



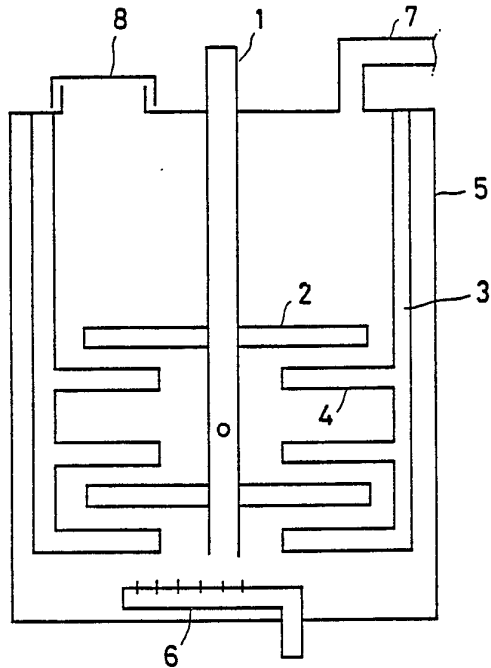
特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類 4 A01G 1/00, C12M 3/00</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO 89/ 08977 (43) 国際公開日 1989年10月5日 (05.10.89)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP89/00306 (22) 国際出願日 1989年3月23日(23. 03. 89) (31) 優先権主張番号 特願昭63-69844 (32) 優先日 1988年3月25日(25. 03. 88) (33) 優先権主張国 JP (71) 出願人(米国を除くすべての指定国について) 株式会社 ビーシーシーテクノロジー (P.C.C. TECHNOLOGY INC.) [JP/JP] 〒150 東京都渋谷区渋谷2丁目8番7号 Tokyo, (JP) (72) 発明者; および (75) 発明者/出願人(米国についてのみ) 高山真策(TAKAYAMA, Shinsaku) [JP/JP] 〒305 茨城県つくば市松代2-11-2 Ibaraki, (JP) (74) 代理人 弁理士 平木祐輔(HIRAKI, Yusuke) 〒105 東京都港区虎ノ門1丁目15番7号 TG115ビル Tokyo, (JP) (81) 指定国 DE(欧州特許), FR(欧州特許), GB(欧州特許), IT(欧州特許), US. 添付公開書類 国際調査報告書</p>		

(54) Title: METHOD OF CULTURING PLANT ORGANS AND CULTURE VESSEL THEREFOR

(54) 発明の名称 植物器官の培養法及びその培養槽

- 1 ... agitator
- 2 ... terminals
- 3 ... baffle member
- 4 ... terminals
- 5 ... culture vessel
- 6 ... air sparger
- 7 ... exhaust pipe
- 8 ... transplantation port



1: 攪拌機 2: 端子 3: 邪魔部材 4: 端子
5: 培養槽 6: 空気スパーサー 7: 排気管 8: 移植口

(57) Abstract

This invention relates to a method of culturing plant organs and a culture device used therefor. According to the present invention, a culture vessel in which both (I) the agitating blades (2) extending from a rotary shaft (1) provided in the central portion of the culture vessel, and (II) the fixed baffle terminals (4) extending inward from positions in the vicinity of the outer wall of the culture vessel are provided in a comb-like arrangement is used so as to prevent the formation of agglomerate of plant organs, which causes a decrease in the plant organ culturing efficiency. The culturing of plant organs is done as the agglomerate is disunited by the rotation of the agitating blades (2). The method and device according to this invention are also used for culturing a large quantity of microorganisms besides plant organs.

(57) 要約

本発明は植物器官の培養方法並びに培養装置に関する。

本発明においては、培養効率の低下の原因となる植物器官の集塊の形成を防ぐために、培養槽の内部に、

- ①培養槽の中心部の回転軸(1)からのびる攪拌羽根(2)
 - ②培養槽外壁付近から内側に向ってのびる固定された邪魔端子(4)
- の両者を歯状に設置した培養槽を用い、攪拌羽根(2)の回転により集塊をほぐしながら培養を行なう。

