中性領域リン酸溶液中での非晶質リン酸カルシウム から第二リン酸カルシウム二水塩への転換

土 井 豊* Edward D. Eanes**

* 朝日大学歯学部歯科理工

** 米国国立衛生研究所 NIH, NIDR

〔受付：昭和61年9月17日〕

Transformation of amorphous calcium phosphate to dicalcium phosphate dihydrate in phosphate solutions at physiological pH

Yutaka Doi* and Edward D. Eanes**

* *Asahi university, School of Dentistry, Dental Materials & Technology
Hozumi-cho, Hozumi 1851-1, Gifu 501-02*

** *National Institutes of Health, NIDR, Mineralized Tissue Research Group
Bethesda, Maryland 20892*

〔Accepted for publication : September 17, 1986〕

Key words : Amorphous calcium phosphate / brushite / phosphate solution / ACP-DCPD
transformation / matrix vesicle

Abstract : Amorphous calcium phosphate (ACP) prepared in unstable supersaturated solutions was found to transform to brushite at physiological pH when introduced to phosphate solutions the concentration of which were comparable with those of the inorganic phosphate reported in matrix vesicles. Comparison of non-treated dry ACP and pressed ACP after being reground showed that brushite forms as a result of a slow dissolution of ACP. In this regard, ACP acts as calcium reservoir, resulting in a slow release of calcium in phosphate solutions.

Thermodynamic analysis of the solution of calcium and phosphate at the concentrations used confirmed that brushite was stable phase even at pH higher than 7.20. Scanning electron micrograms of the solid samples taken from the phosphate solutions with the initial pH adjusted at 7.40 showed plate-like crystals characteristic of brushite. With time, however, the thermodynamically most stable phase of HAp precipitated on to the brushite crystals.

From the data presented it is suggested that macromolecules and ions which inhibit ACP transformation, possibly to hydroxyapatite, may play an important role on ACP dissolution, which favors brushite formation in phosphate solutions.

結 言

骨、象牙質の初期石灰化に基質小胞が重要な役割を果していることが認識され始めて以来^{1,2)},

基質小胞は間葉系石灰化の初期段階を考える上で不可欠の存在となりつつある。多くの研究者によって¹⁻¹¹⁾ 基質小胞内に非晶質リン酸カルシウムの存在が認められ、経時的に水酸化アパタイトと思われる針状結晶に転換しながら、基質小胞外の基質液へ移行し初期石灰化が始まると考えられてい

* 岐阜県本巣郡穂積町穂積 1851-1 (〒 501-02)

** Bethesda, Maryland 20892, U.S.A.

る。*in vitro* の系においても、血清中で蛋白質と結合していないカルシウム ($\sim 1.3\text{mM}$)、リン酸濃度 ($1 \sim 2\text{mM}$)¹²⁾ と同程度か少し高めになるように、カルシウムとリン酸溶液を 37°C 、中性 pH 領域で混合すると Ca/PO_4 モル比が約 1.5 の非晶質リン酸カルシウム (Amorphous Calcium Phosphate; ACP) が自発沈殿することが知られている^{9,13-16)}。このように生成した ACP は、オクタカルシウムリン酸塩 (Octacalcium Phosphate; OCP) を経て、最終的な安定相である水酸化アパタイトに転換する¹⁶⁻¹⁸⁾。

一方、基質小胞中のリン酸濃度は、血清あるいは基質液中のものに比べ極めて高く、 30mM 以上あるという報告もある^{19,20)}。溶液中のカルシウム、リン酸濃度の積が一定の場合、 Ca/PO_4 モル比が小さい程、すなわちリン酸濃度が相対的に高い程 ACP は生成しにくいことが *in vitro* で示されており²¹⁾、果して高濃度リン酸溶液下で通常の ACP が生成し、それが水酸化アパタイトに転換するか否かは未だ不明である²²⁾。特に、Roufosse ら²³⁾ によって初期石灰化段階で第二リン酸カルシウム・2水塩が X 線回折で検出された²⁴⁾ ことは、それが artifact による可能性が高いにもかかわらず、従来までの ACP とは異なる非晶質リン酸カルシウムが石灰化初期に関与し得るか否かを再考察する動起を与えた²⁰⁾。

