

Table 1 日本薬局方収載マイコプラズマ否定試験法の比較

試験法	特徴	長所	短所
①培養法	人工培地（液体培地、寒天培地）に検体を接種してマイコプラズマを培養し、マイコプラズマ特有のコロニーを検出する 所要日数：4週間以上 検出感度：1～10cfu/ml	・マイコプラズマの直接培養法	・判定まで非常に時間がかかる ・培養細胞を汚染するマイコプラズマは人工培地では増殖しないものもある
②指標細胞を用いたDNA染色法	指標細胞(Vero細胞)に検体を接種し、細胞に依存して増殖したマイコプラズマをDNA特異的蛍光色素で染色して細胞核外の微小なDNA蛍光斑点として検出する間接検出法 所要日数：4～7日 検出感度：10～100cfu/ml	・培養細胞を汚染するマイコプラズマは細胞に依存して増殖しやすいため、培養法で検出されないマイコプラズマも検出できる	・DNAを蛍光染色する間接検出法であり、マイコプラズマDNAを特異的に検出するわけではない ・細胞由来DNAも染色されるため、判定に熟練を要する
③PCR法	検体からDNAを抽出し、マイコプラズマ特異的プライマーにより増幅して検出する方法 所要日数：1～2日 検出感度：1～10 copy / reaction	・迅速に判定できる ・検出感度、特異性に優れている	・マイコプラズマの不活性菌、DNA断片も検出され、感染性のあるマイコプラズマを検出するとは限らない ・プライマーに依存して検出されるマイコプラズマ種が規定される ・キャリーオーバーによる偽陽性が出やすい

