大型培養槽を用いた多芽体の大量増殖に関する研究

秋田 求[†]・重岡武雄^{††}・小泉蓉子^{††}・川村道生^{††}

PCC テクノロジー筑波研究室

305 茨城県つくば市御幸が丘 協和発酵筑波研究所内

Mass Propagation of Multiple Shoots Using a Large Bioreactor.

Motomu AKITA Takeo SHIGEOKA, Yoko KOIZUMI and Michio KAWAMURA

Tsukuba Lab., P. C. C. Technology Inc.

c/o Tsukuba Res. Labs, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.

Miyukigaoka, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

Summary

The shoot primordium is a suitable inoculant for large scale culture of shoots comparing with the shoot itself. A culture method of multiple shoots starting from the shoot primordium was established. The influence of scale up conditions on the growth of multiple shoots originating from the primordia was also investigated.

Shoot primordium of *Stevia rebaudiana* has been induced and maintained in modified MS liquid medium containing NAA and BA. The primordia grew constantly by about 7 times in 1 month in the liquid shake culture. The multiple shoots were then induced efficiently from the primordia by eliminating the growth hormones from the MS medium. They grew constantly by about 20 times in 1 month in the liquid shake culture. The growth of shoots in culture vessels of different sizes, 0.3 l (flask), 6 l (jar fermentor) and 500 l (bioreactor), were compared by inoculating the primordia at a fixed density of about 10 g l⁻¹. The shoots grew actively to fill up culture vessels within a month, and the final weight of shoots per unit volume of medium was similar in each culture vessel. This result strongly suggests that multiple shoots can be mass propagated in a large scale without affecting the culture efficiency.

緒 言

植物の器官大量培養技術は、種苗の大量生産や、分化組織において顕著に生産されるような有用代謝物を生産する技術として重要と考えられている。大型培養槽を用いた器官大量培養も試み

1993年9月6日受理

現所属

^{†)} 近畿大学生物理工学部生物工学科 649-64 和歌山県那賀郡打田町西三谷

^{††)} 協和発酵筑波研究所 305 茨城県つくば市御幸が丘

Present address

^{†)} Department of Biotechnological Science, Faculty of Biology-Oriented Science and Technology, Kinki Univ., Nishimitani, Uchta, Naga, Wakayama 649-64, Japan

^{††)} Tsukuba Res. Labs, Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd., Miyukigaoka, Tsukuba, Ibaraki 305, Japan

られ、毛状根培養においてはその成功例も報告されている¹⁾。しかし、種苗生産上、より重要な、多芽体を対象とした大量培養技術は、いまだ実験室スケールをでていないものと考えられる。萩森らによるジギタリスの培養に関する報告²⁾のように、多芽体を高密度培養する可能性を強く示唆する報告は見られるものの、実際に大スケールで培養が行われていない一因としては、多芽体を移植材料として用いるために生じる問題があるものと考えられる。すなわち、多芽体は比較的大型で複雑な形状をしているために移植操作が繁雑となり、かつ、移植操作中に物理的に傷害を受けやすい。さらに、通常、一個体上の生長点数は限られているために、移植後の増殖効率が低くなる恐れがあるといった問題が考えられる。これら、移植物性状に関係する問題を解決する方法の一つとしては、苗条原基や不定胚のように、比較的单純な形状をし、かつ、多芽体誘導能の高い組織を移植材料として選ぶことが考えられる。我々は、このような考えに基づき、苗条原基を移植材料とする、スケールアップに適した多芽体増殖系を確立した。苗条原基は、移植操作中に物理的ストレスを比較的受けにくく、かつ、多芽体誘導能が高いので、少量の移植物から高い効率で多芽体を得ることが期待される。なお、このような増殖系では、苗条原基の増殖段階(以下 STEP 1)と苗条原基からの多芽体の誘導と増殖段階(以下 STEP 2)の2段階の培養を経て多芽体を得ることになる。

また、植物器官培養用に開発した 500 l 容の大型培養槽の一つを用いて培養を行い、フラスコ、小型培養槽、さらに大型培養槽とスケールアップしたときの培地あたり生育量の変化を観察し、多芽体培養のスケールアップが可能であるか、また、スケールアップ中に増殖効率、すなわち、培地あたりの生育量がどのように変化するかについて観察し、大型培養槽による多芽体大量培養の可能性を明らかにしたので報告する。

