

生体アパタイト結晶の形成機構，結晶構造の欠陥と異所性石灰化

寛 光夫*

Mechanism of biologically induced apatite crystals,
the cause of crystal defects and extraosseous calcification

KAKEI, Mitsuo*

要旨

今回、我々が提唱してきた結晶形成機構をもとに、有害イオン曝露およびエストロゲン欠乏によるエナメル質の結晶構造欠陥の形成過程について報告する。また、軟組織に形成される異所性石灰化機構を理解するために、歯石や石灰化を伴った動脈硬化試料から得られた観察結果をもとに、結晶の微細構造の比較観察することの重要性について述べる。

キーワード： 有害イオン曝露，エストロゲン欠乏，動脈硬化，異所性石灰化，結晶の微細構造

Abstract

In this study, the mechanism by which crystal defects were formed by either exposure to unwanted chemical substances or estrogen deficiency was discussed based on the recent calcification model. Furthermore, taking the findings obtained from dental calculus together with vascular mineralization into consideration, it should be emphasized that studying the crystal structures could provide a better understanding of the mechanism of bony tissue formation in the soft tissues.

1. はじめに

フッ素やカドミウムによる有害イオン曝露は、斑状歯やイタイタイ病を引き起こすことで知られている。以前からフッ素曝露による斑状歯の結晶には中央部に穴を有する所見が報告されていたが (Kerebel and Daculsi, 1976; Yanagisawa *et al.*, 1989), 初期齲蝕の結晶に類似していたことから、齲蝕によるものであると解釈されていた。フッ素は歯学分野では、あたかも虫歯予防の魔法薬のように扱われているが、実際には全く逆で、有害以外のなにものでもないことが明らかとなってきた。また、カドミウム曝露は骨軟化症を引き起こし、過度な摂取により骨粗鬆症に至る骨の病気で、イタイタイ病として広く知られている。カドミウム曝露は、腎臓機能の低下によるカルシウムイオンの排出にともない、血中濃度の恒常性を維持す

るために破骨細胞による骨結晶の過剰な吸収の結果によるとされている (Kido *et al.*, 1989, 1990)。しかしながら、骨軟化症や更年期の女性に多く発症することに対する説明が十分になされていない。一方、更年期女性に多く発症する骨粗鬆症では、エストロゲン欠乏が骨芽細胞の活性を低下させ、破骨細胞の増殖に働き、吸収と形成のバランスが崩れて起こると報告されている (Harris *et al.*, 1996)。そのために、破骨細胞による骨吸収の抑制に関する研究が主体となっており、骨形成への影響に関しては単に骨芽細胞の活性低下が述べられているだけで、詳しい研究がなされていないのが現状である。そこで、エストロゲン欠乏が骨形成に与える影響について明らかにする必要がある。

今回、いままで提唱してきたアパタイト結晶の形成機構をもとにして、有害イオン曝露およびエストロゲ

2010年8月27日受付，2010年10月28日受理

* 〒350-0283 埼玉県さかど市けやき台1-1 明海大学歯学部口腔解剖学分野

Division of Oral Anatomy, School of Dentistry, Meikai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, Saitama 350-0283, Japan

ン欠乏によるエナメル質結晶の構造欠陥のメカニズム、さらに、骨組織における骨軟化症や骨粗鬆症など骨疾患の発症過程について結晶形成過程の観点から考察する。

一方、軟組織における異所性石灰化である動脈硬化症や筋組織の難病である進行性骨化性線維異形成症では、細胞の形質転換説が広く提唱され、確立されつつある (Urist, 1965; Shioi *et al.*, 2000; Collett and Canfield, 2005; Hruska *et al.*, 2005; Derfoul *et al.*, 2006; Kirton *et al.*, 2006; Danilevicius *et al.*, 2007; El-Abbadi and Giachelli, 2007; Guerraty and Mohler Iii, 2007; Kaplan *et al.*, 2007). この分野では、組織あるいは細胞の培養系におけるアルカリホスファターゼ活性、基質小胞や骨形成マーカーなどを指標とした生化学的手法を主体とした研究が行なわれているが、結晶構造を示し石灰化を確認した論文はいまだに見当たらないのが現状である。今回、動脈硬化症の結晶を観察する機会を得たので、正常な硬組織で形成される結晶の微細構造と比較した結果をもとに、軟組織の病的石灰化で提唱されている“細胞の形質転換説”の矛盾について検討する。

2. 結晶の形成機構

生体アパタイト結晶は有機質に囲まれた無機質層で形成される (有機質の被膜構造) (Nakahara and Kakei, 1984, 1989; Kakei *et al.*, 2000). さらに、アパタイト結晶の形成機構には、二つの経路があることが最近明らかとなってきた。二つの経路とは、アパタイトの前駆体であるオクタカルシウムホスフェイト (OCP) を介する経路と、中心線を介する経路である。化石試料の観察からは、カンブリア紀から三畳紀に現れたコノドント歯状化石のエナメル、象牙質様の両組織には中心線を有する結晶が認められず、シルル紀後期になると軟骨魚類からは、歯の象牙質、デボン紀には、硬骨魚類の骨、さらに、両生類以降ではエナメル質に中心線を有する結晶が出現する。脊椎動物の進化と共にこうした結晶の微細構造に違いがみられ、同時に硬組織における結晶の進化を反映したものと考えられる (Kakei *et al.*, 2003, 2007; 筧 & 三島, 2010). 今まで、OCP は病的石灰化を含む全ての硬組織におけるアパタイト結晶形成の前駆体と考えられてきた (Brown *et al.*, 1962; Brown, 1966; Brown *et al.*, 1987; Nelson *et al.*, 1986, 1989). さらに、OCP は長らく中心線と同一視されてきた。最近、この両者には、物理的な性質の違いなどから本質的に異なることが明らかとなってきた (Kakei *et al.*, 2005, 2009c; 筧 & 三島, 2010). また、正常な各種硬組織では厳密な細胞支配により、どちらか一方の経路で形成される

