クキタチナの試験管内大量迅速育苗の簡易化と生産費 シミュレーションによる技術改良の方向について

奥野耕太郎・松本孝一*・久島 繁**

筑波大学大学院環境科学研究科 305 つくば市天王台 1-1-1

*筑波大学大学院バイオシステム研究科 305 つくば市天王台 1-1-1

**筑波大学応用生物化学系 305 つくば市天王台 1-1-1

A Trial of Improvement of Micropropagation of *Brassica campestris* cv. Kukitachina by Cost Simulation

Kotaro OKUNO, Koichi MATSUMOTO* and Shigeru HISAJIMA**

Graduate School of Environmental Science, University of Tsukuba, Ibaraki 305 Japan

*Graduate School of Biosystem Studies, University of Tsukuba, Ibaraki 305 Japan

**Institute of Applied Biochemistry, University of Tsukuba, Ibaraki 305 Japan

Abstract

The previously described cost simulation model was used to improve micro-propagation of *Brassica campestris* cv. Kukitachina *in vitro*. The simulation was based on data obtained from different practical experiments including the use of simple medium and food containers, rooting from excised single shoots and acclimatization at a time, and so on.

There was no significant difference between the effect of Otsuka hydroponic culture nutrient or Hyponex with additives and the modified Murashige and Skoog's medium on successive shoot multiplication. Also the reagent grade sucrose could be replaced with table sugar, granular sugar or reagent grade glucose without adverse effect on the successive shoot multiplication. The above results suggested that cheap carbon sources could be successfully used in micropropagation. Also in comparison with culture bottles, food containers were equally effective for successive shoot multiplication. The shoots multiplied three times every 20 days. Rooting from excised shoots and acclimatization of *in vitro* plants were possible in nursery boxes and seventy per cent of regenerants were successfully planted out.

The production cost of *in vitro* plants at 10,000 level production, using the above modified procedure was calculated to be 61.0 yen per plant. This represents a 39% cost reduction when compared with the previously described laboratory procedure. Improvement of micropropagation by simulation of production cost was discussed.

緒 言

我々は植物組織培養技術を地方振興に生かす方策^{1,2)}あるいは地方振興を通じて日本の自然環

1996年6月18日受付

1996年9月4日受理

境保全の一助とする方策を考えてきた^{1,2)}。その際、技術の簡易化、適正技術化とともに生産費の推定が技術導入に踏切るために重要な条件と考えられた。恐らく、企業は生産費計算について何等かの方法を持っているのであろう。しかし、この経済計算/生産費に関する報告は少ない^{3,4)}。生産費計算のモデルが出来れば、技術適正化ないし簡易化の方向も見えてくるのではないかと推定される。我々は、詳細な経済計算のモデルより、まず、小規模生産者が必要とするような簡易なモデル計算を試みた^{4,5)}。

前報でクキタチナ (*Brassica campestris* cv. Kukitachina) をモデルに実験室手法による試験管内大量迅速育苗法の確立⁵⁾、生産費シミュレーションによる生産方法の改良方向の推定を行った。本報告では、前述のシミュレーションにより推定された簡易化あるいは生産費低減の方向を実験的に検討し、それに基づき生産費計算法を作成し、その生産費シミュレーションにより生産方法の改善の方向の推定を試みた。

材料および方法

1. 供試材料

前報の方法により benzyl amino purine (BAP) 5 μ M を添加した改良 Murashige & Skoog 培地 (MMS 培地) 上で連続増殖させたクキタチナの 1.5~2 cm の側芽を実験に供した⁵⁾。

2. 培養容器と簡易減菌

特記しない限り、培養にはポリプロピレン製食品コンテナ (130×145×90 mm) を用いた。簡易無機培地の利用および簡易炭素源の利用を検討する実験では、既報と同様に培養ガラス瓶を用いた⁵⁾。食品コンテナは中性洗剤を用いて水洗後、10% 塩化ベンザルコニウム液の 100 倍液に一晩浸漬した。水道水ですすいだ後、10 W の紫外線ランプの点灯した無菌箱内に移し、容器および蓋の内側に紫外線を 45 分間照射した後、蓋をした²⁾。

3. 培養方法

特記しない限り、大塚液肥 (大塚製薬、徳島)²⁾ にアンモニア態窒素、鉄および微量元素を補った基本培地として用いた (Table 1)。ショ糖 3%、寒天 0.8% および BAP 5 μ M を添加した上記の培地 250 ml を含む食品用コンテナに 25 の側芽を置床し 20 日間培養した。培養ガラス瓶を用いる場合、40 ml の MMS 培地を含む培地に 4 個の側芽を置床した。特記する以外、培養方法は前報に準じた⁵⁾。

