—原著—

核酸クロマト型チップを用いた大麻 DNA 検査キットの開発と実証評価

山室匡史¹, 宮本重彦², 立入直紀³, 石井 歩⁴, 松田駿太郎⁵, 岩田祐子¹,
瀬川尋貴¹, 桑山健次¹, 辻川健治¹, 金森達之¹, 井上博之^{1*}

¹科学警察研究所

〒277-0882 千葉県柏市柏の葉 6-3-1

²株式会社カネカ

〒676-8688 兵庫県高砂市高砂町宮前町 1-8

³宮城県警察科学捜査研究所

〒981-0103 宮城県宮城郡利府町森郷字塚崎 3-1 宮城県警察機動センター

⁴神奈川県警察科学捜査研究所

〒231-0023 神奈川県横浜市中区山下町155-1

⁵大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所

〒541-0053 大阪府大阪市中央区本町 1-3-18

Development and demonstration of cannabis DNA detection kit using DNA chromatography chip.

Tadashi Yamamuro¹, Shigehiko Miyamoto², Naoki Tachiiri³, Ayumu Ishii⁴,
Shuntaro Matsuta⁵, Yuko T. Iwata¹, Hiroki Segawa¹, Kenji Kuwayama¹,
Kenji Tsujikawa¹, Tatsuyuki Kanamori¹ and Hiroyuki Inoue^{1*}

¹*National Research Institute of Police Science*

6-3-1, Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-0882, Japan

²*Kaneka Corporation*

1-8, Miyamaemachi, Takasago-cho, Takasago, Hyogo 676-8688, Japan

³*Forensic Science Laboratory, Miyagi Prefectural Police H.Q.*

3-1, Tsukazaki, Morigo, Rifu-cho, Miyagi-gun, Miyagi 981-0103, Japan

⁴*Scientific Crime Laboratory, Kanagawa Prefectural Police H.Q.*

155-1, Yamashita-cho, Naka-ku, Yokohama, Kanagawa 231-0023, Japan

⁵*Forensic Science Laboratory, Osaka Prefectural Police H.Q.*

1-3-18, Hommachi, Chuo-ku, Osaka 541-0053, Japan

(Received 5 May 2020; accepted 20 July 2020;

Published online 14 September 2020 in J-STAGE DOI: 10.3408/jafst.786)

* 現所属：国際医療福祉大学医学部法医学

〒286-8686 千葉県成田市公津の杜 4-3

Department of Forensic Medicine, School of Medicine, International University of Health and Welfare
4-3, Kozunomori, Narita, Chiba, 286-8686, Japan

** 本論文の内容は、日本法科学技術学会第23回学術集会発表（平成29年11月）において奨励賞を受賞した。

The forensic identification of cannabis is performed by a combination of chemical analysis and morphological examination. Recently, molecular biological analysis using cannabis DNA information has been noticed as a new approach. In this study, the cannabis DNA detection kit using a DNA chromatography chip was developed, and the demonstration evaluation in the forensic chemical laboratory was carried out.

The DNA detection kit of a “four-line version” which had the function to distinguish fiber-type from drug-type cannabis showed as high accuracy (98.3%) as the current identification method on cannabis identification. However, there was a tendency to mistake a part of the drug-type samples as “fiber-type cannabis”. In the kit of a “three-line version” which was specialized for the cannabis DNA detection, the accuracy of 99.0% was confirmed on the cannabis identification. There were no false positives throughout all evaluations. In addition, some of the combustion residues that could not be identified as cannabis by the current identification method were classified to be “cannabis positive” by the DNA detection kit, indicating the effectiveness of a new approach.

As a result of this study, it was shown that the quick and accurate cannabis DNA analysis could be carried out by the DNA detection kit even by analytical chemists who didn't have expertise in molecular biology.

Key words: *Cannabis sativa*, DNA extraction, PCR, DNA detection kit, DNA chromatography chip

緒 言

大麻 (*Cannabis sativa* L.) は、我が国において、大麻取締法によって栽培や所持が厳しく規制されている。近年、大麻事犯の検挙人員が増加しており、特に若年層における乱用の拡大が見られるなど、大きな社会問題となっている¹⁾。現在、犯罪鑑識における大麻の鑑定は、幻覚成分テトラヒドロカンナビノール (THC) 等の大麻の含有成分を検出する分析化学的検査と、剛毛や腺毛等の大麻草に特徴的な構造を顕微鏡下で観察する形態学的検査の併用によって行われている²⁻⁴⁾。しかし、多様な形態の押収物の中には、燃焼、断片化、劣化等によって特徴的構造が破壊された資料や、栽培事案における大麻の根や幼若個体、形態が大きく異なる大麻加工製品など、現行の検査法では対応の難しい資料が散見されている。

近年、大麻証明の3番目の手法として、大麻のDNA配列情報を利用する分子生物学的手法による検査が注目されている⁵⁻¹⁸⁾。大麻DNA検査は、現

行の検査法で対応の難しい大麻資料に対して異なるアプローチからの証明法となることが期待されているが、高価な専用機器 (シーケンサー、リアルタイムPCR装置) や高度な分子生物学的知識が必要な場合が多く、化学検査を中心に実施している犯罪鑑識機関の薬物鑑定担当部署では実施困難なのが現状である。

我々は以前、大麻DNA検査の実用化を目標として、「核酸クロマトグラフィー」を用いた大麻特異的DNAの簡便・迅速な検出系の構築を行った¹⁹⁾。核酸クロマトグラフィーは、DNA抽出液に対して、タグのついた特殊なプライマーでPCR増幅反応を行い、増幅産物を専用ストリップ (核酸クロマト型チップ) に展開させて、標的となるDNAの含有の有無をバンドの有無に変換し、目視で判定可能とする技術であり、様々な分野での活用例が報告されている²⁰⁻²⁵⁾。我々が構築した大麻特異的DNA検出系には、薬物種大麻 (THCを多く含有し、乱用に用いられる種) と繊維種大麻 (THCをほとんど含有せず、麻繊維の採取に用いられる種) を識別で

きる「4 本ライン版」と、薬物種と繊維種の識別機能を廃して大麻検出に特化し、4 本ライン版キットの100倍の検出感度を有する「3 本ライン版」の2種類が存在し、いずれも非常に正確な大麻識別が可能であった¹⁹⁾。当該検出系に必要な資機材は、比較的安価な PCR 装置（サーマルサイクラー）のみであり、操作手順も簡便なことから、薬物鑑定担当部署においても実施可能な DNA 検査手法となることが期待される。しかしながら、大麻試料からの DNA 抽出液の取得が容易でなければ、検出系がどれだけ簡便であっても DNA 検査は成立せず、また、検査できたとして、分子生物学の専門家であっても高い正確性が維持されるかは不明であり、鑑定実務への応用に関しては大きな課題が残されている。

そこで本研究では、根幹となる検出方法として核酸クロマト型チップによる大麻特異的検出系¹⁹⁾を採用した上で、DNA の簡易抽出から大麻判定に至るまで一連の工程を実施可能な「大麻 DNA 検査キット」を開発し、薬物鑑定担当部署において実資料を用いた実証評価試験を行った。

