

# $\mu$ CT や各種分析機器を用いた化石種と 現生種における口腔領域の硬組織解析

三島弘幸\*

Hard tissue analysis of the oral area in fossil and  
living species using  $\mu$ CT and various analytical instruments

Hiroyuki Mishima\*

## Abstract

X-ray CT (CT: X-ray computed tomography) and X-ray  $\mu$ CT ( $\mu$ CT: X-ray micro-computed tomography) are characterized by the fact that the sample to be studied can be analyzed non-destructively without cutting or slicing. Here, the research results on the tissue structure of the jawbone of *Eusthenopteron foodi* (Devonian, Canadian), modern sperm whale teeth and Miocene horse molars, Pliocene marine mammal penile bones, human premolar cementum and jawbones and teeth of *Mosasaurus* sp. (Cretaceous, Morocco) are exhibited. Using various methods such as X-ray CT, X-ray  $\mu$ CT, micro-Raman spectroscopy, and FE-SEM, the detailed internal structure, the composition and constituent crystals of hard tissue can be analyzed in a more multidimensional manner.

Key words: X-ray computed tomography, X-ray micro-computed tomography, micro-Raman spectroscopy, FE-SEM, hard tissue

## 1. 緒言

従来古生物学や解剖学の組織構造解析に用いられてきた手法、例えば実体顕微鏡、光学顕微鏡、偏光顕微鏡、電子顕微鏡（走査電子顕微鏡 SEM や透過電子顕微鏡 TEM）などに加えて、新たな解析手法が近年になって報告されている（三島 2020）。例えば、X 線コンピュータトモグラフィー（CT: X-ray computed tomography）、X 線マイクロコンピュータトモグラフィー（ $\mu$ CT: X-ray micro-computed tomography）、顕微ラマン分光法、X 線分析顕微鏡などである（Mishima et al. 2021）。これら各種解析機器のうち、CT、 $\mu$ CT、顕微ラマン分光法などを用いて、化石種及び現生種の口腔領域の顎や歯などの硬組織を研究し

た研究成果を概説する。

CT や  $\mu$ CT は、研究対象となる化石試料を切断や薄片化せず非破壊で解析できる点が特徴である（Bhullar et al. 2019；林ほか 2005；Jenkins et al. 2017；高橋ほか 2016）。本稿において、初めにデボン紀 *Eusthenopteron foodi* の頭蓋骨化石の研究成果を概説する。次に新第三紀中新世ウマ科の臼歯化石を用いた研究例を概説する。併せて、鮮新世海生哺乳類の陰茎骨化石、現生のマッコウジラの歯やヒト小白歯セメント質の研究成果について概説する。最後に、白亜紀 *Mosasaurus* 類の顎骨と歯の化石の研究成果を概説する。

2022年4月4日受付, 2022年9月2日受理

\*鶴見大学歯学部歯科理工学 〒230-8501 横浜市鶴見区鶴見2-1-3

Department of Dental Engineering, Tsurumi University School of Dental Medicine, 2-1-3 Tsurumi, Tsurumi-ku, Yokohama 230-8501 Japan

E-mail: mishima-h@tsurumi-u.ac.jp

## 2. 研究の成果

### 1) *Eusthenopteron foodi* 化石の成果

*Eusthenopteron foodi* は、肉鱗類のエウステノプテロン科に属し、四肢動物の祖先に近縁とされ、水棲から陸上に進出する中間形の動物であるとされている (Shellis 1981). *Eusthenopteron foodi* の  $\mu$ CT の 3 次元復構画像・3D 像 (図 1) において、外骨格の皮骨に凹凸構造の皮骨結節が肉眼像で観察するより明瞭に表現され、以下のことが確認できた (Mishima et al. 2017; 千葉・三島 2018). 上顎骨と歯骨には小さな歯が存在している. 歯は円錐歯であるが、顎骨中の歯の基部では、迷路状構造の緻密象牙質が存在する. 顎骨に浅い歯槽が観察される. 本研究で用いた  $\mu$ CT の空間分解能では、歯と歯槽骨の間の構造は不鮮明で歯足骨のような構造は確認できなかった. SEM (Scanning electron microscopy; 走査電子顕微鏡) 解析では象牙質から歯槽骨へは漸移的に移行していた (Mishima et al. 2017). 歯足骨あるいは石灰化した歯根膜の存在は確認できなかった (図 2). 今後この点についてはさらに検討していきたい. 歯の最表面には、エナメルイドがあり、その下層に象牙質が存在していた. X 線回折法や透過型電子顕微鏡の解析から、

