

[原著]

シルル紀から石炭紀のコノドント化石の硬組織の構造の解析

三島弘幸*・笥 光夫**・北原正大***・安井敏夫****・見明康雄*****

Analysis of structure on hard tissue of conodont fossils from Silurian to Carboniferous

MISHIMA, Hiroyuki*, KAKEI Mitsuo**, KITAHARA Masahiro***, YASUI Toshio**** and MIAKE Yasuo*****

Abstract

The purpose of the present study is to examine the nature of apatite crystals found in the hard tissue of conodont fossils. The tooth apparatus of conodont fossils (Yokokurayama Formation, Silurian, Kochi, Japan, Contact Beechweed Limestone, Devonian, Indiana, USA, Grassy Creek formation, Upper Devonian, Missouri, USA, and Hushpuckney shale, Carboniferous, Missouri, USA) were used in this study. The specimens were observed and analyzed using a stereoscopy, a scanning electron microscopy, a transmission electron microscopy, an electron-probe microanalyzer, a laser Raman microprobe spectrometry, and an x-ray diffraction method. The backscattered electron image of SEM observation revealed that the crystals were highly calcified and needle-shaped. The surface layer was more calcified than the inner layer. The small tubules were observed in the inner layer. The hard tissue of the conodont consisted of two layers of differing crystal size. Under higher magnification, the crystals were observed in the lattice of (100) and the central dark lines were not present. Ca, P, and F were detected in the crystal using the EPMA. The Ca/P ratio was from 1.60 to 1.76. The weight % F was from 3.203 ± 0.646 to 5.456 ± 0.185 . By Raman spectrum analysis, the peak of 965 cm^{-1} was detected, which was from PO_4^{3-} . Our results indicate that the apatite crystal in conodont was not hydroxyapatite but was fluorapatite. It is considered that the surface layer of conodont was enameloid and the inner layer was orthodontin or osteodontin. This study was performed under the cooperative research program of Center for Advanced Marine Core Research (CMCR), Kochi University (06B004, 07A005, 07B020, 08A004, 08B004, 09A008, 09B008). This work was supported by (JPPS) KAKENHI (20592168).

Key words: conodont, hard tissue, apatite crystal, microstructure, trace elements, EPMA, Raman spectrum analysis

2009年10月1日受付, 2009年12月25日受理

* 〒780-0955 高知市旭天神町292-26 高知学園短期大学医療衛生学科

Department of Medical Hygiene, Kochi Gakuen College, 292-26 Asahitenjincho, Kochi, 780-0955, Japan

** 〒350-0283 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, School of Dentistry, Mekai University, 1-1 Keyakidai, Sakado, 350-0283, Japan

*** 〒783-8505 南国市岡豊町小蓮 高知大学医学部脳神経外科学講座

Department of Neurosurgery, Kochi Medical School, Kochi University, Kohasu, Okoo, Nankoku, Japan

**** 〒781-1301 高岡郡越知町越知丙737-12 横倉山自然の森博物館

The Yokogurayama Natural Forest Museum, 737-12 Ochihei, Ochicho, Takaoka, 781-1301, Japan

***** 〒261-8502 千葉市美浜区真砂1-2-2 東京歯科大学超微構造学

Department of Ultrastructural Science, Oral Health Science Center, Tokyo Dental College, 1-2-2 Masago, Mihama, Chiba, 261-8502, Japan

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

1. 緒言

コノドント化石は、コノドント動物（所属不明）の硬組織の一部とされてきたが、近年においてコノドント化石が口腔領域において咀嚼器官（conodont element）として機能していたとする報告がなされてきた（Sansom *et al.*, 1992; Smith *et al.*, 1996; Smith and Coates, 1998, Smith and Coates, 2000）。Smith *et al.* (1996) は、コノドント化石の外層がエナメル質相同の組織であり、その内層は象牙質と軟骨からなると報告している。また、ニール（2008）は、コノドントが太古の無顎類の歯であると述べており、体の中の硬組織において歯が最初に出現し、その後骨が出現したとしている（ニール, 2008; Smith and Coates, 2000）。コノドント化石に関する多くの報告は、光学顕微鏡や走査電子顕微鏡レベルの、組織についての議論である。コノドント化石の結晶はアパタイト結晶であるが（Kakei *et al.*, 2001, 2004; 筧・三島, 2007; Pietzner *et al.*, 1968）、その硬組織の超微構造やその化学組成をもとにした総合的な議論はあまりなされていなかった（Mishima *et al.*, 2008a）。本研究は、シルル紀から石炭紀までの間に産出したコノドント化石の、硬組織のアパタイト結晶の構造的、あるいは組成の性状を検索することを目的とし、行われた。

