市販 β -TCP 焼結体と比較した合成リン酸オクタカルシウム (OCP) の 骨芽細胞の分化能

川井 忠^{1, 2)}・穴田 貴久¹⁾・本田 義知¹⁾
鎌倉 慎治³⁾・松井 有恒^{1, 2)}・松井 桂子²⁾
越後 成志²⁾・鈴木 治¹⁾

Analysis of osteoblastic cell differentiation by synthetic octacalcium phosphate (OCP) as compared with commercially available β -TCP ceramic

KAWAI Tadashi^{1, 2)}・ANADA Takahisa¹⁾・HONDA Yoshitomo¹⁾
KAMAKURA Shinji³⁾・MATSUI Aritsune^{1, 2)}・MATSUI Keiko²⁾
ECHIGO Seishi²⁾・SUZUKI Osamu¹⁾

Abstract: Octacalcium phosphate (OCP) has been suggested to be a precursor of biologic apatite crystals in bones and teeth. Previous studies have shown that synthetic OCP facilitates osteoblastic cell differentiation in vitro. The present study was designed to investigate whether OCP facilitates osteoblastic cell differentiation in vitro as compared with commercially available sintered β -tricalcium phosphate (β -TCP) ceramic, a bone regenerative and biodegradable material used clinically. Mouse-bone-marrow-derived stromal ST-2 cells were cultured on dishes pre-coated with powdered OCP or commercially available sintered β -TCP ceramic. The capacity for proliferation and differentiation was determined up to day 21 of culture. The proliferation of ST-2 cells on OCP coating was inhibited initially, but the cell number increased similar to that of commercially available sintered β -TCP ceramic or control culture dishes up to day 14. On the other hand, the alkaline phosphatase activity of ST-2 cells on the OCP coating, a maker of osteoblastic differentiation, was higher than that of commercially available sintered β -TCP ceramic or control up to day 14. Measurement of the mRNA expression level of osteopontin (OPN) by real-time PCR on day 21 of culture showed that the OPN mRNA level of ST-2 cells on OCP coating was higher than that of cells on commercially available sintered β -TCP ceramic. Chemical analysis of the supernatants of the medium after incubation on the coatings of OCP and commercially available sintered β -TCP ceramic revealed distinct patterns: commercially available sintered β -TCP ceramic decreased both Ca^{2+} and inorganic phosphate ion (Pi) concentrations, whereas OCP decreased Ca^{2+} but increased Pi ion concentrations beyond the control. These changes may be derived from the intrinsic physicochemical properties of OCP. The present study demonstrated that OCP facilitates osteoblastic cell differentiation more than that associated with commercially available sintered β -TCP ceramic.

Key words: octacalcium phosphate (OCP), β -tricalcium phosphate (β -TCP), bone regeneration (骨再生), cell differentiation (細胞分化)

¹⁾ 東北大学大学院歯学研究科顎口腔創建学講座顎口腔機能創建学分野

(主任：鈴木 治教授)

²⁾ 東北大学大学院歯学研究科口腔病態外科学講座口腔外科学分野

(主任：越後成志教授)

³⁾ 東北大学大学院医工学研究科生体再生医工学講座骨再生医工学分野

(主任：鎌倉慎治教授)

¹⁾ Division of Craniofacial Function Engineering, Tohoku

University, Graduate School of Dentistry (Chief: Prof. SUZUKI Osamu)

²⁾ Division of Oral Surgery, Department of Oral Medicine and Surgery, Tohoku University, Graduate School of Dentistry (Chief: Prof. ECHIGO Seishi)

³⁾ Division of Bone Regenerative Engineering, Tohoku University, Graduate School of Biomedical Engineering (Chief: Prof. KAMAKURA Shinji)

