

イソフラボンの骨形成促進効果の検討—*in vitro*—

奥村紀子¹・吉川隆章^{*1}・飯田 仁²・市島國雄¹・高倉義典²

¹奈良県立医科大学第一病理学教室 ²同整形外科教室

Osteogenic Effect of Genistein on Cultured Bone Marrow Cells

Noriko OKUMURA¹, Takafumi YOSHIKAWA^{*1}, Jin IIDA²,
Kunio ICHIJIMA¹ and Yoshinori TAKAKURA²

Departments of Pathology¹ and Orthopaedic Surgery², Nara Medical University, Nara 634-8521

ABSTRACT

The effect of genistein, a soybean isoflavone, on new bone formation by bone marrow cells from mature rats and humans was examined. Bone marrow cells were collected from the femoral diaphysis of 7-week-old Fisher rats, cultured in MEM containing fetal calf serum and then cultured with or without the addition of dexamethasone to the bone-forming medium. Genistein was added at concentrations of 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} or 10^{-8} M. Bone formation was examined 2 weeks after culture. After informed consent was obtained from a 55-year-old woman with lumbar spondylosis deformans, bone marrow cells were collected from her ilium for culture by the same process, and bone formation investigated. In both rats and humans, when dexamethasone was added to the bone-forming medium, genistein (10^{-7} M and 10^{-8} M) caused a significant increase in the levels of calcium, alkaline phosphatase, and DNA compared with cells not cultured in genistein. In conclusion, genistein was found to promote bone formation at physiological concentrations across species, and thus may be useful as a bone formation-promoting factor. *Soy Protein Research, Japan* **6**, 128-134, 2003.

Key words: genistein, osteogenesis, marrow, dexamethasone

大豆たん白質は、生体内において様々な作用を来すことより、種々の慢性疾患予防が期待されている^{1,2)}。中でも大豆たん白質の一種であるgenistein, daidzein, glyciteinなどのイソフラボンは、エストロゲンと構造

が類似しておりレセプターを競合することから、微弱的なエストロゲン作用を示すことが知られている³⁾。このことを利用し閉経後の女性の動脈硬化や骨粗鬆症の治療、さらに前立腺がん予防にもなるという報告もあり注目されている。

殊に、骨吸収抑制機序が認めることや、エストロゲ

^{*}〒634-8521 橿原市四条町840

ン投与に認められるような女性生殖器への発がん性もないことから⁴⁾、骨特異性にエストロゲン類似作用があると考えられており、今後骨粗鬆症への治療にも利用されると期待される。しかしながら、genisteinの骨代謝に与える効果については、不明な点が多い。

一方、1988年Maniatopoulousらは骨髄細胞培養の際にデキサメサゾンなどを加えて培養すると、bone like tissueが形成されると報告した⁵⁾。この培養骨組織は、形態学的にも生化学的にも、遺伝子発現的にも骨組織としての機能をもつことが報告された^{6~10)}。このin vitro骨形成実験モデルを用いて、今回我々は、成熟ラットとヒトにおいて、培養時にgenisteinを負荷し、骨代謝への影響を検討した。

方法と材料

ラット骨髄細胞培養におけるgenisteinの効果の検討

7週齢雄Fischer系ラットの大腿骨の骨幹部より骨髄細胞を採取し、T-75フラスコで初期培養した。培地は α -Minimal Essential Medium (MEM) に、15%牛胎仔血清、抗生剤 (Sigma) を含む標準培地を使用した。7日間初期培養後、0.01%トリプシン処理により細胞浮遊液を調整した。

細胞浮遊液を 10^4 cells/cm²濃度で6 well plateへ播種し、デキサメサゾン負荷群と非負荷群に分けて、それぞれにgenisteinを 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} Mの濃度ずつ負荷したグループを作成した。2週間培養後、培養組織を肉眼的、顕微鏡的に観察し、各々のグループでAlkaline phosphatase (ALP) 活性、Ca量を測定した。

