



PIXE分析法による生体試料中微小領域の元素分布

Determination of Elemental Distribution in Small Area of Biological Samples Using PIXE Analysis

湯川雅枝
Masae Yukawa

放射線医学総合研究所 研究基盤部 部長

1 緒言

近年、生体内微量元素の生理学的な役割が注目されている。水俣病、イタイタイ病に代表される重金属中毒や、皮膚障害に見られるZnの欠乏症のような、微量元素の健康影響解明や防護に始まった研究は、中毒症や欠乏症のメカニズム研究から、微量元素が生命活動で担っている役割、そして微量元素相互あるいは共存物質とのCombined effect解明へと進んでいる。これらの背景には、微量元素分析法の進歩があり、非常に微細な試料（例えば、一個の細胞）中での元素分布の把握が可能になってきた。X線マイクロアナライザー（EPMA）や荷電粒子励起X線（PIXE）分析法がこれに当たる。これらは、非破壊多元素同時分析法であり、細く絞られた電子線や陽子線を試料に当てることで、ミクロンからサブミリオーダーの空間分解能で元素の分布を調べることができる。PIXE法においては、加速された荷電粒子を特性X線の励起源とする。X線励起やガンマ線励起に比べて、原子の軌道電子を2～5桁励起しやすいため、検出感度が高くなる。また電子励起の場合は、陽子より軽いターゲット原子により制動されやすく、制動輻射X線によるバックグラウンドが高くなる。さらに、X線検出器の特性上、水素、炭素、窒素、酸素に関する感度が非常に低い。これは、これらの元素を主成分とする生物試料にとって、中・重元素の検出を容易にする。

著者らは、加速器を利用したPIXE分析法を生体試料中の微量元素分布測定に応用してきた。本稿では、PIXE分析法の有用性と将来の可能性について述べることにする。

2 PIXE分析法とは

PIXE分析法は、高感度微量元素分析法のひとつである。加速器などから取り出される高エネルギー荷電粒子線を試料

に照射すると、内核電子が原子外にはじき出され、エネルギー準位の高い軌道電子が空席を埋めようとする。この際に、このエネルギー差に相当する特性X線を放出する。この特性X線のエネルギーは元素に固有のものであり、X線強度は元素量に比例するので、特性X線を測定することによって元素の定性定量を行うのがPIXE法の原理である。特性X線の測定にSi (Li) 半導体のようなエネルギー分散型の検出器を用いれば、X線のエネルギースペクトルが得られ、多元素同時分析ができる。また、試料に荷電粒子を照射し、励起X線を測定するだけなので、溶解、分解などの化学処理を必要としない非破壊分析法でもある。生体試料を分析する場合の実効的な元素の検出限界はng（ナノグラム）レベルである。

さらに、この方法のもっとも優れた特徴は、マイクロビームスキニングが行えることである。荷電粒子を励起源とすることから、照射ビームを磁場により細く絞ることができる。通常数100ミクロン程度のビームを取り出すことはそれほど大変なことではない。さらにこのビームを絞りミクロンオーダーのものとし、偏向コイルや平行板電極をつかって試料表面を走査すると、微少な試料表面での元素マッピングができる。通常励起源としては2～3MeV程度の陽子線を用いることが多く、加速器はバンデグラフやタンデムなど静電加速器を利用するのが一般的である。

3 放射線医学総合研究所のPIXE分析装置

放射線医学総合研究所（放医研）では、1998年、老朽化したバンデグラフ加速器の更新を行うこととし、それにあわせてPIXE装置の更新も計画した。加速器は、メンテナンスの容易さ、マイクロPIXEの可能性、速中性子線や重粒子イオンによる照射の可能性を考慮して、タンデム型を選択し、High Voltage Engineering社製 Model4117MC Tandetron

