

究がすでに行われている。現在、骨髄、脂肪組織、臍帯血由来の間葉系幹細胞が、その採取技術および *in vitro* での培養技術も確立されており、それぞれの由来によって分化能を含む細胞の性質の違いなども示されてきている¹¹⁾。幹細胞は多分化能と同時に自己複製能を持つ細胞である¹²⁾ため、正常細胞でありながら増殖能力を持つ。幹細胞を再生医療製品に利用するためには、細胞を生体内から取り出して *in vitro* で培養して増殖させるという工程を経る場合が多い。しかし、この *in vitro* 培養中の自己複製能（細胞増殖能）が正常に制御されていないとがん化のような望まない変化が起きる可能性も否定できない。実際、2005年に脂肪細胞由来のヒト間葉系幹細胞を長期間（4～5ヶ月）*in vitro* で培養すると自然に形質転換（がん化）する細胞が確認されたという報告¹³⁾がなされた際には注目されたが、2010年にその報告は取り下げられている¹⁴⁾。しかしながら一方で、別のグループによって骨髄由来間葉系幹細胞について同様の報告¹⁵⁾もされているため、幹細胞を用いた再生医療製品の実用化に向けて、幹細胞の *in vitro* 培養中の性質の変化について観察し、その特性を知ることは重要であろう。

我々はこれまでに、ヒト骨髄由来間葉系幹細胞（hMSC）を用いて *in vitro* 培養期間中の変化について、特に遺伝子発現の変化に着目して検討を行ってきた。hMSC を *in vitro* で継代培養を続けていくと、通常は徐々にその増殖能力が低下していく。図1に7ドナー分の hMSC の増殖曲線を示した。それぞれのドナーによる増殖能の違いは見られるものの、そのほとんどが培養期間50日程度で増殖能は低下し始め、100日を越えるとほとんど増殖しなくなってくる。また図2に示すように、細胞の形態は培養期間28日頃まではあまり変化がみられないが、50日辺りでは細胞が少し広がり扁平化しているのが観察された。さらに、増殖能が低下した hMSC には、Senescence associated β -galactosidase (SA- β -Gal) staining によって老化している細胞が含まれていることも確認している¹⁶⁾。このように、hMSC は通常はがん細胞のように無限増殖能を有するわけではなく、*in vitro* で培養し続けるとその増殖能力は低下し老化を伴う変化が生じる。その際の遺伝子発現の変化を調べたところ、hMSC を *in vitro* での培養を続けることによって、TGF β シグナル伝達系、p16などの細胞周期制御因子の遺伝子発現の変化（上昇）を伴って細胞

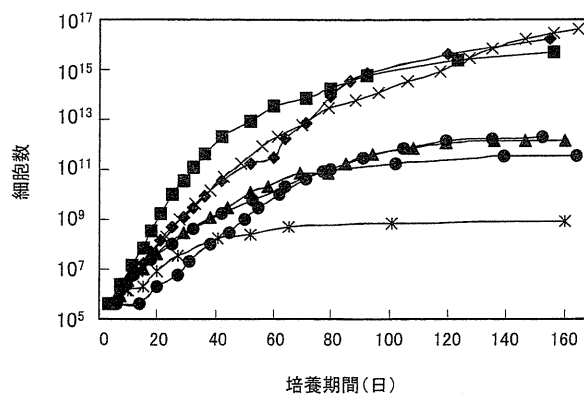


図1 hMSC の増殖曲線

第1章 再生医療製品の許認可について

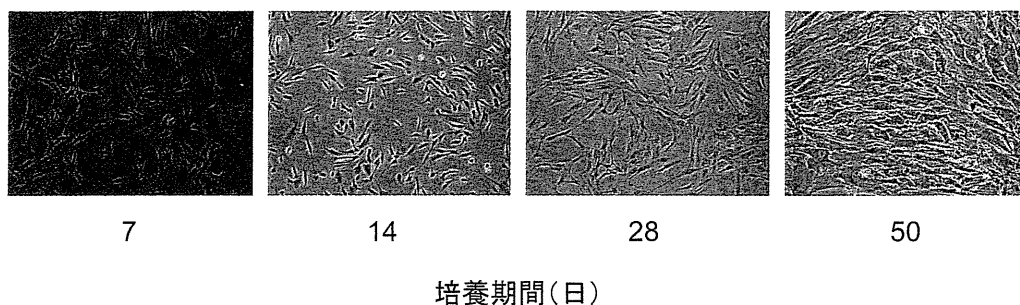


図2 *in vitro* 培養中における hMSC の形態の変化

周期が停止する方向へ変化することが判明した¹⁶⁾。hMSC の *in vitro* 培養中の p16 遺伝子発現の変化は顕著なものであった。さらに、FGF-2 が *in vitro* 培養時に hMSC の TGF β 2 や p16 などの細胞周期制御因子の発現を抑えることにより TGF β シグナル伝達系を介した細胞周期や細胞老化を制御している可能性を見出した¹⁶⁾。

4.3 *in vitro* 培養期間中の間葉系幹細胞の品質評価について

再生医療製品は、患者本人または他人から細胞または組織を取り出し培養などの加工を施すが、患者に使用される際の細胞などの安全性を担保する方法の確立は最重要課題の1つである。前述のように、hMSC は *in vitro* 培養中に老化などの変化を示すが、培養前後での細胞の変化について正しく把握し、再生医療製品としての使用に妥当かどうかについて判断しなければならない。

4.3.1 *in vitro* 培養中の遺伝子発現の変化

hMSC の *in vitro* 培養中の p16 遺伝子発現の変化は顕著なものであり、無限増殖能を持つがん細胞ではほとんど発現が認められないため、がん化の1つの指標となり得るのではと着目した。しかしながら、がん細胞の中にはヒト子宮頸がん由来株化細胞である HeLa S3 のように無限増殖能を持ちながらも p16 が高発現している細胞も存在するため、p16 単独での発現解析によって幹細胞の異常な変化（がん化）を判断することには限界があると考えられる。一方、Shibata ら¹⁷⁾により、p16 遺伝子が hMSC の老化に大きく関わり、そのプロモーター領域のメチル化によってその機能（発現増加による細胞老化）が制御されていることも明らかにされている。

我々はさらに、複数のドナー由来の hMSC を用いて *in vitro* 培養期間中の遺伝子発現の変化について網羅的な検討を行ってきている。培養期間としては、実際に再生医療製品の材料として hMSC を用いる場合を想定し、妥当な期間内（多少長めに設定し50日程度）で検討した。ちなみに、間葉系幹細胞を *in vitro* で培養すると自然に形質転換（がん化）する細胞が確認されたという報告¹⁵⁾においても、その形質転換は全て培養50日以上での長期間で確認されている。培養期間3日、20日、50日で発現レベルに変化が認められなかった遺伝子を抽出し、さらに全てのドナーでの共通性から絞り込んだところ、幹細胞の自己複製制御や発がん制御に関与する c-myc, Bmi-1,

