

博士論文

論文題目 シロイヌナズナにおける放射性同位元素を用いた
無機元素動態の可視化技術の開発

氏 名 杉田 亮平

目次

第1章	序論.....	1
第2章	リアルタイム RI イメージングシステムの定量性.....	8
第1節	定量範囲測定.....	8
2-1-1	実験方法	9
2-1-2	結果と考察	10
第2節	FOS と試料間の距離が定量性に及ぼす影響	13
2-2-1	実験方法	13
2-2-2	結果と考察	14
第3節	シロイヌナズナにおける自己吸収の影響	15
2-3-1	実験方法	15
2-3-2	結果と考察	17
第4節	遮蔽材を用いた、自己吸収が定量性に及ぼす影響の推定.....	20
2-4-1	実験方法	21
2-4-2	結果と考察	21
第5節	シミュレーションを用いた自己吸収の影響の検証.....	23
2-5-1	実験方法	23
2-5-2	結果と考察	24
第3章	間欠照明システムの構築による様々な核種における 輸送動態の可視化および動態解析.....	52
第1節	間欠照明システムの構築.....	52
3-1-1	諸言	52
3-1-2	実験方法	53

3-1-3	結果と考察	54
第 2 節	RI 像と実画像の同時取得システム	55
3-2-1	実験方法	55
3-2-2	結果と考察	56
第 3 節	様々な核種を用いた RRIS 連続撮影および積み下ろしの解析	57
3-3-1	実験方法	58
3-3-2	結果と考察	60
第 4 章	光合成産物における輸送動態の可視化	81
4-1	諸言	81
4-2	実験方法	81
4-3	結果および考察	84
第 5 章	総合考察	99
引用文献	107
謝辞	113
論文の内容の要旨	114

略語表

cpm	count per minute
CCD	charge coupled device
EGS	Electron Gamma Shower
FOS	fiber optic plate with scintillator
GaAsP	gallium arsenide phosphide
IP	Imaging Plate
MCP	micro channel plate
MGRL	Molecular Genetics Research Laboratory
MRI	magnetic resonance imaging
PC	polycarbonate
PE	polyethylene
PET	polyethylene terephthalate
PET	positron emission tomography
PETIS	Positron Emitting Tracer Imaging System
PPS	polyphenylenesulfide
PSL	photostimulated luminescence
PlanTIS	Plant Tomographic Imaging System
R ²	R-squared, 決定係数
RI	radioisotope
ROI	region of interest
RRIS	real-time radioisotope imaging system
S/N 比	signal-noise 比
VIPER	Versatile Imager for Positron Emitting Radiotracers

第1章 序論

植物の生育と無機元素

植物は17の必須無機元素を選択的に吸収・代謝することで生長している。炭素以外の無機元素は主に根によって土壌から吸収されるため、作物生産の現場では施肥という形で土壌中に無機元素を補い、植物の生育を向上させてきた。ところが、今までの施肥は、生産量の向上を目指すあまり、必要量以上に行われがちであった。過剰の施肥は、生産コストを上げる他、環境への負荷を与える。農作物に吸収されなかった余剰の肥料は、土壌に浸透し、地下水を汚染する。この点、植物栄養学の研究は、最適な施肥量や施肥をするタイミングなど植物生育の最適化、効率化に資することができると考えられる。炭素においては光合成により取り込まれる。炭素は大気中に二酸化炭素として無尽蔵に存在するため、畑作などにおいては施肥を行うことはあまりない。一方、施設栽培においては、冬季に栽培する果菜類を中心に二酸化炭素施用が行われる（大須賀 2003）。これは、栽培施設内の換気が難しい冬場に特に問題となる、施設中の二酸化炭素の減少による植物生長の停滞、いわゆる二酸化炭素飢餓の発生を抑制するためである。二酸化炭素の供給はプロパンガスの燃焼などによって行われる。近年では植物工場が注目されつつあり、これは、光源、湿度や二酸化炭素濃度などの植物生育環境を制御した、閉鎖的な空間での栽培システムである。天候に左右されないこの栽培システムは、作物の生産量・価格の面で市場への安定的な供給が可能となるため、社会的にも大きな期待がよせられている。そのため、二酸化炭素施肥の需要は今後ますます高まっていくと考えられる。

植物体内に吸収された無機元素は、生長する組織に輸送される。他の組織へ元素を供給する組織はソース器官、元素を受け入れ盛んに生長する組織や次世

代のために貯蔵する組織はシンク器官と呼ばれる。シンク器官とソース器官の関係を把握することは、農作物の収量を向上するため重要と目されるため、これまで様々な研究が行われてきた。植物の個体レベルでは、シンクやソースの切除によるシンク・ソース能の解析（田中ら 1972, Ofosu-Budu *et al.* 1995）や、ソース器官である一枚の葉とシンク器官である根のみから成り立つモデル植物を用いた解析（Sawada *et al.* 1986, 1987）などが行われてきた。組織レベルにおいては、光合成産物の転流経路の解析（長南 1986, Turgeon *et al.* 1996）などが行われている。近年は、分子レベルでの研究が盛んであり、光合成産物であるスクロースや単糖の輸送体（Baroja-Fernández *et al.* 2012, Toyofuku *et al.* 2000）をはじめ、元素の吸収や分配機構を制御する遺伝子の単離や機能解析が進められてきている。物質の移動を追跡する目的には、放射性同位元素（RI; radioisotope）を用いたトレーサー実験（追跡実験）は古くから用いられてきた強力な手法である（Bukovac *et al.* 1957, Biddulph *et al.* 1958）。RIの検出には、液体シンチレーションカウンターや γ カウンターなどによる放射線計測の他、IP (Imaging Plate) などによるオートラジオグラフィーが用いられる。これらの解析法では、植物を切断・粉碎といった操作が必要であり、生きたままの植物を試料として取り扱うことはできない。ところが、シンク・ソースのバランス、およびこれらをつなぐ輸送は刻一刻と変化するため、生きた植物を経時的に解析することで、破壊実験では得られなかった新しい知見が見出されることが期待される。

ライブイメージング

植物体内における物質輸送の経時的解析手法の一つとして、RIを用いたライブイメージングが挙げられる。ライブイメージング装置の例として、医療診断に利用されているPET (positron emission tomography) を植物に応用したシ

システムがある。PETの検出原理は、ポジトロン（陽電子）放出核種に由来するポジトロンが電子と対消滅し、 180° 反対方向に同時に発生する消滅 γ 線を、対向に配置した2台の検出器で同時検出することにより画像を構築するというものである。PETの原理を植物に応用した例には、磁気共鳴画像(MRI; magnetic resonance imaging)による3次元画像とポジトロン放出核種のイメージングを重ね合わせたシステム、PlanTIS(Plant Tomographic Imaging System, Jahnke *et al.* 2009, Beer *et al.* 2010, Loukiala *et al.* 2010)、20 cm x 30 cmといった広範囲の撮影を可能としたシステム、Duke VIPER (Versatile Imager for Positron Emitting Radiotracers, Kiser *et al.* 2008)、検出器が小型、かつ可動式のシステム、PhytoBeta imager (Andrew *et al.* 2012)、空間分解能が高いシステム、PETIS (Positron Emitting Tracer Imaging System, Fujimaki *et al.* 2010) やポジトロン放出核種と γ 線放出核種の同時検出が可能なシステム、phoswich imaging detector (Wu *et al.* 2011) などがある。核種としては ^{11}C (Minchin *et al.* 2003, 伊藤ら 2010) の他、 ^{13}N (Ohtake *et al.* 2001)、 ^{15}O (Kiyomiya *et al.* 2001, Nakanishi *et al.* 2001)、 ^{52}Fe (Tsukamoto *et al.* 2009)、 ^{52}Mn (Tsukamoto *et al.* 2006) や ^{107}Cd (Fujimaki *et al.* 2010) などが利用されている。これらのシステムの特徴は定量性に優れている点である。放射線エネルギーは、植物体などの遮蔽によりそのエネルギーが減衰（自己吸収）するため、定量性が低下することが問題となる。ポジトロン放出核種が放出する消滅 γ 線は透過力が強いいため、自己吸収の影響が少なく、定量性に優れる。ただし、ポジトロンが放出される位置と、消滅 γ 線が発生する位置との間に数ミリオーダーのずれが生じるため、薄い組織の定量は難しい。さらには、ポジトロン放出核種は、半減期が短いものが多く（ ^{11}C ; 20分）、長期的な植物生理現象の解析が難しい他、核種の調製に大規模な施設を必要とする。

リアルタイム RI イメージングシステムの開発

東京大学放射線植物生理学研究室では、リアルタイム RI イメージングシステム (RRIS ; real-time radioisotope imaging system) を開発している (Nakanishi *et al.* 2009)。RRIS の特徴は、ポジトロン放出核種その他、 β 線放出核種など様々な汎用の RI が利用できることである。また、 β 線放出核種はポジトロン放出核種と比較して半減期が長いものが多く、長期的な解析が可能である。RRIS による放射線の可視化は 4 つのステップにより行われる。すなわち、(1) 放射線は可視光に変換され、(2) 可視光はさらに電子に変換され、(3) 電子は増幅された後、(4) カメラにより検出・撮像されるというものである (図 1-1a)。可視光は微弱なため、撮影は暗箱内で行われる (図 1-1b)。(1) から (4) の各ステップについて、以下に詳細を記す。

- (1) 植物が吸収した RI から放出される放射線は、FOS (fiber optic plate with scintillator) 表面の CsI(Tl)シンチレータにより可視光に変換される (図 1-1a)。FOS は、プレート状に束ねられた光ファイバーに、CsI(Tl)シンチレータが厚さ 100 μm に蒸着され、さらに、厚さ 10 μm の保護材に覆われている。FOS (縦 10 cm x 横 10 cm) は 2 枚並べて使用するため、可視化できる範囲は縦 20 cm x 横 10 cm である。
- (2) 可視光は GaAsP (gallium arsenide phosphide) イメージインテンシファイア (C8600-04、浜松ホトニクス製) の光電面により電子へと変換される。
- (3) 変換された電子は電子増倍管の一種である MCP (micro channel plate) により増幅される。
- (4) 増幅された電子は最終的に CCD (charge coupled device) カメラ (C3077-70、浜松ホトニクス製) により検出、撮像される。撮影画像の解像度は、1 pixel 当たり 400 μm である。カメラの撮影制御および画像解析

は、計算機ソフト：AQUACOSMOS（浜松ホトニクス製）で行う。暗箱は 60 cm x 40 cm x 40 cm の大きさのものが備わっている。

リアルタイム RI イメージングシステムの課題

今後 RRIS を、多種類の元素動態の解析に利用していくためには、克服すべき大きな課題が 2 点あると考えられた。1 点目は、自己吸収が定量性に及ぼす影響度合いを把握すること、2 点目は、RRIS 撮影と植物への照明を両立させるためのシステムを構築することである。1 点目の課題は、定量的な解析の実現につながる問題である。 β 線は、物質との相互作用が大きいことから透過力が弱く、特に ^{14}C （最大エネルギー；157 keV）などの弱い β 線を放出する核種の検出においては自己吸収の影響が顕著である（Klein *et al.* 2000）。そこで、核種ごとに自己吸収の度合いを把握し、定量的解析が可能となる条件を明らかにすることが必要と考えられた。2 点目の課題である、RRIS 撮影と植物への照明の両立は、生きた植物の生理活動を解析対象とするために欠かせない。ところが、RRIS に用いるカメラシステムは、高感度である反面、強い光に対して脆弱であり、カメラに強い光が入射すると故障原因になる。FOS は光を透過することから、カメラに照明の光が入射することを防ぐためには、FOS を遮光する必要があった。そこで、植物を明条件下で撮影する際には、植物と FOS との間に遮光のためにアルミ板を設置してきたが、アルミ板の放射線遮蔽効果により、RI の検出感度が低下するという難点があった。特に、 ^{35}S （最大エネルギー；167 keV）のような低エネルギー β 線放出核種の検出はほとんど不可能になってしまう（Yamawaki *et al.* 2009）。このような問題により、RRIS は強い β 線エネルギーを放出する ^{32}P など限られた核種を対象とした研究（Kanno *et al.* 2007）に利用されてきた。

本研究では、対象の植物をシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) として、様々な無機元素における輸送動態の可視化を目的とした、RRIS の「定量性の評価」、「改良」、および「応用」を行った。まず、様々な核種に対する RRIS の定量性を評価した。すなわち、RI 線源および各 RI を吸収させたシロイヌナズナの各組織を用い、定量可能な範囲を組織別に検証した。次に、RRIS の撮像と植物への照明を両立させるためのシステム構築を、さらに RI 像と実画像の同時撮影システムの構築を行った。こうした基本システムの改良の後、シロイヌナズナの体内における様々な核種の輸送動態を可視化し、動態の特徴から元素動態を三つのカテゴリーに分けることで、輸送様式のパターンを推察した。さらには、元素の輸送途中の各組織への供給メカニズムの解明を目的とした実験例として、元素の維管束から周囲組織への輸送割合を比較した。また、放射性物質の投与と撮像の同時実施が難しい $^{14}\text{CO}_2$ の動態解析にチャレンジすることで、光合成産物の輸送動態への展開例を示した。

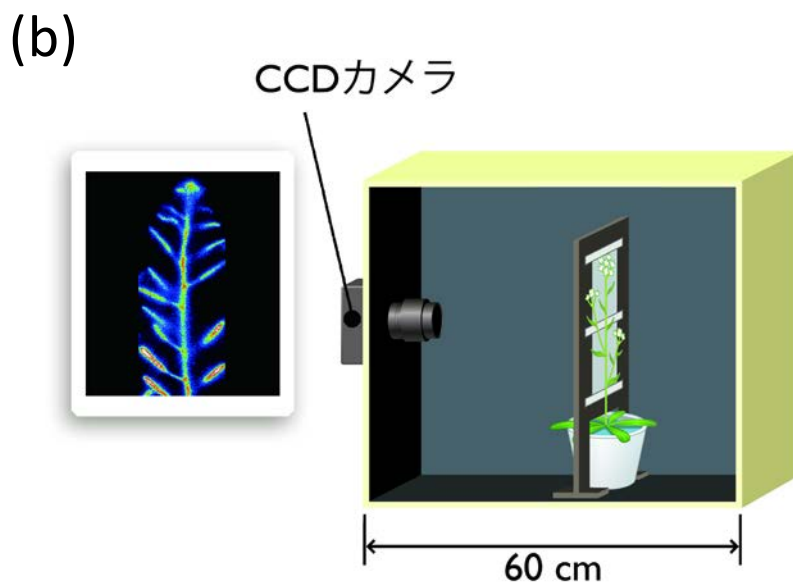
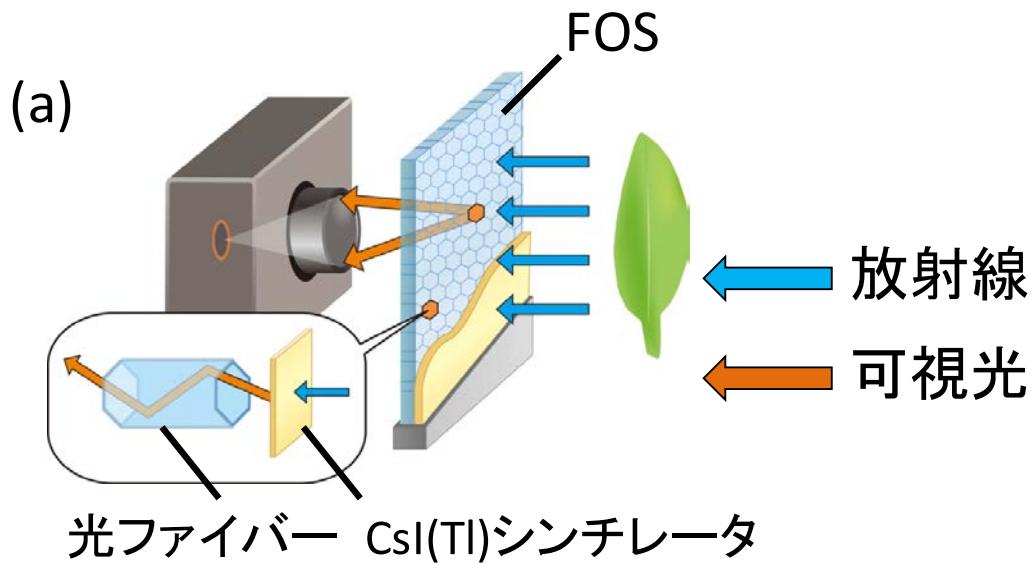


図 1-1 リアルタイム RI イメージングシステム (RRIS) の概略図

- (a) 可視化の概略図。放射線は FOS (fiber optic plate with scintillator) 表面の CsI(Tl)シンチレータにより可視光に変換され、CCD カメラで検出される。光ファイバーにより、可視光の拡散を抑えられた。
- (b) 撮影概略図。可視光が微弱なため、撮影を暗箱内で行った。

第2章 リアルタイム RI イメージングシステムの定量性

第1節 定量範囲測定

RRIS 画像からRI量の経時変化を解析するにあたり、定量可能な範囲（定量下限値 / 上限値およびダイナミックレンジ）を把握することは重要である。

RRIS における定量は、画像のシグナル強度を測定することで行うため、定量可能な範囲を評価する手段として、標準液の希釈系列を実際に RRIS で検出し、検量線を作成する方法がある。過去にこの方法で ^{32}P の定量可能な範囲を解析したところ、RRIS のダイナミックレンジは 2×10^3 であると示された

（Kanno *et al.* 2007）。しかし、RIはエネルギーなどの異なる線質の放射線を放出し、また、同じ濃度（ $\text{Bq}/\mu\text{L}$ ）のRIを比較しても、放出される放射線の量はRIによって異なるため、定量可能な範囲はRIごとに異なると考えられる。そのため、本節では様々な核種における定量可能な範囲を解析し、それらをIPと比較することで、植物研究へのRRISの応用の可能性を評価した。IPを比較対照として用いたのは、測定精度が高く、RIの検出に広く利用されているためである。本実験では、入手可能かつ線質違いを幅広くカバーすることを考え、 ^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs （表 2-1）を解析対象とした。このうち、 ^{28}Mg （半減期；20.9時間）は娘核種の ^{28}Al （2.2分）と永続平衡となる核種である。 ^{28}Mg の放出する β 線エネルギーは、平均 / 最大が 152 keV/860 keV であるが（表 2-1）、娘核種の ^{28}Al の放出する β 線のエネルギーの平均 / 最大値は 1242 keV/2863 keV であり、 ^{28}Mg よりも高い。そのため、RRIS による ^{28}Mg - ^{28}Al の画像化においては、 ^{28}Al 由来の β 線が優勢的であると推測される。

2-1-1 実験方法

^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs においてはポリエチレンテレフタレート製シート（PET；polyethylene terephthalate）に、各濃度のRI標準液を2 μL ずつ滴下し（ $n=6$ ）、スポットを作成した（図2-1a）。スポットの濃度は次の通りである。 ^{14}C ；1.8–14800 Bq/2 μL 、 ^{22}Na ；0.22–1850 Bq/2 μL 、 ^{65}Zn ；7.2–59200 Bq/2 μL 、 ^{86}Rb ；0.22–1850 Bq/2 μL 、 ^{109}Cd ；0.90–7400 Bq/2 μL 、 ^{137}Cs ；0.11–3700 Bq/2 μL 。 ^{14}C は ^{14}C 標識スクロースを用いた。 ^{28}Mg は、 ^{27}Al （ α , 3p） ^{28}Mg 反応により製造した（Iwata *et al.* 1992, 田野井ら 2011）。 ^{28}Mg 溶液の希釈系列を作成し、方眼紙に3 μL ずつ滴下することで（ $n=2$ ）スポットを作成した。各RIのスポットを乾燥させた後、10 μm 厚のポリエチレン製ラップ（PE；polyethylene）で梱包した。 ^{14}C においては、 ^{14}C が放出する β 線エネルギーの減衰を極力防ぐため、PE 製ラップの代わりに1.2 μm 厚のポリフェニレンサルファイド製フィルム（PPS；polyphenylenesulfide）を用いた。各RIのスポットを RRIS で撮影し（積算時間；3, 5, 10, 15 分）、シグナル強度（intensity）を測定した。また、IP（BAS IP MS；GE ヘルスケア・ジャパン製）による画像取得も行った（コンタクト積算時間；3, 5, 10, 15 分）。IP画像の読み取りは FLA-5000（GE ヘルスケア・ジャパン製）を用いて行い、各スポットのシグナル強度（PSL 値；photostimulated luminescence）を測定した。

各スポットのシグナル強度を基に検量線を作成し、RRIS およびIPにおいて各RIの定量可能な範囲を求めた。定量下限値は、 $\sqrt{2} \times 10 \times \sigma$ （ σ ；バックグラウンドの標準偏差）として算出した。定量上限値は検量線の決定係数（ R^2 ）が 0.995 以上を保つ範囲に基づいて決定した。ダイナミックレンジは、定量上限値を定量下限値で除した値とした。

2-1-2 結果と考察

RI線源の作製

RRIS は、pixelごとにシグナルを検出し、画像を構築するため、定量下限値や上限値を決める要因は、pixel当たりのシグナル強度となる。そのため、スポットのシグナル強度から定量性を解析するには、単位面積当たりでの解析が必要であり、測定する関心領域（ROI； region of interest）の大きさが重要となってくる。しかし、スポットの大きさや形が異なる場合、ROIをスポットの形状に合わせて設定することが困難となる。そのため、スポットの作製時に、各スポットの大きさと形を均一にすることが重要であった。また、スポットに用いる台紙の深さ方向にRIが浸透すると、台紙自身により放射線が遮蔽され、例えば ^{14}C などが放出する低エネルギー β 線の正確な測定値が得られなくなる危険性が考えられた。そこで、スポットの作製に当たっては、台紙としてPET製シートを用いた。PET製シートは材質の特性上、深さ方向への浸透がないため、台紙の厚さによる放射線エネルギーの減衰はないと考えられる。さらに、滴下した溶液は表面張力により半球体状に保たれ、横方向への浸透がないため、大きさと形が均一なスポットを作成することができた（図2-1b）。ただし、PET製シートに滴下した2 μL の溶液を常温静置して完全に乾燥させるためには4時間程度を要した。ドラフト内での乾燥作業などを検討したが、空気の対流により溶液が広がってしまうことが分かった。一方、 ^{28}Mg は半減期が短いため（20.9時間）、迅速な試料作製が必要であり、乾燥に4時間を要するPET製シートを台紙に使うことは不利と考えられた。この点、 ^{28}Mg - ^{28}Al が放出する β 線エネルギーは非常に強いため（2863 keV）、台紙の深さ方向への浸透によるエネルギーの減衰は無視できると考えられた。そこで、スポットの台紙として、表面が撥水性のある方眼紙を用いた。同じ液量のスポットで比較した場合、

PET製シートより方眼紙の方がスポットは大きくなったが、滴下直後は溶液が半球体に保たれたため、横方向への浸透は少なく、大きさと形がほぼ均一なスポット画像を取得できた（図2-1c）。ただし、スポットの外周部に沿ってリング状に、シグナル強度が高い領域が存在した（図2-1d）。これは、溶液の接触部分が固定されたまま接触部分近傍での溶媒の蒸発速度が増大し、溶液内において溶質が接触部分へと向かう流れが発生するために現れる、コーヒーステイ現象（Deegan *et al.* 1997）が原因と思われた。

定量可能範囲

RRISの定量下限値は積算時間を増加させてもほとんど変化がなく（図2-2、表2-2）、例えば ^{22}Na に関しては、3-15分で一定して $3 \times 10^{-1} \text{ Bq/mm}^2$ であった。RRISで用いているCCDカメラでは1 pixelにおいて1 photon/frameを検出し、30 frame/secの速度で読み込みを行っている。そして、1 pixelごとに一定時間内に検出したphoton数を積算したものをシグナルとし、画像を構築する。そのため、積算時間が長いほど、シグナルは強くなる。ところが、CCDカメラ内で常に発生している暗電流などによるノイズが、読み取りごとに一定量存在するため、積算時間が増加するとノイズも増加してしまう。したがって、シグナルとノイズの割合（S/N比； signal-noise）は積算時間の延長によって向上することはなく（図2-4a）、多くの核種において、5-15分において定量下限が一定となったと考えられる（表2-2）。バックグラウンドから、積算時間の変化における単位時間当たりの定量下限値（ $\sqrt{2} \times 10 \times \sigma/\text{mm}^2/\text{min}$ ）を算出したところ、RRISでは積算時間10分までは定量下限値が減少したが、10分以降においてはその減少はわずかであったことも（図2-4b）、今回の結果を支持すると考えられる。なお、積算時間を短縮し3分にすると、定量下限値が上がった（表2-2）。これは、計数されるphoton数の減少により、計数誤差の割合

が高まったためと推察される。一方、IPの定量下限値は、積算時間の増加に伴って下がった（表 2-2）。IPは輝尽性蛍光体に放射線のエネルギーが蓄積することを利用しているため（宮原 1998）、積算時間の増加に伴いシグナルが増加し S/N 比が向上したと考えられる（図2-4c）。単位時間当たりの定量下限値も、積算時間の増加とともに減少した（図2-4d）。RRIS とIPの検出原理を考慮すると、積算時間を 15 分以上に増加させるとIPでは積算時間の増加に伴って定量下限値は下がる傾向を示すものの、RRIS における定量下限値はほとんど変わらないと予想される。

定量上限値は、RRIS では積算時間によらず一定であった（図 2-2、表 2-2）。定量上限値が積算時間によって変化しないことは、定量下限値の場合と同様に、CCD カメラの撮像原理によって説明されるものである。つまり、RRIS の定量上限値は、frame 当たりの測定できるカウントの上限が、RRIS の定量上限になるため、画像取得の積算時間は影響されず、放射線の量によって決まると考えられる。なお、スポットには、前述した通り、コーヒースティン現象によるシグナルの偏りが見られた。このことは定量上限値を過小評価し、定量下限値を過大評価する原因になりえるものの、ダイナミックレンジにはあまり影響しないと推測された。次に、IPで検出したスポットを解析したところ、 ^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs 全ての核種において、積算時間が 3 分や 5 分という短時間においては今回の測定したRI濃度の範囲では上限を超えることがなかった（図 2-3）。そのため、上限値を算出することができなかった（表 2-2）。すなわち、積算時間が短い場合、RRIS に比べ、IPの方が上限値は高いと言える。反対に、積算時間を増加した場合、IPの定量上限値は下がり、上限値が算出された。これは、輝尽性蛍光体が吸収・蓄積できる放射線量を超えたためである（宮原 1998）。

本実験により、RRIS は積算時間の増加に伴って定量上限値 / 下限値がほと

んど変化せず、ダイナミックレンジは3桁のオーダーであることが示された（表 2-2）。このことは、RRIS によるライブイメージングでは、積算時間を15分から3分や5分と短くした場合でも、定量性を損なうことなく、物質動態を解析できることを示すものと考えられた。

第2節 FOSと試料間の距離が定量性に及ぼす影響

放射線の性質上、試料がシンチレータ表面から離れると画像の解像度が悪くなるため、定量に影響を与えることが予想される。イネの葉など平坦な組織であれば、植物とFOSを密着して固定し、空間を抑えることが比較的容易である。一方、シロイヌナズナは立体的に枝を伸ばすことや、ロゼット葉、茎生葉は、生長とともに湾曲することから、FOS表面に地上部を固定すると、FOSとの間に部分的に空間が存在する可能性がある。また、生きた植物はRRISでの撮影の間に生長が進むため、FOSと植物試料の間に空間ができる場合もある。そこで、植物試料とFOSの間に空間が存在した場合の定量性について実験的に評価するため、スポット試料とFOSとの間に人為的にスペースを作成し、FOS表面から試料までの距離と、検出されるシグナル強度の関係を調べた。

2-2-1 実験方法

^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs をスポットしたシートに、スポットの領域に穴をあけた0.2-0.4 mm厚のポリカーボネート製シート（PC；polycarbonate）をFOSと試料との間に設置することで、FOSと試料の間に人為的に空間を設け（図2-5a）、RRISで撮影した（積算時間；15分）。スポットの濃度は次の通りである。 ^{22}Na ；0.22–1850 Bq/2 μL 、 ^{28}Mg ；0.17–1360 Bq/3

μL , ^{65}Zn ; 7.2–59200 Bq/2 μL , ^{86}Rb ; 0.22–1850 Bq/2 μL , ^{109}Cd ; 0.90–7400 Bq/2 μL , ^{137}Cs ; 0.11–3700 Bq/2 μL 。

2-2-2 結果と考察

ROIの面積を、RI線源と同一面積（ 3.3 mm^2 、 ^{28}Mg は 5.3 mm^2 ）に設定した場合、 0.4 mm 厚のスペースが存在することで、スペースが無い状態よりもシグナル強度が約3-5割低下した（図2-5b）。シグナル強度の低下の原因は、放射線が放射状に放出されるため、FOS表面での単位面積当たりに入射する放射線の数が減少したことと考えられる。そこで、RI線源から放射線が放射状に広がることを考慮し、ROI同士が重なり合わない最大の大きさをROI（ 51 mm^2 、 ^{28}Mg は 46 mm^2 ）を設定したところ、ROI内のシグナル強度は少なくとも $0.2\text{-}0.4\text{ mm}$ の範囲において空間距離に依存しない結果となった（図2-5c）。この結果により、FOSと試料の間に空間が存在した場合でも、ROI面積を試料面積よりも広く設定することで、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{137}Cs 、 ^{109}Cd を定量的に解析することが可能であることが示された。ただし、実際にRRISを用いて植物体内におけるRIの輸送動態を解析する際には、測定対象とする植物組織上に設定したROI面積が広くなればなるほど、測定対象組織以外の近隣組織から放出された放射線も検出してしまう可能性が高まる。したがって、定量に必要なROI面積をなるべく狭くするためにも、植物試料とFOSの間の距離は極力抑えるように試料を設置することが重要である。ただし、植物試料をFOSへ強固に固定すると、植物への負荷が増加するため、固定方法には工夫が必要である。

第3節 シロイヌナズナにおける自己吸収の影響

放射線は物質との相互作用によってエネルギーを失う。特に植物体の主な構成元素である炭素、酸素、水素などの軽元素は、 β 線に対する遮蔽効果が高い。つまり、植物組織により β 線は自己吸収の影響を強く受けると思われる。一方で、X線や γ 線のような電磁波に対しては軽元素の遮蔽効果は低いため、 γ 線計測では高い定量性が見込める。しかしながら、エネルギーの低い電磁波でも自己吸収を無視できるのかは不明である。このように、自己吸収の影響度合いは核種や植物組織によって異なると考えられるため、定量的な画像解析を行う際に十分検討する必要がある。そこで本節では、シロイヌナズナの組織による自己吸収の影響を確認した。

2-3-1 実験方法

供試植物

供試植物として、温度 22 °C、照度 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 、明 / 暗期 16 h/8 h の条件下、MGRL (Molecular Genetics Research Laboratory) 水耕液 (Fujiwara *et al.* 1992, 表 2-3) で生育させた播種後 31 日目および 43 日目のシロイヌナズナ (*A. thaliana*:Col-0) を用いた。

RI吸収

$^{14}\text{CO}_2$ の植物への投与にあたっては、まず、 ^{14}C 標識炭酸水素ナトリウム (2 MBq) と乳酸をバイアル瓶内で混合することで $^{14}\text{CO}_2$ を発生させた。次に、 $^{14}\text{CO}_2$ を生成したバイアル瓶を、シリンジ針およびチューブを用いて、植物を密閉したポリ袋に連結することで、播種後 31 日目の植物を $^{14}\text{CO}_2$ に曝露した

(図2-6a)。バイオトロン (22 °C, 照度 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, 明 / 暗期 16 h/8 h) にて 24 時間、 $^{14}\text{CO}_2$ を供与した。

^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs の投与においては、経根吸収で行った。各RIを添加した 30 mL の MGRL 水耕液に播種後 43 日目の植物を移植し、バイオトロン (22 °C, 照度 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$, 明 / 暗期 16 h/8 h) にて 3 日間 (^{28}Mg は 24 時間) 生育した (図2-6b)。添加したRI濃度は、 ^{22}Na ; 3 kBq/mL, ^{28}Mg ; 3 kBq/mL, ^{65}Zn ; 10 kBq/mL, ^{86}Rb ; 3 kBq/mL, ^{109}Cd ; 10 kBq/mL, ^{137}Cs ; 0.5 kBq/mL である。生育期間中は適時、MGRL 水耕液を追加し、水耕液が 30 mL となるように保った。

RI測定

各RIを吸収させたそれぞれのシロイヌナズナを組織ごとに切断し、花 (茎頂および蕾を含む)、莢、花茎、ロゼット葉、茎生葉に分別した。 $^{14}\text{CO}_2$ を吸収させた組織はPPS製フィルム、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs を吸収させた組織は PE 製ラップで梱包した後、RRIS で撮影した (積算時間 ; 15 分, 図2-6c)。また RRIS 撮影後、ただちにIPにて撮影した (コンタクト積算 ; 60 分)。

RRIS 撮影後、それぞれのサンプル中のRI量を次のように測定し、RRIS で検出したシグナル強度と比較した。

(1) ^{14}C 測定

^{14}C の測定において、 ^{14}C 標識スクロースは液体シンチレーションカウンター (LSC-6100、ALOKA 製) で測定した (2 min)。植物組織中の ^{14}C 測定は、組織を 24 時間凍結させた後、ホモジェナイザーの粉碎による植物懸濁液をPET製シートに滴下して、スポットを作製した。溶液を乾燥させた後、PPS製フィルムで梱包し、IPにて測定した (コンタクト積算 ; 60 分)。

(2) ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs 測定

各組織中のRI量は γ カウンターで測定（cpm； count per minute）した（積算時間； 1分）。

2-3-2 結果と考察

^{14}C の測定は一般的に液体シンチレーションカウンター（液シン）が用いられる（Sun *et al.* 1999）。液シンでは、蛍光物質を含有するシンチレーションカクテルが放射線と相互作用することにより発した微弱な光を測定することにより、液シンに含まれる放射線量を算出する。そして、液シンを用いた植物試料内の低エネルギー β 線放出核種の測定においては、植物組織による自己吸収の影響を排除するため、通常は組織を粉碎して測定するが、その際に、粉碎した植物組織によりシンチレーションカクテルが着色される場合がある。シンチレーションによって発せられた微弱な光は色素に吸収されるため、計数効率が低下し、正確な定量が妨げられる（カラークエンチング）。これに対処するため、外部標準添加法による補正や、組織の脱色によってカラークエンチングの影響を抑える方法があるが、実験操作が非常に煩雑になる。さらに、特に ^{14}C の測定において、脱色は収率の低下を引き起こす可能性もある（Smith *et al.* 1987）。そこで、自己吸収の影響を受けない測定法として、植物を溶液中で懸濁することで均一化させ、その懸濁液を紙に滴下して表面線量を測定することで、組織の厚さによる自己吸収の影響を排除する、という手法が過去に考案されている（Radwan 1967）。そこで、この手法を一部改編し、 ^{14}C の測定を試みた（以後、スポット法と称する）。実験に先立ち、本手法の測定精度を次の方法で検討した。まず、既知の ^{14}C 標識スクロース（9-148 Bq）を液シンで測定した。次に、 ^{14}C 標識スクロース（9-148 Bq）と植物懸濁液を混合し、そ

れをPET製シートに10 µL ずつ滴下してスポットを作製した(図2-7a)。植物懸濁液は、様々な厚みの花茎や葉などから作製した。最後に、スポットしたシートをIPにコンタクトし、各スポットのシグナル強度を測定した。その結果、液シンの測定値とスポット法により測定したシグナル強度との相関は、 $R^2=0.9942$ であり(図2-7b)、本手法で精度高く ^{14}C が測定できると示された。

そこで、RRISで撮影した組織に含まれる放射線量を上記のスポット法で測定し、RRISで得られたシグナル強度との相関を調べることで、組織による自己吸収がRRISの測定に与える影響を解析した。まず、それぞれの組織におけるRI量の測定結果を、組織ごとにわけずに、組織全体として比較した。RRISとスポット法により測定したシグナル強度から検量線を作成し、そこから求めた相関(R^2 値)は0.8396であった(図2-8a)。次に、組織ごとに比較した結果、 R^2 値は花; 0.9815、莢; 0.7101、花茎; 0.2263、ロゼット葉; 0.8973、茎生葉; 0.6384であった(図2-8b, 8c, 8d, 8e, 8f)。花やロゼット葉と比較して、莢、花茎、茎生葉におけるRRISとスポット法による測定値の相関は低かった。莢、花茎はロゼット葉と比較して組織が厚いため、自己吸収の影響が大きかったと考えられる。茎生葉の厚さは、ロゼット葉と同程度だったが、葉が巻いた形状をしているため、FOSに固定する際に葉が重なり合う部分があった。その結果、ロゼット葉よりも厚くなり、RRISのシグナル強度とスポット法による定量値との相関が低かったと考えられる。一方、RRISで撮影した組織を、粉砕せずにIPで測定し、それぞれのシグナル強度を比較すると、 R^2 値は0.9857であった(図2-9)。以上の結果から、シロイヌナズナの莢や花茎などの厚い組織において、RRISやIPなどのイメージング画像を基に、 ^{14}C の定量をすることは難しいことが示された。一方、花やロゼット葉などの薄い組織においては、正確な定量は難しいものの、ある程度の誤差を許容した測定が可能であることが示唆された。また、莢などの厚い組織においても、自己吸収の度合いが

