

(19)日本国特許庁(JP)

**(12)特許公報(B2)**

(11)特許番号  
**特許第7617586号**  
**(P7617586)**

(45)発行日 令和7年1月20日(2025.1.20)

(24)登録日 令和7年1月9日(2025.1.9)

(51)国際特許分類

G 01 N	33/497 (2006.01)	F I	G 01 N	33/497	Z
G 01 N	33/64 (2006.01)		G 01 N	33/64	
G 01 N	33/98 (2006.01)		G 01 N	33/98	
G 01 N	19/00 (2006.01)		G 01 N	19/00	H
G 01 N	5/02 (2006.01)		G 01 N	5/02	Z

請求項の数 29 (全34頁)

(21)出願番号 特願2022-536337(P2022-536337)  
 (86)(22)出願日 令和3年7月12日(2021.7.12)  
 (86)国際出願番号 PCT/JP2021/026065  
 (87)国際公開番号 WO2022/014512  
 (87)国際公開日 令和4年1月20日(2022.1.20)  
 審査請求日 令和5年1月6日(2023.1.6)  
 (31)優先権主張番号 特願2020-122610(P2020-122610)  
 (32)優先日 令和2年7月17日(2020.7.17)  
 (33)優先権主張国・地域又は機関  
 日本国(JP)

(73)特許権者 501203344  
 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
 茨城県つくば市觀音台3-1-1  
 (73)特許権者 301023238  
 国立研究開発法人物質・材料研究機構  
 茨城県つくば市千現一丁目2番地1  
 (74)代理人 100190067  
 弁理士 繼成朗  
 中久保亮  
 茨城県つくば市池の台2 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構  
 畜産研究部門内  
 (72)発明者 石田三佳  
 茨城県つくば市池の台2 国立研究開発 最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ケトーシス罹患判定方法及び装置

**(57)【特許請求の範囲】****【請求項1】**

動物(ヒトを除く。)から採取した体液から発生したガスをガスセンサに与え、前記体液から発生したガスに対する前記ガスセンサから出力されるシグナルを使用して、前記体液から発生したガス中のケトン類の濃度に基づいて前記動物のケトーシス罹患の判定を行う。

**ケトーシス罹患判定方法。****【請求項2】**

前記体液から発生したガスは、前記ケトン類に加え、アルコール類、アルデヒド類、二トリル類、有機酸、水(水蒸気)、窒素、酸素及び二酸化炭素からなる群から選択され少なくとも一つをさらに含有する、請求項1に記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項3】**

動物(ヒトを除く。)から採取した体液から発生したガスをガスセンサに与え、前記体液から発生したガスに対する前記ガスセンサから出力されるシグナルを使用して、前記体液から発生したガス中の特定の成分の濃度に基づいて前記動物のケトーシス罹患の判定を行う。

**ケトーシス罹患判定方法において、**

前記特定の成分は、質量スペクトルにおいてm/z値が50~80の範囲にピークを有する物質である、ケトーシス罹患判定方法。

**【請求項4】**

前記ケトーシス罹患の判定にあたり、前記体液または前記体液から発生したガスを質量分析することにより、前記特定の成分の質量スペクトルにおける $m/z$ 値を確認する、請求項3に記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項5】**

前記体液または前記体液から発生したガスをプロトン移動反応飛行時間型質量分析(PTR-TOF-MS)により質量分析する、請求項4に記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項6】**

前記特定の成分は、アセトン、プロパノール、ブタノール、酢酸、プロピオン酸、酪酸、2-ブタノン、ブタナール、2-メトキシ-1-プロペン及び2-メチル-プロパナー  
ルからなる群から選択された少なくとも一つである、請求項3から5の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。 10

**【請求項7】**

前記特定の成分は、アセトン及び2-ブタノンからなる群から選択された少なくとも一つである、請求項6に記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項8】**

前記体液から発生したガスは、ケトン類、アルコール類、アルデヒド類、ニトリル類、有機酸、水(水蒸気)、窒素、酸素及び二酸化炭素からなる群から選択された少なくとも一つを含有する、請求項3から5の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項9】**

前記ケトン類はアセトン及び2-ブタノンからなる群から選択された少なくとも一つであり、前記アルコール類は、メタノール、エタノール、プロパノール及びブタノールからなる群から選択された少なくとも一つであり、前記アルデヒド類は、ホルムアルデヒド、アセトアルデヒド、ブタナール及び2-メチル-プロパナー  
ルからなる群から選択された少なくとも一つであり、前記ニトリル類はアセトニトリルであり、前記有機酸は、ギ酸、酢酸、プロピオン酸及び酪酸からなる群から選択された少なくとも一つである、請求項2または8に記載のケトーシス罹患判定方法。 20

**【請求項10】**

前記体液は乳汁、血液、尿、唾液、汗からなる群から選択される、請求項1から9の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項11】**

前記体液を収容した容器の温度を5～50に設定し、前記体液から発生したガスを前記ガスセンサに与える、請求項1から10の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。 30

**【請求項12】**

前記ケトーシス罹患の判定は、前記シグナルの時間変化のパターンに基づいて行う、請求項1から11の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項13】**

前記ガスセンサは表面応力センサである、請求項1から12の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項14】**

前記体液を収容した容器に、ケトーシス罹患の判定に影響を与える成分を実質的に含有していないガスを通すことにより得られたガスを前記体液から発生したガスとして前記表面応力センサに供給する、請求項13に記載のケトーシス罹患判定方法。 40

**【請求項15】**

前記表面応力センサに前記体液から発生したガスの供給を開始した以降の前記シグナルを使用して前記ケトーシス罹患の判定を行う、請求項13または14に記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項16】**

前記表面応力センサは膜型表面応力センサである、請求項13から15の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項17】**

10

20

30

40

50

前記表面応力センサの感應膜の材料としてPoly(4-methylstyrene)、Poly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)、Poly(vinylidene fluoride)、Cellulose Acetate Butyrate、Poly(ethyleneimine)、フェニル基修飾シリカ / チタニア複合ナノ粒子及びPolystyreneからなる群から選択された少なくとも一を使用する、請求項13から16の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項18】**

前記表面応力センサとして、前記群から選択された一の材料を感應膜に使用した第1の表面応力センサと、前記群から選択された他の材料を感應膜として使用した第2の表面応力センサとを少なくとも使用する、請求項17に記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項19】**

前記体液から発生したガスとバージガスとを前記表面応力センサに交互に与え、前記体液から発生したガスに対応する前記シグナルと前記バージガスに対応する前記シグナルとを使用して前記ケトーシス罹患の判定を行う、請求項13から18の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項20】**

前記体液から発生したガスを追加のガスセンサに供給し、前記表面応力センサからのシグナルと前記追加のガスセンサからのシグナルとに基づいて前記ケトーシス罹患の判定を行う、請求項13から19の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項21】**

前記体液から発生したガスを前記表面応力センサに供給する時間区間と前記バージガスを前記表面応力センサに与える時間区間に加えて、所定の標準ガスを前記表面応力センサに与える時間区間を設け、前記ケトーシス罹患の判定にあたって前記標準ガスに対応する前記シグナルを更に使用する、請求項19に記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項22】**

標準ガスとバージガスとを前記表面応力センサに交互に与え、前記標準ガスに対応する前記シグナルと前記バージガスに対応する前記シグナルとに基づいた標準ガス対応のデジタルデータと、

前記体液から発生したガスとバージガスとを前記表面応力センサに交互に与え、前記体液から発生したガスに対応する前記シグナルと前記バージガスに対応する前記シグナルとに基づいた測定対象体液対応のデジタルデータと

を準備し、

前記ケトーシス罹患の判定は、前記標準ガス対応のデジタルデータと前記測定対象体液対応のデジタルデータとに基づいてケトーシス罹患判定を行う、  
請求項19に記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項23】**

前記標準ガスとバージガスとが交互に与えられる前記表面応力センサと前記体液から発生したガスとバージガスとが交互に与えられる前記表面応力センサとは同一の個体である表面応力センサであるか、または互いに別の個体である表面応力センサである、請求項22に記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項24】**

前記標準ガスは参照体液から発生するガスである、請求項21から23の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項25】**

前記体液から発生したガスを追加のガスセンサに供給し、前記表面応力センサからのシグナルと前記追加のガスセンサからのシグナルとに基づいて前記ケトーシス罹患の判定を行う、請求項21から24の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

**【請求項26】**

請求項13から19の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法に用いるための装置であつて、

少なくとも一つの表面応力センサと、

10

20

30

40

50

動物から採取された検査対象の体液から発生した試料ガスを供給する第1のガス流路と、測定すべきガス成分を含有しないパージガスを供給する第2のガス流路とを設け、

前記第1のガス流路から供給される試料ガスと前記第2のガス流路から供給されるパージガスとを交互に切り替えて前記少なくとも一つの表面応力センサに供給して前記少なくとも一つの表面応力センサからシグナルを発生させ、前記シグナルを情報処理装置で処理することにより、前記体液から発生した試料ガス中のケトン類または特定の成分の濃度に基づいて前記動物のケトーシス罹患の判定を行う、ケトーシス罹患判定装置において、

前記特定の成分は、質量スペクトルにおいて $m/z$ 値が50～80の範囲にピークを有する物質である、ケトーシス罹患判定装置。

10

#### 【請求項27】

請求項26に記載のケトーシス罹患判定装置において、

追加のガスセンサと前記試料ガスを前記追加のガスセンサに供給する追加のガス流路とを設け、

前記少なくとも一つの表面応力センサからの前記シグナルと前記追加のガスセンサからのシグナルとを前記情報処理装置で処理することにより、請求項20に記載のケトーシス罹患判定方法を行う、ケトーシス罹患判定装置。

#### 【請求項28】

請求項21から24の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法に用いるための装置であつて、

20

少なくとも一つの表面応力センサと、

動物から採取された検査対象の体液から発生した試料ガスを供給する第1のガス流路と、測定すべきガス成分を含有しないパージガスを供給する第2のガス流路と、

所定の標準ガスを供給する第3のガス流路とを設け、

前記第1のガス流路から供給される試料ガスと前記第2のガス流路から供給されるパージガスと前記第3のガス流路から供給される標準ガスとを所定の順序で切り替えて前記少なくとも一つの表面応力センサに供給して前記少なくとも一つの表面応力センサからシグナルを発生させ、前記シグナルを情報処理装置で処理することにより、前記体液から発生した試料ガス中のケトン類または特定の成分の濃度に基づいて前記動物のケトーシス罹患の判定を行う、ケトーシス罹患判定装置において、

30

前記特定の成分は、質量スペクトルにおいて $m/z$ 値が50～80の範囲にピークを有する物質である、ケトーシス罹患判定装置。

#### 【請求項29】

請求項28に記載のケトーシス罹患判定装置において、

追加のガスセンサと前記試料ガスを前記追加のガスセンサに供給する追加のガス流路とを設け、

前記少なくとも一つの表面応力センサからの前記シグナルと前記追加のガスセンサからのシグナルとを前記情報処理装置で処理することにより、請求項25に記載のケトーシス罹患判定方法を行う、ケトーシス罹患判定装置。

40

#### 【発明の詳細な説明】

##### 【技術分野】

##### 【0001】

本発明は、動物のケトーシス罹患判定に関し、具体的には動物が泌乳した乳汁、その他動物から採取した体液から発生したガスの組成に基づくケトーシス罹患判定に関する。

##### 【背景技術】

##### 【0002】

ケトーシスとは、主としてケトン体の産生が亢進し、その利用能を上回ることにより、大量のケトン体が動物の組織、体液中に蓄積している状態である。例えば、血中のケトン体が増量した状態はケトン血症、尿中のケトン体が増量した状態はケトン尿症、乳中のケ

50

トン体が増量した状態はケトン乳症とも呼ばれる。ケトン体は、脂肪の合成や分解における中間代謝産物であり、カルボニル基 ( $> \text{C} = \text{O}$ ) と 2 個の炭化水素 (R-) が結合した化合物の総称であり、動物の体内に存在するケトン体としては、アセト酢酸、 - ヒドロキシ酪酸 (3 - ヒドロキシ酪酸とも呼ばれる。)、及びアセトンなどがある。

#### 【0003】

脂肪酸は、肝臓でアセト酢酸を経てアセトンまたは - ヒドロキシ酪酸に分解され、最終的には組織で酸化を受け二酸化炭素と水に代謝される。糖質の代謝が障害されると、血中グルコースの代わりに、生体内のエネルギー源として貯蔵されていた脂肪が使用され、肝臓では脂肪分解に伴うケトン体の産生が亢進する。そのため、糖尿病による糖利用障害や、絶食・飢餓状態などの際に、徐々に組織の処理能力の限界を超えてケトン体が血中に蓄積すると、ケトーシス (ケトン血症) となる。

10

#### 【0004】

ケトーシスになると、吐き気や嘔吐、腹痛などの消化器症状が現れる。ケトン体は酸性物質であるため、ケトン体の量がさらに増え、血液が酸性に傾くと、ケトーシスからケトアシドーシス (アシドーシス状態) に進行する。このケトアシドーシスが続くと、意識障害や昏睡状態 (例えば糖尿病性昏睡) に至り、最悪の場合は死に至る可能性があることが知られている。従って、ケトーシス (またはケトアシドーシス) は、組織におけるグルコースの利用が障害されたとき (糖尿病等) や、糖質供給が不十分のとき (絶食・飢餓状態等) をはじめ、妊娠悪阻、嘔吐、下痢、脱水、過脂肪食、甲状腺中毒症、消化吸收障害、小児自家中毒、糖原病等により発症する。

20

#### 【0005】

また、反芻動物は、消化管内発酵産物である酪酸からの - ヒドロキシ酪酸の生成があるため、生理的状態においても血中ケトン体濃度は非反芻動物に比べて高く、ケトーシスの発症も多いことで知られている。とりわけ乳牛においては、分娩前後に大きなエネルギー変化が生じ、分娩後の泌乳開始に伴って多くのエネルギーを必要とするが、乾物摂取量 (DMI) が十分に増加していない時期には負のエネルギーバランス (NEB) となる。このNEBに対して乳牛は体内に貯蔵されている糖質、タンパク質、脂質を使って適応しようとするが、それが十分に達成されなかった場合にはケトーシスに陥る。ケトーシスに罹患した乳牛は、DMIの低下や泌乳量の減少等の臨床症状を示す一方、明らかな臨床症状を伴わず、体内的ケトン体が増加している潜在性ケトーシスも増加傾向にあり、それが泌乳量や他の代謝性疾患の発症に影響を与えるという問題がある。

30

#### 【0006】

従来、乳牛の潜在性ケトーシスの判定には、血液中の - ヒドロキシ酪酸 (BHB A) 濃度が使用されている (非特許文献 1 参照)。これは、 - ヒドロキシ酪酸が他のケトン体であるアセトンやアセト酢酸よりも安定しているからであり、具体的な基準値としては、潜在性ケトーシスとその後の疾病発生や生産性低下との関連性に基づき、 $1.0 \text{ mmol/L} \sim 1.4 \text{ mmol/L}$  の範囲が示されている。また、血液以外にも、乳汁や尿を用いた潜在性ケトーシスの判定が行われており、これまでに、試験紙を用いた半定量法が開発されている。なお、乳牛の潜在性ケトーシスの診断等に関しては、必要に応じて非特許文献 1 を参照されたい。

40

#### 【先行技術文献】

#### 【特許文献】

#### 【0007】

【文献】国際公開第 2011 / 148774 号

【文献】特許第 5535636 号

#### 【非特許文献】

#### 【0008】

【文献】及川伸、「潜在性ケトーシスに関する最近の研究動向」、日獸会誌 68 33-42(2015). (<http://nichiju.lin.gr.jp/mag/06801/b1.pdf>)

【文献】A. H. Gustafsson and U. Emanuelson, "Milk acetone concentration as a

50

n indicator of hyperketonaemia in dairy cows: The critical value revised", Animal Science 1996, 63: 183-188.

