

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23246167

研究課題名(和文)細胞内のX線トレーサーの動態をミクロンの解像力で観察するRIイメージング法の開発

研究課題名(英文)Development of an RI imaging method for observing the dynamic of X ray tracer in an intracellular by the resolution of a micron

研究代表者

石井 慶造 (Ishii, Keizo)

東北大学・工学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00134065

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 38,200,000円

研究成果の概要(和文)：鉄および亜鉛のような金属元素は、植物の成長および生命活動において重要な役割を果たす。植物中のこれらの金属元素の生体内観察は分子レベルでの新陳代謝メカニズムを解明し、品種改良および人工栽培に役に立つことが期待される。我々は、ピンホールカメラの原理とX線だけを放射するRIトレーサーの使用に基づいたミクロン3次元RIイメージングシステムを開発した。X線RIトレーサーとして鉄55線源を用いて、3次元RIイメージングに成功した。小松菜の新芽中の鉄55トレーサーの挙動を調べるのに本装置を応用した。鉄55の分布の時間変化を取得し、鉄55の投与後ある程度時間が経ってから葉への集積が顕著になることを発見した。

研究成果の概要(英文)：Metallic elements such as iron and zinc play an important role in the growth and life activity of plants. It is expected that the in-vivo observation of these metallic elements in plants enables to elucidate their metabolism mechanism at a molecular level and it becomes useful for the selective breeding and the artificial cultivation. We developed a 3D RI imaging system based on the use of RI source emitting only x-rays (X-ray RI source) and the principle of a pinhole camera. We succeeded to perform 3D RI imaging by using a  $^{55}\text{Fe}$  source as the X-ray RI source. We applied it to investigate the movement of  $^{55}\text{Fe}$  tracer in a sprout of Japanese mustard spinach. We obtained the time change of distribution of  $^{55}\text{Fe}$  tracer in the plant and found that the  $^{55}\text{Fe}$  accumulation in leaf became remarkable after a period of time after administration of  $^{55}\text{Fe}$ .

研究分野：原子力学

キーワード：RI imaging 55Fe tracer pinhole camera

## 1. 研究開始当初の背景

放射性同位元素 (RI) を用いた生物学の研究は各大学のアイソトープ総合センターなどで盛んに行われてきたが、最近では、生物に投与した薬剤にレーザーを照射し、薬剤から発生する蛍光を測定して生物中での薬剤の代謝を細胞レベルで調べることができるレーザー励起蛍光顕微鏡が開発され、RI を用いた研究が少なくなっている。しかし、RI を用いた研究はまだまだ発展する可能性を秘めている。

動植物の生体中の鉄などの金属元素は発育などに強く関与しており、それらの細胞中での動きが観察できれば、細胞レベルで且つ分子化学・遺伝子学的に解明できることが期待される。しかし、鉄のようにもともと生体内に存在する元素の場合は、これまでの方法での測定は難しい。

## 2. 研究の目的

本研究では数ミクロンの空間分解能で検出可能な数 keV の X 線を放出する核種 (鉄 55 等) をトレーサーとして、ピンホールカメラの原理および X 線 CCD カメラを組み合わせて、10 ~ 40  $\mu\text{m}$  サイズの細胞の内部でのトレーサーの動きを 1 ~ 2  $\mu\text{m}$  の空間分解能で3次元的に動態観察できるミクロン RI イメージングシステムを開発する。

## 3. 研究の方法

バックグラウンドとなるガンマ線を出さない鉄 55 からの 5.9 keV の X 線が数  $\mu\text{m}$  径のピンホールを空けた薄い金属板でコリメートできることとピンホールカメラの原理を利用して、2段階 (4 年間) で下記の要領で研究開発する。第一段階 (2 年間) では、1) ミクロンピンホール金属膜の開発、2) X 線 CCD カメラの性能特性の評価と検出窓の製作、これらを基に、3) ミクロン RI 二次元イメージングシステムを製作する。第2段階 (2 年間) では、4) ピンホール金属膜の微小 3 次元駆動システムの開発、5) 深度情報解析アルゴリズムを開発し、ミクロン RI 三次元イメージングシステムを製作し、6) その性能評価を行う。第2段階の最後の1年間は、ミクロン RI 三次元イメージングシステムを、7) 植物を水耕栽培して、鉄の動態観察に応用し、システム自身の性能評価に加えて、応用面での利便性など総合評価を行う。

