



Title	骨無機質内の非晶質及びアパタイト結晶に関するX線結晶学的研究
Author(s)	青葉, 孝昭
Citation	大阪大学, 1978, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/32361
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

骨無機質内の非晶質及びアパタイト 結晶に関するX線結晶学的研究

大阪大学歯学部
口腔病理学講座

青葉孝昭

目 次

I. 非晶質リン酸カルシウムからアパ タイト結晶への転化過程

1. 緒 言	-----	2
2. 材料及び方法	-----	5
(1) 非晶質リン酸カルシウムの合 成	-----	5
(2) 結晶化度の測定	-----	7
(3) X線小角散乱法による表面積		

の測定	-----	8
(4) 電子顕微鏡による形態観察	----	9
3. 結果	-----	10
(1) 転化過程にみられた結晶学的 性状の変化	-----	10
(イ) 結晶化度の変化	-----	10
(ロ) 表面積の変化	-----	12
(ハ) 形態の変化	-----	13
(2) 転化過程に及ぼす各種イオン の影響	-----	14
(イ) magnesium	-----	14
(ロ) carbonate	-----	15
(ハ) fluoride	-----	15
(ニ) 各種イオンの効果の比較	----	16
4. 考察	-----	17
(1) 非晶質リン酸カルシウムから アパタイトへの転化の機構に ついて	-----	17
(2) 転化過程に及ぼす各種イオン の影響	-----	22

5. 総括ならびに結論 ----- 28

6. 参考文献 ----- 31

(原稿枚数39枚, 図9枚, 表4枚)

II. 非晶質成分の定量に及ぼすアパタイトの結晶格子の乱れの影響

1. 緒言 ----- 2

2. 材料及び方法 ----- 4

(1) アパタイト試料の作製 ----- 4

(2) アパタイトの結晶性の評価 ----- 5

(3) 結晶化度の測定及び電子顕微鏡による形態観察 ----- 8

3. 結果 ----- 8

(1) 転化過程にみられた結晶性の変化 ----- 8

(2) アパタイトの結晶性に及ぼす各種イオンの影響 ----- 10

(イ) fluoride ----- 10

(ロ) carbonate ----- 11

(ii) strontium 及び magnesium ----- 12

(3) アパタイトの形態に及ぼす
各種イオンの影響 ----- 13

(4) X線回折像のバックグランド
に及ぼす結晶格子の乱れの ----- 14

4. 考察 ----- 15

(1) 転化過程にみられたアパタイト
の結晶性の変化と結晶格子
の乱れの原因 ----- 16

(2) アパタイトの結晶性に及ぼす
各種イオンの作用 ----- 20

(3) 非晶質成分の定量方法に及ぼ
す結晶格子の乱れの影響 ----- 26

5. 総括ならびに結論 ----- 30

6. 参考文献 ----- 33

(原稿枚数40枚、図9枚、表5枚)

Ⅲ. 骨アパタイトの結晶格子の乱れと その原因

1. 緒 言 ----- 2

2. 材料及び方法 ----- 5

(1) 骨試料の作製 ----- 5

(2) アパタイトの合成 ----- 5

(3) 骨アパタイト及び合成アパ
タイトの結晶性の評価及び形態

観察 ----- 6

3. 結 果 ----- 7

(1) 骨アパタイトの結晶性 ----- 7

(2) 骨アパタイトの形態観察 ----- 7

(3) アパタイトの結晶成長過程に
及ぼす CO_3^{2-} の影響 ----- 8

4. 考 察 ----- 10

(1) 骨アパタイトの結晶格子の乱
れの原因 ----- 10

(2) 骨無機質内の非晶質成分に
ついて ----- 15

(3) 骨アパタイトの形成過程に
ついて ----- 19

(4) 骨無機質の性状とミネラル

代謝との関連性について ----- 22

5. 総括ならびに結論 ----- 25

6. 参考文献 ----- 28

(原稿枚数 39 枚, 図 4 枚, 表 3 枚)

/

骨無機質内の非晶質及びアパタイト
結晶に関するX線結晶学的研究
I. 非晶質リン酸カルシウムから
アパタイト結晶への転化過程

青 葉 孝 昭

大阪大学歯学部口腔病理学教室

X-ray diffraction study on the amorphous and
crystalline components in bone mineral.

I. Transformation of amorphous calcium phosphate
to crystalline hydroxyapatite.

Takaaki Aoba (Department of Oral Pathology,
Osaka University Dental School, Osaka)

大阪市北区中之島4丁目3番48号 (〒530)

緒

言

骨無機質は生体のミネラル代謝に重要な役割を果たしていることから、その組成や石灰化機構に関する研究は古くから行なわれてきた。

X線回折法を用いた研究では、骨無機質の主要な構成成分はアパタイト様の結晶構造をもつことが明らかにされている^{1,2)}。また、最近の研究ではアパタイト結晶とともに、*octacalcium phosphate*^{3,4)}, *dicalcium phosphate dihydrate*^{5,6)}, さらには *amorphous calcium phosphate*^{7~10)} (以下 OCP, DCPD, ACP あるいは非晶質成分と記す) などが骨無機質内に含まれており、これらのリン酸カルシウムが骨アパタイトの前駆物質の役割を果たしているという考え方が提唱されている^{4,10,11)}。

しかしながら、OCP や DCPD については骨無機質内でその存在を確めた報告は極めて少なく^{12,13)}、骨アパタイトの形成過程における OCP や DCPD の役割については推測の域を出

ていない⁴⁾。他方、ACPに関しては、骨アパタイトの形成過程に関与していることを示唆する報告が数多くみられる。まず¹⁾ in vitroでの実験から、中性もしくはアルカリ性に保った Ca^{2+} と PO_4^{3-} の過飽和溶液中では、ACPが最初に生成され、ついですみやかにアパタイトに転化することが明らかにされている^{14~17)}。また、X線回折法や赤外吸収法を用いた研究から、骨無機質内には重量比で約30~40%ものACPが含まれていると報告されている^{2,8)}。さらに、胎児の骨や生後まもない幼若な骨では、ACPが骨無機質の70%近くも占めており、成長発育に伴ってこのACP量は減少し、逆に骨アパタイト量が増加すると報告されている¹⁸⁾。なお、Molnar¹⁹⁾は骨組織を電子顕微鏡で観察し、骨芽細胞と形成された骨アパタイトとの間にACPが存在すると報告している。これらの研究に基づいて、最近10年間に発表された骨無機質に関する総説の多くでは、骨無機質はACPとアパタイトの二つの成分から

成りたっており、骨の石灰化過程ではACPが最初に形成され、ついで骨アパタイトに転化すると述べられている。^{20~22)}

しかしながら、最近になってこの骨無機質内でのACPの存在に関して否定的な見解が報告されている^{4, 23)}。その理由としては、溶液中では非常に不安定な存在であるACPが、*in vivo*でアパタイトに転化することなく、長期間安定に存在するとは考えられないことがあげられている。また、ひとつの実験事実として、*in vitro*ではACPからアパタイトへの転化が進むにつれて溶液のpHは低くなるが、骨無機質を水溶液中に浸漬した場合にはpHに変化が認められないことも報告されている²⁴⁾。

従って、骨無機質内でのACPの存在や、このACPから骨アパタイトへの転化過程については、再検討を要する問題を多く残していると考えられる。そこで、本研究ではこれらの問題点について考察をすすめる目的で、*in vitro*でのACPからアパタイト結晶への転化過

程（以下転化過程と記す）と骨無機質の性状について、主にX線回折法を用いて結晶学的な検討を加えた。

本報では、まず転化過程にみられる結晶学的性状（結晶化度、粒子の大きさ、形態）の変化を調べ、ついで Mg^{2+} 、 CO_3^{2-} 、 F^- の各無機イオンがこの転化過程に及ぼす影響について明らかにした。

材料及び方法

(1) ACP の合成

酢酸アンモニウムの $1.5M/800ml$ 溶液を激しく攪拌しながら、この溶液中に酢酸カルシウム $42mM/100ml$ とオスリン酸アンモニウム $25mM/100ml$ の各溶液を同時にすばやく加え反応させた。合成時の溶液の pH はアンモニア水を加えて 7.6 に調整し、反応は $20^\circ C$ で行なった。 Ca^{2+} と PO_4^{3-} の各溶液を加えると、ただちに白濁を生じた。約 $40ml$ の溶液から反

反応生成物を遠沈分離し、ついで 4°C に冷した蒸留水で3回洗った。その後、ドライアイス—アセトンにて凍結乾燥した。白濁を認めてから生成物を凍結するまでに要した時間は5分以内であった。

また、反応生成物の経時的な性状の変化を調べるために、最初の12時間は溶液をゆっくりと攪拌し、その後は7日目まで 20°C の保温器内に静置した。試料の作製に際しては、適当な時間間隔で約40 mlの溶液から反応生成物を遠沈分離し、水洗後、凍結乾燥した。

Mg^{2+} が転化過程に及ぼす影響を調べる実験群では、酢酸マグネシウム8 mM及び2 mMを酢酸カルシウム42 mM溶液中に加えた。 CO_3^{2-} と F^{-} の影響を調べる場合には、炭酸アンモニウムとフッ化ナトリウム(5, 12.5, 25 mM)をそれぞれオスリン酸アンモニウム25 mM溶液中に加えた。これらの実験群におけるACPの合成及び試料の作製は上記と同様にして行なった。

(2) 結晶化度の測定

Harper ら⁷⁾は骨無機質内の結晶質成分量(結晶化度)を求める際に、骨無機質のX線回折像を peak area (回折線強度)とバックグラウンドに区別し、peak areaの大きさを測定している(図1)。

本実験では転化過程にみられる結晶化度の変化を明らかにする目的で、Harper らの方法に準じてアパタイトの(002)及び(310)回折線の peak area を測定した。測定は定時計数法で行ない、(002)回折線については 24.5° から $27.5^{\circ}(2\theta)$ 、(310)回折線については 38° から $41^{\circ}(2\theta)$ までの角度範囲を走査($\frac{1}{4}^{\circ}(2\theta)/\text{分}$)した。また、各回折線の走査に要したと同じ時間(12分)について 24.5° 、 27.5° 、 38° 、 41° の各位置(2θ)でカウント数を計測した。バックグラウンドの大きさ(図1-B)は各角度位置における計測値を平均した値であらわした。peak area (図1-A)については、総カウント数からバックグラウンドにあたるカウント数を除

いた値であらわした。

(3) X線小角散乱法による表面積の測定

転化過程でみられる粒子の大きさの変化を明らかにする目的で、X線小角散乱法を用いて転化過程で得られた各試料の表面積を測定した。

X線小角散乱法は回折角 $5^\circ (2\theta)$ 以下の角度範囲で測定される散乱強度を利用する。この散乱曲線の性質は大きな距離での電子密度のゆらぎによって決定され、通常の広角回折を生じる原子的な大きさの不均一性に依存しない点が大きな特徴である²⁵⁾。Porod^{26,27)}はこの小角散乱曲線の性質を利用して、測定された散乱強度 (I) 比がそれらの試料の表面積 (S) の比率に等しい ($I_1/I_2 = S_1/S_2$) ことを明らかにしている。

本実験では、散乱強度の測定に際して各試料 7 mg を精秤し、試料板 (15×5 mm, 厚さ 0.3 mm) に充填した。その際、試料の密度と厚さが等しくなるように注意した。散乱強度の

測定は理学電機製小角散乱装置を用いて、 3° から 5° (散乱角) の角度範囲について走査速度 $2^\circ/\text{分}$, チャート送り速度 $1\text{cm}/\text{分}$, 時定数 5sec の条件で行なった。なお, Porod の理論は完全にポイントコリメーションされた散乱強度について成立するものである。ただし, 散乱強度の測定に際しては強度をかせぐ目的で、一般に縦に長い有限幅のスリット系が用いられる。そのため、各試料の表面積を求める場合には、Schmidt らの方法^{28,29)} に準じて実測散乱強度のスリットコリメーションによる誤差を補正した。なお、散乱強度の測定に用いたスリット系及び補正方法の詳細については別途に報告した³⁰⁾。

以上の測定に用いたX線回折条件は表-1に示した。また、以上の解析に必要な計算はすべて、大阪大学計算機センターNEAC 2200/500電子計算機を用いて行なった。

(4) 電子顕微鏡による形態観察

各試料をカーボン補強したコロジオン膜上

に載せ、HU-12A 型電子顕微鏡により、100 kV で観察した。なお、必要に応じて試料冷却装置を利用した。

結 果

(1) 転化過程にみられた結晶学的性状の変化

(1) 結晶化度の変化

凍結乾燥した各粉末試料の X 線回折像を測定すると、1.5~2.0 時間（白濁を認めてからの経過時間をあらわす）の試料では、アパタイトの (002) 回折線がバックグラウンドから分離してくることがわかった（図 2）。また、4.5 時間の試料では (002) 回折線の強度は強くなり、(310) 回折線も認められた。

図 3 は、転化過程で認められた (002) 及び (310) 回折線の peak area の経時的な変化を示したものである。なお、各粉末試料を試料板に充填する際の配向状態や密度の違いによって、カウント数に誤差を生じることが考え

られる。そこで、同一試料について充填、カウント数の測定を数回繰り返し行なったところ、測定値のバラツキの程度は十分に小さいことが確かめられた(表2)。また、散乱強度は試料の構成原子によって決定されるが、転化過程で得られた各試料については吸着水量が異なっていると考えられる。そのため、各試料を約150℃で加熱し、吸着水の蒸発に伴う重量減少量を測定すると、ACPでは約22%(重量比)の値が得られた。また、転化過程で得られたアパタイトについては、反応時間に伴って吸着水量は減少することがわかった(表3)。従って、各試料の peak area の値を比較する場合には、散乱強度に及ぼす吸着水の影響を考慮に入れる必要がある。そこで、吸着水を最も多量に含んでいるACPについて、吸着水による散乱強度が全散乱強度に占める割合を計算してみると約3%にすぎないことが確かめられた。

図3に示した結晶化度の変化曲線から、転

化過程は3つの時期に区分することができた。すなわち、反応開始時から約1.5時間のあいだでは、peak areaには殆んど変化が認められず、ACPが溶液中で安定に存在していた(矛1期)。この時期について、peak areaは短時間(2.0~4.0時間)に急激に大きくなった(矛2期)。その後、peak areaは反応時間とともに除々に大きくなる傾向が認められた(矛3期)。

(ロ) 表面積の変化

Porodの理論によれば、散乱強度(I)と散乱角(ε)のあいだで $\log(I)$ vs. $\log(\varepsilon)$ のプロットを行なうと、高角度範囲では直線関係が得られ、この直線の勾配は3~4の値を示すことが知られている^{26,27)}。転化過程で得られた各試料の散乱曲線についても、 $\log(I)$ vs. $\log(\varepsilon)$ は50' (ε) 以上の角度範囲で直線関係が得られ、その勾配もほぼ等しい値(約4)を示した(図4)。そこで、各試料について50' から60' の角度範囲で求められた

散乱強度(スリットコリメーションの補正を加えた値)を平均し、それらの強度比から $I_1/I_2 = S_1/S_2$ の関係に従って表面積比を求めた。

図5は、24時間の試料の表面積を1とした場合の、経時的な表面積の変化を示したものである。この結果、peak area が急激に大きくなる時期に一致して、表面積も急激に大きく(約4~5倍)なることがわかった。なお、3時間から24時間(第3期の初期)までの試料については表面積に殆んど変化が認められなかった。ただし、その後は経過時間とともに表面積は徐々に減少していくことがわかった。

(1) 形態の変化

ACP試料(0時間から1.5時間の試料)を電子顕微鏡により観察すると、約200~1000Åの球状の粒子が認められた。また電子線照射により空孔が生じた(図6-A)。なお、これら粒子の電子線回折像では散漫な散乱像が認められた。2時間から24時間(第2期から

チ3期初期)までの試料では、個々のアパタイト結晶を明確に区別することはできず、不規則な形状を示す凝集体(cluster)として観察された(図6-B)。しかしながら、これら試料では既にアパタイト様の回折像が得られた。7日目の試料では、幅が約 $60\sim 80\text{ \AA}$ の棒状結晶が認められた(図6-C)。

(2) 転化過程に及ぼす各種イオンの影響

Mg^{2+} , CO_3^{2-} , F^- の各イオンを合成時の溶液に添加した各実験群について、転化過程にみられる結晶化度の変化を調べ、これらイオンが転化過程に及ぼす影響について比較した。

(1) magnesium

Mg^{2+} を加えた実験群で測定された peak area の変化を図7に示した。 8 mM の Mg^{2+} を加えた場合の peak area の変化については、図3に示した結果(イオンを加えていない実験群で得られた peak area の変化)と極めて類似していた。ただし、 Mg^{2+} 濃度を 21 mM に高めると、ACPが安定に存在しうる期間(チ1

期) 及び第2期に要する時間はともに1に延長することになった。

(ロ) carbonate

各濃度(5, 12.5, 25mM)の CO_3^{2-} を加えると、第1期はいずれの実験群においても延長した(図8)。特に、25mMの CO_3^{2-} を加えた場合には、第1期に約20時間を要した。また、第2期に要する時間も延長することになった。

(ハ) fluoride

図9は F^- を加えた実験群で測定されたpeak areaの変化を示したものである。5mMの F^- を加えた実験群においては、 Mg^{2+} や CO_3^{2-} の場合とは反対に、第1期及び第2期に要する時間はいずれも短縮した。ただし、 F^- 濃度を12.5, 25mMと高めると、第1期に要する時間は5mMの F^- を加えた場合よりも延長した。ただし、第2期については、5mMの F^- を加えた場合とほぼ同じ時間(約1時間)を要することになった。なお、25mMの

F⁻を加えた実験群ではアパタイトの回折像に混って、わずかにCaF₂の回折像も認められた。

(二) 各種イオンの効果の比較

表4は、転化過程に及ぼすMg²⁺, CO₃²⁻, F⁻の影響を比較したものである。高濃度のMg²⁺と、本実験で用いた各濃度のCO₃²⁻は、ACPが溶液中で安定に存在しうる期間を延長させる作用を示した。なお、各実験群を通して25 mMのCO₃²⁻を加えた場合に、ACPは最も長時間(約20時間)安定に存在し得ることがわかった。また、表4では各実験群で得られた24時間目のアパタイトについて、そのpeak areaの大きさを示した。その結果、8 mM及び21 mMのMg²⁺を加えた場合には、比較対照としたイオンを加えていない実験群で得られたアパタイトのpeak areaと殆んど同じ大きさを示した。CO₃²⁻を加えた場合には、他の実験群に比べてpeak areaは著しく小さくなった。またこのpeak areaの変化はCO₃²⁻濃

度に依存していることが確かめられた。 F^- を加えた場合には、 CO_3^{2-} の場合と逆に、 F^- 濃度が高いほど peak area の値は大きくなることがわかった。

考 察

(1) ACP から アパタイト への転化の機構について

X線回折法により散漫な散乱像を示す構造については、一般に (1) 原子の配列が不規則で結晶格子に相当する周期構造をもたない (本来の意味での amorphous な構造) 場合と、(2) 結晶格子としてならぶ範囲が非常に小さいために十分な回折線強度が得られない場合の二つがあげられる^{31, 32)}。

ACP の構造については (1) の場合に相当し、アパタイトの微細結晶ではないと考えられている。すなわち、ACP とアパタイトの X 線回折像を比較すると、図 2 に示したように最

大散乱強度の認められる位置(2θ)が異なっている。この事実に関して、Bienenstockら³³⁾は数個の単位胞(unit cell)から成り立つ微細なアパタイトを仮定した場合にも、その回折像がACPの回折像とは一致しないことを明らかにしている。また、ACPのCa/Pモル比は多くの場合に1.5に近い値を示すこと¹⁵⁾や、ACPを加熱処理すると600~700℃の間で $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ に転化すること³⁴⁾などが知られている。これらの結果から、ACPはアパタイトと異なる組成をもつと考えられており、一般には $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$ としてあらわされている^{34~36)}。さらに、動径分布解析法を用いた最近の研究では、ACPでは約9.5 Å以上の範囲に及ぶ原子の結合関係が認められないことから、ACPを構成する最小単位の組成は $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ であるという考え方も提唱されている^{37, 38)}。なお、本実験で合成したACPを電子顕微鏡で観察すると、200~1000 Åの大きさをもつ球状粒子として認められた。また、ACPは転化

過程で得られたアパタイトに比べて、表面積は非常に小さい(約 $1/5 \sim 1/10$)が、多量の吸着水を含んでいることが確かめられた。Holmesら³⁹⁾もガス吸着法を用いた実験において、ACPの表面積は約 $60 \text{ m}^2/\text{g}$ であり、ACPから転化したアパタイトは約 $200 \text{ m}^2/\text{g}$ の表面積をもっと報告している。従って、電子顕微鏡やX線小角散乱法で捉えられたACP粒子については、 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ あるいは $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ の組成をもつイオンの凝集体の間に水分子が介在して、大きな集合体を構成していると考えられる。

つぎに、ACPがアパタイトに転化する機構については、これまでに二つの考え方が提唱されている。そのひとつは、ACPがもとの原子配置を保ったままアパタイトの結晶格子に組み込まれるという考え方である⁴⁰⁾。他のひとつはアパタイトの核が新たに形成されるというもので、転化過程においてACPはいったん溶解し、アパタイトの核形成に必要な Ca^{2+} と PO_4^{3-} の供給源の役割を果たしているとい

う考え方である^{16,41)}。本実験で転化過程にみられる peak area の変化を調べたところ、peak area が急激に大きくなる時期を含む、いわゆる S 字状の変化曲線が得られた。さらに表面積の変化を調べた結果からも、この peak area が急激に大きくなる時期に一致して、表面積も増加することが確かめられた。Walton⁴²⁾ は、結晶化の過程が S 字状の変化曲線であらわされる場合には、この過程で新たに核形成が生じていることを示していると述べている。従って、転化過程でみられた peak area と表面積の変化曲線は、転化過程でアパタイトの核が新たに形成されるという後者の考え方を支持するものである。なお、本実験で区別した転化過程の三つの時期は、核形成に必要な誘導期 (induction period)、核形成期及び結晶成長期を意味すると考えられる。

転化過程の核形成期に peak area や表面積が急激に増加する現象については、小さな表面積をもつ ACP が溶解し、微細なアパタイト

の核が多数形成されたことによると考えられる。 Boskey ら⁴³⁾は誘導期から核形成期に移行する際の活性化エネルギー(約33 kcal/mol)が、核形成期にみられる活性化エネルギー(約16 kcal/mol) よりも高い値を示すことを報告している。従って、最初のアパタイトの核が形成されるためには Ca^{2+} と PO_4^{3-} の非常に高度の過飽和状態を必要とするが、いったん核が形成された後ではアパタイトの核自身が触媒的な役割を果たして核形成を進行させると考えられる。つぎに、核形成期から結晶成長期に移行すると peak area は大きくなるが、その増加の速度は非常に遅くなった。この理由としては、ACP が完全に溶解したため核形成に必要な Ca^{2+} と PO_4^{3-} の高度の過飽和状態が維持し得なくなったことによると考えられる。ただし、この時期にアパタイトの結晶成長が続いていることは、表面積が徐々に減少することや、電子顕微鏡により不規則な凝集体が棒状結晶へ形態変化することから

認められた。なお、この結晶成長の機構としては、既存の微細な核の溶解を伴う再結晶化の現象によると考えられる。

(2) 転化過程に及ぼす各種イオンの影響

骨無機質に30~40%ものACPが含まれていると報告されてより、この少量のACPが骨アパタイトに転化することなく、骨無機質内で長時間安定に存在しうる機構について多くの検討がなされてきた。骨無機質内に30~40%ものACP量が維持される理由のひとつとして、骨組織が不断に吸収と新生を繰り返していることから、新生された骨無機質内に少量のACPが含まれていることがあげられてきた⁴⁴⁾。しかしながら、骨の改造速度については長幹骨の緻密質で年に5~11%、また骨全体でも1日当り約0.004%程度にすぎないことが知られている⁴⁵⁾。従って、この程度の改造現象によって骨無機質量の30~40%に相当するACPが不断に新生されているとは考えられない。そこで次の考え方として、ACP