【文献】F. Enjalbert, M. C. Nicot, C. Bayourthe, and R. Moncoulon, "Ketone Bodies in Milk and Blood of Dairy Cows: Relationship between Concentrations and Utilization for Detection of Subclinical Ketosis", Journal of Dairy Science Vol. 84, No. 3, 2001.

**【発明の概要】**

**【発明が解決しようとする課題】**

**【0009】**

近年の農場の大規模化を背景に、乳牛をはじめとする家畜（産業動物）の飼養管理システムが個体管理から群管理に変遷する中で、周産期病であるケトーシス及び潜在性ケトーシスを早期に発見することに対するニーズが存在している。

10

**【0010】**

上述したような血液を用いる診断は客観的でありかつ正確性には優れるが、スループットが小さい割には費用が高額になりやすく、また、飼育現場での測定が難しいという問題がある。最近、現場での測定が可能な小型の装置が開発されたが、血液中の - ヒドロキシ酪酸濃度は採食後に上昇するため、検査精度を確保するにはサンプリングのタイミングが制限される。

10

**【0011】**

尿を用いた検査は非侵襲的ではあるが、現在実用レベルに達している試験紙を用いた半定量法では、血液検査と比べて正確性に劣る。また、動物によっては尿検体の採取が容易ではない場合や、尿検体が採取できるタイミングに制約があるため、診断のための試料としては利用しにくい場合がある。

20

**【0012】**

乳汁を用いた検査でも、試験紙を用いた半定量法の有用性は確認されているものの、血液検査と比べると、感度及び特異度には改善の余地がある。なお、乳牛などの給餌・搾乳・乳汁からのケトーシス診断等を自動化するシステムが特許文献 2 で提案されている。しかし、ここでは液体の乳汁をそのままの形で分析するという技術思想に基づいてシステムが構成されているため、検査のための流路などの複雑化（検査用試薬流路の追加等）、検査用試薬などの消耗品費用の増大等の問題があった。

30

**【0013】**

そこで、本発明は、動物のケトーシス罹患及び / またはケトーシス罹患の可能性の有無を、現場等で簡便に判定できるようにすることを課題とする。

また、本発明は、当該判定を行うための装置を提供することも課題とする。

**【課題を解決するための手段】**

**【0014】**

上記課題の解決のために、本発明者らは、検体の種類、すなわち、従来の検査方法で用いられる検体がいずれも液体である点に着目した。

**【0015】**

例えば、乳牛においては、非特許文献 3 に乳汁中のアセトン濃度は血中アセトン濃度と同程度であり、高い相関があることが開示されているが、他方では給与される飼料の違いによって、ヒトの嗅覚や味覚ではっきりと識別できるほどに乳汁の香りや風味が異なることが知られている。言い換えると、ヒトの嗅覚や味覚で識別できる乳汁の香りや風味は、飼料の違いに大きく影響を受ける。これが示唆していることは、健常な牛からのものであるという一つのカテゴリに属する乳汁であってもその揮発・蒸発成分の組成が大きくばらつくため、疾患有する牛からの乳汁の揮発・蒸発成分との比較を行う際に、両者の識別が困難である可能性があることである。従来、実用的な嗅覚センサがほとんど入手できなかったことに加えて、このような可能性も原因であったと考えられるが、これまで、乳汁から発生したガスと疾患との関連性については、本発明者らが知る限りにおいて、ほとんど知見は得られていなかった。

40

50

**【 0 0 1 6 】**

しかしながら、後述する実施例で示すように、ガス検出手段として表面応力センサを用いた測定では、特定の感應膜材料を用いた場合に、飼料の異なる健常な乳牛から得た2種類の乳汁について、これらの乳汁から発生したガスの組成に起因するような顕著な差は確認されなかった。

**【 0 0 1 7 】**

のことから、本発明者らは、従来の常識にとらわれず、乳汁から発生したガスと疾患との間に一定の相関関係が成り立ち得るとの仮説の下、乳汁から発生したガスを用い、当該ガスに対するガス検出手段の応答を使用して特定の疾患の罹患判定を行うことを着想した。さらには、動物から採取される乳汁以外の体液、例えば血液、尿、唾液、汗も、そこから発生するガスを用いることでこの種の罹患判定を行うことが可能であるという着想を得た。

10

**【 0 0 1 8 】**

そして、本発明者らは、鋭意検討を行なった結果、動物の乳汁等の体液から発生したガスの組成に基づいて当該動物のケトーシス罹患の判定が可能であることを見出し、本発明を完成するに至った。

**【 0 0 1 9 】**

すなわち、本発明は、以下の [ 1 ] ~ [ 22 ] を要旨とする。

**【 0 0 2 0 】**

[ 1 ] 動物（ヒトを除く。）から採取した体液から発生したガスをガス検出手段に与え、前記体液から発生したガスに対する前記ガス検出手段の応答を使用して、前記体液から発生したガスの組成に基づく前記動物のケトーシス罹患の判定を行う、ケトーシス罹患判定方法。

20

[ 2 ] 前記体液は乳汁、血液、尿、唾液、汗からなる群から選択される、[ 1 ] に記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 3 ] 前記体液から発生したガスは、ケトン類、アルコール類、アルデヒド類、ニトリル類、有機酸、水（水蒸気）、窒素、酸素、二酸化炭素の少なくとも一つである、[ 1 ] または [ 2 ] に記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 4 ] 前記体液から発生したガスはケトン類及びアルコール類の少なくとも一つであり、前記ケトン類はアセトンであり、前記アルコール類は、メタノール、エタノール、プロパノール及びブタノールからなる群から選択された少なくとも一つである、[ 3 ] に記載のケトーシス罹患判定方法。

30

[ 5 ] 前記ガス検出手段はガスセンサであり、前記ガス検出手段の応答はガスセンサから出力されるシグナルである、[ 1 ] から [ 4 ] の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 6 ] 前記ケトーシス罹患の判定は、前記シグナルの時間変化のパターンに基づいて行う、[ 5 ] に記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 7 ] 前記ガスセンサは表面応力センサである、[ 5 ] または [ 6 ] に記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 8 ] 前記体液を収容した容器に、ケトーシス罹患の判定に影響を与える成分を実質的に含有していないガスを通すことにより得られたガスを前記体液から発生したガスとして前記表面応力センサに供給する、[ 7 ] に記載のケトーシス罹患判定方法。

40

[ 9 ] 前記表面応力センサに前記体液から発生したガスの供給を開始した以降の前記シグナルを使用して前記ケトーシス罹患の判定を行う、[ 7 ] または [ 8 ] に記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 10 ] 前記表面応力センサは膜型表面応力センサである、[ 7 ] から [ 9 ] の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 11 ] 前記表面応力センサの感應膜の材料としてPoly(4-methylstyrene)、Poly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)、Poly(vinylidene fluoride)、Cellulose Acetate Butyrate、Poly(ethyleneimine)、フェニル基修飾シリカ／チタニア複合ナノ粒子及びP

50

olystyreneからなる群から選択された少なくとも一を使用する、[ 7 ] から [ 10 ] の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 12 ] 前記表面応力センサとして、前記群から選択された一の材料を感應膜に使用した第1の表面応力センサと、前記群から選択された他の材料を感應膜として使用した第2の表面応力センサとを少なくとも使用する [ 11 ] に記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 13 ] 前記体液から発生したガスとバージガスとを前記表面応力センサに交互に与え、前記体液から発生したガスに対応する前記シグナルと前記バージガスに対応する前記シグナルとを使用して前記ケトーシス罹患の判定を行う、[ 7 ] から [ 12 ] の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 14 ] 前記体液から発生したガスを前記表面応力センサに供給する時間区間と前記バージガスを前記表面応力センサに与える時間区間に加えて、所定の標準ガスを前記表面応力センサに与える時間区間を設け、前記ケトーシス罹患の判定にあたって前記標準ガスに対応する前記シグナルを更に使用する、[ 13 ] に記載のケトーシス罹患判定方法。 10

[ 15 ] 標準ガスとバージガスとを前記表面応力センサに交互に与え、前記標準ガスに対応する前記シグナルと前記バージガスに対応する前記シグナルとに基づいた標準ガス対応のデジタルデータと、前記体液から発生したガスとバージガスとを前記表面応力センサに交互に与え、前記体液から発生したガスに対応する前記シグナルと前記バージガスに対応する前記シグナルとに基づいた測定対象体液対応のデジタルデータとを準備し、前記ケトーシス罹患の判定は、前記標準ガス対応のデジタルデータと前記測定対象体液対応のデジタルデータとに基づいてケトーシス罹患判定を行う、[ 13 ] に記載のケトーシス罹患判定方法。 20

[ 16 ] 前記標準ガスとバージガスとが交互に与えられる前記表面応力センサと前記体液から発生したガスとバージガスとが交互に与えられる前記表面応力センサとは同一の個体である表面応力センサであるか、または互いに別の個体である表面応力センサである、

[ 15 ] に記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 17 ] 前記標準ガスは参考体液から発生するガスである、[ 14 ] から [ 16 ] の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。

[ 18 ] 前記体液から発生したガスを追加のガスセンサに供給し、前記表面応力センサからのシグナルと前記追加のガスセンサからのシグナルとに基づいて前記ケトーシス罹患の判定を行う、[ 7 ] から [ 17 ] の何れかに記載のケトーシス罹患判定方法。 30

[ 19 ] 少なくとも一つの表面応力センサと、動物から採取された検査対象の体液から発生した試料ガスを供給する第1のガス流路と、測定すべきガス成分を含有しないバージガスを供給する第2のガス流路とを設け、前記第1のガス流路から供給される試料ガスと前記第2のガス流路から供給されるバージガスとを交互に切り替えて前記少なくとも一つの表面応力センサに供給して前記少なくとも一つの表面応力センサからシグナルを発生させることにより、前記体液から発生した試料ガスの組成に基づく前記動物のケトーシス罹患の判定を行う、ケトーシス罹患判定装置。

[ 20 ] 追加のガスセンサと前記試料ガスを前記追加のガスセンサに供給する追加のガス流路とを設け、前記少なくとも一つの表面応力センサからの前記シグナルと前記追加のガスセンサからのシグナルとに基づいて前記ケトーシス罹患の判定を行う、[ 19 ] に記載のケトーシス罹患判定装置。 40

[ 21 ] 少なくとも一つの表面応力センサと、動物から採取された検査対象の体液から発生した試料ガスを供給する第1のガス流路と、測定すべきガス成分を含有しないバージガスを供給する第2のガス流路と、所定の標準ガスを供給する第3のガス流路とを設け、前記第1のガス流路から供給される試料ガスと前記第2のガス流路から供給されるバージガスと前記第3のガス流路から供給される標準ガスとを所定の順序で切り替えて前記少なくとも一つの表面応力センサに供給して前記少なくとも一つの表面応力センサからシグナルを発生させることにより、前記体液から発生した試料ガスの組成に基づく前記動物のケトーシス罹患の判定を行う、ケトーシス罹患判定装置。

[ 22 ] 追加のガスセンサと前記試料ガスを前記追加のガスセンサに供給する追加のガ

10

20

30

40

50

ス流路とを設け、前記少なくとも一つの表面応力センサからの前記シグナルと前記追加のガスセンサからのシグナルとに基づいて前記ケトーシス罹患の判定を行う、[21]に記載のケトーシス罹患判定装置。

**【発明の効果】**

**【0021】**

本発明によれば、動物が泌乳した乳汁等の体液を検査対象とし、当該乳汁等から発生したガスの組成に基づいて当該動物のケトーシス罹患の判定を行うことができる。

このため、本発明によれば、多くの場合に検体採取の際に動物に与える負荷及びストレスが小さい手法により、当該動物のケトーシス罹患及び／またはケトーシス罹患の可能性の有無を、現場等で簡便に、高スループットかつ低コストで判定することができる方法を提供することができる。