本方法ならびに装置は、植物器官のほか、微生物の大量培養にも用いられる。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AT	オーストリア	FR	フランス	MR	モーリタニア
AU	オーストラリア	GA	ガボン	MW	マラウイ
BB	バルバドス	GB	イギリス	NL	オランダ
BE	ベルギー	HU	ハンガリー	NO	ノルウェー
BG	ブルガリア	IT	イタリア	RO	ルーマニア
BJ	ベナン	JP	日本	SD	スーダン
BR	ブラジル	KP	朝鮮民主主義人民共和国	SE	スウェーデン
CF	中央アフリカ共和国	KR	大韓民国	SN	セネガル
CG	コンゴ	LI	リヒテンシュタイン	SU	ソビエト連邦
CH	スイス	LK	スリランカ	TD	チャード
CM	カメルーン	LU	ルクセンブルグ	TG	トーゴ
DE	西ドイツ	MC	モナコ	US	米国
DK	デンマーク	MG	マダガスカル		
FI	フィンランド	ML	マリ		

明 細 書

植物器官の培養法及びその培養槽

技 術 分 野

- 5 本発明は植物器官の大量培養法およびその培養槽に関する。

背 景 技 術

- 植物組織の培養に用いる培養槽としては、例えば、
10 通気攪拌型培養槽、エアリフト型培養槽が利用されて
いる他、気相培養装置（特開昭59-45873号公報、特開
昭59-45879号公報）、回転ドラム型培養槽（H.Tanaka
ら、バイオテクノロジー・アンド・バイオエンジニア
リング、25巻2359ページ、1983年）、スピンスルター
15 型培養槽（D.J.Styerら、プレナム・プレス刊「ティ
ッシュカルチャー・イン・フォレストリー・アンド
・アグリカルチャー」、117ページ、1985年）などが
知られており、主として植物の細胞を培養する手段と
して利用されてきた。しかし、植物の細胞が通常数mm
以下の集塊となり、まれに2～3cm程度の集塊を形成
20 することもある程度に過ぎないのに対し、植物の器官、
例えば根、莖葉、植物体などを培養すると細胞と比較
してはるかに大型に生長し、通常でも数cm以上、時には
数十cmにも達することがあるので、従来報告されて
いる培養槽はいずれも培養した植物器官が塊状になり

通気攪拌を行った場合には植物器官が強い剪断応力を受けて生育が顕著に阻害されるので、植物の器官を効率良く培養することは容易ではない。わずかに、前記の培養装置の中で気相培養装置、回転ドラム型培地装置、スピフィルター型培養槽が良好であろうと考えられている程度である。しかし、一般に培養槽の建設費は非常に高価なので、植物の器官培養のみのために培養槽を建設することは非常に効率が悪いため、植物細胞と植物器官、時には微生物の培養に対しても効率良く使用できることが望ましい。この点、従来の培養槽で微生物、植物細胞、植物器官の培養に汎用的に利用できる培養槽は開発されていない。

従来の培養槽を用いた場合には、いずれの培養槽においても良く生育した植物器官が塊状になることが多く、直径数cmから時には数十cmを超えることもある。このように生育した植物器官は、塊状になった内部にまで酸素が供給されずに枯死してしまうので、植物器官を大量に培養する上で大きな障害になっている。しかも、現在までに知られている培養層では、培養される植物器官に対して機械的な障害を与えずに植物器官を塊状にならないように効率良く培養する装置は知られていない。

発明の開示

本発明は、植物器官の集塊を攪拌機でほくしながら

培養を行うことを特徴とする植物器官の培養方法及び植物器官の集塊をほぐす攪拌機を設けた植物器官の培養槽に関し、さらに攪拌羽根と邪魔端子とを交互に設けたことを特徴とする植物器官の培養槽及び攪拌羽根と邪魔端子との間隙を植物器官の大きさとした植物器官の培養槽に関する。

図面の簡単な説明

第1図は本発明に用いる植物器官のほぐし装置の1例を示す図である。

10 1…攪拌機、2…端子、3…邪魔部材、4…端子、5…培養槽、6…空気スパージャー、7…排気管、8…移植口。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明の培養槽が第1図に例示される。攪拌機1は攪拌端子2を有し、この端子は棒状、板状、その他の種々の細長い形状のものが用いられる。端子の数は任意でよいが槽の大きさ植物器官のほぐしたい程度によって実験的に求めることができる。

