

# MALDI-TOF 質量分析計を用いた羊毛とその他の獣毛の混用率の測定 (第 1 報)

渡辺 惣汰\*, 家田 繭子\*, 鈴木 洋介\*, 八木 潤\*

## Measurement of the mixture ratio of wool and other animal hair in yarn using MALDI-TOF mass spectrometry (first report)

WATANABE Sota\*, IEDA Mayuko\*, SUZUKI Yosuke\* and YAGI Jun\*

\*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance 6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba, 277-0882 Japan

In Chapter 51 of the Customs Tariff Schedules, duty rate for yarn varies depending on whether it is wool or other animal hair. Tariff classification also differs according to the mixture ratio when wool in the yarn falls below 85 %. To determine tariff classification, identifying the animal species of raw fibers of yarn and calculating the mixture ratio of wool in yarn is important. The microscope observation method and the DNA analytical method are used to identify animal hair. However, the former requires skill, and calculating the mixture ratio of wool in the yarn is not possible in the latter. Consequently, we focused on ISO 20418-2, which can identify a variety of animal hair and calculate their mixture ratio using MALDI-TOF MS. In this report, whether the type of animal hair could be identified and whether the mixture ratio of wool in yarn could be calculated, based on ISO 20418-2 using customs analysis equipment, were verified. As a result, some animal hair could be identified, but due to the low signal-to-noise ratio of the mass spectrum, further studies are needed to calculate a mixture ratio of wool in yarn.

### 1. 緒 言

繊維製品である毛糸は、天然繊維や化学繊維を紡績して作られる。獣毛は天然繊維の一種であり、羊、やぎ、やく、アルパカ、らくだ、うさぎ等の毛が毛糸の原料として使用される。やぎではカシミアやぎ、アンゴラやぎからそれぞれ得られるカシミア、モヘヤが、うさぎではアンゴラうさぎから得られるアンゴラが有名である。

関税率表第 51 類において、羊毛とその他の獣毛製の小売用でない毛糸には、特に特惠税率で格差がある。また、羊毛を含む複数種の獣毛が混在する毛糸の場合、羊毛の混用率が 85 %以上であるか否かにより関税分類が異なる。したがって、適正な関税分類のためには、毛糸に含まれる獣毛を鑑別し、羊毛の混用率を求める必要がある。

既存の分析法として、日本産業規格 JIS L 1030-1 及び 2 には光学顕微鏡又は電子顕微鏡を用いた観察による繊維製品中の獣毛鑑別法及び混用率の測定法が規定されているが、これらは高度の熟練と経験を要する<sup>1,2)</sup>。また、国際規格 ISO 18074 には DNA 分析による鑑別法が規定されており、羊、やぎ及びやくの獣毛鑑別が可能である<sup>3)</sup>。加えて、関税中央分析所報第 60 号において、ISO 18074 はアルパカ及びうさぎの獣毛鑑別にも応用可能との報告がある<sup>4)</sup>。ただし、DNA 分析では羊毛の混用率を算出できず、防縮加工等により DNA が損傷した獣毛は鑑別できない<sup>4)</sup>。

ISO 20418-2 には、電気泳動で精製した獣毛由来のセラチンをトリプシン処理によって切断し、ペプチド断片をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析計（以下、MALDI-TOF MS と略記する。）で測定する分析法が規定されている（以下、ISO 法と略記する。）。本法は、機器分析により様々な種類の獣毛を鑑別でき、それらの混用率を算出することも可能であるため<sup>5)</sup>、分析者の技術が要求される顕微鏡観察法や獣毛の鑑別しかできない DNA 分析法に比べて有利である。

ISO 法では、一般的なドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミド電気泳動（以下、SDS-PAGE と略記する。）を行い、ゲル中のセラチンを切り出してトリプシン処理する。一方で、税関分析で活用されている泳動装置（DIRECT BLOT）では、ゲル中を移動したたんぱく質は自動でポリフッ化ビニリデン（以下、PVDF と略記する。）製の膜に転写される<sup>6)</sup>ため、ISO 法と同様の処理はできない。転写後の PVDF 膜はセラチンの切り出しが容易で、保存も可能である等の利点があるため、泳動後のゲルよりも扱い易く、DIRECT BLOT を活用することができれば、ISO 法の簡略化が期待される。PVDF 膜上のたんぱく質をトリプシン処理する手法については、次の 2 法が報告されている。①直接法：PVDF 膜のたんぱく質にトリプシン溶液を滴下し、膜ごと MALDI-TOF MS へ導入する手法<sup>7)</sup>。②抽出法：PVDF 膜をトリプシン溶液に浸し、膜上のたんぱく質をペプチド断片化して溶液中に抽出する手法<sup>8)</sup>。

本研究は、毛糸に含まれる獣毛の鑑別及び羊毛の混用率の算出を効率的に実施可能な分析法の確立を目的とした。本報では、第

\* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

1 報として、ISO 法に DIRECT BLOT の電気泳動を組み合わせた場合、獣毛を鑑別可能であるか検証した結果、いくつかの見解が得られたため報告する。

## 2. 実 験

### 2.1 試料及び試薬

#### 2.1.1 試料

市販の毛糸 (単一種の獣毛 100 % と成分表記があるもの) : 計 11 検体

成分として記載されている獣毛の動物種と検体数の内訳は以下の通り。

羊 : 3 検体 (以下, A, B 及び C とする。C のみ防縮加工品。)