また、本発明によれば、当該判定を行うための装置を提供することもできる。

**【図面の簡単な説明】**

**【0022】**

**【図1】**本発明で使用可能な測定システムの概略構成を示す図。

**【図2】**MSSの光学顕微鏡写真の例を示す図。

**【図3】**MSSなどの表面応力センサに試料ガスを与えたときのシグナル強度の時間変化を説明する概念図。

**【図4】**実施例の試験1について、ChAのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図。

**【図5】**実施例の試験2について、ChAのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図。

**【図6】**実施例の試験3について、ChAのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図。

**【図7】**実施例の試験3について、ChBのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図。

**【図8】**実施例の試験3について、ChDのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図。

**【図9】**実施例の試験3について、ChEのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図。

**【図10】**実施例の試験4について、測定aでのChAのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図。

**【図11】**実施例の試験4について、測定aでのChDのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図。

**【図12】**実施例の試験4について、測定bでのChAのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図。

**【図13】**実施例の試験4について、測定bでのChDのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図。

**【図14】**実施例の試験4について、測定bでのChEのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図。

**【図15A】**実施例の試験5において、ケトーシス罹患牛の乳汁の、プロトン移動反応飛行時間型質量分析（PTR-TOF-MS）で得られた質量スペクトルを示す図。

**【図15B】**実施例の試験5において、健康牛の乳汁の、PTR-TOF-MSで得られた質量スペクトルを示す図。

**【図16A】**実施例の試験5において、ケトーシス罹患牛の尿の、PTR-TOF-MSで得られた質量スペクトルを示す図。

**【図16B】**実施例の試験5において、健康牛の尿の、PTR-TOF-MSで得られた質量スペクトルを示す図。

**【図17A】**実施例の試験5において、ケトーシス罹患牛の乳汁及び尿、並びに、健康牛の乳汁及び尿中の、PTR-TOF-MSによる、アセトン及び2-ブタノンの濃度の測

10

20

30

40

50

定結果を示す図。

【図 17 B】図 17 A に示す測定結果のうち、アセトンの濃度の測定結果を示す図。

【図 17 C】図 17 A に示す測定結果のうち、2 - ブタノンの濃度の測定結果を示す図。

【図 18】実施例の試験 5 について、C h A の M S S からのシグナル（単位は m V ）の時間変化（単位は秒）を示す図。

【図 19】実施例の試験 5 について、C h B の M S S からのシグナル（単位は m V ）の時間変化（単位は秒）を示す図。

【図 20】実施例の試験 5 について、C h C の M S S からのシグナル（単位は m V ）の時間変化（単位は秒）を示す図。

【図 21】実施例の試験 5 について、C h F の M S S からのシグナル（単位は m V ）の時間変化（単位は秒）を示す図。

【図 22】実施例の試験 5 について、C h G の M S S からのシグナル（単位は m V ）の時間変化（単位は秒）を示す図。

【発明を実施するための形態】

【0023】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

以下に記載する構成要件の説明は、本発明の代表的な実施形態に基づいてなされることがあるが、本発明はそのような実施形態に制限されるものではない。また、以下では検査対象としてもっぱら乳汁を使用する場合を説明するが、動物から採取された他の体液、例えば血液、あるいは血液中の成分の変化が反映される唾液、尿、汗などの他の体液が検査に好都合な態様で得られる場合には、これらの体液を使用することもできる。なお、血液については、他の検査などの目的で血液を採取する必要がある際に、その血液の一部を流用することで動物に追加の負担を与えないようにすることが可能である。さらには、動物から簡単かつ苦痛が非常に少ない態様で血液を採取できる機器、採取手法が確立された場合には、ケトーシス罹患判定のための検査対象の試料として血液から発生するガスを利用することの有用性がさらに高くなると考えられる。また、尿については、近年、乳牛等を飼養する畜舎からのアンモニアの発生（揮散）を抑制することに対する関心が高まっており、より適切なふん尿処理を行う観点から尿を回収する装置が開発され、回収された尿を化学肥料の代替物として活用する試みもなされている。そのため、その尿の一部を流用することで動物に追加の負担を与えないようにすることが可能である。

【0024】

本発明の一実施形態に係るケトーシス罹患判定方法（以下、「本実施形態の方法」ともいう。）は、動物が泌乳した検査対象の乳汁から発生したガスをガス検出手段に与え、前記乳汁から発生したガスに対する前記ガス検出手段の応答を使用して、前記乳汁から発生したガスの組成に基づく前記動物のケトーシス罹患の判定を行う。

【0025】

本実施形態の方法は、乳汁を分泌する動物に対して適用される。当該動物としては、例えば、乳牛（乳用牛）、肉牛（肉用牛）、山羊、羊、スイギュウ（水牛）、ヤク、馬などの家畜（産業動物）が挙げられるが、これらに限定されない。より好ましくは、本実施形態の方法は、乳汁を生産するために飼養される動物の、ケトーシス罹患の診断のため、あるいは、診断補助として使用される。また、本実施形態の方法は、ヒトにおいて、ケトーシスと関連性のある疾患の診断補助として適用することもできる。

【0026】

本明細書において、「乳汁から発生したガス」とは、ある環境下で乳汁から揮発・蒸発した気体成分、すなわち、乳汁の揮発成分・蒸発成分を指す。当該揮発成分・蒸発成分は、ヒトの嗅覚によって感知される香氣成分、及び、ヒトの嗅覚によって感知されない非香氣成分の両方を包含する。なお、ヒトの嗅覚は個人差が極めて大きく、感知可能な成分もヒト毎に大きく異なるので、本実施形態の方法で検査対象とする乳汁から発生したガスを香氣の有無によって分類することは意図されず、また、そのいずれかに限定することも意図されない点に留意されたい。また、検査対象として乳汁以外の体液を使用する場合、当

10

20

30

40

50

該体液から発生したガスは、上記定義における「乳汁」を当該体液に置き換えたものを意図するものとする。

#### 【0027】

具体的には、乳汁から発生したガスとしては、例えば、アセトンなどのケトン類；メタノール、エタノール、プロパノール、ブタノールなどのアルコール類；ホルムアルデヒドやアセトアルデヒドなどのアルデヒド類；アセトニトリルなどのニトリル類；ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸などの有機酸；及び、水（水蒸気）、窒素、酸素、二酸化炭素などが挙げられる。また、本発明者らの予備実験によれば、健康牛及びケトーシス罹患牛の乳汁のプロトン移動反応飛行時間型質量分析（PTR-TOF-MS）の結果から、乳汁から発生したガスには、上記物質の他に、2-Butanone（2-ブタノン）、Butanal（ブタナール）、2-Methoxy-1-Propene（2-メトキシ-1-プロペン）、2-Methyl-Propanal（2-メチル-プロパナル）なども含まれる可能性がある。10

#### 【0028】

乳汁に含まれるケトン体としてはアセト酢酸、-ヒドロキシ酪酸、アセトンなどが含まれるが、アセトンは揮発性が非常に高いため、従来の液体を検体とする検査では測定対象とはされておらず、-ヒドロキシ酪酸及び／またはアセト酢酸が用いられている。これに対して、本実施形態の方法では、乳汁から発生したガスを検体とするため、測定対象のケトン体としては-ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸に限定されず、アセトンも含めることができる。また、-ヒドロキシ酪酸やアセト酢酸はアセトンの前駆体であり、試料中の-ヒドロキシ酪酸、アセト酢酸、アセトンの濃度には相関関係があることから、ケトーシスに罹患した動物では、いずれの濃度も上昇する。そのため、本実施形態の方法では、乳汁から発生したガス中のアセトン濃度を指標として用い、ケトーシス罹患の判定を行うことが可能である。20

#### 【0029】

本実施形態の方法において、ガス検出手段としては特に限定されず、ガスセンサ、ガスクロマトグラフ、ガス分析用試験紙等、乳汁から発生したガスを検知可能なものであればよい。本実施形態の方法の一態様において、上記ガス検出手段はガスセンサであり、上記ガス検出手段の応答は、当該ガスセンサから出力されるシグナルである。当該態様において、ケトーシス罹患の判定は、当該シグナルの時間変化のパターンに基づいて行われる。また、当該態様において、好ましくは、上記ガスセンサは表面応力センサであり、より好ましくは、当該表面応力センサは膜型表面応力センサ（MSS）である。なお、以下では、本発明の理解を容易にするために、上記ガス検出手段がガスセンサである態様のうち、当該ガスセンサが表面応力センサである態様を例に挙げて説明する。30

#### 【0030】

表面応力センサは、適切な感應膜材料を選択することで、一つの感應膜から複数の対象物質に対する応答信号（シグナルとも呼ぶ）を、それらが重畠した形で得ることができる。つまり、多くの対象物質について、感應膜材料を適切に選択することで、それぞれの対象物質に対する表面応力センサの応答においてその振幅や応答波形が互いに異なるようになることができる。従って、複数の表面応力センサ出力を組み合わせることにより、複数の対象物質に対応するパラメータを適宜組み合わせた測定値を求めることが可能となる。この際、表面応力センサの出力のパターンマッチングや機械学習を行うことで、これらの出力から適切に特徴を抽出して、比較的少数の表面応力センサを使用するだけで表面応力センサの個数よりも多数のパラメータに基づくケトーシス罹患判定を実現できる。もちろん、これに限るものではないが、測定対象から発生するガス中に存在している成分であってケトーシス罹患判定に有用である特定の成分の検出に特に好都合な他の種類のガスセンサが使用可能である等の場合には、必要に応じて表面応力センサに加えてそのようなガスセンサを併用することもできる。40

#### 【0031】

図1は、本実施形態の方法において使用可能な測定システムの概略構成を示す図である。なお、図1では、表面応力センサとして膜型表面応力センサ（MSS）を使用する構成

10

20

30

40

50

を示すが、もちろんこれにより一般性を失うものではない。

#### 【0032】

図1に示される概略構成では、2本のガス流路へ、それぞれ図の左側から白抜き矢印で示すように、測定すべきガス成分ではなく、また当該ガス成分の測定に影響をできるだけ与えない不活性のガス（バージガス、基準ガスとも呼ばれる）を供給する。バージガスとしては、例えば、窒素ガスや大気を使用することができ、後述する実施例では、バージガスとして窒素ガスを使用している。なお、バージガスとして大気などを使用して簡便な測定を行う場合、測定現場（農場等）の大気に、飼料から発生した有機酸やアンモニアなどのケトーシス罹患判定に影響を与えるガスがわずかに混入している可能性がある。このような場合、このようなガスの混入濃度が罹患判定結果に与える影響が意図した測定精度の実現に悪影響を与えない程度のものであれば（このような場合を、「ケトーシス罹患判定に影響を与える成分を実質的に含まない」と称する）、そのようなガスの混入は無視することができる。このような2系統のガス流はガス流路ごとに設けられているマスフローコントローラ（MFC）によりその流量を制御される。具体的には2本のガス流路中のガス流を所望の時間間隔で交互に切り替えるとともに、ガス流量を時間軸上で一定になるように制御している。なお当然のことであるが、ガス流の制御は、MFCに限らず、様々なポンプやバルブなどを組み合わせた系などを使用しても良い。この際、ポンプやバルブを設置する位置は、それぞれサンプルの上流であっても下流であっても良く、サンプルやセンサの位置を含め、どのような順序で構成されていても良いことは言うまでも無い。

10

#### 【0033】

図1において、上側に示すガス流路は測定すべきガス成分を含有しないバージガスを MSS に与えることで、MSS の表面に塗布されている感應膜中に拡散している各種のガスを脱着させて MSS を初期化するバージ処理を行う。一方、図1の下側にあるガス流路を通るガス流は MFC の直後に設置されたバイアル瓶中の試料から揮発・蒸発したガス成分を含んだ状態で MSS に供給される。もちろん、試料が最初からガス状である場合や液体状態の試料から揮発・蒸発したガスが測定系に対して与えられる場合には、バイアル瓶を使用しない構成を採用することができる。2本のガス流路からのガス流は別のバイアル瓶において合流した後、MSS に供給される。

20

#### 【0034】

また、MSS 表面の感應膜によるガスの吸着・脱着の速度は温度の影響を受けるため、図1に示した測定系の温度を所望の値に維持するのが好ましい。そのための手段としては、例えば、測定システム全体を恒温槽、インキュベータ等に収容してもよいし、あるいは、MSS 及びその周辺部品（以下、これらを「センサモジュール」もしくは単に「モジュール」とも称する。）はインキュベータ等に収容し、試料を収容したバイアル瓶は当該インキュベータ等の外側に設置した状態で、測定系の温度を所望の値に維持する構成としてもよい。後者の構成では、複数の試料を測定する場合に、センサモジュールを収容したインキュベータ等の外側でバイアル瓶の交換作業等を行うため、前者の構成に比べて測定系（特に、センサモジュール）の温度の維持管理が比較的容易であるというメリットがある。言い換えると、前後の構成は、単独の試料を測定する場合により適しており、後者の構成（以下、「開放系」とも称する。）は、複数の試料を測定する場合により適している。なお、以下で説明する実施例では、測定システム全体をインキュベータ内に収容して測定を行った例と、開放系とした例がある。

30

#### 【0035】

また、図1において試料を収容したバイアル瓶の温度を所望の値に維持することも好ましい。これにより、試料から揮発・蒸発するガス成分濃度のバラツキを低減することができ、測定精度をより向上させることができる。この場合において、バイアル瓶の温度は、上述した測定系の温度と同じであってもよく、異なっていてもよい。具体的には、バイアル瓶の温度の設定値としては、例えば、5、10、20、25、30、40、50 が挙げられるが、これらに限定されない。

40

#### 【0036】

50

また、MFCなどのシステム内の各種の機器の動作を制御し、また表面応力センサからのシグナルを取り込んで記録し解析する等の各種の処理を行うことによって以下で説明する評価方法を実現する情報処理装置、更に外部の機器等との間で情報や指令等の交換を行うためのインターフェースや通信機器も本システムに含まれるが、図示は省略した。

#### 【0037】

MSSの光学顕微鏡写真の例を図2に示す。図2に示されるMSSはシリコン単結晶から切り出される、半導体素子技術分野で使用されるシリコンウエハから形成されたものであり、その中央の円形部分（正方形等の他の形状でもよい）がその周囲の枠状部に当該円形部分の上下左右4か所で接続され固定されている。MSSに与えられたガス成分が円形部分の表面に塗布された感應膜に吸着・脱着することでMSSに印加された表面応力がこれら4か所の固定領域に集中し、これら固定領域に設けられているピエゾ抵抗素子の電気抵抗変化がもたらされる。これらのピエゾ抵抗素子は枠状部に設けられた導電領域（図2では砂目状の領域として示される）によって相互接続されてホイートストンブリッジが形成される。このホイートストンブリッジの対向する2つの節点間に電圧を印加し、残りの2つの節点間に現れる電圧をMSSから出力されるシグナルとしてMSSの外部に取り出して所要の解析を行う。このようなMSSの構造や動作については例えば特許文献1に詳述されている。なお図2では、感應膜は、MSSの円形部分だけでなく、枠状部も含めMSSチップ表面に広く塗布されている。これは感應膜をスプレーコーティングによって塗布した場合に見られる状態であるが、枠状部などに塗布された感應膜は実質的にセンサ出力信号に寄与しないため、このように塗布した場合でも問題なくセンサとして使用することが可能である。もちろん、インクジェットやディスペンサーなどによって、円形部分だけに感應膜が塗布されたMSSを使用する事も可能である。

