

明 細 書

発明の名称：

包装容器入り細胞培養食品、包装容器入り細胞培養食品の製造方法、及び
包装容器入り細胞培養食品の保存方法

技術分野

[0001] 本発明は、細胞培養食品に関し、特に細胞培養食品の劣化を抑制する技術に関する。

背景技術

[0002] 近年、培養肉などの細胞培養食品の製造に関する技術開発が進展している。細胞培養食品は、食糧危機やフードロスなどの課題の解消に役立つだけでなく、畜産の生産量を低減させ、地球温暖化防止等にも寄与するものとして期待されている。

一方、細胞培養食品の品質を保った状態で保存可能にする技術は未だ十分には発展しておらず、無菌状態に保つことで細胞培養食品の品質が維持され得るという程度の認識が、一般的な状況である。

例えば、細胞培養食品を無菌環境下で包装して微生物を起因とした品質劣化を防止することによって、追加での滅菌処理や食品添加物の添加、あるいは冷凍保存などを行うことなく細胞培養食品の品質を維持することができると考えられている。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：特表2023-519478号公報

特許文献2：特表2022-513441号公報

特許文献3：特表2022-532498号公報

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Cell Transplantation, Volume 29: 1-7, 2020

非特許文献2：Journal of Nutritional Science and Vitaminology 50, 45-4

9, 2004

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、一般的な食品保存に関する課題として、酸素濃度が21%の大気環境下で食品を保存すると、食品における油脂やビタミン、色素、香気成分等が酸化して、食品の味覚が損なわれてしまうという問題があった。

また、食品における筋細胞の保存に関する課題として、例えば酸素濃度が1%存在する環境下で2時間保存しただけで、筋細胞由来のスーパーオキシドジスムターゼの作用によって筋細胞内のスーパーオキシドアニオンが酸素と過酸化水素に分解されるということがある。そして、過酸化水素存在下でタンパク質分解酵素の活性が促進され、筋細胞数が減少するとの報告がなされている（非特許文献1、非特許文献2）。このようにして食品に含まれるタンパク質が分解されると、意図せぬ食感や味になってしまうという問題があった。

[0006] そこで、本発明者らは鋭意研究して、上記の問題を解消することができ、細胞培養食品の劣化を抑制可能な包装容器入り細胞培養食品を開発することに成功して、本発明を完成させた。

具体的には、密封された包装容器内に、培養細胞と共にタンパク質分解酵素阻害剤を封入することによって、細胞培養食品における生細胞の減少率を低減させることができた。

[0007] また、これに加えて、包装容器内を低酸素状態にすることによって、細胞培養食品における生細胞数の減少率をより大きく低減させることができた。

さらに、包装容器を他の包装容器内に密封して、他の包装容器内であり且つ包装容器外の空間を低酸素状態にすることによって、細胞培養食品における生細胞数の減少率をより大きく低減させることにも成功した。

[0008] ここで、特許文献1には、培養組織を包装する工程及び封止する工程が無菌条件下で行われるため、追加の滅菌処置又は保存添加物の必要がなく、長い品質保持期間を有する包装された培養組織（例えば、肉）が生産されるこ

とが記載されている（段落0022）。

また、特許文献2には、培養細胞を利用する食用食品に関し、完全に無菌の環境で育てられるため、食用食品の保存可能期間を大幅に延長することができる旨が記載されており、常在菌（細菌、酵母など）は存在せず、無菌包装によって冷凍の必要が無いことが記載されている（段落0227）。

さらに、特許文献3には、増殖プロセスが無菌であるため、得られる包装食品は無菌であり、新鮮な肉などの従来の新鮮な製品よりもはるかに長い貯蔵寿命を有すること、得られた食品は無菌であるため、冷却を必要とせずに出荷できることが記載されている（段落0145）。

[0009] しかしながら、これらの特許文献には、密封された包装容器内に、培養細胞と共にタンパク質分解酵素阻害剤を封入することによって、細胞培養食品における生細胞の減少率を低減することについては、記載も示唆もされていない。

また、包装容器内を低酸素状態にすることや、包装容器を他の包装容器内に密封して、他の包装容器内であり且つ包装容器外の空間を低酸素状態にすることによって、細胞培養食品における培養細胞の減少率を低減させることについても、記載も示唆もされていない。

[0010] 本発明は、上記の事情に鑑みてなされたものであり、培養細胞を含有する細胞培養食品の劣化を抑制することの可能な包装容器入り細胞培養食品、包装容器入り細胞培養食品の製造方法、及び包装容器入り細胞培養食品の保存方法の提供を目的とする。