今回の研究目的は、あらかじめ合成しておいた ACP を高濃度リン酸溶液 ($\sim 60\text{mM}$) に導入した場合、どのような転換過程を経て、他のリン酸カルシウムへ移行するかを検討することにある²²⁾。

実験材料・方法

ACP 合成

Ca/PO_4 モル比が約 1.5 を有する非晶質リン酸カルシウム (ACP) は、種々のカルシウム塩 ($1.3 \sim 13\text{mM}$) とリン酸塩 ($2.0 \sim 10\text{mM}$) を、pH スタット^{16,25,26)}、もしくは緩衝溶液を用い、中性からアルカリ領域で、 2° 、 5° 、 25° 、 37°C で反応させて得た^{14-18,27-29)}。両溶液を混合し、白色沈殿が生じた時点で反応をやめ、遠沈後、蒸留水で 3 回洗浄し、凍結乾燥した。このようにして得られた生成物は、X 線回折、IR、化学分析により

Fig. 1 Schematic experimental apparatus.

Ca/PO_4 モル比が約 1.5 を有する非晶質リン酸カルシウムであることを確認後、実験に供した。

ACP のリン酸溶液中での溶解速度を減少させる目的で、一部の試料を加圧 ($7800\text{kg}/\text{cm}^2$) し、その後、乳鉢を用いて粉碎し、 38 、 53 、 75 、 100 、 $300\mu\text{m}$ のフルイを通した。尚、加圧後の ACP のかさ密度は 2.10 であった。

反応溶液調製

リン酸水溶液 ($\sim 60\text{mM}$) は KH_2PO_4 を、蒸留後、脱イオンした水に溶解して作製した。リン酸水溶液の初期 pH は 3N KOH 溶液にて調製し、ACP 導入後の溶液の pH はオリオンリサーチ、もしくは、pH M84 のリサーチ pH メーターを使用して測定した。反応は一部を除いて 25°C で行い、Fig. 1 の模式図で示した実験装置にて行った。反応時に空気中の CO_2 が溶解し、pH を下げたり、ACP から他のリン酸カルシウムへ転換する速度を遅延するのを防ぐ目的で、室温もしくは 37°C で水蒸気を飽和した窒素ガスを溶液中に通した。

溶液の化学分析及び固相同定

経時的に反応途中の溶液を採取し、 $0.2\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを使用し、固相とロ液を分離しロ液はカルシウム及びリン酸濃度測定に用いた。カルシウム濃度は原子吸光法により、リン酸濃度はリンモリブデン法による比色定量法により求めた。尚、原子吸光法による Ca 濃度測定の際、高濃度のリン酸による干渉作用を除くため、 $10,000\text{ppm}$ のランタン溶液を使用した。メンブレ

ンフィルター上の固相は、ドライアイス温度で急速凍結し、真空乾燥後、デバйкаメラ、もしくはローターフレックスでX線回折を行い、反応過程における固相の変化を経時的に検討した。更に、この様にして得られた固相の一部を査走型電子顕微鏡 (SEM) で観察し、形態の違いに基づく固相解析を行った。

熱力学的解析

ACp をリン酸溶液に導入した場合、ACP より溶解度の小さいリン酸カルシウム塩* が反応中に析出する可能性がある。ACP より溶解度の小さいリン酸カルシウム塩には、DCPD、OCP、TCP、HAP 等があり、これらの塩が反応途中で析出し安定に存在している時には、その塩の溶解度積は当然のことながら溶液組成から算出した値と同じになっていることが熱力学的に示されている。したがって溶液の全カルシウム、全リン酸濃度、及び pH を基にイオン活動度を算出し^{16-18,22,25,26)}、上述の固相に対するみかけの溶解度積を算出し、この値がどの固相の値に近いかな否か、すなわち液相と固相が平衡状態に近いかな否かを調べるにより、どの固相が反応中に関与しているかを知ることができる。イオン活動度の算出にはデービス (Davis) の式を用い**、 Ca^{2+} が HPO_4^{2-} 、 H_2PO_4^- 、及び PO_4^{3-} とイオンペアを形成するこ

