綜 説

組 織 石 灰 化 の 機 構

——とくにその初期過程について——

金 沢 徹

北海道大学医学部 第一生理学教室*

〔受付：昭和51年10月15日〕

I. はじめに

組織へのリン酸カルシウムの沈着（石灰化）は、骨や歯など正常な硬組織の形成や病的石灰化で見られるものであるが、これらの石灰化はいずれも基本的に共通な機構をもつと考えられている。これまでこの機構について多数の研究がなされてきたが、その詳細は今日なお明らかでない。しかし、数年来この分野の研究に重要な進歩がみられた結果、石灰化機構についての考え方は最近大きく転換した。

従来、組織の石灰化は細胞が直接関与しないものであって、もっぱら細胞外領域で起こる物理化学的ないし生化学的過程であるとみなされてきた。しかし、後述するように、石灰化は、（1）組織への不定形リン酸カルシウムの沈着とそれがリン灰石（apatite）結晶へ移行する過程を含む初期石灰化と、（2）すでにできたリン灰石結晶を核として結晶が生長増殖する後期石灰化に区別して考えなければならない。このうち後期石灰化は、従来通り細胞の直接関与しない物理化学的過程とみなすこともできるが、初期石灰化については、その過程が細胞によって直接制御されていることを強く示唆する結果が最近集積されつつある。そこで本稿では、石灰化の初期過程を中心に、石灰化機構について最近の知見を紹介したい。

II. 硬組織リン酸カルシウムの物理化学的性質

骨や象牙質のような硬組織のミネラルは、大別

して物理的にも化学的にも全く性質を異にする2種類のリン酸カルシウムからなっている¹⁻⁴⁾。そのひとつはX線回折に対し結晶性を示さない不定形リン酸カルシウムで、他のひとつは微細なリン灰石結晶である。一般に幼若な組織ほど不定形リン酸カルシウムの含有量は高く、若い骨や象牙質では全ミネラルの約65%を占めるが、成熟したものでは35%に減少する^{1,2)}（表1）。他方、成熟したエナメル質では不定形リン酸カルシウムは全く認められない²⁾。

表 1 硬組織リン酸カルシウムの結晶性と年齢*

出生後日数	灰 分 (%)	リン酸カルシウム(%)	
		不 定 形	結 晶 性
8	18.4	69.5	30.5
13	30.0	56.0	44.0
18	32.3	47.0	53.0
32	42.1	37.0	63.0
41	46.5	36.0	64.0
50	47.8	36.0	64.0
264	56.6	35.5	64.5

* ラット大腿骨(文献²⁾より引用)。

1. 合成リン酸カルシウム

in vitro で過飽和溶液からリン酸カルシウムが沈殿する反応は、硬組織ミネラルの形成に関する基礎的知識を与えるものとしてこれまで多くの研究がなされてきたが、ここでは主に最近の知見を要約するに止めたい。

過飽和溶液からリン酸カルシウムが沈殿するとき最初に形成されるのは不定形リン酸カルシウム

Initial Process of Tissue Calcification

Tohru KANAZAWA (Department of Physiology Hokkaido University School of Medicine, Sapporo)

* 札幌市北区北15条西7丁目 (〒060) Jap. J. oral Biol., 19 : 1-18, 1977.

であるが、これは不安定な中間体であって、やがてより安定な hydroxyapatite 結晶 ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) へ移行する^{5,6)}。この変換過程はつぎの3段階からなると考えられている⁵⁻⁹⁾。(1) 不定形リン酸カルシウムがいったん溶解する、(2) 溶解によって生じたイオンから hydroxyapatite 結晶の核が形成される、(3) その核をもとにして自己触媒的に hydroxyapatite 結晶が生長増殖する。不定形リン酸カルシウムを水の存在下におくと、自発的に上の過程ですべて hydroxyapatite 結晶に移行してしまうが、 $\text{Mg}^{2+10,11)}$, $\text{F}^{-10)}$, $\text{CO}_3^{2-12)}$, pyrophosphate^{13,14)}, nucleotides¹⁵⁾, poly-L-glutamate¹⁶⁾, polyacrylate¹⁶⁾, protein-polysaccharides¹⁶⁾ などが存在すると不定形リン酸カルシウムは安定化され、hydroxyapatite 結晶への移行は抑制される。

不定形リン酸カルシウムの主成分は tricalcium phosphate ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) と考えられているが⁴⁾、このほかにも calcium monohydrogen phosphate (CaHPO_4) がかなり含まれている¹⁷⁾。その含有量は不定形リン酸カルシウム調製時の pH で異なるが、生理的 pH (7.4) では22.8% (Pとして) に達するので、不定形リン酸カルシウムの Ca/P モル比は1.36に低下する。しかしこれを水で洗滌すると溶解度の高い CaHPO_4 が溶出するので、Ca/P 比は tricalcium phosphate のそれ (1.50) に近い値を示すようになる。また正常な細胞外液のイオン組成をもつ合成塩類溶液に hydroxyapatite

結晶を加えると、直ちに結晶表面に多量のカルシウム塩が沈着するが¹⁸⁾、これは Mg^{2+} によって安定化された非結晶性 calcium carbonate phosphate で、結晶表面を薄層状におおっていると思われる。生体硬組織に存在する安定な不定形リン酸カルシウムの一部は、おそらくこの種のものと考えられる。なお、生理的イオン組成をもつ合成塩類溶液は、hydroxyapatite 結晶に対してのみでなく¹⁹⁾、不定形リン酸カルシウムに対しても過飽和の状態にあることが最近明らかにされた²⁰⁾。これについては後に述べる。

合成不定形リン酸カルシウムは、電子顕微鏡で見ると直径300~1000Åの球状粒子であるが^{8,21)}、最近 X線動径分布関数法によってその基本構造が推定された²²⁾ (図1)。それによると、不定形リン酸カルシウムの構成単位は Ca^{2+} と PO_4^{3-} からなるイオン群 (ion cluster) であって、 $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ の化学式で表わされる。1個のイオン群は長径約9.5Åの規則性をもった領域 (ordered domain) を構成している。この構成単位が無秩序に集合して上記のような球状粒子を形成する。水分子はこのイオン群内部には入り得ないが、イオン群相互間には十分な間隙があり、比較的多量の水分子 (重量で不定形リン酸カルシウムの15~20%) やその他のイオンがこの間隙に収容されている。

hydroxyapatite は電子顕微鏡で微細な針状結晶として認められるが、その構造については文献^{4, 23,24)}を参照していただきたい。

図1 不定形リン酸カルシウムの構造 (模式図)

2. 硬組織リン酸カルシウム

生体組織におけるリン灰石結晶の形成は、in vitro での hydroxyapatite 結晶の形成と同様、不定形リン酸カルシウムを前駆体とすると考えられている^{2,3)}ので、組織石灰化の初期相ではとくに不定形リン酸カルシウムの沈着が重要な過程である。すでに述べたように、不定形リン酸カルシウムは本来不安定で、周囲に水が存在するとリン灰石結晶へ移行する性質をもっているため、骨や象牙質に多量に存在する不定形リン酸カルシウムは何らかの機転で安定化されていると考えられる。

最近 Wergedal と Baylink²⁵⁾は、幼若ラットの骨膜性骨形成の初期相における不定形リン酸カルシウムを、in vivo でエレクトロンマイクロプローブ法を用いて直接分析し、1.35の Ca/P モル比を得た。また Neuman と Bareham²⁶⁾は、雛頭蓋冠に $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ と思われる溶解度の高いリン酸カルシウムが存在することを明らかにした。X線回折では $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ の結晶は検出されない^{4,27)}から、このリン酸カルシウムも非結晶性と考えられる。これらの結果は前述の合成不定形リン酸カルシウムの性質とよく一致するので、硬組織の不定形リン酸カルシウムの組成は in vitro で合成したものと類似していると思われる。

従来、骨や象牙質の不定形リン酸カルシウムを電子顕微鏡で観察することは困難とされてきた。これは、骨や象牙質を生体から切り離すと不定形リン酸カルシウムが不安定になり、標準作製中にリン灰石結晶へ移行してしまうためである。しかし、不定形リン酸カルシウムは脱水すると安定になるので、硬組織を凍結乾燥することによって不定形リン酸カルシウムの電子顕微鏡観察が可能となる²⁸⁾。このような方法を用いて、骨の不定形リン酸カルシウムは合成不定形リン酸カルシウムとよく似た直径100~400Åの球状粒子であることが示されている。

合成不定形リン酸カルシウムの構成単位が長径9.5Åのイオン群 ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$) であることはすでに述べた。硬組織の不定形リン酸カルシウムがこれと同じ構造をもつか否かは明らかでない。むしろ骨では、不定形リン酸カルシウムは長径約 20Å

のイオン群を構成単位とすることが示唆されている²⁹⁾。他方、脱皮間期のカニ肝臓の細胞質に蓄積される不定形リン酸カルシウム³⁰⁾は、合成不定形リン酸カルシウムと同じ X線動径分布関数を示すことが最近 Betts ら³¹⁾によって明らかにされた。このことは、前者の基本構造が合成不定形リン酸カルシウムと同じであることを示している。したがって、合成不定形リン酸カルシウムは少なくともある種の生体ミネラルに対して優れたモデルであると考えられる。

硬組織のリン灰石結晶は in vitro で合成した hydroxyapatite 結晶と似ているが、同一ではない。それについては文献⁴⁾を参照していただきたい。

III. 石灰化における細胞の役割

石灰化の初期過程に対して直接細胞が果たす役割には、主につぎの2つの面が考えられる。(1) 細胞外液からカルシウムイオンとリン酸イオンをとりこみ、不定形リン酸カルシウムの形で細胞内に蓄積する。さらにこれを細胞間基質 (matrix) の石灰化部位へ輸送する。(2) 基質における初期石灰化の場として基質小胞 (matrix vesicles) を形成する。

