

明 細 書

発明の名称：培養肉製造のための細胞増殖用の培地

技術分野

[0001] 本発明は、培養肉製造の技術分野に関する。より具体的に培養肉製造に用いる細胞の増殖用の培地、当該培地の製造方法、培養肉製造のための細胞の調製方法、及び培養肉製造用の細胞増殖促進剤に関する。

背景技術

[0002] 食肉生産は、これまで家畜の飼育により行われてきた。一方、家畜の飼育には、大量の穀物及び水を必要とし、広い飼育場を必要とする。近年、気候変動や食料不足の問題が取り上げられており、より環境負荷が低く、生産効率の高い持続可能な食肉生産が望まれるようになってきている。そうした中で、新たな食肉生産方法として、細胞から培養肉を生産する研究開発に注目が集まっている。

[0003] 食肉の代替物として、植物由来の代用肉が知られているが、その食感や味は食肉には及んでいない。一方、動物細胞を培養する培養肉では、本来の食肉に近い食感や味を達成することができ、また食肉に比較して細菌やウイルス汚染のリスクが低いという利点がある。技術的には培養肉の製造は可能になってきている。しかしながら、これまでの培養肉製造で用いられている細胞培養培地は、基礎研究や医薬品応用で用いられた大規模培養技術を利用するものであり、そのコストや、食肉としての安全性の面から、食品の製造のための使用が難しかった。基礎研究や医薬品応用で用いられた細胞培養培地では、アミノ酸、ビタミン、無機塩及びグルコースなどの炭素源を含む基礎培地に、添加成分としてウシ胎児血清（FBS）を添加することが一般的である（非特許文献1：Mol Ther. 2004 Mar;9(3):475-82）。一方、FBSは胎児より採取した血清であるため、大量入手が困難であるとともに、価格、輸送コスト、感染症リスク、及び動物愛護の点で課題がある。そうした課題を解決すべく、FBSの必須成分を試薬として補った完全合成培地

が開発されている（非特許文献2：The Canadian Journal of Chem Engineering Vol.94, (10) October 2016 1855-1862）。しかしながら、こうした完全合成培地には、組み換えタンパク質、ホルモン剤、血清由来成分などが用いられており、食品として使用するには課題があった。

[0004] 培養肉の製造のための細胞培養培地としては、様々なアプローチが試みられてきている。臓器細胞の産生物を利用した培地（特許文献1：特許第6111510号公報）、藻類産生物を利用する培地（非特許文献3：Scientific Reports, Jan 31;7:41594）、食品残渣の加水分解物を利用した培地（非特許文献4：Food Funct., 2020, 11, 2477-2488）、その他の食品原料成分を利用した培地（特許文献2：国際公開第2021/148955号）などが挙げられる。

先行技術文献

特許文献

[0005] 特許文献1：特許第6111510号公報

特許文献2：国際公開第2021/148955号

非特許文献

[0006] 非特許文献1：Mol Ther. 2004 Mar;9(3):475-82

非特許文献2：The Canadian Journal of Chem Engineering Vol.94, (10) October 2016 1855-1862

非特許文献3：Scientific Reports, Jan 31;7:41594

非特許文献4：Food Funct., 2020, 11, 2477-2488

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0007] 培養肉の製造に使用する細胞を大量に培養可能な培地を、食品原料成分を細胞増殖促進剤として添加することで提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0008] 本発明者らが、培養肉の製造に用いることが可能な培地について鋭意研究

を行ったところ、ホエイを細胞増殖促進剤として培地へと添加することにより、培養肉の原料となる細胞の高い増殖活性を達成できたことを見出し、本発明に至った。そこで、本発明は以下に関する：

〔１〕 基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを含む、細胞増殖用の培地。

〔２〕 増殖された細胞が、培養肉製造に用いられる細胞である、項目１に記載の培地。

〔３〕 前記培地が、動物由来血清を含まない、項目１又は２に記載の培地。

〔４〕 前記動物由来血清が、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）である、項目３に記載の培地。

〔５〕 前記細胞が、線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる少なくとも１の細胞を含む、項目１～４のいずれか一項に記載の培地。

〔６〕 前記脂肪組織由来細胞が、脂肪幹細胞、多胞性脂肪細胞、及び単胞性脂肪細胞からなる群から選ばれる少なくとも１の細胞である、項目５に記載の培地。

〔７〕 前記筋組織由来細胞が、筋芽細胞及び筋衛星細胞からなる群から選ばれる少なくとも１の細胞である、項目５に記載の培地。

〔８〕 前記細胞が、ウシ由来の細胞である、項目１～７のいずれか一項に記載の培地。

〔９〕 さらに、食品原料成分を含む、項目１～８のいずれか一項に記載の培地。

〔１０〕 食品原料成分が、卵白、大豆、魚粉、及び小麦粉から選ばれる、項目９に記載の培地。

〔１１〕 培養肉製造のための細胞を調製する方法であって、
基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを含む培地で細胞を培養する工程を含む、前記方法。

〔１２〕 前記培地が、動物由来血清を含まない、項目１１に記載の方法。

〔１３〕 前記動物由来血清が、ウシ胎児血清（ＦＢＳ）である、項目１２に記載の方法。

〔１４〕 前記培地が、さらに、食品原料成分を含む、項目１１～１３のいずれか一項に記載の方法。

〔１５〕 前記食品原料成分が、卵白、大豆、魚粉、及び小麦から選ばれる、項目１４に記載の方法。

〔１６〕 前記細胞が、ウシ由来の細胞である、項目１１～１５のいずれか一項に記載の方法。

〔１７〕 前記細胞が、線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる少なくとも１の細胞を含む、項目１１～１６のいずれか一項に記載の方法。

〔１８〕 前記脂肪組織由来細胞が、脂肪幹細胞、多胞性脂肪細胞、及び単胞性脂肪細胞からなる群から選ばれる少なくとも１の細胞である、項目１７に記載の方法。

〔１９〕 前記筋組織由来細胞が、筋芽細胞及び筋衛星細胞からなる群から選ばれる少なくとも１の細胞である、項目１７に記載の方法。

〔２０〕 前記細胞が筋芽細胞又は筋衛星細胞であり、さらに筋芽細胞又は筋衛星細胞から筋管細胞への分化誘導工程を含む、項目１９に記載の方法。

〔２１〕 項目１１～２０のいずれか一項に記載の方法により調製された細胞を集積する工程を含む、培養肉の製造方法。

〔２２〕 前記調製された細胞を、他の細胞、血液、組織、及び細胞外マトリクスからなる群から選ばれる少なくとも１の物質と合わせて集積することの特徴とする、項目２１に記載の製造方法。

