

験法は、大量の製品を製造するバイオ医薬品に適用することが想定されており、また基本的にセルバンク等の試験法として想定されているものであるため、ロットを構成しない自己由来製品や1ロットの製造量が極めて限られる再生医療等製品では、日局で規定されている検体量に準拠した形での試験の実施が困難な場合が多い。また、試験に長時間を要するため、再生医療等製品の出荷前に試験結果が得られないという問題も生じている。

そこで、本研究ではマイコプラズマ否定試験について、検体量や迅速性など、再生医療等製品の特性を踏まえた試験法に関する考え方を整理するとともに、再生医療等製品に現実的に適用可能な適切な試験法について検討した。

## B. 研究方法

### 1) マイコプラズマ参照品

*Acholeplasma laidlawii* (NBRC 14400), *Mycoplasma fermentans* (NBRC 14854), *M. hyorhinitis* (NBRC 14858), *M. orale* (NBRC 14477), *M. pneumoniae* (NBRC 14401)及び *M. salivarium* (NBRC 14478)は製品評価技術基盤機構 (NBRC) から、*M. arginini* (ATCC 23838) は American Type Culture Collection (ATCC) からそれぞれ購入後、液体培地で増殖し、1mL ずつクライオチューブに分注後、凍結保存 (-80°C) されたバリデーション用マイコプラズマ参照品を用いた。各菌株の由来、自然界の宿主、及び post preservation titer(CFU)を Table 1 に示した。

### 2) 細胞

Mesenchymal stem cell (MSC ; Lonza) は Mesenchymal stem cell growth medium (PromoCell) に Insulin-Transferrin-Selenium-A を添加して培養した。CHO-DG44 細胞 (Life Technologies) は CD DG44 培地

(GIBCO) を用いて培養した。Vero 細胞 (JCRB 細胞バンク JCRB0111) は Eagle's minimal essential medium (Sigma-Aldrich) に 5%ウシ胎児血清 を用いて培養した。

### 3) MSC の細胞数の検討

種々の濃度の MSC の細胞懸濁液を調製し、マイクロチューブに 900 $\mu$ l ずつ分注した。*M. hyorhinitis* を溶解後、無血清 MEM 培地を用いて段階希釈し、最終濃度が 100 CFU/mL または 10 CFU/mL となるように細胞懸濁液にスパイクした。細胞懸濁液及び陰性対照となるマイコプラズマ非感染細胞懸濁液 450 $\mu$ L をそれぞれ 2 本ずつマイクロチューブに分注し、MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection Prep Kit (Roche Diagnostics) のマニュアルに従いマイコプラズマ DNA を抽出した。なお、carrier DNA の検討では、Salmon sperm DNA を終濃度 4.4 $\mu$ g/mL となるように試料に添加後、DNA 抽出を行った。抽出したマイコプラズマ DNA は、MycoTOOL PCR Mycoplasma Detection kit (Roche Diagnostics) を用いて検出した。PCR 増幅はキットのプロトコールに従いタッチダウン PCR とした。反応後の検出はマイクロチップ電気泳動 MultiNA を用いて行い、マイコプラズマ特異的な 450bp のバンドが検出された場合に陽性と判定した。なお、positive control (PC)として、キットに添付の増幅バンドの部分配列を含むプラスミド(増幅断片のサイズは 300bp)の他に、PC-Mh (*M. hyorhinitis* のゲノム DNA)、PC-Mo (*M. orale* のゲノム DNA) を用いた。これらはいずれも ATCC から購入したもので 1 pg/reaction を使用した。

### 4) マイコプラズマ参照品の検出

CHO-DG44 細胞は 5 $\times$ 10<sup>6</sup> cells/mL の細胞懸濁液、MSC は 2 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/mL の細胞懸濁液に Salmon sperm DNA 4.4 $\mu$ g/mL を添加したも

のを調製し、それぞれマイクロチューブに900 $\mu$ lずつ分注した。マイコプラズマ参照品7種を溶解後、無血清 MEM 培地を用いて段階希釈し、細胞懸濁液に1/10量スパイクして最終濃度が100, 10, 1 CFU/mLとなるように調製した。各試料について、以後、3)と同様の操作によりマイコプラズマ DNA の抽出、MycoTOOL PCR による検出を行った。

#### 5) 検体量の検討

Vero 細胞を用いた検体量の検討は MycoTOOL PCR と MycoSEQ (Life Technologies)を用いて行った。MycoTOOL PCR で検出する場合、 $5 \times 10^6$  cells/mL の Vero 細胞懸濁液 0.9ml に Roche 社の carrier DNA 溶液 ( $1 \times 10^7$  個の CHO 細胞ゲノムを含有、DNA 濃度は非公開)を終濃度 80  $\mu$  L/mL 検体となるようにマイクロチューブに添加後、マイコプラズマ参照品7種を最終濃度が10 CFU/mLとなるように1/10量スパイクした。この細胞懸濁液及び陰性対照となるマイコプラズマ非感染細胞懸濁液 0.1mL をそれぞれ2本ずつマイクロチューブに分注し、以後は3)と同様の操作によりマイコプラズマ DNA の抽出、MycoTOOL PCR による検出を行った。

MycoSEQで検出する場合、Vero細胞 $5 \times 10^6$  cells/mLに最終濃度が10 CFU/mLとなるようにマイコプラズマ参照品を添加した細胞懸濁液 0.1mL を MycoSEQ Mycoplasma Detection Kit (Life Technologies)のマニュアルに従い抽出及び検出を行った。

#### 6) マイコプラズマ感染細胞の作製と培養上清のマイコプラズマ測定

マイコプラズマ参照品 *M. hyorhinitis* を無血清 MEM 培地を用いて希釈し、最終濃度が10 CFU/mLとなるように $1 \times 10^4$  cells/mLに調製した Vero 細胞懸濁液に接種した。その後、抗生物質を添加しない培地で繰り返し継代を行

い、*M. hyorhinitis* 感染 Vero 細胞株を樹立した。100 mm dish で培養した継代3日目のコンフルエントに増殖した *M. hyorhinitis* 感染 Vero 細胞から培養上清を回収し(上清画分)、10 mL の PBS を dish に添加してスクレイパーにより細胞を回収した(細胞ペレット画分)。各画分のサンプル量を11mlに揃えて、それぞれ1 mL を検体とし、carrier DNA 溶液を添加後、MycoTOOL PCR キットのマニュアルに準じてマイコプラズマ DNA の抽出を行い、MycoTOOL real-time PCR のマニュアルに従い定量を行った。なお、キットに添付された positive control のほか、 $1 \times 10^7$  CFU/mL の *M. hyorhinitis* 菌液から抽出したゲノムの希釈列をスタンダードに用い、CFU に換算してマイコプラズマを定量した。

#### 7) マイコプラズマの遠心濃縮

10 CFU/mL あるいは1 CFU/mL の *M. hyorhinitis* をスパイクし、キャリア DNA 溶液を添加した Vero 細胞培養上清(50mL、10 mL)について(1)遠心: 16,000 $\times$ g で30分間の遠心、または(2)細胞添加後遠心: 終濃度 $5 \times 10^4$  cells/mLとなるように Vero 細胞を添加後に16,000 $\times$ g で30分間の遠心を行った。遠心後、上清を除去し、得られた菌体ペレットを0.45mLのPBSに懸濁し、キャリア DNA 溶液を添加後に MycoTOOL のマニュアルに従い DNA を抽出し、PCR で検出した。対照として、細胞懸濁液に *M. hyorhinitis* をスパイクしたサンプル未処理(細胞懸濁液)、及び未処理の細胞培養上清に *M. hyorhinitis* をスパイクしたサンプル0.45mLにキャリア DNA を添加してから菌体のゲノムを抽出し、PCR 測定を行い検出の有無を判定した。

