

動物血液の迅速無機元素分析法の 開発に関する研究

(Study on the development of a rapid analytical method for
inorganic elements in animal blood)

学位論文の要約

高橋文人

指導教授：田崎 弘之

誘導結合プラズマ質量分析法（ICP-MS）は、低費用、簡便な操作かつ短時間でリチウム（Li）からウラン（U）までの広い質量範囲の元素濃度の情報を得る事ができること、試料量が非常に少ない場合（<0.1 mL）でも、一定量の無機元素情報を得ることができ、大量のデータを必要とするケモメトリックス解析には、有益な手法の一つであると考えられる。今回、ICP-MS の測定方式の一つである半定量法を用いて、迅速無機分析法の開発に関する研究を行った。

本研究では、この手法を複数の生物材料に対して適用し、分類・判別の解析を行い、食餌や疾患に依存した分類が可能か検証を行った。これらの手法の新たな開発を通し、獣医学分野へ貢献することを最終的な目標とした。

第1章 生物材料に対する ICP-MS 半定量法での分析およびケモメトリックス解析での適用検討

本章は研究の予備実験と位置づけ、1) ICP-MS 半定量法により分析が可能であるか、2) 得られた分析値を用いて、ヒツジ血漿から異なる餌を与えたヒツジ群の分類、また、イヌ血清から脱毛疾患の分類が可能であるか検討を行った。ICP-MS 半定量法を用いヒツジ血漿中の 20 元素を測定し、得られた無機元素の多変量データについて主成分分析を行った結果、データの分布には食餌条件ごとの傾向が認められ、食餌条件を判別できる可能性が示唆された。次に、線形判別分析を行い、変数増加法により Br および Rb からなる判別関数を作成した。10-ホールドクロスバリデーションにより妥当性確認を行い、今回作成した判別関数は有効であることが確認できた。

他方、脱毛疾患犬と正常犬血清中の無機元素情報から、疾患群の判別が可能か検討した。その結果、主成分分析において疾患に依存した 2 つの区分に明確に分類することが出来なかった。また、線形判別分析を行い、Rb 及び Sr からなる判別関数を作成したが、一部判別率が 90%を下回った。得られた Na、K および Ca などの多量元素濃度は、通常の動物の正常値より低い結果であったことから、今回用いた ICP-MS 半定量法の真度確認や多量元素の低い結果の改善が必要であると考えられた。そこで、第2章にお

いて、生物材料中無機元素に対する ICP-MS 半定量法での真度の検証を行なうこととした。

第 2 章 生物材料に対する ICP-MS 半定量法での真度の評価

生物材料としてウシ血清を用いて、半定量法と実績が十分ある定量法との測定データの比較、半定量法での真度の評価を行った。ウシ血清に対し、ICP-MS 半定量法と定量法の 2 法で測定、両方法での濃度比 (%) を比較した結果、全 37 元素の濃度比は K および Ca 以外の元素では、85.0~118%であった。K および Ca は、半定量法での濃度が低く、定量法に対する濃度比は、それぞれ 66.1%と 44.1%であった。K および Ca に対する半定量法では、校正標準液に両元素を添加することで、真度の改善を達成することができた（定量法に対する濃度比、K:106%、Ca:95.1%）。ウシ血清に対する半定量法での真度を検証するため、添加回収試験を行った。その結果、K および Ca ではそれぞれ $103 \pm 5.8\%$ 、 $96.6 \pm 5.8\%$ 、それ以外の元素においても、88.6~118%であった。定量法との比較と添加回収試験の結果から、ウシ血清に対して ICP-MS 半定量から得られた測定データは一定の真度を有していることが示された。

第 3 章 ウシ血清を用いた肥育条件および肥育時期の分類

第 2 章で精度確認した ICP-MS 測定方法を用いて、肥育場所と食餌試料（以下、肥育条件）が異なる 2 群のウシ（16.3~21.3 ヶ月齢去勢ホルスタイン）から得られた血清中無機元素情報によって、肥育条件の判別が可能か検討を行った。ICP-MS 半定量法を用い牛血清中の 24 元素を測定し、得られた無機元素の多変量データについて主成分分析および PLS 判別分析を行った。その結果、データの分布には肥育条件ごとの傾向が認められた。次に、線形判別分析を行い、変数増加法により Br、Mo および I からなる判別関数を作成した。この判別関数は関数を作成するのに用いた 2 つのグループ由来のウシ血清に対して、100%近い確率で判別することができた。

