

平成 21 年 6 月 12 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19760619

研究課題名 (和文) 微小領域三次元微量元素分析法の研究

研究課題名 (英文) Study on Three-dimensional Trace-elemental Analysis in a Minute Area

研究代表者

佐藤 隆博 (SATOH TAKAHIRO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・放射線高度利用施設部・研究職

研究者番号：10370404

研究成果の概要：組織切片などの微小な試料を回転させ、イオンマイクロビームを用いた微量元素分析を行い、コンピュータ断層撮影法等で用いられている画像再構成の手法を適用し、微小試料内の微量元素の三次元分布を測定する手法を開発した。本手法では、X線の発生量や吸収量を正確に補正する必要があるため、イオンマイクロビームを用いて試料の密度を三次元的に測定した。この測定結果から、微量元素分布の投影像を補正し画像再構成を行うことで、正確な微量元素の三次元分布を得ることに成功した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,800,000	0	2,800,000
2008年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	150,000	3,450,000

研究分野：イオンビーム工学

科研費の分科・細目：総合工学・原子力学

キーワード：加速器、イオンビーム、元素分析

## 1. 研究開始当初の背景

大気中で  $1\mu\text{m}$  の空間分解能で数 ppm 以下の微量元素の二次元分布画像の測定を可能とする大気マイクロ PIXE (Particle Induced X-ray Emission; 粒子励起 X 線) 分析システムを、日本原子力研究開発機構 (原子力機構) が 2002 年に開発した。この分析システムによって、培養細胞内の微量元素である鉄やカルシウムの動態がアポトーシス (自死) に深く関与していることが、世界で初めて示された。このように、本測定システムは医学・生物学をはじめとする様々な分野

において利用されつつあり、今後は、より臨床に即した分析法として、組織切片内の元素分布測定が望まれている。一般に組織切片は細胞が層状になっているが、現状のシステムでは細胞内元素の二次元分布しか得ることができず、組織切片の分析において現状のマイクロ PIXE 分析システムは必ずしも効果的ではない。このように、この分析法を診断に応用する場合、培養細胞だけでなく厚みがある組織切片の  $10\mu\text{m}$  以下の空間分解能を持つ三次元分析手法の開発が必要不可欠である。

既に三次元分析を実用化している X 線 CT などでは、二次元の投影像を様々な角度から測定し、画像再構成によって、測定対象の三次元構造を取得している。そこで、X 線 CT と同様の手法を、マイクロ PIXE に応用すれば、高空間分解能の三次元微量元素分析が実現できると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、平成 19 年度～20 年度の 2 年間で、マイクロ PIXE 分析法と CT の画像再構成法を用いた三次元微量元素分布分析法を開発し、1mm 以下の微小な組織切片内において空間分解能  $10\mu\text{m}$  以下の立体的な微量元素分析を実現することを目的とした。微小な組織切片内の微量元素の三次元分析が実現すれば、疾病の細胞レベルの診断に応用できる。

## 3. 研究の方法

X 線 CT のように、二次元の投影像を様々な角度から測定し、画像再構成によって、測定対象の三次元構造を取得する手法を、マイクロ PIXE に応用し、組織切片内微量元素の三次元分布の測定を行う場合、X 線 CT とは異なり、以下の 2 つの理由により、そのままでは正確な投影像を得られない。

- (1) 試料を通過するイオンビームのエネルギーの減衰により、特性 X 線の発生断面積が変化する。
- (2) 試料内で発生した特性 X 線が試料内で吸収される。

イオンビームのエネルギーの減衰と、特性 X 線の吸収は、そのほとんどが試料内の主要元素によるものであり、生物試料の場合、その主要元素は炭素、水素、酸素である。ナトリウムより軽い元素の測定はマイクロ PIXE では困難であるが、生物試料内の主要元素の比率はほとんど一定であると仮定し、試料の三次元密度分布がわかれば、試料内の主要元素分布を得られる。そこで本研究では、マイクロ PIXE と同様にマイクロビームを用いる STIM ( Scanning Transmission Ion Microscopy; 走査透過イオン像) -CT によって試料の三次元的な密度分布を測定した。この測定データに基づいて、マイクロ PIXE で得られる特性 X 線の発生量を補正し、得られた二次元像から画像再構成を行うことにより、組織切片内の微量元素の三次元分布を得ることができる。