20 ほぐし効果を高めるために邪魔部材を設けることが好ましく、例えば第1図の邪魔部材3が設けられる。

攪拌機と邪魔部材はお互いに接触しない位置に設けられ、空間における攪拌端子と邪魔部材の端子4の最短距離が凡そのほぐした植物器官の大きさとなる。

培養槽5には他の空気スパージャー6、排気管7、

移植口 8 等が設けられる。

かかる装置を利用して培養を行う際、好ましくは 1 ~ 5 日毎に 10 ~ 60 回 / 分の回転速度で 20 分 ~ 5 時間作動させる。

- 5 攪拌機は槽のどこに設けてもよく、作動させるとき以外培養液から離しておける構造が特に好ましく、当業者であればこれらの改良型培養槽を容易に設計できる。

10 本発明の培養槽は植物器官の培養槽のみならず微生物の大量培養槽として汎用的に使用することができる。

本発明の装置を用いて培養することにより植物器官の集塊がほとんど形成されず、かつ損傷もほとんどなく培養することができるので効率良く多量に植物器官を培養することができる。

- 15 本発明に用いられる植物器官としては、一般にシダ類、裸子植物、被子植物に分類される植物の器官であればいずれでも用いられるが、通常は、葉、茎、芽、生長点、根、球根、胚などの植物器官があげられるが、特に大量に培養することが本質的には可能であり、また
20 た大きな集塊を形成する特性を有している根や茎葉が望ましい。

植物器官は固体あるいは液体培養して増殖した後、本発明の植物器官ほくし装置を培養槽内に設置した培養装置で培養する。もちろん、本発明の培養装置で培

養して増殖した後に、さらに本発明の培養装置に移植してさらに培養を繰り返すこともできる。その際培養は例えば次のように行なう。

植物器官を培養増殖する培地の組成は基本的には植物組織の培養に用いる培地であればいかなる培地でも利用することができる。すなわち、培地としては、10
5 ~100g/lの糖、0.1~10mg/lの植物ホルモン類および窒素源、無機物、ビタミン類などをほどよく含有するものであれば天然または合成培地のいずれでも用
10 いられる。

糖としては、シュクロース、グルコース、ラクトース、マルトースなどが用いられる。

植物ホルモン類としては、オーキシン類（ α -ナフタレン酢酸、2,4-ジクロロフェノキシ酢酸、インドール酢酸、インドール酪酸など）、サイトカイニン類
15 （カイネチン、ベンジルアデニン、ゼアチン、4PIなど）、ジベレリン類（主としてGA3, GA4, Ga7など）、アブサイジン酸、エチレンなどが用いられる。

窒素源としては、硝酸カリウム、硝酸ナトリウム、
20 硝酸アンモニウム、硝酸カルシウム、硫酸アンモニウム、アミノ酸類（グリシン、グルタミン酸、リジン、アスパラギン酸など）、イーストエキス、肉エキス、ペプトンなどが用いられる。

無機物としては、塩化カリウム、塩化カルシウム、

塩化マンガン、塩化ニッケル、塩化コバルト、塩化アルミニウム、塩化鉄、硫酸マグネシウム、硫酸ナトリウム、硫酸ニッケル、硫酸鉄、硫酸マンガン、硫酸チタン、硫酸亜鉛、硫酸銅、リン酸二水素ナトリウム、
5 リン酸二水素カリウム、ヨウ化カリウム、ホウ酸、モリブデン酸ナトリウムなどが用いられる。

その他必要に応じて培地にビタミンB₁、イノシトール、塩酸ピリドキシン、ニコチン酸、塩酸チアミン、ビオチンなどを加えてもよい。

10 具体的な培地としてはムラシゲ・スクーグ氏培地、リンスマイヤー・スクーグ氏培地、ホワイト氏培地、クノップ氏培地などが用いられる。

15 培養は温度10～35℃、照度0～20,000ルクス、pH 3.5～8.5で行い、培養時間は10～100日間であることが多い。

植物器官の一般的な培養方法ならびに本発明の方法で植物器官をほくしながら培養する方法の工程を以下に示す。

20 植物器官の培養には基本的には既知の方法が用いられる。すなわち、一般的には次のような手順で植物器官の造成、増殖培養を行なう。まず、植物の葉、茎、根などの組織を小片（5×5～50×50mm）に切断し、表面を例えば次亜塩素酸ソーダ、エチルアルコールなどで殺菌処理した後、無菌水で良く洗う。このように

