(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7496175号
(P7496175)

(45)発行日　令和6年6月6日(2024.6.6)

(24)登録日　令和6年5月29日(2024.5.29)

(51)国際特許分類

Ｃ１２Ｎ	*5/07*	*(2010.01)*	Ｃ１２Ｎ	5/07
Ｃ１２Ｎ	*1/12*	*(2006.01)*	Ｃ１２Ｎ	1/12

ＦＩ

Z

請求項の数　14　（全21頁）

(21)出願番号　特願2023-530127(P2023-530127)
(86)(22)出願日　令和4年6月23日(2022.6.23)
(86)国際出願番号　PCT/JP2022/025179
(87)国際公開番号　WO2022/270598
(87)国際公開日　令和4年12月29日(2022.12.29)
審査請求日　令和5年12月19日(2023.12.19)
(31)優先権主張番号　特願2021-104448(P2021-104448)
(32)優先日　令和3年6月23日(2021.6.23)
(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)
（出願人による申告）国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構、ムーンショット型農林水産研究開発事業委託研究、産業技術力強化法第１７条の適用を受ける特許出願
早期審査対象出願

(73)特許権者　591173198
学校法人東京女子医科大学
東京都新宿区河田町８－１
(74)代理人　100099759
弁理士　青木 篤
(74)代理人　100123582
弁理士　三橋 真二
(74)代理人　100117019
弁理士　渡辺 陽一
(74)代理人　100141977
弁理士　中島 勝
(74)代理人　100138210
弁理士　池田 達則
(74)代理人　100197169
弁理士　柴田 潤二

最終頁に続く

(54)【発明の名称】　動物細胞培養用組成物の製造方法、それにより得られる動物細胞培養用組成物及びそれを用いた動物細胞の培養方法

(57)【特許請求の範囲】

【請求項１】

動物細胞培養用組成物を製造する方法であって、

以下：

（１）藻類を固体酸触媒と混合し、加熱することによって、藻類抽出物を得る工程；及び

（２）前記藻類抽出物を、動物細胞培養用培地に添加し、前記藻類抽出物の濃度を調整する工程

を含み、

前記固体酸触媒が、木質系原料に由来する炭化物にスルホ基を導入してスルホ化することにより得た木質固体酸触媒である、方法。

【請求項２】

前記動物細胞培養用培地に含まれる血清が１％（ｖ／ｖ）未満であり、及び／又は前記動物細胞培養用培地に含まれる無血清培養の添加因子が１μｇ／Ｌ未満である、請求項１に記載の方法。

【請求項３】

前記動物細胞培養用培地に含まれるグルコースが１０ｍｇ／Ｌ未満である、請求項１又は２に記載の方法。

【請求項４】

前記動物細胞培養用培地に含まれる、Ｌ－グルタミン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－シスチン、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチ

オニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、及びＬ－バリンからなる群から１又は複数選択されるアミノ酸が、それぞれ０．１ｍｇ／Ｌ未満である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項５】
前記動物細胞培養用培地に含まれるビタミン類が１μｇ／Ｌ未満である、請求項１又は２項に記載の方法。
【請求項６】
前記動物細胞培養用培地が、無機塩培地である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項７】
前記藻類が、微細藻類である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項８】
前記藻類が、クロレラ属の微細藻類である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項９】
前記藻類が、クロロコックム目の微細藻類である、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項１０】
前記工程（１）が、６０℃～２００℃で実施される、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項１１】
前記工程（１）が、２時間～２４時間実施される、請求項１又は２に記載の方法。
【請求項１２】
請求項１又は２に記載の方法により得られる動物細胞培養用組成物を用いる、動物細胞の培養方法。
【請求項１３】
（ｉ）動物細胞を培養した後の廃液（第１廃液）を使って藻類を培養する工程；
（ｉｉ）前記藻類を回収し、固体酸触媒と混合して加熱することによって、藻類抽出物を得る工程；
（ｉｉｉ）前記藻類抽出物を、前記（ｉ）の藻類培養後の廃液（第２廃液）に添加し、前記藻類抽出物の濃度を調整して動物細胞培養用組成物を製造する工程；及び
（ｉｖ）前記動物細胞培養用組成物を用いて動物細胞を培養する工程
を含む、藻類及び動物細胞のリサイクル培養方法であって、
前記固体酸触媒が、木質系原料に由来する炭化物にスルホ基を導入してスルホ化することにより得た木質固体酸触媒である、方法。
【請求項１４】
動物細胞培養用組成物の調製に用いるための藻類抽出物の製造方法であって、
（１）藻類を固体酸触媒と混合し、加熱することによって藻類抽出物を得る工程
を含み、
前記固体酸触媒が、木質系原料に由来する炭化物にスルホ基を導入してスルホ化することにより得た木質固体酸触媒である、方法。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、動物細胞培養用組成物の製造方法、それにより得られる動物細胞培養用組成物及びそれを用いた動物細胞の培養方法に関する。
【背景技術】
【０００２】
哺乳類細胞は医学、薬学、理工学、農学、獣医学等といった様々な研究・産業分野において利用されている。それらの細胞培養技術を用いた研究により様々な病因が解明され、様々な治療法の開発をもたらした。様々な疾患の治療／予防のために、哺乳動物細胞から生産されたバイオ医薬・抗体医薬やワクチンが利用されている。更に、培養細胞は、細胞生物学、生化学、遺伝学、生理学、分子生物学等といった基礎的学術分野の進展にも大きく貢献した。より最近になって、培養した筋細胞は「培養肉」の細胞源として利用されて

いる。「培養肉」のタンパク質生産効率は従来の家畜飼育による生産に比べはるかに効率的であり、食肉生産を従来の家畜飼育によるものから培養肉生産システムに変えることで、最大で９９％の土地利用、９６％の水消費、９６％の温室効果ガス排出、４５％のエネルギー消費を削減できると報告されている。そのため今後培養細胞を用いた食肉生産が持続可能な食料生産システムとして世界的に広がってくると考えられている。将来、食料としての培養哺乳類細胞の使用により、莫大な量の細胞が必要になることが予測されている。

【０００３】

哺乳類細胞の培養には培地が不可欠であり、現在でも大量の培地が細胞研究に用いられる。培地は様々な栄養素を含むが、主なものはグルコースとアミノ酸である。それらの栄養素は穀物や従属栄養微生物に由来し、それらの従属栄養微生物も穀物に由来する様々な栄養素を必要とする。穀物の栽培は多くの化学肥料と農薬を必要とし、莫大な量のエネルギーを要し、温室効果ガス（ＧＨＧ）の発生と環境汚染の原因となる。また穀物生産は地球温暖化や環境汚染などの環境変化により大きく影響を受ける。

【０００４】

現在のところ、１５０，０００種以上の藻類がＡｌｇａｅＢａｓｅ（ｈｔｔｐ：／／ｗｗｗ．ａｌｇａｅｂａｓｅ．ｏｒｇ／）に登録されており、この数は日々更新されている。種の多様性のため、藻類の性質は多岐にわたり、純水か海水のいずれか又はその両方の環境で生育する種から、好塩基性及び好アルカリ性種にまで及ぶ。それらの特徴に応じ、多様な用途が現在開発されつつある。その中には、微細藻類の窒素同化能を利用する排液処理や、化石燃料の燃焼から発生する二酸化炭素ガスの固定等が含まれる（非特許文献１～３）。

【０００５】

微細藻類は、炭水化物（糖類）や脂質をはじめとする栄養素を光合成により二酸化炭素から合成し、窒素ガス／アンモニア／硝酸塩等を使ってアミノ酸を産生する。微細藻類は太陽エネルギーと無機物を利用することによって、効率的に様々な栄養素を生産する。微細藻類によって生産されたそれらの栄養素は、エネルギー及び食品産業分野等様々な分野において利用される。例えば、微細藻類から抽出された脂質は、石油に代わる代替エネルギーとして期待されている（非特許文献４）。その上、微細藻類から抽出されたグルコースは、バイオエタノールを生産する酵母の栄養素として利用されている（非特許文献５～６）。更に、微細藻類により生産されたアミノ酸を含む栄養素は、栄養補助食品、ペットフード、土壌用の肥料として利用されている（非特許文献７～１０）。微細藻類は、ほとんど残留物なく最も効率的に栄養素を合成する光合成生物であると一般に考えられている（非特許文献１１）。

【０００６】

インビトロにおいて細胞を培養するためには、アミノ酸、ビタミン、ミネラル等を含む合成培地に加えて、多くの場合は、ヒト、ウシの胎児、ウシの新生児、馬、ニワトリ、ウサギ等の血清が必要とされている。血清には増殖因子などの細胞の増殖に必要な因子が含まれており、これらが細胞の増殖に不可欠となる場合が多い。しかしながら、血清は、ロット毎に品質が異なっており、安定しておらず、高価であるなどの課題を抱えており、これらを代替する物質が求められていた。そのような課題に対して、特許文献１～３では、微細藻類の抽出物が、細胞培養において、血清の機能を一部代替し得ることが記載されている。しかしながら、微細藻類の抽出物が、細胞培養に必須であるアミノ酸（特に、グルタミン等）やビタミン等の成分を含まない合成培地（例えば、無機塩培地）との混合によって、細胞を培養し得るかについては記載されておらず、ましてや、血清や無血清培養の添加因子を完全に代替し得ることについては全く記載されていない。

【０００７】

液体酸を用いて微細藻類を加水分解によって抽出した藻類抽出物を添加した培地（例えば、アミノ酸及び／又はビタミン類を含有しない培地）において、動物細胞が培養し得ることが報告されている（特許文献４）。しかしながら、その抽出液が、血清や無血清培養の添加因子を完全に代替し得ることについては記載されていない。

