

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。

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0003] 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

[0004] 本発明者らは、エンドウ豆由来素材または酵母エキス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。

[0005] すなわち、本発明は以下の通り例示できる。

[1]

エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスを含有する、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]

前記エンドウ豆由来素材が、エンドウ豆発酵物および／またはエンドウ豆タンパク質である、前記(具体的には[1] ～ [4] のいずれかに記載の) 組成物。

[6]

前記エンドウ豆発酵物が、エンドウ豆醤油である、前記(具体的には[5] に記載の) 組成物。

[7]

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] ～ [6] のいずれかに記載の) 組成物。

[8]

前記動物が、食肉用の動物である、前記(具体的には[1] ～ [7] のいずれかに記載の) 組成物。

[9]

前記動物が、ウシまたは鶏である、前記(具体的には[1] ～ [8] のいずれかに記載の) 組成物。

[1 0]

前記細胞が、MyoD+細胞またはPAX7+細胞である、前記(具体的には[1] ～ [9] のいずれかに記載の) 組成物。

[1 1]

前記細胞が、筋芽細胞または衛星細胞である、前記(具体的には[1] ～ [1 0] のいずれかに記載の) 組成物。

[1 2]

血清を実質的に含有しない、前記(具体的には[1] ～ [1 1] のいずれ

かに記載の) 組成物。

[1 3]

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 2] のいずれかに記載の) 組成物。

[1 4]

産物の製造方法であって、
エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスの存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。

[1 5]

前記産物が、培養肉である、前記 (具体的には [1 4] に記載の) 方法。

[1 6]

動物細胞を培養する方法であって、
エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスの存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。

[1 7]

動物細胞の生育を向上させる方法であって、
エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスの存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。

[1 8]

動物細胞の分化を促進する方法であって、
エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスの存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。

[1 9]

前記エンドウ豆由来素材が、エンドウ豆発酵物および／またはエンドウ豆タンパク質である、前記 (具体的には [1 4] ~ [1 8] のいずれかに記載の) 方法。

[2 0]

前記エンドウ豆発酵物が、エンドウ豆醤油である、前記 (具体的には [1

9] に記載の) 方法。

[2 1]

前記培養時の培地における前記エンドウ豆発酵物の濃度が、0.1～100 mg/mLである、前記（具体的には [1 9] または [2 0] に記載の) 方法。

[2 2]

前記培養時の培地における前記エンドウ豆タンパク質の濃度が、0.05～50 mg/mLである、前記（具体的には [1 9] ～ [2 1] のいずれかに記載の) 方法。

[2 3]

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 4] ～ [2 2] のいずれかに記載の) 方法。

[2 4]

前記動物が、食肉用の動物である、前記（具体的には [1 4] ～ [2 3] のいずれかに記載の) 方法。

[2 5]

前記動物が、ウシまたは鶏である、前記（具体的には [1 4] ～ [2 4] のいずれかに記載の) 方法。

[2 6]

前記細胞が、MyoD+細胞またはPAX7+細胞である、前記（具体的には [1 4] ～ [2 5] のいずれかに記載の) 方法。

[2 7]

前記細胞が、筋芽細胞または衛星細胞である、前記（具体的には [1 4] ～ [2 6] のいずれかに記載の) 方法。

[2 8]

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 [1 4] ～ [2 7] のいずれかに記載の) 方法。

[2 9]

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〔14〕～〔28〕のいずれかに記載の）方法。

図面の簡単な説明

〔0006〕〔図1〕エンドウ豆醤油の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖を示す図。

〔図2〕エンドウ豆醤油の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖速度を示す図。

〔図3〕エンドウ豆醤油、大豆醤油、または大豆タンパク質加水分解物の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖を示す図。

〔図4〕エンドウ豆醤油、大豆醤油、または大豆タンパク質加水分解物の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖速度を示す図。

〔図5〕エンドウ豆醤油またはエンドウ豆タンパク質加水分解物の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖を示す図。

〔図6〕エンドウ豆醤油またはエンドウ豆タンパク質加水分解物の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖速度を示す図。

〔図7〕植物性タンパク質の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖を示す図。

〔図8〕植物性タンパク質の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖速度を示す図。

〔図9〕大豆タンパク質の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖速度を示す図。

〔図10〕エンドウ豆タンパク質の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖を示す図。

〔図11〕エンドウ豆タンパク質の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖速度を示す図。

〔図12〕エンドウ豆醤油および／またはエンドウ豆タンパク質の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖を示す図。

〔図13〕エンドウ豆醤油および／またはエンドウ豆タンパク質の存在下での、無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞の増殖速度を示す図。

[図14]エンドウ豆醤油または酵母エキスの存在下での、無血清培地におけるヒト筋肉幹細胞の増殖を示す図。

[図15]エンドウ豆醤油、エンドウ豆タンパク質、大豆醤油、大豆タンパク質酸加水分解物、または酵母エキスの存在下での、無血清培地におけるニトリ筋肉幹細胞の分化を示す図。

[図16]エンドウ豆醤油、エンドウ豆タンパク質、大豆醤油、大豆タンパク質酸加水分解物、または酵母エキスの存在下での、無血清培地におけるニトリ筋肉幹細胞の増殖を示す図。

発明を実施するための形態

[0007] < 1 >有効成分

< 1 - 1 >有効成分

本発明においては、エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスを有効成分として使用する。

[0008] エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスを総称して、「有効成分」ともいう。

[0009] 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。

[0010] 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。

[0011] 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。分化促進効果は、例えば、動物細胞が鶏等の鳥類の細胞である場合に得られてよい。分化促進効果は、具体的には、例えば、動物細胞が鶏等の鳥類のPAX7+細胞である場合に得られてよい。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.)。

[0012] 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。

[0013] 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、生育向上効果の一態様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。

[0014] <1-1-1>エンドウ豆由来素材

「エンドウ豆由来素材」とは、エンドウ豆に由来する素材を意味する。

[0015] エンドウ豆由来素材の種類は、所望の機能（例えば、生育向上機能または分化促進機能）を有する限り、特に制限されない。エンドウ豆由来素材としては、エンドウ豆の加工品が挙げられる。エンドウ豆由来素材（例えば、エンドウ豆の加工品）としては、エンドウ豆発酵物やエンドウ豆タンパク質が挙げられる。エンドウ豆由来素材としては、1種の素材を用いてもよく、2種またはそれ以上の素材を組み合わせ用いてもよい。

[0016] エンドウ豆の種類は、エンドウ豆由来素材が所望の機能（例えば、生育向上機能または分化促進機能）を有する限り、特に制限されない。エンドウ豆としては、実エンドウやサヤエンドウが挙げられる。実エンドウとしては、青エンドウ、赤エンドウ、黄エンドウ等の成熟エンドウ豆やグリーンピース等の未熟エンドウ豆が挙げられる。エンドウ豆としては、特に、実エンドウが挙げられる。エンドウ豆として、さらに特には、成熟エンドウ豆が挙げられる。エンドウ豆としては、1種のエンドウ豆を用いてもよく、2種またはそれ以上のエンドウ豆を組み合わせ用いてもよい。すなわち、エンドウ豆由来素材は、1種のエンドウ豆に由来してもよく、2種またはそれ以上のエンドウ豆に由来してもよい。すなわち、エンドウ豆由来素材としては、1種のエンドウ豆に由来する素材を用いてもよく、2種またはそれ以上のエンドウ豆に由来する素材を組み合わせ用いてもよい。

[0017] <1-1-1-1>エンドウ豆発酵物

「エンドウ豆発酵物」とは、エンドウ豆を微生物により発酵して得られる産物を意味する。ここでいう「発酵」とは、培地成分として培養に利用されることを意味してよい。すなわち、「エンドウ豆を微生物により発酵する」とは、エンドウ豆を含有する培地で微生物を培養することを意味してよい。すなわち、「エンドウ豆発酵物」とは、具体的には、エンドウ豆を含有する培地で微生物を培養することにより得られる産物を意味してよい。エンドウ豆発酵物としては、1種の発酵物を用いてもよく、2種またはそれ以上の発酵物を組み合わせて用いてもよい。

[0018] エンドウ豆発酵物が由来するエンドウ豆の種類は、エンドウ豆発酵物を製造できる限り、特に制限されない。エンドウ豆については上述の通りである。エンドウ豆発酵物は、1種のエンドウ豆に由来してもよく、2種またはそれ以上のエンドウ豆に由来してもよい。すなわち、エンドウ豆発酵物としては、1種のエンドウ豆に由来する発酵物を用いてもよく、2種またはそれ以上のエンドウ豆に由来する発酵物を組み合わせて用いてもよい。

[0019] エンドウ豆発酵物としては、エンドウ豆醤油が挙げられる。「エンドウ豆醤油」とは、エンドウ豆を原料として製造される醤油様調味料を意味してよい。「醤油様調味料」とは、日本農林規格の「しょうゆ」と同様の用途で用いることが可能な液体調味料またはその加工品を意味してよい。加工品としては、乾燥物（例えば、乾燥粉末）が挙げられる。エンドウ豆醤油としては、特開2014-110771に記載の方法で製造されたものが挙げられる。

[0020] 以下、エンドウ豆発酵物の製造方法について例示する。すなわち、エンドウ豆発酵物は、同製造方法により製造されたものであってよい。

[0021] エンドウ豆発酵物は、エンドウ豆を微生物により発酵する（具体的には、エンドウ豆を含有する培地で微生物を培養する）ことにより製造することができる。

[0022] すなわち、まず、エンドウ豆を含有する培地で微生物を培養してよい。すなわち、エンドウ豆発酵物の製造方法は、エンドウ豆を含有する培地で微生物

物を培養する工程を含んでいてよい。同工程を、「培養工程」ともいう。培養工程は、具体的には、エンドウ豆を含有する培地で微生物を培養して培養物を得る工程であってよい。同培養物を、「発酵物」ともいう。