デキサメサゾン負荷群の培地は、 α MEMに、15%牛胎仔血清、抗生剤を含む標準培地に 10^{-8} M dexamethasone (Dex, Sigma)、10 mM Na β -glycerophosphate (MERCK)、82 μ g/mL ascorbic acid phosphate (Wako Co. Japan) を加えたものを使用した。非負荷群の培地は、標準培地を用いた。

ALP活性の測定 2週間培養した培養組織を各培養皿底面より、scraperで収集し2 mLのエッペンドルフチューブに入れた。0.2% Nonidet P40を1 mL加え、超音波により細胞分解した後、遠心分離 (4℃, 13,000回転/分, 10分間) を施行し、上清をALPの酵素液とした。酵素液5 μ Lをassay buffer (0.56 M 2-amino-2-methylpropanol (AMP), 1.0 mM MgCl₂, 10 mM p-nitrophenyl phosphate) 1 mLを加え、37℃でIncubationし、30分後、0.2 M NaOHを2 mL加え反応停止後、OD 410 nmの吸光度を測定した。ALP活性は、検量線により、p-nitrophenolの μ mol数で表現した¹¹⁾。

Ca量の測定 上記の沈澱物に、20%蟻酸1 mLを加え、1週間冷蔵庫 (4℃) にて振騰し脱灰した。脱灰後、遠心分離 (4℃, 13,000回転/分, 10分間) し、上清のCaを測定した。CaはOCPC法 (o-Cresolphthalein complexon, Wako Pure Chemical Industries, Ltd, Japan, code 272-21801) にて測定した⁵⁾。

ヒト骨髄細胞培養におけるgenisteinの効果の検討

変形性腰椎症の55歳の女性より、同意を得て、手術中全身麻酔下で、腸骨より3 mL採取し、2つのT75フラスコに播種し標準培地で初期培養した。2週間培養して得られた骨髄間葉系細胞を0.01%トリプシン処理により細胞浮遊液を調整した。

ラット骨髄細胞と同様に培養細胞をデキサメサゾン負荷群と非負荷群とにし、それぞれにgenisteinを 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} Mの濃度ずつ負荷したグループを作成し2週間培養後、培養組織を肉眼的、顕微鏡的に観察し、ALP活性、DNAを測定した。

ALP活性 前述したように、同様にしてALP活性を測定した。

DNAの測定 2週間培養した培養組織を各培養皿底面より、scraperで収集し2 mLのエッペンドルフチューブに入れた。0.5 mL buffer (0.05 M NaPO₄, 2.0 M NaCl, 2×10^{-3} M EDTA, pH7.4) を加え、30秒間間隔をおいて3回超音波にて培養組織を破碎した。その0.1 mLにHoechst 33258の0.9 mLを加え、蛍光 (356 nm, excitation and 492 emission) を測定した¹²⁾。標準曲線は、牛胸腺DNAを用いて作製した。

なお、ラット、ヒト共に1グループは6 wellから成り、それぞれの値を統計処理した。

統計処理

測定値はMicrosoft Excel 2001を使用し、平均値 $\pm$ 標準偏差で表し、二群間の比較は対応のないMann-WhitneyのU検定を用いた。

結 果

ラット骨髄細胞培養皿の肉眼的および顕微鏡的所見

ラット骨髄細胞培養皿の肉眼的写真をFig. 1に示す。デキサメサゾンを負荷しない培養皿 (Fig. 1-A) では、白色の石灰化細胞結節は見られないが、デキサメサゾンを負荷することで、培養皿上に白色の石灰化細胞結節が多数見られる (Fig. 1-B)。Genistein 10^{-5} Mを添加すると、石灰化が抑制され骨形成が見られなかった (Fig. 1-C)。Genistein 10^{-6} M添加した群では、わずかに石灰化細胞結節が見られるのみであった (Fig. 1-D)。Genistein 10^{-7} M、 10^{-8} Mを添加した群 (Fig. 1-E, F)

