[特集・講演録]

# 魚類の歯の形成における細胞による結晶形成の制御

# 笹川一郎\*

# Cellular regulation for crystal formation during odontogenesis in fish

### SASAGAWA, Ichiro\*

#### 要旨

魚類を例に、歯の結晶形成様式とそこで細胞が果たす役割について検討した。サメ・エイ類では、最 初に象牙芽細胞由来のチューブ状小胞の中でエナメロイドの結晶が形成される。さらに小胞中で結晶成 長が起こり、周囲にあるコラーゲン線維に添う結晶集積は見られない、後半の結晶成長には、主に歯胚 上皮細胞が関与する.一方,硬骨魚類のエナメロイド形成では、象牙芽細胞由来の基質小胞が多数出現 し、基質小胞で結晶様構造の形成が起こる.基質小胞に由来すると思われる高電子密度の線維状構造が 出現することもある、次いで、プロテオグリカンと考えられる物質が存在する部位で、コラーゲン線維 に添う結晶沈着が主要な石灰化として進行する。後半は歯胚上皮細胞により、有機基質は分解・脱却さ れ、結晶成長が促される、消失したコラーゲン線維の配列は結晶配列として維持される、細胞に由来す る小胞構造がエナメロイドの主たる結晶形成を担うのは、サメ・エイ類のチューブ状小胞の段階と考え られる。硬骨魚類では最初、結晶様構造は基質小胞、あるいは線維状構造に出現するが、主たる石灰化 はコラーゲン線維への結晶沈着であると考えられる. コラーゲン線維への結晶沈着はサメ・エイ類の象 牙質から見られ、長い歴史を持つ石灰化様式である。象牙芽細胞は、小胞構造やコラーゲン線維を介し て結晶形成を制御し、結晶配列にも関与する。一方、歯胚上皮細胞は、有機基質を分解・脱却し、物質 輸送を行うことで結晶周囲の微小環境を制御し、主に結晶成長に関与するといえる.この硬骨魚類の歯 胚上皮細胞の機能は哺乳類のエナメル質形成とよく似ているが、それぞれ独自に発達したと考えられ る.

キーワード: 結晶形成,細胞制御,魚類,歯,エナメロイド

# 1. はじめに

生鉱物形成には、細胞が直接・間接に関わっている のだが、その仕方は多様である. Simkiss and Wilbur (1989, Fig. 18.1) は次のように大別している. すな わち, a)細胞の外側に鉱物形成が起こる, b)細胞 内の小器官中で鉱物形成が起こり、外に排出される, c)細胞質の一部がちぎれて、鉱物を含んだ基質小胞 などの小胞となる, d)細胞群(上皮細胞層)が閉鎖 空間中に"内部媒質"作り、環境を制御して鉱物沈着 を起こす, e)細胞が複数癒合して中に空間 (syncytium)を作り、生鉱物を形成する. おそら く、これらの石灰化様式は、進化の過程で一斉に出現 したわけではなく、当然新旧があるのであろう.たと えば、脊椎動物の複雑な構造をもつ器官・組織形成で も、新旧の形成様式がモザイク状に組合わされている とされる.歯でも、構成する各硬組織には異なる進化 の歴史があるので、実態は寄木細工のようなものであ る.歯の生鉱物形成は典型的な生物制御起因の過程の 一つであり、細胞によりきっちり制御された結晶形 成、結晶成長が起こり、一定の構造を示す硬組織が形 成され、一見それらがみごとに組合わさって歯という 器官ができるように見える.しかし、歯の石灰化機構

# 2010年11月12日受付, 2010年12月10日受理

\* 〒951-8580 新潟市中央区浜浦町1-8 日本歯科大学新潟生命歯学部先端研究センター Advanced Research Centre, The Nippon Dental University, School of Life Dentistry at Niigata, 1-8 Hamaura-cho, Niigata 951-8580, Japan E-mail: ichsasgw@ngt.ndu.ac.jp にしても、細胞の関与の仕方は一様ではなく、いくつ かの様式があり、それぞれ進化の過程を反映している と考えられる.ここでは、このような視点で歯の石灰 化様式をとらえてみる.なお、文中では、原子やイオ ンが規則正しく配列する構造の無機物質を意味する時 は結晶を、さらに非晶質物質を含めやや広い意味の時 は鉱物を使用する.

魚類の歯の形成における石灰化は,脊椎動物の進化 における早い段階のそれを垣間見ることができる可能 性がある.魚類の石灰化様式を哺乳類などと比較する ことは,脊椎動物における石灰化機構の進化を探るう えで重要と思われる.本論では,魚類に特徴的なエナ メロイドと象牙質の石灰化を取り上げ,主に細胞が果 たす役割について概観する.

#### 2. 魚類の歯の形成過程

最初に魚の歯の形成の概要について,エナメロイド 形成を中心に述べる.

まず. エナメル質と比較してエナメロイドの特徴を とらえておく.エナメロイドは魚類の歯の表層にある のに対し、エナメル質は少数の魚類、大部分の両生 類・爬虫類・哺乳類の歯の表面を覆い、哺乳類で特に 厚く発達する。エナメル質は上皮由来の硬組織であ り、歯胚上皮細胞のエナメル芽細胞が主となって有機 基質を分泌し、石灰化を促進する。<br />
一方、エナメロイ ドは間葉と上皮の両方が関わる硬組織で、間葉由来の 象牙芽細胞が有機基質の形成と初期石灰化までもっぱ ら形成にたずさわり、その後は歯胚上皮細胞が引き継 いで高度な石灰化層とする. エナメル質は象牙質の外 側に形成されるのに対し、エナメロイドは象牙質の表 面から内側に形成され、象牙質の最表層に相当する. 魚類の歯のエナメロイド形成にもかなり多様性があ り、単純ではないが、以下はほぼ共通する特徴であ る.

#### 1) エナメロイド基質形成期

エナメロイド基質は歯の形成の最初に,エナメル器 の上皮細胞と歯乳頭細胞の境から歯乳頭側に作られ る.エナメロイドは,歯の形成全体を通して,最初に 結晶が出現する場所となる.頭部神経堤細胞に由来す る外胚葉性間葉組織から分化した象牙芽細胞が,その 有機基質を形成し,結晶の核形成にも直接関与すると 考えられている.