材料および方法

1. 大麻 DNA 検査キット

1.1. キットの構成

大麻 DNA 検査キットは、DNA 抽出試薬 A 液、DNA 抽出試薬 B 液、PCR マスターミックス、プライマーミックス、展開バッファーおよび核酸クロマト型チップの6点から構成され、全て、株式会社カネカ製である。なお、キットは、既報の検出系に応じて4本ライン版と3本ライン版の2種類があるが、プライマーミックスおよび核酸クロマト型チップ以外の構成部品は共通である。PCR マスターミックスとプライマーミックスについては使用直前まで -20°C で、それ以外の構成部品については室温で保管した。

DNA 抽出試薬 A 液および B 液は、市販の DNA 抽出キットである「カネカ簡易 DNA 抽出キット version2」（カネカ）に含まれる同名の構成部品について、大麻草からの DNA 抽出のために最適化を行い、濃度や分量を変更したものである。

PCR マスターミックスは、TaKaRa Taq HS Perfect Mix（タカラバイオ）をベースとし、ウラシル DNA グルコシラーゼによる PCR キャリーオーバー防止の対策が加えられた改良型の PCR 試薬である。

プライマーミックスは、核酸クロマト型チップによる検出用のタグが結合された専用のプライマーセットであり、4 本ライン版のものは4領域（ITS, THCAS, trnL, trnG-psbI）の一斉増幅に、3 本ライン版のものは3領域（ITS, trnL, trnG-psbI）

Fig. 1 Structure of the DNA chromatography chips for the kit.

(A) Four-line version. (B) Three-line version.

の一斉増幅にそれぞれ最適化された溶液である。各領域用のプライマーの配列は既報の通りである¹⁹⁾。

展開バッファーは、核酸クロマト型チップ上に PCR 産物を展開する際に、液量の不足を補うために添加する緩衝液である。

Fig. 1 に 2 種の核酸クロマト型チップの構造を示す。未発色の状態では同一の外観であるが、4 本ライン版は、緑色植物検出用ライン 1 本 (ITS)、薬物種大麻検出用ライン 1 本 (THCAS)、大麻検出用ライン 2 本 (trnL, trnG-psbI) から構成され、3 本ライン版はそこから薬物種大麻検出用ラインが除かれた構造である。

1.2. キットの使用手順

大麻 DNA 検査キットの標準的な使用手順のフローチャートと所要時間を Fig. 2 に示す。本キットは、DNA の簡易抽出、PCR 増幅、PCR 産物の確認という 3 工程からなる。

1.2.1 DNA の簡易抽出

試料 1~2 mg を 1.5 mL マイクロチューブに秤量し、DNA 抽出試薬 A 液 50 μ L を加え、ヒートブ

ロックを用いて 98 $^{\circ}$ C で 8 分加熱した。その後、DNA 抽出試薬 B 液を 1 mL 加えて攪拌し、上清を回収した後、精製水を用いて 10 倍に希釈したものを DNA 抽出液とした。

1.2.2 PCR 増幅

PCR マスターミックス 10 μ L、プライマーミックス 5 μ L、前項で得られた DNA 抽出液 5 μ L の 3 液を氷上において 200 μ L チューブ内で混合し、PCR 反応液とした。サーマルサイクラー (Life ECO, BIOER 社) を用いて、所定の条件 (Fig. 2 参照) で PCR 増幅反応を行い、PCR 産物を得た。また、試料由来の DNA 抽出液と同時に、陽性対照試料と陰性対照試料についても同一の条件で増幅を行った。陽性対照試料には、薬物種大麻の種子から精製抽出された 1 ng/ μ L の DNA 溶液を用い、陰性対照試料には、精製水または精製水に対して前項の DNA 抽出操作を行った後の抽出液を用いた。

1.2.3 PCR 産物の確認

前項で得られた PCR 産物に展開バッファー 160 μ L を加え、核酸クロマト型チップの先端部を

Fig. 2 Operation flowchart and the required time of the cannabis DNA detection kit.

チューブ内の溶液に直接浸すことで展開を開始させた。室温で10分間の展開を行った後、各検出ラインが桃色に呈色するか否かを目視で確認した。

なお、増幅産物によるコンタミネーションの発生を避けるため、PCR 産物の確認の操作は DNA の簡易抽出および PCR 増幅の操作と物理的に隔絶した環境（異なる実験室、実験台）で実施した。

1.3 キットによる検査結果の判定

呈色が確認されたバンド位置に基づいた検査結果の判定法を Fig. 3 に示す。

1.3.1 4 本ライン版の判定

4 箇所のバンドの有無で16通り生じ得るバンドパターンについて、「薬物種大麻（1 通り）」「繊維種大麻（1 通り）」「大麻の疑い（5 通り）」「その他植

Fig. 3 Classification of the DNA chromatography chip band patterns.

(A) Band patterns counted as "cannabis positive".

(B) Band patterns counted as "cannabis negative".

(C) "Undeterminable" band patterns (recommended to be retested).

物（1通り）」「植物 DNA なし（1通り）」「異常（7通り）」の6種に分類した。そのうち、「薬物種大麻」および「繊維種大麻」の2通りのバンドパターンのみを「大麻陽性」と判定した（Fig. 3(A)）。また、「大麻の疑い」「その他植物」「植物 DNA なし」の3種7通りのバンドパターンを「大麻陰性」と判定した（Fig. 3(B)）。

上記以外のパターンは「異常」と判定した（Fig. 3(C)）。なお、結果が「異常」となった試料については、本来であれば検査のやり直しが推奨されるが、本研究においては、「異常」という結果のまま計上した。

また、同時に検査した陽性対照が「薬物種大麻」かつ陰性対照が「植物 DNA なし」のパターンを示していなかった場合の検査結果は、確認されたバンドパターンによらず、全て一律に無効とし、本研究の解析から除外することとした。

1.3.2 3本ライン版の判定

3箇所バンドの有無で8通り生じ得るバンドパターンについて、「大麻（1通り）」「大麻の疑い（2通り）」「その他植物（1通り）」「植物 DNA なし（1通り）」「異常（3通り）」の5種に分類した。そのうち、「大麻」となる1通りのバンドパターンのみを「大麻陽性」と判定した（Fig. 3(A)）。また、「大麻の疑い」「その他植物」「植物 DNA なし」の3種4通りのバンドパターンを「大麻陰性」と判定した（Fig. 3(B)）。

上記以外のパターンは「異常」と判定し（Fig. 3(C)）、4本ライン版と同様、「異常」という結果の

まま計上した。

なお、同時に検査した陽性対照が「大麻」かつ陰性対照が「植物 DNA なし」のパターンを示していなかった場合の検査結果は、確認されたバンドパターンによらず、全て一律に無効とし、本研究の解析から除外することとした。

2. 実証評価試験

2.1. 検査対象

実証評価試験の検査対象の概要を Table 1 に示す。具体的には、下記の通りである。

- (1) 科学捜査研究所に鑑定嘱託された植物様の資料（大麻（加工品も含む）、危険ドラッグの葉片等）。合計415例。なお、鑑定実務への影響を最小限とするため、通常は廃棄される含有成分検査後の抽出残渣を転用することとした。
- (2) キットの性能評価のために検査担当者が必要と判断した試料（研究用大麻、タバコ、茶、園芸用植物等）。合計19例。

ただし、3本ライン版の評価試験の検査対象は、4本ライン版の評価試験と同一のものとした。具体的には、4本ライン版の評価試験で得られた上記の検査対象434例のDNA抽出液を -20°C で保管し、3本ライン版のキットによるPCR増幅以降の操作に用いた。

2.2. 実施時期

4本ライン版：平成29年5月～平成29年8月

3本ライン版：平成29年12月～平成30年2月

2.3. 実施機関

4本ライン版：科学捜査研究所（3所属）薬物鑑

Table 1 Summary of the samples of demonstration evaluation.

