

<令和4年度助成>

培養肉への応用を目指した 可食クライオゲル多孔体での高密度細胞培養

藤田 聡^{1, 2)}・Xia Ping¹⁾⁽¹⁾ 福井大学 学術研究院工学系部門 繊維先端工学講座、⁽²⁾ 福井大学 ライフサイエンスイノベーションセンター)

1. 緒言

世界的に代替タンパク源のニーズが高まっており、畜産の環境負荷、将来の食料問題、動物の命を奪うという倫理的問題、宗教的理由など種々の理由がある。代替タンパク質としては、植物由来の代替肉^{1, 2)}、昆虫食^{3, 4)}、培養肉^{5, 6)}などの開発が進んでいる。特に培養肉は、従来の畜産と比べ、多くの土地とエネルギーを消費し環境負荷が高いという問題を解決し、持続可能な社会の実現につながる技術として期待されている^{6, 7)}。培養肉自体は、動物細胞を培養して得られる生体組織を模倣した構造体であり、組織工学の技術を応用して製造される。筋肉組織の構造を十分再現した構造体を形成するためには、適した細胞足場材料の開発が強く求められている。細胞足場材料としてはこれまで医療用途では、コラーゲンやゼラチンなどのタンパク質が用いられてきた⁸⁾。これらは動物由来の細胞外マトリクス成分が用いられてきたが、培養肉の開発にあたっては、非動物由来成分を用いることが望ましい。

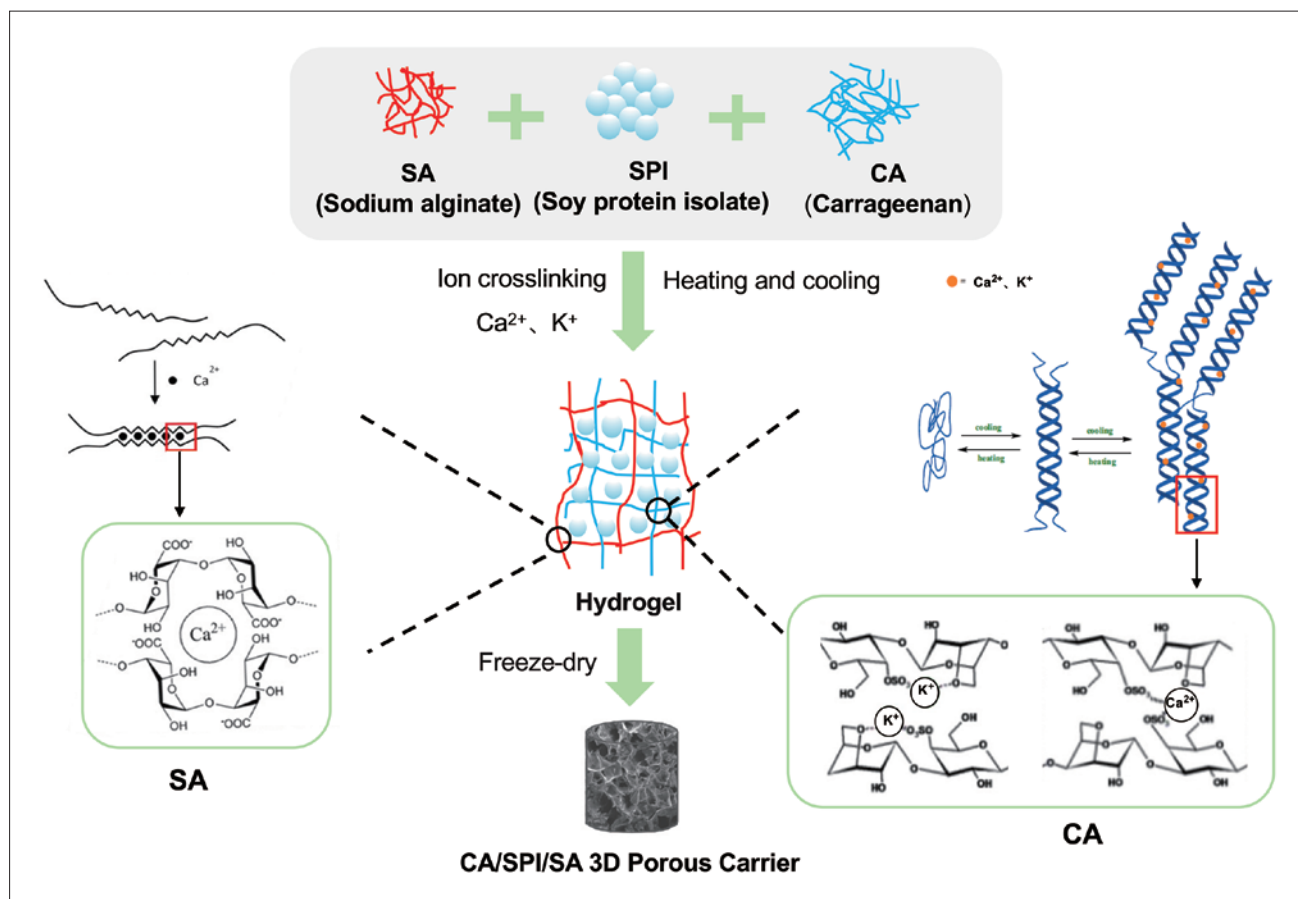
本研究では代替肉にも広く使われる原料である大豆タンパク質に着目した。大豆タンパク分離物 (SPI) は植物由来であり、食品原料として粉末で流通している^{9, 10)}。SPI を細胞の接着や増殖の足場として利用するためには、他の成分と組み合わせてハイドロゲルなどの形状に加工する必要がある。本研究では、カラギーナン (CA) およびアルギン酸ナトリウム (SA) との組み合わせを検討した。これらはいずれも食品原料であるため、食品としての安全性を確保しつつ、効果的な細胞培養足場を提供することが期待される (Scheme 1)。