エナメルイドの結晶は fluorapatite (FAP) と同定された (Mishima et al. 2017). 顕微ラマン分光法によってもエナメルイドの結晶は FAP であることが確

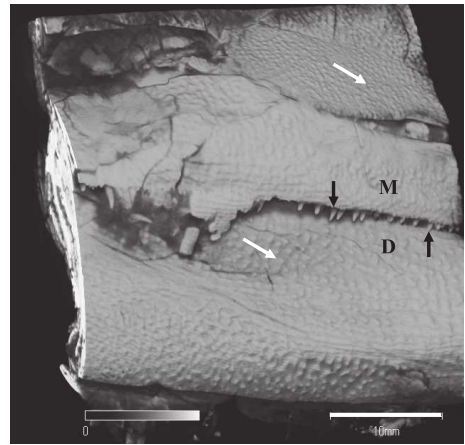


図 1. *Eusthenopteron foodi* 化石の  $\mu$ CT による 3D 像. 皮骨に凹凸構造の皮骨結節 (白矢印) が観察される. 顎骨に歯が認められる (黒矢印). 頭部と肩帯には皮骨 (真皮組織に形成される骨) が表面を覆っている. M: 上顎骨 (上顎の歯が萌出している部位), D: 歯骨 (下顎の歯が萌出している部位). カナダ産. スケール: 10 mm.

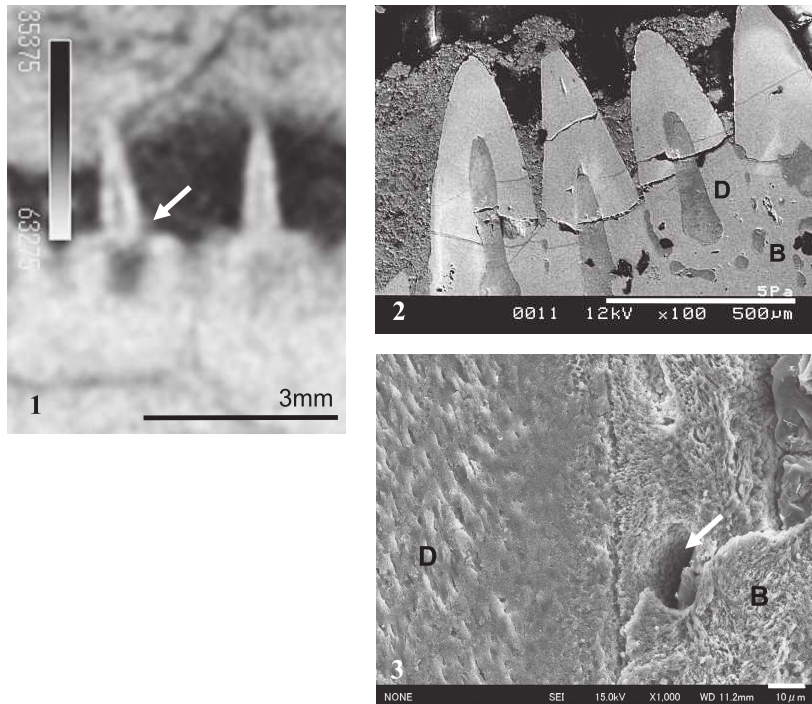


図 2. *Eusthenopteron foodi* 化石の  $\mu$ CT 像と SEM 像.

1:  $\mu$ CT 像. 歯骨に浅い歯槽が認められる. 矢印: 歯槽. スケール: 3 mm.

2: SEM 像, 反射電子像. 歯と歯骨とが骨結合している. 歯骨の下層は海綿質が観察される. D: 象牙質, B: 歯骨. スケール: 500  $\mu$ m.

