

# シームレスカプセル化技術を利用した バイオカプセル種子の開発

担 当 機 関 名	研 究 期 間
森 下 仁 丹 株 式 会 社	平成14年度～16年度

## I. 3ヶ年の研究成果の要約

### 1. 技術開発課題の目的

多糖類ゲルビーズとは全く異なる構造と機能を有する当社独自のシームレスカプセルを利用し、冷蔵設備のない簡易な施設でも高発芽率を保ちながら3ヶ月程度保存でき、作り置きが可能で、適した時期に播種できる実用性の高いバイオカプセル種子を開発する。これにより、種子繁殖が困難な植物の組織培養により、大量増殖したクローン不定胚等の「種子化」が可能になり、新しい農林業を生み出すことに貢献する。

### 2. 担当者

森下仁丹株式会社研究開発本部 部 長 浅田雅宣  
次 長 釜口良誠 課 長 松浦洋一 主 任 中野修身  
研究員 金谷 忠 研究員 中辻雅章 研究員 吉野智恵  
大阪府立食とみどりの総合技術センター 主任研究員 岩本 嗣  
大阪大学大学院基礎工学研究科 教授 田谷 正仁 助教授 紀ノ岡正博  
助手 西岡 求 大学院生 尾島由紘

### 3. 研究の実施場所

自 社 森下仁丹株式会社 大阪府大阪市中央区玉造1丁目1-30  
研究委託先 大阪府立食とみどりの総合技術センター 大阪府羽曳野市尺度442  
研究委託先 大阪大学大学院基礎工学研究科 大阪府豊中市待兼山町1-3  
研究委託先 大阪府立大学大学院農学生命科学研究科 (平成14年度と15年度)  
大阪府堺市学園町1-1

### 4. 要約

#### ア. 技術開発の方法と結果

ア-1 カプセル皮膜の開発：バイオカプセル種子としての特性を考慮し、外皮膜としてゼラチン、内皮膜として融点40℃前後の硬化油脂を選択した。

ア-2 粒(不定胚)のカプセル化装置開発：粒を懸濁状態で送液可能なモノポンプを採用し、配管とノズルを太くし、配管の接合部分を滑らかにすることにより、長さの異なる不定胚の詰まりを無くし、送液をスムーズにした。

- ア-3 不定胚の効率的作出条件確立：アスパラガスは雄株の商品価値が高いため、優良品種「ウェルカム」を目的植物とした。アスパラガスの茎頂組織からの多芽集塊の誘導と多芽集塊からのEC誘導に成功し、カプセル化に適したサイズのアスパラガスの不定胚を液体培地で同調的に大量培養する基礎技術を確立した。
- ア-4 不定胚の熱測定：ニンジン不定胚では、発熱量と状態に相関性が認められたが、アスパラガス不定胚では、発熱量が少なく、明確ではなかった。
- ア-5 バイオカプセル種子の試作：カプセル皮膜物質の厚さ等の条件を決定し、無菌状態でアスパラガス不定胚入りカプセルの調製技術を確立した。カプセル化不定胚を保存安定性と発芽試験に供した。さらに、空カプセルが無い様に、不定胚密度を上げてカプセル化を試み、99.8%のカプセル化率を達成した。
- ア-6 不定胚大量生産システムの開発：外皮膜と内皮膜の酸素遮蔽能により、カプセル内の酸素濃度は、休眠誘導が可能なレベルまで下がった。不定胚の画像処理システム（ハードとソフト）を構築し、不定胚の円形度により、良、不良の判定が可能となった。さらに、アスパラガスの正常体と変異体の遺伝子をRAPD法で分析し、変異体の識別を可能とした。長期継代培養後の懸濁細胞と誘導した不定胚、さらにその再生植物体は、形態観察と本RAPD法で変異は認められなかった。
- ア-7 バイオカプセル種子の発芽、保存性の確認：従来のアスパラガスの未脱水不定胚は発芽率が低かったが、脱水処理により発芽率の向上が認められた。脱水不定胚のカプセル化は従来条件では困難であったが、不定胚懸濁液の比重を下げ、装置の配管やノズル部等を太く滑らかにする改造によりカプセル化が可能となった。脱水不定胚をカプセル化し、室温と低温（10℃）で保存した。54日間保存後、カプセルから取り出した不定胚の発芽活性は、55%と高く保たれていた。カプセルからの発芽率は、21.4%であったが、向上させるべく検討中である。
- ア-8 再生植物体の評価：アスパラガス不定胚から再生した植物体1460個体と親植物の「ウェルカム」雄株優良系統20個体の染色体数は、全て $2n=20$ であった。再生植物体の18項目の特性調査を行い、茎数と太さを除く16項目において、親株と有意な差は認められなかった。
- ア-9 市場調査と販路の開拓：種苗会社を訪問し、技術紹介を行い、必要性質等を聞いた。さらに、完成を期待され、完成時の販路の手ごたえを得た。

#### イ. 事業化の見通し

アスパラガス不定胚において99.8%のカプセル化率を達成し、発芽率以外の周辺の技術はほとんど確立したため、今後、発芽率を向上させ、保存安定性を高めることにより、種苗会社と組んで事業化を目指し、ビジネスを構築したい。

#### ウ. 特許出願、学会発表

- ・特許：3件出願準備中
- ・平成16年度日本生物工学会大会で2件口頭発表
- ・平成16年度大阪府立食とみどりの総合技術センター研究発表会で3件口頭発表
- ・平成17年度日本育種学会2005年大会（筑波）で2件ポスター発表予定

## II. 3カ年の研究成果の本文

### 1. 技術開発課題の目的

種子繁殖が困難な植物や、雌雄どちらかの株の商品価値が高い植物や、栄養繁殖性の植物等では、組織培養によるクローン不定胚やプロトコウム様球体(PLB)による繁殖が考えられており、不定胚等をアルギン酸Caゲルで包んだ「人工種子」が検討されてきたが、物理的に強固でないこと、乾燥に耐えないこと、長期保存が困難なこともあり、実用化に至っていない。