[0023] 微生物の種類は、エンドウ豆発酵物を製造できる限り、特に制限されない。微生物としては、細菌や真菌が挙げられる。

[0024] 細菌としては、乳酸菌が挙げられる。

[0025] 乳酸菌としては、テトラゲノコッカス・ハロフィラス (*Tetragenococcus halophilus*) 等のテトラゲノコッカス属細菌、ビフィドバクテリウム・ロンガム (*Bifidobacterium longum*)、ビフィドバクテリウム・ブレーベ (*Bifidobacterium breve*)、ビフィドバクテリウム・ビフィダム (*Bifidobacterium bifidum*)、ビフィドバクテリウム・アドレセンティス (*Bifidobacterium adolescentis*)、ビフィドバクテリウム・アンギュラツム (*Bifidobacterium angulatum*)、ビフィドバクテリウム・デンティウム (*Bifidobacterium dentium*)、ビフィドバクテリウム・シュードカテヌラータム (*Bifidobacterium pseudocatenulatum*)、ビフィドバクテリウム・アニマリス (*Bifidobacterium animalis*)、ビフィドバクテリウム・シュードロンガム (*Bifidobacterium pseudolongum*)、ビフィドバクテリウム・サーモフィラム (*Bifidobacterium thermophilum*) 等のビフィドバクテリウム属細菌、ラクトバチルス・マリ (*Lactobacillus mali*)、ラクトバチルス・ヒルガルディ (*Lactobacillus hilgardii*)、ラクトバチルス・ブレビス (*Lactobacillus Brevis*)、ラクトバチルス・デルブレッキ (*Lactobacillus delbrueckii*)、ラクトバチルス・カゼイ (*Lactobacillus casei*)、ラクトバチルス・パラカゼイ (*Lactobacillus paracasei*)、ラクトバチルス・ガセリ (*Lactobacillus gasserii*)、ラクトバチルス・アシドフィラス (*Lactobacillus acidophilus*) 等のラクトバチルス属細菌が挙げられる。乳酸菌としては、特に、*Tetragenococcus* 属細菌が挙げられる。乳酸菌として、さらに特には、*Tetragenococcus halophilus* が挙げられる。乳酸菌は、例えば、耐塩性乳酸菌であってよい。「耐塩性乳酸菌」とは、例えば、8% (w/w) の塩化ナトリウムを含有する培地で増殖

可能な乳酸菌を意味してよい。例えば、*Tetragenococcus halophilus*は、耐塩性乳酸菌の一例であり得る。乳酸菌としては、例えば、醤油の生産に一般的に利用される乳酸菌を選択してよい。

[0026] 真菌としては、酵母や糸状菌が挙げられる。

[0027] 酵母は、出芽酵母であってもよく、分裂酵母であってもよい。酵母は、一倍体の酵母であってもよく、二倍体またはそれ以上の倍数性の酵母であってもよい。酵母としては、ジゴサッカロマイセス・ロキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*) やジゴサッカロマイセス・サパエ (*Zygosaccharomyces sapae*) 等のジゴサッカロマイセス属酵母、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 等のサッカロマイセス属酵母、ピチア・ファリノサ (*Pichia farinosa*)、ピチア・シフェリイ (*Pichia ciferrii*)、ピチア・シドウィオラム (*Pichia sydowiorum*)、ピチア・パストリス (*Pichia pastoris*) 等のピチア属 (ウィッカーハモマイセス (*Wickerhamomyces*) 属ともいう) 酵母、キャンディダ・ベルサチリス (*Candida versatilis*)、キャンディダ・エシエルシ (*Candida etschelsii*)、キャンディダ・ユティリス (*Candida utilis*) 等のキャンディダ属酵母、ハンゼヌラ・ポリモルファ (*Hansenula polymorpha*) 等のハンゼヌラ属酵母、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) 等のシゾサッカロマイセス属酵母が挙げられる。酵母としては、特に、ジゴサッカロマイセス・ロキシー (*Zygosaccharomyces rouxii*)、ジゴサッカロマイセス・サパエ (*Zygosaccharomyces sapae*)、ピチア・ファリノサ (*Pichia farinosa*)、キャンディダ・ベルサチリス (*Candida versatilis*)、キャンディダ・エシエルシ (*Candida etschelsii*)、サッカロマイセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、シゾサッカロマイセス・ポンベ (*Schizosaccharomyces pombe*) が挙げられる。また、酵母としては、特に、*Zygosaccharomyces*属酵母が挙げられる。酵母として、さらに特に、*Zygosaccharomyces rouxii*が挙げられる。*Zygosaccharomyces rouxii*としては、*Zygosaccharomyces rouxii* NBRC 1130株 (ATCC 56077) が挙げられる。*Saccharomyces cerevisiae*としては、*Saccharomyces cerevisiae* NB

RC 10217株 (ATCC 18824)、BY4742株 (ATCC 201389)、BY4743株 (ATCC 201390)、S288C株 (ATCC 26108) が挙げられる。Schizosaccharomyces pombeとしては、Schizosaccharomyces pombe NBRC 1628株が挙げられる。酵母は、例えば、耐塩性酵母であってよい。「耐塩性酵母」とは、例えば、8% (w/w) の塩化ナトリウムを含有する培地で増殖可能な酵母を意味してよい。例えば、Zygosaccharomyces rouxii、Zygosaccharomyces sapae、Pichia farinosa、Candida versatilis、およびCandida etchellsiiは、いずれも、耐塩性酵母の一例であり得る。酵母としては、例えば、醤油の生産に一般的に利用される酵母を選択してよい。

[0028] 糸状菌としては、アスペルギルス・オリゼー (*Aspergillus oryzae*)、アスペルギルス・ソーヤ (*Aspergillus sojae*)、アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*)、アスペルギルス・タマリ (*Aspergillus tamarii*)、アスペルギルス・カワチ (*Aspergillus kawachii*)、アスペルギルス・アワモリ (*Aspergillus awamori*)、アスペルギルス・サイトイ (*Aspergillus sitoi*) 等のアスペルギルス属真菌が挙げられる。糸状菌としては、特に、*Aspergillus oryzae*や*Aspergillus sojae*が挙げられる。糸状菌としては、例えば、醤油の生産（具体的には麴の生産）に一般的に利用される糸状菌を選択してよい。

[0029] これらの菌株は、例えば、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクション (ATCC, Address: 10801 University Boulevard Manassas, VA 20110, United States of America) より分譲を受けることができる。すなわち各菌株に対応する登録番号が付与されており、この登録番号を利用して分譲を受けることができる (<http://www.atcc.org/>参照)。各菌株に対応する登録番号は、アメリカン・タイプ・カルチャー・コレクションのカタログに記載されている。また、これらの菌株は、例えば、NBRC (NITE Biological Resource Center) から入手することができる。また、これらの菌株は、例えば、各菌株が寄託された寄託機関から入手することができる。

[0030] 微生物としては、1種の微生物を用いてもよく、2種またはそれ以上の微

生物を組み合わせてもよい。微生物としては、例えば、糸状菌、酵母、および乳酸菌を組み合わせてもよい。2種またはそれ以上の微生物を組み合わせる場合、それら微生物は、同時に培養してもよく、そうでなくてもよい。例えば、まず、糸状菌を培養し、次いで、酵母および乳酸菌を培養してもよい。なお、まず、或る微生物Aを培養し、次いで、或る微生物Bを培養する場合、微生物Bの培養における「エンドウ豆」とは、微生物Aの培養後のエンドウ豆（すなわち、微生物Aによる発酵後のエンドウ豆）を意味してよい。

[0031] 培養条件は、エンドウ豆発酵物を製造できる限り、特に制限されない。培養は、エンドウ豆を含有する培地を用いること以外は、例えば、微生物の培養に用いられる通常の条件で実施することができる。培養は、例えば、固体培養により（すなわち固体培地で）実施してもよく、液体培養により（すなわち液体培地で）実施してもよい。培養は、特に、液体培養により（すなわち液体培地で）実施してよい。

[0032] 培養に使用する培地は、エンドウ豆を含有し、エンドウ豆発酵物を製造できる限り、特に制限されない。培地としては、エンドウ豆に加えて、例えば、炭素源、窒素源、リン酸源、硫黄源、その他の各種有機成分や無機成分から選択される成分を必要に応じて含有する培地を用いることができる。培地は、エンドウ豆そのものであってもよい。すなわち、エンドウ豆に微生物を直接植菌して培養してもよい。培地成分の種類や濃度は、当業者が適宜設定することができる。具体的な培地組成については、例えば、微生物の培養に用いられる通常の培地組成を参照することができる。培地は、1種のエンドウ豆を含有してもよく、2種またはそれ以上のエンドウ豆を組み合わせてもよい。

[0033] 培養におけるエンドウ豆の利用形態は、エンドウ豆発酵物を製造できる限り、特に制限されない。エンドウ豆は、例えば、さやから分離して培養に用いてもよく、さやから分離せずに培養に用いてもよい。エンドウ豆としては、例えば、生鮮品（具体的には、可食部の生鮮品）を、そのまま、あるいは

適宜加工に供してから、培養に用いてよい。加工としては、切断、破碎、裏ごし、搾汁、分画、希釈、濃縮、乾燥、加熱が挙げられる。これらの加工は、単独で、あるいは適宜組み合わせで実施してよい。

[0034] 炭素源としては、糖類が挙げられる。糖類として、具体的には、グルコース、フルクトース、ガラクトース、キシロース、アラビノース、スクロース、ラクトース、セロビオース、廃糖蜜、澱粉加水分解物、バイオマス加水分解物が挙げられる。炭素源としては、1種の炭素源を用いてもよく、2種またはそれ以上の炭素源を組み合わせで用いてもよい。

[0035] 窒素源として、具体的には、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、リン酸アンモニウム等のアンモニウム塩、ペプトン、カゼインペプトン、ソイペプトン、ポテトペプトン、小麦ペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、コーンステープリカー等の有機窒素源、アンモニア、ウレアが挙げられる。窒素源としては、1種の窒素源を用いてもよく、2種またはそれ以上の窒素源を組み合わせで用いてもよい。

