

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、植物由来の代替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。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。（非特許文献1：ALTEX, 2018;35(1):99-118.）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 2016, Vol.94, (10) 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、ステロイドホルモン剤、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, 2017;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、非特許文献5：Jpn J Exp Med. 1985 Apr;55(2):45-51、非特許文献6：Prog Immunobiol Stand. 1971;5:202-8、非特許文献7：BMC Biotechnology . 2023 Feb 8;23(1):4.）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：ALTEX. 2018;35(1):99-118.

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

非特許文献3：Scientific Reports. 2017;7:41594

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

非特許文献5：Jpn J Exp Med. 1985 Apr;55(2):45-51

非特許文献6：Prog Immunobiol Stand. 1971;5:202-8

非特許文献7：BMC Biotechnology . 2023 Feb 8;23(1):4.

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、卵白又は卵白乾燥物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卵白又は卵白乾燥物とを含む、細胞増殖用の培地。

〔１－２〕 細胞増殖用の培地の製造のための、卵白又は卵白乾燥物の使用。

〔１－３〕 細胞増殖促進剤の製造のための、卵白又は卵白乾燥物の使用。

〔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、又は項目１－２に記載の使用。

〔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、又は項目１－２、１－３又は２に記載の使用。

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

〔５〕 前記細胞が、線維芽細胞又は筋組織由来細胞を含む、項目１～４のいずれか一項に記載の培地、又は項目１－２、１－３、若しくは２～４に記載の使用。

〔６〕 前記細胞が、ウシ、ブタ、ニワトリ由来の細胞である、項目１～５のいずれか一項に記載の培地、又は項目１－２、１－３、若しくは２～５に記載の使用。

〔７〕 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卵白又は卵白乾燥物とを含む培地で細胞を培養する工程を含む、前記方法。

〔８〕 前記培地が、動物由来血清を含まない、項目７に記載の方法。

〔 9 〕 前記動物由来血清が、ウシ胎児血清（ F B S ）である、項目 8 に記載の方法。

〔 1 0 〕 前記細胞が、ウシ、ブタ、ニワトリ由来の細胞である、項目 7 ～ 9 のいずれか一項に記載の方法。

〔 1 1 〕 前記細胞が、線維芽細胞、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 0 に記載の方法。

〔 1 2 〕 項目 7 ～ 1 1 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。

〔 1 3 〕 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、項目 1 2 に記載の製造方法。

〔 1 4 〕 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 1 3 に記載の製造方法。

〔 1 5 〕 集積後にさらに培養することを含む、項目 1 2 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の製造方法。

〔 1 6 〕 卵白又は卵白乾燥物を含む、培養肉製造用の細胞増殖促進剤。

〔 1 7 〕 動物由来血清非含有培地へと添加される、項目 1 6 に記載の細胞増殖促進剤。

〔 1 8 〕 線維芽細胞、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 の細胞の増殖を促進する、項目 1 6 又は 1 7 に記載の細胞増殖促進剤。

〔 1 9 〕 前記細胞が、ウシ、ブタ、ニワトリ由来の細胞である、項目 1 8 に記載の細胞増殖促進剤。

発明の効果

〔 0009 〕 卵白又は卵白乾燥物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、無血清培地でウシ線維芽細胞（ A ）及びウシ筋芽細胞（ B ）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2]図2は、無血清培地でニワトリ線維芽細胞（A）及びニワトリ筋芽細胞（B）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、無血清培地でブタ線維芽細胞を培養する際に、卵白乾燥物を添加した培地で培養した場合のFBS添加培地における細胞数に対する細胞増殖率を示す。

[図4]図4は、無血清培地でニワトリ線維芽細胞（A）及びブタ線維芽細胞（B）を培養する際に、細胞増殖促進剤として卵白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5]図5は、凍結乾燥後の卵白試料の分子量解析を行った結果である。

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卵白又は卵白乾燥物とを含む、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卵白又は卵白乾燥物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、卵白又は卵白乾燥物を含む、培養肉製造用の細胞増殖促進剤にも関する。

[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卵白又は卵白乾燥物とを含む。卵白又は卵白乾燥物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、卵白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。卵白又は卵白乾燥物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。卵白又は卵白乾燥物は、比較的低い濃度、例えば0.001～0.5質量%、好ましくは0.003～0.2質量%で配合することで細胞増殖活性を亢進することができる。低濃度で配合されることによ

