

エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置による 現生及び化石の歯の象牙質の解析

三島弘幸・大野由香・中石裕子・野村加代*

Analysis of dentin in extant animals and fossil animals using an energy
dispersive X-ray fluorescence spectrometer

MISHIMA, Hiroyuki, OONO, Yuka, NAKAISHI, Yuko and NOMURA, Kayo*

Abstract

The present study was designed to examine how the mineral elements of dentin change with the process of fossilization by using an energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer (EDXRF). The EDXRF can analyze the chemical composition of hard tissue and identify the presence of crystal present. In the cementum-covered dentin of humans and whales, the Ca/P molar ratio was 1.83 and 1.82 (average), while the Ca/P molar ratio was as low as 1.55 (average) in that of Asian elephants. As these different species vary significantly in tooth size, tooth form, and tooth formation mechanism, it is suggested that these differences affect the chemical composition of dentin. In the fossil incisor of *Gomphotherium* sp. from a Miocene specimen recovered in Florida, the Ca/P molar ratio of dentin was high with an average of 2.02. This might have resulted from the reduction in atomic weight percentage of P, and suggests P may have flown out into the surrounding stratum during the process of fossilization. It is also presumed that vivianite was formed in the outer edge of the fossil. In the fossil specimens, the elements of Al, Si, Mn, and Fe were present in possible trace amounts. It is presumed that these elements entered into the dentin from the stratum. It is considered that some elements may enter during the apatite crystal formation. We conclude that the entering elements change with differences in the deposition environment or the fossilization process.

Key words: teeth, dentin, extant, fossil, energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer

1. はじめに

エネルギー分散型蛍光 X 線分析装置 (Energy dispersive X-ray fluorescence spectrometer: EDXRF) は、X 線を試料に照射し、試料に含まれる構成元素から放射される蛍光 X 線を分析する方法である (日本分析機器工業会刊行物作成小委員会, 2004)。非破壊分析であるため、試料へのダメージが少なく、近年では、歯科学、鉱物学や地質学分野でも用いられてきている (Belkova and Tazaki, 2004; 深沢, 2000; 三島弘幸, 2000; 脇元ほか, 2004)。EDXRF は走査電子

顕微鏡に装着されているエネルギー分散型 X 線分光装置 (Scanning electron microscopy-energy dispersive X-ray spectrometer: SEM-EDS) とは異なる (日本電子顕微鏡学会関東支部, 2000)。

EDXRF は試料表面に炭素などの蒸着を必要とせず、前処理が短くてすむという利点がある。さらに、真空中あるいは大気中環境下でも分析でき、凹凸のある試料にも対応できる非破壊分析法である。

この分析法を現生と化石の歯の組成変化や化石化作用の解析に用いることは意義があると考えられる。こ

2005年4月28日受付、2005年9月22日受理

*〒780-0955 高知県高知市旭天神町292-26 高知学園短期大学保健科

Department of Health Sciences, Kochi Gakuen College, 292-26 Asahitenjincho, Kochi 780-0955, Japan

Corresponding author: MISHIMA, Hiroyuki. E-mail: mishima@kochi-gc.ac.jp

うした組成変化や化石化作用に関する研究は、エナメル質では進められているが、象牙質に関しての報告は少ない (Aoba, *et al.*, 1991; Sakae *et al.*, 1991)。本研究では、歯が地層中に堆積され、化石化作用の過程で、象牙質の無機成分がどのように変化するかを検索する目的で、EDXRFにて解析し、検討を加えた。

2. 材料と方法

用いた試料は、現生の動物では、ヒトの中切歯 2 例と第 3 大臼歯 2 例、マッコウクジラの歯 2 例、アジアゾウの切歯 2 例である。化石では、更新世の下部野尻湖層 III 上部 (7N III J17-19, 10N III E15-58, 10N III E15-110) と中部野尻湖層 I (10N III E16-7, 10N III 17-2) から産出したナウマンゾウ *Palaeoloxodon naumanni* の切歯化石 5 例 (約 4.3-4.1 万年前; 野尻湖地質グループ, 2003 による) 及び更新世のシベリア産マンモスゾウ *Mammuthus primigenius* の切歯化石 2 例 (約 5 万年前)、及び中新世のフロリダ産の *Gomphotherium* sp. の上顎切歯化石 1 例を用いた。現生の試料は、縦断面あるいは横断面に硬組織切断機 (Isomet low speed saw, Buehler 社製) を用いて切断し、その断面の象牙質の中層を分析した。野尻湖層産の試料は、強化剤で補強処理されていないものを用い、破断面の象牙質の中層を分析した。その他の化石試料も破断面の中層を分析した。