からアパタイトへの転化を阻害する物質の存在が注目されている^{44, 46~53)}。これまでの研究においては、in vivoでACPを安定化させる作用を示す物質として、 Mg^{2+} ^{46, 47)}、 CO_3^{2-} ^{5, 44, 48)}、pyrophosphate⁴⁹⁾、diphosphonate⁵⁰⁾、ATP^{51~53)}などがあげられている。

本実験においては、高濃度(21 mM)の Mg^{2+} や5~25 mMの CO_3^{2-} はACPを安定化させるとともに、核形成期においても抑制的に働くことが確かめられた。この Mg^{2+} や CO_3^{2-} の作用機序については、ACPの溶解度を下げる⁴⁶⁾ことにより、アパタイトの核形成に必要な Ca^{2+} と PO_4^{3-} の供給を阻たげていると考えられる。なお、Thomas⁵⁴⁾、Jethi⁵⁵⁾らは転化過程でみられる Mg^{2+} の抑制作用が Ca^{2+} 濃度を増すことによって消失すると報告している。本実験においても、8 mMの Mg^{2+} は転化過程に殆んど影響を及ぼさないことが確かめられた。従って、 Mg^{2+} が抑制作用を示す際の存在様式としては、 Ca^{2+} と競合的な関係をもちながらACP表面に

吸着していると考えられる。 CO_3^{2-} に関して
も、 CO_3^{2-} を含む溶液中で合成されたACPは
 CO_3^{2-} を含んでおり³⁶⁾、その多くはACP表面に
吸着していると考えられている⁵⁶⁾。なお、
Blumenthalら⁵⁷⁾はATPの作用機序に関連した
報告のなかで、形成されたアパタイトの微細
な核(embryonicな核)にATPが吸着すると、
この微細な核は溶液中で安定に存在しうるの
に必要な大きさの核(criticalな核)にまで成
長しえないため再び溶解してしまうと述べて
いる。 Mg^{2+} や CO_3^{2-} がアパタイトの growth
site に吸着して、結晶成長を抑制することは
よく知られている^{58, 59)}。従って、これらイ
オンが転化過程で形成されたembryonicな核
の表面に吸着し、criticalな核への成長を阻
害することも十分に考えられる。

F^- が転化過程に及ぼす作用としては、低濃
度(5mM)の場合には核形成の誘導期を短縮す
るが、高濃度になると低濃度の場合よりも誘
導期は延長することが注目される。著者ら

が先に小角散乱法を用いてACPの粒度分布を調べた実験では、 F^- (4.2 mM) の存在下で合成したACPと、比較対照のために F^- を加えずに合成したACPとでは、その粒度分布に以下のような違いのあることが確かめられた³⁰⁾。すなわち、 F^- を加えていない実験群では、ACPは100 Å以上の大きな慣性半径をもつ成分を最も多く含んでおり、アパタイトに転化するにつれて小さい慣性半径をもつ成分が増加した。他方、 F^- を加えた場合には、反応開始直後に得られたACP試料で既に小さな(約20 Åあるいはそれ以下)慣性半径をもつ成分が多く含まれていた。この解析結果から、 F^- の存在下ではACPが形成されるとともに、アパタイトの核形成も生じていることが示唆された。従って、低濃度の F^- を加えた場合に誘導期が短縮する理由としては、 F^- によるアパタイトの核形成の促進作用が寄与していると考えられる。他方、 F^- 濃度が高くなると誘導期が延長する傾向を示すことについては、

Termineら¹⁷⁾も同様の現象を報告している。

また、Hasvoldら⁶⁰⁾は高濃度の F^- の存在下では形成されたACP内に F^- がとりこまれていることを示唆している。従って、高濃度の F^- はACPの組成や性状に影響を及ぼし、ACPの溶解度をさげる効果をもたらすのかも知れない。

本実験において Mg^{2+} , CO_3^{2-} , F^- の各無機イオンがACPの安定化に及ぼす影響を調べたところ、ACPが最も長く溶液中で安定に存在しうる期間は約20時間であった。これまでの報告においても各種の無機イオンあるいは有機物質を含む溶液中でACPが安定に存在しうる期間については、数時間から数日の範囲にあることが知られている^{46-53, 57)}。

Blumenthalら⁶¹⁾は牛の血漿中でACPが安定に存在しうる期間を調べ、約30時間にすぎないと報告している。以上のことから、骨無機質内の非晶質成分についての考察をすすめる際の重要な結論としては、無機イオンあるいは有機物質などの阻害物質の存在下でもACPは

溶液中に長期間安定に存在することはできず、比較的容易にアパタイトに転化してしまうと考えられる。

最後に、アパタイトの(002)及び(310)回折線のpeak areaの大きさは、 CO_3^{2-} や F^- によって影響されることが注目された。このpeak areaの変化をもたらす原因としては、試料内の結晶質の量的な変化と、結晶自身の質的な(結晶性)変化が考えられる。核形成期に認められたpeak areaの急激な増加は、主にアパタイトの核が増加するという前者の原因によると考察した。しかしながら、結晶成長期においてはACPは完全に溶解しており、アパタイトへの転化が終了していると考えられる。従って、結晶成長期でpeak areaが増加する原因としては、アパタイトの量的な変化よりもむしろ質的な変化によると考えられる。さらに、 CO_3^{2-} や F^- がpeak areaの大きさに違いをもたらす機構を考察する際にも、これらイオンがアパタイトの結晶性に及ぼす

影響を明らかにする必要があると考えられる。
これらの問題点については、骨無機質内の非晶質成分の定量方法にみられる問題点と関連して、次報において詳細な検討を加える。

統括ならびに結論

本報では、X線回折法を用いてACPからアパタイトへの転化過程にみられる結晶学的性状の変化を調べ、さらに Mg^{2+} , CO_3^{2-} , F^- の各イオンがこの転化過程に及ぼす影響について検討した。その結果、以下のことが明らかにされた。

(1) アパタイトの(002)及び(310)回折線のpeak areaを測定した結果、転化過程はpeak areaが急激に増加する時期を含むS字状の変化曲線であらわされた。また、X線小角散乱法により表面積の変化を調べた結果、peak areaが急激に増加する時期に一致して表面積も増

加することがわかった。従って、転化過程ではアパタイトの核形成が新たに生じており、ACPは核形成に必要な Ca^{2+} と PO_4^{3-} の供給源の役割を果たしていることが確かめられた。

(2) 電子顕微鏡による観察から、ACPは200~1000 Åの球状粒子として認められた。また、ACPから転化したアパタイトの形態に関しては、結晶成長が進むにつれて不規則な凝集体から棒状結晶へ変化した。

(3) 8mMの Mg^{2+} を加えた場合には、転化過程で著明な変化は認められなかった。他方、21mMの Mg^{2+} を加えると、ACPが溶液中で安定に存在しうる期間は長くなり、核形成期に要する時間も長くなった。

(4) CO_3^{2-} (5~25mM)を加えた場合には、ACPは長時間(最も長い場合で約20時間)安定に存在し、核形成期に要する時間も長くなった。また、溶液中の CO_3^{2-} 濃度が高いほどpeak areaは小さな値を示した。

(5) 5mMの F^- を加えた場合には、アパタイト

トの核形成は促進された。ただし、高濃度の F^- を加えた場合(12.5, 25 mM)には、この核形成の促進作用は認められなかった。なお、溶液中の F^- 濃度が高くなるにつれて peak area は大きな値を示した。

以上の結果から、 Mg^{2+} , CO_3^{2-} , F^- の各無機イオンの存在下においても ACP がアパタイトに転化することなく長期間安定に存在することはできないと考えられる。

文 献

31

- 1) DeJong, W.F.: La substance minerale dans les os.
Rec.Trav.Chim., 45:445-448, 1926.
- 2) Carlström, D. and Glas, J.E.: The size and shape of
the apatite crystallites in bone as determined
from line-broadening measurements on oriented
specimens. Biochem.Biophys.Acta, 35:46-53, 1959.
- 3) Hayek, E.: Die Mineralsubstanz der Knochen. Klin.
Woch., 45:857-863, 1967.
- 4) Brown, W.E. and Chow, L.C.: Chemical properties of
bone mineral. Annual Rev.Mat.Sci., 6:213-236, 1976.
- 5) Francis, M.D. and Webb, N.C.: Hydroxyapatite forma-
tion from a hydrated calcium monohydrogen phosphate
precursor. Calcif.Tiss.Res., 6:335-342, 1971.
- 6) Neuman, W.F. and Bareham, B.J.: Evidence for the
presence of secondary calcium phosphate in bone
and its stabilization by acid production. Calcif.
Tiss.Res., 18:161-172, 1975.
- 7) Harper, R.A. and Posner, A.S.: Measurement of non-
crystalline calcium phosphate in bone mineral.
Proc.Soc.Exp.Biol., 122:137-142, 1966.
- 8) Termine, J.D. and Posner, A.S.: Amorphous/crystalline
interrelationships in bone mineral. Calcif.Tiss.
Res., 1:8-23, 1967.

- 9) Termine, J.D., Wuthier, R.E. and Posner, A.S.:
Amorphous-crystalline mineral changes during
endochondral and periosteal bone formation.
Proc.Soc.Exp.Biol.Med., 125:4-9, 1967.
- 10) Quinaux, N. and Richelle, L.J.: X-ray diffraction
and infrared analysis of bone specific gravity
fractions in the growing rat. Israel J.Med.Sci.,
3:677-690, 1967.
- 11) Walton, A.G., Bodin, W.J., Furedi, H. and Schwartz, A.:
Nucleation of calcium phosphate from solution.
Canad.J.Chem., 45:2695-2701, 1967.
- 12) Müenzenberg, K.J. and Gebhardt, M.G.: Brushite,
octacalcium phosphate, and carbonate-containing
apatite in bone. Clin.Orthop., 90:271-273, 1973.
- 13) Lenart, G., Bidlo, G. and Pinter, J.: Some basic
problems in the examination of the calcium
hydrogen phosphate of bone. Clin.Orthop., 83:
263-275, 1972.
- 14) Eanes, E.D., Gillessen, I.H. and Posner, A.S.:
Intermediate states in the precipitation of
hydroxyapatite. Nature, 23:365-367, 1965.
- 15) Eanes, E.D., Gillessen, I.H. and Posner, A.S.:
Mechanism of conversion of non-crystalline
calcium phosphate to crystalline hydroxyapatite.

In Crystal growth(ed. by Preiser,H.S.),pp.373-376,Oxford,Pergamon Press,1967.

- 16) Termine,J.D. and Posner,A.S.: Calcium phosphate formation in vitro. I.factors affecting initial phase separation. Arch.Biochem.Biophys.,140: 307-317,1970.
- 17) Termine,J.D.,Peckauskas,R.A. and Posner,A.S.: Calcium phosphate formation in vitro. II.effects of environment on amorphous-crystalline transformation. Arch.Biochem.Biophys.,140:318-325, 1970.
- 18) Termine,J.D. and Posner,A.S.: Infrared analysis of rat bone:age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions. Science,153:1523-1525,1967.
- 19) Molnar,Z.: Development of the parietal bone of young mice: I.crystals of bone mineral in frozen-dried preparation. J.Ultrastruct.Res.,3:39-45, 1959.
- 20) Posner,A.S.: Crystal chemistry of bone mineral. Phys.Rev.,49:760-791,1969.
- 21) Eanes,E.D. and Posner,A.S.: The formation and structure of bone mineral. In Biological calcification:cellular and molecular aspects(ed. by

- Schraer, H.), New York, Appleton-Century-Croft, 1969.
- 22) Becker, G.L.: Calcification mechanisms: roles for cell and mineral. *J. Oral Path.*, 6:307-315, 1977.
- 23) Posner, A.S. and Betts, F.: Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure. *Accounts Chem. Res.*, 8:273-281, 1975.
- 24) Posner, A.S., Blumenthal, N.C., Boskey, A.L. and Betts, F.: Synthetic analogue of bone mineral formation. *J. Dent. Res.*, 54B:88-93, 1975.
- 25) Alexander, L.E.: X-ray diffraction methods in polymer science, pp.137-197, New York, John Wiley & Sons, Interscience, 1969.
- 26) Porod, G.: Die Röntgen Kleinwinkelstreuung von dichtgepackten Kolloiden Systemen I. *Kolloid-Z.*, 124:83-114, 1951.
- 27) Porod, G.: Die Röntgen Kleinwinkelstreuung von dichtgepackten Kolloiden Systemen II. *Kolloid-Z.*, 125:51-57, 1952.
- 28) Schmidt, P.W. and Hight, R.J.: Slit height corrections in small-angle X-ray scattering. *Acta Cryst.*, 13:480-483, 1960.
- 29) Schmidt, P.W.: Collimation corrections in small-angle X-ray scattering. *Acta Cryst.*, 19:938-942,

1965.

- 30) 青葉孝昭, 森脇豊, 堤定美: X線小角散乱法による非晶質リン酸カルシウムからアパタイト結晶への転化過程に関する研究. 基礎誌, 1978(投稿中).
- 31) Turnbull, D. and Polk, D.E.: Structure of amorphous semiconductors. J. Non-Crystalline Solids, 8-10: 19-35, 1972.
- 32) Termine, J.D. and Lundy, D.R.: Vibrational spectra of some phosphate salts amorphous to X-ray diffraction. Calcif. Tiss. Res., 15:55-70, 1974.
- 33) Bienenstock, A. and Posner, A.S.: Calculation of the X-ray intensities from arrays of small crystallites of hydroxyapatite. Arch. Biochem. Biophys., 124:604-615, 1968.
- 34) Eanes, E.D.: Thermochemical studies on amorphous calcium phosphate. Calcif. Tiss. Res., 5:133-145, 1970.
- 35) Eanes, E.D. and Posner, A.S.: Intermediate phases in the basic solution preparation of alkaline earth phosphates. Calcif. Tiss. Res., 2:38-48, 1968.
- 36) Termine, J.D. and Eanes, E.D.: Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations. Calcif. Tiss. Res., 10:171-197, 1972.
- 37) Betts, F. and Posner, A.S.: An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate.

Mat.Res.Bull.,9:353-360,1974.

- 38) Posner,A.S.,Blumenthal,N.C. and Betts,F.:
Structure and stabilization of cytoplasmic
amorphous calcium phosphate. 22nd annual ORS,
p.133,1976.
- 39) Holmes,J.M. and Beebe,R.A.: Surface areas by gas
adsorption on amorphous calcium phosphate and
crystalline hydroxyapatite. Calcif.Tiss.Res.,
7:163-174,1971.
- 40) West,V.C.: Observations on phase transformation
of a precipitated calcium phosphate. Calcif.
Tiss.Res.,7:212-219,1971.
- 41) Blumenthal,N.C. and Posner,A.S.: Hydroxyapatite:
mechanism of formation and properties. Calcif.
Tiss.Res.,13:235-243,1973.
- 42) Walton,A.G.: The formation and properties of
precipitates,pp.10-56,Wiley-Interscience,New York,
1967.
- 43) Boskey,A.L. and Posner,A.S.: Conversion of amor-
phous calcium phosphate to microcrystalline
hydroxyapatite. A pH-dependent,solution-mediated,
solid-solid conversion. J.Phys.Chem.,77:2313-
2317,1973.

- 44) Termine, J.D.: Mineral chemistry and skeletal biology. Clin.Orthop., 85:207-241, 1972.
- 45) Eanes, E.D., Termine, J.D. and Posner, A.S.: Amorphous calcium phosphate in skeletal tissues. Clin.Orthop., 53:223-235, 1967.
- 46) Nielsen, S.P.: Effects of magnesium on calcification of young bone in tissue culture. Calcif. Tiss. Res., 11:78-94, 1973.
- 47) Boskey, A.L. and Posner, A.S.: Magnesium stabilization of amorphous calcium phosphate: a kinetic study. Mat. Res. Bull., 9:907-916, 1974.
- 48) Greenfield, D.J., Termine, J.D. and Eanes, E.D.: A chemical study of apatites prepared by hydrolysis of amorphous calcium phosphates in carbonate-containing aqueous solutions. Calcif. Tiss. Res., 14:131-138, 1974.
- 49) Fleisch, H., Russell, R.G.G., Bisaz, S., Termine, J.D. and Posner, A.S.: Influence of pyrophosphate on the transformation of amorphous to crystalline calcium phosphate. Calcif. Tiss. Res., 2:49-59, 1968.
- 50) Francis, M.D., Russell, R.G.G. and Gleish, H.: The inhibitory effects of diphosphonates on the formation of calcium phosphate crystals in vitro and on pathological calcification in vivo. Science 165:1264-1265, 1969.

- 51) Meyer, J.L., McCall, J.T. and Smith, L.H.: Inhibition of calcium phosphate crystallization by nucleoside phosphates. *Calcif. Tiss. Res.*, 15:287-293, 1974.
- 52) Termine, J.D. and Conn, K.M.: Inhibition of apatite formation by phosphorylated metabolites and macromolecules. *Calcif. Tiss. Res.*, 22:149-157, 1976.
- 53) Blumenthal, N.C., Betts, F. and Posner, A.S.: Nucleotide stabilization of amorphous calcium phosphate. *Mat. Res. Bull.*, 10:1055-1060, 1975.
- 54) Thomas, W.C. and Tomita, A.: Mineralization of human and bovine tissue in vitro. *Amer. J. Path.*, 51:621-628, 1967.
- 55) Jethi, R.K. and Wadkins, C.L.: Studies of the mechanism of biological calcification. I. evidence for a multi-step mechanism of calcification by tendon matrix. *Calcif. Tiss. Res.*, 7:277-289, 1971.
- 56) Posner, A.S.: Bone mineral on the molecular level. *Fed. Proc.*, 32:1933-1937, 1973.
- 57) Blumenthal, N.C., Betts, F. and Posner, A.S.: Stabilization of amorphous calcium phosphate by Mg and ATP. *Calcif. Tiss. Res.*, 23:245-250, 1977.
- 58) Tomazic, B., Tomson, M. and Nancollas, G.H.: Growth of calcium phosphates on hydroxyapatite crystals:

the effect of magnesium. Archs oral Biol.,20:
803-808,1975.

- 59) Ingram,G.S.: The role of carbonate in dental mineral. Caries Res.,7:217-230,1973.
- 60) Hasvold,O. and Dahm,S.: The effect of fluoride on the transformation of amorphous calcium phosphate into crystalline apatite. Calcif.Tiss.Res., 22(Suppl.):425-427,1977.
- 61) Blumenthal,K.C. and Posner,A.S.: Effect of preparation conditions on the properties and transformation of amorphous calcium phosphate. Mat.Res.Bull.,7:1181-1190,1972.

図の説明

図 1. アパタイトの (002) 及び (310) 回折線の Peak area (A) とバックグラウンド (B).

図 2 ACP から アパタイト への転化過程にみられた X 線回折像の変化。

図 3 ACP から アパタイト への転化過程にみられた Peak area の変化。

(A) (002) 回折線の Peak area の変化曲線

(B) (310) 回折線の Peak area の変化曲線

図 4 $\log I$ vs. $\log(\varepsilon)$.