## 2) エナメロイド石灰化期・象牙質形成初期

エナメロイド基質が形成されると,引き続き歯乳頭 側に象牙質基質が形成される.硬骨魚類では,尖頭側 のエナメロイド象牙質境付近で明瞭な結晶の集積が起 こり,石灰化はエナメロイド表面側と象牙質の歯乳頭 側へそれぞれ進行する.

#### 3) エナメロイド成熟期・象牙質形成期

その後,結晶の集積がエナメロイド表面に達する と、今度は上皮側のエナメル器細胞の関与により、有 機基質の分解と脱却、CaやPの流入によって結晶成 長が起こり、最終的に結晶が大部分を占め、哺乳類の エナメル質に類似したエナメロイドが形成される.こ の第3の時期は哺乳類のエナメル質成熟期とよく似て いる.一方、象牙質は象牙芽細胞によって根側に添加 されていく.

なお,これらの詳細は文献(笹川,1993;1996, Sasagawa, 1988;1989;1995;1997a, Sasagawa and Akai, 1992;1999など)を参照していただきた い.

#### 3. 魚類の歯での結晶形成の様式

一般に,魚類のエナメロイドと象牙質の形成では, 次の3種類の結晶形成様式が順次出現する.1)細胞 から分離した小胞の中での結晶形成,2)コラーゲン 線維に富む有機基質中での結晶形成と結晶成長, 3)上皮細胞の制御による結晶成長,の順である.

#### 1)細胞から分離した小胞の中に結晶が形成される

細胞質の一部がちぎれ,結晶あるいは結晶様構造を 含んだ小胞となる様式である.エナメロイド基質形成 期と,一部は象牙質形成期にも見られる.サメ・エイ 類と硬骨魚類では異なるので,分けて以下に記述す る.

(1) サメ・エイ類

エナメロイド基質には、単位膜に囲まれたチューブ 状の小胞が多数存在する.このチューブ状小胞は、象 牙芽細胞の突起と連続することから、象牙芽細胞に由 来する.チューブ状小胞の中でエナメロイドの結晶形 成が起こる(図1-A, B).明瞭な六角柱を示す結晶 でも、まだ周囲に単位膜が見られるので、結晶はこの 小胞中で成長すると考えられる.おそらく、結晶形成 は象牙芽細胞が直接制御していると思われる.小胞中 の結晶の大きさには差があるので、形成は一斉ではな く、次々と始まるのであろう.また、結晶形成はエナ メロイド全層で点々と起こり、特に集中する特定の場 所はないが、全体としての結晶集積は尖頭側が歯頸部 より先行する.

サメの成熟エナメロイドでは、高濃度(3.0~ 3.5%)のフッ素が検出される(須賀ら、1978).エナ メロイド結晶形成の初期から既に高濃度(2.5%以 上)になり、結晶はフッ素化カーボネイトアパタイト (fluoridated carbonate-apatite)とされる(Miake *et al.*, 1991).チューブ状小胞中で結晶が形成され、成 長するので、フッ素は象牙芽細胞から供給される可能 性が高い.



図1.サメ・エイ類エナメロイドでのチューブ状小胞内で起こる結晶形成(A・B)と、象牙質での基質小胞と結晶様構造(C・D・E).A、チューブ状小胞と、その内部の結晶の前駆体と思われる高電子密度物質(矢印,Sasagawa,2002b).B、長い結晶(大矢印)とチューブ状小胞(小矢印)、コラーゲン線維(縞のある線維).結晶の周囲には膜構造がある(右上拡大,矢印).A・Bはホシザメ,非脱灰、ウランと鉛の二重染色(U-Pb)、縮尺50nm.C・D、象牙前質中の基質小胞(小さい円形構造)と象牙芽細胞の突起(大型の方、矢印).E、コラーゲン線維に沿う結晶形成の開始部位.基質小胞の崩壊(左上拡大,矢印).C・D・Eはアカエイ,非脱灰,U-Pb、縮尺100nm.

チューブ状小胞の周囲にコラーゲン線維は存在する が、量は少ない.高電子密度で約17nm 周期の縞をも つ太い線維と、約55nm の周期の縞を持つ線維の2種 類が認められる.硬骨魚類や哺乳類のコラーゲン線維 とは、形態がやや異なる.サメ・エイ類のエナメロイ ドでは、小胞中で結晶が大きくなるので、コラーゲン 線維に添う結晶沈着は見られない.しかし、結晶の長 軸が線維の走向に揃うように見える現象があり、これ はコラーゲン線維とチューブ状小胞の伸長方向、すな わち象牙芽細胞によるこれらの配列の方向が一致して いることによると思われる(Sasagawa and Akai、1992).

一方,象牙前質は密なコラーゲン線維で構成され, 基質小胞と象牙芽細胞の突起侵入が認められる

(Sasagawa, 1989). 断片的なチューブ状小胞と17 nm 周期縞の太い線維は,エナメロイドに近い部分に 少数認められる程度で,象牙質基質には見られない. 象牙質では,コラーゲン線維に沿う結晶集積が主な石 灰化様式とされるが (Garant, 1970),部分的には基 質小胞での結晶様構造の形成も関与していると考えら れる.アカエイでは,象牙質形成中(すでに石灰化が 進んでいる段階)の根側の象牙前質には多数の基質小 胞が存在し、中に結晶様構造をもつ基質小胞も見られ る(図1-C, D, E).しかし、歯冠側の象牙前質で は、基質小胞はほとんど見られない(Sasagawa, 1994).サメ・エイ類の象牙質形成は、哺乳類などの 象牙質形成と一見よく似ているが、その詳細について は実はあまりわかっていない.現生の脊椎動物の中で も、サメ・エイ類では基本的な象牙質形成が見られる 可能性が高く、今後の研究が期待される.

