

[H27-3]

## イオンマイクロビームによる微量元素イメージング技術の高度化とその応用 Improvement and Application of Imaging Technique for Trace Elements using Ion Microbeam

土橋邦生<sup>#A)</sup>, 佐藤隆博<sup>B)</sup>, 古賀康彦<sup>A)</sup>, 解良恭一<sup>A)</sup>, 江夏昌志<sup>C)</sup>, 久田剛志<sup>A)</sup>, 櫻井映子<sup>D)</sup>, 遠藤圭汰<sup>E)</sup>, 栗田正<sup>E)</sup>, 吉田文代<sup>E)</sup>, 中井啓<sup>E,F)</sup>, 石川栄一<sup>E)</sup>, 原田聡<sup>G)</sup>, 瀬川昂史<sup>G)</sup>, 笠松哲光<sup>A)</sup>, 長嶋友海<sup>A)</sup>, 村上博和<sup>A)</sup>, 松田康裕<sup>H)</sup>, 奥山克史<sup>I)</sup>, 山本洋子<sup>J)</sup>, 林美加子<sup>J)</sup>, 橋本直樹<sup>K)</sup>, 能町正治<sup>J)</sup>, 安田啓介<sup>L)</sup>, 佐野英彦<sup>K)</sup>, 斎藤隆史<sup>H)</sup>, 古川純<sup>E)</sup>, 野田祐作<sup>E)</sup>, 山田尚人<sup>B)</sup>, 佐藤忍<sup>E)</sup>, 横山彰人<sup>B)</sup>, 大久保猛<sup>B)</sup>, 石井保行<sup>B)</sup>, 渡部創<sup>M)</sup>, 佐野雄一<sup>M)</sup>, 新井剛<sup>N)</sup>, 植木裕<sup>O)</sup>, 畠山泰輔<sup>O)</sup>, 石井慶造<sup>O)</sup>, 松山成男<sup>O)</sup>, 寺川貴樹<sup>O)</sup>, 藤原充啓<sup>O)</sup>, 及川絃奈<sup>O)</sup>, 加田渉<sup>A)</sup>, 神谷富裕<sup>A)</sup>

Kunio Dobashi<sup>#A)</sup>, Takahiro Satoh<sup>B)</sup>, Yasuhiko Koga<sup>A)</sup>, Kyoichi Kaira<sup>A)</sup>, Masashi Koka<sup>C)</sup>, Takeshi Hisada<sup>A)</sup>, Eiko Sakurai<sup>D)</sup>, Keita Endo<sup>A)</sup>, Tadashi Kurita<sup>A)</sup>, Fumiyo Yoshida<sup>A)</sup>, Kei Nakai<sup>E,F)</sup>, Eiichi Ishikawa<sup>E)</sup>, Satoshi Harada<sup>G)</sup>, Takashi Segawa<sup>G)</sup>, Tetsuhiro Kasamatsu<sup>A)</sup>, Nagashima Tomomi<sup>A)</sup>, Hirokazu Murakami<sup>A)</sup>, Yasuhiro Matsuda<sup>H)</sup>, Katsushi Okuyama<sup>I)</sup>, Hiroko Yamamoto<sup>J)</sup>, Mikako Hayashi<sup>J)</sup>, Naoki Hashimoto<sup>K)</sup>, Masaharu Nomachi<sup>J)</sup>, Keisuke Yasuda<sup>L)</sup>, Hidehiko Sano<sup>K)</sup>, Takashi Saito<sup>H)</sup>, Jun Furukawa<sup>E)</sup>, Yusaku Noda<sup>E)</sup>, Naoto Yamada<sup>B)</sup>, Shinobu Satoh<sup>E)</sup>, Yoshihiro Iwata<sup>M)</sup>, Masakazu Oikawa<sup>B)</sup>, Akihito Yokoyama<sup>B)</sup>, Takeru Ohkubo<sup>B)</sup>, Yasuyuki Ishii<sup>B)</sup>, Sou Watanabe<sup>N)</sup>, Yuichi Sano<sup>N)</sup>, Tsuyoshi Arai<sup>O)</sup>, Yu Ueki<sup>P)</sup>, Taisuke Hatakeyama<sup>P)</sup>, Keizo Ishii<sup>P)</sup>, Shigeo Matsuyama<sup>P)</sup>, Atsuki Terakawa<sup>P)</sup>, Mitsuhiro Fujiwara<sup>P)</sup>, Hirona Oikawa<sup>P)</sup>, Wataru Kada<sup>A)</sup>, Tomihiro Kamiya<sup>A)</sup>

<sup>A)</sup> Gunma University

<sup>B)</sup> National Institutes of Quantum and Radiological Science and Technology

<sup>C)</sup> Beam Operation Co., Ltd

<sup>D)</sup> Iwaki Meisei University

<sup>E)</sup> University of Tsukuba

<sup>F)</sup> Ibaraki Prefectural University of Health Sciences Hospital

<sup>G)</sup> Iwate Medical University

<sup>H)</sup> Health Sciences University of Hokkaido

<sup>I)</sup> Asahi University

<sup>J)</sup> Osaka University

<sup>K)</sup> Hokkaido University

<sup>L)</sup> Kyoto Prefectural University

<sup>M)</sup> Akita University

<sup>N)</sup> Japan Atomic Energy Agency

<sup>O)</sup> Shibaura Institute of Technology

<sup>P)</sup> Tohoku University

### Abstract

In the H27-3 project, micro-particle induced X/gamma-ray emission (micro-PIXE/PIGE) analysis and PIXE tomography using a MeV-class proton microbeam were applied to various fields such as medicine and environmental science by developing sample preparation and data processing methods as a result of intensive cooperation among 11 sub-groups in the 2016 fiscal year. In medical applications, the trace elements involved in various diseases were researched, and the effects of medicines and medical materials were verified. Above all, an increase of silicon in lymph of asbestosis, an increase of trace metal in lung microvessels after treatment with nicotine, and possible involvement of calcium with the effect of bortezomib came out. Moreover, the micro-PIXE/PIGE analysis provided advances in the dental material supplying fluorine and the radiosensitive nano-particle including carboplatin. In application to plant science, it was revealed that the 2 lines of *Lotus* have different distributions of iron in their shoots and roots from each other. For PIXE tomography, an efficient sample preparation method and more quantitative image reconstruction algorithm were developed, and it was revealed that the elemental distribution in an adsorbent for high-level radioactive liquid waste and a soil particle holding cesium. In addition, an experimental spectroscopy system for ion beam induced luminescence was developed, and was successful in visualizing the distribution of a chemical state in standard samples.

**Keyword:** microbeam, PIXE, PIGE

### 1. はじめに

本課題は、11 のサブグループが密に連携し、試料

調整法の共有や分析システムの開発などを通して、  
大気マイクロ PIXE/PIGE (particle induced

[H27-3]

X/gamma-ray emission) 分析、PIXE トモグラフィ及び荷電粒子誘起発光分光 (IBIL, ion beam induced luminescence) の医療や環境科学への応用を進めることを目的としている。医療への応用では、各種疾患における微量元素の関与の調査や薬剤や医療材料の効果の検証を行った。環境科学への応用では、土壌や水から植物への元素移行を調査するとともに、放射性廃液処理用吸着材の残留元素分析を行った。さらに、応用研究を支えるために標準物質の開発や画像再構成アルゴリズムの改良を行った。これらのうち本稿では、「アスベスト暴露患者の肺と肺門リンパ節の元素分析及び免疫組織化学分析の予備研究」、「ラット肺微小血管内皮細胞内微量元素分析の高精度化と応用」、「マイクロ PIXE/PIGE を用いた細胞および組織内ホウ素検出の検討」、「放射線感受性カルボプラチン含有ヒアルロン酸-プロタミンナノパーティクルの開発」、「大気マイクロ PIXE を用いた多発性骨髄腫細胞内微量元素の動態解析」、「自動 pH サイクル装置を用いた S-PRG パーニッシュによる脱灰抑制効果」、「マイクロ PIXE 分析を用いたミヤコグサ根端における鉄局在の可視化」、「PIXE トモグラフィ分析システムの開発」、「CMPO-HDEHP/SiO<sub>2</sub>-P 吸着材における残留 Eu の分布評価」、「PIXE トモグラフィによる土壌試料の 3 次元元素分析」及び「IBIL 分光システム開発」についての詳細を以下に示す。