4. 発根と順化

300×400×50 mm の底が網目のプラスチック製育苗箱に古新聞を敷き、ここへ川砂を底から 2 cm の深さに敷きつめ、大塚液肥または水道水約 1.5 l を加えた。培養ガラス瓶の中で増殖したシュートの中から長さ 2~4 cm のシュートを切り出し、20 ずつ準備した育苗箱に芽挿しした。サランラップ (旭化成工業、東京) で覆いをして、四隅をビニールテープで固定した。挿し芽の終わった育苗箱は風雨および直射日光のあたらない場所に移して 1 週間放置した。さらに 1 週間かけて少しずつラップを開放し、処理開始から 2 週間後に全開とした。

5. 試験管苗生産費計算は既報に準じて行った⁴⁾。本報告では、既報の実験室的手法⁵⁾とは異なり、食品コンテナを用い、育苗箱による発根と順化の同時処理を行ったので、既報の試験管苗生産費計算式中の一部を下記のごとく変更した。既報計算式中の変数に小文字 a を付し、本報告の計算式では変数に小文字 b を付して区別した。

Table 1 Effect of different media on lateral shoot proliferation of *B. campestris*

	average length (cm)	shoot with M. S. (%)	multiplication of shoots	leaf color
MMS medium	3.2	78	3.0	++++
MMS (only mineral)	2.9	96	3.0	++++
OHCN	2.3	70	2.3	++
CHCN+NH ₄	2.6	75	2.4	+++
OHCN+Fe	3.0	71	2.6	+++
OHCN+Kh	2.2	64	2.5	+
OHCN+NH ₄ +Kh	3.2	67	2.4	++
OHCN+Fe+Kh	2.8	82	2.6	++
OHCN+NH ₄ +Fe	2.9	59	2.2	++++
OHCN+NH ₄ +Fe+Kh	2.9	88	3.4	++++
Hyponex	2.6	94	3.1	+++
Hyponex+NH ₄	2.8	88	3.2	++++
Hyponex+Fe	2.7	83	2.7	+++
Hyponex+Kh	3.0	78	2.9	++
Hyponex+NH ₄ +Fe	2.0	86	3.4	++++
Hyponex+NH ₄ +Fe+Kh	2.8	67	2.6	++++

NH₄: NH₄Cl 1030 mg/lFe: FeSO₄·7H₂O 14 mg/l, Na₂·EDTA 18.7 mg/lKh: MnSO₄·4H₂O 35.8 mg/l, ZnSO₄·7H₂O 21 mg/l, H₃BO₃ 12.4 mg, KI 16.6 mg,CuSO₄·5H₂O 0.05 mg/l, Na₂MoO₄·2H₂O 0.5 mg/l, CoCl₂·6H₂O 0.05 mg/l

OHCN: Otsuka Hydroponic Culture Nutrient

M. S.: multiple shoots

Color +: weak ~++++: strong

Lateral buds were cultured in the above different media containing 3% sucrose and 0.8% agar under 3,000 Lx (16h light and 8h dark) at 27°C for 20 days⁵⁾.

〈最終培養容器数，総使用容器数および総培地量〉

最終培養容器数：Bb(個) = $A/i = a \times r^{n-1} / (i \times r)$ 最大必要数：Cb(個) = $Bb \times (1 + 1/r) = a \times r^{n-2} (1 + r) / (i \times r)$ 総使用容器数：Eb(個) = $Sn/i = a \times (r^n - 1) / (i \times (r - 1))$ 総培地量：Mb(ℓ) = $m \times Eb = m \times a \times (r^n - 1) / (i \times (r - 1))$

〈最大培養棚段数と延べ使用棚段数〉

最大棚段数：Fb(段) = $b \times Bb / 4500 = b \times a \times r^n / (i \times 4500)$ 食品コンテナの専有面積は 187 cm² である。延べ使用棚段数：Gb(段・日) = $\{4 + (b \times Eb / 4500)\} \times d$
 $= \{4 + b \times a \times (r^n - 1)\} / (i \times (r - 1) \times 4500) \times d$

〈最大蛍光灯数と延べ点灯時間〉

最大蛍光灯数：Hb(本) = $2 \times Fb = 2 \times b \times a \times r^n / (i \times 4500)$ 蛍光灯延べ点灯時間：Tb(本・時間) = $2 \times 16 \times Gb$
 $= 2 \times 16 \times \{4 + b \times a \times (r^n - 1)\} / (i \times (r - 1) \times 4500) \times d$

A：最終的なシュートの培養本数，i：1 容器当たりの側芽の置床本数，a：初代培養時の置床シュート数，r：側芽の増加率(倍)，n：継代回数，Sn：側芽の総切出し本数，m：1 容器当たり培地の分注量(ℓ)，b：1 培養容器当たりの専有面積(cm²)，d：継代間隔(日)