各試料はエネルギー分散型 X 線分析装置 (EDXRF: JSX-3200, 日本電子製) を用いて、象牙質の無機質中の構成元素の定性分析と定量分析 (半定量) を行った。分析部位はセメント質が覆う歯根象牙質 (中層) で、研磨面及び破断面を測定した。管電圧 30kV、管電流 0.34-1.26mA、計数時間 300-600 秒、フィルター全開、分析範囲 7 mm、バルク FP (ファンダメンタルパラメーター) 法、真空下の条件で測定した。エネルギー校正には、Al、Mn、Mo の混合試料を使用して、校正した。EDXRF での分析値と理論値を比較するために、標準となる 3 種のリン酸カルシウムの定量分析を行い、Ca/P 原子量比を求めた。用いたリン酸カルシウムは、Brushite (Dicalcium phosphate dihydrate: DCPD、 $\text{Ca}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)、Monetite (Dicalcium phosphate: DCP、 Ca_2HPO_4)、Octacalcium phosphate (OCP、 $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) の 3 種である。

蛍光 X 線分析装置には EDXRF 以外に蛍光 X 線の波長から解析する波長分散方式蛍光 X 線分析装置 (Wavelength Dispersive X-ray Fluorescence spectrometer: WDSXRF) がある。EDXRF より、感度がよく、軽元素の B から分析できる利点がある。予察実験として、ヒト中切歯と第 3 大臼歯の薄片で、歯根象牙質の分析を行った。WDSXRF は X-ray

spectrometer 3270 (Rigaku) を用いた。しかし、管電圧 50kV、管電流 20mA と共に高く、試料に X 線照射による色調変化が見られ、貴重な化石試料には WDSXRF は不適と判断された。そのため本研究では EDXRF による解析結果を報告する。

3. 結果および考察

1) リン酸カルシウムの 3 種の定量分析

EDXRF により DCPD、DCP、OCP の 3 種のリン酸カルシウムを分析した。粉末試料のため、試料を圧縮し、ペレット試料とし、定量分析を行った。DCPD では、Ca/P モル比の理論値は 1.0 であるが、測定値の Ca/P 原子量比は 0.95 であった。DCP では Ca/P モル比は 1.0 であり、測定値の Ca/P 原子量比は 1.01 であった。OCP では Ca/P モル比は 1.33 であり、測定値の Ca/P 原子量比は 1.27 であった。3 種のリン酸カルシウムとも蛍光 X 線分析装置の測定値は妥当な分析結果となった。予備実験では圧縮せずに分析を行ったが、この場合分析結果に差が生じた。SEM-EDS 分析は、極表面を分析するため、試料は薄くて良い。しかし、EDXRF では、元素により分析の深さが異なるが、かなり内部にいたる深部の分析が可能である。粉体試料では、十分に厚く盛り上げて、圧縮することにより良い結果が得られた。そのため、粉体試料を EDXRF にて分析する際は注意を要する。さらにより正確に結晶を同定するには、X 線回折法を併用しなければならない。

2) 現生象牙質の定量分析

ヒト切歯と大臼歯では、分析値に極端な違いが認められなかった。第 3 大臼歯の分析結果を図 1 に示す。ヒト象牙質では、Ca/P 原子量比が 1.83 (平均値) であった。微量元素として、Mg (平均値 0.92 重量%) や Na (平均値 0.85 重量%) が検出された (図 1)。象牙質の無機質成分である生体アパタイト結晶において、 Ca^{2+} の位置に Mg^{2+} や Na^+ が置換されると報告されている (Elliott, 1994)。また象牙質の無機質含有量では、Mg で 1.1 重量%、Na で 0.07 重量% とされている (Elliott, 1994)。分析された Na の量が報告と異なるが、検出された Mg や Na は象牙質の無機質成分由来と考えられる。過去の SEM-EDS 分析では Mg は象牙質に検出しているが、Na は検出されていない (Mishima and Kozawa, 1998)。今回 EDXRF で Na が検出されたのはより広範囲な分析によると考えられるが、今後詳細に検討を加えたい。