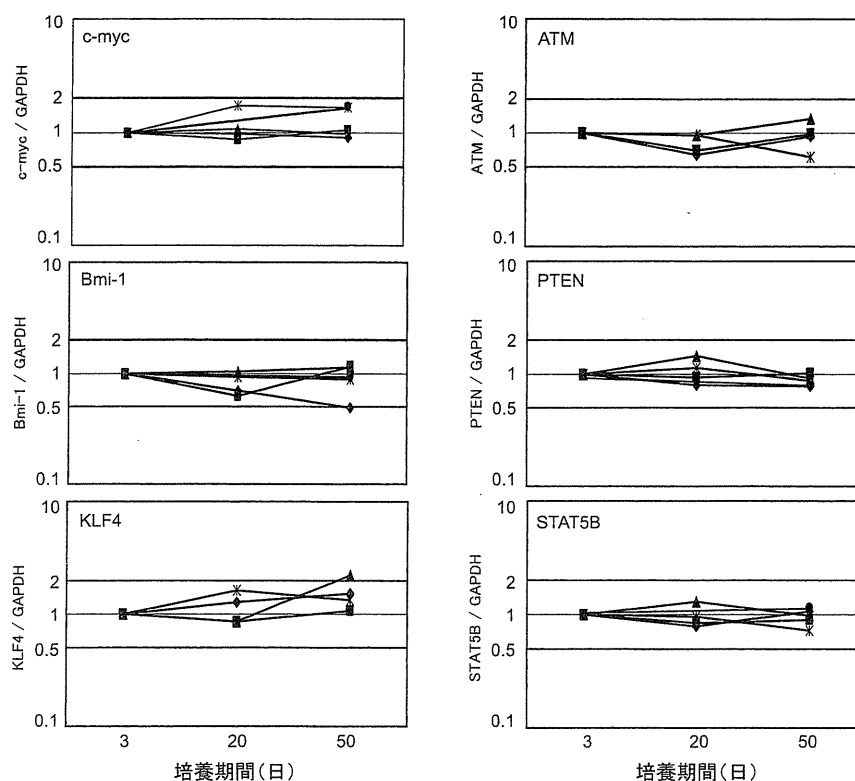


図3 hMSCの*in vitro*培養中におけるc-myc, Bmi-1, KLF4, ATM, PTEN, STAT5Bの遺伝子発現の変化
3日間培養時を1として

KLF4, ATM, PTEN, STAT5B などが見出された。定量的リアルタイム PCR にて発現レベルを測定したところ、いずれも複数のドナーに共通して培養期間50日以内の発現レベルにほとんど変化がないことが確認された(図3)。このことから、上記の遺伝子の mRNA 発現レベルは50日間の培養の前後において通常は有意な変化が見られないと考えられ、もしも培養前後において発現レベルに大きな差が見られた場合には細胞の培養中に何か変化が起こった可能性が示唆される。以上の結果から、*in vitro* 培養前後における上記遺伝子の発現を確認することは、培養中の細胞の変化を探る1つの判断基準となり得るかもしれない。幹細胞の培養過程における安全性について、遺伝子発現の確認など簡便に評価できる系の確立をめざして、現在もさらなる検討を続けている。

4.3.2 FISH による染色体異常解析

hMSCの*in vitro*での培養中における染色体異常解析について検討するために、c-mycをターゲットとして遺伝子発現解析と同時にFISHによるコピー数異常解析を行った¹⁸⁾。図4に5ドナー由来のhMSC(hMSC-A~E)を用いてc-mycのmRNA発現レベルと染色体レベルでの変化について検討した結果を示した。hMSC-A~Dでは、培養50日以内におけるc-mycのmRNA

第1章 再生医療製品の許認可について

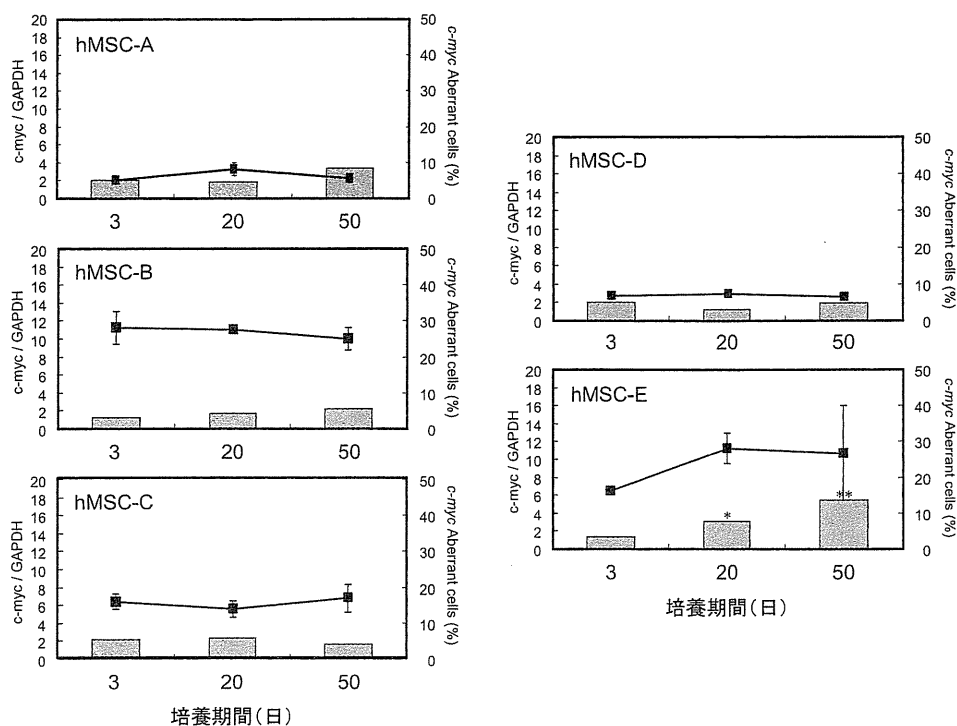


図4 hMSCの*in vitro*培養中におけるc-mycの遺伝子発現レベルと染色体レベルでの変化¹⁸⁾

** $p < 0.01$, * $p < 0.05$: 3日間培養と比較して

発現レベルとコピー数には有意な変化は認められなかった。一方、hMSC-Eにおいては、c-myc コピー数異常細胞率が培養日数の経過に伴い有意に増加していたが、mRNA レベルについては増加傾向が見られるものの統計学的には有意な差は認められなかった。このことから、染色体レベルでの異常細胞率が15%程度（つまり正常細胞が85%程度と数としては異常細胞よりかなり多く含まれている状態）の細胞では、mRNA 発現レベルにおいて有意な変化を検出するのは難しい可能性が示される一方で、hMSCの培養中の変化についての観察の手法としてFISHによる染色体異常解析の有用性が示された。

4.3.3 様々な培養条件が細胞に与える影響

*in vitro*での様々な細胞培養条件は、幹細胞の性質に影響を及ぼす。用いる培養液の種類もその1つであろう。再生医療製品に用いるための間葉系幹細胞の培養には一般的に牛血清または自家ヒト血清が培地に添加されるが、牛血清使用による病原性ウイルスやプリオンなどの混入の危険性やヒト血清使用のための患者への身体的負担などの回避のために無血清培地を用いる方法も検討されており、間葉系幹細胞の増殖培養に適した無血清培地も研究開発されている^{19,20)}。そこで我々は、間葉系幹細胞の増殖培養用に開発された無血清培地 STK2を用いてhMSCに与える影響について検討したところ、牛胎児血清を用いた従来の培地2種と比較してSTK2を用いた培養によってhMSCの増殖能が高まることを確認した²¹⁾。さらに、培養50日以内のhMSCの遺伝

