凍結乾燥ゼラチンゲル法によるフルオルアパタイト 生成に関する研究

村 上 一 志 亀 田 晃 遠 藤 敏 哉

日本歯科大学新潟歯学部歯科矯正学教室（主任：亀田 晃教授）

〔受付：平成2年2月9日〕

A study on the formation of fluorapatite crystallized with freeze-drying gelatin gel method

Hitoshi Murakami, Akira Kameda and Toshiya Endo

*Department of Orthodontics, School of Dentistry at Niigata, The Nippon
Dental University, 1-8 Hamaura-cho, Niigata 951, Japan*
(Chief : prof. Akira Kameda)

〔Accepted for publication : February 9, 1990〕

Key words : Gelatin gel method / freeze-drying gelatin gel method / fluorapatite / tray / crystal growth

Abstract : In order to develop a clinically available simple method for forming fluorapatite the reaction products formed with the gelatin gel method and with a newly developed freeze-drying method using a tray were examined. Observations of the reaction processes were made with the naked-eye, pH measurements in the gels and determination of the Ca/P ratio of the reaction products. Also, the reaction products were examined by X-ray diffraction and infrared spectroscopy, and observed with a scanning electron microscope. As a result, it proved feasible with the newly developed freeze-drying gelatin gel method to form a fluorapatite, which is favourably comparable with fluorapatite formed using the conventional gelatin gel method. It is suggested that the new freeze-drying gelatin gel method could be an effective method of use for clinical applications with the aid of a tray.

I. 緒 言

歯科矯正治療におけるダイレクトボンディング法は、主にその接着力を酸処理により粗造化したエナメル質表面と接着剤との機械的嵌合効力に依存しているため、装置装着時の酸処理操作と装置除去操作により、エナメル質を被い耐酸性を示すと言われていた cuticle および耐蝕蝕性の高い最表層エナメル質の喪失を招き、また矯正治療中、治療後に耐酸性の減弱した脆弱なエナメル質が口腔内にさらされるために、白濁、脱灰、二次蝕蝕の誘因となることがあるといわれている¹⁻³⁾。

この耐酸性の減弱したエナメル質を化学的に補償する目的で、ゲル法によるフルオルアパタイト（以下 FAp と略す）の結晶生成およびエナメル質歯質強化に関する一連の研究が、シリカハイドロゲル^{4,5)}、ゼラチンゲル⁶⁾、セルロース系ゲル⁷⁾、ポリアクリル酸系ゲル⁸⁾を用いて行われてきている。一方、佐藤ら⁹⁾はトレー法を応用した場合のシリカハイドロゲル法および凍結乾燥シリカハイドロゲル法について、ゲル基質ならびに反応生成物の比較検討を行い、臨床応用に際して、凍結乾燥シリカハイドロゲル法は検討の余地があると述べている。また、遠藤ら¹⁰⁾はトレー法を適用したゼラチンゲル法および凍結乾燥ゼラチンゲル法に用いるフッ化物ゲルを比較し、凍結乾燥ゼラチン

Fig. 1 Schematic diagram of the formation of fluorapatite crystallized with the gelatin gel method.

The equivalent volume of mixed solution of 0.1M sodium fluoride and 0.3M phosphoric acid as well as 8N sodium hydroxide was added to gelatin. After formation of 5% gelatin gel fluorapatite was formed by the addition of 0.5M calcium nitrate to the 5% gelatin gel substance.

ゲル法に用いるゲル基質は、FAp生成に際し、良好な物理化学的特性を有していたと報告している。

そこで、従来のゼラチンゲル法および新たに開発した凍結乾燥ゼラチンゲル法により生成した反応生成物の比較観察分析をし、凍結乾燥ゼラチンゲル法によるFAp生成の有効性について検討する目的で本研究を行った。

II. 実験方法

1. ゼラチンゲル基質の調整法ならびに反応生成物の生成法および抽出法

1) ゼラチンゲル基質の調整法 (Fig. 1)

亀田らの考案したゼラチンゲル法に準拠して⁶⁾、平林ら¹¹⁾の指摘に基づき5%ゼラチンゲル基質を調整した。すなわち、0.1M フッ化ナトリウム溶液と0.3M リン酸溶液の等量混合液を溶媒として5%ゼラチン溶液を調整し、10~15°Cで2時間膨潤させた。次に約30°Cの水浴中に数分間浸

漬させてから、70°Cを超えない温浴で内容物温度を15分以内に60°Cにした後、8N水酸化ナトリウム溶液を添加してpHメーター（堀場社製イオンメーター、N-8F）にてpH 6.5に調整し、ゼラチンゾル溶液とした。このゾル溶液を内径が縦26mm、横66mm、高さ35mmのアクリル樹脂製トレーに30mlずつ分注し、密封後20°C低温恒温器（ヤマト科学社製、IL-71）中に24時間静置し、ゲル化したものを対照群ゼラチンゲル基質とした。また、対照群ゼラチンゲル基質を凍結乾燥した凍結乾燥ゼラチンゲル基質に、脱イオン水を加えて凍結乾燥前の重量に戻し、室温に24時間放置した後、20°C低温恒温器中に24時間静置したものを実験群ゼラチンゲル基質とした。

2) 反応生成物の生成法および抽出法

対照群および実験群ゼラチンゲル基質 30ml 上にそれぞれ0.5M 硝酸カルシウム溶液を15ml添加し、密封後20°C低温恒温器中に168時間静置し反応生成物を生成した (Fig. 1)。

