.

#### 4 結果

Fig. 5 には、アブラムシ 12 個体に対する無標準法<sup>2)</sup>による分析結果を示す。12 個体中 6 個体は翅のあるもの、6 個体は翅の無いものである。Ca と Fe には個体差は見られないが、他の元素に関しては大きな個体差が見られる。翅のあるものを赤系の線で表示しているが、元素によっては翅の有無で元素濃度に差異があるようにも見られる。

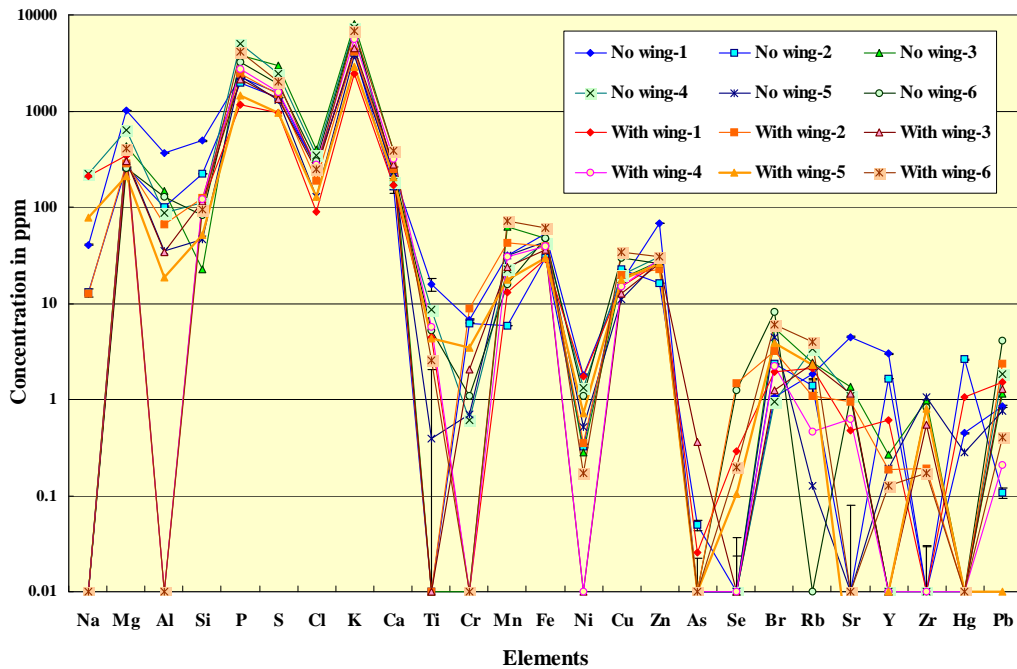


Fig. 5 Elemental concentrations in 12 aphids (Six have wings and the other have no wing).

Fig. 6 にはタカラダニ 7 個体の結果を示す。5 番 7 番が特に小さい固体（推定 1  $\mu\text{g}$  前後）であったが、特に軽元素の濃度が、固体が小さくなるほど低くなる傾向が示されている。