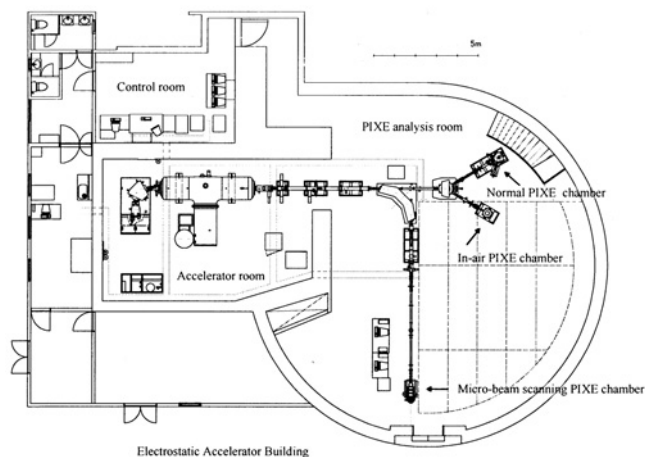


図1 放射線医学総合研究所の静電加速器棟内PIXE装置概観

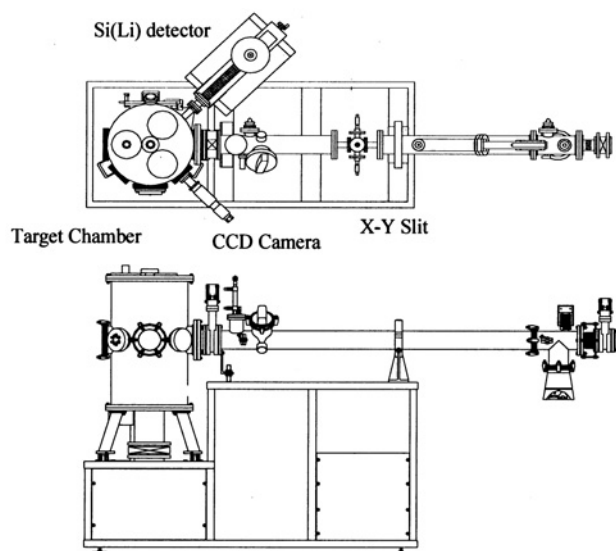


図2 ノーマルPIXEラインのレイアウト

(タンデム型ダイナミトロン、定格加速エネルギー0.4～3.4MeV ($^1\text{H}^+$)、最大定格ビーム電流 $5\ \mu\text{A}$ (3.4MeV)) を導入した。イオン源は、ディオブラズマトロンを2基備え、短時間にイオン源を切り替えることで、より多くのマシンタイムを提供できる。当面PIXE専用機として利用することから、3本のビームラインを備えるように企画した。現在、図1に示すような構成になっている。

3.1 ノーマル (conventional) PIXEライン

ここでは、0.5～2.0mm角で、ビーム電流100nAまでの陽子ビームが利用でき、試料ホルダーには、20mm ϕ のものが15個同時装着できる。X線検出器としては、軽中重元素用にSi (Li) 検出器を、重元素用にCdZnTe検出器を備えており、同時計数によって、Na ($Z=11$) からU ($Z=92$) の元素分析が可能である。図2と図3にノーマルPIXEラインのレイアウト及びサンプルホルダーを示した。図4は、