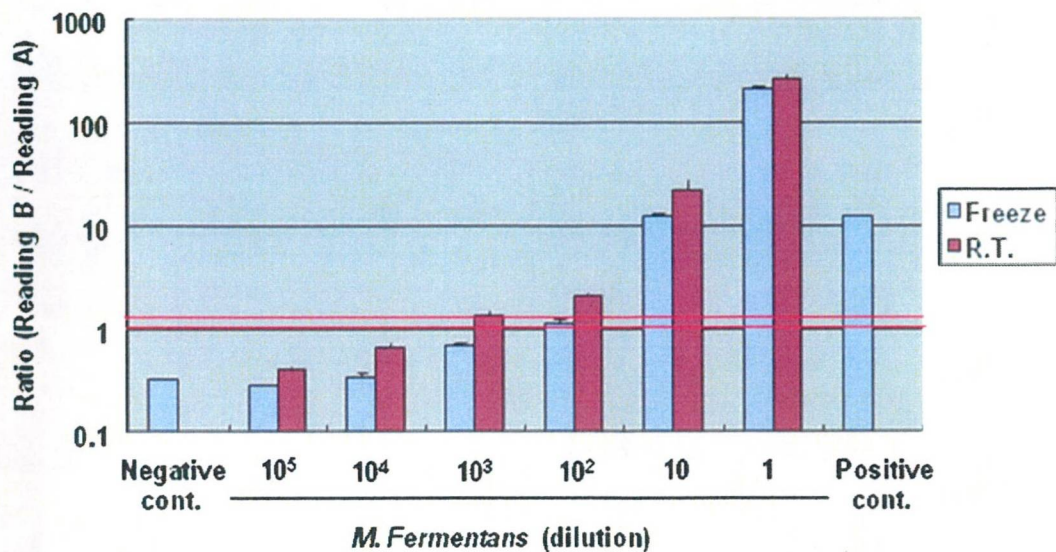


Fig.1 Mycoplasma detection by MycoAlert

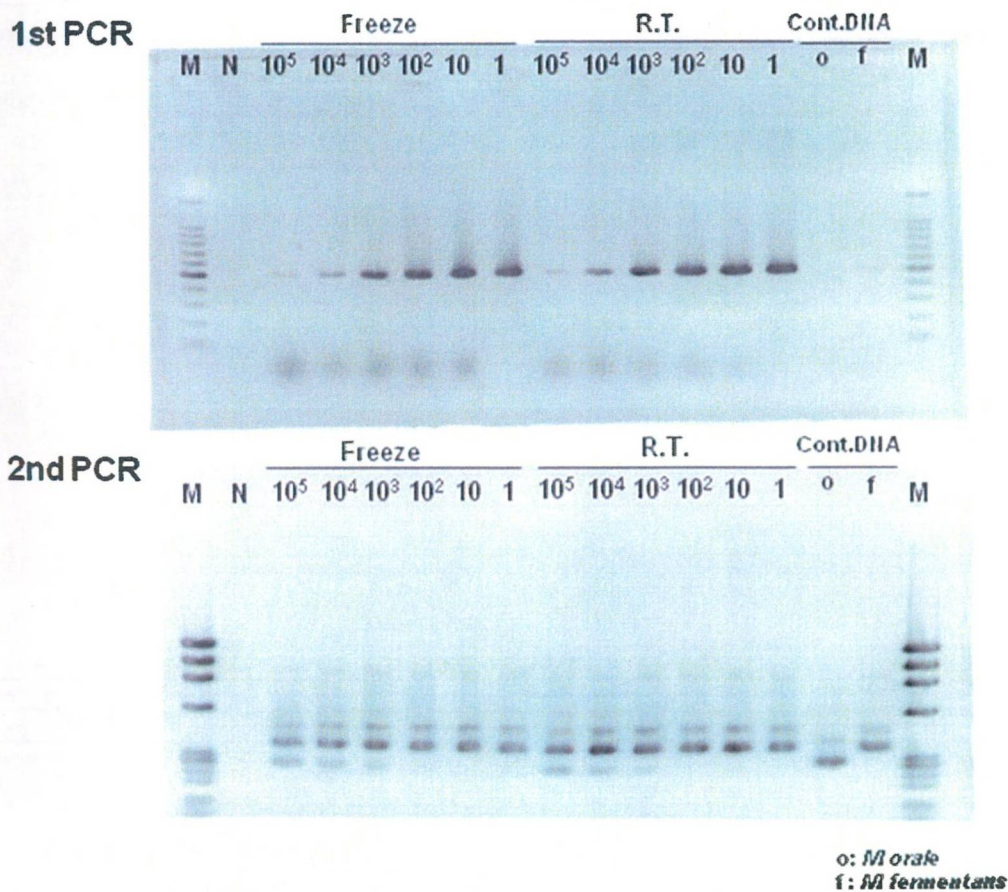


Fig.2 Mycoplasma detection by Nested PCR

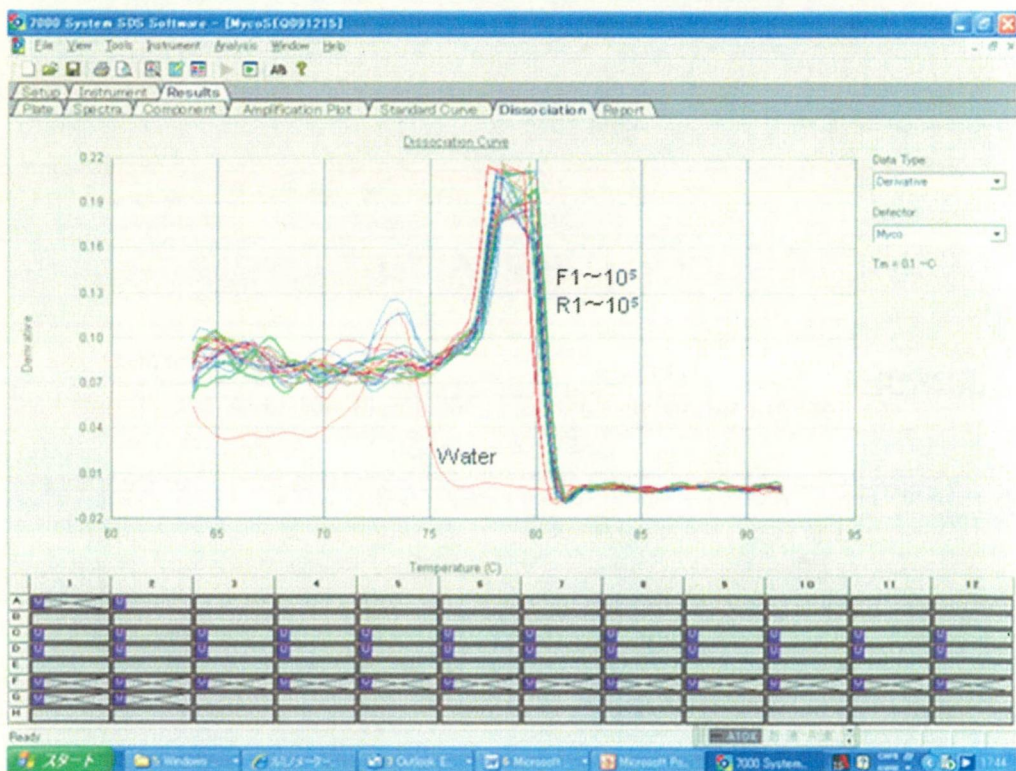
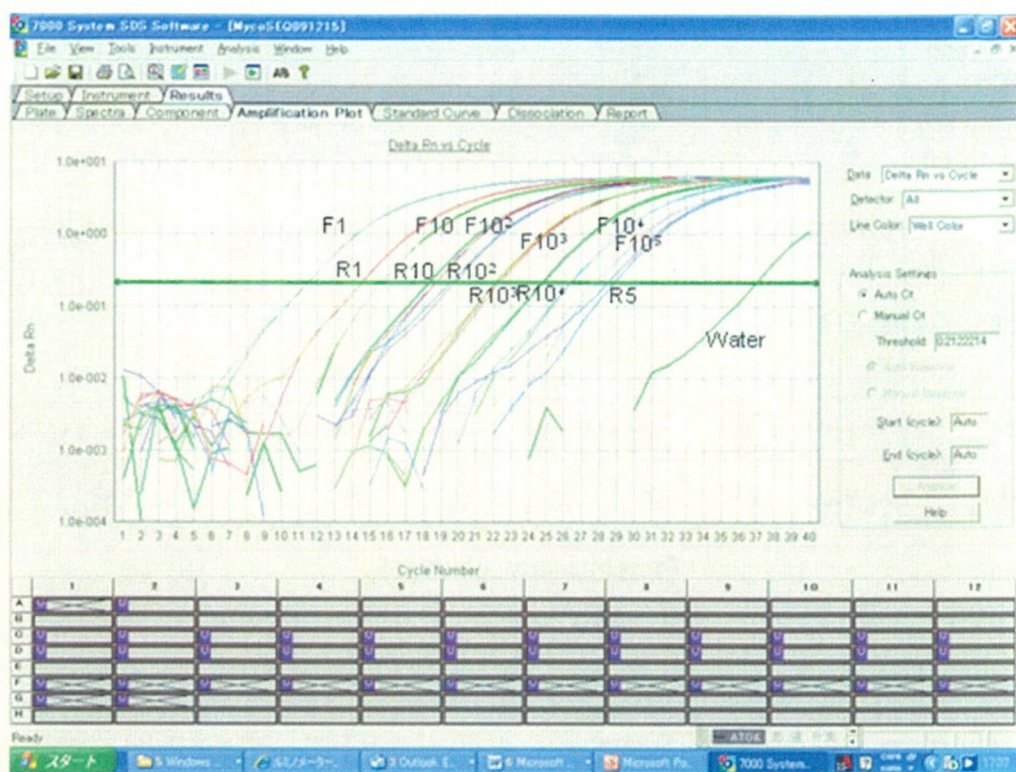


Fig.3 Mycoplasma detection by real-time PCR method

Table 2 Mycoplasma detection results by real-time PCR

<i>M.fermentans</i> Dilution	R.T.			Freeze		
	Ct	Tm	Detection	Ct	Tm	Detection
1	14.45	79.1	+	11.4	79.1	+
10	18.25	79.1	+	15.57	79.1	+
10 ²	19.49	79.1	+	18.63	79.1	+
10 ³	22.27	79.1	+	22.1	79.1	+
10 ⁴	24.77	79.1	+	26.37	79.1	+
10 ⁵	28.8	79.1	+	27.95	79.1	+
Positive cont.	29.44	79.7	+			
Negative cont	37	73.5	-			

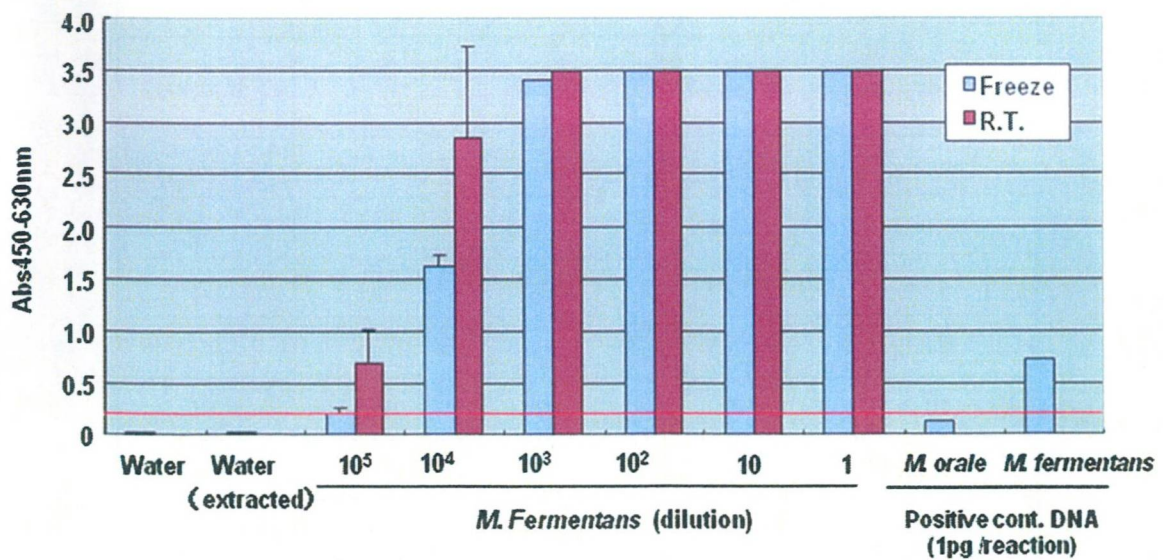


Fig. 4 Mycoplasma detection by PCR ELISA method

Table 3 Comparison of Mycoplasma detection methods

		<i>M.fermentans</i> dilution					
		1 (4.5 x 10 ⁶ CFU/ml)	10 (4.5 x 10 ⁵ CFU/ml)	100 (4.5 x 10 ⁴ CFU/ml)	1000 (4.5 x 10 ³ CFU/ml)	10000 (450 CFU/ml)	100000 (45 CFU/ml)
MycoAlert	Freeze	+	+	+/-	-	-	-
	R.T.	+	+	+	+	-	-
PCR (1st PCR)	Freeze	+	+	+	+	+	+
	R.T.	+	+	+	+	+	+
Nested PCR (2nd PCR)	Freeze	+	+	+	+	+	+
	R.T.	+	+	+	+	+	+
Real-time PCR	Freeze	+	+	+	+	+	+
	R.T.	+	+	+	+	+	+
PCR-ELISA	Freeze	+	+	+	+	+	+/-
	R.T.	+	+	+	+	+	+