実験方法

1. 実験材料

モデル植物として茎頂培養由来のステビア(*Stevia rebaudiana*)の無菌培養系を用いた。継代培養には、窒素成分を 1/2 量に改変し、シュクロース濃度を 30 g l^{-1} としたホルモンフリーの Murashige & Skoog (MS) 培地³⁾を用いた。ただし、ゲルライト 2 g l^{-1} を用いて固化した。培地はオートクレーブ殺菌 (120°C , 1.2 気圧, 20 分間) して用いた。継代培養は固形培地 10 ml を入れた試験管を用いて明条件下で行った。

2. 培地

STEP 1 の培養は、窒素成分を 1/2 量に改変し、シュクロース濃度を 30 g l^{-1} , NAA 0.1 ppm, BA 1 ppm を加えた MS 培地を用いて行った。また、STEP 2 の培養は、同様に、窒素成分を 1/2 量に改変し、シュクロース濃度を 10 g l^{-1} または 30 g l^{-1} とした MS 培地を用いて行った。

3. 培養条件

(1) フラスコスケール

フラスコスケールの培養の場合は、300 ml 容洋ラン用三角フラスコに培地 200 ml を入れてオートクレーブ滅菌 (120°C , 1.2 気圧, 20 分間) して用いた。培養は、すべて 25°C 下で行った。明条件下で培養する場合には、蛍光灯照明下 (約 2.5 W m^{-2}) で 16 時間日長とした。振盪速度は 125 rpm とした。

(2) 小型ジャーファーマンタースケール

ジャーファーマンターとして、多孔質のスパージャーを底部に有する 6 l 容ガラス製ジャーファーマンターを用いた。このジャーファーマンターのガラス部内径は、約 16 cm であった。ジャーファーマンターに、STEP 2 用培地 5 l を入れ、120°C、1.2 気圧、20 分間加熱殺菌した。あらかじめ液体振盪培養によって増殖させておいた苗条原基を移植して培養を開始した。培養は、すべて明条件下(16 時間日長、約 2.5 W m^{-2})、25°C 下において行った。各ジャーファーマンターに対しては、培養期間中、無菌フィルターを介して約 250 ml min^{-1} となるよう通気した。

(3) 大型培養槽スケール

培養に用いた大型培養槽(縦約 700 mm、直径約 1000 mm)の全容積は、約 500 l である。垂直方向に比して水平方向に長い形状をしており、底部には直径約 30 cm の円盤型の多孔質フィルターをスパージャーとして固定した。この培養槽は、内部に培養物が絡み付いたり滞留したりする場所がないこと、エアーレーション時スパージャーから細胞が面で供給されること、および、光照射が可能であることといった特徴を有している。STEP 2 用培地を培養槽に入れ、ジャケット内および培養槽内に直接に蒸気を吹込み、120°C、1.2 気圧を 30 分間保って殺菌した。殺菌操作後の培地量は 300 l となるようにした。あらかじめ液体振盪培養によって増殖させておいた苗条原基約 3 kg(新鮮重)を培養槽に移植して培養を開始した。移植後は、培養槽上面から 4 灯のメタルハライドランプを用いて光照射(16 時間日長)した。このメタルハライドランプ 1 灯の直下における光量を測定した結果、約 50 W m^{-2} であった。培養中、培養温度 25°C、通気量 15 l min^{-1} を保った。なお、培地調整および培地殺菌操作中は、攪拌翼 2 枚によって攪拌を行ったが、培養中には、攪拌操作は行わなかった。

実験結果および考察

1. 苗条原基を経由する培養系の確立

大型培養槽へのスケールアップを想定した多芽体の大量増殖系として、苗条原基の増殖段階(STEP 1)と苗条原基からの多芽体の誘導・増殖段階(STEP 2)からなる 2 段階の培養系の構築を行った。

Fig. 1 Shoot primordium of *Stevia rebaudiana*.

Fig. 2 Growth of shoot primordia of *Stevia rebaudiana* in liquid shake culture. 10 g l^{-1} primordia were inoculated and cultured for 1 month.

Fig. 3 Multiple shoots of *Stevia rebaudiana* induced on the primordia.

