連載総説

Bio-PIXE その理論と応用

第11章 マイクロビーム PIXE の生物学利用

(2) 超高分解能マイクロビーム PIXE 計画による生物学利用計画[†]神谷富裕^{*1}

^{*1} 日本原子力研究所高崎研究所放射線高度利用センター
370-1292 群馬県高崎市綿貫町 1233

Key Words : microbeam, PIXE, elemental analysis

1. はじめに

マイクロビームは、MeV 領域のエネルギーをもつイオンビームを $1\mu\text{m}$ 以下の精度で局所的に照射するものである。PIXEをはじめとするイオンビーム分析の対象となる試料は、自然界に存在するものであれ、人工のものであれ、多くは空間的な構造を持つ。従来の PIXE ではそれを敢えて均一化して分析していた。むしろ PIXE での試料調製においてそれが重要でもあった。しかしそれらの試料は、本来局所的分析が求められているものが多く、微細な構造を持つ試料に対してはビームを微細化して試料に照射するのはきわめて自然な成り行きであった。1970 年代の初めには、 μm オーダーの構造を持つ試料の微視的分析の要請から英国の Harwell 研究所の Cookson らが 3 MV ペレトロン加速器からのプロトンビームを四連の四重極電磁石レンズを用いて集束し、PIXE 分析を行ったのがマイクロビームの始まりである¹⁾。その後英国の

オックスフォード大学およびオーストラリアのメルボルン大学を初めとし、日本を含む世界各国の研究グループによって空間分解能の向上や、高速データ収集・解析手段などの技術開発、および広い分野にわたる応用研究が進められてきた^{1), 2)}。

マイクロビームは、PIXE, RBS (Rutherford Backscattering Spectroscopy), NRA (Nuclear Reaction Analysis) 等イオンビーム分析手法と組み合わせることにより、生物学、医学、鉱学、冶金学、地質学、考古学および半導体や超伝導体等の材料工学等幅広い分野の試料に対応した局所微量元素分析が可能である。その一方で、物質中の飛程に沿って単位長さあたりに与えるエネルギー (LET) が大きいという特性を活かすことによって励起や欠陥導入などイオンとの相互作用による半導体素子や生物細胞の局部照射効果の研究^{3) - 6)}を行うための有力な手段でもある。日本原子力研究所高崎研究所 (以下原研高崎) では複合加速器施設 TIARA^{7), 8)} において図 1 に示すとおり、タンデム、シングルエンドおよびサイクロトロンビームラインにそれぞれ重イオン^{9), 10)}、軽イオン^{11), 12)}、そして高エネルギー重イオン¹³⁾の各マイクロビーム装置を設置し、それぞれイオンビームの特徴を活かした多目的の研究への応用を進めている。

[†] Bio-PIXE, Theory and Applications. Chapter 11. Application of Microbeam PIXE to Biology. (2) Biological Application in a Super-high Resolution Microbeam PIXE Project. Tomihiro KAMIYA : Advanced Radiation Technology Research Establishment, Japan Atomic Energy Research Institute, 1233 Watanuki-cho, Takasaki-shi, Gunma Pref. 370-1292, Japan.

図1 TIARA施設とマイクロビーム装置の配置

2. 高分解能マイクロビームシステム

軽イオンマイクロビーム形成装置では、PIXE分析による生物医学試料等の局所微量元素分析を $1\mu\text{m}$ 以下の高分解能で行うためにサブミクロンビーム形成技術の開発を行った。その具体的な目標性能として H^+ および He^+ の軽イオンにおいて電流 100pA 以上、ビームスポットサイズ $0.25\mu\text{m}$ とした。このようなサブミクロンレベルでは、レンズ系における色収差の影響が大きい。そこで著者らは、ビームのエネルギー幅を従来より1桁小さい $\pm 1 \times 10^{-5}$ 以下に抑えることを目指した。まず、加速器自身の加速電圧の変動によるビームエネルギー幅の増大を抑える

ために $\pm 1 \times 10^{-5}$ 以下の電圧安定度をもつシングルエンド加速器¹²⁾を選択した。それでもイオン源から引き出されたビームそのものに依然として残るエネルギー幅の影響を取り除くためにビーム輸送系には90度分析電磁石による高分解能のエネルギー分析系を導入した。