Table 4 Comparison of detection of Mycoplasma DNA by PCR methods

Mycoplasma DNA/PCR reaction	Real-time PCR		PCR-ELISA	
	<i>M. hyorhina</i>	<i>M. orale</i>	<i>M. hyorhina</i>	<i>M. orale</i>
100pg	3/3	3/3	n.d.	5/5
10 pg	3/3	3/3	5/5	5/5
1 pg	3/3	3/3	5/5	0/5
100 fg	3/3	3/3	1/5	0/5
10 fg	1/3	1/3	0/5	0/5
1 fg	0/3	0/3	n.d.	n.d.
0.1fg	0/3	0/3	n.d.	n.d.

n.d.: not determined

Fig. 5 昨年度までに得られていた hMSC ロット 4 F1560 株の染色体異常

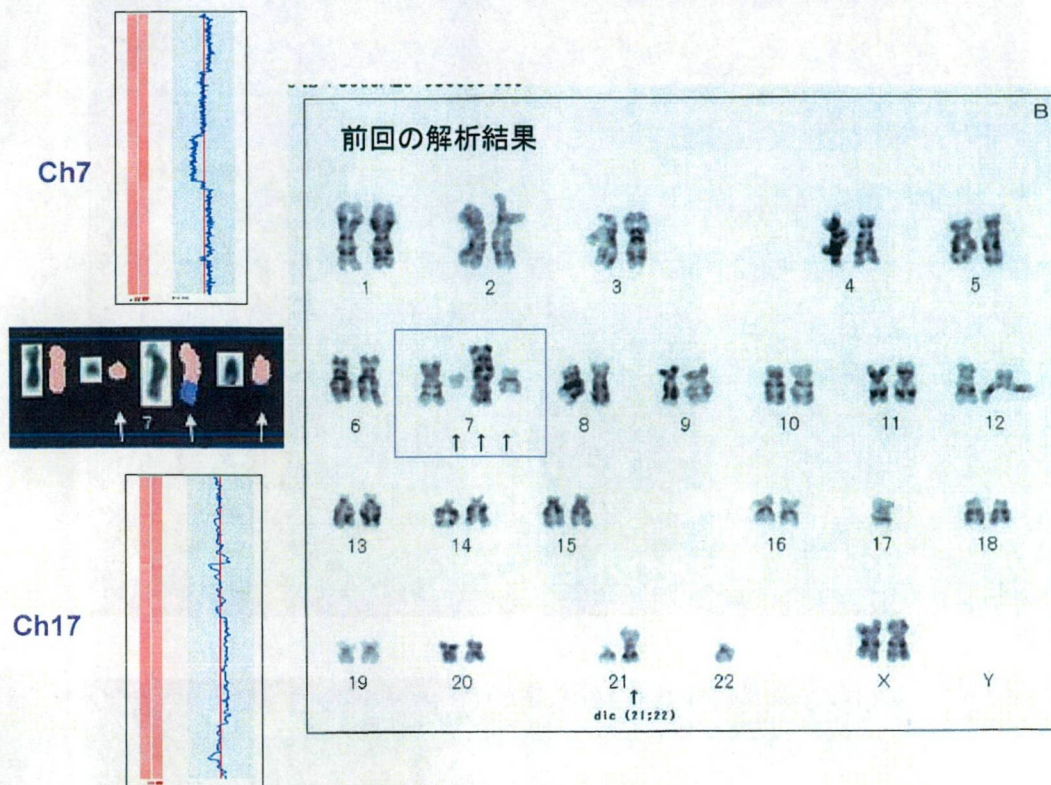


Fig. 6 異常を示した細胞と同一ロットの別継代細胞に観察された染色体異常 (Gバンド)

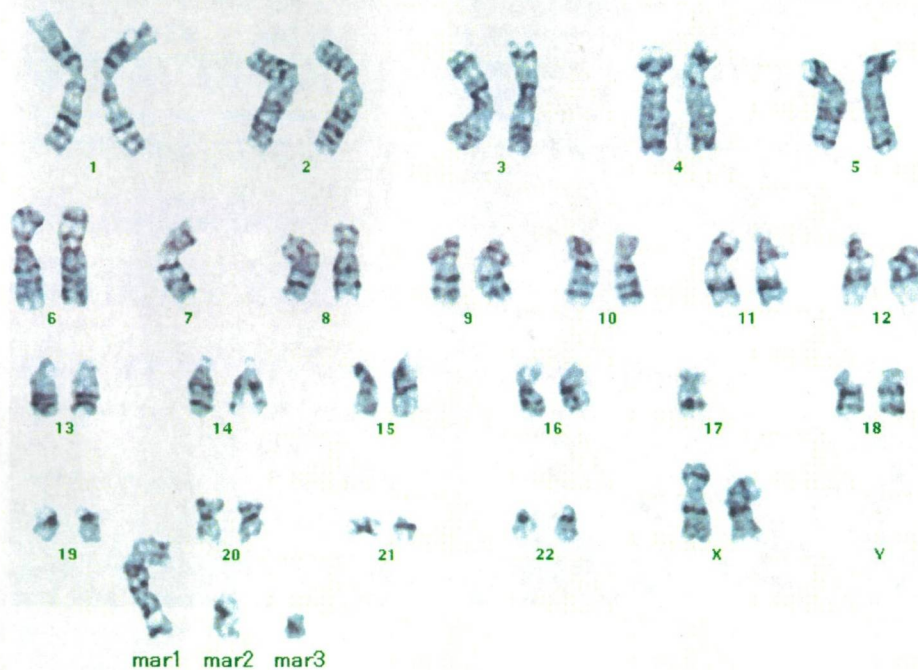


Fig. 7 同一ロット別継代細胞のセントロメア FISH 解析 (入手後 11 継代)

