

DNA分析による大麻草とホップの識別と 大麻オイル中の大麻草DNAの検出方法の検討

秋元 里美*, 岡本 健*, 安藤 利典*, 池田 啓久*, 倉嶋 直樹*

Study on a PCR-based analysis method for identification of Cannabis sativa and detection of cannabis DNA in hemp oils

Satomi AKIMOTO*, Ken OKAMOTO*, Toshinori ANDO*, Yoshihisa IKEDA*, and Naoki KURASHIMA*

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

In this study, a PCR-based analysis for discrimination of Cannabis sativa (C. sativa) from Humulus lupulus was examined using newly designed primers from a chloroplast trnL-F region and the known cannabis-specific primer (cp-Can). As a result, we found that the PCR-based analysis can identify C. sativa by selectively producing its amplicons. Furthermore, the results of nested PCRs using the primers above suggested that trace amounts of C. sativa DNA in hemp oils could be detected.

1. 緒 言

大麻草 (*Cannabis Sativa*) は、アサ科アサ属に属する雌雄異株の一年草であり、60種類以上のカンナビノイドと総称される特有成分を含むことが分かっている¹⁾。カンナビノイドの一つであるテトラヒドロカンナビノールは、幻覚などの薬理作用を有しております¹⁾。日本では大麻取締法により大麻の所持や栽培が禁止されている。

大麻の分析には、呈色反応、薄層クロマトグラフィ、ガスクロマトグラフィなどのカンナビノイドの確認を目的とした化学的試験と大麻草に特徴的な剛毛や鐘乳体を検鏡観察する植物形態学的試験が行われる²⁾。しかし、大麻草を原料とした加工品の場合、カンナビノイドや剛毛の観察が困難な場合がある。

近年、DNA分析により大麻草を識別する方法が多数報告されており^{3)~7)}、大麻草の葉緑体DNA上に存在する *trnL* 領域に着目して設計された cp-Can プライマー（以下、大麻草特異的プライマーという）を用いれば、PCR増幅と電気泳動法で大麻草とその近縁種であるホップ (*Humulus lupulus*) の識別が可能であるということが分かっている⁶⁾。大麻草特異的プライマーを用いた場合、大麻草のみバンドが検出され、ホップを含めた他の植物については、バンドが検出されないという結果となるが、バンドが検出されなかつた場合、該当植物が大麻草でないのか、DNA抽出やPCRの不良なのかを判断することは難しい。

関税中央分析所では、大麻加工品と称される物品に対するDNA分析の有用性を研究しており、これまでの研究で、大麻草入りク

ッキーにおいて大麻草特異的プライマーを用いたPCR法により大麻草DNAを検出したことが報告されているが、大麻オイルにおいては大麻草特異的プライマーを使用したPCR法では大麻草DNAの検出に成功していない⁷⁾。

そこで本研究では、新規にプライマー設計し、大麻草とその近縁種であるホップをバンドの有無ではなく検出されるバンドの長さによって識別する方法を検討したので報告する。また、大麻オイルから大麻草特異的プライマーを用いて大麻草DNAを検出する方法を検討したので報告する。

2. 実 験

2.1 試料、試薬及び分析機器

2.1.1 試料

大麻草 1種

ホップ（市販ハーブティー）1種

大麻オイル 1検体

2.1.2 試薬

1M Tris-HCl (pH 8.0), 0.5M EDTA (pH 8.0), TE (pH 8.0), ヘキサデシルトリメチルアンモニウムプロミド (CTAB), 塩化ナトリウム, クロロホルム, イソアミルアルコール, β-メルカプトエタノール, 2-プロパノール, エタノール, メタノール（和光純薬工業）

プロテナーゼ K（タカラバイオ）

2.1.3 プライマー

本研究で使用したプライマーの情報を Table 1 及び Fig.1 に示す。

Table 1 Nucleotide sequences of primers used in this study

	name	Sequence 5'-3'
common primers for <i>C. sativa</i> and <i>H. lupulus</i>	cannabisF1*	GCAATCCTGAGCCAAATCCG
	cannabisF2*	AATCCTGAGCCAAATCCGGT
	cannabisF3*	AACAAATGGAGTTGGCTGCG
	cannabisF4*	CAAATGGAGTTGGCTGCGTT
	cannabisF5*	AAACAAGGATTAGAAAGCAAT
	cannabis_uniF1 ⁴⁾	CGAAATCGGTAGACGCTACG
	cannabisR1*	GGTCATTCAAGGTCCGGTTGT
	cannabisR2*	TACCAACTGAGCTACCCGA
	cannabisR3*	CCACTAACGGAATGAGAGGA
	cannabis_uniR1 ⁴⁾	ATTGAACTGGTGACACGAG
<i>C. sativa</i> -specific primer	primerD ⁵⁾	GGGATAGAGGGACTTGAAC
	cp-Can ⁷⁾	GAGTTGGCTGCGTTAATCCG

