

次世代畜産技術としての培養肉技術の基礎的研究

古澤 和也^{*1}, 木村 恒久^{*1}, 西嶋 茂宏^{*2}

Study on Cultured Meat Technology as an Advanced Livestock Technology

Kazuya FURUSAWA ^{*1}, Tsunehisa KIMURA ^{*1}, Shigehiro NISHIJIMA ^{*2}

^{*1} Faculty of Environmental and Information Sciences, Department of Environmental and Food Sciences

^{*2} Faculty of Engineering, Department of Applied Nuclear Technology

Cultured meat technologies have been extensively investigated in food technology and tissue engineering fields, because they could reduce environmental loads, such as greenhouse gas emissions and deforestation for expanding farm area. Previously, the cultured meats have been produced by culturing animal muscle cells, which could be directly available from fresh meats and obtained by myogenic differentiation of mesenchymal stem cells. The constructing costs and tastes for the cultured meats have been improved by recent research and developments, whereas their textures, which are physical tastes related to mechanical properties and hierarchical structures of cultured meats, have not been reproduced by any cultured meat technologies. In this study, we have investigated the method for controlling the texture of cultured meats by regulating the rheological properties and hierarchical structures. To construct the cultured meats, we have tried two methods: one is a template scaffold method with multichannel collagen hydrogels (MCCG) which has multichannel structures and collagen fiber alignments, another one is a magnetic field-induced orientation of myoblasts and ECMs. By using the former method, we have reproduced muscle fiber alignments and extracellular matrix (ECM) structures of skeletal muscle tissues. In contrast, the latter method requires further researches and developments for controlling the rheological properties and hierarchical structures of cultured meats.

Key Words : Cultured Meats, Tissue Engineering, Engineered Muscle Tissues

1. 緒 言

世界の人口は増加の一途をたどっており、それに伴い食糧の需要も高まってきている。食肉の需要も増加傾向にあり、特に現在の途上国での需要が今後大幅に増大することが予測されている。このような人口爆発に伴う食肉需要の増大に対応するためには、より大規模な畜産開発が必要となる。一方で、畜産動物の飼育には、大量の飼料や水など様々な資源やエネルギーを消費し、更に大量の廃棄物の排出を伴う。このような大量消費型の畜産業を続けることは今後さらに困難となるだろう。したがって、人類が持続的に食肉を利用していくためには、次世代の畜産技術の開発が必要不可欠である。その一つとして着目されている技術が、培養肉の製造技術である。培養肉とは筋組織をつくる細胞を三次元的に成型培養することで、家畜動物を経由せずに製造した人工食肉である⁽¹⁾。既に、2013年にオランダの Mark J. Post が培養肉でできたハンバーガーの試食会を実施している。また、2018年には米国農務省（USDA）と米食品医薬品局（FDA）において細胞培養肉の研究開発を規制・監督するという

* 原稿受付 2020 年 05 月 29 日

^{*1} 環境情報学部 環境食品応用化学科

^{*2} 工学部 原子力技術応用工学科

E-mail: kfurusawa@fukui-ut.ac.jp

声明をだすなど、培養肉が現実の課題となってきた。このように、培養肉の技術開発や関連する行政の対応など、技術のインパクトの大きさから報道も多く、現在は誰もが培養肉の存在を知っている状況となってきた。

培養肉に対する期待の高まりとともに、培養肉の製造技術の研究開発も盛んに進められている。培養肉のパイオニアである Mark J. Post らは、現在も培養肉の低コストかつ安定的な供給を実現するために数多くの技術開発を続けている。その成果として、試作当初は培養肉 1 枚あたり 3,000 万円の製造コストが、現在は条件付きではあるが培養肉 1 枚当たり 1,400 円にまで低減することができるとの試算を出せるような状況にまでたどり着いている。また、食肉としての味についても味付けの面での研究が進んでおり、より美味しい培養肉の製造が可能になってきている。このような化学的な味の面でのおいしさの改善が実施されている一方で、実際の食肉の食感を再現できていない。食品のおいしさにとって食感は極めて重要な役割を持っている。したがって、培養肉が食肉に代わって利用されるためには、食肉の食感を培養肉で再現する必要がある。食感は食品の力学的性質を口腔内で感じ取る感覚である。食品の力学的性質は、食品の階層構造によって決まる。それゆえ、食肉の同じ食感を持つ培養肉を製造するためには、食肉の階層構造を再現することが有力な戦略となる。