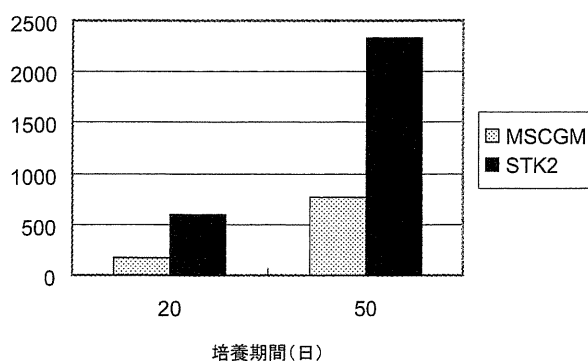


図5 hMSCの*in vitro*培養開始時における遺伝子発現レベルと比較して有意に変化した遺伝子数

MSCGM：牛胎児血清を10%含むhMSC増殖用培地

STK2：hMSC増殖用無血清培地

子発現の変化について網羅的に解析した。培養開始時と比較して20日後と50日後の遺伝子発現が有意に変化した遺伝子数は、培養20日および50日ともにSTK2の方が多く、培養50日では2,000以上の遺伝子の発現レベルが培養開始時と比較して有意に変化した(図5)。有意に発現が変化した遺伝子について解析したところ、IGF-1, FGF, TGF- β , EGF, HGF, PDGF, MYC, JUN, SMAD3, TP53など、様々な成長因子や細胞増殖または細胞周期などに関わる遺伝子の発現が変化しており、多くのシグナル伝達系がSTK2培養によって変化していた²²⁾。無血清培地STK2は、短期間で多くのhMSCを得られるという利点はあるが、より多くの細胞を得るために培養期間を延長した場合には細胞の性質が変化する可能性についても注意を払う必要がある。

細胞培養条件の1つとして、酸素濃度にも着目した。通常の培養条件では大気中の酸素濃度と同様に20%であるが、生体内における酸素濃度は2~5%であると言われている。そのため、通常の培養条件では酸化ストレスを受けている可能性も否定できず、その影響で培養期間が長くなるにつれて増殖能が低下し細胞が老化するのかもしれない。そこで、hMSCを通常の培養条件(20% O₂)下と生体内環境に近い培養条件(5% O₂)下でそれぞれ50日程度培養し、増殖や老化および細胞周期制御に関わる遺伝子の発現レベルなどを比較した。hMSCの増殖、DNA複製能、老化については、50日程度の培養期間中において培養中の酸素濃度による有意な違いは認められなかった。一方で、細胞周期制御に関わるp16, p21, TGF β 1, TGF β 2の遺伝子発現レベルは、20% O₂条件下においては、培養初期と比べて50日培養後にはいずれも上昇したが、5% O₂条件下においてはp21, TGF β 1, TGF β 2の発現上昇が有意に抑えられ、p16も同様の傾向が見られた(図6)。また、Jinら²³⁾がhMSCを1% O₂条件下で長期培養し20% O₂条件下と比較した結果、20% O₂条件下では100日以上培養で細胞老化が認められたが、1% O₂条件下ではp16の遺伝子発現の上昇が抑えられ細胞老化を防ぐことを見出している。また、ヒトやマウスのiPS細胞の樹立の際に5% O₂条件下で行うことでその効率が改善されることも報告されている²⁴⁾。このことから、培養中の酸素濃度は様々な幹細胞の品質に影響を及ぼす重要な要素の1つ

第1章 再生医療製品の許認可について

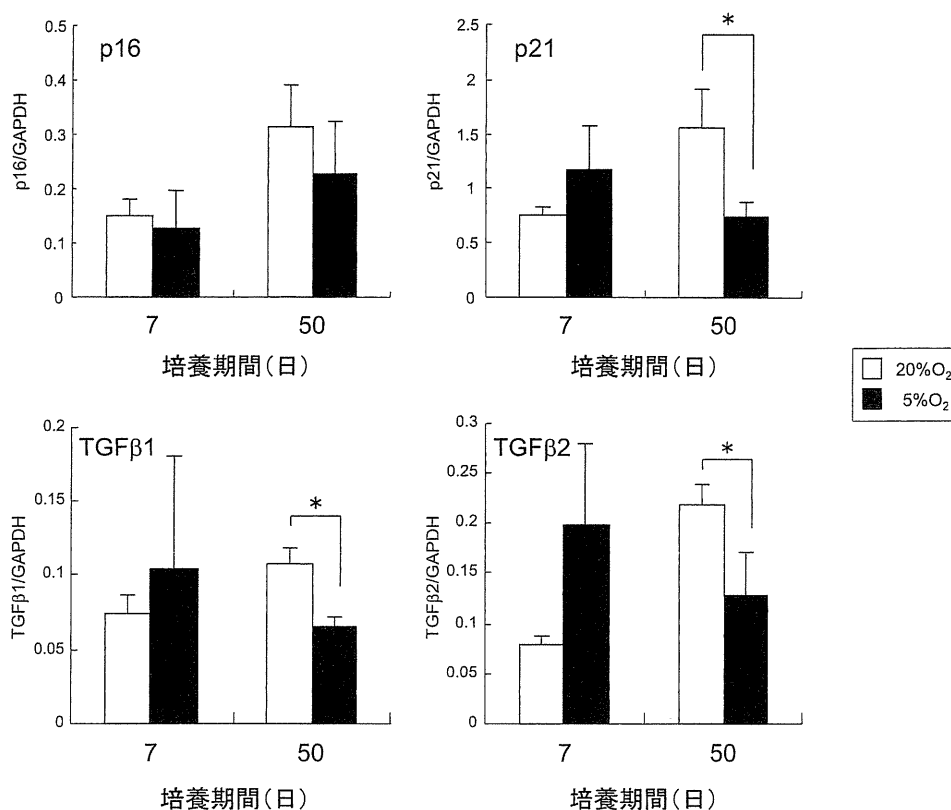


図6 hMSCのp16, p21, TGFβ1, TGFβ2のmRNA発現に及ぼす酸素濃度の影響

であると考えられる。

その他、幹細胞を再生医療製品として用いるために行う過程として凍結保存が挙げられる。特に細胞のバンク化などを目指す場合には、その凍結保存技術の安定性は細胞の品質評価に関わる重要な課題となってくる。現在は、凍結保存前後における細胞の生存率による評価が一般的であるが、今後は増殖能や分化能などを含めた細胞の品質について総合的に評価できる試験系の開発が必要となってくるであろう。

4.4 免疫不全動物を用いた造腫瘍性試験への取り組み

造腫瘍性試験のガイドラインとして、ICH-Q5D（生物薬品製造用細胞基材の由来、調製および特性解析についてのガイドライン）やWHO-TRS878が参考とされる場合が多いが、WHO-TRS878の2010年7月の改正案では、患者に移植する動物由来生細胞および細胞・組織利用製品の原料となる細胞は「対象外」とであるとされ、現段階では、再生医療製品を対象とした造腫瘍試験のガイドラインは実質存在しないと考えられる。それをふまえた上で、我々がこれまでに免疫不全動物を用いて行った皮下移植試験について以下に紹介する。

4.4.1 ノードマウスを用いた hMSC 皮下移植試験

雄性のノードマウスを用いて背部皮下に hMSC を 3×10^6 細胞移植し、移植部位の腫瘍形成について16週間観察した。ポジティブコントロールとしてヒト子宮頸がん由来の HeLa S3を用いて比較検討した。それぞれの細胞を移植して1週間後に、HeLa S3群では全てのマウスに腫瘍形成が認められたが、hMSC 群では腫瘍形成は認められなかった。さらに16週間後まで hMSC 移植群での腫瘍形成は認められなかった。

