

培養槽における壁面増殖を抑制する一方法

角陸 悟*・岩本昌克*・福井宏至**

1. はじめに

植物細胞を液内培養で大量増殖させる時にしばしば使用する気泡塔型やエアリフト型などの培養槽では、通常強制通気して植物細胞に酸素を供給する。この場合、培地内部に懸濁して増殖する細胞群と培地上面に付着して増殖する細胞群が培養槽内に混在し、不均質な増殖が起こることをしばしば経験する。極端な場合には壁面での増殖が活発で、培地内部で増殖細胞が認められない場合がある。このような不均質性は良好な増殖を妨げ、再現性のある実験結果の獲得を困難にする¹⁾。この不均質な増殖は空気供給で生じた気泡が細胞を培地上面に押し上げて培地上面の内壁に付着させるために起こると考えられる。これを防ぐため、小さな培養槽ではゆすって細胞を落としたり²⁾、培地に消泡剤を添加したり、磁石で内壁に固定した金属製のへらで壁面増殖細胞をそぎ落としたり³⁾、培地中のCaイオン減量によって壁付着を抑制する⁴⁾など様々な工夫がなされている。しかし、消泡剤添加では細胞増殖を妨げる危険性が指摘されており、広く応用できる有効な壁面増殖阻止法がないのが現状である。

ここでは、空気吹き込み型の培養槽で細胞を培養する時に生じる壁面増殖を抑制する工夫の一つとして、水不溶性のシリコングリースを培養槽内壁の培地上面付近に塗布する方法が有効であることが分かったので紹介する。

2. 材料および方法

培養細胞

培養実験には、 10^{-6} M 2,4-dichlorophenoxyacetic acid と 3% 蔗糖を添加した Linsmaier-Skoog (LS) 培地で巡回培養器 (80 rpm) 上で 10 日ごとに継代・維持したタバコ培養細胞 (BY-2) を用いた。

使用した試薬と器具

培養槽の内壁に塗布した試薬は、シリコングリース (シリコン・コンパウンド H. V. G, Toray Dow Corning Silicone 社製), ワセリン (Nacalai tesque, 京都) であり、培地に添加した消泡剤は、Antifoam DB-110N Emulsion (Dow Corning Co.) で、添加濃度は 200 ppm とした。

培養槽として、ガラス製シリンダー (5.6×32 cm, 600 ml 容) あるいは耐熱性プラスチック (ポリメチルペンテンポリマー製) シリンダー (TPX®, 6×28 cm, 600 ml 容) を用いた。空気供給口として先端に焼結ガラス球 (外径 10 mm) のついたガラス管 (外径 8 mm) と排気口としてガラス管 (8 mm) を差し込んだシリコンゴム製のストッパーでシリンダー上部を封じた (Fig. 1)。

内壁のコーティング

培地を注入する前に推定培地上面の上下 2 cm (面積約 70 cm²) の内壁にシリコングリースあるいはワセリン (約 200 mg) をガーゼで薄く均質に塗布した。

細胞増殖

上述の培養槽に 400 ml の上記 LS 培地を入れ、10 日間の液内振盪培養で得たタバコ新鮮細胞 2 g を移植した。メンブランフィルター (Gelman, Vacushield TM) で除菌した空気を焼結ガラス球を通じて 0.2 vvm の割合で供給し、25°C 暗黒下で 7 日ないし 10 日間培養した。

培養後の細胞を濾集し、新鮮重量を計量後、凍結乾燥し乾燥重量を求めた。壁面増殖細胞塊が非常に多量に、液内増殖細胞と分けて収穫し、秤量することはできなかった。

3. 実験結果

無処理の培養槽、シリコングリースを塗布したガラ

Satoru KADORIKU*, Masakatsu IWAMOTO*, Hiroshi FUKUI**

Prevention of Wall Growth in a Bioreactor by Silicone Grease Coating.

* 隆祥産業(株)バイオグループ
(〒761-14 香川県香川郡香南町池内 958)

** 香川大学農学部生物資源科学科
(〒761-07 香川県木田郡三木町池戸)

* RYUSHO INDUSTRIAL Co. Ltd., Ikenouchi 958,
Konan-cho, Kagawa-gun, Kagawa 761-14, Japan

** Department of Bioresource Science, Faculty of Agriculture,
Kagawa University, Ikenobe, Miki-cho, Kida-gun, Kagawa 761-07, Japan

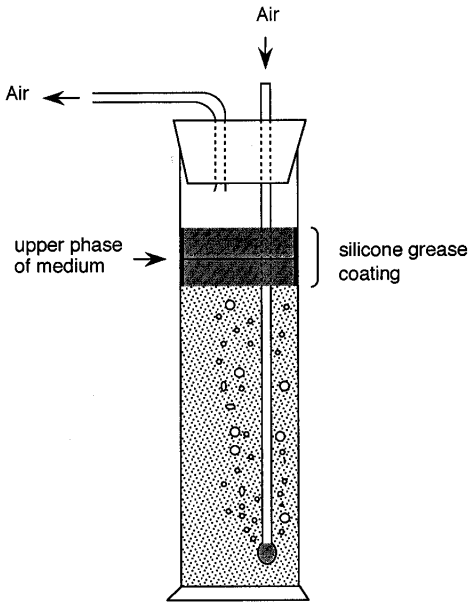


Fig. 1 Bioreactor used for testing the effect of silicone grease coating on prevention of wall growth.

