

## 脊椎動物の歯と石灰化-生体アパタイト結晶の構造と形成機構の進化

寛 光夫\*・三島弘幸\*\*

## Tooth and calcification mechanism in vertebrates - Evolution of apatite crystals and their formation mechanism

KAKEI, Mitsuo\* and MISHIMA, Hiroyuki\*\*

## 要旨

脊椎動物の歯のエナメル質および象牙質に形成されるアパタイト結晶の微細構造の観察を通じて、これら硬組織における結晶の構成変化と形成機構の進化について検討した。脊椎動物の捕食器官としての歯はカンブリア紀に登場したコノドントに始まると推測されている。初期の歯のエナメル質、象牙質は共にフロールアパタイトにより構成されていた。魚類が登場すると、象牙質の結晶は中心線を有するヒドロキシアパタイトに変わり、エナメル質が中心線を有する結晶になるのは両生類以降であることが分かる。こうした結晶のフロールアパタイトからヒドロキシアパタイトへの変化は、結晶形成機構の進化を反映したものと推測される。

キーワード：脊椎動物，歯牙組織，フロールアパタイト，ヒドロキシアパタイト，結晶形成機構の変化

## Abstract

On the basis of the detailed structures of apatite crystals formed in the teeth of several vertebrates, we attempted to estimate the transitional period of crystals from fluorapatite to hydroxyapatite accompanied by the change of the pathway for apatite formation during the geological periods. Conodonts are considered to have appeared around the Cambrian and to be the first vertebrates equipped with tooth apparatus. Both enamel and dentin of a primary tooth consisted of fluorapatite. The development of hydroxyapatite with the central dark lines first occurred in dentin when fish appeared around the Silurian, followed by the amphibian's enamel during the Devonian. The development of hydroxyapatite might reflect a change of the mechanism of crystal formation.

Key words: Vertebrate, tooth, fluorapatite, hydroxyapatite, change of crystal formation mechanism

## 1. はじめに

脊椎動物の硬組織を構成する無機物として、リン酸カルシウムから成る結晶があり、炭酸アパタイト結晶として知られている。これらは、歯牙、骨といった食

物摂取や体を支えるなどの機能のために重要な役割を担っている。さらに、骨は血中におけるカルシウム濃度を一定に保つための貯蔵庫としての役割を持つと考えられている。

2009年8月31日受付，2009年10月20日受理

\*〒350-0283 埼玉県坂戸市けやき台1-1 明海大学歯学部 口腔解剖学分野  
Division of Oral Anatomy, Meikai University School of Dentistry  
1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0283, Japan  
Email: m-kakei@dent.meikai.ac.jp

\*\*高知学園短期大学，医療衛生学科歯科衛生専攻  
Department of Medical Hygiene, Kochi Gakuen College

炭酸アパタイト結晶は、無機成分の違いからフッ素イオンを結晶格子に取り入れたフロールアパタイト fluorapatite と、それを含まないヒドロキシアパタイト hydroxyapatite に大別される。また、中心線 central dark line (CDL) の有無により、結晶の微細構造の観点からも区分することが可能である。中心線は、結晶構造中に他の格子に比べ、アクセントのあるやや暗い格子として観察される (Marshall and Lawless, 1981; Nakahara, 1982)。この中心線の有無の違いは、結晶形成機構の違いを反映したものと考えられる。こうしたアパタイト結晶が、生物の進化過程でいつ頃に出現したかについて推測することは、硬組織の進化を推測するうえで意義があると考えられる。また、炭酸アパタイト結晶は、炭酸カルシウムの結晶とは異なり化石化における続成作用を受け難く、いままのところ中心線を含め結晶格子を約4億年にわたり保っていることが確かめられている (Kakei *et al.*, 2007a)。そのため、化石試料から、結晶の微細構造の観察により、硬組織の進化について年代を遡って判定することが可能である。同時に、アパタイト結晶の出現や結晶形成機構の進化 (あるいは推移) についても、推測が可能と考えられる。一方、原核生物であるバクテリアの中には、歯石といったアパタイト結晶を伴った石灰化物を形成するものがあることが知られている (Kakei *et al.*, 2000)。バクテリアの石灰化は、特殊な飼育環境やホストとなる生物の存在下において形成されることを考慮すると、結晶進化を論じる点では不適であると考えられる。しかしながら、こうした単細胞生物の石灰化物を観察することは、多細胞生物における病的石灰化を含めた石灰化機構の解明において、重要な手がかりを与えてくれることは事実である。こうしたバクテリアや腕足類のシャミセンガイの観察結果から得られた情報を含め、脊椎動物の歯の組織であるエナメル質と象牙質に着目して、アパタイト結晶の推移と石灰化機構の進化について述べてみたい。