1. リン酸カルシウムの細胞内沈着と輸送

造骨細胞、造歯細胞、骨端軟骨細胞など、硬組織形成に関与する諸細胞にリン酸カルシウムが沈着することはすでに10年前に発見されていた³²⁻³⁵⁾が、その後これが組織の石灰化と密接に関連していることが明らかにされた。このリン酸カルシウムには、主に組織化学的方法で細胞質にみいだされる可溶性リン酸カルシウムと、電子顕微鏡下で電子密度の高い顆粒として主にミトコンドリア内にみいだされるものがある。

a. 可溶性リン酸カルシウムの細胞質沈着

新鮮な未固定組織を glyoxal bis (2-hydroxyanil) (GBHA) 溶液で処理することによって、不安定な細胞内カルシウム塩を赤色顆粒 (Ca-GBHA) として検出する組織化学的方法が Kashiwa^{32,36)}によって開発され、これを用いて骨³²⁾、歯³³⁾の造骨細胞、軟骨細胞、造歯細胞、エナメル芽細胞の細胞質に多量のカルシウム塩がみいだされた。こ

のカルシウム塩は組織固定の操作で細胞から失われたり転位したりする。またリン灰石結晶のような不溶性カルシウム塩はこの方法で染まらない。したがって上記の GBHA 陽性カルシウムは、不安定な可溶性塩として細胞内に存在すると考えられる。カルシウム塩の検出にひきつづき、未固定組織を硝酸銀溶液で処理することによって、上記諸細胞の細胞質に可溶性リン酸塩の存在することが示された^{36,37)}。このリン酸は組織を EDTA で前処理するとカルシウムの流出に伴って消失するので、細胞内ではカルシウムと結合しリン酸カルシウムの形で存在すると考えられる。

その後 Rolle³⁸⁾ はこの細胞内 GBHA 陽性カルシウムの量と、隣接する基質の石灰化の程度とに密接な相関のあることを明らかにした。また Kashiwa と Komorous³⁹⁾ は上記の組織化学的方法を用いて、軟骨の石灰化に際し軟骨細胞の細胞質とその近傍の基質にリン酸カルシウムを含む直径約 1μ の球状粒子を認めた。さらに基質の粒子が細胞内粒子と形態的に似ていることから、組織の石灰化に際し石灰化粒子が細胞から基質へ放出される可能性を示唆した。

組織の石灰化に際しカルシウムがいったん細胞内に蓄積されたのち基質へ輸送されることは、エレクトロンオートラジオグラフィーを用いた ^{45}Ca のとりこみ測定の結果からも示唆された。すなわち、Matthews ら⁴⁰⁾ は幼若ラットの腹腔内に注射した ^{45}Ca がはじめ骨端板の軟骨細胞内に沈着し、つぎに細胞周辺へ移行し、最後に予備石灰化帯（骨端板の石灰化部位）の基質に蓄積する事実を観察した。最近 Park と Kashiwa⁴¹⁾ は GBHA の稀薄溶液で骨端軟骨を染めると、軟骨細胞の核周辺に局限して GBHA 陽性顆粒が認められることを報告した。この顆粒は核周辺に局在する点から、Golgi 液胞内にあると推定される。この所見は、細胞から基質へのカルシウム輸送に Golgi 装置が関与する可能性を示している。

なお、石灰化組織の細胞内にカルシウムが蓄積することは、骨から単離した細胞を用いて行われたカルシウム含有量の直接測定⁴²⁻⁴⁴⁾ や ^{45}Ca のとりこみ測定⁴⁵⁾ によっても確かめられている。

b. リン酸カルシウムのミトコンドリア沈着

肝、腎などの軟組織から分離したミトコンドリアが、adenine nucleotides の存在下で、呼吸に依存して多量のカルシウムイオンとリン酸イオンをとりこみ⁴⁶⁻⁵⁰⁾、電子密度の高いリン酸カルシウム顆粒を形成する⁴⁸⁻⁵¹⁾ ことは以前からよく知られていたが、最近、骨端軟骨細胞から分離したミトコンドリアも同様にリン酸カルシウムを蓄積することが示された^{52,53)}。ミトコンドリアにとりこまれるカルシウムイオンとリン酸イオンのモル比 (Ca/P) は $1.5\sim 2.0$ で⁵⁴⁾、hydroxyapatite 結晶の値 (1.67) に近いが、X 線回折や電子回折の結果はこのリン酸カルシウムが不定形であることを示している^{51,55)}。ミトコンドリアはリン酸カルシウム顆粒の形成とともに多量の ATP をとりこむ⁵⁰⁾ から、顆粒の不定形リン酸カルシウムはこの ATP によって安定化され则认为られる。

電子顕微鏡下で認められるこのような電子密度の高いミトコンドリア顆粒は、in vivo の軟組織には存在しないが、造骨細胞^{34,56)}、骨端軟骨細胞^{35,57)}、鳥の殻腺上皮細胞^{58,59)}、鹿の角の軟骨細胞^{60,61)} など、硬組織形成に関与する諸細胞や、実験的に石灰化を誘発した組織⁶²⁻⁶⁴⁾ では広く観察されている。in vivo でみられるミトコンドリア顆粒が多量の無機質を含むことは顕微灰化法によって確かめられており⁵⁶⁾、またその無機質がカルシウムとリンからなることはエレクトロンマイクロプローブ法によって明らかにされている⁶⁵⁾。

ミトコンドリアへのリン酸カルシウム沈着が組織の石灰化に重要な役割を果すことは、つぎの一連の事実によって強く示唆される。1969年、Martin と Matthews³⁵⁾ は、骨端軟骨細胞のミトコンドリア顆粒が骨端板の細胞層（骨端側から骨化点に向かって、静止帯→増殖帯→増生帯→予備石灰化帯の順で細胞が配列している）に沿って特徴的な勾配をもった分布を示すことを明らかにした（図2）。すなわち、ミトコンドリア顆粒は静止帯と増殖帯では僅かしかみられないが、予備石灰化帯に近づくにつれ著しく数と密度を増し、予備石灰化帯に達すると逆に急激に減少した。他方、骨端軟骨の石灰化が障害されているクル病ラットでは、骨端軟骨細胞のミトコンドリア顆粒は著しく減少し、僅かに予備石灰化帯近傍でごく少数認め

図2 骨端軟骨各部におけるカルシウム沈着

られるにすぎなかった⁵⁷⁾が、これにビタミンDを投与すると、正常の密度と分布を回復した。

その後 Brighton と Hunt^{66,67)} は、K-pyroantimonate 法（カルシウムイオンと反応し、電子密度の高いアンチモン・カルシウム複合体の沈殿を生ずる）を用いて、骨端板各層のカルシウム分布を調べた（図2）。それによると、骨端板最上部の静止帯と増殖帯では、アンチモン・カルシウム沈殿は軟骨細胞（主に細胞膜とミトコンドリア）に局在し、基質には全く認められなかった。増生帯上部でも、沈殿はなお主に細胞に局限したが、増生帯中部から下に向うにつれて基質へ移動し、ミトコンドリア内の沈殿は著しく減少した。予備石灰化帯では沈殿は基質にのみ認められるようになり、細胞からは全く消失した。他方、基質では、アンチモン・カルシウム沈殿は増生帯上部の基質小胞内にはじめて現われ、予備石灰化帯へ近づくにつれ基質小胞を中心に増加した。

以上の事実は、石灰化の初期過程として、まずリン酸カルシウムがミトコンドリアに沈着し、つぎにそれが基質へ輸送されることによって基質の石灰化が起こることを強く示唆している。リン酸カルシウムがどのような機構でミトコンドリアから基質へ輸送されるかは明らかでない。もしミトコンドリアのリン酸カルシウムの構成単位が、前記の合成不定形リン酸カルシウムと同様、電気的に中性な $10\text{\AA}$ 程度のイオン群とすれば、不定形リン酸カルシウムがそのような小単位に解離して細胞の膜系を通過し、基質へ輸送される可能性は充分考えられよう^{31,68)}。

なお、これまで述べたミトコンドリア顆粒は、固定脱水した標本について観察されたものである。このものでは、固定脱水操作によって可溶性

リン酸カルシウムはすでに失われている可能性が高い。最近 Gay と Schraer⁶⁹⁾ は、不安定なリン酸カルシウムが失われるのを避けるため、凍結切片標本を用いて造骨細胞の電子顕微鏡観察を行なった。その結果、通常の固定脱水操作でみられるよりはるかに多くのミトコンドリア顆粒がみだされた。さらに、ミトコンドリア外の細胞質にも、リボゾームよりやや小さい一群の顆粒が認められた。凍結切片標本ではじめて認められるこれらの顆粒も、その電子密度からみて、少なくとも一部は無機質と考えられる。これはあるいはリン酸カルシウムの細胞内輸送を示すものかもしれない。

2. 基質小胞の形成

後述するように、基質における石灰化の初発部位は、基質小胞と呼ばれる膜で囲まれた直径約 1μ の小胞である。この小胞は、造骨細胞、造歯細胞、骨端軟骨細胞など、硬組織形成に関与する諸細胞によってつくられ、基質に供給される。これについては、つぎに項を改めて述べることにしよう。

IV. 基質小胞 (matrix vesicles) における石灰化

1. 基質における初期石灰化の場合

1967~1970年、Anderson^{70,71)} と Bonucci^{72,73)} は骨端軟骨の基質に単位膜で囲まれた直径 $300\sim 1000\text{\AA}$ の球形ないし不規則形小胞（基質小胞）を多数認めた。この小胞は、静止帯から予備石灰化帯にいたるまで、骨端板のすべてのレベルにみられたが、とくに増殖帯以下の基質では、将来石灰化する縦中隔にのみ存在し、石灰化することのない横中隔には認められなかった。

骨端板の電子顕微鏡観察でリン酸カルシウムの針状結晶が最初に認められる部位は、増生帯下部に存在する上記の基質小胞内であった^{70,73)} (図2)。骨端板のこのレベルでは、結晶は基質小胞外には全く認められなかった。基質小胞がこのレベルから予備石灰化帯に近づくにつれ、結晶は数を増して小胞内部を満たし、球状の塊りをつくった。さらに石灰化の進んだ領域では、結晶の塊りは小胞外へ放射状に広がり、やがて融合して基質小胞の存在は不鮮明となった。電子顕微鏡でみられるこのような針状結晶は、電子回析によってリン灰石結晶であることが確かめられた。結晶の出現に先立ち、ときに基質小胞内に電子密度の高い微細顆粒が認められた⁷³⁾。この顆粒はリン灰石結晶の電子回折像を示さないが、EDTAで組織を脱灰すると消失するので、おそらくリン灰石結晶の前駆体として沈着した不定形リン酸カルシウムと思われる。