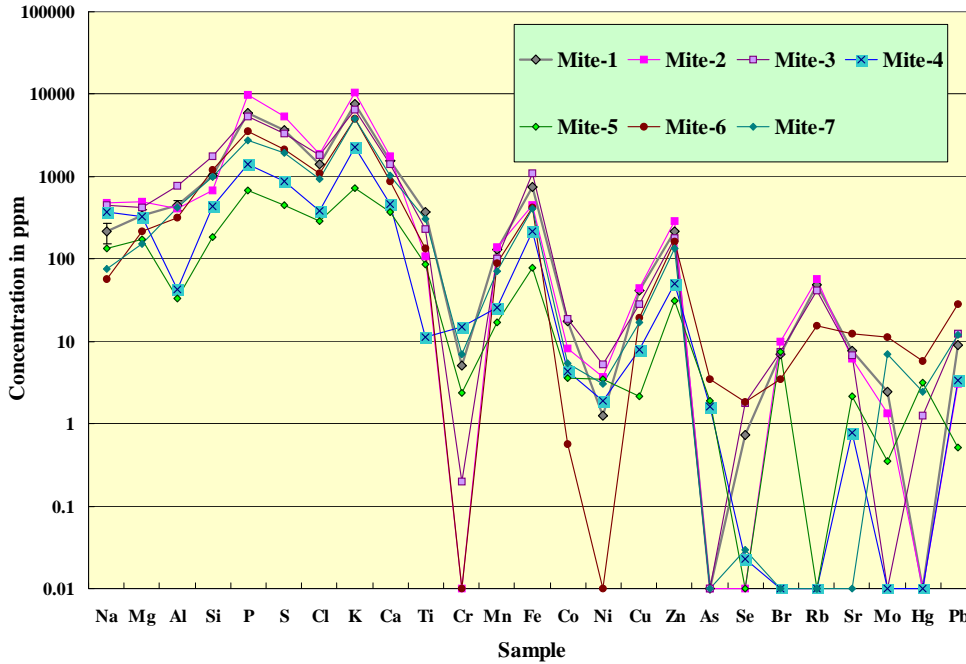


Fig. 6 Same as Fig. 5 but for seven Takara mites, whose weights are estimated to be 1 – 10  $\mu\text{g}$ .

Fig. 7 にはインパチェンスの種 4 個体中の K 濃度を示す。無調製ターゲットは、そのまま 1 個ずつ糸状接着剤の上に固定し作成、無標準法により測定・定量された。一方 10 個以上の種をまとめて硝酸灰化 - 内部標準法により処理し、同法により得られた結果を右端に示す。個体差は若干見られるものの、各個体の無標準法により求められた K 濃度は、実験誤差の範囲内で内部標準法の結果と一致しており、本法が種などの植物に対しても適用可能であることが確認された。これら 4 個の種中の元素濃度を本法で求めた結果を Fig. 8 に示す。種の重量はおおよそ 0.5 mg 程度であった。検出器 (No.2) 不調のため、軽元素に関しては 1 試料のみの結果であるが、予想通り種中の主要元素濃度は、魚の卵と同様<sup>2</sup> 大きな個体差を示してはいない。

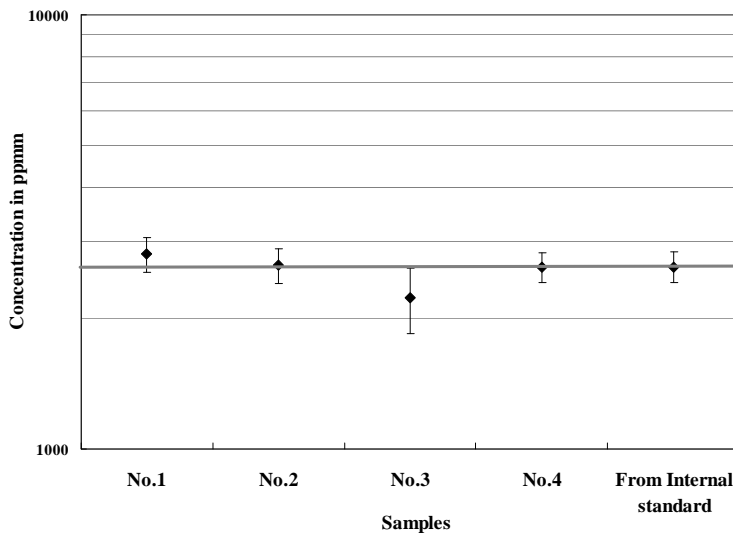


Fig. 7 Comparisons of the potassium concentrations for four untreated seeds of impatiens obtained by the standard-free method and those obtained by the internal-standard method.



