

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 10 月 20 日(20.10.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/167364 A1

- (51) 国際特許分類:
G01N 27/62 (2006.01) *G01N 1/04* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/062176
- (22) 国際出願日: 2016 年 4 月 15 日(15.04.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-083770 2015 年 4 月 15 日(15.04.2015) JP
- (71) 出願人: 株式会社資生堂 (SHISEIDO COMPANY, LTD.) [JP/JP]; 〒1040061 東京都中央区銀座 7 丁目 5 番 5 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 本山 晃 (MOTOYAMA, Akira); 〒2248558 神奈川県横浜市都筑区早渕 2-2-1 株式会社資生堂 リサーチセンター (新横浜) 内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 青木 篤, 外 (AOKI, Atsushi et al.); 〒1058423 東京都港区虎ノ門三丁目 5 番 1 号 虎ノ門 3 7 森ビル青和特許法律事務所 Tokyo (JP).

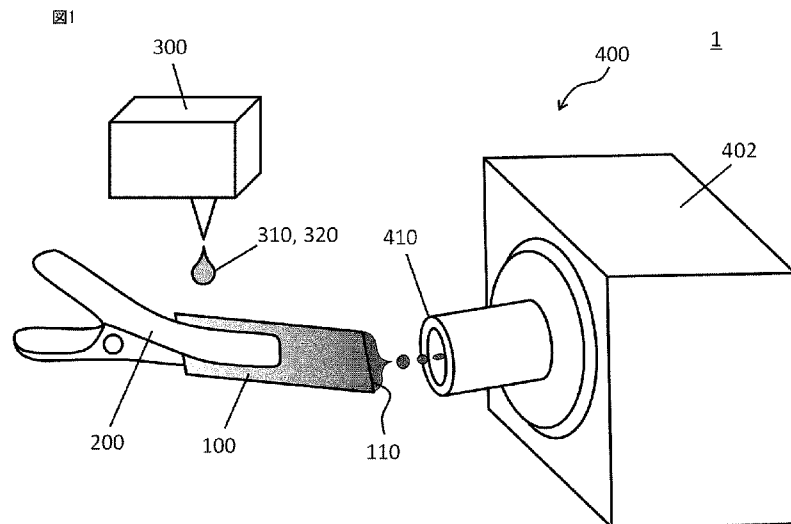
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーロパ (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ユーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

— 国際調査報告 (条約第 21 条(3))

(54) Title: METHOD OF ANALYSIS

(54) 発明の名称: 分析方法



(57) Abstract: The present invention is a method for qualitatively or quantitatively analyzing a component contained in a sample, the method comprising: a step in which a sample solution (310) containing a sample dissolved in a solvent is supplied to a carrier (100) in which are formed a group of minute spaces for guiding the sample solution from a solution-receiving section (120) that receives the sample solution to at least one end; a step in which the sample solution that has arrived at the one end of the carrier is suctioned from a suction port (410) for suctioning the sample solution in a mass spectrometry device (400), in a state where the suction port and the carrier are not connected; and a step in which mass spectrometry of the component is performed.

(57) 要約: 本発明は、試料に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、溶媒に溶解された試料を含む試料溶液 (310) を受ける液受け部 (120) から少なくとも一端に該試料溶液を導く微小空間群が形成された担体 (100) に、該試料溶液を供給する工程と、質量分析装置 (400) の該試料溶液を吸引する吸引口 (410) と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到達した該試料溶液を該吸引口から吸引する工程と、該成分の質量分析を行う工程を含む。



WO 2016/167364 A1

明 細 書

発明の名称：分析方法

技術分野

[0001] 本発明の一実施形態は、試料に含まれる成分を定性又は定量分析する方法に関する。本発明の具体的な実施形態は、角層成分を迅速かつ簡便に分析する方法に関する。

背景技術

[0002] 従来、少量の有機化合物、ペプチド、タンパク質、及び合成ポリマーなどの様々な分析物に対して、試料を定性的又は定量的に分析する方法として、HPLC法、ガスクロマトグラフィー法、NMR法、又は質量分析法などが知られているが、これらの分析方法は、分析物の前処理を必要とし、簡便な方法であるとは言えなかった。

[0003] 特に分析対象を皮膚とした場合、皮膚状態は、季節又は哺乳動物（例えば、ヒト）の体調若しくは年齢、あるいは皮膚への化粧品の塗布前後等、種々の要因により時々刻々と変化するため、迅速かつ簡便な分析方法が求められている。皮膚状態の改善又は成分（例えば、水分、タンパク質）の保持を目的として、化粧品又は医薬品を塗布し、その効果が達成されたか否かを瞬時に測定することは重要である。これまで、皮膚状態の変化により、角層に含まれるNMF（天然保湿因子）の量が変化することが知られている。NMFの成分としては、アミノ酸、ミネラル、PCA（ピロリドンカルボン酸）、乳酸塩、尿素等が挙げられる。したがって、ある皮膚状態におけるこれらの成分を定性的又は定量的に迅速かつ簡便に分析する手法が望まれる。

[0004] 特許文献1には、皮膚から採取した試料を熱分解マスペクトル法又は熱脱着マスペクトル法を用いて、皮膚表面又は皮膚内部に存在する特定物質の定量を行う皮膚存在物質の分析方法が開示されている。このとき、皮膚から試料を採取する際に粘着性テープを使用する。しかしながら、角層に含まれる成分の分布状態を精度良く定量することができないという問題がある。

[0005] 一方、皮膚から採取した試料に含まれる各成分を分析する方法として質量分析が有効な手段となる。質量分析は、試料をイオン化し、生成したイオンを電界又は磁界の働きによって m/z 値に分け、質量スペクトルを得る分析法である。この場合、試料の状態に応じて最適なイオン化法を選択することが重要となってくる。質量分析におけるイオン化法として、種々の方法が知られているが、近年、DESI (Desorption Electrospray Ionization) や、DART (Direct Analysis in Real Time) が注目されている（特許文献2及び3）。DESIは、イオン化した溶媒を試料に付着させてイオンを脱離させる方法である。また、DARTとしては、電子励起状態の原子又は分子を大気中の水に衝突させてペニングイオン化させて生成したプロトンを試料に付加してイオン化させる方法が知られている。

[0006] さらに、従来のイオン化法において、質量分析用の試料調製が容易な手法として、ペーパースプレーイオン化法が知られている。これは、試料をろ紙に載せ、染み込ませるため、試料の取り扱いが容易であり、固体試料や液体試料のいずれにおいても対応が可能である。また、使用されるろ紙が分離場としても利用できるといった利点を有する（特許文献4）。しかしながら、イオン化のために高電圧をかけることが必要であり、試料測定に危険を伴う。このように、DESI、DART、ペーパースプレーイオン化法は、試料をイオン化するための設備を必要とするため、複雑な構成の装置となる。さらに、ペーパースプレーイオン化法を低電圧（～3V程度）で安全に行える方法もあるが、カーボンナノチューブ（CNT）を含浸させたる紙が必要であり、測定コストが嵩む、含浸ろ紙の作製に手間がかかる（非特許文献1）。

[0007] また、インレットイオン化法も知られ、試料のイオン化に電圧、熱、及びガスは不要であり、（高）電圧、高熱、ガスによる危険性が少ない。装置の小型化が可能であり、初期投資やランニングコストが安いといった利点を有する（非特許文献2、非特許文献3）。しかしながら、インレットイオン化

法では、試料をあらかじめ液体に溶解させる必要があるため、固体試料やその表面上の成分を分析することは困難である。また、非特許文献2、非特許文献3に記載の分析装置では、液体に溶解させた試料を装置に注入する際にピペット等の注入具を用いているため、他の試料を分析する際には注入具を交換する必要があるため、手間がかかり、簡便な方法ではない。

[0008] 以上のように、試料中の成分を分析する方法では、装置が複雑になることや、たとえ装置を簡便にできたとしても短時間に容易に分析することができない。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特開平9－243636号公報

特許文献2：特開2008－180659号公報

特許文献3：特開2014－206488号公報

特許文献4：米国特許出願公開第2012／0119079号明細書

非特許文献

[0010] 非特許文献1：R. Narayanan, et al., Angew. Chem. Int. Ed., 53, 5936-5940 (2014)

非特許文献2：V. S. Pagnotti, et al., Anal. Chem., 83, 3981-3985 (2011)

非特許文献3：B. Wang, et al., Anal. Chem., 86, 1000-1006 (2014)

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は、上記の従来技術が有する問題に鑑み、試料に含まれる成分、特に角層に含まれる成分及びその分布状態を短時間で容易に分析可能な分析方法及びその分析方法を可能にする分析装置を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、上記したペーパースプレーイオン化法とインレットイオン

化法の利点を併せ持った新規な分析方法を見出した。すなわち、本発明者らは、溶媒に溶解させた試料を含む試料溶液を担体（例えば、ろ紙）に含浸させ、該担体と質量分析装置の分析部の吸引口とが接しない状態で、試料溶液を吸引口から吸引させて、電圧、熱及びガスなどを必要せずに数秒以内に質量分析を行うことに成功し、本発明を完成するに至った。

[0013] すなわち、本発明は、以下の通りである。

〔１〕 試料に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、

溶媒に溶解された試料を含む試料溶液を受ける液受け部から少なくとも一端に該試料溶液を導く微小空間群が形成された担体に、該試料溶液を供給する工程と、

質量分析装置の分析部の該試料溶液を吸引する吸引口と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到達した該試料溶液を該吸引口から吸引する工程と、

該成分の質量分析を行う工程

を含むことを特徴とする前記分析方法。

[0014] 〔２〕 試料に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、

該試料を塗布する塗布部から少なくとも一端に至るまでに微小空間群が形成された担体に、該試料を塗布する工程と、

該塗布部に溶媒を供給する工程と、

質量分析装置の分析部の、該溶媒に溶解された該試料を含む試料溶液を吸引する吸引口と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到達した該試料溶液を、該吸引口から吸引する工程と、

該成分の質量分析を行う工程

を含むことを特徴とする前記分析方法。

[0015] 〔３〕 試料に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、

該試料が転写される部分から少なくとも一端に至るまでに微小空間群が形成された担体に、該試料を転写する工程と、

該試料が転写された部分に溶媒を供給する工程と、

質量分析装置の分析部の、該溶媒に溶解された該試料を含む試料溶液を吸引する吸引口と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到達した該試料溶液を、該吸引口から吸引する工程と、

該成分の質量分析を行う工程
を含むことを特徴とする前記分析方法。

- [0016] [4] 角層に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、
表面に粘着層を有するシート体を、該粘着層側が皮膚となるように貼り付け、該皮膚から該シート体を剥がすことにより角層を剥離する工程と、
該シート体に付着した該角層を、該シート体と微小空間群が形成された担体とで挟み込む工程と、
該担体に溶媒を供給する工程と、
質量分析装置の分析部の、該溶媒に溶解させた該角層を含む試料溶液を吸引する吸引口と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到達した該試料溶液を、該吸引口から吸引する工程と、
該成分の質量分析を行う工程
を含むことを特徴とする前記分析方法。

- [0017] [5] 角層に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、
微小空間群が形成され、表面に粘着層を有する担体を、該粘着層側が皮膚となるように貼り付け、該皮膚から該担体を剥がすことにより角層を剥離する工程と、
該担体に溶媒を供給する工程と、
質量分析装置の、該溶媒に溶解させた該角層を含む試料溶液を吸引する吸引口と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到達した該試料溶液を、該吸引口から吸引する工程と、
該成分の質量分析を行う工程
を含むことを特徴とする前記分析方法。

- [0018] [6] 該試料溶液を該担体の一端に導くガイド機構が該担体に取り付けられていることを特徴とする、上記 [1] ～ [5] に記載の分析方法。

- [0019] [7] 該担体の一端の角の角度が少なくとも1つが90°未満でないことを特徴とする、上記[1]～[6]に記載の分析方法。
- [0020] [8] 該担体に溶媒を供給した後に、該試料溶液を供給することを特徴とする、上記[1]、[6]及び[7]に記載の分析方法。
- [0021] [9] 該試料を塗布又は転写する前及び／又は後に、該担体に溶媒を滴下することを特徴とする、上記[2]、[3]、[6]及び[7]に記載の分析方法。
- [0022] [10] 該角層を付着させる前又は後に、該担体に溶媒を滴下することを特徴とする、上記[4]～[7]に記載の分析方法。
- [0023] [11] 試料に含まれる成分を定性又は定量分析する分析装置であって、
微小空間群が形成された担体と、
該担体を保持する保持部と、
該担体に溶媒又は試料溶液を供給する供給部と、
吸引口を有し、該成分を定性又は分析する分析部と
を備え、
該担体と該吸引口とが接しない状態で該担体が該保持部で保持され、該供給部から供給された該溶媒に溶解された試料を含む該試料溶液が担体の一端に到達し、該到達した試料溶液を該吸引口から吸引することを特徴とする質量分析装置。

