繊維製品中のカシミア及び他の獣毛類の MALDI-TOF 質量分析計による同定

大箸 信一^{*1, #}・出村 由香^{*1}・佐野 元昭^{*1}・吉岡陽一郎^{*2}**Identification of Cashmere and Other Animal Hair Fibers in Textiles
by MALDI-TOF Mass Spectrometry***Shinichi Ohashi^{*1, #}, Yuka Demura^{*1}, Motoaki Sano^{*1}, and Yoichiro Yoshioka^{*2}*^{*1} Genome Biotechnology Laboratory, Kanazawa Institute of Technology,
3-1 Yatsukaho, Hakusan, Ishikawa 924-0838, Japan^{*2} Boken Quality Evaluation Institute, 1-8-15 Ue-Machi, Chuo-Ku, Osaka 540-0005, Japan

Abstract: We have recently developed new methods by which we can identify the animal species based on the difference in the amino acid sequences of keratin proteins using SDS-PAGE and MALDI-TOF mass spectrometry. In this paper, we report the effect of processing, especially dyeing, on the identification of animal species. The method was also successfully applied for identifying animal species in blends with natural fibers, chemical fibers, and other animal fibers. Camel, alpaca, horse, rabbit, and other animal hair fibers were used and animal species-specific peaks were observed in MALDI-TOF mass analysis.

(Received 3 October, 2013 ; Accepted 17 December, 2013)

1. 緒 言

カシミアは獣毛の中でも最も貴重で、高価な繊維の一つである。一頭のカシミアヤギから1年間に取れる繊維の量は150~200 gと少量であり、世界的な供給量は極めて限られている。そのため、カシミア製品の品質を保証し、消費者を守るためには鑑別技術が非常に重要である。現在、鑑別技術としては顕微鏡技術が実用化されているほとんど唯一の技術で、日本では光学顕微鏡法が、欧米では電子顕微鏡法が主に利用されている。顕微鏡法は用いる装置も比較的安価であり、簡便な方法であるが、人手と時間がかかり、鑑別技術者の経験に依存する部分が大きく、また、試料によっては顕微鏡による鑑別が極めて難しい場合があるため、顕微鏡法に代わる、または、補完する方法の開発が強く望まれている。

顕微鏡法の代替法としてはDNA法[1-3]が最も期待されており、一部実用化されているだけでなく、国際標準化に向けた手続きが進められている[4]。DNA法は感度が非常に高いのが特徴であるが、濃染色されたものなど、一部の試料については検出が困難な場合があることが報告されている[2]。この他に、抗原-抗体反応を利用した方法[5]などが報告されているが、いずれも実用化には

至っていない。

獣毛の約90%はケラチンⅠ、ケラチンⅡ、ケラチン関連タンパク質などのタンパク質からなっている。ケラチンタンパク質のアミノ酸配列は動物種により異なっていることが知られており、この違いを検出することができれば、動物種の同定が可能である(ペプチド法)。HollemeyerらはMALDI-TOF質量分析計を利用して羽毛及び獣毛の同定を試み、種特異的なピークの存在を報告している[6]。しかし、その後、この方法の詳細は報告されていない。

羊毛中のケラチンタンパク質についてはPlowmanらの詳細な研究が報告されている[7,8]。これまでに、11種類のタイプⅠケラチンタンパク質、6種類のタイプⅡケラチンタンパク質、26種類のケラチン関連タンパク質が報告されている。これらのケラチンタンパク質の特徴の一つは、シスチン含量が非常に高いことで、分子内、分子間で多数のジスルフィド(S-S)結合が形成されている。そのため、一般にケラチンタンパク質は不溶性で、分子種が多様であることと相まって、ペプチド法を用いた獣毛の同定を困難にしている。

