

第97回化石研究会例会講演要旨

[特別講演]

骨の細胞

小澤英浩 (新潟大・歯)

骨は活発な代謝を営みながら一定の形態と機能を保っている。体重がかからないように宙づりで飼育したラットでは足の骨は細くなり、組織学的にも皮質骨は薄くなり海綿骨も少なくなる。この実験結果は荷重の変化だけでも骨は大きく変化することを示している。また現在、高齢化社会の進行に伴って重大化しているのは骨がもろくなって様々な症状をひきおこす骨粗鬆症(骨多孔症, osteoporosis)の治療、予防である。老人性骨粗鬆症は一義的にはカルシウムの欠乏であり、それによる上皮小体ホルモン(PTH)量の上昇と骨吸収の促進が原因である。また閉経後の骨粗鬆症ではエストロジェンの減少により骨形成が抑制され、さらに血中のカルシウムが増加するのでPTHが減り骨芽細胞の機能が低下する。さらに活性型ビタミンDも低下して腸管からのカルシウム吸収が減少し、全体として骨の量が減って折れやすくなる。この様な現象に直接関与して骨の形態、機能を維持するものはbone cellsといわれる骨芽細胞、骨細胞、破骨細胞さらにそれらの前駆細胞である。また、骨の増減については全身的なホルモンによる支配と同時に局所的な因子も関連し、骨の細胞周囲の微小環境の作用も見逃すことができない。

骨形成と石灰化

骨形成は間葉由来の骨芽細胞がその担い手である。骨形成の過程は、骨芽細胞が骨の基質を作り、そこに基質小胞(matrix vesicles)が出現して初期石灰化を起し、さらにコラーゲン性石灰化が始まるという段階的な変化をとる。一般に、まず分化した骨芽細胞によって骨の有機基質が形成され、基質小胞が出現する。基質小胞は骨芽細胞に由来すると考えられ、強いアルカリフォスターゼ活性を示し、酸性リン脂質をその膜に多くもっていることが特徴である。基質小胞中に結晶が形成され、結晶が成長して膜を破り粟のイガ状となって石灰化球が作られる。その後はコラーゲン線維にそった石灰化が進行して骨が形成されていく。基質小胞はラットの足の骨のようないったん軟骨モデルができる軟骨内骨化、さらに頭蓋冠のように直接骨ができる膜内骨化の両方の初期石灰化期に出現する。基質小胞性石灰化からコラーゲン性石灰化へ移る過程はまだ完全に解明されていないが、ある種のプロテアーゼ

が基質小胞から放出され、それがコラーゲン線維周囲にあって石灰化を阻害しているプロテオグリカンなどを除く、あるいはコラーゲン線維のホールゾーンに結合しているデコリンという糖が除かれることによって、そこに石灰化が生ずる可能性が論じられている。

骨芽細胞の構造と機能

活動中の骨芽細胞は形態学的には豊富な粗面小胞体と発達したゴルジ装置を有し、活発にI型コラーゲンを分泌すること、及び強いアルカリフォスターゼ活性で特徴づけられている。骨芽細胞は多様な機能をもっており、I型コラーゲンを分泌する他にもプロテオグリカン、オステオカルシン、オステオネクチン、オステオポンチンなど多くの非コラーゲン性タンパク質も分泌し、さらにある段階ではTGF- β 、IGFなど骨形成を誘導する物質も作っていることが解かってきている。これらの事実は骨芽細胞は骨形成を行うだけでなく、骨のリモデリングにも関与していることを示している。すなわち骨芽細胞は骨芽細胞の分化、増殖を促進するエストロジェンのレセプターを有しているだけでなく、多くの骨吸収促進物質に対するレセプターも持ち、骨吸収をコントロールする機構も備えていると考えられる。たとえば、骨吸収促進因子の一つであるビタミンDのレセプターは、最近の実験によればそれは主に骨芽細胞の核に存在し、細胞質中の微小管にそって核に集められることが解ってきた。骨芽細胞の中には、骨表面にあってそれ自身骨は形成しないが、骨細胞と連携して働くbone lining cells、骨内表面にありPTHのレセプターを多くもっているPT cells、EGFレセプターを多くもっていて情報の中立ちをしていると考えられるER rich cellsなども含まれる。Rodanは骨形成能をもつ骨芽細胞をworking cell、他の骨芽細胞をinformation processing cellあるいはhelper cellと分類している。

骨細胞

骨細胞は骨芽細胞が骨中に埋め込まれたもので、ミネラルホメオステシスや骨代謝維持の担い手として重要な役割を果たしている。骨細胞は多くの突起を出し、それぞれの突起が連続して全体として細胞性の網目構造を成していることは光学顕微鏡、走査電子顕微鏡によって確かめられている。突起はギャップ結合により連絡し、迅速な物質輸送、情報交換が示唆されている。また、豊富なアクチン線維が突起の中に存在し、運動性にも富むことが考えられる。ミネラルのホメオステ

ーシス (恒常性) は主に骨表面の bone lining cells と、この骨細胞の細胞集団によって、骨の形態変化を伴うことなく行われていると考えられている。