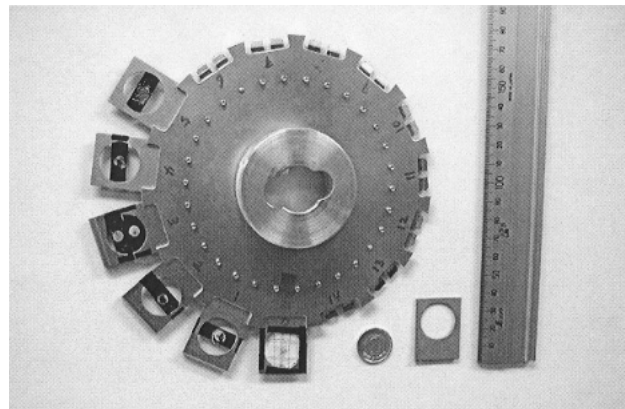


図3 ノーマルPIXE用サンプルホルダー

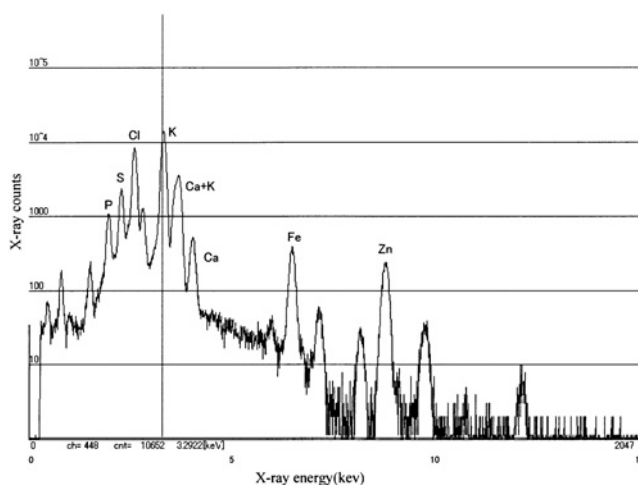


図4 NIST標準試料Oyster tissueのPIXEスペクトル

NIST (National Institute of Science and Technology, USA) の標準試料Oyster Tissueを分析した時のスペクトルである。

3.2 マイクロPIXEライン

マイクロPIXE分析システムは、Oxford Micro-beams社製Model OM2000を導入した。陽子線のマイクロビーム化のための0.5mm ϕ の object slit、2組の X-Y slits、1組の quadrupole triplet magnets と、試料表面の陽子ビーム走査用の scanning coil、システムの運転管理とデータ処理用のソフトウェアで構成されている。プロトンビームのサイズは、1 μm ～2mm角の可変で、最大ビーム電流は50pA、最大ビーム走査範囲は2.5mm $\times$ 2.5mmである。X線検出器はSi (Li) を用いている。これにより、試料表面上最大2mm角の部位で、空間分解能1 μm の元素マップを多元素同時に作成することができるようになった。マイクロPIXE分析用ビームラインの構成を図5に示す。図6はサンプルホルダーで、10 $\times$ 24mmのアルミ板に空けられた5mm ϕ の穴の中心に試料をバックングフィルムで固定する。3軸マニピュレータの

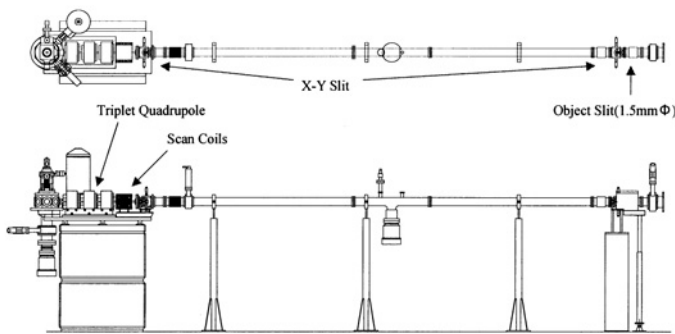


図5 マイクロPIXEラインのレイアウト

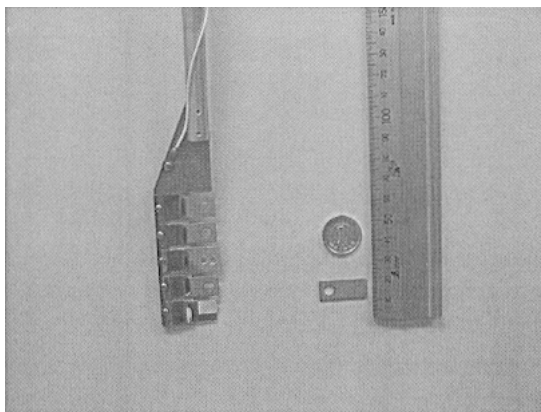


図6 マイクロPIXE用サンプルホルダー

取り付けられたサンプルホルダーに、5枚同時に取り付けられるようになっている。図7は、マイクロPIXEチャンバーのレイアウトを示す。ビームサイズの調整やサンプル表面の状態の確認などに使用するマイクロSCOPEとビーム軸に対し45度の角度に配置したSi (Li) 半導体検出器を備えている。図8に、現在までに得られたもっともよく絞られたマイクロビームサイズを示した。これは、2000メッシュの金のグリッドを用いて推定したものである。