課題を解決するための手段

[0011] 上記目的を達成するため、本発明の包装容器入り細胞培養食品は、培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品であって、密封された包装容器内に前記培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤が封入されてなる構成としてある。

また、本発明の包装容器入り細胞培養食品を、前記タンパク質分解酵素阻害剤が、ロイペプチン、E-64、アプロチニン、ペスタチン、EDTA、

A E B S F、及びラクタシスチンからなる群から選択された少なくとも一つである構成とすることが好ましい。

[0012] また、本発明の包装容器入り細胞培養食品を、前記包装容器内が低酸素状態である構成とすることが好ましい。

また、本発明の包装容器入り細胞培養食品を、前記包装容器が密封された他の包装容器内に封入されており、前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間が低酸素状態である構成とすることが好ましい。

[0013] また、本発明の包装容器入り細胞培養食品を、前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間に、脱酸素剤が封入されている構成とすることが好ましく、前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間に、二酸化炭素発生剤が封入されている構成とすることも好ましい。

[0014] また、本発明の包装容器入り細胞培養食品を、前記包装容器内に、又は、前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間に、低酸素濃度に調製された液体又はゲルが封入されている構成とすることも好ましい。

また、本発明の包装容器入り細胞培養食品を、前記包装容器がガス透過性を有し且つ前記他の包装容器がガスバリア性を有する構成とすることも好ましい。

[0015] また、本発明の包装容器入り細胞培養食品を、前記包装容器内に、液体又はゲルが充填されている構成とすることも好ましい。

さらに、本発明の包装容器入り細胞培養食品を、上記の包装容器入り細胞培養食品を様々に組み合わせた構成とすることも好ましい。

[0016] 本発明の包装容器入り細胞培養食品の製造方法は、培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品の製造方法であって、前記培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤を包装容器内に密封する方法としてある。

また、本発明の包装容器入り細胞培養食品の製造方法を、前記包装容器内を低酸素状態にする方法とすることが好ましい。

[0017] また、本発明の包装容器入り細胞培養食品の製造方法を、前記包装容器を、他の包装容器内に脱酸素剤及び／又は二酸化炭素発生剤と共に封入して、

前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間を低酸素状態にする方法とすることが好ましい。

また、本発明の包装容器入り細胞培養食品の製造方法を、前記包装容器を、他の包装容器内に封入し、前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間を、真空包装により低酸素状態にする方法とすることが好ましい。

また、本発明の包装容器入り細胞培養食品の製造方法を、前記包装容器内に、又は、前記包装容器を他の包装容器内に封入した当該他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間に、低酸素濃度に調製された液体又はゲルを封入する方法とすることが好ましい。

[0018] 本発明の包装容器入り細胞培養食品の保存方法は、培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品の保存方法であって、前記培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤を包装容器内に密封する方法としてある。

また、本発明の包装容器入り細胞培養食品の保存方法を、前記包装容器内を低酸素状態にする方法とすることが好ましい。

また、本発明の包装容器入り細胞培養食品の保存方法を、前記包装容器を、他の包装容器内に脱酸素剤及び／又は二酸化炭素発生剤と共に封入して、前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間を低酸素状態にする方法とすることが好ましい。

発明の効果

[0019] 本発明によれば、培養細胞を含有する細胞培養食品の劣化を抑制することの可能な包装容器入り細胞培養食品、包装容器入り細胞培養食品の製造方法、及び包装容器入り細胞培養食品の保存方法の提供が可能となる。

図面の簡単な説明

[0020] [図1]本発明の第一実施形態に係る包装容器入り細胞培養食品の構成を示す模式図である。

[図2]本発明の第二実施形態に係る包装容器入り細胞培養食品の構成を示す模式図である。

[図3]本発明の第二実施形態に係る包装容器入り細胞培養食品の応用例の構成

を示す模式図である。

[図4]実施例における生細胞数の測定試験の工程を示す図である。

[図5]実施例における生細胞数の測定試験の結果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0021] 以下、本発明の包装容器入り細胞培養食品、包装容器入り細胞培養食品の製造方法、及び包装容器入り細胞培養食品の保存方法の実施形態について詳細に説明する。ただし、本発明は、以下の実施形態及び後述する実施例の具体的な内容に限定されるものではない。

[0022] [第一実施形態]

本実施形態の包装容器入り細胞培養食品は、培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品であって、密封された包装容器内に培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤が封入されてなることを特徴とする。

本実施形態において、包装容器は特に限定されないが、軟包材からなる袋状（バッグ形状）のものを好適に用いることができる。例えば、包装容器として、熱可塑性樹脂のフィルム又はシートからなるものを好適に用いることができる。