I はスリット系の補正を加えた小角散乱強度。 ε は散乱角。図内に示した時間は反応時間をあらわす。

図 5 ACP から アパタイト への転化過程に

みられた表面積の変化。各試料の表面積は24時間目の試料を1とし、それとの相対値で示した。

図6 ACPからアパタイトへの転化過程でみられた形態変化。

(A) ACP（反応開始直後の試料）の電子顕微鏡像。電子線回折法による検索では散漫な散乱像が得られた（挿入図）。

(B) 反応開始時から6時間経過した試料の電子顕微鏡像。不規則な凝集体を呈していたが、電子線回折法による検索では、アパタイトの回折像が得られた（挿入図）。

(C) 7日間経過した試料の電子顕微鏡像。アパタイトの特徴である棒状結晶が認められた。

（図内のスケールは0.1 μ をあらわす。）

図7 Mg^{2+} を加えた実験群で得られた Peak area の変化曲線。

図8 CO_3^{2-} を加えた実験群で得られた Peak area の変化曲線。

図9 F^- を加えた実験群で得られた Peak area の変化曲線

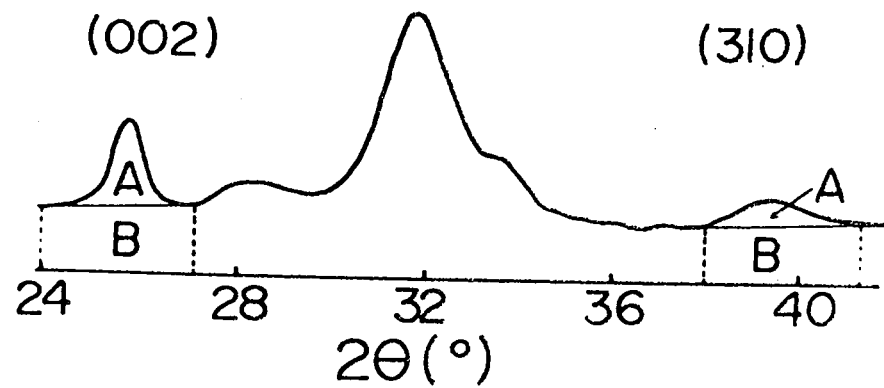


图 1

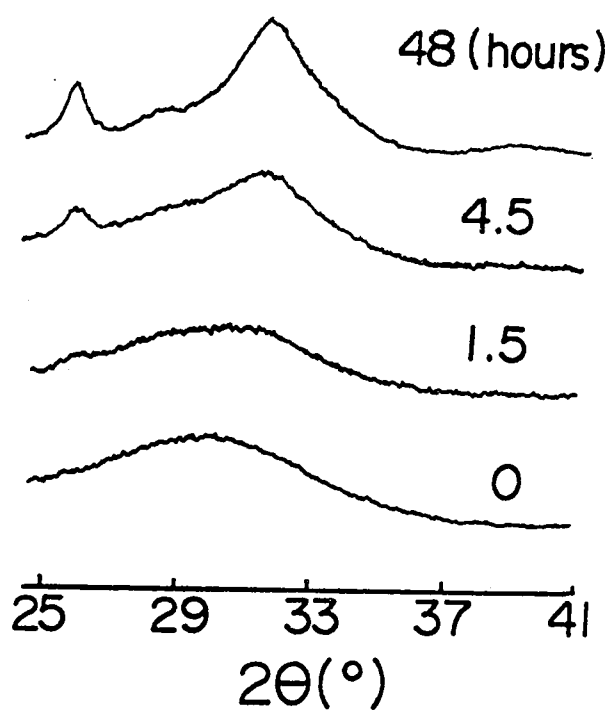


图 2

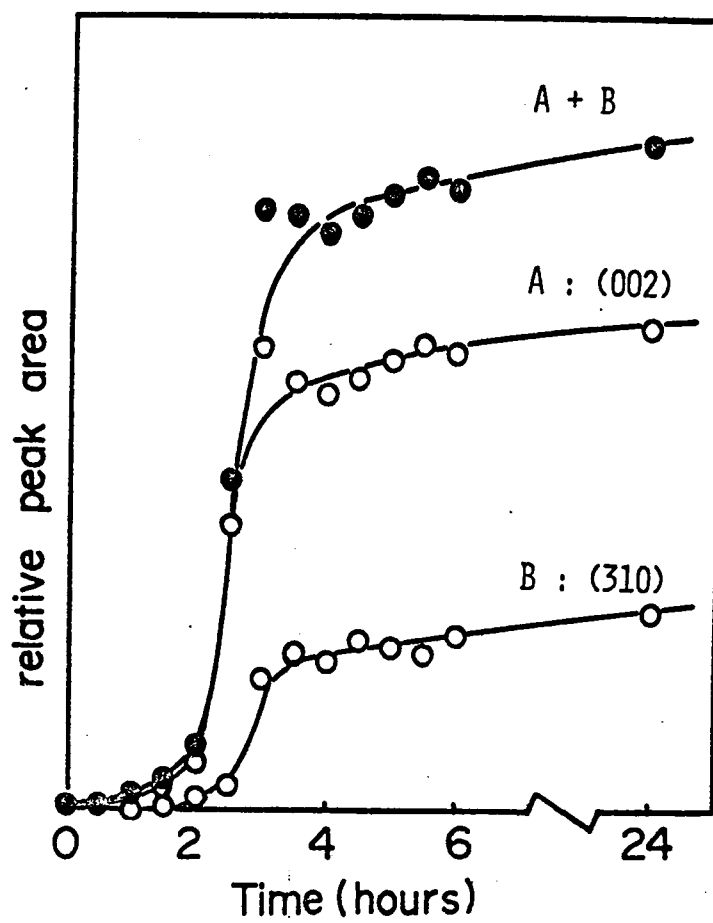


图 3

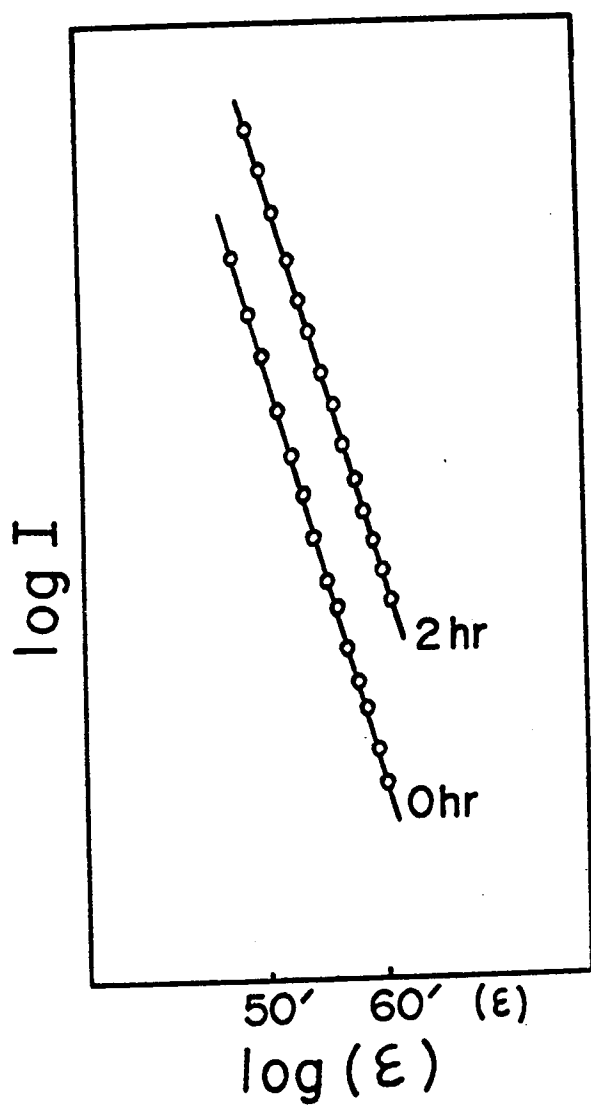


图 4

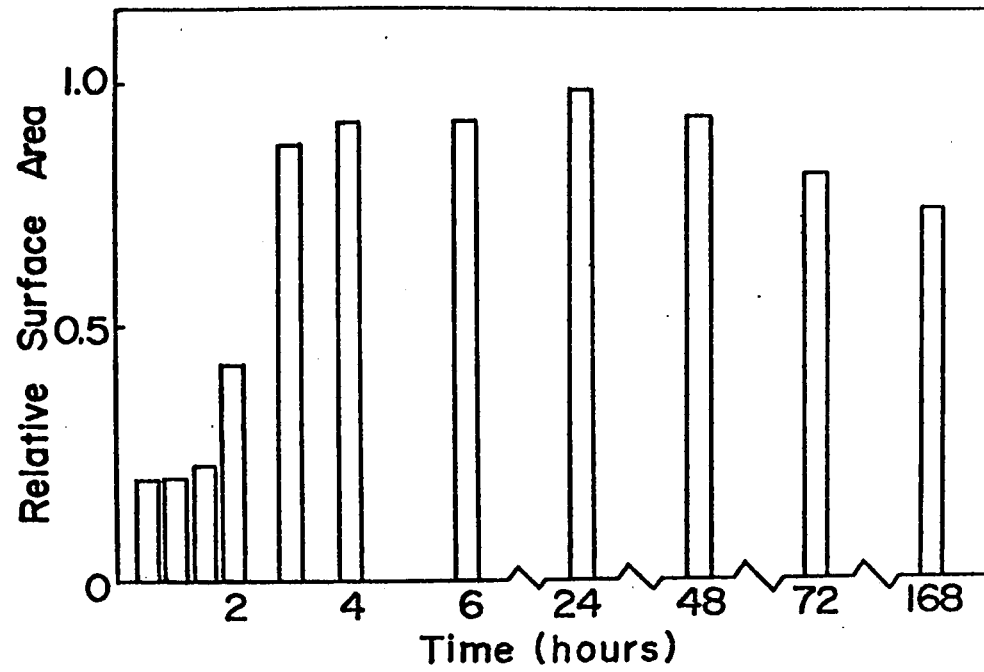
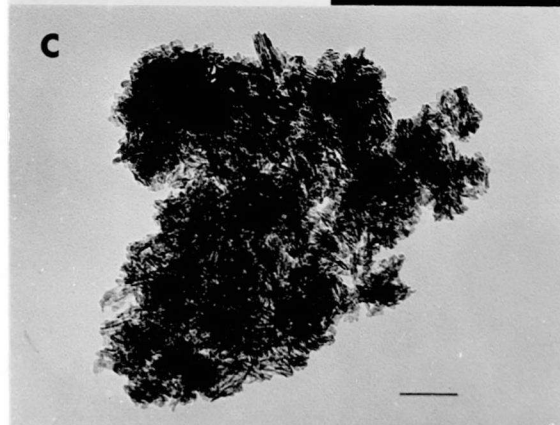
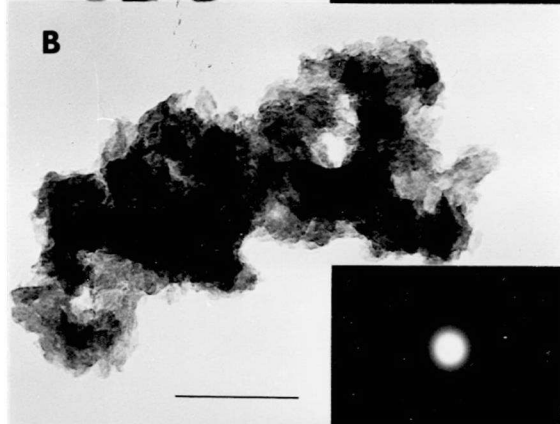
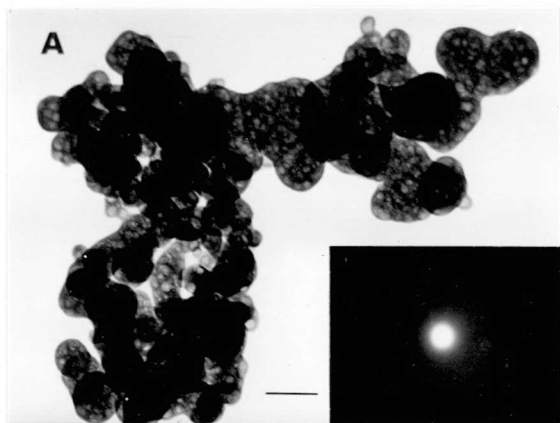


图 5



☒ 6

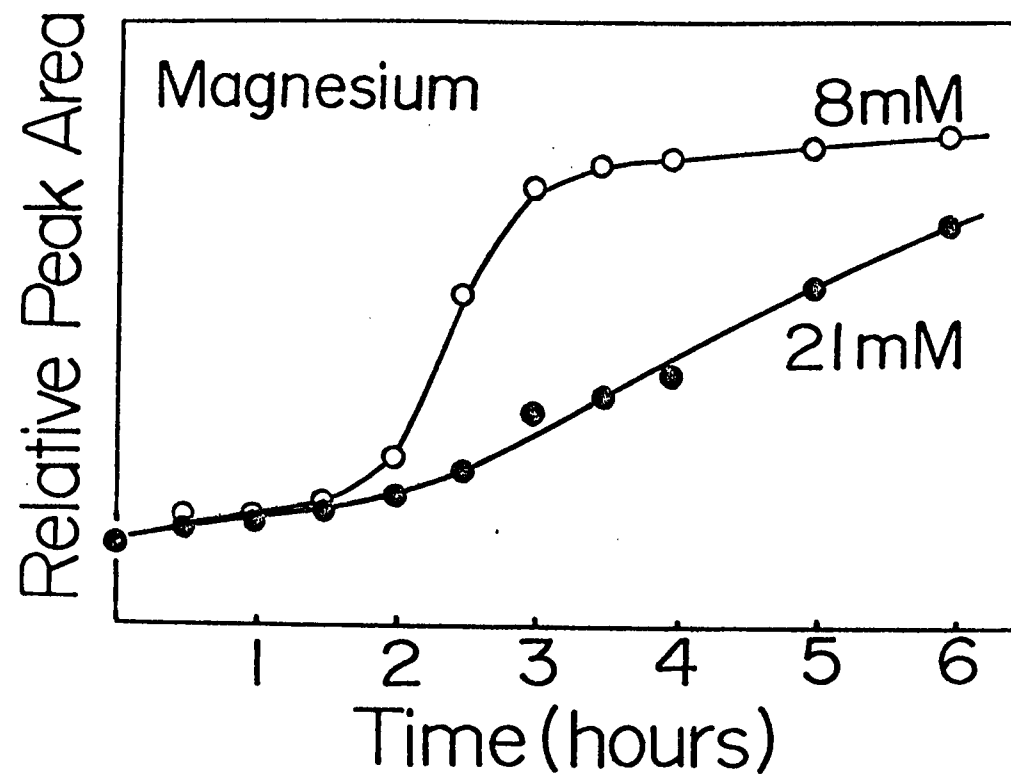


图 7

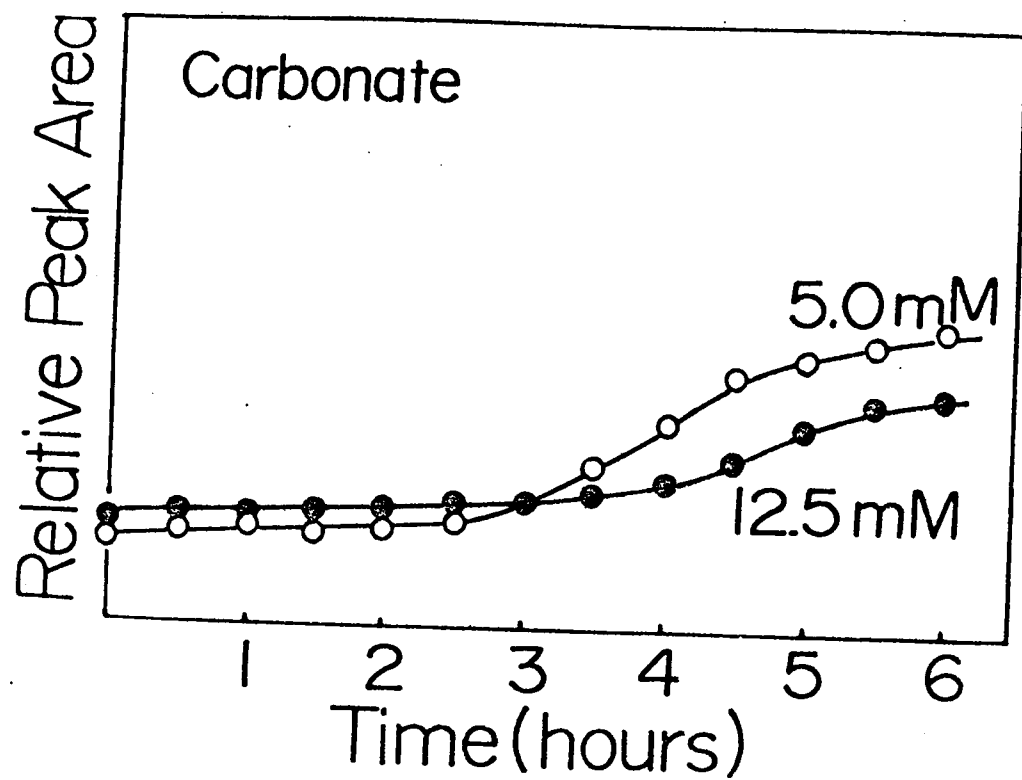


图 8

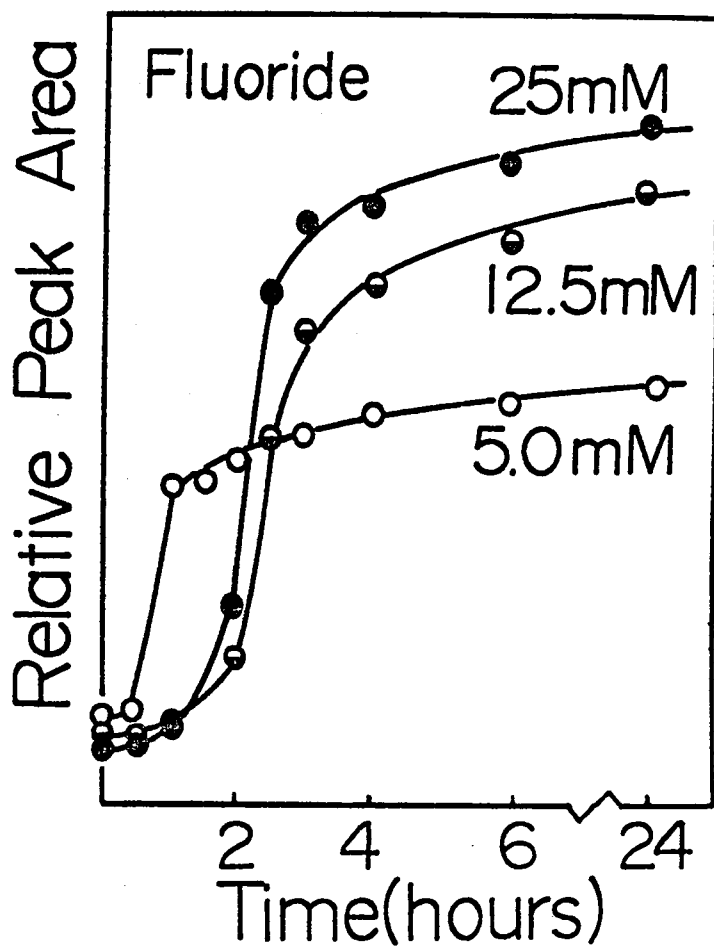


图 9

表1. X線回折の測定条件

X線	CuK α
管電圧, 電流	35 kVp, 23 mA
発散角	1°
受光スリット幅	0.4 mm
装置	Geigerflex D-1

表2. Peak areaの測定値

測定回数	peak area ¹⁾	
	(002)	(310)
1	3510	1100
2	3422	1114
3	3522	1190
4	3669	1253
5	3620	1175
平均 2)	3549 (87)	1175 (59)

(1) 転化過程で得られた4時間目の試料についての測定例を示した。

(2) ()内の数値は標準偏差を示した。

表3. 吸着水量の比較

試料 ¹⁾	吸着水量(重量%)
0 (時間)	21.9
2	16.2
4	13.3
6	13.0
24	11.9
72	7.1
7 (日)	6.6

1) 各試料は反応開始時からの経過時間で示した。

表4. 転化過程に及ぼす各種イオンの影響

添加イオンが濃度 (mM)		転化に要する時間 第1期 ¹⁾ 第2期 ²⁾		Peak area ³⁾ の大きさ
Non	-	1.5	2.0	100
Mg ²⁺	8.0	1.5	2.0	105
	21.0	2.5	4.0	95
CO ₃ ²⁻	5.0	3.0	2.5	70
	12.5	4.0	2.5	45
	25.0	20<	5.0<	-
F ⁻	5.0	1.0>	1.0	105
	12.5	1.5	1.0	180
	25.0	1.5	1.0	210

(1) ACPが溶液中で安定して存在する期間をあらわす。

(2) アパタイトの核形成期。

(3) 各実験群24時間目の試料について、Peak areaの大きさを比較した。Peak areaの大きさは、イオンを加えていない実験群で得られた試料のPeak areaを100とし、それとの相対値であらわした。

抄 録

本報ではX線回折法を用いて、in vitroでの非晶質リン酸カルシウム（ACP）からアパタイトへの転化過程にみられる結晶学的性状の変化を調べた。アパタイトの（002）及び（310）回折線のPeak areaを測定した結果、転化過程はPeak areaが急激に増加する時期を含むS字状曲線であらわされた。また、X線小角散乱法により表面積の変化を調べた結果、Peak areaが急激に増加する時期に一致して、表面積も大きくなることがわかった。従って、転化過程ではアパタイトの核形成が新たに生じており、ACPはいったん溶解して核形成に必要な Ca^{2+} と PO_4^{3-} の供給源の役割を果たしていると考えられた。さらに、Peak areaと表面積の変化曲線から、転化過程は三つの時期（核形成の誘導期、核形成期及び結晶成長期）に区別しうると考えられた。

ACPの合成時の溶液に Mg^{2+} （21mM、

Mg/Ca モル比で 0.5)、あるいは CO_3^{2-} (5 ~ 25 mM、 CO_3/PO_4 モル比で 0.2 ~ 1) を加えると、誘導期及び核形成期に要する時間はともに延長した。ただし、ACP が溶液中で安定に存在しうる時間については、最も長い場合 (25 mM の CO_3^{2-} を加えた実験群) で約 20 時間であった。従って、ACP は Mg^{2+} や CO_3^{2-} の存在下でも溶液中で長期間安定には存在しえず、比較的容易にアパタイトに転化すると考えられた。他方、5 mM の F^- を加えた場合には誘導期及び核形成期はいずれも短縮し、 F^- は核形成の促進作用をもつと考えられた。ただし、 F^- 濃度が高くなると、核形成期のみが短縮し、誘導期には顕著な変化は認められなかった。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った大阪大学歯学部口腔病理学講座八木俊雄教授、ならびに大阪大学歯学部歯科理工学講座山賀礼一教授に深甚なる謝意を表するとともに、終始かわらぬ御指導、御教示いただいた歯科理工学講座森脇豊助教授に深く感謝致します。また御援助いただいた口腔病理学教室諸兄、歯科理工学教室諸兄、ならびに電子顕微鏡室石丸昌司氏に心から御礼申し上げます。

本論文の一部は、第17回歯科基礎医学会（50年，新潟）で発表した。

本研究の経費の一部は、昭和50年度文部省科学研究費（奨励A）によった。

骨無機質内の非晶質及びアパタイト
結晶に関するX線結晶学的研究
II. 非晶質成分の定量に及ぼすアパ
タイトの結晶格子の乱れの影響

青 葉 孝 昭

大阪大学歯学部口腔病理学教室

X-ray diffraction study on the amorphous and
crystalline components in bone mineral.

II. The effect of lattice defects of apatite
on the quantitative analysis of amorphous
component.

Takaaki Aoba (Department of Oral Pathology,
Osaka University Dental School, Osaka)

大阪市北区中之島4丁目3番48号(〒530)

緒 言

非晶質成分と結晶質成分が共存するという現象については、生体硬組織に限らず高分子領域や金属領域などでも認められている^{1,2)}。特に、高分子や金属では非晶質成分が物性に大きな影響を及ぼすことから、非晶質成分の定量的測定が試みられている。その際、X線回折法は他の測定方法（赤外吸収法、密度法、核磁気共鳴法など）と比較して定量性に優れているため、最もよく利用されている³⁾。X線回折法により試料内の結晶質成分と非晶質成分の比率を求める方法は、結晶質成分からのX線散乱はpeak area（回折線強度）に寄与しており、非晶質成分からの散乱はX線回折像のバックグラウンドに寄与するという考え方に基いている^{1,3)}。Harper⁴⁾, Termine⁵⁾らもこの考え方に基いて、骨無機質からのX線回折像をpeak areaとバックグラウンドに区別し、骨無機質内のアパタイトと非晶質成分（

以下ACPと記す)の比率を求めている。

彼らの報告以降、骨無機質は重量比で30~40%もの非晶質成分を含んでいると考えられてきた^{6~8)}。

しかしながら、Posner⁹⁾やBrown¹⁰⁾らは最近になって、溶液中で極めて不安定な存在であるACPがin vivoで長期間安定に存在するとは考えられないことを理由にあげて、骨無機質内の非晶質成分の存在に否定的な見解を報告している。前報¹¹⁾においても、ACPからアパタイトの転化過程(以下転化過程と記す)で抑制的に働く Mg^{2+} や CO_3^{2-} の無機イオンの存在下でもACPは溶液中で長時間安定に存在しえないことが確かめられた。

そこで、本報においては骨無機質内の非晶質成分の存在に関して考察をすすめる目的で、これまで用いられているX線回折法による非晶質成分の定量方法の問題点について検討を加えることにした。その際に、前報¹¹⁾において、アパタイトのpeak areaの大きさは試

料内のアパタイト量の変化とともに、アパタイトの質的な(結晶性)変化にも依存していることが示唆された。そこで、本実験では転化過程で得られたアパタイトの結晶性を結晶子の大きさと結晶格子の乱れに区別して評価し、アパタイトの格子の乱れがpeak areaやX線回折像のバックグラウンドに及ぼす影響について明らかにした。

材料及び方法

(1) アパタイト試料の作製

前報¹⁾と同様にしてACPを合成し、7日間反応させた。ACPから転化したアパタイトを得るために、適当な時間間隔で反応生成物を遠沈分離し、水洗後、凍結乾燥した。

また、 F^- 、 CO_3^{2-} 、 Sr^{2+} 、 Mg^{2+} を合成時の溶液に加え、これらのイオンがアパタイトの結晶性に及ぼす影響について調べた。 F^- はフッ化ナトリウムを用いて、合成時の溶液のF/Caモ

ル比が $1/10$ となるようにオスリン酸アンモニウム溶液中に 4.2 mM 加えた。 CO_3^{2-} はアンモニウム塩を用いてオスリン酸アンモニウム溶液中に 8 mM ($\text{CO}_3/\text{PO}_4 = 1/2$) 加えた。 Sr^{2+} , Mg^{2+} については Ca^{2+} とのモル比が $2/3$ となるように、それぞれの酢酸塩 16.8 mM を酢酸カルシウム溶液中に加えた。 各実験群とも合成時の溶液の pH はアンモニア水を加えて 7.6 に調整した。

(2) アパタイトの結晶性の評価

前報¹⁾の図1に示したように、ACP から転化したアパタイトの各回折線は大きく広がっており、隣接する回折線との分離は困難であった。 ただし、 (002) 回折線については他の回折線との重なりが少なく、比較的単独な回折線プロファイルを得ることができた。 そこで、各実験群で得られたアパタイトについて、その (002) 回折線プロファイルをフーリエ及びバリアンズ解析することにより、結晶子の大きさと格子の乱れを区別して結晶性

の評価を行なった。

フーリエ解析法としては、単独の回折線プロファイルによる解析が可能なSmith法¹²⁾を用いた。ただし、Smith法では他の精度のよい解析法（例えば次数の異なる複数の回折線を利用するWarren法¹³⁾）と比べた場合に、結晶子の大きさについては同程度の解析精度を期待しうるが、他方格子の乱れについては精度のよい解析結果が得られにくいと報告されている¹⁴⁾。そこで、本実験ではSmith法により結晶子の大きさのみを求め、格子の乱れについては同じ回折線プロファイルをバリエーション解析することにより求めた。

Wilson^{15,16)}によれば、回折線プロファイルから求められたバリエーション量(W)は結晶子の大きさ、格子のmistake及び歪みに基づくバリエーション(W_m , W_d)がそれぞれ加成的にあらわれたものと解釈されている。そこで、Smith法により求めた結晶子の大きさからWilsonの式に従って W_p を計算し、 W から W_p を除

いて mistake と歪みによるバリエーション量 (W_{m+s}) を求めた。本実験では格子の乱れの大きさをあらわす場合に、この W_{m+s} の値を用いた。

なお、バリエーション解析の過程で Pike らの方法¹⁷⁾により回折線プロファイルの図心の位置 (2θ) を決定し、さらに Langford らの方法¹⁸⁾ に準じて回折線の最適バックグラウンドレベルを求めた。以上の解析方法の詳細は別途に報告した¹⁹⁾。