実験は、日本原子力研究開発機構のイオン照射研究施設 TIARA のシングルエンド加速器とサブミクロンマイクロビーム形成装置

を用いて行った。図 1 に実験装置の概要を示す。3MeV のプロトンビームをサブミクロンマイクロビーム形成装置によってビーム径  $1\mu\text{m}$  以下まで集束させ、PC で制御したビームスキャナで走査する。最大スキャン範囲は  $1\text{mm}\times 1\text{mm}$  である。今回は試料のサイズに合わせて、 $473\mu\text{m}\times 237\mu\text{m}$  のスキャンサイズで測定を行った。ビームは  $5\mu\text{m}$  の厚さのポリカーボネートフィルムを通して大気中で試料に照射される。試料は大気中で針の先に酢酸ビニル樹脂によって固定され、この針によって試料を  $15^\circ$  ずつ回転させる。STIM-CT の測定時には、試料の背後に粒子検出器を設置して試料を通過したビームのエネルギーを測定する。また、マイクロ PIXE の測定時には試料の前方  $40^\circ$  に設置した X 線検出器を用いた。測定試料としては、直径  $100\mu\text{m}$  の金属捕集材の繊維を用いた。

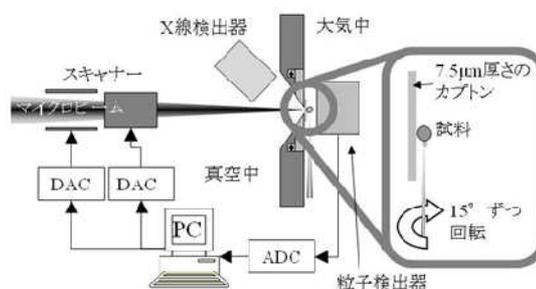


図 1 実験装置の概略図。実験には 3MeV のプロトンマイクロビームを使用した。ビーム径は  $1\mu\text{m}$  である。

## 4. 研究成果

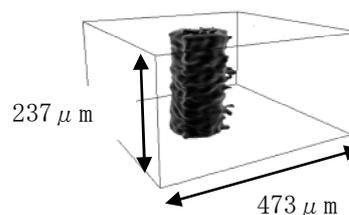


図 2 12 個の STIM 投影像と Shepp & Logan フィルターによる FBP によって得た、試料の三次元構造。

STIM の投影像は  $128\text{ pixel}\times 128\text{ pixel}$  で測定した。これは一般的な X 線 CT と比較すると、それほど高い空間分解能ではないが、イオンマイクロビームのサイズが最小で  $1\mu\text{m}$  であるため、 $100\mu\text{m}$  程度の試料の測定には十分である。そこで、1 つの投影像をなるべ

く長時間測定して統計制度を向上させ、15° ずつ 12 個の投影像から、Shepp & Logan フィルターと FBP (Filtered Back-Projection) を用いることにより、図 2 のように、試料の三次元構造を得た。

次に、X 線検出器を用いて、マイクロ PIXE の二次元投影像の測定を行った。図 3 にマイクロ PIXE の測定で得た、試料中の硫黄と鉄の測定結果を示す。

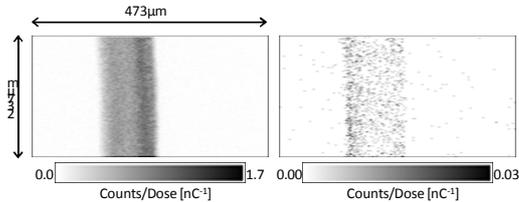


図 3 マイクロ PIXE で得た、試料中の硫黄と鉄の二次元分布。

硫黄と鉄は、共に、金属捕集繊維の径の方向に濃度の分布があるように見えるが、硫黄は鉄と異なり試料に一樣に分布していると考えられ、マイクロ PIXE の測定結果に見られる X 線強度の違いは、3-(1)及び 3-(2)の理由によるものと考えられた。FBP によって正確な三次元分布を得るためには元となる二次元分布における 3-(1)及び 3-(2)の効果を補正が必要である。イオンビームが試料中を通過する際のエネルギーを図 1 の三次元データ、試料全体の平均密度から推定し、特性 X 線の発生量はイオンビームのエネルギーの 4 乗に比例すると仮定すると、3-(1)に関する補正量  $C_E$  は

$$C_E(x, y, z) = \{E(x, y, z)\}^4 / E_0^4$$

となる。ここで  $E_0$  はイオンビームの試料に入射前のエネルギー、 $E$  は試料内のある位置のエネルギーである。一方、3-(2)の X 線の吸収による補正量を  $C_a$  とすると、

$$C_a(x, y, z) = \exp[-\mu_{\text{target}}(x, y, z) \times l(x, y, z)]$$

となる。ここで、 $\mu_{\text{target}}$  と  $l$  はそれぞれ、X 線の線減弱係数と X 線が試料を通過する長さである。これらの式から、測定されたマイクロ PIXE の二次元投影像は

$$I_c(x, y, z) = LI_m(x, y) / \int_0^L C_E C_a dz$$

という式で補正した。ここで  $I_c$ 、 $I_m$  はそれぞれ、補正された X 線強度、測定された X 線強度である。また、 $L$  は照射したイオンビームの飛程である。これらの補正は我々が以前開発した計算コードを用いた。15° ずつ 12 個のマイクロ PIXE の二次元像と FBP によって再構成した試料中の硫黄の三次元像を、図 4 に示す。