現在の培養肉の製造技術の主流は、ウシなどの間葉系幹細胞を筋管細胞へと分化させつつ三次元培養する方法である。三次元培養の方法としては、3D プリンターを利用する技術や、細胞を球状の塊に成型したものを積層して三次元化する技術などが開発されている⁽²⁾。しかし、これらの技術では実際の食肉の微細構造を再現することができない。動物の筋組織は、筋線維（筋管細胞）が一定方向に配列した配向構造を持っており、その筋線維が束になって筋線維束が作られ、さらにその筋線維束が筋膜によって束ねられた複雑な階層構造でつくられている。このような階層構造が、食肉特有の食感を作り出す重要な因子となっている。素材の面から食肉を見ると、食肉の基本素材となる筋組織は、筋細胞からなる筋線維とゲル状の物質からなる細胞外基質（ECM）の組み合わせでできている。ECM は、コラーゲンやラミニン、フィブロネクチンなどの構造タンパク質やプロテオグリカンなどからつくられており、生体組織の微細構造の基本骨格となる重要な素材である。したがって、食肉と同じ食感を持つ培養肉を製造するためには、筋組織の階層構造を細胞と ECM の組み合わせで再現する技術の開発が必要不可欠である。そこで、本研究では培養肉の階層構造を制御する技術するための研究に取り組んだ。

物質の力学的特性はその階層構造に依存して変化するため、実質的には筋組織の階層構造をどのようにして再現するのが核心となる課題である。ECM に接着する接着依存性細胞の多くは、ECM をつくる生体高分子やそれらの複合体からなる線維構造の配向を感じ取り、配向方向に沿って細胞の形を伸長する機能を持つ⁽³⁾。このような機能は接着誘導と呼ばれており、細胞の配向制御の基本的な戦略として利用されている。したがって、配向構造を持つ人工 ECM をつくりそれを用いて筋組織をつくる細胞を配向させながら培養することで、筋細胞が配向した再生筋組織を構築することが可能である。そこで本研究では、強磁場を用いて異方性人工 ECM を作成し、これを用いることで細胞を配向する技術の開発に取り組んだ。一方で、この方法だけでは、筋線維束が筋膜によって束ねられた高次構造を再現することができない。筋組織から細胞を取り除いた ECM は、一定方向に配列した多管構造をもっている。既に我々はコラーゲン水溶液をリン酸緩衝液中に透析することで、多管構造を持つコラーゲングル（マルチチャネルコラーゲングル：MCCG）を調製する技術を開発している⁽⁴⁾。MCCG の多管構造は筋組織の ECM の形態を高度に再現している。そこで、MCCG の多管構造内部で筋組織をつくる細胞を多管構造の長軸方向に配向させ、実際の筋組織の階層構造を再現した培養肉を構築することにも挑戦した。本報告では、上記二つの研究開発のこれまでの進捗状況について報告する。

2. 研究内容

2.1 マルチチャネルコラーゲングルを用いた培養肉製造技術の開発

モデル培養肉となる再生筋組織をつくる細胞として、マウス由来筋芽細胞様細胞（C2C12）（理化学研究所 Cell Bank より提供）を用いた。人工 ECM の素材としてウシ真皮由来のアテロコラーゲン水溶液（5 mg/mL, IPC-50, 高研（株）より購入）を用いた。再生筋組織の鋳型細胞足場となる MCCG を調製するために、幅 8 mm, 奥行 8 mm, および厚さ 1 mm の大きさの矩形の孔が開いたシリコンゴム製の型を用いた。シリコンゴムの型を 60 mm ポリスチレンディッシュに置き、矩形の孔にアテロコラーゲン水溶液を型に充填してから、10 mL の pH7.0 のリン酸緩