回折線プロファイルの測定には、graphite 弯曲結晶による単色化 X 線 ($\text{Cu K}\alpha$) を使用した。また散乱強度の変動幅を小さくするために、できるだけゆっくりと走査し ($1/32^\circ(2\theta)/\text{分}$)、時定数を大きくした (20 sec)。その他の X 線回折の測定条件は前報¹⁹⁾に示したとおりである。なおフリーエ解析を行なう際には、高度の結晶性を示す鉾物アパタイト (Durango, Mexico 産出) を標準試料に用いて、Stokes のたたみ込み法²⁰⁾によって装置による回折線の拡がりを補正した。

以上のフーリエ及びバリアンズ解析に必要な計算はすべて、大阪大学計算機センター N E A C 2200/500 電子計算機を用いておこなった。

(3) 結晶化度の測定及び電子顕微鏡による形態観察

各実験群について、前報と同様にしてアパタイトの(002)回折線プロファイルの peak area を測定し、転化過程にみられる結晶化度の変化を調べた。また、各実験群7日目の試料について HU-12A 電子顕微鏡を用いて観察した。

結 果

(1) 転化過程にみられた結晶性の変化

転化過程は核形成の誘導期、核形成期、結晶成長期の三つの時期に区別することができる¹⁾。本実験では、核形成期と結晶成長期で得られたアパタイトについて、その結晶性

を評価した。

図 1-A はフーリエ解析法により、回折線プロファイルをフーリエ級数に展開し、求められたフーリエ余弦係数(A_n)をプロットしたものである。この図では、各アパタイトの結晶性は A_n vs. n (フーリエ級数の次数) の直線部分の傾きによってあらわされる。従って、アパタイトの結晶性は反応の経過時間とともによくなることがわかった。Smith 法はこの A_n vs. n の傾きから $(1-x)\cos\theta$ の数表を用いて結晶子の大きさと格子の乱れを区別して評価する方法である。本実験では森脇らが作製した Smith の数表の 10 倍精度の数表¹⁴⁾を用いて、結晶子の大きさを求めた。図 1-B はバリエーション解析法により求めたバリエーション量(W)を、測定した角度範囲(2θ)に対してプロットしたものである。この図では、縦軸に示したバリエーション量が大きいほど、アパタイトの結晶性は悪いことを示している。

以上の解析により求められた結晶子の大きさと、格子の乱れの大きさ(W_{m+s})を表1にまとめた。結晶子の大きさについては、核形成期のアパタイトでは約65~85 Åの値を示した。また、結晶成長期の初期(3~24時間)では大きな変化は認められなかった(85~100 Å)。ただし、7日まで経過するあいだに150~170 Åと大きくなり、結晶成長していることがわかった。他方、格子の乱れについては反応時間とともに減少していくことが確かめられた。なお、転化過程でみられた格子の乱れと peak area の変化を比較してみると、格子の乱れが減少するのに伴って peak area は大きくなる関係にあることがわかった(図2)。

(2) アパタイトの結晶性に及ぼす各種イオンの影響

④ fluoride

図3に peak area の測定結果を示したが、核形成期は反応開始後約1時間で始まり、2.5~3.0時間で結晶成長期に移行することがわかった。

た。核形成期から結晶成長期の初期で得られたアパタイトについては、イオンを加えていない実験群の場合と類似した結晶性を示した(表2)。ただし、7日まで反応が進むと、結晶子はわずかに大きく(約 $180\text{\AA}$)、格子の乱れも小さくなっていることがわかった。なお、 F^- を加えた実験群においても、格子の乱れが減少するにつれて peak area は大きくなる関係にあることが確かめられた(図3)。

(ロ) carbonate

CO_3^{2-} を作用させた実験群では、核形成期は約8時間で始まり、その後3~4時間の間に結晶成長期に移行した(図4)。表3は結晶性の評価結果を示したものである。この場合に、核形成期のアパタイトでは(002)回折線とバックグラウンドとの分離の程度が悪く、解析可能な回折線プロファイルが得られなかったため、形成された核の大きさについては明らかにしえなかった。結晶成長期の初期にあたる12時間のアパタイトでは、結晶子の大き

さは約60 Åであり、イオンを加えていない実験群やF⁻を加えた実験群の核形成期のアパタイト(約65 Å)よりも小さいことがわかった(表3)。さらに、CO₃²⁻を加えた場合の特徴的な結果として、その後の結晶成長期においても結晶子の大きさには著明な変化が認められず、C軸方向の結晶成長が著しく阻害されていることがわかった。また、CO₃²⁻の存在下では格子の乱れも非常に大きいことが注目された。なお、結晶成長期にみられた格子の乱れの変化とpeak areaの変化とのあいだには、図2や図3に示したと同様の関係が認められた(図4)。

(i) strontium 及び magnesium

本実験では2価の陽イオンとして、そのイオン半径がCa²⁺(0.99 Å)より大きいSr²⁺(1.12 Å)と、逆に小さいMg²⁺(0.66 Å)を用いた。

Sr²⁺を加えた場合には、ACPは約30時間溶液中で安定に存在した。また結晶性の評価結果では、Sr²⁺はCO₃²⁻と同様に結晶成長を抑

制し、格子の乱れを大きくすることがわかった(表4)。なお、 Sr^{2+} を加えた実験群で得られたアパタイトの特徴として、(002)回折線プロフィールの図心の位置(2 θ)が低角度方向に大きく移動していた。従って、 Sr^{2+} の存在下で得られたアパタイトのc軸方向の格子定数は、他の実験群で得られたアパタイトの値よりも大きいことがわかった。

Mg^{2+} を加えた実験群では、ACPは8~10時間溶液中に安定に存在した。結晶性の評価結果では、反応時間とともに結晶子は大きくなり、格子の乱れも減少していくことが確認された(表5)。とりわけ、7日目のアパタイトの格子の乱れは比較的小さく、イオンを加えていない実験群で得られた値に類似していることが注目された。

(3) アパタイトの形態に及ぼす各種イオンの影響

イオンを加えていない実験群で得られたアパタイト(7日目の試料)は、60~80 Åの幅を

もつ棒状結晶として観察された(前報図5-A)。F⁻を作用させた場合には、均一な大きさの棒状結晶(幅は約100Å)が認められた(図5-A)。CO₃²⁻を加えた実験群では、結晶性の評価結果からC軸方向の結晶成長が抑制されていることがわかったが、個々の結晶も棒状よりは球状に近い像を呈した(図5-B)。Sr²⁺を作用させた場合には、薄い板状結晶が認められ、弯曲した像も観察された(図5-C)。Mg²⁺を作用させた場合にも、Sr²⁺の場合と同様に薄い板状結晶が観察されたが、弯曲した像については認められなかった(図5-D)。

(4) X線回折像のバックグラウンドに及ぼす格子の乱れの影響

Wilson^{15,16)}は、最適バックグラウンドレベルにおいて求められたバリエーション量については大きな角度範囲(2θ)で直線的に変化することを指摘している。本実験ではバリエーション解析法により格子の乱れの大きさを求める場合に、回折線プロファイルにあらかじめ高目

のバックグラウンドレベルを設定し、これより0.6%づつ段階的に減少させたバックグラウンドレベルにおいてバリエーション解析の計算を繰り返した。以上の計算過程により求められた最適バックグラウンドレベルにおけるバリエーション量について W vs. 2θ のプロットを行なうと、図2に示したように大きな角度範囲では直線関係が認められた。

図6は測定された格子の乱れの大きさ(表1~5)と最適バックグラウンドレベルの関係を示したものである。この図に示したバックグラウンドレベルは(002)回折線の図心の位置における値(相対値)であらわした。その結果、格子の乱れが大きくなるとバックグラウンドレベルは高くなり、両者のあいだには直線関係が認められた。

考 察

(1) 転化過程にみられたアパタイトの結晶

性の变化と格子の乱れの原因

前報において転化過程にみられた peak area と表面積の変化を調べた結果、核形成期に peak area は急激に大きくなり、表面積も ACP の 3~5 倍に増加することが確かめられた¹⁾。これらの変化をもたらす原因としては、小さな表面積をもつ ACP が溶解し、微細なアパタイトの核が増加することによると考察した。本実験において核形成期のアパタイトの結晶性を評価した結果では、結晶子の大きさは約 65 Å で結晶成長期へ移行する比較的短時間のあいだに約 30 Å 程大きくなっていることがわかった。従って、核形成期ではアパタイトの核が結晶成長していることがわかった。

本実験で得られた興味ある結果として、結晶成長の初期(3~6 時間)では、結晶子の大きさには殆んど変化が認められなかった。前報¹⁾において表面積を測定した結果においても、この時期では表面積に変化は認められなかった。また、電子顕微鏡による観察から

も、この時期のアパタイトは不規則な凝集体として認められるのみで、アパタイトの特徴とされている棒状結晶は観察されなかった。ただし、アパタイトの格子の乱れについてはこの時期においても減少していることが確かめられている(表1)。従って、図2に示したように結晶成長期の初期に認められた peak area の増加は、この格子の乱れの減少(結晶格子の質的向上)によると考えられた。

つぎに、本実験で測定されたアパタイトの格子の乱れの原因について考察を加える。

これまでの報告では、低温($\sim 100^{\circ}\text{C}$)の溶液中で合成されたアパタイトについては一般に結晶格子内の Ca^{2+} が欠落した、いわゆる Ca-deficient なアパタイトであることが指摘されている^{21~23)}。この結晶格子内の Ca^{2+} の欠落に伴う電荷の不均衡については、欠落した Ca^{2+} の位置での H_3O^{+} の置換や、 PO_4^{3-} の位置における HPO_4^{2-} や $\text{H}_4\text{O}_4^{4-}$ の置換、あるいは OH^{-} の位置での欠損(vacancy)や水分子の置換によっ

て補償されると考えられている^{24~27)}。Termines²⁸⁾は合成したACP表面には少量の HPO_4^{2-} が吸着しており、転化過程ではこの HPO_4^{2-} がアパタイト表面に吸着しているにとどまらず、結晶格子内にも置換していることを指摘している。

本実験で得られた7日目のアパタイト試料について、そのCa/Pモル比をキレート滴定法²⁹⁾により測定してみると、化学量論的な組成のアパタイト(1.67)よりもかなり低い値(1.58)が得られた。また、異種イオンを含んでいない化学量論的な組成のアパタイトは1200℃以上に加熱しても安定で、重量減少を生じないことが知られている³⁰⁾。そこで、本実験で得られた各試料について、示差熱天秤装置(理学電機製)により分析を加えてみた。得られた示差熱分析(DTA)及び熱重量分析(TGA)曲線から、ACPから転化したアパタイトでは吸着水の蒸発による重量減少(約150℃以下で認められる)以外にも、200~500℃及び600

～700℃ の温度範囲で重量減少を伴った化学反応の生じていることが認められた(図7)。
また、結晶成長がすすみアパタイトの結晶性がよくなると、重量減少量は少なくなることもわかった。なお、200℃以上で認められた重量減少については、結晶格子内にとりこまれている水成分(H_3O^+ や水分子)が失われたことによると考えられる。他方、 HPO_4^{2-} を含むCa-deficientなアパタイトを加熱すると、200～500℃で HPO_4^{2-} はピロリン酸塩に転化し、さらに高温では $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ に転化することが知られている^{31, 32)}。実際に示差熱天秤装置により1000℃まで加熱した試料のX線回折像ではアパタイトに混って $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の存在が認められた。従って、ACPから転化したアパタイトは Ca^{2+} の欠落に加えて、 H_3O^+ や水分子あるいは HPO_4^{2-} などを含んでいると考えられた。

以上のことから、ACPから転化したアパタイトの格子の乱れの原因としては、 H_3O^+ や

HPO_4^{2-} などの異種イオンの置換によつて生じた原子配置の乱れが重要であると考えられる。

(2) アパタイトの結晶性に及ぼす各種イオンの作用

F^- がアパタイトの結晶成長を促進し、結晶性を高める作用をもつことはよく知られている^{33~36)}。ただし、核形成期から結晶成長期初期で測定された結晶子の大きさについては、 F^- を加えていない実験群の結果と殆んど差が認められなかった。Sraer³⁷⁾やPosner³⁸⁾らも同様の現象を認めており、 F^- は核形成期のアパタイトの結晶性には影響を及ぼさず、その後の結晶成長速度を速めることにより結晶性をよくすると報告している。なお、転化過程で最初に形成されるアパタイトの核のa軸方向の大きさについて、Eanes³⁹⁾は約20 Å、すなわち単位胞(unit cell)二つ程度の大きさであると述べている。ただし、著者らは先に F^- を含む実験群の核形成期で得られたアパタイトを電子顕微鏡で観察し、8.2 Åの間

隔(アパタイトの(100)または(010)の面間隔をあらわす)の格子縞が6~10本平行に並んだ像を認めた⁴⁰⁾。この観察結果から、 F^- の存在下では核形成期において既にアパタイトのa軸方向の大きさは60~100 Åに達していることがわかった。また、本実験で行なった電子顕微鏡による観察から、結晶成長期で得られたアパタイトは幅のひろい均一な形態の棒状結晶として認められた。従って、 F^- はアパタイトのc軸方向とともにa軸方向の結晶成長を促進させる作用をもつと考えられる。なお、 F^- の存在下で均一な形態のアパタイト結晶が得られることについては、Kerebelら⁴¹⁾が F^- の影響を受けたエナメル質アパタイトで同様の所見を報告している。 F^- がアパタイトの結晶成長を促進させる作用機序としては、 F^- を含むアパタイトの溶解度が低いために、溶液の過飽和度が高くなること⁴²⁾によると考えられる。

他方、 F^- はアパタイトの格子の乱れを減少

させる作用を示した。この F^- の作用機序としては、 F^- が OH^- の位置に置換することにより、 OH^- の位置でみられる欠陥(OH^- の欠損や水分子の置換)を修復する⁴³⁾ことによると考えられる。また、可児ら⁴⁴⁾は F^- の格子の乱れの修復能力については、 F^- 単独で作用させるよりも Ca^{2+} が共存する場合に大きくなると報告している。この報告は、 F^- の置換に伴って生じる電荷の不均衡を補償するために、 Ca^{2+} や PO_4^{3-} の位置においても置換イオンの移動が起り、欠陥のより少ない結晶構造になることを示している。本実験条件下においても F^- は Ca^{2+} と共存していることから、このような格子の乱れの修復効果がみられたと考えられる。

CO_3^{2-} , Sr^{2+} , Mg^{2+} はいずれもアパタイトの結晶性を低下させたが、各イオンの間ではその作用に差異が認められた。 CO_3^{2-} がアパタイトのc軸方向の結晶成長を抑制することは、X線回折法、電子顕微鏡のいずれの方法に

よって確認された。また、 CO_3^{2-} はアパタイトの格子の乱れを非常に大きくする作用を示した。これらの CO_3^{2-} の作用機序については、骨アパタイトの格子の乱れの原因を考察するなかで、次報において詳細な検討を加える。

Sr^{2+} を加えた実験群で得られたアパタイトについては、X線回折法ではC軸方向の結晶成長は抑制されている結果が得られた。一方、電子顕微鏡による観察では CO_3^{2-} の場合と異なり、弯曲した比較的大きな板状結晶として認められた。Carlström⁴⁵⁾やBrown¹⁰⁾らは、弯曲した結晶では形態的に大きな場合にも結晶格子が規則的にならぶ範囲は小さく、X線回折法では微細な結晶とみなされることを指摘している。他方、 Sr^{2+} は CO_3^{2-} と同様にアパタイトの格子の乱れを大きくする作用を示した。この Sr^{2+} の作用機序を考える際に、アパタイトのC軸方向の格子定数は他の実験群で得られたアパタイトと比較して大きいこ

とが注目される。すなわち, Collin⁴⁶⁾ は結晶格子内に置換した Sr^{2+} 量に比例して, アパタイトの c 軸方向の格子定数が直線的な関係をもちながら大きくなることを明らかにしている。なお, $^{85}\text{Sr}^{2+}$ を用いてアパタイトへの Sr^{2+} の取り込み量を調べた実験においても, かなりの量の Sr^{2+} が格子内の Ca^{2+} と置換しうることが明らかにされている。^{47,48)} 従って, Sr^{2+} の存在下では Ca-deficient なアパタイトにみられる異種イオンの置換に加えて, Ca^{2+} よりイオン半径の大きな Sr^{2+} が格子内に置換することにより, アパタイトの原子配置に一層大きな乱れが生じたと考えられる。

Mg^{2+} については CO_3^{2-} や Sr^{2+} と比較して, 結晶性とりわけ格子の乱れに及ぼす影響は小さいことが注目された。イオン半径の異なる Mg^{2+} が結晶格子内の Ca^{2+} と置換しているとすれば, Sr^{2+} の場合と同様に原子配置に乱れを生じることが予想される。しかしながら, 002) 回折線プロファイルの図心の位置を調べ

た結果では、 Sr^{2+} の場合と異なり回折線の移動は認められなかった(表5)。また、Neuman⁽⁴⁹⁾によれば、アパタイトに含まれている Mg^{2+} の大部分(95%以上)は結晶表面に吸着しているにすぎないと報告されている。従って、 Mg^{2+} に関しては結晶格子内に置換している割合が極めて少ないため、アパタイトの原子配置に大きな影響を及ぼさないと考えられる。ただし、 Mg^{2+} は Ca^{2+} と競合的な関係をもちながら結晶表面の growth site (例えば kink position) に吸着する⁽⁵⁰⁾ ことにより、結晶成長速度を遅くしていると考えられる。

なお、 Sr^{2+} や Mg^{2+} を加えた実験群では、板状結晶とともに棒状を呈する像も認められた。Steve - Bocciarelli⁽⁵¹⁾, Bachra⁽⁵²⁾, Landis⁽⁵³⁾らは、試料傾斜装置を用いて電子顕微鏡により骨アパタイトを観察した報告のなかで、針状結晶に見える部分が実際には薄い板状結晶の端に相当することを明らかにしている。従って、 Sr^{2+} や Mg^{2+} を加えた実験で認められた棒

状部分については板状結晶の端にあたると思われる。

(3) 非晶質成分の定量方法に及ぼす格子の乱れの影響

本実験で得られたアパタイトの格子の乱れの評価結果に基づいて、これまで用いられてきた骨無機質内の非晶質成分の定量方法にみられる問題点について考察を加える。X線回折法による非晶質成分の定量方法については、緒言で述べたように結晶質成分からのX線散乱は peak area に寄与し、他方非晶質成分からの散乱はX線回折像のバックグラウンドに寄与するという考え方に基づいている¹³⁾。

この考え方の妥当性を検討するため、まず合成したACPとアパタイト試料を混合して、ACPとアパタイトの比率を異にする試料を作製した。これらの試料のX線回折像を測定してみると、ACP量が増加するにつれてバックグラウンドは高くなり、peak areaは減少することがわかった(図8)。さらに、X線回

折像から 24.5° と $27.5^\circ(2\theta)$ の位置においてバックグラウンドレベルを求め、ACP量に対してプロットした(図9)。その結果、ACP量が増加するとバックグラウンドレベルは直線的に高くなることが確かめられた。従って、ACPからのX線散乱は散漫な散乱としてバックグラウンドに寄与していることは確かであると考えられた。他方、転化過程で得られたアパタイトの結晶性を評価した結果から、アパタイトの格子の乱れがpeak areaの大きさに影響を及ぼしていることがわかった(図2~4)。さらに格子の乱れが大きくなるにつれてバックグラウンドレベルは高くなり、この両者の間には直線関係が認められた(図6)。これらの結果から、格子の乱れをもつアパタイトからのX線散乱も、その一部は散漫な散乱を生じ、ACPからの散乱とともにバックグラウンドに寄与していることがわかる。従って、X線回折像をpeak areaとバックグラウンドに区別し、それぞれが試料内のアパタイト及びACP

からの散乱に基づくという考え方については、アパタイトの格子の乱れによる影響を考慮していない点で誤っていると考えられる。

Harper⁴⁾や Termine⁵⁾らはこのアパタイトの結晶性の違いによる影響を考慮するため、非晶質成分の定量に必要な100%結晶質標準試料として、骨アパタイトと類似した結晶性をもつ合成アパタイトを用いることが重要であると述べている。しかしながら、骨アパタイトとX線結晶学的性状が等しい合成アパタイトを得ることは實際上極めて困難なことである。Millerら⁵⁴⁾は、合成アパタイトのような単一の大きさの粒子からなる試料と大きさの異なる粒子を含む試料(骨アパタイトもその一例と考えられる)のX線結晶学的性状を比較し、結晶性が等しい場合にはpeak areaの大きさに違いが生じることを指摘している。Termine²⁸⁾、Posner⁹⁾らも標準試料に用いる合成アパタイトの性状を骨アパタイトの性状に近づけるほど、測定されるACP量はこれ

までに報告されている値(30~40%)よりも少なくなることを明らかにしている。

なお、骨無機質内の非晶質成分の定量方法としては、X線回折法以外に赤外吸収法を用いて、 $560\sim600\text{ cm}^{-1}$ の位置にみられる2つの PO_4^{3-} の ν_4 ピーク(P-Oの伸縮振動)の分離度を測定する試みがなされている⁵⁵⁾。ただし、異種イオンの置換に伴うアパタイトの原子配置の乱れによってP-Oの原子間距離がわずかに変化すると、 PO_4^{3-} の ν_4 ピークの分離度は悪くなると考えられる。実際に、Fowler⁵⁶⁾はアパタイト格子内の Ca^{2+} の一部が Sr^{2+} と置換した場合には、各赤外吸収ピークが広がる(隣接する2つのピークについていえば、分離度が悪くなる)ことを明らかにしている。従って、赤外吸収法による非晶質成分の定量方法についても、X線回折法の場合と同様にアパタイトの格子の乱れの影響を受けていると考えられる。

総括ならびに結論

ACPから転化したアパタイトについて、(002)回折線プロファイルをフーリエ及びバリアンズ解析することにより、結晶子の大きさと結晶格子の乱れを区別して結晶性の評価を行なった。その結果、以下のことが明らかにされた。

(1) ACPから転化したアパタイトは微細な結晶で、大きな格子の乱れをもつことがわかった。この格子の乱れの原因としては、結晶格子内の Ca^{2+} の欠落や、 H_3O^+ や HPO_4^{2-} などの異種イオンの置換によって生じた原子配置の乱れが重要であると考えられた。

(2) ACPからアパタイトへの転化過程に F^- を作用させると、核形成期から結晶成長期の初期に得られたアパタイトの結晶性については、イオンを加えていない実験群と殆んど変わらない結果が得られた。ただし、その後の結晶成長期においては、 F^- は結晶子を大き

くし、格子の乱れを減少させる作用を示した。

(3) CO_3^{2-} はアパタイトのC軸方向への結晶成長を著しく阻害し、格子の乱れを大きくする作用を示した。

(4) Sr^{2+} を作用させると、電子顕微鏡では弯曲した薄い板状の結晶が観察され、X線回折法では結晶子は小さく、格子の乱れは大きい結果が得られた。 Sr^{2+} はアパタイトの結晶格子内の Ca^{2+} と置換することにより、原子配置の乱れを一層大きくすると考えられた。

(5) Mg^{2+} は結晶成長を抑制したが、格子の乱れに及ぼす影響は小さいことがわかった。この Mg^{2+} の作用は、 Mg^{2+} の大部分がアパタイトの結晶格子内に置換せず、表面に吸着していることによると考えられた。

(6) peak area の大きさは、試料内のアパタイトの量的な変化にのみ依存するものではなく、アパタイトの格子の乱れの(質的な)変化にも依存していることがわかった。さらに、

格子の乱れをもつアパタイトからのX線散乱は、その一部が散漫な散乱となり、ACPからの散乱とともにX線回折像のバックグラウンドに寄与していることが確かめられた。

以上の結果から、従来用いられてきた骨無機質内の非晶質成分の定量方法については、アパタイトの格子の乱れによる影響と非晶質成分による影響が区別されていないと考えられる。

文 献

- 1) Alexander, L.E.: X-ray diffraction methods in polymer science. PP.137-197, John Wiler & Sons, New York, 1969.
- 2) 増本 健他: 特集・非晶質金属の特性.
日本金属学会会報, 15:151~206, 1976.
- 3) Alexander, L.E. and Klug, H.P.: Basic aspects of X-ray absorption in quantitative diffraction analysis of powder mixtures. *Analyt.Chem.*, 20:886-889, 1948.
- 4) Harper, R.A. and Posner, A.S.: Measurement of non-crystalline calcium phosphate in bone mineral. *Proc.Soc.Exp.Biol.*, 122:137-142, 1966.
- 5) Termine, J.D. and Posner, A.S.: Amorphous/crystalline interrelationships in bone mineral. *Calcif.Tiss.Res.*, 1:8-23, 1967.
- 6) Posner, A.S.: Crystal chemistry of bone mineral. *Phys.Rev.*, 49:760-791, 1969.
- 7) Eanes, E.D. and Posner, A.S.: The formation and structure of bone mineral. In *Biological calcification: cellular and molecular aspects* (ed. by Schraer, H.), Appleton-Century-Croft, New York, 1969.
- 8) Becker, G.L.: Calcification mechanisms: roles for cell and mineral. *J.Oral Path.*, 6:307-315, 1977.

