

学 位 論 文 要 旨

液体クロマトグラフィータンデム質量分析法を用いた
革および膠の由来動物種の同定に関する研究
Study on identification method for animal source of leather and glue
using LC-MS/MS

熊澤 雄基
Yuki Kumazawa

革は動物の皮からクロムや植物タンニンで鞣されて作られ、昔から様々な用途に使用されている。使用される動物種はウシ、ヒツジ、ヤギ、ワニなど様々であるが、その表記は故意的または意図的な理由により、誤って記載されることがある。革の動物種判定は主に電子顕微鏡による形態観察によって行われているが、正しく動物種を判定するためには分析者の熟練した経験が必要とされ、さらに形態特徴が類似した動物種間では判定が困難であった。一方、熱変性コラーゲン（＝ゼラチン）を主成分とする膠は、様々な動物の骨や皮から抽出され、古くから壁画や絵画などの膠着剤、顔料の分散剤などとして使用されてきた。文化財製作当時の動物利用の実態や、使用した材料、芸術家の技法などの情報を得るためには、膠の存在を明らかにすることに加え、その由来動物種を同定することが望まれている。DNA に基づいた PCR 法が革や膠の由来動物種同定に検討されてきたが、製造工程などで DNA の分解や損傷が起こるため適用が難しく、実用化には至っていない。最近では質量分析装置を用いて、コラーゲンのアミノ酸配列の種間差を検出することで、骨や皮衣服、ゼラチンや膠などの由来動物種同定が可能となった。しかしながら、コラーゲン配列が未知な動物種や、複数種混合試料への適用の難しさが課題であった。そこで本研究では、これらの課題を解決するため、複数のコラーゲンマーカープепチドを LC-MS で分析し、その検出パターンで動物種判定を行う新規分析法の開発を行った。

第 1 章では、質量分析法は革の動物種同定のための有力なツールであることを、DNA 検出による PCR 法、抗体検出による western blotting 法と免疫蛍光染色法で比較して示した。ウシとブタの皮膚、クロム革、タンニン革を分析した

結果、ペプチド検出による本法では、全ての試料の動物種同定に成功した。一方、対照とした方法は、革からコラーゲンや DNA の検出は認められず、また、使用した抗 I 型コラーゲン抗体や DNA 検出プライマーの種間交差反応も確認されたことから、動物種判定は不可能であるという結論に至った。

第 2 章では、迅速かつ簡便に行える革の動物種判定方法を開発した。まず、0.25%水酸化カルシウムによる脱クロム処理時間を 2 時間、250 ug/mL のトリプシンで 4 時間消化反応を行うことで、革から効率的にコラーゲンペプチドを生成する最適な条件を見出した。続いて、ショットガンプロテオミクス解析で同定したペプチドの中から、12 個の I 型コラーゲン由来マーカーペプチドを選択することで、その検出パターンで 10 種の動物種を判定する方法を構築した。本法はコラーゲン配列が未知な動物種にも適用可能であり、さらに簡便な操作でかつ 1 日で試験完了するため、ルーチン分析にも有用であることが示された。

第 3 章では、第 2 章で開発した方法を市場革や製品革へ適用した。まず、様々な産地由来の 75 個の市場革を分析したところ、シカ革を除いた全ての革製品の動物種同定に成功した。シカ革は産地によってマーカーペプチドの検出パターンが異なることが判明した。さらに革をヤスリで削って粉末化することで、脱クロム処理なしで高感度にマーカーペプチドを検出できることを見出し、市販のワニ革時計ベルトの裏面の僅かな損傷だけで動物種を同定することに成功した。これらのことから、本法は革製品の動物種認証に有用であり、さらに革の損傷を最小限に抑えた準非破壊分析が可能であることが示された。

第 4 章では、本アプローチをもとに複数種混合試料へ適用可能な膠の由来動物種判定法を開発し、市場膠と絵画試料に適用した。対象となる動物種を 8 種（ウシ、ウマ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、シカ、ウサギ、チョウザメ）とし、さらにこれらの動物種が 2 種混在する場合でも判定が可能となるように 12 個の I 型コラーゲン由来マーカーペプチドを新たに選択した。市場膠製品を分析した結果、全ての膠の由来動物種を同定することができ、表記と異なる動物種や複数の動物種を原材料とする製品も見つかった。また、カミーユ・ピサロ作《収穫》（1882）の地塗りには、ウシとヒツジの 2 種に由来する膠が使用されていることを明らかにした。本法は、微量試料の測定も可能であり、今後、様々な美術作品や歴史的資料の測定へ応用されることが期待される。

以上、本研究では質量分析を用いた革と膠の由来動物種判定法を開発し、市場革や製品革、市場膠、絵画試料に適用することでその有用性を実証した。予め選択したコラーゲンマーカーペプチドの検出パターンで判定を行うことで、これまで不可能であったコラーゲン配列未知種の試料や、複数種が混合した試料の分析が可能になった。さらに、高感度な LC-MS 分析の使用が、膠の微量試料分析や、革の準非破壊分析を可能にした。本法が、これまで動物種同定が難しかった試料へ適用されることで、市場製品の認証検査の拡大や、考古学資料分析による知見獲得など様々な用途に繋がることを期待される。