

技術ノート

培地循環型バイオリアクターによる植物細胞培養と細胞量のオンライン評価

田谷正仁*・東稔節治**・Jiri E. Prenosil***

現在植物細胞培養に用いられているバイオリアクターは、以前より微生物の分野で蓄積されてきた発酵技術をベースとしたものが多く、懸濁細胞を用いた通気攪拌槽型あるいはエアリフト型リアクターがおもに採用されている。しかし、植物細胞は剪断力に比較的弱く、細胞塊あるいは組織として増殖するので沈降しやすい、など微生物と異なる特性をもっている。このため、植物細胞培養に適したバイオリアクターが開発される必要があり、近年精力的な研究がなされている^{1,2)}。

本稿では、植物細胞に与える物理的ダメージが比較的少ないリアクターとして、培地循環型の“Expanded bed reactor”に関して述べるとともに、均一なサンプリングが困難な植物細胞培養に対して、培地の電導度測定が細胞量のオンライン計測に有望な手段となることを紹介する。

1. 電導度測定に基づく細胞量の評価

一般に植物細胞は、カルスまたはある程度分化した不定根などの状態で培養される場合が多い。したがって、培養槽内から均一な細胞懸濁液を採取することが極めて難しいばかりでなく、直接のサンプル採取は微生物による汚染の危険性を増大させることにもなる。現在、植物細胞培養において採用されている細胞量評価法のおもなものは、乾(湿)重量測定法、細胞体積測定法、細胞数計測法などである。しかし、これらの方法では、迅速性、精度、簡便さなどの点でいずれも一長一短がある。

そこでわれわれは、植物細胞濃度の一般的な評価方法を開発することを目的として、Hahlbrock³⁾が示した培

地の電導度測定法に着目し、本方法を適用した細胞量のオンライン評価を試みた。Fig. 1は、コーヒー(*Coffea arabica* L.)およびタバコ(*Nicotiana tabacum* L.)カルスの懸濁培養系において、培地電導度の低下と細胞増殖量の関係を図示したものである。いずれの植物細胞に対してもよい直線関係が認められ、

$$\Delta X = k \cdot (\Delta C)$$

で表すことができた。ここで、 ΔX =増殖した乾燥細胞重量(g/l)、 ΔC =低下した電導度(mS/cm)、 k =比例定数(g·cm/(l·mS))である。Fig. 1の直線の傾きより、コーヒーおよびタバコ細胞に対する比例定数 k の値は、それぞれ3.6および2.8g·cm/(l·mS)であった。また、同様の関係が他のカルス細胞あるいは毛状根細胞でも認められ^{5,6)}、Fig. 1に示すような標準線さえあらかじめ決定しておけば、電導度測定による細胞量の評価は、多くの植物細胞培養系に適用しうるものと考えられる。

植物細胞培養の培養液上澄をサンプリングし、オフラインで電導度を測定するには、市販の電導度計および電導度セルが使用できる(たとえば、東亜電波工業(株)や英国 Philips Co. 等から入手可能)。しかし、バイオリアクターシステム内に電導度セルを組み込みオンライン計測を行おうとする場合には、多数回にわたってオートクレーブ可能な伝導度セルが必要となる。われわれは、一對の白金板とガラス管から成るフローセルタイプの電導度セルを自作している(Fig. 2)。白金表面は、塩化白金酸中での電気分解により白金黒で被覆する。また、セル定数はKCl溶液を用いて定期的に検定する⁷⁾。

以上のような電導度セルヘリアクター内の培養液をポンプで送り込むことにより、必要時にオンラインで培地の電導度を測定できる(Fig. 3参照)。必要があれば、培養液を粗いメッシュで濾過してセルへ流す。

2. Expanded bed reactor による植物細胞培養

前述のように、植物細胞は一般的に細胞塊あるいは組織を形成しながら増殖する。また、細胞への酸素供給のために採用される通気・攪拌は、細胞にダメージを与え

* Masahito TAYA, ** Setsuji TONE and *** Jiri E. PRENOSIL: Plant Cell Culture by Medium-circulating Bioreactor and On-line Estimation of Cell Mass.

*** 大阪大学基礎工学部 (〒560 豊中市待兼山町 1-1) Faculty of Engineering Science, Osaka University, Toyonaka 560, Osaka, Japan.

*** スイス連邦工科大学 Department of Chemical Engineering, Swiss Federal Institute of Technology (ETH), CH-8092 Zurich, Switzerland.