3: 歯槽近心側面において歯根膜がなく, 歯と歯骨とが骨結合している. 血管が入るハバース管 (矢印) が観察される. D: 象牙質, B: 歯骨. スケール: 10  $\mu$ m.

認できた (図3). エナメロイドの下層の象牙質の結晶は type B ( $\text{PO}_4^{3-}$  に  $\text{CO}_3^{2-}$  が置換) の炭酸含有アパタイト結晶 (carbonate apatite:  $\text{CO}_3\text{Ap}$ , biological apatite) であった (Mishima et al. 2017). 最近の電界放出形走査電子顕微鏡 (Field Emission Scanning Electron Microscope: FE-SEM) では、低加速電圧の 1 kV で、高解像度の画像が得られ、試料の最表面の形態を観察することができるようになった (河野ほか 2006; 清水 2018). 低加速電圧の 1 kV で撮影したエナメロイドの FAp を図4に示す。結晶表面の微細な凹凸形態が認められた。この凹凸構造は元々の構造とは考えにくく、地層中での化石化作用によると推定した。結晶の形態は紡錘形や卵円形を呈していた。結晶の配向性として、一定の方向に規則的に配列している領域と不規則な配列の領域が混在していた。エナメロイドの組織中にエナメル細管 (Torii 1998) が観察された。エナメル細管はワニ類、単孔類、有袋類のエナメル質中に認められる細孔である。外表面近くのエナメル細管には内エナメル上皮細胞の突起が入り、エナメロイド

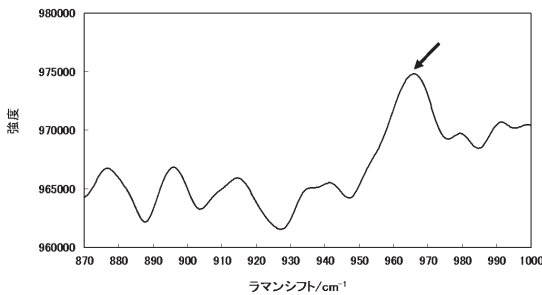


図3. エナメロイドのラマンスペクトル。リン酸基のラマンバンドからエナメロイドを同定。矢印は  $967\text{ cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ ) を示す。Mishima et al. (2017) より図を改変して、引用。

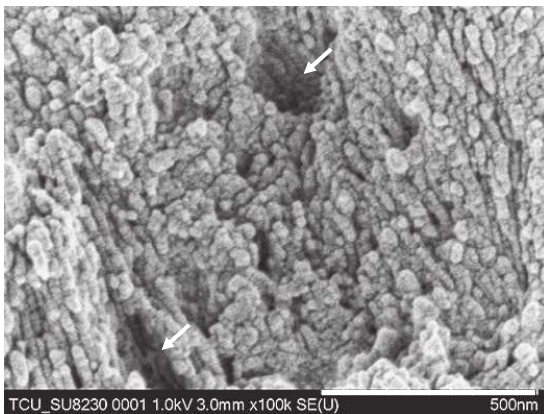


図4. エナメロイドの FAp の SEM 像。FAp 結晶は紡錘形や卵円形をしている。エナメル細管が観察される (矢印)。スケール: 500 nm.

と象牙質の境界近くのエナメル細管には象牙芽細胞の突起が入ると考えられる。本稿では *Eusthenopteron fodi* のエナメロイド中に認められる細孔を便宜上エナメル細管としている。

## 2) 化石と現生の歯や骨における成果

第三紀中新世のウマ科の臼歯化石では、咬合面において、Protocone 原錐 (舌側, 図5-1 矢印) が独立しており、咬合面の形態や  $\mu\text{CT}$  像から *Hipparion* 属の右 M1 または M2 と判断した (図5)。 $\mu\text{CT}$  を使用することにより臼歯の内部において Protocone 原錐 (舌側) が独立している状態が認められ、右 M1 または M2 と同定できた。同様に現生のマッコウクジラの歯、鮮新世海生哺乳類の陰茎骨化石などの種の同定、そして歯や骨の部位の同定に CT や  $\mu\text{CT}$  を取り入れる有効性が確認できた (三島 2020)。