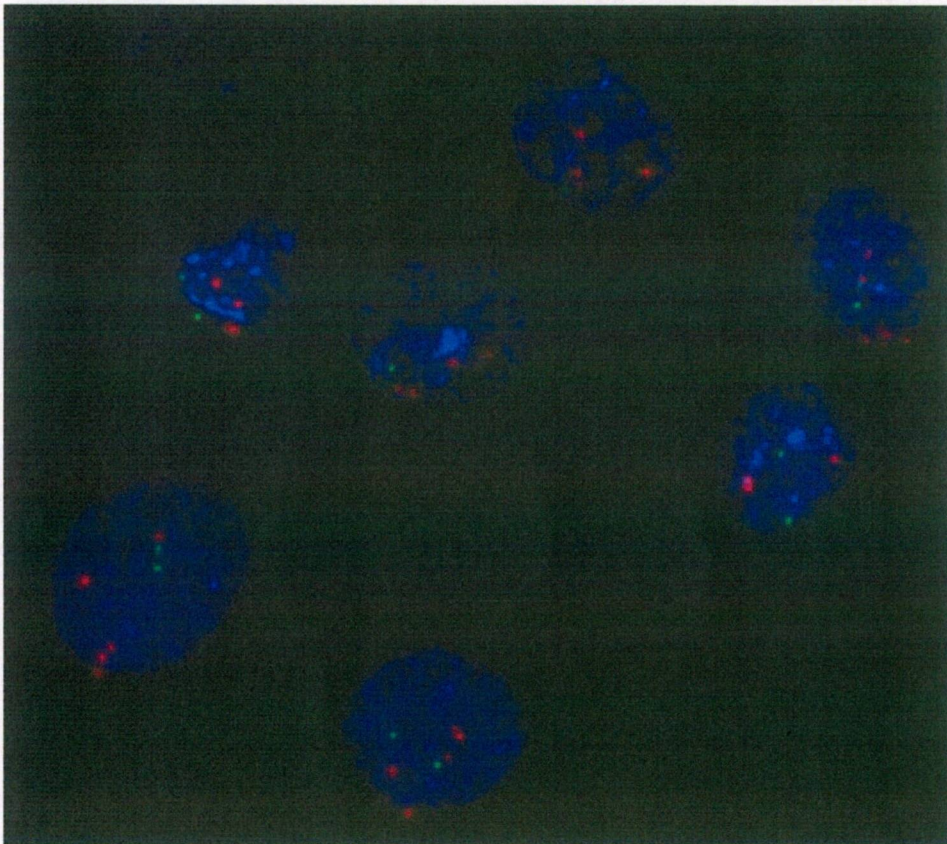
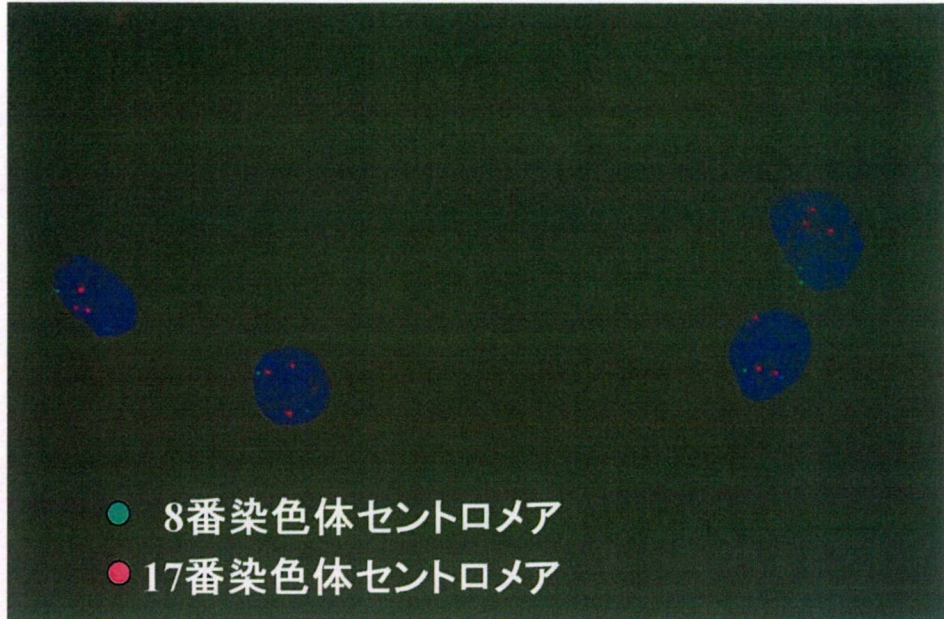
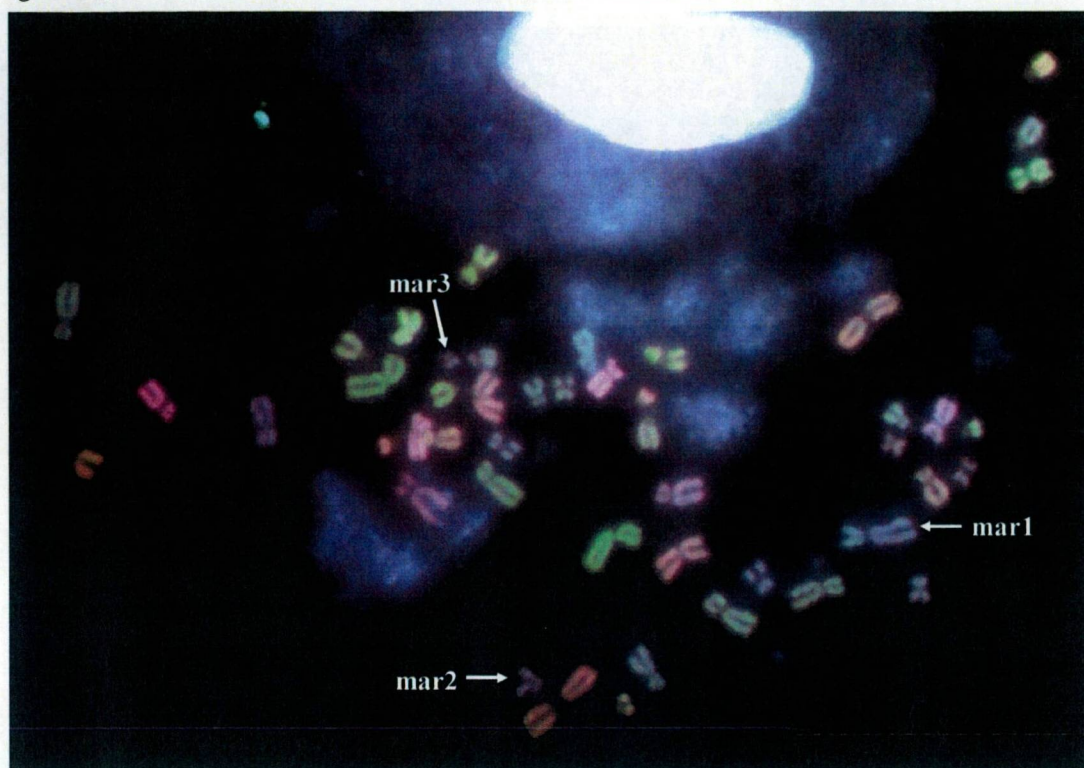


Fig. 8 新しく入手した同一ロット hMSC 細胞の m-FISH 解析 (約 20 継代)



1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	X	Y
Grey	Purple	Blue	Green	Yellow	Red	Light Blue	Dark Blue	Red	Yellow	Red	Green	Purple	Green	Dark Green	Orange	Light Blue	Red	Light Blue	Dark Blue	Yellow	Light Blue	Dark Blue	Yellow

Fig. 9 新しく入手した同一ロット hMSC 細胞のメタフェーズ FISH

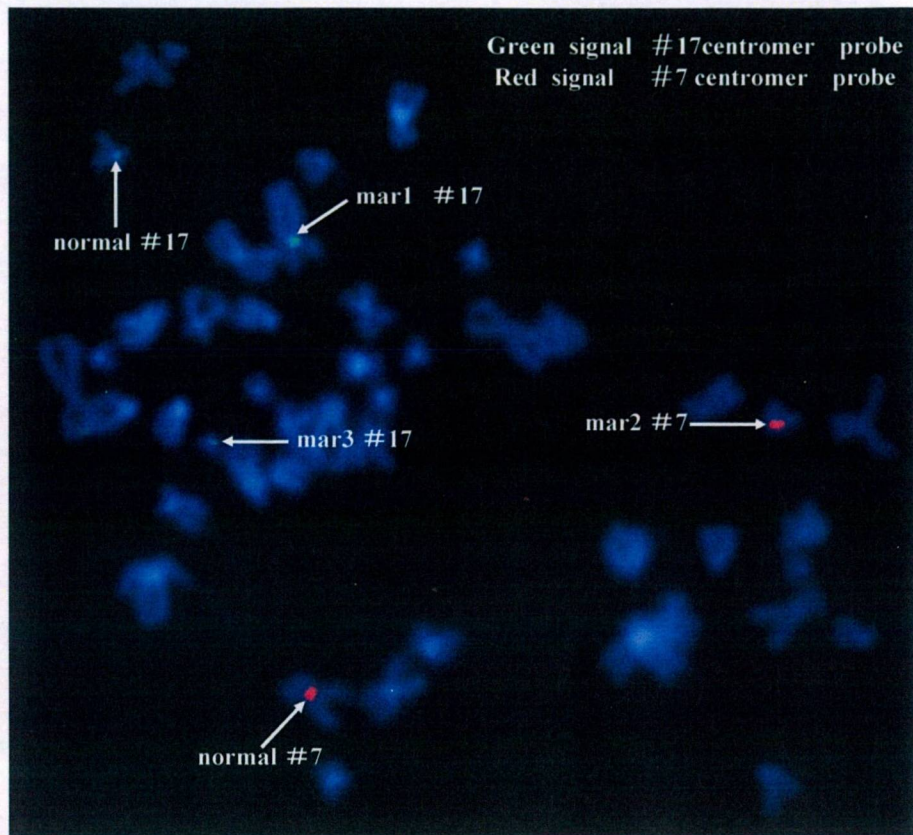


Fig. 10 ナノ LC-MS/MS システム (DiNa/LTQ-Orbitrap)