【０００８】
　また、藻類由来のアミノ酸（例えば、マイコスポリン様アミノ酸（特許文献５））や、硫酸化多糖（特に、フコダイン（特許文献６））が細胞増殖効果を示すことが記載されているが、血清や無血清培養の添加因子を完全に代替し得ることについては記載されていない。
【０００９】
　海藻類バイオマスや植物系材料から、単糖を含む糖化液を得るための加水分解触媒として固体酸を用いる技術が報告されているが、得られる糖化液により、細胞培養を行うことについては開示されていない（特許文献７～８）。
【先行技術文献】
【特許文献】
【００１０】
【文献】特開昭５７－６５１７９号公報
【文献】特開昭５７－２０６３８４号公報
【文献】特開昭６０－１８６２８０号公報
【文献】国際公開第２０２１／０６６１１３号
【文献】特開２０１６－２１６７５０号公報
【文献】国際公開第００／６２７８５号
【文献】特開２０１４－３６５８９号公報
【文献】特開２０１９－１９９４６２号公報
【非特許文献】
【００１１】
【文献】L. Wang, M. Min, Y. Li, P. Chen, Y. Chen, et al., Cultivation of green algae Chlorella sp. in different wastewaters from municipal wastewater treatment plant. Appl. Biochem. Biotechnol. 162 (2010) 1174-1186.
【文献】F. Rossi, E.J. Olguin, L. Diels, R. De Philippis, Microbial fixation of CO2 in water bodies and in drylands to combat climate change, soil loss and desertification. N. Biotechnol. 32 (2015) 109-120.
【文献】J. Cheng, Y. Zhu, Z. Zhang, W. Yang, Modification and improvement of microalgae strains for strengthening CO2 fixation from coal-fired flue gas in power plants. Bioresour. Technol. (2019) doi: 10.1016/j.biortech.2019.121850.
【文献】I. Ajjawi, J. Verruto, M. Aqui, L.B. Soriaga, J. Coppersmith, et al., Lipid production in Nannochloropsis gaditana is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. Nat. Biotechnol.35 (2017) 647-652.
【文献】S.H. Ho, S.W. Huang, C.Y. Chen, T. Hasunuma, A. Kondo, et al., Bioethanol production using carbohydrate-rich microalgae biomass as feedstock. Bioresour. Technol. 135 (2013) 191-198.
【文献】G.E. Lakatos, K. Ranglova, J.C. Manoel, T. Grivalsky, J. Kopecky, et al., Bioethanol production from microalgae polysaccharides. Folia Microbiol. (Praha). (2019) doi: 10.1007/s12223-019-00732-0.
【文献】S. McCusker, P.R. Buff, Z. Yu, A.J Fascetti, Amino acid content of selected plant, algae and insect species: a search for alternative protein sources for use in pet foods. J. Nutr. Sci. 3 (2014) e39.
【文献】G. Gutierrez-Salmean, L. Fabila-Castillo, G. Chamorro-Cevallos, Nutritional and toxicological aspects of Spirulina (Arthrospira). Nutr. Hosp. 32 (2015) 34-40.
【文献】E.T. Alori, O.O. Babalola, Microbial inoculants for improving crop quality and human health in Africa. Front. Microbiol. 9 (2018) 2213.
【文献】M.I. Khan, J.H. Shin, J.D. Kim, The promising future of microalgae: current status, challenges, and optimization of a sustainable and renewable ind

ustry for biofuels, feed, and other products. Microb. Cell Fact.17 (2018) 36.
【文献】A.K. Singh, M.P. Singh, Importance of algae as a potential source of biofuel. Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand). 60 (2014) 106-109.
【発明の概要】
【発明が解決しようとする課題】
【００１２】
本発明は、環境負荷と環境変化への影響のリスクを減らす新規細胞培養系を確立することを目的とする。
【課題を解決するための手段】
【００１３】
本発明者らは、上記課題を解決するために、種々の角度から検討を加えて研究開発を行ってきた。その結果、驚くべきことに、固体酸触媒を用いて、微細藻類から抽出された栄養素を添加した培地（特に、血清及び／又は無血清培養の添加因子を実質的に含有しない培地）は、動物細胞を培養可能であることを見出した。すなわち、本発明は、以下の態様を含む。
【００１４】
［１］　動物細胞培養用組成物を製造する方法であって、
以下：
（１）藻類を固体酸触媒と混合し、加熱することによって、藻類抽出物を得る工程；及び
（２）前記藻類抽出物を、動物細胞培養用培地に添加し、前記藻類抽出物の濃度を調整する工程
を含む、方法。
［２］前記動物細胞培養用培地が、血清及び／又は無血清培養の添加因子を実質的に含まない、項目１に記載の方法。
［３］　前記動物細胞培養用培地が、グルコースを実質的に含まない、項目１又は２に記載の方法。
［４］　前記動物細胞培養用培地は、Ｌ－グルタミン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－シスチン、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、及びＬ－バリンからなる群から１又は複数選択されるアミノ酸を実質的に含まない、項目１～３のいずれか１項に記載の方法。
［５］　前記動物細胞培養用培地が、ビタミン類を実質的に含まない、項目１～４のいずれか１項に記載の方法。
［６］　前記動物細胞培養用培地が、無機塩培地である、項目１～５のいずれか１項に記載の方法。
［７］　前記藻類が、微細藻類である、項目１～６のいずれか１項に記載の方法。
［８］　前記藻類が、クロレラ属の微細藻類である、項目１～７のいずれか１項に記載の方法。
［９］　前記固体酸触媒が、木質系原料に由来する炭化物にスルホ基を導入してスルホ化することにより得た木質固体酸触媒又はフェノール樹脂にスルホ基を導入してスルホ化することにより得た樹脂固体酸触媒である、項目１～８のいずれか１項に記載の方法。
［１０］　前記工程（１）が、７０℃～１５０℃で実施される、項目１～９のいずれか１項に記載の方法。
［１１］　前記工程（１）が、２時間～２４時間実施される、項目１～１０のいずれか１項に記載の方法。
【００１５】
［１２］　項目１～１１のいずれか１項に記載の方法により得られる、動物細胞培養用組成物。
【００１６】
［１３］　項目１～１１のいずれか１項に記載の方法により得られる動物細胞培養用組

成物を用いる、動物細胞の培養方法。
【００１７】
［１４］ （ｉ）動物細胞を培養した後の廃液（第１廃液）を使って藻類を培養する工程；
（ｉｉ）前記藻類を回収し、固体酸触媒と混合して加熱することによって、藻類抽出物を得る工程；
（ｉｉｉ）前記藻類抽出物を、前記（ｉ）の藻類培養後の廃液（第２廃液）に添加し、前記藻類抽出物の濃度を調整して動物細胞培養用組成物を製造する工程；及び
（ｉｖ）前記動物細胞培養用組成物を用いて動物細胞を培養する工程
を含む、藻類及び動物細胞のリサイクル培養方法。
【００１８】
［１５］ 動物細胞培養用組成物の調製に用いるための藻類抽出物の製造方法であって、
（１）藻類を固体酸触媒と混合し、加熱することによって藻類抽出物を得る工程
を含む、方法。
［１６］ 前記動物細胞培養用培地が、血清及び／又は無血清培養の添加因子を実質的に含まない、項目１５に記載の方法。
［１７］ 前記動物細胞培養用組成物が、グルコースを実質的に含まない、項目１５又は１６に記載の方法。
［１８］ 前記動物細胞培養用組成物は、Ｌ－グルタミン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－システチン、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、及びＬ－バリンからなる群から１又は複数選択されるアミノ酸を実質的に含まない、項目１５～１７のいずれか１項に記載の方法。
［１９］ 前記動物細胞培養用組成物が、ビタミン類を実質的に含まない、項目１５～１８のいずれか１項に記載の方法。
［２０］ 前記動物細胞培養用組成物が、無機塩培地である、項目１５～１９のいずれか１項に記載の方法。
［２１］ 前記藻類が、微細藻類である、項目１５～２０のいずれか１項に記載の方法。
［２２］ 前記藻類が、クロレラ属の微細藻類である、項目１５～２１のいずれか１項に記載の方法。
［２３］ 前記固体酸触媒が、木質系原料に由来する炭化物にスルホ基を導入してスルホ化することにより得た木質固体酸触媒又はフェノール樹脂にスルホ基を導入してスルホ化することにより得た樹脂固体酸触媒である、項目１５～２２のいずれか１項に記載の方法。
［２４］ 前記工程（１）が、７０℃～１５０℃で実施される、項目１５～２３のいずれか１項に記載の方法。
［２５］ 前記工程（１）が、２時間～２４時間実施される、項目１５～２４のいずれか１項に記載の方法。
［２６］ 前記工程（１）が、加圧下において実施される、項目１５～２５のいずれか１項に記載の方法。
【発明の効果】
【００１９】
本発明の方法によれば、細胞の培養に必要な栄養素を微細藻類から容易に抽出可能であり、安価であり、かつ環境負荷を低減させる新たな細胞培養系を提供することが可能となる。
【図面の簡単な説明】
【００２０】
【図１】グルコース／血清含有又は不含ＤＭＥＭを用いて培養した初代ウシ筋芽細胞の相対生細胞数。
【図２】各抽出条件で得た藻類抽出液を添加したグルコース／血清不含ＤＭＥＭを用いて