#### (2) 硬骨魚類の条鰭類

硬骨魚類の歯の発生では、多数の基質小胞の出現が 以前から知られている(メダカ Yamada and Ozawa, 1978;マダイの稚魚 Sasaki *et al.*, 1982). 哺乳類な どにくらべ、硬骨魚類の基質小胞は形態と大きさが均 質で、数が多いのが特徴である.特に、形成初期のエ ナメロイドの有機基質中には、多数の基質小胞が見ら れ、豊富なコラーゲン線維と共存している(図2-A、B). テラピアでは、基質小胞は象牙芽細胞からの 発芽で生じている.

テラピア・キュウセンベラ・コイなどの真骨類で は、エナメロイド基質中に結晶様構造を含む基質小胞 は多数存在するが、その多くで基質小胞を起点にした 石灰化球形成は起こらない.エナメロイド象牙質境か らのコラーゲン性石灰化が進行すると、その中に埋没 する.おそらく、エナメロイド中には石灰化の進行を 阻害する機構があり、最初に結晶沈着が進行するエナ メロイド象牙質境では、それが取り除かれるか、ある いは結晶沈着に必要な物質が添加されるなどの仕組み が考えられるが、実態はまだ不明である(Sasagawa, 1988;1995).

シロザケ・ガー・ポリプテルスのエナメロイド基質 では、基質小胞と線維状構造が出現する.線維状構造 は基質小胞の崩壊産物に由来すると考えられている (図2-C, D).この場合、基質小胞中に結晶様構造 は見られず、線維状構造の上に結晶様構造が出現する (Sasagawa and Igarashi, 1985; Sasagawa and

Ishiyama, 2003).

最初にエナメロイドの結晶の集団がまとまって沈着 するのは、エナメロイド象牙質境のややエナメロイド 側である.基質小胞や線維状構造が起点となり、石灰 化球の結晶集団が形成されるところもあるが、そのよ うな構造が無くても結晶集団は出現するように見え る.この結晶沈着はコラーゲン線維に添うものなの で,次の2)で述べる.

続く象牙質の形成でも基質小胞は引き続き出現し, 石灰化象牙質形成後の象牙前質にも見られる.した がって,基質小胞は,エナメロイド基質形成期の最初 から石灰化した象牙質形成期の象牙前質まで,歯の形 成のほぼ全期間に現れる.

線維状構造が出現するシロザケでも根側の象牙質形 成では線維状構造は見られず,基質小胞から直接石灰 化球が形成される.この時の象牙質は象牙芽細胞の突 起が入らない均質象牙質である(Sasagawa and Igarashi, 1985).しかし,キュウセンベラやコイの, 象牙芽細胞の突起(象牙線維)を入れる象牙細管が多 数存在する真正象牙質では様子が異なり,石灰化象牙 質形成後の象牙前質にある基質小胞は,結晶沈着の開 始点としては機能していないようである.この場合, 基質小胞が直接石灰化に関与するのは,エナメロイド 象牙質境で最初に結晶沈着が起こる時期のみである (Sasagawa, 1988).

基質小胞と線維状構造は最初に結晶様構造が出現す る場所となるが、その後の主たる結晶沈着の起点とな るわけではない.この点がサメ・エイ類のチューブ状 小胞とは大きく異なる.



図2.硬骨魚類エナメロイドでの基質小胞(A·B)と、線維状構造と結晶様構造(C·D).A·B、テラピアの基質小胞と針状結晶様構造(矢印)、非脱灰、U-Pb、縮尺100nm(A)、50nm(B).C·D、線維状構造(小矢印)と細長い結晶様構造(Dの大矢印)、ガー(C)とポリプテルス(D)、非脱灰、U-Pb、縮尺100nm.

2) コラーゲン線維に富む有機基質中での結晶形成と 結晶成長

コラーゲン線維を豊富に含む有機基質への結晶沈着 の様式であり,脊椎動物の象牙質や骨,鱗などでもっ とも普遍的に見られる.細胞群が閉鎖空間中に"内部 媒質"を作り,環境を制御して鉱物沈着を起こす型で あり,この場合,関与する細胞は象牙芽細胞である. 象牙質と硬骨魚類のエナメロイドの主要な石灰化様式 である.ただし,サメ・エイ類のエナメロイドでは見 られない.

#### (1) サメ・エイ類

サメ・エイ類のエナメロイドでは、有機基質中のコ ラーゲン線維が少なく、また既に結晶の成長が進んで いるので、コラーゲン線維に沿って針状結晶が沈着す る段階は無い.すなわち、エナメロイド石灰化期で は、既に明瞭な格子像が認められる六角柱状の結晶が 形成され、この結晶が密にエナメロイドを占めるよう になる.結晶取り巻く単位膜は消失し、周囲には少数 の断片化したコラーゲン線維とチューブ状小胞がある (Sasagawa, 1999; Sasagawa and Akai, 1999). 一方,象牙質形成ではコラーゲン線維に沿う結晶沈 着が進行する(図3-A).17nm 周期縞の線維と チューブ状小胞は象牙質基質ではほとんど見られない (アカエイ, Sasagawa, 1994).

#### (2) 硬骨魚類の条鰭類

硬骨魚類エナメロイドでは、コラーゲン線維に沿う 細長い結晶の沈着が起こる.エナメロイド象牙質境付 近を開始点とし、主たる石灰化としてエナメロイド表 面側と、象牙前質側へ進行する(図3-B, C).

エナメロイド基質には、コラーゲン線維の間を埋め るようにプロテオグリカン (Proteoglycan, PG)構 成物質が豊富に存在する (Kogaya, 1994). 微細構造 上も,結晶様構造が見られる場所には PG と考えられ る細網状構造が共存している. 石灰化した部位の有機 基質はトルイジンブルーに濃染するようになるので、 非石灰化部との区別が容易である. この染色性の変化 は、哺乳類の象牙質と同様, PG を主体とした有機基 質の性質変化を反映していると考えられる.

エナメロイドの結晶形成・集積の初期段階では,コ ラーゲン線維の間にある PG と考えられる細網状構造





図3. サメ・エイ類の象牙質でのコラーゲン線維に沿う結晶沈着(A)と、硬骨魚類エナメロイ ドでのコラーゲン線維に沿う結晶沈着(B·C). 黒く見えるのが結晶あるいは結晶様構 造. A、アカエイの象牙質石灰化前線近傍、非脱灰、U-Pb、縮尺100nm. B·C、テラピア のエナメロイド、非脱灰、U-Pb、縮尺50nm(B)、500nm(C).