[0023] 具体的には、図1に示すように、例えば2枚のフィルムの周縁部11を熱溶着して得られた、密封された収容部12を内部に有する包装容器10を用いることができる。

この収容部12には、培養細胞Cと共に、タンパク質分解酵素阻害剤Pが封入されている。また、培養細胞Cの乾燥を防止するために、収容部12に液体又はゲルLを培養細胞Cと共に封入しておくことが好ましい。

なお、本実施形態において、包装容器10の形状は矩形状に限定されず、多角形や円形などどのような形状であってもよい。また、包装容器10はバッグ形状でなくてもよい。

[0024] 細胞培養食品は、培養細胞を含む食品であり、細胞性食品とも称される。細胞培養食品には、いわゆる培養肉などの他、培養細胞からなる魚肉や乳製品、菓子、野菜等、培養細胞を含む様々な食品が含まれ得る。

[0025] 培養細胞Cの種類は、特に限定されないが、例えば筋細胞、間質細胞、脂肪細胞、軟骨細胞、肝細胞、内皮細胞、腎細胞、上皮細胞、神経細胞、リンパ系細胞、腸細胞、心筋細胞、線毛上皮細胞から選択された1つ又は複数の動物細胞を用いることができる。

また、培養細胞Cとして、例えば種、葉、茎、根、未熟胚、成熟胚、カルス、小孢子、分裂組織、子葉、胚軸、上胚軸、中胚軸、子葉鞘、根生、幼芽、または生殖組織の細胞から選択された1つ又は複数の植物細胞を用いることもできる。

また、培養細胞Cとして、昆虫や微生物などその他の生物の細胞を用いることもできる。さらに、これらの細胞を組み合わせることも可能である。

[0026] タンパク質分解酵素阻害剤Pとしては、例えばロイペプチン、E-64、アプロチニン、ペスタチン、EDTA、AEBSF、又はラクタシスチンを好適に用いることができる。また、これらのタンパク質分解酵素阻害剤から選択した複数のものを組み合わせることもよい。

[0027] 液体又はゲルLの種類は、特に限定されないが、例えば生理食塩水や水などの液体、多糖類やタンパク質などのゲル等を用いることができる。

[0028] また、本実施形態の包装容器入り細胞培養食品において、包装容器10内が低酸素状態である構成とすることも好ましい。

包装容器10内が低酸素状態であるとは、酸素濃度が21%である大気環境下よりも酸素濃度が低い状態であることを意味する。

[0029] 具体的には、包装容器10内の酸素濃度が、20%以下であることが好ましく、15%以下であることがより好ましく、12%以下であることがさらに好ましく、10%以下であることがより一層好ましく、5%以下であることがより一層好ましく、3%以下であることがより一層好ましく、2%以下であることがより一層好ましく、1%以下であることが特に好ましい。

[0030] 本実施形態において、包装容器10内を低酸素状態にする方法は特に限定されないが、例えば、真空包装により包装容器10を形成することによって

、包装容器 10 内を好適に低酸素状態にすることができる。

また、包装容器 10 内に、低酸素濃度に調製された液体又はゲルを封入することによって、包装容器 10 内を好適に低酸素状態にすることもできる。

[0031] 本実施形態においては、包装容器 10 の材料は、ガスバリア性を有するものとするのが好ましい。

具体的には、包装容器 10 の材料の $23^{\circ}\text{C}-90\% \text{RH}$ での酸素透過度は、 $40 \text{ cc/m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{atm}$ 以下であることが好ましく、 $4.4 \text{ cc/m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{atm}$ 以下であることがより好ましく、 $0.4 \text{ cc/m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{atm}$ 以下であることがさらに好ましく、 $0.1 \text{ cc/m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{atm}$ 以下であることが特に好ましい。

包装容器 10 の材料としては、例えば、ヒートシール性を有するポリエチレンからなる内層、酸素吸収剤を含む酸素吸収中間層、及びバリア性を備えた外層を有する材料などを好適に用いることが可能である。

[0032] 本実施形態の包装容器入り細胞培養食品の製造方法は、培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品の製造方法であって、培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤を包装容器内に密封することを特徴とする。

また、本実施形態の包装容器入り細胞培養食品の保存方法は、培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品の保存方法であって、培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤を包装容器内に密封することを特徴とする。