破骨細胞

破骨細胞は骨の有機基質を溶かし、同時にアパタイト結晶も溶かして骨を吸収し、骨に侵食窩 (ハウシブ窩) を作る。すなわち、古い骨を溶かし、そこを新しい骨に置き換える役割を果たしている。破骨細胞は複雑な形態を呈するが、一般には多くの核を持った巨細胞で、細胞質にはミトコンドリアが多く、骨に面するところには波状縁を有している。有機基質やカルシウムの吸収を行う波状縁の外側周囲にはアクチン線維が豊富な明帯 (clear zone) があり、ここで骨と密着することにより吸収する領域を確保している。破骨細胞の機能はまず酸で無機結晶を溶かすことである。細胞内の炭酸脱水素酵素によってプロトンが作られ、波状縁のプロトンポンプによって能動輸送され、そこに強い酸性域を作って骨を溶かす。遊離したカルシウムは細胞中に取り込まれ、細胞側壁のカルシウムポンプによって血中へ排出される。次に酵素による骨の有機基質の分解と吸収である。この作用は主に水解小体系の酵素が波状縁から開口分泌され、同時に分泌された酸によって活性化されて基質を溶かすと考えられている。この時、吸収の場を確保するために外側が明帯によって封鎖されることが大切である。明帯にはある種の接着因子があって、これが骨のオステオポンチンなどと反応して結合し封鎖がおこると考えられる。

破骨細胞に作用するホルモンとしてはカルシトニンが知られている。カルシトニンは破骨細胞の活動を抑制し、かつ破骨細胞の形成そのものを阻害する。¹²⁵I-カルシトニンをを用いた実験によると、破骨細胞の細胞膜には数万から数十万のカルシトニンレセプターがあるとされており、特異的にカルシトニンと結合し、作用発現をする。破骨細胞に取り込まれたカルシトニンとカルシトニンレセプターの複合体は細胞膜からゴルジ装置へ送られ、そこに長く留まるが、一部は水解小体に運ばれて分解されるものもある。カルシトニンが破骨細胞に結合するとサイクリック AMP を増加させ、その結果細胞骨格に影響をおよぼし、細胞の運動性を奪い、さらに波状縁を消失させ、破骨細胞が骨表面から離脱するという状態に至らしめる。しかし、この効果は時間が経つと消えて、破骨細胞が再度吸収を始めることも知られている (エスケープ現象)。

破骨細胞の由来

現在では、破骨細胞は血液幹細胞由来の単核細胞が血管系を介して骨組織へ運ばれ、そこで骨芽細胞などから局所的な情報を受け取り、癒合・多核化して破骨細胞に分化するものと考えられている。マクロファ-

ジの水解小体を認識する ED1 抗体によって染めると、破骨細胞の水解小体と波状縁の膜が強く染まり、血液幹細胞由来の単球・マクロファージ系の細胞と極めて似通った染色性を示すことから、破骨細胞はマクロファージと近縁の細胞であることが強く支持される。破骨細胞は単球・マクロファージ系の細胞に由来することはほぼ確実だが、破骨細胞へ枝分かれする細胞の同定についてはまだ議論がある。現在、単球となる前の段階あたりから分化するという考えが有力である。破骨細胞への分化をコントロールする物質については現在研究が進められているが、骨芽細胞系細胞から出る M-CSF や、活性型ビタミン D などが関与していると考えられている。

骨形成と骨吸収のカップリング

破骨細胞の分化や活性化には近接して存在する骨芽細胞系細胞が関与することがよく知られている。すなわち破骨細胞あるいは破骨細胞の前駆細胞の周囲にはアルカリフォスファターゼ活性をもった骨芽細胞や間質細胞が密に接し、細胞間の情報交換が行われている。微細構造学的にも破骨細胞と骨芽細胞系細胞との間には両方向性にレセプターを介した取り込み構造が認められ、両細胞間に細胞の直接接触による情報交換が行われていることが示唆される。破骨細胞の分化・活性化におけるこの様な細胞間相互作用に関しては *in vitro* ではすでに Chambers らにより多くの報告がなされており、最近でも骨芽細胞と脾臓の細胞との共培養実験で、破骨細胞の分化には骨芽細胞が直接接触することが必要であることが確認されている。すなわちビタミン D を添加した培地で両細胞を一緒に培養すると、速やかに酒石酸抵抗性酸性フォスファターゼ可染性で、カルシトニンレセプターを有する破骨細胞に極めてよく似た多核巨細胞が出現してくる。この破骨細胞様多核巨細胞は骨芽細胞が共存しないと決して形成されない。破骨細胞との間に接触を保つ細胞としては骨芽細胞以外に骨細胞も知られている。すなわち吸収を受けて掘り出された骨細胞と破骨細胞の間にも情報交換を思わせる接触構造があり、ここにも細胞間相互作用が存在する可能性が示唆されている。

破骨細胞の分化や活性化を促進する因子としては、PTH、ビタミン D₃ などの体液性因子の他に局所因子として種々のサイトカインが知られているが、それらの多くは骨芽細胞に直接作用し、その結果、骨芽細胞から分泌されるある種の因子を介して間接的に破骨細胞に影響をおよぼすことについてはすでに述べた。この事実は骨組織において破骨細胞の機能の促進は骨芽細胞系細胞のコントロール下におかれていることを明確に示している。一方、カルシトニンは直接破骨細胞に作用し、その分化や活性化をすばやく、強力に抑制

