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 #.A), 佐藤隆博 B), 櫻井映子 C), 中井啓 D).D, 原田聡 E), 笠松哲光 A), 松田康裕 F), 渡部創 G), 野田 祐作 ^{H)}, 畠山泰輔 D, 岩田吉弘 J), 古賀康彦 A)、江夏昌志 B), 山田尚人 B), 大久保猛 B), 横山彰人 B), 石井保 行 B), 神谷富裕 ^{B)}, 遠藤圭汰 D), 吉田文代 D), 松下明 D).J), 栗田正 D), 山本陽平 D), 山本哲哉 D), 瀬川昂史 E), 江原茂 E), 長嶋友海 A), 永井清絵 A), 長嶺竹明 A)、村上博和 A), 牛村秀耶 K), 奥山克史 D, 山本洋子 M), 小松 久憲 K), 佐野英彦 K), 林美加子 M)、能町正治 M)、斎藤隆史 F), 佐野雄一 G), 安倍諒司 N), 新井剛 N), 青原勉 ^{H)}, 佐藤忍 ^{H)}, 古川純 ^{H)}, 佐多大地 H), 石井慶造 H), 松山成男 H), 寺川貴樹 H), 藤原充啓 H), 今泉光太 H), 鈴木脩平

Kunio Dobashi ^{#, A)}, Takahiro Satoh ^{B)}, Eiko Sakurai ^{C)}, Kei Nakai ^{D)}, Satoshi Harada ^{E)}, Tetsuhiro Kasamastu ^{A)}, Yasuhiro Matsuda ^{F)}, Sou Watanabe ^{G)}, Yusaku Noda ^{D)}, Taisuke Hatakeyama ^{H)}, Yoshihiro Iwata ^D, Yasuhiko Koga ^{A)}, Masashi Koka ^{B)}, Naoto Yamada ^{B)}, Takeru Ohkubo ^{B)}, Yasuyuki Ishii ^{B)}, Tomihiro Kamiya ^{B)}, Endo Keita ^{D)}, Yoshida Fumiyo ^{D)}, Matsushita Akira ^{D),J)}, Kurita Tadashi

^{D)}, Yamamoto Yohei ^{D)}, Yamamoto Tetsuya ^{D)}, Takashi Segawa ^{E)}, Shigeru Ehara ^{E)}, Tomomi Nagashima ^{A)}, Kie Nagai ^{A)}, Takeaki Nagamine ^{A)}, Hirokazu Murakami ^{A)}, Syuya Ushimura ^{K)}, Katsushi Okuyama ^{L)}, Hiroko Yamamoto ^{M)}, Hisanori Komatsu ^{K)}, Hidehiko Sano ^{K)}, Mikako Hayashi ^{M)}, Masaharu

Nomachi ^{M)}, Takashi Saito ^{F)}, Yuichi Sano ^{G)}, Ryoji Abe ^{N)}, Tsuyoshi Arai ^{N)}, Shinobu Satoh ^{H)}, Jun Furukawa ^{H)}, Daichi Sata ^{H)}, Keizo Ishii ^{H)}, Shigeo Matsuyama ^{H)}, Atsuki Terakawa ^{H)}, Mitsuhiro

Fujiwara ^{H)}, Kota Imaizumi ^{H)}, Shuhei Suzuki ^{H)}

A) Gunma University

^{B)} National Institutes for Quantum and Radiological Science and Technology

^{C)} Iwaki Meisei University

^{D)} University of Tsukuba

^{E)} Iwate Medical University

F) Health Sciences University of Hokkaido

^{G)} Japan Atomic Energy Agency

^{H)} Tohoku University

^{I)} Akita University

^{J)} Ibaraki Prefectural University of Health Sciences

^{K)} Hokkaido University

^{L)} Asahi University

^{M)} Osaka University

^{N)} Shibaura Institute of Technology

Abstract

In the H27-3 project, micro-particle induced X/gamma-ray emission (micro-PIXE/PIGE) analysis using MeV-class proton microbeams found wider application in various field such as medicine and environmental science by the development of the sample preparation and the analytical method in the 2015 fiscal year. In "Pulmonary Aluminosis Diagnosed with micro-PIXE", a patient diagnosed as idiopatic pulmonary fibrosis were corrected as pulmonary aluminosis with micro-PIXE. This paper is an important report showing the usefulness of micro-PIXE for diagnosis of aluminosis and pulmonary diseases induced by inhalation of particles in work places. In "The time-dependent elemental analysis of silica in lung tissue of silica inhaled mouse", Fas and p62 expressing histiocytes were co-localized in granulomas with silica particles that showed an increase of iron levels on silica particles in mouse lungs. Iron complexed with silica induces apoptosis, and may lead to dysregulations of autophagy in histiocytes of granulomas, and these mechanisms may contribute to granuloma development and progression in silicosis. In "Elemental and immunohistochemical analysis of lung and hilar lymph node in a patient with asbestos exposure", macrophage via lymphatic drainage plays an important role in the intrathoracic translocation of inhaled particles. This paper showed micro-PIXE/PIGE could be usefull for analysis of the inhalational elemental distribution and quantification in the human body. In "Boron Analysis for Neutron Capture Therapy using micro-PIXE/PIGE", freeze-dried cells exposed to boronophenylalanine was measured using micro-PIXE/PIGE. Element distribution images were analyzed using MATLAB, and calculated the ratio of intra cellular boron concentration to extra cellular one. The ratio reached about 2 with U251 human glioma cell lines. In "Innovation of Hyaluronic Acid and Protamine Nanoparticles and Their Ability to