反応開始168時間後に、反応層を可及的に他の2層（硝酸カルシウム添加層、ゲル基質層）と混じり合うことのないように分離して、遠心沈澱管に移し、70°C温浴でゼラチンゲル基質を破壊し、細菌コラゲナーゼ溶液（*Clostridium histolyticum*, 0.05M Tris-0.05M NaCl-0.05M CaCl₂ buffer, pH 6.7)¹²⁾ 10mlを添加し37°C恒温槽（ヤマト科学社製、IC-62）中に24時間静置後、遠心分離（3500rpm, 15分間）を行い、沈澱物を50°C恒温器（マルトール社製、MD-205）中に保管して反応生成物を抽出し、実験に供した。

なお、対照群ゼラチンゲル基質、実験群ゼラチンゲル基質を用いてFApを生成する方法を、それぞれゼラチンゲル法、凍結乾燥ゼラチンゲル法と、また、それぞれにより生成した反応生成物を対照群反応生成物、実験群反応生成物と記載した。

2. 反応生成物の評価

1) 反応進行の肉眼的観察

対照群および実験群ゲル基質に0.5M 硝酸カルシウム溶液をそれぞれ添加した時点を反応開始として、反応開始時および反応開始168時間後に、白色沈澱生成状態やリーゼガング環形成状態などを肉眼的に観察比較した。

2) 反応液の pH の変動

反応開始168時間後に 対照群, 実験群それぞれ10個のトレーの硝酸カルシウム添加層 (トレー中のゲル基質上の上清溶液), 反応層 (白色沈澱層 およびリーゼガング環形成層), ゲル基質層の 3つの部位について, 互いに溶液が混じり合うことのないように分離し, それぞれについて3回ずつ pH メーターにて pH を測定し, その平均値を pH 値とした。

3) 反応生成物の Ca および P の定量値ならびに Ca/P モル比の算出

反応開始168時間後の対照群, 実験群それぞれ 10個のトレーについて, 反応層を可及的に他の2層 (硝酸カルシウム添加層, ゲル基質層) と混じり合うことのないように分離して遠心沈澱管に移し, 70°C の温浴中でゼラチンゲル基質を破壊し, コラゲナーゼ溶液 10 ml を添加して24時間後遠心分離 (3500rpm, 15分間) を行い, 上清を廃棄してから反応生成物 (沈澱物) を脱イオン水で洗浄した。この操作を 3日間数回繰り返すことにより遊離カルシウム およびリンを除去した。4日後に遠心分離をした後, 上清を廃棄し, 沈澱物に 1N塩酸溶液 30ml を加えて振盪器 (ヤマト科学社製, SA-31) にて 24時間振盪して沈澱物を溶解し, 再び遠心分離を行い, 得られた各群 それぞれ 10個の上清を試料として, 3回ずつ 超微量遠心方式生化学自動分析装置 (横河北辰電機社製, IL Multistat III PLUS) にて Ca および P の値を求め, 反応生成物の Ca/P モル比を算出し, 平均値を求めた。

4) X線回折による定性分析

対照群, 実験群の反応生成物を メノウ乳鉢にて微粉碎し300mesh に調整した後, X線回折装置 (日本電子社製, JDX-8030型) にて粉末X線回折測定を行った。標準物質として, 高度の結晶性を有する鈣物フルオルアパタイト (Mexico Durango 産出) を, 同様に調整してX線回折測定を行った。測定条件は各試料および 標準物質とも同一とし, Table 1 に示した。

(1) データ検索 (同定)

対照群, 実験群反応生成物の測定データの smoothing, background 除去および peak search を行った後, JCPDS カードを用いて Hanawalt

Table 1 Analytical conditions of X-ray diffraction

Target	Cu
Filter	Ni
Voltage	40 KV
Current	30 mA
Scanning Range	10-80 degree
Step Scanning Method	
Degree	0.02 degree
Fixed Time	2 second
Slit	
Divergence Slit	1 degree
Receiving Slit	1 degree
Soller Slit	0.2 mm
Graphite Monochromator	

法にて 1 次検索および 2 次検索を行った。

(2) Line profile および peak shift の検討

対照群, 実験群反応生成物および 標準試料の各測定 データ において, 回折角が 2θ が 46° から 53° の間に出現し, 互いに重なるの少ない回折線 (222), (312), (213), (321), (410), (402) について, line profile および peak shift の比較検討を行った。

(3) 結晶性の評価

光学系による回折線の拡がりをシリコンを標準物質として補正し, Rachinger の方法¹³⁾ により $K\alpha_1$, $K\alpha_2$ の分離を行い, $K\alpha_1$ のピークのみ回折線の回折角度および 積分幅を求め, Scherrer の式¹⁴⁾ より複数の回折線について D を計算し, Hall の解析法¹⁵⁾ の関係図を求め, その切片 ($1/\epsilon$) から結晶子の大きさを, 勾配 (η) から格子不整を分離して算出した。

$$D = K \cdot \lambda / \beta \cos \theta (K = 1)$$

(Scherrer の式)

$$\beta \cos \theta / \lambda = 1/\epsilon + \eta (\sin \theta / \lambda)$$

(Hall の解析法)