平成13年1月に、導入したCCDカメラ (Roper Scientific製Cool SNAP) によって、マイクロスキャン中のビームを視覚的に捕らえることに成功した。また、平成13年3月には、Oxford Micro-beams社製のSTIM (Scanning Transmission Ion Microscopy) 装置が導入された。これは、プロトンが試料を通過する時に起こるエネルギーロスが試料の密度に依存することを利用したもので、試料の厚み・密度を視覚画像として得ることができるようになった。これにより、マイクロPIXEの元素マップだけでは捕らえにくかった、比較的均一で薄い生物試料などのスキャン範囲がリアルタイムで確認できるようになった。図9にブナの葉について得られた画像を示す。

3.3 大気圧PIXEライン

PIXE分析は非破壊法であるが、通常真空チャンバー中で

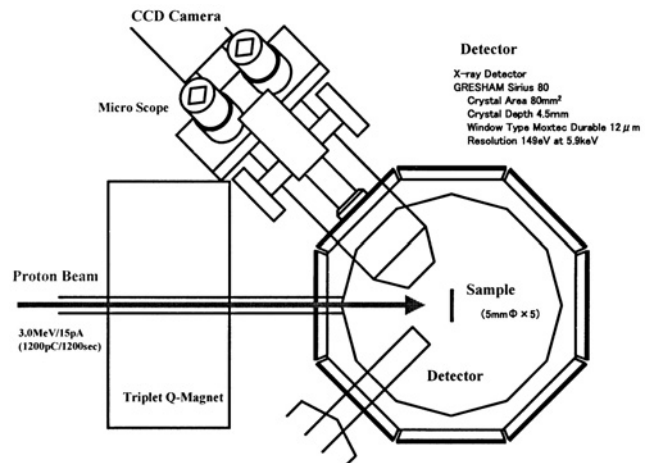


図7 マイクロPIXEチャンバーのレイアウト

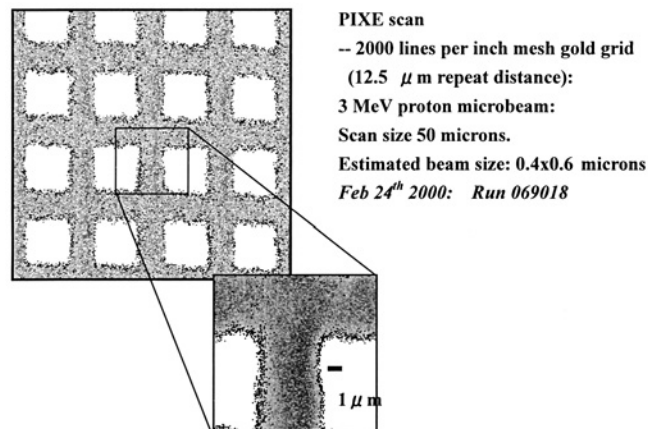


図8 プロトンビームの分解能テスト

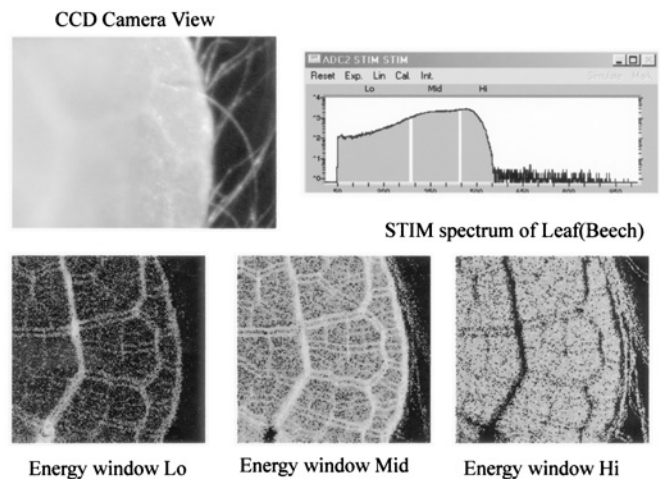


図9 ブナの葉のSTIMマップ
スキャンニングエリア：2×2mm、低エネルギー側では密度の高い部分を、高エネルギー側では密度の低い部分の像を示している。

照射を行うため、試料を乾燥する必要がある。しかし、液体や生の試料の照射を行うためには、大気圧での照射が必要であり、このラインの構築を計画した。まだ未完成であるが、