#dobashi@health.gunma-u.ac.jp

Release Contents upon Radiation", the particles, which release anticancer drug with response to radiation, was innovated, and their ability was tested in vitro. The particles were generated by mixing solution of protamine and hyaluronic acid, supplemented with carboplatin (Pt-containing anticancer drug). The hyaluronic acid released anticancer drug with response to radiation, which may lead to the targeted chemoradiotherapy in clinics. In "Analysis of Elements in Multiple Myeloma Cell Line using In-air Micro-PIXE", the association between elemental change in multiple myeloma cells and anti-myeloma agent such as melphalan, thalidomide and bortezomib was evaluated. The influence of bortezomib on multiple myeloma cell line was investigated by in-air micro-PIXE. There are no differences in distribution of P, S, Cl and K in the cell treated with 0nM and 20nM. In the cell treated with 50nM bortezomib, Ca accumulated in the nucleus. The Ca distribution may associate with the bortezomib-induced cell death. In "Analysis of Distribution of Zr inside an adsorbent for the extraction chromatography technology", Decontamination performance of Mo and Zr by the extraction chromatography using adsorbent with HDEHP extractant was demonstrated by batch-wise adsorption/elution experiments and column separation experiments. Adsorbed Zr was stayed inside the particle even after contacting with eluents though Mo was selectively eluted from the adsorbent by (COOH)₂ solution. The residual Zr must form complex with HDEHP, and it was revealed to have periodic structure. Distribution of the residual Zr inside the particle was evaluated by micro-PIXE and PIXE-CT analyses. In "Analysis of Element Localization within Poplar", model tree poplar was subjected to the external supply of CsCl on its leaf for identifying the relationship between potassium and cesium localizations within the plant body. In the stem and the node, K was accumulated at cortex, endodermis and cambium. The K amount in the pith tissue was obviously low. About the Cs localization, the cortex tissue in node contained relatively high concentration of Cs, but the micro-PIXE image was not clear. These results indicated the similar distribution of K and Cs, but the further investigation including the application method of Cs is necessary. In "Three-dimensional distribution measurement of cesium in clay particles", PIXE-computed tomography (CT) was performed for investigation of Cs distribution in clay particles three dimensionally. In "Calibration of Analytical Sensitivity for Heavy Elements on Micro-PIXE System in TIARA by Standard Reference Material", standard reference material (SRM) for determination of trace elements in biological materials was made by macro porous cation-exchange resin. The SRM was used for calibration of analytical sensitivity for several elements on micro-PIXE System in TIARA. A new SRM was prepared for calibration of analytical sensitivity for S, Fe, Ni, Zn and Pb. Moreover, in "Development of Analysis Software", a new analysis software for quantitative analysis in micro-PIXE.

Keyword: ion 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ソフトウェアの開発などを通し τ , $\neg \uparrow \rho \mu$ PIXE/PIGE (Particle Induced X/Gamma-ray Emission) 分析の医療や環境科学への 応用を進め、国民の健康や環境改善に寄与すること 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定量解析ソフトウェア の開発を行った。これらのうち本稿では、「マイク ロ PIXE により職場のアルミニウム吸入が原因と診 断された肺線維症症例」、「シリカモデルマウスに おける肺組織内沈着シリカの経時的な元素解析と周 囲細胞のアポトーシスおよびオートファジーへの影 響」、「アスベスト暴露患者の肺内リンパ節を用い た大気マイクロ PIXE の元素解析と免疫組織学的検 討」「マイクロ PIXE/PIGE を用いたホウ素分析およ び画像化の検討」、「ヒアルロン酸-プロタミンパー ティクルの作成とその放射線による内容放出率のマ イクロ PIXE を用いた測定」、「大気マイクロ PIXE を用いた骨髄腫細胞株の元素分布解析」、「予防填 塞材の自動 pH サイクルを用いた脱灰抑制効果のマ イクロ PIXE/PIGE による検証」、「マイクロ PIXE を用いた抽出クロマトグラフィ用吸着材内のジルコ

ニウムの分布測定」、「マイクロ PIXE によるポプ ラ内元素局在の解析」、「PIXE-CT を用いた粘土粒 子中のセシウムの 3 次元分布測定」、「標準物質を 用いた TIARA マイクロ PIXE システムにおける重元 素に対する分析感度の校正」、及び「マイクロ PIXE 用ソフトウェアの開発」ついての詳細を、以下に示 す。

マイクロ PIXE により職場のアルミニウム吸入が原因と診断された肺線維症症例

2.1 方法

原因不明の肺線維症と診断された、約20年以上金属工場にてアルミナの梱包に携わっていたアルミニウム工場労働者の肺切除検体のパラフィン切片を厚さ15 μmのスライスに切り、厚さ5 μmのポリカーボネートフィルムに載せて、パラフィン切片側が大気中、ポリカーボネート膜側が真空中になるように、イオンマイクロビーム照射装置にセットした。 真空側からポリカーボネートの膜を通してイオンマイクロビームをパラフィン切片に照射し、特性 X線を検出することで、パラフィン切片内の元素分布を大気マイクロ PIXE で測定した。

2.2 結果

Figure 1 に示すように生検された肺組織から、 micro-PIXE 分析により大量のアルミニウム(AI)が 検出され、職業場での Al の吸入により発症した肺線 維症であることが明らかとなった。このデータをも とに労災に申請し、労災と認定された。



Figure 1. Elemental analysis: The intensity of the element materials in lung tissue is shown by gray scale. White dots indicate the location of elements in the lung specimen. (A) This case, (B) Idiopathic pulmonary fibrosis without occupational inhalation. Phosphorus was markedly observed in both lungs from the patient and from control. Aluminum was prominently localized only in the patient's lung. Silicon was slightly detected in the patient's lung.