本技術開発では、森下仁丹(株)が開発した水も包むことが可能なシームレスカプセルを用いて不定胚等を包み、物理的強度が高く、乾燥に耐え、高発芽率を保ちながら3ヶ月程度保存でき、適した時期に播種できる実用性の高いバイオカプセル種子を開発することを目的とする。これにより、PLBや組織培養で大量増殖されたクローン不定胚等の「種子化」が可能になり、種苗工場とドッキングした新しい農林業を生み出すことに貢献する。

### 2. 技術開発課題の内容

#### (1) 技術開発の実施に必要な事業

##### ア. 基礎となる試験研究の概要及び技術開発の目的

当社は、油性物質のカプセル化を手始めに、独自に開発した同心3重ノズル構造のカプセル化装置を用いて、界面形成を利用した W/O/W の真球の3層構造カプセルの生産技術を確立した。これにより、水性の液体を包むことが出来るようになり、カプセル内で生細胞の培養増殖も可能にしている。カプセルサイズは 0.3mm～10mm の範囲で自由に設定でき、外部に水分が与えられると外皮膜に混合したリパーゼの作用により内皮膜の硬化油が崩壊する機能を持ったカプセルの開発も進め、基礎となる知見を得ている。このようなカプセルに不定胚等の粒径 2～6mm の再分化可能組織を適当な培地とともに包括する技術を開発する。これにより、長期保存が可能で、播種し水が与えられると速やかにカプセルが崩壊し発芽に至るバイオカプセル種子が得られ、ビジネスに繋げる。

本技術開発では、実用化に向け、各要素技術について、下記の研究機関と連携を図り、技術開発を進めてきた。

連携機関	大阪府立食とみどりの総合技術センター	主任研究員	岩本 嗣
	不定胚誘導、培養、不定胚提供、情報		
	大阪大学大学院基礎工学研究科	教授	田谷正仁
	不定胚大量増殖バイオリアクター、不定胚の識別、遺伝的変異の識別		
	大阪府立大学大学院農学生命科学研究科	助教授	深田はるみ
	不定胚発芽状態、休眠状態の熱量測定による把握 (平成14, 15年度)		

## イ. 技術開発の内容

### イー1 カプセル皮膜の開発

バイオカプセル種子に最も適したカプセルの外皮膜と内皮膜素材を選定した。

#### イー1-1 皮膜に適した素材の探索、収集

水溶性外皮膜素材を集め、物性を調べ、カプセル化の可否を評価した。疎水性硬化油脂素材を集め、物性を調べた。

#### イー1-2 皮膜の水分蒸散、酸素透過性の測定

各種膜素材で内皮膜と外皮膜を調製し、水分の蒸散、酸素透過性を測定した。

#### イー1-3 リパーゼ入り皮膜の開発

乾燥時には安定で、水を与えると1～2日間で崩壊するカプセルとした。

### イー2 粒（不定胚、PLB）のカプセル化装置開発

従来の液体のカプセル化装置の知見を基に、不定胚、PLBのような粒を無菌条件下でカプセル化出来る試験装置を製作した。

### イー3 不定胚の効率的作出条件確立

#### イー3-1 アスパラガス、ニンジン等

アスパラガス、ニンジン等の不定胚の作出条件を確立した。

#### イー3-2 液体培地での不定胚増殖条件確立

カプセル化に適したサイズで大量培養を可能とする基礎条件を確立した。

よりサイズが揃い、発芽活性の高い不定胚を篩い分けや沈降などにより分別取得した。

### イー4 不定胚の熱測定

#### イー4-1 アスパラガス、ニンジン等

不定胚誘導時、休眠状態、発芽状態での熱測定を行い、状態と発熱量の関係を明確にした。

#### イー4-2 カプセル化した不定胚の熱測定

カプセル化した不定胚の熱測定を行い、状態の把握の可能性を認めたが、目的のアスパラガスの不定胚の発熱量が少なかったため、発芽率の高い“種子”の選別は困難であった。

#### イー4-3 リパーゼによる硬化油分解熱

予備試験で、リパーゼによるカプセルの硬化油の分解時に発生する熱量を調べたが、明確な発熱挙動が得られなかったため、平成15年度で熱測定は終了とした。

### イー5 バイオカプセル種子の試作

#### イー5-1 “種子”用カプセル化技術の確立

先に絞り込んだ皮膜素材と製作した装置を用いてバイオカプセル種子に適したカプセル構造（内皮膜、外皮膜の厚さ、リパーゼ量等）を決定した。リパーゼはその後の検討で、不定胚に影響を与えるため、除いた。

#### イー5-2 不定胚封入カプセルの試作

アスパラガスの不定胚を無菌状態でカプセル化することに成功した。それを

保存安定性、発芽試験に供し、保存温度の影響を認めた。

#### イー6 不定胚大量生産システムの開発

##### イー6-1 不定胚の形状と再分化効率の解明

不定胚の形状により、再分化率に差があることを見出し、再分化率の高い不定胚を誘導するとともに、カプセル化種子に適した不定胚の形態識別画像処理システム（ハード及びソフト）を開発し、形態識別を可能とした。遺伝子解析のRAPD法は、変異の判定に使える可能性を見出した。

##### イー6-2 バイオリアクターシステムの製作

アスパラガス不定胚の高密度フラスコ培養が可能になり、当面は大規模なリアクターは必要でないことが分かったため、形態と遺伝子による変異の識別に注力した。

#### イー7 “種子”の保存、発芽試験

各種温度条件下で保存安定性、発芽率等の確認

##### イー7-1 カプセル化種子の保存性を確認

アスパラガス不定胚カプセルを各種温度、湿度条件下で保存し、発芽条件を検討した。

##### イー7-2 発芽挙動の検討

不定胚の生長に影響を与えるカプセル化の因子を検討し、発芽するカプセル化種子の構築に注力した。

#### イー8 再生植物体の評価

アスパラガス不定胚から再生した植物体の形態、特性評価を行い、親植物の「ウェルカム」雄株優良系統の3年性株と比較した。さらに、再生植物体の染色体を調査した。

#### イー9 市場調査と販路の開拓

販路開拓のため、種苗会社へ技術紹介を行い、市場の意見を聞いた。

### ウ. 技術開発の実施結果

#### ウー1 カプセル皮膜の開発

##### ウー1-1 皮膜に適した素材の探索、収集

外皮膜素材の探索：本シームレスカプセルの外皮膜素材として、温度によるゾル-ゲル転移によって皮膜形成が可能である必要がある。ゲル化剤としてゼラチン、寒天、カラギーナンを選択し、可塑剤、皮膜強化剤を種々混合したものの物性の測定を検討したところ、ゼラチンが低粘度（150cP）でかつゲル強度（3.07kg）が高く、物性的に外皮膜に最も適していた。