#### 8) Vero 細胞でのマイコプラズマ増殖曲線

マイコプラズマ参照品 *M. hyorhinitis* を無血清 MEM 培地を用いて希釈し、最終濃度が10

CFU/mL となるように  $1 \times 10^4$  cells/mL に調製した Vero 細胞懸濁液に接種した。その後 6 well dish に 3mL ずつ播き、培養を行った。培養開始日 0 から 6 日まで、毎日、2 well の細胞をスクレイパーで細胞を培地ごと回収し全細胞画分とした。また、別の 2 well について培養上清を回収し（培養上清画分）、well に残った細胞は 1mL の PBS を添加してスクレイパーで回収した（細胞ペレット画分）。全てのサンプルは  $16,000 \times g$  で 30 分遠心し、上清を除去後のマイコプラズマ及び細胞を含むペレットを再び PBS 0.45mL に懸濁し、carrier DNA 溶液を添加後にマイコプラズマ DNA の抽出を行った。対照として、Vero を含まない MEM 培地に 10 CFU/mL となるようにマイコプラズマを添加したものも同様に培養し、培地画分とした。各画分について MycoTOOL real-time PCR により定量した。同時に、同じ条件で培養した非感染 Vero 細胞を培養開始日 0 から 6 日まで連日ハーベストし、細胞数をカウントした。

（倫理面への配慮）

本研究では、倫理面への配慮が必要な試料・資料の取り扱いはない。

## C. 研究結果

### 1. 再生医療製品の特性とマイコプラズマ迅速試験法

再生医療等製品は生きた細胞をそのまま投与するという点で従来の医薬品と大きく異なる特性を有している。そのために、感染性因子が含まれている場合でも不活化・除去などの工程を適用することができず、十分に検査された原材料の使用、原料細胞の試験、中間工程検査、最終製品での試験が重要となる。再生医療等製品のマイコプラズマ否定試験は最終製品での試験が求められ、日局試験法が参考とされている。

日局にはマイコプラズマ否定試験法として、A. 培養法、B. 指標細胞を用いた DNA 染色法、C. ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）による検出法の 3 つの試験法が提示されているが、日局では原則として A 法及び B 法による実施を求めており、C 法はあくまで B 法を補完する二次的な試験と位置付けられている。しかし、A 法や B 法は、大量にある被検細胞液を対象として試験をすることを想定しており、また試験期間についても、A 法では 4 週間、B 法では 4-7 日間の培養が必要であるなど、判定までに長期間を必要としている。再生医療等製品では多くの場合、培養終了後に迅速に患者に投与する必要があり、従来の試験法を用いたのでは試験結果が得られるのが患者に投与後になり、場合によっては NAT による迅速試験で投与の可否を判断したうえで、投与後も継続して試験を実施するという方法も取られている。また、局方では検体量が 10mL (A 法) あるいは 1mL (B 法) であり、再生医療等製品では実施が困難な場合もある。このような現状から、迅速で高感度な核酸増幅法 (NAT) の利用が望まれ、局方 C 法の位置づけ及び試験内容の見直しが要望された。

一方、欧州薬局方 (EP) は迅速なマイコプラズマ試験法として NAT 法を適用するためのバリデーション法を示しており (European Pharmacopoeia 2.6.7 Mycoplasmas, EP 7.0, 2011, p.156-161.)、EP のバリデーション法に適合しているとされる NAT を用いたマイコプラズマ検出キットが既に市販され、医薬品製造に用いる細胞基材の品質管理に使用されている。日局 C 法見直しの要望を受け、EP や USP、生物学的製剤基準のマイコプラズマ否定試験等も参考に日局の見直しが行われ、2014 年 6 月にマイコプラズマ否定試験 17 局改正案が公表された。

17 局での主な改正点としては、C 法が全面改正され、16 局では特定のプライマーを用い

た PCR 法が例示されていたが、17 局では核酸増幅法 (NAT) のバリデーション法が提示され、7 種の参照マイコプラズマ (*Acholeplasma laidlawii*, *Mycoplasma arginine*, *M. fermentans*, *M. hyorhinitis*, *M. orale*, *M. pneumoniae*, *M. salivarium*) を用いた適切なバリデーションに適合する NAT であればどの方法でも利用が可能となった。また、C 法の位置づけも改正され、同等性試験を実施してこれら 7 種のマイコプラズマ全てについて 10CFU/mL を検出可能であれば A 法を代替可能、100CFU/mL を検出可能であれば B 法を代替可能とされた。日局の改正は 2016 年 4 月施行予定であるが、この改正により、再生医療等製品でもバリデーションに適合する NAT が利用できれば、迅速にマイコプラズマ否定試験を実施できることとなった。

## 2. 市販キットによるマイコプラズマ検出：細胞が異なる場合

EP のバリデーションに適合しているとされる市販の NAT 法は複数販売されているが、これらはバイオ医薬品製造に用いられる細胞基材の品質管理を目的として開発されたものであり、再生医療等製品にそのまま当てはめることが可能か、また細胞数が少ない場合も同様の感度で検出ができるのかは不明である。そこで、まず市販キットの一例として MycoTOOL PCR を取り上げ、再生医療等製品の一例として Mesenchymal stem cell (MSC) をモデル細胞としてマイコプラズマの検出感度を検討した。

まず、MycoTOOL の標準プロトコールとなる CHO 細胞と同じ細胞濃度の  $5 \times 10^6$  cells/mL の MSC を調製し、*M. hyorhinitis* をスパイクして MycoTOOL PCR による検出頻度を検討した。MSC は CHO 細胞に比べて細胞が大きく、培養面積も多く必要であり、 $5 \times 10^6$  cells/mL からの DNA 抽出液は粘性が高く濁ったものと

なった。それでも *M. hyorhinitis* のスパイク量が 100 CFU/mL であれば 4 レーン全てで陽性のバンドが検出されたが、スパイク量が 10 CFU/mL の場合は 2/4 のレーンで検出されたにとどまった (Fig.1, Table 3)。

次に、細胞数を減らして検出頻度を検討した。100 CFU/mL をスパイクした場合には、細胞濃度が  $2 \times 10^5$  cells/mL 以上あれば 100% 陽性となったが、 $5 \times 10^4$  cells/mL では検出率が 1/2 に低下し、 $5 \times 10^3$  cells/mL 以下では全て陰性であった (Table 3)。一方、*M. hyorhinitis* のスパイク量を 10 CFU/mL とした場合、どの細胞濃度でも 100% 陽性とはならず、特に  $5 \times 10^4$  cells/mL 以下では全く検出されなかった。MycoTOOL の DNA 抽出法は細胞 DNA に依存して DNA を回収するものであるため、細胞量が少ないとマイコプラズマ DNA の収率が低く、細胞濃度が低い場合には carrier DNA を添加して DNA を抽出することが推奨されている。そこで、MSC に carrier DNA として sermon sperm DNA を添加して抽出を行ったところ、スパイク量が 10 CFU/mL でも、MSC が  $5 \times 10^5 \sim 5 \times 10^4$  cells/mL の範囲では確実に検出が可能となった。

次に、 $2 \times 10^5$  cells/mL の MSC にバリデーション用マイコプラズマ参照品 7 種をスパイクし、sermon sperm DNA を添加した条件でマイコプラズマの検出を検討した。その結果、この条件では参照品 7 種全てについて、10CFU/mL を 100% の確率で検出可能なことが確認された (Table 4)。これは  $5 \times 10^6$  cells/mL の CHO 細胞で得られた結果 (Table 5) と同等の検出感度である。細胞数が少ないため、細胞あたりの汚染量としての検出感度は CHO 細胞の 1/25 という計算になる。