D, ϵ : 結晶子の大きさ, λ : X線の波長

μ : 格子不整, θ : ブラッグ角

β : 結晶子の大きさによる回折線の広がり

(4) 格子定数の精密測定

各群の測定したデータの X 線回折波形を Rachinger の方法¹³⁾ により $K\alpha_1$, $K\alpha_2$ に分離した後, ピークトップ法を用いて回折角度を決定した。これより得られた複数の回折線の正確な 2θ か

ら、最小自乗法で精密な格子定数を求めた。

5) 赤外線吸収スペクトルによる組成解析

対照群、実験群の各反応生成物0.5mg を KBr 150mg と混合し200mesh に調整後、錠剤形成器にて錠剤を作製した。また、対照用として KBr 150mg のみの錠剤も作製した。これらの錠剤を赤外分光光度計（日立社製、270-30 型）にて 4000 cm^{-1} から 400 cm^{-1} まで透過赤外測定を行った。

6) 走査型電子顕微鏡による形態観察

各群の反応生成物を試料台に両面テープにて接着し、真空蒸着機（日立社製、E-101）にて白金蒸着後、走査型電子顕微鏡（日立社製、S-800 型、以下 SEM と略す）にて形態観察を行った。

III. 実験結果

1. 反応進行の肉眼的観察

対照群においては、反応開始時、硝酸カルシウム層とゲル層とは明瞭な界面を呈して約4mm の反応層を形成し、硝酸カルシウム層、白色反応層、ゲル層の3層は明らかに区別された。また、反応開始168時間後では、白色反応層は約13mm に増加し、試験管を用いたゼラチンゲル法による FAp 生成時に認められたリーゼガング環現象と同様の所見が観察された。

一方、実験群においても、反応開始時、硝酸カルシウム層、白色反応層、ゲル層の3層に区別されたが、凍結乾燥ゲルに加水した際に発生しゲル化後も残留している幅約9mm のゲル表面の気泡のため、白色反応層は対照群ほど明瞭な界面を形成することができなかった。また反応開始168時間後では、白色反応層は約13mm に増加したが、対照群と比較して幅の広い不明瞭な波状の周期的沈澱層が観察された（Fig. 2）。

2. pH の測定

対照群および実験群の pH 値（平均値）および標準偏差を Table 2 に示した。両群とも著しい pH の低下が認められたが、実験群より対照群の方が若干低い値を示した。

3. 反応生成物の Ca および P の定量ならびに Ca/P モル比の算出

各群の Ca および P の定量値ならびに Ca/P モル比の平均値および標準偏差を Table 3 に示し

た。Ca、P ともに実験群は対照群よりわずかに低い値を示した。またこれらの定量分析結果より算出した Ca/P モル比は、対照群1.23 (S. D. $\pm$ 0.04)、実験群1.24 (S. D. $\pm$ 0.01) となり、いずれも理論値1.67より低い値を呈した。

4. X線回折法による反応生成物の定性分析

1) X線回折像およびデータ検索

回折角 2θ が 10° から 80° の X線回折像を Fig. 3 に、対照群および実験群における信頼値180以上の1次検索結果を Table 4-1, 2 に、2次検索結果を Fig. 4-1, 2 に示した。

2) Line profile および peak shift の検討

対照群反応生成物、実験群反応生成物、標準試料の回折角 2θ が 46° から 53° の間に出現した回折線の line profile と peak shift を Fig. 5 に示した。

3) 結晶性の評価

対照群、実験群の各反応生成物について、結晶性を結晶子の大きさと格子不整とに分離して評価する Hall の解析法¹⁵⁾による $\sin\theta/\lambda \sim \beta \cos\theta/\lambda$ の関係図を Fig. 6 に、また結晶子の大きさおよび格子不整を Table 5 に示した。

4) 格子定数

対照群、実験群反応生成物について a 軸および c 軸格子定数を Table 5 に示した。

5. 赤外線吸収スペクトルによる組成解析

対照群、実験群反応生成物の測定図形を Fig. 7 に示した。対照群および実験群に共通して、2700-3700, 3400, 1640-1660, 1540, 1450, 1100, 1040, 970, 860-880, 610, 580 cm^{-1} に吸収帯を認めた。

6. 走査型電子顕微鏡による形態観察

対照群および実験群の反応生成物の典型的 SEM 所見を Fig. 8 に示した。両群ともに六角柱状結晶が放射状に成長した球状物の生成が認められ、個々の結晶は c 軸方向のみならず a 軸および b 軸方向にも成長し、互いに密に連結し、結晶相互間の空隙は認められなかった。アパタイト型の結晶の集合体である球状物の大きさは、対照群、実験群ともに直径約 $10\mu\text{m}$ であった。

IV. 考察

ダイレクトボンディング法の適用により耐酸性の減弱したエナメル質を化学的に補償するため考

Fig. 2 Naked-eye observations of reactive products crystallized in the control group and experimental group.

Control group

A : With a clear surface boundary being shown between the additional solution layer and gel layer, approximately 4 mm of a reactive layer as formed at the commencement of the reaction, and these three layers were sharply differentiated.

B : The reactive layers increased to about 13mm 168 hours after the commencement of the reaction, and Liesegang rings were confirmed.

Experimental group

C : Even though three layers were differentiated after the commencement of the reaction, the surface boundary was not noted as clear as that in the control group because of bubbles on the surface of the gel layers which were about 9 mm wide.

D : Reactive layers increased to about 13mm 168 hours after the commencement of the reaction, however, a wavy periodic-layered precipitate, which was wider and more indistinct than that in the control group, was recognized.

