

—原著—

キンギョ咽頭歯の微細形態学的研究

—マイクロCTを応用した観察法—

石田陽子¹⁾, 星和人²⁾⁴⁾, 田中みか子¹⁾, 監物新一²⁾,
坂井日出男²⁾, 小澤英浩³⁾, 河野正司¹⁾, 江尻貞一²⁾

¹⁾ 新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
顎顔面再建学講座 摂食機能再建学分野
(主任: 河野正司教授)

²⁾ 新潟大学大学院医歯学総合研究科 口腔生命科学専攻
顎顔面再建学講座 硬組織形態学分野
(指導: 江尻貞一助教授)

³⁾ 松本歯科大学総合歯科医学研究所
(指導: 小澤英浩松本歯科大学副学長)

⁴⁾ 東京大学大学院医学系研究科・医学部 外科学専攻
感覚・運動機能医学講座

Fine structural studies of goldfish pharyngeal teeth

— Application of μ CT for a novel method of hard tissue observation —

Yoko Ishida¹⁾, Kazuto Hoshi^{2) 4)}, Mikako Tanaka¹⁾, Shinichi Kenmotsu²⁾,
Hideo Sakai²⁾, Hidehiro Ozawa³⁾, Shoji Kohno¹⁾, Sadakazu Ejiri²⁾

¹⁾ Division of Removable Prosthodontics, Department of Tissue Regeneration and Reconstruction,
Section for Oral Life Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science
(Chief: Prof. Shoji Kohno)

²⁾ Division of Anatomy and Cell Biology of the Hard Tissue, Department of Tissue Regeneration and Reconstruction,
Section for Oral Life Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Science
(Director: Assoc. Prof. Sadakazu Ejiri)

³⁾ Institute for Dental Science, Matsumoto Dental University
(Director: Prof. Hidehiro Ozawa)

⁴⁾ Sensory and Motor System Science, Surgical Science, Tokyo University Graduate School of Medicine Faculty
平成13年5月17日受付 5月26日受理

Key words : microfocus X-ray computed tomography(マイクロCT), pharyngeal teeth(咽頭歯), goldfish(キンギョ)

Abstract: Recently, microfocus X-ray computed tomography (μ CT), which can non-destructively obtain the two- or three-dimensional information of hard tissue at sufficient magnification, has been applied in bone science.

In this experiment, we attempted to apply μ CT on morphological studies of fish pharyngeal teeth, which are difficult to investigate for their morphological characteristics, because of their complicated form and location. Goldfish pharyngeal teeth were assessed by μ CT and conventional morphological techniques in order to clarify the three-dimensional fine structure of the teeth.

The μ CT images had high contrast and high resolution which are almost equal to those of contact microradiograph. The images clearly showed that pharyngeal teeth are directly connected to pharyngeal bone. In the reconstructed three-dimensional images of skull of goldfish, the spatial localizations of pharyngeal teeth, teeth-germ and pharyngeal bone were clearly observed.

In comparison with SEM method, μ CT technique is non-destructive and does not require any specimen preparation. Therefore, μ CT will become an effective means and bring new developments for future researches on hard tissues and comparative anatomy of various kinds of animals.

抄録：最近，骨などの硬組織微細形態を非破壊的に2次元・3次元像として観察できる μ CTの応用が脚光を浴びている。そこで本研究は従来形態学的観察が困難とされてきた魚類咽頭歯に着目し， μ CTを用いてキンギョ咽頭歯の立体微細形態を明らかにするとともに，従来用いられてきた組織学的方法による観察も行い， μ CTの有用性を比較検討した。

その結果，contact microradiography (CMR) に匹敵する高分解能のCT像が得られ，咽頭歯が咽頭骨と骨性結合している状態が明瞭に観察された。また3次元再構築像では，頭蓋を構成する骨が立体的に観察でき，咽頭歯およびその歯胚と咽頭骨の空間的位置関係が明瞭に観察された。走査電子顕微鏡による観察結果と比較すると，試料作製過程における構造の破壊がなく μ CTが容易でかつ非破壊な手法であることが確認された。本法を応用することによって今後各種動物等の硬組織研究，特に比較解剖学的研究に新たな展開が期待される。