内皮膜素材の探索：内皮膜としては、室温においては固体である種々の硬化油脂の融点を測定し、カプセル化に適している硬化油脂を選んだ。

##### ウー1-2 皮膜の水分蒸散、酸素透過性の測定

上で検討した内皮膜素材の水分の蒸散を測定し、透湿度を求め、表1に示し

た。④と⑤の融点が 42～44℃であり、透湿度も低く、さらに、④の方が速く凝固し、皮膜形成性に優れていた。そのため、バイオカプセル種子の内皮膜用の硬化油脂として④を用いることにした。

皮膜の酸素透過性は、酸素透過測定装置で測定した。その結果、外皮膜として用いるゼラチン皮膜では、透過係数は、 $1.7 \times 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$  と酸素透過性に乏しく、内皮膜の測定では、硬化油脂の WITOCAN 42/44 と PHARMASOL A-105 を用いて、透過係数を求めたところ、どちらも  $5 \times 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$  となった。外皮膜の拡散係数は、内皮膜より約 1/300 小さい値であり、酸素の遮蔽性は外皮膜が担っていることが明らかになった。

表 1 検討した硬化油脂の融点と透湿度

	硬化油脂	融点 (°C)	透湿度 R (g/m <sup>2</sup> ・hr)
①	パームカーネル H	43～45	1.09
②	WITEPSOL H-15	44～46	0.79
③	インカカオ 200	38～40	0.81
④	WITOCAN 42/44	42～44	0.75
⑤	PHARMASOL A-105	42～44	0.76

### ウー 1-3 リパーゼ入り皮膜の開発

安定な液状リパーゼを 60℃の 26%ゼラチン溶液に 0.05、0.5% (V/V) の割合で添加して外皮膜とし、WITOCAN 42/44 を内皮膜の硬化油脂として赤色色素水溶液をカプセル化した。水を与えることでリパーゼが硬化油脂を分解し、0.05%では 24 時間で、0.5%は 4 時間で赤色色素の漏出が認められた (図1)。そのため、外皮膜にリパーゼを 0.05～0.1%添加することにより、乾燥時にはリパーゼが働かず安定で、播種して水を与えると 1～2 日間で崩壊するカプセルを調製することが可能となった。



図1 リパーゼの作用による内皮膜の崩壊  
リパーゼは外皮膜に 0.05%添加

### ウー 2 不定胚・粒用カプセル化装置開発

バイオカプセル種子用のカプセル化機のモノポンプ部とノズル部の模式図を図2に示した。ノズルは、同心3重管とし、内径は、不定胚が通るように、φ4mm と太くすることで直径 9mm のカプセルまで調製可能とした。

#### ・カプセル化機の特徴と改良

4～6mmの細長いアスパラガスの不定胚をカプセル化するため、従来のカプセル化機を大幅に改造する必要があった。

改良・改善点を以下に列挙する。

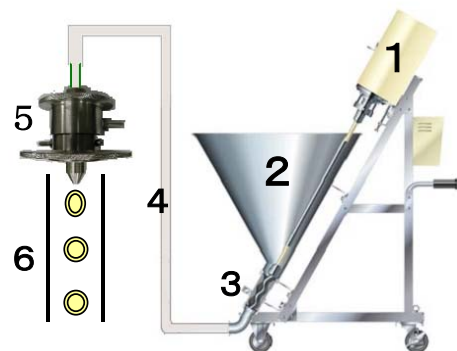


図2 バイオカプセル種子用カプセル化機のノズルとポンプ部分  
1. モノポンプのモーター  
2. ホッパー 3. モノポンプ部  
4. 配管 5. 同心3重ノズル部  
6. 形成管

- ① 不定胚懸濁液の送液用モノポンプに大きいローターを採用し、アスパラガスの5～6mmの不定胚を傷付けずに定量的に送ることが可能となった。
- ② 配管の内径を6mmに太くし、接続部分を滑らかにした。
- ③ 形成管の内径を7mm→30mmへと太くした。
- ④ 配管の温度制御の自動化、凝固液の温度制御精度の向上。
- ⑤ 冷却機のカパアップ。

この様な改造・改良により、不定胚の詰まりや不均一な流れを改善し、不定胚入りカプセルの収率が4→11→40%へと大幅に向上した。さらに、形状の揃った不定胚を用い、不定胚密度を上げてカプセル化することにより、**99.8%**のカプセル化率を達成した。これは、1000個に2個程度の空カプセルの割合であり、セルソーターの様な選別機を用いる必要が無く、ビジネス化できるレベルである。

・脱水不定胚用にカプセル化機の改良

後述するように、発芽率向上のため不定胚の脱水処理を行ったが、微細根毛の発生と比重低下により、内容液組成と装置を改良する必要があった。そのため、比重調節剤の添加量を減らし、モノポンプのホッパー中での分散性を高め、送液をスムーズにした。装置は、モノポンプ排出部の出口内径をφ6mmに、ノズルの不定胚懸濁液導入部のアダプターを滑らかに改良し、連結部分の凹凸を解消する工作を行った。その結果、4～6mmの脱水不定胚のカプセル化を問題なく行うことが可能となった。

### ウー 3 不定胚の効率的作出条件確立

#### ウー 3-1 アスパラガス、コーヒー

・カルス経由の Embryogenic Cell (EC) 誘導

植物ホルモン組成、供試部位、スクロース濃度、光条件を検討し、EC形成培地 (MS + 2.0mg/l 2,4-D + 0.2mg/l 2iP + 1.0mg/l GA<sub>3</sub> + 5.0%スクロース + 0.8%寒天) を決定した。この培地上に茎頂組織を置床し、25℃、3,000 lx、16時間照明で培養することにより、EC形成率は17.5%となった。