が消失する. 微細な細長い針状結晶あるいはリボン状 結晶がコラーゲン線維に沿って沈着するが, 脱灰切片 ではコラーゲン線維の細線維が一部ほどけて間隙がひ ろがる. 結晶はコラーゲン線維と長軸を揃えて配列す る. エナメロイドでは, コラーゲン線維が束をなして 交錯しているので, 結晶の配列もそれを写し取る. エ ナメロイド表面までコラーゲン線維に沿って結晶集積 が進む (テラピア Sasagawa, 1997a). エナメロイ ドでは, コラーゲン線維に沿う石灰化の進行に伴い, 残存する基質小胞と線維状構造は石灰化部へ埋め込ま れていく.

同時に,象牙質でもコラーゲン線維に沿う石灰化が 進む.象牙前質では基質小胞が残存する.石灰化の様 子はエナメロイドと象牙質ではまったく異なる.すな わち,エナメロイド側ではコラーゲン線維に沿う石灰 化が不規則に進み,凹凸が著しい.一方,象牙質では 全体にほぼ一線となる(石灰化前線の形成).これは, コラーゲン線維の配列や細胞の関与の差によると考え られるが,詳細はまだ不明である.

# 3) 上皮細胞による結晶成長とその制御

上皮細胞層が閉鎖空間中の環境を制御し,その中で 鉱物成長が進む.主に関与する細胞は歯胚上皮細胞で あり,結晶集積がエナメロイド表層に達した後のエナ メロイド成熟期を中心に起こる.有機基質の大部分が 消失する,一方,結晶成長が進み,大型結晶が密につ まった硬組織が完成する.この段階では象牙質の形 成・石灰化が進行しているので,エナメロイドの成熟 には歯胚上皮細胞(エナメル器細胞)が主に関与する と考えられる.しかし,象牙芽細胞の突起は依然とし てエナメロイドに侵入しているので,この突起を介し た象牙芽細胞の関与もありうる.



図4. サメ・エイ類エナメロイドの成熟期内エナメル上皮細胞遠心端細胞膜の陥入(B 矢印)と大型のエ ナメロイド結晶(A)と、歯胚上皮細胞の組織化学的手法による結果(C, Sasagawa, 2002aから 改編). A、ホシザメの石灰化期後期エナメロイドの結晶、非脱灰、鉛単染色、縮尺100nm. B、アカ エイの成熟期内エナメル上皮細胞遠心端、脱灰、U-Pb、縮尺500nm. C、太い黒線・黒丸は酵素反 応のある部分、アカエイ、1;エナメロイド基質形成期、2;同石灰化期、3;同成熟期前 期、4;同成熟期後期、ACP;酸性ホスファターゼ、ALP;アルカリホスファターゼ、CaATP;カ ルシウムーATP アーゼ、BL;基底膜、C;血管、D;脱灰部分、E;エナメロイド、IDE;内エナメ ル上皮細胞、ODE;外エナメル上皮細胞、UD;非脱灰部分.

#### (1) サメ・エイ類

アカエイ・ネコザメの場合,前の段階で既に六角柱 状の結晶となっていたが,さらに太く大きな柱状結晶 に成長する(図4-A).有機基質は大部分が消失し, チューブ状小胞とコラーゲン線維の小断片がわずかに 残る程度である.ネコザメなどの厚いエナメロイドで は,一定の特有な構造,すなわち,結晶の疎な表層 と,表層と直交する同じく結晶が疎な隔壁によって仕 切られた結晶の密な柱状部分(palisades, Garant, 1970)ができる.

歯胚上皮細胞は内・外エナメル上皮細胞の二層から なる.内エナメル上皮細胞は背の高い円柱状で,その 細胞質にはゴルジ装置のほか,滑面小胞体・ミトコン ドリア・水解小体・小胞が多く見られる.遠心端には 細胞膜の陥入が見られることもあるが,硬骨魚類のよ うに恒常的かつ規則正しい形態を示すわけではない (図4-B).エナメロイド石灰化期までは厚い基底 膜が見られるが,成熟期では消失し,半接着斑様の構 造が連続するという特徴がある(図4-C).外エナ メル上皮細胞は,石灰化期では内エナメル上皮細胞と 同じ方向にやや細長くなり、ミトコンドリアを多く含

む.細胞間隙が外側に向い開く傾向がある.毛細血管 は外エナメル上皮細胞に接して存在するが,深くエナ メル器側に入り込むことはない(Sasagawa, 1999; Sasagawa and Akai, 1999).形態的所見は,石灰化 期から成熟期にかけて歯胚上皮細胞がエナメロイド有 機基質の吸収・分解・Ca などの物質輸送に関与して いる事を示唆する.しかし,後述の硬骨魚類ほど顕著 な形態変化ではない.

組織化学的検討も,形態学的所見から得られた仮説 を支持している. すなわち, アカエイでは, 酸性ホス ファターゼ (acid phosphatase, ACPase)の反応は 石灰化期から成熟期前半の内エナメル上皮細胞遠心側 細胞質の顆粒に強く現れ、これらがエナメロイド有機 基質の分解に関与する水解小体であることを示した. ネコザメでは、内エナメル上皮細胞に加えて、同時期 の外エナメル上皮細胞中の顆粒にも ACPase の反応 が見られる.物質輸送を示唆するアルカリホスファ ターゼ (alkaline phosphatase, ALPase)の反応はエ ナメロイド基質形成期の終わりから成熟期前半にかけ て、内エナメル上皮細胞の細胞膜に認められるが、そ のピークはエナメロイド石灰化期である.また, Ca 輸送を行うカルシウム-ATPアーゼ(calcium adenosine triphosphatase, Ca-ATPase)の反応は, エナメロイド石灰化期から成熟期の半ばすぎまで、内 エナメル上皮細胞の細胞膜に見られた (Sasagawa, 1997b; 2002a, 図4-C). 酵素活性の高い時期はエ ナメロイド結晶が成長する時期と重なる.

