

植物細胞培養のための多連式連続バッチ培養装置

豊田秀吉・松田克礼・望月俊彦
大石康晴・平井篤造(1984年1月12日受付)
(1984年6月24日受理)
近畿大学農学部
(〒577 東大阪市小若江 3-4-1)

植物体からカルスを誘導し、増殖のよい均一な細胞集団をうるためには、培地中に添加する組成成分の種類や濃度だけでなく種々の物理的条件の検討を必要とする¹⁾。特に連続培養系の開発にあたっては、培養条件の検討に加えてその装置の機能性や経済性なども重要な問題となってくる²⁾。本研究では実験室レベルでの基礎研究のため、上記の問題点を考慮し、かつ安価に作製しうる連続バッチ培養装置を考案した。以下にその特徴と操作法を述べる。

本実験には、トマト (*Lycopersicon esculentum* Mill) 品種福寿2号の腋芽から、既報³⁾に従って誘導したカルスを Murashige-Skoog (MS)⁴⁾ の培地 (0.5 mg/ml 2, 4-D・Na 塩と 0.05 mg/l カイネチン, pH 5.6) で数回継代培養して用いた。

本実験の多連式連続バッチ培養装置を Fig. 1 と Fig. 2 に示した。装置は大別して培養槽部 (CV 1-CV 4)、培地供給部 (滅菌水供給槽 WS 1, WS 2 と培地調整槽 MPV) および排気槽部 (EV 1-EV 4) の三部からなる。各槽はシリコン栓で密封しテフロン管 (口径 7 mm, 15 mm) で連結した。CV には空気供給管と排気管および培地供給管 (細胞採取管 OT 1-OT 4 に接続) をとりつけた。空気供給管の CV 内先端部にはガラスフィルター (SGF) をとりつけた。装置の滅菌については、培地供給部を加圧蒸気滅菌 (120°C, 20分) し、他の二部にはオートクレイブの排気口から得た加圧蒸気 (1.2 気圧) を導入した。滅菌後、両部を接続する場合は、同様にして得た加圧蒸気の噴出気流で行った。CV への通気には、コンプレッサー (AC) (日立製作所, 35 RC-20 B 型) から得た加圧空気 (0.2 kg/cm², 15 l/分) を、空気濾過用ミリポアフィルター (MF 1) で無菌濾過して用いた。濾過後の空気量は毎分 11 l であった。CV へ供給

する空気量は、排気口 (AO 1-AO 4) に微小流量計 (FM) を接続し各 CV の入口にとりつけた C 1-C 4 弁で調節した。供給空気量は CV の有効液量に対する1分間の通気量の比 (vvm)⁵⁾ で表示した。CV 内の培養液を攪拌するため回転数可変式のスターラ (30~1500 rpm) を使用し任意の回転数を設定した。スターラの放熱による培養液の温度上昇は 1°C 以下でほとんど影響はなかった。各 CV 間に照度の差を与える場合には CV の外表面をガーゼなどで被覆し槽内照度を調節した。本装置では 20 W の蛍光灯を2本使用し 0~4,000 lux の照度範囲を設けた。また、培養温度を制御するため、本装置を定温培養器 (器内の温度変化, ±1°C 以下) 内に収納し任意の培養温度を設定した。

上記培養装置での培養にあたり、連結管などでの培養細胞によるめづまりを防止するため、カルス塊をあらかじめ振とう培養し、孔径 500 μm のメッシュを通過する細胞けんたく液のみを用いた。細胞けんたく液を CV へ注入する方法を Fig. 2 に示した。すなわち、細胞液容器 (CS) の2つの連結管を予備空気供給部 (AS) と OT へそれぞれ接続し AS からの加圧空気で一定量の細胞液を CV 内へ圧入した。最適培地条件を解析するため順次条件を変更していく場合、一定期間培養したのち、増殖良好区の細胞液のみを残し他槽の細胞液を完全に排出した。CV 1 槽を増殖良好区とし以下の操作を説明する。すなわち、CV 1 槽に組成の異なる培養液を新たに供給するため、槽内に残存する培養液のみを SGF で濾過し他槽の OT から排水した。この場合の加圧空気は CO 6 から CV 1 内へ導入したものを用了。また、それぞれの培地の調整にあたっては、MPV にとりつけたミリポアフィルター (MF 2) で無菌濾過した培地成分を注入し、その後一定量の滅菌水を WS より圧入した。次に、