## 2. アスベスト暴露患者の肺と肺門リンパ節の元素分析及び免疫組織化学分析の予備研究

### 2.1. 背景と目的

気道から吸入された微量元素、さらにアスベストは全身の臓器への分布が認められることがある。大気マイクロ PIXE では、微量な肺組織を用いた元素分布の測定が可能である。そこで、肺内微粒子の分布メカニズムを検討するために、アスベスト吸入歴のある肺癌症例のパラフィン切片を用いて、肺内及び肺門部リンパ節の微粒子の分析を大気マイクロ PIXE により行った。また、同一のパラフィン切片を用いてマクロファージ表面マーカーの免疫染色を行い元素分布との関連性を検討した。

### 2.2. 方法

肺切除検体のパラフィン切片にイオンマイクロビームを照射し、パラフィン切片内の元素分布を測定した。また、マクロファージの免疫組織染色には Figure 1 のように anti CD163 antibody を用いた。

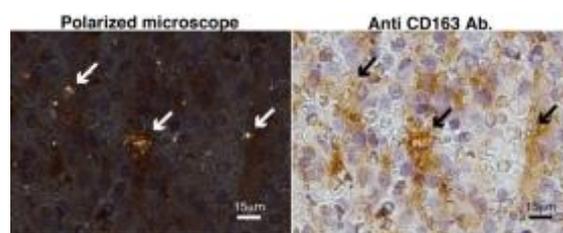


Figure 1. The high-power field images from the polarized microscope and the anti-CD163 staining of the hilar lymph node. White arrowheads indicate polarized elements. Black arrowheads indicate co-localized anti-CD163 antibodies.

### 2.3. 結果

Figure 2 に大気マイクロ PIXE で得られた分析結果を示す。肺野より肺門部リンパ節のパラフィン切片から、より多くの外来から吸入されたシリカを大気マイクロ PIXE 分析により検出した。また同じパラフィンブロックからのマクロファージの免疫染色でも、マクロファージの集積が肺門部リンパ節で高率に認められた。

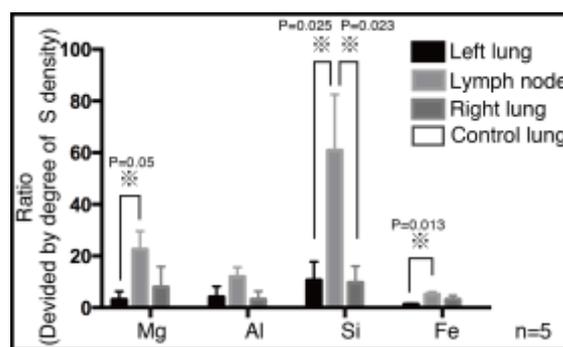


Figure 2. The quantitative analysis of inhaled elements in the left and right lung parenchyma, lymph node, and control lung by in-air micro PIXE.

### 2.4. 考察

大気マイクロ PIXE によって、同一組織検体のパラフィン切片を用いて患者の粉塵吸入の有無が推定でき、さらに免疫組織学検討を加えることによって、粉塵の生体内での分布のメカニズムの解明の一助となる可能性が示唆された<sup>[1]</sup>。

## 3. ラット肺微小血管内皮細胞内微量元素分析の高精度化と応用

### 3.1. 背景

ラット肺微小血管内皮細胞 (LMCs) に代謝酵素が存在することが報告されている<sup>[2]</sup>。したがって、喫煙により肺微小血管内皮細胞と通過して吸収されたニコチンは、ニコチンよりも低毒性のコチニンに代謝を受ける。しかし、大気汚染物質の PM2.5 の存在下での作用については、明らかになっていない。

[H27-3]

### 3.2. 方法

3 週令の雄性ラットの肺から微小血管内皮細胞を採取・培養して、ニコチン、PM2.5 モデルの Wakosil (シリカゲル) の影響を検討した。

### 3.3. 結果

Figures 3 と 4 に、大気マイクロ PIXE で分析した結果を示す。ニコチンのみで処理した細胞には、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) を構成する微量金属の割合が増えていたが、Wakosil 存在下でニコチンを作用させると、細胞内元素そのものが減少し、アポトーシスを起こしている可能性が推察された。

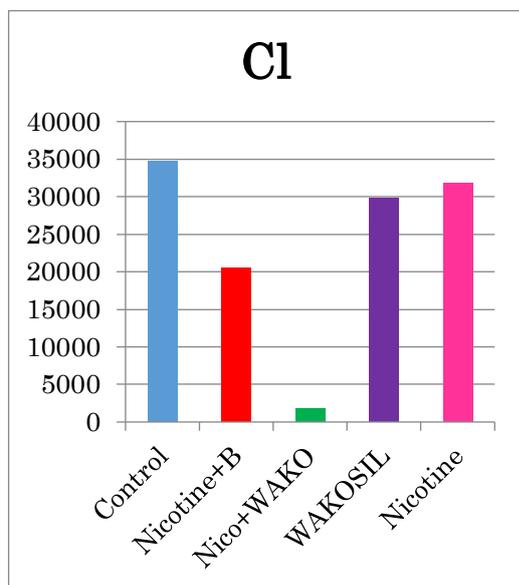


Figure 3. The characteristic X-ray counts from chlorine.

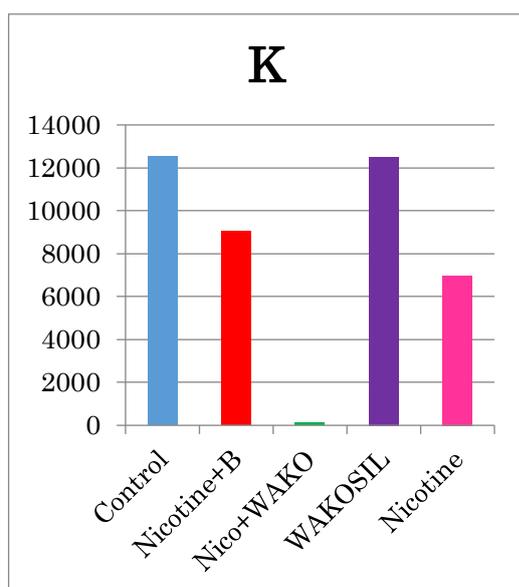


Figure 4. The characteristic X-ray counts from potassium

## 4. マイクロ PIXE/PIGE を用いた細胞および組織内ホウ素検出の検討

### 4.1. 背景と目的

ホウ素中性子捕捉療法 (BNCT, boron neutron capture therapy) は、薬物の生体内濃度差を利用した粒子線治療である。原子炉を用いた臨床試験が各国で行われてその有用性が報告されてから、秒品併設可能な加速器中性子源の開発をめぐって幾つかのグループが成果を上げている。その実現とともに、治療に関する周辺技術も応用可能なように準備刷る必要があるが、線量分布、患者セッティングシステムとともに重要なのが、照射中に短時間でホウ素濃度を測定する技術である。

BNCT の性能向上のためには、安定した中性子源のほか、腫瘍選択的に  $^{10}\text{B}$  を取り込む新規化合物の開発が必要である。軽元素であるホウ素の濃度測定では、プラズマ発光分析または即発ガンマ線分析、臨床では  $^{18}\text{F}$  を付加したアミノ酸 PET を用いたイメージングが利用されている。一方、細胞レベルでの可視化は、アルファトラッキングや、SIMS 等の報告があるが、一般的な分析技術として確立されているとは言えない。そこで本研究では、ホウ素の検出および、新規化合物に対応した、組織内、あるいは細胞内でのホウ素分布解析に大気マイクロ PIXE/PIGE が利用可能であるかの検討として、ホウ素濃度測定として広く用いられる誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-AES) と大気マイクロ PIXE/PIGE 分析法を細胞検体で比較した。