4.4.2 3種類の免疫不全マウスを用いた皮下移植による腫瘍形成の比較²⁵⁾

3種類の免疫不全マウス：ノードマウス (T 細胞欠損), NOD/Shi-*scid* (SCID) マウス (T および B 細胞欠損), NOD/Shi-*scid* ILsRg^{null} (NOG) マウス (T, B および NK 細胞欠損) それぞれ雄性5匹, 雌性5匹, 計10匹を用いて, 背部皮下に HeLa S3をそれぞれ 1×10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 移植し, 1×10^3 , 10^4 , 10^5 移植群は22日間, 1×10^2 移植群は43日間観察した。その結果を表1に示す。細胞移植後22日後において, ノードマウスは, 1×10^5 移植群でのみ腫瘍形成が認められたが, その形成率は10匹中8匹で80%であった。また, SCID マウスは, 1×10^4 移植群での腫瘍形成が認められたが20%であり, 1×10^5 移植群で90%であった。一方, NOG マウスでは 1×10^4 移植群では100%で, 1×10^3 移植群でも60%であった。そして, 移植後43日後までに, 1×10^2 移植群でも60%のマウスで腫瘍形成が認められた。さらに, 10^1 移植群でも78日後までに 5/10 (50%) の腫瘍形成が確認されている²⁵⁾。このように, NOG マウスはがん細胞の皮下移植による腫瘍形成について他の免疫不全マウスよりも感受性が高いことがわかり, より少ない細胞数, 観察期間

表1 ノードマウス, SCID, NOG マウスに HeLa S3を移植した際の腫瘍形成について²⁵⁾

* $p < 0.05$: SCID マウスと比較して, ** $p < 0.01$: ノードマウスと比較して, # $p < 0.05$: ノードマウスおよび SCID マウスと比較して, ## $p < 0.01$: ノードマウスおよび SCID マウスと比較して

細胞数	性	腫瘍形成が認められたマウス数 (%)		
		ノードマウス	SCID	NOG
1×10^2	雄	—	0/ 5 (0%)	3/ 5 (60%)
	雌	—	0/ 5 (0%)	3/ 5 (60%)
	全	—	0/10 (0%)	6/10 (60%) *
1×10^3	雄	0/ 5 (0%)	0/ 5 (0%)	3/ 5 (60%)
	雌	0/ 5 (0%)	0/ 5 (0%)	3/ 5 (60%)
	全	0/10 (0%)	0/10 (0%)	6/10 (60%) #
1×10^4	雄	0/ 5 (0%)	2/ 5 (40%)	5/ 5 (100%) **
	雌	0/ 5 (0%)	0/ 5 (0%)	5/ 5 (100%) ##
	全	0/10 (0%)	2/10 (20%)	10/10 (100%) ##
1×10^5	雄	5/ 5 (100%)	5/ 5 (100%)	—
	雌	3/ 5 (60%)	4/ 5 (80%)	—
	全	8/10 (80%)	9/10 (90%)	—

第1章 再生医療製品の許認可について

で試験を行うことができる可能性が示された。

4.5 おわりに

2007年の iPS 細胞をはじめ2010年の Muse 細胞など、世界初で「日本発」の新しい技術が次々と開発され、その再生医療への応用が大いに期待されている。しかしながら、その新しさ故にその評価法が未だ定まっていない部分もあることも否定できない。特に、生きた細胞を治療に用いる際にはその安全性の担保が必須となってくる。本節では、再生医療製品に使用される間葉系幹細胞の安全性評価法の確立に向けての我々の取り組みについていくつか紹介した。

ヒト由来の細胞・組織を加工した医薬品または医療機器の品質および安全性を確保するための基本的な技術要件は、平成20年2月8日付け薬食機発第0208003号厚生労働省医薬食品局長通知および平成20年9月12日付け薬食機発第0912006号厚生労働省医薬食品局長通知に定められており、両通知を含めた現在の我が国における規制については前節までを参照されたい。また、ヒト間葉系幹細胞を加工した医薬品または医療機器について対象疾患別に作成された評価指標の内容については、次節にてその詳細が紹介されているので参考にして頂きたい。

文 献

- 1) Y. Kurokawa, M. Kitada, S. Wakao, K. Nishikawa, Y. Tanimura, H. Makinoshima, M. Goda, H. Akashi, A. Inutsuka, A. Niwa, T. Shigemoto, Y. Nabeshima, T. Nakahata, Y. Nabeshima, Y. Fujiyoshi and M. Dezawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 8639 (2010)
- 2) K. Takahashi, K. Tanabe, M. Ohnuki, T. Ichisaka, K. Tomoda, S. Yamanaka, *Cell*, **131**, 1 (2007)
- 3) Y. Jiang, B. N. Jahagirdar, R. L. Reinhardt, R. E. Schwartz, C. D. Keene, X. R. Ortiz-Gonzalez, M. Reyes, T. Lenvik, T. Lund, M. Blackstad, J. Du, S. Aldrich, A. Lisberg, W. C. Low, D. A. Largaespada and C. M. Verfaillie, *Nature*, **418**, 41 (2002)
- 4) N. Rosenthal, *N. Engl. J. Med.*, **349**, 267 (2003)
- 5) M. Korbling and Z. Estrov, *N. Engl. J. Med.*, **349**, 570 (2003)
- 6) K. Hishikawa, S. Miura, T. Marumo, H. Yoshioka, Y. Mori, T. Takato and T. Fujita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 1103 (2004)
- 7) E. M. Horwitz, P. L. Gordon, W. K. K. Koo, J. C. Marx, M. D. Neel, R. Y. McNall, L. Muul and T. Hofmann, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8932 (2002)
- 8) B. E. Petersen, W. C. Bowen, K. D. Patrene, W. N. Mars, A. K. Sullivan, N. Murase, S. S. Boggs and J. S. Greenberger, *Science*, **284**, 1168 (1999)
- 9) A. A. Mangi, N. Noiseux, D. Kong, H. He, M. Rezvani, J. S. Ingwall and V. J. Dzau, *Nat. Med.*, **9**, 1195 (2003)