上記の事実から明らかなように、少なくとも石灰化の初期段階では、リン灰石結晶の生成、増殖、配向は基質小胞を中心に起こるもので、基質のコラーゲン原繊維はこれに全く関与していない。したがって、かつて唱えられたように^{19,74,75)}石灰化の初期過程でコラーゲン原繊維が結晶形成の核として作用したり、結晶の配向を規定したりする可能性は考えられない。コラーゲン原繊維がリン灰石結晶と接触し、その配向に影響を及ぼすのは、石灰化がかなり進行したあとと思われる。

基質における石灰化の初発部位が基質小胞であることは、つぎのような一連の研究によってさらに確かめられた。クル病ラットでは、骨端板の基質小胞は数、分布、形態などいずれも正常と変りないが、リン灰石結晶は増生帯の全域にわたってほとんど認められない⁷⁶⁻⁷⁸⁾ (クル病ラットでは石灰化が障害されているので、予備石灰化帯は肥大した増生帯で置きかえられている)。これにビタミンDとリン酸を投与して治療すると、リン灰石結晶がはじめ増生帯下部縦中隔の基質小胞内に現われ、その後時間とともに結晶をもつ基質小胞の数が増加した⁷⁶⁾。また、クル病ラットから分離した骨端軟骨薄片を準安定なリン酸カルシウム溶液とインキュベートすると、軟骨薄片の基質小胞に

リン灰石結晶の形成がみられた^{77,78)}。さらに、正常ラットの骨端板で最初にカルシウムの沈着する基質部位が基質小胞であることは、K-pyroantimonate法によって組織化学的にも確かめられた^{66,67)}。

骨端軟骨の石灰化のみでなく、類骨(osteoid)⁷⁹⁻⁸¹⁾、歯の象牙前質(predentin)⁸²⁻⁸⁴⁾、鹿の角^{60,61,85)}などでも、同様に初期石灰化の場は基質小胞であることが明らかにされている。また、動脈硬化症^{86,87)}や悪性腫瘍⁸⁸⁾などにみられる病的石灰化に際しても、同じような基質小胞の出現が観察されている。したがって、細胞間質における石灰化の初発部位が基質小胞であることは、石灰化が生理的か病的かを問わず、組織石灰化一般に共通した普遍的現象と考えられる。

2. 基質小胞の由来

基質小胞が直接細胞に由来することは、それが単位膜に囲まれていて^{71,89)}、まれではあるが内部にリボゾームを含むことがある⁷¹⁾点から明らかである。これが単に細胞の突起の横断面ではなく、細胞から完全に分離した存在であることは、連続切片標本によって確かめられている^{72) 73) 83) 90)}。また、基質小胞が骨端軟骨細胞^{71,89)}、造骨細胞⁷⁹⁻⁸¹⁾、造歯細胞^{82,84)}などからつくられることは、形態学的所見から充分推定されるところである。さらに、最近 Rabinovitch と Anderson⁹¹⁾はラジオトレーサーを用いて骨端板における脂質の合成と輸送を追跡し、骨端板の基質小胞が軟骨細胞からつくられることを支持する結果を得た。

基質小胞がこれらの細胞からどのようにしてつくられるかは明らかでない。しかし、つぎの理由から、基質小胞は細胞の出芽か変性崩壊によってつくられる可能性が高いと思われる。(1) 形態学的所見がこれを示唆する^{73,81,84)}。(2) 基質小胞の膜と骨端軟骨細胞の形質膜とは共通の酵素組成をもち、ともに alkaline phosphatase 活性、ATPase 活性および pyrophosphatase 活性を示す⁹²⁻⁹⁶⁾。これは基質小胞の膜が直接軟骨細胞の形質膜からできることを示唆しており、上記の機構を支持するものである。(3) 形質膜の表面にのみ存在するとされている 5'-AMPase が単離した基質小胞に認められる⁹²⁾。(4) 基質小胞と形質

膜の脂質組成がよく似ている⁹⁷⁻⁹⁹⁾。(5) 発生期の歯組織において、形質膜外側表面に固有の H-2 組織適合性抗原が、基質小胞膜と前造歯細胞の形質膜に共通して認められる¹⁰⁰⁾。

これに対して、細胞内でつくられた小胞がそのままの形で細胞外へ放出されて基質小胞となる可能性は少ない。Thyberg¹⁰¹⁻¹⁰³⁾ はリソゾームが細胞から放出されて基質小胞になることを示唆したが、基質小胞にはリソゾームに存在する acid phosphatase が欠けている^{92, 93, 95)}ことや、上述のように基質小胞膜と形質膜の組成が類似している点から、この可能性は考えがたい。また、単離した基質小胞の酵素、脂質組成は小胞体やゴルジ膜の組成と一致しない^{92, 95)}、succinic dehydrogenase のレベルが低い⁹⁵⁾のでミトコンドリアとも異なる。最近 Rabinovitch と Anderson⁹¹⁾ は、細胞が分泌した高分子サブユニットから細胞外で基質小胞が再構成されるとの仮説を提出したが、この機構では基質小胞と形質膜の組成の類似性を説明することが困難である。

3. 基質小胞における石灰化の機構

Termine と Eanes²⁰⁾ が明らかにしたように、一般に細胞外液のカルシウムイオンとリン酸イオンは、溶解度の低いリン灰石結晶はもとより、溶解度の高い不定形リン酸カルシウムに対しても過飽和の状態にあると考えられる。それにもかかわらず正常の軟組織が石灰化しないのは、後述の如く、細胞外液にピロリン酸のような石灰化抑制因子^{104, 105)}が含まれているためと思われる。このような抑制因子を含まない生理的合成塩類溶液を pH 7.4, 37° でインキュベートすると、不定形リン酸カルシウムの沈殿を生ずるが、その沈殿速度は著しく遅く、到底 in vivo での組織石灰化の速度に見合うものではない。したがって、in vivo で基質小胞に石灰化が起こるためには、基質小胞において、(1) 細胞外液の石灰化抑制因子が除去されること、(2) 何らかの機転でリン酸カルシウム沈着が促進されることが必要である。

組織の石灰化に際し、上記のような石灰化抑制因子の除去とリン酸カルシウム沈着の促進がいかにして起こるのかについては、現在明確な答えは得られていない。しかし、基質小胞が pyrophos-

phatase 活性、alkaline phosphatase 活性および ATPase 活性を示す事実⁹²⁻⁹⁶⁾や、カルシウムに対して親和性の高い酸性リン脂質¹⁰⁶⁾に富むこと⁹⁷⁻⁹⁹⁾から、これまでつぎのような可能性が考えられてきた。(1) 基質小胞の pyrophosphatase がピロリン酸を分解して抑制を除き、その結果石灰化が開始される。(2) 基質小胞の alkaline phosphatase がリン酸エステルを加水分解し、その結果リン酸イオン濃度が上昇してリン酸カルシウムの沈着が起こる¹⁰⁷⁾。(3) 基質小胞の ATPase が ATP を加水分解し、その結果生じたエネルギーを用いてカルシウムイオンが基質小胞内に能動的に輸送され沈着する。(4) 基質小胞の酸性リン脂質がカルシウムを結合することによって石灰化を促進する。以下、順を追ってこれらの可能性を検討しよう。

a. ピロリン酸の加水分解

ピロリン酸が組織の石灰化に関与していることを示唆する知見はこれまで多数報告されているが、それについてはすでに詳しい総説^{104, 108-110)}があるので、最初にそれを要約しておこう。

(1) ピロリン酸は in vitro で不定形リン酸カルシウムの表面に吸着し、hydroxyapatite 結晶の生成を抑制する^{13, 14, 16)}が、不定形リン酸カルシウムの生成は阻害しない。この効果の発現に必要なピロリン酸濃度はきわめて低く、2~3 μM である¹³⁾。

(2) ピロリン酸は正常血漿 (1~6 μM)¹⁰⁵⁾、尿 (10~100 μM)^{111, 112)}、唾液 (0.1~1 μM)¹¹³⁾、骨^{114, 115)}、象牙質¹¹⁶⁾、エナメル質¹¹⁶⁾、骨端軟骨¹¹⁷⁾など、広く各種の組織に認められ、とくに血漿、尿、唾液に含まれるピロリン酸の濃度は、in vitro で hydroxyapatite 結晶の生成を阻害するのに充分である。

(3) 動物に皮下注射したピロリン酸は、大動脈^{118, 119)}、皮膚^{120, 121)}などの軟組織に誘発される実験的石灰化を抑制する。また組織培養による胎児性組織の石灰化もピロリン酸で抑制される¹²²⁾。しかし、経口投与したピロリン酸は、腸管の alkaline phosphatase で分解されるため効果がない。皮下注射した場合でも、石灰化の部位によってはピロリン酸の抑制効果は発現しないことがあ

る^{109,123)}。これはピロリン酸が石灰化部位に到達する前に酵素的に分解されるためと考えられる。ピロリン酸の P-O-P 結合の代りに P-C-P 結合をもつ diphosphonates¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾ は、ピロリン酸と同様、in vitro で hydroxyapatite 結晶の生成を阻害するが^{14,124,125)}、酵素的分解を受けないので、経口投与でも組織の石灰化を強力に抑制する¹⁰⁸⁻¹¹⁰⁾。