なお，電気費用 2(エアコン用電力)(円)の計算式中，発根を苗箱で行う場合，培養日数(D1)の代りに培養日数 D1+ 伸長日数 D4 を用いた。

結 果

1. 種々の無機培地が培養体の生長に与える影響

MMS 培地²⁾に代る簡易培地の利用を検討した(Table 1)。MMS 培地と有機成分を除いた MMS 培地で培養した側芽の生長には大きな差異は認められなかった。MMS 培地と大塚液肥培地に置床した側芽を比較すると、シュート長、発生側芽数には大きな差異は認められなかった。しかし、展開した葉の緑色は大塚液肥に置床したもののほうが MMS 培地に置床したものに比べ薄くなった。また新しく発生した側芽は MMS 培地に比べ葉身が小さく、葉柄も細くなり全体に伸長が劣った。大塚液肥に微量要素を補った培地に置床した側芽は MMS 培地上での生育と同様に新しい側芽を発生した。しかし、葉色は大塚液肥単独に比べて一段と薄くなり、ほとんど白色化してしまう個体もあった。大塚液肥にアンモニア態窒素および鉄を補った培地に置床した側芽は、大塚液肥単独のものに比べて濃い葉色を示したものの、MMS 培地のものと同様の葉色にはならなかった。また新しく発生した側芽の展開も MMS 培地のものに比べ劣った。大塚液肥にアンモニア態窒素、鉄、微量要素を補った培地に置床した側芽は MMS 培地のものと同様な葉色および側芽の形態と伸長を示した。0.3% ハイポネックス培地(村上物産、東京)²⁾に置床した側芽は、MMS 培地に置床した側芽に比べ葉色は劣ったものの、シュート長、新しい側芽の発生数、形態および伸長については大きな差異は認められなかった。ハイポネックス液肥に微量要素を補うと、側芽の葉色が一層薄くなった。ハイポネックス液肥にアンモニア態窒素を補った培地に置床した側芽は葉色の回復が認められた。また鉄を補った培地に置床したものは葉色の回復が認められた。アンモニア態窒素と鉄の両方を補った培地に置床した側芽は MMS 培地と同様の葉色および生長を示した。

2. 種々の炭素源が培養体の生長に与える影響

グラニュー糖、白砂糖あるいは1級ブドウ糖を炭素源にすると外植体の生育と増殖は1級ショ糖を炭素源とした場合に比して差異はなかった(Table 2)。澱粉を用いると、1級ショ糖を用いた場合に比べて葉色が薄くなり、生育が著しく劣り、新しい側芽の発生数も少なかった。

3. 培養容器の大型化の検討

食品コンテナ内で培養した側芽は、平均シュート長 3.0~3.4 cm、側芽発生個体率 98~100%、平均側芽増加率 3.0~3.2 倍となり、培養ガラス瓶で培養した場合と比べて大きな差異は認められなかった。

Table 2 Effect of carbohydrate on proliferation of lateral shoots

	Average length	Shoots with multiple shoots	Multiplication of lateral shoots
Chemical grade sucrose	2.6 cm	84%	2.8 times
Glanular sugar	2.6	86	2.9
Table sugar	2.7	82	3.1
Chemical grade glucose	2.6	60	2.2
Chemical grade starch	2.1	68	2.3

The experimental conditions were the same as employed in Table 1 except MMS medium contains 3% different sugars.

Table 3 Combination of rooting and acclimatization of *B. campestris* shoots in nursery tray

Shoot length	medium	replication	rate of acclimatization	Maximum root length	Average number of roots
2~4 cm	OHCN	20	70%	3.1 cm	2.0
2~4 cm	tap water	20	70	2.4	3.5

Shoots were cultured in vermiculite bed of containers wetted with Otsuka Hydoroponic Culture Nutrient. The containers were covered with wrapping film for a week. Plants were occasionally exposed to air and kept for 14 days then planted out.

4. 発根と順化の同時処理の検討

長さ 2~4 cm のシュートに大塚液肥を与え発根と順化の同時処理をすると、70% の挿し芽が発根し、処理後も順調に生育して移植用の苗となった。発根した個体についての平均根数は 2.0 本、平均最大根長は 3.1 cm であった (Table 3)。2 週間の処理期間中に下葉が枯れるものも認められたが、発根した個体はラップを取り除いた後、新しい葉を次々と展開した。また水道水を与えた場合でも、70% の挿し芽が発根し、処理後も大塚液肥を与えると順調に生育した。

5. 生産費に影響を及ぼす因子

順化後の土壌移植苗 1 本の生産費に影響を及ぼす因子を生産費計算式を用いて、既報と同様に⁵⁾簡易なシミュレーションにより検討した。

1) 生産本数の影響：生産本数を 110, 1101, 3303, 5126, 11060, 111101 本と変化させると、1 本当たり生産費は 954.2, 162.5, 90.0, 76.1, 61.0, 56.7 円と変化した (Table 4)。