〔２３〕 前記他の細胞が、培養細胞又は動物から取得された細胞である、項目２２に記載の製造方法。

〔２４〕 集積後にさらに培養することを含む、項目２１～２３のいずれか一項に記載の製造方法。

〔 2 5 〕 ホエイを含む、培養肉製造用の細胞増殖促進剤。

〔 2 6 〕 動物由来血清非含有培地へと添加される、項目 2 5 に記載の細胞増殖促進剤。

〔 2 7 〕 線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる少なくとも 1 の細胞の増殖促進する、項目 2 5 又は 2 6 に記載の細胞増殖促進剤。

〔 2 8 〕 前記脂肪組織由来細胞が、脂肪幹細胞、多胞性脂肪細胞、及び単胞性脂肪細胞からなる群から選ばれる少なくとも 1 の細胞である、項目 2 7 に記載の細胞増殖促進剤。

〔 2 9 〕 前記筋組織由来細胞が、筋芽細胞及び筋衛星細胞からなる群から選択され少なくとも 1 の細胞である、項目 2 7 に記載の細胞増殖促進剤。

〔 3 0 〕 前記細胞が、ウシ由来の細胞である、項目 2 5 ～ 2 9 のいずれか一項に記載の細胞増殖促進剤。

〔 3 1 〕 基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを混合して、細胞増殖用の培地を取得する工程；

前記培地を加熱殺菌する工程

を含む、培地の製造方法。

〔 3 2 〕 前記加熱殺菌する工程が、煮沸処理により行われる、項目 3 1 に記載の方法。

〔 3 3 〕 前記加熱殺菌する工程が、熱プレート交換機又は蒸気洗浄装置により行われる項目 3 1 に記載の方法。

発明の効果

〔 0009 〕 ホエイを基礎培地へと添加することにより、細胞の細胞増殖活性を亢進する細胞培養培地を提供することができる。

図面の簡単な説明

〔 0010 〕 〔 図 1 〕 図 1 は、 7 頭のウシ由来の初代筋芽細胞及び線維芽細胞をそれぞれ培養し、無血清培地及び 1 0 % F B S 添加培地で培養した場合の増殖率を示す。

〔 図 2 〕 図 2 は、無血清培地でウシ筋芽細胞を培養する際に、細胞増殖を亢進さ

せる食品原料成分をスクリーニングした結果を示す。

[図3]図3は、無血清培地でウシ脂肪細胞を培養する際に、細胞増殖を亢進させる食品原料成分をスクリーニングした結果を示す。

[図4]図4は、無血清培地でウシ線維芽細胞を培養する際に、細胞増殖を亢進させる食品原料成分をスクリーニングした結果を示す。(A)はホルスタイン由来の線維芽細胞、(B)は一代雑種牛(F1)由来の線維芽細胞、(C)は黒毛和種由来の線維芽細胞を用いた結果である。

[図5]図5は、無血清培地でウシ筋芽細胞を培養する際に、細胞増殖促進剤としてホエイを用いた場合の濃度依存的な増殖促進効果を調べたグラフである。

[図6]図6は、無血清培地でウシ筋芽細胞を培養する際に、ホエイと組み合わせたときに、細胞増殖を亢進させる食品原料成分をスクリーニングした結果を示す。

[図7]図7は、無血清培地でウシ腎臓細胞を培養する際に、細胞増殖を亢進させる食品原料成分をスクリーニングした結果を示す。

[図8]図8は、10%FBS添加培地(10%FBS)及びホエイ添加培地(ホエイ)をそれぞれ用いて増殖させた筋芽細胞に分化誘導処理を行い、ミオシン重鎖(MyHC)及び核(DAPI)を蛍光染色して示した写真を示す。

[図9]図9は、FBS原液及び1%ホエイ溶液をそれぞれ加熱処理し、加熱処理後に基礎培地へ添加して調製された10%FBS添加培地及び0.1%ホエイ添加培地と、加熱処理を行っていない非加熱の10%FBS添加培地及び0.1%ホエイ添加培地とにおいて筋芽細胞を培養して増殖させたのちの細胞数を表す。

発明を実施するための形態

[0011] 本発明は、基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを含む、細胞増殖用の培地に関する。また、別の態様では、本発明は、基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを含む細胞増殖用の培地で細胞を培養する工程を含む

、培養肉製造のための細胞の調製方法にも関し、調製された細胞から培養肉を製造する方法にも関する。さらに別の態様では、本発明は、ホエイを含む、培養肉製造用の細胞増殖促進剤にも関する。さらに別の態様では、基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを混合して、細胞増殖用の培地を取得する工程と、前記培地を加熱殺菌する工程とを含む、培養肉製造用の培地の製造方法にも関する。

[0012] [細胞増殖用培地]

本発明に係る細胞増殖用の培地は、基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを含む。ホエイは食品原料であることから、本発明の培地で培養された細胞は、食品としての安全性が高い。また、ホエイは安価な原料であることから、本発明の培地は、調製コストも低いという利点も有する。ホエイを含有することにより、細胞増殖活性を亢進することができる。かかる培地で培養された細胞は、食品としての安全性が高いことから培養肉製造に用いることができる。本発明の培地は、ホエイを含む一方で、動物由来血清を含まない無血清培地に関する。

[0013] 動物由来血清とは、動物の血液から製造された血清をいう。取得された血液を凝固させて得られた上澄み液を血清という。動物由来血清としては、任意の動物、例えば、ウシ、ウマ、ヤギ、ロバ、ウサギ、トリなどの動物由来の血清であってもよいが、特にウシ血清（BCS）、ウシ胎児血清（FBS）を指す。血清には、アルブミン、グロブリンなどのタンパク質の他、中性脂肪、コレステロール、リン脂質、遊離脂肪酸などの血清脂質が含まれ、さらにホルモン、サイトカイン、増殖因子などを含む。特に胎児血清は、細胞の増殖に必要とされる成分が豊富に含まれており、研究や医薬分野において、培地へ添加することが一般的である。動物由来血清を含まない培地を無血清培地と呼ぶ。一方で、無血清培地は、動物由来血清を含まないが、血清由来の精製された成分を含んでもよいし、血清由来成分の組換えタンパク質を含んでもよい。動物由来血清は熱変性を受けやすく、加熱殺菌を行った場合に、活性が減少する（図9）。したがって、動物由来血清を含む培地は、通