[0036] リン酸源として、具体的には、リン酸2水素カリウム、リン酸水素2カリウム等のリン酸塩、ピロリン酸等のリン酸ポリマーが挙げられる。リン酸源としては、1種のリン酸源を用いてもよく、2種またはそれ以上のリン酸源を組み合わせで用いてもよい。

[0037] 硫黄源として、具体的には、硫酸塩、チオ硫酸塩、亜硫酸塩等の無機硫黄化合物、システイン、シスチン、グルタチオン等の含硫アミノ酸が挙げられる。硫黄源としては、1種の硫黄源を用いてもよく、2種またはそれ以上の硫黄源を組み合わせで用いてもよい。

[0038] その他の各種有機成分や無機成分として、具体的には、例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム等の無機塩類；鉄、マンガン、マグネシウム、カルシウム等の微量元素類；ビタミンB1、ビタミンB2、ビタミンB6、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、ビタミンB12等のビタミン類；アミノ酸類；核酸類；これらを含むペプトン、カザミノ酸、酵母エキス、麦芽エキス、肉エキス、コーンステープリカー等の有機成分が挙げられる。その他の各種有機成分

や無機成分としては、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用いてもよい。

[0039] 培地は、例えば、少なくとも、塩化ナトリウムを含有してよい。すなわち、培地は、例えば、エンドウ豆および塩化ナトリウムを含有してよい。

[0040] 培養は、例えば、好気条件で実施してよい。好気条件の場合、培地の溶存酸素濃度は、例えば、飽和溶存酸素濃度を100%とする比率として、5~50%、好ましくは10~20%に制御されてもよい。好気条件での培養は、具体的には、例えば、静置培養、通気培養、振盪培養、攪拌培養、またはそれらの組み合わせで実施してよい。培養温度は、例えば、25~45℃、25~35℃、好ましくは27℃~33℃、より好ましくは28℃~32℃であってよい。培養期間は、例えば、10時間~6ヶ月間、10時間~2ヶ月間、10時間~1ヶ月間、10時間~200時間、好ましくは15時間~120時間であってよい。培地のpHは、例えば、pH3~10、好ましくはpH3~8であってよい。培養中、必要に応じて培地のpHを調整してよい。pHの調整には、無機または有機の酸性またはアルカリ性の物質、例えばアンモニアガス等、を用いることができる。培養は、例えば、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で実施してよい。また、培養は、前培養と本培養とに分けて実施してもよい。例えば、前培養を寒天培地等の固体培地上で実施し、本培養を液体培地で実施してもよい。なお、「培地が或る成分を含有する」とは、培養が種培養と本培養とに分けて行われる場合には、少なくとも本培養の際に培地が当該成分を含有することを意味する。すなわち、例えば、エンドウ豆は、少なくとも、本培養の際に培地に含有される。培養は、例えば、所望の機能（例えば、生育向上機能または分化促進機能）を有する培養物が得られるまで継続してよい。

[0041] また、培養は、例えば、特開2014-110771に記載の態様で実施できる。すなわち、例えば、まず、適宜前処理を実施したエンドウ豆に糸状菌を植菌して培養を実施し、エンドウ豆の麴を製造することができる。エンドウ豆の麴を

製造する際の培養は、例えば、25～45℃、湿度85～95%で、12～240時間実施してよい。次いで、エンドウ豆の麴を塩化ナトリウム水溶液と混合し、酵母および乳酸菌を植菌して培養（具体的には、熟成）を実施し、発酵物を製造することができる。熟成は、例えば、15～35℃で適宜攪拌しながら3～6ヶ月間実施してよい。また、熟成は、例えば、35～55℃で適宜攪拌しながら1日～2ヶ月間実施してよい。

[0042] 培地中のエンドウ豆や塩化ナトリウム等の培地成分の含有量は、エンドウ豆発酵物を製造できる限り、特に制限されない。

[0043] 培地中のエンドウ豆の含有量は、例えば、0.5%(w/w)以上、1%(w/w)以上、2%(w/w)以上、3%(w/w)以上、4%(w/w)以上、5%(w/w)以上、7%(w/w)以上、10%(w/w)以上、15%(w/w)以上、20%(w/w)以上、25%(w/w)以上、30%(w/w)以上、40%(w/w)以上、50%(w/w)以上、または70%(w/w)以上であってもよく、100%(w/w)以下、70%(w/w)以下、50%(w/w)以下、40%(w/w)以下、30%(w/w)以下、25%(w/w)以下、20%(w/w)以下、15%(w/w)以下、10%(w/w)以下、7%(w/w)以下、5%(w/w)以下、4%(w/w)以下、3%(w/w)以下、2%(w/w)以下、または1%(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。培地中のエンドウ豆の含有量は、具体的には、例えば、0.5～1%(w/w)、1～2%(w/w)、2～3%(w/w)、3～4%(w/w)、4～5%(w/w)、5～7%(w/w)、7～10%(w/w)、10～15%(w/w)、15～20%(w/w)、20～25%(w/w)、25～30%(w/w)、30～40%(w/w)、40～50%(w/w)、50～70%(w/w)、または70～100%(w/w)であってもよい。培地中のエンドウ豆の含有量は、具体的には、例えば、0.5～100%(w/w)、0.5～50%(w/w)、1～30%(w/w)、または2～10%(w/w)であってもよい。

[0044] 培地中の塩化ナトリウムの含有量は、例えば、0%(w/w)以上、0.1%(w/w)以上、0.2%(w/w)以上、0.5%(w/w)以上、1%(w/w)以上、2%(w/w)以上、3%(w/w)以上、4%(w/w)以上、5%(w/w)以上、6%(w/w)以上、7%(w/w)以上、8%(w/w)以上、9%(w/w)以上、10%(w/w)以上、12%(w/w)以上、または15%(w/w)以上であってもよく、20%(w/w)以下、15%(w/w)以下、12%(w/w)以下、1

0%(w/w)以下、9%(w/w)以下、8%(w/w)以下、7%(w/w)以下、6%(w/w)以下、5%(w/w)以下、4%(w/w)以下、3%(w/w)以下、2%(w/w)以下、1%(w/w)以下、0.5%(w/w)以下、0.2%(w/w)以下、または0.1%(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。培地中の塩化ナトリウムの含有量は、具体的には、例えば、0~0.1%(w/w)、0.1~0.2%(w/w)、0.2~0.5%(w/w)、0.5~1%(w/w)、1~2%(w/w)、2~3%(w/w)、3~4%(w/w)、4~5%(w/w)、5~6%(w/w)、6~7%(w/w)、7~8%(w/w)、8~9%(w/w)、9~10%(w/w)、10~12%(w/w)、12~15%(w/w)、または15~20%(w/w)であってもよい。培地中の塩化ナトリウムの含有量は、具体的には、例えば、0~20%(w/w)、0.1~20%(w/w)、1~20%(w/w)、5~20%(w/w)、5~15%(w/w)、または5~12%(w/w)であってもよい。なお、培地中の塩化ナトリウムの含有量についての「0%(w/w)以上」には、培地が塩化ナトリウムを含有しない場合（すなわち0%(w/w)）と培地が塩化ナトリウムを含有する場合（すなわち0%(w/w)超）が包含される。よって、例えば、「培地中の塩化ナトリウムの含有量が0~20%(w/w)である」とは、培地が塩化ナトリウムを含有しないか、培地が塩化ナトリウムを20%(w/w)以下の含有量（具体的には0%(w/w)超且つ20%(w/w)以下の含有量）で含有することを意味する。

[0045] エンドウ豆や塩化ナトリウム等の培地成分は、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。エンドウ豆や塩化ナトリウム等の培地成分は、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、エンドウ豆や塩化ナトリウム等の培地成分は、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、当該成分の消費後）に培地にさらに供給されてもよい。

[0046] エンドウ豆や塩化ナトリウム等の培地成分は、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」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。エンドウ豆や塩化ナトリウム等の培地成分は、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、エンドウ豆や塩化ナトリウム等の培地成分は、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。

[0047] 「培養の一部の期間」の長さは、エンドウ豆発酵物を製造できる限り、特に制限されない。「培養の一部の期間」の長さは、培地成分の種類、微生物の種類、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、10時間以上、20時間以上、40時間以上、60時間以上、80時間以上、100時間以上、120時間以上、または150時間以上の期間であってもよい。なお、「培養の全期間」とは、培養が種培養と本培養とに分けて行われる場合には、本培養の全期間を意味する。

[0048] このようにして微生物を培養することにより、培養物（すなわちエンドウ豆発酵物）が得られる。

[0049] 培養物は、そのまま、あるいは適宜処理に供してから、エンドウ豆発酵物として利用してよい。すなわち、エンドウ豆発酵物の製造方法は、培養物を処理に供する工程を含んでいてよい。例えば、培養物は、そのまま、あるいは適宜処理に供してから、エンドウ豆発酵物として本発明の組成物の製造に

利用してよい。また、例えば、培養物は、そのまま、あるいは適宜処理に供してから、エンドウ豆発酵物として本発明の方法に利用してよい。処理は、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。処理としては、分画、希釈、濃縮、乾燥、加熱、滅菌が挙げられる。例えば、分画の場合、所望の機能（例えば、生育向上機能または分化促進機能）を有する画分を回収すればよい。分画により回収される画分は、具体的には、所望の機能（例えば、生育向上機能または分化促進機能）を有する成分を含有する画分であってよい。エンドウ豆発酵物の形状は、特に制限されない。エンドウ豆発酵物は、例えば、粉末、フレーク、ペースト、液体等の任意の形状であってよい。すなわち、培養物は、所望の形状に加工されていてよい。すなわち、エンドウ豆発酵物の製造方法は、エンドウ豆発酵物を所望の形状に加工する工程を含んでいてよい。例えば、培養物を乾燥および粉末化してエンドウ豆発酵物として利用してよい。エンドウ豆発酵物の製造方法は、例えば、エンドウ豆発酵物を乾燥および粉末化する工程を含んでいてよい。乾燥手段としては、凍結乾燥、スプレードライ、ドラムドライが挙げられる。エンドウ豆発酵物には、賦形剤等の添加剤が配合されてもよい。

