

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)

高橋文人

日本獣医生命科学大学生体分子化学教室研究生
(指導教授：田崎弘之)

目 次

序論	1
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	
1-1 緒言	5
1-2 材料および方法	6
1-2-1 試料	6
1-2-2 試薬	6
1-2-3 分析方法	7
1-2-4 統計解析	8
1-3 成績と小括	
1-3-1 ヒツジ血漿およびイヌ血清に対する ICP-MS 半定量分析での適用検討	9
1-3-1-1 小括	11
1-3-2 ICP-MS 半定量法データを用いたケモメトリックス解析での適用検討	
1-3-2-1 ヒツジ血漿中無機元素情報を用いた食餌条件の分類	12
1-3-2-2 イヌ血清中無機元素情報を用いた脱毛疾患の分類	15
1-3-2-3 小括	18
第 2 章 生物材料に対する ICP-MS 半定量法での真度の評価	
2-1 緒言	20
2-2 材料および方法	
2-2-1 試料	21
2-2-2 試薬	22
2-2-3 分析方法	22

2-2-4	統計解析	23
2-3	成績と小括	
2-3-1	ICP-MS 半定量法と ICP-MS 定量法での測定結果の比較	24
2-3-2	ICP-MS 半定量法での K および Ca 測定条件検討	28
2-3-3	ICP-MS 半定量法での添加回収試験	30
2-3-4	小括	31
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		
3-1	諸言	33
3-2	材料および方法	
3-2-1	試料	34
3-2-2	試薬	34
3-2-3	分析方法	34
3-2-4	統計解析	35
3-3	成績と小括	
3-3-1	肥育場所と食餌試料（肥育条件）の判別	36
3-3-2	肥育時期の判別	41
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		
4-1	諸言	48
4-2	材料および方法	
4-2-1	試料	48
4-2-2	試薬	49
4-2-3	分析方法	49
4-2-4	統計解析	49
4-3	成績と小括	

4-3-1	第3章での肥育条件の分類で用いた変数の有効性の検証	50
4-3-2	肥育条件分類における汎用性のある変数の組み合わせ検討	54
4-3-3	Br、Mo、Rb、Sr、I および Ba の 6 元素を用いた判別関数での 他の動物種への適用検討	59
	総括	63
	参考文献	68
	謝辞	81
	英文要旨	82

序 論

ケモメトリックスは、1970年代に誕生した化学 (chemistry) と計量学 (metrics) からなる合成語であり、数学的、統計的手法を活用し、最適な分析手順や実験の企画・選択を行うとともに、化学データから得られる化学情報量の最大化を行う学問分野である (Massart ら、1998)。ケモメトリックスは、探索データ解析、実験計画およびモデル化に用いられ、分析装置から得られる多変量データ中の隠された情報を見つけだすために使われる。また、装置の制御や多変量較正に用いられた例もある (Voncina 2009)。ケモメトリックスで新しい手法開発が盛んに行なわれているのが、パターン認識であり、スペクトルやクロマトグラムパターンから試料を客観的に分類、識別および帰属するために適用される。食品の産地や等級を、産地や等級という直接的な情報を与えず成分パターンの異同から客観的にそれらを判別したり、血液成分や尿成分パターンから病名を推定する目的で適用される (相島 1991)。探索データ解析で多く使われる手法は、主成分分析 (PCA) およびクラスター解析である。一方、パターン認識で多く使われる手法は、線形判別関数 (LDA)、K近傍法 (KNN) および人工神経回路網 (ANN) などである (Voncina 2009)。

近年では、コンピュータと情報化技術を用いて、化学領域の問題に適用を目指すケモインフォマテックス (Begam ら、2012; Xu ら、2002; Bajorath 2009) や医薬品分子設計分野 (Begam ら、2012; Xu ら、2002; Bajorath 2009) との融合も行なわれ、本手法の利用が拡大化している。同様に、生物学の分野においても、生物情報科学と呼ばれるバイオインフォマテックスが導入され、生物学的なデータを情報科学の手法によって解析し、生物学上の種々な問題を解くことを目的としている。

バイオインフォマテックスの対象情報は、遺伝子領域 (ゲノム) から始まって転写領域 (トランスクリプトーム)、タンパク領域 (プロテオーム)、代謝産物領域 (メタボローム) および病態など表現型領域 (フェノーム) までである。1980年代の爆発的なゲノム研究技術の発展に引き続き、ポストゲノムの研究対象として、トラ

ンスクリプトームおよびプロテオーム研究が盛んになった。これらの研究は、現在に至るまでの技術の進歩により、より高度かつ高速の研究が進展しつつある。さらには、数十万といわれる地球上の代謝産物に目を向けたメタボローム研究も現在隆盛期に入りつつある。その主要分析技術は、代謝産物中の質量分析や核磁気共鳴スペクトル分析である。これらは、従来の各代謝産物の厳密な分離と精密な定量を行なうのではなく、血液、尿、組織および細胞試料を混合物のまま一斉分析する方法をとる。得られた混合物のスペクトルデータを多変量解析することで、変動要因や差異となる代謝産物を抽出・同定していく。実験動物以外の動物を対象としたメタボローム研究が始まったのは、比較的最近である。これまでに、犬の肝臓病と門脈シャントを区別する代謝産物マーカーの探索研究（Whitfield ら、2005）や、飼料を制限して飼育したウシやニワトリの食餌後の代謝産物マーカーの探索研究（Katayama ら、2012）などを初め、ここ数年で急増してきている。他方、元素を分析する汎用機器として原子吸光光度計（AAS）や誘導結合プラズマ発光分析装置（ICP-AES）などがあげられるが、バイオインフォマテックスの分野では、誘導結合プラズマ質量分析計（ICP-MS）を使用した報告が多い。その理由として、ICP-MS は、1) 多元素同時分析が可能であり、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、2) 1) の特徴から、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可能であること、3) 低費用、簡便な操作が可能なこと、などがあげられる。従って、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。Baxter ら（1997）はワイン中の無機元素を ICP-MS を用いて測定し、得られた元素濃度組成を用いることで地理的起源を分類できることを示した。同様の研究は、Coetzee ら（2005）でも報告されている。これらの研究で用いられる膨大な多変量データ群は、ICP-MS による定量分析から得られたものである。

他方、ICP-MS における測定方法には、定量法と半定量法があるが、これまで分析の大部分は定量法で実施されてきた。定量法は、伝統的な測定方法であり、測定元

素すべての標準液を用いて、複数のプロットによる検量線を作成後、試料溶液中の元素濃度を求める手法である。一方、半定量法は、複数の元素を含む較正標準液と試料溶液を測定し、得られた較正標準液中元素のイオン強度から各元素の補正係数を算出し、これを用いて全質量範囲の元素濃度を算出する手法である。従って、半定量法は定量法に比べて、すべての測定元素の標準液を用意する必要がなく、較正標準液の濃度は1点で、試料溶液の希釈も必要としない。

ICP-MSによる半定量法導入初期の目的は、ICP-MS装置で定量分析をする場合、検量線の範囲や試料溶液の希釈率を決めるための事前測定としての活用であった。飲料水 (Amarasiriwardena ら、1997、1990; Soldevila ら、1998)、ムラサキガイ、牛肝臓、無脂肪ミルク粉末、小麦、トマト葉および松葉 (Amarasiriwardena ら、1997) などの標準試料を用いて、半定量法での較正標準液の包含元素や元素濃度の条件検討、並びにその評価の研究が多数行われた。同様に日常的な食事由来の元素の摂取量の推定に用いられるトータルダイエットの標準物質においても報告がなされている (Amarasiriwardena ら、1997)。これらの研究では、半定量法での真度は概ね70%以上であると報告されている。他方、ICP-MSによる半定量測定データと定量測定データから算出した各元素濃度の比較検討の研究も行われており、ワイン (Coetzee ら、2005) や米 (Laursen ら、2009a) に対する両測定法の分析結果は、ほぼ同等であることが報告されている。以上のように半定量法の有用性が示唆されたことから、現在では、植物 (Leng ら、2011; Zuluaga ら、2011)、農作物や農産加工品 (Castillo ら、1999; Almedia ら、2002; Catarino ら、2006; Jakubowski ら、1991; Gomez ら、2004)、河川水や堆積物 (Bayon ら、1998; Balaram ら 2003; Chen ら、2008; Entwistle ら、1997; Hu ら、1997)、医薬品 (Moreton ら、1999; Wang ら、2000) およびラット肝臓 (Kim ら、2011) などの多種多様な試料中元素分析の例が報告されるようになってきた。

また、報告例は少ないが、ICP-MSによる半定量測定は、多量の情報を必要とするケモメトリックス解析と組み合わせたとき、その優位性をより発揮できる可能性が

ある。実践的な取り組みとして、Laursen ら (2009ab) は、3つの遺伝子型の異なる米に対し、ICP-MS 半定量分析データを用いた主成分分析を行った結果、ICP-MS 定量分析データでの主成分分析よりも試料群を判別する力量は高いと報告している。同様の取り組みは、小麦、大麦、ソラマメおよびポテトにおける無機元素組成を用いて、従来の栽培方法と有機農法を識別する手法が報告されている (Laursen ら、2011)。Coetzee ら (2005) は、地域が異なる 3つのワイン中の無機元素を ICP-MS による半定量法にて測定し、得られた多変量データから判別関数を作成し、この関数の活用により、100%の確率で地域を判別できることを示した。これは、ICP-MS 半定量データのケモメトリックス解析への適用の高さを示すものである。しかし、血清、血液および臓器などの生物材料の分析に関して、ICP-MS 半定量分析の精度を検討した報告は未だ少ないのが現状である。

そこで本研究では、ICP-MS 半定量分析での精度確認、次いで、様々な種類の餌を与えた動物や疾患のある動物の血液を用いて、元素濃度によりそれらの条件を分類することが可能であるか検討を行った。

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

1-1 緒言

多元素同時分析が可能である ICP-AES や ICP-MS を用いることで、少量の試料で多元素の情報を得ることが可能となり、多種多様な試料中元素に関する報告がなされている。両装置共に、AAS と比較した場合、多元素同時分析が可能であること、検量線の直線域が広いこと、フレームが高温であることを理由として化学干渉が少ないことなどの利点があるが、ICP-MS は、感度の点で ICP-AES よりも優れていることが指摘されている。他方、ICP-MS では、目的とした元素と同じ質量数のイオンや分子イオンのスペクトルが重なることで、干渉が起こるスペクトル干渉の問題が指摘されている。ICP-MS による分析では、試料中の共存元素によるマトリックス干渉の問題も指摘されており、特に塩類による干渉の問題は、塩類の含有量が比較的高い生物材料の分析では問題となることが考えられた。他方、このような生物材料を ICP-MS で分析した事例では、分析対象元素の全てに対して検量線を作成する従来の定量法によるものが多く、本研究の一つの課題としている半定量による分析事例は、ウシ肝臓 (Amarasiriwardena ら、1997)、ラット肝臓 (Kim ら、2011) およびヒト血清 (Zhao ら、2009) などで行われたものが存在するが、その数は未だ少ないのが現状である。特にヒト以外での、血漿や血清を対象とした研究を見出すことはできなかった。従って本章の目的として、全ての元素を 1 つの較正標準液で補正し、それにより精度のある分析が可能であるかを、ヒツジの血漿とイヌの血清を用いて検討をした。

他方、本研究では、ICP-MS で得られた元素に関する成績を用いて、対象とした動物の生息域、疾患の有無、餌の違いなどによる各種分類を目的としている。しかし、ICP-MS により得られた元素の情報を用いたケモメトリックス解析例が少なく、選択した試料に依っては、分類がうまくいかないことも考えられる。

以上、本章を今後の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。

1-2 材料および方法

1-2-1 試料

生後1年未満のロムニー種ヒツジから集めた全30血漿試料を用いた。血漿試料は、3つの異なった肥育条件で適宜食餌を与えたヒツジから集めた(Goldingら、2011)。その内訳は、チコリ、アカツメクサ、シロツメクサおよびオオバコを含むハーブークローバー混合(N=10)、オオバコ、ライグラスおよびシロツメクサを含むプラントーグラス混合(N=10)、ライグラスおよびホワイトクローバーを含むグラス混合(N=10)である。この実験は2007年2月15日にはじまり、3月29日で終了した。ヒツジに対する実験は、ニュージーランドマッセイ大学の倫理規定に沿って行われた。血漿試料はエッペンドルフチューブに入れられて、マッセイ大学が発行した動物の健康に関する証明書を付け、冷凍下で日本獣医生命科学大学に移送された。試料の移送はニュージーランドと日本の保健局により許可された。

脱毛疾患犬45頭、正常犬100頭から得た計145頭分の血清を用いた。脱毛疾患犬は、雄13頭、雌32頭、年齢6ヶ月～2歳、体重7.70～13.30kgであり、個々の個体により異なるが、体の一部に脱毛箇所が見られた。一方、正常犬は、雄50頭、雌50頭、全100頭において犬種はビーグル、年齢は8ヶ月であった。

1-2-2 試薬

硝酸1.42(超高純度試薬:関東化学製)を希釈して、5%硝酸および1%硝酸を作成し、試料および標準液の溶解に用いた。リチウム(Li)、マグネシウム(Mg)、イットリウム(Y)、セリウム(Ce)、コバルト(Co)およびタリウム(Tl)標準液(関

東化学製)を希釈し、1 µg/L 混合較正標準液を作成、ICP-MS 半定量分析に用いた。

1-2-3 分析方法

使用する容器からの元素の汚染を防ぐため、分析前に1%硝酸で洗浄したエッペンドルフチューブにヒツジ血漿 0.1 mL, またはイヌ血清 0.05 mL を入れ、1%硝酸で10 mL にした(硝酸は比重 1.42 硝酸: 関東化学製を希釈して用いた)。Milli-Q Element A-10 (日本ミリポア製) で作成した超純水は、酸の希釈や分析に用いた。

ICP-MS (7500ce; アジレントテクノロジー製) に より、37 元素同時測定した。選択した 37 元素は、Li、ホウ素 (B)、ナトリウム (Na)、Mg、アルミニウム (Al)、ケイ素 (Si)、リン (P)、塩素 (Cl)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、チタン (Ti)、バナジウム (V)、クロム (Cr)、マンガン (Mn)、鉄 (Fe)、Co、ニッケル (Ni)、銅 (Cu)、亜鉛 (Zn)、ガリウム (Ga)、ゲルマニウム (Ge)、ヒ素 (As)、セレン (Se)、臭素 (Br)、ルビジウム (Rb)、ストロンチウム (Sr)、ジルコニウム (Zr)、モリブデン (Mo)、銀 (Ag)、カドミウム (Cd)、スズ (Sn)、アンチモン (Sb)、ヨウ素 (I)、セシウム (Cs)、バリウム (Ba)、タングステン (W) および鉛 (Pb)。37 元素のうち、含有量が 0.01 µg/mL 以上の元素を対象とした。分析条件の一覧と選択した元素は表 1 に示した。

元素の測定は半定量分析を用いて行った。1 µg/L の Li、Mg、Y、Ce、Co および Tl 含有較正標準液は半定量分析に対しての補正力価として用いた。ICP-MS 測定データの抽出には、ChemStation software (アジレントテクノロジー製)を用いた。

表 1 ICP-MS の測定条件と選択した元素の質量数

操作条件		選択した元素 (m/z)					
プラズマ条件		Li	7	Mn	55	Zr	90
RF パワー	1600 W	B	11	Fe	57	Mo	95
プラズマガス流量	15.0 L/分	Na	23	Co	59	Ag	107
キャリアガス流量	0.7 L/分	Mg	24	Ni	60	Cd	111
サンプリング位置	8.0 mm	Al	27	Cu	63	Sn	118
ポンプ回転速度	0.1 rps	Si	29	Zn	66	Sb	121
データ採取条件		P	31	Ga	71	I	127
取得方式	スペクトルピークホッピング	Cl	35	Ge	72	Cs	133
積分時間	0.1 秒/点	K	39	As	75	Ba	137
繰返し回数	1	Ca	43	Se	82	W	182
		Ti	47	Br	79	Pb	206
		V	51	Rb	85		
		Cr	53	Sr	88		

1-2-4 統計解析

ヒツジ血漿およびイヌ血清から得られた元素情報は、エクセル 2003（マイクロソフト製）を用いて解析した。各群での元素濃度は平均値および標準誤差として表した。有意差の算出は t 検定を用いた。

ヒツジ血漿およびイヌ血清中の元素情報を活用することで、食餌条件や疾患の有無の分類ができるか調べるために、主成分分析 (Principal Component Analysis: PCA) および偏最小 2 乗判別分析 (Partial Least Square-Discriminant Analysis: PLS-DA) を行った (SIMCA user's Guide 2008)。ICP-MS で算出された試料中の各々の元素濃度は、多変量解析に用いた。主成分分析および偏最小 2 乗判別分析は SIMCA-P+ (Umetrics AB, Umeå, Sweden) を用いて実施した。主成分分析および偏最小 2 乗判別分析のスコアプロットとローディングプロットは標準化した情報を用いた。主成分分析は、説明変数（元素濃度）の情報のみから探索的に傾向を導き出し、視覚的

に結果を得る手法であるが、偏最小 2 乗判別分析は、目的変数（試料群）を適切に説明できるように説明変数を選択して重み付けをする手法である（相島、1992）。算出された寄与率は、各主成分での情報の吸収量（反映量）を表し、寄与率の合計は累積寄与率、最大 1 となる。また、固有値は各主成分での寄与率に 100 を乗じ、試料数で除することで算出、1 以上が有効な情報量の目安となる（涌井ら、2008）。

マハラノビスの汎距離（観測値と各群の重心との距離）を用いた線形判別関数は、MULSEL 解析ソフトを用いて実施した。判別関数を構成する変数（元素）は、変数増加法を用い選択した。係数の有意差検定（ $P < 0.01$ ）と判別の有意性検定（ $P < 0.01$ ）のあと、変数選択の基準値をヒツジ血漿は 7.8、イヌ血清では 12 と設定した（柳井 2008；杉山 1983；田中ら、1984）。

ヒツジ血漿 30 試料を食餌の種類に基づき 3 つの群にわけ、10-ホールドクロスバリデーション法により、判別関数の妥当性確認を行った（永田ら、2007）。各々の群から 1 つの試料を除き、残りの 27 試料を用いて判別関数を作成した。除いた試料の情報は 27 試料から作成した判別関数に挿入し、判別関数の妥当性を調査した。この操作を除いた試料をかえ、計 10 回行った。