カラギーナン (CA) は海藻から抽出される硫酸化多糖であり、ゲル化剤、増粘剤、安定剤、乳化剤として、食品添加物や化粧品などで広く使用されている^{11, 12)}。その水溶液は高温では溶液に、常温では二重らせんの三次元ネットワークを形成してハイドロゲルの状態に可逆的に変化する。 K^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} などのカチオンはゲル化を促進し、イオン種や濃度によってテクスチャや機械的強度をコントロールすることができる。また、タンパク質とも反応することから肉加工工程や菓子類にも利用される。

アルギン酸ナトリウム (SA) も海藻由来の多糖であり、D- マンヌロン酸と L- グルロン酸から成る酸性多糖である¹³⁾。側鎖のカルボキシル基により、pH 応答性を示すほか、L- グルロン酸部で Ca^{2+} などの2価の金属イオンが配位することで、エッグボックス構造と呼ばれる架橋構造が形成され、ゲル化する。この性質を利用して菓子類などの食品添加物や、細胞やタンパク質などの包摂に利用される。

筋芽細胞が足場上に浸潤して伸長し、堅固な筋肉組織を形成するためには、足場材料内部に適切な空隙が必要である。SPI、CA、SA から構成されるハイドロゲルでは細胞の浸潤に必要な十分な多孔度がない。本研究では、凍豆腐の製法に倣って、多孔質材料を得ることにした。

凍豆腐や高野豆腐は、日本古来から製造されてきた食品である。豆腐は中国で生まれた食品であるのに対し、凍豆腐は日本の寒さ厳しい環境のなか生み出されてきた独特の製法を持つ^{14, 15)}。いずれも豆腐の凍結・融解を繰り返すことで、大豆タンパク質の凝集が促進され、多孔質構造となる^{16, 17)}。こうした分子メカニズムは、大豆タンパク質からナノ材料を製



Scheme 1 Design of porous edible cryogel for cultured meat.

法する新たな手法としても注目をあつめている¹⁸⁾。そこで本研究でもゲル化と融解の繰り返しと凍結乾燥により多孔質の構造体を得ることにした。この構造により、細胞増殖が促進されると期待される。溶液濃度、温度の調整および架橋剤の添加により、細胞接着成長に適した細孔サイズと強靱な機械的強度を検討する。これにより、細胞が成長するために必要な構造と機械的強度を持つ可食な足場材料が得られる。

2. 方法

2.1 CA/SPI/SA クライオゲルの調製

3%のCA水溶液、15% SPI水溶液、5% SA水溶液を一晩攪拌して調製した。これを所定の体積比で混合し、80℃の湯浴中で均一に溶解するまで加熱した後、室温に冷却した。つづいて再度80℃の湯浴で加熱して溶液状態に戻した。この加熱と冷却のプ

ロセスを3回繰り返した。最後に、溶液を、迅速にシリンジを使用して内径10 mm円筒形の型に注ぎ、室温に冷却することで固化させて厚さ3 mmのハイドロゲルを得た。このハイドロゲルを1日、異なる種類・濃度の塩溶液に浸して架橋を促進させ、その後、脱イオン水で30分間洗浄した。最後に、4℃で冷蔵し、-30℃で一晩凍結してから、凍結乾燥し、多孔質のクライオゲルを得た。調製した試料中のCA、SPI、SAの組成をTable 1に示す。

2.2 クライオゲルのキャラクターゼーション

クライオゲルの多孔質構造は走査電子顕微鏡(SEM)により観察された。SEM画像からImageJを用いて平均孔径が測定された。クライオゲルの多孔度は、エタノールに30分間浸漬し、エタノールの浸透前後の重量変化から計測された。測定は3回繰り返し行われた。試料表面の官能基は全反射フーリエ変換赤外線分光法(ATR-FTIR)測定により行われた。

Table 1 Composition of prepared cryogel.