Table 2 pH values

	Control group	Experimental group
Additional solution layers	3.29±0.03	3.32±0.05
Reactive layers	3.17±0.04	3.22±0.08
Gel layers	3.25±0.04	3.29±0.10

Values are given as mean ± S.D.

案された ゲル法によるフルオルアパタイト生成法を、具体的に臨床応用する方法のひとつとしてトレーを用いた凍結乾燥ゲル法が考えられる。

すでに佐藤ら⁹⁾は トレー法を応用した凍結乾燥

Table 3 Qualitative value of Ca and P, and Ca/P mol ratio. Ca and P in experimental group showed a little lower value than those in the control group. Mol ratio of Ca/P in each group revealed less than 1.67 of theoretical.

	Control group	Experimental group
Ca (mg/dl)	78.6±0.5	78.5±0.3
P (mg/dl)	49.3±0.5	49.1±0.4
Ca/P mol ratio	1.23±0.04	1.24±0.01

Values are given as mean ± S.D.

Fig. 3 X-ray diffraction patterns of reactive products in the control group and in the experimental group, in comparison with those of mineral fluorapatite.

シリカハイドロゲル法について研究し、いくつかの問題点があることを指摘している。すなわち、

1) 従来のシリカハイドロゲル基質は、凍結乾燥後脱イオン水を加えても元のゲル状態に戻らない非可逆性のゲルであった

2) 凍結乾燥シリカハイドロゲル法に用いるフッ化物ゲルは、SEM による形態観察の結果、網目構造が認められなかった

3) したがって、凍結乾燥シリカハイドロゲル法は、硝酸カルシウムを添加してもゲル界面を形成せず、速やかな対流による化学反応となるため、良好な結晶性を有する反応生成物を生成しなかった

4) 結論として、凍結乾燥シリカハイドロゲル法は、臨床応用に際しては、凍結乾燥の方法そのものを変更するか、ゲル基質を他のものとするかいずれかの方法を開発すべきであるなどである。

一方、遠藤ら¹⁰⁾は従来のゼラチンゲル法と凍結乾燥ゼラチンゲル法に用いるゲル基質の物理的、化学的特性について有意な相違は認められず、トレー法を適用した凍結乾燥ゼラチンゲル法に用い

るフッ化物ゲルは、ゲル媒体として有効であったと報告している。

以上の報告に立脚し、本研究は、ゼラチンゲル法および新たに開発した凍結乾燥ゼラチンゲル法により生成した FAp 結晶（反応生成物）を比較し、トレー法を応用した凍結乾燥ゼラチンゲル法の有効性について検討を行ったものである。

1. 反応進行の肉眼的観察

ゲル法は、溶液に対する透過性のやや低いゲルを媒体として、その中で適当な成分を適当な速度をもって拡散会合させ結晶を成長させるものであり、したがってゲル界面上に硝酸カルシウムを添加しても、界面が損なわれることなくカルシウムイオンを漸次供給する必要がある。実験群ゲルにおいては、ゲル上層部に多数の気泡が認められ平滑な界面を形成せず、場所によって拡散速度が異なるため、対照群と比べて境界不明瞭な波状のリーゼガング環を形成したものであると思われる。遠藤ら¹⁰⁾は、従来の対照群ゼラチンゲル基質に比べ、実験群ゼラチンゲル基質は、ゲル基質上に気泡が存在するため、FAp 生成に何らかの影響を与えているのではないかと報告している。

Table 4-1 Result of 1st search match match (Control group)

JCPDS No.	Chemical formula	Peak of matching	Percent of matching	Reliability factor	Error
1 : * 150876	Ca ₅ F(PO ₄) ₃ FLUORAPATITE, SYN	6/6	85%	486	.8
2 : D340010	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH) HYDROXYLFLUOROXYAPATITE, SYN	10/10	90%	353	.7
3 : D110232	Ca ₄ P ₂ O ₉	6/7	75%	323	.7
4 : 180303	Ca ₃ (PO ₄) ₂ , X H ₂ O	5/5	83%	320	.6
5 : * 90432	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH) HYDROXYLAPATITE	6/6	85%	317	.5
6 : I 40733	Ca(OH) ₂ PORTLANDITE, SYN	3/4	60%	291	.6
7 : D210141	Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ CO ₃ F _{1.5} (OH) _{.5} CARBONATE-FLUORAPATITE	4/4	80%	269	.5
8 : 310267	Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ CO ₃ F _{1.5} (OH) _{.5} CARBONATE-FLUORAPATITE	4/4	80%	269	.5
9 : * 350816	CaF ₂ FLUORITE, SYN	3/3	75%	259	.4
10 : D 40864	CaF ₂ FLUORITE, SYN	3/3	75%	259	.4
11 : 1210145	Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ CO ₃ (OH)F CARBONATE-HYDROXYLAPATITE	3/3	75%	237	.4
12 : 370759	C ₁₁ PF ₆	3/4	60%	225	.6
13 : 100348	Ca	2/2	66%	211	.5
14 : D340011	Ca ₅ (PO ₄) ₃ F FLUORAPATITE, SYN	8/8	88%	191	.8

Table 4-2 Result of 1st search match (Experimental group)