これらの事実は、基質小胞の石灰化に先だって、基質小胞近傍のピロリン酸が分解除去されなければならないことを強く示唆している。すでに述べたように、基質小胞には pyrophosphatase 活性、alkaline phosphatase 活性および ATPase 活性が認められるが、Majeska と Wuthier⁹⁴⁾ は骨端軟骨から単離した基質小胞についてこれらの活性を比較検討し、この三者が同一酵素に由来すると結論した。さらに Felix と Fleisch^{126,127)} は、基質小胞の pyrophosphatase 活性の至適 pH が、高い基質濃度 (2 mM) では 8.5 であるのに対して、生理的基質濃度 (血漿濃度 3.5 μ M) では 7.0 近傍 (生理的 pH) まで低下することを明らかにした。これらの結果は、基質小胞の酵素が in vivo では pyrophosphatase として働く可能性を示している。他方、Matsuzawa と Anderson⁹³⁾ の電子顕微鏡的細胞化学的研究によると、基質小胞の phosphatase は小胞膜の外側表面に局在し、その活性は基質小胞が骨端側から予備石灰化帯へ近づくにつれ増大した。この事実は、基質小胞の pyrophosphatase が石灰化に先だって活性化されることを示している。

一方、Alcock ら^{109,128)} は幼若ラットの肋軟骨に上述の phosphatase と著しく性質の異なった neutral pyrophosphatase をみいだした。この酵素は、上記のものと違って、ピロリン酸以外のリン酸エステルを分解しない。また、高い基質濃度でも活性の至適 pH は 7.0 である。この酵素活性は肋軟骨の石灰化が始まる直前急激に増大し、石灰化が完了すると消失するので、この酵素もまた石灰化に関与していると考えられる (図 3)。骨端軟骨から単離した基質小胞にはこの酵素の活性は認められないが、元来この酵素は著しく不安定なので、基質小胞の分離操作によって失活する可

図 3 肋軟骨の石灰化と neutral pyrophosphatase 活性

幼若ラット肋軟骨の石灰化 (カルシウム濃度の上昇) と neutral pyrophosphatase 活性 (相対値) の関係を示す (文献128) より引用。

性が高い。

以上の結果から、基質小胞の pyrophosphatase とピロリン酸が石灰化において果たす役割を推定し、要約するとつぎのようになる。まず、石灰化に先だち、基質小胞の pyrophosphatase が活性化されて小胞近傍のピロリン酸が加水分解される。その結果抑制がとれて、基質小胞の不定形リン酸カルシウムはリン灰石結晶へ移行し始める。

b. リン酸エステルの加水分解

骨端軟骨から単離した基質小胞の phosphatase は、中性領域で広い基質特異性を示し、ピロリン酸以外にも、ATP や各種のリン酸エステルを加水分解する⁹⁵⁾。したがって、この酵素が in vivo で適当なリン酸エステルを加水分解し、局所的にリン酸濃度を上昇させて基質小胞の石灰化を惹起する可能性は否定できない。事実 Ali⁹⁵⁾ は、骨端軟骨から単離した基質小胞を G-6-P その他のリン酸エステル存在下でリン酸カルシウム溶液 ($^{45}\text{Ca}^{2+}$ を含む, $\text{Ca} \times \text{P} = 1.60 \text{ mM}^2$) とインキュベートすると、リン酸エステルの加水分解に伴って ^{45}Ca が基質小胞内にとりこまれ、そこでリン灰石結晶が形成されることを示した。このとき、基質小胞をあらかじめ熱処理して phosphatase を失活させておくと、 ^{45}Ca のとりこみもそれに平行して消失した。これらの事実は上記の仮説を支持する可

にみえる。しかし, *in vivo* で基質小胞近傍にリン酸エステルが充分供給されることを示す確かな証拠はない。また Howell ら¹²⁹⁾ は, クル病ラットの骨端板増生帯から微小穿刺法を用いて採取した細胞外液のリン酸イオン濃度が, クル病を治療して石灰化を再開させても上昇しないことをみいだした。この事実も上記の仮説と一致しない。

c. カルシウムの能動的とりこみ

基質小胞に ATPase 活性がみいだされて以来, ATP のエネルギーを用いて基質小胞がカルシウムイオンを能動的にとりこみ蓄積する可能性が指摘されてきた^{92,93)}。事実 Ali ら^{95,130)} は, 骨端軟骨から単離した基質小胞を ATP 存在下で $^{45}\text{Ca}^{2+}$ 溶液とインキュベートすると, $^{45}\text{Ca}^{2+}$ が小胞内にとりこまれることを示した。さらに, 基質小胞を熱や超音波で前処理するとこのとりこみが消失することから, これが ATP 分解に伴うカルシウムイオンの能動輸送であることを示唆した。しかし Felix と Fleisch¹²⁷⁾ は, 熱処理で失活した基質小胞に, 小腸の可溶性 alkaline phosphatase を加えただけで $^{45}\text{Ca}^{2+}$ のとりこみが回復することをみいだした。この結果は, 上記の $^{45}\text{Ca}^{2+}$ とりこみが膜結合性 ATPase を必要としないことを示している。したがって, Ali らが観察した $^{45}\text{Ca}^{2+}$ のとりこみは, おそらく ATP の分解によってリン酸イオン濃度が上昇した結果, リン酸カルシウムの沈殿が生じたためと思われる。

筋小胞体¹³¹⁻¹³³⁾ や赤血球^{134,135)} でみられるように, 一般にカルシウムイオンの能動輸送に関与する ATPase はカルシウムイオンによって強く活性化されるのが特色である。これに対して, 基質小胞の ATPase はカルシウムイオンによって逆に抑制されることが知られている⁹⁴⁾。この点も基質小胞によるカルシウムイオンの能動輸送に対して否定的である。

d. リン脂質と石灰化

1958 年以来, Irving¹³⁶⁻¹³⁸⁾ は一連の組織化学的研究によって骨端軟骨, 骨, 歯などの石灰化部位に Sudan black B で染まる脂質の存在することを明らかにした。この脂質は石灰化が開始される部位にのみ認められ, 石灰化の完了した領域ではみられなかった。また, 石灰化を実験的に抑制す

るとこの脂質は消失したが, 石灰化を回復させると再び出現した¹³⁹⁻¹⁴²⁾。これらの研究によって, 組織石灰化の初期過程に脂質の関与する可能性はじめて実験的に示唆された。

その後 Wuthier ら^{143,144)} は, 骨端軟骨各層の脂質を生化学的に分析し, 脂質濃度が骨端板の静止帯では低いのに対して予備石灰化帯では著しく増加すること, 石灰化の完了した海綿質(予備石灰化帯に隣接する)では逆に著明に減少することを示した。とくにこの脂質のうち, phosphatidylserine, phosphatidylinositol などの酸性リン脂質はカルシウムと固く結合していて, 脱灰したのちはじめて抽出可能となることが明らかにされた。このような酸性リン脂質も静止帯から予備石灰化帯にかけ, 石灰化の程度に比例して増加したが, 海綿質では逆に著明に減少した。これらの結果は上記の組織化学的所見とよく一致し, とくに酸性リン脂質が石灰化の初期過程に関与することを示唆している。

酸性リン脂質が石灰化を惹き起こすことは, *in vitro* の実験でも確かめられた。すなわち, Ennever らは骨¹⁴⁵⁾, 象牙¹⁴⁶⁾, 口腔微生物^{147,148)}, その他¹⁴⁹⁾ から抽出した酸性リン脂質を準安定なリン酸カルシウム溶液とインキュベートすると, リン脂質が石灰化の核として働き, リン酸カルシウムの沈着が起こることを示した。また, 脱灰した骨基質をリン酸カルシウム溶液とインキュベートした場合も基質の再石灰化がみられたが¹⁴⁵⁾, 脱灰した骨基質からあらかじめリン脂質を抽出除去しておくとも再石灰化は起こらなかった。

酸性リン脂質のうちとくに phosphatidylserine がカルシウムに対して高い親和性を示すことは従来から知られていたが¹⁵⁰⁻¹⁵³⁾, Cotmore ら¹⁰⁶⁾ は phosphatidylserine が *in vitro* でカルシウムとリン酸を化学量論的に結合し, リン酸カルシウム・リン脂質複合体の微細球状粒子を形成することを示した。この複合体のリン酸カルシウムは不定形のまま安定である。これは phosphatidylserine の結合によって不定形リン酸カルシウムが安定化されている¹⁵⁴⁾ ためと思われる。これと同じようなリン酸カルシウム・リン脂質複合体は, 生体組織でも石灰化した腫瘍から分離されている^{155,156)}。

表 2 骨端軟骨のリン脂質^a

脂 質	軟 骨 細 胞		基 質 小 胞
	増 殖 帯	増 生 帯	
Sphingomyeline	5.6±0.3	9.1±0.6	13.3±2.5
Phosphatidylcholine	57.9±1.1	57.9±1.2	36.8±3.0
Lysophosphatidylcholine	1.7±0.3	4.7±0.1	3.3±1.3
Phosphatidylethanolamine	19.1±0.6	9.1±0.8	13.1±1.9
Lysophosphatidylethanolamine	5.2±1.1	9.1±0.8	7.8±1.2
Phosphatidylserine	3.0±0.3	4.7±0.4	9.3±0.7
Lysophosphatidylserine	0.3±0.3	0.0±0.0	3.5±1.0
Phosphatidylinositol	4.4±0.4	3.7±0.8	4.6±0.4
Phosphatidic acid	0.2±0.1	0.1±0.1	0.4±0.2
Cardiolipin	1.2±0.2	0.8±0.5	1.4±0.3

^a 全脂質 P に対する比率(%)±標準誤差(文献⁹⁹)より引用。

このような生体組織の複合体でも phosphatidylserine の大部分はカルシウムと結合している。

すでに述べたように、基質石灰化の初発部位は基質小胞であるが、Peress⁹⁷⁾および Wuthier⁹⁸⁾は骨端軟骨から単離した基質小胞と細胞の脂質組成を比較分析し、基質小胞の phosphatidylserine が細胞のそれに比して著しく多いことをみいだした(表2)。この事実は、先に述べた諸結果と考え合わせると、phosphatidylserine が基質小胞の石灰化に重要な役割を果たすことを強く示唆していると云えよう。