#### 【0038】

図3に、MSSなどの表面応力センサに試料ガスを与えたときのシグナル強度の時間変化の概念図を示す。図3(a)にはMSSに与えるガスが試料ガスであるのかそれともバージガスであるのかを時間軸上で示す。具体的には、MSSに与えられるガス中の測定対象ガスの濃度が試料ガスを与えている試料ガスインジェクション期間中は0よりも大きな濃度 $C_g$ であり、バージガスを与えることで下流側のガス流路中の試料ガスを流し去るとともにMSSの感應膜（及び、ガス流路の管壁等）に吸着されている試料ガス成分を脱着するバージ動作を行うバージ期間中は試料ガス濃度が0となっている。図3(b)は図3(a)に示すガスの種類の切り替えを行った際のMSSからのシグナルの強度を、図3(a)と時間軸を揃えて示す。シグナル強度は多くの要因に支配されるが、基本的にはMSS上の感應膜近傍のガス中の成分濃度と感應膜表面の同じ成分の濃度との差により引き起こされるガスと感應膜との間の当該成分の吸着・脱着の速度が主要な要因となる。そのため、シグナル強度の時間変化は図3(a)に示されるガスの切り替え直後から始まり、上下の飽和値へ向かって指数関数的に漸近する曲線に近いものとなる。図3(b)は理想的な場合の当該曲線を示す。実際の当該曲線の形状や曲線の最大値等は、感應膜への吸着・脱着速度や感應膜に吸着・脱着される成分の種類によりかなり変化し、またシグナルの変化範囲も大きく相違することが多い。さらに、感應膜の粘弾性特性や、測定対象ガスの感應膜への拡散、あるいは感應膜材料と測定対象ガスとの物理化学的な相互作用などによって、シグナルはより複雑な経時変化を示す事もある。このように、MSSからのシグナルの経時変化や振幅等に基づいて試料中の各主成分の量・濃度や複数成分間の比率等を求めることが可能となる。具体的に言えば、乳汁から発生したガスのうち、ケトン類の測定に適したシグナルを与える感應膜材料が存在し、またアルコール類の測定に適したシグナルを与える感應膜材料も存在する。従って、これらの材料から適宜選択されたものを塗布した表面応力センサを単独で使用して乳汁から発生したガスを測定し、あるいは異なる材料をそれぞれ塗布した複数種類の表面応力センサを使用して同様の測定を行うことによって、乳汁から発生したガスの組成に基づいた判定を行うことができる。

#### 【0039】

ここで感應膜を形成する材料の吸着・脱着特性は多様であって、上述の単純化したモ

10

20

30

40

50

ルから逸脱した応答を示す感應膜材料も存在する。しかしながら、表面応力センサの応答を解析等する場合、上記モデルを用いて最初の検討を行うのは多くの場合に有益であるということができる。

#### 【0040】

なお、図3ではMSSに試料ガスを1回だけ与えるように図示されているが、MSSなどの表面応力センサを使用した測定においては、試料ガスとバージガスとを交互に切り替えて供給することにより、図3に示したような測定を複数回繰り返すのが通常である。以下では、試料ガスインジェクションと当該インジェクションに関連付けられているバージとの組を測定サイクルと呼ぶ（詳細は後述）。また、試料ガス中のある成分の吸着速度と脱着速度とが大きく異なるなどの事情がない限り、試料ガスインジェクション期間とバージ期間とは同じ時間長とする場合が多いが、もちろん、試料ガスインジェクション期間とバージ期間とを異なる時間長としてもよい。

10

#### 【0041】

通常、検査対象の乳汁から発生するガスは、乳汁中の微量成分であるため、ガス成分のセンサへの吸着及び脱離に伴って生じるそれぞれのセンサシグナルのうち、有効なシグナル値が得られるまでに比較的長い時間がかかる事がある。また、脱離しにくい成分がセンサに残存している場合、次に測定する試料ガスのシグナル値の再現性が下がってしまうこともある。そのため、本態様では、1回の測定サイクルにおける試料ガスインジェクション期間とバージ期間とを異なる長さとすることも有効となる場合があり、試料ガスインジェクション期間として有効なシグナル値を得るために十分な時間を確保した上で、バージ期間を試料ガスインジェクション期間よりも長くすることが好ましい。具体的には、後述する実施例では、試料ガスインジェクション期間を120秒とし、バージ期間をその2倍の240秒としている。また、1回の測定サイクルを、「バージ期間 - 試料ガスインジェクション期間 - バージ期間」の測定シーケンスとすることで、複数回の測定を行う場合に、2回目以降の試料ガスインジェクションの前に実質的に2度バージを行うようにすることも有効である。後述する実施例においても、この測定シーケンスを採用することで、2回目以降の試料ガスインジェクションの前に、直近の試料ガスインジェクションの終了から480秒（240秒 + 240秒）のバージ期間を確保している。このように、試料ガスインジェクション期間に対してバージ期間を長くすることによって、試料ガスインジェクション中にMSS上の感應膜に吸着された成分の脱着が十分に行われやすくなり、ベースラインをより安定させることができるために、測定を複数回繰り返す場合において判定精度を確保するのに特に有効である。

20

#### 【0042】

言い換えると、試料ガスインジェクション期間に対してバージ期間が短い場合には、判定精度に悪影響が出る可能性がある。現実の測定では測定時間が長くなることは、それ自体測定のスループットを低下させるなどの不都合があるだけではなく、測定系内外の環境の各種のパラメータ（流速、ガス圧力、温度等）を長時間安定させることがしばしば困難であったり、測定系の大型化、高価格化を招いたりといった問題がある。さらに、測定系は通常はポンプ等の能動部品を含むことから、これらの部品からの発熱による長時間にわたる温度変化も、判定精度に悪影響を与える恐れがある。従って、本態様においては、測定サイクルの時間の配分を、試料ガスインジェクション期間（サンプリング時間）には有効なシグナル値を得ることが可能な範囲内で極力短く配分し、バージ期間（バージ時間）ができるだけ長くすることが望ましい。あるいは、ベースライン変動が問題となる場合の対策として、判定精度に影響を与える成分の量があらかじめ規定された値である参照乳（詳細は後述する）を準備しておき、測定毎に参照乳から発生するガスを測定してキャリブレーションを行う等により、短時間のバージによる悪影響を除去あるいは軽減することもできる。

30

#### 【0043】

なお、上述したように、図1に示される概略構成を有する測定システムでは、通常、2本のガス流路中のガス流は、所望の時間間隔で交互に切り替えられ、ガス流量が時間軸上

40

50

で一定になるようにMFC（もしくはポンプ等）で制御されるが、測定システムの構成やガス検出手段（図1ではMSS）の仕様等によっては、ページ期間のガス流量を試料ガスインジェクション期間のガス流量よりも多くすることで、ベースラインをより安定させることができ場合もある。

#### 【0044】

本態様では、MSSなどの表面応力センサに試料ガスを与えることで得られる、図3に示すようなシグナル強度の時間変化の測定結果（以下、単に「測定結果」ともいう。）を使用して、乳汁から発生したガスの組成に基づく動物のケトーシス罹患の判定を行う。

#### 【0045】

具体的には、測定結果をそのまま使用してもよいし、あるいは、測定結果に対して任意のデータ分析処理を施してもよい。例えば、測定サイクルの時間範囲から任意に選択した時点を基準点とし、この時点を基準にオフセット処理を行う。その後、上記時間範囲から別の任意の時点を判定点として、判定点または判定点の近傍の値から特徴量を求めるこによって、ケトーシス罹患及び／またはケトーシス罹患の可能性の有無を判定することができる。この特徴量としては、例えば判定点におけるオフセット処理後のシグナル強度、判定点におけるシグナルのグラフの傾き、判定点近傍におけるシグナルのグラフの平均傾斜や曲率等でよい。なお、シグナルのオフセット処理を行っていない生シグナルは、センサの長期的な経時変化や、センサシグナルの絶対値としての現在の状態など、独特の情報が含まれているため、オフセット処理を行わず、生シグナルの値をそのまま利用したり、あるいは生シグナルから任意の特徴量を抽出したりして解析を行っても良い。

10

#### 【0046】

なお、ここでオフセット処理とは、基準点 $t_0$ におけるシグナル強度 $S(t_0)$ が0（一般的には任意の定数）になるように、シグナル強度のグラフをその強度軸方向に平行移動することで、オフセット処理後のシグナル強度 $S'(t) = S(t) - S(t_0)$ を求める処理である。

20

#### 【0047】

基準点としては、例えば、試料ガスインジェクション期間の開始直前（つまりページ期間の終了）の時点、ページ期間の開始直前（つまり試料ガスインジェクション期間の終了）の時点が挙げられるが、これら以外の任意の時点であってもよい。ただし、ページとインジェクションとの切り替えを行う時点で表面応力センサに与えるガスを切り替えるため、この境界点の近傍では表面応力センサからのシグナルが乱れることがある。また、切り替えを行っても、バルブ等の切り替え機構からある程度の長さのガス流路を経た位置にある表面応力センサの周囲のガスが実際に切り替わるまでには無視できない時間遅れが生じる場合がある。このシグナルの乱れなどの不安定性や時間遅れの影響が問題となり得るのであれば、基準点としてはこの切り替えの時点から時間的にわずかにずらした時点を採用してもよい。

30

#### 【0048】

また、測定サイクルの時間範囲から任意に選択した時点を基準点とし、当該選択した時点を基準にオフセット処理を行う。その後、上記時間範囲内の別の任意の時点を判定点として、判定点または判定点の近傍の値から特徴量を求めるこによって、ケトーシス罹患及び／またはケトーシス罹患の可能性の有無を判定することができる。この特徴量としては、例えば判定点におけるオフセット処理後のシグナル強度、判定点におけるシグナルのグラフの傾き、判定点近傍におけるシグナルのグラフの平均傾斜や曲率等でよい。なお、シグナルのオフセット量が十分小さい、あるいはオフセット前のシグナル強度から求められた特徴量が十分大きい場合には、オフセット処理を省略してもよい。ただし、このような条件を満たす判定点は、測定サイクルの時間長や、試料ガスインジェクション期間及びページ期間の時間長だけでなく、測定システムの構成（ガス流路、測定系へのガス供給形態、ガス流量等）や測定条件、さらには、ガス検出手段が表面応力センサ（より具体的にはMSS）である場合には感應膜材料の種類などによっても異なり得るため、予め参照乳などを用いて感應膜材料毎にケトーシス罹患の判定に有効な特徴量が抽出できる基準点と

40

50

判定点の組み合わせを確認しておくことが望ましい。

#### 【0049】

なお、上述したように、本態様では、測定サイクルの時間の配分や、測定シーケンスの構成を適切に設定することによってベースラインの変動を抑制し、ベースラインを安定させることができるため、抽出される特徴量の差異が微小な場合であっても判定精度を確保することができる。具体的には、バージ期間を長くすることによって感応膜から十分にガスが脱離するため、試料ガスインジェクション前の状態を毎回同じような状態に戻すことが可能となる。すなわち、バージ期間を長くすることは、測定系のリセットを十分に行うために有用である。この十分にリセットが行われた時点が試料ガスインジェクション直前の時点であり、ここをオフセットの基準点としてシグナル再現性が確保され、結果的に高精度の判定が容易になる。また、特に、試料ガスインジェクション開始直前のバージ時シグナルを基準としてオフセット処理を行うとともに、インジェクション期間の終了からわずかに時間が経過した時点に判定点を設定することで、当該判定点におけるシグナル強度の変動がより明りょうになりやすく、ケトーシス罹患の判定に有効な特徴量が得られやすい。実施例に示す実験では、インジェクション期間終了から数秒～数十秒経過の時点のシグナル強度あるいは当該時点近傍でのシグナル強度の変化を観測することで、目視による判定が最も容易になった。

10

#### 【0050】

なお、上の説明では試料ガスとバージガスとを切り替える測定シーケンスに基づく測定を行ったが、本発明はそれに限られるものではない。例えば、試料ガスに含有されてその濃度がケトーシス罹患の判定に影響を与える可能性のある成分を含む別のガス（標準ガス）についての測定を測定シーケンスに挿入して、3種類のガスの切り替え測定からのシグナルに基づいてケトーシス罹患の判定を行うことができる。

20

#### 【0051】

このような標準ガスとしては、ケトーシス罹患の疑いの無い健常な動物から得られた乳汁を参照乳とし、当該参照乳から発生する試料ガス成分と同じ成分組成を有するガスを標準ガスとしてよい。このような参照乳としては、例えば、検査対象の動物と同じ飼育環境に属する動物（以下、「同一群の動物」ともいう。）から得られた乳汁であってよく、この場合、当該乳汁は、個体乳（単一の個体から得られた乳汁。同一群の動物のうち健常であることが判っている動物から得られた乳汁が好ましい。）であってもよく、合乳（搾乳タンク等で複数の個体乳が混合された乳汁。バルク乳とも呼ばれる。）であってもよい。

30

#### 【0052】

あるいは、そのように想定される試料ガスの一部の成分（例えば、成分量のわずかな違いを特に高精度で測定したい成分等）についての組成を同じにしたガスを標準ガスとするなど、必要に応じて各種の組成に設定することができる。そして、測定上の各種の要請や制約条件なども勘案してこれら3種類のガスの供給シーケンスを適宜設定する。例えば、以下のようガス供給時間区間の繰り返しを含む測定シーケンスが考えられる：

A．バージガスを供給する [試料ガスと標準ガスの一方を供給する バージガスを供給する 試料ガスと標準ガスの他方を供給する バージガスを供給する] (あるいは[ ]内を繰り返す)

40

B．バージガスを供給する [試料ガスと標準ガスを交互に供給する バージガスを供給する] (あるいは[ ]内を繰り返す)

C．バージガスを供給する [試料ガスと標準ガスの一方とバージガスとの交互供給を繰り返す バージガスを供給する 試料ガスと標準ガスの他方とバージガスとの交互供給を繰り返す] (あるいは[ ]内を繰り返す)

これ以外にもガス供給時間区間の各種のガス供給シーケンスが考えられる。何れのガス供給シーケンスでも、一連の測定シーケンス中は温度、ガス圧力・流量、センサ特性の経時変化などの測定条件はシーケンス内で大きく変化しないと考えられるので、試料ガスと標準ガスとの比較により、両ガス間の微量な組成の違いを精密に測定でき、また測定結果への外乱の影響が低減できるなど、測定の安定性の向上を図ることもできる。