やぎ (カシミヤ) : 3 検体 (以下, A, B 及び C とする。)

やぎ (モヘヤ), やく, アルパカ, らくだ及びうさぎ (アンゴラ) : 各 1 検体

以下, それぞれを羊毛, カシミヤ, モヘヤ, やく, アルパカ, らくだ及びアンゴラの毛糸と表記する。

#### 2.1.2 試薬

ドデシル硫酸ナトリウム (以下, SDS と略記する。), リン酸二水素ナトリウム, リン酸水素二ナトリウム, トリス (ヒドロキシメチル) アミノメタン (以下, Tris と略記する。), 0.1 M 塩酸, グリセロール, ブロモフェノールブルー (以下, BPB と略記する。), 酢酸, メタノール, アセトニトリル, L-メチオニン, トリフルオロ酢酸 (以上, 富士フイルム和光純薬)

D,L-ジチオスレイトール (以下, DTT と略記する。), ヨードアセトアミド (以下, IAA と略記する。), クマシーブリアントブルー R (以下, CBB と略記する。), トリプシン (ブタ膵臓由来) (以上, シグマ アルドリッチ)

Amersham Low Molecular Weight Calibration kit for SDS Electrophoresis (以下, LMW マーカーと略記する。)(GE Healthcare)

重炭酸アンモニウム (MP Biomedicals)

ポリビニルピロリドン K-30 (以下, PVP と略記する。)(ナカライテスク)

$\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸 (以下, CHCA と略記する。)(東京化成工業)

PEPTIDE CALIBRATION STANDARD (BRUKER)

### 2.2 装置

pH メーター	: Waterproof pHTestr20 (Eutech Instruments 社/ Oakton Instruments 社製)
ブロックバス	: Thermomixer comfort (Eppendorf 社製)
電気泳動装置	: DIRECT BLOT BM-80 (シャープ社製)
遠心分離機	: MX-305 (トミー精工社製)
乾燥機	: MOV212F (山洋電機社製)
MALDI-TOF MS	: MALDI-8020 (島津製作所製)

### 2.3 試薬の調製

#### 2.3.1 たんぱく質の抽出及び電気泳動

・4 % SDS を含む 0.2 M リン酸緩衝液 (pH 7.8)

リン酸水素二ナトリウムを 28.4 g, リン酸二水素ナトリウムを 15.6 g それぞれ超純水に溶かして全量を 500 mL とした。リン酸水素二ナトリウム水溶液を 100 mL 量り取り, pH メーターで pH を測定しつつ, 攪拌しながらリン酸二水素ナトリウム水溶液を徐々に加え, pH を 7.8 に調整した。400 mg の SDS を調製したリン酸緩衝液に溶かし, 全量を 10 mL とした。

・DTT 溶液

1.9 mg/10  $\mu$ L となるように DTT を超純水に溶解した。

・IAA 溶液

4.7 mg/50  $\mu$ L となるように IAA を超純水に溶解した。

・Tris-HCl 緩衝液 (0.5 M (pH 6.8) 及び 0.2 M (pH 9.0) )

目的とする濃度に合わせて Tris を量り取り, 160 mL 程度の超純水に溶解させ, pH を測定しつつ攪拌しながら 0.1 M 塩酸を徐々に加えた。目的の pH に調整した後, 超純水で全量を 200 mL とした。

・泳動用試料希釈液

10 % (w/v) となるように SDS 水溶液を調製した。0.5 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 6.8) を 4 mL, 10 % SDS 水溶液を 1 mL, グリセロールを 4 mL, 超純水を 1 mL それぞれ量り取って混合した。この調製液に BPB を少量添加した。

・CBB 染色液

CBB を 0.1 g, 酢酸を 1 mL, メタノールを 50 mL それぞれ量り取って混合し, 超純水で全量を 100 mL とした。

・脱色液

メタノール 100 mL に超純水を 100 mL 加えた。

#### 2.3.2 PVDF 膜のトリプシン処理

##### (1) 直接法

・トリプシン用緩衝液

重炭酸アンモニウム 0.4 g を超純水に溶かして全量を 100 mL とした。この重炭酸アンモニウム水溶液 1 mL にアセトニトリルを 800  $\mu$ L, 超純水を 200  $\mu$ L 加えた。

・トリプシン溶液

50  $\mu$ g/mL となるようにトリプシンをトリプシン用緩衝液に溶かした。

##### (2) 抽出法

・PVP 溶液

PVP を 5 mg, L-メチオニンを 10 mg, 酢酸を 6  $\mu$ L 量り取り, 超純水で全量を約 1 mL とした。

・トリプシン用緩衝液

0.2 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 9.0) 200  $\mu$ L にアセトニトリルを 100  $\mu$ L 加え, 超純水で全量を 2 mL とした。

・トリプシン溶液

2  $\mu$ g/mL となるようにトリプシンをトリプシン用緩衝液に溶かした。

### 2.3.3 MALDI-TOF MS による測定

#### (1) 直接法

##### ・マトリックス溶液

TFA を 1  $\mu$ L, アセトニトリルを 300  $\mu$ L 量り取って混合し, 超純水で全量を 1 mL とした溶液に, 過剰量の CHCA を加えて飽和させた.

#### (2) 抽出法

##### ・マトリックス溶液

TFA を 1  $\mu$ L, アセトニトリルを 700  $\mu$ L 量り取って混合し, 超純水で全量を約 1 mL とした溶液に, CHCA 5 mg を溶かした.