Fig. 11 LTQ-Orbitrap により得られる LC-MS データの例

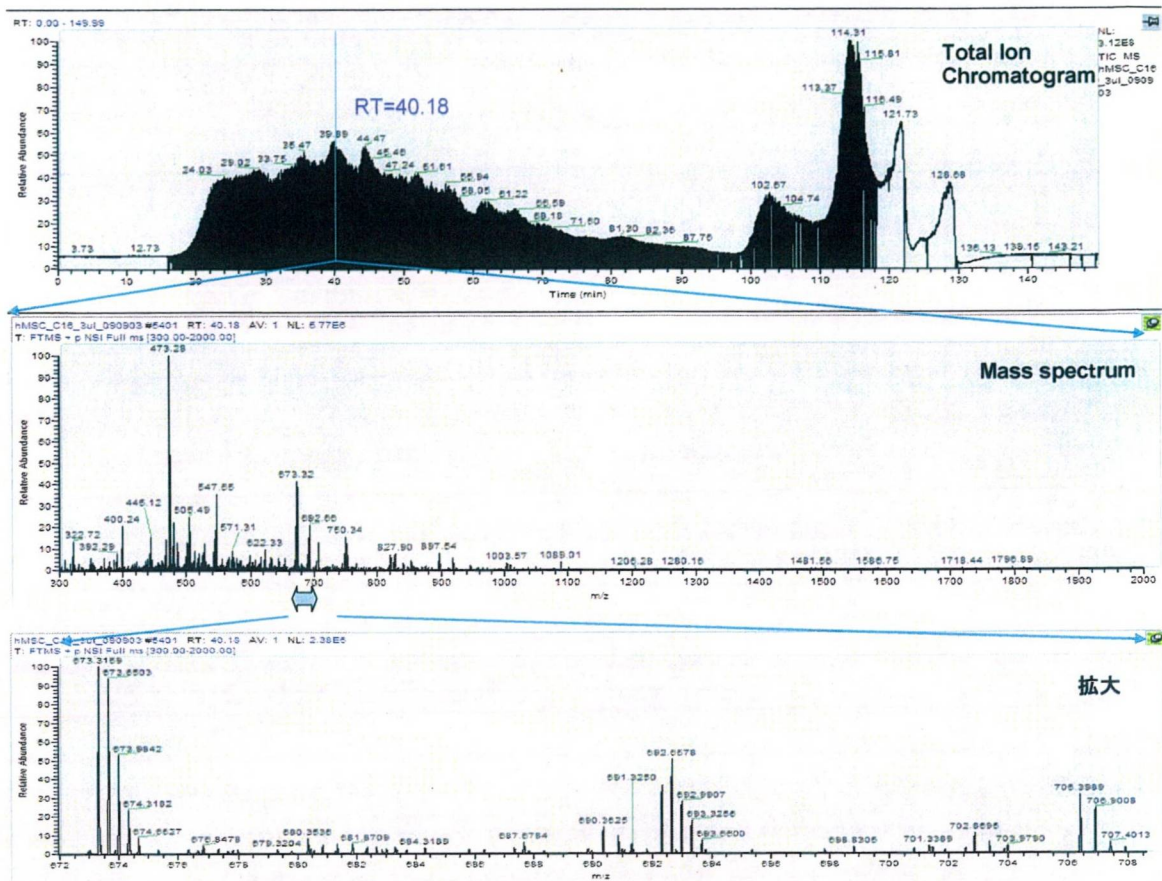


Fig. 12 Progenesis による LC-MS データの可視化と定量比較のためのアラインメント

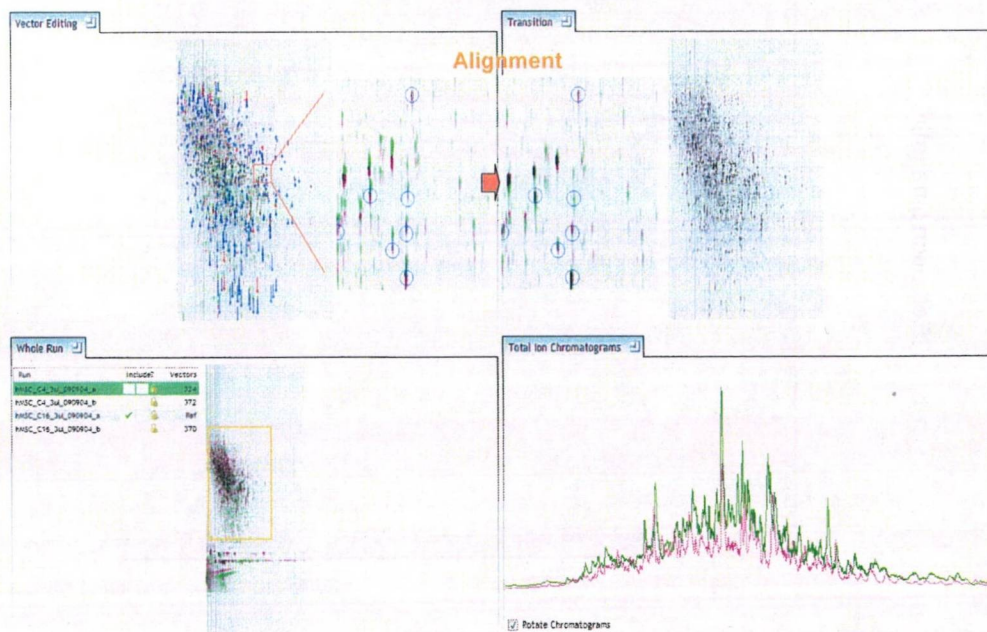


Fig. 13 Progenesisにおけるペプチドピーク検出と比較の例

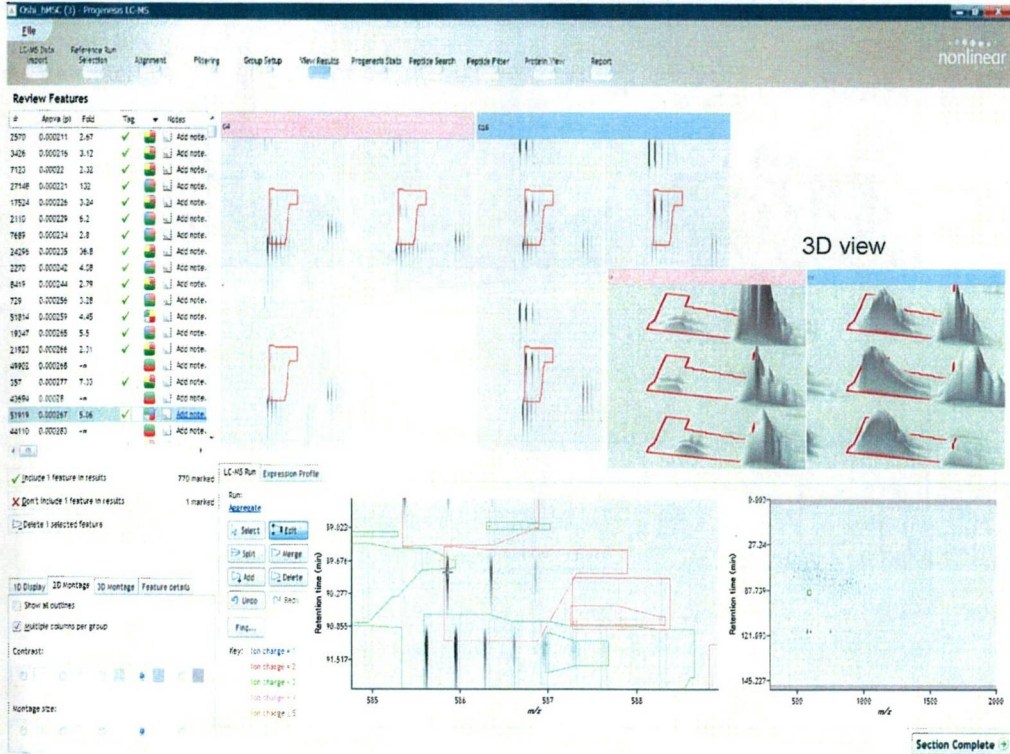


Fig. 14 検出された間葉系幹細胞特異的 CD 抗原の 2 次元マップ上の位置

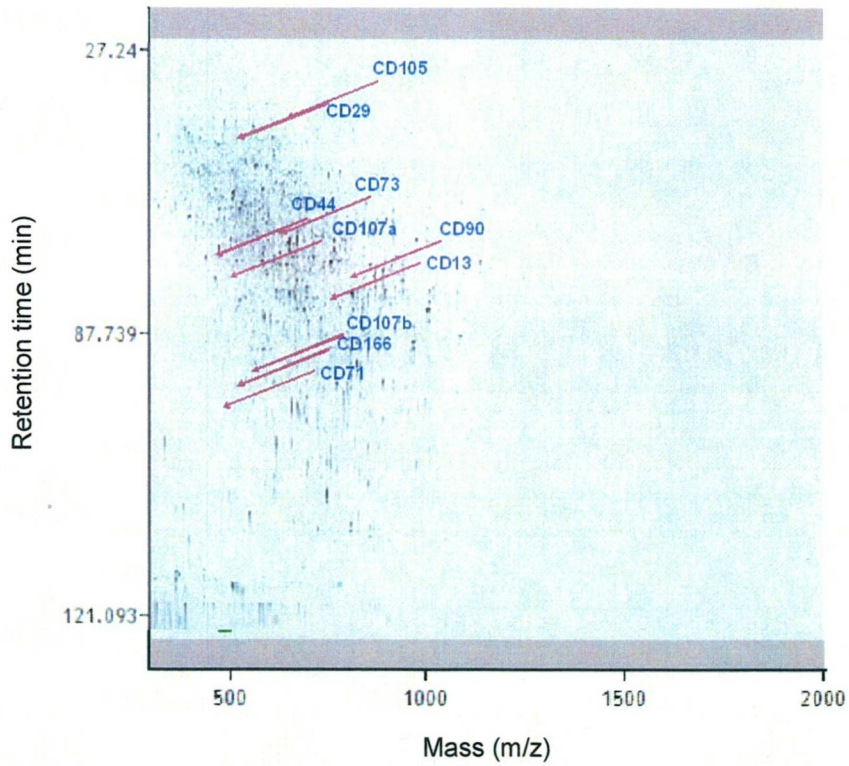
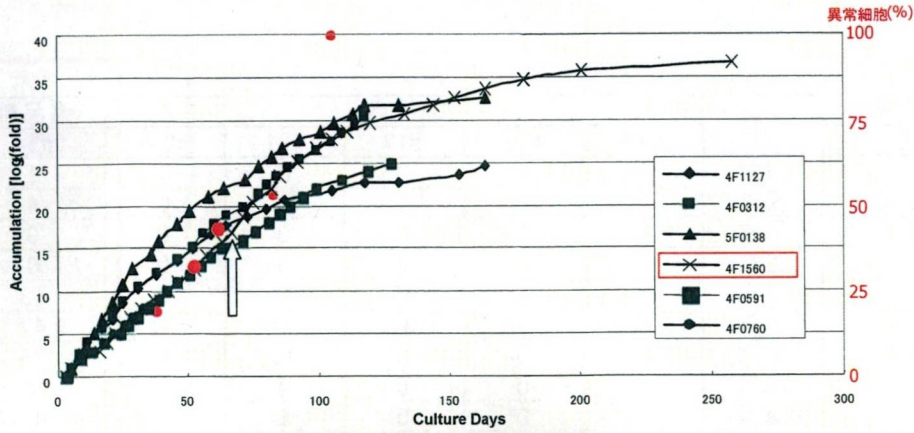
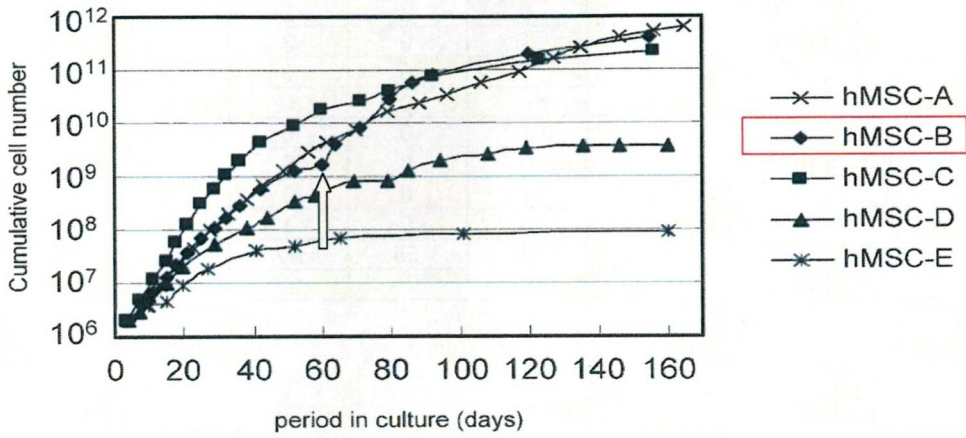


Fig. 15 異常出現hMSC ロットの異なる継代培養間の増殖曲線の比較

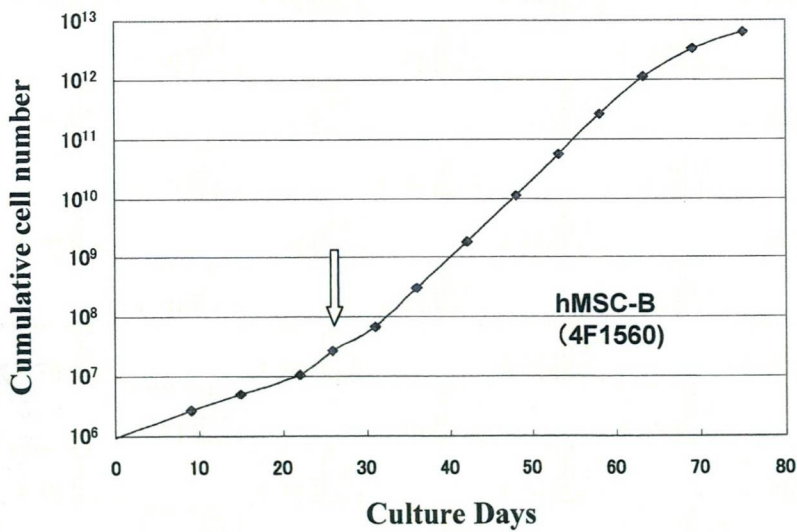


昨年度までに報告した異常ロットの増殖曲線と異常細胞の出現頻度



療品部における同一ロット(hMSC-B)の増殖曲線

