

2016A1692

BL20B2

## 霊長類の歯牙内部における微細構造の非破壊的可視化 Non-destructive Visualization of Microstructures in Primate Teeth

佐々木 智彦<sup>a</sup>, 清水 大輔<sup>b</sup>  
Tomohiko Sasaki, Daisuke Shimizu<sup>b</sup>

<sup>a</sup>京都大学, <sup>b</sup>中部学院大学  
<sup>a</sup>Kyoto University, <sup>b</sup>Chubugakuin University

二次象牙質の蓄積量やセメント質の層構造などの、歯牙内部の微細構造は、霊長類を含めた哺乳類の年齢推定に用いられる。しかし、現在のところ破壊的な観察方法しか存在しないため、CT撮影によりこれが非破壊的に観察可能かどうかを調べた。二次象牙質はその境界を明瞭には観察できなかったが、セメント質の層構造は、個体によっては、観察することができた。実験後の被写体を従来方法で観察し、今回の結果と比較することにより、従来から観察されてきた層構造と同一のものを、非破壊的に観察できていることが確認された。

**キーワード：** 象牙質、セメント質、年齢推定、CT

### 背景と研究目的：

ヒトは、他の霊長類に比べ、突出して長寿である。食料生産や医療技術の発達を差し引いても、その長い寿命は、ヒトの、生物としての、大きな特徴である[1]。この特徴がどのように進化してきたのかを調べるには、過去の人類の寿命を明らかにする必要がある。化石標本から各個体の死亡時の年齢を調べ、その時代におけるヒトの生活史を復元することが、これを可能にする現在唯一の方法である。

化石からその死亡時の年齢を推定する方法は様々あるが、中でも、歯の内部の微細構造を用いた方法は、他の方法にはない有利な点を備えている。たとえば、歯は人体で最も硬い組織であり、保存されやすく、標本数が確保されやすい。また、骨は一生の間に内部組織が常に置き換えられるのに対して、歯は既にある内部組織を保ったまま付加的に成長する。このため歯には、内部の微細構造に、個体が成長してきた記録が残されており、この点で、骨よりも年齢推定に適している。

成熟個体に適用可能な、歯牙の微細構造を用いた方法として、二次象牙質を用いたものと、セメント質を用いたものが挙げられる。二次象牙質は、歯牙内腔の壁面に、一生を通じて徐々に蓄積される硬組織であり、その蓄積量が年齢を示す指標として用いられる。セメント質は、歯根の表面に、1年に1本形成されるといわれる層構造を作りながら蓄積し、この層の数が年齢推定に利用される。

しかし、二次象牙質は、年齢との関連が低い一次象牙質と接しており、この境界が識別され、分離されなければ、年齢との高い相関を得ることは難しいと考えられる。実際、(大型放射光施設のX線を用いない)通常のマикроCT(Computed Tomography)を用いた著者らの研究では、一次と二次の象牙質を分離することはできず、その合算体積(に相当する量)と年齢との間に、弱い相関を報告しているのみである[2]。また、セメント質の層構造を通常のマикроCT撮影を用いて可視化に成功した例は、我々の知る限り、これまでに報告されておらず、著者らの予備的調査においても可視化することはできなかった。

一次象牙質と二次象牙質の境界や、セメント質の層構造は、歯を薄片標本にし、透過型光学顕微鏡で観察することにより、認識することができる。しかし、数少ない貴重な化石標本を薄片にすることは、非現実的である。そこで著者らは、大型放射光施設、SPring-8のX線を用いたCT撮影によって、一次象牙質と二次象牙質の境界や、セメント質の層構造が、非破壊的に可視化できるかどうかを検証した。単色のX線はCT画像のアーティファクトを軽減し、高い空間コヒーレンスはCT画像上において物体間の境界を強調することが知られている[3]。本実験において、