受付日：2008年7月17日

採択日：2009年10月27日

緒 言

我々は生体材料として、リン酸カルシウム的一种であるリン酸オクタカルシウム (octacalcium phosphate; OCP) の骨再生能に関する研究を進めてきた。従来から歯や骨の無機成分の生体アパタイトは、OCP 等の前駆物質を経由して形成されと考えられてきた¹⁾。実際に生体内において、エナメル質²⁾、象牙質³⁾、および骨内⁴⁾での存在が検討され、生体物質であることが示唆されている。一方、我々は OCP の合成法⁵⁾を確立し、合成した OCP を用いて骨再生に関する研究を行った。その結果、生体内に埋入された OCP は生体類似アパタイトに転換し、優れた骨伝導能を示すことが確認された^{5~8)}。また OCP は生理的環境下において、ハイドロキシアパタイト (hydroxyapatite; HA) や代表的な生体内吸収性材料である β -リン酸三カルシウム (β -tricalcium phosphate; β -TCP) と比較してより高い溶解度をもつと予測されており⁹⁾、実際に生体内において、埋入された OCP 自身が生体内吸収性を示して骨再生を促進することが報告されている^{5, 8, 10, 11)}。さらに、OCP は *in vitro* で HA と比較して前骨芽細胞の骨芽細胞への分化促進能を有することが確認されている^{8, 12)}。本研究では、現在吸収性骨補填材料として臨床応用されている既存の β -TCP 焼結体と、人工合成した OCP を用い、*in vitro* における骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化能を比較検討することを目的とした。

方 法

1. プレート上への OCP, β -TCP 焼結体のコーティング

OCP は湿式合成法⁵⁾で合成し、120℃で2時間乾熱滅菌後、粒子径 $53\mu\text{m}$ 以下に整粒した。作製した試料は、X線回折装置 (Mini Flex 2005G301, XRD, 株式会社リガク、東京) によって分析した。また、既存の β -TCP 焼結体 (オスフェリオン[®], オリパス株式会社, 東京) も同様に $53\mu\text{m}$ に整粒し、XRD での確認を行った。OCP, β -TCP 焼結体の Ca/P 比は、1.23, 1.5 であった。OCP は焼成すると脱水・分解してしまうので、 β -TCP 焼結体と異なり未焼結である。本来は未焼結の β -TCP と比較すべきであるが、今回は医療材料として使用されている β -TCP 焼結体との比較を目的とした。整粒した OCP ならびに β -TCP 焼結体をそれぞれ滅菌水と混合してスラリーとし、48well プレート上に OCP もしくは β -TCP 焼結体が 3.0mg/well となるようにスラリーを入れ、その後水分を蒸発させて OCP, β -TCP それぞれのコーティングを行った (図 1)。なお、細胞播種前に UV クロスリンカー (FS-1500, フナコシ, 東京)

によるコーティング物の紫外線処理を行い、またコントロールとしてコーティング無しのプレートを用いた。

2. 細胞播種, および培養

培養に使用する骨芽細胞様細胞として、骨芽細胞の表現型を示すことが知られているマウス骨髄由来間質細胞株 ST-2 細胞 (理研筑波研究所, 茨城) を用いた。OCP および β -TCP 焼結体コーティング上、さらにコントロールのプレートに、ST-2 細胞を 3×10^4 個ずつ各 well に播種し、培養には α -minimal essential medium (α -MEM; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) に 10% fetal bovine serum (FBS; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) と 1% penicillin/streptomycin (Invitrogen-Gibco, Carlsbad, CA, USA) を加えた培地を用い、37℃, 5% CO₂ 条件下のインキュベーター内で培養した。培地は3日ごとに交換した。

3. 細胞増殖および分化能の評価

培養から 3, 7, 14, 21 日で、細胞増殖能および分化能を評価した (N 数を各々 3 とした)。細胞増殖能の評価には Cell Counting Kit-8 (同仁化学研究所, 東京) を用いた。また細胞分化能は、LabAssayTM ALP (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いて、アルカリフォスファターゼ (ALP) 活性で評価した。培養 21 日目の ST-2 細胞の Osteopontin (OPN) の mRNA 発現量も評価した。RNeasy kit (Qiagen, Valencia, CA, USA), および RQ1 RNase-free DNase (Promega, WI, USA) を使用し、RNA の精製を行った。その後、抽出した RNA から Super Script III Reverse Transcriptase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用い cDNA を合成した。mRNA の発現は Light Cycler 1.5 (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) を用いた Real-time TaqMan PCR 法にて、OPN, Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) の発現量について検討を行った。Primer および probe は ProbeFinder (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) に基づいて選択し、OPN, GAPDH の塩基配列は GenBank データベースを参考にした。使用した各 primer を以下に示す。

OPN: 5'-CCCGGTGAAAGTGACTGATT-3', 5'-TTCTTCA GAGGACACAGCATTC-3'; GAPDH: 5'-CAATGAATACG GCTA-3', 5'-TTACTCCTTGGAGGCCATGT-3'.