JCPDS No.	Chemical formula	Peak of matching	Percent of matching	Reliability factor	Error
1 : * 150876	Ca ₅ F(PO ₄) ₃ FLUORAPATITE, SYN	6/6	85%	450	.7
2 : 310267	Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ CO ₃ F _{1.5} (OH) _{.5} CARBONATE-FLUORAPATITE	4/4	80%	434	.8
3 : D210141	Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ CO ₃ F _{1.5} (OH) _{.5} CARBONATE-FLUORAPATITE	4/4	80%	434	.8
4 : * 350816	CaF ₂ FLUORITE, SYN	2/3	50%	388	1.0
5 : D 40864	CaF ₂ FLUORITE, SYN	2/3	50%	386	1.0
6 : 100348	Ca	2/2	66%	362	.8
7 : D110232	Ca ₄ P ₂ O ₉	6/7	75%	321	.6
8 : 360766	H ₂ O	3/3	75%	244	.6
9 : I 40733	Ca(OH) ₂ PORTLANDITE, SYN	3/4	60%	229	.4
10 : 370908	CO ₂	4/4	80%	206	.6
11 : 30297	H ₃ PO ₃	2/3	50%	193	.7
12 : 190272	Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ (CO ₃) ₃ (OH) ₂ CARBONATE-HYDROXYLAPATITE, SYN	2/2	66%	193	.3
13 : D340010	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH) HYDROXYLFLUOROXYAPATITE, SYN	10/10	90%	192	.4
14 : 180303	Ca ₃ (PO ₄) ₂ . XH ₂ O	5/5	83%	192	.3
15 : 1210145	Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ CO ₃ (OH)F CARBONATE-HYDROXYLAPATITE	3/3	75%	186	.3
16 : 370759	C ₁₁ PF ₆	3/4	60%	181	.4

2. pH の測定

ゼラチンゲル法による FAp 生成は,
18NaOH+6H₃PO₄+2NaF+10Ca(NO₃)₂→

Ca₁₀(PO₄)₆F₂+20NaNO₃+18H₂O
の化学反応を起こすと考えられるが,反応層の pH
の低下は, 生じた H⁺ がゲル中を速やかに拡散

Fig. 4-1 Result of the 2nd search match of reactive products (Control group).

することに起因すると考えられる。亀田ら⁶⁾、平林ら¹¹⁾、遠藤¹⁶⁾は、この pH の低下により、一度ゲル法を用いて生成された結晶構造の不完全な(化学的安定性の劣る)FApを脱灰し、再び結晶性の良好な結晶の生成が可能であろうという観点から、ゲル法により、結晶性のより良好なFApを生成するには、むしろ pH の低下は必要であると述べている。また、青木¹⁷⁾は、pH の変動を

コントロールすることによる結晶性の調整の可能性を示唆している。

対照群と実験群を比較してみると、3層(硝酸カルシウム層、反応層、ゲル層)のいずれについても実験群のほうがわずかに高い値を示しているが、X線回折による定性分析、SEMによる形態観察などの結果から推察すると、結晶成長に関しては影響を与えるものではないと思われた。

Fig. 4-2 Result of the 2nd search match of reactive products (Experimental group).

3. 反応生成物の Ca および P の定量ならびに Ca/P モル比の算出

Ca, P いずれの定量値も対照群と実験群との間に有意な相違は認められず, Ca/P モル比についても近似した値を示した。反応生成物の Ca/P モル比は対照群1.23, 実験群1.24で, いずれも理論

値1.67より低い値を示したが, 一般に低温 (4 ~ 100°C), 常圧下で湿式合成されたアパタイトの Ca/P モル比は通常広範囲 (1.33~1.95位) に変化し, 合成時の温度が低くなるほど結晶性が悪くなるといわれている¹⁸⁾。また, biological apatite の Ca/P モル比は1.60付近で, 理論値1.67より低い

Fig. 5 X-ray diffraction patterns of reactive products (control group and experimental group) from diffraction angles from 46° through 53°, as compared with those of mineral fluorapatite.

Fig. 6 Correlation chart of $\sin\theta/\lambda \sim \beta\cos\theta/\lambda$ by Hall's analyses.

The slopes of respective lines are responsible for lattice imperfection, and the intercept of y is related to crystallite size.

Table 5 As a result of Hall's analyses, crystallite size in the control group exhibited the same value as that in the experimental group, and lattice imperfections in the control group was less than that in the experimental group. When carrying out precision measurement, the a-axis lattice constant in the control group was 9.38 Å and in the experimental group 9.39 Å, and the c-axis lattice constant in both groups demonstrated the same value, 6.88 Å.

	Control group	Experimental group
Crystallite size (Å)	580	580
Lattice imperfection	0.001	0.002
Lattice constant (Å)	a-axis	9.38
	c-axis	6.88

Fig. 7 Result of infrared spectra of the control and experimental group.

As a result of making composition analyses according to the location of absorption band, PO_4^{3-} (1100 cm^{-1} , 1040 cm^{-1} , 970 cm^{-1} , 610 cm^{-1} , 510 cm^{-1}), H_2O (2700–3700 cm^{-1} , 1640–1660 cm^{-1}), OH^- (3400 cm^{-1}), CO_3^{2-} (1450 cm^{-1} , 860–880 cm^{-1}), and organic substance (1540 cm^{-1}) were confirmed to be common to both groups.