[0050] <1-1-1-2>エンドウ豆タンパク質

「エンドウ豆タンパク質」とは、エンドウ豆に由来するタンパク質を意味する。「エンドウ豆タンパク質」には、エンドウ豆の全長タンパク質に限られず、その断片（すなわち、部分タンパク質）も包含されてよい。エンドウ豆の全長タンパク質の断片としては、エンドウ豆の全長タンパク質の加水分解物が挙げられる。すなわち、エンドウ豆タンパク質は、例えば、加水分解されていてよく、いなくてもよい。一態様において、エンドウ豆タンパク質は、加水分解されていなくてよい。エンドウ豆タンパク質としては、1種のタンパク質を用いてもよく、2種またはそれ以上のタンパク質を組み合わせ用いてもよい。

[0051] エンドウ豆タンパク質が由来するエンドウ豆の種類は、エンドウ豆タンパ

ク質が所望の機能（例えば、生育向上機能または分化促進機能）を有する限り、特に制限されない。エンドウ豆については上述の通りである。エンドウ豆タンパク質は、1種のエンドウ豆に由来してもよく、2種またはそれ以上のエンドウ豆に由来してもよい。すなわち、エンドウ豆タンパク質としては、1種のエンドウ豆に由来するタンパク質を用いてもよく、2種またはそれ以上のエンドウ豆に由来するタンパク質を組み合わせ用いてもよい。

[0052] エンドウ豆タンパク質としては、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。エンドウ豆タンパク質の製造方法は特に制限されない。エンドウ豆タンパク質は、例えば、エンドウ豆からの抽出により製造することができる。エンドウ豆タンパク質は、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、エンドウ豆タンパク質としては、精製品を用いてもよいし、エンドウ豆タンパク質を含有する素材を用いてもよい。エンドウ豆タンパク質を含有する素材としては、エンドウ豆タンパク質の粗抽出物（すなわち、エンドウ豆から粗抽出されたタンパク質）が挙げられる。エンドウ豆タンパク質を含有する素材としては、エンドウ豆の破砕物（例えば、エンドウ豆の粉末）も挙げられる。エンドウ豆の破砕物（例えば、エンドウ豆の粉末）は、エンドウ豆の破砕により製造することができる。エンドウ豆は、例えば、さやから分離して破砕してもよく、さやから分離せずに破砕してもよい。エンドウ豆タンパク質を含有する素材におけるエンドウ豆タンパク質の含有量は、例えば、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) 以上であってよい。

[0053] なお、エンドウ豆タンパク質の量（例えば含有量（濃度）や使用量）は、エンドウ豆タンパク質を含有する素材を用いる場合にあっては、当該素材中のエンドウ豆タンパク質そのものの量に基づいて算出されるものとする。対象物（例えば、素材や組成物）中のエンドウ豆タンパク質の含有量は、例えば、ケルダール法等の公知のタンパク質定量法により測定できる。

[0054] <1-1-2>酵母エキス

「酵母エキス」とは、酵母の抽出物を意味してよい。酵母エキスとしては、1種の酵母エキスを用いてもよく、2種またはそれ以上の酵母エキスを組み合わせて用いてもよい。

[0055] 酵母エキス用の酵母の種類は、酵母エキスが所望の機能（例えば、生育向上機能または分化促進機能）を有する限り、特に制限されない。酵母エキス用の酵母としては、エンドウ豆発酵物の製造方法において例示した酵母が挙げられる。酵母エキス用の酵母としては、特に、*Saccharomyces cerevisiae*等の*Saccharomyces*属酵母、*Schizosaccharomyces pombe*等の*Schizosaccharomyces*属酵母、*Candida utilis*等の*Candida*属酵母が挙げられる。酵母エキス用の酵母として、さらに特には、*Saccharomyces*属酵母や*Candida*属酵母が挙げられる。酵母エキス用の酵母としては、1種の酵母を用いてもよく、2種またはそれ以上の酵母を組み合わせて用いてもよい。

[0056] 酵母エキスとしては、市販品を用いてもよく、適宜製造して取得したものをを用いてもよい。酵母エキスの製造方法は特に制限されない。酵母エキスは、例えば、公知の方法により酵母菌体から製造することができる。酵母エキスの調製法としては、自己消化法、酵素分解法、酸分解法、アルカリ分解法、物理的破碎法、凍結融解法が挙げられる。

[0057] 酵母エキスの形状は、特に制限されない。酵母エキスは、例えば、粉末、フレーク、ペースト、液体等の任意の形状であってよい。

[0058] <1-2>他の成分

有効成分は、例えば、他の成分と併用されてもよい。他の成分としては、レシチンが挙げられる。すなわち、有効成分は、例えば、レシチンと併用されてよい。他の成分（例えば、レシチン）は、例えば、生育向上機能および／または分化促進機能を有してよい。他の成分の生育向上機能および分化促進機能については、それぞれ、有効成分の生育向上機能および分化促進機能についての記載を準用できる。

[0059] 「レシチン」とは、リン脂質を含有する素材を総称してよい。レシチンは、リン脂質を主成分として含有してよい。レシチンにおけるリン脂質の含有

量は、例えば、50 %(w/w)以上、70 %(w/w)以上、90 %(w/w)以上、または95 %(w/w)以上であってよい。レシチンの種類は、特に制限されない。レシチンとしては、例えば、所望の機能（例えば、生育向上機能または分化促進機能）を有するものを選択してよい。レシチンとしては、植物レシチン、卵黄レシチン、それらの派生物が挙げられる。植物レシチンとしては、大豆レシチン、アブラナレシチン、ヒマワリレシチンが挙げられる。派生物としては、分別レシチン、酵素処理レシチン、酵素分解レシチンが挙げられる。レシチンとしては、特に、大豆レシチンが挙げられる。レシチンとしては、1種のレシチンを用いてもよく、2種またはそれ以上のレシチンを組み合わせて用いてもよい。

[0060] レシチンとしては、市販品を用いてもよく、適宜製造して取得したものをを用いてもよい。レシチンの製造方法は特に制限されない。レシチンは、例えば、レシチンを含有する原料からの分離により製造することができる。具体的には、大豆レシチンは、例えば、大豆油からの分離により製造することができる。

[0061] <2>本発明の組成物

本発明の組成物は、有効成分（すなわち、エンドウ豆由来素材および／または酵母エキス）を含有する組成物である。

[0062] 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。

[0063] 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。

- [0064] 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。
- [0065] 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。
- [0066] 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。
- [0067] 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。
- [0068] 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よい。

[0069] 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。

[0070] 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、レシチンが挙げられる。すなわち、本発明の組成物は、例えば、レシチンを含有してよい。

[0071] 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。

[0072] 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。

[0073] 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。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。

[0074] 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。

[0075] 本発明の組成物がエンドウ豆発酵物を含有する場合、本発明の組成物におけるエンドウ豆発酵物の含有量は、例えば、0.1 mg/g以上、0.2 mg/g以上、0.5 mg/g以上、1 mg/g以上、2 mg/g以上、5 mg/g以上、10 mg/g以上、20 mg/g以上、50 mg/g以上、100 mg/g以上、200 mg/g以上、500 mg/g以上、1000 mg/g以上、2000 mg/g以上、5000 mg/g以上、10000 mg/g以上、20000 mg/g以上、または50000 mg/g以上であってもよく、100000 mg/g以下、50000 mg/g以下、20000 mg/g以下、10000 mg/g以下、5000 mg/g以下、2000 mg/g以下、1000 mg/g以下、500 mg/g以下、200 mg/g以下、100 mg/g以下、50 mg/g以下、20 mg/g以下、10 mg/g以下、5 mg/g以下、2 mg/g以下、1 mg/g以下、0.5 mg/g以下、または0.2 mg/g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エンドウ豆発酵物の含有量は、具体的には、例えば、0.1~0.2 mg/g、0.2~0.5 mg/g、0.5~1 mg/g、1~2 mg/g、2~5 mg/g、5~10 mg/g、10~20 mg/g、20~50 mg/g、50~100 mg/g、100~200 mg/g、200~500 mg/g、500~1000 mg/g、1000~2000 mg/g、2000~5000 mg/g、5000~10000 mg/g、10000~20000 mg/g、20000~50000 mg/g、または50000~100000 mg/gであってもよい。本発明の組成物におけるエンドウ豆発酵物の含有量は、具体的には、例えば、0.1~100000 mg/g、0.2~20000 mg/g、0.5~5000 mg/g、または1~1000 mg/gであってもよい。「エンドウ豆発酵物の含有量」とは、特記しない限り、元の培養物の含有量に換算したエンドウ豆発酵物の含有量、元の培養上清の含有量に換算したエンドウ豆発酵物の含有量、または製品として提供および流通するエンドウ豆発酵物の含有量を意味するものとする。すなわち、例えば、「エンドウ豆発酵物の含有量が0.1 mg/g以上である」とは、特記しない限り、元の培養物の含有量に換算したエンドウ豆発酵物の含有量、元の培養上清の含有量に換算したエンドウ豆発酵物の含有量、および製品として提供および流通するエンドウ豆発酵物の含有量の

少なくともいずれかが0.1 mg/g以上であればよい。「元の培養物」とは、培養後に濃縮や希釈等の濃度変化が生じていない培養物を意味し、具体的には、培養終了時の培養物を意味してよい。元の培養物を、「元の発酵物」ともいう。「元の培養上清」とは、培養物の上清であって、培養後に固液分離以外の濃縮や希釈等の濃度変化が生じていない培養物を意味し、具体的には、培養終了時の培養物を固液分離して得た上清を意味してよい。製品として提供および流通するエンドウ豆発酵物としては、市販のエンドウ豆醤油が挙げられる。なお、100%(w/w) (すなわち1000 mg/g) を超える含有量は、培養物が濃縮されて本発明の組成物に含有されていることを意味する。すなわち、例えば、2000 mg/gという含有量は、培養物が培養後に2倍に濃縮されて本発明の組成物に含有されていることを意味する。

