

Table 7. Reactivity grades of SRM-A, SRM-B and Negative-SRM obtained from L929. Elution test using the distilled water extracts under the four kinds of extraction temperature / hours.

Ext. cond.	Grade					
	SRM-A		SRM-B		Negative-SRM	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
37°C , 24h	0	0	0	0	0	0
50°C , 72h	0	0	0	0	0	0
70°C , 24h	0	0	0	0	0	0
121°C , 1h	0	0	0	0	0	0

Ext.med. : distilled water

(L929 Cells)

Table 8. Comparison of the Reactivity Grade in L929 Elution test with the colony forming rate(%) in V79 colony assay using the same material extracts.

SRM-A	L929Cells	V79Cells
Extraction Conc.(%)	MEM Elution Test(Grade)	Colony Assay(%)
100	4	0
50	4	0
25	4	0
12.5	0	0
2.5	0	0
1.25	0	101
control	0	100

6cm²/ml(5%fcs-MEM)37°C, 24h-extraction

Table 9. Cytotoxic Potential of Materials

Materials	Cytotoxicity IC ₅₀ (%)							
	MCOassay		Colony Assay			Agar Diffusion Assay		
	Extraction Period (Days)	1	3	1	3	Zone Index	Lysis Index	
PMMA	>100	>100	>100	>100	>100	0	0	
PMMA-0.1% ZDEC	>100	100	>100	>100	>100	0	0	
PMMA-0.5% ZDBC	>100	>100	>100	>100	>100	0	0	
FA	88 ± 12	75 ± 14	>100	>100	89 ± 4	0	0	
FA-0.1% ZDEC	40 ± 5	53 ± 11	89 ± 15	89 ± 15	72 ± 4	0	0	
FA-0.5% ZDBC	72 ± 12	57 ± 12	<100	<100	88 ± 3	0	0	

MCOassay and colony assay were performed using Balb/3T3 cells in 10% FCS-MEM medium. Each value represents mean or mean ± SD.

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

医療用具の臨床試験に関する基準（GCP）に関する研究
分担研究者：上田 慶二（東京都多摩老人医療センター 名誉院長）

研究要旨 医療用具の臨床試験の実施に関する基準（医療器具 GCP）は平成4年7月に通知されているが、現在国際標準化機構（ISO）において国際協調に向けて検討がなされている。また国内においては医薬品の臨床試験については ICH GCP に基づく基準（医薬品の臨床試験の実施に際する基準、以下医薬品 GCP と記す。）が実施されているので、これらを基礎資料として医療用具の GCP のあり方について研究を行なった。

ISO において検討されている GCP と医薬品 GCP とは治験依頼者と治験責任医師の役割や文献レビューの取り扱いなどで差異が認められることが明らかになった。医薬品 GCP を医療用具に適用する場合に問題となる点は、有害事象に関しては、発生したもののみでなく、発生が予想される場合についても考慮が必要であることならびに医療器具の不具合についての記載も必要であることなどであることが示された。また医療用具 GCP の主な適用範囲は、改正される薬事法上の「高リスク医療機器」や「新規の機器」となると考えられる。

協力研究者：赤松 功也	みつわ台総合病院 顧問
伊藤 公一	日本大学医学部 教授
打田日出夫	大雄会病院 IVR センター 室長
金井 淳	順天堂大学医学部 教授
川田 志明	慶応大学医学部 教授
鈴木 博昭	東京慈恵会医科大学 客員教授
妙中 義之	国立循環器病センター 人工臓器部長
外 須美夫	北里大学医学部 教授

上野 紘機	東レ医薬・医療開発センター 理事
小野 清	ボストンサイエンティフィックジャパン 薬事部臨床開発マネジャー
中崎 知道	ジンマー株式会社 品質保証・薬事開発部 長代行
野田 義寛	テルモ研究開発センターQS チーム主任部)
山本 芳子	スリーエムヘルスケア 薬事部担当部長

A. 研究目的：

医療用具の臨床試験の実施に関する基準（医療器具 GCP）については、平成4年7月に通知され、医療用具の承認申請に添付する臨床試験についてはその遵守が求められている。現在 ISO（国際標準化機構）において医療用具 GCP の改正作業が進められていることから、ISO GCP 改正案の検討を進めるとともに、医薬品分野で採用されている GCP との差異について科学的検討を加え、わが国の医療用具 GCP をどのように改正、制定すべきかその具体案の提示を行なう。

B. 研究方法：

検討班においては、現行医療用具 GCP、ISO GCP 改正案ならびに医薬品 GCP（省令第28号）を検討資料として、平成13年9月3日、11月19日、平成14年1月21日と3月27日に計4回の検討会を開催して以下のごとき協議を行ない、結論を得た。

C. 研究結果：

1) GCP 規制における医療用具と医薬品の相違点と問題点

医薬品の臨床試験の実施については、日、米、EU が ICH GCP を用いて協調化を図っているが、医療用具については、米国が IDE、EU が EN540、わが国は通知 GCP を用いるなど差異があり、国際的に協調化を図れるか、否かが問題であり、今後の討議が注目される。

医療用具においては、治験を必要とする器具と必要としない器具があるが、その分類基準が日、米、EU の3極で異なるのが協調化に際する問題である。

新しい GCP 体制の実施に際しては、医療用具の治験審査委員会における審査に際する委員の専門性に関する問題や治験依頼企業における体制（手順書の整備、モニター、監査に対する対応など）などが問題となろう。

2) ISO 14155 草案 (ISO G 草案)と医薬品 GCP(省令第28号)との差異

ISO 14155 (案)と医薬品 GCP (省令第28号)を対比すると以下に述べる諸点において差異が認められるので、今後の検討が必要である。

ISO 草案の 3.5 ethic committee においては、委員会の構成や運営に関する規定はなく、医薬品 GCP (省令第28号) 27条-34条にみられる詳細な規定は見られない。

ISO 草案の 3.16 serious adverse device effect (重篤な有害用具作用)は医薬品 GCP 省令第28号と異なり、治験被験者またはその他の人々(検査担当医師や、技師、看護婦を含む)に対する有害作用を含んでいる。

