

ヒト及びアカネズミ毛根由来細胞の培養

山口泰典*, 古志直之、田下智亜紀

培養正常細胞を低侵襲的に得る方法として、抜去した毛根部分から培養可能な細胞を得る方法を開発した。インフォームドコンセントを与えられた成人ボランティア5名より本人自身が容易に抜去できるまゆ毛を用いて、毛根に由来する正常細胞の培養を種々条件下で検討したところ、年齢や性別に関係なく簡易な方法で繊維芽細胞様の培養細胞を得ることが可能となった。それらの細胞の最適培養条件を明らかにすると共に、継代培養を重ねることによって細胞の増殖性がどのように変化するかを分析した。また、野生哺乳動物のひげまたは体毛の毛根部分からバイオリソースとして培養可能な細胞を得る目的で、アカネズミ (*Apodemus speciosus*) をモデル動物とし、そのひげ及び体毛由来の細胞を培養できる簡易で効率の良い方法を開発した。

キーワード：培養正常細胞，毛根，バイオリソース，アカネズミ

動物の培養正常細胞は多様な研究の材料として有用であるが、近年 iPS 細胞の作製技術が確立されるに至り、バイオリソースとしての重要性が増している¹⁻³⁾。特に、種々の遺伝的背景を有する培養正常細胞のライブラリーは、難病の原因解明や治療法の開発に貢献するものと期待されている。これらの培養正常細胞は、主に侵襲的に得られた皮膚組織を材料とすることが多い。しかし、この方法は多少とも苦痛が伴うので、ヒトが対象である場合はボランティアの確保と事前の十分なインフォームドコンセントの実施が容易ではない。また仮に、採取が不調に終わったときに再度侵襲的に組織を採取することは困難である。実験動物についても、動物福祉の観点から苦痛を伴う侵襲的な組織採取は極力避けるべきである。

毛は成長と脱落をくり返すが、毛包中には幹細胞を含む種々の細胞が存在しており、毛包を皮膚組織とともに採取して培養することによって、色々な特性を持った培養細胞が得られ、その中には分化多能性を有して神経細胞などに分化できるものがあることが知られている⁴⁾。

毛包由来細胞の採取も、当初は毛包を含む皮膚を侵襲的に採取して培養する方法が行われたが⁵⁻⁸⁾、後に極めて低侵襲的な手技で得られる抜去毛を用いてもケラチノサイトを主とする正常培養細胞が得られることが示された^{9, 10)}。この場合、ヒト後頭部の毛髪を抜去して **Dispase** で処理後に、ケラチノサイト用の無血清培地 (**Defined keratinocyte-SFM**, GIBCO) で培養する方法が用いられている。そこで我々は、老若男女誰でもが自分自身で抜去しやすいまゆ毛を対象として、培養正常細胞を得ることを試みた。また、ケラチノサイトではなく、培養正常細胞の中で最も培養しやすく、iPS 細胞培養の際の支持細胞層としても利用できる繊維芽細胞の培養を目指した。

また、哺乳動物のひげや体毛を材料として、培養正常細胞を得ることも試みた。その構想は、科学研究費助成事業 (学術研究助成基金助成金、課題番号 26640139) として採択されている。つまり、絶滅が危惧され

る希少哺乳動物については、皮膚や血液を侵襲的に採取することは現実的ではないので、容易に採取可能なひげや体毛を採取し、毛根由来の培養正常細胞を凍結保存しておく。将来その動物が絶滅した場合には、凍結保存してあった正常細胞を解凍して培養後に初期化し、「未来の最先端技術」で生殖細胞に分化させ、体外受精及び近縁動物種の子宮への移植を経て、絶滅した哺乳動物を復活させるという提案である¹¹⁾。万一の絶滅を想定して、受精卵を凍結保存しておくことは有効な方法であるが、絶滅危惧動物から受精卵を採取することは困難である。また、仮に受精卵を凍結保存できても、少数の個体から得た受精卵では、遺伝的多様性の確保が不十分であると想定されるので、未来の絶滅動物復活プロジェクトに寄与するには心許ない。ひげや体毛であれば同じ動物種であっても遺伝的背景が多様な多数の個体から正常細胞を容易に確保できる。

そこで今回は、野生哺乳動物のモデルとしてアカネズミを用い、そのひげと体毛を材料にして細胞培養を試み、培養条件の最適化を模索した。アカネズミは、日本の固有種であるが、北海道から九州まで分布しており、福山大学敷地内やその周辺でも実習や研究用に比較的容易に採取されているので、ひげや体毛を採取するには好適な野生動物である¹²⁾。