・多芽集塊経由の EC 誘導

カルス経由の条件では変異の可能性が高いため、茎頂組織から多芽集塊を経てEC誘導を試みた。そのメリットは、次のようなものである。

- ① 選抜優良系統の雄株と同じ特性を持った外植体を利用
- ② 材料の殺菌処理が不要
- ③ 採取時期が限定されず、常時供給が可能
- ④ 遺伝的変異の少ない外植体を供給可能

結果を列挙すると、アスパラガスの茎頂組織から多芽集塊誘導のホルモン (アンシミドール) は、5～10mg/l が適していること、さらに多芽集塊からの EC 誘導には、2,4-D 2mg/l、GA<sub>3</sub> 1mg/l、ショ糖 5%の培地組成が好ましく、その継代培養においては、2,4-D 2mg/l、ショ糖 3%で EC 形成率が高かった。また、培養期間は24～32週において EC 形成率が高かった。形態を図3に示した。



若茎から茎頂組織を摘出

多芽集塊の誘導

不定胚形成能の高い EC の選抜

図3 多芽集塊を経る EC の誘導

・ コーヒー不定胚の誘導および増殖

*Coffea canephora* の葉片を 1/2MS、スクロース 3%、2ip 20  $\mu$ M の不定胚誘導培地に置床し、2 ヶ月でカルスを経由せず不定胚が得られた (図4)。さらに、この不定胚から液体培地で二次不定胚を得、増殖させ得た。



図4 コーヒー葉からの不定胚誘導

ウー 3 - 2 液体培地での不定胚増殖条件確立

不定胚形成には、継代培養時の細胞密度も影響することが明らかになり、液体培地で 10,000 培から 20,000 倍に希釈することで不定胚形成率は高くなった。この流れを図5に示した。この様にして継続的に誘導し、増殖させた不定胚をその都度サイズによる篩い分けを行い、カプセル化に供した。



ECから不定胚の誘導

懸濁培養不定胚

不定胚の発芽

図5 液体培地でのアスパラガス EC から不定胚の誘導

よりそろったサイズの不定胚を得るために、以下の試みを行った。

・同調化：まず PCV を測定し、10,000 倍希釈で培養を開始し、誘導 2 週間目に培地交換しながら、108~1,000  $\mu$ m の細胞集塊を集めて培養を続ける。次に誘導 3 週間目に 200~500 又は 500~1,000  $\mu$ m の細胞集塊を集め、新しい培地を加えて 2 分割し、不定胚を希釈する。さらに、誘導 4 週間目に新しい培地を加えて 3~4 分割し、不定胚を希釈すると、誘導開始後 5-6 週間目には、1,000~2,000  $\mu$ m の揃った不定胚を得ることができる。以上の方法により、1,000~2,000  $\mu$ m の不定胚が 54.7%を占めるまでに向上し (図6)、同調化が可能となった。

・不定胚の効率的な発芽条件

0.2%のゼランガムを加えた MS 固体培地で密閉して培養すると発芽率は2.0%であった。一方ゼランガムの濃度を1%に変えて培地を固くし、ミリシールという通気膜を用いて、培養容器内の湿度を下げることで発芽率が高まり、正常発芽率が88%まで向上した。培養容器内で発芽した幼植物体は、生育を続け、順化・鉢上げを経て、完全な植物体に再生した。

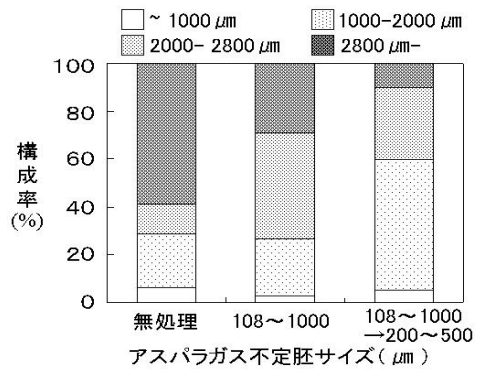


図6 アスパラガスの不定胚誘導に及ぼすサイズ選抜の効果

ウー4 不定胚の熱測定

不定胚の発芽過程の追跡や不定胚の状態（特に休眠状態）の評価が非破壊で可能になると、保存条件の設定や、保存状態の把握ができ、バイオカプセル種子のビジネス構築時には、極めて有力なツールとなる。そのため、高感度熱量計を用いて不定胚が微量発生する熱量を測定し、評価を試みた。

ウー4-1 アスパラガス、ニンジン等

熱量計の測定セル中の培地を3mlとし、カプセル化に適したサイズの1.5-2.0 mm および2.0-3.0 mmの大きさのニンジン不定胚5、10、20個を接種し、密閉した蓋と微細孔のあるシリコ栓を使用して測定した（図7）。5個と10個は2回測定した平均値である。 $f(t)$ は熱損失を補正した真の熱変化曲線に対応する。通気性のあるシリコ栓の方が明確な発熱量の差が認められた。

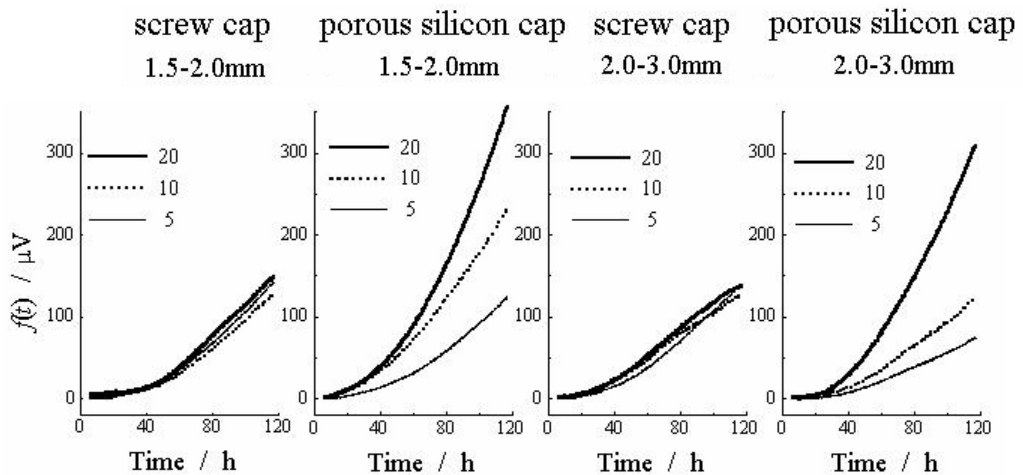


図7 ニンジン不定胚の生育-発熱曲線。図中の数字は接種した不定胚の個数を表す。

$f(t)$  曲線について、各条件下でその値が  $20 \mu V$  および  $50 \mu V$  に達したときの時間を接種した胚の数に対してプロットすると、各々時間と個数との相関が認められた。熱測定により、不定胚の出芽活性を評価することが可能と考えられた。