*primers newly designed in this study

2.1.4 分析装置

分光光度計 : V-660 SPECTROPHOTOMETER (日本分光)
PCR 增幅装置 : Veriti 96 well Thermal cycler (Applied Biosystems)
画像解析装置 : BIO-PROFILE System2 (VILBER LOURMAT)
DNA シークエンサー : 3500XL Genetic Analyzer
(Applied Biosystems)

2.2 実験方法

2.2.1 DNA 抽出と濃度測定

大麻草及びホップからの DNA 抽出は、試料 100 mg を使用し、3% CTAB buffer 700 μL を用いて行い、DNA 抽出溶液の最終容量が 100 μL になるようにした。

大麻オイルからの DNA 抽出は、試料約 160 mg を容量 1.5 mL のマイクロ遠心チューブに採取し、メタノールで洗浄したもの (500 μL のメタノールを加え、激しく振とうした後、14,000 rpm で 1 分間遠心分離し、メタノール層をマイクロピペットで除去する操作を 3 回繰り返す) を、DNeasy® Plant Mini Kit (QIAGEN) (以下、「DNA 抽出キット」という) でプロトコールに従い、最終容量 200 μL になるよう行った。

抽出した DNA 濃度は、光路長 1 cm のセルで測定した際に、二本鎖 DNA 50 ng/μL の 260 nm における吸光度 (A_{260}) が 1 に相当することに基づいて⁸⁾、それぞれの 260 nm の吸光度から求めた。DNA の純度は、試料由来のたんぱく質の濃度に比例する 280 nm の吸光度 (A_{280}) に対する 260 nm の吸光度 (A_{260}) の比 (A_{260}/A_{280} 比) から算出した⁹⁾。

2.2.2 大麻草・ホップ共通プライマー及び大麻草特異的プライマーを用いた PCR 增幅

各試料から抽出した DNA を錠型とし、TaKaRa Ex Taq® (タカラバイオ)を用いて PCR 法で *trnL-trnF* 領域の特定配列を増幅した。PCR の反応溶液は、DNA 抽出液 (10 ng/μL) 1 μL, 10 × Ex Taq buffer 3.0 μL, dNTP mixture (2.5 mM each) 2.4 μL、プライマー (10 μM) 各 1.5 μL, Ex Taq polymerase (5 U/μL) 0.1 μL, 減菌水 20.5 μL (全量 30 μL) とした。プライマーには、Table 1 に示す大麻草・ホップ共通プライマーと大麻草特異的プライマーを組み合わせて使用した。PCR の反応条件は、95 °C (4 分) の加熱を行い、95 °C (30 秒), 58 °C–63 °C (1 分; 使用プライマーにより温度を変更。Table 2 参照), 72 °C (1 分) のサイクルを 30–35 回繰り返した後、伸長反応 72 °C (5 分) を行った。増幅した PCR 産物の有無は、2% アガロースゲル電気泳動により確認した。

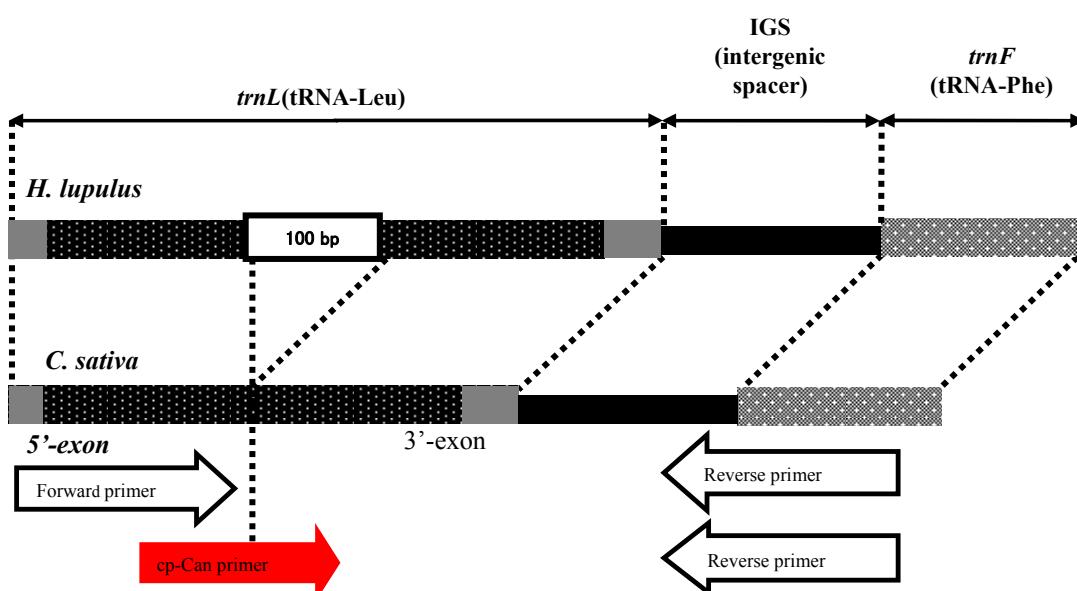


Fig. 1 Schematic representation of *trnL-trnF* region from *Cannabis sativa* (*C. sativa*) and *Humulus lupulus* (*H. lupulus*) and the priming sites of primers used for PCR amplification.