石灰化に対する phosphatidylserine の作用には2つの面が考えられる。第1は、石灰化の核として不定形リン酸カルシウムの沈着を促進することである。第2は不定形リン酸カルシウムを安定化することである。phosphatidylserine が不定形リン酸カルシウムを安定化し、リン灰石結晶への移行を抑制することは、in vitro の実験^{106,154)}で明らかにされている。したがって、基質小胞に沈着した不定形リン酸カルシウムをリン灰石結晶へ移行させ石灰化を完結させるためには、不定形リン酸カルシウムの沈着後に、phosphatidylserine を分解することが必要となろう。事実、骨端軟骨には phosphatidylserine を加水分解する phospholipase 活性が存在し、その分布は予備石灰化帯でもっとも高いことが知られている¹⁵⁷⁾。また、基質小胞には軟骨細胞に比してリン脂質の部分分解産物、とくに lysophosphatidylserine がはるかに

多く含まれている⁹⁹⁾(表2)。これらの結果は、基質小胞の phosphatidylserine-phospholipase 系が初期石灰化の制御に寄与している可能性を示唆している。

V. 石灰化の制御

正常リンパ液の組成をもつ合成塩類溶液にひとたび hydroxyapatite 結晶が生じると、結晶形成はとどまることなく進行する¹⁸⁻²⁰⁾。これはリンパ液が生理的な温度と pH で hydroxyapatite に対し過飽和の状態にあるためである。しかし、in vivo では石灰化は勿論無制限に続くわけではなく、一定の限度をもって停止するから、生体には石灰化を制御する何らかの機構が存在するはずである¹⁵⁸⁾。この制御機構がどのようなものかはまだ明らかでないが、(1) ピロリン酸—pyrophosphatase 系、(2) 酸性リン脂質—phospholipase 系、(3) protein-polysaccharides 系、の3つが基本的な制御系として考えられる。このうち前二者についてはすでに詳述したので、ここでは protein-polysaccharides についてのみ述べよう。

石灰化の制御に protein-polysaccharides が関与することを示唆する事実はこれまでいくつか報告されている。Di Salvo と Schubert¹⁵⁹⁾は、軟骨から分離した protein-polysaccharides がリン酸カルシウムと結合して安定なコロイド状複合体をつくることを示した。また Campo¹⁶⁰⁾は、関節軟骨、骨端軟骨、肋軟骨などから分離した prote-

図 4 組織石灰化の初期過程

in-polysaccharides によって、リン酸カルシウムの沈殿が抑制されることを認めた。この抑制効果は、軟骨から抽出した酵素を用いて protein-polysaccharides を前処理すると消失した。さらに Howell ら^{161,162)} は、骨端軟骨増生帯の基質から微小穿刺法を用いて細胞外液を採取し、その中に in vitro でリン酸カルシウム沈殿を抑制する protein-polysaccharides が存在することを示した。予備石灰化帯から採取した細胞外液には、このような抑制効果をもつ protein-polysaccharides はみられなかった。これらの結果は、石灰化抑制作用をもつ protein-polysaccharides が石灰化部位で酵素的に分解されることを示唆しており、したがって石灰化の制御に protein-polysaccharides が関与する可能性を示すものと云えよう。

VI. むすび

すでに述べたことから明かなように、石灰化の初期過程に関する研究はこの数年大いに進展したが、石灰化の機構についてはなお明確な結論は得られていない。これまで挙げた実験事実も、厳密には情況証拠と云わざるを得ないものが多い。しかし、それにもかかわらず、石灰化の初期過程についてこれまで述べた諸結果と矛盾しないスキームを描くことは、今後の研究を進める上で重要なことと思われるので、以下そのようなスキーム(図4)を述べて稿を終りたい。

(1) 細胞外液のカルシウムイオンとリン酸イ

オンが造骨細胞、造歯細胞、骨端軟骨細胞などにとりこまれて、不定形リン酸カルシウムの形でミトコンドリアと細胞質に沈着する。このとき、カルシウムイオンが形質膜を通して細胞に流入する過程は受動的であるが¹⁶³⁻¹⁶⁵⁾、細胞質からミトコンドリアにとりこまれる過程はエネルギーを必要とする能動輸送である⁴⁵⁾。他方、リン酸イオンの輸送はカルシウムイオンの動きに伴う受動的過程である。細胞内に沈着した不定形リン酸カルシウムは、マグネシウムイオン、ATP、ADP、リン脂質などによって安定化される。

(2) ミトコンドリアと細胞質の不定形リン酸カルシウムは、微細な構成単位に解離し micropackets^{21,68)} として細胞外に放出され、基質小胞へ輸送されて、そこに沈着する。このとき、基質小胞の酸性リン脂質が核として働かし、安定な不定形リン酸カルシウム・リン脂質複合体を形成する。細胞外液のピロリン酸もこの不定形リン酸カルシウムの安定化に寄与する。

(3) 石灰化部位の基質小胞では、phospholipase と pyrophosphatase の活性化が起こり、酸性リン脂質とピロリン酸が加水分解される。その結果、不定形リン酸カルシウムは不安定となってリン灰石結晶へ移行する。その後、この結晶を核として自己触媒的にリン灰石結晶が生長増殖し、基質小胞外へ放射状に広がって、しだいに融合していく。この段階で初めてリン灰石結晶とコラーゲン原繊維の間に結合を生じ¹⁶⁶⁾、石灰化はコラー

ゲン原繊維の影響下で進行するようになる。

以上のスキームには、勿論多くの仮定が含まれており、それは今後実験的に検証されなければならないものである。

文 献

- 1) HARPER, R. A. and POSNER, A. S.: Measurement of non-crystalline calcium phosphate in bone mineral. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **122**: 137-142, 1966.
- 2) TERMINE, J. D. and POSNER, A. S.: Infrared analysis of rat bone: Age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions. *Science*, **153**: 1523-1525, 1966.
- 3) TERMINE, J. D. and POSNER, A. S.: Amorphous/crystalline interrelationships in bone mineral. *Calcif. Tiss. Res.*, **1**: 8-23, 1967.
- 4) POSNER, A. S.: Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol. Rev.*, **49**: 760-792, 1969.
- 5) EANES, E. D., GILLESSEN, I. H. and POSNER, A. S.: Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite. *Nature (Lond.)*, **208**: 365-367, 1965.
- 6) EANES, E. D. and POSNER, A. S.: Kinetics and mechanism of conversion of non-crystalline calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **28**: 233-241, 1965.
- 7) BOSKEY, A. L. and POSNER, A. S.: Conversion of amorphous calcium phosphate to microcrystalline hydroxyapatite. A pH-dependent, solution-mediated, solid-solid conversion. *J. Phys. Chem.*, **77**: 2313-2317, 1973.
- 8) EANES, E. D., TERMINE, J. D. and NYLEN, M. U.: An electron microscopic study of the formation of amorphous calcium phosphate and its transformation to crystalline apatite. *Calcif. Tiss. Res.*, **12**: 143-158, 1973.
- 9) BLUMENTHAL, N. C. and POSNER, A. S.: Hydroxyapatite: Mechanism of formation and properties. *Calcif. Tiss. Res.*, **13**: 235-243, 1973.
- 10) BACHRA, B. N., TRAUTZ, O. R. and SIMON, S. L.: Precipitation of calcium carbonates and phosphates. II. The effect of magnesium and fluoride ions on the spontaneous precipitation of calcium carbonates and phosphates. *Arch. Oral Biol.*, **10**: 731-738, 1965.
- 11) BOSKEY, A. L. and POSNER, A. S.: Magnesium stabilization of amorphous calcium phosphate: A kinetic study. *Mat. Res. Bull.*, **9**: 907-916, 1974.
- 12) BACHRA, B. N., TRAUTZ, O. R. and SIMON, S. L.: Precipitation of calcium carbonates and phosphates. I. Spontaneous precipitation of calcium carbonates and phosphates under physiological conditions. *Arch. Biochem. Biophys.*, **103**: 124-138, 1963.
- 13) FLEISCH, H., RUSSELL, R. G. G., BISAZ, S., TERMINE, J. D. and POSNER, A. S.: Influence of pyrophosphate of the transformation of amorphous to crystalline calcium phosphate. *Calcif. Tiss. Res.*, **2**: 49-59, 1968.
- 14) FRANCIS, M. D.: The inhibition of calcium hydroxyapatite crystal growth by polyphosphonate and polyphosphates. *Calcif. Tiss. Res.*, **3**: 151-162, 1969.
- 15) MEYER, J. L., MCCALL, J. T. and SMITH, L. H.: Inhibition of calcium phosphate crystallization by nucleoside phosphates. *Calcif. Tiss. Res.*, **15**: 287-293, 1974.
- 16) TERMINE, J. D., PECKAUSKAS, R. A. and POSNER, A. S.: Calcium phosphate formation in vitro. II. Effects of environment on amorphous-crystalline transformation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **140**: 318-325, 1970.
- 17) TERMINE, J. D. and EANES, E. D.: Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations. *Calcif. Tiss. Res.*, **10**: 171-197, 1972.
- 18) EANES, E. D.: The interaction of supersaturated calcium phosphate solutions with apatite substrates. *Calcif. Tiss. Res.*, **20**: 75-89, 1976.
- 19) NEUMAN, W. F. and NEUMAN, M. W.: The chemical dynamics of bone mineral. *Chicago Univ. Press, Chicago*, 1958.
- 20) TERMINE, J. D. and EANES, E. D.: Calcium phosphate deposition from balanced salt solutions. *Calcif. Tiss. Res.*, **15**: 81-84, 1974.
- 21) NYLEN, M. U., EANES, E. D. and TERMINE, J. D.: Molecular and ultrastructural studies of non-crystalline calcium phosphates. *Calcif. Tiss. Res.*, **9**: 95-108, 1972.
- 22) BETTS, F. and POSNER, A. S.: An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate. *Mat. Res. Bull.*, **9**: 353-360, 1974.
- 23) POSNER, A. S., PERLOFF, A. and DIORIO, A. F.: Refinement of hydroxyapatite structure. *Acta Cryst.*, **11**: 308-309, 1958.
- 24) KAY, M. I., YOUNG, R. A. and POSNER, A. S.: Crystal structure of hydroxyapatite. *Nature (Lond.)*, **204**: 1050-1052, 1964.
- 25) WERGEDAL, J. E. and BAYLINK, D. J.: Electron microprobe measurements of bone