とも考慮した^{16,18,25,26)}。更に、溶液中の全カルシウム濃度 (T_{Ca}) 及び全リン酸濃度 (T_{PO_4}) は、上述のイオンペアも考慮し次式で示されるものとした¹⁸⁾。

$$T_{\text{Ca}} = [\text{Ca}] + [\text{Ca H}_2\text{PO}_4] + [\text{Ca PO}_4]$$

$$T_{\text{PO}_4} = [\text{PO}_4] + [\text{HPO}_4] + [\text{H}_2\text{PO}_4] + [\text{H}_3\text{PO}_4] + [\text{Ca PO}_4] + [\text{Ca HPO}_4] + [\text{Ca H}_2\text{PO}_4]$$

実際の計算では、ACP、DCPD、OCP、TCP、HAp、に対して不変系となる二成分、 $(\text{Ca}^{2+})(\text{OH}^-)^2$ と $(\text{H}^+)^3(\text{PO}_4^{3-})$ の常用対数目盛に溶液の組成をプロットする、いわゆる化学ポテンシャルプロット²²⁾により熱力学的解析をした。

ACP 導入後の溶液の pH 変化

Fig. 2 は、種々の pH (6.50~7.40) に調製した 62.5mM の KH_2PO_4 溶液 (25°C) に ACP 粉末 (32mg/ml) を導入した後の溶液の pH の経時変化を示したものである。初期 pH 7.40 の場合を除いて、いずれの場合でも、ACP 導入後、極めて短時間内 (約 1.5 分) に溶液の pH が上昇し、その程度は初期 pH が低い程大きくなっている。初期 pH が 7.00 以上の場合、この初期の pH 上昇後 pH は急激に低下し、その後徐々に低下する傾向を示した。初期 pH が 6.90 以上の溶液では、1.5~2 分後に見られる pH の低下はわずかで、その後再び pH が上昇した。特に、初期 pH

* 本論文で使用する種々のリン酸カルシウム塩の略号、英語名、化学式、及び 25°C における溶解度積¹⁶⁻¹⁸⁾を列記する。

ACP (Amorphous Calcium Phosphate ;

$$\text{Ksp} = (\text{Ca}^{2+})^3 (\text{PO}_4^{3-})^{1.87} (\text{HPO}_4^{2-})^{0.2} = 1.51 \times 10^{-25}$$

DCPD (Dicalcium Phosphate Dihydrate ;

$$\text{Ksp} = (\text{Ca}^{2+}) (\text{HPO}_4^{2-}) = 2.57 \times 10^{-7}$$

OCP (Octacalcium Phosphate ;

$$\text{Ksp} = (\text{Ca}^{2+})^4 (\text{H}^+) (\text{PO}_4^{3-})^3 = 6.46 \times 10^{-48}$$

TCP (β -Tricalcium Phosphate ; $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$)

$$\text{Ksp} = (\text{Ca}^{2+})^3 (\text{PO}_4^{3-})^2 = 1.15 \times 10^{-29}$$

HAp (Hydroxyapatite ; $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$)

$$\text{Ksp} = (\text{Ca}^{2+})^5 (\text{PO}_4^{3-})^3 (\text{OH}^-) = 2.57 \times 10^{-59}$$

尚、Ksp に用いた () はイオン活動度を示す。

** $f_i = -0.5209 Z_i^2 \{ \sqrt{\mu} / (1 + \sqrt{\mu}) - 0.3 \sqrt{\mu} \}$

ここで f_i は i イオンの活動度、 Z_i は電荷数、 μ はイオン強度 ($\mu = \sum m_i Z_i^2$; m_i は i イオンのモル濃度) である。

Fig. 2 Time plot of pH of 63mM KH_2PO_4 solution inoculated with ACP (32mg/ml). Initial solution pH; A. 6.50, B. 6.80, C. 6.90, D. 6.95, E. 7.00, F. 7.20, and G. 7.40.

Fig. 3 Time plot of pH of 63mM KH_2PO_4 solution inoculated with P-P-ACP (32mg/ml) having different particle sizes. Initial pH of the solution was adjusted at 7.40. Numbers in this figure represent the particle size.