Table 2 Primer pairs with annealing temperatures and expected lengths of PCR products

Forward primer	Rivers primer	Temperature setting	Length of PCR product (<i>C.sativa/H.lupulus</i>)
cannabisF1	cannabisR1		490 bp / 579 bp
cannabisF1	cannabisR2		677 bp / 770 bp
cannabisF2	cannabisR1		489 bp / 578 bp
cannabisF3	cannabisR2	58 °C	575 bp / 674 bp
cannabisF4	cannabisR1		386 bp / 484 bp
cannabisF5	cannabisR3		400 bp / 495 bp
cannabis_uniF1	cannabis_uniR1		819 bp / 914 bp
	cannabisR1	63 °C	380 bp
	cannabisR2	63 °C	566 bp
cp-Can	cannabisR3	60 °C	323 bp
	primerD	60 °C	280 bp
	cannabis_uniR1	58 °C	605 bp

2.2.3 nested PCR の検出限界の確認

大麻草から抽出した DNA を PCR 液 30 μL 中に 5 pg–10 ng の範囲で添加し、プライマーとして cp-Can、及び cannabis_uniR1 を使用し、2.2.2 の PCR 条件（サイクル数 35 サイクル）で 1st PCR を行い、PCR 産物の有無を 2% アガロースゲル電気泳動により確認した。

1st PCR で得られた増幅産物を、イソプロパノール沈殿により精製した後、滅菌水 20 μL で希釈し、2nd PCR の錆型とした。2nd PCR は、プライマーとして、cp-Can と cannabis_R1, cannabis_R2, cannabis_R3 又は primerD の 4 通りの組み合わせで、2.2.2 の条件（サイクル数 30 回）で反応させた。

2nd PCR の終了後、反応液の 2 μL を 2% アガロースゲルにアプライし、電気泳動による増幅バンドの有無から nested PCR の検出限界を確認した。

2.2.4 大麻オイルの nested PCR

大麻オイルから抽出した DNA (2–10 ng/μL) 1 μL を使用して、2.2.3 と同様のプライマー及び反応条件で 1st PCR を行い、2% アガロースゲル電気泳動により確認した。1st PCR の増幅産物をイソプロパノール沈殿で精製した後、滅菌水（大麻草のみ 80 μL、他は 10 μL）で希釈した。その後、プライマーに cp-Can 及び cannabis_R2 又は primerD の 2 通りの組み合わせで、2nd PCR を 2.2.3 と同様の条件で行った。2nd PCR の増幅産物は、2% アガロースゲル電気泳動により確認した。

2.2.5 塩基配列解析

イソプロパノール沈殿により精製した PCR 産物を、PCR で使用した各プライマーを用いて Big Dye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) でプロトコールに従い、サイクルシークエンス反応を行った。サイクルシークエンス反応後、エタノール沈殿法により未反応の蛍光色素を除去し、DNA シークエンサーにより各 PCR 産物の塩基配列を決定した。シークエンサーにより各 PCR 産物の塩基配列を決定した。シークエンサー（ATGC ver.4, GENETYX CORPORATION）を用

いて連結し、コンセンサス配列を得た上で、DNA Data Bank of Japan(以下、DDBJ と略記する)の Basic Local Alignment Search Tool (以下、BLAST と略記する) を用いて相同性検索を行った。

3. 結果及び考察

3.1 大麻草、ホップ及び大麻オイルからの DNA 抽出

大麻草、ホップおよび大麻オイルから抽出した DNA の収量と純度を Table 3 に示す。

DNA 抽出キットを用いて大麻オイルから抽出した DNA は、大麻草から抽出したものと比較して、収量及び純度が低い値となつた。大麻草の製品から大麻の DNA を抽出するためには、製品中に大麻草由来の植物片又は DNA が少なくとも含まれている必要がある。DNA の収量は、製品中に残留する植物片や DNA の量に依存するため、今回の大麻オイルから抽出した DNA の収量が低くなった原因是、同製品中に含まれる植物片や DNA が微量であったためと考えられる。今回の研究で使用した大麻オイルを検鏡観察した際、微細な植物片が僅かしか観察されなかったことは、試料中に含まれる植物片は極微量であったことを裏付けている。また、大麻オイルから抽出した DNA の純度が低くなった原因は、油分などのきょう雜物の残留によるものと考えられる。

