

DNA 分析による羊毛と織獣毛の識別について

徳島 将光*, 五十嵐 智大*, 松本 啓嗣*

Identification between wool and fine animal hair by DNA analysis method

TOKUSHIMA Masamitsu*, IGARASHI Tomohiro* and MATSUMOTO Yoshitsugu*

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

In the Customs Tariff Schedules, yarns of animal hair classified in Chapter 51 have different tax rates depending on the animal species of raw materials. The identification method between wool and fine animal hair is not described in the Customs Analysis Method, therefore we decided to analyze them by microscope observation according to Japanese Industrial Standard L 1030-1. ISO 18074, identification of some animal fibres by DNA analysis method, was established in 2015, and it enabled identification of animal species by chemical analysis. In this report, we examined ISO 18074 and clarified that this method was available in customs analysis and allowed the identification of alpaca and angora rabbit in addition to sheep, cashmere goat and yak.

1. 緒 言

実行関税率表第 51 類には羊毛、織獣毛、粗獣毛及び馬毛の糸並びにこれらの織物が分類される。このうち小売用にしていない羊毛製の糸は第 51.06 項又は第 51.07 項に分類され、いずれも協定税率は 2.7%、特惠税率は 2.16%である。一方、小売用にしていない織獣毛製の糸は第 51.08 項に分類され、協定税率は 2.5%、特惠税率は無税であり、特に特惠税率適用国の産品において税率格差が大きい。

したがって、適正かつ公平な関税の徴収のためには、羊毛と織獣毛を識別する必要があるが、その識別方法は税関分析法には規定されていない。日本産業規格には L 1030-1 として規定があり、光学顕微鏡又は電子顕微鏡による観察により識別を行うこととなっているが、羊毛と一部の織獣毛の識別には熟練を要する¹⁾。

そのような状況において 2015 年に国際規格 ISO 18074 として DNA 分析による繊維製品の識別法が規定され、羊、カシミアやぎ及びやぐの 3 種の動物の繊維について、識別が可能となった^{2),3)}。本研究では、羊毛と織獣毛の DNA 分析による識別方法を税関分析法として確立するため、ISO 18074 の識別可能な動物種の拡大を試みるとともに、様々な市販の毛糸について分析したところ、いくつかの知見が得られたので報告する。

2. 実 験

2.1 試 料

市販の毛糸 : 35 検体

内訳は Table 3 を参照のこと。

また、カシミア及びモヘヤについては、その原料となる動物

はそれぞれカシミアやぎ及びアンゴラやぎであり、両者は生物学的には同一種であるやぎ（学名：*Capra hircus*）に分類されるため、本研究では区別していない。

2.2 試 薬

2.2.1 酵素分解用試薬

1 M Tris-HCl (pH 8.0), 500 mM EDTA (pH 8.0) (以上、ニッポンジーン社製)

塩化ナトリウム、スクロース、ドデシル硫酸ナトリウム (以下、SDS と略記する。) (以上、和光純薬工業社製)

D,L-ジチオトレイトール (以下、DTT と略記する。), パパイン (以上、シグマ-アルドリッチ社製)

プロテアーゼ K (350 U/ mL) (タカラバイオ社製)

2.2.2 DNA 精製用試薬

クロロホルム、3-メチル-1-ブタノール、エタノール、イソプロピルアルコール (以下、IPA と略記する。), 臭化セチルトリメチルアンモニウム (以下、CTAB と略記する。), 過塩素酸ナトリウム-水和物 (以上、和光純薬工業社製)

デキストリン (Difco 社製)

グリコーゲン (ナカライテスク社製)

Amicon Ultra-0.5 mL 遠心式フィルター (メルクミリポア社製)

2.2.3 PCR 用試薬

プライマー (シグマ-アルドリッチ社製)

KOD FX (東洋紡社製)

2.3 装 置

PCR 増幅装置 : Verti 96 well Thermal Cycler (Life technologies 社製)

画像解析装置 : BIO-PROFILE Systems2 (VILBER LOURMAT 社製)