- 9) Posner, A.S. and Betts, F.: Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure. *Accounts Chem. Res.*, 8:273-281, 1975.
- 10) Brown, W.E. and Chow, L.C.: Chemical properties of bone mineral. *Annual Rev. Mat. Sci.*, 6:213-236, 1976.
- 11) 青葉孝昭: 骨無機質内の非晶質及びアパタイトに関するX線結晶学的研究.
I. 非晶質リン酸カルシウムからアパタイトへの転化過程に
基礎誌, 1978(投稿中).
- 12) Smith, R.S.: Measurement of crystallite size and strain of electroplated films. *IBM J. Develop.*, 4:205-207, 1960.
- 13) Warren, B.E. and Averbach, B.L.: The effects of cold work distortion on X-ray patterns. *J. Appl. Phys.*, 21:595-599, 1950.
- 14) 森脇豊, 可児徳子, 堤定美, 山賀礼一: フーリエ解析法による
象牙質および骨の結晶性評価.
歯科理工学雑誌, 11:50-57, 1970.
- 15) Wilson, A.J.C.: On variance as a measure of line broadening in diffractometry, general theory and small particle size. *Proc. Phys. Soc.*, 80:286-294, 1962.
- 16) Wilson, A.J.C.: On variance as a measure of line broadening in diffractometry, II. mistakes and strain. *Proc. Phys. Soc.*, 81:41-46, 1963.

- 17) Pike, E.R. and Wilson, A.J.C.: Counter diffractometry—the theory of the use of centroids of diffraction profiles for high accuracy in the measurement of diffraction angles. *Brit.J.Appl. Phys.*, 10:57-68, 1959.
- 18) Langford, J.I. and Wilson, A.J.C.: On variance as a measure of line broadening in diffractometry, some preliminary measurements on annealed aluminium and nickel and on cold-work nickel. In *Crystallography and crystal perfection*, pp.207-222, Academic Press, New York & London, 1963.
- 19) Moriwaki, Y., Aoba, T., Tsutsumi, S. and Yamaga, R.: X-ray diffraction studies on the lattice imperfection of biological apatites. *J.Osaka Univ. Dent.Sch.*, 16:33-45, 1976.
- 20) Stokes, A.R.: A numerical Fourier analysis method for the correction of widths and shapes of lines on X-ray powder photographs. *Proc.Phys.Soc. (London)*, 61:382-391, 1948.
- 21) Posner, A.S. and Perloff, A.: Apatite deficient in divalent cations. *J.Res.Nat.Bur.Std.*, A58:279-286, 1957.
- 22) Elliott, J.C.: Recent progress in the chemistry, crystal chemistry and structure of the apatites.

Calcif.Tiss.Res.,3:293-307,1969.

- 23) 金澤 孝文, 門間英毅: リン酸カルシウムの化学・アパタイトの組織, 構造, 物性, 最近の進歩(1).
化学の領域, 27: 662-672 (1973).
- 24) Berry, E.E.: The structure and composition of some calcium-deficient apatites. J.Inorg.Nucl. Chem., 29:317-327, 1967.
- 25) Joris, S.J. and Amberg, C.H.: The nature of deficiency in nonstoichiometric hydroxyapatite.
II. spectroscopic studies of calcium and strontium hydroxyapatites. J.Phys.Chem., 75:3172-3178, 1971.
- 26) Simpson, D.R.: Substitutions in apatite: I. Potassium bearing apatite. Am.Mineral., 53:432-444, 1968.
- 27) Simpson, D.R.: Problems of the composition and structure of the bone minerals. Clin.Orthop., 86:260-286, 1972.
- 28) Termine, J.D. and Eanes, E.D.: Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations. Calcif.Tiss.Res., 10:171-197, 1972.
- 29) Szekeres, L., Kardos, E. and Szekeres, G.L.: Volumetric determination of calcium and phosphate ions in presence of ions; aluminium, fluoride and sulfate. Microchemical J., 11:1-12, 1966.
- 30) Mooney, R.W. and Aia, M.A.: Alkaline earth phosphates. Chem.Rev., 61:433-462, 1961.

- 31) Gee, A. and Deitz, V.R.: Pyrophosphate formation upon ignition of precipitated basic calcium phosphates. *J.Amer.Chem.Soc.*, 77:2961-2965, 1955.
- 32) Aoba, T., Ishida, T., Yagi, T., Hasegawa, K. and Moriwaki, Y.: Investigation of thermal changes of synthetic calcium phosphates by X-ray diffractometry and derivatography. *J.Osaka Univ.Dent.Sch.*, 15: 7-15, 1975.
- 33) Eanes, E.D., Zipkin, I., Harper, R.A. and Posner, A.S.: Small-angle X-ray diffraction analysis of the effect of fluoride on human bone apatite. *Archs oral Biol.*, 10:161-173, 1965.
- 34) Frazier, P.D., Zipkin, I. and Mills, L.F.: X-ray diffraction study of human bone. direct methods of estimating changes in line broadening. *Archs oral Biol.*, 12:73-78, 1967.
- 35) Zipkin, I., Sokoloff, L. and Frazier, P.D.: A study of the effect of fluoride on bone and osteoarthritis in mice. *Israel J.Med.Sci.*, 3:719-725, 1967.
- 36) Faccini, J.M.: Fluoride and bone. *Calcif.Tiss.Res.*, 3:1-16, 1969.
- 37) Schraer, H., Posner, A.S., Schraer, R. and Zipkin, I.: Effect of fluoride on bone crystallinity in the growing rat. *Biochem.Biophys.Acta*, 64:565-567, 1962.

- 38) Posner, A.S., Eanes, E.D., Harper, R.A. and Zipkin, I.: X-ray diffraction analysis of the effect of fluoride on human bone apatite. *Archs oral Biol.*, 8:549-570, 1963.
- 39) Wuthier, R.E. and Eanes, E.D.: Effect of phospholipids on the transformation of amorphous calcium phosphate to hydroxyapatite in vitro. *Calcif. Tiss. Res.*, 19:197-210, 1975.
- 40) Aoba, T. and Moriwaki, Y.: The effect of fluoride ion on apatite formation from amorphous precursor. *J. Dent. res.*, 56:698, 1977.
- 41) Kerebel, B., Daculsi, G. and Verbaere, A.: High-resolution electron microscopy and crystallographic study of some biological apatites. *J. Ultrastruct. Res.*, 57:266-275, 1976.
- 42) Bachra, B.N., Trautz, O.R. and Simon, S.L.: Precipitation of calcium carbonates and phosphates. III. the effect of magnesium and fluoride ions on the spontaneous precipitation of calcium carbonates and phosphates. *Archs oral Biol.*, 10:731-738, 1965.
- 43) 森脇 豊: 生体アパタイトの格子不整. 虫歯のシンポジウム (須賀昭一, 石井俊文編), 口腔保健協会, 東京, 1977.

- 44) 可児徳子, 河合庄治郎, 森脇豊, 山根礼一: アパタイト結晶の格子不整におよぼす CaF_2 の影響について.
産科理工学雑誌, 11:192-196, 1970.
- 45) Carlström, D. and Glas, J.E.: The size and shape of the apatite crystallites in bone as determined from line-broadening measurements on oriented specimens. Biochem. Biophys. Acta, 35:46-53, 1959.
- 46) Collin, R.L.: Strontium-calcium hydroxyapatite solid solutions precipitated from basic, aqueous solutions. J. Am. Chem. Soc., 82:5067-5069, 1960.
- 47) Neuman, W.F., Björnerstedt, R. and Mulryan, B.J.: Synthetic hydroxyapatite crystals. II. aging and strontium incorporation. Arch. Biochem. Biophys., 101:215-224, 1963.
- 48) Nilsson, B.E.: Uptake of ^{45}Ca and ^{85}Sr in the tibia and the femur in rats. Calcif. Tiss. Res., 3:96-99, 1969.
- 49) Neuman, W.F. and Mulryan, B.J.: Synthetic hydroxyapatite crystals. IV. magnesium incorporation. Calcif. Tiss. Res., 7:133-138, 1971.
- 50) Thomas, W.C. and Tomita, A.: Mineralization of human and bovine tissue in vitro. Amer. J. Path., 51:621-628, 1967.
- 51) Steve-Bocciarelli, D.: Morphology of crystallites in bone. Calcif. Tiss. Res., 5:261-269, 1970.

- 52) Bachra, B.N.: Calcification in vitro of demineralized bone matrix. electron microscopic and chemical aspects. *Calcif. Tiss. Res.*, 8:287-303, 1972.
- 53) Landis, W.J., Paine, M.C. and Glimcher, M.J.: Electron microscopic observations of bone tissue prepared anhydrously in organic solvents. *J. Ultrastruct. Res.*, 59:1-30, 1977.
- 54) Miller, A.G. and Burnell, J.M.: The effects of crystal size distributions on the crystallinity analysis of bone mineral. *Calcif. Tiss. Res.*, 24:105-111, 1977.
- 55) Termine, J.D. and Posner, A.S.: Infrared analysis of rat bone: age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions. *Science*, 153: 1523-1525, 1967.
- 56) Fowler, B.O.: Infrared studies of apatite. II. preparation of normal and isotopically substituted calcium, strontium, and barium hydroxyapatites and spectra-structure-composition correlations. *Inorg. Chem.*, 13:207-214, 1974.

図の説明

図 1. ACP から アパタイト への転化過程に
みられた結晶性の変化。(A) フーリエ
解析結果。(B) バリヤンス解析結果。

図 2 ACP から アパタイト への転化過程に
みられた (002) 回折線の Peak area とア
パタイトの格子の乱れの変化。

図 3 F を加えた実験群における (002) 回
折線の Peak area と格子の乱れの変化。

図 4. CO_3^{2-} を加えた実験群における (002) 回
折線の Peak area と格子の乱れの変化。

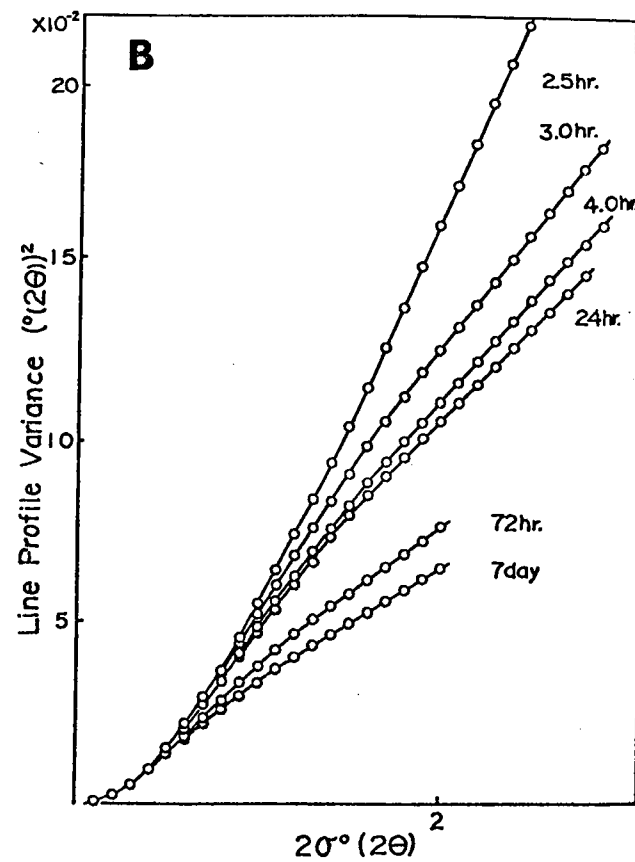
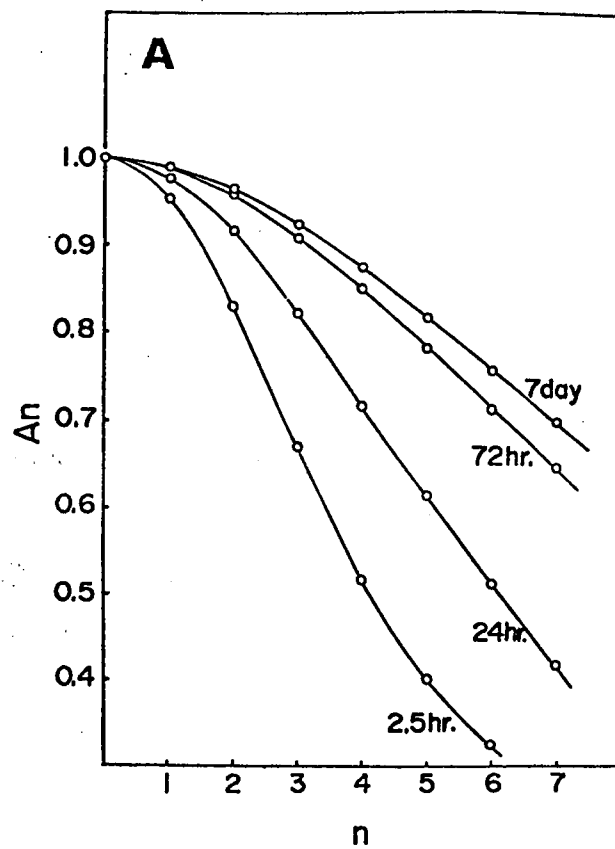
図 5 各実験群 7 日目の試料の電子顕微鏡
像。F (A), CO_3^{2-} (B), Sr^{2+} (C), Mg^{2+} (D) の各イ
オンがアパタイトの形状に及ぼす影
響を比較した。

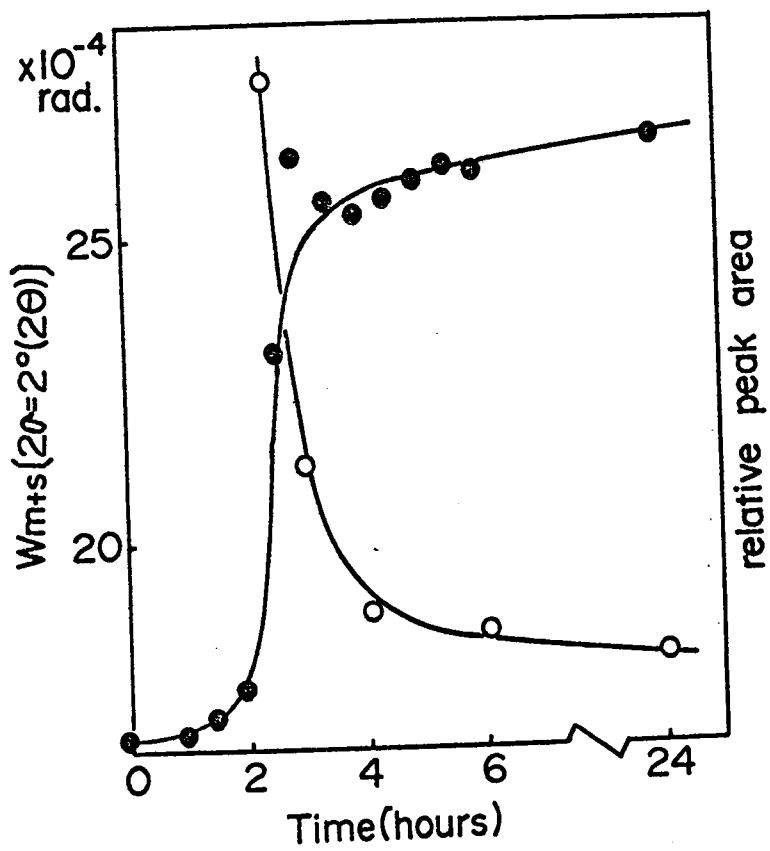
図 6 X線回折像のバックグラウンドレベルに及ぼす格子の乱れの影響。

図 7 ACP からアパタイトへの転化過程で得られた各試料の示差熱分析 (DTA) 曲線と熱重量分析 (TGA) 曲線。図内に示した時間は反応開始時からの経過時間をあらわしす。

図 8 アパタイト / ACP の比率を異にする各試料の (002) 回折線プロファイル。

図 9 X線回折像のバックグラントレベルに及ぼす ACP の影響。





图乙

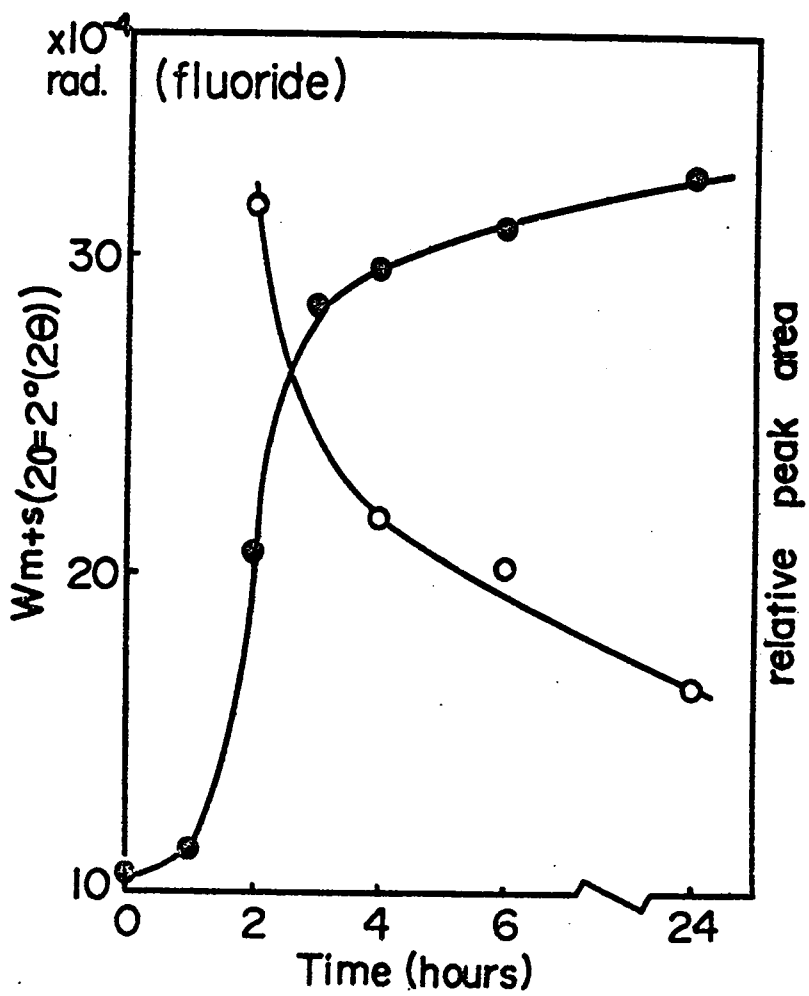


图 3

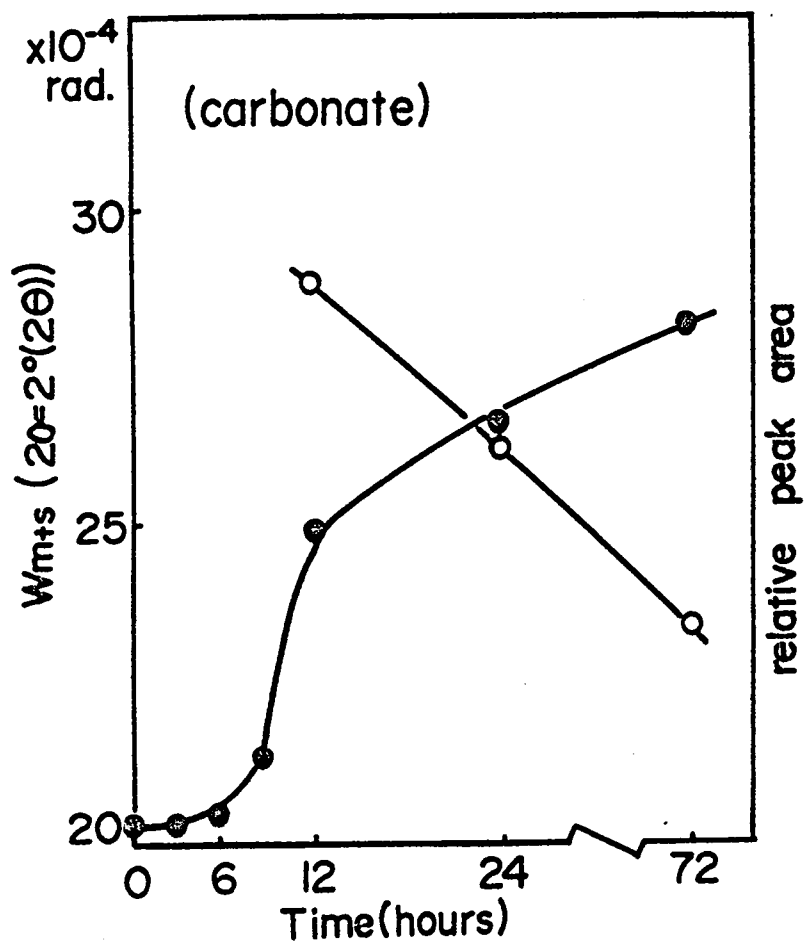
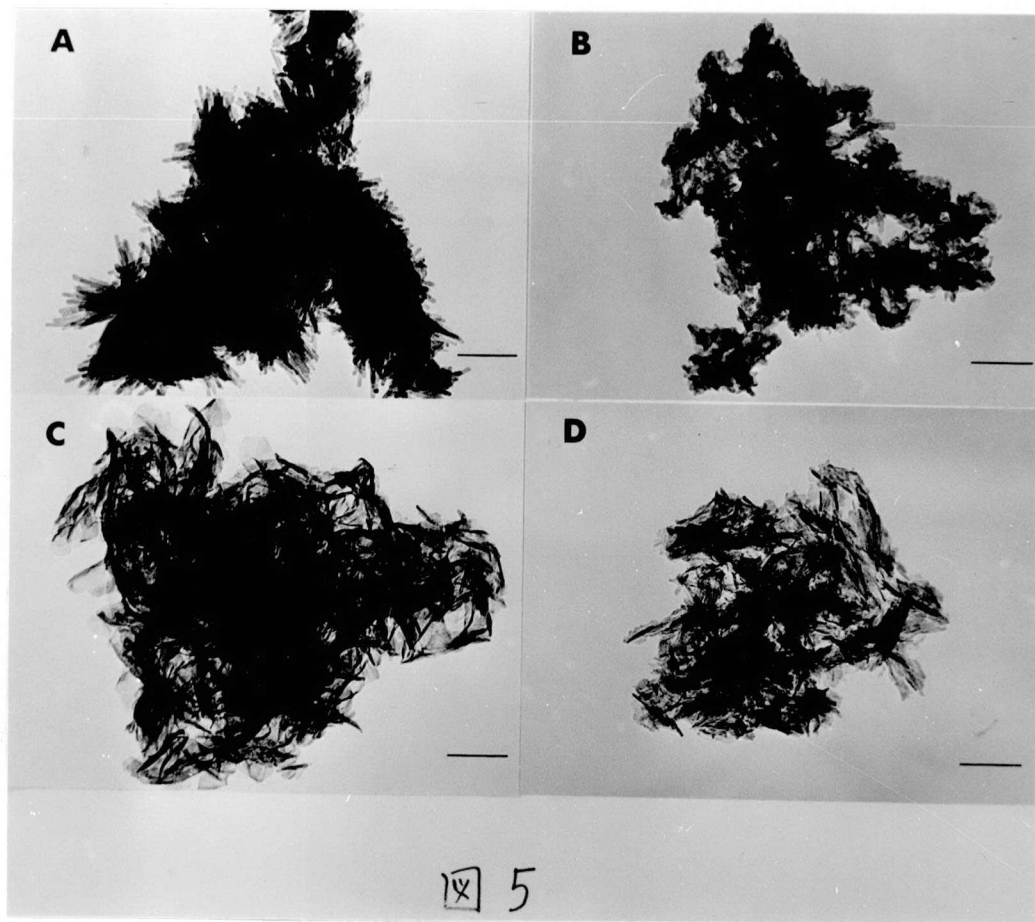