Ca-deficient apatite であるといわれている¹⁹⁾。亀田ら⁶⁾は5%のゼラチンゲル基質により生成した反応生成物の Ca/P モル比は1.30と、また平林ら¹¹⁾は6%ゼラチンゲル基質により生成した反応生成物においては1.33と、いずれも Ca-deficient apatite であつたと報告している。

4. X線回折法による反応生成物の定性分析

1) X線回折像および同定

Fig. 8 As a result of morphological observations with the scanning electron microscope, aggregations of hexagonal prismatic crystals were recognized in the experimental group as well as in the control group. Hexagonal prismatic crystals developed not only in the direction of the c-axis but also in the directions of a-axis and b-axis. They were linked together, and no spacing among crystals was observed.

対照群、実験群ともに標準試料に比べてX線強度は劣り、peak broadening が認められるものの、両群の回折線においてはそれらの差は観察されず、ほぼ同様の結晶性を有する反応生成物であると考えられた。また検索結果により、対照群では FAp, hydroxyl fluorapatite, hydroxyapatite, carbonate-fluorapatite, carbonate-hydroxylapatite (以下それぞれ OH-FAp, OHAp, CO₃-FAp, CO₃-OHAp と略す) の生成が、また実験群では FAp, CO₃-FAp, CO₃-OHAp, OH-FAp の生成が確認された。Rathje²⁰⁾ は F⁻ を含むハイドロキシアパタイトはハイドロキシアパタイトとフルオルアパタイトの固溶置換体であるハイドロキフルオルアパタイトとして存在すると述べている。

本研究では従来よりフルオルアパタイトの前駆物質と考えられている brushite の生成は確認されなかったが、これは反応開始168時間後をもって実験結果としているために、すでに brushite がハイドロキシアパタイト、フルオルアパタイトへと転化、成長してしまったものと思われる。すなわち、小川ら²¹⁾ はフッ化水素酸を適用したシリカハイドロゲル法において、brushite は少なくとも反応開始後1時間以内あるいは反応直後に生成され、その後間もなくこれを結晶種子核としてハイドロキシアパタイト、フルオルアパタイトへと転

化、成長してゆく可能性を示唆し、遠藤¹⁶⁾ はフッ化水素酸を適用したゼラチンゲル法において、反応開始4時間後から24時間後において brushite の生成を認めているが、120時間後から240時間後においてはその存在を確認していない。一方平林ら¹¹⁾ はフッ化ナトリウムを適用した15~20%の高濃度のゼラチンゲルにおいては、反応開始240時間後でも brushite の生成が可能であると報告しているが、5%のゼラチンゲルを用いた本研究では brushite は認められなかった。

2) Peak shift

対照群、実験群ともに生成した反応生成物は FAp と OHAp の固溶置換体として存在することが示唆された。FAp の含有量の多い固溶置換体のX線回折像は high angle 側へ shift するという観点から、両群の回折線の peak shift を比較検討したところ、著明な相違は認められなかった。このことから対照群と実験群のフッ素イオン含有率はほぼ同程度と推測され、凍結乾燥処理を施したゲルを用いても化学的に安定した結晶性の良好な固溶置換体が得られると考えられた。

3) 結晶性の評価

結晶性とは結晶子の大きさと結晶構造の完全さを総合的に表した言葉であり、異種イオンの置換や原子配列の乱れ、構成原子の欠落など結晶構造上の不完全さをまとめて格子不整と表現している。すなわち結晶性の良否は結晶子の大きさと格子不整の2つの因子によって決定され、これら両因子を分離して評価する Hall の解析法を用いて対照群、実験群の反応生成物を評価した。

一般に高度の結晶性を有する物質においては、結晶サイズが大きく格子不整が少ない。本研究においては、結晶サイズは対照群、実験群ともに同一値を示したが、対照群の格子不整は実験群のそれより少なかった。すなわちX線結晶学的に凍結乾燥ゼラチンゲル法よりゼラチンゲル法の方が優れていることが確認された。これは反応進行の肉眼的観察で述べたように、対照群では明瞭なゲル界面を呈しているのに対し、実験群では多数の気泡のために平滑な界面とならず、そのために Ca²⁺ の拡散速度が場所により異なったことが反応生成物の結晶性の低下を招いたのではないかと思われる。

る。

4) 格子定数

LeGeros²²⁾ ら²³⁾は、アパタイトの a 軸格子定数は F^- , CO_3^{2-} により短縮し, HPO_4^{2-} , Cl^- により延長すると、また c 軸格子定数は CO_3^{2-} により延長すると述べている。Kay ら²⁴⁾は OHAp の格子定数の値を $a = 9.424\text{\AA}$, $c = 6.879\text{\AA}$, FAp では $a = 9.368\text{\AA}$, $c = 6.884\text{\AA}$ と報告している。また小菅²⁵⁾は合成 FAp について $a = 9.37\text{\AA}$, $c = 6.88\text{\AA}$, 可児²⁶⁾は $a = 9.36\text{\AA}$, $c = 6.88\text{\AA}$ と報告している。本研究では、a 軸格子定数は対照群 $9.38\text{\AA}$, 実験群 $9.39\text{\AA}$ であったが、これは CO_3^{2-} よりむしろ F^- の影響が大きいと考えられる。つまり対照群、実験群とも c 軸格子定数が同一値を示したことから、およびデータ検索により CO_3^{2-} FAp の存在は実験群において高信頼値を示し、また赤外線吸収スペクトルにより CO_3^{2-} の存在が両群とも確認されていることにより示唆された。また、実験群において凍結乾燥処理による F^- のわずかな減少も影響していると考えられる。このことは対照群の格子不整が実験群のそれよりも小さい値を示したことから推測された。遠藤ら¹⁰⁾はゼラチンゲルを凍結乾燥処理した場合、実験群ゼラチンゲルの F^- の残留率は対照群ゼラチンゲルの 95.3% であったと報告している。