## 2. アパタイト結晶の微細構造

1960年頃に電子顕微鏡による観察で、エナメル質のアパタイト結晶に、他の格子と異なるアクセントを有する格子 (後の中心線) の存在が報告されていたが、高倍率での観察では消失するなどの理由から、アーティファクトであると考えられていた。しかしながら、1980年代になり、Marshall and Lawless (1981) により中心線の存在が明らかにされ、結晶核として再び研究対象となった。その後、中心線を有するアパタイト結晶は、脊椎動物や歯石などの各種硬組織にも存在が確認されている (Nakahara and Kakei, 1984, 1989; Kakei *et al.*, 2000)。一方、魚類のエナメル質

(エナメロイド) あるいはサメ皮歯の硬組織の結晶などには、この中心線が認められない (Miake *et al.*, 1991)。そのため、中心線を持たない魚のエナメル質の結晶を、異常な結晶として扱った論文もある (Barry and Kemp, 2007)。一般に、魚のエナメル質結晶はフッ素を結晶構造に取り込んでいるため、フロールアパタイトとして知られている。

## 3. OCP と中心線

結晶核である中心線の組成について、多くの研究者によって支持されているのが、アパタイトの前駆物質であるオクタカルシウムホスフェイト octacalcium phosphate (以下 OCP と記述する) が結晶中に取り残されたとする説である (Nelson and Barry, 1989)。Brown 等により唱えられた OCP 説では、フロールアパタイトもヒドロキシアパタイトも、この前駆物質の加水分解により安定なアパタイト結晶になるとする説であり、病的石灰化も同様なメカニズムにより形成されると説明されている (Brown *et al.*, 1962, 1981, 1987)。さらに、OCP はアパタイトに比べて溶解し易い点も、中心線の特徴と類似していることが挙げられている。しかしながら、前駆物質である OCP と中心線の耐熱性を比較すると、中心線ははるかに高い温度でも耐熱性を示す (Kakei *et al.*, 2005)。これは、低い温度で OCP がアパタイトに移行する特徴と相反する現象である。さらに、一本の OCP 格子から2本のアパタイト格子が形成されるのに対して、中心線ではこの現象は生じない (Nakahara and Kakei, 1983)。耐酸性について比べると、人のエナメル結晶は中心線を含む結晶の中央部は溶解し易いが、サメのエナメロイド結晶は徐々に周りから溶解していくなど、耐酸性の違いが結晶構造に表れている (図1)。

## 4. 結晶形成機構と有機質

生体アパタイト結晶が形成される場合、有機質の役割が重要であることに異論を挟む余地はない。低倍率の観察では、エナメル質や象牙質の初期石灰化部位では、それぞれリボン状あるいは針状と呼ばれている構造が、染色の有無に関わらず認められる (図2)。無染色の切片でこれらを高倍率で観察すると、共に結晶格子を示さず、電子密度を持ったファジーな構造を呈していることから、無機成分の存在がわかる (Nakahara and Kakei, 1984)。さらに染色切片では、二重の有機質の薄い被膜が観察される (図2 b)。この二重膜構造は以前まで、クリスタルゴーストと呼ばれ、酢酸ウラニルによる染色過程で、無機成分が溶解して形成されたフリンジであるとされていた構造である。しかしながら、現在では鉛の単染色でも