#### (2) 硬骨魚類の条鰭類

ガー・ポリプテル・テラピアのエナメロイド成熟期 では、大型の細長い柱状結晶が形成され、結晶の幅は 石灰化期の10倍以上に大きくなる(図5-D). 有機 基質は大部分消失し、コラーゲン線維は見られなくな る. わずかに残存する有機基質は、歯頸部側で断片状 の細線維構造(内層)と、チューブ状構造(外層)を とる. これらはコラーゲン線維などの分解物と考えら れる.

エナメロイド石灰化期から成熟期の歯胚上皮細胞の 微細構造は、かなり種差が認められるが、一般に、円 柱状の内エナメル上皮細胞は発達した小胞体とゴルジ 装置,多くの糸粒体と水解小体を持つようになる.特 に,石灰化期と成熟期では遠心端に刷子縁が発達する (図 5 - C. E). 真骨類のテラピアやキュウセンベラ では、内エナメル上皮層の外側に直接外エナメル上皮 細胞層が接し、さらにエナメル器のところどころに外 側から毛細血管が深く入り込んでくる(図5-B). 外エナメル上皮細胞の細胞質は迷路状の小管構造と糸 粒体に富むようになる. このような形態は、哺乳類の エナメル質成熟期に見られる、刷子縁を持つエナメル 芽細胞 (ruffle-ended ameloblast, RA) と乳頭層細胞 によく似ている (図5-A, B, C, テラピア, キュ ウセンベラ Sasagawa, 1997a). ガーとポリプテル スでも、内エナメル上皮細胞の形態変化は基本的にテ ラピアと同様である.しかし,毛細血管は接するもの の,エナメル器中に陥入することはない.また,内・ 外エナメル上皮間に星状網があり、ガーでは加えて中 間層細胞もある (図5-E). 以上より, 条鰭類でも 歯胚上皮細胞はこの時期、エナメロイドの有機基質の 分解と吸収、物質輸送を行っていることが示唆され る.

このような歯胚上皮細胞の形態学的な所見による推 定は組織化学的検討からも支持される. すなわち, ポ リプテルスとガーでは、内エナメル上皮細胞の細胞質 中の顆粒に出る ACPase の反応はエナメロイド石灰 化期から成熟期前半に強く,これらがエナメロイド有 機基質の分解に関与していることが推定される.物質 輸送を示唆する内エナメル上皮細胞の細胞膜に見られ る ALPase, K+依存性 p-ニトロフェニルホスファ ターゼ (K<sup>+</sup>-dependent, p-nitrophenvlphosphatase, K-NPPase, おそらく Na-K ATPase)の反応も石灰化 期をピークに、一部成熟期にかけて出現する. さら に、細胞を介したCa輸送に関与するCa-ATPaseの 反応は石灰化期から成熟期の半ば過ぎまで、内エナメ ル上皮細胞と、ガーでは加えて中間層細胞の細胞膜に 見られた (Sasagawa, 1998a; b; Sasagawa and Ishiyama, 2002; 2005a; 2005b, ⊠ 5 – E).



図5. 硬骨魚類エナメロイド成熟期での歯胚上皮細胞の形態と大型のエナメロイド結晶(A・B・C・D)と、 歯胚上皮細胞の組織化学的手法による結果(E, Sasagawa and Ishiyama, 2005a から改編). A,内 エナメル上皮細胞(IDE,縦断,弱拡大像),テラビア,脱灰,U-Pb,縮尺5µm. B,外エナメル上 皮細胞(ODE),上は毛細血管(C)と赤血球(矢印),下の暗調細胞は内エナメル上皮細胞 (IDE),キュウセンベラ,脱灰,U-Pb,縮尺5µm. C,内エナメル上皮細胞遠心端(Aの四角相当 部分の斜断,強拡大像)の刷子縁(矢印),テラピア,脱灰,U-Pb,縮尺5µm. D,成熟期エナメ ロイド表層の結晶,ガー,非脱灰,鉛単染色,縮尺100nm. E,太い黒線・黒丸は酵素反応のある部 分,ガー,3;エナメロイド成熟期,D;象牙質,NPP;pーニトロフェニルホスファターゼ,SI; 中間層,SR;星状網(エナメル髄),PD;象牙前質,他は図4-Cと同様.

総じて,魚類のエナメロイド形成では,歯胚上皮細 胞は形成後半に活発に活動し,1)エナメロイド有機 基質の分解と除去を行って,結晶が成長する空間を作 り,2)CaやPを供給することで結晶成長を促し, かつ制御しているものと考えられる.この様相は,哺 乳類のエナメル質成熟期のエナメル器細胞の機能によ く似ている.ただ,エナメル質有機基質は上皮細胞自 らが分泌したものであるのに対し,エナメロイド基質 は象牙芽細胞に由来するとされる.また,エナメロイ ド基質中での有機基質分解における歯胚上皮細胞の関 与の詳細はわかっていない.エナメル質と異なり,象 牙芽細胞の突起も存在するので,その影響も考慮しな くてはならない.

4.魚類の歯にみられる石灰化様式の歴史性について 以上に述べた魚類の歯の形成に見られる石灰化様式 の系統的(歴史的)な意味について考察してみたい. まず,細胞や組織など微細構造(ミクロ)の形質を扱 う場合でも、その生物のマクロの形態に基づく系統発 生の結果や議論を基礎に据えるべきである(渡部ほ か,1987)、という指摘は重要である.ここでは、現 生魚類の歯の発生(個体発生)の中で、特に石灰化に 関して現れる形態や機能を、従来の系統分類の成果を 考慮しながら、それらの系統上の新旧関係や相互関 係、あるいは分岐分類でいう極性を考察する.

1)細胞から分離した小胞が起こす結晶形成

細胞の一部が分離して小胞を作り,そこで結晶が形 成され,それが主たる石灰化となるのはサメ・エイ類 (板鰓類)の段階である.さらに,全頭類ギンザメの 歯でも似たような小胞中の結晶核が形成される.ギン ザメの歯板にはプレロミン (prelomin)というエナメ ロイドに似た高石灰化層がある.プレロミンの結晶 は,間葉系細胞に由来する単位膜で囲まれた tubular saccules の中で形成される (Ishiyama *et al.*, 1991). サメ・エイ類のチューブ状小胞での結晶形成過程と極 めてよく似ているが,形成される結晶はカーボネイト アパタイトではなく,ウイットロカイト (whitlockite) である.