(1) STEP 1

ステビアについては、液体振盪培養された細胞からの再分化⁴⁾や苗条原基の誘導など^{5,6)}についてすでに報告がある。これらの報告をもとに、予備実験として、ステビアの葉や茎切片を様々な濃度の NAA と BA を含む MS 固形培地(シュクロース 30 g l^{-1} を含み、ゲルライト 2 g l^{-1} で固化したもの)上に移植して培養し、ホルモン条件を絞り込んだ。次に、この固形培地による検討結果をもとに、液体振盪培養における基本培地組成やホルモン濃度に対する反応をみた。結果、窒素成分を $1/2$ 量に改変し、シュクロース濃度を 30 g l^{-1} とした MS 培地を基本培地とし、これに NAA 0.1 ppm , BA 1 ppm を添加したときステビア植物体の脇芽部分から、苗条原基様組織塊が誘導された。この組織塊は、固いカルス状の組織表面に多数の突起を有し、これらの突起部分ですでに分化が起こっているものと考えられた(Fig. 1)。組織塊からは、この突起部分を中心として、後に培養条件を変更することによって、植物体が高頻度で誘導され、これらの特徴から、この組織はいわゆる苗条原基と考えられた。

このようにして誘導された苗条原基は、その形状と植物体誘導能を維持しながら、同一の培地中で継代維持する事ができた。また、苗条原基は、移植操作中や培養中に碎けても影響なく増殖した。Fig. 2 には、1 か月毎に苗条原基を 10 g l^{-1} (新鮮重あたり)となるように移植することを繰

Fig. 4 Growth of multiple shoots of *Stevia rebaudiana* in liquid shake culture. 10 g l^{-1} primordia were inoculated and cultured in the step 2 medium containing 30 g l^{-1} sucrose for 1 month.

Fig. 5 Schematic diagram of culture method for mass propagation of *Stevia rebaudiana* starting from the shoot primordium.

り返した場合の増殖を示した。苗条原基は、1か月の培養でおおむね7倍の倍率(新鮮重換算)で安定して増殖することがわかった。

(2) STEP 2

次に、苗条原基から多芽体を誘導・伸長させるのに適した培養条件について検討した。結果、多芽体誘導は、ホルモンフリー条件に移すことで良好に起こること、および、多芽体の生育には、培地中のシュクロース量および窒素量が大きな影響を与えることが明らかとなった。一連の検討から、苗条原基からの多芽体の誘導には、窒素成分を1/2量に改変し、シュクロースを 10 g l^{-1} または 30 g l^{-1} としたホルモンフリーのMS培地が適しているものと考えられた。

多芽体の誘導と生育は非常に良好であった(Fig. 3)。苗条原基は、移植等の操作中に碎けても、影響なく多芽体を誘導した。また、Fig. 4には、苗条原基の各継代時に苗条原基 10 g l^{-1} (新鮮重あたり) をとり、STEP 2 培養条件に移して培養した場合の多芽体の生育量を示した。シュクロース濃度は、 30 g l^{-1} とした。増殖量は、光条件に関わりなく、1か月あたり約20倍(新鮮重換算)と考えられたが、暗条件下では乾物率が減少する傾向がみられた。また、STEP 2 のシュ

ークロース濃度を 10 g l^{-1} とした場合には、約 180 g l^{-1} の多芽体を得られた。すなわち、液体振盪培養の場合には、シュークロース濃度を 30 g l^{-1} に高めた場合で、培地あたり生育量が若干増大した。しかし、後に行ったジャーファーマンターによる培養の際には、シュークロース濃度を 10 g l^{-1} とした方が明らかに生育が良かった。その原因については不明であるが、このことから、ジャーファーマンタースケール以上の多芽体誘導・増殖には、シュークロース濃度を 10 g l^{-1} とするものとした。

以上の結果から、大型培養槽による多芽体の大量培養に好適と思われる、苗条原基を用いた培養系が、ステビアを材料として確立された (Fig. 5)。すなわち、苗条原基を大量培養しておき、これを大型培養槽に移植してさらに培養して多芽体を得る培養法が考えられた。また、本培養系では、少なくとも増殖量には光があまり影響を与えないことから、増殖量のみに着目すれば、培養槽内への光照射効率を問題とせず、以降の大型培養槽を用いた場合の増殖効率の変化に関する検討が可能と考えられた。

2. 小型ジャーファーマンターにおける多芽体増殖

小型ジャーファーマンターに、STEP 1 によって得られた苗条原基を移植し、多芽体の誘導を試みた結果、フラスコを用いた場合と同様に良好な多芽体の増殖が確認された。培養終了時、ジャーファーマンター内は、多芽体で満たされた状態であった (Fig. 6)。