他に検出された元素で Rh は EDXRF の装置内から発生するものである。さらに Zn, Si, S が図 1 に示されているが、これらのスペクトルはごく微量であり、

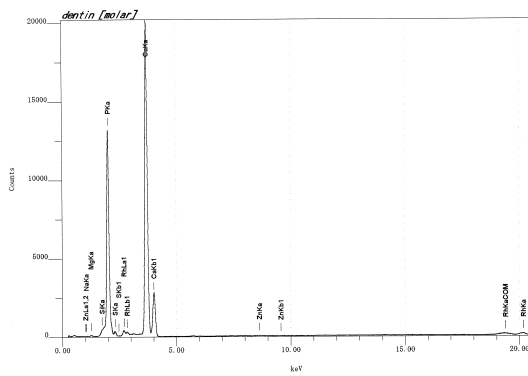


図1 ヒト第3大臼歯の歯根象牙質のEDXRFによる定性分析結果。Na: 0.85重量% (平均値)、Mg: 0.92重量% (平均値)、Ca/P原子量比: 1.83 (平均値)。縦軸: カウント数、横軸: X線エネルギー (keV)。

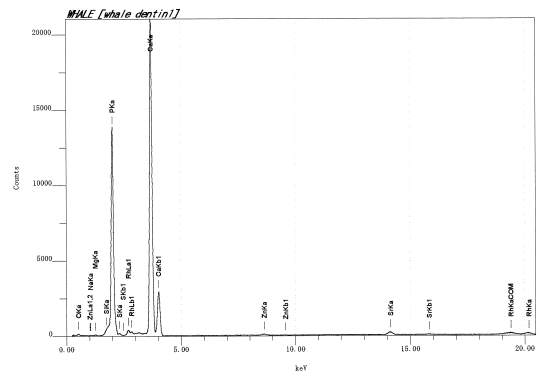


図2 マッコウジラの歯根象牙質のEDXRFによる定性分析結果。Na: 1.01重量% (平均値)、Mg: 0.51重量% (平均値)、Ca/P原子量比: 1.82 (平均値)。縦軸: カウント数、横軸: X線エネルギー (keV)。

またノイズやエスケープピークの可能性が強いため、これら元素については言及しない。なお、図2から図5において示されている微量元素(Zn, S, Ag, Cd, K, Sr)、また図6での微量元素(S, Ag, Mn)も同様の理由で言及しない。

生体アパタイト結晶は biological apatites とも呼ばれ、ハイドロキシアパタイト $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (OHAp)とは区別して考えられている(Elliott, 1994)。海外においては、生体アパタイト結晶をダーライト Dahllite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4, \text{CO}_3)_6(\text{OH})_2$ と呼ばれることがある(Espinoza and Mann, 1992; 渡部, 1997)。生体アパタイト結晶は CO_3 を含むことから、炭酸含有アパタイトあるいは Carbonate hydroxyapatite (CHA) と呼ばれることもある(岡崎, 1992; LeGeros, 1991)。また生体アパタイト結晶は Mg も結晶中に含まれる。生体アパタイト結晶からなるエナメル質と象牙質では、Mg の含有比率が異なり、象牙質ではその含有比率が高い(Elliott, 1994)。Ca/P モル比では、エナメル質結晶は OHAp の 1.67 より低く、1.59 であり、象牙質では 1.67 かその値より高い(Elliott, 1994)。LeGeros ほか(1988)はアパタイト結晶中に CO_3 イオンを含むと、Ca/P モル比は高くなり、1.65-2.33 に変化すると報告している。本研究で得られた歯根象牙質の Ca/P 原子量比は 1.83 であり、象牙質結晶中に CO_3 イオンを多く含有していると推定される。しかし、分析例が少ないので、さらに例数を増やし、またラマン分光法など別の分析機器も併用しながら、検証していきたい。歯冠と歯根での部位差の有無もあわせて検討したい。

マッコウジラの象牙質(図2)では Ca/P 原子量比が 1.82(平均値)であった。微量元素では、Na(平均値 1.01重量%)と Mg(平均値 0.51重量%)が検出され、ヒト象牙質に比較し、Na が多く含まれていた。アジアゾウ(図3)では Ca/P 原子量比が 1.55(平均値)と低