50

## 【0053】

なお、標準ガスまで使用する場合には測定装置のガス供給系に標準ガス用のガス流路を追加することになるが、これはガス供給系についての各種の既存技術を利用して容易に実現できる。たとえば、標準ガスは最初から気体の状態で準備しておくこともできるし、あるいは液体や固体から蒸発させることでガス供給系に導入してもよい。また、標準ガスを提供する際に、当初準備しておいた気体や液体・固体から発生する気体にパージガスなどの別の気体を混合させてもよい。また、これら3系統のガス流路は最終的には合流させる必要があるが、3つの流路を一か所で合流させてもよいし、あるいは試料ガス流路の上流側を一部分流させて標準ガス流路を構成し、そこに標準ガスが導入された後、両ガス流路をパージガスとの合流点の手前で合流させるなどの構成も考えられる。

10

## 【0054】

さらには、求められる判定精度が実現できる限りにおいて測定の再現性が高くかつセンサチップや測定装置間のバラツキなども較正可能である場合には、試料ガスの測定と標準ガスの測定とを互いに独立させ、別々の好都合な時点で行う測定手順やそのための測定系の構築も可能である。例えば標準ガスの測定と試料ガスの測定とを同時にあるいは一連の測定シーケンス中で相次いで行うのではなく、それぞれ別個に行い、これらの測定から得られた標準ガス測定データと試料ガス測定データとを比較してもよい。ここで、頭書の条件、すなわち求められる判定精度が実現できる限りにおいて測定の再現性が高くかつセンサチップや測定装置間のバラツキなども較正可能であるという条件、が満足される限り、試料ガスの測定に使用されるセンサチップや測定装置と標準ガスの測定に使用されるセンサチップや測定装置とは互いに同一の個体であってもよいし、一方の測定に使用されるものとは別のセンサチップや測定装置を使用してもよい。また、パージガスを利用すること無く、試料ガスと標準ガスのみを使用して測定しても良い。この場合は、標準ガスをパージガスとして利用して測定を行っても良い。さらには、試料ガスのみ、あるいは標準ガスのみを使用した測定も可能である。この場合、試料ガス、あるいは標準ガスを、十分に長い時間センサに曝露することにより、それぞれのガスが感応膜に十分に吸着・拡散し、センサが一定のシグナル値を示すまで待っても良い。このシグナルの絶対値をそのまま特徴量として利用しても良いし、測定前に大気などに十分に長い時間曝した場合のシグナルを測定しておき、それを基準点として利用しても良い。

20

## 【0055】

これに限定されるものではないが、例えば、同じ動物からの過去の乳汁と今回の搾乳結果の乳汁とを比較する場合、過去の乳汁自体あるいはそこからの揮発成分・蒸発成分を変質しないように保存しておくのは現実的ではない。そこで、過去の健常であることがすでに判っている時点での乳汁から得られたガスを測定してこれを標準ガスのデータとして蓄積しておけば、同一の動物からの今回の乳汁から得られたガスを試料ガスとして同様にデータ化することで、測定の再現性や各種のバラツキの較正可能性が担保できさえすれば、それぞれの測定の対象の乳汁がいずれも新鮮な状態での上記ガスの比較が実現できる。なお、ここで各ガスの測定結果のデータ化は特に限定しない。非限定的な例を挙げれば、各ガスとパージガスとの交互切り替えを行った時のセンサからの出力をそのままデジタル化するだけでもよいし、その他の形式の測定の際のセンサ出力のデジタル化をおこなってもよいし、その他例えば上述のようなデジタル化の結果のデジタル値を更にデータ処理するなどしてよい。

30

## 【0056】

表面応力センサの感応膜の材料としては、Poly(4-methylstyrene)（ポリ(4-メチルスチレン)）、Poly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)（ポリ(2,6-ジフェニル-p-フェニレンオキシド)）、Poly(vinylidene fluoride)（ポリ(フッ化ビニリデン)）、Cellulose Acetate Butyrate（酢酸酪酸セルロース）、Poly(ethyleneimine)（ポリ(エチレンイミン)）、フェニル基修飾シリカ/チタニア複合ナノ粒子（以下、「Phenyl-STNPs」とも称する。）及びPolystyrene（ポリスチレン）が挙げられるが、これらに限定されない。これらの感応膜材料は、一種を単独で用いてもよく、複数種を組み合わ

40

50

せて用いてもよい。

#### 【0057】

例えば、検査対象の試料として乳汁から発生したガスを使用する態様では、上記感応膜材料のうち、Poly(4-methylstyrene)、Poly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)、Poly(vinylidene fluoride)、Cellulose Acetate Butyrate及びPoly(ethyleneimine)からなる群から選択された少なくとも一を使用することができる。中でも、Poly(4-methylstyrene)、Poly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)、Cellulose Acetate Butyrate及びPoly(ethyleneimine)からなる群から選択された少なくとも一を使用することが好ましい。

また、検査対象の試料として尿から発生したガスを使用する態様では、上記感応膜材料のうち、Poly(4-methylstyrene)、Poly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)、Poly(vinylidene fluoride)、Phenyl-STNPs及びPolystyreneからなる群から選択された少なくとも一を使用することができる。中でも、Poly(4-methylstyrene)、Poly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)及びPoly(vinylidene fluoride)からなる群から選択された少なくとも一を使用することが好ましく、Poly(4-methylstyrene)及びPoly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)からなる群から選択された少なくとも一を使用することがより好ましい。

言い換えると、上記感応膜材料のうち、Poly(4-methylstyrene)、Poly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)及びPoly(vinylidene fluoride)は、乳汁及び尿を含む複数種類の検査対象に対して好適に使用され得る感応膜材料であり、その意味において、より汎用性に優れた感応膜材料であると言える。

上で例示した感応膜材料を用いた具体的な測定例については後述する。

#### 【0058】

なお、Poly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)（ポリ（2，6-ジフェニル-p-フェニレンオキシド））は、「テナックス」あるいは「Tenax」（登録商標）という名称でも知られる材料であり、その純度や添加物により数種類のものが市販されている。例えば、Tenaxの後ろにサフィックスを付加してTenax TAやTenax GR（Tenax GRはTenax重合時に23%のグラファイトカーボンを配合したもの）などが挙げられ、本実施形態の方法では、これらのいずれも用いることができる。また、Tenaxは各種の粒度分布のものが提供されており、粒度の範囲は、例えばTenax TA 20/35というようにメッシュで表記される。なお、後述する実施例では、Poly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)としてTenax TA 60/80（ジーエルサイエンス株式会社より入手）を使用した。

#### 【0059】

以下、実施例により本発明をより詳細に説明する。なお、以下の実施例は本発明を限定するものではなく、その理解を助けるためのものであることに留意されたい。

#### 【実施例】

#### 【0060】

本実施例では、図1に概略の構成を示した測定システムを使用した。

使用したMSSは、それぞれ異なる感応膜材料を塗布した複数個のMSSからなる集合体であった。以下では、それらの感応膜材料のうち、Poly(4-methylstyrene)を使用したMSSを「ChA」、Poly(2,6-diphenyl-p-phenylene oxide)を使用したMSSを「ChB」、Poly(vinylidene fluoride)を使用したMSSを「ChC」、Cellulose Acetate Butyrateを使用したMSSを「ChD」、Poly(ethyleneimine)を使用したMSSを「ChE」、フェニル基修飾シリカ／チタニア複合ナノ粒子（Phenyl-STNPs）を使用したMSSを「ChF」、Polystyreneを使用したMSSを「ChG」として説明する。

#### 【0061】

<試験1：飼育環境の異なる健康牛の乳汁から発生したガスの測定>

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 北海道農業研究センターにおいて、放牧により生牧草を給与して飼養された乳牛（放牧牛）の乳汁10mL（試料1）、及び、舎飼いによりサイレージを給与して飼養された乳牛（舎飼牛）の乳汁10mL（試料

10

20

30

40

50

2)を、それぞれバイアル瓶に収容して測定を行った。

なお、試料1及び試料2の乳汁は、ヒトの嗅覚で判別が可能であるほど香りが異なっており、ヒトの味覚による風味も大きく異なっていた。

#### 【0062】

測定システムを収容したインキュベータの温度は30℃に設定した。試料ガス及びバージガスの流量は10scmとし、サンプリング時間（各測定サイクルにおいて試料ガスインジェクションを行う時間）は120秒とした。また、サンプリング時間とバージ時間（各測定サイクルにおいてバージガスをMSSに与えてそのバージを行う時間）との比を1:4として測定を行った。具体的には、各測定サイクルでの測定シーケンスは、先ずバージガスを240秒間流し、次に試料ガスを120秒間流し、その後、再度バージガスを240秒間流す、という構成とした。つまり、各測定を連続的に実施したため、試料ガスを流した後に流すバージガスと、次の試料ガスを流す前に流すバージガスとは、途切れることなく連続的に流れることになった。従って、バージ時間は上記2つのバージ時間の合計となり、サンプリング時間とバージ時間との比は実質的に1:4となるのである。なお、これらの測定条件は、測定システムの構成に応じて適宜調整することができる点に留意されたい。10

#### 【0063】

上記測定シーケンスを行っている間に試料の切り替え（別の乳汁への切り替えなど）を行う手順についてここで説明する。サンプリング時間終了後、試料が入っているバイアル瓶を切り替えバルブによってガス流路から切り離す。これにより、測定対象の試料を、測定に影響を与えることなく任意のタイミングで次の試料に切り替えることができる。20

#### 【0064】

測定試料の交換作業（バイアル瓶の付け替え等）は数十秒を要し、また試料交換を行ったことを測定システムのデータ設定等に反映させる入力作業等が必要となるので、互いに異なる試料を測定する2つの測定の間にはセンサモジュールが停止する時間が必要となる。ところが、センサモジュールの停止によりモジュール温度が低下するため、ベースラインが変動する。このベースラインの変動は微細なシグナル差を測定する上では大きなノイズになるため、測定間のモジュール停止は1秒以内に抑えるのが理想的である。ここで、上述したようにサンプリング時間終了後に試料を収容しているバイアル瓶（もちろん、他の種類の試料収容容器等でも同様である）をガス流路から切り離すことで、切り離されている間にバイアル瓶の交換及びこの交換に伴うその他の作業を行うことができる。従って、このような手法では試料の切り替えをバージ処理と並行して行うことで、試料の切り替え時間を測定シーケンス上に実質的に現れないようにできる。30

#### 【0065】

結果を図4に示す。

図4は、ChAのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図である。図4では、試料1の測定結果を淡灰色で示し、試料2の測定結果を濃黒色で示した。

なお、図4に示す結果は、上記測定シーケンスの試料ガスインジェクション期間の開始時点（すなわち、最初のバージ期間の終了時点）をオフセットの起点に設定し、同一の試料について複数回の測定を行った結果のうち、典型的な結果をプロットしている。後述する図5～図14、及び、図18～図22についても同様である。40

#### 【0066】

図4からわかるように、ChAの感應膜材料を用いた場合には、試料ガスインジェクション期間の開始直後にシグナル強度が鋭く立ち上がった後、飽和値へ向かって漸近する挙動において、放牧牛に比べて舎飼牛のシグナル強度が若干高い時間区間（約270秒から325秒までの範囲）が見られるものの、何らかの特徴量を抽出して有意な差が得られるほどの差ではなく、当該時間区間以外のシグナルの時間経過はほぼ一致している。言い換えると、ChAの感應膜材料を用いた場合には、ヒトの嗅覚や味覚ではっきりと識別できるほどに香りや風味が異なる乳汁であっても、MSSで検知されるガス成分に対するシグナ50

ルとしては明確な差が見られなかった。このことから、ChAのMSSからのシグナルの経時変化においてこれとは異なる傾向が見られる場合には、乳牛の疾患に起因するものである可能性が高いことが示唆された。

#### 【0067】

<試験2：ケトーシス罹患牛の乳汁を模した乳汁から発生したガスの測定>

非特許文献2によれば、健康牛の乳中アセトン濃度は0.7 mmol/L未満であるのに対し、乳量の低下が明確に見られる高ケトン血症(hyperketonaemia)罹患牛の乳中アセトン濃度は1.4 mmol/Lを上回るとされている(表1参照)。

そこで、上記試験1で用いた試料2(舍飼牛の乳汁)の乳中アセトン濃度が0.7 mmol/Lであると仮定し、これと同じ舍飼牛の乳汁10mLにアセトン濃度70mmol/Lの水溶液を0.1mL添加して、乳中アセトン濃度が1.4 mmol/Lに近似するようにした試料(試料3)を調製し、これをケトーシス罹患牛の乳汁を模した乳汁とした。また、比較のために、試験1で用いたのと同じ舍飼牛の乳汁10mLに蒸留水を0.1mL添加した試料(試料4)を調製し、試料3及び試料4をそれぞれバイアル瓶に収容して測定を行った。

#### 【0068】

測定システムを収容したインキュベータの温度等の測定条件は、試験1と同様とした。

#### 【0069】

結果を図5に示す。

図5は、ChAのMSSからのシグナル(単位はmV)の時間変化(単位は秒)を示す図である。図5では、試料3の測定結果を淡灰色で示し、試料4の測定結果を濃黒色で示した。

#### 【0070】

図5からわかるように、ChAの感応膜材料を用いた場合には、試料3と試料4との間にシグナルの経時変化の違いが確認された。具体的には、試料ガスインジェクション期間の開始直後にシグナル強度が鋭く立ち上がった後、飽和値へ向かって漸近する挙動が異なる。また、試料ガスインジェクション期間からパージ期間に切り換えた直後のシグナル強度の鋭い立ち下りからベースラインに収束(復帰)するまでの挙動(シグナル強度が減少する傾向)にも違いが見られる。さらに、シグナル強度の飽和値にも違いが見られる。なお、パージ期間の開始時点をオフセットの起点に設定した場合と比較すると、図5に示す結果の方が試料3と試料4との測定結果の違いがより明りょうであった。

#### 【0071】

一方、ChB、ChD、ChEの感応膜材料を用いた場合にも試料3と試料4との間にシグナルの経時変化の違いが確認されたが、ChAの場合と比較するとそれほど明りょうではなかった(データ示さず)。このことは、ChB、ChDまたはChEのMSSによる測定結果単独での判定は困難である可能性を示唆するものであるとも言えるが、ChAやそれ以外の感応膜材料を用いたMSS(あるいはMSSとは異なるタイプの表面応力センサを含む他のガス検出手段)との組み合わせによる判定が可能である可能性を否定するものではない。

#### 【0072】

<試験3：ケトーシス罹患牛の乳汁から発生したガスの測定(1)>

乳中の-ヒドロキシ酪酸を半定量する製品(サンケトペーパー、(株)三和化学研究所)を用いた試験により強陽性(BHBA濃度1000μM)と判定された乳汁10mL(試料5)、及び、陰性(BHBA濃度50μM)と判定された乳汁10mL(試料6)を、それぞれバイアル瓶に収容して測定を行った。

