

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第3558652号

(P3558652)

(45) 発行日 平成16年8月25日(2004.8.25)

(24) 登録日 平成16年5月28日(2004.5.28)

(51) Int. Cl.⁷

F I

C 1 2 N	5/04	C 1 2 N	5/00	F
C 1 2 P	1/00	C 1 2 P	1/00	Z
C 1 2 P	21/02	C 1 2 P	21/02	C
//(C 1 2 P	1/00	C 1 2 P	1/00	Z
C 1 2 R	1:91)	C 1 2 R	1:91	

請求項の数 15 (全 10 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願平10-536107
 (86) (22) 出願日 平成10年2月18日(1998.2.18)
 (65) 公表番号 特表2001-504710(P2001-504710A)
 (43) 公表日 平成13年4月10日(2001.4.10)
 (86) 国際出願番号 PCT/CA1998/000121
 (87) 国際公開番号 W01998/037176
 (87) 国際公開日 平成10年8月27日(1998.8.27)
 審査請求日 平成12年11月9日(2000.11.9)
 (31) 優先権主張番号 08/802,268
 (32) 優先日 平成9年2月19日(1997.2.19)
 (33) 優先権主張国 米国(US)

(73) 特許権者 504022375
 ファイトバイオテック・インコーポレーテッド
 カナダ国ケベック エイチ9イー・1エス2、イル・ビザール、リユー・サン・ラファエル 248
 (74) 代理人 100089705
 弁理士 社本 一夫
 (74) 代理人 100076691
 弁理士 増井 忠式
 (74) 代理人 100075270
 弁理士 小林 泰
 (74) 代理人 100080137
 弁理士 千葉 昭男

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 植物細胞培養物の増殖を高める方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

懸濁状の植物細胞の細胞増殖を再誘導および刺激することによりインビトロ培養植物細胞の増殖速度および細胞濃度を高める方法であって、

a) 植物細胞培養物を栄養培地中に懸濁させた状態で細胞分裂の開始に適した増殖条件下に増殖させ；そして

b) 細胞培養物に、初期増殖段階と細胞培養物の死の前との間のいずれかの時点で、細胞培養物にとって有毒でなく細胞分裂を再誘導するのに十分である量の追加のアンモニウムイオンを補充し；

これにより、培養物の植物細胞濃度を高めるために細胞分裂を再誘導、刺激、維持および増大させる

工程を含む方法。

【請求項2】

工程 a) の増殖を、培養物の酸素取込み速度を監視しながら行わせる、請求項1記載の方法。

【請求項3】

工程 b) のアンモニウムイオンを、酸素取込み速度が実質的にプラトーに達したときに添加する、請求項2記載の方法。

【請求項4】

工程 b) のアンモニウムイオンが、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 、 NH_4NO_3 、 $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ 、酢酸アンモニウム

10

20

ムおよびグルタミンよりなる群から選択される、請求項1記載の方法。

【請求項5】

工程b)がさらに、炭水化物、溶存酸素、ホスフェートおよびカリウムよりなる群から選択される栄養素を添加することを含む、請求項1記載の方法。

【請求項6】

炭水化物が、ショ糖、グルコースおよびフルクトースよりなる群から選択される、請求項5記載の方法。

【請求項7】

工程a)の増殖を、フラスコ、いずれか適切な培養器、またはバイオリアクター内で行わせる、請求項5記載の方法。

10

【請求項8】

工程a)の増殖を、培養器またはバイオリアクター内において、バッチ式、供給バッチ式または連続式で行わせる、請求項7記載の方法。

【請求項9】

適切な増殖条件が、無菌性、混合速度、温度、光、酸素供給および栄養培地である、請求項7記載の方法。

【請求項10】

さらに工程b)の後に実施する2工程：

c)ファイトケミカル産生のために植物細胞培養物を改変すること；そして

d)ファイトケミカルを産生させ、産生したファイトケミカルを増殖した植物細胞バイオマスおよび培地から単離すること；

20

を含む、請求項9記載の方法。

【請求項11】

ファイトケミカルが、アルカロイド類、タキサン類、タキシン類、テルペン類、ステロイド類、キノン類、フラボノイド類、タンニン類、サポニン類、クマリン類、カロテノイド類、およびその任意の生合成中間体よりなる群から選択される、請求項10記載の方法。