2. 材料と方法

本研究に用いられたコノドント化石の試料は以下の通りである。

- ①横倉山層群, シルル紀, 高知県, 日本（5例）
- ②Contact Beechweed Limestone, デボン紀, Indiana, アメリカ（5例）
- ③Grassy Creek Formation, デボン紀後期, Missouri, アメリカ（5例）
- ④Maple Mill Formation, デボン紀後期, Iowa, アメリカ（5例）
- ⑤Hushpuckney Shale Formation, 石炭紀, Missouri, アメリカ（5例）

試料は、下記の方法により行われた。

- 1) 試料（①–⑤）を無蒸着にて低真空走査電子顕微鏡（低真空SEM, Scanning Electron Microscope, S-2380N, Hitachi）で、試料の表面を観察した。
- 2) 試料の一部（①–③, ④）は、微細構造を観察するために、アラルダイトにて包埋し、その後超薄切片（厚さ約60Å）を作製し、透過型電子顕微鏡（TEM, JEM100CX, JEOL）にて観察した。加速電圧80kVにて観察を行った。
- 3) 化石の断面を観察するために、試料（①–⑤）はアルコール脱水後、ポリエステル系常温硬化樹脂

（カストライト, Buehler 社製）にて包埋し、あるいは無包埋にて、仕上砥で化石の表面の片面を研磨し、最終的にダイヤモンド研磨紙（粒径0.1μm）にて研磨し、研磨面を実体顕微鏡にて観察・写真撮影を行った。その後、試料を無蒸着にて、低真空SEMにて観察した。さらに、一部の試料（①–⑤）はカーボン蒸着を施し、SEMにて観察した。用いたSEMは、S-2380N（Hitachi）並びにJSM-6340（JEOL）である。また同時に試料の組成分析をEPMA（JXA-8200, JEOL）にて行った。分析はエネルギー分散型検出器（EDS: Energy Dispersive Spectrometer）と波長分散型検出器（WDS: Wavelength Dispersive Spectrometer）の2種の検出器にて、定性分析や定量分析を行った。SEM-EDS（走査電子顕微鏡によるエネルギー分散型分析）は点分析にて行い、加速電圧15kVで分析し、分析時間は60秒であった。SEM-WDS（走査電子顕微鏡による波長分散型分析）は加速電圧10kV、分析時間は20秒、分析範囲は10μm×10μmで行った。

- 4) カーボン蒸着を施していない試料（①–⑤）は、ラマン分光装置にて分析を行った（機種: Raman rxn systems, Kasier optical systems ならびに T-64000, LabSpec, Horiba）。レーザーの波長は514 nm および532nm を用い、レーザーの出力は0.5 mW、分析範囲は1μmであり、分析時間は10秒であった。

- 5) 研磨した試料の一部（④, ⑤）はX線回析装置 RINT2000（リガク製）を用いて、硬組織の結晶の同定を行った。条件は管電圧40KV、管電流200mAで行い、kβ フィルターを用いて解析した。X線の照射時間は300秒である。コリメーター径は100μmである。

3. 結果

1) 実体顕微鏡およびSEMの観察結果

SEM観察は、石灰化の状態や元素組成状態が把握できる反射電子像を用いて行った。コノドント化石（横倉山層群産やHushpuckney Shale Formation産）では、鋸歯状の形態をしているタイプ（図1, 2）と円錐形のタイプが存在する。鋸歯状のコノドント化石の表面では、顆粒状や針状の結晶が集合していた（図3）。鋸歯状のコノドント化石研磨標本（Hushpuckney Shale Formation産）の光顕像（図4）において、コノドント化石の硬組織は、外層と内層に区分され、2層性であった。SEMの反射電子像においても、同様に2層性であり、外層と内層の境界領域がより白色を示し、電子密度が高かった。円錐形のコノドント化石

(横倉山層群産)では、内部の中心には円錐形の内腔が観察され、その内腔近くに球状の構造物(平均直径 $5\mu\text{m}$) (図5の矢印)が認められた。円錐形のタイプでは外層は薄い層として存在していた。円錐形のタイプ (Maple Mill Formation 産) のコノドント化石においても、不明瞭ながら、薄い外層と厚い内層の2層が認められた。外層には、円錐形の長軸の方向に平行な成長線が認められ、その間隔は $3\sim 4\mu\text{m}$ であった。内層の組織構造には2種類あり、その一つは細管

