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*

[受付：昭和53年3月25日]

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用いてフーリエ及びバリエーション解析し、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、 CO_3^{2-} や Sr^{2+} は逆に格子の乱れを大きくする作用を示した。なお、 Mg^{2+} 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 からの散乱と同様に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。

結 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¹⁾。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づいている^{1,3)}。Harper⁴⁾、Termine⁵⁾ らもこの考え方に基づいて、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

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)

Jap J oral. Biol. 20 : 603-615, 1978

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 からアパタイトへの転化過程(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きた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変化(結晶性)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¹¹⁾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、凍乾乾燥した。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 $1/10$ となるように第2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第2リン酸アンモニウム溶液中に 8 mM ($CO_3/PO_4=1/2$) 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¹¹⁾の図2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エンス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が、他方、格子の乱れについては精度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ンス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ンス量 (W) は結晶子の大きさ、格子の mistake 及び歪みに基づくバリエンス (W_m , W_s) 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ンス量 (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、バリエンス解析の過程で 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 彎曲結晶による単色化 X 線 ($CuK\alpha$) 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 ($1/32^\circ$ (2θ)/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¹¹⁾に示したとおりである。なおフーリエ解析を行なう際には、高度の結晶性を示す鉱物アパタイト (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ス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¹¹⁾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¹¹⁾。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

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) バリアンス解析結果

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 はバリアンス解析法により求めたバリアンス量 (W) を、測定した角度範囲 (2σ) に対してプロットしたものである。この図では、縦軸に示したバリアンス量が大きいほど、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 ($Wm+s$) 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

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ス ($Wm+s$) 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。

パタイトでは約 65~85Å 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

(イ) 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。核

表 2 転化過程にみられたアパタイトの結晶性の変化-F⁻の影響

試 料	結晶子の 大 き さ (Å)	格子の乱れ (×10 ⁻⁴ rad.)	図心の位置 (°(2θ))
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

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

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

図 4 CO₃²⁻ 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

日まで反応が進むと、結晶子はわずかに大きく(約180Å)、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められた(図3)。

(□) carbonate

CO₃²⁻ 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

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60Å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65Å)よりも小さいことがわかった(表3)。

表 3 転化過程にみられたアパタイトの結晶性の
変化—CO₃²⁻ の影響

試 料	結晶子の 大 き さ (Å)	格子の乱れ (×10 ⁻⁴ rad.)	図心の位置 (°(2θ))
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

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)。

(ハ) 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⁺ (0.99Å) より大きい Sr²⁺ (1.12Å) と、逆に小さい Mg²⁺ (0.66Å) 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、

表 4 転化過程にみられたアパタイトの
結晶性の変化—Sr²⁺ の影響

試 料	結晶子の 大 き さ (Å)	格子の乱れ (×10 ⁻⁴ rad.)	図心の位置 (°(2θ))
43(時間)	80	25.1	25.652
72	90	21.9	25.586
7(日)	95	20.3	25.540

Sr²⁺ を加えた実験群で得られたアパタイトの特徴として、(002) 回折線プロファイルの図心の位置

(2θ) が低角度方向に大きく移動していた。従って、Sr²⁺ 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。

Mg²⁺ 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められた(表5)。

表 5 転化過程にみられたアパタイトの
結晶性の変化—Mg²⁺ の影響

試 料	結晶子の 大 き さ (Å)	格子の乱れ (×10 ⁻⁴ rad.)	図心の位置 (°(2θ))
24(時間)	85	21.4	25.937
72	120	14.9	25.899
7(日)	140	12.4	25.880

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近づい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、60~80Åの幅を示す棒状結晶として観察された(前報図6-C)。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 軸方向の結晶成長は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、彎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、彎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(2σ)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

図5 各実験群7日目の試料の電子顕微鏡像。F⁻ (A), CO₃²⁻ (B), Sr²⁺ (C), Mg²⁺ (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。(図内のスケールは0.1 μ)

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

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. 2σ のプロットを行なうと、図1に示したように大きな角度範囲 (2σ) 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変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められた¹¹⁾。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65Åで、結晶成長期へ移行する比較的短時間のあいだに約30Å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、結晶成長期の初期(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¹¹⁾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た(表1)。従って、図2に示したような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(~100°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)}。Termine ら²⁸⁾は、合成した ACP の表面には多量の HPO_4^{2-} が吸着しており、転化過程で得られたアパタイトでは HPO_4^{2-} が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°C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アパタイト試料について、示差熱天秤装置(理学電機製)により分析をおこなった。その結果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°C以下で認められる)以外にも、200~500°C 及び600~700°C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確かめられた(図7)。なお、結晶成長がすすみアパタイトの

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す。

結晶性がよくなると、重量減少量は少なくなることともわかった。なお、200°C 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)が失な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°C 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°C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っ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の初期で測定さ

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。Schraer³⁷⁾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 $20\text{\AA}$ 、すなわち単位胞 (unit cell) 2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、 $8.2\text{\AA}$ 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 $\text{\AA}$ 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⁴²⁾こと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も確められた。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、彎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、彎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、 $^{85}Sr^{2+}$ 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の小さいことが注目された。イオン半径の小さい 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 ら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、アパタイトの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結晶も認められた。Steve-Boccialire⁵¹⁾, Bachra⁵²⁾, Landis⁵³⁾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、針状結晶にみ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+} を加えた実験群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考えられる。

(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^{1,3)}。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° (2θ) 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

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ウンドレベルに及ぼす ACP の影響

ベルは直線的に高くなることが確められた。従って、ACP からのX線散乱が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 からの散乱と同様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示す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、560~600cm⁻¹の位置にみられる2つのPO₄³⁻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、PO₄³⁻の ν_4 ピークの分離度は悪くなると考えられる。実際に、Fowlar⁵⁶⁾はアパタイト格子内のCa²⁺の一部がSr²⁺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エンス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Ca²⁺の欠落や、H₃O⁺やHPO₄²⁻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) CO₃²⁻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) Sr²⁺を作用させると、電子顕微鏡では彎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。Sr²⁺はアパタイトの結晶格子内のCa²⁺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) Mg²⁺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Mg²⁺の作用は、Mg²⁺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からの散乱と同様に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。

稿を終えるにあたり、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。

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. and POSNER, A. S.: Measurement of noncrystalline 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, 1966.
- 7) EAMES, 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関する研究, 歯基礎誌, 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.*, A 58 : 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) KEREDEL, B., DACULSI, G. and VERBAERE, A. : High-resolution electron microscopy and crystallographic study of some biological apatite. *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, 山賀礼一 : 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. 歯科理工学雑誌, **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., BJORNERSTEDT, 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.