[0033] これらの包装容器入り細胞培養食品の製造方法及び保存方法において、包装容器内を低酸素状態にすることが好ましい。

また、これらの包装容器入り細胞培養食品の製造方法及び保存方法において、包装容器入り細胞培養食品は、図 1 を用いて上述したものと同様である。

[0034] このような本実施形態によれば、1 つの包装容器を用いることで、培養細胞におけるタンパク質の分解が抑制された包装容器入り細胞培養食品を得ることができ、培養細胞におけるタンパク質の分解が抑制された状態で包装容器入り細胞培養食品を保存することができる。

また、1 つの包装容器を用いることで、包装容器内が低酸素状態に維持さ

れた包装容器入り細胞培養食品を得ることができ、包装容器内を低酸素状態に維持した状態で包装容器入り細胞培養食品を保存することもできる。

[0035] このため、本実施形態によれば、比較的簡易な構成によって、タンパク質が分解されて食品が意図せぬ食感や味になってしまうという問題や、大気環境下で食品を保存する場合に食品の味覚が損なわれてしまうという問題を解消することができ、細胞培養食品の劣化を抑制することが可能となる。

[0036] [第二実施形態]

本実施形態の包装容器入り細胞培養食品は、包装容器が密封された他の包装容器内に封入されている点で第一実施形態と相違しており、その他の構成については、以下に説明する点を除いて第一実施形態と同様である。

すなわち、本実施形態の包装容器入り細胞培養食品は、培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品であって、密封された包装容器内に前記培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤が封入されてなり、包装容器が密封された他の包装容器内に封入されており、他の包装容器内であり且つ包装容器外の空間が低酸素状態であることを特徴とする。

[0037] 具体的には、図2に示すように、インナー包装容器10aが、アウター包装容器20内に封入されている。インナー包装容器10a及びアウター包装容器20は、軟包材からなるバッグ形状のものを好適に用いることができる。

インナー包装容器10aは、例えば2枚のフィルムの周縁部11aを熱溶着して得ることができ、密封された収容部12aを内部に有している。

[0038] また、アウター包装容器20も同様に、2枚のフィルムの周縁部21を熱溶着して得ることができ、密封された収容部22を内部に有している。

なお、本実施形態において、インナー包装容器10aとアウター包装容器20の形状は矩形状に限定されず、多角形や円形などどのような形状であってもよい。

[0039] インナー包装容器10aの収容部12aには、培養細胞Cと共に、タンパク質分解酵素阻害剤Pが封入されている。また、培養細胞Cの乾燥の防止や

培養の足場材として使用するために、収容部 12a に液体又はゲル L を培養細胞 C と共に封入しておくことが好ましい。

[0040] さらに、本実施形態の包装容器入り細胞培養食品は、アウター包装容器 20 内であり且つインナー包装容器 10a 外の空間（以下、容器間空間と称する場合がある。）が低酸素状態となっている。

具体的には、容器間空間の酸素濃度が、20%以下であることが好ましく、15%以下であることがより好ましく、12%以下であることがさらに好ましく、10%以下であることがより一層好ましく、5%以下であることがより一層好ましく、3%以下であることがより一層好ましく、2%以下であることがより一層好ましく、1%以下であることが特に好ましい。

[0041] 本実施形態において、容器間空間を低酸素状態にする方法は特に限定されないが、例えば、真空包装によりアウター包装容器 20 を形成することによって、容器間空間を好適に低酸素状態にすることができる。

また、容器間空間に、低酸素濃度に調製された液体又はゲルを封入することによって、容器間空間を好適に低酸素状態にすることもできる。

[0042] さらに、本実施形態の応用例として、図 3 に示すように、容器間空間に、低酸素化剤 30 を封入しておくことによって、容器間空間を低酸素状態にすることも好ましい。

低酸素化剤 30 としては、脱酸素剤又は二酸化炭素発生剤を好適に用いることができる。また、これらを組み合わせて用いてもよい。

[0043] 具体的には、脱酸素剤として、例えばエージレス(R)（三菱ガス化学株式会社）を好適に用いることができる。このような脱酸素剤を用いることによって、容器間空間における酸素が脱酸素剤に吸収され、容器間空間の酸素濃度を 0.1%以下に維持することができ、容器間空間の残りの気体のほとんどを不活性化ガスの窒素にすることが可能である。

[0044] また、二酸化炭素発生剤として、例えばアネロパック(R)（三菱ガス化学株式会社）を好適に用いることができる。このような二酸化炭素発生剤を用いることによって、容器間空間において二酸化炭素発生剤が充填され、容器間