1-3 成績と小括

1-3-1 ヒツジ血漿およびイヌ血清に対する ICP-MS 半定量分析での適用検討

異なる食餌試料を与えた 3 つのヒツジ群から得られた血漿中の 20 元素を、ICP-MS での半定量法により測定した（表 2）。マメ科の種では、Mg、Fe、Cu、Zn 同様、Ca や K を含有していることは良く知られている（Underwood 1981）。このように、異なる食餌試料でのヒツジ血漿中元素濃度は、食餌の種類に依存して影響を受けると考えられた。しかしながら、表 2 に示した通り、それらの元素での有意差は観察されなかった。また、Cl、Na、P および K などの多量元素の群間の有意差もなかった。これらの元素は動物の生命を維持するのに必要であるため、これらの元素濃度は一

定に保たれていると考えられた。一方、Br、Se、Rb および Sr などの微量元素の群間においては、有意差が得られた。Se を除いたこれらの元素の機能は、動物組織では明らかになっていないため、この研究の目的を元素濃度による動物の分類とした。従って、これらの微量元素は群間を分類する重要な変数となると考えられた。

表 2 3 つの異なる餌の種類を与えたヒツジ血漿中の 20 元素の分析結果

	ハーブ-クローバー群 (n = 10)		プラント-グラス群 (n = 10)		グラス群 (n = 10)	
	平均値 (μ g/mL)	標準誤差 (μ g/mL)	平均値 (μ g/mL)	標準誤差 (μ g/mL)	平均値 (μ g/mL)	標準誤差 (μ g/mL)
Li	7.29	0.30	2.08	1.05	7.11	0.35
B	0.142	0.005	0.0939	0.0068	0.0236	0.0011
Na	240	1	234	1	234	1
Mg	1.32	0.02	1.34	0.03	1.30	0.02
Si	5.56	0.08	5.56	0.11	5.58	0.08
P	6.54	0.15	6.22	0.19	5.64	0.18
Cl	376	3	372	2	359	1
K	12.7	0.3	12.2	0.3	12.6	0.2
Ca	5.75	0.05	5.47	0.05	5.46	0.04
Ti	0.0388	0.0012	0.0409	0.0042	0.0328	0.0010
Cr	0.0140	0.0004	0.0167	0.0003	0.0175	0.0003
Fe	1.30	0.08	1.50	0.14	1.53	0.21
Cu	0.959	0.067	0.972	0.057	1.01	0.07
Zn	0.638	0.012	0.601	0.032	0.522	0.017
Se ^a	0.0597	0.0024	0.107	0.003	0.128	0.003
Br ^a	17.4	0.2	36.3	0.8	26.7	0.7
Rb ^a	0.380	0.011	0.420	0.014	0.167	0.008
Sr ^a	0.249 ^b	0.006	0.250 ^b	0.009	0.179	0.004
I	0.0245	0.0046	0.0048	0.0009	0.0068	0.0012
Ba	0.142	0.004	0.209	0.008	0.151	0.004

^a 3 群間の有意差: $P < 0.05$ 、^b ハーブ-クローバー群とプラント-グラス群間の有意差: $P > 0.05$

一方、脱毛疾患群と正常群から得られたイヌ血清中の 14 元素について、ICP-MS 半定量法により測定を行い、その結果を表 3 に示した。2 群の分析結果において、有意差 ($P < 0.05$) が見られた 10 元素は、Na、P、Cl、K、Fe、Cu、Zn、Se、Rb および Sr であった。ただし、2 群において、極端に元素濃度に差がある元素は見られなかった。

表 3 脱毛疾患群と正常群でのイヌ血清中の 14 元素の分析結果

元素	脱毛疾患群 (N = 45)		正常群 (N = 100)	
	平均値 ($\mu\text{g/mL}$)	標準誤差 ($\mu\text{g/mL}$)	平均値 ($\mu\text{g/mL}$)	標準誤差 ($\mu\text{g/mL}$)
Na ^a	339	5.8	367	5.9
Mg	1.79	0.037	1.82	0.031
Si	4.62	0.16	4.94	0.243
Pa	12.5	0.33	11.7	0.19
Cl ^a	443	6.9	473	6.5
K ^a	12.8	0.25	15.0	0.18
Ca	7.47	0.136	7.44	0.077
Fe ^a	1.49	0.063	1.74	0.056
Cu ^a	0.837	0.021	0.782	0.010
Zn ^a	1.04	0.043	0.907	0.017
Se ^a	0.408	0.011	0.316	0.006
Rb ^a	0.314	0.007	0.254	0.003
Sr ^a	0.303	0.007	0.360	0.006
Ba	0.024	0.0004	0.025	0.0004

^a 2 つの群間の有意差: $P < 0.05$

1-3-1-1 小活

ヒツジ血漿およびイヌ血清において、ICP-MS 半定量法から得られた 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。今回の研究において、多量元素の真度を確認するための適当な標準試料を見つけることができなかった。ただし、微量元素である Se と Zn の 2 元素の認証値 (Se ; $0.133 \pm 0.012 \mu\text{g/mL}$ 、Zn ; $2.36 \pm 0.14 \mu\text{g/mL}$) がある標準試料 BCR-639 (ヒト血清 ; European Commission、Joint Research Centre) の測定を行ったところ、Se は $0.125 \pm 0.005 \mu\text{g/mL}$ 、Zn は $2.28 \pm 0.04 \mu\text{g/mL}$ と、標準試料の認証値と我々の分析結果に有意差は見られなかった。また、Fe および Cu など他の微量元素は、通常の動物の正常値であったことから、多量元素の分析結果が主に低値になっていると考えられた (Takahashi ら、2013)。

今回の測定は、ICP-MS による半定量法を用いている。すべての元素の標準溶液を用意し、検量線法を用いる定量法に対し、半定量法は簡便、迅速に多くの元素情報を得るという測定手法の特徴から、数種類の元素からなる較正標準液のみを測定する。今回用いた ICP-MS 半定量法において、多量元素の分析結果が低い理由は、使用する較正標準液濃度に対し、多量元素の含有量が高く、較正標準液の適用濃度範囲を超えているためとの報告がある (Laursen ら、2009a)。また、生物材料中には様々な濃度レベルの元素が存在するため、ICP-AES や ICP-MS を用いた生物材料の分析に対して、元素組成を原因とした干渉の問題が指摘された報告 (Mochizuki ら、2002) もある。このことから、この手法を用いて研究を進めていくには、半定量法の真度の確認や多量元素の低い分析結果の改善が必要であると考えられた。

1-3-2 ICP-MS 半定量法データを用いたケモメトリックス解析での適用検討

1-3-2-1 ヒツジ血漿中無機元素情報を用いた食餌条件の分類

ICP-MS 半定量分析を用いた血漿からの情報は、主成分分析により再度算出した。

主成分分析は、説明変数（元素濃度）の情報のみから探索的に傾向を導き出し、視覚的に結果を得る方法の1つであり、分散が最大になるような合成変量を求める手法である（宮下ら、1995；涌井ら、2008）。その結果、第1主成分(PC1)-第2主成分(PC2)の固有値は1より大きく、各主成分での情報の吸収量の指標となる第1主成分の寄与率は30.6%、第2主成分17.6%であり、累積寄与率は48.2%であった。図1に示したように、血漿から得られた情報の分布は、食餌の種類に依存した3つの区分に分類された。この結果は、血漿中の元素濃度により動物の食餌の種類識別が可能であることを示している。主成分分析から得られたローディングプロットを図2に示した。その結果として、ハーブ-クローバー群ではCa濃度が高く、プラント-グラス群ではBrとBa濃度が高かった。グラス群では特に濃度が高い元素は見られず、逆に他の群より低い濃度の元素はRbとSrであった。

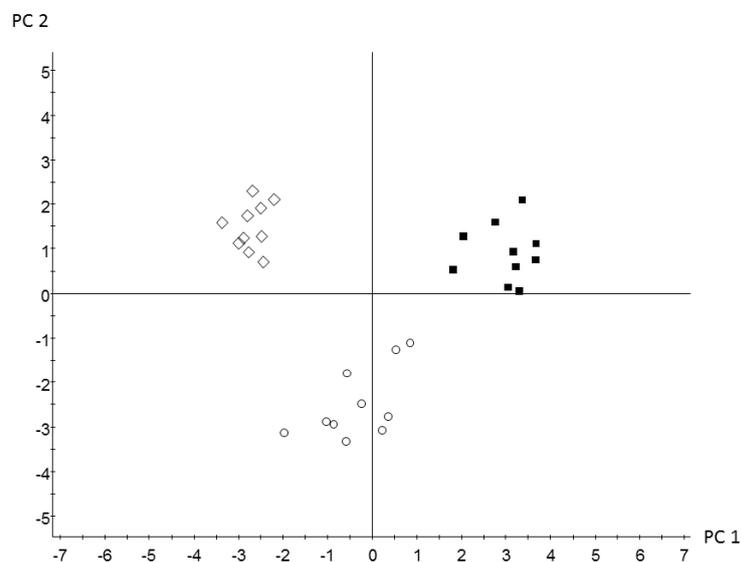


図1 3つの異なる餌の種類を与えたヒツジ血漿から得られた30試料のスコアプロット。データは第1-第2主成分に基づいた。（■：ハーブ-クローバー群、○：プラント-グラス群、◇：グラス群）

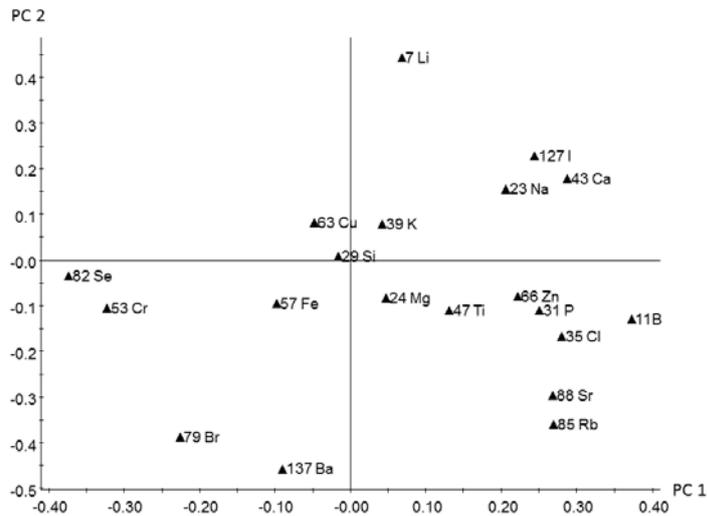


図 2 3つの異なる餌の種類を与えたヒツジ血漿から得られた 30 試料のローディングプロット。データは第 1-第 2 主成分に基づいた。

異なった食餌条件でのヒツジ 3 群の測定結果を用いて、線形判別関数を行なった。その結果、Br と Rb からなる判別関数を作成した。

$$\text{ハーブ-クローバー群} = 3.377 [\text{Br}] + 262.531 [\text{Rb}] - 79.261 \quad (\text{A})$$

$$\text{プラント-グラス群} = 7.392 [\text{Br}] + 274.243 [\text{Rb}] - 191.773 \quad (\text{B})$$

$$\text{グラス群} = 5.570 [\text{Br}] + 97.600 [\text{Rb}] - 82.511 \quad (\text{C})$$

[Br]および[Rb]は各々の元素濃度($\mu\text{g/mL}$)を表している。判別得点は、判別関数に元素濃度を代入して得られた数値として算出された。食餌の種類に影響をうけた各々の試料での最も高い判別得点を調べるため、30 試料の変数 (Br および Rb) の結果を A、B、C へ同様に代入した。その結果、この研究において、判別関数により群の分類を達成することができた (表 4)。

作成した判別関数は妥当性確認により、その有効性を確認する必要がある。妥当性確認では、一定の基準を設けて、判別関数作成のためのモデリング試料と判別関数を検定するための予測試料に分け、作成した関数を用いて予測用試料を予測することで、判別精度の検証を行う（宮下ら、1995）。今回の研究では、試料を10群に分け検証する10-ホールドクロスバリデーション法により評価した。その結果、作成された判別関数は各々由来の試料を100%分類することができた（表4）。

表4 異なる餌の種類を与えたヒツジ血漿から得られた3群判別モデルによる分類とクロスバリデーションでの判別率

群名	試料数	分類 (%)	クロスバリデーション ^{a)} (%)
ハーブ-クローバー群	10	100	100
プラント-グラス群	10	100	100
グラス群	10	100	100

a) 10-ホールドクロスバリデーション

1-3-2-2 イヌ血清中無機元素情報を用いた脱毛疾患の分類

脱毛疾患群と正常群の血清濃度について、主成分分析を行い、そのスコアプロットを図3に示した。その結果、脱毛疾患群と正常群から得られた情報の分布は、症状の相違に依存した2つの区分に明確に分類することが出来なかった。続いて、主成分分析と同じ測定データを用いて、偏最小2乗判別分析を行ったところ（図4）、図4のスコアプロットでは一部重なりはあるが、概ね2つの区分に分ける事が出来た。また、偏最小2乗判別分析でのローディングプロットを図5に示した。脱毛疾患群に多い元素は、SeおよびRb、正常群に多い元素はSrであった。

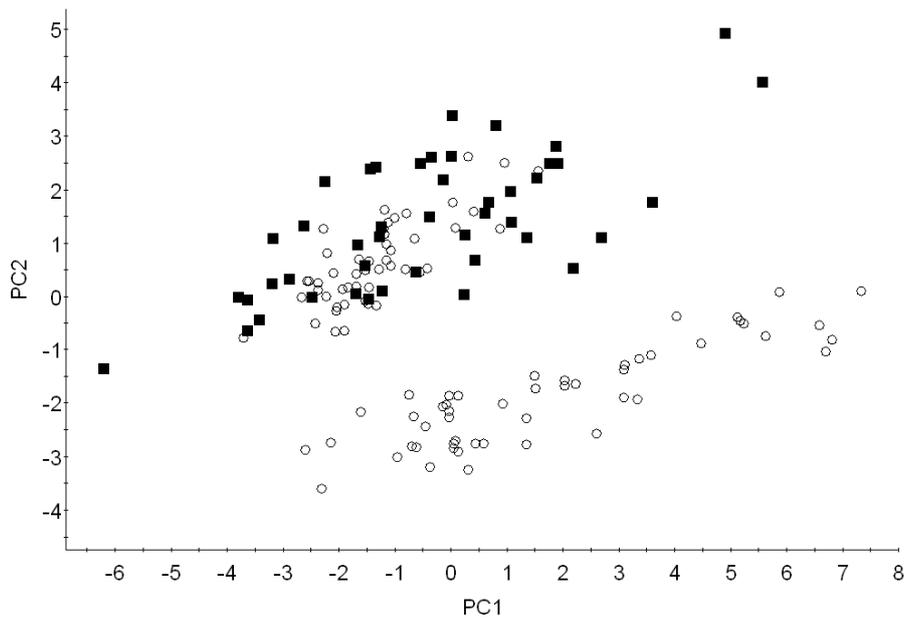


図 3 脱毛疾患群と正常群のイヌ血清中無機元素情報での主成分分析のスコアプロット。データは第 1-第 2 主成分に基づいた。(■：脱毛疾患群，○：正常群)

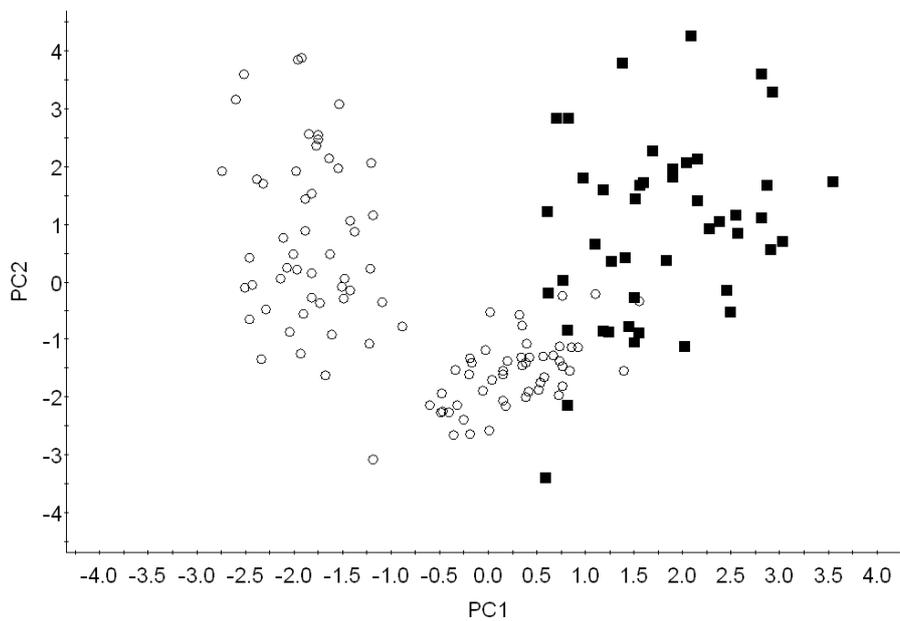


図 4 脱毛疾患群と正常群のイヌ血清中無機元素での偏最小 2 乗判別分析のスコアプロット。データは第 1-第 2 主成分に基づいた。(■：脱毛疾患群，○：正常群)

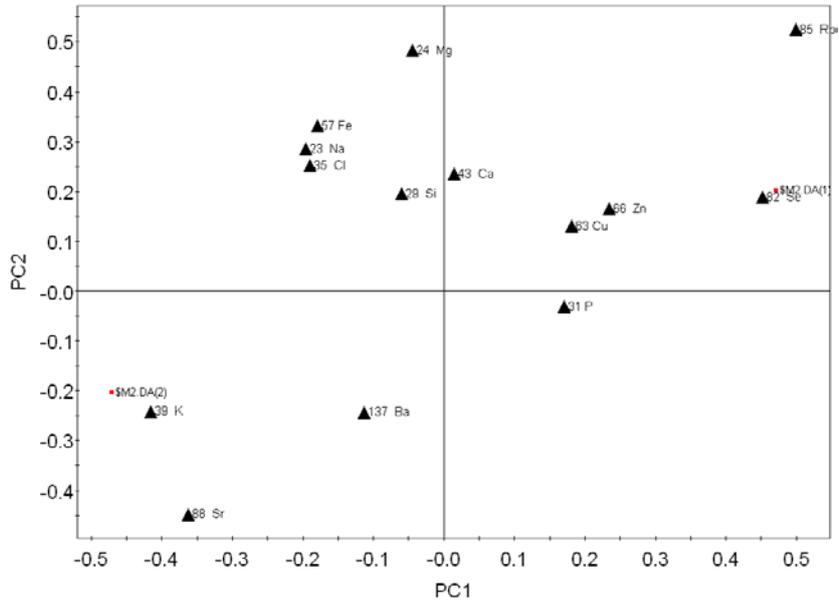


図 5 脱毛疾患群と正常群のイヌ血清中無機元素情報での偏最小 2 乗判別分析のローディングプロット。データは第 1-第 2 主成分に基づいた。

脱毛疾患群と正常群のイヌ血清の測定結果を用いて、線形判別分析を行い、Rb および Sr からなる判別関数を得た。

$$\text{脱毛疾患群} = 201.260 [\text{Rb}] + 19.195 [\text{Sr}] - 34.529$$

$$\text{正常群} = 115.972 [\text{Rb}] + 71.106 [\text{Sr}] - 27.529$$

: [Rb]および[Sr]は各々の元素濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を代入する。

判別関数の作成に用いた全 145 試料の変数 (Rb および Sr) の結果をそれぞれの式に代入したところ、脱毛疾患群由来のイヌ血清試料を疾患群とした判別率は 88.9% (40/45 試料)、正常群由来の試料を正常群とした判別率は 94.0% (94/100 試料) であり、脱毛疾患群の判別率が 90%を下回った。