- mineralization rate in vivo. *Am. J. Physiol.*, 226 : 345-352, 1974.
- 26) NEUMAN, W. F. and BAREHAM, B. J.: Evidence for the presence of secondary calcium phosphate in bone and its stabilization by acid production. *Calcif. Tiss. Res.*, 18 : 161-172, 1975.
- 27) TERMINE, J. D.: Mineral chemistry and skeletal biology. *Clin. Orthop.*, 85 : 207-241, 1972.
- 28) MILLER, A. L. and SCHRAER, H.: Ultrastructural observations of amorphous bone mineral in avian bone. *Calcif. Tiss. Res.*, 18 : 311-324, 1975.
- 29) POSNER, A. S., BLUMENTHAL, N. C., BOSKEY, A. L. and BETTS, F.: Synthetic analogue of bone mineral formation. *J. Dent. Res.*, 54 : B88-B93, 1975.
- 30) BECKER, G. L., CHEN, C.-H., GREENAWALT, J. W. and LEHNINGER, A. L.: Calcium phosphate granules in the hepatopancreas of the blue crab *Callinectes sapidus*. *J. Cell Biol.*, 61 : 316-326, 1974.
- 31) BETTS, F., BLUMENTHAL, N. C., POSNER, A. S., BECKER, G. L. and LEHNINGER, A. L.: Atomic structure of intracellular amorphous calcium phosphate deposits. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 72 : 2088-2090, 1975.
- 32) KASHIWA, H. K.: Calcium in cells of fresh bone stained with glyoxal bis (2-hydroxyanil). *Stain Techn.*, 41 : 49-55, 1966.
- 33) KASHIWA, H. K. and SIGMAN, M. D., Jr.: Calcium localized in odontogenic cells of rat mandibular teeth by the glyoxal bis (2-hydroxyanil) method. *J. Dent. Res.*, 45 : 1796-1799, 1966.
- 34) CAMERON, D. A., PASCHALL, H. A. and ROBINSON, R. A.: Changes in the fine structure of bone cells after the administration of parathyroid extract. *J. Cell Biol.*, 33 : 1-14, 1967.
- 35) MARTIN, J. H. and MATTHEWS, J. L.: Mitochondrial granules in chondrocytes. *Calcif. Tiss. Res.*, 3 : 184-193, 1969.
- 36) KASHIWA, H. K.: Calcium phosphate in osteogenic cells. A critique of the glyoxal bis (2-hydroxyanil) and the dilute silver acetate methods. *Clin. Orthop.*, 70 : 200-211, 1970.
- 37) KASHIWA, H. K.: Localization of phosphate in bone cells of fresh calvaria by means of a dilute silver acetate solution. *Anat. Rec.*, 162 : 177-186, 1968.
- 38) ROLLE, G. K.: The distribution of calcium in normal and tetracycline-modified bones of developing chick embryos. *Calcif. Tiss. Res.*, 3 : 142-150, 1969.
- 39) KASHIWA, H. K. and KOMOROUS, J.: Mineralized spherules in the cells and matrix of calcifying cartilage from developing bone. *Anat. Rec.*, 170 : 119-128, 1971.
- 40) MATTHEWS, J. L., MARTIN, J. H. and COLLINS, E. J.: Metabolism of radioactive calcium by cartilage. *Clin. Orthop.*, 58 : 213-223, 1968.
- 41) PARK, H. Z. and KASHIWA, H. K.: Calcium localized in juxtanuclear granules of epiphyseal chondrocytes with a dilute glyoxal bis (2-hydroxyanil) solution. *Calcif. Tiss. Res.*, 19 : 189-197, 1975.
- 42) NICHOLS, G., Jr. and ROGERS, P.: Bone cell calcium stores: Their size, location, and kinetics of exchange. *Calcif. Tiss. Res.*, 9 : 80-94, 1972.
- 43) HIRSCHMANN, P. N. and NICHOLS, G., Jr.: The isolation and partial characterization of a calcium-rich particulate fraction from bone cells. *Calcif. Tiss. Res.*, 9 : 67-79, 1972.
- 44) DZIAK, R. and BRAND, J. S.: Calcium transport in isolated bone cells. I. Bone cell isolation procedures. *J. Cell. Physiol.*, 84 : 75-84, 1974.
- 45) DZIAK, R. and BRAND, J. S.: Calcium transport in isolated bone cells. II. Calcium transport studies. *J. Cell. Physiol.*, 84 : 85-96, 1974.
- 46) DELUCA, H. F. and ENGSTROM, G. W.: Calcium uptake by rat kidney mitochondria. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, 47 : 1744-1750, 1961.
- 47) VASINGTON, F. D. and MURPHY, J. V.: Ca^{45} uptake by rat kidney mitochondria and its dependence on respiration and phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 237 : 2670-2677, 1962.
- 48) LEHNINGER, A. L., ROSSI, C. S. and GREENAWALT, J. W.: Respiration dependent accumulation of inorganic P and Ca^{45} by rat liver mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 10 : 444-448, 1963.
- 49) ROSSI, C. S. and LEHNINGER, A. L.: Stoichiometry of respiratory stimulation, accumulation of Ca^{45} and phosphate, and oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 239 : 3971-3980, 1964.
- 50) CARAFOLI, E., ROSSI, C. S. and LEHNINGER, A. L.: Uptake of adenine nucleotides by respiring mitochondria during active accumulation of Ca^{45} and phosphate. *J. Biol. Chem.*, 240 : 2254-2261, 1965.
- 51) GREENAWALT, J. W., ROSSI, C. S. and

- LEHNINGER, A. L. : Effect of active accumulation of calcium and phosphate ions on the structure of rat liver mitochondria. *J. Cell Biol.*, **23** : 21-38, 1964.
- 52) ARSENIS, C. : Role of mitochondria in calcification. Mitochondrial activity distribution in the epiphyseal plate and accumulation of calcium phosphate ions by chondrocyte mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **46** : 1928-1935, 1972.
- 53) SHAPIRO, I. M. and LEE, N. H. : Calcium accumulation by chondrocyte mitochondria. *Clin. Orthop.*, **106** : 323-329, 1975.
- 54) ROSSI, C. S. and LEHNINGER, A. L. : Stoichiometric relationships between accumulation of ions by mitochondria and the energy-coupling sites in the respiratory chain. *Biochem. Z.*, **338** : 698-713, 1963.
- 55) THOMAS, R. S. and GREENAWALT, J. W. : Microincineration, electron microscopy, and electron diffraction of calcium phosphate-loaded mitochondria. *J. Cell Biol.*, **39** : 55-76, 1968.
- 56) MARTIN, J. H. and MATTHEWS, J. L. : Mitochondrial granules in chondrocytes, osteoblasts and osteocytes. An ultrastructural and microincineration study. *Clin. Orthop.*, **68** : 273-278, 1970.
- 57) MATTHEWS, J. L., MARTIN, J. H., SAMPSON, H. W., KUNIN, A. S. and ROAN, J. H. : Mitochondrial granules in the normal and rachitic rat epiphysis. *Calcif. Tiss. Res.*, **5** : 91-99, 1970.
- 58) HOHMAN, W. and SCHRAER, H. : The intracellular distribution of calcium in the mucosa of the avian shell gland. *J. Cell Biol.*, **30** : 317-331, 1966.
- 59) SCHRAER, R., ELDER, J. A. and SCHRAER, H. : Aspects of mitochondrial function in calcium movement and calcification. *Federation Proc.*, **32** : 1938-1943, 1973.
- 60) SAYEGH, F. S., DAVID, R. W. and SOLOMON, G. C. : Mitochondrial role in cellular mineralization. *J. Dent. Res.*, **53** : 581-587, 1974.
- 61) SAYEGH, F. S., SOLOMON, G. C. and DAVID, R. W. : Ultrastructure of intracellular mineralization in the deer's antler. *Clin. Orthop.*, **99** : 267-284, 1974.
- 62) CAULFIELD, J. B. and SCHRAG, P. E. : Electron microscopic study of renal calcification. *Am. J. Path.*, **44** : 365-381, 1964.
- 63) REYNOLDS, E. S. : Liver parenchymal cell injury. III. The nature of calcium-associated electron-opaque masses in rat liver mitochondria following poisoning with carbon tetrachloride. *J. Cell Biol.*, **25** : 53-75, 1965.
- 64) BLOOM, S. and CANCELLA, P. A. : Myocytolysis and mitochondrial calcification in rat myocardium after low doses of isoproterenol. *Am. J. Path.*, **54** : 373-391, 1969.
- 65) SUTFIN, L. V., HOLTROP, M. E. and OGI-LVIE, R. E. : Microanalysis of individual mitochondrial granules with diameters less than 1000 angstroms. *Science*, **174** : 947-949, 1971.
- 66) BRIGHTON, C. T. and HUNT, R. M. : Mitochondrial calcium and its role in calcification. Histochemical localization of calcium in electron micrographs of the epiphyseal growth plate with K-pyroantimonate. *Clin. Orthop.*, **100** : 406-416, 1974.
- 67) BRIGHTON, C. T. and HUNT, R. M. : Histochemical localization of calcium in growth plate mitochondria and matrix vesicles. *Federation Proc.*, **35** : 143-147, 1976.
- 68) LEHNINGER, A. L. : Mitochondria and calcium ion transport. *Biochem. J.*, **119** : 129-138, 1970.
- 69) GAY, C. and SCHRAER, H. : Frozen thin-section of rapidly forming bone: Bone cell ultrastructure. *Calcif. Tiss. Res.*, **19** : 39-49, 1975.
- 70) ANDERSON, H. C. : Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J. Cell Biol.*, **35** : 81-101, 1967.
- 71) ANDERSON, H. C. : Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J. Cell Biol.*, **41** : 59-72, 1969.
- 72) BONUCCI, E. : Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.*, **20** : 33-50, 1967.
- 73) BONUCCI, E. : Fine structure and histochemistry of "calcifying globules" in epiphyseal cartilage. *Z. Zellforsch.*, **103** : 192-217, 1970.
- 74) GLIMCHER, M. J. and KRANE, S. M. : The organization and structure of bone, and the mechanism of calcification. In *Treatise on Collagen* (B. S. Gould, ed.), p. 67, Academic Press, New York, 1968.
- 75) HÖHLING, H. J. and ASHTON, B. A. : Quantitative electron microscopic investigations of mineral nucleation in collagen. *Cell Tiss. Res.*, **148** : 11-26, 1974.
- 76) SIMON, D. R., BERMAN, I. and HOWELL, D. S. : Relationship of extracellular matrix vesicles to calcification in normal and healing rachitic epiphyseal cartilage. *Anat. Res.*, **176** : 167-180, 1973.
- 77) ANDERSON, H. C., CECIL, R. and SAJDE-RA, S. W. : Calcification of rachitic rat ca-