同様の検討を、マイコプラズマの増殖に用いる Vero 細胞を用いて行ったところ、 $5 \times 10^6$  cells/mL の細胞濃度でも 100 CFU/mL であれば 4/4 の検出が得られたが、10CFU/mL では

2/4 レーンで陽性シグナルが得られなかった (Fig. 2)。細胞濃度を 1/5 に減らすと全て陽性シグナルとなり、MSC と類似した結果となった。

今回の検討により、CHO 細胞用に開発された市販の検出キット MycoTOOL PCR を CHO 細胞以外の細胞で用いる場合には、CHO 細胞での検出条件そのままでは十分な検出感度が得られない場合があることが確認された。MSC では細胞数を CHO 細胞の 1/10 以下に減らす必要があり、また carrier DNA の添加がマイコプラズマ DNA の抽出・検出には必要である。再生医療等製品では様々な細胞が利用されており、必ず対象細胞を用いて、予め十分な検出感度が得られる最適条件を検討することが必要と考えられる。

### 3. 検体量が少ない場合のマイコプラズマの検出感度

再生医療では、治療の目的に応じて使用する細胞の種類は多様であり、またオーダーメイドで作成されることが多いため培養規模が小さく、充分量の検体を試験に用いることが困難な場合もある。

EP のバリデーションに適合する市販のマイコプラズマ検出キットでの推奨検体量は各キットにより異なっている (Table 2)。例えば、MycoTOOL の標準検体量は、細胞懸濁液を検体とする場合は 1 ml (0.9mL を使用) であるが、MycoSEQ では従来の培養法と同じ 10 mL の使用が推奨されている。再生医療製品の最終製品は培養規模が小さいものも多く、マイコプラズマ否定試験の推奨検体量に満たない可能性もある。英国薬局方 (BP) では、細胞治療製品に無菌試験を適用する際の総製品量と検体採取量に関する考え方として、細胞懸濁液が 10mL を超える十分な量がある場合には総量の 1%、1mL 以上 10mL 未満の場合には 0.1mL、総量が 1mL 未満の場合には適用しないとの考

え方を示している (Table 6)。しかし、マイコプラズマ NAT では適切な検体量が確保できれば実施が可能であり、適用しないという考え方は必ずしも適切ではないと考えられる。そこで被検液が 0.1mL しか得られない場合でも NAT によるマイコプラズマ否定試験が実施可能かどうかについて検討した。

Vero 細胞懸濁液 0.1mL ( $5 \times 10^5$  cells) に 10 CFU/mL となるようにマイコプラズマ標準株 7 種をそれぞれスパイクした試料について、MycoTOOL PCR と MycoSEQ の 2 製品を用いてマイコプラズマの検出を検討した。その結果、MycoTOOL PCR では *A. laidlawii*, *M. fermentans*, *M. pneumoniae*, *M. salivarium* の 4 菌種についてはこの試験条件でも 100% の検出感度が得られたが、残りの 3 菌種については検出できない場合が認められた。また、MycoSEQ を用いた場合、今回の測定条件ではどの菌種も 100% の検出はできず、3 菌種は全く検出されなかった。両キットともに推奨検体量での検出限界は 10 CFU/mL 以下と公表されているが、検体量の低下により検出感度の低下が確認された (Table 7)。

### 4. 培養上清を検体とする場合

マイコプラズマは細胞に付着して増殖するものが多く、基本的に、細胞のマイコプラズマ汚染は細胞懸濁液を検体とすることが求められる。しかし、再生医療等製品の最終製品には、培養角膜シートのように細胞シートの完全性が要求されるものや、培養軟骨製品のように医療材料に包埋して投与する場合もあり、最終製品に NAT の適用は困難な場合もある。このような場合には細胞懸濁液ではなく培養上清を検体とすることも想定される。そこで、マイコプラズマ汚染細胞では、培養上清と細胞画分によるどのような比率でマイコプラズマが分布するのかを検討した。

*M. hyorhinitis* 感染 Vero 細胞株を作製し、コ

ンフルエントの時点で培養上清と細胞画分それぞれに含まれるマイコプラズマを測定したところ、上清中のマイコプラズマは細胞を汚染するマイコプラズマの5%未満であり、マイコプラズマの大部分は細胞画分に存在することが明らかになった (Fig. 4)。培養細胞を汚染するマイコプラズマが10~100 CFU/mL程度の場合でも上清中のマイコプラズマの比率が同程度と仮定すると、培養上清中のマイコプラズマの濃度は0.5~5 CFU/mL以下と想定される。この場合、細胞懸濁液を測定すれば NAT の検出限界以上となり検出可能だが、上清のみを測定した場合には検出は困難と予想される。しかし、培養上清中のマイコプラズマ含有量は低濃度でも容量はある程度得られるのであれば、total のマイコプラズマ量は検出限界以上となる可能性がある。そこで、上清中のマイコプラズマを濃縮して測定する方法を検討した。

10 CFU/mL あるいは 1 CFU/mL の *M. hyorhinis* をスパイクした Vero 培養上清 10mL、50 mL について、16,000×g で 30 分遠心したペレット、または培養上清に Vero 細胞  $5 \times 10^4$  個を添加後、16,000×g で 30 分遠心処理を行い得られたペレットから抽出したものを、未処理の上清及び細胞懸濁液 1ml から抽出した場合と比較した (Table. 8)。その結果、10CFU/mL の場合、細胞懸濁液では 100%の検出感度が得られたが、培養上清 1mL では十分な検出感度が得られず、10mL からの遠心濃縮でも感度は上がらなかった。50mL から遠心濃縮した場合は 100%の頻度で検出できるようになった。また、上清に Vero 細胞を添加後に遠心した場合は、10mL からの濃縮でも 100%検出された。遠心操作によりマイコプラズマ全量が回収できれば 10mL の遠心でも 10 倍濃縮となり 100%の頻度で検出できることを期待したが、今回の条件はマイコプラズマがごく低濃度で菌体量が少ないため、遠心のみでは上清を除去して pellet にする過程で菌体

のロスが起こり十分な回収ができなかったものと推測される。一方、細胞を添加した場合は細胞ペレットと共にマイコプラズマが沈殿するため、十分な濃縮が可能になったと思われる。今回は Vero 細胞を共沈剤として使用したが、細胞に限らず、菌体を共沈させるものを添加して菌体の回収率を上げることで十分な濃縮が可能と考えられる。

## 5. Vero 細胞を用いたマイコプラズマの増幅

マイコプラズマ否定試験 17 局改正案には、Vero 細胞を用いてマイコプラズマを増幅後に NAT で検出する方法も示されている。培養上清中のマイコプラズマは高濃度であれば直接測定可能だが、低濃度の場合、前述の遠心法などを利用して濃縮後に測定する方法の他に、Vero 細胞で増幅することにより高感度に検出する方法もある。また、検体量が少ないため感度が得られない場合でも、Vero 細胞で増幅すれば感度を上げられる可能性がある。そこで、Vero 細胞を用いたマイコプラズマの増幅について検討した。

