

タバコ植物細胞の大量培養

畦地 昭二*

(1984年6月22日受理)

1. はじめに

昭和48年度のはじめ, タバコ植物細胞を工業規模培養するためのテストプラントの設計に着手, 同49年度末完成した¹⁾. 選抜育成の成果として, *Nicotiana tabacum* L. cv. Bright Yellow-2 から誘導された培養細胞株 BY-2 は, 液内培養時の分散性にすぐれ, 植物細胞としては増殖速度も大きく, 大量培養に必要な条件を備えていた²⁾.

小型の培養槽試験により, 培地組成³⁾, 温度⁴⁾, 通気・攪拌条件の適正化をはかる⁵⁾一方, 1,500 l 培養槽を用い連続培養の可能性を検討した⁶⁾. 前者は標準型の通気・攪拌槽, 後者は曝気型槽である.

テストプラントには, 20 kl 培養槽3基, 20 l, 200 l, 2,000 l 種培養槽各1基, 20 kl 槽への連続(滅菌)給液・排液設備その他を設備した.

回分培養では, 槽規模拡大に伴う障害はとくには認められなかった. しかし, 実際的な種々な知見が得られた⁷⁾.

連続培養では, 基礎実験操作と工業設備操作との差異にもとづく, あるいは, 連続培養の特質に由来するトラブルが発生した. 初期には両者が複合した諸障害がみられ, 前者を解決したあとも, 連続培養の安定化についてはなお時間を必要とした⁸⁾.

以下, 連続培養達成までの経過を, 実際的な体験事項をも含めて概説する.

2. 回分培養

2.1 槽規模の拡大

培地は Linsmaier と Skoog の培地⁹⁾に対し, 増殖を速くするため, リン成分を3.5倍に, その他も若干改変した第1表の培地¹⁰⁾を用いた.

第1図は, 種細胞を 20 l→200 l→2,000 l 培養槽に順

次植えつぎ, 20 kl 槽で最終培養した一連の結果である⁷⁾. 各槽の培養条件, 20 kl 槽における最大比増殖速度 μ_{max} , 接種から最大細胞濃度になるまでの平均的比増殖速度 $\bar{\mu}$, 消費された糖に対する細胞収率 $Y'_{X/S}$, 培地に用いた糖に対する同上収率 $Y'_{X/S}$ を併せて示した. 大量培養では, $\bar{\mu}$, $Y'_{X/S}$ を重視する. μ (day^{-1}) は次式で求めた.

$$\mu = \frac{1}{t} \ln \frac{X}{X_i} \quad (1)$$

X は細胞(乾物)濃度 (g/l), 添字 i は前回の測定値, t は時間 (測定間隔 day), である.

細胞濃度 X は, 槽の大小にはおおむね影響されていないようにみえる. 200 l 槽は, 培養液 pH (調節はしていない), 同じく糖濃度 S (フェノール硫酸法による全糖値), 同じくリン酸イオン濃度 PO_4^{3-} の変化が特異であり, そのため培養時間も長い, 別途の試験例からみても, この 200 l 槽の結果は槽容量の影響ではないことは明らかである. しかし, その理由はよく分からない.

そうした途中経過にもかかわらず, 20 kl 槽はむしろ良好な成績を示した. 回分培養成績は, 槽規模にはほぼ無関係である, と考えてよいであろう. ただし, 細胞の組成品質, 有用成分¹¹⁾の採取等を目的とする培養では, 上記種培養過程での異常原因, 影響などにもよく注意する必要がある.

ごくまれに異例の発泡を示すことがあり, 20 kl 槽で体験された⁷⁾. 第1図のように, 増殖期には発熱量 Q が増え, 同時に発泡する. 泡の高さは発熱量の曲線に相似であり, 20 kl 槽でのピーク値は通常約 50 cm 程度である. しかし, 異常例では泡の高さは 2 m をこえて槽頂に達し, 遂には排気管から流出した. 培地には 50 ppm の消泡剤を加えておいたが, 予想外のため消泡剤を追加する準備はなく, 泡切り羽根は(攪拌機が)低速であるためまったく役に立たなかった.