構造が認められる組織構造である。その細管は比較的直線状であり (図6a), その径は $1\sim 1.3\mu\text{m}$ であった。外層に向かい走行し、枝分かれをしていて、外層との境界では、さらに枝分かれをし、消失していた。一部の終枝は外層の中層まで進入していた。内層の中心部に、横倉山層群産と同様に内腔が認められた。長軸に平行で、かつ細管をほぼ直交する成長線が数本認められ、その間隔は $1.4\sim 2\mu\text{m}$ であった。他方の内層は多数の管状構造が認められるものである。その管

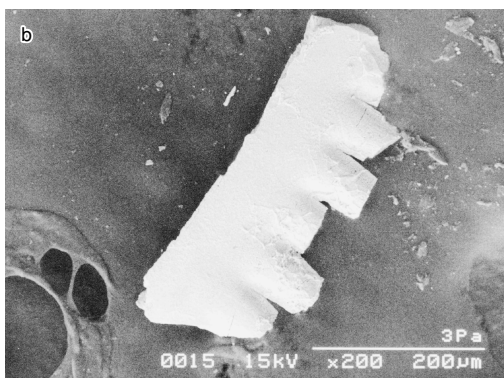
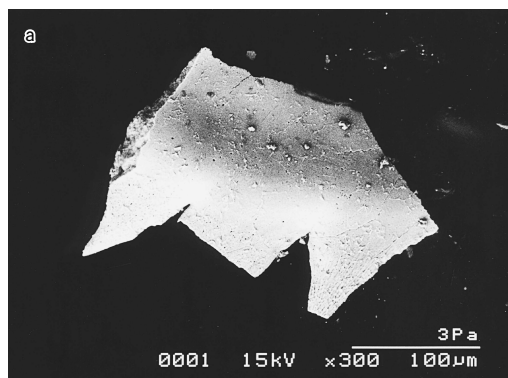


図1a, b SEM: 反射電子像。横倉山産層群。鋸歯状の形態をしている。

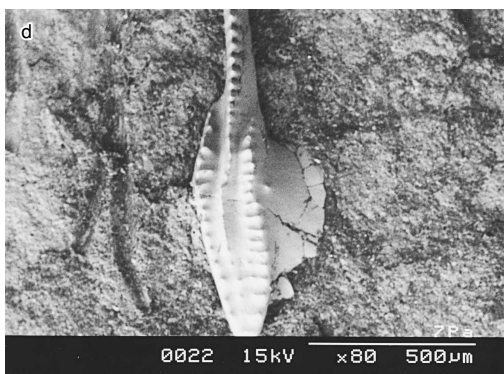
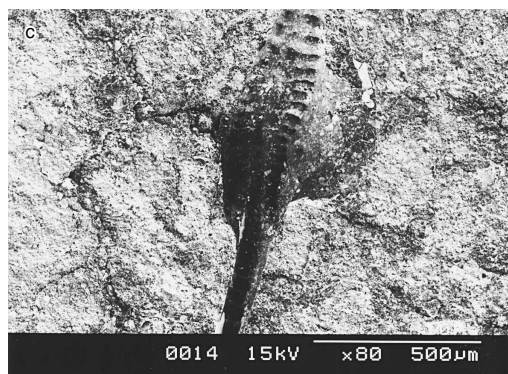
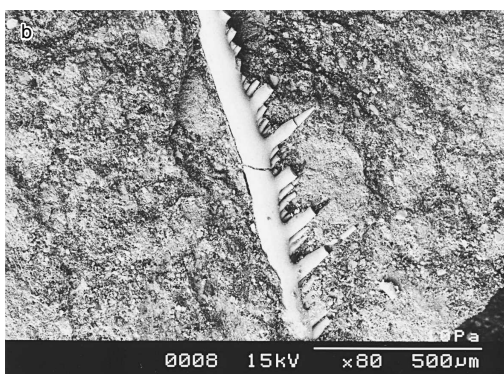
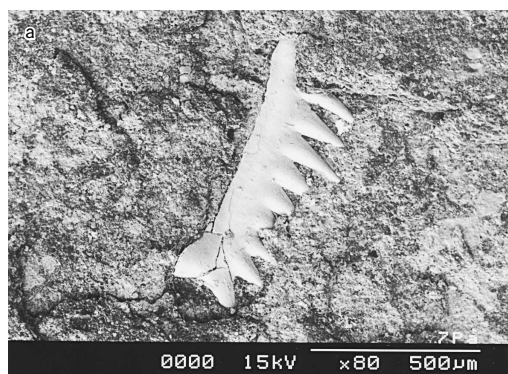