【請求項12】

さらに工程b)の後に実施する2工程：

c)組換えタンパク質および抗体の産生のために植物細胞培養物を改変すること；そして

d)組換えタンパク質および抗体を産生させ、産生した組換えタンパク質および抗体を増殖した植物細胞バイオマスおよび培地から単離すること；

30

を含む、請求項9記載の方法。

【請求項13】

植物ベースの培養法を工業的規模にまで拡大する方法であって、

a)植物細胞培養物を請求項1記載の方法に従って増殖させて、高い細胞濃度の第1容量の培養物を得て；そして

b)植物細胞培養を工業的規模にまで拡大するために、濃厚な第1容量の少なくとも一部を第2容量の培養物に接種し、その際第2容量は第1容量より大きく；

これにより、植物細胞培養物の接種容量比が従来のバッチ式培養法を用いた場合より低くなる；

40

工程を含む方法。

【請求項14】

高濃度が細胞数約 $3 \times 10^6 \sim 60 \times 10^6$ 個/mlである、請求項13記載の方法。

【請求項15】

接種容量比が約1:20~1:60である、請求項14記載の方法。

【発明の詳細な説明】

発明の背景

(a)発明の分野

本発明は、植物由来の経済的に重要な複雑な化学物質(ファイトケミカル、phytochemicals)を工業レベルで産生させるために、植物細胞培養物の増殖を高める方法に関する。

50

(b) 先行技術の記述

ファイトケミカルは、従来の化学的方法では妥当な収率および価格で合成できず、また複雑でありかつ関与する生化学的経路がほとんど理解されていない場合が多いため微生物の遺伝子操作によっても製造できない、非タンパク質生体分子である。これらの貴重な分子の製造は、大部分は輸入された外来植物バイオマスの抽出および精製により行われ、収率が低い (< 1 ~ 5%)。それらのバイオマスの繁殖農業および長期的供給は、不可能でないとすれば保証するのが困難な場合が多い。したがってこれらの供給問題のため、これらのユニークな生体分子を薬剤、栄養および化粧品などの工業に有効利用するのが著しく妨げられてきた。

植物細胞の培養は1960年代以来、工業的に重要な複雑なファイトケミカル(二次代謝産物)の産生に代わる実用的方法として検討されてきた。しかし、より良い性能をもつ細胞系の選択や、特異的な増殖培地および生産培地の開発、ならびに固定化培養法、器官培養法および形質転換培養法を含めたこの研究は、経済的生産性レベルを達成するのに実際に成功してはいない。これらの研究は大部分が小規模の、制御および監視のなされない固形および液体フラスコ培養を用いて行われ、一般に再現性のない低い産生レベルが得られた(14~28日で < 100~200mg L⁻¹)。さらに、二次代謝産物は大部分が細胞内に保持され、産生を向上させる遺伝子操作は成功していない。

それでもやはり、一定数の価値ある前進がここ数年にわたって達成された。工業的に重要な数種類の二次代謝産物につき、生産性の高い正常および形質転換植物細胞系ならびに製造プロトコールが開発された。適切に設計された組換えタンパク質および抗体がクローン化され、植物中および培養植物細胞中で産生された。従来のバイオリアクターを用いると、植物細胞を大規模(20,000~75,000L)で培養することにより、達成される容量生産性(volumetric productivity)が低いのを補うことができるが、ファイトケミカル産生はフラスコ内で得られるより常に低い。

したがって価値あるファイトケミカルを製造するための植物細胞ベースのバイオプロセスは、基本的培養法の生産性が低く、低い生産速度を補うのに必要な大型バイオリアクターシステムへの投資が高いため、現在でもなお非経済的である。このタイプのバイオプロセスは基本的に3段階を含む:1)植物細胞バイオマスを増殖させて高濃度にする第1段階;2)このバイオマスを刺激または攻撃して目的の二次代謝産物を高率かつ高濃度で生合成させる生産段階;ならびに3)ファイトケミカルを培養ブロスから抽出および精製する最終段階。この最終段階(下流処理)は従来の化学工学技術を用いて行われる。

この分野の大部分の研究は、このバイオプロセスにおいてより華々しい第2段階の改良、すなわち植物細胞バイオマスにおける二次代謝を誘導してそれによるファイトケミカル産生を最大にするための培養法(産生培地、形質転換培養および器官培養、誘発(elicitation)、遺伝子操作など)の開発に集中し、ある程度成功した。このバイオプロセスの第1段階、すなわち二次代謝産物の生産性の鍵となるものにつき、深く研究されたことはほとんどない。すべての場合、高濃度(乾燥バイオマス約30~50⁺g L⁻¹)の生産性バイオマスは高い糖濃度を用いて達成された。従来の静的(バッチ式)条件下でのこれらの培養のバイオマス増殖は緩慢である(分裂時間約24~72時間)が、高い湿潤バイオマス濃度(>300g L⁻¹)を達成できる。

