

明 細 書

発明の名称：動物細胞の培養方法

技術分野

[0001] 本発明は、動物細胞の培養方法およびそれに関連する技術に関するものである。

背景技術

[0002] 動物細胞の培養には、ウシ胎児血清等の血清を含有する培地が広く用いられている。しかし、安全性や経済性等の観点から、血清を含有しない無血清培地の開発が望まれている。例えば、血清を生育因子等の代替成分で代替した無血清培地が開発されている。

[0003] 動物細胞の培養には、トランスフェリンが用いられる場合がある（非特許文献1）。トランスフェリンは、鉄と結合し、鉄の輸送に寄与することが知られている（非特許文献2～3）。

[0004] また、ヒノキチオールは、鉄イオンと結合し、鉄イオンの膜透過性を増加させる能力を有する、鉄イオノフォアとして知られている（非特許文献4）。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Tatsuma Yao and Yuta Asayama. Animal-cell culture media: History, characteristics, and current issues. *Reprod Med Biol.* 2017 Apr; 16(2): 99-117.

非特許文献2：Fang, X. et al. The molecular and metabolic landscape of iron and ferroptosis in cardiovascular disease. *Nature Reviews* 20, 7-23 (2023).

非特許文献3：Waldvogel-Abramowski, S. et al. Physiology of Iron Metabolism. *Transfus. Med. Hemother.* 41, 213-221 (2014).

非特許文献4：Science;12 May 2017;Vol.356, Issue 6338;p.608-616; doi: 1

0.1126/science.aah3862

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明は、動物細胞の培養方法およびそれに関連する技術を提供することを課題とする。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは、ヒノキチオール等の鉄イオノフォアを利用することにより血清の非存在下で動物細胞を培養できることを見出し、本発明を完成させた。

[0008] すなわち、本発明は以下の通り例示できる。

[1]

鉄イオノフォアを含有する、動物細胞培養用組成物。

[2]

動物細胞の生育向上用および／または分化促進用の組成物である、前記（具体的には、[1]に記載の）組成物。

[3]

培地または培地添加物である、前記（具体的には、[1]または[2]に記載の）組成物。

[4]

前記培地が、基礎培地、流加培地、または灌流培地である、前記（具体的には、[3]に記載の）組成物。

[5]

前記鉄イオノフォアが、ヒノキチオール、 α -ツヤプリシン、および γ -ツヤプリシンからなる群より選択される少なくとも1種の成分である、前記（具体的には、[1]～[4]のいずれかに記載の）組成物。

[6]

前記鉄イオノフォアが、ヒノキチオールである、前記（具体的には、[1]～[5]のいずれかに記載の）組成物。

[7]

さらに、鉄を含有する、前記（具体的には、[1] ～ [6] のいずれかに記載の）組成物。

[8]

前記鉄が、鉄塩である、前記（具体的には、[7] に記載の）組成物。

[9]

前記動物が、哺乳類、鳥類、魚類、または甲殻類である、前記（具体的には、[1] ～ [8] のいずれかに記載の）組成物。

[1 0]

前記動物が、食肉用の動物である、前記（具体的には、[1] ～ [9] のいずれかに記載の）組成物。

[1 1]

前記動物が、ウシ、ブタまたは鶏である、前記（具体的には、[1] ～ [1 0] のいずれかに記載の）組成物。

[1 2]

前記動物が、ヒトである、前記（具体的には、[1] ～ [9] のいずれかに記載の）組成物。

[1 3]

前記細胞が、筋幹細胞、脂肪前駆細胞、腎由来細胞、またはT細胞である、前記（具体的には、[1] ～ [1 2] のいずれかに記載の）組成物。

[1 4]

血清を実質的に含有しない、前記（具体的には、[1] ～ [1 3] のいずれかに記載の）組成物。

[1 5]

動物由来アルブミンを実質的に含有しない、前記（具体的には、[1] ～ [1 4] のいずれかに記載の）組成物。

[1 6]

トランスフェリンを実質的に含有しない、前記（具体的には、[1] ～ [

15] のいずれかに記載の) 組成物。

[17]

動物細胞の生育を向上させる機能および／または動物細胞の分化を促進する機能を有する、前記(具体的には、[1]～[16]のいずれかに記載の) 組成物。

[18]

産物の製造方法であって、

鉄イオノフォアが存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。

[19]

前記産物が、培養肉である、前記(具体的には、[18]に記載の) 方法。

[20]

動物細胞を培養する方法であって、

鉄イオノフォアが存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。

[21]

動物細胞の生育を向上させる方法であって、

鉄イオノフォアが存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。

[22]

動物細胞の分化を促進する方法であって、

鉄イオノフォアが存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。

[23]

前記鉄イオノフォアが、ヒノキチオール、 α -ツヤプリシン、および γ -ツヤプリシンからなる群より選択される少なくとも1種の成分である、前記(具体的には、[18]～[22]のいずれかに記載の) 方法。

[24]

前記鉄イオノフォアが、ヒノキチオールである、前記(具体的には、[18]～[23]のいずれかに記載の) 方法。

[25]

前記培養が、鉄の存在下で実施される、前記（具体的には、[18]～[24]のいずれかに記載の）方法。

[26]

前記鉄が、鉄塩である、前記（具体的には、[25]に記載の）方法。

[27]

前記培養時の培地における前記鉄イオノフォアの濃度が、1 nM～100 μ Mである、前記（具体的には、[18]～[26]のいずれかに記載の）方法。

[28]

前記培養時の培地における前記鉄イオノフォアの濃度が、10 nM～10 μ Mである、前記（具体的には、[18]～[27]のいずれかに記載の）方法。

[29]

前記培養時の培地におけるヒノキチオール濃度が、1 nM～2.5 μ Mである、前記（具体的には、[23]または[24]に記載の）方法。

[30]

前記培養時の培地におけるヒノキチオール濃度が、10 nM～1 μ Mである、前記（具体的には、[23]または[24]に記載の）方法。

[31]

前記培養時の培地における前記鉄濃度が、200 nM～500 μ Mである、前記（具体的には、[25]または[26]に記載の）方法。

[32]

前記動物が、哺乳類、鳥類、魚類、または甲殻類である、前記（具体的には、[18]～[31]のいずれかに記載の）方法。

[33]

前記動物が、食肉用の動物である、前記（具体的には、[18]～[32]のいずれかに記載の）方法。

[34]

前記動物が、ウシ、ブタまたは鶏である、前記（具体的には、[18]～[33]のいずれかに記載の）方法。

[35]

前記動物が、ヒトである、前記（具体的には、[18]、[20]～[32]のいずれかに記載の）方法。

[36]

前記細胞が、筋幹細胞または脂肪前駆細胞である、前記（具体的には、[18]～[35]のいずれかに記載の）方法。

[37]

前記細胞が、腎由来細胞またはT細胞である、前記（具体的には、[18]、[20]～[35]のいずれかに記載の）方法。

[38]

前記培養が、血清を実質的に含有しない培地で実施される、前記（具体的には、[18]～[37]のいずれかに記載の）方法。

[39]

前記培養が、動物由来アルブミンを実質的に含有しない培地で実施される、前記（具体的には、[18]～[38]のいずれかに記載の）方法。

[40]

前記培養が、トランスフェリンを実質的に含有しない培地で実施される、前記（具体的には、[18]～[39]のいずれかに記載の）方法。

[41]

前記鉄イオノフォアが存在下で動物細胞を培養することにより、動物細胞の生育が向上する、且つ／又は、動物細胞の分化が促進される、前記（具体的には、[18]～[40]のいずれかに記載の）方法。

発明の効果

[0009] 本発明によれば、動物細胞を培養することができる。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]ヒノキチオールが存在下での、無血清培地におけるウシ筋幹細胞の増殖を示す図。縦軸は増加倍率を示す。横軸は群番号を示す。

[図2]血清培地または、ヒノキチオールの存在下での無血清培地におけるブタ

脂肪前駆細胞(PSPA)の増殖を示す図。縦軸は増加倍率を示す。横軸は群番号を示す。

[図3]ヒノキチオールが存在下での、浮遊培養系におけるHEK293派生細胞株を継代培養した生細胞数を示す図。3、7、10、13、17、および20日目に細胞数の計測と継代を実施した。縦軸は細胞数($\times 10^6$ cells/ml)、横軸は培養開始からの経過日数(days)を示す。

[図4]ヒノキチオールが存在下での、無血清培地におけるCD8陽性ヒトT細胞の増殖を示す図。縦軸は増加倍率を示す。横軸は群番号を示す。

発明を実施するための形態

[0011] <1>有効成分

<1-1>有効成分

本発明においては、鉄イオノフォアを有効成分として使用する。

[0012] 鉄イオノフォアを、「有効成分」ともいう。

[0013] 有効成分は、動物細胞の培養に利用することができる。具体的には、有効成分の存在下で動物細胞を培養することができる。

[0014] 有効成分の利用により、具体的には有効成分の存在下で動物細胞を培養することにより、動物細胞の生育が向上してよい、すなわち、動物細胞の生育が向上する効果が得られてよい。同効果を、「生育向上効果」ともいう。言い換えると、有効成分は、動物細胞の生育を向上させる機能を有してよい。同機能を、「生育向上機能」ともいう。すなわち、有効成分の存在下で動物細胞を培養することにより、有効成分の非存在下で動物細胞を培養する場合と比較して、動物細胞の生育が向上してよい。有効成分の非存在下で動物細胞を培養する場合としては、有効成分を利用しないこと以外は、有効成分の存在下で動物細胞を培養するのと同じ条件で動物細胞を培養する場合が挙げられる。生育向上効果は、例えば、血清が実質的に存在しない条件で動物細胞を培養する（すなわち血清を実質的に含有しない培地で動物細胞を培養する）場合に得られてよい。生育向上効果は、例えば、動物由来アルブミンが実質的に存在しない条件で動物細胞を培養する（すなわち動物由来ア

ルブミンを実質的に含有しない培地で動物細胞を培養する）場合に得られてよい。生育向上効果は、例えば、血清および動物由来アルブミンが実質的に存在しない条件で動物細胞を培養する（すなわち血清および動物由来アルブミンを実質的に含有しない培地で動物細胞を培養する）場合に得られてよい。生育向上効果は、例えば、動物細胞がMyoD+細胞（すなわち、MyoDを発現している細胞）である場合に得られてよい。MyoD+細胞は、例えば、筋芽細胞であってよい。生育の向上としては、増殖速度の増大が挙げられる。生育向上効果は、有効成分の存在下と非存在下での動物細胞の生育（例えば増殖速度）を測定し比較することにより確認できる。

