

DNA分析を利用した大麻加工品の識別法の検討

長澤 由実*, 松島 紋子*, 行本 剛*, 三輪 洋一*, 勅使川原尚行*

Study on a method to discriminate *Cannabis sativa* contained in cannabis products by DNA analysis

Yoshimi NAGASAWA*, Ayako MATSUSHIMA*, Takeshi YUKIMOTO*, Yoichi MIWA*, and Naoyuki TESHIGAWARA*

*Central Customs Laboratory, Ministry of Finance

6-3-5, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882 Japan

In Japan, it is prohibited to export or import cannabis under the Cannabis Control Law and Customs Law without prior authorization. The term “cannabis” used in the Cannabis Control Law is defined as *Cannabis sativa* L. (*C. sativa*) and its products. Cannabis is typically identified based on its morphological characteristics and by chemical analysis which detects the presence of cannabinoids. In the case of *C. sativa* leaf and cannabis resin, it is easy to identify them to be cannabis using physical and chemical examinations, but it is sometimes difficult to identify products such as hash oil and cannabis cookies. In recent years, a study was reported indicating the possibility of distinguishing *C. sativa* by DNA analysis methodology using a primer designed specifically for *C. sativa*. In this study, we confirmed that it is possible to identify the presence of *C. sativa* contained in cannabis products by analyzing the base sequence of the PCR products which was amplified using a specific primer for *C. sativa*.

1. 緒 言

大麻取締法上の「大麻」とは、大麻草（カンナビス・サティバ・エル）及びその製品をいい、輸出や輸入は同法で厳しく禁止されており、関税法でも輸入または輸出してはならない貨物として定められている。大麻草はアサ科アサ属の植物であり、60種類以上あるカンナビノイドと総称される特有成分を含んでおり、このうちテトラヒドロカンナビノール（THC）が大麻摂取時に起こる幻覚作用の本体と言われている^{1)~3)}。

大麻の鑑定は、主として呈色反応、赤外分光法、ガスクロマトグラフィー、薄層クロマトグラフィーなどを用いた化学的手法によるTHCをはじめとする大麻草由来成分の検出及び、顕微鏡を用いた大麻草の植物形態学的特徴である剛毛や鍾乳体を確認することにより行っている。試料が大麻草や大麻樹脂そのもののときには、比較的容易に判定することができるが、液体大麻や大麻クッキー等の大麻加工品である場合、共存物質の影響や、抽出・加熱などの加工処理のため、判定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検査法が多数報告されており^{4)~6)}、含有成分や形態から大麻草である事の判定が困難な場合に適用できると考えられている。DNA分析には様々なアプローチがあるが、葉緑体DNA上の*trnL*領域に着目した研究は以前から行われており、大麻草の塩基配列を基に設計された特異的プライマーを用いて判別する方法が報告されている。特に室らによ

って設計されたプライマーを用いれば、得られたPCR産物を電気泳動で確認することで大麻草の識別が可能であると報告されている⁷⁾。しかし、これまでの報告は大麻草や種子に対する識別法であり、大麻加工品については検討されていない。

そこで本研究では、大麻加工品として大麻クッキー及び液体大麻を試料とし、DNA抽出方法の検討及びDNA分析を利用した大麻草の製品であるかの識別が可能か否かについて検討した。

2. 実 験

2.1 試料及び試薬

2.1.1 試料

大麻クッキー2種及びプレーンクッキー1種
液体大麻6検体

2.1.2 試薬

ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド
(和光純薬工業)

1M Tris-HCl (pH8.0)、0.5M EDTA (pH8.0)、TE (pH8.0)
(遺伝子工学研究用、和光純薬工業)

塩化ナトリウム、クロロホルム、アミルアルコール、β-メルカ
プトエタノール、イソプロピルアルコール、エタノール

(特級、和光純薬工業)

プロテナーゼ K (タカラバイオ)