発明の効果

- [0024] 本発明によれば、試料に含まれる成分、具体的には角層に含まれる成分（例えば、NMF、脂質、ペプチド、タンパク質など）の分布状態や組成を短時間で容易に精度良く定量することが可能である。また、本発明によれば、皮膚に経皮吸収した薬剤、合成高分子などを定性的又は定量的に分析するための方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

- [0025] [図1]本発明の質量分析装置の典型例を示す図である。
- [図2] (A) 本発明の質量分析装置における担体の一端110と吸引口410

の周辺を上から外観した図である。(B) a - a' 方向の断面図を示す。

[図3] (A) ガイド機構 10a を具備した担体 100'、及び (B) b - b' 方向の断面図を示す。

[図4] 種々のガイド機構 (10b、10c、10d、10d') を具備した担体の断面図を示す。

[図5] (A) 担体 100'' の縁側にガイド機構 (段差) を具備した担体を示す。(B) c - c' 方向の断面図を示す。

[図6] (A) 担体 100 上に 2 枚のシート体 500 を載置して、(B) ガイド機構 10f を形成させた一例を示す図である。(C) d - d' 方向の断面図を示す。

[図7] (A) 担体 100 上に 1 枚のシート体 500' を載置して、(B) 該シート体の縁側にガイド機構 10g を形成させた例を示す。(C) e - e' 方向の断面図を示す。

[図8] 粘着シート体 600 によって剥離された角層 700 を、該粘着シート体 600 と担体 100 との間に挟み込んだ例を示す。

[図9] 担体 100 に保持させた粘着層 800 上に剥離された角層 700 を担持させた例を示す。

[図10] 17 個のアミノ酸標準混合物を試料として分析を行い、本発明の分析方法の再現性を示す図である。該試料を 3 つの担体 (ろ紙小片) を用いてそれぞれ分析した結果を示す。

[図11] 17 個のアミノ酸標準混合物を試料として分析を行い、本発明の分析方法の線形性及び感受性を示す図である。

[図12] 17 個のアミノ酸標準混合物を試料として分析を行い、本発明の分析方法の線形性を示す図である。

[図13] アンジオテンシン II を試料として分析を行い、本発明の分析方法の実施可能性を実証した図である。

[図14] インスリンを試料として分析を行い、本発明の分析方法の実施可能性を実証した図である。

[図15]市販の化粧品を試料として分析を行い、本発明の分析方法の有効性を実証した図である。

[図16]ヒト皮膚（角層）を試料として分析を行い、本発明の分析方法の有効性を実証した図である。

発明を実施するための形態

[0026] 本発明者らは、試料に含まれる成分を定性的又は定量的に分析するための抽出微小液滴導入質量分析（Extractive micro-Droplet Introduction Mass Spectrometry；EmDI-MS）を新たに開発した。本発明は、該EmDI-MSを用いて、試料に含まれる成分（例えば、角層に含まれる成分を定性又は定量分析する方法に関する。本出願において、本発明の分析方法の概念及び詳細が、固体試料及び液体試料を超高速に直接分析する応用例とともに初めて示される。本明細書では、EmDI-MSが、その有効性が認められているペーパースプレーイオン化法とインレットイオン化法の特徴を併せ持たせることによって、独自の分析方法として確立されたことを示す。EmDI-MSにおいて、担体に積層（載置）された固体試料及び液体試料の成分は、一度に供給される数 μ lの溶媒によって抽出される。抽出された成分を含む試料溶液は、担体の一端から瞬時に質量分析装置の分析部に導入され、質量分析が数秒以内で完了する。ここで、特記すべきことは、本発明のEmDI-MSは、ペーパースプレーイオン化法とインレットイオン化法の利点を併せ持つことであり、例えば、分析物をイオン化するために高電圧、レーザー、熱又はガスを必要としない点、高速分析であって、かつ試料の取り扱いが容易な点、さらには分離可能である点が挙げられる。このEmDI-MSによって、従来欠点とされた（高）電圧印加（ペーパースプレーイオン化法）と、固体試料のハンドリングの困難性（インレットイオン化法）が解消される。本発明者らは、少量の有機化合物、ペプチド、タンパク質、及び合成ポリマー、角層成分などの様々な分析物に対して、試料を前処理せずに、超高速（例えば、＜1秒）であって、定性的及び定量的な分析を可能にした。

[0027] 本発明によれば、試料に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、溶媒に溶解された試料を含む試料溶液を受ける液受け部から少なくとも一端に該試料溶液を導く微小空間群が形成された担体に、該試料溶液を供給する工程と、質量分析装置の該試料溶液を吸引する吸引口と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到達した該試料溶液を該吸引口から吸引する工程と、該成分の質量分析を行う工程を含むことを特徴とする分析方法等が提供される。

[0028] 1. 分析手法（概念）

本発明は、本質的には質量分析装置を用いる分析方法であるが、分析物をイオン化するために電圧、熱及びガスを必要とせず、2～3秒以内（場合により、1秒未満）に定性的又は定量的な分析を完了させることができる。より具体的には、本発明の分析手法は、従来のペーパースプレーイオン化法とインレットイオン化法のそれぞれの長所を合わせ持つことを特徴とする。典型的には、図1及び2に示すように、本発明の分析手法は、溶媒に溶解された試料を含む試料溶液310を受ける液受け部120から少なくとも一端に該試料溶液を導く微小空間群が形成された担体100に、該試料溶液310を供給する工程（1）と、質量分析装置1の分析部400の該試料溶液を吸引する吸引口410と該担体100とが接しない状態で、該担体100の一端110に到達した該試料溶液を吸引口410から吸引する工程（2）、及び分析部400において質量スペクトルを得る工程（3）を含む。

[0029] また、他の態様として、工程（1）では、あらかじめ試料を溶解させた試料溶液に代えて、担体100に試料を直接塗布した後、溶媒320を供給して担体100において目的成分を溶媒320に溶解させて試料溶液としてもよい。

[0030] 別の態様として、工程（1）では、試料を担体100に転写して、試料が転写された部分に溶媒320を供給して、担体100において目的成分を溶媒320に溶解させて試料溶液としてもよい。

[0031] 担体上の試料に数 μ Lの溶媒を供給して得られる試料溶液を用いてもよい

。

[0032] 本発明では、他の実施態様として、例えば、図8に示すように角層に含まれる成分を定性又は定量分析する場合、表面に粘着層を有するシート体600を、粘着層側が皮膚となるように貼り付け、皮膚からシート体600を剥がすことにより角層700を剥離し、シート体600に付着した角層700を、シート体600と微小空間群が形成された担体100とで挟み込み、担体100に溶媒320を供給して角層700に含まれる成分を溶媒320に溶解させて試料溶液としてもよい。

[0033] また、角層に含まれる成分を定性又は定量分析する場合には、図9に示すように粘着層800を有する担体100の粘着層800側が皮膚となるように貼り付け、皮膚から担体を剥がすことにより角層700を剥離した後、担体100に溶媒320を供給して、角層700を溶媒320に溶解させて試料溶液としてもよい。

[0034] 工程(2)では、担体100に供給した試料溶液310が吸引口410から分析部400に取り込まれる。

[0035] 工程(3)では、工程(2)において分析部400の真空圧に起因して生じる吸引力によって吸引された試料溶液に含まれる成分の質量を分析部400にて測定する。

[0036] 本発明の分析方法は、あらかじめ試料を溶解させた試料溶液310を分析部400に取り込ませる他に、溶媒320を担体100上の試料に供給して目的成分を抽出した試料溶液とした後、その試料溶液を瞬時に真空下の分析部400に取り込ませることで、目的成分を定性又は定量的に分析することができる。これにより、前処理の操作を減らし、測定時間も瞬時となり、しかも分析装置に一度に取り込める目的成分の量を大幅に上げられるため、絶対感度を高められる。

[0037] 分析部400の内部の真空圧及び温度から、吸引された液滴の気化体積を計算すると、一滴約6 μ Lの水は約12Lもの体積となる。実際に、圧力への影響は軽微であり、しかも瞬時に元の真空圧に戻るため、測定には影響が

ないことを確認している。分子量の小さい水が最も気化体積が大きくなるが、本発明の分析方法は、溶媒を水とした場合に測定可能であることを実証しているため、他のいずれかの溶媒を使用することができると言える。このように、溶媒種を変更できるということは、担体上の載置した試料から、溶媒の極性を変えることにより粗分画が可能（目的成分を順次分析できる）ことになる。この点、従来のペーパースプレーイオン化法と同様に、妨害成分が多い血液など場合においても迅速に分析できるという利点を有する。

[0038] 2. 試料調製

本発明によれば、本発明の分析方法によって測定可能な試料は、限定されないが、固体試料若しくは半固体試料又は液体試料のいずれであってもよく、任意の物体表面上に存在する成分を含む。一態様において、試料を溶媒に溶解させた試料溶液 310 を分析に用いてもよい。別の態様において、担体 100 に予め塗布した液体又は（半）固体の試料に適切な溶媒 320 を供給し、試料溶液として使用することができる。更なる態様において、担体 100 に転写した試料に適切な溶媒 320 を供給し、試料として使用してもよい。また、他の態様として、図 9 に示すように、粘着層 800 を有する担体 100 を用いて皮膚から剥離させた角層 700 を試料として使用することもでき、角層 700 に適切な溶媒 320 を供給し、試料溶液として用いることもできる。又は、表面に粘着層を有するシート体（粘着シート体 600）を用いて角層から剥離させた角層 700 を試料とし、さらに適切な溶媒 320 を供給し、試料溶液とすることができる。上記の通り、いずれの試料も使用することができるが、試料を塗布し、試料溶液を含浸させ、又は剥離した角層を粘着させたシート材を挟むための担体を必要とする。

[0039] 試料調製において使用される溶媒は、試料を溶解させ、試料に含まれる成分を抽出するものであればよく、限定されないが、水、有機溶媒（例えば、エタノール、メタノール、アセトニトリル、ヘキサン）、又はそれらの混合物であってもよい。酸や塩基、微量のイオンペア剤や塩を加えてもよい。供給する量は、1 滴でもよく、約 2～20 μL に相当する量であってもよい。

なお、試料が担体１００に含浸している場合には、上記の通り、担体１００に溶媒３２０を供給する態様が好ましいが、別の態様として、試料が目的成分を含む試料溶液である場合、担体１００に試料溶液３１０を直接供給し、試料溶液が分析部４００の吸引口４１０から吸引されて分析され得る。この場合の試料溶液の量は、上記の供給量に準ずる。

[0040] 一態様として、上記担体１００に試料溶液３１０を供給する前に、予備浸潤として、該担体１００に上述した溶媒のいずれかを滴下してもよい。別の態様として、試料を塗布又は転写する前及び／又は後に、該担体１００に上述した溶媒のいずれかを滴下してもよい。他の態様として、角層７００を付着させる前又は後に、該担体１００に上述した溶媒のいずれかを滴下してもよい。

[0041] ３．担体

本発明の分析方法は、試料を積層（載置）等するための担体１００を使用することを特徴とする。後述するように、典型的には、本発明の分析方法は、本発明の質量分析装置１における分析部４００が有する吸引口４１０と、試料溶液３１０が供給された担体１００とが接しない状態で質量分析を行うものである。ここで、使用され得る担体１００は、供給される試料溶液３１０又は溶媒３２０を受ける液受け部１２０から、該担体１００の少なくとも一端に試料溶液を分析部４００の吸引口４１０へと導くための微小空間群が形成されていることが好ましい。

[0042] 本明細書で使用するとき、「液受け部」（１２０）とは、供給される試料溶液３１０又は溶媒３２０を受ける担体１００上の任意の領域を意味し、液受け部１２０とそれ以外の領域を明確に区別することを意図しない。試料が、担体１００に載置された状態であれば、試料に含まれる成分を溶解させるための溶媒３２０を供給する部分（又は構造）を意味し、また、試料が液体試料であれば、該試料溶液３１０を供給する部分（又は構造）を意味する。なお、液受け部は、単に、供給部３００から供給された試料溶液３１０又は溶媒３２０を一時的に受ける担体１００上のいずれかの領域であってよいが

、担体１００がガイド機構１０を具備している場合は、ガイド機構に接するか又はその近傍の領域であることが好ましい。また、一態様において、担体１００において試料を溶解又は抽出させる場合には、液受け部１２０は、吸引口４１０から遠い、担体１００上の一端付近（図示せず）であってもよい。

[0043] 担体１００を保持部２００（例えば、クリップ）で保持した場合、担体上に液受け部を形成させるための余白を必要とする。このような余白は、例えば、図２では、 S_1 及び S_2 に相当するが、先端側にある余白部分（ S_2 ）は必ずしも設けなくてもよく、保持部２００は、担体の一端１１０と重なってもよい。一方、保持部２００の側面に沿った余白部分（ S_1 ）は、保持部２００の両側であってよく、又は片側にあってもよい。