Sample	CA	SPI	SA	Salt solution	
#1	18%	67%	15%	CaCl ₂	0.05M
#2	18%	67%	15%	CaCl ₂ /KCl	0.05M
#3	18%	67%	15%	CaCl ₂	0.5M
#4	18%	67%	15%	CaCl ₂ /KCl	0.5M

2.3 細胞培養

マウス筋芽細胞（C2C12 細胞）は、10%ウシ胎児血清（FBS）を添加した Dulbecco's Modified Eagle Medium（DMEM）で 37℃、5% CO₂ のインキュベータ内で培養された。凍結乾燥した多孔体（φ 10 mm、h 3 mm、体積 300 μL）はエタノール滅菌および PBS で洗浄され、培地中に 1 日浸漬して膨潤させた。その後、C2C12 細胞を 5×10^5 cells/piece の密度で播種された。これを 10 日間振盪培養した。細胞はヨウ化プロピジウム（PI）/カルセイン AM（CAM）染色により、それぞれ死細胞と生細胞を識別し顕微鏡で観察された。

3. 結果および考察

3.1 形態学的分析

架橋時のイオン溶液の種類および濃度を変えた 4 種類のクライオゲルを調製した。SEM により観察されたクライオゲルの表面および断面の構造を Fig. 1

に示す。得られたクライオゲルの表面は比較的滑らかである一方で、断面は大きな空隙が見られた。

断面画像をもとに空隙のサイズおよび多孔度を計測したところ、空隙の平均サイズは 200 ~ 300 μm と細胞の浸潤には十分な大きさを有していた。またイオン濃度が 0.5 M で架橋されたクライオゲル #3 および #4 は多孔度は高くなった（Fig. 2）。

3.2 機械的特性

作製したクライオゲルについて圧縮試験（Fig. 3）および引張試験（Fig. 4）で機械的強度を評価した。K⁺に浸漬した試料については強度および硬さはいずれも向上した。K⁺は SA の架橋にはほとんど寄与しないと考えられるが、CA の架橋には寄与することが知られている。今回観察された、K⁺の添加時におけるクライオゲルの機械的強度の向上は K⁺を介した CA 分子鎖の相互作用によるものと考えられる。

クライオゲルを水中に浸漬し、その膨潤度を測定した結果、浸漬から 12 時間で膨潤度が上昇し、約

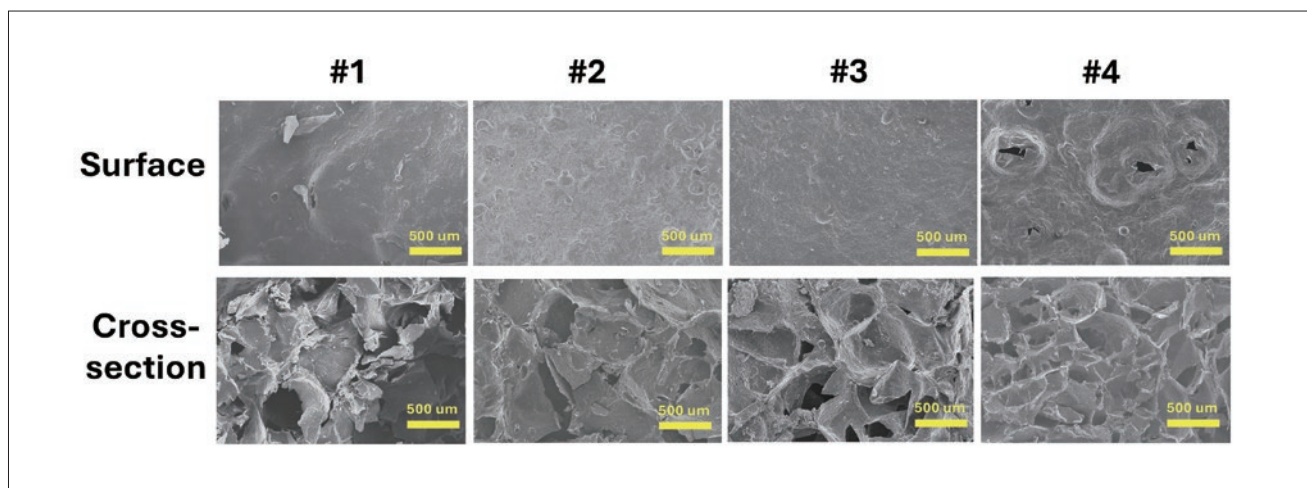


Fig. 1 SEM images of the surface and cross-section of the prepared cryogel. Scale bars = 500 μm.

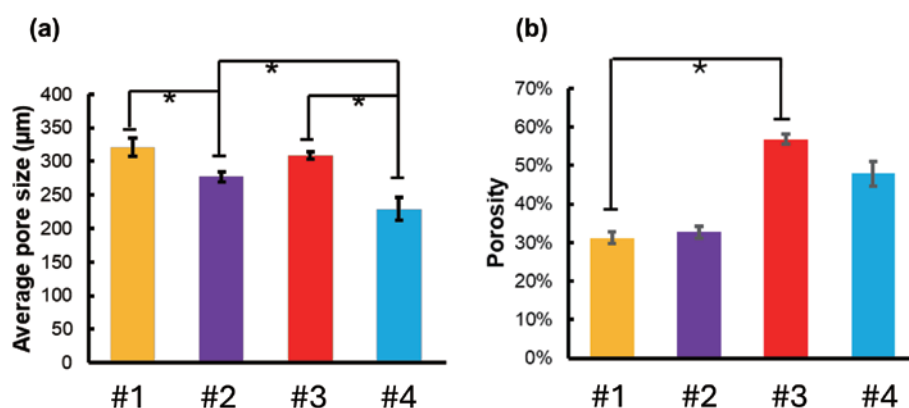


Fig. 2 (a) Average pore size measured from SEM images.
(b) Porosity percentage calculated based on the images.

