

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月 1日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2008～2011

課題番号：20592154

研究課題名（和文）現生と化石哺乳類をつなぐ、エナメル質組織発生における比較解剖学的研究

研究課題名（英文）Comparative Study on amelogenesis between living and extinct mammals

研究代表者

鈴木 久仁博（SUZUKI KUNIHIRO）

日本大学・松戸歯学部・教授

研究者番号：30256903

研究成果の概要（和文）：サイ類の歯の組織構造の比較から独特のエナメル芽細胞の動態が明らかにされた。今後、南米の化石を加え組織発生と形態変化の時空的な変異を考察する。同時期に同所に生息した束柱目の2属は、組織発生と生態学的研究とを関連させる。長鼻目の切歯エナメルバンドは研究例が少なく臼歯との比較が可能になった。有袋類の組織発生学および分子生物学的な研究は、哺乳類の顎と歯の形成における一般性と特殊化について示唆を与える。

研究成果の概要（英文）：A comparison of the histology of the tooth of rhinoceroses revealed a unique ameloblastic movement. We will research the South American fossils and compare their variation of the morphology and histology with other location and period. 2 genus of the Desmostylia which inhabited the same place for the same period. We are associating developmental study and ecological study. The incisor enamel band of the Proboscidea has been studied few examples, and the comparison with the molar enamel is enabled. histological development and the molecular biologic study of Marsupials give a suggestion about generality and specialization in the formation of the mammalian jaws and teeth.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：歯学・形態系基礎歯科学 2002

キーワード：歯学 細胞・組織 発生・分化

1. 研究開始当初の背景

これまで様々な特徴を持つ化石および現生の哺乳類のエナメル質を比較してきたが、これらのデータを新たに重ねあわせることによって組織構造の

進化過程の復元が可能になってくる。さらに、これまで手掛けてきた有袋類の発生過程を比較することにより包括的な哺乳類の進化・放散過程を考

察できる。

2. 研究の目的

エナメル質はエナメル芽細胞の活動が記録された生体物質であり、エナメル芽細胞および形成細胞群としての歯胚の動態と変化過程を個体発生的、系統発生的に捉えることができる。研究対象は特殊な組織構造を持つ動物種としてこれまでも研究を進めてきた長鼻目と化石哺乳類の束柱目であり、もうひとつは縦型のシュレーゲル条を持つと考えられるサイ科の仲間である。また、哺乳類のエナメル質形成の起源に迫るために、現生哺乳類の有袋類に焦点を当てる。そして、エナメル質の形成過程を非破壊的な画像構築や連続切片による三次元立体構築において視覚化し、ヒトを含む哺乳類の歯の特徴がどのように形成されてきたかを探ることを本研究の目標とする。

3. 研究の方法

本研究は現生哺乳類と化石哺乳類の両面からエナメル質の組織発生の検索を進め、組織構造と発生学的特徴から哺乳類の進化を探るものである。現生種については歯胚の観察ができるものは切片からの立体構築、TEM および SEM 像によるエナメル芽細胞の観察、mCT による非破壊的観察を行う。更に、可能な限り歯胚の培養を行い、免疫組織学的にエナメル芽細胞の機能検索および遺伝子発現の検索も行う。化石種については研磨標本を中心に光学顕微鏡、SEM 像の観察を行い、連続研磨標本による立体構築も取り入れエナメル小柱の形成過程を探る。

一方、原始的な哺乳類の情報を得るため有袋類の歯の組織標本と発生様式の観察のための胚培養を行い、顎顔面領域の遺伝子発現の検索からその特徴を把握する。

研究材料

奇蹄目サイ科の臼歯エナメル質

Rhinoceros Subhyracodon Teleoceras

束柱目の臼歯および切歯エナメル質

Desmostylus Paleoparadoxia

長鼻目の臼歯および切歯エナメル質

Barytherium Stegolophodon Elephas

火獣目の臼歯エナメル質

Pyrotherium

有袋類の胚および新生児

Monodelphis domestica

(ハイイロジネズミオポッサム)

1. エナメル質の組織構造から形成過程を比較検討し哺乳類の進化・放散過程を探る

1) 複雑なエナメル質構造の情報を得るためサイ科、束柱目、長鼻目、南米産の火獣目について現生種と化石種の歯の組織と発生様式の観察のための研磨標本の作製を行う。

2) 完成歯、未完成歯のエナメル質の構造を走査型電子顕微鏡(日立 S-2150, S-2700)、フィールドエミッション型走査電顕(JSM6340)を用いて観察する。