- 表面殺菌した小片を滅菌固体培地に培地 2 ~ 10 ml 当り小片 1 個の割合で置床後、10 ~ 35℃ で 20 ~ 50 日間静置培養すると茎葉、根などの分化組織の塊が得られる。かくして得られる分化組織の塊を滅菌した植物組織培養用液体培地を含むフラスコまたは培養槽に移植し液体培養する。液体培地での培養は、例えば 300 ml 容エルレンマイヤーフラスコでは 30 ~ 200 ml 程度の液体培地と培地 100 ml 当り上記の組織塊を 1 ~ 5 個を移植し、10 ~ 35℃、毎分 60 ~ 250 回転の振とう培養を行なう。
- 5
- 10 培養槽を用いる場合は、例えば 3 l 容の培養槽を用いる場合は 1 ~ 2 l の培地と上記分化組織塊を培地 100 ml 当り 1 から 5 個を培養槽に入れ、10 ~ 35℃ で毎分 0.5 ~ 3 l の無菌空気を通気しつつ培養する。このようなフラスコまたは培養槽による液体培養により移植した分化組織がさらに生育して移植した量の 2 から 20
- 15 倍に生育したら、生育した分化組織を 2 ~ 20 個に分割してフラスコあるいは培養槽を用いた液体培地に上記の方法と同様に液体培地 100 ml 当り分割した組織を液体培地 100 ml 当り 1 ~ 5 個移植して同一条件で培養する操作を繰り返して分化組織を増殖する。このような
- 20 方法を初めとして、たとえば特開昭 54-40138、特開昭 55-15734、特開昭 55-118319、特開昭 61-36022 などの既知の方法がそのまま利用できる。

前記培養によって得られる培養物を培養槽に移植し

大量培養する。

本発明に用いる植物器官ほぐし装置の一例を第1図に示す。

以下に実施例を示す。

5 実施例 1

ベラドンナの莖を約5 cmの長さに切り、70%エチルアルコールで2分間、次いで次亜塩素酸ナトリウム水溶液（有効塩素量0.5%）で100分殺菌した後に5~10 mmの切片に切った。該切片を、第1表に示したムラシゲ・スクーグ培地にN-（2-クロロ-4-ピリジル）N-フェニル尿素を培地1当り1 mgおよび寒天を培地1当り8 gの濃度で添加した培地10 mlを含有する直径24 mm、長さ125 mmの試験管に移植し、22℃、2500ルクス連続照明下30日間培養した。

15 培養30日後、生育した組織を無菌的に取り出し、ピンセットとメスを用いて組織から発生した根のみを無菌的に採取した。これらの根を再度、第2表の組成を有する新しく作成した培地100 mlを含有するコニカルビーカーに移植して、22℃で30日間培養し、生育した根の塊を得た。この根の塊をピンセットとメスを用いて無菌的に分割し、第1表の培地および前記と同様の培養方法で継代増殖を繰り返して根のみを増殖させた。このようにして増殖した根を無菌的に取り出し、ピンセットとメスを用いて組織から発生した根のみを無菌

的に採取した。これらの根を第2表の組成のうちシュー
ークロースを60.0gに変更し、さらに α -ナフタレン
酢酸を0.3mgに変更した液体培地8を含有する10容の
本発明第1図の培養槽に培養槽当りコニカルビーカー
5 4本分を移植して、22℃で40日間第1図、器官ほぐし
装置を2日に1回2時間ずつ毎分30回転でほぐし装置
を運転して培養した。その結果、根が集塊を形成する
ことなく分枝増殖し、培養槽全体に均一に分散して生
育し、培養槽当り3700g(乾燥重として210g)に達した。
10 これに対し、ほぐし装置を内蔵しない培養槽を用いた
場合は根が液面下に浮き上がり、培養槽内部に充満す
る形に生育し、集塊内部の根は枯死するに至った。根
の生育量は培養槽当り2400g(乾燥重として130g)にす
ぎなかった。

15

(本頁以下余白)