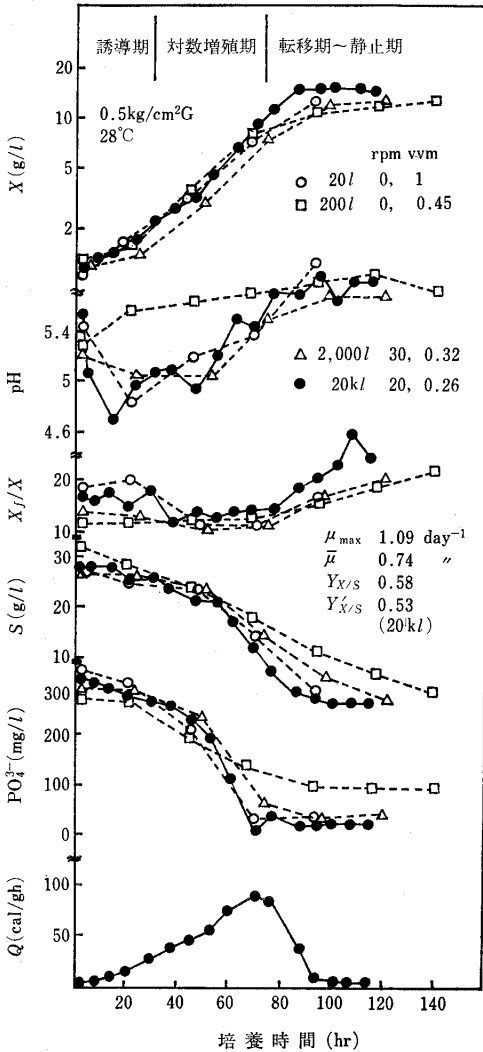
異常発泡の理由として, 2,000 l 槽からの種細胞にはつぶれたものが目立ち, 流出した微細粒子, 細片が多か

* Shoni AZECHI : Large Scale Culture of Tobacco Plant Cells

日本専売公社中央研究所 (〒227 横浜市緑区梅が丘6-2) Central Research Institute, The Japan Tobacco and Salt Public Corporation (6-2, Umegaoka, Midori-ku, Yokohama, Kanagawa 227)

第1表 培地の組成

スクロース	30,000mg/l	CaCl ₂ ·2H ₂ O	220mg/l
NH ₄ NO ₃	1,485	KH ₂ PO ₄	600
KNO ₃	1,710	H ₃ BO ₃	6.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	260	KI	0.83
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10.6	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	塩酸チアミン	0.4
Na ₂ -EDTA	37.3	2,4-D	0.2
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	NaOH	pH 6 まで



第1図 各槽の回分培養特性

ったことから、これらが発泡を多くしたことが考えられる。接種時期、細胞の状態にも注意が要る。発泡は激しかったが、培養成績は他の 20 kl 槽試験の値と同等であ

った。

20 kl 槽の成績が概して良好である理由の一つは、培地滅菌時の高温時間が短いためと考えられる。20~2,000 l 槽における蒸煮滅菌では、培地が100°C 以上に加温されている時間は前後の昇温・冷却を含め約50~90分である。一方、20 kl 槽は連続滅菌器を使用するので、昇温・冷却は速やかであり、上記の時間は30~40分である。多くの試験例について、増殖速度 μ_{max} はこの時間にほぼ逆相関している、滅菌培地の褐色化度 (370 nm 光による吸光度および肉眼視) はこの時間にほぼ比例していることから、褐色化の程度が増殖速度、収率等に影響しているためとみなされる。

2.2 増殖倍率の増大⁷⁾

雑菌汚染の防止には、ある程度、増殖倍率を高くして植えつき回数を少なくすることが望ましい。

接種細胞量または槽の組み合わせを変え、最大1,600倍程度まで試験した結果、約300倍以上の試験では、培養液の pH、細胞湿物重量濃度 X_f と乾物重量濃度 X との比、 X_f/X が第1図よりも大幅に低下し、一時期、増殖が抑制される傾向がみうけられた。特に、1,600倍では pH の低下が著しく、細胞集塊も緻密化したので、途中 NaOH を添加し pH を 4.5 から 4.8 程度に高めさせたが、翌日には再びもとの値に戻ったのでその後はなりゆきとした。しかし、培養の中期以降は第1図と同様に次第に増大した。