図2a, b, c, d SEM: 反射電子像。コノドント化石 (Hushpuckney Shale Formation 産)。鋸歯状の形態をしている。

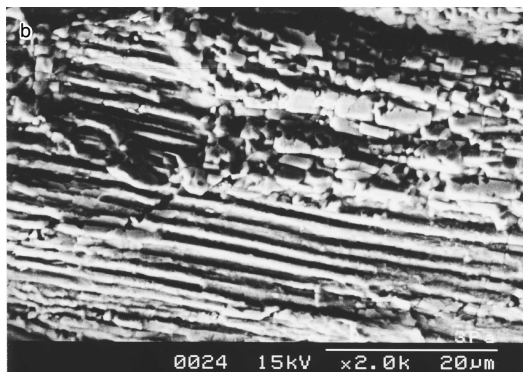
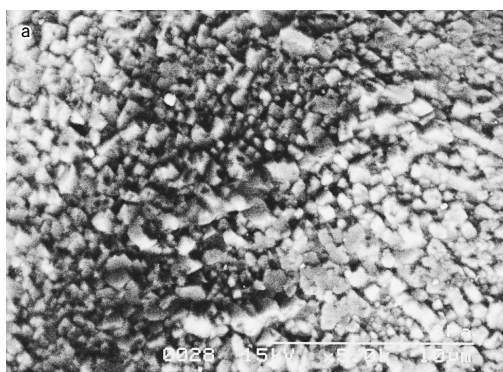


図3 a, b SEM：反射電子像。表面構造（横倉山層群産）。
表層では、顆粒状（a）や針状の結晶（b）が集合している。

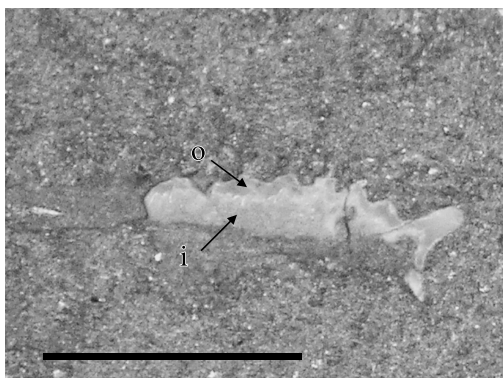


図4 光顕像 研磨標本(Hushpuckney Shale Formation 産)。硬組織は2層性である。o：外層，i：内層。Bar：500µm。



図5 SEM：片面研磨標本 反射電子像（横倉山産層群）。歯髓腔に石灰化球（矢印）が認められる。o：外層，i：内層。

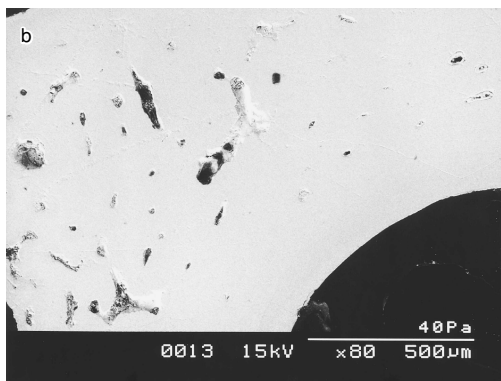
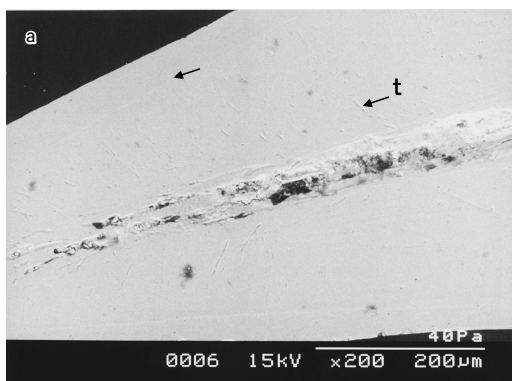


図6 SEM：反射電子像（Maple Mill Formation 産）。a：不明瞭ながら外層と内層の2層性である。内層は象牙質である。細管構造（t）が認められる。矢印は外層と内層の境界。b：中心部に骨様象牙質が認められる。

状の横断像（直径8～25 μm ）や縦断像（短径33～42 μm ）が認められた（図6b）。また多数の管状構造が認められる標本の先端の中心部には横倉山層群産と同様に、内腔が認められ、その領域の組織は細管構造を呈していた。