なお、本研究は、福山大学学術研究倫理審査委員会（ヒト倫理部会、動物倫理部会）で承認されている。

材料と方法

培養液 DMEM 培養液（コーニング）、DMEM 培養液（フェノールレッド不含、和光純薬）、William's 培養液（WME、GIBCO）、DMEM/Ham's F-12 培養液（和光純薬）、ASF104N（味の素）、MCDB 153 培養液（コスモバイオ）、OPTIPRO SFM 培養液（GIBCO）、Essential 8 培養液（GIBCO）、NutriStem XF/FF 培養液（フナコシ）、PCT Keratinocyte 培養液（CnT-57、フナコシ）、HtCell-STM-FF Kit 培養液（サーモサイエンティフィック）、DEF-CS 培養液（タカラバイオ）

緩衝液 ハンクス平衡塩類溶液（HBSS、ナカライテスク）、ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（DPBS-、ナカライテスク）、エチレンジアミン四酢酸（ethylenediaminetetraacetic acid、EDTA、シグマアルドリッチ）、リンゲル液（日本薬局方、大塚製薬）

培養液添加物 牛胎児血清（FBS）、HyCell-STEM-FF 6x supplement（サーモサイエンティフィック）、抗生物質-抗真菌剤混合溶液（100×、ナカライテスク）、100mM ピルビン酸ナトリウム溶液（100×、ナカライテスク）、GLUTAMAX I（100×、インビトロジェン）、Insulin-transferrin-selenium（100×、インビトロジェン）、MEM 非必須アミノ酸（100×、サーモサイエンティフィック）

麻酔薬 イソフルラン（マイラン製薬）、抱水クロラル（ナカライテスク）

酵素 TrypLE™ Select（10×、GIBCO）

凍結保存液 セルリザーバーワン（DMSO 含有、ナカライテスク）

細胞の還元活性測定試薬 alamarBlue™（ナカライテスク）、3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium Bromide（MTT、和光純薬）

染色液 Dimamidinophenylindol(DAPI、ナカライテスク) 1ng/mL、トリパンブルー0.16%/0.85%NaCl

培養器 滅菌済みシャーレ（φ60mm、ファルコン）、滅菌済みコラーゲンタイプ1コートシャーレ（φ60mm、イワキ）、滅菌済みコラーゲンタイプIコート12ウェルプレート（イワキ）、滅菌済み接着細胞用12ウェルプレート（イワキ又はスミロン）、滅菌済み接着細胞用48マルチウェルプレート（スミロン）、カバーガラ

ス (φ18mm 丸型 No. 1、マツナミ)

動物 福山大学構内及び周辺で捕獲されたアカネズミ (*Apodemus speciosus*)

麻酔 容積約 4.7L の蓋付きガラス水槽にアカネズミを入れた後、イソフルラン 500 μL を加えて麻酔した。麻酔が不十分な場合は、イソフルランを 100 μL ずつ追加する。その後、3.2% 抱水クロラール/リングル液を体重 10g 当たり 0.14mL 腹腔注射し、ヒゲ及び体毛を抜去する。抜去後は、37°C に保温して回復を待つ。他の実験用にジエチルエーテルで安楽死させたアカネズミからも、安楽死直後にヒゲ及び体毛を抜去した。

毛の抜去 60% イソプロパノールを含んだ脱脂綿で、抜去する部分の毛を逆立てるように 2 回拭く。クリーンベンチ内で、滅菌した毛抜きを用いて抜去し、φ60mm 滅菌シャーレに入れてある標準の 5 倍濃度の抗生物質-抗真菌剤混合溶液と FBS10% を含む HBSS に投入する。この際、長い毛は滅菌したハサミで 5mm 程度に切断する。予め FBS20% 添加 DMEM 培養液を 1 ウェル当たり 150 μL ずつ分注してある滅菌済みコラーゲンタイプ I コート 12 ウェルプレートへ、毛根部分が底面につくように滅菌したピンセットで移す。この上から、滅菌した φ18mm 丸形スライドガラスを被せる。

細胞培養 翌日から 2 日ごとに、各ウェルの古い培養液を除去し、新鮮な FBS20% 添加 DMEM 培養液又は DEF-CS などの培養液を 150 μL ずつ添加する操作を繰り返す。適宜、顕微鏡観察して毛根部分から細胞の増殖・遊出が認められたら、培養液を 150 μL ずつ毎日添加する。ウェル中の培養液の量が 1mL 程度になったら、2 日ごとに、古い培養液を半量除去し、同量の新鮮な培養液を加える。細胞がウェル底面の 1/2 以上まで増殖したら、剥離して滅菌済みコラーゲンタイプ I コートシャーレ (φ60mm) へ移す。細胞の剥離は、以下の手順で行う。細胞が十分増殖したシャーレ又はウェルの培養液を除き、0.02% EDTA 含有 DPBS- で 2 回リンスする。0.02% EDTA 含有 DPBS- で希釈した TrypLE 溶液を加えて 37°C、3 分間、80rpm で振盪後、丁寧にピペッティングして剥離した細胞を滅菌済み遠心管へ移す。190g、4 分間の遠心分離で細胞を回収し、沈殿した細胞を新しい培養液と混和してシャーレ又はウェルに播種する。