上述の構造が、非破壊的に可視化されることが期待された。

実験の後の、2019年に、European Synchrotron Radiation Facility (ESRF)におけるCT撮影によって、ヒトのセメント質層構造の可視化に成功した旨の論文が、発表された[4]。セメント質層構造を初めて非破壊的に観察し発表した、画期的な成果である。しかし、この研究では、CT画像に見える層構造と薄片標本で観察できる構造との対応関係は、調べられなかった。本報告では、SPring-8の実験で得られたCT画像について報告するとともに、被写体標本を実験後に薄片にし、その顕微鏡像とCT画像を比較した結果について、報告する。

#### 実験：

被写体とした標本は、象牙質の境界を見るために、比較的高齢なチンパンジーの下顎犬歯を1本もちいた。また、セメント質の層構造を見るために、ニホンザルの切歯を2個体分、上下それぞれ1本ずつ、計4本用いた。切歯が提供されたニホンザルは、実験前に、その左右反対側の上顎切歯が薄片にされ、顕微鏡観察によりセメント質の層数が、15本、および4本であることが確認された個体である。なお、実験申請時に予定していた古人骨の歯は、使用しなかった。実験時間を短縮・簡略化するため、年齢情報のない古人骨標本の撮影は省略し、結果の検証に有益と思われる年齢情報のある、チンパンジーとニホンザルの撮影を優先した。

CT撮影は、ビームラインBL20B2にて行われた。主な撮影条件は表1に示すとおりである。ここに示すX線エネルギーの値は、最適なコントラストが得られるよう、予備的な数回の事前撮影を経て、決められたものである。X線検出器は2048×2048画素・露光時間2秒のCCDカメラを使用した。

表1. CT撮影条件

	X線エネルギー	画素サイズ	プロジェクション枚数	標本—検出器間距離
チンパンジー 犬歯	51 keV	6.47 $\mu\text{m}$	1800 枚	600 mm
ニホンザル 切歯	30 keV	6.47 $\mu\text{m}$	1800 枚	600 mm

CT撮影の後に、ニホンザル下顎切歯の内の1本を薄片にし、光学顕微鏡下で観察した。まず、比較したいCT断層画像を選定し、その断面が歯のどの部分を通っているか、3次元画像化ソフトウェアを用いて判断し、実際の歯の表面に書き込んだ。この書き込みを目標に歯を研磨し、約100  $\mu\text{m}$ 厚の薄片を作成した。研磨剤は3  $\mu\text{m}$ 粒径のものを、仕上げとして使用した。ヘマトキシリン溶液で10分間染色し、透過型光学顕微鏡(Nikon Eclipse Ni-U)で観察した(10x4)。

#### 結果および考察：

チンパンジーの犬歯CT画像において、一次象牙質と二次象牙質の境界は、X線吸収率の違いなどから、うっすらとは認識できた。しかし、二種類の象牙質を歯根全域にわたって区別できるほどの、明瞭なコントラストは得られなかった。一方で、うっすら認識できた二次象牙質の厚みは、年齢に比して非常に薄かった。二次象牙質の成長速度に、大きな個体差があることが示唆され、たとえ二次象牙質が単離できたとしても、年齢推定の精度の大幅な向上は、期待できないのではないかと考えられた。

一方、ニホンザル切歯のCT画像では、1つの個体に、セメント質の層が確認された。この個体では、実験前に、右側上顎切歯のセメント質層が15層であることが、薄片観察により確認されていた。今回CT撮影された左側上顎切歯にも、15本の層がCT画像上で確認された(図1)。

しかしながら、もう一方の個体では、セメント質の層構造は不明瞭であった。この個体はセメント質が比較的明瞭に観察された個体よりも若く、層の数は少ない(実験前の切片観察では4本)はずである。明瞭な個体においても、歯の内側の比較的若い時期に作られた層は、構造がやや不明瞭である。このことから、セメント質層構造のCTによる可視化は、形成初期の構造に対しては比較的困難である可能性が考えられた。

層構造がCT画像で比較的明瞭に観察された個体において、実験後に被写体となった下顎の切歯を薄片にし、顕微鏡観察を行った。同じ部位の断面においてCT画像と比較すると、セメント質の層構造が、両者において一致していた(図2)。このことにより、CT画像において認識されている層構造は、薄片の顕微鏡観察により認識される層構造と、同一のものであることが確認さ