2) 透過型電子顕微鏡の結果

コノドント化石（横倉山層群産）において、組織構造は2層性であった（図7a）。外層は大きい結晶（長軸の長さ80～320nm、短軸の長さ40～120nm）の集合体であり、内層はより小さな結晶（径40nm）の集合体であった。今回の材料では、時代や産地が異なっているが、基本的な組織構造は変化せず、同様な2層構造であった。また、外層（Grassy Creek formation産）のアパタイト結晶の内部において、格子間隔が8.12Åの（100）の格子構造が観察された（図7b）。また観察した試料すべてで、中心線（Central dark line）は認められなかった。

3) SEM-EDS, SEM-WDS分析, 電子回折法, ラマン分光法およびX線回折法の結果

Hushpuckney Shale Formation産と横倉山層群産の外層のSEM-EDSの定性分析結果では、主要な元

素はCa, Pであり、微量元素として、Fが検出された（図8a）。Hushpuckney Shale Formation産の外層の一部の領域では、部分的に微量元素としてNaやSが分析されることがあった。定量分析（SEM-EDS分析）では、Hushpuckney Shale Formation産のCa/Pは平均で1.60であった。Hushpuckney Shale Formation産の試料のFの定量分析（SEM-WDS分析）において、Fは $3.803 \pm 0.236\text{Wt}\%$ を示した。Hushpuckney Shale Formation産の内層の主要な元素はCa, Pであり、微量元素としてFが検出された。部分的に内層の一部の領域では、微量元素としてNa, Si, S, Feが分析されることがあった。Ca/Pは平均で1.63であった。微量元素のFの定量分析（SEM-WDS分析）において、Fは $3.203 \pm 0.646\text{Wt}\%$ を示した。標準試料として、fluorapatite (F-Ap) も分析を行った。F-Apでは、Fは $3.831 \pm 0.061\text{Wt}\%$ を示した。

Maple Mill Formation産の主要な元素はCa, Pであり、微量元素としてFが検出された。内層ではCa/Pは平均で1.96であった。Fは $5.456 \pm 0.185\text{Wt}\%$ であった。

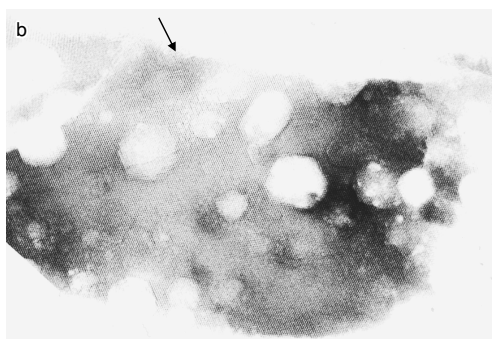
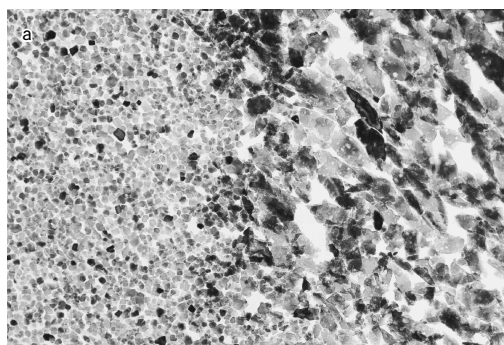


図7 透過型電子顕微鏡像。コノドント化石の組織は2層性である。

a：外層（右）は大きい結晶の集合体であり、内層（左）はより小さな結晶の集合体である。x40,000.（横倉山層群）。b：アパタイト結晶の内部において、100の格子構造（矢印）が観察される。中心線（Central dark line）がない。x500,000.（Grassy Creek Formation産）

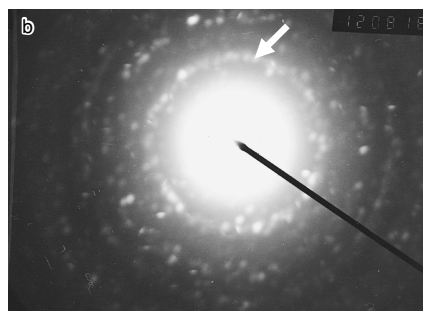
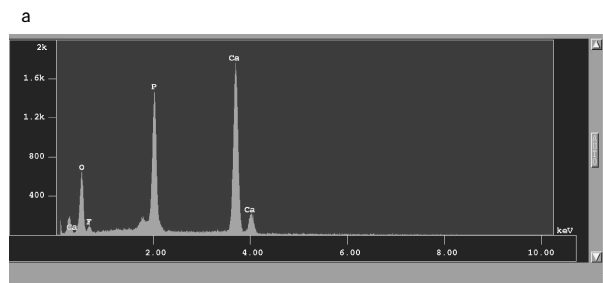