Vero 細胞に 10 CFU/mL となるように *M. hyorhinis* をスパイク後、経時的に dish1 の全細胞 (培養上清を含む)、dish2 の培養上清、及び dish2 の上清を除去した細胞画分に分けてマイコプラズマを定量した。その結果、Vero 細胞を含まない MEM 培地に *M. hyorhinis* をスパイクしても増幅しないが、Vero 細胞に接種した場合、Vero 細胞の増殖に伴って *M. hyorhinis* が増幅し、10CFU/mL が 3 日で  $10^6$  CFU/mL、6 日で  $10^9$  CFU/mL まで急激な増幅が認められた (Fig. 5)。この結果から、試験に数日かかるが、検体として低濃度の上清しか得られないような場合でも Vero 細胞で増幅後に測定することにより高感度に検出できる可能性が示唆された。ただし、データは示さないが、最初にスパイクするマイコプラズマを 1CFU/mL とした場合、低濃度のため必ずしも

全ての well でマイコプラズマが増殖するわけではないことも経験している。なお、細胞画分と上清中のマイコプラズマを比較したところ、やはりマイコプラズマはほとんどの時点で細胞ペレット中に回収され、培養上清中のマイコプラズマはほとんどの時点で全マイコプラズマの10%以下であった。

#### D. 考察

再生医療等製品の特性を踏まえたマイコプラズマ否定試験法に関する考え方を実験も踏まえて考察した。再生医療等製品では迅速試験が求められるが、これについては日局の改正によりバリデーションに適合する NAT が利用できるのであれば、迅速な試験が実施可能となった。ただし、目的とする製品である細胞を用いて検出感度の確認を行う必要がある。また、検体の種類や量による考慮事項は以下にまとめた。

##### 1. 再生医療等製品の細胞特性に応じたマイコプラズマ試験の適用

再生医療等製品は、製品ごとに多様な特性を持っており、臨床適用においても様々なバリエーションが存在する。例えば、培養角膜上皮細胞や角膜内皮細胞では、臨床適用されるのは非常に少量の細胞であり、培養角膜シートで重層化した角膜細胞が  $10^7$  cells/0.2mL 程度とされている。試験に用いることが出来る検体も同様に少量である場合も多い。また、培養角膜上皮シートや培養心筋シートなどでは最終製品の形態がシート状であり、これらの最終製品を対象に試験を実施する場合、その一部を剥ぎ取って被検液とするのか、あるいは試験のために別途パイロット培養した被検細胞を調製し、最終製品の試験に用いることも想定される。この場合には、パイロット培養された被検液は患者に投与される培養製品と同様の操作が適用されており、汚染等のリスクが同一とみなせること

が十分に説明可能であることが必要である。

一方、抗腫瘍活性が期待される活性化リンパ球などは、細胞が懸濁液の状態で培養されており、最終製品も容易に懸濁状態にすることが可能であり、NAT 法を適用するための DNA の抽出操作も比較的容易であると想定される。一方、接着細胞では通常はトリプシン等により細胞を懸濁状態にする操作が必要となるが、この操作により、細胞に接着しているマイコプラズマが除去されてしまう可能性がある。このような細胞懸濁操作の必要な製品を対象とする場合には、マイコプラズマの添加回収試験を実施することにより十分な感度が担保されることを確認しておく必要がある。

さらに再生医療等製品の種類によっては、培養軟骨製品や培養骨細胞製品のように医療材料等に包埋して投与される製品もある。このような製品では、最終製品に NAT 法を適用することが困難な場合もある。このような場合、包埋後にそれ以上の汚染の可能性がないことを前提に、混合する直前の細胞と医療材料を対象にそれぞれ DNA 抽出操作を行って各検体で NAT 試験を行うことにより、マイコプラズマの存在を否定することも可能であろう。

また、特定の医療材料の中で培養され、簡単な洗浄の後にそのまま投与されるような製品の場合には、スキャホールドから直接、NAT 検査用の DNA 抽出が必要とされる場合もあると考えられる。このような場合には、指標となるマイコプラズマをスキャホールドに添加し、十分な添加・回収ができることを示すことで評価が可能と考えられる。

##### 2. マイコプラズマ否定試験に用いる検体量の考え方

再生医療等製品は非常に少量しか培養しない製品から比較的大量に培養される製品まで、多様な特徴を有する。日局の培養法では、カンテン平板培地で 0.2mL 以上の検体（細胞懸濁

液)をプレート2枚以上に接種すること、液体培地では10mL以上の検体を1本以上の培地に接種すること、とされている。試験に用いる検体の量が多いほど感度が高くなると想定されるが、本来、日局で対象としているのは細胞バンクを形成する細胞基材での試験であり、大量培養が可能であり数百 mL の細胞懸濁液が得られるため、そのうちの10mLを被検液として用いることは合理的と考えられる。しかし、再生医療等製品で非常に少量しか培養されない製品の場合、大量の検体を用いてマイコプラズマ試験を実施するのは合理的ではない。

BPの無菌試験法では、再生医療製品の被検量は製品量の一定比率を用いるとの考え方が示され、製品量が少ない場合に試験を行わないという考え方を示している。しかし、NATの被検液量を設定するときには、NATの特性に応じた考え方を適用すべきであろう。

市販のマイコプラズマ測定用NATも細胞基材の品質管理を想定して作られており、標準検体量はMycTOOLで1mL、MycSEQでは10mLを用いて行うこととされるが、特に検体量が少ない場合を想定して0.1mLを検体として検討を行った。その結果、0.1mLからでも測定は可能であるが、10CFU/mLを測定可能な感度を有するキットを使用しても、検体の容量を標準使用量の1/10又は1/100の0.1mLに減らすと当然のことながら感度は低下し、偽陰性となる菌種が認められた。BPでは総量が1mL未満の製品では試験の適用はなしとしているが、適切な量が確保できるのであれば、どの程度の感度を得られるのかを確認したうえでNATが適用できる場合に試験の実施を不要とすることはできないと考えられる。また、総量の1%を試験するという場合には、被検サンプル数を増やすという考え方や、Vero細胞に接種して検体の容量と検出感度を上げるという方法を取ることも可能と考えられる。

### 3. 培養上清を検体とする場合の考え方

マイコプラズマは細胞に接着して増幅するため、被検液としては細胞懸濁液を選択すべきとされるが、再生医療等製品では必ずしも細胞懸濁液を検体とすることができない場合がある。細胞からマイコプラズマが十分に回収できていることがバリデーションされていれば培養上清を検体としてもよいと考えられるが、今回の検討でも示されたように培養上清中のマイコプラズマは細胞培養中のマイコプラズマのごく一部であることが確認されており、培養細胞のマイコプラズマ汚染を検出するには、大量の培養上清からマイコプラズマを濃縮する等の方法を取る必要があると考えられる。上清からの濃縮法としては、16,000×gで30分間の遠心処理により、ある程度濃縮可能であるが、低濃度の試料からの濃縮では細胞などのマイコプラズマを共沈させるものを添加して遠心する方法が培養上清中のマイコプラズマを回収する方法として利用できる。また、Vero細胞に接種して増幅後に測定する方法は、時間はかかるが、3日で10<sup>5</sup>倍に増幅させることが可能であり、低濃度の試料を高感度に測定するのに有用な方法と考えられる。しかし、特に検出に際して偽陽性や偽陰性を生じることがないことを評価しておくことが重要と考えられる。また、上清を検体として用いる場合には、最終細胞製品への製剤化の過程で汚染が起らないことを確認しておくことも必要と思われる。製剤化の過程で汚染のリスクが否定されない場合は、投与後の試験も考慮すべきとおもわれる。

### E. 結論

再生医療等製品の最終製品の出荷試験として実施が求められているマイコプラズマ否定試験について、再生医療等製品の特性を踏まえた試験法に関する考え方を整理した。再生医療等製品では迅速試験法が求められているが、



NAT を再生医療等製品に適用する場合に考慮すべき事項を明らかにした。また、検体の種類や検体の採取量など、再生医療等製品の特性を考慮した、現実的に適用可能な試験法について考察した。