- 10) B. E. Strauer, M. Brehm, T. Zeus, M. Kosterling, A. Hernandez, R. V. Sorg, G. Kogler and P. Wernet, *Circulation*, **106**, 1913 (2002)
- 11) S. Kern, H. Eichler, J. Stoeve, H. Kluter and K. Bieback, *Stem Cells*, **24**, 1294 (2006)
- 12) R. Pardal, M. F. Clarke and S. J. Morrison, *Nat. Rev. Cancer*, **3**, 895 (2003)
- 13) D. Rubio, J. Garcia-Castro, M. C. Martin, R. Fuente, J. C. Cigudosa, A. C. Lloyd and A. Bernad, *Cancer Res.*, **65**, 3035 (2005)
- 14) R. Fuente, A. Bernad, J. Garcia-Castro, M. C. Martin and J. C. Cigudosa, *Cancer Res.*, **70**, 6682 (2010)
- 15) G. V. Røsland, A. Svendsen, A. Torsvik, E. Sobala, E. McCormack, H. Immervoll, J. Mysliwicz, J.-C. Tonn, R. Goldbrunner, P. E. Lønning, R. Bejerkvig, and Schichor, *Cancer Res.*, **69**, 5331 (2009)
- 16) T. Ito, R. Sawada, Y. Fujiwara, Y. Seyama, and T. Tsuchiya, *Biochem Biophys Res Commun.*, **359**, 108 (2007)
- 17) K. R. Shibata, T. Aoyama, Y. Shima, K. Fukiage, S. Otsuka, M. Furu, Y. Kohno, K. Ito, S. Fujibayashi, M. Neo, T. Nakayama, T. Nakamura, and J. Toguchida, *Stem Cells*, **25**, 2371 (2007)
- 18) R. Sawada, A. Matsuoka, Y. Matsuda and T. Tsuchiya, *YAKUGAKU ZASSHI*, **128**, 1851 (2008)
- 19) F. Mannello and G. A. Tonti, *Stem Cells*, **25**, 1603 (2007)
- 20) C.-H. Liu, M.-L. Wu, S.-M. Hwang, *Biochem. Eng. J.*, **33**, 1 (2007)
- 21) I. Ishikawa, R. Sawada, Y. Kato, K. Tsuji, J. Shao, T. Yamada, R. Kato and T. Tsuchiya, *YAKUGAKU ZASSHI*, **129**, 381 (2009)
- 22) R. Sawada, T. Yamada, T. Tsuchiya and A. Matsuoka, *YAKUGAKU ZASSHI*, **130**, 1387 (2010)
- 23) Y. Jin, T. Kato, M. Furu, A. Nasu, Y. Kajita, H. Mitsui, M. Ueda, T. Aoyama, T. Nakayama, T. Nakamura and J. Toguchida, *Biochem Biophys Res Commun.*, **391**, 1471 (2010)
- 24) Y. Yoshida, K. Takahashi, K. Okita, T. Ichisaka and S. Yamanaka, *Cell Stem Cell*, **5**, 237 (2009)
- 25) K. Machida, H. Suemizu, K. Kawai, T. Ishikawa, R. Sawada, Y. Ohnishi and T. Tsuchiya, *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 123 (2009)

5 次世代医療機器評価指標作成事業—再生医療分野—

松岡厚子*¹，澤田留美*²，加藤玲子*³

5.1 はじめに

疾病の治療法は、各種技術革新に伴う新規医薬品および新医療機器の開発によって、飛躍的な進歩を遂げている。加えて、ここ10年間では、生きている細胞を使って、ヒトの失われた構造または機能の代替を行う治療法が現実のものとなってきた。いわゆる再生医療である。

再生医療で使用される製品（細胞・組織加工製品）という観点から見ると、生きている細胞からのみ構成される製品だけではなく、各種医用材料と組み合わせて構成される製品も考えられる。従来、医薬品あるいは医療機器とは多くの点で異なる製品である。

当該製品が薬事法の規制に該当する製品か否かについては、使用細胞の由来、製品の適用範囲などによって議論のあるところであるが、本節では、生きているヒト細胞を含む細胞・組織加工製品を薬事法のもとで規制する（患者への使用にあたって、承認審査を要する）必要がある場合について、行政の一施策を紹介する。当該施策は、経済産業省と厚生労働省の合同事業の一部であり、最初に合同事業の概要を、その後、厚生労働省側の分担（次世代医療機器評価指標作成事業）のうち再生医療分野について紹介する。

5.2 合同検討会（医療機器開発ガイドライン評価検討委員会（経済産業省）および次世代医療機器評価指標検討会（厚生労働省））の概要

医療機器の開発の特徴は、その基盤技術の多様性、開発・改良のスピードの速さなどがあげられるが、この特徴に応じた薬事法における承認審査制度を確立することが、有用性の高い医療機器をいち早く患者に届けるために必要である。このため、数年後に実用化が期待される新しい医療機器（次世代医療機器）を対象として、開発の迅速化および薬事審査の円滑化を目指して、平成17年度より経済産業省と厚生労働省が合同で検討会を開始した。両省が合同で検討することにより、医療機器の開発段階から承認審査までを見通した、医療現場への迅速な導入を目指したものである。

具体的には、(独)産業技術総合研究所が事務局を務める開発作業部会（開発 WG）と、国立医薬品食品衛生研究所が事務局を務める審査作業部会（審査 WG）が、それぞれ専門家を集めた WG を運営し、前者は「医療機器開発ガイドライン」を、後者は「次世代医療機器評価指標」を作成する。合同検討会では、実現可能性や臨床現場におけるニーズなどに着目して対象となる医療機器を選定し、対象機器について両 WG が作成したガイドラインなどを承認する。承認された医療機器開発ガイドライン（以下、開発ガイドライン）は経済産業省の HP にて公開され、承認さ

* 1 Atsuko Matsuoka 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 部長

* 2 Rumi Sawada 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 第三室 室長

* 3 Reiko Kato 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 主任研究官

れた次世代医療機器評価指標（以下、評価指標）は厚生労働省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室長通知として発出されている。

5.2.1 開発 WG

経済産業省の委託を受けて、(株)産業技術総合研究所が、事務局を担当している。開発 WG の委員構成は、医学系学会、工学系学会および関連企業からの専門家である。今後実用化が期待される先進的な医療機器について、医療機器開発や薬事審査の円滑化・迅速化に資する医療機器開発ガイドラインを厚生労働省との連携の下、産学の協力を得て策定している。

これまでに、12件の開発ガイドラインが作成されており¹⁾、再生医療に関連するものは3件ある。

作成した開発ガイドラインの国際標準化も、製品の国際市場での実用化に向けた開発 WG の活動の1つである。

5.2.2 審査 WG

厚生労働省の担当部局である医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室からの委託（次世代医療機器評価指標作成事業）を受けて、国立医薬品食品衛生研究所医療機器部が事務局を担当している。

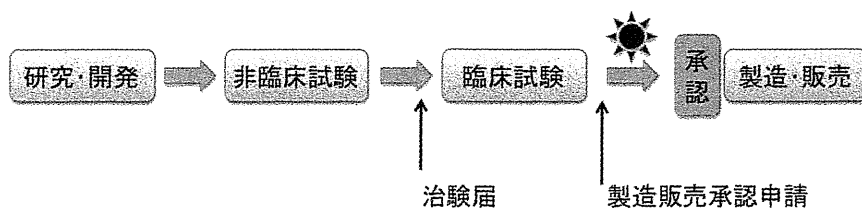
審査 WG の委員構成は主に大学の臨床医からなり、平成17年度から平成22年度までに、のべ21の WG を立ちあげ、そこにはのべ147名の委員に参画いただいた。承認前例のない次世代医療機器では審査側の審査経験も乏しく、画期的な新医療機器の発展を妨げずに審査の迅速化に資する評価指標を作成するために、柔軟に議論をかわしている。審査の迅速化という観点から、どの事項が審査のクリティカルパスになるか、非臨床から臨床への移行に際してどのようなエンドポイントを確認しておく必要があるか、に着目して評価指標を作成している。医療機器全体を対象としており、その中の1分野として細胞・組織加工製品を扱っている。これまでに、14件の評価指標を発出してきており、再生医療関連では5件の評価指標がある。


ところで、医療機器は、不具合が生じた場合の人体へのリスクの程度に応じて、I（リスクが極めて低い）からIV（生命の危険に直結するおそれがある）までの4段階に分類されている。製造販売規制も、クラスに応じて届け出（クラスI）、認証（クラスII）、承認（クラスIIIおよびIV）と、異なる。認証、承認過程では、審査の透明性、公平性を保つためにそれぞれ、認証基準、承認基準が作成され、それに従って審査を行う。しかし、承認前例のない次世代医療機器（審査時には新医療機器となる）では、該当する基準などはなく、審査が遅滞する原因の1つともなり得る。そこで、次世代医療機器の審査の道しるべとして、評価指標は作成されている。図1の上部に、医療機器の開発から製造・販売までに関連する薬事の流れを簡単に示している。評価指標は、次世代医療機器の承認審査で活用されることが期待されるものである。