培養した初代ウシ筋芽細胞の相対生細胞数。
【図３】各抽出条件で得た藻類抽出液を添加したグルコース／血清不含ＤＭＥＭを用いて培養した初代ウシ筋芽細胞の相対生細胞数。
【図４】各培地で培養した初代ウシ筋芽細胞の顕微鏡像。
【図５】各培地で培養した初代ウシ筋芽細胞の顕微鏡像。
【図６】各抽出条件で得た藻類抽出液を添加したグルコース／血清不含ＤＭＥＭを用いて培養した初代ウシ筋芽細胞の相対生細胞数。
【図７Ａ】固体酸処理藻類（クロロコックム）抽出液を用いた動物筋細胞培養（顕微鏡写真）。
【図７Ｂ】固体酸処理藻類(クロロコックム)抽出液を用いた動物筋細胞培養(定量評価)。
【発明を実施するための形態】
【００２１】
以下、本発明の実施形態について、必要に応じて図面を参照にしながら説明する。実施形態の構成は例示であり、本発明の構成は、実施形態の具体的構成に限定されない。なお、本明細書で引用されている全ての文献は、その全内容が参照により本明細書に援用される。
【００２２】
一実施態様において、本発明は、動物細胞培養用組成物の製造方法であって、
以下：
（１）藻類を固体酸触媒と混合し、加熱することによって、藻類抽出物を得る工程；及び
（２）前記藻類抽出物と、血清及び／又は無血清培養の添加因子を実質的に含まない動物細胞培養用培地を混合する工程
を含む、方法を提供する。
【００２３】
また、一実施態様において、本発明は、動物細胞培養用組成物を製造する方法であって、 以下：
（１）藻類を固体酸触媒と混合し、加熱することによって、藻類抽出物を得る工程；及び
（２）前記藻類抽出物を、動物細胞培養用培地に添加し、前記藻類抽出物の濃度を調整する工程を含む、方法を提供する。
【００２４】
本発明の方法により得られる藻類由来の成分（藻類抽出物）を含む動物細胞培養用組成物は、血清及び／又は無血清培養の添加因子を実質的に含んでいなくても、動物細胞の維持及び増殖に必要とされる血清又は無血清培養の添加因子を添加した動物細胞用培地と同等、又はそれ以上の効果を発揮するという驚くべき知見を発見したことにより完成させたものである。従って、本発明により提供される動物細胞培養用組成物は、従来の動物細胞の培養において用いられる血清又は無血清培養の添加因子の添加を必要としない。特に、血清は、ロット毎に品質が異なっており、また、高価であるなどの課題があったが、本発明はこれらの課題の解決に寄与する。動物細胞培養用組成物における藻類抽出物の濃度は、藻類抽出物の抽出条件や、原料として用いられる藻類の種類もしくは量、培養する動物細胞の種類などによって条件が異なるため、限定されるものではないが、例えば、動物細胞培養用組成物の全容量に対して、藻類抽出物が、０．１～９９％（ｖ／ｖ）、１～８０％（ｖ／ｖ）、２～５０％（ｖ／ｖ）、３～３０％（ｖ／ｖ）、５～２５％（ｖ／ｖ）含まれていてもよい。
【００２５】
本明細書において「血清」とは、血液が凝固した時、上澄みにできる淡黄色の液体成分のことをいい、増殖因子などの細胞の増殖に必要な因子が含まれている。その由来は、ヒト、ウシの胎児、ウシの新生児、馬、ニワトリ、ウサギ等であってもよく、特に限定されない。本発明によって提供される動物細胞培養用組成物は、これらの血清が含まれていなくても、血清が含まれていた場合と同等又は以上に動物細胞を増殖させることができる。
【００２６】

本明細書において「無血清培養の添加因子」とは、無血清培地において、血清の代わりに、一般に添加される細胞を増殖（成長）させる因子をいい、例えば、インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム、アルブミン、メルカプトエタノール、プロスタグランジンなど、目的の細胞に合わせて無血清培地に添加されるものをいう。本発明によって提供される動物細胞培養用組成物は、これらの無血清培養の添加因子が含まれていなくても、無血清培養の添加因子が含まれていた場合と同等又は以上に動物細胞を増殖させることができる。

【００２７】

本明細書において、「固体酸触媒」（「固体酸」ともいう。）とは、反応溶液中において固体で分散する酸からなる触媒をいい、例えば、ゼオライト、アルミナ、シリカ、Ｈ－モルデナイト、ニオブ酸等の無機固体酸や、強酸性イオン交換体（例えば、アンバーリスト（商標）－１５、ナフィオン（商標）ＮＲ－５０等）などのような樹脂等の有機素材にスルホン基、カルボキシル基、フェノール性水酸基等の酸性基を導入したもの等が挙げられ、接触表面積を多くするために粉末状又は粒状に調製した固体酸触媒が用いられ得る。藻類を加水分解する時に固体酸を用いることにより、液体酸を用いた時に必要であった中和処理が必要なくなる。これにより、中和処理によって生じ得る塩による塩濃度の上昇が抑えられる。また、固体酸触媒は、回収して再利用可能であり、環境負荷を低減させることも可能となる。

【００２８】

一実施態様において、本発明において適用可能な固体酸触媒としては、木質系原料に由来する炭化物にスルホ基を導入してスルホ化することにより得た木質固体酸触媒又はフェノール樹脂にスルホ基を導入してスルホ化することにより得た樹脂固体酸触媒などが用いられ得る。

【００２９】

本発明の一実施態様において用いられ得る木質固体酸触媒は、木質系原料を焼失しない程度の温度条件下にて炭化されて炭化物とし、スルホ基（またはスルホン酸基とも称される）を導入するスルホ化が行われて得られるものであってもよい。木質系固体酸触媒としては、例えば、特許第５５２８０３６号等やＪ．Ａｍ．Ｃｈｅｍ．Ｓｏｃ ２００８， ｖｏｌ．１３０， Ｎｏ．３８， １２７８７－１２７９３に開示の固体酸等を用いることができる。

【００３０】

本発明の一実施態様において用いられ得る樹脂固体酸触媒は、原料のフェノール樹脂にスルホ基が導入しスルホ化が行われて得られるものであってもよい。

【００３１】

本発明に用いられ得る動物細胞培養用培地は、Ｌ－グルタミン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－シスチン、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、及びＬ－バリンからなる群から１又は複数選択されるアミノ酸を実質的に含まない動物細胞培養用培地であり得る。従来の動物細胞培養用培地に含まれるこれらのアミノ酸が欠損していても、本発明によって得られる藻類抽出物は、これらのアミノ酸を代替することができ、動物細胞を増殖させ得る。

【００３２】

一実施態様において、本発明に用いられ得る動物細胞培養用培地は、ビタミン類を実質的に含まない動物細胞培養用培地であり得る。本発明に用いられ得る、ビタミン類を実質的に含まない動物細胞培養用培地とは、例えば、パントテン酸、塩化コリン、葉酸、ｉ－イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン、及びこれらの薬学的に許容し得る塩からなる群から１又は複数選択されるビタミン類を実質的に含まないものであってもよい。従来の動物細胞培養用培地に含まれるこれらのビタミン類が欠損していても、本発明によって得られる藻類抽出物は、これらのビタミン類を代替することができ、動物細胞を増殖させ得る。