## 2.4 実験方法

### 2.4.1 たんぱく質の抽出及び電気泳動

#### 2.4.1.1 たんぱく質の抽出

試料を約 150 mg 量り取って 50 mL ビーカーに入れ, はさみで 5 分程度切り刻んだ. 細断した試料を 2 mL のマイクロチューブに約 15 mg 量り取り, 以下の Scheme 1 に沿って処理した.

##### About 15 mg of chipped sample yarn in 2 mL micro tube

- Add 500  $\mu$ L of 0.2 M phosphate buffer (pH 7.8) containing 0.4 % SDS
- Add 10  $\mu$ L DTT solution and shake
- Heat for 15 min at 95  $^{\circ}$ C
- Centrifuge (6,500  $\times$  g, 1 min)
- Add 10  $\mu$ L DTT solution and shake
- Centrifuge (6,500  $\times$  g, 1 min)
- Heat for 15 min at 95  $^{\circ}$ C
- Centrifuge (6,500  $\times$  g, 1 min)
- Add IAA solution 50  $\mu$ L and shake
- Heat for 15 min at 25  $^{\circ}$ C
- Centrifuge (6,500  $\times$  g, 1 min)
- Add 20  $\mu$ L DTT solution and shake
- Centrifuge (15,000  $\times$  g, 5 min)
- Collect the supernatant

##### Protein extract

Scheme 1 Protein extraction from yarn.

#### 2.4.1.2 たんぱく質抽出液の電気泳動

2.4.1.1 で得られたたんぱく質抽出液を泳動用試料希釈液で 3 倍希釈したものを用いて, DIRECT BLOT による SDS-PAGE を行った. 試料のアプライ量は 5  $\mu$ L とし, LMW マーカースを 3  $\mu$ L 同時にアプライして泳動した. PVDF 膜は孔径 0.1  $\mu$ m (Merck Millipore) と 0.22  $\mu$ m (フナコシ) を用いた. たんぱく質が転写された PVDF 膜は, CBB 染色液で染色後, 脱色液で脱色して風乾した.

### 2.4.2 PVDF 膜のトリプシン処理

#### (1) 直接法

染色後の PVDF 膜からカッターでバンドを切り出し, 導電性両面テープで MALDI-TOF MS 用サンプルプレートに貼り付けた後, トリプシン溶液を 1  $\mu$ L 滴下した. サンプルプレートを専用のケースに入れ, パラフィルムで封をした上で, 超純水でよく湿らせた

キムタオルと共にチャック付きポリ袋に入れた. この袋ごと乾燥機に入れ, 37  $^{\circ}$ C で終夜反応させた.

#### (2) 抽出法

染色後の PVDF 膜からカッターでバンドを切り出し, 以下の Scheme 2 に沿って処理した.

##### Protein on fragment of PVDF membrane in 1.5 mL micro tube

- Add 100  $\mu$ L of acetonitrile
- Remove acetonitrile
- Add 1 mL of PVP solution
- Heat for 30 min at 37  $^{\circ}$ C
- Transfer the fragment of PVDF to new micro tube
- Add 1 mL of 5 % (v/v) of acetonitrile
- Shake for 15 min at 1,000 rpm
- Remove 5 % (v/v) of acetonitrile
- Add 1 mL buffer for trypsin
- Shake for 10 min at 1,000 rpm
- Remove buffer for trypsin
- Repeat (A) twice more
- Add 20  $\mu$ L of trypsin solution
- Heat over night at 37  $^{\circ}$ C

##### Peptide solution

Scheme 2 Enzymatic degradation of protein on a fragment of a PVDF membrane.

### 2.4.3 MALDI-TOF MS による測定

いずれの手法でも, 0.1 % TFA に溶解させた Peptide calibration standard を用いた測定を同時に行い,  $m/z$  1000–3000 の範囲を 7 点校正した. また, 試料の測定は, 累積ショット数 10, プロファイル数 300 で実施した.

#### (1) 直接法

トリプシン処理後の PVDF 膜断片にマトリックス溶液を 1  $\mu$ L 滴下し, 風乾後, 膜を貼り付けたサンプルプレートをそのまま MALDI-TOF MS に導入し, 測定した.

#### (2) 抽出法

マイクロピペットに ZipTip C18 (Merck Millipore) を取り付け, 70 % アセトニトリル水溶液及び 0.1 % TFA 水溶液 10  $\mu$ L で 3 回洗浄した. 2.4.2 (2) で得られたペプチド溶液を 10  $\mu$ L で 10 回吸排出してペプチドを ZipTip に吸着させた後, 0.1 % TFA 水溶液 10  $\mu$ L で 3 度洗浄した. そして, マトリックス溶液を 2  $\mu$ L 程度吸い, MALDI-TOF MS 用サンプルプレート上で 5 回吸排出した後に滴下した. 液滴を完全に乾燥させてから, MALDI-TOF MS で測定した.

