

明 細 書

発明の名称：動物細胞培養用基礎培地用組成物

技術分野

[0001] 本発明は、動物細胞培養用基礎培地用組成物およびその利用、動物細胞の培養方法等に関する。

背景技術

[0002] 細胞培養とは、生体組織から分離した細胞を培養液中で増殖・維持することである。近年に、培養肉の開発など、特に動物細胞の、生体外での培養の研究がすすんでいる。動物細胞を培養するために用いられる培地は、一般的に、無機塩、炭水化物、アミノ酸、ビタミン、タンパク質、ペプチド脂肪酸、脂質、血清などから構成される。

[0003] 「細胞農業」とは、動物や植物から採取した細胞に栄養を直接与えることで細胞を増殖させ、それを食品として生産する技術である。細胞農業技術を用いて生産した肉や魚などを総称して、「細胞性食品」と呼称する。細胞性食品のうち、「肉」に該当するものを「培養肉」と呼称する場合がある。

[0004] 細胞性食品は、食品安全保障や環境負荷の低減などの観点から、世界中で開発が進んでいる。細胞性食品の事業化には、食品製造に適した原料・製造プロセスであることと、製造コストの低下の2項目が特に重要である。インテグリカルチャー株式会社（東京都文京区、日本）は、細胞性食品の製造で最も重要な要素である基礎培地用組成物を、食品として認可されている食品添加物原料のみで再現したI-MEM 1.0の研究開発に成功した（プレスリリースPRTIMES 「インテグリカルチャー、独自開発のすべて食品原料から成る基礎培地用組成物「I-MEM（アイメム）」を10月26日（水）から世界で受注開始」；<https://prtimes.jp/main/html/rd/p/000000025.000034252.html>）。

[0005] I-MEM 1.0は、細胞培養肉などの製造で大きな課題だった培地の

成分の食品化や製造コストの削減をもたらすものである。しかしながら、製造コストの低下に関しては、I-MEM 1.0でも十分とは言えず、より安価で安全な基礎培地用組成物の開発が求められている。

[0006] 特表2005-532057は、細胞を培養するための動物性たんぱく質非含有培地を記載している。特表2005-532057の請求項1および2は以下の通りである。

〔請求項1〕 ダイズ加水分解物および酵母加水分解物を含む、動物性タンパク質非含有細胞培養培地。

〔請求項2〕 請求項1に記載の動物性タンパク質非含有細胞培養培地であって、前記ダイズ加水分解物は、少なくとも0.05% (w/v) の濃度で存在し、酵母加水分解物は、少なくとも0.05% (w/v) の濃度で存在する、動物性タンパク質非含有細胞培養培地。

[0007] 請求項1および2の記載からも理解される通り、特表2005-532057の培地は、大豆加水分解物を必須成分として含む。さらに、特表2005-532057における細胞の培養は、ウイルス、組換えタンパク質などの生物学的生成物を細胞中で生成することを主目的とする（特表2005-532057の例えば、請求項23、段落[0011]、[0012]等）。

[0008] 動物細胞培養用の培地で食品として用いることができ、培養性を維持しつつ、食品添加物などの使用を抑え、環境負荷の少ない培地の開発が希求されていた。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：特表2005-532057

非特許文献

[0010] 非特許文献1：プレスリリースPRTIMES 「インテグリカルチャー、独自開発のすべて食品原料から成る基礎培地「I-MEM（アイメム）」を10月26日（水）から世界で受注開始」；<https://prtimes>

. j p / m a i n / h t m l / r d / p / 0 0 0 0 0 0 0 2 5 . 0 0 0 0 3
4 2 5 2 . h t m l

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明者らは、上記問題解決のために、鋭意研究に努めた結果、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM培地）の組成の一部を酵母エキスを置き換え、さらにシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンを加えることで、食品添加物であるアミノ酸の添加を抑えながら従来のDMEM培地と同様の培養性を維持することを見出し、本発明を想到した。

課題を解決するための手段

[0012] 限定されるわけではないが、本発明は、以下の態様を含む。

[0013] 1

[1]

酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖を含む動物細胞用基礎培地用組成物であって、前記組成物中のアミノ酸が、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンを含む、前記動物細胞用基礎培地用組成物。

[2]

前記組成物中の全アミノ酸の含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.002～1.0質量部である、[1]に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[3]

前記組成物中の全アミノ酸に対する、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの割合が、50%以上である、[1]または[2]に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[4]

前記組成物中のシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.001～1.0質量部である、[1]～[3]のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成

物。

[5]

前記組成物中のシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.1～5.0質量部である、[1]－[4]のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[6]

前記組成物中のシスチンおよび／またはシステインの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.0001～0.02質量部である、[1]－[5]のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[7]

前記組成物中のシスチンおよび／またはシステインの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.005～1.0質量部である、[1]－[6]のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[8]

前記組成物中のグルタミンの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.001～1.0質量部である、[1]－[7]のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[9]

前記組成物中のグルタミンの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.1～5.0質量部である、[1]－[8]のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[10]

前記酵母抽出物が、高アミノ酸型の酵母抽出物である、[1]－[9]のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[11]

前記酵母抽出物の総アミノ酸含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.75質量部以上である、[1]－[10]のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[1 2]

前記酵母抽出物が、低核酸型の酵母抽出物である、[1] – [1 1] のいずれか 1 項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[1 3]

前記酵母抽出物の総核酸含量が、基礎培地用組成物を 1 0 0 としたときに 2 . 0 質量部以下である、[1 – [1 2] のいずれか 1 項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[1 4]

前記酵母抽出物が、高アミノ酸型かつ低核酸型の酵母抽出物である、[1] – [1 3] のいずれか 1 項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[1 5]

前記酵母抽出物の含量が、基礎培地用組成物を 1 0 0 としたときに 0 . 0 5 ~ 2 0 . 0 質量部である、[1] – [1 4] のいずれか 1 項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[1 6]

さらにビタミンを含む、[1] または [2] に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

[1 7]

酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖を含み、アミノ酸がシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンである、動物細胞用基礎培地で、動物細胞を培養することを含む、動物細胞の培養方法。

[1 8]

前記酵母抽出物が、高アミノ酸型の酵母の抽出物、低核酸型の酵母の抽出物、または、高アミノ酸型かつ低核酸型の酵母の抽出物である、[1 7] に記載の培養方法。

[1 9]

[1 7] または [1 8] に記載の培養方法によって培養された動物細胞。

[2 0]

〔 1 9 〕 の動物細胞を含む、加工食品。

[0014] | |

〔 1 〕

酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖を含む動物細胞用基礎培地であって、前記アミノ酸がシスチンおよびグルタミンである、前記動物細胞用基礎培地。

〔 2 〕

前記アミノ酸の含量が、基礎培地を 1 0 0 としたときに 0 . 0 0 5 ~ 1 . 0 質量部である、〔 1 〕 に記載の動物細胞用基礎培地。

〔 3 〕

前記アミノ酸のうち、シスチンおよびグルタミンの割合が、5 0 % 以上である、〔 1 〕 または〔 2 〕 に記載の動物細胞用基礎培地。

〔 4 〕

前記アミノ酸のうち、シスチンおよびグルタミンの含量が、基礎培地を 1 0 0 としたときに 0 . 0 0 2 5 ~ 1 . 0 質量部である、〔 1 〕 または〔 2 〕 に記載の動物細胞用基礎培地。

〔 5 〕

前記酵母抽出物が、高アミノ酸型の酵母抽出物である、〔 1 〕 または〔 2 〕 に記載の動物細胞用基礎培地。

〔 6 〕

前記酵母抽出物の総アミノ酸含量が、基礎培地を 1 0 0 としたときに 0 . 7 5 質量部以上である、〔 1 〕 または〔 2 〕 に記載の動物細胞用基礎培地。

〔 7 〕

前記酵母抽出物が、低核酸型の酵母抽出物である、〔 1 〕 または〔 2 〕 に記載の動物細胞用基礎培地。

〔 8 〕

前記酵母抽出物の総核酸含量が、基礎培地を 1 0 0 としたときに 2 . 0 質量部以下である、〔 1 〕 または〔 2 〕 に記載の動物細胞用基礎培地。

[9]

前記酵母抽出物が、高アミノ酸型かつ低核酸型の酵母抽出物である、[1] または [2] に記載の動物細胞用基礎培地。

[1 0]

前記酵母抽出物の含量が、基礎培地を 1 0 0 としたときに 0 . 0 5 ~ 2 0 . 0 質量部である、[1] または [2] に記載の動物細胞用基礎培地。

[1 1]

さらにビタミンを含む、[1] または [2] に記載の動物細胞用基礎培地。

[1 2]

前記無機塩として、塩化カルシウムを含む、[1] または [2] に記載の動物細胞用基礎培地。

[1 3]

酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖を含み、アミノ酸がシスチンおよびグルタミンである、動物細胞用基礎培地で、動物細胞を培養することを含む、動物細胞の培養方法。

[1 4]

前記酵母抽出物が、高アミノ酸型の酵母の抽出物である、[1 3] の培養方法

[1 5]

前記酵母抽出物が、低核酸型の酵母の抽出物である、[1 3] の培養方法。

[1 6]

前記酵母抽出物が、高アミノ酸型かつ低核酸型の酵母の抽出物である、[1 3] の培養方法。

[1 7]

[1 3] の培養方法によって培養された動物細胞。

[1 8]

[17] の動物細胞を含む、加工食品。

[19]

酵母抽出物の、アミノ酸、無機塩および糖と組み合わせた、動物細胞用基礎培地への使用であって、ここにおいて、前記アミノ酸がシスチンおよびグルタミンである、前記使用。

発明の効果

[0015] 酵母エキ스는、酵母が持つアミノ酸やペプチド、核酸が含まれた調味料である。本発明は、培地組成の一部を酵母エキ스에置き換えることで、従来の市販の基礎培地用組成物と比べて組成物に添加する成分を減少させ、動物細胞の培養に要するコストと環境負荷の低減を可能にした。