[0044] 本発明において使用される担体１００は、微小空間群が形成されていることが好ましい。ここで、本明細書で使用するとき、「微小空間群」とは、毛管現象を生じるような構造を有する物体を意味し、含浸させた試料溶液は微小空間群を通じて、担体１００の少なくとも一端１１０に導く役割を果たす。本発明において使用可能な担体としては、上記の液受け部と微小空間群を有する担体であればよく、限定されないが、例えば、ろ紙、繊維、樹脂、布、薄層クロマトグラフィープレート（ガラス、アルミニウム等の板上にシリカゲル、アルミナ、ポリアミド樹脂などの吸着剤を薄膜状に固定した薄層プレート）であってもよい。

[0045] 本発明の分析方法に使用される担体１００の形状は、担体１００に含浸した試料溶液が、担体１００の少なくとも一端１１０で、分析部４００の吸引口４１０に吸引され得るのに適した形状であることが好ましい。担体１００の形状としては、吸引口４１０に近いが尖っていないことが好ましく、例えば、このような担体の一端の角の角度は 90° 未満でない形状であることが好ましい。担体１００の形状としては、例えば、正方形、長方形、台形等が挙げられる。好ましい態様として、ろ紙を用いた場合を例にすると、ろ紙としては、例えば、市販の定性ろ紙（ＧＥヘルケア・ジャパン社製；円形ろ

紙：最大500mm径、角型ろ紙：最大600mm）を使用することができる。次に、吸引口410の状態（形状、大きさ等）に合わせて、ろ紙を適切な形状と大きさを有するように切り出したろ紙小片を用いることが好ましい。例えば、ろ紙小片の形状及び大きさは、限定されないが、典型的には、長方形（例えば、短辺2.5mm×長辺10mm）、台形（上底2.5mm×下底10mm）であってもよい。このようなろ紙小片は、切断前のろ紙に試料を積層した後に、ろ紙から切り出してもよい。また、担体100の一端の角の角度は、上記の通り、90°未満でないことが好ましい。このような角度としては、好ましくは90°以上180°未満、より好ましくは90°以上150°未満、さらにより好ましくは90°である。

[0046] 本発明に使用される担体100は、上記の通り、液受け部120と微小空間群が形成されていることが好ましいが、さらに、該担体100には、試料溶液310又は溶媒320を分析部400の吸引口410から吸引させるのを補助するためのガイド機構が設けられてもよい。ここで、「ガイド機構」は、当業者において一般的に使用される用語であって、本発明においては、上記の通り、試料溶液310又は溶媒320を分析部400の吸引口410から吸引させるのを補助するための構造を意味し、材質及び大きさは限定されない。このようなガイド機構の役割を果たすものとして、例えば、図2に示すように、ろ紙小片を保持することを兼ねた保持部200（例えば、クリップ）の側縁10であってもよい。また、本発明は、試料をイオン化するために高電圧をかける必要がないため、使用される保持部200は、絶縁性のものであってもよい。

[0047] 例えば、クリップを用いてろ紙小片を固定する態様において、ろ紙小片は、クリップでその全体が覆われることなく、ろ紙小片に余白が残るように固定されることが好ましい。この余白のうち、クリップ側面の余白部分は、試料溶液310又は溶媒320を供給する液受け部120に相当する。該余白部分の幅は、限定されないが、約0.5～2mmであればよい。供給後に、試料溶液310又は溶媒320が、ろ紙の一端110、すなわち、分析部4

〇〇の吸引口４１０に向かって含浸しながら流れるように、クリップ側面１０は、ガイド機構としての役割を果たす。一方、ろ紙小片に存在する余白のうち、吸引口４１０に近い側の余白部分（図２中の S_2 ）は、上記の通り、必ずしも設けなくてもよいが、余白部分を設ける場合は、試料溶液による微小液滴（液溜め）が形成するに足る大きさであればよい。このような余白部分の面積は、限定されないが、約 $0.001 \sim 10 \text{ mm}^2$ であることが好ましい。

[0048] なお、当業者に理解されるように、保持部２００の側縁をガイド機構１０として用いてもよく、又は担体上に設けた溝をガイド機構（１０a、１０b、１０c、１０d、１０d'）として用いてもよい。例えば、図３に示した担体では、設けた溝の形状は、断面図に示されるように、傾斜面と曲面を有するものであるが、溝の深度及び位置についても限定されない。したがって、本発明の目的が達成される限り、ガイド機構として利用される担体上の溝の形状、深度、及び位置は限定されず、例えば、図４に示されるガイド機構（１０b、１０c、１０d、１０d'）が例示される。また、図５に示されるように、担体１００"の一側面に段差を設けることによって、この段差をガイド機構１０eとして利用することができる（図５（A））。ガイド機構１０eを有する担体１００"の断面は、図５（B）に示される通りである。

[0049] 一方、担体１００に溝を設けずに、担体１００の表面上に、シート体５００を載置させることによってガイド機構を設置することができる。例えば、図６のように、担体１００上に、２枚のシート体５００を互いに間隔を空けて載置することによって、これらの２枚のシート体５００の間にガイド機構１０fを設置することができる。また、図７のように、１枚のシート体５００'を担体１００に載置することによって、図５の場合と同様に、シート体５００'の側縁を利用して担体１００上に段差を形成させ、これをガイド機構１０gとして利用することができる。ここで、使用可能なシート体５００は、特に限定されず、いずれの素材であってもよく、溶媒を吸収しない性質を有するものであってもよい。担体に載置するシート体は、溶媒の蒸発を

抑制する効果を有し、担体上で成分を抽出する場合には抽出効率を高める作用を有する。

[0050] 試料が皮膚の角層である場合を例として、試料及び担体の調製について説明する。本明細書で使用するとき、「角層」とは、皮膚の最外層にあって、表皮角化細胞が角化した扁平な角層細胞が重なった層を意味する。細胞－細胞間は角層細胞間脂質で満たされ、角層は角層細胞が約15層重なり、平均して約10～20 μ m厚を有する。角層は、部位によってもその層厚が異なり、頬では比較的薄く、一方、踵などでは角層細胞の重なりは約50層に達する。本発明の方法で測定可能な層厚は、特に限定されないが、約5～15層を分析対象とする。角層を剥離するには、テープストリッピング法が有効である。角層を剥離するために使用可能な、表面に粘着層を有するシート体（粘着シート体600など）には、特に限定されないが、D-Squame（CuDerm社製）、セロテープ（登録商標）（ニチバン社製）、PPSテープ（ニチバン社製）などが挙げられる。例えば、このようなシート材を用いて角層を採取した後、該粘着シート体600と微小空間群が形成された担体100を用いて、該粘着シート体600に付着した角層700を挟み込む（図8）。角層を挟み込んだ該担体に溶媒を供給し、該角層の成分が溶解した該溶媒試料溶液として用いることができる。また、表面に粘着層800を有し、微小空間群が形成された担体100を用いることも可能である。この場合、担体100上には、剥離された角層700を保持しているため、該担体に溶媒を供給することにより試料溶液とすることができる（図9）。

[0051] 4. 質量分析装置

本発明は、典型的には、溶媒に溶解させた試料を含む試料溶液310を担体100に含浸させ、該担体100と分析部400の吸引口410とが接しない状態で、該試料溶液310を吸引口410から吸引させて、電圧、熱及びガスなどを必要とせずに数秒以内に質量分析を行う（図1参照）。より具体的には、試料に含まれる成分を定性又は定量分析する分析装置であって、微小空間群が形成された担体100と、

該担体を保持する保持部２００と、
該担体に溶媒３２０又は試料溶液３１０を供給する供給部３００と、
吸引口４１０を有し、該成分を定性又は分析する分析部４００と
を備え、

該担体１００と該吸引口４１０とが接しない状態で該担体１００が該保持部２００で保持され、該供給部３００から供給された該溶媒に溶解された試料を含む試料溶液３１０が一端１１０に到達し、該到達した試料溶液を該吸引口４１０から吸引することを特徴とする質量分析装置１を提供することができる。

[0052] 本発明で使用される「保持部」（２００）とは、分析部４００の吸引口４１０の前で担体１００を保持する部分又は手段を意味する（図１及び２参照）。保持部２００は、試料をイオン化するために高電圧を必要としないため、絶縁性の材質であってもよく、担体を保持するに足りる構造を有するものであれば限定されない。保持部２００には、限定されないが、絶縁性クリップ、又は導電性クリップ等であってもよい。

[0053] 本発明で使用される「供給部」（３００）とは、担体１００に試料溶液３１０又は溶媒３２０を供給するために、該試料溶液又は溶媒を貯留する空間と該試料溶液等を吐出する手段を有するものであって、例えば、ピペット、シリンジなどが挙げられる。なお、供給部３００は、特に限定されず、ピペットの使用のように独立した構造を有するものであってよく、又は保持部２００に具備させてもよく、担体１００に固定してあってもよい。

[0054] 本発明で使用される「分析部」（４００）とは、試料溶液を吸引するための吸引口４１０の他に、試料溶液中の成分が分析に供せられる部分であり、成分の性状に応じて発生する測定シグナルを検出する。このような分析部４００は、限定されないが、ハイブリッド型タンデム質量分析機器（例えば、LTQ-Orbitrap（登録商標）（Thermo Fisher Scientific, Inc., San Jose, CA））、6430qTOF（Agilent Technologies, Inc., CA）、L

CMS-8050（島津製作所，京都））、イオンモビリティ-TOF型質量分析計（例えば、Synapt G2 SI（日本ウォーターズKK））、qTOF型質量分析計（例えば、6530qTOF（アジレントテクノロジーズ））、三連四重極型質量分析計（例えば、6430QQQ（アジレントテクノロジーズ））、小型単四重極型質量分析計（例えば、QDa（日本ウォーターズKK））、Q-Orbitrap型質量分析計（QExactive（サーモフィッシャーサイエンティフィック））等を使用することができる。

[0055] 本発明によれば、担体100の一端110と吸引口410とが接しない状態で、試料溶液が担体の一端110から吸引口410に吸引されることを特徴とするが、試料溶液の粘性、分析部400内の真空圧に起因して生じる吸引口410付近での吸引力等の条件に応じて、該担体の一端110に形成された微小液滴を吸引されるよう、該担体の一端110と吸引口410との距離および高さを調整する。該担体の一端110と吸引口410との距離は、限定されないが、0.1～0.5mmであることが好ましい。また、分析部400内の真空圧は、限定されないが、0.1hPa以下であることが好ましい。

[0056] 本発明の質量分析装置1を用いた試料の分析は、典型的には、以下の通りである。担体100を保持部200に固定し、該担体の一端110を分析部400の吸引口410に接しないように、間隔が0.1～0.5mmとなるように調整し、固定する。次に、例えば、試料として液体を用いる場合、調製した試料溶液310を供給部300から担体100上の液受け部120に供給する。供給された試料溶液は、担体100に含浸しながら、担体の一端110で貯留し、速やかに分析部400の吸引口410から分析部400に吸引される。吸引された試料溶液は、分析部400で測定され、測定シグナルを得ることができる（実施例1～4参照）。

実施例

[0057] 以下、製造例及び実験例を挙げて本発明の構成及び効果をより明確に説明する。但し、本発明はこれらの実施例によって何ら制限されるものではない

。

[0058] 本実施例において具体的に使用される材料及び装置を以下に説明する。

[0059] (1) 材料

LC/MSグレードのメタノール (MeOH) 及びアセトニトリル (ACN) を和光純薬株式会社 (大阪、日本) から購入した。MilliQ水精製システムモデルMQ Advantageを用いて新鮮な水を得た。この装置は、Eliz RO/IEX清浄器、SP-TOF清浄器、及びASM自動浄化モジュール (Millipore Inc.) で構成されている。ギ酸 (99%) をナカライテスク日本 (大阪、日本) から入手した。

[0060] 塩酸リジンを味の素株式会社 (東京、日本) から入手した。グリシン (d2) をSigma-Aldrich社から購入した。

[0061] ろ紙42 (55mm径) をWhatman (GE Healthcare Life Sciences, Inc., UK) から入手した。後述するように、処理せずに使用したが、分析において適切なサイズの小片に切断した。角層成分を分析する場合には、Promotool, Inc. (東京、日本) から入手可能な粘着皮膚ストリッピングテープ (Skinchecker (登録商標)) を用いた。

[0062] 実施例1で使用される17個のアミノ酸からなる標準混合物を、0.1M塩酸中の1mM (nmol/μL) として、Agilent Technologies, Inc. (Palo Alto, CA) から入手した (品番5061-3330; L-アスパラギン酸、グリシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-セリン、L-スレオニン、L-チロシン、L-プロリン、L-アルギニン、L-ヒスチジン、L-グルタミン酸、L-シスチン、L-フェニルアラニン、L-リジン、及びL-メチオニン)。

[0063] 実施例2において使用される試薬グレードのアングiotenシンII及びインスリンをSigma-Aldrichから入手した。また、化粧品 (イプサ メタボライザー モイストホワイトW1) をShiseido Co.