### 4.2. 方法

ホウ素化合物は、p-dihydroxyboryl-phenylalanine (BPA) と fructose が錯体溶液として用いられる。BPA と ructose を NaOH 溶液中に、1M:1.2M で混じて溶解する。その後、溶液の pH を 7.4 に HCl を用いて滴定し調節した。最終的な溶液中のホウ素濃度は、最大で 1300  $\mu\text{gB/mL}$  である。

Carbon nanohorn にホウ素が内包された粒子をパイロット試験的に用いた。粒子は、産総研より供給を受けた。ただし、成分中のホウ素は  $^{10}\text{B}$  濃縮ではなく、天然組成である。

予め、Poly lysine coating を施した 5  $\mu\text{m}$  厚のポリカーボネート膜を試料台として用いた。専用のホルダに最終的に貼付して分析を行う。細胞は 96well プレート、ないしは専用で作成したアクリル容器の底に、ポリカーボネート膜を接着させ、その上で付着細胞の培養を行った。細胞株は、ラットグリオーマ細胞の C6、チャイニーズハムスターの線維芽細胞 V79、ヒトグリオーマ細胞の U251 を主に用いた。細胞培養は通常の条件 (湿度 100%、37°C、二酸化炭素 5%) で行い、コンフルエント前の状態で資料を作成した。ホウ素薬剤添加は、一定時間培地中にホウ素薬剤を添加することで行われた。

組織標本は、まずホウ素の可視性を確認するため以下の手順で作成した。

- ラットに C6 細胞を皮下および脳内に接種す

[H27-3]

る。2週間後、あらかじめ溶解した BPA 溶液を 26mgB/kg になるように尾静脈よりボラス投与する。

- 0.5,1,2,3 時間後に腫瘍、正常側大脳半球、血液、腎臓、肝臓を 50-100 mg 取り出し、樹脂包埋し、凍結する。
- クライオスタットで 5-20  $\mu\text{m}$  厚さで組織を薄切し、ポリカーボネート膜に乗せる。

薬剤暴露を終えた試料は、PBS で 2 度そつと洗浄し、組織切片はそのまま急速凍結し、凍結乾燥機で水分を昇華させた標本を、1.7 MeV の陽子線ビームを用いた大気マイクロ PIXE/PIGE で分析した。

測定データから、解析ソフトウェアによって元素の二次元分布マップおよびスペクトラムを得た。

#### 4.3. 結果と考察

Figure 5 に、ホウ素暴露後の細胞から得られたスペクトラムを示す。基本的な元素およびガンマ線に、ホウ素のピークが視認可能であった。

Figure 6 に、細胞の形状を示す P、K の分布と、同時に同じ試料で検出した PIGE のホウ素カウントの分布を示す<sup>[3]</sup>。細胞外領域に比べて、細胞領域に多い傾向が伺われる。

動物組織から得たスペクトルと元素分布を Figure 7 に示す。2次元マップでは、凍結切片の厚みにかかわらず、個々の細胞の分離は困難であった。

従来のホウ素濃度測定 (ICP-AES) と、本法によるホウ素カウント比の関連を Figure 8 に示す。高濃度ほどカウント比が増加する傾向にはあるが、50  $\mu\text{g/g}$  以下ではスペクトラムとバックグラウンドの分離が不十分であり、単純な液体を添加した場合の班定量的検討と異なり、生体組織の低濃度領域では、定量的検討は困難と思われた<sup>[4]</sup>。組織によるカウントの差異は明らかではなかった。

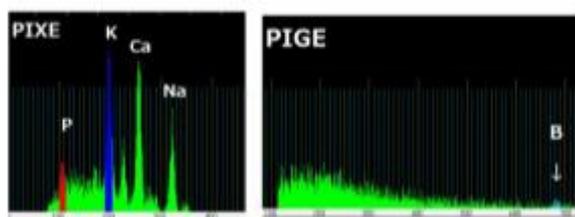


Figure 5. The spectra of PIXE and PIGE (U251 human glioma cells) .

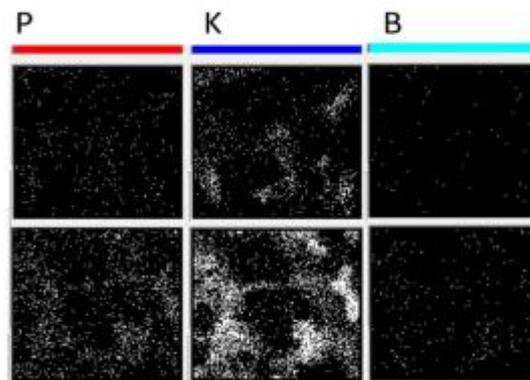


Figure 6. The 2-dimensional location of the boron (B) , and phosphorus (P) , potassium (K) .

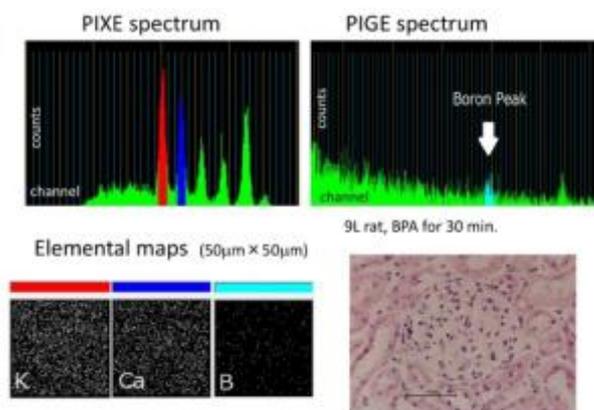


Figure 7. The spectra and 2-dimensional location maps from renal tissue samples.

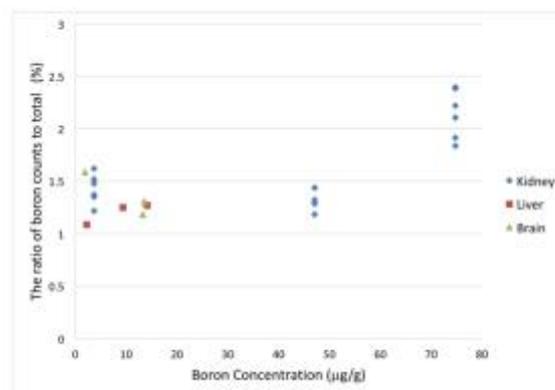


Figure 8. The relation between boron count ratio and boron concentration.

[H27-3]

## 5. 放射線感受性カルボプラチン含有ヒアルロン酸-プロタミンナノパーティクルの開発

### 5.1. 背景

我々は、放射線照射により抗がん剤を放出するマイクロカプセルを研究し、放射線による腫瘍への抗がん剤標的療法を研究してきた<sup>[5]</sup>。現在までのマイクロカプセルの作成方法は、アルギン酸の  $\text{Fe}^{2+}$  重合が放射線照射により、 $\text{Fe}^{3+}$  に変化すること、ヒアルロン酸がアセチルグルコサミンに分解することを利用して、アルギン酸、ヒアルロン酸、抗癌剤カルボプラチン（白金系抗がん剤）の混合溶液を、 $\text{FeCl}_2$  溶液中に噴霧しておこなってきた<sup>[5]</sup>。しかし、カプセル径が  $20\ \mu\text{m}$  前後大と大きく、静脈から注射した場合、肺、脳などへの毛細血管に捕捉される問題点があった。一方、ヒアルロン酸は溶液中で負に帯電し、溶液中で正に帯電するプロタミンと混和することで、ナノパーティクルを形成する性質を持つ。さらに、ヒアルロン酸が放射線によりアセチルグルコサミンに分解することから、ヒアルロン酸プロタミンをカルボプラチン水溶液中で反応させれば、放射線に反応しカルボプラチンを放出するパーティクルが作成できると考えられる。今回、我々は、上述の方法でパーティクルを作成し、パーティクルが放射線に反応して、カルボプラチンを放出するか否かについて大気マイクロ PIXE 分析を使用して検討した。