凍結保存 細胞がコンフルエントになる直前のシャーレを選んで細胞を剥離後、遠心分離して細胞を回収する。2~5×10⁵ 個/mL になるように凍結保護液 (セルリザーバーワン又はバンバンカー) に懸濁し、凍結保存チューブに 1mL ずつ分注する。これを、-80°C フリーザー中の発泡スチロール容器に移して徐冷凍結したのち、液体窒素冷凍保存コンテナへ入れる。

細胞数の測定 接着細胞を剥離後、細胞浮遊液を等量のトリパンブルー染色液と混和する。改良ノイバウエル血球計算盤又はフックス・ローゼンタール血球計算版及び自動測定装置 Luna™ にて生死判別しながら計数し、平均値を算出する。また、剥離しないで測定する場合は、37°C に加温した alamarBlue™ を培養液の 10% 量添加して培養し、2~7 時間後に培養液の OD_{573nm} と OD_{605nm} の差を算出し、対照群の値と比較して相対的な細胞数の変化を推定する。MTT を用いる場合は培養液に、終濃度が 250 μg/mL になるように添加し、2~7 時間後に 0.04N の HCl を含むイソプロパノールで色素を抽出して、OD_{540nm} と OD_{700nm} の差から、alamarBlue 場合と同様に相対的な細胞数の変化を推定する。

DAPI 染色による細胞核の観察 毛をエタノール：酢酸=3:1 の固定液で室温、30 分間処理し、蒸留水でリンス後に細胞核を 1ng/mL の DAPI 染色液で室温、30 分間染色する。毛を蒸留水でリンス後、スライドガラスに載せ、無蛍光グリセリン：PBS=9:1 とカバーガラスで封入し、蛍光顕微鏡の U 励起で観察する。

細胞集団倍加時間 細胞増殖の指標として、細胞密度が 2 倍になるのに要した時間を T_d として定義する。

$$T_d = T \log_2 / \log_{10} (N_2 / N_1)$$

ただし、T = T₂ - T₁ N₁ : 時刻 T₁ における細胞密度、N₂ : 時刻 T₂ における細胞密度

結果および考察

まゆげ由来細胞の作製 この研究で得られたまゆげ毛根由来細胞（MUG 細胞）の一覧を表 1 に示す。12 ウエルプレートで培養したまゆ毛から、細胞が増殖・遊出する割合は、1/12 (8.3%)～11/22 (50.0%)であり、平均の遊出率は 26.2%であった。

表 1 MUG 細胞の由来

細胞	性別	年齢
MUG/1	男	59
MUG/2	男	23
MUG/3	男	22
MUG/4	女	23
MUG/5	男	21

FBS の非働化 細胞培養において、FBS を 56℃、30 分間処理し、細胞に悪影響を与える補体などの成分を非働化する方法が一般的に知られているが、その効果については判断が分かっている¹³⁻¹⁵⁾。そこで、供給元とロットが異なる 4 種類の FBS について、それまで非働化して使用してきた FBS（HyClone ロット AYG161519）と比較した。具体的には、MUG/1 細胞（継代番号 6）を 48 マルチウエルにウエル当たり 3.2×10^4 個播種し、FBS20%添加 DMEM 培養液で 6 日間培養後、alamarBlue 法によって非働化の効果を分析した。alamarBlue の吸光度について、これまで使用してきた非働化 FBS（HyClone、ロット AYG161519）の値を 100.0 とした相対値で表 2 に示した。どの FBS においても、非働化した場合の方が細胞の増殖が良い。ロット差も認められ、非働化して使用している現用の FBS のロットが最良であった。

表 2 FBS 非働化の効果

供給元	ロット	FBS	非働化 FBS
HyClone	AYG161519	—	100.0
HyClone	AYK176955	91.1	95.3
GIBCO	1512125	94.1	95.8
JBS	021633	76.1	77.1
Equitech-Bio	SFBU30-2487	88.9	95.2

無血清培養液での培養 近年種々の無血清培養液が開発されている。これらの無血清培養液は、FBS の場合のようなロット差がほとんどなく、安定的に細胞培養できるとされる。そこで、MUG/1 細胞（継代番号 17）を 48 マルチウエルにウエル当たり 3.3×10^3 個播種し、20%FBS 添加 DMEM 培養液および 5 種類の無血清培養液で 7 日間培養後、alamarBlue 法によって細胞の増殖を分析し、その結果を表 3 に示した。20%FBS 添加 DMEM 培養液と比較すると無血清培養液での細胞増殖はかなり劣るが、OPTIPRO SFM や Essential8 培養液を用いれば、MUG 細胞の無血清培養が可能であると判断できる。