結晶により構成されている。例えば、シャミセン貝、コノドントの捕食器、魚のエナメル質 (エナメロイド) などは OCP 経路の機構により結晶が形成される (Barry and Kemp, 2007; Mishima *et al.*, 2008). この経路では、フッ素イオンが存在すると、結晶化が促進され、結果としてフロールアパタイトを形成することが報告されている (Newesely, 1960). 一方、多くの脊椎動物の硬組織では中心線を有した結晶から成っている (Marshall and Lawless, 1981; Nakahara, 1982; Nakahara and Kakei, 1983; 1984, 1989). この中心線経路では OCP 経路と異なりフッ素イオンの介入することなしに結晶形成が行われると考えられる。エナメル質で結晶形成過程を観察すると、核形成から成熟まで有機質の被膜構造内で起こることが認められる (図 1). また、模式図に示すように、初期の無機質の層 (M) における成分組成に特徴があり、結晶化を抑制するマグネシウム (Mg) イオンの存在が挙げられる (図 2). しかしながら、この Mg イオンの存在により無秩序な核形成が抑制されていると推測される。Mg の抑制効果は炭酸脱素酵素によって供給される炭酸イオンによりある種の $\text{CO}_3\text{-Mg}$ 塩を無機層内で析出することで打ち消され、同時に活性化された Ca, PO_4 イオンにより、最初のアパタイト格子形成が誘導されると推測される。その結果、結晶の核となる中心線は最初のアパタイト格子と $\text{CO}_3\text{-Mg}$ 塩により構成されていると考えられる。この $\text{CO}_3\text{-Mg}$ 塩の物理的特性に関しては、中心線がかなりの熱処理にも耐えることから (Kakei *et al.*, 2005), 単に炭酸マグネシウム塩ではなく、ハントライト, $\text{Mg}_3\text{Ca}(\text{CO}_3)_4$, と呼ばれるものが候補としてあげられる (Casciani *et al.*, 1979). 核形成後は、被膜を構成する有機質により必要な Ca, PO_4 イオンが供給され結晶の成長が起り、有機質の被膜内で成熟が完了するものと考えられる。

3. 有害イオン暴露による結晶構造欠陥

有害イオン暴露によって生じる結晶の構造欠陥を観察するには、ラットなどげっ歯類のエナメル質の結晶は最適である。エナメル質の発生源は象牙質や骨と異なるが、基本的石灰化機構は同じであることから (Nakahara and Kakei, 1983, 1984, 1989), 骨疾病のメカニズム解明に応用することが十分に可能である。エナメル質の結晶は、骨などの結晶に比べて長く、大きいので、構造欠陥を観察することが比較的容易であることに加え、骨組織と異なり破骨細胞による吸収がなく、膠原線維など石灰化に関与しない有機質成分の混入を考慮する必要がないなどの利点がある。

以前より、フッ素暴露により生じたエナメル質に

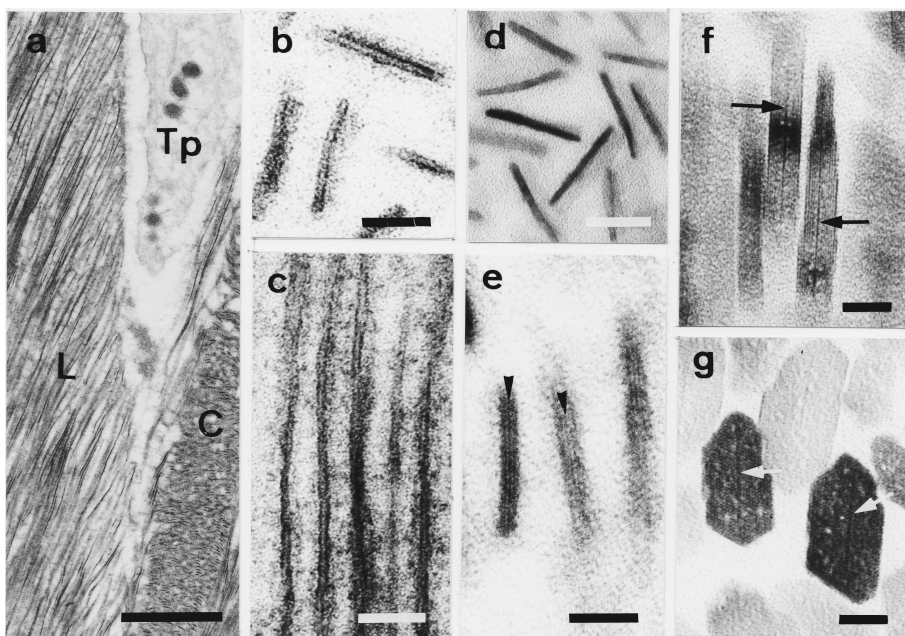


図1. ラット切歯エナメル質におけるアパタイト結晶形成過程.

- a, エナメル芽細胞のトームス突起 (Tp) 下に形成されたリボン状構造物の横断面 (C) および縦断面 (L)
 b, リボン状構造物の横断面の微細構造.
 c, リボン状構造物の縦断面の微細構造.
 d, 図bの無染色像.
 e, 有機質被膜内に形成された最初の格子 (矢頭).
 fとg, 未成熟結晶縦断面像 (f) と横断面像 (g) に見られる中心線 (矢印).
 a-cとe: ウラン-鉛の二重染色. d, f, g: 無染色. Bar=1.0μm (a), 300nm (b-d), 10nm (e-g).