培養開始時の移植量と培養 1 か月後の増殖量との関係を調べた結果を、Fig. 7 に示した。移植量の多少は、最終の生育量には大きな影響を与えず、 1 g l^{-1} の苗条原基を移植した場合でも、それ以上の苗条原基を移植した場合とほとんど変わらない量の多芽体を得られることがわかった。このことによって、少量の移植材料からも効率良く多芽体を得られる本増殖系の有用性が、小型ジャーファーマンターレベルでも確認されたものと考えられた。

Fig. 6 Growth of multiple shoots of *Stevia rebaudiana* in the jar fermentor.
(a) jar fermentor (I. D.=16 cm) filled with multiple shoots.
(b) multiple shoots taken out from a jar fermentor.

Fig. 7 Relationship between the inoculated weight of the shoot primordia and the final weight of the multiple shoots in the jar fermentor culture. 5 l medium for step 2 containing 10 g l^{-1} sucrose was put in the jar fermentor and used. The culture period was 1 month.

Fig. 8 Growth of multiple shoots of *Stevia rebaudiana* in the 500 l scale bioreactor. The culture period was 1 month.

仮にスケールアップ中にも増殖効率が変化しなければ、本実験の結果は、1 トンの培地あたり約 1 kg の苗条原基の移植で、培養槽を満たすまでの多芽体の増殖が期待されることを意味するものであり、本培養系が、大型培養槽を用いた多芽体の大量増殖系に適していることを強く示唆しているものと考えられた。そこで、さらに大型の培養槽を用い、培地あたり移植量を一定にした場合の、スケールアップ中の増殖効率の変化を観察した。

3. 大型培養槽における多芽体増殖

500 l 容の大型培養槽を用い、培地量 300 l に対して約 10 g l^{-1} となるように苗条原基を移植して培養した結果、培養開始 1 か月で、多芽体が培養槽内を満たすまでに増殖した (Fig. 8)。本培養では、上面のみから光照射したため、光強度に応じて多芽体の形状に著しい差が認められた (Fig. 9)。すなわち、培養槽の底部に近づくにつれて、徒長し黄化した植物体が得られた。より均一な多芽体を大量生産するために、将来、大型培養槽内の各部分に平均的に光照射することが可能なシステムを開発する必要があるものと考えられた。

培養中、攪拌を行わなかったにもかかわらず、培養槽内には均一に多芽体が分布した。また、培養槽内に褐変・枯死した個体は見られず、このことは、培養槽内が多芽体で満たされていたにもかかわらず、溶存酸素や基質が欠乏するような部分が培養槽内に存在しなかったことを示唆してい

Fig. 9 Plants cultured at different area in the 500 l scale bioreactor.

The number indicates the distance from the surface area; No.1 indicates the surface area and No.4 indicates the bottom area in the bioreactor.

Table 1 The effect of scale up on the growth of multiple shoots of *Stevia rebaudiana*

Culture vessel	Medium volume (l)	Total weight of multiple shoots (FW g/culture)	Growth per medium volume (FW g/l)	DW/FW (%)
flask	0.2	35.7	179	3.7
jar fermentor	5	8.8×10^2	175	3.3
bioreactor	300	4.8×10^4	160	3.5

る。これは、多芽体による溶存酸素消費量が比較的少ないこと、および、多芽体が互いに絡まり合っても、各個体間には、培地が移動するのに適当な空間が確保されていたためと考えられる。しかし、多芽体が非常に高密度に存在し、培養槽内の一部分で多芽体が褐変・枯死する場合があることも、異なる形状の培養槽を用いた培養では観察されており、今後、効率的な多芽体の増殖を行うためには、多芽体の適当な培養密度を明らかにし、また、培養密度を制御する方法を開発する必要がある。

Table 1 には、フラスコスケールから大型培養槽にいたるまでの、培養効率(培地あたりの生育量)を示した。培養効率は、スケールアップに伴ってやや減少する傾向にあったが、おおむね一定の値を示した。この結果は、本培養系を用いて、培養スケールに関わりなく多芽体がほぼ一定の効率で得られること、すなわち、多芽体の増殖がさらに大スケールでも効率よく行われることを示唆するものである。