TaqMan probes は 5' 末端を FA, 3' をダーククエンチャーにてラベルされた以下の配列をもつものを使用した。

OPN: 5'-AGAGGAG-3' (Universal ProbeLibrary probe # 82); GAPDH: 5'-GGTGGTGG-3' (Universal ProbeLibrary probe # 77).

TaqMan PCR は、1 回の検定につき TaqMan Master; 200nM, forward および reverse primer; 100nM, Universal

図 1

- (a) プレート上への OCP または β -TCP 焼結体のコーティング。プレートを横から見た図。
 (b) コーティング後のプレートの真上からの写真。

ProbeLibrary probe; cDNA template を最終容量が $20 \mu\text{l}$ として調整を行った。Real-time PCR 反応は 95°C (10 秒), 60°C (30 秒), 2°C (1 秒) の条件で 35 サイクルの反応を行った。測定した OPN の発現量を内部標準コントロール GAPDH 発現量で規格化して評価した。

4. カルシウム (Ca^{2+}), および無機リン酸 (Pi) イオン濃度の測定

OCP および β -TCP 焼結体コーティングしたプレート上, さらにコントロールのプレート上に ST2 は播種せずに, α -MEM を加え, 細胞培養と同じ条件下で 3 日間インキュベーター内に置き, α -MEM を回収後, α -MEM 内に含まれる Ca^{2+} と, Pi のイオン濃度を測定した。 Ca^{2+} 濃度測定にはカルシウム E-テストワコー (和光純薬工業株式会社, 大阪), Pi イオン濃度測定にはホスファ C-テストワコー (和光純薬工業株式会社, 大阪) を用いた。

5. 培地の過飽和度の評価

OCP および β -TCP 焼結体コーティング上に培地を加えた後インキュベーションした上清の Ca^{2+} および Pi イオン濃度から, 培地の過飽和度 (Degree of Supersaturation; DS) を計算した¹³⁾。DS は (1) 式で表される。

$$\text{DS} = \text{IP}/\text{Ksp} \quad (1)$$

ここで, IP はイオン活動度積 (Ionic activity product), Ksp は溶解度積 (Solubility product) である。すなわち DS の値は IP をリン酸カルシウムの Ksp で除して表され, 飽和状態では DS は 1 となる。この数値が大きいほど高い過飽和 (溶液からリン酸カルシウムが析出できる状態) となり, 逆に 1 を下回ると, 不飽和 (リン酸カルシウムが溶解

する状態) となる。計算では, ひとつの溶液組成から, それぞれ HA, OCP および dicalcium phosphate dihydrate (DCPD) の DS が得られる。DS は分析値の $[\text{Ca}]$, $[\text{P}]$ 以外に, $[\text{Mg}]$, $[\text{Na}]$, $[\text{K}]$, $[\text{Cl}]$, $[\text{F}]$, の各濃度および pH を用いて算出した¹⁴⁾。その際 pH は 7.2 とし, $[\text{Ca}]$, $[\text{P}]$ 以外のイオン濃度は, α -MEM の一般的組成を参考にした。なお, DS の計算では, HCO_3^- の存在, イオンペアとして CaH_2PO_4 , CaHPO_4^0 , MgHPO_4^0 , CaHCO_3^+ , MgHCO_3^+ の存在を仮定している。Ksp として HA は 2.63×10^{-60} ¹⁵⁾, OCP は 1.05×10^{-47} ¹⁶⁾ を用いた。過飽和度の測定により, ST-2 細胞を取り巻く培地の環境の違いが, OCP, β -TCP 焼結体, コントロールで違いがあるかを検討した。