常、加熱殺菌には供されず、フィルター滅菌やUV滅菌などを用いて殺菌される。

[0014] 本発明においてホエイを基礎培地へと添加することで、無血清培地であっても高い細胞増殖活性を達成することができる。したがって、本発明のホエイは、細胞増殖促進剤（細胞培養サプリメントともいうことがある）ということができる。本発明に係る細胞増殖促進剤は、培養肉製造のための細胞培養において用いることができ、動物由来血清非含有培地へと添加することができる。ホエイの細胞増殖促進効果は、煮沸により減少しない（図9）。したがって、ホエイを含む培地を使用する際に、加熱殺菌を使用することが可能である。培地の加熱殺菌のために、プレート熱交換器、蒸気洗浄装置などの機器を用いることができる。大量培養が必要となる工業的培養においては、培地の簡便な滅菌処理が求められている。加熱殺菌が可能であると、培地調製後、調製した培地を蒸気洗浄装置を用いた直接的な加熱殺菌、又は、プレート式熱交換器を用いた流路上での殺菌を行い、そのまま培養槽へと導入が可能になり、培地調製から培養までの工程が簡素化される。熱変性されやすい成分を別途フィルター滅菌やUV滅菌などで滅菌し、加熱殺菌がされた培地に添加されてもよい。

[0015] ホエイ（乳清又は乳漿ともいう）とは、乳から固形分を除いた水溶液をいう。チーズやヨーグルトなどの乳製品を製造する過程で副産物として大量に生成するため安価である。より具体的にレンネットなどの凝固剤を乳汁又は発酵乳汁に添加して凝固させた凝乳から固形分を分離することでホエイが得られる。固形分としては乳脂肪やカゼインなどのタンパク質の一部又は全部が除かれる。ホエイの主成分はラクトグロブリン、ラクトアルブミン、ラクトフェリンであるが、遊離アミノ酸や、無機塩類、ビタミンなどの多種の微量成分を含む。

[0016] 本発明に用いられるホエイは、任意の哺乳動物由来のホエイであってよい。一例として、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ヒト、ロバの乳汁から得られたホエイを使用することができる。入手の容易さから特にウシホエイを使用す

ることができる。ホエイは、液体であってもよいし、ホエイを乾燥させた乾燥粉末であってもよい。細胞増殖促進剤として添加する観点からは、輸送コストの削減が期待できるため乾燥粉末形態が好ましい。乾燥粉末形態のホエイは市販のものを用いてもよいし、乳清を凍結乾燥することで調製してもよい。乾燥粉末のホエイを増殖促進剤として用いる場合、0.0025質量%～1.0質量%となるように基礎培地に添加される。ホエイの濃度は、増殖効果を発揮する観点から、0.025質量%以上が好ましく、0.05質量%以上がさらに好ましい。増殖促進効果がプラトーに達する観点から、0.8質量%以下が好ましく、0.5質量%以下がさらに好ましい。液体のホエイを用いる場合には、乾燥粉末に換算して添加量を決定することができる（図5）。

[0017] 基礎培地は、細胞培養するための培地であって、細胞の維持と増殖に必要な最低限の成分を含む培地をいう。基礎培地中に細胞を播種することで、細胞を死滅させることなく維持することができ、細胞を増殖可能であってもよい。基礎培地としては、様々な培地が市販されているが、通常、アミノ酸類、ビタミン類、緩衝剤、無機塩類及び炭素源を含む。アミノ酸としては、必須アミノ酸及び非必須アミノ酸が含まれる。ビタミン類としては、ビタミンB1、ビタミンC、ニコチン酸、葉酸などが含まれる。緩衝剤としては、HEPESなどが含まれる。炭素源としてはグルコースなどの単糖類、スクロースなどの二糖類、オリゴ糖類や多糖類が添加されうる。通常、基礎培地に対して、血清などの添加剤を添加することによって、細胞培養培地を調製することができる。基礎培地としては、本技術分野に知られている任意の基礎培地を使用することができ、一例としてダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、イーグル基礎培地（BME）、RPMI1640培地、DMEM/F12培地、F10培地、F12ハム培地、MEM、M199培地、エイムス培地、イスコフ改変培地、グラスゴー改変培地、フィッシャー培地などが挙げられる。

[0018] 細胞培養の際には、基礎培地に、細胞増殖促進剤が添加される。従来の細

胞培養であれば、ウシ胎児血清（FBS）などの血清が、細胞増殖促進剤として添加される（図1）。一方、本発明の細胞増殖用の培地は、細胞増殖促進剤としてホエイを含む。一例として、本発明の細胞増殖用の培地は、動物由来血清を含まず、その代替としてホエイを含む。本発明では、ホエイとは異なる他の添加剤が培地に添加されてもよい。そのような添加剤としては、本技術分野において無血清培地において添加される既知の成分が挙げられる。本技術分野において無血清培地において添加される添加剤としては、例えば、脂質、ホルモン剤、成長因子、サイトカイン、血清由来タンパク質、抗生物質などが挙げられる。ホルモン剤としては、デキサメタゾンなどが挙げられる。成長因子としては、FGF、IGF、インスリンが挙げられ、その任意のファミリーが使用されてもよい。サイトカイン類としては、IL-1 α 、IL-1 β などが挙げられ、一例として、0.1~1000 ng/mlの濃度となるよう添加しうる。血清由来タンパク質としてはフェチュイン、フィブロネクチン、アルブミン、グロブリンなどが挙げられ、一例として、0.0001~1%の濃度となるよう添加しうる。抗生物質としてはペニシリン、ストレプトマイシンなどを、一例として、ペニシリン10~500 U/ml、ストレプトマイシン 10~500 μ g/mlの濃度となるよう添加しうる。無血清培地や低血清培地で一般に使用される添加剤である、ITS（インスリン・トランスフェリン・亜セレン酸ナトリウム）も本発明のホエイを含む無血清培地に添加されうる。その添加量は、一例として、100倍濃縮のプレミックス液を0.1~5%の濃度となるよう添加しうる。