[0015] 有効成分の利用により、具体的には有効成分の存在下で動物細胞を培養することにより、動物細胞の分化が促進されてよい、すなわち、動物細胞の分化を促進する効果が得られてよい。同効果を、「分化促進効果」ともいう。言い換えると、有効成分は、動物細胞の分化を促進する機能を有してよい。同機能を、「分化促進機能」ともいう。すなわち、有効成分の存在下で動物細胞を培養することにより、有効成分の非存在下で動物細胞を培養する場合と比較して、動物細胞の分化が促進されてよい。有効成分の非存在下で動物細胞を培養する場合としては、有効成分を利用しないこと以外は、有効成分の存在下で動物細胞を培養するのと同じ条件で動物細胞を培養する場合が挙げられる。分化促進効果は、例えば、血清が実質的に存在しない条件で動物細胞を培養する（すなわち血清を実質的に含有しない培地で動物細胞を培養する）場合に得られてよい。分化促進効果は、例えば、動物由来アルブミンが実質的に存在しない条件で動物細胞を培養する（すなわち動物由来アルブミンを実質的に含有しない培地で動物細胞を培養する）場合に得られてよい。分化促進効果は、例えば、血清および動物由来アルブミンが実質的に存在しない条件で動物細胞を培養する（すなわち血清および動物由来アルブミンを実質的に含有しない培地で動物細胞を培養する）場合に得られてよい。分化促進効果は、例えば、動物細胞がPAX7+細胞（すなわち、PAX7を発現している細胞）である場合に得られてよい。PAX7+細胞は、例えば、衛星

細胞であってよい。衛星細胞は、活性化されていてもよい。分化としては、筋分化が挙げられる。分化の促進としては、分化速度の増大や分化細胞の比率の増大が挙げられる。分化促進効果は、有効成分の存在下と非存在下での動物細胞の分化（例えば分化速度や分化細胞の比率）を測定し比較することにより確認できる。動物細胞の分化は、例えば、分化の指標となるタンパク質の発現を指標として測定できる。例えば、筋分化においては、分化の進行に応じて、Sprouty1、Pax7、MyoD、Myogenin、Myosin heavy chain (MHC) が順に発現し得る (Manuel Schmidt et al. Adult stem cells at work: regenerating skeletal muscle. Cell Mol Life Sci. 2019 Jul;76(13):2559-2570.)。

- [0016] 有効成分の利用により、具体的には有効成分の存在下で動物細胞を培養することにより、少なくとも生育向上効果が得られてもよい。
- [0017] 有効成分の利用により、具体的には有効成分の存在下で動物細胞を培養することにより、生育向上効果および分化促進効果が得られてもよい。
- [0018] 有効成分は、例えば、トランスフェリンの代わりに利用されてよい。有効成分は、例えば、トランスフェリンの機能を代替してよい。有効成分は、トランスフェリンと比較して安価であり得る。また、トランスフェリンはタンパク質であるため冷蔵保管が必要であるのに対し、有効成分は常温保管が可能であり得る。よって、有効成分の利用は、トランスフェリンの利用と比較して、経済性および／または保存性において有利であり得る。
- [0019] 一態様においては、動物細胞の培養により産物が製造されてよい。産物としては、培養肉や目的物質が挙げられる。目的物質は、動物細胞により製造できるものであれば、特に制限されない。目的物質としては、タンパク質やウイルスが挙げられる。産物としては、特に、培養肉が挙げられる。動物細胞の培養により産物を製造する場合、有効成分の利用により、産物の生産が向上してよい。すなわち、有効成分の存在下で動物細胞を培養することにより、有効成分の非存在下で動物細胞を培養する場合と比較して、産物の生産が向上してよい。例えば、有効成分の利用による動物細胞の生育の向上およ

び／または分化の促進により、産物の生産が向上してよい。すなわち、生育向上効果または分化促進効果の一態様は、産物の生産が向上する効果であってよい。産物の生産が向上する効果は、例えば、血清が実質的に存在しない条件で動物細胞を培養する（すなわち血清を実質的に含有しない培地で動物細胞を培養する）場合に得られてよい。産物の生産が向上する効果は、例えば、動物由来アルブミンが実質的に存在しない条件で動物細胞を培養する（すなわち動物由来アルブミンを実質的に含有しない培地で動物細胞を培養する）場合に得られてよい。産物の生産が向上する効果は、例えば、血清および動物由来アルブミンが実質的に存在しない条件で動物細胞を培養する（すなわち血清および動物由来アルブミンを実質的に含有しない培地で動物細胞を培養する）場合に得られてよい。生産の向上としては、生産量の向上や生産速度の向上が挙げられる。

[0020] 「鉄イオノフォア」とは、生体膜における鉄イオンの透過性を増大させる機能を有する物質を意味してよい。「鉄イオノフォア」とは、具体的には、例えば、鉄イオンと結合して生体膜を通過する物質を意味してもよい。鉄イオノフォアとしては、ヒノキチオール (hinokitiol; 「 β -ツヤプリシン」ともいう)、 α -ツヤプリシン、 γ -ツヤプリシンが挙げられる。鉄イオノフォアとしては、特に、ヒノキチオールが挙げられる。鉄イオノフォアとしては、1種の物質を用いてもよく、2種またはそれ以上の物質を組み合わせで用いてもよい。

[0021] 有効成分が塩を形成し得る場合、有効成分は、フリー体として使用されてもよく、塩として使用されてもよく、それらの組み合わせとして使用されてもよい。すなわち、「有効成分」という用語は、特記しない限り、フリー体の有効成分、もしくはその塩、またはそれらの組み合わせを意味してよい。「フリー体」とは、塩を形成していない形態を意味する。また、有効成分が水和物を形成し得る場合、有効成分は、非水和物として使用されてもよく、水和物として使用されてもよく、それらの組み合わせとして使用されてもよい。すなわち、「有効成分」という用語（例えば、「フリー体の有効成分」

や「有効成分の塩」）は、特記しない限り、非水和物および水和物を包含してよい。有効成分は、使用時にはイオン等のいずれの形態をとっていてもよい。

[0022] 塩は、本発明の目的に応じて許容可能なものであれば特に制限されない。例えば、動物細胞の培養により喫食用の産物を製造する場合、塩としては、経口摂取可能なものを選択してよい。例えば、カルボキシル基等の酸性基に対する塩としては、具体的には、アンモニウム塩、ナトリウム、カリウム等のアルカリ金属との塩、カルシウム、マグネシウム等のアルカリ土類金属との塩、アルミニウム塩、亜鉛塩、トリエチルアミン、エタノールアミン、モルホリン、ピロリジン、ピペリジン、ピペラジン、ジシクロヘキシルアミン等の有機アミンとの塩、アルギニン、リジン等の塩基性アミノ酸との塩が挙げられる。また、例えば、アミノ基等の塩基性基に対する塩としては、具体的には、塩酸、硫酸、リン酸、硝酸、臭化水素酸等の無機酸との塩、酢酸、クエン酸、安息香酸、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、コハク酸、タンニン酸、酪酸、ヒベンズ酸、パモ酸、エナント酸、デカン酸、テオクル酸、サリチル酸、乳酸、シュウ酸、マンデル酸、リンゴ酸、メチルマロン酸、アジピン酸等の有機カルボン酸との塩、メタンスルホン酸、ベンゼンスルホン酸、p-トルエンスルホン酸等の有機スルホン酸との塩が挙げられる。例えば、コハク酸の塩としては、特に、ナトリウム塩が挙げられる。塩としては、1種の塩を用いてもよく、2種またはそれ以上の塩を組み合わせ用いてもよい。

[0023] 有効成分としては、市販品を用いてもよく、適宜製造して取得したものを用いてもよい。有効成分の製造方法は特に制限されない。有効成分は、例えば、化学合成、酵素反応、発酵法、抽出法、またはそれらの組み合わせにより製造することができる。有効成分は、所望の程度に精製されていてもよく、そうでなくてもよい。すなわち、有効成分としては、精製品を用いてもよいし、有効成分を含有する素材を用いてもよい。有効成分としては、例えば、有効成分の含有量が1% (w/w) 以上、5% (w/w) 以上、10% (

w/w) 以上、30% (w/w) 以上、50% (w/w) 以上、70% (w/w) 以上、90% (w/w) 以上、または95% (w/w) 以上の素材を用いてもよい。

[0024] なお、有効成分の量（例えば含有量（濃度）や使用量）は、有効成分を含有する素材を用いる場合にあっては、当該素材中の有効成分そのものの量に基づいて算出されるものとする。また、有効成分の量（例えば含有量（濃度）や使用量）は、有効成分が塩または水和物を形成している場合にあっては、塩または水和物の質量を等モルの水和していないフリー体の質量に換算した値に基づいて算出されるものとする。

[0025] <2>本発明の組成物

本発明の組成物は、有効成分（すなわち、鉄イオノフォア）を含有する組成物である。

[0026] 本発明の組成物は、例えば、動物細胞の培養に利用することができる。すなわち、本発明の組成物は、動物細胞培養用の組成物であってよい。本発明の組成物は、例えば、後述する本発明の方法に記載の態様で動物細胞の培養に利用することができる。

[0027] 本発明の組成物（具体的には、動物細胞培養用の組成物）は、例えば、培地であってよい。培地としては、基礎培地、流加培地（feed medium）、灌流培地（perfusion medium）が挙げられる。「基礎培地」とは、培養開始時の培地を意味してよい。基礎培地を、「初発培地」ともいう。「流加培地」とは、流加培養において培養開始後に培養系に供給される培地を意味してよい。「灌流培地」とは、連続培養（これは灌流培養に限られない）において培養開始後に培養系に供給される培地を意味してよい。

[0028] 本発明の組成物（具体的には、動物細胞培養用の組成物）は、例えば、培地添加物であってもよい。「培地添加物」とは、培地に添加して用いられる組成物を意味してよい。培地添加物が添加される培地としては、基礎培地、流加培地、灌流培地が挙げられる。

[0029] 本発明の組成物の利用により、動物細胞の生育が向上してよい、すなわち

、動物細胞の生育が向上する効果（生育向上効果）が得られてよい。例えば、培地である本発明の組成物で動物細胞を培養することにより、生育向上効果が得られてよい。また、例えば、培地添加物である本発明の組成物を添加した培地で動物細胞を培養することにより、生育向上効果が得られてよい。言い換えると、本発明の組成物は、動物細胞の生育を向上させる機能（生育向上機能）を有してよい。よって、本発明の組成物は、動物細胞の生育の向上に利用されてよい。すなわち、本発明の組成物は、例えば、動物細胞の生育向上用の組成物であってもよい。