6. 統計的解析

本研究における統計処理にはすべて, Tukey's 多重比較分析法を用いた。

結 果

1. XRD による合成 OCP の結晶相の確認

作製した試料を粉末にし, XRD 測定を行った結果, すでに報告されている通りの, $2\theta = 4.8^\circ$ における (1, 0, 0) 面でのピークを含む, OCP に特徴的なパターンが確認された。また, オスフェリオン®の XRD から β -TCP 焼結体のピークが確認された (図 2)。

2. 細胞増殖能の変化

培養 3 日目では, OCP コーティング上の ST-2 細胞は,

図2 XRD 測定結果

(a) OCP, (b) β -TCP 焼結体. ∇ は OCP の特徴を示しており, $\blacktriangledown$ は β -TCP 焼結体の特徴を示している.

図3 細胞増殖

培養初期では OCP では細胞増殖が抑制されるが, 21 日まではその他と同様に増加している.

β -TCP 焼結体およびコントロールと比較して細胞増殖は抑制されていた. 一方, 培養 14 日目以降では, OCP コーティング上の ST-2 細胞の増殖は, β -TCP 焼結体およびコントロールと同等になった. また β -TCP 焼結体とコントロールには, 細胞増殖に大きな差は見られなかった (図 3).

図4 ALP 活性

培養 14 日, 21 日では, OCP による ALP 活性は β -TCP 焼結体より優位である. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

3. 細胞分化能の変化

ST-2 細胞の ALP 活性は, 培養 7 日目までは OCP, β -TCP 焼結体およびコントロールともに同等レベルであった. しかし, 培養 14 日目, 21 日目には, OCP コーティング上の ST-2 細胞の ALP 活性は β -TCP 焼結体およびコントロールと比較して有意に増加していた. また, 培養 21 日目では, β -TCP 焼結体上の ST-2 細胞の ALP 活性はコントロール上の ST-2 細胞よりも, 増加していた (図 4).

培養 21 日目での OCP, β -TCP 焼結体およびコントロール上の ST-2 細胞の OPN の mRNA を Real-time PCR で測

図5 Real-time PCRによる、OCP, β -TCP, コントロール上のST-2細胞のOPNのmRNAの発現結果
OCPは、 β -TCP焼結体よりも有意にOPNのmRNAを発現している。 ** $P < 0.01$.

図6

α -MEM中の(a) Ca^{2+} , (b) Pi濃度測定. OCPでは Ca^{2+} を多く取り込み, Piを多く放出している.
** $P < 0.01$.

表1 OCP, β -TCP焼結体, Controlの α -MEM中での Ca^{2+} , Pi濃度および α -MEM中のHA, OCP, DCPDに関する過飽和度

材料	カルシウム (mM)	リン酸 (mM)	過飽和度 (DS)		
			HA	OCP	DCPD
OCP	0.57	1.06	2.77×10^{10}	2.08×10^2	4.22×10^{-1}
β -TCP焼結体	1.14	0.50	1.02×10^{11}	3.66×10^2	3.98×10^{-1}
Control	1.90	0.81	4.10×10^{12}	9.07×10^3	9.89×10^{-1}

定した結果, OCP上のST-2細胞は, β -TCP焼結体上のST-2細胞よりもOPNのmRNAを有意に多く発現していた. OCPとコントロール, β -TCPとコントロールの間には, OPNのmRNAの発現には有意差は認められなかった(図5).

4. 培地の Ca^{2+} およびPiイオン濃度評価

3日間インキュベートしたOCPならびに β -TCP焼結体コーティング上, およびコントロールの α -MEMを回収し, Ca^{2+} , Piイオン濃度を測定したところ, Ca^{2+} 濃度は, コントロールが最も高く, 次いで β -TCP焼結体, OCPの順で(図6a), OCPが最も Ca^{2+} を吸収したことを示した. またPiイオン濃度は, OCPが最も高く, 次いでコントロール, β -TCP焼結体の順であった(図6b). このことはOCPが最もPiイオンを放出したことを示している.