なお、試料5及び試料6の測定は、乳汁採取後、約24時間常温に静置されたものを用いて行った。

#### 【0073】

試料5及び試料6の測定では、常温(約25℃)環境にバイアル瓶を置き、測定システムは開放系とした。測定中、センサモジュールの温度は約36.5℃で安定していた。

10

20

30

40

50

試料ガス及びバージガスの流量等、その他の測定条件は試験 1 と同様とした。

#### 【 0 0 7 4 】

なお、試料 5 及び試料 6 を採取した乳牛がそれぞれケトーシス罹患牛及び健康牛であることは、上記製品を用いた乳汁試料の試験結果に加え、 P T R - T O F - M S による乳汁試料及び尿試料の質量スペクトルにおけるアセトンに由来するピーク強度を総合的に分析して判定している。後述する試験 4 及び試験 5 についても同様である。

#### 【 0 0 7 5 】

結果を図 6 ~ 図 9 に示す。

図 6 は、 C h A の M S S からのシグナル（単位は m V ）の時間変化（単位は秒）を示す図である。  
10

図 7 は、 C h B の M S S からのシグナル（単位は m V ）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図 8 は、 C h D の M S S からのシグナル（単位は m V ）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図 9 は、 C h E の M S S からのシグナル（単位は m V ）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図 6 ~ 図 9 では、試料 5 の測定結果を淡灰色で示し、試料 6 の測定結果を濃黒色で示した。

#### 【 0 0 7 6 】

図 6 からわかるように、 C h A の感応膜材料を用いた場合には、試料 5 のシグナルの経時変化は、試料 6 のそれとは大きく異なっていた。具体的には、試料 5 では、試料ガスインジェクション期間の開始直後にシグナル強度が鋭く立ち上がった後、さらにシグナル強度が増加しながら飽和値へ向かって漸近するのに対して、試料 6 では、試料ガスインジェクション期間の開始直後にシグナル強度が鋭く立ち上がった際のシグナル強度は試料 5 よりも小さく、また、飽和値へ向かって漸近する際のシグナル強度の変化量は約 0 . 1 m V の範囲内に収まっている。結果的に、試料 5 と試料 6 とでは、シグナル強度の飽和値に有意な差が生じている。また、試料ガスインジェクション期間からバージ期間に切り換えた直後のシグナル強度の鋭い立ち下りからベースラインに収束（復帰）するまでの挙動（シグナル強度が減少する傾向）について見ると、試料 5 及び試料 6 のいずれもシグナル強度の鋭い立ち下りが生じているが、試料 5 では、試料 6 よりも高いシグナル強度値からベースラインに向けて緩やかに収束しており、試料 6 では、より短時間でシグナル強度が収束し、ベースラインへ復帰している。  
20

#### 【 0 0 7 7 】

また、図 6 に示した C h A の感応膜材料を用いた場合と同様の測定結果は、図 7 ~ 図 9 に示す C h B 、 C h D 、 C h E の感応膜材料を用いた場合にも得られた。

#### 【 0 0 7 8 】

これらの結果から、 C h A 、 C h B 、 C h D 、 C h E の感応膜材料を用いた M S S により、各々単独の測定結果から、ケトーシス罹患の判定が可能であることがわかった。より具体的には、測定結果に対して適切なオフセット処理を施すことによって、上述した試験紙を用いた半定量法により陰性と判定された乳汁と強陽性と判定された乳汁との違いを明確に識別できることがわかった。また、これらの M S S を使用して得られた複数の測定結果を組み合わせることによって、ケトーシス罹患の判定精度をより高めることができるこ  
30 とが示唆された。  
40

#### 【 0 0 7 9 】

なお、図示はしていないが、 C h C の感応膜材料を用いた M S S では、 C h A 、 C h B 、 C h D 、 C h E の感応膜材料を用いた M S S と同様に、単独の測定結果からのケトーシス罹患の判定が可能であることを示す結果が得られたが、複数の測定結果を組み合わせることがより好ましいことが示唆された。言い換えると、 C h C の感応膜材料を用いた M S S は、 C h A 、 C h B 、 C h D 、 C h E の感応膜材料を用いた M S S （あるいは M S S とは異なるタイプの表面応力センサを含む他のガス検出手段）との組み合わせによる判定に  
50

より適していることが示唆された。

#### 【0080】

<試験4：ケトーシス罹患牛の乳汁から発生したガスの測定(2)>

乳中の - ヒドロキシ酪酸を半定量する製品（サンケトペーパー、（株）三和化学研究所）を用いた試験により偽陽性～陽性（B H B A濃度100～200μM）と判定された乳汁10mL（試料7）、及び、陰性（B H B A濃度0～50μM）と判定された乳汁10mL（試料8）を、それぞれバイアル瓶に収容して、温度条件の異なる以下の2種類の測定を行った。

なお、試料7及び試料8の測定は、乳汁採取直後に冷蔵されたものを用いて行った。

#### 【0081】

##### 〔測定a〕

測定aでは、常温（約20℃）環境にバイアル瓶を置き、測定システムは開放系とした。測定中、センサモジュールの温度は約36.5℃で安定していた。

バイアル瓶の温度条件以外の、試料ガス及びパージガスの流量等、その他の測定条件は試験1と同様とした。

#### 【0082】

##### 〔測定b〕

測定bでは、約30℃に設定した湯浴中にバイアル瓶を設置し、測定システムは開放系とした。測定中、センサモジュールの温度は約36.5℃で安定していた。

バイアル瓶の温度条件以外の、試料ガス及びパージガスの流量等、その他の測定条件は試験1と同様とした。

#### 【0083】

測定a及び測定bの結果を、それぞれ、図10～図11、及び、図12～図14に示す。

図10は、測定aでのChAのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図11は、測定aでのChDのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図12は、測定bでのChAのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図13は、測定bでのChDのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図14は、測定bでのChEのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図10～図14では、試料7の測定結果を淡灰色で示し、試料8の測定結果を濃黒色で示した。

#### 【0084】

図10からわかるように、測定aにおいて、ChAの感応膜材料を用いた場合には、試料7と試料8との間にシグナルの経時変化の違いが確認された。具体的には、試料ガスインジェクション期間の開始直後にシグナル強度が鋭く立ち上がった後、飽和値へ向かって漸近する挙動が異なる。また、試料ガスインジェクション期間からパージ期間に切り換えた直後のシグナル強度の鋭い立ち下りからベースラインに収束（復帰）するまでの挙動（シグナル強度が減少する傾向）にも違いが見られる。さらに、シグナル強度の飽和値にも違いが見られる。

#### 【0085】

ここで、測定bにおいてChAの感応膜材料を用いた場合の結果を示す図12を参照すると、図10に示す結果よりも、試料7のシグナルの経時変化は、試料8のそれとは大きく異なっていることがわかる。具体的には、試料8では、測定aで得られた結果と測定bで得られた結果とに特に違いは見られなかったが、試料7では、測定aで得られた結果よりも測定bで得られた結果において、試料ガスインジェクション期間からパージ期間に切り換えた直後のシグナル強度の鋭い立ち下り時のシグナル強度値が高く、その値からベー

10

20

30

40

50

スラインに向けて緩やかに収束している。その結果、図12に示す測定bの結果では、試料7と試料8との間で、ページ期間におけるシグナル強度の減少挙動の違いがより明りようである。

#### 【0086】

これらの結果から、MSSの感應膜材料として適切な材料を選択することに加えて、試料を収容したバイアル瓶の温度を適切に制御することによって、試料(乳汁)から発生したガスの測定精度をより向上させることができ、ひいてはケトーシス罹患及び/またはケトーシス罹患の可能性の有無の判定精度をより向上させることができることが示唆された。

#### 【0087】

また、図10及び図12に示したChAの感應膜材料を用いた場合と同様の特徴を有する測定結果は、図11及び図13に示すChDの感應膜材料を用いた場合にも得られた。

10

#### 【0088】

なお、図示はしていないが、ChBの感應膜材料を用いた場合にも、ChA、ChDの感應膜材料を用いた場合と同様の特徴を有する測定結果が得られたが、バイアル瓶の温度条件の違いと測定結果との相関関係は、ChA、ChDの感應膜材料を用いた場合の方がより顕著であった。

#### 【0089】

さらに、ChEの感應膜材料を用いた場合には、測定aにおいては試料7及び試料8との間の、シグナルの経時変化の違いが明りようではなかったのに対して、測定bにおいては、図14に示すように、ChA、ChDの感應膜材料を用いた場合(図12、図13)に匹敵するほど、試料7のシグナルの経時変化が、試料8のそれとは異なっていた。

20

#### 【0090】

これらの結果から、ChA、ChDの感應膜材料を用いたMSSによる測定において、試料を収容したバイアル瓶の温度を任意の値に維持することで、各々単独の測定結果から、ケトーシス罹患の可能性がある段階での判定が可能であることがわかった。より具体的には、測定結果に対して適切なオフセット処理を施すことによって、上述した試験紙を用いた半定量法により偽陽性～陽性と判定された乳汁と陰性と判定された乳汁との違いを明確に識別できることがわかった。また、当該バイアル瓶の温度を適切な値に設定することで、判定精度をより向上させることができることがわかった。これらの知見は、ChBの感應膜材料を用いたMSSについても同様に当てはまる。さらに、試料を収容したバイアル瓶の温度と、MSSの感應膜材料の組み合わせによっては、単独の測定結果からのケトーシス罹患の判定が可能になる場合や、他の感應膜材料を用いたMSS(あるいはMSSとは異なるタイプの表面応力センサを含む他のガス検出手段)との組み合わせによる判定に有用な測定結果が得られる場合があることが示唆された。

30

#### 【0091】

<試験5：ケトーシス罹患牛の尿から発生したガスの測定>

[乳汁及び尿を用いたプロトン移動反応飛行時間型質量分析]

測定システムを用いた試料の測定にあたり、プロトン移動反応飛行時間型質量分析(PTR-TOF-MS)により、ケトーシス罹患牛及び健康牛から採取した乳汁及び尿の測定を行った。

40

#### 【0092】

図15A及び図15Bは、それぞれ、ケトーシス罹患牛の乳汁、及び、健康牛の乳汁の、PTR-TOF-MSで得られた質量スペクトルを示す図である。

ここで、ケトーシス罹患牛は、乳中の-ヒドロキシ酪酸を半定量する製品(サンケトペーパー、(株)三和化学研究所)を用いた試験により陽性～強陽性(BHBA濃度200～1000μM)と判定された乳牛であり、健康牛は、上記試験により陰性(BHBA濃度0～50μM)と判定された乳牛である。測定に用いた乳汁試料の量は2mLであり、ガスの希釈倍率は100倍とした。後述する尿試料の測定(図16A及び図16B)についても同様である。

#### 【0093】

50

図15A及び図15Bからわかるように、ケトーシス罹患牛の乳汁と健康牛の乳汁の質量スペクトルにおいて、ピーク位置( $m/z$ 値)は類似性が高いが、 $m/z$ 値が約50～80の範囲にあるピーク強度は、ケトーシス罹患牛と健康牛とで有意な差が見られ、分析の結果、各図中に矢印で示すように、アセトン及び2-ブタノンに由来するピークが含まれていることが確認された。

#### 【0094】

図16A及び図16Bは、それぞれ、ケトーシス罹患牛の尿、及び、健康牛の尿の、PTR-TOF-MSで得られた質量スペクトルを示す図である。

#### 【0095】

図16A及び図16Bの質量スペクトルにおいても、上述した乳汁試料と同様の結果が得られた。すなわち、ケトーシス罹患牛の尿と健康牛の尿の質量スペクトルにおいて、ピーク位置( $m/z$ 値)は類似性が高いが、 $m/z$ 値が約50～80の範囲にあるピーク強度は、ケトーシス罹患牛と健康牛とで有意な差が見られ、分析の結果、各図中に矢印で示すように、アセトン及び2-ブタノンに由来するピークが含まれていることが確認された。  
10

#### 【0096】

さらに、興味深いことに、図15Aと図16A、及び、図15Bと図16Bを対比すると、ケトーシス罹患牛の乳汁と尿の質量スペクトル、及び、健康牛の乳汁と尿の質量スペクトルは、全体のピークプロファイルがほぼ一致していることがわかる。そこで、これらの試料における特徴的な成分であるアセトン及び2-ブタノンの濃度について、さらに分析を行った。

#### 【0097】

図17A、図17B及び図17Cは、ケトーシス罹患牛の乳汁及び尿、並びに、健康牛の乳汁及び尿中の、PTR-TOF-MSによる、アセトン及び2-ブタノンの濃度の測定結果を示す図である。図17Aは、アセトン及び2-ブタノンの濃度の測定結果と一緒に示した図であり、実線がアセトン、破線が2-ブタノンである。図17B及び図17Cは、図17Aに示したアセトン及び2-ブタノンの濃度の測定結果を別々に示した図であり、図17Bがアセトン、図17Cが2-ブタノンである。

#### 【0098】

図17A～図17Cに示した測定結果から、本試験において、ケトーシス罹患牛及び健康牛から採取された乳汁及び尿における特徴的な成分であるアセトン及び2-ブタノンの濃度は、ケトーシス罹患牛の乳汁と尿、及び、健康牛の乳汁と尿の間で、非常に近しい値であること、さらに言えば、その差はわずかであり、ほぼ一致しているとみなせる程度であることがわかった。  
30

#### 【0099】

このように、図15A及び図15B、図16A及び図16B、並びに、図17A～図17Cに示したPTR-TOF-MSの結果は、乳牛の乳汁と尿という異なる種類の体液であっても、ケトーシス罹患の有無と、それらの体液から発生するガスの組成における特定の成分(例えば、アセトン及び2-ブタノン)の含有量(濃度)との間の相関関係は共通していることを示しており、ひいては、上記試験1～4での測定に用いた乳汁のみならず、動物から採取される乳汁以外の体液、例えば血液、尿、唾液、汗も、そこから発生するガスを用いることでケトーシス罹患の判定を行うことが可能であることを示唆している。  
40

#### 【0100】

#### 【尿試料の測定】

次に、上述した知見を基に、ケトーシス罹患牛の尿2mL(試料9)、及び、健康牛の尿2mL(試料10)を、それぞれバイアル瓶に収容して測定を行った。

#### 【0101】

試料9及び試料10の測定では、常温(約25℃)環境にバイアル瓶を置き、測定システムは開放系とした。測定中、センサモジュールの温度は約36.5℃で安定していた。試料ガス及びパージガスの流量等、その他の測定条件は試験1と同様とした。