図8 a：SEM-EDS分析（横倉山層群産の外層）。Ca, PとFが検出された。b：電子線回折法。（002）の回折像が認められる（矢印、横倉山層群産の外層）。

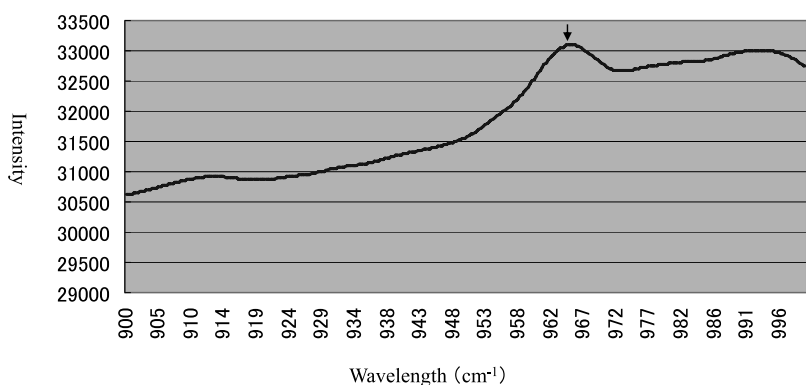


図9 ラマン分光法（外層）。965cm⁻¹のピークが認められる（矢印）。PO₄³⁻に由来する。

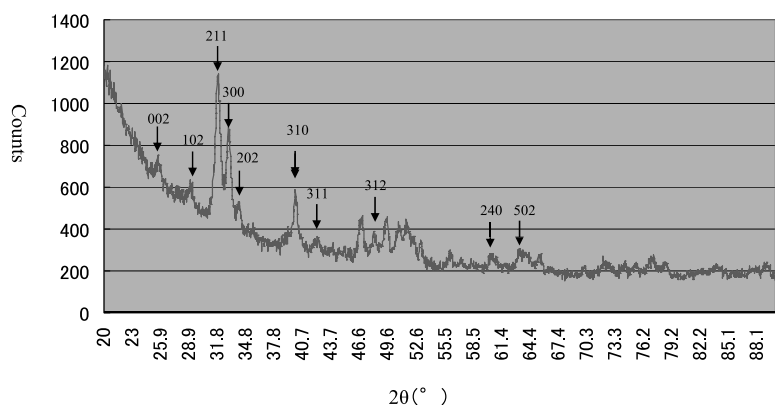


図10 X線回折パターン（Maple Mill Formation産）。矢印は fluorapatite (FAP) を示す。

Grassy Creek Formation 産において主要な元素は Ca, P であり, 微量元素として F が検出された。外層では Ca/P は平均で 1.62 であった。F は $3.572 \pm 0.268 \text{ Wt\%}$ であった。Ca や P では内層より密度分布が高い。内層では Ca/P は平均で 1.60 であった。F は $3.232 \pm 0.134 \text{ Wt\%}$ であった。

Contact Beechweed Limestone 産において, 主要な元素は Ca, P であり, 微量元素として F が検出された。外層では Ca/P は平均で 1.62 であった。F は $4.137 \pm 0.089 \text{ Wt\%}$ であった。Ca や P では内層より密度分布が高い。内層では Ca/P は平均で 1.61 であった。F は $3.815 \pm 0.180 \text{ Wt\%}$ であった。

横倉山層群産コノドン化石を構成する結晶は, 電子線回折法において, 外層に F-Ap の (002) の回折像が認められた (図 8 b)。その回折像はデバイ環を呈し, 結晶に明瞭な配向性がなかった。Grassy Creek Formation 産や Contact Beechweed Limestone 産の試料でも, 同様の所見が得られた。

ラマン分光法にて, 横倉山層群産の外層および内層を解析した。外層と内層とも不明瞭ながら, 965cm⁻¹

のラマンバンドが認められた (図 9)。標準試料として, F-Ap をラマン分光法にて分析すると, 964cm⁻¹ にラマンバンドが認められた。このラマンバンドは PO₄³⁻ に由来する。Hushpuckney Shale Formation 産においても, 965cm⁻¹ に近似するラマンバンドが認められた。

