

有蹄類家畜ヒツメ試料に対する無標準定量法の開発

世良耕一郎、鈴木一由¹、田口 清¹、伊藤じゅん²
後藤祥子³、高橋千衣子³、齋藤義弘³

岩手医科大学サイクロトロンセンター
〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

¹ 酪農学園大学獣医畜産学部
〒069-8501 北海道江別市文京区緑町 582

² 日本アイソトープ協会学術部研修課
〒113-8941 東京都文京区本駒込 2-28-45

³ 日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
〒020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

1 はじめに

我々は、血清・毛髪・臓器など様々な試料に対する「無標準法」の開発を進めてきた¹⁻⁴。ヒトツメ試料に対しても、特に有害元素による人体曝露調査研究の目的で開発を行い⁵、無調製のツメ試料の定量分析が可能となっている。これらの方法の開発により試料調製の手順が著しく簡略化され、さらに1 μL、1 mg以下の微量試料の定量分析が可能となったため、種々の試料に対する「無標準法」は基礎・臨床医学、環境学の分野において広く利用されている。一方では、ヒト以外から採取される生物試料の定量分析の需要が高まっている。特に環境学の分野においては、Phytoremediation（植物による環境浄化）を利用した環境浄化の研究がNMCCにおいても数グループにより行われ、モエジマシダなどHyper accumulatorと呼ばれる植物の分析が行われている⁶。我々は、灌漑用水に含まれる有害元素の農作物への移行を調べるため、「生きたままの植物に対する無標準定量法」の開発に

着手している。また環境モニタリングのため、野鳥の羽毛、臓器、魚類の臓器などの分析も始められている。特に動物類から採取される試料は微小なものの、試料調製に手間のかかるものが多く、無標準法の開発が望まれる。

獣医学の分野においては、共著者の一人(鈴木)を中心として被毛の分析が行なわれ、種々の疾患と体内元素濃度との関連が明らかにされた⁷⁻¹⁰⁾。さらに二年ほど前から、家畜の健康管理のために有蹄類家畜のヒヅメ試料の分析が行われている。従来わが国においては、有蹄類家畜は屋内で飼育されることが多かったが、近年は屋外飼育が普及し歩行傷害が問題となってきた。近年の有蹄類家畜の体重増加も歩行障害の一因であり、ヒヅメの状態は歩行傷害と密接な関連があることが知られている。体重増加により末梢血液循環不足が生じ、それが蹄の角化不全をもたらす。さらにヒヅメ中の元素濃度は、体毛と同様に体内元素濃度分布を反映するため、体調管理に重要な情報を与えるものと期待される。汚れ易い被毛と比べ、ヒヅメ試料の中央部は外的環境からの影響を受けにくい、という利点もある。有蹄類家畜に対しては、健康維持・適切な歩行の維持のため定期的な **hoof cutting** が施行されており、適度な厚さの試料が定期的に得られるのも利点である。ヒヅメはヒトツメとは異なり、多量のきれいな試料を容易に採取できる利点があるが、試料調製に手間がかかり、さらに「硝酸灰化法」が必要なためハロゲンなど揮発性元素が失われる。体内ハロゲン族元素濃度は家畜の健康状態と密接な関係があるため、その情報も失われてはならない。以上の観点から、ヒヅメ試料に対する「無調製・無標準法」の開発に着手した。

2 実験方法

2.1 試料採取及び調製

上述のように、ウシなどの有蹄類家畜の蹄に対しては、健康管理のため定期的に **cutting** が行われている。Cutting の際には、底から順に 1 mm ほどの厚さで切り出され、蹄の形状が整えられる。そのため内部の試料は外部の汚染の影響を受けない清浄な状態で、1 mm 前後の厚さで切り出される。スライスされた蹄試料は成長に応じた縞状の構造を有しており、外側の外層は茶色に変色し半ば無機化した状態となっているが、内側の中層は半透明な白色で、僅かな弾力性も有している。境界は明確であり、それらは別々に測定される。

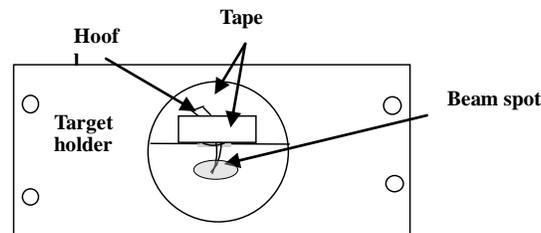


Fig.1 Schematic view of a hoof sample on the holder. A hoof is cut so as to taper it to a point and is hung at the center of a target holder. Only the top of the nail is irradiated by a proton beam.

無調製・無標準法のためのヒヅメ試料は、ヒトツメ試料の場合と同様⁵⁾、先細りになるように切り出され、先端の薄い部分のみにビームが当るよう、上から垂れ下げてターゲットとする(図1)。

このような条件化においては、ビームのエネルギーロス、X線の自己吸収による影響は小さいものと期待される。切り出されたヒヅメ試料は、アセトン中で60分間超音波洗浄された。ヒトツメ試料の場合、蒸留水中の洗浄ではCl、K、Brなどの元素が漏出することが確認されており、アセトン中の洗浄が適当であると確認されたため⁵⁾、ヒヅメ試料においてもその条件が踏襲された。

ヒヅメ試料の無標準法のための変換係数を決定するために、試料は硝酸灰化・内部標準法においても測定された。そのための試料は、無調製・無標準法の試料においてビームが当る先端部を取り囲む円形の部分が30 mgほど切り出された。内部標準として原子吸光分析用標準In溶液がIn=1000 ppmになるよう加えられ、圧力容器中で濃硝酸とともに電子レンジで加熱され灰化が行われた¹¹⁾。

