

RI と各種の要素技術で米粒中のカドミウム分布の可視化に挑む



廣瀬 農
Hirose Atsushi

1 はじめに—米内部の Cd 分布—

カドミウム (Cd) はイタイイタイ病の原因となった重金属であり、その主要な摂取経路は米である。Cd による米の汚染と健康被害の全体像については多数の既報が存在するため、ここでは1粒の米の内部における Cd の分布に絞って述べる。一般的に、カリウム (K)、マグネシウム (Mg) 等の金属元素 (いわゆるミネラル) は、玄米の表面付近に存在する糊粉層及び胚に集積することが知られている。糊粉層や胚は精米処理によって「米ぬか」として取り除かれるため、K や Mg は精米によって大きく濃度が減少する。これに対し Cd は、精米による濃度低下の割合が小さいことから、白米つまりは胚乳内にも分布していることが古くから知られてきた。ただし、胚乳に多く存在しているとはいえ、その濃度は元素マッピングで頻用される SEM-EDX や EPMA の検出限界よりも3桁程度低く、これらの装置による可視化は困難である。近年では放射光や LA-ICP-MS を用いたイメージングが行われるようになってきたが、その報告例はまだ少なく、イネの種子内部における Cd の分布・動態の詳細については未解明な部分が多く残されている。

筆者らは、登熟期イネ種子内部における Cd の3次元分布の変化を、古典的手法であるオートラジオグラフィ (ARG) にいくつかの要素技術を組み合わせることで可視化した。本稿では、可視化に至るまでの技術的な試行錯誤と、その結果得られたデータの一部を紹介する。

2 粘着フィルム法による凍結切片の作成

ARG とは、RI を含む試料と感光体を密着させることで、試料内の RI 分布を2次元画像として取得する分析法である。本研究では Cd の RI として ^{109}Cd 、感光体としてはイメージングプレート (IP) を使用した。米粒は立体であるため、ARG で分布を分析するためには薄い平面状の試料、すなわち切片を作製する必要がある。生物試料から切片を得る方法にはいくつかの方法が存在するが、本研究では水溶性 Cd の移動を避けるために凍結切片法を採用した。この手法では低温で固化する樹脂内に凍結した試料を埋め込み、クライオトームと呼ばれる装置で包埋剤ごと試料を削って切片を作成する (木材をカンナで削るイメージである)。しかし、研究開始当初に試みた一般的な凍結切片作製法では、作成した切片は粉末つまりはコメ粉になってしまい、切片を得ることはできなかった (図 1a)。

この時、切片こそ得られなかったものの、包埋剤

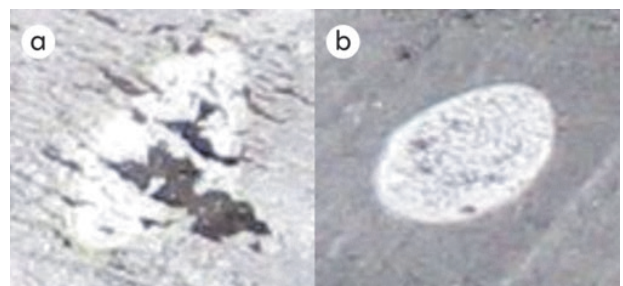


図1 粘着フィルムの効果
a: フィルム無し b: フィルム有り

に埋まったままの種子の断面に IP を押し付けて得た像からは、胚乳内部に不均一に ^{109}Cd が分布している様子がうかがえた。そこで、何とかして切片を作成して詳細な像を得たいと文献検索を続けて見つけたのが、粘着フィルムを包埋ブロックに貼付してから切片を作製する方法（川本法）である¹⁾。一般的にはマウスの全身凍結切片作製等に用いられている方法であるが、これがイネ種子からの切片作製にも応用できることを示した文献²⁾を見つけられたのは幸運であった。実際に川本法のキットを入手して試したところ、**図 1b**のようにきれいに形状の保たれた切片を、非常に高い成功率で作成できることが分かった。川本法を使用すると、微視的には切片が粉碎されていたとしても、相対的な位置は保持したままフィルム上に残る。このため、開花後間もない時期の胚乳のように、試料内の液状の部分からも凍結切片を作製可能であり、この点も登熟過程のイネ種子の解析に好都合である。