以上のことから、大麻オイルから高純度の DNA を抽出するためには、前処理や抽出方法、抽出後の精製方法を更に検討する必要がある。

Table 3 Yields and purities of DNAs extracted from *C. sativa* leaves, *H. lupulus strobilus* and hemp oil

Method of extraction	Total DNA (μg)	A ₂₆₀ /A ₂₈₀
100 mg of <i>C. sativa</i> leaves	CTAB	180.7
100 mg of a herb tea sample (<i>H. lupulus</i>)	CTAB	89.7
160 mg of Hemp oil	Kit	1.2

3.2 PCR 増幅及び配列解析

Table 1 の大麻草・ホップ共通プライマーを組み合わせて行った PCR の結果を Fig.2 に示す。全てのプライマーの組み合わせで大麻草 (Lane 1) 及びホップ (Lane 2) のいずれにおいても増幅産物がバンドとして確認され、バンドの長さを比較すると、大麻草のバンド長はいずれもホップのバンド長よりも短かった。これは、PCR 増幅産物に含まれる *trnL* に関して、大麻草に約 100 bp の欠失があるためである⁶⁾。また、各 PCR 産物から得られた塩基配列について DDBJ の BLAST で相同性検索を行った結果、それぞれ大麻 (*C. sativa*) 及びホップ (*H. lupulus*) と高い相同意性 (97%以上) を示した。

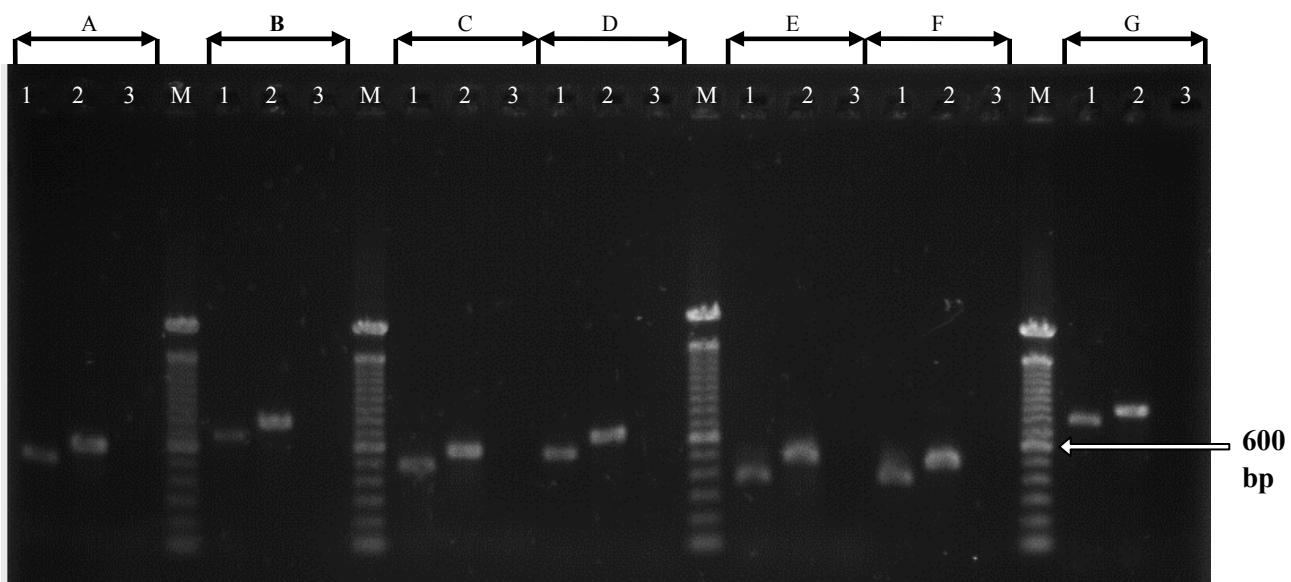


Fig. 2 Result of PCR amplifications using sets of common primers for *C. sativa* and *H. lupulus*: (A) cannabisF1 and cannabisR1, (B) cannabisF1 and cannabisR2, (C) cannabisF2 and cannabisR1, (D) cannabisF3 and cannabisR2, (E) cannabisF4 and cannabisR1, (F) cannabisF5 and cannabisR3, and (G) cannabis_uniF1 and cannabis_uniR1.

Lane 1, *C. sativa* leaves; Lane 2, *H. lupulus*; Lane 3, water (negative control); Lane M, 100 bp DNA ladder marker.