* 財務省関税中央分析所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

2.4 実験

2.4.1 試薬の調製

- ・酵素分解用緩衝液（以下，Buffer A と略記する.）
1M Tris-HCl を 5.0 mL，500 mM EDTA を 2.0 mL，SDS を 0.2 g，スクロースを 1.2 g 及び塩化ナトリウムを 170 mg を各々量り取って混合し，DTT を 920 mg を添加して溶解させ，滅菌水で 10 mL に定容したもの.
- ・抽出液保存用緩衝液（以下，Buffer B と略記する.）
500 mM EDTA を蒸留水で 500 倍希釈したもの.
- ・パパイン懸濁液
パパインを滅菌水で懸濁し，0.5 U/ μ L の濃度にしたもの.
- ・過塩素酸ナトリウム水溶液
過塩素酸ナトリウム一水和物を 7.1 g 量り取り，蒸留水で 10 mL に定容したもの.
- ・多糖水溶液
グリコーゲンまたはデキストリンを 200 mg 量り取り，蒸留水で 10 mL に定容したもの.
- ・クロロホルム/3-メチル-1-ブタノール混合液（以下，CIAA と略記する.）
クロロホルム 9.6 mL に対して 3-メチル-1-ブタノールを 0.4 mL 加えたもの.
- ・5 M 塩化ナトリウム水溶液
塩化ナトリウムを 29.2 g 量り取り，蒸留水で 100 mL に定容したもの.
- ・10%CTAB 塩化ナトリウム水溶液
CTAB を 1 g，塩化ナトリウムを 410 mg 量り取り，温水中で攪拌し完全に溶解させ，蒸留水で 10 mL に定容したもの.

2.4.2 DNA 抽出物の調製

2.4.2.(1) 試料の酵素分解

酵素分解は Scheme 1 に従って行った.

50 mg of chipped sample yarn in 2 mL micro tube

- Add 600 μ L of buffer A
- Heat for 20 min at 60°C (shake for 10 sec at 500 rpm every 3 minutes)
- Cool down to room temperature
- Add 10 U enzyme solution
- Heat for 1 h at 50°C and 500 rpm
- Add another 10 U enzyme solution
- Heat over night at 50°C at 500 rpm

Enzymatic reaction solution

Scheme 1 Enzymatic degradation of yarn

2.4.2.(2) DNA 抽出物の精製

DNA の抽出及び精製は scheme 2, 3 に従って行った.

Enzymatic reaction solution

- Cool down to room temperature
- Add 300 μ L of sodium perchlorate solution
- Shake for 20 min at 500 rpm
- Add 300 μ L of CIAA
- Centrifuge (3,300 g, room temperature, 1 min)
- Take 500 μ L of supernatant and put in new 1.5 mL micro tube
- Add 500 μ L of CIAA
- Shake for 10 min using rotator
- Centrifuge (5,500 g, room temperature, 1 min)
- Take 420 μ L of supernatant and put in new 1.5 mL micro tube
- Add 840 μ L of IPA and 3 μ L of polysaccharide solution
- Mix completely
- Leave to stand for 30 min- over night
- Centrifuge (18,000 g, room temperature, 15 min)
- Remove supernatant
- Add 840 μ L of 70% ethanol
- Mix completely
- Centrifuge (18,000 g, room temperature, 5 min)
- Remove supernatant
- Add 330 μ L of buffer B

Partially purified DNA extract

Scheme 2 Extraction and partially purification of sample DNA

Partially purified DNA extract

- Add 50 μ L of sodium chloride solution and 40 μ L of 10% CTAB solution with sodium chloride
- Mix completely
- Heat for 10 min at 68°C at 500 rpm
- Cool down to room temperature
- Add 300 μ L of CIAA
- Shake for 10 min using rotator
- Centrifuge (3,300 g, room temperature, 2 min)
- Take 250 μ L of supernatant and put in Amicon Ultra filter attached to the micro tube
- Centrifuge (14,000 g, 4°C, 15 min)
- Discharge the filtrated solution
- Re-attach Amicon Ultra filter to the micro tube
- Add 300 μ L of buffer B to Amicon Ultra filter
- Centrifuge (14,000 g, 4°C, 7 min)
- Discharge the filtrated solution
- Repeat (A) once more
- Add 30 μ L of buffer B to Amicon Ultra filter
- Attach Amicon Ultra filter upside down to a new micro tube
- Centrifuge (1,000 g, 4°C, 2 min)
- Repeat (B) once more