これらは、象牙芽細胞などに由来する単位膜に囲ま れた小胞中での結晶形成という点で基質小胞と共通で はあるが、出現する結晶の種類や形態が異なるので、 同じものではない.おそらく、初期の脊椎動物の象牙 質外層では、間葉系細胞に由来する小胞中での多様な 結晶形成が行われており、その一部が現在ではサメ・ エイ類のエナメロイドのチューブ状小胞、ギンザメの プレロミンの tubular saccules、さらに基質小胞での 結晶(あるいは結晶様構造)形成であると考えられ る.

基質小胞は、<br />
コラーゲン線維を豊富に含む有機基質 を持つ象牙質や骨などの硬組織に広く存在し、サメ・ エイ類の象牙質形成から哺乳類の骨や象牙質の形成ま で見られるので、長い歴史を持つと思われる、硬骨魚 類の歯の発生では、基質小胞はエナメロイドから象牙 質の形成まで歯の形成全体を通して出現する.しか し、結晶沈着に関しては、前述のように、基質小胞は 最初の結晶形成に関与しているように見えるものの. 常に結晶集積・石灰化球形成の起点とは言えないよう である. すなわち、ガー・ポリプテルスでは基質小胞 中に結晶様構造は出現せず,石灰化への直接の関与が 疑われる. さらに、テラピアでもエナメロイド基質中 では、結晶様構造を持つ基質小胞が存在するが、その 多くがその後の主たる石灰化の出発点とはならない. また、コイ・キュウセンベラなどの象牙細管がある真 正象牙質の形成では、一旦石灰化象牙質が形成される と、 基質小胞は結晶集積点としては機能していないと 思われる.エナメロイドと真正象牙質の組み合わせを 持つ歯では、エナメロイド象牙質境で最初の結晶出現 の時だけ基質小胞が関与し、それ以後の主たる石灰化 には関与しないことになる.一方、シロザケなどの象 牙細管が見られない薄い均質象牙質では、基質小胞は 石灰化球を作り、石灰化に関与し続けると思われる所 見がある. 魚類の均質象牙質と真正象牙質では、基質 小胞の振る舞いが異なる可能性がある. 哺乳類の膜内 骨化と軟骨内骨化でも、似たような違いは無いか、検 討が必要と思われる. さらに、基質小胞性石灰化が引 き続くコラーゲン線維での結晶形成の引き金として必 **須か、という問題もまだ解明されていないので、比較** 解剖学の手法による探求も重要と考えられる.

哺乳類の外套象牙質の初期石灰化では基質小胞が出 現する.一方,石灰化開始後では基質小胞は見られ ず,添加的石灰化が起こる(須田ほか,2007).哺乳 類の象牙質では,基質小胞の出現は痕跡的と言っても よいだろう.

2) コラーゲン線維に沿う結晶形成と結晶成長

コラーゲン線維に沿う石灰化様式は、サメ・エイ類 の象牙質形成で既に認められるので、基質小胞と同様 に、古くから存在したと思われる.しかし、基質小胞 性石灰化とは異なり、現在でも脊椎動物の骨・鱗・歯 の象牙質・同セメント質に広く認められる、主たる石 灰化機構として存在する.ただし、コラーゲン線維に 沿う石灰化は、哺乳類と魚類の象牙質で同じように見 えるものの、まったく同じ機構なのかどうか、詳細は まだ不明である.魚類皮膚のコラーゲン線維の性質は 哺乳類と似ているとされるが、やや異なっているよう でもある (Kimura *et al.*, 1981).

一般に生鉱物形成においては、特定の有機基質(主

にタンパク質)が結晶核形成を行い,さらに,結晶成 長の制御に関与していることが特徴とされる(渡 部,1996).従来から,骨や象牙質形成でも,基質小 胞性の結晶形成を重視する見方に対し,コラーゲン線 維(I型)そのものによる結晶形成,さらには骨や象 牙質に特異なタンパク質(オステオカルシン・オステ オネクチン・オステオポンチン・骨シアロタンパク 質・象牙質リンタンパク質など)による結晶形成を重 視する見方があり,現在も研究が進んでいる.しか し,骨と象牙質のコラーゲン線維は他の組織・器官の ものと同じなのに,なぜこの部位にだけ石灰化が起こ るのか,骨の石灰化に必要な特異タンパク質は何か, についてはまだ決定打が無く,諸説がある.詳しくは 他の総説(須田ほか,2007など)を参照されたい.

最近では、哺乳類の骨形成の微細構造から、主要な 有機基質として I 型コラーゲン線維と PG の細網状構 造が認められ、非石灰化部位では Ca が PG の部位に、 P がコラーゲン線維の部位に密に分離局在し、結晶形 成を抑制するとされる.一方、石灰化球が形成された 部位では、ALPase 活性が現れ、PG が減少し小型化 して、Ca と P が共存するようになる.さらに、コ ラーゲン線維は隙間が開いて太くなり、結晶周囲には 骨の特異タンパク質が認められるとされる(Hoshi *et al.*, 1999;2001).このコラーゲン線維周囲の PG が 減少して結晶沈着が進む現象は、テラピアなどのエナ メロイド石灰化期にも共通して認められる.

# 3) 歯胚上皮細胞による結晶成長の促進と制御

象牙質や骨ではコラーゲン線維が結晶沈着後も残る のに対し、エナメロイドではコラーゲン線維に沿う石 灰化の過程を通過するが、その後コラーゲン線維や他 の有機基質の大部分が分解・消失し、結晶成長が促進 されるのが大きな特徴である.この有機基質の分解と 吸収,結晶の成長には主に歯胚上皮細胞が関与してい る. 魚類のエナメロイド石灰化期と成熟期では、内エ ナメル上皮細胞をはじめとする歯胚上皮細胞は、細胞 の形態変化や組織化学的特徴から、エナメロイド有機 基質の分解・脱却と Ca の輸送などを行い、結晶成長 を促し、高石灰化層形成に積極的に関与していると考 えられる.この様子は哺乳類のエナメル質形成の成熟 期によく似ている. さらに, 形態的な観察によると, 魚類・両生類・爬虫類のエナメル質形成でも、顕著と はいえないが、成熟期に相当する歯胚上皮細胞の形態 段階は認められる (Sasagawa et al., 2008). 有機基 質の脱却と結晶成長の促進は、エナメロイドとエナメ ル質に共通な歯胚上皮細胞の役割と理解され、サメ・ エイ類の歯の誕生から続く歴史的背景を持つと思われ る.