, Ltd (東京、日本) から入手した。

[0064] (2) 担体及びその使用

ろ紙 (55 mm 径) (Whatman (GE Healthcare Life Sciences, Inc., UK) を長方形片 (典型的には 2.5×10 mm) に切断した。形状は、必ずしも長方形ではある必要はなく、微小液滴が質量分析機器のエントランスキャピラリーに面するろ紙一端で吸引される限り、任意の形状であってもよい。同様に、ろ紙小片の大きさは限定されないが、質量分析に供される試料をろ紙に保持するのに十分な大きさであることが必要である。次に、任意の材料 (金属、プラスチックなど) で作製されたクリップにろ紙小片を挟む。その後、ろ紙小片の先端部を質量分析機器のエントランスキャピラリーの開口部 (吸引口) に近接して配置した。エントランスキャピラリーの位置を基準にして、質量分析機器内への吸引力が、ろ紙小片の一端に形成した微小液滴を吸引するのに十分な高さに固定し、エントランスキャピラリーとろ紙小片間の距離を約 0.5 mm とした。距離は、抽出溶媒の組成に応じて最適化され、適宜調整し得る。エントランスキャピラリーの中心線とろ紙小片の中心線を一致させることが好ましい。しかしながら、微小液滴がろ紙小片の一端で形成され、首尾よく質量分析機器内に吸引される限り、軸を一致させる必要はない。

[0065] 供給する抽出溶媒の体積は、典型的には $5 \sim 20 \mu\text{L}$ であるが、ろ紙小片のサイズに合わせて変化させてもよい。一般に、ろ紙小片のサイズを大きくすると、それに応じて供給すべき抽出溶媒の体積は増やす必要がある。これは、過剰な溶媒によってろ紙小片に「ドーム」を形成させ、ろ紙小片の一端で微小液滴 (液溜め) を形成させるためであるが、必要条件ではない。

[0066] (3) 分析部

全ての実施例において、ハイブリッド型タンデム質量分析機器である LTQ-Orbitrap (登録商標) (Thermo Fisher Scientific, Inc., San Jose, CA) を用いて、質量分析データを取得した。試料溶液を導入するための三次元操作段階として、ナノス

プレーフレックスイオン供給源（登録商標）を質量分析機器のソースマニホールドに取り付けた。E m D I - M S 実験では電圧が不要なため、高電圧（典型的には、 $\pm 2 \sim 5 \text{ kV}$ ）を供給するために使用される接続ケーブルは使用しなかった。ワニ口クリップ付き導電ケーブルを用いて、主要な導電面／非導電面を接続することによって試料領域のアース電位を固定した。

[0067] 特に指示のない限り、各実験において、エントランスキャピラリーの温度を 350°C に設定した。出口への意図しない電圧印加を回避するために、キャピラリー電圧を 0 kV とした。質量分析のほとんどを線形型四重極イオントラップ質量分析器 L T Q（登録商標）を用いて行った。機器特有の設定を以下の通りとした；マイクロスキャン数：1、最大射出時間： 10 ms 、スキャン速度：通常又は高速、A G C イオン標的設定（フルスキャン）：3. $00 \text{ e} + 4$ 。X c a l i b u r 2. 1 ソフトウェア（T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c, C A）を用いて、質量分析機器を制御し、さらに、データ分析を行った。

[0068] 実施例 1：本発明の分析方法の検証

本発明の分析方法の検証は、17 個のアミノ酸標準混合物を用いて、（a）再現性、（b）線形性、及び（c）感度の観点から行った。

[0069] （a）再現性

銅製ワニ口クリップを用いて、同一サイズ及び同一形状の3つのろ紙小片をそれぞれクランプした（具体的には、 $2.5 \text{ mm} \times 10 \text{ mm}$ の長方形のろ紙小片上に 10 nmol の各アミノ酸を積層した）。ろ紙小片は、室温（約 25°C ）にて約15分間放置し、乾燥された。中心軸を一致させて、質量分析機器のエントランスキャピラリー前にろ紙小片を配置し、 $10 \mu\text{L}$ の M e O H - 精製水（1：1）の全量を手動で一時に供給した。同時に、質量分析機器を用いてデータ収集を開始するが、取得質量飛程を $m/z \ 50 - 500$ に設定しておいた。各試料の実行時間を30秒に設定したが、実際の分析時間はいずれも数秒以内であった。さらに、再現性を評価するために、同じ手法を3つのろ紙小片について繰り返した。平均した質量スペクトルは、各

データのT I C C（全イオン電流クロマトグラム）から得ることができ、見かけのピーク強度比（y軸の高さ）から定性的に比較した（図10）。

[0070] （b）線形性

17個のアミノ酸標準とグリシン（d2）の混合物を用いた内部標準法によって、本発明のE m D I - M S法の線形性について評価した。混合物溶液（後述）を4つのろ紙小片に積層した。ここで、17個のアミノ酸量は、ろ紙小片（2.5 mm×10 mm）あたり1、5、10及び50 ngとした（以下、それぞれ「S t d 1」、「S t d 2」、「S t d 3」及び「S t d 4」と称する）。グリシン（d2）量は、内部標準として機能させるために、一定量（10 ng）とした。

[0071] S t d 1、S t d 2及びS t d 3は、3つのろ紙小片上に3つの標準溶液の分注液を積層させることによって調製した。S t d 3を調製するために、10 mMの標準溶液を含む母液（各1 mMのアミノ酸）を積層した。S t d 1及びS t d 2について、0.01 mMと0.1 Mのアミノ酸を含む溶液をそれぞれ用いた（いずれも10 mMの内部標準を含む）。これらは、メタノール-精製水（1：1）を用いて、母液を連続希釈さえることによって調製された。S t dの調製について、1 mMの内部標準でスパイクされた母液の分注液を別のろ紙小片に積層した。分注液は、積層-乾燥サイクルを繰り返すことによって、ろ紙小片に10回積層された。乾燥プロセスは、室温にて穏やかな空気流下で行われた。

[0072] S t d 1～S t d 4のろ紙小片は、上述した手順と同様に、E m D I - M S分析に供された。S t d 1～S t d 4較正標準の平均質量スペクトルから、それぞれのアミノ酸と内部標準間のピークの高さを計算し、比較した。次に、ろ紙小片上に積層されたアミノ酸量をx軸としてプロットし、較正曲線を作製した。本発明の分析方法における線形性を、最小二乗法によって生じさせた較正線の R^2 （決定係数）と切片から評価した（図11）。

[0073] （c）感受性

感受性は、S t d 1の質量スペクトルにおけるアミノ酸シグナルのシグナ

ル対ノイズ（S/N）比から推定した（図12）。検出下限（LLOD）は、 $S/N > 3$ の推定濃度として定義した。

[0074] 実施例2：標準試料を用いた分析方法の検証

ペプチドを用いて、本発明の分析方法の実施可能性について検証した。本実施例においては、ペプチドとしてアンジオテンシンⅠⅠ及びインスリンを使用し、それぞれ、1 mMの0.1%ギ酸と2%ACNを含む精製水に溶解した。各溶液の10 μ Lを別々のろ紙小片（2.5 mm $\times$ 10 mmの長方形）に積層し、ろ紙小片を室温にて乾燥させた。各ろ紙小片にはペプチドが10 nmol積層されたことになる。実施例1の手順に従って、本発明のEmD1-MS分析を行ったが、本実施例では、抽出溶媒を0.1%ギ酸を含有するACN-精製水（1：1）に変更した。さらに、「予備湿潤」によってペプチドの抽出効率を高め、かつ微小液滴の質量分析機器内への吸収を容易にするために、抽出溶媒をろ紙小片に2回適用した。予備湿潤では、0.1%ギ酸を含むACN-精製水（1：1）を5 μ L適用した。抽出及び微小液滴の形成のために、予備湿潤プロセスの直後（約10秒後）に上記溶媒（10 μ L）を適用した。アンジオテンシンⅠⅠ及びインスリンの分析した結果（質量スペクトル）をそれぞれ図13及び14に示した。これらの質量スペクトルから明らかなように、アンジオテンシンⅠⅠ及びインスリンのそれぞれ特有の質量スペクトルが観察されたため、本発明の分析方法はペプチドを用いた試料についても分析が可能であることが実証された。

[0075] 実施例3：化粧品を用いた分析方法の検証

次に、化粧品を用いて、本発明の分析方法の実施可能性について検証した。化粧品（プロトタイプの化粧液、前処理なし）の一部（1 μ L）をろ紙小片（2.5 mm $\times$ 10 mmの長方形）に積層した。ろ紙小片を室温にて約10分間乾燥させた後、実施例1の手順に従って、本発明のEmD1-MS分析を行った。結果を図15に示す。化粧品には、多数の成分を含むが、主に、合成ポリマー、界面活性剤、及び有効成分に明確に分離することができ、半固形物を用いた場合であっても、本発明の分析方法の有効性が実証された。

。

[0076] 実施例4：ヒト皮膚（角層）を用いた分析方法の検証

ヒト皮膚を用いて、角層に含まれる成分をE m D I－MS法によって分析した。粘着テープストリッピング法によって、試料として、粘着テープデバイス（S k i n c h e c k e r（登録商標））を用いて、健康な男性ボランティア（48歳）の内側前腕から角層を採取した。典型的な手順を以下に示す。

- （1）石鹸で内側前腕を穏やかに洗浄する。
- （2）平衡化のために30分間待つ。
- （3）S k i n c h e c k e r（登録商標）を用いたテープストリッピングによって角層（10層）を回収する。
- （4）回収した角層をろ紙上に置き、固定させるために接着領域を穏やかに圧をかける。
- （5）角層が接着したろ紙を小片（2.5mm×10mmの長方形）に切断する。
- （6）ワニ口クリップ（金属、プラスチック他）を用いてろ紙小片をクランプし、質量分析機器のエントランスキャピラリー付近に設置する。
- （7）ろ紙に5～10μLの抽出溶媒を供給させ、速やかにE m D I－MS分析を行う。
- （8）1回のE m D I－MS実験は、数秒以内に完了する。

[0077] 角層を用いて分析した結果を図16に示す。この結果から明らかなように、角層に含まれるNMF（天然保湿因子）の成分としてのアミノ酸、ミネラル、PCA（ピロリドンカルボン酸）、乳酸塩、尿素などの質量スペクトルが出現し、ヒト皮膚を試料とした場合においても、本発明の分析方法の有効性が実証された。

[0078] 図1は、既述した本発明の方法を実施する分析装置を示す。図1において、分析装置は、分析部410、微小空間群が形成された担体100を保持する保持部200、担体100に試料を供給する供給部300を主要な構成要

素として具備している。分析部４００は、イオン源としての真空容器、該容器内に真空を形成する真空ポンプ、前記容器内に高電圧を印加する高電圧源、イオン源たる前記真空容器に連通しイオン化された試料を分離する分析部、該分析部において選別されたイオンを増感して検出する検出部等を含むことができ、これらの構成要素は筐体内４０２内に収納されている。筐体４０２の一側面には、試料導入部を構成する吸引口４１０が設けられている。

[0079] 担体１００は、吸引口４１０の近傍において、担体の一端１１０が吸引口４１０に接触することなく試料溶液が担体の一端１１０から吸引可能な位置に保持部２００によって保持される。担体１００は、例えばろ紙、繊維、樹脂、布、薄層クロマトグラフィープレート（ガラス、アルミニウム等の板上にシリカゲル、アルミナ、ポリアミド樹脂などの吸着剤を薄膜状に固定した薄層プレート）とすることができる。保持部２００は、スタンド（図示せず）やフレーム（図示せず）等の固定手段を用いて、吸引口４１０の前方の所定位置に固定するようにしてもよい。供給部３００は、ピペットやシリンジ等によって構成することができる。供給部３００は、担体１００に溶媒３２０又は試料溶液３１０を供給可能な位置に配置される。供給部３００は、スタンド（図示せず）やフレーム（図示せず）等の固定手段を用いて、担体１００の上方の所定位置に固定するようにしてもよい。

[0080] 本明細書に開示された実施形態を実現する代替方法があることに留意すべきである。従って、本実施形態は、例示であって、制限的なものではないと考えるべきである。さらに、特許請求の範囲は、本明細書に与えられた詳細に限定されるものではなく、その全範囲及び同等物に権利がある。

符号の説明

- [0081] １ 質量分析装置
- １０ ガイド機構
- １０ａ、１０ｂ、１０ｃ、１０ｄ、１０ｄ'、１０ｅ、１０ｆ、１０ｇ
ガイド機構
- １００、１００'、１００'' 担体

1 1 0	担体の一端
1 2 0	液受け部
2 0 0	保持部
3 0 0	供給部
3 1 0	試料溶液
3 2 0	溶媒
4 0 0	分析部
4 1 0	吸引口
5 0 0、5 0 0'	シート体
6 0 0	粘着シート体
7 0 0	角層
8 0 0	粘着層

請求の範囲

[請求項1]