### 3. 結果及び考察

#### 3.1 たんぱく質の抽出及び電気泳動

羊毛, カシミア, モヘヤ, やく, アルパカ, らくだ及びアンゴラの毛糸から抽出したたんぱく質を, DIRECT BLOT で電気泳動し, PVDF 膜に転写して得られた泳動像を Fig. 1 に示す. 羊毛及びカシミアの毛糸は3製品測定したが, 全て Fig. 1 と同様の泳動像を示した. ISO 法では, 泳動時間を短くし, バンドが完全に分離する前に終了させているが, DIRECT BLOT では再現できなかった. そのため, ISO 法で例示されている泳動像<sup>9)</sup>よりも移動度が大きい, 中央に明確なバンドが2本並ぶ形は類似しており, ISO 法の泳動像を縦に引き伸ばしたものに近い. Fig. 1 の中央付近のバンド2本について分子量の大きいバンドをバンド A, 小さいバンドをバンド B とする. ISO 法では泳動像の中央のバンド2本をまとめて切り出すことになっているため, バンド A か B に目的のケラチンが存在する可能性が考えられた. DIRECT BLOT ではなく, 一般的な泳動装置で類似の実験を実施すると, 45 kDa 付近にケラチンのバンドが得られるとの報告があるが<sup>9)</sup>, 泳動試料中の夾雑物の影響が泳動方式によって異なることで, バンド A 及び B の移動度に差異が生じたものと思料される. 本報では泳動像の特徴が ISO 法に類似した点を考慮し, バンド A 及び B を以後の実験に供した.

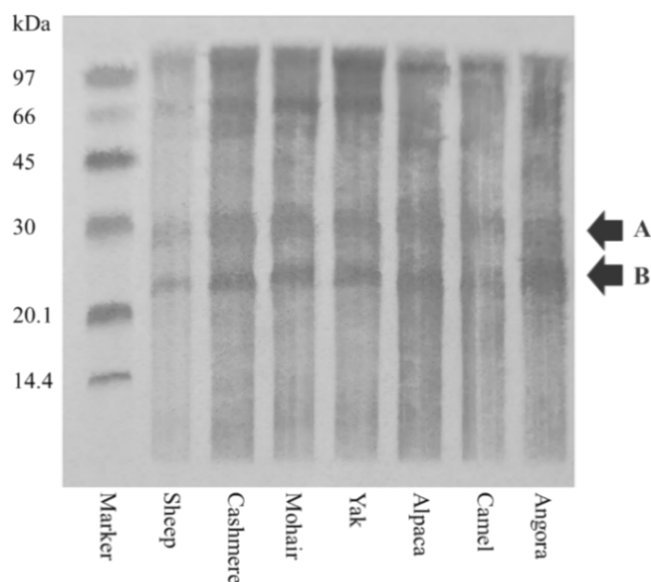


Fig.1 Electrophoretic patterns of protein extracted from yarn.

#### 3.2 MALDI-TOF MS による測定結果

##### 3.2.1 直接法により得られた測定結果について

羊毛の毛糸から抽出したたんぱく質を電気泳動し, 得られた転写後の PVDF 膜から切り出したバンドを直接法により処理した後, MALDI-TOF MS で測定した結果を Fig. 2 及び 3 に示す. 直接法では, PVDF 膜の孔径が 0.2  $\mu\text{m}$  以下である必要があり, 孔径が小さ

いほど膜上にたんぱく質が留まりやすくなるため, 最適な孔径は 0.1  $\mu\text{m}$  との報告がある<sup>7)</sup>. しかし, 孔径 0.1  $\mu\text{m}$  の PVDF 膜は現在製造されておらず, 今後入手困難になると予想されたため, 広く市販されている孔径 0.22  $\mu\text{m}$  のものを用いた検証も実施した. Fig. 2 は孔径 0.1  $\mu\text{m}$ , Fig. 3 は 0.22  $\mu\text{m}$  の PVDF 膜を処理して得られた結果である. Fig. 2 の方が Fig. 3 よりも若干良好であったが, いずれも有意な結果は得られなかった. 泳動条件やトリプシン溶液の組成等, 更なる条件検討により改善される可能性も考えられるが, 最適な消耗品の入手に難がある本法の活用は現実的でないと考え

##### 3.2.2 抽出法により得られた測定結果について

羊毛の毛糸から抽出したたんぱく質を電気泳動し, 得られた転写後の PVDF 膜 (孔径 0.22  $\mu\text{m}$ ) から切り出したバンドを抽出法により処理した後, MALDI-TOF MS で測定した結果を Fig. 4 に示す. 直接法と比較して, 明らかにマスペクトルの SN 比が改善され, ペプチド断片と考えられるピークが認められた. 特に, ISO 法で確認する領域である  $m/z$  2,450-2,750 近傍に注目し, 複数種の毛糸を測定して比較した結果が Fig. 5 及び 6 である. バンド A を処理して得られた結果 (Fig. 5) では, 羊毛 A, カシミア A 及びやくの毛糸のマスペクトルに差異が見られなかった. 一方で, バンド B を処理して得られた結果 (Fig. 6) では, 毛糸の原料となった獣毛の動物種によって特徴が表れた. 羊とやぎ (カシミア及びモヘヤ) を比較すると, 特に  $m/z$  2,383 のピークの有無による違いが見られた. また, やくでは  $m/z$  2,500 に特徴的なピークが見られ, 羊と区別できた. 羊, やぎ及びやくに共通したピークも複数認められたが, いずれもウシ科に分類されるため, 近い動物種であることに起因すると考えられる. 羊とは明確に異なる結果となったらくだとアルパカは, ほぼ同一のマスペクトルを示した. これらはいずれもらくだ科であり, ISO 法でも特徴的なピークは同じになるとされている<sup>9)</sup>. 本法でらくだとアルパカの区別は困難と考えられるが, 関税分類上, 区別する必要はない. アンゴラの毛糸は他の試料とは全く異なる動物種の獣毛であり, ピークパターンに明確な特徴が表れた. したがって, Fig. 6 の領域のピークパターンを確認することで, 少なくとも本報で測定した種類の獣毛のみで作られた毛糸の鑑別は可能と思料される. また, DNA 分析で鑑別できない防縮加工された羊毛 C の毛糸でも, 防縮加工されていないものと同一の結果が得られたため, DNA が損傷してしまうような加工がされたものでも鑑別できる可能性がある. ただし, Fig. 6 から ISO 法の理論値<sup>9)</sup>と同じ  $m/z$  のピークは確認されなかった. 電気泳動とトリプシン処理の手法を変更したことにより, ISO 法とは異なる種類のケラチンやその他のたんぱく質が切断されたものと推測される. また, 全体的なピークの SN 比が低く, 羊毛の混用率が 85 %未満の毛糸を測定し, 羊毛の混用率を求めようとした場合, 羊毛に特徴的なピークである  $m/z$  2383 のピークは, 定量下限として知られている SN 比 10 を下回る可能性がある. 今後は, トリプシン用緩衝液の組成の見直しや, 自己消化を防ぐ処理がされたトリプシンを使用する等, SN 比を向上させる工夫が求められる.