### 5.2. 方法

2.0 mg プロタミン、1.6 mg ヒアルロン酸 を秤量し、各々 1.0 ml tube 中で 0.1 M Tris-HCl に別々に溶解することで、プロタミン溶液とヒアルロン酸溶液を作成した。カルボプラチン溶液 (1mg / 1 ml) を 2 本のマイクロチューブに、2 ml ずつ分注し、続いて、2 本のうちの 1 本にプロタミン溶液 400  $\mu\text{l}$  を、他の 1 本にヒアルロン酸 400  $\mu\text{l}$  を混和して、プロタミン-カルボプラチン溶液とヒアルロン酸-カルボプラチン溶液を作成した。続いて、プロタミン-カルボプラチン溶液 2 ml に、ヒアルロン酸-カルボプラチン溶液 2 ml を混和後、30 分間静置下にて反応させ、プロタミン-ヒアルロン酸-カルボプラチンパーティクルを析出させた。析出したパーティクルは、直径  $0.8\ \mu\text{m}$  孔のセルロース膜で濾過され、セルロース膜上にパーティクルを捕捉した。捕捉したパーティクルを 0.5 Mol Tris-buffer 中に再浮遊後、超音波破碎装置で微細化し、実験に使用した。

上記パーティクル 1 億個を 0.1 M Tris 1ml 中に浮遊させ、140 KeV X 線 5 Gy を、線量率 0.304 Gy/min で照射した。

照射前と照射後のパーティクル浮遊液 2  $\mu\text{l}$  を、0.1  $\mu\text{m}$  厚のマイラー膜を張ったターゲットホルダ上に滴下後、液体窒素で冷却したイソペンタン中にホルダ下面のみを接触させ、凍結後、真空 ( $1 \times 10^{-3}$  Torr) 中で乾燥し、検体とし、大気マイクロ PIXE で分析した。

描出されたパーティクルは次の 3 つのグループに

分類した。

- パーティクルの輪郭が明瞭で、周囲に Carboplatin の放出が見られない。(Figure 9-A)
- パーティクルの輪郭が不整で、周囲に Carboplatin の放出が見られる。(Figure 9-B)
- パーティクルが微細化し、その概形を伴わない (Figure 9-C)

これらの発生率を、10 視野中の全パーティクル数に対する、各パーティクル数の百分率で計測した。

統計計算は、ANOVA (analysis of variance) を用い、 $P < 0.05$  を有意差ありと判定した。

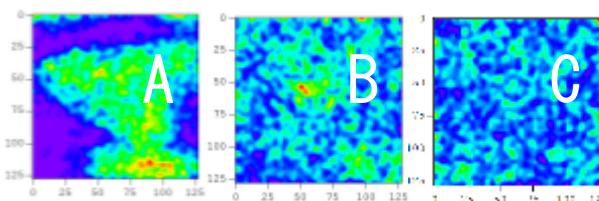


Figure 9. The particles imaged by micro PIXE camera. A: Class I: Particles that have clear margin and distinct Pt contamination, B: Class II: Particle that have unclear margin and irregular contour, C: Class III: Particles that were fragmented into the small particles.

### 5.3. 結果

生成されたパーティクルを Figure 9-A に示す。パーティクルは Pt 分布を場増加する事により検出可能であった。

Figure 10 に大気マイクロ PIXE による分析結果を示す。放射線照射前では、輪郭が明瞭で、周囲に Carboplatin の放出が見られない Class I のパーティクルは放射線照射前で  $7.3 \pm 0.5\%$  で、5 Gy を照射したパーティクルの  $1.3 \pm 0.1\%$  よりも有意に高かったが、その発生率はわずかであった。

放射線照射の有無に関係無く、一番多く見られたのは、Class II のパーティクルの輪郭が不整で、周囲に Carboplatin の放出が見られたパーティクルであった。その頻度は、放射線照射前で  $28.2 \pm 2.1\%$ 、5 Gy 照射後で  $33.7 \pm 3.2\%$  で、わずかであった。

Class III の微細化されたパーティクルに関しては、照射前が  $17.3 \pm 1.3\%$ 、照射後が  $5.2 \pm 1.9\%$  であり、照射前の方が微細なパーティクルが多く見られた。

[H27-3]

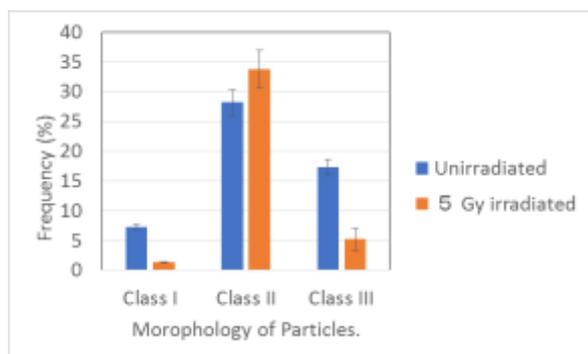


Figure 10. The frequency of particles classified basing on their morophologica changes. Cf Figure 9. The frequency of those particles wase assessed by mean percentage of particles in 10 vies of the in-air micro-PIXE at 12 × 12 μm<sup>2</sup> area.

#### 5.4. 考察

大気マイクロ PIXE を用いて、プロタミン-ヒアルロン酸パーティクルを画像化した。今回、パーティクルからの薬剤放出を示す Class II の頻度が放射線照射により、増加していたが、その差はわずかで、有意な上昇とは言えなかった。さらに、放射線照射前でも Class II のパーティクルが有意に増加しているため、パーティクルの安定化が必要と考えられた。また、パーティクルの微細化を示す Class III のパーティクルが放射線の方が少ないことから、放射線により、パーティクルが凝集している可能性が考えられた。

上記 2 点の問題 (i) パーティクルの安定化、(ii) パーティクル凝集に対する対策として、(i') プロタミン-ヒアルロン酸反応時に、乳酸鉄を加えることにより、パーティクルを安定化させることが考えられた。また、(ii') パーティクル生成後、Lipid に封入する事により、パーティクル同士が、凝集するのを防止させることが考えられた。

## 6. 大気マイクロPIXEを用いた多発性骨髄腫細胞内微量元素の動態解析

### 6.1. 背景

多発性骨髄腫 (MM) は、自家造血幹細胞移植やサリドマイドなどの新規薬剤が導入され、50% 生存期間が 3 年から 5 年に改善してきている。しかしながら、ほとんどの患者は化学療法に抵抗性であり、未だ治癒が望めない。今研究では、MM の病態解明および新たな疾患の病型分類・治療法の開発へと結びつけることを目的とし、大気マイクロ PIXE 分析を用いた MM 細胞内の微量元素の測定法の確立と検討を行った。

### 6.2. 方法

MM 細胞株 (KMS11) を用いて、プロテアソーム阻害剤ボルテゾミブを 0 nM、20 nM、50 nM の濃度

で添加し、24 時間培養を行った。細胞を TRIS-HNO<sub>3</sub> (pH 7.4) にて洗浄後、3 × 10<sup>5</sup> 個/mL に再懸濁後、集細胞遠心装置にて、500 rpm、15 分遠心し、0.5 μm 厚のポリカーボネート膜に細胞を接着させ、真空蒸着させる。この試料を大気マイクロ PIXE 分析チャンパーに装着、順次測定し、MM 細胞内微量元素を解析した。

### 6.3. 結果と考察

Figure 11 に大気マイクロ PIXE 分析で得られた線スペクトルを示す。1 細胞あたりの比較では、0 nM と 20 nM では各元素のピークに差は認められなかった。しかしながら、50 nM では 0 nM に比べ、Ca のピークが高かった。さらに、P、S、Cl、Ca の元素分布を比較したところ、0 nM と 20 nM では各元素の分布に差は認められなかった。50 nM では他の濃度と比較し、P 分布が断片化しており、細胞死による核の断片化を反映していると示唆された。また、50 nM では Ca 分布の核への集積が認められた。

ボルテゾミブはプロテアソームを阻害し、細胞に小胞体ストレス (ER ストレス) を与えることで細胞死に導くとされている。今回の検討で、ボルテゾミブ 50 nM 添加にて MM 細胞内の Ca の上昇が認められた。細胞内において Ca イオンはおもに小胞体に貯蔵されており、ER ストレスにより細胞質内に Ca イオンが放出され<sup>6)</sup>、ミトコンドリアが取り込むことで、シトクロム C などのアポトーシス誘導因子が放出される。以上より、プロテアソーム阻害による ER ストレスの結果である Ca の上昇が認められ、Ca の動態が MM 細胞におけるボルテゾミブの薬効への関与が示唆された。

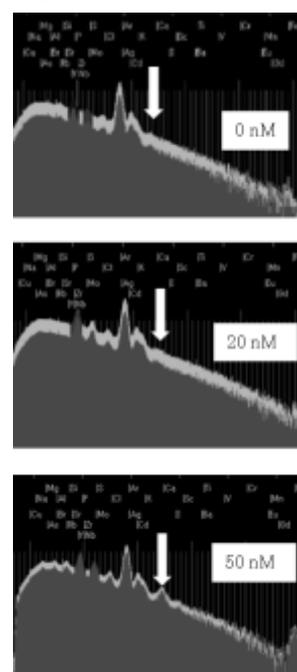


Figure 11. The spectrum of KMS11 after bortezomib treatment.