1-3-2-3 小括

ともに多量元素の低い分析結果を持つデータ群からの主成分分析において、ヒツジ血漿中無機元素から得られたスコアプロット上では、3群の区分が可能であったが、イヌ血清では、2群の区分ができなかった。また、それぞれのデータ群から作成した判別関数においても、主成分分析の傾向と同様、ヒツジ血漿の判別率は3群とも100%であったが、イヌ血清では90%を下回った。

ヒツジ血漿とイヌ血清の分析における相違点として、分析に用いた試料量が、イヌ血清はヒツジ血漿の半分の量であった。そのため、イヌ血清のケモメトリックス解析対象元素が14元素とヒツジ血漿の20元素に比べて少なかった。生物材料の例ではないが、無機元素組成によるケモメトリックス解析を用いた遺伝子型の異なる米の判別 (Laursen ら、2009a)、乾シイタケおよび黒大豆の原産地の判別 (Kadokura ら、2006 ; Homura ら、2006) では、ケモメトリックス解析に用いる元素数を増やすと、判別率が向上すると報告されている。前述の Laursen らの報告では、ICP-MS 半定量法から得られた30元素を解析に用いることで、主成分分析において米の種類に依存した3つの区分に分類が可能であった。この30元素は、真度が優れた(真度70%以上)14元素、真度が低い(真度70%以下)16元素と分けることができるが、それぞれ真度で分けた14元素または16元素群でのデータ情報を用いた主成分分析では、どちらもスコアプロット上において明確な区分ができなかった。このことから、イヌ血清を用いた脱毛疾患の分類において判別率が低かった理由として、解析に用いた元素数が少なかったことが要因の一つである可能性が考えられた。このことは、無機元素の測定に対し、ICP-MS より測定感度が低い吸光光度法、AAS 法や ICP-AES 法などを選択していれば、測定可能な元素数が減り、判別率がさらに下がった可能性も考えられた。

健康な生体は一定の無機元素のバランスを保ち、正常な生理機能を維持しているが、いったんそのバランスがくずれ恒常性が失われると、それぞれの無機元素の過剰蓄積や欠乏に由来する特有の疾病が引き起こされることが知られている (荒川ら、

2009)。イヌ血清での判別率が低かった 2 つ目の理由として、前述の疾病による無機元素の血液中濃度への影響と経口による飼料中の無機元素の血液への反映における代謝過程の相違が考えられた。また、疾病の進行状況も重要な要素である可能性が推察された。

ヒツジ血漿中多量元素の低い分析結果でも食餌条件が分類できたことから、各元素の真度が分類手法の成否に 100%関与している訳ではないと推察されるが、真度不足の元素の改善により、目的とする分類の判別精度が向上する可能性があること、また、種々の生物材料に対して汎用性のある手法とするには、真度の把握と改善は重要であると考えられた。以上より、次章において、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 ICP-MS 半定量法での真度の評価とケモメトリックス解析での

適用評価

2-1 緒言

Kirchhoff らの研究により、原子には固有のスペクトル線が観測されることが分かり、その後の多くの実験により、それぞれの原子にはそのエネルギー準位に基づいた多数のスペクトル線があることが実証された。原子のスペクトル分析法は、主に原子吸光分析法と原子発光分析法とに分けられる（日本薬学会 2010）。原子吸光分析法は、1955 年にオーストラリアの Walsh らによって、新しい分光化学分析法として提唱された。特にフレイム温度（3000 K 以下）では基底状態の原子が多いことが分かってからは、フレイム法を中心に発展、装置の開発も進み、1960 年ごろから急速に普及した。一方、原子発光分析法、特にアルゴンプラズマを用いた ICP-AES は、1960 年代から研究が始められ、1970 年後半には、ほぼ現在の装置の形が完成、1980 年代に入り、市販機が数多く市場に出回り、一気に普及した。ICP-AES は、5000～6000 K に及ぶ高温のアルゴンプラズマで生成した励起原子および励起イオンからの共鳴発光線を測定する手法である。この方法の特徴として、多元素同時分析が可能であること、検量線の直線範囲が広いこと、高温の励起源によるマトリックス干渉が抑制されることなどが挙げられる（上本ら、2009）。

ICP-MS は、1980 年代に Houk らによって最初の装置が報告され、従来の原子吸光分析法や ICP-AES などの光学的な分析法にかわる微量元素の分析法として普及しつつある。ICP-AES と同じアルゴンプラズマを用い、プラズマ中で生成したイオンを質量分析部に導入して、その質量数およびイオン強度を測定する手法である（上本ら、2009）。ICP-MS の利点として、元素の検出下限値が ppt レベルから ppq オーダーであることから、高感度分析かつ多元素同時分析が可能であること、定性および定量分析ができること、検量線の直線域が広いこと、同位体比の測定が可能であることが挙げられる。従って、微量元素や超微量元素を含む多くの元素情報を迅速に得る

ことが出来ることから、食品試料 (Millour ら、2011; Rose ら、2010; Noel ら、2003)、生物学的試料 (Fujimori ら、1998; Hasegawa ら、2001; Matuura ら、2001; Smith ら、2010)、地質学的試料 (Rong ら、1999; Ealciani ら、2000) や環境試料 (Lee ら、2000) など幅広い分野の試料の分析に用いられている。しかし、ICP-MS では、目的元素と同じ質量数のイオンや分子イオンのスペクトルが重なり干渉を及ぼすスペクトル干渉の問題が指摘されている。また、試料中の共存元素によるマトリックス干渉の問題も指摘されており、特に塩類による干渉の問題も大きいとされており、これらの干渉の問題が、AAS や ICP-AES など他の元素分析装置に比べ、精度に大きな影響を与える場合もあることが指摘されている。

ICP-MS を用いた半定量法は、高感度、分析操作の簡便さ、多元素一斉分析などの測定手法の特徴から、血液など場合によっては大量に入手することが難しい生物材料の測定に適している。また、得られる情報量が多いため、多変量解析への適用の高さも示唆される。しかし、この手法での生物材料での測定例はほとんど報告がない。

第 1 章からの問題提起を受け、本研究の目的として、生物材料に対し、半定量法を用いた無機元素測定データは真度の点などに問題がないのか評価することとした。そこで、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試みた。

2-2 材料および方法

2-2-1 試料

ICP-MS 半定量分析と定量分析による測定結果の比較、半定量分析での測定条件の検討および添加回収試験のための試料として、細胞培養用牛血清 (Code : 12183650、KOHJIN BIO 製 東京、日本) を用いた。

2-2-2 試薬

硝酸 1.42 (超高純度試薬：関東化学製) を希釈して、5%硝酸および 1%硝酸を作成し、試料および標準液の溶解に用いた。Milli-Q Element A-10 (日本ミリポア製) で作成した超純水は、酸の希釈や分析に用いた。Li、Mg、Y、Ce、Co、Tl 標準液(関東化学製)を希釈し、1 ng/mL 混合較正標準液を作成、ICP-MS 半定量分析に用いた。カリウム標準液(関東化学製)およびカルシウム標準液(関東化学製)を希釈し、較正標準液に添加、K および Ca の測定に用いた。Custom Assurance Standard (XSTC-622B; SPEX CertiPrep 製)、各々の元素標準液は希釈し、ICP-MS 定量分析および添加回収試験に用いた。ロジウム (Rh) 標準液(関東化学製)は希釈し、定量分析での内標準元素として用いた。

2-2-3 分析方法

選択した元素の種類と半定量と定量法の比較

ICP-MS 定量分析では、試料 1.25 mL を 1%硝酸で 50mL に希釈後、試料濃度に応じて希釈し、内標準元素として Rh を添加後、34 元素同時測定した。選択した 34 元素は、質量の小さい順に、Li、B、Na、Mg、Al、Si、P、K、Ca、Ti、V、Cr、Mn、Fe、Co、Ni、Cu、Zn、Ga、Ge、As、Se、Rb、Sr、Zr、Mo、Ag、Cd、Sn、Sb、Cs、Ba、W および Pb である。半定量の分析ではこれら 34 元素に Cl、Br および I の 3 元素を加え 37 元素を対象とした。定量分析においては、検量線が必要となるが、今回の検討では 4~5 点よりなる検量線を用いた。分析条件の一覧と選択した各元素の質量数は表 5 に示した。ICP-MS 測定データの抽出には、ChemStation software (Agilent Technologies)を用いた。

表 5 ICP-MS の測定条件と選択した元素の質量数

プラズマ条件	半定量法	定量法
RF パワー	1600 W	1600 W
プラズマガス流量	15.0 L/分	15.0 L/分
キャリアガス流量	0.7 L/分	0.7 L/分
サンプリング位置	8.0 mm	8.0 mm
ポンプ回転速度	0.1 rps	0.1 rps
データ採取条件		
取得方式	スペクトルピークホッピング	スペクトルピークホッピング
積分時間	0.1 秒/点	0.5 秒/点
繰返し回数	1	3
質量数範囲	6~238	Li-7, B-11, Na-23, Mg-24, Al-27, Si-29, P-31, K-39, Ca-44, Ti-47, V-51, Cr-53, Mn-55, Fe-57, Co-59, Ni-60, Cu-63, Zn-66, Ga-71, Ge-72, As-75, Se-82, Rb-85, Sr-88, Zr-90, Mo-95, Ag-107, Cd-111, Sn-118, Sb-121, Cs-133, Ba-137, W-182, Pb-206

添加回収試験

添加回収試験では、試料 0.625 mL を採取し、Custom Assurance Standard 又は各々の標準液を濃度に依存して添加、1%硝酸で 25 mL に希釈した。それぞれの溶液について半定量 ICP-MS 分析を行った。各元素の添加量は、2.5 ng:Mn、Co、Ge、Zr、Ag、Cd、Sn、Sb、Cs、W および Pb、6.25 ng:V、Ni、Ga、As および Mo、12.5 ng:Li、62.5 ng:Al、Ti、Cr、Se および Sr、250 ng:I、500 ng:Cu、Zn、Rb および Ba、2.5 mg:B および Fe、25 mg:Mg、P、K、Ca および Br、250 mg:Na、Si および Cl とした。

2-2-4 統計解析

ウシ血清から得られたデータはエクセル 2003 を用いて計算した。ウシ血清の元素

濃度および添加回収率は、平均値および標準偏差として表した。有意差の算出は t 検定を用いた。相関係数の有意水準は、IBM SPSS Statistic 19 (IBM, Japan)を用いて計算した。

2-3 成績と小括

2-3-1 ICP-MS 半定量法と ICP-MS 定量法での測定結果の比較

ウシ血清に対し、ICP-MS 半定量法と ICP-MS 定量法の 2 法で測定、その測定結果を表 6 に示した。なお、半定量法と定量法において、濃度が 0.004 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の元素に対しては、有意差の検定および濃度比を算出しなかった。

表6 ICP-MS 半定量法および ICP-MS 定量法によるウシ血清中の無機元素測定結果

元素	①ICP-MS 半定量法*1 ($\mu\text{g/mL}$)	②ICP-MS 定量法*1 ($\mu\text{g/mL}$)	①/② $\times 100$ (%)	有意差 検定*2 $\alpha = 0.05$	有意差 検定*2 $\alpha = 0.01$
Li	0.021 \pm 0.001	0.024 \pm 0.0007	87.5	×	○
B	0.182 \pm 0.012	0.187 \pm 0.007	97.3	○	○
Na	3050 \pm 60	3160 \pm 38	104	×	○
Mg	18.5 \pm 0.4	18.0 \pm 0.5	103	○	○
Al	0.024 \pm 0.009	0.028 \pm 0.007	85.7	○	○
Si	45.0 \pm 2.0	38.2 \pm 0.5	118	×	×
P	94.0 \pm 2.3	101 \pm 4	93.1	×	○
Cl	3670 \pm 50				
K	156 \pm 3	236 \pm 9	66.1	×	×
Ca	38.6 \pm 0.8	87.6 \pm 2.4	44.1	×	×
Ti	0.159 \pm 0.032	0.153 \pm 0.018	104	○	○
V	0.0070 \pm 0.0005	0.0066 \pm 0.0011	106	○	○
Cr	0.037 \pm 0.001	0.038 \pm 0.004	97.4	○	○
Mn	<0.004	<0.004			
Fe	2.14 \pm 0.10	2.35 \pm 0.09	91.1	×	○
Co	<0.004	<0.004			
Ni	0.0072 \pm 0.0017	0.0077 \pm 0.0008	93.5	○	○
Cu	0.680 \pm 0.046	0.685 \pm 0.02	99.3	○	○
Zn	0.780 \pm 0.04	0.837 \pm 0.026	93.2	○	○
Ga	0.0068 \pm 0.0003	<0.004			
Ge	<0.004	<0.004			
As	0.0064 \pm 0.0016	0.0057 \pm 0.0006	112	○	○
Se	0.122 \pm 0.015	0.111 \pm 0.003	110	○	○
Br	18.8 \pm 1.9				
Rb	0.339 \pm 0.008	0.334 \pm 0.010	101	○	○
Sr	0.101 \pm 0.004	0.097 \pm 0.003	104	○	○
Zr	<0.004	<0.004			
Mo	0.0085 \pm 0.0008	0.010 \pm 0.0002	85	×	○
Ag	<0.004	<0.004			
Cd	<0.004	<0.004			
Sn	<0.004	<0.004			
Sb	<0.004	<0.004			
I	0.118 \pm 0.005				
Cs	<0.004	<0.004			
Ba	0.200 \pm 0.006	0.190 \pm 0.006	105	○	○
W	<0.004	<0.004			
Pb	<0.004	<0.004			

*1 平均値 \pm 標準偏差として算出

*2 ○ : $p > 0.05$ or 0.01 、 × : $p < 0.05$ or 0.01

半定量と定量の成績において、有意な差があった元素は、Li、Na、Si、P、Cl、K、Ca、Fe および Mo の 9 元素であった(有意水準 0.05 で検定)。有意水準 0.01 で検定した場合には、Si、K および Ca の 3 元素で有意差が観察された。半定量と定量の比較として、両者の濃度比 (%) も検討した。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かったことを原因として、定量法に対する濃度比は、それぞれ 66.1%と 44.1%であった。以上の成績に関して、詳細に観察してみると、例えば、有意水準 0.05 および 0.01 の両方で有意差が得られ、半定量と定量の濃度比が 118%であった Si であっても、半定量と定量で得られた成績はそれぞれ、45 と 38.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であった。従って、K および Ca 以外の元素では、今後のケモメトリックス分析に大きな支障がでるような違いは観察されていないと考えられた。他方、K および Ca の問題は、全 37 元素の半定量と定量で得られた成績間の相関を示した図においても明らかとなった。図 6 は、横軸と縦軸に、それぞれ半定量と定量の成績をあてはめたものである。全 37 元素で得られた半定量と定量の成績における相関係数は $R=0.999$ ($p<0.01$) であった。半定量と定量結果の成績の間には、有意な相関が観察されたことから、半定量法が定量法に比べて遜色がないことが示唆されたが、K および Ca の値は図 6 に示したように大きく逸脱していた。

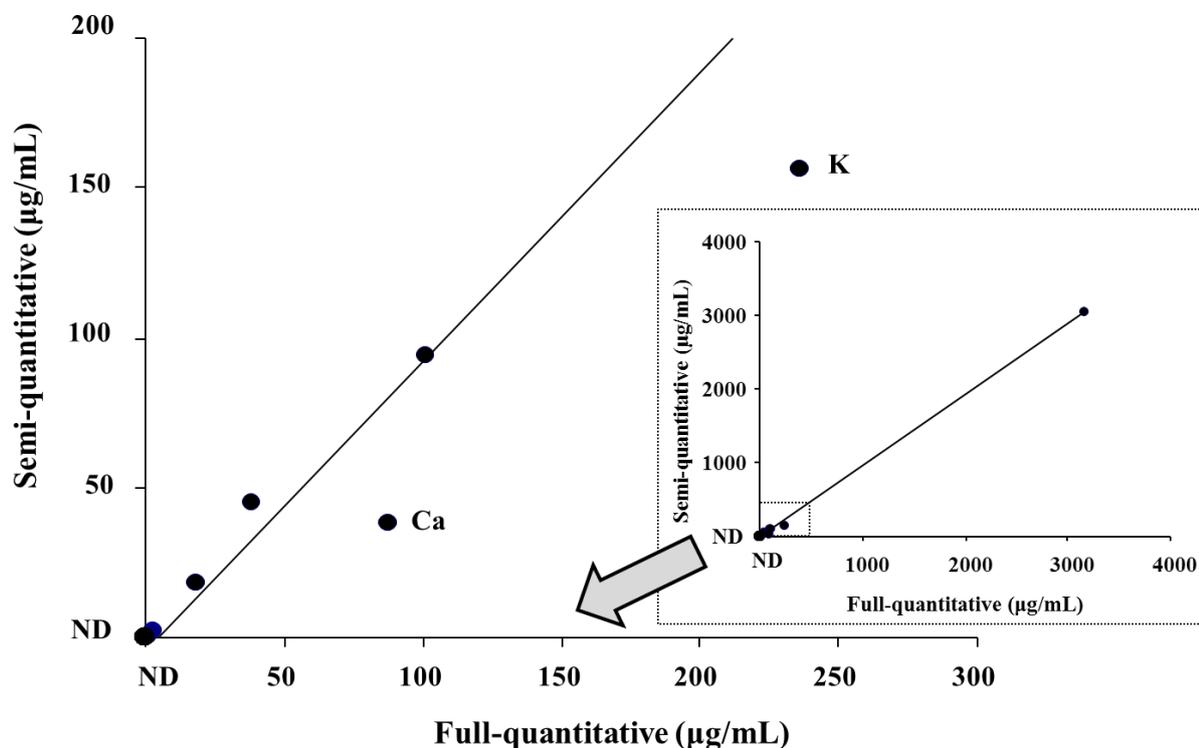


図6 ICP-MS 半定量法と定量法による牛血清中の無機元素データのプロット図

ICP-MS 半定量法での米の分析において、多量元素の測定結果が低い理由は、使用する較正標準液濃度に対し、多量元素の含有量が高く、較正標準液の適用濃度範囲を超えているためとの報告がある (Laursen ら、2009a)。今回、ウシ血清中の元素濃度範囲が、0.004 µg/mL 以下の重金属類から、4000 µg/mL の Na までと広がった。そのため、使用した較正標準液における K および Ca の適用濃度範囲を超えてしまい、両元素の濃度が低い結果になったと推察された。多量元素が、使用した較正標準液での適用濃度範囲を超えてしまった場合の対処方法がいくつか報告されている。河川水や植物の標準物質の測定において、試料溶液の希釈が必要であるとの報告 (Amarasiriwardena ら、1997) や、米の測定では、較正標準液濃度を高い濃度に変更すると改善するとの報告 (Laursen ら、2009a) がある。また、土壌や堆積物の測