また、解析ソフト (TRI/3D-BON, ラトック社製) を使用することにより異なる組織の組織無機質密度 (TMD: Tissue mineral density) の密度計算ができ、TMD の定量が可能になった。その例として、ヒト上顎小白歯のセメント質の事例を述べる。セメント質ではその硬度に変異があり、硬度が高いセメント質と硬度が小さく柔らかいセメント質があることが知られている (Yamaguchi et al. 2016)。硬さが異なるセメント質の試料を  $\mu\text{CT}$  で得たデータから TMD 値を求めて、TMD 画像での硬さの違いをカラー化して表現できることが可能になった (図6) (千葉・三島 2018; 三島 2020; Yamaguchi and Mishima 2021)。化石試料において非破壊検査の  $\mu\text{CT}$  による TMD 値の解析を用いることにより軟骨、骨、エナメル質、象牙質、セメント質の識別が可能になると思われる。

さらに天然鉱物のアパタイト結晶と現生の歯及び骨を構成する生体アパタイト結晶について、顕微ラマン分光法を用いることにより、天然鉱物のアパタイト結晶と生体アパタイト結晶の違いが明瞭になった。前者の結晶は FAp であり、後者の結晶は  $\text{CO}_3\text{Ap}$  (type B) であった (Kobayashi 1992; Mishima et al. 2018)。

## 3) 白亜紀 *Mosasaurus* 類化石の成果

*Mosasaurus* 類化石の顎骨の研磨標本の顕微鏡観察、SEM 観察及び  $\mu\text{CT}$  解析結果、さらに先行研究 (Caldwell 2007; Bertin et al. 2018; Liu et al. 2016) などの報告例から、白亜紀 *Mosasaurus* 類化石に原始的な歯槽 (sub-theodont) を持つことが確認できた。顎骨は厚いセメント質と骨性結合していた。顎骨試料や  $\mu\text{CT}$  像 (図7) から判断して、歯が顎骨の中で発生して、その後歯が成長し、顎骨の舌側方向に斜めに萌出していくことが判明した。このような歯の萌出機

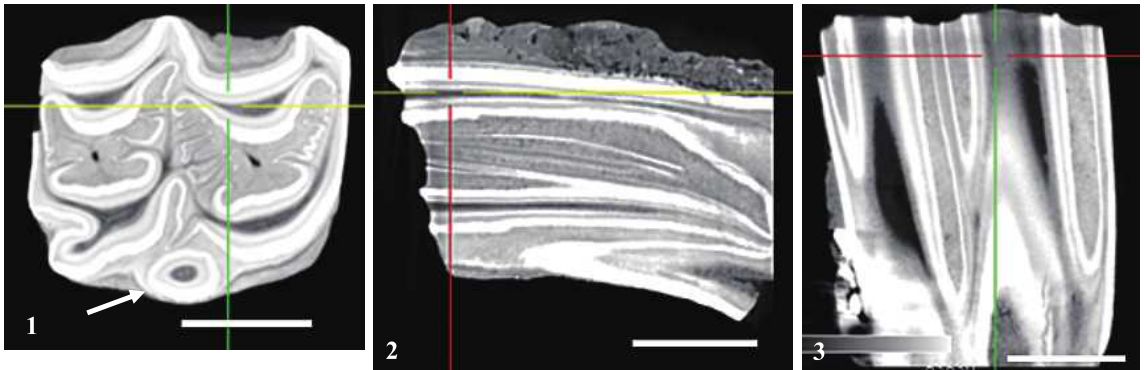


図5. *Hipparion* 属の臼歯化石のμCT像。1：咬合面近くの横断像，2：頬舌断像，3：近遠心像。1においてProtocone原錐（舌側）が独立している（矢印）。*Hipparion* 属の右M1またはM2と同定した。中国産。スケール：10 mm