[0019] 細胞増殖促進剤としてホエイが基礎培地に添加される場合、さらに追加の食品原料成分が添加されてもよい。細胞培養に適した効果が発揮されれば任意の成分を添加することができる。細胞培養に適した効果とは、例えば分化抑制効果又は増殖促進効果をいう。一例として、ホエイ単独で添加される場合よりも細胞増殖活性が高くなる成分が好ましく、卵白、大豆、小麦粉、魚粉、例えばカツオ節由来の成分が添加されうる。これらの食品由来の成分は、抽出物として添加されてもよいし、乾燥粉末が添加されてフィルターによ

り不溶成分が除かれてもよい。高い細胞増殖促進効果を発揮する観点で、ホエイと大豆、ホエイとカツオ節、ホエイと卵白の組み合わせが好ましく、特にホエイと卵白及びホエイと大豆の組み合わせが好ましい（図6）。これらの組み合わせを細胞増殖促進剤として基礎培地に添加すると、10%ウシ胎児血清（FBS）よりも高い細胞増殖促進効果を発揮しうる。卵白、大豆、小麦粉、カツオ節の乾燥粉末は、0.0025質量%～1.0質量%となるように基礎培地に添加される。これらの食品原料成分は、増殖効果を発揮する観点から、0.005質量%以上が好ましく、0.01質量%以上がさらに好ましい。成分の凝集を避ける観点から、0.5質量%以下が好ましく、0.1質量%以下がさらに好ましい。ホエイと、他の食品原料成分との質量比は、10:1～1:10の範囲で適宜選択することができる。好ましくは5:1～1:5であり、より好ましくは3:1～1:3である。

[0020] [細胞]

本発明に係る細胞培養培地は、任意の動物細胞を培養することができる。培養肉を製造する観点から、ウシ、ブタ、ヤギ、ヒツジ、ウサギ、ニワトリ、ダチョウ、カモなどの家畜由来の細胞を使用しうる。特にウシの細胞を用いる場合、ホルスタイン種、ジャージー種、黒毛和種、褐毛和種、短角種、無角和種、並びにそれらの交配種のうちの任意の種の細胞であってもよいが、特に食肉製造の観点から肉用種である黒毛和種、褐毛和種、短角種、無角和種の細胞が好ましい。これらの動物の任意の細胞を培養することができる（図4）。本発明に係る細胞培養培地は、細胞が集合した組織を培養することもできる。動物の細胞は、動物から取得された初代細胞、及び初代細胞から継代された継代細胞であってもよいし、株化された細胞であってもよい。初代細胞は、動物組織を培地中で切り刻むことにより取得することができる。体性幹細胞、胚性幹細胞、誘導多能性幹細胞などの幹細胞から分化された細胞であってもよい。培養肉を製造する観点から、線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の細胞を培養することが好ましい（図2～4）。

[0021] 線維芽細胞は、結合組織を構成する細胞であり、コラーゲン、エラスチンなどの細胞外マトリクスを産生する。筋肉に存在する線維芽細胞を特に筋線維芽細胞と呼ぶ。筋線維芽細胞は、骨格筋において筋線維の束を取り囲む結合組織を形成する。筋線維芽細胞は、 α -SMAを発現し、細胞外マトリクスを産生するとともに、脂肪を蓄積することができ、歯ごたえ及び食味に寄与する。

[0022] 脂肪組織由来細胞とは、脂肪組織を構成する細胞であり、脂肪組織から分離されて培養された細胞である。脂肪組織由来細胞としては、脂肪幹細胞、多胞性脂肪細胞、及び単胞性脂肪細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の細胞である。脂肪幹細胞は、様々な細胞への分化能を有する間葉系幹細胞であり、筋細胞、脂肪細胞、結合組織の細胞へと分化することができる。多胞性脂肪細胞は、褐色脂肪細胞としても知られており、生体では脂肪の燃焼に寄与する。単胞性脂肪細胞は、白色脂肪細胞としても知られており、細胞内に脂肪滴をため込むことができる。脂肪組織由来細胞は、脂肪を含有することから食肉の食味に寄与する。

[0023] 筋組織由来細胞とは、筋組織を構成する細胞であり、筋組織から分離されて培養された細胞である。筋組織由来細胞としては、筋芽細胞、筋衛星細胞、筋管細胞が挙げられるが、筋管細胞は増殖性を有さないため、増殖させる観点からは、筋芽細胞及び/又は筋衛星細胞が好ましい。筋衛星細胞は、筋肉中に含まれる体性幹細胞であり、増殖し、筋芽細胞に分化することができる。筋芽細胞とは、筋線維の由来となる細胞であり、増殖性を有する単核の細胞である。筋芽細胞が分化すると、筋芽細胞同士が融合し、多核の筋管細胞を形成し、さらに成熟して筋線維となる。筋線維は、筋肉を構成するタンパク質であるアクチン線維及びミオシン線維から構成される筋原線維を構成単位としており、ミオシンのアイソフォームにより、赤色筋線維（I型、IIA型）と白色筋線維（IIB）に分類され、食肉の食味の違いに寄与する。

[0024] [培養肉]

培養肉とは、細胞培養を介して製造される食肉のことをいう。本発明にお

いて「培養肉製造のため」とは、培養肉の製造に用いる方法であり、食品衛生的に許容されることが要求される。食品衛生上、動物由来血清、ホルモン剤、遺伝子組み換えタンパク質の使用は避けることが好ましい。一般に食肉とは、筋繊維、結合組織、及び脂肪の集合体をいう。一方、培養肉は食肉の構造を模倣することが好ましいが、必ずしも食肉の構成を全て含まなくてもよく、線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の培養細胞を含むものであればよい。複数種の細胞の培養物を含むことがより好ましい。培養肉は、線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の培養細胞にくわえ、細胞外マトリクスを含んでもよい。培養肉の製造方法は、例えば以下の

線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の培養細胞を培養する工程

培養された細胞を回収し、集積する工程

を含む。培養肉の製造方法は、さらに、分化誘導工程や集積後の培養工程を含んでもよい。本発明は、本発明に係る細胞増殖用培地で培養された細胞を含む培養肉にも関する。

[0025] 細胞の培養は、本発明に係る細胞増殖用培地、すなわち基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを含む培地に、細胞を播種することで行われる。培養は、本技術分野において周知の条件、例えば37℃CO₂インキュベータ内で培養される。培養は平板培養であってもよいし、浮遊培養であってもよい。増殖した細胞は、トリプシン処理などにより細胞を培養物として回収することができ、回収後さらに継代培養を行ってもよい。細胞の培養は、剥離可能な構築物に細胞を播種して培養することもできる。増殖した細胞が付着された構築物を培養物として回収することができる。かかる構築物は、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、エンタクチンなどの細胞外マトリクスで構築することができ、細胞が付着した構築物を集積して培養肉を成型してもよい。