図面の簡単な説明

[0016] [図1] 図1は、実施例1の最低限添加が必要なアミノ酸種の検討における、細胞画像の結果を示す。

[図2] 図2は、実施例2のMDBK細胞およびHDFa細胞を用いた培養試験における、細胞画像の結果を示す。

[図3] 図3は、実施例4において各種酵母エキ스를使用した場合の、生細胞数を450nm吸光度測定により比較した結果を示す。各継代において、左より、DMEM、P.C.（ポジティブコントロール）、酵母エキスA、酵母エキスB、酵母エキスC、酵母エキスD、N.C.（ネガティブコントロール）の結果である。

[図4] 図4は、実施例5において、酵母エキスA、Bを使用し、酵母エキ스의添加量を2.0g/Lに増やし、塩化カルシウムを基礎培地に加えた場合の、生細胞数を450nm吸光度測定により比較した結果を示す。各継代において、左より、P.C.（ポジティブコントロール）、酵母エキスA、酵母エキスB、N.C.（ネガティブコントロール）の結果である。

[図5] 図5は、実施例6において、酵母エキスA、酵母エキスA-Bを使用し、ニワトリから摘出した各種臓器由来細胞を培養した場合の、3継代目時点の生細胞数を計測した結果である。P.C.（ポジティブコントロール）、

酵母エキスA、酵母エキスA-Bにおいて左より、肝臓、筋肉、肺、腎臓および脳の各組織の結果を示す。

[図6]図6は、実施例7において酵母エキスAを用いて、RL34細胞（ラット正常肝臓由来細胞）を培養した場合の細胞数を調べた結果を示す。縦軸は、ポジティブコントロールであるDMEM培地を用いて培養した場合の細胞数を1.0とした場合の値である。横軸のP1、P2、P3は、各々1継代目、2継代目、3継代目の結果を示す。

[図7]図7は、実施例7において酵母エキスAを用いて、MDBK細胞（ウシ正常腎臓由来細胞）を培養した場合の細胞数を調べた結果を示す。縦軸は、ポジティブコントロールであるDMEM培地を用いて培養した場合の細胞数を1.0とした場合との値である。横軸のP1、P2、P3は、各々1継代目、2継代目、3継代目の結果を示す。

[図8]図8は、実施例7において酵母エキスAを用いて、ウシ筋肉由来細胞を培養した場合の細胞数を調べた結果を示す。縦軸は、ポジティブコントロールであるDMEM培地を用いて培養した場合の細胞数を1.0とした場合との値である。横軸のP1、P2、P3は、各々1継代目、2継代目、3継代目の結果を示す。

[図9]図9は、実施例8において種々のアミノ酸添加量の基礎培地を用いてMDBK細胞を3回継代培養した結果である。図9の縦軸は、生細胞数である。

[図10]図10は、Ｌ-システインまたはＬ-シスチンを含む基礎培地を用いて、MDBK細胞（株化細胞）（図10A）、RL34細胞（株化細胞）（図10B）、アヒル肝臓由来細胞（初代培養細胞）（図10C）を3回継代培養した結果である。図10の縦軸は、3回継代培養後の生細胞数である。

発明を実施するための形態

[0017] 非限定的に本発明は、以下の態様を含む。本明細書において他に断りがないう限り、本明細書で使用される技術および科学用語は、当業者が通常理解している意味と同じ意味を有する。本明細書に開示された物質、材料および例

は単なる例示であり、制限することを意図していない。本明細書において「一態様において」と言及する場合は、その態様に限定されない、即ち、非限定的であることを意味する。

[0018] 1. 動物細胞培養基礎培地用組成物

一態様において、本発明は、動物細胞用基礎培地用組成物に関する。

[0019] 前記動物細胞用基礎培地用組成物は、酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖を含み、前記組成物中のアミノ酸が、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンを含む。一態様において、前記動物細胞用基礎培地用組成物は、酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖からなり、前記アミノ酸がシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンである。

[0020] 前記動物細胞用基礎培地用組成物中の全アミノ酸の含量は特に限定されない。ここにおける、前記「全アミノ酸」は、動物細胞用基礎培地用組成物の構成成分であり、アミノ酸単体として、動物細胞用基礎培地用組成物に添加されるものであり、後述する酵母抽出物に含まれるアミノ酸とは区別される。「全アミノ酸」とは、前記組成物中の必須成分として含まれるシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンに加え、動物細胞用基礎培地用組成物に添加される、その他の種類のアミノ酸を含む。

[0021] 非限定的に、前記組成物中の全アミノ酸の含量が、基礎培地用組成物を100としたときに5.0質量部以下、3.0質量部以下、2.0質量部以下、1.0質量部以下、0.5質量部以下、0.1質量部以下、0.08質量部以下、0.07質量部以下である。非限定的に、前記組成物中の全アミノ酸の含量が、基礎培地用組成物を100としたときに、0.0005質量部以上、0.001質量部以上、0.002質量部以上、0.003質量部以上、0.004質量部以上、0.005質量部以上、0.01質量部以上、0.03質量部以上、0.05質量部以上、0.06質量部以上である。

[0022] 非限定的に、前記組成物中の全アミノ酸の含量が、基礎培地用組成物を100としたときに、0.0005～5.0質量部、0.001～5.0質量部、0.001～3.0質量部、0.002～3.0質量部、0.002～

2.0質量部、0.002～1.0質量部、0.003～2.0質量部、0.005～1.0質量部、0.01～0.5質量部、0.03～0.1質量部、0.002質量部～0.07質量部、0.004質量部～0.07質量部である。好ましくは、前記アミノ酸の含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.002～1.0質量部である。

[0023] シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの割合は特に限定されない。シスチンおよび／またはシステインとグルタミンが同量でもよく、あるいは、いずれかの方が多くてもよい。好ましくは、グルタミンの方が多い。一態様において、質量で、グルタミンがシスチンおよび／またはシステインの1.5倍以上、2倍以上、3倍以上、5倍以上、8倍以上、10倍以上である。一態様において、グルタミンがシスチンおよび／またはシステインの約1.2倍である。

[0024] シスチン、システイン、およびグルタミンはL体でもD体でもよい。シスチン、システイン、およびグルタミンの一部がL体で、残りがD体でもよい。一態様においてシスチン、システインおよびグルタミンはL体である。

[0025] 「前記組成物中のアミノ酸が、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンを含む。」とは、前記アミノ酸の主成分が、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンであることを意味する。一態様において、前記組成物中の全アミノ酸に対する、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの割合が、50%以上である。一態様において、前記組成物中の全アミノ酸に対する、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの割合が、55%以上、60%以上、65%以上、70%以上、75%以上、80%以上、85%以上、90%以上、93%以上、95%以上、98%以上、99%以上である。一態様において、前記組成物中の全アミノ酸に対する、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの割合が、100%である。しかしながら、「シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの割合が100%」に限定されず、前記組成物に、他のアミノ酸が多く添加されている場合の方が、栄養値があがり増殖能が

増す可能性も推察される。

[0026] 非限定的に、前記組成物中のアミノ酸のうち、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに、0.0005質量部以上、0.0008質量部以上、0.001質量部以上、0.002質量部以上、0.0025質量部以上、0.003質量部以上、0.005質量部以上、0.01質量部以上、0.03質量部以上、0.05質量部以上、0.06質量部以上である。

[0027] 非限定的に、前記組成物中のアミノ酸のうち、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに、0.00025～5.0質量部、0.0005～5.0質量部、0.0008質量部～5.0質量部、0.0008質量部～3.0質量部、0.001～5.0質量部、0.001～3.0質量部、0.001～2.0質量部、0.001～1.0質量部、0.002～5.0質量部、0.002～3.0質量部、0.002～1.0質量部、0.0025～1.0質量部、0.003～2.0質量部、0.005～1.0質量部、0.01～0.5質量部、0.03～0.1質量部、0.002質量部～0.07質量部である。一態様において、前記組成物中のアミノ酸のうち、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.001～1.0質量部である。一態様において、前記組成物中のアミノ酸のうち、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.002～1.0質量部である。

[0028] 非限定的に、前記組成物中のシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.025～25.0質量部、0.05～25.0質量部、0.08質量部～25.0質量部、0.08質量部～15.0質量部、0.1～25.0質量部、0.1～15.0質量部、0.1～10.0質量部、0.1～5.0質量部、0.2～25.0質量部、0.2～15質量部、0.2～5.0質量部、0.25

～5.0質量部、0.3～10.0質量部、0.5～5.0質量部、0.3～2.5質量部、0.4～2.0質量部、0.1～3.5質量部である。一態様において、前記組成物中のシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.1～5.0質量部である。一態様において、前記組成物中のシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.2～5.0質量部である。

[0029] 非限定的に、前記組成物中のシスチンおよび／またはシステインの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.00001～0.2質量部、0.00005～0.15質量部、0.00008～0.1質量部、0.0001～0.1質量部、0.0001～0.08質量部、0.0001～0.04質量部、0.0001～0.02質量部、0.0001～0.01質量部、0.0002～0.1質量部、0.0002～0.08質量部、0.0002～0.05質量部、0.0002～0.02質量部、0.0002～0.01質量部、0.0002～0.005質量部、0.0004～0.008質量部である。一態様において、前記組成物中のシスチンおよび／またはシステインの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.0001～0.02質量部である。

[0030] 非限定的に、前記組成物中のシスチンおよび／またはシステインの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.0005～10.0質量部、0.0025～7.5質量部、0.004～5.0質量部、0.005～5.0質量部、0.005～4.0質量部、0.005～2.0質量部、0.005～1.0質量部、0.005～0.5質量部、0.01～5.0質量部、0.01～4.0質量部、0.01～2.5質量部、0.01～1.0質量部、0.01～0.5質量部、0.01～0.30質量部、0.02～0.40質量部である。一態様において、前記組成物中のシスチンおよび／またはシステインの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.005～1.0質量部である。