一定である同一地点での経時的な解析は可能であると考えられる。

^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs においては、RRIS 撮影後の各組織を γ カウンターで測定することで、RI 量を定量した。まず、全組織における RRIS のシグナル強度と γ カウンターの測定値を比較した結果、 R^2 値は ^{22}Na ; 0.9803 (図 2-10a)、 ^{28}Mg ; 0.9869 (図 2-11a)、 ^{65}Zn ; 0.9883 (図 2-12a)、 ^{86}Rb ; 0.9659 (図 2-13a)、 ^{109}Cd ; 0.9960 (図 2-14a)、 ^{137}Cs ; 0.9937 (図 2-15a) であった。次に、ロゼット葉と茎生葉における検量線の傾きを比較した結果、 ^{22}Na ; 10.49/9.458 (ロゼット葉 / 茎生葉 ; 図 2-10e, 10f)、 ^{28}Mg ; 27.86/29.83 (図 2-11e, 11f)、 ^{65}Zn ; 2.380/2.308 (図 2-12e, 12f)、 ^{86}Rb ; 89.87/80.39 (図 2-13e, 13f)、 ^{109}Cd ; 2.123/1.987 (図 2-14e, 14f)、 ^{137}Cs ; 5.694/5.602 (図 2-15e, 15f) となり、ロゼット葉と茎生葉では差がほとんどないことが分かった。一方、花、莢、花茎における検量線傾きはロゼット葉よりも小さく (表 2-4)、実際の RI 量と比較して RRIS のシグナル強度が小さい、つまり自己吸収の影響を受けたと考えられた。各核種の、花、ロゼット葉、茎生葉における R^2 値は、花 ; 0.9196-0.9835、ロゼット葉 ; 0.9793-0.9991、茎生葉 ; 0.9520-0.9978 の範囲であり、核種による差は小さかった (表 2-4)。しかし、組織内の立体的な分布を予測できないサンプルにおいては、組織の厚みと自己吸収の関係を検証するには限界がある。例えば、今回の供試した花茎と莢の直径はそれぞれ 0.5-1.6 mm および 0.5-1.0 mm であり、花茎の方が厚い組織が多く、サンプル間の差異も大きかったため、相関が低くなると予想された。ところが、 ^{22}Na においては、莢における RRIS と γ カウンターの相関 ($R^2=0.7088$) は花茎 ($R^2=0.9625$) に比べて低く、反対に、 ^{137}Cs における相関は、莢 ($R^2=0.9652$) の方が花茎 ($R^2=0.8249$) に比べて高かった。組織ごとに元素の立体的な分布様式が定まっているとすると、組織ごとに自己吸収の度合いは

一定となり、組織が厚くても RRIS と γ カウンターの相関は高くなる。今回の試験では ^{22}Na における花茎、および ^{137}Cs における莢が这个机会に当てはまると想定される。一方、元素の立体的な分布がサンプルごとに異なる場合は、RRIS と γ カウンターの相関が異なることが想定される。今回の試験では ^{22}Na における莢、 ^{137}Cs における花茎が这个机会に当てはまるものと思われる。

花茎中の ^{22}Na や莢中の ^{137}Cs など、RRIS のシグナル強度と RI 量との間に高い直線関係が見られた核種、組織においては、組織ごとに検量線を作成することで高い定量性を確保することは可能であることが示された。具体的には、RRIS での撮影後に組織中の RI 量を γ カウンターで測定し、その値を基に RRIS により取得したデータを補正することで定量的な画像解析が可能であると考えられる。一方、花茎中の ^{137}Cs や莢中の ^{22}Na など、定量評価が困難な組織においては、例えばある短時間での RI の輸送動態の経時変化解析のような、大きく RI 分布が変化しない試験や、自己吸収の度合いが一定である同一地点での ROI による経時的変化の解析が可能であると考えられる。

第4節 遮蔽材を用いた、自己吸収が定量性に及ぼす影響の推定

3 節では、核種および植物組織により自己吸収の影響が異なることが示された（表 2-4）。本節では、組織の厚さが自己吸収に与える影響を定量的に解析することを目的とした。しかし、植物組織では組織の厚さや RI の分布が不均一なため、定量的な解析に利用することが難しい。そこで、植物の模擬として、厚さが均一な PE 製ラップ、および PC 製シートを遮蔽材として用いることで、自己吸収が定量性に及ぼす影響を推定した。

2-4-1 実験方法

^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs のスポットしたシートに、遮蔽材を重ね合わせ、遮蔽材をFOS側へ固定して、RRISで撮影した（積算時間；15分）。スポットの濃度は次の通りである。 ^{14}C ；1.8–14800 Bq/2 μL 、0.22–1850 Bq/2 μL 、 ^{22}Na ；0.22–1850 Bq/2 μL 、 ^{65}Zn ；7.2–59200 Bq/2 μL 、 ^{86}Rb ；0.22–1850 Bq/2 μL 、 ^{109}Cd ；0.90–7400 Bq/2 μL 、 ^{137}Cs ；0.11–3700 Bq/2 μL 。遮蔽材は、植物体による遮蔽効果と極力同じにするため、PE製ラップおよびPC製シートを用いた。PE製ラップは（ $-\text{CH}_2-$ ）で構成され、PC製シートは（ $-\text{O}-(\text{C}=\text{O})-\text{O}-$ ）で構成される。これらの元素は植物の主要構成元素である。PE製ラップの遮蔽材は、1枚の厚さが10 μm であり、1枚ずつ重ねる枚数を増やし、最大で3枚（厚さ30 μm ）重ねて、 ^{14}C の遮蔽に使用した。PC製シートの遮蔽材は、1枚の厚さがそれぞれ0.2 mm、0.3 mm、および0.4 mmであり、 ^{22}Na 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs の遮蔽に用いた（図2-16a）。

2-4-2 結果と考察

測定するROI面積は、RI線源であるスポットと同一面積（3.3 mm^2 ）に設定した。遮蔽によるシグナル強度は、遮蔽が無い状態でのシグナル強度と比較して、 ^{14}C は4-7割（遮蔽厚10-30 μm ，図2-16b）に減少、その他の核種においては遮蔽厚0.2-0.4 mmで、 ^{22}Na ；7-9割、 ^{65}Zn ；5-7割、 ^{86}Rb ；4-6割、 ^{109}Cd ；6-8割、 ^{137}Cs ；6-8割に減少した（図2-16c）。

^{65}Zn が放出する放射線の最大エネルギー（ポジトロン/ γ 線；329 keV/1116 keV）は、 ^{22}Na （ポジトロン/ γ 線；546 keV/1275 keV）と比較して弱いにも関わらず、遮蔽の影響度合いは小さかった。この現象は、RRISが主に検出す

る放射線の種類が核種によって異なり、そのために、遮蔽の効果も一律でない可能性を示していると考えられた。この点については、次節でシミュレーションによる検討を試みた。

^{22}Na 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs の検出においては、0.2 mm の遮蔽材によりシグナル強度が 4-6 割以上減少したが、遮蔽の厚さが 2 倍である 0.4 mm では 6-9 割の減少であり、単位厚さ当たりの遮蔽効果は小さくなった（図 2-16c）。低エネルギー放射線に対して、PC 製シートは遮蔽効果が大きく、0.2 mm の厚さで十分に遮蔽できたが、0.2 mm の遮蔽を透過できる程度のエネルギーを持つ放射線に対しては、PC 製シートの遮蔽効果は小さく、遮蔽材を 0.4mm に厚くしても十分には遮蔽できなかつたと考えられた。

なお、RI 線源と FOS の間に遮蔽を設置したことで線源が FOS 表面から離れ、3 節の結果と同様に、放射線の拡散によってシグナル強度が低下したことも考えられた。そこで、 ^{22}Na のスポットについて、ROI 面積を広く設定して（ 51 mm^2 ）測定した。その結果、スポットと同一面積で ROI を設定した場合と比較して、ROI 面積が大きくなることによりシグナル強度は増加したものの、遮蔽の厚さの増加に対するシグナル強度の減少率は同じように観察された（図 2-16d）。本節の結果により、試料と FOS の間の距離に加えて、植物体による遮蔽（自己吸収）の影響が RRIS によるシグナルの検出に大きく影響することが明示された。

^{86}Rb から放出される β 線エネルギーは、 β 線放出核種の中でも比較的強い（表 2-1）。 ^{86}Rb の検出においては、他の核種と比較して遮蔽の影響は小さいものの、0.4 mm の遮蔽でシグナル強度が 6 割減少した（図 2-16c）。つまり、多くの β 線放出核種において、特に植物組織内部の深度が大きい位置に RI が存在する場合、自己吸収の影響を強く受けることが示唆された。また、RRIS は放射線の線質により、検出感度が異なることが示唆された。

第5節 シミュレーションを用いた自己吸収の影響の検証

4節で得られた、遮蔽効果が核種ごとに異なるという結果は、放射線エネルギーだけでなく、線質の違いも影響していることを示唆するものと考えられた。そこで本節では各放射線の線質に着目し、FOSの検出に対する各放射線の寄与率をRIごとに検証した。RIは一度の崩壊において様々な放射線を放出するため、実際のRI線源を用いて線質の違いによるRRISでの検出感度の違いを検証することが事実上不可能であることから、本節では計算機シミュレーションを用いた。また、組織内の元素分布が均一でない場合に自己吸収の度合いが変化する可能性を考え、RI分布を3パターン想定して、自己吸収がRRIS測定に与える影響をシミュレーションした。

2-5-1 実験方法

EGS5 (Electron Gamma Shower) コードシステムを用いたモンテカルロシミュレーションを用いた。EGS5コードシステムは光子(電磁波)および電子のカスケード反応をシミュレーション可能な計算コードで、医療分野での被曝シミュレーションにも利用されている(Hirayama *et al.* 2005)。シミュレーションを行うにはEGS5コードに含まれる関数を呼び出すプログラムをFortran言語で作成する必要があることから、EGS5コードシステムに付属して配布されているサンプルコードを改変してプログラムを作成した。なお、プログラムの構築、データ取得などシミュレーションのプログラミングは、東京大学放射線植物生理学研究室の廣瀬 農特任助教が構築したものを利用した。シミュレーションに用いたRIは ^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs である。

^{28}Mg においては、娘核種である ^{28}Al のシミュレーションも行った。

シミュレーション環境

ハードウェア ; CPU Core i5-760 2.8GHz、メモリ 4GB

OS ; Ubuntu Server 10.04 LTS

Fortran コンパイラー ; インテル Fortran コンパイラー 11.1 Linux 版

シミュレーションに用いたモデル系

シミュレーションは、RRIS によるシグナル強度と強い相関を持つと考えられる、CsI(Tl)シンチレータへのエネルギー付与を算出した。まず、RIが均一に分布した直径 1 mm の花茎をモデル化し、各RIが 10 万壊変行った場合の、CsI(Tl)シンチレータへのエネルギー付与を放射線の線質ごとに算出した。次に、RI分布が異なる花茎をモデル化し、自己吸収の影響をシミュレーションした。モデルの仕様は次の通りである。花茎は直径 1 mm とした。花茎内部のRI分布は 3 パターン、設定した (図 2-17a)。一つ目は、維管束にのみRIが存在する花茎をモデル化した (周辺局在)。維管束外部組織 : 維管束 : 維管束内部組織の幅を 1 : 1 : 3 とした。二つ目は、中心部にRIが局在する花茎をモデル化した (中心局在)。三つ目は、均一にRIが分布した花茎をモデル化した (均一分布)。

2-5-2 結果と考察

CsI(Tl)シンチレータへのエネルギー付与におけるシミュレーションにより、RRIS による各RIの検出には、 β 線、ポジトロン、およびX線が大きな割合を占め、 γ 線の寄与は小さいことが示された (表 2-5)。 γ 線は透過力が強い

め、CsI(Tl)シンチレータを透過し、CsI(Tl)シンチレータにエネルギーを寄与することができない、つまり、RRISは γ 線の検出効率が悪いことが考えられた。

RI分布が異なる花茎のシミュレーションでは、核種によって大きく結果が異なった(図 2-17b)。 ^{28}Al 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd においては、花茎内におけるRI分布の違いが、RRISで検出されるシグナル強度に与える影響は小さかった。これは、 ^{28}Al 、 ^{86}Rb においては、 β 線の持つエネルギーが高いこと、 ^{65}Zn 、 ^{109}Cd においては透過力の強いX線を主に検出しているため、自己吸収の影響を受けにくいことに起因すると考えられる(表 2-5)。X線と γ 線はともに電磁波の一種であり、性質の違いはない。そのため、CsI(Tl)シンチレータの検出における両者の検出効率の違いは、エネルギー強度の違いであると考えられる。表 2-5で示したように、 ^{65}Zn 、 ^{109}Cd が放出するX線エネルギーは、8 keV、22 keVであり、CsI(Tl)シンチレータへのエネルギー寄与はそれぞれ36.9%、48.4%である。これらの低エネルギーX線は、組織は透過することができるが、CsI(Tl)シンチレータは透過しないため、自己吸収の影響が小さかったと考えられる。一方、 ^{22}Na 、 ^{137}Cs が放出する γ 線エネルギーはそれぞれ1275 MeV、624 keVと大きく、CsI(Tl)シンチレータへのエネルギー寄与はそれぞれ4%、20.8%にとどまった(表 2-5)。つまり、CsI(Tl)シンチレータは、透過力の強い γ 線とはほとんど相互作用せず、透過力の弱い β 線を主に検出する(表 2-5)。 β 線は自己吸収の影響を受けやすいため、花茎内の ^{22}Na 、 ^{137}Cs の検出においては、周辺局在や均一分布と比較して、中心局在の場合はシグナル強度が顕著に低下すると推察された(図 2-17b)。

また、 ^{14}C においては、均一分布と周辺局在分布の間でも検出されるシグナル強度に差が見られた(図 2-17b)。均一分布は周辺分布と比較して、花茎表面付近の ^{14}C 量が多いため、自己吸収の影響が小さいと考えられた。

以上の結果により、①高エネルギー β 線は、植物組織による自己吸収の影響

はあるが、その度合いが小さいこと、②低エネルギーβ線は自己吸収の影響が大きいこと、③低エネルギーX線は植物組織を透過するが、CsI(Tl)シンチレータでは効率良く相互作用するため、RRISの検出に与える自己吸収の影響が小さいこと、④高エネルギーγ線は植物組織のみならずCsI(Tl)シンチレータをも透過するため検出に対する寄与率が低く、自己吸収の影響は、同時に放出されるβ線のエネルギー強度に依存することが示唆された。

今回検証に用いなかった核種においても、その核種が放出する放射線の線質から、RRISでの検出効率が予測できると考えられる。例えば、³²Pが放出するβ線エネルギーは695 keV/1711 keV（平均 / 最大）であり、⁸⁶Rbの放出するβ線エネルギー（668 keV/1774 keV）によく似ている（表 2-1）。⁸⁶Rbはβ線その他、1077 keVのγ線を放出するが、CsI(Tl)シンチレータへのエネルギー寄与率はわずか0.2%であり、無視できる量である（表 2-5）。すなわち、³²Pは⁸⁶Rbと比較して自己吸収の影響度合いはほとんど変わらないと解釈でき、⁸⁶Rbは自己吸収の影響度合いが小さいため、³²Pにおいてもその度合いは小さいと考えられる。このことは、RRISでは植物体内の³²Pを高い定量性をもって検出できることを示しており、過去におこなったダイズの葉における解析結果（頼ら 2008）などの定量性を保証するものと考えられる。

表 2-1 本研究で用いた核種における壊変様式、半減期、および放出エネルギー特性

核種	壊変様式	半減期	β線エネルギー(keV)		γ線 or X線エネルギー(keV)
			平均	最大	
C-14	β^-	5700 y	49.5	157	-
Na-22	β^+ , EC	2.6 y	216	546	1275, 551 (annihilation)
Mg-28	β^-	20.9 h	152	860	1589
(Al-28)	β^-	2.2 m	1242	2863	1779
P-32	β^-	14.3 d	695	1711	-
S-35	β^-	87.5 d	48.7	167	-
Ca-45	β^-	163 d	77.2	257	-
Mn-54	EC	312 y	-	-	835, 5.37 (Cr-K α)
Zn-65	β^+ , EC	244 d	143	329	1116, 551 (annihilation)
Rb-86	β^-	18.6 d	668	1774	1077
Cd-109	EC	461 d	-	-	22 (Ag-K α), 88 (^{109m}Ag)
Cs-137	β^-	30.2 y	514	1176	662 (^{137m}Ba)

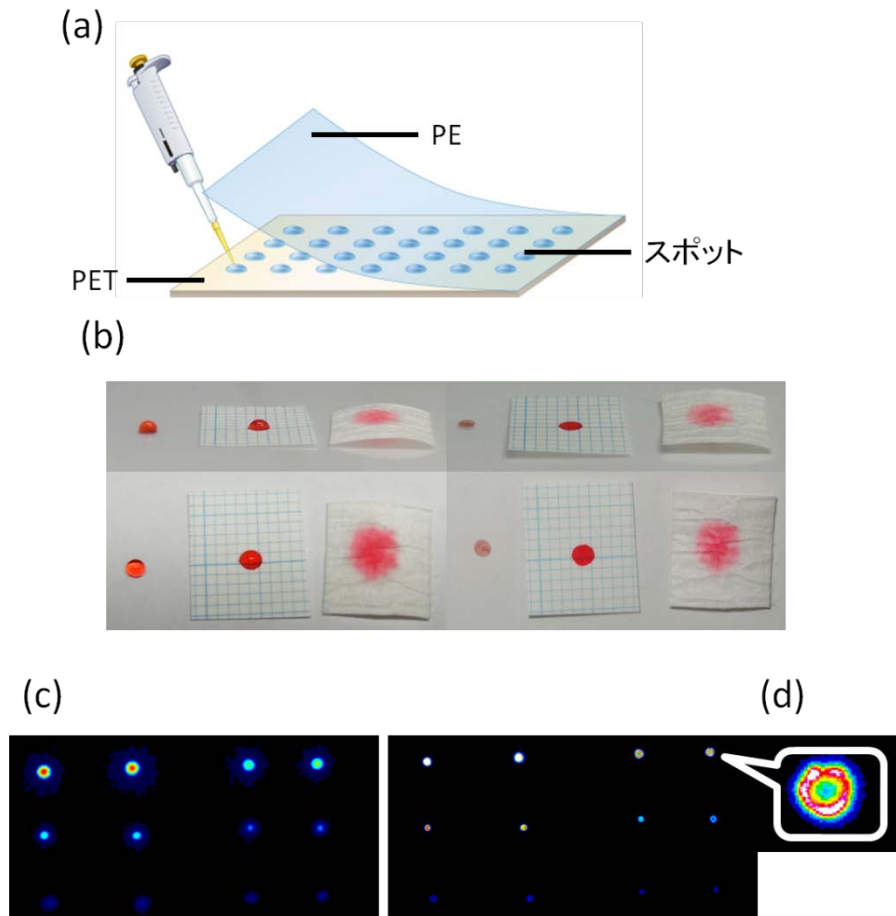


図 2-1 スポットの作製

- (a) 試料の概略図。ポリエチレンテレフタレート製シート（PET）に RI 標準液をスポットした（ $2\ \mu\text{L}$ ）。スポットが乾燥した後、ポリエチレン製ラップ（PE）で梱包した。
- (b) サフラニン染色液を用いたスポット予備実験。台紙の比較として PET 製シート、方眼紙、および濾紙を用いてスポットした（ $2\ \mu\text{L}$ ）。左列；滴下直後、右列；乾燥後のサンプル。
- (c) RI 標準液から作製したスポットの検出。左；RRIS、右；IP
- (d) IP 画像の拡大図。スポットの RI 分布に偏りが生じた。

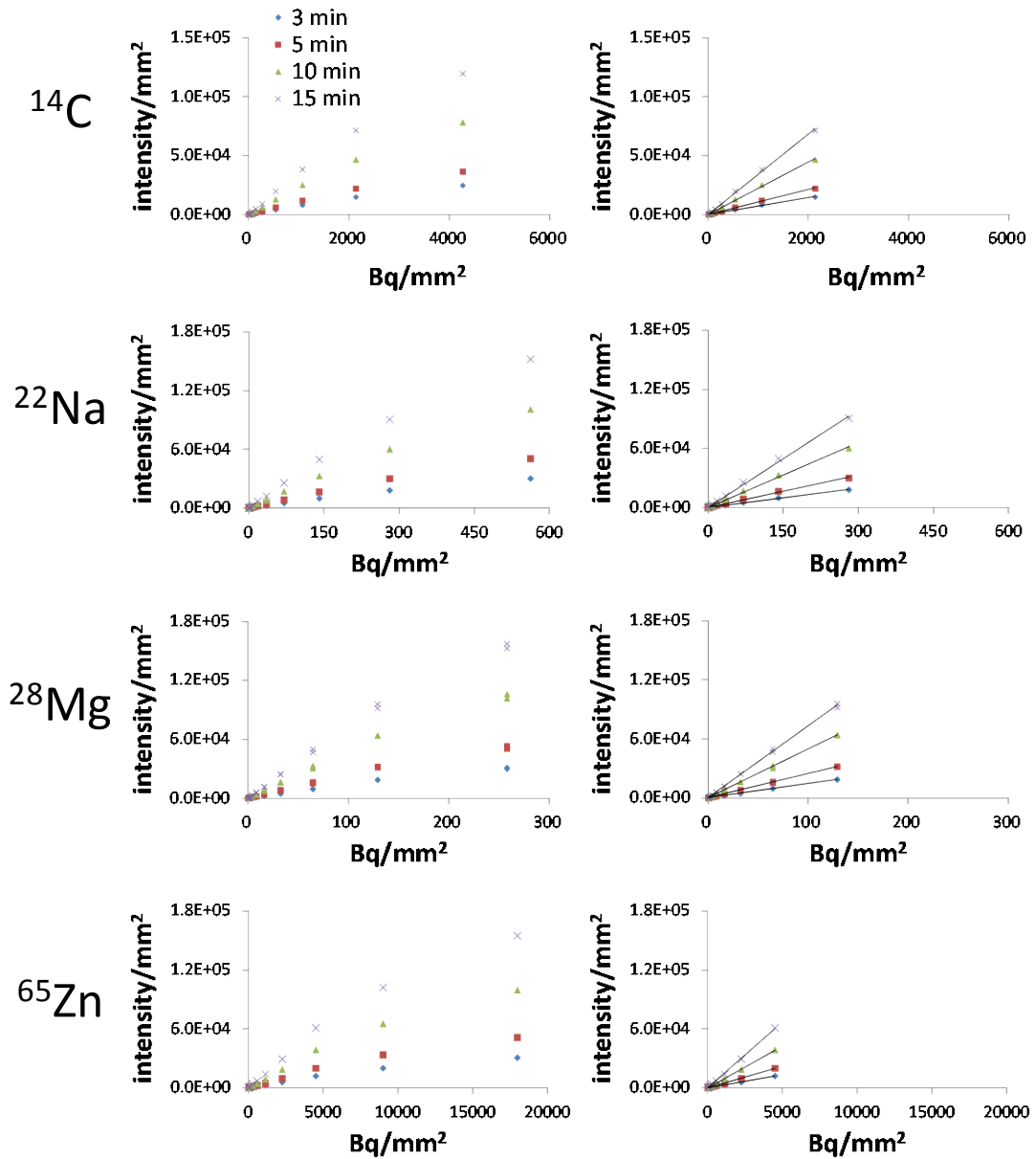


図 2-2 RRIS における定量可能範囲

左；測定結果の全体図、右；定量可能範囲。定量上限値は検量線の決定係数 (R^2) が 0.995 以上を保つ範囲とした。定量下限値は $\sqrt{2} \times 10 \times \sigma$ (σ ；バックグラウンドの標準偏差) として算出した。

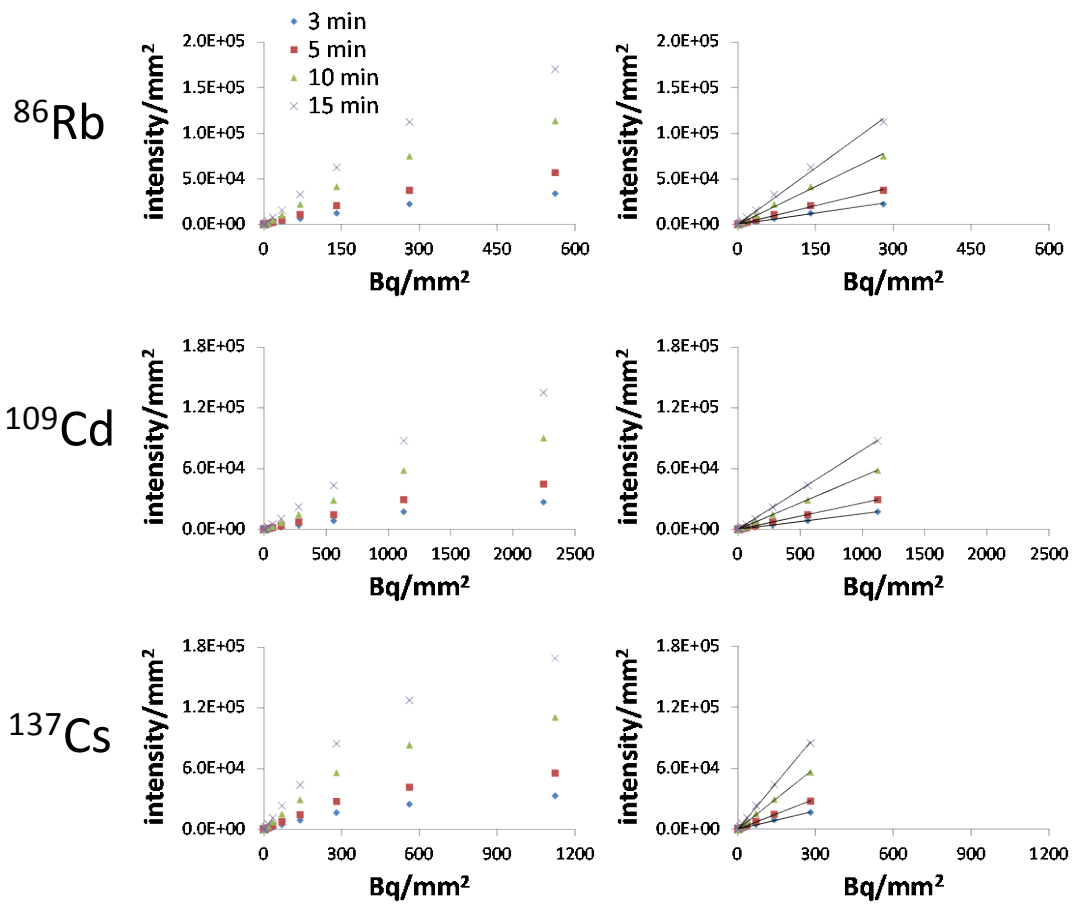


図 2-2 続き

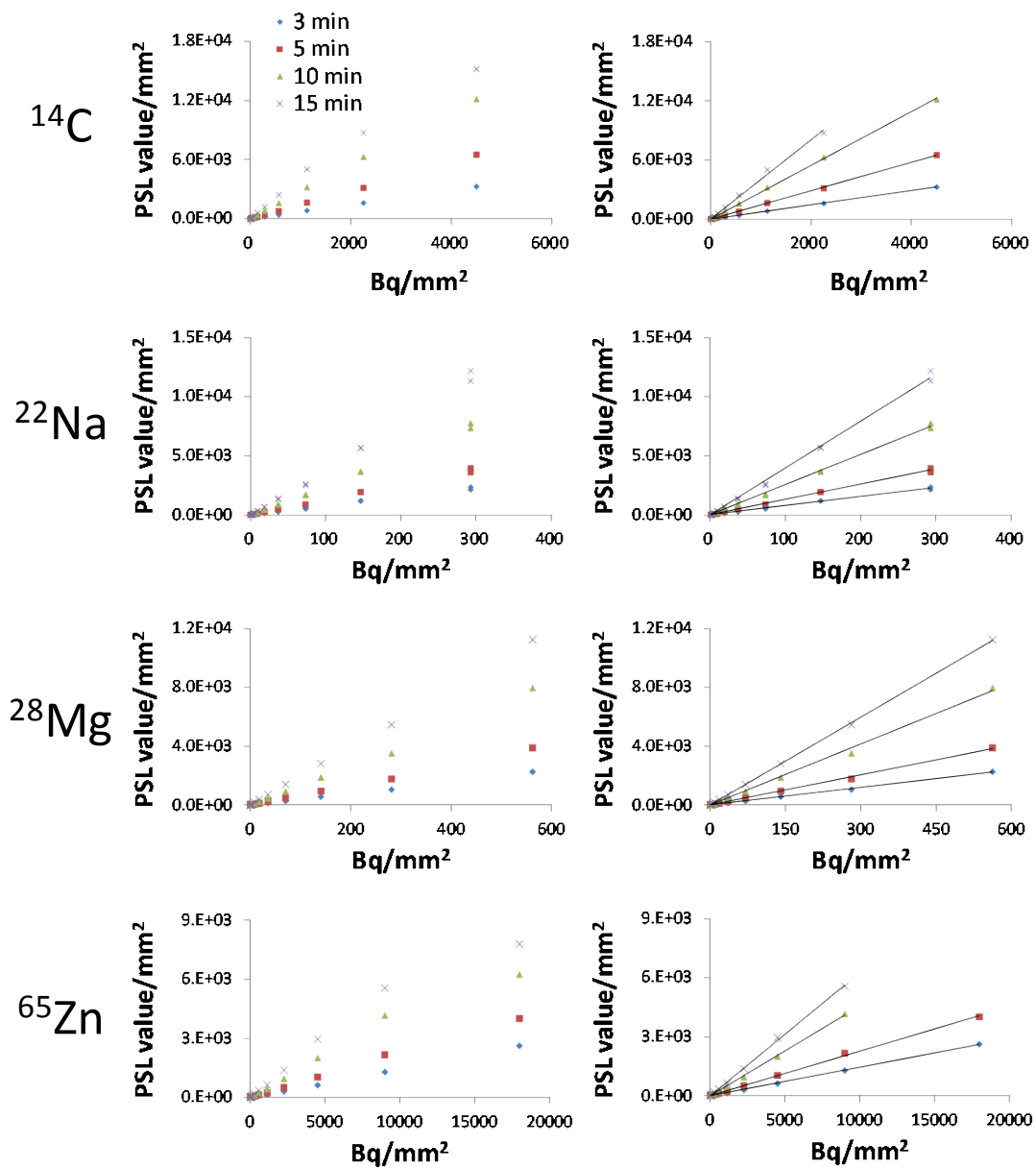


図 2-3 IPにおける定量可能範囲

左；測定した全体図、右；定量可能範囲。定量上限値は検量線の R^2 値が 0.995 以上を保つ範囲とした。定量下限値は $\sqrt{2} \times 10 \times \sigma$ (σ ；バックグラウンドの標準偏差) として算出した。

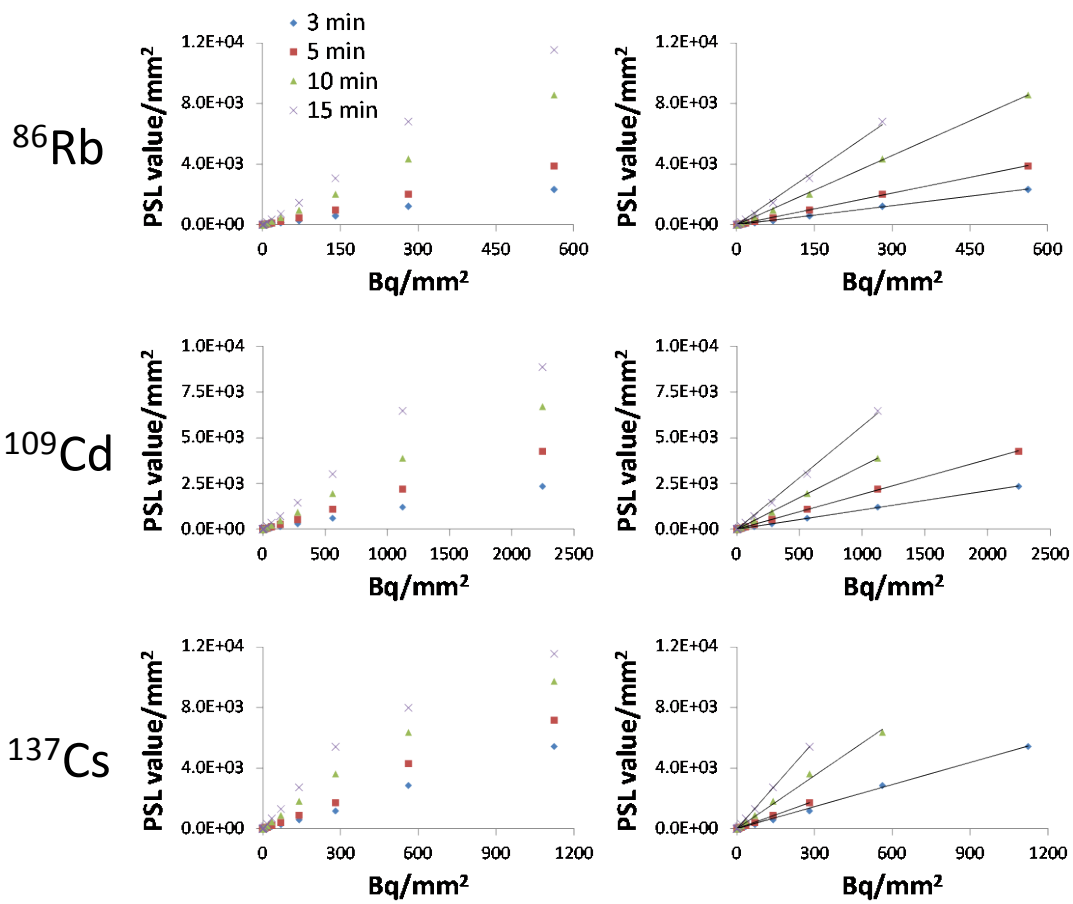


図 2-3 続き

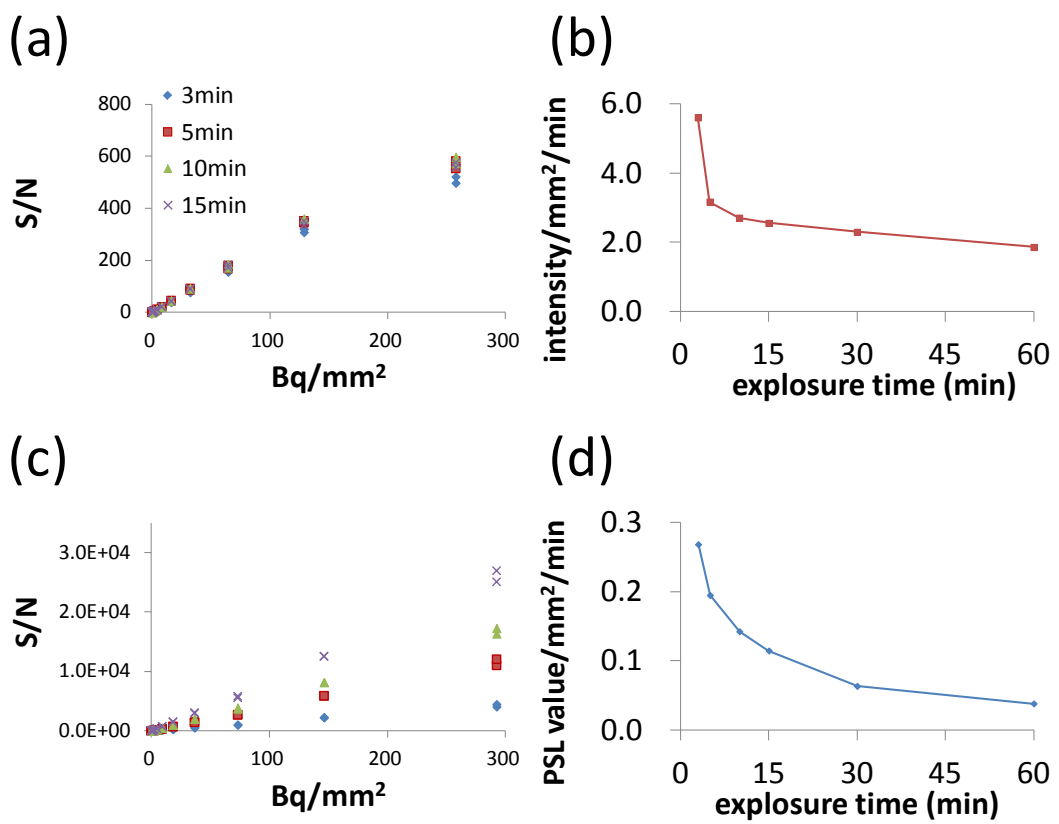


図 2-4 定量下限値における積算時間の影響

- (a) RRIS における S/N 比 (^{28}Mg)。
- (b) RRIS における単位時間当たりの定量下限値。
 定量下限値は $\sqrt{2} \times 10 \times \sigma$ として算出した。
- (c) IP における S/N 比 (^{28}Mg)。
- (d) IP における単位時間当たりの定量下限値。
 定量下限値は $\sqrt{2} \times 10 \times \sigma$ として算出した。

表 2-2 RRIS および IP における定量下限値、定量上限値、ダイナミックレンジ、および検量線の決定係数。定量上限値を定量下限値で除することでダイナミックレンジを算出した。