空間の酸素濃度を6～12%、二酸化炭素濃度を5～8%に維持することができ、容器間空間の残りの気体のほとんどを不活性化ガスの窒素にすることが可能である。

[0045] 本実施形態において、インナー包装容器10aの材料は、ガス透過性を有するものとするのが好ましい。

具体的には、インナー包装容器10aの材料の23℃-90%RHでの酸素透過度は、41cc/m²・day・atm以上であることが好ましく、200cc/m²・day・atm以上であることがより好ましく、1000cc/m²・day・atm以上であることがさらに好ましく、5000cc/m²・day・atm以上であることが特に好ましい。

インナー包装容器10aの材料としては、例えば、低密度ポリエチレンやポリメチルペンテン、シリコン等を好適に用いることが可能である。

[0046] また、本実施形態において、アウター包装容器20の材料は、ガスバリア性を有するものとするのが好ましい。

具体的には、アウター包装容器20の材料の23℃-90%RHでの酸素透過度は、40cc/m²・day・atm以下であることが好ましく、4.4cc/m²・day・atm以下であることがより好ましく、0.4cc/m²・day・atm以下であることがさらに好ましく、0.1cc/m²・day・atm以下であることが特に好ましい。

アウター包装容器20の材料としては、例えば、ヒートシール性を有するポリエチレンからなる内層、酸素吸収剤を含む酸素吸収中間層、及びバリア性を備えた外層を有する材料などを好適に用いることが可能である。

[0047] 本実施形態の包装容器入り細胞培養食品の製造方法は、培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品の製造方法であって、培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤を包装容器内に密封し、さらに以下のいずれかを行う方法である。

[0048] すなわち、包装容器を、他の包装容器内に封入し、他の包装容器内であり且つ包装容器外の空間（容器間空間）を、真空包装により低酸素状態にすることが好ましい。

また、包装容器内に、又は、容器間空間に、低酸素濃度に調製された液体又はゲルを封入することも好ましい。

さらに、包装容器を、他の包装容器内に脱酸素剤及び／又は二酸化炭素発生剤と共に封入して、容器間空間を低酸素状態にすることも好ましい。

[0049] また、本実施形態の包装容器入り細胞培養食品の保存方法は、培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品の保存方法であって、前記培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤を包装容器内に密封し、さらに以下のいずれかを行う方法である。

[0050] すなわち、本実施形態の包装容器入り細胞培養食品の製造方法と同様に、包装容器を、他の包装容器内に封入し、他の包装容器内であり且つ包装容器外の空間（容器間空間）を、真空包装により低酸素状態にすることが好ましい。

また、包装容器内に、又は、容器間空間に、低酸素濃度に調製された液体又はゲルを封入することも好ましい。

[0051] さらに、包装容器を、他の包装容器内に脱酸素剤及び／又は二酸化炭素発生剤と共に封入して、容器間空間を低酸素状態にすることも好ましい。

本実施形態の包装容器入り細胞培養食品の保存方法において、保存温度は、5℃程度とすることが好ましい。なお、細胞の保存に適する温度は、一般的に−60〜−80℃程度である。また、細胞培養に適する温度は、一般的に37℃程度である。

これらの包装容器入り細胞培養食品の製造方法及び保存方法において、包装容器入り細胞培養食品は、図2又は図3を用いて上述したものと同様である。

[0052] このような本実施形態によれば、培養細胞におけるタンパク質の分解を抑制できると共に、他の包装容器内であり且つ包装容器外の空間を低酸素状態に維持することができ、それによって包装容器内を低酸素状態に維持することが可能となる。

すなわち、2つの包装容器を用いることで、培養細胞におけるタンパク質

の分解を抑制できると共に、包装容器内が低酸素状態に維持された包装容器入り細胞培養食品を得ることができ、また包装容器内を低酸素状態に維持した状態で、包装容器入り細胞培養食品を保存することもできる。

[0053] このように、本実施形態によっても、比較的簡易な手法によって、タンパク質が分解されて食品が意図せぬ食感や味になってしまうという問題や、大気環境下で食品を保存する場合に食品の味覚が損なわれてしまうという問題を解消することができ、細胞培養食品の劣化を抑制することが可能となっている。

実施例

[0054] 以下、本発明の包装容器入り細胞培養食品、包装容器入り細胞培養食品の製造方法、及び包装容器入り細胞培養食品の保存方法の効果を確認するために行った試験について説明する。

まず、インナー包装容器とアウター包装容器の2種類の包装容器を準備した。そして、インナー包装容器に培養細胞と培養液とタンパク質分解酵素阻害剤を封入したもの3個と、インナー包装容器に培養細胞と培養液のみを封入したもの3個を作成した。

また、アウター包装容器内であり且つインナー包装容器外の容器間空間に低酸素化剤を封入したもの2種類と、低酸素化剤を封入しないもの1種類を作成した。そして、一定期間経過後のインナー包装容器内における培養細胞の生細胞数を測定した。