衝液 (20 mM Na_2HPO_4 , 13 mM KH_2PO_4) を流し込むことで, MCCG を調製した. 次に, MCCG を 0.5 mM のゲニピン水溶液で 48 時間化学架橋することで, MCCG の弾性率を強化した. ゲニピン架橋による MCCG の弾性率の変化と播種された C2C12 の形態変化については既報にて報告されている⁽⁵⁾⁽⁶⁾. MCCG の多管構造の両端は開放された孔になっていないため, このままでは C2C12 を多管構造内腔へ直接播種することができない. そこで, 使い捨てメスで MCCG の両端を切除することにより多管構造を開放した. 以上の様に調製した MCCG に C2C12 を播種し, 再生筋組織を構築した. この際, C2C12 は, MCCG の多管構造内腔だけでなく, 外表面にも播種された. 組織構築後 1 週間は, 10 %ウシ胎児血清を含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) 中で培養することで, C2C12 を増殖させた. その後 2 週間は 10%ウマ血清を含む DMEM 中で培養することで増殖した C2C12 の筋管細胞への分化誘導を行った.

構築した再生筋組織を 4%パラホルムアルデヒド水溶液中に浸漬し 4 °C で反応させることにより固定化を行った. 固定化組織の中に含まれる F アクチンと細胞核を蛍光標識するために, 試料を Alexa-488 標識 Phalloidin (A12379, Life Technologies Japan Ltd.) と DAPI で 6 時間蛍光標識した. 蛍光標識された試料について, 蛍光顕微鏡 (Optiphot-2, ニコン製) を用いてホルマウントの蛍光像の観察を行った.

一定期間の培養ののちに得られた再生筋組織の形態が Fig. 1 に示されている. 一定方向に配列した筋芽細胞の細胞塊が形成されていることがわかる. このような形態の細胞塊が MCCG の多管構造のほぼすべてに形成されていることを確認している. 多管構造内部の細胞塊と MCCG のコラーゲンゲル基質の部分は, 実際の筋組織の筋線維と筋膜にそれぞれ対応している. このことから, 実際の筋組織の階層構造を高度に再現することができたことがわかる. しかし, この再生筋組織に電気刺激を印加しても, 筋収縮運動は引き起こされなかった. これは, 筋芽細胞が収縮機能を持つ筋管細胞として分化していないためと考えられる. すなわち細胞あるいはタンパク質レベルでのミクロな組織形態を再現することができていない可能性がある. 今後は, この方法において C2C12 を効果的に分化誘導することができる培養条件の検討が必要である.

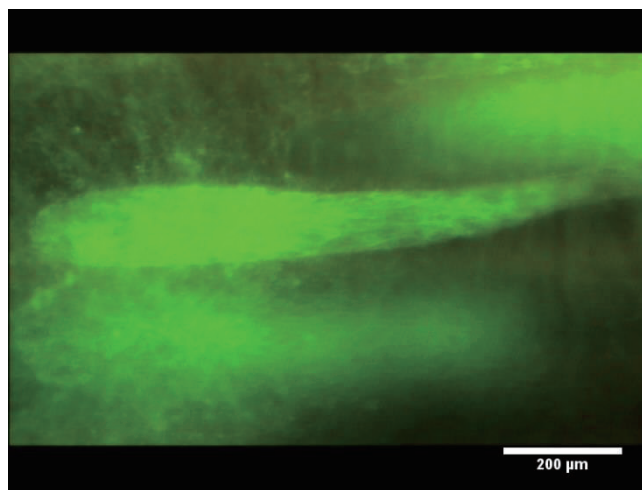


Fig. 1. A whole mount fluorescence microscope image for the engineered muscle tissues. Cell aggregates are assembled in the multichannel structure of MCCG and they aligned parallel to the long axis of channel.