通知「次世代医療機器評価指標の公表について」には、以下の記載がある。

「評価指標とは、承認申請資料の収集やその審査の迅速化の観点から、製品の評価において着目すべき事項（評価項目）を示すものである。評価指標は、法的な基準という位置付けではなく、

第1章 再生医療製品の許認可について



 医療機器の審査

医療機器		審査基準など
一般医療機器	クラスI	なし（承認・認証不要）
管理医療機器	クラスII	認証基準（JIS規格）
高度管理医療機器	クラスIII, IV	承認基準（JIS規格）
新医療機器（次世代）		評価指標

図1 評価指標はどこで使われるか？

技術開発の著しい次世代医療機器を対象として現時点で考えられる評価項目を示したものであり、製品の特性に応じて、評価指標に示すもの以外の評価が必要である場合や評価指標に示す評価項目のうち適用しなくてもよい項目があり得ることに留意すること。

加えて、評価指標は、医療機器の開発者にとっても審査での評価項目がわかれば、その項目に注意して機器の設計、開発を行えばよく、開発の迅速化にも寄与すると考えられる。

医療機器は多種多様であり、評価指標に記載される「評価にあたって留意すべき事項」も機器によって大きく変わる。評価指標を踏まえて、審査側がどのように審査したかは、PMDAのHPに掲載されている審査報告書²⁾が参考になる。国産の植込み型補助人工心臓2件が同時に、平成22年12月8日に製造販売承認を取得したが、この承認を後押しした要因の1つが、「次世代型高機能人工心臓の臨床評価に関する評価指標」³⁾で、審査の迅速化に寄与したものと考えられる。現在承認審査中の自家培養軟骨では、「関節軟骨再生に関する評価指標」⁴⁾が参考となると思われる。

5.2.3 これまでに公開された医療機器開発ガイドラインおよび発出された次世代医療機器評価指標（平成23年12月現在）

(1) 医療機器開発ガイドライン¹⁾

- ① 再生医療分野
 - ヒト細胞培養加工装置についての設計ガイドライン
 - 除染パスボックス設計ガイドライン
- ② 整形外科分野
 - ハイブリッド型人工骨・骨補填剤
 - 次世代（高機能）人工股関節

再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み

- カスタムメイド骨接合材料
 - ③ 神経外科分野
 - 植込み型神経刺激装置
 - ④ 胸部外科分野
 - 高機能人工心臓システム
 - ⑤ ナビゲーション医療
 - ナビゲーション医療分野共通
 - 骨折整復支援システム
 - 脳腫瘍焼灼レーザスキャンシステム
 - ナビゲーション医療機器の位置的性能の品質担保
 - ⑥ 体外診断装置
 - DNA チップ
- (2) 次世代医療機器評価指標
- ① 再生医療分野
 - 重症心不全細胞治療用細胞シート⁵⁾
 - 角膜上皮細胞シート⁵⁾
 - 角膜内皮細胞シート⁶⁾
 - 関節軟骨再生⁴⁾
 - 歯周組織治療用細胞シート⁷⁾
 - ② 整形外科分野
 - 整形外科用骨接合材料カスタムメイドインプラント⁴⁾
 - 整形外科用カスタムメイド人工股関節⁷⁾
 - ③ 神経外科分野
 - 神経機能修復装置⁴⁾
 - ④ 胸部外科分野
 - 次世代型高機能人工心臓の臨床評価³⁾
 - ⑤ ナビゲーション医療
 - 骨折整復支援装置⁵⁾
 - 関節手術支援装置⁵⁾
 - 軟組織に適用するコンピュータ支援手術装置⁶⁾
 - コンピュータ診断支援装置⁷⁾
 - ⑥ 体外診断装置
 - DNA チップを用いた遺伝子型判定用診断薬³⁾

5.3 再生医療分野の評価指標

これまでに再生医療分野では、5件の評価指標を発出してきている。5件の対象製品の共通点は生きているヒト細胞をその構成に含み、全体としてある形状を呈しているということである。したがって、「ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」⁸⁾（以下「ヒト自己指針」という。）および「ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針」⁹⁾（以下「ヒト同種指針」という。）が評価指標運用の基本となっている。5件の評価指標すべてにおいて、「1. はじめに」には、「ヒト自己指針」および「ヒト同種指針」に記載の技術要件に加えて、当該製品特有の留意すべき事項を示している、という共通の記載がある。また、「3. 本評価指標の位置付け」も、「細胞・組織加工医療機器の種類や特性、臨床上の適用法は多種多様であり、また本分野における科学的進歩や経験の蓄積は日進月歩であることから、本評価指標が必要事項すべてを包含しているとみなすことが必ずしも適切でない場合もある。」という記載は共通である。

使用細胞については、現時点ではまだ、ES細胞、iPS細胞は対象とはしていない。

評価指標では、「評価にあたって留意すべき事項」が記載されているが、大きく3つの項目にわかれる。品質管理、非臨床試験、および臨床試験（治験）である。品質管理では、*in vitro*で実施可能な評価項目があげられ、非臨床試験では疾患モデル動物を用いる製品の有効性、安全性の確認が記載されている。これらは、5件の評価指標いずれも同程度の記載がある。しかし、臨床試験では、具体的な観察・測定項目、観察期間、臨床評価まであげたものから、具体的な記載にまで言及できなかったものまで、5件の評価指標の間でも差がある。

以下に、3件の評価指標について当該WGの活動も含め、対象製品の特色に焦点をあてて、概要を紹介する。

5.3.1 重症心不全細胞治療用細胞シート⁵⁾

平成17年度から19年度にかけて審査WGを運営し、自己骨格筋芽細胞シートに関する調査、有害事象としての不整脈について、また有害事象が起きた場合の対応についての討議から始めた。細胞としては、自己および同種を、また、骨格筋芽細胞だけでなく、間葉系幹細胞も対象とした。適応疾患は単に重症心不全とするのではなく、例えば、NYHA分類でⅢ度以上、左室駆出率35%未満、心臓移植以外に治療手段がないなど、具体的な基準を設定することを、評価指標は勧めている。

評価指標に集約した文章を作成するまでに至った過程、すなわち、それまでの各種調査報告などはWGの報告書¹⁰⁾に記載されており、そこに、評価指標にあげた、1行の項目に関連することが詳細に解説されている。例えば、平成18年度の報告書には、以下の3件の調査報告が掲載されている。

- ① 細胞シート製造過程について
- ② 細胞シートにかかる動物実験に関する指針
- ③ 臨床段階（移植後、有効性など）について

評価指標にある「催不整脈性の評価」, 「心機能, 血流評価」, 臨床試験における「被験者心筋と細胞シートの細胞間の適切な電氣的結合の欠如等による不整脈の誘発」などの, 心筋に特化した留意点は, これら調査報告書に解説されている。

細胞シートの作製を, 温度応答性培養皿を用いることを前提として討議を開始したため, 温度応答性培養皿そのものについての留意事項を, WGの平成19年度報告書に記載した。

5.3.2 関節軟骨再生⁴⁾

平成21年度に審査WGを運営した。関節軟骨の変性を主体とする病変である変形性関節症の潜在患者数は全世界で数千万人とも推定され, 本症による中高年者の日常生活動作(ADL)や生活の質(QOL)の低下は大きな社会問題となりつつあり, 軟骨の有効な治療法の開発が急務であるという背景のもとに活動した。