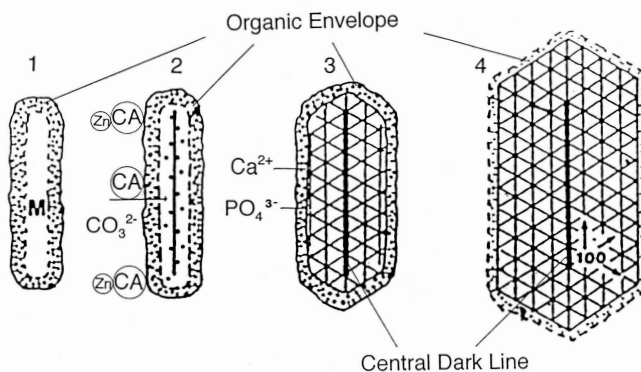


図2. アパタイト結晶の核形成と成熟過程の模式図.

- 1, 有機質被膜 (organic envelope) に囲まれた Ca, PO₄, Mg イオンを含む無機層 (M).
 2, 炭酸脱水酵素 (CA) による炭酸イオン供給で形成された CO₃-Mg 塩 (黒点) と最初の結晶格子.
 3と4, 中心線 (central dark line) と結晶成熟過程.

は、初期の虫歯にみられるような中心部に孔を有する結晶が観察されていた (Kerebel and Daculsi, 1976; Yanagisawa *et al.*, 1989). そのため、歯質強化の効果とは矛盾した、虫歯によるものと解釈されていた。しかしながら、周囲に溶解した形跡がみられず、あきらかに虫歯の結晶と異なっている (図3)。フッ素症の結晶では、中心線を欠いているのかかわらず、なぜ周囲に結晶の格子が形成されているのかに関して、ラットの実験により明らかとなり (Kakei *et al.*, 2007), 次のように説明される。図4は結晶の縦

断面であり、矢印は中心線を示す。中心線が形成されずに中央部を欠損した結晶にもかかわらず、周辺部では結晶形成が継続しているのが分かる。これは、中心部では炭酸イオンの供給が不十分となり Mg がイオン状態で残り結晶化を阻止するが、影響を受けない周辺部ではすでに形成された下部の結晶格子を土台として成長すると考えられる。すなわち、この部位の横断像では、中央部を欠いた結晶構造を呈することになる (図5)。一方、生化学的分析から、炭酸イオンの供給の供給に関わる炭酸脱水酵素の合成の減少がみられ

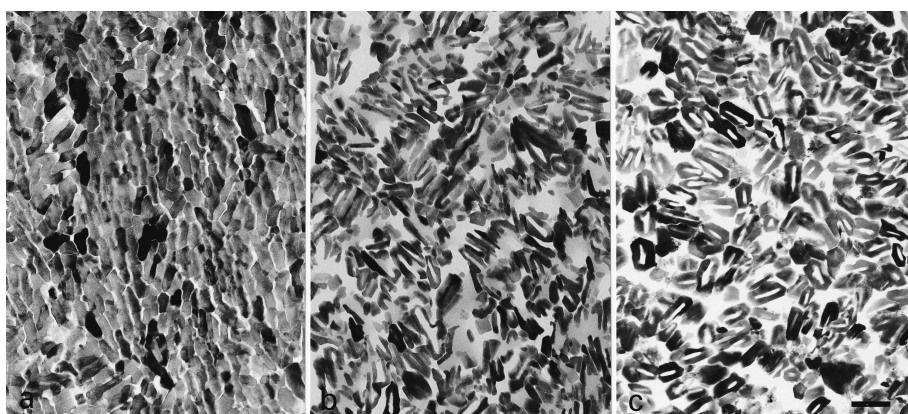


図3. 人エナメル質のアパタイト結晶。
a, 正常. b, 初期齲蝕. c, フッ素症. 無染色. Bar=200nm.

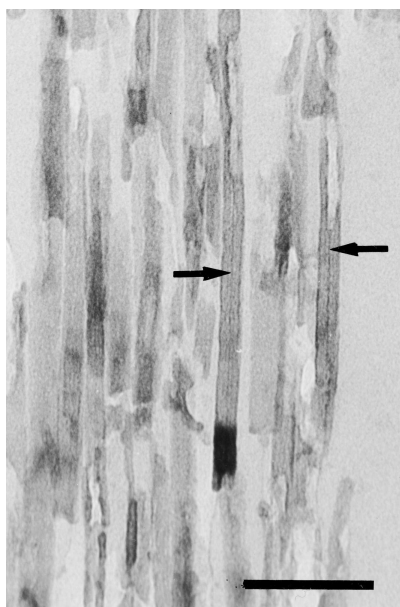


図4. フッ素暴露で形成されたラット切歯エナメル質のアパタイト結晶の縦断像。矢印は中心線。無染色。Bar=400nm.



図5. フッ素暴露で形成されたラット切歯エナメル質のアパタイト結晶の横断像。無染色。Bar=200nm.