緒 言

魚類には咽頭歯が存在し，特にコイ・フナ等のコイ科魚類においては咽頭歯がよく発達していることが報告されている¹⁾。コイの咽頭歯は第5鰓弓から発生した咽頭骨上に配列し，魚類の歯のなかでも肥大化が著しく²⁾，また脱落・萌出を繰り返す多生歯性であることから，その発生や形態分化について多くの組織学的・微細形態学的研究がなされてきた^{3) 4) 5) 6) 7) 8)}。コイ科魚類の咽頭歯に関しては，左右それぞれ1から3列の歯列により構成され，その並び方により種属の分類にも利用されてきた²⁾。このように，コイ科コイ属の魚の咽頭歯に関する報告は多数認められるが，コイ科フナ属であるキンギョの報告はまだない。咽頭歯の形態や植立状態を3次元的に観察する方法としては，従来，走査型電子顕微鏡が用いられてきたが，咽頭歯を露出させるために試料を切断したり軟組織を消化したりする必要があった。そのため，咽頭歯の局在位置や，軟組織中の後継歯胚との位置関係の把握が困難であり，試料作成技術にも熟練が必要であった。

一方で，近年，電子部品や精密機械等に存在する数 μ mオーダーの微小欠陥を非破壊で検出するために開発されたマイクロCT (microfocus X-ray computed tomography) が，硬組織微細形態を非破壊的に2次元・3次元像として観察できる有用な手法として骨代謝研究分野において応用されている。そこで今回われわれは，マイクロCT^{9) 10) 11) 12)}を用いて，その局在位置や形態が複雑で，従来の組織学的方法では立体的な微細構造を知ることは困難であったコイ科フナ属であるキンギョの咽頭歯の立体微細形態を検索した。また，光学顕微鏡・電子顕微鏡による観察も行い，マイクロCTによる硬組織微細形態観察法の有用性を比較検討した。

材料と方法

頭尾長54mmのキンギョを用い，麻酔を施したのち，4%パラホルムアルデヒド溶液あるいは2%パラホルムアルデヒド・2.5%グルタルアルデヒド混合溶液を心臓より灌流し，一昼夜同固定液に浸漬した。固定したキンギョをそのままマイクロCT (ELESCAN, 日鉄エレクトックス(株), 東京) にて透視像を観察し，スライス面を決め，CT断層像を撮影した。さらにマイクロCT前額断像を28 μ のスライス間隔で連続的に540枚撮影し，その画像情報を3次元画像解析装置 (TRI, ラトックエンジニアリング社, 東京) に入力し，キンギョ頭部の3次元再構築像を作成した。また固定した試料の一部でアリザリンレッド染色透明標本を作成した。同試料の咽頭骨を取り出し，8規定水酸化カリウムで軟組織を除去したのち，アセトン乾燥・金イオンスパッタコーティングを施し，走査型電子顕微鏡 (S560, HITACHI, 東京) で観察した。さらに半切した頭部をメチルメタクリレート樹脂に包埋し，研磨切片を作成してコンタクトマイクロラジオグラフィーを作成した。一部の試料は10%EDTAで3日間脱灰したのち，パラフィン切片を作成し，アザン染色を施して光顕観察した。

結 果

キンギョ咽頭歯は，口吻から平均約12mmの食道直前の咽頭部に存在し (図1a,b)，左右それぞれ4個の歯が1列をなして咽頭骨の上に植立していた (図1b,c)。4個の歯はそれぞれ形態が異なっていた。アリザリンレッド染色では歯冠表層は強く染色されなかった (図1c)。