2.2 照射及び測定条件

サイクロトロンにより加速された8.3 MeV H_2^+ ビームは、2枚のTiフォイル、He雰囲気中で減速され、2.9 MeVの陽子ビームとなり、6 mmφにグラファイトコリメータで整形され、試料を照射する。ビーム電流は、無調製・無標準法、硝酸灰化法、いずれの場合もおよそ80 nAであった。

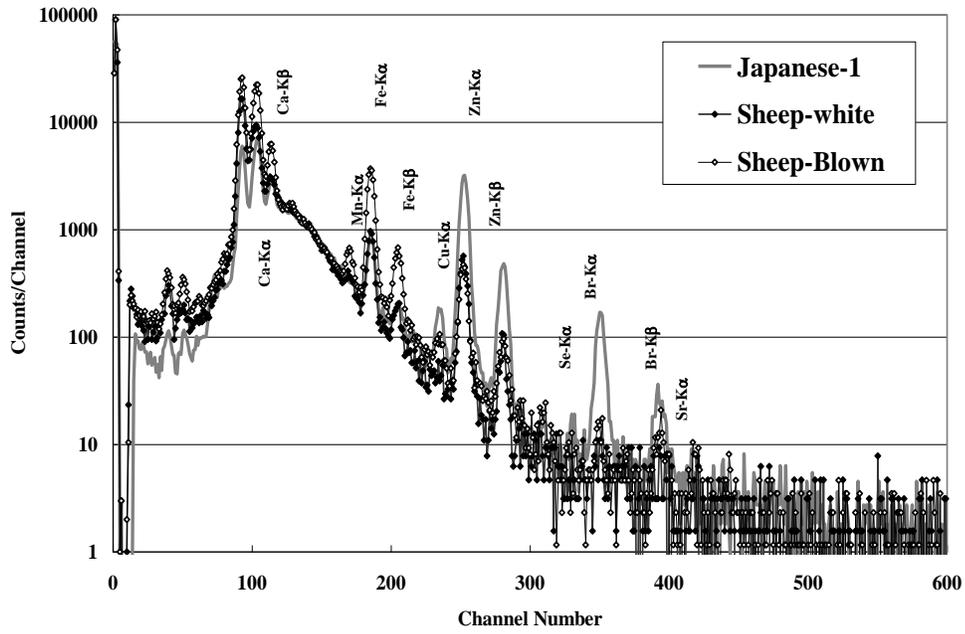
試料から発生するX線は、2台のSi(Li)検出器で測定されるが、一方(検出器1)の窓には300 μm Mylar filmがX線吸収体として装着され、K(カリウム)以上の中・重元素からのX線を測定する。もう1台(検出器2)は吸収体を用いず、Na~Caまでの軽元素分析を目的とするが、計数率を調整するため2 mmφのグラファイトコリメータとともに用いられる。この「2検出器同時測定システム」により、全元素の短時間同時分析が可能となる¹²⁾。検出器1に装着される吸収体は、ヒトツメ試料の無調製・無標準法のために用いた300 μm Mylar filmであり、ヒトツメとヒヅメ中の主元素構成がほぼ同等であると予想されることから選択された。

2.3 ヒヅメ試料に対する無標準法

図2 a-d)に、4人の人物(日本人、フィリピン人)から採取されたヒトツメ試料と、4種の有蹄類家畜(羊・ポニー・仔牛・乳牛)から採取されたヒヅメ試料との比較を1対1で行う。ヒヅメに関しては、外層の茶色の部分と、中層の白色部とを分けて比較する。これらの図から、ヒヅメはヒトツメと比べ、Kが多くZnとCuが少ない傾向が見られる。外側の茶色の層(外層)と内側の白色の層(中層)との比較においては、前者がCa, Mn, Fe, Cuを多く含むことが分かる。だが連続X線の形状は、ヒヅメとヒトツメにおいてほぼ同一であることが確認できる。例外はフィリピンの零細鉱業鉱夫から採取されたツメ試料(図2-d)であり、これには細かい傷の中に金属紛が埋め込まれ除去困難であったため、金属元素のピークが突出し連続X線の形状が影響を受けていると解釈できる。PIXEスペクトルの中・高エネルギーにおいて支配的なSEB(二次電子制動放射)の形状は、特にその高エネルギー領域において重元素濃度に大きく影響を受けることが知られており¹³⁾、そのため形状に差異が生じたものであり例外的なケースと言える。他のヒトツメとの比較においては、ヒヅメ試料からの連続X線の形状はほぼ一致しており、このことからヒトツメのために開発された無標準法が、多種の有蹄類家畜から採取されたヒヅメ試料にも適用可能であることが予測される。

無標準法の手順は、以前に報告を行ったものと同様である¹³⁾。図3に、無標準法の解析に使用される連続X線領域を斜線で示す。このスペクトルは乳牛のヒヅメ(白色)を2.9 MeV陽子で照射し、検出器1において300 μm Mylar吸収体を用いて得られたものである。図中に示すように、2.6-15.2 keVの領域の連続X線収量 Y_{CX} が、その領域の全X線収量から全てのピーク終了を差し引くことにより求められる。指標元素としてはヒトツメやヒト毛髪と同様Znが指定されたが、Znは

a)



b)