【００３３】
一実施態様において、本発明に用いられ得る動物細胞培養用培地は、グルコースを実質的に含まない動物細胞培養用培地であってもよく、さらにピルビン酸を実質的に含まない動物細胞培養用培地であってもよい。従来の動物細胞培養用培地に含まれるグルコースが欠損していても、本発明によって得られる藻類抽出物は、グルコースを代替することができ、動物細胞を増殖させ得る。
【００３４】
本明細書において、「実質的に含まない」とは、該当する物質がほとんど含まれていないことを意味しているが、該当する物質が全く含まれていないことを意味するのではなく、例えば、グルコースであれば定量下限の１０ｍｇ／Ｌ未満（例えば、１０ｍｇ／Ｌ未満、５ｍｇ／Ｌ未満、又は１ｍｇ／Ｌ未満）含まれるものであってもよく、例えばアミノ酸（例えば、Ｌ－グルタミン等）であれば、定量下限の０．１ｍｇ／Ｌ未満含まれるものであってもよく、又はビタミン類であれば定量下限の１μｇ／Ｌ未満含まれるものであってもよい。また、血清であれば、１％（ｖ／ｖ）未満（例えば、１％（ｖ／ｖ）未満、０．５％（ｖ／ｖ）未満、又は０．１％（ｖ／ｖ）未満）含まれるものであってもよく、無血清培養の添加因子であれば、１μｇ／Ｌ未満（例えば、１μｇ／Ｌ未満、０．５μｇ／Ｌ未満、０．１μｇ／未満）含まれるものであってもよい。
【００３５】
本明細書において、「藻類」とは、光合成により酸素を産生する生物のうち、主に地上に生息するコケ植物、シダ植物、種子植物を除いたものの総称をいう。藻類は光合成に必要な環境が整えば、酸素、栄養分（例えば、グルコース、アミノ酸）を自ら作り出すことができ、増殖することができる。本発明は、藻類から抽出された成分を含む組成物を添加した培地において、細胞を培養可能であることを見出したことにより完成したものである。
【００３６】
一実施態様において、本発明を適用し得る藻類は、「微細藻類（「単細胞藻類」ともいう。）であってもよい。本明細書において、「微細藻類」とは、藻類の中でも、個体が単一の細胞からなる藻類をいい、複数の微細藻類個体が集まり、群体を形成する微細藻類も含み、淡水産または海産、あるいは、狭塩性または広塩性の微細藻類が存在する。例えば、クロロフィルａおよびｂを葉緑体の主要色素とする緑藻類、クロロフィルｄを主要色素とする単細胞性の藍藻類（シアノバクテリア）、クロロフィルａおよびフィコビリンタンパク質を主要色素とする単細胞性の紅藻類が微細藻類の例として挙げられる。さらに詳しく例を挙げると、緑藻類では、緑藻綱クラミドモナス目のクラミドモナス・レインハルドティ（Ｃｈｌａｍｙｄｏｍｏｎａｓ ｒｅｉｎｈａｒｄｔｉｉ）（和名：クラミドモナス）（淡水産）、ドナリエラ目のドナリエラ・サリナ（Ｄｕｎａｌｉｅｌｌａ ｓａｌｉｎａ）（和名：ドナリエラ）（海産）、オオヒゲマワリ目のボルボックス・カルテリ（Ｖｏｌｖｏｘ ｃａｒｔｅｒｉ）（和名：ボルボックス）（淡水産）、クロロコックム目のクロロコックム・リットラレ（Ｃｈｌｏｒｏｃｏｃｃｕｍ ｌｉｔｔｏｒａｌｅ）（海産）、ヨコワミドロ目のヒドロディクティオン・レティキュラツム（Ｈｙｄｒｏｄｉｃｔｙｏｎ ｒｅｔｉｃｕｌａｔｕｍ）（和名：アミミドロ）（淡水産）、ペディアストラム・デュプレックス（Ｐｅｄｉａｓｔｒｕｍ ｄｕｐｌｅｘ）（和名：クンショウモ）（淡水産）、セネデスムス・ディモルファウス（Ｓｃｅｎｅｄｅｓｍｕｓ ｄｉｍｏｒｐｈｕｓ）（和名：イカダモ）（淡水産）、トレボウキシア藻綱クロレラ目のクロレラ属（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｓｐ．）（和名：クロレラ）（例えば、クロレラ・ブルガリス（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｖｕｌｇａｒｉｓ）（淡水産）、クロレラ・ピレノイドサ（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｐｙｒｅｎｏｉｄｏｓａ）（淡水産）、クロレラ・エルプソイデア（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｅｌｌｉｐｓｏｉｄｅａ）（淡水産）、クロレラ・レギラリス（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｒｅｇｕｌａｒｉｓ）など）（淡水産））、ユーグレナ植物門ユーグレナ藻綱ユーグレナ目のユーグレナ・グラシリス（Ｅｕｇｌｅｎａ ｇｒａｃｉｌｉｓ）およびユーグレナ プロキシマ（Ｅｕｇｌｅｎａ ｐｒｏｘｉｍａ）（和名：ミドリムシ）（淡水産）などが挙げられる。単細胞性の藍藻類では、シアノバクテリア門のアカリオクロリス・マリナ（Ａｃ

ａｒｙｏｃｈｌｏｒｉｓ ｍａｒｉｎａ）（海産）、スピルリナ・サブサルサ（Ｓｐｉｒｕｌｉｎａ ｓｕｂｓａｌｓａ）（淡水産）、アルスロスピラ・プラテンシス（Ａｒｔｈｒｏｓｐｉｒａ ｐｌａｔｅｎｓｉｓ）（淡水産）、シネココッカス属（Ｓｙｎｅｃｈｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．）（海産または淡水産）などが挙げられる。単細胞性の紅藻類では、紅藻植物門イデユココゴメ綱イデユココゴメ目のシアニジウム カルダリウム（Ｃｙａｎｉｄｉｕｍ ｃａｌｄａｒｉｕｍ）（和名：イデユココゴメ）（淡水産）または紅藻植物門イデユココゴメ綱イデユココゴメ目のガルディエリア パルティータ（Ｇａｌｄｉｅｒｉａ ｐａｒｔｉｔａ）（淡水産）などが挙げられる。単細胞性の車軸藻類では、緑色植物門の車軸藻綱クレブソルミディウム目のスティココックス属（Ｓｔｉｃｈｏｃｏｃｃｕｓ ｓｐ．）（海産）が挙げられる。また、単細胞性のアオサ藻綱の藻類であるフィラメントス－ウルボフィテ（Ｆｉｌａｍｅｎｔｏｕｓ－ｕｌｖｏｐｈｙｔｅ）が挙げられる。本発明が適用され得る藻類は、上記で挙げられた藻類の他、それらの遺伝子操作が行われた遺伝子組換え体であってもよく、上記以外の藻類であってもよい。例えば、本発明が適用し得る藻類は、淡水産もしくは海産、および／または狭塩性または広塩性の微細藻類であってもよいが、好ましくは海産および／または広塩性の微細藻類であり、例えばクロロコックム・リトラレ（Ｃｈｌｏｒｏｃｏｃｃｕｍ ｌｉｔｔｏｒａｌｅ）や、シネココッカス属の藻類などに適用可能であるが、これに限定されない。

【００３７】

本発明に用いられる藻類は、天然の藻類を用いても良く、公知の培養法によって増殖させた藻類を用いても良い。

【００３８】

一般に、タンパク質や多糖などの生体高分子は、加熱下（例えば、約６０℃～約２００℃、好ましくは約８０℃～約１８０℃、より好ましくは約７０℃～約１５０℃、さらに好ましくは約９５℃～約１３５℃）で加水分解され、オリゴマーやモノマー（タンパク質においてはペプチドやアミノ酸、多糖においてはオリゴ糖、単糖）を生じる。従って、本発明では、加熱工程が、約６０℃～約２００℃、好ましくは約８０℃～約１８０℃、より好ましくは約７０℃～約１５０℃、さらに好ましくは約９５℃～約１３５℃で実施されてもよい。また、本発明の加熱工程の時間は、用いられる藻類の種類、量、又は濃度、あるいは反応溶液のｐＨ、温度などの条件によって調整することができ、例えば、約３０分～約４８時間、約１時間～約３６時間、約２時間～約２４時間、約２．５時間～約１２時間、約２．５時間～約７時間実施されてもよい。なお、本明細書において、「約」との用語は、それが付された数値の±１０％、好ましくは±５％、より好ましくは±３％、さらに好ましくは±１％の範囲の数値が含まれることを意味する。

【００３９】

一実施態様において、工程（１）で用いられる藻類は、加熱処理に供される前に、乾燥処理、例えば凍結乾燥に供されてもよい。

【００４０】

一実施態様において、工程（１）は、加圧下で実施されてもよい。本明細書において、「加圧下」とは、大気圧、すなわち１気圧よりも高い気圧条件をいい、例えば、１．１気圧以上、１．５気圧以上、１．８気圧以上、又は２気圧以上で実施されてもよい。例えば、１．１～３００気圧、１．５～２００気圧、１．８～１００気圧、２～５０気圧、例えば２～２０気圧であってもよい。加圧条件は、任意の装置や方法によって実施されてもよく、例えば、オートクレーブを用いることによって加圧条件を実現することができる。

【００４１】

一実施態様において本発明は、上述の方法により得られる、動物細胞培養用組成物を提供する。

【００４２】

また、一実施態様において本発明は、上述の方法により得られる、動物細胞培養用組成物を用いる、動物細胞の培養方法を提供する。

【００４３】

本明細書において、動物細胞とは、脊椎動物（哺乳類（「哺乳動物」ともいう。）、鳥類、両生類、爬虫類または魚類）の細胞、または無脊椎動物（例えば、ホヤ、節足動物（甲殻類（例えば、エビ、カニなど）、昆虫類など）、棘皮動物（ウニ、ナマコ、ヒトデなど）、軟体動物（例えば、貝、イカ、タコなど）など）の細胞を含む意味で用いられる。一実施態様において、本発明を適用し得る動物細胞は、脊椎動物（例えば、ヒト、サル、ウシ、クジラ、クマ、シカ、ウマ、ブタ、イノシシ、ヒツジ、ウサギ、ラット、マウス、ハムスター、ヤギ、イヌまたはネコなどの哺乳動物、ニワトリ、アヒル、ガチョウ、ウズラ、カモ、キジなどの鳥類、カエル、サンショウウオ、イモリなどの両生類、ワニ、トカゲ、ヘビ、カメ、スッポンなどの爬虫類、マグロ、サケ、マス、コイ、サメ、ウナギ、フグなどの魚類）の細胞、無脊椎動物（例えば、ホヤ、節足動物（甲殻類（例えば、エビ、カニなど）、昆虫類など）、棘皮動物（ウニ、ナマコ、ヒトデなど）、軟体動物（例えば、貝、イカ、タコなど）など）の細胞、あるいはそれら由来の初代細胞、株化細胞、多能性幹細胞（例えば、ＥＳ細胞、ｎｔＥＳ細胞、Ｍｕｓｅ細胞、ｉＰＳ細胞）、または組織幹細胞（例えば、間葉系幹細胞）あるいはそれらから分化誘導された細胞であってもよい。また、動物細胞の生体組織における由来は、例えば、筋肉系（例えば、筋芽細胞）、皮膚系（例えば、線維芽細胞、ケラチノサイト）、肝臓系（例えば、肝実質細胞）、腎臓系（例えば、腎細胞（例えば、ＨＥＫ２９３））、心臓系（例えば、心筋細胞）、消化器系（例えば、口腔粘膜細胞、腸管上皮細胞、壁細胞）、造血系（例えば、造血幹細胞）、生殖組織系（例えば、卵巣細胞（例えば、ＣＨＯ細胞）、精細胞、子宮上皮細胞）、粘膜系（例えば、上皮細胞）、骨組織系（例えば、骨芽細胞、軟骨細胞）などであってもよく、これら以外の組織に由来するものであってもよい。