(YAKUGAKU ZASSHI 128; 1851-1856, 2008)



療品部由来の同一ロット細胞の再培養による増殖曲線

Table 5 新しく入手した同一ロット細胞における8及び17番染色体セントロメアFISHによる異常解析

シグナル個数		判定	細胞数					療品部
Ch8	Ch17		#12	#15	#17	#21	#24	#14
1	2	正常	2	1	3	0	1	1
	3	異常	1	0	1	1	0	4
	6	異常	0	0	1	0	0	3
2	1	正常	1	3	2	0	0	0
	2	正常	75	60	48	41	0	13
	3	異常	11	28	34	33	73	47
	4	異常	5	5	9	13	15	28
	5	異常	0	0	0	4	5	2
	6	異常	0	0	0	1	2	0
	8	異常	0	0	0	0	1	0
3	2	正常	3	0	0	1	0	0
	3	正常	1	0	2	2	0	10
	4	正常	0	1	0	3	2	3
	5	異常	0	0	0	0	0	2
	6	異常	0	0	0	0	0	1
4	4	正常	1	1	0	0	0	1
	5	異常	0	0	0	0	0	1
	6	異常	0	1	0	0	1	0
	7	異常	0	0	0	1	0	0
合計		正常	83	66	55	47	3	28
		異常	17	34	45	53	97	84