ISO 草案 6.7.2.g)の緊急状況下におけるインフォームドコンセント取得の規定が医薬品 GCP 省令第28号 55条の規定に比し緩やかである。

ISO 草案 6.3 Clinical investigation plan では治験計画書作成の責任者が特定されていないが、医薬品 CGP (省令第28号) 第4条では治験依頼者に治験実施計画書作成などの業務に関する手順書の作成を義務づけており、また医師など業務を行なうことについて必要な専門的知識を有する者の確保を義務づけている。欧州では治験調整医師が ISO 現行医療器具 CGP の治験総括医師に近い役割を果たすので、ISO では総括報告書の作成と承認に当たることも想定されている点が問題である。

ISO 草案 6.12 Auditing, 9. Monitor ならびに part 2 4.3.4 monitoring arrangement の規定の記載が、医薬品 GCP (省令第28号)と異なる。ことにモニター報告書の内容が医薬品 GCP (省令第28号) 21条, 22条, 23条に比し詳細な規定がみられない。ISO 草案 6.13 Final report については、作成責任者が特定されておらず(医薬品 GCP 省令第28号 25条では、治験依頼者が作成するとされている)、また 11.2 では final report に治験責任医師の署名が必要とされている(医薬品 GCP 省令第28号にはその規定はない)。

ISO 草案 6.13 Final report については、作成責任者が特定されておらず(医薬品 GCP 省令第28号 25条では、治験依頼者が作成するとされている)、また 11.2 では final report に治験責任医師の署名が必要とされている(医薬品 GCP 省令第28号にはその規定はない)。

ISO 草案 part 2, 4.12 では Publication policy として論文発表の内容について治験計画書に特定することを求めているが、医薬品 GCP (省令第28号)にはかかる規定はない。

ISO 草案 part 2、4.5.1 には Literature review の項目があり、治験計画書には治験の実施を正当化し、最適な治験デザインを作成するため文献のレビューと文献リストの記載が含まれなければならないとしているが、医薬品 GCP (省令第28号)にはかかる規定はない。

3) 医薬品 GCP (省令第28号) を基礎に医療用具 GCP を検討する際の問題点

医療用具は本質が、低分子化学物質、高分子材料、金属材料、電気、磁気、光、放射線、ソフトウェアなどで構成される器具機械やバイオリジクスなどであり、化学物質である医薬品と大きく異なるため、前臨床試験の内容、治験用医療用具の管理、治験計画書やその概要書などについて異なる記載が必要であることは言うまでもない。

医療用具においては、有害事象の発生が予想される場合にも注意が必要であり、また「不具合」という用語が用いられていることに配慮して、医療用具 GCP を作成する必要があることが明らかにされた。

4) GCP の適用範囲の決定について

医療用具は多種多様であり、全ての臨床試験を医薬品なみの GCP に準拠して行なう必要もないと考えられ、可能であれば国際的に共通の GCP の適用範囲を定めることが望ましい。日本においては、医療用具のクラス分類に基づいて GCP に準拠した臨床試験の必要性を定めているが、米国では IDE にて定める低リスク デバイスの場合には、倫理委員会の承認の下で、簡略化された GCP により臨床試験が出来る制度がある。また IDE 除外規定もみられる。欧州では Literature review による CE マーク承認取得のルートがあり、治験対象となる医療

器具の種類は限定されている。

日本においては、GCP の適応範囲を平成14年以降に改正される薬事法に基づく「高リスク医療器具」ならびに「新規性の高い器具」とすることが妥当であるとされた。

D. 考察

医療用具の臨床試験については、従来より厚生省の通知の基準により規定されてきているが、医療用具の開発がグローバル化しており臨床試験の基準の国際的協調化が望まれている。

医薬品の臨床試験については、日、米、欧の3極の間で合意した ICH GCP に基づく臨床試験の実施に関する基準があり、医療用具についても国際的に ISO において臨床試験の基準の国際的協調化の活動がみられる。かかる状況下においてわが国においてもこれらの基準を踏まえ国際的に協調しうる臨床試験の実施基準の設定が望ましい。

今回研究班において、まず医薬品 GCP を基準として ISO の原案との差異を検討したが、些細な点を除きほぼ類似していることが判明した。その後医薬品 GCP を医療用具の臨床試験に適用した場合の不都合な点について検討した。医薬品が化学物質であるのに反し、医療用具はその本質が大きく変わるので、前臨床試験の内容、治験用医療用具の管理、治験計画書やその概要書などについて医療用具に適合した異なる記載が必要であるが、臨床試験の実施基準の本質的な規定につ

いては医薬品 GCP と同様な基準を適応し得ると考えられた。

今後平成 14 年に予定されている薬事法の改正により医療用具の治験のあり方の規制が変わりうるので、その新たな体制に対応し、治験依頼者にも医療機関と治験担当医師にも適応した新 GCP の設定が望まれる。

investigation
of medical devices – Part 2:
Clinical
investigation plans.”

E. 結論

医療用具のグローバルな開発の時代を迎え、医療用具の臨床試験に対しても、医薬品 GCP をベースにした新 GCP の設定が望まれる。

F. 健康危険情報

該当する事項は見られなかった。

G. 研究発表

1. 論文発表

上田慶二 「治験における原資料のあり方」

臨床医薬 16(6):796-806、2000

2. 学会発表

なし

H. 参考資料

1. 医薬品の臨床試験の実施の基準に関する省令（平成 9 年 3 月 27 日 厚生省令第 28 号）
2. ISO/DIS 14155-1 “Clinical investigation of medical devices - Part 1: General requirement.”
3. ISO/DIS 14155-2 “Clinical

厚生科学研究費補助金（医薬安全総合研究事業）
分担研究報告書

医療用具の有効性、安全性評価手法に関する国際ハーモナイゼーション研究

分担研究者 岡野 光夫 東京女子医科大学 先端生命医科学研究所 所長

研究協力者

麻坂 美智子	日本メドトロニック株式会社薬事総括部
石川 烈	東京医科歯科大学歯学部
上田 実	名古屋大学大学院医学研究科、頭頸部感覚器外科学講座
大串 始	ティッシュエンジニアリングセンター
大野 邦夫	旭メデイカル株式会社
岡野 光夫	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所
片倉 建男	テルモ株式会社研究開発センター
久保木 芳秀	株式会社デビュージャパン
熊谷 憲夫	聖マリアンナ医科大学形成外科
澤 芳樹	大阪大学医学部外科学第一講座
篠崎 尚史	東京歯科大学角膜センター
清水 達也	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所
高村 健太郎	株式会社ジャパンティッシュエンジニアリング
土屋 利江	国立医薬品食品衛生研究所療品部
堤 定美	京都大学再生医科学研究所
寺岡 慧	東京女子医科大学 腎センター
大和 雅之	東京女子医科大学 先端生命医科学研究所