2) 鉢上げの影響：鉢上げ率が実験値 70% から 63%, あるいは 77% と 10% 上下に変動すると、本当たり生産費は 61.0 円からそれぞれ 66.2 円 (8.59% 増加) あるいは 56.7 円 (7% 減少) となった。

3) 初代シュート数の影響：初代シュート数を 1, 4, 16, 64 と変化させると、1 本当たり生産費はそれぞれ 61.0 円, 58.9 円 (3.5% 減少), 56.7 円 (7% 減少), 53.0 円 (14% 減少) と変化した。

4) 増殖率の影響：シュートの連続増殖率が実験値 3 から 2.7, 3.3 と 1 割上下に変動すると、1 本当たり生産費は 61.0 円からそれぞれ 67.3 円 (10% 増加), 56.6 円 (7% 減少) となった。

5) 植込み本数の影響：容器当たりの植込み数が実験値 25 から 22, 28 と変動すると、1 本当たり生産費は 61.0 円からそれぞれ 62.7 円 (3% 増加), 59.5 円 (2.5% 減少) となった。

6) 容器の価格の影響：現在の容器の購入単価 400 円から 300 円, 200 円と変動すると、1 本当たり生産費は 61.0 円からそれぞれ 59.7 円 (2% 減少), 58.4 円 (4% 減少) となった。

7) 移植速度の影響：外植体の移植速度を 60 から 90 および 120 外植体/時間とすると、1 本当たり生産費は 61.0 円から 51.1 円 (16% 減少) および 46.5 円 (24% 減少) となった。単位時間生産苗数 (労働生産性) もそれぞれ 23.2 本/時間から 32.3 本/時間, 39.8 本/時間に上昇した。

8) 総合的に、鉢上げ率 70%, 初代シュート数 1, 培養容器 (食品用コンテナ) 価格 400 円, 移植速度 60 外植体/時間から鉢上げ率 77%, 初代シュート数 16, 培養容器 300 円, 移植速度 90 外植体/時間に变化すると、1 本当たり生産費は 61.0 円から 42.8 円 (30% 減少) となった。培養日数は 176 日から 122 日と 54 日減少した。

Table 4 Effect of number of plantlets on production cost

	depreciation 1,	depreciation 2,	supplies,	labour,	water and enargy,	total cost
case 1: 110 plantlet production						
cost	54,304.3	1,292.8	240.9	4,996.0	44,119.9	104,953.9
ratio %	51.7	1.2	0.2	4.8	42	100
cost/plant	493.7	11.8	2.2	45.4	401.1	954.2
case 2: 1101 plantlet production						
cost	72,264.1	5,859.7	2,083.9	39,082.4	59,674.2	178,964.3
ratio %	40.4	3.3	1.2	21.8	33.3	100
cost/plant	65.5	5.3	1.9	35.5	54.2	162.5
case 3: 3303 plantlet production						
cost	80,816.5	19,995.2	6,213.4	114,824.0	74,971.8	296,820.9
ratio %	27.2	6.7	2.1	38.7	25.3	100
cost/plant	24.5	6.1	1.9	34.8	22.7	90.0
case 4: 5126 plantlet production						
cost	84,237.4	33,207.2	9,625.1	177,513.6	85,795.4	390,378.7
ratio %	21.6	8.5	2.5	45.5	22.0	100
cost/plant	16.4	6.5	1.9	34.6	16.7	76.1
case 5: 11060 plantlet production						
cost	90,224.0	73,965.3	20,721.7	381,588.8	107,428.0	673,927.8
ratio %	13.4	11.0	3.1	56.6	15.9	100
cost/plant	8.2	6.7	1.9	34.5	9.7	61.0
case 6: 111101 plantlet production						
cost	108,184.1	903,715.2	208,183.4	3,822,347.2	444,214.4	5,486,644.3
ratio %	2.0	16.5	3.8	69.7	8.1	100
cost/plant	1.0	8.1	1.9	34.4	4.0	49.4

* cost: yen, cost/piece: yen per plant

Cost was analyzed according to the procedure mentioned previously with some modification in the materials and method⁹⁾.