い値であった。ヒトやマッコウジラに比較して、アジアゾウでは Mg を多く含み、平均値 2.67重量%であった。この所見は長鼻類の切歯では Mg の含有量が多いとする Sakae *et al.*, (1994; 1995)の報告を支持するものである。長鼻類の切歯象牙質において Mg は結晶の相転移を制御している可能性がある(Sakae *et al.*, 1995)。Na は平均値 0.84重量%であった。

なお、熱重量分析及び示差熱分析結果から、有根歯のヒトやブタならびに無根歯のラットの象牙質に比較し、アジアゾウの切歯象牙質は有機質が多く、平均 30%含まれていると報告されている(寒河江ほか, 1992)。象牙質の石灰化球での SEM-EDS の分析結果でも動物種により Ca/P 原子量比に差が認められている(Mishima *et al.*, 2004)。これら Ca/P 原子量比や微量元素の含有量の違いは動物の種差あるいは歯の形態や大きさ、歯の形成機構(一生菌性、二生菌性や無根歯)、あるいは食性の違いで、象牙質の組成において差が出ることが示唆される。しかし個体変異の可能

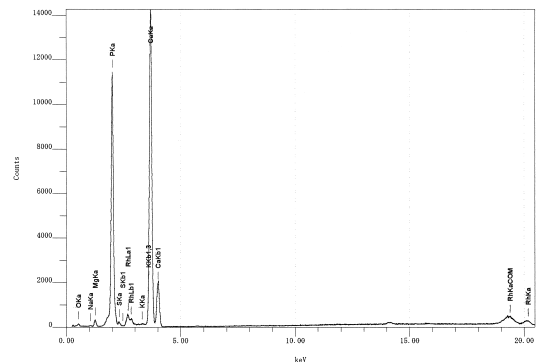


図3 アジアゾウの歯根象牙質のEDXRFによる定性分析結果。Na: 0.84重量% (平均値)、Mg: 2.67重量% (平均値)、Ca/P原子量比: 1.55 (平均値)。縦軸: カウント数、横軸: X線エネルギー (keV)。

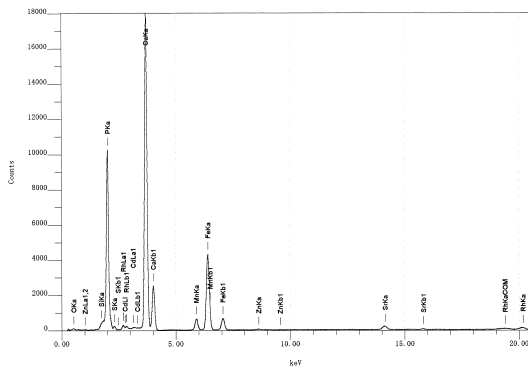


図4 野尻湖層産ナウマンゾウの歯根象牙質のEDXRFによる定性分析結果。Si:0.17重量% (平均値)、Mn:0.38重量% (平均値)、Fe:1.84重量% (平均値)、Ca/P原子量比:1.92 (平均値)。縦軸:カウント数、横軸:X線エネルギー (keV)。

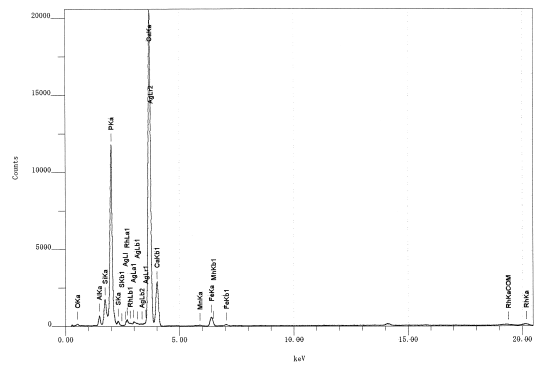


図6 フロリダ産の*Gomphotherium* sp. の歯根象牙質のEDXRFによる定性分析結果。Al:1.51重量% (平均値)、Si:1.48重量% (平均値)、Fe:0.21重量% (平均値)、Ca/P原子比:2.02 (平均値)。縦軸:カウント数、横軸:X線エネルギー (keV)。

性もあり、今後さらに詳細に検索していきたい。

3) 化石象牙質の定量分析

更新世の野尻湖層産ナウマンゾウ(図4)の分析において、Ca/P原子量比が1.92(平均値)であった。微量元素として、3種(Fe, Mn, Si)の元素が検出され、Feは1.84重量% (平均値)、Mnは0.38重量% (平均値)、Siは0.17重量%(平均値)であった。Mgは検出されなかった。