こうした状況にもかかわらず、いずれの場合も糖の消費は良好であり、ほぼ予定倍率の増殖が達成された。なお、高倍率にすると第1図に示した誘導期の回数が減り、全培養時間が幾分短縮されることも利点である。この試験以後は、特に理由がない限り100倍程度を常用した。

2.3 培地濃度の増大と生産性の向上¹²⁾

第2図は、第1表培地の全成分濃度を1/2から5/3倍まで変化させた培地(B)による結果である。当然ながら、培地濃度の増大に伴い細胞濃度すなわち生産量は増大している。糖濃度 S は培地濃度なりの変化を示すが、 X_f/X は培地濃度が高いほど大きく低下している。図示しなかった pH 値もほぼ同様であった。

この試験と同時に、第1表培地の糖濃度だけを上記の割合で変化させた培地(A)を比較した。糖濃度が高く他の成分割合が第1表の値よりも少ない培地では、培養終りに糖が若干残る傾向を示すが、 X 、 X_f/X 、pH の変化は全体として培地(B)と同様であった。

第3図は、上記(A)、(B)培地の結果から、培地の糖濃度 S_0 と細胞生産速度との関係を示した。生産速度

は、単位培養液量当たり時間当たりの細胞生産量であり、回分培養については近似的に次の式で示される。

$$\begin{aligned}
 [\text{生産速度}] &= \frac{X_{\max}}{t} = \frac{X_{\max}\bar{\mu}}{\ln X_{\max} - \ln X_0} \\
 &= \frac{(X_0 + S_0 Y'_{X/S})\bar{\mu}}{\ln(X_0 + S_0 Y'_{X/S}) - \ln X_0} \quad (2)
 \end{aligned}$$

X_0 は培養開始時の細胞濃度 (g/l) であり接種量による。 t は X_{\max} になるまでの時間 (day) である。この式の $\bar{\mu}$, $Y'_{X/S}$, X_0 に試験結果の中庸値を与えると曲線のようにであり、バラツキはこれらの値に関係している (矢印等)。

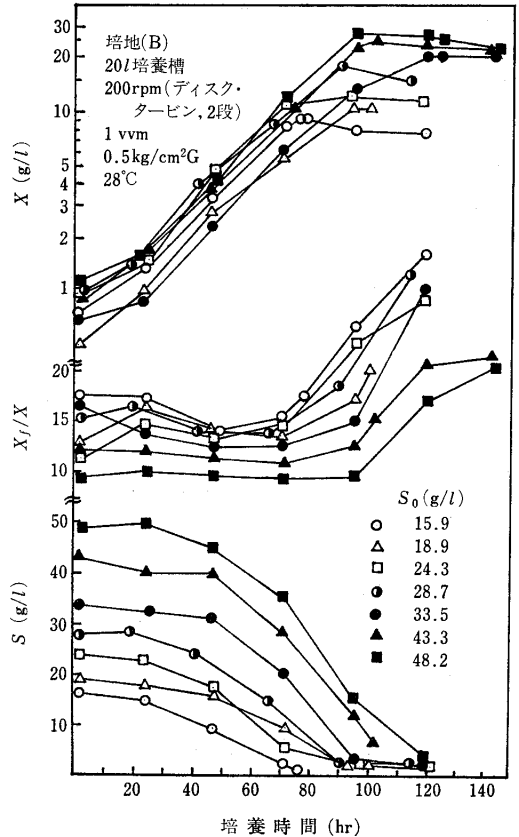
結論として、第3図は、培地濃度を高くすると生産速度は増大すること、細胞の組成等を問わなければ(A), (B)培地間の差は少ないこと、を表しているが、適正な培養状態を維持しなければ、矢印記号等のように生産性は大きく損なわれることをも示している。