[0030] 本発明の組成物の利用により、動物細胞の分化が促進されてよい、すなわち、動物細胞の分化を促進する効果（分化促進効果）が得られてよい。例えば、培地である本発明の組成物で動物細胞を培養することにより、分化促進効果が得られてよい。また、例えば、培地添加物である本発明の組成物を添加した培地で動物細胞を培養することにより、分化促進効果が得られてよい。言い換えると、本発明の組成物は、動物細胞の分化を促進する機能（分化促進機能）を有してよい。よって、本発明の組成物は、動物細胞の分化の促進に利用されてよい。すなわち、本発明の組成物は、例えば、動物細胞の分化促進用の組成物であってもよい。

[0031] 本発明の組成物の利用により、少なくとも生育向上効果が得られてもよい。

[0032] 本発明の組成物の利用により、生育向上効果および分化促進効果が得られてもよい。すなわち、本発明の組成物は、例えば、動物細胞の生育向上および分化促進用の組成物であってもよい。

[0033] 一態様においては、動物細胞の培養により産物（例えば、培養肉や目的物質）が製造されてよい。動物細胞の培養により産物を製造する場合、本発明の組成物の利用により、産物の生産が向上してよい。例えば、本発明の組成物の利用による動物細胞の生育の向上および／または分化の促進により、産物の生産が向上してよい。すなわち、本発明の組成物（具体的には、動物細胞培養用の組成物）の一態様は、産物の生産向上用の組成物であってもよい。

- [0034] 本発明の組成物は、有効成分からなるものであってもよく、有効成分以外の成分を含有していてもよい。有効成分以外の成分を、「追加成分」ともいう。すなわち、有効成分は、そのまま、あるいは追加成分と組み合わせて、本発明の組成物として用いてよい。追加成分としては、1種の成分を用いてもよく、2種またはそれ以上の成分を組み合わせて用いてもよい。
- [0035] すなわち、本発明は、有効成分を使用することを含む、本発明の組成物の製造方法を提供する。本発明の組成物の製造における有効成分の使用態様は、有効成分を含有する組成物が得られる限り、特に制限されない。本発明の組成物の製造における有効成分の使用としては、有効成分を組成物に配合することが挙げられる。「有効成分を組成物に配合する」とは、組成物に有効成分を含有させることを意味してよい。「有効成分を組成物に配合する」とは、具体的には、有効成分と追加成分とを組み合わせることを意味してもよい。
- [0036] 追加成分は、本発明の目的を達成できる（例えば生育向上効果または分化促進効果が得られる）限り、特に制限されない。追加成分は、例えば、動物細胞の種類や本発明の組成物の使用態様等の諸条件に応じて、適宜選択できる。追加成分としては、培地成分が挙げられる。培地成分については後述する。例えば、少なくとも、本発明の組成物が培地である場合に、本発明の組成物は培地成分を含有してよい。追加成分として、具体的には、鉄が挙げられる。すなわち、本発明の組成物は、例えば、鉄を含有してよい。
- [0037] 本発明の組成物は、例えば、適宜製剤化されていてもよい。製剤化にあたっては、添加剤を適宜使用してよい。すなわち、追加成分としては、製剤化用いられる添加剤も挙げられる。添加剤としては、賦形剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、安定剤、矯味矯臭剤、希釈剤、界面活性剤が挙げられる。添加剤は、例えば、本発明の組成物の形状等の諸条件に応じて、適宜選択できる。
- [0038] 本発明の組成物の形状は、特に制限されない。本発明の組成物は、例えば、粉末、フレーク、錠剤、ペースト、液体等の任意の形状であってよい。
- [0039] 本発明の組成物における各成分（すなわち、有効成分および任意で追加成

分)の含有量や含有量比は、本発明の目的を達成できる(例えば生育向上効果または分化促進効果が得られる)限り、特に制限されない。すなわち、例えば、本発明の組成物における有効成分の含有量は、有効量(例えば生育向上効果または分化促進効果が得られる量)であってよい。本発明の組成物における各成分の含有量や含有量比は、動物細胞の種類や本発明の組成物の使用態様等の諸条件に応じて適宜設定できる。

[0040] 本発明の組成物における有効成分の含有量は、0%(w/w)より多く、且つ、100%(w/w)以下である。本発明の組成物における有効成分の含有量は、例えば、1 ppb(w/w)以上、10 ppb(w/w)以上、100 ppb(w/w)以上、1 ppm(w/w)以上、10 ppm(w/w)以上、100 ppm(w/w)以上、1000 ppm(w/w)以上、1%(w/w)以上、2%(w/w)以上、5%(w/w)以上、または10%(w/w)以上であってもよく、100%(w/w)以下、100%(w/w)未満、99.9%(w/w)以下、90%(w/w)以下、50%(w/w)以下、20%(w/w)以下、10%(w/w)以下、5%(w/w)以下、2%(w/w)以下、1%(w/w)以下、1000 ppm(w/w)以下、100 ppm(w/w)以下、10 ppm(w/w)以下、または1 ppm(w/w)以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせであってもよい。本発明の組成物における有効成分の含有量は、具体的には、例えば、1 ppb(w/w)~1 ppm(w/w)、1 ppm(w/w)~10 ppm(w/w)、10 ppm(w/w)~100 ppm(w/w)、100 ppm(w/w)~1000 ppm(w/w)、1000 ppm(w/w)~1%(w/w)、1%(w/w)~10%(w/w)、または10%(w/w)~20%(w/w)であってもよい。本発明の組成物における有効成分の含有量は、具体的には、例えば、1 ppb(w/w)~10%(w/w)、1 ppb(w/w)~1%(w/w)、または1 ppb(w/w)~1000 ppm(w/w)であってもよい。本発明の組成物が2種またはそれ以上の有効成分を含有する場合、本発明の組成物におけるそれら2種またはそれ以上の有効成分の含有量を、それぞれ独立に、あるいは合計で、上記例示した本発明の組成物における有効成分の含有量の範囲に設定してよい(ただし、本発明の組成物におけるそれら2種またはそれ以上の有効成分の総含有量は100%(w/w)以下である)。なお、本発明の組成物が2種またはそれ以上の有効成分を含有する場合、「本発明の組成物における有効成分の含有量」とは、特記しない限り、本発明の組成物

におけるそれら2種またはそれ以上の有効成分の総含有量を意味するものとする。

- [0041] 一態様において、本発明の組成物は、血清を実質的に含有していなくてよい。「本発明の組成物が血清を実質的に含有しない」とは、本発明の組成物における血清の含有量が1% (w/w) 以下、0.1% (w/w) 以下、0.01% (w/w) 以下、または0.001% (w/w) 以下であることを意味してよく、本発明の組成物における血清の含有量が0 (ゼロ) である (すなわち、本発明の組成物が血清を含有しない) 場合も包含してよい。
- [0042] 一態様において、本発明の組成物は、動物由来アルブミンを実質的に含有していなくてよい。「本発明の組成物が動物由来アルブミンを実質的に含有しない」とは、本発明の組成物における動物由来アルブミンの含有量が1% (w/w) 以下、0.1% (w/w) 以下、0.01% (w/w) 以下、または0.001% (w/w) 以下であることを意味してよく、本発明の組成物における動物由来アルブミンの含有量が0 (ゼロ) である (すなわち、本発明の組成物が動物由来アルブミンを含有しない) 場合も包含してよい。
- [0043] 一態様において、本発明の組成物は、トランスフェリンを実質的に含有していなくてよい。「本発明の組成物がトランスフェリンを実質的に含有しない」とは、本発明の組成物におけるトランスフェリンの含有量が0.001% (w/w) 以下、0.0001% (w/w) 以下、0.00001% (w/w) 以下、または0.000001% (w/w) 以下であることを意味してよく、本発明の組成物におけるトランスフェリンの含有量が0 (ゼロ) である (すなわち、本発明の組成物がトランスフェリンを含有しない) 場合も包含してよい。
- [0044] 本発明の組成物における各成分 (すなわち、有効成分および任意で追加成分) の含有量は、例えば、後述する本発明の方法における培地中の各成分の濃度が得られるように設定することができる。
- [0045] 本発明の組成物が2種またはそれ以上の成分を含有する場合、それら成分は、互いに混合されて本発明の組成物に含有されていてもよく、それぞれ別

個に、あるいは、任意の組み合わせで別個に、本発明の組成物に含有されていてもよい。例えば、本発明の組成物は、有効成分のパッケージと追加成分のパッケージのセットとして提供されてもよい。このような場合、セットに含まれる成分は使用時に適宜併用することができる。

[0046] <3>本発明の方法

本発明の方法は、有効成分（すなわち、鉄イオノフォア）の存在下で動物細胞を培養する工程を含む、動物細胞の培養方法である。同工程を、「動物細胞の培養工程」ともいう。

[0047] 有効成分の利用により、具体的には有効成分の存在下で動物細胞を培養することにより、動物細胞の生育が向上してよい、すなわち、動物細胞の生育が向上する効果（生育向上効果）が得られてよい。すなわち、本発明の方法（具体的には、動物細胞の培養方法）の一態様は、例えば、動物細胞の生育を向上させる方法であってもよい。

[0048] 有効成分の利用により、具体的には有効成分の存在下で動物細胞を培養することにより、動物細胞の分化が促進されてよい、すなわち、動物細胞の分化を促進する効果（分化促進効果）が得られてよい。すなわち、本発明の方法（具体的には、動物細胞の培養方法）の一態様は、例えば、動物細胞の分化を促進する方法であってもよい。

[0049] 有効成分の利用により、具体的には有効成分の存在下で動物細胞を培養することにより、少なくとも生育向上効果が得られてもよい。

[0050] 有効成分の利用により、具体的には有効成分の存在下で動物細胞を培養することにより、生育向上効果および分化促進効果が得られてもよい。すなわち、本発明の方法（具体的には、動物細胞の培養方法）の一態様は、例えば、動物細胞の生育を向上させ且つ分化を促進する方法であってもよい。

[0051] 動物細胞の培養の目的は、特に制限されない。

[0052] 一態様においては、動物細胞の培養により産物（例えば、培養肉や目的物質）が製造されてもよい。すなわち、動物細胞が培養により培養肉を形成できる場合、同細胞の培養により培養肉を製造することができる。培養肉は、