	Location of demonstration			Total	Correct identification
	Lab A	Lab B	Lab C		
(1) Forensic plant samples	92	156	167	415	
Cannabis	67	151	163	381	(Drug-type) Cannabis
Herbal products	10	2	3	15	Plant other than cannabis
Unidentifiable samples	15	3	1	19	Unknown
(2) Samples selected as necessary	12	0	7	19	
Cannabis (for research use)	1	0	3	4	(Drug-type) Cannabis
Plant samples	7	0	4	11	Plant other than cannabis
Unidentifiable samples	4	0	0	4	Unknown

定担当部署

3 本ライン版：科学警察研究所および科学捜査研究所（1 所属）薬物鑑定担当部署

科学捜査研究所 3 所属における 4 本ライン版の検査数は Table 1（Lab A～Lab C）に示す通りである。そのうち、Lab B および Lab C における実施分については、3 本ライン版の検査を科学警察研究所が実施した。

なお、4 本ライン版の評価試験開始前に、各実施機関に対してキットの取扱い説明会を実施した。

2.4. 解析項目

検査結果を集計し、「現行の検査法による鑑定結果と大麻 DNA 検査キットによる判定結果の比較」、「特異な試料に対する大麻 DNA 検査キットの有効性」、「検出ラインごとの正確性と大麻判定の正確性」、「4 本ライン版と 3 本ライン版の性能の差異」という各項目について解析を行った。

また、3 本ライン版の検査結果が不良であった一部の試料に関して、DNA 抽出液の10倍濃縮や 5 倍希釈を行った上で再検査を行い、改善のための対策を検討した。

結果および考察

1. 実証評価試験の検査結果

実証評価試験で得られた検査結果の一例を Fig. 4 に示す。

4 本ライン版において（Fig. 4(A)），#1～#7 および#10は「薬物種大麻」と分類されて「大麻陽性」であり，#8 は「植物 DNA なし」，#9 は「その他植物」と分類されて「大麻陰性」と判定された。同様に，3 本ライン版において（Fig. 4(B)），#1～#7 および#10は「大麻」と分類されて「大麻陽性」であり，#8 は「植物 DNA なし」，#9 は「その他植物」と分類されて「大麻陰性」と判定された。これらの判定結果は，現行の検査法による鑑定結果とも一致していた。なお，いずれの検査においても，陽性対照および陰性対照が正常なバンドパターンを示していることから，当該検査結果は有効と判断された。

3 本ライン版の実証評価試験は，数か月冷凍保管されていた DNA 抽出液に対して実施されたが，問題なく PCR 増幅が確認された。一般に，DNA は

凍結融解によって断片化や収量の低下が見られる懸念があるが，本研究においては，それら DNA 抽出液の劣化による影響はなかったものと考えられた。

全ての実証評価試験を通じて，検査結果が無効となったのは，陰性対照試料が「異常」のバンドパターンを示した 1 事例（試料10検体+陽性対照試料+陰性対照試料の 1 セット）のみであった（検査対象全 434例は，この10検体を除いた数値である）。これは，陰性対照試料の THCAS ラインにわずかな着色が認められたものであるが，当該検査を実施した機関での以降の検査において同様の事態は認められなかったことから，「異常」となった原因は実験環境の汚染によるものでなく，核酸クロマト型チップの非特異的な呈色等による偶発的なものと推察された。実験操作や検査の正常性を担保する上で，陽性対照試料と陰性対照試料の結果を考慮することは，極めて重要と考えられた。

また，抽出から判定に至る検査の全ての工程を概ね 3 時間以内に実施できることや，最大で96サンプル（94検体+陽性対照試料+陰性対照試料）まで一斉に処理できることも確認された。一斉処理可能なサンプル数は PCR 装置に依存するものの，短時間に多量の検体を検査できることは，本キットの利点と言える。

実証評価試験の期間を通じて，実験操作や機器に関するトラブルは生じず，キットを用いた大麻 DNA 検査は，各薬物鑑定担当部署において安定的に実施された。以降の評価や解析は，各実施機関における検査結果を合算したものを対象として行った。

2. 現行の検査法による鑑定結果と大麻 DNA 検査キットによる判定結果の比較

鑑定嘱託された植物資料に対する大麻 DNA 検査の結果を Fig. 5 に示す。

4 本ライン版において，現行の検査法による鑑定結果が大麻となった381資料については，97.4%が「大麻陽性」，危険ドラッグの葉片15資料については，全て「大麻陰性」と判定された（Fig. 5(A)）。このことから，大麻 DNA 検査が，現行の鑑定法とおおむね同等の正確性を有していることが示された。しかし，大麻資料のうち，「薬物種大麻」とい

Fig. 4 Example of demonstration evaluation results.

(A) Four-line version. (B) Three-line version.

#1~7,10: cannabis samples, #8~9: herbal products, NC: negative control (water instead of DNA solution), PC: positive control (drug-type cannabis DNA).

4-i, 4-iv, 4-v, 3-i, 3-iii, 3-iv: classification of band patterns in Fig. 3.

P: cannabis positive, N: cannabis negative.

うバンドパターンが確認されたものは83.5%にとどまり、13.9%は「繊維種大麻」に分類された。これらは全て、鑑定における含有成分検査で大麻由来の幻覚成分 THC が十分に検出されている（データ未掲載）ことから、真に繊維種であるとは考えにくく、薬物種大麻が誤認されたものと推察された。

一方、3本ライン版に関しては、大麻381資料の

うち98.4%が「大麻陽性」、危険ドラッグの葉片15資料の全てが「大麻陰性」と判定され（Fig. 5(B)), 4本ライン版をわずかに上回る正確性が確認された。

Fig. 5 Results of cannabis DNA detection for the forensic plant samples.
(A) Four-line version. (B) Three-line version.

3. 特異な試料に対する大麻 DNA 検査キットの有効性

3.1. 乾燥植物片以外の状態の大麻草資料

4本ライン版において、薬物種大麻と推察される資料の一部が「繊維種大麻」と誤認されていた原因を検討するために、鑑定嘱託された大麻資料のうち、乾燥植物片以外の状態で検査された大麻草35例の結果について個別に解析を行った。生の植物体と、鑑定における外観検査によって一部腐敗していたことが確認された大麻草の検査結果を、Fig. 6に示す。

4本ライン版において、「大麻陽性」と判定された割合については、生の植物体で95.0%、一部腐敗した大麻草で93.3%と高い正確性が示されていたが、「繊維種大麻」と分類された割合に着目すると、それぞれ55.0%および60.0%と非常に高い値であった (Fig. 6(A))。381資料中53例の「繊維種大麻」のうち、20例がこれら乾燥植物片以外の状態の資料に由来しており、顕著な偏りが確認された。生の大麻の植物体は、乾燥の過程で平均67%の重量減少が生じることが報告されており²⁶⁾、多くの水分を含有するため、単位重量当たりのDNA量が乾燥植物片

Fig. 6 Results of cannabis DNA detection for forensic cannabis samples other than dried materials.
(A) Four-line version. (B) Three-line version.