ちなみに、第2図にみられる X_f/X の低下は、増殖に伴い細胞が大型で緻密な集塊になることを意味している。培養液の pH 低下も細胞塊の緻密化を助長するようであり、また、後述する連続培養^{1,2)}では、通気・攪拌 (酸素供給) の過剰が、緻密化・大型化の傾向を著しくすることが観察されている。

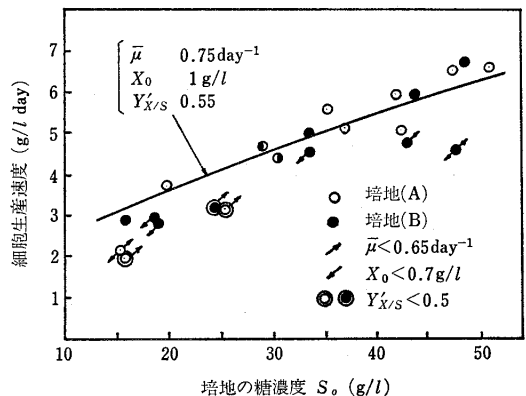
特に高濃度培地における X_f/X の大幅な低下は、細胞にとっては必要成分、酸素等のすべてが十分すぎる環境であるため、増殖がきわめて旺盛になる結果とみなされる。しかし、細胞塊の大型化・緻密化が著しくなると、高倍率培養で述べたように、そのために代えて増殖が抑制され、結果として $\bar{\mu}$ が低下し、さらには集塊のまま褐色化壊死する細胞がふえる、といった状況が第2図の試験でも高濃度培地に多く観察された。

一方、通常濃度の培地でも、細胞の X_f/X 値が接種直後 (ほぼ30分以内) に、接種前の60~80%に減少する⁷⁾ことが認められる (各図の最初の X_f/X 値は低下した後の値である)。このことは、接種された細胞は苛酷な環境変化に直面することを示すもので、高濃度培地ほど原形質分離等の傷害を受けやすいことが観察される。これは結果として X_0 を減少させる。

これらを緩和・改善することが培養制御の第一歩とも言えよう。なお、培地濃度を高くすると培養終期には X_f 値の増大に伴い、攪拌・混合も困難になるので^{12,13)}、実用域は $S_0=45 \text{ g/l}$ 程度までとみなされる。図中に示した通気・攪拌条件は、培養時に測定した酸素移動容量係数 $k_L a$ 値¹⁴⁾によれば、かなり過大であったと考えられる。



第2図 培地の濃度を変えた回分培養

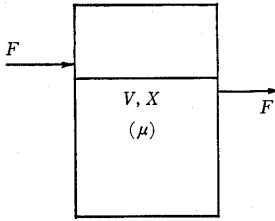


第3図 糖濃度と細胞生産速度

3. 連続培養¹⁵⁾

3.1 連続培養の生産速度

細胞生産には、生産速度が大きい第4図の連続培養が有利である。第3図に示した回分培養の生産速度は、 S_0



第4図 連続培養

$$\begin{aligned}
 t=0 \text{ にて } & X_i \\
 t=t \text{ にて } & X \\
 F(\text{l/day}), & V(\text{l}) \\
 D \text{ (希釈率)} & = F/V \text{ (day}^{-1}\text{)}
 \end{aligned}$$

=30g/l のとき, 4.3g/l day であり, 前後の滅菌時間等を考慮すると, この値は80%程度に減少する¹⁶⁾. 一方, 連続培養の生産速度は, 希釈率 D と細胞濃度 X との積で示され, $S_0=30\text{g/l}$, 細胞収率を0.45, $D=0.35\text{day}^{-1}$, とすると, $DX=0.35X=0.35 \cdot 30 \cdot 0.45=4.7\text{g/l day}$, である¹⁷⁾.

この理由で, テメトプラントは, 連続培養の達成を目的として建設された.

3.2 工業規模設備・操作に起因したトラブル^{1,8)}

小型の実験設備では, 培養槽とは別の滅菌槽で蒸煮滅菌した培地を連続給液することが多い. この場合, 糖分のカaramel化はある程度避けられないが, 他の成分への影響は少ないとみなされる.

一方, 工業設備では, 連続滅菌用の熱交換器を使用する. テストプラントでは, 20~2,000l 槽にも工業設備に類似の自家製熱交換器を用いた.