今回のデータ

Table 6 4継代と比べ16継代のhMSC細胞で発現が3倍以上増加したタンパク質

Accession	Peptides	Score	Anova (p)*	Fold	Description	Average Normalised	
						C4	C16
NDUA5_HUMAN	1	32.83	5.95E-04	5.54	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1	7.26E+05	4.02E+06
SHQ1_HUMAN	2	69.91	5.16E-04	5.12	Protein SHQ1 homolog OS=Homo sapiens	8.25E+05	4.22E+06
EIF3C_HUMAN	3	94.54	6.58E-03	4.16	Eukaryotic translation initiation factor 3	3.14E+05	1.31E+06
HXA10_HUMAN	1	49.08	4.76E-04	3.95	Homeobox protein Hox-A10 OS=Homo	5.09E+04	2.01E+05
FADS3_HUMAN	1	41.46	0.02	3.84	Fatty acid desaturase 3 OS=Homo sapiens	2.38E+05	9.16E+05
RAB36_HUMAN	1	43	4.59E-03	3.54	Ras-related protein Rab-36 OS=Homo	2.55E+04	9.03E+04
RGS3_HUMAN	1	38	4.59E-03	3.54	Regulator of G-protein signaling 3	2.55E+04	9.03E+04
TM87A_HUMAN	2	85.64	1.79E-03	3.22	Transmembrane protein 87A OS=Homo	1.54E+06	4.95E+06
UBF1_HUMAN	3	59.13	0.03	3.13	Nucleolar transcription factor 1 OS=Homo	3.23E+05	1.01E+06

Table 7 4 継代と比べ 16 継代の hMSC 細胞で発現が 3 倍以上低下したタンパク質

Accession	Peptides	Score	Anova (p)*	Fold	Description	Average Normalised	
						C4	C16
DUT_HUMAN	1	70.9	5.36E-04	11.22	Deoxyuridine 5'-triphosphate	8.98E+04	8002.85
SPSY_HUMAN	1	78.97	0.23	8.69	Spermine synthase OS=Homo sapiens	1.34E+05	1.55E+04
GRHPR_HUMAN	2	45.4	9.79E-04	6.76	Glyoxylate reductase/hydroxypyruvate	7.08E+06	1.05E+06
PSME3_HUMAN	1	70.23	0.01	6.11	Proteasome activator complex subunit 3	4.72E+05	7.73E+04
HNRPF_HUMAN	3	159.44	5.78E-03	4.37	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein	6.97E+05	1.60E+05
EIF3E_HUMAN	2	92.55	8.56E-05	4.07	Eukaryotic translation initiation factor 3	1.21E+05	2.97E+04
TBB2A_HUMAN	16	989.63	1.38E-03	3.78	Tubulin beta-2A chain OS=Homo sapiens	4.03E+07	1.07E+07
HSP74_HUMAN	4	223.15	1.76E-03	3.75	Heat shock 70 kDa protein 4 OS=Homo	8.65E+05	2.31E+05
RP1BL_HUMAN	1	91.77	7.73E-03	3.67	Ras-related protein Rap-1b-like protein	8.07E+05	2.20E+05
ACSL3_HUMAN	1	27.88	2.23E-03	3.65	Long-chain-fatty-acid--CoA ligase 3	2.42E+05	6.63E+04
ZN225_HUMAN	1	33.74	3.65E-04	3.42	Zinc finger protein 225 OS=Homo sapiens	2.72E+05	7.95E+04
TBB3_HUMAN	18	908.79	2.38E-03	3.38	Tubulin beta-3 chain OS=Homo sapiens	4.05E+07	1.20E+07
HMGL1_HUMAN	2	97.14	7.17E-06	3.35	Putative high mobility group protein 1-	1.38E+06	4.12E+05
TBB2C_HUMAN	18	1137.69	1.43E-03	3.34	Tubulin beta-2C chain OS=Homo sapiens	4.70E+07	1.41E+07
YI016_HUMAN	5	305.49	1.15E-05	3.13	Putative tubulin beta chain-like protein	6.93E+06	2.22E+06
1B53_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, B-	5.37E+05	1.75E+05
1B59_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, B-	5.37E+05	1.75E+05
1A03_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, A-	5.37E+05	1.75E+05
1B57_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, B-	5.37E+05	1.75E+05
1B52_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, B-	5.37E+05	1.75E+05
1B15_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, B-	5.37E+05	1.75E+05
1A30_HUMAN	1	26.96	1.36E-04	3.07	HLA class I histocompatibility antigen, A-	5.37E+05	1.75E+05
PCNA_HUMAN	2	130.08	3.98E-03	3.05	Proliferating cell nuclear antigen	2.32E+05	7.61E+04

Table 8 糖鎖と PHN の組み合わせ

MSC	¹² C-PHN 標識糖鎖 1	¹² C-PHN 標識糖鎖 2	¹² C-PHN 標識糖鎖 3
神経様細胞	¹³ C-PHN 標識糖鎖 1	¹³ C-PHN 標識糖鎖 2	¹³ C-PHN 標識糖鎖 3
混合	↓	↓	↓
分析試料溶液	試料 1	試料 2	試料 3

Table 9 糖鎖プロファイルの要約

偏数	検出された m/z 値		糖組成 ^{a)}	推定糖鎖構造	MSC		N2d		平均存在比率 t-検定	N2dのMSC に対する 平均増減 割合 ^{b)}	RSD (%)
	MSC (¹³ C)	N2d (¹³ C)			平均存在比率 (%) ^{b)}	RSD (%)	平均存在比率 (%) ^{b)}	RSD (%)			
[M+H] ⁺	999.36	1002.37	Hex9HexNAc2(M9)		1.7	89	0.9	92	0.50	+0.15	261
[M+H] ⁺	1813.69	1819.69	Hex8HexNAc2(M8)		0.3	52	0.2	78	0.41	+0.17	263
[M+H] ⁺	1651.68	1657.70	Hex7HexNAc2(M7)		0.2	63	0.2	63	0.98	+1.44	127
[M+H] ⁺	1489.61	1495.63	Hex6HexNAc2(M6)		1.2	68	1.0	53	0.70	+1.08	120
[M+H] ⁺	1327.54	1333.56	Hex5HexNAc2(M5)		0.8	24	0.9	6	0.78	+1.22	87
[M+H] ⁺	987.41	993.43	dHex1Hex2HexNAc2		2.0	28	1.6	25	0.48	+0.69	63
[M+H] ⁺	1149.49	1155.51	dHex1Hex3HexNAc2		24.0	36	26.8	34	0.72	+1.23	38
[M+2H] ²⁺	838.83	841.84	dHex1Hex5HexNAc3		0.7	27	0.5	32	0.19	+0.38	124
[M+H] ⁺	1514.66	1520.67	dHex1Hex4HexNAc3		2.7	53	1.4	8	0.19	+0.12	480
[M+2H] ²⁺	867.34	870.35	Hex5HexNAc4		0.4	71	0.2	80	0.41	+0.07	697
[M+2H] ²⁺	940.38	943.39	dHex1Hex5HexNAc4		4.0	51	3.7	27	0.84	+0.99	41
[M+2H] ²⁺	1012.87	1015.88	Hex5HexNAx4 NeuNAc1		0.7	39	0.7	32	0.90	+0.94	53
[M+2H] ²⁺	1158.42	1161.43	Hex5HexNAx4 NeuNAc2		5.3	45	4.4	50	0.65	+0.62	70
[M+2H] ²⁺	1085.94	1088.94	dHex1Hex5HexNAc4 NeuNAc1		7.1	58	8.3	61	0.76	+1.28	37
[M+2H] ²⁺	1231.49	1234.5	dHex1Hex5HexNAc4 NeuNAc2		14.2	11	15.7	16	0.44	+1.21	50