考 察

組織培養苗生産の低コスト化を図る方策として、これまでジャーファーマンターを利用したタンク培養法の開発、移植用ロボットの開発、自動順化装置の開発など、培養操作の機械化、自動化を進める研究が行われてきた⁶⁻¹⁰⁾。しかし、これらの技術の導入には高価な設備が必要と考えられ、資金力の小さな経営体が最初から採用できる方策とは考えにくい。本研究は大規模な商業的種苗生産ではなく、投資力の小さい小規模経営体を念頭に置いているため、設備投資によらない作業能率の合理化、および設備、資材の低減の方向性に沿って検討を進めることとした。前報の実験室的手法による試験管内大量迅速育苗の実験結果⁵⁾およびそれを基礎にしたシミュレーションから示唆された簡易化と低コスト化の方策を検討した。すなわち、大量迅速育苗工程を①培地作成工程、②容器の滅菌工程、③培養工程、④発根、順化工程に区分し、それぞれについて、液肥・低価格炭素源を使用した簡易培地の利用、乾熱滅菌や高圧蒸気滅菌にかわる簡易殺菌法、作業能率向上のための大型容器(食品コンテナ)の使用、発根と順化の同時処理を検討した。

簡易培地をコスト面から検討した例としては、ハイポネックスの微量要素改良、ハイポネックスの基本培地としての利用等の研究がある^{4,11,12)}。しかし、ブラシカ属についての簡易培地の研究例は見あたらない。大塚液肥およびハイポネックス液肥は単独ではMMS培地と同等の生育効果は得られなかった。しかし、窒素および微量成分等を添加すると側芽の連続培養にMMS培地と同等の効果が認められた(Table 1)。市販液肥に数種の成分を添加して、省力的にかつ安

価な培地を作り得ることが分った²⁾。

また、大塚液肥の1ℓ当たりの価格は約1円となり、アンモニア態窒素、鉄、微量元素の価格を加えても約4円である⁴⁾。また0.3%ハイポネックス溶液は6円/ℓで、アンモニア態窒素を添加すると約8円/ℓとなる。一方、1級試薬を使ったMMS培地(無機成分のみ)の1ℓ当たりの価格はおよそ9円となり、大量の培地を作成する場合には大塚液肥の利用が経済的および労力的に有利と考えられた²⁾。消耗品費の苗生産費に占める割合は数%と低く、消耗品費に占める無機培地の費用の占める割合は20%以下であった。

通常ショ糖が植物組織培養の炭素源として用いられている。他の糖の炭素源としての有効性は報告されている。しかし、培地に添加した糖類の培養体内での代謝機構についての研究は限られており、ショ糖、グルコース、フルクトースを除いては、理論的に利用できる糖を推定しにくい¹³⁻¹⁶⁾。一方、商業用の培養苗生産で低価格炭素源グラニュー糖の利用が進んでいる。本研究ではクキタチナの側芽の大量増殖に対する低価格炭素源の利用の可否を検討した。グラニュー糖、白砂糖、ブドウ糖は1級ショ糖とほとんどかわらない効果を示し、十分に利用可能と考えられる(Table 2)。グラニュー糖および白砂糖の化学的成分はショ糖であり、試薬ほどの純度を生物は要求しないのであろう。アサガオ培養細胞では、培地のショ糖が細胞壁インペルターゼによる水解後、生成した還元糖の一部は取り込まれ、一部が培地に放出され、その際グルコースがフルクトースより優先的に取り込まれ消費されると示唆されている^{13,14,17)}。この知見は全ての植物種に共通かどうか不明であるが、多くの種で可能性があると考えられ、多くの種の組織培養にグルコースがショ糖と同様の効果を持つと推測される。価格によっては工業用のブドウ糖あるいはブドウ糖果糖液(液糖)の利用も期待でき、炭素源の原価を低下させる可能性がある。

1級ショ糖に代えて澱粉を用いると側芽の生育が明らかに劣り、澱粉の利用は難しいと考えられた(Table 2)。アサガオ培養細胞を可溶性澱粉を含む培地で液内培養し、培養残さをペーパークロマトグラフィーで分析すると多種類の水解還元糖が検出される(未発表)。同時に α -アミラーゼ活性が見られ、ヨード澱粉反応はネガティブになった(未発表)。澱粉は α -アミラーゼで水解後細胞に取り込まれることが推測できる。このことから、炭素源としての澱粉の分解と利用の速度および効率が外植体の生育と増殖に影響すると推測できる。この代謝機構から推定すれば多くの種で、澱粉は効率の悪い炭素源といえるであろう。

MMS培地にショ糖と寒天あるいはゲランガムの価格を加えた培地費用を計算してみると、資材費の約6~8割は寒天またはゲランガムの費用である²⁾。培地の低コスト化を進める上で、安価な固化剤の開発が期待される一方、固化剤のかわりに繰り返し利用できるパーミキュライト、砂、ロックウール等を支持体とした液体静置培養についても研究が進んでおり¹⁸⁾、今後の検討課題と考えられる。また白砂糖を用いるとその費用は全体の1~2割を占めた。