5. 培地の過飽和度 (DS)

α -MEMに含まれるイオンの濃度, pHおよびイオンペ

アを考慮に入れてDSの値を求めたところ, OCPコーティング上の α -MEM中では, DCPDに対するDSは1以下であるため, DCPDに関し不飽和, OCPに対するDSは1以上であるため, OCPに関し過飽和で, 同様にHAに関し大きな過飽和条件下にあることを示した. また, β -TCP焼結体コーティング上の α -MEM中においても同様に過飽和度の傾向を示し(表1), OCP, β -TCP焼結体各々のコーティング上の α -MEM中は同様な環境であることがわかった. 但し, β -TCP焼結体のインキュベーションによる培地のHA塩に関する過飽和度は(1.02×10^{11}), OCPのインキュベーションによる培地のそれ(2.77×10^{10})よりも3.7倍大きかった. このことは, β -TCP焼結体の培地の方がOCPの培地よりもHAを析出する能力が潜在的に高いことを意味する.

考 察

OCPコーティング上で培養したST-2細胞のALP活性の

有意な上昇と、Real-time PCR の結果による OPN の mRNA の発現の結果より、OCP は β -TCP 焼結体に比較して骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化促進能に優れていることが推察された。また、OCP コーティング上と β -TCP 焼結体コーティング上の α -MEM 中の Ca^{2+} と、Pi イオン濃度を測定し比較した結果、OCP コーティング上で Ca^{2+} は減少し、Pi イオンは増加していることが確認されたことから、OCP の方が β -TCP 焼結体よりも Ca^{2+} を多く吸収し、Pi イオンを多く放出していることが明らかになった。今回の研究では、培養 3 日間の溶解性を分析したが、OCP は培地交換ごとに Pi イオンの放出が確認されているので、OCP が ST2 細胞の骨芽細胞様細胞への分化を促進した期間の培地の条件と同様であると考察される。一方、本研究では、培地の過飽和度 (DS) の解析から、OCP および β -TCP 焼結体ともに HA を析出できる環境にあるが、その程度は β -TCP 焼結体の方が高いことが示された。材料が骨伝導を示すのは材料表面での bone-like apatite 形成が重要な因子になるとされている¹⁷⁾。しかしながら、本研究は OCP の方が β -TCP 焼結体よりも骨芽細胞の分化を促進することを示した。このことは、OCP が骨芽細胞の分化を促進するのは、bone-like apatite の材料表面上での析出だけでなく、OCP-HA 転換過程自体が重要な作用をもつという報告⁸⁾ を支持するものと考えられる。 Ca^{2+} が細胞接着または増殖に重要な影響を及ぼすことはすでに知られており^{18~20)}、また Pi イオンも骨芽細胞分化や骨形成に影響を及ぼすことが報告されている²¹⁾。 Ca^{2+} を多く吸収する OCP コーティング上の ST-2 細胞の増殖能は、培養初期において、 β -TCP 焼結体、コントロールと比べると違いが生じている。 β -TCP 焼結体、コントロール上の ST-2 細胞は、培養 7 日目の well 上でコンフルエントに近い状態になっていると思われ、その結果培養 14 日目では OCP、 β -TCP 焼結体、コントロール上の細胞増殖は同等となったと思われる。また OCP コーティングは、Pi イオンを培地中に放出し、 β -TCP 焼結体コーティングでは Pi イオンを吸収した結果、OCP コーティング上の ST-2 細胞は、培地中の Pi イオンの影響を受け、分化が β -TCP 焼結体、コントロールより促進されたと思われた。すなわち本実験の *in vitro* での Ca^{2+} 、Pi イオンの濃度測定の結果から得られた、OCP と β -TCP 焼結体の各々の特異性が、骨芽細胞分化能の違いに影響を与えている可能性が考えられた。OCP ならびにその他のリン酸カルシウムがどのような機序で骨再生を促進しているかは明らかではないが、 Ca^{2+} 吸収や Pi イオン放出、またさまざまな成長因子との関わりが働いていることが推察される。