[0026] 集積工程は、回収された1又は複数種の細胞の培養物を成型することを含む。集積工程で成型された培養物は、ステーキなどのように1枚肉であってもよいし、枝肉であってもよいし、ミンチ状であってもよい。集積工程は、細胞の培養物を、他の細胞、血液及び組織からなる群から選ばれる少なくとも1の物質と合わせて集積することを含む。他の細胞としては、培養細胞であってもよいし、動物から採取された細胞であってもよい。より具体的には、本発明に係る細胞増殖用培地で培養された他の細胞と合わせて成型することができる。一例として、本発明に係る細胞増殖用培地で培養された筋組織由来細胞を、本発明に係る細胞増殖用培地で培養された脂肪組織由来細胞及び/又は線維芽細胞と集積することができる。集積後にさらに共培養を行うこともできる。一例として、回収された1又は複数種の細胞の培養物を混合し、細胞外マトリクスに播種して共培養することができる。細胞外マトリクスとしては、コラーゲン、エラスチン、フィブロネクチン、ラミニン、エンタクチンなどが使用しうる。この際の培地についても、本発明の細胞増殖用培地を用いることができる。

[0027] 集積工程は、回収された1又は複数種の細胞の培養物を、血液及び/又は組織と集積してもよい。組織としては、動物から取得されたものであっても、培養されたものであってもよい。一例として、食肉の処理過程で分離された血液、脂肪組織や筋組織などを培養物と集積して培養肉を製造してもよい。

[0028] 分化誘導工程は、細胞培養後に行われてもよいし、集積工程の前、集積工程中、集積工程後に行われてもよい。分化誘導工程により、単核の筋衛星細胞及び筋芽細胞を多核の筋管細胞へと分化させ、さらに筋線維として成熟させることができる。分化誘導は、本技術分野に既知の方法により行われてよいが、一例として高い二酸化炭素濃度下で培養する手法が知られており、一例として5～10%（v/v）のCO₂雰囲気下で培養することにより、筋管細胞への分化を促進することができる。

[0029] [培地の製造方法]

本発明に係る細胞増殖用の培地は、以下の工程を含む製造方法により調製

される：

基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを混合して、細胞増殖用の培地を取得する工程；

前記培地を加熱殺菌する工程。

本発明に係る製造方法は、さらに熱変性を受けやすい成分についてフィルター滅菌を行い、培地へと添加する工程を含んでもよい。培養肉の製造のためには、細胞を大量に培養することが必要とされており、大量の培地を調製する必要がある。大量の培地は、細胞播種前に殺菌されていることが必要であり、簡便で大量に処理可能な加熱殺菌が好ましい。基礎培地とホエイとを混合されて調製された細胞増殖用の培地は、加熱処理に対して変性を受けにくいいため、加熱処理に供することができる。加熱処理は培地に添加されたホエイの活性が失われない限りで任意に選択することができ、一例として煮沸処理が行われうる。加熱温度は、対象細菌を殺菌する観点から適宜選択されるが、一例として60℃～180℃で行われうる。十分な殺菌を達成する観点から75℃以上が好ましく、100℃以上がさらに好ましい。培地の変性を防ぐ観点から、150℃以下が好ましく、130℃以下がさらに好ましい。加熱殺菌の時間は、十分な殺菌を達成する観点から適宜選択することができる。一例として、加熱処理は0.5秒～60分行われる。培地調製槽で調製された培地を流路で培養槽に導入する過程で加熱殺菌が行われうる。流路で加熱殺菌を行うために、一例としてプレート式熱交換器を用いることができる。

[0030] 本明細書において言及される全ての文献はその全体が引用により本明細書に取り込まれる。以下に説明する本発明の実施例は例示のみを目的とし、本発明の技術的範囲を限定するものではない。本発明の技術的範囲は特許請求の範囲の記載によってのみ限定される。本発明の趣旨を逸脱しないことを条件として、本発明の変更、例えば、本発明の構成要件の追加、削除及び置換を行うことができる。

実施例

[0031] 試験 1 : 細胞の採取

(1) 筋芽細胞の採取

ウシ筋芽細胞は、最長筋を用いて、以下の工程により細胞を採取した。ウシから採取した組織をエタノールとリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄後に、クリーンベンチ内ではさみを用いて細かく刻んだ。0.2% コラゲナーゼ I (Worthington) を添加したダルベッコ改変イーグル培地中で、37℃で1.5時間振とう培養を行い筋組織を消化させた。消化後の反応液に20% FBSを加える事で反応を停止させた。消化液を80×gで3分間遠心分離し浮遊組織をピンセットで除いた上で、上澄み液を分取した。再度80×gで3分間遠心分離して得た上澄み液を細胞分別用のナイロンメッシュ (100 μm) に通した。ろ過液を1500×gで5分間遠心分離して得た沈殿を、20% FBSを含むダルベッコ改変イーグル培地中で懸濁した。細胞懸濁液を100 μmのナイロンメッシュに通した後、再度40 μmのナイロンメッシュに通し、ろ液を1500×gで5分間遠心分離した。沈殿を赤血球溶解液 (pluriSelect Life Science) で氷上で5分間静置し、血球細胞を除去した。リン酸緩衝液で2回洗浄した上で、10% FBSを含むダルベッコ改変イーグル培地中にプールさせ、培養皿に播種した。増殖した細胞を試験に用いた。

[0032] (2) 脂肪細胞の採取

ウシ脂肪細胞は腸管付近の脂肪組織を用い、以下の工程により細胞採取した。ウシから採取した組織をエタノールとPBSで洗浄後に、クリーンベンチ内ではさみを用いて細かく刻んだ。0.2% コラゲナーゼ I (GIBCO) を添加したダルベッコ改変イーグル培地中で、1時間振とう培養を行い、脂肪組織を消化した。消化後の反応液に20% FBSを加え、180×gで10分間遠心分離した。浮遊組織をピンセット等で除いた上で、上澄み液を分取した。上澄み液を細胞分別用のナイロンメッシュ (100 μm) に通した上で、420×gで5分間遠心分離した。沈殿を赤血球溶解液で氷上で5分間静置し、血球細胞を除去した。リン酸緩衝液で2回洗浄した上で、10