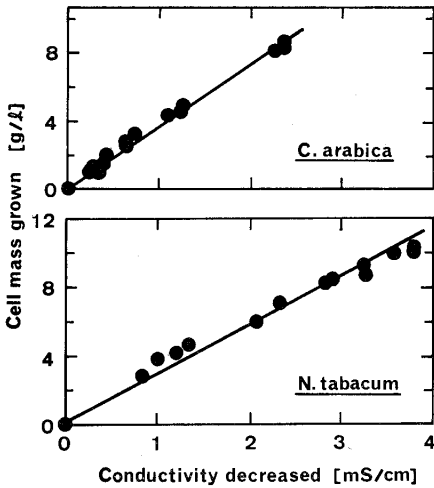


Fig. 1. Relationship between cell mass grown and conductivity decreased during suspension cultures of *C. arabica* and *N. tabacum*. The plant cells were cultivated at 25°C in Erlenmeyer flasks containing Murashige and Skoog (MS) medium⁴⁾ with the following supplementary components (mg/l): thiamine·HCl(1.0), cysteine·HCl(10), 2,4-dichlorophenoxyacetic acid(1.0), kinetin(0.2), and glucose(2000) for *C. arabica*, and indole-3-acetic acid (2.0), kinetin (0.2) and sucrose(2000) for *N. tabacum*.

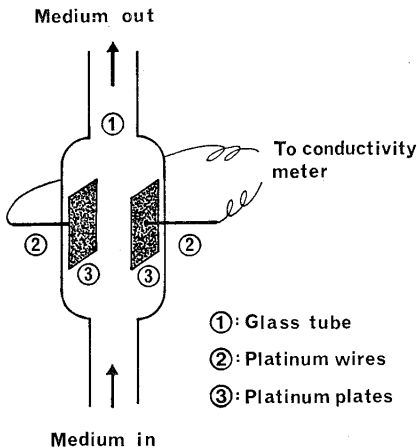


Fig. 2. Schematic diagram of handmade conductivity cell. The conductivity cell consisted of a pair of platinum electrode plates in parallel (surface area: 1 cm², distance: 1.5 cm) enclosed in a glass tube and the electrode surface was coated with platinum black.

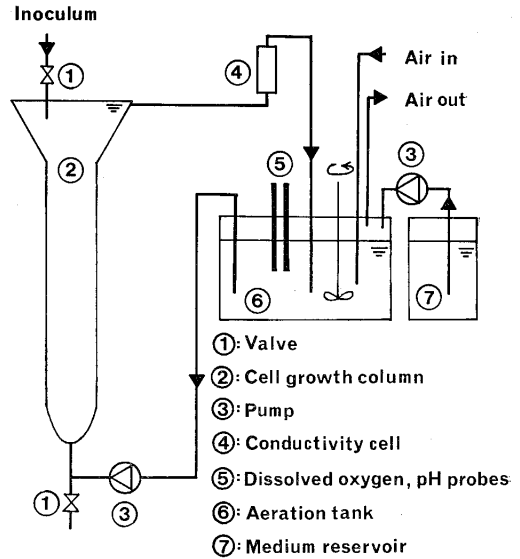


Fig. 3. Schematic diagram of medium-circulating expanded bed reactor system. The total volume of system was 3 l (volume of cell growth column: 1 l).

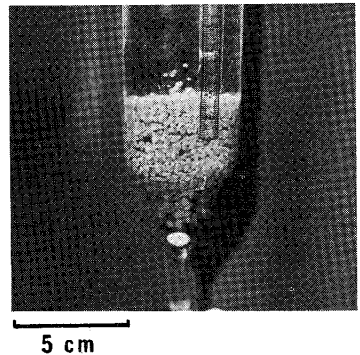


Fig. 4. Photograph of *C. arabica* in expanded bed reactor.