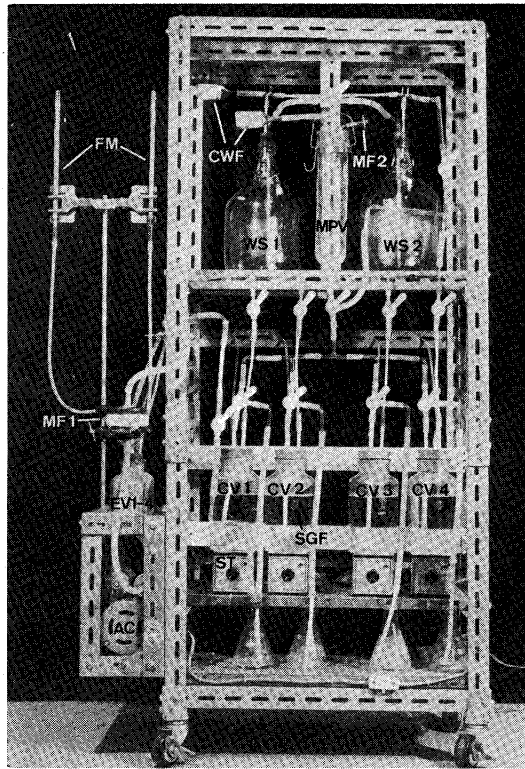


Fig. 1. Continuous multi-batch culture system for plant cells.

Keys : CV1-CV4=1l culture vessels with working capacity of 750 ml. ST=magnetic stirrer. SGF=sintered glass filter (NO. 1, pore size ; 10-20 μ m) for aeration. AC=air compressor. EV1-EV4= 250 ml vessels for exhausting air from culture vessels, containing 0.1% HgCl_2 . MPV=500ml vessel for preparing medium. MF1= millipore filter (FG, diameter ; 47 mm, pore size ; 0.2 μ m) for sterilizing air from the compressor. MF 2=millipore filter (GS, diameter ; 25 mm, pore size ; 0.2 μ m) for sterilizing medium. CWF=cotton wool filter. WS=3l water reservoir. FM=air-flow meter.

上記の増殖良好区の細胞液を他槽へ移送するため、細胞液を排出した三槽を滅菌水で十分洗浄した。CV 1 槽から他の三槽へ細胞液を移送する場合、S 1 弁を閉じ三方向切替弁 CO 1 を上部方向に開き CO 2 弁から CO 4 弁を順次開閉して一定量の細胞液を移送した。以上のように細胞液を採取したり培地を移送した場合には、滅菌水で連結管などを洗浄し洗液は OT から排水した。OT を使用しないときは、CO 弁を閉じ OT 先端部を 0.1% HgCl_2 液に浸漬し採取口からの雑菌汚染を防止した。

筆者らは本培養装置を使用してトマト品種福寿 2 号から誘導したカルス細胞培養条件を検討した。その結果、2, 4-D \cdot Na とカイネチン濃度はそれぞれ 0.5 mg/l と 0.05 mg/ml (MS 培地中)、通気量は 0.1~0.3 vvm、攪

拌速度は 100~250 rpm、温度は 26°C の培養条件が最も適していると判明した。照度に関しては本実験の範囲 (0~4000 lux) で細胞増殖量に有意な差は認められなかった。

文 献

- 1) 庄野邦彦, 1973. 植物組織培養 (竹内正幸ほか編), p. 86-101, 朝倉書店, 東京.
- 2) Street, H.E., 1977. In "Plant Tissue and Cell Culture," (ed. by Street, H.E.) p. 69-85, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 3) Toyoda, H., H. Tanpo, T. Kunita, T. Hirai, 1983. Mem. Fac. Agr. Kinki Univ., 16 : 31-40.