- [0031] 非限定的に、前記組成物中のアミノ酸のうち、グルタミンの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに、0.00025～5.0質量部、0.0005～5.0質量部、0.0008質量部～5.0質量部、0.0008質量部～3.0質量部、0.001～5.0質量部、0.001～3.0質量部、0.001～2.0質量部、0.001～1.0質量部、0.002～5.0質量部、0.002～3.0質量部、0.002～1.0質量部、0.0025～1.0質量部、0.003～2.0質量部、0.005～1.0質量部、0.01～0.5質量部、0.03～0.1質量部、0.002質量部～0.06質量部である。一態様において、前記組成物中のアミノ酸のうち、グルタミンの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.001～1.0質量部である。一態様において、前記組成物中のアミノ酸のうち、グルタミンの含量が、基礎培地を100としたときに0.002～1.0質量部である。
- [0032] 非限定的に、前記組成物中のグルタミンの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.025～25.0質量部、0.05～25.0質量部、0.08質量部～25.0質量部、0.08質量部～15.0質量部、0.1～25.0質量部、0.1～15.0質量部、0.1～10.0質量部、0.1～5.0質量部、0.2～25.0質量部、0.2～15質量部、0.2～5.0質量部、0.25～5.0質量部、0.3～10.0質量部、0.5～5.0質量部、0.3～2.5質量部、0.4～2.0質量部、0.1～3.2質量部である。一態様において、前記組成物中のグルタミンの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.1～5.0質量部である。一態様において、前記組成物中のグルタミンの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.2～5.0質量部である。
- [0033] 前記動物細胞用基礎培地用組成物に含まれるアミノ酸は、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンであり、好ましくは、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミン以外のアミノ酸を含まない。「シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミン以外のアミノ酸」は、

特に限定されず、天然アミノ酸、非天然のアミノ酸を含む。一態様として、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミン以外のアミノ酸は、イソロイシン、ロイシン、トレオニン、トリプトファン、バリン、ヒスチジン、フェニルアラニン、メチオニン、リジン（リジン塩酸塩を含む）、チロシン、アルギニン、グリシン、セリンを含む。

[0034] 「酵母抽出物」（「酵母エキス」とも呼称する）は、酵母菌体から、含有成分を抽出したものである。一般に、主成分として、タンパク質および、それを分解したペプチド、アミノ酸や核酸の関連物質、ミネラル、ビタミン類を含み、調味料、家畜飼料、健康補助食品、微生物培養の培地、加工食品の品質改良剤等としての使用が知られている。

[0035] 酵母抽出物に含まれるアミノ酸は、動物細胞用基礎培地用組成物の構成成分であり、アミノ酸単体として、動物細胞用基礎培地用組成物に添加される、アミノ酸（すなわち、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンを含む）とは区別される。

[0036] 前記動物細胞用基礎培地用組成物に含まれる酵母抽出物が由来する酵母細胞の種類は特に限定されない。一態様において（即ち、非限定的に）、酵母細胞としては、パン酵母、ビール酵母、清酒酵母、トルラ酵母等の細胞が挙げられる。一態様として、パン酵母（学名：*Saccharomyces cerevisiae*（サッカロミセス・セレビジエ））が含まれる。

[0037] 酵母抽出物には、含有される成分に応じて、アミノ酸を多く含む高アミノ酸型の酵母抽出物、高核酸型・高アミノ酸型の酵母抽出物、高核酸型の酵母抽出物などが知られている。特定のアミノ酸、有機酸および／または核酸が多く含まれる酵母抽出物も知られている。例えば、特にアミノ酸のうち、グルタミン酸を高濃度で含む、高グルタミン酸アミノ酸型の酵母抽出物、有機酸のうち、コハク酸を高濃度で含む、高コハク酸型の酵母抽出物、核酸のうち、イノシン酸、グアニル酸を高濃度で含む高核酸型の酵母抽出物などがある。

[0038] 非限定的に、前記酵母抽出物は、高アミノ酸型の酵母抽出物である。非限

定的に、前記酵母抽出物は、低核酸型の酵母抽出物である。非限定的に、前記酵母抽出物は、高アミノ酸型かつ低核酸型の酵母抽出物である。

- [0039] 一態様において、高アミノ酸型の酵母抽出物は、酵母抽出物 100 g あたり、30000 mg 以上、35000 mg 以上、40000 mg 以上、45000 mg 以上の総アミノ酸を含む。
- [0040] 酵母抽出物 100 g あたり、30000 mg の総アミノ酸を含む場合、酵母抽出物中のアミノ酸含量は 30% である。後述の実施例 3 では、培養培地中の最終濃度が 0.25 g/L ~ 2.0 g/L となるように、酵母エキスを添加した。酵母抽出物中のアミノ酸含量が 30% の場合、培養培地中のアミノ酸濃度は、0.075 g/L ~ 0.6 g/L (1000 g) である。この場合、酵母抽出物の総アミノ酸含量は、基礎培地用組成物を 100 としたときに、0.75 質量部 ~ 6.0 質量部となる。
- [0041] 非限定的に、前記酵母抽出物の総アミノ酸含量が、基礎培地用組成物を 100 としたときに 0.30 質量部以上、0.50 質量部以上、0.60 質量部以上、0.75 質量部以上、1.0 質量部以上、1.5 質量部以上である。一態様において、前記酵母抽出物の総アミノ酸含量が、基礎培地を 100 としたときに 0.75 質量部以上である。
- [0042] 非限定的に、前記酵母抽出物の総アミノ酸含量が、基礎培地用組成物を 100 としたときに 20 質量部以下、15 質量部以下、10 質量部以下、8 質量部以下、6 質量部以下である。
- [0043] 非限定的に、前記酵母抽出物の総アミノ酸含量は、基礎培地用組成物を 100 としたときに 0.30 質量部以上 20 質量部以下、0.50 質量部以上 10 質量部以下、0.60 質量部以上 8 質量部以下、0.75 質量部以上 6 質量部以下である。
- [0044] 一態様において、低核酸型の酵母抽出物は、酵母抽出物において 10% 以下、8% 以下、5% 以下、3% 以下、2% 以下の核酸を含む。
- [0045] 後述の実施例 3 では、培養培地中の最終濃度が 0.25 g/L ~ 2.0 g/L となるように、酵母エキスを添加した。酵母抽出物中の核酸含量が 10

%の場合、培養培地中の核酸濃度は、 $0.025\text{ g/L} \sim 0.2\text{ g/L}$ (1000 g)である。この場合、酵母抽出物の総核酸含量は、基礎培地用組成物を 100 としたときに、 0.25 質量部 ~ 2.0 質量部となる。

[0046] 非限定的に、前記酵母抽出物の総核酸含量が、基礎培地用組成物を 100 としたときに、 3.0 質量部以下、 2.0 質量部以下、 1.5 質量部以下、 1.0 質量部以下、 0.7 質量部、 0.5 質量部以下、 0.3 質量部以下である。一態様において、前記酵母抽出物の総核酸含量が、基礎培地用組成物を 100 としたときに 2.0 質量部以下である。

[0047] 非限定的に、前記酵母抽出物の総核酸含量が、基礎培地用組成物を 100 としたときに 0.01 質量部以上、 0.05 質量部以上、 0.10 質量部以上、 0.20 質量部以上、 0.25 質量部以上である。一態様において、前記酵母抽出物の総核酸含量が、基礎培地用組成物を 100 としたときに 0.25 質量部以上である。

[0048] 非限定的に、前記酵母抽出物の総核酸含量は、基礎培地用組成物を 100 としたときに 0.05 質量部以上 2.0 質量部以下、 0.10 質量部以上 2.0 質量部以下、 0.20 質量部以上 2.0 質量部以下、 0.25 質量部以上 2.0 質量部以下である。

[0049] 前記動物培養基礎培地用組成物に含まれる前記酵母抽出物は、 1 種類であってもよく、または 2 種類以上であってもよい。

[0050] 非限定的に、前記酵母抽出物は、後述の実施例に記載される酵母エキスA、B、CまたはDのいずれか、あるいは、これらの混合物であってもよい。一態様において、前記酵母抽出物は、後述の実施例に記載される酵母エキスAまたはB、あるいは、これらの混合物であってもよい。一態様において、前記酵母抽出物は、後述の実施例に記載される酵母エキスAであってもよい。具体的には、イーストエキスYK-21NL、ハイマックスPR、YP21-CM、イーストエキス21-NYP（いずれも富士食品工業販売）などがあげられる。

[0051] 前記動物細胞用基礎培地用組成物における、前記酵母抽出物の含量は特に

限定されない。酵母抽出物の含量は、動物細胞の増殖効果が得られる濃度であって、かつ、（濃度が高すぎることによる）増殖阻害は生じない程度の濃度であることが望ましい。非限定的に、前記動物細胞用基礎培地用組成物において、前記酵母抽出物の含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.01～25.0質量部、0.05～20.0質量部、0.10～15.0質量部、0.20～10.0質量部、0.25～5.0質量部、0.25g～2.0質量部である。一態様において、前記動物細胞用基礎培地用組成物において、前記酵母抽出物の含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.05～20.0質量部である。

[0052] 前記酵母抽出物と併用して、または、前記酵母抽出物以外、酵母抽出物以外の天然物由来の抽出物を、前記動物細胞用基礎培地用組成物の構成成分として使用してもよい。非限定的に、前記天然物由来の抽出物は、例えば、とうもろこし、小麦、大麦、米などの穀類。インゲン豆、エンドウ豆などの豆類（大豆を除く）、肉、骨などの動物組織または菌体、菌糸などからの微生物組織由来の抽出物を含み得る。