3 連続切片像からの 3 次元画像再構築

川本法の採用により、1つの試料から数十枚の連続切片を欠落無く作製できるようになった。そうになると、一連の連続切片のデータを重ね合わせ、RI の立体分布を取得してみたいという欲が出てきた。とはいえ、数十枚のオートラジオグラムを1枚1枚手作業で回転・平行移動して重ね合わせる方法では時間がかかりすぎるし、重ね合わせの際に主観が入ることは望ましくない。そこで、自動レジストレーションが可能なソフトウェアを複数試用し、ImageJ のプラグインである StackReg³⁾ が有望であるという感触を得た。しかしながら、オートラジオグラムには種子そのものの形状データは含まれないため、1粒1粒の試料のデータを個別に自動処理すると、種子断面の形ではなく RI 分布同士の類似性をもとに位置合わせが行われてしまい、正しい 3 次元分布が得られない。この対策として考案したのが、数十粒の試料を単一のブロックに包埋し、更にブロックの 4 隅に ^{109}Cd を吸収したイネの根をポジションマーカーとして埋め込んだ状態で連続切片を作成する方法である（**図 2**）。この方法で作成した切片には数十粒の試料が同時に含まれるため、切片ごとに1粒の種子内の分布形状は変動しても、種子同士、及び

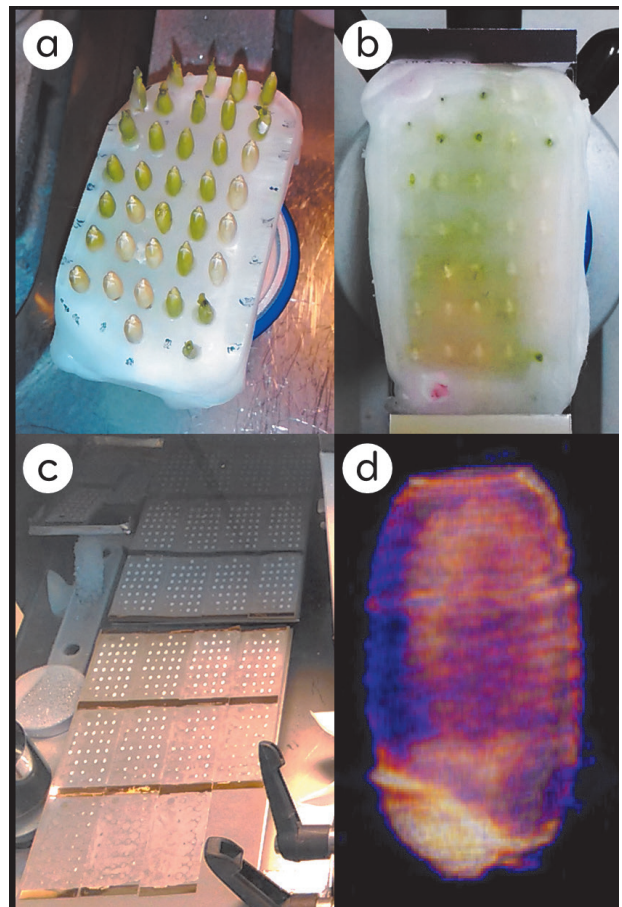


図 2 種子の包埋と連続切片作製の様子

a: 面出した包埋剤の上に凍結した種子を接着 b: 種子の隙間に包埋剤を充填し、川本法で切片化 c: 作製した切片をウレタンフォームで裏打ち d: ImageJ によって得られた ^{109}Cd の 3 次元分布像

種子とポジションマーカーの大まかな位置関係は保たれる。これによって単一種子をレジストレーションした時と比較して位置合わせの精度が大きく向上した。

4 シミュレーションによる ARG 条件の最適化

^{109}Cd は X 線の放出率が高く、汎用 IP である BAS-MS で容易に撮像できる核種である。このため、 ^{109}Cd を使い始めた当初は特に深く考えることなく、BAS-MS を用いてオートラジオグラフィを行っていた。しかし、 ^{109}Cd の放出する放射線について少し知識が増えるにつれ、BAS-MS は必ずしもベストな IP ではないのでは？ という疑問を感じるようになった。 ^{109}Cd の放射線のうち、X 線・ γ 線は全放出エネルギーの 25% 程度を占めるにすぎず、残りのエネルギーは数 keV ~ 数十 keV のオージェ電子や

内部転換電子として放出されている。これらの飛程の短い電子を ARG で検出することができれば、より高感度・高分解能の像が得られるはずだが、BAS-MS 表面の保護層はこれらの電子線を止めてしまっているのではないだろうか？そのような観点から IP の選択を再検討したところ、製品名から ^3H 検出専用の IP と思い込んでいた BAS-TR (TRitium) が、 ^{109}Cd の撮像にも有用である可能性に気が付いた。BAS-TR は ^3H の微弱な β 線を検出するため、表面保護層を持たない。このため、 ^{109}Cd の電子線も効率良く検出できるはずである。