ス製とプラスチック製の培養槽、ワセリンを塗布したガラス製培養槽を用いて、タバコ細胞を増殖させた結果を Fig. 2 に示す。同様の培養実験を4回繰り返かし、シリコングリース塗布が壁面増殖を減少させるのに有効である結果を得た。

無処理の培養槽では、培養開始2日目には培地中にほとんど細胞が見られず、培地上面の壁面で集中的に細胞が増殖し始め、4~5日後には細胞集塊の内部は酸素欠乏によると思われる細胞の著しい褐変が見られた。シリコングリースを塗布した培養槽では、ガラス製、プラスチック製を問わず空気供給で生じた気泡が培地表面で瞬間的に消失し、細胞が培地上面の内壁で増殖する傾向を抑制し、多くの細胞が培地内で浮遊・増殖し、壁面増殖細胞を落とす必要を感じなかった。Fig. 2の実験結果はガラス製とプラスチック製で細胞増殖に差があるが、4回の実験結果を総合すると、有意差はないと判断された。消泡剤を添加した培養槽でもシリコングリース塗布とほぼ同様に液内増殖が活発であったが、培養後期には消泡効果が減衰し壁面増殖が顕著になり、細胞の褐変が認められた (Fig. 3 左)。シリコングリース塗布 (Fig. 3 右) では幾分の壁面増殖が認められたが、液内増殖が活発であることが分かる。ワセリンはシリコングリースに比べて耐熱性が低く、オートクレーブ中に培地に懸濁する傾向が認められ、細胞増殖が抑制された。

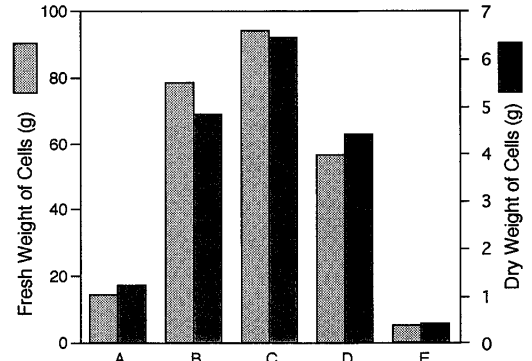


Fig. 2 Cell growth of *Nicotiana tabacum* (BY-2) in various bioreactors; A: Normal bioreactor, B: Bioreactor coated with silicone grease, C: Plastic bioreactor coated with silicone grease, D: Bioreactor containing antifoam, E: Bioreactor coated with vaseline.

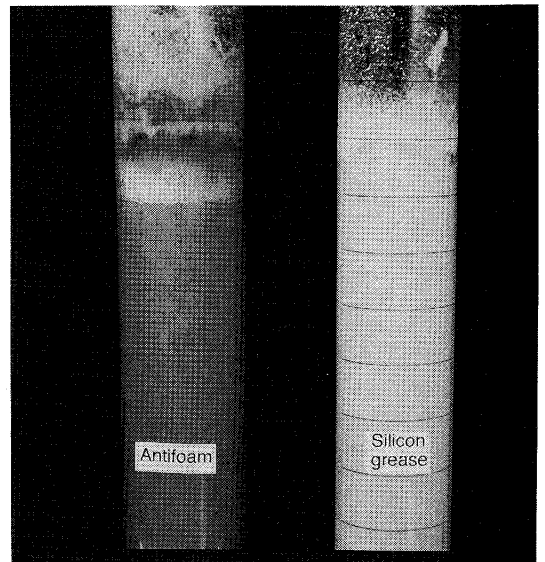


Fig. 3 Bioreactors containing antifoam and coated with silicone grease on day 7.

4. 終わりに

植物培養細胞は一般的に壁面増殖する性質を持つため、二次代謝産物生産などにしばしば使用されるエアリフト型バイオリアクターを含む気泡塔培養槽においては壁面増殖が良好な増殖と物質生産の大きな障害になると言われている。そこで、壁面増殖し易い細長タイプの培養槽を用いて、壁面増殖を抑制する簡便な方法を工夫した。タバコ細胞 (BY-2 株) は壁面増殖しやすい細胞と判断されるが、シリコングリースを内壁に塗布する簡便な方法で壁面増殖を減少させることができた。消泡剤添加で

は、消泡剤が収獲細胞に混在することになるが、シリコングリース塗布では消泡剤の収獲細胞への混入を防ぐことが可能である。

(1994年12月24日受理)

文 献

- 1) Wagner, F., H. Vogelmann, 1977. In "Plant Tissue Culture and Its Bio-technological Application" (eds. by Barz, W., E. Reinhard, M. H. Zenk), p. 245-252, Springer-Verlag, Berlin.
- 2) 山川 隆, 1985. 植物組織培養の技術(竹内正幸, 中島哲夫, 古谷 力編), p. 176-178, 朝倉書店, 東京.
- 3) 三澤正愛, 1977. 植物細胞組織培養—実際・応用・展望—(原田 宏, 駒嶺 穆編), p. 325-388, 理工学社, 東京.
- 4) Takayama, S., M. Misawa, K. Ko, T. Misato, 1977. *Physiol. Plant.*, **41**: 313-320.