主に、筋組織により構成されていてよい。よって、「動物細胞が培養により培養肉を形成できる」とは、例えば、動物細胞が培養により分化し筋組織を形成できることを意味してよく、具体的には、動物細胞が培養により筋管細胞に分化し筋組織を形成できることを意味してよい。また、動物細胞が目的物質生産能を有する場合、同細胞の培養により目的物質を製造することができる。すなわち、本発明の方法（具体的には、動物細胞の培養方法）の一態様は、有効成分の存在下で動物細胞を培養する工程を含む、産物の製造方法であってもよい。また、動物細胞の培養工程は、具体的には、有効成分の存在下で動物細胞を培養して産物を製造する工程であってもよい。培養肉の製造方法においては、培養された動物細胞が培養肉を形成してよい。目的物質の製造方法においては、培養された動物細胞が目的物質を生産してよい。言い換えれば、動物細胞が培養により目的物質を生産できる場合、同細胞の培養により目的物質を製造することができる。目的物質としては、タンパク質やウイルスが挙げられる。目的物質がウイルスを含む場合において、目的物質の製造方法は、さらに、動物細胞にウイルスを産生させる工程を含んでもよい。動物細胞の培養により産物を製造する場合、有効成分の利用により、産物の生産が向上してよい。例えば、有効成分の利用による動物細胞の生育の向上および／または分化の促進により、産物の生産が向上してよい。すなわち、本発明の方法（具体的には、動物細胞の培養方法）の一態様は、産物の生産を向上させる方法であってよい。

[0053] 「動物細胞」とは、動物の細胞を意味する。動物細胞は、特に制限されない。動物細胞は、例えば、動物細胞の培養の目的等の諸条件に応じて適宜選択できる。例えば、動物細胞の培養により培養肉を製造する場合、動物細胞は、培養により培養肉を形成できる限り、特に制限されない。「動物」とは、動物界 (Animalia) に分類される生物を意味してよい。動物としては、脊椎動物や水生生物が挙げられる。脊椎動物としては、哺乳類、鳥類、爬虫類、両生類、魚類が挙げられる。脊椎動物としては、特に、哺乳類、鳥類、魚類が挙げられる。脊椎動物としては、特に、哺乳類が挙げられる。哺乳類と

しては、ヒト、サル、チンパンジー等の霊長類；ハムスター、マウス、ラット、モルモット等のげっ歯類；ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギ、ウマ、シカ、スイギュウ、トナカイ、ロバ、ラクダ、イヌ、ネコ等のその他の陸生哺乳類；クジラ、イルカ、トナカイ、トド等の水生哺乳類が挙げられる。鳥類としては、鶏、七面鳥、カモ、ガチョウ、ホロホロ鳥、ウズラ、ダチョウが挙げられる。魚類としては、ウナギ、マグロ、クエ、タイ、サケ、トラフグが挙げられる。水生生物としては、水生哺乳類や魚類に加えて、エビやカニ等の甲殻類、ホタテやカキ等の貝類、イカやタコ等の他の水生生物が挙げられる。水生生物としては、特に、魚類や甲殻類が挙げられる。培養肉の製造に好適な動物としては、食肉用の動物が挙げられる。食肉用の動物としては、上記例示した動物の内、その肉を食用にできるものが挙げられる。食肉用の動物（特に哺乳類）としては、特に、ウシ、ブタ、ヒツジ、ヤギ、ウサギが挙げられる。食肉用の動物（特に哺乳類）としては、さらに特には、ウシやブタが挙げられる。食肉用の動物（特に哺乳類）としては、さらに特には、ウシが挙げられる。食肉用の動物（特に鳥類）としては、特に、鶏、七面鳥、カモ、ガチョウ、ホロホロ鳥、ウズラ、ダチョウが挙げられる。食肉用の動物（特に鳥類）としては、さらに特には、鶏が挙げられる。食肉用の動物（特に水生生物）としては、特に、上記例示した魚類や甲殻類が挙げられる。食肉用の動物（特に水生生物）としては、さらに特には、ウナギ、マグロ、エビが挙げられる。動物細胞が由来する組織または細胞は、特に制限されない。動物細胞が由来する組織または細胞としては、卵巣、腎臓、副腎、舌上皮、嗅上皮、松果体、甲状腺、メラノサイト、皮膚、脾臓、肝臓、肺、膵臓、子宮、胃、結腸、小腸、大腸、膀胱、前立腺、精巣、胸腺、筋肉、結合組織、骨、軟骨、血管組織、血液（臍帯血を含む）、骨髓、心臓、眼、脳、神経組織が挙げられる。動物細胞は、分化していてもよく、していなくてもよい。動物細胞として、具体的には、生殖細胞、体細胞、幹細胞、前駆細胞が挙げられる。生殖細胞としては、精子や卵子が挙げられる。体細胞としては、筋芽細胞、線維芽細胞、骨髄細胞、Bリンパ球、Tリンパ球、好

中球、赤血球、血小板、マクロファージ、単球、骨細胞、周皮細胞、樹状細胞、脂肪細胞、間葉細胞、上皮細胞、表皮細胞（たとえば、角化細胞（ケラチノサイト）、角質細胞等）、内皮細胞、血管内皮細胞、肝実質細胞、軟骨細胞、卵丘細胞、神経細胞、グリア細胞、オリゴデンドロサイト（希突起膠細胞）、マイクログリア（小膠細胞）、アストロサイト（星状膠細胞）、心臓細胞、食道細胞、筋肉細胞（たとえば、平滑筋細胞、骨格筋細胞）、膵臓ベータ細胞、メラニン細胞、単核細胞が挙げられる。幹細胞としては、造血幹細胞、衛星細胞（筋幹細胞）、神経幹細胞、間葉系幹細胞、乳腺幹細胞、嗅粘膜幹細胞、神経冠幹細胞、肝幹細胞、膵幹細胞、生殖幹細胞、腸管幹細胞、毛包幹細胞等の成体幹細胞；胚性幹細胞（ES細胞）、胚性腫瘍細胞、胚性生殖幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS細胞）等の多能性幹細胞；癌細胞が挙げられる。前駆細胞としては、衛星細胞、膵前駆細胞、血管前駆細胞、血管内皮前駆細胞、造血前駆細胞（臍帯血由来のCD34陽性細胞等）が挙げられる。培養肉の製造に好適な動物細胞としては、衛星細胞（筋幹細胞）、間葉系幹細胞、胚性幹細胞（ES細胞）、人工多能性幹細胞（iPS細胞）等の幹細胞や、筋芽細胞が挙げられる。培養肉の製造に好適な動物細胞としては、特に、衛星細胞（筋幹細胞）や筋芽細胞が挙げられる。筋芽細胞は、幹細胞に分類されてもよい。

[0054] 「動物細胞が或る条件を満たす細胞である」とは、培養の少なくとも一部の期間において動物細胞が当該条件を満たしていれば足り、培養の全期間において動物細胞が当該条件を満たすことを要しない。すなわち、「動物細胞が或る条件を満たす細胞である」とは、培養開始時に動物細胞が当該条件を満たす（すなわち、当該条件を満たす動物細胞を用いて培養を開始する）場合に限られず、培養開始後に動物細胞が当該条件を満たす場合も包含してよい。例えば、「動物細胞が筋芽細胞である」とは、筋芽細胞である動物細胞を用いて培養を開始する場合に限られず、培養開始後に動物細胞が筋芽細胞に分化する場合も包含してよい。

[0055] 動物細胞の培養は、有効成分の存在下で実施される。「動物細胞の培養が

有効成分の存在下で実施される」とは、例えば、有効成分を含有する培地で動物細胞を培養することを意味してよい。「動物細胞の培養が有効成分の存在下で実施される」とは、例えば、動物細胞の培養時に有効成分が培養系に供給されることを意味してもよい。

[0056] 有効成分は、例えば、本発明の組成物の形態で動物細胞の培養に用いてもよい。本発明の組成物は、例えば、培地として動物細胞の培養に用いてよい。すなわち、例えば、本発明の組成物が培地である場合、本発明の組成物（すなわち、培地）で動物細胞を培養してよい。すなわち、「有効成分を含有する培地で動物細胞を培養する」ことには、培地である本発明の組成物で動物細胞を培養することも包含されてよい。また、本発明の組成物は、例えば、培地添加物として動物細胞の培養に用いてよい。すなわち、例えば、本発明の組成物が培地添加物である場合、本発明の組成物（すなわち、培地添加物）を培地に添加し、本発明の組成物を添加した培地で動物細胞を培養してよい。すなわち、「有効成分を含有する培地で動物細胞を培養する」ことには、培地添加物である本発明の組成物を添加した培地で動物細胞を培養することも包含されてよい。また、例えば、動物細胞の培養時に本発明の組成物またはそれを添加した培地を培養系に供給してよい。すなわち、「動物細胞の培養時に有効成分が培養系に供給される」ことには、動物細胞の培養時に本発明の組成物またはそれを添加した培地が培養系に供給されることも包含されてよい。

[0057] 培地組成や培養条件は、動物細胞の培養が有効成分の存在下で実施されること以外は、動物細胞の培養の目的を達成できる限り、特に制限されない。培地組成や培養条件は、例えば、動物細胞の種類や動物細胞の培養の目的等の諸条件に応じて適宜設定することができる。例えば、動物細胞の培養により培養肉を製造する場合、培地組成や培養条件は、動物細胞の培養により培養肉を形成できる限り、特に制限されない。動物細胞の培養は、有効成分の存在下で実施されること以外は、例えば、動物細胞の培養に利用される通常の培地および通常の条件をそのまま、あるいは適宜改変して用いて実施する

ことができる。動物細胞の培養により培養肉を製造する場合、動物細胞の培養は、有効成分の存在下で実施されること以外は、例えば、動物細胞の分化による筋組織の形成（例えば、培養肉の製造）に利用される通常の培地および通常の条件をそのまま、あるいは適宜改変して用いて実施することができる。

[0058] 培養は、例えば、液体培地を用いて実施することができる。培養は、回分培養 (batch culture)、流加培養 (Fed-batch culture)、連続培養 (continuous culture)、またはそれらの組み合わせにより実施することができる。連続培養としては、灌流培養 (perfusion culture) やケモスタット培養 (chemostat culture) が挙げられる。なお、培養開始時の培地を、「初発培地」または「基礎培地」ともいう。また、流加培養において培養系（例えば、初発培地）に供給される培地を、「流加培地 (feed medium)」ともいう。また、連続培養（これは灌流培養に限られない）において培養系（例えば、初発培地）に供給される培地を、「灌流培地 (perfusion medium)」ともいう。また、流加培養または連続培養において培養系に流加培地または灌流培地を供給することを、単に、「培地供給」ともいう。培地供給は、培養の全期間を通じて実施されてもよく、培養の一部の期間においてのみ実施されてもよい。また、培地供給は、連続的に実施されてもよく、間欠的に実施されてもよい。培養（特に、灌流培養等の連続培養）の際には、培養液の引き抜きが実施されてよい。培養液の引き抜きは、培養の全期間を通じて実施されてもよく、培養の一部の期間においてのみ実施されてもよい。培養液の引き抜きは、連続的に実施されてもよく、間欠的に実施されてもよい。培養液の引き抜きと培地供給は、同時に実施されてもよく、そうでなくてもよい。培養容器は、例えば、フィブロネクチン等の細胞接着分子でコーティングされていてもよい。培養は、例えば、足場材を用いて3次元的に実施してもよい。動物細胞の培養により培養肉を製造する場合、培養は、例えば、形成すべき培養肉の形状に合わせた足場材を用いて3次元的に実施してもよい。