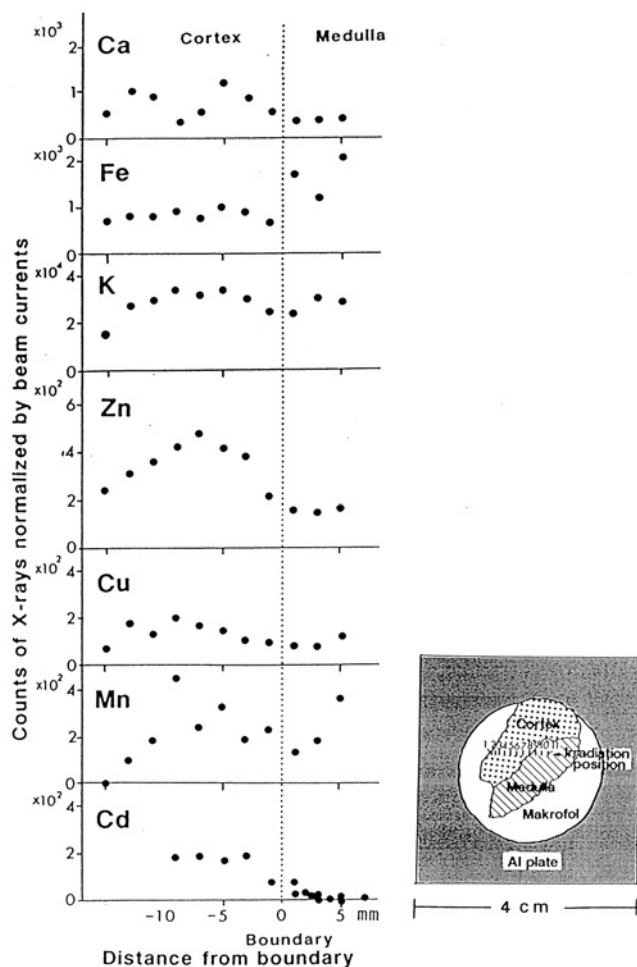


図10 人の腎臓切片中の元素プロファイル

将来は、液体クロマトグラフのような化学形によって分離を行う機種と元素分析機器であるPIXEとの結合を行い、HPLC（高速液体クロマトグラフ：High Performance Liquid Chromatography）-PIXEを実施したいと考えている。

4 生体試料への応用

4.1 サブミリオーダーのプロトンビームによる元素分布測定

加速器から取り出された数100 μm サイズのプロトンビームを用いて、生物試料中の元素分布を測定した例をいくつか紹介する。

図10は、ヒトの腎臓切片中の元素プロファイルである¹⁾。図中に凍結乾燥した試料切片の模式図を示したが、大きさは約10mm×10mm、厚み約1mmで、皮質と髄質部を含むように切り出されている。この試料切片を薄いプラスチック膜に張り付け、アルミ板のサンプルホルダーに取り付けてある。試料切片上で、皮質と髄質にまたがった線上を陽子線で照射した。ビームサイズは0.1×1mmの細長い長方形で、短い方に直角にビームを動かしてプロファイルをとった。照射位

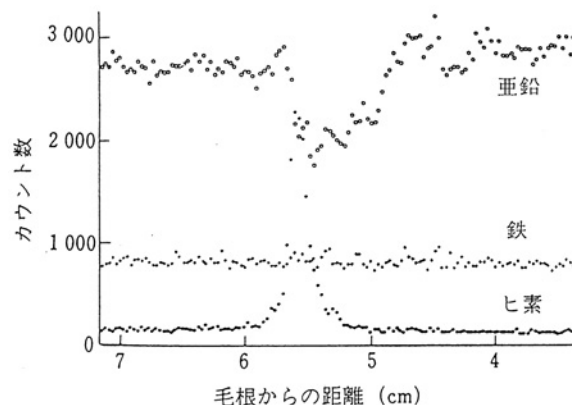


図11 1本の毛髪中での元素分布

置の間隔は1mmである。元素によってプロファイルが違い、ZnやCuは皮質のほうに多く、Feは髄質に多い。イタイタイ病の原因とされたCdは皮質に蓄積されていて髄質にはないことがわかる。