2.3 考察

原因不明の肺線維症と診断された患者の中には、 実は職場や環境からの粉塵吸入が原因である症例が 含まれていることが明らかとなった。このように、 肺線維症の原因究明において、大気マイクロ PIXE は、極めて有用な方法であることが明らかとなった

シリカモデルマウスにおける肺組織内 沈着シリカの経時的な元素解析と周囲 細胞のアポトーシスおよびオートファ ジーへの影響

3.1 背景と目的

シリカ(Si)の吸入は肺に炎症と線維化を引き起 こす。Siによって誘導される肺線維症発症のメカニ ズムの一つに、Si表層に鉄成分(Fe)が結合しオキ シダントを発生させ、組織にアポトーシスを引き起 こすことが提唱されている。そこで、肺内へ吸入さ れたSiの化学変化を検討し肺組織像と比較すること で、Siによる肺障害の病態を明らかにする。

- 3.2 方法
- 3.2.1 マウス処置

C57/BL6j マウスにシリカを経鼻的に投与した。Si 粉末は phosphate bufferd saline (PBS) に懸濁し超音 波粉砕した。Si 懸濁 PBS (1.5 mg/g body weight) を C57Bl/6 マウスに経鼻的に投与した。コントロールと して C57Bl/6 マウスに PBS を経鼻的に投与した。

3.2.2 測定

1 週目と 8 週目のマウス肺組織のパラフィン切片 を厚さ 15 μmのスライスに切り、厚さ 5 μmのポ リカーボネートフィルムに載せて、2.1 と同様にマイ クロ PIXE 分析にてパラフィン切片内の元素分布を 測定した。また、肺組織は鉄染色 (Belin blue stain)、 抗 Fas 抗体で染色した。

3.3 結果

1週目の肺組織中のSiと比較し、8週目のSiには 有意に多量のFeが沈着していた。8週目の肺組織中 では、Si粒子を多く含む肉芽組織にアポトーシスを 誘導するFasとオートファジーの抑制を示すp62を 多く発現する組織球が集積していた(Figure 2)。



Figure 2. Fas expression was higher at the sites of heavy silica particle deposition area compared to light deposition area in silicosis mice lung on day 56. Polarizing microscopic analysis indicates the heavy silica particle deposition and light silica deposition.

3.4 考察

吸入された Si には、時間経過とともに体内の Fe が沈着し、その結果その周囲の細胞にアポトーシス の増加およびオートファジーの抑制を誘導すること により、珪肺の肉芽組織の形成が促進されることが 示唆された^[2]。

アスベスト暴露患者の肺内リンパ節を 用いた大気マイクロPIXEの元素解析と 免疫組織学的検討

4.1 方法

4.1.1 マイクロ PIXE 分析

アスベスト暴露患者の肺切除検体のパラフィン切 片を 2.1 と同様の方法にてパラフィン切片内の元素 分布を測定した。

4.1.2 免疫組織染色

免疫組織染色には 10 μ m のスライスのパラフィン切片に対して、マクロファージの表面マーカーである anti CD163 抗体を使用した。

4.2 結果

大気マイクロ PIXE 解析では、肺実質より肺門部 リンパ節から、より多くの6倍近い濃度のSiを検出 した。また同じパラフィンブロックからの免疫染色 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。これらの結果から、肺胞マクロフ ァージによって肺内に吸入された元素が肺門部リン パ節に運ばれている可能性が示唆された。

4.3 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^[3]。

マイクロ PIXE/PIGE を用いたホウ素分 析および画像化の検討

腫瘍細胞内にあらかじめ取り込まれたホウ素(B) と、熱中性子を反応させる粒子線治療であるが、腫 瘍のB分布がこの治療の成否を決する要因である。 この解析に、マイクロ PIXE/PIGE を用いて検討を行 った。今回は画像解析によって細胞内、細胞外のB 分布比を推定することを目標とした。

5.1 方法

5.1.1 試料調整

U251 および C6 cell line を用いた。96 ウェルプレートの底部をポリカーボネート膜に置き換え、ポリリジンで表面処理を行った。培地および細胞を加え、細胞を膜に接着させた後、ホウ素化合物を添加し2時間静置後、培地を除去洗浄し、凍結乾燥処理した。

5.1.2 分析と解析

付着細胞の部分を切り出してマイクロ PIXE/PIGE 用フォルダーに固着し、マイクロ PIXE/PIGE による 分析を行う。あらかじめ、窒化ホウ素を用いたコン トロールで、PIGE スペクトルの B のピークを検出し 位置を同定、同時測定のマイクロ PIXE で細胞特異 的とされている P、S、K の元素分布を得る。得た画 像から MATLAB[®]上で、細胞領域(P、S、K の共存 在領域)を定義し、細胞領域と非細胞領域での B の 元素密度の比を求めた。

5.2 結果

Figure 3 に U251 の例を示す。U251 は、ホウ素加 サンプルで細胞内外 B 比は、2-2.4 を示した。C6 は 細胞領域を正しく認識できず、B 添加有無では変化 を示さなかった。



Figure 3. Boron analysis for U251 cell

ヒアルロン酸-プロタミンパーティクル の作成とその放射線による内容放出率 のマイクロ PIXE/PIGE を用いた測定

現在まで我々は、放射線照射に反応して内抗がん 剤を放出するパーティクルを作成し、抗腫瘍効果の 増強と抗癌剤副作用軽減を研究してきた。すなわち、 1)抗癌剤を含むパーティクルを腫瘍周囲に注入し、 2)腫瘍に対して放射線を照射、パーティクルから抗 がん剤を放出させ、3)放出された抗癌剤と放射線の 相乗効果によりがん治療効果を増強する。また、4) 抗がん剤のパーティクルによる限局化により、抗が ん剤の副作用を軽減するというものである^[4]。

現在まで我々は、抗がん剤、アルギン酸とヒアル ロン酸を Fe²⁺下で重合させ、パーティクルを作成し、 アルギン酸の Fe²⁺重合が、放射線により Fe³⁺に変化 し、重合形態が変わること、ヒアルロン酸が放射線 照射によりアセチルグルコサミンに分解することを 利用して、放射線により抗がん剤を放出するパーテ ィクルを作成してきた^[5]。しかし、その系が 21 µm 前後と大きく、静脈注射により体内に注入した時、 肺、脳の毛細血管に捕捉され、肺塞栓や脳塞栓を起 こす欠点があった。これには、パーティクルの微細 化が必要と考えられた。

一方、水溶液中でヒアルロン酸負に帯電し、プロ タミンが正に帯電し、ヒアルロン酸水溶液とプロタ ミン水溶液を混合すると、微細なパーティクルが生 じることが知られている^[6]。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、プロタミンとヒアルロン酸パーティクル に抗がん剤を取り込ませれば、放射線に反応して、 抗がん剤を放出するパーティクルができる可能性が 考えられた。

