

- 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 Hoshi²⁾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CT⁹⁾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 m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