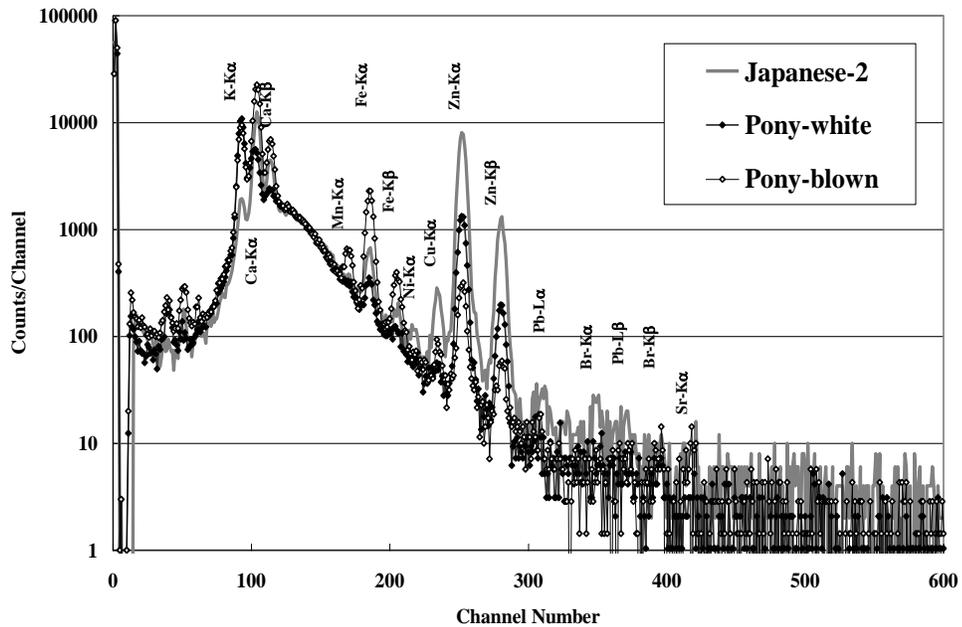
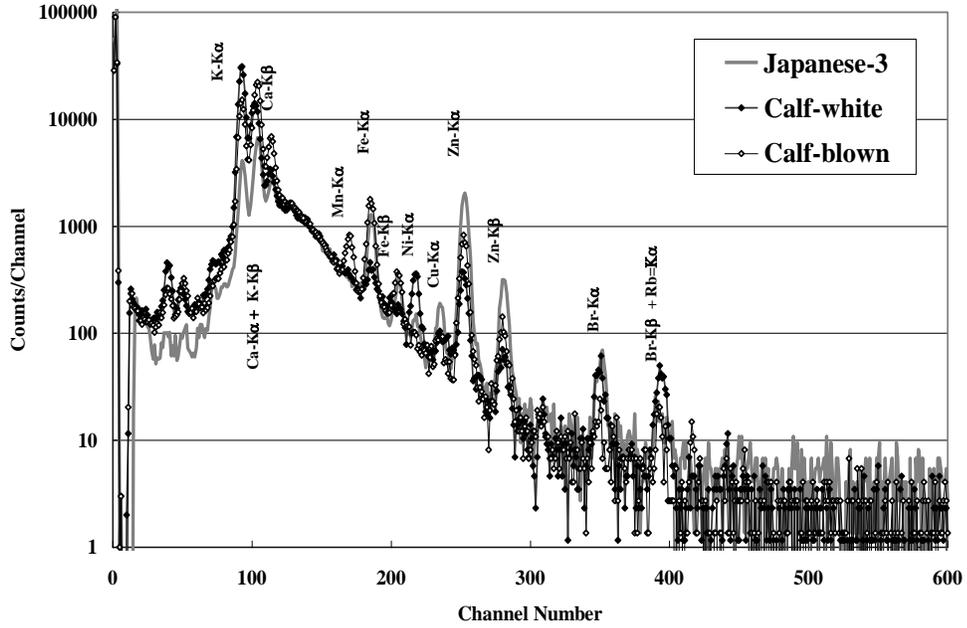


Fig. 2 a, b) Comparison of X-ray spectra between nail samples taken from Japanese persons ; Japanese-1 (a) and Japanese-2 (b), and a hoof samples taken from a sheep (a) and a pony (b), where a 300 μ m Mylar film was used as an X-ray absorber.

c)



d)

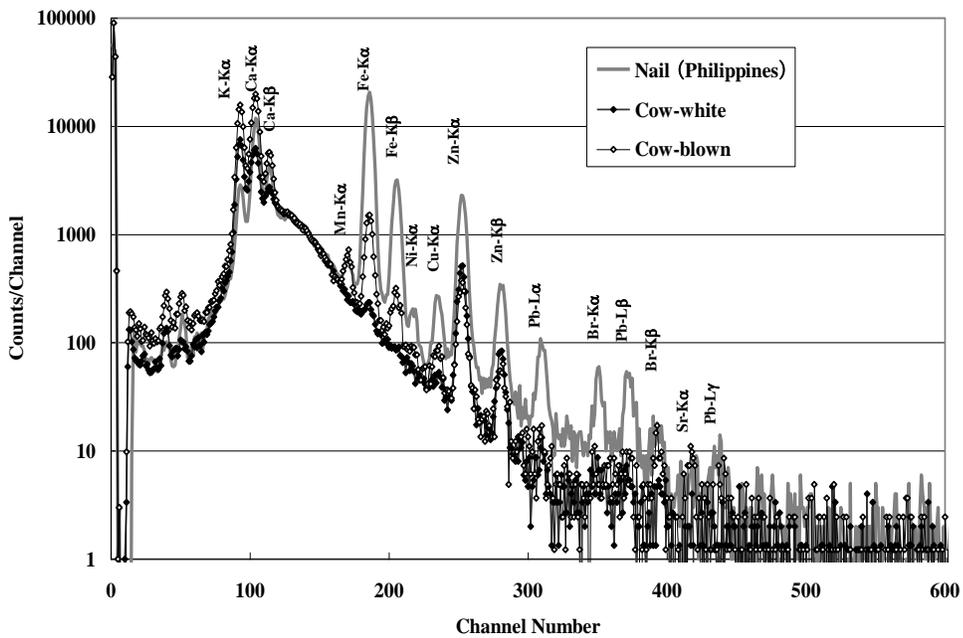


Fig. 2 c, d) Same comparisons as those in Fig. 2 a, b) but for a nail samples taken from a Japanese-3 (c) and a Philippine person (d), and hoof samples taken from a calf (c) and a cow (d).