表 3 無血清培地での培養

培養液	alamarBlue の吸光度 (相対値)
DMEM+FBS20%	100.0
OPTIPRO SFM	77.8
Essential 8	78.1
MCDB 153	40.7
HyCell-STEM-FF	71.7
Defined Keratinocyte-SFM Kit	43.6

無血清培養液の混合 MUG/1 細胞(継代数 7)を、5 種類の培養液又はそれらを等量に混合した培養液(FBS 無添加)で 10 日間培養した。MTT 法で分析し、ASF104N 培地のみの場合を 100 とした相対値で細胞の増殖を表 4 に示した。OPTIPRO SFM を用いた場合の細胞増殖が良く、特に OPTIPRO SFM と WME 又は ASF104N を等量混合した場合が、MUG 細胞の無血清培養に適していることがわかる。

表 4 混合した無血清培養液での培養

培養液	MEM/F-12	WME	ASF104N	Cnt-57	OPTIPRO SFM
MEM/F-12	71.2	91.0	98.2	101.1	127.6
WME		95.5	89.4	127.8	152.2
ASF104N			100.0	109.6	147.1
Cnt-57				20.4	111.6
OPTIPRO SFM					129.3

低酸素濃度での培養 酸素濃度が高いほど細胞増殖が悪くなるという報告がある¹⁶⁾。そこで、通常の CO₂ インキュベーター (95%空気、5%CO₂) とマルチガスインキュベーター (90% N₂、5%O₂、5%CO₂) で MUG/5 細胞(継代数 11)を 7 日間培養後、alamarBlue 法によって分析した。1 2 ウエルプレートを使用し、DMEM/Ham's F-12 培養液を用い、添加物として FBS20%の場合と血清代替物である HyCell-STEM-FF supplement の場合を比較した。3.6×10⁴の細胞を FBS20%添加で培養した場合を 100 とした相対値で表した結果を表 5 に示す。FBS20% 添加の場合は、通常の CO₂ インキュベーターで培養 (20%O₂) した方が細胞の増殖が少し良い傾向にあると思われる。一方、血清代替物である HyCell-STEM-FF supplement を用いた無血清培養は、FBS20%添加の場合に比べて細胞増殖が劣っていた。また、この場合には、酸素濃度はほとんど関係ないか、やや 5%O₂ の方が良い傾向があると思われる。また、1 ウエル (3.6cm²) 当たりの播種細胞数が 4.5×10³ (1250 個/cm²) 以下では、細胞の増殖はほとんど見られないことがわかる。

表 5 低酸素濃度と FBS 代替添加物の効果 (培養 7 日間)

播種細胞数	FBS20%		HyCell-STEM-FF supplement	
	20% O ₂	5% O ₂	20% O ₂	5% O ₂
3.6×10 ⁴	100	85	52	63
1.8×10 ⁴	49	39	20	18
9.0×10 ³	23	13	6	2
4.5×10 ³	6	3	0	0
2.3×10 ³	0	0	0	0
1.1×10 ³	0	0	0	0

次に同じ実験を、培地交換しながら 57 日間培養した結果を表 6 に示す。FBS20%および HyCell-STEM-FF supplement 添加のどちらでも、5% O₂の方が良い。このような長期培養では、HyCell-STEM-FF supplement 添加の方が、FBS20%添加の場合よりも細胞増殖が良い傾向が認められた。特に、播種細胞数が 2.3×10³ 以下の場合でも、HyCell-STEM-FF supplement 添加、5% O₂の条件ではある程度の細胞増殖が維持されていると考えられる。7 日間と 57 日間の培養の結果から、初期には FBS20%添加で培養し、その後血清代替物を添加した無血清培養液に交換することが適切ではないかと考えられる。

表 6 低酸素濃度と FBS 代替添加物の効果 (培養 57 日間)

播種細胞数	FBS20%		HyCell-STEM-FF supplement	
	20% O ₂	5% O ₂	20% O ₂	5% O ₂
3.6×10 ⁴	100	138	106	140
1.8×10 ⁴	73	126	85	131
9.0×10 ³	58	117	69	124
4.5×10 ³	57	83	63	84
2.3×10 ³	24	43	23	77
1.1×10 ³	39	43	25	73