今回使用した OCP と β -TCP 焼結体の製法は異なるため、結晶構造に違いが生じている。最近、HA や β -TCP の微細構造が、それぞれの骨再生能、生体内吸収性に関与し

ているとの報告がある^{22, 23)}。また OCP においても、微細構造が、骨再生能に影響を与えることが報告されている²⁴⁾。実験に使用した OCP と β -TCP 焼結体の微細構造の違いが、溶解性や細胞試験の結果に影響しているものと考えられる。

生体アパタイトの前駆物質として、OCP 以外では amorphous calcium phosphate (ACP) および DCPD も提案されてきた。先に OCP, ACP, DCP と Ca 欠損 HA (Ca/P 1.5)、化学量論的 HA (Ca/P 1.67) (HA はいずれも未焼成) に対する骨形成を比較したところ、前駆物質群 (OCP, ACP, DCP) は未焼結 HA 群に比較して、骨組織の出現が早く生じたこと、その中でも特に OCP に早く骨形成が生じたこと⁵⁾、ACP および DCP は OCP を経由して HA に転換することが示唆されてきたこと^{9, 25)}、また膜性骨の骨形成開始点となる bone nodule と超微形態構造が類似していることが確認されたため、OCP が HA の直接の前駆物質と考えられ⁵⁾、我々は特に、骨再生担体材料として OCP に着目してきた。OCP が細胞に及ぼす影響は、これまでにいくつか研究されており、OCP の前骨芽細胞の骨芽細胞への分化促進能についてもいくつか報告されている^{8, 12, 26)}。また OCP は培地⁸⁾、擬似体液¹³⁾ または生体内^{5~8)} において、HA に転換する傾向があることが確認されている。最近の *in vitro* の研究から、OCP による前骨芽細胞の骨芽細胞への分化促進能は、OCP の用量に依存して発揮されることが報告されている²⁷⁾。

また *in vivo* では、ラットやウサギの骨欠損部に埋入された OCP による骨再生能が報告されている^{11, 14, 28~30)}。ラット頭蓋骨に作成した臨界骨欠損部に OCP、未焼成の HA⁵⁾、 β -TCP 焼結体を埋入したところ、OCP が生体内で最も早く吸収され、OCP による骨再生量が最も大きいことが判明している¹⁰⁾。

本実験から、OCP は β -TCP 焼結体と比較し、骨芽細胞の分化をより促進することが明らかとなった。本研究で用いた合成 OCP と、これら既存の生体材料との比較、さらには、OCP の物理化学的な最適化をはかることによって、骨再生材料として臨床応用され得ると思われる。また、今後十分に解明されていない OCP による骨再生促進のメカニズムの研究も同時に行っていく必要があると思われる。

結 語

本実験から、*in vitro* におけるリン酸オクタカルシウム (OCP) による骨髄間質細胞の骨芽細胞への分化促進能は、臨床応用されている β -TCP 焼結体よりも優れていることが確認された。