% F B S を含むダルベッコ改変イーグル培地中にプールさせ、培養皿に播種した。増殖した細胞を試験に用いた。

[0033] (3) 線維芽細胞の採取

線維芽細胞は、ウシの皮膚組織を、下記工程により細胞を採取した。組織をエタノールと P B S で洗浄後に、クリーンベンチ内で真皮層を剥がし単離した。単離した組織をはさみで細かく刻み、10% F B S を含むダルベッコ改変イーグル培地を含む培養皿に静置し、37℃のCO₂インキュベータ内で数日間培養した。遊走してきた細胞を回収して、実験に用いた。

[0034] 試験2：無血清培地と血清含有培地の増殖能の比較

(i) 培地

無血清培地としては、ダルベッコ改変イーグル培地に、1%ペニシリンーストレプトマイシン溶液、1% I T S 液体培地サプリメント、2 ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子、細胞培養用脂質添加剤(sigma, L0288)を加えたものを使用した。

血清含有培地としては、ダルベッコ改変イーグル培地に、ペニシリンーストレプトマイシン溶液、10% F B S を添加したものを使用した。

[0035] (ii) 増殖試験

本試験は、全7種類の異なる個体由来の初代ウシ筋芽細胞・線維芽細胞について、無血清培地及び血清含有培地において増殖試験を行った。約 $5 \times 10^3 \text{ cells/cm}^3$ の細胞を播種し、37℃・CO₂濃度5%に設定したCO₂インキュベータ内で培養した。培養3日後にトリプシン処理により得た生細胞数をカウントし、初期播種細胞数に対する増殖後の細胞数の割合を算出した。7種類の異なる個体由来の初代ウシ筋芽細胞・線維芽細胞について、全てのデータを平均化して示した(図1)。無血清培地で培養された細胞の細胞増殖活性は低い一方、F B S 含有培地で培養された細胞の細胞増殖活性は高かった。F B S 含有培地で培養された培養物は、無血清培地の培養物に比較して、約4倍の細胞数となった。

[0036] 試験3：無血清培地での細胞増殖を亢進させる食品素材の探索

(1) ウシ筋芽細胞を用いた探索試験

(i) 培地

試験2で調製された無血清培地中に、食品成分を添加剤として添加して試験培地を調製した。食品成分は、卵白・大豆・ホエイ・小麦粉・カツオ節（いずれも乾燥粉末）を用いた。各種食品成分は無血清培地に対して0.1%（カツオ節のみ0.02%）で溶かし、遠心分離後の上清を0.45 μ mのフィルターろ過して不溶成分を除去したものを試験に用いた。コントロールとして、添加剤無添加培地及び10% FBSを添加した培地を用いた。

[0037] (ii) スクリーニング試験

ホルスタインウシ由来の筋芽細胞を用いて、無血清培地の増殖を促進させる成分の探索を行った。約 5×10^3 cells/cm²の細胞を播種し、37℃・CO₂濃度5%に設定したCO₂インキュベータ内で培養した。培養3日後にトリプシン処理により得た生細胞数をカウントし、無血清培地での細胞数に対する食品成分添加培地での細胞数の割合を算出した（図2）。ホエイを添加した培地で培養した場合に、10% FBS添加培地の培養物よりは少ないものの、無血清培地の培養物と比較して細胞数が多かった。また、卵白を添加した培地で培養した場合に、10% FBS添加培地の培養物よりは少ないものの、無血清培地の培養物と比較して細胞数が多かった。

[0038] (2) ウシ脂肪細胞を用いた探索試験

(i) 培地

試験2で調製された無血清培地中に、食品成分を添加して試験培地を調製した。食品成分は、卵白・大豆・ホエイ・小麦粉（いずれも乾燥粉末）を用いた。各種食品成分は無血清培地に対して0.1%で溶かし、遠心分離後の上清を0.45 μ mのフィルターろ過して不溶成分を除去したものを試験に用いた。コントロールとして、添加剤無添加（無血清）培地及び10% FBSを添加した培地を用いた。

[0039] (ii) スクリーニング試験

黒毛和牛由来脂肪細胞用いて、無血清培地の増殖を促進させる成分の探索

を行った。約 $2 \times 10^4 \text{ cells/cm}^3$ の細胞を播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot \text{CO}_2$ 濃度 5% に設定した CO_2 インキュベータ内で培養した。培養 4 日後にトリプシン処理により得た生細胞数をカウントし、無血清培地での細胞数に対する食品成分添加培地での細胞数の割合を算出した（図 3）。ホエイを添加した培地で培養した場合に、10% FBS 添加培地の培養物よりは少ないものの、無血清培地の培養物と比較して細胞数が多かった。一方、他の食品成分は、細胞増殖活性には影響しなかった。

[0040] (3) ウシ線維芽細胞を用いた探索試験

(i) 培地

試験 2 で調製された無血清培地中に、食品成分を添加剤として添加して試験培地を調製した。食品成分は、卵白・大豆・ホエイ・小麦粉・カツオ節（いずれも乾燥粉末）を用いた。各種食品成分は無血清培地に対して 0.1%（カツオ節のみ 0.02%）で溶かし、遠心分離後の上清を $0.45 \mu\text{m}$ のフィルターろ過して不溶成分を除去したものを試験に用いた。コントロールとして、添加剤無添加（無血清）及び 10% FBS を添加した培地を用いた。

[0041] (ii) スクリーニング試験

ホルスタイン種・黒毛和種・F1（一代雑種牛）由来の線維芽細胞をそれぞれ用いて、無血清培地の増殖を促進させる成分の探索を行った。約 $5 \times 10^3 \text{ cells/cm}^3$ の細胞を播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot \text{CO}_2$ 濃度 5% に設定した CO_2 インキュベータ内で培養した。培養 3 日後にトリプシン処理により得た生細胞数をカウントし、無血清培地での細胞数に対する食品成分添加培地での細胞数の割合を算出した（図 4 A：ホルスタイン、B：F1、C：黒毛和種）。食品原料成分の細胞増殖活性は、ウシの種類によって変動があったが、傾向は一致していた。ホルスタイン種及び黒毛和種では、ホエイを添加した培地で培養した場合に、10% FBS 添加培地の培養物よりは少ないものの、無血清培地の培養物と比較して細胞数が多かった。一方 F1 では、ホエイを添加した培地で培養した場合に、10% FBS 添加培地の培養物に匹敵した