と比較して少ないことが予想される。また、物理的に崩れやすくなっている乾燥植物片に比べ、生の植物体はサンプリングの際に細片化が生じにくく、DNA 抽出試薬に接触する表面積が小さくなることで、DNA 抽出効率の低下も生じ得る。さらに、腐敗試料は、DNA の分解や断片化が進んでいる可能性があり、いずれも、乾燥植物片と比較して、抽出された DNA 量が不十分になりやすい状況である。核酸クロマト型チップの検出感度を検討した既報において、薬物種大麻検出用の THCAS ラインの検出感度は、他の 3 領域 (ITS, trnL, trnG-psbI) と比較して 10 倍程度低いことが示されている¹⁹⁾。す

なわち、不十分な DNA 量と検出感度の違いにより、バンド濃度のバランスが大きく崩れ、THCAS ラインのみ不検出となった薬物種大麻資料が、「繊維種大麻」と誤認されているものと推察された。このことから、4 本ライン版キットで「繊維種大麻」のバンドパターンが確認された場合には、含有成分検査の結果 (THC の含有の有無) と併せて、その意味を慎重に吟味することが必要である。

一方、3 本ライン版においては、生の植物体で 95.0%、一部腐敗した大麻草で 100% の資料が「大麻陽性」と判定され、高い正確性が示された (Fig. 6(B))。特に、4 本ライン版で ITS ラインと TH-

Fig. 7 Results of cannabis DNA detection for forensic combustion residue samples.

Combustion residue containing cannabinoids belongs to the “unidentifiable samples” group, not the “cannabis” group in Table 1.

(A) Four-line version. (B) Three-line version.

CAS ラインが不検出となり「異常」と分類された資料 1 例に関して、3 本ライン版では全てのラインが検出され、「大麻」と分類することができた。薬物種か繊維種かの識別機能を廃し、大麻判定に特化したことで、乾燥植物片以外の状態の大麻資料に対して、極めて明確な判定を行うことが可能となったものと評価できる。

3.2. 燃焼残渣物

鑑定嘱託された植物資料のうち、燃焼残渣物の検

査結果を Fig. 7 に示す。

4 本ライン版において、含有成分検査と形態学的検査で大麻と鑑定された燃焼残渣物 4 資料については、100%が「大麻陽性」と判定され、THC が確認されたものの剛毛等が確認されず大麻と鑑定されなかった13資料についても、77%が「大麻陽性」と判定された (Fig. 7(A))。「特徴的構造が破壊された大麻草」と推察される燃焼残渣物について、大麻 DNA 検査キットで「大麻陽性」と判定できたこと

は、従来と異なるアプローチの検査法の有効性が示されたものと言える。

同様に、3本ライン版においても、燃焼残渣物合計17資料のうち、14資料が「大麻陽性」と判定できることが示された (Fig. 7(B)). しかし、大麻と鑑定された燃焼残渣物1例について、「大麻の疑い」と分類され、「大麻陰性」の判定となった。この試料は、ITSラインとtrnG-psbIラインが検出されたのに対し、trnLラインのみが不検出となったもので、4本ライン版においても、全ラインが検出されていたものの、trnLラインの呈色が非常に弱かったことが確認されており、バランスの良いPCR増幅が困難であったことが推察された。燃焼残渣物のように状態の悪い試料については、DNAの分解・

断片化やPCR阻害物質のために、PCR増幅のバランスが崩れて正しい結果とならない危険性が示された。

また、4本ライン版および3本ライン版のいずれにおいても、「植物DNAなし」の結果にとどまる資料が確認された。燃焼の程度によっては、DNAが完全に破壊されているものと推察され、大麻DNA検査が全ての燃焼残渣資料に適用できるわけではないことが明らかとなった。

3.3. その他の試料

その他の各種試料に対する大麻DNA検査の判定結果をTable 2に示す。

大麻草由来の試料については、根、茎、種子、幼苗において、「大麻陽性」と判定することが可能だった。

Table 2 Results of cannabis DNA detection for a variety of samples.

Sample	Total	Four-line version						Three-line version				
		P		N			A	P	N			A
		4-i	4-ii	4-iii	4-iv	4-v	4-vi	3-i	3-ii	3-iii	3-iv	3-v
<u>Forensic samples <cannabis></u>												
Cannabis root	1	1						1				
Cannabis stem	2	2						2				
Cannabis seed	2	1	1					2				
Cannabis seedling	1	1						1				
Cannabis leaves												
+ Soil	2	1				1		1			1	
+ Organic solvent	4	4						4				
+ Tobacco	2	2						2				
+ Mold	2	2						2				
+ Insect	1	1						1				
+ Adhesive tape	1	1						1				
Cannabis resin	1					1					1	
<u>Forensic samples <unidentifiable></u>												
Cannabis oil	2		1			1		1			1	
Soil (used to grow cannabis)	2					2					1	1
Plant fragment (THC+)	2	1			1			1		1		
<u>Selected samples <plant other than cannabis></u>												
Opium poppy	1				1					1		
Edible plants & garden plants	8				4	4				4	4	
Bamboo charcoal	2					1	1				2	
<u>Selected samples <unidentifiable></u>												
Hempseed oil	1					1					1	
Paper products	3					3					3	

4-i, ii, iii, iv, v, vi, 3-i, ii, iii, iv, v: classification of band patterns in Fig. 3.

P: cannabis positive, N: cannabis negative, A: Abnormality.

た。なお、大麻取締法においては、成熟した茎と種子は規制の対象外となっていることから、大麻 DNA 検査で「大麻陽性」であることが、必ずしも違法性を証明するものでないことには注意が必要である。

また、大麻草の葉片と共に、土、有機溶媒の残液、タバコ、カビ、昆虫、採証テープを混在させた状態で DNA 抽出操作を行った場合においても、土を混在させた 2 例中の 1 例（「植物 DNA なし」）を除いて、「大麻陽性」と判定された。抽出時に、鑑定実務で想定されるこれらの物質が混入したとしても、多くの場合は影響を受けずに大麻 DNA 検査を実施できることが示された。なお、土に関しては、一般に PCR 阻害物質が多く含有されることが知られており²⁷⁾、混入によって大麻 DNA の PCR 増幅が阻害され、バンドが検出されなかったものと推察されたことから、可能であればサンプリング時に除去することが推奨される。

さらには、大麻樹脂 1 例について、「植物 DNA なし」と分類された。大麻樹脂からの DNA 抽出は可能であるが、PCR 増幅可能な清浄な DNA を得るためには、クリーンアップ操作（臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム（CTAB）による精製抽出や抽出液への適量の活性炭粉末等の添加）を行う必要があることが報告されている^{13,28)}。本実証評価試験においては、簡易的な DNA 抽出であったため、PCR 阻害物質の影響を除去しきれず、PCR 増幅反応が進行しなかったものと考えられる。

押収資料であった大麻オイル 2 例については、現行の検査法では形態的特徴が確認できず大麻と判定されなかったものの、大麻 DNA 検査では 1 例が「大麻陽性」、1 例が「大麻陰性」と判定された。他の植物（オリーブ）においては、製造されたオイルからの DNA の抽出が可能であったことが報告されているが、オイル中に含有される DNA はヌクレアーゼによる分解を受けやすく、清浄で十分な量の DNA を抽出することは非常に困難であるとされている²⁹⁾。今回の試験では、オイル中の DNA が抽出されたわけではなく、ろ過が不十分で微小な植物体が残留するオイルについて、植物体中の DNA が抽出され、「大麻陽性」と判定できたものと思料され