* 財務省関税中央分析所 〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-5

2.2 実験方法

2.2.1 大麻クッキーの調製

小麦粉 110 g、マーガリン 225 g、はちみつ 105 g、卵 1 個、ベーキングパウダー 2 g を均一になるまで混合し、クッキー生地を作成した¹⁾。作成したクッキー生地 10 g に対して、液体窒素で凍結後、粉碎した大麻草を 0.1 g、0.3 g を加え攪拌したのち、マーガリンを塗ったアルミホイルの上にのせ、200℃で約 7 分焼いたものをそれぞれ 0.1 g 入り大麻クッキー及び 0.3 g 入り大麻クッキーとした。また、大麻草を入れないクッキー生地 10 g のみを焼いてプレーンクッキーを作成し、比較対象（ブランク）とした。

2.2.2 DNA 抽出

大麻クッキー及びプレーンクッキーから各々約 10 mg 及び 100 mg を採取し、cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) 法と DNeasy® Plant Mini kit (QIAGEN) の 2 種類の方法を用いて DNA を抽出した。DNeasy® Plant Mini kit は、添付のプロトコールに従い、最終容量 100 µL になるように溶出した。また、液体大麻は約 100 mg を採取し、CTAB 法を用いて DNA を抽出した。

2.2.3 DNA 抽出物の収量及び純度

DNA 抽出物の収量及び純度の算出には、GeneQuant (GE

Healthcare) を用いた。光路長 1 cm のセルで測定した際に、二本鎖 DNA 0.05 µg/µl の 260 nm における吸光度が 1 に相当することから、260 nm の吸光度を測定し、DNA の濃度を算出した。DNA の純度は、280 nm の吸光度 (A_{280}) に対する 260 nm の吸光度 (A_{260}) の比から算出した。

2.2.4 ユニバーサルプライマー及び大麻草特異的プライマーを用いた PCR 増幅

鋳型として大麻クッキー、プレーンクッキー及び液体大麻より抽出した DNA を用いた。酵素には TaKaRa Ex Taq® (タカラバイオ) を使い、反応液組成はプロトコールに従った。Table 1 及び Fig. 1 に示したユニバーサルプライマーまたは大麻草特異的プライマーを用い、PCR により増幅した。サーマルサイクラーには Veriti 96 well Thermal cycler (Applied Biosystems) を使用した。PCR サイクルは、初めに 95℃、4 分間の変性後、変性 94℃、0.5 分間、アニーリング 55℃、1 分間、伸長 72℃、1 分間を 1 サイクルとして、これを 30 回繰り返す、最後に 72℃、10 分間の伸長を行った。得られた PCR 産物は 2% アガロースにて電気泳動を行い、エチジウムブロマイドにより染色し、紫外線で可視化させることで、増幅した PCR 産物の有無を確認した。

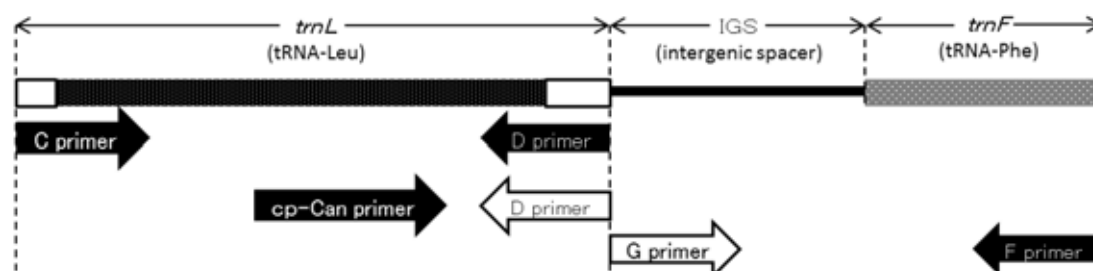


Fig. 1 Schematic representation of the *trnL-trnF* region and the positions of primer sets used for PCR amplification
Black arrows represent universal primers and the other white arrows represent *C. sativa*-specific primers.