[0076] 本発明の組成物がエンドウ豆タンパク質を含有する場合、本発明の組成物におけるエンドウ豆タンパク質の含有量は、例えば、0.05 mg/g以上、0.1 mg/g以上、0.2 mg/g以上、0.5 mg/g以上、1 mg/g以上、2 mg/g以上、5 mg/g以上、10 mg/g以上、20 mg/g以上、50 mg/g以上、100 mg/g以上、200 mg/g以上、500 mg/g以上、700 mg/g以上、または900 mg/g以上であってもよく、1000 mg/g以下、900 mg/g以下、700 mg/g以下、500 mg/g以下、200 mg/g以下、100 mg/g以下、50 mg/g以下、20 mg/g以下、10 mg/g以下、5 mg/g以下、2 mg/g以下、1 mg/g以下、0.5 mg/g以下、0.2 mg/g以下、または0.1 mg/g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エンドウ豆タンパク質の含有量は、具体的には、例えば、0.05~0.1 mg/g、0.1~0.2 mg/g、0.2~0.5 mg/g、0.5~1 mg/g、1~2 mg/g、2~5 mg/g、5~10 mg/g、10~20 mg/g、20~50 mg/g、50~100 mg/g、100~200 mg/g、200~500 mg/g、500~700 mg/g、700~900 mg/g、または900~1000 mg/gであってもよい。本発明の組成物におけるエンドウ豆タンパク質の含有量は、具体的には、例えば、0.05~1000 mg/g、0.1~1000 mg/g、0.2~1000 mg/g、または0.5~1000 mg/gであってもよい。

[0077] 本発明の組成物が酵母エキスを含有する場合、本発明の組成物における酵

母エキスの含有量は、例えば、0.01 mg/g以上、0.02 mg/g以上、0.05 mg/g以上、0.1 mg/g以上、0.2 mg/g以上、0.5 mg/g以上、1 mg/g以上、2 mg/g以上、5 mg/g以上、10 mg/g以上、20 mg/g以上、50 mg/g以上、100 mg/g以上、200 mg/g以上、500 mg/g以上、700 mg/g以上、または900 mg/g以上であってもよく、1000 mg/g以下、900 mg/g以下、700 mg/g以下、500 mg/g以下、200 mg/g以下、100 mg/g以下、50 mg/g以下、20 mg/g以下、10 mg/g以下、5 mg/g以下、2 mg/g以下、1 mg/g以下、0.5 mg/g以下、0.2 mg/g以下、0.1 mg/g以下、0.05 mg/g以下、または0.02 mg/g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酵母エキスの含有量は、具体的には、例えば、0.01～0.02 mg/g、0.02～0.05 mg/g、0.05～0.1 mg/g、0.1～0.2 mg/g、0.2～0.5 mg/g、0.5～1 mg/g、1～2 mg/g、2～5 mg/g、5～10 mg/g、10～20 mg/g、20～50 mg/g、50～100 mg/g、100～200 mg/g、200～500 mg/g、500～700 mg/g、700～900 mg/g、または900～1000 mg/gであってもよい。本発明の組成物における酵母エキスの含有量は、具体的には、例えば、0.01～1000 mg/mL、0.02～1000 mg/mL、0.05～1000 mg/mL、または0.1～1000 mg/mLであってもよい。「酵母エキスの含有量」とは、酵母エキスの乾燥重量に基づいて算出される酵母エキスの含有量を意味する。

[0078] 本発明の組成物における追加成分の含有量は、100%(w/w)未満である。

[0079] 本発明の組成物がレシチン含有する場合、本発明の組成物におけるレシチンの含有量は、例えば、0.1 μ g/g以上、0.2 μ g/g以上、0.5 μ g/g以上、1 μ g/g以上、2 μ g/g以上、5 μ g/g以上、10 μ g/g以上、20 μ g/g以上、50 μ g/g以上、100 μ g/g以上、1 mg/g以上、10 mg/g以上、または100 mg/g以上であってもよく、1000 mg/g未満、100 mg/g以下、10 mg/g以下、1 mg/g以下、100 μ g/g以下、50 μ g/g以下、20 μ g/g以下、10 μ g/g以下、5 μ g/g以下、2 μ g/g以下、1 μ g/g以下、0.5 μ g/g以下、または0.2 μ g/g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、0.1 μ g/g～0.2 μ g/g、0.2 μ g/g～0.5 μ g/g、0.5 μ g/g～1 μ g/g、1 μ g/g～2 μ g/g、2 μ

g/g $\sim$ 5 μ g/g、5 μ g/g $\sim$ 10 μ g/g、10 μ g/g $\sim$ 20 μ g/g、20 μ g/g $\sim$ 50 μ g/g、50 μ g/g $\sim$ 100 μ g/g、100 μ g/g $\sim$ 1 mg/g、1 mg/g $\sim$ 10 mg/g、10 mg/g $\sim$ 100 mg/g、または100 mg/g以上且つ1000 mg/g未満であってもよい。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、0.1 μ g/g以上且つ1000 mg/g未満、0.2 μ g/g以上且つ1000 mg/g未満、0.5 μ g/g以上且つ1000 mg/g未満、または1 μ g/g以上且つ1000 mg/g未満であってもよい。

[0080] 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。

[0081] 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。

[0082] 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。

[0083] 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。

[0084] <3>本発明の方法

本発明の方法は、有効成分（すなわち、エンドウ豆由来素材および／または酵母エキス）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。

[0085] 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。

[0086] 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。

[0087] 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。

[0088] 動物細胞の培養の目的は、特に制限されない。

[0089] 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。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。

[0090] 「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、骨髓細胞、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β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；癌幹細胞が挙げられる。前駆細胞としては、衛星細胞、腓前駆細胞、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。

[0091] また、動物細胞としては、MyoD+細胞（すなわち、MyoDを発現している細胞）やPAX7+細胞（すなわち、PAX7を発現している細胞）が挙げられる。MyoD+細胞は、例えば、筋芽細胞であってよい。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。MyoD+細胞やPAX7+細胞としては、上記例示した動物種のMyoD+細胞やPAX7+細胞が挙げられる。PAX7+細胞としては、特に、鶏等の鳥類のPAX7+細胞が挙げられる。動物細胞は、例えば、生育向上効果を得る場合に、MyoD+細胞であってよい。動物細胞は、例えば、分化促進効果を得る場合に、PAX7+細胞であってよい。動物細胞は、具体的には、例えば、分化促進効果を得る場合に、鶏等の鳥類のPAX7+細胞であってよい。

[0092] 「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MyoD+細胞である」とは、MyoD+の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MyoD+となる場合も包含してよい。

[0093] 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。

[0094] 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。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] 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。

[0098] 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。

[0099] 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。

[0100] 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。

[0101] 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。

[0102] また、その他市販の培地としては、CELLiST Basal Media BASAL3、BASAL4P、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 CD 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。

[0103] 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。

[0104] 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。

[0105] 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。

[0106] 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、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、レシチン、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。

[0107] 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。

- [0108] 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。
- [0109] 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。
- [0110] 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。
- [0111] 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。
- [0112] 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。
- [0113] 脂質としては、コレステロールが挙げられる。
- [0114] 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。
- [0115] 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-ピペラジエタンスルホン酸（4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineet

hanesulfonic 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。

- [0116] 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が用いられてよい。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。
- [0117] サイトカインとしては、インターロイキンが挙げられる。
- [0118] 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。
- [0119] 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、ポリーレーリシン、ポリーD-リシンが挙げられる。
- [0120] 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。
- [0121] 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。

[0122] 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。

[0123] 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。

[0124] 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。

[0125] 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、中性付近であってもよい。「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℃であってもよい。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日以上であつてもよく、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日であつてもよい。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。

[0126] 培地がエンドウ豆発酵物を含有する場合、培地におけるエンドウ豆発酵物の濃度は、例えば、0.1 mg/mL以上、0.2 mg/mL以上、0.5 mg/mL以上、1 mg/mL以上、2 mg/mL以上、5 mg/mL以上、10 mg/mL以上、20 mg/mL以上、または50 mg/mL以上であつてもよく、100 mg/mL以下、50 mg/mL以下、20 mg/mL以下、10 mg/mL以下、5 mg/mL以下、2 mg/mL以下、1 mg/mL以下、0.5 mg/mL以下、または0.2 mg/mL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。培地におけるエンドウ豆発酵物の濃度は、具体的には、例えば、0.1～0.2 mg/mL、0.2～0.5 mg/mL、0.5～1 mg/mL、1～2 mg/mL、2～5 mg/mL、5～10 mg/mL、10～20 mg/mL、20～50 mg/mL、または50～100 mg/mLであつてもよい。培地におけるエンドウ豆発酵物の濃度は、具体的には、例えば、0.1～100 mg/mL、0.2～50 mg/mL、0.5～20 mg/mL、または1～10 mg/mLであつてもよい。「エンドウ豆発酵物の濃度」とは、特記しない限り、元の培養物の濃度に換算したエンドウ豆発酵物の濃度、元の培養上清の濃度に換算したエンドウ豆発酵物の濃度、または製品として提供および流通するエンドウ豆発酵物の濃度を意味するものとする。すなわち、例えば、「エンドウ豆発酵物の濃度が0.1 mg/mL以上である」とは、特記しない限り、元の培養物の濃度に換算したエンドウ豆発酵物の濃度、元の培養上清の濃度に換算したエンドウ豆発酵物の濃度、および製品として提供および流通するエンドウ豆発酵物の濃度の少なくともいずれかが0.1 mg/mL以上であればよい。例えば、培養後に2倍に濃縮した培養物を0.1 mg/mLとなるように培地に添加した場合、培地に