		RRIS				IP			
		定量下限値 (Bq/mm ²)	定量上限値 (Bq/mm ²)	ダイナミックレンジ	決定係数 (R ²)	定量下限値 (Bq/mm ²)	定量上限値 (Bq/mm ²)	ダイナミックレンジ	決定係数 (R ²)
C-14	3 min	4 × 10 ⁰	2 × 10 ³	3 × 10 ²	0.9972	4 × 10 ⁰	≧4 × 10 ³	≧1 × 10 ³	0.9999
	5 min	2 × 10 ⁰	2 × 10 ³	1 × 10 ³	0.9976	2 × 10 ⁰	≧4 × 10 ³	≧2 × 10 ³	0.9997
	10 min	2 × 10 ⁰	2 × 10 ³	1 × 10 ³	0.9981	1 × 10 ⁰	≧4 × 10 ³	≧4 × 10 ³	0.9996
	15 min	2 × 10 ⁰	2 × 10 ³	1 × 10 ³	0.9983	1 × 10 ⁰	2 × 10 ³	1 × 10 ³	0.9951
Na-22	3 min	3 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9973	5 × 10 ⁻¹	≧6 × 10 ²	≧1 × 10 ³	0.9989
	5 min	3 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9972	5 × 10 ⁻¹	≧6 × 10 ²	≧1 × 10 ³	0.9982
	10 min	3 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9972	3 × 10 ⁻¹	≧6 × 10 ²	≧2 × 10 ³	0.9972
	15 min	3 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9972	3 × 10 ⁻¹	≧6 × 10 ²	≧2 × 10 ³	0.9998
Mg-28	3 min	3 × 10 ⁻¹	1 × 10 ²	5 × 10 ²	0.9993	6 × 10 ⁻¹	≧3 × 10 ²	≧5 × 10 ²	0.9966
	5 min	1 × 10 ⁻¹	1 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9995	3 × 10 ⁻¹	≧3 × 10 ²	≧1 × 10 ³	0.9975
	10 min	1 × 10 ⁻¹	1 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9995	3 × 10 ⁻¹	≧3 × 10 ²	≧1 × 10 ³	0.9985
	15 min	1 × 10 ⁻¹	1 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9989	1 × 10 ⁻¹	≧3 × 10 ²	≧2 × 10 ³	0.9975
Zn-65	3 min	2 × 10 ⁻¹	4 × 10 ³	3 × 10 ²	0.9992	2 × 10 ⁻¹	≧2 × 10 ⁴	≧1 × 10 ³	0.9996
	5 min	9 × 10 ⁰	4 × 10 ³	5 × 10 ²	0.9990	2 × 10 ⁻¹	≧2 × 10 ⁴	≧1 × 10 ³	0.9986
	10 min	9 × 10 ⁰	4 × 10 ³	5 × 10 ²	0.9990	9 × 10 ⁰	9 × 10 ³	1 × 10 ³	0.9990
	15 min	4 × 10 ⁰	4 × 10 ³	1 × 10 ³	0.9990	9 × 10 ⁰	9 × 10 ³	1 × 10 ³	0.9990
Rb-86	3 min	5 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	5 × 10 ²	0.9957	1 × 10 ⁰	≧6 × 10 ²	≧5 × 10 ²	0.9994
	5 min	3 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9959	5 × 10 ⁻¹	≧6 × 10 ²	≧1 × 10 ³	0.9996
	10 min	3 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9956	3 × 10 ⁻¹	≧6 × 10 ²	≧2 × 10 ³	0.9996
	15 min	1 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9960	3 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9968
Cd-109	3 min	2 × 10 ⁰	1 × 10 ³	5 × 10 ²	0.9999	4 × 10 ⁰	≧2 × 10 ³	≧5 × 10 ²	0.9997
	5 min	1 × 10 ⁰	1 × 10 ³	1 × 10 ³	1.0000	2 × 10 ⁰	≧2 × 10 ³	≧1 × 10 ³	0.9997
	10 min	5 × 10 ⁻¹	1 × 10 ³	2 × 10 ³	0.9999	2 × 10 ⁰	1 × 10 ³	5 × 10 ²	0.9999
	15 min	5 × 10 ⁻¹	1 × 10 ³	2 × 10 ³	0.9999	1 × 10 ⁰	1 × 10 ³	1 × 10 ³	0.9984
Cs-137	3 min	5 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	5 × 10 ²	0.9964	5 × 10 ⁻¹	≧1 × 10 ²	≧2 × 10 ³	0.9979
	5 min	3 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9983	5 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	5 × 10 ²	0.9996
	10 min	3 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9988	5 × 10 ⁻¹	6 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9950
	15 min	3 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9989	3 × 10 ⁻¹	3 × 10 ²	1 × 10 ³	0.9999

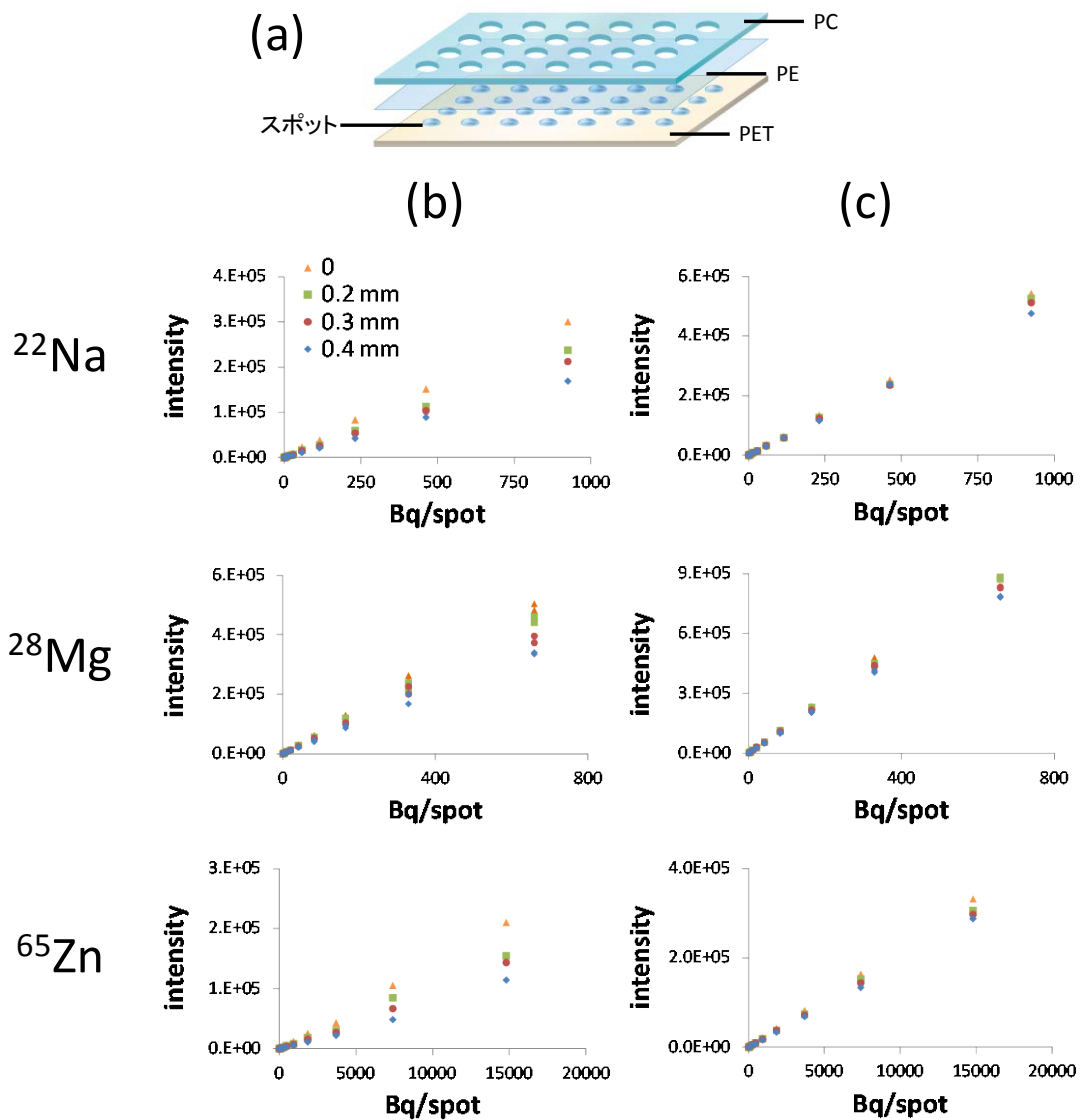


図 2-5 FOS と試料間の距離が定量性に及ぼす影響

- (a) 試料の概略図。RI 標準液をスポットしたシートに、穴を開けたポリカーボネート製シート (PC ; 0.2, 0.3, 0.4 mm) を FOS との間に重ねることで、FOS と試料の間に人為的に空間を設けた。
- (b) 測定する関心領域 (ROI ; region of interest) をスポットと同一面積に設定して測定した解析結果。
- (c) ROI 面積を拡大して測定した解析結果。

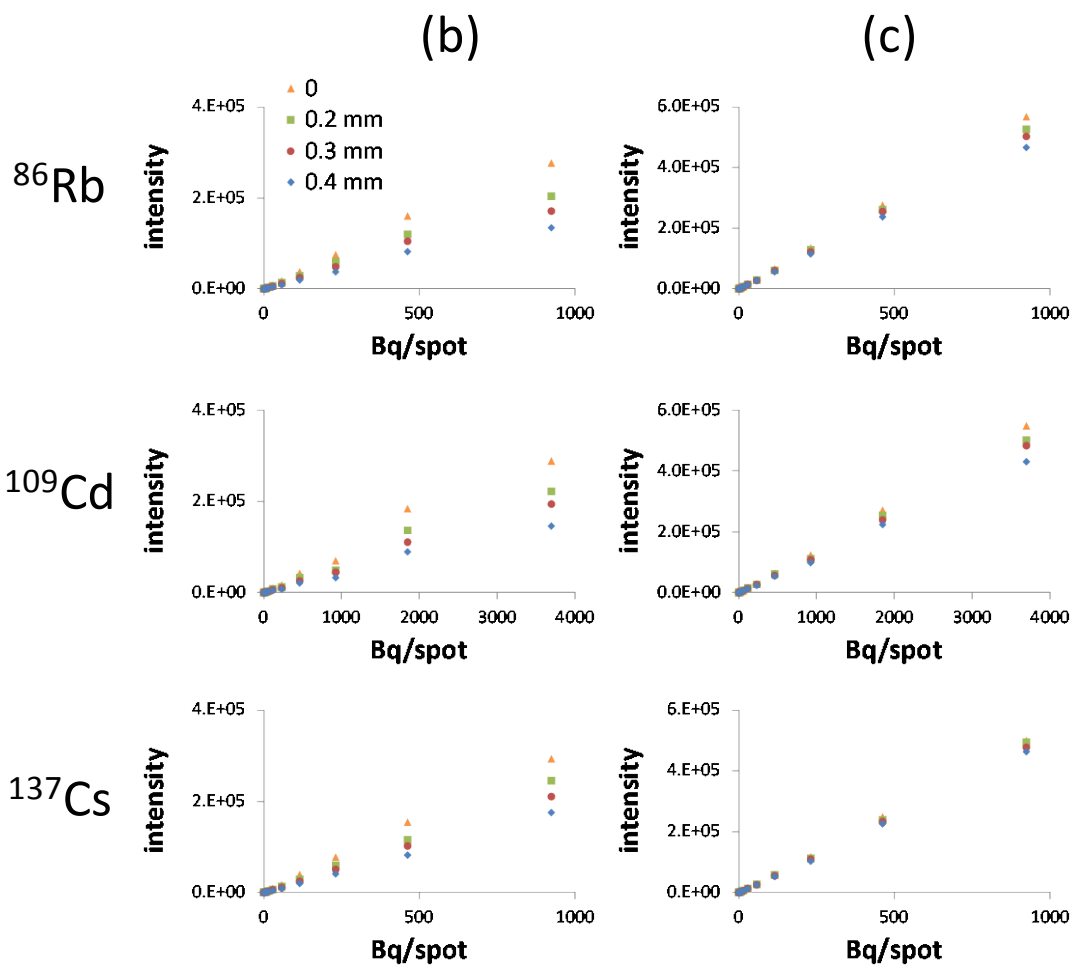


図 2-5 続き

表 2-3 MGRL 水耕液の組成

組成	終濃度
NaH ₂ PO ₄ ・2H ₂ O Na ₂ HPO ₄ ・12H ₂ O	1.75 mMPi
MgSO ₄ ・7H ₂ O	1.5 mM
Ca(NO ₃) ₂ ・4H ₂ O	2.0 mM
KNO ₃	3.0 mM
Na ₂ ・EDTA	67 μM
FeSO ₄ ・7H ₂ O	8.6 μM
MnSO ₄ ・4H ₂ O	10.3 μM
H ₃ BO ₃	30 μM
ZnSO ₄ ・7H ₂ O	1.0 μM
CuSO ₄ ・5H ₂ O	1.0 μM
(NH ₄) ₆ ・Mo ₇ O ₂₄ ・4H ₂ O	0.024 μM
CoCl ₂ ・6H ₂ O	0.13 μM

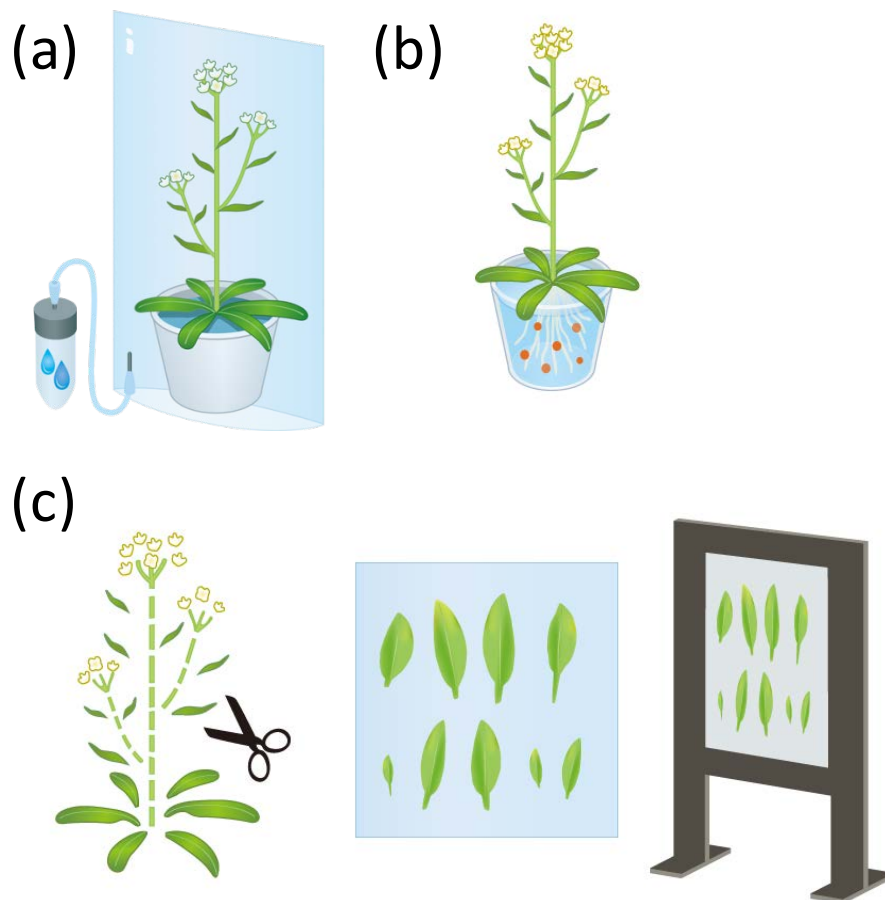


図 2-6 シロイヌナズナにおける自己吸収の影響の解析方法

- (a) $^{14}\text{CO}_2$ の植物への投与は、まず ^{14}C 標識炭酸水素ナトリウム (2 MBq) と乳酸をバイアル瓶内で混合することで $^{14}\text{CO}_2$ を発生させた。次に、 $^{14}\text{CO}_2$ を生成したバイアル瓶を、シリンジ針およびチューブを用いて、植物を密閉したポリ袋に連結することで、植物へ $^{14}\text{CO}_2$ を添加した。バイオトロンにて 24 時間、 $^{14}\text{CO}_2$ を植物に吸収させた。
- (b) バイオトロンにて 3 日間 (^{28}Mg のみ 24 時間)、以下の RI をそれぞれ経根吸収させた。
 ^{22}Na ; 3 kBq/mL, ^{28}Mg ; 3 kBq/mL, ^{65}Zn ; 10 kBq/mL, ^{86}Rb ; 3 kBq/mL, ^{109}Cd ; 10 kBq/mL, ^{137}Cs ; 0.5 kBq/mL。
- (c) RI を吸収させたシロイヌナズナを組織ごとに切断した。組織を花 (蕾を含む)、莢、花茎、ロゼット葉、茎生葉に分別した。それぞれの組織を PE 製ラップ (^{14}C は PPS 製フィルム) で梱包した後、RRIS で撮影した。

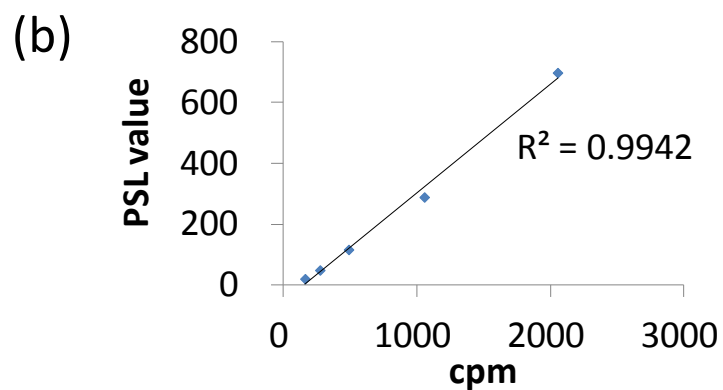
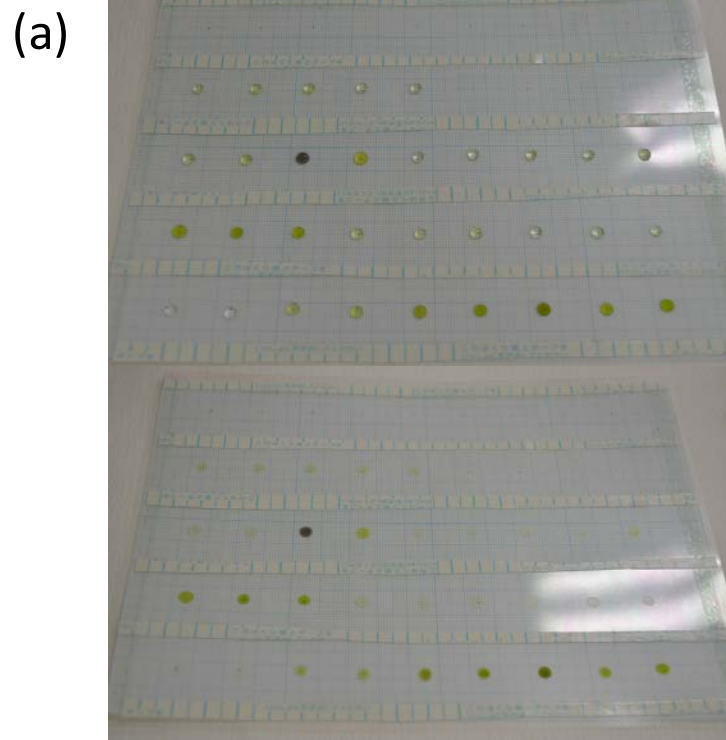


図 2-7 植物懸濁液のスポットにおける ^{14}C 測定法

- (a) 試料の写真。PET 製シートに植物懸濁液をスポットした（スポット法、各 $10\ \mu\text{L}$ ）。上段；乾燥前、下段；乾燥後
- (b) スポット法の測定精度の解析結果。液体シンチレーションカウンターによる ^{14}C 標識スクロースの測定値（cpm）、および IP による同量の ^{14}C 標識スクロースを添加した植物懸濁液の測定値（PSL value）を比較した。

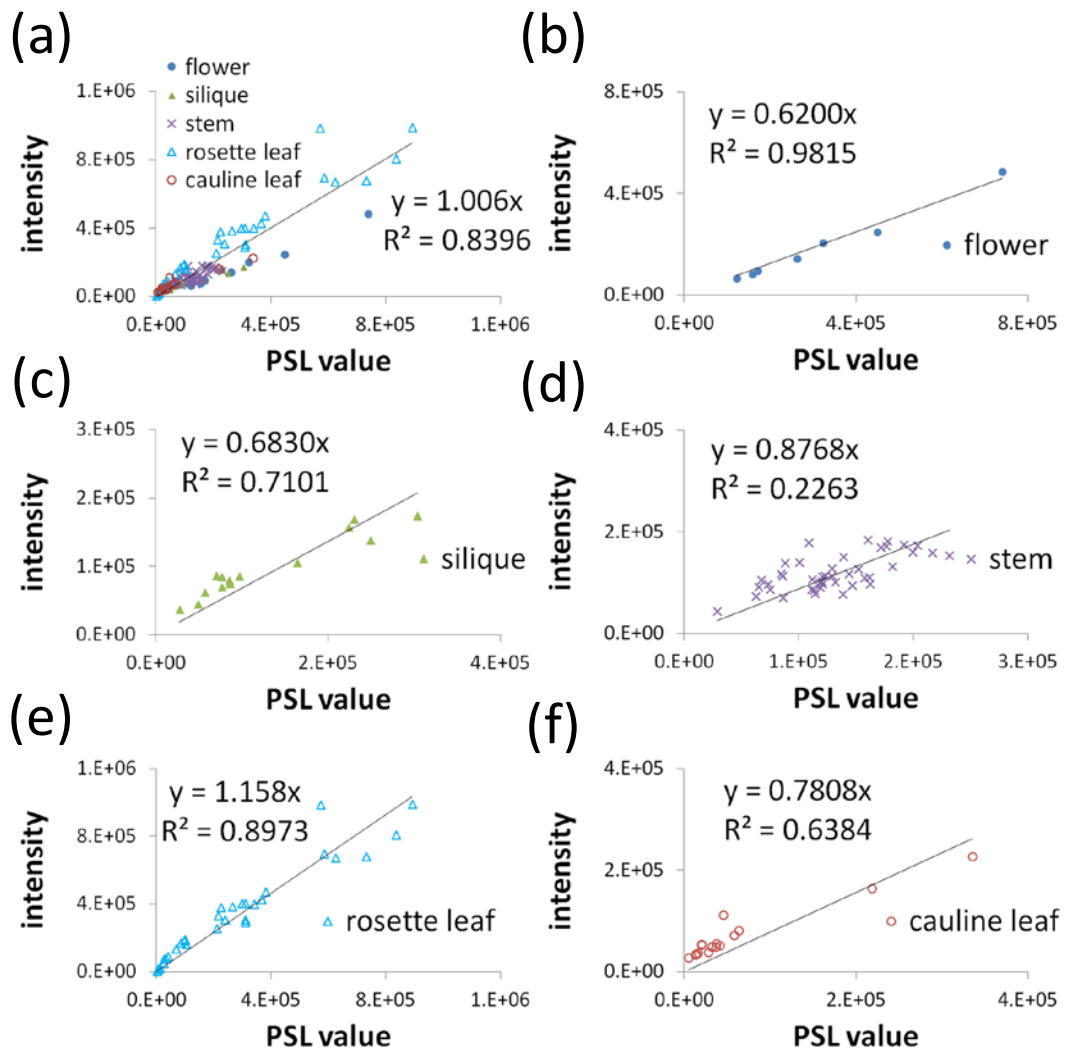


図 2-8 自己吸収が ^{14}C の定量性に及ぼす影響

RRIS (intensity) およびスポット法 (PSL value) により、(a) 植物全体、
 (b) 花、(c) 花茎、(d) 莢、(e) ロゼット葉、および (f) 茎生葉における
 ^{14}C の測定比較を行った。

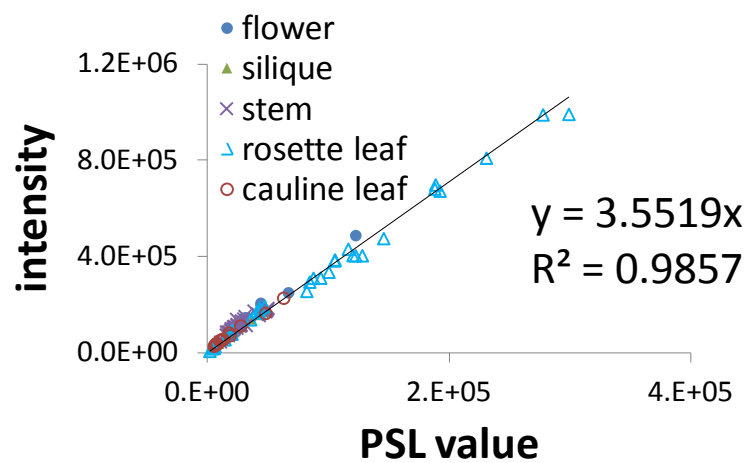


図 2-9 RRIS および IP による ^{14}C 測定の比較

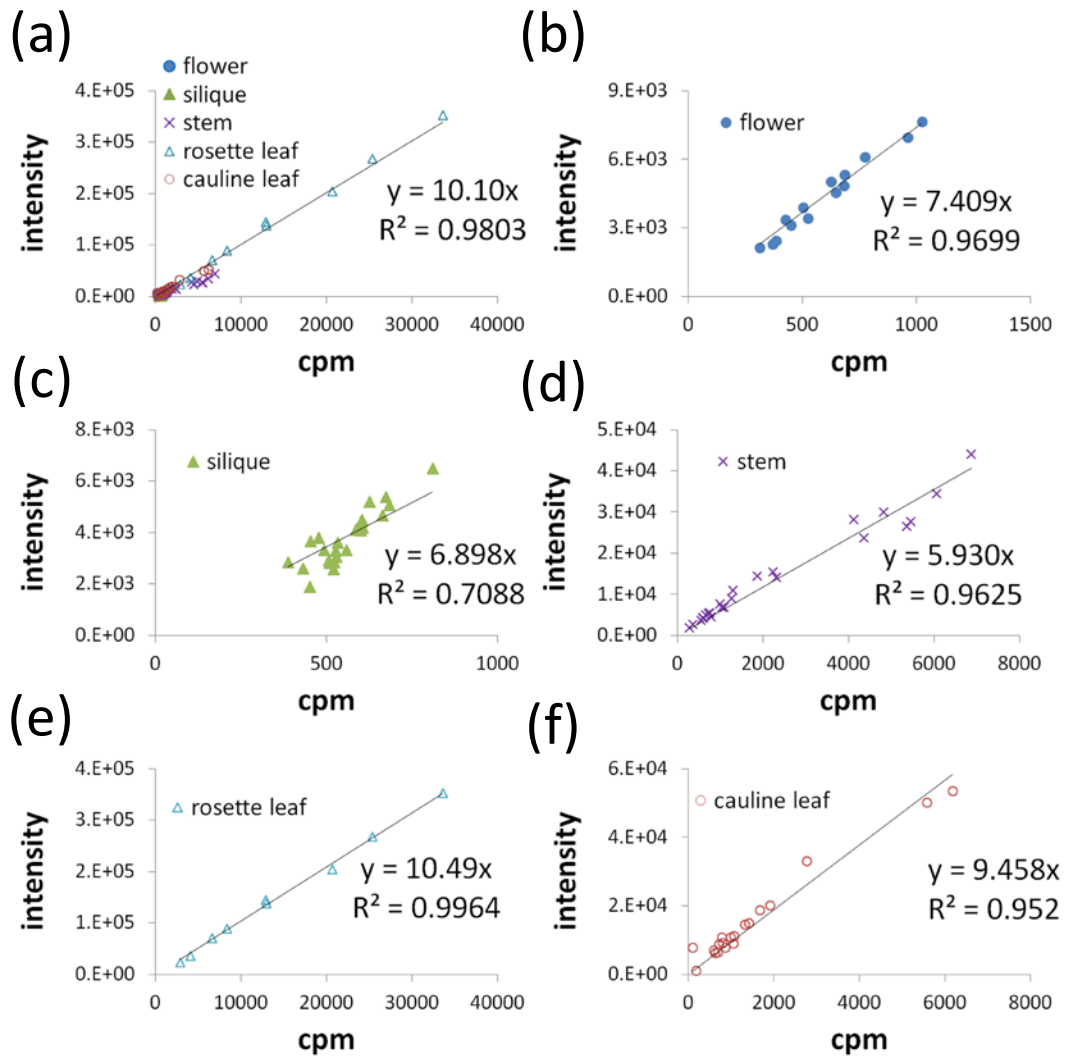


図 2-10 自己吸収が ^{22}Na の定量性に及ぼす影響

RRIS (intensity) および γ カウンター (cpm) により、(a) 植物全体、(b) 花、(c) 花茎、(d) 莢、(e) ロゼット葉、および (f) 茎生葉における ^{22}Na の測定比較を行った。

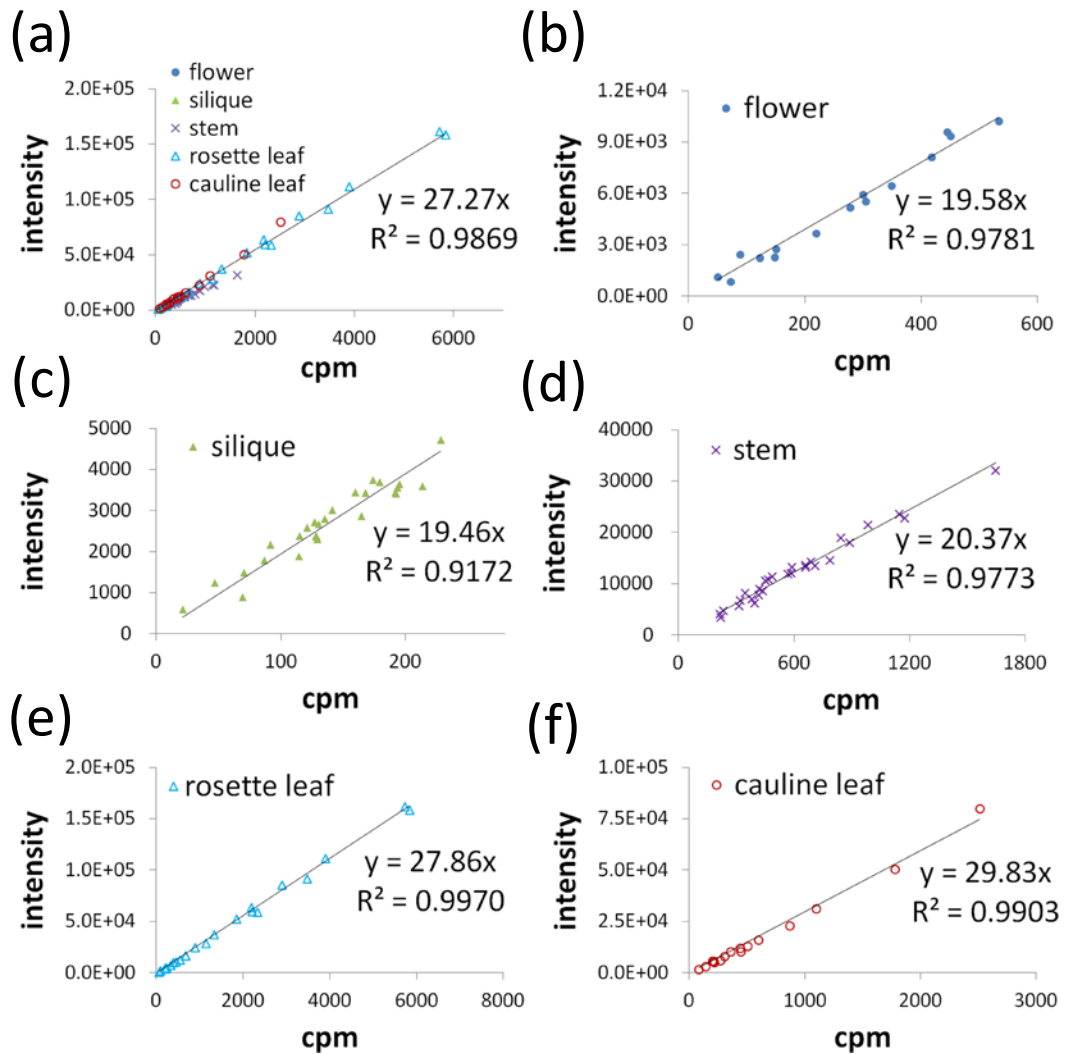


図 2-11 自己吸収が ^{28}Mg の定量性に及ぼす影響

RRIS (intensity) および γ カウンター (cpm) により、(a) 植物全体、(b) 花、(c) 花茎、(d) 莢、(e) ロゼット葉、および (f) 茎生葉における ^{28}Mg の測定比較を行った。

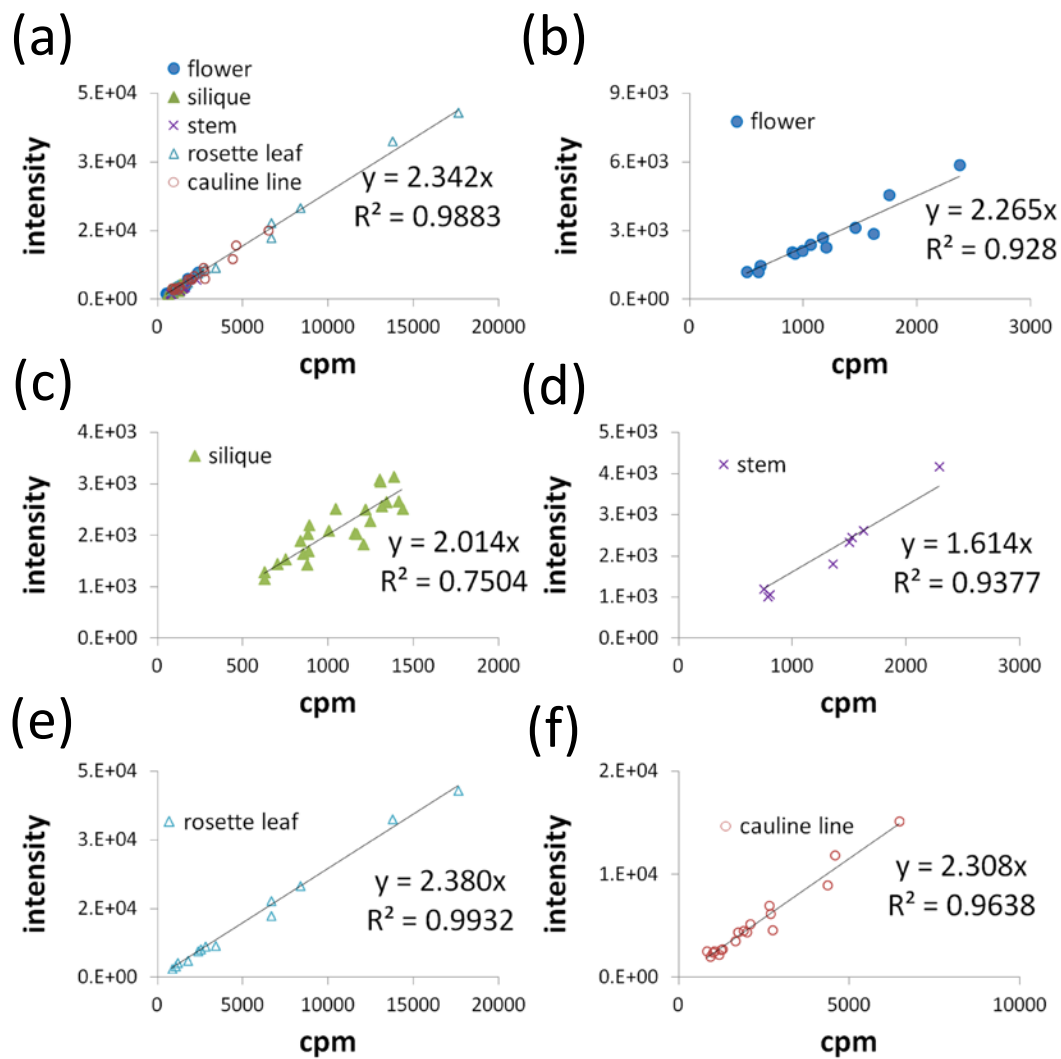


図 2-12 自己吸収が⁶⁵Znの定量性に及ぼす影響

RRIS (intensity) およびγカウンター (cpm) により、(a) 植物全体、(b) 花、
 (c) 花茎、(d) 莢、(e) ロゼット葉、および (f) 茎生葉における⁶⁵Znの測定比
 較を行った。

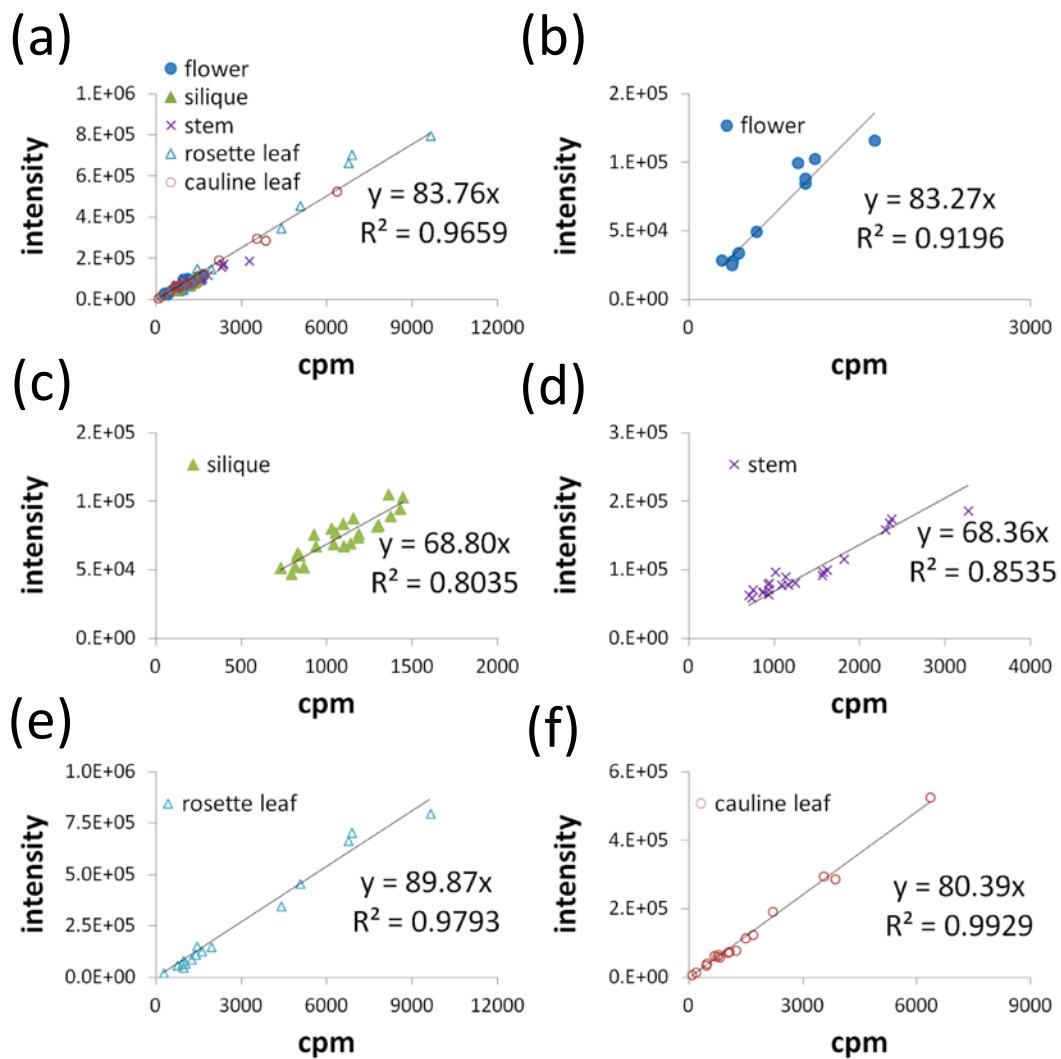


図 2-13 自己吸収が ^{86}Rb の定量性に及ぼす影響

RRIS (intensity) および γ カウンター (cpm) により、(a) 植物全体、(b) 花、(c) 花茎、(d) 莢、(e) ロゼット葉、および (f) 茎生葉における ^{86}Rb の測定比較を行った。