図11は、一本の毛髪について長さ方向での元素分布を調べた例である²⁾。この毛髪の主は、Asを摂取した時期があり、そのAsが毛髪に排泄された様子がはっきりと観察されている。また、その時期に毛髪中のZn濃度が下がっており、AsとZnの間に何らかの相関がある可能性を示唆した。

このように、サブミリオーダーのプロトンビームを用いても、試料中の大まかな元素分布や組織学的なレベルでの元素分布の測定は十分可能である。しかしながら、もっと微細な元素分布を観察しようとする、ビームサイズをもっと小さくし、元素分布測定の空間分解能をあげる必要がある。そこで、マイクロビームPIXEが登場する。

4.2 放医研のマイクロビーム装置による分析結果

4.2.1 魚の鱗、耳石

魚の鱗は、木の年輪と同様成長に伴う線が見られることと、体表面にあって水中の物質を吸着することから、環境の汚染指標となる可能性があると言われている。また、耳石も成長に伴って日周輪が見られる。耳石の場合は、頭蓋骨内の脳近くにあり、外界の汚染を受けないことで、生理的な状態を反映する指標となりうる。

著者らは、東京湾で釣られたセイゴ（スズキの幼魚、体長約15cm）について鱗と耳石を採取し、元素分布について調べた³⁾。その結果を図12、13に示す。これらの結果は、放医研と同じマイクロPIXEシステムを備えたオックスフォード大学並びにシンガポール大学での運転操作訓練の一部として実施した実習によるものである。図に示すようにプロトンビームサイズは、約1 μm 、スキャンニングエリアは2.5mm×2.5mmである。鱗の日周輪は、PおよびCaの元素マップとできればに捉えられている。その他の元素のマップでは、