り、凝集を抑制し、培地調製が容易となる。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、卵白又は卵白乾燥物を含む一方で、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。

[0014] 本発明において卵白又は卵白乾燥物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、本発明の卵白は、細胞増殖促進剤（細胞培養サプリメントともいうことができる）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。

[0015] 卵白とは、鳥類の卵において、殻及び黄身を分離することにより得られる物質である。鳥としては任意の種類であってもよいが、大量入手を可能にする観点から、家禽、例えばニワトリ、ウズラ、シチメンチョウ、アヒル、ガチョウ、ダチョウなどが挙げられる。卵白は、卵からの単離物であってもよいし、単離物の乾燥物であってもよい。乾燥物は、通常乾燥粉末として提供される。輸送コストの削減が期待できるため卵白乾燥物が好ましい。乾燥物は

任意の乾燥手法を用いて調製されてもよいが、より好ましくは凍結乾燥により調製される。卵白乾燥物は市販のものを用いてもよいし、卵白を乾燥処理することで調製してもよい。卵白又は卵白乾燥物は、培地に溶解されたのちに、適切なポアサイズのフィルターを用いてろ過することで、不溶物を除去することができる。一例として $0.3 \sim 0.5 \mu\text{M}$ 、特に $0.45 \mu\text{M}$ のフィルターを用いてろ過しうる。卵白乾燥物を増殖促進剤として用いる場合、使用する細胞の種類に応じて、その増殖率が高くなるよう適宜選択された濃度で添加される。一例として、 0.001 質量％～ 0.5 質量％となるように基礎培地に添加される。卵白の濃度は、増殖効果を発揮する観点から、 0.002 質量％以上が好ましく 0.003 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か、又は低減を抑制する観点から、 0.2 質量％以下が好ましく、 0.1 質量％以下がさらに好ましい。単離物を用いる場合には、乾燥物に換算して添加量を決定することができる。

[0016] 卵白には、種々のタンパク質により主に構成されており、例えばオボアルブミン、オボトランスフェリン、オボムコイド、オボムチン、グロブリン、リゾチーム、アビジンなどが知られている。また、遊離アミノ酸、無機塩類、ビタミンなどの微量成分も含みうる。卵白又は卵白乾燥物は、 $5000 \sim 800000 \text{ Da}$ の平均分子量を有することにより特徴づけることができる。平均分子量は、卵白の処理により変化するが、加水分解処理、特に酵素的加水分解処理及び化学的加水分解処理が行われていないことを担保する観点から、 10000 Da 以上、 15000 Da 以上、又は 18000 Da 以上の平均分子量を有することが特に好ましい。

[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

B 1、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、H E P E S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（D M E M）、イーグル基礎培地（B M E）、R P M I 1 6 4 0培地、D M E M / F 1 2培地、F 1 0培地、F 1 2ハム培地、M E M、M 1 9 9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（F B S）などの血清が、細胞増殖促進剤として添加される。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卵白又は卵白乾燥物を含む。したがって、本発明の細胞増殖用の培地は、動物由来血清を含まず、その代替として卵白又は卵白乾燥物を含むものであり、卵白又は卵白乾燥物を血清代替物ということもできる。本発明では、卵白又は卵白乾燥物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、F G F、I G F、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、I L - 1 α 、I L - 1 β などが挙げられ、一例として、0. 1 ~ 1 0 0 0 n g / m L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. 0 0 0 1 ~ 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10～500U/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（インスリートランスフェリンー亜セレン酸ナトリウム）も本発明の卵白又は卵白乾燥物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卵白又は卵白乾燥物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、例えば分化促進効果又は抑制効果又は増殖促進効果をいう。一例として、卵白又は卵白乾燥物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、大豆、小麦、魚粉、微生物、例えばクロレラ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。これらの食品原料は、0.0025質量%～1.0質量%となるように基礎培地に添加され、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。卵白又は卵白乾燥物と、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、ブタ、ニワトリの細胞を使用することが好ましい。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。

[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] 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。