ている (図6)。

カドミウムイオン暴露に関しては、実験的にラットの切歯エナメル質の漂白化現象がみられ、フッ素暴露と類似した現象が報告されていた (Wilson and Deeds, 1939)。この報告でも予期されるように、フッ素暴露で観察されたと同様に中央部を欠いた結晶構造が観察されている (Kakei *et al.*, 2009b)。生化学的分析では、フッ素の場合と異なり、炭酸脱水酵素の合成に影響はみられないが (図6b)、著しい活性の減少がみられている (図7)。これは、酵素の補酵

素である亜鉛がカドミウムイオンによって置換されることにより著しい活性の低下を招いたと推測される (Bonner *et al.*, 1980; Bertini *et al.*, 1986)。これら有害イオン暴露によるエナメル結晶の構造欠陥に関する模式図を図8に示す。いずれの場合にも、エナメル結晶の構造欠陥から、骨組織ではアモルファスな鉱物の増加あるいは結晶形成不全が起こり、骨軟化症発症と関係することが示唆される。なお、更年期の女性に多くみられたイタイイタイ病の理由のひとつとして、後述するエストロゲン欠乏との相乗効果が推測される。

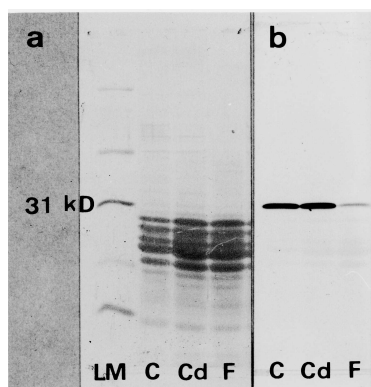


図6. ラット未成熟エナメル基質の電気泳動パターン(a)とイムノブロット法による炭酸脱水酵素の分析(b)。各試料の電気泳動パターンに大差は認められないが(a)、炭酸脱水酵素抗体に対する反応の強弱からフッ素暴露群では炭酸脱水酵素の合成阻害と判断される。コントロール群(C)、カドミウム暴露群(Cd-100ppm)とフッ素暴露群(F-2ppm)。

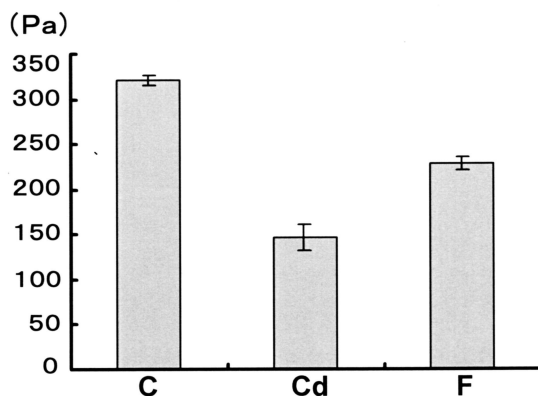


図7. 差動式圧力センサー法によるラット未成熟エナメル基質の炭酸脱水酵素活性の比較。コントロール群(C)、カドミウム暴露群(Cd-100ppm)とフッ素暴露群(F-2ppm)。

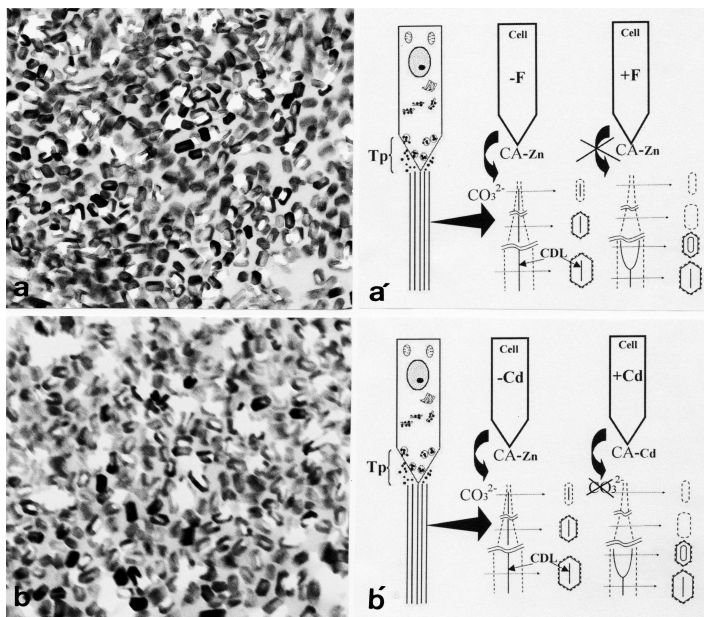


図8. フッ素 (F) 暴露 (a, a'), カドミウム (Cd) 暴露 (b, b') のエナメル結晶像と結晶構造欠陥過程の模式図。フッ素暴露 (+F) では炭酸脱水酵素 (CA) の合成阻害、カドミウム暴露 (+Cd) では亜鉛 (Zn) とカドミウムイオンの置換による活性阻害により結晶核 (CDL) が形成されない。一、十はフッ素又はカドミウム暴露の有無。Tp, エナメル芽細胞の突起 (トームス突起)。Tpの各下線は形成中の未成熟結晶。矢印は拡大した一本の未成熟結晶。CDL, 中心線。破線は有機質の被膜構造。

4. エストロゲン欠乏による結晶構造欠陥

卵巣摘出によるエストロゲン欠乏ラットでは、エナメル質における結晶に、有害イオン曝露と同様に中央部を欠いた結晶構造が観察された (図 9 a)。エストロゲンの働きは多岐にわたっており、いまだに十分に解明されていないが、予備実験では、炭酸脱水酵素活性が減少を示すことから、急激な欠乏は硬組織における酵素合成に影響を与えていることが推測される。こうした構造欠陥は一時的に多く観察されるが、その後こうした結晶は減少し、やがて認められない。すなわち、急激なエストロゲン欠乏による効果と考えられる。しかしながら、エナメル小柱を構成する結晶を観察すると、中心線を有する結晶の減少が顕著になり、電子密度の低い結晶の割合が増加しているのが認められる (図 9 b)。電子密度の低い結晶には、弱い結晶格子から全く呈さないアモルファスな状態が多く観察される。これらの結果から、更年期ではエストロゲンが徐々に減少するに伴い、骨組織における結晶形成に影響がでることが推測される。

最近、骨粗鬆症に対する様々な治療薬が開発されているが、破骨細胞の抑制に重点が置かれ、骨形成における影響についてほとんど考慮されていない。こうした骨形成における影響の有無について、結晶の微細構造観察や炭酸脱水酵素活性の測定を通して検討する必要があると考えられる。