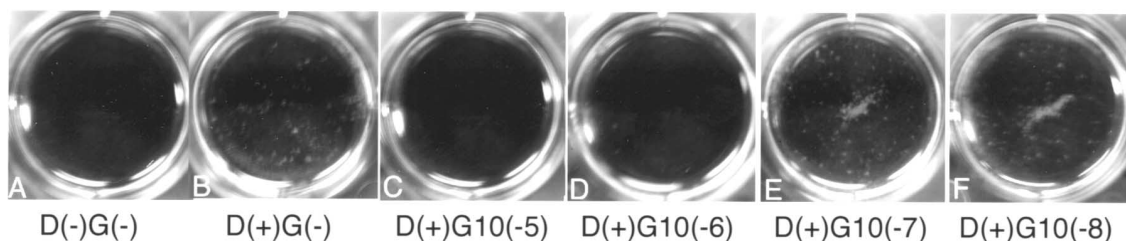


Fig. 1. Photographs of cultured rat bone marrow cells after 2 weeks of incubation. A, Dex (-) genistein (-); B, Dex (+) genistein (-); C, Dex (+) genistein 10^{-5} M; D, Dex (+) genistein 10^{-6} M; E, Dex (+) genistein 10^{-7} M; F, Dex (+) genistein 10^{-8} M. When genistein was added at 10^{-7} M or 10^{-8} M (E and F), it was macroscopically obvious that more white, calcified nodules were formed than in the absence of genistein (B).

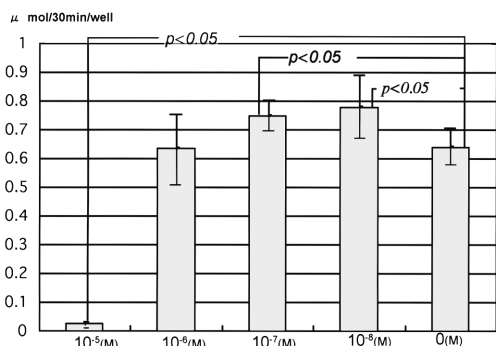


Fig. 2-A. ALP activity of genistein-treated rat bone marrow cells cultured with dexamethasone. High activity was observed in cultures with 10^{-7} and 10^{-8} M genistein.

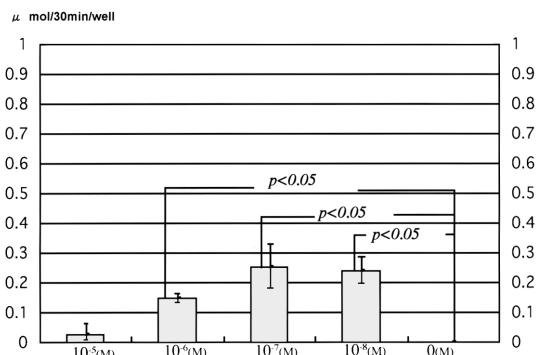


Fig. 2-B. ALP activity of genistein-treated rat bone marrow cells cultured without dexamethasone. Values were lower compared with culture in the presence of dexamethasone, but the activity was relatively high in cultures with 10^{-6} , 10^{-7} , and 10^{-8} M genistein.

では、genisteinを添加しない群より、白色の石灰化細胞結節が、より多数形成されるのが肉眼的に観察された。

ラット骨髓細胞培養 (Dex(-), Genistein(-), Fig. 1-A) の位相差顕微鏡像では、紡錘形細胞の密な増殖が見られるが、石灰化細胞結節は見られなかった。ラット骨髓細胞培養 (Dex(+), Genistein 10^{-5} M, Fig. 1-C) の位相差顕微鏡像では、培養細胞の増殖は抑制され、骨の再生像は見られなかった。ラット骨髓細胞培養 (Dex(+), Genistein 10^{-7} M, Fig. 1-E) 位相差顕微鏡像では、培養細胞は重層化し、石灰化基質が多数見られた。ラット骨髓細胞培養 (Dex(+), Genistein 10^{-8} M, Fig. 1-F) でも同様に多数の石灰化細胞結節が観察された。