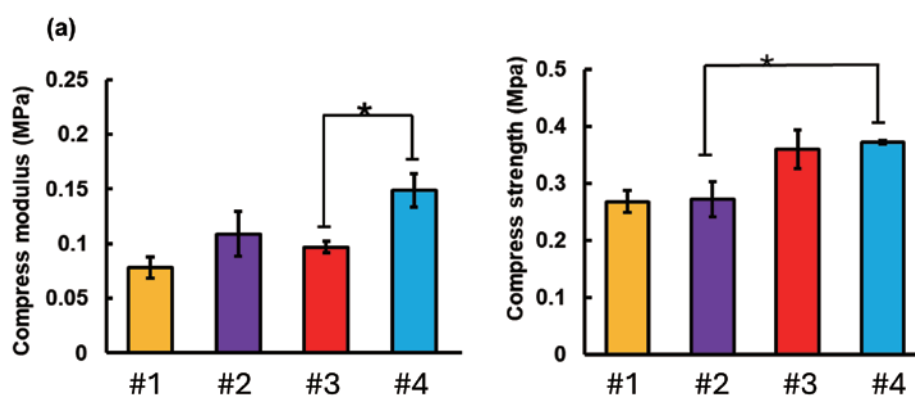


Fig. 3 Mechanical properties of cryogels measured by compression tests.
(a) Compression modulus. (b) Compression strength. Data shown as mean $\pm$ SD ($n = 3$, $*p < 0.05$).

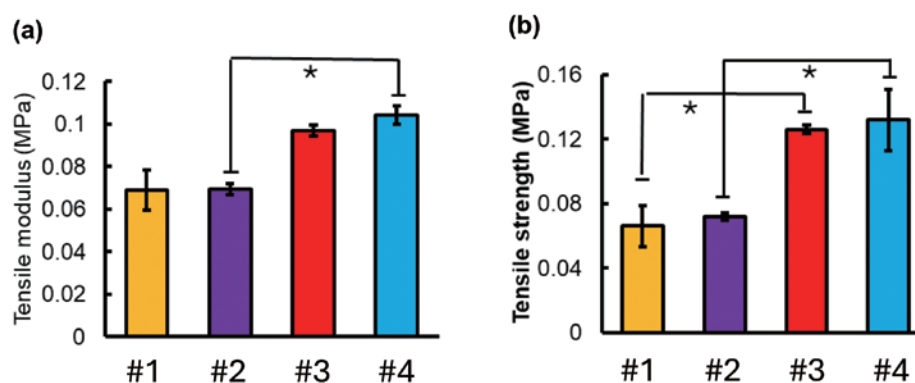


Fig. 4 Mechanical properties of cryogels measured by tensile tests.
(a) Tensile modulus. (b) Tensile strength. Data shown as mean $\pm$ SD ($n = 3$, $*p < 0.05$).

24 時間で約 2,000%に達しほぼ平衡状態となった。く変化することはなかった。
その後 72 時間まで浸漬しておいても膨潤度が大き

3.3 ATR-FTIR 分析

作製したクライオゲルについて FTIR 測定を行った。比較のため、原料の SPI、SA、CA のスペクトルも合わせて Fig. 5 に示す。このスペクトルの Amide I のピーク ($1,500 \sim 1,700 \text{ cm}^{-1}$) の吸光度ピーク面積の比を用いて、 α -ヘリックス、 β -シート、 β -ターン、ランダムコイル含量を決定した¹⁹⁻²¹⁾。 β シート含量は、 $1,610 \sim 1,640 \text{ cm}^{-1}$ および $1,660 \sim 1,680 \text{ cm}^{-1}$ の吸光度ピークの面積比として計算した。 α -ヘリックス、 β -ターン、ランダムコイルの含有量は、それぞれ $1,650 \sim 1,660$ 、 $1,680 \sim 1,695$ 、 $1,640 \sim 1,650 \text{ cm}^{-1}$ で計算した。その結果、粉末状態の SPI では β -sheet 構造が 83%、 α -helix 構造が 14% であったのに対し、クライオゲルでは 98% が β -sheet であった (Fig. 6)。これは凍結融解のプロセスに応じて β -sheet への結晶化が促進された結果と考えられる。