Purified DNA extract

Scheme 3 Purification of DNA extract

2.4.3 PCR 及び電気泳動

KOD FX を用いた PCR により，対象領域の DNA 増幅を行った. 反応溶液は，DNA 抽出物：2 μ L，2 \times PCR Buffer：15 μ L，dNTP mixture (2 mM)：6 μ L，種特異的プライマー (5 μ M)：各 1 μ L，共通プライマー (5 μ M)：各 0.5 μ L，KOD FX DNA Polymerase (1 U/ μ L)：0.3 μ L，滅菌水：3.7 μ L (合計 30 μ L に調製) とした. PCR の反応条件は，熱変性を 95°C で 5 分間行った後，熱変性：95°C (30 秒)，アニーリング：62°C (30 秒)，伸長反応：72°C (30 秒) のサイクルを 35 回繰り返し，72°C で 5 分間伸長反応を行った. 増幅した PCR 産物は 1.5% アガロースゲル (ゲル 100 mL に対し 1 μ L のエチジウムブロマイドを添加したもの) を用いて，電気泳動を行った後，画像解析装置で確認した.

3. 結果及び考察

3.1 分解酵素の検討

2.4.2.(1)において使用する分解酵素について、ISO 18074 で指定されているパパインと、ケラチン分解活性を有するプロテアーゼ K の比較検討を行った。2.4.2.(1)の手順に従い、同一ユニット量及び反応時間による反応終了後の試料の様子を Fig. 1 に示す。パパインを使用した場合、未分解の毛が多く残り、2.4.2.(2)にて必要な量の反応上清 300 μ L を採取することが困難であった。一方、プロテアーゼ K を使用した場合、パパインに比べて未分解の毛の量が大幅に減少し、反応上清 300 μ L を容易に採取することができた。したがって、分解酵素にはプロテアーゼ K を使用することとした。

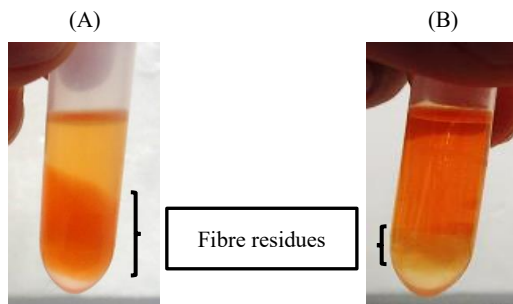


Fig. 1 Results of enzymatic degradation (A: papain, B: protease K)

3.2 種特異的プライマーを使用した PCR による毛糸の動物種の識別

3.2.1 種特異的プライマーの設計

ISO 18074 に記載のある羊、やぎ（カシミアやぎ）及びやくに加えて、毛糸に使用されることの多い動物種であるアルパカ及びうさぎ（アンゴラうさぎ）を識別対象に加えることとした。

DNA Data Bank of Japan（以下、DDBJ と略記する。）から、上記 5 種の動物のミトコンドリア DNA の塩基配列を取得し、その中の ND5 領域において 5 種の動物の間で塩基配列が異なる部分を探索し、アルパカ及びうさぎの種に特異的なプライマーを設計した。各動物種のプライマーを Table 1 に示す。

プライマー選抜のために使用した各動物の DNA 抽出物は Table 2 に示す市販の毛糸を使用して 2.4.2. の手順に従って調製した。それらを使用して得られた PCR 産物の電気泳動図を Fig. 2, 3 に示す。

Table 1 List of primers for PCR reaction.