2.2 磁場配向技術を用いた培養肉製造技術の開発

3.0×10^6 cells/mL の細胞密度で C2C12 を懸濁した 3 mg/mL の中性コラーゲン水溶液に, およそ 7 T の磁場を 28 °C で 2 時間印加しながらゲル化させることで再生筋組織を構築しようとした. この磁場の印加条件は, Torbet らの研究報告でコラーゲン線維の磁場配向が示唆された条件と同様の条件である⁽⁷⁾. 磁場の印加は, 京都大学農学部 に設置されている電磁石を使用して行った. 上述の細胞懸濁液について, 磁場を印加せず 37 °C で 2 時間静置することで再生筋組織を構築した. しかしながら, 磁場を印加しながらゲル化した試料では, ゲル化時間が短かったか, あるいはゲル化温度低すぎたためか, 十分にコラーゲン水溶液がゲル化せず, 再生筋組織を得ることがで

きなかった。磁場を与えずにゲル化させた試料では、しっかりと固まった試料を得ることができた。この試料を10%のウシ胎児血清を含むDMEM中で培養し、培養2日後の様子を位相差顕微鏡で観察した結果がFig. 2に示されている。コラーゲンゲル中のC2C12は培養2日後でも丸まったままの形を維持していた。

一方で同様の実験をコラーゲンゲルの代わりにマトリゲルに変えた実験も実施した。マトリゲルは生体内の基底膜に含まれるタンパク質などの組成を模倣した足場素材である。こちらの方法では、磁場印加条件でも、しっかりと固まった試料を調製することができた。磁場印加の有無にかかわらず、マトリゲル内部ではC2C12が良く伸長し、また細胞数も増加していることがわかった (Fig. 3)。マトリゲル内部のC2C12の形態は、磁場を印加しない条件で調製したコラーゲンゲル中のC2C12の形態よりも、より生体内の筋芽細胞の形態に近いことから、コラーゲンゲルよりもマトリゲルの方が、足場素材として適していることが示唆された。一方で、磁場の印加の有無による再生筋組織の形態の違いは観察されなかった。これは、マトリゲルをつくる生体高分子が磁場の印加によって配向していないか、もしくはマトリゲルは配向しているが、その配向構造が細胞の配向のために機能していないかのどちらかが原因と考えられる。この課題は、細胞を含まない状態でマトリゲルに磁場を印加して得られた試料の構造解析を行うことや、磁場の印加条件を変えることなどを組み合わせることで解決する。

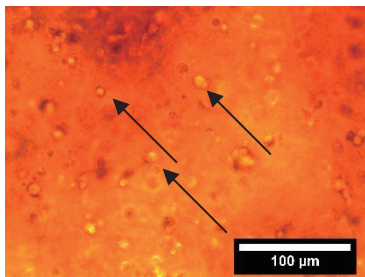


Fig. 2. Cellular morphology of C2C12 cells cultured in the collagen hydrogel. Arrows indicate C2C12 cells.

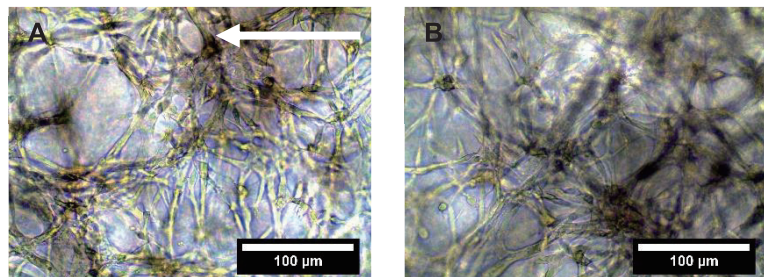


Fig. 3. Cellular morphology of C2C12 cells cultured in the matrigels with (A) and without (B) magnetic field application. There were no significant effects of magnetic field on the cellular morphology. The arrow indicates the direction of magnetic field.

