

学位論文内容の要約

愛知学院大学

甲 第671号	論文提出者 田口 祐一
論文題目 マイルカ科2種の下顎歯象牙質の成長線の マイクロCTによる観察とEPMAによる成分分析	

I. 緒言

鯨類の年齢査定は、歯を持つハクジラでは、歯を縦断した後、その断面に現れる象牙質、セメント質に形成される成長線を数えることによって年齢を推定する方法が一般的である。この方法の利点は手軽且つ安価に年齢を査定出来ることであるが、標本の縦断面を観察するため、標本の破壊という欠点を有する。

本研究の目的はマイクロ CT を用い、非破壊的に象牙質成長線の観察を行い年齢査定に応用することである。また、一般的に成長線は象牙質、セメント質の石灰化の良、不良により形成されると言われているが、成長線を構成する歯質の成分についても EPMA による成分分析を行った。

II. 資料と方法

1. 資料、マイクロ CT および EPMA の撮影条件

資料は、和歌山県太地町にて、2011年1月23日と、2月20日に捕獲されたマダライルカ(*Stenella attenuate*)のメスとハナゴンドウ(*Grampa griseus*)のメス各1頭の頭部を、独立行政法人水産総合センターの承諾を経たものを使用した。

マダライルカの下顎6歯、ハナゴンドウの下顎4歯について、マイ

クロ CT(XTek-H255、Nikon)撮影を行った。撮影条件は、マダライルカは X 線管電圧 75kV、X 線管電流 $138 \mu\text{A}$ 、 $8.48 \mu\text{m/voxel}$ 、ハナゴンドウは X 線管電圧 85kV、X 線管電流 $170 \mu\text{A}$ 、 $16.59 \mu\text{m/voxel}$ でそれぞれ撮影した。

撮影したデータは VG-StudioMax2.0(Volume Graphics、FRG)を用いて三次元画像再構築を行った。CT 画像と脱灰切片標本を比較、検討するために頬舌側方向で根尖孔開口部を通る断面の設定を基準断面とし、三次元データの座標軸の調整を行い CT 画像とした。

COMPO 像撮影については EPMA(JXA-8530F、日本電子社)を用い、マダライルカはマイクロ CT 撮影に用いなかった 3 歯を、ハナゴンドウはマイクロ CT 撮影を行った 4 歯の撮影を行い、元素マッピング成分分析については、加速電圧 15.0kV、照射電流 $4.960\text{e-}008\text{A}$ 、ビーム径 $5 \mu\text{m}$ の条件で分析を行った。

2. マダライルカ下顎歯の EPMA による COW0 像撮影と成分分析

マイクロ CT 撮影に用いなかったマダライルカの 3 歯を、オステオレジン包埋キット（和光純薬工業株式会社、大阪）を用いて樹脂包埋を行った後に、頬舌方向に歯冠先端と根先端を含むようライツミクロトーム(LEICA、FRG)で縦断し、

MetaServ250Grinder-Polisher(BUEHLER, USA)にて研磨を行い、EPMAにて象牙質成長線のCOMPO像観察、象牙質成長線の成分分析を行った。

3. マダライルカ下顎歯のマイクロCT撮影と凍結切片標本作製

マダライルカの歯は、マイクロCT撮影後に水産総合センターで用いられている凍結切片作製方法に従い標本作製を行った。薄切片封入後、歯冠先端と歯根尖孔とが同一標本内で見られるものを顕微鏡にて確認し選択し、選択した脱灰切片標本と同じCT画像を得るため、三次元画像上にて歯冠先端と根尖孔を含む頬舌方向断面の調整をした。

4. ハナゴンドウ下顎歯のマイクロCT撮影とEPMAによるCOMPO像撮影

ハナゴンドウの成長線の確認の際に、COMPO像にて肉眼的に観察が可能であること、歯冠が磨耗により鈍角であること、歯の彎曲が強く軸面の設定が困難であることなどのため、撮影後の4歯は樹脂包埋を行い、COMPO像で象牙質の観察と、CT画像での成長線の確認を行った。

Ⅲ. 結果

1. マダライルカ下顎歯の EPMA による COMPO 像観察と成分分析

マダライルカの歯の縦断面を EPMA を用い、COMPO 像にて象牙質部を観察したところ、明層部と暗層部は、象牙質の成長にともなう構造の違いとして認められた。両層を比較すると、明層部の管間象牙質が、暗層部の管間象牙質よりも明るく確認出来た。

EPMA による元素マッピング成分分析を、Ca、P、C、Mg、O について行ったところ、C については COMPO 像と比較すると、両層の濃淡が逆転しているように分布の違いが現れた。象牙質の石灰化に関する Ca と P の成分について、COMPO 像と EPMA によって分析した Ca と P の成分の波形を併記したものでは、P の波形は微弱であるが、Ca の波形は明層部で Ca の量と関連して高く、暗層部は波形の低い部と一致している。以上の結果から、成長線の明層部は暗層部よりも Ca、P が高く、暗層部は明層部に比べ C が多く含まれていた。

2. マダライルカ下顎歯の成長線の CT 画像と脱灰切片標本像の対比

CT 画像上で成長線を確認する際は明層部を、脱灰切片標本上では濃染部をそれぞれ 1 本とし、成長線の対比を行った。

脱灰切片標本像での成長線の確認は、最外層の濃染部は出生前に形成された象牙質であり、新産線として確認できた。年齢査定において新産線は除外するため、成長線は7本確認できた。CT画像上で確認出来る成長線の本数は7本であり、他の5歯も同様に7本確認できた。CT画像上での成長線の確認は、歯頸部付近の最も歯幅が広い部分で明瞭に観察ができ、根尖部や歯髓腔側付近では成長線間の間隔が狭く、確認は困難であった。