る。なお、大麻種子由来の市販品であるヘンプシードオイルは、「植物 DNA なし」と分類され、「大麻陰性」であった。

大麻栽培に用いられた土を検査した結果は、4 本ライン版では 2 例とも「植物 DNA なし」であり、3 本ライン版では 1 例が「植物 DNA なし」、もう 1 例が「異常」であった。土壌中には栽培履歴を反映した植物 DNA が、微細な植物片の中に「細胞内 DNA」の形で含有されるだけでなく、死んだ植物の細胞膜や細胞壁が壊れて流出し、「細胞外 DNA」の形で含有されていることが知られている³⁰⁾。しかし、前述の通り PCR 阻害物質も大量に含有されており、また、DNA を強く吸着する物質も多いため、特に、細胞外 DNA を清浄な形で回収するには土壌専用の DNA 抽出キットによる操作が必須である³⁰⁾。本研究の簡易抽出試薬では土壌中から清浄な DNA を抽出することは困難であったが、3 本ライン版キットで「異常」となった資料では、大麻特異的な *trnL* ラインと *trnG-psbI* ラインでわずかな呈色が見られており、大麻に由来する DNA（おそらく細胞内 DNA）が含有されていた可能性も考えられる。土壌専用の抽出キットを用いて得られた DNA 溶液に対して、PCR 増幅以降の操作を行うことで、土壌中の大麻栽培履歴の有無を検査できる可能性が残されていることから、今後の検討が必要である。

現行の検査法では大麻と判定されなかった「THC を含有する植物片」2 例に関しては、1 例が「（薬物種）大麻」、もう 1 例が「その他植物」と分類された。前者は、ビニール袋に付着していたごく微量の資料で、形態的特徴の確認が困難だったものであり、大麻 DNA 検査の結果から、大麻草の微小片であったことが示唆された。一方、後者は、形態学的検査の結果、大麻草とは異なる特徴が観察されており（データ未掲載）、大麻 DNA 検査の結果と併せ、大麻草以外の植物であったことが推察された。大麻草以外の天然の植物が THC を合成するとは考えにくいことから、危険ドラッグの製造目的で何らかの植物に外部から THC が添加された可能性や、大麻草と同一の袋で保管されたために THC が付着した可能性が考えられる。これは、大麻である

か疑わしい鑑定資料中の植物片について、DNA 検査によって「大麻ではない」ことを明確化できた事例であると言える。

また、あへん法によって栽培を規制されているケシ (*Papaver somniferum*) は、「その他植物」と分類され、「大麻陰性」と判定された。同様に、一般的な食用植物や園芸植物についても、全て「大麻陰性」と判定されており、大麻と誤判定されたものは 1 例もなかった。既報においても、本検出系は、60 種の薬用植物に対して交差性を持たないことが示されており¹⁹⁾、特異性の高さが確認された。ただし、本実証試験における 8 例中 4 例については、「植物 DNA なし」の分類にとどまっており、清浄な DNA が抽出できなかったことが示唆された。4 例は、コーヒーや茶という濃い色を有した植物試料であり、ポリフェノール等の PCR 阻害物質の影響が強かったことが考えられた。

竹炭は、2 例中 1 例について、4 本ライン版で「異常」の結果となった。「異常」の結果は、大麻検出用のバンドである trnG-psbI のみに発色が確認されたためであるが、同一条件で再度検査を行った結果、再現性が認められなかったほか、3 本ライン版の trnG-psbI には発色が見られなかった（「植物 DNA なし」）。このことから、竹炭が trnG-psbI 領域を増幅させる大麻に類似した DNA 配列を有しているわけではなく、核酸クロマト型チップの非特異的

な発色が起こったものと考えられる。

また、紙製品 3 例（コピー用紙、トイレットペーパーおよび紙製ウエス）はいずれも「植物 DNA なし」であった。紙の主成分は植物繊維に由来しているが、加工の過程で DNA は破壊されており、DNA 検査の結果に影響を与えないと考えられた。例えば、資料が紙巻きタバコの形状である場合や、ごく微量の資料を濾紙上に回収する場合において、紙を含めた状態でサンプリングを行い、検査を実施できることが期待される。

4. 検出ラインごとの正確性と大麻判定の正確性

大麻 DNA 検査キットによる判定に関して、正答が判明している試料に対する感度、特異度、正答率、陽性的中率および陰性的中率を算出し、結果の正確性について解析を行った。

4 本ライン版の結果を Table 3 に示す。411 試料に対して、ITS、trnL、trnG-psbI の 3 ラインは、感度 0.95 以上 (0.959, 0.982, 0.987)、正答率 0.95 以上 (0.959, 0.983, 0.985) といずれも非常に高い値を示した。しかし、薬物種大麻検出用の TH-CAS ラインは、感度 0.834、正答率 0.844 と、他のラインより 10% ほど低い結果となった。これは、前述の通り、THCAS の検出感度が他のラインより低いために偽陰性が生じやすくなっているものと推察され、薬物種大麻を「繊維種大麻」と誤認する事例に繋がっている。しかし、THCAS の結果は大麻か否

Table 3 Discrimination ability of cannabis DNA detection kit (four-line version).

	Total	Classification				Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
		(Positive)		(Negative)						
		TP	FP	TN	FN					
ITS	411 ^{a)}	394	0	0	17	0.959	—	0.959	1.000	0.000
THCAS	411 ^{a)}	321	0	26	64	0.834	1.000	0.844	1.000	0.289
trnL	411 ^{a)}	378	0	26	7	0.982	1.000	0.983	1.000	0.788
trnG-psbI	411 ^{a)}	380	1	25	5	0.987	0.962	0.985	0.997	0.833
Cannabis detection	406 ^{a),b)}	374	0	25	7	0.982	1.000	0.983	1.000	0.781

TP: True Positive, FP: False Positive, TN: True Negative, FN: False Negative, PPV: Positive Predictive Value, NPV: Negative Predictive Value, Sensitivity = $TP / (TP + FN)$, Specificity = $TN / (FP + TN)$, Accuracy = $(TP + TN) / (TP + FP + TN + FN)$, PPV = $TP / (TP + FP)$, NPV = $TN / (TN + FN)$.

^{a)} Unidentifiable samples (e.g. combustion residue containing cannabinoids) were excluded. (23 samples)

^{b)} Samples showing “abnormality” were excluded. (5 samples)

かの判定には関与しない項目であるため、大麻判定の偽陰性には繋がっていない。また、trnG-psbI で 1 例の偽陽性が確認されたが、これは、前項の竹炭の試料であり、他のラインの結果と併せて「異常」と分類されたため、大麻判定の偽陽性には繋がっていない。このように、複数ラインのバンドの組み合わせで判定を行うことで、大麻判定の信頼性・堅牢性が確保されており、感度0.982，特異度1.000，正答率0.983という非常に高い正確性が認められた。

同様に、3 本ライン版の結果を Table 4 に示す。411試料に対して、ITS, trnL, trnG-psbI の 3 ラインは、感度0.96以上 (0.968, 0.984, 0.992)，正答率0.96以上 (0.968, 0.985, 0.993) と、いずれも 4 ライン版と同等以上の非常に高い値を示した。大麻判定の正確性についても、感度0.990，特異度1.000，正答率0.990と99%の試料に対して正確な判

定が可能であった。

以上の結果より、4 本ライン版と 3 本ライン版のいずれのキットについても、非常に正確な大麻判定が可能であることが実証された。特に、全ての検査を通じて、大麻判定の偽陽性が 1 例も見られなかったことは、大麻以外の鑑定資料を大麻と誤認する危険性が極めて低いということであり、鑑定実務への応用が十分に期待できる。

5. 4 本ライン版と 3 本ライン版の性能の差異

正解不正解を問わず、全434試料に対する 4 本ライン版と 3 本ライン版の検査結果の直接比較を行い、その一致率を算出した結果を Table 5 に示す。

4 本ライン版と 3 本ライン版の結果の一致率は、全体で97.7%と非常に高かった。中でも、4 本ライン版で「薬物種大麻」と分類された326例のうち、325例が 3 本ライン版で「大麻」と分類されており、

Table 4 Discrimination ability of cannabis DNA detection kit (three-line version).