とは言え、BAS-TR は原則として 1 回のみでの使用が推奨されており、気軽に使い捨てできるほど安価でもない。そこで実際に BAS-TR の購入を行う前に、放射線輸送計算コード EGS⁵⁾ を用いたシミュレーションを行い、保護層の有無が ARG に与える影響を検討することとした。また、切片が厚くなるほど感度の面では有利である一方で、IP との接触面から離れた RI から放出された光子の寄与率が上がり、解像度は低下すると推定されたことから、切片厚についても同時に検討した。

シミュレーションの結果からは、保護層の薄い高精細用 IP である BAS-SR に $50\ \mu\text{m}$ 厚切片を組み合わせた場合は電子線（オージェ電子、内部転換電子）の潜像形成への寄与率が 40% 程度であるのに対し、BAS-TR と $5\ \mu\text{m}$ 厚切片を組み合わせた場合では約 75% まで増加すると推定された。また、保護層のない BAS-TR と $5\ \mu\text{m}$ 厚切片の組み合わせは、BAS-SR に $20\ \mu\text{m}$ 厚切片を組み合わせた場合と同等の感度を保ちつつ、解像力は 2 倍程度となるという予測も得られた。

以上の結果をもとに BAS-TR の購入に踏み切り、実際の切片を用いて検証を行った結果、BAS-TR と $5\ \mu\text{m}$ 厚切片を組み合わせることで、BAS-SR + $5\ \mu\text{m}$ 厚切片の場合、あるいは BAS-TR + $40\ \mu\text{m}$ 厚切片の場合と比較して高画質の画像が得られることが確認できた（図 3）。この検証の過程で、包埋剤の粘着性によって BAS-TR に試料が張り付いてしまうことが判明したが、BAS-TR を複数回使用する目的で販売されている $1.2\ \mu\text{m}$ 厚のフィルムで切片表面を覆うことで、画質を大きく損なうことなく使用できることも分かった。

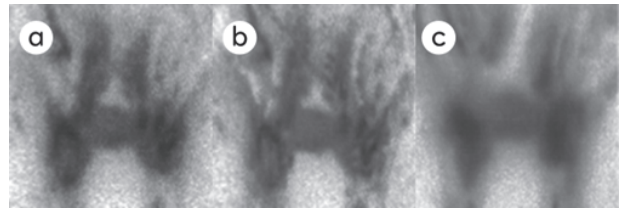


図 3 IP 種別と切片厚が画質に与える影響

^{109}Cd を吸収させたイネの節の隣接切片で比較した。a : BAS-SR + $5\ \mu\text{m}$ 厚切片 b : BAS-TR + $5\ \mu\text{m}$ 厚切片 c : BAS-TR + $40\ \mu\text{m}$ 厚切片

5 米粒内の Cd の 3 次元分布

以上の要素技術を組み合わせて得られたデータの一例を示す。図 4 は出穂直前のイネの水耕液に ^{109}Cd もしくは ^{65}Zn を添加し、特定の開花後日数で採取した種子内の RI 分布を可視化したものである。種子の横断面の分布は BAS-TR で直接得ているのに対し、矢状面の分布は横断面の連続切片のデータから再構築している。受粉直後の米粒内では Cd はあまり明確な局在を示さないが、登熟中期から独特の分布が形成される。胚乳内部に分布しているのは従来言われていたとおりだがその分布は均一ではなく、胚に接続する風船状構造とでも言うべき分布である可能性が示唆された。Cd の分布と比較するため、同族かつ植物の必須元素である亜鉛 (Zn) の分布も可視化したが、図 4 が示すとおり Cd とは大きく異なる分布を示した。Zn に限らず、今回 Cd で観察された分布を示す元素は筆者の知る限りは無い。この分布が形成される理由については確定的な結論を得られていないが、現時点では Cd の流入経路と胚乳内の物質生産が複合的に影響していると考えている。考察の詳細については図 4 の原著⁵⁾をご参照いただきたい。 ^{109}Cd の添加時期が Cd の分布に与える影響や、マイクロオートラジオグラフィによる Cd 局在部位の検証結果についても報告している。

6 おわりに

本稿では筆者らが開発・実施したイメージング手法について、論文では通常記載しない技術上の試行錯誤に力点をおいて紹介した。一般的に、ある手法が開発されている時期は多くの変法やその利点・欠点についての知識がコミュニティ内で共有されているが、手法が確立・洗練された後は代表的なプロト