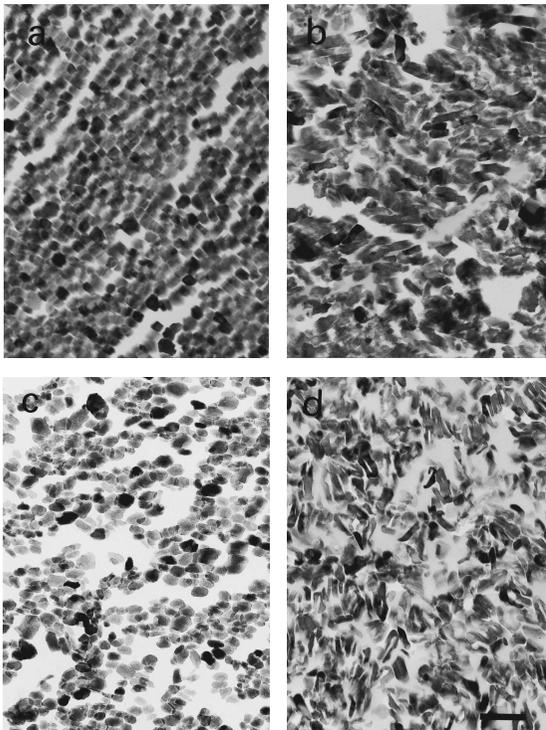


図1 酸に対するフローラアパタイトとヒドロキシアパタイトの結晶構造にみられる溶解性の違い。(a, c) ヨシキリザメ(現生)。(b, d) 人。(a, b) 酸処理前。(c, d) 酸処理後。(a-d) 同倍率。Bar=200nm.

確認されることから、有機質の被膜であることが明らかとなっている。すなわち、二重の有機質の薄い被膜にサンドイッチされた無機層から成る三層構造が最初に形成されることから石灰化が始まる (Nakahara and Kakei, 1984)。こうした三層構造は、フローラアパタイトとヒドロキシアパタイトの結晶形成過程で共通している構造であり、この無機層に結晶が形成される (図2 d)。

### 5. OCP 経路による結晶形成機構

OCP 説では、アパタイトの前駆物質である OCP を介してアパタイト結晶が形成される。OCP の存在はすでに古くから分析機器により確認されていたが、OCP の不安定性により形態的にとらえることができなかった。しかし最近、歯石における結晶中に OCP の格子を電顕写真に収めることができた (Kakei *et al.*, 2009)。さらに、フローラアパタイトを形成するシャミセンガイや硬骨魚 (スポテッドガー) のエナメロイド結晶でも観察することができた (図3)。この観察で、中心線を持たないアパタイト結晶が OCP の転換により形成される経路が明らかとなった。Newesely (1961) によると、この OCP 経路ではフッ

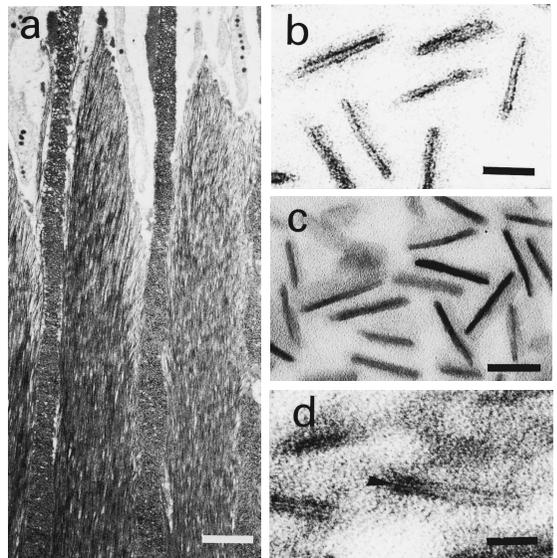


図2 ラット切歯エナメル質における初期結晶形成過程。ウランと鉛の二重染色像。(a) エナメル芽細胞のトームス突起下に形成されたりボン状構造物。(b) 横断されたりボン状構造物の二重染色像。(c) 横断されたりボン状構造物の無染色像。(d) 被膜構造内に形成された最初の結晶格子 (矢頭)。ウランと鉛の二重染色像。Bar=2 μm(a), 20nm (b and c), 10nm(d).