Table 1 Primer sequences used for PCR amplification

	name	Sequence 5'-3'	reference
universal primer	C	CGAAATCGGTAGACGCTACG	(4)
	D	GGGATAGAGGGACTTGAAC	(4)
	F	ATTGAACTGGTGACACGAG	(4)
	<i>rbcL</i> Fw	ATGTCACCACAAACAGAGACTAAAGC	(8)
	<i>rbcL</i> Rv	GTAAAATCAAGTCCACCRG	(8)
<i>C. sativa</i> -specific primer	G	GAGGGTTTCTAATTGTTATGTT	(4)
	cp-Can	GAGTTGGCTGCGTTAATCCG	(7)

2.2.5 配列解析

増幅した PCR 産物をイソプロパノール沈殿により精製し、PCR で使用した各プライマーを用いて BigDye® Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) 添付のプロトコールに従い、シーケンス反応を行った。シーケンス反応後、エタノール沈殿により未反応色素を除去し、DNA シークエンサーにより PCR 産物の塩基配列を決定した。DNA シークエンサーは 3500 XL Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を使用した。解析にはシーケンスアセンブリソフト ATGC ver. 4 (GENETYX

CORPORATION) を使用し、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) の Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) による配列相同性検索を行った。

3. 結果及び考察

3.1 結果

3.1.1 大麻クッキーからの DNA 抽出方法の検討

大麻クッキー及びプレーンクッキーから各々約 10 mg 及び 100 mg を採取し、CTAB 法と DNeasy® Plant Mini kit (以下、kit と略す) を用いて DNA を抽出し、収量と純度を求めた (Table 2)。

DNA の収量は、大麻クッキー及びプレーンクッキーともに CTAB 法を用いて抽出したほうが、多く (約 1.5-7 倍) 得られた。DNA の純度は、 A_{260}/A_{280} 比が 1.8-2.0 になれば、DNA が十分精製されていることを示すが、今回得られた A_{260}/A_{280} 比はいずれも 1.7 以下であったことから、全体的に低かった。

また、試料約 100 mg から抽出した DNA の状態を電気泳動により確認したところ、kit で得られた DNA は電気泳動で確認出来ず、

CTAB 法で得られた DNA は様々な長さに断片化していることが分かった (Fig.2)。

Table 2 Yields and purities of DNA extracted from various cookie samples containing *C. sativa* leaves under different conditions of sampling amount using CTAB method and DNeasy® Plant Mini kit

	Total DNA(mg)		A ₂₆₀ /A ₂₈₀	
	CTAB	kit	CTAB	kit
20 mg of <i>C. sativa</i> leaves	9.2	1.5	1.7	1.1
10 mg of cookie sample	2.4	0.7	1.1	1.4
10 mg of cookie sample (the <i>C. sativa</i> leaves content of 0.1 g/10g)	2.3	1.0	1.2	1.3
10 mg of cookie sample (the <i>C. sativa</i> leaves content of 0.3 g/10g)	3.7	2.6	1.2	1.1
100 mg of cookie sample	6.2	0.9	1.6	1.3
100 mg of cookie sample (the <i>C. sativa</i> leaves content of 0.1 g/10g)	8.7	2.2	1.5	1.2
100 mg of cookie sample (the <i>C. sativa</i> leaves content of 0.3 g/10g)	13.5	2.1	1.6	1.3

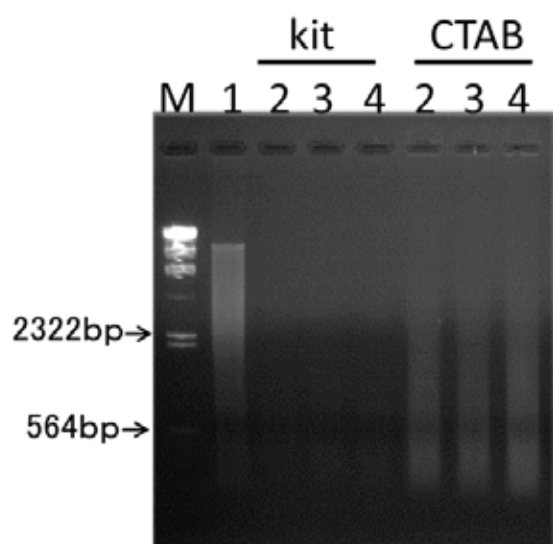


Fig. 2 Agarose gel electrophoresis of genomic DNA extracted from 100 mg of each cookie using CTAB method and DNeasy® Plant Mini kit
Lane 1, λ-Hind III digested; Lane 2, *C. sativa* leaves; Lane 3, cookie sample (*C. sativa* leaf content of 0.1 g/10 g); Lane 4, cookie sample (*C. sativa* leaf content of 0.3 g/10 g)