全てのヒツメ試料に一定以上の濃度で安定して存在するため、指標元素に適している。添字 S で指定される指標元素の濃度 C_S は指標元素ピーク収量 Y_S の Y_{CX} に対する比 $R_S = Y_S/Y_{CX}$ から、変換係数 K_S を用いて $C_S = R_S \cdot K_S$ により求められる。変換係数に関しては、無標準法ターゲットの Zn 濃度の結果と、ビーム照射部の周囲を切りぬき硝酸灰化・内部標準法を適用したターゲットのそれを数試料比較することにより求められるが、図 2 においてヒツメとの類似性が確認されているため、ヒツメと同様の値をまず使い、比較を行なうことにより修正する方針とした。無標準法の精度は、4 種の有蹄類家畜から採取された 28 ヒツメ試料において内部標準法の結果と比較を行なうことにより、確認される。

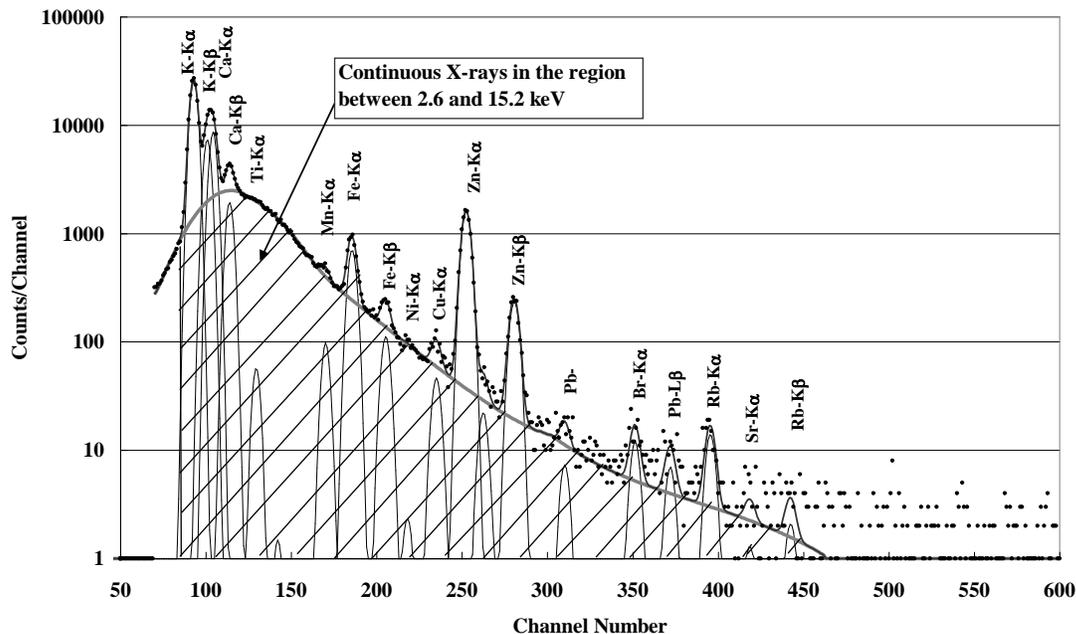


Fig. 3 Procedure for the standard-free method for a hoof sample. All peak functions are subtracted from the spectrum in the region between 2.6-15.2 keV indicated by the shadowed portion and the total yield of continuous X-rays Y_{cx} is obtained. Zinc was designated as the index element in the same manner as in the case of human nails

3 結果と議論

図 4 に、ヒツメ試料中の無標準法と内部標準法で求めた Zn 濃度を、比較して示す。ヒツメ試料はいずれも中層の白色部で、乳牛(n=11)、仔牛(n=12)、羊(n=3)、ポニー(n=2) の計 28 試料である。内部標準法の結果は、上述のように無標準法の照射部の周囲を切りぬいた試料に対し、硝酸灰化・内部標準法を適用して求めたものである。両法による結果は、殆ど全ての試料に対し実験誤差の範囲内で互いに一致し、ヒツメに対して確立された無調製・無標準法が、修正なしでヒツメ試料にも適用可能であることが確認された。

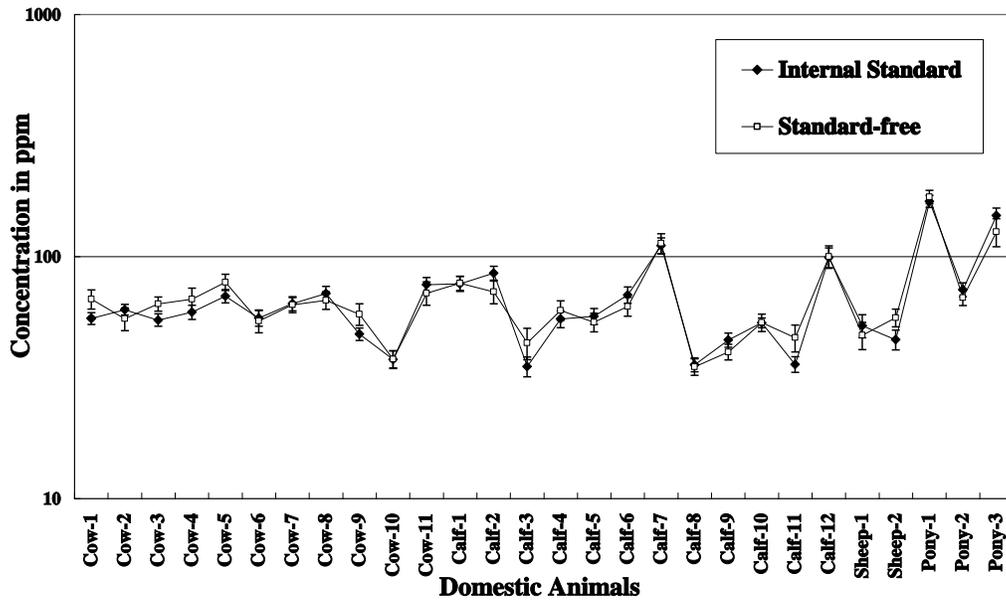


Fig. 4 Zinc concentration in 28 white hoof samples taken from cow (n=11), calf (n=12), sheep (n=3) and pony (n=2), where the results obtained by the present method are compared with those obtained by the internal-standard method combined with chemical ashing method.