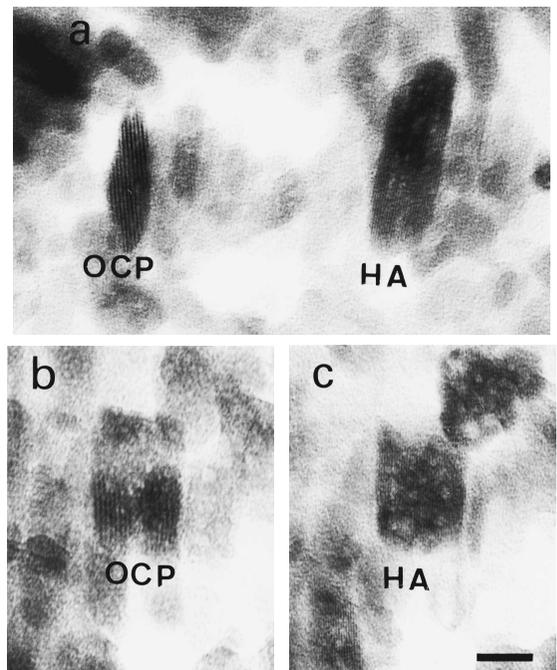


図3 (a) スポテッドガー (現生) のエナメロイドにみられたオクタカルシウム・ホスフェイト (OCP) とヒドロキシアパタイト (HA) の結晶格子。(b, c) 電子顕微鏡観察下における同一結晶の OCP (b) から電子線被曝の影響による HA (c) への変化。(a-c) 同倍率。Bar=20nm.

素イオンの存在により結晶化が促進され、結果としてフロールアパタイトが形成される。

## 6. 中心線経路による結晶形成機構

一方、フッ素イオンが結晶形成に介入しない結晶は中心線を有するヒドロキシアパタイトであり、多くの脊椎動物の硬組織に観察される。この中心線の形成過程では、マグネシウムと炭酸イオンの関係が重要と考えられる。初期石灰化では、有機質の被膜に囲まれた無機層には、カルシウム、リン酸とマグネシウムイオンが共存した、電子密度の高いアモルファスな状態を呈していると推測される。このマグネシウムは、イオンの状態では結晶化の進行を阻害していると考えられる (LeGeros, 1981)。Casciani *et al.* (1979) 等の顕微ラマン分光法による分析では、初期石灰化部位 (結晶核形成部位) にハントライト、 $Mg_3Ca(CO_3)_4$ 、と呼ばれる炭酸とマグネシウムを主体とした化合物の形成が先行することが報告されている。さらに、こうした初期石灰化部位では、炭酸脱水酵素が存在している (Kakei and Nakahara, 1996)。これらの状況証拠から、炭酸脱水酵素がマグネシウムイオンを塩に変えることで、核形成を促進する役割を担っていると考えられる (Kakei *et al.*, 1997, 2007b)。これにより、結晶の中央部には炭酸とマグネシウムが多く含まれている理由が理解される。引き続き、中心線形成後に OCP を経ずにヒドロキシアパタイト結晶の成長が起こる。

こうした異なる結晶をあわせ持つ歯として、サメなど魚類の歯は注目に値する。すなわち、同一個体でありながら、エナメル質 (エナメロイド) はフッ素イオンを結晶構造に含むフロールアパタイトである。一方、象牙質は中心線を有するヒドロキシアパタイトである。これは、象牙質に結晶形成機構の進化が起きたためと考えられる。

## 7. 化石と現生の歯のアパタイト結晶の比較

### 1) 材料

今回、化石と現生の脊椎動物の歯を試料として、構成するアパタイト結晶の微細構造、および形成機構の進化について比較し、考察を行った。

化石試料：コノドント (Hushpuckney shale Formation, Missouri, U.S.A., Carboniferous), ユーステノプテロン (Miguasha Formation, Quebec, Devonian), モササウルス (Monaco, Cretaceous), ホラアナグマ (France, Pleistocene), ナウマンゾウ (Nojiriko Formation in Nagano, Pleistocene)。現生の試料：ヨシキリザメ, アフリカツメガエル。