图 4



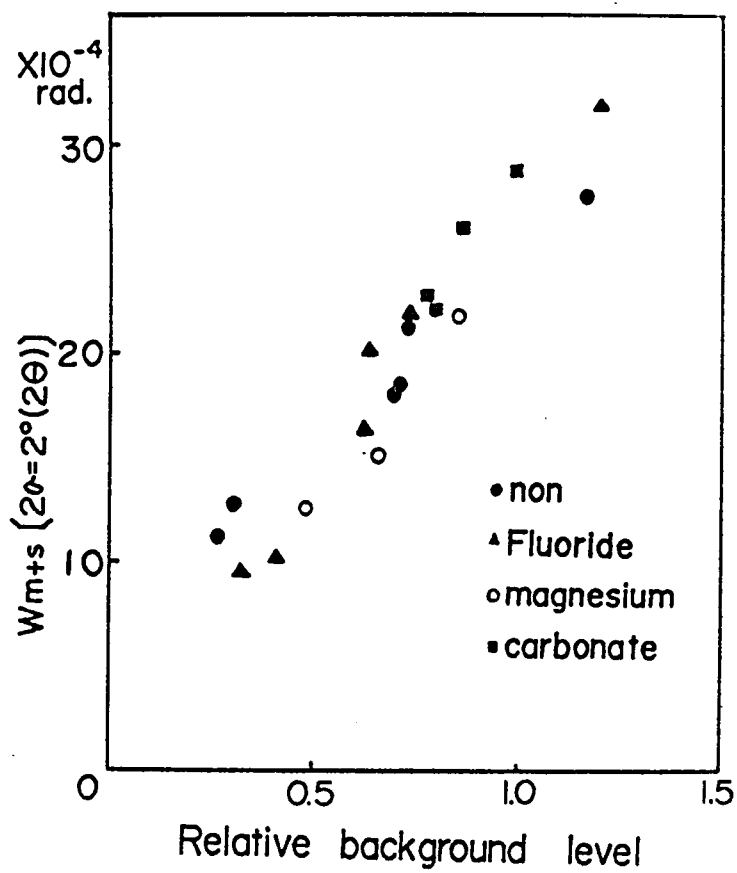
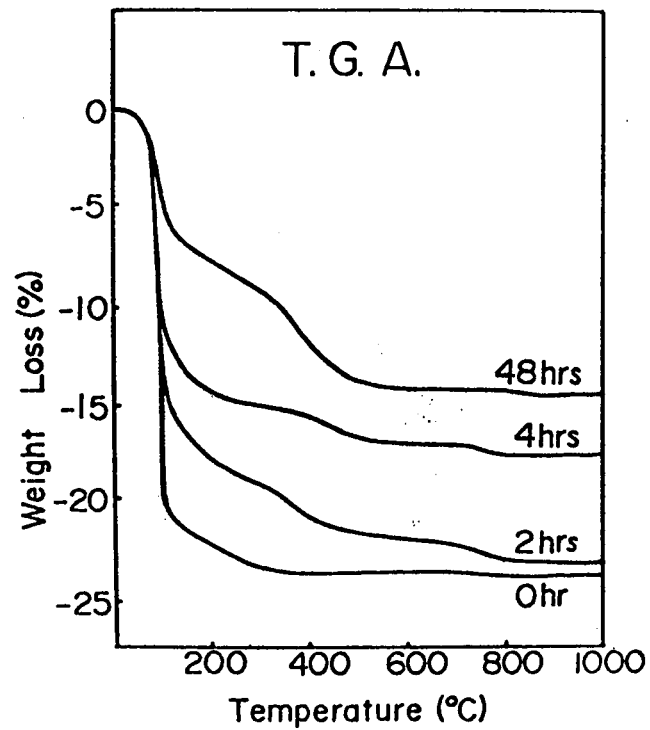
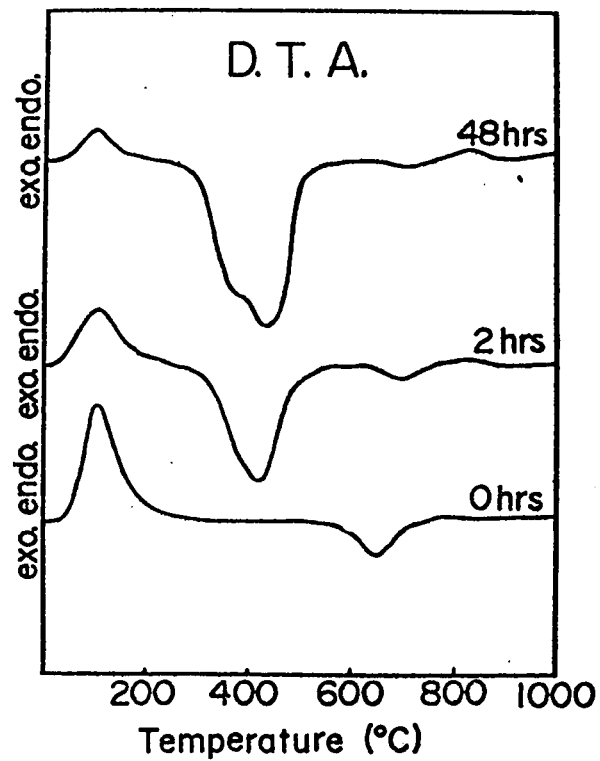


图 6



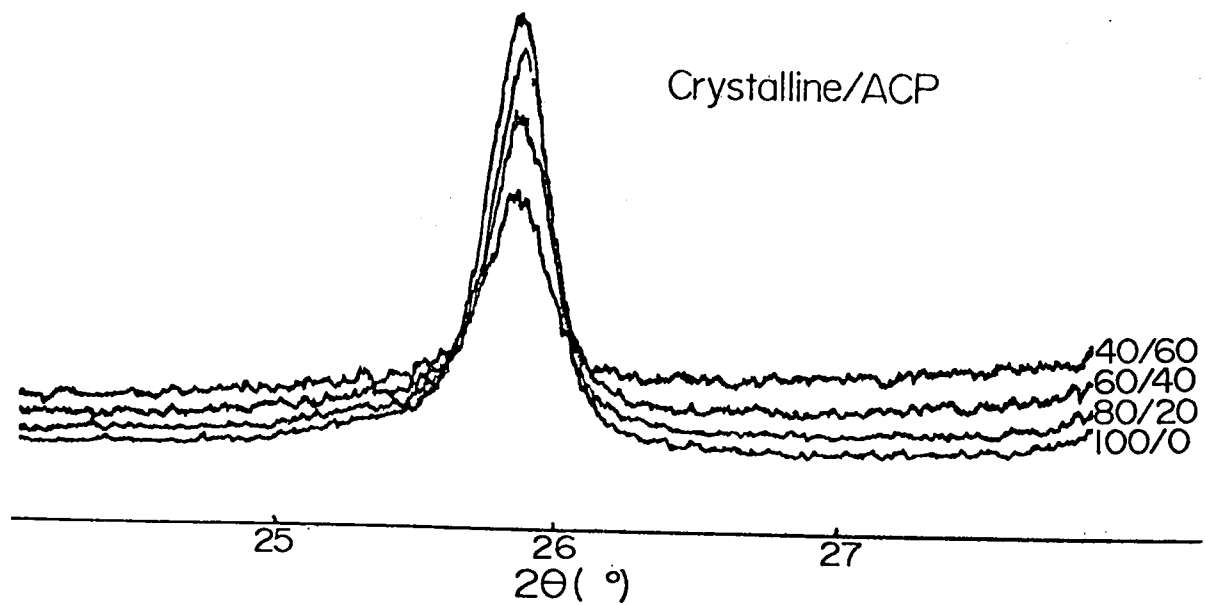


图 8

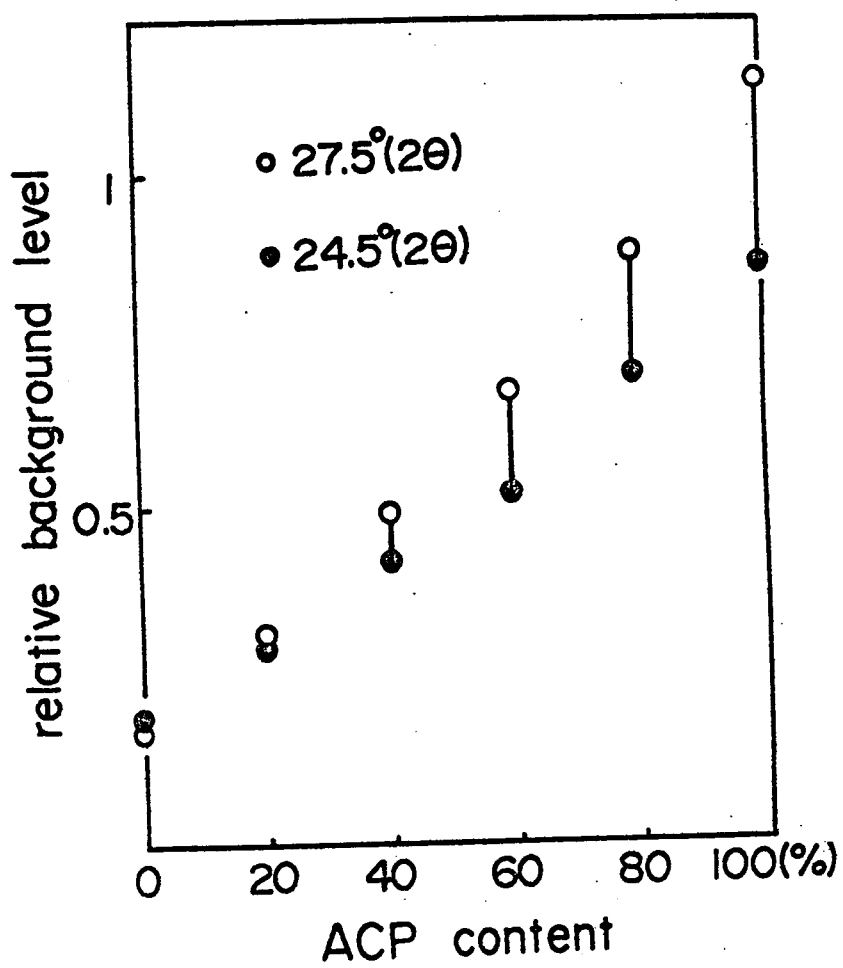


图 9

表1. 転化過程にみられたアパタイトの結晶性の変化

試料 ¹⁾	結晶子の大きさ (Å)	格子の乱れ ²⁾ ($\times 10^{-4}$ rad.)	図心の位置 ($^{\circ}(2\theta)$)
2.5 (時間)	65	27.6	26.014
3.0	85	21.2	26.014
4.0	95	18.7	26.011
6.0	95	18.5	25.977
24	100	17.9	25.948
72	155	12.9	25.868
7 (日)	170	11.0	25.845

(1) 各試料は反応開始時からの経過時間であらわした。

(2) 格子の乱れの大きさは、 $2^{\circ}(2\theta)$ で求められたmistakeと歪みによるバリアンズ ($W_m + s$) であらわした。

なお、(1), (2)については以下の表においても同様である。

表2. 転化過程にみられたアパタイトの結晶性の変化 — 下の影響

試料	結晶子の大きさ (Å)	格子の乱れ ($\times 10^{-4}$ rad.)	図心の位置 ($^{\circ}(2\theta)$)
2.0 (時間)	45	31.7	26.073
4.0	85	21.8	25.958
6.0	95	20.2	25.881
24	110	16.4	25.853
72	175	10.4	25.837
7 (日)	180	10.0	25.826

表3. 転化過程にみられたアパタイトの結晶性の変化 — CO_2 の影響

試料	結晶子の大きさ ($\text{\AA}$)	格子の乱れ ($\times 10^{-4} \text{ rad.}$)	図心の位置 ($^\circ (2\theta)$)
12 (時間)	60	28.8	26.000
24	70	26.3	26.010
72	80	23.5	25.913
7 (日)	85	22.3	25.904

表4. 転化過程にみられたアパタイトの結晶性の変化 — Sr^{2+} の影響

試料	結晶子サイズ (Å)	格子の乱れ ($\times 10^{-4}$ rad.)	圆心位置 ($^{\circ}(2\theta)$)
48 (時間)	80	25.1	25.652
72	90	21.9	25.586
7 (日)	95	20.3	25.540

表5. 転化過程にみられたアパタイトの結晶性の変化 — Mg^{2+} の影響

試料	結晶子の大きさ (Å)	格子の乱れ ($\times 10^{-4}$ rad.)	図心の位置 (° (2 θ))
24 (時間)	85	21.4	25.937
72	120	14.9	25.899
7 (日)	140	12.4	25.880

抄 録

本報では、非晶質リン酸カルシウム (ACP) から転化したアパタイトの (002) 回折線プロファイルをフーリエ及びバリアンズ解析し、各アパタイトの結晶性を結晶子の大きさと結晶格子の乱れに区別して評価した。

その結果、ACP から転化したアパタイトは微細な結晶で、大きな格子の乱れをもつことが確められた。さらに、反応時間とともに結晶子は大きくなり、格子の乱れは減少することも確められた。また、F⁻ は格子の乱れを減少させ、CO₃²⁻ や Sr²⁺ は逆に格子の乱れを大きくする作用を示した。なお、Mg²⁺ はアパタイトの結晶成長を遅延させるが、格子の乱れに及ぼす影響は小さいことがわかった。このアパタイトの格子の乱れの原因としては、異種イオンの置換に伴う原子配置の乱れが重要であると考えられた。

さらに、X線回折像の Peak area の大きさは試料内のアパタイトの量的な変化のみに依存

するものではなく、アパタイトの格子の乱れの（質的な）変化にも依存していることがわかった。また、格子の乱れをもつアパタイトからのX線散乱は、その一部が散漫な散乱となり、ACPからの散乱とともにX線回折像のバックグラウンドに寄与していることが確かめられた。従って、従来用いられてきた骨無機質内の非晶質成分の定量方法については、アパタイトの格子の乱れによる影響と非晶質成分による影響が区別されていないと考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った大阪大学歯学部口腔病理学講座八木俊雄教授、ならびに大阪大学歯学部歯科理工学講座山賀礼一教授に深甚なる謝意を表するとともに、終始かわらぬ御指導、御教示いただいた歯科理工学講座森脇豊助教授に深く感謝致します。また御援助いただいた口腔病理学教室諸兄、歯科理工学教室諸兄、ならびに電子顕微鏡室石丸昌司氏に心から御礼申し上げます。

本論文の一部は、第18回歯科基礎医学会（51年、盛岡）で発表した。

本研究の経費の一部は、昭和50年度文部省科学研究費（奨励A）によった。

1

骨無機質内の非晶質及びアパタイト
結晶に関するX線結晶学的研究
Ⅲ. 骨アパタイトの結晶格子の乱れ
とその原因

青 葉 孝 昭

大阪大学歯学部口腔病理学教室

X-ray diffraction study on the amorphous and
crystalline components in bone mineral.

III. Lattice defects of bone apatite.

Takaaki Aoba (Department of Oral Pathology,
Osaka University Dental School, Osaka)

大阪市北区中之島4丁目3番地48号(〒530)

緒 言

前報¹⁾において、骨無機質の非晶質成分の定量方法を検討した結果、これまでに報告されている骨無機質内の非晶質成分量については、骨アパタイトの結晶格子の乱れによる影響を含んでいることが示唆された。この考え方を一層確かなものとするには、骨アパタイトの格子の乱れの大きさを測定し、格子の乱れの原因を明らかにする必要がある。

X線回折法を用いて骨アパタイトの結晶性を評価する試みは、比較的古くから行なわれてきた。²⁻⁴⁾ しかしながら、これまでの報告では適切な解析方法が確立されていなかったために、結晶子の大きさの評価にとどまるものが多く、格子の乱れの大きさを明らかにした報告は極めて少ない⁴⁾。例えば、Posner³⁾はヒト骨アパタイトの(002)回折線プロファイルをフーリエ解析し、結晶子の大きさとして120~140Åの値を報告しているが、格

子の乱れについては不明であると述べている。
 ただし、著者は前報¹⁾において、amorphous calcium phosphate (以下ACPあるいは非晶質成分と記す) から転化した結晶性の悪いアパタイトについても、フーリエ及びバリアンス解析法を併用することにより、格子の乱れを評価しうることを明らかにした。

Glas⁴⁾ はエナメル質アパタイトの格子の乱れを測定した報告のなかで、格子の乱れの原因としては形成過程に生じる機械的な応力による歪みをあげている。しかしながら、歯や骨を構成する生体アパタイトは一般に HPO_4^{2-} , CO_3^{2-} , H_2O^+ などの異種イオンを含むアパタイトとして特徴づけられており、^{5,6)} 森脇らの⁷⁾ は生体アパタイトの格子の乱れの原因として、異種イオンの置換に伴う結晶組成濃度の局所的な不均一さに注目している。とりわけ、骨アパタイトの格子の乱れの原因を考察する際に、骨無機質には Ca^{2+} , PO_4^{3-} について CO_3^{2-} が多く含まれている(重量比で3~5%⁸⁾)

ことが注目される。さらに、血漿中の CO_3^{2-} 濃度は Ca^{2+} や PO_4^{3-} の 10~20 倍にも達しており、肥大軟骨細胞層（最初にアパタイトの核形成が生じる部位）の組織液中には血漿中よりも多量の CO_3^{2-} が含まれていることも知られている⁹⁾。従って、骨アパタイトの形成過程に高濃度の CO_3^{2-} が関与していることは十分に予想される。

そこで、本実験では最初に年齢の異なるヒト顎骨及び発育途上にあるラット脛骨を試料として、骨アパタイトの結晶性について結晶子の大きさと格子の乱れを区別して評価した。ついで、骨アパタイトの格子の乱れの原因を明らかにする目的で、in vitro の実験において CO_3^{2-} がアパタイトの結晶成長過程に及ぼす影響について検討した。なお、本報及び前報^{1,10)} で得られた結果に基づいて、総括的な立場から骨無機質内の非晶質成分の有無、骨アパタイトの形成過程、さらには骨無機質の性状と生体のミネラル代謝との関連性に

についても考慮を加えた。

材料及び方法

(1) 骨試料の作製

骨材料としては、年齢の異なるヒト顎骨緻密質6例（上顎骨3例、下顎骨3例）と、発育途上にあるSD系雄性ラット（阪大徹研、生後4、7、10週）の脛骨骨幹部緻密質を用いた。各骨材料は液体窒素を用いて凍結乾燥した。乾燥後、骨表面に附着している軟組織（骨膜を含む）を剝離し、ついで骨髓組織も除去した。各骨試料はメノウ乳鉢内で微粉碎し、200メッシュ標準ふるいを通過させた。

(2) アパタイトの合成

1.5M酢酸アンモニウム溶液を激しく攪拌しながら、10mM酢酸カルシウムと6mM第2リン酸アンモニウムの各溶液を同時にすばやく加え、反応させた。また、 CO_2 の影響を

調べた実験群では、反応開始時の溶液の CO_3/PO_4 モル比が 0.1, 1, 10 の割合になるように、炭酸アンモニウムを第 2 リン酸アンモニウム溶液に加えた。各実験群とも、合成時の溶液の pH はアンモニア水を加えて 7.6 に調整した。また、最初の 1 時間溶液を攪拌した後、 20°C の保温器内に静置し、反応開始時から 3 日、1, 2, 3, 4 週目に反応生成物を遠沈分離した。各反応生成物を蒸留水にて洗った後、凍結乾燥した。

(3) 骨アパタイト及び合成アパタイトの結晶性の評価及び形態観察

前報¹⁾と同様にして、各アパタイト試料の (002) 回折線プロファイルをフーリエ及びバリマンス解析し、結晶子の大きさと格子の乱れを評価した。なお、各アパタイト結晶を HU-12A 電子顕微鏡により観察した。

結 果

(1) 骨アパタイトの結晶性

ヒト骨試料から測定された結晶子の大きさ
と格子の乱れを表1に示した。格子の乱れ
の大きさは前報¹⁾と同様に、バリアンス解析
法により求められた mistake と歪みによるバ
リアンス量 (W_{m+s}) であらわした。その
結果、ヒト骨アパタイトは約 $120 \sim 170 \text{ \AA}$ の大
きさを示し、大きな格子の乱れをもつことが
認められた。また、高齢者の骨アパタイト
ほど結晶子は大きく、格子の乱れは小さくな
る傾向が認められた。

表2に、ラット脛骨アパタイトの解析結果
を示した。生後4週から10週の間結晶子
は約 $105 \text{ \AA}$ から $115 \text{ \AA}$ とわずかに大きくなり、格
子の乱れは減少することがわかった。

(2) 骨アパタイトの形態観察

電子顕微鏡により骨試料を観察すると、多
くの場合に約 $200 \sim 500 \text{ \AA}$ の球状ないし棒状結晶

が認められた(図1-A)。稀には Selvig¹⁾が報告しているような板状結晶も認められ、その内部には $8.2\text{\AA}$ の間隔をもつ格子縞も観察された(図1-B)。ただし、合成したACPと同じ特徴をもつ粒子(約 $200\sim 1000\text{\AA}$ の球状粒子で、電子線照射により空孔を生じる¹⁰⁾)は認められなかった。

(3) アパタイトの結晶成長過程に及ぼす CO_3^{2-} の影響

溶液中の CO_3^{2-} 濃度を異にする各実験群について、3日目の反応生成物をX線回折法で同定すると、いずれもアパタイトの回折像が得られ、 CaCO_3 その他の化合物の存在は認められなかった(図2)。図3は各実験群で得られたアパタイト試料について、フーリエ及びバリアンス解析法により求められた結晶子の大きさと格子の乱れを反応時間に対してプロットしたものである。各実験群ともに4週間経過すると、反応はほぼ平衡に近づいていることがわかった。

CO_3^{2-} を加えていない実験群 ($\text{CO}_3/\text{PO}_4=0$) の4週目のアパタイト試料では、結晶子の大きさとして約190 Åの値が得られた。また、電子顕微鏡による観察では棒状結晶が認められた(図4-A)。 $\text{CO}_3/\text{PO}_4=1$ の実験群で得られた4週目の試料では、結晶子の大きさは約150 Åで、細い棒状結晶として観察された(図4-B)。 他方、 $\text{CO}_3/\text{PO}_4=10$ の実験群では、結晶子の大きさは約90 Åと非常に小さく、球状に近い結晶が観察された(図4-C)。 格子の乱れについては、溶液中の CO_3^{2-} 濃度が高くなるにつれて大きくなることが確かめられた(図3-B)。 $\text{CO}_3/\text{PO}_4=10$ の実験群では、4週目のアパタイトについても非常に大きな値 (20.5×10^{-4} ラジアン)を示し、本実験で求めた骨アパタイトの格子の乱れよりも大きいことがわかった。