試料に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、

溶媒に溶解された試料を含む試料溶液を受ける液受け部から少なくとも一端に該試料溶液を導く微小空間群が形成された担体に、該試料溶液を供給する工程と、

質量分析装置の分析部の該試料溶液を吸引する吸引口と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到達した該試料溶液を該吸引口から吸引する工程と、

該成分の質量分析を行う工程
を含むことを特徴とする前記分析方法。

[請求項2]

試料に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、

該試料を塗布する塗布部から少なくとも一端に至るまでに微小空間群が形成された担体に、該試料を塗布する工程と、

該塗布部に溶媒を供給する工程と、

質量分析装置の分析部の、該溶媒に溶解された該試料を含む試料溶液を吸引する吸引口と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到達した該試料溶液を、該吸引口から吸引する工程と、

該成分の質量分析を行う工程
を含むことを特徴とする前記分析方法。

[請求項3]

試料に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、

該試料が転写される部分から少なくとも一端に至るまでに微小空間群が形成された担体に、該試料を転写する工程と、

該試料が転写された部分に溶媒を供給する工程と、

質量分析装置の分析部の、該溶媒に溶解された該試料を含む試料溶液を吸引する吸引口と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到達した該試料溶液を、該吸引口から吸引する工程と、

該成分の質量分析を行う工程
を含むことを特徴とする前記分析方法。

- [請求項4] 角層に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、
表面に粘着層を有するシート体を、該粘着層側が皮膚となるように
貼り付け、該皮膚から該シート体を剥がすことにより角層を剥離する
工程と、
該シート体に付着した該角層を、該シート体と微小空間群が形成さ
れた担体とで挟み込む工程と、
該担体に溶媒を供給する工程と、
質量分析装置の分析部の、該溶媒に溶解させた該角層を含む試料溶
液を吸引する吸引口と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到
達した該試料溶液を、該吸引口から吸引する工程と、
該成分の質量分析を行う工程
を含むことを特徴とする前記分析方法。
- [請求項5] 角層に含まれる成分を定性又は定量分析する方法であって、
微小空間群が形成され、表面に粘着層を有する担体を、該粘着層側
が皮膚となるように貼り付け、該皮膚から該担体を剥がすことにより
角層を剥離する工程と、
該担体に溶媒を供給する工程と、
質量分析装置の分析部の、該溶媒に溶解させた該角層を含む試料溶
液を吸引する吸引口と該担体とが接しない状態で、該担体の一端に到
達した該試料溶液を、該吸引口から吸引する工程と、
該成分の質量分析を行う工程
を含むことを特徴とする前記分析方法。
- [請求項6] 該試料溶液を該担体の一端に導くガイド機構が該担体に取り付けら
れていることを特徴とする、請求項1～5のいずれか1項に記載の分
析方法。
- [請求項7] 該担体の一端の角の角度が少なくとも1つが90°未満でないこと
を特徴とする、請求項1～6のいずれか1項に記載の分析方法。
- [請求項8] 該担体に該試料溶液を供給する前に、該担体に溶媒を滴下すること

を特徴とする、請求項 1、6 及び 7 のいずれか 1 項に記載の分析方法。
。

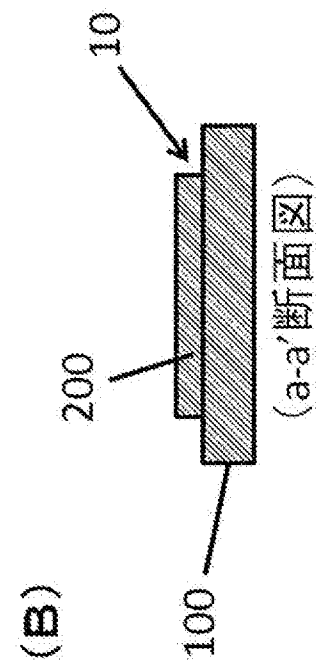
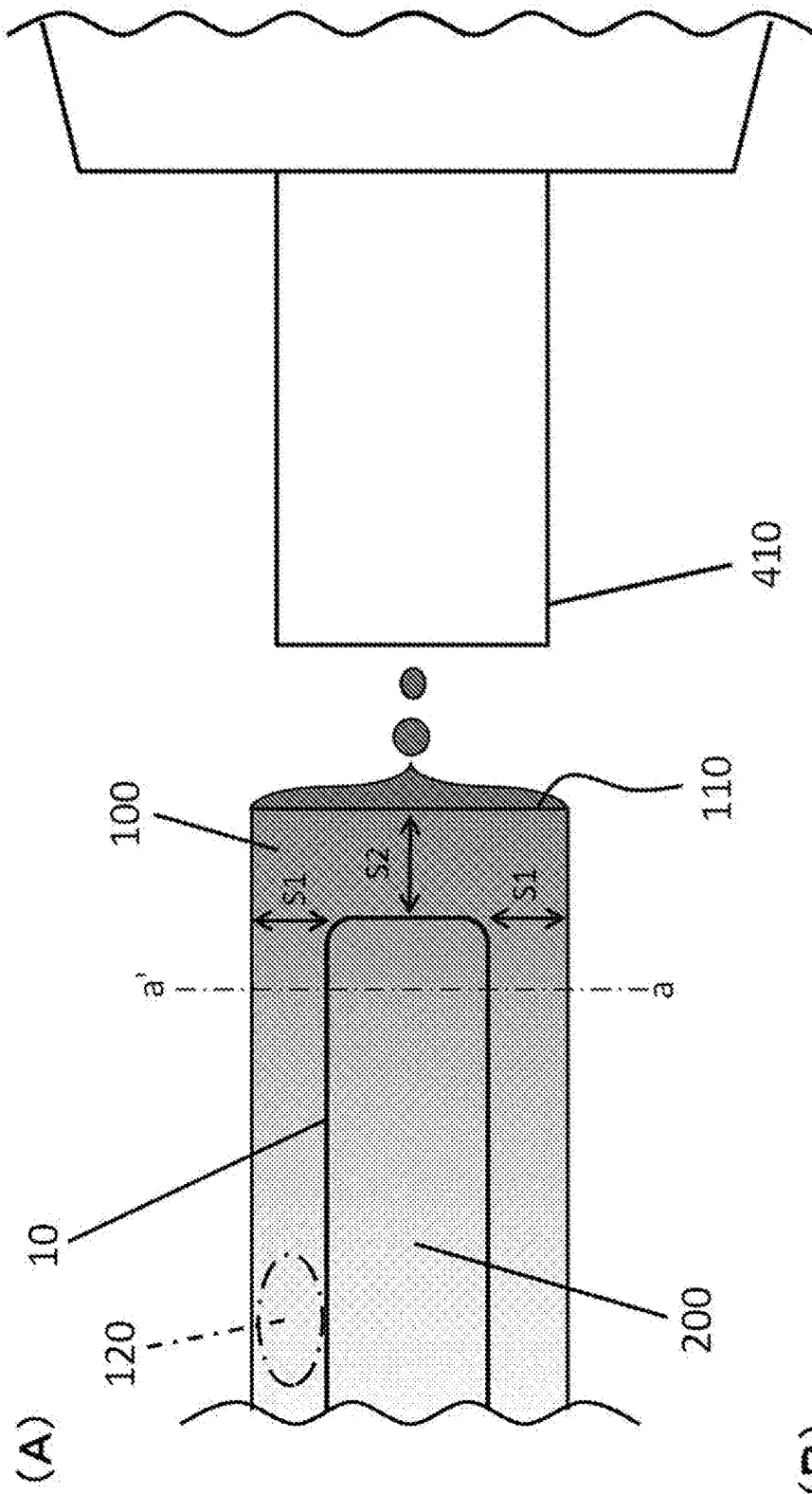
[請求項9] 該試料を塗布又は転写する前及び／又は後に、該担体に溶媒を滴下することを特徴とする、請求項 2、3、6 及び 7 のいずれか 1 項に記載の分析方法。

[請求項10] 該角層を付着させる前又は後に、該担体に溶媒を滴下することを特徴とする、請求項 4～7 のいずれか 1 項に記載の分析方法。

[請求項11] 試料に含まれる成分を定性又は定量分析する分析装置であって、
 微小空間群が形成された担体と、
 該担体を保持する保持部と、
 該担体に溶媒又は試料溶液を供給する供給部と、
 吸引口を有し、該成分を定性又は分析する分析部と
 を備え、
 該担体と該吸引口とが接しない状態で該担体が該保持部で保持され、
 該供給部から供給された該溶媒に溶解された試料を含む該試料溶液が担体の一端に到達し、該到達した試料溶液を該吸引口から吸引することを特徴とする質量分析装置。

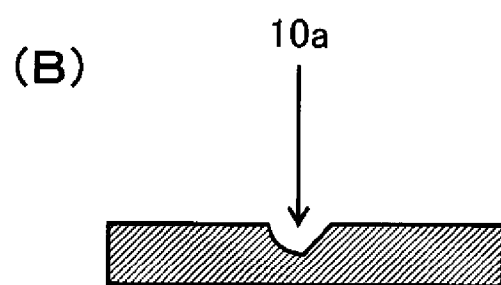
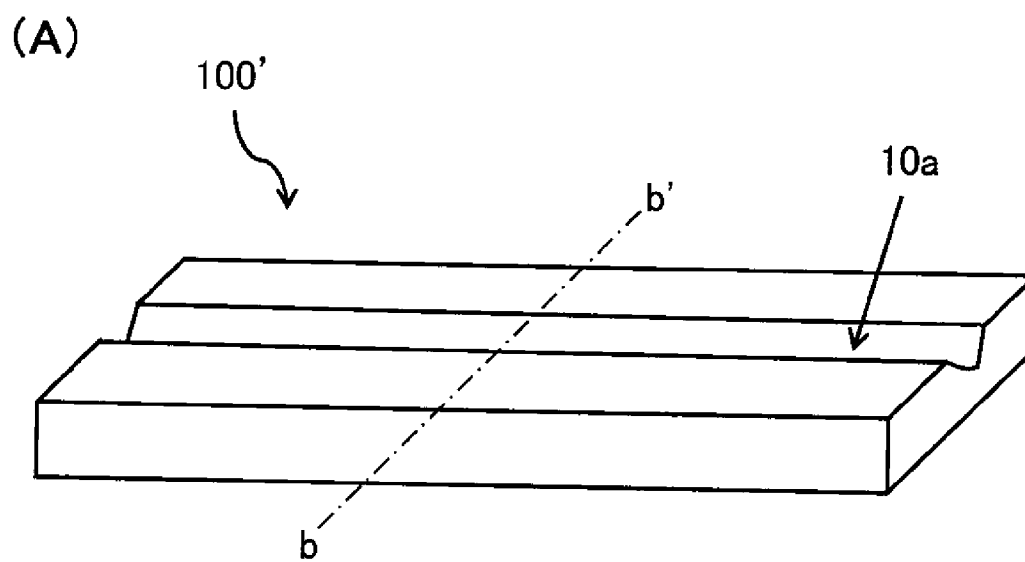
[図2]

図2



[図3]

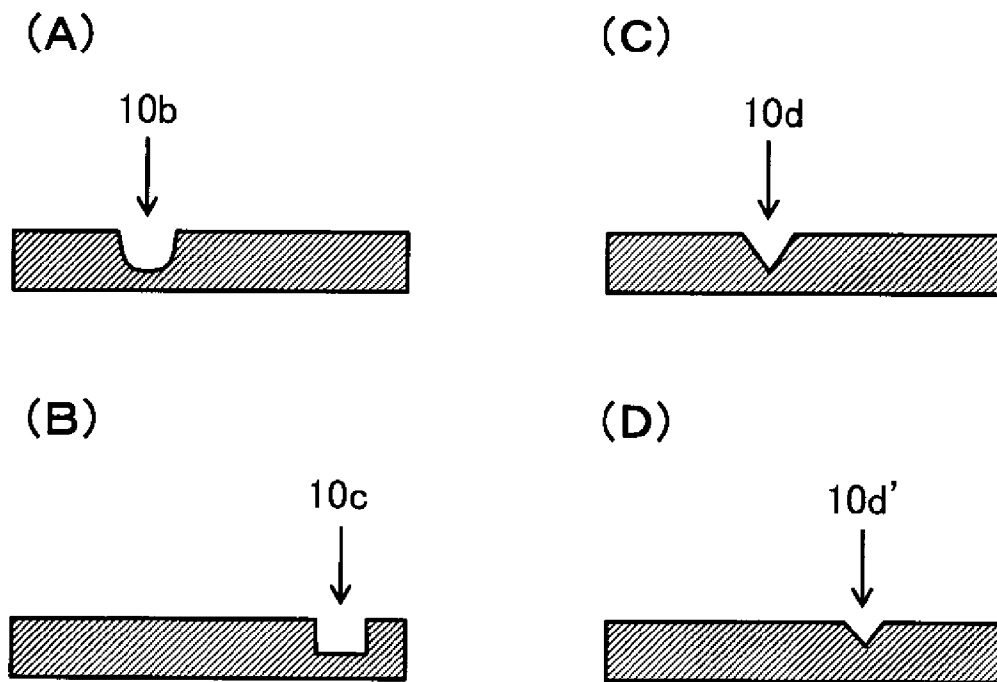
図3



(b-b' 断面図)