3) 三次元立体構築のために連続研磨標本の作製を行う。

4) 上記の走査電顕像を順次取込み、構築のソフトウェアを用いて画像処理をする。

5) エナメル芽細胞の動態と組織構造との関係をエナメル小柱の形態と位置の変化から読取る。

6) データを検討し、学会発表を準備し論文としてまとめる。

2. 有袋類の発生から哺乳類の進化・放散過程を探る

1) ハイイロジネズミオポッサムの歯の発生における咬頭形成を調べるため、カルシウムの沈着を調べるアリザリンレッド染色を用いて検討する。

2) 歯胚の石灰化過程を調べるために μ CT(TOSCANER-30000)で画像を取込んだ後、三次元立体構築ソフトウェアTriBON を用いて咬頭の形成過程を示す。

3) 歯胚の立体観察のためにエナメル芽細胞をエナメル質表面に残して走査型電子顕微鏡(日立 S-2150, S-2700)、フィールドエミッション型走査電顕(JSM6340)を用いて観察する。

4) データを検討し、学会発表を準備し論文としてまとめる。

3.有袋類の頭部神経堤由来組織の発生学的特徴を分子基盤から明らかにする

1) 正確な発生過程を追うために生殖行動をビデオ撮影し交尾を確認する。

2) 神経堤由来細胞の動態を調べるために必要な発生日数(時間)の胚を採取する。

3) 更に細かい発生段階の胚は培養によって獲得する。

4) 顎顔面の発生に関する遺伝子の発現を検索する。

5) データを検討し、学会発表を準備し論文としてまとめる。

4. 研究成果

エナメル質に独特な縦型シュレーゲル条を持つサイ類について、エナメル質の組織発生を直接に追跡する方法として臼歯の連続研磨標本を走査電顕で観察し、得られた画像を立体構築してエナメル小柱の動的な位置関係や形態の変化を捉える試みを行った。試料としてシアトル(アメリカ合衆国)のワシントン州立パーク博物館より提供された北米の化石サイ *Subhyracodon* を用いた。研究成果は論文(Suzuki K, et al. Int J Oral-Med Sci, 7, 72-76, 2008)として発表し、各種学会(158回 日本古生物学会例会.2009/1、A Grant for Supporting Project for Strategic Research Meeting, 2009/2.)で討論し特に古生物学の観点からの議論を深めることができた。また、2010年3月には国立台湾自然科学博物館と国立台湾博物館にて東アジアの哺乳類の研究を行い、前者とは共同研究の足掛かりをつくることができ、台湾産のサイ類化石の臼歯を試料とする事が可能となり調査と論文発表の準備を進めている。加えて、林原自然科学博物館との共同研究によってモンゴルのサイ化石について調査する機会を得ており、エナメル質の微細構造とサイ類に独特なエナメル質組織構造の形成過程の研究を進めている。今後、現生および化石の他種との比較を進めることにより、サイ類におけるエナメル質の系統発生的な考察が

可能となり、哺乳類の進化における生態的变化と外部形態の変遷がどのように組織構造に反映されているのかを、エナメル小柱の運動から解明するという新しい取組みとなるであろう。更に、生物地理学的に広い観点でエナメル質の分化を捉えるために南米の化石哺乳類にも注目し、縦型シュレーゲル条を持つエナメル質についてエナメル小柱の立体構築の手法を用いた研究の一部を公表した(第50回 歯科基礎医学会学術大会、2008/9)。これらの試みは類縁的に離れた生物集団の間で類似性を持った組織構造を発達させる場合、どのような仕組みがそこに存在するのかをエナメル質形成の観点から明らかにする契機となるであろう。今後は南アメリカの研究者との共同研究が必要になると考えられ、歯の組織発生と形態変化の時間的・空間的な広がりと変異の検索が哺乳類の適応放散に新しいヒントを与えてくれるものとする。

東柱目デスマスチルス類に関しては能登半島の新しい標本を調査し、エナメル質の特徴からデスマスチルスとパレオパラドキシアの同定を補完し中期中新世の西海岸に2系統のデスマスチルスが生息していたという新しい知見が得られ、学会発表をおこなった。加えてパレオパラドキシアの切歯エナメル質は報告が少ないため論文(International Journal of Oral-Medical Science, 9 (2), 154-158 (2010))として発表したが、更に歯の組織構造の比較研究に進む必要がある。共伴する多数の化石を含め、当時の生息環境を示す貴重な標本として別に論文を準備している。今後は古生物学と現生生物学の重要な接点として種分化の背景となる生態学的研究とのリンクを目指す観点が必要と思われる。