れた。これまでの破壊的な方法によるものと同じものを、非破壊的に観察していることが確認できたという点において、今後、この手法を発展させていく上で、重要な発見である。

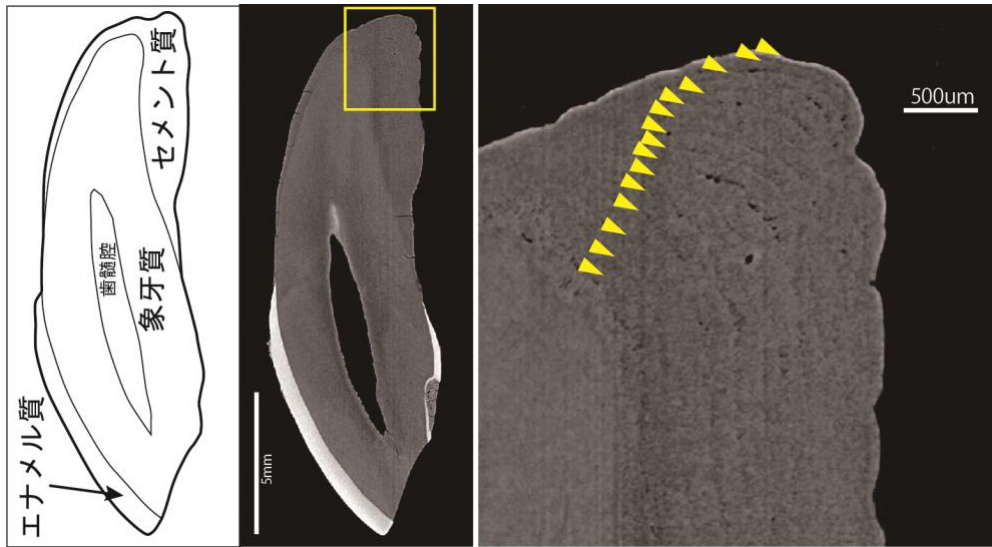


図 1. CT 撮影により可視化されたセメント質の層構造。(ニホンザル左側上顎切歯)



図 2. CT 画像 (グレー) と顕微鏡像 (カラー) との比較。セメント質部分を拡大 (右)

#### 今後の課題：

一次象牙質と二次象牙質の境界を明瞭にし、二次象牙質を仮想的に分離するためには、CT 画像のコントラストを上げる必要がある。プロジェクション枚数を増やし、ノイズを減らすなどの方法が考えられる。しかし一方で、たとえ二次象牙質が分離できたとしても、その蓄積量には個体差が大きく、年齢推定の精度を必ずしも向上させるとは言えない可能性が、今回の実験で示唆された。このことを明らかにするには、今後、複数の個体に対して今回と同様な実験を行う必要がある。

セメント質の層構造は、大型放射光施設の X 線を用いた CT 撮影により、非破壊的に可視化で

きることが明らかとなった。しかし、層構造の解像度は、今回の撮影条件で必ずしも十分ではなく、個体によっては不鮮明となることも明らかとなった。今後、画像の解像度を上げるために、画素サイズを小さくすることが考えられるが、標本の大きさがカメラの視野をこえてしまうため、撮影には更なる工夫が必要である。標本全体を複数回に分けて撮影し、それぞれのプロジェクション画像を撮影後に接合させ、カメラサイズを大きくしたのと同じ効果を得る方法や、カメラの視野をこえてしまった部位の情報を、比較的粗い解像度で撮影した全体 CT 画像で補完する方法など、今後、試行していきたい。

**参考文献：**

- [1] M. Gurven, H. Kaplan, *Popul. Dev. Rev.* **33**, 321-365 (2007).
- [2] T. Sasaki, O. Kondo, *Anthropol. Sci.* **122**, 23-35 (2014).
- [3] P. Tafforeau, et al., *Appl. Phys. A* **83**, 195-202 (2006).
- [4] A. L. Cabec et al., *Am. J. Phys. Anthropol.* **168**, 25-44 (2019).

---

(Received: March 27, 2019; Early edition: August 30, 2019;  
Accepted: December 16, 2019; Published: January 22, 2020)