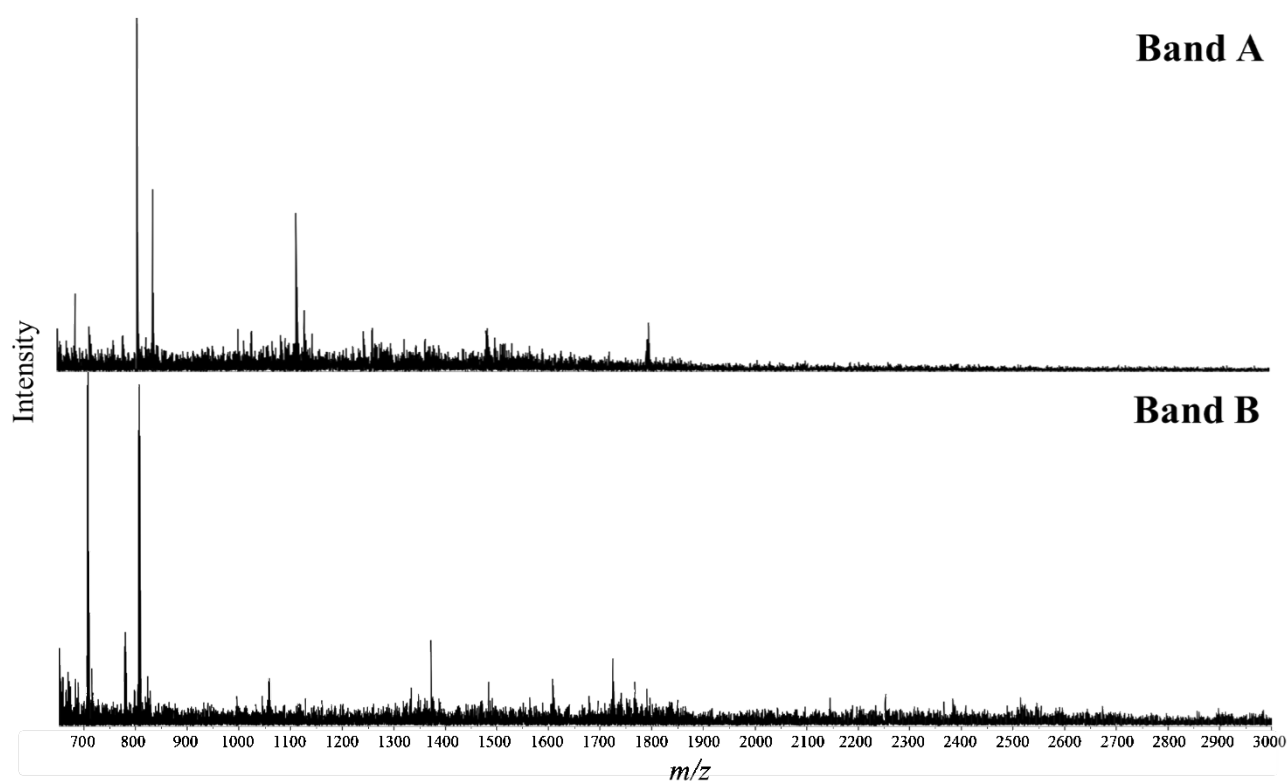


Fig.2 Mass spectra of wool protein processed by the direct method. (Wool protein was blotted on a PVDF membrane with a pore diameter of 0.1  $\mu\text{m}$ .)