研究要旨 細胞・組織を用いた医療用具利用に関する国内でのガイドライン作り推進を目的に、広範な領域の専門家からなる委員会を発足、各委員が専門分野の現状に関する調査を行った。また日欧米でのガイドラインに関する資料の収集・比較検討を行い、国際標準化にむけて日本の現状と将来について討論を行った。

A. 研究目的

細胞・組織を用いた医療用具に関する臨床および研究レベルでの国際的な現状を十分に調査し、その利用に関する国内でのガイドライン作りを推進する。また日欧米でのガイドラインの比較検討を行い、細胞・組織利用の安全性や機能評価法の国際標準化にむけたガイドライン作成の可能性を追求することを目的とする。

B. 研究方法

細胞・組織を用いた医療用具の有効性、安全性評価に関する国際ハーモナイゼーション研究を開始するにあたり大学、企業、国立研究所、厚

生労働省に所属する専門家からなる細胞組織医療用具委員会を発足した。今年度はヒト又は動物の細胞組織を用いた医療用具利用の国内外での現状把握を行うため、分野ごとに各専門家が分担し細胞組織医療用具に関する調査を行った。また各国における規制内容、基準、ガイドラインなどの作成状況についても調査を行い、資料を収集、日欧米それぞれの内容に関して比較検討を行った。

C. 研究結果

各委員の調査結果を調査報告(1)～(19)に示す。調査報告(1)～(17)からほぼ全身の臓器に関してその不

全あるいは欠損組織に対する新たな治療法として細胞・組織を使った医療用具の開発研究が行われている現状が明らかとなった。皮膚・骨・軟骨・角膜・心臓弁・血管に関しては既に組織としての医療用具が臨床に用いられている。また細胞を直接移植する細胞移植治療も脳・心筋・閉塞性動脈硬化症などによる虚血部位に対して臨床応用されている。また、調査報告(19)ではバイオマテリアルの安全性評価としてマテリアル上の細胞の細胞間接着を評価することの有効性が示唆された。また国際標準化機構/外科用インプラント専門委員会(ISO/TC150)における組織工学に関する活動に関する報告(19)では国内での国際標準化にむけた専門家グループの選定・設置が提案された。

次に各国における規制内容、基準、ガイドラインの比較検討にあたり規制内容一覧に示す資料を収集し比較検討を行った。特に米国の「Proposed approach to Regulation of Cellular and Tissue-Based Products」(翻訳資料1)、EUの「Points to Consider on the Manufacture and Quality Control of Human Science Cell Therapy Medical Products」(翻訳資料2)、日本の「細胞・組織医薬品等の取り扱い及び使用に関する基本的考え方」の3者について日欧米規制対比を表にまとめた。細胞採取、培養、加工、移植の各過程における感染防止、加工に伴う安全性・有効性の評価に関しては概ね共通な内容となっている。相違点としては欧米がヒト由来の細胞・組織に限ったものであるのに対し、日本の場合はヒト・動物由来の細胞・組織全体を対象としている。欧米のものは自己と他家由来のものとして明確に分類しているのに対し、日本では明確な分類は行われていない。日本のものでは無対価であることや倫理委員会の詳細がもりこまれている。米国のものは具体的な事例を挙げ理解しやすい規制となっている。また「急速に進歩する医学領域での技術革新や製品開発が不必要な規制によって制限をうけることなく

進展することを保証するものである」と明言され、日々変化する状況に柔軟に対応できるような規制づくりが意図されており、実際に Tissue Reference Group を組織し迅速に専門的な対応、決断が行えるようなシステムづくりが行われている。

D. 考察・今後の研究計画

今年度の研究では、細胞・組織を用いた医療用具に関する臨床応用・研究開発・規制の現状を把握したが、近年の本分野での医療用具の開発は日進月歩であり、それに対応しうるような柔軟なガイドライン作成が必須である。また、昨今問題となっているような不測の事態が生じた際の対応に関してもあらかじめ議論し迅速に対応できるようなシステム作りが重要と考えられた。この観点から以下の事項につきより具体的な調査研究を行うこととした。①既に臨床応用されている皮膚・骨・軟骨・角膜に関して細胞ソースから移植までの全行程でのより詳細な情報を収集し、臨床応用に至るまでに生じた問題点や現在の問題点を抽出する。②全国的なアンケート調査を行い、細胞・組織医療用具臨床使用の実態(症例数、治療効果、ガイドラインとの整合性など)およびここ数年で臨床応用されうるような医療用具の動向を把握し生じうる問題点を予測し、新たに必要となる安全性や機能に関する評価法を模索する。③海外、特に米国において新たに医療用具が開発された時や不測の事態が生じた時の具体的な対応を検証し、迅速・柔軟な対応に必要なシステム作りを議論し、併せて安全性、機能評価法の国際標準化の可能性を模索する。

E. 健康被害状況

なし

G. 研究発表

なし

F. 知的所有権の出願・登録状況

なし

調査報告（1）

皮膚

（担当：聖マリアンナ医科大学形成外科 熊谷憲夫）

1 対象臓器・疾患および細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性

輸液法や抗生剤の開発、全身臓器のモニタリング管理などにより、重傷熱傷患者の救命率は格段に向上した。しかし、全身の90%以上がⅢ度熱傷の患者では、従来の皮膚移植による治療では採皮部の不足のため治療が極めて困難であった。しかし、培養表皮移植の技術により切手サイズの健常皮膚から作製した表皮シートで体表全体の熱傷創も治療可能になった[1]。

深達性Ⅱ度熱傷は創部の感染などにより、容易にⅢ度熱傷に移行する。深達性Ⅱ度熱傷の上皮化を促進させることは、患者の苦痛を早期に取り除くだけでなく、治療期間の短縮にもつながる。また、二次的に瘢痕拘縮が生じる可能性も少なくなる。同種培養表皮は通常の創傷被覆材と違い、単に創面を保護するだけではなく創傷治癒を促進するサイトカインも放出するため深達性Ⅱ度熱傷を早期に上皮化させる[2]。米国では上記のような必要性からすでにその販売がFDAに認可されている。