しかし、共通の基盤があるものの、歯胚上皮細胞に

よるこれらの機能が,脊椎動物全体を通じて同じ様に 現れているわけではない.哺乳類のエナメル質に匹敵 する大きな結晶と密度を示すのは魚類のエナメルイド であり,化石も含め両生類や爬虫類のエナメル質の結 晶の大きさはここに到達しない(Kawasaki and Fearnhead, 1983).おそらく,歯胚上皮細胞の成熟 期の機能は,魚類,なかでも硬骨魚類の条鰭類のエナ メロイド形成で特に発達したものと考えられる.すな わち,脊椎動物の中では,哺乳類エナメル質と条鰭類 エナメロイドで独自にそれぞれ発展したものと思われ る.したがって,これらは共有原始形質を元として類 似はするが,別な,それぞれに固有な派生形質と考え られる.

エナメロイドとエナメル質の関連については,すで に詳しく述べたので(笹川・石山,2007),ここでは 多く触れない.エナメル質は哺乳類の進化の中で大き く分化・発展した硬組織といえる.一方,サメ・エイ 類と硬骨魚類の条鰭類の歯ではエナメロイドが発達し た.少なくとも,エナメロイドを持つ条鰭類の歯は, エナメル質を持つ哺乳類の歯の祖先型ではない.エナ メル質とエナメロイドは,上皮と間葉というそれぞれ 由来が異なる相似の組織で,魚類の鰭と鯨類の鰭くら いの関係にあると思われる.

なお, エナメロイドのコラーゲン線維などの有機基 質が, 他と異なる性質を持つこと(Shimoda *et al.*, 1999)も分解・吸収が起こる原因のひとつであるが, こちらはまだ詳細は不明である.また,大型で密な結 晶からなる硬組織を作る機能は上皮細胞だけのものか と言うとそうでもない.前述のギンザメの歯板のプレ ロミン,さらに肺魚の岩様象牙質(petrodentine) は,共に上皮細胞が関与せずに,間葉系の細胞のみか ら形成されるエナメロイド様の高石灰化組織である点 が注目される(Ishiyama *et al.*, 1990;1991).象牙 芽細胞でも場合によっては似たような機能があるとい える.

近年は遺伝子を中心とする分子レベルでの系統解析 や機能解析が大きく進んでいるが,比較解剖学や比較 発生学などの形態学分野が解明しつくされたというわ けではない.特に顕微鏡を用いた微細構造段階では, まだまだ未知の部分が多く残されている.今後は分子 レベルとマクロ・ミクロの形態との関連が重要になる と思われるので,それらの研究が相まって発展するこ とが望まれる.電子顕微鏡による形態学は分子と高次 の形態との橋渡しが可能で,いまも重要な方法のひと つと言えるだろう.

# 引用文献

Garant, P. R. (1970) An electron microscopic study of

the crystal-matrix relationship in the teeth of the dogfish *Squalus acanthias* L. J. Ultrastruct. Res. **30**, 441-449.

- Hoshi, K., Kemmotsu, S., Takeuchi, Y., Amizuka, N. and Ozawa, H. (1999) The primary calcification in bones follows removal of decorin and fusion of collagen fibrils. J. Bone Miner. Res. 14, 273-280.
- Hoshi, K., Ejiri, S. and Ozawa, H.(2001) Localizational alterations of calcium, phosphorus and calcificationrelated organics such as proteoglycans and alkaline phosphatase during bone calcification. J. Bone Miner. Res. 16, 289-298.
- Ishiyama, M. and Teraki, Y. (1990) The fine structure and formation of hypermineralized petrodentine in the tooth plate of extant lungfish (*Lepidosiren paradoxa* and *Protopterus* sp.). Arch. Histol. Cytol. 53, 307-321.
- Ishiyama, M., Yoshie, S., Teraki, Y. and Cooper, E. W. T. (1991) Ultrastructure of pleromin a highly mineralized tissue comprising crystalline calcium phosphate known as whitlockite, in holocephalian tooth plates. In: Suga, S. and Nakahara, H. (eds) *Mechanisms and Phylogeny of Mineralization in Biological Systems*, pp.453-457, Springer, Tokyo.
- Kawasaki, K. and Fearnhead, R. W. (1983) Comparative histology of tooth enamel and enameloid. In : Suga, S. (ed) *Mechanisums of Tooth Enamel Formation*, pp.229-238, Quintessence, Tokyo.
- Kimura, S., Kamimura, T., Takema, Y. and Kubota, M. (1981) Lower vertebrate collagen. Evidence for type I -like collagen in the skin of lamprey and shark. *Biochim. Biophys. Acta* 669, 251-257.
- Kogaya, Y. (1994) Sulfated glycoconjugates in amelogenesis. Comparative histochemistry and evolution of ectoderm-derived hard tissues. *Prog. Histochem. Cytochem.* 29, 1-110.
- Miake, Y., Aoba, T., Moreno, E. C., Shimoda, S., Prostak, K. and Suga, S. (1991) Ultrastructural studies on crystal growth of enameloid minerals in elasmobranch and teleost fish. *Calcif. Tissue Int.* 48, 204-217.
- Sasagawa, I. (1988) The appearance of matrix vesicles and mineralization during tooth development in three teleost fishes with well-developed enameloid and orthodentine. *Archs. oral Biol.* **33**, 75-86.
- Sasagawa, I. (1989) The fine structure of initial mineralisation during tooth development in the gummy shark, *Mustelus manazo*, Elasmobranchia. J.

Anat. 164, 175-187.