## F. 健康機器情報

該当なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 細胞基材に対するマイコプラズマ否定試験の PCR 法の見直しに関する研究、医薬品医療機器レギュラトリーサイエンス 45 (5), 442-451 (2014)
- 2) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 日本薬局方参考情報掲載マイコプラズマ否定試験の PCR 法改正のための共同研究、マイコプラズマ学会雑誌(印刷中)

### 2. 学会発表

- 1) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 日局参考情報「バイオテクノロジー応用医薬品/生物起源由来医薬品の製造に用いる細胞基材に対するマイコプラズマ

否定試験」の PCR 法の見直しに関する共同研究、日本薬学会第 134 年会 (2014.3) 熊本

- 2) 窪崎敦隆, 菊池裕, 宮原美知子, 遊佐精一, 島崎愛加, 石橋侑季, 鈴木俊宏, 小原有弘, 大谷梓, 佐々木裕子, 松山晃文, 大倉華雪, 古田美玲, 内田恵理子, 山口照英: マイコプラズマ否定試験に利用可能な標準菌株および標準 DNA の調製、日本薬学会第 134 年会 (2014.3) 熊本
- 3) 内田恵理子, 古田美玲, 菊池裕, 窪崎敦隆, 遊佐精一, 宮原美知子, 佐々木裕子, 小原有弘, 大谷梓, 松山晃文, 大倉華雪, 山口照英: 日本薬局方参考情報掲載マイコプラズマ否定試験の PCR 法改正のための共同研究、日本マイコプラズマ学会第 41 回学術集会(2014.5) (東京)
- 4) 内田恵理子: 生物薬品委員会の検討課題ーマイコプラズマ否定試験の改正による NAT 法の積極的活用ー、第 13 回日本薬局方に関する研修会 (2014. 10) (大阪, 東京)
- 5) 内田恵理子: 新しいマイコプラズマ否定試験法、第 15 回医薬品等ウイルス安全性シンポジウム(2015.2) (東京)
- 6) 古田美玲, 内田恵理子, 山口照英: 再生医療製品のマイコプラズマ否定試験としての NAT の適用に関する研究、第 14 回日本再生医療学会総会(2015.3) (横浜)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

Table 1 バリデーション用マイコプラズマ参照菌株の濃度とゲノムコピー数

Strain	Origin	Host	Post preservation titer (CFU/mL)		Genome copies/CFU ratio
			mean	SE	
<i>Acholeplasma laidlawii</i> NBRC 14400	Sewage	Bovine	2.87E+08	6.67E+06	18.92
<i>Mycoplasma fermentans</i> NBRC14854	Ulcerative balanitis	Human	7.97E+06	2.79E+06	67.38
<i>Mycoplasma hyorhinis</i> NBRC14858	Nasal cavity of pig	Swine	2.19E+08	3.68E+07	10.23
<i>Mycoplasma orale</i> NBRC14477	Human-orpharynx of child	Human	1.18E+08	1.02E+07	22.20
<i>Mycoplasma pneumoniae</i> NBRC14401	Human-atypical pneumoniae	Human	2.42E+07	6.86E+06	57.85
<i>Mycoplasma salivarium</i> NBRC14478	Saliva	Human	6.93E+07	4.11E+07	30.30
<i>Mycoplasma arginini</i> ATCC23838	Mouse brain experimentally infected with scrapies	Bovine, Caprine	5.30E+08	2.29E+07	8.11

Table 2 EP 準拠市販マイコプラズマ検出キットの特徴

キット名	MycoTOOL (PCR)	MycoTOOL (real-time PCR)	MycoSEQ	CytoCheck	MilliProbe	
会社	Roche Diagnostics		Life Technologies	Greiner bio-one	Merck Millipore	
特化	CHO		-	-	-	
抽出	推奨検体量	1 mL	100 $\mu$ L-10 mL	1mL	20mLまで可能	
	細胞濃度/細胞数上限	5 $\times$ 10 <sup>6</sup> cells/mL	1 $\times$ 10 <sup>6</sup> cells (1 $\times$ 10 <sup>6</sup> ~ 2 $\times$ 10 <sup>8</sup> cellsでは上清を使用)	上清	細胞と分離後抽出	
核酸増幅	ターゲット	16S rRNA (DNA)	16S rRNA (DNA)	非公開(DNA)	16S-23S rRNA spacer (DNA)	16S rRNA
	プライマー・プローブ配列	公開	非公開	非公開	非公開	非公開
	PCR原理	Touch down PCR	Real-time Touch down PCR	Real-time PCR	PCR	TMA法
	検出	PAGE	プローブ法	SYBR Green法	DNA-chip	蛍光プローブ
公表検出下限	< 10CFU/mL	< 10 CFU/mL	< 10 CFU/mL (10mL使用時)	< 10 CFU/mL	< 10 CFU/mL	

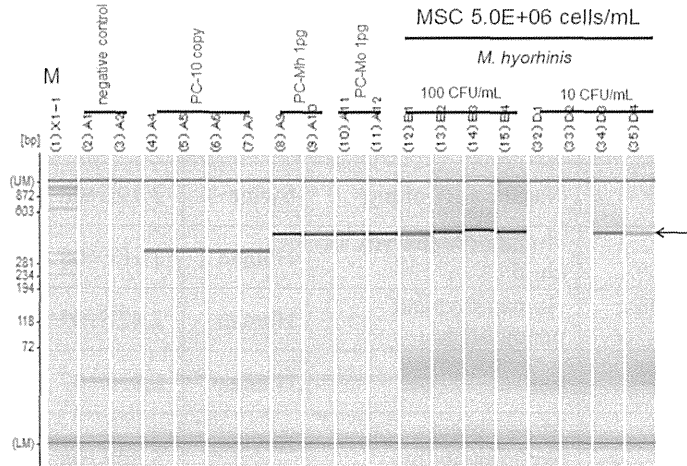


Fig.1 MSC ( $5 \times 10^6$  cells/mL)にスパイクした *M. hyorhinis* の MycoTOOL PCR による検出

Table 3 MycoTOOL PCR による *M. hyorhinis* の検出：細胞の種類と細胞濃度の影響

<i>M. hyorhinis</i>	Sermon sperm DNA	cells/mL							
		CHO	MSC						
		$5 \times 10^6$	$5 \times 10^6$	$5 \times 10^5$	$2 \times 10^5$	$5 \times 10^4$	$5 \times 10^3$	$5 \times 10^2$	0
100 CFU/mL	-	2/2*	4/4	8/8	4/4	2/4	0/4	0/4	1/4
	+	nd	nd	nd	nd	8/8	8/8	8/8	4/4
10 CFU/mL	-	6/6	2/4	7/8	2/4	0/4	0/4	0/4	1/4
	+	nd	nd	4/4	4/4	8/8	7/8	6/8	4/4