ビームの集束には二連の四重極電磁石 (Q) レンズ (図2) を用いている。主なパラメータ等を表1に示す。マイクロビーム集束系は、レンズからターゲットまでの距離 0.2m に対してマイクロスリットからレンズまでの長さが約 8m あり、レンズ系の縮小率が 12×60 となっている。このように二連四重極電磁石レンズでは、X方向とY方向で縮小率が異なるため、マイ

図2 二連四重極電磁石レンズ

表1 原研 TIARA マイクロビーム装置

軽イオンマイクロビーム	
加速器	3MVシングルエンド
イオン	H, He
集束レンズ	二連Qレンズ
磁極長	80mm
ポア径	10mm
縮小率	12×60
最小ビームサイズ	$\phi 0.25\mu\text{m}$
電流	100pA (目標)
主要研究対象	高分解能局所微量分析

クロスリットでのビームオブジェクトの形状は長方形にする必要があるが、レンズの構成がもっとも単純で精密な軸出しが容易に行えるという利点がある。

ビームサイズの計測には、図3に示すように表面にラインとスペースの微細レリーフパターンを持つシリコンウエハー^{(14), (15)}を標準試料として用い、マイクロビームをX, Y方向に走査して二次電子マッピングを行い、パターンのエッジにおける発生量のピークの幅から求

図3 シャープなエッジを持つシリコンの凹凸パターンによるビームサイズの評価
この試料の二次電子像をとり、 $0.5\mu\text{m}$ 幅の凸の部分で横切る線上の二次電子強度曲線のエッジに対応するピークの幅からビームサイズを評価した。

めた。2 MeVのHeイオンビームを用いてビームサイズ計測を行った結果、ビーム電流約10 pAで最小ビームサイズ $0.25 \times 0.25 \mu\text{m}^2$ が得られた。

ターゲットビーム電流は、集束レンズ系のアクセプタンスに依存する。アクセプタンスは目標とするビームサイズで決められる。このビームサイズで100 pAの電流を得るのに必要なビーム輝度は、 $27.8 \text{ pA} \mu\text{m}^{-2} \text{ mrad}^{-2}$ である。それには、イオン源の高輝度化が不可欠である。

3. 大気マイクロPIXE分析システムの開発

μm あるいはそれ以下のレベルの微細ビームを試料上で二次元的に走査できるマイクロビームは、多元素を同時に高感度で分析できるPIXE分析法と組み合わせることにより、試料中に含有される元素の分布を高空間分解能で画像化することが可能である。さらに、マイクロビームを大気中に取り出すことにより大気中で試料が分析可能となり、試料調製が容易となるとともに大気あるいはガス導入による冷却

効果により試料への照射損傷が軽減されるという利点がある。

集束方式のマイクロビームの広範囲に試料上に走査可能である利点を活かして、マイクロビームを大気に取り出すため、十分薄い有機膜を窓材として採用した。十分な強度を持ちマイクロPIXE分析の障害となる添加物がなく、細胞試料を付着しやすくする親水化処理が容易である厚さ $5 \mu\text{m}$ のPET(マイラー)膜が最適と考えた。これはビームの大気取出し窓としてよく用いられるポリイミド(カプトン)膜に比べ耐放射線特性はやや劣るが、 $100 \text{ pA} / \mu\text{m}^2$ 程度のマイクロビーム照射に対しても $10 \times 10 \mu\text{m}^2$ 程度の走査によって10時間以上の寿命をもつことが確認された。これを凍結乾燥法による生物細胞(培養した牛の大動脈内皮細胞)試料のバックリングとして使用し、マイクロビーム走査によって世界で初めて $1 \mu\text{m}$ レベルの空間分解能での大気中試料のマイクロPIXEイメージを取得することに成功した。さらにマイクロPIXE分析に先立ち、あらかじめ透過イオンエネルギー