におけるエンドウ豆発酵物の濃度は、元の培養物の濃度に換算して、0.2 mg/mLである。

[0127] 培地がエンドウ豆タンパク質を含有する場合、培地におけるエンドウ豆タンパク質の濃度は、例えば、0.05 mg/mL以上、0.1 mg/mL以上、0.2 mg/mL以上、0.5 mg/mL以上、1 mg/mL以上、2 mg/mL以上、5 mg/mL以上、7 mg/mL以上、10 mg/mL以上、15 mg/mL以上、20 mg/mL以上、または30 mg/mL以上であってもよく、50 mg/mL以下、30 mg/mL以下、20 mg/mL以下、15 mg/mL以下、10 mg/mL以下、7 mg/mL以下、5 mg/mL以下、2 mg/mL以下、1 mg/mL以下、0.5 mg/mL以下、0.2 mg/mL以下、または0.1 mg/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。培地におけるエンドウ豆タンパク質の濃度は、具体的には、例えば、0.05～0.05 mg/mL、0.1～0.1 mg/mL、0.2～0.2 mg/mL、0.5～0.5 mg/mL、1～1 mg/mL、2～2 mg/mL、5～5 mg/mL、7～7 mg/mL、10～10 mg/mL、15～15 mg/mL、20～20 mg/mL、または30～50 mg/mLであってもよい。培地におけるエンドウ豆タンパク質の濃度は、具体的には、例えば、0.05～50 mg/mL、0.1～30 mg/mL、0.2～20 mg/mL、または0.5～15 mg/mLであってもよい。

[0128] 培地が酵母エキスを含有する場合、培地における酵母エキスの濃度は、例えば、0.01 mg/mL以上、0.02 mg/mL以上、0.05 mg/mL以上、0.1 mg/mL以上、0.2 mg/mL以上、0.5 mg/mL以上、1 mg/mL以上、2 mg/mL以上、または5 mg/mL以上であってもよく、10 mg/mL以下、5 mg/mL以下、2 mg/mL以下、1 mg/mL以下、0.5 mg/mL以下、0.2 mg/mL以下、0.1 mg/mL以下、0.05 mg/mL以下、または0.02 mg/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。培地における酵母エキスの濃度は、具体的には、例えば、0.01～0.02 mg/mL、0.02～0.05 mg/mL、0.05～0.1 mg/mL、0.1～0.2 mg/mL、0.2～0.5 mg/mL、0.5～1 mg/mL、1～2 mg/mL、2～5 mg/mL、または5～10 mg/mLであってもよい。培地における酵母エキスの濃度は、具体的には、例えば、0.01～10 mg/mL、0.02～5 mg/mL、0.05～2 mg/mL、または0.1～1 mg/mLであってもよい。「酵母エキスの濃度」とは、酵母エキスの乾燥重量に基づいて算出され

る酵母エキスの濃度を意味する。

[0129] 動物細胞の培養は、レシチンの存在下で実施されてもよい。「動物細胞の培養が或る成分（例えば、レシチン）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、レシチン）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。

[0130] 培地がレシチンを含有する場合、培地におけるレシチンの濃度は、例えば、0.1 $\mu\text{g/mL}$ 以上、0.2 $\mu\text{g/mL}$ 以上、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 以上、1 $\mu\text{g/mL}$ 以上、2 $\mu\text{g/mL}$ 以上、5 $\mu\text{g/mL}$ 以上、7 $\mu\text{g/mL}$ 以上、10 $\mu\text{g/mL}$ 以上、15 $\mu\text{g/mL}$ 以上、20 $\mu\text{g/mL}$ 以上、30 $\mu\text{g/mL}$ 以上、または50 $\mu\text{g/mL}$ 以上であってもよく、100 $\mu\text{g/mL}$ 以下、50 $\mu\text{g/mL}$ 以下、30 $\mu\text{g/mL}$ 以下、20 $\mu\text{g/mL}$ 以下、15 $\mu\text{g/mL}$ 以下、10 $\mu\text{g/mL}$ 以下、7 $\mu\text{g/mL}$ 以下、5 $\mu\text{g/mL}$ 以下、2 $\mu\text{g/mL}$ 以下、1 $\mu\text{g/mL}$ 以下、0.5 $\mu\text{g/mL}$ 以下、または0.2 $\mu\text{g/mL}$ 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。培地におけるレシチンの濃度は、具体的には、例えば、0.1~0.2 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2~0.5 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5~1 $\mu\text{g/mL}$ 、1~2 $\mu\text{g/mL}$ 、2~5 $\mu\text{g/mL}$ 、5~7 $\mu\text{g/mL}$ 、7~10 $\mu\text{g/mL}$ 、10~15 $\mu\text{g/mL}$ 、15~20 $\mu\text{g/mL}$ 、20~30 $\mu\text{g/mL}$ 、30~50 $\mu\text{g/mL}$ 、または50~100 $\mu\text{g/mL}$ であってもよい。培地におけるレシチンの濃度は、具体的には、例えば、0.1~100 $\mu\text{g/mL}$ 、0.2~50 $\mu\text{g/mL}$ 、0.5~30 $\mu\text{g/mL}$ 、または1~15 $\mu\text{g/mL}$ であってもよい。

[0131] 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。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。

[0132] 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。

[0133] 「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、動物細胞が筋芽細胞、筋細胞、または筋管細胞へ分化した後の培養の全期間の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以上の期間であってよい。

[0134] 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。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 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。

[0138] 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。

[0139] <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。

[0140] 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

[0141] 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。

[0142] (1) 無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞を用いたエンドウ豆醤油の活性評価

(1-1) ウシ筋肉幹細胞の調製

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、ウシ筋肉幹細胞とした。

[0143] (1-2) 無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞を用いたエンドウ豆醤油の活性評価

(1-1) で得られたウシ筋肉幹細胞を、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6 well plate (BD FALCON社, Cat #353046) に、4200~5300 cells/2 mL/cm²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、細胞を無血清培地またはエンドウ豆醤油含有無血清培地に継代し、隔日ごとに培地交換を行った。無血清培地として、StemFit[®] Basic03 (Ajinomoto社) 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。エンドウ豆醤油含有無血清培地として、無血清培地にエンドウ豆醤油 (San-J社, 製品名: No Soy Gluten Free Tamari) またはエンドウ豆醤油 (キッコーマン社, 製品名: いつでも新鮮 えんどうまめしょうゆ) を0.33%添加したものを用いた。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。

[0144] 結果を図1～2に示す。エンドウ豆醬油（San-J社）およびエンドウ豆醬油（キッコーマン社）は、いずれも、無血清培地においてウシ筋肉幹細胞の増殖を促進した。

[0145] [表1]

表 1

群番号	培地	添加物
1)	血清培地	添加なし
2)	無血清培地	添加なし
3)	エンドウ豆醬油含有無血清培地	0.33% エンドウ豆醬油（San-J 社）
4)	エンドウ豆醬油含有無血清培地	0.33% エンドウ豆醬油（キッコーマン社）

[0146] （1－3）エンドウ豆醬油と大豆醬油およびその他の抽出物との活性比較評価

（1－1）で得られたウシ筋肉幹細胞を、血清培地に懸濁した。細胞懸濁液を1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectinでコーティングした6 well plateに、5100～5300 cells/2 mL/cm²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、細胞を無血清培地またはエンドウ豆醬油含有無血清培地または大豆醬油含有無血清培地または大豆タンパク質酸加水分解物含有無血清培地または酵母エキス含有無血清培地に継代し、隔日ごとに培地交換を行った。無血清培地およびエンドウ豆醬油含有無血清培地については（1－2）に記載の通りである。大豆醬油含有無血清培地として、無血清培地に大豆醬油（キッコーマン社、製品名：いつでも新鮮 しぼりたて生しょうゆ 卓上ボトル）を0.38%添加したものをを用いた。大豆タンパク質酸加水分解物含有無血清培地として、無血清培地に大豆タンパク質酸加水分解物（Sigma社、Cat No. S1674）を0.5 mg/mLの終濃度で添加したものをを用いた。酵母エキス含有無血清培地として、無血清培地にBacto™ Yeast Extract（Thermo Fisher

Scientific社, Cat No. 212750) を0.5 mg/mLの終濃度で添加したものを用いた。表2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。

[0147] 結果を図3～4に示す。大豆醤油含有無血清培地において、ウシ筋肉幹細胞は増殖しなかった。大豆タンパク質加水分解物は、無血清培地においてウシ筋肉幹細胞の増殖を部分的に促進したが、エンドウ豆醤油よりも効果は低かった。酵母エキ스는、無血清培地においてウシ筋肉幹細胞の増殖を促進した。

[0148] [表2]

表2

群番号	培地	添加物
1)	血清培地	添加なし
2)	無血清培地	添加なし
3)	エンドウ豆醤油含有無血清培地	0.33% エンドウ豆醤油 (San-J 社)
4)	大豆醤油含有無血清培地	0.38% 大豆醤油
5)	大豆タンパク質加水分解物含有 無血清培地	0.5 mg/mL 大豆タンパク質加水分解物
6)	酵母エキス含有無血清培地	0.5 mg/mL Bacto™ Yeast Extract

[0149] (1-4) エンドウ豆醤油とエンドウ豆タンパク質加水分解物との活性比較評価

(1-1) で得られたウシ筋肉幹細胞を、血清培地に懸濁した。細胞懸濁液を1 μg/cm² fibronectinでコーティングした6 well plateに、5300 cells/2 mL/cm²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、細胞を無血清培地またはエンドウ豆醤油含有無血清培地またはエンドウ豆タンパク質加水分解物含有無血清培地に継代し、隔日ごとに培地交換を行った。無血清培地およびエンドウ豆醤油含有無血清培地については(1-2)に記載の通りである。エンドウ豆タンパク質加水分解物含有無