Target species	Direction	Sequence (5' to 3')	Annealing temperature	Product size	Remarks
Alpaca	Forward	CCCACTGATAGAAAACAACAAGACC	62°C	179 bp	Designed in this study
	Reverse	GTGAGGCTGGTTAATGCCAATC			
Goat	Forward	GTGGTAGCTATTTTATCTGGGCTT		239 bp	Obtained from AIST ⁴⁾
	Reverse	GCTTTATTTTAGCACTAGAAACCGC			
Rabbit	Forward	AAGACTATACCCTTCACAGCCTC		163 bp	Designed in this study
	Reverse	GGGATGTGGGCAATAAGAGTGATG			
Sheep	Forward	GGAGTGCACCCAGGAAAGATTC		385 bp	Obtained from AIST ⁴⁾
	Reverse	CCAACCGAAACTGTTAACCTATAAGGAG			
Yak	Forward	GATACCGCGCCGTTAAACAG		333 bp	Obtained from AIST ⁴⁾
	Reverse	ACTCCTAGCCCCAATACTGGACTAA			
Common	Forward	GAAGCTGCTGCCTGATACTGAC		480 bp	Obtained from AIST ⁴⁾
	Reverse	GTCCTTTTGAGTTCATTCGTAGGACTAA			

Table 2 Standard samples of each animal species.

Animal species	Sample name	Composition
Alpaca	Sample A-1	Alpaca 100%
Goat	Sample G-1	Cashmere 100%
Rabbit	Sample R-1	Angora 80%, Nylon 20%
Sheep	Sample S-1	Wool 100%
Yak	Sample Y-1	Yak 100%

Fig. 2, 3 に示す電気泳動の結果から、今回設計したアルパカ及びうさぎのプライマーはいずれも対応する動物の毛のみを含む試料の DNA 抽出液を供した場合にのみバンドがそれぞれ 100-200 bp の間で検出され、他の 4 種の動物の DNA 抽出液を供した場合はバンドが検出されず、種に特異的な DNA が増幅された。

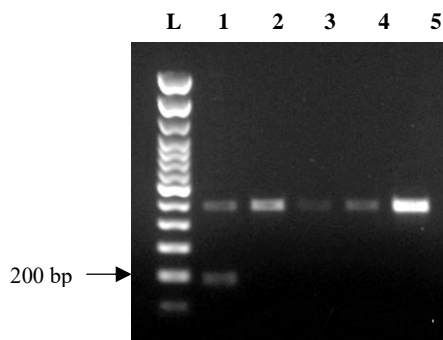


Fig. 2 Electrophoresis images of PCR products of alpaca primer with 1.5% agarose TAE gel.

Lane L: 100 bp DNA ladder, Lane 1: sample A-1, Lane 2: sample G-1, Lane 3: sample R-1, Lane 4: sample S-1, Lane 5: sample Y-1

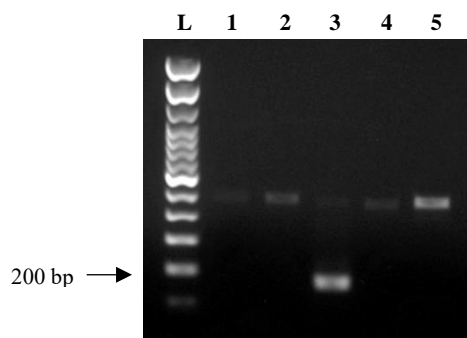


Fig. 3 Electrophoresis images of PCR products of rabbit primer with 1.5% agarose TAE gel.

Lane L: 100 bp DNA ladder, Lane 1: sample A-1, Lane 2: sample G-1, Lane 3: sample R-1, Lane 4: sample S-1, Lane 5: sample Y-1

あわせて ISO 18074 に記載のある羊、やぎ及びやくのプライマーについて、今回新たに追加した動物種のアルパカ及びうさぎの DNA 抽出液を使用して PCR 反応を行った。各 PCR 産物の電気泳動図を Fig. 4 に示す。電気泳動図において各プライマーに対応する動物種の DNA 抽出液を用いた場合のみバンドが検出され、アルパカ及びうさぎの DNA 抽出液を用いた場合はバンドは検出されなかった。

以上の結果より、今回使用した 5 種の動物のプライマーはいずれも他の 4 種の動物種に対して種に特異的な DNA が増幅されることを確認した。

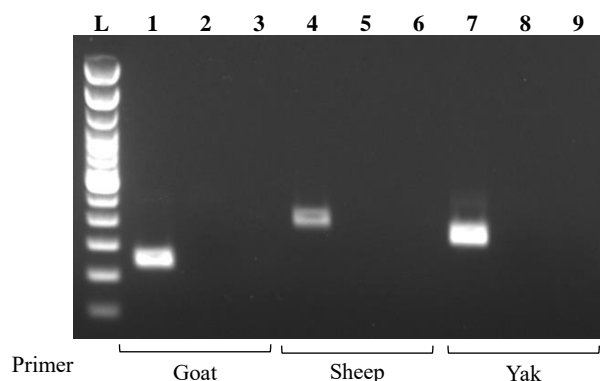


Fig. 4 Electrophoresis images of PCR products of 3 primers with 1.5% agarose TAE gel.