5. 異所性石灰化と結晶の微細構造

異所性石灰化は硬組織以外に動脈や筋組織などの軟組織にも石灰化を生じることである (Halverson and McCarty, 1997)。特に、石灰化を伴う動脈硬化症は典型的な例といえる。一般に、血管壁に生じる石灰化は、動脈の炎症過程から開始するといわれている。この石灰化機構について最近広く受け入れられている説では、平滑筋細胞や筋線維芽細胞が骨をつくる骨芽細胞に形質転換することにより起こるとされている。すなわち、軟組織の石灰化は骨組織と同じ過程を経て形成されると広く信じられている (Urist, 1965; Shioi *et al.*, 2000; Collett and Canfield, 2005; Hruska *et al.*, 2005; Derfoul *et al.*, 2006; Kirton *et al.*, 2006; Danilevicius *et al.*, 2007; El-Abbadi and Giachelli, 2007; Guerraty and Mohler Iii, 2007; Kaplan *et al.*, 2007)。この説は、Urist (1965) によって移植した脱灰骨の周りに骨形成が生じ、骨形成を誘導するタンパク質の存在が示唆されたとする報告以来多くの研究者により骨形成誘導タンパク質の存在が支持されている。しかしながら、異所性石灰化物には、腎結石に見られるようにアパタイト結晶以外の結晶の存在が報告されているなどこの説に対する矛盾がみられる (Giachelli, 1999)。特に、最終産物である結晶の微細構造についての報告はほとんど見当たらない。形質転換説を支持する研究では、主に培養系にお

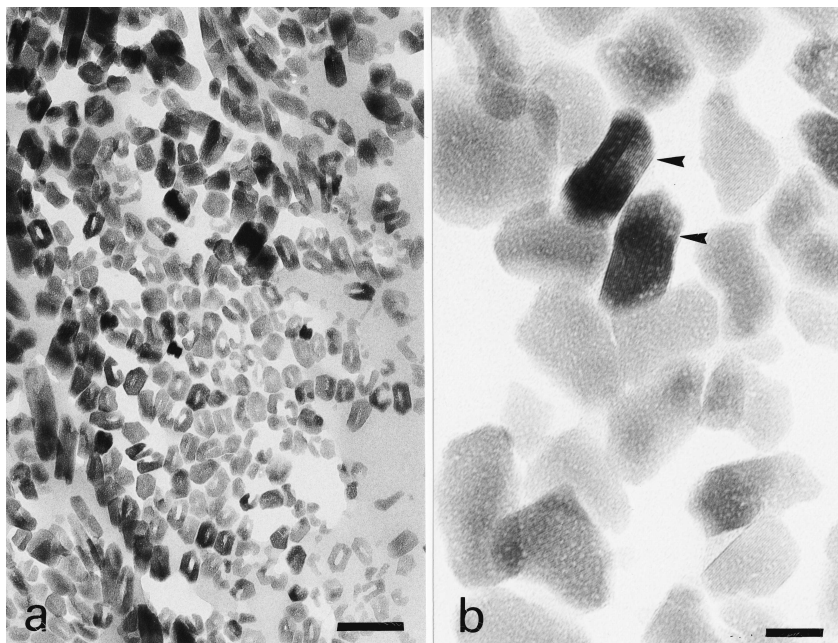


図 9. 卵巣摘出ラットの切歯エナメル質のアパタイト結晶。

(a)、中心部を欠いた結晶の出現。(b)、中心線を持った正常な結晶 (矢頭) と電子密度が低く、格子形成の見られないアモルファス鉱物。無染色。Bar=100nm (a), 20nm (b)。



図10. ラット骨のアパタイト結晶. 矢印は中心線. 無染色. Bar=10nm.

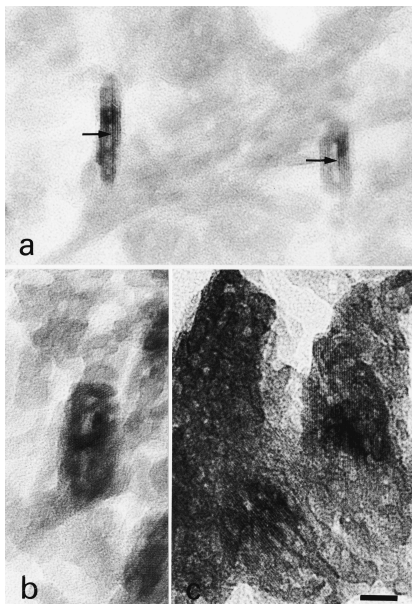


図11. 人の動脈硬化症に形成された中心線を持つアパタイト結晶(a)と大きさの異なった中心線を欠くアパタイト結晶(b, c). 無染色. Bar=10nm (a~c).

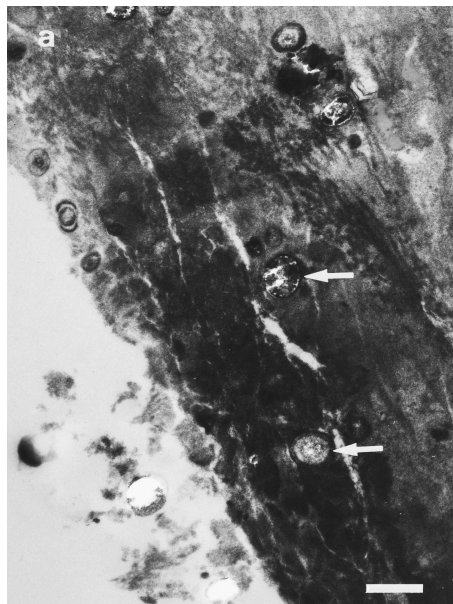


図12. 人の動脈硬化症に形成された石灰化物に埋没した細胞由来の顆粒 (矢印). 無染色. Bar=1.0 μ m.