## 7. 自動 pH サイクル装置を用いた S-PRG

[H27-3]

## バーニッシュによる脱灰抑制効果

### 7.1. 背景

歯面に塗布しフッ素を供給する材料として、欧米諸国で広く用いられているフッ化物バーニッシュがある。近年では、多機能性表面処理ガラスフィラー (S-PRG filler, surface reaction type pre-reacted glass ionomer filler) を含有するバーニッシュの開発も進んでいる。この S-PRG filler は Fをはじめ  $\text{Na}^+$ 、 $\text{BO}_3^{3-}$ 、 $\text{Sr}^{2+}$ 、 $\text{SiO}_3^{2-}$ 、 $\text{Al}^{3+}$  などのイオン徐放性を持つ。そのため、S-PRG filler 配合歯面塗布材料であるバリアコートは抗菌性に優れ、歯質の耐酸性や再石灰化効果をもたらすことから根面齶蝕の新たな予防材料となることが期待されている。我々が開発した自動 pH サイクル装置は、溶液が還流するため、口腔内の pH の変化や歯質周囲のフッ素濃度のシミュレーションが可能である。そこで、今回は自動 pH サイクル装置を用いて、フッ化物徐放性材料を塗布した象牙質の脱灰変化の観察およびフッ化物局所応用としてのフッ化物バーニッシュの有効性について検討した。

### 7.2. 方法

本研究では健全ヒト抜去臼歯、歯頸部にフッ化物バーニッシュとして Enamel Pro® Varnish, Premier® (EP) と Vanish™ 5% NaF White Varnish, 3M ESPE (WV) を、S-PRG バーニッシュとして S-PRG Varnish, SHOFU (S-PRG) の塗布を行い、材料を塗布しなかったものをコントロールとした。塗布後に材料を含み厚さ 200  $\mu\text{m}$  に切断した切片を Single-Section 試料として用いた。Single-Section 試料は自動 pH サイクル装置を用いた負荷シミュレーションを行う前と、4 週間行った後に Transverse microradiography (TMR) 撮影を行い、得られた画像から Integrated Mineral Loss (IML) を算出した。負荷前から 4 週間後の IML の増加量を  $\Delta\text{IML}$  として脱灰抑制効果の比較を行った。また、大気マイクロ PIXE/PIGE を使用して、エナメル質内のフッ素量を測定した<sup>[7,8]</sup>。

### 7.3. 結果

ミネラル変化とフッ化物取り込み量の結果を Figure 12 に示す (同一文字には有意差なし)。4 週間後のミネラル量の変化 ( $\Delta\text{IML}$  ( $\text{Vol}\% \times \mu\text{m}$ )) では WV 群と S-PRG 群がコントロール群と EP 群と比較して有意に少なく、脱灰抑制効果が認められた。フッ素の取り込みでは S-PRG 群と EP 群がコントロール群と比較して優位に多くのフッ素を取り込むことが示された。S-PRG 群のみがコントロールと比較して脱灰抑制効果とフッ素の取り込みの両方で有意差を示した。この結果から、S-PRG バーニッシュの歯面塗布によって象牙質の脱灰を抑制することが示され、S-PRG バーニッシュのフッ化物局所応用としての有効性が示唆された。

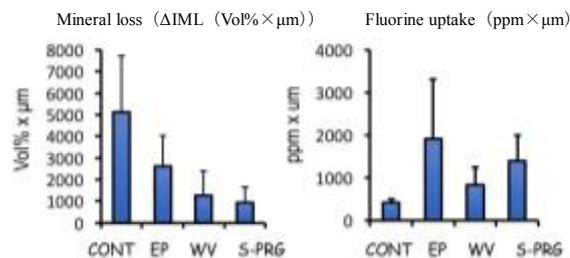


Figure 12. The  $\Delta\text{IML}$  for group WV and S-PRG significantly lower value comparing to that for CONT ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test). There was no significant difference in  $\Delta\text{IML}$  between group WV and S-PRG ( $P > 0.05$ ). The F uptake for group EP and S-PRG had significantly higher value comparing to that for group HI and Cont ( $p < 0.05$ , Kruskal-Wallis test). There was no significant difference in F uptake between group WV and CONT ( $p > 0.05$ ).

### 7.4. 結論

S-PRG バーニッシュはフッ素以外のイオンを放出し抗菌作用を示すことが既に報告されていることから、今後、脱灰抑制と細菌付着作用などを併せ持つ多機能う蝕予防材料への開発が期待される。

## 8. マイクロPIXE分析を用いたミヤコグサ根端における鉄局在の可視化

### 8.1. 背景

植物の生育には窒素、リン、カリウムのように多量に必要な養分に加えて、ホウ素、ケイ素、カルシウム、マンガン、鉄、亜鉛などといった微量要求性の元素が、構造の維持や酵素活性の補助因子、エネルギー転移反応などにおいて重要な役割を担っている。これら微量元素の生理的な役割を明らかにするためには、植物組織内における蓄積量や局在を知る事が重要である。中でも個々の元素の組織レベルでの局在様式は、元素の欠乏や過剰といった情報が植物体のどこで認識され、またどのように輸送活性を制御するシグナルが伝達されているのかを解明する上で非常に重要な知見となる。放射線を利用した元素イメージング手法である大気マイクロPIXEは、複数元素の同時測定が可能であり、かつ高解像度な像が得られることから、これらの情報を取得するために極めて有効な手法である<sup>[9]</sup>。本報告ではマメ科のモデル植物であるミヤコグサで明らかになりつつある金属蓄積の系統間差を明らかにするため、凍結切片法による鉄の局在解析を行った結果について述べる。

### 8.2. 実験

実験にはマメ科のモデル植物であるミヤコグサを用いた。複数金属の蓄積能に差が認められる Gifu B-129 系統 (B-129) と Miyakojima MG-20 系統 (MG-20) を播種し、発芽後 3 週間 1/10 Hoagland's 水耕液で栽培した。各個体から基部側、中間部、根端側の根を

[H27-3]

サンプリングし、新鮮な状態で凍結切片用のコンパウンドに浸潤・包埋した。サンプルが崩壊しないよう緩やかに凍結した後、クライオマイクロトームにより 30  $\mu\text{m}$  厚の輪切り切片を作製した。それぞれの切片をポリカーボネートフィルム上に接着し、3 MeV の  $\text{H}^+$  ビームを照射して、大気マイクロ PIXE 分析を実施した。

### 8.3. 結果と考察

ミヤコグサの地上部と根の元素濃度を ICP-AES を用いて測定した結果から、B-129 は MG-20 よりも根における鉄濃度が高いことが示された (Table 1)。一方、地上部においては MG-20 の鉄濃度の方が高いことから、これらの系統では水耕液から吸収した鉄を、根から地上部へ輸送するための鉄輸送活性に系統間差があることが示唆された。B-129 の根においてどのような部位に鉄が蓄積しているかを明らかにするために大気 Micro-PIXE 法による鉄の局在解析を行ったところ、B-129 の根端部位において特徴的な鉄の局在が認められた (Figure 13)。局在部位を特定するために、組織の形態を明瞭に示すカリウムの画像と重ねたところ、表皮と維管束組織に該当する部位に鉄が蓄積していることが明らかとなった。このことから、MG-20 と比較して B-129 では根端表皮層への蓄積量が多く、また導管を介した鉄の地上部への輸送が抑制されていることが示唆された。導管液中では鉄はクエン酸と錯体を形成して輸送されることが知られており、導管内へクエン酸を輸送する機能が低下すると地上部への鉄輸送が抑制されることから<sup>[10,11]</sup>、これらに関連する機能の系統間差を分子生物学的に検証することで、ミヤコグサにおける鉄輸送機構の一端が明らかになるものと考えられる。