[0059] 培養に用いる培地は、例えば、基礎培地、流加培地、および灌流培地につ

いて、それぞれ独立に選択することができる。

[0060] 培養に用いる培地は、市販の培地であってもよく、適宜調製した培地であってもよい。

[0061] 培養に用いる培地としては、動物細胞の培養に必須の成分（例えば、炭素源、窒素源、無機塩、等）を含有する培地が挙げられる。

[0062] 培養に用いる培地として、具体的には、ダルベッコ改変イーグル培地 (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (DMEM)、ハムF12培地 (Ham's Nutrient Mixture F12)、DMEM/F12培地、マッコイ5A培地 (McCoy's 5A medium)、最小必須培地 (Minimum Essential Medium) (MEM)、イーグル最小必須培地 (Eagle's Minimum Essential Medium) (EMEM)、 α 改変型イーグル最小必須培地 (alpha Modified Eagle's Minimum Essential Medium) (α MEM)、ロズウェルパーク記念研究所 (Roswell Park Memorial Institute) (RPMI) 1640培地、イスコフ改変ダルベッコ培地 (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) (IMDM)、MCDB131培地、ウィリアム培地E (William's Medium E)、フィッシャー培地 (Fischer's Medium) が挙げられる。

[0063] また、培養に用いる培地（例えば、特に幹細胞（特に多能性幹細胞）の培養に用いる培地であってよい）として、具体的には、STEMPRO（登録商標）hESC SFM培地 (Life Technologies社)、mTeSR1培地 (STEMCELL Technologies社)、TeSR2培地 (STEMCELL Technologies社)、TeSR-E8培地 (STEMCELL Technologies社)、Essential 8培地 (Life Technologies社)、HEScGRO（商標）Serum-Free Medium for hES cells (Millipore社)、PluriSTEM（商標）Human ES/iPS Medium (EMD Millipore社)、NutriStem（登録商標）hESC XF培地 (Biological Industries Israel Beit-Haemek社)、NutriStem（商標）XF/FF Culture Medium (Stemgent社)、AF NutriStem（登録商標）hESC XF培地 (Biological Industries Israel Beit-Haemek社)、S-medium (DSファーマバイオメディカル株式会社)、StemFit（登録商標）AK03N培地 (味の素株式会社)、hESF9培地、hESF-FX培地、CDM培地、DEF-CS 500 Xeno-Free 3D Spheroid Culture Medium (Cellartis社)、StemFlex培地 (Thermo Fisher Scien

tific社)等が挙げられる。

[0064] また、その他市販の培地としては、CELLiST Basal Media BASAL3、BASAL10 (味の素株式会社)、Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific)、RPMI 1640 (Thermo Fisher Scientific)、CD293 (Thermo Fisher Scientific)、CHO-S-SFMII (Thermo Fisher Scientific)、CHO-SF (Sigma-Aldrich)、EX-CELL C D CHO (Sigma-Aldrich)、EX-CELLTM302 (Sigma-Aldrich)、IS CHO-CD (Irvine Scientific)、IS CHO-CDXP (Irvine Scientific)等の動物細胞培養用の培地が挙げられる。

[0065] 上記例示したような培地は、例えば、有効成分を添加して培養に用いてよい。

[0066] また、培養に用いる培地は、例えば、本発明の組成物(具体的には、培地である本発明の組成物)であってよい。すなわち、本発明の組成物が培地である場合、本発明の組成物を、そのまま、あるいは適宜、所望の組成の液体培地として調製し、培養に用いてよい。例えば、本発明の組成物を水や水性緩衝液等の水性媒体で希釈して液体培地として調製し、培養に用いてよい。

[0067] また、培養に用いる培地は、例えば、本発明の組成物(具体的には、培地添加物である本発明の組成物)が添加された培地であってもよい。本発明の組成物が添加される培地は、市販の培地であってもよく、適宜調製した培地であってもよい。

[0068] 培地は、各種培地成分を含有してよい。培地成分としては、炭素源、アミノ酸源、ペプチド、タンパク質、ビタミン、脂肪酸、脂質、有機酸、核酸、アミン、抗酸化剤、無機成分、pH緩衝剤、成長因子、サイトカイン、ホルモン、細胞接着因子、細胞外マトリックス成分、血清、抗生物質、遺伝子発現誘導剤が挙げられる。このような培地成分は、いずれも、例えば、動物細胞の生存または増殖に必須または有効であり得る。このような培地成分は、いずれも、例えば、上記例示したような培地に予め含有されていてもよく、上記例示したような培地に添加してもよい。

[0069] 炭素源としては、グルコース、フルクトース、スクロース、マルトース等

の糖類が挙げられる。

[0070] アミノ酸源としては、アミノ酸が挙げられる。また、ペプチドおよびタンパク質は、いずれも、アミノ酸源の一例であり得る。アミノ酸としては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、システイン、メチオニン、フェニルアラニン、チロシン、トリプトファン、ヒスチジン、リジン、アルギニン、セリン、トレオニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、アスパラギン、グルタミン、プロリン、オルニチンが挙げられる。アミノ酸は、例えば、L体であってよい。

[0071] ペプチドとしては、ジペプチドやトリペプチドが挙げられる。ペプチドとして、具体的には、グリシルグリシルグリシンや大豆ペプチドが挙げられる。アミノ酸についての記載は、ペプチドを構成するアミノ酸にも準用できる。

[0072] タンパク質としては、アルブミンやトランスフェリンが挙げられる。

[0073] ビタミンとしては、ビタミンA、ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB3、ビタミンB5、ビタミンB6、ビタミンB7、ビタミンB9、ビタミンB12、ビタミンC、ビタミンD、ビタミンE、およびビタミンKやそれらの前駆体が挙げられる。

[0074] 脂肪酸としては、オレイン酸、アラキドン酸、リノール酸が挙げられる。

[0075] 脂質としては、コレステロールが挙げられる。

[0076] 有機酸としては、ピルビン酸（ピルビン酸ナトリウム等）が挙げられる。

[0077] 核酸としては、ヒポキサンチンやチミジンが挙げられる。

[0078] アミンとしては、プトレシン等のポリアミンが挙げられる。

[0079] 抗酸化剤としては、リポ酸が挙げられる。

[0080] 無機成分としては、ナトリウム、カリウム、カルシウム、マグネシウム、リン、各種微量元素（例えば、Co、Cu、F、Fe、Mn、Mo、Ni、Se、Si、Ni、Bi、V、およびZn）が挙げられる。無機成分として、具体的には、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、硫酸マグネシウム、リン酸二水素ナトリウム等の無機塩が挙げられる。無機成分とし

ては、特に、鉄が挙げられる。鉄は、例えば、二価鉄であってもよく、三価鉄であってもよく、それらの混合物であってもよい。鉄としては、鉄塩が挙げられる。鉄塩としては、硫酸鉄（例えば、硫酸鉄(II)）、硝酸鉄（例えば、硝酸鉄(III)や硝酸鉄(II)）、塩化鉄（例えば、塩化鉄(III)や塩化鉄(II)）、硫化鉄（例えば、硫化鉄(III)や硫化鉄(II)）、クエン酸鉄アンモニウム（例えば、クエン酸鉄アンモニウム(III)）が挙げられる。鉄（例えば、鉄塩）は、例えば、水和物であってもよい。鉄としては、1種の成分を用いてもよく、2種またはそれ以上の成分を組み合わせ用いてもよい。

[0081] pH緩衝剤としては、炭酸水素ナトリウム、リン酸塩、N, N-ビス（2-ヒドロキシエチル）-2-アミノエタンスルホン酸（N,N-bis(2-hydroxyethyl)-2-aminoethanesulfonic acid (BES)）、4-（2-ヒドロキシエチル）-1-ピペラジニエタンスルホン酸（4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES)）、N-〔トリス（ヒドロキシメチル）メチル〕グリシン（N-[tris(hydroxymethyl)methyl]glycine (Tricine)）が挙げられる。

[0082] 成長因子としては、線維芽細胞増殖因子（fibroblast growth factor ; FGF）、肝細胞増殖因子（hepatocyte growth factor ; HGF）、上皮成長因子（epidermal growth factor ; EGF）、トランスフォーミング増殖因子（TGF）- α 、トランスフォーミング増殖因子（TGF）- β 、血管内皮増殖因子（VEGF）、アクチビンA、インスリン様成長因子-1（Insulin-like growth factor-1 ; IGF-1）が挙げられる。FGFとしては、塩基性線維芽細胞増殖因子（basic fibroblast growth factor ; bFGF）が挙げられる。成長因子としては、特に、bFGFが挙げられる。すなわち、培地成分としては、少なくとも、bFGFが用いられたい。すなわち、培地は、少なくとも、bFGFを含有してよい。bFGFとしては、ウシ塩基性線維芽細胞増殖因子（bovine basic fibroblast growth factor ; bbFGF）が挙げられる。「ウシ塩基性線維芽細胞増殖因子（bovine basic fibroblast growth factor ; bbFGF）」とは、ウシ由来（bovine-derived）のbFGFを意味してよい。bbFGFについての「ウシ（bovine）」とは、ウシ

(Bos) 属生物を意味してよい。ウシ (Bos) 属生物としては、*Bos taurus*が挙げられる。bbFGFは、ウシ (Bos) 属生物に見出されるbFGFに限られず、それらの改変体であってもよい。