【００４４】

本発明により提供され得る動物細胞培養用組成物は、１以上の藻類由来の成分を含むものであってもよく、例えば、２以上の藻類由来の成分を含むものであってもよい。例えば、グルコースを多く含む藻類由来の成分と、タンパク質を構成するアミノ酸を多く含む藻類由来の成分とを組み合わせて含むものであってもよい。また、本発明により提供され得る動物細胞培養用組成物は、固体酸触媒以外の抽出方法、例えば、超音波処理や、液体酸を用いた方法（例えば、国際公開第２０２１／０６６１１３号）により得られた藻類抽出物を含むものであってもよい。

【００４５】

本発明の細胞を培養する方法において、藻類由来の成分を含む組成物を添加する培地は、培養する細胞の種類によって適宜選択すればよいが、緩衝作用を有する媒体が好ましく、例えば、リン酸緩衝液、イーグル培地、ダルベッコ改良イーグル培地（ＤＭＥＭ）、ＤＭＥＭ：Ｆ１２培地、グラスゴー最小必須培地、グレース昆虫培地、ハム培地、イスコフ改良イーグル培地、ＲＰＭＩ－１６４０培地、Ｌ－１５培地、マッコイ５Ａ培地などであってもよく、これらの培地において、血清及び／又は無血清培養の添加因子を実質的に含まないものが用いられ得る。また、グルコース、ビタミン類及び／又はタンパク質構成アミノ酸（例えば、Ｌ－グルタミン、Ｌ－アルギニン、Ｌ－シスチン、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－セリン、Ｌ－スレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、及びＬ－バリンからなる群から選択される１以上のアミノ酸）を実質的に含まないものであってもよい。培地は、液体培地であってもよく、固形培地であってもよい。本発明の方法により得られる藻類抽出物を、動物細胞培養用培地に添加することによって、細胞の生存に必要な栄養素（例えば、増殖因子、グルコース、及びタンパク質構成アミノ酸、ビタミン類など）が供給され、細胞培養が可能となる。藻類抽出物を動物細胞培養用培地に添加する割合は、培養する細胞の種類などに応じて適宜調整すればよいが、例えば、藻類抽出物が添加された動物細胞培養用培地の全容量に対して、藻類抽出物が、０．１～９９％（ｖ／ｖ）、１～８０％（ｖ／ｖ）、２～５０％（ｖ／ｖ）、３～３０％（ｖ／ｖ）、５～２５％（ｖ／ｖ）含まれていてもよい。

【００４６】

一実施態様において、本発明は、血清及び／又は無血清培養の添加因子を実質的に含まない動物細胞培養用組成物の調製に用いるための藻類抽出物の製造方法であって、
藻類を固体酸触媒と混合し、加熱することによって藻類抽出物を得る工程
を含む、方法を提供する。

【００４７】

また、一実施態様において、本発明は、動物細胞培養用組成物の調製に用いるための藻類抽出物の製造方法であって、
藻類を固体酸触媒と混合し、加熱することによって藻類抽出物を得る工程
を含む、方法を提供する。

【００４８】

血清及び／又は無血清培養の添加因子を実質的に含まない動物細胞培養用組成物の調製に用いることを予定している、藻類抽出物を製造する方法も本発明の範囲に含まれる。従って、本発明によって提供される藻類抽出物と、動物細胞培養用培地とを混合する工程は、本発明を実施する者と同一の者によって実施されてもよく、本発明を実施する者と別の者によって実施されてもよい。

【００４９】

一実施態様において、本発明により提供される藻類抽出物は、血清及び／又は無血清培養の添加因子を実質的に含まない動物細胞培養用培地と、別々にパッケージングされたキットとして提供されるものであってもよい。

【００５０】

一実施態様において、本発明は、藻類及び動物細胞のリサイクル培養方法を提供する。当該方法は：
（ｉ）動物細胞を培養した後の廃液（第１廃液）を使って藻類を培養する工程；
（ｉｉ）前記藻類を回収し、固体酸触媒と混合して加熱することによって、藻類抽出物を得る工程；
（ｉｉｉ）前記藻類抽出物を、前記（ｉ）の藻類培養後の廃液（第２廃液）に添加し、前記藻類抽出物の濃度を調整して動物細胞培養用組成物を製造する工程；及び
（ｉｖ）前記動物細胞培養用組成物を用いて動物細胞を培養する工程
を含み得る。

【００５１】

本発明により、再生医療またはバイオ医薬などの分野や、培養食品の分野における動物細胞の培養工程において大量に産生され、廃棄されるしかなかった動物細胞を培養した後の培地（廃液）が、藻類（例えば、微細藻類）の培養に活用することが可能となる。また、藻類を培養した後の培地（廃液）が、さらに動物細胞の培養に用いることができる。これにより、藻類及び動物細胞のリサイクル培養方法が確立され、環境負荷の低減に寄与する。

【００５２】

上記の工程（ｉ）「動物細胞を培養した後の廃液（「第１廃液」と称する。）を使って藻類を培養する工程」において、第１廃液（本明細書において、便宜的に「廃液」と記載されるが、実際に廃棄されることを意味するものではない。）としては、動物細胞の培養に通常用いられ得る培地であって、動物細胞を培養した後の培地を使用することができる。本発明に適用され得る、動物細胞を培養する前の動物細胞用培地は、公知のものであれば限定されるわけではないが、例えば、イーグル培地、ダルベッコ改良イーグル培地（ＤＭＥＭ）、ＤＭＥＭ：Ｆ１２培地、グラスゴー最小必須培地、グレース昆虫培地、ハム培地、イスコフ改良イーグル培地、ＲＰＭＩ－１６４０培地、Ｌ－１５培地、マッコイ５Ａ培地、Ｍ１９９培地などであってもよく、動物細胞を培養可能な培地であれば用いることができる。

【００５３】

本発明に適用し得る第１廃液を供給する動物細胞の培養方法は、公知の培養方法（例えば、３７℃、飽和水蒸気下、５％CO_2の加湿雰囲気下）に従えばよく、特に限定されな

い。
【００５４】
上記の工程（ｉｉ）「前記藻類を回収し、固体酸触媒と混合して加熱することによって、藻類抽出物を得る工程」は、上記の動物細胞培養用組成物を製造する方法の工程（１）についての説明が適用される。
【００５５】
上記の工程（ｉｉｉ）「前記藻類抽出物を、前記（ｉ）の藻類培養後の廃液（「第２廃液」と称する。）に添加し、前記藻類抽出物の濃度を調整して動物細胞培養用組成物を製造する工程」は、上記の動物細胞培養用組成物を製造する方法の工程（２）についての説明が適用され得る。ただし、上記の工程（ｉｉｉ）では、動物細胞培養用培地に替えて、前記（ｉ）の藻類培養後の廃液（第２廃液）を適用することができる。本工程で調整された動物細胞培養用組成物を用いて、動物細胞を培養することができる。これらの方法を実施することにより、藻類及び動物細胞のリサイクル培養方法が確立される。
【００５６】
さらに、他の態様において、工程（ｉｖ）で動物細胞を培養した後の廃液を上記工程（ｉ）の第１廃液として藻類を培養すること、すなわち、工程（ｉ）をさらに実施してもよい。また、さらに、工程（ｉ）～（ｉｖ）を任意に回数繰り返すものであってもよい。
【実施例】
【００５７】
以下に、本発明を実施例に基づいて更に詳しく説明するが、これらは本発明を何ら限定するものではない。
【００５８】
＜実施例１＞
１．材料と方法
１－１．微細藻類培養
本研究では、真核微細藻類クロレラ・ブルカリス・ベイエリンク（Ｃｈｌｏｒｅｌｌａ ｖｕｌｇａｒｉｓ Ｂｅｉｊｅｒｉｎｃｋ）（以下、「クロレラ」という。）（ＮＩＥＳ－２１７０）（国立環境研究所、茨城県）を使用した。Ｃ．ｖｕｌｇａｒｉｓはガンボーグＢ５培地（富士フィルム和光純薬、大阪府）と０．１％のハイポネックス（ハイポネックスジャパン、東京都）を混合した培地を利用して培養した。培養はそれぞれ１Ｌのネジ口メディウム瓶（アズワン、大阪府）を４本用いて、４連低速スターラー（アズワン）上で６０ｒｐｍ、ガス交換器（東海ヒット、静岡県）によるCO_2ガス濃度２０％ガス流量５０ｍＬ／分、２４時間光条件下（ＬＣ－ＬＥＤ ４５０Ｗ， タイテック、埼玉県）、室温（２５℃）の環境下で行った。７日培養後、微細藻類を遠心機（Ｓｏｒｖａｌｌ Ｘｐｒｏ Ｓｅｒｉｅｓ Ｃｅｎｔｒｉｆｕｇｅ、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｃｈｅｒ Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，マサチューセッツ州、米国）を用い（１７００×ｇ、１０分）回収し、純水で２度遠心洗浄後（１７００×ｇ、５分）、５０ｍＬスクリュー瓶（アズワン）に回収した。その後、凍結乾燥機（ＦＤＵ－１２００， 東京理化、東京都）により乾燥させた。
【００５９】
１－２．微細藻類からの栄養素抽出
微細藻類から栄養素を抽出するために加水分解法（以下、「固体酸処理」および「液体酸処理」という。）を用いた。上述した乾燥藻類の重量を秤量し、固体酸を用いた場合は表１に示す各条件で処理した。具体的には、凍結乾燥したクロレラ（１００又は２００ｍｇ）、固体酸（ＺＰ１５０ＤＨ、フタムラ化学株式会社、愛知、日本）２００ｍｇを蒸留水（４ｍＬ）を加え、所定の温度で加熱撹拌した。反応後、固形物をろ過により取り除き、ろ液を１７００×ｇで５分遠心処理後、その上清を細胞培養実験に用いた。
【００６０】
液体酸処理の場合は、凍結乾燥したクロレラを５０ｇ／Ｌに調製し、１Ｎ ＨＣｌ、１００℃、２４時間ヒートブロック（Ｌａｂｎｅｔ Ｉｎｔｅｒｎａｔｉｏｎａｌ Ｉｎｃ．，ニュージャージー州、米国）を使って加熱した。加熱処理後、水酸化ナトリウムにより