一方、Fig.3に示すように、大麻草特異的プライマーと大麻草・ホップ共通プライマーを組み合わせて行ったPCRでは、ホップ(Lane 2)からはバンドが検出されず、大麻草(Lane 1)のみバン

ドが検出された。各PCR産物から得られた塩基配列についてDDBJのBLASTで相同性検索を行った結果、いずれも大麻(*C. sativa*)と高い相同性(97%以上)を示した。

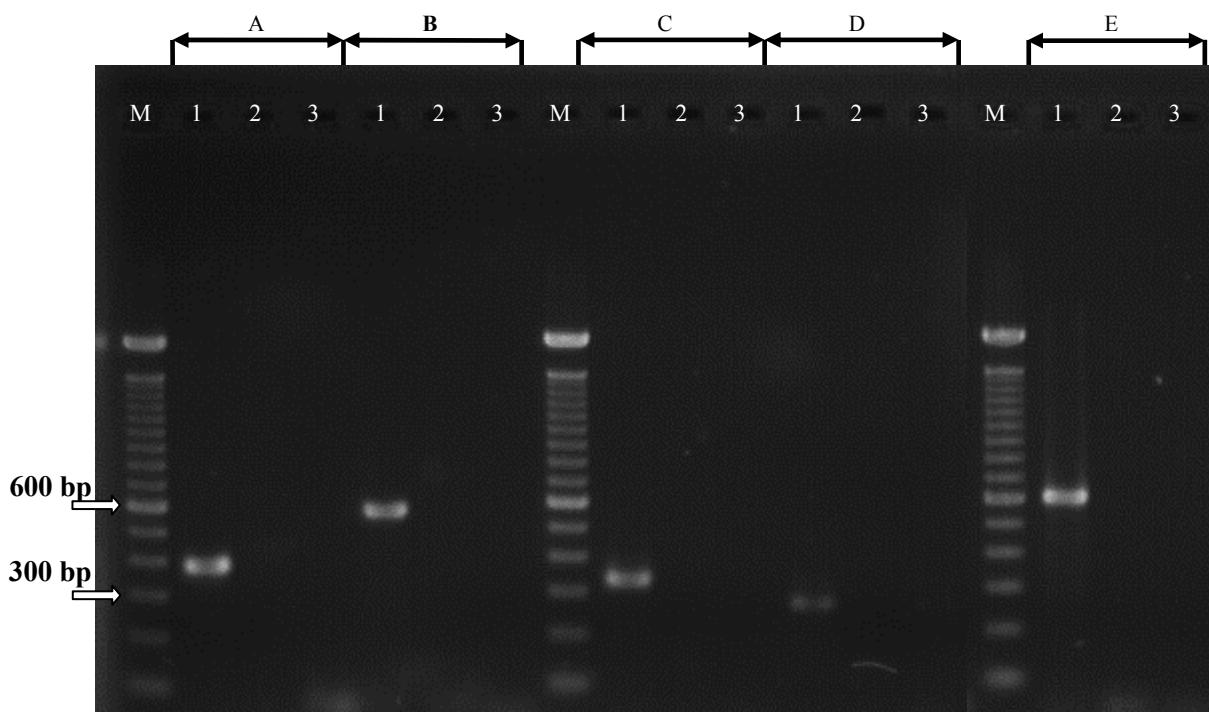


Fig. 3 Result of PCR amplifications with primer combinations (A) cp-Can and cannabisR1, (B) cp-Can and cannabisR2, (C) cp-Can and cannabisR3, (D) cp-Can and primerD, and (E) cp-Can and cannabis_uniR1.

Lane 1, *C. sativa* leaves; Lane 2, *H. lupulus*; Lane 3, water (negative control); Lane M, 100 bp DNA ladder marker.

以上により、大麻草・ホップ共通プライマー又は大麻草・ホップ共通プライマーと大麻草特異的プライマーの組み合わせで PCRを行った後、電気泳動法で分離・検出することで、大麻草とホップの区別が可能であることが確認された。

しかしながら、今回使用した大麻草・ホップ共通プライマーについては、植物全体で高度に保存されている DNA 領域の塩基配列から設計されており、大麻草やホップ以外にも反応し、大麻草と同じ長さのバンドが得られる可能性がある。よって、今後はホップ以外の大麻草の近縁種について同様の結果が得られるかどうか検証する必要がある。

更に、今回の大麻草・ホップ共通プライマーと大麻草特異的プライマーの組み合わせによる判別法では、内部コントロールが存在しないため、バンド検出されなかった際、PCR 反応が正常に行われていない可能性を排除できない。今後は、内部コントロールとして機能する共通プライマーを追加したデュプレックス PCR などに改善する必要がある。