	Total	Classification				Sensitivity	Specificity	Accuracy	PPV	NPV
		(Positive)		(Negative)						
		TP	FP	TN	FN					
ITS	411 ^{a)}	398	0	0	13	0.968	—	0.968	1.000	0.000
trnL	411 ^{a)}	379	0	26	6	0.984	1.000	0.985	1.000	0.813
trnG-psbI	411 ^{a)}	382	0	26	3	0.992	1.000	0.993	1.000	0.897
Cannabis detection	409 ^{a),b)}	379	0	26	4	0.990	1.000	0.990	1.000	0.867

a) Unidentifiable samples (e.g. combustion residue containing cannabinoids) were excluded. (23 samples)

b) Samples showing “abnormality” were excluded. (2 samples)

Table 5 Direct comparison of identification results between four-line version and three-line version. (Total 434 samples)

Four-line version	Three-line version					Concordance rate (%)
	Cannabis	Suspected cannabis	Plant other than Cannabis	No plant DNA	Abnormality	
Drug-type Cannabis	<u>325</u>	1	0	0	0	99.7
Fiber-type cannabis	<u>60</u>	0	0	0	0	100
Suspected Cannabis	2	<u>0</u>	0	0	0	0.0
Plant other than cannabis	0	<u>0</u>	<u>19</u>	0	0	100
No plant DNA	3	0	<u>0</u>	<u>18</u>	1	81.8
Abnormality	2	0	0	<u>1</u>	<u>2</u>	40.0
Concordance rate (%)	98.2	0.0	100	94.7	66.7	97.7

Underlined number: The identification results were counted as a match.

両者の結果はよく一致していた。残りの1例は、大麻の燃焼残渣物が「大麻の疑い」と分類された前述のケースである。また、4本ライン版で「繊維種大麻」と分類された60例は、3本ライン版でも全て「大麻」と分類されており、大麻草における判定結果の一致率は極めて高かった。

同様に、4本ライン版で「その他植物」と分類された19例は、3本ライン版でも全て「その他植物」と分類されており、大麻以外の植物試料に対する判定結果が一致することも確認された。

4本ライン版で「植物DNAなし」と分類された22例のうち、3本ライン版では18例が「植物DNAなし」であったが、3例は「大麻」と分類された。3本ライン版の検出感度が4本ライン版の約100倍であることから¹⁹⁾、4本ライン版では検出できなかった少量の大麻DNAが検出されたものと推察され、検出感度の向上による有効性が確認された。なお、残りの1例は3本ライン版で大麻栽培に用いられた土が「異常」と分類された前述のケースである。

4本ライン版で「大麻の疑い」または「異常」と分類された例に着目すると、3本ライン版との一致率は顕著に低かった。例えば、4本ライン版で「大麻の疑い」となった2例、「異常」となった5例中

2例が、3本ライン版では「大麻」と判定された。逆に、前述の通り、3本ライン版で「大麻の疑い」であったが、4本ライン版で「薬物種大麻」と判定されたケースも認められている。「大麻の疑い」は、「複数ある大麻検出用ラインで呈色の有無がばらついている」バンドパターンであり、「異常」は、「緑色植物検出用ラインが呈色していないにもかかわらず大麻検出用ラインが呈色している」バンドパターンである (Fig. 3)。いずれも、DNAの不足や劣化、PCR阻害等の影響によって、PCR増幅過程で各領域の増幅バランスが大きく崩れた結果生じ得る状況であり、試料が有するDNA配列情報を正しく反映した結果ではない可能性が高い。それが、「大麻の疑い」と「異常」の分類に見られる一致率の低さにつながっているものと考えられた。

実証評価試験を通じて、「大麻の疑い」または「異常」と分類された全サンプルの一覧を Table 6 に示す。偶発的な着色によると思料される「異常」例 (A-183, B-36) を除くと、trnG-psbI ラインが検出されやすいという傾向が見られ。この傾向は、4本ライン版と3本ライン版に共通して確認された。BLAST 検索の結果、trnG-psbI のプライマーは、他の領域に比べ、増幅産物の予想配列長が最も

Table 6 List of samples classified as suspected cannabis or abnormality.

Sample ID	Sample details	Four-line version					Three-line version			
		Class	ITS	THCAS	trnL	trnG-psbI	Class	ITS	trnL	trnG-psbI
C-69	Forensic sample, Cannabis	4-iii	+	w	—	+	3-i	+	w	+
C-70	Forensic sample, Cannabis	4-iii	+	—	—	+	3-i	+	+	+
A-75	Forensic sample, Combustion residue of cannabis	4-i	+	+	w	+	3-ii	+	—	+
A-183	Selected sample, Bamboo charcoal	4-vi	—	—	—	+	3-iv	—	—	—
(B-36)	Negative control, Water	4-vi	—	w	—	—	(Not examined)			
C-22	Selected sample, Withered cannabis	4-vi	—	—	+	+	3-i	w	+	+
C-155	Forensic sample, Cannabis (a piece of brown plant)	4-vi	—	—	w	+	3-v	—	—	+
C-156	Forensic sample, Cannabis	4-vi	—	—	w	+	3-v	—	—	+
C-168	Forensic sample, Putrid cannabis	4-vi	—	—	+	+	3-i	+	+	+
A-104	Forensic sample, Soil (used to grow cannabis)	4-v	—	—	—	—	3-v	—	w	w

4-i, iii, v, vi, 3-i, ii, iv, v: classification of band patterns in Fig. 3.

w: The coloration of the band was observed but weak.

B-36 was excluded from the analysis in this study.

短く設計されており, trnG-psbI は DNA の断片化などの劣化に強く, 他の領域では増幅が困難な試料であっても, 増幅が可能であることが示唆された. このことが, 状態の悪い大麻試料などにおいて, 各バンドの有無や濃度にばらつきが生じる要因の一つとなっているものと推察され, 「大麻の疑い」と「異常」の分類自体が一致していない場合でも, 4 本ライン版と 3 本ライン版の各ラインの増幅の特性は概ね一致していることが確認された.

なお, 4 本ライン版と 3 本ライン版の実用上の差異に着目すると, 4 本ライン版では, 「繊維種大麻」と分類された試料に関して, 真に繊維種大麻なのか薬物種大麻が誤認されたものなのか, 検査担当者に分子生物学的知識がなければ解釈が難しいケースが生じる懸念があるのに対し, 3 本ライン版では, 薬物種と繊維種の識別機能が排除され, 「大麻」という解釈の余地のない結果が得られることが, むしろ利点となり得るものと評価された. さらに, 4 本ライン版より 3 本ライン版の検出感度が高いことを併せて考えると, 3 本ライン版の方が, 大麻鑑定における実用性が高くなることが期待された.