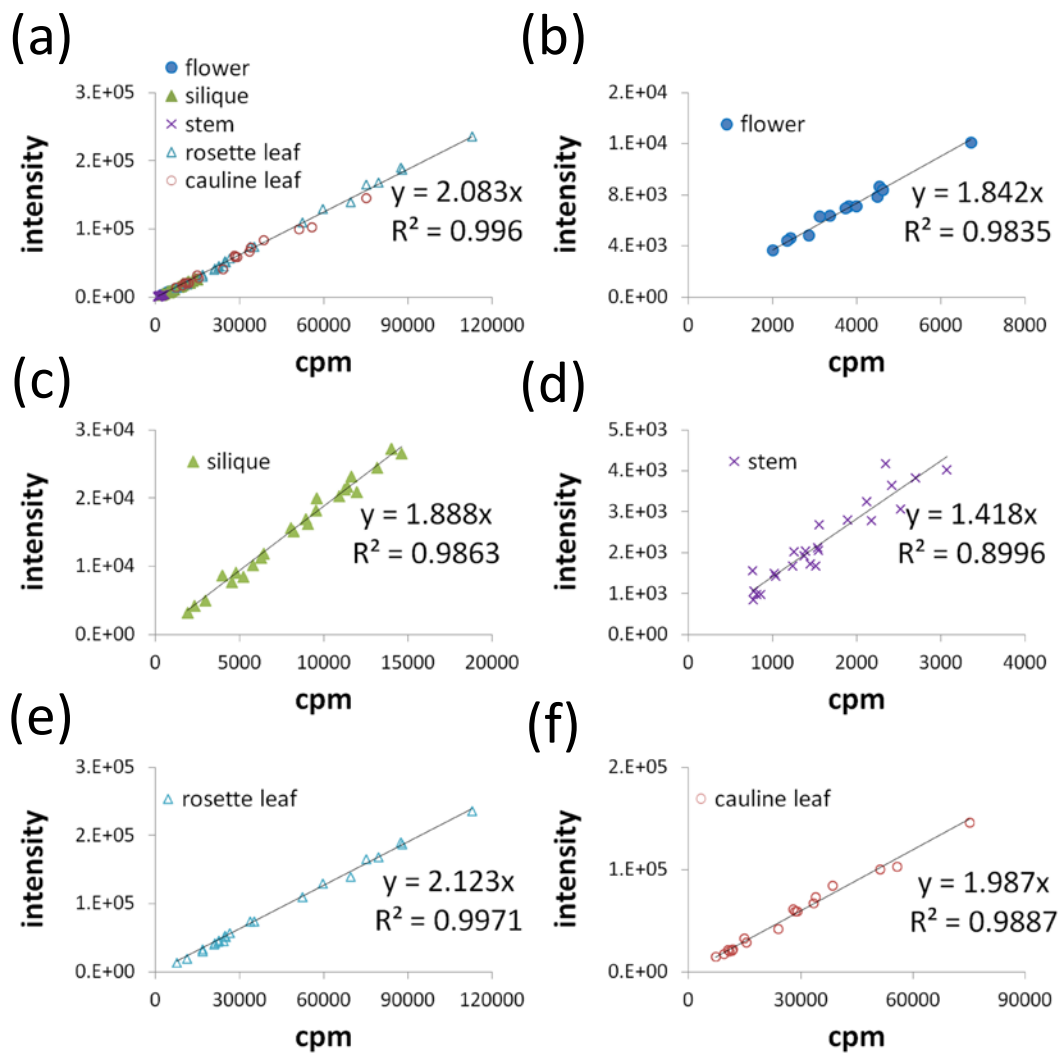


図 2-14 自己吸収が¹⁰⁹Cd の定量性に及ぼす影響

RRIS (intensity) およびγカウンター (cpm) により、(a) 植物全体、(b) 花、
 (c) 花茎、(d) 莢、(e) ロゼット葉、および (f) 茎生葉における¹⁰⁹Cd の測定比
 較を行った。

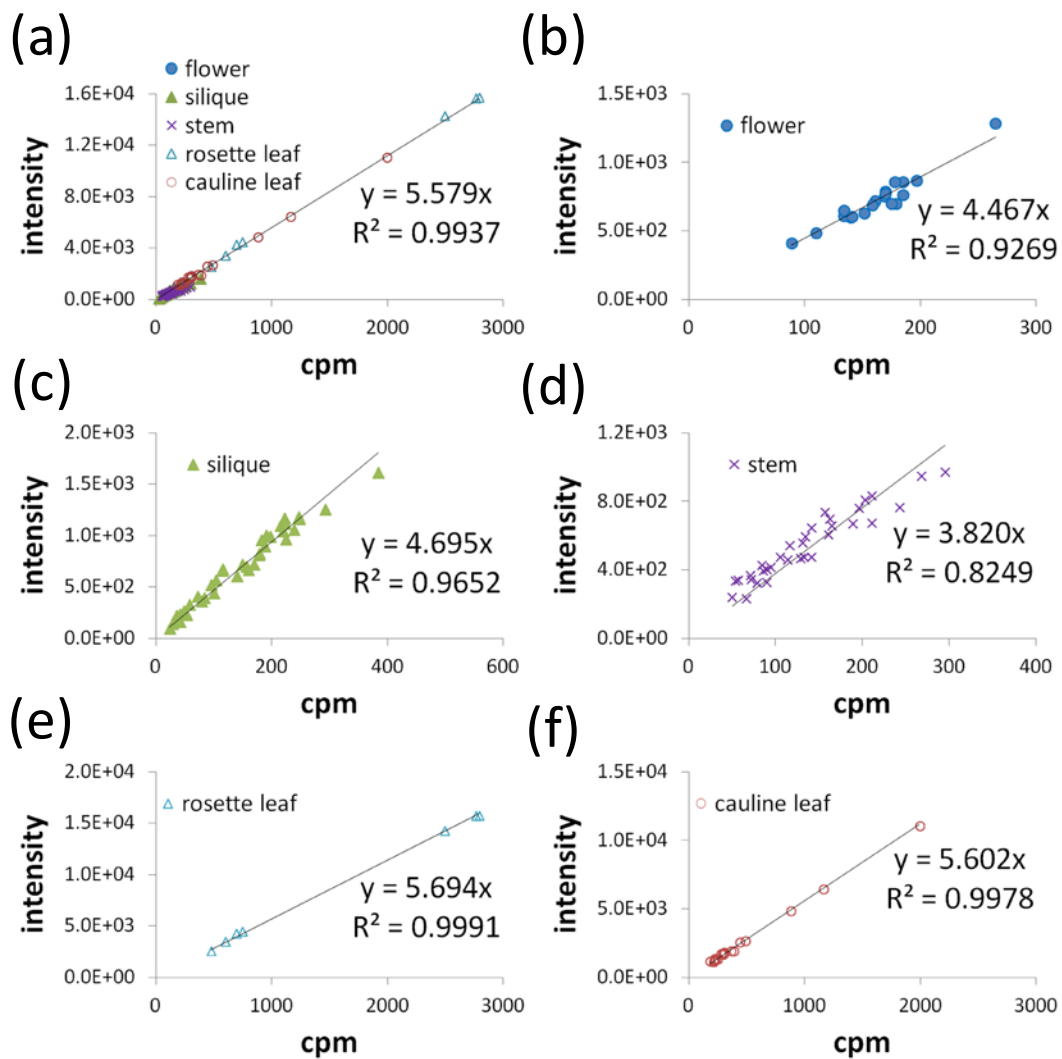


図 2-15 自己吸収が¹³⁷Cs の定量性に及ぼす影響

RRIS (intensity) およびγカウンター (cpm) により、(a) 植物全体、(b) 花、
(c) 花茎、(d) 莢、(e) ロゼット葉、および (f) 茎生葉における¹³⁷Cs の測定比較を行った。

表 2-4 RRIS および γ カウンターの測定値から算出した検量線の決定係数 (R^2)、傾きおよびサンプル数 (n)

		C-14	Na-22	Mg-28	Zn-65	Rb-86	Cd-109	Cs-137
whole	R^2	0.8396	0.9803	0.9869	0.9883	0.9659	0.9960	0.9937
	傾き	1.006	10.10	27.27	2.342	83.77	2.083	5.579
	n	111	90	109	76	90	101	117
flower	R^2	0.9815	0.9699	0.9781	0.9280	0.9196	0.9835	0.9269
	傾き	0.6200	7.410	19.58	2.270	83.27	1.842	4.467
	n	7	14	15	13	11	13	19
silique	R^2	0.7101	0.7088	0.9172	0.7504	0.8035	0.9863	0.9652
	傾き	0.6830	6.898	19.46	2.014	68.80	1.888	4.695
	n	14	24	27	24	24	24	39
stem	R^2	0.2263	0.9625	0.9773	0.9377	0.8535	0.8996	0.8249
	傾き	0.8768	5.930	20.37	1.614	68.36	1.418	3.820
	n	43	24	28	8	22	24	33
rosette leaf	R^2	0.8973	0.9964	0.9970	0.9932	0.9793	0.9971	0.9991
	傾き	1.158	10.49	27.86	2.380	89.87	2.123	5.694
	n	31	9	23	13	16	22	7
cauline leaf	R^2	0.6384	0.9520	0.9903	0.9638	0.9929	0.9887	0.9978
	傾き	0.7808	9.458	29.83	2.308	80.39	1.987	5.602
	n	16	19	16	18	17	18	19

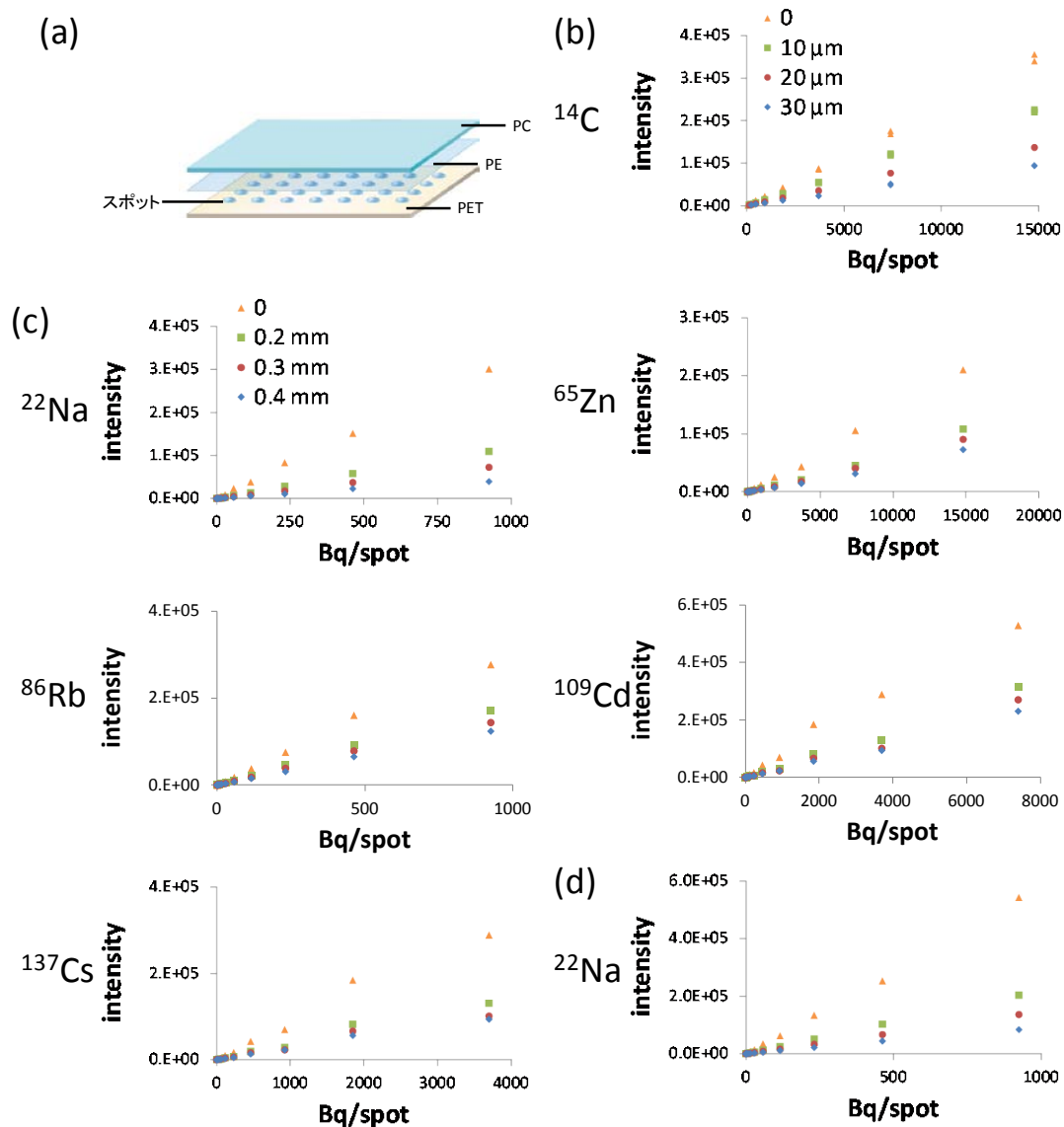


図 2-16 遮蔽材による放射線遮蔽効果が定量性に及ぼす影響

- (a) 試料の概略図。RI 標準液をスポットしたシートに、PC 製シート (0.2, 0.3, 0.4 mm) を FOS との間に重ねることで、放射線の遮蔽を行った。
- (b) 遮蔽材の影響解析。 ^{14}C においては PE 製ラップ (10, 20, 30 μm) を用いて遮蔽した。測定する ROI をスポットと同一面積に設定して測定した。
- (c) 遮蔽材の影響解析。 ^{22}Na , ^{65}Zn , ^{86}Rb , ^{109}Cd , ^{137}Cs においては、PC 製シートを用いて遮蔽した。測定する ROI はスポットと同一面積に設定して測定した。
- (d) 遮蔽材の影響解析。 ^{22}Na において、ROI 面積を拡大して測定した。

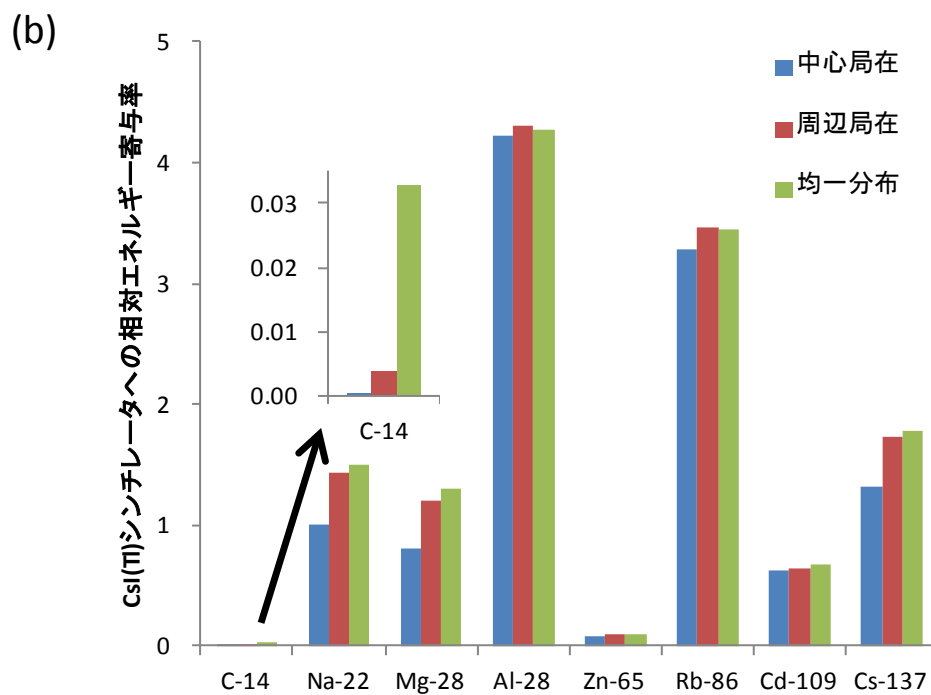
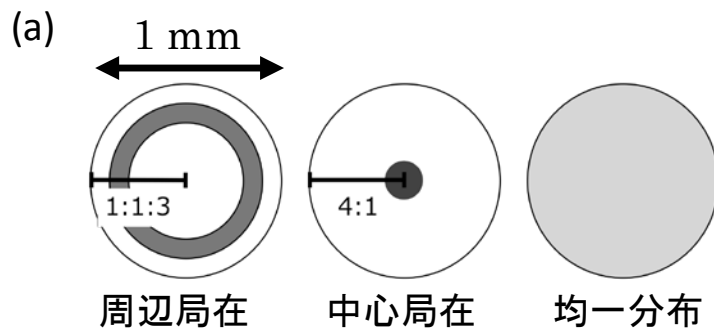


図 2-17 シミュレーションを用いた花茎内の RI 分布による自己吸収の影響

- (a) モデル化した花茎の概略図。花茎は直径 1 mm とした。RI 分布は 3 種類設定した。一つ目は、維管束にのみ RI が存在した花茎をモデル化した（周辺局在）。維管束外部組織：維管束：維管束内部組織の幅を 1：1：3 とした。二つ目は、中心部に RI が局在した花茎をモデル化した（中心局在）。三つ目は、均一に RI が分布した花茎をモデル化した（均一分布）。
- (b) 各 RI が 10 万壊変したときのシミュレーション結果。Na-22 の中心局在の値を 1 として図示した。

表 2-5 核種および線質による RRIS の検出特性

それぞれの RI が 10 万壊変した場合の、CsI(Tl)シンチレータが吸収したエネルギー総量に対する線質ごとの吸収割合を寄与率 (%) として算出した。

核種	壊変様式	平均 エネルギー	CsI吸収エネルギー量 (MeV/100,000decay)	寄与率 (%)
C-14	β	0.049	39.3	100.0
Na-22	Positron	0.216	1709.7	93.9
	γ	1.275	72.4	4.0
	ce Total	1.274	0.0	0.0
Mg-28	β	0.152	1004.0	64.3
	γ 1	0.031	446.0	28.6
	γ 7	1.373	39.7	2.5
	γ 4	0.942	32.9	2.1
	γ 2	0.401	31.4	2.0
	γ 9	1.620	3.2	0.2
	γ 8	1.589	2.5	0.2
	γ 10	1.014	0.5	0.0
	ce (K, γ 1)	0.029	0.0	0.0
	Auger (K)	0.001	0.0	0.0
	ce (L, γ 1)	0.031	0.0	0.0
	γ 3	0.607	0.0	0.0
	γ 5	0.983	0.0	0.0
	γ 6	1.342	0.0	0.0
	X-ray (K)	1.487	0.0	0.0
	Al-28	β	1.242	5030.8
γ		1.779	73.7	1.4
Zn-65	X-ray (K α 1)	0.008	44.3	36.9
	X-ray (K α 2)	0.008	22.2	18.4
	γ 3	1.116	32.8	27.3
	X-ray (K β)	0.009	11.5	9.6
	Positron	0.143	9.0	7.5
	ce (K, γ 3)	1.107	0.3	0.3
	ce (L, γ 3)	1.114	0.0	0.0
	γ 2	0.771	0.0	0.0
	γ 1	0.345	0.0	0.0
	Auger (K)	0.007	0.0	0.0
	X-ray (L)	0.001	0.0	0.0
Auger (L)	0.001	0.0	0.0	
Rb-86	β	0.668	4115.3	99.8
	γ	1.077	7.6	0.2
	X-ray (K α 1)	0.013	0.0	0.0
	X-ray (K α 2)	0.013	0.0	0.0
	Auger (K)	0.011	0.0	0.0
	Auger (L)	0.002	0.0	0.0
Cd-109	X-ray (K α 1)	0.022	394.4	48.4
	X-ray (K α 2)	0.022	210.4	25.8
	X-ray (K β)	0.025	131.0	16.1
	ce (L)	0.084	29.5	3.6
	γ	0.088	27.9	3.4
	ce (K)	0.063	8.0	1.0
	ce (M)	0.087	6.4	0.8
	X-ray (L)	0.003	0.4	0.0
	Auger (K)	0.019	0.0	0.0
	Auger (L)	0.003	0.0	0.0
Cs-137	β	0.188	1472.2	69.2
	ce (K, γ 2)	0.624	443.6	20.8
	ce (L, γ 2)	0.656	77.3	3.6
	γ 2	0.662	65.9	3.1
	X-ray (K α 1)	0.032	24.7	1.2
	ce (M, γ 2)	0.660	16.5	0.8
	X-ray (K α 2)	0.032	12.7	0.6
	X-ray (K β)	0.036	11.9	0.6
	ce (N, γ 2)	0.661	3.8	0.2
	X-ray (L)	0.004	0.2	0.0
	γ 1	0.284	0.0	0.0
	Auger (K)	0.026	0.0	0.0
	Auger (L)	0.004	0.0	0.0

第3章 間欠照明システムの構築による様々な核種における 輸送動態の可視化および動態解析

第1節 間欠照明システムの構築

3-1-1 諸言

RRIS の技術的課題の一つに、遮光と照明の両立があった。放射線から変換された可視光は非常に微弱である。さらに、RRIS で用いたカメラシステムは高感度である半面、強い光にさらされると受光素子の焼き付きなどの損傷を引き起こす。そのため、CCD カメラ周辺は完全に遮光されている必要がある。その一方で、植物の生存には強い照明が必要である。

従来のシステムにおける遮光・照明条件と課題を以下に述べる。

第1世代 RRIS

RRIS 開発初期段階においては、遮光と照明を両立できず、暗条件下でのみ撮影を行っていた (Kanno *et al.* 2007)。光合成をはじめとした通常の生理活動を保った状態での解析が難しく、短時間での吸収実験を中心に行っていた (図3-1a)。

第2世代 RRIS

暗箱の中にさらに植物育成用のチャンバーを設置し、チャンバー内のみを照明することにより、撮影と同時に照明を使うことができるようになった (図3-1b)。照明には白色LEDライトを用いた。ただし、FOSはLEDの光を透過するため CCD カメラに光が到達してしまう。そこでFOS表面を50 μm厚のアル

ミ板で覆うことで遮光を行った (Yamawaki et al. 2009)。ところが、アルミ板は、低エネルギー放射線を遮蔽してしまうため、 ^{32}P などの高エネルギー放射線を放出する核種しか検出できなかった。

本研究の目標は、様々な核種における輸送動態の可視化である。そのため、アルミ板による遮光を行わずに植物への照明を用いた撮影システムを構築する必要があった。特に ^{14}C は遮蔽の影響が大きく、2章4節の結果では、厚さ $30\ \mu\text{m}$ の PE 製ラップの遮蔽によりシグナル強度が3割にまで減衰した (図 2-16b)。そこで、第3世代 RRIS として、アルミ板で遮光する代わりに、撮影する間のみ照明を消す、間欠照明システムの構築を検討した。

3-1-2 実験方法

供試植物

供試植物として、温度 $22\ ^\circ\text{C}$ 、照度 $100\ \mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 、明 / 暗期 16 h/8 h の条件下、MGRL水耕液 (表 2-3) で生育させた播種後 56 日のシロイヌナズナ (*A. thaliana*:Col-0) を用いた。

照明

照明には、赤色 (中心波長: $660\ \text{nm}$) が 64 個、青色 (中心波長: $470\ \text{nm}$) が 6 個で構成された LED ライト (木下電機製) を用いた。RRIS の撮影と照明の制御を別々に行った場合、照明制御に何らかの問題が発生した場合、LED ライトが消光されないまま RRIS の撮影が開始される危険性があり、これを防ぐことが重要であった。そこで RRIS の撮影制御ソフト: AQUACOSMOS を用いて LED ライトの照明も制御することで、一方が停止した場合、他方も停

止できるようにシステムを構築した。LEDライトの点灯制御は、撮影制御ソフト：AQUACOSMOSおよびRS-232C経由で制御が可能なりレーユニットを組み合わせて行った（図3-1c）。

RRIS 撮影条件

^{86}Rb 添加したMGRL水耕液（1 MBq/30 mL）にシロイヌナズナを移植した後、RRISにより72時間連続撮影を行った。FOSへの植物の固定には、メディカルテープおよび多数の穴があるPE製ラップを用いた。照明はLEDライト（照度 $100 \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ）を用いて、暗期15分と明期44.5分を交互に繰り返し行い、暗期においてRRISを用いて15分の積算画像を取得した。なお、LEDライトの点灯や消灯のタイミングがずれる危険性を考慮し、RRISの撮影が開始される前後に、15秒ずつ暗期を設けた。

3-1-3 結果と考察

間欠照明システムにより、植物への照明と撮影の両立が可能となった（図3-2）。本節では、放射線エネルギーが強い ^{86}Rb の可視化を行ったが、アルミ板を使わずに照明と遮光の両立が可能となったことにより、 ^{14}C や ^{35}S といった低エネルギー β 線放出核種における可視化もできると考えられる。ただし、撮影時に消光を必要とするため、連続照明下とは植物生理が異なることが考えられる。光合成や呼吸に大きく関わる気孔の開閉は数分オーダーで光環境に反応する（難波ら 2004）ことから、15分の撮影期間中は光合成活性などが低下していると予想される。実際に研究応用する際には、これらを考慮した実験系および考察が必要である。

第2節 RI像と実画像の同時取得システム

RI像と実画像を別々に取得するシステムでは、RIの局在部位を特定するために、二つの画像を重ね合わせる必要がある。これまでの RRIS 撮影においては、実画像の撮影を、RRIS の撮影の前後に行っていたことから、RIが特定の部位にのみ集積する場合や、あるいは、長期間の撮影中に植物が生長する場合などには、RI像と実画像を正確に重ね合わせることが難しい、という課題があった。そこで、間欠照明における明期に植物試料をデジタルカメラで撮影するシステムを構築し、RRIS によるRI像と実画像を重ね合わせる撮影手法を検討した。

3-2-1 実験方法

供試植物

供試植物として、温度 22 °C、照度 100 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ 、明 / 暗期 16 h/8 h の条件下、MGRL水耕液（表 2-3）で生育させた播種後 43 日のシロイヌナズナ（*A. thaliana*:Col-0）を用いた。

RRIS 撮影条件

^{32}P -リン酸を添加した MGRL 水耕液（500 kBq/30 mL）にシロイヌナズナを移植した後、RRIS により 48 時間連続撮影を行った。FOSへの植物の固定は、メディカルテープおよび多数の穴がある PE 製ラップを用いた。照明はLEDライト（照度 100 $\mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$ ）を用いて、暗期 15 分と明期 45 分を交互に繰り返し行い、暗期において RRIS を用いて 15 分の積算画像を取得した。

実画像撮影

植物試料の実画像撮影用にデジタルカメラ（D5100、ニコン製）を、植物試料を中心として CCD カメラと対向の位置に設置した（図 3-3）。デジタルカメラの撮影制御には Camera Control Pro 2（ニコンイメージングジャパン製）を用いた。実画像撮影は 1 時間ごとに 1 回、明期開始後 3 分において撮影した。RI 像と実画像の重ね合わせは、画像処理ソフト：Photoshop（アドビ システムズ製）を用いた。

3-2-2 結果と考察

48 時間にわたる RRIS の撮影期間中に、供試植物の花茎がおよそ 1.5 cm 伸長したが、花茎の先端とシグナルの位置の上端が一致しており（図 3-4）、根に吸収された ^{32}P -リン酸が、植物の地上部の隅々にまで速やかに輸送される様子が捉えられた。また、花茎において、 ^{32}P のシグナル強度が高い部分が見られたが（図 3-4）、実画像と重ね合わせたところ、この部分は、メディカルテープで植物を固定した部位であることが分かった。つまり、花茎上のシグナルの局在は、FOS と植物との空間距離が短いことに起因しており、生理学的な要因を反映しているものではないと考えられる。そして、このような検証も、RI 像と実画像の正確な重ね合わせによって、容易に行うことができるようになった。

ライブイメージングにおいて、RI 像と実画像を連続的に重ね合わせた研究例として、PlanTIS が挙げられる。PlanTIS は、RI 像と MRI（magnetic resonance imaging）による 3 次元画像を重ね合わせることで、例えば、土壌中における根や根菜と RI 分布の位置合わせ、も可能である（Jahnke *et al.* 2009）。本システムを用いて土壌中における植物組織の実画像を取得するに

は、土壌への植物の設置に工夫が必要である。具体的には、土壌を透明ケースに充填し、ケース側面に根を2次元的に伸長させる、というような工夫であり、自然状態で生育させた植物の実画像取得は不可能である。一方、地上部におけるRI像と実画像を連続的に撮影し、両者を重ね合わせて解析した研究例は見当たらなかった。これは、ライブイメージングに関する多くのシステムが、半減期が数分から数十分と短いポジトロン放出核種を解析対象にしているためと思われる。短半減期のポジトロン放出核種では、解析する時間は数時間程度であることが多く、撮影時間中に植物の位置が大きく変わることがほとんどない。そのため、撮影時間中に実画像を連続的に取得する必要性が少ないと考えられる。

第3節 様々な核種を用いた RRIS 連続撮影および積み下ろしの解析

本章1節により、アルミ板を用いずに照明と遮光を両立する間欠照明システムを構築したため、低エネルギー β 線放出核種の可視化が期待できた。そこで本節では、放出する低エネルギー β 線放出核種の ^{35}S をはじめとする様々な核種を用いて、シロイヌナズナにおける元素の輸送動態の可視化を行った。植物に吸収された元素は、維管束内から周辺組織への積み下ろし、さらには周辺組織から維管束内への積み込みを行いながら輸送・分配される。そのため、各元素の分布は、元素ごとの積み下ろし・積み込みのメカニズムの違いによって大きく異なると考えられる。そこで、RRISによって取得した元素の分布画像を基に、元素の輸送経路である節および節間（節と節の間）における維管束からの積み下ろしのメカニズムについて元素ごとに解析を行い、それぞれを比較した。

3-3-1 実験方法

供試植物

供試植物として、温度 22 °C、照度 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 、明 / 暗期 16 h/8 h の条件下、MGRL水耕液（表 2-3）で生育させた播種後 43 日±2 日のシロイヌナズナ（*A. thaliana*:Col-0）を用いた。

FOS表面への植物の固定方法

植物試料とFOSの空間距離を小さくすることは定量性の確保のために重要である。シロイヌナズナにおいては、各方向に枝や莢が生長するため、FOSに植物をしっかり近接させるためには、ある程度圧迫する必要があるが、できる限り植物に負荷をかけずに固定することが望ましい。そこで、ガス透過性、水蒸気透過性、光透過率に優れた、シリコーンゴムシート（0.1 mm 厚、エスケー製）を用いて植物をFOS側へ固定した。

RRIS 撮影条件

地上部の高さが約 25 cm に生長したシロイヌナズナを、RIを含むMGRL水耕液（20 mL）に移植した後、RRISにより 24 時間連続撮影を行った。添加した各RIは次の通りである。 ^{22}Na ； 25 kBq/mL、 ^{28}Mg ； 25 kBq/mL、 ^{32}P -リン酸； 50 kBq/mL、 ^{35}S -硫酸； 500 kBq/mL、 ^{45}Ca ； 250 kBq/mL、 ^{54}Mn ； 50 kBq/mL、 ^{65}Zn ； 75 kBq/mL、 ^{109}Cd ； 50 kBq/mL、 ^{137}Cs ； 25 kBq/mL。地上部のうち、基部から約 3-22 cm の範囲を撮影範囲とした。照明はLEDライト（照度 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ ）を用いて、明期 15 分と暗期 15 分を交互に繰り返し、暗期において RRIS を用いて 15 分の積算画像を取得した。取得した画像は ImageJ を用いて半減期補正を行い、再画像化した。半減期補正による再

画像化のプラグインは、廣瀬 農特任助教により構築したものを利用した。

^{28}Mg 、 ^{45}Ca および ^{22}Na を用いた維管束からの蓄積率の解析

解析は、花茎において維管束を通じて長距離輸送されているイオンの積み下ろした割合（蓄積率）に着目して実施した。まず、花茎の中の特定の部位（A領域と称する）に流入するRI量と、この部位よりもさらに上部（B領域と称する）へ移行するRI量を算出した（図 3-15a）。A領域は、節および節間に高さ 1.5 mm の大きさを四箇所設定し、下から順に A1-A4 領域とした。また、それぞれの A 領域に対応した B 領域（B1-B4）を図 3-15b に図示したように設定した。すなわち、A1 より上部全域が B1 となり、同様に A2 より上部全域が B2 である。 ^{28}Mg の解析においては、A1 は節間に、A2、A3 および A4 は節に設定した。 ^{45}Ca の解析においては、A1、A3 および A4 は節間に、A2 は節に設定し、 ^{22}Na においては、A1、A2 は節に、A3、A4 は節間に設定した。次に、A 領域内のシグナル量を、A 領域に到達した全てのシグナル量（A+B）で除することで（例： $A1 / (A1+B1)$ ）、各 A 領域のイオン通過量に対するイオン蓄積率を算出した。

^{28}Mg 、 ^{45}Ca および ^{22}Na において、茎頂がFOSの上部を超えていたため、花茎の先端 3 cm においては可視化されなかった。ただし、RRIS 撮影後に取得したIP画像（コンタクト積算時間；60分）に基づき、RRIS では可視化されなかった領域のシグナル強度を測定した結果、RRIS で可視化した範囲のシグナル強度に対して、 ^{28}Mg および ^{45}Ca は1%未満、 ^{22}Na は5%程度であることから、当該領域が計算に含まれなくとも、蓄積率の算出にはほとんど影響がないと判断した。

3-3-2 結果と考察

様々な核種における輸送動態の可視化

^{22}Na (図 3-5)、 ^{28}Mg (図 3-6)、 ^{32}P -リン酸 (図 3-7)、 ^{35}S -硫酸 (図 3-8)、 ^{45}Ca (図 3-9)、 ^{54}Mn (図 3-10)、 ^{65}Zn (図 3-11)、 ^{109}Cd (図 3-12)、および ^{137}Cs (図 3-13) の輸送動態を可視化できた。また、 ^{35}S -硫酸の輸送動態を可視化できたことから、間欠照明システムを用いることで、低エネルギー β 線放出核種を用いた輸送動態の可視化が可能であることが実証された (図 3-8)。また、シリコーンゴムシートを用いた FOS と植物の固定は、密着性が良く、植物と FOS 間の空間による解像度の低下を抑えることができた。

各 RI の連続画像を比較した結果、地上部における元素の分布様式は大きく三つのグループに分類された (図 3-14)。

グループ 1 : ^{22}Na 、 ^{32}P -リン酸、 ^{35}S -硫酸、 ^{137}Cs は植物全体に分布した (均一型)。

グループ 2 : ^{65}Zn 、 ^{109}Cd は植物全体に分布し、特に茎生葉や莢において局所的に分布した (局在型)。

グループ 3 : ^{28}Mg 、 ^{45}Ca 、 ^{54}Mn は葉や茎頂側に比べ花茎の基部側に蓄積した (蓄積型)。花茎における ^{28}Mg 、 ^{45}Ca 、および ^{54}Mn の輸送は数時間単位での動きであることが示唆された (図 3-14)。

今回使用した ^{28}Mg は ^{28}Al と放射平衡に達しており、核種の分別ができない本イメージング手法ではこの二つの核種分布を同時に取得するため、画像解析から得られる RI の動態は ^{28}Mg の動態のみを表わしているわけではない。しかしながら、 ^{28}Al が、半減期である約 2 分の間に ^{28}Mg の分布位置とかけ離れた場所に移動することは考えにくく、反対に、花茎で捉えられた ^{28}Mg の移動は数時間単位でのイベントであって、 ^{28}Al よりも圧倒的に速いとも考えられない。つまり、

本実験においては積算時間内での²⁸Alと²⁸Mgの器官レベルでの分布はほぼ同一ととらえることができ、今回得られた分布像は²⁸Mgの分布を表していると言えるよう。

各核種の分布様式には、輸送過程における元素の化学形態や輸送体が大きく影響していることが考えられる。グループ1に分類された元素は、一価カチオン、およびアニオンである。グループ2に分類された亜鉛とカドミウムは共に、有機酸などにキレートされて長距離輸送されることが報告されている