マイクロCT前額断像では，咽頭歯は不透過性の強い領域として観察され，また歯胚の一部が機能歯の内側に

認められた (図2a)。CMR所見から、歯冠部はより不透過性の強い表層と透過性の高い内層の2層から形成されていることが示された。また、咽頭歯は咽頭骨に骨性結合していることも明瞭に観察された (図2b)。パラフィン切片のアザン染色では、咽頭骨と咽頭歯は骨様の基質で結合しており、萌出歯に近接した領域には、歯小囊に包まれた歯胚が観察された (図2c)。

マイクロCT断層像を用いて3次元再構築した頭部表面観では、頭蓋を形成している骨の立体的な構成が非常に明瞭に示された (図2d)。再構築した頭部3次元像の矢状断面観では、4個の咽頭歯の局在位置が明瞭に観察され、また咽頭歯は基底後頭骨に支持された角質板に対向していることが明瞭に観察された (図2e)。

4個の咽頭歯のうち、吻側の歯は犬歯様の形態を呈していた (図3a,b)。尾側の歯ほど扁平で、広い切縁を有しており、その切縁には縞模様が見られた (図3a,b)。もっとも尾側の歯はバターナイフに類似した形態を呈していた (図3c)。3次元再構築像においては、機能歯の歯冠形態と類似した形態を呈する後継歯胚が機能歯の内側に宙に浮いているように観察された (図3b)。また咽頭歯と咽頭骨の骨性結合領域が明瞭に観察された。基底後頭骨に支持された角質板が、凹面をなして咽頭歯に対向しているのが認められた (図3a,b,c)。走査電顕像では、咽頭歯を観察するために軟組織を8規定水酸化カリウムにて除去したため、歯胚は消失していた (図3d,e,f)。また、咽頭歯と咽頭骨の結合部位には大きな孔が認められた (図3f)、その周囲の骨表面には小孔が多数認められた。最も尾側の咽頭歯では、咽頭骨と吻側の下端でわずかに骨性結合しているのみで、尾側に大きな硬組織欠損部位が認められた。走査電顕像においても、尾側の歯には縞模様が見られた (図3d)。