本研究においては、苗条原基のような植物体誘導効率の高い培養系を使用することによって、多芽体大量培養が大型培養槽を用いて可能であること、および、少なくとも苗条原基を利用した場合には、小型培養槽での結果から予想された増殖効率が大型培養槽でも得られることが実証できた。本報のような、大型培養槽に移植したのちにも増殖効率が高い培養系については、すでに中園によって、不定胚増殖系を用いたイネの大量培養の例が紹介されており^{7,8)}、彼らによる、さらに大型の培養槽での増殖結果の報告が期待される。今後は、さらに実プラントにより近い大型の培養槽を用いて、培養効率の変化について検討する一方で、スケールアップに伴う他の問題、例えば、培養槽内を培養物が流動しないような場合にも槽内に平均的にかつ効率良く光照射できるシステムや、培養槽から大量の培養物を傷つけることなく効率良く取り出す技術などの開発を

行う必要があろう。

参 考 文 献

- 1) Wilson, P. D. G., M. G. Hilton, P. T. H. Meehan, C. R. Waspe, M. J. C. Rhodes: The cultivation of transformed roots from laboratory to pilot plant., In: Nijkamp, H. J. J. *et al.* (Eds), Progress in plant cellular and molecular biology, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 700~705 (1990)
- 2) Hagimori, M., T. Matsumoto and Y. Mikami: Jar fermentor culture of shoot-forming culture of *Digitalis purpurea* L. using a revised medium. Agric. Biol. Chem., 48: 965~970 (1984)
- 3) Murashige, T. and F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant., 15: 473~497 (1962).
- 4) Ferreira, C. M. and W. Handro: Production, maintenance and plant regeneration from cell suspension cultures of *Stevia rebaudiana* (Bert) Berton. Plant Cell Report, 7: 123~126 (1988)
- 5) Ferreira, C. M. and W. Handro: Micropropagation of *Stevia rebaudiana* through leaf explants from adult plants. Planta medica, 54: 157~160 (1988)
- 6) Miyagawa, H., N. Fujioka, H. Kohda, K. Yamasaki, K. Taniguchi and R. Tanaka: Studies on the tissue culture of *Stevia rebaudiana* and its components; (II) Induction of shoot primordia. Planta Medica, 52: 321~323 (1986)
- 7) 中園敦之: イネバイオ苗大量生産システムの開発, 組織培養, 18: 489~493 (1992)
- 8) 中園敦之: タンク培養によるイネクローン苗工場生産システムの開発, 「植物種苗の工場生産と利用」, 第3回 SHITA シンポジウム講演予稿集, p. 71~78 (1992)

~~~~~ 書 評 ~~~~~

パソコンによる

「カルマン・ニューロコンピューティング」

著 者: 村瀬治比古

体 裁: A 5 判 175 pp. フロッピーディスク

小山 修平

(3.5 インチ 2 HD) 付き

石田 良平

定 価: 9,270 円

発行所: 森北出版株式会社

本書は、農学研究者と工学研究者により執筆されたニューロ学習法とニューロ応用の解説書である。特に、アルゴリズムを理解する上で大変役に立つソースプログラムが付録となっている。

ニューロ学習アルゴリズムで最も多用されているものはルーメルハートらによって考案された PDP 理論に基づく誤差逆伝播法(バックプロパゲーション法, BP 法)である。しかし, その BP 法にも局所解の問題など多くの課題があることはよく知られているものの BP 法に代わるニューロ学習アルゴリズムについては限られた研究にとどまっていた。

その様な状況の中で実際のニューロ応用に関わる研究現場から生まれたもう一つのニューロ学習アルゴリズムについてまとめたものが本書である。著者らの日頃の研究の中かはそのパイプロダクトとして生まれたニューロ学習アルゴリズムであることから各章の参考文献にも見られるように応用面での実績を伴っていることも注目したい。

本書の構成は 6 章から成り立っている。各章は次のようになっている。

第 1 章: ニューラルネットワークと学習

第 2 章: カルマンニューロトレーニング(KNT)法と BP 法の比較

第 3 章: KNT 法による学習と基本プログラミング

第 4 章: ノイズ入力とニューロ学習

第 5 章: KNT 法による階層型ニューラルネットワークの応用

第 6 章: 遺伝的アルゴリズムと KNT 法の比較

(p. 141 へ続く)