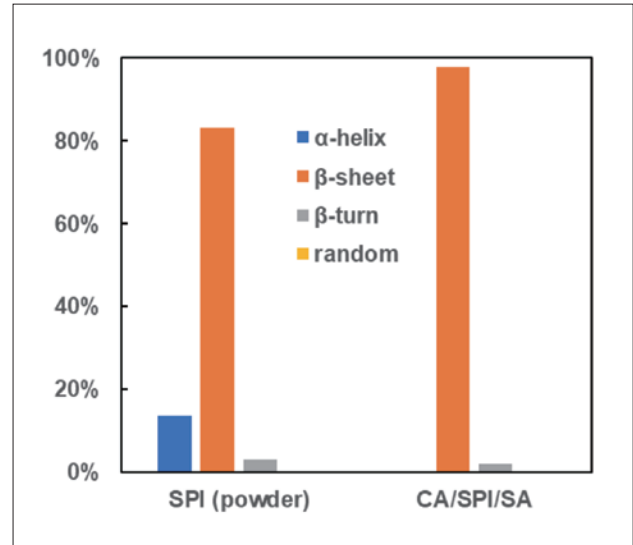


Fig. 6 Proportions of protein structures calculated by deconvolution of the Amide I peak in the FTIR spectrum.

3.4 *In vitro* 評価

凍結乾燥前のハイドロゲル、および凍結乾燥後のクライオゲルを用いて培養を行った。培養 2 日目か

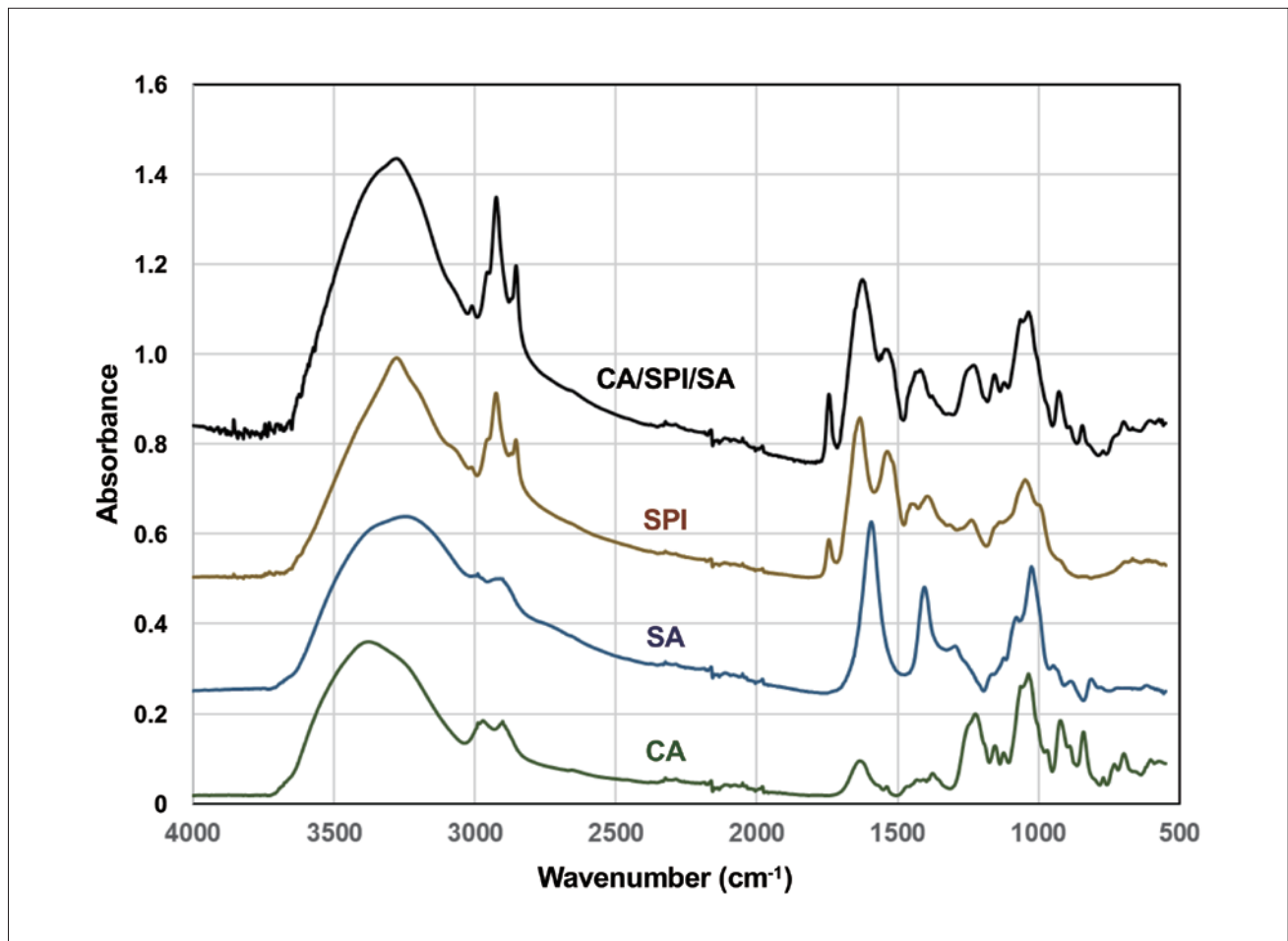


Fig. 5 FTIR spectra of CA/SPI/SA cryogel, with spectra of each components (CA, SPI, and SA) shown for comparison.