培養容器の大型化は培地作成、容器の洗浄、培養体の継代等の作業能率を高める。しかし、一方で容器の滅菌や無菌操作が不完全であると雑菌汚染の被害が大きいこと、および容器の形状に適したより大型のオートクレーブが必要になるという欠点がある。従って、培養容器の大型化を考える場合には容器の滅菌方法と合わせた検討が必要である。本研究では培養ガラス瓶にかわる容器として食品用コンテナの利用を試みた。また、微生物学の研究で用いられている簡易滅菌法¹⁹⁾を一部改変して食品コンテナの滅菌に応用した。

容器の形状は培養体の生育に対して影響を与える場合がある。クキタチナ側芽を食品コンテナ

で培養したところ、培養ガラス瓶とほぼ同様な生育と側芽の平均増加率 3.0 を示した。

本実験では、川砂をつめた苗箱をラップで覆って内部を高湿度状態に保つことにより、茎葉の萎凋を防ぎながら切除シュートの発根と順化の同時処理を試みた。2~4cm の長さのシュートの発根・順化率/鉢上げ率は 70% で、大塚液肥を基本培地として培養ガラス瓶内で発根させた場合の 80% よりも劣った (Table 3)。前報によれば、培養瓶内で発根した幼植物は短期間の順化処理でほとんどが土壌への移植が可能な苗に生長した⁵⁾。試験管内での植物体発根および鉢上げ率は生産費に大きく影響する。もし両者を 100% 近くにできれば、その生産費は苗箱での発根と順化の同時処理による試験管苗より生産費が安くなる可能性も考えられよう。

未発根の培養体を培養容器の外で発根させることは、健全で丈夫な根を持つ幼植物が得られることに加えて、煩わしい無菌操作工程を一段階省略することができるので経済的にも有利と推定される²⁰⁾。培養容器の外での発根の困難な植物もあるが、ミスト発根法の利用により、ガーベラおよび多種の観用植物で培養容器の外での発根操作が行われている^{21,22)}。in vitro で増殖したナタネ (*Brassica napus*) の切除シュートがバーミキュライトを支持体として培養容器の外で容易に発根することが報告されている²³⁾。一方、容器内で発根と順化を一貫して行うために容器の通気性を改良した各種のプラントボックスおよびフッ素樹脂フィルムを用いたカルチャーパックの開発も進んでいる^{24,25)}。ただ、植物体再生率および順化率が価格に相応して高くならないと、生産費は上昇すると推測される。これらは定量的な生産費の計算式が出来れば、直ちにシミュレーションによりどちらの生産方法が有利か見当がつくのではないかと考えられる。

以上のようにアンモニア態窒素等を補った大塚液肥培地を含む食品コンテナ中で、クキタチナ側芽は 20 日毎に約 3 倍に増殖させることが可能であった。苗箱を用いての発根と順化の同時処理により再生植物体の 7 割は土壌移植可能であった。この段階でクキタチナの試験管内大量迅速育苗の簡易化と低コスト化が可能と考えられた。

生産費シミュレーションによる生産方式の検討

本実験の諸段階で簡易化が試みられており、この試験管苗生産方法を簡易法と呼称する。既報に準じてこのパターンで生産する試験管苗生産費を計算した^{3,5)}。同時に、生産費に影響を及ぼすいくつかの因子を検討し、最後に今後の生産方法の改良の方向を探った。

生産本数の増加に伴い生産費は減少し、100 本レベルから 1,000 本レベルに増加すると急激に生産費が減少した (Table 4)。一方、3,000、5,000、10,000 本と増えると生産費の減少率は鈍化した。生産本数の増加に伴い、固定経費 2 と労働費の割合が高くなった。小規模経営体が数千本から数万本を生産すると想定して計算式がたてられており、1 万本レベルの生産を想定すると、生産費が 61.0 円/本程度となる。労働費は約 56.6% となり、固定経費 1、固定経費 2、水道光熱費がほぼ 10% 程度、消耗品は 3% 強となった。既報の実験室的手法による生産では固定経費 2 は生産費の約 26%、労働費は約 50.0% となり、生産費の 4 分の 3 を占め、削減の方向性が立てやすいように考えられた⁵⁾。しかし、簡易法では大きく削減に寄与する項目が労働費以外に見受けられず、労働生産性をあげるように建物の構造、シュートの切り分けと移植の迅速化等を含め 5 種の費目について小さな改善を一つ一つ積み重ねて行く必要があるように見受けられる。

また、実験室的手法と簡易法の 1 万本生産レベルでの 1 本あたり経費の絶対金額を比較してみると、固定経費 1 が 13.0 円から 8.2 円に、固定経費 2 が 25.9 円から 6.7 円へ、消耗品費が 2.0

円から 1.9 円へ、労働費が 50.8 円から 34.5 円へ、水道光熱費が 9.6 円から 9.7 円となっている。生産費の減少に容器の大型化による省力化と、発根と順化の同時処理による資材の節減と省力化が大きく貢献している半面、培地等の消耗品費ならびに水道光熱費の削減はほとんどないようである。