著者らは、最近、SDS-PAGE電気泳動とMALDI-TOF質量分析計を用いた羊毛・獣毛の鑑別法を報告した[9]。粉碎した獣毛を界面活性剤を含む緩衝液中でジチオスレイトール(DTT)を用いて還元して可溶化し、得られた抽出液をSDS-PAGE電気泳動で分離する。得られたタンパク質バンドを切り出し、トリプシン処理を行った後、MALDI-TOF質量分析計で分析することにより、 m/e =

corresponding author

^{*1} 金沢工業大学ゲノム生物学研究所^{*2} (一財)ボーケン品質評価機構

2450-2750 の範囲に動物種特異的なピークを見いだした。

本報告では、上記の方法が実際の織物などの繊維製品に含まれている獣毛類の同定に使えるかどうかを明らかにするため、加工、特に、染色の影響、他の繊維との混紡の影響などについて明らかにした結果を報告する。また、本方法の他の動物種の同定への応用についても述べる。

2. 実験

2.1 材料

分析試料は CCMi Fiber Box 2011[10]中の繊維、および、カシミア・キャメルヘア工業会会員の国内紡績業より提供を受けた繊維、織物を用いた。試料は更なる洗浄などは行わず、そのまま用いた。

2.2 繊維の粉碎

繊維はハサミで細断、または、レッチェ社製ボールミル(MM400)で粉碎した。粉碎した繊維は室温で真空乾燥後、用いた。

2.3 繊維の還元・溶解

25 mg の繊維を 1.5 ml マイクロチューブに秤り取り、50 mmol/l の DTT を含む 4% ドデシル硫酸ナトリウム(SDS)、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.8)を 0.5 ml 加え、95℃ に保つことで反応を開始した。反応はアルミブロックバスを用い、静置状態で行った。所定時間後、15,000 rpm で 5 分間遠心分離し、抽出液と不溶物を分けた。分離した抽出液に 100 mmol/l の濃度になるようにヨード酢酸アミド(IAA)を加え、25℃ で 30 分間反応し、25 mmol/l の DTT を添加して反応を停止した。15,000 rpm で 5 分間遠心分離し、以降の分析に用いた。くり返し反応を行う場合は、遠心分離後の不溶物に再度、DTT、SDS を含むリン酸緩衝液を加え、同様の操作を行った。

Fig. 1 Maldi-Tof mass spectra of (a) cashmere, Alashan type white and (b) cashmere, bleached from white in the region 700-3000.

2.4 電気泳動

SDS-PAGE 電気泳動は既製ゲル(アトー社製 e・パジェル, ゲルサイズ 90 mm×83 mm, 厚さ 1 mm)および電気泳動槽(アトー社製 AE-6513P 型)を用いて行った。染色はクマシーブリリアントブルー(CBB)(アトー社製イージーステイン・アクア)で行い、水で脱色し、写真撮影を行った。

2.5 スポットの採取、トリプシン処理、質量分析

SDS-PAGE 電気泳動ゲルからのスポットの切り出し、CBB の除去、ゲル内トリプシン処理、トリプシン処理ペプチドの溶出、マトリックスとの混合、および Maldi-Tof 質量分析用金属プレートへのスポットティングは xcise (Proteome Systems, 島津製作所)を用いて行った。マトリックスとしては CHCA を用いた。Maldi-Tof 質量分析装置は島津 AXIMA-CFRplus を用い、タンパク質の同定には Matrix Science 社製 Mascot を用いた。データベースとしては NCBI および MSDB を利用した。

3. 結果と考察

3.1 羊毛・獣毛の抽出及び同定に及ぼす加工の影響

市販されている繊維製品のほとんどは、漂白、染色などさまざまな加工が加えられている。化学分析を行う場合、こうした加工が分析結果に影響を及ぼすことは少なくない。一方で、分析工程を単純化するためには前処理をできるだけ減らし、どの試料に対しても同一の前処理で済ませることが望ましい。そこで、羊毛・獣毛製品の加工処理としてよく用いられている漂白、脱色、染色などの影響を調べた。

