

食資源のサステナビリティを拓く高開口率足場シートを用いた3次元組織構築技術の開発

堀 武 志*

Development of a 3D Tissue Assembly Technology Employing a High Porosity Scaffold toward Food Supply Sustainability

Takeshi HORI*

The world population is increasing, raising concerns about meat production systems and whether they will be able to sustainably meet the demands of meat consumption in the future. This provides the impetus for creating a meat supply system that is not as resource-intensive as traditional methods, ultimately reducing the burden on the environment. Considering this, we attempted to develop a method of meat production based on cell cultures. Current cell-based meat systems have limitations such as structural complexity as well as a high proportion of cell scaffolding materials that remain in the cultured meat. In this study, we developed a novel cell scaffold with a mesh sheet that harnesses a high aperture ratio in response to these issues. It is expected that by utilizing this cell scaffold sheet, it will be possible to produce cell-cultured meat that closely resembles genuine animal meat.

1. 緒言

世界人口は2050年に100億人に達すると考えられており、現在の食肉供給システムでは供給が追いつかなくなる懸念がある。また、自然環境への負荷を小さくした食糧供給システムを構築することの重要性が認識されている。食肉供給と環境負荷の問題を解決する新たな食糧供給システムとして細胞農場が注目されている。細胞農場とは、動物や植物から収穫される産物を、人工的な細胞培養により生産する方法である。細胞培養により作製された肉、すなわち培養肉は世界中で開発が進んでおり、シンガポール等では既に販売もされている。

これまでの培養肉の研究開発は、主に細胞の調達や大量生産の方法について行われてきた。そして現在は、構造や食感、味などを本物の食肉に似せるという課題が挙げられる。たとえば3D細胞プリント技術を使った場合、コラーゲンゲルなどの細胞足場材料の占める割合が高く、細胞の存在比率が比較的小さいという問題がある。実際の食肉が有する層状構造を十分に模倣できておらず、これらは食感や味とも関係してくるものと考えられる。そこで本研究では、細胞シート工学を発展させ、培養肉の作製に資する要素技術の開発を行った。

2. メッシュシートの実験

実際の食肉には、筋肉層だけでなく、脂肪層や間質細胞（コラーゲンを分泌する線維芽細胞等）層がある。これらの層の配置や存在比率を模倣しなければ、本物の食肉とはかけ離れた培養肉になってしまう。しかし、現在の組織工学の技術ではこの筋肉構造を模倣することは難しい。そこで本研究では、まず初めに、申請者が以前開発した「メッシュ培養法^{1,2)}」を改良することにより食用の細胞シートを作製することを試みた。

メッシュ培養法とは、微細な目のメッシュシートの上で細胞を培養する方法であり、ディッシュの上で行う従来の細胞培養法とは大きく異なる。

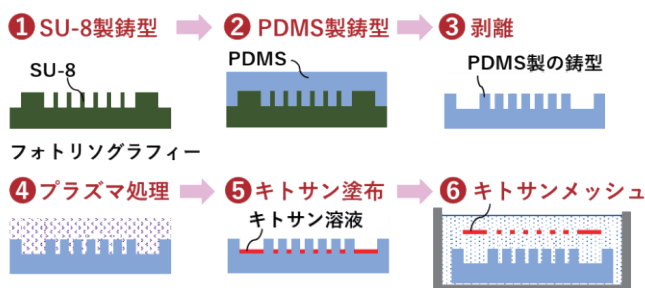


図1 キトサンメッシュシートの実験方法。

フォトリソグラフィーによりSU-8（樹脂）製の型を作製した。その鋳型にPDMS（ポリジメチルシロキサン）を流し込み硬化させることでPDMS製の鋳型を作製した。その鋳型にキトサン溶液をスピンコートした。乾燥後にメッシュを剥がすことによりメッシュシートが得られた。

2024年2月28日 受理

* 豊田理研スカラー

東京医科歯科大学学生体材料工学研究所診断治療システム医工学分野

メッシュ培養法では、まず表面張力を利用してメッシュ上に細胞を播種する。播種された細胞は、メッシュに接着し、メッシュの開口部を埋めるように増殖する。数日間の培養により、メッシュの目が細胞により埋まった所望の細胞シートが得られる。メッシュの開口部の中では、細胞-細胞接着が優位になっている。すなわち生体内の組織に類似した細胞間接着が起きている。ディッシュ上で起きる細胞-基板間接着とは異なり、細胞が基板との接着によるメカニカルストレスを受けにくく、細胞の機能が向上することが明らかになっている。継続的な培養により三次元的な厚みを持った細胞シートを作製することができ、また、細胞シートにおける足場材料の存在比率を低く抑えることができる。