ける様々な骨形成マーカーやアルカリフォスファターゼ活性などの生化学的分析, また, 簡便な von Kossa, alizarin red 染色法や基質小胞の出現などによる石灰化の有無が論じられているのみである。以前より培養系の石灰化の研究で指摘されているが, こうした方法では実際に石灰化が生じたか否かを判定することは不十分である (Bonewald *et al.*, 2003)。 (なお, Bonewald *et al.*, (2003) は, 針状構造の確認が必要としているが, これでもまだ石灰化を証明するには不十分であることも付け加えておく。) 異所性石灰化における結晶の微細構造についての研究は, おそらく Faure *et al.*, (1982) が初めて報告し, その後は, ほとんどなされていないと思われる。彼らが撮った結晶の微細構造からは, 骨の結晶との違いが認められるが, 骨形成様式との違いについては述べられていない。今回, 我々は動脈硬化症に形成された結晶の微細構造の観察では, 中心線を有するものと無い二つのタイプの結晶が混在し, 大きさも様々であり, 格子欠陥を示す結晶など骨の結晶との違いが観察された (図 10, 11) (Kakei *et al.*, 2009a)。特に, 細胞死後の内容物の細胞外基質への散在や, 細胞小器官が石灰化物内に埋没しているなど, 骨組織とは著しく異なっていた (図 12)。このような二つのタイプの結晶が混在する所見は, バクテリアの死を伴う歯石の石灰化物にも同じように観察されている (図 13, 14) (Kakei *et al.*, 2000, 2009c)。さらに, 中心線を有するかどうかは, 結晶の形成機構の違いに由来すると考えられる。一般に, 正常な硬組織では, いずれか一方の結晶により構成されている (Kakei *et al.*, 2009a, 2009c)。このことから, 動脈硬化の石灰化が軟組織の細胞が骨芽細胞に形質転換して形成されるとは考え難い。なお, 二つのタイプの結晶が混在する理由に関して以下のように推測される。

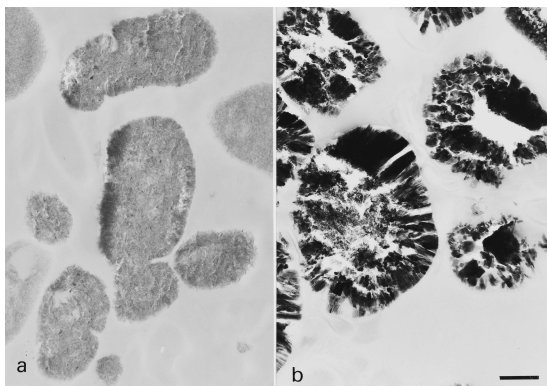


図13. 歯石における死んだバクテリア内に形成された針状構造物 (a) と結晶 (b)。無染色。Bar=0.5 μ m (a and b)。

細胞小器官には, 多くの炭酸脱水酵素のアイソザイムが存在していることが一般に知られている。細胞死により組織中に分解し, 散在した成分をもとに結晶形成の場である有機質の被膜構造が再構築される (図 14)。このときに, 被膜構造に酵素を取り込んだか否かにより, 二つのタイプの結晶が出来ると考えられる。

筋組織が徐々に骨組織になる進行性骨化性線維異形成症 (FOP) について, 今回の動脈硬化の所見をもとに私見を述べてみたい。これは, 外科的に石灰化物を除いてもさらに悪化するなど, 病的石灰化の中で最も手に負えない難病とされている。この発症のメカニズムに関して, 筋芽細胞が骨様細胞に形質転換することにより起こるとする説が大勢を占めている。少数の意見として, 石灰化物は二次的に形成されたもので, 一次的原因ではないとする論文も見られる (El-Labban *et al.*, 1993; Anger *et al.*, 2008)。こうした筋組織が石灰化する症例は健康人にも見られており, 度重なる筋肉の傷害を受けやすいフットボール, ラグビー選手などに発症することが多く報告されている (King, 1998)。FOP 患者の場合, 首, 背中の筋組織の石灰化から始まることが多く, 異常な筋線維や打撲後に炎症を伴い石灰化が起こるなど, 筋組織自体が容易に崩壊することに関係があると推測される。炎症後