しかしインビトロ培養した植物細胞の基本的な有効増殖行動は、別個の2期、すなわち細胞分裂とこれに続く細胞拡張からなる。植物細胞培養の分野で、培養において両期を明りょうに区別して別個に測定したグループはない。通常はバイオマス濃度の上昇によって初めて増殖を定量測定する。本発明者らの研究(Pepin, M.F.ら(1995) *Biotechnology and Bioengineering*, 47:131-138)によれば、炭水化物および溶存酸素の利用が制限されない普通の(バッチ式)増殖条件下で、培養植物細胞の分裂は典型的な14~21日のバイオマス増殖期の間の最初の3~7日後に停止する。これにより培養の特徴的な呼吸パターンが生じ、細胞分裂が終了するとプラトーに達する。

その後、水、炭水化物、硝酸塩および他の多量養素(macronutrient)を取り込んだ際に、細胞およびバイオマスの拡張のみによって培養物増殖が起きる。この現象は3種の異なる

10

20

30

40

50

る植物細胞につき観察された：ビチス・ビニフェラ (*Vitis vinifera*) (Pepin, M.F.ら (1995) *Biotechnology and Bioengineering*, 47:131-138)、エシュショルチア・カリフォルニカ (*Eschscholtzia californica*) およびギンゴ・ピロバ (*Ginkgo biloba*)。これは、この現象がインビトロで培養した植物細胞の多く (すべてではないとしても) の増殖行動の特徴であることを示す。

これに関して、第1 (増殖) 段階の期間を短縮し、植物細胞ベースのバイオプロセスにおける細胞濃度を最大にするためには、インビトロ培養植物細胞の細胞増殖を改良する新規な培養法を提供するのがきわめて望ましいであろう。次いで、きわめて高い経済的生産性レベルを植物細胞ベースのバイオプロセスにより得るために、この培養法を二次代謝産物ならびに組換えタンパク質および抗体の産生を誘導するために開発された他の培養技術と組み合わせることができる。

10

発明の概要

本発明の目的のひとつは、培養植物細胞の、より速い真の (細胞の) 増殖速度を提供することである。

本発明の他の目的は、従来の (バッチ式) 培養を用いて得られるもの (細胞数 $< 2 \sim 2.5 \times 10^6$ 個 ml^{-1}) よりはるかに高い、植物細胞培養の細胞濃度 (少なくとも約 $20 \sim 60 \times 10^6$ 個 ml^{-1}) を提供することである。

本発明の他の目的は、これらの高い細胞濃度 (約 $20 \sim 60 \times 10^6$ 個 ml^{-1}) を、植物細胞ベースのバイオプロセスによる二次代謝産物、組換えタンパク質および抗体の産生に提供することである。

20

本発明の1態様によれば、インビトロ培養植物細胞の細胞分裂を再誘導および刺激する新規な動的培養法が提供される。きわめて高い経済的生産性レベルを植物細胞ベースのバイオプロセスにより得るために、この培養法を二次代謝産物ならびに組換えタンパク質および抗体の産生を誘導するために開発された他の培養技術と組み合わせることができる。

本発明方法の1態様は、培養物中の植物細胞濃度を高めるために、まずバッチ式で増殖させた植物細胞培養物にさらにアンモニウムイオンを動的に供給して、細胞分裂を再誘導、刺激、維持し、その速度を高め、かつ細胞増殖の程度を高めることにある。この独自の方法は、適切に選ばれた植物成長調節剤を培地に補充すると持続性細胞分裂が誘導されるであろうという点で、この分野の従来の考えおよび方法と著しく異なる。

本発明方法の他の態様は、同様に植物細胞培養物に NH_4 を動的に供給し、同時にそれらの生存にとって重要な他の多量養素 (主に炭水化物、溶存酸素、ホスフェートおよびカリウム) を供給することからなる。その理由は、アンモニウム添加に際し細胞分裂再誘導の前または途中でこれらの多量養素が欠乏すると、予想される細胞増殖増大が制限され、事実、増殖が低下し、おそらく培養物が死ぬ可能性があるからである。

30

本発明方法の他の態様は、細胞増殖を高めるために、植物細胞培養物に培養物の特定の生理学的状態でこれら特定の多量養素を同時に動的に供給することからなる。その理由は、これらの多量養素が過剰である場合には毒性の問題や望ましくない代謝が生じるので、経験による大量養素添加では細胞増殖が予想した最大にまで増大しない可能性があり、事実、遅滞期の延長および増殖低下が起きる可能性があるからである。

本発明方法の他の態様は、細胞増殖を高めるために、植物細胞培養物に適切にプログラミングされた添加方式でこれら特定の多量養素を同時に動的に供給することからなる。その理由は、これらの多量養素の初期濃度を高めると、または培養物に経験によりバッチ添加すると、これらの多量養素が過剰である場合には毒性の問題や望ましくない代謝が生じるので、細胞増殖が予想した最大にまで増大しない可能性があり、事実、遅滞期の延長および増殖低下が起きる可能性があるからである。