ニンジン不定胚の発熱量の知見から、本熱量測定は非破壊で保存状態の把握に使える可能性を見出した。図8に示すように、Aの酸素が多い状態では発熱量が多く、Cの酸素が無い状態ではほとんど発熱せず、Bのわずかに酸素がある状態では少し発熱が観察された。これは、非破壊で2日間の発熱量測定により、カプセルの皮膜状態の良し悪しと保存状態の把握が可能という評価方法に繋がる知見である。

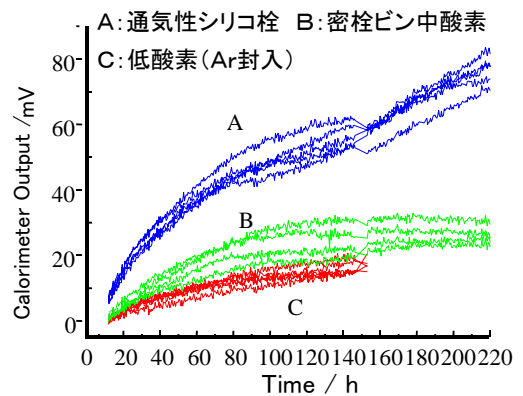


図8 不定胚の状態における発熱量の差

#### ウー 4-2 カプセル化した不定胚の熱測定

カプセル化したニンジン不定胚では、状態の把握の可能性を認めたが、目的のアスパラガスの不定胚の発熱量が少なかったため、発芽率の高い“種子”の選別や状態の把握に適用することは困難であった。そのため、平成15年度で熱測定は終了とした。

#### ウー 4-3 リパーゼによる硬化油分解熱

予備試験で、リパーゼによるカプセルの硬化油の分解時に発生する熱量を調べたが、明確な発熱挙動が得られなかったため、平成15年度で熱測定は終了とした。

#### ウー 5 バイオカプセル種子の試作

##### ウー 5-1 “種子”用カプセル化技術の確立

先に絞り込んだ皮膜素材と製作した装置を用いて調製するバイオカプセル種子(図9)に適したカプセル構造(内皮膜、外皮膜の厚さ、リパーゼ量等)を次のように決定した。

カプセルの直径：8.13mm、 内容液部の直径：7mm  
 外皮膜(ゼラチン)の厚さ：0.16mm、内皮膜(硬化油脂)の厚さ：0.4mm

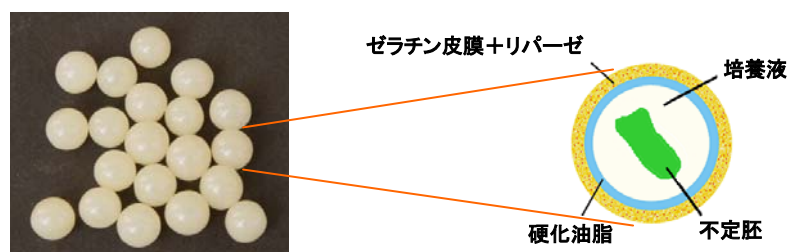


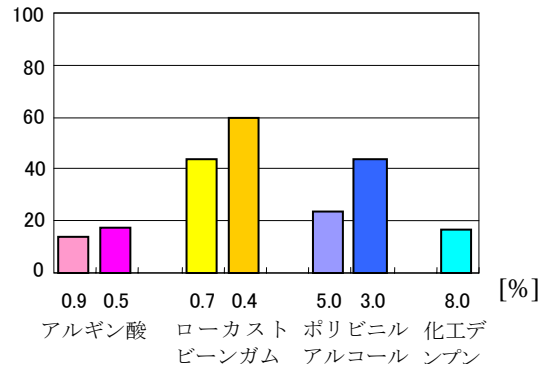
図9 アスパラガスのバイオカプセル種子とその構造

リパーゼはその後の検討で、不定胚に影響を与えることがあるため、添加することを止めた。(将来的には再度検討する。)

・不定胚懸濁液用増粘剤決定

シームレスカプセル化操作は、その特性から一度に多くの種類のサンプルを調製することには向かない。そこで諸条件を一度に検討するために96穴マイクロプレートを用いた。マイクロプレートの穴1コの内径は6.4mmであり、カプセルの最内層の内径7mmに近い数値であったため、培地200μlと不定胚を入れ、液面に硬化油をのせてフタをすることにより、ほぼ同じ挙動を示すと思われた。

内容液は、物性面では不定胚を分散させモノポンプで送るために、密度と粘度が重要な因子となる。不定胚を分散させるために、スクロース3%のMS培地の粘度を上げる必要があり、図10に示した増粘物質を検討した。その結果、カプセル化要件を満たし、分化率が最も高かったローカストビーンガム0.4%を採用した。



・脱水条件検討

アスパラガス不定胚の再分化率は、不定胚を脱水することにより向上するという廣澤らの知見より、本カプセル化種子に適した不定胚の脱水条件を検討した。表2に示すように、脱水方法により処理後の不定胚の大きさや性質が異なり、その後の分化率に大きな差が認められた。液体同調培養時の不定胚は水分を多量に含んでいるため透明感があるが、水分が抜けるにしたがって白色へ変化して行く（図11）。表2中の「脱水無し」と③区の分化率が2.1%、9.5%に対して白色に変化した不定胚の分化率は72%程度まで上昇する。予備検討も含めたこれらの知見から、脱水後カプセル化可能なサイズで白色となる⑧区の条件を選択し、得られた不定胚をカプセル化に用いた。