[0053] 一態様において、前記酵母抽出物以外の天然物由来の抽出物には、大豆加水分解物は含まない。

[0054] 前記動物細胞用基礎培地用組成物に含まれる前記無機塩の種類は、特に限定されない。非限定的に、カルシウム、鉄、カリウム、マグネシウム、ナトリウム、亜鉛等の塩が含まれる。非限定的に、塩は、塩化物、硫酸化物、リン酸化物、塩酸化物、炭酸水素化物、硝酸化物等が含まれる。非限定的に、無機塩は、塩化カルシウム、塩化鉄、塩化カリウム、硫酸マグネシウム、塩化ナトリウム、リン酸二水素ナトリウム、炭酸水素ナトリウム、硫酸鉄硝酸鉄、塩化マグネシウム、硫酸亜鉛等を含む。一態様において、前記無機塩として、塩化カルシウムを含む。一態様において、前記動物細胞用基礎培地用組成物は、2種類以上の無機塩を含んでもよい。

[0055] 一態様において、前記動物細胞用基礎培地用組成物は、塩化カルシウム、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムからなる群から選

択される2種類以上の無機塩を含む。一態様において、前記動物細胞用基礎培地用組成物は、塩化カルシウムと、塩化カリウム、塩化ナトリウムおよび炭酸水素ナトリウムを含む。

[0056] 前記動物細胞用基礎培地用組成物に含まれる前記無機塩の量は特に限定されない。無機塩の種類に応じて、動物細胞の培養に適切な濃度を適宜採用可能である。

[0057] 「糖」は、多価アルコールの最初の酸化生成物であり、ホルミル基 ($-CHO$) またはカルボニル基 ($>C=O$) を1つ有する。ホルミル基を持つ糖は、アルドース、カルボニル基を持つ糖は、ケトースと分類される。糖は植物の組織やはちみつ、果物に多く含まれ、特にグルコースは生物のエネルギー源となる。

[0058] 単糖2分子がグリコシド結合により1分子となったものを二糖といい、単糖3分子が結合したものを三糖、同様に4分子のものを四糖という。単糖2分子〜20分子程度が結合したものをオリゴ糖という。多数の単糖がグリコシド結合により重合したものを多糖という。糖のヒドロキシ基を水素に置換したものをデオキシ糖、アルドース末端の炭素をカルボキシル基に置き換えたものをウロン酸、ヒドロキシ基をアミノ基に置き換えたものをアミノ糖、ケトン基やアルデヒド基がアルコールに還元されたものを糖アルコールと呼ぶ。

[0059] 糖の例として、単糖のグルコース（ブドウ糖）、マンノース、フルクトース（果糖）、ガラクトース、キシロースなどが知られている。グルコース2分子からなる二糖として、トレハロース、イソトレハロース、マルトース（麦芽糖）、セロビオース、イソマルトースなどが知られている。その他の二糖として、ラクトース（乳糖）（ β -ガラクトースと β -グルコースが1,4-ガラクトシド結合）、スクロース（ショ糖）（ α -グルコースと β -フルクトフラノース（フルクトース）が1,2-グリコシド結合）などが知られている。

[0060] 前記動物細胞用基礎培地用組成物に含まれる糖の種類は、特に限定されな

い。非限定的に、グルコース（ブドウ糖）、フラクトース、トレハロース、ガラクトース、スクロースまたはマルトースが含まれる。一態様において、前記動物細胞用基礎培地用組成物に含まれる前記糖は、グルコース（ブドウ糖）である。一態様において、前記動物細胞用基礎培地用組成物は、2種類以上の糖を含んでもよい。

[0061] 前記動物細胞用基礎培地用組成物に含まれる前記糖の量は特に限定されない。糖の種類に応じて、動物細胞の培養に適切な濃度を適宜採用可能である。

[0062] 一態様において、前記動物細胞用基礎培地用組成物は、さらに、ビタミンを含んでもよい。

[0063] 「ビタミン」は、生物の生存・生育に微量に必要な栄養素のうち、その生物の体内で十分な量を合成できない炭水化物・タンパク質・脂質以外の有機化合物の総称である。ビタミンは機能で分類され、物質名ではない。たとえばビタミンAはレチナール、レチノールなどからなる。ビタミンは脂溶性ビタミンと水溶性ビタミンに分類される。以下は、ヒトのビタミンの例である。

[0064] 脂溶性ビタミン

ビタミンA： レチノール、 β -カロテン、 α -カロテン、 β -クリプトキサンチンなど

ビタミンD： エルゴカルシフェロール、コレカルシフェロール

ビタミンE： トコフェロール、トコトリエノール

ビタミンK： フィロキノン、メナキノンの2つのナフトキノン誘導体

水溶性ビタミン

ビタミンB群

ビタミンB₁： チアミン

ビタミンB₂： リボフラビン。ビタミンGともいう。

ビタミンB₃： ナイアシン。ビタミンPPともいう。

ビタミンB₅： パントテン酸

ビタミンB₆： ピリドキサル、ピリドキサミン、ピリドキシン

ビタミンB₇： ビオチン。ビタミンB_w、ビタミンHともいう。

ビタミンB₉： 葉酸。ビタミンB_c、ビタミンMともいう。

ビタミンB₁₂： シアノコバラミン、メチルコバラミン、ヒドロキシコ
バラミン

ビタミンC： アスコルビン酸

[0065] 上記ビタミンの定義に当てはまらないが、ビタミンと似た作用のある物質を、「ビタミン様物質」と呼ぶことがある。ビタミン様物質のなかには、歴史的には誤ってビタミンと考えられたもの、あるいは定義の変更によりビタミンとされなくなったものも含まれる。以下、ビタミン様物質の例を挙げる。

[0066] ビタミンB₄： アデニン

ビタミンB₈： エルガデニル酸 (Ergadenylic acid、アデニル酸)

ビタミンB₁₀： 葉酸はじめ各種ビタミンB群の混合物。ビタミンRともいった。

ビタミンB₁₁： 葉酸類似化合物。

ビタミンB₁₃： オロト酸

ビタミンB₁₄： 葉酸またはリボ酸などの混合物。

ビタミンB₁₅： パンガミン酸

ビタミンB₁₆： ジメチルグリシン

ビタミンB₁₇： アミグダリン

ビタミンB_H： イノシトール

ビタミンB_P： コリン

ビタミンB_T： カルニチン

ビタミンB_X： パラアミノ安息香酸（葉酸の部分構造、別名：PABA）

ビタミンF： リノール酸などの必須脂肪酸

ビタミンI： 米糠の抽出物。

ビタミンJ： カテコール、フラビンまたはコリン

ビタミンL₁： アントラニル酸

ビタミンL₂： アデニルチオメチルペントース

ビタミンN： チオクト酸 (α -リポ酸)

ビタミンO： カルニチン

ビタミンP： クエルセチン、ヘスペリジン、ルチン、エリオシトリンなどのフラボノイド

ビタミンQ： ユビキノン

ビタミンS： サリチル酸

ビタミンT： テゴチン

ビタミンU： 塩化メチルメチオニンスルホニウム（「キャベジン」とも呼称される。）

ビタミンV： ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド

[0067] 前記動物細胞用基礎培地用組成物に含まれるビタミンの種類は、特に限定されない。本明細書において、特に明記しない限り、「ビタミン」は、上記ビタミン様物質を含む。

[0068] 非限定的に、前記動物細胞用基礎培地用組成物に含まれる該ビタミンは、パントテン酸塩（例えば、パントテン酸カルシウム）、葉酸、ピリドキシン若しくはその塩（例えば、ピリドキシン塩酸塩）、リボフラビン、チアミン若しくはその塩（例えば、チアミン塩酸塩）、コリン（例えば、グリセロフォスファチジルコリン）、イノシトール（例えば、myo-イノシトール）およびニコチン酸アミド（ビタミンV）からなる群から選択される、1または2以上のビタミンである。一態様において、前記動物細胞用基礎培地用組成物は、パントテン酸塩（例えば、パントテン酸カルシウム）、葉酸、ピリドキシン若しくはその塩（例えば、ピリドキシン塩酸塩）、リボフラビン、チアミン若しくはその塩（例えば、チアミン塩酸塩）、コリン（例えば、グリセロフォスファチジルコリン）、イノシトール（例えば、myo-イノシトール）およびニコチン酸アミド（ビタミンV）を全て含む。

- [0069] 前記動物細胞用基礎培地用組成物に含まれる前記ビタミンの量は特に限定されない。ビタミンの種類に応じて、動物細胞の培養に適切な濃度を適宜採用可能である。
- [0070] 前記動物細胞用基礎培地用組成物は、酵母抽出物、アミノ酸、無機塩、ビタミンおよび糖以外にも、他の成分を含んでもよい。他の成分とは、動物細胞用基礎培地用組成物に使用しうる成分であればよく、例えば、pH指示薬（フェノールレッド）、グルタチオン、リノレン酸等の脂肪酸、チミジン等を含む。
- [0071] 「動物細胞用基礎培地」とは、動物細胞を培養、増殖および／または分化するための培養培地のベースとなる培地であり、非限定的に、通常は適宜血清等を添加して使用される。本明細書において、「培養」は、特に明記しない限り、増殖の意味も含めて使用される。本明細書において「動物細胞用基礎培地用組成物」とは、動物細胞を培養するための動物細胞用基礎培地のベースとなる組成物である。動物細胞用基礎培地用組成物は、液体組成物であっても固体組成物であってもよい。動物細胞用基礎培地用組成物は、例えば液体組成物でありそのまま動物細胞用基礎培地として使用されてもよい。また、水分を除去したペースト状であり、適当な水分活性とすることにより保存、販売等され、適量の水分を添加して動物細胞用基礎培地として使用してもよい。あるいは、固体組成物で、乾燥処理等を行った粉体原料として保存・販売等され、使用時に溶媒（例えば水）に溶解し、動物細胞用基礎培地として使用してもよい。本明細書において、「動物細胞用基礎培地」または「基礎培地」は、「動物細胞用基礎培地用組成物」と同義に使用される場合もある。
- [0072] 動物細胞が由来する動物の種類は特に限定されない。一態様において、前記動物細胞は、哺乳類などの脊椎動物の細胞である。脊椎動物は、哺乳類、爬虫類、鳥類、両生類のいずれであってもよく、例えば、ヒト、ウシ、ブタ、ウサギ、ニワトリ、ヒツジ、ヤギなどが含まれる。一態様において、脊椎動物は、ヒト以外の哺乳類である。一態様において、前記動物細胞は、卵殻