表3には、各実験群4週目のアパタイトの(002)回折線の図心の位置(2θ)を示した。 溶液の CO_3^{2-} 濃度が高い実験群ほど、図心

の位置は低角度方向に移動しており、アパタイトのc軸方向の格子定数は大きくなることわかった。

考 察

(1) 骨アパタイトの格子の乱れの原因

これまでの骨アパタイトの結晶性を評価した報告では、骨アパタイトの結晶性が悪い原因として結晶子の微細なことがあげられてきた^{3,12)} しかしながら、本実験ではフーリエ及びバリアンス解析法を併用することにより、骨アパタイトは微細なことに加えて、大きな格子の乱れをもつことが確かめられた。さらに、ヒト及びラット骨試料のいずれについても、増齢に伴って結晶子は大きくなり、格子の乱れは減少することが確かめられた。生体アパタイトの格子の乱れが成長過程で減少する傾向を示すことは、森脇らのウシ胎児エナメル質を用いた実験においても指摘されてい

る¹³⁾

つぎに、 CO_3^{2-} がアパタイトの結晶成長過程に及ぼす影響を調べた実験では、溶液中の CO_3^{2-} 濃度が高いほど、結晶性及び電子顕微鏡像のうえで骨アパタイトに類似した特徴をもつアパタイト結晶が得られた。また、溶液中の CO_3^{2-} 濃度が高いほど得られたアパタイトの(002)回折線は低角度方向に移動しており、c軸方向の格子定数は大きいことが確かめられた。LeGeros¹⁴⁾はアパタイトの結晶格子内に置換した CO_3^{2-} 量に比例して、アパタイトのc軸方向の格子定数が大きくなると報告している。従って、溶液中の CO_3^{2-} 濃度が高いほど形成されたアパタイトの結晶格子内には多量の CO_3^{2-} が置換しており、アパタイトの格子の乱れは大きくなることが確かめられた。なお、結晶格子内に置換した CO_3^{2-} 量が1%増加すると、アパタイトのc軸方向の格子定数は $0.0045 \text{ \AA}$ 大きくなる関係が得られている^{12,14)}。そこで、各実験群4週のアパタイトについて

、表3に示した(002)回折線の四心の位置(2 θ)から格子定数を計算し、結晶格子内に置換している CO_3^{2-} 量を比較してみた。その結果、 $\text{CO}_3/\text{PO}_4 = 0$ の実験群で得られたアパタイトに比べて、 $\text{CO}_3/\text{PO}_4 = 1$ の実験群のアパタイトでは約1.8%、 $\text{CO}_3/\text{PO}_4 = 10$ の実験群のアパタイトでは約2.2%結晶格子内に CO_3^{2-} を多く含んでいることがわかった。

つぎに、アパタイト結晶格子内での CO_3^{2-} の置換位置について、McCConnell¹⁵⁾やTrautz¹⁶⁾は、 PO_4^{3-} の位置をあげている。この場合には、正四面体の構造をもつ PO_4^{3-} の位置に三角形の平面構造をもつ CO_3^{2-} が置換することになり、原子配置に大きな乱れをもたらすことは充分に予想される。さらに、 PO_4^{3-} と CO_3^{2-} の置換に際して生じる電荷の不均衡は、 Ca^{2+} の位置での Na^+ や H_3O^+ の置換によって補償されると考えられている。^{17,18)}これらの異種イオンの置換もまた原子配置の乱れをもたらす一因になると考えられる。なお、 CO_3^{2-} の置換位

置について、高温状態では OH^- の位置にも CO_3^{2-} の置換が起り得ることが報告されている。¹⁹⁾

ただし、この位置での置換は構造的に極めて不安定なため、²⁰⁾ 生体アパタイトの場合に OH^- の位置に置換している CO_3^{2-} 量は極めて少ないと考えられている。²¹⁾

骨無機質に含まれている CO_3^{2-} については、これまでも骨無機質の組成や性状を考えるうえで注目されてきた。例えば、骨無機質の Ca/P モル比はエナメル質や象牙質の場合と異なり、1.67 (化学量論的な組成のアパタイトの Ca/P モル比) より大きな値を示すことが知られている。^{8, 22)} Pellegrino ら²³⁾ は骨無機質の CO_3^{2-} 含有量が多いほど Ca/P モル比は大きな値を示し、この CO_3^{2-} 量と Ca/P モル比の値との間には直線関係のみられることを明らかにしている。この CO_3^{2-} の骨無機質内での存在様式については、三通りの考え方が提唱されている。第1に、 CaCO_3 として分散混合している。²⁴⁻²⁶⁾ 第2に、骨アパタイト表面に

吸着している^{27,28)}。そして第3に、骨アパタイトの結晶格子内に置換している²⁹⁾という考え方である。ただし、 CaCO_3 として存在するという考え方については、骨無機質内での存在が確かめられておらず、また微量の PO_4^{3-} が共存すると CaCO_3 の結晶化が生じない³⁰⁾ことから、現在では否定的な意見が強くなっている。

他方、Posnerら^{31,32)}は骨無機質の示差動径分布曲線や赤外吸収スペクトルが、結晶格子内に数%の CO_3^{2-} を含む合成アパタイトから得られた結果と非常に類似していると報告している。従って、骨アパタイト表面に吸着している CO_3^{2-} の存在を無視することはできないが、骨無機質内の CO_3^{2-} の多くは骨アパタイトの格子内(その多くは PO_4^{3-} の位置と考えられる)に置換していると考えられる。

以上のことから、本実験で測定された骨アパタイトの格子の乱れの原因としては、 CO_3^{2-} の置換に伴う原子配置の乱れが重要であると考えられた。

(2) 骨無機質内の非晶質成分について

骨無機質内に ACP が存在するという考え方の根拠としては、X線回折法や赤外吸収法による ACP の定量結果³³⁻³⁵⁾ と、Molnar³⁶⁾ の電子顕微鏡による骨組織内での ACP 粒子の観察結果があげられている。本研究では前者の根拠について検討を進めてきたが、そのなかで以下の諸点を明らかにすることができた。すなわち、第1報¹⁰⁾ では、ACP からアパタイトへの転化を抑制する作用をもつ CO_3 や Mg^{2+} などを溶液中に加えた場合にも、ACP は長期間安定に存在することはできず、比較的容易にアパタイトに転化することがわかった。第2報¹¹⁾ では、Harper ら³³⁾ が ACP の定量の際に用いている peak area の大きさは、試料内のアパタイトの量的な変化にのみ依存するものではなく、アパタイトの格子の乱れの(質的な)変化にも依存していることが確かめられた。また、格子の乱れをもつアパタイトは、ACP と同様に散漫な散乱を生い

て、X線回折像のバックグラウンドにも寄与していることが確かめられた。さらに、本報においては骨アパタイトが大きな格子の乱れをもち、この格子の乱れは増齢とともに減少する傾向にあることが確かめられた。以上の結果から、in vivoでいったん形成されたACPが長期間安定に存在しうるとは考えられず、30~40%というACP量^{33~35)}については、骨アパタイトの格子の乱れによる影響を含んだ過剰に見積られた値であると考えられる。

他方、Molnar³⁶⁾は凍結乾燥した骨組織を電子顕微鏡で観察し、骨芽細胞と形成された骨アパタイトの間にACP(空孔をもつ球状粒子)が存在すると報告している。しかしながら、Molnarの報告以降、骨無機質を電子顕微鏡により観察した報告は数多くみられるが、ACP様の粒子を認めた報告は極めて少ない。わずかにDotyら³⁷⁾が骨形成不全症の患者の骨で、またMillerら³⁸⁾が鳥類の骨髓内の骨で、骨アパタイトに混って少量のACP様

の粒子を認めたと報告しているにすぎない。
 骨組織以外では、大動脈弁の石灰化部位で空
 孔をもつ球状粒子の存在が報告されている。³⁹⁾
 なお、Fittton⁴⁰⁾は骨組織内に微細な顆粒状の
 粒子を認め、電子線回折法では非晶質な像が
 得られたと報告している。ただし、Appleton
^{41,42)}はFitttonの報告している顆粒がパロイン
 で処理すると溶解し、EDTAで脱灰したのちにも
 も認められることから、有機物質の可能性が
 あると述べている。Lubenら⁴³⁾は Ca^{2+} と PO_4^{3-}
 からなる微細な顆粒を認めているが、Ca/P
 モル比が1に近い値を示すことから CaHPO_4 の
 組成と考えている。さらに、Termineら⁴⁴⁾
 もヒドラジンで脱有機処理した骨で50~100 Å
 程度の顆粒を認めているが、電子線回折法で
 はアパタイト様の回折像が得られたと報告し
 ている。また、Boothroyd⁴⁵⁾は透過電子線
 に対する結晶の方向によって、棒状結晶も顆
 粒状にみえることを指摘している。Steve-
 Bocciarelli,⁴⁶⁾ Bachra,⁴⁷⁾ Landis⁴⁸⁾らは試料傾斜装

置を利用して、顆粒状粒子の集合体が実際には薄い板状のアパタイト結晶であることを証明している。本実験においても凍結乾燥処理した骨粉末試料を観察した際に、微細な球（棒）状結晶や格子縞を識別しうる板状結晶は認められたが、ACPは全く認められなかった。なお、電子顕微鏡を用いた観察において骨無機質内にACPが認められにくい理由について、通法に従った超薄切片作製過程では水溶液が使われているため、骨無機質に含まれていたACPがアパタイトに転化してしまうと考えられてきた。⁴⁹⁾ そのため最近の研究では、試料作製過程に生いると考えられる変化を防ぐために、凍結切片の作製や有機溶媒を用いる方法が試みられている。^{48, 50-53)} しかしながら、これらの方法を用いた報告においても、微細な顆粒状の粒子は認められている^{48, 53)} が、ACPの存在については確認されていない。

以上、本研究で行なったX線回折法による

検討結果と、これまでに報告されている電子顕微鏡による観察結果を総合的に評価してみると、in vitro で認められるACPが骨無機質内に存在している可能性は少ないと考えられる。また、骨無機質内に非晶質成分が存在すると考えられてきた原因としては、骨アパタイトが微細なことに加えて、本研究で明らかにした骨アパタイトの格子の乱れが重要な役割を果たしていると考えられる。

(3) 骨アパタイトの形成過程について

これまでの報告では骨無機質内に多量のACPが存在するという考え方に基いて、骨アパタイトの形成過程でACPが前駆物質の役割を果たしていると考えられてきた⁴⁹⁾。しかしながら、本研究ではこれまでの報告と異なり、ACPが骨無機質内に存在する可能性は少ないと考えられた。従って、骨アパタイトの形成過程におけるACPの役割についても再検討を要すると考えられる。

電子顕微鏡により軟骨や骨の石灰化過程を

観察した報告では、最初のアパタイトの核は基質小胞内か、もしくは小胞の膜が崩壊した後に形成されることが明らかにされている。

50, 54-57) さらに、この基質小胞内でのアパタイトの核形成に先だて、軟骨細胞や骨芽細胞内のミトコンドリアに Ca^{2+} や PO_4^{3-} を含む顆粒が多数認められ、この Ca^{2+} が基質小胞内に移動していくことも指摘されている。⁵⁸⁻⁶⁰⁾ このミ

トコンドリア内の顆粒については、 Ca^{2+} , PO_4^{3-} の他に Mg^{2+} , phospholipid などを含んでいると報告されている。⁶¹⁾ Thomasら⁶²⁾ は、この顆粒が非晶質な電子線回折像を呈し、また 600°C で加熱すると $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ の回折像のみが認められたと報告している。in vitro でみら

れるACPの特徴のひとつとして、ACPは $600 \sim 700^\circ\text{C}$ で加熱されると直接 $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ に転化することが知られている。⁶³⁾ 従って、この

Thomasらの報告はミトコンドリア内の顆粒がACPであることを示唆するものとして注目される。Lehninger⁶⁴⁾ はこれらの報告に基づ

いて、石灰化に関与する Ca^{2+} と PO_4^{3-} の移動経路として、まずミトコンドリア内に高濃度の Ca^{2+} と PO_4^{3-} が蓄積されて ACP を形成し、この ACP が小胞内にとじこめられて細胞外に放出されると考えている。また、ACP は細胞内から細胞外へ放出されるまでの間、 Mg^{2+} 、phospholipid、ATP などによって安定化されていると考えられている^{65,66)}

従って、in vitro で認められる ACP からアパタイトへの転化の現象が、最初の骨アパタイトの核形成過程でみられる可能性は十分に考えられる。ただし、基質小胞内の Ca^{2+} と PO_4^{3-} を含む電子線不透過な物質が ACP の形態的特徴を示していないことから、核形成過程に ACP と異なる組成のリン酸カルシウム、例えば octacalcium phosphate や dicalcium phosphate dihydrate (以下 OCP, DCPD と記す) が関与している可能性も否定しえない。in vitro でのアパタイトの形成過程に、OCP が中間生成物として存在するという現象につ

いては、多くの研究者によって報告されている。⁶⁷⁻⁷⁰⁾

つぎに、本研究ではACPからアパタイトへの転化過程でアパタイトの核がいったん形成されると、核自身が触媒的な働きをして核形成から結晶成長への過程は進行することが確かめられた。^{Nancollus ら^{69,71)} Eanes,⁷²⁾ Moreno ら⁷³⁾} は合成したアパタイトを核としてあらかじめ溶液中に加えた実験において、溶液中の Ca^{2+} 、 PO_4^{3-} 濃度が血漿中の値に近い場合には、ACPの生成を伴うことなしにアパタイトの形成が生じることを明らかにしている。従って、骨アパタイトの形成過程においても最初の核が形成された後には、ACPのような前駆物質の存在を必要とすることなく結晶化が進行し得ると考えられる。

(4) 骨無機質の性状とミネラル代謝との関連性について

生体のミネラル代謝において、骨無機質は Ca^{2+} の供給源として重要な役割を果たしている

ことが知られている。これまでの報告の多くでは、この骨無機質の機能に関連してアパタイトより溶解度の大きいACPの存在が注目されてきた。Ortner⁷⁴⁾、Lopezら⁷⁵⁾は新生された骨では多量のACPを含んでおり、副甲状腺ホルモンを作用させた場合にはACPを多量に含む骨組織が選択的に吸収されると報告している。また、Tannenbaumら⁷⁶⁾は鳥類の骨を用いた実験から、多量の Ca^{2+} を必要とする卵殻の形成期では骨内のACP量が減少すると報告している。これらの報告はいずれも、骨無機質の組成が生体のミネラル代謝と密接な関係をもちなから変化していることを示している点で興味がある。しかしながら、本研究で明らかにした骨アパタイトの格子の乱れを重視した考え方にたてば、これらの現象については以下のように考えることができる。すなわち、アパタイトの溶解度は格子の乱れによって大きく影響されることが知られており⁷⁷⁾、格子の乱れが大きいほどア

パタイトは溶解しやすくなると考えられる。さらに、本研究では骨アパタイトの格子の乱れの原因として CO_3^{2-} が重要な役割を果していることを指摘したが、 CO_3^{2-} はアパタイト構造のイオンの結合関係を弱め、化学的安定さを低下させることが知られている⁷⁸⁾。例えば、エナメル質の蝕の進行過程では、エナメル質アパタイトの溶解に際して CO_3^{2-} 量が最初に減少することはよく知られた事実である⁷⁹⁾。また、Pellegrino ら⁸⁰⁾ は尿毒症の患者の骨で、 Ca^{2+} 量が減少している場合には CO_3^{2-} 量も減少していることを報告している。従って、 CO_3^{2-} を含む格子の乱れの大きい骨アパタイトは溶解しやすく、生体のミネラル代謝における Ca^{2+} の供給源の役割を果し得ると考えられる。

Schraer ら⁸⁰⁾ は産卵期の鳥類の骨無機質の性状を調べた報告のなかで、Tannenbaum ら⁷⁶⁾ によって ACP 量が増加すると報告されている時期に、骨アパタイトの結晶性が悪くなることを明らかにしている。Russell ら⁸¹⁾ も

尿毒症の患者で血液透析を繰り返した場合に、骨無機質内のACP量が増加するとともに骨アパタイトの結晶性も悪くなることを報告している。本研究ではTermineら³⁵⁾が報告しているラット骨無機質内のACP量が減少する時期に一致して、骨アパタイトの結晶性はよくなる（特に格子の乱れが減少する）ことを確めた。これらの結果はいずれも、ACP量の変化として捉えられてきた骨無機質の変化が、実際には骨アパタイトの結晶性の変化によっても説明しうるものとして注目される。

総括ならびに結論

本報ではヒト顎骨及びラット脛骨緻密質を試料として、骨アパタイトの結晶性を結晶子の大きさと格子の乱れに区別して評価した。また、骨アパタイトの格子の乱れの原因を明らかにするため、 CO_3^{2-} がアパタイトの結晶成

長過程に及ぼす影響について検討した。その結果、以下のことが明らかにされた。

(1) 骨アパタイトの結晶性を評価した結果、結晶子は小さく、大きな格子の乱れをもつことが認められた。また、ヒト及びラット骨のいずれの場合にも、増齢に伴って結晶子は大きくなり、格子の乱れは減少する傾向が認められた。

(2) 骨試料を電子顕微鏡で観察すると、球状の微細な結晶や格子縞が識別される板状結晶は認められたが、ACP粒子については認められなかった。

(3) *in vitro* の実験において、溶液中の CO_3^{2-} 濃度が高いほど、結晶性及び電子顕微鏡像のうえでは骨アパタイトに類似した特徴をもつアパタイトが得られた。また、溶液中の CO_3^{2-} 濃度の高い実験群で得られたアパタイトほど、結晶格子内に置換している CO_3^{2-} 量は多く、格子の乱れも大きいことが認められた。

(4) 骨アパタイトの結晶格子内にも多量の

CO_3^{2-} が置換している (PO_4^{3-} の位置と考えられる) ことから、本実験で測定した骨アパタイトの格子の乱れの原因として CO_3^{2-} が重要な役割を果たしていると考えられた。

本研究で得られた結果から、骨無機質は微細なうえに格子の乱れの大まかいアパタイト結晶から成り立っており、非晶質成分が存在する可能性は少ないと考えられる。

- 1) 青葉孝昭：骨無機質内の非晶質及びアパタイト結晶に関するX線結晶学的研究。
Ⅱ. 非晶質成分の定量に及ぼすアパタイトの結晶格子の乱れの影響。
基礎誌, 1978 (投稿中).
- 2) Carlstrom, D. and Glas, J.E.: The size and shape of the apatite crystallites in bone as determined from line broadening measurements on oriented specimens. Biochem. Biophys. Acta, 35:46-53, 1959.
- 3) Posner, A.S., Eanes, E.D., Harper, R.A. and Zipkin, I.: X-ray diffraction analysis of the effect of fluoride on human bone apatite. Archs oral Biol., 8:549-570, 1963.
- 4) Glas, J.E. and Omnell, K.A.: Studies on the ultrastructure of dental enamel. I. size and shape of the apatite crystallites as deduced from X-ray diffraction data. J. Ultrastruct. Res., 3:334-344, 1960.
- 5) Trautz, O.R.: X-ray diffraction of biological and synthetic apatites. Ann. N.Y. Acad. Sci., 60:696-712, 1955.
- 6) Simpson, D.R.: Problems of the composition and structure of bone mineral. Clin. Orthop., 86:260-286, 1972.

- 7) Moriwaki, Y., Aoba, T., Tsutsumi, S. and Yamaga, R.:
X-ray diffraction studies on the lattice imperfection of biological apatites. J.Osaka Univ. Dent.Sch., 16:33-45, 1976.
- 8) Zipkin, I.: The inorganic composition of bones and teeth. In Biological calcification (ed. by Schraer, H.), pp.69-103, Appleton-Century-Crofts, 1970.
- 9) Howell, D.S., Pita, J.C., Marquez, J.F. and Madruga, J.E.: Partition of calcium, phosphate, and protein in the fluid phase aspirated at calcifying sites in epiphyseal cartilage. J.Clin.Invest., 47: 1121-1132, 1968.
- 10) 青葉孝昭: 骨無機質内の非晶質及びアパタイト結晶に関する研究.
I. 非晶質リン酸カルシウムからアパタイト結晶への転化過程.
基礎誌, 1978 (投稿中).
- 11) Selvig, K.A.: Periodic lattice images of hydroxyapatite crystals in human bone and dental hard tissues. Calcif.Tiss.Res., 6:227-238, 1970.
- 12) Brown, W.E. and Chow, L.C.: Chemical properties of bone mineral. Annual Rev.Mat.Sci., 6:213-236, 1976.
- 13) 森脇 豊, 可見徳子, 古座谷隆, 堤 定美, 下出直悠, 山賀礼一:
牛歯エナメル質の成熟に伴う結晶性の変化について. 齒科理工学雑誌,
9: 78-85, 1968.

- 14) LeGaros, R.Z.: Effect of carbonate on the lattice parameters of apatite. *Nature*, 24:403-404, 1965.
- 15) McConnell, D.: The problem of the carbonate apatites. IV. structural substitutions involving CO_3 and OH. *Bull. Soc. Franc. Mineral.*, 75:428, 1952.
- 16) Trautz, O.R.: Crystallographic studies of calcium carbonate phosphate. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 85:145-160, 1960.
- 17) Simpson, D.R.: The nature of alkali carbonate apatites. *Am. Mineral.*, 49:363-376, 1965.
- 18) McClellan, G.H. and Lehr, J.R.: Crystal chemical investigation of natural apatites. *Am. Mineral.*, 54:1374-1391, 1969.
- 19) Elliott, J.C.: Tooth enamel (ed. by Stack, M.V. and Fearnhead, R.W.), P. 50, John Wright & Son, Bristol, 1965.
- 20) McConnell, D.: Crystal chemistry of bone mineral: hydrated carbonate apatites. *Am. Mineral.*, 55:1659-1669, 1970.
- 21) Elliott, J.C.: Recent Progress in the chemistry, crystal chemistry and structure of the apatites. *Calcif. Tiss. Res.*, 3:293-307, 1969.
- 22) Biltz, R.M. and Pellegrino, E.D.: The chemical anatomy of bone. I. a comparative study of bone

- composition in sixteen vertebrates. J.Bone & Jt.Surg.,A51:456-466,1969.
- 23) Pellegrino,E.D. and Biltz,R.M.: Bone carbonate and the Ca/P molar ratio. Nature(London),219: 1261-1262,1968.
- 24) Herman,H. and Dallemagne,M.J.: The main mineral constituent of bone and teeth. Archs oral Biol., 5:137-144,1961.
- 25) Pellegrino,E.D. and Biltz,R.M.: The composition of human bone in uremia. observations on the reservoir functions of bone and demonstration of a labile fraction of bone carbonate. Medicine(Baltimore),44:397-418,1965.
- 26) Engstrom,A: Aspects of the molecular structure of bone. In The biochemistry and physiology of bone,2nd(ed. by Bourne,G.H.),pp.237-257,Academic Press,New York & London,1971.
- 27) Hendricks,S.B. and Hill,W.L.: The nature of bone and phosphate rock. Proc.N.A.S.,36:731-737,1950.
- 28) Termine,J.D. and Lundy,D.R.: Hydroxide and carbonate in rat bone mineral and its synthetic analogues. Calcif.Tiss.Res.,13:73-82,1973.
- 29) McConnell,D.: Infrared absorption of carbonate apatite. Science,155:607,1967.

- 30) Bachra, B.N., Trautz, O.R. and Simon, S.L.: Precipitation of calcium carbonates and phosphates. I. spontaneous precipitation of calcium carbonates and phosphates under physiological conditions. Arch. Biochem. Biophys., 103:124-138, 1963.
- 31) Posner, A.S. and Betts, F.: Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure. Acc. Chem. Res., 8:273-281, 1975.
- 32) Blumenthal, N.C., Betts, F. and Posner, A.S.: Effect of carbonate and biological macromolecules on formation and properties of hydroxyapatite. Calcif. Tiss. Res., 18:81-90, 1975.
- 33) Harper, R.A. and Posner, A.S.: Measurement of non-crystalline calcium phosphate in bone mineral. Proc. Soc. Exp. Biol., 122:137-142, 1966.
- 34) Termine, J.D. and Posner, A.S.: Amorphous/crystalline interrelationships in bone mineral. Calcif. Tiss. Res., 1:8-23, 1967.
- 35) Termine, J.D. and Posner, A.S.: Infrared analysis of rat bone: age dependency of amorphous and crystalline mineral fractions. Science, 153: 1523-1525, 1967.
- 36) Molnar, Z.: Development of the parietal bone of young mice: I. crystals of bone mineral in frozen-

dried preparation. J.Ultrastruct.Res.,3:39-45,
1959.