表2 各種脱水条件

	固体培地		ろ紙の有無	MS培地の添加	脱水期間 [日]	脱水後の不定胚の色	脱水後の不定胚の長さ [mm]	分化率 [%]
	ジェランガム濃度 [%]	スクロース濃度 [%]						
脱水無し	—	—	—	—	—	—	—	2.1
①	1	3	×	×	7~10	白	8	33.3
②	1	1	×	×	9~12	白	10	42.9
③	1	0	×	×	14	やや透明	12	9.5
④	—	3	○	○	5	白	7	72.2
⑤	—	3	○	○	7	白	8	66.7
⑥	—	3	○	○	12	白	10	33.3
⑦	0.3	3	○	○	5	透明	4~6	注1
⑧	1	3	○	○	5	白	4~6	カプセル

注1) 透明不定胚は、分化率が低いため、発芽試験を行わなかった。

## ウー 5-2 不定胚封入カプセルの試作

・カプセル機は無菌フード内に設置し、部品はオートクレーブした。発芽率向上のために、脱水したアスパラガスの3~6mmの不定胚を先に決定したMS、3%スクロース、0.4%ローカストビーンガム、pH5.8のカプセル内容液に1% (W/V)の割合で懸濁し、カプセル化を行った。装置改良前は、

ポンプ部、配管、ノズル部で不定胚の詰まり等のトラブルがあったが、改良後はスムーズにカプセル化が可能となった。カプセル化は、量産が可能な240個/分で行った。乾燥後のカプセルの外径は8.5~9.2mmであり、やや黄みを帯びた乳白色(図9)であるが、光に透かしてみると不定胚の入っているカプセルは識別が可能であった。このようにして得た不定胚入りカプセルを発芽、保存試験に供している。

・コーヒー不定胚のカプセル化も同様に行い、発芽試験に供している。

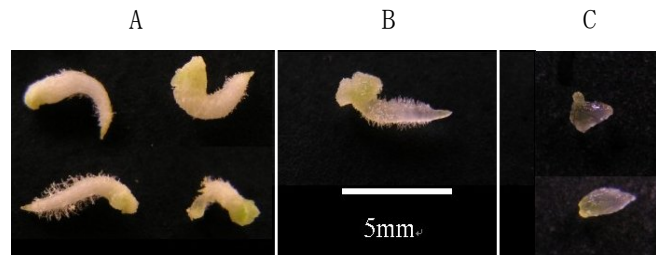


図11 脱水処理を施した不定胚  
A：脱水が十分である不定胚  
B：脱水が不十分である不定胚  
C：脱水前の不定胚

## ウー 6 不定胚大量生産システムの開発

### ウー 6-1 不定胚の形状と再分化効率の解明

#### a. 画像評価システムの構築

##### i) 不定胚認識システム(ソフト)構築

画像処理を行うプログラムを作成し、自動処理可能なシステムを構築した。ニンジン不定胚を用い形状認識を試みたところ認識可能であることが確認できた。さらに、アスパラガス不定胚についても適用したところ、認識可能であることが分かった。

##### ii) 画像取得システム(ハード)構築

汎用性の高いシステムを目指し、LED照明とマクロレンズを装着したCCDカメラにて、画像取得システムを構築した(図12)。

iii) 不定胚形状を表現できるパラメータとして、体積は、2次元的评价で投影面積として、形状は、下記に定義された円形度を指標として評価を試みた。アスパラガス不定胚において、発育段階の進行とともに円形度が増加することが確認された。

##### iv) 発育段階の形状判定

投影面積と円形度の相関により、発育段階の進行とともに両パラメータの増加

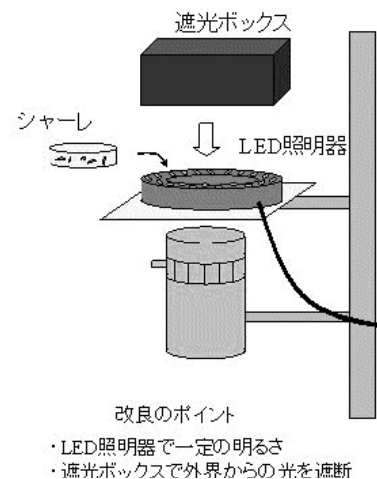


図12 画像取得システム

は、直線的であることが確認された。

v) 健全不定胚の形状判定

継代培養中における健全不定胚の判定を行うため、継代培養した不定胚群から小型不定胚のみを取り出し、その増殖および形状変化について検討を行った。継代培養期間の増加に伴い、上記で求めた投影面積と円形度の標準的な相関より上方の群となることが分った。つまり、比較的細長い不良胚群へと形状が変化することがわかった。継代回数の限界が存在することが示唆され、画像判定は正常形態か否かを判定できることが明らかとなった。

b. 遺伝的変異の解析

ビジネスにとって、再生植物体の変異は大きな問題である。遺伝子レベルにおける評価法として、広範なゲノム DNA 領域を対象とした Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法を検討した。

・ RAPD プライマーの決定

配列が公開されている 60 種類のプライマーの内、PCR 増幅断片の数と鮮明さを考慮したうえで、表 3 に示す 11 個の RAPD プライマーを選択し、以降の実験に使用した。

・ RAPD 法のアスパラガス (グリーンフレッチェ) 変異体解析への適用

RAPD 法の有効性を確かめるため、広島県立農業技術センターより分与されたアスパラガス (グリーンフレッチェ) 植物体の正常体と茎がねじれている変異体との差異を検討した。

表 3 選択した RAPD プライマー一覧

プライマー番号	Tm 値 (°C)	配列 (5'-3')
A-1	42.7	CAGGCCCTTC
A-2	42.7	TGCCGAGCTG
A-14	38.5	TCTGTGCTGG
A-18	38.5	AGGTGACCGT
B-6	42.7	TGCTCTGCC
B-10	42.7	CTGCTGGGAC
C-2	42.7	GTGAGGCGTC
C-7	42.7	GTCCCGACGA
C-9	42.7	CTCACCGTCC
C-19	38.5	GTTGCCAGCC
C-20	38.5	ACTTCGCCAC