。また、卵白を添加した培地で培養した場合に、10% FBS 添加培地の培養物よりは少ないものの、無血清培地の培養物と比較して細胞数が多かった。

[0042] 試験4：無血清培地に添加するホエイの濃度の検討

(i) 培地

無血清培地は、ダルベッコ改変イーグル培地に、ペニシリン・ストレプトマイシン溶液、ITS 液体培地サプリメント、 2 ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子、0.1%細胞培養用脂質添加剤、BSAを加えたものを使用した。食品成分は、ホエイ(乾燥粉末)を用いた。各種食品成分は無血清培地に対して各種濃度(1.0質量%、0.5質量%、0.25質量%、0.1質量%、0.05質量%、0.025質量%、0.01質量%、0.005質量%、0質量%)で溶かし、遠心分離後の上清を $0.45\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターろ過して不溶成分を除去したものを試験に用いた。

[0043] (ii) 試験

ホルスタイン種由来筋芽細胞用いて、無血清培地の増殖を促進させるホエイ濃度の検討を行った。約 $5 \times 10^3\text{ cells/cm}^2$ の細胞を播種し、 37°C ・ CO_2 濃度5%に設定した CO_2 インキュベータ内で培養した。培養3日後にトリプシン処理により得た生細胞数をカウントし、無血清培地での細胞数に対する食品成分添加培地での細胞数の割合を算出した(図5)。細胞増殖促進剤として、ホエイは0.005質量%から細胞増殖促進効果を発揮し、0.1質量%で細胞増殖促進効果がプラトーに達した。

[0044] 試験5：無血清培地に添加するホエイと食品成分との併用効果の検討(ウシ筋芽細胞)

(i) 培地

試験4の無血清培地中に、食品成分を添加剤として添加して試験培地を調製した。食品成分は、卵白・大豆・小麦粉・カツオ節(いずれも乾燥粉末)を用いた。各種食品成分は無血清培地に対して0.1%(カツオ節のみ0.02%)で溶かし、遠心分離後の上清を $0.45\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターろ過して

不溶成分を除去したものを試験に用いた。陰性コントロールとして、食品成分無添加（無血清）及び10% FBSを添加した培地を用いた。以上の培地に、さらに0.1%ホエイを添加した場合と、ホエイ未添加の場合で、下記の試験を行った。なお、ホエイはフィルターろ過前に添加された。

(i i) 試験

ホルスタイン種由来筋芽細胞用いて、無血清培地の増殖を促進させる成分の探索を行った。約 $5 \times 10^3 \text{ cells/cm}^3$ の細胞を播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot \text{CO}_2$ 濃度5%に設定した CO_2 インキュベータ内で培養した。培養3日後にトリプシン処理により得た生細胞数をカウントし、無血清培地での細胞数に対する食品成分添加培地での細胞数の割合を算出した（図6）。ホエイは、他の食品原料成分と組み合わせた場合も増殖促進効果を発揮した。増殖促進効果は、相加的であり、増殖促進効果を有する大豆や卵白と組み合わせることで、10% FBSに匹敵する増殖促進効果を発揮した。

[0045] 比較例1：無血清培地での細胞増殖を亢進させる食品素材の探索（ウシ腎臓細胞株）

(i) 培地

試験2で調製された無血清培地中に、食品成分を添加剤として添加して試験培地を調製した。食品成分は、卵白・大豆・ホエイ・小麦粉（いずれも乾燥粉末）を用いた。各種食品成分は無血清培地に対して0.1%で溶かし、遠心分離後の上清を0.45 μm のフィルターろ過して不溶成分を除去したものを試験に用いた。コントロールとして、添加剤無添加（無血清）及び10% FBSを添加した培地を用いた。

(i i) スクリーニング試験

ATCCより入手したウシ腎臓細胞株（MDBK）用いて、無血清培地の増殖を促進させる成分の探索を行った。約 $1 \times 10^4 \text{ cells/cm}^3$ の細胞を播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot \text{CO}_2$ 濃度5%に設定した CO_2 インキュベータ内で培養した。培養4日後にトリプシン処理により得た生細胞数をカウントし、無血清培地での細胞数に対する食品成分添加培地での細胞数の割合を算出した（

図7)。ウシ腎臓細胞に対しては、食品原料成分は、増殖促進効果を発揮しなかった。

[0046] 試験6：ホエイ培地で培養した筋芽細胞の分化

ホルスタイン種由来筋芽細胞用いて、食品成分添加培地で増殖させた細胞が筋管細胞への分化誘導することを確認した。食品成分添加培地は、ダルベッコ改変イーグル培地に、ペニシリノーストレプトマイシン溶液、ITS液体培地サプリメント、 2 ng/mL ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子、細胞培養用脂質添加剤、 0.2% BSAを加えたものに 0.1% のホエイ粉末を溶解させた。遠心分離後の上清を $0.45\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターろ過して不溶成分を除去したものを試験に用いた。コントロールの血清含有培地には、ダルベッコ改変イーグル培地に、ペニシリノーストレプトマイシン溶液、 10% FBSを加えたものを使用した。分化誘導培地には、ダルベッコ改変イーグル培地に、ペニシリノーストレプトマイシン溶液、 2% ウマ血清を加えたものを用いた。約 $0.75 \times 10^4\text{ cells/cm}^2$ の細胞を播種し、 $37^\circ\text{C} \cdot \text{CO}_2$ 濃度 5% に設定した CO_2 インキュベータ内で4日間培養させた後、分化誘導培地に交換してさらに6日間培養した。筋管への分化は、ミオシン重鎖に対する免疫染色を行う事で確認した。

[0047] 免疫染色は下記の工程により行った。

1. 細胞をリン酸緩衝液(PBS)で1回洗浄した後、 4% パラホルムアルデヒドで 4°C で1晩インキュベートして固定を行った。
2. PBSで3回洗浄後、 1% Triton X-100/PBSで室温5分間処理して等価処理を行った。
3. PBSで3回洗浄後、免疫染色用の市販のブロッキング溶液(ケー・イー・シー)を用いて室温で30分間ブロッキングを行った。
4. $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ の抗ミオシン重鎖モノクローナル抗体(Clon MF20)含む液中で室温1時間処理して、1次抗体反応を行った。
5. PBSで3回洗浄後、Alexa 488標識ヤギ抗マウスIgG(abcam, ab150117)の500倍希釈液で室温で30分間処理