中和した。固形物をろ過により取り除き、ろ液を１７００×ｇで５分遠心処理後、その上清を細胞培養実験に用いた。

【００６１】

超音波を用いた処理の場合は、凍結乾燥したクロレラを５０ｇ／Ｌに調製し、超音波細胞破砕装置（Ｂｉｏｒｕｐｔｏｒ　ＵＣＤ－２００ＴＭ，　コスモバイオ、東京都）を用いて抽出した。２０ｋＨｚの出力で１０分の処理時間で抽出を行った。固形物をろ過により取り除き、ろ液を１７００×ｇで５分遠心処理後、その上清を細胞培養実験に用いた。

【表１】

	藻類種	藻類重量（ｍｇ）	固体酸量（ｍｇ）	温度（℃）	時間（時間）
抽出条件１	クロレラ	２００	２００	１３０	３
抽出条件２	クロレラ	１００	２００	１３０	３
抽出条件３	クロレラ	１００	２００	１６０	３

【００６２】

１－３．細胞培養と細胞生死判別試験

初代ウシ筋芽細胞は東京芝浦臓器株式会社から購入したウシ頬肉から単離した。初代ウシ筋芽細胞は１０％ウシ胎仔血清（ＦＢＳ、Ｔｈｅｒｍｏ－Ｆｉｓｃｈｅｒ　Ｓｃｉｅｎｔｉｆｉｃ，マサチューセッツ州、米国）と１％ペニシリン－ストレプトマイシン（Ｐ／Ｓ、Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ、Ｃａｒｌｓｂａｄ、カリフォルニア州、米国）が補充されたダルベッコ改良イーグル培地（ＤＭＥＭ）（Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ，ミズーリ州、米国）により３７℃で５％CO_2を含む湿潤雰囲気下で培養した。相対生細胞数は、ＸＴＴアッセイ（Ｂｉｏｌｏｇｉｃａｌ　Ｉｎｄｕｓｔｉｅｓ，コネチカット州、米国）および細胞の顕微鏡観察により評価した。ウシ筋芽細胞を９６ウェルプレート（ＡＧＣテクノグラス株式会社、静岡県、日本）中に３０，０００細胞／ウェルの密度で播種し、１０％ＦＢＳと１％Ｐ／Ｓが補充されたＤＭＥＭ中で一晩培養した。一晩培養後、培地を捨て、リン酸塩緩衝生理食塩水（ＰＢＳ、Ｓｉｇｍａ－Ａｌｄｒｉｃｈ社）で２回洗浄した。その後、１０％ＦＢＳ含有ＤＭＥＭ、ウシ血清不含ＤＭＥＭ、栄養欠損培地および栄養欠損培地に藻類抽出物添加したサンプルを用いて細胞を３日間培養した。各溶液中の色素による吸光度の差をなくすために、ＸＴＴアッセイを実施する直前に、各溶液を取り、１００μＬの１０％ＦＢＳと１％Ｐ／Ｓを加え、次いで５０μＬのＸＴＴ試薬を添加した。それに続く細胞生死判別試験はプロトコル通り実施した。グルコース不含ＤＭＥＭ（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）またはＤＭＥＭの無機塩成分のみを含む無機塩培地を自作し、栄養素欠損培地として使用した。また動物細胞の位相差画像は、顕微鏡（ＥＬＩＰＳＥ　ＴＳ２、株式会社ニコン、東京都、日本）によりソフトウェア（ＮＩＳ－Ｅｌｅｍｅｎｔｓ　ＢＲ、ニコン）を使って取得した。

【００６３】

なお、本実施例で用いられた培地は、特に断りがない限り、以下の組成のものを用いた。またＦＢＳに関しては１０％ＦＢＳ含有またはＦＢＳを含まない培地を用いた。

（Ａ）通常の動物細胞培養に用いられる培地ＤＭＥＭの栄養素・ミネラル組成

（ｉ）糖質

・グルコース：１０００ｍｇ／Ｌまたは４５００ｍｇ／Ｌ
・ピルビン酸：１１０ｍｇ／Ｌ

（ｉｉ）アミノ酸

・Ｌ－アルギニン：８４ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－シスチン：４８ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－グルタミン：５８４ｍｇ／Ｌ
・グリシン：３０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－ヒスチジン：４２ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－イソロイシン：１０５ｍｇ／Ｌ

・Ｌ－ロイシン：１０５ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－リジン：１４６ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－メチオニン：３０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－フェニルアラニン：６６ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－セリン：４２ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－トレオニン：９５ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－トリプトファン：１６ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－チロシン：７１ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－バリン：９４ｍｇ／Ｌ
（ｉｉｉ）ビタミン
・パントテン酸：４ｍｇ／Ｌ
・塩化コリン：４ｍｇ／Ｌ
・葉酸：４ｍｇ／Ｌ
・ｉ－イノシトール：７．２ｍｇ／Ｌ
・ナイアシンアミド：４ｍｇ／Ｌ
・ピリドキシン：４ｍｇ／Ｌ
・リボフラビン：０．４ｍｇ／Ｌ
・チアミン：４ｍｇ／Ｌ
（ｉｖ）ミネラル
・$CaCl_2$：２００ｍｇ／Ｌ
・ＫＣｌ：４００ｍｇ／Ｌ
・$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$：０．１０ｍｇ／Ｌ
・$MgSO_4$：９８ｍｇ／Ｌ
・ＮａＣｌ：６４００ｍｇ／Ｌ
・$NaHCO_3$：３７００ｍｇ／Ｌ
・NaH_2PO_4：１０９ｍｇ／Ｌ
・フェノールレッド：１５ｍｇ／Ｌ

【００６４】

（Ｂ）藻類抽出液を用いた動物細胞培養実験で使用した培地組成
（１）ＤＭＥＭ（グルコース不含）
藻類抽出液を用いることで糖質（グルコース・ピルビン酸）を代替可能であることを示すために用いた。
（ｉ）糖質
・グルコース：０ｍｇ／Ｌ
・ピルビン酸：０ｍｇ／Ｌ
（ｉｉ）アミノ酸
・Ｌ－アルギニン：８４ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－シスチン：４８ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－グルタミン：５８４ｍｇ／Ｌ
・グリシン：３０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－ヒスチジン：４２ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－イソロイシン：１０５ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－ロイシン：１０５ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－リジン：１４６ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－メチオニン：３０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－フェニルアラニン：６６ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－セリン：４２ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－トレオニン：９５ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－トリプトファン：１６ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－チロシン：７１ｍｇ／Ｌ

・Ｌ－バリン：９４ｍｇ／Ｌ
（ｉｉｉ）ビタミン
・パントテン酸：４ｍｇ／Ｌ
・塩化コリン：４ｍｇ／Ｌ
・葉酸：４ｍｇ／Ｌ
・ｉ－イノシトール：７．２ｍｇ／Ｌ
・ナイアシンアミド：４ｍｇ／Ｌ
・ピリドキシン：４ｍｇ／Ｌ
・リボフラビン：０．４ｍｇ／Ｌ
・チアミン：４ｍｇ／Ｌ
（ｉｖ）ミネラル
・$CaCl_2$：２００ｍｇ／Ｌ
・ＫＣｌ：４００ｍｇ／Ｌ
・$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$：０．１０ｍｇ／Ｌ
・$MgSO_4$：９８ｍｇ／Ｌ
・ＮａＣｌ：６４００ｍｇ／Ｌ
・$NaHCO_3$：３７００ｍｇ／Ｌ
・NaH_2PO_4：１０９ｍｇ／Ｌ
・フェノールレッド：１５ｍｇ／Ｌ

【００６５】

（２）無機塩培地

藻類抽出液を用いることで糖質（グルコース・ピルビン酸）、アミノ酸（Ｌ－アルギニン、Ｌ－シスチン、Ｌ－グルタミン、グリシン、Ｌ－ヒスチジン、Ｌ－イソロイシン、Ｌ－ロイシン、Ｌ－リジン、Ｌ－メチオニン、Ｌ－フェニルアラニン、Ｌ－セリン、Ｌ－トレオニン、Ｌ－トリプトファン、Ｌ－チロシン、Ｌ－バリン）およびビタミン（パントテン酸、塩化コリン、葉酸、ｉ－イノシトール、ナイアシンアミド、ピリドキシン、リボフラビン、チアミン）を代替可能であることを示すために用いた。

（ｉ）糖質
・グルコース：０ｍｇ／Ｌ
（ｉｉ）アミノ酸
・Ｌ－アルギニン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－シスチン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－グルタミン：０ｍｇ／Ｌ
・グリシン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－ヒスチジン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－イソロイシン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－ロイシン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－リジン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－メチオニン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－フェニルアラニン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－セリン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－トレオニン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－トリプトファン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－チロシン：０ｍｇ／Ｌ
・Ｌ－バリン：０ｍｇ／Ｌ
（ｉｉｉ）ビタミン
・パントテン酸：０ｍｇ／Ｌ
・塩化コリン：０ｍｇ／Ｌ
・葉酸：０ｍｇ／Ｌ
・ｉ－イノシトール：０ｍｇ／Ｌ