今回、ヒアルロン酸-プロタミンパーティクルに抗 がん剤カルボプラチン(白金(Pt)を含有する抗が ん剤)を取り込ませ、パーティクルを作成し、その サイズ、放射線照射後の抗がん剤放出について検討 した。

- 6.1 材料と方法
- 6.1.1 パーティクル作成

ヒアルロン酸 1.6 mg とプロタミン 1.3 mg を、5 ml のカルボプラチン水溶液 (5 mg/ml) に溶解し、室温 にて 30 分間静置してパーティクルを作成した。パー ティクルは、セルロース膜フィルター (0.8 µm pore) にてろ過後、15000 rpm の遠心にて分離した。ペレッ ト状に分離されたパーティクルは、超音波破砕装置 にて粉砕することで微細化後、蒸留水 1ml に再浮遊 し、パーティクル浮遊液を作成した。

6.1.2 X線照射とマイクロ PIXE 用の試料作成

パーティクル浮遊に、140 KeV 軟線 X 線を 10 Gy 照射した後、マイラー膜上に滴下後、凍結真空乾燥 を施し、micro PIXE 用の試料とした。

6.1.3 マイクロ PIXE によるパーティクル検出と放 射線照射によるパーティクルからの抗がん

剤放出

試料を 3MeV のプロトンマイクロビーム(径 2 μm) で、12.5×12.5 μm の範囲をスキャンし、抗がん剤に 含まれる Pt の特性 X 線を画像化した。画像より、照 射前のパーティクルの径を測定し、照射後において は、パーティクルからの Pt 分布を基に、破裂率を計 測した。

6.2 結果

6.2.1 マイクロ PIXE によるパーティクルの画像化 マイクロ PIXE によりパーティクルの Pt 分布を基

にパーティクルを画像化した(Figure 4 A)。パーティクルには、Pt が含まれ、その径は 742 ± 41 nm であった。

6.2.2 10 Gy 照射後のパーティクルの変化と内容放 出

放射線 10 Gy 照射後のパーティクルを Figure 4 B に示す。放射線照射後、パーティクルは微細化し、 周囲には放出された Pt が認められた。



Figure 4. Nanopaticles imaged, basing on Pt-destribution by micro PIXE camera. A: Before radiation. B: After 10 Gy radiation.

6.2.3 パーティクルの内容放出率

マイクロ PIXE の 10 視野中の全パーティクル数に 対する、抗がん剤(カルボプラチン)を放出してい るパーティクルの数の百分率を、パーティクルの抗 がん剤放出率として、その百分率を Figure 5 に示す。 放射線照射(100 KeV X 線 10 Gy)により、パーティ クルの抗がん剤放出率は有意に上昇し、その値は 60.23 ± 7.23%であった。



Figure 5. Percentage of Pt-releasing Particle. S: Significantly increased

7. 大気マイクロ PIXE を用いた骨髄腫細胞 株の元素分布解析

多発性骨髄腫(MM)は、血液細胞の一種である 形質細胞の腫瘍性疾患である。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となり、 未だ治癒が望めない。本研究では、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 を用 いた MM 細胞株内の微量元素の測定法の確立と検討 を行った。

- 7.1 対象と方法
- 7.1.1 使用細胞

骨髄腫細胞株 KMS-11 を用いた。

7.1.2 方法

KMS-11 をプロテアソーム阻害剤の一つである Bortezomib 終濃度 0nM、20nM、50nM にて 24 時間処 理を行った。同時に、細胞の生存率を測定するため セルカウンティングキット CCK-8 を使用した。

細胞を TRIS-HNO3 (pH 7.4) にて洗浄後、4~8 × 103 個/µL の濃度に再懸濁する。集細胞遠心装置に て、浮遊液 50 µ L を 500 rpm、15 分遠心し、0.5 µm 厚のポリカーボネート膜細胞を接着させ、液体窒素 にて-150 ℃に冷却したイソペンタンに沈め真空蒸 着させた。この試料を、大気マイクロ PIXE 分析チ ャンバーに装着、順次測定し、KMS-11 細胞内微量 元素を解析した。

7.2 結果

KMS-11 細胞株は浮遊細胞であり接着性に乏しい ため、体腔液細胞診などでも用いられる集細胞遠心 装置「サイトスピン」を用いてポリカーボネート膜 に接着させた。細胞濃度は細胞の大きさにもよるが、 $4\sim 8 \times 103$ 個/ μ L 程度で良好な細胞密度が得られ た。

KMS-11 細胞株では、S、K が細胞全体に比較的均 ーに分布していたのに対し、P は核に高濃度で分布 していた。Fe、Cu、Zn などの微量金属元素は明らか な分布が同定されなかった。

Bortezomib による処理では、0 nM を 100%とした 場合それぞれ 20 nM は 97.3%、50 nM は 38.6%の生 存率であった。それぞれの濃度で各元素を比較した ところ、P、S、K および微量金属元素では Bortezomib の濃度による差は認められなかった。しかし、Ca は 50nM で他の濃度では認められなかった Ca の核内へ の集積が認められた。

7.3 まとめ

今回、浮遊細胞である MM 細胞株 KMS-11 のマイ クロ PIXE 用試料作成法を開発した。集細胞遠心装 置を用いることによって、in vitro において様々な薬 剤が添加された MM 細胞株の微量元素を、マイクロ PIXE にて測定することが可能となった。プロテアソ

予防填塞材の自動 pH サイクルを用いた 脱灰抑制効果のマイクロ PIGE/PIXE に よる検証

序や耐性獲得の解明に結び付けたい。

予防填塞は乳歯の小窩裂溝う蝕予防に広く使用されているが、予防填塞による脱灰抑制効果と乳歯へのフッ素の取り込みを観察した研究は少ない。本研究では、自動 pH サイクル装置を使用し、乳歯に対する各種予防填塞材料の脱灰抑制効果とフッ素の取り込みについて検討した。