らシェーカーにより培養容器を振盪させた。凍結乾燥前のハイドロゲルは、3つのサンプルが培養液中で粉末に分解し、これはハイドロゲルの機械的強度が十分ではなく、高速での振盪に耐えられなかったことを示す。

一方凍結乾燥後のクライオゲルでは、振盪後も培養液中での完全な保持が確認され、クライオゲルの優れた安定性が示された。ライブ/デッド染色による分析から、これらのハイドロゲルは良好な生体適合性を有しており、多孔性構造が細胞の成長に適した条件を提供していることが示された。さらに断面のSEM観察によっても、ゲル内部に細胞が浸潤している様子が観察された (Fig. 7)。

播種時の細胞数は 5×10^5 cells で、6日間の培養後には、 1.2×10^6 cells、10日間の培養後には 2.2×10^6 cells と増殖を示した (Fig. 8)。倍加時間は約72時間であった。これは一般的な細胞培養条件である培養ディッシュ等で培養した場合よりは遅かつ

た。多孔質材料内部への効率的な細胞の浸潤には培養条件の改良が望まれる。

4. 展望

クライオゲルは3D多孔質構造を持ち、その構造が細胞の成長に必要な環境と酸素を提供する能力を持っていることが確認された。この多孔性構造は、細胞にとって理想的な培養環境を提供し、培養液との接触面積を増やすことで栄養素と酸素の交換を効率的に行えるため、細胞の生存率と増殖率を向上させる。ライブ/デッド染色による結果もこれを支持しており、クライオゲルの生体適合性が証明された²²⁾。しかし、振盪培養においてハイドロゲルが粉末状に分解する現象が見られたため、物理的な安定性には問題があることが示唆された。この問題を解決するために、クライオゲル化したところ、強度が向上した。SPI分子はより強固なネットワーク構造を形成

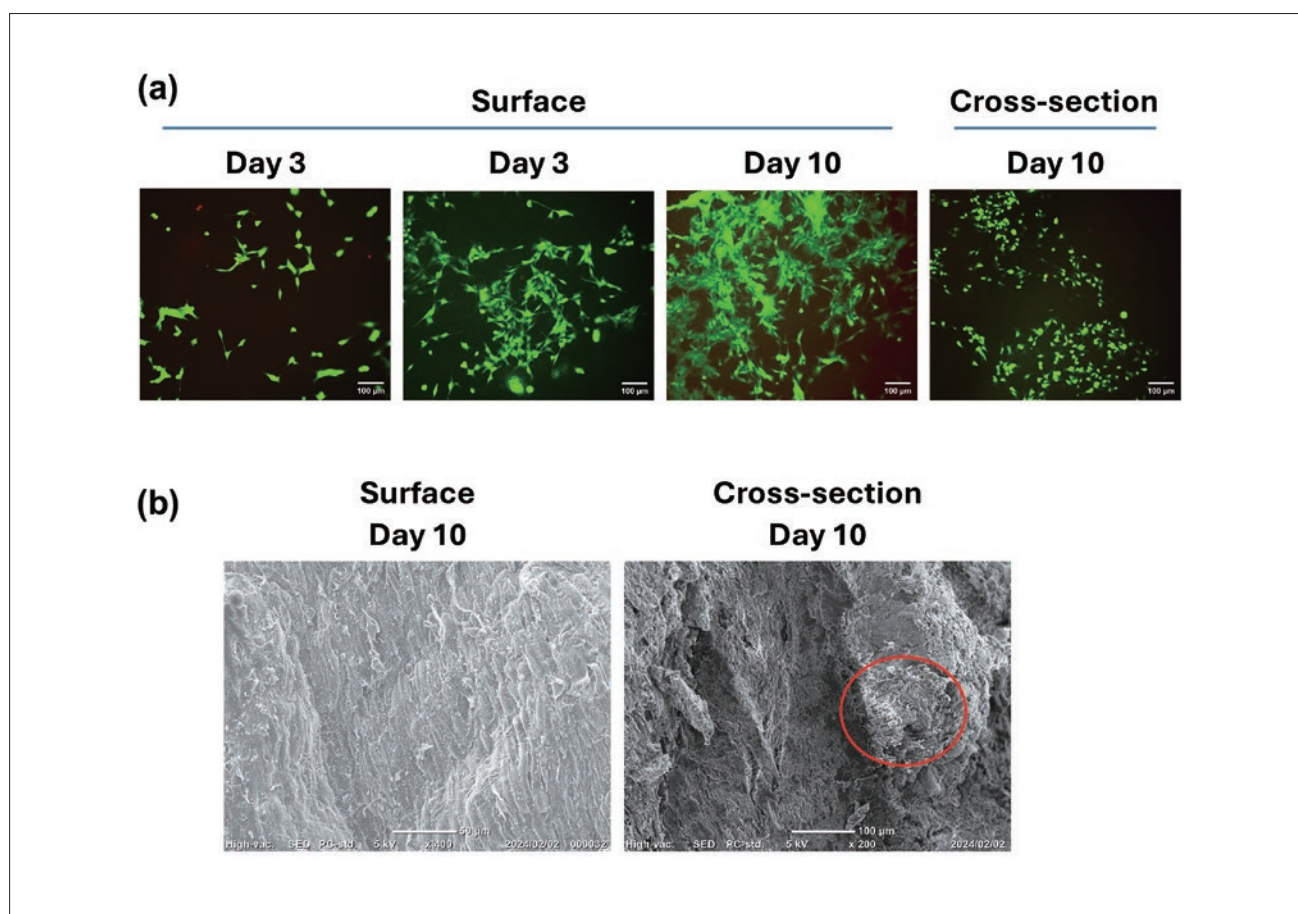


Fig. 7 Cellular morphology of C2C12 cultured on cryogel.