3.3 大麻草 DNA の nested PCR による高感度検出

過去の研究⁷⁾で、大麻オイルから抽出した DNA を鋳型とし、大麻草特異的プライマーを使用した PCR で增幅産物が得られなかつたことが報告されている。このことから、PCR による大麻草 DNA 検出の感度向上のため、nested PCRを行った。

今回検討する nested PCR の検出限界を確認するために、鋳型とする大麻草から抽出した DNA を PCR 溶液 30 μL 中に 5 pg–10 ng の範囲で加え、1st PCR (35 サイクル)を行った結果、Fig. 4 に示すように、DNA 量が 0.5 ng (濃度として 17 pg/μL) 以上のときに 1st PCR でバンド検出が可能であることが確認された。

次に、1st PCR の増幅産物を精製し、30 μL の系で 2nd PCR を行った結果、Fig. 5 に示すように、1st PCR における DNA 添加量が 5 pg (濃度として 0.17 pg/μL) の時でも良好にバンドとして検出可能であることが確認された。

以上のことから、今回の nested PCR の条件における大麻草 DNA の検出限界は 5 pg 以下であり、1 回目の PCR では電気泳動法でバンドが確認できない極微量な DNA 量であっても、nested PCR により大麻草 DNA を検出可能であることが分かった。

nested PCR は作業が煩雑であるが、鋳型 DNA が少量でも検出が可能なため、DNA が少量しか採取できないサンプルに効果的であると考えられる。

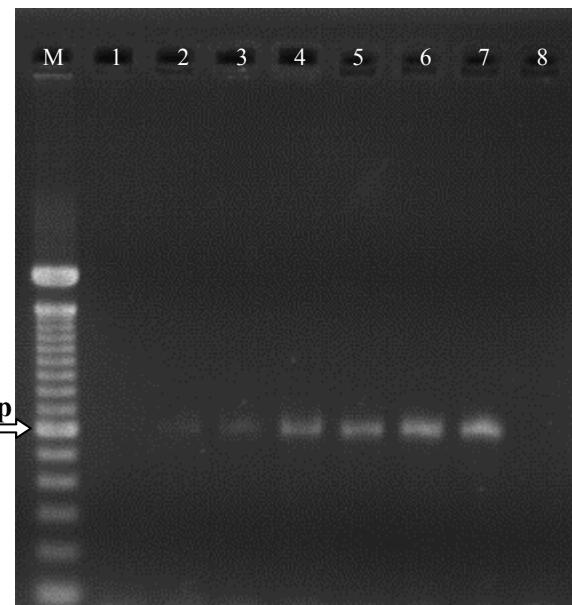


Fig. 4 Result of 1st PCR amplifications using primers cp-Can and cannabis_uniR1.
Lane 1, 0.1 ng *C. sativa* DNA; Lane 2, 0.5 ng *C. sativa* DNA; Lane 3, 1 ng *C. sativa* DNA; Lane 4, 3 ng *C. sativa* DNA; Lane 5, 5 ng *C. sativa* DNA; Lane 6, 7 ng *C. sativa* DNA; Lane 7, 10 ng *C. sativa* DNA; Lane 8, water (negative control); Lane M, 100 bp DNA ladder marker.