3.1.2 PCR 増幅及び配列解析

3.1.2(1)大麻クッキー及びプレーンクッキー

ユニバーサルプライマー *rbcl* Fw 及び *rbcl* Rv を用いて PCR を行った結果、大麻クッキー及びプレーンクッキーともに 600bp 付近に PCR 産物が確認できた (Fig.3(A))。これら PCR 産物の塩基配列を DDBJ の BLAST による相同性検索を行った結果、いずれも *Triticum aestivum* (小麦) と 100% の相同性を示した。

ユニバーサルプライマー C 及び D を用いて、プレーンクッキーを鋳型に PCR を行った結果、650bp 付近に PCR 産物が確認できた (Fig.3(B))。得られた PCR 産物の塩基配列を DDBJ の BLAST による相同性検索を行った結果、*Triticum aestivum* (小麦) と 100% の相同性を示した。大麻クッキーを鋳型に、同様に PCR を行った結果、400bp 付近と 650bp 付近の 2 つに PCR 産物が確認できた。

得られた PCR 産物の塩基配列の決定を試みたが、二種類の塩基が混在してしまい、配列を決定することが出来なかった。

大麻草特異的プライマー G 及びユニバーサルプライマー F と大麻草特異的プライマー cp-Can 及びユニバーサルプライマー D を用いて PCR を行った結果、プレーンクッキーでは PCR 産物は得られず、大麻クッキーでは 250bp 付近に PCR 産物が確認できた (Fig.3(C)-(D))。これら PCR 産物の塩基配列を DDBJ の BLAST による相同性検索を行った結果、いずれも *Cannabis sativa* (大麻草) と 100% の相同性を示した。

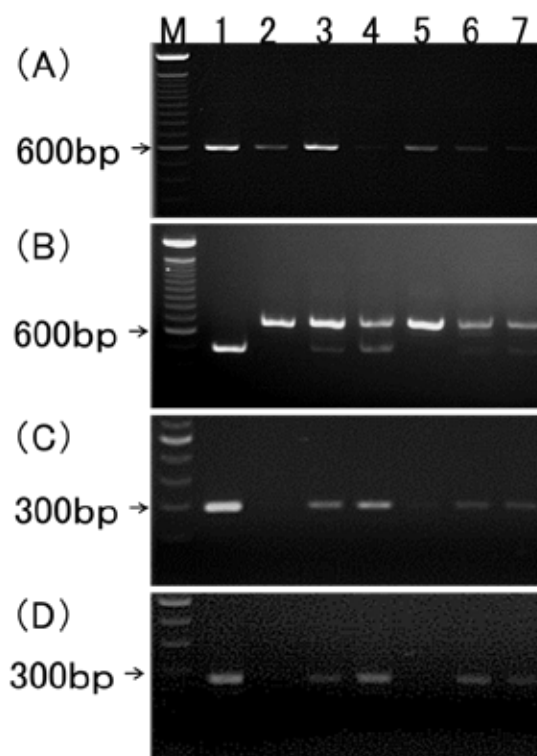


Fig. 3 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified using primer sets *rbcl* Fw and *rbcl* Rv (A), C and D (B), G and F (C), and cp-Can and D (D)
Lane M, DNA size marker (100 bp ladder); Lane 1, *C. sativa* leaves; Lanes 2-4, 10 mg of cookie sample, cookie sample (*C. sativa* leaf content of 0.1 g/10 g) and cookie sample (*C. sativa* leaf content of 0.3 g/10 g); Lanes 5-7, 100 mg of cookie sample, cookie sample (*C. sativa* leaf content of 0.1 g/10 g) and cookie sample (*C. sativa* leaf content of 0.3 g/10 g)