2 つ目の取り組みとして、ウシの肥育時期の判別が可能か調べるため、肥育条件の判

別で用いた試料とその分析値を、肥育後期群と肥育中期群とに分類し直し、主成分分析および PLS 判別分析を行った。その結果、データの分布には一部重なりが見られたが、条件ごとの傾向が認められた。次に、線形判別分析を行い、P、Ca、Ti および Se からなる判別関数を作成した。この判別関数は 100%の精度で、関数を作成するのに用いた 2 つのグループ由来のウシ血清を判別することができた。

肥育条件の検討と同じ多変量データを用いたが、グループを分ける条件が異なると、グループ間の元素濃度の挙動（変動）も異なり、それぞれの目的に合わせた判別の活用が可能であることが示された。

第 4 章 線形判別関数を用いた肥育条件分類における変数（元素）の選択検討

試料が変わる度に最適な変数の選択と変数の組み合わせを開発検討すると負担が大きいため、汎用性のある固定した変数の組み合わせが可能か検討を行った。新たにウシ群（計 27 試料）の血清を測定し、前述のウシ 2 群の計 3 群の分類を行ったところ、Br、Mo、Rb、Sr、I および Ba の 6 元素を用いた判別関数をもっとも判別精度が高く、判別率は 99.3%であった。ウシ血清などの生物材料の分類では、Br と I などのハロゲン類を加えることが非常に重要な点である可能性が示唆された。

この 6 元素を用いた判別関数が動物種を超えた汎用的な手法として活用できるか検証するため、ウマ（90 試料）血清中無機元素を測定し、ウマ群と前述のウシ 3 群の計 4 群に対する判別関数を作成した結果、判別率は 98.3%と非常に高かった。以上のことから、Br、Mo、Rb、Sr、I および Ba の 6 元素を用いた判別関数は、ウシ 3 群とウマ群の高い精度での分類が可能であり、異なる動物種でも分類への活用が可能な汎用性のある手法であることが示された。

第 1 章からの問題提起をうけ、本研究の第 2 章では、まだ実用例が少ない ICP-MS 半定量法と実績が十分ある定量法において、ウシ血清に対する真度を比較し、半定量法から得られた測定データの有用性を明らかにすることができた。この手法を用いるこ

とで、簡便・迅速に分類・判別の研究を行なうことができ、より多くの分類手法の確立につなげることが出来ると考えられる。ただし、生物材料の種類により無機元素組成は異なっているため、最適な較正標準液の構成元素や濃度も試料種ごとに異なると推察され、その試料種での測定対象元素の真度を担保できる較正標準液を用意する必要があると考えられた。

動物の血漿や血清中の多量元素は、生体内での濃度が高く、生体内の代謝において濃度レベルが一定に保たれているため、判別の指標になりにくいことが示された。一方、微量元素は、生体内の代謝よりも他の要因（肥育条件や環境条件）により変動が起こることが予想され、群間を分類する重要な変数となることが推察された。動物に対する元素の検査項目が多量元素に限られる理由は、血液中の多量元素以外の濃度が低いこと、汎用的な測定方法での測定感度が低い点が挙げられる。ICP-MSを用いた測定は、今まで測定対象とならなかった微量元素の変動を知ることができ、頑健な判別手法の開発や微量元素の新たな機能発見につながる可能性を持っている。

第3章では、同じウシ血清中の無機元素データ群を用いて、肥育条件と肥育時期、2通りの群分けを行った。肥育条件の分類では、微量元素すべてに有意差がみられたが、肥育時期の分類では、肥育条件での判別関数の変数として選択されたMoとIにも有意差が見られなかった。このことから、肥育条件の相違での元素と肥育時期の相違での元素の挙動は、まったく異なることが示唆され、それぞれの目的に合わせた判別の活用が可能であることが示された。

第4章では、土壌中に一定量含有している元素とハロゲン（BrおよびI）からなる変数を用いた判別関数での判別は、異なる動物種の肥育条件の分類にも活用できることが示された。汎用性のある変数の活用は、試料ごとまたは動物種ごとの開発検討の負担を少なくし、迅速な検査手法の導入が可能になると考えられた。

今後は、迅速無機分析法による生物材料の解析例を増やし、応用・発展させていくことにより、愛玩動物や家畜に対して、特別な餌を与えたブランド家畜の判別法や新しい病気診断法などの確立につなげ、獣医学分野へ貢献していきたい。