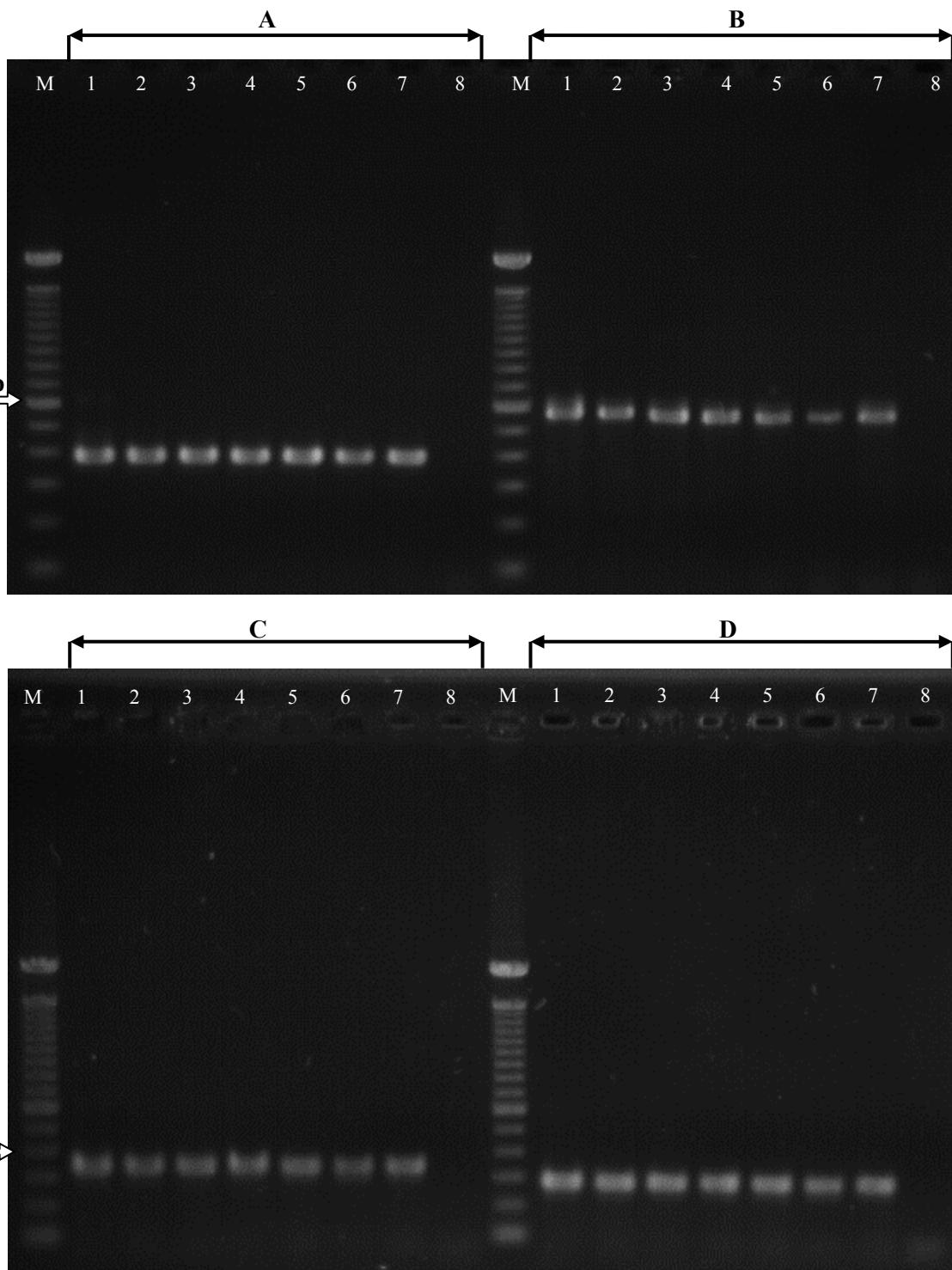


Fig. 5 Results of 2nd PCR amplifications using primer sets of (A) cp-Can and cannabisR1, (B) cp-Can and cannabisR2, (C) cp-Can and cannabisR3, and (D) cp-Can and primerD.
Lane 1, 10 ng *C. sativa* DNA; Lane 2, 0.1 ng *C. sativa* DNA; Lane 3, 0.07 ng *C. sativa* DNA; Lane 4, 0.05 ng *C. sativa* DNA; Lane 5, 0.03 ng *C. sativa* DNA; Lane 6, 0.01 ng *C. sativa* DNA; Lane 7, 5 pg *C. sativa* DNA; Lane 8, water (negative control); Lane M, 100 bp DNA ladder marker.

3.4 大麻オイル DNA の nested PCR

大麻オイルから DNA 抽出キットで抽出した DNA を使用して nested PCR を行った結果を Fig.6 に示す。いずれの条件でも 1st PCR ではバンドを検出することができなかった (data not shown) が、2nd PCR では標準大麻草と同じ位置 (280 bp 及び 566 bp) に

バンドを微弱ながら検出できた。大麻オイルの 1st PCR でバンドが検出できなかった理由について、添加した DNA 量が 2–10 ng と 1st PCR の検出限界 (0.5 ng) 以上のものであってもバンドの検出ができなかったことから、鑄型 DNA の量ではなく、DNA 抽出液に存在するきょう雜物の影響が大きいと考えられる。