することができる。なお最近、破骨細胞にエストロゲンが作用し、抑制的な効果を及ぼす可能性が示唆されている。

骨組織には骨芽細胞によって分泌された TGF- β , BMP, IGF などのサイトカインが不活性な状態で埋め込まれているが、これらは破骨細胞によって骨吸収が生じる時に酸によって活性化された状態で掘り出され、吸収窩表面へ蓄積すると考えられている。活性化された TGF- β , BMP, IGF は骨芽細胞の前駆細胞を骨表面へ誘導し、そこで前骨芽細胞を骨芽細胞に分化させ、吸収窩を埋める新しい骨を形成する。この様に骨は常に骨吸収と骨形成が周期的かつ連鎖的に生じておりモデリングをくり返している。様々な原因でこのバランスが崩れるとそこに種々の病的状態が生じてくる。

[個人講演]

1. Origin and evolution of skeletal tissues in vertebrates.

Masatoshi Goto (Dept. Anat., Sch. Dent. Med., Tsurumi Univ., Yokohama.)

Originally, the skeletal tissues of vertebrates were formed in the mesenchymal region which is filling up the three germ layers. There are three layers of skeletal tissues, that is, the dermal bones which are formed beneath the ectodermal layer, the vertebra which are formed around the notochord, rib and limb bones which are formed in muscles of the mesoderm, and the branchial bones which are formed around the branchial intestine of the endoderm. The dermal bones are called the exoskeleton, whereas the other bones are called the endoskeleton.

The exoskeleton was formed as bone from the beginning, but the endoskeleton was formed initially as cartilage and was gradually replaced by bone during the evolution of the vertebrates. This process is repeated in the ontogeny, the bones derived from the exoskeleton are made by membranous ossification, whereas the bones from the endoskeleton are formed by cartilaginous ossification.

The dermal bones of exoskeleton originated from the dermal armour of the ostracoderms which were formed as means of remove excess calcium calcium in the blood. The dermal armour was composed of the superficial dentine tubercle and the basal osseous layer (aspidin). The dentine tubercle functioned as a sense organ and evolved to the placoid and ganoid scales in primitive fishes. In the

formation of jaws, the tubercles on the margin of mouth evolved to form the jaw teeth as a predatory organ. Tooth structure changed gradually during evolution, that is, the outer highly mineralized layer changed from the ectomesenchymal enameloid of fishes to the epithelial enamel of tetrapods and the aprismatic enamel of reptiles to the prismatic enamel of mammals, and tooth support changed from the fibrous attachment of chondrichthyes to the ankylosis of osteichthyes and the thecodonty of reptiles to the gomphosis of mammals.

The osseous tissue (aspidin) of the dermal armour of ostracoderms changed into the bone layer of fish scales and evolved to the well developed armour of turtles and armadillos. It entered into the deep layer of the body and become the dermal bones (membranous bones), that is, most bones of skull and clavicle in tetrapods. Morphologically, they cannot be distinguished from other bones, but they are very clearly affected in some inherited diseases such as cleidocranial dysostosis.

On the other hand, the endoskeleton was composed of cartilages in primitive fishes. In primitive cartilagenous fishes, some parts became calcified cartilage and they were replaced by bones in fishes. In the evolution of tetrapods, the cartilage gradually became replaced by bones as a terrestrial support and as sociated with locomotion, and all of the endoskeleton of mammals are composed of bones except the surface of joints and the walls of the respiratory organs.

In this way, the skeletal tissues of vertebrates were changed from a mechanism for removing excess calcium from the blood to an organized functional support for the vertebrate body.

2. Appearance of new characteristics features on the teeth structure along with the teeth evolution

Yukishige Kozawa (Dept. Anat., Nihon Univ. Sch. Dent. Matsudo)

Molar teeth of the Proboscidea and the Equidae showed dynamic morphological changes along with the evolution, such as to be vast the volume, to be complex the form, the development of coronal cementum and to degenerate the root. The tooth enamel develops more and more thick along the evolution, but recent species has more thinner

enamel than the ancestors result of the resorption and the developmental abstraction.

The proboscidean ancestor of *Palaeomastodon* had more systematic arranged Hunter-Schreger bands avoid near the dentino-enamel junction, of which area showed very complex arrangement. The enamel of *Mastodon* and *Stegodon* developed to about 10mm thick (maximum), that was the most thickest one in mammalian enamel. The bands of *Mastodon* showed very systematic characters. On the enamel of *Stegodon*, the systematic character of bands was observed outer 2/3 layer, but inner 1/3 layer showed complex arrangement. Opposite to these species, the enamel of *Elephas* has very complex arrangement of bands in inner 2/3 layer, and the outer 1/3 layer of enamel showed somewhat systematic characters. On the evolution from *Barytherium* to *Deinotherium*, the bands evolved very complex course.

On the Equidae, the bands developed to systematical features from *Hyracotherium* to *Mesohippus*. However, the inner half of enamel on the *Hipparion* showed complex form of the bands and outer half were systematical arrangement bands. On the *Equus*, the inner enamel layer of half or two-third were the complex types of bands.

It is concluded that the inner complex bands of ancestor enamel developed into special feature of *Equus* and *Elephas* enamel. This may be showed the early structure of enamel development become to the new characteristic features in these species.