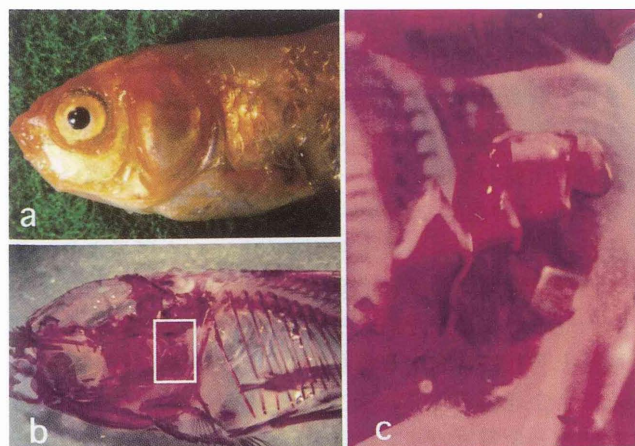


図1

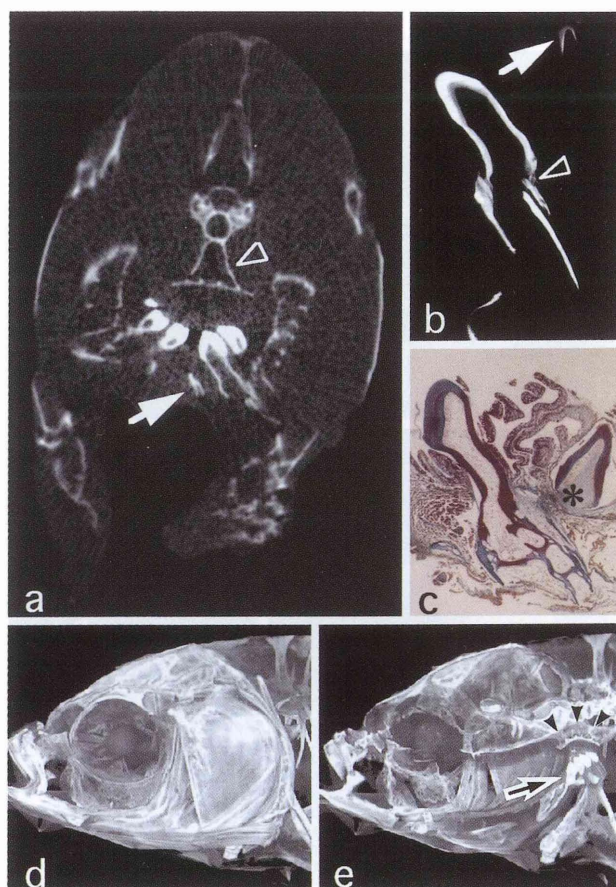


図2

図1a: キンギョ頭部の実体顕微鏡写真。

図1b: アリザリンレッド染色透明標本。頭部のみを矢状断し、左半側を除去してある。咽頭歯を囲みで示す。

図1c: アリザリンレッド染色透明標本。1bの囲み部を拡大。右咽頭骨内側面観。左が吻側。咽頭骨には4個の歯が植立していた。咽頭歯表層は他の部分に比して染色性が弱い。

図2a: マイクロCT前額断層写真。左右の咽頭歯が不透過性の強い領域として認められる。咽頭歯は基底後頭骨に支持された角質板 (矢頭) と対向している。歯胚の一部を矢印で示す。(x6)

図2b: contact microradiography (CMR)。歯冠部には透過性の異なる2層が認められる。歯胚の一部を矢印で示す。咽頭歯は、咽頭骨と歯足 (矢頭) で骨性結合している。