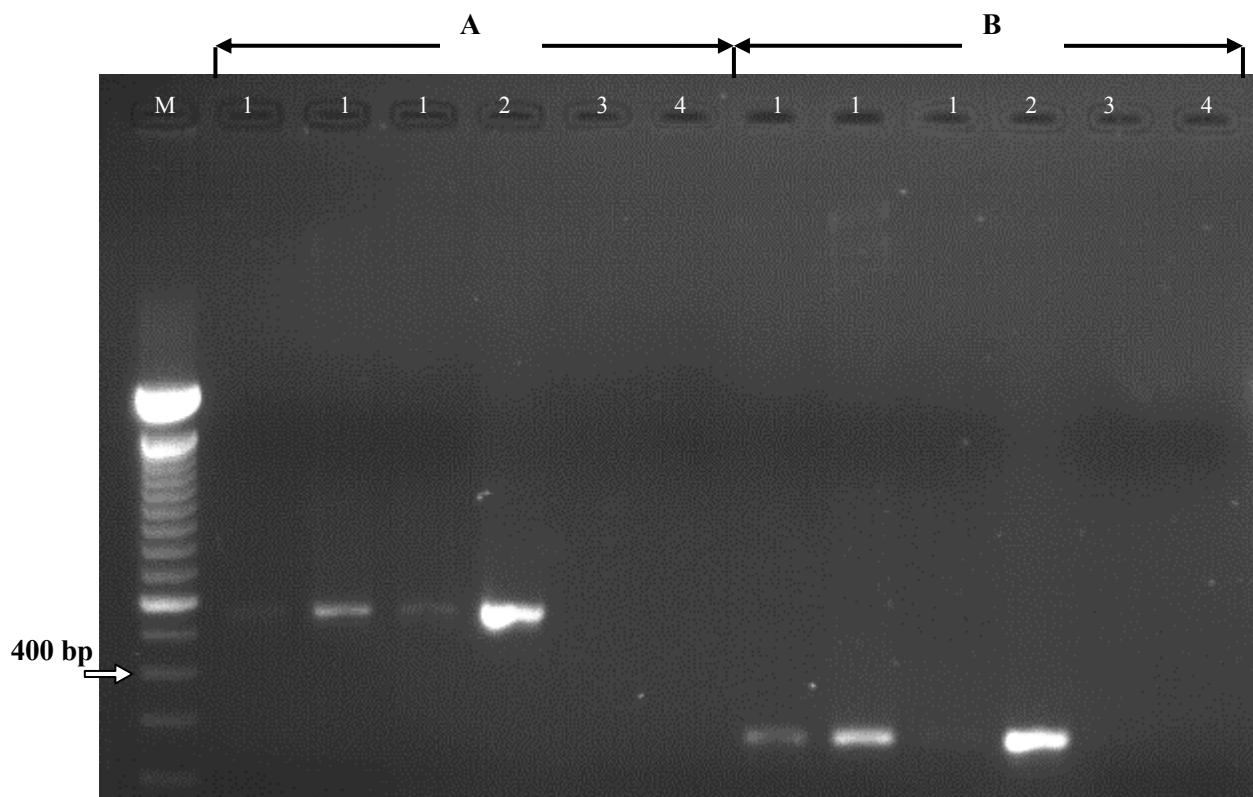


Fig. 6 Result of nested PCR amplifications using DNA extracted from a hemp oil sample with primer sets of (A) cp-Can and cannabisR2 and (B) cp-Can and primerD.
Lane 1, hash oil sample; Lane 2, *C. sativa* leaves; Lane 3, *H. lupulus*; Lane 4, water (negative control); Lane M, 100 bp DNA ladder marker.

なお、今回行った nested PCR では、大麻オイルについて微弱なバンドしか検出されず、かつ充分な再現性が得られなかつたことから、今後はこれらの改善を課題としたい。

4. 要 約

大麻草の DNA 分析において、大麻草特異的プライマーではバンドの有無で大麻草か他の植物かを識別していたが、本研究では、バンドの長さの差異で識別するためのプライマーとして大麻草・

ホップ共通プライマーを設計し、大麻草とその近縁種であるホップとの識別の可否の確認を行った。その結果、大麻草特異的プライマー及び大麻草・ホップ共通プライマーの 2 種類の PCR 結果を組み合わせることでより確実に識別が可能であると考えられた。

大麻オイルから大麻草 DNA を検出するための方法として、今回設計したプライマーを用いた nested PCR の検討を行った。その結果、nested PCR を用いる事で大麻オイルから大麻草 DNA を検出できる可能性が示唆された。

文 献

- 1) 田浦大志, 正山祥生, 森元 聰 : 生物物理, **45**, 178 (2005).
- 2) United Nations Office on Drugs and Crime : Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products (2009). (<https://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook.pdf>)
- 3) V.H.G Dias et al. : *Forensic Sci Int : Genetics* **14**, 201 (2015).
- 4) A. Linacre, J. Thorpe : *Forensic Sci Int.*, **91**, 71 (1998).
- 5) L. C. Tsai, H. M Hsieh, L. H. Huang, J. C. Wang, A. Linacre, J. C. Lee, : *Forensic Sci. Int.*, **158**, 250 (2006).
- 6) 室友紀, 今村真二, 中村博明, 長谷川正紀, 湯浅勲 : 法科学技術, **15**, 143 (2010).
- 7) 長澤由美, 梶島紋子, 行本剛, 三輪洋一, 勅使河原尚行 : 関税中央分析所報, **54**, 81 (2014).
- 8) 東京大学大学院農学生命科学研究科：“実験応用生命科学”，p.125 (2001), (朝倉書店).
- 9) 中山広樹, 西方敬人：“バイオ実験イラストレイテッド ①分子生物学実験の基礎”，p.62 (2002), (秀潤社).