8.1 方法

試料は健全ヒト乳臼歯に窩洞形成を行い、予防填 塞として、ティースメイトF-12.0 (TM)、ビューテ ィシーラント(BS)、フジIIILC(IIILC)を填塞し た後、厚さ200 µmに切断した切片を用いた(n = 12)。 自動 pH サイクル装置を使用し試料の脱灰と再石灰 化を1~5 週繰り返した後に Transverse Microradiography (TMR)撮影を行い、予防填塞周囲 のエナメル質のミネラル喪失量(IML)と脱灰深度 (Ld)を算出した。予防填塞を填塞しなかったもの をコントロールとした。自動 pH サイクル装置によ り5週間脱灰させた試料のエナメル質表層における フッ素の取り込みをマイクロ PIGE/PIXE を使用して 測定した(n = 3)。

8.2 結果

予防填塞群はコントロール群と比較して IML、Ld は減少し、最も低い値を示したIIILC 群の IML と Ld は、それぞれコントロール群の 20.70%と 19.06%だっ た。予防填塞群の中では、IIILC 群、BS 群、TM 群 の順に低い値を示した。また、予防填塞を填塞した エナメル質内のフッ素量はIIILC でコントロールの 約 177 倍と非常に高い値を示し、次いで TM 群、BS 群の順であった。このことから、以下の結論が得ら れた.

- 1. いずれの予防填塞も乳歯に対する脱灰抑制 効果があり、その効果には差が認められた。 最も高い脱灰抑制効果を示したのはⅢLC で あった。
- 2. BS は、エナメル質内のフッ素量が TM より 少なかったが、TM より脱灰抑制を示した。 このことから、フッ素以外の因子が脱灰抑制 に関与していることが示唆された。

マイクロ PIXE を用いた抽出クロマトグ ラフィ用吸着材内のジルコニウムの分 布測定

放射性廃棄物の減容化及び有害度低減のため、使 用済核燃料からの長半減期核種、特にAm, Cmをは じめとしたマイナーアクチノイド(MA)の分離・回 収技術の開発が注目されている。我々は抽出クロマ トグラフィを用いた MA 回収技術の開発を実施して きた^[7]。本技術によって MA を効率的に回収するた めには、予め高レベル放射性廃液より Mo、Zr を除 去しておくことが望ましいことが明らかになった^[8]。 高い酸濃度の溶液から選択的に Mo, Zr を回収する手 法として、HDEHP を含浸させた吸着材を用いた抽出 クロマト法に着目し開発を行っている。本研究では、 Mo, Zr の吸着・溶離性能について確認するとともに、 未溶離元素の分布等について評価することで、適切

なプロセスを構築することを試みた。

9.1 実験

9.1.1 吸着材の性能評価試験

HDEHP 含浸吸着材の Mo、Zr 吸着・溶離性能を評価することを目的として、吸着・溶離バッチ試験、 カラム分離試験を実施した。Mo、Zr の溶離液候補と して、シュウ酸溶液及び H₂O₂溶液を用いて試験を実 施した。

9.1.2 マイクロ PIXE 分析

上記バッチ試験によって使用した吸着処理後の吸 着材、及びシュウ酸溶液によって溶離させた吸着材 について、マイクロ PIXE 分析及び PIXE-CT 分析を 行うことで、残留元素の吸着材内部の分布を評価し た。

9.2 結果及び考察

9.2.1 吸着·溶離試験

模擬高レベル放射性廃液として用いた、希土類元 素などの3価イオン、Srなどの2価イオン、Csなど の1価イオンが混在する、4 M HNO3 溶液から、選 択的に Mo 及び Zr が吸着されることが明らかになっ た。MA も高レベル放射性廃液中では3価のイオン として存在しており、HDEHPには吸着されない。し たがって MA 回収の前段階として、HDEHP が Mo、 Zr 除染に有効であることが明らかになった。一方、 カラムを繰り返し利用するためには、吸着させた Mo、 Zr の溶離が必要となる。カラム分離試験の結果、本 研究で用いた溶離液では、Mo の溶離は達成されたが、 Zr はそのほとんどが吸着材中に残留した。

9.2.2 マイクロ PIXE 分析

吸着処理後の吸着材、及びシュウ酸溶液によって 溶離操作した後の吸着材について得られた特性 X 線 スペクトルを Figure 6 に示す。1.75、2.00、2.30 keV 付近のピークは、それぞれ Si Kα、Zr Lα、Mo Lα に帰属された。溶離操作の前後において Mo のスペ クトル強度が低下しているのに対し、Zr の強度がほ とんど低下しておらず、Zr がシュウ酸によって溶離 され難いという実験結果を反映しているものと考え られる。

本研究と合わせて実施した X 線回折実験の結果、 残留している Zr は結晶性の周期構造を持つことが 示唆された。Zr は HDEHP と錯形成しているものと 考えられるが、Zr の溶離率を向上させるためには、 この結晶性の錯体の構造を特定し、適切な溶液によ って溶解させる手法が有効であると思われる。今後

画像解析を進めていき、吸着材中に残留した Zr の 3 次元分布を取得し、吸着材中における偏りについて 評価を行う予定である。また、合わせて吸着材中に 形成された錯体構造を特定し、適切な溶離液の選定 に資する。



Figure 6. X-ray spectrum obtained by micro-PIXE analysis on adsorbents

10. マイクロ PIXE によるポプラ内元素局在 の解析

植物の健全な生育には微量ながらも必須とされる 元素があり、様々な代謝反応やストレス応答におい て重要な働きを担っている。また毒性元素について もその局在を明らかにすることが作用機構を解明す る上で非常に重要である。X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、植物組織中の微量元素分布の解析 に非常に有効な手法である。本研究では、福島第一 原発事故によって環境中に放出された放射性セシウ ムの樹木における動態観察に適用した。