更新世のシベリア産マンモスゾウ(図5)ではCa/P原子量比が1.79(平均値)であった。微量元素として、Mgは1.62重量%(平均値)で、Alは0.47重量%(平均値)検出された。ナウマンゾウやマンモスゾウにおいて、Al, Si, Mn, Feの元素が化石試料では微量に含まれ、それらは地層中から象牙質にしみこんだものと考察される。アパタイト結晶のCaの位置にFeや

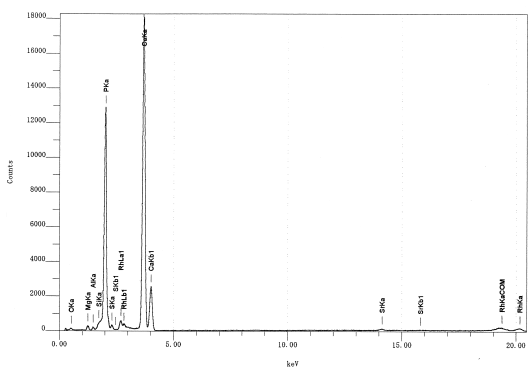


図5 シベリア産マンモスゾウの歯根象牙質のEDXRFによる定性分析結果。Mg:1.62重量% (平均値)、Al:0.47重量% (平均値)、Ca/P原子量比:1.79 (平均値)。縦軸:カウント数、横軸:X線エネルギー (keV)。

Mnが置換して入り込む可能性があり、PO₄の位置にSiO₄が置換して入り込む可能性がある(LeGeros, 1991; Elliott, 1994)。しみこむ元素は埋没状況、堆積環境、化石化作用などの違いにより変化すると思われる。

中新世のフロリダ産の*Gomphotherium* sp.(図6)ではCa/P原子比は平均2.02と高い値を示した。これはPの原子量%が減少し、Caの原子量%は減少せず、その結果Ca/P原子量比が高くなった結果であると推定される。切歯化石発見時に、切歯化石の周囲に象牙質から流失したPを核とした藍鉄鉱Fe₃²⁺(PO₄)₂・8H₂Oが見られることがある(Espinoza and Mann, 1992)。化石化作用の過程で、地層中にPが流出したと考察される。本試料もPが象牙質から流失し、周囲に藍鉄鉱が形成された可能性が推測される。またAlは1.51重量%(平均値)、Siは1.48重量%(平均値)、Feは0.21重量%(平均値)であった。Al, Si, Feの元素が*Gomphotherium* sp. 試料では微量に含まれ、地層中から象牙質にしみこんだものと考察される。

4. まとめ

- 1) 蛍光X線分析法は、組織のより深部の構成成分を解析でき、硬組織の結晶の同定が可能となる。X線回折法を併用すれば、より正確になる。
- 2) ヒトやクジラではセメント質が覆う象牙質のCa/P原子量比が平均で1.83や1.82であるのに対し、アジアゾウでは1.55と低い値を示した。これにより、動物の種差あるいは歯の形態や大きさ、歯の形成機構の違いで、象牙質の組成において差が出るということが示唆された。
- 3) 中新世のフロリダ産の*Gomphotherium* sp. ではCa/P原子量比は平均2.02と高い値を示した。こ

れは、化石化作用の過程でPの原子量%が減少し、地層中にPが流出し、周囲に藍鉄鉱が形成されたためと推定される。

- 4) 化石試料に微量に含まれるAl、Si、Mn、Feの元素は地層中から象牙質にしみこんだと推定される。一部の元素はアパタイト結晶中に入り込む可能性があると考えられる。しみこむ元素は堆積環境や化石化作用の違いにより変化するとと思われる。

謝辞

リン酸カルシウム試料を提供された米国国立標準局国立歯学研究所の高木章三博士ならびに日本大学松戸歯学部理工学教室の早川徹博士、野尻湖層産の試料を提供していただいた野尻湖発掘調査団に心よりお礼申し上げます。また、エネルギー分散型蛍光X線分析装置を使用させていただいた日本大学松戸歯学部第2解剖学教室の小澤幸重教授をはじめとする教室員の方々に深謝いたします。分析の技術的な問題に対して助言をしていただいた日本電子株式会社応用研究センターの安東和人氏にも深謝いたします。