Table 9 つづき(1)

[M+2H] ²⁺	1158.95	1161.96	dHex2Hex5HexNAc4 NeuNAc1		0.1	48	0.2	45	0.64	+1.40	28
[M+2H] ²⁺	1304.53	1307.55	dHex2Hex5HexNAc4 NeuNAc2		1.1	16	1.2	10	0.62	+1.09	17
[M+2H] ²⁺	1049.91	1052.92	Hex6HexNAc5		0.2	77	0.2	78	0.79	+0.66	49
[M+2H] ²⁺	1195.49	1198.5	Hex6HexNAc5 NeuNAc1		0.4	22	0.2	33	0.13	+0.32	176
[M+2H] ²⁺	1341.04	1344.1	Hex6HexNAc5 NeuNAc2		1.2 _{d)}	—	0.6	—	—	+0.02	—
[M+2H] ²⁺	1486.6	1489.6	Hex6HexNAc5 NeuNAc3		8.1	40	2.3	46	0.04	-0.81	9
[M+2H] ²⁺	1632.17	1635.2	Hex6HexNAc5 NeuNAc4		1.7	24	0.6	59	0.03	-0.55	60
[M+2H] ²⁺	1122.96	1126.0	dHex1Hex6HexNAc5 (Lac1)		12.1	6	12.5	10	0.68	+1.06	52
[M+2H] ²⁺	1268.52	1271.5	dHex1Hex6HexNAc5 NeuNAc1(Lac1)		3.8	79	5.8	87	0.59	+1.72	31
[M+2H] ²⁺	1414.08	1417.1	dHex1Hex6HexNAc5 NeuNAc2		1.8	59	2.2	52	0.67	+1.57	64
[M+2H] ²⁺	1559.63	1562.7	dHex1Hex6HexNAc5 NeuNAc3		0.5	41	0.6	49	0.41	+1.85	71
[M+2H] ²⁺	1305.55	1308.6	dHex1Hex7HexNAc6 (Lac)		2.5	28	5.2	36	0.09	+3.10	52
[M+2H] ²⁺	1451.11	1454.1	dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc1(Lac)		0.7	19	0.9	30	0.26	+1.72	68
[M+2H] ²⁺	1596.67	1599.7	dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc2(Lac)		0.5	49	1.0	42	0.17	+2.94	49
[M+3H] ²⁺	1161.79	1163.8	dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc3		0.9	21	2.0	50	0.14	+3.31	65
[M+3H] ²⁺	1258.83	1260.8	dHex1Hex7HexNAc6 NeuNAc4		0.9	38	1.9	64	0.25	+2.85	62

Table 9 つづき(2)

[M+3H] ⁺	1186.45	1188.5	dHex1Hex8HexNAc7 NeuNAc2(Lac)		0.4	34	0.7	14	0.02	+3.29	65
[M+3H] ⁺	1283.5	1285.5	dHex1Hex8HexNAc7 NeuNAc3(Lac)		0.3	34	0.6	60	0.35	+2.16	70
[M+3H] ⁺	1380.56	1382.6	dHex1Hex8HexNAc7 NeuNAc4(Lac)		0.2	67	0.9	66	0.15	5.92	21

a) Hex, ヘキソース; HexNAc, *N*-アセチルヘキソサミン; dHex, デオキシヘキソース; NeuNAc, *N*-アセチルノイラミン酸; Lac, *N*-アセチルラクトサミン構造を有する糖鎖. b) 検出された全糖鎖のイオン強度の合計に対する各糖鎖のイオン強度の割合(%). c) 数値が+1.0 のとき, N2d 由来糖鎖の量は MSC 由来糖鎖量の 2.0 倍に増加していることを示す. d) 糖鎖試料 1 からのみ検出された糖鎖のため, 統計処理は行わず.

Table 10 アガロースゲル (pH 3.0-8.0) を用いた二次元電気泳動による MSC 及び神経様分化細胞由来膜タンパク質の発現差異解析

スポット 番号	ピーク面積比 (N2d/MSC)	同定されたタンパク質	GI 番号	分子量 (Da)	帰属されたペプチドの数	
					MSC	N2d
1	1.65	— ^{a)}				
2	1.60	—				
3	0.56	—				
4	2.10	—				
5	1.02	alpha 1 type V collagen preproprotein	89276751	183,558	12	N.D.
6	2.19	—				
7	1.27	—				
8	0.64	prepro-alpha1(I) collagen	1418928	138,911	3	21
9	1.37	Laminin subunit gamma-1	126369	177,606	15	N.D.
10	0.96	—				
11	2.38	タンパク質 11		162,464	12	24
12	4.39	—				
13	3.21	—				
14	1.09	hypoxia up-regulated 1 precursor	5453832	111,335	10	11
15	2.14	collagen (VI) alpha-1 chain	1915902	47,807	1	5
		collagen, type VI, alpha 1 precursor	87196339	108,529	1	2
16	2.82	タンパク質 16		94,299	N.D.	10
17	1.84	タンパク質 17		89,321	10	17
18	1.90	—				
19	2.05	—				
20	2.08	—				
21	1.64	—				
22	1.80	—				
23	1.22	Caldesmon	2498204	93,249	12	16
24	1.84	タンパク質 24		72,332	10	16
25	1.85	タンパク質 25		93,249	14	6
26	1.42	Caldesmon	2498204	93,249	16	12
27	1.41	lamin A/C isoform 1 precursor	27436946	74,139	12	24
28	1.85	タンパク質 28(1)	13676857	70,021	N.D.	1
		タンパク質 28(2)	2498204	93,249	10	N.D.

Table 10 のつづき

29	2.47	タンパク質 29(1)		53,517	4	1
		タンパク質 29(2)		70,020	3	1
30	1.53	タンパク質 30(1)		53,517	4	3
		タンパク質 30(2)		70,021	3	2
31	1.44	heat shock 70kDa protein 8 isoform 2	24234686	53,517	2	3
		heat shock 70kDa protein 8 isoform 1	5729877	70,898	3	2
		heat shock 70kDa protein 2	13676857	70,021	3	2
32	1.10	—				
33	1.49	タンパク質 33(1)		66,193	4	4
34	0.77	—				
35	0.97	—				
36	0.74	—				
37	0.64	—				
38	0.60	—				
39	0.69	filamin A, alpha isoform 2	160420317	280,757	10	25
		Fibronectin	2506872	262,439	11	6
40	0.85	—				
41	1.17	prepro-alpha1(I) collagen	1418928	138,911	12	N.D.
42	3.19	タンパク質 42(1) (タンパク質 A)	61743954	628,705	N.D.	2(8 ^b)
43	1.21 ^c	prepro-alpha2(I) collagen	179596	129287	9	N.D.
44	2.15	タンパク質 44(1)		53,517	9	3
45	2.02	タンパク質 45(1)		331,773	12	N.D.
		タンパク質 45(2)		92,468	N.D.	9
46	1.80	タンパク質 46(1)		116,722	N.D.	45
		タンパク質 46(2)		113,715	7	N.D.
47	0.51	—				
48	0.59	prepro-alpha1(I) collagen	1418928	138,911	9	2
		collagen type III alpha 1 preproprotein	4502951	138,555	N.D.	5

スポット番号, 図 14 参照; GI 番号; GenInfo Identifier number; a) 同定されず. b) pH 3.0–10.0 のアガロースゲルを用いたときの本数(図 4B, スポット A). c) pH 3.0–10.0 のアガロースゲルを用いたときの値. タンパク質同定に使用した Protein filter; peptide provability < 0.001.