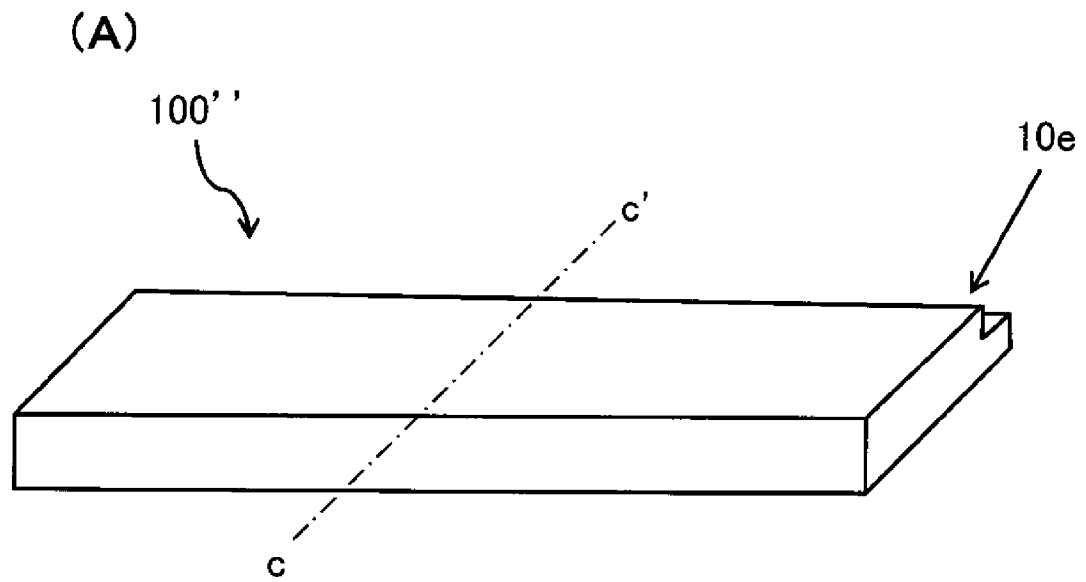
[図4]

図4



[図5]

図5



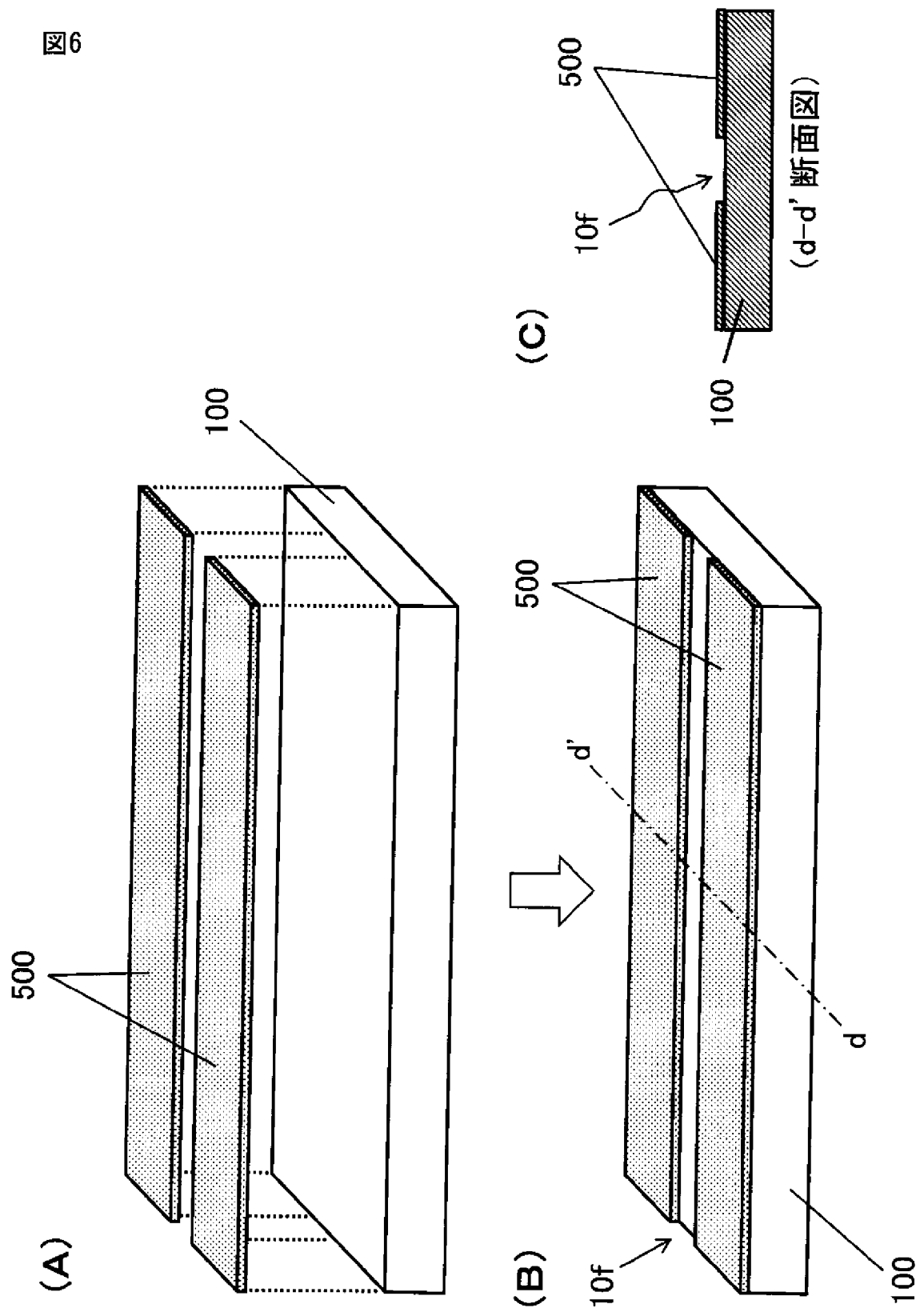
(B)



(c-c' 断面図)

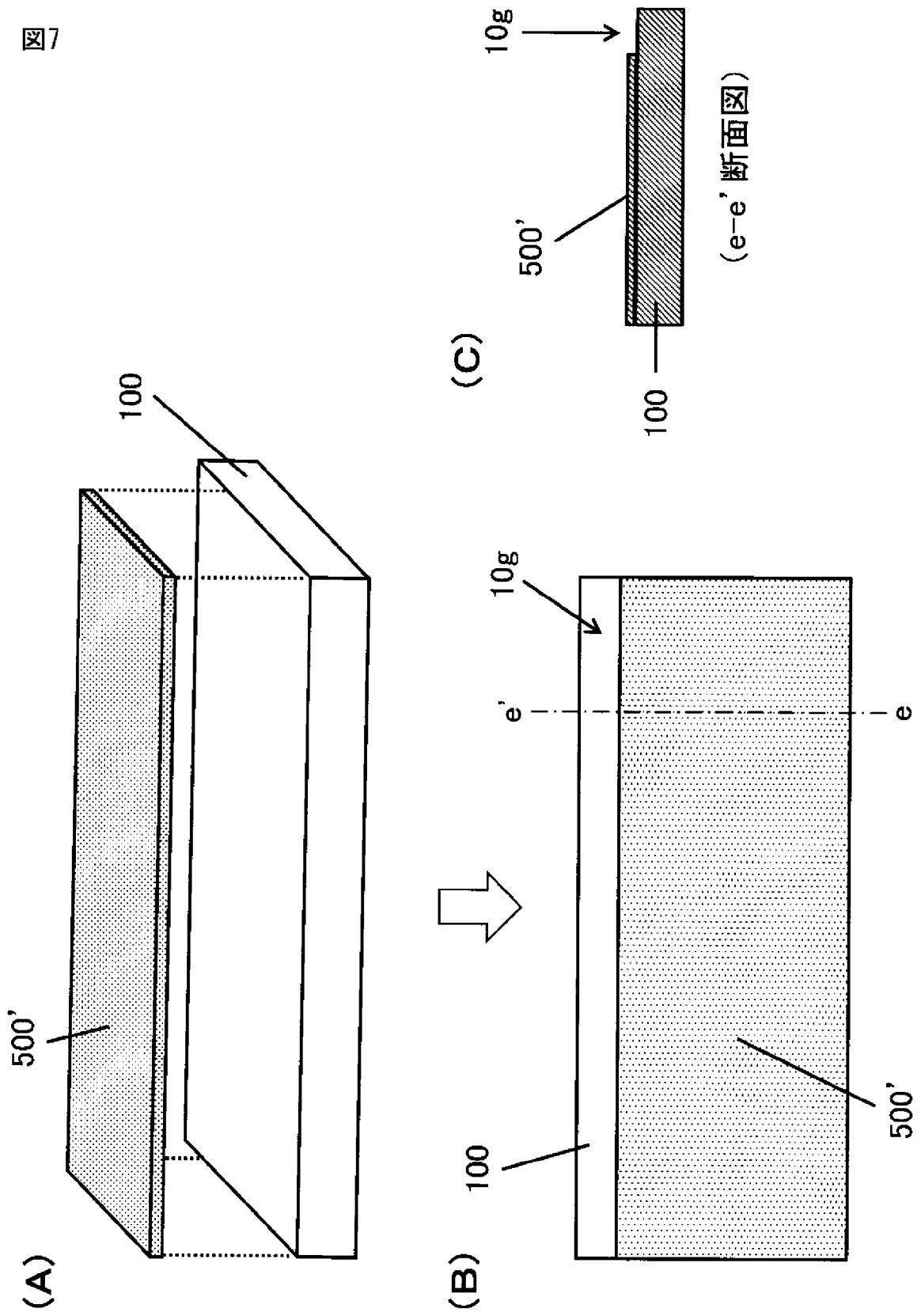
[図6]

図6



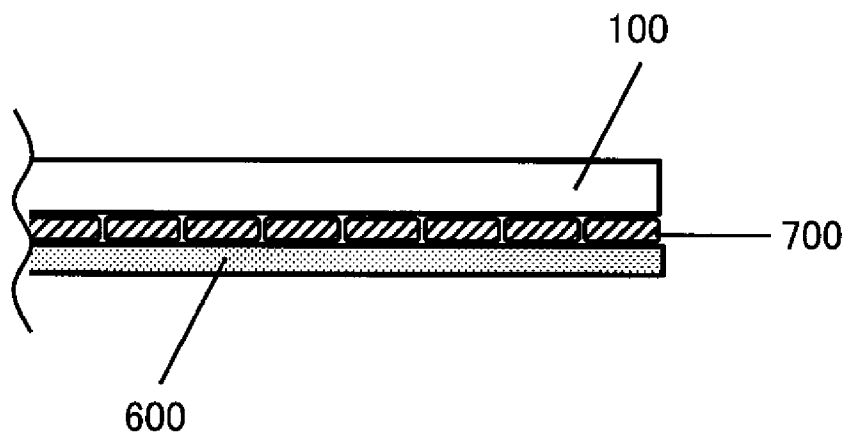
[図7]

図7



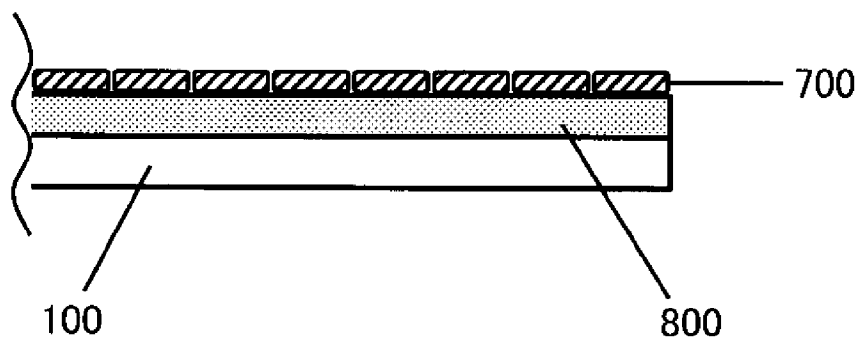
[図8]

図8



[図9]

図9



[10]