播種細胞数と増殖度 MUG/3 細胞(継代数 19)を φ60mm のコラーゲンコートシャーレ(21cm²)に、8.0×10⁵ 個～2.5×10⁴ 個播種し、FBS10%添加 DMEM 培養液で 7 日間培養した後、各シャーレ中の細胞数を計数し、Td 値を算出した(表 7)。この範囲では播種細胞数が少ないほど、Td 値が小さく増殖が速い傾向が認められる。播種細胞数が多い場合に Td 値が大きいの、培養の早期に接触阻止が生じて細胞の増殖が低下したためであると推測され、19 回継代を経てもこの細胞集団が接触阻止という正常性を維持していることを示唆している。また、この培養面積(21cm²)で少なくとも 1.25×10⁶ 個(6.0×10⁴/cm²)までは培養可能であることがわかる。

表 7 播種細胞数と集団倍加時間

播種細胞数	7日後の細胞数	Td (日)
8.0×10^5	1.25×10^6	10.9
4.0×10^5	5.8×10^5	13.1
2.0×10^5	5.6×10^5	4.7
1.0×10^5	3.5×10^5	3.9
5.0×10^4	1.6×10^5	4.2
2.5×10^4	1.0×10^5	3.5

継代培養と集団倍加時間 MUG/1細胞及びMUG/5細胞をコラーゲンコートシャーレに 5×10^4 個播種し、コンフルエント状態に増殖したら剥離して希釈し、改めて 5×10^4 個で播種するという継代培養を繰り返した。継代ごとに、集団倍加時間 Td を算出した結果を図 1 に示す。継代数 8 までは MUG/1 細胞と MUG/5 細胞で Td 値にほとんど差は見られない。しかし、継代数 9 になると、MUG/1 細胞の Td 値が急激に大きくなって増殖が悪くなり、これ以上の継代培養ができなくなった。一方、MUG/5 細胞では継代数 10 でも、徐々に Td 値が増加しているのみである。2 例の比較ではあるが、MUG/1 細胞は 59 歳、MUG/5 細胞は 21 歳の男性ボランティアに由来しているので、この年齢差が継代数 9 における Td 値の大きな差に反映されている可能性がある。今後は、MUG/5 細胞や他の MUG 細胞について、継代培養を繰り返し Td 値が急激に大きくなる継代数があるかどうかを分析する必要がある。

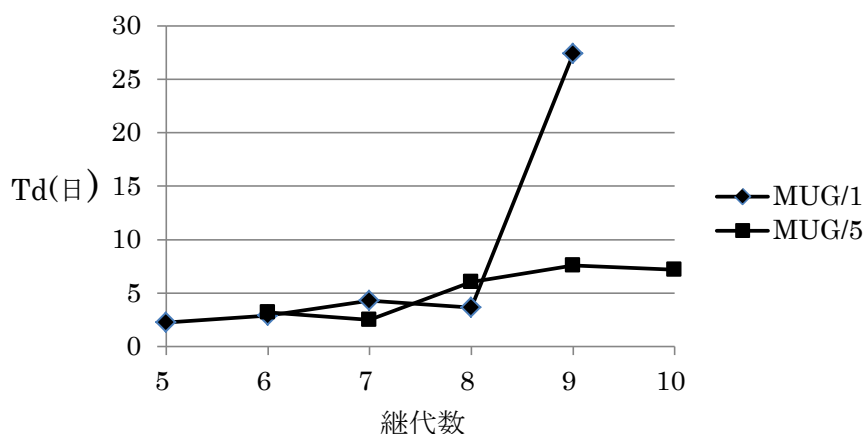


図 1 継代数と集団倍加時間の変化

アカネズミ抜去毛由来細胞の培養 抜去したアカネズミのヒゲ及び体毛をそのまま 4 種類の培養液を用いて、5% O_2 又は20% O_2 の CO_2 インキュベーターで培養し、培養 15 日目に細胞の遊出率を計測した (表 8)。最近発売された無血清培養液である DEF-CS 培養液 (タカラバイオ) を用いて 5% O_2 の環境で培養することで、約 10% の毛根から正常培養細胞の増殖・遊出が認められた。

表 8 アカネズミ抜去毛由来細胞の遊出率

培養液	5% O ₂	20% O ₂
DMEM+FBS20%	3/52 (5.8%)	1/33 (3.0%)
OPTIPRO SFM+FBS20%	1/38 (2.6%)	—
Nutristem	1/51 (2.0%)	—
DEF-CS	14/139 (10.1%)	—

酵素処理したアカネズミ抜去毛由来細胞の培養 抜去したアカネズミのヒゲ及び体毛をタンパク質分解酵素である TrypLE (室温) で処理し、DEF-CS 培養液、5% O₂ の環境で培養した。培養 15 日目に細胞の遊出率を計測した結果を表 9 に示す。TrypLE、6 分間の処理で、細胞の増殖・遊出率が向上することがわかる。毛根部分の外層は毛鞘で覆われおり、タンパク質を分解することで細胞が培養基質に接触しやすくなって、細胞の増殖・遊出が促進されたと考えられる。