定においては、多量元素の含有量が半定量法での適用濃度範囲を超えているため、測定感度が低い原子吸光法での測定が適切との報告 (Entwistle ら、1997) がある。

そこで、上記の報告を参考として、ウシ血清中の K および Ca の測定条件の検討を、1) 試料の希釈、2) 異なる較正標準液の濃度の設定および 3) 較正標準液への K および Ca の添加を行った。この 3 つの対処法により、K および Ca 半定量における改善が可能であるかを次の章で検討した。

2-3-2 ICP-MS 半定量法での K および Ca 測定条件検討

ICP-MS 半定量法での K および Ca の真度改善のための 3 つの取り組みを行った。1 つ目の取り組みとして、試料溶液中の K および Ca 濃度が較正標準液に比べ高いこと (1000 倍以上) による影響が考えられたため、試料溶液を 5、20 及び 200 倍と希釈した後、測定を行った。その結果、K での 5~200 倍希釈液の測定結果はかわらず、低い結果の改善はできなかった。また、Ca においても、20 倍希釈液での結果は上がったが、定量分析での結果には届かず、大幅な改善には至らなかった (データは示さず)。このことから、試料溶液の希釈は、測定結果の改善に対し効果がないことが分かった。

2 つ目の取り組みとして、今回、1 ng/mL (Li、Mg、Y、Ce、Co および Tl) 較正標準液を使用した。試料溶液中の K および Ca 濃度に比べ、較正標準液の濃度が低いことが考えられたため、較正標準液の濃度を 1 ng/mL から、10 ng/mL または 100 ng/mL とかえ測定を行った。その結果、K および Ca の測定結果は、1 ng/mL 較正標準液を用いた結果と変わらなかった (データは示さず)。このことから、高い濃度の較正標準液の使用は、半定量分析での測定結果の改善に対し、効果がないことが分かった。

較正標準液の構成元素 (Li、Mg、Y、Ce、Co および Tl) に K 及び Ca を使用していないことによる影響が考えられた。そこで、3 番目の検討として、1 ng/mL 較正標準液に K および Ca を 1、10 および 100 ng/mL と 3 条件で添加し、測定を行った (図 7)。3

条件での K および Ca の測定結果は、ICP-MS 定量分析データとの濃度比が K では 91.9 ~106%、Ca では 93.6~98.2%であった。このことから、較正標準液の構成元素に K および Ca を加えることで、半定量分析での両元素の測定結果が改善されることが示唆された。3 つのどの添加濃度でも濃度比は両元素とも良好であったが、100 ng/mL 添加での精度が一番良いことから、較正標準液への K 及び Ca の添加濃度は 100 ng/mL と決定した。

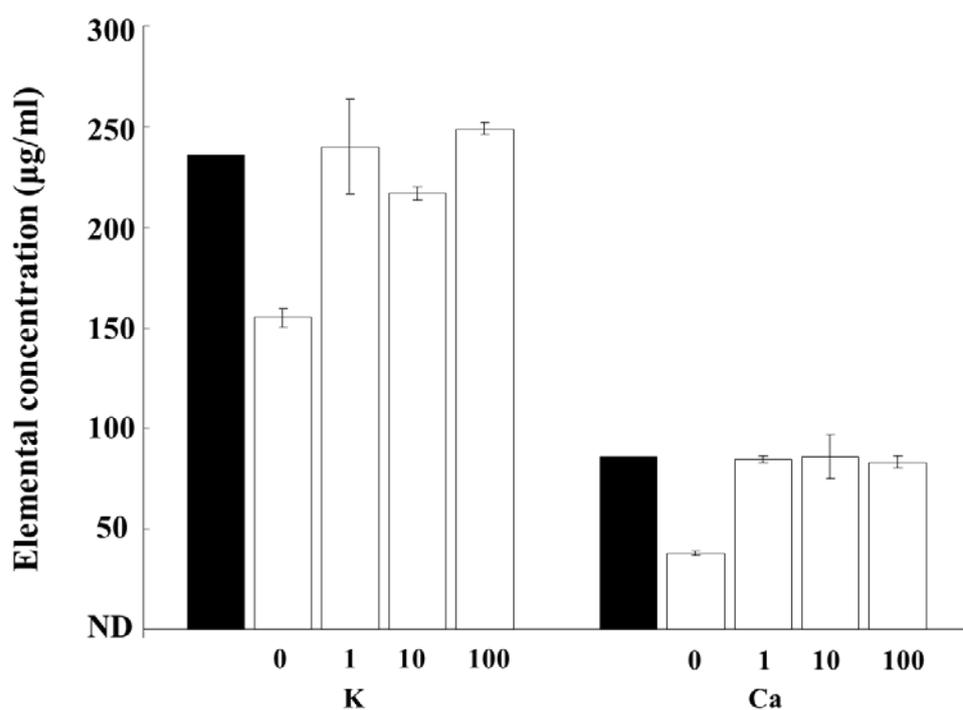


図7 KとCaを3条件で添加した較正標準液を用いた ICP-MS 半定量分析でのウシ血清中の K と Ca 測定結果。平均値±標準偏差 (N=6) で示した。黒棒および白棒はそれぞれ、定量法および半定量法での結果。0 : K と Ca 標準液の添加なし。1~100 : K と Ca 濃度がともに 1~100 ng/mL となるように標準液を添加。

一方、較正標準液として通常使用しない K および Ca を添加したため、両元素に近い質量数を持つ元素においては、高い測定結果になる傾向があった。この現象は、1～100 ng/mL 添加すべての条件で見られ、特に Ti、V および Cr は 150%程度、高い測定結果となった。この標準液を用いた測定は、いくつかの元素の真度に影響を与えるため、この条件では K および Ca のみを測定すると決定した。試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（場合によっては複数）を用意する必要があると考えられた。

2-3-3 ICP-MS 半定量法での添加回収試験

次の検討として、添加回収試験を表 7 に示した 37 元素に対し実施した。K および Ca の測定では、1 ng/mL 較正標準液に 100 ng/mL K および Ca を添加した標準液を用いた。K および Ca の回収率はそれぞれ $103 \pm 5.8\%$ 、 $96.6 \pm 5.8\%$ と良好であり、この条件での測定の有効性が示された。また、別の 2 つの濃度条件で同様に回収率を求めたが、K は 89.3～99.0 %、Ca は 90.0～99.2 % と良好であった（データ示さず）。これらのことより、K および Ca に対する半定量分析では、較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。K および Ca 以外の元素の測定では、試料は 1 ng/mL 較正標準液を用いて測定を行った。その結果を表 7 に示した。濃度が 0.004 $\mu\text{g/mL}$ 以下の元素に対しては、0.004 $\mu\text{g/mL}$ 濃度相当の元素を添加したが、回収率の範囲は 88.6～108%であった。濃度が 0.004 $\mu\text{g/mL}$ 以上の元素に対しては、試料に元素濃度に依存した量をそれぞれ添加した。その結果、B 以外の元素の結果は 91.2～118%となった。B は添加量を増やすと回収率が改善されることから、低い濃度帯での真度不足の可能性が示唆された。厚生労働省が出している食品衛生検査の検査指針での適正な添加回収率を、70-120%としていることから、半定量法が生物材料の分析に使用可能である手法であることが示唆された。

表 7 ICP-MS 半定量法によるウシ血清中の無機元素の回収率

元素	回収率 ^{a)} (%)	元素	回収率 ^{a)} (%)
Li	103±2.9	Ga	103±4.0
B	161±5.8	Ge	93.3±17.3
Na	91.7±1.0	As	118±12.2
Mg	103±2.9	Se	94.7±6.9
Al	91.2±6.1	Br	105±5.8
Si	103±5.8	Rb	100±0.6
P	113±11.5	Sr	101±2.3
Cl	104±3.7	Zr	98.7±5.8
K	103±5.8	Mo	101±4.6
Ca	96.6±5.8	Ag	92.2±5.5
Ti	97.4±2.3	Cd	88.6±10.5
V	104±8.3	Sn	105±5.8
Cr	101±4.0	Sb	97.6±5.8
Mn	111±5.8	I	92.0±5.8
Fe	116±5.8	Cs	93.4±5.8
Co	100±5.8	Ba	96.5±2.9
Ni	105±12.2	W	96.1±0.6
Cu	112±2.9	Pb	95.0±10.0
Zn	105±2.9		

試料には 2.5mg～250mg までの濃度に依存した元素量を添加した。

a) 3 点の回収率の平均値±標準偏差

2-3-4 小括

この章において、第 1 章の課題であった ICP-MS 測定における真度の評価と、較正標準液の追加により、多量元素の低い結果を改善することができた。較正標準液を構成する元素やその元素濃度は、対象とする検体種の元素濃度レベルや元素組成により、種々のものが検討され用いられている (Amarasiriwardena ら、1997; Soldevila

ら、1998)。ただし、ICP-MS の多元素一斉測定では、検体種によっては多量元素と微量元素が共存し各種の干渉を受ける可能性があり、別の測定原理を持つ ICP-AES や AAS での測定結果と比較し、結果の妥当性を検証した報告もある (Almeida ら、2002; Catarino ら、2006)。この研究においても結果は示していないが、ウシ血清に対し、ICP-AES、AAS、イオンクロマトグラフおよび電位差滴定法を用いて含有量が多い 14 元素について測定し、ICP-MS 半定量法の結果と比較、結果に差がないことを確認している。

第 3 章では、この章で検証した ICP-MS 測定方法を用いて、ウシ血清中無機元素情報により、肥育条件 (食餌試料および肥育場所) の分類が可能か検討を行うこととした。

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

3-1 緒言

牛肉の判別手法として、品種間で異なる DNA 領域を判別マーカーとして利用する DNA 解析を用いた品種判別があり、黒毛和種とホルスタイン種、およびその交雑種の識別が可能であると報告されている (Sasazaki ら、2004; Hara ら、2010; Suekawa ら、2010)。また、この手法は日本産と外国産を識別する牛肉の産地判別にも活用されている (Sasazaki ら、2007、2011)。DNA 解析を用いた手法は他に、牛肉の雌雄判別 (Numabe ら、1995; Yamanaka ら、1999) や、加工肉に対する原材料表示の適合性の検証のために開発された肉種判別 (対象：牛、豚、鶏、馬および羊) がある (Tanabe ら、2007)。これらの手法は、様々な畜産物の産地偽装を受け開発された技術であり、いくつかの民間の分析受託機関では、検査メニューとして受託を請け負っている。

一方、安定同位体比質量分析法を用いて、日本国内に流通している牛肉の産地と外国産とを判別する手法も開発されている (Nakashita ら、2009)。この分析は、炭素、窒素、水素および酸素などの軽元素の安定同位体比値を用いて解析される。飼料の相違 (稲わら、配合飼料の違いなど) が炭素に、飼料中のタンパク質の相違が窒素に、飲料水の相違 (地域の水の安定同位体比は、牛の組織の安定同位体比に反映) が酸素および水素に反映され、牛肉中のこれらの元素の安定同位体比の違いをもとに分類する。特に有力銘柄ほど生産地が限定され、配合飼料に特徴を有するため、判別の対象となりうることができる。これまで安定同位体比分析は、生活環境の情報の履歴を活用するという特徴から、環境物質循環の解明や動物の食性の研究などに用いられてきた (Hobson 1999; Kelly 2000)。この手法の確立は、DNA 解析同様、牛肉の産地偽装の理化学的検証手法として強く求められている。

また、試料に原子炉からの中性子線を照射して、比較的半減期の長い放射性核種から放出される放射線を測定する放射化分析法があり、まだ研究段階であるが、この手法を用いて国産と外国産牛肉の判別の検討が行われている (Saito ら、2008)。

この手法の利点は、試料の前処理が不要で非破壊で測定ができることだが、原子炉などの特殊な装置を使うことが難点となっている。

他方、産地偽装の理化学的検証法と同様に、牛の月齢判別も畜産学の分野において重要な課題の一つである。国内産の牛肉に関しては、全頭検査とトレーサビリティ導入の結果、消費者の国産牛肉に対する信頼は回復してきたと考えられる。しかし、牛肉の個体識別の情報管理が完備されていない米国においては、骨格の成熟度（骨の骨化）や赤身度から判断する手法を用いて牛の月齢判別をおこなっている（Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, 2004）。しかし、この手法は検査官が目視で行う方法であり、理化学的な手法はまだ開発されていないことから、食の安全という観点からも理化学的な牛の月齢判別は重要と考えられる。そこで本研究では、異なる餌で飼育されたウシの血清中の無機元素データを用いることで、肥育場所と食餌試料の違いが識別できるか、また、ウシの肥育時期の識別が可能か検討を行った。

3-2 材料および方法

3-2-1 試料

16.3～21.3 ヲ月齡去勢ホルスタインから集めた 116 頭分の血清を用いた。これらの血清は、肥育場所と食餌試料が異なるハーブ牛（N=58）および開拓牛（N=58）から集められた。それぞれのウシ群（N=58）は、肥育時期の違いにより、肥育中期（N=39）と肥育後期（N=19）の分類で構成された。ハーブ牛は、麦わらとジンジャー、シナモン、オレガノ、ガーリックなど 4 種類の天然ハーブとビタミン E を強化した原料を配合した飼料を与えて育てた。開拓牛は、乾燥飼料に焼酎の濃縮液を添加したもので肥育した。

各ウシ個体から 30 mL 採血後、凝固するまで室温におき、4000rpm、15 分の条件で遠心分離した後、得られた血清をマイクロチューブに入れ-20℃の冷凍庫で保存した。

3-2-2 試薬

第 2 章と同様に調製した。

3-2-3 分析方法

第 2 章と同様に実施した。

3-2-4 統計解析

ウシ血清から得られた元素情報は、エクセル 2003（マイクロソフト製）を用いて解析した。各々のウシ群での元素濃度は平均値および標準誤差として表した。有意差の算出は t 検定を用いた。

血清中の元素情報を活用することで、肥育場所と食餌試料の相違、また肥育時期の区別ができるかどうかを調べるために主成分分析（Principal Component Analysis: PCA）および偏最小 2 乗判別分析（Partial Least Square-Discriminant Analysis: PLS-DA）を行った。ICP-MS で算出された試料中の各々の元素濃度は、多変量解析に用いた。主成分分析および偏最小 2 乗判別分析は SIMCA-P+（Umetrics AB, Umeå, Sweden）を用いて実施した。主成分分析および偏最小 2 乗判別分析のスコアプロットとローディングプロットは標準化した情報を用いた。

マハラノビスの汎距離を用いた線形判別関数は、MULSEL 解析ソフトを用いて実施した。判別関数を構成する変数（元素）は、変数増加法を用い選択した。係数の有意差検定（ $P < 0.01$ ）と判別の有意性検定（ $P < 0.01$ ）のあと、変数選択の基準値を肥育場所と食餌試料の相違の判別では 33、肥育時期の判別では 12 と設定した。

この研究で作成した判別関数に対し、全 116 試料それぞれの結果を判別関数に代入し、分類の割合を算出した。また、10-ホールドクロスバリデーション法により、判別関数の妥当性確認を行った。各々の群から計 11 または 12 試料を除き、残りの試料（105 または 104 試料）を用いてバリデーション用判別関数を作成した。除いた試料の情報は、残りの試料で作成した判別関数に挿入し、判別関数の判別率を調査

した。この操作を除いた試料をかえ、計 10 回行い、合計の判別率を算出した。

3-3 成績と小括

3-3-1 肥育場所と食餌試料（肥育条件）の判別

今回の研究において、肥育場所と食餌試料（以下、肥育条件）が異なる 2 つのウシ群から得られた血清中の 24 元素について、ICP-MS での半定量法により測定を行い、その結果を表 8 に示した。2 群の分析結果において、有意差 ($P < 0.05$) が見られた元素は、24 元素中 19 元素であった。逆に有意差が見られなかった元素は、Mg、P、K、Ca および Cu であった。食餌試料として与えた麦わらや稲わらには、Mg、K、Cl、Fe、Cu、Zn および Mn が多く含まれている (National Agriculture and Food Research Organization 2009)。また、配合飼料には、P および Ca が多く含まれている。有意差がなかった 5 元素は、今回与えた飼料中には多く含まれていたが、2 群での有意差という点では、顕著な差は見られなかった。これら 5 元素の濃度は、血清中の濃度が高く、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ことの要因が考えられた。一方、微量元素は、生体内の代謝よりも他の要因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。

表 8 肥育条件が異なる 2 群でのウシ血清中の 24 元素の分析結果

元素	ハーブ牛群 (N = 58)		開拓牛群 (N = 58)	
	平均値 (μ g/mL)	標準誤差 (μ g/mL)	平均値 (μ g/mL)	標準誤差 (μ g/mL)
Li ^a	0.0018	0.00008	0.0024	0.00009
Na ^a	3280	26.1	3390	27.7
Mg	21.8	0.54	22.5	0.44
Si ^a	20.0	0.39	22.1	0.30
P	107	2.5	110	2.6
Cl ^a	4810	32.9	4950	41.2
K	145	1.6	146	1.7
Ca	83.9	1.46	87.2	2.80
Ti ^a	0.156	0.0050	0.171	0.0048
V ^a	0.0056	0.0001	0.0069	0.0002
Cr ^a	0.0266	0.0006	0.0325	0.0010
Mn ^a	0.0037	0.0002	0.0054	0.0003
Fe ^a	2.25	0.056	2.58	0.055
Cu	0.797	0.0172	0.829	0.0223
Zn ^a	1.08	0.021	0.995	0.0162
Ge ^a	0.0026	0.0001	0.0033	0.0002
As ^a	0.0024	0.0002	0.0038	0.0002
Se ^a	0.176	0.0083	0.139	0.0041
Br ^a	60.3	2.44	38.6	0.69
Rb ^a	0.173	0.0035	0.203	0.0033
Sr ^a	0.0670	0.0019	0.0527	0.0012
Mo ^a	0.0149	0.0006	0.0074	0.0002
I ^a	0.0770	0.0023	0.126	0.0024
Ba ^a	0.0236	0.0008	0.0184	0.0006