[0055] 具体的には、インナー包装容器として、コロナ処理を施した直鎖状低密度ポリエチレン（LLDPE）からなるバッグを使用した。インナー包装容器の23℃-90%RHでの酸素透過度は、8900cc/m²・day・atmであり、サイズは、50mm×50mmである。インナー包装容器のフィルムの厚みは、100μmである。

[0056] また、アウター包装容器として、12μPET/15μナイロン/70μCPP（無延伸ポリプロピレン）であるフィルムからなるバッグを使用した。12μPET層がアウター包装容器の外表面を構成している。アウター包装容器の23℃-90%

RHでの酸素透過度は、 $0\text{ cc/m}^2 \cdot \text{day} \cdot \text{atm}$ であり、サイズは、 $110\text{ mm} \times 160\text{ mm}$ である。 OUTER包装容器のフィルムの厚みは、 $97\text{ }\mu\text{m}$ である。

[0057] 培養細胞としては、マウス由来筋細胞（C2C12，株式会社ケー・イー・シー）を使用した。

また、培養液としては、 10% FBS（コスモ・バイオ株式会社，型番S-FBS-NL-025）を含むDMEM high glucose（富士フイルム和光純薬株式会社，型番043-30085）を使用した。

また、タンパク質分解酵素阻害剤としては、プロテアーゼインヒビターカクテル粉末（シグマアルドリッチジャパン合同会社，型番P2714-1BTL）を使用した。

[0058] そして、タンパク質分解酵素阻害剤を添加せず低酸素化剤を封入しない比較例1の包装容器入り細胞培養食品と、タンパク質分解酵素阻害剤を添加せず低酸素化剤として二酸化炭素発生剤を封入した参考例1の包装容器入り細胞培養食品と、タンパク質分解酵素阻害剤を添加せず低酸素化剤として脱酸素剤を封入した参考例2の包装容器入り細胞培養食品と、タンパク質分解酵素阻害剤を添加して低酸素化剤を封入しない実施例1の包装容器入り細胞培養食品と、タンパク質分解酵素阻害剤を添加して低酸素化剤として二酸化炭素発生剤を封入した実施例2の包装容器入り細胞培養食品と、タンパク質分解酵素阻害剤を添加して低酸素化剤として脱酸素剤を封入した実施例3の包装容器入り細胞培養食品を用いて、図4に示す工程により試験を行った。

[0059] まず、分化済みの培養細胞（マウス由来筋細胞）を含む細胞懸濁液と培養液とタンパク質分解酵素阻害剤をINNER包装容器に注入して密閉した（ステップ10）。INNER包装容器への培養細胞の播種量は、 124 万個/バッグ である。また、INNER包装容器への培養液の注入量は、 4 mL である。

そして、 37°C で1日間保存した（ステップ11）。これにより、培養細胞を、INNER包装容器の内面に接着させた。

[0060] 次に、インナー包装容器内の培養液を排出して、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 1.88 mL（ナカライテスク株式会社、型番14249-95）、2%ゼラチン溶液 0.1 mL（株式会社ニッピ、型番892303）と交換した（ステップ 12）。

また、タンパク質分解酵素阻害剤をインナー包装容器に注入した（ステップ 13）。インナー包装容器への 100 倍希釈タンパク質分解酵素阻害剤（シグマアルドリッチジャパン合同会社、型番P2714-1BTL）の注入量は、0.02 mL である。

[0061] そして、インナー包装容器をアウター包装容器内に封入した（ステップ 14）。このとき、比較例 1 と実施例 1 では低酸素化剤を封入せず、参考例 1 と実施例 2 では低酸素化剤として二酸化炭素発生剤であるアネロパック(R)（三菱ガス化学株式会社）を封入し、参考例 2 と実施例 3 では低酸素化剤として脱酸素剤であるエージレス(R)（三菱ガス化学株式会社）を封入した。

[0062] このように、アウター包装容器内を低酸素状態に維持して（参考例 1、参考例 2、実施例 2、実施例 3）、又は低酸素状態にせずに（比較例 1、実施例 1）、5℃で 6 日間保存した後（ステップ 15）、インナー包装容器をアウター包装容器から取り出して、インナー包装容器内の培養細胞における生細胞数の測定を行った（ステップ 16）。生細胞数の測定は、以下のように行った。