〔質疑〕

大野照文(京大)：エナメル質は不規則になることによって mechanical に強くなるのか？

小澤：長鼻類の場合、*Stegodon* の仲間の厚いエナメル質は、咬合面で外層が内層より咬耗するため、2段面を形成する。この場合、咬耗に抵抗し高位段面を形成するのがシュレーゲル条の乱れた不規則な層に相当する。しかし、不規則な層が不明瞭な *Gomphotherium* や *Palaeomastodon* においてはこのような現象は認められない。これはシュレーゲル条の不規則な層が機械的、物理的な強さが高いことを示している。

大野：シュレーゲル紋の para-, dia-zone はどのような方向性をもつのか。

小澤：para-zone と dia-zone が区別されるシュレーゲル条においては、para-zone のエナメル小柱の走向は比較的直線的、dia-zone では曲走すると一般的に言われている。現実には前者のほうが後者より石灰化度

も高く硬い。両者が歯冠を層状にとりまくため、物理的な強度をもち、咀嚼、咬耗に抵抗力をましていると考えられる。しかし、エナメル小柱の走向の方向性、シュレーゲル条の型は様々であり動物によって特徴的である。

大野：方向性と軟体動物の crossed lamella の structure は似ている。結晶の作られる方向性がどのようにして制御されるのだろうか。

小澤：まず結晶の大きさであるが、エナメル象牙境からエナメル質表面までのびる長い結晶だとの考えと、長さ nm 幅 nm の結晶であるという考えがあり、後者は多くの教科書が採用している。しかし、幼若なラットの歯から未完成のエナメル質の結晶を取りだすと、非常に長いものが認められること、結晶のマクロ的大きさは主に電顕的な超薄切片から得られたもので、超薄切片では結晶の全長を知るのには困難であることなどから、必ずしも前者の考えが否定されたものではない。

前者の考えでは、エナメル象牙境で initiation した結晶が伸長して成長し、エナメル質表面に達するというものになる。即ちアパタイトの最初の結晶の沈着が、配列の方向性を決定することになる。我々は高分解能電顕のスルーフォーカスによって原子配列を立体的に観察し、ねじれたアパタイトの結晶格子像を得ている。即ち螺旋を描いてアパタイトが成長し、エナメル質の構造が形成される可能性がある。

後者は、エナメル質結晶がエナメル芽細胞膜にほぼ垂直に形成され、エナメル小柱の形はエナメル芽細胞のトームスの突起の細胞膜の形によって決まるというものである。電顕的には、細胞膜にほぼ垂直にアパタイトの結晶が形成される。しかし、エナメル質の結晶形成にはエナメルリン、アメロジェニンなどと呼ばれるエナメルタンパクという先駆体があり、これと結晶配列ないし細胞膜との関連性は不明のままである。

3. On the structure of *Desmostylus incisor*

Kunihiro Suzuki and Yukishige Kozawa*

(Chiba Pref. Matsudo High School ;

Dept. Anat., Nihon Univ. Sch. Dent., Matsudo*)

Desmostylid is one of mammals having most specialized teeth. The histological structure of the teeth is also remarkable. But the studies of incisors have reported less than of molars which have well-developed enamels. This study has been made for a incisor of *Desmostylus* found from the California U.S.A. at Middle Miocene deposits.

In observation of the dentinal ground section, the dentinal tubules are parallel arrangement and the secondary curvatures of dentinal tubules are found

clearly.

In observation of the longitudinal section of the enamel, the Hunter-Schreger bands are found clearly. But bifurcation and variety of the width of the bands are observed. Thus the Hunter-Schreger bands of the incisor is less regular than those of molars. The angle between enamel-dentine junction and the course of the bands is about 45° - 60° at inner nearly one fourth part of the thickness of the enamel. At the other part, the Hunter-Schreger bands run approximately flat in many cases. But near the surface of the enamel, the bands become indistinct.

The Retzius lines are found in a repeating pattern throughout the entire enamel, running in almost the opposite direction to the Hunter-Schreger bands.

In observation of the transverse section, many enamel tufts are found all around of the enamel-dentine junction, and also lamellae are observed frequently. The Retzius lines are observed clearly like the growth rings in a tree trunk. The course of enamel prisms are seen to bend from side to side and to run against each other. Thus the Hunter-Schreger bands are more indistinct than longitudinal section.

In observation of the tangential section, the grooves made by the enamel tufts or lamellae are found. The enamel prisms meander complicatedly. The Hunter-Schreger bands are discontinued and indistinct.

In the structure of the incisor enamel, the enamel prisms are less organized. The irregularity remained with the Hunter-Schreger bands. It is necessary to study the histological differences between incisors and molars in many respect.

[質疑]

神谷英利(京大): エナメル小柱の断面の形態は臼歯と切歯でどう違うか。

鈴木: 切歯のエナメル小柱の断面の大きさは深層で小さく、中層、表層では大きくなり($4\mu\text{m}\sim 7\mu\text{m}$), 形も不規則である。部位によっても変異も大きく、今後臼歯とのより精密な対比が必要と考えている。

4. Analysis of Tooth Enamel Crystals from *Desmostylus*.

Toshiro Sakae (Dept. Anat., Nihon Univ. Sch. Dent., Matsudo)

Desmostylus is a fossil animal known as its unique $\delta\epsilon\sigma\mu\omicron\varsigma$ (desmos) $\tau\upsilon\lambda\omicron\varsigma$ (tylos) tooth form and

thick enamel. Its diet, habitat and classification have been not settled yet. I could obtain two samples, namely A and B, of *Desmostylus* tooth by courtesy of Dr. Inuzuka. Sample A was found in America, 4mm thick enamel, translucent and black to brown in color, showing clear perikymata, Hunter-Schreger bands, and incremental lines indicating good preservation. Sample B was found in Tsuzara, Japan and was fragments of powdery enamel, opaque white to yellowish in color, and enamel texture was hardly seen suggesting bad preservation.