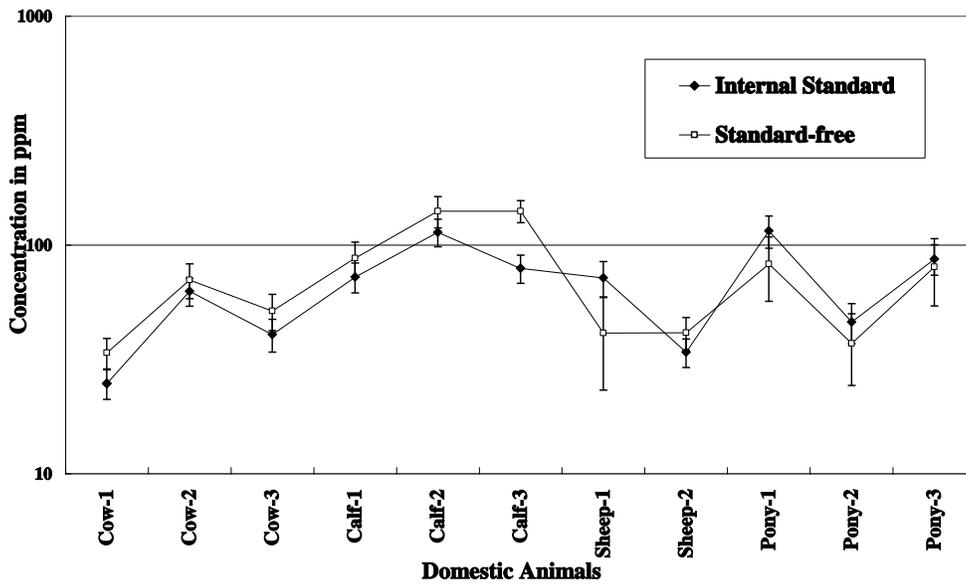


Fig. 5 Same as Fig. 4 but for 11 blown hoof samples taken from cow (n=3), calf (n=3), sheep (n=3) and pony (n=3).

図5には同様の比較を11の茶色(外層)ヒヅメ試料に対して示す。図から、特に乳牛と仔牛において、両法の一致が悪いことが分かる。茶色の外層部は外部に近接し、土などの成分のコンタミ、さらに機械的損傷により無機化が進んでいるものと推測される。図2に見られるように、Ca、Fe、Mnなどが高濃度に集積し、それが連続X線の形状、さらに無標準法の精度に影響を与えているものと思われる。しかし体内元素濃度分布などの獣医学的情報は白色部の中層から得られるため、中層に対する精度が確認された本法は、有蹄類家畜の健康管理に極めて有効な方法であると言える。

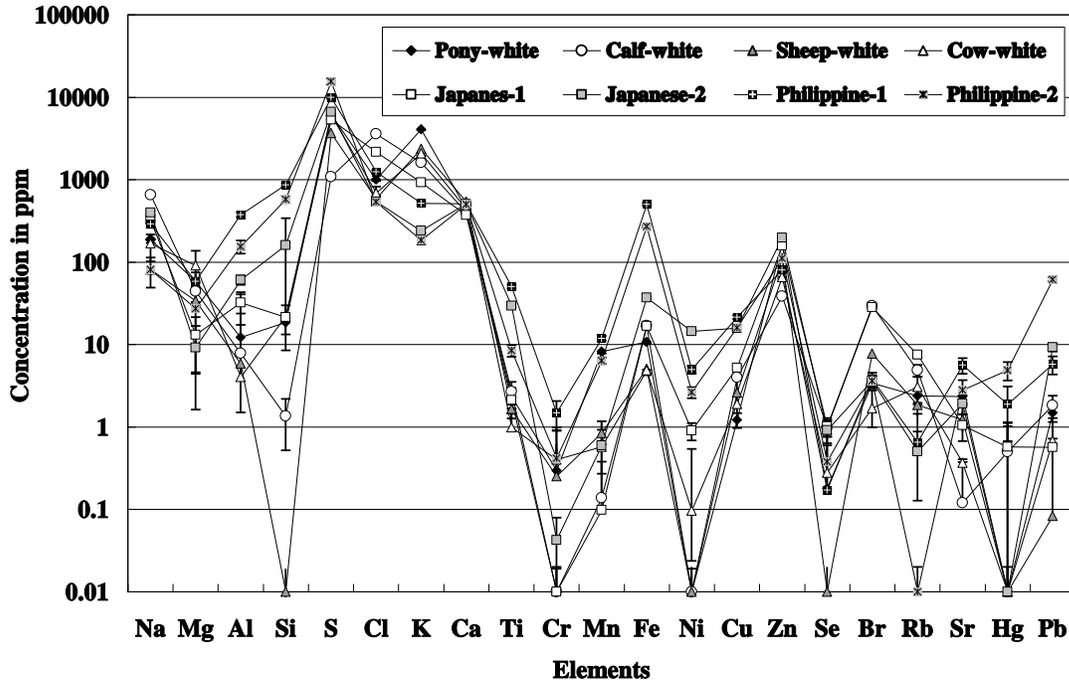


Fig.6 Results of elemental concentration of 21 elements in hoof (white) samples taken from four species of domestic animals and nails taken from two Japanese and two Philippine persons.