10.1 実験方法

セシウム (Cs) の局在解析にはモデル樹木である ポプラを用いた。人工気象器で無菌的に栽培したポ プラの葉面に 1 mM CsCl を 20 µL 含んだ紙を密着さ せ、葉面吸収を再現した。器官をサンプリングした 後、凍結切片用コンパウンドに包埋した。クライオ ミクロトームにより作成した切片をポリカーボネイ トフィルムに接着、3 MeV のプロトンマイクロビー ムを照射することにより放出される特性 X 線を測定 した。

10.2 結果および考察

Csの局在を明らかにする上で、視野に含まれてい る樹木の組織ならびにその構造を明確にとらえてお くことが必要である。Csの同族元素であるカリウム (K)は植物にとっての必須元素であり、含有量が 大きいことから、マイクロ PIXE を用いた形態観察 に適している。ポプラの茎と節を対象として K 局在 を観察したところ(Figure 7)、K は表皮(co)、内 皮(en)、形成層(ca)に多く含まれ、髄(pi)では 少ないことが明らかとなった。一般的に K は細胞の 内側に含まれていると考えられているが、得られた 像は細胞の形を反映した図となっていた。このこと から切片作成時に細胞内に含まれていた K が流出し、 周囲にある細胞壁に吸着された可能性が示された。 視野組織に含まれる細胞の形態観察には適している が、生きている状態での元素局在を検証するために は考慮すべき課題である。次に Cs を吸収させた葉の 付け根である節を用いて Cs 局在を観察したところ、 髄組織 (pi) で少なく皮層 (co) で高いという分布 が観察された (Figure 8) 。これらの結果から、ポプ ラの節において Cs は K と似た局在様式を示すこと が示された。より明瞭な Cs シグナルを得る必要があ るため、今後の試験には処理濃度や手法のさらなる 検討が必要である。



Figure 7. Potassium Localization in Poplar



Figure 8. Potassium and Cesium Localization in the Node of Poplar

11. PIXE-CT を用いた粘土粒子中のセシウ ムの3次元分布測定

福島第一原子力発電所の事故により、¹³⁷Cs や ¹³¹I 等の放射性物質が、環境中に放出されその汚染が問 題となっている。特に¹³⁷Cs は半減期が約 30 年と長 く、土壌を取り除くことにより除染を行う必要があ るが、その汚染土の量が膨大になり問題となってい る。¹³⁷Cs は土壌粒子と強固に吸着することが知られ ており、汚染土壌の減容化のためには、¹³⁷Cs が土壌 粒子のどこにどのような形で取り込まれているかを 詳細に調べ、それを元に技術を開発する必要がある。 そこで、高空間分解能であり、多元素同時分析が可 能なマイクロ PIXE に CT の技術を組み込んだ PIXE-CT システムの開発を行い、土壌粒子中の¹³⁷Cs の分布を 3 次元的に測定した。

11.1 PIXE-CT

TIARA の 3MV シングルエンド加速器を用いて、 試料を回転させながらマイクロ PIXE を行い、得ら

れた 2 次元マップを 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り、逆投影することで、 試料の断面画像を得ることが可能になる。PIXE-CT は、非破壊分析、多元素同時分析、生体試料の分析、 数 ppm オーダーの元素の分析が可能であるため、3 次元元素分布測定法としては、非常に有効な手法で あると考えられる。実験条件としては、ビームエネ ルギーは3 MeV、ビーム径は1 × 1 μ m²、スキャン 範囲は 199 × 200 μ m²である。試料としては、福島 第一原子力発電所の事故による放射性セシウムの吸 着を模擬し、土壌粒子に炭酸セシウムを吸着させた 約 100 μ m 径の粒子をアラルダイトでカーボンファ イバーに固定したものである。この試料を5分毎に 9° ずつ回転させながらマイクロ PIXE 分析を行った。

11.2 STIM による吸収補正

マイクロ PIXE 分析を行う際に、試料中でのビー ムのエネルギーロスによる X 線発生断面積の変化と、 発生した特性 X 線の自己吸収の影響を考慮する必要 がある。これらの影響の補正を STIM により得た面 密度データを用いて再構成の際に補正を行った。補 正を行った場合と行わなかった場合の結果を Figure 9 に示す。全体的に輝度値が約 15%程度上昇してお り、特に②の断面での影響が顕著である。また、CT 画像より¹³⁷Cs は粒子の表面から約 15 µm 程度の深さ で分布していることが確認できる。これは、東北大 学のミクロン CT システムの吸収端差分法により得 られた結果^[9]と同様であり、システムの有用性が確 認された。



Figure 9. Cross section images of Cs in silt particle before/after applied correction

12. 標準物質を用いた TIARA マイクロ PIXE システムにおける重元素に対する 分析感度の校正

PIXE 分析における装置の校正や分析値の相互比 較のために、イオン交換樹脂中に分析目的元素を正 確量含有する標準物質(SRM)を開発している。こ れまでに、マクロポーラス型イオン交換樹脂に、生 体関連元素の Al、Ca、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、 Sr、Pt および Pbを一定量吸着させた SRM を調製し た。PIXE 分析に供し、特性 X 線強度と元素含有量 から、TIARAマイクロビームシステムにおける分析 感度を検出器毎に求め、その成果を報告した^[10]。本 法で校正した TIARA マイクロビームシステムで、植 物試料(地衣類)ならびに動物試料(ワムシ類)に含ま れる pg 以下の微少量元素の定量に成功した^[11,12]。本 研究では、TIARA マイクロビームシステムに修理完 了した Pure-Ge X 線検出器の校正をおこない、従来 の検出器と比較したので報告する。

12.1 実験

12.1.1 SRM の調製

既報に従い調製した^[10]。重元素測定用に樹脂体積 あたり、Fe、Ni、Zn、および Pb をそれぞれ 100 と 150 ppmv 含有量する 2 種類の SRM を調製した。原 料の陽イオン交換樹脂にスルホン基として存在する S は、2778 ppmv である。