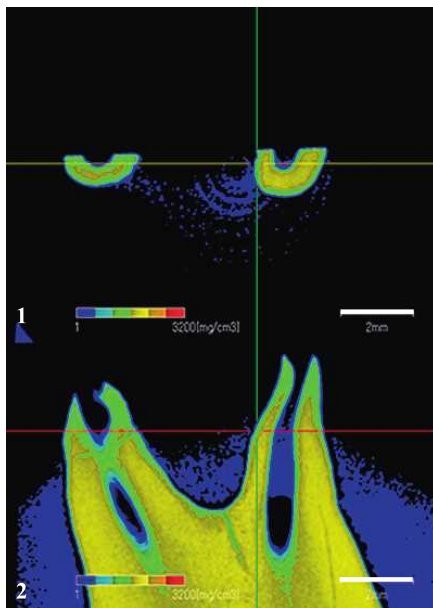


図6. μCT像による硬度が小さいセメント質のTMD像。頬舌方向に半切した上顎小白歯において、セメント質や象牙質の硬さの違いをカラー化して表現している。硬度が小さい領域（緑色）が広範囲である。1：歯根部の横断像（2の赤線の歯根横断面）。2：歯根部の縦断像（1の黄色線の頬舌断）。スケール：2 mm。Yamaguchi and Mishima (2021) より図を改変して、引用。

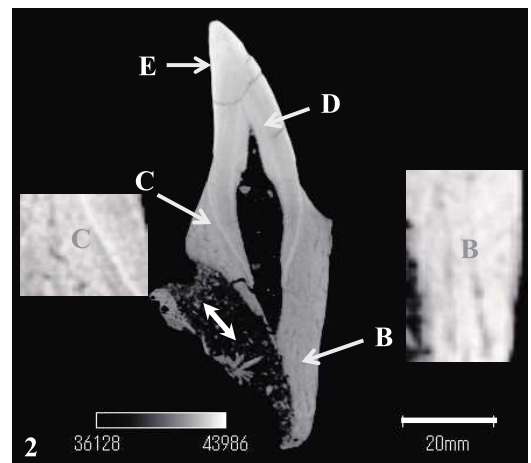
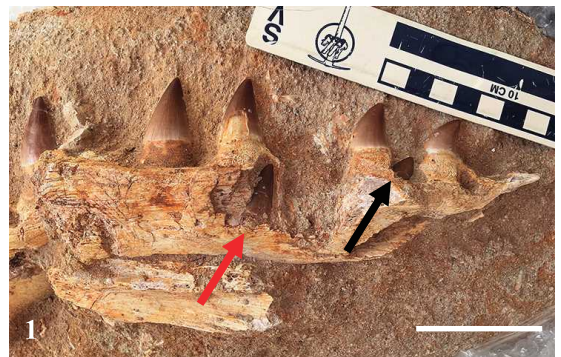


図7. モササウルス類の顎骨化石。

- 1：モササウルス科 *Prognathodon* sp. の顎骨において、後継歯（赤矢印）が存在する。歯の間に斜めに萌出する。黒矢印：後継歯が萌出し始めている。舌側面。谷本正浩会員提供。スケール：5 cm。
- 2：モササウルス亜科 Mosasaurinae 顎骨のX線μCT像。舌側（左側）に萌出し始めた後継歯が抜け落ちた後の歯槽（両方向矢印）が認められる。歯は骨と骨性結合している。左挿入図：セメント質の拡大，右挿入図は顎骨の拡大。縦断面。モロッコ産。E：エナメル質，D：象牙質，C：セメント質，B：顎骨。スケール：20 mm。