を有する卵を産卵する（卵生の）動物、例えば鳥類や爬虫類由来の細胞である。一態様において、前記動物細胞はニワトリの細胞である。

[0073] 動物細胞の細胞の種類は特に限定されず、例えば、成体由来の体細胞、胚、受精卵株化された培養細胞など、いずれであってもよい。非限定的に、例えば、ニワトリの場合、胚、好ましくは、0日胚～21日胚、2日胚～19日胚、4日胚～17日胚、6日胚～15日胚を使用しうる。

[0074] 動物細胞が由来する組織は特に限定されない。非限定的に、前記動物細胞は、筋肉由来の細胞、皮膚由来の細胞、腸由来の細胞、心臓由来の細胞、脳由来の細胞、胃由来の細胞、胚膜由来の細胞、肝臓由来の細胞、腎臓由来の細胞、または、肺由来の細胞である。

[0075] 以下の態様において、アミノ酸は、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンであり、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンであるアミノ酸を主成分とする。一態様として、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミン以外のアミノ酸を含まないが、それに限定されない。シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンは、前記動物細胞用基礎培地用組成物の必須の要素ではあるが、他のアミノ酸を組み合わせるにより、栄養学的にその成長が促進される可能性も推察される。

[0076] 一態様において、本発明は、酵母抽出物の、アミノ酸、無機塩および糖と組み合わせた、動物細胞用基礎培地用組成物への使用であって、ここにおいて、前記アミノ酸がシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンである。

[0077] 一態様において、本発明は、動物細胞用基礎培地用組成物に使用される、酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖の組合せであって、ここにおいて、前記アミノ酸がシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンある、前記組合せ、に関する。

[0078] 一態様において、本発明は、酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖を含む、動物細胞用基礎培地用組成物の製造用のキットであって、前記アミノ酸

がシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンである、前記キット、に関する。前記キットにおいて、酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖の各成分は、動物細胞用基礎培地用組成物の製造を行うまで、個別の状態で存在してもよく、あるいは、2以上の成分が混合された状態で存在してもよい。

[0079] 2. 動物細胞の培養方法

一態様において、本発明は、動物細胞の培養方法に関する。

[0080] 非限定的に、前記培養方法は、酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖を含み、アミノ酸がL-シスチンおよび／またはL-システイン、並びにL-グルタミンを含むものである、動物細胞用基礎培地で、動物細胞を培養することを含む。

[0081] 前記動物細胞の培養方法における培養条件は、特に限定されない。動物細胞が由来する動物種、組織等に応じて、適切な培養条件を採用可能である。

[0082] 一態様において、前記酵母抽出物は、高アミノ酸型の酵母の抽出物である。

[0083] 一態様において、前記酵母抽出物は、低核酸型の酵母の抽出物である。

[0084] 一態様において、前記酵母抽出物は、高アミノ酸型かつ低核酸型の酵母の抽出物である。

[0085] 一態様において、前記動物細胞の培養方法において使用する前記動物細胞用基礎培地は、ビタミンを含んでも良い。

[0086] 「酵母抽出物」、「アミノ酸」、「無機塩」、「ビタミン」、「糖」、「動物細胞用基礎培地」の意義は、「1. 動物細胞培養基礎培地用組成物」に記載した通りである。

[0087] 「1. 動物細胞培養基礎培地用組成物」に記載した事項は、特に矛盾がない限り、本項目の培養方法にも援用される。

[0088] 一態様において、本発明は、酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖を含み、アミノ酸がL-シスチンおよび／またはL-システイン、並びにL-グルタミンを含む培地であって、動物細胞の培養方法用の培地に関する。

- [0089] 一態様において、本発明は、酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖を含み、アミノ酸がＬ－シスチンおよび/またはＬ－システイン、並びにＬ－グルタミンを含む培地の、動物細胞の培養方法への使用に関する。
- [0090] ３．動物細胞および加工品
- 一態様において、本発明は、本発明の動物細胞の培養方法によって培養された、動物細胞を含む。
- [0091] 一態様において、本発明は、前記動物細胞を含む加工食品に関する。
- [0092] 「動物細胞の培養方法」、「動物細胞」等の意義は、「１．動物細胞培養基礎培地用組成物」、「２．動物細胞の培養方法」に記載した通りである。
- [0093] 「１．動物細胞培養基礎培地用組成物」、「２．動物細胞の培養方法」に記載した事項は、特に矛盾がない限り、本項目の動物細胞、加工食品にも援用される。
- [0094] 本発明の動物細胞の培養方法によって培養された、動物細胞、加工食品は、従来の市販の基礎培地用組成物を用いる場合と比べて、より環境負荷が低く生産することが可能である。よって結果として低コストで、環境負荷の少ない動物細胞、加工食品が得られる。また、動物細胞の培養方法では得られなかった、より複雑な呈味を有しており、本来の動物組織の持つ肉独特の呈味を有する、という特徴をも有している。
- [0095] 「加工食品」は、例えば、培養された動物細胞を含む、または、培養された動物細胞からなる肉（培養肉）を含む。培養肉は、例えば、ウシ、ブタ、ウサギ、ニワトリ、ヒツジ、ヤギなどの肉として、通常の肉と同様に食材として調理して使用することが可能である。「加工食品」の「食品」は、調理前の食材、調理後の食品（食事）のいずれの意味も含む。「加工食品」の「加工」とは、単に食材を調理して食事を作成するに留まらず、食材を予備的に加工し、より加工度の高い食材を製造する、あるいは、食材に加工処理を行いその呈味、物性などを調整した新たな食材を提供する等の、食材の加工処理全体を施すことを意味する。

実施例

[0096] 以下、実施例に基づいて本発明を詳細に説明するが、本発明はこれらの実施例に限定されるものではない。当業者は本明細書の記載に基づいて容易に本発明に修飾・変更を加えることができ、それらは本発明の技術的範囲に含まれる。

[0097] 実施例 1 最低限添加が必要なアミノ酸種の検討

本実施例では、動物細胞を培養するにあたって、アミノ酸源として酵母エキスをを用いた場合に、酵母エキスのみで追加のアミノ酸添加なしに細胞が増殖できるのか、できない場合においては、最低限必要になるアミノ酸はどのアミノ酸なのか、について検討した。

[0098] (方法)

ダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) 培地に含まれる組成のうち、アミノ酸を除いた組成をイオン交換水に溶解し、A. A. - I M E M B u f f e r (表 1) を調製した。

[0099] 表 1 A. A. - I M E M B u f f e r 組成

[0100]

[表1]

物質名	mg/L	試薬メーカー
塩化カルシウム(粒状)	378	関東化学㈱
塩化鉄(III)六水和物	0.068	純正化学㈱
塩化カリウム	404	関東化学㈱
硫酸マグネシウム(結晶)	202	関東化学㈱
食塩	5726	市販品
リン酸二水素ナトリウム(結晶)	144	関東化学㈱
パントテン酸カルシウム	4	金剛薬品㈱
グリセロフォスファチジルコリン	8	バイオアクティブズジャパン㈱
葉酸	4	金剛薬品㈱
myo-イノシトール	7	築野食品工業㈱
ニコチン酸アミド	4	金剛薬品㈱
ピリドキシ塩酸塩	4	金剛薬品㈱
リボフラビン	0.4	金剛薬品㈱
チアミン塩酸塩	4	金剛薬品㈱
ブドウ糖	5000	兼松塩商㈱
炭酸水素ナトリウム	3737	関東化学㈱

[0101] A. A. − I M E M B u f f e r にさらに、以下に示した 7 種類 (B、D、E、F、H、I および J) の酵母エキスをそれぞれ、培地中の最終濃度が 1 g / L となるように添加した。

[0102] 表 2 実施例 1 で添加した酵母エキス

[0103]

[表2]

	各酵母エキスの特長	総アミノ酸量 (mg/100g)	総核酸量(%)
B	高アミノ酸型酵母エキス	65317	1.01
D	高アミノ酸型酵母エキス	76739	0.38
E	高核酸型酵母エキス	28256	36.26
F	高アミノ酸、高核酸型酵母エキス	44737	3.91
H	高コハク酸型酵母エキス	29722	11.41
I	高グルタミン酸型酵母エキス	21044	0.55
J	アミノ酸核酸含有型酵母エキス	24857	4.76

[0104] 「A. A. - I MEM Buffer + 酵母エキス」に、DMEM培地において、培養細胞の増殖に必要とされている各種アミノ酸を、表3の条件1～16の通りに添加し、細胞培養試験を実施した。これにより、酵母エキスを培養材料としたときの、細胞の増殖のために、アミノ酸として添加しなければならない必須アミノ酸種を検討した。各アミノ酸の添加量はDMEM培地組成に含まれる量と同量とした。また、DMEM培地と同様のアミノ酸組成としたものをP. C. (ポジティブコントロール)とし、DMEM培地と同様のアミノ酸組成で添加量を1/8量を添加したものを条件19、1/32としたものを条件20とした。実験に使用した試薬は、いずれも食品添加物グレードのものを使用した。