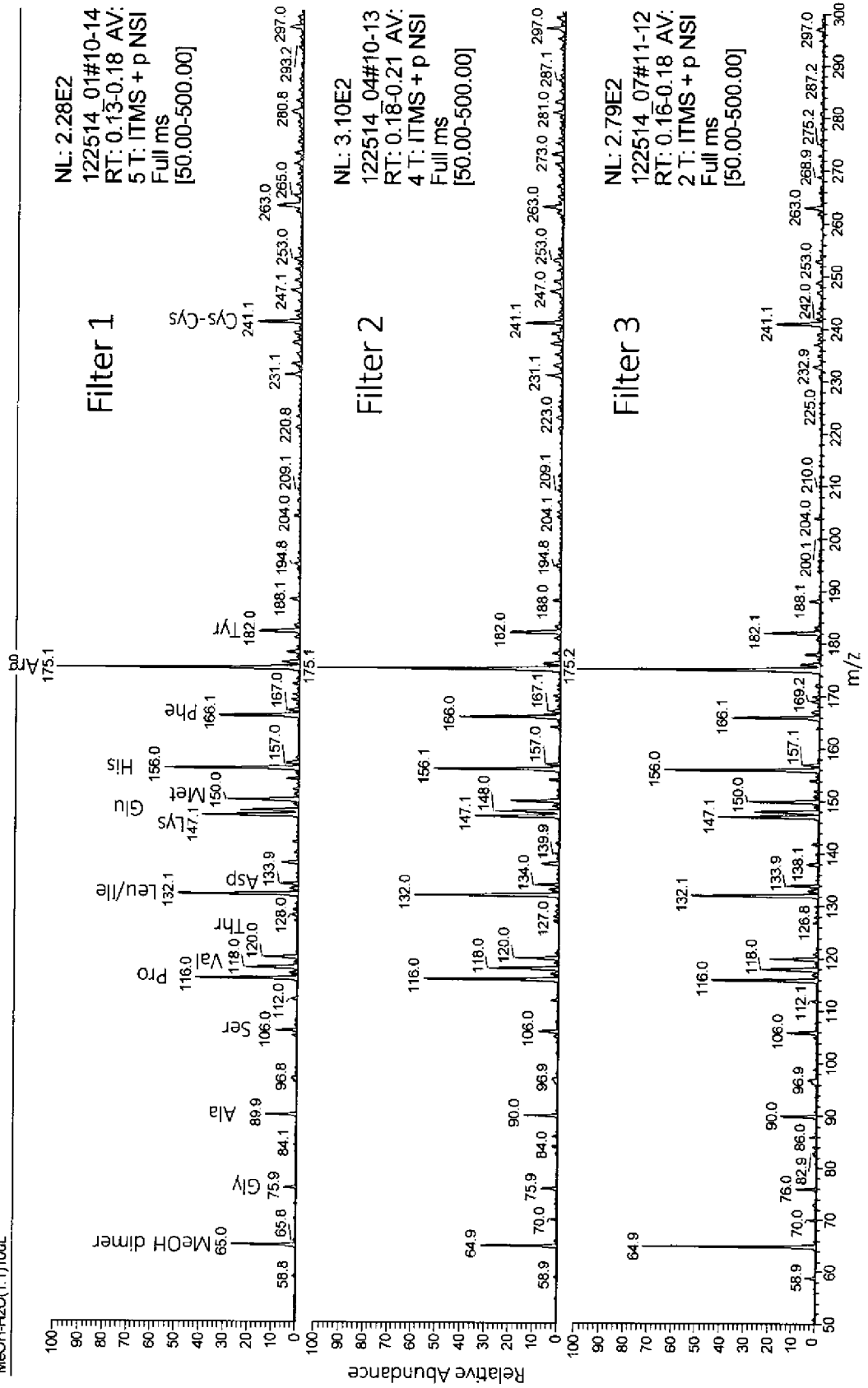
10

17 Amino Acid Standards (10nmol each)
1mM in 0.1N HCl x 10uL on filter, extracted by MeOH-MQW(1:1) 10uL

D:\Users\A\122514_01
MeOH+H2O(1:1)10uL

12/25/2014 10:58:15 AM

Paper2.5x10mm 10uL 1mM17AAs

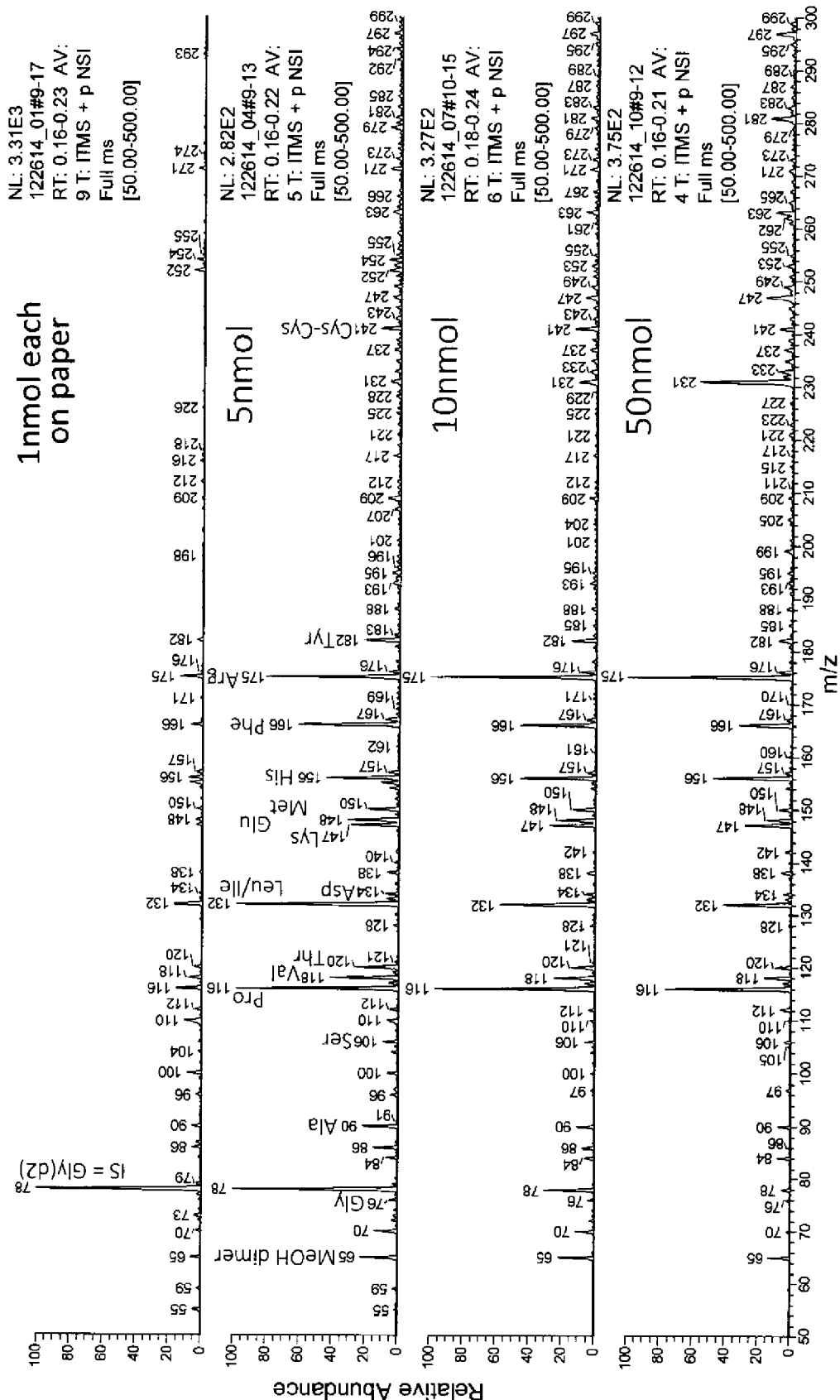


[11]

17 Amino Acid Standards + IS (Gly(d2))
1mM in 0.1N HCl x 10uL on filter, extracted by MeOH-MQW(1:1) 10uL

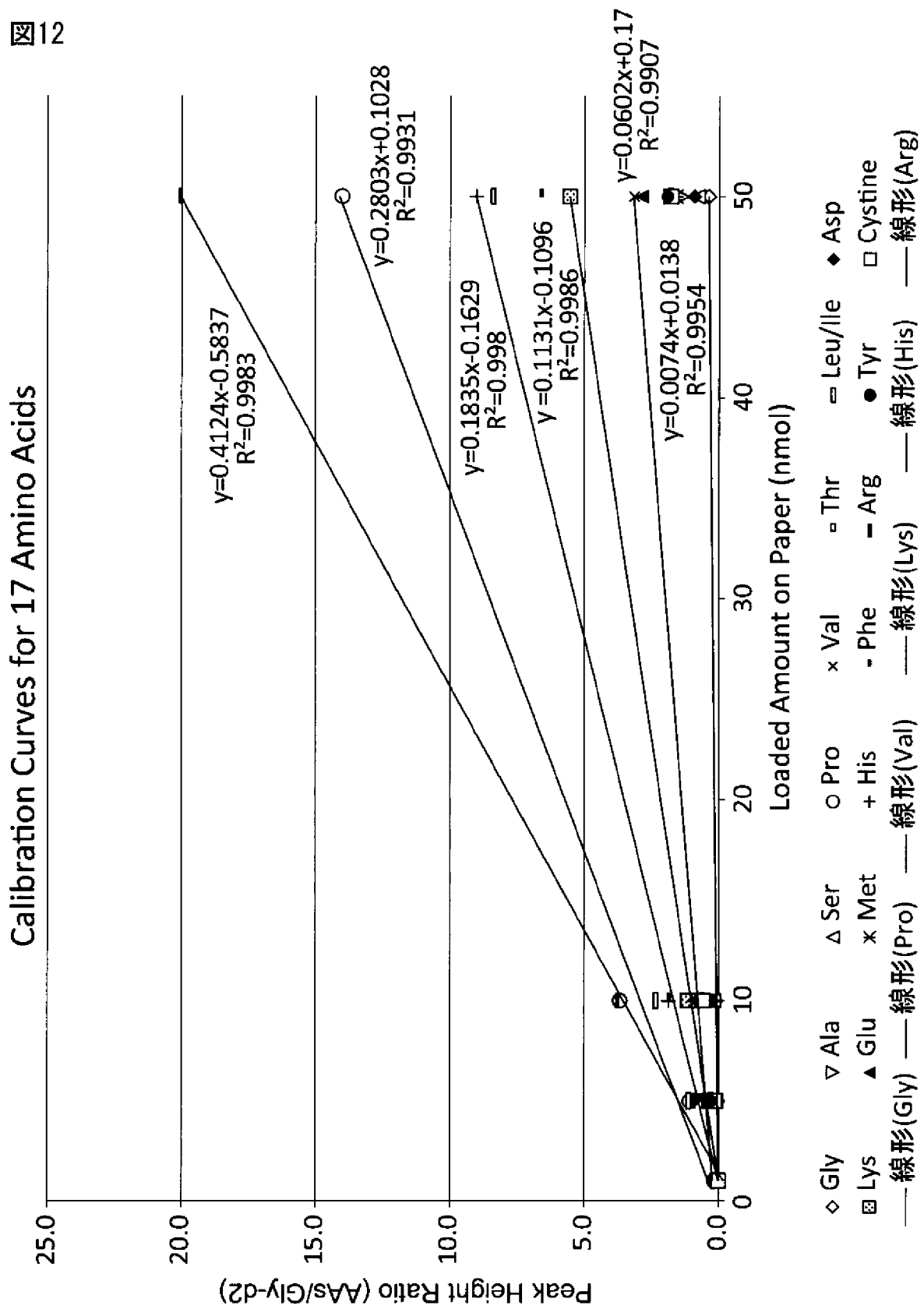
D:\Users\1122614_01
MeOH-H2O(1:1)5+10uL

12/26/2014 5:25:26 PM Paper2.5x10mm 1nmol17AAs+10nmolGd5



[図12]