これまでのメッシュ培養法では、ポリエチレンテレフタレート製のメッシュが使用されてきたため食用として利用できなかった。そこで本研究では、食用に利用でき、環境負荷が小さい材料でメッシュシートを作製することを目指した。注目した材料は、バイオマス材料であり生物生産量がセルロースに匹敵するほど多量に存在するキトサンである。キトサンは、エビやカニなどの殻の主成分であるキチンから得られる高分子多糖である。サプリメントや医療器具にも利用されている安全性の高い物質である。キトサンメッシュシートを作製するために、まずキトサン粉末を酢酸に溶解した。この溶液を、微細なピラーを有するPDMS（ポリジメチルシロキサン）の鋳型の上にスピコートし、乾燥後に剥離した（図1）。この方法により、キトサンメッシュシートを作製することができた。微細なピラーの形状を変えることにより、丸形開口部と菱形開口部のメッシュシートを作製することができた（図2AとB）。メッシュシートの厚みは20 μm 程であったが、強度は高く、ピンセットで持ち上げても破れなかった（図2C）。

3. キトサンメッシュシートを用いた細胞シートの作製

作製したキトサンメッシュシートを用いて線維芽細胞の培養を試みた。線維芽細胞はメッシュ培養が行いにくいいため、すなわちメッシュへの接着率が低いため、この細胞の培養ができれば、他の種類の細胞への適用も見込まれる。表面張力を利用してメッシュシートの上に線維芽細胞の懸濁液を載せ培養を行ったところ、厚みを持った細胞シートが形成された（図3）。この細胞シートは、ディッシュ底面から浮遊させた状態で設置されている。培養液中の酸素や栄養素が細胞シートの上下から効率的に細胞へ供給された結果、厚みを持った細胞シートが形成されたものと考えられた。

メッシュ培養の重要な特徴として、細胞の配向性（細胞の向き）を制御できる点が挙げられる。細胞を配向させることにより、若い筋芽細胞から成熟した筋管細胞へと誘導することができる。筋管形成は、食肉の歯ごたえなどに関係してくるものと考えられる。菱形開口部を有するメッシュシートで線維芽細胞を培養することにより、多くの細胞をメッシュ上で配向させることができた。今後は実際に筋芽細胞を用いて実験を行う計画である。

4. 結言

本研究では、キトサンを材料として高開口率の細胞足場メッシュシートを作製し、さらにそのシートを用いた細胞培養に成功した。この新しい細胞培養法は、以下に挙げられる特徴を有する。1) 細胞シートの上下から、効率的に細胞へ栄養を供給できる、2) 開口部の形状を調節することにより、筋肉細胞の成熟・分化を促進できる、3) 培養肉中における足場材料の混入比率を抑えられる、4) 細胞シートを容易に積層できる。今後は、筋肉細胞層、脂肪細胞層、線維芽細胞層を積層し、層状構造を有する培養肉の作製を目指す。

REFERENCES

- 1) T. Hori and O. Kurosawa, *Tissue Eng Part C Methods* (2018). doi: 10.1089/ten.TEC.2018.0269.
- 2) T. Hori, O. Kurosawa, K. Ishihara, T. Mizuta and H. Iwata, *Tissue Eng Part C Methods*, **26** (2020) 170-179.

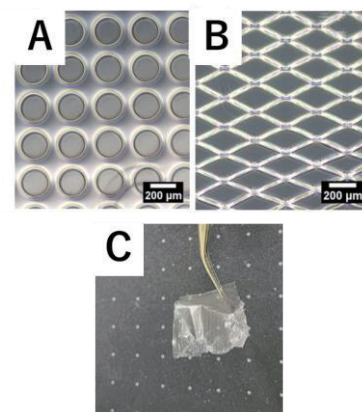


図2 キトサンメッシュシート。

- A) 円形開口部を有するメッシュシート、
B) 菱形開口部を有するメッシュシート、
C) プレートから剥離したキトサンメッシュシート。スケールバー = 200 μm

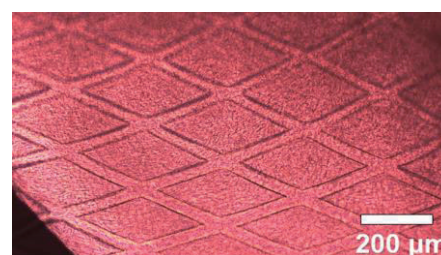


図3 キトサンメッシュシートを用いた細胞培養。
キトサンメッシュシート上に正常線維芽細胞を播種し、2日間培養した。