が6.50の場合では1時間後には溶液のpHは7.10以上に達し、この状態が2時間後以上続いた。

各条件下での反応生成物は初期pHが7.00以上の場合には、HAPのみが検出され、ACPがHAPに転換していることがわかった。初期pHが6.90以上では、HAPに加えてDCPDが確認された。DCPDの量は、初期pHが低い程、また反応時間が長い程多くなり、経時的にACPがDCPDに転換していることが明らかとなった。特に初期pHが6.50の場合には、ACP導入後、pHが急に上昇し、7.10以上の状態が2時間以上継続していたにもかかわらず、中性近くでは不安定と考えられていたDCPDが生成していた。

これらの結果は、ACPの溶解速度がDCPDの生成、ひいては安定性にも関与していることを示唆するものである。この事実を更に確認するために、加圧後粉碎化したACP (Powdered, Pressed ACP, P-P-ACP) を使い、中性pH領域下で同様の実験をした (Fig. 3)。粒子径の違いによって溶液のpHの変動は若干異なるが、P-P-ACP導入後においてはpHは下がらず、通常のACPの場合

Fig. 4 Time plot of the solution calcium and phosphate concentrations after inoculation of ACP and P-P-ACP with the particle size less than $38\mu\text{m}$.

A and B, respectively, are total phosphate and calcium concentrations of the ACP-inoculated solution. C and D, respectively, are total phosphate and calcium concentrations of the P-P-ACP-inoculated solution. Note the difference between the ACP and P-P-ACP dissolution behaviour.

合とは異なる転換過程を経ていることが想像できる。

Fig. 4は、ACP及び粒径 $38\mu\text{m}$ 以下のP-P-ACP導入後の溶液中のカルシウム及びリン酸濃度 (T_{Ca} , T_{PO_4}) 変化をプロットしたものである。 T_{Ca} 及び T_{PO_4} の経時変化はP-P-ACPとACPの場合では明らかに異なる。特に、ACP導入後の T_{Ca} は約10分後までは上昇するがその後急激に減少しHAPに転換していることがわかる。

溶液組成の熱力学的解析

Fig. 5は、溶液の T_{Ca} , T_{PO_4} 及びpHに基づいてFig. 4の結果を熱力学的に解析したもので、 $-\log(\text{H}^+)^3(\text{PO}_4^{3-})$ と $-\log(\text{Ca}^{2+})(\text{OH}^-)^2$ の二成分系に溶液組成をプロットしたものである。各リン酸カルシウム塩の溶解度積は実線で示され、この線より右上の領域では、溶液は関与する固相に対して不飽和であり、左下の領域では過飽和になっている。P-P-ACP導入後約60分後に、溶液組成はDCPDの飽和線に沿って動き、固相と溶液が平衡に近い状態にあることが理解できる。

Fig. 5 Chemical potential plot of $p(\text{Ca}^{2+})(\text{OH}^-)^2$ vs $p(\text{H}^+)^3(\text{PO}_4^{3-})$ for ACP transformation calculated based on T_{Ca} , T_{PO_4} and pH shown in Figs. 3 and 4. Thick solid line corresponds to the solubility product of each solid phase. Above this line the solution is undersaturated with respect to the corresponding phase, while below the line the solution is supersaturated. The solubility product of ACP was calculated based on the formula, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_{1.87}(\text{HPO}_4)_{0.2}$ reported by Meyer and Eanes¹⁸⁾. Open and closed circles represent the solution chemical potential after inoculation of ACP and P-P-ACP, respectively. Numbers in this figure represent times of reaction.

固相のX線回折及び SEM 観察

Fig. 6 は、初期 pH 7.40における P-P-ACP 導入前、導入後の反応生成物をX線回折で経時的に調べた結果である。ACP 導入5分後で DCPD (図中で星印で示した) が析出し、400分後でも安定に存在していることがわかる。Fig. 7 は、Fig. 6 で得られた各時間での反応生成物の SEM 像の典型例(10分、40分後)であり、形態の違う3種類の固相が存在していることが理解できる。複雑な形状をした固相は、反応前の P-P-ACP と同じ形状を有することから未反応の P-P-ACP と考えられる。比較的大きな平板状の結晶は、溶液組

Fig. 6 Typical X-ray diffraction patterns of the solids taken out of the P-P-ACP-inoculated reaction shown by the open circles in Fig. 5.