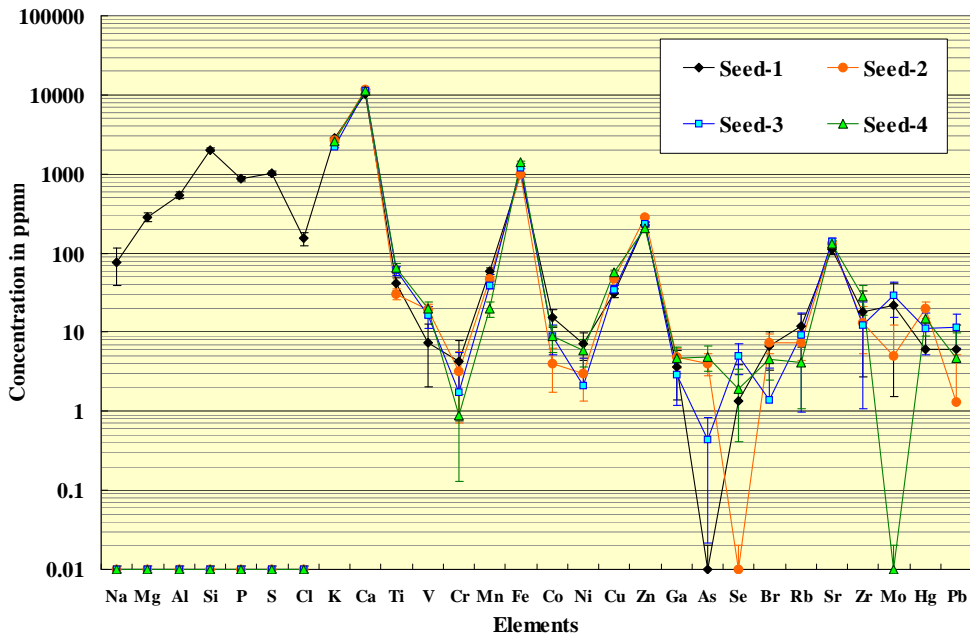


Fig. 8 Same as Fig. 5 but for four seeds of *impatiens* whose weights are estimated to be around 0.5 mg.

Fig. 9 には大きな *Crangon* を均一粉末化した試料を糸状の接着剤バックングに付着させ、本研究において確立された甲殻類に対する無標準法を用いて得られた分析結果を示す。これは *Crangon* 1 個体のみを粉末化したものである。用意された 3 ターゲット間の差異は主要元素には見られず、ほぼ均一な粉末が得られていることが確認できる。また結果を見ると、注目元素である鉛と水銀濃度は陸上の虫よりも大分高く、逆にヒ素濃度は低いことが分った。

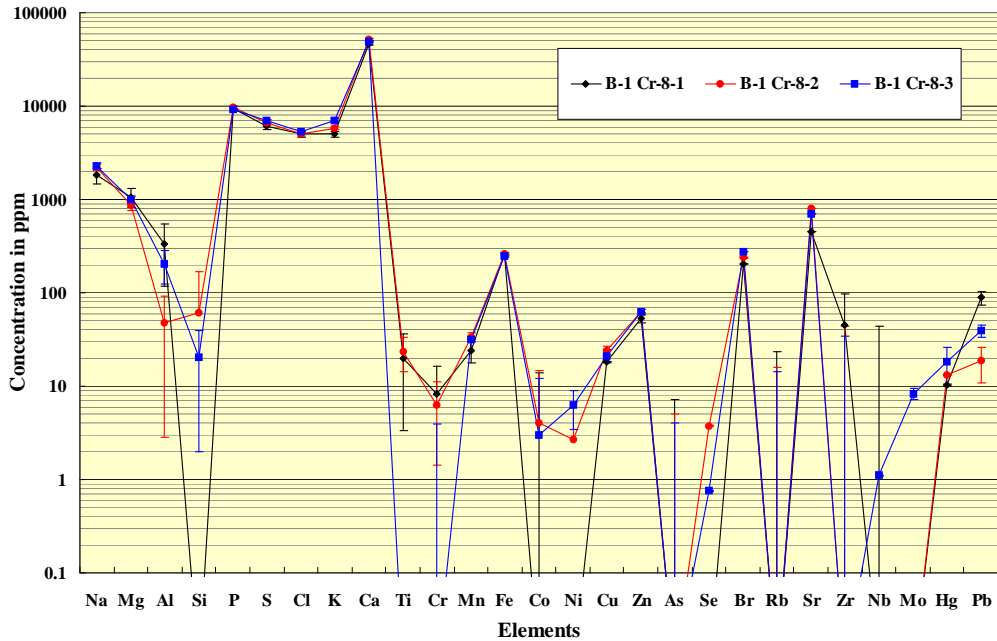


Fig. 9 Elemental concentrations in powdered ocean lives *Crangon* sp. B-1, Cr-8.