## 2) 結果と考察

現在、アパタイト結晶形成機構には二経路があることがわかってきた (Kakei *et al.*, 2005, 2009)。これを、地質年代的に2種類の結晶の出現時期を推定すると、フロールアパタイトはヒドロキシアパタイトに先行して出現してきたことは明らかである。5億4500万年前に現れた腕足類のシャミセンガイの貝殻に見られるように、カンブリア紀にはすでにフロールアパタイトが脊椎動物の出現以前に出現していたことが伺える。

脊椎動物では、カンブリア紀にあらわれたコノドントの捕食器官が、最初の歯であると言われている。この捕食器官は、エナメル質 (エナメロイド)、象牙質に相当する両組織により構成されている (図4)。コノドントのエナメル質 (エナメロイド) の結晶は象牙質全体を覆っており、結晶は鱗状に配列していた (図4)。エナメル質の結晶には続成作用によると考えられる小さな空胞がある。象牙質の結晶には空胞の形成はみられず、エナメル質に比べかなり小さく、中心線を欠いている (図5)。結晶は共にフロールアパタイトであることは微細構造から判断できる。無機成分の分析でも、両組織にはフッ素が検出される。特に、エナメル質では象牙質に比べ多く含まれていることが分

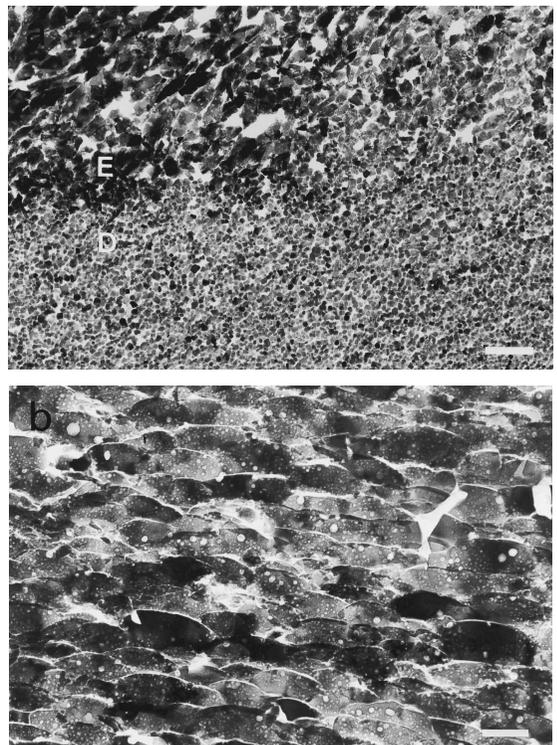


図4 コノドントのエナメロイド(E)と象牙質(D)。(a)エナメロイドの結晶は象牙質の結晶より大きい。(b)鱗状に配列したエナメロイドの結晶。Bar=0.5 $\mu$ m(a), 0.4 $\mu$ m(b)。

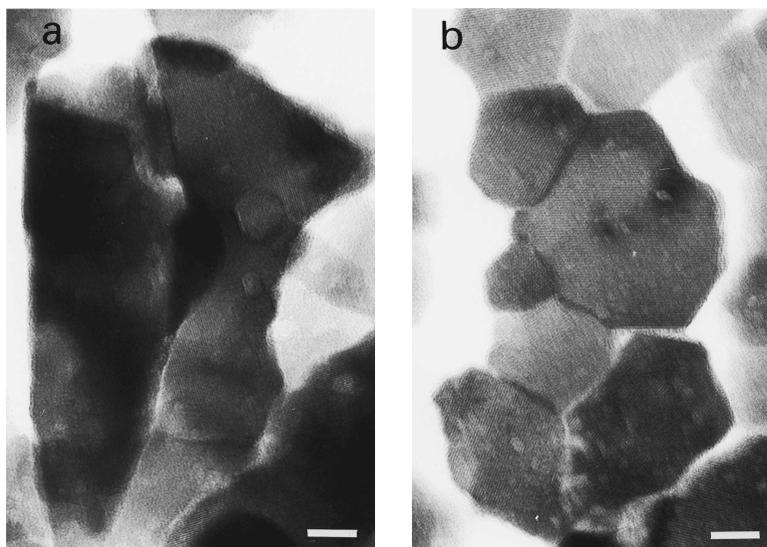


図5 中心線を欠いたコノドント(図4)のエナメロイドと象牙質の結晶の微細構造。  
(a) エナメロイドの結晶。(b) 象牙質の結晶。Bar=20nm (a), 12.5nm (b)。