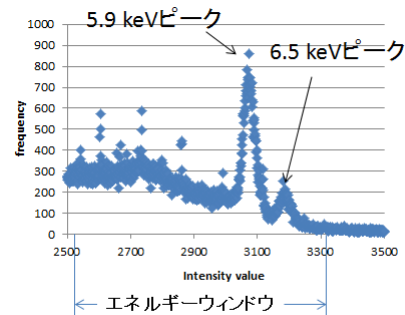
当初の計画では、第一段階で、半減期 11.4 日のゲルマニウム 71 などの X 線放出放射性同位元素の製造を計画していたが、東日本大震災によって使用を予定していた AVF サイクロトンが破損し、長期間シャットダウンしていたため、線源としては鉄 55 線源を本研究では、使うこととした。実験用植物としてイネを予定していたが、簡易に短時間で生育する植物に変更した。

## 4. 研究成果

第1段階から第2段階にかけて、ミクロン RI イメージングの有効性を検討するため、ミクロン RI イメージングと相補的な分析法である PIXE

元素分析法により動物及び植物中の金属元素の濃度及び分布等を測定した。

次に、第1段階の前半 (平成 23 年度) で、1) ピンホールカメラの幾何的条件および機械的条件をシミュレーションにより検討し、コリメータ (材質: W) の穴径/厚さで決定される視野範囲・バックグラウンドなどの最適化を行った。これにより、厚さによって視野が顕著に変化すると予想に反し、視野中心の感度はコリメータ厚さに依存せず、また、視野範囲はほとんどの幾何配置条件において一定となることが分かった。同様にバックグラウンドを低く保つには、厚さを 5  $\mu\text{m}$  程度と穴径に比較して厚くすることが有効であることが分かった。さらに、2) ピンホールの基板の作成について検討を行った。コリメータとして有望な 5  $\mu\text{m}$  程度の W 膜は単体では形状を保つことはできないことが分かった。Si 板上に W 膜を蒸着する方法が考えられた。しかし、基板全面に蒸着するとそりを生じさせる可能性があることが分かり、穴周辺だけに蒸着を施すと良いことが分かった。次に、3) X 線 CCD カメラの性能評価を行った。X 線 CCD 撮影画像の画素値には放射線によって誘起された電荷量のほか、暗電流ノイズ・読み出しノイズという不可避な雑音が含まれ、X 線検出信号をこれらと分離するには十分なノイズ特性とエネルギー分解能が必要であることが分かった。鉄 55 線源を使用してエネルギースペクトルを取得し、信号/雑音の分離特性の調査を行ったところ、ノイズと X 線は十分に分離できることが分かった。

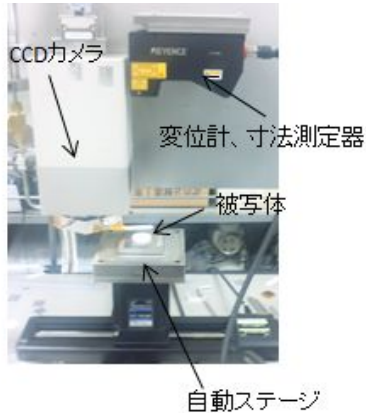


CCDカメラのMn K- $\alpha$ 線のエネルギースペクトル

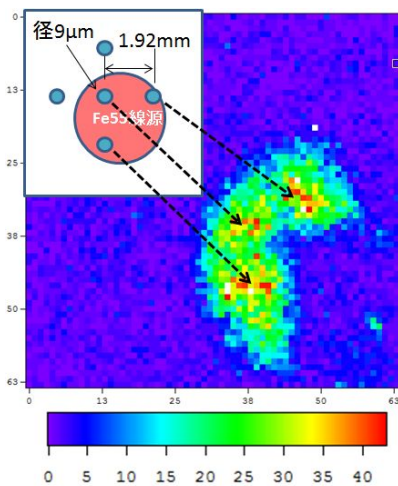
また、暗電流ノイズは露光時間に比例して増大するが、X 線の統計量確保に必要な測定時間内ではほぼ影響しないことが分かった。

第一段階の後半 (平成 24 年度) で、1) ミクロンピンホールコリメータ金属膜を製作した。ピンホールコリメータ (数  $\mu\text{m}$ ) の製作が可能な厚さ 4  $\mu\text{m}$  のシリコンウエハに金を蒸着し、半導体微細構造技術を応用して、直径 9 ~ 13  $\mu\text{m}$  のピンホールの製作に成功した。つぎに、2) ミクロン 2次元 RI イメージングシステムを、X 線 CCD カメラを使用した X 線計測システム、製作したピンホール、これらを支持するゴニオステージシステム (測定幾何条件の調整用) を組み合わせて製作した。鉄 55 線源を用いて、