40

本発明方法の他の態様は、本発明方法に従って高い細胞濃度 ($20 \sim 60 \times 10^6$ 個 ml^{-1}) にまで増殖させた一定容量の植物細胞培養物を、従来の植物細胞培養法を用いてこれまで可能であった培養容量 (3 ~ 60倍) よりはるかに多量 (20 ~ 60倍) の新たな培養容量に接種するのに使用することであり、これにより植物細胞ベースの培養法をはるかに簡単に、少ない経費で、速やかに工業的規模にまで拡大できる。

50

本発明方法をフラスコ内で実施してもある程度は成功するが、最高の結果を得るのに必要な効率的制御計画での管理下に高い溶存酸素伝達速度および栄養素の連続添加が可能である適切な培養器またはバイオリクターを用いて実施するのが最良である。

植物細胞の固定化、形質転換および器官植物細胞培養が増殖効率の改善という点でプラスの反応を示すが、本発明方法の1態様は植物細胞懸濁培養にもより良好に適用できる。

培養植物細胞の前記の効果的増殖パターン、ならびにプログラミングされたNH₄および他の重要な多量栄養素の添加に際し細胞分裂が再誘導および最大化される可能性は、多くの植物細胞種に特徴的であるので、本発明はすべての培養植物細胞種に適用できる。本発明に従って使用できる植物細胞種には以下のものが含まれるが、これらに限定されない：ピチス・ピニフェラ、エシュショルチア・カリフォルニカ、ギンゴ・ピロバ、ダウカス・カロ
10
タ (*Daucus carota*)、ダチュラ・ストラモニウム (*Datura stramonium*)、リコペルシ
コン・エスキュレンタム (*Lycopersicon esculentum*)、リコペルシコン・ピンピネリフ
オリウム (*L. pimpinellifolium*)、メディカゴ・サティバ (*Medicago sativa*)、フィザ
リス・エキソカルパ (*Physalis exocarpa*)、ソラナム・メラノセラスム (*Solanum mel
anocerasum*)、タゲテス・パチュラ (*Tagetes patula*)、タゲテス・エレクタ (*T. erect
a*)、トリフォリウム・プラテンセ (*Trifolium pratense*)、カタランタス・ロゼウス (*Catharanthus
roseus*)、トリプテリギウム・ウィルフォルディ (*Tripterygium wilfor
dii*)、タキサス属 (*Taxus*) 種、パパベル・ソムニフェルム (*Papaver somniferum*) お
よびニコチニア・タバクム (*Nicotinia tabacum*)。

しかしすべての場合、考慮している特定の植物細胞種の増殖行動と栄養状態および生理学
20
的状态との関係の評価するためには、また本発明方法によりさらに利益(高い細胞増殖)
を得るのに適した栄養素(糖類および溶存酸素を含む)添加計画を開発するためには、さ
らに栄養の研究が必要である。

ファイトケミカル産生のための植物細胞の改変には、本発明による増殖方法の実施中およ
び/または実施後に行う物理的、化学的および/または生物学的ストレス下での培養; 生
産培地の使用; 誘発; 固定化、器官または形質転換培養法の使用; ならびに遺伝子操作が
含まれるが、これらに限定されない。

適切に計画された組換えタンパク質および抗体のための植物細胞培養の改変には、遺伝子
操作; 本発明による増殖方法の実施中および/または実施後に行う物理的、化学的および
/または生物学的ストレス下での培養; 生産培地の使用; ならびに固定化、器官または形
30
質転換培養法の使用が含まれるが、これらに限定されない。

本発明の1態様によれば、植物細胞の細胞増殖を再誘導および刺激することによりインビ
トロ培養植物細胞の増殖速度および細胞濃度を高める方法であって、

a) 植物細胞培養物を栄養培地中で細胞分裂の開始に適した増殖条件下に増殖させ; そし
て

b) 細胞培養物に、初期増殖段階と細胞培養物の死の前との間のいずれかの時点で、細胞
培養物にとって有毒でなく細胞分裂を再誘導するのに十分である量の追加のアンモニウム
イオンを補充し; これにより、培養物の植物細胞濃度を高めるために細胞分裂を再誘導、
刺激、維持および増大させる