20

第1表 ムラシゲ・スクーグ改変培地

	硝酸アンモニウム	825	mg
	硝酸カリウム	950	mg
5	塩化カルシウム・2水塩	220	mg
	硫酸マグネシウム・7水塩	185	mg
	リン酸第一カリウム	85	mg
	Na ₂ ・EDTA・2水塩	18.65	mg
	硫酸第一鉄・7水塩	13.9	mg
10	ホウ酸	3.1	mg
	硫酸マンガン・4水塩	11.15	mg
	硫酸亜鉛・7水塩	4.3	mg
	ヨウ化カリウム	0.415	mg
	モリブデン酸ソーダ・2水塩	0.125	mg
15	硫酸第一銅	0.0125	mg
	塩化コバルト	0.0125	mg
	ビタミンB1	0.2	mg
	イノシトール	50.0	mg
	塩酸ピリドキシン	0.25	mg
20	ニコチン酸	0.25	mg
	グリシン	1.00	mg
	シュークロース	30.0	g
	ナフタレン酢酸	0.1	mg

第2表 ムラシゲ・スクーグ培地

	硝酸アンモニウム	1,650	mg
	硝酸カリウム	1,900	mg
5	塩化カルシウム・2水塩	440	mg
	硫酸マグネシウム・7水塩	370	mg
	リン酸第一カリウム	170	mg
	Na ₂ ・EDTA・2水塩	37.3	mg
	硫酸第一鉄・7水塩	27.8	mg
10	ホウ酸	6.2	mg
	硫酸マンガン・4水塩	22.3	mg
	硫酸亜鉛・7水塩	8.6	mg
	ヨウ化カリウム	0.83	mg
	モリブデン酸ソーダ・2水塩	0.25	mg
15	硫酸第一銅	0.025	mg
	塩化コバルト	0.025	mg
	ビタミンB1	0.40	mg
	イノシトール	100	mg
	塩酸ピリドキシン	0.50	mg
20	ニコチン酸	0.50	mg
	グリシン	2.00	mg
	シュエクロース	30.0	g

産業上の利用可能性

本発明装置で植物器官を培養することにより、従来の培養法では集塊を形成することが多く培養効率の低下の原因となっていた問題点が解決され、植物器官を培養槽内に分散させながら均一に効率よく培養することができる。本発明の装置は微生物の培養装置としても有用である。

10

15

20

請求の範囲

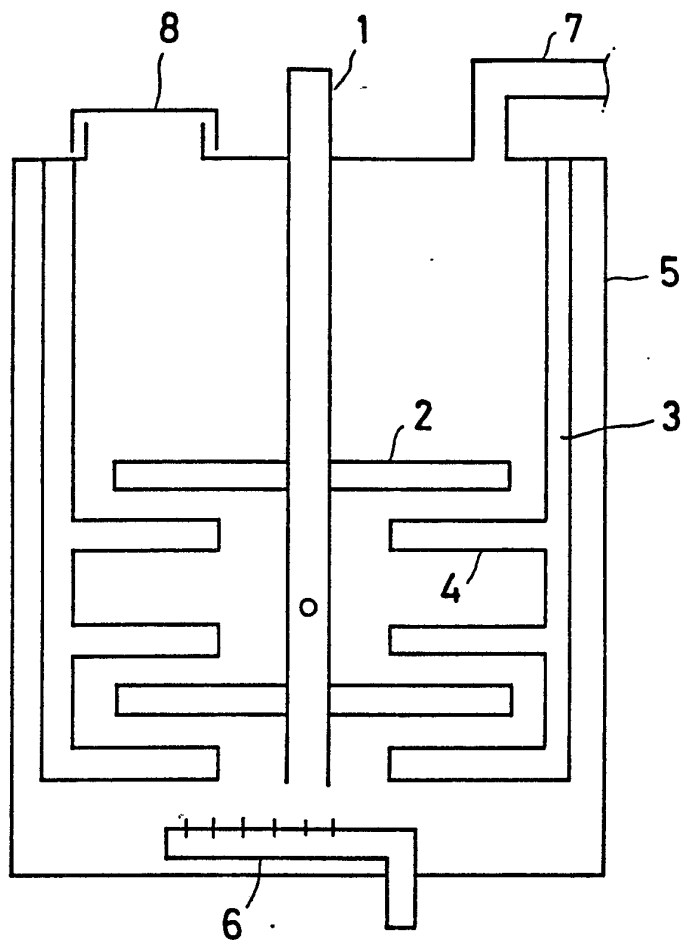
1. 植物器官の集塊を攪拌機でほぐしながら培養を行うことを特徴とする植物器官の培養方法。
- 5 2. 植物器官の集塊をほぐす攪拌機を設けた植物器官の培養槽。
3. 攪拌羽根と邪魔端子とを交互に設けたことを特徴とする植物器官の培養槽。
- 10 4. 攪拌羽根と邪魔端子との間隙を植物器官の大きさとすることを特徴とする請求項2又は3記載の培養槽。