[0105] 表3 試験培地のアミノ酸条件

[0106]

[表3]

	物質名	mg/L	試薬メーカー
条件1	アミノ酸添加なし	-	-
条件2	L-イソロイシン	107	日理化学株
条件3	L-ロイシン	107	日理化学株
条件4	L-トレオニン	97	日理化学株
条件5	L-トリプトファン	16	日理化学株
条件6	L-バリン	96	日理化学株
条件7	L-ヒスチジン	32	純正化学株
条件8	L-フェニルアラニン	67	日理化学株
条件9	L-メチオニン	30	日理化学株
条件10	L-リジン塩酸塩	149	日理化学株
条件11	L-チロシン	73	日理化学株
条件12	L-アルギニン	71	関東化学株
条件13	グリシン	30	純正化学株
条件14	L-セリン	43	フロンティアフーズ株
条件15	L-シスチン	49	日理化学株
条件16	L-グルタミン	596	日理化学株
条件17	上記 L-トリプトファン以外のアミノ酸添加	1548	-
条件18	上記 L-グルタミン以外のアミノ酸添加	968	-
条件19	上記すべてのアミノ酸を 1/8 添加	196	-
条件20	上記すべてのアミノ酸を 1/32 添加	49	-
P.C.	上記すべてのアミノ酸添加	1564	-

[0107] A. A. - I M E M B u f f e r + 酵母エキス、表3の各条件のアミノ酸に、さらに、10%非動化处理ウシ胎児血清 (FBS)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン (PSA) を添加して、細胞培養試験を行った。

[0108] 細胞培養試験には、マウス由来筋芽細胞株C2C12を用いた。C2C1

2細胞を12ウェルプレートに 5×10^4 細胞／ウェルとなるように播種し、 37°C の CO_2 インキュベーターにて各条件の培地で3日間培養した。各条件で培養後の細胞について、細胞の接着、増殖について観察を行った。さらに、培養後の細胞画像を撮影し、細胞の生育具合を確認した。

[0109] (結果)

細胞画像の結果を図1に示す。図1の細胞画像から、細胞の培養容器底面に占める割合が50%以上のものは○、10～50%のものは△、細胞の接着がみられないものは×として結果を表4に示した。

[0110] 表4 各条件における細胞増殖スコア

[0111] [表4]

条件1	条件2	条件3	条件4	条件5	条件6
×	×	×	×	×	×
条件7	条件8	条件9	条件10	条件11	条件12
×	×	×	×	×	×
条件13	条件14	条件15	条件16	条件17	条件18
×	×	△	×	○	×
条件19	条件20	P.C.			
○	×	○			

[0112] 図1および表4に示されたように、全てのアミノ酸を添加した場合（P.C.）、1／8量を添加した場合（条件19）には、細胞の接着、その後の増殖が見られるのに対し、全てのアミノ酸の1／32量添加した場合（条件20）、およびアミノ酸無添加（条件1）では、細胞の接着がみられなかった。このことから、酵母エキス（培地中の最終濃度1g／L）だけでは、細胞の接着と増殖に必要なアミノ酸が不足しており、さらなるアミノ酸の添加

が必要であることが明らかとなった。

[0113] D E M E培地において必要とされるアミノ酸をそれぞれ単独で添加し、酵母エキス以外に添加が必要となるアミノ酸を検討した。その結果、ほとんどのアミノ酸については単独の添加でも細胞の接着が見られなかったのに対し、L-シスチンを添加した条件15のみ、細胞の接着が観察され、酵母エキスに、L-シスチンを加えることによって、細胞の接着が改善されることが明らかになった。

[0114] さらに、全てのアミノ酸を1/8以上添加した場合には（条件19、P. C.）、細胞が増殖、接着しているのに対し、L-グルタミンのみを除いた条件18では接着している細胞の割合が著しく少なくなることから、L-グルタミンが細胞の増殖に必要であることが判明した。一方、単にL-グルタミンのみを加えた条件16では、細胞の接着が見られないことから、L-グルタミンのみでは不十分で、L-シスチンも必要であることが分かった。以上の結果から、基礎培地に最低限必要なアミノ酸としてはL-シスチンおよびL-グルタミンであることが明らかとなった。

[0115] また、条件19では細胞の接着、増殖が確認されたのに対し、条件20ではほとんど細胞が接着しなかったことから、L-シスチンが少なくとも6.13 mg/L、L-グルタミンが74.5 mg/L必要であることが示唆された。

[0116] 実施例2 複数細胞種における培養試験

実施例1において、C2C12細胞の培養にはL-シスチンおよびL-グルタミンの添加が必要であることが示された。本実施例では、マウス由来筋芽細胞株であるC2C12細胞だけでなく、他の株化細胞でもこれらのアミノ酸が必須であるかどうかについて、検証を行った。MDBK細胞（ウシ腎臓由来細胞株）およびHDFa細胞（成人ヒト皮膚線維芽細胞株）を用いて、実施例1と同様に、細胞培養試験を実施した。

[0117] （方法）

D M E M培地組成のうち、アミノ酸を除いた組成をイオン交換水に溶解し

、A. A. - I M E M B u f f e r（表1）とし、実施例1で使用した各酵母エキスを等量ずつブレンドし、酵母エキスM i xとした。この酵母エキスM i xを、培地中の最終濃度が1 g／Lとなるようにさらに添加した。そこに、表5のようにL-シスチンまたはL-シスチンおよびL-グルタミンを添加し、各細胞における細胞の生育具合を確認した。なお、細胞培養試験は、A. A. - I M E M B u f f e r + 酵母エキス、表5の各条件のアミノ酸に、さらに、10%非動化处理ウシ胎児血清（F B S）、1%ペニシリン-ストربتマイシン-アムホテリシン（P S A）を添加して行った。

[0118] 表5 試験培地のアミノ酸条件

[0119] [表5]

	物質名	mg/L	試薬メーカー
条件1	アミノ酸添加なし	—	—
条件2	L-シスチン	49	日理化学(株)
条件3	L-シスチン	49	日理化学(株)
	L-グルタミン	596	日理化学(株)
P.C.	表2に記載のすべてのアミノ酸	1564	—

[0120] M D B K細胞およびH D F a細胞の各細胞を、12ウェルプレートに5 × 10⁴細胞／ウェルとなるように播種し、37℃のCO₂インキュベーターで培養した。M D B K細胞は培養5日目、H D F a細胞は培養4日目の各細胞の状態を撮影し、細胞の接着具合を確認した。

[0121] （結果）

細胞画像の結果を図2に示す。図2の細胞画像から、細胞の培養容器底面に占める割合が50%以上のものは○、10～50%のものは△、細胞の接着がみられないものは×として結果を表6に示した。

[0122] 表6 各条件における細胞増殖スコア

[0123]

[表6]

	条件1	条件2	条件3	P.C.
MDBK 細胞	×	○	○	○
HDFa 細胞	×	△	○	○

[0124] 図2および表6に示されたように、いずれの細胞においてもアミノ酸を添加せず、酵母エキスM i xのみ加えた条件1では細胞の接着がみられないのに対し、Lーシスチンを添加した条件2では細胞の接着がみられた。また、LーシスチンとLーグルタミンを添加した条件3では細胞の増殖が確認できた。

[0125] この結果から、LーシスチンとLーグルタミンが細胞の接着と増殖に大きく寄与していることが確認できた。LーシスチンとLーグルタミンと酵母エキスが培地に含まれていることにより、少なくとも実施例1および実施例2で調べた3種類の株化細胞で細胞の培養が可能であることが明らかとなった。

[0126] 実施例3 添加する酵母エキスの検討 各種酵母エキスの細胞増殖適性確認試験

本実施例では、培地に添加するのに最適な酵母エキスを選定するため、特徴の異なる複数の酵母エキスを用いて、細胞増殖適性確認試験を行った。

[0127] (方法)

表7の組成の基礎培地とした。

[0128] 表7 試験用基礎培地

[0129]

[表7]

物質名	濃度(mg/L)	製品メーカー
塩化カリウム	400	富田製薬
塩化ナトリウム	6400	富田製薬
グルコース	4500	兼松塩商
L-グルタミン	584	フロンティアフーズ
L-シスチン	48.34	フロンティアフーズ
炭酸水素ナトリウム	3700	トクヤマ

[0130] そこに表8のA～Hの8種類の酵母エキスをそれぞれ、培地中の最終濃度が0.25g/L、0.5g/L、1.0g/L、2.0g/Lとなるように添加した。8種類の酵母エキ스는いずれもサッカロマイセス属由来のものであり、表8に示した特徴を有するものである。

[0131] 表8 使用した酵母エキスの種類

[0132]

[表8]

	各酵母エキスの特長	総アミノ酸量 (mg/100g)	総核酸量 (%)
A	高アミノ酸型酵母エキス	48231	0.16
B	高アミノ酸型酵母エキス	65317	1.01
C	高アミノ酸型酵母エキス	67756	2.32
D	高アミノ酸型酵母エキス	76739	0.38
E	高核酸型酵母エキス	28256	36.26
F	高アミノ酸、高核酸型 酵母エキス	44737	3.91
G	高核酸型酵母エキス	27000	33.77
H	高コハク酸型酵母エキス	29722	11.41

[0133] 試験には初代培養細胞である、アヒルの肝臓由来細胞を用いた。アヒルの肝臓由来細胞は生体から摘出後、3継代目まではDME M培地の組成と同様の組成の基礎培地に10%血清、PSAを1%加えた培地で培養した。アヒル肝臓由来細胞を、96ウェルプレートに 1.5×10^4 細胞/ウェルとなるように播種し、それぞれの培地に10%血清、PSA 1%を加え、細胞培養試験を実施した。