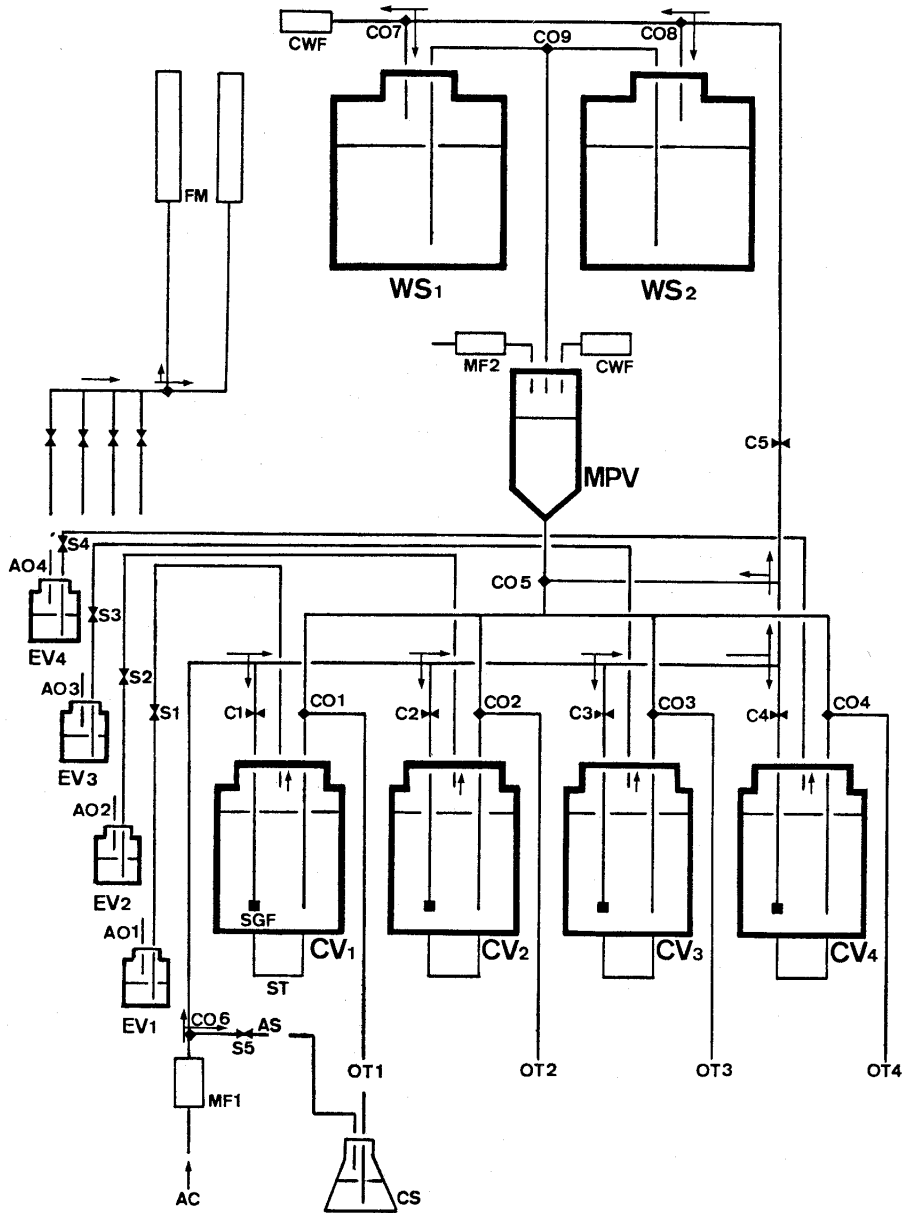


Fig. 2. Flow-diagram for continuous multi-batch culture system shown in Fig. 1. Additional keys : C1-C5=valves for controlling the flow-rate of air. S1-S5=stopper valves. CO 1-CO 9=valves for changing the directions of air flow. Arrows in the figure represent the directions of air flow. OT 1-OT 4=culture harvesting lines. AO 1-AO 4=outlets for exhausting air, which are linked with air-flow meter. AS=air supplying line for inducing the callus suspension into culture vessels. CS=callus suspension to be induced into the culture vessel.

4) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant.*,
15 : 473-497.

5) 三澤正愛, 1979. 植物細胞組織培養 (原田 宏,
駒嶺 穆編), p. 334-343. 理工学社, 東京.

Summary

Continuous Multi-Batch Culture System for Plant Cells

Hideyoshi TOYODA, Yoshinori MATSUDA, Toshihiko MOCHIZUKI,
Yasuharu OISHI and Tokuzo HIRAI

*Faculty of Agriculture, Kinki University,
Kowakae 3-4-1, Higashiosaka 577, Japan*

The system devised in the present study was equipped with plural culture vessels and some devices for changing chemical and physical culture conditions. The operation for the system was very easy and the sterility was kept over long periods. Conditions suitable for tomato cell culture were rapidly and easily established by using the system.