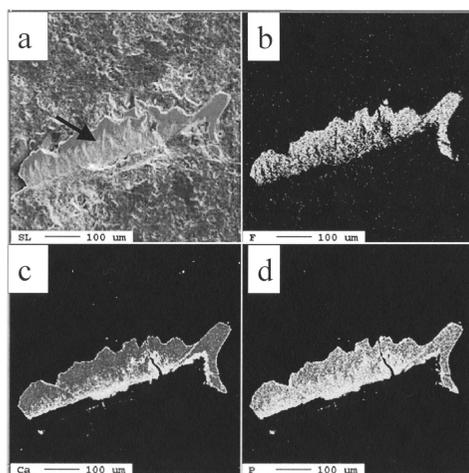


図6 コノドント(図4)の反射電子像と元素マッピング。  
(a) 反射電子像。矢印はエナメロイドと象牙質の境を示す。  
(b) F元素。(c) Ca元素。(d) P元素。

かる(Mishima *et al.*, 2008)(図6)。

軟骨魚類があらわれるシルル紀には、歯の象牙質にはフロールアパタイトに代わり中心線を有するヒドロキシアパタイトが形成され、エナメル質に先立って、象牙質形成にアパタイト結晶の新しい形成機構が登場したことが推測される。現時点では、ヒドロキシアパタイトは軟骨魚類(サメ)の現れた年代頃(シルル紀)までに出現したと推測するのが妥当と考えられる。エナメル質では、まだヒドロキシアパタイトへの推移はみられない。

デボン紀に入ると、硬骨魚類があらわれてくるが、

軟骨魚類と同様にエナメル質はまだフロールアパタイトにより構成されている(図7)。ユーステノプテロンではエナメル質(エナメロイド)の結晶はエナメル象牙境に対して長く直交している。しかしながら、エナメル質(エナメロイド)の先端部では厚く、徐々に歯頸部に向かって薄くなっており、象牙質の先端部を覆っているものと考えられる。

デボン紀後期になり、両生類が出現すると、エナメル質でも変革が起こり、フロールアパタイトからヒドロキシアパタイトに推移したことが分かる。象牙質における結晶の大きさは、哺乳類に至るまでほとんど変化が見られないようである。しかしながら、両生類におけるエナメル質のヒドロキシアパタイト結晶では、電子線によるダメージが比較的大きいように思われる。両生類以降は、歯の両組織はヒドロキシアパタイトであり、中心線が各結晶に観察される(図8)。ホールステッド(1984)は、エナメロイドとエナメル質の転換は両生類で起こったと報告している。

こうした観察結果から、脊椎動物の歯の象牙質では、カンブリア紀から、数千万から一億年の間に、フッ素イオンを加速剤として用いるOCP経路から、中心線経路による石灰化機構への進化が起き、エナメル質では、両生類の出現に伴いフロールアパタイトからヒドロキシアパタイトへと推移し、現在の哺乳類の歯に至っていると考えられる。フロールアパタイトから中心線を有するヒドロキシアパタイトへの進化は、エナメル質には虫歯をもたらしたが、骨芽細胞や破骨細胞による骨の成長にとっては形成および吸収し易い結晶構造であるといえる。