Fig. 10 には同様の結果を示すが、粉末化した *Neomysis* に対するものである。これはグループ C1 と C2 の 60 試料を合わせ、一緒に粉末化し得られたものである。この結果から、多

数の小個体を合わせて均一化した場合でも、リン以外の主要元素に対しては十分な均一性が得られていることが確認できた。これらの群において、鉛は非常に高い値を示す一方、水銀、ヒ素の濃度は比較的lowかった。

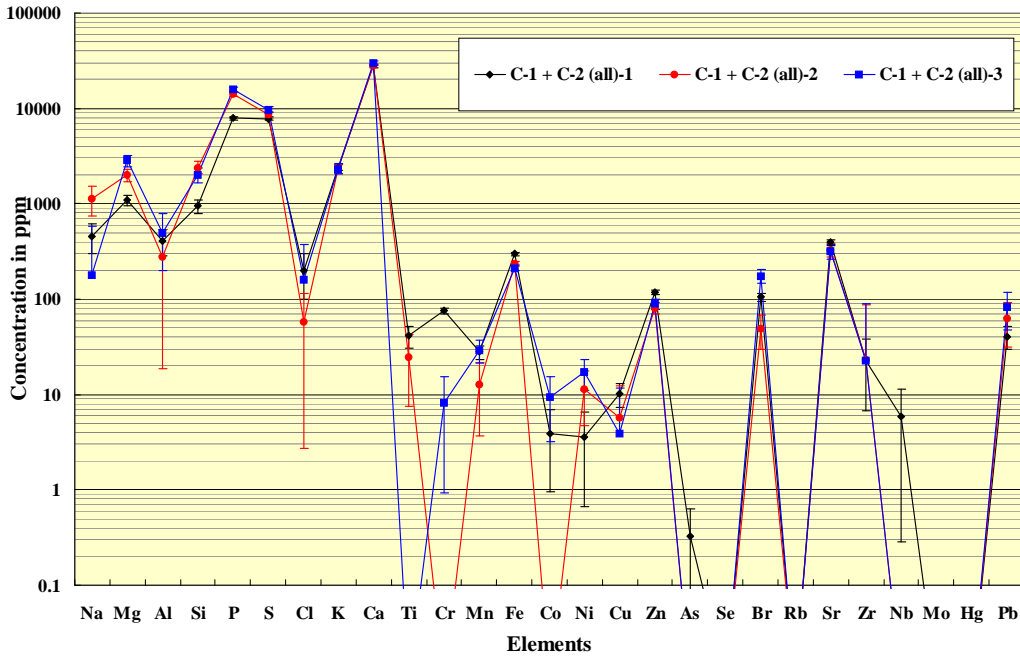


Fig. 10 Same as Fig. 9 but for powdered *Neomysis* sp. (C1+C2).

小さい *Neomysis* と *Crangon* のそれぞれ数百個体を均一粉末化した結果のそれぞれの平均値を求め、両者の比較を行った結果を Fig. 11 に示す。概ね両者は似たような元素分布を示すが、鉛、モリブデン、カリウムは明確に *Crangon* が高く、一方ヒ素、マグネシウム、鉄は *Neomysis* が高い。これは両者の食物連鎖への関与の関わり方の相違を反映している。