今後の改善作業あるいは改善項目を捜すため、生産費計算式中の因子に数値を代入しシミュレーションを系統的に実施した。1 万本レベルの生産を想定して、予備的に検討したところ、生産費の削減に影響を与える因子として、鉢上げ率(ここでは発根順化成功率を意味する)、初代シュート数、増加率(連続シュート増殖率)、外植体の移植速度が見出された。しかし、容器当たり培養体数、容器当たり培地量、容器の大きさ、容器の値段等は 1-2% の影響のみと判明した。次いで、具体的に改善の見込みそうな目標数値を捜し、生産方法の改善方向を探った。

鉢上げ率約 70% は、技術的な習熟で率の向上が見込めると経験的に推測されるところから、改善目標を 77% と想定した。初代シュート数はシュートを確保する手間を考慮しなければ、任意に数量を増やし得る。64 本のシュートを確保するには 20 数瓶の増殖シュートを確保しなければならず、16 本のシュートの確保であれば、6-7 瓶のそれですむ。目標値を生産費の 7% の減少を見込める 16 本と想定した。シュートの連続増殖率の向上は生産費の削減に大きく影響する。しかし、容易に増殖率を向上させられる感触は得られていない。そこで、この値は実測値にとどめた。外植体の移植速度の生産費に対する影響は大きかった。実測値である 1 時間に 60 外植体の移植は移植および培養室への搬出入も含めてゆとりのある数字となっている。この値は若干の個人差の吸収機能も付与して決定されている。メスをハサミに換える等の工夫により数値は変動すると考えられ、1 時間に 90 外植体あるいは 120 外植体の移植は不可能な数値とは見受けられない。そこで、改善目標値を 60 分に 90 個体の移植と想定した。食品用コンテナの購入単価は単品価格の 400 円とした。しかし、数百の単位で購入するのであれば、購入価格は少なくとも 300 円/コンテナに低下すると見積もられる。そこで、4% の生産費の低減が予測される 300 円/コンテナを改善目標値と想定した。

最後に、生産費に影響を与える因子の複合した改善目標の結果、すなわち改善の目標生産費を算出した。鉢上げ率 70%、初代シュート数 1、容器当たり外植体数 25、容器当たり培地量 250 ml、移植速度 60 外植体/時間、食品用コンテナ価格 400 円の数値を、鉢上げ率 77%、初代シュート数 16、容器当たり外植体数 25、容器当たり培地量 250 ml、移植速度 90 外植体/時間、食品用コンテナ価格 300 円に変更して、生産費をシミュレーションすると、生産費は 61.0 円/本から 42.8 円/本、すなわち約 30% の大幅な生産費の削減が予測された。同時に、培養日数は 176 日から 122 日と 54 日減少し、生産回転が早く、施設利用効率が高くなると予測された。

実験室的手法での 10,000 本レベルの試験管苗生産費は 101.3 円/本であり、培養ボトルを食品コンテナに変更するシミュレーションにより 80.1 円/本と 21% の減少が予測された⁵⁾。食品用コンテナの導入と苗箱での発根と順化の同時処理を主体として改善をはかり、今回簡易法を確立すると、生産費は 61 円、すなわち実験室的手法のその約 60% に下がり、シミュレーションされた結果より約 20 円安くなった。更に今後の改善方向を生産費シミュレーションにより探ると 42.8 円/本すなわち、実験室的手法による生産費 101.3 円の約 40% が目標値となると考えられる。今後、この目標値を道標に生産方法の改善をさらに進めたい。

このシリーズの研究で示されたように、実験室的手法によるある植物の大量迅速育苗法の確立、

生産費計算と生産費シミュレーションによる次の段階の改善方法の予測, シミュレーション結果の実験による検証, 検証結果に基づく生産費の計算と生産費シミュレーションにより次の段階の改善の予測を繰り返して改善方向を探る手法は, 生産方法を系統的に改善する助けになる可能性が考えられる。今後, 種々の生産方式別に生産費計算式を立て, 生産費をシミュレーションしながら生産方法の改良とシミュレーションの有効性を検討してみたい。また, 今後, 大規模な組織培養苗の生産費計算方式が必要となると, キノコの大規模生産方式の生産費計算式がこの参考になるものと考えられる²⁶⁾。