図4 大気マイクロPIXEおよびSTIMシステム模式図

マッピングを行うSTIM(Scanning Transmission Ion Microscopy)技術を開発し、分析試料に対してビーム損傷を与えることなく形状や構造をイメージングしてビーム照準することが可能になった¹⁶⁾。このとき膜と試料を透過した陽子のエネルギーを測定するため、粒子検出器としてSi PINダイオードを試料の背面において用いた。マイクロビーム走査・多次元データ収集システムによって得られた細胞試料のSTIM像は、その後のマイクロPIXE分析による元素分布像とよく一致した。図4にシステムの概要を模式的に示す。

4. マイクロPIXEの生物学・環境科学への応用

細胞分析の予備的な実験として、牛の大動脈

内皮細胞の培地にプロモデオキシウリジンを投与してそれが細胞周期のS期にDNA合成のために細胞核に取り込まれる様子を微量な臭素元素のマイクロPIXEマップによって確認することに成功した(図5)¹⁷⁾。これは抗癌剤のような薬品の有効性が、事前に培養癌細胞に投与した場合の薬品中の特徴的な元素が細胞内の特定部位に取り込まれるかどうかによって検証可能であることを示すものであり、特に医学、医療への貢献が期待される。

大気エアロゾルを分析する環境科学の分野においても黄砂等のエアロゾル粒子、霧や雨滴にたいする試料調整法を確立し、個別粒子の元素マッピングを実現した¹⁸⁾。図6は数個の黄砂粒子が存在する領域を対象とし、元素の分布状況を三次元的に示したものである。黄砂粒子は

図5 マイクロPIXEマップで捉えた牛の上皮血管細胞内の元素分布画像
核にプロモデオキシウリジンの臭素が集積していることがわかる。走査幅は、 $20 \times 20 \mu\text{m}^2$

図6 黄砂粒子（粒子径 $12\mu\text{m}$ 以上）の元素マップ（走査幅は $25\mu\text{m}\times 25\mu\text{m}$ ）

SiやCa, Feを主成分とし、さらにこれらの粒子表面にS成分が吸着した状態で存在することが推測される。粒子の混合状態を細かく検討することにより、黄砂粒子の輸送中における動態を解析することが可能になった。また、霧粒のような数十 μm 程度の液滴もシアノアクリレートモノマーにより液滴を固化することにより、マイクロPIXE分析が可能となり、地球温暖化や酸性雨や都市大気汚染問題の究明あるいは問題解決の前進に寄与することが期待されている。

また、核反応分析（NRA）と組み合わせて、マイクロPIXEによるCaマッピングとの同時測定により歯質中のフッ素分布測定が可能になった。これによりこれまで経験的にう歯予防に有効性が認められていたフッ素の徐放歯科材料を臨床で使用した場合、フッ素の歯質中への浸透性についての定性的定量的な検証が進

められている。

5. 超高分解能マイクロビームPIXE計画

大気マイクロPIXE分析システムでは、現在 $1\mu\text{m}$ 以下の空間分解能での分析技術が確立され、生物、医学研究における細胞レベルでの微量元素の挙動の解析や、環境科学分野においてエアロゾルなどの大気中の微粒子解析から大気汚染や温暖化の問題を解く鍵を得ようとしている。いま、さらに応用研究が進展するのに伴い、従来のサブミクロンからナノ領域の空間分解能での微量元素の挙動分析が求められる。このためナノレベルのビーム形成技術を用いた超高分解のマイクロビームPIXEが求められる。

このとき必然的にマイクロビーム強度も大幅に減少するが、実用的な分析利用においては、多数の細胞等の試料に対する極微量元素の定量化が十分短時間で可能であることが求め

図7 大立体角検出器の概念図

られる。そこで、マイクロビーム入射によって発生する特性X線をできる限り効率よく検出するために大立体角X線検出器を製作している(図7)。さらに、AlやMgなど比較的軽元素からの低エネルギーX線も高効率で検出するため、薄い検出器のX線入射膜を採用した。このとき高エネルギーの後方散乱陽子も検出器に入射し、不感時間を増加させるため、多素子検出器としてその影響を分散させる設計である。

分析の空間分解能がナノレベルとなるとビームサイズに対して相対的にそれが通過する細胞などの数 μm 以上の厚みを持った試料中の飛程が増大する。このため、必然的に深さ方向まで含めた三次元的な分析も要求されるであろう。したがって分析システムの高度化、特に検出感度のさらなる向上が不可欠なのである。