ラット骨髓細胞培養時におけるALP活性

デキサメサゾン負荷群 genisteinの濃度が 10^{-8} , 10^{-7} MのALP活性が最も高値を示し、いずれもgenisteinを負

荷しないコントロールとの間に有意差を認めた。 10^{-5} Mでは、コントロール群に比し有意に抑制される結果となった (Fig. 2A)。

デキサメサゾン非負荷群 genisteinを添加していないコントロール群のALP活性値が測定感度以下であった。しかし、コントロール群に比べ、 10^{-6} , 10^{-7} M、および 10^{-8} Mの濃度で有意にALP活性値が上昇したが、 10^{-5} Mの濃度では上昇したものの有意差は認めなかった (Fig. 2B)。

ラット骨髓細胞培養時におけるCa量

デキサメサゾン負荷群 genisteinの濃度が 10^{-7} , 10^{-8} Mの濃度でコントロールに比し有意にCaが上昇したが、 10^{-5} , 10^{-6} Mの濃度では、抑制され、コントロールとの間に有意差も認めた (Fig. 3A)。

デキサメサゾン非負荷群 全てのグループでCaは測定感度以下であった (Fig. 3B)。

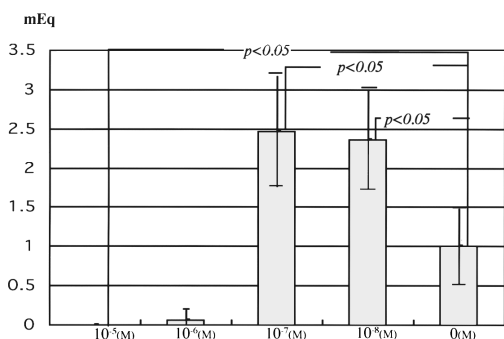


Fig. 3-A. Ca level of genistein-treated rat bone marrow cells cultured with dexamethasone. High levels were observed in cultures with 10^{-7} and 10^{-8} M genistein.

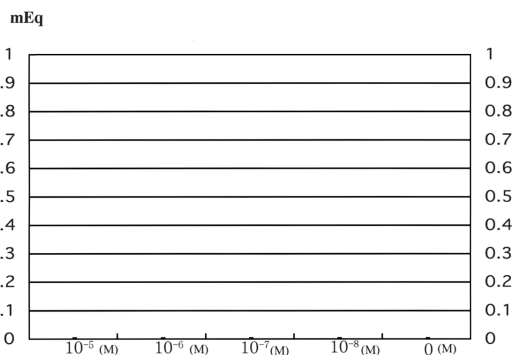


Fig. 3-B. Ca level of genistein-treated rat bone marrow cells cultured without dexamethasone. Ca was below the measurable limit in all cases.

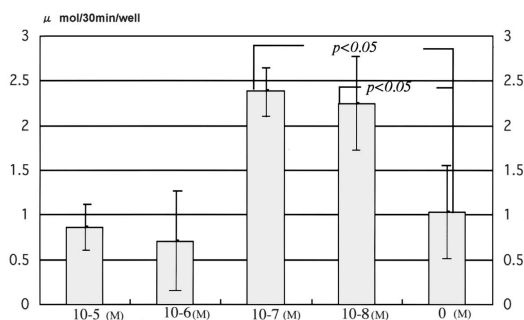


Fig. 4-A. ALP activity of genistein-treated human bone marrow cells cultured with dexamethasone. High activity was observed in cultures with 10^{-7} and 10^{-8} M genistein.