性能評価を行い、高分解能のRIイメージングの撮影に成功した。



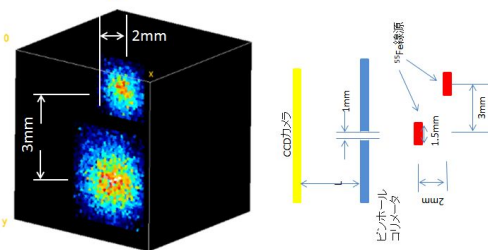
ミクロン2次元RIイメージングシステム



9 μm径のピンホール画像

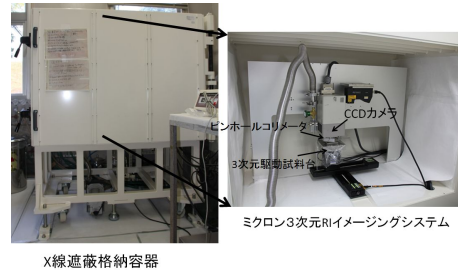
第2段階の前半(平成25年度)で、1)ピンホール金属膜の微小3次元駆動システムを製作した。RIの3次元イメージングを実現するには、複数方向から画像を取得する必要がある。そこで、ピンホール金属板とCCDカメラの受光面を固定して、被写体を水平に2次元で微小移動できる駆動ステージを製作し、さらにピンホール金属膜と被写体との距離を微小変化できるような構造にした。次に、2)深度情報解析アルゴリズムの開発を行った。ピンホールから得られる画像は2次元画像であり、鉄55の3次元分布を得るためには、深度方向の分布の情報を得る必要がある。そこで、ピンホールの位置を平行にずらして撮像し、丁度、両眼でものを見るような条件で測定し、これを解析することにより深度方向の分布を得る方法を考案した。これは、当初、考えていたML法を用いる方法より、はるかに簡単な方法であることが分かった。これらの技術を基にして、3)ミクロンRI3次元イメージングシステムの製作と鉄55点線源によるその性能評価を行った。微小3次元駆動システム、X線CCDカメラ、ピンホール金属膜及び全装置を制御するシステムを開発し、ミクロンRI3次元システムを製作した。鉄55の点線源によるRI3

次元イメージングを行い、3次元画像を得ることに成功した。

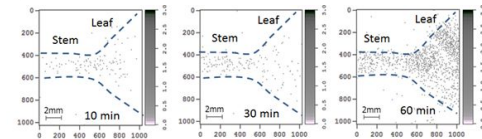


ミクロン3次元RIイメージング

第2段階の後半(平成26年度)においては、ミクロンRI3次元イメージングシステムを用いて植物中の鉄55のイメージングの実験を行った。1) RI管理区域内に、鉄55を含んだ溶液中で植物を生育できる人工気象器を導入し、カイワレ大根、小松菜などを生育した。2) ミクロンRI3次元イメージングシステムを低放射線環境下で使用可能にするために、本装置を納入できる容積を持つ遮蔽体で覆った容器を作成し、人工気象器に隣接して設置した。



3) 鉄55溶液を作成し、小松菜を水栽培し、鉄55を含んだ新芽試料を作成し、ミクロンRI3次元イメージングシステムで新芽中での鉄の分布とその動態測定を行った。感度を上げるために、空間分解能を約2mmにして観察した。鉄55は、投与してから10分後ではそれほど移行しないが、30分~60分後に茎から葉にかけて急激的に移行することが観測され、初めて植物中の鉄55の動きをイメージングすることに成功した。



小松菜の新芽中における鉄55の時間変化を画像化

## 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10件)

丸山隆史、石井慶造 他、ミクロンRIイメージングシステムによる植物中の鉄の動態観察、査読無、第30回PIXEシンポジウム要旨集、平成26年10月22日、P38

S.Inagaki, Y.Sato, K.Ishii et al., Development

of micron RI imaging system, 査読無, Abstract book of 8<sup>th</sup> International Symposium on BioPIXE, September 14, 2014, P67

稲垣俊輔, 佐藤由良, 石井慶造, ミクロン RI イメージングシステムの開発, 査読無, 日本原子力学会「2014 年秋の大会」予稿集, 平成 26 年 8 月 22 日, P756

K.Ishii et al., Application of PIXE analysis to investigation of plants cultivated with contaminated soil of Fukushima, 査読有, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 332 (2014) 46-49

Hiroyuki Sugai, Keizo Ishii, et al., PIXE analyses of cesium in rice grains, 査読有, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 318 (2014) 191-193

A. Ishizaki, K. Ishii, et al., Concentration of Cs in plants and water resulting from radioactive pollution, 査読有, Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B 318 (2014) 105-108