- 笹川一郎(1993)板鰓類のエナメロイドの特徴. 化石 研会誌 26, 28-41.
- Sasagawa, I. (1994) The fine structure of the dentine matrix and mineralization during dentinogenesis in sting rays, elasmobranchs. *Bulletin de l'Institut Oceanographique, Monaco*, no special 14, 1, 167-174.
- Sasagawa, I. (1995) Fine structure of tooth germs during the formation of enameloid matrix in *Tilapia nilotica*, a teleost fish. *Archs. oral Biol*. 40, 801-814.
- 笹川一郎(1996)硬骨魚類条鰭類の歯のエナメロイド と上皮性エナメル質.和田浩爾・小林巌雄編著:海 洋生物の石灰化と硬組織,219-240頁,東海大学出版,東京.
- Sasagawa, I. (1997a) Fine structure of the cap enameloid and of the dental epithelial cells during enameloid mineralisation and early maturation stages in the tilapia, a teleost. J. Anat. 190, 589-600.
- Sasagawa, I. (1997b) Light microscopic localization of ACPase, ALPase and Ca-ATPase activities in the tooth germs of elasmobranchs. Arch. Comp. Biol. Tooth Enamel 5, 13-22.
- Sasagawa, I. (1998a) Activity of alkaline and acid phosphatases in dental epithelial cells and enameloid during odontogenesis in two teleost fish, Oreochromis niloticus and Tilapia buttikoferi. Eur. J. Oral Sci. 106, 513-518.
- Sasagawa, I. (1998b) Mechanisms of mineralization in the enameloid of elasmobranchs and teleosts. *Connect. Tissue Res.* **39**, 511-518.
- Sasagawa, I. (1999) Fine structure of dental epithelial cells and the enameloid during the enameloid formation stages in an elasmobranch, *Heterodontus japonicus*. Anat. Embryol. 200, 477-486.
- Sasagawa, I. (2002a) Fine structural and cytochemical observations of dental epithelial cells during the enameloid formation stages in red stingrays *Dasyatis akajei. J. Morphol.* **252**, 170-182.
- Sasagawa, I. (2002b) Mineralization patterns in elasmobranch fish. *Microsc. Res. Tech.* **59**, 396-407.
- Sasagawa, I. and Akai, J. (1992) The fine structure of the enameloid matrix and initial mineralization during tooth development in the sting rays, *Dasyatis akajei* and *Urolophus aurantiacus*. J. Electron Microsc. 41, 242-252.
- Sasagawa, I and Akai, J. (1999) Ultrastructural observations of dental epithelial cells and enameloid

during enameloid mineralization and maturation stages in stingrays, *Urolophus aurantiacus*, an elasmobranch. J. Electron Microsc. **48**, 455-463.

- Sasagawa, I. and Igarashi, A. (1985) Fine structure of initial calcification during odontogenesis in the dog salmon (*Oncorhynchus keta*, Teleostei). Jpn. J. Oral Biol. 27, 685-698.
- Sasagawa, I. and Ishiyama, M. (2002) Fine structure and Ca-ATPase activity of the stratum intermedium cells during odontogenesis in gars, *Lepisosteus*, Actinopterygii. *Connect. Tissue Res.* **43**, 505-508.
- Sasagawa, I. and Ishiyama, M. (2003) Fine structural observations of the initial mineralization during enameloid formation in gar-pikes, *Lepisosteus oculatus*, and polypterus, *Polypterus senegalus*, bony fish. In: Kobayashi, I. and Ozawa, H. (eds) *Biomineralization (BIOM 2001)*; formation, diversity, evolution and application. Proceedings of the 8<sup>th</sup> International Symposium on Biomineralizations, pp.381-385, Tokai Univ. Press, Kanagawa.
- Sasagawa, I. and Ishiyama, M. (2005a) Fine structural and cytochemical mapping of enamel organ during the enameloid formation stages in gars, *Lepisosteus oculatus*, Actinopterygii. *Archs. oral Biol*. 50, 373-391.
- Sasagawa, I. and Ishiyama, M. (2005b) Fine structural and cytochemical observations on the dental epithelial cells during cap enameloid formation stages in *Polypterus senegalus*, a bony fish (Actinopterygii). *Connect. Tissue Res.* **46**, 33-52.
- 笹川一郎・石山巳喜夫(2007)魚類のエナメル質とエ

ナメロイド. 化石研会誌 40, 6-14.

- Sasagawa, I., Ishiyama, M., Yokosuka, H. and Mikami M. (2008) Fine structure and development of the collar enamel in gars, *Lepisosteus oculatus*, Actinopterygii. *Frontiers of Materials Science in China* 2, 134-142.
- Sasaki, T., Kawahara, T., Tominaga, H., Nakagawa, H. and Higashi, S. (1982) Structure and distribution of matrix vesicles in dentine matrix of red sea bream, *Pagrus major. Jap. J. Oral Biol.* 24, 752-755.
- Shimoda, S., Tanabe, T., Fukae, M. and Kawasaki, K. (1999) Degradation of collegen in the developing enameloid of sea bream. J. Hard Tissue Biol. 8, 6-8.
- Simkiss, K. and Wilbur, K. M. (1989) Biomineralization, Cell Biology and Mineral Deposition. Academic Press, San Diego, 337 pp.
- 須賀昭一・和田浩爾・小川正昭(1978) サメの形成期 ならびに成熟した enameloid の石灰化像と弗素分 布. 歯基礎誌 20, 67-81.
- 須田立雄・小澤英浩・高橋榮明・田中 栄・中村浩 彰・森 論史 (2007) 新 骨の科学. 医歯薬出版, 東京, 330頁.
- 渡部哲光(1996)バイオミネラリゼーション研究-近 況と将来への展望.和田浩爾・小林巌雄編著:海洋 生物の石灰化と硬組織,3-25頁,東海大学出版,東 京.
- 渡部真人・久家直之・三枝春生(1987) CLADISTICS の紹介. 化石研会誌 19, 38-44.
- Yamada, M. and Ozawa, H.(1978) Ultrastructural and cytochemical studies on the matrix vesicles calcification in the teeth of the killifish, *Oryzias latipes. Arch. Histol. Jap.* 41, 309-323.