X-ray diffraction (XRD) showed that both enamel samples were composed of apatite. Lattice parameters of apatite were $a=9.4395(6)$ and $c=6.8915(5)$ Å for sample A and $a=9.417(3)$ and $c=6.883(2)$ Å sample B. The a -axis length value of sample A was comparable to that of *Elephas* (9.438 Å) and *Loxodonta* (9.441 Å) molar enamel, but smaller than that of human molar enamel (9.446 Å). CO_2 content estimated by infrared absorption analysis was 5.9% for sample A and 3.0% for sample B. The CO_2 content of sample A was greater than those of human, *Elephas* and *Loxodonta*, ca. 4.0%. Thermogravimetry (TG) and differential thermal analysis (DTA) of sample A showed a complex endo-exothermic reaction at 860°C . This suggested presence of calcite, endotherm at 895°C , but XRD did not show any calcite in sample A. The complex reaction may be due to evolution of CO_2 from the enamel apatite. TG-DTA showed that weight losses at the temperatures between 200 and 600°C were 2.7% for sample A and 3.7% for sample B. and those between 600°C and 1200°C were 4.2% for sample A and 5.8% for sample B. The larger value for sample B suggested presence of HPO_4 . The XRD patterns of the samples after heated at 1200°C showed apatite ($a=9.414(1)$ Å, $c=6.880(3)$ Å) for sample A and apatite ($a=9.385(1)$ Å, $c=6.897(1)$ Å) + whitlockite ($a=10.418(1)$ Å, $c=37.336(9)$ Å) for sample B. This result suggested high Mg content of sample B, but energy dispersive spectroscopic (EDS) analysis showed no significant difference in Mg content among the two samples. EDS analysis of sample A showed decrease in Ca/P ratio and increase Cl content from the inner to outer layers, in harmony with the data for human and other animals, suggesting that the sample was

not suffered severe diagenesis. Ca/P ratio of sample A in *ca.* 1.7 indicating substitution of CO₂ for OH in apatite structure.

〔質疑〕

大野：(Ca, Mg)/P ratio のカーブは続成作用の結果として説明されないか。

寒河江：続成作用の結果としても、元々の特徴としても両方の見方ができるが、続成作用はほとんど受けなかったのではないかと考えている。

5. Differences in the development of tooth enameloid between elasmobranchs and teleosts.

Ichiro Sasagawa (Dept. Anat., Nippon Dent. Univ., Niigata)

The enameloid that covers tooth crowns in both elasmobranchs and teleosts is a hypermineralized tissue which corresponds to the enamel in mammals. Nevertheless, there are many differences in terms of the details of the development of tooth enameloid between elasmobranchs and teleosts. In elasmobranchs, the enameloid matrix consists mainly of the tubular vesicles and the 'giant' fibers with stripes at intervals of about 17nm, but collagen fibers are the dominant constituents of the enameloid matrix in teleosts. The differences in the mineralization of the enameloid can be summarized as follows: the site of initial mineralization is the boundary between the enameloid and the dentin in teleosts, while it is in crystals appear throughout the enameloid layer in elasmobranchs. A number of matrix vesicles are found at the site of the initial mineralization in teleosts, while in elasmobranchs no matrix vesicles but many tubular vesicles are present. Initial crystals appear in the matrix vesicles in teleosts, but in elasmobranchs they are first found in the tubular vesicles. Crystals are small and slender during the early stage of their formation in teleosts, but large crystals are seen even at the early stages in elasmobranchs. Additional mineralization occurs along collagen fibers in teleosts, but not in elasmobranchs.

Therefore, it suggests that organic contents and the mechanisms of the initial mineralization in the enameloid are different in elasmobranchs and teleosts.

However, the hypermineralized tissue covering the tooth surface named "enameloid" in both elasmobranchs and teleosts, is similar in its final

form.

〔質疑〕

石山巳喜夫(日齒大)：①軟骨魚類のエナメロイド基質形成期における上皮の役割について。②硬骨魚類のエナメロイド石灰化過程における結晶成長の様態について。

笹川：①エナメロイド基質形成期では上皮側がエナメロイド形成に関与する程度はきわめて低いものと思われる。②初期石灰化後はコラーゲン線維にそって針状結晶の集積として石灰化が進む。石灰化がエナメロイド表面に達すると、エナメロイド表層にやや大きな結晶が出現してくる。最終的には表層には大型の結晶、深層には小型の結晶が観察されるようになる。

6. The fine structure of hypermineralized dental tissues (pleromin and petrodentine) in tooth plates of primitive fish with special reference to the mineralization mechanism

Mikio Ishiyama (Dept. Histol., Nippon Dent. Univ., Niigata)

This study aims to disclose the fine structural and crystallographical characteristics of the development of the mesenchymal hard tissues, holocephalian pleromin and dipnoan petrodentine, by means of some histological techniques.