Asterisks represent the major diffraction peaks of DCPD and the remainder corresponds to the HAP diffraction peaks.

成が固相の DCPD の溶解度積と近い状態で特に多く見い出されることから DCPD と推定でき、残りのフレーク状の結晶は HAP であると考えられる。

考 察

血清中に存在するカルシウムと無機リン酸濃度比に近い組成比 ($\text{Ca}/\text{PO}_4=0.5\sim 2$) で溶液のリン酸カルシウム濃度を中性 pH 領域で上げると、第二リン酸カルシウム2水塩(DCPD)の飽和濃度をかなり越えて初めてリン酸カルシウム塩が自発沈殿する¹⁶⁻¹⁸⁾。沈殿生成物はX線回折に対して非晶質で、上述の溶液組成の Ca/PO_4 モル比には無関係に、 Ca/PO_4 モル比が約1.5を有することが示されている^{13,14,17,18,21)}。この様に生成した非晶質リン酸カルシウム(ACP)は、中性領域では不安定で徐々に溶解し、オクタカルシウムリン酸塩(OCP)を経て水酸化アパタイトに転換する^{16-18,30)}。

溶解度積に基づく熱力学的見地からすれば

Fig. 7 Representative scanning electron micrographs of the solids taken out of the P-P-ACP-inoculated reaction. A. 10 minutes after ACP inoculation. B. 40 minutes after ACP inoculation.

After partial dissolution of ACP in irregular shape, large, well-crystallized, plate-like DCPD appears. 10 minutes after ACP inoculation, newly formed HAp precipitated as spots on DCPD crystals. At 40 minutes the newly formed solid on DCPD crystals changed its morphology to flake-like shape.

ACP 生成以前に DCPD (Fig. 5 参照) が生成することは可能であり、しかも DCPD は中性領域では比較的容易に硬組織の最終安定相である水酸化アパタイト (HAp) に移行する為、骨の石灰化の前駆物質として提唱されたことがある^{12,13)}。特に、Francis と Webb⁸¹⁾ により、DCPD を種結晶として HAp がエピタキシャルに成長し得ることが見い出されてから、DCPD の前駆物質としての重要性が認められ始めた。DCPD 前駆体説^{12,81)} は、ACP 前駆体説^{14,15,21)} と同様、骨、象牙質の石灰化初期の固相の低 Ca/PO_4 モル比、低結晶性をうまく説明できたが、歯石^{32,33)}、尿路結石³⁴⁾ 等の石灰化部位以外では、一部の例外²³⁾ を除き検出されず、更に、*in vitro* の系で ACP 生成時並びに溶解時に ACP より溶解度が小さい^{17,18,22)} DCPD が検出できないことが明らかにされてから、しだいに衰退していった。

しかしながら、基質小胞及び小胞膜で見い出される無機リン酸濃度 (30~140mM)¹⁹⁾ に近いリン酸濃度環境下では、今回の研究結果が示す様に、ACP は中性領域でも DCPD に転換し得ることが明らかとなった。特に、見かけの溶解速度を減少させた P-P-ACP においては、pH 7.60 付近でも DCPD が生成し (Fig. 3)、ACP の溶解速度 (Fig. 4, 5) が DCPD の生成に深く関与していることが示唆された。基質小胞中及び小胞膜近く

では種々のタンパク、糖類が存在し^{8,10,19)} それらが ACP の安定性に深く関与し¹⁶⁾、ACP の見かけの溶解速度を調製し得ることは明らかであり、ACP から DCPD が生成する可能性は十分考えられる。