Table 1. Iron Concentration in Shoot and Root of 2 *L. japonicus* Lines, MG-20 and B-129

Element	Accession	Concentration (nmol / g D.W.)			
		Shoot		Root	
		Average	S.D.	Average	S.D.
Fe	MG-20	1293.5	122.2	1905.9	247.1
	B-129	810.8	80.6	3254.2	473.6

D.W. Dry weight, S.D. Standard deviation (n = 5)

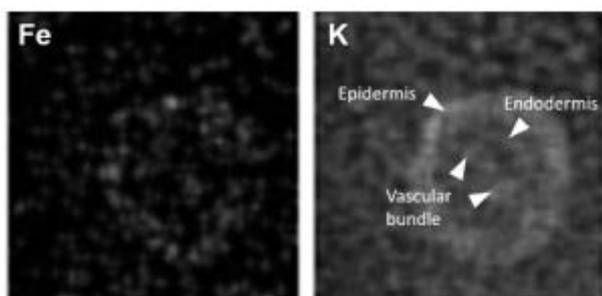


Figure 13. The iron and potassium localization in root tip

of B-129 line measured by micro-PIXE.

## 9. PIXE トモグラフィ分析システムの開発

### 9.1. 背景

本研究では、マイクロ PIXE、走査透過イオン顕微 (STIM, scanning transmission ion microscopy)、最尤推定 - 期待値最大化 (ML-EM, maximum likelihood-expectation maximization) アルゴリズムを組み合わせた PIXE トモグラフィ分析システムを開発している。本システムでは微小試料を回転させる必要があるため、以前は細いポリイミドチューブを斜めにカットし、その先端に試料を接着していたが<sup>[12]</sup>、顕微鏡下でマニピュレータ等を用いた操作が難しかった。今回、接着剤を塗布したカーボンファイバーで試料を拾い上げることで、Figure 14 のようなターゲットを容易に作成できるようになった。カーボンファイバーが投影像に含まれることになるが、STIM トモグラフィの結果から試料とカーボンファイバーの領域を自動で判別し、PIXE トモグラフィの投影像について、それぞれの領域毎にビームエネルギーの減弱や X 線吸収を補正した後、ML-EM による画像再構成で三次元元素分布を得るプログラムを開発した。さらにテストとして、多孔質シリカ吸着材内部の元素分布を測定した。

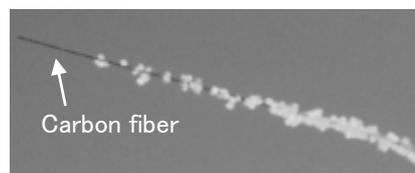


Figure 14. The microphotograph of a target for PIXE tomography. Bolus silica particles were stuck to a carbon fiber with glue.

### 9.2. 実験

開発した PIXE トモグラフィ分析システムは、3 MeV の水素イオンビームを用いる。ビーム径は 1  $\mu\text{m}$ 、ビーム電流は約 100 pA、スキャンエリアは 150  $\times$  150  $\mu\text{m}^2$  (128  $\times$  128 ピクセル) である。Si(Li)半導体 X 線検出器が、ビームから 140°の角度で設置されている。試料は回転ステージで 9°ずつ回転し、10 分間  $\times$  40 回の投影像測定が行われる。STIM トモグラフィでは、9°ずつ 5 分間  $\times$  40 回の投影像測定が約 100 cps のビーム強度で行われた。Figure 15 に STIM トモグラフィで得た試料の三次元形状を示す。この結果から、PIXE トモグラフィにおける投影像の X 線の発生断面面積や吸収の補正を行った

[H27-3]

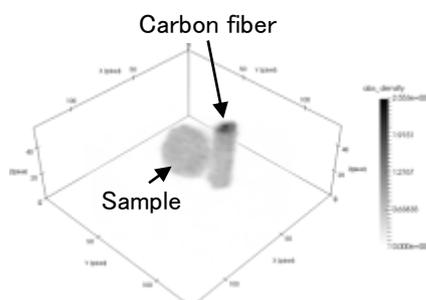


Figure 15. The 3-dimensional density distribution measured by STIM tomography.

### 9.3. 結果

Figure 16 に PIXE トモグラフィによる測定結果を示す。このように、試料の固定法と画像再構成法を改良し、吸着材に残留している微量元素分布を測定することができた。この結果は、吸着材の改良を行う上で非常に有用である。

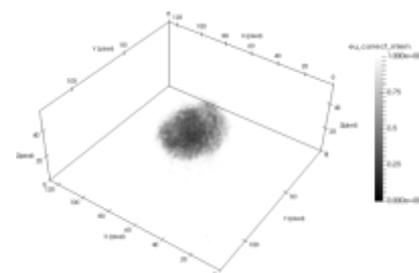


Figure 16. The 3-dimensional relative distribution of Eu measured by PIXE tomography.

## 10. CMPO-HDEHP/SiO<sub>2</sub>-P 吸着材における残留 Eu の分布評価

### 10.1. 背景

原子力研究開発機構では、使用済燃料再処理に伴って発生する廃棄物の減容化・有害度低減のため、高レベル放射性廃液 (HLLW) からの 3 価のマイナーアクチノイド (MA(III): Am(III), Cm(III)) の分離を行うことを目的として、抽出クロマトグラフィ技術の開発を進めている。本技術では、平均粒径 50  $\mu\text{m}$  の多孔質シリカ粒子にスチレンジビニルベンゼン重合体を被覆し、MA(III)と相互作用する抽出剤を含浸させたものを吸着材として用いる。

今までに実施してきた基礎研究、及び実 HLLW を用いた分離試験等の結果、1 段目のカラムで HLLW から MA(III)と希土類元素 (RE(III)) とを回収し、2 段目のカラムにて MA(III)/RE(III)分離を行うフローシートが有望であることが明らかになっている<sup>[13]</sup>。一方、2 段操作を行うことで、設備容量や廃棄物発生量が多くなるため、1 段で MA(III)回収が可能な吸着材やフローシートの開発が求められている。

筆者らは、1 段目カラムで用いる CMPO 抽出剤と、2 段目カラムで用いる HDEHP 抽出剤の 2 つを含浸させた吸着材を用いることで、1 ステップのカラム操

作で MA(III)が回収可能なフローシートを構築可能であることを見出した。しかし、カラムの繰り返し利用のためには、MA(III)回収操作後に吸着材中に残留する RE(III)の洗浄が必要であり、適切な溶離剤の選定や吸着材構造の改良が課題として挙げられた。

本研究では、MA(III)溶離液と接触後に吸着材中に残留する RE(III)の分布を調査することを目的として、PIXE トモグラフィ実験を実施した。

### 10.2. 実験

CMPO 及び HDEHP をモル比で 2:1、CMPO の吸着材中重量比が 20 wt%となるよう、多孔質シリカ担体を含浸させたものを吸着材とした。この吸着材に Eu(III)をバッチ処理によって吸着させ、MA(III)回収用溶離液である DTPA 溶液 (pH = 2.3)、または RE(III)洗浄液の候補として検討している酢酸アンモニウム溶液 (pH = 7) と接触させたものを測定試料とした。

PIXE トモグラフィ実験では、3 MV に加速されたプロトンビームを  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$  に整形し、 $150 \times 150 \mu\text{m}^2$  の領域に照射した。カーボンファイバー上に固定された粒子を 9°毎に回転させながら照射を行い、発生する特性 X 線強度を測定した。3 次元画像の再構成は既報に従って実施した<sup>[12]</sup>。