構はヘビ類の歯の萌出機構と異なり、オオトカゲ類の萌出機構に類似する (Bertin et al. 2018; Liu et al. 2016)。また、象牙質には周期の異なる成長線が確認された (図 8)。 *Mosasaurus* 類の象牙質の成長線の間隔は Gren and Lindgren (2013) の報告によると、日周期間隔で  $6\text{--}34\ \mu\text{m}$  とされている。今回観察された成長線は報告された周期間隔から推定して、周期間隔の狭い成長線の間隔は  $210\text{--}320\ \mu\text{m}$  であり、月齢周期と推定した。それより間隔が広い成長線の間隔は  $940\text{--}2400\ \mu\text{m}$  であり、年周期の成長線と推定した。日周期の成長線は今回用いた  $\mu\text{CT}$  では分解能の限界もあり、確認できなかった。歯を切断せず、 $\mu\text{CT}$  解析をすることにより、年齢査定ができる可能性が示唆された。また、成長線の周期は哺乳類と異なり規則的ではなく、 *Mosasaurus* 類の生体リズム、特に Ca 代謝リズムが不規則であることが推定される。歯の組織構造解析から、古生物の生理的機能の解析が可能になると思われる。

### 3. まとめ

CT,  $\mu\text{CT}$ , 顕微ラマン分光法など各種分析装置や FE-SEM の高分解能 SEM を用いた多方面の手法からの研究は、古生物や現生物の硬組織の内部構造の構造解析や構成する結晶の同定に有効であった。また、動物種の同定、あるいは骨の部位や歯種においても、より詳細な解析結果が得られた。今後 CT や  $\mu\text{CT}$  の手法は古生物学の組織学的研究において、顕微鏡など

の二次元的構造解析と併用して三次元的構造解析として広く用いられると思われる。

### 謝辞

*Eusthenopteron foodi* の化石については、寛光夫会員に助言と援助いただいた。モササウルス類化石においては、谷本正浩会員 (きしわだ自然資料館・大阪市立自然史博物館) に助言と援助をいただいた。ウマ臼歯化石の同定に関しては、仲谷英夫会員 (鹿児島大学) に助言をいただいた。現生マッコウクジラの歯や鰭脚類の陰茎骨化石の同定に関しては、小寺稜会員 (鶴見大学歯学部) に援助いただいた。また、 $\mu\text{CT}$  の使用にあたり、千葉敏江氏 (鶴見大学) に援助していただいた。これらの方々に深謝いたします。

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 (18A009, 18B008; 19A003, 19B002; 20A009, 20B008) のもとで (海洋研究開発機構の協力により) 実施された。なお、本研究は、東京都市大学ナノ科学技術学際研究センターとの共同研究である。

### 文献

- Bertin TJC, Thivichon-Prince B, LeBlanc ARH, Caldwell MW, Viriot L (2018) Current Perspectives on Tooth Implantation, attachment, and replacement in Amniota. *Frontiers in Physiology* 9, 1-20, doi: 10.3389/fphys.2018.01630
- Bhullar B-AS, Manafzadeh AR, Miyamae JA, Hoffman

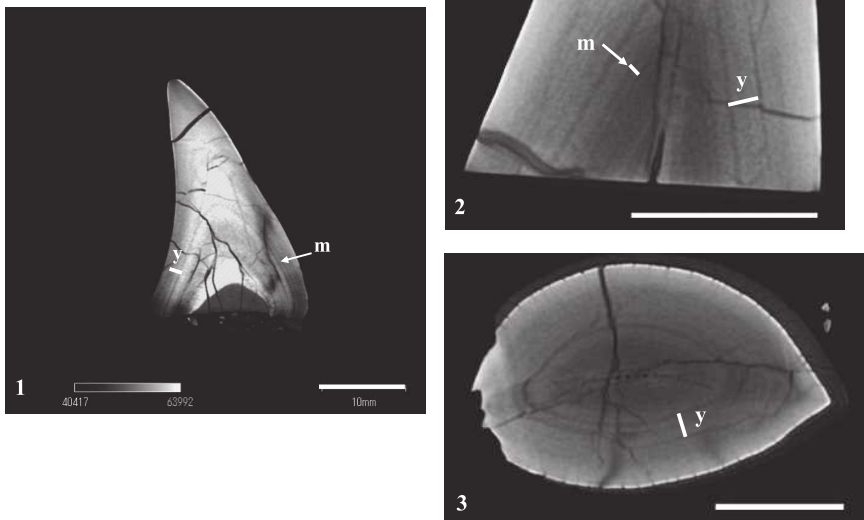


図 8. モササウルス亜科 Masasaurinae の歯化石の  $\mu\text{CT}$  像。成長線が歯の象牙質の内部に観察される。y: 年周期, m: 月齢周期。モロッコ産。1: 縦断像, スケール: 10 mm, 2: 縦断像, スケール: 5 mm, 3: 横断像, スケール: 5 mm。