12.1.2 PIXE 分析

TIARA マイクロビームシステムにより 3 MeV プ ロトンをサブミクロンにしぼり、スキャンエリア 20 × 20 μ m で、大気中 250 nC の照射を行った。今回 は、Table 1 の A、D の 3 種類の検出器について、 PIXEana^[13]で X 線スペクトルの解析を行い、再校正 した。

Table 1. List of X-ray Detector on Micro beam PIXE System in TIARA

Detector (SSD)	Model	Active Area /mm ²	Crystal Thickness /mm	FWHM @5.9 keV /eV	Position
A (Si(Li))	PGT LS30135	30	5	135	Vac.
B (PureGe)	CANBERR A GUL0110	100	10	118	Vac.
C (PureGe)	PGT IGX100138	100	10	138	Air
D* (PureGe)	APTEC PS 305- D7.5C	250	12	310	Air

* Repaired in 2015

12.2 結果と考察

12.2.1 軽元素用 SSD の再校正

Table 2 に、2016 年の今回測定 (2016) 結果 [A (Si(Li)) *]と、比較のため、2012 年測定結果[A (Si(Li)) **] を示す。PGT LS30135 の分解能は、S-K_{a1}(2.307 keV) から Pb-L_{$\alpha1$} (10.550 keV) にかけての FWHM は、 110-220 eV であり、前回の校正時と同様に特性 X 線 のピーク分離に十分であることが確かめられた。分 析感度は、歳測定した全ての元素で、3 倍程度大き くなっている。原因は不明だが、検出装置の配置や 調整によって変化したものと考えられる。立体角の 変化は感度に大きく影響を与える。マイクロ PIXE システムは研究施設であり、様々な改良が加えられ ている。分析値、特に定量性の確保には、標準物質 等よる感度校正が随時必要である。また、マイクロ PIXE の測定実験は 10 時間連続となる。今回の測定 後半では、アンプのゲインがゆっくりドリフトし、 特性X線のピーク位置が5ch程度低エネルギー側に シフトした。エレクトロニクスも老朽化が進んでい るのかも知れないが、長時間測定をおこなうユーザ ーは、このことにも注意しなければならない。

12.2.2 重元素用 SSD の再校正

結果を Table 2 の[D (PureGe) *]に示す。PS 305-D7.5C は高エネルギー側の特性 X 線測定用に導 入された検出器で、重元素の分析に有効であると期 待される。Fe-K_{$\alpha 1$}(6.398 keV)から Pb-L_{$\beta 1$}(12.612 keV) での FWHM は、330-380 eV を低く、スペクトル干渉 が問題となった。たとえば 26Fe-K_{β1}(7.057 keV)が 28Ni-K_{a1} (7.471 keV) と重なり合い、²⁸Ni-K_{a1}のピ ークが非対称となった。これはスペクトル解析で、 ある程度補正できる。しかし環境、生体試料では、 Fe に対して Co、Ni の含有量は通常 1/10 以下である ので、スペクトル干渉により、定量値の精度、確度 が十分に得られないことが予想されるので、分解能 の向上が望まれる。分析感度はこれまで用いた全て の測定器中で最も大きく、PGT LS30135 に対して Fe から Pb に対して 4 から 7 倍の感度を示した。この PS 305-D7.5C については修理前の 2008 年に Zn の感 度を測定しており、その結果は150 ± 10 (n = 8) であり、今回の結果と一致した。微量成分の画像化、 定量化に、大きな威力を発揮すると期待される。し かし、修理前に比べ、バックグラウンドとなる連続 X線が、スペクトル全体に広がり、S/N比を下げて いる。Fe から Pb のスペクトル解析においては、 150ppmvの含有量に対して(ピーク成分のカウント) / (バックグラウンド成分のカウント)が 1.2 程度で あり、PGT LS30135 の 20 以上に比べてかなり小さい。 バックグランドが大きいことは、定量においては不 確実性の増加、画像化においてはノイズ成分の増加 につながる。装置の各種設定等により、バックグラ ウンドの低減が必要である。

Table 2. Analytical Sensitivity for Elements by Several X-ray Detectors on Micro beam PIXE System in TIARA

	Sensitivity / Count pg ⁻¹ nC ⁻¹ (n)						
	A (Si(Li))	*	A (Si(Li)) **		B (PureG	e)	
Al	ND		100 ± 16	(14)	101 ± 19	(6)	
s	222 ± 13	(5)	74 ± 13	(13)	77 ± 14	(6)	
Ca	ND		71 ± 14	(14)	58 ± 12	(6)	
Mn	ND		38 ± 5	(3)	23 ± 4	(3)	
Fe	72 ± 7	(5)	33 ± 11	(7)	22 ± 8	(3)	
Co	ND		24 ± 10	(6)	17 ± 7	(3)	
Ni	49 ± 3	(5)	15 ± 6	(8)	9.1 ± 5	(3)	
Cu	ND		18 ± 7	(6)	12 ± 5	(3)	
Zn	27 ± 3	(5)	10 ± 2	(8)	6.9 ± 1.6	(3)	
Sr	ND		1.2 ± 0.6	(8)	1.2 ± 0.9	(3)	
Pb	58 ± 05	(5)	10+03	(14)	0.7 ± 0.2	(6)	

-							
	Sensitivity / Count pg ⁻¹ nC ⁻¹ (n)						
	C (PureGe)		D (PureGe) *				
Al	ND		ND				
S	ND		ND				
Ca	ND		ND				
Mn	140 ± 22	(3)	ND				
Fe	130 ± 23	(7)	340 ± 40	(4)			
Co	91 ± 40	(6)	ND				
Ni	65 ± 11	(8)	210 ± 28	(4)			
Cu	65 ± 22	(6)	ND				
Zn	62 ± 11	(8)	160 ± 15	(4)			
Sr	4.7 ± 1.3	(8)	ND				
Ph	53 + 15	(14)	44 + 5	(4)			

*This work, **Measuerd at 2012

12.3 まとめ

標準物質(SRM)により、マイクロ PIXE システムにおける各種元素の定量特性の評価が可能となった。今後とも、測定系を中心に、装置改善をすすめ PIXE 分析の高度化を進めていく。

