

大麻種子の 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium Chloride (TTC) による発芽能力鑑定法

緒方 潤,^a 花尻(木倉)瑠理,^a 吉松嘉代,^b 木内文之,^b 合田幸広^{*,a}Detection Method for the Ability of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Germination by the Use of 2,3,5-Triphenyl-2H-tetrazolium Chloride (TTC)Jun OGATA,^a Ruri KIKURA-HANAJIRI,^a Kayo YOSHIMATSU,^b
Fumiya KIUCHI,^b and Yukihiro GODA^{*,a}^aNational Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan,
and ^bTsukuba Division, Research Center for Medical Plant Resources, National Institute
of Biomedical Innovation, 1-2 Hachimandai, Tsukuba City 305-0843, Japan

(Received July 16, 2008; Accepted August 1, 2008)

Cannabis plants show a high Δ^9 -tetrahydrocannabinol content and are used as a psychoactive drug. Therefore the cultivation of hemp and its possession are prohibited by law in Japan. Meanwhile, *Cannabis* seeds have been used as a component of *shichimi-togarashi* (a Japanese spice), bird feed, or a crude drug (*mashinin*). To exclude the possibility of germination, it is officially noticed that hemp seeds must be killed. However, the number of violators has increased in recent years. To judge the ability of seed germination, a germination test is performed. However, the test requires several days and thus has not been used for on-site inspection. In this study, we developed a rapid detection method to determine the ability of *Cannabis* seeds to germinate using 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC). The principle of the assay is as follows. The endogenous respiratory enzymes in hemp seeds convert added colorless TTC into red 1,3,5-triphenylformazan. Consequently, a living embryo is stained red, while red does not appear in the dead seeds. The reaction was active over a pH range of 8.0–9.0, and the optimum activity was found from 40 to 50°C. Under the optimum conditions, we were able to determine the ability of seeds to germinate based on the presence of color within 20 min. Since this method is rapid and simple, it is applicable to on-site inspections. In addition, it could be used as an alternative technique to the germination test, because erroneous decisions cannot occur under the assay principle.

Key words—*Cannabis sativa* L.; tetrazolium salt; germination test; hemp; 2,3,5-triphenyl-2H-tetrazolium chloride (TTC); marijuana

緒 言

大麻 (cannabis, hemp, marijuana, marihuana) *Cannabis sativa* L. は中央アジア原産のアサ科の1年草で古くから世界各国で栽培され、繊維、食品、油、薬など様々な原料及び用途に利用されている。¹⁾ 一方で、本植物には向精神作用があることが知られており、20世紀後半以降、幻覚剤としての濫用が日本を含め世界各国で大きな社会問題となっている。²⁾ 本植物は成分として麻酔性の強い Δ^9 -テトラヒドロカンナビノール (酸) を含むことから、日本では大麻取締法により、その所持、栽培などが禁止されている。

しかし、本植物の種子 (果実: 瘦果) は、江戸時代より「麻の実」として調味料 (七味唐辛子) に利用され、ペットショップなどでは「鳥のエサ」としても購入することができる。また、日本薬局方では、生薬「マシニン」 (麻子仁: Hemp Fruit) が規定され、薬物として使用されている。³⁾ これらの点を踏まえ、大麻取締法では、大麻種子の所持や売買、流通に関しての規制を行ってはいないが、一般市場に流通している大麻種子 (果実) は加熱などによる発芽防止処理が施されており、水を与えても発芽することはない。

近年、大麻事犯は増加の一途を辿り、平成18年、大麻栽培による検挙者数は100人を超えている。⁴⁾ 一般に流通している大麻種子は上記の理由により発芽することはないが、発芽可能な種子が様々な方法で日本国内に持ち込まれていることも事実で

^a国立医薬品食品衛生研究所, ^b独医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部

*e-mail: goda@nihs.go.jp

ある。また、インターネット上などでは「麻の実標本」、「Cannabis Seeds」などとしてアサ（大麻）の種子が販売されており、これらの種子に高い発芽率が認められている。⁵⁾