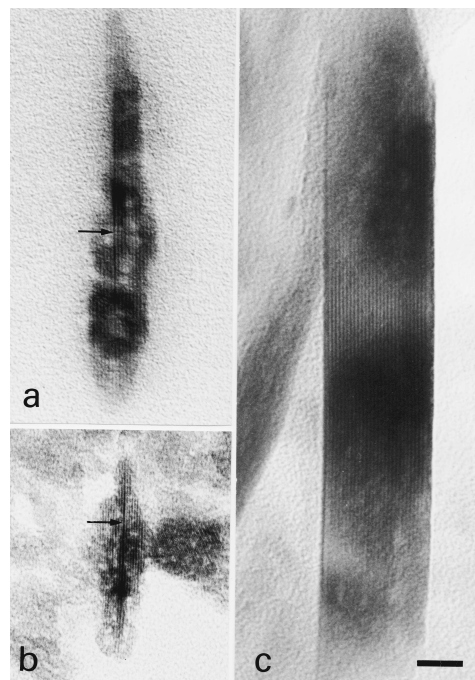


図14. 歯石に形成された中心線 (矢印) を伴うアパタイト結晶 (a, b) と中心線を欠いたアパタイト結晶 (c)。無染色。Bar=10nm (a~c)。

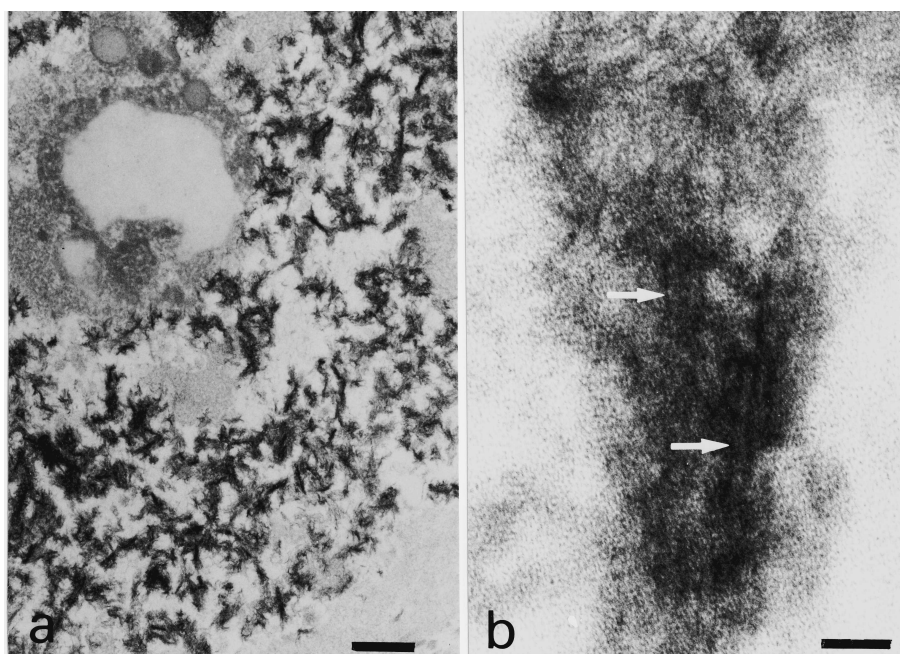


図15. 人の動脈硬化症における細胞基質成分で形成された針状構造 (a) と針状構造の被膜構造 (矢印) (b). ウラン-鉛の二重染色. Bar=300nm (a), 10nm (b).

に石灰化が起こることは、石灰化には免疫系の細胞が関与している可能性を示唆している。特に、免疫抑制剤による石灰化の抑制効果を考慮すると (Kaplan *et al.*, 2007), FOP 患者における石灰化は筋芽細胞の形質転換よりも、おそらくマクロファージなど免疫系の細胞のオーバーワークによる細胞死を伴った石灰化の可能性が考えられる。原因を解明するためにも、最終産物であるアパタイト結晶の微細構造を比較研究することは十分に意義があると考ええる。

引用文献

- Anger, T., Carson, W., Weyand, M., Daniel, W. G., Hoeher, M. and Garlichs, C. D. (2008) Atherosclerotic inflammation triggers osteogenic bone transformation in calcified and stenotic human aortic valves: Still a matter of debate. *Exp. Mol. Pathol.* **86**, 10-17.
- 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.
- Bertini, I., Luchinat, C. and Viezzoli, M. S. (1986) Metal substitution as a tool for the investigation of zinc proteins. In: Bertini I. Luchinat C. Maret W. Zeppezauer M., (eds) *Zinc Enzymes*, (Progress in inorganic biochemistry and biophysics. Vol. 1.) Birkhauser, Boston, MA, chapter 3, 24-47.
- Bonewald, L. F., Harris, S. E., Rosser, J., Dallas, S. L., Camacho, N. P., Boyan, B., and Boskey, A. (2003) von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Calcif. Tissue Int.* **72**, 537-547.
- Bonner, F.W., King, L. J. and Parke, D.V. (1980) The effect of dietary cadmium on zinc, copper and iron levels in the bone of rats. *Toxicol. Lett.* **5**, 105-108.
- Brown, W. E. (1966) Crystal growth of bone mineral. *Clin. Orthop.* **44**, 205-220.
- Brown, W. E., Eidelman, N. and Tomazic, B. (1987) Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation. *Adv. Dent Res.* **1**, 306-313.
- Brown, W. E., Smith, J. P., Lehr, J. R. and Frazier, A. W. (1962) Octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* **196**, 1048-1055.
- 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.
- Collett, G., D. and Canfield, A. E. (2005) Angiogenesis and pericytes in the initiation of ectopic calcification. *Circ. Res.* **96**(9), 930-938.