引用文献

- Aoba, T., Miake, Y., Shimoda, S., Prostack, K., Moreno, E. C. and Suga, S. (1991) Dental apatites in vertebrate species: morphology and chemical properties. In: Suga, S. and Nakahara, H. (eds.) *Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological system*, pp. 459-463, Springer-Verlag, Tokyo.
- Belkova, N. L. and Tazaki, K. (2004) Fossilization of bacteria in the Kotelnikovsky hot springs located on the northwest coast of lake Baikal, Russia. *J. Fossil Reseach* **37**, 8-17.
- Elliott, J.C. (1994) *Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates*. pp.259-304, Elsevier, Amsterdam.
- Espinoza, E. O. and Mann, M.-J. (1992) *Identification guide for ivory and ivory substitutes* (2nd ed.). WWF Publications, Baltimore, 35pp.
- 深沢正幹 (2000) 炭酸ガスレーザーと試作フッ素含有ペースト併用による歯質耐酸性効果. 日本歯科保存学雑誌 **43**, 583-591.
- LeGeros, R.Z., Orly, I., LeGeros, J.P., Gomez, C., Kazimiroff, J., Tarpley, T. and Kerebel, B. (1988) Scanning electron microscopy and electron probe microanalyses of the crystalline components of human and animal dental calculi. *Scanning Microsc.* **2**, 345-356.
- LeGeros, R.Z. (1991) *Calcium phosphate in oral biology and medicine*. pp. 82-107, Karger, Basel.
- Mishima, H. and Kozawa, Y. (1998) SEM and EDS analysis of calcospherites in human teeth. *Eur. J. Oral Sci.* **106**, 392-396.
- 三島弘幸 (2000) 化石の研究法 採集から最新の解析法まで. 化石研究会編, pp. 316-317, 共立出版, 東京.
- Mishima, H., Iwasa, Y., Yamazoe, T., and Kozawa, Y. (2004) Morphological and chemical analyses of calcospherites of dentin in man and other animals. In: Kobayashi, I. and Ozawa H. (eds.) *Biom mineralization (BIOM 2001) formation, diversity, evolution and application*, pp.357-359, Tokai University Press, Kanagawa.
- 日本分析機器工業会刊行物作成小委員会 (2004) 分析機器の手引き (12版). 社団法人日本分析機器工業会, 東京, 295頁.
- 日本電子顕微鏡学会関東支部 (2000) 走査電子顕微鏡. 共立出版, 東京, 427頁.
- 野尻湖地質グループ (2003) 第14次野尻湖発掘地の地質と堆積環境-野尻湖発掘地とその周辺の地質 その14-. 野尻湖ナウマンゾウ博物館研究報告 **11**, 15-22.
- 岡崎正之 (1992) 歯と骨をつくるアパタイトの化学. 東海大学出版会, 東京, 184頁.
- Sakae, T., Mishima, H. and Kozawa, Y. (1991) Proboscidea fossil teeth suggest the evolution of enamel crystal. In: Suga, S. and Nakahara H. (eds.), *Mechanisms and phylogeny of mineralization in biological system*, pp. 477-481, Springer-Verlag, Tokyo.
- 寒河江登志郎、赤石茂、三島弘幸、小澤幸重 (1992) ゾウの牙の象牙質の熱重量分析および示差熱分析. 日大口腔科学 **18**, 655-659.
- Sakae, T., Mishima, H., Takahashi-Kunuki, Y., Suzuki, K. and Kozawa, Y. (1994) Dentin apatites from teeth of different animals: crystallographic properties. *Bull de l'Institut Oceanographique, Monaco* **14**, 215-219.
- Sakae, T., Mishima, H., Kozawa, Y. and LeGros, R.Z. (1995) Thermal stability of mineralized and demineralized dentin: a differential scanning calorimetric study. *Connect. Tissue Res.* **33**, 193-196.
- 脇元理恵, 田崎和江、縄谷奈緒子、池田頼正、今井茂雄、佐藤一博、奥野正幸 (2004) 大島紬を染める泥の特性. 地球科学 **58**, 199-214.
- 渡部哲光 (1997) バイオミネラリーゼーション、生物が鉱物を作ることの不思議. 東海大学出版会, 東京, 180頁.