15

20

1/1

第 1 図



1:攪拌機 2:端子 3:邪魔部材 4:端子
5:培養槽 6:空気スパーツァー 7:排気管 8:移植口

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No PCT/JP89/00306

I. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER (if several classification symbols apply, indicate all) ⁶		
According to International Patent Classification (IPC) or to both National Classification and IPC		
Int.Cl ⁴ A01G1/00, C12M3/00		
II. FIELDS SEARCHED		
Minimum Documentation Searched ⁷		
Classification System	Classification Symbols	
IPC	A01G1/00, C12M1/00-1/08, 3/00-3/04 C12N5/00-5/02	
Documentation Searched other than Minimum Documentation to the Extent that such Documents are Included in the Fields Searched ⁸		
Jitsuyo Shinan Koho		1926 - 1989
Kokai Jitsuyo Shinan Koho		1971 - 1989
III. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT ⁹		
Category [*]	Citation of Document , ¹¹ with indication, where appropriate, of the relevant passages ¹²	Relevant to Claim No. ¹³
A	JP, A, 57-189689 (Institut biochimii i fiziologii mikroorganizmov Akademii Nauk SSSR) 22 November 1982 (22. 11. 82) &SE, A, 8102585&US, A, 4379846 &CH, A, 651586	1 - 4
A	JP, A, 55-15734 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.) 4 February 1980 (04. 02. 80) (Family: none)	1
A	JP, A, 61-40788 (Albright & Wilson Limited) 27 February 1986 (27. 02. 86) &GB, A, 2162537&EP, A1, 171970 &AU, A, 8545709	1
<p>[*] Special categories of cited documents: ¹⁰</p> <p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>"E" earlier document but published on or after the international filing date</p> <p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p> <p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>"X" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step</p> <p>"Y" document of particular relevance: the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>"&" document member of the same patent family</p>		
IV. CERTIFICATION		
Date of the Actual Completion of the International Search		Date of Mailing of this International Search Report
June 14, 1989 (14. 06. 89)		July 3, 1989 (03. 07. 89)
International Searching Authority		Signature of Authorized Officer
Japanese Patent Office		

I. 発明の属する分野の分類		
国際特許分類 (IPC) Int. Cl ⁴ A01G1/00. C12M3/00		
II. 国際調査を行った分野		
調査を行った最小限資料		
分類体系	分類記号	
IPC	A01G1/00. C12M1/00-1/08.3/00-3/04 C12N5/00-5/02	
最小限資料以外の資料で調査を行ったもの		
日本国実用新案公報 1926-1989年 日本国公開実用新案公報 1971-1989年		
III. 関連する技術に関する文献		
引用文献の カテゴリー ※	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	請求の範囲の番号
A	JP, A. 57-189689 (インスチツト・ピオヒミー・イ・フィジオロジエ・マイクロオル ガニズモフ・アカデミー・ナウク・エスエスエスエル) 22. 11月. 1982 (22. 11. 82) &SE, A. 8102585 &US, A. 4379846 &CH, A. 651586	1-4
A	JP, A. 55-15734 (協和醸酵株式会社) 4. 2月. 1980 (04. 02. 80) (ファミリーなし)	1
A	JP, A. 61-40788 (アルプライト・エンド・ウイムソン・リミテッド) 27. 2月. 1986 (27. 02. 86) &GB, A. 2162537 &EP, A1. 171970 &AU, A. 8545709	1
※引用文献のカテゴリー 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの 「E」 先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す) 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の後に公表された文献		「T」 国際出願日又は優先日の後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの 「&」 同一パテントファミリーの文献
IV. 認 証		
国際調査を完了した日 14. 06. 89	国際調査報告の発送日 03.07.89	
国際調査機関 日本国特許庁 (ISA/JP)	権限のある職員 特許庁審査官 森田ひとみ	