本評価指標では, 損傷関節軟骨などの治療を目的として適用される製品を対象とし, 使用細胞は自己および同種とも, ヒト軟骨細胞および間葉系幹細胞を対象とした。

軟骨再生に関する当時の世界の動向をふまえつつ, FDAの文書「Guidance for Industry Preparation of IDEs and INDs for Products Intended to Repair or Replace Knee Cartilage」や EMEAの文書「Assessment Report for ChondroCelect and Annex I」などを参考にした。実施した調査については, 以下の表題で報告書¹⁰⁾に記載した。

- ① 関節軟骨再生評価指標調査報告
- ② 関節軟骨再生製品についての生体適合性を含めた生物学的安全性評価の考え方
- ③ Mechanical testing (侵襲的方法も含む評価法全般) について
- ④ 実験動物・疾患モデルの選択について
- ⑤ 臨床研究に関する報告

評価指標には, 損傷関節軟骨などの治療目的であることから, 製品に必要とされる特有の項目として「力学的適合試験」があげられている。最終製品の態様によっては, 力学特性を, 耐荷重性, 摺動特性, 粘弾性などについて評価する必要がある場合があることが記載されている。さらに「細胞の造腫瘍性・過形成」の項において, 免疫不全動物における腫瘍形成能試験において, 移植した細胞が体内で軟骨を形成した場合も一見, 腫瘍のように見えることがあるので, 形態的特徴だけでなく組織病理学的特徴による評価も検討すること, という記載がある。

5.3.3 歯周組織治療用細胞シート⁷⁾

平成22年度に審査WGを運営した。本評価指標では, 歯周組織破壊を伴う歯周疾患(歯周炎)などの治療を目的として適用されるヒト骨膜細胞加工医療機器, ヒト歯根膜細胞加工医療機器, ヒト骨髄由来間葉系幹細胞加工医療機器およびヒト脂肪由来間葉系幹細胞加工医療機器のうち細胞シート状の製品(支持体が含有された製品を含む)を対象とした。使用細胞としては, 自己および同種を対象とした。

委員会には, 骨膜シート, 歯根膜シートおよび細胞やサイトカインを利用した歯周病治療の開発に携わっておられる臨床の先生方にご参加いただき, 複数の視点から討議いただいた。その結

第1章 再生医療製品の許認可について

果、評価指標の「用語の定義」には、10件の用語（歯周組織、硬組織、歯周基本治療、細胞シート、支持体、組織付着療法、臨床的アタッチメントゲイン、歯槽骨、プロービングデプスおよび歯肉退縮）が掲載されているが、歯周病学会用語集から抜萃したものを、委員に一般向けに加筆修正していただいたものである。「非臨床試験」の項では、歯周組織治療用細胞シートの有効性評価のための欠損モデルとして大型動物が用いられることが記載されている。その有効性評価は、X線のらびに組織学的に歯槽骨、歯根膜、セメント質の形態計測などによることが記載されている。また、臨床試験の評価項目については、複数の具体的な項目が委員より提案され、討議された。委員全員の合意を得られた評価項目は評価指標の本文に、また、それ以外の項目については、評価指標 6. 参考情報 の項に Appendix として掲載され、「臨床試験（治験）」の項は充実した記載となっている。

一方、報告書には、以下の6件の調査報告を掲載した。

- ① 歯科再生治療の現状：組織修復と臓器置換型再生治療
- ② 骨の再生について
- ③ 歯周組織再生治療における細胞移植について
- ④ 自己骨髄幹細胞移植による歯周組織再生治療と課題について
- ⑤ リコンビナントサイトカインを用いた歯周組織再生誘導
- ⑥ 細胞シートの内外の動向について

上記3件も含めて、細胞・組織加工製品の臨床研究の実施にあたっては、「ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針」¹¹⁾の対象となる可能性が高く、研究体制、細胞調製、移植、および倫理などについてこの指針を遵守する必要がある。ただし、この指針は、薬事法における治験は対象外としている。

5.4 細胞・組織加工製品の实用化のための今後の課題

細胞・組織加工製品の薬事規制のうち、(独)医薬品医療機器総合機構（PMDA）の「確認申請」制度は平成23年6月に廃止され、平成23年7月より開設された「薬事戦略相談」¹²⁾に包含される形になった。薬事戦略相談は、大きく医薬品、医療機器、細胞・組織加工製品の3つにわけられている。

表1は、これまで確認申請を終了した製品の一覧である。全9件のうち5件は医薬品に、4件は医療機器に分類された。製品がどちらに該当するかは厚労省医薬食品局審査管理課医療機器審査管理室に相談することを、評価指標は勧めている。製品中の細胞が産生するサイトカインなどによる効能効果を謳う場合には医薬品へ、物理的に治療部位に留置されることが使用目的の場合は医療機器に振り分けられるようである。いずれに振り分けられても、細胞・組織加工製品はPMDA生物系審査第二部を中心に審査が行われる。

参考までに、医薬品の審査手数料は、最も高額な例（新医薬品）で30,347,700円、医療機器の審査手数料は最も高額な例（新医療機器、クラスⅣ）で9,370,000円である¹³⁾。

再生医療製品の許認可と組織工学の新しい試み

表1のうち、現在までに、製造・販売承認取得に至った製品は、J-TEC社の自家培養表皮だけである。同社の自家培養軟骨は、現在承認審査中である。自己活性化樹状細胞2件は、事業中止が伝えられている。

一方、海外に目を転じてみると、平成22年10月から、世界で初めて、ES細胞による脊髄損傷の臨床試験を始めた米国バイオ企業ジェロン社がある。しかし、同社は平成23年11月15日に、その中止を発表した。新聞からの情報をまとめると、副作用（有害事象）が認められたわけではないが、治療効果（有効性）も認められなかったとのことである。

生きている細胞をその構成に含む細胞・組織加工製品は、厳密に言えばその性状は刻々と変化している。従来の医薬品、医療機器とは、明らかに異なる。その実用化には、従来の医薬品、医療機器よりもさらに高いハードルがあるようにも思える。

細胞・組織加工製品の開発を妨げず、かつ有効性、安全性を確保するための規制のあり方は？自己および同種製品の安全性評価は、全く同じ基準で行う必要があるのか。いいかえれば、自己製品について、同種製品に対するのと同程度の厳密さが要求されるべきか？など。これらを解決するには、日本再生医療学会をはじめとする関連学会、産業界および行政が連携してその道筋を

表1 細胞・組織加工医薬品等の確認申請終了製品

平成23年2月現在

製品	適用	申請者	分類	申請日	確認終了日
自己活性化樹状細胞	前立腺癌	キリン	医薬品	H12.10.24	H13.10.30
自己活性化樹状細胞	多発性骨髄腫	キリン	医薬品	H12.10.24	H13.10.30
自家培養表皮	重篤な広範囲熱傷	J-TEC	医療機器	H12.12.18	H14.3.26
自家培養軟骨	関節軟骨損傷	J-TEC	医療機器	H13.9.7	H16.2.19
自家培養皮膚	皮膚欠損創を有する重症熱傷	BCS (→セルバンク)	医療機器	H15.3.15	H20.1.22
自家骨格筋芽細胞	左室梗塞巣を有する虚血性心疾患	テルモ	医薬品	H16.6.25	H18.4.28
同種間葉系幹細胞	移植片対宿主病(GVHD)*	JCR	医薬品	H16.6.25	H19.6.21
他家培養角膜上皮細胞シート	角膜上皮幹細胞疲弊症	アルプラスト	医療機器	H20.3.28	H21.6.25
自家骨格筋芽細胞シート	重症心不全	テルモ	医薬品	H22.1.29	H23.1.31