[0023] 脂肪細胞は、細胞質内に脂肪滴を有する細胞を言い、白色脂肪細胞及び褐色脂肪細胞に大別され、またこれらの前駆細胞である脂肪幹細胞を含む。脂肪細胞は、グルコースから脂肪酸への生合成を行うとともに、脂肪酸を脂肪酸輸送経路により取り込むことで、成熟し肥大化する。培養肉製造にあたり、線維芽細胞及び筋組織由来細胞とともに、脂肪細胞を集積することで食味を向上することができる。

[0024] ウシの細胞を用いる場合には、特に線維芽細胞及び筋芽細胞の培養を目的に、卵白又は卵白乾燥物を使用することができる。線維芽細胞を培養した場合、10%FBSを使用した場合と比較して、50%を超える相対増殖率を有しており、未添加の陰性対照と比較して増大しており、大豆、かつお節、小麦を用いた場合よりも相対増殖率が高いことが示された（図1A）。また、筋芽細胞を培養した場合、10%FBSを使用した場合と比較して、34%の相対増殖率を有しており、未添加の陰性対照と比較して増大しており、大豆、かつお節、小麦を用いた場合よりも相対増殖率が高いことが示された（図1B）。ウシの筋芽細胞の培養に、FBSに代えて、酵素処理した卵白調製物を用いることが開示されている（非特許文献4）。本発明では、卵白をそのまま又は乾燥処理のみの処理で用いた場合もウシ線維芽細胞及び筋芽細胞を増殖可能である点で簡便な方法といえる。ウシ線維芽細胞及び筋芽細胞を培養する場合には、卵白又は卵白乾燥物に加えてさらにITSが添加される。

[0025] ニワトリの細胞を用いる場合には、特に線維芽細胞及び筋芽細胞の培養を目的に、卵白又は卵白乾燥物を使用することができる。線維芽細胞を培養した場合、10%FBSを使用した場合と比較して、少なくとも80%の相対増殖率を有しており、使用濃度によっては、10%FBS添加と同等又はそれ以上の相対増殖率を有する。卵白又は卵白乾燥物を使用することで、未添加の陰性対照と比較して有意に増大しており、また、小麦、米、トウモロコシ、小麦タンパク質を用いた場合よりも相対増殖率が高いことが示された（図2A）。なお、大豆やクロレラを用いて、ニワトリ線維芽細胞を培養した場合、10%FBSを添加した場合と同等の相対増殖率を有することから、これらの成分を細胞増殖促進剤として使用することもできる。また、卵白又は卵白乾燥物を用いて筋芽細胞を培養した場合、10%FBSを使用した場合と比較して、70%を超える相対増殖率を有する。この相対増殖率は、未添加の陰性対照の相対増殖率に比較して増大しており、小麦、米ぬか、ひよこ豆、カツオ、魚ゼラチン、エビ、ホエイ、ブタゼラチン、未添加の陰性対照を用

いた相対増殖率よりも高いことが示された（図2B）。ニワトリの皮膚細胞の培養の際に、FBSに代えて、卵白・卵黄分画物を用いることが開示されている（非特許文献5：Jpn J Exp Med, (1985)。本発明では、培養肉の製造を目的とするため、線維芽細胞及び／又は筋芽細胞を増殖する点に特徴を有する。ニワトリの筋芽細胞の培養において、通常、FBSは代替性に乏しい一方で、卵白又は卵白乾燥物は、FBSの代替物として十分な増殖促進作用を有する。

[0026] ブタの細胞を用いる場合には、特に線維芽細胞の培養を目的に、卵白又は卵白乾燥物を使用することができる。線維芽細胞を培養した場合、10%FBSを使用した場合と比較して、少なくとも75%の相対増殖率を有する。卵白又は卵白乾燥物を使用することで、未添加の陰性対照と比較して有意に増大する（図3）。

[0027] [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、線維芽細胞又は筋組織由来細胞又は脂肪細胞の培養物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、線維芽細胞又は筋組織由来細胞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：

線維芽細胞又は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。

[0028] 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卵白又は卵白乾燥物とを含む培地に、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インキュベーター内で培養される。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。

[0029] 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。

[0030] 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。

[0031] 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、又は細胞質内に脂肪滴を蓄積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。

[0032] [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卵白又は卵白乾燥物とを混合して、細胞増殖用の培地を取得する工程；