確認できる成長線の本数については、脱灰切片標本像と同じであった。

3. ハナゴンドウ下顎歯のCT画像とEPMAによるCOMPO像観察

ハナゴンドウはマイクロCT撮影後にEPMAによる観察を行った。撮影したCT画像では、マダライルカでは確認が困難であった歯髓側付近、根尖部の成長線を観察することができた。

CT画像上で観察すると、成長線の数は新産線を除き、4歯とも16本あることが確認され、4歯すべてに象牙質の正中中央部にOsteodentinと呼ばれる楕円体物がみられた。また、歯頸部外側の象牙質では、石灰化不良と思われる区域が成長線1層のみでなく、3~4層を含んでいる箇所もあった。COMPO像上では楕円体の構

造物の外周に層状の形成過程を示す構造を認め、CT 画像で歯頸部外側の象牙質に認められた石灰化が不良と思われた区域に、球間象牙質、石灰化球が確認でき、象牙細管がそれぞれを貫いているのを認めた。

IV. 考察

1. マダライルカ下顎歯の EPMA による COMPO 像観察と成分分析

COMPO 像は資料表面に EPMA による電子線を照射し、放出された反射電子を検出して像を構築している。反射電子線は原子番号が大きいほど反射電子線を放出しやすい性質を持つため、明層部と暗層部では生化学的組成が異なることが確認出来た。EPMA による象牙質の Ca、P、C、Mg、O の元素マッピングでは、石灰化度の高い明層部は Ca と P が多く、C に関しては逆に石灰化度の低い暗層部において多く認められていた。C は Ca、P よりも原子番号が小さい元素であるため、COMPO 像と元素マッピング分析の結果は一致し、成長線の形成は象牙質基質の形成過程による化学的組成の結果現れるといえる。

2. マダライルカの下顎歯の CT 画像と脱灰切片標本像の対比

マダライルカの下顎歯について、脱灰切片標本では成長線を 7 本、

CT 画像では撮影を行った 6 歯すべて 7 本であった。成長線は、根尖部付近や歯髄側付近などの象牙質成長線の間隔が狭い部分については不明瞭であった。脱灰切片標本像上で測定すると、象牙質成長線の間隔は歯髄側の成長線で濃染部、淡染部合わせて約 $9\mu\text{m}$ であった。これに対し、マイクロ CT の分解能は一片を $8.48\mu\text{m}/\text{voxel}$ で撮影したため、CT 画像上での明層部と暗層部の判別が困難であったと考えられる。

3. ハナゴンドウの歯の CT 画像と EPMA による COMPO 像観察

マダライルカよりも大きい歯を持つハナゴンドウでは、CT 画像上で成長線を十分観察することが出来た。また、ハナゴンドウの歯は彎曲の強い歯であったが、CT 画像にて三次元的な観察が行えるため、様々な方向から成長線を確認することができた。

象牙質の正中部に存在した楕円体物の構造物は、Osteodentin(骨様象牙質)としてマッコウクジラの象牙質に出現するとされている。

Osteodentin とは多数の不規則な髓腔を含む象牙質であるが、ハナゴンドウの COMPO 像ではそのような構造は認めることは出来ず、二次的に層状な象牙質が形成されているのを確認できる。ハナゴンドウの歯に存在するこの構造物は、本来の骨様象牙質ではなく、

二次象牙質あるいは象牙粒に相当するものといえる。また、石灰化不良な球間象牙質がみられる区域が、歯頸部付近の外層に確認できたが、ヒトの球間象牙質は象牙質の成長が盛んな部分に現れるとされているため、出生後の根尖側方向に成長の盛んな時期に形成されたと思われる。今回の研究ではマイルカ科のものを用いたが、マイルカ科の歯は一般的に歯髄腔中に象牙質が形成されると、そこで象牙質の形成は停止するため、歯髄腔が象牙質で閉鎖された高齢な個体では年齢査定を行うことは不可能になる。しかし、根尖孔が閉じず、終生成長を続けるマッコウクジラのような種においては、個体の体長が大きく、歯も大きいことから、マイクロ CT での撮影による非破壊的な観察に適していると思われる。また、CT 画像では三次元的な観察が行えることから、彎曲の強い歯や、資料価値の高い標本の成長線の年齢査定において、マイクロ CT を利用した年齢査定法は有用であると考えられる。

今回のマイクロ CT 撮影による象牙質の成長線の CT 画像では、マダライカの下顎歯 6 歯では 7 本、ハナゴンドウの下顎歯 4 歯では 16 本の、成長線をそれぞれすべてで確認され、マダライカは 7 歳、ハナゴンドウは 16 歳の個体であったことが推定された。

V. 結論

1. 従来言われている象牙質の成長線は形成過程で、象牙質基質の生化学的な成分に差が生じて、CT画像で石灰化度が高い明層部、石灰化度が低い暗層部が観察される。このCa、P、Cの成分組成の違いによるX線吸収率の差を利用して、マイクロCTによる非破壊的な成長線の観察が可能となった。
2. マダライルカの下顎歯の脱灰切片標本像で成長線を7本確認し、CT画像上でも6歯すべてで、成長線を7本確認した。また、ハナゴンドウについてはCT画像上で4歯とも16本成長線を確認した。
3. マイクロCTによる年齢査定法は、終生象牙質の形成が行われる種の歯、彎曲が強く脱灰切片標本上で観察が困難な歯、資料的に価値の高い歯の観察において有用であった。