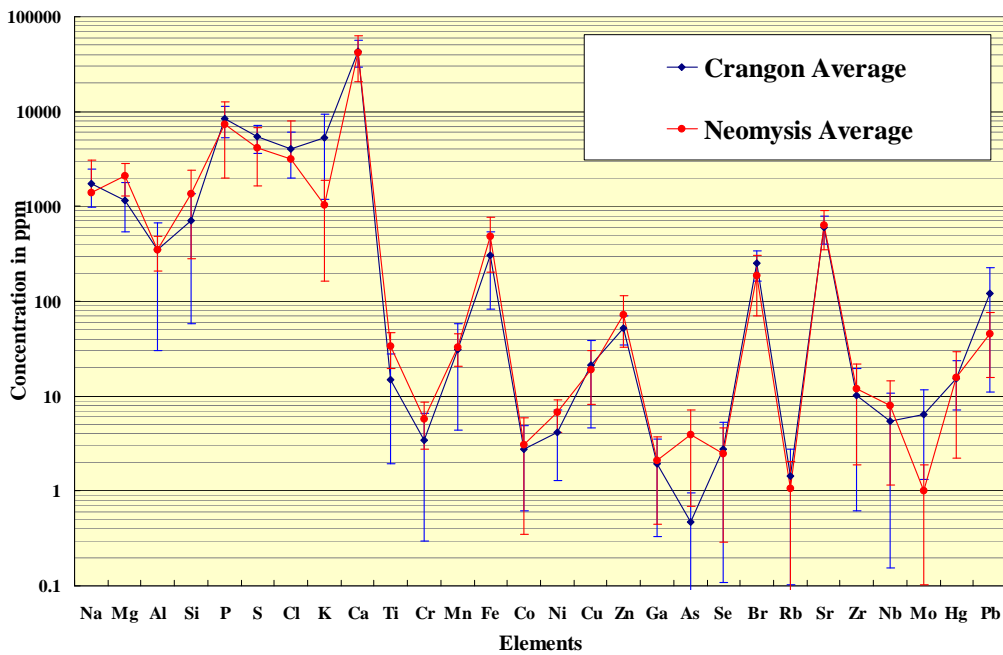


Fig 11 Comparison of average elemental concentrations in *Crangon* sp. and *Neomysis* sp.

本法により求めた無調製の小さな *Neomysis* 3 個体 (a2、a3、a5) の分析結果を Fig. 12 に示す。これらはいずれも同じ海域で同時に採取された試料であるが、著しい個体差を示している。中でも a5 は特長的であり、鉛、ガリウム、ヒ素、チタン濃度が他の 2 個体と比べ格段に高い。一方軽元素に関しては他の 2 個体よりもかなり低い値を示している。

Fig. 13には同様の比較を *Crangon* 4個体に対して示す。この中でCr-13の試料は半分には壊れたため、一方のみを測定した。Fig.12の*Neomysis*ほどの著しい個体差は見られず、似たような傾向を見せている。やはり鉛と水銀濃度が高いのが注目される。