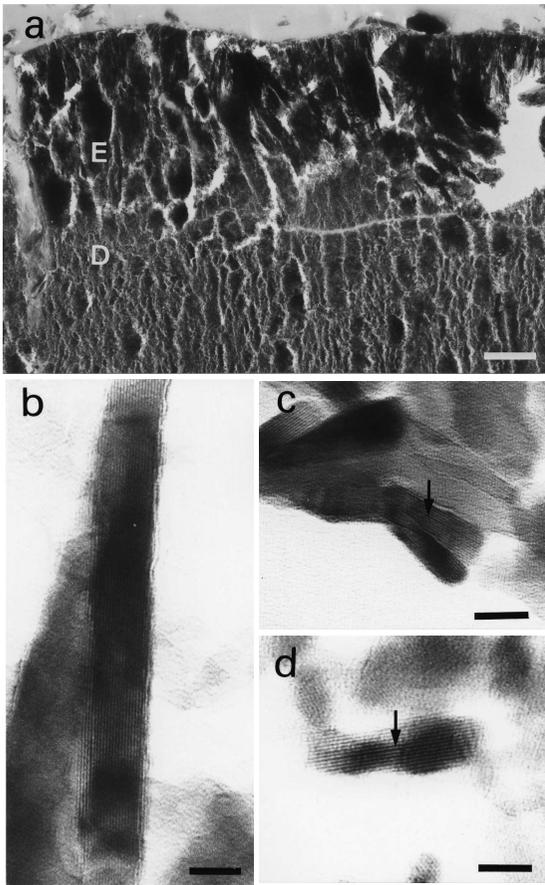


図7 ユースノプテロンのエナメロイド(E)と象牙質(D) (a). (b)中心線を欠いたエナメロイドの結晶. (c, d)中心線(矢印)を有する象牙質の結晶. Bar=1.4 $\mu$ m (a), 10nm (b-d).

また化石で、ホラアナグマやナウマンゾウの一部のエナメル質では、理由はあきらかではないが、中心線を含む中央部が溶けている結晶が観察されることがある(図9)。しかしながら、フローレアパタイトではこうした所見は観察されず、ヒドロキシアパタイトと容易に区別できる。

#### 引用文献

- Barry, J. C. and Kemp, A. (2007) High resolution transmission electron microscopy of developing enamel in the Australian lungfish, *Neoceratodus forsteri* (Osteichthyes: Dipnoi). *Tissue Cell* **39**, 387-398.
- Brown, W. B., Eidelman, N. and Tomazic, B. (1987) Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation. *Adv. Dent. Res.* **1**, 306-313.
- Brown, W. B., Mathew, M. and Tung, M. S. (1981) Crystal chemistry of octacalcium phosphate. *Prog.*

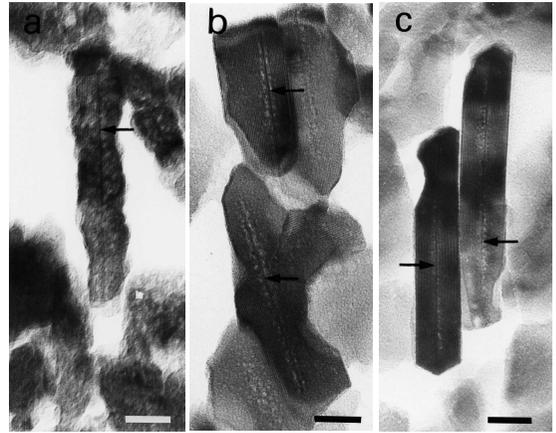


図8 中心線(矢印)を有する両生類と哺乳類のエナメル質の結晶. (a)アフリカツメガエル(現生). (b)ホラアナグマ. (c)ナウマンゾウ. Bar=16.7nm (a-b), 20nm (c).

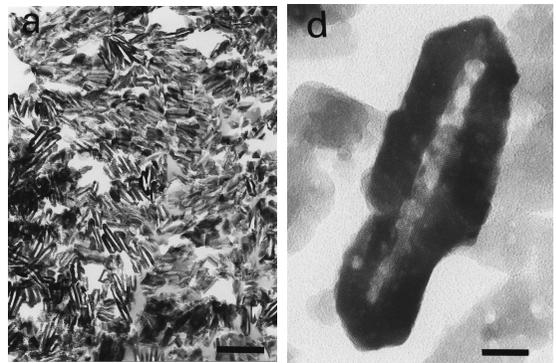


図9 化石化過程で溶解が生じた結晶. (a)ナウマンゾウ. (b)ホラアナグマ. Bar=0.2 $\mu$ m (a), 10nm (b).

*Crystal Charact.* **4**, 59-87.