図6にはヒヅメ及びヒトツメ試料中の21元素濃度を、4種の有蹄類家畜から採取されたヒヅメと、4人の人物(日本人・フィリピン人各2)から採取されたヒトツメ試料に対して示す。本法により、硝酸灰化により失われるClやBrなどのハロゲン族元素を含む多くの体内元素濃度の情報が得られることが確認できた。また、これらの異なるヒヅメ、ヒトツメ試料中の元素濃度分布は類似していることが分かった。特にCa濃度は、茶色の外層中に突出していたものの、白色の中層においてはヒトツメと殆ど同じ値を示し、種による違いもないことが示されている。ツメ、ヒヅメ中の主元素であるSとZnも、概ね同様な値を示しているが、仔牛のSのみが低い値を示した。我々が参加する研究において、それぞれ1000人以上の乳児とその母の毛髪分析が行なわれたが¹⁴⁾、乳幼児の毛髪中の硫黄濃度が成人と比して低い値を示す傾向のあることが確認されている。ウシヒヅメ試料に関しても、同様な傾向があると言えるかもしれない。

ヒヅメとヒトツメの間には、著しい形状の差が存在する。前者は三次元的に、厚さ方向（下方向）にも成長するが、ヒトツメは平面的に前方に伸びる。以前の我々の分析により、ヒトツメの場合には、同一のツメ内であってもその縦横方向ともに元素濃度分布が大きく変動することが確認されている⁵⁾。これが、比較的安定した結果を与える毛髪分析と比べ、ツメ試料分析の結果から体内元素濃度を推定することの困難さにつながっている。さらにヒトツメ試料の場合、傷に埋め込まれた不純物を取り除くことも困難である。これらの理由により、ツメ試料は毛髪ほど分析の対象とはなっていない。それに対しヒヅメ試料は底から平面状に内部(上部)に向かいカットされ、同一のスライスの内部はほぼ同時期に成長したものと推定される。通常 hoof cutting は、家畜の正常歩行の維持の為に一定期間（ウシの場合は半年に1回程度）毎に行なわれるため、同一のスライス内での元素濃度変動は少ないものと期待される。

平面状に切り出されたヒヅメ試料内の元素濃度空間変動を調べるため、16のターゲットが同一の試料から切り出された。図7のように、7試料が水平方向に左から右に向かい順々に2mmおきに切り出され、さらに垂直方向の分布を調べるため、同様に9試料が下から上（体に対して後方から前方）に向けて2mm毎に切り出された。

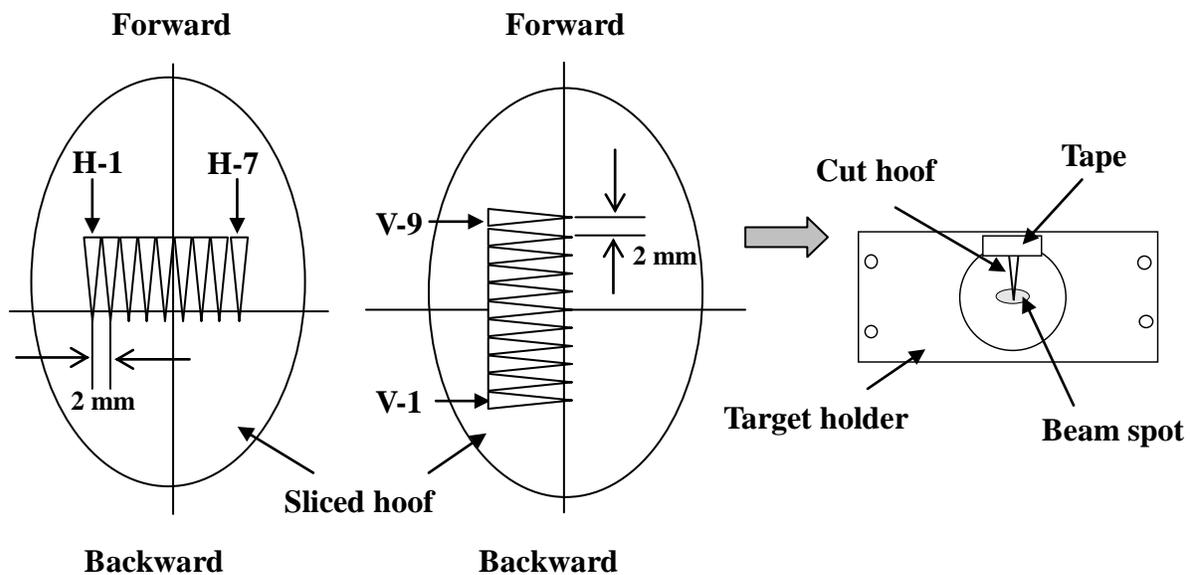


Fig. 7 Target preparation for investigating position dependence on the same sliced hoof sample. Seven targets were prepared by cutting hoof every 2 mm along the horizontal axis, while nine targets were prepared along the vertical axis.