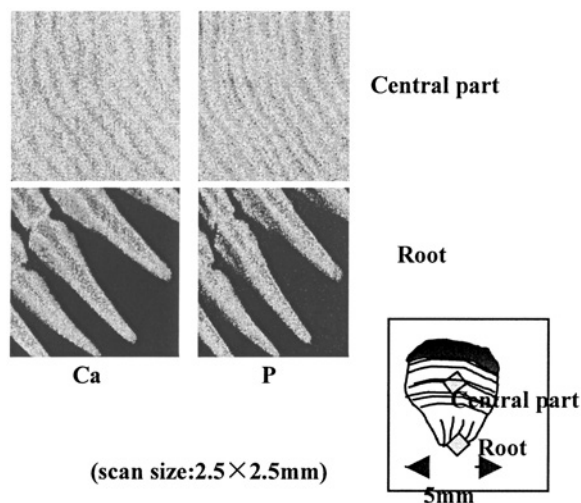


図12 魚の鱗の元素マッピング

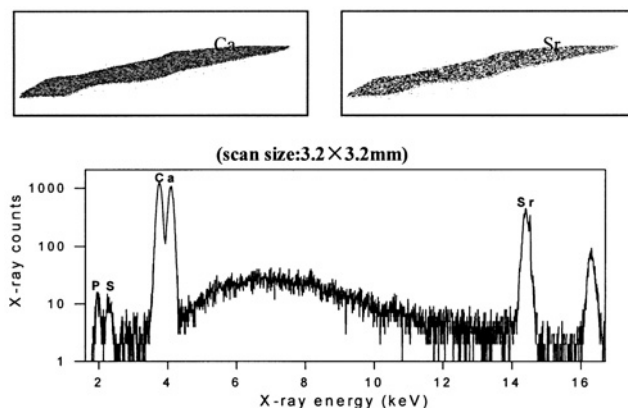


図13 魚の耳石の元素マッピング

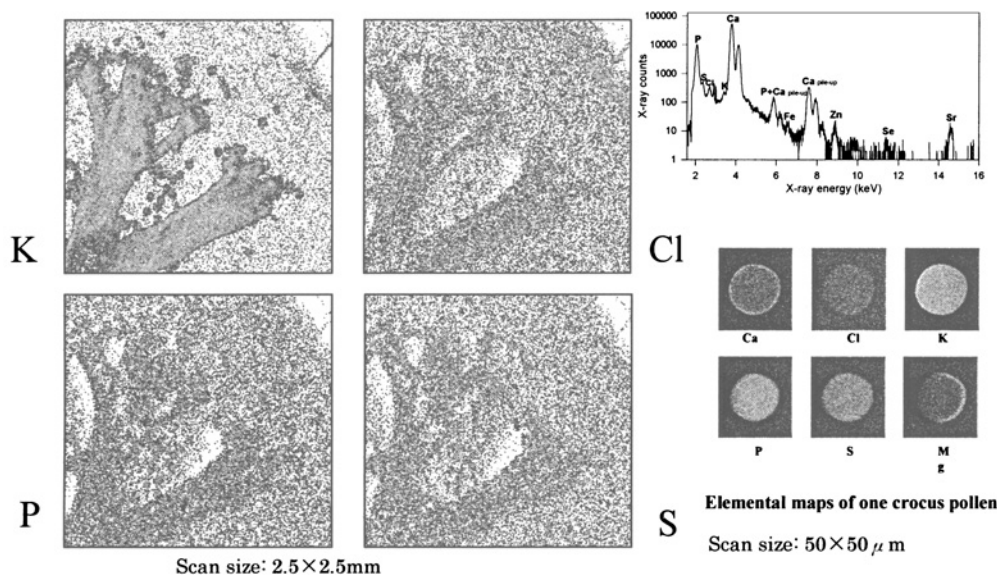


図14 クロッカスの雄しべと花粉の元素マップ

鱗の構造と対応したものは見いだせなかった。さらに時間をかけて照射を行い、X線の計数値を上げる必要があるであろう。いずれにしても、このマイクロPIXE装置により、光学的な画像ではなく、元素の分布図として、日周輪を観察する事ができた。耳石については均一な組織のような観察結果が得られた。耳石は米粒ほどの大きさであるので樹脂包埋して切片とした。この切断面の選択が日周輪の観察に適していなかったのかも知れない。

4.2.2 クロッカスの雄しべ

植物の試料として、クロッカスの雄しべを対象とした例を示す。クロッカスの雄しべをプレパラート上で軽く押しつぶして乾燥したものをサンプルホルダーにのせて照射試料とした。ビームサイズは約 $1\mu\text{m}$ 、スキャンニングエリアは

$2.5\text{mm} \times 2.5\text{mm}$ である。雄しべの形がKマップによってはっきりと見られる(図14)。小さな球は、一つ一つの花粉である。この花粉1個を拡大してマッピングしたものが図中下部に示してある。スキャンニングエリアは $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ で、6元素のマップによって花粉の形が描かれた。花粉の大きさは、約 $30\mu\text{m}$ と推定される。この場合、花粉の表面だけを観察していることになるが、断面を出すことができれば、花粉内部の元素分布を見ることができるようになり、1個の細胞中での元素分布の観察が可能であることが示された。