### 10.3. 結果と考察

溶離操作前後の吸着材から得られた X 線プロファイルから、DTPA 溶液との接触では Eu L 線強度の変化は見られなかったが、酢酸アンモニウム溶液との接触により、一部 Eu(III)が溶離している様子が確認された。これらの結果は事前に実施したバッチ試験の分析結果と合致するものであった。一方、解析によって得られた残留 Eu(III)の 3 次元マッピングから、酢酸アンモニウム溶液と接触することで、Eu(III)の分布が吸着材表層部と中心部との 2 層に分かれている様子が観察された。また、表層部と比較すると中心部の濃度が大きいことが分かった。これにより溶離が吸着材表層より起こっていること、溶離液が中心部には到達し難いことが示唆された。今後、溶離液組成と合わせて、吸着材構造の改良が必要であることが明らかになった。

## 11. PIXE トモグラフィによる土壌試料の 3 次元元素分析

### 11.1. 背景

2011 年に発生した福島第一原子力発電所事故により環境中に放射性セシウムが拡散し、土壌粒子と吸着することが分かっている。吸着の詳細なメカニズムを分析するためには、非破壊分析・他元素同時分析が求められ、その手法として PIXE 分析が挙げられる。PIXE 分析はトモグラフィによって 3 次元元素分布取得が可能である。そこで本研究では、土壌試料に対するセシウムの吸着パターンを立体的に取得するために、PIXE トモグラフィによる 3 次元元素分布測定を行った。

[H27-3]

## 11.2. 方法

試料を回転させながらマイクロ PIXE 分析を行い 360°方向の 2 次元元素分布を取得、さらに ML-EM アルゴリズムを利用した画像再構成プログラムによる逆投影により、試料の断面元素画像を得ることができた。断面の元素分布画像を取得する他の方法として試料を薄くスライスする方法や吸収端差分法を用いたミクロン CT<sup>[14,15]</sup>などが挙げられるが、これらの手法は試料の破壊や消費が必要であることや多元素同時分析が不可能であるといった欠点がある。それに対して PIXE トモグラフィは非破壊分析・他元素同時分析・生体試料分析<sup>[16]</sup>・数 ppm オーダーの検出効率を有しており、3 次元元素分布法として非常に有効な手法といえる。今回、実験は 3MeV の水素イオンビームを用い、ビーム径は  $1.0 \times 1.0 \mu\text{m}^2$ 、スキャン範囲は  $150 \times 150 \mu\text{m}^2$ 、として測定した。照射電荷量は平均で  $0.017 \mu\text{C}$  であった。試料は福島第一原子力発電所事故による放射性セシウムの吸着を仮定し、セシウム溶液を 24 時間浸漬させた後に繰り返し洗浄を行った土壌をエポキシ系接着剤でカーボンファイバーに固定したものを使用した。この試料を 5 分ごとに 9 度ずつ回転させながら照射を行った。

## 11.3. 試料径毎の X 線吸収の補正

PIXE トモグラフィでは、試料内部にビームのエネルギーが減衰して X 線の発生断面積が変化する。また、発生した X 線は試料内部で自己吸収により検出器に入射するまでに減衰される。今回、試料を一様分布の円形と仮定して補正する手法を考案した。補正結果を Fig1. に示す。断層像からは試料径に依らず補正の影響は確認できなかったが、投影データの画素値の上昇が確認された。補正の結果、セシウムの一様な分布が得られたことから、吸着時に細分化したセシウムが乾燥の際に固着したものと考えられる。今後は補正の精度評価を行う予定である。

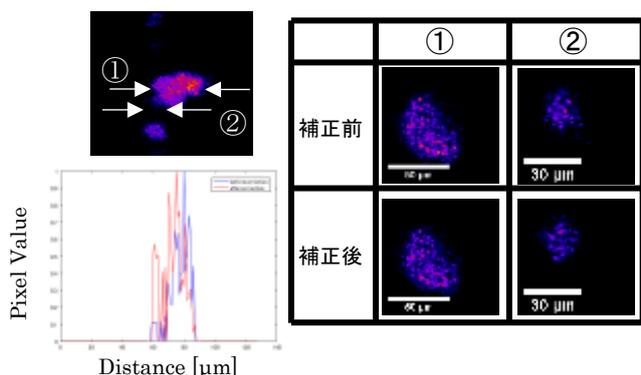


Figure 17. The cross-section images of Cs in soil sample before applied correction and after

## 12. IBIL 分光システム開発

### 12.1. 背景

荷電粒子と試料との相互作用により、特性 X 線と

同時に生じる多様な信号を利用した複合分析法の開発が盛んにおこなわれている。とりわけ、IBIL は古くから着目され、PIXE との複合分析応用が示されている<sup>[17]</sup>。IBIL の波長は、試料構成元素間の化学状態に寄与する最外殻電子のエネルギー準位が影響する。このため IBIL を顕微分光すれば、試料内部の化学状態分布が取得できる。一方、有機物のような試料からも IBIL が観察されている<sup>[18]</sup>。しかしながら、有機物を対象とした分析では照射中に起こる試料の変質により発光スペクトルが変化するため、従来の技術では信頼性の高い計測が困難であった。そこで本研究では、荷電粒子誘起発光顕微分光技術を高度化し、大気取り出しイオンマイクロビームを利用した IBIL スペクトルの計測を短い時間間隔で可能とした。本技術を有機物試料や大気中微粒子などの分析に応用し、IBI スペクトルを連続的に取得した。

### 12.2. 実験

IBIL 顕微分光分析システムの概略を Figure 18 に示す。本システムでは、3 MeV の水素イオンマイクロビームを励起源として誘起される IBIL を顕微集光両凸レンズで光ファイバ入射端に集光し、小型背面入射型 CCD 分光器 (Spectra Co-op, Solid LambdaCCD) により分光分析する。特に本分析体系では波長範囲 200-900 nm のグレーティングを採用することで、紫外から可視光の範囲を測定範囲としている。ビーム照射領域と光ファイバ入射端を共焦点とする本光学系は、信号対雑音比の点で有利だけでなく、既存設備である PIXE 用半導体 X 線検出器と同時利用する際の配置上の制約を最小限にとどめることが可能である。本実験体系では X 線検出器に対しビーム軸に軸対象の位置に IBIL 用の顕微集光光学系を設置することで PIXE と IBIL の同時計測を可能とした。

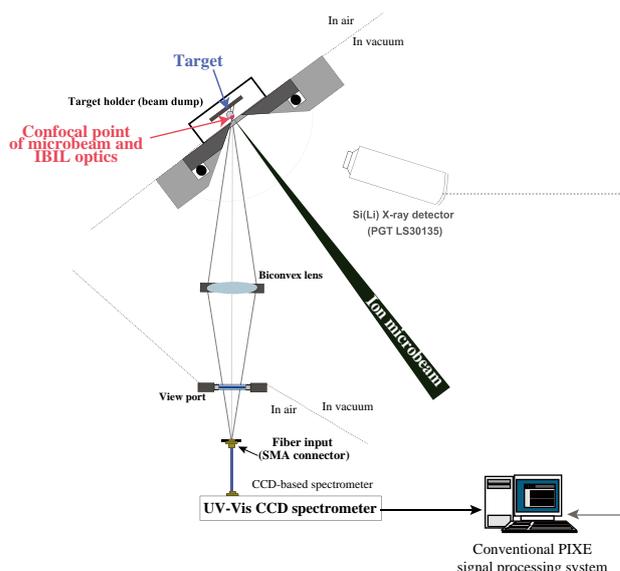


Figure 18. The schematic drawing of IBIL microanalysis system with micro-optics.