The hypermineralized pleromin was distributed intratrabecularly in the bony tissue consisting of the tooth plate and was produced by the mesenchymal pleromoblast. An immature matrix of pleromin was a sparse tissue and is not mineralized before matrix secretion was completed. The mineralization of pleromin was initiated by the occurrence of the matrix vesicle-like structure in the peripheral portion of pleromin, then the mineralization extended along the collagen filaments in the peripheral portion. This mineralization, however, could not propagate into the main portion of pleromin, because this portion contained few collagen filaments. The mineralization of the main portion started after completion of the mineralization in the peripheral portion. The initially appearing large crystalline substances deposited specifically within tubular succules is the main portion. X-ray diffractometry showed that the crystals of the main portion are identified as whitlockite.

On the other hand, the hypermineralized petrodentine constituted a central portion of the

tooth plate and was produced by the mesenchymal petroblast. Petrodentine was deposited not gradually but intermittently unlike that known in the common dentinogenesis. Petroblast secreted a collagenous matrix in certain thickness, then began to modify the matrix with a degradation and absorption of the intramatrix collagen filaments. The petroblasts, therefore, appear very likely to have a prominent biphasic function similar to the ameloblast. In the initial stage of the petrodentine mineralization, the matrix vesicle failed to appear, and instead large ribbon-like crystalline substances deposited diffusely in the matrix of petrodentine. The petrodentine crystals were identified as hydroxyapatite by X-ray diffractometry.

The present study suggests that there are considerable differences in the fine structural and crystallographical characteristics between dipnoan petrodentine and holocephalian pleromin. Therefore, it would be more appropriate to regard that pleromin and petrodentine are distinct each other. [コメント]

後藤仁敏(鶴見大)：象牙質の定義について、私は上皮に誘導される細胞(象牙芽細胞)によって形成される硬組織を象牙質とよび、そうでないものは象牙質とよばないようにしている。したがって、肺魚の petrodentine(岩様象牙質)は象牙質、ギンザメのプレロミンはプレロミンとよぶのは適切であると思う。

7. Histological studies on growth increments in fossil fish otoliths by SEM

Masashi Takahashi (The Nippon Dent. Univ. Sch. Dent. Niigata, Dep. Anat.)

The purpose of this study is to investigate growth increments preserved in fossil fish otoliths.

Materials investigated in this study are recent, Pleistocene, Pliocene, and Miocene fish otoliths. Sagittal ground sections of them were prepared and observed with polarizing microscopy, microradiograph, and scanning electron microscopy.

The season of hatch, age and season of death of fossil fish were determined from the observation of incremental layers of fossil fish otoliths. The pattern of incremental layers of recent fish otoliths was related to the depth under sea level in which their fishes had lived. Most of Pliocene fossil fishes investigated in this study are considered from the pattern of incremental layers of their otoliths to

have lived in the same depth under sea level as the recent fishes of the same genus do. But it is considered that some fishes, such as *Diaphus*, which live in the deep sea now lived in the somewhat shallower sea than recent during Pliocene.

The change in width of a pair of thin growth bands, 1 to 4 μ m wide, consisting of a thin light band and a thin dark band in ground sections of recent fish otoliths coincides almost with the periodic change in height of the tide. An obscure thin dark band exists within theory that a pair of thin growth bands is not a daily increment but one with an average period of 24 hours and 50 minutes. These tidal growth increments were preserved in fossil fish otoliths.

[質疑]

大野：①潮汐模様の詳細について、②緯度分布について質問する。

高橋：Evans (1972) はザルガイの殻の成長線で、石灰化度の低い隔週輪を小潮時期の成長線と考えたが、生体染色した魚類耳石の蛍光線の位置から、これが反対の大潮時期の成長線である可能性が高くなった。魚類の生息緯度のちがいと成長線のパターンとの関係については検討していない。

佐佐哲郎(麻布大)：成長線の形成過程を実験的に実証する試み(dating)が行われているが、同時に、その形成機構を生理・生化学的に明らかにする必要がある。この様な試みがあったら紹介してもらいたい。また、今後、この方面ではどの様な研究方針が考えられるか教えてもらいたい。

高橋：魚類耳石の成長線の形成機構に関する生理・生化学的検討は行っていないが、平衡胞内の pH や有機物組成の時間的変化が昼夜の変化に一致するか、潮汐のリズムに一致するかを検討する必要がある。

8. Some problems on the growth structure of bivalvian internal shell layer.

Iwao Kobayashi (Dept. Geol. & Mine., Fac. Sci., Niigata Univ., Niigata)

A shell of bivalvian molluscs is one of calcified tissues which grow additionally until death as the result of the continuously metabolic activity of a mantle. Hence, a part of life history was also recorded in the internal shell structure. As the result, many problems on age determination, paleoecology and astronomy were studied using calcified tissues.

There are the following problems about the so-

called growth line of internal shell structure. 1) What is growth structure? 2) What is the minimum unit of growth structure? It is pointed out that tidal and daily lines are discriminated as the minimum unit. On the other hand, there is a physiological study on the relationship of body rhythm and shell formation. Lunar and annual periodical structures are important for paleoecological problems. 4) The change of growth patterns during a life in related with the individual development. Therefore, the ontogeny of one form partly in made clear by a study of growth structure. 5) The growth of shell in affected by outer environmental changes. Natural accident, such as storm or abnormal temperature, will be recorded as a mark of growth line.