皮膚は表皮と真皮から構成されている。真皮中の線維芽細胞は創傷治癒を促進するサイトカインを放出する。また、コラーゲン、フィブロネクチンといった細胞外マトリックスも産生するため、下腿潰瘍や褥瘡といった難治性潰瘍の新たな治療法として期待されている[3]。

現在、広範囲重傷熱傷患者の治療に同種皮膚移植がひろく行われている。しかし、他の臓器移植と同様、同種皮膚移植においてもドナーの不足という問題を抱えている。さらに、この問題は広域災害が生じた場合、より深刻になると思われる。以上のことから細胞・組織を用いた人工皮膚の開発は急務と考える。

2 細胞ソース

表皮幹細胞は有毛部では毛包の bulge 領域に、手掌や足底といった無毛部では表皮

基底部に存在する[4]。そのため表皮細胞の培養では、他の臓器のようにES細胞にこだわる必要はなく、分層皮膚中の細胞で十分培養表皮の作製は可能である。但し、年齢とともに増殖能が低下するため、同種移植のドナーには乳幼児が適している。このことは線維芽細胞のドナーにおいても同様である。

3 単離・培養・増殖法

表皮細胞の培養は Green の方法に準じて行うのが実用的である[5]。すなわち、除菌した分層皮膚片をトリプシンで処理する。次にこれを攪拌した後、ナイロンメッシュガーゼで濾過し、得られた表皮細胞浮遊液をあらかじめ放射線を照射したマウス3T3細胞と共培養する。表皮細胞の培養にはDME培地とF-12培地を3:1に混合し、これに10%牛胎児血清、Insulin、Adenin、Transferin

、Triiodothyronine、Hydrocortisone、Choratoxinを加えた培地を使用する。初回の培地交換後は上記の培地にEGFを加える。37℃、10%CO₂のインキュベータで培養し、通常1週間に2回の割合で培地交換を行う。共培養で用いるマウス3T3細胞はシャーレ上の表皮細胞の増殖とともに、シャーレから剥がれ、培地交換とともに消失する。

線維芽細胞の培養は、採取した皮膚をTissue Chopperを用いて1mm角程度の組織片とした後、除菌後、無血清線維芽細胞培養培地を用いて培養する。

4 各種の培養皮膚代替物

培養皮膚代替物は表皮細胞、線維芽細胞、あるいはその両者を併用して作製される。培養表皮は欧米ではEpicer™という商品名で販売されている[6]。

線維芽細胞で作製された培養皮膚代替物は培養真皮と呼ばれているが、線維芽細胞を組み込んでいるマトリックスの違いから各種の製品が開発されている。米国ではバ

イオブレン TM (ナイロンメッシュ) に線維芽細胞を組み込んだ TransCyteTM、バイクリルメッシュ TM (吸収縫合糸) に線維芽細胞を組み込んだ DermagraftTM が販売されている [7,8]。北里大学人工皮膚開発センターではヒアルロン酸とアテロコラーゲンから凍結真空乾燥法で作製したマトリックスを用いた培養真皮を開発している [3]。

表皮細胞と線維芽細胞の両者で作製された培養皮膚代替物は培養皮膚と呼ばれている。米国で販売されている ApligrafTM は I 型コラーゲンに新生児由来の同種表皮細胞と同種線維芽細胞を組み込んでいる [9]。欧州で販売されている VivoDermTM はヒアルロン酸膜に自家の表皮細胞と線維芽細胞を播種して作製されている [10]。また、線維芽細胞を埋入したフィブリンシート上で表皮細胞を培養して作製した複合型培養皮膚も開発されている [11]。

5 移植法

移植床となる創面に壊死組織があれば切除する。次に創面を止血、洗浄した後、移植する。

6 今後の課題

皮膚は表皮と真皮から構成されている。皮膚全層欠損創の治療には表皮と真皮の両者で構成された培養皮膚の移植が理想である。現在、*in vitro* での表皮の作製法は確立されている。しかし、培養真皮中には生体真皮と異なり線維芽細胞以外の細胞は組み込まれていない。また、マトリックスも生体の組成、構築とは異なる。そのため、現在最も開発が求められている細菌感染を伴う広範囲重傷熱傷の患者では、培養真皮あるいは培養皮膚を移植しても移植片は融解し生着しない。今後、生体真皮により近い培養真皮の開発によって、自家皮膚移植と同等な臨床成績が得られる培養皮膚の作製が望まれる。

7 参考文献

1) Kumagai N, Nishina H, Tanabe H, et al: Clinical application of autologous cultured epithelia for the treatment of burn wounds and burn

scars. *Plast Reconstr Surg* 82: 99-108, 1988

2) 熊谷憲夫、松崎恭一、長瀬健彦: 培養皮膚による創傷治療. *外科治療* 82:

456-460, 2000

3) 黒柳能光: 厚生科学再生医療プロジェクト一同種培養真皮の開発. *医学のあゆみ* 200: 247-251, 2002

4) Rochat A, Kobayashi K, Barrandon Y: Location of stem cells of human hair follicles by clonal analysis. *Cell* 76: 1063-1073, 1994

5) Rheinwald JG, Green H: Serial cultivation of human epidermal keratinocytes: the cell formation of keratinizing colonies from single cells. *Cell* 6: 331-344, 1975

6) Carsin H, Ainaud P, Le Bever H, et al: Cultured epithelial autografts in extensive burn coverage of severely traumatized patients: a five year single-center experience with 30 patients. *Burn* 26: 379-387, 2000

7) Phillips TJ: Tissue-engineered skin. *Arch Dermatol* 135: 977-978, 1999

8) Pudue GF, Hunt JL, Still Jr JM, et al: A multicenter clinical trial of a biosynthetic skin replacement, Dermagraft-TC, compared with cryopreserved human cadaver skin for temporary coverage of excised burn wounds. *J Burn Care Rehabil* 18: 52-57, 1997

9) Falanga V, Margolis D, Alvarez O, et al: Rapid healing of venous leg ulcers and lack of clinical rejection with an allogeneic cultured human skin equivalent. *Arch Dermatol* 134: 293-300, 1998

10) Harris PA, diFancesco F, Barisoni D, et al: Use of hyaluronic acid and cultured autologous keratinocytes and fibroblasts in extensive burns. *Lancet* 353: 35-36, 1999

11) 猪口貞樹: 自家複合型培養皮膚移植. *医学のあゆみ* 200: 231-235, 2002

調査報告（2）

骨軟骨

（担当：産業技術総合研究所 ティッシュエンジニアリング研究センター
大串 始）

1.対象臓器・疾患および細胞・組織を用いた医薬品・医療用具の必要性

種々の骨軟骨疾患が存在し、これらに対して細胞あるいは組織を用いての治療がおこなわれつつある。本報告では、軟骨および骨疾患別に我々の経験をふまえて解説する。なお、実験レベルでは遺伝子導入された細胞やES細胞が用いられる可能性はあるが、本文では現段階で治療に応用できる細胞について述べる。

軟骨疾患

軟骨は圧迫と屈曲に対して柔軟性を示す組織で細胞成分と細胞外基質により構成される。骨とちがい細胞外基質にはミネラルの沈着はほとんどなく、メス等により容易に切断することが出来る。すなわち、直達の外力により軟骨の障害は起こりうる。しかし、軟骨障害は放置しても修復されることがないばかりか変性を生じやすい。この治療として、軟骨損傷部の軟骨下骨に小穴をいくつか空ける (multiple drilling) がおこなわれることがあるが、完全な軟骨の修復にはいたらず、時間の経過とともに変性することが知られている。最近、小さな自己の骨軟骨片を複数個採取して軟骨変性部に移植するいわゆるモザイクプラステイがおこなわれることもある [1]。しかし、複数の自己骨軟骨片を採取するという欠点があり、また用いられる範囲も限定されていて手術手技も簡単ではない。以上より、軟骨損傷は修復能を有する細胞を用いての治療の対象となりうる。この治療対象となる軟骨障害には離断性骨軟骨炎やスポ

ーツ等の外傷による軟骨損傷が考えられる。また、変性疾患としての変形性関節症や慢性関節リウマチも、変性範囲が限られている場合には適応となるであろう。

骨疾患

骨組織はカルシウムと燐の結晶であるハイドロキシアパタイトを主成分とする細胞外基質の豊富な組織である。このハイドロキシアパタイトはランダムに存在するのではなく、コラーゲン繊維の上に存在する。骨組織の表面には骨形成の役割をはたす骨芽細胞 (Osteoblast) が存在して、既存の骨組織の上で活発な新生骨組織を形成している。また、他の組織と同様、骨組織には豊富な血管が存在している。以上の構造により、骨は障害を受けても、自己修復能が活発である。例えば、ほとんどの骨折は外固定により修復され、手術療法等を必要としない。しかし、関節内におこる陥没骨折や骨障害が広範囲に及ぶ重度の骨折では骨移植等の必要性が生じる。さらに、骨腫瘍における腫瘍部の搔爬においては骨移植の必要性がある。また、高齢化社会にともない、変形性関節症の患者が増加しつつあるが、この症例に対する人工関節置換手術時に骨移植を併用する事がある。これらの骨移植には自家骨移植が用いられるが、自分の健常骨を犠牲にするという欠点がある。同種骨が用いられることもあるが、移植免疫反応が生じる。以上より、細胞を用いての再生治療が可能になれば、これらの問題点を解決できうる。

2. 細胞ソース

軟骨修復

軟骨は修復能が無いいため、軟骨損傷が大きい場合は人工関節等の手術を必要とする。しかし、人工関節手術は骨との固着部でのゆるみを生じる事があり、また人工関節自身の耐久性の為に若年者には適応がない。さらに手術そのものに対する患者の負担が大きい。いわゆるモザイクプラステイが最近用いられるようになってきたが、上記に述べているように、健常部を採取するという欠点がある。そこで、下記の細胞を用いての治療が最近おこなわれつつある。

軟骨細胞：自己軟骨細胞を培養により増殖させ治療に用いるのはBrittberg等[2]がはじめて報告した。この問題点は、健常部位より軟骨細胞を採取する必要がある、またその採取そのものの手術を必要とする。しかし、上記のモザイクプラステイと異なり、軟骨細胞数を増殖出来るため、少量の軟骨より比較的広範囲の欠損にも応用可能である。なお、以上のように自己の軟骨細胞を使用するが、同種の細胞でも修復能が良いことが動物実験では報告されている[3]。アメリカのAdvanced Tissue Science (ATS)ではNeocyte[4]という同種の軟骨細胞を軟骨治療に用いるようであるが、詳細は不明である。

骨髄間葉系幹細胞：骨髄には間葉系幹細胞が含まれ、その幹細胞が軟骨細胞へ分化するのが知られている[5, 6]。患者骨髄を採取して、この間葉系幹細胞を増殖しコラーゲンゲルに埋入[7]して軟骨欠損部へ移植する治療も脇谷等より試みられている。この幹細胞に関しては同種の細胞を用いての治療はおこなわれていない。

骨修復

以前より、骨欠損部へは同種の骨を移

植する方法と、自家骨を移植する方法がおこなわれていた。同種の骨は拒絶される事が多く、ある程度修復されても、その同種の骨と修復骨が置き換わるまでに長期間を必要とした。この点に比し、自家骨は当然の事ながら、拒絶されることが無く、また自家骨には骨を形成する骨芽細胞が含まれているため、移植による修復は早期におこなわれる。すなわち、自家骨移植には骨芽細胞を含む自家の細胞が移植出来る利点も有する。しかしながら、自家骨は自己の組織を犠牲にする必要があり、その欠点は明白である。さらに、最近ハイドロキシアパタイト等の人工骨を用いる場合もあるが、これらは無機物質であり、当然細胞活性をもたない。そのため、応用される範囲は限定される。これらの欠点を補うために下記の細胞を用いての治療が開始されつつある。

骨髄間葉系幹細胞：骨髄には間葉系幹細胞が含まれ、その幹細胞は上記の軟骨修復に述べているように、軟骨細胞へ分化するが骨形成細胞である骨芽細胞へも分化する[5, 6]。そこで、自己の間葉系幹細胞を用いての治療がおこなわれてきている。簡単な治療としては、新鮮な骨髄を移植する方法[8]があるが、その方法による骨形成は不確かである。また、単純な細胞移植では移植された部位に細胞が保持される可能性はすくない[9]。すなわち、細胞を保持するセラミック等の担体を必要とする。そこで、培養技術を用いることによりこの幹細胞の増殖[10]が試みられ、またこの細胞と種々セラミックとの複合体が治療に用いられる[6]。最近、同種の培養間葉系幹細胞が骨再生能を有するという報告がなされているが[11]、我々の研究では、たとえminor mismatchの細胞でも拒絶され[12]、骨再生能が無いことを確認しているため、この同種の細胞を用いる治療は可能性は少

ないと思われる。

培養骨芽細胞： 以上のように、培養技術を用いることにより、間葉系幹細胞をin vitroで増殖可能であるが、この培養幹細胞が生体内で骨形成を生じるにはこの細胞がさらに骨芽細胞へ分化するという過程を必要とする。そこで、もしこの幹細胞をあらかじめin vitroで骨芽細胞へ細胞分化させ得れば[13]、生体内において直ちに骨形成を生じることが可能になり、非常に早期の新生骨形成を期待できる[14]。すなわち、この増殖された間葉系幹細胞を続けて培養表1用いられる細胞

	細胞種類	方法	利点と欠点
軟骨修復	軟骨細胞	健常部より軟骨組織を採取し、コラーゲナーゼ処理により、軟骨細胞を分散して培養により増殖させる。	正常の軟骨細胞に近い機能を持つと思われる。ただし増殖能に問題有り、また健常部分の軟骨を犠牲にする。
	間葉系幹細胞	腸骨より骨髓針を用いて骨髓を採取し、培養により間葉系幹細胞を増殖させる。	採取も容易で、また増殖も良好であるが、機能的な軟骨細胞へ分化するかの疑問がある。
骨修復	間葉系幹細胞	同上	採取も容易で、増殖能も良好である。また、骨芽細胞への分化も軟骨細胞に比し効率はよい。しかし、移植された間葉系幹細胞の骨芽細胞までの分化に時間がかかる。
	骨芽細胞	上記により増殖された幹細胞を、培養条件下にさらにデキサメサゾン等を用いて骨芽細胞へ分化させる。	骨形成細胞である骨芽細胞がすでに存在するので、効率はよい。しかし、全体の培養期間が長くなる。

3. 細胞単離・培養・増殖法

軟骨細胞： 膝軟骨の非加重部より200～500g程度の軟骨層を採取し、コラーゲナーゼ/トリプシン処理により分散された軟骨細胞を得る。この軟骨細胞を単層培養により増殖させる[2]。越智等は単層培養でなく、I型コラーゲンゲル(3%アテロコラーゲンゲル)に包埋して、Ham F12培地と自己血清存在下に3次元培養をおこなっている[15]。約3週間培養すると弾力のある形状のどとのった移植片が作製出来る。

することにより、骨芽細胞への分化誘導が試みられている[13]。この分化誘導を種々生体材料上でおこなえば、骨芽細胞を含んだ材料を移植する事が可能となる[6]。実験レベルでは、既存の骨組織上に存在する骨芽細胞(幹細胞も含まれる)を採取する方法もあるが、骨組織を犠牲にする必要があり、臨床的には意義が少ないと思われる。また、同種の骨芽細胞は移植免疫の為、臨床で用いられることはない。

骨髓間葉系幹細胞： 骨髓細胞を採取しMEM培地で初期培養をおこなう[9]。この初期培養では通常15%の牛胎児血清あるいは患者自己血清を用いる。培地の交換時(通常週に3回)に浮遊系の細胞を除去して附着性の細胞が培養皿よりはがれないようにおこなう。約10日から2週間でこの附着性の細胞(間葉系幹細胞が多く含まれる細胞集団である)はコンフルエントにまで増殖する。この細胞をトリプシン等により培養皿よりはがして種々生体材料と混和して骨欠損部等に移植する[6]。この方法は我

々が用いている方法であるが、骨髄には多量の赤血球が含まれる、これを除去する為に比重遠心法（Ficoll、Percoll等）により採取された細胞を用いて初期培養をおこなうこともある[16]。

骨芽細胞：上記の間葉系幹細胞をトリプシン処理により培養皿よりはがす。この細胞をさらにグリセロリン酸、ビタミンC、

Dexamethasoneの存在の下で生体材料上（セラミック等）で2週間2次培養する[13, 14, 17]。この2次培養約10日頃より骨芽細胞が出現しミネラルの沈着（骨基質）を引き起こす。この骨芽細胞・骨基質を含んだ生体材料を移植材料として用いる[6]。

表2、細胞の担体として用いられる生体材料

	材料	用途	文献	コメント（利点、欠点）
軟骨修復	コラーゲン	軟骨細胞や間葉系細胞の担体	3, 15	他の分野において生体内にすでに数多く使用されている。牛由来ではBSEの問題がある。
	ヒアルロン酸	間葉系幹細胞の担体、あるいは軟骨細胞培養の添加剤として用いられる。	25	すでに、関節疾患で多く用いられている。操作性に問題があり。
	ポリ乳酸	細胞移植後の被覆材	23	最近、整形外科領域で臨床に用いられつつある。分解時に炎症反応をおこす可能性がある。
骨修復	多孔体ハイドロキシアパタイト	間葉系幹細胞や骨芽細胞の担体	6, 8, 10 12-14	すでに数多く骨疾患の充填剤として用いられている。吸収性がほとんどなく、小児等に用いるには適応を選ぶべし。また、荷重部には用いる限界がある。
	多孔体リン酸三カルシウムセラミック(TCP)	間葉系幹細胞や骨芽細胞の担体	18	上記に比し、吸収性があるので、小児にも広く応用可能。ただし、その吸収性の為、骨再生がおこる前に消失する可能性あり。
	炭酸カルシウム（珊瑚骨格）	間葉系幹細胞や骨芽細胞の担体	19	ヨーロッパでは人工骨として多く用いられてきた。TCPと同様吸収性がある。
	アルミナセラミック	間葉系幹細胞や骨芽細胞の担体	20	機械特性に優れ、整形外科領域で広く用いられる材料。特に人工関節材料として用いられる。
	チタン	間葉系幹細胞や骨芽細胞の担体	21	同上（歯科領域でも良く用いられる）
	コラーゲン	間葉系幹細胞や骨芽細胞の担体、また上記のセラミック等との複合体としても用いられる	24	上記セラミックや炭酸カルシウムに比しそのまま用いるには機械特性が弱い。小さな欠損部か他の担体との複合化が必要。