X 線回折法の回折パターンにおいて, Maple Mill Formation 産の内層の結晶は, F-Ap と同定された (図 10)。

4. 考察

光顕像や SEM の反射電子像の観察から, コノドン化石の硬組織は 2 層性であることが確認できた。また外層の硬組織は内層より電子密度が高く, EPMA 分析の面分析でも Ca や P の元素密集度が高かった (Mishima *et al.*, 2008b)。TEM の低倍率による観察でも, 硬組織は 2 層性であり, 結晶の大きさが異なっていた。外層は大きな結晶からなり, 内層はより小さな結晶からなっていた。TEM の高倍率による観察では, アパタイト結晶の格子構造 (100) が観察され

表1 各種の分析で得られた外層と内層の比較

	TEM 結晶の径 (nm)	SEM-EDS SEM-WDS 検出元素	ラマン分光装置 ラマンバンド：該当す る分子	電子線回折法 回折像	X線回折法
外層	長径80～320 短径40～80	Ca, P, F (Na, S) * Ca/P : 1.60～1.62 F : 3.803 ± 0.236～ 4.137 ± 0.089Wt%	965cm ⁻¹ : PO ₄ ³⁻ (F-Ap)	002 (F-Ap)	—
内層	40	Ca, P, F (Na, Si, S, Fe) * Ca/P : 1.60～1.96 F : 3.203 ± 0.646～ 5.456 ± 0.185Wt%	965cm ⁻¹ : PO ₄ ³⁻ (F-Ap)	—	F-Ap

* (括弧内の元素は一部の領域でのみ検出された)

—未測定

た。結晶には中心線が認められなかった。EPMAの分析結果ではCa, Pが主に検出され、微量元素としてFが検出された。外層ではCa/P比は1.60から1.62であり、Fの重量%は3.803 ± 0.236から4.137 ± 0.089であった。内層はCa/P比は1.60から1.96であり、Fの重量%は3.203 ± 0.646から5.456 ± 0.185であった。内層では、Fの含有量の変動が激しい。産地あるいは時代により、組成に差があることを意味するかもしれない。Fの含有量(重量%)はF-Ap結晶の含有量に近似していた。また外層にFが多く含有していた。Elliott (1994) がエナメル質や象牙質の微量元素には、F以外にCO₂, Na, K, Mg, Clが含有されていると報告しているが、コノドント化石で検出されたSi, S, Feは堆積後の続成作用で、地層から混入されたと推定される(三島ほか, 2005)。

ラマン分光法において、F-Ap結晶と近似する965 cm⁻¹にラマンバンドが認められた。このバンドはPO₄³⁻を示す。Elliott (1994) が報告しているハイドロキシアパタイト(OH-Ap)では、PO₄³⁻を示すバンドは962 cm⁻¹であり、標準試料として用いたF-Apの結果から考察して、コノドント化石の結晶はOH-Apではなく、F-Apに近似する結果となった。またX線回折法の結果でも、結晶はF-Apと判断される。

以上の所見から(表1)、コノドント化石の硬組織の結晶はハイドロキシアパタイト(Hydroxyapatite: OH-Ap)やバイオロジカルアパタイト(biological apatite: Bi-Ap)(Elliott, 1994; Kakei *et al.*, 2001, 2004)とは異なり、F-Ap結晶と同定される(寛・三島, 2007)。結晶はサメのエナメロイドと同様に、深層では外層と内層の境界面に平行あるいは斜めに走行していた(Shellis, 1981)。組織的には、エナメロイドと判断される。

内層では、石灰化球が認められ、内層の石灰化様式

は球状石灰化を示した。この所見はSmith *et al.* (1996) の報告でも記載されている。また、細管構造を呈し、細管は外層の境界付近で分枝していた。これらの組織の特徴は象牙質の特徴を示す(Smith *et al.* 1996; Smith and Sansom, 2000)。象牙質の記録は後期カンブリア紀(約5.1億年前)の化石からであり、3つの象牙質(脈管象牙質、骨様象牙質、真性象牙質)に区別されると報告されている(Smith and Sansom, 2000)。コノドント化石は、組織学や化学組成から総合的に考察すると、外層はエナメロイドであり、内層は真性象牙質や骨様象牙質からなると考察される。外層と内層の境界付近で、内層の最表層は、反射電子像で白色を呈して電子密度が高い領域が存在する。この領域は、外套象牙質に相当すると考察される。また、内部の中心に存在する円錐形の空洞は、歯髄腔と判断される。なお、象牙質を構成する結晶はOH-Apではなく、F-Apである。脊椎動物の歯の象牙質結晶はBi-Apであり(Elliott, 1994; 三島ほか, 2005; Mishima *et al.*, 2006)、この点がコノドントの象牙質の特異な点と思われる。生体内の結晶において、F-Apが先行して出現した(寛・三島, 2007)と考察される。なお、Smith and Sansom (1996) が報告している内層に存在するとされる軟骨組織は、これまでの研究では認められず、今後さらに検討していきたい。