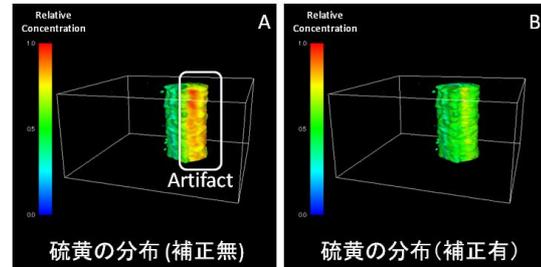


図 4 画像再構成で得た試料中の硫黄の三次元分布。A で示した画像は、補正を行わず、画像再構成を行ったもの。B は補正を行ったもの。A には偽の分布が見られる。

硫黄は試料中に一樣に分布していると考えられるが、 $C_E$  及び  $C_a$  による補正を行わない場合、図 4 の A に示すように、偽の分布を生じた。一方、図 4 の B はマイクロ PIXE の二次元画像の補正を行なった後、FBP による画像再構成を行ったものである。A で見られた偽の分布が抑制され、一樣な分布とすることができた。

同様に、鉄の分布についても二次元のマイクロ PIXE 画像に 3-(1)及び 3-(2)の補正を行った後、画像再構成を行った結果を図 5 に示す。

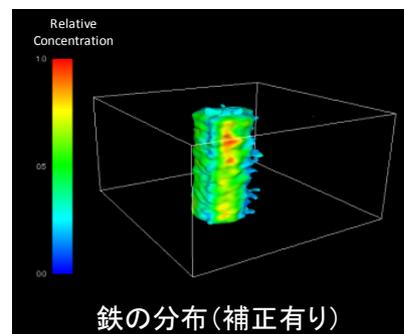


図 5 画像再構成で得た試料中の鉄の三次元分布。図 4 の B と同様に補正後に FBP による再構成を行った。鉄が金属捕集材の繊維に局在している様子が観察された。

以上のように、共にイオンマイクロビームを用いた分析法である STIM-CT とマイクロ PIXE を使い、試料を回転させることによって、微小な繊維中の硫黄と鉄の分布を三次元的に測定することに成功した。このことから、本手法は、生体の組織切片のような、硫黄を多く含む試料中に含まれる微量な金属元素を、細胞レベルで三次元分析することに使用できるという見通しが得られた。一方、回転させ多数の投影像を測定する必要があるため、現状で 1 つのサンプルの測定に 10 時間ほどかかっており、今後、統計精度を保ちつつ測定時間を短縮することが不可欠であることが、明らかとなった。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① T. Satoh, M. Oikawa, T. Kamiya, Three-dimensional measurement of elemental distribution in minute samples by combination of in-air micro-PIXE and STIM, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B, Volume 267, Issues 12-13, 2009, Pages 2125-2127, 査読有り

[学会発表] (計 4 件)

- ① T. Satoh, Three-Dimensional Measurement of Elemental Distribution in Minute Samples by Combination of In-air Micro-PIXE and STIM, The 4th International Symposium on Biomedical Research Using Accelerator Technology, 2008 年 11 月 16 日、群馬大学 (前橋)
- ② 佐藤隆博、大気マイクロ PIXE を用いた微小試料の三次元元素分布測定、第 25 回 PIXE シンポジウム、2008 年 9 月 12 日、群馬大学 (前橋)
- ③ T. Satoh, Three-Dimensional Measurement of Elemental Distribution in Minute Biological Samples by In-air Micro-PIXE and STIM, 11th International Conference on Nuclear Microprobe Technology and Applications, 2008 年 7 月 24 日, Debrecen (Hungary)
- ④ 佐藤隆博、大気マイクロ PIXE による三次元元素分析、第 24 回 PIXE シンポジウム、2007 年 9 月 12 日、大妻女子大学 (多

摩)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

佐藤 隆博 (SATOHI TAKAHIRO)

独立行政法人日本原子力研究開発機構・放射線高度利用施設部・研究職

研究者番号：10370404

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし