

<p>める基準) 第五十八条 法第八十条の二第四項に規定する治験をすることについては、第二十七条から第五十五条までの規定を準用する。</p> <p>(法第八十条の二第五項の厚生労働省令で定める基準) 第五十九条 (略)</p>	<p>める基準) 第五十八条 法第八十条の二第四項に規定する治験をすることについては、<u>第四条第一項、第五条、第七条第一項(第八号及び第十号から第十二号までを除く。)、第八条第一項、第十一条、第十三条(第十号、第十二号から第十五号まで及び第十七号を除く。)、第十四条、第十六条(第一項第六号及び第七項を除く。)、第二十一条第一項、第二十六条第一項(第一号から第四号までを除く。)</u>及び同条第二項並びに第二十七条から第五十五条までの規定を準用する。</p> <p>(法第八十条の二第五項の厚生労働省令で定める基準) 第五十九条 <u>適用せず</u></p>
---	---

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

平成14年度厚生科学研究費補助金細胞組織医療用具委員会

委員一覧

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
大串 始	テイ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
小川 哲朗	ペンタックス株式会社ライフケア事業本部
片倉 建男	テルモ株式会社研究開発センター
久保木 芳秀	東レ株式会社研究・開発企画部
熊谷 憲夫	聖マリアンナ医科大学形成外科
黒田 享	株式会社ジャパンテイッシュエンジニアリング
澤 芳樹	大阪大学大学院医学系研究科臓器制御外科
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
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
麻坂 美智子	日本メドトロニック株式会社薬事総括部
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の安全性・有効性の評価法に関し広範な領域の専門家からなる委員会において、各委員が専門分野の細胞・組織の医療用具に関する調査を行い報告するとともに、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

再生医療分野の急速な発展により今後、種々の細胞・組織医療用具が臨床応用されることが予測される。現段階ではこれら細胞・組織医療用具の有効性、安全性の評価法に関しては十分な調査・研究が行われておらず既存の法規制では臨床応用に至る過程で種々の

問題が生じると予測される。そこで本研究では細胞・組織医療用具に関する詳細な調査研究を行い問題点を抽出するとともに細胞・組織医療用具に関する評価システムならびに具体的な手法を提案する。細胞・組織を用いた医療用具に関しては、すでに各国レベルで規制・ガイドラインがもうけられてい

るが、必ずしも均一なものでなく、今後国際化のなかで種々の問題が生じることが予想される。そのため、本研究ではそういった国際的な規制・ガイドラインの現状把握とともに国際標準となりうるような評価手法を提案する。この研究により、細胞・組織医療用具の適切な臨床応用を推進しあわせて国際標準化を図る。

B. 研究方法

昨年度、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が本年度もこの委員会を継続して細胞・組織を用いた医療用具に関する調査研究を行った。昨年度は広範な領域の臓器を対象とした細胞・組織医療用具の国内外の現状に関する調査研究を行い、既に皮膚・軟骨に関しては商品として臨床応用されているほか殆どすべての臓器に関する細胞・組織の開発研究が行われている現状が明らかとなった。本年度は特に今後数年のうちに臨床応用される可能性の高い領域の細胞・組織医療用具についてその安全性・有効性の評価法という観点からより具体的な調査を行った。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 WG11 の会議に当委員会の4人が参加したがその内容に関して討論を行い国際標準化にむけた課題点を抽出した。

C. 研究結果

今後数年のうちに臨床応用される可

能性の高い臓器に関して各委員の調査結果を調査報告(1)～(8)に示す。医師・医療機関が主体となって行う臨床研究として骨(口腔外科領域を含む)、血管・角膜が既に臨床応用されている。また、循環器領域においては細胞移植という形で骨髄由来の細胞を使った臨床研究も始まっており現時点では未加工であるが数年内に加工した細胞の移植が行われる可能性がある。その他、心臓弁、心筋、歯周組織などの医療用具も数年のうちに臨床応用される可能性が報告された。安全性・有効性の評価法に関しては、感染、scaffold使用時の有害物質の残留など共通な項目に加え各臓器に特異的な評価事項が示された。次に国際標準化機構／外科用インプラント専門委員会(ISO/TC150)に関する報告を調査報告(9)に示す。その中で ASTM(the American Society for Testing and Materials)と ISO の関係が議題となり、ASTM 側からは ASTM でのスタンダードは十分にインターナショナルでありそのまま ISO のスタンダードとして使用しても良いのではないかという提案が行われた旨が報告された。これに対して、ASTM における組織工学関連の活動に関しては分野によって不十分な面もあり今後日本としても分野によっては独自の提案を ISO に対して積極的に提出していくべきであり、そのためのシステム作りが必要であることが指摘された。さらに委員会の討論においても日本において米国のような細胞・組織医療用具に関し迅速に専門的な対応、決断が行えるようなシステムが無く、また行政と医療現場との考えかたや知識の隔たりがあることが今後の課題として挙げられた。

D. 考察・今後の研究計画

本年度の調査報告より今後5年以内に種々の細胞・組織医療用具の臨床応用が行われることが予測され、既に臨床研究という形で患者に用いられていることが判明した。現時点では種々の臓器に対応できるような明確な指針やシステムが整っていないことよりそれぞれの細胞・組織医療用具を治験を経て広く臨床の場へ普及させるためにはかなりの時間を要することが予測される。その結果、臨床研究という形で医師・医療機関が主体となって個別に行われることにもなりかねず、安全性・有効性に関し不測の事態が生じることが懸念される。そこで来年度は各臓器に関して報告された細胞・組織医療用具の安全性・有効性の評価法に関し、共通の項目と臓器特異的な項目に分類するとともに各領域の複数の研究者・臨床家にもその内容を提示し確認を行い、追加事項などに関する意見を収集する。また欧米における安全性・有効性の具体的な評価法とも比較検討を行い国際標準化をはかる。これらの研究成果を厚生労働省側に提示し今後の細胞・組織医療用具の安全性・有効性の審査時に活用していただくとともに、臨床サイドにもこれらの情報を提示しあらかじめ臨床応用にむけて評価すべき必要事項を明確にすることでより円滑な臨床応用が可能になるものと予測される。また、委員会において行政と医療現場との考え方や知識の隔たりを減じ、互いに緊密に意見交換できる場や組織作りの可能性を検討する。これは新たな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・柔軟に対応するために必要なシステム構築への基盤になるものとする。

調査報告（1）

骨

（担当：東京医科歯科大学歯学部 石川 烈）

I. はじめに

1). 概論

骨組織はリモデリングと呼ばれる“吸収と添加”を繰り返し、絶えず新しい組織として造り変えられており、一般的には生体内の他の組織より比較的自己修復能が活発な組織であると考えられている。しかしながら、重度の骨折や腫瘍で失われた骨組織は元の状態には再生しない。そのため従来の治療法

では、患者本人から腸骨や腓骨などの一部を採取して欠損部位へ移植する“自家骨移植”が行われてきたが、採取できる組織量が限られる上、患者の肉体的負担が非常に大きくなることが欠点であり、こうした理由から自家骨に変わる生体吸収・親和性の骨欠損部補填材料の開発が進められてきた。自家骨移植に代わる補填材料は以下の2つに大別される。

① 他家骨移植

凍結腸骨および大腿骨頭骨、凍結乾燥骨 (FDBA)、脱灰凍結乾燥骨 (DFDBA)

② 生体埋植材料：

a) 生体内在性物質

コラーゲン由来材料、ハイドロキシアパタイト凝集体 etc.

b) 生体非内在性物質

金属（チタン）

有機性高分子（ポリ乳酸、ポリ乳酸-ポリグリコール酸コポリマー、HTRポリマー etc.）

生体親和性ガラス（Hench の Bioglasses、AW-ガラス、CPSP-ガラス、リン酸ガラス etc.）

無機リン酸化合物（ハイドロキシアパタイト焼結体、第3リン酸カルシウム、CMP etc.）

c) 生体・非生体由来材料の複合体

コラーゲン・ハイドロキシアパタイト複合体、キール骨

生理活性物質とその担体材料

（BMP/ポリ乳酸、機能性コラーゲン複合体、多孔性ハイドロキシアパタイト、FGF/フィブリンゲル、ゼラチンコーティングポリ乳酸 etc.）

d) 細胞と、その足場となる支持体の複合材料

などが実際に臨床応用または研究段階にある。①の他家骨移植に用いられ

る脱灰凍結乾燥骨 (DFDBA) は、骨バンク制度のない日本では臨床応用が困難であるが、欧米では広く認知され

ている骨補填材料である。骨誘導因子を保持しており、欠損部の補填と同時に骨誘導性に作用し骨組織再生を引き起こすと考えられている。②については主にハイドロキシアパタイト、第3リン酸カルシウム材についての研究が進められている。ハイドロキシアパタイトなどの非吸収性材料は経時的な強度の劣化が問題となり長期的な観点からは加重部位への適用が制限される。人工関節などを除けば吸収性で効率的かつ早期に新生骨に置換され得る人工骨材料の開発が望まれている。一方、近年の加速度的な再生医学の発展により、骨組織再生の分野にも新しいコンセプトに基づいた再生療法が確立されつつある。組織欠損が大きい場合、母床骨からの連続した骨再生つまり骨伝導だけでは不十分であり、移植材料には骨誘導能を付与する必要が生じる。また骨リモデリングの機構は多くの分化・成長因子が関与し制御されることにより成り立っているが、この中で特に重要な役割を果たしていると考えられている骨形成性タンパク

(BoneMorphogeneticProtein: BMPs) についての研究が進められている。成長因子を包埋して骨誘導能を獲得した移植材料についての研究は数多く行われているが、その中でも特に骨形成促進作用が顕著な rhBMP-2 についての研究は、臨床応用に期待されている

段階である。その他 Fibroblast Growth Factor (FGF), Insulin Like Growth Factor (IGF) なども骨形成に促進的な作用を有することから、近い将来有用な応用法が見出される可能性が高い。また、生きた細胞を支持体に播種し付着増殖させる培養技術を用いることにより、極少量の自家細胞から自家移植材料を作り出す組織工学的な手法が可能となってきた。培養細胞と支持体の複合移植材についてはすでに 80 年代より研究が行われていたが近年の細胞生物学および材料学の進歩は急激にその臨床応用への可能性を高めてきた。

2). 歯周組織再生

歯槽骨の吸収は歯周炎の特徴的な病態の一つであるが、それと同時に歯周靭帯および歯根セメント質界面における線維性付着の喪失が進行することにより、最終的に歯牙の脱落を招く疾患である。一度失われた歯周組織は元の形態・機能を回復することはなく重度に進行した歯周炎の治癒後は著しい機能低下と審美障害が残る。歯槽骨を再建する研究は古くから行われており、様々な補填材が開発された。次に実際に歯周治療において製品化され用いられている骨補填材、または行われている歯周組織再生療法を示す。

- a) 自家骨： 口腔内（上顎結節、臼後結節、オトガイ部、前鼻棘部 etc）、口腔外（腸骨、脛骨 etc）
- b) 他家骨： 凍結乾燥骨 (FDBA)、脱灰凍結乾燥骨 (DFDBA)
- c) 異種骨： 脱蛋白牛骨基質 (Bio-OssR)、牛焼成骨-アテロコラーゲン複合体 (Bone-jectR)

d) 人工骨： β -tricalcium phosphate (SynthograftR)、
ハイドロキシアパタイト (アパセラムR)
生体活性化ガラス (BioGranR)、セラミック

※ 歯周組織再生療法： EmdogainR、 Guided Tissue Regeneration (GTR) 法

全身の骨再建療法と同様に、これらの骨補填材のほとんどは骨誘導能や骨伝導能を有し、歯槽骨の誘導・再生には有効であるが、それ以外の歯周組織つまり歯根膜、セメント質を誘導する能力は認められない。インプラント体周囲の造骨や歯槽堤増大などの骨再生療法には有用であるが、本来の歯が持つ支持組織で最も重要な歯根膜とセメント質の再生にはあまり寄与しないことが明らかになっている。歯根の周囲における歯槽骨の再生は、歯根膜の再生が伴わない場合アンキローシスやそれに続く歯根吸収を引き起こすか、または口腔上皮細胞の歯根・歯槽骨界面への侵入による上皮性付着が形成され、生物学的に不安定な状

態で治癒することがわかっている。動物実験において明らかに組織学的に歯周支持組織の再生・誘導が確認されているのは EmdogainR と GTR 法のみであり、その他の手段は歯周組織再生に対する有効性についてのコンセンサスが確立されていない。EmdogainR と GTR 法についても適応範囲は限られるため、より効率的で確実に歯周組織再生に働き歯槽骨の再生とともに歯根膜の再生も同時に達成できる技術の開発が強く望まれている。

II. 早期に臨床応用が予想される細胞・組織医療用具
骨・歯周組織組織再生のための移植材料は大きく分けて4つに分類される。

- 1) 細胞 - 担体
- 2) 成長因子 - 担体
- 3) 細胞 - 成長因子 - 担体
- (4) 充填材料)

1). 細胞 - 担体

① 細胞の選択

近い将来、臨床応用の実現可能な段階にある細胞ソースを以下に示す。

※骨再生

- a) 骨膜由来細胞
- b) 骨髄間葉系幹細胞
- c) 骨芽細胞 (a または b からの分化誘導によって得られる)
- d) 骨髄外間葉系幹細胞 (脂肪、末梢血)

※歯周組織再生（上に加えて）

- a) 歯周組織由来細胞（歯根膜, 歯槽骨）
- b) 歯根膜由来体性幹細胞

1) 骨再生

骨膜由来細胞を 10%FBS、アスコルビン酸 (50 μ g/ml)、L-グルタミン (292 μ g/ml) を含む MEM 培地中で 37°C、5% CO₂ 存在下にて培養し、これを細胞密度 50~100 \times 10⁶/ml で種々の担体に播種して免疫不全ラットに移植した実験¹⁾では、移植材は軟骨様組織となり、やがて骨髓成分を含む新生骨に成熟した。骨膜由来細胞は骨芽細胞様の形質を発現していることが明らかになっており細胞供給源として有用かもしれない。骨膜以外に成人における骨系間葉系前駆細胞の貯蔵庫としては骨髓がある^{2, 3, 4)}。ヒトその他の動物の骨髓中には間葉系幹細胞 (MSC) が存在し^{5, 6, 7, 8)}、さらに造血系、血管系などの種々の組織へ分化しうる可能性を持つ前駆細胞が存在することが明らかにされている^{9, 10, 11)}。このことより、採取された骨髓から間葉系幹細胞を分離し¹²⁾継代培養することによって移植に用いることの出来る十分な数の細胞を得ることが出来る。細胞表面マーカーの検索により骨髓中から前骨芽細胞を得ることは可能である^{13, 14)}。現在、分離培養した前駆細胞を骨芽細胞へ分化させる方法は確立しており、Dexamethasone、Ascorbic acid、 β -glycerophosphate の存在下で骨髓間葉系幹細胞は骨形成能を持つ細胞へ分化することがわかっている¹⁵⁾。10~20ml の骨髓液を通常の穿刺吸引法

で採取し、大きなボーンチップを取り除いた後細胞をパーコール密度勾配にかける。低密度勾配 (1.03g/ml) に存在する間葉系幹細胞を分画から回収して遠心した後、患者自己血清添加 DMEM にサスペンドして培養皿に播種する。間葉系幹細胞は選択的に培養皿へ接着するのに対して造血系その他細胞は浮遊する。コロニー形成した細胞を継代培養し、十分量に達したら骨形成性細胞への分化誘導を行い適当な担体へのせて欠損部位へ補填する。その他骨髓以外の採取部位として脂肪組織、末梢血中にも間葉系幹細胞が存在する研究結果が報告されており^{16, 17, 18)}、骨髓からの穿刺吸引に比べ、より侵襲性の低い採取法として期待されている。一方、加齢に伴って骨髓内全細胞数に占める間葉系幹細胞数は減少することが明らかになっている^{19, 20)}。また骨前駆細胞の性質は継代や凍結保存を行っても失われないことが確認されており¹²⁾、このことは患者が健康時にたった一度の骨髓採取によって得られた間葉系幹細胞を凍結保存しておくことにより必要な時期に十分な量を再生療法に用いることが出来る細胞バンクへの有用性を示している。

2) 歯周組織再生

歯周組織再生においては歯根膜由来細胞の使用が可能性として有力である。歯根膜組織からの細胞は、主に抜

去歯に付着する組織片から Outgrowth 法によって得る。新鮮抜去歯からメスを用いて歯根膜組織片を採取し、シャーレ上に静置して患者自己血清添加 MEM を加える。組織片から拡散増殖した細胞を継代培養し移植に用いる。この場合抜去歯として第三大臼歯の利用が考えられるが、これが得られないときの細胞組織の回収法に問題が残る。また、現在までのところのようなマーカー分子を発現している細胞が歯周組織再生に必要であるかは決定されていない。免疫組織学的研究によれば、歯根膜由来細胞には、Alkaline phosphatase, Collagen type 1, 骨芽細胞への分化に必須である Core binding factor 1 (Cbfa1) が発現しているが、骨芽細胞のマーカーである Osteocalcin (OCN), Bone sialoprotein (BSP) は発現していない。この歯根膜組織には線維芽細胞、骨芽細胞、セメント芽細胞、マラッセの上皮細胞、未分化間葉系細胞などの多種の細胞が存在しているが、これまでの歯根膜由来細胞を用いた研究結果はこれらの細胞が混在した状態で行われたものであり、歯根膜を特徴づける特異的な細胞のマーカーの同定には至っていない。Yamada ら²¹⁾は、歯根膜の遺伝子プロファイリングを行い、PLAP-1 (periodontal ligament associated protein-1) を含む 974 の新規遺伝子の同定に成功している。最近、Saito ら²²⁾は歯根膜組織の特徴に類似した歯根膜線維芽細胞株 PDL-L2 を分離し、骨形成因子 (BMP)-2 の影響を検討したところ、BMP-2 非存在化では石灰化が生じないのに対し、BMP-2 によりある程度石灰化が生じる

ようになったとしている。一方、不均一な細胞を含む培養歯根膜細胞では BMP-2 非存在下でも容易に骨芽細胞である MC3T3-E1 以上に石灰化を生じることを示している。この理由として、PDL-L2 では Cbfa1 の転写活性の抑制がその細胞機能を制御している可能性を示した。また、セメント芽細胞についての特徴もまだ十分に解明されていない。その理由として単離したセメント芽細胞ほとんど得られていないことに起因している。唯一 Somerman らのグループはマウスよりセメント芽細胞株 OCCM30 の樹立に成功しているが²³⁾、セメント芽細胞も骨芽細胞と同様に BSP, OCN, alkaline phosphatase, type 1 collagen を産生し、明らかな違いが認められていない。現在のところ、セメント芽細胞のマーカーとなる分子が特定されていないが、免疫組織学的研究によれば、Cementum-derived Attachment Protein (CAP) がセメント芽細胞には発現しているが、その他の細胞には発現していないことが *in vitro* において報告されている^{24, 25)}。セメント芽細胞の分化に関しても、歯小囊由来細胞を BMP-2 で処理すると石灰化能をもつ cementoblast/osteoblast 表現型へと分化することが報告され²⁶⁾、さらに、いくつかの研究では、歯槽骨由来細胞にセメント芽細胞の前駆細胞が存在する可能性を報告している²⁷⁾が、まだ十分には解明されていない。歯周組織由来細胞を組織再生に用いた研究として、Lang ら²⁸⁾はミニプタにおいて GTR と歯槽骨由来細胞の移植との併用により、良好な歯周組織再生が得られることを報告している。それに対し

歯根膜線維芽細胞の移植では、歯槽骨由来細胞の移植ほどセメント質形成および骨形成が生じなかったとされている。今後、歯根膜細胞、セメント芽細胞を含む歯周組織細胞についての表現型および機能を明らかにし、歯周組織再生に必要な細胞を選択的に獲得する方法が必要になってくるものと思われる。一方、歯周組織に間葉系幹細胞のような体性幹細胞が存在するかどうかは明らかにされていない。筆者らの研究室では、間葉系幹細胞の

マーカーの一つとして知られるSTRO-1に対する抗体を用い、歯根膜由来の細胞の中にもSTRO-1陽性細胞が存在するデータを得ている。これらの細胞がセメント質、骨、歯根膜への分化能および歯周組織再生へ応用への可能性について現在検討中である。

② 担体の選択

現時点での臨床応用可能と考えられる担体を以下に示す。

a) 吸収性：

β -TCP (β -TriCalcium Phosphate)

PGA (PolyGlycolicAcid) メッシュ/スポンジ

PLLA (Poly-L-LacticAcid) メッシュ/スポンジ

コラーゲンメッシュ/スポンジ/ビーズ

フィブリンゲル

ゼラチンゲル

他家骨、異種骨材料

b) 非吸収性：

多孔性セラミックス、多孔性HA (HydroxyApatite)

c) 骨類似複合体材料：

ハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体

担体については、細胞による新規細胞外マトリックスを合成するための機械的な安定性に重要な役割を果たしており、材料の機械的特性がその組織のものと適合することが望ましい。一方、骨芽細胞は移動能が高く、生体親和性、骨伝導能性の担体があればその進入を期待できる。条件として200~400 μ mの気孔構造を持つこと²⁹⁾、それぞれの気孔が連結されていること³⁰⁾が必要となる。上記の担体はいずれも良好な細胞付着性および生体内における骨伝導性、血管侵入性を示す。

TCPはHAと同様リン酸カルシウム系セラミックスの一種であるが、HAと異なり生体内において吸収され最終的には新生骨に置換される。焼成温度の違いにより吸収速度の遅い α タイプ、速やかな β タイプに分類される。 β -TCPは既に単体で歯周治療に応用されており(SynthograftR)、その吸収性の速さから比較的狭い骨欠損部への一時的な補填材として推奨されている。これに細胞を播種・増殖させ移植することにより更に効率的な骨再生を期待できる。口腔外の他の部位、特

に過重負担部位へは強度および吸収速度の速さから強固な創外固定が必要になることが予想される。生体吸収性ポリマーであるPGAやPLLA、コラーゲンをを用いた研究も盛んに行われ^{31, 32)}臨床応用に期待される担体材料である。PGA、PLLA、コラーゲンともに良好な細胞進入性を示すとともに高い賦形性により移植部位に適合させやすいなどの利点があるが強度的な問題が残る。部位によってはそれ単体ではなくチタンプレートのような補強材とともに用いることが必要である。またPGAやPLLAは工業的に大量生産が可能であり安価であるが、抗原性に関しては完全にはクリアーされておらず今後の改良が待たれる材料である。非吸収性の多孔性ハイドロキ

シアパタイトは単独でも良好な骨伝導能を有し、部分的ではあるが吸収性のある材料であることがわかってきている^{33, 34)}。歯科領域においては80年代より製品化され移植材料としての信頼性は高いが恒久的に骨欠損を消失させうる材料ではないことが次第に明らかになり、細胞移植との併用によりこの問題点が解決されることが望まれる。口腔外においては、 β -TCPに比較して移植直後の強度は確保しやすいため、成人においては適応の範囲は広くなると考えられる。

2). 成長因子 - 担体

① 成長因子の選択

近い将来、臨床応用の実現可能な段階にある成長因子を以下に示す。

rhFGF-2 (basic Fibroblast Growth Factor)
 rhBMP-2 (Bone Morphogenetic Protein)
 TGF- β (Transforming Growth Factor- β : Cartilage Inducing Factor)
 IGF (Insulin Like Growth Factor)
 GDF (Growth Differentiation Factor)

現在までに多数のFGFが同定されており、骨再生におけるFGFsの役割が解析されている^{35, 36, 37)}。FGFは単なる線維芽細胞増殖因子ではなく生物の形態形成において重要な細胞間シグナル分子として働き、骨形成における機能はその一部であると考えられる。bFGF (FGF-2)は、*in vitro*において骨細胞、軟骨細胞の増殖を促進し³⁸⁾、また*in vivo*においては血管新生作用が認められており³⁹⁾、骨新生に対しても促進的に働くと考えられる。

rhFGF-2を、凍結乾燥I型コラーゲンを担体としてウサギ下顎骨欠損部へ埋入移植した実験では、担体のみの対照側と比較して著しい骨増生が起こったことが報告されている。また同動物においてrhFGF-2・コラーゲン/多孔性ハイドロキシアパタイト複合体が良好な骨伝導能を有したことも示されている。一方、微量なFGFが持続的に放出されるような固形のコラーゲンペレットを担体としてウサギ大腿骨離断部に作製した広範な骨欠損部

位に移植した実験では著しい骨新生を示した⁴⁰⁾。この他ウサギ⁴¹⁾およびカニクイザル⁴²⁾頭骸骨において rhFGF-2 含浸ゼラチンハイドロゲル移植により骨欠損部での完全な骨再生に成功している。歯周組織再生についてはビーグル⁴³⁾またはカニクイザル⁴⁴⁾に人工的な歯周組織欠損を作製し rhFGF-2・フィブリンゲル/架橋ゼラチン複合体を移植した結果、歯槽骨新生と同時に歯根セメント質・歯根膜組織の再生が起こったことが報告されている。一方、TGF- β も FGF と同様に骨誘導能を示すには至らないが、骨細胞増殖促進作用⁴⁵⁾ および血管新生作用⁴⁶⁾ を有することから *in vivo* において骨伝導能を促進する活性を持ち、比較的小さな骨欠損部の骨再生に対して有効であることがこれまでの研究により示唆されている。また軟骨誘導能を持つことが示されており、間接的に大きな骨欠損部位の有効性を期待できる。BMP の骨誘導能についての研究は 1965 年の発見以来⁴⁷⁾、精製 BMP⁴⁸⁾、続いて遺伝子組み換え型 BMP が得られるようになってから急速に発展した⁴⁹⁾。特に rhBMP-2 については多くの研究が行われ、*in vivo* における強い骨誘導能が報告されている。幼若サルの下顎骨に幅 3cm の離断欠損を作製しチタンプレートによる固定後、担体とともに BMP を移植すると、10 週後のプレート除去時には欠損部に完全な新生骨が形成されることが確認されている⁵¹⁾。一方、多孔性ハイドロキシアパタイト気孔内に陰圧下で rhBMP-2・コラーゲン混合溶液を浸透させ凍結乾燥後ラット下腿部に埋入した実験では、rhBMP-2 はハイドロキシアパタイ

トと良好な親和性を示し気孔内に著明な骨形成を起こした⁵²⁾。このことは応力のかかる部位を想定した場合、ある程度初期強度を備えた移植材料としてハイドロキシアパタイトが有効であることを示すと同時に rhBMP-2 の強力な骨誘導能を表している。またさらに大規模な骨欠損を想定し、長管骨の欠損に対して海綿骨と同等の機械的強度を持つハイドロキシアパタイト・コラーゲン複合体からなる骨類似複合体材料に rhBMP-2 を含浸させてビーグル犬の脛骨に移植した実験⁵³⁾ では、術後 8 週ですでに創外固定器なしで歩行可能になり、術後 24 週では骨髓腔をもった完全な長管骨の再生が確認されている。この他数多くの研究から BMP の有する強力な骨誘導能は、かなりの広範囲にわたる骨再生においても応用し得る可能性が示唆されている。ヒトにおいては口腔外科および整形外科領域において既に臨床治療が行われているが、ヒトでは rhBMP-2 による骨・軟骨形成が誘導されにくいことが知られており⁵⁴⁾、分化の可塑性がヒトにおいては制限されていることが明らかになりつつある。より効果的な臨床応用に向けて動物種間における BMP に対する応答性の差がどのようなメカニズムに起因するのか解明する必要がある。歯周組織再生においては、数多くの報告がされているが、筆者らの研究室ではビーグル犬の臼歯部に人工的に作製した歯槽骨欠損部に rhBMP-2 含浸ゼラチンスポンジを埋植したところ著しい歯槽骨の再生を認めた⁵⁰⁾。しかし新生骨形成に対する効果と比較すると、セメント質形成は少なく、骨性癒着が生じる場

合があるなど、いくつかの問題点が明らかとなっている。また BMP ファミリーに属する GDF-5, 6, 7 と歯周組織再生との関連についても解析を行っている。GDF-5, 6, 7 は腱や靭帯組織の分化に関与し、異所性に移植を行うと、腱靭帯様組織を形成することが知られているが、歯胚の中でセメント質、歯根膜、固有歯槽骨に分化する歯小嚢に GDF-5, 6, 7 が発現し⁵⁵⁾、さらに歯根形成期には歯根膜細胞、セメント芽細胞、歯槽骨壁の骨芽細胞に発現していることを *in situ* hybridization で明らかにしている⁵⁶⁾。このようなことから、GDF-5, 6, 7 も歯周組織において、歯根膜の形成およびそのセメント質、歯槽骨への付着の形成に関与している可能性が考えられ、歯周組織再生治療におけるその有用性が示唆される。

② 担体の選択

成長因子を包埋する担体については、細胞 - 担体複合体のものに準じ、十分な初期強度、生体における吸収性および吸収速度、血管侵入性、また欠損部適合性の観点から自在な賦形能を持つことなどが要求される。これらに加え、含浸した成長因子を一定期間にわたって適度に放出し続ける物質徐放性が求められる。FGF は過剰に反応させると骨芽細胞に対してアポトーシスを誘導することや⁵⁷⁾、高濃度では逆に軟骨・骨形成を強力に抑制することも知られており⁵⁸⁾、このことから成長因子の放出を時間的・空間的にコントロールできる担体が望ましい。

3). 細胞 - 成長因子 - 担体

適当な成長因子によって細胞の増殖・分化が促進され、血管増生による栄養条件の向上、また移植材周辺組織改変への作用を期待した薬物徐放など、3 者を併用した場合にはより効率的な組織再生が期待できるかもしれない。しかしその前に成長因子の移植細胞に対する詳細な作用機序の解明が必要になる。現段階ではこれまで述べた移植細胞と 1 種類もしくは複数の成長因子の併用が考えられる。動物実験においては、コラーゲンビーズに骨髄細胞を付着増殖させ BMP 含有コラーゲングエルとともに移植する方法により、霊長類の顎骨の大幅な再生に成功している⁵³⁾。この方法は移植細胞数を格段に増やすことが出来ると同時に欠損部への優れた適合性および成長因子の効果的な併用を可能にしており、臨床応用にて成果が期待される技術の一つである。

4). 骨補填材料を用いる場合

高い骨誘導能もしくは骨伝導能をもつ補填材を欠損部位へ充填し骨再生を期待するものであるが、細胞や成長因子などを併用した場合に比べ、移植条件の設定をより簡略化することができ、材料学的性質の自由度も高くすることが可能であるが、欠損範囲が広い場合には補填材内部の骨新生が起こりにくいことが予想され、現段階では狭い欠損範囲内での適応に限定されると考えられる。現在本邦で治験段階にある骨補填材料ではノリアン SRSR がある。これは α -TCP を主成分とする骨補填材でペースト状態では適度な流動性および賦形性をもつが生体内へ移植する (37°C の温度条件にお

く)と練和後 5~10 分間で硬化して 10MPa の初期高度に達し、12 時間後には材料のもつ最高強度 55Mpa に達する。反応が急速に進行する過程においても補填材は生理的に許容される温度および pH に維持され、またその硬化物は天然骨無機質の大半を占める dahlite からなっており生体親和性が高く吸収置換を繰り返す骨代謝の生理的なプロセスを阻害しないことが明らかになっている。使用態様の類似した骨補填材として先に認可されているバイオベックスRがあるが、このような材料学的性質により、不定形

を呈する骨折部位や骨欠損内に専用のアプリケーターを用いることにより最小限の外科処置で注入が可能になるため患者の手術侵襲低減に寄与するとともに、急速な硬化によってもたらされる早期の機能回復により就床期間の短縮にも期待されている。このように骨補填材はその性質および使用法に高い自由度を付与することが出来る。

Ⅲ. 臨床応用までに予想される期間

1) 細胞-担体

細胞ソース	担体	予想時期	その他
骨髄由来細胞	β -TCP、PGA、PLLA、 コラーゲンゲル、フィブリンゲル ゼラチンゲル、多孔性 HA、 上記の複合体 etc	現在~	動物実験において有効性が確認され、実際に一部医療機関で臨床応用が始まっている。
骨膜由来細胞	同上	現在~	上に比べ手術侵襲が大きく、また骨髄由来細胞より骨芽細胞を樹立できる為、あまり必要性がない。
血液、脂肪組織由来細胞	同上	5年以上	骨前駆細胞の樹立は、理論的には可能であるが未だ研究段階であり、今後の動物実験を含めた報告が待たれる。

歯周組織再生（上記に加えて）

歯根膜由来細胞	同上	2年以内	歯周組織再生において重要な役割を果たす細胞であり、その有効性は動物実験において確認されている。歯根膜組織特異的なマーカーについての、より詳細な解析が待たれる。細胞の採取方法に問題を残す。
歯根膜由来体性幹細胞	同上	5年以上	歯根膜由来細胞中に組織幹細胞の存在を示唆する報告はある。

2) 成長因子-担体

成長因子	担体	予想時期	その他
bFGF	PGA、 PLLA 、 コラーゲンゲル、フィブリンゲル	3年以内	直接的には骨誘導能を持たないとされるが、強力な血管新生作用および骨芽細胞増殖能により、動物実験において骨再生を起こすことが確認されている。
rhBMP-2	同上	現在～	動物実験により骨再生に寄与することは明らかであり、すでに臨床治験が始まっているが、効果的な臨床応用に向けてヒトを含めた霊長類への有効性については、投与条件の設定、作用機序など解決する点が多い。
TGF-β	同上	3年以内	動物実験において有効性は確認されている。
GDF-5, 6, 7	同上	5年以上	腱、靭帯、歯周組織の発生期において重要な役割を果たしている因子である。より詳細な検討と動物実験での有効性の確認が待たれる。

- 3) 細胞-成長因子-担体
1)、2)に同じ。

4) 骨充填材

	主成分	予想時期	その他
骨セメント材	α-TCP、炭酸カルシウム etc	現在～	手術侵襲低減、就床期間の短縮において有利である。適応範囲の拡大に期待される。

IV. 有効性の評価方法について
対象は骨再生治療の結果に対して不利に働くことが予想される医学的条件を持たず、共通の理由により一定の骨欠損を有した者から選択された被験者群において、治験実施医療機関ごとに層別置換ブロックランダム割付法により無作為に2群に振り分け、一

方を実験群として医療用具を適応し、もう一方を対象群として適応せずに手術を完了する。新生骨形成の評価法はX線画像診断が中心となる。術前および術後の骨欠損部のコントラストを比較することで移植材料の補填状態を確認するとともに、補填部位の経時的な変化を観察評価する。画像の規

規格化を図るために常にX線画像診断による判定は、手術担当医師以外の治験分担医師によって行われる。またX線不透過度を補正するためのステップウェッジや骨欠損部辺縁の位置を明示するためのインジケータの使用によりX線画像診断の信頼性や再現性を向上させる。撮影時期は移植材料に

より前後するが、手術前(手術当日)、術後2週間、術後6ヶ月、術後12ヶ月、および24ヶ月時点でのX線画像の比較に基づき骨透過像の変化などを独自の基準に従って設定されたスコアで評価する。以下にX線透過性材料を用いた場合のスコアの一例を示す。

- 0：骨透過像は認められず、明瞭な骨梁を確認できる。
- 1：骨透過像が消失し、欠損部位全体に一様の不透過像が確認される。
- 2：骨透過像を示す領域が減少している。
- 3：骨透過像に変化が見られない。
- 4：骨透過像の拡大等、疾患の憎悪を認める。

歯周組織再生領域においては、厳密な撮影条件の規格化が要求されるためフィルム保持器やステントを利用する。また歯牙支持組織の再生度の判定として最も重要な検査項目、臨床的アタッチメントレベルについての検査を行う必要があり、プロービング値計測などの歯周組織検査を同時に行い

評価する。

V. 安全性の評価方法について
移植材料の物理的および化学的性質、安定性、生物学的安全性について試験を行う。おもに担体として使用する移植材料についての評価が中心となる。

- 1. 材料学的性状：外観、流動性、圧縮強度、崩壊率、粒度分布、硬化反応、蛍光X線分析(硬固物)
- 2. 材料学的安定性：長期安定性試験、過酷試験、材質劣化試験
- 3. 生物学的安全性：急性全身毒性、変異原性、細胞毒性、埋植、感作性、皮内反応、発熱性物質、溶血性

実際の移植に関しては、手術前、手術直前および術後の所定の時期に全身状態、局所状態の調査を行うとともに、

自覚もしくは他覚的な有害事象の発生の有無について予後経過を追跡する。

- 1. 手術部位の自他覚症状
- 2. 全身的臨床検査

1. 手術部位の自他覚症状

充填部位について疼痛や違和感を問診し、同時に他覚症状を確認する。疼痛、違和感については独自に設定したスコアで段階的に判定し、自他覚症状ともに異常所見が確認されなかった場合以外は有害事象ありと記録する。

2. 全身的臨床検査

所定の時期に検体を採取して検査を実施する。血液学的検査（白血球数、赤血球数、ヘモグロビン量、血小板数、白血球分類）、生化学的検査（GOT, GPT, ALP, BUN, Na, K, Cl, Ca, P, クレアチニン）、尿検査（総タンパク、糖、沈渣）、炎症性反応（CRP, 赤沈）について検査し、正常値から逸脱しているものについては治療用具との関連性を判定する。

VI. 臨床応用後に発生しうる危険性・問題点

他家もしくは異種生体組織由来の骨移植材料については、どんなに処理されていようとも感染の可能性は0にはならない。ちなみに1994年には医科全体で35万症例（うち歯科では56000症例）の他家骨移植が行われたが、感染の報告は1例もない。しかし未知のウイルスやプリオンのような新種の感染も出てくることは十分考えられる。また細胞の足場として用いられる担体は口腔内のような感染の可能性の高い部位においては細菌の足場ともなり、感染のリスクファクターになり得る。特に非吸収性材料においてはその危険性が高くなる傾向がある。移植材料の経時的な変化も問題である。非吸収性材料における経年的劣化による強度低下、それに続く再骨折、ま

た吸収性材料の分解遅延による骨再生への影響など、臨床応用に先立って移植材の生体内動態についても詳細に検討されるべきである。再生する新生骨の性状も問題になり、特に長管骨のような外力の加わる部位においては機能力負担構造が欠落した場合は致命的となる。より確実性の高い骨再生を達成するためには足場となる重合体のデザインなども含め、より詳細な検討が必要である。また成長因子による細胞増殖は治癒過程においてその促進と抑制が厳密にコントロールされて成り立っている。一方、癌遺伝子の発現は成長因子と互いに密接に関連しあっていることも明らかになっており、安易な成長因子の投与による異所性骨化や過剰な骨増生の危険性も考えられる。歯周組織においては新生骨の過剰な増生による歯根面へのアンキローシス（骨性癒着）の危険性を常に念頭に置くべきである。アンキローシスが生じた場合には歯根膜組織による咬合圧負担機能は失われ、また歯根吸収を併発し結果的に歯牙の脱落を招く。

一方、骨髄採取時の危険性としては偶発的事故がある。厳密な安全管理のもと全身麻酔下で行なわれたにも関わらず、非常に低い確率ではあるが致命的な事故が報告されている。これまでに全世界で4例の死亡事故が報告されており、ほとんどが全身麻酔の合併症である。

VII. 参考文献

- 1). Vacanti, C. A., Kim, W. S., Upton, J., Vacanti, M. P., Mooney, D., Schloo, B. and Vacanti, J. P. (1993). Tissue Engineered growth of bone and cartilage. *Transplant. Proc.* 25 (1), 1019-1021
- 2). Haynesworth, S. E., Goshima, J., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone* 13, 81-88
- 3). Nakahara, H., Bruder, S. P., Haynesworth, S. E., Holecek, J., Baber, M., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. (1990). Bone and cartilage formation in diffusion chambers by subcultured cells derived from the periosteum. *Bone* 11, 181-188
- 4). Nakahara, H., Goldberg, V. M., and Caplan, A. I. (1992). Cultured-expanded periosteal-derived cells exhibit osteochondrogenic potential in porous calcium phosphate ceramics in vivo. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 276, 291-298
- 5). Beresford, J. (1989). Osteogenic stem cells and the stromal system of bone marrow. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 240, 270-280
- 6). Bruder, S. P., Gazit, D., Passi-Even, L., Bab, I., and Caplan, A. I. (1990). Osteochondral differentiation and the emergence of stage-specific osteogenic cell-surface molecules by bone marrow cells in diffusion chambers. *Bone Miner.* 11, 141-151
- 7). Caplan, A. I. (1991). Mesenchymal stem cells. *J. Orthop. Res.* 9, 641-650
- 8). Dennis, J. E., and Caplan, A. I. (1993). Porous ceramic vehicles for rat-marrow-derived (*Rattus norvegicus*) osteogenic cell delivery: Effect of pre-treatment with fibronectin or laminin. *J. Oral. Implant.* 19, 106-115.
- 9). Dennis, J. E., and Caplan, A. I. (1996). Differentiation potential of conditionally immortalized mesenchymal progenitor cells from adult marrow of a H-2K^b-tsA58 transgenic mouse. *J. Cell. Physiol.* 167, 523-538
- 10). Dennis, J. E., Merian, A., Awadallah, A., and Caplan, A. I., (1998). A quadripotential mesenchymal progenitor cell isolated from the marrow of an adult mouse. *J. Bone. Miner. Res.* 14, 1-10.
- 11). Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S. and Marshak, D. R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
- 12). Bruder, S. P., Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., (1997). Growth kinetics, self-renewal and the osteogenic potential of purified human mesenchymal stem cells during extensive subcultivation and following cryopreservation. *J. Cell. Biochem.* 64 (2), 278-294.

- 13). Bruder, S. P., Jaiswal, N., Ricalton, N. S., Kraus, K. H., and Kadiyala, S., (1998). Mesenchymal stem cells in osteobiology and applied bone regeneration. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 355 ; 247-256
- 14). Bruder, S. P., Horowitz, M. C., Mosca, J. D., and Haynesworth, S. E., (1997). Monoclonal antibodies reactive with human osteogenic cell surface antigens. *Bone* 21, 225-235
- 15). Jaiswal, N., Haynesworth, S. E., Caplan, A. I. and Bruder, S. P., (1997). Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *J. Cell. Biochem.* 64 (2), 295-312.
- 16). Ferrari G, Cusella-De Angelis G, Coletta M, Paolucci E, Stornaiuolo A, Cossu G, Mavilio F. (1998). Muscle regeneration by bone marrow-derived myogenic progenitors. *Science* 279, 1528-1530
- 17). Patricia, A. Z., (2002). *Tissue Engineer* 7, 211-228
- 18). Kuznetsov SA, Mankani MH, Gronthos S, Satomura K, Bianco P, Robey PG., (2001). Circulating skeletal stem cells. *J. Cell. Biol.* 153, 1133-1140.
- 19). Oreffo, R. O., Bord, S., and Triffitt, J. T., (1998). Skeletal Progenitor cells and ageing human populations. *Clin. Sci.* 94 (5), 549-555.
- 20). Muschler, G. F., Boehm, C., Easley, K., (1997). Aspiration of obtain osteoblast progenitor cells from human bone marrow: The influence of aspiration volume. *J. Bone. Jt. Surg.* 79 (11), 1699-1709.
- 21). Yamada, S., Murakami, S., Maibara, R. et al (2001). Expression profile of active genes in human periodontal ligament and isolation of PLAP-1, a novel SLRP family gene. *Gene* 275:279-286.
- 22). Saito, Y., Yoshizawa, T., Takizawa, F., et al (2002). A cell line with characteristics of the periodontal ligament fibroblasts is negatively regulated for mineralization and Runx2/Cbfa1/Osf2 activity, part of which can be overcome by bone morphogenetic protein-2. *J. Cell. Sci.* 115, 4191-4200
- 23). D'Errico, J. A., MacNeil, R. L., Takata, T., Berry, J., Strayhorn, C., Somerman, M. J., (1997). Expression of bone associated markers by tooth root lining cells, in situ and in vitro. *Bone* 20, 117-126.
- 24). Saito, M., Iwase, M., Maslan, S., et al, (2001). Expression of cementum-derived attachment protein in bovine tooth germ during cementogenesis. *Bone* 29, 242-248.
- 25). Komaki, M., Kang, M., Narayanan, A. S., (2000). Role of MAP kinases p42erk-2/p44erk-1 in cementum-derived attachment-protein-mediated cell attachment. *J. Dent. Res.* 79, 1789-93.
- 26). Zhao, M., Berry, J. E., Franceschi, R. T., et al (2002). Bone morphogenetic protein-2 induces

- dental follicle cells to differentiate toward a cementoblast/osteoblast phenotype. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1441-1451.
- 27). Lang, H., Schuler, N., Arnhold, S., et al (1995). Formation of differentiated tissues in vivo by periodontal cell populations cultured in vitro. *J. Dent. Res.* 74, 1219-1225.
- 28). Lang, H., Schuler, N., Nolden, R. (1995). Attachment formation following replantation of cultured cells into periodontal defects—a study in minipigs. *J. Dent. Res.* 77, 393-405.
- 29). Boyan, B. D., Hummert, T. W., Dean, D. D., Schwartz, Z., (1996) Role of material surfaces in regulating bone and cartilage cell response. *Biomaterials* 17, 137-146.
- 30). Ohgushi, H., Okumura, M., Yoshikawa, T., Inoue, K., Senpuku, N., Tamai, S., Shors, E.C., (1992). Bone formation process in porous calcium carbonate and hydroxyapatite. *J. Biomed. Mater. Res.* 26, 885-895.
- 31). Kinoshita, Y., (2002). In "Method of tissue engineering" (Atala, A. & Lanza, R. P. eds) Chapter 107, 1195-1204, Academic press, San Diego, 2002.
- 32). Isogai, N., Landis, W., Kim, T. H., Gerstenfeld, L. C., Upton, J., Vacanti, J. P., (1999). Formation of phalanges and small joints by tissue-engineering. *J. Bone Joint. Surg. Am.* 81, 306-316.
- 33). Uchida, A., Araki, N., Shinto, Y., Yoshikawa, H., Kurisaki, E., Ono, K., (1990). The use of calcium hydroxyapatite ceramic in bone tumour surgery. *J. Bone Joint. Surg. Br.* 72, 298-302
- 34). Hasegawa, M., Doi, Y., Uchida, A., (2003). Cell-mediated bioresorption of sintered carbonate apatite in rabbits. *J. Bone Joint. Surg. Br.* 85, 142-147.
- 35). Kawaguchi, H., Nakamura, K., Tabata, Y., Ikada, Y., Aoyama, I., Anzai, J., Nakamura, T., Hiyama, Y., Tamura, M., (2001). Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 875-880.
- 36). Kuroda, S., Kasugai, S., Oida, S., Iimura, T., Ohya, K., Ohyama, T., (1999). Anabolic effect of aminotermally truncated fibroblast growth factor 4 (FGF4) on bone. *Bone* 25, 431-437.
- 37). Miyake, A., Konishi, M., Martin, F. H., (1998). Structure and expression of novel member, FGF-16, of the fibroblast growth factor family. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 243, 148-152.
- 38). Gospodarowicz, D., Ferrara, N., Schweigerer, L., (1987). Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr. Rev.* 8, 95-114.
- 39). Folkman, J., Klagsbrun, M., (1987). Angiogenic factor. *Science* 235, 442-447.