(a) Fluorescence microscopy images showing cell adhesion and proliferation on the surface of the cryogel at day 3 and day 10, and in the cross-section at Day 10. Green fluorescence indicates live cells. Scale bars = 100 μm. (b) SEM images of the cryogel surface and cross-section at day 10, revealing the cell morphology and distribution. Surface scale bar = 50 μm, cross-section scale bar = 100 μm.

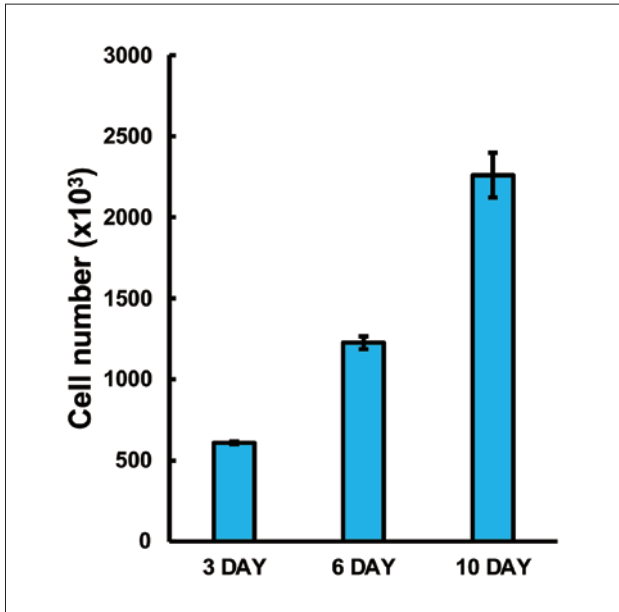


Fig. 8 Quantitative analysis of cell proliferation on cryogel over time. The graph presents cell counts at 3, 6, and 10 days post-seeding, starting with an initial seeding density of 5×10^5 cells.

したためと考えられる。さらに、細胞の浸潤と増殖に適した多孔質構造をさらに最適化するためには、多孔度の調節が重要である。添加物の添加により多孔度を増加させることは一つの方法であるが、細胞の種類によって適切な多孔度が異なるため、ターゲットとする細胞種に応じたカスタマイズが必要である。また、多孔質材料の化学的特性も細胞の接着や増殖に影響を与えるため、表面処理を工夫することで細胞の活性化を図ることも考えられる。

本研究で開発した可食材料からのみ構成される3D多孔質構造を有するクライオゲルは多くの利点を提供するが、その特性を最大限に活かすためには、材料の物理的・化学的特性の最適化が必要である。また、細胞培養の環境に適応するために、振盪速度や振盪時間の調整も必要となり、さらなる試験と改良が求められる。

謝 辞

本研究は公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団の支援を受けました。この場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