〔質疑〕

佐俣：成長線部分とそれ以外の石灰化の進んだ部分とでは含有有機物の量に差があると一般的に言われているが、それは定量的に明らかにされているのか。また両部分では含まれる有機物の種類が異なっているのではないか。例えば、成長線部分には石灰化と直接関係のないものが、成長線以外の部分には石灰化と関連したものが含まれている可能性が考えられるが、この様な観点から有機物を検討した例はあるのか。あったら紹介してもらいたい。

小林：成長線の形態的検討がまだまだ不十分と思われるが、一般に成長線と言われる部分とそれ以外の部分での石灰化の程度が異なること、および有機物の量については定性的に観察されているに過ぎない。両者での有機物は異なる可能性があるが、この点も不明である。現在、成長構造に関連する最低の構造として、明帯と暗帯とがあり、前者は石灰化度が大きく、有機物量が少ないことが知られている。暗帯に含まれる有機物と形態型の有機物とは染色能力が異なる。有機物については総体的な研究であり、今後形態との関係を明らかにする方向を加味して検討する必要がある。

9. Preservation of shell structures in some fossil molluscs from Cenozoic deposits, Japan.

Seiichi Suzuki*, Yoshinori Hikida* and Yoshihiro Togo** (Dept. Earth Sci. and Astro., Fukuoka Univ. Educ., Munakata*; Dept. Earth Sci., Hoppaido Univ. Educ., Iwamizawa**)

Molluscan shells tend to be dissolved, altered or replaced by other minerals in the process of fossilization. The aragonitic shell structures particularly undergo these changes, but some types of fossilization preserve the structures. In this report

we will describe on the original microstructures remaining in silicified or chloritized fossil shells and on the organic matrix replaced by secondarily precipitated aragonite within the nacreous layer of some fossil bivalves.

Silicified shells were found from four outcrops of the Oligocene-Miocene Ashiya Group and from one of the Middle Miocene Kunnui Formation, these outcrops being composed of calcareous sandstone beds. The silicification occurs in many species having originally aragonitic shells and unsilicified shells are usually converted to calcite. Shell Microstructures are well preserved in the areas of quartz grains, but not in the areas of length-slow chalcedony. In the fossil shells from some outcrops of the Ashiya Group, the chloritization also preserves the original shell microstructures.

In some shells of *Acila divaricata* from the Lower Pleistocene Takanabe Member of the Miyazaki Group and the Tomioka Formation of the Taga Group, the interlamellar and intercrystalline organic matrices of the nacreous structure were replaced by secondary aragonite crystals. This may be an example of preservation by the permineralization.

〔質疑〕

大野：①珪化の起きる時期はいつか。②珪化の起きる地層の特徴は？また特殊な環境のみで形成されるのか。

鈴木：①スライドで示したように、アラレ石が直接シリカで交代されているので殻体の方解石化以前である。方解石化は粗粒堆積物中では容易に行われる傾向がみられるので、珪化は埋没過程のかなり早期に行われたものと判断している。②確認している限りでは、いずれも石灰質砂岩からなり、化石内容からみて浅海域で形成されたと思われる。特殊な環境というよりむしろありふれた環境のようである。

島本昌憲(東北大)：複数の鉱物種が共存している時に晶出する順序をどのように検討すればよいか。変質が進行する時期は化石作用のどの段階であるか。

鈴木：交代が部分的である場合、交代部と非交代部の境界の形状に交代鉱物特有のパターンがみられる。そこで交代鉱物同士が直接接触している部位において、どちらのパターンが支配しているかで順序を判断できる。珪化と緑泥石化では前者の方が早いと思われる。いずれの交代もかなり早期の段階であろう。

佐俣：再結晶したアラレ石は有機物が一度溶脱して、そのすき間を埋めて成長したものなのか、あるいは残存していた有機物の上で再び成長したものなのか、い

ずれか教えていただきたい。

鈴木：EDTA でエッチングした断面試料の SEM 観察では二次沈着性アラレ石中に有機物様の物質はみられないので、現段階では前者の方と考えている。

10. Ultrastructural Features of Some Aragonitic Shell Layers of Molluscs

Hiroshi Nakahara (Meikai Univ. Sch. Dent., Oral Anat. Dept.)

The developing and mature shell layers which contain aragonite crystals were observed by TEM in combination with ultrathin sectioning. The materials included nacreous layer and crossed lamellar layer of gastropod and bivalve, and inner ligament of bivalve. Electron stained section of all three shell layers show thin organic envelope which consists of aspartic acid rich protein surrounding each growing and mature crystals.

Although the shape and arrangement of the minerals differ, all three shell layers exhibit similar internal pattern of minerals indicating polysynthetic twinning of aragonite.

In the case of elongated ligament crystals, usually two to five twin lamellae are inserted through the central zone (along diagonal line) of the hexagonally shaped cross section of crystals. The crystals of crossed lamellar layer (also elongated) show twin pattern similar to that of ligament, however, the twin pattern is more widely distributed than that of ligament: many twin planes (parallel lines) were observed throughout the rectangular cross section of crystals. In nacreous layer, apparent twin pattern was observed in the section cut parallel to the flat surface of crystal tablet. It seems to be obvious that each nacreous tablet consists of several divisions of aragonite which exhibit different crystallographical orientation.

The structural resemblance in organic and mineral phases among the three layers suggest that they may be evolved from a common ancestral form which probably was similar to the nacreous layer of recent gastropod.