Lane L: 100 bp DNA ladder, Lane 1: sample G-1, Lane 2, 5, 8: sample A-1, Lane 3, 6, 9: sample R-1, Lane 4: sample S-1, Lane 7: sample Y-1

3.2.2 毛系の動物種の識別試験

3.2.1 で設計したアルパカ及びうさぎのプライマーを合わせた計 5 種の動物のプライマーを使用して、2.1 に示す試料計 35 検体から調製した各 DNA 抽出物に対して PCR を行った。各 PCR 産物の電気泳動図においてバンドが検出された動物種と成分表示にある動物種を比較した。全ての試料の試験結果を Table 3 に示す。また、今回試験を行った試料のうち Table 4 に示す試料について、得られた PCR 産物の電気泳動図を Fig. 5 に示す。

Table 3 Result of identification test.(○: detected band, △: detected weak band)

No .	sample No.	Ingredient	Detection of PCR products				
			alpaca	cashmere or mohair	rabbit	wool	yak
1		wool 100%				△	
2	sample S-1	wool 100%				△	
3		cashmere 100%	n.d.				
4	sample A-1	alpaca 100%	○				
5	sample R-2	angora47%, wool 30%, nylon 13%, cashmere 10%		○	○	○	
6	sample G-2	cashmere 50%, yak 50%		○			
7	sample G-1	cashmere 100%		○			
8	sample R-3	angora 80%, acrylic20%			○	○	
9		alpaca 70%, wool 30%	n.d.				
10		alpaca 100%	○				
11		wool (supertwash) 75%, nylon25%				○	
12		silk 45%, mohair 45%, wool 10%		○		○	
13		cashmere 100%		○			
14		cashmere 100%		○			
15	sample S-2	wool (preshrunked) 100%	n.d.				
16		wool (superwash) 100%				○	
17		wool (preshrunked) 100%	n.d.				
18		wool 100%				○	
19		wool 100%				○	
20		wool 100%				△	
21		wool 100%				○	
22		wool 80%, alpaca 20%	○			○	
23		wool 65%, cotton 35%				○	
24	sample SY	wool 53%, alpaca 40%, camel + yak 7%	○			○	○
25		wool 45%, cashmere 35%, silk 20%		○		△	
26		wool 75%, hemp25%				○	
27		wool 65%, silk 35%				○	
28		wool 50%, alpaca 20%, acrylic30%	△			○	
29		wool 58%, mohair 25%, silk 17%		○		○	
30		wool 75%, cashmere 23%, nylon 2%		△			
31		mohair 35%, acrylic 20%, alpaca 10%, wool 10%	○	○		△	
32		mohair 76%, nylon 24%		○			
33		mohair 65%, wool 25%, bamboo 10%		○		○	
34	sample R-1	angora 80%, nylon 20%			○		
35	sample Y-1	yak 100%					○

Table 4 Samples of each animal species in 3. 2. 2.

	Sample name	Composition
(A)	Sample R-2	Angora 47%, Wool 30%, Nylon 13%, Cashmere 10%
(B)	Sample SY	Wool 53%, Alpaca 40%, Camel + Yak 7%
(C)	Sample R-3	Angora 80%, Acrylic 20%
(D)	Sample S-2	Preshrunk wool 100%
(E)	Sample G-2	Cashmere 50%, Yak 50%