- EA, Brainerd EL (2019) Rolling of the law is essential for mammalian chewing and triosphenic molar function. *Nature* 566, 528-532
- Caldwell MW (2007) Ontogeny, anatomy and attachment of the dentition in mosasaurs (Mosasauridae: Squamata). *Zoological Journal of the Linnean Society* 149, 687-700
- 千葉敏江・三島弘幸 (2018) X線マイクロCTによるイメージング技術の新展開. *細胞* 50, 710-712
- Gren JA, Lindgren J (2013) Dental histology of Mosasaurus and marine Crocodylian from the lower Campanian of southern Sweden. 4th Triennial International Mosasaur Meeting abstract booklet, 18
- Liu M, Reed DA, Cecchini GM, Lu X, Ganjawalla K, Gonzales CS, Monahan R, Luan X, Diekwisch TGH (2016) Varanoid tooth eruption and implantation modes in a late Cretaceous Mosasaurus. *Frontier in Physiology*. 7 1-9, doi: 10.3389/fphys.2016.00145
- 林 昭次・竹村貴人・遠藤邦彦・真鍋 真 (2005) 骨化石観察におけるX線CTの有用性—恐竜 *Stegosaurus* の皮膚装甲の内部構造を例として—。地質ニュース610, 45-49
- Jenkins KM, Jones MEH, Zikmund T, Boyde A, Daza JD (2017) A review of tooth implantation among Rhynchocephalians (Lepidosauria). *Journal of Herpetology* 51, 300-306
- Kobayashi T (1992) Apatite from Japan. *Tokyo Dental College Memoirs on Liberal Arts and Sciences* 8, 22-3.
- 河野崇史, 名越正泰, 佐藤 馨 (2006) 極低加速走査電子顕微鏡 (SEM) による銅板表層の微細構造観察技術. *JFE 技報* 13, 5-8
- Mishima H, Kakei M, Sasagawa I, Miake Y (2017) Nature of apatite crystals in the tooth of *Eusthenopteron* from Devonian. *Journal of Hard Tissue Biology* 26, 399-404
- Mishima H, Miake Y, Matsumoto Y, Hayakawa T (2018) Comparative examination of natural apatite crystal and biological apatite crystal. *Journal of Oral Tissue Engineering* 16, 65-73
- 三島弘幸 (2020) X線CTやX線 $\mu$ CTを活用した三次元構造解析. *地球科学* 74, 211-214
- Mishima H, Chiba T, Miake Y (2021) Analysis of the origin of cementum based on marine reptile *Mosasaurus* fossil. *Journal of Oral Bioscience Supplement* 2021, 302
- 高橋啓一・島口 天・馬場理香・北川博道 (2016) X線CT装置を活用した青森県陸奥湾から産出した長鼻類化石の再検討. *化石研究会会誌* 49, 87-91
- 清水健一 (2018) 低加速・超高分解能FE-SEMによるAl-Li-Cu合金表面に生成されるポーラス型アルミニウムアノード酸化皮膜の観察. *表面技術* 69, 52-55
- Shellis P (1981) Comparative histology of dental tissues. In: *Dental Anatomy and Embryology*, ed by Osborn J W, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 58-165
- Torii S (1998) Origin of enamel prisms and Hunter-Schreger bands in Reptilian enamel. *Connective Tissue Research* 38, 45-51
- Yamaguchi M, Yao-Umezawa E, Tanimoto Y, Shimizu M, Kikuta J, Hikida T, Takahashi-Hikida M, Horihata S, Suzuki K, Kasai K (2016) Individual variations in the hardness and elastic modulus of the human cementum. *Journal of Hard Tissue Biology* 25, 345-350
- Yamaguchi M, Mishima H (2021) Hardness variations and chemical compositional changes in human cementum. *Journal of Oral Tissue Engineering* 19, 1-9