初期の連続培養試験は, 細胞濃度 X の低下に伴いやがて基質濃度が増大, 細胞塊が褐色化・壊死する現象のために, 3~4週間以上は継続できなかった. 原因究明の中で, 熱交換器へのスケールの析出に気付いた. 主成分は $(\text{CaMg})_3(\text{PO}_4)_2$ であった¹⁷⁾が, 他の微量成分の一部もスケールとして析出するため, その成分の不足が増殖を阻害したものと推定された. 対策として,

(1) スケールとなりやすいリン成分を別の溶液として, 分離滅菌する(連続滅菌設備を時分割使用する, または2系統とする)¹⁸⁾.

(2) 培地の糖, 窒素成分以外を, あらかじめ30%程度増量する¹⁹⁾.

の2点を実施した結果, 上記の阻害はほぼ解消し, 一応任意の期間, 連続培養を継続できるようになった.

この件は, 蒸煮滅菌と同温度への昇温にもかかわらず, 伝熱壁が作用したトラブルであり, 工業設備としてはあらかじめ考慮すべきことであった. しかしなお,

(2) の措置の適正值については検討の余地がある.

3.3 連続培養の特質に由来したトラブル^{1,8)}

連続培養の継続は可能になったが, 細胞濃度 X が増減すると同時に, 細胞集塊の緻密化・壊死を伴う不安定現象の防止について, なお多くの試験を必要とした.

第5図は, 主として200l, 2,000l 槽試験から得られた安定化に関する情報を確かめるため, 20kl 槽で実施した連続培養結果である. [A]は不安定状態を醸した期間, [B], [C]は後述する操作で安定状態に導いた期間である. 比増殖速度 μ は次式で求めた(記号は(1)式, 第4図を参照).

$$\mu = \frac{1}{t} \ln \frac{X}{X_i} + \frac{F}{V} \quad (3)$$

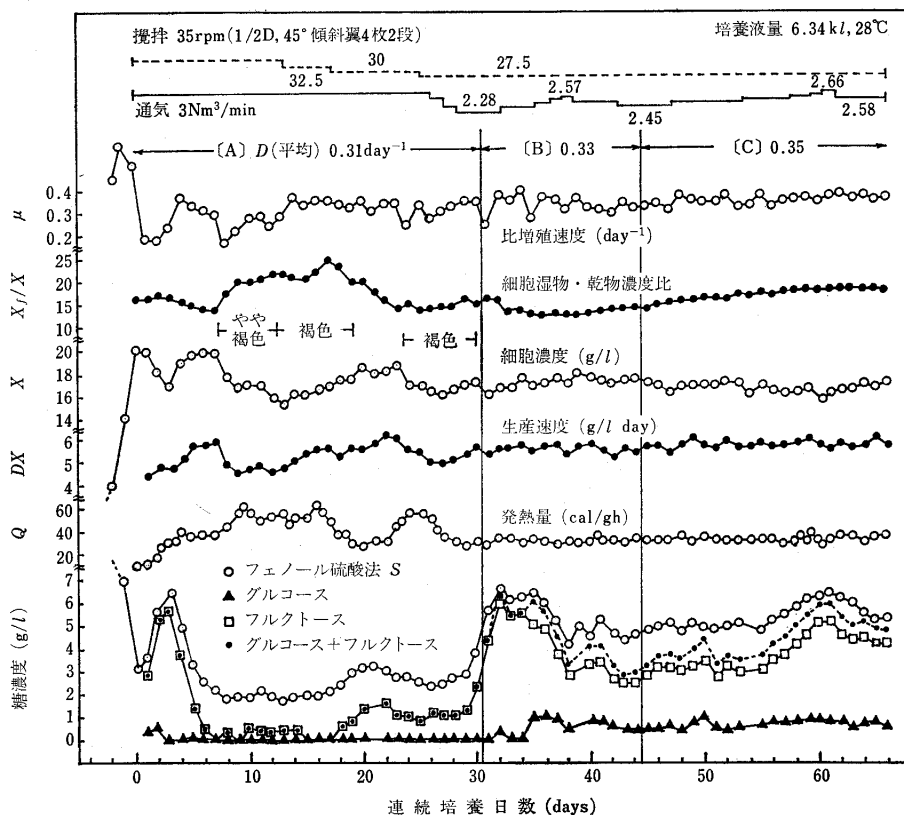
[A]期間にみられる不安定状態の原因は, おもに通気・攪拌の過剰と希釈率の不適当によることが, 各槽の試験から次第に明らかになった. 同時に, 細胞観察からは, 第6図のように, 連続培養においても個々の細胞は回分培養と同様に, 増殖休止期→増殖期→(再び)増殖休止期→, をくり返しているものと推定された²⁰⁾. これらを総合して, 不安定状態に関する次の見解が得られた.