^a 2 つの群間の有意差: $P < 0.05$

肥育条件が異なる 2 群のウシ血清濃度について、主成分分析を行い、そのスコアプロットを図 8 に示した。その結果、第 1-第 2 主成分の固有値は 1 より大きく、第 2 主成分までの累積寄与率は 47.1%であった。図 8 に示したように、ウシ血清から得られた情報の分布は、肥育条件の相違に依存した 2 つの区分に分類された。この結果から、ウシ血清中の元素濃度により肥育条件の識別が可能であることが示唆された。続いて、主成分分析と同じ測定データを用いて、偏最小 2 乗判別分析を行い、そのスコアプロットを図 9 に示した。このモデルでの評価指標として、 R^2Y 、 Q^2Y を用いた。 R^2Y (最大 1) はモデル条件(寄与率)が良いかの指標、 Q^2Y は新しいデータに対する予測率 (0.5 以上であれば優れている) の指標である (SIMCA user's Guide 2008)。PLS モデルでの第 2 主成分までの R^2Y (モデル寄与率) は 0.87、 Q^2Y (予測率) は 0.86 とどちらも 0.5 を超え、優れたモデルであることが判明した。また、偏最小 2 乗判別分析でのローディングプロットを図 10 に示した。その結果、ハーブ牛群に多い元素は、Br、Sr、Mo および Ba、開拓牛群に多い元素は、Li および I であった。ハーブ牛群には、食餌試料として 4 種のハーブを添加した配合飼料を与えているが、ハーブ類には Mo が多く含まれており (Kagawa 2011)、食餌試料へのハーブの添加が Mo 濃度増加につながったと考えられた。また、Br は土壌や海水に一定量含まれるため、肥育場所での土壌や環境水の相違が影響している可能性が示唆された。

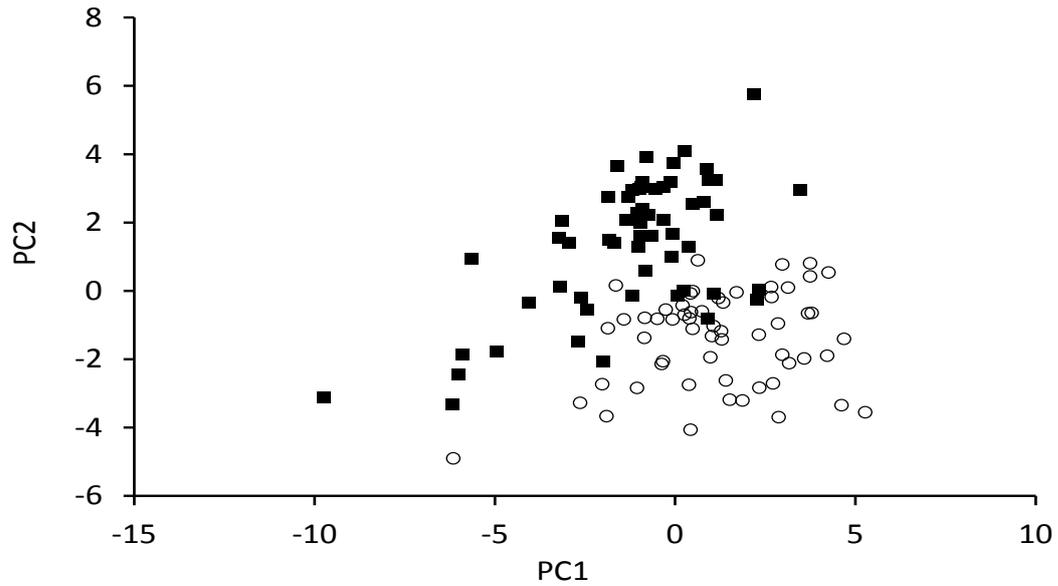


図 8 肥育条件が異なる 2 群(116 試料)のウシ血清中無機元素情報での主成分分析のスコアプロット。データは第 1-第 2 主成分に基づいた。
(■:ハーブ牛, ○:開拓牛)

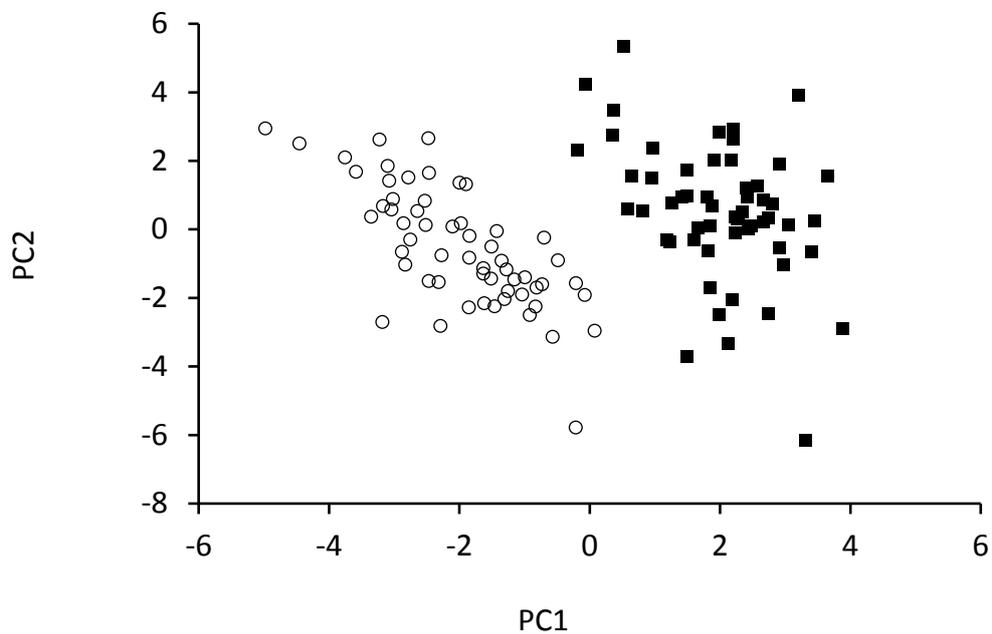


図 9 肥育条件が異なる 2 群(116 試料)のウシ血清中無機元素情報での偏最小 2 乗判別分析のスコアプロット。データは第 1-第 2 主成分に基づいた。
(■:ハーブ牛, ○:開拓牛)

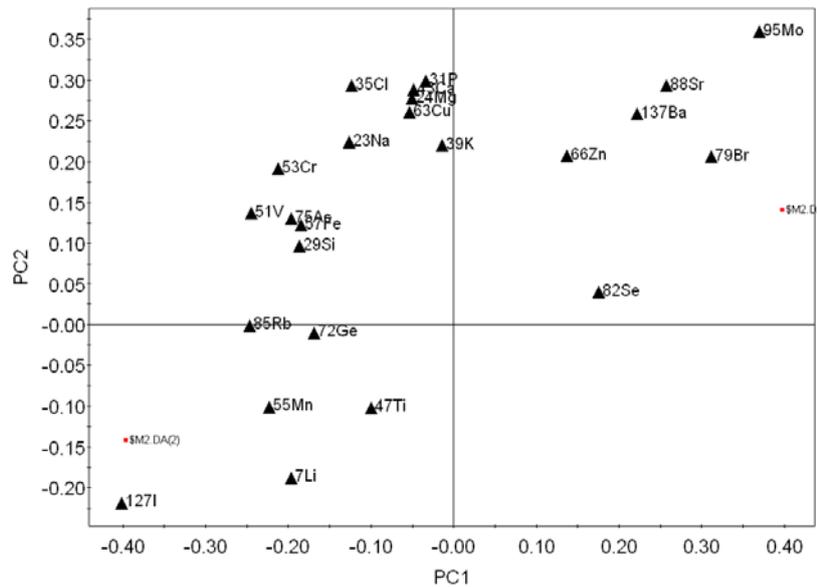


図 10 肥育条件が異なる 2 群 (116 試料) のウシ血清中無機元素情報での偏最小 2 乗判別分析のローディングプロット。データは第 1-第 2 主成分に基づいた。

最後に、肥育条件が異なる 2 群のウシ血清の測定結果を用いて、線形判別分析を行った。その結果、Br、Mo および I からなる判別関数を作成した。

$$\text{ハーブ牛群} = 0.230[\text{Br}] + 1012.312[\text{Mo}] + 146.439[\text{I}] - 20.149$$

$$\text{開拓牛群} = 0.048[\text{Br}] + 236.432[\text{Mo}] + 368.750[\text{I}] - 24.989$$

[Br]、[Mo] および [I] は各々の元素濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) を表している。判別得点は、判別関数に元素濃度を代入して得られた数値として算出した。各々の血清試料での高い判別得点を調べるため、116 試料の変数 (Br、Mo および I) の結果をそれぞれの式に代入した。その結果、ハーブ牛群由来の血清試料をハーブ牛群とした判別率は 96.6% (56/58 試料)、開拓牛群由来の血清試料を開拓牛群とした判別率は 100% (58/58 試料) であり、判別関数により 2 群の分類が可能であることが示された (表 9)。また、作

成した判別関数の有効性を確認するために、10-ホールドクロスバリデーションにより評価を行った。その結果、各群の分類はそれぞれ、96.6% (56/58 試料)、100% (58/58 試料)の判別率であった。

表 9 肥育条件が異なるウシ血清 (N=116) から作成した判別関数での分類とクロスバリデーションでの判別率

群名	試料数	分類 (%)	クロスバリデーション ^{a)} (%)
ハーブ牛群	58	96.6 (56/58)	96.6 (56/58)
開拓牛群	58	100 (58/58)	100 (58/58)

a) 10-ホールドクロスバリデーション

安定同位体比分析による牛肉の銘柄牛 (ブランド牛) の識別のような分析手法の確立には、複数の銘柄 (ブランド) を明確に分ける無機元素情報が必要である。1つの変数で判別する場合、各群での変数の有意差がかなり大きくないと、正確な判別が難しい。安定同位体比分析が複数の変数を用いるように、複数の無機元素の情報を活用する本手法は、判別手法の確立につながるものと考えられた。

3-3-2 肥育時期の判別

二つ目の研究として、ウシの肥育時期の判別が可能かどうか調べるため、肥育条件の判別で用いた試料とその分析結果を、肥育後期群 (N=38) と肥育中期群 (N=78) とに分類し直し、表 10 に示した。2 群の分析結果において、有意差 ($P < 0.05$) が見られた元素は、24 元素中 17 元素であった。逆に有意差が見られなかった 7 元素は、Na、K、Fe、Rb、Mo、I および Ba であった。肥育条件が異なる 2 群 (表 10) では、

微量元素すべてに有意差がみられたが、肥育時期の相違では Rb、Ba、特に肥育条件の相違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た。また、肥育中期群と比べ、肥育後期群に多い元素は P、Cl および Ca であった。どちらの群のウシに対しても、食餌試料として与えたわらには Cl、配合飼料には P や Ca が多く含まれていることから、肥育時期が進むにつれ、食餌試料由来のこれらの元素濃度が増加したと推察された。Ti は土壌中に 0.5%程度含まれ、また、飼料中の Se 含有量は、生育場所での土壌中の Se 含有量を反映するとの報告 (Kamata 2003) があり、この両元素の相違は、肥育場所もしくは与えた飼料の生育場所での土壌由来であると考えられた。

表 10 肥育後期群 (N=38) と肥育中期群 (N=78) でのウシ血清中の 24 元素の分析結果

元素	肥育後期群 (N=38)		肥育中期群 (N=78)	
	平均値 (μ g/mL)	標準誤差 (μ g/mL)	平均値 (μ g/mL)	標準誤差 (μ g/mL)
Li ^a	0.0015	0.00007	0.0024	0.00007
Na	3290	46.3	3350	18.3
Mg ^a	20.3	0.70	23.1	0.35
Si ^a	19.6	0.57	21.7	0.24
P ^a	119	3.4	103	1.9
Cl ^a	4980	58.7	4830	27.0
K	144	2.2	146	1.3
Ca ^a	90.3	1.97	83.3	2.11
Ti ^a	0.127	0.0043	0.182	0.0033
V ^a	0.0071	0.0003	0.0058	0.0001
Cr ^a	0.0336	0.0012	0.0276	0.0006
Mn ^a	0.0031	0.0002	0.0053	0.0002
Fe	2.43	0.088	2.41	0.046
Cu ^a	0.874	0.0276	0.784	0.0151
Zn ^a	0.958	0.0223	1.07	0.016
Ge ^a	0.0024	0.0002	0.0032	0.0001
As ^a	0.0042	0.0003	0.0025	0.0002
Se ^a	0.109	0.0037	0.181	0.0054
Br ^a	34.3	0.68	56.8	1.88
Rb	0.187	0.0044	0.188	0.0036
Sr ^a	0.0555	0.0021	0.0620	0.0016
Mo	0.0107	0.0009	0.0114	0.0005
I	0.103	0.0065	0.101	0.0028
Ba	0.0212	0.0010	0.0209	0.0007

^a 2 つの群間の有意差: $P < 0.05$

肥育時期の異なる 2 群のウシ血清濃度について、主成分分析を行い、そのスコアプロットを図 11 に示した。その結果、第 1-第 2 主成分の固有値は 1 より大きく、累積寄与率は 47.1%であった。図 11 に示したように、ウシ血清から得られた情報の分布は、肥育時期に依存し、一部重なりがあるものの 2 つの区分に分類することができた。続いて、主成分分析と同じ測定データを用いて、偏最小 2 乗判別分析を行った。そのスコアプロットおよびローディングプロットを図 12 および図 13 に示した。モデルでの評価指標である第 2 主成分までの R^2Y は 0.89、 Q^2Y は 0.88 とどちらも 0.5 を超え、偏最小 2 乗判別分析では優れたモデルであることが判明した。

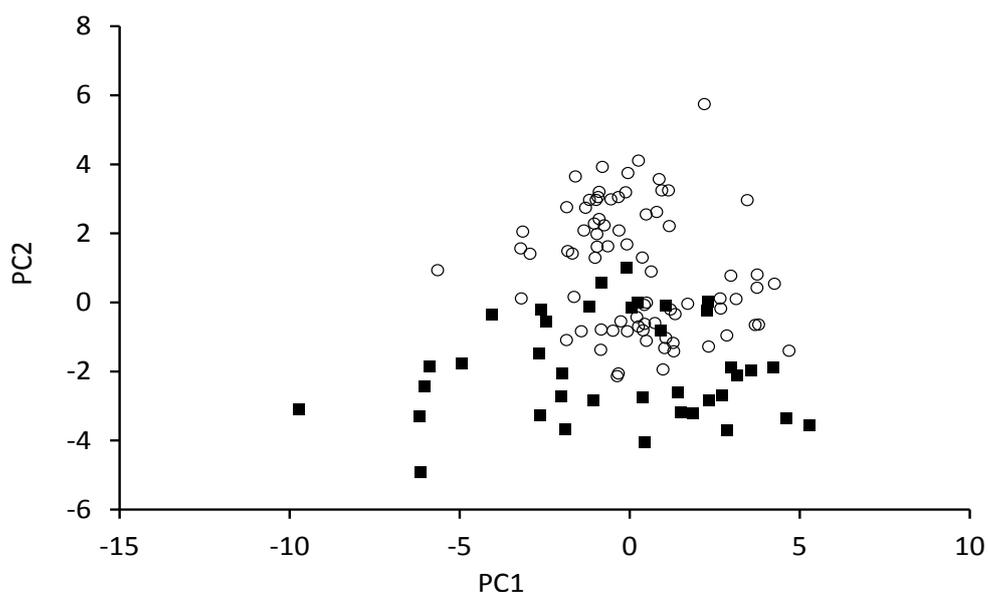


図 11 肥育後期群 (N=38) と肥育中期群 (N=78) のウシ血清中無機元素情報での主成分分析のスコアプロット。データは第 1-第 2 主成分に基づいた。

(■: 肥育後期群, ○: 肥育中期群)

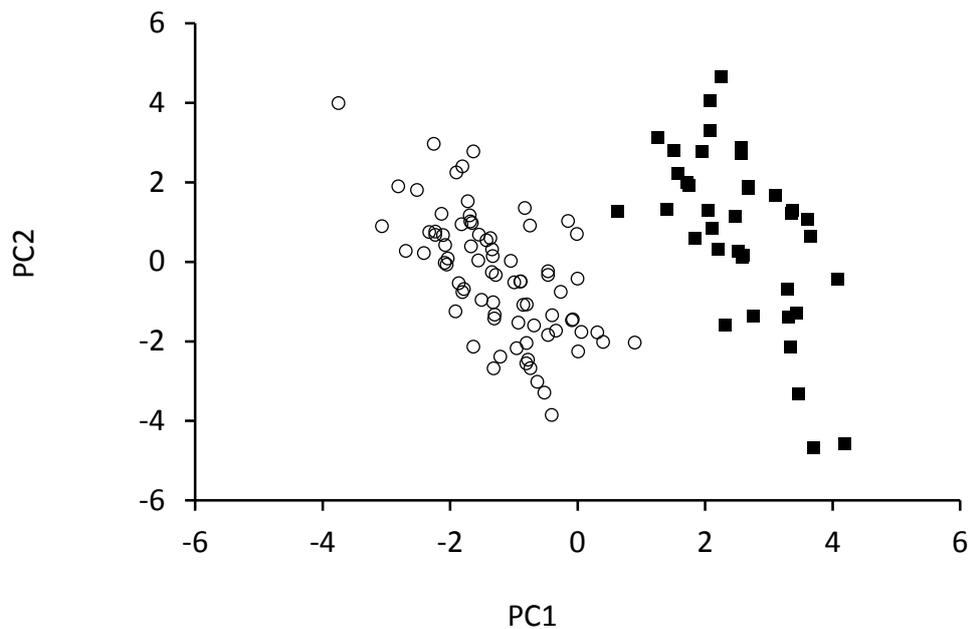


図 12 肥育後期群 (N=38) と肥育中期群 (N=78) のウシ血清中無機元素情報での偏最小 2 乗判別分析のスコアプロット。データは第 1-第 2 主成分に基づいた。
(■: 肥育後期群, ○: 肥育中期群)