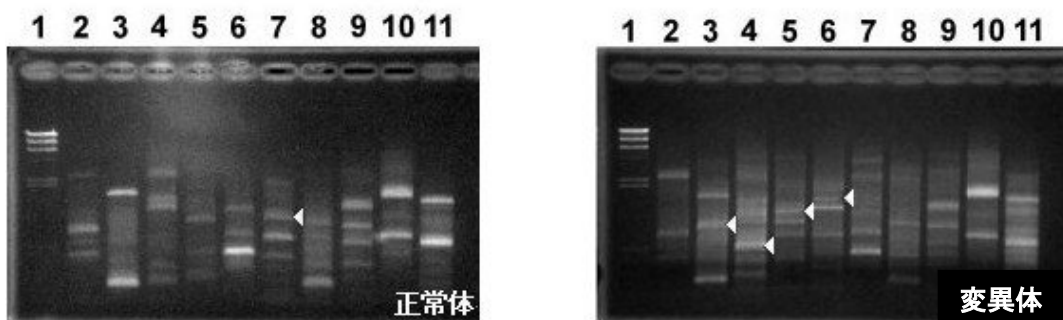


図 13 アスパラガス正常体と変異体の RAPD パターン

プライマーは 1,  $\lambda$  HindIII marker; 2, A-1; 3, A-2; 4, A-14; 5, A-18; 6, B-6; 7, B-10; 8, C-2; 9, C-7; 10, C-9; 11, C-19

その結果、図 13 に白矢印で示すように、正常体と変異体で異なる RAPD パターンが得られ、本研究で選択した RAPD プライマーによる DNA の差異の検出は可能であることが示された。

・ Embryogenic cell (EC) の培養期間における差異の検討

用いた EC 懸濁培養株は、EC の形成が認められてから、

(A) 短期：2 週間ごとに固体継代培養を約 3 ヶ月行い、その後、液体培地に移植し、2 週間ごとに 2 代継代した EC 懸濁細胞および懸濁細胞から再生した不定胚と植物体。

(B) 長期：2 週間ごとに固体継代培養を約 11 ヶ月行い、その後、液体培地に移植し、2 週間ごとに 8 代継代した EC 懸濁細胞および懸濁細胞から再生した不定胚と植物体。

両者の間での RAPD パターンの差異は認められず、RAPD プライマーを用いた試験範囲では、EC 細胞、不定胚、再生植物体の遺伝的変異は認められなかった。

・ ストレス条件下で長期継代して形態が異常になった不定胚から再生した植物体の RAPD パターン

通常とは異なるストレス条件下で、長期間継代した不定胚は、次々に 2 次不定胚を形成し、細長い形状を示し、肥大した不定胚が多数を占めるようになる。このような異常な形態を示す不定胚から再分化した植物体の DNA を抽出し、RAPD 分析したところ、プライマー B6 で、DNA の電気泳動パターンに差が認められた。

以上の結果から、長期間継代培養した EC 懸濁細胞から得た 1 次不定胚から再分化した植物体には遺伝的な変異は認められず、バイオカプセル種子にはこの不定胚を用いる。RAPD 法は、変異植物体やストレス条件下で誘発された不定胚での変異体と正常体との差異の検出が可能であり、不定胚や植物体の遺伝的変異の評価・識別が可能であることが示唆された。

## ウー 7 “種子” の保存、発芽試験

### ウー 7-1 カプセル化種子の保存性を確認

無菌的に調製したアスパラガス不定胚を封入したバイオカプセル種子を冷蔵庫で保存した。その後、表面殺菌し、表 4 に示す①～④の処理を施し、MS 寒天培地に置床した。カプセル化種子から不定胚を取り出して対象区⑤とした。

表 4 カプセル化種子の発芽に及ぼす影響

	発 芽 処 理	処理 種子数	発芽数	発芽率 (%)
①	外皮膜除去	280	0	0.0
②	穿孔	280	2	0.7
③	外皮膜除去+穿孔	190	16	8.4
④	無処理	280	0	0.0
⑤	不定胚の取り出し +洗浄	50	43	86.0

その結果、表 3 に示すように、⑤の洗浄した不定胚の発芽率は 86.0%であった。③区においては、8.4%の種子で発芽が認められた。一方、①区では、発芽は認められず、②区ではほとんど発芽しなかった。さらに、その後の検討では、②区と③区の条件で、発芽率は各々 21.4%、15.7%と向上した。以上の結果から、カプセル内への空気の流入は不可欠であることが明らかとなった。

次に、カプセル化したアスパラガス不定胚の 10℃における保存性を検討した。保存後、不定胚をカプセルから無菌的に取り出し、寒天培地上で発芽試験を行い、

生長する不定胚の数を調べ、生存率を求めた（図14）。本カプセル内では54日間で54%の生存率を保持していた。

#### ウー7-2 発芽挙動の検討

シームレスカプセル調製時に使用する硬化油脂の種類や添加するノウハウである微量物質（保湿剤、界面活性剤、増粘剤、比重調節剤、リパーゼ）の不定胚の生長に与える影響を、96穴マイクロプレートを用いて検討した。その結果、リパーゼは、その反応生成物であるグリセリンのモノ脂肪酸エステルが不定胚の生長に影響を与えたため除き、他の物質も比重調節剤以外は、影響を及ぼす傾向にあったため、カプセル化が可能な最小添加量とした。これにより、カプセル化条件は、厳しくなったが、カプセルに亀裂を入れることで、発芽が認められる様になった（図15）。

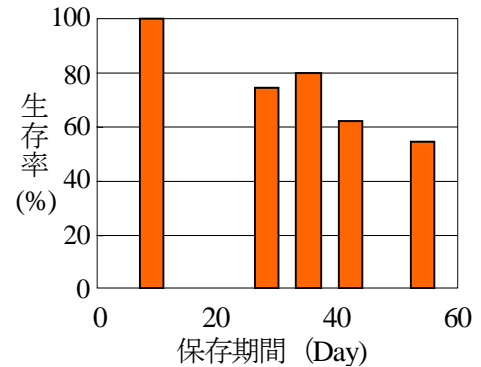


図14 10°Cにおけるカプセル化アスパラガス不定胚の保存安定性



図15 カプセル化種子の発芽

#### ウー8 再生植物体の評価

再生植物体1460個体と親植物の「ウエルカム」雄株優良系統20個体の根端組織の染色体数は、全て $2n=20$ であり、染色体数は安定していた。

再生植物体の生育特性調査を特性調査表に基づいて行った。18項目の中で、茎数と茎の太さを除く16項目において、親植物である「ウエルカム」雄株優良系統と有意な差は認められなかった。