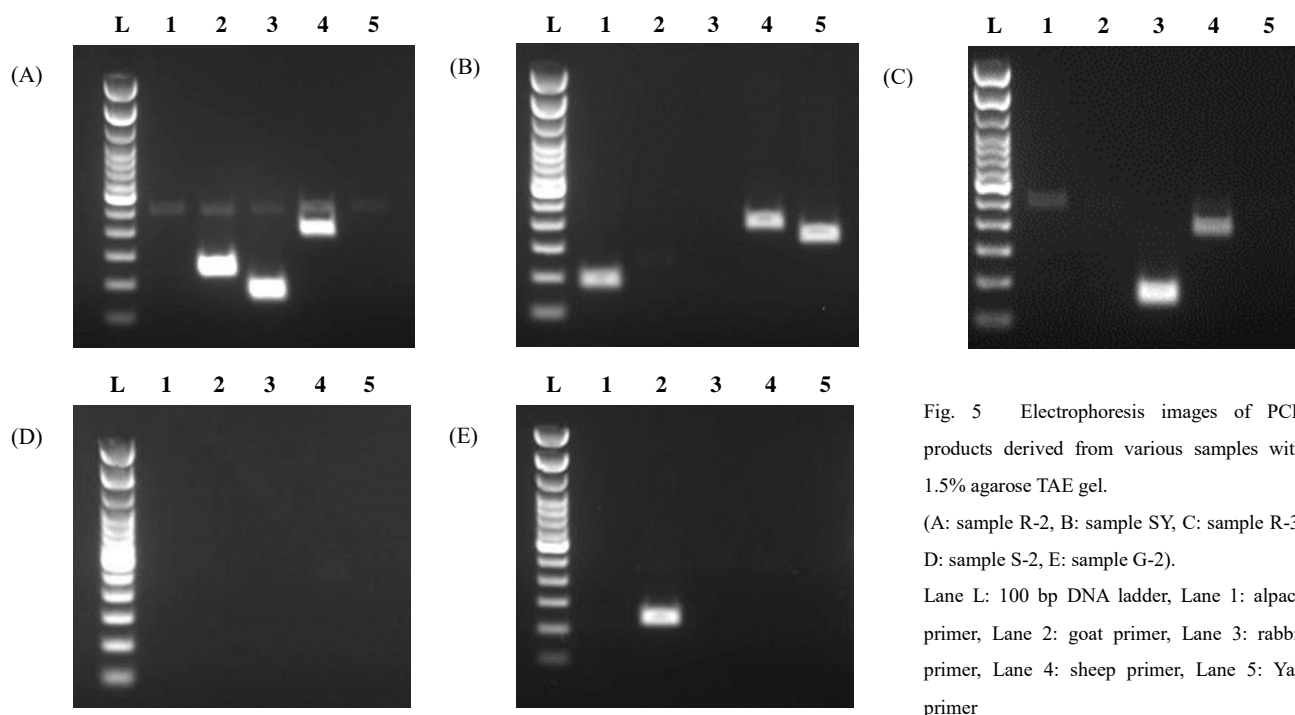


Fig. 5 Electrophoresis images of PCR products derived from various samples with 1.5% agarose TAE gel.

(A: sample R-2, B: sample SY, C: sample R-3, D: sample S-2, E: sample G-2).

Lane L: 100 bp DNA ladder, Lane 1: alpaca primer, Lane 2: goat primer, Lane 3: rabbit primer, Lane 4: sheep primer, Lane 5: Yak primer

試料 36 検体のうち 29 検体は sample R-2 (Fig.5(A)) 及び sample SY (Fig. 5 (B)) のように、今回識別対象とした動物種に関して、電気泳動図でバンドが検出された動物種と成分表示にある動物種が一致する結果が得られた。

一方, sample R-3 (Fig. 5 (C)) は成分表示上ではアンゴラとアクリルのみを原料としているにもかかわらず、電気泳動図ではうさぎのほかに羊のバンドが検出され、ラベルに表記されていないが、羊毛が使用されていることが推測された。

そこで、推測が正しいか確認するために顕微鏡観察を行った。光学顕微鏡でアンゴラを観察した際に確認することができる特徴として、他の動物の毛と異なり、アンゴラの毛は中心部が空洞になっていることが挙げられる。Fig. 6 に示す sample R-3 の異なる 3 か所を撮影した顕微鏡写真には中空構造を有しアンゴラと推測される繊維及び鱗片構造のないアクリルと推測される繊維のほか、鱗片構造を有するが中空構造を持たない繊維の存在が確認された。識別試験の結果及び JIS 1030-1 に掲載されている各種獣毛の顕微鏡写真との比較から sample R-3 には成分表