血清培地として、無血清培地にPea peptone (ORGANOTECHNIE社) を0.46 mg/mLの終濃度で添加したものをを用いた。表3に群番号と培地をまとめた。4日ごと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。

[0150] 結果を図5～6に示す。エンドウ豆タンパク質加水分解物は、無血清培地においてウシ筋肉幹細胞の増殖を部分的に促進したが、エンドウ豆醤油よりも効果は低かった。

[0151] [表3]

表3

群番号	培地	添加物
1)	無血清培地	添加なし
2)	エンドウ豆醤油含有無血清培地	0.33% エンドウ豆醤油 (San-J 社)
3)	エンドウ豆タンパク質加水分解物含有無血清培地	0.46 mg/mL Pea peptone

[0152] (2) 無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞を用いたエンドウ豆タンパク質の活性評価

(2-1) ウシ筋肉幹細胞の調製

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、ウシ筋肉幹細胞とした。

[0153] (2-2) 無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞を用いた植物性タンパク質の活性評価

(2-1) で得られたウシ筋肉幹細胞を、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) を添加したものをを用いた。細胞懸濁液を1 μ g/cm² fibronectin (Corning社, Cat

#F2006) でコーティングした6 well plate (BD FALCON社, Cat # 353046) に、4200～5300 cells/2 mL/cm²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、細胞を無血清培地またはエンドウ豆タンパク質含有無血清培地に継代し、隔日ごとに培地交換を行った。無血清培地として、StemFit[®] Basic03 (Ajinomoto社) のアルブミンをオミットした培地に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) および0.33%エンドウ豆醤油 (San-J社, 製品名: No Soy Gluten Free Tamari) を添加したものをを用いた。エンドウ豆タンパク質含有無血清培地として、無血清培地に2.5 g/L エンドウ豆タンパク質 (Roquette社, 製品名: NUTRALY S S85F; タンパク質含有量約85%) を添加したものをを用いた。また、エンドウ豆タンパク質以外の7種類の植物性タンパク質についても、表4に示す濃度で無血清培地に添加して植物性タンパク質含有無血清培地を調製し、評価した: 小麦アルブミン (日清ファルマ社, 製品名: NA-1)、大麦/米タンパク質 (Zea10社, 製品名: Beretein™Barley and Rice Protein)、カボチャ種子タンパク質 (Shinhigh International Crops社, 製品名: Organic Pumpkin seed protein)、緑豆タンパク質 (オルガノフードテック社, 製品名: オルプロテイン[®] MP-AC)、ムング豆タンパク質 (Shinhigh International Crops社, 製品名: Mung bean protein)、ナタネタンパク質 (Merit Functional Foods社, 製品名: Puratein[®]C Canola Protein)、麻の実タンパク質 (Jinzhou Qiaopai Biotech社, 製品名: Hemp Protein 60%)。表4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。

[0154] 結果を図7～8に示す。エンドウ豆タンパク質、カボチャ種子タンパク質、緑豆タンパク質、ムング豆タンパク質、ナタネタンパク質にウシ筋肉幹細胞の細胞増殖促進作用が認められ、特に、エンドウ豆タンパク質に最も高い活性が認められた。

[0155]

[表4]

表 4

群番号	添加物
1)	添加なし
2)	2.5 g/L 小麦アルブミン
3)	2.5 g/L 大麦/米タンパク質
4)	2.5 g/L エンドウ豆タンパク質
5)	2.5 g/L カボチャ種子タンパク質
6)	2.5 g/L 緑豆タンパク質
7)	2.5 g/L ムング豆タンパク質
8)	2.5 g/L ナタネタンパク質
9)	2.5 g/L 麻の実タンパク質

[0156] (2-3) 無血清培地におけるウシ筋肉幹細胞を用いた大豆タンパク質の活性評価

(2-1) で得られたウシ筋肉幹細胞を、血清培地に懸濁した。血清培地については(2-2)に記載の通りである。細胞懸濁液を1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectinでコーティングした6 well plateに、5300 cells/2 mL/cm²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、細胞を無血清培地または大豆タンパク質含有無血清培地に継代し、隔日ごとに培地交換を行った。無血清培地として、StemFit[®] Basic03 (Ajinomoto社) に10 ng/mL bbFGF および20 ng/mL EGFおよび5 ng/mL HGFおよび0.5 g/L 大豆タンパク質酸加水分解物 (Sigma社, Cat No. S1674) を添加したものをを用いた。大豆タンパク質含有無血清培地として、無血清培地に2.5 g/L 大豆タンパク質 (日本植物蛋白食品協会, 製品名: 粉末状大豆たん白) を添加したものをを用いた。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8日目までの増殖速度を計算した。

[0157] 結果を図9に示す。大豆タンパク質は、無血清培地においてウシ筋肉幹細胞

胞の増殖を促進しなかった。

[0158] (2-3) 異なるエンドウ豆タンパク質の活性比較評価

(2-1) で得られたウシ筋肉幹細胞を、血清培地に懸濁した。血清培地については(2-2)に記載の通りである。細胞懸濁液を1 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectinでコーティングした6 well plateに、5300 cells/2 mL/cm²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、細胞を無血清培地またはエンドウ豆タンパク質含有無血清培地に継代し、隔日ごとに培地交換を行った。無血清培地として、StemFit[®] Basic03 (Ajinomoto社) に10 ng/mL bbFGF および20 ng/mL EGFおよび5 ng/mL HGFおよびBacto[™] Yeast Extract (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 212750) を添加したものをを用いた。エンドウ豆タンパク質含有無血清培地として、無血清培地に2.5 g/L エンドウ豆タンパク質 (Roquette社, 製品名: NUTRALYS S85F; タンパク質含有量約85%) または2.5 g/L エンドウ豆タンパク質 (HENGYUAN BIOTECHNOLOGY社, 製品名: HYPP-A85%) を添加したものをを用いた。表5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。

[0159] 結果を図10～11に示す。いずれのエンドウ豆タンパク質も、無血清培地においてウシ筋肉幹細胞の増殖を促進した。

[0160] [表5]

表5

群番号	添加物
1)	添加なし
2)	2.5 g/L エンドウ豆タンパク質 (NUTRALYS S85F)
3)	2.5 g/L エンドウ豆タンパク質 (HYPP-A85%)

[0161] (2-4) エンドウ豆醤油とエンドウ豆タンパク質の組み合わせによる活性評価

(2-1) で得られたウシ筋肉幹細胞を、血清培地に懸濁した。血清培地

については（２－２）に記載の通りである。細胞懸濁液を $1\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ fibronectinでコーティングした6 well plateに、 $4200\ \text{cells}/2\ \text{mL}/\text{cm}^2$ 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、細胞を無血清培地またはエンドウ豆由来物含有無血清培地に継代し、隔日ごとに培地交換を行った。無血清培地として、StemFit[®] Basic03（Ajinomoto社）に $10\ \text{ng}/\text{mL}$ bbFGF および $20\ \text{ng}/\text{mL}$ EGFおよび $5\ \text{ng}/\text{mL}$ HGFを添加したものをを用いた。エンドウ豆由来物含有無血清培地として、無血清培地に 0.33% エンドウ豆醤油、または $2.5\ \text{g}/\text{L}$ エンドウ豆タンパク質（Roquette社、製品名：NUTRALYS S85F；タンパク質含有量約 85% ）、または $2.5\ \text{g}/\text{L}$ エンドウ豆タンパク質（HENGYUAN BIOTECHNOLOGY社、製品名：HYPP-A85%）、または 0.33% エンドウ豆醤油および $2.5\ \text{g}/\text{L}$ エンドウ豆タンパク質、または 0.33% エンドウ豆醤油および $2.5\ \text{g}/\text{L}$ エンドウ豆タンパク質および大豆レシチン（辻製油社、製品名：SLP-ホワイト）を添加したものをを用いた。表６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。

[0162] 結果を図１２～１３に示す。エンドウ豆醤油およびエンドウ豆タンパク質を組み合わせることにより、細胞増殖が顕著に促進された。また、エンドウ豆醤油およびエンドウ豆タンパク質および大豆レシチンを組み合わせることにより、細胞増殖がさらに促進された。

[0163]

[表6]

表 6

群番号	培地	添加物
1)	無血清培地	添加なし
2)	エンドウ豆醤油含有無血清培地	0.33% エンドウ豆醤油
3)	エンドウ豆タンパク質含有 無血清培地	2.5 g/L エンドウ豆タンパク質 (NUTRALYS S85F)
4)	エンドウ豆醤油および エンドウ豆タンパク質含有 無血清培地	0.33% エンドウ豆醤油および 2.5 g/L エンドウ豆タンパク質 (NUTRALYS S85F)
5)	エンドウ豆醤油および エンドウ豆タンパク質および 大豆レシチン含有無血清培地	0.33% エンドウ豆醤油および 2.5 g/L エンドウ豆タンパク質 (NUTRALYS S85F) および 10 mg/L 大豆レシチン
1')	無血清培地	添加なし
2')	エンドウ豆醤油含有無血清培地	0.33% エンドウ豆醤油
3')	エンドウ豆タンパク質含有 無血清培地	2.5 g/L エンドウ豆タンパク質 (HYPP-A85%)
4')	エンドウ豆醤油および エンドウ豆タンパク質含有 無血清培地	0.33% エンドウ豆醤油および 2.5 g/L エンドウ豆タンパク質 (HYPP-A85%)
5')	エンドウ豆醤油および エンドウ豆タンパク質および 大豆レシチン含有無血清培地	0.33% エンドウ豆醤油および 2.5 g/L エンドウ豆タンパク質 (HYPP-A85%) および 10 mg/L 大豆レシチン

[0164] (3) 無血清培地におけるヒト筋肉幹細胞を用いたエンドウ豆醤油の活性評価

(3-1) ヒト筋肉幹細胞の調製

人胎児由来のヒト筋肉幹細胞 (SCR社, Cat No. 3510) から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、ヒト筋肉幹細胞とした。ヒト筋肉幹細胞はPAX7とMyoDを発現していた。