・ナイアシンアミド：０ｍｇ／Ｌ
・ピリドキシン：０ｍｇ／Ｌ
・リボフラビン：０ｍｇ／Ｌ
・チアミン：０ｍｇ／Ｌ
（ｉｖ）ミネラル
・$CaCl_2$：２００ｍｇ／Ｌ
・ＫＣｌ：４００ｍｇ／Ｌ
・$Fe(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$：０．１０ｍｇ／Ｌ
・$MgSO_4$：９８ｍｇ／Ｌ
・ＮａＣｌ：６４００ｍｇ／Ｌ
・$NaHCO_3$：３７００ｍｇ／Ｌ
・NaH_2PO_4：１０９ｍｇ／Ｌ
・フェノールレッド：１５ｍｇ／Ｌ

【００６６】

２．結果

２－１．微細藻類抽出物を使った細胞培養

ウシ筋芽細胞培養の栄養素として藻類抽出物が利用可能かどうかを調べた。ウシ筋芽細胞を、グルコース及び／又は血清不含培地を使って培養した場合、３日後に栄養含有培地で培養した場合に比べ、いずれも細胞生存数の低下が認められた（図１）。しかしながら、固体酸を用い、Ｃ．ｖｕｌｇａｒｉｓから抽出された抽出物を５％、１０％及び２０％添加することにより細胞生存率が回復し（図２）、さらに栄養含有培地を用い培養した場合よりも高い相対生細胞数を示した。この効果は抽出条件１（１３０℃、３時間）で最も高いものであった。この結果は、藻類抽出物が、哺乳類細胞の培養に、重要な栄養素であるグルコースおよびウシ血清の代用物として利用されることを証明した（図２）。

【００６７】

次に、固体酸を用いた藻類抽出物の製造方法について、より最適な条件を探索するために、以下の各条件で微細藻類を加水分解し、得られた藻類抽出物を用いてウシ筋芽細胞を３日間培養した。

【表２】

	藻類種	藻類重量（ｍｇ）	固体酸量（ｍｇ）	温度（℃）	時間（時間）
抽出条件１	クロレラ	２００	２００	１３０	３
抽出条件４	クロレラ	１００	２００	７０	６
抽出条件５	クロレラ	１００	２００	７０	２０
抽出条件６	クロレラ	１００	２００	１００	３
抽出条件７	クロレラ	１００	２００	１００	６

【００６８】

その結果、抽出条件７（１００℃、６時間）にて加水分解して得られた藻類抽出物は、抽出条件１（１３０℃、３時間）で得た藻類抽出物と同程度の細胞増殖性を示した（図３）。

【００６９】

さらに、藻類抽出物が全て栄養素および動物血清の代用物としても利用可能かどうかを調べた。ここでは、栄養素および血清を含まない無機塩培地を使用した。この培地を使って３日間培養した結果、大部分の細胞は死滅した（図４、図６）。しかしながら、２０％および１０％固体酸処理藻類抽出液を添加することで、ウシ血清不含ＤＭＥＭおよび１０％ウシ血清含有ＤＭＥＭで培養した場合を上回る生細胞数が得られた（図４、図６）。この結果は無機塩成分に固体酸処理藻類抽出液を用いることで動物細胞の培養に必要な栄養素と動物血清を代替できることを示している。一方無機塩に液体酸処理藻類抽出液を添加することでウシ血清不含ＤＭＥＭと同等の生細胞数を示した（図５、図６）。しかし超音

波処理藻類抽出液の添加効果はウシ血清不含ＤＭＥＭを用いた時の生細胞数に及ばなかった（図５、図６）。

【００７０】

＜実施例２＞

藻類抽出物の濃度について、図２、図３及び図６に示すように濃度が高い方が概して相対生細胞数が大きかった。しかし、必ずしもそうでない場合があり、これは抽出条件や藻類の種類によって異なっていた。従って、以下に記すリサイクルシステムを構築する場合、生細胞数が最大となるように抽出条件や培地の成分分析等に基づき抽出物の濃度を決定する必要がある。

【００７１】

上記のように、藻類抽出物の動物細胞培養用培地への添加は、血清やグルコース等を実質的に含まない場合であっても、動物細胞の培養に大きな効果をもたらした。本発明者らは、動物細胞培養後の廃液を用いて藻類の培養が可能であることを既に明らかにしている（Haraguchi Y, Shimizu T. Microalgal culture in animal cell waste medium for sustainable ‘cultured food’ production. Arch. Microbiol. 2021 Nov;203(9):5525-5532.）。

【００７２】

動物細胞（Ｃ２Ｃ１２マウス筋芽細胞）を２日間培養した後の培養廃液（第１廃液）を用いクロロコックム・リットラレを２日間培養した培養廃液（第２廃液）に、本願発明の方法による藻類（クロロコックム・リットラレ）からの抽出物を添加したところ、動物細胞（Ｃ２Ｃ１２マウス筋芽細胞）の培養が可能であることが明らかとなった（図７、Ａ：培養後の顕微鏡写真；Ｂ：相対生細胞数の定量評価）。従って、動物細胞培養後の廃液を用いて藻類を培養し、その藻類の固体酸処理によって抽出した抽出物を、動物細胞廃液（第１廃液）を用い藻類を培養した後の廃液（第２廃液）に添加して動物細胞の培養に使うというリサイクルシステムを構築できることが示された。