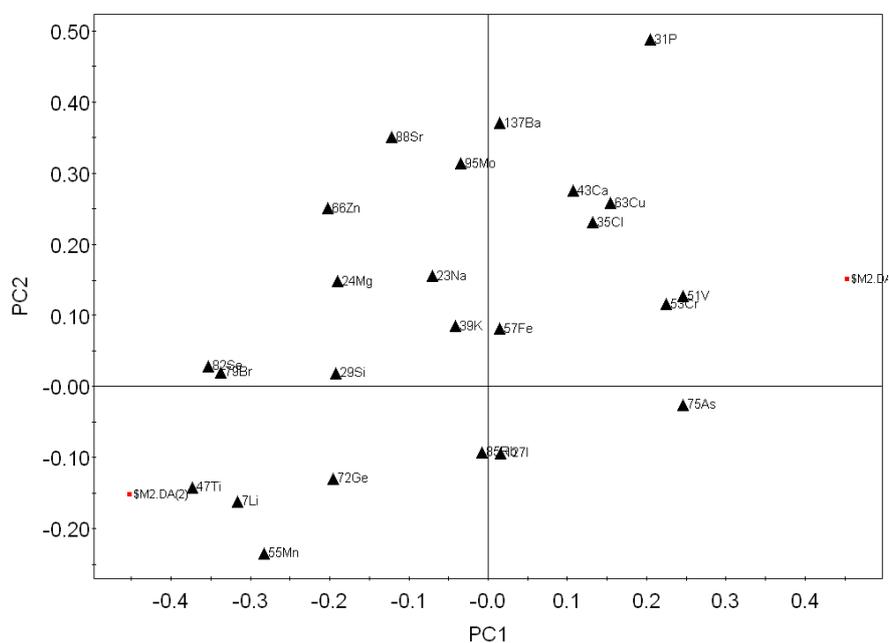


図 13 肥育後期群 (N=38) と肥育中期群 (N=78) のウシ血清中無機元素での偏最小 2 乗判別分析のローディングプロット。データは第 1-第 2 主成分に基づいた。

肥育時期が異なる 2 群の牛血清の測定結果を用いて、線形判別分析を行った。その結果、P、Ca、Ti および Se からなる判別関数を作成した。

$$\text{肥育後期群} = 0.358[\text{P}] + 0.244[\text{Ca}] - 64.441[\text{Ti}] + 8.539[\text{Se}] - 28.726$$

$$\text{肥育中期群} = 0.00088[\text{P}] + 0.118[\text{Ca}] + 200.313[\text{Ti}] + 102.522[\text{Se}] - 32.436$$

[P]、[Ca]、[Ti]および[Se]は各々の元素濃度 (µg/ml) を表している。判別得点は、判別関数に元素濃度を代入して得られた数値として算出した。各々の血清試料での高い判別得点を調べるため、116 試料の変数 (P、Ca、Ti および Se) の結果をそれぞれの式に代入した。その結果、肥育後期群由来の牛血清試料を肥育後期群とした判別率は 100% (38/38 試料)、肥育中期群由来の試料を肥育中期群とした判別率は 100% (78/78 試料) であり、判別関数により肥育時期の分類が可能であることが示された (表 11)。また、作成した判別関数の有効性を確認するために、10-ホールドクロスバリデーションにより評価を行った。その結果、各群の分類はともに 100%の判別率であった。

表 11 肥育後期群 (N=38) と肥育中期群 (N=78) ウシ血清から作成した判別関数での分類とクロスバリデーションでの判別率

群名	試料数	分類 (%)	クロスバリデーション ^{a)} (%)
肥育後期群	38	100 (38/38)	100 (38/38)
肥育中期群	78	100 (78/78)	100 (78/78)

a) 10-ホールドクロスバリデーション

今回、判別関数の変数として P と Ca が選択されたが、この両元素は、配合飼料中に多く含有していること、血清中の濃度が高く、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ことを考えあわせると、汎用的、かつ明確な指標とはなりにくい可能性がある。主成分分析での 2 群の区分けが明確ではなかったことに対して、これらの要因が関係している可能性がある。一方、現在の月齢判別は、骨格の成熟度（骨の骨化）や赤身度から目視で判別する手法であることから、今回の研究手法と目視での判別をお互いの補完の目的で組み合わせることで、精度向上につなげることができると考えられた。

以上、本研究ではウシを 2 群に分け、餌と肥育時期の違いを判別できるかをそれぞれ検討し、ウシ血清中の無機元素情報を用いることで、肥育条件の相違とウシの肥育時期の相違に関して、判別手法の開発手順を示すことができた。さらに頑健な判別手法の確立には、血清中の無機元素以外の成分との組み合わせによる判別、複数の分析手法を組み合わせた判別が、各種識別に有効であると考えられる。また、本研究では、既に ICP-MS 半定量法の分析精度を確認した血清を用いて各種判別を行ったが、食品という観点から考えると、肉における元素含量を基にした判別を可能とするのが实际的である。今回の研究を踏まえて、今後は肉片など血清以外の分析対象部位での判別を検討していく必要があると思われる。

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

4-1 緒言

農作物などの産地判別では、すでに産地の分かっている試料の分析データを用いて判別モデルを作成し、そのモデルにより未知試料を判別する手法が用いられている。この手法の代表的なものに線形判別分析があるが、作成する判別関数が一次関数と簡易で理解しやすく、関数作成に使用した試料以外を予測した場合の精度と安定性の面で優れている。また、一度判別関数を作成すれば、表計算ソフトなどで未知試料の判別を行うこともできる(永田ら、2007)。

判別関数に用いる変数の数と変数の組み合わせは非常に重要である。測定したすべての変数を用いて判別関数を作成することも可能だが、その場合関数作成に使用した試料に対する判別率は高くなるが、未知試料の判別率が大きく下がる。一方、変数の数が少ないほど、未知試料の安定性は増すが、関数作成に使用した試料についての判別率は下がる(日本食品科学工学会、1996; 相島、1992)。また、採用する変数の数は、判別関数の作成に用いた試料数の1/3以下に収めることが望ましいと報告されている(宮下ら、1995)。このように、最適な変数の数と変数の組み合わせが判別率向上のポイントであり、選択する変数の数により、変数のデータを得るための分析に係る負担も大きく異なってくる。

そこでこの章では、第3章の肥育条件の分類の作成で用いた変数の有効性を調べるため、新たなウシ群の血清を測定し、3群のウシ群の判別率を検証した。併せて、汎用性のある変数の組み合わせを決める事はできないか検討を行った。

4-2 材料および方法

4-2-1 試料

日本獣医生命科学大学附属牧場富士アニマルファームで飼育されている27頭分の

乳牛血清を用いた（以下、日獣大ウシ）。各ウシ個体から採血後、凝固するまで室温におき、4000rpm、15分の条件で遠心分離した後、得られた血清をマイクロチューブに入れ-20℃の冷凍庫で保存した。

ウマ血清は日本の9つの地区で育てられた90頭から集めた。試料を集めた地域は、千葉、埼玉、東京、静岡および福島であり、試料を集めた時期は2011年12月から2012年12月であった。

静岡で収集された血液試料は静岡理工科大学に、その他の地域で収集された試料は日本獣医生命科学大学に冷蔵下で輸送され、20分間3000rpmで遠心分離を行った。血清試料は、エッペンドルフチューブに移され、-20℃で分析まで保管した。研究は、日本獣医生命科学大学の実験動物に対する倫理規定に従った実施した。

第2章で用いた細胞培養用ウシ血清を室内再現精度の検討で使用した。

4-2-2 試薬

第2章と同様に調製した。

4-2-3 分析方法

第2章と同様に実施した。

4-2-4 統計解析

ウシ血清およびウマ血清から得られた元素情報は、エクセル2003（マイクロソフト製）を用いて解析した。ウシ群およびウマ群での元素濃度は、平均値および標準誤差として表した。

ICP-MSで測定し算出した試料中の各々の元素濃度は、多変量解析に用いた。主成分分析および偏最小2乗判別分析はSIMCA-P+（Umetrics AB, Umeå, Sweden）を用いて実施した。主成分分析および偏最小2乗判別分析のスコアプロットとローディングプロットは標準化した情報を用いた。

マハラノビスの汎距離を用いた線形判別関数は、MULSEL 解析ソフトを用いて実施した。判別関数を構成する変数（元素）は、変数増加法を用い選択した。

室内再現精度の算出は、エクセル 2003（マイクロソフト製）を用いた。ウシ血清中元素濃度から平均値および標準偏差を算出した後、相対標準偏差を求めた。

4-3 成績と小括

4-3-1 第 3 章での肥育条件の分類で用いた変数の有効性の検証

今回の研究において、日獣大ウシから得られた血清中の 24 元素について、ICP-MS での半定量法により測定を行い、その結果を表 12 に示した。

表 12 日獣大ウシ血清中無機元素（24 元素）の分析結果

元素	平均値 (μ g/mL)	標準誤差 (μ g/mL)
Li	0.012	0.0007
Na	2870	22
Mg	20.1	0.4
Si	42.8	0.7
P	108	4
Cl	4900	36
K	159	3
Ca	96.4	0.6
Ti	0.225	0.009
V	0.014	0.0005
Cr	0.055	0.002
Mn	0.003	0.0002
Fe	1.79	0.14
Cu	0.703	0.021
Zn	0.790	0.021
Ge	0.005	0.0005
As	0.010	0.0003
Se	0.076	0.003
Br	11.1	0.3
Rb	0.138	0.003
Sr	0.077	0.002
Mo	0.015	0.0008
I	0.146	0.011
Ba	0.029	0.001

今回得られた日獣大ウシ群と第3章で測定した2つのウシ群、計3群から得られたウシ血清濃度について偏最小2乗判別分析を行い、そのスコアプロットを図14に示した。その結果、第1-第2主成分の固有値は1より大きく、第2主成分までの累積寄与率は81.0%であった。このモデルでの第2主成分までの R^2Y （モデル寄与率）は0.81、 Q^2Y （予測率）は0.80とどちらも0.5を超え、ウシ血清中の元素濃度により3群の肥育条件の識別が可能であることが示唆された。また、偏最小2乗判別分析でのローディングプロットを図15に示した。

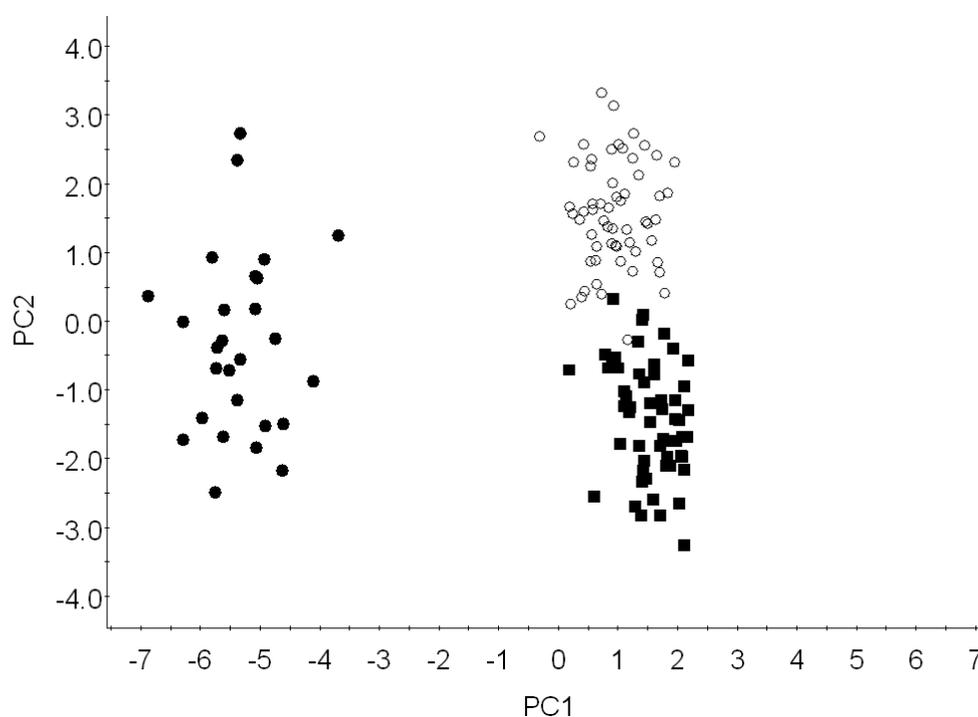


図14 肥育条件が異なる3群（135試料）のウシ血清中無機元素情報での偏最小2乗判別分析のスコアプロット。データは第1-第2主成分に基づいた。

（■：ハーブ牛、○：開拓牛、●：日獣大ウシ）

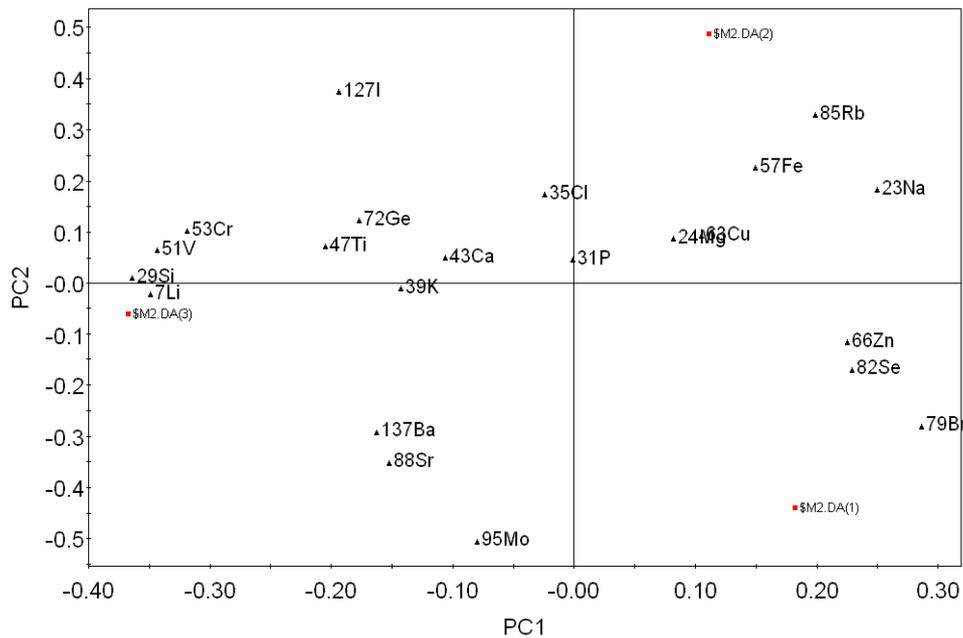


図 15 肥育条件が異なる 3 群（135 試料）のウシ血清中無機元素情報での偏最小 2 乗判別分析のローディングプロット。データは第 1-第 2 主成分に基づいた。

まず、第 3 章の肥育条件の分類で選択された変数、Br、Mo 及び I の 3 元素の有効性の検証のため、今回の日獣大ウシ群を加えた 3 群に対する 3 元素の分析データを用いて判別関数を作成した（表 13）。その結果、作成された判別関数は各々由来の試料を表 13 に示すとおり、90%以上の確率で分類することが可能であった。この 3 元素は、第 3 章での 2 群の肥育条件分類のため選択された変数であったが、日獣大のウシ群を加えた 3 群の判別に対しても、判別精度は全試料合計 96.5%と高いレベルであった。

一方、ウシ 3 群の全測定元素データを用いて、改めて 3 元素からなる判別関数を作成したところ（表 14）、Na、Si および Br が選択された。この判別関数での判別率は全試料合計 90.9%と、第 3 章の肥育条件の分類で選択された元素（Br、Mo 及び I）での判別関数より、判別精度が劣っていた（表 14）。

表 13 第 3 章の肥育条件の分類で選択された元素 (Br、Mo 及び I) から作成した判別関数と判別率

群名	試料数	判別率 (%)	判別関数
ハーブ牛	58	93.1% (54/58)	$0.325[\text{Br}] + 1084[\text{Mo}] + 82.8[\text{I}] - 21.1$
開拓牛	58	100% (58/58)	$0.171[\text{Br}] + 619[\text{Mo}] + 148[\text{I}] - 14.9$
日獣大ウシ	27	96.3% (26/27)	$-0.054[\text{Br}] + 1339[\text{Mo}] + 199[\text{I}] - 24.3$
計	143	96.5% (138/143)	—

表 14 3 群のウシ血清中無機元素から作成した判別関数と判別率

群名	試料数	判別率 (%)	判別関数
ハーブ牛	58	77.6% (45/58)	$-2.35[\text{Si}] + 0.108[\text{Na}] + 0.134[\text{Br}] - 158$
開拓牛	58	100% (58/58)	$-1.75[\text{Si}] + 0.110[\text{Na}] - 0.075[\text{Br}] - 165$
日獣大ウシ	27	100% (27/27)	$4.29[\text{Si}] + 0.049[\text{Na}] - 0.587[\text{Br}] - 159$
計	143	90.9% (130/143)	—

4-3-2 肥育条件分類における汎用性のある変数の組み合わせ検討

Na、Si および Br から作成した判別関数の判別精度が悪い理由として、Na などの多量元素は生命を維持するのに必要なため、生体内の元素濃度が一定に保たれており、食餌試料や肥育場所での影響を受けにくいと考えられた。

他方、Si は ICP-MS 分析での再現精度が悪いことの要因が考えられた。そこで、第 2 章の精度確認で用いたウシ血清を測定し、ICP-MS 測定での各元素の室内再現精度を算出した (表 15)。

Association of Official Analytical Chemists ガイドライン (2002) によると、

室内再現精度（相対標準偏差）の目安は、対象濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ で 6%、 $1 \mu\text{g/mL}$ で 8%、 $0.01 \mu\text{g/mL}$ で 15%である。表 15 に示した結果は、Si 以外の元素は基準を満たしていたが、同じ濃度レベルでも、元素により精度に差が見られることが分かった。また、ガイドライン内であっても、再現精度が優れた元素を変数として用いた方が、より判別での精度も上がることが予想された。

表 15 ウシ血清中無機元素（24 元素）の室内再現精度結果

元素	相対標準偏差 (%)
Li	3.7
Na	3.4
Mg	2.0
Si	10.3
P	1.8
Cl	3.5
K	1.3
Ca	3.5
Ti	10.3
V	10.1
Cr	12.2
Mn	(9.8)*
Fe	2.6
Cu	3.3
Zn	2.2
Ge	(19.3)*
As	14.2
Se	8.1
Br	2.4
Rb	1.8
Sr	2.5
Mo	6.4
I	4.6
Ba	2.1