- Brown, W. B., Smith, J. P., Leher, J. R. and Frazier, A. W. (1962) Octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* **196**, 1048-1054.
- Casciani, F. S., Etz, E. S., Newbury, D. E. and Doty, S. B. (1979). Raman microprobe studies of two mineralizing tissues: Enamel of the rat incisor and the embryonic chick tibia. *Scan. Electron Microsc.* **2**, 383-391.
- ホルステッド, L. B.著, 田隅本生監訳 (1984) 3. 皮膚と象牙質と歯. 脊椎動物の進化様式, 32-50頁, 法政大学出版, 東京.
- Kakei, M. and Nakaraha, H. (1996) Aspects of carbonic anhydrase and content during mineralization of the rat enamel. *Biochim. Biophys. Acta* **1289**, 226-230.
- Kakei, M., Nakahara, H., Kumegawa, M., Yoshikawa, M. and Kunii, S. (2000) Demonstration of the central dark line in crystals of dental calculus.

- Bioch. Bioph. Acta* **1524**, 189-195.
- Kakei, M., Nakahara, H., Tamura, N., Itoh, H. and Kumegawa, M. (1997) Behavior of carbonate and magnesium ions in the initial crystallites at the early developmental stages of the rat calvaria. *Ann. Ant.* **179**, 311-316.
- Kakei, M., Sakae, T. and Mishima, H. (2007a) Changes in biological apatite formation during the evolution of hard tissue. In: Arias, J. L. and Fernández, M. S. (eds) *Biom mineralization : from Paleontology to materials science*, pp.107-115, Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Kakei, M., Sakae, T., Yoshikawa, M. and Tamura, N. (2005) Physical properties of the central dark lines in biological apatite of vertebrate calcified tissues and synthetic octacalcium phosphate. *J. Fossil Res.* **38**, 43-48.
- Kakei, M., Sakae, T. and Yoshikawa, M. (2009) Electron microscopy of the octacalcium phosphate in dental calculus. *J. Electron Microsc.* (in press).
- Kakei, M., Sakae, T., Yoshikawa, M. and Tamura, N. (2007b) Effect of fluoride ions on apatite crystal formation in rat hard tissues. *Ann. Anat.* **189**, 175-181.
- LeGeros, R. Z. (1981) Apatites in biological system. *Prog. Crystal Growth Charact.* **4**, 1-45.
- Marshall, A. F. and Lawless, K. P. (1981) TEM study of the central dark line in enamel crystallites. *J. Dent. Res.* **60**, 1773-1782.
- Miake, Y., Aoba, T., Moreno, E. C., Shimoda, S., Probst, K. and Suga, S. (1991) Ultrastructural studies on crystal growth of enameloid minerals in elasmobranch and teleost fish. *Calcif. Tissue Int.* **48**, 204-217.
- Mishima, H., Kakei, M., Yasui, T., Miyamoto, S., Miake, Y. and Yanagisawa, T. (2008) Apatite crystal in hard tissue of Conodont fossils. *Front. Mater. Sci. China* **2**, 179-171.
- Nakahara, H. (1982). Electron microscopic studies of the lattice image and "central dark line" of crystallites in sound and carious human dentin. *Bull. Josai Dent. Univ.* **11**, 209-215.
- Nakahara, H. and Kakei, M. (1983) The central dark line in developing enamel crystallite: An electron microscopic study. *Josai Shika Daigaku Kiyo* **12**, 1-7.
- Nakahara, H. and Kakei, M. (1984) TEM observations on the crystallites of dentin and bone. *Josai Shika Daigaku Kiyo* **13**, 259-263.
- Nakahara, H. and Kakei, M. (1989) Ultrastructural and protein aspects of apatite formation in vertebrate hard tissues. In: Crick, R. E. (ed) *Origin, Evolution, and Modern Aspects of Biom mineralization in Plants and Animals*, pp.225-235, Plenum Press, New York.
- Nelson, D. G. A. and Barry, J. C. (1989) High resolution electron microscopy of nonstoichiometric apatite crystals. *Anatomical Record* **224**, 265-276.
- Newesely, H. (1961) Darstellung von "Okutacalciumphosphat" (Tetracalcium hydrogentriphosphat) durch homogene Kristallisation. *Monatsh. Chem.* **91**, 1020-1023.