分析試料としては CCMi Fiber Box 2011 に含まれる羊毛・獣毛のうち、脱色などの加工が施されたものを用いた。羊毛・獣毛はハサミで細かく切るか、ミキサーミルで粉碎し、抽出は 50 mmol/l の DTT を含む 4% SDS、0.1 M リン酸緩衝液(pH 7.8)を用い、95℃ で 1 時間行った。さらに、遠心分離して上清を分け、残渣に同様の抽出緩衝液を加えて、3 時間反応した。抽出タンパク質溶液を SDS-PAGE 電気泳動で分離し、ケラチン I が含まれるバンドを切り出し、トリプシン処理を施した後、MALDI-TOF 質量分析計で同定を行った。Fig. 1 には、未処理および漂白処理を行ったカシミアの MALDI-TOF 質量分析スペクトルを示す。両者のスペクトルはほとんど違いがなく、加工により新たなピークが生じることもなかった。他の加工試料についても全く同様の結果であった。

Fig. 2 には、未処理、および加工処理を施したカシミア、羊毛、ヤクの MALDI-TOF 質量分析スペクトルを示した。m/e = 2450-2750 の領域にはカシミアで m/e = 2692、羊毛で 2665、ヤクで 2504 付近に動物種特異的なピークが現れるが、分析を行った全ての試料についてこれらのピークが認められた。また、加工により新たなピークの出現も認められなかった。以上のことから、定性分析に対して白

Fig. 2 Maldi-ToF mass spectra of unprocessed and processed cashmere, wool and yak in the region 2450-2750. a) Cashmere, Alashan type white ; b) cashmere, bleached from white ; c) cashmere, brown ; d) cashmere, decolored from brown ; e) wool, fine, native sheep ; f) wool, descaled, native sheep ; g) wool, steamed, native sheep ; h) yak, dark brown ; i) yak, bleached.

色繊維をより白くするための漂白，有色繊維を白くするための脱色などの加工の影響は全くないことが明らかになった。

つぎに，染色した試料について，同様の分析を行った。その結果を Table 1 に示す。全ての試料について，Fig. 2 に示したのと同様の動物種特異的のピークが観察され，染色の影響もないことが明らかになった。

Table 1 Effect of Dyeing on Species Identification.

Species	Product	Color	Specific Peaks
Cashmere	Knit	Brown	○
Cashmere	Knit	Gray	○
Cashmere	Knit	Purple	○
Cashmere	Knit	Beige	○
Cashmere	Fabric	Black	○
Cashmere	Fabric	Black	○

Fig. 3 Maldi-ToF mass spectra of fiber blends in the region 2450-2750.

3.2 綿，絹，化学繊維などとの混紡の影響

市販されている獣毛製品の多くは，綿，絹，麻などの天然繊維やナイロン，レーヨンなどの化学繊維，他の獣毛繊維などと混紡されている。このような混紡製品であっても単品同様の方法で分析可能かどうかは，方法の汎用化にとって非常に重要である。Fig. 3 には $m/e = 2450-2750$ の範囲の質量分析スペクトルを示した。本方法では羊毛・獣毛部分のスペクトルのみが見られ，全ての試料は単品で見られる羊毛・獣毛特異的のスペクトルを示し，また，新たなピークも認められなかった。絹はタンパク質であり，妨害ピークが現れる可能性があったが，そのようなピークも全く認められなかった。

カシミアと羊毛の混紡品については両種の特異的なピークが認められた。

3.3 カシミア，羊毛，ヤク以外の獣毛の分析

これまで示して来たように，カシミア，羊毛，ヤクについては $m/e = 2450-2750$ の範囲に特異的なピークが認められ，これを用いることによって動物種を容易に同定することができる。そこでつぎに，この方法が他の獣毛へ適用可能であることを明らかにするため，他の獣毛類について同様の分析を行った。その結果を Table 2 に示す。全ての獣毛について $m/e = 2450-2750$ の範囲に主ピークが認められ，多くの動物についてその位置が互いに異なった。しかし，近縁種，例えば，キャメルとアルパカ，カシミアとモヘヤ，ウサギとアンゴラウサギなどはそれぞれ全く同じ位置にピークが現れた。いずれの獣毛についてもカシミア，羊毛，ヤクの同定を妨害するピークは示さず，また，この領域を観察することで動物種の同定が可能であることが明らかになった。

4. 結 語

羊毛・獣毛を粉碎し，界面活性剤を含む還元剤溶液中

Table 2 Animal Species Specific Peaks in Maldi-Tof Mass Spectrometry.