- [0083] サイトカインとしては、インターロイキンが挙げられる。
- [0084] ホルモンとしては、デキサメサゾン、ヒドロコルチゾン、エストラジオール、プロゲステロン、グルカゴン、インスリンが挙げられる。
- [0085] 細胞接着因子または細胞外マトリックス成分としては、Type I コラーゲン、Type II コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニン、ポリーL-リシン、ポリーD-リシンが挙げられる。
- [0086] 抗生物質としては、アンホテリシンB、カナマイシン、ゲンタマイシン、ストレプトマイシン、ペニシリンが挙げられる。
- [0087] 一態様において、培地は、血清を実質的に含有していなくてよい。培地は、例えば、培養の全期間において、血清を実質的に含有していなくてよい。「培地が血清を実質的に含有しない」とは、培地における血清の含有量が1% (w/w) 以下、0.1% (w/w) 以下、0.01% (w/w) 以下、または0.001% (w/w) 以下であることを意味してよく、培地における血清の含有量が0 (ゼロ) である (すなわち、培地が血清を含有しない) 場合も包含してよい。
- [0088] 一態様において、培地は、動物由来アルブミンを実質的に含有していなくてよい。アルブミンが由来する動物としては、動物細胞について例示した動物が挙げられる。培地は、例えば、培養の全期間において、動物由来アルブミンを実質的に含有していなくてよい。「培地が動物由来アルブミンを実質的に含有しない」とは、培地における動物由来アルブミンの含有量が1% (w/w) 以下、0.1% (w/w) 以下、0.01% (w/w) 以下、または0.001% (w/w) 以下であることを意味してよく、培地における動物由来アルブミンの含有量が0 (ゼロ) である (すなわち、培地が動物由来アルブミンを含有しない) 場合も包含してよい。
- [0089] 有効成分等の各種成分は、いずれも、初発培地、流加培地、灌流培地、ま

たはそれらの組み合わせに含有されていてよい。すなわち、培養の過程において、有効成分等の各種成分を単独で、あるいは任意の組み合わせで、培地に供給してもよい。これらの成分は、いずれも、1回または複数回供給されてもよく、連続的に供給されてもよい。初発培地、流加培地、および灌流培地の組成（例えば、含有する成分の種類および／または濃度）は、同一であってもよく、そうでなくてもよい。すなわち、初発培地に含有される成分の種類は、流加培地または灌流培地に含有される成分の種類と、同一であってもよく、そうでなくてもよい。また、初発培地に含有される各成分の濃度は、流加培地または灌流培地に含有される各成分の濃度と、同一であってもよく、そうでなくてもよい。例えば、流加培地が灌流培養に用いられる場合に、初発培地と流加培地の組成は同一であってもよい。また、組成（例えば、含有する成分の種類および／または濃度）の異なる2種またはそれ以上の流加培地または灌流培地を用いてもよい。例えば、複数回の流加培地または灌流培地の供給が間欠的に実施される場合、流加培地または灌流培地の組成は、各回で同一であってもよく、そうでなくてもよい。また、有効成分等の各種成分は、いずれも、粉末等の、流加培地または灌流培地に含有されない形態で、培地に供給してもよい。

[0090] 培養開始時の動物細胞の播種量は、例えば、生細胞数に換算して、 1×10^2 cells/mL以上、 1×10^3 cells/mL以上、 1×10^4 cells/mL以上、 1×10^5 cells/mL以上、 1×10^6 cells/mL以上、または 1×10^7 cells/mL以上であってもよく、 1×10^8 cells/mL以下、 1×10^7 cells/mL以下、 1×10^6 cells/mL以下、 1×10^5 cells/mL以下、 1×10^4 cells/mL以下、または 1×10^3 cells/mL以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせであってもよい。培養開始時の動物細胞の播種量は、具体的には、例えば、生細胞数に換算して、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^3$ cells/mL、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^4$ cells/mL、 $1 \times 10^4 \sim 1 \times 10^5$ cells/mL、 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ cells/mL、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ cells/mL、または $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ cells/mLであってもよい。培養開始時の動物細胞の播種量は、具体的には、例えば、生細胞数に換算して、 $1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$ cells/mL、 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^7$ cells/mL、または1

$\times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ cells/mLであってもよい。生細胞数は、例えば、生死細胞オートアナライザーVi-CELL™ XR（ベックマン・コールター社）を用いて測定することができる。

[0091] 培養は、例えば、5～15%CO₂等のCO₂含有雰囲気下で実施してよい。培地のpHは、例えば、中性付近であってよい。「中性付近」とは、例えば、pH6～8、pH6.5～7.5、またはpH6.8～7.2を意味してよい。培養中、必要に応じて培地のpHを調整することができる。培地のpHは、アンモニアガス、アンモニア水、炭酸ナトリウム、重炭酸ナトリウム、炭酸カリウム、重炭酸カリウム、炭酸マグネシウム、水酸化ナトリウム、水酸化カリウム、水酸化カルシウム、水酸化マグネシウム等の各種アルカリ性または酸性物質を用いて調整することができる。培養温度は、例えば、30～38℃であってよい。培養期間は、例えば、0.5日以上、1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、12日以上、15日以上、または20日以上であってもよく、60日以下、50日以下、40日以下、30日以下、25日以下、20日以下、15日以下、12日以下、10日以下、9日以下、8日以下、または7日以下であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせであってもよい。培養期間は、具体的には、例えば、1～60日、3～25日、または5～20日であってもよい。培養は、例えば、産物が所望の程度に生産されるまで継続してよい。

[0092] 本発明の方法における各成分（すなわち、有効成分および任意で追加成分）の使用量（例えば、培地における濃度）や使用量比（例えば、培地における濃度比）は、本発明の目的を達成できる（例えば生育向上効果または分化促進効果が得られる）限り、特に制限されない。すなわち、例えば、本発明の方法における有効成分の使用量は、有効量（例えば生育向上効果または分化促進効果が得られる量）であってよい。具体的には、例えば、培地における有効成分の濃度は、有効濃度（例えば生育向上効果または分化促進効果が得られる濃度）であってよい。本発明の方法における各成分の使用量や使用

量比は、動物細胞の種類や本発明の組成物の使用態様等の諸条件に応じて適宜設定できる。

[0093] 培地における有効成分の濃度は、例えば、1 nM以上、3 nM以上、5 nM以上、10 nM以上、30 nM以上、50 nM以上、100 nM以上、300 nM以上、400 nM以上、500 nM以上、600 nM以上、700 nM以上、1 μ M以上、1.5 μ M以上、2 μ M以上、2.5 μ M以上、3 μ M以上、5 μ M以上、7 μ M以上、10 μ M以上、15 μ M以上、20 μ M以上、25 μ M以上、30 μ M以上、40 μ M以上、50 μ M以上、または70 μ M以上であつてもよく、100 μ M以下、70 μ M以下、50 μ M以下、40 μ M以下、30 μ M以下、25 μ M以下、20 μ M以下、15 μ M以下、10 μ M以下、7 μ M以下、5 μ M以下、3 μ M以下、2.5 μ M以下、2 μ M以下、1.5 μ M以下、1 μ M以下、700 nM以下、600 nM以下、500 nM以下、400 nM以下、300 nM以下、100 nM以下、50 nM以下、30 nM以下、10 nM以下、5 nM以下、または3 nM以下であつてもよく、それらの矛盾しない組み合わせであつてもよい。培地における有効成分の濃度は、具体的には、例えば、1 nM～3 nM、3 nM～5 nM、5 nM～10 nM、10 nM～30 nM、30 nM～50 nM、50 nM～100 nM、100 nM～300 nM、300 nM～400 nM、400 nM～500 nM、500 nM～600 nM、600 nM～700 nM、700 nM～1 μ M、1 μ M～1.5 μ M、1.5 μ M～2 μ M、2 μ M～2.5 μ M、2.5 μ M～3 μ M、3 μ M～5 μ M、5 μ M～7 μ M、7 μ M～10 μ M、10 μ M～15 μ M、15 μ M～20 μ M、20 μ M～25 μ M、25 μ M～30 μ M、30 μ M～40 μ M、40 μ M～50 μ M、50 μ M～70 μ M、または70 μ M～100 μ Mであつてもよい。培地における有効成分の濃度は、具体的には、例えば、1 nM～100 μ M、5 nM～30 μ M、10 nM～10 μ M、または10 nM～1 μ Mであつてもよい。一態様において、培地における有効成分の濃度は、特に、2.5 μ M以下、2 μ M以下、1.5 μ M以下、1 μ M以下、700 nM以下、600 nM以下、500 nM以下、または400 nM以下であつてもよい。例えば、有効成分として少なくともヒノキチオールが選択される場合に、培地におけるヒノキチオールの濃度またはヒノキチオールを含む有効成分の総濃度は、2.5 μ M以下、2 μ M以下、1.5 μ M以下、1 μ M以下、700 nM以下、600 nM以下、500 nM以下、または400 nM以下であつても

よい。一態様において、培地における有効成分の濃度は、具体的には、例えば、1 nM～2.5 μ M、3 nM～2 μ M、5 nM～1.5 μ M、または10 nM～1 μ Mであってもよい。例えば、有効成分として少なくともヒノキチオールが選択される場合に、培地におけるヒノキチオールの濃度またはヒノキチオールを含む有効成分の総濃度は、1 nM～2.5 μ M、3 nM～2 μ M、5 nM～1.5 μ M、または10 nM～1 μ Mであってもよい。培地が2種またはそれ以上の有効成分を含有する場合、培地におけるそれら2種またはそれ以上の有効成分の濃度を、それぞれ独立に、あるいは合計で、上記例示した培地における有効成分の濃度の範囲に設定してよい。なお、培地が2種またはそれ以上の有効成分を含有する場合、「培地における有効成分の濃度」とは、特記しない限り、培地におけるそれら2種またはそれ以上の有効成分の総濃度を意味するものとする。

[0094] 動物細胞の培養は、鉄の存在下で実施されてよい。「動物細胞の培養が或る成分（例えば、鉄）の存在下で実施される」とは、例えば、当該成分を含有する培地で動物細胞を培養することを意味してよい。「動物細胞の培養が或る成分（例えば、鉄）の存在下で実施される」とは、例えば、動物細胞の培養時に当該成分が培養系に供給されることを意味してもよい。

[0095] 培地が鉄を含有する場合、培地における鉄の濃度は、例えば、200 nM以上、500 nM以上、1 μ M以上、1.5 μ M以上、2 μ M以上、3 μ M以上、5 μ M以上、7 μ M以上、10 μ M以上、15 μ M以上、20 μ M以上、25 μ M以上、30 μ M以上、40 μ M以上、50 μ M以上、70 μ M以上、100 μ M以上、150 μ M以上、または200 μ M以上であってもよく、500 μ M以上、200 μ M以上、150 μ M以上、100 μ M以上、70 μ M以上、50 μ M以上、40 μ M以上、30 μ M以上、25 μ M以上、20 μ M以上、15 μ M以上、10 μ M以上、7 μ M以上、5 μ M以上、3 μ M以上、2 μ M以上、1.5 μ M以上、1 μ M以上、または500 nM以上であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせであってもよい。培地における鉄の濃度は、具体的には、例えば、200 nM～500 nM、500 nM～1 μ M、1 μ M～1.5 μ M、1.5 μ M～2 μ M、2 μ M～3 μ M、3 μ M～5 μ M、5 μ M～7 μ M、7 μ M～10