[0063] まず、インナー包装容器からダルベッコリン酸緩衝生理食塩水を除去し、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（ナカライテスク株式会社、型番14249-95）で 1 回洗浄した。次に、アクターゼ（ナカライテスク株式会社、型番12679-54）0.4 mL をバック全体に浸してから全て液体を除去し、37℃で 4 日間 CO₂ インキュベーター（三洋電機株式会社、型番MC018AIC）で保管した。

[0064] 次に、10% FBS（コスモ・バイオ株式会社、型番S-FBS-NL-025）を含む DMEM high glucose（富士フイルム和光純薬株式会社、型番043-30085）1 mL で細胞を剥離し、剥離した細胞を 15 mL チューブ（Corning 社製、型番430791）に回収した。

さらに、15 mL チューブに回収した溶液から0.1 mL をサンプリングして、1.5 mL エッペンチューブへアプライした。

[0065] そして、細胞計数用カートリッジ (Chemometec社, 型番941-0012) を用いて、数十 μ L の細胞液をサンプリングし、カートリッジを細胞計数装置 (Chemometec社, 型番NC-200) にセットして細胞数を測定し、インナー包装容器内における生細胞を算出した。

[0066] 生細胞数の測定は、比較例1、参考例2、実施例1、及び実施例3については各3回ずつ、参考例1と実施例2については各2回ずつ実施して、それぞれの平均を算出した。その結果を図5に示す。

なお、図5の容器間空間における実施例1と実施例2の O_2 と CO_2 の各濃度は、使用した低酸素化剤の製品データにもとづくものであって実測値ではない。また、比較例1の O_2 と CO_2 の各濃度は、一般的な大気環境下のものであって実測値ではない。

[0067] 図5に示されるように、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加せず容器間空間を低酸素状態にしなかった比較例1の生細胞数は、2.1 (万個/バッグ) であった。

また、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加せず容器間空間における酸素濃度を6~12%の低酸素状態にした参考例1の生細胞数は、5.2 (万個/バッグ) であり、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加せず容器間空間における酸素濃度を0.1%以下の低酸素状態にした参考例2の生細胞数は、2.1 (万個/バッグ) であった。

[0068] さらに、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加して容器間空間を低酸素状態にしなかった実施例1の生細胞数は、1.7 (万個/バッグ) であり、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加して容器間空間における酸素濃度を6~12%の低酸素状態にした実施例2の生細胞数は、4.0 (万個/バッグ) であり、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加して容器間空間における酸素濃度を0.1%以下の低酸素状態にした実施例3の生細胞数は、3.0 (万個/バッグ) であった。

[0069] このように、包装容器入り細胞培養食品を 5℃で 6 日間保存した場合、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加して容器間空間を低酸素状態にしなかった実施例 1 の生細胞数は、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加せず容器間空間を低酸素状態にしなかった比較例 1 の生細胞数に比較して約 8 倍であった。

これらのことから、本実施形態の包装容器入り細胞培養食品によれば、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加することによって、細胞培養食品における生細胞の減少率を低減することができ、細胞培養食品の劣化を抑制できることが分かった。

[0070] また、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加して容器間空間における酸素濃度を 6～12%の低酸素状態にした実施例 2 の生細胞数は、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加せず容器間空間を低酸素状態にしなかった比較例 1 の生細胞数に比較して約 19 倍であった。

さらに、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加して容器間空間における酸素濃度を 0.1%以下の低酸素状態にした実施例 3 の生細胞数は、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加せず容器間空間を低酸素状態にしなかった比較例 1 の生細胞数に比較して約 14 倍であった。

[0071] これらのことから、本実施形態の包装容器入り細胞培養食品によれば、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加すると共に、容器間空間を低酸素状態にすることにより、細胞培養食品における生細胞の減少率をより大きく低減することができ、細胞培養食品の劣化をさらに抑制できることが分かった。

[0072] ここで、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加せず容器間空間における酸素濃度を 6～12%の低酸素状態にした参考例 1 の生細胞数と、酸素濃度を 0.1%以下の低酸素状態にした参考例 2 の生細胞数は、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加せず容器間空間を低酸素状態にしなかった比較例 1 の生細胞数に比較して、それぞれ約 2 倍、10 倍であった。

一方で、包装容器内にタンパク質分解酵素阻害剤を添加して容器間空間に

おける酸素濃度を6～12%の低酸素状態にした実施例2の生細胞数は、酸素濃度を0.1%以下の低酸素状態にした実施例3の生細胞数よりも多くなっていた。

[0073] 実施例2と実施例3では、包装容器にタンパク質分解酵素阻害剤を添加することによってタンパク質分解酵素の活性を阻害したため、培養細胞に由来するタンパク質の分解が抑制され、タンパク質分解酵素による生細胞数の減少を防ぐことができた。