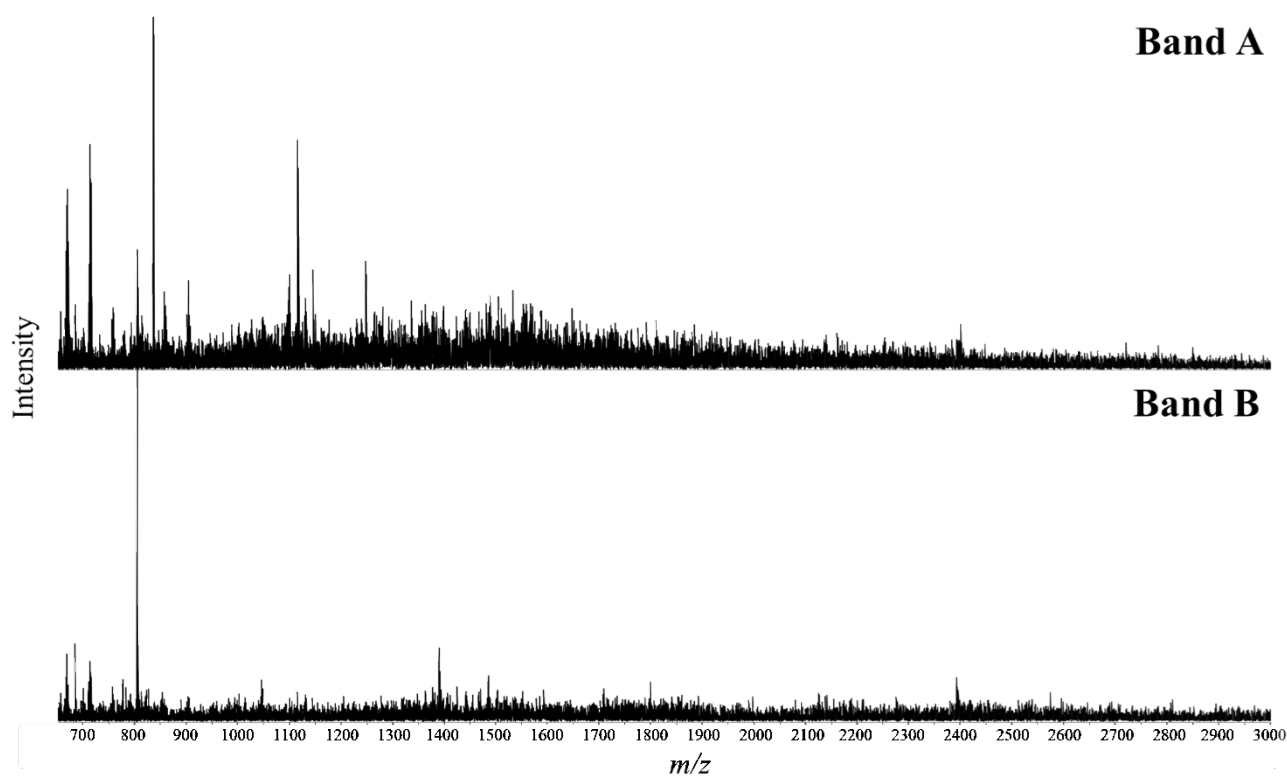


Fig.3 Mass spectra of wool protein processed by the direct method. (Wool protein was blotted on a PVDF membrane with a pore diameter of 0.22  $\mu\text{m}$ .)