4. 治療・移植法あるいは使用法

軟骨修復

軟骨欠損部を周囲の正常軟骨組織を傷つけないように廓清する。次に脛骨近位部

よりから採取した骨膜を欠損部周囲の軟骨縁に縫合固定し、さらにフィブリン湖で縫合部を接着する。培養細胞浮遊液を注入後、注入部を縫合、さらにフィブリン湖で接着

して細胞が流出しないようにする。以上はおもにGenzyme社が用いている方法である[18]。この方法では細胞が浮遊液の状態であるので、流出を防ぐのは困難である。そこで、越智等[15]はコラーゲンゲル内で培養した軟骨細胞を骨膜で被った軟骨欠損部へ注入している。脇谷等は間葉系幹細胞[7]をコラーゲンゲル内で培養して用いている。なお、これらは自家骨膜を用いて被覆しているが、ポリマーである生体吸収性のPGAも使用可能である。

骨修復

培養間葉系幹細胞をトリプシン処理により細胞を分散させた後、多孔体のセラミック等に混和して[10]、細胞・セラミック複合体を作製して骨欠損部等に導入する。培養骨芽細胞を用いるには、これらセラミック上で間葉系幹細胞を骨芽細胞にまで培養条件下に誘導してこの骨芽細胞・セラミック複合体を用いる[6, 14]。疾患や部位により、用いられるセラミックが決定される。骨欠損部で加重を受けやすいところでは気孔率の少ないハイドロキシアパタイトセラミック等が用いられ、小児や既存骨からの骨再生が期待できるところでは、生体吸収性のTCP[18]やcalcium carbonate[19]が用いられるであろう。ただし、これらのリン酸カルシウムセラミックや炭酸カルシウムは脆弱である。そこで機械特質に優れたアルミナ、チタン、ガラスセラミック等の材料も利用できるであろうか。この点に関して、動物実験であるが、我々はこれらの材料[20-22]や高分子であるポリ乳酸[23]やコラーゲン[24]も骨髄の骨芽細胞への分化を支持することを確認している。さらに、アルミナセラミックで出来た人工関節に培養骨芽細胞を組み込んで治療に用いている。

5. 考察と今後の課題

関節軟骨組織は関節表面を覆い、水分含量の高い細胞外基質に囲まれている。そのため、衝撃を吸収するクッションの役割と摩擦係数を低下させ滑動性をよくする役割を果たしている。しかし、この組織には血流が存在せず、さらに細胞外基質は密度が高い為、関節軟骨そのものには修復能はほとんどない。この修復能を獲得するために、Brittberg等は自己軟骨細胞の増殖をおこない、軟骨修復に用いた[2]。この技術はその後Genzyme Tissue Repair社によってシステム化された[25]。すなわち、患者の膝関節軟骨の一部(5x8mm)を採取し、マサチューセッツ州のケンブリッジに送ると軟骨細胞が分離・増殖された後に送り返され移植される。1977年にアメリカ食品医薬品局の認可を受け、Carticelとして販売を開始している。欧米で数千例以上に施行され、臨床的に有効とされているが、組織的に関節軟骨の成分である硝子軟骨として修復されているかの疑問点が残されている。特に用いられている単層培養では軟骨細胞の脱分化が起こる可能性があり、この欠点を補うためコラーゲンゲル[15]や種々の生分解性ポリマー(poly glycolic acid, polylactic acid, hyaluronic acid)での3次元培養がおこなわれている[26, 27]、立石、牛田らは牛や山羊の軟骨培養の研究で、培養中に静水圧をかけることにより培養細胞の軟骨形質発現を維持することを試みている[28]。

この軟骨細胞を利用する方法に比し、軟骨へ分化しうる幹細胞等の未分化細胞を利用することもおこなわれている。すなわち、骨髄間葉系幹細胞の利用である。特に、生体内でのこの幹細胞の分化は重要であり、その為には幹細胞の担体を必要とする。表2にみられるように、種々の生体材料を担体として用いることで軟骨形成は可能であり、数年前より脇谷等

は患者間葉系細胞を用いて軟骨修復治療をおこなっている。

骨修復に関しては、間葉系細胞とセラミックの複合体により犬や山羊の長幹骨の欠損を治癒した報告がアメリカ [29] やフランス [30] のグループよりされている。また、イタリアのグループより患者培養幹細胞を用いて難治性の骨折（擬関節）を治療した事も報告されている [29]。この培養幹細胞を用いる方法に比し、幹細胞をさらに骨芽細胞へ分化させると同時に骨基質も産生する方法（再生培養骨形成）は、生体内での骨形成が短期間で確実なものである。この方法は我々が開発したが [6, 13, 14]、JD de Bruijn等によっても追試されてその有効性が確認されている [32]。これは、生体内に移植前にはあらかじめ骨芽細胞/骨基質（再生培養骨）がHA内に形成されていることによる。同様の方法により、上田等は生体吸収性のTCPを用いても良好に骨再生がおこなわれることを報告している [33]。現在、我々は病院で採取された患者骨髄細胞を用いて、この再生培養骨形成をティッシュエンジニアリング研究センター内でおこなっている。この再生培養骨は再度病院へ搬送して治療に用いられている。

以上、軟骨細胞や骨髄間葉系幹細胞と生体材料を用いての治療方法を概説した。これらの成果は、細胞の増殖と分化を人為的に制御する技術を応用したものであり、種々の難治性の骨関節疾患治療が可能であることを示している。しかし、これらの治療方法は開発されたばかりであり、今後の検討を要する。

文献とURL

1. Hangody L, Feczko P, Bartha L, Bodo G, Kish G, Mosaicplasty for the treatment of articular defects of the knee and ankle Clin Orthop 2001 Oct;(391 Suppl):S328-36

2. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L, Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. N Engl J Med 1994 Oct 6;331(14):889-95

3. Wakitani S, Goto T, Young RG, Mansour JM, Goldberg VM, Caplan AI Repair of large full-thickness articular cartilage defects with allograft articular chondrocytes embedded in a collagen gel. Tissue Eng 1998 Winter;4(4):429-44