一般に種子の発芽力の有無は外観などからでは確認が困難であるため、発芽試験によって確認がなされている。当然ながら大麻種子の発芽能力を判定する方法としては、実際に発芽試験を行うことになるが、種を播種し、判定するにはある程度の日数が必要となる。したがって、大麻種子を所持した人間に対し、その場で、試験を実行することは不可能である。また、一度に多量の検体を処理するためには予試験法があることが望ましい。そこでこれらの諸事情を考慮し、一般市販試薬（テトラゾリウム塩類）を用いた、迅速かつ簡便な大麻種子の発芽能力（生死判別）を検定する方法（鑑別法）を確立したので報告する。

実験方法

1. 試料 発芽能力（発芽防止未処理）を有する大麻種子として、メキシコ産系統種子（以下、メキシコ種）（2007年収穫）及び栃木白の種子（以下、栃木白種）（2005年収穫）は畑医薬基盤研究所薬用植物資源研究センター筑波研究部において栽培、収穫されたものを使用した。また、一般流通市場品試料（発芽防止処理済み）として都内ペットショップにて「鳥のエサ」（以下、飼料種子）及び食料品店にて「麻の実」（以下、食用種子）を購入し、実験に供試した。

2. 発芽試験 試料である各種子は流水にて十分に洗浄後、70%アルコールに1分間浸漬後、実験シャーレに MilliQ 水を十分に含ませた脱脂綿をひいたものに播種し、常温にて放置した。培養時のカビの繁殖を防止するため極力、無菌的に操作した。

3. 呈色反応 2,3,5-Triphenyl-2*H*-tetrazolium chloride (TTC) は和光純薬工業より、1,3,5-triphenylformazan (TPF) は関東化学工業よりそれぞれ購入した。0.1% TTC 水溶液を作成し、実験に使用する際の各種子は、胚を露出させるために粉碎し用いた。これらを直接、TTC 水溶液 500 μ l 中に入れ、60分間常温にて放置した。反応後は目視により発芽能力の有無を検討した。

4. 最適化条件の検討 反応温度、時間及び

pH に関して詳細な検討を行った。反応温度に関する条件検討では反応時間を10分間とし、プレインキュベーション時間を2分間とした。反応時間の検討では、温度（4°C、25°C 及び 45°C）についても検討に加えた。至適反応 pH の測定には反応温度 45°C、反応時間 10分とし、酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液（3-5）、リン酸カリウム緩衝液（6, 7）、トリス-塩酸緩衝液（8, 9）、グリシン-水酸化ナトリウム緩衝液（10, 11）を用い、終濃度 0.1M とし測定を行った（カッコ内は使用 pH を示す）。

これらすべての条件検討では、各種子1粒を1試験区とし、各種子を縦線に沿って2分割後、胚のみを全摘出して使用し、反応容量 500 μ l とし 1.5 ml チューブ内で反応を行った。反応終了後、胚を MilliQ 水にて3回洗浄し、胚に付着した TPF をメタノール：クロロホルム（2：1）混液 1 ml を用いて溶出した。検出は島津 UV-2550 UV-Visible Spectrophotometer を用い、480 nm の吸光度にて活性能力を検定した。

結果及び考察

1. 発芽試験 本研究で用いた各種大麻種子試料は、通常発芽試験を行い、発芽能力の有無を確認した。その結果、発芽防止未処理の2種（メキシコ種及び栃木白種）は100%発芽が観察された（各20粒）。播種後10日間で発根及び根の伸長がすべての種子で確認された。特に収穫後の保存期間年数の短いメキシコ種は播種後の発芽速度は速く、5日程度で根の伸長までが確認された。また、一般流通市場品（発芽防止処理済み）としての飼料種子及び食用種子は播種後4週間を経過しても、発芽を確認することはできなかった（各200粒）。一般市場流通品の中には播種後、10%程度の確率で発根と思われる形態がみられたが、その後の根の伸長は観察されなかった。これは、播種、給水によって胚自体が膨潤し、種皮外に幼根が現れたものと考えられた。そこで、今回の発芽試験での能力検定は根の伸長までを確認して、その能力の有無を判断した。