5. 赤外線吸収スペクトルによる組成解析

測定図形の吸収帯の位置により組成解析を行ったが、対照群および実験群反応生成物に共通に認められた $2700\text{--}3700$, $1640\text{--}1660\text{cm}^{-1}$ は H_2O に、 3400cm^{-1} は OH^- に、 1100 , 1040 , 970 , 610 , 580cm^{-1} は PO_4^{3-} に、 1450 , $860\text{--}880\text{cm}^{-1}$ は CO_3^{2-} に、 1540cm^{-1} は有機物に帰属する吸収バンドであった。したがって両群とも PO_4^{3-} , OH^- , H_2O の存在が認められ、X線回折法により FAp や OHAp と同定された所見と一致した。また、両群に CO_3^{2-} の存在が認められたが、一般に湿式法で合成されたアパタイトは CO_3^{2-} の含有量が多く結晶性が悪いと言われており、ゼラチンゲル法も湿式法の一つであるために CO_3^{2-} が認められたものと思われるが、結晶性をより向上させるために CO_3^{2-} をいかに除去あるいは減少させるかが今後の検討課題となるであろう。

6. 走査型電子顕微鏡による形態観察

両群ともにある核を中心に放射状に成長したと思われる FAp 結晶の集合体である球状物が認められ、両群の所見に明らかな相違は認められなかったが、シリカハイドロゲル法のように結晶相互間に空隙のある FAp は観察されなかった。これはシリカハイドロゲルに比較してゼラチンゲルのほうがゼリー強度、粘度ともに強く、結晶の c 軸方向への自由な成長が制限されるためであると考えられる。Nylén ら²⁷⁾はアパタイト結晶はその形成初期に c 軸方向の大きさが決まり結晶成長は厚さの増大によって起こると述べており、また生成された結晶の a 軸方向の大きさの違いは結晶の成熟度の違いであるとしている。すなわち、ゼラチンゲルの場合、制限された c 軸方向への成長後、a, b 軸方向への成長が行われ結晶間の空隙が生じないものと考えられる。遠藤ら¹⁰⁾は対照群ゼラチンゲル、実験群ゼラチンゲルともに同程度のゼリー強度、粘度を示したと報告している。

V. 結 論

ゲル法による FAp 生成法の臨床応用を目的として、トレー法を用いてゼラチンゲル法および新たに開発した凍結乾燥ゼラチンゲル法により生成した反応生成物について比較検討を行い、次のような結果が得られた。

1) 凍結乾燥ゼラチンゲル法とは、ゼラチンゲル基質を凍結乾燥した凍結乾燥ゼラチンゲルに、脱イオン水を添加して乾燥前の重量に戻した後、カルシウムイオンを供給して FAp を生成する方法である。

2) 反応進行の肉眼的所見により、対照群は反応開始時、硝酸カルシウム層とゲル層とで明瞭な界面を呈したが、実験群ではゲル表面に存在する気泡のために明瞭な界面を確認することができなかった。また反応開始168時間後では、両群ともにリーゼガング環を認めたが、対照群が明瞭であるのに対し、実験群では比較的不明瞭な波状の所見が観察された。

3) pH の測定の結果、反応層の pH 値は対照群が 3.17, 実験群が 3.22 と著しく低下した。

4) Ca/P モル比は、対照群 1.23, 実験群 1.24 で

あり、理論値1.67より低い値を示した。

5) X線回折法による定性分析の結果、両群ともFApおよびOHApの生成が認められ、結晶子の大きさは対照群、実験群ともに同一値を示したが、格子不整は実験群の方が大きい値を呈した。また、a軸格子定数は対照群9.38Å、実験群9.39Å、c軸格子定数は対照群6.88Å、実験群6.88Åを示した。

6) 赤外線吸収スペクトルによる組成解析の結果、両群とも PO_4^{3-} 、 OH^- 、 H_2O 、 CO_3^{2-} の存在が認められた。

7) SEMによる形態観察の結果、両群とも放射状に成長したFAp結晶の集合体の生成が認められた。

以上の結果から、トレー法を適用した凍結乾燥ゼラチンゲル法は、従来のゼラチンゲル法と同様に良好なFApの生成が可能であり、臨床応用に際して有効な手段であることが示唆された。

本研究の一部は、平成元年度日本歯科大学歯学会大会(1989年9月、新潟)および第48回日本矯正歯科学会大会(1989年10月、金沢)において発表した。

抄録：ゲル法の臨床応用を簡便に具体化するため、トレーを用いた凍結乾燥ゼラチンゲル法による良好なフルオルアパタイト生成を目的として、ゼラチンゲル法および新たに開発した凍結乾燥ゼラチンゲル法により生成した反応生成物について、反応進行の肉眼的観察、pH測定、Ca/Pモル比の算出、X線回折法による定性分析(同定、結晶サイズおよび格子不整、格子定数)、赤外線吸収スペクトルによる組成解析および走査型電子顕微鏡による形態観察を行い、比較検討した。その結果、新たに開発したトレー法を適用した凍結乾燥ゼラチンゲル法は、従来のゼラチンゲル法同様、良好なフルオルアパタイトの生成が可能であり、トレー法の臨床応用に際して有効な手段であることが示唆された。