μM 、 $10\ \mu\text{M}\sim 15\ \mu\text{M}$ 、 $15\ \mu\text{M}\sim 20\ \mu\text{M}$ 、 $20\ \mu\text{M}\sim 25\ \mu\text{M}$ 、 $25\ \mu\text{M}\sim 30\ \mu\text{M}$ 、 $30\ \mu\text{M}\sim 40\ \mu\text{M}$ 、 $40\ \mu\text{M}\sim 50\ \mu\text{M}$ 、 $50\ \mu\text{M}\sim 70\ \mu\text{M}$ 、 $70\ \mu\text{M}\sim 100\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}\sim 150\ \mu\text{M}$ 、 $150\ \mu\text{M}\sim 200\ \mu\text{M}$ 、または $200\ \mu\text{M}\sim 500\ \mu\text{M}$ であってもよい。培地における鉄の濃度は、具体的には、例えば、 $200\ \text{nM}\sim 500\ \mu\text{M}$ 、 $500\ \text{nM}\sim 100\ \mu\text{M}$ 、 $1\ \mu\text{M}\sim 50\ \mu\text{M}$ 、または $1.5\ \mu\text{M}\sim 30\ \mu\text{M}$ であってもよい。培地が2種またはそれ以上の形態の鉄を含有する場合、培地におけるそれら2種またはそれ以上の形態の鉄の濃度を、それぞれ独立に、あるいは合計で、上記例示した培地における鉄の濃度の範囲に設定してよい。なお、培地が2種またはそれ以上の形態の鉄を含有する場合、「培地における鉄の濃度」とは、特記しない限り、培地におけるそれら2種またはそれ以上の形態の鉄の総濃度を意味するものとする。なお、鉄のモル濃度は、化合物を構成する鉄のモル数に基づいて算出する。例えば、 $1\ \mu\text{M}$ の硫化鉄(III) (Fe_2S_3) の場合、鉄のモル濃度は $2\ \mu\text{M}$ である。

[0096] 有効成分等の各種成分は、いずれも、培養の全期間において培地に含有されていてもよく、培養の一部の期間にのみ培地に含有されていてもよい。すなわち、「培養が或る成分を含有する培地で実施される」とは、当該成分が培養の少なくとも一部の期間において培地に含有されていれば足り、当該成分が培養の全期間において培地に含有されていることを要しない。例えば、有効成分と鉄は、培養の少なくとも一部の期間において培地中に共存していてもよい。有効成分等の各種成分は、いずれも、例えば、培養開始時に培地に含有されていてもよく、培養開始後に培地に供給されてもよい。また、有効成分等の各種成分は、いずれも、例えば、培養開始時に培地に含有され、且つ、培養開始後（例えば、有効成分の消費後）に培地にさらに供給されてもよい。

[0097] 有効成分等の各種成分は、いずれも、例えば、培養の全期間において上記例示した濃度で培地に含有されていてもよく、培養の一部の期間にのみ上記例示した濃度で培地に含有されていてもよい。すなわち、「培養が或る成分を或る濃度で含有する培地で実施される」、「培養時の培地に或る成分が或

る濃度で含有される」、または「培養時の培地における或る成分の濃度が或る濃度である」とは、培地中の当該成分の濃度が培養の少なくとも一部の期間において当該濃度の範囲内にあれば足り、培地中の当該成分の濃度が培養の全期間において当該濃度の範囲内にあることを要しない。有効成分等の各種成分は、いずれも、例えば、培養開始時に上記例示した濃度で培地に含有されていてもよく、培養開始後に上記例示した濃度となるように培地に供給されてもよい。また、有効成分等の各種成分は、いずれも、例えば、培養開始時に上記例示した濃度で培地に含有され、且つ、培養開始後（例えば、当該成分の消費後）に上記例示した濃度となるように培地にさらに供給されてもよい。

[0098] 「培養の一部の期間」の長さは、本発明の目的を達成できる（例えば生育向上効果または分化促進効果が得られる）限り、特に制限されない。「培養の一部の期間」の長さは、動物細胞の種類や培養期間の長さ等の諸条件に応じて適宜設定できる。「一部の期間」は、例えば、培養の全期間の10%以上、20%以上、30%以上、40%以上、50%以上、60%以上、70%以上、80%以上、90%以上、95%以上、97%以上、または99%以上の期間であってよい。また、「一部の期間」は、例えば、0.5日以上、1日以上、2日以上、3日以上、4日以上、5日以上、6日以上、7日以上、8日以上、9日以上、10日以上、12日以上、または15日以上期間であってよい。

[0099] また、培地中の有効成分等の各種成分の濃度は、いずれも、例えば、培養中の特定の期間を通じての平均値として、上記例示した濃度に設定されてもよい。すなわち、「培養が或る成分を或る濃度で含有する培地で実施される」、「培養時の培地に或る成分が或る濃度で含有される」、または「培養時の培地における或る成分の濃度が或る濃度である」とは、培養中の特定の期間を通じての培地中の当該成分の濃度の平均値が当該濃度の範囲内にあることを意味してもよい。「培養中の特定の期間を通じての培地中のある成分の濃度の平均値」とは、培養中の特定の期間における当該成分の濃度の変動を

把握できるものであれば特に制限されないが、例えば、培養中の特定の期間を通じて60分ごと、30分ごと、20分ごと、または10分ごとに測定された培地中の当該成分の濃度の平均値を意味してよい。「培養中の特定の期間」としては、培養の全期間や培養の一部の期間が挙げられる。「培養の一部の期間」については、上述した通りである。

[0100] 有効成分等の各種成分は、いずれも、培養の全期間を通じて培地へ供給されてもよく、培養の一部の期間においてのみ培地へ供給されてもよい。「培養の一部の期間」については、上述した通りである。有効成分等の各種成分は、いずれも、例えば、連続的に培地へ供給されてもよく、間欠的に培地へ供給されてもよい。有効成分等の各種成分は、いずれも、例えば、毎日培地へ供給されてもよく、数日おきに培地へ供給されてもよい。

[0101] 流加培地または灌流培地中の有効成分等の各種成分の濃度は、いずれも、例えば、上記例示した培地中の当該成分の濃度の範囲であってよい。また、流加培地または灌流培地中の有効成分等の各種成分の濃度は、例えば、上記例示した培地中の当該成分の濃度の1倍以上、1.1倍以上、1.3倍以上、1.5倍以上、2倍以上、3倍以上、5倍以上、7倍以上、10倍以上、15倍以上、または20倍以上の濃度であってもよく、100倍以下、70倍以下、50倍以下、30倍以下、20倍以下、15倍以下、10倍以下、7倍以下、5倍以下、3倍以下、2倍以下の濃度であってもよく、それらの矛盾しない組み合わせであってもよい。流加培地または灌流培地中の有効成分等の各種成分の濃度は、具体的には、例えば、上記例示した培地中の当該成分の濃度の1～2倍、1.1～2倍、1.3～2倍、1.5～2倍、2～3倍、3～5倍、5～7倍、7～10倍、10～15倍、15～20倍、20～30倍、20～50倍、20～70倍、または20～100倍であってもよい。流加培地または灌流培地中の有効成分等の各種成分の濃度は、具体的には、例えば、上記例示した培地中の当該成分の濃度の1～100倍、2～50倍、または5～20倍であってもよい。

[0102] 有効成分等の各種成分の濃度は、いずれも、例えば、化合物の検出または

同定に用いられる公知の方法により測定することができる。そのような方法としては、HPLC、UPLC、LC/MS、GC/MS、NMRが挙げられる。

[0103] 上記のようにして動物細胞を培養することができる。また、一態様において、上記のようにして動物細胞を培養することにより、産物（例えば、培養肉や目的物質）が得られてよい。目的物質が生産される場合、目的物質は、培養物中、例えば、培地中、細胞表層、細胞内、またはそれらの組み合わせ、に蓄積してよい。目的物質は、適宜、培養物から回収してよい。すなわち、目的物質の製造方法は、さらに、目的物質を回収する工程を含んでいてもよい。

[0104] <4>有効成分の使用

また、本発明は、上記例示した用途での有効成分の使用を開示する。すなわち、本発明は、例えば、動物細胞を培養するための有効成分の使用、動物細胞の生育を向上させるための有効成分の使用、動物細胞の分化を促進するための有効成分の使用、動物細胞培養用の組成物等の本発明の組成物の製造における有効成分の使用を開示する。

[0105] また、本発明は、上記例示した用途に用いるための有効成分を開示する。すなわち、本発明は、例えば、動物細胞の培養に用いるための有効成分、動物細胞の生育の向上に用いるための有効成分、動物細胞の分化の促進に用いるための有効成分、動物細胞培養用の組成物の製造に用いるための有効成分を開示する。

実施例

[0106] 以下、非限定的な実施例を参照して、本発明をさらに具体的に説明する。

[0107] 実施例1：無血清培地におけるウシ筋幹細胞を用いたヒノキチオール活性評価

（1-1）ウシ筋幹細胞の調製

食用のウシすね肉から筋肉組織を採取し、磁気活性化細胞分離システム（MACS）を用いてCD56陽性細胞を単離し、ウシ筋幹細胞とした。

[0108] （1-2）無血清培地におけるウシ筋幹細胞を用いたヒノキチオール活性

評価

(1-1) で得られたウシ筋幹細胞を、血清培地に懸濁した。血清培地として、Advanced DMEM (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 12491015) に、20% FBS (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 10270106)、10% horse serum (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 16050-130)、および1% GlutaMAX™ Supplement (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 35050061) を添加したものを用いた。細胞懸濁液を1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectin (Corning社, Cat #F2006) でコーティングした12 well plate (BD FALCON社, Cat #353046) に、25000 cells/0.2 mLの細胞密度となるように播種し、隔日ごとに培地交換を行った。培養開始4日目に、細胞をヒノキチオール含有無血清培地、ヒノキチオールおよび鉄含有無血清培地、鉄含有無血清培地、トランスフェリンおよび鉄含有無血清培地、トランスフェリン含有無血清培地、またはヒノキチオールおよびトランスフェリン非含有無血清培地に継代し、隔日ごとに培地交換を行った。全ての培地のベースとして、E8培地 (DMEM/F12、64 mg/LのL-ascorbic acid 2-phosphate magnesium、14 $\mu\text{g}/\text{L}$ のsodium selenium、19.4 mg/Lのinsulin、543 mg/LのNaHCO₃、2 $\mu\text{g}/\text{L}$ のTGF β 1をpH 7.4で340 mOsmに合わせた培地。Chen, G. et al. Nature Methods 8, 424-429 (2011)) に5 ng/mL HGF (Peprotech社, Cat #294HGN005) および20 ng/mL EGF (Sigma社製 Cat #E9644) および10 ng/mL bFGF (Peprotech社, Cat #AF-450-62) を添加したものを用いた。E8培地は、鉄を約1.63 μM 含有する。表1に群番号と培地をまとめた。4日ごとにセルカウントおよび継代を実施し、4日目から12日目までの連続2継代の増殖速度を計算した。