\*: 検出数/試験数 ; nd: not determined

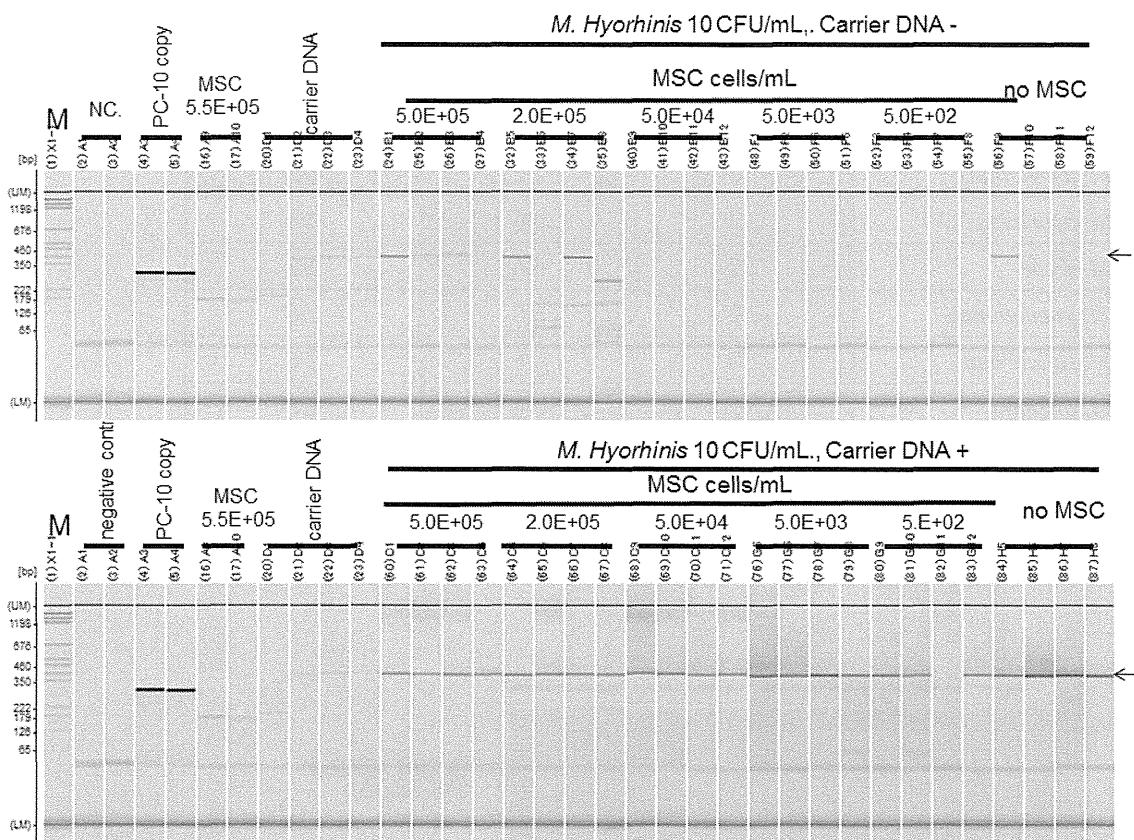


Fig.2 MSCにスパイクした *M.hyorhinis* の MycoTOOL PCR 検出に与える細胞数と Carrier DNA の影響

Table 4 MSC にスパイクしたマイコプラズマ参照株の MycoTOOL PCR による検出 ( $2 \times 10^5$  cells/mL, Carrier DNA+)

Strain	100cfu/ml	10cfu/ml	1cfu/ml
<i>A. laidlawii</i>	4/4*	4/4	0/4
<i>M. fermentans</i>	4/4	4/4	1/4
<i>M. hyorhinis</i>	4/4	4/4	2/4
<i>M. orale</i>	4/4	4/4	2/4
<i>M. pneumoniae</i>	4/4	4/4	4/4
<i>M. salivarium</i>	4/4	4/4	2/4
<i>M. arginini</i>	4/4	4/4	0/4

\*: 検出数/試験数

Table 5 CHO 細胞にスパイクしたマイコプラズマ参照株の MycoTOOL PCR による検出  
( $5 \times 10^6$  cells/mL)

Strain	100cfu/ml	10cfu/ml	1cfu/ml
<i>A. laidlawii</i>	2/2*	6/6	0/6
<i>M. fermentans</i>	2/2	2/2	2/2
<i>M. hyorhinitis</i>	2/2	6/6	0/6
<i>M. orale</i>	2/2	6/6	2/6
<i>M. pneumoniae</i>	2/2	6/6	2/6
<i>M. salivarium</i>	2/2	6/6	2/6
<i>M. arginini</i>	2/2	6/6	1/6

\*: 検出数/試験数

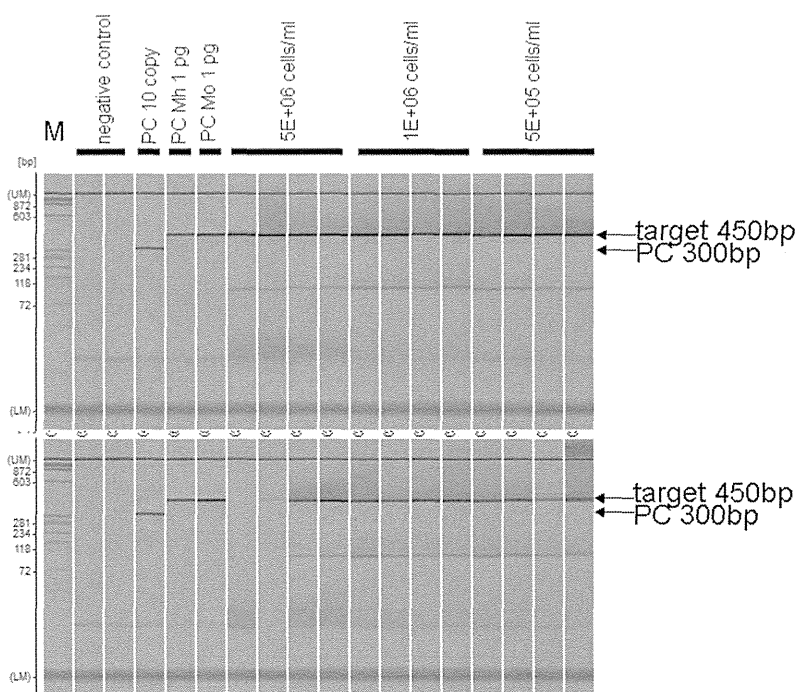


Fig.3 Vero 細胞にスパイクした *M.hyorhinitis* の MycoTOOL PCR による検出  
上: 100CFU/mL, 下: 10CFU/mL

Table 6 細胞治療製品の総製品量と検体の採取量の考え方(BP)

総製品量	検体量
総量 $\geq 10$ mL	総量の 1%
1 mL $\leq$ 総量 < 10 mL	100 $\mu$ L
総量 < 1 mL	適用しない

Table 7 検体量 0.1mL でのマイコプラズマ検出の陽性頻度

菌 種	MycoSEQ	MycoTOOL PCR
<i>A. laidlawii</i>	1/4	4/4
<i>M. arginini</i>	1/4	1/4
<i>M. fermentans</i>	2/4	4/4
<i>M. hyorhina</i>	0/4	1/4
<i>M. orale</i>	0/4	0/4
<i>M. pneumoniae</i>	2/4	4/4
<i>M. salivarium</i>	0/4	4/4

細胞懸濁液：VERO 細胞、 $5 \times 10^6$  cells

マイコプラズマ：10CFU/mL

検体量：0.1mL

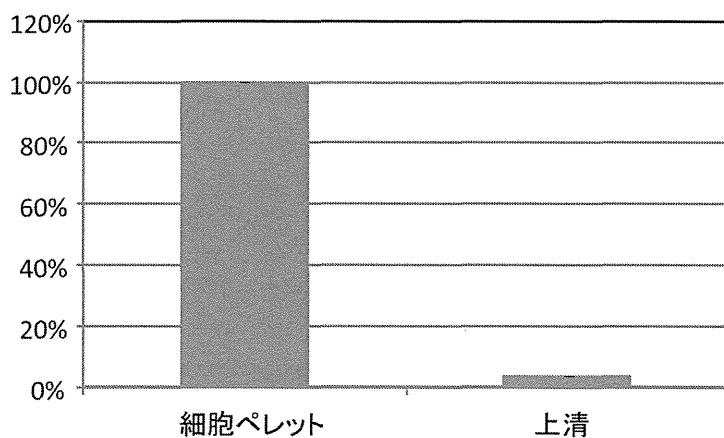


Fig. 4 マイコプラズマ汚染細胞での細胞と上清のマイコプラズマの比率

*M. hyorhina* 感染 Vero 細胞の MycoTOOL real-time PCR による測定

Table 8 培養上清からのマイコプラズマの濃縮 (検出：MycoTOOL PCR)