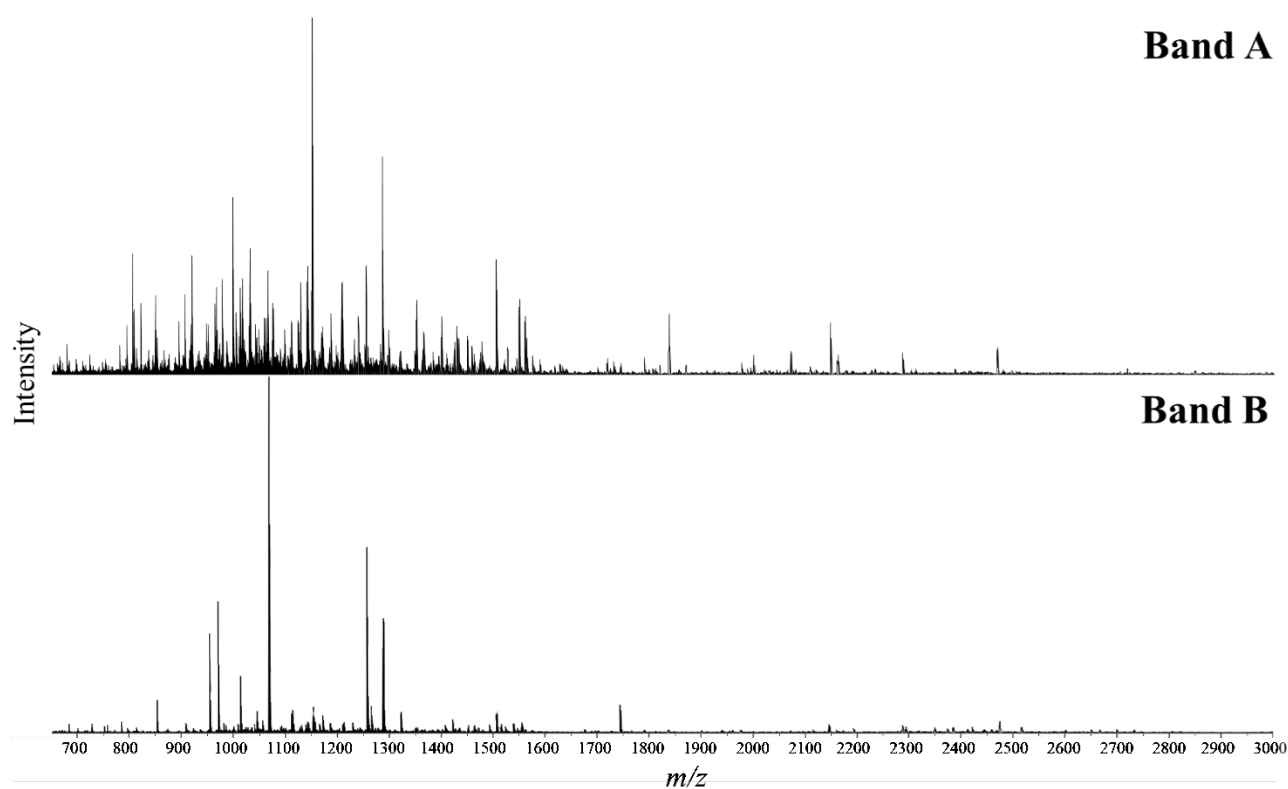


Fig.4 Mass spectra of peptides obtained by the extraction method.

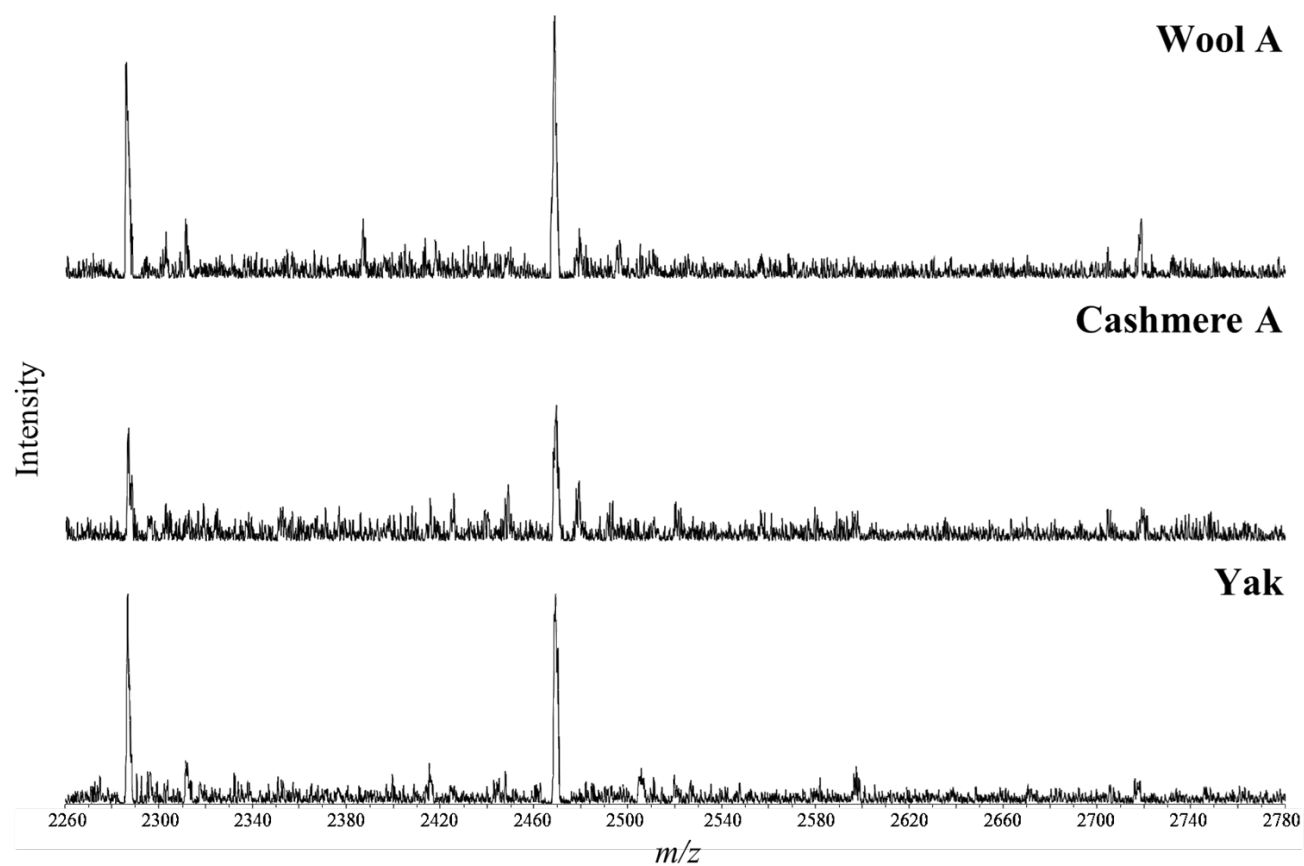


Fig.5 Enlarged mass spectra of peptides obtained from the band A procession by the extraction method.