- [0109] 結果を図1に示す。ヒノキチオールにウシ筋幹細胞の細胞増殖促進作用が認められた。すなわち、ヒノキチオール等の鉄イオノフォアが動物細胞の培養（特に増殖促進）に有効であることが明らかとなった。また、ヒノキチオール等の鉄イオノフォアによりトランスフェリンを代替できることが明らかとなった。また、鉄濃度の増強によりヒノキチオールのウシ筋幹細胞の細胞増殖促進作用がさらに向上する場合があった。

[0110] [表1]

表 1

群番号	添加物
1	ヒノキチオール 0.30 μ M
2	ヒノキチオール 0.03 μ M
3	ヒノキチオール 0.30 μ M + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 μ M
4	ヒノキチオール 0.03 μ M + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 μ M
5	ヒノキチオール 0.30 μ M + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.1 μ M
6	ヒノキチオール 0.03 μ M + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.1 μ M
7	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 μ M
8	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.1 μ M
9	トランスフェリン 0.14 μ M + $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.1 μ M
10	トランスフェリン 0.14 μ M
11	蒸留水

[0111] 実施例 2：無血清培地におけるブタ脂肪前駆細胞(PSPA)を用いたヒノキチオールの活性評価

(2-1) PSPAの入手

ブタ脂肪前駆細胞(PSPA)としては、Nakajima, et al. Biochem Biophys Res Commun. 2003 Sep 26;309(3):702-8に記載の、ブタ胎児皮下組織に由来する脂肪前駆細胞株を、理研RCBより入手し用いた。

[0112] (2-2) 無血清培地におけるブタ脂肪前駆細胞(PSPA)を用いたヒノキチオールの活性評価

(2-1) のブタ脂肪前駆細胞(PSPA)を、血清培地を用いて培養した。血清培地として、DMEM (Gibco社, Cat No. 10313-021)に、10% FBS (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 10270106)、1% GlutaMAX™ Supplement (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 35050061)、1%ペニシリンストレプトマイシン (ナカライテスク社, Cat No. 09367-34) を添加したものを用了。無血清培地としては、前記E8培地をベースとした培地を使用した。12 well plate に、10,000 cells/cm²となるようにPSPAを播種し、細胞を血清培地、トランスフェリン含有無血清培地、ヒノキチオールおよび鉄含有無血清培地 (トランスフェリン非含有) に継代し、隔日ごとに培地交換を行った。表2に群番号と培地および添加物をまとめた。培養開始4日後にセルカウントを実施し、細胞数の増加倍率を計算した。

[0113] 結果を図2に示す。ヒノキチオールにブタ脂肪前駆細胞の細胞増殖促進作用が認められた。

[0114] [表2]

表2

群番号	培地	添加物
1	血清培地	-
2	無血清培地	トランスフェリン 0.01 uM
3	無血清培地	ヒノキチオール 0.25 uM + FeSO ₄ · 7H ₂ O 1 uM
4	無血清培地	ヒノキチオール 0.5 uM + FeSO ₄ · 7H ₂ O 1 uM

[0115] 実施例3：浮遊培養系を用いたヒノキチオール添加によるHEK293細胞の増殖性確認

(3-1) HEK293細胞の入手

HEK293としては、HEK293細胞株から派生したクローン細胞株であるViral Production Cells 2.0 (Thermo Fisher Scientific社: A49784) を用了。なお、HEK293細胞株は、ヒト胎児の腎由来の細胞株として

広く知られている。

(3-2) 浮遊培養系におけるHEK293細胞を用いたヒノキチオール
の活性評価

125 mL三角フラスコ(VIOLAMO社、SEF125V)を用いて、30mL Viral Production Medium (Thermo Fisher Scientific社: A4817901)にGlutaMAX™ Supplement (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 35050061)を終濃度4 mMとなるように添加した培地にHEK293細胞株から派生したクローン細胞株であるViral Production Cells 2.0を播種し、37℃、8%CO₂に設定したインキュベーター内で攪拌培養し、2継代実施した。その後、30 mLのBasal 10 (味の素ヘルシーサプライ株式会社、CELLiST™ Basal media BASAL10)をベースとした培地、またはヒノキチオールを終濃度500 nMとなるように添加した自社培地にて継代し培養を実施した。培養3日或いは4日ごとに生死細胞オートアナライザーVi-CELL BLU (Beckman社製)を用いて生細胞数を測定してから継代することを繰り返し、計20日間培養した。

[0116] 結果を図3に示す。ヒノキチオールの添加によって、HEK293細胞の細胞増殖促進作用が認められた。

[0117] 実施例4：無血清培地におけるCD8陽性ヒトT細胞を用いたヒノキチオールの活性評価

(4-1) 無血清培地におけるCD8陽性ヒトT細胞を用いたヒノキチオールの活性評価

CD3 Monoclonal Antibody (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 16-0037-85)をPBSと混合して24ウェルプレートに添加した。37℃で1時間インキュベーションした後、PBSで3回washした。ベース培地としてCTS™ OpTmizer™ T Cell Expansion (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. A104851)に、CTS™ Immune Cell SR (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. A2596101)、200mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 25030081)、P/S/Amphotericin B (Fujifilm-Wako社, Cat No. 161-23181)、IL2 (PeproTech社, Cat No.

200-02) を添加したものを用いた。コーティングした24ウェルプレートに、表3に示すようにヒノキチオールを添加した培地群を作成して、CD8+T細胞 (LONZA社, Cat No. 2W-300) をそれぞれの群で培養した。7日後にセルカウントを実施し、増殖速度を計算した。

[0118] [表3]

表3

群番号	添加物
1	蒸留水
2	ヒノキチオール 0.49 uM
3	ヒノキチオール 0.0049 uM

[0119] 結果を図4に示す。ヒノキチオールにCD8陽性ヒトT細胞の細胞増殖促進作用が認められた。

産業上の利用可能性

[0120] 本発明によれば、動物細胞を培養することができる。

請求の範囲

- [請求項1] 鉄イオノフォアを含有する、動物細胞培養用組成物。
- [請求項2] 動物細胞の生育向上用および／または分化促進用の組成物である、請求項1に記載の組成物。
- [請求項3] 培地または培地添加物である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項4] 前記培地が、基礎培地、流加培地、または灌流培地である、請求項3に記載の組成物。
- [請求項5] 前記鉄イオノフォアが、ヒノキチオール、 α -ツヤプリシン、および γ -ツヤプリシンからなる群より選択される少なくとも1種の成分である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項6] 前記鉄イオノフォアが、ヒノキチオールである、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項7] さらに、鉄を含有する、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項8] 前記鉄が、鉄塩である、請求項7に記載の組成物。
- [請求項9] 前記動物が、哺乳類、鳥類、魚類、または甲殻類である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項10] 前記動物が、食肉用の動物である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項11] 前記動物が、ウシ、ブタまたは鶏である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項12] 前記動物が、ヒトである、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項13] 前記細胞が、筋幹細胞、脂肪前駆細胞、腎由来細胞、またはT細胞である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項14] 血清を実質的に含有しない、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項15] 動物由来アルブミンを実質的に含有しない、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項16] トランスフェリンを実質的に含有しない、請求項1または2に記載の組成物。

- [請求項17] 動物細胞の生育を向上させる機能および／または動物細胞の分化を促進する機能を有する、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項18] 産物の製造方法であって、
鉄イオノフォアが存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。
- [請求項19] 前記産物が、培養肉である、請求項17に記載の方法。
- [請求項20] 動物細胞を培養する方法であって、
鉄イオノフォアが存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。
- [請求項21] 動物細胞の生育を向上させる方法であって、
鉄イオノフォアが存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。
- [請求項22] 動物細胞の分化を促進する方法であって、
鉄イオノフォアが存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。
- [請求項23] 前記鉄イオノフォアが、ヒノキチオール、 α -ツヤプリシン、および γ -ツヤプリシンからなる群より選択される少なくとも1種の成分である、請求項18～22のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項24] 前記鉄イオノフォアが、ヒノキチオールである、請求項18～22のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項25] 前記培養が、鉄の存在下で実施される、請求項18～22のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項26] 前記鉄が、鉄塩である、請求項25に記載の方法。
- [請求項27] 前記培養時の培地における前記鉄イオノフォアの濃度が、1 nM～100 μ Mである、請求項18～22のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項28] 前記培養時の培地における前記鉄イオノフォアの濃度が、10 nM～100 μ Mである、請求項18～22のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項29] 前記培養時の培地におけるヒノキチオールの濃度が、1 nM～2.5 μ Mである、請求項24に記載の方法。
- [請求項30] 前記培養時の培地におけるヒノキチオールの濃度が、10 nM～1 μ Mである、請求項24に記載の方法。
- [請求項31] 前記培養時の培地における前記鉄の濃度が、200 nM～500 μ Mであ

る、請求項 25 に記載の方法。

- [請求項32] 前記動物が、哺乳類、鳥類、魚類、または甲殻類である、請求項 18～22 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項33] 前記動物が、食肉用の動物である、請求項 18～22 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項34] 前記動物が、ウシ、ブタまたは鶏である、請求項 18～22 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項35] 前記動物が、ヒトである、請求項 18、20、21、および 22 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項36] 前記細胞が、筋幹細胞または脂肪前駆細胞である、請求項 18～22 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項37] 前記細胞が、腎由来細胞またはT細胞である、請求項 18、20、21、および 22 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項38] 前記培養が、血清を実質的に含有しない培地で実施される、請求項 18～22 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項39] 前記培養が、動物由来アルブミンを実質的に含有しない培地で実施される、請求項 18～22 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項40] 前記培養が、トランスフェリンを実質的に含有しない培地で実施される、請求項 18～22 のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項41] 前記鉄イオノフォアが存在下で動物細胞を培養することにより、動物細胞の生育が向上する、且つ／又は、動物細胞の分化が促進される、請求項 18～22 のいずれか一項に記載の方法。