H. SUGAI\*, K. FUJIKI, K. ISHII, et al., "Improvement of the Detection Efficiency of the In-Air Submilli-PIXE Camera for Biological Application", 査読有, International Journal of PIXE Vol. 22, 1 & 2. (2012) 37-43

S. HIRAISHI, K. ISHII, "PIXE Study on the Growth Environment of Plants", 査読有, International Journal of PIXE Vol. 22, 1 & 2. 201-206 (2012)

A.Terakawa, K.Ishii, H.Yamazaki, et al: "PIXE analysis of amurine solid tumor treated with proton therapy combined with cisplatin", 査読有, X-Ray Spectrometry 40. 198-201 (2011)

S.Ohkura, K.Ishii, S.Matsuyama, et al: "In vivo 3D imaging of Drosophila melanogaster using PIXE-micron-CT", 査読有, X-Ray Spectrometry 40. 191-193 (2011)

(学会発表) (計 11 件)

丸山隆史, 石井慶造 他, ミクロン RI イメージングシステムによる植物中の鉄の動態観察, PIXE 研究協会 第 30 回 PIXE シンポジウム, 平成 26 年 10 月 22 日, 岩手医科大学 循環器医療センター, 盛岡

Y.Sato, K.Ishii et al., Development of micron RI imaging system, 8<sup>th</sup> International Symposium on BioPIXE, September 16, 2014, Bled, Slovenia

石井慶造 他, ミクロン RI イメージングシステムの開発, 日本原子力学会「2014 年秋の大会」, 平成 26 年 9 月 10 日, 京都大学 吉田キャンパス, 京都

寺川貴樹, 石井慶造 他, キノコにおけるアルカリ金属元素移行研究への PIXE 法の応用, 日本原子力学会, 2014 年春の大会, 2014 年 3 月 26 日 ~ 28 日, 東京都市大学世田谷キャン

パス, 東京

寺川貴樹, 石井慶造 他, PIXE 法を用いたシイタケにおけるアルカリ金属元素の移行に関する研究, 第 29 回 PIXE シンポジウム, 2013 年 11 月 13 日 ~ 15 日, 福井県若狭湾エネルギー研究センター, 若狭

押川峻, 石井慶造 他, 植物中微量元素の生育土壌依存性調査への PIXE 分析法への応用, 日本原子力学会, 2013 年秋の大会, 2013 年 9 月 3 日 ~ 5 日, 八戸工業大学, 八戸

石井慶造 他, マイクロピンホールカメラを用いた X 線画像の取得のための基礎検討, 日本原子力学会, 2013 年秋の大会, 2013 年 9 月 3 日 ~ 5 日, 八戸工業大学, 八戸

能澤雄一郎, 石井慶造 他: "造影剤を用いたショウジョウバエの X 線動画撮影" PIXE シンポジウム. (20121107-20121109). 東京工業大学, 東京

唐橋昌宏, 石井慶造 他: "PIXE と軽元素核反応を併用した多元素同時分析法の開発" PIXE シンポジウム. (20121107-20121109). 東京工業大学, 東京

菅井裕之, 石井慶造 他: "画像 PIXE 法による土壌および植物中の Cs 元素の分析" PIXE シンポジウム. (20121107-20121109). 東京工業大学, 東京

S.Hiraishi, K.Ishii, S.Matsuyama, et al: "PIXE study on the growth environment of plants" Seventh International Symposium on Bio-PIXE. (20111101). 東北大学, Sendai

T.Kawamura, Y.Ito, A.Terakawa, K.Ishii, et al: "Submilli-PIXE analysis of a murine fibrosarcoma tumor treated with proton therapy combined with cisplatin" Seventh International Symposium on Bio-PIXE. (20111101). 東北大学, Sendai

(図書) (計 1 件)

(産業財産権)

出願状況 (計 1 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況 (計 1 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:

国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

石井 慶造 (ISHII, Keizo)  
東北大学・工学研究科・教授  
研究者番号: 00134065

(2)研究分担者

寺川 貴樹 (TERAKAWA, Atsuki)  
東北大学・工学研究科・准教授  
研究者番号: 10250854

松山 成男 (MATSUYAMA, Shigeo)  
東北大学・工学研究科・准教授  
研究者番号: 70219525

人見 啓太郎 (HITOMI, Keitaro)  
東北大学・工学研究科・准教授  
研究者番号: 60382660

(3)連携研究者

森 敏 (MORI, Satoshi)  
東京大学・農学生命科学研究科・名誉教授  
研究者番号: 90011915