処 理	10 CFU/ml	1 CFU/ml
未処理(細胞懸濁液) 1ml	4/4	1/4
未処理(培養上清) 1ml	9/12	4/12
上清 10 ml、遠心 pellet	2/6	1/6
上清 50 ml、遠心 pellet	6/6	1/6
上清 10 ml、細胞添加、遠心 pellet	6/6	0/6
上清 50 ml、細胞添加、遠心 pellet	6/6	5/6

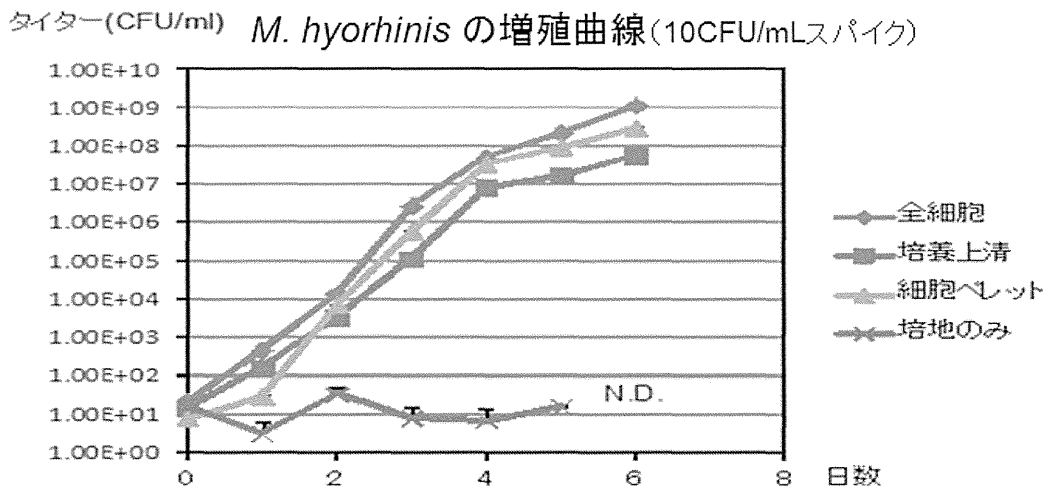
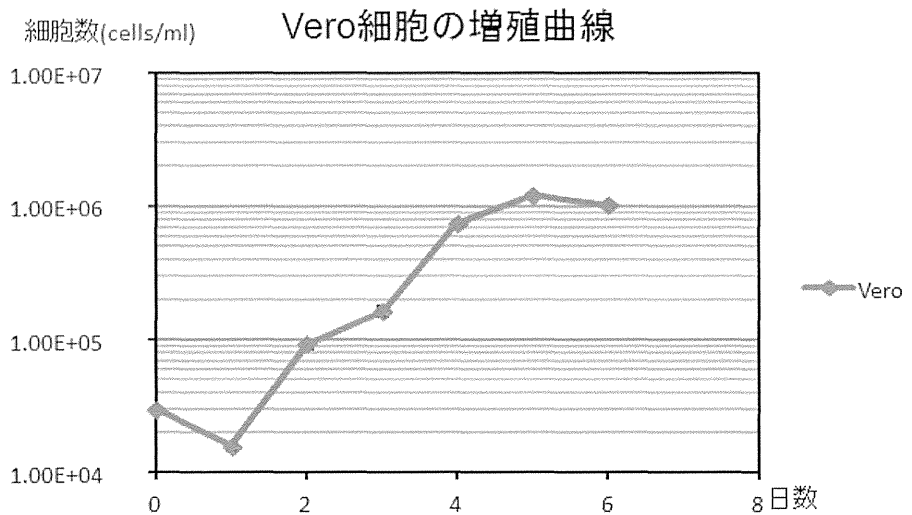


Fig.5 Vero 細胞によるマイコプラズマの増幅 (検出 : MycoTOOL real-time PCR)

厚生労働科学研究費補助金  
(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業  
(医薬品等規制調和・評価研究事業))  
分担総合研究報告書

ウシ等由来原料の基準に関する研究

研究分担者 吉倉廣 国立感染症研究所 客員研究員

本研究では、国際獣疫事務局 (OIE) において、日本、米国等が新たに牛海綿状脳症 (BSE) の「無視できるリスク国」に指定されたことを踏まえ、海外規制状況、国内規制に対する国内研究者の意見等について調査を行うとともに、医薬品等に用いる原料規制のあり方を提言する。

吉倉 廣 (国立感染症研究所・客員研究員)

**協力研究者**

飛梅 実 (国立感染症研究所)

小野寺節 (東京大学大学院)

甲斐智恵子 (東京大学医科学研究所)

北本哲之 (東北大学大学院)

四方 靖 (株式会社エーザイ)

中村好一 (自治医科大学)

毛利資郎 (東北大学)

山口照英 (国立医薬品食品衛生研究所)

山本茂貴 (東海大学)

**A. 研究目的**

生物由来原料を用いる医薬品等については、最終製品の安全性を確保するため、薬事法に基づき、当該生物由来原料に対して細菌やウイルス安全性に係る基準 (平成 15 年 5 月 20 日厚生労働省告示第 210 号 生物由来原料基準) を定めている<sup>2)</sup>。特に、細胞培養技術等を活用して製造される医薬品等については、培地等にウシ血清をはじめとする反芻動物由来原料が用いられていることから、伝達性海綿状脳症 (TSE) の発生リスクに応じて、原料として使用可能な部

位、原産国を定めて規制している。今般、国際獣疫事務局 (OIE) において、日本、米国等が新たに牛海綿状脳症 (BSE) の「無視できるリスク国」に指定されたことを踏まえ、海外規制状況、国内規制に対する国内研究者の意見等について調査を行うとともに、医薬品等に用いる原料規制のあり方を提言する<sup>2)</sup>。

**B. 研究方法**

海外規制状況、国内規制に対する国内研究者の意見等について調査を行うとともに、会議を通じ研究協力者との意見交換を実施し、研究班としての提言をまとめる。

**C. 研究結果**

海外の規制状況、OIE、欧州食品安全機関 (EFSA)、アメリカ食品医薬品局 (FDA) 等の国際機関のリスク評価情報を収集し、検討を行った。これらをもとに、ウシ由来原料に関する原産国、使用可能部位等に対する現状における問題点の抽出・整理を行った。



#### D. 考察

平成 15 年に制定された生物由来原料基準では、EFSA 等が用いていた地理的 BSE リスク（GBR）に基づき、個別評価を経て使用可能国が選定された<sup>1)</sup>。

平成 17 年に CVO/EU 議会は、BSE 分類は、可能な限り OIE ガイドラインに基づく必要があると結論を示した<sup>3)</sup>。これを受け、EFSA は、専門家によるパネルを設置し、平成 19 年には、EFSA は、GBR 評価手法は OIE の基準の枠組みに一致させる方針を決めた<sup>4)</sup>。現時点では、WTO の SPS 協定のリファレンスとされる OIE 基準が今後国際的なスタンダードとして受け入れられる方向にあると考えられ、本邦においても原則的に OIE の基準に沿って、生物由来原料基準による規制を見直す方向性が確認され、以下の個別事案の提言をまとめた。