- rtilage by extracellular matrix vesicles. *Am. J. Path.*, **79**: 237-254, 1975.
- 78) ANDERSON, H. C. and SAJDERA, S. W.: Calcification of rachitic cartilage to study matrix vesicle function. *Federation Proc.*, **35**: 148-153, 1976.
 - 79) BERNARD, G. W.: The ultrastructural interface of bone crystals and organic matrix in woven and lamellar endochondral bone. *J. Dent. Res.*, **48**: 781-788, 1969.
 - 80) BERNARD, G. W. and PEASE, D. C.: An electron microscopic study of initial intramembranous osteogenesis. *Am. J. Anat.*, **125**: 271-290, 1969.
 - 81) BONUCCI, E.: The locus of initial calcification in cartilage and bone. *Clin. Orthop.*, **78**: 108-139, 1971.
 - 82) BERNARD, G. W.: Ultrastructural observations of initial calcification in dentine and enamel. *J. Ultrastruct. Res.*, **41**: 1-17, 1972.
 - 83) EISENMANN, D. R. and GLICK, P. L.: Ultrastructure of initial crystal formation in dentin. *J. Ultrastruct. Res.*, **41**: 18-28, 1972.
 - 84) SISCA, R. F. and PROVENZA, D. V.: Initial dentin formation in human deciduous teeth. An electron microscopic study. *Calcif. Tiss. Res.*, **9**: 1-16, 1972.
 - 85) SAYEGH, F. S., SOLOMON, G. C. and DAVIS, R. W.: Cellular basis of mineralization in the antler tip. *J. Dent. Res.*, **52**: (special issue): 62, 1973.
 - 86) PAEGLE, R. D.: Ultrastructure of calcium deposits in arteriosclerotic human aortas. *J. Ultrastruct. Res.*, **26**: 412-423, 1969.
 - 87) KIM, K. M.: Calcification of matrix vesicles in human aortic valve and aortic media. *Federation Proc.*, **35**: 156-162, 1976.
 - 88) SCHAJOWICZ, M. D., CABRINI, M. D., SIMES, R. J. and KLEIN-SZANTO, A. J. P.: Ultrastructure of chondrosarcoma. *Clin. Orthop.*, **99**: 267-284, 1974.
 - 89) BONUCCI, E.: Further investigation on the organic/inorganic relationships in calcifying cartilage. *Calcif. Tiss. Res.*, **3**: 38-54, 1969.
 - 90) ANDERSON, H. C., MATSUZAWA, T., SAJDERA, S. W. and ALI, S. Y.: Membranous particles in calcifying cartilage matrix. *Trans. N. Y. Acad. Sci.*, **32**: 619-630, 1970.
 - 91) RABINOVITCH, A. L. and ANDERSON, H. C.: Biogenesis of matrix vesicles in cartilage growth plates. *Federation Proc.*, **35**: 112-116, 1976.
 - 92) ALI, S. Y., SAJDERA, S. W. and ANDERSON, H. C.: Isolation and characterization of calcifying matrix vesicles from epiphyseal cartilage. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **67**: 1513-1520, 1970.
 - 93) MATSUZAWA, T. and ANDERSON, H. C.: Phosphatases of epiphyseal cartilage studied by electron microscopic cytochemical methods. *J. Histochem. Cytochem.*, **19**: 801-808, 1971.
 - 94) MAJESKA, R. J. and WUTHIER, R. E.: Studies on matrix vesicles isolated from chick epiphyseal cartilage. Association of pyrophosphatase and ATPase activities with alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, **391**: 51-60, 1975.
 - 95) ALI, S. Y.: Analysis of matrix vesicles and their role in the calcification of epiphyseal cartilage. *Federation Proc.*, **35**: 135-142, 1976.
 - 96) SAJDERA, S. W., FRANKLIN, S. and FORTUNA, R.: Matrix vesicles of bovine fetal cartilage: Metabolic potential and solubilization with detergents. *Federation Proc.*, **35**: 154-155, 1976.
 - 97) PERESS, N. S., ANDERSON, H. C. and SAJDERA, S. W.: The lipids of matrix vesicles from bovine fetal epiphyseal cartilage. *Calcif. Tiss. Res.*, **14**: 275-281, 1974.
 - 98) WUTHIER, R. E.: Lipid composition of isolated epiphyseal cartilage cells, membranes and matrix vesicles. *Biochim. Biophys. Acta*, **409**: 128-143, 1975.
 - 99) WUTHIER, R. E.: Lipids of matrix vesicles. *Federation Proc.*, **35**: 117-121, 1976.
 - 100) SLAVKIN, H. C., CROISSANT, R. D., BRINGAS, P., MATOSIAN, P., WILSON, P., MINO, W. and GUENTHER, H.: Matrix vesicle heterogeneity: Possible morphogenetic functions for matrix vesicles. *Federation Proc.*, **35**: 127-134, 1976.
 - 101) THYBERG, J. and FRIBERG, U.: Ultrastructure and acid phosphatase activity of matrix vesicles and cytoplasmic dense bodies in the epiphyseal plate. *J. Ultrastruct. Res.*, **33**: 554-573, 1970.
 - 102) THYBERG, J. and FRIBERG, U.: Electron microscopic enzyme histochemical studies on the cellular genesis of matrix vesicles in the epiphyseal plate. *J. Ultrastruct. Res.*, **41**: 43-59, 1972.
 - 103) THYBERG, J.: Electron microscopic studies on the initial phases of calcification in guinea pig epiphyseal cartilage. *J. Ultrastruct. Res.*, **46**: 206-218, 1974.
 - 104) RUSSELL, R. G. G. and FLEISCH, H.: Inorganic pyrophosphate and pyrophosphatases in calcification and calcium homeostasis. *Clin. Orthop.*, **69**: 101-117, 1970.

- 105) RUSSELL, R. G. G., BISAZ, S., DONATH, A., MORGAN, D. B. and FLEISCH, H.: Inorganic pyrophosphate in plasma in normal persons and in patients with hypophosphatasia, osteogenesis imperfecta and other disorders of bone. *J. Clin. Invest.*, **50**: 961-969, 1971.
- 106) COTMORE, J. M., NICHOLS, G. and WUTHIER, R. E.: Phospholipid-calcium phosphate complex: Enhanced calcium migration in the presence of phosphate. *Science*, **172**: 1339-1341, 1971.
- 107) ROBISON, R.: The possible significance of hexose phosphoric esters in ossification. *Biochem. J.*, **17**: 286-293, 1923.
- 108) FLEISCH, H. and RUSSELL, R. G. G.: A review of the physiological and pharmacological effects of pyrophosphate and diphosphonates on bones and teeth. *J. Dent. Res.*, **51** Suppl.: 324-332, 1972.
- 109) ALCOCK, N. W.: Calcification of cartilage. *Clin. Orthop.*, **86**: 287-311, 1972.
- 110) RUSSELL, R. G. G. and FLEISCH, H.: Pyrophosphate and diphosphonates in skeletal metabolism. Physiological, clinical and therapeutic aspects. *Clin. Orthop.*, **108**: 241-263, 1975.
- 111) FLEISCH, H. and BISAZ, S.: Isolation from urine of pyrophosphate, a calcification inhibitor. *Am. J. Physiol.*, **203**: 671-675, 1962.
- 112) RUSSELL, R. G. G. and HODGKINSON, A.: The urinary excretion of inorganic pyrophosphate by normal subjects and patients with renal calculus. *Clin. Sci.*, **31**: 51-62, 1966.
- 113) HAUSMANN, E., BISAZ, S., RUSSELL, R. G. G. and FLEISCH, H.: The concentration of inorganic pyrophosphate in human saliva and dental calculus. *Arch. Oral Biol.*, **15**: 1389-1392, 1970.
- 114) PERKINS, H. R. and WALKER, P. G.: The occurrence of pyrophosphate in bone. *J. Bone Joint Surg.*, **40-B**: 333-339, 1958.
- 115) SOLOMONS, C. C. and STYNER, J.: Osteogenesis imperfecta: Effect of magnesium administration on pyrophosphate metabolism. *Calcif. Tiss. Res.*, **3**: 318-326, 1969.
- 116) BISAZ, S., RUSSELL, R. G. G. and FLEISCH, H.: Isolation of inorganic pyrophosphate from bovine and human teeth. *Arch. Oral Biol.*, **13**: 683-696, 1968.
- 117) WUTHIER, R. E., BISAZ, S., RUSSELL, R. G. G. and FLEISCH, H.: Relationship between pyrophosphate, amorphous calcium phosphate and other factors in the sequence of calcification in vivo. *Calcif. Tiss. Res.*, **10**: 198-206, 1972.
- 118) FLEISCH, H., SCHIBLER, D., MAERKI, J. and FROSSARD, I.: Inhibition of aortic calcification by means of pyrophosphate and polyphosphates. *Nature (Lond.)*, **207**: 1300-1301, 1965.
- 119) SCHIBLER, D., RUSSELL, R. G. G. and FLEISCH, H.: Inhibition by pyrophosphate and polyphosphate of aortic calcification induced by vitamin D₃ in rats. *Clin. Sci.*, **35**: 363-372, 1968.
- 120) SCHIBLER, D. and FLEISCH, H.: Inhibition of skin calcification (calciophylaxis) by polyphosphates. *Experientia*, **22**: 367-369, 1966.
- 121) GABBIANI, G.: Effect of phosphates upon experimental skin calcinosis. *Canad. J. Physiol. Pharmacol.*, **44**: 320-327, 1966.
- 122) FLEISCH, H., STRAUMANN, F., SCHENK, R., BISAZ, S. and ALLGÖWER, M.: Effect of condensed phosphates on calcification of chick embryo femurs in tissue culture. *Am. J. Physiol.*, **211**: 821-825, 1966.
- 123) IRVING, J. T., SCHIBLER, D. and FLEISCH, H.: Bone formation in normal and vitamin D-treated rachitic rats during the administration of polyphosphates. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **123**: 332-335, 1966.
- 124) FLEISCH, H., RUSSELL, R. G. G., BISAZ, S., CASEY, P. A. and MÜHLBAUER, R. C.: The influence of pyrophosphate analogues (diphosphonates) on the precipitation and dissolution of calcium phosphate in vitro and in vivo. *Calcif. Tiss. Res.*, **2** Suppl.: 10-10A, 1968.
- 125) FRANCIS, M. D., RUSSELL, R. G. G. and FLEISCH, H.: Diphosphonates inhibit formation of calcium phosphate crystals in vitro and pathological calcification in vivo. *Science*, **165**: 1264-1266, 1969.
- 126) FELIX, R. and FLEISCH, H.: The pyrophosphatase and (Ca²⁺-Mg²⁺)-ATPase activity of purified calf bone alkaline phosphatase. *Biochim. Biophys. Acta*, **350**: 84-94, 1974.
- 127) FELIX, R. and FLEISCH, H.: Role of matrix vesicles in calcification. *Federation Proc.*, **35**: 169-171, 1976.
- 128) ALCOCK, N. W. and SHILS, M. E.: Association of inorganic pyrophosphatase activity with normal calcification of rat costal cartilage in vivo. *Biochem. J.*, **112**: 505-510, 1969.
- 129) HOWELL, D. S., PITA, J. C., MARQUEZ, J. F. and MADRUGA, J. E.: Partition of calcium, phosphate, and protein in the fluid phase aspirated at calcifying sites in epiphyseal cartilage. *J. Clin. Invest.*, **47**: 1121-1132, 1968.