興味あることは、DCPD が X 線回折で検出される以前に若干の HAp が生成していたことである (Fig. 6)。その後約 12 時間までは、DCPD の生成量の増大に伴って HAp の生成量が増大する傾向を示した。この事は、ACP から HAp 及び ACP から DCPD への転換が互いに無関係に進行しているためと考えることもできる。しかし、Fig. 5 が示す様にこの間の溶解組成は固相の DCPD に極めて近く、先に DCPD が生成し、その一部が HAp に徐々に転換していると考えの方が妥当であろう。反応時の固相の SEM 像も DCPD → HAp 転換説を指示し、HAp の多くは DCPD 上に析出し、DCPD 結晶上で HAp 量が増加する様相を呈していた (Fig. 7)。

中性領域では DCPD に比べ HAp の方が安定相であり、たとえ ACP から DCPD への転換が引き続いて起こるとしても最終的には HAp に全て移行することが十分予想される。Neuman ら³⁵⁾ によると DCPD に HAp が共存すると、DCPD 単独の場合に比べ HAp への転換速度が早くなることが示されており、Fig. 3 で見られる約 200~

800 分での急激な pH の減少は、DCPD から転換した HAp が DCPD→HAp の転換を促進しているものと考えられる。

ACP を中性領域のリン酸溶液に導入すると、まず ACP の溶解が始まるが溶液の Ca/PO_4 モル比は極めて小さい。ACP が溶解するとリン酸溶液中のカルシウム濃度は徐々に上昇することになり、ACP はいわばカルシウムのリザーバーの役目を果たしているとも考えることもできる。Francis と Webb⁸¹⁾ 及び Wuthier ら²⁰⁾ によると、上述の様な実験条件、即ち、リン酸溶液にカルシウム溶液を徐々に加える、では自発沈殿したリン酸カルシウムは X 線回折に対して ACP と同様非晶質であるが、固相としての Ca/PO_4 モル比は従来までの ACP から予想される値に比べ小さく、DCPD の組成比 ($\text{Ca}/\text{PO}_4=1.0$) に近いことが報告されている。これは非晶質な第二リン酸カル

シウム (Amorphous Dicalcium Phosphate ; ADCP) と定義すべきもので、基質小胞中で見出される非晶質リン酸カルシウムも、Ali³⁶⁾、小沢と山本³⁷⁾によれば、 Ca/PO_4 モル比が 0.8~1.0 の範囲にあることが報告されており、高濃度リン酸溶液下では ADCP が生成する可能性もある。ADCP から DCPD へは移行しやすく²⁰⁾、しかも高濃度リン酸溶液下では今回の実験結果が示す様に DCPD は比較的安定であり^{22, 88, 39)}、容易に X 線回折もしくは電子線回折で同定でき得る⁴⁰⁾。しかしながら、初期石灰化部位で DCPD を確認した報告は Roufosse ら²³⁾ のものを除いてなく、基質小胞中の非晶質リン酸カルシウムが ACP か ADCP であるか、またそれが DCPD に移行し、最終安定相である HAp に転換し、初期石灰が始まるのを明らかにすることは今後の研究課題となろう。

抄録：血清中のカルシウム、リン酸濃度比に近い状態で合成した非晶質リン酸カルシウム (Amorphous Calcium Phosphate ; ACP) を基質小胞中で報告されている無機リン酸濃度と同程度のリン酸溶液に導入すると、中性 pH 領域においてさえ第二リン酸カルシウム二水塩 (Dicalcium Phosphate Dihydrate ; DCPD) に転換することが示された。未処理の ACP と加圧後粉碎して見かけの溶解速度を減少させた ACP の比較から、DCPD の生成及び安定性に ACP の溶解速度が深く関与していることが明らかとなった。これらの事実より、小胞中の無機リン酸濃度に近い、リン酸溶液に ACP が存在すると、ACP の溶解が徐々に進行し、溶液中のカルシウム濃度が上昇し、DCPD に対して溶液が過飽和になると、DCPD が析出することが明らかとなった。この意味において、ACP はカルシウムリザーバーの役目を果たし、ACP の溶解を阻害できるタンパク及びイオン類が存在すると、DCPD が生成しやすく、生成した DCPD は比較的安定に存在し得ることが示唆された。