*：定量下限以下のため、参考値。

農作物などの産地判別において、農作物中無機元素濃度は生産地での土壌の元素組成を反映し、土壌に含まれる成分は産地を判別する変数として選択される場合が多い。表 16 には、農作物の産地判別に用いられる変数（元素）を示した（Ariyama ら、2004: Ariyama ら、2007: Homura ら、2006: Kadokura ら、2010: Kadokura ら、2006: 門倉ら、2007a: 門倉ら、2007b: Hattori ら 2009: 鈴木ら、2007: Yasui 2009）。表 16 に示した元素は、地殻中に比較的多く含まれる元素と一致しており、生物材料においても群を分ける重要な変数になると考えられた。このことは、第 1 章のヒツジ血漿での分類の変数に Rb が選択されたことも裏付けの 1 つとなっている。ただし、Si は地殻中に一番多い元素であるが、1 品目も変数として選択されず、多量元素も変数として選択される割合が少なかった。

そこで、表 16 で 5 つ以上の品目で選択されている Mn、Rb、Sr、Mo および Ba が変数候補として有力であることが推察された。ただし、Mn の含有量は農作物中では多いが、血清中では少ないため検討対象から除外した。

表 16 農作物の産地判別に用いられる変数（元素）の例

	ネギ	黒大豆	タマネギ	カボチャ	ショウガ	一番茶	そば	乾しいたけ	アスパラガス	計
Li					●					1
Na	●		●					●		3
Mg			●			●	●	●		4
Si										0
P	●		●	●						3
Cl										0
K	●			●	●		●			4
Ca	●			●					●	3
Ti										0
V										0
Cr										0
Mn	●	●	●		●	●	●			6
Fe	●							●		2
Cu	●								●	2
Zn	●		●	●					●	4
Ge										0
As										0
Se										0
Br										0
Rb	●		●	●	●	●	●		●	7
Sr	●	●	●	●		●	●		●	7
Mo	●		●		●			●	●	5
I										0
Ba	●	●	●	●		●				5

第 3 章でのウシ 2 群の分類では、ハロゲン類として Br および I、第 1 章のヒツジ 3 群の分類では Br が変数として選択されている。

Br は地殻中で 3 番目、海水中に 2 番目に多い元素であることから、土壌や環境水中にも多く含まれ、また、穀類中にも多く含有している (Sakurai, 2006)。一方、一部の海藻類では、臭化物イオンから有機臭素化合物を合成する酵素を持っているとの報告があるが、哺乳動物においては、Br を含む酵素やタンパク質の存在の報告はまだされていない (桜井, 2005)。

I は母岩に比べ土壌中濃度は高いとの報告があるが、その理由として、長い年月の

間に雨水を通じて大気中の I が土壌に蓄積、また大気から植物に沈着した I が植物の枯れるのに伴い、土壌に移行したためと考えられている（桜井、2006）。氷河や洪水によって水で土壌が洗われた地域や降雨や昇華によって I が失われた地域では、土壌やそこで収穫される作物の I 濃度が低くなり、I 欠乏症発生の原因となる（糸川、2000）。農業活動では、主に動物の排泄、I を含有する肥料および農薬の使用により、I が土壌中に付加されると報告されている（World Health Organization、2009）。

このように、ウシ血清中 Br および I 濃度は土壌や環境からの影響を直接、または農作物由来の飼料を通して間接的に受け、その結果、判別関数での分類に寄与する変数となることが推察される。

以上のことから、以下の4条件を満たす変数の選択および組み合わせを検討した。

- ①多量元素を除外する（生体内において恒常性が保たれているため）
- ②室内再現精度が優れた元素を選択する
- ③土壌中に一定量含まれ農作物の分類変数として活用されている元素を選択する
- ④Br および I を選択する

その結果、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、全試料合計の判別率は99.3%であった（表17）。

表17 Br、Mo、Rb、Sr、I および Ba から作成した判別関数の判別率

群名	試料数	判別率(%)
ハーブ牛	58	98.3% (57/58)
開拓牛	58	100% (58/58)
日獣大ウシ	27	100% (27/27)
計	143	99.3% (142/143)

この判別率は、表 13 に示した第 3 章の肥育条件の分類で選択された元素 (Br、Mo 及び I) での判別関数の判別率 96.5%を上回った。さらに、改めて 6 変数からなる判別関数を作成した場合の判別率 97.2%をも上回った。

興味深いのは、農作物の産地判別では、Br および I などのハロゲン類が変数として選択されている品目がないことである。一方、ウシ血清の分類では Br 及び I を除いて判別関数を作成すると、表 17 に示した判別率が 83.9%と大きく下がってしまう。このことは、ウシ血清などの生物材料の分類では、農作物の無機元素を用いる場合と異なり、Br と I を加えることが非常に重要な点であることが示唆された。

4-3-3 Br、Mo、Rb、Sr、I および Ba の 6 元素を用いた判別関数での他の動物種への適用検討

この 6 元素を用いた判別関数が他の動物種へ適用できれば、動物種を超えた肥育条件分類の汎用的な手法として活用でき、動物種ごとの開発検討の負担が少なくなる。また、分析する元素も絞られるため、分析の負担を軽減でき、現場の検査体制も迅速に整える事が可能となる。そこで、6 元素を用いた判別関数の汎用性を検討するため、ウシ以外の動物種として、90 試料のウマ血清中無機元素を測定した(表 18)。続いてその分析データを用いて、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、判別関数による判別精度を調べた。

その結果(表 19)、96.6%以上の判別率でウマ群を含めた 4 群をそれぞれ分類することができ、全試料合計では 98.3%であった。6 元素から Br または I を除くと、判別率はそれぞれ、94.0、90.6%と下がることから、Br および I の重要性も再度検証することができた。

表 18 ウマ血清中無機元素の分析結果

元素	平均値 ($\mu\text{g/mL}$)	標準誤差 ($\mu\text{g/mL}$)
Li	0.020	0.002
B	0.201	0.011
Na	3500	40
Mg	23.7	0.4
Si	31.6	0.8
P	85.8	2.2
Cl	5030	43
K	167	3
Ca	118	1
Ti	0.119	0.006
V	0.009	0.0004
Cr	0.040	0.001
Fe	2.51	0.06
Cu	0.998	0.022
Zn	0.521	0.011
Ge	0.008	0.0003
Se	0.131	0.005
Br	25.3	2.5
Rb	0.157	0.010
Sr	0.258	0.009
Mo	0.013	0.001
I	0.022	0.0009
Ba	0.008	0.001

表 19 Br、Mo、Rb、Sr、I および Ba の 6 元素を用いた判別関数での判別率

群名	試料数	判別率 (%)
ハーブ牛	58	96.6% (56/58)
開拓牛	58	100% (58/58)
日獣大ウシ	27	100% (27/27)
ウマ	90	97.8% (88/90)
計	233	98.3% (229/233)

次に、ウマ群 90 試料は、9 つの異なる地域由来であるため、ウマ群を地域ごとに分類し、ウシ群と合わせ判別が可能か検証を行った。ただし、判別関数を作成するにあたり、各群由来の試料が 6 試料以上ないと使用するソフトでは分類できないため、5 群計 80 試料に対して検証を行った。その結果(表 20)、全試料合計 96.9%の判別率で 8 群をそれぞれ分類することができた。誤判別の割合はウシ群よりウマ群の方が高く、ウシ群全体での判別率は 99.3% (142/143)、ウマ群全体では 92.5% (74/80)であった。この理由として、ウシ群全体の試料数がウマ群よりかなり多く、ウシ群の情報がより反映された判別関数になっていることが考えられた。このことは、ウマ 5 群のみで作成した判別関数での判別率が 95.0%と上がることから示唆された(データは示さず)。さらに、6 元素から Br または I を除くと、判別率はそれぞれ、92.8、89.2%と下がり、ハロゲン類の重要性が再度確認できた。

表 20 Br、Mo、Rb、Sr、I および Ba の 6 元素を用いた判別関数での判別率

群名	試料数	判別率 (%)
ハーブ牛	58	98.3% (57/58)
開拓牛	58	100% (58/58)
日獣大ウシ	27	100% (27/27)
ウマ A	15	86.7% (13/15)
ウマ C	12	100% (12/12)
ウマ E	15	100% (15/15)
ウマ H	31	93.5% (29/31)
ウマ I	7	71.4% (5/7)
計	223	96.9% (216/223)

データは示していないが、ウシ 3 群とウマ 1 群 (90 試料) の計 4 群での主成分分析、ウシ 3 群とウマ 9 群の計 12 群での主成分分析において、どちらのスコアプロット上でも各群の分離が明瞭ではなく、一部重なりが見られた。同じ分析結果を用いて PLS-DA 分析を行ったが、各群の分離の改善は見られなかった。特に、12 群の分類では、群の数が多すぎるのと、3 試料以下の群が 4 つもあったことが、スコアプロット上の分離の低下につながったと考えられた。

一方、6 元素を用いた判別関数による分類は、ウマ群を地域で分けた場合でも 96% の確率で判別が可能であり、非常に優れた分類ツールであると考えられた。

以上のことより、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肥育条件分類が可能であり、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。今後は、ウシやウマ以外の動物種の血液を用いて、この 6 元素を用いた判別関数での分類手法の検証を行っていききたい。

総 括

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 および 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偏最小 2 乗判別分析を行った。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、主成分分析および偏最小2乗判別分析を行った。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。以上のことより、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、
土壌中無機元素の偏りに起因する風土病や食餌由来の無機元素の偏りに起因する疾患
(代謝病など)などの診断法の確立につなげ、獣医学分野へ貢献していきたい。

参考文献

- Almedia, C. M. and M. T. Vasconcelos. 2002. Advantages and limitations of the semi-quantitative operation mode of an inductively coupled plasma-mass spectrometer for multi-element analysis of waines. *Analytica Chimica Acta* 463: 165-175.
- Amarasiriwardena, C. J., B. Gercken, M. D. Argentine and R. M. Barnes. 1990. Semi-quantitative analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of analytical atomic spectrometry* 5: 457-462.
- Amarasiriwardena, D., S. F. Durrant, A. Lászity, A. Kvska, M. D. Argentine and R. M. Barnes. 1997. Semiquantitative analysis of biological materials by inductively coupled plasma–mass spectrometry. *Microchemical Journal* 56: 352-372.
- Association of Official Analytical Chemists Guidelines. 2002. AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals. 1-38.
- Ariyama, K., H. Horita and A. Yasui. 2004. Application of inorganic element ratios to chemometrics for determination of the geographic origin of welsh onions. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52: 5803-5809.
- Ariyama, K., Y. Aoyama, A. Mochizuki, Y. Homura, M. Kadokura and A. Yasui. 2007. Determination of the geographic origin of onions between three main production areas in japan and other countries by mineral composition. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55: 347-354.

- Bajorath, J. 2009. Chemoinformatics: Concepts, methods, tools, for drug discovery (methods in molecular biology). Humana Press, USA: New Jersey.
- Balaram, V. and T. G. Rao. 2003. Rapid determination of REEs and other trace elements in geological samples by microwave acid digestion and ICP-MS. Atomic Spectroscopy 24(6): 206-212.
- Baxter, M. J., H. M. Crews, M. J. Dennis, L. Goodall and D. Anderson. 1997. The determination of the authenticity of wine from its trace element composition. Food Chemistry 60: 443-450.
- Bayon, M. M., J. I. G. Alonso and A. S. Medel. 1998. Enhanced semiquantitative multi-analysis of trace elements in environmental samples using inductively coupled plasma mass spectrometry. Journal of Analytical Atomic Spectrometry 13: 277-282.
- Begam, B. F. and J. S. Kumar. 2012. A study on cheminformatics and its applications on modern drug discovery. Procedia Engineering 38: 1264-1275.
- Castillo, J. R., M. S. Jimenez and L. Ebdon. 1999. Semiquantitative simultaneous determination of metals in olive oil using direct emulsion nebulization. Journal of analytical atomic spectrometry 14: 1515-1518.
- Catarino, S., A. S. Curvelo-Garcia and R. B. Sousa. 2006. Measurements of contaminant elements of wines by inductively coupled plasma-mass spectrometry: A comparison of two calibration approaches. Talanta 15: 1073-80.

- Chen, H., E. D. Zlotorzynska, P. E. Rasmussen, N. Hassan and M. Lanouette. 2008. Evaluation of semiquantitative analysis mode in ICP-MS. *Talanta* 74: 1547-1555.
- Coetzee, P. P., F. E. Steffens, R. J. Eiselen, O. P. Augustyn, L. Balcaen and F. Vanhaecke. 2005. Multi-element analysis of south african wines by ICP-MS and their classification according to geographical origin. *Journal of analytical atomic spectrometry* 53: 5060-5066.
- Ealciani, R., E. Novaro, M. Marchesini and M. Gucciardi. 2000. Multi-element analysis of soil and sediment by ICP-MS after a microwave assisted digestion method. *Journal of analytical atomic spectrometry* 15: 561-565.
- Entwistle, J. A. and P. W. Abrahams. 1997. Multi-element analysis of soils and sediments from scottish historical sites. The potential of inductively coupled plasma-mass spectrometry for rapid site investigation. *Journal of Archaeological Science* 24(5): 407-416.
- Fujimori, E., K. Inagaki and H. Haraguchi. 1998. Multielement determination major-to-ultratrace elements in biological samples by analytical plasma spectrometry. *Japan analyst* 48: 57-67.
- Gómez, M. M. C., R. Brandt, N. Jakubowski and J. T. Andersson. 2004. Changes of the metal composition in German white wines through the winemaking process. A study of 63 elements by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 52(10): 2953-2961.

- Hara, K., Y. Kon, S. Sasazaki, F. Mukai and H. Mannen. 2010. Development of novel SNP system for individual and pedigree control in a Japanese Black cattle population using whole-genome genotyping assay. *Animal Science Journal* 81(4): 506–512.
- Hasegawa, T., K. Inagaki and H. Haraguchi. 2001. Multielement correlation analysis of major-to-trace elements in human blood serum for medical diagnosis as studied by ICP-AES and ICP-MS. *Analytical Sciences* 17(Supplement): i979-i982.
- Hattori, S., N. Funaki and Y. Houmura. 2009. Determination of the geographic origin of asparagus by inorganic analysis. *Nippon Shokuhin Kogaku Kaishi* 56: 108-113.
- Hobson, K. A. 1999. Tracing origins and migration of wildlife using stable isotopes: A review. *Oecologia* 120: 314-326.
- Homura, Y., T. Suzuki, H. Kosaka, H. Horita and A. Yasui. 2006. Determination the geographic origin of one grain of black soybean "Tanbaguro" by using inorganic elements composition. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 53 (12): 619-626.
- Hu, Y., F. Vanhaecke, L. Moens and R. Dams. 1997. Semi-quantitative panoramic analysis of industrial samples by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 355: 105-111.

- Jakubowski, N., R. Brandt, D. Stuewer, H. R. Eschnauer and S. Görtges. 1991. Analysis of wines by ICP-MS: Is the pattern of the rare earth elements a reliable fingerprint for the provenance?. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* 364(5): 424-428.
- Kadokura, M., Y. Homura, H. Watanabe, H. Horita, T. Suzuki and A. Yasui. 2010. Technique for Checking the Geographic Origin of Pumpkin by Inorganic Element Composition. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology* 57(2): 78-84.
- Kadokura, M., Y. Usui and K. Ariyama. 2006. Determination of the geographic origin and the cultivation method of dried shiitake mushroom by inorganic analysis. *Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi* 53 (9): 489-497.
- Kagawa, Y. 2011. Standard tables of food composition in japan 2010. Kagawa Education institute of nutrition, Japan: Tokyo.
- Kamata, H. 2003. Selenium functions and its application to the ruminant. *Eiyouseirikennkyukaihou* 47(1): 37-52.
- Katayama, K., T. Sato, Y. Ohta, H. Amao, T. Ozawa, P. R. Kenyon, T. Arai and H. Tazaki. 2012. Non-targeted analyses of animal plasma: Betaine and choline represent the nutritional and metabolic status. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition* DOI:10.1111/j.1439-0396.20110125.x

- Kelly, J. F. 2000. Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Canadian Journal of Zoology* 78: 1–27.
- Kim, K. H, N. Ishizaki, E. Iguchi, M. Funaba and T. Matsui. 2011. Effect of magnesium deficiency on various mineral concentrations in rat liver. *Biological Research on trace elements* 144(1-3): 865-871.
- Laursen, K. H., J. K. Schjoerring, J. E. Olesen, M. Askegaard, U. Halekoh and S. Husted. 2011. Multielemental fingerprinting as a tool for authentication of organic wheat, barley, faba bean, and potato. *The Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59(9): 4385-4396.
- Laursen, K. H., T. H. Hansen, D. P. Persson, J. K. Schjoerring and S. Husted. 2009a. Multi-element fingerprinting of plant tissue by semi-quantitative ICP-MS and chemometrics. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 24: 1198-1207.
- Laursen, K. H., T. H. Hansen, D. P. Persson, J. K. Schjoerring and S. Husted. 2009b. Recent developments in plant tissue analysis. *The Proceedings of the International Plant Nutrition Colloquium XVI UC Davis*.
- Lee, K., M. Oshima, T. Takayanagi and S. Motomizu. 2000. Simultaneous determination of trace elements in river-water samples by ICP-MS in combination with a discrete microsampling technique after enrichment with a chitosan-based chelating resin. *Analytical Sciences* 16: 731-738.

- Leng, A., Q. Xu, M. Xie, W. Zhang, Y. Bao, Y. Du, Z. Cheng, H. wang, X. Ying and T. Kang. 2011. ICP-MS determination of trace elements of different growth time in the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major. *Journal of Medicinal Plants Research* 5(19): 4843-4850.
- Madsen, R., T. Lundstedt and J. Trygg. 2010. Chemometrics in metabolomics A review in human disease diagnosis. *Analytica Chimica Acta* 659: 23-33.
- Massart, D. L., B. G. M. Vandeginste, S. N. Deming, Y. Michotte and L. Kaufman. 1988. *Chemometrics: a text book*. Amsterdam, Nederland: Elsevier.
- Matsuura, H. and H. Haraguchi. 2001. Multielement determination major-to-ultratrace elements in salmon egg by ICP-AES and ICP-MS. *Analytical Sciences* 17: i975-i978.
- Millour, S., L. Noël, A. Kadar, R. Chekri, C. Vastel and T. Guérin. 2011. Simultaneous analysis of 21 elements in foodstuffs by ICP-MS after closed-vessel microwave digestion: Method validation. *Journal of Food Composition and Analysis* 24: 111-120.
- Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. 2004. Physiological maturity of beef cattle carcasses terms of reference [homepage on the Internet]. Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries, Tokyo; [cited 30 December 2012]. Available from URL: http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/bse/b_kaigai/kentokai/00/index.html.