文 献

- 1) Maijer, R. and Smith, D. C.: Crystal growth on the outer enamel surface-An alternative to acid etching. *Am. J. Orthodo.* **89**: 183-193, 1986.
- 2) 亀田 晃：ダイレクトボンディングを用いたBegg法について(その3)一矯正治療期間中、後における脱灰、2次う蝕の予防という面から一。歯科ジャーナル **9**: 479-491, 1979.
- 3) 亀田 晃、遠藤敏哉：矯正治療期間中の歯質の白濁、脱灰の予防。歯科ジャーナル **29**: 1174-1184, 1989.
- 4) 亀田 晃：ダイレクトボンディングを用いたBegg法について(その1)一臨床技術を中心として一。歯学 **64**: 439-453, 1976.
- 5) Rubin, B.: Calcification and the ground substance: Precipitation of calcium phosphate crystals from a nutrient gel. *Nature* **225**: 78-79, 1970.
- 6) 亀田 晃、遠藤敏哉、吉田 満、栄枝浩介、比佐進吉、神賀利典、門井隆典：ゼラチンゲル法によるフルオルアパタイト生成に関する研究。日矯歯誌 **45**: 429-441, 1986.
- 7) 千葉 亮、亀田 晃、遠藤敏哉：セルロース系ゲルによるフルオルアパタイト生成に関する研究。歯学 **75**: 1358-1375, 1988.
- 8) 亀田 晃、吉田 満、遠藤敏哉、峰岸孝安、平形浩喜、和田仁志：ポリアクリル酸系ゲル剤によるフルオルアパタイト生成に関する研究。歯学 **75**: 1376-1393, 1988.
- 9) 佐藤幹雄、亀田 晃、遠藤敏哉：凍結乾燥シリカハイドロゲル法によるフルオルアパタイト生成に関する研究。歯学 **77**: 1327-1342, 1989.
- 10) 遠藤敏哉、岡 健治、村上一志、吉田 満、小菅直樹、亀田 晃：凍結乾燥ゼラチンゲル法(トレー法)に用いるフッ化物ゲルの物理化学的特性に関する研究。歯学 **77**: 1408-1415, 1989.
- 11) 平林俊雄、亀田 晃、遠藤敏哉：ゼラチンゲル法によるフルオルアパタイト生成にゼラチン濃度の及ぼす影響に関する研究。日矯歯誌 **46**: 1-17, 1987.
- 12) 伊勢村知子、斎藤英一、真田一男：唾液ペプチドP-BおよびP-Cの生理機能の検討。歯基礎誌 **23**: 247-252, 1981.
- 13) Rachinger, W. A.: A correction for the $\alpha_1 \alpha_2$ doublet in the measurement of widths of X-ray diffraction lines. *J. Sci. Instr.* **25**: 254-255, 1984.
- 14) 日本化学会編：実験化学講座4, 1版, pp.238-250, 丸善, 東京, 1956.
- 15) Hall, W. H.: X-ray line broadening in metals. *Proc. Phys. Soc.* **A62**: 741-743, 1949.
- 16) 遠藤敏哉：シリカハイドロゲル法およびゼラチンゲル法により生成したフルオルアパタイトの比較検討に関する研究。日矯歯誌 **46**: 163-182, 1987.
- 17) 青木秀希、加藤一男：水熱法によるOHアパ

- タイト合成に関する研究（第2報）pH と温度が OH アパタイト生成におよぼす影響. 歯理工誌 **14** : 36-39, 1973.
- 18) 金澤孝文, 門間英毅：りん酸カルシウムの化学—アパタイトの組成・構造・物性, 最近の進歩(1) —. 化学の領域 **27** : 662-672, 1973.
- 19) 可児徳子, 可児端夫, 酒井映子, 新海研志, 河野節, 久保憲昭, 中西国夫, 山村利貞：湿式法による Hydroxyapatite の合成について. 口腔衛生会誌 **24** : 176-181, 1974.
- 20) Rathje, W.: The formation of hydroxyfluor-apatite in tooth enamel under influence of drinking water containing fluoride. J. Dent. Res. **31** : 761-766, 1952.
- 21) 小川正昭, 亀田 晃, 栄枝浩介：フルオルアパタイト生成過程における反応液の pH の変動と結晶成長に関する研究. 日矯歯誌 **43**:222-236, 1984.
- 22) LeGeros, R. Z.: Effect of carbonate on the lattice parameters of apatite. Nature **206** : 403-404, 1965.
- 23) LeGeros R. Z., LeGeros, J. P. and Trautz, O. R.: The effect of various ions on the unit cell dimensions and crystallinity of the apatites. J. Dent. Res. **43** : 775-776, 1964.
- 24) Kay, M. I., Young, R. A. and Posner, A. S.: Crystal structure of hydroxyapatite. Nature **12** : 1050-1052, 1964.
- 25) 小菅直樹：エナメル質表面に *In vitro* で生成したフルオルアパタイトに関するX線結晶学的研究. 日矯歯誌 **41** : 314-329, 1982.
- 26) 可児徳子：フッ化物によるアパタイト結晶の格子不整修復に関するX線結晶学的研究. 阪大歯学誌 **15** : 42-56, 1970.
- 27) Nylen, M. U., Eanes, E. D. and Omnell, K. A.: Crystal growth in rat enamel. J. Cell. Biol. **18** : 109-123, 1963.