(Cobbett *et al.* 2000, Lee *et al.* 2011)。また、亜鉛の輸送体がカドミウムも輸送することという実験結果も示されている (Rensing *et al.* 1997, Uraguchi *et al.* 2012)。グループ3には、多価カチオンが分類された。

本節により取得した、シロイヌナズナにおける連続RI像と、既往の研究報告とを比較することで、元素の輸送動態における植物種間差を検討した。まず、シロイヌナズナの根に吸収された³²P-リン酸および³⁵S-硫酸は4時間以内に植物体全体に輸送されたが(図3-7, 3-8)、莢内の一部分に局所的に蓄積する様子は示されなかった(図3-14)。一方、シロイヌナズナと同じアブラナ科の植物であるナタネを用いて、莢における³²P-リン酸および³⁵S-硫酸の輸送動態を解析した研究(Nakanishi *et al.* 2009)では、³²Pは莢の中心部分に、³⁵Sは莢の先端部分に多く蓄積した。イネ幼植物においては、³²P-リン酸および³⁵S-硫酸を経根吸収させると、15分後には植物体全体からシグナルが検出された

(Kobayashi *et al.* 2013)。また、⁴⁵Caも、吸収開始後48時間には、イネ全体に輸送された(Kobayashi *et al.* 2013)。一方、本研究の結果、⁴⁵Caは、吸収開始後24時間の時点においても花茎上部にはほとんど輸送されず、花茎基部側に蓄積することが示された(図3-9)。カドミウムの吸収輸送について、¹⁰⁷Cdを用いて解析した報告によると、イネにおいては、¹⁰⁷Cdは節に多く蓄積する(Fujimaki *et al.* 2010)が、本実験では、シロイヌナズナの花茎におい

て、節に ^{109}Cd が蓄積する様子は見られなかった（図3-12）。PETISを用いたオオムギにおける ^{52}Mn の輸送動態に関する研究では（Tsukamoto *et al.* 2006）、シロイヌナズナと同様に（図3-10）、 ^{52}Mn の輸送速度は遅いと結論付けられた。ただし、オオムギにおいて、 ^{52}Mn は植物体全体に分布したが（Tsukamoto *et al.* 2006）、シロイヌナズナでは花茎の基部側に ^{54}Mn が多く蓄積した（図3-10）。以上のことから、植物体内での元素の輸送動態は、元素による違いのみならず、同じ元素でも植物種間で大きく異なる可能性が示された。

花茎における ^{28}Mg 、 ^{45}Ca および ^{22}Na の積み下ろしの解析

グループ3（蓄積型）に分類されたマグネシウム、カルシウムやマンガンは生長に必須であることから、花茎先端の組織にも輸送されていると考えられたため、今回の撮影で花茎の茎頂はほとんど可視化されなかったことは、非常に興味深い。そこで、グループ3に属する ^{28}Mg と ^{45}Ca の積み下ろしを解析し、さらには、均一型である ^{22}Na も同様に解析を行い、元素ごとの長距離輸送メカニズムについて比較考察した。

RI連続画像からA領域ならびにB領域におけるシグナル量を算出した結果、 ^{28}Mg 、 ^{45}Ca および ^{22}Na は全てのROIにおいて吸収開始後8.5-24時間ではシグナル強度が単調増加した（図3-16a, 16b, 16c, 16d, 16e, 16f）。このことから花茎では、茎頂から根に向かう方向の輸送は経根吸収から24時間以内にはほとんどないことが示唆され、輸送としては上方への移行のみを考慮すればよいことがわかった。また、A領域およびB領域において、 ^{28}Mg 量と ^{45}Ca 量は直線的に増加したが、 ^{22}Na の増加量は直線的でなかった。このことは、花茎に輸送された ^{22}Na には、ロゼット葉を経由せずに花茎へ直接輸送されたものと、ロゼット葉に入った後に花茎へ輸送されものが存在し、撮影初期には後者がまだ検出されなかったことを表しているのではないかと考えた。

蓄積率を解析した結果、 ^{28}Mg と ^{45}Ca は各A領域における蓄積率には経時的な変化がないことが示され（図 3-17a, 17c）、このことから、 ^{28}Mg と ^{45}Ca は組織ごとに一定の割合で維管束から周辺組織に積み下ろされている可能性が考えられ、また、24 時間の間は再転流が起きていないと考えられた。さらに、花茎上の位置（地上部基部からの高さ）と蓄積率に高い相関があり、高い位置にある花茎ほど ^{28}Mg および ^{45}Ca の通過量当たりの蓄積率が高く、花茎が 1.5 mm 上部に向かうにつれ蓄積率は、 ^{28}Mg はおよそ0.17 %、 ^{45}Ca は0.14 %ずつ増加することが示された（図 3-17b, 17d）。一方 ^{22}Na の蓄積率は、 ^{22}Na 吸収開始後 24 時間において、地上部55 mmの位置で0.01 %であった。さらに、節間での ^{22}Na の蓄積率には経時的な変化は見られなかった一方、節においては時間とともに増加した（図 3-17e）。この点、 ^{28}Mg および ^{45}Ca の蓄積率に関して得られた結果には、節と節間の区別は見られなかった（図 3-17b, 17d）。これらのことは、 ^{22}Na は節と節間での輸送メカニズムは異なることを示唆するものと考えられた。現時点で想定される仮説としては、例えば、根から吸収された後、直接花茎へ輸送された ^{22}Na と、ロゼット葉に入った後に篩管により花茎へ輸送された ^{22}Na では、節における積み下ろしのメカニズムが異なることが考えられる。つまり、撮影期間後半には、節で検出されたシグナル量のうち篩管輸送された ^{22}Na の占める割合が大きくなり、かつ、篩管から積み下ろされる ^{22}Na の方が蓄積率は高いという仮説である。今後、今回観察された積み下ろしが導管由来か篩管由来か、という点を明らかにすることで、各イオンの輸送メカニズムを解くために必要な情報が得られるものと思われる。さらには、根の切片を作成するなどして様々な元素およびトレーサーの水平方向の分布を調べるなど検討が必要であろう。

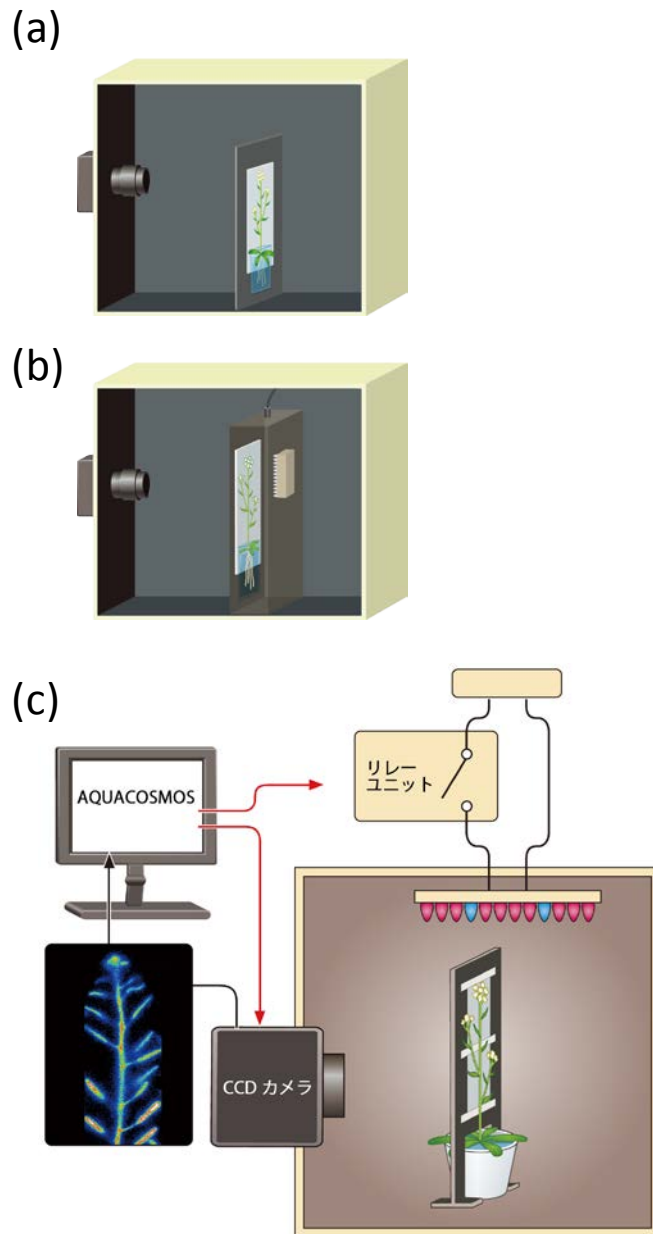


図 3-1 RRIS における照明システムの概略図

- (a) 第 1 世代 RRIS 概略図。照明を用いて撮影ができなかった。
- (b) 第 2 世代 RRIS 概略図。暗箱内に植物育成用のチャンバーを設置することで照明を行った。FOSと植物との間にアルミ板を設置することで、FOSを透過する光を遮光した。
- (c) 第 3 世代 RRIS 概略図。間欠照明システムにより、アルミ板を用いずに撮影と照明を両立した。AQUACOSMOSおよびリレーユニットを組み合わせ、撮影および照明制御を行った。

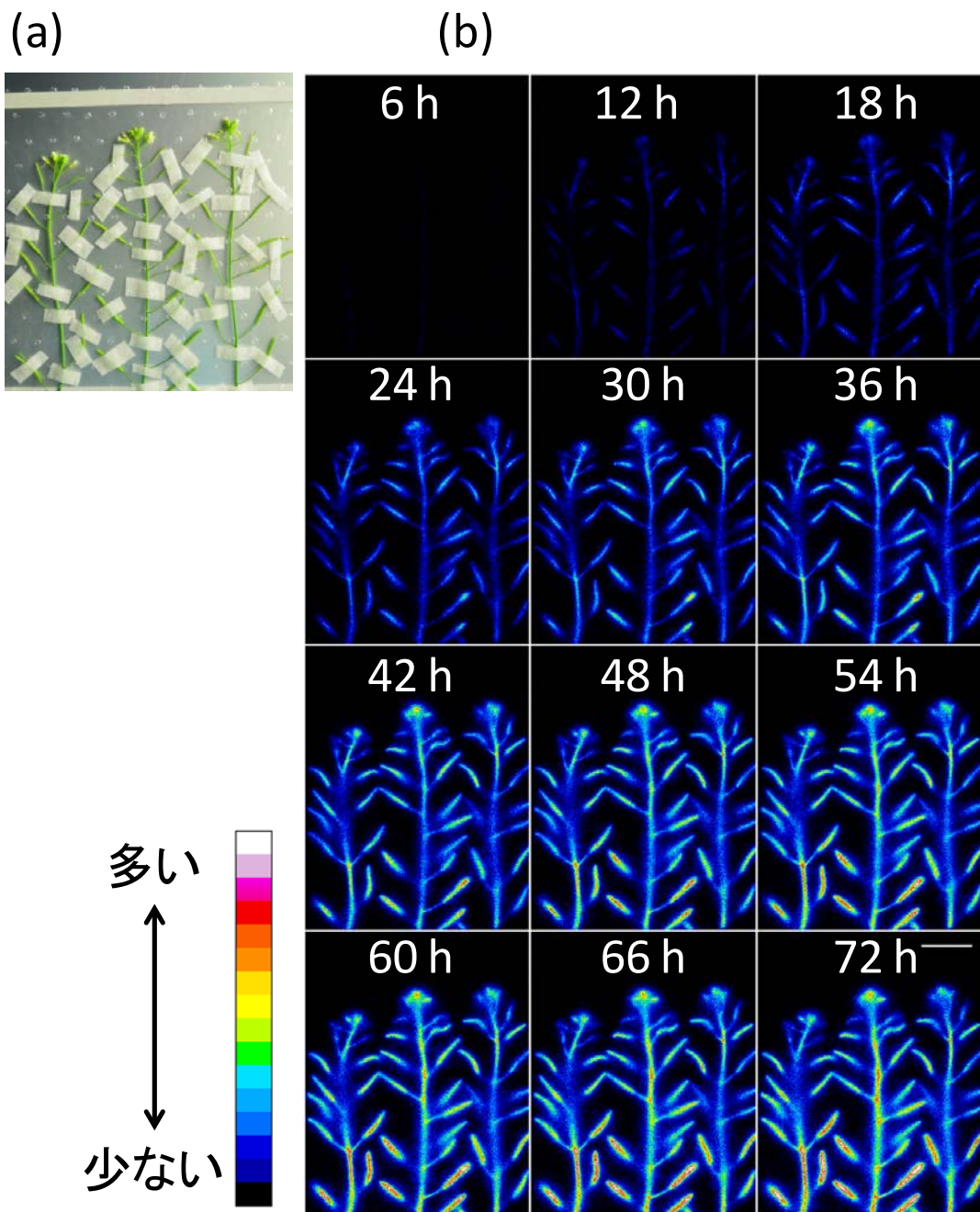


図 3-2 間欠照明システムを用いた RRIS 撮影

(a) 供試植物の実画像。

(b) シロイヌナズナにおける ^{86}Rb の輸送動態。暗期 15 分、明期 45 分を繰り返し行い、暗期において、RRIS により 15 分の積算画像を取得した。各画像に表記した時間は、吸収開始後の経過時間を表す。スケール ; 20 mm

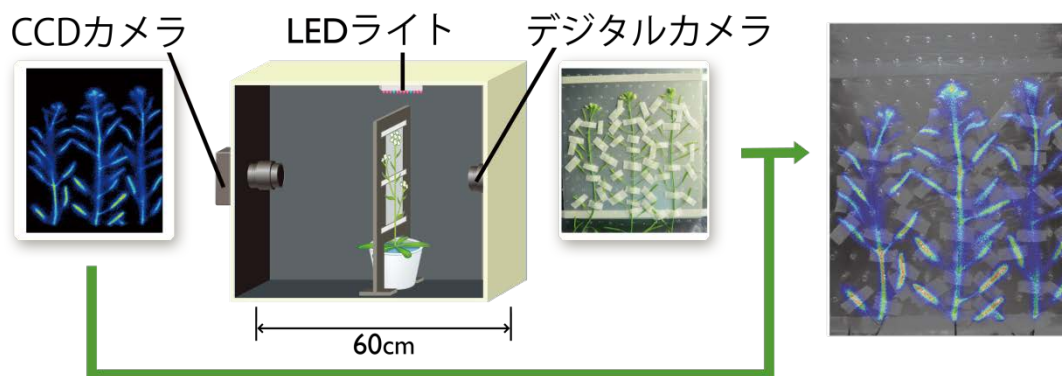


図 3-3 RRIS および実画像の同時撮影概略図

間欠照明の明期において、デジタルカメラによる実画像を撮影した。

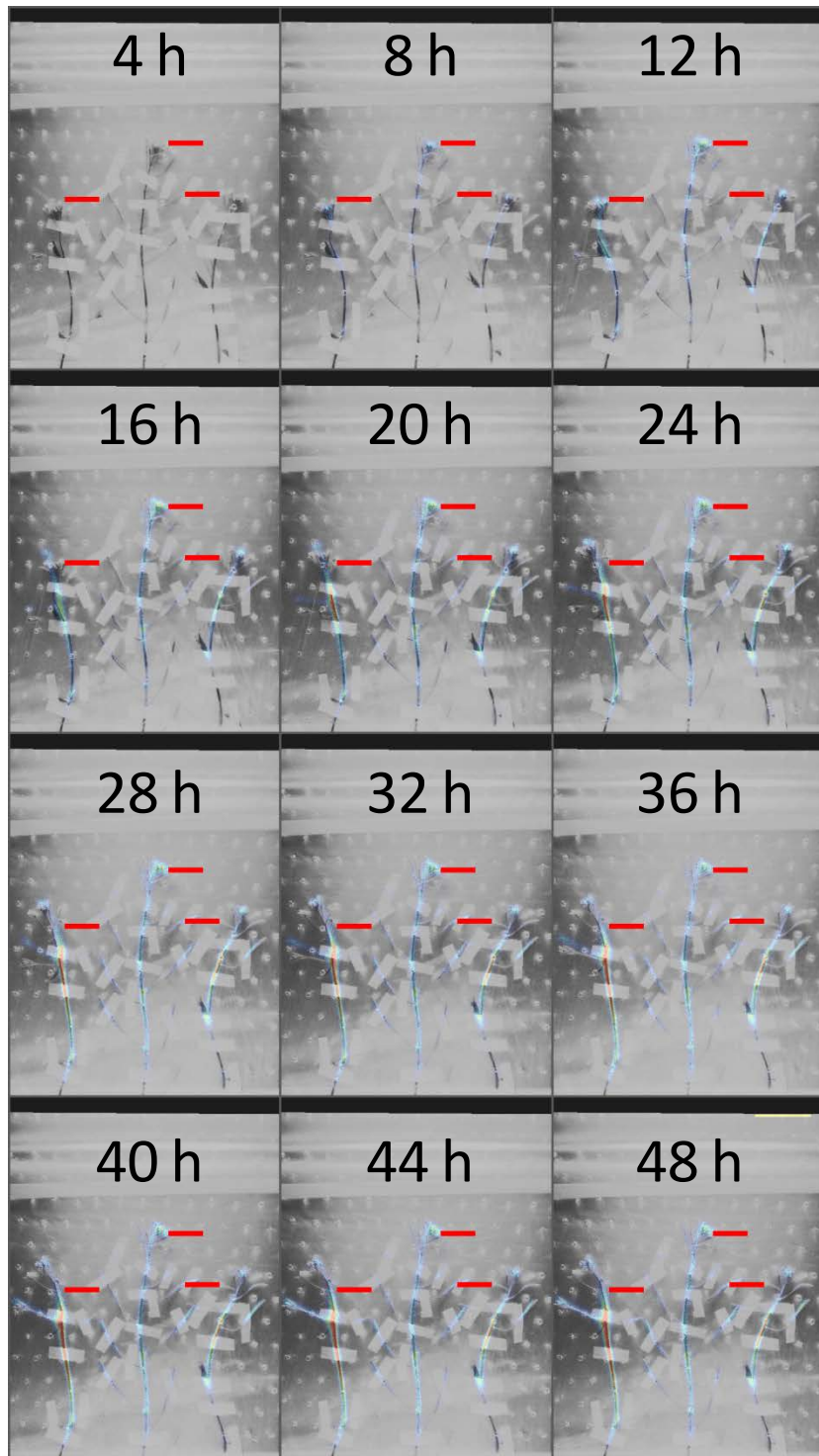


図 3-4 シロイヌナズナにおける ^{32}P の輸送動態および実画像の重ね合わせ
 間欠照明により、明期 45 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像当
 たり 15 分ずつ、合計 48 画像（48 時間）を取得した。また、暗期にデジ
 タルカメラを用いて実画像を撮影した。撮影開始時における花茎先端部分
 を赤線で示した。

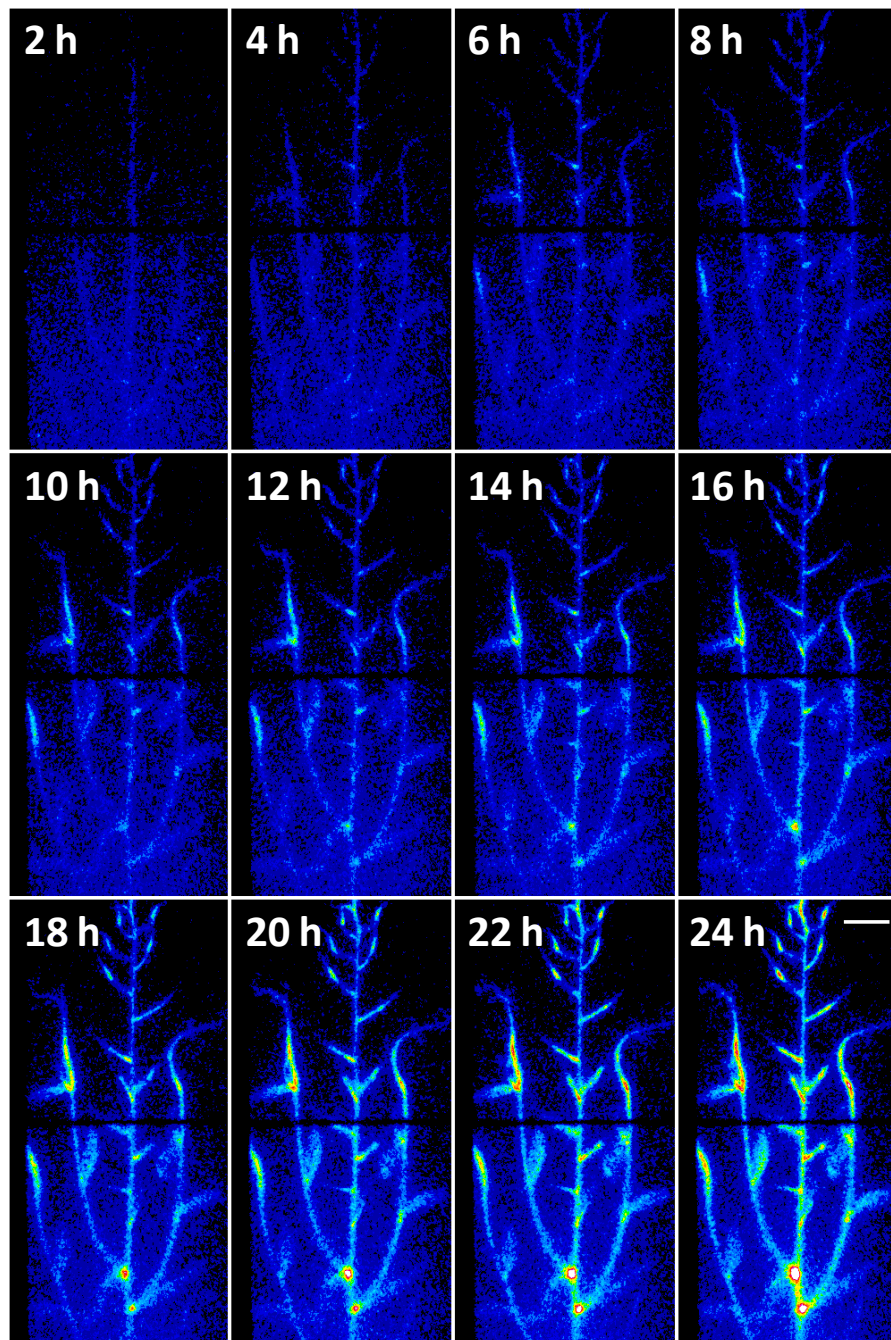


図 3-5 シロイヌナズナにおける ^{22}Na の輸送動態

間欠照明により、明期 15 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像当たり 15 分ずつ、合計 48 画像（24 時間）を取得した。スケール；20 mm

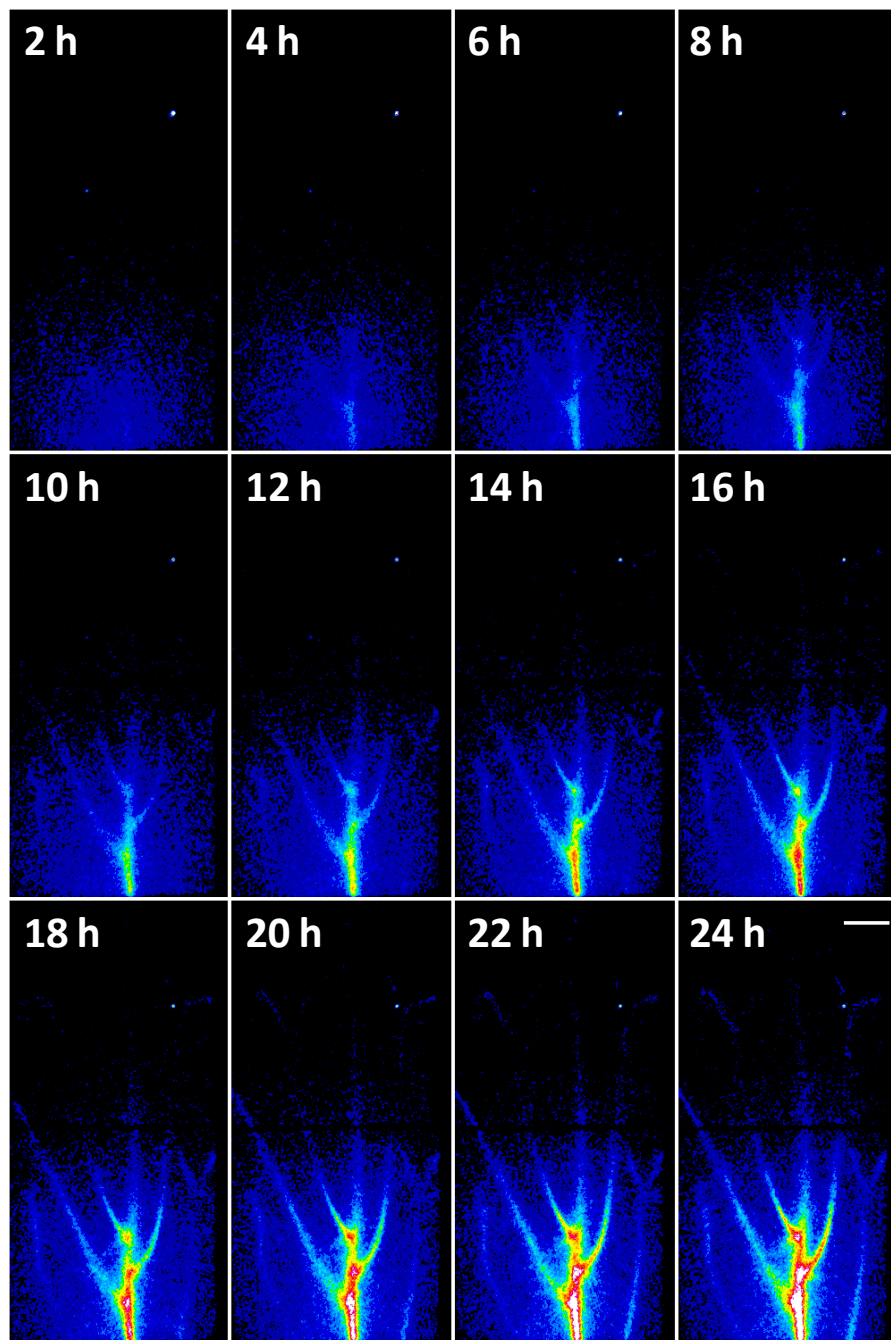


図 3-6 シロイヌナズナにおける ^{28}Mg の輸送動態

間欠照明により、明期 15 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像当たり 15 分ずつ、合計 48 画像（24 時間）を取得した。スケール；20 mm

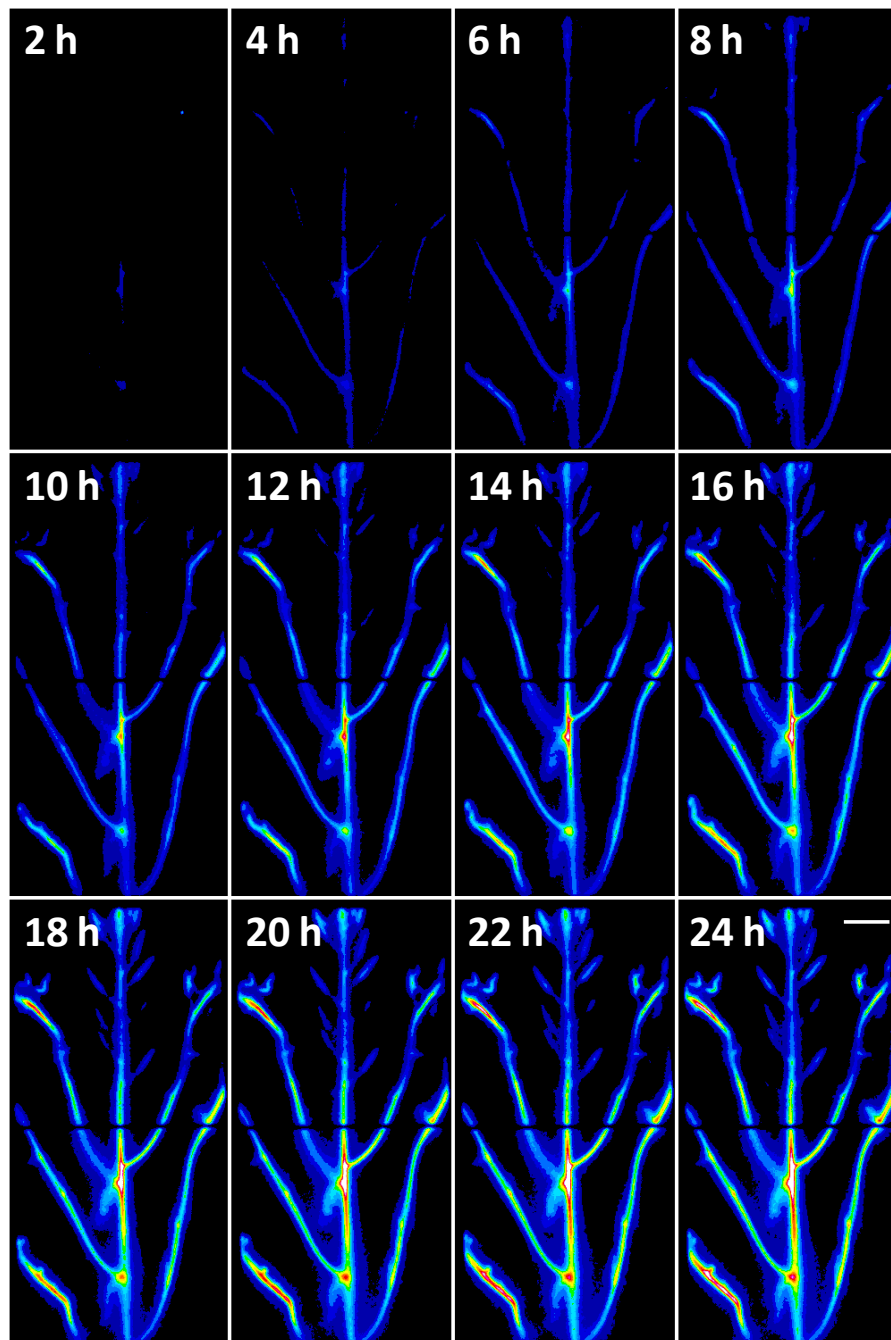


図 3-7 シロイヌナズナにおける ^{32}P -リン酸の輸送動態

間欠照明により、明期 15 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像当たり 15 分ずつ、合計 48 画像（24 時間）を取得した。スケール；20 mm

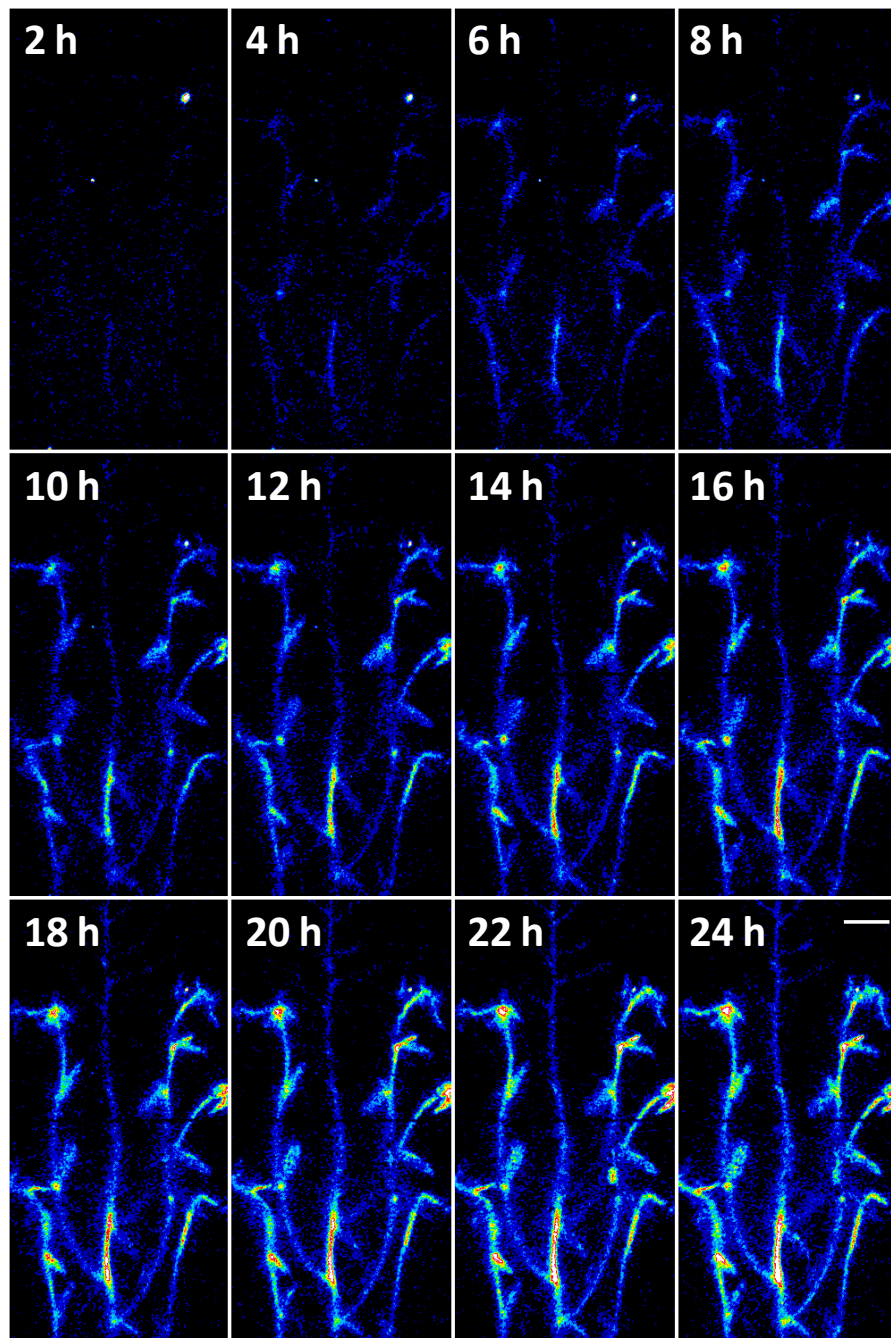


図 3-8 シロイヌナズナにおける ^{35}S -硫酸の輸送動態

間欠照明により、明期 15 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像当たり 15 分ずつ、合計 48 画像（24 時間）を取得した。スケール；20 mm

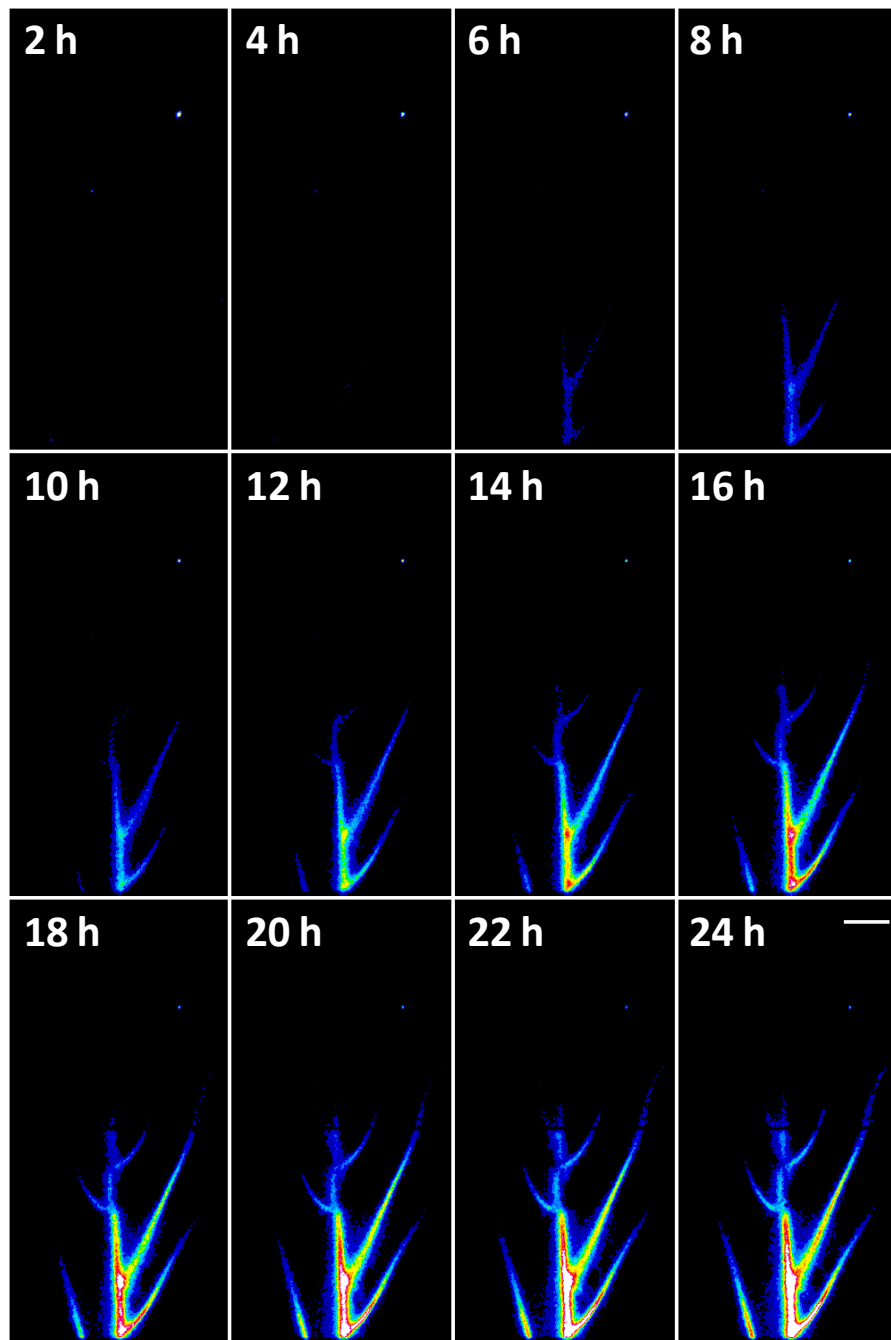


図 3-9 シロイヌナズナにおける ^{45}Ca の輸送動態
 間欠照明により、明期 15 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像当たり 15 分ずつ、合計 48 画像（24 時間）を取得した。スケール；20 mm