文 献

- 1) Watt, F. and Grime, G. W. : "Principles and Applications of High-energy Ion Microbeams", Adam Hiller, Bristol (1987)
- 2) Traxel, K. : *Nucl. Instr. Meth.*, **B50**, 177 (1990)
- 3) Fischer, B. E. : *ibid.*, **B30**, 284 (1988)

- 4) Horn, K. M., Doyle, B., Sexton, F. W., Laird, J. S., Saint, A., Cholewa, M. and Legge, G. J. F. : *ibid.*, **B77**, 355 (1993)
- 5) Siegle, R., Cohen, D. D. and Dytlewski, N. : *ibid.*, **B158**, 31 (1999)
- 6) Folkard, M., Vojnovic, B., Schettino, G., Forsberg, M., Bowey, G., Prise, K. M., Michael, B. D., Michette, A. G. and Pfauntsch, S. J. : *ibid.*, **B130**, 270 (1997)
- 7) Tanaka, R. : Proc. The 5th Japan-China Joint Symp. on Accelerator for Nuclear Science and Their Applications, Osaka, Japan, 201 (1993)
- 8) Saitoh, Y., Tajima, S., Takada, I., Mizuhashi, K., Uno, S., Ohkoshi, K., Ishii, Y., Kamiya, T., Yotsu-moto, K., Tanaka, R. and Iwamoto, E. : *Nucl. Instr. Meth.*, **B89**, 23 (1994)
- 9) Kamiya, T., Utsunomiya, N., Minehara, E., Tanaka, R. and Ohdomari, I. : *ibid.*, **B64**, 362 (1992)
- 10) Kamiya, T., Utsunomiya, N., Minehara, E. and Tanaka, R. : Proc. of 3rd Int. Conf. on Evolution in Beam Applications, Takasaki, Japan, 286 (1991)
- 11) Kamiya, T., Suda, T. and Tanaka, R. : *Nucl. Instr. Meth.*, **B104**, 43-48 (1995)
- 12) Kamiya, T., Suda, T. and Tanaka, R. : *ibid.*, **B118**, 447-450 (1996)
- 13) Kamiya, T., Yokota, W., Kobayashi, Y., Cholewa, M., Krochmal, M. S., Laken, G., Lasen, I. D., Fiddes, L., Parkhill, G. and Dowsey, K. : 7th Int. Conf. on Nuclear Microprobe Technology and Applications (Bordeaux, France, 10-15 Sep. 2000) to be published in *Nucl. Instr. Meth. B*
- 14) Ohdomari, I., Sugimori, M., Koh, M., Noritake, K., Takiguchi, Y., Shimizu, H., Tanaka, R., Kamiya, T. and Utsunomiya, N. : *Nucl. Instr. Meth.*, **B54**, 71 (1991)
- 15) Ohdomari, I., Sugimori, M., Koh, M., Noritake, K., Shimizu, H., Tanaka, R., Kamiya, T., Utsunomiya, N. and Minehara, E. : *ibid.*, **B72**, 436 (1992)
- 16) Kamiya, T., Sakai, T., Oikawa, M., Satoh, T., Ishii, K., Sugimoto, A. and Matsuyama, S. : 3rd International Symposium on Bio-PIXE, Uji, Kyoto (Japan) ; 16-19 Nov. 1999, *Int. J. PIXE*, **9**, 217-225 (1999)
- 17) Sugimoto, A., Ishii, K., Matsuyama, S., Satoh, T., Gotoh, K., Yamazaki, H., Akama, C., Sato, M., Sakai, T., Kamiya, T., Oikawa, M., Saidoh, M. and Tanaka, R. : Proc. of the 3rd Int. Symp. on Bio-PIXE, Nov. 16-19, 1999, Uji, Japan, *Int. J. PIXE*, **9**, 151-160 (1999)
- 18) Kasahara, M., Ma, C.-J., Kamiya, T. and Sakai, T. : 7th Int. Conf. on Nuclear Microprobe Technology and Applications (Bordeaux, France, 10-15 Sep. 2000) to be published in *Nucl. Instr. Meth. B*