引用文献

- 1) 奥野耕太郎・久島 繁・石塚皓造: 地域農業振興への組織培養の利用について1, ハカラシナの実験室的手法による試験管内大量迅速育苗について, 筑波大学農林技術センター研究報告, 7: 7~21(1994)
- 2) 奥野耕太郎・久島 繁・石塚皓造: 地域農業振興への組織培養の利用について2, ハカラシナの実験管内大量迅速育苗系の簡易化について, 筑波大学農林技術センター研究報告, 7: 23~36(1994)
- 3) 水野直美: 植物培養液のコストダウンについて, 育種学会雑誌, 41 別冊 2: 240~241(1991)
- 4) 奥野耕太郎・久島 繁・石塚皓造: 地域農業振興への組織培養の利用について3, 生産コスト解析の例, 筑波大学農林技術センター研究報告, 7: 37~56(1994)
- 5) 久島 繁・奥野耕太郎・石塚皓造: クキタチナ(*Brassica campestris*)の試験管内大量迅速育苗と生産費シミュレーションによる生産法の改良の方向付け, 植物工場学会誌, 7: 191~203(1995)
- 6) 古在豊樹: 植物組織培養と培養容器内環境調節, 化学と生物, 26: 13~119(1988)
- 7) 三輪敬之・山本敏郎・櫛橋康博・児玉啓司: 植物組織培養技術の自動化に関する研究, 精密工学会誌, 54: 1107~1112(1988)
- 8) 長岡正昭・辻 顕光: バイオナーサリーシステムと関連技術開発の現状と展望, SHITA Report, NO.1 種苗工場, 50~55(1991)
- 9) 高山真策: クローン増殖と人工種子, オーム社, 東京 pp 147~164(1989)
- 10) 高山真策: ジャーファーマンターによる種苗大量生産技術, SHITA Report, NO.1 種苗工場, 64~72(1991)
- 11) 水野直美・門馬輝明: ハイポネックス培地の分析と再構成(第1報), 園芸学会雑誌 61 別冊 1: 452~453(1991)
- 12) 門馬輝明・水野直美: ハイポネックス培地の分析と再構成(第2報)園芸学会雑誌 61 別冊 2: 466~467(1992)
- 13) 久島 繁: アサガオカルスにおける投与糖から内生ショ糖への変換, Redioisotopes, 24: 403~409(1975)
- 14) 久島 繁・新井勇治・伊藤達郎: 朝顔カルス細胞の培養に伴う糖含量およびショ糖代謝関連酵素活性の消長, 澱粉科学, 25: 223~228(1978)
- 15) Hisajima, S. and T. Ito: Activity and cellular distribution of disaccharidases in cultured cells of Japanese morning-glory, Agric. Biol. Chem., 47: 107~109(1983)
- 16) Hisajima, S. and T. A. Thorpe: Carbohydrate utilization and activities of various glycosidases in cultured Japanese morning-glory callus. Plant Tissue Culture Letters, 2, 14~21(1985)
- 17) Hisajima, S.: Studies on the sucrose metabolism in callus cells of Japanese morning-glory (*Pharbitis nil* L.), Memoir Tokyo Univ. Agric., 21: 1~55(1979)
- 18) 谷本秀夫・嘉儀 隆: 植物組織培養における各種支持体の影響, 園芸学会雑誌, 60 別冊 1: 426~427(1991)
- 19) 杉村幸子: やさしい微生物学実験, ニューサイエンス社, 14~36(1986)
- 20) Debergh, P. C.: Acclimatization techniques of plants from *in vitro*, Acta Horticulturae, 289: 291~300(1991)
- 21) Huang, M. C and Y. C. Chien: A scheme for commercial multiplication of Gerbera(*Gerbera hybrida* Hort.)through shoot tip culture, J. Japan. Soc. Hort. Sci., 54: 94~100(1985)
- 22) Maene, L. and P. Debergh: Liquid medium addition to established tissue culture to improve

- elongation and rooting in vivo, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 5: 23~33(1985)
- 23) Karthak. K., O. L. Gamborg and F. Constabel: *In vitro* plant formation from stem explants of Rape (*Brassica napus* cv. Zephyr), *Physiol. Plant.*, 31: 217~220(1974)
- 24) 元岡茂治・小西 耕・小西昌子・澤 慶子・佐竹美保・小西国義: 固体支持体を充填したセル型トレー培地によるミヤコワスレの組織培養, *園芸学会雑誌*, 60: 971~979(1992)
- 25) 田中道男・長江嗣郎・深井誠一・五井正憲・彦坂昌俊・新川孝代: フッソ樹脂フィルムの植物組織培養への応用, *園芸学会雑誌*, 61 別冊 2: 502~503(1992)
- 26) 松山正彦・寺沢 泰・沢田恭彦・堀部和雄: ファジィ数を用いた植物生産環境システムの経済性分析(第1報)一きのこ工場の設備投資と費用計算一, *植物工場学会誌*, 8: 89~98(1996)
- 27) 川村泰史・久島 繁・植物組織培養の生産コストシミュレーションによる技術改良の方向付けー山菜シオデを例にー, *筑波大学農林技術センター研究報告*, 9: 47~62(1996)