表 9 TrypLE 処理したアカネズミ抜去毛由来細胞の遊出率

処理時間	0 分	2 分	4 分	6 分	8 分	10 分
遊出率	0/9	0/13	1/7	3/13	1/13	0/5

まゆげ由来培養細胞の遊出状態 まゆ毛から増殖・遊出してくる細胞の形態を位相差顕微鏡で観察した。典型的な繊維芽細胞様の形態を示す場合 (図 2)、上皮細胞様の形態を示す場合 (図 3)、及びこれらが混在した場合 (図 4) があった (スケールバーは 500 μm)。

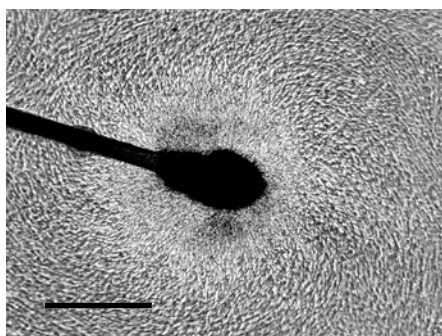


図 2 繊維芽細胞様の形態

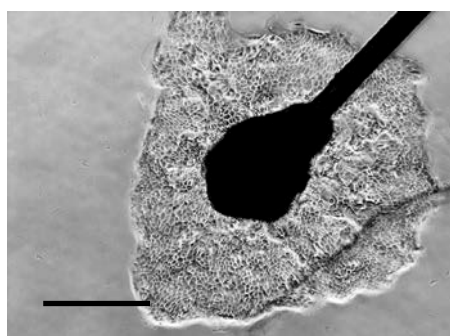


図 3 上皮細胞様の形態

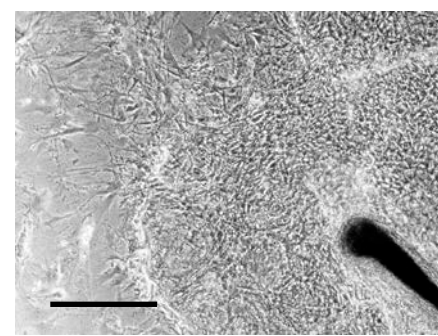


図 4 混在した形態

まゆげ由来培養細胞の増殖形態 まゆ毛から遊出した細胞を FBS20% 添加 DMEM 培養液で長期間培養すると、繊維芽細胞様の場合はよく増殖して図 5 (スケールバーは 10 μm) のようなコンフルエント状態になり、接触阻止によって増殖が停止したままで維持培養することができた。一方、上皮細胞様の場合は、しばらく増殖した後、増殖が停止し、終末分化した角化上皮と思われる形態 (図 6、スケールバーは 500 μm) になって、次第に死滅した。

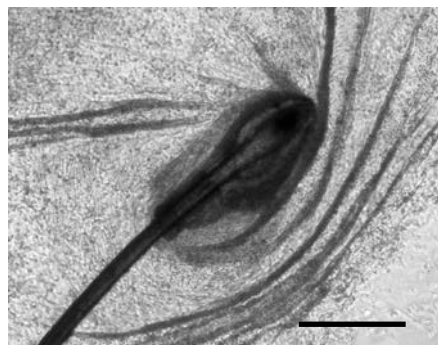
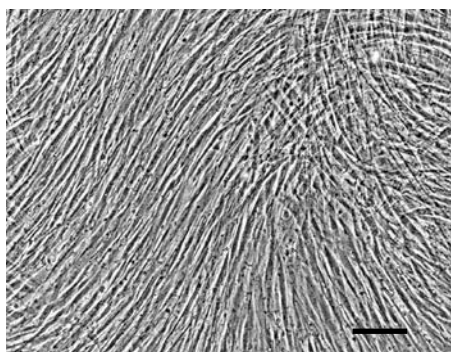


図5 コンフルエントになった場合 図6 終末分化して死滅に向かう場合

アカネズミ毛由来培養細胞の遊出状態 アカネズミの毛から遊出してくる細胞の形態を、位相差顕微鏡で観察した。ひげの場合（図7）、体毛の場合（図8）ともに種々の形態を示す主に上皮様細胞の増殖・遊出が観察された（スケールバーは500 μm ）。