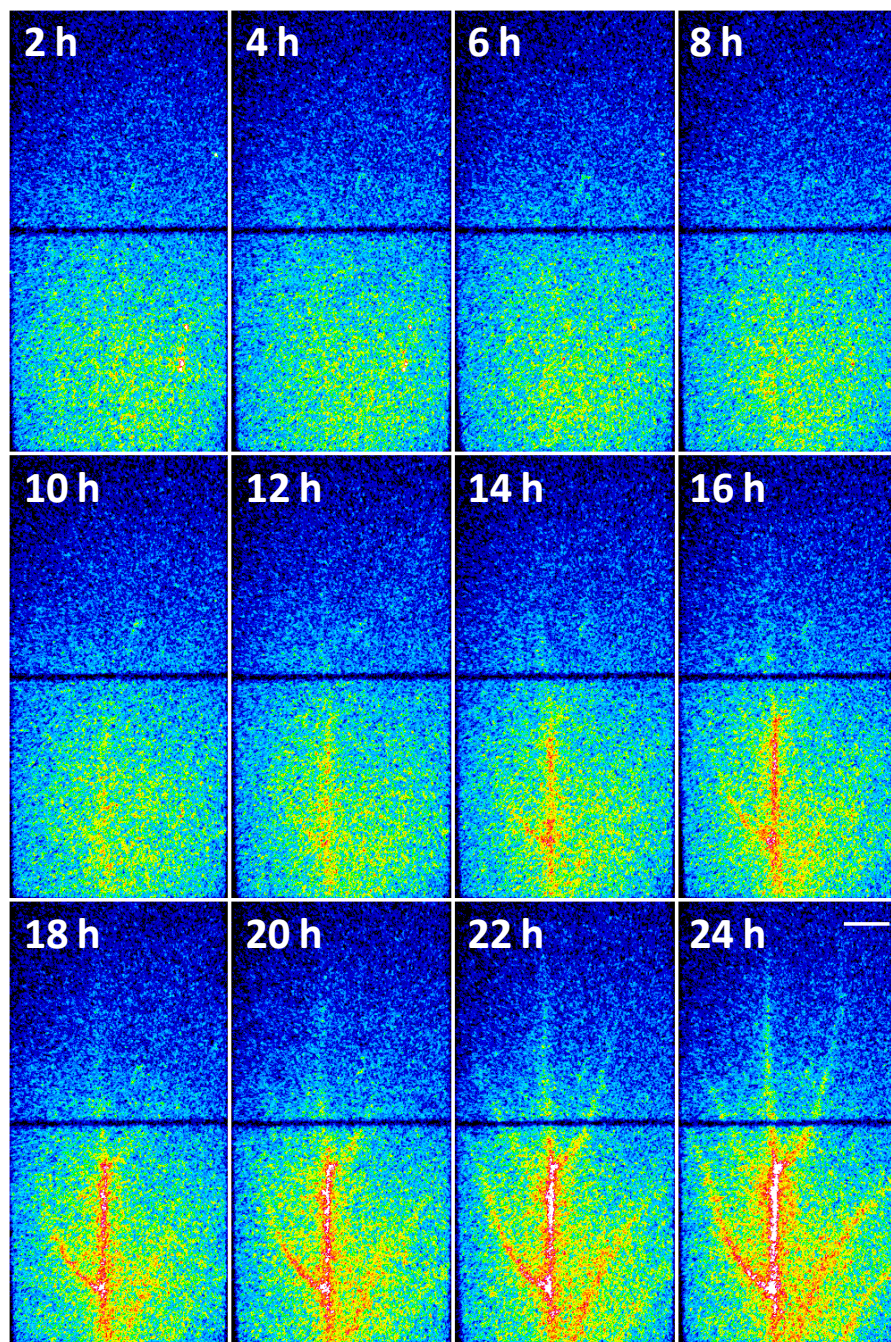


図 3-10 シロイヌナズナにおける ^{54}Mn の輸送動態

間欠照明により、明期 15 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像当たり 15 分ずつ、合計 48 画像（24 時間）を取得した。スケール；20 mm

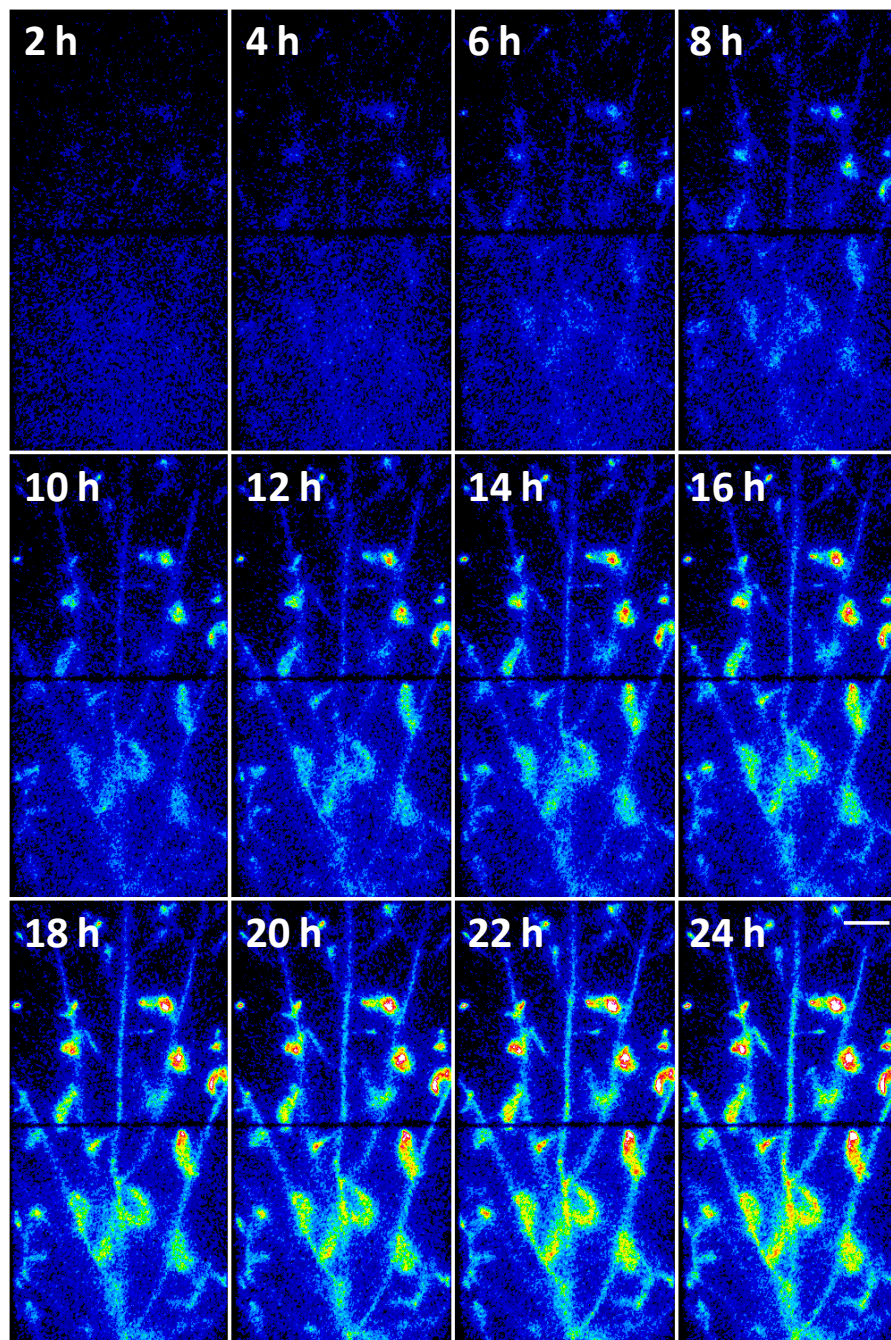


図 3-11 シロイヌナズナにおける ^{65}Zn の輸送動態

間欠照明により、明期 15 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像当たり 15 分ずつ、合計 48 画像（24 時間）を取得した。スケール；20 mm

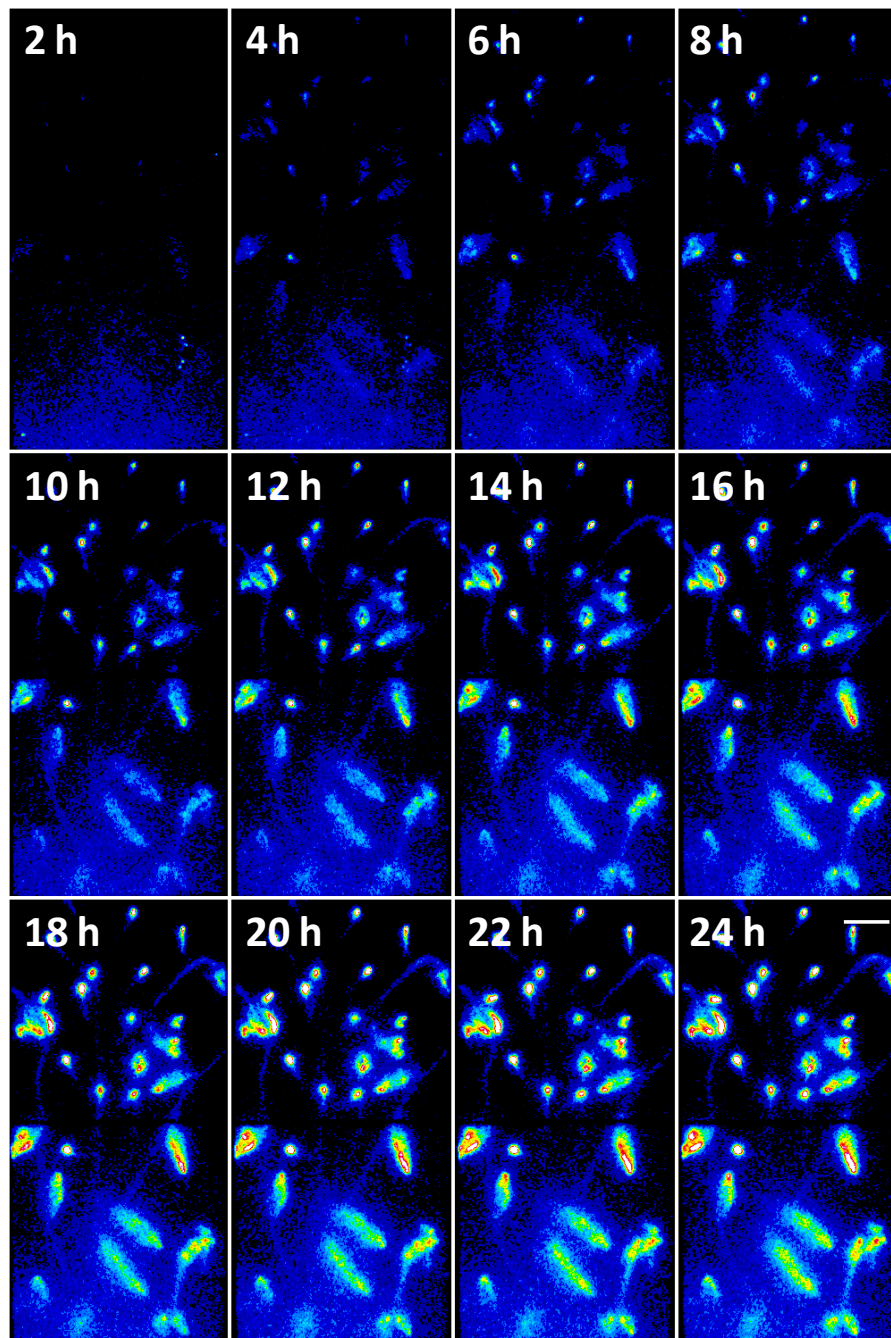


図 3-12 シロイヌナズナにおける ^{109}Cd の輸送動態

間欠照明により、明期 15 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像当たり 15 分ずつ、合計 48 画像（24 時間）を取得した。スケール；20 mm

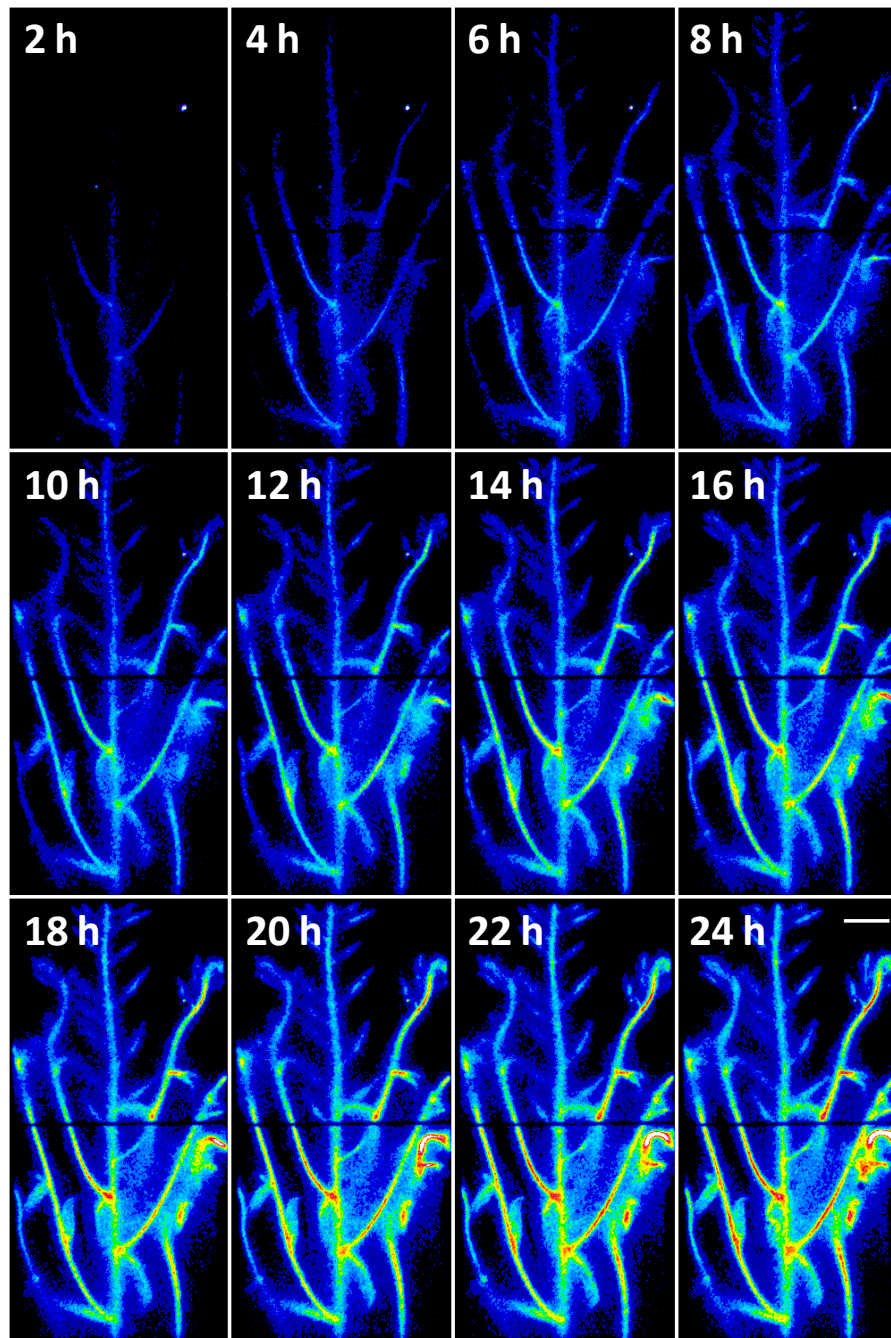


図 3-13 シロイヌナズナにおける ^{137}Cs の輸送動態

間欠照明により、明期 15 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像当たり 15 分ずつ、合計 48 画像（24 時間）を取得した。スケール；20 mm

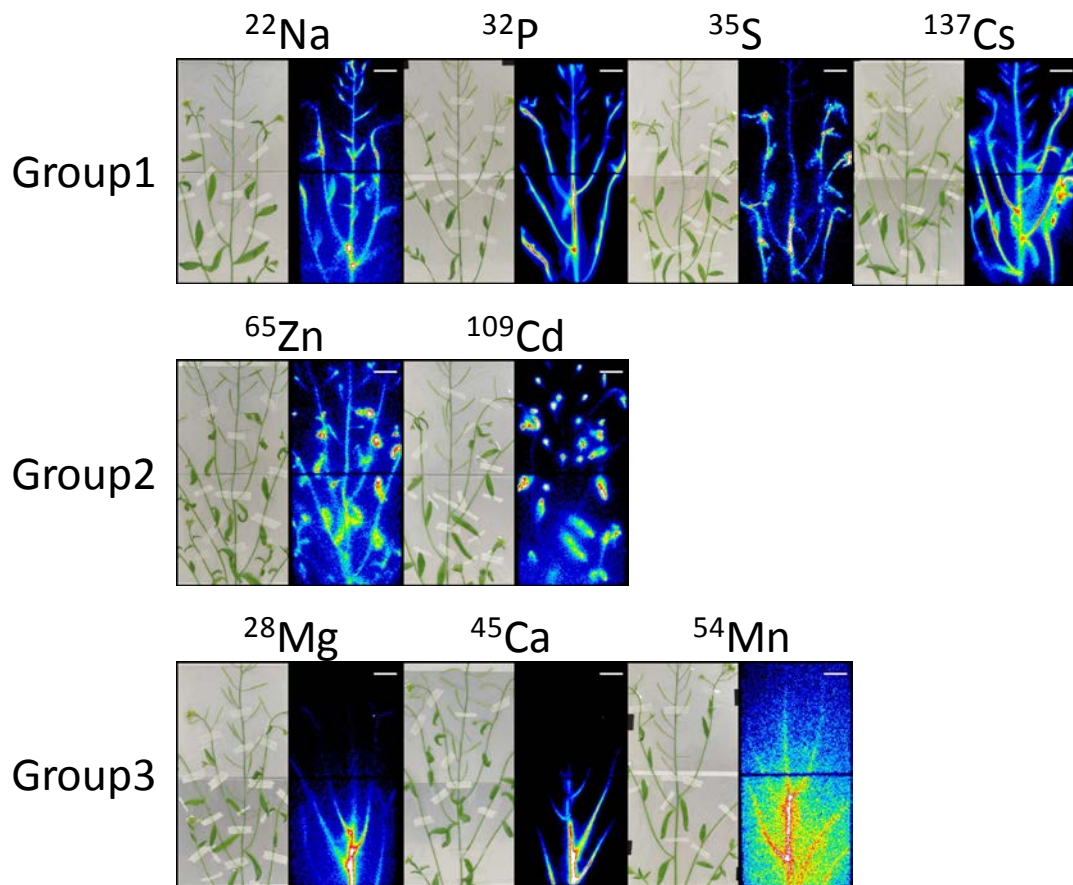


図 3-14 各元素の分布様式

分布様式によりそれぞれのRIを三つのグループに大別した。

Group1 (均一型) ; 植物全体に分布した元素。

Group2 (局在型) ; 組織に局在した元素。

Group3 (集積型) ; 花茎基部側に蓄積した元素。

各RI像において、左：実画像、右：吸収開始後 24 時間の RRIS 画像。

スケール ; 20 mm

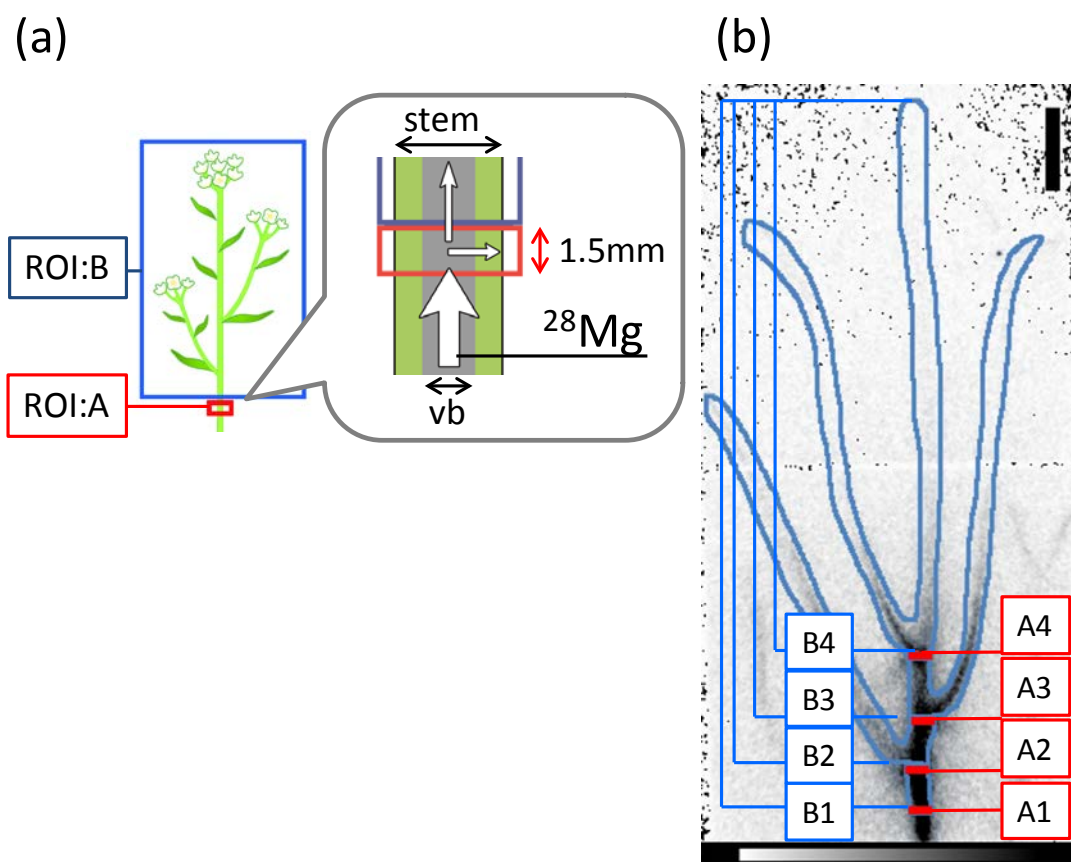


図 3-15 積み下ろしの解析手法

- (a) ROI および花茎内の概略図。ROI: A は高さ 1.5 mm に設定した。ROI: B は ROI: A より上部全域とした。vb ; 維管束
- (b) ROI の設定画像。ROI: A (赤枠) および ROI: B (青枠) をそれぞれ 4 箇所設定し、下から順に A1-A4、B1-B4 とした。A1 より上部全域を B1 とした。

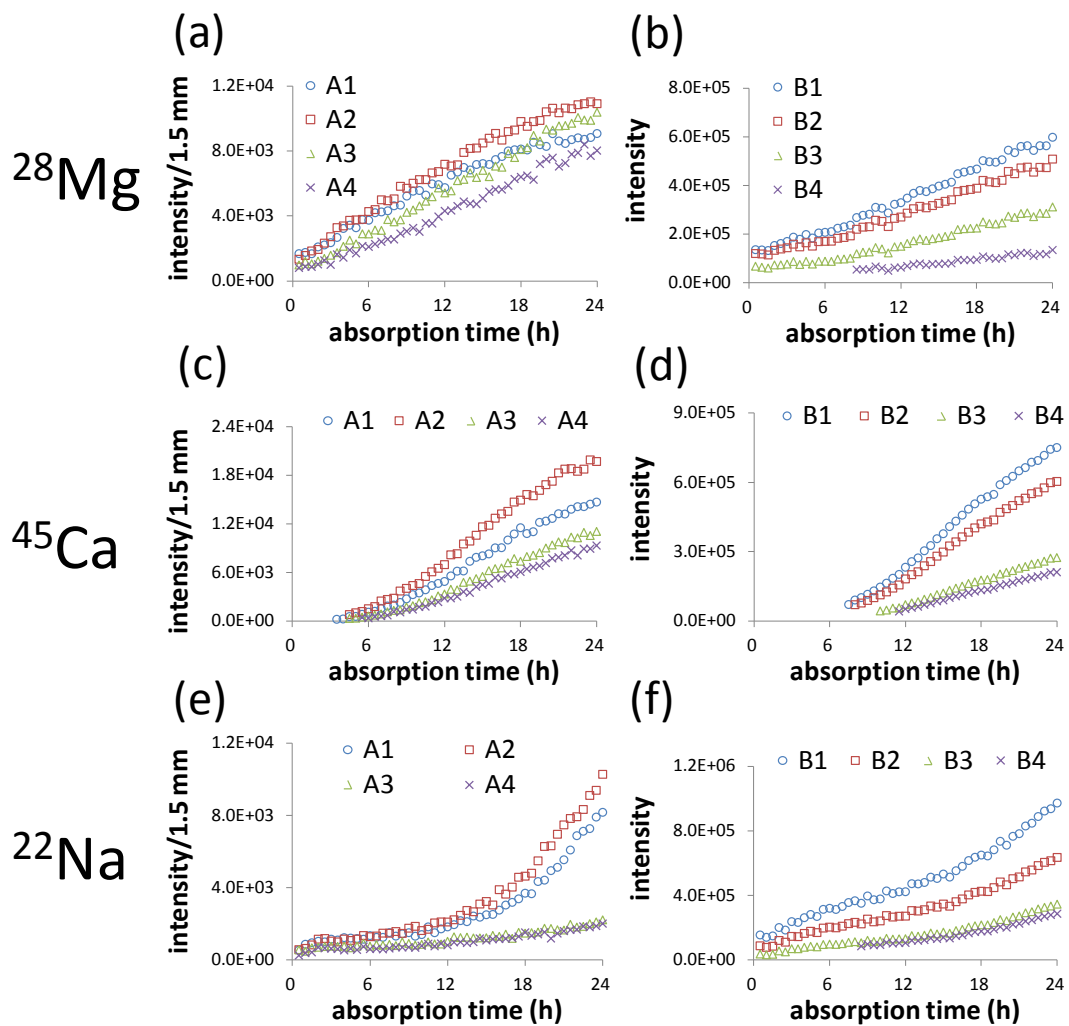


図 3-16 花茎における ^{28}Mg 、 ^{45}Ca および ^{22}Na の積み下ろし量および移行量

(a) ROI: Aにおける ^{28}Mg 量の経時的変化。

A1 は節間に、A2、A3 および A4 は節に設定した。

(b) ROI: Bにおける ^{28}Mg 量の経時的変化。

(c) ROI: Aにおける ^{45}Ca 量の経時的変化。

A1、A3 および A4 は節間に、A2 は節に設定した。

(d) ROI: Bにおける ^{45}Ca 量の経時的変化。

(e) ROI: Aにおける ^{22}Na 量の経時的変化。

A1、A2 は節に、A3、A4 は節間に設定した。

(f) ROI: Bにおける ^{22}Na 量の経時的変化。

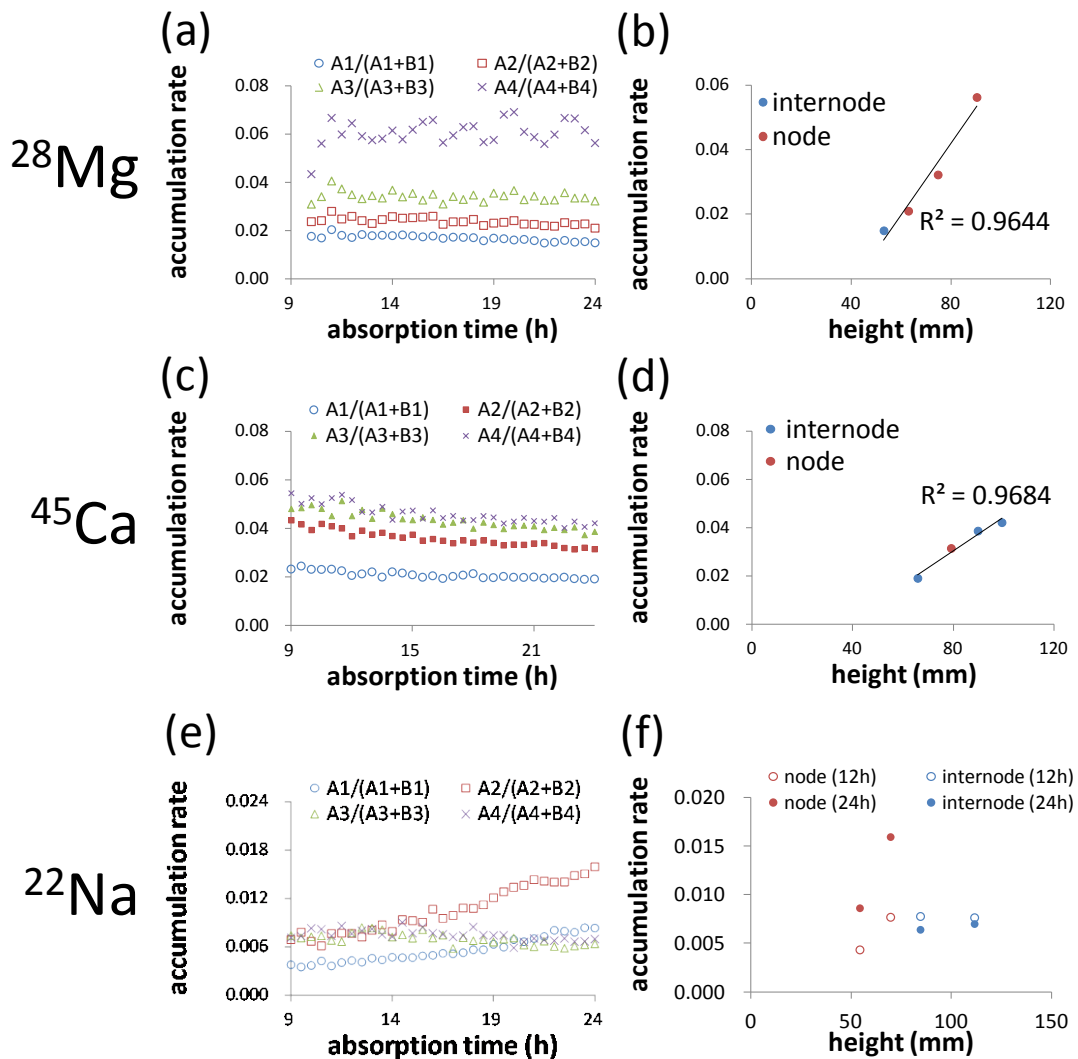


図 3-17 花茎における ^{45}Ca および ^{22}Na の蓄積率

(a) ^{28}Mg 蓄積率の経時的変化。

A1 は節間に、A2、A3 および A4 は節に設定した。

(b) ^{28}Mg 蓄積率と ROI の位置との相関。

(c) ^{45}Ca 蓄積率の経時的変化。

A1、A3 および A4 は節間に、A2 は節に設定した。

(d) ^{45}Ca 蓄積率と ROI の位置との相関。

(e) ^{22}Na 蓄積率の経時的変化。

A1 と A2 は節に、A3 と A4 は節に設定した。

(f) ^{22}Na 蓄積率と ROI の位置との相関。

^{22}Na 吸収開始後 12 時間および 24 時間における蓄積率を図示した。

第4章 光合成産物における輸送動態の可視化

4-1 諸言

植物は光合成を行うことにより炭素を獲得し有機物を生産する。その光合成産物は呼吸によるエネルギー獲得に利用されるほか、植物自体を作り上げるために植物体内の生長する組織に輸送される。光合成産物を対象とした輸送動態の解析では、 ^{14}C 標識スクロースなどの炭素源を葉や莢といった特定の組織に吸収させ、移行を追跡する実験が数多くなされてきた (Chen *et al.* 2001)。

RRIS による可視化において、これまでのRIの投与方法は経根や葉面吸収であったが、ここでは、二酸化炭素の投与および光合成された後の産物の動態解析を試みた。まず、特定の組織の光合成産物を標識するための実験系を構築した。続いて、RRIS を用いた ^{14}C -光合成産物の輸送動態の可視化および解析を試みた。可視化および解析は、 $^{14}\text{CO}_2$ をパルス吸収させその後を観察するパルス - チェイス実験、および $^{14}\text{CO}_2$ の吸収と RRIS 撮影を同時に行うことで、光合成により ^{14}C が固定されていく動態を可視化する連続吸収実験の二通りを行った。

4-2 実験方法

供試植物

シロイヌナズナ (*A. thaliana*:Col-0) を温度 22 °C、照度 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$ 、明 / 暗期 16 h/8 h の条件下において MGRL 水耕液 (表 2-3) で生育し、播種後 30 ± 1 日目に、地上部高が 15 cm の植物を使用した。RRIS 撮影では地上部 6-15 cm を撮影範囲とした。

$^{14}\text{CO}_2$ 吸収

1.5 mLのセプタム栓付のバイアル瓶内で、 ^{14}C 標識炭酸水素ナトリウム（2 MBq）と乳酸を混合することにより $^{14}\text{CO}_2$ を生成した。100 mL プラスチックポッドに移植した供試植物を PE 製のポリ袋（100 μm 厚）で密封し、 $^{14}\text{CO}_2$ を生成したバイアル瓶に、シリンジ針およびチューブを用いて連結することで、植物を $^{14}\text{CO}_2$ に曝露した。 $^{14}\text{CO}_2$ の投与方法は、以下の二通りである。

パルス - チェイス実験（pulse）

バイオトロンにて明条件下で供試植物に $^{14}\text{CO}_2$ を1時間投与した。その後、 ^{14}C で標識された植物体内の光合成産物を RRIS で48時間、連続撮影を行った。

連続吸収実験（continuous）

供試植物に $^{14}\text{CO}_2$ を吸収させながら RRIS で24時間、連続撮影を行った。 ^{14}C が放出する β 線のエネルギーは、100 μm 厚のポリ袋によりエネルギーの多くが遮蔽されることから、連続吸収実験においては、1.2 μm 厚のPPS製フィルムとポリ袋を樹脂製粘土でつなぎ合わせた袋を作成し、PPS製フィルム側を FOSに固定した。

さらに $^{14}\text{CO}_2$ を投与するためにポリ袋で密閉する部位を、以下のように三種類設けた。

ロゼット葉吸収処理区（rosette）

ロゼット葉上部からプラスチックポッドを含めた下部全域をポリ袋で密閉す

ることで、ロゼット葉のみ $^{14}\text{CO}_2$ を投与した（図4-1a）。ポリ袋の開閉部分は樹脂製粘土を用いて密閉した。根に $^{14}\text{CO}_2$ を供給させないために、プラスチックポッドなどの隙間部分を樹脂製粘土で密閉した。なお、ロゼット葉上部においてポリ袋で密閉したため、主茎の基部側 2 cm 程度、および背丈の低い分げつも、 $^{14}\text{CO}_2$ に曝露された。

花茎吸収処理区（shoot）

ロゼット葉上部から上の全体をポリ袋で密閉することで、花茎のみに $^{14}\text{CO}_2$ を投与した（図4-1b）。

植物全体吸収処理区（whole）

植物全体をポリ袋で密閉することで、植物全体に $^{14}\text{CO}_2$ を投与した（図4-1c）。ただし、根に $^{14}\text{CO}_2$ を供給させないために、プラスチックポッドなどの隙間部分を樹脂製粘土で密閉した。

RRIS 撮影条件

FOSと植物との固定にはシリコーンゴムシートを用いた。また、FOSを ^{14}C で汚染させないための保護材としてPPS製フィルムをFOS表面に被せた。明期 15 分と暗期 15 分を交互に繰り返す間欠照明を採用し、15 分の暗期の間 RRIS を用いて 15 分の積算画像を取得した。つまり 1 枚目の画像は撮影開始後 30 分目となる。24 時間 -48 時間の RRIS 撮影後、ただちに植物を IP にコンタクトし、RI 像を取得した（コンタクト積算時間；60 分）。得られた画像の解析は、AQUACOSMOS を用いて行った。

4-3 結果および考察

$^{14}\text{CO}_2$ 投与時の密閉方法

植物を密閉し CO_2 を投与する実験では、ガラス製やアクリル製などのチャンバーを用いる研究例が多い (Mahon *et al.* 1974)。アクリル製などのチャンバーは、箱の容量が一定であることから、実験ごとに $^{14}\text{CO}_2$ の比放射能をコントロールできる利点がある一方で、組織の大きさに合わせたチャンバーを準備する必要がある。この点、本実験で CO_2 を投与する部位として選んだ、ロゼット葉、花茎や地上部全体という組織は、大きさや形状が様々であり、専用のチャンバーを準備するのは難しかった。その上、RRIS で使用している暗箱が大きいことから、チャンバーの設置には空間的制約があった。そこでチャンバーとして、ポリ袋を用いた。ポリ袋は入手、加工が容易である一方で、形状が固定されず容量が一定しないことから、実験ごとに ^{14}C の比放射能は一定ではなかった。今後、比放射能をコントロールする必要があるときには、 $^{14}\text{CO}_2$ を発生させた後、容量が一定な箱の中で拡散させた後利用するなどの工夫が必要である。

ポリ袋と植物を樹脂製粘土で密着させることで、 $^{14}\text{CO}_2$ が入った空間を密閉した。しかし、実験後に植物を取り出してオートラジオグラムを得る際には、樹脂製粘土は植物に付着すると完全に除去することが困難であり、付着した粘土が ^{14}C シグナルを弱化してしまう。そこで、植物と樹脂製粘土の間にメディカルテープを貼った。これにより、植物に樹脂製粘土が付着することを防止するとともに、高い密閉性を保つ事ができた。