図2c: アザン染色したパラフィン切片。脱灰処理のため、エナメル質様物質が消失している。軟組織内に、歯小囊に包まれた歯胚 (*) が認められる。

図2d: 多重スライス像を用いた頭部の3次元再構築像。表面観。

図2e: 多重スライス像を用いた頭部の3次元再構築像。矢状断面観。凹面状の角質板 (矢頭) と対向する咽頭歯 (矢印) が明瞭に示されている。

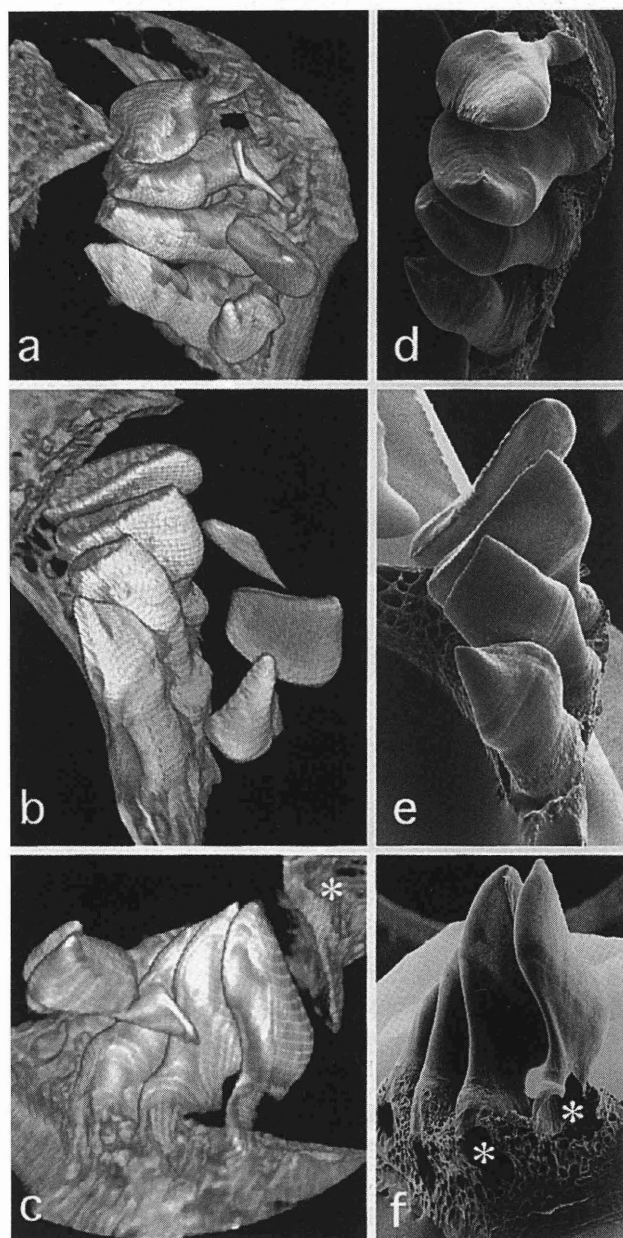


図3

- 図3a: 近心内側から見た咽頭歯部の3次元再構築像。上が尾側、下が吻側。
- 図3b: 吻側から見た咽頭歯部の3次元再構築像。機能歯の近心内側に、歯胚が認められる。
- 図3c: 尾側から見た咽頭歯部の3次元再構築像。右が尾側、左が吻側。右側に角質板(*)が認められる。
- 図3d: 図3aと同様の構図で撮影した咽頭歯部の走査電顕像。尾側の歯の切縁に縞模様が認められる。
- 図3e: 図3bと同様の構図で撮影した咽頭歯部の走査電顕像。
- 図3f: 図3cと同様の構図で撮影した咽頭歯部の走査電顕像。咽頭歯と咽頭骨の結合部に、大きな孔(*)と多数の小孔が認められる。(x40)

考 察

コイ科魚類に属するコイ(コイ属)とキンギョ(フナ属)の咽頭歯において大きく異なる点は、歯列の数と咽頭歯の数である^{2) 5) 8)}。コイでは左右それぞれ1つの主列と2つの副列をもち、主列には1個、副列には3個の歯が植立していることが報告されている^{3) 4)}。これに対し、キンギョでは歯列が左右1列ずつで、1列に4個の歯が植立していた。次に個々の歯の形態の相違について考えると、コイにおいては、稚魚から成魚への成長に伴い、咽頭歯が交換するたびにその形態が変化していくことが報告されている。第1代目に発生する咽頭歯はいずれも円錐形で同形歯性を示すのに対し、3回以上の交換を経て各歯の分化度に差が現れ、成魚では異形歯性を示すようになる⁴⁾。これらのうち、主列尾側歯群が、強く屈曲した歯鉤や咬合面溝の存在といったコイ咽頭歯の特徴を持つのにに対し、主列吻側歯群ではこれらの特徴が弱いという⁴⁾。キンギョの尾側咽頭歯ではバターナイフ状の弱いカーブが認められるものの、歯鉤と特徴づけられるような明瞭な形態は認められず、コイ咽頭歯の主列尾側歯群に見られるような臼歯状の形態は呈していなかった。キンギョ咽頭歯のうち、最も吻側の歯は犬歯様で、コイ咽頭歯の発生初期に見られる円錐形の歯に類似していた。一方、他の3個の歯は扁平で、コイ咽頭歯のうち主列吻側歯群の歯の形態に類似していた。これらの点から、キンギョの咽頭歯は、コイ咽頭歯に類似した特徴を一部もっているものの、コイ咽頭歯尾側歯群ほど異形歯性は強くないといえる。