工程を含む方法が提供される。

本発明の1態様によれば、工程 a) の増殖を、培養物の酸素取込み速度を監視しながら行
40
わせることができる。

本発明の1態様によれば、工程 b) のアンモニウムイオンを、酸素取込み速度が実質的に
プラトーに達したときに添加できる。

アンモニウムイオンには、(NH₄)₂SO₄、NH₄NO₃、(NH₄)₂PO₄、酢酸アンモニウムおよび
グルタミンが含まれるが、これらに限定されない。

炭水化物、溶存酸素、ホスフェートおよびカリウムを含めた他の栄養素(これらに限定さ
れない)も添加できる。炭水化物にはショ糖、グルコースおよびフルクトースが含まれる
が、これらに限定されない。

本発明の1態様によれば、工程 a) の増殖を、フラスコ、いずれか適切な培養器、または
50

バイオリアクター内で行わせることができる。好ましくは、工程 a) の増殖を培養器またはバイオリアクター内において、バッチ式、供給バッチ (fedbatch) 式または連続式で行わせ、より好ましくはバイオリアクター内においてバッチ式で行わせる。

“ 適切な増殖条件 ” という表現は、本明細書中で用いる場合、無菌性、混合速度、温度、光、酸素供給および栄養培地に関するものとする。

本発明の 1 態様によれば、本方法はさらに工程 b) の後に実施する 2 工程：

c) ファイトケミカル産生のために植物細胞培養物を改変すること；そして

d) ファイトケミカルを産生させ、産生したファイトケミカルを増殖した植物細胞バイオマスおよび培地から単離すること；

を含むことができる。

10

“ ファイトケミカル ” という表現は、本明細書中で用いる場合、アルカロイド類、タキサン類、タキシン類、テルペン類、ステロイド類、キノン類、フラボノイド類、タンニン類、サポニン類、クマリン類、カロテノイド類、およびその任意の生合成中間体を表すものとする。

本発明の他の態様によれば、本方法はさらに工程 b) の後に実施する 2 工程：

c) 組換えタンパク質および抗体の産生のために植物細胞培養物を改変すること；そして

d) 組換えタンパク質および抗体を産生させ、産生した組換えタンパク質および抗体を増殖した植物細胞バイオマスおよび培地から単離すること；

を含むことができる。

本発明の他の態様によれば、植物ベースの培養法を工業的規模にまで拡大する方法であって、

20

a) 植物細胞培養物を本発明方法に従って増殖させて、高い細胞濃度の第 1 容量の培養物を得て；そして

b) 植物細胞培養を工業的規模にまで拡大するために、濃厚な第 1 容量の少なくとも一部を第 2 容量の培養物に接種し、その際第 2 容量は第 1 容量より大きく；

これにより、植物細胞培養物の接種容量比 (volumetric inoculation ratio) が従来のバッチ式培養法を用いた場合より低くなる；

工程を含む方法が提供される。

“ 高濃度 ” という表現は、本明細書中で用いる場合、細胞数約 $3 \times 10^6 \sim 60 \times 10^6$ 個 ml^{-1} の濃度を意味するものとする。

30

“ 接種容量比 ” という表現は、本明細書中で用いる場合、約 1:20 ~ 1:60 の比率を意味するものとする。

発明の詳細な記述

本発明によれば、下記の動的培養法が提供される：

a) 懸濁培養した特定の種の生存可能な植物細胞の十分な量の接種物を、適切な培養器に入れた一定量の新鮮な無菌培地に添加する；この培地は最初はその植物細胞の増殖に適したすべての多量養素、微量養素および植物成長調節剤を十分な量含む；

b) この植物細胞懸濁培養物を適切な増殖条件下 (必要に応じて無菌性、混合速度、温度、必要ならば光、酸素供給など) に保持する；

c) この植物細胞懸濁培養物を、細胞分裂が開始して監視条件下 (バイオマスおよび細胞濃度の上昇、主な多量養素 (炭水化物、アンモニウムおよびホスフェートイオンなど) の取込み) で持続しうるのに適した期間、これらの適切な増殖条件下に保持する；

40

d) この培養物の細胞増殖曲線に沿った適切な時点で (これは、細胞外 NH_4 取込み終了、細胞分裂終了、最大酸素取込み速度などと一致するであろう)、 NH_4 イオン、ならびに細胞の生存および分裂の継続に必須である他の多量養素 (これには炭水化物、溶存酸素、ホスフェートおよびカリウムが含まれるが、これらに限定されない) を、必要に応じて細胞分裂の持続に適した速度で培養物に定期的または連続的に供給する；

e) 重要な多量養素 (これには炭水化物および溶存酸素が含まれるが、これらに限定されない) が有害なほど枯渇することなく、または有毒となる可能性のある重要な多量養素 (これには NH_4 および供給無機塩類の対イオンが含まれるが、これらに限定されない) を過