2. 呈色反応 大麻種子試料4種（メキシコ種、栃木白種、飼料種子、食用種子）を用い、TTC⁶⁻⁸⁾による呈色試験を行った。発芽能力を検討する方法としては、本実験のテトラゾリウム塩類 [TTC, 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-

2*H*-tetrazolium bromide (MTT), 3,3'-[3,3'-dimethoxy-(1,1'-biphenyl)-4,4'-diyl]-bis[2-(4-nitrophenyl)-5-phenyl-2*H*-tetrazolium chloride] (Nitro-TB) など] 以外に, iodine-potassium iodide (IKI)⁸⁾ 3-amino-7-dimethylamino-2-methylphenazine hydrochloride (Neutral Red),⁹⁾ Evans Blue¹⁰⁾ による呈色試験法があるが, 簡便性と正確性⁸⁾において TTC を含むテトラゾリウム塩類が優れていると考えられ, 今回は TTC 法を用いることにした. 本法による鑑定は, 種子胚(芽)中の呼吸系酵素活性によって TTC が還元され TPF (赤色物質) に変換し (Fig. 1), 結果として胚が着色することを肉眼で判定するものである. その結果, メキシコ種 (54 粒) 及び栃木白種 (180 粒) において 100% 赤色の着色が観察された. これらの着色は明確に赤色と判定できるものであり, 「薄く」や「淡く」等の状態の着色はみられなかった (Fig. 2). また, 上記 2 種に着色の差はみられなかった. なお, 種子の成熟及び保存時に虫による被害にあったものや, 胚自体が腐敗や酸化によって褐色に変化したものについては除外した.

一般流通市場品の種子では 100% 着色がみられなかった (各 100 粒). また, オートクレーブ処理 (120°C, 10 min) したメキシコ種及び栃木白種でも同様に着色はみられなかった. これらの結果は胚の成分などが着色に影響を与えるものではないということを示している. 基質濃度 0.1, 0.2, 0.5 及び 1.0 % の TTC 溶液を実験に用いたが, 陽性反応において違いはみられなかった. テトラゾリウム塩類は, 高濃度で染色が鋭敏になるものの, 陰性判定においても長時間で淡く着色がみられることから, 0.1% TTC 溶液を標準液として以下の実験にも使用した (data not shown). 一連の実験でみられる着色は植物組織 (胚組織) のみで, 溶液の色が変化するもの

ではない.

3. 最適化条件の検討 本法の大麻種子における最適条件を検討するために, 反応後の着色胚から TPF をメタノール:クロロホルム (2:1) で抽出し, 分光光度計 (480 nm) により定量する方法を採用した. 市販の TPF のスペクトル解析の結果においても 480 nm 付近に極大が存在した.

本反応は生きた細胞や組織が有する酵素による還元力を利用 (二次反応) したものである. そこで, この酵素反応の最適条件を検討するために, 反応温度, 時間及び pH について調査した. 温度は 20-70°C で 10°C ずつ変化させ反応時間 10 分で測定した. 40-50°C の間で最大活性が得られることが分かった (Fig. 3).

反応時間は温度 (4°C, 25°C 及び 45°C) の条件も考慮して行った. 25°C 及び 45°C では時間の経過とともに活性 (着色) には直線の上昇がみられ, 25°C (常温) よりも 45°C の方が約 3 倍強い活性が得られている (Fig. 4). これらの結果を踏まえると鑑別法として加温することは早期判定にも重要であると考えられる. また, 胚全体をみると, 着色の部分的 (幼芽や幼根など) 差はみられないが, 胚の外側 (種皮と接している面) 部分に早期の着色がみられた. 4°C での反応では活性の時間の上昇がみられなかった. これは生細胞の酵素反応 (活動) が停止していることに起因するものと考えられる.