#### ウー9 市場調査と販路の開拓

ビジネス性のある植物の市場調査により、太い雄株の商品価値が高く、クローン植物のビジネス性のあるアスパラガスを目的植物に選んだ。

タキイ種苗（株）を訪問し、研究農場応用研究グループのメンバーと面談し、本アグリビジネス事業により開発が可能となったカプセル化不定胚の技術紹介と取り組みを紹介した。さらに、種苗会社としての意見や要求品質を聞き、下記のコメントを得た。

- ①ここまで技術が進んでいることは知らなかった。興味は大いにある。
- ②他社が開発したモノを販売することは、可能であるので、完成したらぜひ持ってきてもらいたい。
- ③種子と言うからには、保存性が高いものが望ましい。
- ④変異や空カプセルが無く、発芽率は限りなく100%が必要。

これらの要件を満足し、バイオカプセル種子が完成すれば持参し、ビジネスの話を進めたい。さらに、他の植物種に関しても、要望を聞きたいと思っている。

## エ. 考察

### エー 1 技術開発

研究委託機関との連携により、事業性のあるアスパラガスの不定胚の大量生産に繋がる同調的誘導系を確立し、得られる細長い不定胚の効率的なシームレスカプセル化技術を確立した。カプセル化不定胚の発芽率は、まだ 21.4%であるが、今後の検討で向上可能と思われる。また、重要な変異の遺伝子的評価の基礎技術も確立し、技術的には当初計画の 90%は達成できたと思われる。これらの技術は、今後の多様な植物の不定胚のカプセル化に道を開き、ビジネスを構築するために必須のものであり、本アグリビジネスの助成金があつて可能となったものである。

事業化時には問題となるカプセル化率は **99.8%**を達成し、1000 個に 2 個程度の空カプセル率となり、実用レベルと思われる。

アスパラガスの EC 懸濁細胞、不定胚、再生植物体は 11 ヶ月間の継代培養においても、形態的、遺伝的な異常が認められず、非常に安定しており、この系の不定胚をカプセル化に用いることで、変異の出現率は極めて低いと思われる。また、RAPD 法はストレス条件下で出現した変異株において電気泳動パターンの違いが認められ、変異株の評価・識別の手法として有効であることが示唆された。

### エー 2 ビジネス構築

種苗会社との話し合いにより、バイオ“種子”が備えるべき必要性質情報を入手したので、さらに、それらを満足すべく品質向上を目指したい。アスパラガス 1 品目では、企業のビジネスとしては小さいため、学会での発表や全国の農業試験場に広く技術宣伝を行い、有用植物の不定胚を持つ機関との連携を視野に入れ、品揃えを拡充することによって、利益を生む事業として成立させたい。

## オ. まとめと事業化の見通し

### オー 1 得られた成果

森下仁丹(株)と研究委託機関との連携により、アスパラガス不定胚(粒)の無菌的カプセル調製技術は、アスパラガスだけでなくニンジン、コーヒーやその他の植物種にも展開できる汎用性のある技術として確立した。カプセル化アスパラガス不定胚の発芽率は 21.4%であった。不定胚のカプセル化率は 99.8%を達成し、実用化レベルとなった。

目的植物アスパラガスの同調的不定胚誘導技術は、液体培地で可能となり、大量培養にも対応できる技術として確立した。

不定胚の形態識別技術はハードおよび解析ソフトの開発により、不定胚の良否の判定に使える基礎的知見を得た。

植物体の遺伝的変異解析技術として採用した RAPD 法により、アスパラガスの正常植物体と変異体の遺伝子の DNA 電気泳動パターンの違いが識別可能となった。再生アスパラガス植物体は、1460 個体の 18 項目の形態評価と 11 種のプライ

マーを用いた RAPD 評価において異常は認められていない。

不定胚の熱測定も植物種によれば状態の非破壊評価が可能との知見を得た。

この様に技術的には完成に近づいた。

## オー 2 事業化の見通し

種苗会社に技術紹介を行い、本バイオカプセル種子の完成を期待され、完成したら是非持ってきてもらいたい、とのコメントをもらい、販路に繋がる関係も構築できた。奈良県や広島県の農業技術センターの方にも、興味を持って頂き、研究の完成を期待する旨のコメントを頂いている。

カプセルからの発芽率の向上と2ヶ月以上の保存安定性を確保することにより、事業化は可能との見通しを得ている。

## オー 3 今後の課題

- ・不定胚カプセルの発芽率向上。リパーゼによる崩壊の再検討。
- ・保存安定性の向上。特に温度条件との関係。
- ・各工程のスケールアップ。
- ・学会、展示会等での広範な技術紹介と情報入手。
- ・他の有用植物の不定胚のカプセル化と発芽確認。
- ・将来的に事業として成立させるため、他の植物のカプセル化種子の品揃え。

## カ. 特許出願、学会発表等

### (ア) 工業所有権等

特許3件申請予定

- ①アスパラガスの同調的不定胚誘導方法
- ②不定胚再分化液体培地（増粘剤の効果）
- ③不定胚の画像解析による判定方法

### (イ) 学会発表等

- ・平成16年度日本生物工学会大会（名古屋）にて、2件口頭発表。
  - ①金谷ら、機能性シームレスカプセルの開発---バイオカプセル種子への応用
  - ②尾島ら、アスパラガス不定胚誘導とその生長過程の把握
- ・平成16年度大阪府立食とみどりの総合技術センター研究発表会にて、3件口頭発表。
  - ①岩本ら、アスパラガス不定胚の効率的誘導と同調化技術の開発
  - ②金谷ら、不定胚懸濁液の送液とカプセル化技術の開発
  - ③西岡ら、アスパラガス不定胚生産とその判定システムの構築
- ・日本育種学会2005年大会（筑波）にて、2件ポスター発表予定
  - ①岩本ら、アスパラガス不定胚の効率的誘導と同調化技術の開発
  - ②金谷ら、シームレスカプセル化技術を利用したバイオカプセル種子の開発