6. 検査結果が不良となった試料への対策

より実用性が高いことが期待される 3 本ライン版の評価試験で検査結果が不良となった試料について, 改善方法を検討するため, 条件を変更した上で再検査を行った. 検査結果が不良となった試料として, DNA 配列情報を正しく反映していないと考えられた(「異常」や「大麻の疑い」と分類された)試料 4 例と検出されたバンドの濃度バランスが著しく悪かった(検査結果は「大麻」と分類された)試料 4 例の合計 8 例を選択した. 再検査の結果を Table 7 に示す.

DNA の簡易抽出の最終工程である「水での 10 倍希釈」を実施せず, 相対的に 10 倍濃縮された状態の抽出液を使って再検査を行った結果, 「異常」と分類されていた 2 例 (C-155, C-156) でバンドの濃度バランスが改善し, 「大麻」と分類することが可能となった (Table 7). このことから, 「DNA 抽出液の濃縮」を行うことが, 大麻 DNA 検査における DNA の不足や劣化の対策として有効な場合があることが示された. ただし, 改善した 2 例以外はバン

Table 7 Results of band detection using different concentrations of DNA solution for the three-line version kit.

Sample ID	Sample details	Normal condition				10-fold concentration				1/5 dilution			
		Class	ITS	trnL	trnG-psbI	Class	ITS	trnL	trnG-psbI	Class	ITS	trnL	trnG-psbI
A-75	Forensic sample, Combustion residue of cannabis	3-ii	+	-	+	3-v	-	-	+	3-i	+	w	+
A-104	Forensic sample, Soil (used to grow cannabis)	3-v	-	w	w	3-iv	-	-	-	3-v	-	-	w
C-155	Forensic sample, Cannabis (a piece of brown plant)	3-v	-	-	+	3-i	w	w	+	3-v	-	-	+
C-156	Forensic sample, Cannabis	3-v	-	-	+	3-i	w	w	+	3-iv	-	-	-
B-195	Forensic sample, Cannabis (leaf)	3-i	w	+	+	3-iv	-	-	-	3-i	+	+	+
C-22	Selected sample, Withered cannabis	3-i	w	+	+	3-iv	-	-	-	3-i	+	+	+
C-69	Forensic sample, Cannabis	3-i	+	w	+	3-iv	-	-	-	3-i	+	+	+
C-96	Forensic sample, Cannabis	3-i	+	w	+	3-ii	w	-	+	3-i	+	+	+

3-i, ii, iv, v: classification of band patterns in Fig. 3.

w: The coloration of the band was observed but weak.

ドの検出状況が悪化しており、PCR 阻害の影響を大きく受ける危険性があることも示唆された。

また、「大麻の疑い」と分類されていた1例（A-75）および「大麻」と分類されたもののバンドの濃度バランスが悪かった4例（B-195, C-22, C-69, C-96）は、DNA 抽出の最終工程を「10倍希釈」から「50倍希釈」に変更して相対的に5倍希釈された状態で再検査を行った結果、バンドの濃度バランスの改善が確認された（Table 7）。「DNA 抽出液の希釈」は非常に単純な方法であるものの、既報においても、PCR 阻害物質の影響を減じる対策として有効であることが示されており^{27,28)}、本研究の再検査の結果もこれを支持するものと言える。再検査を行った範囲において、3本ライン版で確認された検査結果の不良は、DNA の不足よりもPCR 阻害が主要因である例が多く、濃縮よりも希釈の方が有効な場合が多いことが示された。

一方で、DNA 抽出液の希釈と濃縮のいずれを行っても結果が改善しない試料も1例確認された（A-104, Table 7）。これは、前述の「大麻栽培に用いられた土」のサンプルであり、DNA の不足・劣化とPCR 阻害物質の双方の影響を受けるような試料については、簡易抽出試薬だけでは対応困難であった。また、濃縮や希釈で「大麻」と分類できるようになったサンプルであっても、バンドの濃度バランスが完全な改善に至らないもの（A-75, C-155, C-156）が存在しており、燃焼残渣物や褐色に変色した葉片など、状態が悪い試料のさらなる結果の改善のためには、植物DNA 抽出専用のキット³¹⁾やCTABなどを用いてクリーンアップした精製DNA が必要であるものと考えられた。

本キットを用いた大麻DNA 検査は、多くの場合において、標準的な使用手順の条件で実施可能であったが、一部の試料に関しては、良好な結果を得るためには、DNA 抽出液の工夫が必要であることが明らかになった。なお、通常の「10倍希釈」の条件で「大麻陽性」と判定されたDNA 抽出液について、「1000倍希釈」にしても問題なく「大麻陽性」となった例が確認されている（データ未掲載）。また、本研究では、鑑定業務への影響の低減を主目的として、含有成分検査後の抽出残渣を活用したが、

種々の有機溶媒による抽出操作は、PCR 阻害物質の除去に繋がり、清浄度の高いDNA を取得するために有効であることも報告されている²⁸⁾。これらのことから、PCR 阻害物質の影響が懸念される試料に対する大麻DNA 検査では、含有成分検査後の抽出残渣を対象とし、標準より高倍率（50倍、100倍）で希釈したDNA 抽出液で検査を開始することが有効であると考えられる。

結 語

本研究は、核酸クロマト型チップを用いた大麻特異的DNA 検出系を利用して、DNA 抽出から大麻判定に至る一連の工程を実施するためのキットを開発し、科学捜査研究所における実証評価試験を行ったものである。

その結果、本研究で開発したキットを用いることで、分子生物学の専門知識を有さない薬物鑑定担当部署の検査者であっても、鑑定実務への応用に十分な、極めて正確な大麻DNA 検査を実施できることが明らかとなった。本キットによる検査は、現行の検査法による鑑定において本来廃棄される含有成分検査後の抽出残渣を転用することができるため、追加の資料を消費することなく、概ね3時間以内に、資料に関するDNA 情報を獲得できる手法である。

当然のことながら、大部分の押収大麻資料については現行の鑑定法でも十分に対応できるため、大麻DNA 検査は大麻鑑定に必須の手法というわけではない。しかし、大麻関連犯罪の多様化により、現行の鑑定法による対応が難しい押収資料が増加していくことも懸念される。今後、必要性に応じ、本キットによるDNA 検査を鑑定実務へ活用していくことが期待される。

謝 辞

本研究を行うにあたり、キットの取扱い説明会にご協力いただいた株式会社カネカの直原啓明氏および佐野創太郎氏、実証評価試験の実施にご協力いただいた宮城県警察科学捜査研究所の齋藤弘一氏および化学科の皆様、神奈川県警察科学捜査研究所の加藤範行氏および薬物科の皆様、大阪府警察本部刑事部科学捜査研究所の片木宗弘氏および化学研究室の