謝辞

本研究は、高知大学海洋コア総合研究センター共同利用研究(採択番号06B004, 07A005, 07B020, 08A004, 08B004, 09A008, 09B008)のもとで(海洋研究開発機構の協力により)実施された。また、本研究は科研費(20592168)の助成を受けたものである。

引用文献

- Elliott, J.C. (1994) Biological apatite. *Structure and Chemistry of the Apatite and other Calcium Orthophosphates*, pp.259-295, Elsevier, Amsterdam.
- Kakei, M., Nakahara, H., Kumegawa, M., Mishima, H. and Kozawa, Y. (2001) High-resolution electron microscopy of the crystallites of fossil enamels obtained from various geological ages. *J. Dent. Res.* **80** 1560-1564.
- Kakei, M., Nakahara, H., Kumegawa, M., Mishima, H. and Kozawa, Y. (2004) Ultrastructural study on the lattice images of calcium phosphate minerals in fossil tooth. In: Kobayashi, I. and Ozawa, H. (eds) *Biomaterialization (BIOM2001) ; Formation, Diversity, Evolution and Application*, pp.364-368, Tokai Univ. Press, Kanagawa.
- 寛光夫・三島弘幸 (2007) 化石試料のアパタイト結晶に見られる微細構造, 亀井節夫先生傘寿記念論文集, 105-107.
- 三島弘幸・大野由香・中石祐子・野村加代 (2005) エネルギー分散型 X 線分析装置による現生及び化石の歯の象牙質の解析. 化石研究会会誌 **38**, 146-150.
- Mishima, H., Oono, Y., Nakaishi, Y., Waziki, S., and Nomura, K. (2006) Apatite crystal in dentin among monophyodont, diophyodont and polyphyodont teeth. *J. Oral Tissue Engin.* **4**, 43-50.
- Mishima, H., Kakei, M., Yasui, T., Miyamoto, S., Miake, Y., and Yanagisawa, T. (2008a) Apatite crystal in hard tissue of conodont fossils. *Front Mater. Sci. China* **2**, 179-181.
- Mishima, H., Kakei, M., Yasui, T. and Miake, Y. (2008b) Structure and chemical composition of apatite crystal in hard tissue of conodont fossil from Silurian to Carboniferous. *Calcified Tiss. Inter.* **82**, s74.
- ニール・シュービン, 垂水雄二訳 (2008) ヒトのなかの魚, 魚のなかのヒト—最新科学が明らかにする人体進化35億年の旅, 早川書房, 東京, 296頁.
- Pietzner, H., Vahl, J., Werner, H. and Ziegler, W. (1968) Zur chemischen Zusammensetzung und mikromorphologie der conodonten. *Palaeontographica Abt. A* **128**, 115-152.
- Sansom, I. J., Smith, M. P., Armstrong, H. A. and Smith, M. M. (1992) Presence of the earliest vertebrate hard tissue in conodonts. *Science* **256**, 1308-1311.
- Shellis, P. (1981) Comparative histology of dental tissues. In: Osborn, J. W. (ed) *Dental Anatomy and Embryology*, pp.158-165, Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- Smith, M. M., Sansom, I. J., and Smith, M. P. (1996) 'Teeth' before armour: The earliest vertebrate mineralized tissues. *Modern Geology* **20**, 303-319.
- Smith, M. M. and Coates, M. I. (1998) Evolutionary origins of the vertebrate dentition: phylogenetic patterns and developmental evolution. *Eur. J. Oral Sci.* **106**, 482-500.
- Smith, M. M. and Sansom, I. J. (2000) Evolutionary origins of dentine in the fossil record of early vertebrates: diversity, development and function. In: Teaford, M. F., Smith, M. M. and Ferguson, M. W. J. (eds) *Development, Function and Evolution of Teeth*, pp.65-81, Cambridge University Press, Cambridge.
- Smith, M. M. and Coates, M. I. (2000) Evolutionary origins of teeth and jaws: developmental models and phylogenetic patterns. In: Teaford, M. F., Smith, M. M. and Ferguson, M. W. J. (eds) *Development, Function and Evolution of Teeth*, pp.133-151, Cambridge University Press, Cambridge.