前記培地を殺菌する工程。

本発明に係る製造方法は、加熱殺菌又は、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。

[0033] 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

[0034] 実施例 1：細胞の調製

(1) ウシ筋芽細胞の採取

ウシ筋芽細胞は、以下の工程により細胞を採取した。採取した筋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ⅠⅠ（Worthington）を添加したダルベッコ改変イーグル（DMEM）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（100μm）に通した。ろ過液を1500gで5分間遠心分離し、得られた沈殿を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100μmのナイロンメッシュに通した後、再度40μm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、20%FBS、4ng/mLヒト塩基性線維芽細胞増殖因子（bFGF）を含むDMEM培地中にプールさせ、培養皿に播種し、増殖した細胞を試験に用いた。

[0035] （２）ウシ及びブタ線維芽細胞の採取

線維芽細胞は、家畜ウシ・家畜ブタの皮膚組織から下記工程により細胞採取した。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%FBSを含むDMEM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。

[0036] （３）ニワトリ筋芽細胞の採取

線維芽細胞は、ニワトリ受精卵18日胚より、下記工程により細胞採取した。ムネ組織をハサミでミンス後に2mg/mLコラゲナーゼⅠⅠ（sigma）を含むDMEM培地に入れ、37℃で1時間酵素反応した。18Gの針を装着した10mLシリンジで組織を懸濁後、懸濁液をフィルター100μmに通した。ろ過した懸濁液を1500rpmで5分間遠心後の沈殿を、

20% FBS、4 ng/mL bFGFを含むDMEM培地で懸濁した。細胞懸濁液を組織培養皿に播種した。1晩培養後の非接着細胞はコラーゲンコート培養皿に播種し、2回継代したものを筋芽細胞として使用した。

[0037] 実施例2：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) ウシ細胞

家畜ウシ由来筋芽細胞及び線維芽細胞を用いて、無血清培地の増殖を促進させる成分の探索を行った。無血清培地としては、DMEM培地に、1%ペニシリン・ストレプトマイシン (PS) 溶液、1% ITS液体培地サプリメント (インスリン・トランスフェリン・亜セレン酸ナトリウム)、2 ng/mL bFGF、細胞培養用脂質添加剤 (sigma) を加えたものを使用した。食品原料成分としては、卵白・大豆・小麦粉・かつお節 (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% (かつお節のみ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。筋芽細胞は、約 5×10^3 cells/cm² の細胞をコラーゲンコートした培養皿に播種し3日間培養した。10% FBSをDMEM培地に添加したものを陽性コントロールとした。線維芽細胞は、 1×10^4 cells/cm² の細胞を組織培養皿に播種し3～4日間培養した。10% FBSをDMEM培地に添加したものを陽性コントロールとした。37℃・CO₂濃度5%に設定したCO₂インキュベーター内で培養後に、トリプシン処理により得られた生細胞数をカウントし、血清含有培地使用時に対する各培養液使用時の細胞数の割合 (相対増殖率 (%)) を算出した。結果を図1に示す。ウシ線維芽細胞を培養した場合 (A)、未添加の陰性対照が30%であった一方、各食品成分を添加した場合に、59% (卵白)、48% (大豆)、40% (かつお節)、及び37% (小麦粉) へと増大しており、特に卵白を用いた場合に、高い細胞増殖率を達成することができた。ウシ筋芽細胞を培養した場合 (B)、未添加の陰性対照が20%であった一方、各食品成分を添加した場合に、34% (卵白)、24% (大豆)、19% (小麦) であり、特に卵白を用いた場合に、高い細胞増殖率

を達成することができた。

[0038] (2) ニワトリ線維芽細胞

A T C Cより入手したニワトリ線維芽細胞株 (D F - 1) 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。無血清培地は、D M E M培地に、4 μ Mインスリン、1 %ペニシリン・ストレプトマイシン (P S) 溶液、0. 2 % B S A、1 %細胞培養用脂質添加剤を加えたものを使用した。血清含有培地は、1 0 % F B SをD M E M培地に添加したものを陽性コントロールとして使用した。食品原料成分としては、小麦粉、米粉、トウモロコシ粉、大豆、卵白、クロレラ (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. 5 %で溶かし、遠心分離後の上清を0. 4 5 μ mのフィルターを通して不溶成分を除去したものを、無血清培地で0. 1、0. 0 2、0. 0 1 %に希釈し試験に用いた。