皆様に、この場を借りて深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 警察庁, 令和元年における組織犯罪の情勢, available from [<https://www.npa.go.jp/sosikihanzai/kikakubunseki/sotaikikaku06/R1.sotajousei.pdf>], accessed Apr. 6, 2020
- 2) Smith F. Cannabis: Methods of forensic analysis, in: *Handbook of forensic drug analysis*. pp. 43–151. Elsevier Academic Press, Burlington, MA, 2004.
- 3) 財津 桂, 花尻(木倉)瑠理, 渡邊和人, II-5 大麻試験法, 日本薬学会編 薬毒物試験法と注解 2017. Pp.155–174, 東京化学同人, 東京, 2017.
- 4) United Nations Office on Drugs and Crime, Recommended methods for the identification and analysis of cannabis and cannabis products, available from [https://www.unodc.org/documents/scientific/ST-NAR-40-Ebook_1.pdf], accessed Apr. 6, 2020.
- 5) Siniscalco Gigliano G., Caputo P. and Cozzolino S., Ribosomal DNA analysis as a tool for the identification of Cannabis sativa L. specimens of forensic interest. *Sci. Justice*, **37**, 171–174, 1997.
- 6) Gigliano G. S., Identification of Cannabis sativa L. (Cannabaceae) using restriction profiles of the internal transcribed spacer II (ITS2). *Sci. Justice*, **38**, 225–230, 1998.
- 7) Linacre A. and Thorpe J., Detection and identification of cannabis by DNA. *Forensic Sci. Int.*, **91**, 71–76, 1998.
- 8) Siniscalco Gigliano G., Preliminary data on the usefulness of internal transcribed spacer I (ITS1) sequence in Cannabis sativa L. identification. *J. Forensic Sci.*, **44**, 475–477, 1999.
- 9) Kohjyouma M., Lee I. J., Iida O., Kurihara K., Yamada K., Makino Y., Sekita S. and Satake M., Intraspecific variation in Cannabis sativa L. based on intergenic spacer region of chloroplast DNA. *Biol. Pharm. Bull.*, **23**, 727–730, 2000.
- 10) Hsieh H. M., Hou R. J., Chen K. F., Tsai L. C., Liu S. W., Liu K. L., Linacre A. and Lee J. C., Establishing the rDNA IGS structure of Cannabis sativa. *J. Forensic Sci.*, **49**, 477–480, 2004.
- 11) Tsai L. C., Hsieh H. M., Huang L. H., Wang J. C., Linacre A. and Lee J. C., Cannabis seed identification by chloroplast and nuclear DNA. *Forensic Sci. Int.*, **158**, 250–251, 2006.
- 12) 室 友紀, 今村真二, 中村博明, 葉緑体 DNA の trnL 領域の解析による大麻草の識別, 日本法科学技術学会誌, **15**, 143–149, 2010.
- 13) El Alaoui M. A., Melloul M., Alaoui Amine S., Stambouli H., El Bouri A., Soulaymani A. and El Fahime E., Extraction of high quality DNA from seized Moroccan cannabis resin (Hashish). *PloS one*, **8**, e74714, 2013.
- 14) Johnson C. E., Premasuthan A., Satkoski Trask J. and Kanthaswamy S., Species identification of Cannabis sativa using real-time quantitative PCR (qPCR). *J. Forensic Sci.*, **58**, 486–490, 2013.
- 15) 長澤由実, 裕島紋子, 行本 剛, DNA 分析を利用した大麻加工品の識別法の検討, 関税中央分析所報, 81–85, 2014.
- 16) Kitamura M., Aragane M., Nakamura K., Watanabe K. and Sasaki Y., Development of loop-mediated isothermal amplification (LAMP) assay for rapid detection of Cannabis sativa. *Biol. Pharm. Bull.*, **39**, 1144–1149, 2016.
- 17) Elkins K. M., Perez A. C. U. and Quinn A. A., Simultaneous identification of four “legal high” plant species in a multiplex PCR high-resolution melt assay. *J. Forensic Sci.*, **62**, 593–601, 2017.
- 18) Kitamura M., Aragane M., Nakamura K., Watanabe K. and Sasaki Y., Rapid identification of drug-type strains in Cannabis sativa using loop-mediated isothermal amplification assay. *J. Nat. Med.*, **71**, 86–95, 2017.
- 19) Yamamuro T., Miyamoto S., Kitamura M., Muro T., Iwata Y. T., Segawa H., Kuwayama K.,

- Tsujikawa K., Kanamori T. and Inoue H., Development of simple and accurate detection systems for *Cannabis sativa* using DNA chromatography. *Forensic Sci. Int.*, **291**, 68–75, 2018.
- 20) Monden Y., Takasaki K., Futo S., Niwa K., Kawase M., Akitake H. and Tahara M., A rapid and enhanced DNA detection method for crop cultivar discrimination. *J. Biotechnol.*, **185**, 57–62, 2014.
- 21) Tian L., Sato T., Niwa K., Kawase M., Tanner A. C. and Takahashi N., Rapid and sensitive PCR–dipstick DNA chromatography for multiplex analysis of the oral microbiota. *BioMed Res. Int.*, **2014**, 180323, 2014.
- 22) Nagai S., Miyamoto S., Ino K., Tajimi S., Nishi H. and Tomono J., Easy detection of multiple *Alexandrium* species using DNA chromatography chip. *Harmful Algae*, **51**, 97–106, 2016.
- 23) Shanmugakani R. K., Akeda Y., Yamamoto N., Sakamoto N., Hagiya H., Yoshida H., Takeuchi D., Sugawara Y., Kodera T., Kawase M., Laolerd W., Chaihongsa N., Santanirand P., Ishii Y., Hamada S. and Tomono K., PCR–dipstick chromatography for differential detection of carbapenemase genes directly in stool specimens. *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**, e00067–00017, 2017.
- 24) Sano S., Miyamoto S. and Kawamoto S., Rapid multiplex nucleic acid amplification test developed using paper chromatography chip and azobenzene-modified oligonucleotides. *J. Biosci. Bioeng.*, **126**, 397–403, 2018.
- 25) Chikamatsu K., Aono A., Kawai A., Hata H., Iwamoto T., Igarashi Y., Takaki A., Yamada H. and Mitarai S., Evaluation of Q Gene Mycobacteria: A novel and easy nucleic acid chromatography method for mycobacterial species identification. *J. Microbiol. Methods*, **163**, 105657, 2019.
- 26) Warner M. L., Alford I., Lawrence D. M., Kohl A. C., Williams S. J. and Yeatman D. T., Comparative analysis of freshly harvested cannabis plant weight and dried cannabis plant weight. *Forensic chem.*, **3**, 52–57, 2017.
- 27) Schrader C., Schielke A., Ellerbroek L. and Johne R., PCR inhibitors-occurrence, properties and removal. *J. Appl. Microbiol.*, **113**, 1014–1026, 2012.
- 28) Yamamuro T., Iwata Y. T., Segawa H., Kuwayama K., Tsujikawa K., Kanamori T. and Inoue H., Development of rapid and simple method for DNA extraction from cannabis resin based on the evaluation of relative PCR amplification ability. *Forensic Sci. Int.*, **287**, 176–182, 2018.
- 29) Raieta K., Muccillo L. and Colantuoni V., A novel reliable method of DNA extraction from olive oil suitable for molecular traceability. *Food Chem.*, **172**, 596–602, 2015.
- 30) 宮口 一, 中原弘明, 杉田律子, 土壤中細胞外 DNA の抽出における市販キットの性能評価, 日本法科学技術学会誌, **24**, 63–72, 2019.
- 31) 吉川ひとみ, 杉田律子, 瀬戸康雄, 法科学的検査のための植物 DNA 抽出キットの比較, 分析化学, **63**, 269–273, 2014.