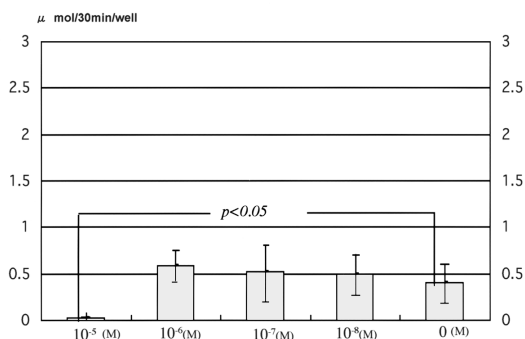


Fig. 4-B. ALP activity of genistein-treated human bone marrow cells cultured without dexamethasone. ALP activity was inhibited by 10^{-5} M genistein.

ヒト骨髄細胞培養皿の顕微鏡的所見

ヒト骨髄細胞培養 (Dex(-), Genistein(-)) の位相差顕微鏡像では、紡錘形細胞の密な増生が見られるが、石灰化細胞結節は見られなかった。ヒト骨髄細胞培養 (Dex(+), Genistein 10^{-7} M) 位相差顕微鏡像では、培養細胞は重層化し、石灰化基質が見られた。

ヒト骨髄細胞培養時におけるALP活性

デキサメサゾン負荷群 genisteinの濃度が 10^{-7} , 10^{-8} Mではコントロールに比し有意にALP活性値が上昇したが、 10^{-5} , 10^{-6} Mの濃度では抑制傾向を認めた (Fig. 4A)。

デキサメサゾン非負荷群 genisteinの濃度が 10^{-6} , 10^{-7} M, および 10^{-8} Mの濃度においてALP活性値の上昇傾向はあったものの有意差は認めなかったが、 10^{-5} Mの濃度ではALP活性値は有意に抑制された (Fig. 4B)。

ヒト骨髄細胞培養時におけるDNA

デキサメサゾン負荷群 genisteinの濃度が 10^{-8} M,

10^{-7} MでDNAが高値を示し、コントロール群との間に有意差も認めた。 10^{-5} M, 10^{-6} Mでは、コントロール群に比し有意にDNAは抑制された (Fig. 5A)。

デキサメサゾン非負荷群 genisteinの濃度が 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} Mで、若干コントロールに比しDNAが上昇したものの有意差は認められず、 10^{-5} Mでは有意にDNAが低下した (Fig. 5B)。

考 察

加齢により男女とも骨量は減少するが、殊に女性は著しくかつ急激で、70歳代では最大骨量の70%まで減少すると言われている。その主因は閉経後のエストロゲン欠乏であることは広く知られており¹³⁾これは閉経後の女性にエストロゲンを補充すれば骨量減少が抑制される¹⁴⁾ことで証明される。そのため、この閉経後骨粗鬆症に対し、欧米では女性ホルモン補充療法

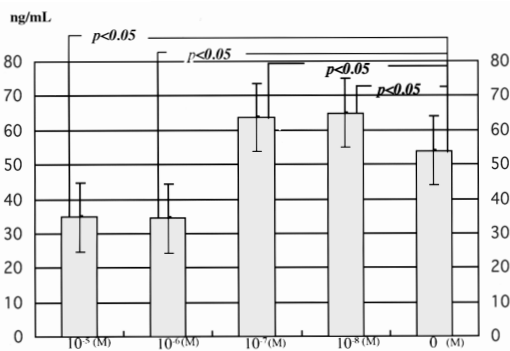


Fig. 5-A. DNA content of genistein-treated human bone marrow cells cultured with dexamethasone. The DNA content was high with 10^{-7} and 10^{-8} M genistein, but was decreased at 10^{-5} M.

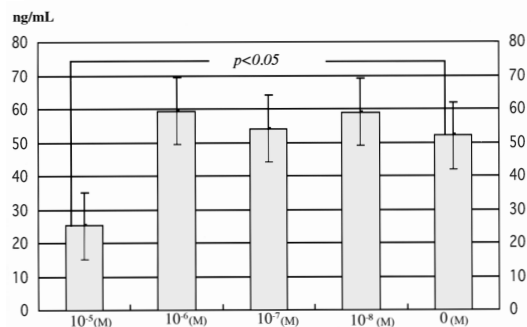


Fig. 5-B. DNA content of genistein-treated human bone marrow cells cultured without dexamethasone. The DNA content was reduced by 10^{-5} M genistein.