#### 【0102】

10

20

30

40

50

結果を図18～図22に示す。

図18は、ChAのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図19は、ChBのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図20、ChCのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図21は、ChFのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図22は、ChGのMSSからのシグナル（単位はmV）の時間変化（単位は秒）を示す図である。

図18～図22では、試料9の測定結果を淡灰色で示し、試料10の測定結果を濃黒色で示した。

#### 【0103】

図18からわかるように、ChAの感応膜材料を用いた場合には、試料9と試料10との間にシグナルの経時変化の違いが確認された。具体的には、試料ガスインジェクション期間の開始直後にシグナル強度が鋭く立ち上がった後、飽和値へ向かって漸近する挙動が異なる。また、試料ガスインジェクション期間からバージ期間に切り換えた直後のシグナル強度の鋭い立ち下りからベースラインに収束（復帰）するまでの挙動（シグナル強度が減少する傾向）にも違いが見られる。さらに、シグナル強度の飽和値にも違いが見られる。

#### 【0104】

また、図18に示したChAの感応膜材料を用いた場合と同様の測定結果は、図19～図22に示すChB、ChC、ChF、ChGの感応膜材料を用いた場合にも得られた。

#### 【0105】

これらの結果から、ChA、ChB、ChC、ChF、ChGの感応膜材料を用いたMSSにより、各々単独の測定結果から、ケトーシス罹患の判定が可能であることがわかった。より具体的には、測定結果に対して適切なオフセット処理を施すことによって、上述した試験紙を用いた半定量法により陰性と判定された乳牛の尿と陽性～強陽性と判定された乳牛の尿との違いを明確に識別できることがわかった。また、これらのMSSを使用して得られた複数の測定結果を組み合わせることによって、ケトーシス罹患の判定精度をより高めることができることが示唆された。

#### 【0106】

例えば、検査対象の試料として乳汁と尿の両方を比較的容易に（動物に追加の負担を与えないように）取得できる場合の測定系としては、ChAの感応膜材料を用いたMSSを単独で使用して、乳汁から発生したガスと尿から発生したガスを測定し、その結果に基づいてケトーシス罹患の判定を行うことができる。

また、複数の感応膜材料を用いる場合の例としては、ChA～ChGの感応膜材料をそれぞれ塗布したMSSの集合体を備えた測定システムを構成し、ChA、ChB及びChCの感応膜材料を用いたMSSでは乳汁から発生したガスと尿から発生したガスを測定し、ChD及びChEの感応膜材料を用いたMSSでは乳汁から発生したガスを測定し、ChF及びChGの感応膜材料を用いたMSSでは尿から発生したガスを測定し、これらの結果を組み合わせることによって、ケトーシス罹患の判定を行うこともできる。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0107】

本発明は、検査対象の体液として乳汁を使用する場合、典型的には、乳牛に適用して好適である。また、乳牛のほかに産業として乳汁を生産するために飼育される動物、例えば、山羊、羊、スイギュウ（水牛）、ヤク等のウシ科の動物、馬などに適用しても好適である。より具体的には、本発明は、乳牛等、乳汁を生産するために多頭飼育される動物において、ケトーシス罹患の個体、及び／又は、ケトーシス罹患の疑いのある個体を予備的に抽出する（スクリーニングする）のに特に好適である。また、乳汁以外の体液も、体液の

10

20

30

40

50

種類や動物の種類、また採取手法によりその採取の容易性や、必要な時点に得られるかどうかの確実性などが異なるが、状況に応じて適宜利用可能な体液を検査対象とすることができる。

【 0 1 0 8 】

近年、乳牛等の飼養管理システムにおいて、モーションセンサ等を活用することによる、疾患や体調変化の兆候等の早期発見の取り組みがなされている。本発明をそのような飼養管理システムと組み合わせることで、動物の健康管理をより簡便かつ効率的に行うことが可能となり、生産性の向上あるいは維持に資することが期待される。

10

20

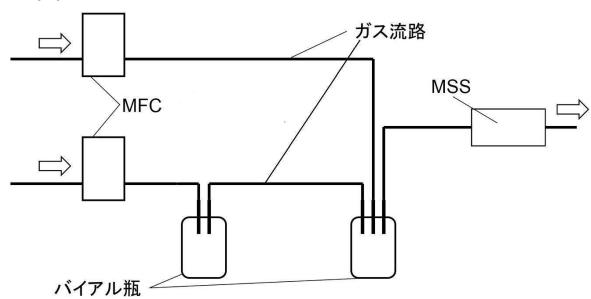
30

40

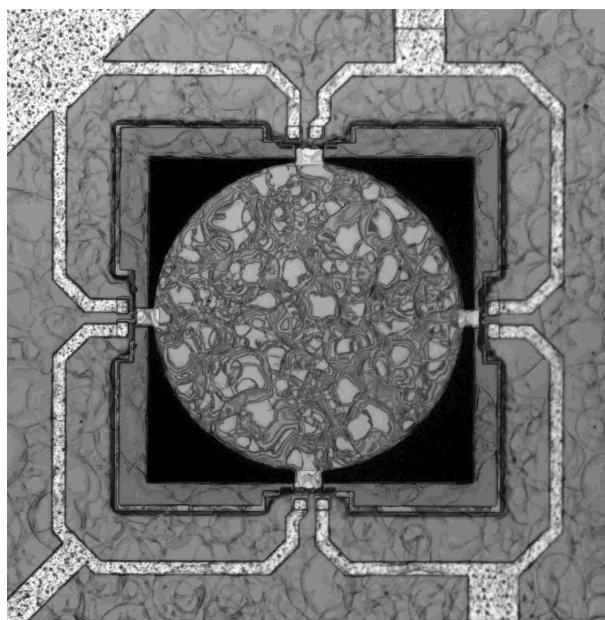
50

【図面】

【図 1】



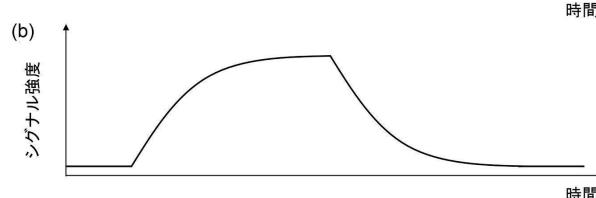
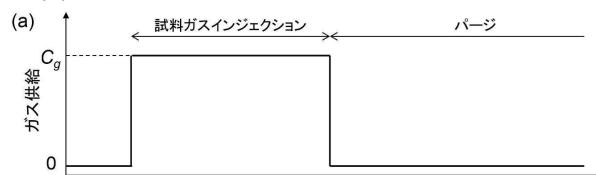
【図 2】