50

剰供給することなく、細胞分裂を最大速度に維持できるように、細胞の増殖、および細胞による主な多量養素（主に炭水化物、溶存酸素、ホスフェートおよびカリウム、これらがすべてではない）の消費速度、および培養条件（多量養素供給方式を含む）を頻繁に監視する；そして

f) 最大細胞濃度が達成され、目的とするファイトケミカル、組換えタンパク質または抗体の産生に培養物を使用できるようになるまで、この動的かつ適応性の培養法を続ける。本発明方法をピチス・ビニフェラおよびエシュショルチア・カリフォルニカ細胞培養物につき2-Lおよび5-Lヘリカル・リボン・インペラー（helical ribbon impeller、HRI）コンピューター監視および制御バイオリアクターにより試験して成功した。従来のバッチ培養物（細胞数約 $2 \sim 2.5 \times 10^6$ 個 ml^{-1} ）と比較して最高で約3倍（すなわちピチス・ビニフェラ培養物につき約 7.2×10^6 個 ml^{-1} 、実施例1参照）および約10倍（すなわちエシュショルチア・カリフォルニカ培養物につき約 20×10^6 個 ml^{-1} ）が達成された。得られた培養法を適正に操作および制御することにより、少なくとも最高約30倍（約 60×10^6 個 ml^{-1} ）の細胞増加が期待される。

本発明は以下の実施例を参照することによりさらに容易に理解されるであろう。これらは本発明を説明するために示したものであって、本発明の範囲を限定するためのものではない。

実施例 I

バイオリアクター内で実施したピチス・ビニフェラ細胞培養の細胞濃度上昇

植物細胞系および懸濁培養

0.1mg L^{-1} - ナフタレン酢酸、0.2mg L^{-1} カイネチンおよび30g L^{-1} ショ糖を補充した植物細胞培養用標準ガンボルグB5増殖培地（Gamborg, O.L.）ら（1968）Exp. Cell Res., 50:151 - 158）100mlを入れた綿栓付き500ml広口三角フラスコ内で暗所において、ピチス・ビニフェラ細胞系の懸濁培養を維持した。この培地を使用前に20分間、水蒸気滅菌した。115mlの懸濁液を入れた500mlフラスコ内で、25 に維持し、115RPMで撹拌しながら振とうフラスコ懸濁培養を行った。バイオリアクター培養のための接種物を同様に1-Lのフラスコ内で調製した。

バイオリアクター培養

コンピューターベースシステムを用いた温度、混合速度、溶存酸素濃度（DO）および培地導電率（監視のみ）の連続監視および制御のために装備した2-Lヘリカル・リボン・インペラー（HRI）バイオリアクター内で、培養を行った。バイオリアクターおよび培地（前記と同じ）を1時間、水蒸気滅菌した。用いた細胞系独自の要件に従って、25 において無光下で培養を実施した。接種容量により、初期バイオマス濃度約 1.6g dw L^{-1} となった。初期混合速度を60RPMに設定した。

実験前に検量した予め分極させた（prepolarized）インゴールド（INGOLD、商標）ポーラログラフプローブを用いて、バイオリアクター培養物の溶存酸素濃度（DO）を測定した。0.2L min^{-1} （約0.1VVM）の速度で通気したバイオリアクターヘッドスペースの酸素分圧を操作することにより、溶存酸素濃度を50%空気飽和に制御した。適正な制御アルゴリズムに従ってコンピューター調節されたガス混合システムにより、自動的にこの組成に調整した。明らかにこの培養システムの初期酸素伝達速度（OTR）は低かった。DO制御装置が飽和した時点で、バイオリアクターの混合速度を培養物の酸素要求に適合するように次第に高めた。達した最高速度は100RPMであった。その結果生じたゆるやかな混合剪断力増大は、実験中にみられた細胞屑の量が少ないことからみて（全バイオマス容量の $< 1 \sim 2\%$ ）、細胞および懸濁液に影響を与えなかった。

多量養素供給計画

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ およびグルコースの濃厚水溶液を別個に調製し、水蒸気滅菌（20分）前に0.1N KOHによりそれらのpHを5.8に調整した。細胞外炭水化物枯渇はピチス・ビニフェラ細胞の生存に著しい影響を与えるので（Pepin, M.F.ら（1995）Biotechnology and Bioengineering, 47:131 - 138）、炭水化物制限を防ぎ、培地が連続的細胞増殖を確実に持続するように、供給計画にはグルコースを含めた。これらの溶液を使用前に混合した。

10

20

30

40

50

供給計画は、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + グルコース溶液を 8.5L h^{-1} の一定速度で添加することからなっていた。これは供給速度 $0.22\text{mM NH}_4 \text{ h}^{-1}$ 、および全グルコース濃度上昇 5g L^{-1} に相当する。Pepinら (1995, *Biotechnology and Bioengineering*, 47:131 - 138) にみられるように、培地の酸素取込み速度 (OUR) および細胞分裂のレベル低下を利用して、バイオリアクター培養物への濃厚 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ + グルコース溶液添加を開始した。