(HRT ; hormone replacement therapy) として一般的に施行されている。本邦でも産婦人科領域では徐々に浸透しつつあるが、まだまだ骨粗鬆症に対する治療薬としては、活性型ビタミンD剤やカルシウム製剤程には普及していない。

その理由としてはエストロゲン剤に対するいくつかの問題点が指摘されているからであろう。第一に子宮がんの発生頻度が3～8倍になること¹³⁾、乳房痛や乳がんの発生頻度の増加、また体重増加、不整性器出血や腹満感などの副作用が強調されることで、服薬コンプライアンスが非常に低いことである。そこで、骨のレセプターに対してはエストロゲン作用を持ちながら、生殖器官のレセプターに対しては、副作用となる様なエストロゲン作用を持たないSERM (selective estrogen receptor modulator) が理想的であり、今回我々が検討したgenisteinを始めとする大豆たん白イソフラボンはSERMとなりうると考えられ注目されている¹⁵⁾。

genistein, daidzein, glyciteinなどのイソフラボンは、エストロゲンと構造が類似しており、レセプターを競合することから微弱なエストロゲン作用を示すことが知られているが³⁾、骨特異性であり、前述した様な女性生殖器官への副作用がない。

イソフラボンの骨に対する作用機序としては基本的にエストロゲンと同様であり、以下の様なものと推測される。一部副甲状腺ホルモンを介して消化管や腎尿管でのCaの再吸収を促進し、エストロゲンがビタミンD受容体の発現を調節している可能性もある。また、近年エストロゲン受容体がヒト、トリの破骨細胞¹⁶⁾ヒト、トリ、ウサギの骨芽細胞に^{17, 18)}存在することが報告され、エストロゲンが骨に直接作用しているとも

考えられる¹⁹⁾。さらに、エストロゲンは骨吸収サイトカインとされるIL-1, IL-6, 腫瘍壊死因子 (TNF) などを介して、骨吸収を調節しているともいわれているが、実際、閉経後の骨粗鬆症患者ではIL-1の産生が亢進しており、さらにエストロゲンを補充すれば正常化すること¹⁹⁾、また卵巣摘出した患者のIL-1, TNF α , GM-CSF産生能を経時的に調べたところ、各サイトカインは上昇し、さらにそれらはエストロゲンの補充で正常値まで戻ったということ、がすでに報告され²⁰⁾エストロゲン欠乏により産生亢進したIL-1は破骨細胞前駆物質から破骨細胞への分化を促進し骨吸収を促している可能性がある。一方、genisteinは、エストロゲン作用以外にtyrosinekinaseの阻害作用を有し、骨吸収を抑制するということがすでに知られているが^{21, 22)}このような作用はエストロゲンでは期待出来ない。

今回我々は、ラットとヒトの骨髄細胞培養時に、genisteinを添加し、Ca, ALP活性、およびDNA活性を測定した。骨髄細胞の培養時にデキサメサゾンを負荷すると培養皿上で骨組織の再生が行われるが^{23, 24)}、genisteinを添加することでCa, ALP活性、およびDNAは上昇し、genisteinが骨形成を促進することを示した。もっとも至適濃度はあるようで、genistein濃度が 10^{-5} Mではover doseとなり、むしろ抑制されていたが、 10^{-7} M, 10^{-8} Mでは一様に、コントロール群に比し有意に測定値は上昇した。これは、非負荷群では、どの濃度でも一様に低い活性しか示さなかったが、 10^{-7} M, 10^{-8} Mで、これらの生化学的マーカーが、上昇する傾向にあったことは興味深い。また、培養細胞の肉眼的所見および顕微鏡的所見はこれらの生化学的結果を支持した。