Animal Species	Type	Peak1 (m/e)	Peak2 (m/e)
Yak	Bovidae	2503	
Long-tailed Chinchilla	Chinchillidae	2556	2558
Horse	Equidae	2563	
Marmot	Sciurida	2581	2684
Alpaca	Camelidae	2583	
Camel	Camelidae	2583	
Human	Hominida	2593	
Fox	Canidae	2638	2711
Leopard	Felida	2651	
Nutria	Myocastoridae	2652	
Lynx	Felida	2654	
Rabbit	Leporidae	2656	2672
Angora rabbit	Lagomorpha	2656	
Sheep	Bovidae	2664	
Swakara	Bovidae	2664	
Sable	Mustelidae	2684	2698
Common Raccoon	Procyonidae	2684	2699
Skunk	Mephitidae	2684	
Cashmere	Bovidae	2691	
Mohair	Bovidae	2691	
American Mink	Mustelidae	2698	2714
Raccoon dog	Canidae	2711	2727

で処理し、SDS-PAGE 電気泳動で分離した後、質量分析することで、原毛のみならず、繊維製品についても動物種の同定が可能であることが明らかになった。本方法は繊維試料の洗浄などの前処理は行わず、単にボールミルによる粉碎またはハサミによる細断のみでよく、また、あらゆる種類の試料について全く同じ方法を適用することができる。

漂白、脱色、染色などの様々な加工が施された製品であっても、全ての試料について動物種特異的なピークが現れ、動物種の同定が可能であった。濃い染色を施された試料についても、同定への影響は全くなかった。

羊毛・獣毛の混紡製品の分析においてはそれぞれの動物種特異的なピークが明瞭に観察され、また、他の天然繊維、化学繊維等が混紡されている場合にも、他の繊維

を分離せず、そのまま分析が可能であることが明らかになった。

キャメル、アルパカ、ウサギ、ウマ、タヌキなどの獣毛についても、質量分析スペクトルは $m/e = 2450-2750$ の範囲にそれぞれ種特異的なピークを示し、この領域を見るだけで、他の動物種が混在するか否かを判断できることが示された。標品があれば動物種が判別可能であり、簡便な動物種推定法として有用であると考えられる。

謝 辞

貴重な助言をいただいた産業技術総合研究所 町田雅彦博士、小池英明博士、カシミヤ・キャメルヘア工業会 清水邦保氏に深く感謝いたします。

本研究は、(独)新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) 平成 22 年度「戦略的国際標準化推進事業」、および、経済産業省平成 23, 24 年度「戦略的国際標準化事業 (国際標準共同研究開発事業)」の支援を受けた。

文 献

1. Subramanian, T. Karthik, N. N. Vijayaraaghavan, *J. Biotechnol.*, **116**, 153 (2005).
2. K. Kerkhoff, G. Cescutti, L. Kruse, J. Muessig, *Text. Res. J.*, **79**, 69 (2009).
3. W. Ji, L. Bai, M. X. Yang, *Forensic Sci. Int.*, **208**, 139 (2011).
4. <http://www.meti.go.jp/information/downloadfiles/c110204d02j.pdf>
5. C. Tonetti, C. Vineis, A. Aluigi, C. Tonin, *Text. Res. J.*, **82**, 766 (2012).
6. K. Hollemeyer, W. Altmeyer, and E. Heinzle, *Anal. Chem.*, **74**, 5960 (2002).
7. J. E. Plowman, *J. Chromatogr. B*, **787**, 63 (2003).
8. S. Clerence, C. D. Cornellison, S. Deb-Choudhury, A. Thomas, J. E. Plowman, and J. M. Deyer, *J. Proteomics*, **73**, 1722 (2010).
9. S. Ohashi, Y. Demura, M. Sano, *Sen'I Gakkaishi*, **68**, 276 (2012).
10. <http://www.cashmere.org/cm/fiber-box.php>