最適 pH は各緩衝液を用い pH 3-11 の間で検討した. pH 8-9 付近で活性は最大となった (Fig. 5). これらの結果は一般的な植物由来酵素の性質と大きな違いはみられなかった. また, TTC が植物体内酵素の直接的基質となることは考え難く, 本反応は細胞呼吸における電子伝達系酵素のプロトンの放出や流入などに関与しているとも考えられる.¹¹⁾ な

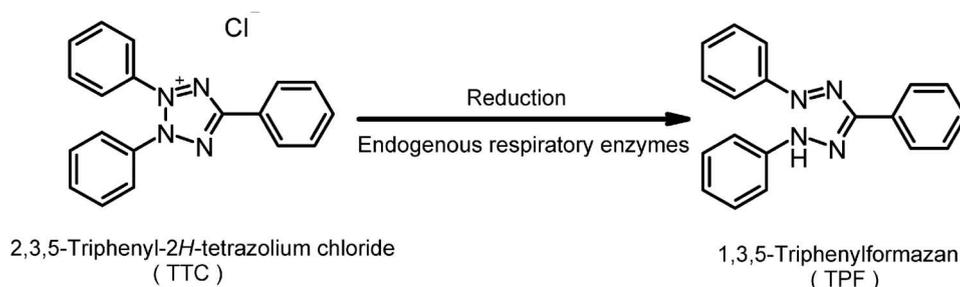


Fig. 1. Proposal Reaction Scheme of TTC to TPF

TTC is a colorless material and TPF is red. This reaction is caused by the endogenous respiration enzymes in embryo cells.

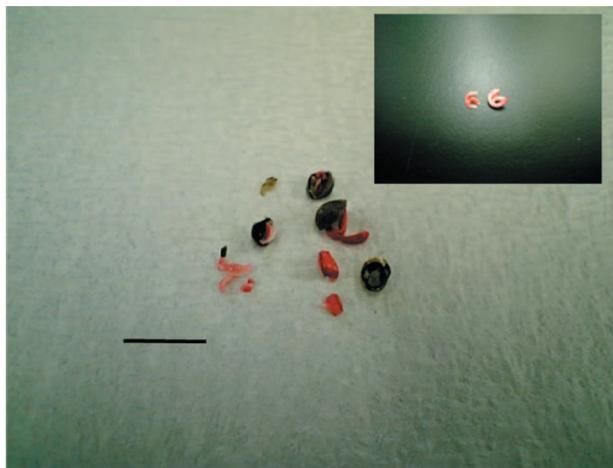


Fig. 2. Hemp Seed “Strain Mexico” by Use of TTC Method after 60 min at Room Temperature

The crushed seeds were directly entered into the TTC solution. The black bar shows a 1 cm scale. Right upper photo: an embryo sectioned from seed coat.

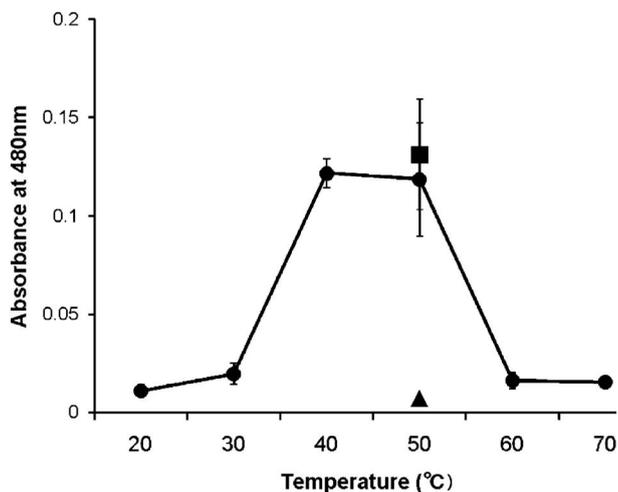


Fig. 3 Effect of Temperature on TTC Activity Using Hemp Seeds

The incubations were carried out under standard conditions. The data are the mean averages from six independent experiments \pm S.D. Absorbance (480 nm) of 1 ml extract from an embryo (Ave. weight at 0.02 g). ●: strain Mexico, ■: cv. Tochigi-shiro, ▲: bird feed.