以上、ラットおよびヒトでも種に関わらず、血中の

生理的濃度に近い 10^{-7} M, 10^{-8} Mの濃度で骨形成に関与する生化学的マーカーの測定値が上昇したという結果は, genisteinが骨代謝に有効に作用し, 今後, 骨粗鬆症など骨形成を必要とする骨疾患の治療薬として期待出来ることを示唆している. また, 骨髄細胞を人工骨上で培養すると骨再生能力の高い人工骨が作製され, 外科的骨再生治療に応用できることを, 我々は,

報告してきた²⁵⁻³⁰⁾. genisteinは, 発がん性もなく, 安全な因子であるため, このような組織工学的な骨再生治療においてgenisteinを添加することで, より骨再生能力の高い培養人工骨の作製が可能である. 今後, さらに, 検討することで, 骨再生促進因子としても期待される.

要 約

大豆たん白質イソフラボン的一种であるgenisteinが, 成熟ラットとヒトにおいて骨髄細胞の骨形成能に与える影響を検討した. まず, 7週齢Fisher系ラットの大腿骨の骨幹部より骨髄細胞を採取しウシ胎児血清を含むMEMにて初期培養後, トリプシン処理し細胞浮遊液を調整した. 細胞浮遊液を6 well plateへ播種し, デキサメサゾンを追加した負荷(骨形成培地)群, および添加しない非負荷群に群分けし, 各々にgenisteinを 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} Mの濃度になるように負荷し, 2週培養後, 骨形成を検討した. 次に変形性腰椎症の55歳の女性より同意を得て腸骨より骨髄細胞を採取し, 同様にして培養し, 骨形成を検討した. デキサメサゾンを追加した骨形成培地群では, genisteinを負荷することでラット, ヒト共に 10^{-7} Mおよび 10^{-8} Mでは, genistein非負荷群に比し, Ca, alkaline phosphatase活性およびDNAが有意に上昇した. ヒトおよびラットにおいて, 種に関わらずGenisteinが生理的濃度で骨形成を促進することを示し, 骨形成促進因子として期待される.

文 献

- 1) Adlercreutz H, Fotsis T and Heikkinen R (1982): Excretion of the ligands enterolactone and enterodiol and of equol in omnivorous and vegetarian women and in women with breast cancer. *Lancet*, **2**, 1295-1299.
- 2) Tikkanen MJ and Adlercreutz H (2000): Dietary soyderived isoflavone phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention? *Biochem Pharmacol*, **60**, 1-5.
- 3) Miksicek JF (1995): Estrogenic flavonoids: Structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med*, **208**, 44-50.
- 4) Adlercreutz H, Goldin BR and Gorbach SL (1995): Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr*, **125**, 757-770.
- 5) Maniopoulos C, Sodek J and Melcher AH (1988): Bone formation in vitro by stromal cells obtained from bone marrow of young adult rats. *Cell and Tissue Research*, **254**, 317-330.
- 6) Davies JE, Chernecky R, Lowenberg B and Shiga A (1991): Deposition and resorption of calcified matrix in vitro by rat marrow cells. *Cells Mater*, **1**, 3-15.
- 7) Davies JE (1996): In vitro modeling of the bone/implant interface. *Anat Rec*, **245**, 426-445.
- 8) Zhou H, Chernecky R and Davies JE (1994): Deposition of cement at reversal lines in rat femoral bone. *J Bone Miner Res*, **9**, 367-374.
- 9) Yoshikawa T, Peel SA, Gladstone JR and Davies JE (1997): Biochemical analysis of the response in rat bone marrow cell cultures to mechanical stimulation. *Biomed Mater Eng*, **7**, 369-377.
- 10) Yao K-L, Todescan R Jr and Sodek J (1994): Temporal changes in matrix protein synthesis and m-RNA expression during mineralized tissue formation by adult rat bone marrow cells in culture. *J Bone Miner Res*, **9**, 231-240.
- 11) Yoshikawa T, Ohgushi H, Okumura M, Tamai S, Dohi Y and Moriyama T (1992): Biochemical and histological sequences of membranous ossification in ectopic site. *Calcif Tissue Int*, **50**, 184-188.
- 12) Labarca C and Paigen K (1980): A simple, rapid and sensitive DNA assay procedure. *Anal Biochem*, **102**, 344-352.
- 13) Christian C and Christian MS (1981): Bone mass in postmenopausal women after withdrawal of