樹脂製粘土としては、多種多様な製品からエアコンの配管用パテ (因幡電機産業製) が最適であった。硬度が高い製品は、RRIS 撮影後に供試植物を回収する際、植物と樹脂製粘土の接触部分が大きく損傷した。一方、硬度が低い製品

に関しては、時間の経過により樹脂製粘土が流れ落ち、密閉性を失った。配管用パテは本来、配管と壁との隙間を密閉する目的として用いられるため、密閉性に優れている。なお、樹脂製粘土の成型は、粘土工作に使われている粘土ひも出し器（クレイガン）を使用した。

炭素の輸送動態解析方法

2章の結果によると、花や葉などの薄い組織は、定量が可能であることが示された（表 2-4）。そこで、花茎の茎頂および茎生葉は、それぞれの組織での¹⁴C量の経時的な変化を比較した。ただし、各処理区において、植物を密閉するポリ袋の大きさが異なることにより、¹⁴CO₂濃度が一定でなかったため、処理区間での¹⁴C量の比較はできなかった。茎や莢などの厚い組織においては、自己吸収の度合いが大きく、RRISやIPの画像上においてシグナル強度が高い組織が必ずしも¹⁴Cを多く含むとは限らない。しかし、自己吸収が一定の組織内であれば、シグナル強度の変動は¹⁴C量の変動を表すと考えられる。そこで、莢においては、測定した莢での経時的な¹⁴C量の増減変化を議論することにした。なお、解析にあたっては、RRIS撮影開始後30分である1枚目におけるROI内のシグナル強度を1とした。また解析は、撮影開始後24時間に絞った（図 4-2, 4-3）。24時間以内であれば、生長による組織の厚みの変化はほとんどなく、また、花茎が伸長することによってFOSへの密着性が損なわれることもないことから、同一のROI内では自己吸収の度合いはあまり変わらないと考えられたためである。ただし、吸収開始直後においては、¹⁴Cの存在位置が大きく変化する、つまりは、光合成により吸収した組織における¹⁴Cは組織表面から内部へ、輸送により維管束から¹⁴Cが積み下ろされた組織は、組織内部から周辺組織へ¹⁴Cが輸送されるため、同一のROI内であっても、組織による自己吸収の影響は一定でないと考えられた。

根への炭素供給源

視野が 10 cm x 20 cm に限られる RRIS の撮影では花茎を対象にした。取得した連続画像では、 $^{14}\text{CO}_2$ の投与部位や投与方法によらず、茎頂や莢に強いシグナルが検出された（図 4-2, 4-3）。一方、根も光合成産物を受け取ると考えられるが、今回の実験では RRIS の撮影対象にしなかった。そこで、根への炭素供給源について、IP画像を基に検討した。

IPの結果からは、パルス - チェイス実験および連続吸収実験ともに、rosette 処理区および whole 処理区において、 ^{14}C が主茎や分枝の茎頂ならびに根へ輸送されることが示された（図 4-4, 4-5；赤矢印）。一方、shoot 処理区では、 ^{14}C はパルス - チェイス実験および連続吸収実験ともにロゼット葉、根および分けつに輸送されなかった（図 4-4, 4-5；青矢印）。これらの結果から、根への炭素の供給源（ソース）はロゼット葉であることが示された。また、花茎で固定された ^{14}C は花茎内でのみ輸送・蓄積が行われていることが示された。

主茎および分枝への炭素供給源

主茎および分枝の茎頂における ^{14}C の輸送動態を解析するため、まず始めに、 ^{14}C のパルス - チェイス実験で取得した連続画像を基に ^{14}C 量の経時的变化を解析した。主茎の茎頂および最も若い分枝の茎頂に ROI を設定したところ（図 4-6a）、分枝の茎頂の ^{14}C 量は、rosette 処理区、shoot 処理区、および whole 処理区の全てにおいて時間とともに増加した（図 4-6b, 6c, 6d）。一方で、主茎の茎頂における ^{14}C 量は、rosette 処理区および whole 処理区では徐々に増加したが、shoot 処理区においては投与終了後まで一定であった（図 4-6b, 6c, 6d）。 $^{14}\text{CO}_2$ を処理した空間にロゼット葉が含まれる rosette 処理区と whole 処理区では主茎の茎頂の ^{14}C 量が増加し、ロゼット葉を含まない shoot 処理区

では主茎の茎頂の ^{14}C 量は増加しないことから、主茎への主な炭素供給源はロゼット葉であることが示唆された。さらに、shoot 処理区では、主茎の茎頂の ^{14}C 量は一定であったことから (図4-6c)、主茎の茎頂における炭素供給減として大きな役割をもつ組織が、花茎にはないことが考えられた。

whole 処理区は、主茎の茎頂と分枝の茎頂の ^{14}C 量はほとんど差がなく (図4-6d)、rosette 処理区では、主茎の茎頂は分枝の茎頂と比較して ^{14}C 量が多いことから (図4-6b)、分枝の茎頂の炭素供給源として、ロゼット葉以外に大きな役割をもつ組織があることが考えられた。

shoot 処理区の主茎以外の茎頂においては、 ^{14}C 量は撮影後に増加したものの、増加度は時間に伴って低くなった (図4-6b, 6c, 6d)。このことから、シロイヌナズナに取り込まれた ^{14}C の師管への積み込み、輸送、さらには師管からの積み下ろし、蓄積といった一連の反応が 24 時間以内でほとんど行われた可能性があると考えられた。

次に、 ^{14}C の連続吸収実験で取得した連続画像を基に、主茎および分枝の茎頂における ^{14}C の輸送動態を解析した。ROIは ^{14}C のパルス - チェイス実験と同様に設定した (図4-6a)。whole 処理区、rosette 処理区の ^{14}C 量の経時的変化は、パルス - チェイス実験と同様の傾向が示された。つまり、 ^{14}C 量は、whole 処理区では、主茎の茎頂と分枝の茎頂の差がほとんどなく (図4-6g)、rosette 処理区は、分枝の茎頂と比較して主茎の茎頂が多かった (図4-6e)。一方 shoot 処理区では、パルス - チェイス実験と異なる傾向が示された。つまり、主茎の茎頂の ^{14}C 量は、パルス - チェイス実験では一定である一方 (図4-6c)、連続吸収実験では増加した (図4-6f)。連続吸収実験は、光合成により ^{14}C の固定される様子を表していることから、主茎の茎頂自身による光合成により炭素固定が行われたと考えられる。

パルス - チェイス実験、連続吸収実験ともに、shoot 処理区において、ロゼ

ット葉からの ^{14}C の供給がないにも関わらず、分枝の茎頂では ^{14}C が経時的に増加したことから（図 4-6c, 6f）、分枝から発生している茎生葉が分枝の茎頂への炭素供給源になっていることが考えられた。そこで、パルス - チェイス実験における shoot 処理したシロイヌナズナの、分枝の茎生葉 2 枚に ROI を設定したところ（図4-7a）、茎生葉の ^{14}C 量は、 $^{14}\text{CO}_2$ 投与終了後は減少した（図 4-7b）。このことは、分枝の茎生葉が、分枝の茎頂への炭素供給源であることを支持するものと考えられる。

莢への炭素供給源

莢における ^{14}C 動態の解析するため、図4-8aに図示したように ROI を設定し、下から Si1-Si4 とした。パルス - チェイス実験の莢において、ROI の ^{14}C 量を解析した結果、rosette 処理区は、全ての莢において ^{14}C 量が増加したことから（図4-8b）、莢の炭素供給源はロゼット葉であることが示された。一方、shoot 処理区では、全ての ROI で ^{14}C 量が減少した（図4-8c）。この結果から、莢の ^{14}C 量は、ロゼット葉から炭素供給がない場合、増加より損失の方が大きいことが示された。この現象は、シンクである莢から他の組織へ ^{14}C の流出はほとんどないと考えられることから、莢自身の光合成により固定された ^{14}C が呼吸により減少したと考えた。さらには、whole 処理区の結果から、ロゼット葉からの炭素の供給が行われても、古い莢は ^{14}C 量が減少することが示された（図4-8d）。一方、連続吸収実験における shoot 処理区の植物を対象とした解析では、測定した全ての莢において ^{14}C 量は増加した（図4-8e）。ロゼット葉から輸送される炭素がなくても、花茎および莢の光合成により炭素を蓄積できることが示された。

シロイヌナズナは同じアブラナ科であるナタネと同様に莢中の種子に油脂を蓄積する植物である。ナタネにおいては、ロゼット葉や茎生葉は、開花期以降、

生長の進行に伴い落葉する特徴があり、落葉後における花茎や莢の光合成能は、落葉以前の葉の光合成能に匹敵する（北條ら 1972、稲永ら 1974）。一方、シロイヌナズナのロゼット葉は開花期以降も緑色を保ち、落葉しない。このような二つの植物種において、莢への炭素輸送動態に違いがあるのか非常に興味深い。ただし、葉の最大展開時期後から光合成能が低下する（Hensel *et al.* 1993）。このことから、ロゼット葉から花茎への ^{14}C 輸送量は、ロゼット葉の最大展開時期以降、生育に伴って減少していくと考えられる。一方、ロゼット葉が枯死によりロゼット葉の炭素固定が行われなくなった後においても、しばらくは莢の発生は続くため、新しい莢が存在する。そのため、ナタネと同様にシロイヌナズナにおいても、花茎や莢の光合成による炭素固定の寄与は大きいと考えられる。本研究で構築した組織別に ^{14}C を供与する実験系は、様々な生育段階のシロイヌナズナを用いることで、シロイヌナズナとナタネにおける莢への炭素輸送動態の違いを明らかにすること、などの応用が可能である。

今後の課題

$^{14}\text{CO}_2$ を連続して shoot および whole に添加した上で同時撮像する場合は、空気中の ^{14}C によるバックグラウンドが大きくなるが、100 μm 厚のシリコーンゴムシートで植物を覆うことで、バックグラウンドを抑えることができた。具体的には、 $^{14}\text{CO}_2$ 添加直後のシリコーンゴムシートで覆われていない領域と覆われた領域のバックグラウンドを比較すると、shoot 処理区においては 97 intensity/ mm^2 から 10 intensity/ mm^2 に減少し、whole 処理区においては 42 intensity/ mm^2 から 5 intensity/ mm^2 に減少した。その結果、植物における ^{14}C の検出感度が上がり、莢など ^{14}C のシグナル強度が低い組織においても可視化ができた（図4-3b）。一方、シリコーンゴムシートを用いた固定や間欠照明により、光合成能および蒸散量が低下した。連続吸収実験の rosette 処理区における

地上部への ^{14}C 輸送量は、バイオトロンにて 1 時間 $^{14}\text{CO}_2$ を吸収させたパルス - チェイス実験の rosette 処理区における地上部への ^{14}C 輸送量と比較して、3 分の 1 程度であり、光合成能が低下していることがわかった。また、バイオトロンにて 24 時間、植物を生育させた場合の水耕液と比較して、24 時間 RRIS で撮影した後の水耕液は、減少量が半分程度であった。さらには、48 時間といった長時間の撮影は、花茎が伸長することで植物が大きく動き FOS から離れた。これらの問題より、植物の FOS への固定方法や照明方法は今後の課題である。

本節では、様々な組織、吸収様式において $^{14}\text{CO}_2$ を吸収させた植物を、RRIS を用いて可視化することで、シンク・ソース組織の関係を解析できる可能性を見出した。ポリ袋と樹脂製粘土による $^{14}\text{CO}_2$ 投与方法は、花茎や莢などの特定の組織への適用も可能であると考えられる。また、 $^{14}\text{CO}_2$ が充填しているポリ袋内において、さらに特定の組織をポリ袋で密閉することで、局所的に $^{14}\text{CO}_2$ を吸収させない組織を設けることなどの応用も可能であろう。

(a) rosette

(b) shoot

(c) whole



図 4-1 シロイヌナズナへの $^{14}\text{CO}_2$ 添加方法

バイアル瓶内で ^{14}C 標識炭酸水素ナトリウム (2 MBq) と乳酸により $^{14}\text{CO}_2$ を生成した。供試植物をポリ袋で密封し、シリンジ針およびチューブを用いて $^{14}\text{CO}_2$ を生成したバイアル瓶と植物を密閉したポリ袋を連結することで、植物へ $^{14}\text{CO}_2$ を添加した。添加部位は三つの処理区を設けた。

(a) ロゼット葉のみ $^{14}\text{CO}_2$ を添加した (rosette 処理区)。

(b) 花茎のみ $^{14}\text{CO}_2$ を添加した (shoot 処理区)。

(c) 植物全体に $^{14}\text{CO}_2$ を添加した (whole 処理区)。

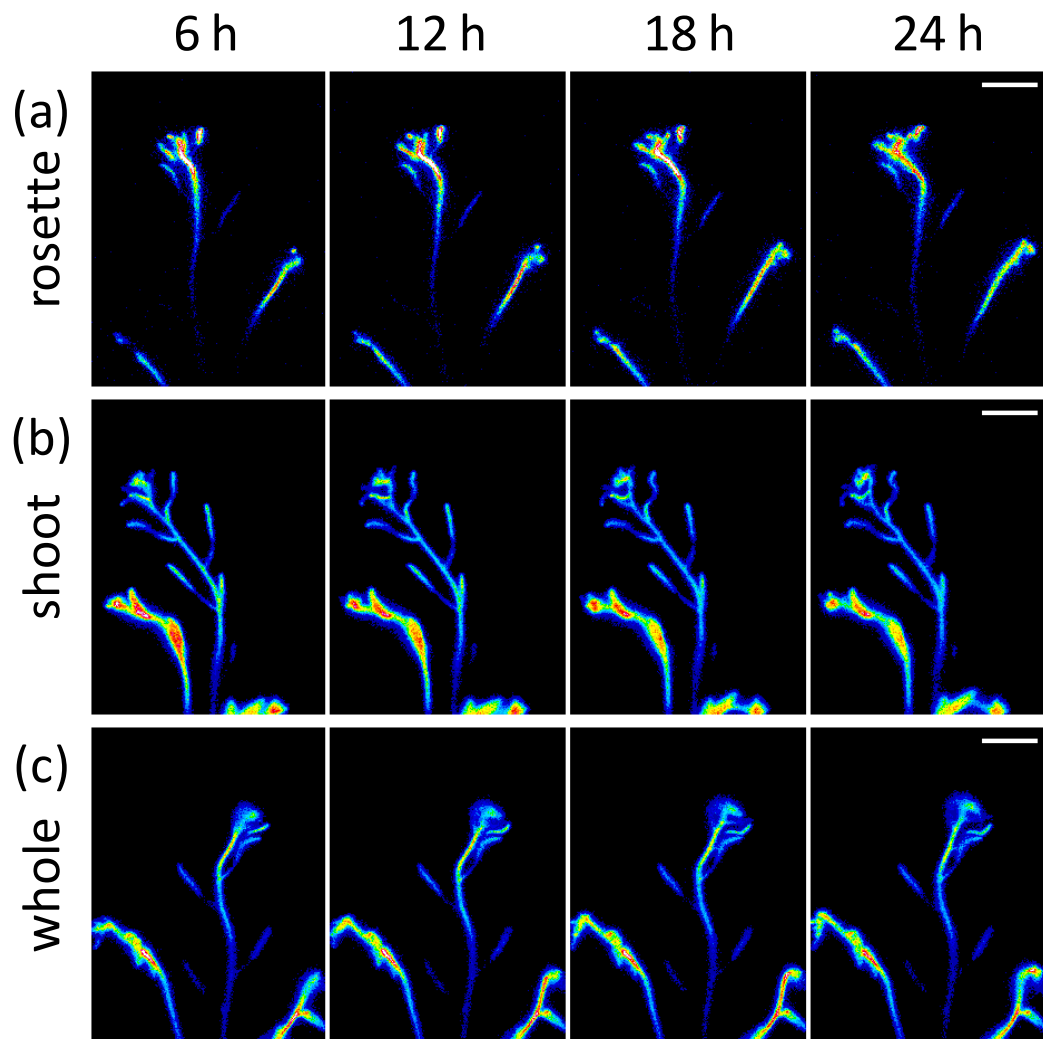


図 4-2 RRIS を用いて可視化したパルス - チェイス実験における ^{14}C の輸送動態

間欠照明により、明期 15 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像当たり 15 分、合計 48 画像（24 時間）を取得した。

(a) rosette 処理区、(b) shoot 処理区、(c) whole 処理区

スケール ; 20 mm

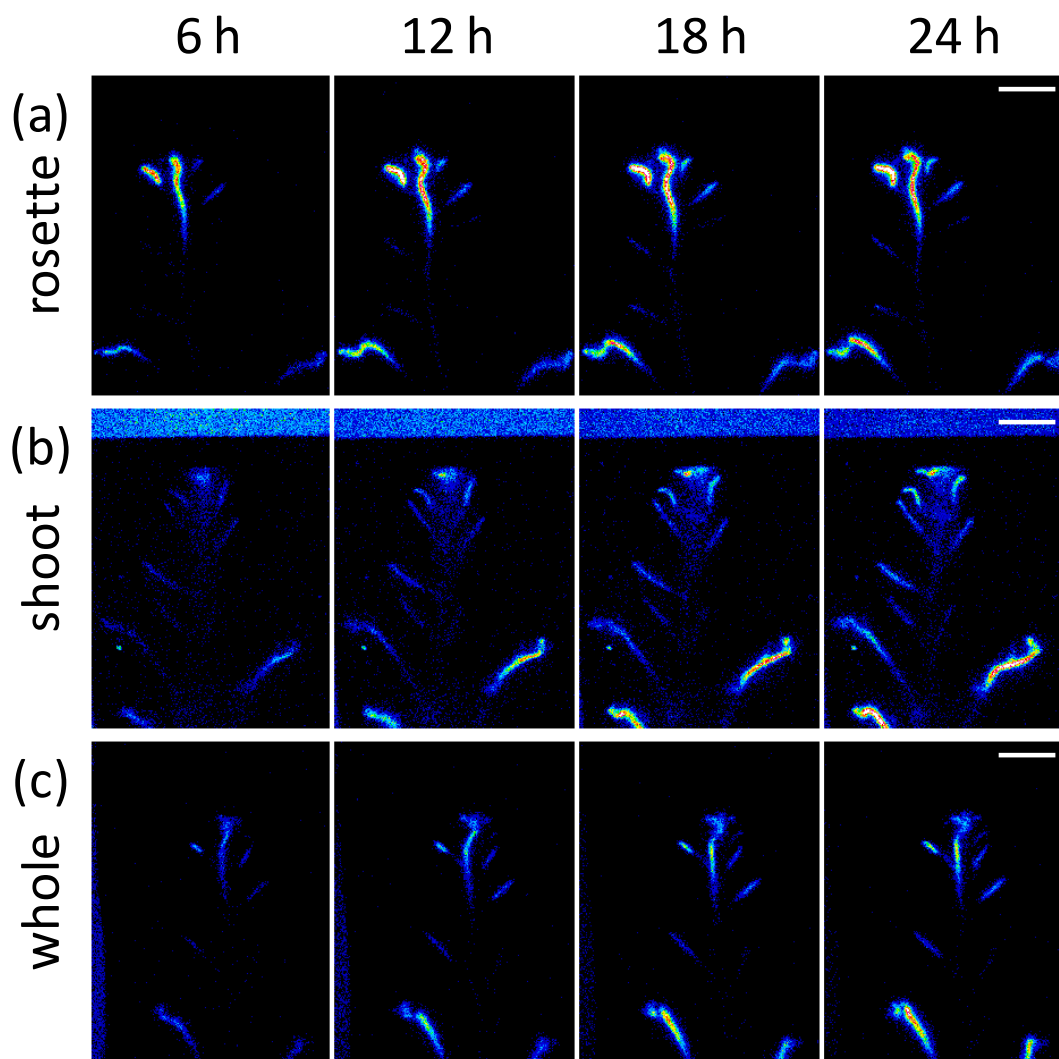


図 4-3 RRIS を用いて可視化した連続吸収実験における ^{14}C の輸送動態
 間欠照明により、明期 15 分、暗期 15 分を繰り返し行い、暗期に 1 画像
 当たり 15 分、合計 48 画像（24 時間）を取得した。

(a) rosette 処理区、(b) shoot 処理区、(c) whole 処理区 スケール：20 mm
 (b) 最上部の青い部分は、シリコーンゴムシートとFOSが重なっていない
 領域であり、バックグラウンドが高かった。

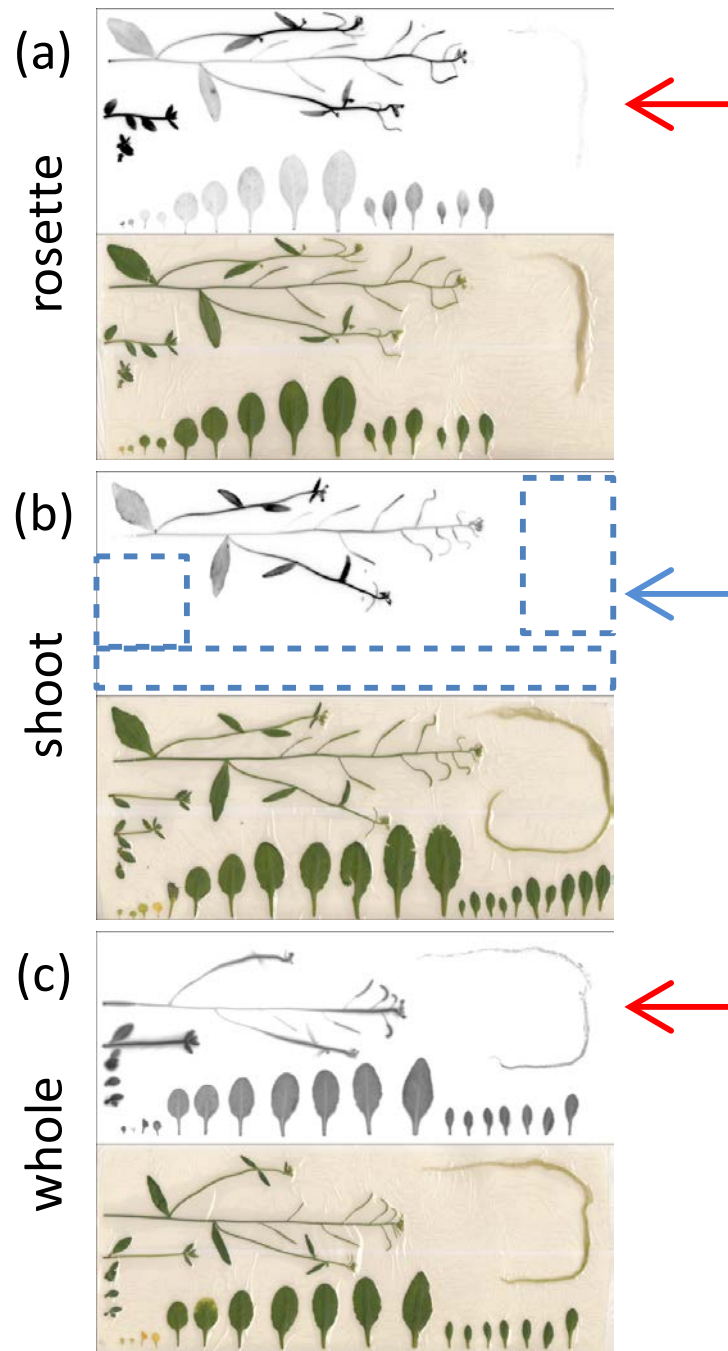


図 4-4 パルス-チェイス実験における RRIS 撮影後の IP 画像
 (a) rosette 処理区、(b) shoot 処理区、(c) whole 処理区
 赤および青矢印は根を指示した。青枠は ^{14}C が検出されなかった
 領域を図示した。コンタクト積算時間；60 分

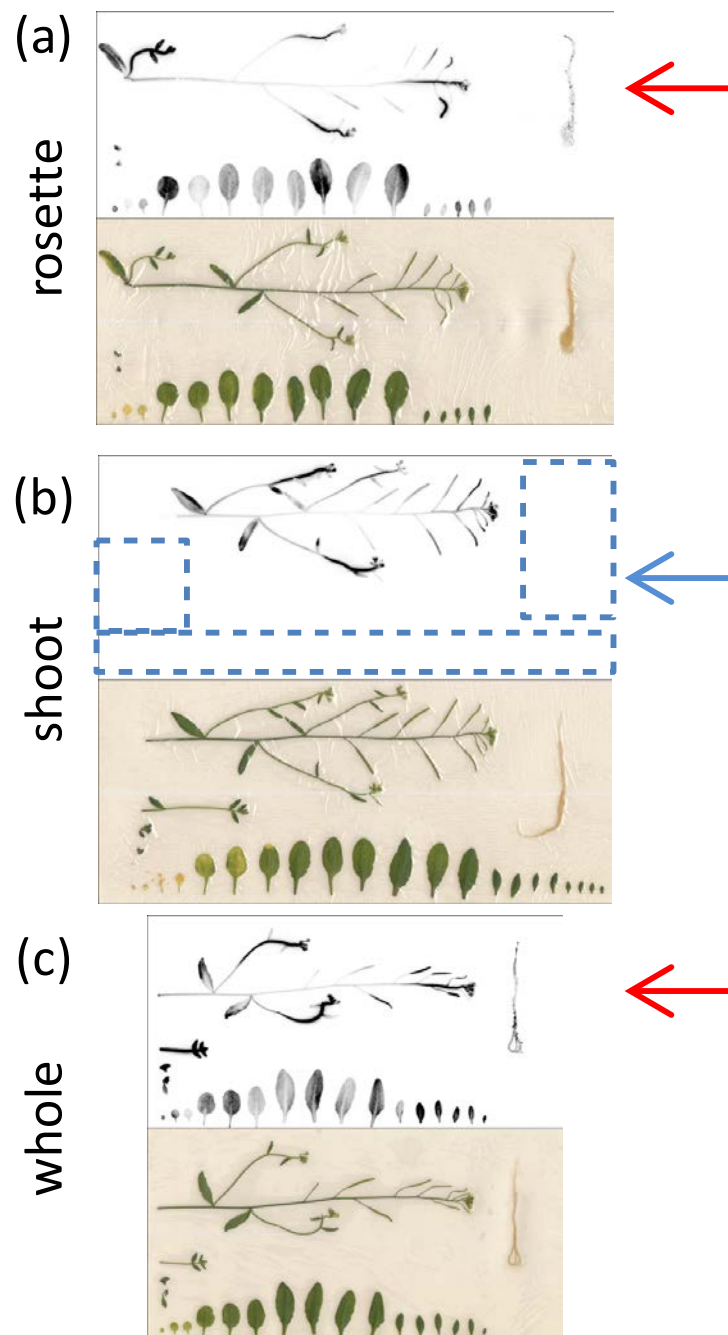


図 4-5 連続吸収実験における RRIS 撮影後のIP画像
 (a) rosette 処理区、(b) shoot 処理区、(c) whole 処理区
 赤および青矢印は根を指示した。青枠は ^{14}C が検出されなかつた領域を図示した。コンタクト積算時間； 60 分

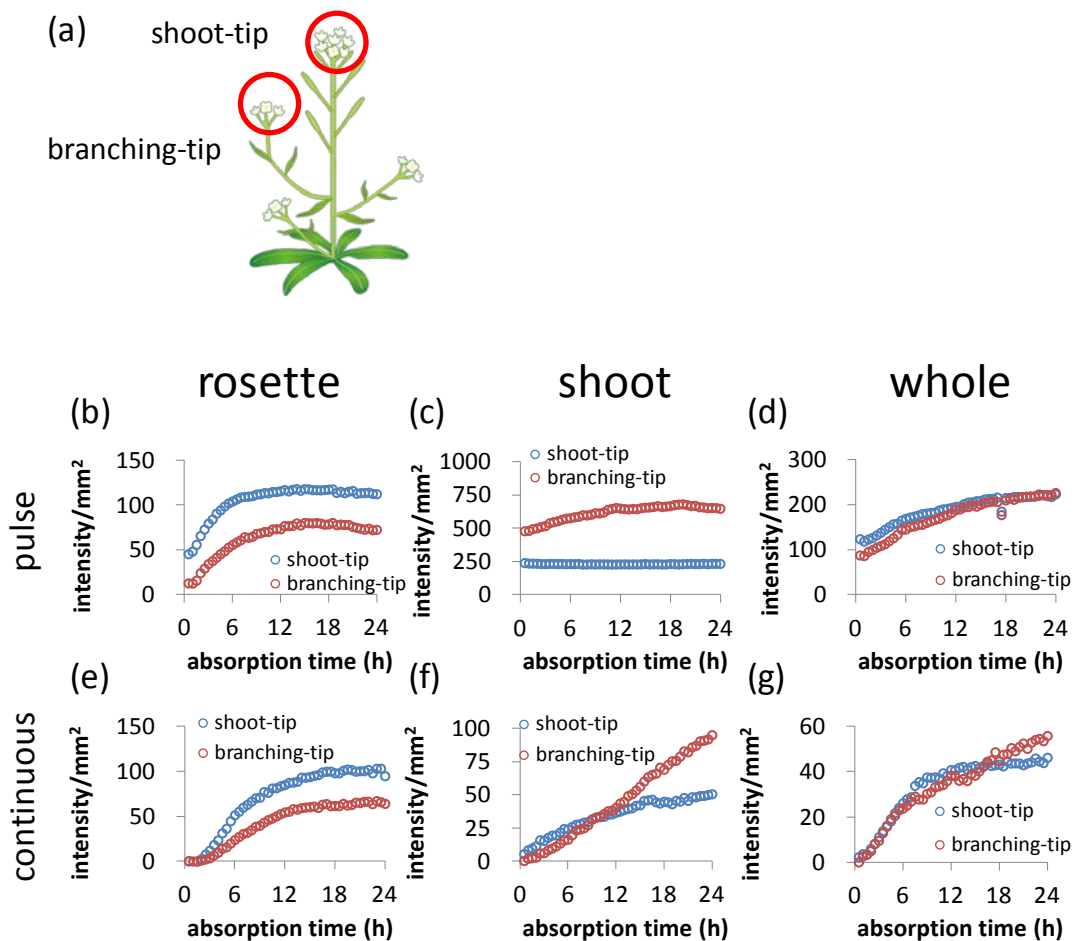


図 4-6 茎頂における ^{14}C 輸送解析

(a) ROI の概略図。主茎および分枝の茎頂に ROI を設定した。
 パルス - チェイス実験を用いた (b) rosette 処理区、(c) shoot 処理区、(d) whole 処理区における主茎および分枝茎頂の ^{14}C 量の経時的変化。
 連続吸収実験を用いた (e) rosette 処理区、(f) shoot 処理区、(g) whole 処理区における主茎および分枝茎頂の ^{14}C 量の経時的変化。

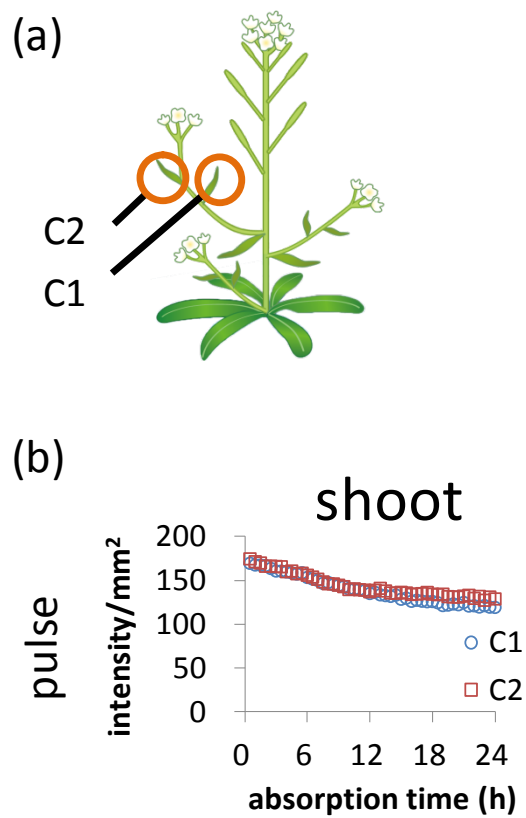


図 4-7 茎生葉における ^{14}C 輸送解析

- (a) ROIの概略図。茎生葉にROIを設定し、下から順にC1, C2とした。
- (b) パルス - チェイス実験を用いた shoot 処理区における茎生葉の ^{14}C 量の経時的変化。

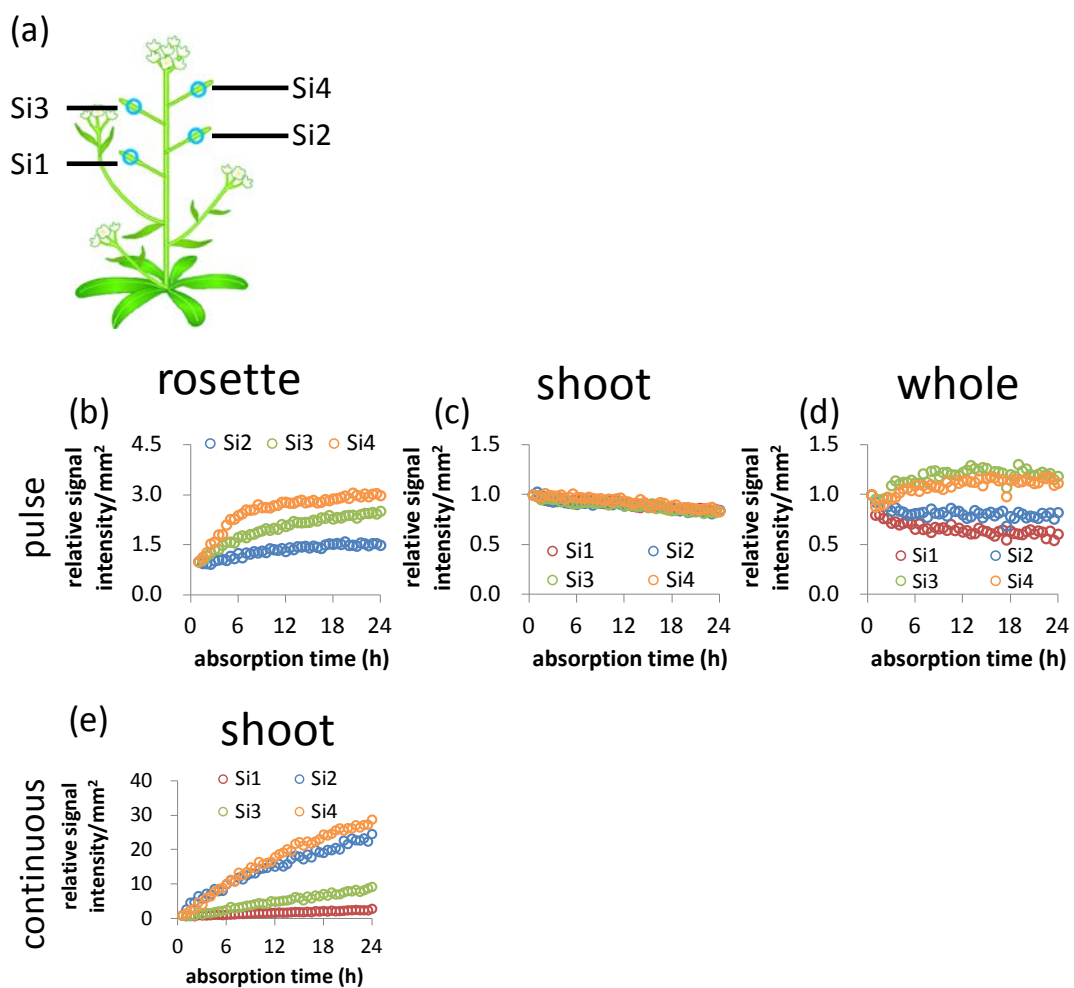


図 4-8 莢における ¹⁴C 輸送解析

- (a) ROIの概要図。莢にROIを設定し、下から順に Si1-Si4 とした。
 パルス - チェイス実験を用いた (b) rosette 処理区、(c) shoot 処理区、(d) whole 処理区における莢の ¹⁴C 量の経時的変化。
 (e) 連続吸収実験を用いた shoot 処理区における莢の ¹⁴C 量の経時的変化

第5章 総合考察

今後 RRIS を、多種類の元素動態の解析に利用していくためには、克服すべき大きな課題が2点あると考えられた。1点目は、自己吸収が定量性に及ぼす影響度合いを把握すること、2点目は、RRIS 撮影と植物への照明を両立させるためのシステムを構築することである。そこで本研究では、これらの課題解決を目指した、RRIS の定量性評価および装置改良を行い、様々な核種の可視化を行った。さらには、RRIS の適用例を示し、応用としてガス状のRIの可視化を行った。本章では、これまで研究全体を通して得られた RRIS に関する知見と今後の展望について論じた。

リアルタイムRIイメージングシステムの定量性

これまでの RRIS を用いた研究では、 ^{32}P が研究対象であったが (Kanno *et al.* 2007, 頼ら 2008)、本研究では、 ^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、および ^{137}Cs の定量的解析を可能とするために、標準液の希釈系列から作製したスポット試料を RRIS で検出し、検量線を作成することで、定量可能な範囲 (定量下限値 / 上限値およびダイナミックレンジ) を解析した。その結果、RRIS によるライブイメージングでは、積算時間を3分といった短時間においても高い定量性能をもって、物質動態を解析できることが示された (表 2-2)。ただし、S/N 比が小さいと計数誤差が大きくなり、定量性が低下した (表 2-2)。RRIS は積算時間により S/N 比が向上しない (図 2-4a) ため、低エネルギー β 線放出核種を用いた輸送動態の可視化においては、RIの投与量を多くする必要がある。