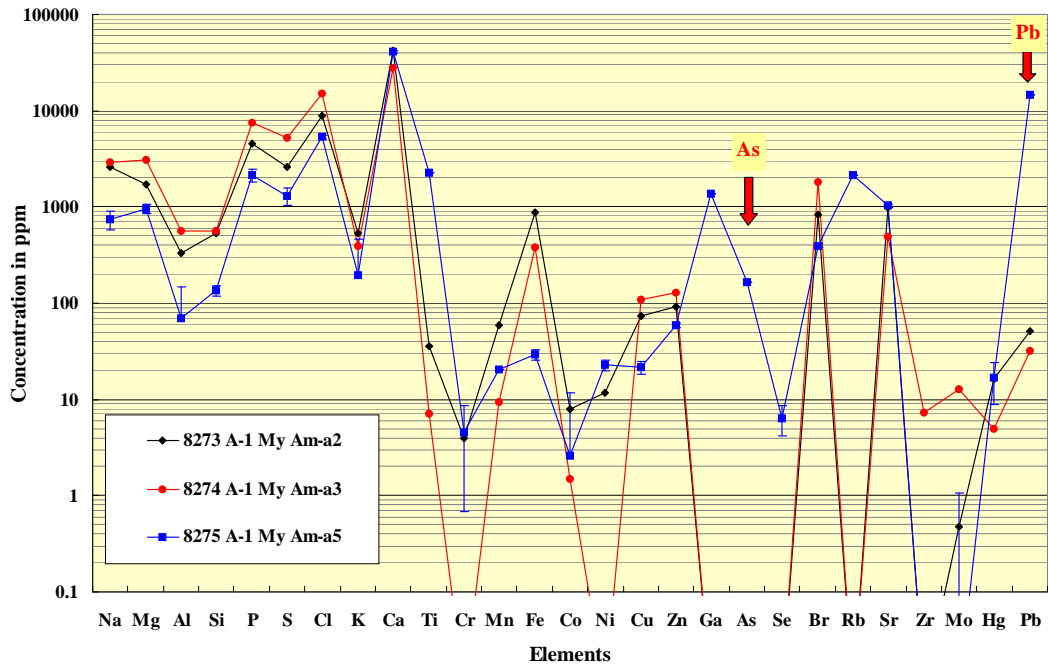


Fig 12. Elemental concentration in three untreated *Neomysis* sp. collected at the same time.

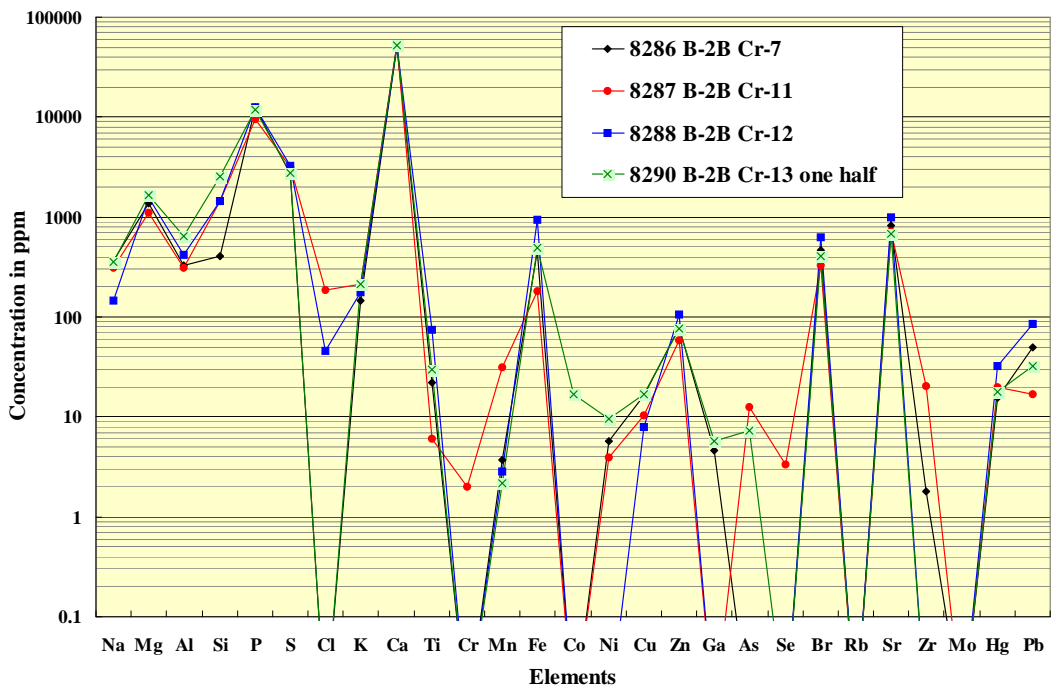


Fig 13. Same as Fig. 12 but for four untreated *Crangon* sp.