- oestrogen/gastagen replacement therapy. *Lancet*, **21**, 459-461.
- 14) Grady D, Rubin SM and Petitti DB (1992): Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med*, **117**, 1016-1037.
 - 15) Ishimi Y, Miyaura C and Ikegami I (1999): Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology*, **140**, 1893-1900.
 - 16) Pensler JM, Radosevich JA and Higbee R (1990): Osteoclasts isolated from membranous bone in children exhibit nuclear estrogen and progesterone receptors. *J Bone Miner Res*, **5**, 797-802.
 - 17) Komms BS, Terpening CM and Benz DJ (1988): Estrogen binding receptor mRNA and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science*, **241**, 81-84.
 - 18) Eriksen EF, Colvard DS and Berg NJ (1988): Evidence of estrogen receptor in normal human osteoblast-like cells. *Science*, **241**, 84-86.
 - 19) Pacifici R, Brown C and Puschek E (1991): The effect of surgical menopause and estrogen replacement on cytokine release from human blood monocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, **88**, 5134-5138.
 - 20) Pacifici R, Rifas L and McCracken R (1989): Ovarian steroid treatment blocks a postmenopausal increase in blood monocyte interleukin1 release. *Proc Natl Acad Sci USA*, **86**, 2398-2402.
 - 21) Akiyama T, Ishida J and Nakagawa (1987): Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem*, **262**, 5592-5595.
 - 22) Blair HC, Jordan Se and Peterson TG (1996): Variable effects of tyrosine kinase inhibitors on avian osteoclasts activity and reduction of bone loss in ovariectomized rats. *J Cell Biochem*, **61**, 629-637.
 - 23) Yoshikawa T, Ohgushi H, Uemura T, Nakajima H, Ichijima K, Tamai S and Tateishi T (1998): Human marrow cells-derived cultured bone in porous ceramics. *Biomed Mater Eng*, **8**, 311-320.
 - 24) Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM and Caplan AI (1992): Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*, **13**, 81-88.
 - 25) Yoshikawa T, Ohgushi H and Tamai S (1996): Immediate bone forming capability of prefabricated osteogenic hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res*, **32**, 481-492.
 - 26) Yoshikawa T and Ohgushi H (1999): Autogenous cultured bone graft-bone reconstruction using tissue engineering approach. *Ann Chir Gynaecol*, **88**, 186-192.
 - 27) Yoshikawa T and Nakajima H, Yamada E, Akahane M, Dohi Y, Ohgushi H, Tamai S and Ichijima K (2000): In vivo osteogenic capability of cultured allogeneic bone in porous hydroxyapatite: immunosuppressive and osteogenic potential of FK506 in vivo. *J Bone Miner Res*, **15**, 1147-1157.
 - 28) Yoshikawa T, Ohgushi H, Dohi Y and Davies JE (1997): Viable bone formation in porous hydroxyapatite: marrow cell-derived in vitro bone on the surface of ceramics. *Biomed Mater Eng*, **7**, 49-58.
 - 29) Yoshikawa T, Ohgushi H, Akahane M, Tamai S and Ichijima K (1998): Analysis of gene expression in osteogenic cultured marrow/hydroxyapatite construct implanted at ectopic sites: a comparison with the osteogenic ability of cancellous bone. *J Biomed Mater Res*, **41**, 568-73.
 - 30) Yoshikawa T, Ohgushi H, Nakajima H, Yamada E, Ichijima K, Tamai S and Ohta T (2000): In vivo osteogenic durability of cultured bone in porous ceramics: a novel method for autogenous bone graft substitution. *Transplantation*, **69**, 128-134.