次に、RRIS を用いた植物の定量的な解析の実現につながる、植物組織の測定における定量性の解析を試みた。定量性は、放射線エネルギーが植物体の遮

蔽によりそのエネルギーが減衰する、自己吸収の影響を受けるが、それらの影響度合いは未解明であり、また、影響度合いは核種や植物組織によって異なると考えられた。自己吸収の影響は、組織を RRIS で測定したシグナル強度と、実際のRI量を比較することに加え、遮蔽材を用いた、遮蔽厚ごとの放射線の遮蔽効果の測定（図2-16）、および計算機シミュレーションによって推測された、放射線の線質の違いによる自己吸収の影響（表 2-5）に基づいて総合的に検討した。検討の結果、シロイヌナズナでは花と葉では全核種で定量的なイメージング解析が可能であり、莢・花茎で可能な核種は ^{28}Mg であることが示された。また、解析によって、 ^{109}Cd が放出する放射線エネルギーは ^{22}Na や ^{137}Cs と比較して弱いにも関わらず、莢における ^{109}Cd の定量性（ $R^2=0.9863$ ）は ^{22}Na （ $R^2=0.7088$ ）や ^{137}Cs （ $R^2=0.9652$ ）と比較して高いことが判明した。この理由は、 ^{109}Cd から放出される様々な放射線のうち、CsI(Tl)シンチレータに与えるエネルギーの90%を占める放射線は低エネルギーX線（22 keV, 88 keV）であり（表 2-5）、このX線が、自己吸収の影響をあまり受けることなくFOSに到達できることにあると考えられた。さらに、本研究では用いなかった核種においても、放出する放射線の線質を基に、RRISによる定量解析の可能性が一定程度推定できると考えられる。具体的には、 ^{14}C と ^{35}S は、 β 線のみ放出する核種であり、放出される β 線エネルギーはそれぞれ50 keV/157 keV（平均/最大）、49 keV/167 keVと非常に類似している。 ^{14}C は莢や茎など厚い組織の定量性が悪かったことから（表 2-4）、 ^{35}S における定量は、莢や花茎では難しく、葉などの薄い組織に限られると考えられる。 ^{42}K は、厚い組織においても定量性が高かった ^{28}Mg （1242 keV/2863 keV）と比較して非常に強いエネルギーの β 線（1430 keV/3526 keV）を放出するため、莖や莢においても定量が可能であると考えられる。放出する β 線のエネルギーが ^{14}C や ^{35}S よりは強いものの、 ^{28}Mg ほど強くない核種を用いて、莖や莢など厚い組織を解析する場

合は、RIの分布が定量性に影響を与えるため（図2-17）、組織における自己吸収の影響を個別に確認する必要があると考えられる。本実験によって²²Na

（216 keV/546 keV）において、莢は定量が難しい一方で、花茎では定量が可能であることが示された（表 2-4）ように、³⁶Clは、X線、 γ 線に加え、 β 線（278 keV/709 keV）を放出するため、莢や花茎などの定量性を推測することが難しく、³⁶Clの輸送動態を定量解析する際には、あらかじめ、組織ごとに定量性を確認する必要がある。なお、PETを応用したライブイメージング装置であるPETISは、葉など薄い組織ほどRIが存在する位置と消滅 γ 線が発生する位置が数ミリのオーダーでずれるため、莢などの小さい組織における核種定量には不向きである（藤巻ら 2004）。また、PETISの定量可能な範囲は3桁のオーダーであり（Kawachi *et al.* 2008）、RRISと同程度である（表 2-2）。

FOS表面から試料までの距離も定量性に影響を与えることが考えられた。そこで、RI線源とFOSとの間に人為的にスペースを作成し、FOS表面から試料までの距離と、検出されるシグナル強度の関係を調べた結果、ROIの面積を、RI線源と同一面積にした場合、0.4 mm 厚のスペースが存在することで、スペースが無い状態よりもシグナル強度が約 3-5 割低下したが、ROI面積を試料面積よりも広く設定することで、定量的に解析することが可能であることが示された（図 2-5）。しかしながら、測定対象とする植物組織上に設定したROI面積が広くなればなるほど、測定対象組織以外の近隣組織から放出された放射線も検出してしまう可能性が高まり、定量性が損なわれる原因となる。そのため、特に複数の組織が隣接して存在する部分を解析対象とする場合には、植物への負荷を抑えつつも、できるだけFOSと植物を近づけて固定することが重要となる。FOSと植物の固定は、過去の研究ではナイロンメッシュ（Nakanishi *et al.* 2009）、サーディカルテープ（Nakanishi *et al.* 2011）などが用いられてきたが、FOSと植物との間に空間が存在する問題点があった。そこで、サーディカ

ルテープと併用して、多数の穴の開いた PE 製ラップを用いて FOS と植物との固定を行ったが、依然として FOS と植物との空間を抑えることができなかった（図 3-2, 3-4）。そこで、0.1 mm 厚のシリコンゴムシートを用いて固定を行った結果、空間距離を抑えることができた（図 3-14）。ただし、48 時間といった長時間の撮影では、撮影期間中に植物が生長し、FOS と植物との空間を抑えることができなかった。さらには、光合成能が大きく低下した（図 4-6）。そのため、さらなる固定方法の改良が必要であり、両面テープによる FOS と植物との固定を試行中である。また、元素の輸送動態の解析において、測定する組織に ROI を設定するにあたり、組織を的確に識別することも定量性において重要となる。そこで、間欠照明における明期に植物試料をデジタルカメラで撮影するシステムを構築し、RRIS による RI 像と実画像を重ね合わせる撮影手法を構築した（図 3-3, 3-4）。この撮影手法は、他の組織と重なりやすいロゼット葉や茎生葉などを解析の対象とする場合に、有効なツールになる。さらに、この撮影手法を用いることは、48 時間などの長時間の撮影や、生長速度が速い植物を用いる場合など、FOS と植物との空間ができ易い実験条件において、植物の生長により組織が動いているかどうかを把握し、解析可能な時間を算出することに有効であると考えられる。

リアルタイム RI イメージングシステムによる研究対象核種の拡張

本研究により、間欠照明システムを構築したことで、RRIS 撮影において、アルミ板を用いずに植物への照明を行えるようになった（図 3-1）。その結果、低エネルギー β 線放出核種である ^{14}C など（図 4-2）をはじめとする様々な核種において、輸送動態の可視化が可能となった（図 3-14）。本研究で可視化した核種の放出エネルギーの値を基に、RRIS で可視化が可能であると予想される核種を図 5-1 に示した。なお、窒素の放射性同位体である ^{13}N から放出され

るポジトロンエネルギーは最大1198 keVであり、RRISでの可視化は可能であると考えられるが、半減期が10分と短く市販されていないため、RRISでの利用は困難である。このように、可視化できると考えられるエネルギー強度の放射線を放出する核種であっても、半減期の問題から市販されておらず、研究対象とするには難しい核種は、可視化が可能な核種としては取り扱わなかった。カリウムの放射性同位体である ^{42}K は、半減期が12時間であり、市販されていないが、東京大学放射線植物生理学研究室は ^{42}K を生成する ^{42}Ar - ^{42}K ジェネレータを有するため、 ^{42}K の利用が可能である。しかし、現状では生成量が最大20 kBq程度と少ないため、本研究で用いた成熟期のシロイヌナズナにおいては、輸送動態の可視化には至らなかった。ただし、幼若期のシロイヌナズナやイネにおいては可視化が出来たことから（data not shown）、実験条件によっては利用が可能である。

リアルタイムRIイメージングシステムにおける照明環境

間欠照明により、RRISでの研究対象となる核種が増えた。しかし、RRIS撮影時に消光を必要とするため、連続照明下とは植物生理活性が異なる可能性がある。例えば、光合成能や蒸散能などの低下が挙げられる。植物へ供給するRI量を多くし、カウント数が十分確保できる条件では、画像取得の積算時間を短くすることが可能であり（表 2-2）、単位時間当たりの撮影枚数を同じとした場合、明期時間を長く行える。つまり、本研究では明期 / 暗期を 15 分 / 15 分で撮影を行ったが、25 分 / 5 分とすることで、間欠照明の影響を小さくできると考えられる。

リアルタイムRIイメージングを用いた積み下ろしの割合の解析

植物に吸収された元素は、維管束内から周辺組織への積み下ろし、さらには

周辺組織から維管束内への積み込みを行いながら輸送・分配される。元素の移動を追跡する目的には、RIを用いたトレーサー実験は強力なツールである。しかし、RI量に基づいた元素量の測定には、比放射能が問題となる。比放射能とは、RIとその元素の単位質量当たりの放射能 (Bq/g)、つまりRIの純度である。RIが植物体内で輸送されるに伴って、植物に内在する非放射性の元素との混合割合が増加し、比放射能が小さくなる。そのため、ROIの位置がRIの添加部位から離れるほど、実際に存在している元素量と比較してRI量から算出される元素量は少なくなると予想される。この点、3章3節で行った、維管束からの積み下ろしの解析法は、それぞれに設定した領域内に含まれるRI量を、蓄積分と通過分に分類するという、比放射能に依存しない算出方法である。そのため、RIの輸送距離による比放射能の低下の影響を受けない解析法であり、実際に行われている元素の蓄積率を反映している。積み下ろしの解析結果では、元素により積み下ろし割合が異なることや (図 3-17a, 17c)、節と節間による輸送動態が大きく異なることが示唆された (図 3-17b, 17d)。この点、本手法を用いれば、利用できる放射性同位元素があるものについて、元素ごとの積み下ろし割合 (シンク能) をそれぞれ評価できると考えている。本研究における積み下ろしの解析は、節、節間に着目したが、3章3節で示されたカドミウムの莢への集積は、他の元素と比較して大きく様相が異なり (図3-14)、カドミウムの莢への積み下ろしは非常に興味深い。¹⁰⁹Cd は莢の定量性が良かったため (表 2-4)、莢におけるカドミウムの積み下ろし割合の解析に応用が可能である。

リアルタイムRIイメージングシステムを用いたガス状RIの可視化

いままでの RRIS において、RIの投与方法は水耕液への投与方法による経根吸収や葉面吸収により行われていたが、本研究によりガス状の核種における動態の

可視化が可能となった（図 4-3）。これにより、 $^{14}\text{CO}_2$ のみならず、植物ホルモンであるエチレンガス（ $^{14}\text{C}_2\text{H}_2$ ）なども研究対象として可能となった。本研究で用いた大きさのポリ袋（1 L）を用いて、 $^{14}\text{CO}_2$ と同じ放射線量（2 MBq）の ^{14}C 標識エチレンガスおよび植物を密閉した場合、エチレンガス濃度はおよそ 10 ppm 程度である。10 ppm のエチレン処理したシロイヌナズナは、胚軸の伸長生長の抑制と肥大、根の伸長生長の抑制、鉤状部の過度の屈曲が起こることが知られている（テイツら 2004）。また、画像取得の積算時間が 15 分の場合、 ^{14}C の定量下限値は、 2 Bq/mm^2 であり（表 2-2）、 ^{14}C 標識エチレンガスは 0.5 pmol/mm^2 に相当する。なお、エチレンガスを用いたライブイメージングは、いまのところ報告例がない。

今後の展望

RRIS を用いた輸送動態の解析において、さらに分子生物学的な解析を組み合わせることで、元素の輸送や蓄積を制御するメカニズムをより詳細に解明していきたい。最初の段階としては、節における積み下ろしに着目し、変異体を用いた解析を予定している。

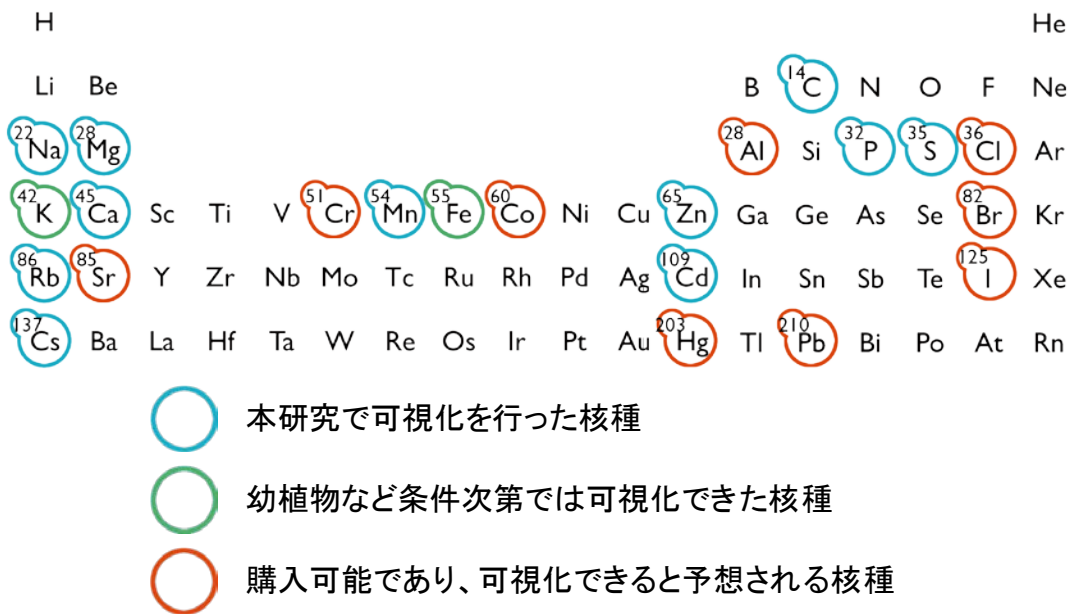


図 5-1 RRIS により可視化できた核種および可視化が可能と予想される核種

引用文献

- Andrew G Weisenberger and Brian Kross and Seungjoon Lee and John McKisson and J E McKisson and Wenze Xi and Carl Zorn and Chantal D Reid and Calvin R Howell and Alexander S Crowell and Laurie Cumberbatch and Brent Fallin and Alexander Stolin and Mark, F.S. PhytoBeta imager: a positron imager for plant biology. *Phys. Med. Biol.* **57**, 4195 (2012)
- Baroja-Fernández, E. *et al.* Sucrose synthase activity in the *sus1/sus2/sus3/sus4* Arabidopsis mutant is sufficient to support normal cellulose and starch production. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 321-326 (2012)
- Beer, S. *et al.* Design and initial performance of PlanTIS: a high-resolution positron emission tomograph for plants. *Phys. Med. Biol.* **55**, 635-646 (2010)
- Biddulph, O., Biddulph, S., Cory, R. & Koontz, H. Circulation Patterns for Phosphorus, Sulfur and Calcium in the Bean Plant. *Plant Physiol.* **33**, 293-300 (1958)
- Bukovac, M. & Wittwer, S. Absorption and Mobility of Foliar Applied Nutrients. *Plant Physiol.* **32**, 428-435 (1957)
- Chen, S. X., Petersen, B. L., Olsen, C. E., Schulz, A. & Halkier, B. A. Long-distance phloem transport of glucosinolates in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **127**, 194-201 (2001)
- Cobbett, C. S. Phytochelatins and Their Roles in Heavy Metal Detoxification. *Plant Physiology* **123**, 825-832 (2000)
- Deegan, R. *et al.* Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops. *Nature* **389**, 827-829 (1997)

- Fujimaki, S. *et al.* Tracing Cadmium from Culture to Spikelet: Noninvasive Imaging and Quantitative Characterization of Absorption, Transport, and Accumulation of Cadmium in an Intact Rice Plant. *Plant Physiol.* **152**, 1796-1806 (2010)
- Fujiwara, T., Hirai, M. Y., Chino, M., Komeda, Y. & Naito, S. Effects of Sulfur Nutrition on Expression of the Soybean Seed Storage Protein Genes in Transgenic Petunia. *Plant Physiol.* **99**, 263-268 (1992)
- Hensel, L., Grbic, V., Baumgarten, D. & Bleecker, A. Developmental and Age-Related Processes that Influence the Longevity and Senescence of Photosynthetic Tissues in Arabidopsis. *Plant Cell* **5**, 553-564 (1993)
- Hirayama, H. *et al.* The EGS5 code system. *Department of Energy* (2005)
- Iwata, R., Kawamura, M., Ido, T. & Kimura, S. Chromatographic purification of no-carrier-added magnesium-28 for biological studies. **159** (1992)
- Jahnke, S. *et al.* Combined MRI-PET dissects dynamic changes in plant structures and functions. *Plant Journal* **59**, 634-644 (2009)
- Kanno, S. *et al.* Real-time imaging of radioisotope labeled compounds in a living plant. *J. Radioanal. Nucl.* **272**, 565-570 (2007)
- Kawachi, N. *et al.* Quality control in Positron Emitting Tracer Imaging System (PETIS) examination for quantification analysis of plant physiological functions. *JAEA-Review 2008-055, JAEA Takasaki Annual Report 2007*, 107 (2008)
- Kiser, M. R., Reid, C. D., Crowell, A. S., Phillips, R. P. & Howell, C. R. Exploring the transport of plant metabolites using positron emitting radiotracers. *Hfsp Journal* **2**, 189-204 (2008)
- Kiyomiya, S. *et al.* Light activates (H₂O)-O-15 flow in rice: Detailed monitoring using a positron-emitting tracer imaging system (PETIS). *Physiol. Plantarum* **113**, 359-367 (2001)

- Klein, O., Binder, R. & Steinke, W. Quantification of Tissue Self-Absorption of Weak β -Radiation in Lyophilized Whole-Body Sections of Rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **31**, S27-S31 (2000)
- Kobayashi, N. I., Tanoi, K., Hirose, A. & Nakanishi, T. M. Characterization of rapid intervascular transport of cadmium in rice stem by radioisotope imaging. *Journal of Experimental Botany* **64**, 507-517 (2013)
- Lee, S. *et al.* Bio-available zinc in rice seeds is increased by activation tagging of nicotianamine synthase. *Plant Biotechnology Journal* **9**, 865-873 (2011)
- Loukiala, A., Tuna, U., Beer, S., Jahnke, S. & Ruotsalainen, U. Gap-filling methods for 3D PlanTIS data. *Phys. Med. Biol.* **55**, 6125-6139 (2010)
- Mahon, J. D., Fock, H. & Calvin, D. T. Changes in specific radioactivity of sunflower leaf metabolites during photosynthesis in $^{14}\text{CO}_2$ and $^{12}\text{CO}_2$ at three concentrations of CO_2 . *Planta* **120**, 245-254 (1974)
- Minchin, P. E. H. & Thorpe, M. R. Using the short-lived isotope C-11 in mechanistic studies of photosynthate transport. *Functional Plant Biology* **30**, 831-841 (2003)
- Nakanishi, T. M. *et al.* Circadian Rhythm in ^{15}O -Labeled Water Uptake Manner of a Soybean Plant by PETIS (Positron Emitting Tracer Imaging System). *Radioisotopes* **50**, 163-168 (2001)
- Nakanishi, T. M. *et al.* Real-time imaging of ion uptake from root to above-ground part of the plant using conventional beta-ray emitters. *J. Radioanal. Nucl.* **282**, 265-269 (2009)
- Nakanishi, T. M., Yamawaki M., Ishibashi H. & Tanoi K. Real-time imaging of ^{35}S -sulfate uptake in a rape seed plant. *Proceedings in Radiochemistry A Supplement to Radiochimica Acta* **1**, 293 (2011)

- Ofosu-Budu, K., Saneoka, H. & Fujita, K. Factors controlling the release of nitrogenous compounds from roots of soybean. *Soil Sci. Plant Nutr.* **41**, 625-633 (1995)
- Ohtake, N. *et al.* Rapid N transport to pods and seeds in N-deficient soybean plants. *J. Exp. Bot.* **52**, 277-283 (2001)
- Radwan, M. Translocation and Metabolism of C14-Labeled Tetramine by Douglas-Fir Orchard Grass and Blackberry. *For. Sci.* **13**, 265-& (1967)
- Rensing, C., Mitra, B. & Rosen, B. P. The zntA gene of Escherichia coli encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 14326-14331 (1997)
- Sawada, S., Hayakawa, T., Fukushi, K. & Kasai, M. Influence of Carbohydrates on Photosynthesis in Single, Rooted Soybean Leaves Used as a Source-Sink Model. *Plant and Cell Physiology* **27**, 591-600 (1986)
- Sawada, S., Kawamura, H., Hayakawa, T. & Kasai, M. Regulation of Photosynthetic Metabolism by Low-Temperature Treatment of Roots of Single-Rooted Soybean Plants. *Plant and Cell Physiology* **28**, 235-241 (1987)
- Smith, I. & Lang, A. Decoloration and Solubilization of Plant-Tissue Prior to Determination of H-3, C-14, and S-35 by Liquid Scintillation. *Anal. Biochem.* **164**, 531-536 (1987)
- Sun, J., Okita, T. & Edwards, G. Modification of carbon partitioning, photosynthetic capacity, and O-2 sensitivity in arabidopsis plants with low ADP-glucose pyrophosphorylase activity. *Plant Physiol.* **119**, 267-276 (1999)
- Toyofuku, K., Kasahara, M. & Yamaguchi, J. Characterization and Expression of Monosaccharide Transporters (OsMSTs) in Rice. *Plant and Cell Physiology* **41**, 940-947 (2000)

- Tsukamoto, T. *et al.* ^{52}Fe Translocation in Barley as Monitored by a Positron-Emitting Tracer Imaging System (PETIS): Evidence for the Direct Translocation of Fe from Roots to Young Leaves via Phloem. *Plant and Cell Physiology* **50**, 48-57 (2009)
- Tsukamoto, T. *et al.* ^{52}Mn translocation in barley monitored using a positron-emitting tracer imaging system. *Soil Sci. Plant Nutr.* **52**, 717-725 (2006)
- Turgeon, R. Phloem loading and plasmodesmata. *Trends Plant Sci.* **1**, 418-423 (1996)
- Uraguchi, S. & Fujiwara, T. Cadmium transport and tolerance in rice: perspectives for reducing grain cadmium accumulation. *Rice* **5**, 1-8 (2012)
- Wu, H. & Tai, Y. A novel phoswich imaging detector for simultaneous beta and coincidence-gamma imaging of plant leaves. *Phys. Med. Biol.* **56**, 5583 (2011)
- Yamawaki, M. *et al.* The development of real-time RI imaging system for plant under light environment. *J. Radioanal. Nucl.* **282**, 275-279 (2009)
- 伊藤小百合、鈴木伸郎、河地有木、石井里美、石岡典子、藤巻 秀、 $^{11}\text{CO}_2$ と植物用ポジトロンイメージング装置を用いたダイズ植物の根粒に対する光合成産物移行のリアルタイム解析、*RADIOISOTOPES*、**59**、145-154 (2010)
- 稲永 忍、玖村敦彦、ナタネの物質生産に関する研究：第1報 生育に伴うナタネ個体群の光合成能ならびに呼吸能の推移、*日本作物學會紀事*、**43**、266 (1974)
- 大須賀隆司、p 170-177、五訂版施設園芸ハンドブック、日本施設園芸協会、東京 (2003)
- 田中 明；藤田耕之輔、トマトの果実生産における Source と Sinkの相対的意義の解析 (第1報)、標準栽培条件下での生育経過および摘芽・摘芯の影響、*日本土壤肥料學雜誌*、**43**、25-30 (1972)

- 田野井慶太郎、齊藤貴之、岩田直子、大前芳美、広瀬 農、小林奈通、岩田
錬、中西友子、²⁸Mgの製造とイネにおける Mg 吸収解析への利用、
RADIOISOTOPES、 **60** 、 299-304 (2011)
- テイツ L.、ザイガー E.、 p. 533、テイツ・ザイガー植物生理学、培風館、
東京 (2003)
- 長南信雄、作物における光合成産物転流の経路と機構、化学と生物、 **24** 、
91-100 (1986)
- 難波和彦、近藤 直、門田充司、笹尾 彰、植物気孔の光応答に基づく効率的
光照射の検討、植物工場学会誌、 **16** 、 165-172 (2004)
- 北條良夫、加藤眞次郎、小林宏信、ナタネのさやの光合成活性と稔実に対する
寄与、日本作物學會紀事、 **41** 、 420-425 (1972)
- 藤巻 秀、河地有木、石岡典子、 [9] 植物用ポジトロンイメージング装置
(PETIS: Positron Emitting Tracer Imaging System) を用いた研究、 p. 109、平
成 16 年度次世代PET装置開発研究報告書、放射線医学総合研究所発行
(2004)
- 宮原諄二、オートラジオグラフィとラジオグラフィ -イメージングプレートと
その応用-. RADIOISOTOPES、 **47** 、 143-154 (1998)
- 頼 泰樹、菅野 里美、林 芳武、大矢智幸、二瓶直登、中西友子、植物中の
物質動態解析のためのβ崩壊核種を用いたリアルタイムオートラジオグラフィ
システムの開発、RADIOISOTOPES、 **57** 、 287-294 (2008)

謝辞

本研究を行うにあたり、御指導、ご鞭撻を賜りました東京大学放射線植物生理学研究室 中西友子教授にお礼申し上げます。研究の方向性など主体性を尊重し、常に温かく見守って頂いたことに大変感謝しております。充実した研究生生活を送ることができました。また、様々な研究発表の機会を与えて頂き、深く感謝致しております。

同研究室 田野井慶太郎准教授には、長期間に渡り研究の取り組みから研究結果に対する議論、論文作成など、惜しみないご協力を頂きました。謹んで多大なる謝意を表します。

同研究室 小林奈通子特任助教には、ひとかたならぬお世話になりました。また、日頃から研究の進み具合を気にかけていただき、深く感謝申し上げます。本研究は、この三人の指導によるところが大であり、深く感謝するものである。

同研究室 廣瀬 農特任助教には、本研究にあたりシミュレーションなどのデータを提供して頂きました。心より感謝いたします。また、日常の議論を通じて多くの知識や示唆を頂き、深く感謝致します。

同研究室 斉藤貴之氏には、実験でご協力をいただきました。ここに感謝いたします。

東北大学アイソトープセンター 岩田 錬教授には、 ^{28}Mg を製造して頂きました。心より感謝いたします。

放射線植物生理学研究室の皆様には日々の研究生生活についてたいへんお世話になりました。

最後に、研究生生活をいつも応援してくれた家族に心から感謝いたします。また、福井理恵氏には、本論文に用いた多くのイラスト図を提供していただき、心から感謝をいたします。

なお、本研究の成果は最先端・次世代研究開発支援プログラム (GS007) の支援による。

平成 26 年 2 月 杉田 亮平

論文の内容の要旨

氏名 杉田 亮平
指導教員 中西 友子

論文題目

シロイヌナズナにおける放射性同位元素を用いた無機元素動態の可視化技術の開発

1. 背景

植物体内の元素分布は刻一刻と変化するため、生きた植物を用いて元素動態を解析することで、サンプリングが必要な破壊実験では得られなかった新しい知見が見出されることが期待される。植物中の元素動態を非破壊で経時的に撮像するために、本研究では、リアルタイム RI イメージングシステム(RRIS)の高度化に取り組んだ。RRIS による元素の可視化には放射性同位元素(RI)を用いるが、プロトタイプでは可視化できる核種が ^{32}P に限られていた。そこで、多種類の元素動態を解析するために、入手できる、できるだけ多くの核種において解析可能な装置の開発を行った。まず、様々な核種に対する RRIS の定量性を評価した。すなわち、RI 線源および各 RI を吸収させたシロイヌナズナの各組織を用い、定量可能な範囲を組織別に検証した。次に、RRIS の撮像と植物への照明を両立させるためのシステム構築を、さらに RI 像と実画像の同時撮影システムの構築を行った。こうした基本システムの改良の後、シロイヌナズナの体内における様々な核種の輸送動態を可視化し、動態の特徴から元素動態を三つのカテゴリーに分けることで、輸送様式のパターンを推察した。さらには、元素の長距離輸送過程における各組織への分配供給メカニズムの解明を目的として、元素の維管束から周囲組織への輸送割合を比較した。また、放射性物質の投与と撮像の同時実施が難しい $^{14}\text{CO}_2$ の動態解析にチャレンジすることで、光合成産物の輸送動態への展開例を示した。

2. リアルタイム RI イメージングシステムの定量性評価

RRIS 画像から RI 量の経時変化を解析するためには、定量性の確保が必須である。各 RI は様々な種類の放射線を各々異なる割合で放出するため、定量可能な条件を RI ごとに検討した。まず、線源を 2 種類(シート上のスポットおよび RI 吸収させた植物組織)用意し、3~15 分の積算時間において、各 RI の濃度とともに RRIS 像と Imaging Plate(IP)像と比較した。核種は入手可能かつ線質の違いを幅広くカバーすることを考えて ^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs を用いた。解析の結果、RRIS は積算時間の増加に伴って定量上限値/下限値がほとんど変化せず、ダイナミックレンジは 3 桁のオーダーであった。このことは、RRIS によるライブイメージン

グでは、3分や5分といった短い時間での画像取得において定量性を損なうことなく、物質動態を解析できることが示された。

続いて、植物試料とシンチレータの空間が定量性に与える影響を評価した。放射線をシンチレータで光に変換した後、その光を撮像する原理上、試料とシンチレータの距離は画像の解像度に影響を及ぼすことから、定量性への影響を調べる必要があった。そこで、線源と FOS(表面にシンチレータを蒸着したプレート)との間に人為的に様々な厚さのスペースを作成し、FOS 表面から試料までの距離と、検出されるシグナル強度の関係を調べた。その結果、線源と FOS が 0.4 mm 離れると、画像上でその線源と同じ面積当たりのシグナル強度は約 3-5 割低下するものの、測定する面積をその線源の面積よりも大きくした場合、シグナル強度は低下しなかった。この結果により、試料と FOS の間の空間が一定しない場合でも、測定面積を試料面積よりも広く設定することで、定量的に解析することが可能であることが示された。

放射線エネルギーは、線源を含む植物体自身の遮蔽によりそのエネルギーが減衰(自己吸収)するため、定量性が低下することが問題となる。そこで、シロイヌナズナを用いて、厚さや構造の異なる各組織別に自己吸収の影響を解析した。その結果、花と葉では全核種で定量的な解析が可能であり、 ^{28}Mg では莢・花茎でも定量可能であった。また、強いエネルギーの放射線を放出する核種ほど定量性が高いわけではなく、例えば、 ^{22}Na や ^{137}Cs と比較して、放出される放射線エネルギーが弱い ^{109}Cd は、高い定量性を示した。 ^{22}Na においては、莢における定量性は花茎に比べて低く、反対に、 ^{137}Cs における定量性は、莢の方が花茎に比べて高かった。このように、定量性は放射線の線質や組織内での RI 分布の影響を受けることが示唆された。続いて、植物の模擬として、厚さが均一な遮蔽材(ポリエチレン製ラップ、ポリカーボネート製シート)を用いて、遮蔽が定量性に及ぼす影響を検証した。その結果、遮蔽厚 10-30 μm の時に ^{14}C は 4-7 割減少し、その他の核種においては遮蔽厚 0.2-0.4 mm で、 ^{22}Na ; 7-9 割、 ^{65}Zn ; 6-7 割、 ^{86}Rb ; 4-6 割、 ^{109}Cd ; 6-8 割、 ^{137}Cs ; 6-7 割減少した。 ^{65}Zn が放出する放射線の最大エネルギーは、 ^{22}Na と比較して弱いにも関わらず、遮蔽の影響度合いは小さかった。この結果から、RRIS の検出感度が放射線の線質により異なると考えられた。そこで、一つの RI から放出される複数の各放射線に着目し、FOS の検出に対する各放射線の寄与率を線質に分けて検証するため、計算機シミュレーションを用いて検証した。解析の対象として、 ^{14}C 、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs に加え、 ^{28}Mg の娘核種である ^{28}Al を用いた。解析の結果、 β 線、ポジトロンやエネルギーの低い X 線は FOS の検出に対する寄与率が高く、エネルギーの高い γ 線の寄与率は低いことがわかった。次に、花茎における自己吸収の影響をシミュレーションした。シミュレーションは、組織内の元素分布が均一でない場合も考慮し、RI 分布を、維管束にのみ RI が存在する花茎(周辺局在)、中心部に RI が局在する花茎(中心局在)、均一に RI が分布する花茎(均一分布)の 3 パターン想定して行った。

解析の結果、 ^{28}Al 、 ^{65}Zn 、 ^{86}Rb 、 ^{109}Cd においては、花茎内におけるRI分布の違いがRRISで検出されるシグナル強度に与える影響は小さかった。これは、 ^{28}Al 、 ^{86}Rb は、放出する β 線のエネルギーが高いこと、 ^{65}Zn 、 ^{109}Cd においては放出するX線の植物組織透過力が高いことが、自己吸収の影響を受けにくい要因であると考えられた。一方、 ^{22}Na 、 ^{137}Cs が放出する γ 線エネルギーはシンチレータへのエネルギー寄与は低く、透過力の弱い β 線やポジトロンを主に検出するため、自己吸収の影響を大きく受けることが示唆された。また、 ^{14}C においては、均一分布と比較して周辺局在分布で得られるシグナル強度は9割程度減少し、周辺局在と比較して中心局在ではさらに9割程度減少した。均一分布は周辺分布と比較して、周辺分布は中心局在と比較して、より花茎の表面方向に ^{14}C 量が多いため、自己吸収の影響が小さいと考えられた。これらの結果から、エネルギーが高い β 線およびX線は、植物組織による自己吸収の影響度合いは小さい一方で、エネルギーが低い β 線および γ 線は、自己吸収の影響が大きいことが示された。

3. 間欠照明システムの構築による様々な核種における輸送動態の可視化

エネルギー強度が強い β 線や弱いX線を放出する一部の核種においては、植物とFOSとの間に遮光のためにアルミ板を設置することで、植物に光りを当てながらRRISで撮像することが可能であったものの、多くの核種にその方法は適用不可能である。そこで、照明方法を備えた撮影システムを構築する必要がある。そこでRI像を撮影する間のみ植物への照明を消灯し、RI撮像を断続的に実施することで、撮像以外の時間は照明を施すシステムを構築した。その結果、今回対象としたRI全てにおいて照明下の植物における輸送動態の可視化が可能となった。さらに、間欠照明における明期に植物試料をデジタルカメラで撮影するシステムを構築し、RRISによるRI像と実画像を重ね合わせる撮影手法を構築した。撮影中に伸長する花茎の先端とRIのシグナルの位置の上端が一致している様子が捉えられた。

以上の改良を施したRRISを用いて、実際に花茎を持つステージのシロイヌナズナにおいて、 ^{22}Na 、 ^{28}Mg 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{45}Ca 、 ^{54}Mn 、 ^{65}Zn 、 ^{109}Cd 、 ^{137}Cs を根から投与することで地上部への蓄積の様子を可視化した。各RI像を比較した結果、地上部における元素の分布様式は、植物全体に分布した ^{22}Na 、 ^{32}P -リン酸、 ^{35}S -硫酸、 ^{137}Cs (均一型)、植物全体に分布し、特に茎生葉や莢において局所的に分布した ^{65}Zn 、 ^{109}Cd (局在型)、葉や茎頂側に比べ花茎の基部側に蓄積した ^{28}Mg 、 ^{45}Ca 、 ^{54}Mn (蓄積型)の三つのグループ(均一型、局在型、蓄積型)に分類された。グループ1に分類された元素は、一価カチオン、およびアニオン、グループ2に分類された亜鉛とカドミウムは共に、有機酸などにキレートされて長距離輸送される元素、グループ3には、多価カチオンが分類された。各元素の分布は、元素ごとの積み下ろし・積み込みのメカニズムの違いに由来することから、維管束からの積み下ろしに着目した解析を行った。解

析は、花茎の中の特定の部位に流入する RI 量と、この部位よりもさらに上部へ移行する RI 量を算出し、そこから蓄積率を割り出すことで行った。研究対象として、蓄積型である ^{28}Mg と ^{45}Ca 、および均一型である ^{22}Na を用いた。その結果、花茎での積み下ろし量は、吸収開始後 8.5-24 時間において、 ^{28}Mg 、 ^{45}Ca は直線的に増加したが、 ^{22}Na においては指数的に増加した。このことは、花茎に輸送された ^{22}Na には、ロゼット葉を経由せずに花茎へ直接輸送されたものと、ロゼット葉に入った後に花茎へ輸送されものが存在し、撮影初期には後者がまだ検出されなかったことを表しているのではないかと考えた。 ^{28}Mg と ^{45}Ca は、吸収開始後 8.5-24 時間において、積み下ろし割合の経時的変化はなかった。なお、興味深いことに、花茎の位置と積み下ろし割合に高い相関があり、高い位置にある花茎ほど通過量当たりの積み下ろした割合が高く、さらには、節と節間による区別が見られなかった。一方 ^{22}Na は、積み下ろし割合の経時的な変化は、節間は一定であったが、節においては時間とともに増加した。これは、直接花茎へ輸送された ^{22}Na と、ロゼット葉に入った後に師管により花茎へ輸送された ^{22}Na では、節における積み下ろしのメカニズムが異なることが考えられる。

4. 光合成産物における輸送動態の可視化

RI 標識ガスの吸収動態のイメージング法の構築と画像解析について纏めた。前章までの RI 投与方法は全て経根であったが、ここでは植物地上部への二酸化炭素の投与を行い、次に光合成産物の動態解析を試みた。まず、組織別に ^{14}C を供与する実験系を構築した。続いて、RRIS を用いた ^{14}C -光合成産物の輸送動態の可視化と解析を試みた。解析では、 $^{14}\text{CO}_2$ を短時間吸収させその動態を観察するパルス-チェイス実験、および $^{14}\text{CO}_2$ を連続的に吸収させ光合成により ^{14}C が固定されていく動態を可視化する 2 パターンを比較した。これらの結果は、RI 標識ガスの輸送動態の可視化解析を可能としただけでなく、特定の組織に $^{14}\text{CO}_2$ を投与することにより、各組織における養分のシンク・ソースの関係を動的に解析できることも示した。

本研究では、シロイヌナズナにおける無機元素の輸送動態の可視化を目的とし、種々の無機元素の輸送動態の可視化技術を開発した。また、可視化した連続画像の解析により、養分吸収過程の定量的な解析が可能となった。さらに、RI 標識したガスの吸収動態の可視化技術も確立した。本研究で確立した技術は、植物体内での分布を制御するメカニズムを解明するために重要な情報を提供することができると考えられる。