## 5 議論

Fig. 5、6 で確認できるように、蚊や小型ハエに対して開発された微小昆虫に対する無標準法は、ダニやアブラムシに対しても有効である。これらは農作物や人に対しての害虫であり、分析需要も多いと思われる。さらに Fig. 7、8 に示すように、同法は植物の種にも有効であることが確認できた。前回の報告により、同法はタラコ 1 粒の定量分析にも有効であることが確認されている<sup>2)</sup>。それらの事実から、同法は特異な元素組成を持つ生物を除き多くの生物試料に有効であり、多くの分野の研究に貢献できるものと期待される。

本研究においては微小甲殻類に対する無標準法が開発され、数  $\mu\text{g}$  以下の無調製試料の定量分析が可能となった。無標準法は試料から発生する連続 X 線収量を基準とするため、平均原子番号の異なる試料に対しては、従来は無標準法の変更が求められる。甲殻類はカルシウムの濃度が突出し、内殻電子の速度分布が異なるためそれが連続 X 線の形状に影響を与える<sup>10)</sup>。そのため独自の無標準法が開発が求められたが、Fig. 4 に見られるようにその精度は満足すべきものであった。これらの微小甲殻類は海洋生態系内の食物連鎖において中心的役割をなすものであり、その分析法が開発されたことには大きな意味がある。本法は津波後の海洋生態系再生の調査研究のみならず、大きな環境の変化に生態系がどのように対応するのかという一般的なテーマに対しても有用な手法であると思われる。

本法は、試料中でのビームのエネルギーロスや X 線の自己吸収の問題を考慮すると、1  $\mu\text{g}$  から 10 mg ほどの無調製生物試料に対し有効であると思われる。そのためそれより大きな無調製試料への適用は困難であるが、「均一化法」により、さらに大きな試料に対しても適用可能であることが示された。そのため 1  $\mu\text{g}$  から 1 g 以上の試料にまで適用でき、数十万倍に成長するこれら微小甲殻類の成長の過程を追うことができる。これらの甲殻類は、その成長に合わせて食物連鎖に果たす役割も変化するため、成長過程を通して同一の分析法が使用できることのメリットは大きい。

これら海洋食物連鎖の中核をなす微小甲殻類の分析結果から、海洋生態系再生に与える有害重元素の影響が深刻であることが分かった。ヒ素、鉛、水銀など、津波が海底から汽水域に運び上げた有害重金属の影響が、海洋食物連鎖にも及んでいることが確認できた。特にヒ素は *Neomysis* に高く、鉛、水銀は *Crangon* に高いと言う事実は、両者の食物連鎖への関り方が異なることを反映している。*Crangon* は生食食物連鎖にのみ関与し、一方 *Neomysis* は生食食物連鎖に加え腐食食物連鎖にも関与していることから、鉛、水銀は食物連鎖全体に、ヒ素は腐食食物連鎖に主に入りこんでいることが予測される。Fig. 12 に見られるように、同じ海域で採取された *Neomysis* が非常に大きな個体差を示すと言う事実は、同種の食餌形態の多様性を示す物である。特長的な元素濃度を示した個体中にヒ素が多いことから、この個体は他の個体よりも腐食食物連鎖への関与比率が高かったことも予想される。今後とも系統的・長期的に、本法を用い海洋生態系の調査研究を行っていきたいと考えている。

## 6 要約

- ① 昨年開発を行った蚊・小型ハエに対する無調製無標準法は、小型ダニ、アブラムシ、そして植物の種に対しても有効であることが確認された。
- ② 糸状に引き伸ばした接着剤が、薄いバック材として有効であることが確認された。強度も充分であり熱にも強く、粘着性を有するため試料の固定が容易である。さらに殆ど不純物を含まない。

- ③ 微小生物試料に対しては、10 mg 以下の試料に対しては無調製で糸状バックキングに付着させ、大きな試料は均一粉末化後、同様に糸状バックキングに付着させる方法により、大きさの 10 万倍以上異なる試料も同一の方法で分析可能となった。
- ④ 微小甲殻類に対する無標準法が開発され、その精度が確認された。その結果、秤量不可能な数  $\mu\text{g}$  程度の甲殻類の定量分析が可能となった。
- ⑤ 本法は、海洋生態系の食物連鎖において中心的役割を果たす微小甲殻類の分析に応用された。
- ⑥ これらの試料から、高濃度の砒素・鉛・水銀などが検出され、これらの重元素の海洋生態系再生への影響が心配される結果となった。
- ⑦ 微小甲殻類中の元素濃度を調べることにより、各個体の食物連鎖への関わり方が推定できる可能性が示唆された。