3.1.2(2) 液体大麻

ユニバーサルプライマー *rbcl* Fw 及び *rbcl* Rv を用いて PCR を行った結果、検体 1~6 の全てにおいて、600 bp 付近に PCR 産物が確認された (Fig.4(A))。これら PCR 産物の塩基配列を DDBJ の BLAST による相同性検索を行った結果、検体 2~6 は *Cannabis sativa* (大麻草) と 100% の相同性を示したが、検体 1 は相同性を示さなかった。

大麻草特異的プライマー G 及びユニバーサルプライマー F を用いて PCR を行った結果、検体 1~6 の全てにおいて、250 bp 付近に PCR 産物が確認された (Fig.4(B))。これら PCR 産物の塩基配列を DDBJ の BLAST による相同性検索を行った結果、検体 1~6 の全てが *Cannabis sativa* (大麻草) と 100% の相同性を示した。

ユニバーサルプライマー C 及び D と大麻草特異的プライマー

cp-Can 及びユニバーサルプライマーD を用いて同様に PCR を行ったが、いずれも PCR 産物を得ることが出来なかった (data not shown)。

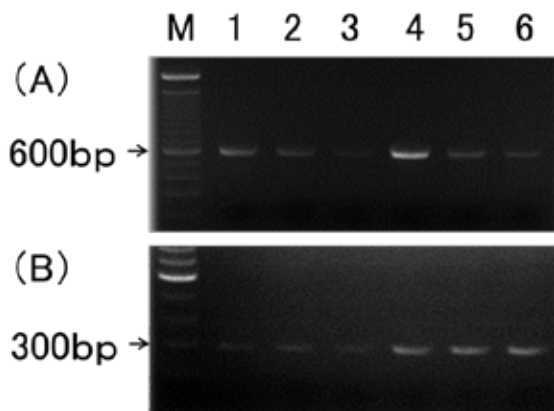


Fig. 4 Agarose gel electrophoresis of PCR products amplified using primer sets *rbcL* Fw and *rbcL* Rv(A), and G and F (B)
Lane M, DNA size marker (100 bp ladder); Lanes 1-6, hash oil samples 1-6.

3.2 考察

3.2.1 DNA 抽出方法の検討

大麻クッキーの採取量を約 10 mg 及び 100 mg と変えて DNA 抽出を行ったが、約 10 mg においても DNA を得ることが出来、また得られた DNA を鋳型に PCR を行うことが出来た。

2 種類の DNA 抽出方法を検討した結果、CTAB 法を用いたほうが、より多く確実に DNA を得ることが出来た。CTAB 法は kit に比べ操作が煩雑であり時間がかかるが、応用範囲が広いことや、糖類やポリフェノールを除けることなどの長所が、大麻加工品からの DNA 抽出には適していると考えられる。

今回、DNA の純度が PCR 増幅に最適とされる純度を満たしていなかったが、これはクッキーに含まれる油分や糖分などの夾雑物の混入が影響を与えていると考えられる。

大麻クッキーと同様に、液体大麻からも CTAB 法を用いて、DNA を抽出することが出来た。液体大麻を顕微鏡で観察したところ、大麻草の植物形態学的特徴である剛毛は確認することができなかったが、微細な植物片を複数観察することが出来た (data not shown)。液体大麻は、粉末状にした大麻草をアルコールなどの溶媒で抽出し、フィルターで濾過した後、得られた濾液を濃縮することにより作ることが出来る¹⁾。観察できた植物片は、濾過の際に分離しきれなかった大麻草の植物片が混入したものと推測される。大麻草の製品から DNA を抽出するためには、大麻草由来の植物片が含まれていることが前提として必要であり、そのため本研究で用いた液体大麻においても DNA の抽出が可能であったと考えられる。