- 130) ALI, S. Y. and EVANS, L.: The uptake of [45 Ca] calcium ions by matrix vesicles isolated from calcifying cartilage. *Biochem. J.*, **134**: 647-650, 1973.
- 131) EBASHI, S. and LIPMANN, F.: Adenosine triphosphate-linked concentration of calcium ions in a particulate fraction of rabbit muscle. *J. Cell Biol.*, **14**: 389-400, 1962.
- 132) KANAZAWA, T., YAMADA, S., YAMAMOTO, T. and TONOMURA, Y.: Reaction mechanism of the Ca^{2+} -dependent ATPase of sarcoplasmic reticulum from skeletal muscle. V. Vectorial requirements for calcium and magnesium ions of three partial reactions of ATPase: Formation and decomposition of a phosphorylated intermediate and ATP-formation from ADP and the intermediate. *J. Biochem.*, **70**: 95-123, 1971.
- 133) 金沢徹: 筋小胞体の Ca 輸送と ATPase. 生物物理, **16**: 187-193, 1976.
- 134) SCHATZMANN, H. J.: Dependence on calcium concentration and stoichiometry of the calcium pump in human red cells. *J. Physiol.*, **235**: 551-569, 1973.
- 135) KNAUF, P. A., PROVERBIO, F. and HOFFMAN, J. F.: Electrophoretic separation of different phosphoproteins associated with Ca-ATPase and Na, K-ATPase in human red cell ghosts. *J. Gen. Physiol.*, **63**: 324-336, 1974.
- 136) IRVING, J. T.: A histological stain for newly calcified tissues. *Nature (Lond.)*, **181**: 704-705, 1958.
- 137) IRVING, J. T.: A histological staining method for sites of calcification in teeth and bone. *Arch. Oral Biol.*, **1**: 89-96, 1959.
- 138) IRVING, J. T.: The sudanophil material at sites of calcification. *Arch. Oral Biol.*, **8**: 735-745, 1963.
- 139) IRVING, J. T.: Histochemical changes in the early stages of calcification. *Clin. Orthop.*, **17**: 92-102, 1960.
- 140) DIRKSEN, T. R. and IKELS, D. G.: Quantitative determination of some constituent lipids in human dentin. *J. Dent. Res.*, **43**: 246-251, 1964.
- 141) IRVING, J. T. and DURKIN, J. F.: A comparison of the changes in the mandibular condyle with those in the upper tibial epiphyses during the onset and healing of scurvy. *Arch. Oral Biol.*, **10**: 179-186, 1965.
- 142) IRVING, J. T., SCHIBLER, D. and FLEISCH, H.: Effect of condensed phosphates on vitamin D-induced aortic calcification in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **122**: 852-856, 1966.
- 143) WUTHIER, R. E.: Lipids of mineralizing epiphyseal tissues in the bovine fetus. *J. Lipid Res.*, **9**: 68-78, 1968.
- 144) IRVING, J. T. and WUTHIER, R. E.: Histochemistry and biochemistry of calcification with special reference to the role of lipids. *Clin. Orthop.*, **56**: 237-260, 1968.
- 145) ENNEVER, J., VOGEL, J. J. and LEVY, B. M.: Lipid and bone matrix calcification in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **145**: 1386-1388, 1974.
- 146) VOGEL, J. J. and ENNEVER, J.: Lipid-dependent calcification of elephant tusk matrix. *J. Dent. Res.*, **54**: 416, 1975.
- 147) TAKAZOE, I., VOGEL, J. and ENNEVER, J.: Calcium hydroxyapatite nucleation by lipid extract of bacterionema matruchotii. *J. Dent. Res.*, **49**: 395-398, 1970.
- 148) VOGEL, J. J. and ENNEVER, J.: The role of a lipoprotein in the intracellular hydroxyapatite formation in bacterionema matruchotii. *Clin. Orthop.*, **78**: 218-222, 1971.
- 149) VOGEL, J. J., CAMPBELL, M. M. and ENNEVER, J.: Calcification of a lysozyme-inositol phosphatide complex in vitro. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **143**: 677-680, 1973.
- 150) ABRAMSON, M. B., KATZMAN, R. and GREGOR, H. P.: Aqueous dispersions of phosphatidylserine: Ionic properties. *J. Biol. Chem.*, **239**: 70-76, 1964.
- 151) NASH, H. A. and TOBIAS, J. M.: Phospholipid membrane model: Importance of phosphatidylserine and its cation exchanger nature. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.*, **51**: 476-480, 1964.
- 152) HENDRICKSON, H. S. and FULLINGTON, J. G.: Stabilities of metalcomplexes of phospholipids: Ca (II), Mg (II) and Ni (II) complexes of phosphatidylserine and triphosphoinositide. *Biochemistry*, **4**: 1599-1605, 1965.
- 153) JOOS, R. W. and CARR, C. W.: The binding of calcium in mixtures of phospholipids. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, **124**: 1268-1272, 1967.
- 154) WUTHIER, R. E. and EANES, E. D.: Effect of phospholipids on the transformation of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite in vitro. *Calcif. Tiss. Res.*, **19**: 197-210, 1975.
- 155) ANGHILERI, L. J.: Calcium binding to phospholipids from experimental tumors. *Z. Krebsforsch.*, **78**: 337-344, 1972.
- 156) ANGHILERI, L. J. and DERMETZEL, R.: Calcium-phosphate-phospholipid complexes in experimental tumors: Their possible relationship with tumor calcification. *Z. Krebsforsch.*, **78**: 337-344, 1972.

- sforsch.*, **79** : 148-156, 1973.
- 157) WUTHIER, R. E. : The role of phospholipids in biological calcification. Distribution of phospholipase activity in calcifying epiphyseal cartilage. *Clin. Orthop.*, **90** : 191-200, 1973.
 - 158) HOWELL, D. S. : Current concepts of calcification. *J. Bone Joint Surg.*, **53-A** : 250-258, 1971.
 - 159) DI SALVO, J. and SCHUBERT, M. : Specific interaction of some cartilage proteinpolysaccharides with freshly precipitating calcium phosphate. *J. Biol. Chem.*, **242** : 705-710, 1967.
 - 160) CAMPO, R. D., TOURTELLOTTE, C. D. and BIELEN, R. J. : The protein-polysaccharides of articular, epiphyseal plate and costal cartilage. *Biochim. Biophys. Acta*, **177** : 501-511, 1969.
 - 161) HOWELL, D. S., PITA, J. C., MARQUEZ, J. F. and GATTER, R. A. : Demonstration of macromolecular inhibitor (s) of calcification and nucleational factor (s) in fluid from calcifying sites in cartilage. *J. Clin. Invest.*, **48** : 630-641, 1969.
 - 162) PITA, J. C., CUERVO, L. A., MADRUGA, J. E., MULLER, F. J. and HOWELL, D. S. : Evidence for a role of proteinpolysaccharides in regulation of mineral phase separation in calcifying cartilage. *J. Clin. Invest.*, **49** : 2188-2197, 1970.
 - 163) BORLE, A. B. : Kinetic analyses of calcium movements in HeLa cell cultures. I. Calcium influx. *J. Gen. Physiol.*, **53** : 43-56, 1969.
 - 164) BORLE, A. B. : Kinetic analyses of calcium movements in HeLa cell cultures. II. Calcium efflux. *J. Gen. Physiol.*, **53** : 57-69, 1969.
 - 165) HARELL, A., BINDERMAN, I. and RODAN, G. A. : The effect of calcium concentration on calcium uptake by bone cells treated with thyrocalcitonin. *Endocrinology*, **92** : 550-555, 1973.
 - 166) TERMINE, J. D., PULLMAN, I. and POSNER, A. S. : Electron Spin resonance study of irradiated bone and its constituents. *Arch. Biochem. Biophys.*, **122** : 318-330, 1967.