通気・攪拌が十分であれば, 増殖期細胞の増殖は旺盛となり, 回分培養における同調的な増殖に近い状態となる. その結果, 大型の細胞集塊が増加すると同時に, 基質消費が供給(給液による)を上廻るようになり, 基質濃度が低下する. さらに第5図の[A]期のように, フルクトースは認められるが, スクロース, グルコースはない状態²¹⁾になると, 一部細胞の褐色化~壊死がはじまる. 壊死細胞が増加すると基質に余裕が生じ, 生き残り細胞が再び上記の順序をくり返す.

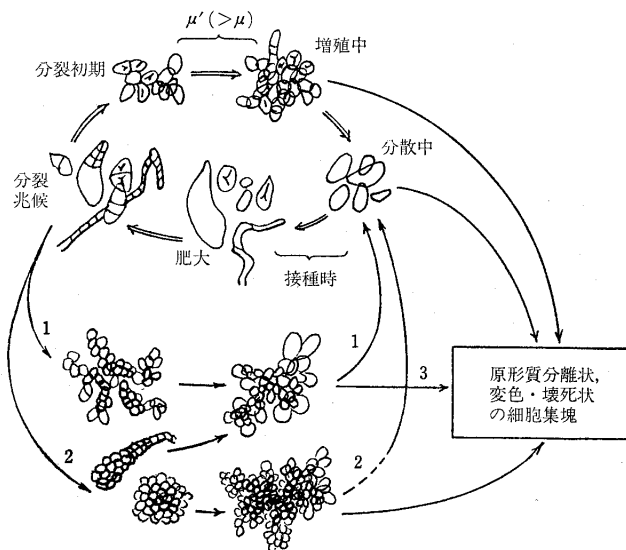
こうした不安定時には, 細胞集塊は, 通気・攪拌, 希釈率あるいは基質の状態により, 回分培養には見うけられない種々の形態に発達する. その形態変化が第6図の1-1, 2-2の経路をゆっくり循環すると同時に, 細胞と基質濃度がそれに同調して周期変化するのが観察される²⁰⁾. 変色・壊死細胞が激増する状態では, 連続培養は困難になる.

一方, 第5図[C]期のように, 細胞・基質濃度がほぼ一定となり十分に安定している状態では, 回分培養における初期から終期までの各形態(第6図の二重線経路)が, ほどよく混在している定常状態が観察される²⁰⁾.

第5図の試験では, 安定状態に導く操作として, [A]期間はまず攪拌速度と通気量を下げ, [B]期間以後は, 通気量を微調節して培養液の糖濃度 S を5g/l程度に維持した. 図示のように, その条件下ではフルクトースの他に若干のグルコースが認められる²¹⁾.



第5図 20kl 槽による連続培養



第6図 細胞形態の変化

二重線：回分培養および適正な連続培養条件下の形態変化の過程。

1-1：やや不適当な連続培養条件下の経路。

2-2：不適当な連続培養条件下の経路。

μ ：連続培養系としての比増殖速度。

μ' ：分裂～増殖期細胞の比増殖速度。

[C]期間には、安定状態における増殖速度の上限値を見極めるため、希釈率を少しずつ増大した。前述の細胞形態（二重線経路）は上限域で観察された。成績値等の

詳細は別報¹⁾を参照されたい。

以上は、回分培養に近い形態変化を、連続培養細胞にも可能にさせる環境を与えることが、連続培養を安定化

する条件であることを示している—こうした見方が実際の連続培養に最もよく適合するようである。

4. おわりに

回分培養の高能率化には記述したような留意点があるので、通気と攪拌とは別個に制御するほうがよいであろう。かつ、通気量の過剰が、時には有害であることは、他の植物細胞にも認められるところであり、細胞塊の沈降防止に余分の通気を必要とするエア・リフト型培養槽の使用に際しては注意がいる。連続培養では、細胞形態の観察を通じて安定化への糸口を見出したことを述べた。これらは、タバコ植物細胞以外にも、ある程度は共通する問題と考えられる。