[0165] (3-2) 無血清培地におけるヒト筋肉幹細胞を用いたエンドウ豆醤油の活性評価

(3-1) で得られたヒト筋肉幹細胞を血清培地に懸濁した。血清培地として、DMEM (Wako社, Cat No. 043-30085)に、10% FBS (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 10099141)および1% Chick Embryo Extract (United States Biological社, Cat No. C3999)を添加したものをを用いた。細胞懸濁液をポリ-L-リジンコート 96wellプレート (IWAKI社, Cat No. 4020-040) に各ウェル 1×10^3 cells/75 uL播種し、2時間後に細胞の接着を確認してから終濃度の2倍濃度のエンドウ豆醤油非含有無血清培地またはエンドウ豆醤油含有無血清培地または酵母エキス含有無血清培地を75 uL添加した。3日間の培養後、Cell Count Reagent SF (Nacalai Tesque社, Cat No. 07553-15) を各ウェルに添加し、再びCO₂インキュベーター内で2時間培養した。培養後、マイクロプレートリーダーを用いて450 nmの吸光度を測定し、細胞増殖能を評価した。エンドウ豆醤油非含有無血清培地として、DMEM に1% Chick Embryo Extract を添加したものをを用いた。エンドウ豆醤油含有無血清培地として、エンドウ豆醤油非無血清培地にエンドウ豆醤油 (San-J社, 製品名 : No Soy Gluten Free Tamari) を0.1%または0.33%添加したものをを用いた。酵母エキス含有無血清培地として、エンドウ豆醤油非無血清培地にBacto™ Yeast Extract (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 212750) を0.2 mg/mL または0.5 mg/mLの終濃度で添加したものをを用いた。表7に群番号と培地をまとめた。

[0166] 結果を図14に示す。エンドウ豆醤油および酵母エキスは、いずれも無血清培地においてヒト筋肉幹細胞の増殖を促進した。

[0167] [表7]

表7

群番号	培地	添加物
1)	エンドウ豆醤油非含有無血清培地	添加なし
2)	エンドウ豆醤油含有無血清培地 1	0.1% エンドウ豆醤油
3)	エンドウ豆醤油含有無血清培地 2	0.33% エンドウ豆醤油
4)	酵母エキス含有無血清培地 1	0.2 mg/mL Bacto™ Yeast Extract
5)	酵母エキス含有無血清培地 2	0.5 mg/mL Bacto™ Yeast Extract

[0168] (4) 無血清培地におけるニワトリ筋肉幹細胞を用いたエンドウ豆醤油の分化活性評価

(4-1) ニワトリ筋肉幹細胞の調製

食用のニワトリの胸肉から筋肉幹細胞を単離した。ニワトリ筋肉幹細胞はPAX7を発現していた。

[0169] (4-2) 無血清培地におけるニワトリ筋肉幹細胞を用いたエンドウ豆醤油の分化活性評価

(4-1) で得られたニワトリ筋肉幹細胞を、血清培地に懸濁した。血清培地として、DMEM (ナカライテスク社, Cat No. 08456-65) に、10% ニワトリ血清 (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 16110-082) および5% ウマ血清 (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 16050-130) を添加したものをを用いた。細胞懸濁液を10 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ゼラチン (Sigma社, Cat No. G1393-20ML) でコーティングした96 well plateに、60,000 cellsの細胞密度となるように播種し、翌日に血清分化培地または無血清分化培地に交換した。血清分化培地として、DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 08460-95) に2% FBS (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 26140-079) を添加した培地を用いた。無血清分化培地として、エンドウ豆醤油非含有無血清分化培地またはエンドウ豆醤油含有無血清分化培地またはエンドウ豆タンパク質含有無血清分化培地または大豆醤油含有無血清分化培地または大豆タンパク質加水分解物含有無血清分化培地または酵母エキス含有無血清分化培地を用いた。エンドウ豆醤油非含有無血清分化培地として、DMEM/F12に1% NEAA (Thermo Fisher Scientific社, Cat No. 11140050)、1 mM Glutamine (味の素ヘルシーサプライ社)、73 mg/mL 0.2%セレン酵母 (メディエンス社)、30 ng/mL IGF-1 (Laurus Bio社, Cat No. Rc LR3-IGF-1)、10 ug/mL Transferrin (Laurus Bio社, Cat No. RTRF-P) を添加した培地を用いた。エンドウ豆醤油含有無血清分化培地またはエンドウ豆タンパク質含有無血清分化培地または大豆醤油含有無血清分化培地または大豆タンパク質加水分解物含有無血清分化培地または酵母エキス含有無血清分化培地として、エンドウ豆醤油非含有無血清分

化培地に表8に示す添加物をそれぞれ添加したものをを用いた。表8に群番号と培地をまとめた。

[0170] その後、1日おきに培地交換し、6日目にmyosin heavy chain (MyHC) の発現を免疫染色法により測定した。細胞を4%パラホルムアルデヒド（ナカライテスク社, Cat No. 09154-85）で15分間固定した。ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（Ca, Mg 不含）（ナカライテスク社, Cat No. 14249-24）で2回洗浄後、0.1% Triton X-100（Sigma社, Cat No. T9284）を含むダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（Ca, Mg 不含）に10分間浸した。その後、ブロッキングバッファーに交換して1時間静置した。ブロッキングバッファーとして、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（Ca, Mg 不含）に5%ウマ血清および0.1% Triton X-100を添加したものをを用いた。その後、0.2% Anti-Myosin Heavy Chain Antibody, clone A4.1025（Merck社, Cat No. 05-716-I-25UL）を含むブロッキングバッファーに置換して4℃で一晩静置した。翌日、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（Ca, Mg 不含）で3回洗浄後、0.1% Goat anti-Mouse IgG2a Antibody, Alexa Fluor 555（Thermo Fisher Scientific社, Cat No. A21137）および0.1% Cellstain Hoechst 33342 溶液（同仁化学研究所, Cat No. H342）を含むブロッキングバッファーに置換して常温で1時間静置した。その後、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（Ca, Mg 不含）で3回洗浄後、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（Ca, Mg 不含）に置換した。蛍光顕微鏡ECLIPSE Ti2-E（Nikon社）にてMyHC 陽性細胞を検出し、Fusion Index（ $\text{Fusion Index} = \text{MyHC陽性核数} / \text{全核数} \times 100 (\%)$ ）を算出した。

[0171] 結果を図15～16に示す。大豆醤油非含有無血清分化培地を用いた場合に比べて、エンドウ豆醤油含有無血清分化培地、エンドウ豆タンパク質含有無血清分化培地、大豆タンパク酸加水分解物含有無血清分化培地、および酵母エキス含有無血清分化培地を用いることで、ニワトリ筋肉幹細胞の筋分化が促進された（図15）。また、筋分化後の核数の計測結果より、これらの培地を用いた分化誘導過程において、細胞数が増加していた（図16）。

[0172]

[表8]

表 8

群番号	培地	添加物
1)	血清分化培地	添加なし
2)	エンドウ豆醤油非含有 無血清分化培地	添加なし
3)	エンドウ豆タンパク質含有 無血清分化培地	2.5 g/L エンドウ豆タンパク質
4)	エンドウ豆醤油含有 無血清分化培地	0.33% エンドウ豆醤油
5)	大豆醤油含有無血清分化培地	0.38% 大豆醤油
6)	大豆タンパク酸加水分解物含有 無血清分化培地	0.5 mg/mL 大豆タンパク酸加水分解物
7)	酵母エキス含有無血清分化培地	0.5 mg/mL Bacto™ Yeast Extract

産業上の利用可能性

[0173] 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] エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスを含有する、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] 前記エンドウ豆由来素材が、エンドウ豆発酵物および／またはエンドウ豆タンパク質である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項6] 前記エンドウ豆発酵物が、エンドウ豆醤油である、請求項5に記載の組成物。
- [請求項7] 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8] 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9] 前記動物が、ウシまたは鶏である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項10] 前記細胞が、MyoD＋細胞またはPAX7＋細胞である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項11] 前記細胞が、筋芽細胞または衛星細胞である、請求項1または2に記載の組成物。
- [請求項12] 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13] 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14] 産物の製造方法であって、
エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスの存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。

- [請求項15] 前記産物が、培養肉である、請求項14に記載の方法。
- [請求項16] 動物細胞を培養する方法であって、
エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスの存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。
- [請求項17] 動物細胞の生育を向上させる方法であって、
エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスの存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。
- [請求項18] 動物細胞の分化を促進する方法であって、
エンドウ豆由来素材および／または酵母エキスの存在下で動物細胞を培養する工程を含む、方法。
- [請求項19] 前記エンドウ豆由来素材が、エンドウ豆発酵物および／またはエンドウ豆タンパク質である、請求項14～18のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項20] 前記エンドウ豆発酵物が、エンドウ豆醤油である、請求項19に記載の方法。
- [請求項21] 前記培養時の培地における前記エンドウ豆発酵物の濃度が、0.1～100 mg/mLである、請求項19に記載の方法。
- [請求項22] 前記培養時の培地における前記エンドウ豆タンパク質の濃度が、0.05～50 mg/mLである、請求項19に記載の方法。
- [請求項23] 前記動物が、哺乳類、鳥類、魚類、または甲殻類である、請求項14～18のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項24] 前記動物が、食肉用の動物である、請求項14～18のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項25] 前記動物が、ウシまたは鶏である、請求項14～18のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項26] 前記細胞が、MyoD+細胞またはPAX7+細胞である、請求項14～18のいずれか一項に記載の方法。
- [請求項27] 前記細胞が、筋芽細胞または衛星細胞である、請求項14～18の

いずれか一項に記載の方法。

[請求項28] 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14～18のいずれか一項に記載の方法。

[請求項29] 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14～18のいずれか一項に記載の方法。