長鼻類については茨城県産のステゴロホドンゾウ切歯のエナメル質の研究を進めている。現生長鼻類との比較研究に貴重な標本となり、古生物学者と共同し投稿を準備している。更に、2010年2月にタイのチェンマイ大学においてアジアゾウ新生児の未萌出切歯と切歯歯胚を剖出し、頭蓋にお

ける位置関係を記載する作業を行った。長鼻類の切歯の発生には不明な点が多く慎重に論文を準備している。また同時に石灰化したリンパ節の組織観察と分析をおこなった。これは、生体の石灰化の問題として捉えて病理学者と共同で投稿の準備を進めている。また、微細構造の研究では当該切歯のエナメル質、いわゆる'エナメルバンド'について検索を進め、論文作成を開始している。加えて、2011年12月に常陸大宮市で左右の切歯と臼歯が保存されたほぼ完全なステゴロホドンの頭蓋化石が発見され、本学松戸歯学部でCT像の撮影、茨城県立博物館で走査電顕用のサンプル採取を行い慎重な観察と論文作成を準備している。切歯エナメル質の研究は学会発表(日本古生物学会, 2011/7. 地学団体研究会, 2011/8)で討論をしている。長鼻類のエナメル質については日本で保存状態の良い標本の発見があり、今後も多面的な観察を続けていく必要がある。中でもエナメルバンドは発生学的にも不明な点が多く、解明にはタイなどのアジアの現生および化石標本が比較のために必要であり、共同研究等の一層の進展が望まれる。

哺乳類のエナメル質形成を、基本的な生殖様式や歯の交換様式の異なる有袋類に遡って比較検討するために、ハイロジネズミオポッサムの歯冠形成過程を発生段階(産後12日~25日)を追って、カルシウムの沈着を調べるアリザリネッド染色と石灰化組織を示す μ CTを用いて咬頭形成を検討した(第114回日本解剖学会総会, 2009/3)。エナメル質の組織発生は歯の咬頭形成と深く関わっているが、有袋類のある種では有胎盤類とは異なった形成順序が知られている。ハイロジネズミオポッサムの臼歯の咬頭形成順序は、これまで報告された近縁の種とは異なっているという新しい知見が得られた。その特徴を学会発表し、論文にした。(International Journal of Oral-Medical Science, 8 (2), 112-115 (2009))。有袋類の歯の特徴を歯胚の形態変化や口腔全体との関係から検討することにより、エナメル質の機

能的側面についても発生的な解析が可能である。ハイロジネズミオポッサムの歯の発生をより精密な発生過程の中で検討するために、生殖過程をビデオ録画で記録し交尾行動と出産行動を観察した。その結果、胎内のオポッサム胚を時間単位で採取する事が可能となり、生殖行動と出産前の胚の特徴を学会発表(第52回歯科基礎医学会学術大会・総会, 2010/9)し、論文を準備している。ハイロジネズミオポッサムの研究は、歯および顎の発生を全身の発生過程の中で検討することを進めている。東北大学、理化学研究所との共同研究が成立し、正確な生殖過程の観察によるオポッサム胚の時間単位での採取、および全胚培養の可能性がみえはじめており、詳細な解析は遺伝子発現を含めて発生学的な解析を検討している。これらの研究のうち神経堤細胞の動態については日本発生物学会(2011, 2012)で発表している。例えば神経堤細胞はneural foldから脱上皮化するとすぐにかたまって顎原器を作り始める。10日から11.5日目の胚の顎の形成時における調節因子の発現を検索するとトリやマウスのようにSox9からSox10への発現の入れ代わりがすぐにはおこらず、両方が同時に発現している期間が長いということが確認できた。これが有袋類のヘテロクロニーとどのように関るかを検討している。有袋類の発生学的研究は、哺乳類の顎と歯の形成過程における一般性と進化における分化と特殊化について大きなヒントを与えるものである。組織発生学的な研究と遺伝子解析による分子生物学的な研究が平行して進むことが望まれるが、雌の妊娠率が50%弱であり、またマウス・ラットの経験が適用できず長期間の全胚培養技術の確立にもう少し時間がかかる見通しであり、飼育・繁殖を含めた現在の研究体制の充実を図ることが重要である

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計8件)