コイの咽頭歯においてはエナメル質様物質の存在が組織学的・微細形態学的に明らかにされており^{3) 8)}、キンギョにおいても、CMR所見より歯冠表層は内層に比べ不透過性が高いことから、象牙質の表面をエナメル質様物質が覆っていることが推測される。したがって、アリザリネッドによる染色性が低かった歯冠表層はエナメル質様物質に覆われていると考えられる。コイ科魚類の成魚の咽頭歯は、歯冠の先端が細くなって屈曲し、咬合面側に向いており、歯鉤と呼ばれている⁴⁾。キンギョの尾側咽頭歯の形態がバターナイフ状にカーブを描いているのは、この歯鉤の特徴が一部現れたものと考えられる。また、対向する角質板が凹面をなしていた所見より、この凹面は咽頭歯の歯冠形態に適合しており、食物をすり合わせるのに適した形態と思われる。コイにおいては咽頭歯とそれに対向する角質板によって咀嚼が行われていることが報告されていることから、キンギョにおいても咽頭歯と角質板の間で咀嚼が行われており、それによって生じた咬耗で縞模様の溝が咽頭歯の歯冠に形成されたと考えることもできる。したがってこの溝は、コイ成魚

の咽頭歯咬合面に認められている咬合面溝に類似した条紋であると考えられる。

走査電顕所見において咽頭歯と咽頭骨の結合部位に認められた大孔については、CMR・アザン染色像においても硬組織の連続性が断たれている部位が認められ、この部位で血管・神経や結合組織が歯の内側に入りこんでおり、その周囲に歯と骨を結合する骨様の領域が形成されるものと考えられる。

マイクロCTにより得られた3次元再構築像は、走査電顕で観察されたキンギョ咽頭歯の立体微細形態と、細部にわたり正確に呼応した形態を表現していることが確認された。また、走査電顕を用いて同様の像を得るには、8規定水酸化カリウムによる軟組織の消化を行う必要がある、これにより軟組織内の後継歯胚は消失してしまった。一方、マイクロCTを用いた場合は、キンギョ頭部から咽頭歯を摘出する必要がないため、軟組織内の歯胚や対向する角質板を同時に観察することができた。すなわち、マイクロCTによる観察法を用いると、キンギョ頭部をそのまま撮影するだけで咽頭歯の立体微細形態を容易かつ正確に把握することが可能であった。したがって、局在位置や形態が複雑で、従来の組織学的手法では観察が困難な硬組織であっても、マイクロCTを用いることによってその立体微細形態を非破壊で容易に検索することが可能であり、今後各種動物等の硬組織研究、特に比較解剖学的研究においては新たな展開が期待される。

文 献

- 1) 後藤仁敏：魚類の歯。「歯の比較解剖学」後藤仁敏，大泰司紀之(編)，31-39頁，医歯薬出版，東京，1986
- 2) 宮地傳三郎，川那部浩哉，水野信彦：コイ科フナ属。「原色日本淡水魚類図鑑」201-210頁，保育社，大阪，1976
- 3) 河島裕：鯉咽頭歯の発生学的研究。久留米医学会誌，28：699-715，1965
- 4) 小寺春人：コイ咽頭歯の形態分化に関する研究。鶴見歯学，8(2)：179-212，1982
- 5) Nakajima T. : Larval vs. adult pharyngeal dentition in some Japanese Cyprinid fishes. J. Dent. Res. 63(9): 1140-1146, 1984
- 6) 三枝博：鯉科のPharyngeal teethについて，「硬組織研究」，医歯薬出版，東京：389-395，1969
- 7) 小寺春人，橋本巖：コイ咽頭歯の硬組織構造について。鶴見歯学，2(1)：59-67，1976
- 8) 中島経夫他：個体発生にもとづくコイ科魚類咽頭歯系の歯式と歯の記号についての考察。岐歯学誌，13(2)：287-296，1986
- 9) Shibata T., Nagano T. : Applying very high resolution microfocus X-ray CT and 3-D reconstruction to the human auditory apparatus. : Nat. Med. 2(8)：860-2, 1996
- 10) 江尻貞一：新しい形態学的解析方法－マイクロCT－：日骨代謝誌，18：15-21，2000
- 11) Uchiyama T., Tanizawa T., Muramatsu H. et al. : Calcif. Tissue Int. 61：493-498, 1997
- 12) Ito M., Nakamura T., Matsumoto T. et al. : Bone 23：163-169, 1998