図12

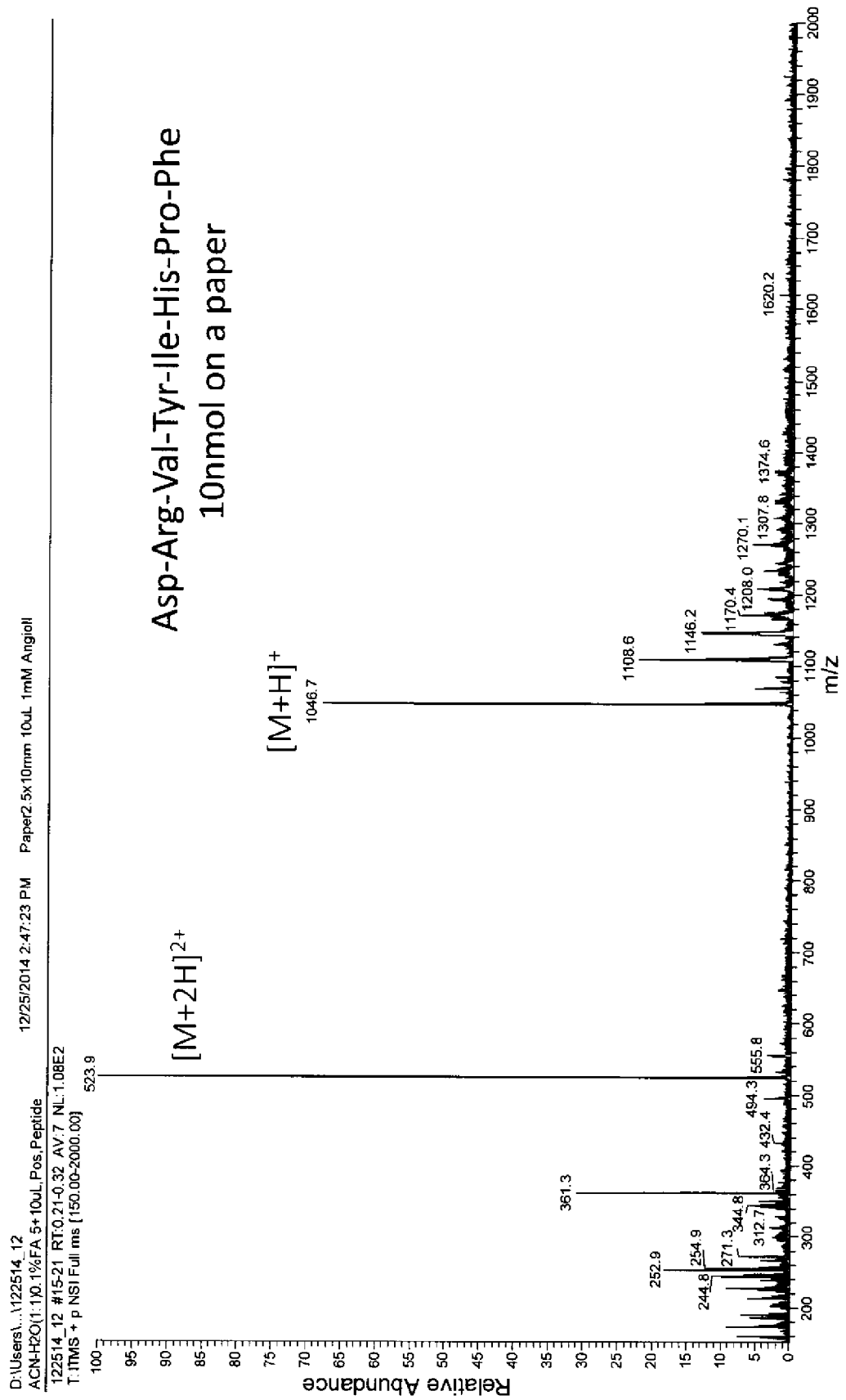


[13]

13

Angiotensin II

1mM in 0.1%FA 2%ACN x 10uL on filter, extracted by 0.1%FA ACN-MQW(1:1) 5+10uL



[14]

14

Insulin

1mM in 0.1%FA 2%ACN x 10uL on filter, extracted by 0.1%FA ACN-MQW(1:1) 5+10uL



[15]

[15]

Cosmetic Product

1uL crude lotion on filter, extracted by MeOH-MQW(1:1) 10uL

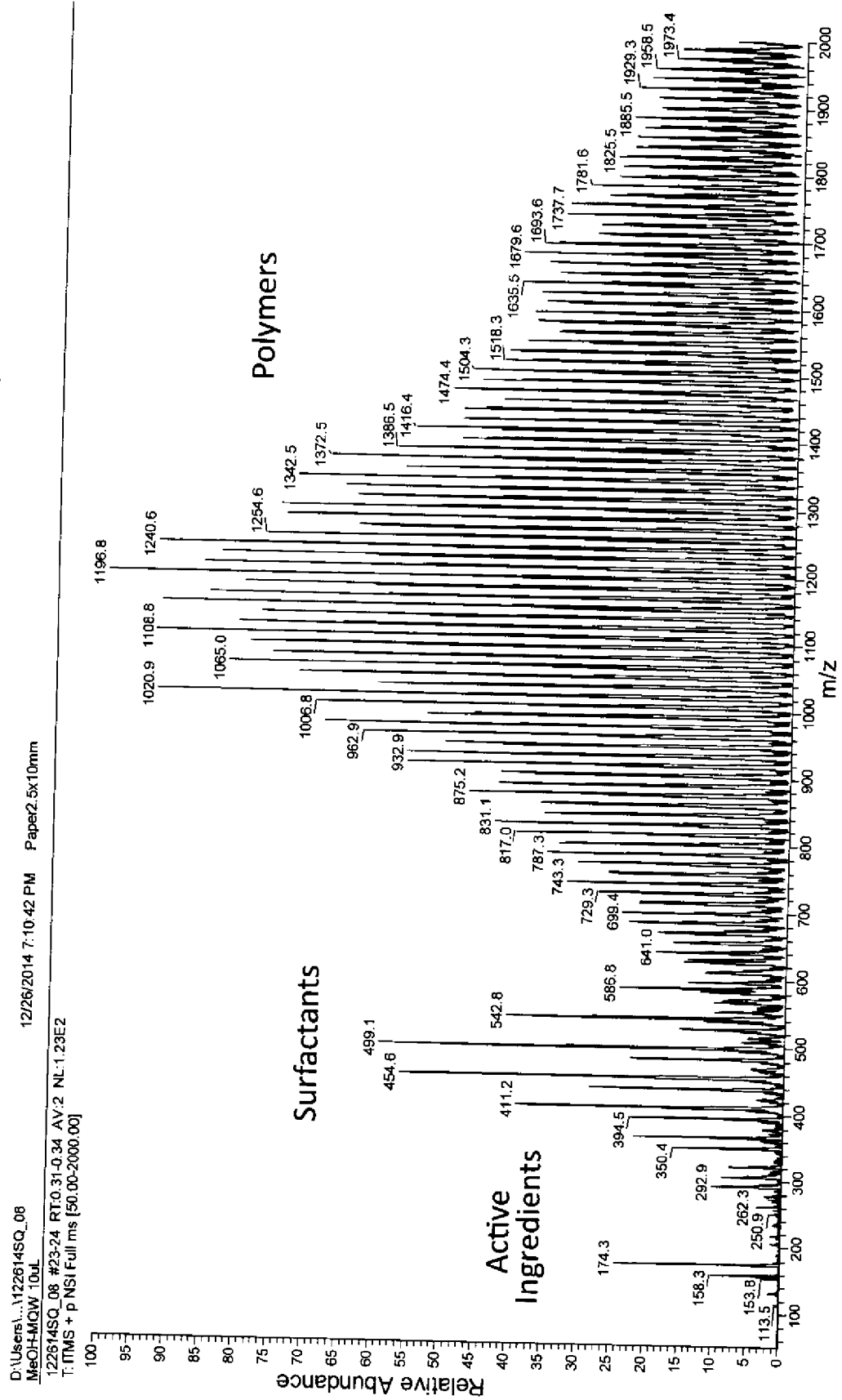
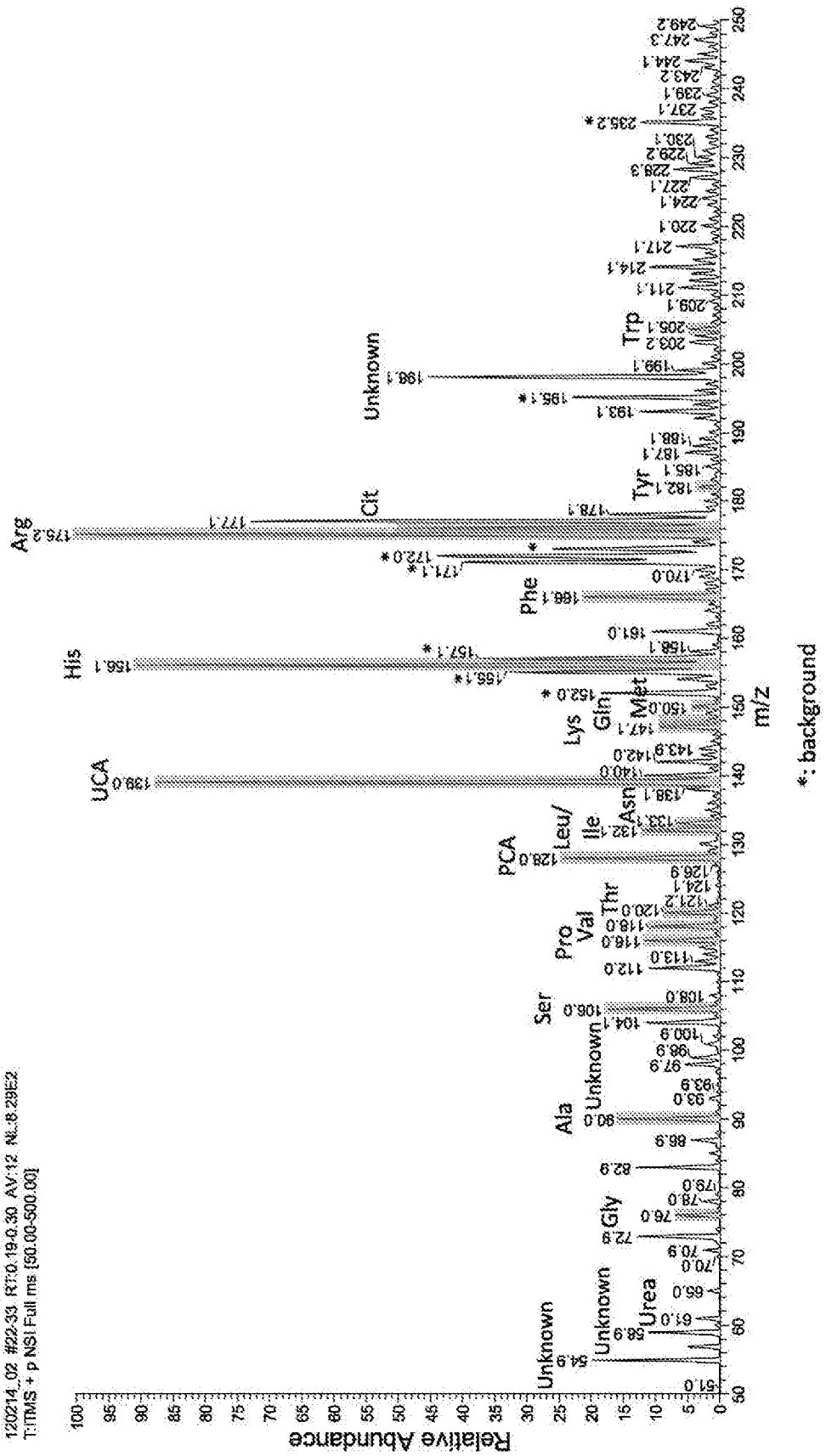


图 16

Tape stripped 9th layer sandwiched with filter, extracted by MeOH-MQW(1:1) 10ul

T:ITMS + p NSI Full ms [50.00-500.00]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/062176

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N27/62(2006.01) i, G01N1/04(2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N27/60-27/70, G01N1/00-1/04, G01N30/04, H01J40/00-49/48

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2012-525687 A (Purdue Research Foundation), 22 October 2012 (22.10.2012), entire text; all drawings & US 2012/0119079 A1 & US 8859986 B2 & WO 2010/127059 A1 & EP 2425448 A1 & CN 102414778 A & KR 10-2012-0027182 A	1-11
A	JP 2014-512538 A (Porex Corp.), 22 May 2014 (22.05.2014), entire text; all drawings & US 2014/0017693 A1 & US 2014/0234891 A1 & US 2015/0185211 A1 & WO 2012/145390 A1 & EP 2699907 A1	1-11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
 "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
 "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
 "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
 "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
 "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
 "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
 "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
24 June 2016 (24.06.16)

Date of mailing of the international search report
05 July 2016 (05.07.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/062176

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2012/056729 A1 (Atonarp Inc.), 03 May 2012 (03.05.2012), entire text; all drawings & US 2014/0017693 A1 & US 2014/0234891 A1 & US 2015/0185211 A1 & WO 2012/145390 A1 & EP 2699907 A	1-11
A	JP 2004-125576 A (Hitachi, Ltd.), 22 April 2004 (22.04.2004), (Family: none)	1-11

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N27/62(2006.01)i, G01N1/04(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. G01N27/60-27/70, G01N1/00-1/04, G01N30/04, H01J40/00-49/48

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 2012-525687 A (パーデュー・リサーチ・ファウンデーション) 2012.10.22, 全文全図 & US 2012/0119079 A1 & US 8859986 B2 & WO 2010/127059 A1 & EP 2425448 A1 & CN 102414778 A & KR 10-2012-0027182 A	1-11
A	JP 2014-512538 A (ポーレックス コーポレイション) 2014.05.22, 全文全図 & US 2014/0017693 A1 & US 2014/0234891 A1 & US 2015/0185211 A1 & WO 2012/145390 A1 & EP 2699907 A1	1-11

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

24.06.2016

国際調査報告の発送日

05.07.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

伊藤 裕美

2W

9515

電話番号 03-3581-1101 内線 3258

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	WO 2012/056729 A1 (アナトープ株式会社) 2012. 05. 03, 全文全図 & US 2014/0017693 A1 & US 2014/0234891 A1 & US 2015/0185211 A1 & WO 2012/145390 A1 & EP 2699907 A	1-11
A	JP 2004-125576 A (株式会社日立製作所) 2004. 04. 22, (ファミリーなし)	1-11