[H27-3]

### 12.3. 結果

Table 2 に無機物と有機物の IBIL ピーク波長の例を示す<sup>[19]</sup>。各有機物において固有ピーク波長の差異を観測した。

またそれぞれの有機物試料では固有のピーク波長に加えてそれぞれ固有の比較的幅の広い発光バンド (NADH 400-600 nm、リボフラビン 500-600 nm、およびトリプトファン 500-700 nm) を有していた。

Figure 19 に、トリプトファンから得られた IBIL スペクトルを例示する。測定結果から、IBIL のピーク波長によって有機試料の種類を判別可能であることが示唆された。

さらに、3-MeV 水素イオンマイクロビーム照射中に IBIL の構造変化の取得に成功した。一例として、PAH (ベンゾ[a]ピレン) の標準試料を照射に使用した。照射の開始時に、最も強い IBIL ピークは約 580 nm であった。ビーム照射量が約 1013 cm<sup>-2</sup> である場合、スペクトルに複数のピークが現れ、照射量が増加するにつれてピークの強度比が変化した<sup>[19]</sup>。PIXE 分析ではこれらの差異は抽出できないが、連続的な IBIL 分析ではこれらの有機物に生じる化学組成構造変化の可視化できた。さらに大気中微粒子など数 μm 程度の粒径の試料についても、IBIL での変化観察が可能であることが確認できた。

Figure 20 に、大気中微粒子を試料とした際の IBIL スペクトルの連続観察例を示す。IBIL の発光量は微量となるが照射初期から 1013 cm<sup>-2</sup> 程度までは確認できなかった 700 nm 近傍のピークについて、照射進行に従い 8×1013 cm<sup>-2</sup> 程度の照射量において顕著に新たなピークとして発現することが確認できた。

Table 2. Examples of IBIL Peak Wavelength from Inorganic and Organic Targets<sup>[19]</sup>

Chemical Composition	Wavelength
SiO <sub>2</sub>	425, 460 nm
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	325 nm
NADH	430 nm
Riboflavin	525 nm

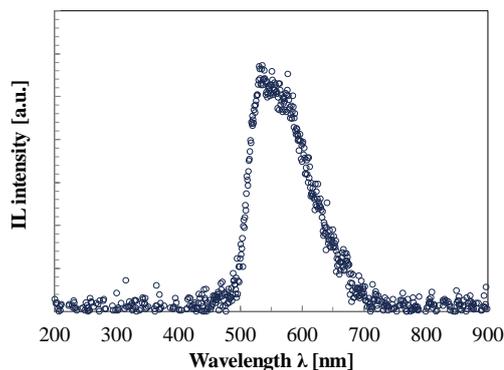


Figure 19. The example of IBIL spectrum obtained from organic targets excited by 3-MeV proton microbeam.

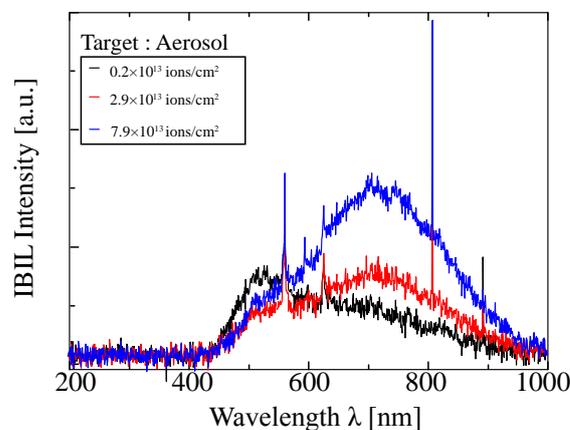


Figure 20. The example of IBIL spectrum obtained from aerosol target obtained from natural environment. A broad peak was observed in spectrum after certain exposure to the proton beam irradiation.

### 12.4. 結論

本研究では、イオンマイクロビームを利用した新たな化学形態分析手法として、IBIL 顕微分光分析技術の開発・高度化を行った。顕微鏡技術に見られる焦点共有をイオンビームと光測定系でも実現することで、高感度な IBIL の連続的な分光分析を実現した。IBIL スペクトルに生じる変化を連続的な分析により評価する新しいイメージングが可能となった。

### 参考文献

- [1] Y. Koga et al., “Elemental and immunohistochemical analysis of the lungs and hilar lymph node in a patient with asbestos exposure, a pilot study,” *Environ. Health Prev. Med.* 21 (2016) 492–500. doi:10.1007/s12199-016-0576-5.
- [2] Y. Ochiai et al., “Metabolism of nicotine in rat lung microvascular endothelial cells,” *J. Pharm. Pharmacol.* 58 (2006) 403–407. doi:10.1211/jpp.58.3.0016.
- [3] K. Endo et al., “Demonstration of Inter- and Intracellular Distribution of Boron and Gadolinium Using Micro-Proton-Induced X-Ray Emission (Micro-PIXE),” *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* 16 (2006) 57–65. doi:10.3727/000000006783981198.
- [4] K. Nakai et al., “Boron analysis for neutron capture therapy

[H27-3]

- using particle-induced gamma-ray emission,” *Appl. Radiat. Isot.* 106 (2015) 166–170. doi:10.1016/j.apradiso.2015.07.035.
- [5] S. Harada et al., “Targeted concurrent chemoradiotherapy, by using improved microcapsules that release carboplatin in response to radiation, improves detectability by computed tomography as well as antitumor activity while reducing adverse effect in vivo,” *Biomed. Pharmacother.* 70 (2015) 196–205. doi:10.1016/j.biopha.2015.01.006.
- [6] S. Orrenius et al., “Regulation of cell death: the calcium–apoptosis link,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 4 (2003) 552–565. doi:10.1038/nrm1150.
- [7] H. Yamamoto et al., “Fluorine mapping of teeth treated with fluorine-releasing compound using PIGE,” *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 210 (2003) 388–394. doi:10.1016/S0168-583X(03)01039-5.
- [8] Y. Matsuda et al., “Fluorine uptake into the human enamel surface from fluoride-containing sealing materials during cariogenic pH cycling,” *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 348 (2015) 156–159. doi:10.1016/j.nimb.2015.01.062.
- [9] T. Yamamoto et al., “Development of Method for Plant Material Analysis by Micro-PIXE (Particle Induced X-ray Emission),” *JAEA-Rev.* 2014–50 (2015) 97.
- [10] E. Delhaize, “A Metal-Accumulator Mutant of *Arabidopsis thaliana*,” *Plant Physiol.* 111 (1996) 849–855. doi:10.1104/pp.111.3.849.
- [11] T.P. Durrett et al., “The FRD3-Mediated Efflux of Citrate into the Root Vasculature Is Necessary for Efficient Iron Translocation,” *Plant Physiol.* 144 (2007) 197–205. doi:10.1104/pp.107.097162.
- [12] T. Satoh et al., “Particle induced X-ray emission-computed tomography analysis of an adsorbent for extraction chromatography,” *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 371 (2016) 419–423. doi:10.1016/j.nimb.2015.09.076.
- [13] S. Watanabe et al., “Flow-sheet Study of MA Recovery by Extraction Chromatography for SmART Cycle Project,” *Procedia Chem.* 21 (2016) 101–108. doi:10.1016/j.proche.2016.10.015.
- [14] K. Ishii, “Micron X-ray computed tomography based on micro-particle-induced X-ray emission,” *Int. J. PIXE.* 25 (2015) 187–215. doi:10.1142/S0129083515500175.
- [15] K. Ishii et al., “Application of micron X-ray CT based on micro-PIXE to investigate the distribution of Cs in silt particles for environmental remediation in Fukushima Prefecture,” *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 371 (2016) 387–391. doi:10.1016/j.nimb.2015.09.054.
- [16] Y. Kawamura et al., “IN-VIVO ELEMENTAL ANALYSIS BY PIXE- $\mu$ -CT,” *Int. J. PIXE.* 17 (2007) 41–46. doi:10.1142/S0129083507001083.
- [17] K.G. Malmqvist et al., “PIXE and ionoluminescence — A synergetic analytical combination,” *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 109 (1996) 227–233. doi:10.1016/0168-583X(95)01212-5.
- [18] W. Kada et al., “Simultaneous ion luminescence imaging and spectroscopy of individual aerosol particles with external proton or helium microbeams,” *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. Sect. B Beam Interact. Mater. At.* 332 (2014) 42–45. doi:10.1016/j.nimb.2014.02.026.
- [19] W. Kada et al., “Continuous observation of ion beam induced luminescence spectra from organic standard targets,” *Int. J. PIXE.* 25 (2015) 127–134. doi:10.1142/S0129083515500138.