4.2.3 メダカの脳

メダカは、実験動物として、以下の点で優れている。硬骨魚類として、脳神経系、内分泌系、循環器系、免疫系などが高度な哺乳動物に認められる系の原型が出来上がっていて、

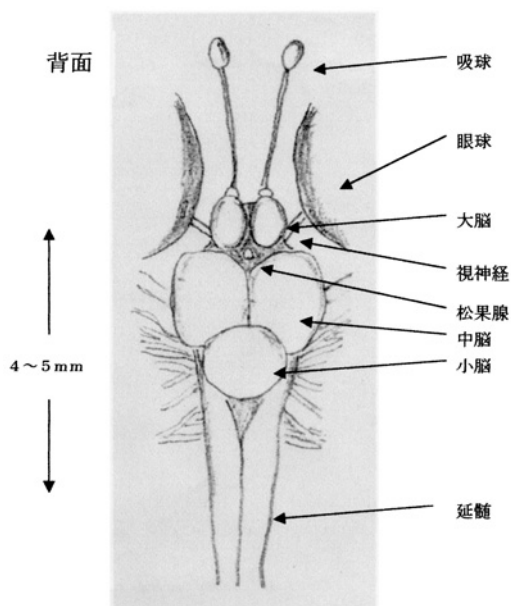


図15 メダカの脳の構造

脊椎動物のモデルとなる。入手が容易で、飼育維持費も他の脊椎動物に比べて安い。狭い空間で室温飼育が可能であり、淡水でよい。放医研では、個体群内で、遺伝子構成の相似化、ホモ化した近交系のメダカを系統維持しており、放射線や化学発ガン剤に対する感受性が調べられている。このメダカの脳を試料として元素のマッピングを試みた。メダカの脳は、大きさが、4~5mmであり、図15に示すような構造をしている。このような小さな組織気管内での元素分布を調べるには、マイクロPIXEはもっとも適している。脳をメダカから取り出し、30 μ m厚の凍結切片として、試料ホルダー上で乾燥して照射試料とした。マイクロビームスキャンによる元素マッピングの結果を図16に示す。PとSの分布によって、脳の形を見ることができた。微量元素については、際だった特徴は見られなかったが、今後切片の作り方や照射時間の検討により結果が得られるものと期待している。

5 PIXE以外のマイクロビーム 利用法

以上述べたように、放医研のマイクロビーム装置は、プロトンやヘリウム原子核(アルファ粒子)を数MeVに加速し、1 μ mオーダーのマイクロビームとすることができる。この性能を利用して、細胞中の細胞核やミトコンドリアなど微小器官だけを照射するマイクロビーム照射計画が進められてい

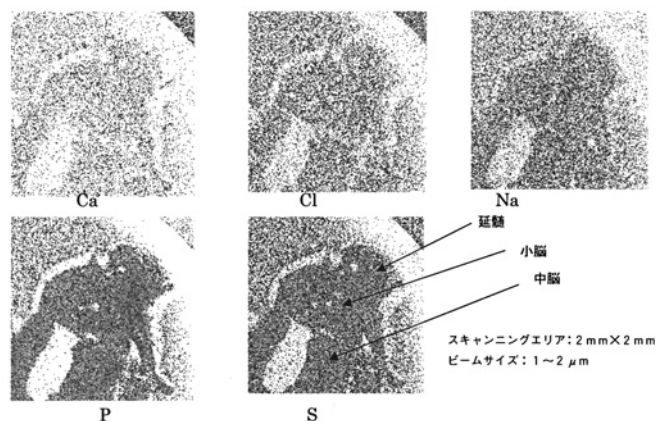


図16 メダカの脳の元素マッピング

る。これにより、放射線の生物影響メカニズムが解明されることが期待される。また、マイクロビームによる表面走査の精密制御が可能なので、マイクロマシナリーの分野でも利用が可能と思われる。

6 まとめ

PIXE分析法の生物試料への応用について紹介した。放医研の新しい装置は、まだ導入から日も浅く、十分な成果が得られてはいない。しかしながら、性能に関する基礎データは取り終わり、若干の照射テストを経て、実働に入る状況に至っている。様々な分野での有効利用を目指して、共同利用の道も模索し始めた。PIXE法の特長を生かした研究への広がりを期待している。

参考文献

- 1) M. Yukawa, K. Kitao : PIXE analysis of the distribution of elements in the human kidney, cerebrum and breast bone. International Journal of PIXE 1, (1991), 354.
- 2) P. Horowitz, M. Aronson, L. Grodzins, W. Ladd, J. Ryan, G. Merriam and C. Lechene : Elemental analysis of biological specimens in air with proton microprobe. Science 194, (1976), 1162.
- 3) M. Yukawa, H. Imasseki and O. Yukawa : Micro-beam scanning PIXE in NIRS and the application tests to biological samples. International Journal of PIXE 10, (2000) 71.

(2001年5月16日受付)