有用物質採取等を目的とする培養では、より複雑な要素がからむとみなされるので、早期に槽培養体験を積み、効果的な培養方式、条件を探ることが大切である。

記述した、タバコ植物細胞の大量培養に関する素朴な知見が、少しでもお役に立てば幸いである。

文 献

- 1) 畦地昭二, 橋本寿夫, 湯山二男, 永塚 敏, 中静素子, 西山 告, 村田 章, 1983. 醗酵工学, **61** : 117-128.
- 2) Noguchi, M., T. Matsumoto, Y. Hirata, K. Yamamoto, A. Katsuyama, A. Kato, S. Azechi, K. Kato, 1977. In "Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application" (ed. by Barz, W., E. Reinhard, M.H. Zenk), p. 85-94, Springer-Verlag, Heidelberg.
- 3) Kato, A., A. Fukasawa, Y. Shimizu, Y. Soh, S. Nagai, 1977. J. Ferment. Technol., **55** : 207-212.
- 4) Kato, A., Y. Hashimoto, Y. Soh, 1976. J. Ferment. Technol., **54** : 754-757.
- 5) Kato, A., Y. Shimizu, S. Nagai, 1975. J. Ferment. Technol., **53** : 744-751.
- 6) Kato, A., S. Kawazoe, M. Iijima, Y. Shimizu, 1976. J. Ferment. Technol., **54** : 82-87.
- 7) 橋本寿夫, 湯山二男, 永塚 敏, 中静素子, 西山告, 村田 章, 畦地昭二, 鈴木 清, 専売小田原試報告 (1984), **20** : 印刷中.
- 8) 畦地昭二, 橋本寿夫, 永塚 敏, 湯山二男, 西山告, 村田 章, 石井比呂志, 中静素子, 1983. 専売小田原試報告, **19** : 93-101, 103-120.
- 9) Linsmaier, E.M., F. Skoog, 1965. Physiol. Plant., **18** : 100-127.
- 10) 加藤 陽, 1982. 醗酵工学, **60** : 105-118.
- 11) たとえば, 松本 隆, 池田 勉, 1982. 植物の化学調節, **17** : 128-139.
- 12) 畦地昭二, 橋本寿夫, 中静素子, 村田 章, 石井比呂志 1984. 専売小田原試報告, **20** : 印刷中.
- 13) Kato, A., S. Kawazoe, Y. Soh, 1978. J. Ferment. Technol., **56** : 224-228.
- 14) 畦地昭二, 橋本寿夫, 村田 章, 宮北一朗, 石井比呂志, 1984. 専売小田原試報告, **20** : 印刷中.
- 15) たとえば, 合葉修一, A.E. ハンフリー, N.F. ミリス, 1976. 生物化学工学, p. 139-172, 東京大学出版会, 東京.
- 16) 飯島正明, 河副定次, 朝倉明子, 宗 義彦, 1980. 専売中研報告, **122** : 1-11.
- 17) 杉田静雄, 党 弘之, 山崎嘉也, 伊豆浦春美, 1983. 専売小田原試報告, **19** : 61-70.
- 18) 杉田静雄, 畦地昭二ほか6名, 特許 : 1054332号.
- 19) 畦地昭二, 永塚 敏, 橋本寿夫, 鈴木 清, 特許 : 1116453号.
- 20) 畦地昭二, 1983. 専売小田原試報告, **19** : 121-137.
- 21) 中静素子, 橋本寿夫, 畦地昭二, 1983. 専売小田原試報告, **19** : 171-178.