して、2次抗体反応を行った。

6. PBS洗浄後にDAPIで核染色を行い、蛍光顕微鏡キーエンス社製のオールインワン顕微鏡による観察した(図8)。ホエイ添加培地及び10% FBS添加培地の両方の培地で増殖させたのちに分化誘導を行うことで、ミオシン重鎖を発現する多核の筋管細胞への分化が確認された。

[0048] 試験7：ホエイの熱耐性試験

加熱処理したホエイ及び血清を用いて培地を調製し、加熱処理による細胞増殖への影響を評価した。水に溶解し調製した1%ホエイ溶液と、非動化済のFBSを用いた。10mlずつ50mlチューブに分注したホエイ溶液とFBSを沸騰した鍋の中に5分間沈め、冷却後にチューブ壁面液体をスピンドウンしたものを加熱済成分とした。熱処理を施さなかった非加熱成分をコントロールとして用いた。

食品成分添加培地として、ダルベッコ改変イーグル培地に、ペニシリンーストレプトマイシン溶液、ITS液体培地サプリメント、5ng/ml ヒト塩基性線維芽細胞増殖因子、細胞培養用脂質添加剤を加えた培地にホエイ溶液を1/10量添加したものを用いた。遠心分離後の上清を0.45μmのフィルターを通して不溶成分を除去したものを試験に用いた。

血清含有培地として、ダルベッコ改変イーグル培地にペニシリンーストレプトマイシン溶液を加えたものに1/10量のFBS添加したものを用いた。

筋芽細胞を $5 \times 10^3 \text{ cells/cm}^2$ の細胞を各種培地を含む培養皿に播種し、 37°C ・ CO_2 濃度5%に設定した CO_2 インキュベータ内で培養した。培養3日後にトリプシン処理により得た生細胞数をカウントした(図9)。ホエイは、加熱処理された場合も、その細胞増殖促進効果に影響がない一方、FBSは加熱処理により細胞増殖促進効果が低下した。

請求の範囲

- [請求項1] 基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを含む、細胞増殖用の培地。
- [請求項2] 増殖された細胞が、培養肉製造に用いられる細胞である、請求項1に記載の培地。
- [請求項3] 前記培地が、動物由来血清を含まない、請求項1又は2に記載の培地。
- [請求項4] 前記動物由来血清が、ウシ胎児血清（FBS）である、請求項3に記載の培地。
- [請求項5] 前記細胞が、線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の細胞を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の培地。
- [請求項6] 前記脂肪組織由来細胞が、脂肪幹細胞、多胞性脂肪細胞、及び単胞性脂肪細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の細胞である、請求項5に記載の培地。
- [請求項7] 前記筋組織由来細胞が、筋芽細胞及び筋衛星細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の細胞である、請求項5に記載の培地。
- [請求項8] 前記細胞が、ウシ由来の細胞である、請求項1～7のいずれか一項に記載の培地。
- [請求項9] さらに、食品原料成分を含む、請求項1～8のいずれか一項に記載の培地。
- [請求項10] 食品原料成分が、卵白、大豆、魚粉、及び小麦粉から選ばれる、請求項9に記載の培地。
- [請求項11] 培養肉製造のための細胞を調製する方法であって、
基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを含む培地で細胞を培養する工程を含む、前記方法。
- [請求項12] 前記培地が、動物由来血清を含まない、請求項11に記載の方法。
- [請求項13] 前記動物由来血清が、ウシ胎児血清（FBS）である、請求項12

に記載の方法。

- [請求項14] 前記培地が、さらに、食品原料成分を含む、請求項11～13のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項15] 前記食品原料成分が、卵白、大豆、魚粉、及び小麦から選ばれる、請求項14に記載の方法。
- [請求項16] 前記細胞が、ウシ由来の細胞である、請求項11～15のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項17] 前記細胞が、線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の細胞を含む、請求項11～16のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項18] 前記脂肪組織由来細胞が、脂肪幹細胞、多胞性脂肪細胞、及び単胞性脂肪細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の細胞である、請求項17に記載の方法。
- [請求項19] 前記筋組織由来細胞が、筋芽細胞及び筋衛星細胞からなる群から選ばれる少なくとも1の細胞である、請求項17に記載の方法。
- [請求項20] 前記細胞が筋芽細胞又は筋衛星細胞であり、さらに筋芽細胞又は筋衛星細胞から筋管細胞への分化誘導工程を含む、請求項19に記載の方法。
- [請求項21] 請求項11～20のいずれか一項に記載の方法により調製された細胞を集積する工程を含む、培養肉の製造方法。
- [請求項22] 前記調製された細胞を、他の細胞、血液、組織、及び細胞外マトリクスからなる群から選ばれる少なくとも1の物質と合わせて集積することを特徴とする、請求項21に記載の製造方法。
- [請求項23] 前記他の細胞が、培養細胞又は動物から取得された細胞である、請求項22に記載の製造方法。
- [請求項24] 集積後にさらに培養することを含む、請求項21～23のいずれか一項に記載の製造方法。
- [請求項25] ホエイを含む、培養肉製造用の細胞増殖促進剤。

- [請求項26] 動物由来血清非含有培地へと添加される、請求項 25 に記載の細胞増殖促進剤。
- [請求項27] 線維芽細胞、脂肪組織由来細胞、及び筋組織由来細胞からなる群から選ばれる少なくとも 1 の細胞の増殖促進する、請求項 25 又は 26 に記載の細胞増殖促進剤。
- [請求項28] 前記脂肪組織由来細胞が、脂肪幹細胞、多胞性脂肪細胞、及び単胞性脂肪細胞からなる群から選ばれる少なくとも 1 の細胞である、請求項 27 に記載の細胞増殖促進剤。
- [請求項29] 前記筋組織由来細胞が、筋芽細胞及び筋衛星細胞からなる群から選択され少なくとも 1 の細胞である、請求項 27 に記載の細胞増殖促進剤。
- [請求項30] 前記細胞が、ウシ由来の細胞である、請求項 25 ～ 29 のいずれか一項に記載の細胞増殖促進剤。
- [請求項31] 基礎培地と、細胞増殖促進剤としてホエイとを混合して、細胞増殖用の培地を取得する工程；
前記培地を加熱殺菌する工程
を含む、培地の製造方法。
- [請求項32] 前記加熱殺菌する工程が、煮沸処理により行われる、請求項 31 に記載の方法。
- [請求項33] 前記加熱殺菌する工程が、熱プレート交換機又は蒸気洗浄装置により行われる、請求項 31 に記載の方法。