- Mochizuki M, R. Hondo and F. Ueda. 2002. Simultaneous analysis for multiple heavy metals in contaminated biological samples. *Biological Trace Element Research* 87: 211-223.
- Moreton, J. A. and H. Trevor. 1999. Use of Virkon as a disinfectant for clinical samples carrying a high risk of infection in inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of Analytical Atomic Spectrometry* 14: 893-894.
- Nakashita, R., Y. Suzuki, T. Korenaga, N. Watanabe and K. Tanaka. 2009. Stable isotope analysis for tracing the geographical origin of beef. *BUNSEKI KAGAKU* 58(12): 1023-1028.
- National Agriculture and Food Research Organization. 2009. Standard table of feed composition in Japan. Japan livestock industry association, Japan: Tokyo.
- Noel, L., J. Leblanc and T. Guerin. 2003. Determination of several elements in duplicate meals from catering establishments using closed vessel microwave digestion with inductively coupled plasma mass spectrometry detection: estimation of dairy dietary intake. *Food Additives and Contaminants* 20(1): 44-56.
- Numabe, T., N. Takada, H. Satoh, T. Oikawa, A. Kifune, K. Kameyama and T. Horiuchi. 1995. The sexing of bovine embryos by chromosomal analysis and polymerase chain reaction. *Japanese journal of embryo transfer* 17(3): 183-190.
- Rong, W. and H. Haraguchi. 1999. Multielement determination of major-to-ultratrace elements in river and marine sediment reference materials by

inductively coupled plasma atomic emission spectrometry and inductively coupled plasma mass spectrometry. *Analytical Sciences* 15: 729-735.

Rose, M., M. Baxter, N. Brereton and C. Baskaran. 2010. Dietary exposure to metals and other elements in the 2006 UK total diet study and some trends over the last 30 years. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment* 27: 1380-1404.

Saito, T., K. Tanoi, H. Matsue, H. Iikura, Y. Hamada, S. Seyama, S. Masuda and T. M. Nakanishi. 2008. Application of prompt gamma-ray analysis and instrumental neutron activation analysis to identify the beef production district. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry* 278: 409-413.

Sakurai, H. 2006. *The encyclopedia of Bio-elements*. Ohmsha, Japan: Tokyo.

Sasazaki, S., D. Hosokawa, R. Ishihara, H. Aihara, K. Oyama and H. Mannen. 2011. Development of discrimination markers between Japanese domestic and imported beef. *Animal Science Journal* 82(1): 67-72.

Sasazaki, S., H. Mutoh, K. Turifune and H. Mannen. 2007. Development of DNA markers for discrimination between domestic and imported beef. *Meat Science* 77: 161-166.

Sasazaki, S., T. Honda, M. Fukushima, K. Oyama, H. Mannen, F. Mukai and S. Tsuji. 2004. Genealogical relationship between pedigree and microsatellite information and analysis of genetic structure of a highly inbred Japanese black cattle strain.

Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 17(10): 1355-1359.

Smith, K. M., M. P. Dagleish and P. W. Abrahams. 2010. The intake of lead and associated metals by sheep grazing mining-contaminated floodplain pastures in mid-Wales, UK: II . Metal concentrations in blood and wool. *Science of the Total Environment* 408: 1035-1042.

Soldevila, J., M. E. Himri, A. Pastor and M. Guardia. 1998. Evaluation of operational parameters affecting semiquantitative multi-elemental analysis by inductively coupled plasma mass spectrometry. *Journal of analytical atomic spectrometry* 13: 803-807.

Suekawa, Y., H. Aihara, M. Araki, D. Hosokawa, H. Mannen and S. Sasazaki. 2010. Development of breed identification markers based on a bovine 50K SNP array. *Meat science* 85: 285-288.

Suzuki, M. and M. Sekine. 2007. The method distinguishing the source of food using the inorganic elements. 埼玉県産業技術総合センター研究報告 第5巻

Takahashi, F., M. Mochizuki, T. Sato, K. Katayama, P. R. Kenyon, S. T. Morris, P. D. Kemp, T. Ozawa, F. Ueda and H. Tazaki. 2013. Semiquantitative multi-analysis of plasma obtained from Romney lambs (*Ovis aries*) by inductively coupled plasma mass spectrometry, and the classification according to feed type. *Animal Science Journal* 84(6): 496-501.

Tanabe, S., M. Hase, T. Yano, M. Sato, T. Fujimura 2007. A real-time quantitative PCR detection method for pork, chicken, beef, mutton, and horseflesh in foods. *Bioscience Biotechnology Biochemistry* 71(12): 3133-3135.

Underwood, E. J. 1981. *The mineral nutrition of livestock*, 2nd edn. Commonwealth Agricultural Bureaux, UK: Wallingford.

User's Guide to SIMCA-P+12.0. 2008. Umetrics AB, Umeå: Sweden.

Voncina, D. B. 2009. Chemometrics in analytical chemistry. *Nova Biotechnologica* 9(2): 211-216.

Wang, T., J. Wu, R. Hartman, X. Jia and R. S. Egan. 2000. A multi-element ICP-MS survey method as an alternative to the heavy metals limit test for pharmaceutical materials. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 23: 867-890.

Whitfield, P. D., P. J. M. Noble, H. Major, R. J. Beynon, R. Burrow, A. I. Freeman and A. J. German. 2005. Metabolomics as a diagnostic tool for hepatology: validation in a naturally occurring canine model. *Metabolomics* 1(3): 215-225.

Xu, J. and A. Hagler. 2002. Chemoinformatics and drug discovery. *Molecules* 7: 566-600.

Yamanaka, M., T. Kudo, Y. Itagaki, S. Sato and T. Nakamura. 1999. Sex identification of beef by polymerase chain reaction. *Animal Science Journal* 70(8): J1111-J1113.

Yasui, A. 2009. Prospect in determination method for the geographic origin of food. *Shokueishi* 50(5): 191-197.

Zhao, T. T. Chen, Y. Qiu, X. Zou, X. Li, M. Su, C. Yan, A. Zhao and W. Jia. 2009. Trace element profiling using inductively coupled plasma mass spectrometry and its application in an osteoarthritis study. *Analytical Chemistry* 81(9): 3683-3692.

Zuluaga, J., N. Rodríguez, I. Rivas-Ramirez, V. Fuente, L. Rufo and R. Amils. 2011. An improved semiquantitative method for elemental analysis of plants using inductive coupled plasma mass spectrometry. *Biological Research on trace elements* 144(1-3): 1302-1317.

相島鐵郎. 1991. ケモメトリックス. *化学と生物* 29(7): 424-432.

相島鐵郎. 1992. ケモメトリックスー新しい分析化学ー. 丸善株式会社, 東京

荒川泰昭. 2009. 生体内微量元素. *臨床検査* 53(2): 149-153.

糸川嘉則. 2000. 最新ミネラル栄養学. 健康産業新聞社, 東京

上本道久(監修), 日本分析化学会関東支部(編集). 2009. ICP 発光分析・ICP 質量分析の基礎と実際. オーム社, 東京

門倉雅史, 有山薫. 2007a. 無機分析によるショウガの原産国判別法の開発. *農林水産消費安全技術センター調査研究報告* 31: 8-15.

門倉雅史, 有山薫. 2007b. 無機分析によるニンニクの前産国判別法の開発. 農林水産消費安全技術センター調査研究報告 31: 1-7.

桜井弘. 2005. 元素 111 の新知識. 講談社, 東京

杉山高一. 1983. 多変量データ解析入門. 朝倉書店, 東京

田中豊, 垂水共之, 脇本和昌. 1984. パソコン統計解析ハンドブック II 多変量解析編 共立出版, 東京

永田忠博, 後藤哲久, 丹野憲二, 安井明美, 湯川剛一郎. 2007. 食品分析法の妥当性確認ハンドブック. サイエンスフォーラム, 東京

日本食品科学工学会 新・食品分析法編集委員会編. 1996. 新食品分析法. 光琳, 東京

日本薬学会編 2010. 衛生試験法・注解 2010. 金原出版, 東京

宮下芳勝, 佐々木慎一. 1995. ケモメトリックス: 化学パターン認識と多変量解析, コンピュータ・ケミストリーシリーズ 3. 共立出版株式会社, 東京

柳井久江. 2008. Practical multivariate analysis greates utilities on excel. オーエムエス出版, 東京

涌井良幸, 涌井貞美. 2008. 図解でわかる多変量解析. 日本実業出版社, 東京

謝 辞

本研究を遂行し学位論文をまとめるのにあたり、懇篤なご指導とご高配を賜りました日本獣医生命科学大学獣医学科生体分子化学教室、田崎弘之教授に厚く御礼申し上げます。また、本研究全般および学位論文をまとめるのにあたり多大なご支援、ご指導を賜りました日本獣医生命科学大学獣医保健看護学科、小林(望月)眞理子准教授に厚く御礼申し上げます。研究全般において有益なご示唆を頂いた日本獣医生命科学大学獣医学科獣医公衆衛生学教室、植田富貴子教授、日本獣医生命科学大学動物科学科、小澤壯行教授、日本獣医生命科学大学獣医学科生化学教室、新井敏郎教授、日本獣医生命科学大学獣医学科生体分子化学教室、片山欣哉准教授および佐藤稲子助教に深く御礼申し上げます。ヒツジ血漿の提供をいただいたマッセイ大学 P. R. Kenyon 教授、S. T. Morris 教授および P. D. Kemp 教授に感謝いたします。ウマ血液からの血清分離に協力いただいた静岡理工科大学物質生命科学科、齋藤明広准教授に感謝いたします。また、本大学院での研究を勧めていただいた一般財団法人日本食品分析センター、西村勉理事に深く感謝いたします。

結びに、本研究に関わる各種実験およびその解析などにご尽力を賜りました日本獣医生命科学大学獣医学科生体分子化学教室在籍室員のみなさま、一般財団法人日本食品分析センター無機試験部のみなさまに衷心よりお礼申し上げます。

Summary

The utilization of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) can be obtained information on multiple elements covering the entire mass range from lithium (Li) to uranium (U) on the condition of low cost, simple operation and short analysis time, which can also be obtained information on the definite amount of inorganic elements even if small samples (<0.1mL). Consequently, these methods have been assumed one of the useful techniques for chemometric analysis requiring a large amount of measurement data. Study on the development of a rapid analytical method for inorganic element was performed using semi-quantitative analysis which is one of the measurement systems of ICP-MS.

In this study, this method was applied to plural biological samples, and the measuring data obtained from this method was analyzed, it was employed to examine whether the type of feed and the type of disease could be classified. As a definitive purpose, we would like to lead the novel development of these techniques for applications in the fields of veterinary medicine and animal husbandry.

1. The analysis of multiple elements for biological samples using semi-quantitative analysis by ICP-MS and the investigation of the applicability for chemometrics analysis.

This chapter was placed to the preliminary experiment for this study, it was performed to examine whether the biological samples could be measured by using semi-quantitative analysis by ICP-MS. Also it was performed to investigate whether the type of the feed stuff could be distinguished by the data from multiple elements in plasmas obtained from lambs, or whether the difference of depilation disease could be distinguished by the data from multiple elements in serum obtained from dogs. Multiple elements in plasma obtained from Romney lambs (*Ovis aries*), younger than 1 year old, fed by different feed were simultaneously measured by ICP-MS. It was employed to examine whether the type of feeds could be distinguished using the multivariate data. Twenty elements in plasma obtained from lambs were analyzed by a semi-quantitative method of ICP-MS, obtained data were then analyzed by principal component analysis (PCA). As a result, the lambs were divided into three groups on a score plots depending on the different conditions, it was suggested to be distinguished the fattening conditions. Discriminant analyses of

the elements were performed using linear discriminant analysis (LDA) with forward stepwise regression, the following discriminant function was made by Br and Rb.

The accuracy of classification of each group, as shown by 10-fold cross-validation, proved the effectiveness of the established discriminant function.

On the other hand, it was employed to examine whether the disease groups could be distinguished using the information of multiple elements in serum obtained from depilation disease dog and normal dog. As a result, the distribution of a score plots based on PCA was not able to classify clearly to two categories depending on disease. Although the discriminant analyses of the elements were performed using LDA, and discriminant function was made by Rb and Sr, some discrimination rate was less than 90%. Because the concentrations of macroelement such as Na, K and Ca were lower than the concentrations of these elements in blood of normal mammals, it was thought to be required for the verification of accuracy and the improvement of the low result of macroelement by using semi-quantitative ICP-MS analysis. Also the differences of classification contribution by each sample were seen, it was thought that the quality of data from multivariate analysis was needed to investigate the applicability for PCA and discriminant function. In chapter 2, we

were performed the verification of accuracy of multiple elements in biological samples using semi-quantitative ICP-MS analysis.

2. The verification of the accuracy for multiple elements in biological samples using semi-quantitative analysis by ICP-MS.

The comparison of measurement data for bovine serum by semi-quantitative analysis with full-quantitative analysis that was fully utilized as traditional analysis, and the verification of analytical results using semi-quantitative ICP-MS were performed. Both semi- and full-quantitative analysis by ICP-MS was performed for bovine serum. The ratio of concentrations (%) was calculated as a comparison of each method against the other. The ratio of the concentrations from a total of thirty-seven elements ranged from 85.0% to 118%, except for K and Ca. While the analytical results obtained for K and Ca using the semi-quantitative analysis was shown low concentrations, each ratio was 65.3% and 44.0% in comparison with the ratio of the concentrations from full-quantitative analysis. The accuracy could be improved by adding both elements to the calibration standard when performing semi-quantitative analysis for K and Ca (the ratio of concentration for

full-quantitative analysis, K: 106%, Ca: 95.1%). Additional recovery tests were performed to evaluate accuracy by semi-quantitative analysis for bovine serum. The results of the recovery test for K and Ca were $103 \pm 5.8\%$ and $96.6 \pm 5.8\%$, and the results of the recovery test for multiple elements except for K and Ca ranged from 88.6% to 118%. From additional recovery tests and the comparison with full-quantitative analysis, it was shown that the measurement data obtained from bovine serum by using semi-quantitative method were accurate.

3. The classification of the fattening condition and the fattening period using the bovine serum

It was performed to investigate whether the fattening region and the feed stuff (the following; the fattening condition) could be distinguished by the data from multiple elements in serum obtained from cattle (Holsteins, 16.3-21.3 months of age) using ICP-MS method evaluated accuracy with chapter 2. Twenty-four elements in serum obtained from cattle were analyzed by a semi-quantitative method of ICP-MS. The data were then analyzed by PCA and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA). As a result, the cattle were divided into two groups on a score plots

depending on the different conditions. Discriminant analyses of the elements were performed using LDA with forward stepwise regression, the following discriminant function was made by Br, Mo and I. This discriminant function classified the samples from each group for the fattening condition and for the fattening period by nearly 100% probability.

As second approach, to investigate whether the types of the fattening period for cattle could be distinguished using the data of elements in the serum, the samples and analytical results using in first approach were reclassified as fattening middle group (N=38) and fattening final group (N=78). PCA and PLS-DA were carried out for data obtained from cattle, the cattle were divided into two groups on a score plots depending on the fattening period though the overlap on figure was seen. Discriminant analyses of the elements were performed using LDA, the following discriminant function was made by P, Ca, Ti and Se. The discriminant function classified the bovine serum from each group by 100% probability.

In this study, same multivariate data was used for the classification of the fattening condition and the fattening period. If the condition which divide each group differed, the behavior of elemental conditions also differed among each group,

it was suggested that the utilization of classification responded to each purpose was effective.

4. Selection examination of the variables (elements) in the classification for the fattening condition using a linear discriminant function

Because the development of the selection of the most suitable variables and the combination of variables were taken a large burden whenever a sample changes, it was performed to investigate whether the combination of fixed flexible variables would be possible. When the serum of cattle groups (a total of 27 samples) was newly measured, and the measuring data to a total of three groups of a cattle group and two cattle above-mentioned groups was classified, the discriminant function using Br, Mo, Rb, Sr, I and Ba had the highest distinction accuracy, and the distinction rate was 99.3%. By the classification of biological samples such as bovine serum, it was suggested that the selection of halogen such as Br and I was a very important.

It was performed to investigate whether discriminant function using 6 elements could be used as flexible technique for all animal species, multiple elements in

serum from horses (90 samples) were measured. As a result, creating the discriminant function to a total of four groups of a horse group and three cattle above-mentioned groups were classified the bovine serum from each group by 98.3% probability. Discriminant function using Br, Mo, Rb, Sr, I and Ba could be classified according to the high accuracy of cattle three groups and a horse group, it was shown that this technique was possible to flexibly use even if different animals species are classified.

In chapter 2 of this study, for semi-quantitative method that had few performed example and full-quantitative that had lots of performed example, the usefulness of measurement data obtained from semi-quantitative method can be made clear according to evaluate the accuracy in bovine serum. The research of classification and discrimination was performed easily and quickly by using this method, which is thought to be able to promote the establishment of more classification systems. Because the composition of the inorganic elements was different for different types of samples, the elements and the concentrations in the optimal calibration standard needed to change with the types of samples. Preparation of the calibration standards

that were able to ensure the accuracy of measuring elements in the different sample types was necessary.

Since macroelement in plasma and serum of animals are high concentration in vivo, and those concentrations should stay constant in metabolism in vivo, it was suggested that macroelement were difficult to become the index of discrimination. On the other hand, it is expected that the variation of trace elements takes place other factor (the fattening condition and the environment condition) rather than metabolism in vivo, trace elements was suggested to be important variable quantities for the classification of plural groups. As the reason the characteristics to be inspected of elements for animals are restricted macroelement, it was thought that the elemental concentration except for macroelement in blood is low, and the measurement sensitivity with generic method is low. The utilization of ICP-MS was taught us the fluctuation of trace elements that did not become measuring objects, and which might lead to the development of robust discriminant technique and the discovery of novel function for trace elements.

In chapter 3, two kinds of group divisions such as the fattening conditions and the fattening period were performed using multivariate data set from same serum

samples. There were significant differences ($p < 0.05$) in all trace elements on the fattening condition. But on the fattening period, there were no significant differences ($p < 0.05$) in trace elements such as Mo and I which were selected as variables of discriminant function in fattening condition. The behavior of multiple elements in serum for the fattening condition and for the fattening period was suggested to differ completely, it was shown that the utilization of classification system responded to each purpose was possible.

In chapter 4, the discriminant function in the variables that consists of elements contained in given quantity in soil could be made clear to be utilizable also for distinction of the fattening conditions of different animal species. The utilization of flexible variables could be reduced the burden of the development every samples or every animal species, and it was suggested to be rapidly enabled the introduction of inspection technique.

A rapid analytical method for inorganic element using semi-quantitative analysis data can be used in studies of pet animals and domestic animals, and a novel disease diagnosis and a method for distinguishing domestic animals fed special feeds can be developed. As a definitive purpose, we would like to lead the novel development of

these techniques for applications in the fields of veterinary medicine and animal husbandry.