3.2.2 PCR 増幅及び配列解析

ユニバーサルプライマーを用いた場合、大麻クッキーでは共存する小麦の存在は示せたが、大麻草の製品であるかを識別することは出来なかった。一方、液体大麻においては、6 検体中 5 検体で大麻草の製品であるかの識別が可能であったが、1 検体におい

ては大麻草の製品であるかを識別することは出来なかった。ユニバーサルプライマーは、植物全体で高度に保存されている塩基配列から設計されており、これらプライマーを用いて、特定の領域を PCR により増幅し、得られた PCR 産物の塩基配列をデータベースに登録されている塩基配列と比較することで、植物種の同定を行うことができる。大麻草のみからできている加工品であれば、ユニバーサルプライマーを用いても大麻草の製品であるかの識別は可能であるが、複数の植物種が混在している場合や、目的とする植物より他の植物のほうが多く存在する場合は、ユニバーサルプライマーを用いての識別は困難であると考えられる。

共存する植物がある場合、大麻草の塩基配列を基に設計された特異的プライマーを用いることで、大麻草を選択的に識別できると考えられる。今回、2 組の大麻草特異的プライマーを用いたところ、大麻クッキーでは 2 組とも大麻草の製品であるかを識別することが可能であった。一方、液体大麻において 1 組は PCR 産物が得られなかったが、もう 1 組は検体 1~6 の全てにおいて大麻草の製品であるかの識別が可能であった。よって、大麻草特異的プライマーを用いれば、大麻加工品に含まれる大麻草の識別は可能であることが分かった。しかし、DNA 分析では、含まれる植物の部位を特定することは出来ないため、大麻草の製品であることの識別は可能であるが、DNA 分析のみでは、「大麻」から除かれている種子や成熟した茎の区別はできない。そのため、DNA 分析だけではなく、他の分析手法を組み合わせることで、「大麻」であるか否かについて総合的に判断していく必要がある。

今回 PCR 産物を得られなかったプライマー対については、原因として DNA の量や純度が低いこと、PCR を阻害する物質の混入の可能性が考えられる。また、電気泳動による DNA 状態の確認により、かなり断片化していることから、加熱などの加工工程による DNA の損傷も影響していると考えられる。

本研究で PCR 産物が得られた大麻草特異的プライマー G は、室らの報告により、大麻草だけではなく、最近縁種と考えられているホップでも PCR 増幅産物を与えてしまうことが分かっている。そのため、シークエンスを解読しないと大麻草とは識別できない。今後は得られた PCR 産物の電気泳動だけで大麻草と識別できるプライマー cp-Can を用いて PCR 産物を得るための条件検討や新しい大麻草特異的プライマーの開発などが必要と考えられる。

4. 要 約

大麻加工品から DNA の抽出が可能であるかどうか、また DNA 分析を用いた検査法が、大麻加工品においても、大麻草の識別が可能であるかどうかについて検討を行った。大麻クッキーを用いて DNA 抽出方法を検討したところ、kit を使用するよりも CTAB 法を用いて抽出したほうが収量良く DNA を得ることが出来、液体大麻からも CTAB 法を用いて DNA を抽出することが出来た。また、得られた DNA を鋳型に、大麻草特異的プライマーを用いて PCR 及びシークエンスを行うことで、大麻加工品中においても大麻草の識別が可能であることを確認した。

文 献

- 1) 大麻研究会: “大麻大百科”, (2007), (株式会社データハウス)
- 2) UNODC: Recommended Methods for the Identification and Analysis of Cannabis and Cannabis Products (2009)
(<http://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook.pdf>)
- 3) M.A. ElSohly: “Marihuana and the Cannabinoids”, (2007), (Human Press)
- 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) M. Kohjyouma, I. J. Lee, O. Iida, K. Kurihara, K. Yamada, Y. Makino, S. Sekita, M. Satake: *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 727 (2000)
- 7) 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)
- 8) Reaction conditions used in the CBOL Plant Working Group paper (<http://barcoding.si.edu/PDF/ReactionConditionsUsedinCBOLPNASPaper.pdf>)