### 謝辞

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. 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 (1996) 467-481
2. K. Sera, H. Suzuki, K. Sawabe, O. Komagata, S. Goto, C. Takahashi and Y. Saitoh, "Standard-Free Method for Quantitative Elemental Analysis of Mosquitoes and Small Flies", *Int'l Journal of PIXE*, in press (2014)
3. J. Schmidt-Chanasit, P. Emmerich, D. Tappe, S. Günther, S. Schmidt, D. Wolff, K. Hentschel, D. Sagebiel, I. Schöneberg, K. Stark, and C. Frank. "Autochthonous dengue virus infection in Japan imported into Germany, September 2013.", *Euro Surveill.* 2014;19(3): pii=20681. (Available online)
4. N. Sukehiro, N. Kida, M. Umezawa, T. Murakami, N. Arai, T. Jinnai, S. Inagaki, H. Tsuchiya, H. Maruyama, and Y. Tsuda, "First Report on Invasion of Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*, at Narita International Airport, Japan in August 2012", *Jpn. J. Infect. Dis.*, Vol. 66, 189-194, (2013)
5. K. Sera, F. Baba, S. Goto, C. Takahashi, Y. Saitoh, and M. Matsumasa, "Analysis of Plants and Sediment from the Tidelands of the Coastal Regions of the Tohoku District Following the 2011 Tsunami.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.22-1-2, 139-147, (2011)
6. K. Sera, S. Goto, C. Takahashi, Y. Saitoh, and K. Yamauchi, "Effects of heavy elements in the sludge conveyed by the 2011 tsunami on human health and the recovery of the marine ecosystem.", *Nucl. Instr. Meth.* B318, 76-82, (2014)
7. Analysis of Contaminated Sludge Deposited on the Land Attacked by Great Tsunami following Tohoku Great Earthquake Disaster., Baba, F., Sera, K., Goto, S., Takahashi, C., and Saitoh, Y., *Int'l Journal of PIXE* Vol.22-1-2, 231-239, (2011)
8. S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, 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)
9. 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)
10. K. Ishii and s.Morita, "Continuous Background in PIXE.", *Int'l Journal of PIXE*, Vol.1-1, 1-29 (1990)

## Quantitative analysis of small bio-samples of nearly 1 $\mu$ g

K. Sera<sup>1</sup>, S. Goto<sup>2</sup>, C. Takahashi<sup>2</sup>, Y. Saitoh<sup>2</sup>, K. Kinoshita<sup>3</sup>  
and M. Matsumasa<sup>4</sup>

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

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

<sup>3</sup>Organization of Revitalization for Sanriku-region, Iwate University  
3-18-8 Ueda, Morioka, Iwate 020-8550, Japan

<sup>4</sup>Department of Biology, Center for Liberal Arts and Sciences, Iwate Medical University  
2-1-1 Nishitokuta, Yahaba, Iwate 028-3694, Japan

### Abstract

We developed and reported standard-free methods for various bio-samples in both in-vacuum and in-air PIXE and they have been applied to quantitative analyses of traces of bio-samples whose weights are less than 0.1 mg. In this study, we established a method of quantitative analysis for bio-samples of nearly 1  $\mu$ g in in-vacuum PIXE. In order to improve sensitivity and accuracy of analysis for smaller samples on the basis of the standard-free method, which makes use of continuous X-rays emitted from the sample, it is essential to design appropriate backing materials for supporting the sample. In the present study, we have examined various backing materials such as thinner and threadlike backings. As a result, it was found that a threadlike backing made of extended adhesive, which contains almost no impurity, is the most suitable for bio-samples of extremely small quantities, since it produces no large amount of continuous X-rays. The method has been applied to quantitative analyses of small insects and plants. Moreover, the method was applied to analyses of small marine organisms such as opossum shrimps and squilla shrimps which are playing important roles in a food chain in marine ecosystem. The results gave us valuable information about regeneration of marine ecosystem in the Sanriku district attacked by the huge tsunami that occurred on March 11, 2011.