お、強アルカリ条件下での保存では、溶液が薄い赤色に変化した。また、Evans Blue 試薬は細胞膜の選択透過性が失われると細胞内へ流入する染色剤であり、細胞の生死判別に用いられる試薬であるが、大麻種子での生死には明確な判定は下せなかった。現在までに TTC を含め、MTT や Nitro-TB など多くのテトラゾリウム塩類を用いた細胞生死判定指示薬が試薬メーカーから生産・販売されているが、試験研究機関以外の場所での、目視による迅速簡易鑑

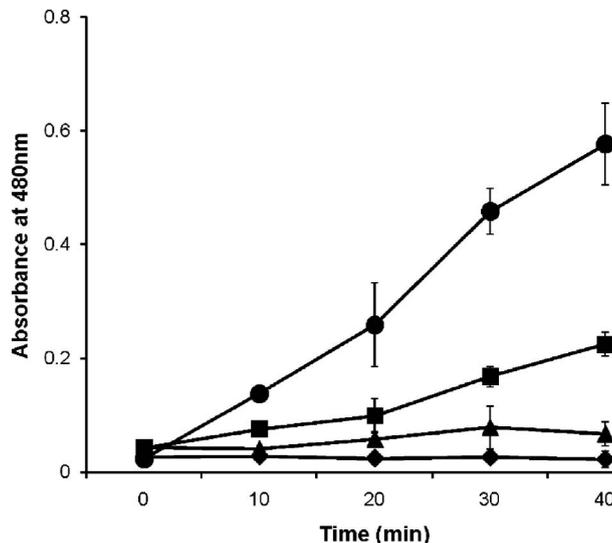


Fig. 4. Formation of TPF from TTC as a Function of Time

The incubations were carried out under standard conditions. The data are the mean averages from six independent experiments \pm S.D. Absorbance (480 nm) of 1 ml extract from an embryo (Ave. weight at 0.035 g). ●: cv. Tochigi-shiro (45°C), ■: cv. Tochigi-shiro (25°C), ▲: cv. Tochigi-shiro (4°C), ◆: bird feed (45°C).

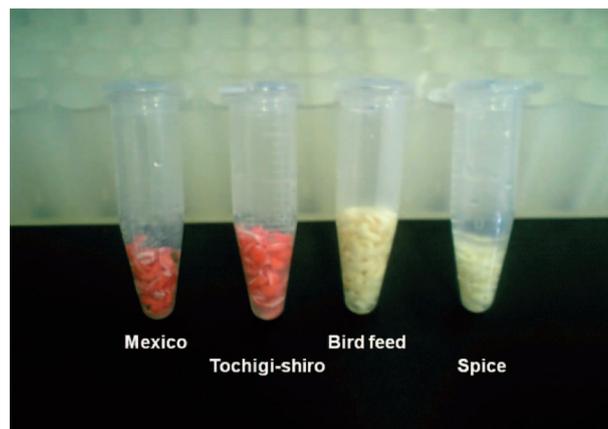


Fig. 6. The Visual Judgment of the Ability of Hemp Seeds Germination

The incubations were carried out below; 45°C, pH 9.0, 20 min.

別という点では、反応指示液そのものが無色透明であること、その反応（判定）産物が水に不溶であること、陽性、陰性の差が色の違いではなく有無であること、誤判定を回避するために、反応産物の色が植物本来の組織の色と異なること等が挙げられる。これらの点を踏まえると、今回用いた TTC は大麻種子判定試験において、最も有効な試薬の 1 つであると考えられた。