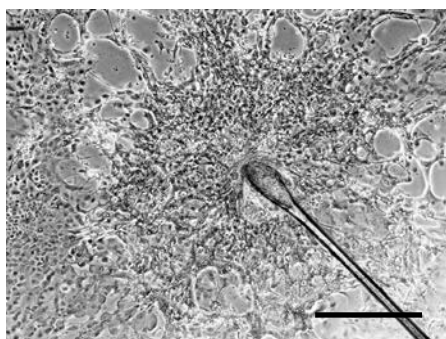


図7 ひげから遊出した細胞

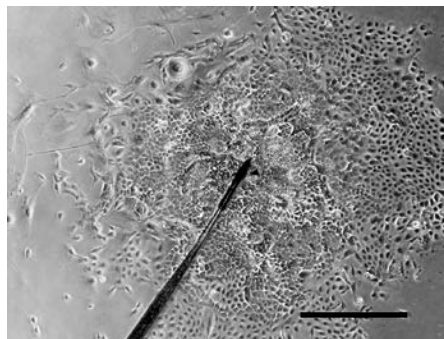


図8 体毛から遊出した細胞

毛根部分の細胞核の分布 抜去直後に酢酸・エタノールで固定した毛根部分の核を DAPI で染色し、蛍光顕微鏡で観察した。まゆ毛の場合、弱拡大（図9）では、毛根の部分全体に細胞核が分布していることがわかる（スケールバーは10 μm ）。強拡大（図10）すると、やや細長い形状をした細胞核が約2個/ μm^2 の密度で分布していることがわかる（スケールバーは5 μm ）。

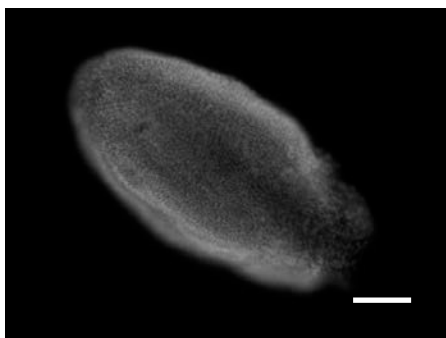


図9 まゆ毛の細胞核の分布（弱拡大）

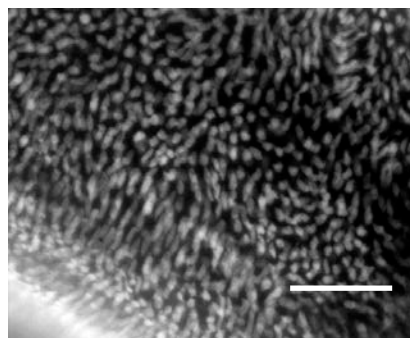


図10 まゆ毛の細胞核の分布（強拡大）

アカネズミのひげ（図 11）と体毛（図 12）の毛根部分を同様に観察した。ひげの毛根には多数の細胞核が観察されるが、体毛の場合は毛根部分がかかなり小さく、分布している細胞核の数も少ないようである（スケールバーは、10 μ m）。

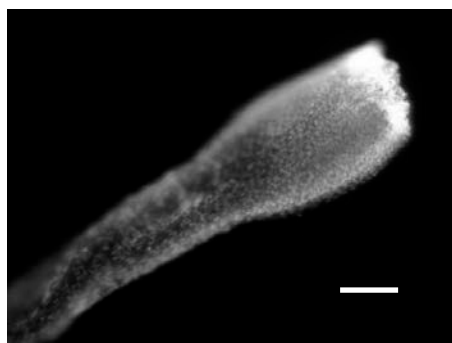


図 11 アカネズミひげの細胞核の分布

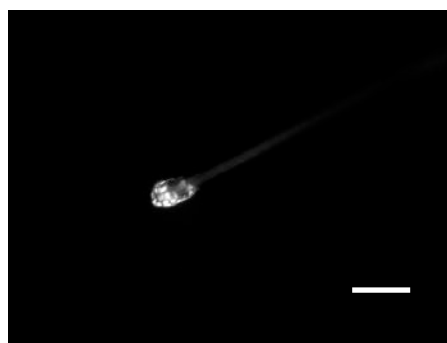


図 12 アカネズミ体毛の細胞核の分布

今後の展望 ヒトのまゆ毛及びアカネズミのひげと体毛から、簡易な方法によって 10%以上の効率で培養正常細胞が得られた。これらの細胞は貴重なバイオリソースとして公的な細胞バンクに寄託し、広く研究に供する予定である。従来、哺乳動物の核型分析は、鼠径部リンパ節や尾部を侵襲的に切除、培養することで行われてきたが、本方法を利用すれば対象の哺乳動物をほとんど傷つけることなく分析できるようになる。また、これらの細胞を利用して iPS 細胞のような分化多能性を有する細胞の作製を試み、作製できた細胞を生殖細胞を含む種々の細胞への分化させる条件を明らかにしていく計画である。さらに、今回はモデル哺乳動物としてアカネズミを用いたが、他の哺乳動物にもこの方法が適用できるかを検討し、貴重な正常細胞の凍結保存コレクションを揃えてゆきたいと考えている。

謝辞

この研究の大部分は、科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金、課題番号 26640139）によって助成されています。アカネズミを捕獲、提供して頂いた佐藤 淳 准教授（福山大学）に心より感謝申し上げます。

文献

- 1) Takahashi, K., and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, **126**, 663-676 (2006).
- 2) Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., and Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*, **131**, 861-872 (2007).
- 3) Yamanaka, S. Patient-Specific Pluripotent Stem Cells Become Even More Accessible. *Cell Stem Cell*, **2**, 1-2 (2010).
- 4) Cotsarelis, G. Epithelial stem cells: a folliculocentric view. *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1459-1468 (2006).
- 5) Najafzadeh, N., Esmailzade, B., and Dastan Imcheg, M. Hair follicle stem cells: In vitro and in vivo neural differentiation. *World J. Stem Cells*. **7**, 866-872 (2015).