- 37) Doty,S.B. and Mathews,R.S.: Electron microscopic and histochemical investigation of osteogenesis imperfecta tarda. Clin.Orthop.,80:191-201,1971.
- 38) Miller,A.L. and Schraer,H.: Ultrastructural observations of amorphous bone mineral in avian bone. Calcif.Tiss.Res.,18:311-324,1975.
- 39) Kim,K.M. and Trump,B.F.: Amorphous calcium precipitations in human aortic valve. Calcif. Tiss.Res.,18:155-160,1975.
- 40) Fitton-Jackson,S.: Fibrogenesis and the formation of matrix. In Bone as a tissue(ed. by Rodahl,K., Nicholson,J.T. and Brown,E.M.),p.165,McGraw Hill, New York,1960.
- 41) Appleton,J.: Ultrastructural observations on the inorganic/organic relationships in early cartilage calcification. Calcif.Tiss.Res.,7:307-317, 1971.
- 42) Appleton,J. and Williams,M.J.R.: Ultrastructural observations on the calcification of human dental pulp. Calcif.Tiss.Res.,11:222-237,1973.
- 43) Luben,R.A.,Sherman,J.K. and Wadkins,C.L.: Studies of the mechanism of biological calcification.

- IV. ultrastructural analysis of calcifying tendon matrix. *Calcif.Tiss.Res.*,11:39-55,1973.
- 44) Termine,J.D.,Eanes,E.D.,Greenfield,D.J. and Nylen,M.U.: Hydrazine-deproteinated bone mineral, physical and chemical properties. *Calcif.Tiss. Res.*,12:73-90,1973.
- 45) Boothroyd,B.: Observations on embryonic chick-bone crystals by high resolution transmission electron microscopy. *Clin.Orthop.*,106:290-310, 1975.
- 46) Steve-Bocciarelli,D.: Morphology of crystallites in bone. *Calcif.Tiss.Res.*,5:261-269,1970.
- 47) Bachra,B.N.: Calcification in vitro of demineralized bone matrix,electron microscopic and chemical aspects. *Calcif.Tiss.Res.*,8:287-303,1972.
- 48) Landis,W.J.,Paine,M.C. Glimcher,M.J.: Electron microscopic observations of bone tissue prepared anhydrously in organic solvents. *J.Ultrastruct. Res.*,59:1-30,1977.
- 49) Posner,A.S.: Crystal chemistry of bone mineral. *Phys.Rev.*,49:760-791,1969.
- 50) Höhling,H.J.,Steffens,H.,Stamm,G. and Mays,U.: Transmission microscopy of freeze dried,unstained epiphyseal cartilage of the guinea pig. *Cell Tiss.*

Res.,167:243-263,1976.

- 51) Landis,W.J.,Hauschka,B.T. and Paine,M.C.: An examination of bone ultrastructure using inert dehydration and ultracryomicrotomy for specimen preparation. J.Bone & Joint Surg.,57-A,571,1975.
- 52) Landis,W.J.,Hauschka,B.T.,Rogerson,C.A. and Glimcher,M.J.: Electron microscopic observations of bone tissue prepared by ultracryomicrotomy. J.Ultrastruct.Res.,59:185-206,1977.
- 53) Gay,C.V.: The ultrastructure of the extracellular phase of bone as observed in frozen thin sections. Calcif.Tiss.Res.,23:215-223,1977.
- 54) Anderson,H.C.: Electron microscopic studies of induced cartilage development and calcification. J.Cell Biol.,35:81-101,1967.
- 55) Bonucci,E.: The locus of initial calcification in cartilage and bone. Clin.Orthop.,78:108-139, 1971.
- 56) Thyberg,J.: Electron microscopic studies on the initial phases of calcification in guinea pig epiphyseal cartilage. J.Ultrastruct.Res.,46: 206-218,1974.
- 57) Schraer,H. and Gay,C.V.: Matrix vesicles in newly synthesized bone observed after ultracryotomy and

- ultramicroincineration. *Calcif.Tiss.Res.*,23:
185-188,1977.
- 58) Martin,J.H. and Matthews,J.L.: Mitochondrial
granules in chondrocytes. *Calcif.Tiss.Res.*,3:
184-193,1969.
- 59) Brighton,C.T. and Hunt,R.M.: Mitochondrial
calcium and its role in calcification. histo-
chemical localization of calcium in electron
micrographs of epiphyseal growth plate with K-
pyroantimonate. *Clin.Orthop.*,100:406-416,1974.
- 60) Sayegh,F.S.,Davis,R.W. and Solomon,G.C.: Mito-
chondrial role in cellular mineralization.
J.Dent.Res.,53:581-587,1974.
- 61) Matthews,J.L. and Martin,J.H.: Intracellular
transport of calcium and its relationship to
homeostasis and mineralization,an electron micro-
scope study. *Am.J.Med.*,50:589-597,1971.
- 62) Thomas,R.S. and Greenawalt,J.W.: Microincineration,
electron microscopy,and electron diffraction of
calcium phosphate loaded mitochondria. *J.Cell
Biol.*,39:55-76,1968.
- 63) Eanes,E.D.: Thermochemical studies on amorphous
calcium phosphate. *Calcif.Tiss.Res.*,5:133-145,
1970.

- 64) Lehninger, A.L.: Mitochondria and calcium transport. *Biochem.J.*, 119:129-138, 1970.
- 65) Cotmore, J.M., Nichols, G.J. and Wuthier, R.E.: Phospholipid-calcium-phosphate complex: enhanced calcium migration in the presence of phosphate. *Science*, 172:1339-1341, 1971.
- 66) Wuthier, R.E. and Gore, S.T.: Partition of inorganic ions and phospholipids in isolated cell, membrane and matrix vesicle fractions: evidence for Ca-Pi-acidic phospholipid complexes. *Calcif.Tiss.Res.*, 24:163-171, 1977.
- 67) Brecevic, Lj. and Furedi-Milhofer, H.: Precipitation of calcium phosphates from electrolyte solution. II. the formation and transformation of the precipitates. *Calcif.Tiss.Res.*, 10:82-90, 1972.
- 68) Meyer, J.L., Eick, J.D., Nancollas, G.H. and Johnson, L.N.: A scanning electron microscopic study of the growth of hydroxyapatite crystals. *Calcif.Tiss. Res.*, 10:91-102, 1972.
- 69) Tomazic, B. and Nancollas, G.H.: The seeded growth of calcium phosphates. surface characterization and the effect of seed material. *J.Colloid & Interface Sci.*, 50:451-461, 1975.
- 70) Eanes, E.D. and Meyer, J.L.: The maturation of

crystalline calcium phosphates in aqueous suspensions at physiologic pH. *Calcif.Tiss.Res.*,23: 259-269,1977.

- 71) Nancollus,G.H. and Tomazic,B.: Growth of calcium phosphate on hydroxyapatite crystals.effect of supersaturation and ionic medium. *J.Phys.Chem.*, 78:2218-2225,1974.
- 72) Eanes,E.D.: The interaction of supersaturated calcium phosphate solutions with apatitic substrates. *Calcif.Tiss.Res.*,20:75-89,1976.
- 73) Moreno,E.C.,Zahradnik,R.T.,Glazman,A. and Hwu,R.: Precipitation of hydroxyapatite from dilute solutions upon seeding. *Calcif.Tiss.Res.*,24: 47-57,1977.
- 74) Ortner,D.J. and Endt,D.W.: Microscopic and electron microprobe characterization of the sclerotic lamellae in human osteons. *Israel J.Med.Sci.*, 7:480-482,1971.
- 75) Lopez,E.,Lee,H.S. and Baud,C.A.: Etude histophysique de l'ós d'um Teleosteen *Anguilla anguilla* L. au course d'une hypercalcémie provoquée par la maturation expérimentale. *Compt.Rend.*,270:2051, 1970.

- 76) Tannenbaum, P.J., Schraer, H. and Posner, A.S.:
Crystalline changes in avian bone related to the
reproductive cycle. II. percent crystallinity
changes. *Calcif. Tiss. Res.*, 14:83-86, 1974.
- 77) Patel, P.R. and Brown, W.E.: Thermodynamic solubility
product of human tooth enamel: powdered sample.
J. Dent. Res., 54:728-736, 1975.
- 78) LeGaros, R.Z., Trautz, O.R. and LeGaros, J.P.:
Apatite crystallites: effects of carbonate on
morphology. *Science*, 155:1409-1411, 1967.
- 79) Coolidge, T.B. and Jacobs, M.H.: Enamel carbonate
in caries. *J. Dent. Res.*, 36:765-768, 1957.
- 80) Schraer, H., Tannenbaum, P.L. and Posner, A.S.:
Crystalline changes in avian bone related to the
reproductive cycle. *J. Dent. Res.*, 46:1072-1074,
1967.
- 81) Russell, J.E., Termine, J.D. and Avioli, L.V.:
Abnormal bone mineral maturation in the chronic
uremic state. *J. Clin. Invest.*, 52:2848-2852, 1973.

図の説明

図1 アパタイトの電子顕微鏡像。

(A) 多くの場合に球状に近いアパタイト結晶が認められた。

(B) 稀には板状結晶が認められ、その内部には格子縞が観察された。

(図内のスケールは 0.1μ をあらわす)

図2 溶液中の CO_3^{2-} 濃度を異にする各実験群3日目の試料のX線回折像。いずれの試料からもアパタイトの回折像が得られた。

図3 アパタイトの結晶成長過程に及ぼす CO_3^{2-} の影響。

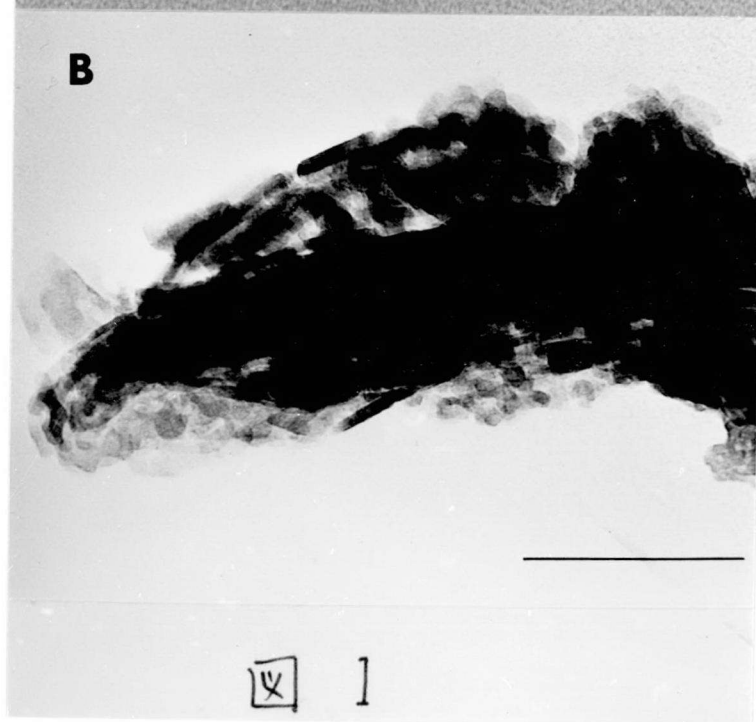
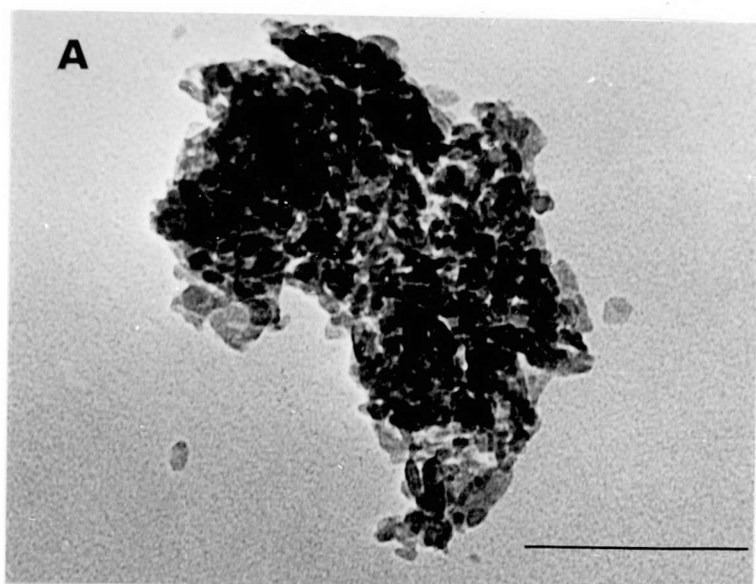
(A) フーリエ解析法による結晶子の大きさの評価結果。

(B) バリアンス解析法による格子の乱れの評価結果。なお、比較の目的

フラット脛骨アパタイトの格子の
乱れの大きさを示した。

図4 溶液中の CO_3^{2-} 濃度の異なる各実験群
4週 of 試料の電子顕微鏡像。

(A) $\text{CO}_3/\text{PO}_4 = 0$. (B) $\text{CO}_3/\text{PO}_4 = 1$. (C) $\text{CO}_3/\text{PO}_4 = 10$. (図内のスケールは 0.1μ を
あらわす)



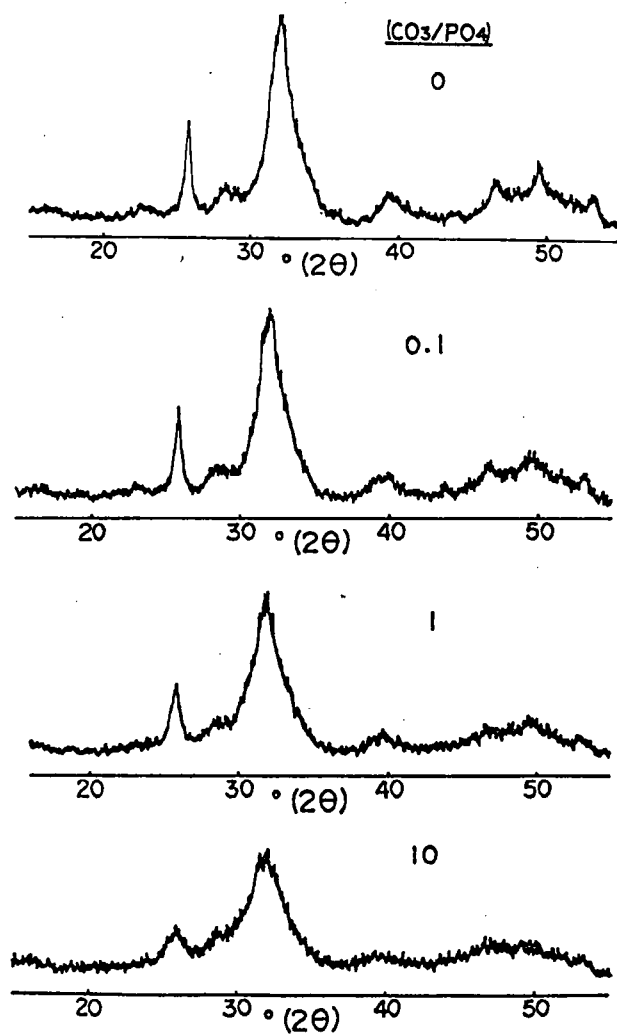
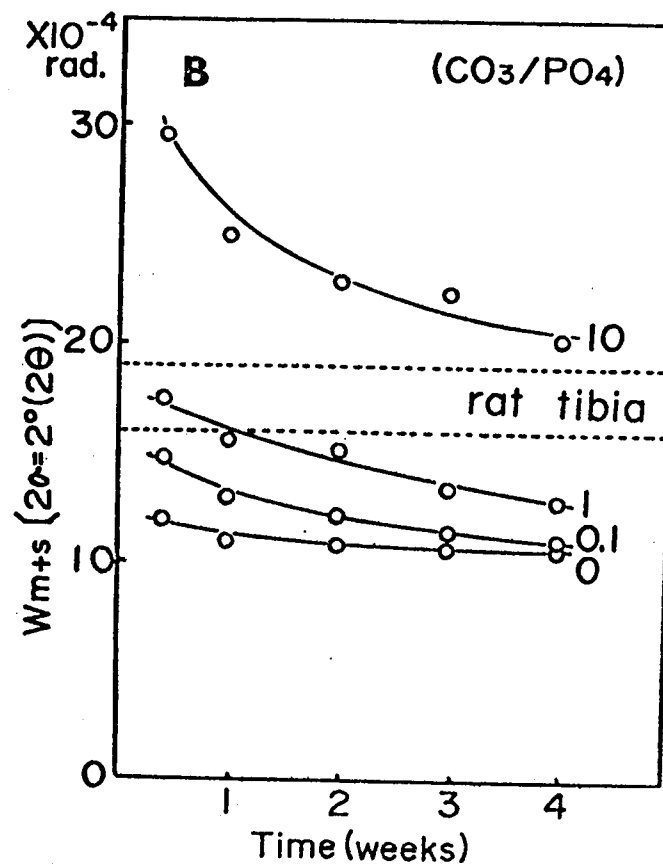
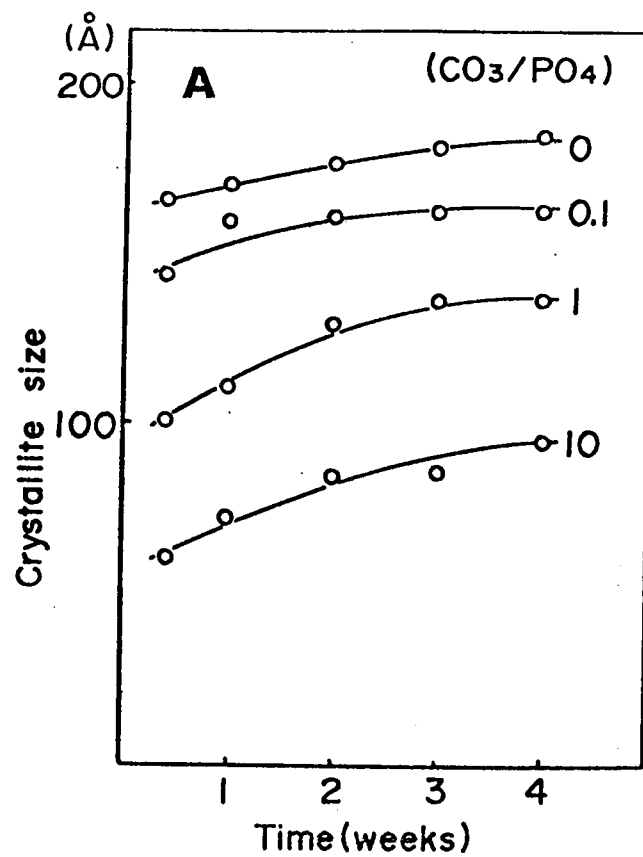
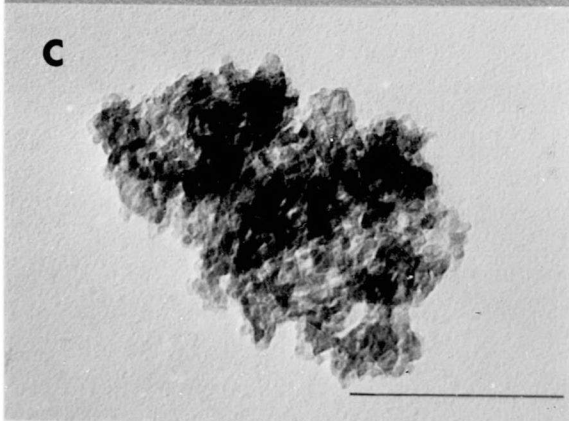
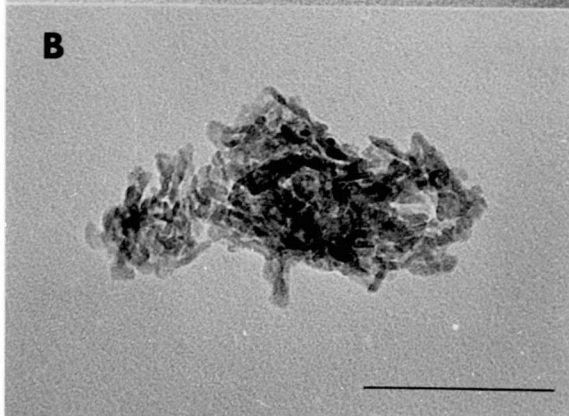
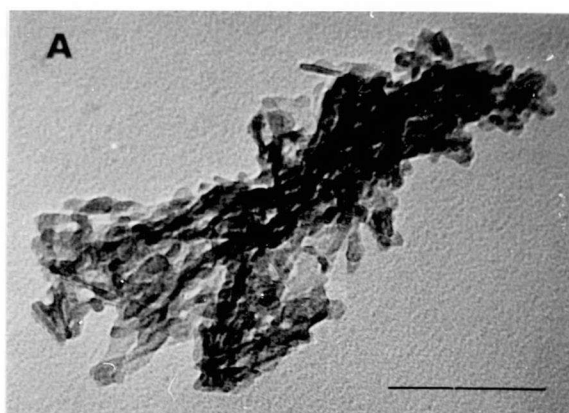


图 2





四 4

表1 ヒト骨アパタイトの結晶子の大きさと格子の乱れ

年齢	部位	結晶子の大きさ (Å)	格子の乱れ ⁽¹⁾ ($\times 10^{-4}$ rad.)
28	下顎骨	120	16.1
35	上顎骨	135	14.0
40	上顎骨	135	12.6
44	下顎骨	165	12.6
72	上顎骨	160	12.1
78	下顎骨	170	11.8

(1) 格子の乱れの大きさは、 $2^\circ(2\theta)$ で求められた mistake と歪みによるバリエーション ($W_m + s$) であらわした。

表2 ラット骨アパタイトの結晶子の大きさと格子の乱れ

年齢 (週)	結晶子の大きさ (Å)	格子の乱れ ⁽¹⁾ ($\times 10^{-4}$ rad.)
4	105	18.8
7	115	17.3
10	115	16.1

(1) 格子の乱れの大きさは、 $Z^0(Z\theta)$ で求められた
mistakeと歪みによるバリエーション(W_m+s)で
あらわした。

表3 フハツイトの(002)回折線の図心の位置

合成時の溶液の CO ₃ /PO ₄ 比	図心の位置 (°(2θ))
0	25.861
0.1	25.850
1	25.821
10	25.815

抄 録

本報では、まずヒト顎骨及びラット脛骨緻密質を試料として、フーリエ及びバリアンス解析法を用いて骨アパタイトの結晶性を結晶子の大きさと結晶格子の乱れに区別して評価した。その結果、骨アパタイトは微細で、大きな格子の乱れをもつことが認められた。さらに、増齢に伴って結晶子は大きくなり、格子の乱れは減少する傾向が認められた。

つぎに、骨アパタイトの格子の乱れの原因を考察するため、 CO_3^{2-} がアパタイトの結晶成長過程に及ぼす影響を調べた。その結果、合成時の溶液中の CO_3^{2-} 濃度が高いほど、得られたアパタイトは結晶性及び電子顕微鏡像のうえで骨アパタイトに類似した特徴をもつことがわかった。この場合に、溶液中の CO_3^{2-} 濃度が高い実験群で得られたアパタイトほど、結晶格子内に置換している CO_3^{2-} 量は多く、格子の乱れは大きいことが認められた。従

って、骨アパタイトの格子の乱れの原因としては、 CO_3^{2-} が重要な役割を果たしていると考えられた。

以上の結果から、骨無機質は微細なうえに格子の乱れの大きいアパタイト結晶から成り立っており、非晶質成分が存在する可能性は少ないと考えられる。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った大阪大学歯学部口腔病理学講座八木俊雄教授、ならびに大阪大学歯学部歯科理工学講座山賀礼一教授に深甚なる謝意を表するとともに、終始かわらぬ御指導、御教示いただいた歯科理工学講座森脇豊助教授に深く感謝致します。また御援助いただいた口腔病理学教室諸兄、歯科理工学教室諸兄、ならびに電子顕微鏡室石丸昌司氏に心から御礼申し上げます。

本論文の一部は、第19回歯科基礎医学会（52年，埼玉）で発表した。

本研究の経費の一部は、昭和52年度文部省科学研究費（一般D）によった。