[0134] 細胞の増殖はIncucyte SX5（ザルトリウス）を用いて、観察画像に占める細胞の割合を各培地毎の細胞増殖を経時的な細胞占有面積率として記録した。この記録データをロジスティック曲線によりフィッティングし、この際の細胞増殖中間点（Exponential Growth 50% : EG50）を算出し、細胞増殖速度を比較した。EG50到達時間が100時間を超えるものは細胞増殖阻害能を有すると判断した。

[0135] また、P. C. にはDMEM培地（富士フィルム）を使用し、N. C. は表6に記載の基礎培地に酵母エキスを添加しないものとした。

[0136] （結果）

各培地で培養した細胞のEG50到達時間の結果を表9に示す。表9のEG50を比較すると、酵母エキスB、酵母エキスE、酵母エキスFは高濃度の添加である、2.0 g/L、1.0 g/Lの添加時に細胞増殖能が低下することがわかった。ただし、これらの増殖阻害は低濃度にするにより低下する。さらに、酵母エキスF、酵母エキスH、および高濃度の添加では細胞増殖阻害能を有しない酵母エキスGにおいて、0.5 g/L以下の添加でもEG50到達時間が100時間以上となっており、細胞増殖速度が低下する。この結果から、これらの酵母エキスは、濃度を低濃度にした場合でも細胞の増殖を抑制することが明らかにになった。

[0137] 表9 各培地で培養した細胞のEG50到達時間（h）

[0138]

[表9]

酵母エキスを添加量(g/L)	P.C.	N.C.	A	B	C	D	E	F	G	H
2.0	25.5	27.2	63.15	200.12	47.57	23.34	31757.88	248749931	88.81	111.91
1.0			74.37	424.35	96.15	32.00	667.98	981.75	99.20	124.44
0.5			67.75	64.38	30.44	61.87	51.45	820.82	584.51	428.71
0.25			57.61	42.14	56.49	56.93	42.75	54.67	350.86	140.55

[0139] 実施例4 添加する酵母エキスの検討 最適酵母エキスの選定

本実施例では、最も細胞増殖に適した酵母エキスを選定するための実験を行った。選定に使用したのは、実施例3で、低濃度で細胞増殖阻害能が認められた酵母エキスを除いた、酵母エキスA、B、CおよびDである。

[0140] (方法)

実験には初代培養細胞である、アヒルの肝臓由来細胞を用いた。アヒルの肝臓由来細胞は生体から摘出後、5～6継代目まではDME M培地の組成と同様の組成の基礎培地に10%血清、PSAを1%加えた培地で培養した。継代培養を繰り返し、細胞が増殖可能か検討した。

[0141] 表7の試験用基礎培地に、各酵母エキスを培地中の最終濃度が1.0g/Lとなるように添加し、さらに、10%血清およびPSA1%を加えて完全培地とした。

[0142] アヒル肝臓由来細胞を60mmディッシュに 1.5×10^5 細胞/ディッシュとなるように播種し、培養を行った。また、継代時に細胞の一部を96ウェルプレートに 5×10^3 細胞/ウェルとなるように播種し、Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所)を用いて生細胞数を450nm吸光度測定により比較した。培養は3継代目まで実施し、それぞれの酵母エキスで培養した際の生細胞数を吸光度の値により比較した。

[0143] (結果)

酵母エキスを添加していないN.C. (ネガティブコントロール)では細胞が増殖しなかったため2継代目で培養ができなくなった。一方、酵母エキスを添加した培地ではいずれもアヒル肝臓由来細胞の継代培養によっても増殖することが明らかとなった。また、特に酵母エキスA、酵母エキスB、酵母エキスCを添加した培地では他の酵母エキスを添加したときと比較して細胞がより増殖することが確認できた。(図3)

[0144] 実施例5 酵母エキス添加培地の最適化

本実施例では、実施例5で特に細胞の増殖が良かった酵母エキスAおよびBを用いて、最適な培地の組成を検討した。

[0145] (方法)

実験には初代培養細胞である、アヒルの肝臓由来細胞を用いた。アヒルの肝臓由来細胞は生体から摘出後、5～6継代目まではDME M培地の組成と同様の組成の基礎培地に10%血清、PSAを1%加えた培地で培養した。継代培養を繰り返し、細胞が増殖可能か検討した。

[0146] 表10の試験用基礎培地に各酵母エキスを2.0g/L添加し、10%血清およびPSA1%を加えて完全培地とした。今回の試験では、実施例4の表7の基礎培地の組成にさらに、塩化カルシウムをDME M培地に含まれる塩化カルシウム量と同量になるように添加し、試験を行った(表10)。

[0147] 表10 試験用基礎培地

[0148] [表10]

物質名	濃度(mg/L)	製品メーカー
塩化カリウム	400	富田製薬
塩化ナトリウム	6400	富田製薬
塩化カルシウム	378.44	富田製薬
グルコース	4500	兼松塩商
L-グルタミン	584	フロンティアフーズ
L-シスチン	48.34	フロンティアフーズ
炭酸水素ナトリウム	3700	トクヤマ

[0149] アヒル肝臓由来細胞を60mmディッシュに 1.5×10^5 細胞/ディッシュとなるように播種し、培養を行った。また、継代時に細胞の一部を96ウェルプレートに 5×10^3 細胞/ウェルとなるように播種し、Cell Counting Kit-8(同仁化学研究所)を用いて生細胞数を450nm吸光度測定により比較した。培養は5継代目まで実施し、それぞれの酵母エキスを培養した際の生細胞数を吸光度の値として比較した。

[0150] なお、P.C.(ポジティブコントロール)はDME M培地と同様の組成の培地を用い、N.C.(ネガティブコントロール)は表10の組成の試験

用基礎培地のみで、酵母エキスを添加していない培地とした。

[0151] (結果)

結果を図4に示す。酵母エキスの添加量を2.0 g/Lに増やし、塩化カルシウムを基礎培地に加えることにより、培養性が改善することが明らかとなった。N. C. は3継代目で細胞が増殖しなくなり、以降培養ができなくなったが、酵母エキスを添加した培地では5継代目時点で、P. C. の約70%以上の培養性を維持出来ることが確認できた。

[0152] 実施例6 酵母エキス添加培地の汎用性確認試験1

本実施例では、実施例5で特に細胞の増殖が良かった酵母エキスA、および、AとBとを等量ブレンドした酵母エキスA-Bを用いて、ニワトリ由来の様々な臓器由来細胞に対して培養試験を実施し、これらの酵母エキスの汎用確認試験を行った。

[0153] (方法)

実験には初代培養細胞である、ニワトリの肝臓、筋肉、肺、腎臓および脳に由来する細胞を用いた。ニワトリの各種臓器由来細胞は生体から摘出後、各培地で培養を行った。なお、酵母エキス添加培地の組成は実施例5の表10の組成の試験用基礎培地に、DMEM培地に含まれるビタミン（表1のパントテン酸カルシウム、葉酸、ピリドキシン塩酸塩、リボフラビン、チアミン塩酸塩、グリセロフォスファチジルコリン、myo-イノシトールおよびニコチン酸アミド）をDMEM培地組成と同量となるように加え、酵母エキスAを2.0 g/L添加したものを使用した。また、ポジティブコントロールとしてDMEM培地の組成と同様の組成の基礎培地を使用した。これらの培地は10%血清、PSAを1%加えて試験に使用した。

[0154] ニワトリから摘出した各種臓器由来細胞を酵母エキス添加培地およびポジティブコントロール培地にそれぞれ播種し、3～4日おきに継代し、3継代目時点の細胞数を計測した。継代時の細胞播種数は 3×10^5 細胞/ウェルとなるように6ウェルプレートに播種した。

[0155] (結果)

結果を図5に示す。ニワトリの各種臓器由来のいずれの細胞においても酵母エキスA添加培地にて培養した細胞は、ポジティブコントロールと同程度の生育が確認された。よって、酵母エキス添加培地は、種々の臓器由来細胞に対して良好な培養性を維持できることが明らかとなった。また、酵母エキスA-B添加培地では、肺・腎臓・脳ではやや培養性が低くなる結果となったが、肝臓・筋肉はP.C. および酵母エキスA添加培地と同程度の培養性がみられた。

[0156] 実施例7 酵母エキス添加培地の汎用性確認試験2

本実施例では、実施例6で増殖性に優れていた酵母エキスAを用いて、由来の異なる株化細胞および初代培養細胞に対して培養試験を実施し、培養性を確認した。

[0157] 実験には株化細胞のRL34（ラット正常肝臓由来細胞）、MDBK（ウシ正常腎臓由来細胞）、初代培養細胞のウシ筋肉由来細胞を用いた。酵母エキス添加培地の組成は実施例5の表10の組成の基礎培地に、DMEM培地に含まれるビタミン（表1のパントテン酸カルシウム、葉酸、ピリドキシン塩酸塩、リボフラビン、チアミン塩酸塩、グリセロフォスファチジルコリン、myo-イノシトールおよびニコチン酸アミド）をDMEM培地組成と同量となるように加え、酵母エキスAを2.0g/L添加したものを使用し、ポジティブコントロールとしてDMEM培地を用いた。これらの培地は非動化処理したFBSを10%、PSAを1%加えて試験に使用した。

[0158] （方法）

DMEM培地で培養した各細胞を、6ウェルプレートにRL34細胞は 3×10^5 細胞、MDBK細胞は 2×10^5 細胞、ウシ筋肉由来細胞は 3×10^5 細胞、の量を播種し、各培地で培養試験を実施した。3～4日おきに継代を実施し、細胞数を計測した。