示にはない羊毛が含まれていると判断した。したがって本識別試験では sample R-3 を正しく識別していると判定した。

また、35 検体のうち 5 検体は成分表示に記載されている動物種のなかに電気泳動図にバンドとして検出されないものがあった。具体例として sample S-2 (Fig.5 (D)) では羊毛 100% であるにもかかわらず羊のバンドが検出されなかった。Sample S-2 の羊毛には成分表示に防縮加工の記載があり、おそらくは防縮加工を施す際に繊維中の DNA が断片化してしまったため PCR により DNA を増幅することができず、結果として電気泳動図においてバンドを検出することができなかったのではないかと考えられる。同様に sample G-2 (Fig. 5 (E)) はカシミアとやぐを原料としているが、やぎのバンドのみが検出され、やぐのバンドは検出されなかった。製品表示に防縮加工の記載はなかったが、sample S-2 と同様に製造の際に受けた何らかの処理の影響により、DNA が断片化してしまったのではないかと推測した。これらの結果から試料によっては動物種を正しく識別することができない場合があることが示唆された。

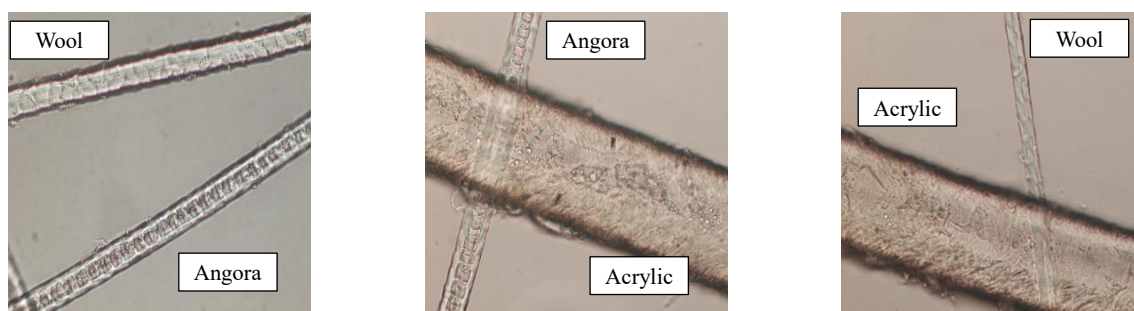


Fig. 6 Micrograms of sample R-3 at 400-fold magnification

4. 要 約

本研究では国際規格 ISO 18074 をもとに羊毛と織獣毛の DNA 分析による識別方法について検討を行った。毛糸からの DNA 抽出法について、分解酵素をパパイニンからプロテアーゼ K に変更することで、同一反応時間及びユニット量での獣毛の分解量が増えることが確認された。これにより DNA 精製に必要な量の反応上清の採取がより容易に行うことが可能になった。

ISO 18074 では識別対象は羊、やぎ及びびやくの 3 種のみであったが、今回新たにアルパカ及びうさぎを識別対象に追加することを試みた。アルパカ及びうさぎのプライマーを新たに設計し、設

計したプライマーが他の 4 種の動物に対して種特異的な DNA 増幅が起きることを確認した。同様に ISO 18074 で指定されている 3 種の動物のプライマーについて、今回追加したアルパカ及びうさぎに関しても DNA が増幅されず、種に特異的な DNA が増幅されることを確認した。

今回設計した 2 種の動物種を加えた計 5 種の動物種のプライマーを使用して、市販の毛糸に対して動物種の識別試験を行い、成分表示との比較を行った。その結果、多くの試料について含有する動物種を正しく識別することができ、動物種を識別するために本法を利用することができると示唆された。

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) ISO 18074, Textiles – Identification of some animal fibres by DNA analysis method – Cashmere, wool, yak and their blends (2015)
- 3) 福田ゆか, 三輪幸弘, 坂川登: 愛知県産業技術研究所研究報告, DNA 解析による種々の獣毛の鑑別 (2003)
- 4) 国立研究開発法人 産業技術総合研究所 生物プロセス研究部門, <https://unit.aist.go.jp/bpri/bpri-design/PrimerSeq-ISO18074.html> (2019.9.25 取得)