4. www.advancedtissue.com

5. M. Owen, "Lineage of osteogenic cells and their relationship to the stromal system" Bone and Mineral vol. 3. Peck W.A. (ed), Elsevier, Amsterdam, p1-25, 1985

6. H. Ohgushi, A. I. Caplan: Stem Cell Technology and Bioceramics: From cell to gene engineering, J. Biomed Mat. Res 48 : 913-927, 1999

7. Wakitani S, Goto T, Pineda SJ, Young RG, Mansour JM, Caplan AI, Goldberg VM Mesenchymal cell-based repair of large, full-thickness defects of articular cartilage J Bone Joint Surg Am 1994 Apr;76(4):579-92

8. H. Ohgushi, M. Ishimura, T. Habata and S. Tamai, Porous ceramics for intra-articular depression fracture, Biomaterials and Bioengineering Handbook, pp397-405, 1999 (Wise L Edit., Marcel Dekker Inc. NY)

9. H Ohgushi, VM Goldberg, AI Caplan: Heterotopic Osteogenesis in porous ceramics induce by marrow cells, J. Orthop. Res. 7:568-578, 1989

10. H Ohgushi, and M Okumura: Osteogenic ability of rat and human marrow cells in porous ceramics.: Acta Orthop. Scand., 61:431-434, 1990

11. <http://www.osiristx.com/>

12. M. Akahane, H. Ohgushi, T.

- Yoshikawa, T. Sempuku, S. Tamai, S. Tabata and Y. Dohi . Osteogenic phenotype expression of allogenic rat marrow cells in porous hydroxyapatite ceramics J. Bone Mineral Res 14: 561-568,1999
- 1 3 . H Ohgushi, Y Dohi, T.Katuda, S.Tamai, S.Tabata, Y.Suwa: In vitro bone formation by rat marrow cell culture, J. Biomed. Mat. Res 32:333-340,1996
- 1 4 . T Yoshikawa, H Ohgushi, S Tamai: Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite, J. Biomed. Mat. Res 32:481-492,1996
- 1 5 . Ochi M, Uchio Y, Tobita M, Kuriwaka M , Current concepts in tissue engineering technique for repair of cartilage defect. Artif Organs 2001 Mar;25(3):172-9
- 1 6 . N Jaiswal, SE Haynesworth, AI Caplan, SP Bruder "Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro" J. Cell. Biochem. 64:295-312,1997
- 1 7 . T.Yoshikawa, H.Ohgushi, T.Uemura, H.Nakajima, K.Ichijima, S.Tamai, T.Tateisi, Human marrow cells-derived cultured bone in porous ceramics. Biomed Mater Eng 8:311-320, 1998
- 1 8 . H. Ohgushi, M.Okumura, S. Tamai, E. C. Shors and A.I. Caplan Marrow cell induced osteogenesis in porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate. J. Biomed. Mat. Res. 24, 1563 - 1570, 1990
- 1 9 . H. Ohgushi, M. Okumura, T.Yoshikawa, K.Inoue, N. Senpuke and S. Tamai, Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite J. Biomed. Mat. Res.,26:885-895,1992
- 2 0 . T. Takaoka, M. Okumura, H. Ohgushi, K. Inoue, Y. Takakura and S. Tamai Histological and biochemical evaluation of osteogenic response in porous hydroxyapatite coated alumina ceramics. Biomaterials 17:1499-1505,1996
- 2 1 . M. Okumura, H. Ohgushi and P. Ducheyne Porous titanium felt as a carrier of osteogenic cells Bioceramics vol.6, pp395-310,1993 (Butterworth-Heinemann Ltd., OxfordEdts. P.Ducheyne and D. Christiansen)
- 2 2 . H. Ohgushi, T. Yoshikawa, H. Nakajima, S. Tamai and Y. Dohi, K. Okunaga Al₂O₃ doped apatite-wollastonite containing glass ceramic provokes osteogenic differentiation of marrow stromal stem cells J. Biomed Mat. Res44:381-388, 1999
- 2 3 . Y. Hasegawa, H. Ohgushi, M.Ishimura, T. Habata, S. Tamai, N. Tomita and Y. Ikada, Marrow Cell Culture on Poly-L-Lactic Acid Fabrics Clin. Orthop.358:235-243,1999
- 2 4 . M. Ikeuchi, Y Dohi, K Horiuchi, H Ohgushi, T. Noshi, T. Yoshikawa, K. Yamamoto, M Sugimura, Recombinant Human Bone Morphogenetic Protein-2 Promotes Osteogenesis within Atelopeptide Type I Collagen Solution by Combination with Rat Cultured Marrow Cells J.Biomed. Mat. Res, 60(1):61-69,2002
- 2 5 . <http://www.genzyme.com>
- 2 6 . Schreiber R.E., Dunkelman N.S., Naughton G. and Ratcliffe A. "A method for tissue engineering of cartilage cell seeding on bioresorbable scaffolds" Annal New York Acad. Sci, 875:398-404,1999
- 2 7 . Solchaga LA, Yoo JU, Lundberg M, Dennis JE, Huijbregtse BA, Goldberg VM, Caplan AI Hyaluronan-based polymers in the treatment of osteochondral defects. J Orthop

Res 2000 Sep;18(5):773-80

28. Murata T., Ushida T., Mizuno S., Tateishi T., Proteoglycan synthesis by chondrocytes cultured under hydrostatic pressure and perfusion. *Material Sci. Eng. C6*, 297-300, 1988

29. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am.* 1998 Jul;80(7):985-96

30. H Petite, V Viateau, WBensaid, A Meunier, C de Pollak, M Bourguignon, K Oudina, L Sedel, G Guillemin, Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol.* ;18(9):959-63, 2000

31. R Quarto, M Mastrogiacomo, R Cancedda, SM Kutepov, V Mukhachev, A Lavroukov, E Kon, M Marcacci, Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells, *N Engl J Med* ;344(5):385-6, 2000

32. JD de Bruijn, I van den Brink, S Mendes, R Dekker, YP Bovell, CA van Blitterswijk, Bone induction by implants coated with cultured osteogenic bone marrow *Adv Dent Res.* 13:74-81, 1999

33. Boo. JS, Yamada Y., Ueda M et. al. Tissue-engineered bone using mesenchymal stem cells and a biodegradable scaffold, *J. Cranio-fac Surg.* In press