引用文献

- 1) Brown, W., Smith, J., et al.: Crystallographic and chemical relations between octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* 196: 1050-1055 1962.
- 2) Tohda, H., Yamada, M., et al.: High-resolution electron microscopical observations of initial enamel crystals. *J Electron Microsc* 46: 97-101 1997.
- 3) Bodier-Houlle, P., Steuer, P., et al.: First experimental evidence for human dentine crystal formation involving conversion of octacalcium phosphate to hydroxyapatite. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 54: 1377-1381 1998.
- 4) Crane, N.J., Popescu, V., et al.: Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization. *Bone* 39: 434-442 2006.
- 5) Suzuki, O., Nakamura, M., et al.: Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite. *Tohoku J Exp Med* 164: 37-50 1991.
- 6) Suzuki, O., Nakamura, M., et al.: Maclura pomifera agglutinin-binding glycoconjugates on converted apatite from synthetic octacalcium phosphate implanted into subperiosteal region of mouse calvaria. *Bone Miner* 20: 151-166 1993.
- 7) Eidelman, N. and Eanes, E.D.: Role of OCP in biological processes. *Monogr Oral Sci*; 18: 50-76 2001.
- 8) Suzuki, O., Kamakura, S., et al.: Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials* 27: 2671-2681 2006.
- 9) Brown, W.E., Mathew, M., et al.: Crystal Chemistry of Octacalcium Phosphate. *Prog Crystal Growth Charact* 4: 59-87 1981.
- 10) Kamakura, S., Sasano, Y., et al.: Implanted octacalcium phosphate is more resorbable than beta-tricalcium phosphate and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 59: 29-34 2002.
- 11) Kamakura, S., Sasano, Y., et al.: Implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat skull defects enhances bone repair. *J Dent Res* 78: 1682-1687 1999.
- 12) Shelton, R.M., Liu, Y., et al.: Bone marrow cell gene expression and tissue construct assembly using octacalcium phosphate micro scaffolds. *Biomaterials* 27: 2874-2881 2006.
- 13) Lu, X. and Leng, Y.: Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials* 26: 1097-1108 2005.
- 14) Suzuki, O., Kamakura, S., et al.: Surface chemistry and biological responses to synthetic octacalcium phosphate. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 77: 201-212 2006.
- 15) Moreno, E.C., Brown, W.E., et al.: Stability of dicalcium phosphate dihydrate in aqueous solutions and solubility product of octacalcium phosphate. *Soil Sci Soc Am Proc* 24: 99-102 1960.
- 16) Moreno, E.C., Kresak, M., et al.: Adsorption of two human parotid salivary macromolecules on hydroxy-, fluorhydroxy- and fluorapatites. *Arch Oral Biol* 23: 525-533 1978.
- 17) Kokubo, T.: Bioactive glass ceramics: properties and applications. *Biomaterials* 12: 155-163 1991.
- 18) Ruoslahti, E. and Pierschbacher, M.D.: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238: 491-497 1987.
- 19) Takeichi, M.: Functional correlation between cell adhesive properties and some cell surface proteins. *J Cell Biol* 75: 464-474 1977.
- 20) Dvorak, M.M., Siddiqua, A., et al.: Physiological changes in extracellular calcium concentration directly control osteoblast function in the absence of calciotropic hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 5140-5145 2004.
- 21) Bellows, C.G., Heersche, J.N., et al.: Inorganic phosphate added exogenously or released from beta-glycerophosphate initiates mineralization of osteoid nodules in vitro. *Bone Miner* 17: 15-29 1992.
- 22) Okuda, T., Ioku, K., et al.: The effect of the microstructure of beta-tricalcium phosphate on the metabolism of subsequently formed bone tissue. *Biomaterials* 28: 2612-2621 2007.
- 23) Okuda, T., Ioku, K., et al.: The slow resorption with replacement by bone of a hydrothermally synthesized pure calcium-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials* 29: 2719-2728 2008.
- 24) Honda, Y., Anada, T., et al.: The effect of microstructure of octacalcium phosphate on the bone regenerative property. *Tissue Eng Part A* 15: 1965-1973 2009.
- 25) Meyer JL, Eanes ED.: A thermodynamic analysis of the secondary transition in the spontaneous precipitation of calcium phosphate. *Calcif Tissue Res* 25: 209-216 1978.
- 26) Liu, Y., Cooper, P.R., et al.: Influence of calcium phosphate crystal assemblies on the proliferation and osteogenic gene expression of rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 28: 1393-1403 2007.
- 27) Anada, T., Kumagai, T., et al.: Dose-dependent osteogenic effect of octacalcium phosphate on mouse bone marrow stromal cells. *Tissue Eng Part A* 14: 965-978 2008.
- 28) Barrere, F., van der Valk, C.M., et al.: Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants. *J Biomed Mater Res A* 66: 779-788 2003.
- 29) Dekker, R.J., de Bruijn, J.D., et al.: Bone tissue engineering on amorphous carbonated apatite and crystalline octacalcium phosphate-coated titanium discs. *Biomaterials* 26: 5231-5239 2005.
- 30) Imaizumi, H., Sakurai, M., et al.: Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. *Calcif Tissue Int* 78: 45-54 2006.