[0159] （結果）

結果を図6～8に示す。いずれの細胞においても酵母エキスA添加培地で培養した細胞は、ポジティブコントロールであるDMEM培地と比較して7

0%以上の培養性を維持することが確認された。

[0160] 実施例 8 基礎培地に添加するアミノ酸濃度下限範囲の検討

本実施例では、基礎培地に添加するアミノ酸（L-グルタミン、L-シスチン）の濃度範囲、特に最低必要濃度の検討を行った。

[0161] （方法）

DMEM培地で培養していたMDBK細胞を、12ウェルプレートに 1×10^5 細胞/ウェルとなるように播種し、各培地が2 ml/ウェルとなるように培地を加え、培養を行った。3～4日おきに継代を実施し、3回目の継代培養が終了した時点での生細胞数を測定した。

[0162] なお、各培地は非動化处理を施したFBS 10%、PSA 1%を添加した状態で試験に用いた。

[0163] 使用細胞：MDBK細胞（株化細胞）

培養前の細胞数： 1×10^5 細胞

アミノ酸添加濃度範囲：0.002～0.063質量%

0.063質量%を1として、そこから半量ずつアミノ酸添加量を減らし、最も少ないアミノ酸添加量を0.002質量%とした。基礎培地の組成を以下の表に示す。

[0164]

[表11]

物質名	g					
	× 1	× 1/2	× 1/4	× 1/8	× 1/16	× 1/32
塩化カリウム	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4	0.4
塩化ナトリウム	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4	6.4
グルコース	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9	4.9
L-グルタミン	0.590	0.295	0.148	0.074	0.037	0.018
L-シスチン	0.049	0.025	0.012	0.006	0.003	0.002
炭酸水素ナトリウム	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7	3.7
酵母エキス A	2	2	2	2	2	2
塩化カルシウム	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
パントテン酸カルシウム	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
α-GPC	0.0074	0.0074	0.0074	0.0074	0.0074	0.0074
葉酸	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
myo-イノシトール	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072	0.0072
ニコチンアミド	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
ピリドキシン塩酸塩	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
リボフラビン	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004	0.0004
チアミン塩酸塩	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004	0.004
水	1000	1000	1000	1000	1000	1000
培地全体、アミノ酸含有割合(w/v、%)	0.063%	0.031%	0.016%	0.008%	0.004%	0.002%
培地全体、L-グルタミン(w/v、%)	0.058%	0.029%	0.014%	0.007%	0.004%	0.002%
培地全体、L-シスチン(w/v、%)	0.0048%	0.0024%	0.0012%	0.0006%	0.0003%	0.0002%
固形分換算、アミノ酸含有割合(w/w、%)	3.46%	1.73%	0.87%	0.43%	0.22%	0.11%
固形分換算、L-グルタミン(w/w、%)	3.20%	1.60%	0.80%	0.40%	0.20%	0.10%
固形分換算、L-シスチン(w/w、%)	0.27%	0.13%	0.07%	0.03%	0.02%	0.01%

[0165] 上記基礎培地で、培養した場合の細胞増殖の結果を図9に示す。図9の横軸は、基礎培地中に含まれるアミノ酸（L-グルタミン、L-シスチン）の、基礎培地を100としたときの質量部（w/v、%）である。図9の縦軸は、3回目の継代培養が終了した時点での生細胞数である。

[0166] （結果）

2継代目時点において、MDBK細胞はアミノ酸添加量を0.002質量%まで減らしても細胞の増殖が確認できた。さらに、3継代目時点において0.002質量%で細胞の増殖がみられないが、維持は可能という結果となった。また、3継代目でも0.004質量%以上で細胞の増殖することが確

認できた。

[0167] 以上の結果から、L-シスチンおよびL-グルタミンの含量の濃度下限範囲は、基礎培地を100とした時に0.002質量%であることが分かった。

[0168] 実施例9 L-シスチンからL-システインへ置き換えた際の培養性の確認

本実施例では、L-シスチンからL-システインへ置き換えた際の培養性の確認を行った。

[0169] 本実施例では、L-シスチンより溶解性の高いL-システイン塩酸塩一水和物を基礎培地に添加するアミノ酸として使用した場合に、その培養性を、L-シスチンとの比較との観点で検討した。

[0170] (方法)

使用細胞：MDBK細胞（株化細胞）、RL34細胞（株化細胞）、アヒル肝臓由来細胞（初代培養細胞）

培養前の細胞数：MDBKおよびRL34細胞＝ 1×10^5 細胞／ウェル、アヒル肝臓由来細胞＝ 1×10^6 細胞／10cmディッシュ

L-システイン塩酸塩一水和物添加量：L-シスチンは、L-システインの二量体であることから、L-シスチンのモル数の2倍となるように添加した。

[0171] 基礎培地の組成を以下の表に示す。

[0172]

[表12]

物質名	g/L	
	L-シスチン	L-システイン塩酸塩一水和物
塩化カリウム	0.4	0.4
塩化ナトリウム	6.4	6.4
グルコース	4.9	4.9
アミノ酸		
L-グルタミン	0.59	0.59
L-シスチン	0.049	0
L-システイン塩酸塩一水和物	0	0.072
炭酸水素ナトリウム	3.7	3.7
酵母エキスA	2	2
塩化カルシウム	0.38	0.38
パントテン酸カルシウム	0.004	0.004
α -GPC	0.0074	0.0074
葉酸	0.004	0.004
myo-イノシトール	0.0072	0.0072
ニコチンアミド	0.004	0.004
ピリドキシン塩酸塩	0.004	0.004
リボフラビン	0.0004	0.0004
チアミン塩酸塩	0.004	0.004
水	1000	1000
培地全体、アミノ酸含有割合(w/v, %)	0.064%	0.066%
培地全体、L-グルタミン含有割合(w/v, %)	0.059%	0.059%
培地全体、L-シスチン含有割合(w/v, %)	0.005%	0.000%
培地全体、L-システイン塩酸塩一水和物含有割合(w/v, %)	0.000%	0.007%
固形分換算、アミノ酸含有割合(w/w, %)	3.46%	3.58%
固形分換算、L-グルタミン(w/w, %)	3.20%	3.19%
固形分換算、L-シスチン(w/w, %)	0.27%	0.00%
固形分換算 L-システイン塩酸塩一水和物(w/w, %)	0.00%	0.39%

[0173] 上記基礎培地に P S A 1 %、F B S 1 0 % を加えた完全培地にて M D B K 細胞および R L 3 4 細胞の継代培養を行った。また、上記基礎培地に P S A

1%、血清10%を加えた完全培地にてアヒル肝臓由来細胞の継代培養を行った。いずれも、継代は3～4日おきに実施し、3回目まで継代培養を行った。

[0174] (結果)

3回目の継代培養終了時点の結果を図10に示す。図10の縦軸は、生細胞数である。株化細胞であるMDBK細胞（株化細胞）およびRL34細胞、並びに、初代培養細胞であるアヒル肝臓由来細胞を用いて培養試験を行ったところ、いずれにおいても、L-シスチンをL-システイン塩酸塩一水和物に置き換えたことによる培養性の差はほとんど見られなかった。

[0175] この結果より、添加するアミノ酸としてはL-シスチン、L-システインのいずれを用いても細胞の培養に影響を与えないことが明らかになった。

[0176] なお、L-システインをさらに2倍量添加した場合にも（0.14%添加）でも同様の結果が得られた。

産業上の利用可能性

[0177] 本発明は、コストと環境負荷の低減された動物細胞用基礎培地を提供する。本発明の培地、動物細胞の培養方法を利用することにより、より安価で環境負荷の少ない方法で、動物細胞を含む加工食品の提供が可能となった。

請求の範囲

- [請求項1] 酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖を含む動物細胞用基礎培地用組成物であって、前記組成物中のアミノ酸が、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンを含む、前記動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項2] 前記組成物中の全アミノ酸の含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.002～1.0質量部である、請求項1に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項3] 前記組成物中の全アミノ酸に対する、シスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの割合が、50%以上である、請求項1または2に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項4] 前記組成物中のシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.001～1.0質量部である、請求項1～3のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項5] 前記組成物中のシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.1～5.0質量部である、請求項1～4のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項6] 前記組成物中のシスチンおよび／またはシステインの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.0001～0.02質量部である、請求項1～5のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項7] 前記組成物中のシスチンおよび／またはシステインの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.005～1.0質量部である、請求項1～6のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項8] 前記組成物中のグルタミンの含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.001～1.0質量部である、請求項1～7のいずれ

か 1 項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。

- [請求項9] 前記組成物中のグルタミンの含量が、基礎培地用組成物の固形分量当たりで0.1～5.0質量部である、請求項1～8のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項10] 前記酵母抽出物が、高アミノ酸型の酵母抽出物である、請求項1～9のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項11] 前記酵母抽出物の総アミノ酸含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.75質量部以上である、請求項1～10のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項12] 前記酵母抽出物が、低核酸型の酵母抽出物である、請求項1～11のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項13] 前記酵母抽出物の総核酸含量が、基礎培地用組成物を100としたときに2.0質量部以下である、請求項1～12のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項14] 前記酵母抽出物が、高アミノ酸型かつ低核酸型の酵母抽出物である、請求項1～13のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項15] 前記酵母抽出物の含量が、基礎培地用組成物を100としたときに0.05～20.0質量部である、請求項1～14のいずれか1項に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項16] さらにビタミンを含む、請求項1または2に記載の動物細胞用基礎培地用組成物。
- [請求項17] 酵母抽出物、アミノ酸、無機塩および糖を含み、アミノ酸がシスチンおよび／またはシステイン、並びにグルタミンである、動物細胞用基礎培地で、動物細胞を培養することを含む、動物細胞の培養方法。
- [請求項18] 前記酵母抽出物が、高アミノ酸型の酵母の抽出物、低核酸型の酵母の抽出物、または、高アミノ酸型かつ低核酸型の酵母の抽出物である、請求項17に記載の培養方法。

[請求項19] 請求項 1 7 または 1 8 に記載の培養方法によって培養された動物細胞。

[請求項20] 請求項 1 9 の動物細胞を含む、加工食品。