図 8-a) に、水平方向に切り出された 7 試料の結果を、11 の主元素に対して示す。図 8-b) には、同様の結果を前後方向に切り出された 9 試料に対して示す。これらの図から見られるように、S、Zn、Ca、K などの主元素は同一の平面状のヒヅメ試料内で大きな変動は示していないが、周辺に近づくに連れやや変動が大きくなることが分かる。このことから、カットされた平面状ヒヅメ試料の中央部近辺を試料とすれば、安定した情報が得られることが確認できた。

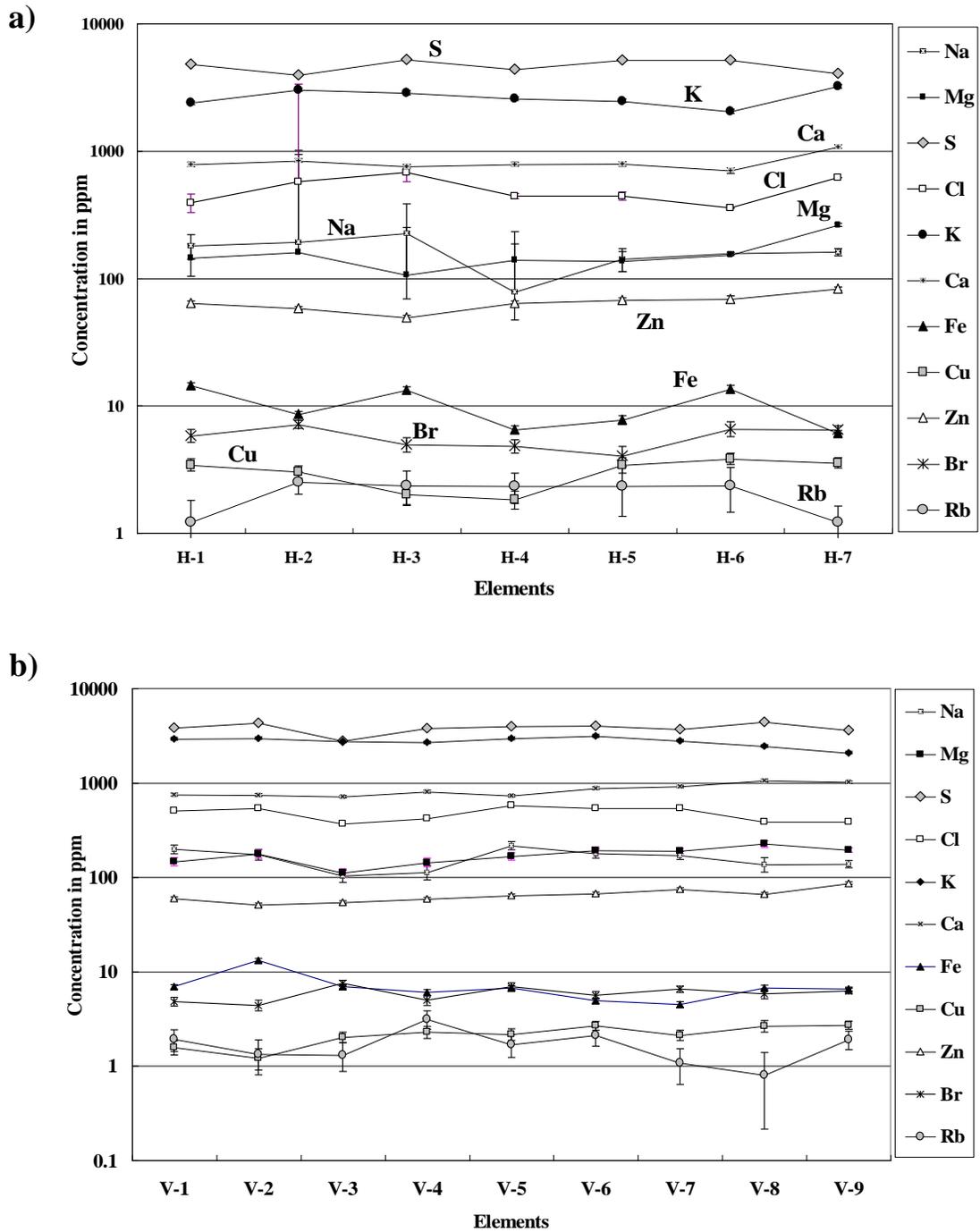


Fig. 8 Changes in concentration of principal 11 elements depending on the position. Figure 8-a) shows dependence on horizontal positions against a body axis. Fig. 8-b) shows the same comparisons but the nine targets were prepared along the forward and backward direction against a body axis.

以上のことから、ヒヅメ試料に対する無調製・無標準法は正確な濃度値を与えるものであることが確認できた。これらの結果から、本法はヒヅメ試料分析による家畜の健康管理や疾患の診断・治療に対し有力なツールとなり得ることが期待される。従来の硝酸灰化・内部標準法の適用は非常に手間がかかり、かつ複雑な手順中に試料の汚染・試料からの元素の漏出などの危険性を含んでいる。本法により、それらの不確定要素が排除され、かつハロゲン族など従来分析不可能だった元素の分析も可能となった。本法はさらに、シカ、カモシカなどの有蹄類野生動物のヒヅメ分析にも応用可能である。それらの分析は、生態系に影響を及ぼす環境変化のモニタリングとしても有用であると期待される。

4 まとめ

以上の結果は以下のように要約できる。

1. 有蹄類家畜から採取したヒヅメ試料に対する「無調製・無標準法」が、無標準法を基礎として開発された。
2. 本法は異なる種の有蹄類家畜ヒヅメに対し、有効であることが確認された。
3. 本法は複雑な試料調製を必要としないため、その過程で生じる試料のコンタミ、元素の試料からの漏出などの問題から開放されている。従来の方法では分析困難であったハロゲン族元素の定量分析も可能となった。
4. 本法は、家畜の健康管理、診断などに有用であると期待される。

謝辞

共同利用の円滑な運営のために日々献身的な働きをしておられる日本アイソトープ協会 NMCC のスタッフの方々、及び岩手医大サイクロトロンセンターのスタッフに謝意を表します。また、NMCC の全国共同利用を有効に活用し、優れた成果を上げられている利用者の方々に敬意と謝意を表します。