##### 1：原産国規制の見直し

1990 年代前半をピークとして、英国を中心に欧州において多数発生した BSE は、1992 年に年間 37,316 頭の発生報告があったが、その後、飼料規制の強化等により発生頭数は大幅に減少し、2013 年には年間 7 頭の発生となっている。ウシとヒトの間に存在する種間障壁等を踏まえると、今後ヒトへの BSE 感染はほぼ無くなるか、あっても極めて少数にとどまると推測される<sup>5)</sup>。更に、世界的な飼料規制の強化により、わが国が GBR のリスク評価に基づき規制した時点よりも BSE のリスクが増大している可能性のある国はないと考える。なお、これは非定型 BSE の発生リスクを考慮に入れたとしても同様と考える<sup>6)</sup>。海外での規制状況等を踏まえ、わが国は、原則的に OIE 基

準に沿った原産国評価をすべきであると結論した。平成 15 年以降使用を許可されてきたが OIE 未評価の国々に関しても、EFSA GBR の妥当性が確認されていること、リスクの上昇が認められないこと<sup>3)</sup>から、いずれは切り替えを進めるべきであるが、直ちに使用禁止等の対応が必要というレベルではないと判断された。

##### 2：個別の原材料のリスクの見直し

###### ア ゼラチン（コラーゲンを含む）

これまで得られた科学的知見等から、皮及び骨由来ゼラチン（コラーゲンを含む）については、アルカリ処理等の高度処理工程を経て製造されるため、その原産国にかかわらず BSE の感染リスクは極めて低いと考えられ、低リスク原材料として使用可能と考える。なお、危険部位であるせき柱骨や頭骨については、引き続き原材料として用いるべきではないと考える<sup>3),7)</sup>。

###### イ ウシ乳及び乳由来成分

ウシ乳については、海外の規制状況、最近の科学的知見等を踏まえると、現時点において、BSE の感染リスクは極めて低いと考えられ、低リスク原材料として使用可能と考える。さらに乳糖など乳由来成分については、既に海外で長年にわたり広く使用され、製品として流通していることから、BSE の感染リスクは十分無視し得ると考える<sup>8)</sup>。

###### ウ 骨炭

骨炭は熱処理（800℃以上）により製造されるものであり、その製法条件が守られる限り、骨炭中にタンパク質成分が存在しな

いことから、BSE の感染リスクは十分無視し得ると考える<sup>9),10)</sup>。

### 3: 高度精製品の見直し

「薬事法施行規則の一部改正等に伴う事務取扱い等について」(平成 15 年 5 月 20 日付医薬審発第 0520001 号・医薬安発第 0520001 号・医薬監麻発第 0520001 号・医薬血発第 0520001 号 4 課長通知) の別添 1 で示されている高度精製品については、反芻動物由来原料としては高度精製品と見なされてこなかった。しかし、ウシ由来原料の一部については、局方収載の添加剤として国際調和されているものや既に海外で長年にわたり広くこれらの原料が使用され、製品として流通している。その製造段階におけるプリオンの除去・不活化に寄与する工程を考慮すると、ウイルスと同様に BSE の感染リスクは十分無視し得ると考えられる。

### 4: リスク低減処理について

ウシ由来原材料を用いる場合に、①バイオ医薬品の製造に用いる細胞基材がプリオンの蓄積・増幅を引き起こすことがないこと、②プリオンの濃縮につながる工程がないことを前提として、ウシ由来原材料の製造過程でのクリアランス値に加え、培養工程での希釈等による除去によるクリアランス値も考慮することにより、プリオンの感染リスクがどの程度低減化されるかを見積もることが可能であると考えられる<sup>11), 12), 13)</sup>。その際、現時点で得られているプリオンの感染価に関する科学的知見をもとに、一定のリスクマージン(安全域: 1000 倍)を考慮した値( $10^{-9}$ )をリスク評価に当

たつての目安として設定することが有用と考えられる。

## E. 結論

「生物由来原料基準」(平成 15 年 5 月 20 日厚生労働省告示第 210 号)によって規定されるウシ等由来原料の基準について、世界の BSE 発生状況、欧米を中心とした現行規制を調査・検討した。これに、科学的知見を加味し、我が国における医薬品等原料のリスクに応じた規制のあり方について提言を作成した。

生物由来原材料基準の一部を改正する件については、平成 26 年 7 月パブリックコメント募集<sup>14)</sup>、平成 26 年 9 月 26 日に「生物由来原料基準の一部を改正する件」が公布<sup>15)</sup>されている。

## F. 健康危険情報

特記事項なし

## G. 研究発表

なし

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

なし

## H. 知的所有権の取得状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

## I. 参考資料

- 資料 1 研究班提言  
 資料 2 生物由来原料基準の一部を改正する件（案）に関する意見の募集について  
 資料 3 生物由来原料基準の一部を改正する件（案）について

## J. 参考文献

- 1) 厚生労働省告示第 2 1 0 号:  
<http://www.nihs.go.jp/dbcb/TEXT/kouseiroudousyokokuji-210.pdf>
- 2) List of Member Countries with BSE risk status:  
<http://www.oie.int/animal-health-in-the-world/official-disease-status/bse/list-of-bse-risk-status/>
- 3) Opinion of the scientific panel on biological hazards on the revision of the Geographical BSE risk assessment(GBR) methodology. The EFSA Journal (2007)463:1-35
- 4) The TSE Roadmap 2 :  
[http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse\\_bse/docs/roadmap\\_2\\_en.pdf](http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/tse_bse/docs/roadmap_2_en.pdf)
- 5) SCIENTIFIC REPORT OF EFSA. Scientific and technical assistance on the minimum sample size to test should an annual BSE statistical testing regime be authorised in healthy slaughtered cattle1. EFSA Journal 2012;10(10):2913
- 6) Protocol for further laboratory investigations into the distribution of infectivity of Atypical BSE EFSA Journal 2014;12(7):3798
- 7) The Sourcing and Processing of Gelatin to Reduce the Potential Risk Posed by Bovine Spongiform Encephalopathy (BSE) in FDA-Regulated Products for Human Use.  
<http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm125182.htm>
- 8) QUESTIONS AND ANSWERS BSE FEED REGULATION, 21 Code of Federal Regulations (CFR) 589.2000, U.S. FDA Center for Veterinary Medicine July 1998
- 9) QUESTIONS AND ANSWERS BSE FEED REGULATION, 21 Code of Federal Regulations (CFR) 589.2000, U.S. FDA Center for Veterinary Medicine July 1998
- 10) Junichi T, Recycling of meat and bone meal for food safety and security, Obihiro Asia and the Pacific Seminar on Education for Rural Development(OASERD)(2005): 1-7
- 11) J. BOOTH, S. VICIK, M. TANNATT, C. GALLO, B. KELLEY: Transmissible spongiform encephalopathy agent clearance by the immunoaffinity and anion-exchange chromatography steps of the ReFacto® manufacturing process. Haemophilia, 13, 580–587, 2007
- 12) Mikihiro Yunokita, et al: Prion removal by nanofiltration under different experimental conditions. Biologicals, 36, 27–36, 2008
- 13) TSE Advisory Committee September 18, 2006 Dorothy Scott, M.D. FDA/CBER, TSE Clearance Studies for pdFVIII: Study Methods and Clearance Levels.
- 14) 生物由来原料基準の一部を改正する件

パブリックコメント案件番号 495140149,  
2014

15) 「生物由来原料基準の一部を改正する件」(平成 26 年厚生労働省告示第 375 号)