分析法

懸濁液試料1mlの細胞凝集物を10% (w/v) 三酸化クロム溶液2mlで解離した後、フーシュ - ローゼンタール (Fusch - Fosenthal) 血球計数器を用いて細胞数を測定した。この混合物を60 に60分間保持した。アセトン1Lに溶解したフルオレセインジアセテート5gの溶液で着色した後、細胞生存性をアッセイした。植物細胞懸濁液試料のpHおよび導電率を、慣用されるpHプローブおよび導電率プローブにより測定した。既知容量 (約10ml) の植物細胞懸濁液をガラス繊維フィルター (ワットマンNo.41、無灰分、 $5\mu\text{m}$) でろ過することにより、バイオマス濃度を測定した。培地試料をその後の分析のために凍結した (-20)。細胞を脱イオン水で洗浄し、湿潤バイオマス濃度 (ww) 測定のために秤量し、乾燥バイオマス濃度 (dw) 測定のために60 で24時間乾燥させた。細胞外炭水化物濃度を、高性能液体クロマトグラフィシステム (ウオーターズ・アソシエーツ社からのポンプモデル6000 A、ギルソン社からの自動インゼクターモデル231/401および屈折率検出器モデル132、マンドル社からのブロックヒーターモデル7980、ならびにヒューレット・パカード社からの積分計モデル3394A) で測定した。炭水化物の分離は、80 に保持したバイオラット・アミネックス、カーボハイドレートHPX - 87C (Carbohydrate HPX - 87C、商標) を用いて行われた。移動相は 1.0ml min^{-1} の速度で流れる水であった。濃度をすべて水の蒸発および湿潤バイオマス容量につき補正し、したがって初期培養物容量基準で報告する。

バイオリアクター培養の酸素取込み速度 (OUR) は、同時に溶存酸素濃度 (DO) 制御装置の動作を止め、かつバイオリアクター混合速度を12RPMに低下させることにより、定期的に測定された。これらの操作条件で、DO測定の動態および植物細胞懸濁液の混合に過度の影響を与えずに、培養物への酸素伝達速度 (OTR) が最小になった。得られたDO低下は方程式1で表される。

$$\frac{dDO}{dt} = \text{OTR} - \text{OUR} \quad (1)$$

d t

これらの一時的操作条件で得られたOTRレベルは、微分値 dDO/dt の5%未満であった。したがって得られたOURは、経時的に低下するDOの傾斜から方程式2により判定された。

$$\frac{dDO}{dt} \sim \text{OUR} \quad (2)$$

d t

対数乾燥バイオマスおよび細胞濃度増殖曲線の直線部分についての線形回帰を用いて、平均比増殖速度を計算した。

結果と考察

プログラミングされたグルコース富化 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 溶液添加を伴う供給バッチ式バイオリアクター培養に関する細胞数および乾燥バイオマスの増殖曲線を、図1Aに示す。7.9日目から9.7日目までの NH_4 添加により、最初のOURレベル低下 (図1B:6.3日目) 後も細胞分裂が持続し、細胞濃度が上昇した。

追加 NH_4 イオンの供給後、最初の48時間の間、比細胞増殖速度 (μ_e)

は 0.28 h^{-1} 、すなわち培養開始以来同じ値に、一定に保持された。細胞増殖期間の延長により、バイオリアクター培養につき生存細胞数 $7.2 \times 10^6 \text{ 個 ml}^{-1}$ の濃度に達することができた。一方、振とうフラスコによる対照培養については、6.5日目に生存細胞数 $2.3 \times 10^6 \text{ 個 ml}^{-1}$ で細胞濃度レベルが低下した (図2)。OURがその最大値に達した時点で濃厚な栄養素溶液を供給するのは、細胞増殖を高めるための有効な計画であることが証明された。