[質疑]

赤井純治(新潟大)：①真珠層の六角板状のものにみられる2方向あるという縞は双晶構造です。赤井・小林がすでに一部発表しています。② aragonite の双晶は天然の無機結晶にもごく普通にみられるもので、そういう点からも、また別の要因からも、双晶構造をつく

ることによって強度をかせぐ、という効果はあまりないのではないかという気がする。③ crossed lamellae 構造の生成の初期過程はどのようなものか教えてほしい。というのは結晶核発生の時点で双晶構造が決まると考えられるから。双晶片がつみ重なる方向へ成長するのか、同時的かあるいはいっきに結晶化するのか。中原：③について、envelop ができてその中で結晶が生成しはじめる。内部に鉱物質の precursorus なのがあるかもしれない。

大野：双晶が様々に出来ているにもかかわらず、どうして最終的な結晶の形は六角形になるのか。

中原：最終的には周囲の有機質の構造によって形が決定されるものと考えられる。

笹川一郎(日歯大)：有機基質の envelop と結晶成長との関係はどのようなものか。Envelop は結晶成長を促進するのか。

中原：Envelop は酸性のタンパク質を主体とし、結晶成長の促進と誘導の機能があると考えられる。

11. Shell microstructure and amino acid composition of organic matrix from *Ezocallista brevisiphonata* shell (Veneridae; Bivalvia)

Masanori Shimamoto (Inst. Geol. & Paleont., Tohoku Univ., Sendai)

In general, a bivalvian shell consists of some shell layers, and each shell layer is composed of a single shell microstructure except the inner shell layer. In some species, however, some different shell microstructures coexist in a single shell layer. This phenomenon is very important for considering an evolutionary pathway of shell microstructures.

The outer shell layer of *Ezocallista brevisiphonata* ordinarily consists of composite prismatic structure, but the structure is temporarily replaced by crossed lamellar structure. An analysis of growth lines was attempted in order to examine the relationship between the formation of crossed lamellar structure and the shell growth rate. The crossed lamellar structure is secreted after decreasing gradually in increment thickness, that is, the temporal secretion of crossed lamellar structure may be related to a low growth rate. Moreover, the secretion of crossed lamellar structure tends to increase during ontogeny.

Amino acid composition of organic matrix in the outer shell layer of *Ezocallista brevisiphonata* was analyzed to infer the phylogenetic position of the species. It resembles the amino acid composition of

species secreting crossed lamellar structure incessantly in the outer shell layer. Therefore, the shell microstructure of *Ezocallista brevisiphonata* may phylogenetically be related to that of species having crossed lamellar structure.

12. Methods in studying the organic matrix in the nacreous layer of *Pinctada fucata*.

Tetsuro Samata* and Masahiko Awaji (*Fac. General Educ., Azabu Univ., Sagamihara ; Nat. Res. Inst. Aquaculture, Mie.)

The analysis of the organic matrix in the nacreous layer of *Pinctada fucata* has been carried out in order to clarify the process of shell formation. But the informations obtained from these analyses are very restricted and further examination related to the process of earlier stage of shell formation is required. At first, the process of formation of the organic matrix should be classified, based on the comparative analysis of the cell secretion and the organic matrix. Secondary, detailed examination is necessary related to the role of the organic matrix in the process of crystal nucleation, crystal growth, formation of shell ultrastructure and determination of crystal form. Thirdly, analysis of the gene, which code the proteins in the organic matrix is also important.

Based on this strategy, the author summarizes the methods in studying the process of shell formation in the nacreous layer of *Pinctada fucata* as follows. It includes three parts, i.e.; 1. theme already examined, 2. recent main theme, 3. theme remained in future.

A. Methods in clarifying the process of shell formation

A-1 analytical methods

I analytical methods of the organic matrix in shell layer

II analytical methods of extrapallial fluid

III analytical methods of DNA in the cell of mantle epitherium

A-2 immunological methods

A-3 cell culture in mantle epitherium

B. Research theme related to the organic matrix

B-1 Process of formation of the organic matrix

B-2 Role of the organic matrix in the process of shell formation

B-3 Comparative biochemistry of the organic matrix

B-4 Comparative paleobiochemistry of the organic matrix

13. Recent Progress of the Studies of Microstructures of Fossils in Japan Focussing on the Studies on the Shell structures

Masae Omori (Fac. General Educ., Azabu Univ.)

After the War, Natn. Committ. of Geol. of Sci. Counc. of Jap (JSC) prepared a W.G. on Microgeology "surveying the internat'l affairs of these researches. And in 1959, "Fossil Club" was established to promote the cooperative works between scientists of various fields in Japan. Then some research groups was organized, supported by the Grant-in Aid for Scientific Res. of the Minist. of Educ. And the Natn. Committ. of Palaeont. of JSC planned out the construction of the Res. Inst. of Palaeont. open for all related scientists". However, as it is not realized yet so the Committ. of JSC is now under replanning of its construction in view of the recent progress of palaeont.

The 1st Intn'l Conf. of Biomineralization was organized at Mainz, Germany in 1970, succeeded to the 6th ones in every four years until now, and the 3rd one of 1977 and the 6th one of 1990 was held in Japan. Through these progress, the following projects advanced remarkably in the field of shell microstructure. (1) The classification of the structural pattern of the microstructure of shell, and its relation to phylogeny. (2) Kinds and distribution of minerals in shells. (3) Mechanisms of the calcification of shell, especially the role of soluble and insoluble protein. (4) Restoration of palaeophysiology, palaeoecology, morphogenesis and the life-history.