約 6×10^4 c e l l s / c m³の細胞を播種し、3 7℃・C O₂濃度5 %に設定したC O₂インキュベーター内で培養した。培養3日後に0. 5 %クリスタルバイオレット / 2 0 %メタノールで細胞を染色した。染色された細胞を1 0 0 %メタノールで溶出させ、プレートリーダーで5 9 0 n mの吸光度を測定し、血清含有培地使用時の吸光度に対する各培養液使用時の吸光度を算出した。ニワトリ線維芽細胞の培養に各種食品成分を0. 1 % ~ 0. 0 1 %添加し、細胞増殖への影響を評価した。結果を図2 (A) に示す。0. 1 %添加した時は大豆・クロレラ・卵白において血清含有時に匹敵する細胞増殖を確認したが、0. 0 1 %添加時には卵白においてのみ細胞増殖活性を確認した。BMC Biotechnol (2023) Feb 8;23(1):4 (非特許文献7) 及びProg Immunobiol Stand(1971) 5:202-8 (非特許文献6) において血清代替報告のある大豆・クロレラと比較しても、卵白の増殖促進効果が高い可能性が示唆された。また、Food Funct., (2020) 11, 2477-2488(非特許文献4) において、卵白分解物で若干の増殖促進効果を報告されているが、その報告と比べても添加する卵白量を削減できることがわかった。また、成長因子を使用しなくても血清含有培地と同等に増殖することがわかった。

[0039] (3) ニワトリ筋芽細胞

ニワトリ筋芽細胞を用いて、無血清培地の増殖を促進させる成分の探索を行った。無血清培地は、DMEM培地に、 $4\text{ }\mu\text{M}$ インスリン、 1% ペニシリン・ストレプトマイシン（PS）溶液、 0.2% BSA、 1% 細胞培養用脂質添加剤、 5 ng/mL bFGFを加えたものを使用した。血清含有培地としては、 10% FBSと 5 ng/mL bFGFをDMEM培地に添加したものを陽性コントロールとして使用した。食品原料成分としては、小麦粉、米ぬか、ひよこ豆、かつお節、魚ゼラチン、エビ粉末、卵白、ブタゼラチン（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% （卵白のみ 0.025% ）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たものを試験に用いた。血清含有培地は、 10% FBSと 5 ng/mL bFGFをDMEM培地に添加したものを陽性コントロールとした。筋芽細胞は、約 $2 \times 10^4\text{ cells/cm}^3$ の細胞をコラーゲンコートされたプレートに播種し、3日間培養後に、トリプシン処理により得られた生細胞数をカウントし、血清含有培地使用時に対する各培養液使用時の細胞数の割合を算出した。結果を図2（B）に示す。ニワトリ筋芽細胞でも、卵白添加時の増殖促進効果が最も高く、血清含有時の 73% の増殖を確認した。

[0040] 実施例3：血清含有培地との比較（ブタ線維芽細胞）

無血清培地としては、DMEM培地に、 $4\text{ }\mu\text{M}$ インスリン、 1% ペニシリン・ストレプトマイシン（PS）溶液、 0.2% BSA、 1% 細胞培養用脂質添加剤を加えたものを使用した。血清含有培地としては、 10% FBSをDMEM培地に添加したものを陽性コントロールとして使用した。食品原料成分として卵白を無血清培地に対して 0.025% 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約 $6 \times 10^4\text{ cells/cm}^3$ の細胞を播種し、 37°C ・ CO_2 濃度 5% に設定した CO_2 インキュベーター内で3日間培養し、Cell countingキット溶液（ドウジン）を添加した。 CO_2 インキュベーターで2時間呈色反応を

行い、450nmの吸光度を測定した。血清含有培地使用時の吸光度に対する各培養液使用時の吸光度の割合を算出した。結果を図3に示す。ブタ線維芽細胞を培養した場合、未添加の陰性対照では細胞増殖は見られなかった（DMEM）一方、食品成分として卵白を用いた場合に、高い細胞増殖率を達成することができた）。

[0041] 実施例4：有効濃度の検証

ニワトリ線維芽細胞株（DF-1）とブタ線維芽細胞を用いて、無血清培地の増殖を促進させる成分の探索を行った。無血清培地としては、DMEM培地に、4μMインスリン、1%ペニシリンーストレプトマイシン（PS）溶液、0.2%BSA、1%細胞培養用脂質添加剤を加えたものを使用した。血清含有培地としては、10%FBSをDMEM培地に添加したものを陽性コントロールとして使用した。