文 献

- 1) Anderson, H. C. : Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. *J. Cell Biol.* **35** : 81-101, 1967.
- 2) Bonucci, E. : Fine structure of early cartilage calcification. *J. Ultrastruct. Res.* **20** : 33-50, 1967.
- 3) Gay, C. V. : The ultrastructure of the extracellular phase of bone as observed in frozen thin sections. *Calcif. Tissue Res.* **23** : 215-223, 1977.
- 4) Borg, T. K., Runyan, R. B. and Wuthier, R. E. : Correlation of freeze fracture and scanning electron microscopy of epiphyseal chondrocytes. *Calcif. Tissue Res.* **26** : 237-241, 1978.
- 5) Cecil, R. N. A. and Anderson, H. C. : Freeze fracture studies of matrix vesicle calcification in epiphyseal growth plate. *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* **1** : 89-95, 1978.
- 6) Sela, J., Bab, I. A. and Muhlrad, A. : A comparative study on the occurrence and activity of extracellular matrix vesicles in young and adult rat maxillary bone. *Calcif. Tissue Int.* **33** : 129-134, 1981.
- 7) Murphree, S., Howard, H. T. Hus. and Anderson, H. C. : *In vitro* formation of crystalline apatite by matrix vesicles isolated from rachitic rat epiphyseal cartilage. *Calcif. Tissue Int.* **34** : S62-S68, 1982.
- 8) Dougherty, W. J. : Ca-enriched amorphous mineral deposits associated with the plasma membranes of chondrocytes and matrix vesicles of rat epiphyseal cartilage. *Calcif. Tissue Int.* **35** : 486-495, 1983.