るだけでなく、リアクター壁面での wall growth を引き起こすこともある。このような植物細胞の培養特性を考慮した場合、Fig. 3 に示すような培地循環型 Expanded bed reactor の適用が考えられる。すなわち、植物細胞はカラム型リアクター内で堆積（一部は、浮遊）した状態で増殖する。一方、培地中への酸素の溶解は別に設けた空気通気槽内で行われ、酸素を富化された培地はポンプで細胞増殖カラムへ循環される。このような培養システムでは、培養の操作条件は簡便化され、スケールアップも容易であると思われる。

Fig. 4 は、上記のカラム内で増殖するコーヒー細胞を示しているが、1~7 mm 程度の細胞塊として存在し

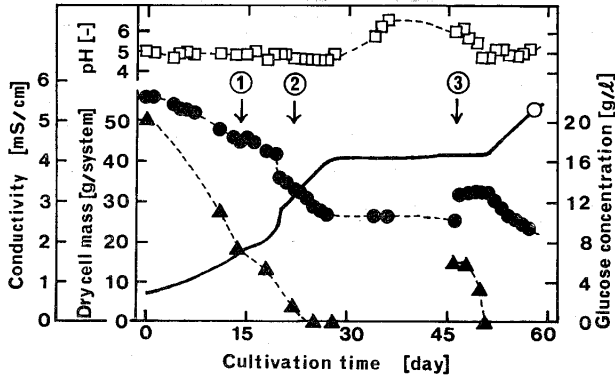


Fig. 5. Time course of *C. arabica* culture with expanded bed reactor system. The cells were cultivated at 25°C using the MS medium shown in the caption for **Fig. 1**. A part of culture broth was replaced with the fresh MS medium with 30 g/l glucose at the time indicated by the arrows. The amounts of the culture broth removed and fresh medium added were as follows: ①; 0.1 l, ②; 0.2 l, ③; 1 l. Symbols: (□); pH, (●); conductivity, (▲); glucose, (○); dry cell mass based on gravimetry, (—); dry cell mass based on conductometry.

ており、培地をかなり大きな循環速度でカラム内へ流しても細胞がカラム内から流出することはなかった。このため、培地の循環速度を適宜設定することにより、細胞への十分な酸素供給が達成された。**Fig. 5**は、Expanded bed reactor システムによるコーヒー細胞の培養経過を示している。図中の矢印は、培養液の一部を新鮮培地と入れ換えた時間を示しており、本システムでは、回分培養はもちろんのこと半回分（あるいは連続）的な培地の供給操作も容易であった。また、**Fig. 5**中の実線は、オンラインで計測した電導度より先に述べた関係式を用いて計算された細胞量を示している。計算値は、培養終了時に測定された細胞量と非常によく一致しており、均一なサンプル採取が困難なパイオリクター系においては、培地の電導度測定が細胞量のモニタリングに対して特に有効な手段となることが確認できた。コーヒー細胞は、二次代謝産物であるカフェインを細胞外生産するが⁸⁾、**Fig. 5**で示した Expanded bed reactor システムにおいても、最終的に約 85 mg/l のカフェインが培地中に蓄積した。

以上のように、培地循環型の Expanded bed reactor は、植物細胞に与える剪断力の小さい培養システムであ

り、多くの植物細胞（あるいは組織）に適用しうるものと思われる。また、培地の電導度をオンラインで測定することにより、リアクター内の細胞量を迅速に把握できることが示された。（1989年6月26日受理）

文 献

- 1) 藤田泰宏, 管 忠三, 松原浩一, 原 康弘, 1986. 日本農芸化学会誌, **60**: 849-854.
- 2) 田中秀夫, 1988. 植物組織培養, **5**: 40-43.
- 3) Hahlbrock, 1975. *Planta* (Berl.), **124**: 311-318.
- 4) Murashige, T., F. Skoog, 1962. *Physiol. Plant*, **15**: 473-479.
- 5) Taya, M., A. Yoyama, O. Kondo, T. Kobayashi, C. Matsui, 1989, *J. Chem. Eng. Jpn.*, **22**: 84-89.
- 6) Taya, M., M. Hegglin, J.E. Prenosil, J.R. Bourne, 1989. *Enzyme Microb. Technol.*, **11**: 170-176.
- 7) 玉虫伶太, 大岩恒夫, 1957. 実験化学講座1(下)(日本化学会編), p. 299-372, 丸善, 東京.
- 8) Prenosil, J.E., M. Hegglin, T. Baumann, P.M. Frischknecht, A. Kappeler, P. Brodelius, D. Haldimann, 1987. *Enzyme Microb. Technol.*, **9**: 450-457.