食品原料成分としては、卵白を無血清培地に対して0.2%で溶かし、遠心分離後の上清を0.45μmのフィルターろ過して不溶成分を除去したものを、無血清培地で0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0.00625, 0.003125, 0.0016%に希釈した。約 6×10^4 cells/cm³の細胞を播種し、37℃・CO₂濃度5%に設定したCO₂インキュベーター内で3日間培養した後に、Cell counting キット溶液（ドウジン）を添加した。CO₂インキュベーターで2時間呈色反応を行い、450nmの吸光度を測定した。血清含有培地使用時の吸光度に対する各培養液使用時の吸光度の割合を算出した。ブタ及びニワトリ線維芽細胞について、0.003%以上で血清含有時の7割以上の増殖活性を確認した。ブタ及びニワトリ細胞において、Food Funct., (2020) 11, 2477-2488(非特許文献4)の報告と比べても添加する卵白量を削減できることがわかった。

[0042] 実施例5：卵白粉末溶解物の分子量の分析

卵白溶液の分子量分布をゲルろ過クロマトグラフィー法により測定した。高速液体クロマトグラフィー（HPLC：島津製作所）にSuperde

x 30 Increase 10/300 GLカラム (c y t i v a)
を 37℃ に設定したカラムオープン内に取り付け、0.5 mL/分の流速で
280 mM NaCl を含むリン酸バッファー (pH=7.4) (以下、溶
離液) を流すことで流路の平衡化を行った。続いて、サンプル溶液及び標準
溶液を 50 µL ずつ注入し、溶出時間ごとの 214 nm の吸収波長を検出し
、得られたピークにより分子量の分布を確認した。平均分子量は、GPC 解
析ソフト (島津製作所) を用いて標準品分子量に対する保持時間から作成し
た較正曲線より算出した。サンプル溶液は、0.2% 卵白粉末を水で溶かし
0.45 µm フィルターに通したあと溶離液で 10 倍希釈してものを用いた
。標準溶液は、オボアルブミン、オボムコイド、シトクロム c、アプチニン
、(Pro-Pro-Gly)₅ を各 0.5 mg/mL 含む溶液を使用した。卵白溶液のピークは標準溶液のシトクロム c のピークの保持時間 (27.7
分) よりも短い保持時間で検出されたため、卵白溶液の主成分はシトクロム
c (105 aa) よりも大きいことがわかった。解析ソフトで算出しところ
、平均分子量は約 37000 Da (336 aa 相当) であった。これは、Food Funct., (2020) 11, 2477-2488 (非特許文献 4) 報告 (15 aa 以下) と
比べて大きい分子量であった。

請求の範囲

- [請求項1] 基礎培地と、細胞増殖促進剤として卵白又は卵白乾燥物とを含む、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、線維芽細胞又は筋組織由来細胞を含む、請求項1に記載の培地。
- [請求項6] 前記細胞が、ウシ、ブタ、ニワトリ由来の細胞である、請求項1～5のいずれか一項に記載の培地。
- [請求項7] 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卵白又は卵白乾燥物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8] 前記培地が、動物由来血清を含まない、請求項7に記載の方法。
- [請求項9] 前記動物由来血清が、ウシ胎児血清（FBS）である、請求項8に記載の方法。
- [請求項10] 前記細胞が、ウシ、ブタ、ニワトリ由来の細胞である、請求項7に記載の方法。
- [請求項11] 前記細胞が、線維芽細胞、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10に記載の方法。
- [請求項12] 請求項7～11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13] 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12に記載の製造方法。
- [請求項14] 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 1 3 に記載の製造方法。

[請求項15] 集積後にさらに培養することを含む、請求項 1 2 に記載の製造方法

。

[請求項16] 卵白又は卵白乾燥物を含む、培養肉製造用の細胞増殖促進剤。

[請求項17] 動物由来血清非含有培地へと添加される、請求項 1 6 に記載の細胞増殖促進剤。

[請求項18] 線維芽細胞、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 1 6 又は 1 7 に記載の細胞増殖促進剤。

[請求項19] 前記細胞が、ウシ、ブタ、ニワトリ由来の細胞である、請求項 1 8 に記載の細胞増殖促進剤。