- Danilevicius, C. F., Lopes, J. B. and Pereira, R. M. (2007) Bone metabolism and vascular calcification. *Braz. J. Med. Res.* **40**, 435-442.
- Derfoul, A., Perkins, G. L., Hall, D. J. and Tuan, R. S. (2006) Glucocorticoids promote chondrogenic differentiation of adult human mesenchymal stem cells by enhancing expression of cartilage extracellular matrix genes. *Stem Cells*. **24**, 1487-1495.
- El-Abbadi, M. and Giachelli, C. M. (2007) Mechanisms of vascular calcification. *Adv. Chronic Kidney Dis.* **14**, 54-66.
- El-Labban, N. G., Hopper, C. and Barber, P. (1993) Ultrastructural finding of vascular degeneration in myositis ossificans circumscripta (fibrodysplasia ossificans). *J. Oral Pathol. Med.* **22**, 428-431.
- Faure, G., Daculsi, G., Netter, P., Gaucher, A. and Kerebel, B. (1982) Apatites in heterotopic calcification. *Scan. Electron Microsc.* **4**, 1629-1634.
- Giachelli, C. M. (1999) Commentary: Ectopic calcification: Gathering hard facts about soft tissue mineralization. *Am. J. Pathol.* **154**, 671-675.
- Guerraty, M. and Mohler III, E. R. (2007) Models of aortic valve calcification. *J. Investig. Med.* **55**(6), 278-283.
- Halverson, P. B. and McCarty, D. J. (1997) Basic calcium phosphate (apatite, octacalcium phosphate, tricalcium phosphate) crystal deposition diseases; calcinosis. In: William J. Koopman, W. J. and McCarty, D. J. (eds) *Arthritis and allied conditions. A textbook of rheumatology. 13th*, pp.2127-2146. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Harris, S. A., Tau, K. R., Turner, R. T. Spelsberg, T. C. (1996) Estrogens and progestins. In: Bilezikian, J. P., Raisz, L. G. and Rodan, G. A. (eds) *Principles of bone biology*, pp.507-520, Academic Press, New York.
- Hruska, K. A., Mathew, S. and Saab, G. (2005) Bone morphogenetic proteins in vascular calcification. *Circ. Res.* **97**, 105-114.
- Kakei, M., Nakahara, H., Kumegawa, M., Mishima, H. and Kozawa, Y. (2003) Ultrastructural study on the lattice images of calcium phosphate minerals in fossil tooth. In: Kobayashi, I. and Ozawa, H. (eds) *Biominearization (BIOM2001) : formation, diversity, evolution and application*, pp.364-368, Tokai University Press, Kanagawa.
- 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., Sakae, T., Mishima, H. (2007) Changes in biological apatite formation during the evolution of hard tissue. In: Arias, J. L. and Fernandez, M. S. (eds) *Biominearization: from paleontology to materials science*, pp.107-115, Editorial Universitaria, Santiago, Chile.
- Kakei, M., Sakae, T., Mishima, H. and Yoshikawa, M. (2009a) Ultrastructure of apatite crystals formed during vascular calcification in humans. *J. Hard Tissue Biolo.* **18**, 135-140.
- Kakei, M., Sakae, T. and Yoshikawa, M. (2009b) Mechanism of cadmium induced crystal defects in developing rat tooth enamel. *Proc. Jpn. Acad. Ser. B* **85**, 500-507.
- Kakei, M., Sakae, T. and Yoshikawa, M. (2009c) Electron microscopy of octacalcium phosphate in the dental calculus. *J. Electron Microscopy* **58**, 393-398.
- 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., Yoshikawa, M. and Tamura, N. (2007) Effect of fluoride ions on apatite crystal formation in rat hard tissues. *Ann. Ant.* **189**, 175-181.
- 寛光夫・三島弘幸 (2010) 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 化石研究会誌 **42**, 175-181.
- Kaplan, F. S., Glaser, D. L., Shore, E. M., Pignolo, R. J., Xu, M., Zhang, Y., Senitzer, D., Forman, S. J. and Emerson, S. G. (2007) Hematopoietic stem-cell contribution to ectopic skeletogenesis. *J. Bone Joint Surg. Am.* **89**, 347-357.
- Kerebel, B. and Daculsi, G. (1976) Ultrastructurale et crystallographique de l'email human dans la fluorose endemique. *J. Biol. Buccale* **4**, 143-154.
- Kido, T., Nogawa, K., Honda, R., Tsuritani, I., Ishizaki, M., Yamada, Y. and Nakagawa H. (1990) The association between renal dysfunction and osteopenia in environmental cadmium-exposed subjects. *Environ. Res.* **51**, 71-82.
- Kido, T., Nogawa, K., Yamada, Y., Honda, R., Tsuritani, I., Ishizaki, M. and Yamada, H. (1989) Osteopenia in inhabitants with renal dysfunction

- induced by exposure to environmental cadmium. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* **61**, 271-276.
- King, J. B. (1998) Post-traumatic ectopic calcification in the muscles of athletes : a review. *Br. Sports Med.* **32**, 287-290.
- Kirton, J. P., Wilkinson, F. L., Canfield, A. E. and Alexander, M. Y. (2006) Dexamethasone downregulates calcification-inhibitor molecules and accelerates osteogenic differentiation of vascular pericytes : implications for vascular calcification. *Circ. Res.* **98**, 1264-1274.
- Marshall, A. F. and Lawless, K. P. (1981) TEM study of the central dark line in enamel crystallites. *J. Dent. Res.* **60**, 1773-1782.
- 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. *Josai Shika Daigaku kiyo* **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 Biomineralization in Plants and Animals*, pp.225-235, Plenum Press, New York.
- Nelson, D. G. A., Barry, J. C., Shields, C. P., Glena, R. and Featherstone, J. D. B. (1989) Crystal morphology, composition, and dissolution behavior of carbonated apatites prepared at controlled pH and temperature. *J. Colloid and interface Science* **130**, 467-479.
- Nelson, D. G. A., Wood, G. J. and Barry, J. C. (1986) The structure of (100) defects in carbonated apatite crystallites : A high resolution electron microscope study. *Ultramicroscopy* **19**, 253-266.
- Newesely, H. (1960) Darstellung von "Oktacalciumphosphat" (tetracalcium-hydrogentriphosphat) durch homogene Kristallisation. *Mh. Chem.* **89**, 1020-1023.
- Shioi, A., Mori, K., Jono, S., Wakikawa, T., Hiura, Y., Koyama, H., Okuno, Y., Nishizawa, Y. and Morii, H. (2000) Mechanism of atherosclerotic calcification. *Z. Kardiol.* **89**, suppl. 2, 75-79.
- Urist, M.R. (1965) Bone : Formation by autoinduction. *Science* **150**, 893-899.
- Wilson, R. H. and Deeds, F. (1939) Experimental chronic cadmium poisoning. *Science* **90**, 498.
- Yanagisawa, T., Takuma, S., Tohda, H., Fejerskov, O. and Fearnhead, W. (1989) High resolution electron microscopy of enamel crystals in cases of human dental fluorosis. *J. Electron Microsc.* **38**, 441-448.