- 9) Eanes, E. D. and Termine, J. D. : Calcium in mineralized tissues. In Calcium in Biology (ed. Spiro T. G.) John Wiley & Sons, Inc. 1983.
- 10) 小澤英治 : 基質小胞石灰化について細胞生理学最近の知見, 結合組織 15 : 1-12, 1983.
- 11) 小萱康徳, 吉田寿穂, 杉藤光孝, 中原将夫 : 基質小胞, その生物学的石灰化初期での役割, 歯学誌 11 : 323-339, 1984.
- 12) Newman, W. F. and Newman, M. W. : The chemical dynamics of bone mineral. University of Chicago Press, Chicago, 1958.
- 13) Eanes, E. D. and Posner, A. S. : Kinetics and mechanism of conversion of noncrystalline calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite. Trans. N. Y. Acad. Sci. 28 : 233-241, 1965.
- 14) Termine, J. D. and Eanes, E. D. : Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate precipitations. Calcif. Tissue Res. 10 : 171-197, 1972.
- 15) Blumenthal, N. C., Betts, F. and Posner, A. S. : Stabilization of amorphous calcium phosphate by Mg and ATP. Calcif. Tissue Res. 23 : 245-250, 1977.
- 16) 土井 豊, E. D. Eanes 他 : 歯質アパタイトの結晶成長および非晶質リン酸カルシウムの沈着に及ぼすエナメルタンパク, 象牙質リンタンパク, 骨コラーゲンの効果, 日本結晶成長学会誌 12 : 89-90, 1985.
- 17) Eanes, E. D. and Meyer, J. L. : The maturation of crystalline calcium phosphate in aqueous suspensions at physiologic pH. Calcif. Tissue Res. 23 : 259-269, 1977.
- 18) Mayer, J. L. and Eanes, E. D. : A thermodynamic analysis of the amorphous to crystalline calcium phosphate transformation. Calcif. Tissue Res. 25 : 59-68, 1978.
- 19) Wuthier, R. E. : Electrolytes of isolated epiphyseal chondrocytes, matrix vesicles, and extracellular fluid. Calcif. Tissue Res. 23 : 125-133, 1977.
- 20) Wuthier, R. E., Rice, G. S., Wallace, J. E. B. Jr., Weaver, R. C., LeGeros, R. Z. and Eanes, E. D. : *In vitro* precipitation of calcium phosphate under intracellular conditions: Formation of brushite from a amorphous precursor in the absence of ATP. Calcif. Tissue Int. 37 : 401-410, 1985.
- 21) Termine, J. D. and Posner, A. S. : Calcium phosphate formation *in vitro*. I. Factors affecting initial phase separation. Arch. Biochem. Biophys. 140 : 307-317, 1970.
- 22) Doi, Y., Hata, Y., Nishikawa, H. and Eanes, E. D. : Transformation of amorphous calcium phosphate to brushite ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) in phosphate solutions at physiological pH. Jpn. Assoc. Dent. Res. [Abstr.] 36, 1984.
- 23) Roufosse, A. H., Landis, W. J., Sabine, W. K. and Glimcher, M. J. : Identification of brushite in newly deposited bone mineral from embryonic chicks. J. Ultrastruct. Res. 68 : 235-255, 1979.
- 24) Doi, Y. Private communication with Wuthier, R. E., 1982.
- 25) Doi, Y. and Eanes, E. D. : Transmission electron microscopic study of calcium phosphate formation in supersaturated solutions seeded with apatite. Calcif. Tissue Int. 36 : 39-47, 1984.
- 26) Doi, Y., Eanes, E. D., Shimokawa, H. and Termine, J. D. : Inhibition of seeded growth of enamel apatite crystals by amelogenin and enamelin proteins *in vitro*. J. Dent. Res. 63 : 98-105, 1984.
- 27) Eanes, E. D., Gillessen, I. H. and Posner, A. S. : Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite. Nature 208 : 365-367, 1965.
- 28) Doi, Y., Aoba, T., Takahashi, J., Okazaki, M. and Moriwaki, Y. : Analysis of electron-excess and electron-deficient centers in x-ray-irradiated tricalcium phosphates by electron spin resonance spectroscopy. Calcif. Tissue Int. 29 : 239-244, 1979.
- 29) Oniki, T. and Doi, Y. : ESR spectra of VO^{2+} adsorbed on calcium phosphates. Calcif. Tissue Int. 35 : 538-541, 1983.
- 30) Tung, M. S. and Brown, W. E. : An intermediate state in hydrolysis of amorphous calcium phosphate. Calcif. Tissue Int. 35 : 783-790, 1983.
- 31) Francis, M. D. and Webb, N. C. : Hydroxyapatite formation from a hydrated calcium monohydrogen phosphate precursor. Calcif. Tissue Res. 6 : 335-342, 1971.
- 32) Rowles, S. L. : The inorganic composition of dental calculus. In: Bone and Teeth, Blackwood, H. J. J. Ed., Proc. 1st. Europ. Symp., Oxford, London, Pergamon Press, pp. 175-183, 1964.
- 33) Kani, T., Kani, M., Moriwaki, Y. and Doi, Y. : Microbeam X-ray diffraction analysis of dental calculus. J. Dent. Res. 62 : 92-95, 1983.
- 34) Prien, E. L. and Frondel, C. J. : Studies in urolithiasis: I. The composition of urinary calculi. J. Urol. 57 : 949-991, 1947.
- 35) Newman, W. F., Newman, M. W., Diamond, A. G., Memauteu, J. and Gibbons, W. S. : Blood: bone disequilibrium. IV.

- Studies of the solubility characteristics of brushite: Apatite mixtures and their stabilization by noncollagenous proteins of bone. *Calcif. Tissue Int.* **34** : 149-157, 1982.
- 36) Ali, S., Wisby, A. and Gay, J. C. : Electron probe analysis of cryosections of epiphyseal cartilage. *Metab. Bone Dis. Relat. Res.* **1** : 97-103, 1978.
- 37) Ozawa, H. and Yamamoto, Y. : An application of energy-dispersive X-ray microanalysis for the study of biological calcification. *J. Histochem. Cytochem.* **31** : 210-213, 1983.
- 38) Francis, M. D. : Solubility behaviour of dental enamel and other calcium phosphates. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **131** : 694-712, 1965.
- 39) Cheng, Pei-Tak. and Pritzker, P. H. : Solution Ca/P ratio affects calcium phosphate crystal phases. *Calcif. Tissue Int.* **35** : 596-601, 1983.
- 40) Landis W. J. and J. M. Glimcher : Electron diffraction and electron probe microanalysis of the mineral phase of bone tissue prepared by anhydrous technique. *J. Ultrastruct. Res.* **63** : 188-223, 1978.