13. マイクロ PIXE 用ソフトウェアの開発

マイクロ PIXE 分析で得られた X 線スペクトルか ら各元素の定量値を得るためには、適切なアルゴリ ズムで制動輻射によるバックグラウンドを設定する とともに、各元素の特性 X線のピークにガウス関数 をフィッティングさせそのピーク面積を算出し、照 射するイオンマイクロビーム(主に3 MV プロトン ビーム)に対する X線の発生断面積と、X線検出器 の検出素子の立体角や厚さ、発生した X 線の吸収な ど、様々なパラメータを考慮する必要がある。これ らの処理は非常に煩雑であるため、それらを自動化 するソフトウェアの開発が不可欠である。これまで、 本課題ではマイクロ PIXE 分析データから各元素の 分布画像を得るソフトウェアである PIXEana^[13] (Figure 10) や Plugin for ImageJ (Figure 11) を開発 し、ユーザーに提供してきたが、今回、X 線スペク トルの定量解析ソフトウェアを新たに開発したので、 その詳細を報告する。



Figure 10. Screenshot of PIXEana



Figure 11. Screenshot of Plugin for Image

13.1 定量解析ソフトウェア

新たに開発したマイクロ PIXE の X 線スペクトル の定量解析ソフトウェアの動作画面を Figure 12 に示 す。この定量解析ソフトウェアでは、バックグラウ ンドの設定に Low Statistics Digital Filter^[14]を用いて いる。また、X 線の発生断面積と吸収断面積の計算 に、ISICSoo^[15]と Xraylib^[16]を使用した。ピークフィ ットには GNU Scientific Library^[17]を用い、元素毎の 特性 X線のエネルギーやX線検出器のエネルギー分 解能を考慮したピークフィットを行い、即座に定量 値を算出することが可能になった。



Figure 12. Screenshot of new software for quantitative analysis

13.2 まとめ

マイクロ PIXE 用の定量解析ソフトウェアを開発 することで、これまでより簡便に各元素の定量値を 算出可能になった。今後はユーザインタフェースの 改善と、マニュアルの整備を行うとともに、元素マ ップの特定の位置のスペクトルを解析可能にするな どの改良を行い、マイクロ PIXE の利用者に提供し ていく予定である。

参考文献

- H. Chino et al., "Pulmonary Aluminosis Diagnosed with In-air Microparticle Induced X-ray Emission Analysis of Particles," Intern. Med. 54 (2015) 2035–2040. doi:10.2169/internalmedicine.54.4246.
- [2] Y. Shimizu et al., "Co-localization of iron binding on silica with p62/sequestosome1 (SQSTM1) in lung granulomas of mice with acute silicosis," J. Clin. Biochem. Nutr. 56 (2015) 74–83. doi:10.3164/jcbn.14-44.
- [3] Y. Koga et al., "In-Air Microparticle Induced X-Ray Emission Analysis of Inhaled Particulates in Thoracic Lymph Node in a Patient with Asbestos Exposure," ATS2015 (2015)
- S. Harada et al., "Imaging and treatment of malignant metastatic tumors by using radiation-sensitive, immunolabeled liquid-core microcapsules," Nucl. Instrum. Meth. B 318 (2014) 173–177. doi:10.1016/j.nimb.2013.06.045.
- [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] A. Umerska et al., "Self-Assembled Hyaluronate/Protamine Polyelectrolyte Nanoplexes: Synthesis, Stability,

Biocompatibility and Potential Use as Peptide Carriers," J. Biomed. Nanotechnol. 10 (2014) 3658–3673. doi:10.1166/jbn.2014.1878.

- [7] S. Watanabe et al., "MA Recovery Experiments from Genuine HLLW by Extraction Chromatography," Proc. Glob. 2011. (2011) 387433.
- [5] 渡部創 et al., "MA吸着ガラスによる高レベル廃液からの MA 分離特性評価,"日本原子力学会「2015 年秋の大会」 F55 (2015)
- [6] 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. Meth. B 371 (2016) 387–391. doi:10.1016/j.nimb.2015.09.054.
- [10] 江夏昌志 et al., "軽イオンマイクロビーム分析/加工シ ステムの改良," JAEA-Technol. 2016-006 (2016). doi:0.11484/jaea-technology-2016-006.
- [11] Y. Iwata et al., "Sensitivity of Micro Beam PIXE System in TIARA for Several Trace Elements," JAEA-Rev. 2010-065 (2011) 118. http://iolissrch.inter.tokai-sc.iaea.go.in/ndfdata/IAEA-Revi.

http://jolissrch-inter.tokai-sc.jaea.go.jp/pdfdata/JAEA-Revi ew-2010-065.pdf

- [12] Y. Iwata et al., "Cultivation of Marine Planktons by the Artificial Seawater and Elemental Mapping by Micro Beam PIXE System of TIARA," JAEA-Rev. 2012-046 (2013) 87. doi:10.11484/jaea-review-2012-046.
- [10] T. Sakai et al., "JAERI Takasaki in-air micro-PIXE system for various applications," Nucl. Instrum. Meth. B 190 (2002) 271–275. doi:10.1016/S0168-583X(02)00469-X.
- [11] C.G. Ryan et al., "SNIP, a statistics-sensitive background treatment for the quantitative analysis of PIXE spectra in geoscience applications," Nucl. Instrum. Meth B 34 (1988) 396–402. doi:10.1016/0168-583X(88)90063-8.
- [15] M. Batič et al., "ISICSoo: A class for the calculation of ionization cross sections from ECPSSR and PWBA theory," Comput. Phys. Commun. 183 (2012) 398–404. doi:10.1016/j.cpc.2011.10.004.
- [16] T. Schoonjans et al., "The xraylib library for X-ray-matter interactions. Recent developments," Spectrochim. Acta Part B At. Spectrosc. 66 (2011) 776–784. doi:10.1016/j.sab.2011.09.011.
- [17] M. Galassi et al., "Gnu Scientific Library Reference Manual," Network Theory Ltd, 2001.