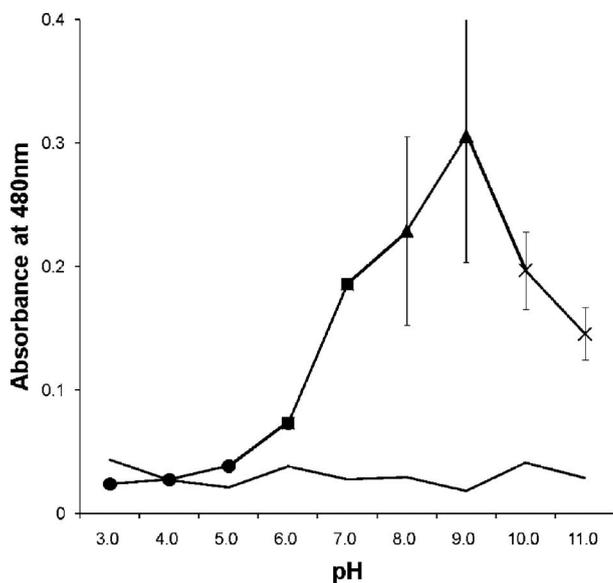


Fig. 5. Effect of pH on TPF Formation Using cv. Tochigi-shiro

The reaction mixture was incubated for 10 min and contained in a total volume 500 μ l: An embryo was sectioned from a seed, 250 μ l 0.2% TTC solution, 250 μ l 0.2M each buffer. The data are the mean averages from six independent experiments \pm S.D. Absorbance (480 nm) of 1 ml extract from an embryo (Ave. weight at 0.035 g). ●: Acetate buffer (3–5), ■: Phosphate buffer (6, 7), ▲: Tris-HCl buffer (8, 9), ×: Glycine-NaOH buffer (10, 11), —: Bird feed.

結 論

TTC を用いた本法は、温度 45°C, pH 9.0, 20 分間の反応において迅速かつ明確に、その発芽能力を鑑定することが可能であると考えられた (Fig. 6)。また、0.1% TTC 水溶液は暗所常温にて 2 ヶ月程度は使用に際して問題はなかった。種子を実際に発芽させる従来の試験では、発芽能力鑑定に数日以上かかる。一方、本法は、短時間で発芽能力を判定することができ、犯罪捜査の現場での試験に利用可能である。また、結果が非常に明確で、その原理を考えると誤判定の可能性がほとんどない。したがって、本法は、大麻種子の発芽能力鑑定法として、従来の

発芽試験に変え得る可能性のある優れた手法であることが明らかとなった。

謝辞 本研究を遂行するに当たり大麻並びに植物の種子発芽に関して有益なご助言をくださった佃医葎基盤研究所薬用植物資源研究センター種子島研究部の飯田修先生、杉村康司博士に厚く御礼申し上げます。また、本研究は、厚生労働科学研究費補助金で行われたもので関係各位に深謝する。

REFERENCES

- 1) Yamamoto I., "Taima no Bunka to Kagaku," Hirokawa Shoten, Tokyo, 2001.
- 2) Taura F., Shyoyama Y., Morimoto S., *Seibutsu-butsumori*, **45** (4), 178–184 (2005).
- 3) The Japanese Pharmacopoeia, 15th ed., ed. by The Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, 2006, p. 1273.
- 4) The General Situation of Administrative Measures against Narcotics and Stimulants Abuse, ed. by The Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, December 2007.
- 5) Yoshizawa M., *Ann. Rep. Tokyo Metro. Inst. P. H.*, **57**, 127–132 (2006).
- 6) Hatano K., *J. Jpn. Forestry Soc.*, **34** (2), 37–41 (1952).
- 7) Honjyo H., Nakagawa I., *Kajyu Shiho A*, **6**, 37–42 (1979).
- 8) Zehao H., Jinmao Z., Xijin M., Jinxing L., *Ann. Bot.*, **93**, 295–301 (2004).
- 9) Utsunomiya T., *Sakumotsugaku kenkyushuroku*, **14**, 14–15 (1971).
- 10) Crippen R. W., Perrier J. L., *Stain Technol.*, **49**, 97–104 (1974).
- 11) Hinkle P. C., Kumar M. A., Resetar A., Harris D. L., *Biochemistry*, **30**, 3576–3582 (1991).