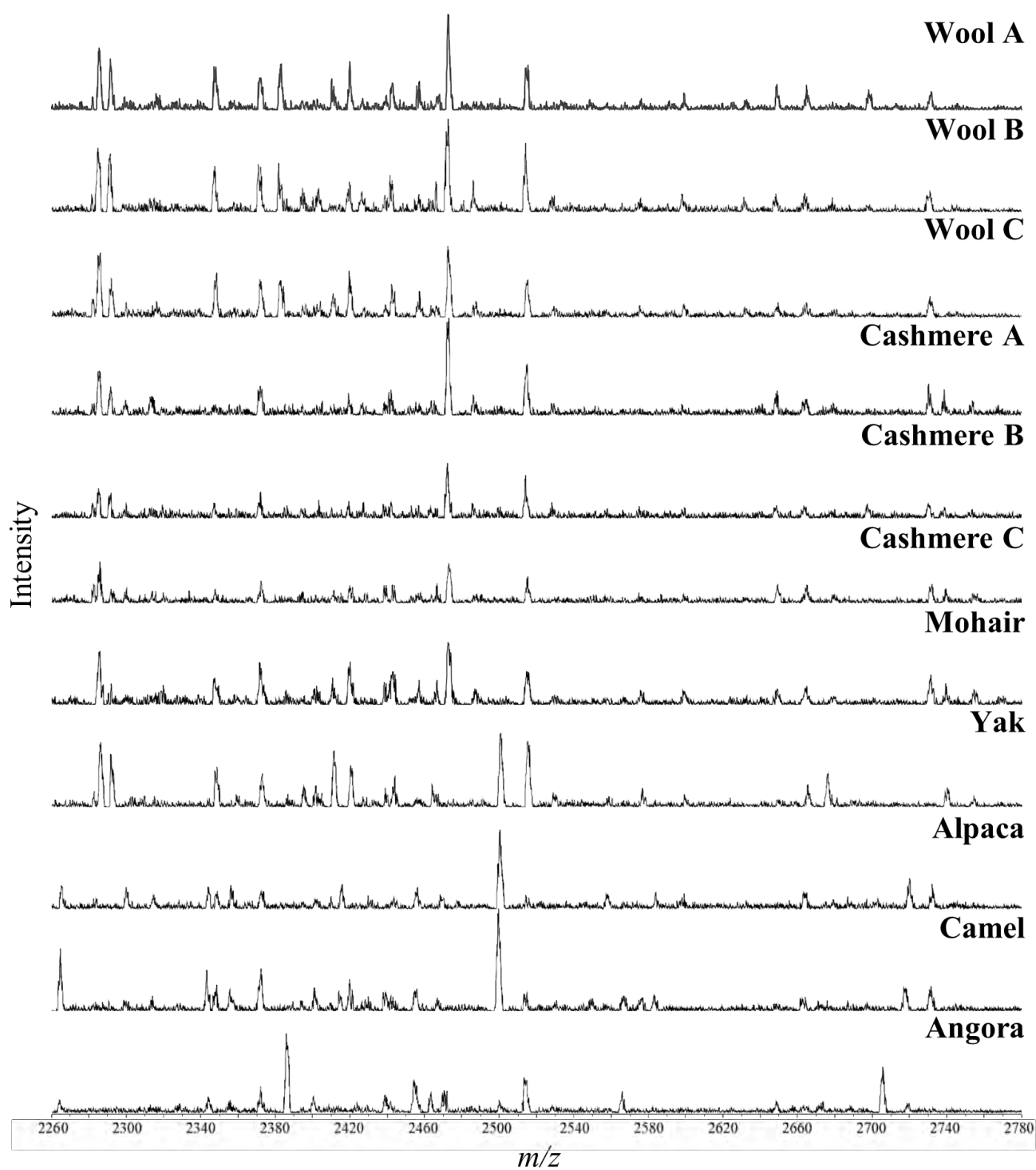


Fig.6 Enlarged mass spectra of peptides obtained from the band B procession by the extraction method.

#### 4. 要 約

本研究は、毛糸中の獣毛鑑別及び羊毛の混用率の算出が効率よく実施可能な手法の確立を目的とした。本報では、第1報として、ISO 法の手順の内、電気泳動方法及びその後の処理法を変更して獣毛を鑑別可能か検証した。

いくつかの毛糸から抽出したたんぱく質を DIRECT BLOT で泳

動し、PVDF 膜に転写して得た精製たんぱく質を、膜ごとトリプシン処理することにより、毛糸の原料となった獣毛の動物種に特徴的なマスペクトルが得られた。また、DNA 分析では測定できなかった防縮加工された羊毛の鑑別も可能であった。本報の結果から、ISO 法と DIRECT BLOT を組み合わせて、いくつかの毛糸を鑑別することが可能となったが、マスペクトルの SN 比が低く、定量に十分なシグナルが得られていないため、現状では毛糸に含まれる羊毛の混用率を算出することは困難であり、更なる改善が求められる。

#### 文 献

- 1) JIS L 1030-1, 繊維製品の混用率試験方法—第1部：繊維鑑別 (2012).
- 2) JIS L 1030-2, 繊維製品の混用率試験方法—第2部：繊維混用率 (2012).
- 3) ISO 18074, Textiles – Identification of some animal fibres by DNA analysis method – Cashmere, wool, yak and their blends (2015).
- 4) 徳島将光, 五十嵐智大, 松本啓嗣：関税中央分析所報, **60**, 75 (2020).
- 5) ISO 20418-2, Textiles – Qualitative and quantitative proteomic analysis of some animal hair fibres – Part 2: Peptide detection using MALDI-TOF MS (2018).
- 6) 矢部公彦, 後藤真一, 西村宗徳, 緑川宇一, 松永貴輝, 木下英樹：シャープ技報, **109**, 30 (2015).
- 7) Ino Y, Hirano H : *FEBS Journal*, **278**, 3807 (2011).
- 8) Bunai K, Nemoto T, Yamane K : *Journal of the Mass Spectrometry Society of Japan*, **51**, 530 (2003).
- 9) 大箸信一, 出村由香, 佐野元昭：繊維学会誌, **68**, 276 (2012).