* 骨髄移植に代表される造血幹細胞移植時の合併症

第1章 再生医療製品の許認可について

整備する必要がある、今後の各方面の協力が期待される。

評価指標は、PMDAでの承認審査時の道しるべとして作成しているが、開発担当者も審査での評価項目がわかれば、その項目に注意して機器の開発、設計を行えばよく、開発の迅速化につながる。また、PMDAでの各種相談時、あるいは臨床医がヒト幹細胞を用いる臨床研究を開始する時にも利用されていると聞いている。将来的には、これから申請されてくる製品の審査過程からのフィードバックなどを得て、各評価指標をより充実させることも検討したい。

文 献

- 1) http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/service/iryoku_fukushi/index.html
- 2) <http://www.info.pmda.go.jp/approvalSrch/ApprovalSrch>
- 3) 平成20年4月4日付け薬食機発第0404002号
- 4) 平成22年12月15日付け薬食機発1215第1号
- 5) 平成22年1月18日付け薬食機発0118第1号
- 6) 平成22年5月28日付け薬食機発0528第1号
- 7) 平成23年12月7日付け薬食機発1207第1号
- 8) 平成20年2月8日付け薬食発第0208003号厚生労働省医薬食品局長通知
ヒト（自己）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針
- 9) 平成20年9月12日付け薬食発第0912006号厚生労働省医薬食品局長通知
ヒト（同種）由来細胞・組織加工医薬品等の品質及び安全性の確保に関する指針
- 10) 次世代医療機器評価指標作成事業；<http://dmd.nihs.go.jp/jisedai/>
- 11) 平成22年厚生労働省告示第380号 ヒト幹細胞を用いる臨床研究に関する指針
- 12) 薬事戦略相談；<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/consult/yakujisenryaku.html>
- 13) 審査等手数料；<http://www.pmda.go.jp/operations/shonin/info/fee.html#1>

デラミネーション破壊の再現と内部クラック観察

迫田 秀行^{*1} 松岡 厚子^{*1}

Reproduction of delamination and observation of internal cracks.

Hideyuki SAKODA, Ph.D., Atsuko MATSUOKA, Ph.D.

Abstract

Delamination of ultra-high molecular weight polyethylene (UHMWPE) components, which is often found at the articulating surface of artificial knee joints and the rim of artificial hip joints, is one of the major causes of failure of artificial joints. Although we have reported the successful development of a new method to reproduce delamination, the mechanism generating delamination has not been fully understood. In this study, delamination tests were carried out and specimens were analyzed using an optical microscope and 3D measuring laser microscope in order to lead to more comprehensive understanding of the mechanism.

Virgin UHMWPE and aged UHMWPE, which had been gamma-irradiated at 25 kGy in air followed by artificial ageing, were prepared. Delamination tests were carried out using a simple reciprocating motion, sliding a distance of 10 mm, or U-shaped motion, sliding a distance of 10×1 mm against hemi-spherical pins with a radius of 3 mm under the load of 5 to 20 kg in deionized water as a lubricant at 37°C. Observation by an optical microscope, observation by a laser microscope and 3D measurement by a laser microscope were carried out periodically during the tests.

Virgin UHMWPE was delaminated by 160,000 cycles under the load of 20 kg with U-shaped motion. With simple reciprocating motion, however, there was no delamination even at the end of 1 million cycles. Aged specimens were delaminated by 100 cycles, except for one tested under a load of 5 kg with simple reciprocating motion, which had bright white spots on the articulating surface. Ordinary 3D measurement of this specimen, scanning the full range, revealed a smooth surface. These spots were internal cracks which could be observed only when the scan range was limited so that the specimen surface was not included in the scan range. From the 3D measurement, it was confirmed that the internal crack was located 70 μm beneath the articulating surface and had a width of 200 μm.

This study provides a method to know the location and size of internal cracks from direct observation and will lead to more comprehensive understanding of the mechanism generating delamination.

Key words : artificial joint, delamination, UHMWPE, fatigue, wear.

※ 1 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
〒158-8501 東京都世田谷区上用賀1-18-1

Corresponding Author : Hideyuki SAKODA, Ph.D.

National Institute of Health Sciences, Division of Medical Devices
Kamiyoga 1-18-1, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, JAPAN
Tel : 03-3700-9264 Fax : 03-3700-9196
E-mail address : sakoda@nihs.go.jp

緒 言

超高分子量ポリエチレン (UHMWPE) 製コンポーネントのデラミネーション破壊は、摩耗とならび人工関節の主要な不具合要因の一つであり、人工膝関節の摺動面や、ハイポラ型人工骨頭および人工股関節のリムで発生する^{6),7)}。デラミネーション破壊とは表面剥離とも呼ばれ、内部に発生した欠陥が疲労破壊により徐々に拡大し、やがて表面に至ることで数mm程度の巨視的な摩耗片を発生する表面の破壊形態で、数 μm 以下の微視的な摩耗粉を恒常的に産生する摩耗とはその機構や形態が異なる。近年、低摩耗化を目指した高度架橋 UHMWPE が開発され臨床においても摩耗量の減少が報告されているため、摩耗粉に起因する骨溶解などの不具合の減少が今後期待されるが、デラミネーション破壊については評価がされておらず、高度架橋 UHMWPE では疲労破壊の低下も報告されていることから、デラミネーション破壊に対する材料の特性が人工関節の長寿命化を制限する主因となる可能性がある。

しかし、摩耗試験法が国際規格^{2),3)}となり、人工関節の開発において必須の試験となっている^{4),5)}のに対し、デラミネーション破壊に関しては、試験法が確立していないこともあり、その評価はほとんど行われていない。我々はデラミネーション破壊を再現する試験法⁸⁾を提案してきたが、デラミネーションの発生機構につい

ては不明なことも多い。そこで、デラミネーション試験を行った試料をレーザー顕微鏡により観察し、デラミネーション発生機構の解明を目指した。

材料および方法

UHMWPE (GUR 1020) で $40 \times 40 \times 10\text{mm}$ の試験片を作製した。未処理試料 (virgin) と、酸化劣化した製品を模擬するため空気中で 25kGy のガンマ線照射をしたのち空気中 80°C で21日間加速酸化¹⁾した試料 (aged) を用意した。この試料を二次元摺動摩耗試験機 (株式会社エムエステック, 京都府向日市⁸⁾⁻¹⁰⁾に取り付け、半径 3mm の半球面状端面を持つコバルトクロム合金製ピンで荷重を加えた。ピンの表面粗さは $Ra < 0.05$ とし、virginは荷重 20kg で、agedは荷重 $5, 10, 20\text{kg}$ で試験した。摺動は $10\text{mm} \times 1\text{mm}$ のコの字運動⁸⁾⁻¹⁰⁾または 10mm の往復動を加えた。試験片数は各条件1個であった。潤滑液には 37°C の蒸留水を用いた。

デラミネーション発生の判定は、重量減少や表面粗さの上昇などでも行えるが、最も簡便な肉眼による方法で行った⁸⁾。100, 1000, 10000万サイクルおよびそれ以降数万サイクル毎に試験を止め、肉眼観察を行った。記録はデジタルマイクロスコープ (Keyence VH-8000C) を用いた光学顕微鏡観察で行った。また、3次元測定レーザー顕微鏡 (島津製作所 LEXT OLS 4000) を用いた、可視光による観察 (カラー像)、