3. 結 言

MCCGを用いた再生筋組織の構築技術の開発では、筋組織の形態を巨視的なレベルで再現することができたとと言える。このような筋組織の巨視的形態を再現した培養肉の構築技術は世界初の技術と言え、培養肉製造技術の発展において意義のある成果が得られたと言える。一方で、筋組織のミクロなレベルでの構造については、再現することができていない可能性が示唆された。この課題は、より完全な培養肉の製造のために解決しなければならない。今後は、MCCGの力学特性の制御を行いつつ、コラーゲン以外の細胞外基質タンパク質をMCCGに含ませるなどの改良を行う。そうして得られた改良MCCGが再生筋組織のミクロな組織形態に与える影響を明らかにすることで、筋組織のミクロなレベルでの組織形態を再現するための最適条件を決定する。以上より、筋組織の組織形態をタンパク質、細胞、そして組織まで広い大きさの範囲で再現した再生筋組織の構築技術を完成させることが今後の目標である。

磁場を用いたゲルの配向誘起による細胞の配向を試みたが、今回の実験では細胞を配向させることができなかった。ゲル化速度が速かったため、配向のための時間が十分でなかったためゲル自体が配向しなかったためと考えられる。ゲルとしてはコラーゲンゲルより、マトリゲルのほうが細胞と相性が良いことが分かった。ゲル化条件を検討し、まずゲル自体が配向しているかどうかを検討する必要がある。磁場強度は強いほど好ましいが、条件を工夫すれば、電磁石程度の磁場強度 (1-2 T) でも配向が可能と思われる。このような電磁石を用いたより詳細な磁場印加実験を実施することで、再生筋組織構築の最適条件を今後決定する。

謝 辞

本研究は、金井学園 2019 年度特別研究費と、科研費補助金（新学術領域研究 課題番号 19H05336、および基盤研究 C 課題番号 19K12793）の援助を受けて遂行した。

文 献

- (1) M. J. Post, “Cultured Meat from Stem Cells: Challenges and Prospects”, *Meat Science*, Vol. 92, No. 3 (2012), pp. 297-301.
- (2) S. Ostrovidov, S. Salehi, M. Costantini, K. Suthiwanich, M. Ebrahimi, R. B. Sadeghian, T. Fujie, X. Shi, S. Cannata, C. Gargioli, A. Tamayol, M. R. Dokmeci, G. Orive W. Swieszkowski, A. Khademhosseini, “3D Bioprinting in Skeletal Muscle Tissue Engineering”, *Small*, Vol. 15, No. 24 (2019), 1805530.
- (3) G. A. Dunn, T. Ebendal, “Contact Guidance on Oriented Collagen Gels”, *Experimental Cell Research*, Vol. 111, No. 2 (1978), pp. 475-479.
- (4) K. Furusawa, S. Sato, J. Masumoto, Y. Hanazaki, Y. Maki, T. Dobashi, T. Yamamoto, A. Fukui, N. Sasaki, “Studies on the Formation Mechanism and the Structure of the Anisotropic Collagen Gel Prepared by Dialysis-Induced Anisotropic Gelation”, *Biomacromolecules*, Vol. 13, No. 1 (2012), pp. 29-39.
- (5) K. Furusawa, T. Mizutani, H. Machino, S. Sasaki, A. Fukui, N. Sasaki, “Application of Multichannel Collagen Gels in Construction of Epithelial Lumen-Like Engineered Tissues”, *ACS Biomaterials Science & Engineering*, Vol. 1, No. 7 (2015), pp. 539-548.
- (6) K. Furusawa, “Effects of Mechanical Properties and Morphologies of Collagen Hydrogels on Tissue Hierarchical Structures of 3D Engineered Muscle Tissues”, *2019 International Symposium Micro-NanoMechatronics and Human Science*, **2019**, pp. 69-71.
- (7) J. Torbet, M.-C. Ronzière, “Magnetic Alignment of Collagen during Self-Assembly”, *Biochemical Journal*, Vol. 219, No. 3 (1984), pp. 1057-1059.

(2020 年 9 月 10 日受理)