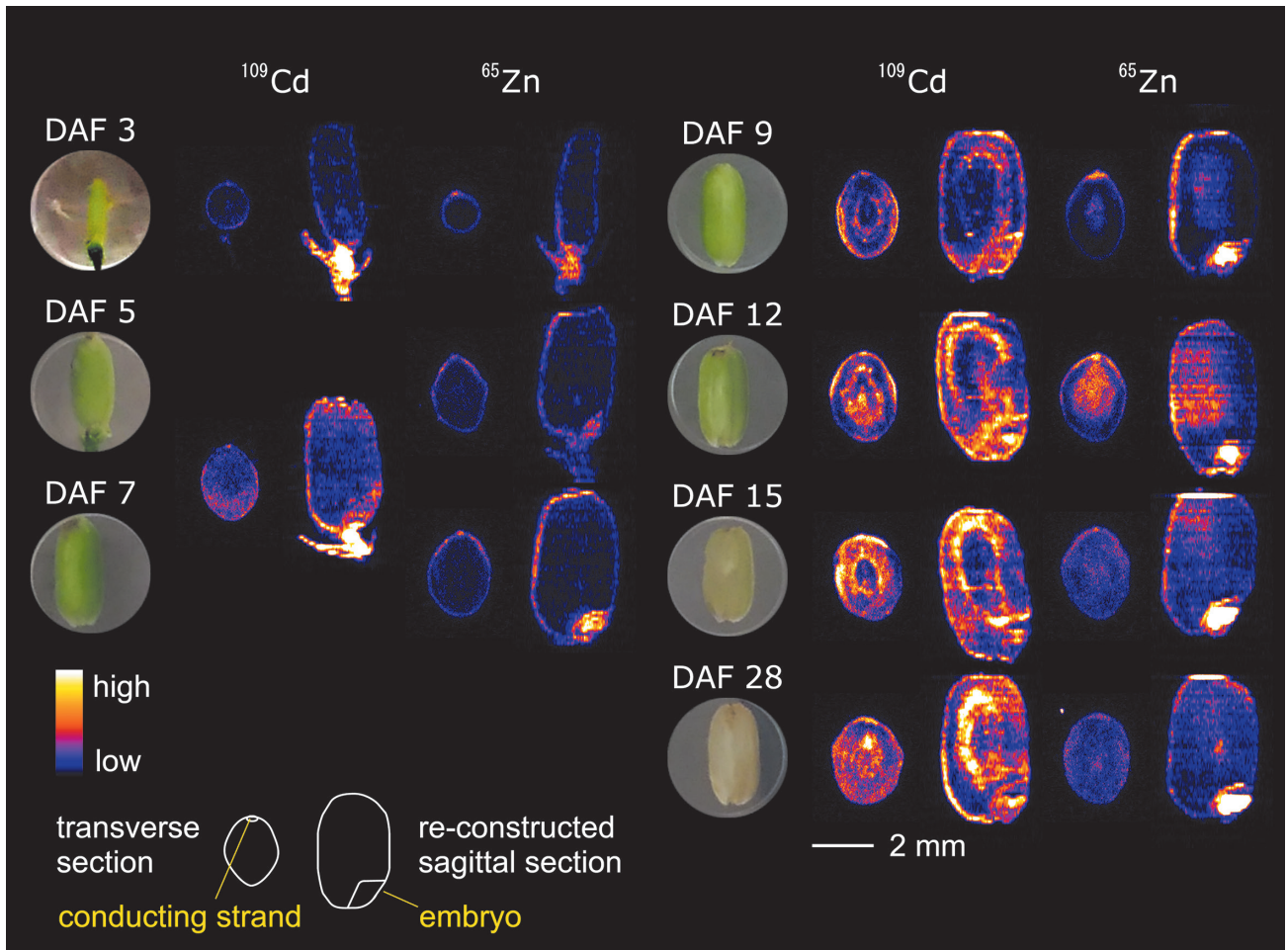


図4 登熟過程におけるイネ種子中の ^{109}Cd と ^{65}Zn の分布 (参考文献5) Fig.1A を一部改変)

^{109}Cd と ^{65}Zn の横断面及び矢状面の分布の変化を可視化した。シグナル強度は対数表示。DAFは開花後の日数を示す

コル以外の周辺情報は失われていく。筆者には ARGはこの時期にさしかかっているように思われ、泥臭い部分についても情報共有したいと考えた。読者諸氏が今後 ARGについて検討される際に、何か1つでも参考にしていただけることがあったなら、望外の幸せである。

参考文献

- 1) Kawamoto, T., *Archives of Histology and Cytology*, **66** (2), 123-143 (2003)
- 2) 川本忠文, *科学*, **77**(6), 567-568 (2007)
- 3) Thevenaz, P., *et al.*, *IEEE Transactions on Image Processing*, **7**(1), 27-41 (1998)
- 4) Hirayama, H., *et al.*, *The EGS5 code system.*, United States Department of Energy (2005)
- 5) Hirose, A., *et al.*, *Plant Direct*, **8**(1), e562 (2024)

(星薬科大学 薬学部)