【図面】

【図１】

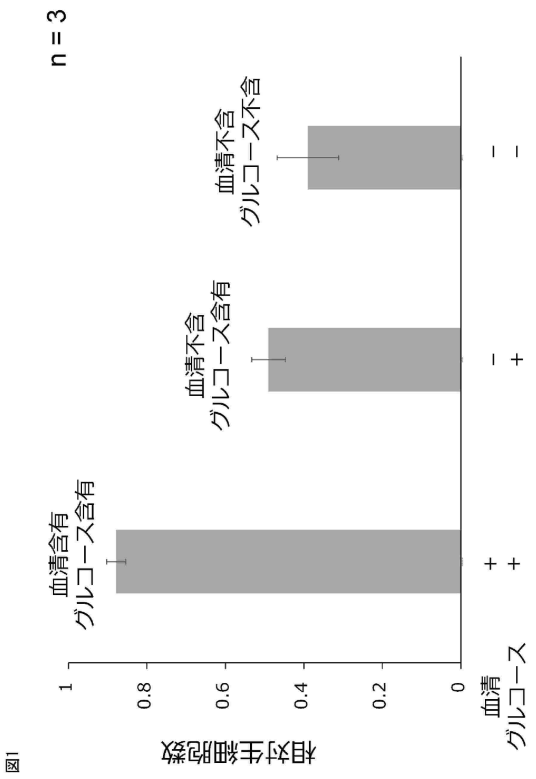


図1

【図２】

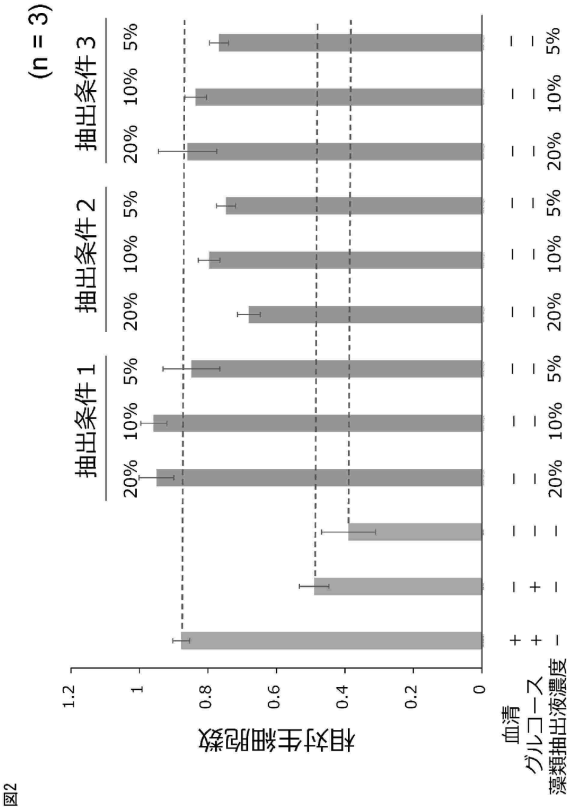


図2

【図３】

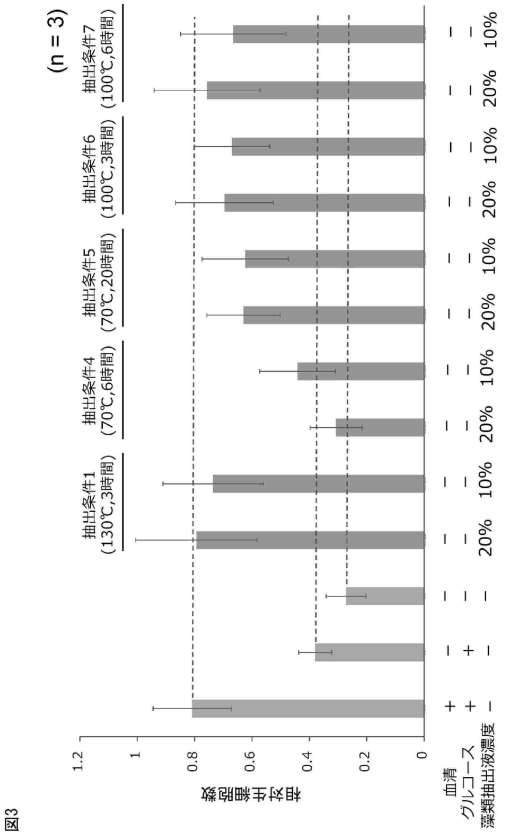


図3

【図４】

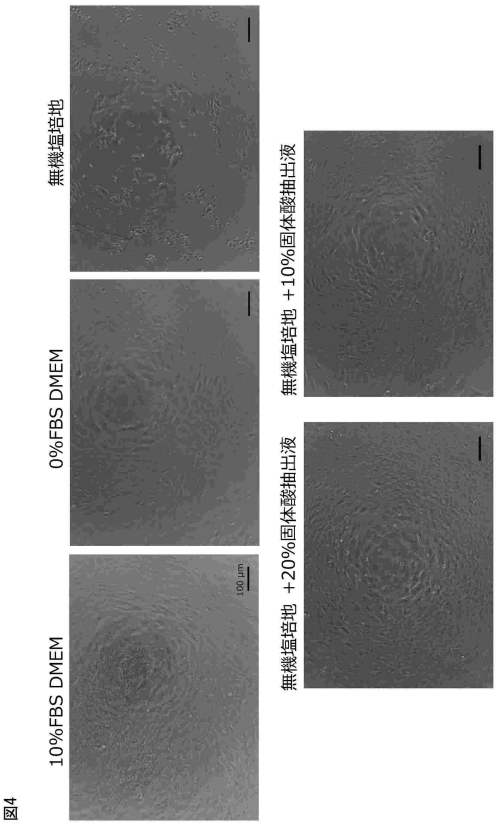


図4

【図５】

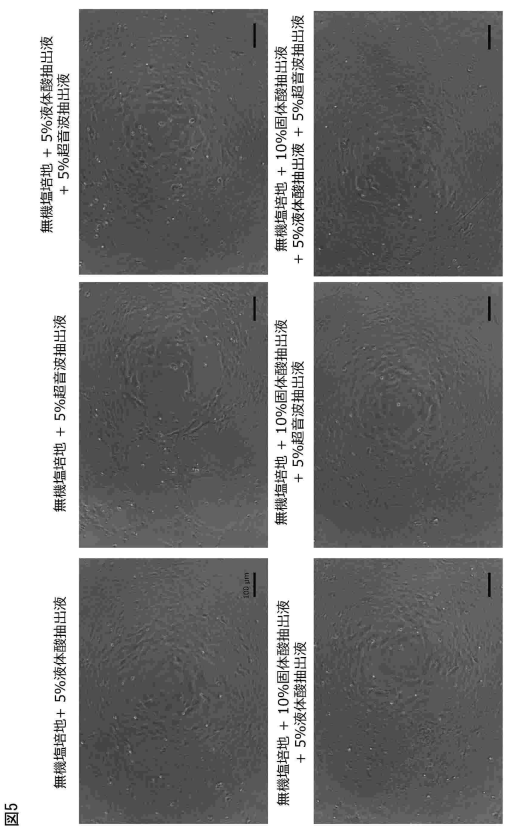


図5

【図６】

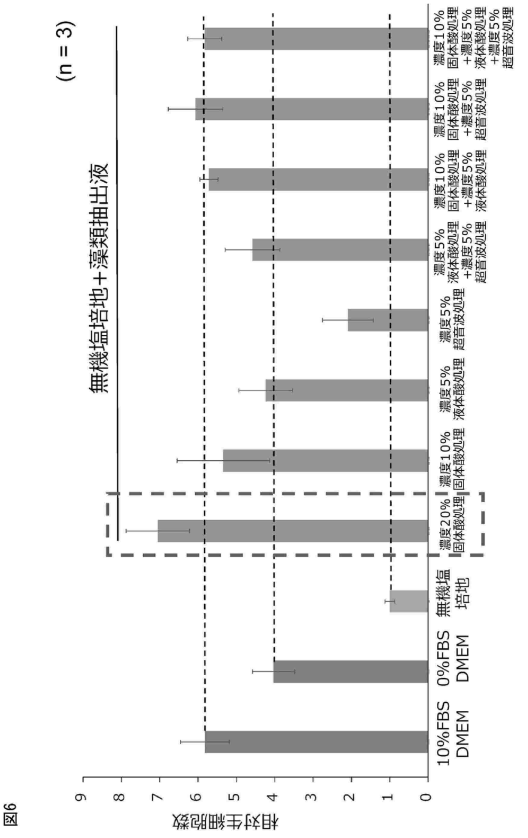


図6

【図７Ａ】

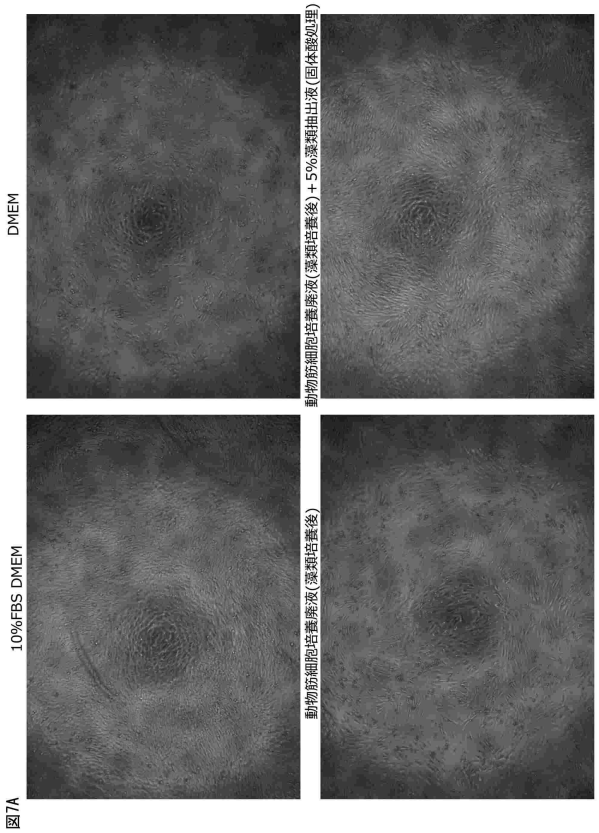


図7A

【図７Ｂ】

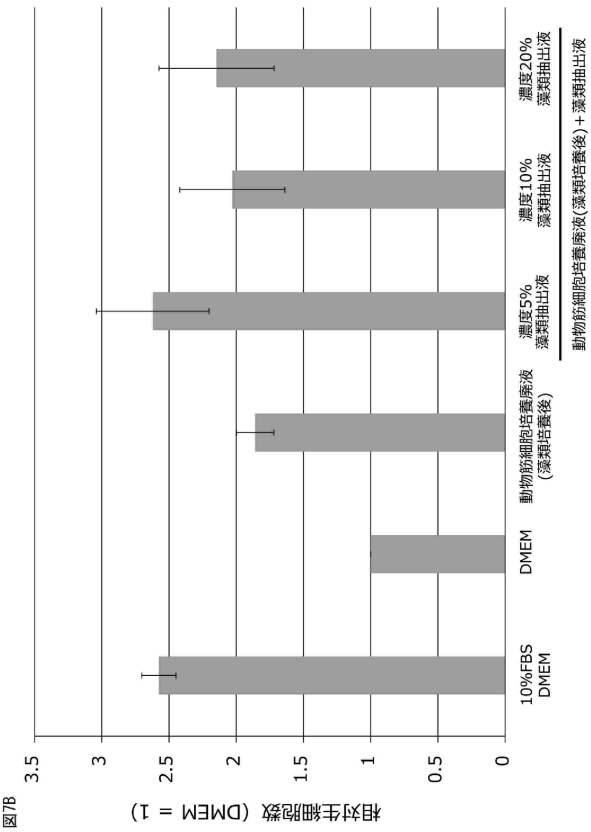


図7B

フロントページの続き

(72)発明者　清水 達也
東京都新宿区河田町８－１ 学校法人東京女子医科大学内
(72)発明者　原口 裕次
東京都新宿区河田町８－１ 学校法人東京女子医科大学内
(72)発明者　山中 久美子
東京都新宿区河田町８－１ 学校法人東京女子医科大学内
(72)発明者　原 亨和
東京都目黒区大岡山二丁目１２番１号 国立大学法人東京工業大学内
(72)発明者　喜多 祐介
東京都目黒区大岡山二丁目１２番１号 国立大学法人東京工業大学内
審査官　山▲崎▼ 真奈
(56)参考文献　国際公開第２０２１／０６６１１３（WO，Ａ１）
特表２０１８－５１６５４０（ＪＰ，Ａ）
特開昭５７－０６５１７９（ＪＰ，Ａ）
特開昭５７－２０６３８４（ＪＰ，Ａ）
特開昭６０－１８６２８０（ＪＰ，Ａ）
OKAMOTO, Y. et al.，Mammalian cell cultivation using nutrients extracted from microalgae，Biotechnology Progress，2020年，Vol.36, Article number e2941，pp.1-9
岡本 裕太 他，PB21 食肉生産に向けた微細藻類抽出液を用いた動物細胞培養，日本藻類学会第44回大会 － 鹿児島・2020 －，2020年，p.68
藻類で培養肉を安く，日経産業新聞，2021年05月07日，p.7
SHIMIZU, T.，Creating Food from Cells - Sustainable Future Food，[online]，2021年05月25日，[retrieved on 2022.08.17], Retrieved from the Internet: 〈URL: https://www.naro.go.jp/laboratory/brain/moon_shot/MS_PM_E03.pdf〉
(58)調査した分野　(Int.Cl.，ＤＢ名)
Ｃ１２Ｎ
ＪＳＴＰｌｕｓ／ＪＭＥＤＰｌｕｓ／ＪＳＴ７５８０（ＪＤｒｅａｍＩＩＩ）
ＣＡｐｌｕｓ／ＭＥＤＬＩＮＥ／ＥＭＢＡＳＥ／ＢＩＯＳＩＳ（ＳＴＮ）