参考文献

1. K. Sera, S. Futatsugawa, K. Matsuda and Y. Miura, "Standard-free method of quantitative analysis for bio-samples", *Int'l Journal of PIXE* Vol.6, No.3, 4 467-481 (1996)
2. K. Sera, S. Futatsugawa and K. Matsuda, "Quantitative analysis of untreated bio-samples", *Nucl. Instr. and Meth.* B 150 226-233 (1999)
3. K. Sera, S. Futatsugawa S. Hatakeyama, Y. Saitoh and K. Matsuda "Quantitative Analysis of Bio-medical Samples of Very Small Quantities by the Standard-free Method.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. 7-3, 4 157-169 (1997)
4. K. Sera, J. Itoh, S. Goto, Y. Saitoh, A. Fujimura, Y. Nozaka, Y. Noda, S. Nishizuka and G. Wakabayashi, "Quantitative Analysis of Very Small Quantity of Organs Taken from Patients and Experimental Animals; Standard-free Method for Organ Samples.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. 18, No.3,4 111-122 (2008)

5. K. Sera, S. Futatsugawa, S. Murao and E. Clemente, "Quantitative Analysis of Untreated Nail Samples for Monitoring Human Exposure to Heavy Metals.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. **12**, No.3, 4 125-136 (2002)
6. 大谷真司、藤巻宏和、世良耕一郎、"宮城県中部七北田川河口域の植物に含まれる重金属元素濃度と土壌中の重金属元素濃"、NMCC 共同利用研究成果報文集 第 14 巻, 69-80 (2008)
7. K. Asano, K. Suzuki, M. Chiba, K. Sera, T. Matsumoto, R. Asano and T. Sakai, "Influence of the Coat Color on the Trace Elemental Status Measured by Particle Induced X-ray Emission (PIXE) in Horse Hair.", *Biol. Trace. Element. Res.* Vol. **103** 169-176 (2005)
8. K. Asano, K. Suzuki, M. Chiba, K. Sera, R. Asano and T. Sakai,
"Twenty-Eight Element Concentrations in Mane Hair Samples of Adult Riding Horses Determined by Particle-Induced X-ray Emission.", Asano, K., Suzuki, K., Chiba, M., Sera, K., Asano, R. and Sakai, T., *Biological Trace Element Research*, Vol. **107** No.2 (2005) 135-140
9. K. Asano, K. Suzuki, M. Chiba, K. Sera, T. Matsumoto, R. Asano and T. Sakai,
"Correlation Between 25 Element Contents in Mane Hair in Riding Horses and Atrioventricular Block.", *Biological Trace Element Research*, Vol. **108** (2005) 127-136
10. K. Asano, K. Suzuki, M. Chiba, K. Sera, R. Asano and T. Sakai,
"Relationship Between Trace Elements Status in Mane Hair and Atrial Fibrillation in Horse.",
Journal of Veterinary Medical Science, Vol. **68**-7 (2006) 761-771
11. S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitou and K. Sera, " Present Status of NMCC and Sample Preparation Method of Bio-Samples.", *Int'l Journal of PIXE* Vol. **3**, No.4 319-328 (1993)
12. K. Sera, T. Yanagisawa, H. Tsunoda, S. Futatsugawa, S. Hatakeyama, Y. Saitoh, S. Suzuki and H. Orihara., "Bio-PIXE at the Takizawa facility (Bio-PIXE with a baby cyclotron)", *Int'l Journal of PIXE* Vol. **2**, No.3 325-330 (1992)
13. K. Ishii and S. Morita, "Continuous Background in PIXE ", *Int'l Journal of PIXE*, Vol. **1**, No.1 1-29 (1990)
14. 絹川直子、伊藤じゅん、前田知子、高辻俊宏、中村 剛、世良耕一郎、野瀬善明、" PIXE による福岡市乳幼児健診の毛髪分析 (第 1 報) ~ 母親の出産後 1 か月及び 10 か月の比較"、NMCC 共同利用研究成果報文集 第 14 巻, 155-169 (2008)

Standard-free method for hoof samples taken from domestic animals such as cow, calf, pony and sheep

K. Sera, K. Suzuki¹, K. Taguchi¹, J. Itoh², S. Goto³, C. Takahashi³ and Y. Saitoh³

Cyclotron Research Center, Iwate Med. University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

¹Department of Veterinary Medicine, Rakuno Gakuen University
582 Bunkyou dai Midorichou, Ebetsu, Hokkaido 069-8501, Japan

²Training section, Japan Radioisotope Association
2-28-45 Honkomagome, Bunkyo, Tokyo 113-8941, Japan

³Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

Abstract

A standard-free method for hoof samples taken from cattle such as cow, calf, pony and sheep has been developed in order to estimate the state of health of these animals. The standard-free method developed for human nails was confirmed to be applicable to quantitative analysis of hoof samples since the shape of continuous X-rays is almost the same for nail and hoof taken from these ungulate animals. Accuracy and sensitivity of the present standard method were examined by comparing the results with those obtained by an internal-standard method combined with a chemical-ashing method, and it is confirmed that the method is applicable to hoof samples taken from domestic animals of many species. The method allows us to quantitatively analyze untreated hoof samples and to prepare the targets without complicated preparation technique which often brings ambiguous factors such as elemental loss from the sample and contamination of the sample during preparation procedure. It is also confirmed that halogens, which are important elements for estimating the state of health and are mostly lost during chemical-ashing, can be analyzed without problem by the present method. It is found that elemental concentration of more than twenty elements can be constantly analyzed and it is expected to be quite useful in order to estimate the state of health and to make diagnosis of domestic animals. It is also confirmed that elemental concentration of essential elements in hoof is not so changed depending on the positions in the sliced sample along both horizontal and vertical axis.

Keywords : PIXE, hoof, Standard-free, Cattle, Domestic animals, Untreated, Veterinary medicine, State of health