10

20

30

40

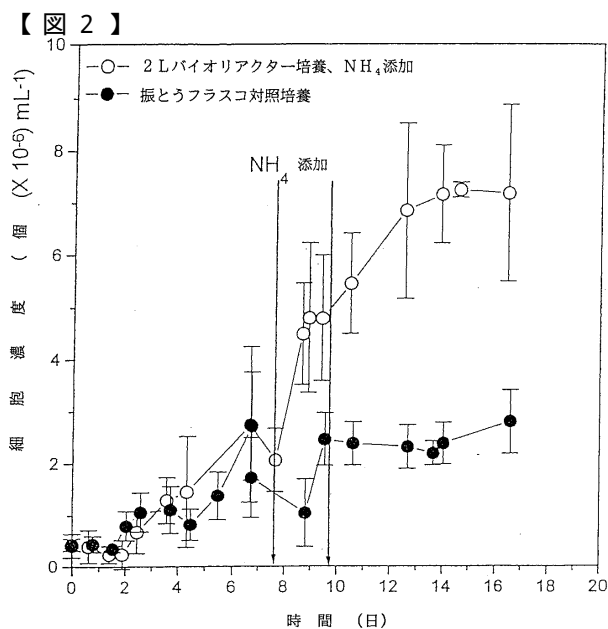
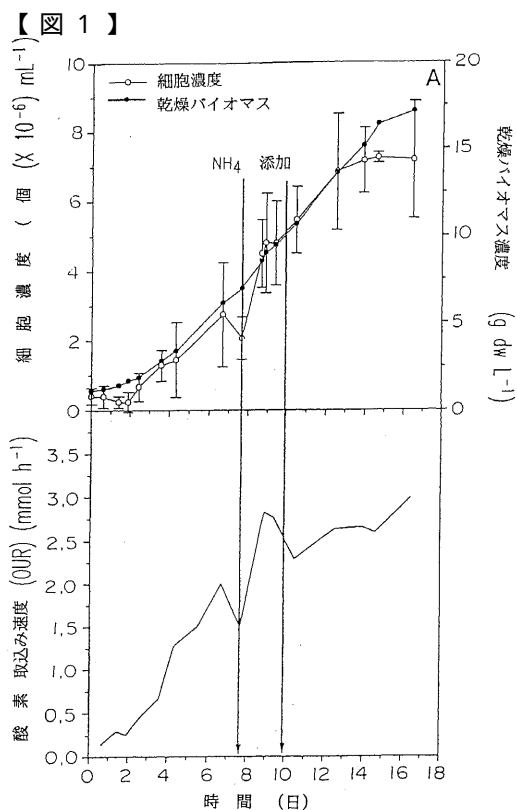
50

追加NH₄イオンの供給後、最初の24時間以内に、容量酸素取込み速度は1.5~2.0mmol h⁻¹から2.6~2.8mmol h⁻¹に上昇し、その後プラトーに達した。細胞分裂再誘導の24時間後、生存細胞濃度低下のため、相対NH₄添加量は9.9mmol NH₄ (細胞数10⁶個 h)⁻¹から5.5mmol NH₄ (細胞数10⁶個 h)⁻¹に低下した。これはより高い酸素取込み速度および細胞分裂増大を持続させるには不十分であったかもしれない。

OURがその最大値に達した時点で濃厚な栄養素溶液を供給するのは、ピチス・ビニフェラ細胞培養の細胞分裂を高めるための有効な計画であることが証明された。グルコース富化(NH₄)₂SO₄水溶液添加により、細胞増殖期間を持続させることができた。対照振とう培養についての細胞数2.3×10⁶個 ml⁻¹と比較して、(NH₄)₂SO₄補充培養については生存細胞濃度が7.2×10⁶個 ml⁻¹に達した。

本発明をその特定の態様に関して記載したが、これらをさらに改変することができ、本発明は一般に本発明の原理に従った本発明のいかなる変更、使用、または応用をも包含することは理解されるであろう。本発明は本発明の開示から当業者に自明の、および前記の本質的特色に適用できる、および以下の請求の範囲に示す程度の逸脱は本発明に包含される。

10



フロントページの続き

- (51) Int.Cl.⁷ F I
 (C 1 2 P 21/02 C 1 2 P 21/02 C
 C 1 2 R 1:91) C 1 2 R 1:91
- (74)代理人 100096013
 弁理士 富田 博行
- (72)発明者 ペピン, マリイ・フランス
 アメリカ合衆国イリノイ州6 1 8 2 1, シャンペイン, ウェスト・スプリングフィールド 2 4 0
 3, アール 1 2
- (72)発明者 アーチアンボルト, ジーン
 カナダ国ケベック エイチ9イー・1エス2, イル・ビザー, リュー・サン ラファエル 2 4 8
- (72)発明者 シャヴァリエ, クロード
 カナダ国ケベック ジェイ0アール・1エル0, サント アデル, シュマン・デュ・ラク 1 1
 5 0

審査官 長井 啓子

- (56)参考文献 特開平08 - 131161 (JP, A)
 竹内正幸ら「新植物組織培養」(昭和54年9月20日朝倉書店発行)第118~120頁

- (58)調査した分野(Int.Cl.⁷, DB名)
 C12N 5/04
 C12P 1/00-41/00
 C12M 1/00-3/08
 BIOSIS/WPIDS(STN)