1. Sakae T, Hirayama K, Yamamoto H, Suzuki K, Hayakawa Y, Takahashi Y, Kuwada T, Nakao K, Nogami K, Inagaki M, Tanaka T, Hayakawa K, Sato I, Kakei M : Three-dimensional Orientation Analysis of Human Enamel Crystallites Using X-ray Diffraction, Journal of Hard Tissue Biology 20(1) : 7-10, 2011
2. Kunihiro Suzuki, Tomoyasu Yamamoto: Histological observation of *Paleoparadoxia* incisor from the Noto Peninsula, Japan. Int J Oral-Med Sci (International Journal of Oral-Medical Sciences)9(2),154-158, 2010
3. Hitoshi Yamamoto, Toshihide Niimi, Rumi Yokota-Ohta, Kunihiro Suzuki, Toshiro Sakae, Yukishige Kozawa : Diversity of Acellular and Cellular Cementum Distribution in Human Permanent Teeth, Journal of Hard Tissue Biology 18(1) : 40-44, 2009
4. Suzuki Kunihiro: The Order of Cusp Calcification on the Upper First Molar of the Gray Short-tailed Opossum (*Monodelphis domestica*: Marsupialia). Int J Oral-Med Sci (International Journal of Oral-Medical Sciences) 8(2), 112-115, 2009
5. Higuchi Yuka, Yamamoto Hitoshi, Jingkei Cai, Suzuki Kunihiro, Han-Sung Jung, Kozawa Yukishige : Comparison of the Structures of Tooth Germs Transplanted into the Subcutaneous Tissue or the Kidney Capsule of Mice, IJOMS(International Journal of Oral-Medical Sciences),7(1) :27-34,2008
6. Suzuki Kunihiro, Sakae Toshiro, Yamamoto Hitoshi, Kozawa Yukishige : Three-dimensional Observation of the Enamel Prisms of *Subhyracodon* molars, International Journal of Oral-Medical Sciences, 7(2) : 113-118, 2008
7. 太田(横田)ルミ, 鈴木久仁博, 新美寿英, 小澤幸重 : エナメル小柱の捻れや彎曲を生み出すエナメル芽細胞の免疫組織学的検討, 日本大学口腔科学, 34(3) : 151-154, 2008
- [学会発表] (計 29 件)
1. 鈴木久仁博, 国府田良樹 : 茨城県常陸大宮市から産出した長鼻類切歯の組織構造. 日本古生物学会, 2011. 7. 2, 金沢大学
2. Yoshio Wakamatsu, Noriko Osumi, Kunihiro

Suzuki : Molecular basis for heterochronic development of marsupial cranial neural crest. 日本発牛生物学会, 2011.5.20, 琉球大学

3. Kunihiro Suzuki, Yasutomo Yamamoto : Histological Characteristics of *Paleoparadoxia* Incisor from the Noto Peninsula, Japan. 日本古生物学会, 2011/1/29, 高知大学

4. Suzuki Kunihiro, Sakae Toshiro, Yamamoto Hitoshi, Kozawa Yukishige : Observation on the Reproduction of the Gray Short-tailed Opossum (*Monodelphis domestica*). 歯科基礎医学会, 2010/9/21, タワーホール船堀

5. 鈴木久仁博, 太田ルミ, 植村範子, 小澤幸重 : 有袋類ハイイロジネズミオボッサム (*Monodelphis domestica*) 臼歯の咬頭形成について. 日本古生物学会, 2009/6/26, 千葉大学

6. 鈴木久仁博, 小澤幸重, 寒河江登志朗, 山本 仁, 太田ルミ, 新美寿英 : 縦型シュレーゲル条の形成について - *Subhyracodon* と *Pyrotherium* の臼歯の場合 -. 歯科基礎医学会, 2008/9/23, TOC 有明コンベンションホール
[図書] (計 0 件)

[産業財産権]
○出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
- (1) 研究代表者
鈴木 久仁博 (SUZUKI Kunihiro)
日本大学・松戸歯学部・教授
研究者番号 : 30256903
- (2) 研究分担者
山本 仁 (YAMAMOTO Hitoshi)
東京歯科大学・歯学部・教授
研究者番号 : 80265165

研究分担者

新美 寿英 (NIIMI Toshihide)
日本大学・松戸歯学部・助手 (専任扱)
研究者番号：70508754

研究分担者

横田 ルミ (YOKOTA Rumi)
日本大学・松戸歯学部・助手
研究者番号：30312044

研究分担者

小澤 幸重 (KOZAWA Yukishige)
日本大学・松戸歯学部・教授
研究者番号：80014132

(3) 連携研究者

()

研究者番号：