- 1) Kyriakopoulou, K.; Dekkers, B.; van der Goot, A. J. Plant-based meat analogues. In *Sustainable Meat Production and Processing*; Academic Press: 2019; pp 103–126.
- 2) Schreuders, F. K.; Dekkers, B. L.; Bodnár, I.; Erni, P.; Boom, R. M.; van der Goot, A. J. Comparing Structuring Potential of Pea and Soy Protein with Gluten for Meat Analogue Preparation. *J. Food Eng.* 2019, 261, 32–39.
- 3) Rumpold, B. A.; Schlüter, O. K. Nutritional Composition and Safety Aspects of Edible Insects. *Mol. Nutr. Food Res.* 2013, 57 (5), 802–823.
- 4) Sogari, G.; Amato, M.; Biasato, I.; Chiesa, S.; Gasco, L. The Potential Role of Insects as Feed: A Multi-perspective Review. *Animals* 2019, 9 (4), 119.
- 5) Post, M. J. Cultured Meat from Stem Cells: Challenges and Prospects. *Meat Sci.* 2012, 92 (3), 297–301.
- 6) Stephens, N.; Di Silvio, L.; Dunsford, I.; Ellis, M.; Glencross, A.; Sexton, A. Bringing Cultured Meat to Market: Technical, Socio-political, and Regulatory Challenges in Cellular Agriculture. *Trends Food Sci. Technol.* 2018, 78, 155–166.
- 7) Tuomisto, H. L.; Teixeira de Mattos, M. J. Environmental Impacts of Cultured Meat Production. *Environ. Sci. Technol.* 2011, 45 (14), 6117–6123.
- 8) Wakuda, Y.; Nishimoto, S.; Suye, S.; Fujita, S. Native Collagen Hydrogel Nanofibres with Anisotropic Structure Using Core-Shell Electrospinning. *Sci. Rep.* 2018, 8 (1), 6248.
- 9) Chien, K. B.; Makridakis, E.; Shah, R. N. Three-Dimensional Printing of Soy Protein Scaffolds for Tissue Regeneration. *Tissue Eng. Part C Methods* 2013, 19 (6), 417–426.
- 10) Jahangirian, H.; Azizi, S.; Rafiee-Moghaddam, R.; Baratvand, B.; Webster, T. J. Status of Plant Protein-Based Green Scaffolds for Regenerative Medicine Applications. *Biomolecules* 2019, 9 (10), 619.
- 11) Necas, J.; Bartosikova, L. Carrageenan: A Review. *Veterinari Medicina* 2013, 58 (4), 187–205.
- 12) Neamtu, B.; Barbu, A.; Negrea, M. O.; Berghea-Neamtu, C. Ş.; Popescu, D.; Zăhan, M.; Mireşan, V. Carrageenan-Based Compounds as Wound Healing Materials. *Int. J. Mol. Sci.* 2022, 23 (16), 9117.
- 13) Fujita, S.; Wakuda, Y.; Matsumura, M.; Suye, S. Geometrically Customizable Alginate Hydrogel Nanofibers for Cell Culture Platforms. *J. Mater. Chem. B* 2019, 7 (42), 6556–6563.
- 14) 酒井宣昭, 鈴木早百合. 福島市立子山における凍み豆腐製造業の現況. *季刊地理学*. 2006, 58 (2), 107–110.
- 15) 酒井宣昭. 宮城県岩出山町における凍り豆腐製造業の特性. *季刊地理学*. 2004, 56 (2), 106–109.

- 16) 大久保一良. 凍豆腐 製造法の変遷, 凍結熟成期間の短縮および「ゆ」からの有効成分の回収. *日本食品工業学会誌*. 1984, 31 (12), 814-820.
- 17) 田村正紀. 凍豆腐と調理. *調理科学*. 1985, 18 (3), 142-146.
- 18) Zhao, J.; Sun, F.; Li, Y.; Liu, Q.; Kong, B. Modification of Gel Properties of Soy Protein Isolate by Freeze-Thaw Cycles Are Associated with Changes of Molecular Force Involved in the Gelation. *Process Biochem.* 2017, 52, 200-208.
- 19) Zhao, X.; Chen, F.; Xue, W.; Lee, L. FTIR Spectra Studies on the Secondary Structures of 7S and 11S Globulins from Soybean Proteins Using AOT Reverse Micellar Extraction. *Food Hydrocolloids* 2008, 22 (4), 568-575.
- 20) Chen, X.; Ru, Y.; Chen, F.; Wang, X.; Zhao, X.; Ao, Q. FTIR Spectroscopic Characterization of Soy Proteins Obtained Through AOT Reverse Micelles. *Food Hydrocolloids* 2013, 31 (2), 435-437.
- 21) Wei, Z.; Dai, S.; Huang, J.; Hu, X.; Ge, C.; Zhang, X.; Xiang, N. Soy Protein Amyloid Fibril Scaffold for Cultivated Meat Application. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2023, 15 (12), 15108-15119.
- 22) Xia, P.; Miyajima, H.; Fujita, S. Porous edible cryogel inspired by the production of shimitofu (freeze-dried tofu) for high-density cell culture in cultured meat. *Food Hydrocolloids* 2025, 163, 111155.

High-density cell culture on a porous edible cryogel aiming for cultured meat

Satoshi FUJITA^{1,2)}, and Xia Ping¹⁾

¹⁾ *Department of Frontier Fiber Technology and Sciences, University of Fukui*

²⁾ *Life Science Innovation Center, University of Fukui*

The global demand for alternative proteins is increasing, prompting a search for innovative, energy-efficient food production methods. This study develops a manufacturing technology for mature tissues that mimic the physical and biochemical properties of biological tissues, using edible porous hydrogel materials derived from soy protein as 3D culture carriers. We explored a combination of soy protein isolates (SPI), which are known for their excellent cell adhesion properties, with carrageenan (CA) and sodium alginate (SA), which are noted for their rapid ion cross-linking capabilities. In the experiments, SPIs, CA and SA were dissolved in water, heated, mixed, and then allowed to gel at room temperature. After repeated heating and cooling to enhance gelation, the resulting hydrogel was immersed overnight in a Ca^{2+} and K^{+} solution to form a CA/SPI/SA hydrogel. A cryogel was subsequently produced by freeze-drying. Myoblasts (C2C12) seeded onto this cryogel and cultured under agitation showed improved mechanical strength, and significant cell adhesion and proliferation after 10 days. These findings suggest that the cryogel's porous structure promotes cell growth, underscoring the biocompatibility of a CA/SPI/SA hydrogel. As a result, this hydrogel may prove to be an effective scaffold for cultured meat production, offering a sustainable protein production solution.