- 6) Yang, J.S., Lavker, R.M., and Sun, T.T. Upper human hair follicle contains a subpopulation of keratinocytes with superior in vitro proliferative potential. *J. Invest Dermatol.*, **101**, 652-659 (1993).
- 7) Mignone, J.L., Roig-Lopez, J.L., Fedtsova, N., Schones, D.E., Manganas, L.N., Maletic-Savatic, M., Keyes, W.M., Mills, A.A., Gleiberman, A., Zhang, M.Q., and Enikolopov, G. Neural potential of a stem cell population in the hair follicle. *Cell Cycle*, **6**, 2161-2170 (2007).
- 8) Amoh, Y., Li, L., Katsuoka, K., Penman, S., and Hoffman, R.M. Multipotent nestin-positive, keratin-negative hair-follicle bulge stem cells can form neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 5530-5534 (2005).
- 9) Limat, A., and Noser, F.K. Serial cultivation of single keratinocytes from the outer root of sheath of human scalp hair follicles. *J. Invest. Dermatol.*, **87**, 485-488 (1986).
- 10) Sasahara, Y., Kitano, Y., Iemoto, A., Yoshikawa, Y., Nakano, Y., Morinaga, T., Takeuchi, K., Kawamata, S., Murakami, Y., and Hashimoto-Tamaoki, T. Establishment of Culture Technique of Keratinocytes from Plucked Human Hair Follicles. *Acta Med. Hyogo*, **32**, 95-104 (2007).
- 11) Ishii, T. Human iPS Cell-Derived Germ Cells: Current Status and Clinical Potential. *J. Clin. Med.*, **3**, 1064-1083 (2014).
- 12) Sato, J.J., Kawakami, T., Tasaka, Y., Tamenishi, M., and Yamaguchi, Y. A few decades of habitat fragmentation has reduced population genetic diversity: A case study of landscape genetics of the Japanese field mouse, *Apodemus speciosus*. *Mammal Study*, **39**, 1-10 (2014).
- 13) Nimura, A., Muneta, T., Otabe, K., Koga, H., Ju, Y.J., Mochizuki, T., Suzuki, K., and Sekiya, I. Analysis of human synovial and bone marrow mesenchymal stem cells in relation to heat-inactivation of autologous and fetal bovine serums. *BMC Musculoskeletal Discord.*, **11**, 208 (2010).
- 14) Pinyopummintr, T., and Bavister, B.D. Development of bovine embryos in a cell-free culture medium: Effects of type of serum, timing of its inclusion and heat inactivation. *Theriogenology*, **41**, 1241-1249 (1994).
- 15) Czuprynski, C.J., and Hamilton, H. The effects of serum on the in vitro adherence and maturation of bovine monocytes. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **9**, 189-193 (1985).
- 16) Grant, M.M., Koo, H.C., and Rosenfeld, W. Oxygen affects human endothelial cell proliferation by inactivation of fibroblast growth factors. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, **263**, 370-375 (1992).

Annu. Rep. Fac. Life Sci. Biotechnol., Fukuyama Univ. (14), 1-12 (2015)

Culture of hair root-derived normal cells from human and Japanese field mouse, *Apodemus speciosus*

Yasunori Yamaguchi, Naoyuki Koshi, and Chiaki Tague

Department of Biotechnology, Faculty of Life Science and Biotechnology,
Fukuyama University, Fukuyama, Hiroshima 729-0292, Japan

To obtain cultured normal cells in a minimally invasive manner, we developed a simple method to culture and freeze-stock the cells from removed hair root portion as a bio- resource sample. Using the eyebrow hair roots that could be easily removed by 5 adult volunteers themselves under informed consent, fibroblast-like normal cells were obtained with very regardless of age or gender by a simple method. We clarified the most suitable culture condition of these cells, and the change of cellular proliferative character under repeating subculture was showed concerning to the age of donor. In addition, to obtain the cultured normal cells as bio- resource samples from whisker or body hair of wild mammals, we used Japanese field mouse, *Apodemus speciosus* as a model animal, and we also clarified the most suitable condition to obtain normal cells of the animal in good efficiency.

Keywords: cultured normal cell, hair root, bio-resource, Japanese field mouse