そして、一般的に細胞は雰囲気中のCO₂濃度が5%程度存在する条件下で保存した場合に細胞数の増加が促進されるが、CO₂発生剤であるアネロパック(R)が添加された実施例3の容器間空間にはCO₂濃度が5～8%程度存在しているところ、包装容器内も同程度のCO₂濃度となり、実施例3の包装容器内は、細胞の保存に最適な環境であったと考えられる。

[0074] 本発明は、以上の実施形態及び実施例に限定されるものではなく、本発明の範囲内において、種々の変更実施が可能であることは言うまでもない。例えば、容器間空間を低酸素状態にする手段として、上記以外の方法を用いるなど適宜変更することが可能である。

産業上の利用可能性

[0075] 本発明は、細胞培養食品の劣化を抑制して保存する場合などに好適に利用することが可能である。

[0076] この明細書に記載の文献及び本願の日本出願明細書の内容を全てここに援用する。

符号の説明

- [0077] 10 包装容器
10a インナー包装容器
11, 11a 周縁部
12, 12a 収容部
20 アウター包装容器
21 周縁部

2 2 収容部

3 0 低酸素化剤（ O_2 吸収剤， CO_2 発生剤）

C 培養細胞

L 液体又はゲル

P タンパク質分解酵素阻害剤

請求の範囲

- [請求項1] 培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品であって、
密封された包装容器内に前記培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤が封入されてなることを特徴とする包装容器入り細胞培養食品。
- [請求項2] 前記タンパク質分解酵素阻害剤が、ロイペプチン、E-64、アプロチニン、ペスタチン、EDTA、AEBSF、及びラクタシスチンからなる群から選択された少なくとも一つであることを特徴とする請求項1記載の包装容器入り細胞培養食品。
- [請求項3] 前記包装容器内が低酸素状態であることを特徴とする請求項1又は2記載の包装容器入り細胞培養食品。
- [請求項4] 前記包装容器が密封された他の包装容器内に封入されており、前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間が低酸素状態であることを特徴とする請求項1又は2記載の包装容器入り細胞培養食品。
- [請求項5] 前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間に、脱酸素剤が封入されていることを特徴とする請求項4記載の包装容器入り細胞培養食品。
- [請求項6] 前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間に、二酸化炭素発生剤が封入されていることを特徴とする請求項4記載の包装容器入り細胞培養食品。
- [請求項7] 前記包装容器内に、又は、前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間に、低酸素濃度に調製された液体又はゲルが封入されていることを特徴とする請求項4記載の包装容器入り細胞培養食品。
- [請求項8] 前記包装容器がガス透過性を有し且つ前記他の包装容器がガスバリア性を有することを特徴とする請求項4記載の包装容器入り細胞培養食品。
- [請求項9] 前記包装容器内に、液体又はゲルが充填されていることを特徴とする請求項1又は2記載の包装容器入り細胞培養食品。
- [請求項10] 培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品の製造方法であつ

て、

前記培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤を包装容器内に密封することを特徴とする包装容器入り細胞培養食品の製造方法。

[請求項11] 前記包装容器内を低酸素状態にすることを特徴とする請求項10記載の包装容器入り細胞培養食品の製造方法。

[請求項12] 前記包装容器を、他の包装容器内に脱酸素剤及び／又は二酸化炭素発生剤と共に封入して、前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間を低酸素状態にすることを特徴とする請求項10記載の包装容器入り細胞培養食品の製造方法。

[請求項13] 前記包装容器を、他の包装容器内に封入し、前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間を、真空包装により低酸素状態にすることを特徴とする請求項10記載の包装容器入り細胞培養食品の製造方法。

[請求項14] 前記包装容器内に、又は、前記包装容器を他の包装容器内に封入した当該他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間に、低酸素濃度に調製された液体又はゲルを封入することを特徴とする請求項10記載の包装容器入り細胞培養食品の製造方法。

[請求項15] 培養細胞を含有する、包装容器入り細胞培養食品の保存方法であって、

前記培養細胞及びタンパク質分解酵素阻害剤を包装容器内に密封することを特徴とする包装容器入り細胞培養食品の保存方法。

[請求項16] 前記包装容器内を低酸素状態にすることを特徴とする請求項15記載の包装容器入り細胞培養食品の保存方法。

[請求項17] 前記包装容器を、他の包装容器内に脱酸素剤及び／又は二酸化炭素発生剤と共に封入して、前記他の包装容器内であり且つ前記包装容器外の空間を低酸素状態にすることを特徴とする請求項15記載の包装容器入り細胞培養食品の保存方法。