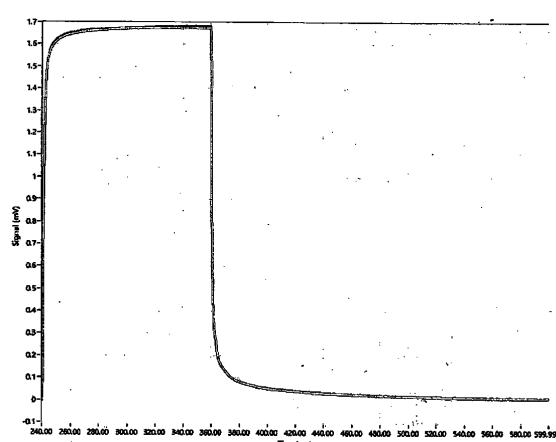
10

20

【図 3】



【図 4】

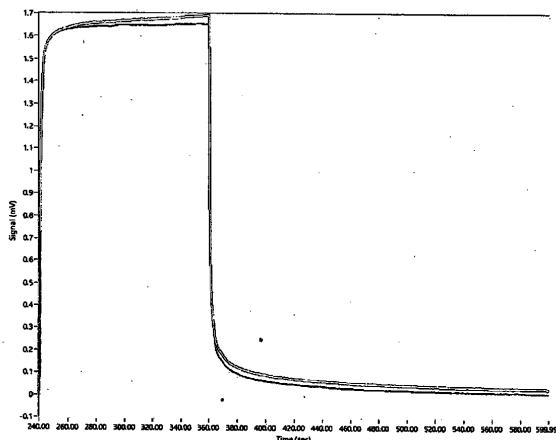


30

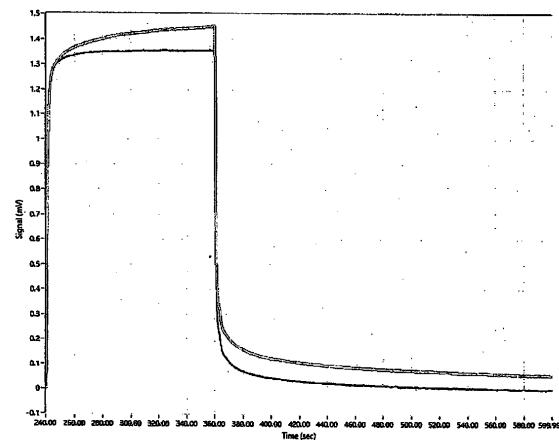
40

50

【図 5】

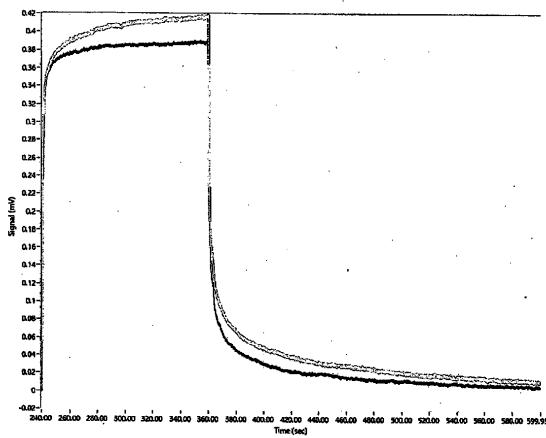


【図 6】

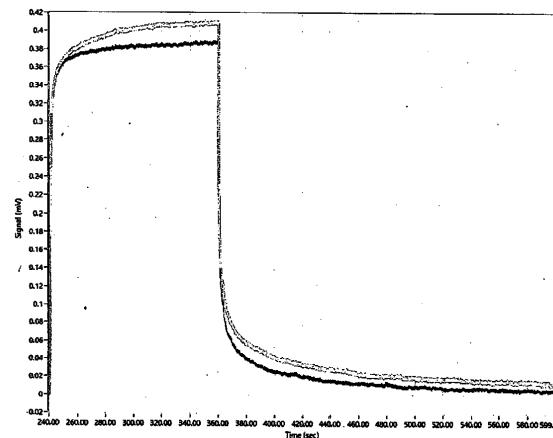


10

【図 7】



【図 8】



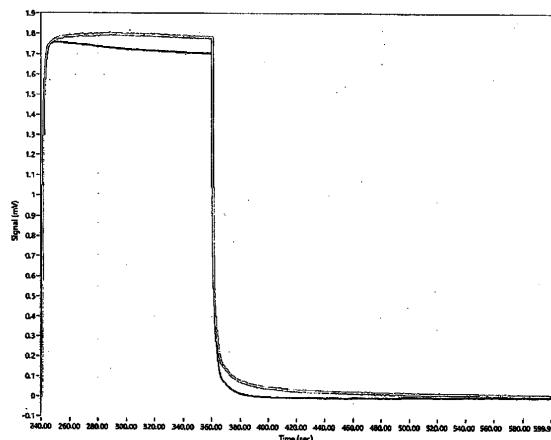
20

30

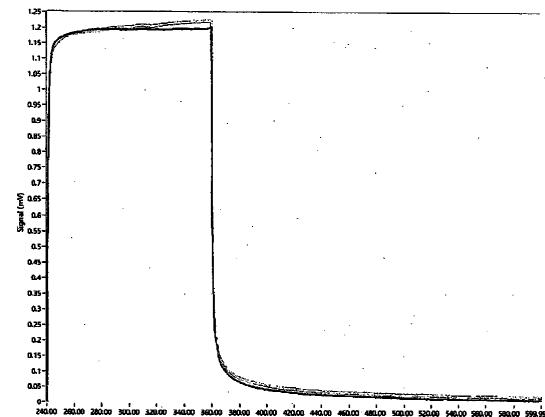
40

50

【図 9】

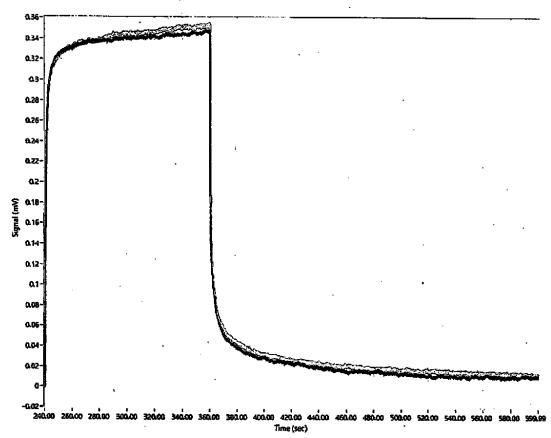


【図 10】

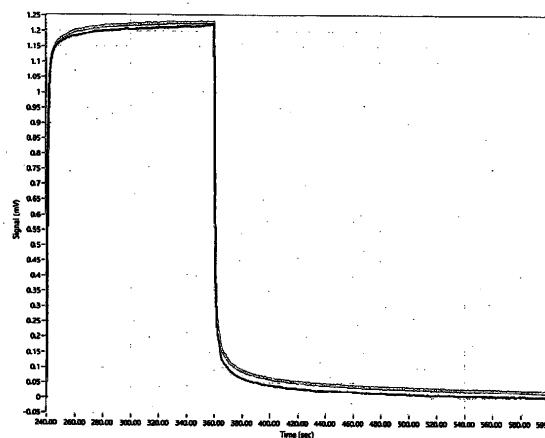


10

【図 11】



【図 12】



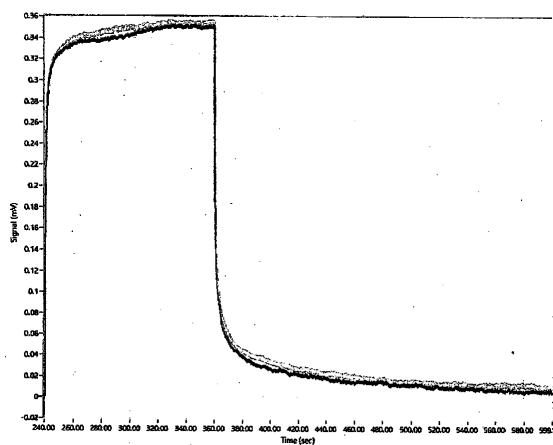
20

30

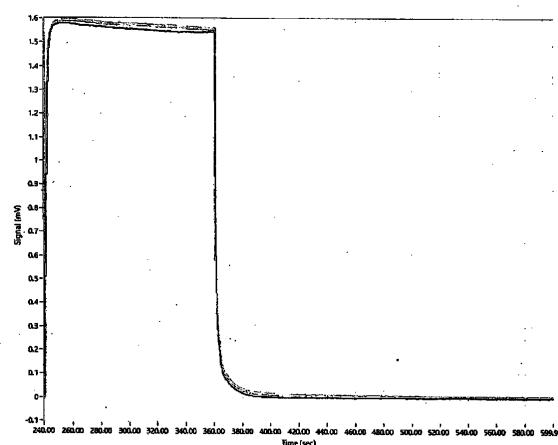
40

50

【図 1 3】

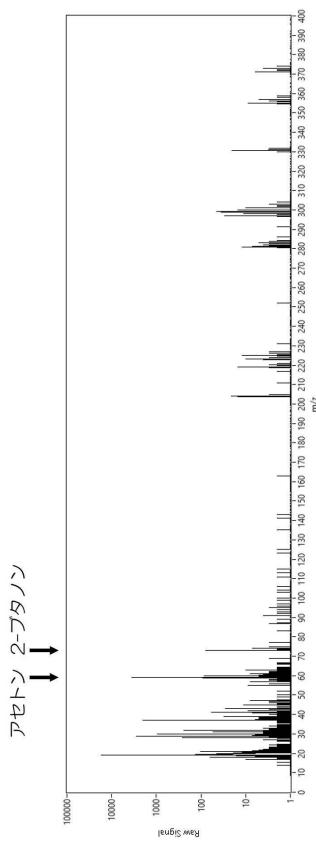


【図 1 4】

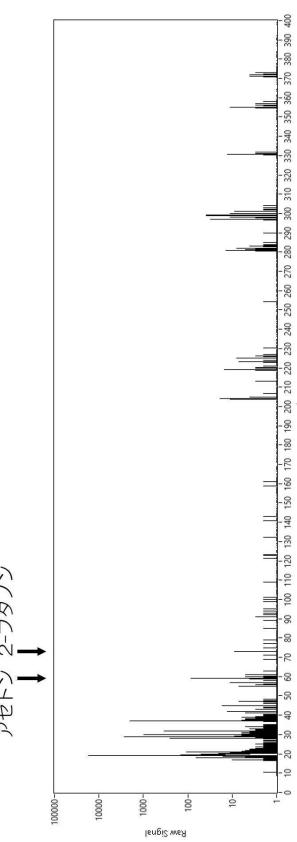


10

【図 1 5 A】



【図 1 5 B】



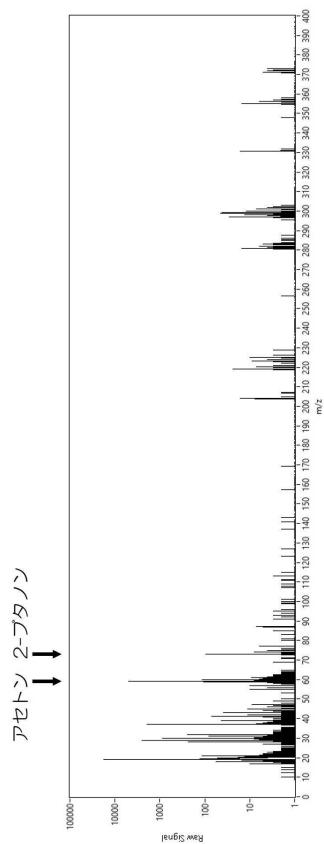
20

30

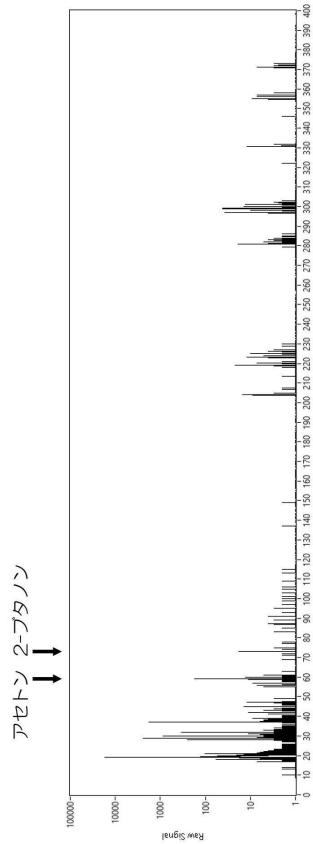
40

50

【図 16 A】



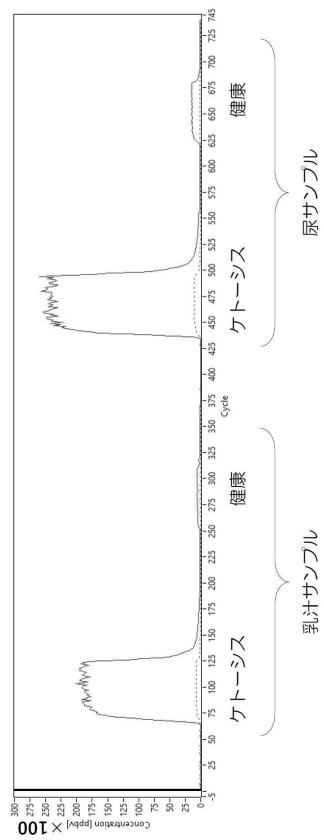
【図 16 B】



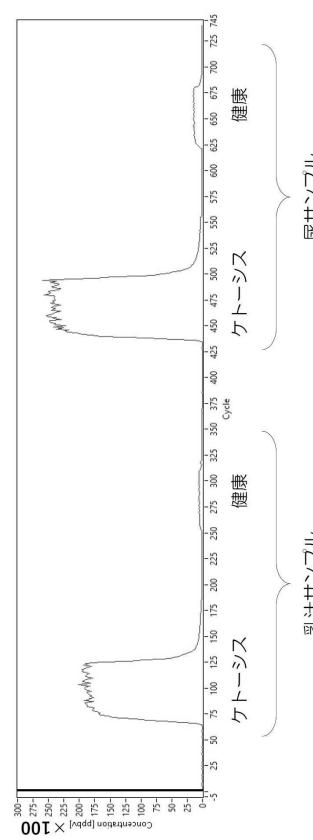
10

20

【図 17 A】



【図 17 B】

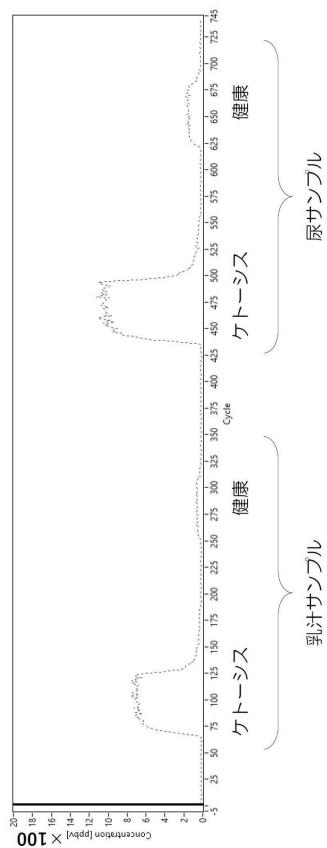


30

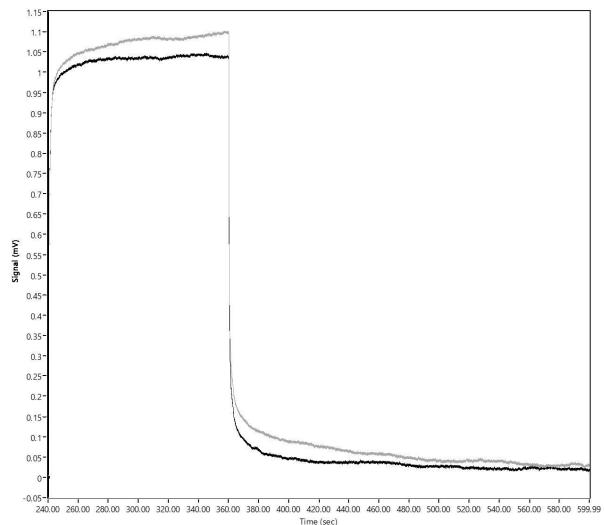
40

50

【図 17C】

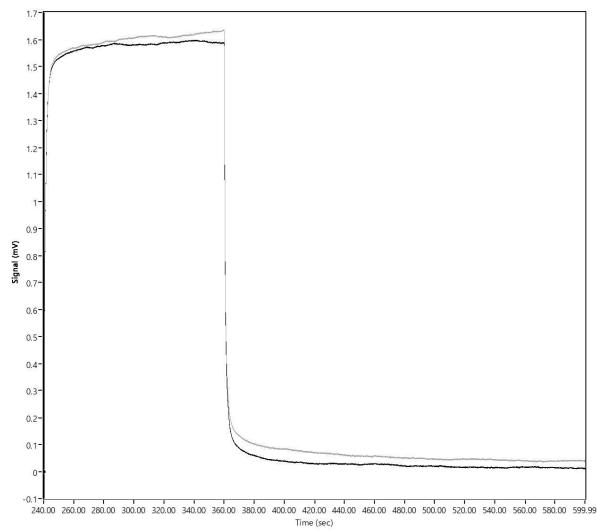


【図 18】

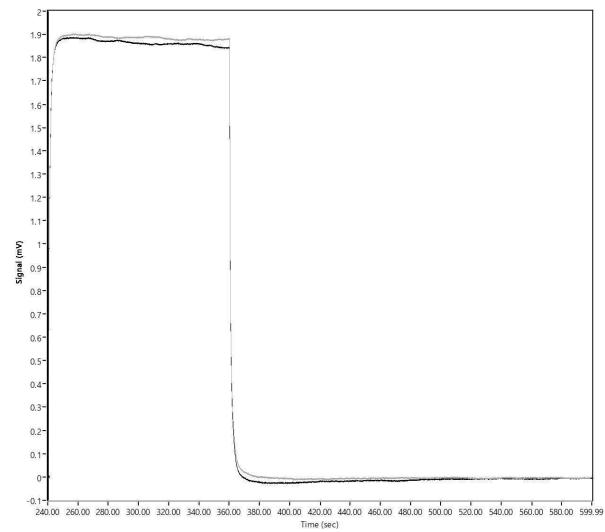


10

【図 19】



【図 20】



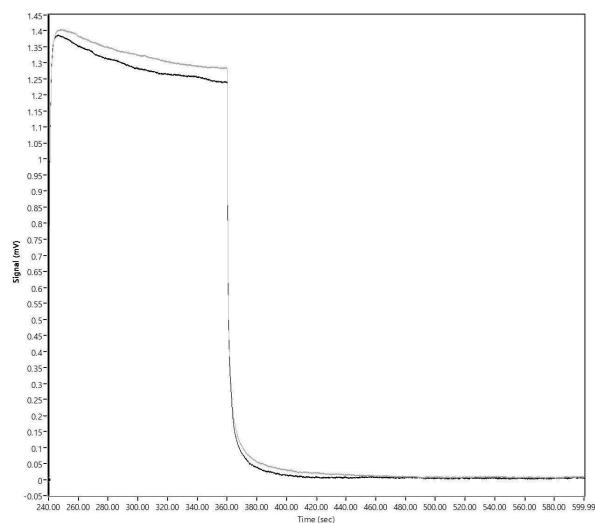
20

30

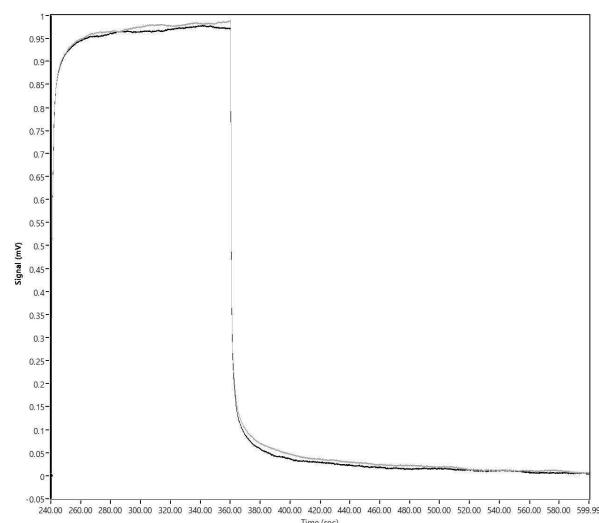
40

50

【図 2 1】



【図 2 2】



10

20

30

40

50

---

フロントページの続き

法人農業・食品産業技術総合研究機構 畜産研究部門内

(72)発明者 吉川 元起

茨城県つくば市千現一丁目2番地1 国立研究開発法人物質・材料研究機構内

(72)発明者 南 皓輔

茨城県つくば市千現一丁目2番地1 国立研究開発法人物質・材料研究機構内

(72)発明者 今村 岳

茨城県つくば市千現一丁目2番地1 国立研究開発法人物質・材料研究機構内

(72)発明者 松阪 秀喜

茨城県つくば市千現一丁目2番地1 国立研究開発法人物質・材料研究機構内

(72)発明者 根本 尚大

茨城県つくば市千現一丁目2番地1 国立研究開発法人物質・材料研究機構内

審査官 中村 直子

特開2017-167036(JP,A)

国際公開第2020/110720(WO,A1)

特開昭62-135771(JP,A)

特開昭49-000151(JP,A)

国際公開第2018/123296(WO,A1)

特開2017-207424(JP,A)

HAUER, C. et al , Determination of Acetone in Cow Milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Detection of , JOURNAL OF DAIRY SCIENCE , American Dairy Science Association , 2001年03月01日 , Vol.84/No.3 , p.575-582 , DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)74510-9

HAUER, C. et al , Determination of Acetone in Cow Milk by Fourier Transform Infrared Spectroscopy for the Detection of , JOURNAL OF DAIRY SCIENCE , American Dairy Science Association , 2001年03月01日 , Vol.84/No.3 , p.575-582

(58)調査した分野 (Int.Cl. , DB名)

G 01 N 33 / 48 - 33 / 98

G 01 N 19 / 00

G 01 N 5 / 02

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )

C a p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )