

生体硬組織における
金属元素濃集現象に関する研究

—ヒザラガイの歯舌の鉄の状態分析—

沼子 千 弥

①

学 位 論 文

生体硬組織における
金属元素濃集現象に関する研究

—ヒザラガイの歯舌の鉄の状態分析—

平成7年12月

東京大学大学院理学系研究科
化学専攻

沼子 千弥

目次

第1章 序論	1
1.1 生体濃縮現象及び生体鉱物化現象	2
1.2 ヒザラガイの歯舌に見られる鉄の特異的濃集	9
1.2.1 ヒザラガイ類	9
1.2.2 ヒザラガイの歯舌に関する先行研究	19
1.3 本研究の研究目的	20
第2章 実験	22
2.1 試料	23
2.2 X線プローブマイクロアナライザー (EPMA) による2次元元素分析	26
2.2.1 試料調製および測定	26
2.3 赤外吸収分光法 (FT-IR 法) による分析	27
2.3.1 試料調製および測定	28
2.4 粉末X線回折法による歯に含まれる結晶質成分の同定	29
2.4.1 試料調製及び測定	29
2.5 走査型電子顕微鏡 (SEM) による歯の表面の元素分析	30
2.5.1 試料調製および測定	30
2.6 Mössbauer 分光法による歯に含まれる鉄の状態分析	31
2.6.1 試料調製	31
2.6.2 測定およびデータ解析	32
2.7 XAFS 法による歯に含まれる鉄の状態分析	32
2.7.1 試料調製	38
2.7.2 測定	38
2.7.3 データ解析	40
2.7.3.1 XANES 領域のデータ処理	41
第3章 結果及び考察	42
3.1 X線プローブマイクロアナライザー (EPMA) による2次元元素分析	43

3.1.1	定性分析	43
3.1.2	ヒザラガイの歯の EPMA による 2 次元元素分析	43
3.2	粉末 X 線回折法による歯に含まれる結晶質の同定	53
3.3	赤外吸収分光法による分析	55
3.3.1	バルクでの分析の結果	55
3.3.2	顕微赤外分光法による分析	57
3.4	走査型電子顕微鏡によるヒザラガイの歯の表面の元素分析	59
3.4.1	ヒザラガイの歯の電子顕微鏡像	59
3.4.2	歯の表面の元素分析	62
3.5	Mössbauer 分光法によるヒザラガイの歯に含まれる鉄の状態分析	64
3.5.1	室温で測定したヒザラガイの歯と標準試料の Mössbauer スペクトル	64
3.5.2	液体窒素温度でのヒザラガイの歯と ferritin の Mössbauer スペクトル	68
3.6	XAFS 法によるヒザラガイの歯に含まれる鉄の状態分析	75
3.6.1	標準試料とヒザラガイの歯の XANES スペクトルの比較	75
3.6.2	褐色の歯の中に存在する鉄の化学形	80
3.6.3	色ごとに分類した 4 種類の歯の XANES スペクトルの比較	85
3.6.4	1mm ステップで測定したヒザラガイの歯舌の XANES スペクトル	86
3.6.5	XAFS 測定で得られるスペクトルの再現性についての検討	90
3.6.6	ヒザラガイの生息環境の差や個体差の問題に関する検討	92
3.6.7	12 種類のヒザラガイ類の歯舌の比較	95
3.6.8	XAFS スペクトルの加成性に関する検討	106
3.6.9	ヒザラガイの歯に含まれる magnetite の比率の算出	111
第 4 章	結論	115
4.1	ヒザラガイの歯の形成プロセス	116
4.2	結言	119
	謝辞	123
	付録 : EXAFS 解析	125
	引用文献	132

第1章 序論

1.1 生体濃縮現象及び生体鉱物化現象

生物の生命活動と無機物質の間には密接な関係があり、生物界では何らかの理由で環境から無機物を選択的に取り込む現象がしばしば観察される。この生物に特有な特定元素の特定器官への濃集を、生体濃縮現象という。鉄を取り込むヘモグロビン、マンガン・ニッケル・モリブデン等の金属を含む酵素や、ビタミン B₁₂ のようにコバルトを含有するものなどは生物が積極的に無機物を利用している例である。また、生物にとっての生理的な有用性はまだ解明されていないが、イネやスギナはケイ素やゲルマニウムを濃縮し¹⁾、ホヤ²⁾やゴカイの一種であるエラコ^{3)・4)}がバナジウムを、またホタテ貝がカドミウムを⁵⁾を濃縮することが報告されている。Table 1.1 に、これらの元素の環境中での存在量と生物に取り込まれた際の金属濃度をまとめた。

Table 1.1 の中で示した、シャコガイ類やワスレガイが形成するマンガン・亜鉛を高濃度に濃集した腎臓顆粒⁶⁻¹⁰⁾や、ヒザラガイ類やカサガイ類が形成する 10 万 ppm もの鉄を濃集する菌のように、生物が体内に濃集した元素を用いて無機質の硬組織(生体鉱物)を形成する現象を生体鉱物化現象(バイオミネラルゼーション・Biomineralization)と呼ぶ。貝殻や真珠、ヒトをはじめとする脊椎動物の骨や歯も、すべて生体鉱物であり、生物が、有機質で構成される軟体部から無機質の硬組織を形成するそのメカニズムに、多くの研究者が興味を引かれ研究を行っている。

Biomineralization の持つ最も興味深い側面は、非生物系では膨大なエネルギーと膨大な時間を要して形成される鉱物や無機材料を、穏やかな環境の中でしかも短時間で合成できることである。さらに、非生物系の合成では熱力学的に高温安定相としてしか得られない鉱物が、生体内では準安定相で存在したり、また特殊な微細構造や生物に特有の結晶形態を有することもある。現在知られているおもな生体鉱物の鉱物名とその組成式を Table 1.2 に示す。例えば炭酸カルシウムは貝殻などに利用されている最も一般的な物質であり、常温での安定相は Calcite、準安定相は Aragonite という鉱物である。カキの貝殻などは Calcite で形成されるがこれらはむしろ少数派で、貝殻や真珠のような貝類の硬組織は Aragonite を用いて形成されることの方が多い。非生物系での Aragonite の選択的な合成は特殊な条件下でのみ可能であり、貝類が Aragonite をいともたやすく合成する様子は、まさに生物の生命活動の妙といえる。

Table 1.1 地殻、河川水、海洋水中における元素の分布量及び生体濃縮された場合の濃度とその器官

元素	* µg/g	* 地殻中の原子 10 ⁻⁴ Si 原子	* 河川水 * µg/l	** 海水 ** µg/l	濃集生物名	器官	濃集濃度 µg/g	ref.
鉄	56	1000	670	4×10^{-5}	ヒザラガイ カサガイ	歯舌 (歯冠部)	101000 82100	Ishii, private communication
マンガン	0.95	17	~5	1×10^{-5}	シヤコガイ ワスレガイ	腎臓顆粒	7010 44200	6) 7)
亜鉛	0.070	1.1	10	3.8×10^{-4}	シヤコガイ ワスレガイ	腎臓顆粒	990 22800	6) 7)
バナジウム	0.135	2.64	1	1.5*	ホヤ エラコ	シグネットリング細胞 液胞	21 5100	2) 3,4)
カドミウム	0.0002	0.0018	-	1×10^{-4} *	ホタテガイ	軟体部	3.0	5)

* J. P. Riley, R. Chester, "Introduction to Marine Chemistry," Academic Press, New York (1971).
** 多賀光彦、那須淑子編 "地球の化学と環境"、三共出版 (1985)

Table 1.2 生物が生成する鉱物名とその組成^{1,5)}

Name	Chemical formula
Calcite	CaCO ₃
Aragonite	CaCO ₃
Vaterite	CaCO ₃
Monohydrocalcite	CaCO ₃ ·H ₂ O
Protodolomite	CaMg(CO ₃) ₂
Hydrocerussite	Pb ₃ (CO ₃) ₂ (OH) ₂
Hydroxylapatite	Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH)
Octacalcium phosphate	Ca ₈ H ₂ (PO ₄) ₆ ·8H ₂ O
Fluorapatite (francolite)	Ca ₅ (PO ₄) ₃ F
Carbonate-hydroxylapatite (dahllite)	Ca ₅ (PO ₄ ,CO ₃) ₃ (OH)
Whitlockite	Ca ₁₈ H ₂ (Mg,Fe ²⁺) ₂ (PO ₄) ₁₄
Struvite	Mg(NH ₄)(PO ₄) ₆ ·6H ₂ O
Brushite	Ca(HPO ₄) ₂ ·2H ₂ O
Vivianite	Fe ²⁺ ₃ (PO ₄) ₂ ·8H ₂ O
Fluorite	CaF ₂
Hieratite	K ₂ SiF ₆
Gypsum	CaSO ₄ ·2H ₂ O
Celestite	SrSO ₄
Barite	BaSO ₄
Jarosite	KFe ³⁺ ₃ (SO ₄) ₂ (OH) ₆
Opal	SiO ₂ ·nH ₂ O
Magnetite	Fe ²⁺ Fe ³⁺ ₂ O ₄
Goethite	α-FeOOH
Lepidocrocite	γ-FeOOH
Ferrihydrite	5Fe ₂ O ₃ ·9H ₂ O
Todorokite	(Mn ²⁺ ,Ca,Mg)Mn ⁴⁺ ₃ O ₇ ·H ₂ O
Birnessite	Na ₄ Mn ₁₄ O ₂₇ ·9H ₂ O
Pyrite	FeS ₂
Hydrotroilite	FeS·nH ₂ O
Sphalerite	ZnS
Wurtzite	ZnS
Galena	PbS
Greigite	Fe ²⁺ Fe ³⁺ ₂ S ₄
Mackinawite	(Fe,Ni) ₉ S ₈
Earlandite	Ca ₃ (C ₆ H ₅ O ₂) ₂ ·4H ₂ O
Whewellite	CaC ₂ O ₄ ·H ₂ O
Weddelite	CaC ₂ O ₄ ·(2+x)H ₂ O (x < 0.5)
Glushinskite	MgC ₂ O ₄ ·4H ₂ O

このように Biomineralization は、生物が特定の元素を特定の器官に濃集して無機固体物質を形成するという現象自体のユニークさの他に、生体内での鉱物生成プロセスや生成物の形態に対する化学的な興味、特定の機能を有した無機材料を穏やかな環境下で選択的に短時間で生成し得ることへの工学的な興味、そしてこのような生物の存在が地球規模の物質循環に大きな影響を与えていることも考えると広くは地球科学的な興味をも持っている。よって Biomineralization の研究は生物学・医学・化学・物理学・工学・鉱物学・地球化学といった様々な分野の研究者によって為されており、境界分野の研究といった色の濃いこともまた一つの特徴である。

さて生体鉱物の中には、骨や歯のようにある機能に則した形状を成すように形成されるものもあれば、ヒトの結石や胆石のように病的な作用により形成されてしまうものもあり、生体鉱物の生成が病理的作用によるのか、また正常な生命活動による選択的なものなのかという観点において、その成因と機能の関連を考えるのは重要なことである。ここでいくつか興味深い事例を挙げて見ようと思う。

石井らは、100種類以上の海洋生物について各組織の元素濃度を測定しており、その中で二枚貝のシャコガイ類やワスレガイが腎臓組織に高濃度のマンガンや亜鉛を濃集した顆粒状物質を蓄積していることを明らかにした^{6, 7)}。顆粒状物質は、シャコガイ類の場合が腎臓組織の細胞の内側に存在する細胞内顆粒 (intracellular granules) であるのに対し、ワスレガイの場合には細胞の外側にある空腔の部分に生成する細胞外顆粒 (extracellular granules) である。これらの腎臓顆粒はいずれも主成分としてカルシウムとリンを、また特異的にマグネシウム、マンガン、亜鉛を高濃度に濃集した無機物であり、特にマンガンの濃度は乾燥重量でシャコガイの仲間のヒレジャコガイで 3270ppm、ワスレガイでは 44200ppm に達する。さらに光学顕微鏡や電子顕微鏡でこれらの腎臓顆粒を観察すると、顆粒内部に同心円の縞状構造が存在していること、これに対応してマンガンや亜鉛の顆粒内での2次元分布も縞状構造を持つことも明らかになっている^{6, 7)}。これは、腎臓顆粒が形成される過程において周期的にマンガンや亜鉛が多く取り込まれることを意味し、腎臓顆粒の形成のメカニズムを解明する上で重要な知見である。その他、この腎臓顆粒はX線的に非晶質な物質であること、マンガンの顆粒内での分布は互いに独立していること、両者はともに顆粒内で2価のリン酸塩の状態で存在することなどが著者らの研究により明らかとなっている⁸⁻¹⁰⁾。

これらと同様な顆粒状物質を蓄積する生物で他に報告されているものとして、イギリスの Simkiss 等により研究が行われているマイマイの一種である *Helixaspersa* が挙げられる¹¹⁻¹³⁾。この生物は肝臓内の好塩基性細胞の内側に直径 1-10 μm 程度の球形の顆粒状物質を 100 個ほども生成する。またこれらの顆粒状物質は X 線的に非晶質であるほか、様々な金属元素のリン酸塩で構成され、顆粒内部には同心円の縞状構造が存在するなど、シャコガイ類やワスレガイの腎臓顆粒と共通点が多い。生理学的な実験によってこの肝臓という器官にはマンガン・コバルト・亜鉛といった種々の金属元素を血液中から取り除く作用があることが知られており、ここから顆粒状物質は体内の過剰な金属元素を回収し正常な生体機能を保持するために金属元素の濃度をコントロールする、いわば無毒化作用の機能を持っていると推測することが出来る。

一方周知の通り、同じ顆粒状物質である尿道結石や胆石の生成は病的な現象である。ヒトの結石や胆石の場合、シュウ酸塩で形成されるものとコレステロールなどの有機物が結晶して生成されるものの 2 種類がその大半を占めている¹⁴⁾。これらは健康な人体でも常に形成されているが、ヒトの体にはこれらの結石が大きく成長する前に体外に排出する機構が確立されていて、病気によりこの排出機能が低下している時でなければ、痛みを伴うほど大きな結石は形成されない。

ワスレガイやシャコガイ類の腎臓顆粒が体内に蓄積される原因としては、ヒトのような結石の排出機構が未発達であることも考えられるが、一方ではこの腎臓顆粒を体内の元素濃度のコントロールの為に積極的に利用しているという可能性もある。このようにシャコガイ類やワスレガイの腎臓顆粒の生理学的な役割や顆粒の生成メカニズムは興味深い問題であるが、まだほとんどが未解決のままである。果たして無毒化作用ような積極的理由のために形成されているのか、または細胞の中での金属元素の過飽和により形成されてしまうなど消極的理由から形成されるものなのかを知るために、これからこの生体鉱物に対してさらなる研究が期待される。

生体鉱物の中で特に興味深い機能を有しているものとして、生物における強磁性物質、特に magnetite (Fe_3O_4) の存在が有名である。Table 1.1 の生物の中で、走磁性細菌類やヒザラガイ類はそれぞれ体内で magnetite を形成することが知られている。現在確認されている生物起源の鉄鉱物¹⁵⁾とそれらが観察される生物種について Table 1.3 にまとめた。

Table 1.3 生物起源の鉄鉱物^{1, 5)}

鉱物	組成	生物
酸化物		
magnetite	Fe ₃ O ₄	バクテリア類、軟体動物、節足動物、脊索動物
maghemite	γ-Fe ₂ O ₃	バクテリア類
goethite	α-FeOOH	軟体動物
lepidocrocite	γ-FeOOH	海綿動物、軟体動物
ferrihydroxide	5Fe ₂ O ₃ ·9H ₂ O	バクテリア類、菌類、環形動物、軟体動物、脊索動物、植物
非晶質水酸化鉄		有孔虫類、環形動物、脊索動物
硫化物		
pyrite	FeS ₂	バクテリア類
hydrotroilite	FeS·nH ₂ O	バクテリア類

R. P. Blackmore¹⁶⁾により発見された走磁性細菌¹⁶⁻²⁵⁾は、その体内に単一磁区の magnetite の微小結晶 (50 ~ 100nm) を合成し、それを利用して泳ぐ性質のあることがその後の研究により明らかになった。走磁性とは磁力線に添って運動する性質のことである。磁鉄鉱の結晶の形態は六角柱型、弾丸型の2種類が報告されている。また環境中の硫酸イオンを還元しそのエネルギーにより生活している硫酸還元菌という細菌の仲間でも、その体内に豆型の磁鉄鉱を形成するものが存在することが、最近明らかとなった²⁹⁾。走磁性細菌の仲間は何種類も存在し、北極を含め地球上至る所の淡水及び海水の泥の中に分布している。日本でも琵琶湖をはじめ各地の湖沼や池の泥の中に、多くの種類のもものが報告されている。これらはすべて地球磁場を感知して行動しており、常に同じ方位、すなわち北半球に生息するものは北指向性、南半球では南指向性を示すこともこれまでの研究で明らかとなっている。また走磁性細菌は一般に好気性細菌であるので、その生存条件が限定されていて、泥の中で常に自分の生存に条件の良い所へ移動するため、合目的に自分の体内の磁鉄鉱と地球磁場との相互作用を利用しているという説が現在有力である。走磁性細菌は自らの体内で形成した鉱物の持つ物性を見事に生活に利用している、興味深い生物なのである。

この他にも地球磁場を感知してそれを積極的に利用していると言われているのは、渡り鳥、ハト、ミツバチ、イルカ、サケ、サメなどの回遊、渡り、帰巣をする生物である³⁰⁻³²⁾。特に鳥の渡りには太陽コンパスの他に磁気を感じて行動することが提唱され、この仮定を裏付ける多くの科学的証拠が挙げられている³³⁻³⁵⁾。

さて、これまで述べてきた磁鉄鉱を生成する生物と比較して、その摂餌器官である歯の中に磁鉄鉱を形成するヒザラガイ類¹⁶⁾は、磁性と生体との関連や、歯の形成メカニズムそのものについても、他とは趣を異にする。一般的に生物は歯などの硬組織を形成する際、主成分としてカルシウム塩を用いることが多いが、鉄を主たる成分として歯を形成する生物はヒザラガイ類やカサガイ類の他に例を見ない。さらに、上記のハトなどと同様に、方向感知の目的で積極的にヒザラガイが歯に磁鉄鉱を濃集し利用しているとは考え難い。なぜ歯の構成成分が磁鉄鉱でなければならないのか、どのような目的に磁鉄鉱を利用しているのか、またどのように歯の中に磁鉄鉱を形成しているのか、この点においてヒザラガイの歯が持つ特異性が浮き彫りにされてくる。

次項では ヒザラガイとヒザラガイの歯の特徴についての詳細をまとめた。

1.2 ヒザラガイの歯舌に見られる鉄の特異的濃集

歯舌は、有機質で構成される基底膜上に多数の歯（歯冠部）が並んでいる、軟体動物に特有の摂餌関連器官である (Photo. 1.1 (d))。軟体動物の種や属が異なるとその形態、すなわち歯の形や本数、並び方などが異なることから、貝殻の形態と共に貝類の分類における標徴として重要視されている。その歯舌の組成に関して、ヒザラガイ類が鉄を濃集するという極めて希な種であることを報告したのは Troschel (1856)³⁶⁾ が初めてと思われる。また Sollas (1907)³⁷⁾ は、カサガイ類の歯舌にケイ素が含まれ、その化学形が opal であると報告している。これを受けて Jones (1935)³⁸⁾ は 20 種類以上の貝類について Fe と Si の高濃度蓄積の有無を調べ、ヒザラガイ類では Fe が、カサガイ類では Fe と Si がその歯舌に高濃度に濃集されていること、その他の貝類ではこの様な特異的な濃集が認められなかったことを報告している。この報告が、後にカサガイ類³⁹⁻⁴³⁾ とヒザラガイ類^{31-32, 44-48)} を歯舌研究の中心に据えた大きな要因になっていると考えられる⁴⁹⁾。

1.2.1 ヒザラガイ類

現生の軟体動物の分類において、ヒザラガイ類は多板綱 (*Polyplacophora*) に属する。体の形態が左右対称で、背側に縦列に並ぶ 8 枚の殻板を持つのが特徴である。体形は一般に卵形か楕円形で扁平なものであるが、中には円盤形のもの、一見してヒザラガイの仲間には見えないながむし状のカセヒザラガイなどもある。Fig. 1.1 に日本近海に生息する最も一般的なヒザラガイ類の外観を、また、Photo. 1.1, (a), (b) にヒザラガイ *Acanthopleura japonica* の外観を示す。

Table 1.4 の軟体動物の系統的分類表に示されるように、多板綱は殻板を構成する殻層の違いから古ヒザラガイ目 *Paleoloricata* と新ヒザラガイ目 *Neoloricata* とに大別され、現生のヒザラガイはすべて新ヒザラガイ目に属する。さらに新ヒザラガイ目は、サメハダヒザラガイ亜目 *Lepidopleurina*、ウスヒザラガイ亜目 *Ischnochitonina*、ケハダヒザラガイ亜目 *Acanthochitonina* の 3 つの亜目に分けられている。現在ヒザラガイは世界で約 600 種類が知られ、日本近海からはおよそ 100 種報告されているが、なお多くの未記載種が残されている。一般にこれらヒザラガイ類は潮間帯に生息している。

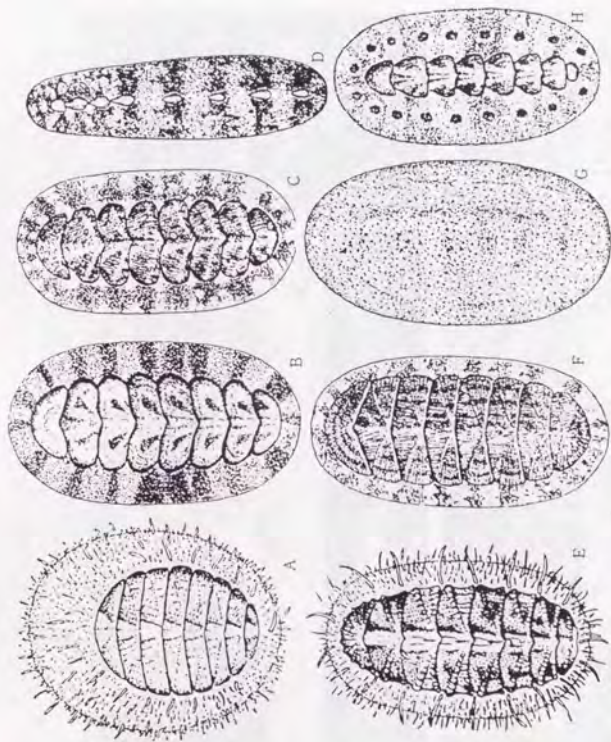


Fig. 1.1 日本近海に生息する最も一般的なヒヅラガイ類

(波部忠重他編, "軟体動物学概説 上巻", p. 8, サイエンス社, 1994)

- A. パバカモ *Placiphorella simpsoni* (体長56mm) B. ヒヅラガイ *Acanthopleura japonica* (55mm)
 C. ニシキヒヅラガイ *Onithochilton hirasei* (55mm) D. ケムシヒヅラガイ *Cryptoplax japonica* (68mm)
 E. ヒゲヒヅラガイ *Mopalia retifera* (27mm) F. ヤスリヒヅラガイ *Lepidosoa coreanica* (50mm)
 G. オオバンヒヅラガイ *Cryptochilton stelleri* (200mm) H. ヒメケハダヒヅラガイ *Acanthochilton rubrolineata* (38mm) (籠)

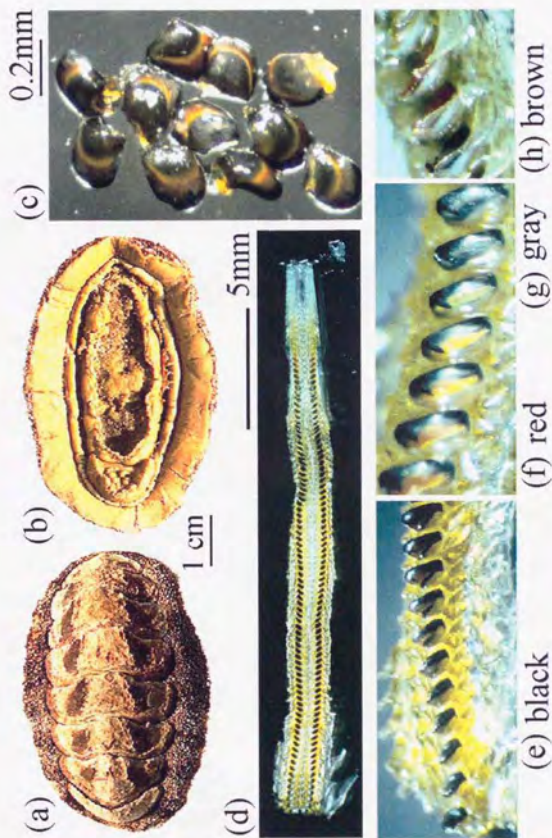


Photo. 1.1 ヒザラガイの外観とヒザラガイの歯舌・歯の
光学顕微鏡写真

(a) ヒザラガイの背中側、(b) 腹側、(c) ヒザラガイの歯、
(d) 歯舌、(e)-(h) 歯舌上での歯の表面の色の变化

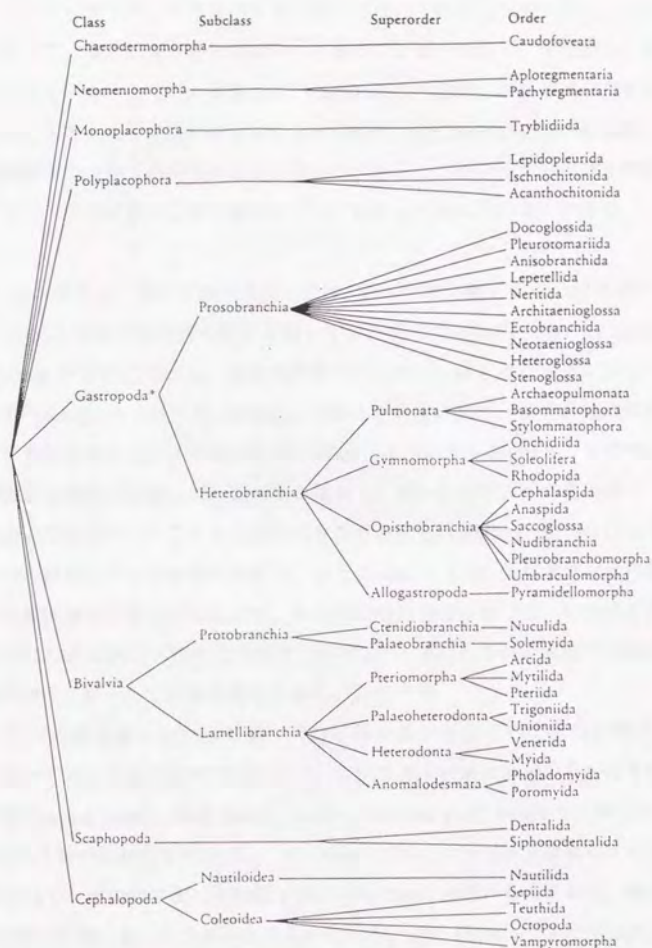


Table 1.4 軟体動物の系統分類表

(出典: R. S. K. Barnes et. al., Ed. "The Invertebrates A New Synthesis", p.p. 153, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988.)

しかし、これらヒザラガイの亜目の分類に関しては、今現在も生物学者による再検討が行われていて、確定的なものではないことをここで述べておく。すなわち、現在学名が付けられているものでも、将来名前が変わったり、属する亜目や属が変化する可能性がある。また、ヒザラガイの分類自体が流動的であるので、進化の系統樹や生息地と種の関連等についての研究はまだ発展途上である。こういった諸事情を考慮し本稿の中ではヒザラガイ類の分類や進化についてはあまり触れないことにする。

Fig. 1.2 にヒザラガイ類の体制模式図と摂餌の際の歯舌の動きの概念図を示す。また、Fig. 1.3 (b) に摂餌の際の歯の動きを表している模式図を示す。Fig. 1.2 (a) の中央に歯舌 (radula) が示されている。食物を摂取するために、歯舌は口付近にあるいくつかの伸出筋 (protractor) と後引筋 (retractor) の働きで前後に動き、歯舌の先端部のみを使用して食物を掻き取るような動作を行う (Fig. 1.2 (b)、Fig. 1.3(b))。その時ヒザラガイの歯冠部と食物が付着している岩石が接触し、硬いヒザラガイの歯によって岩場にヒザラガイの歯形がつくこともしばしば見受けられる。Photo. 1.2 (a) にヒザラガイの口の中で露出している歯舌の外観を、また Photo. 1.2 (b) にヒザラガイの歯形が残っている潮間帯の岩石の様子を示す。無脊椎動物の歯舌における、いわゆる歯の部分は、正式には基底膜と区別する意味で " 歯冠部 " と呼ばれるが、本稿では簡略のため、以後 " 歯 " と統一して以後表記してゆく。

歯舌のうち口の露出面に向かって横一列分の歯の並びをまとめて歯列と呼ぶ。Fig. 1.3(a) にヒザラガイの歯列の模式図を示す。ヒザラガイの歯は歯列中央から外側に向かい、中歯 (central tooth)、側歯 (lateral tooth)、縁歯 (marginal tooth) と分類され、一列の歯列には 17 個の歯が含まれる (Fig. 1.3 (a))。これらのうち鉄を濃集しているのは第 2 側歯のみで、その他の歯は有機質で構成された硬度の低いものである。種によっては歯列中の 17 個の歯のどれかを欠くものもある。また Photo. 1.3 に示したように、鉄を濃集した第 2 側歯の形状もヒザラガイの種類によって異なり、先端が二股または三股に分かれているものや、カギ状に鋭く折れ曲がっているものと様々である。

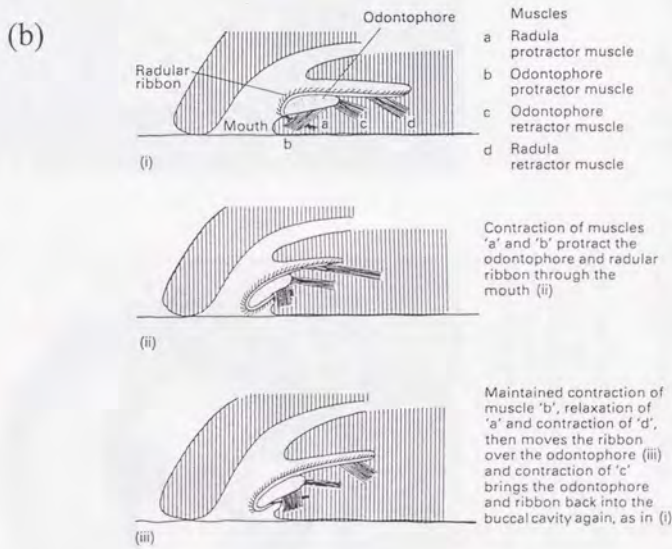
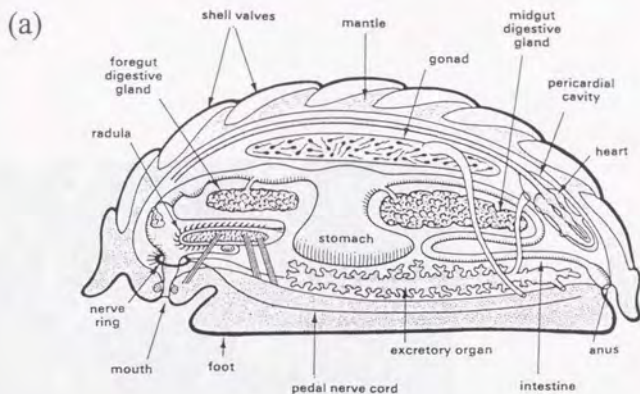


Fig. 1.2 ヒザラガイ綱の体制模式図 (a) と、
摂餌の際の歯舌の動き (b)

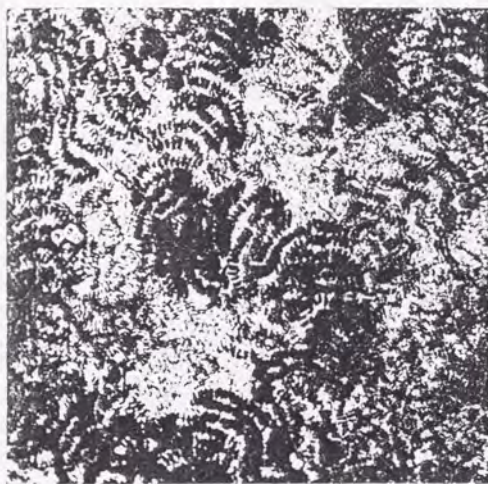
(出典：(a) V. Pearse et. al., Ed. "Living Invertebrates", Blackwell Scientific Publications and The Boxwood Press, California, 1987.,
(b) R. S. K. Barnes et. al., Ed. "The Invertebrates A New Synthesis", Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1988.)

(a)



Radula of *Cryptochiton* photographed against the glass of an aquarium. As in other chitons, there are many transverse rows of 17 teeth—one central tooth flanked by 8 teeth on each side. At the very front the radula is unfolding as it scrapes the glass. Monterey Bay, Calif. (R.B.)

(b)



Radular tooth markings made by a chiton on alga-encrusted rock, Santa Cruz, California. (R.B.)

Photo. 1.2 ヒザラガイ類の口の中の歯舌の様子(a)と
潮間帯の岩の上に見られるヒザラガイ類の歯形(b)

(出典：V. Pearse et. al., Ed. "Living Invertebrates", p.p. 324,
Blackwell Scientific Publications and The Boxwood Press, California, 1987.)

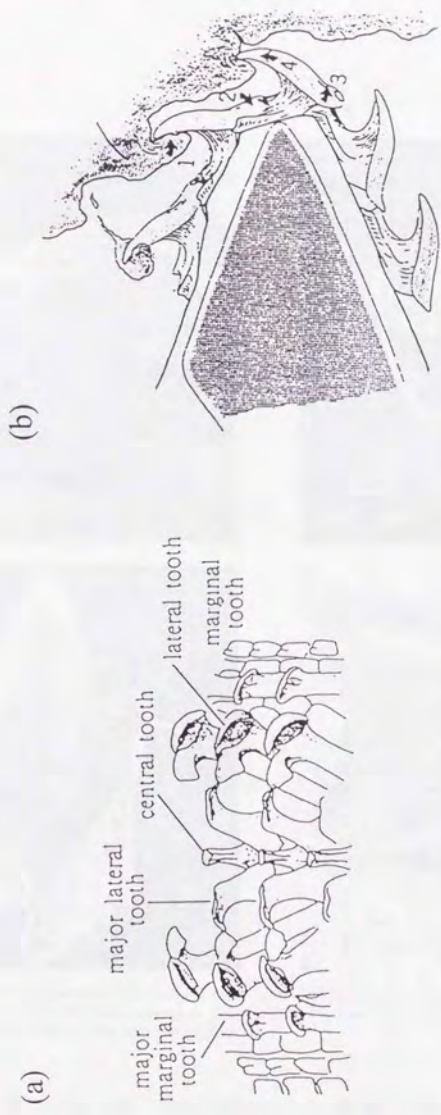
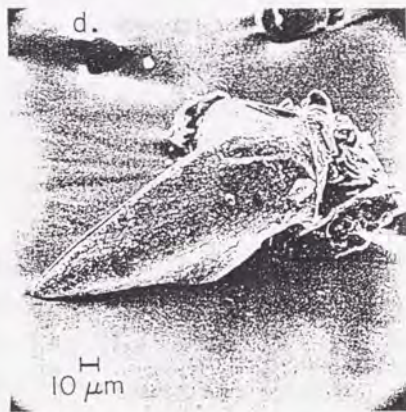
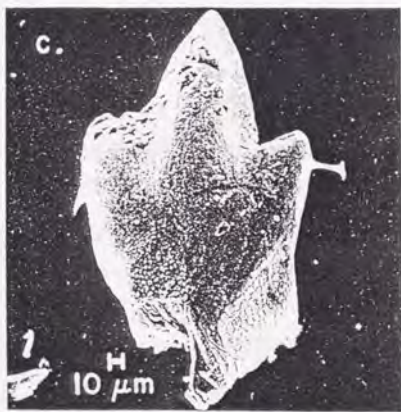
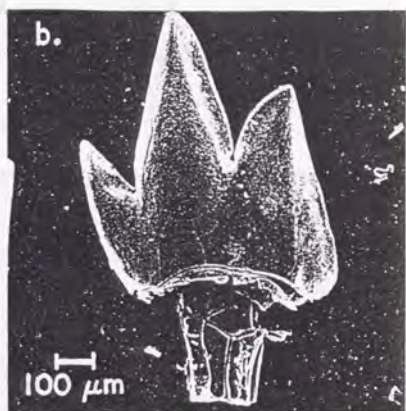
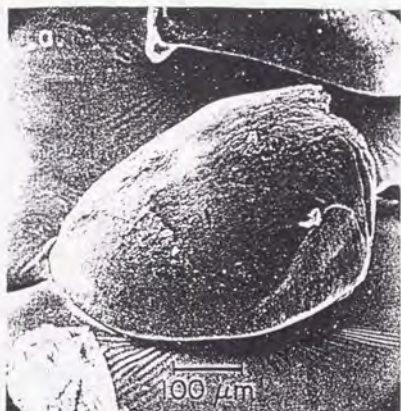


Fig. 1.3 ヒザラガイの歯列を構成する歯の名称・配置(a)と、
 摂餌の際に歯が使用されている様子の模式図(b) 49)



Scanning electron micrographs of typical chiton teeth. (a) *Chiton tuberculatus* (from Barbados), (b) *Cryptochiton stelleri* (California), (c) *Henleya henleyi*, (d) *Lepidopleurus* sp. Photographs were taken on an Etcc Autoscan Electron Micrograph after the samples were coated with a thin layer of gold-palladium.

Photo. 1.3 ヒザラガイ類の種の違いによる歯の形状の変化^{4,5)}

一本の歯舌には約 70～80 列の歯列が存在するが、これらのなかで実際に摂餌に使用されるのは先端部 (Fig. 1.1 (b), Photo. 1.1 (d) 歯舌の左端, (e)) の数列のみである。この付近の歯は表面がなめらかで摂餌に使用されるのに十分な硬度を有し、Fig. 1.2 (b), Fig. 1.3(b) の様に岩の表面に付着している藻類などを掻き取って口の中へと運ぶが、硬い岩との接触で歯はだんだん磨耗し、歯こぼれもする。すると新しい歯が後方からどンドンと送られてきてこれを補充する。このため歯舌の中で口側とは反対の端に位置する歯舌囊 (Photo. 1.1 (d) 歯舌の右端) では、常に新しい歯が形成されている。歯舌囊の中に収まっている未成熟な歯は表面が粗く硬度も低い (Photo. 1.1 (h)) が、その後徐々に成熟を受けながら基底膜と共にベルトコンベアーのように口の方に押し出され、常に状態の良い成熟した歯を摂餌に用いている。その成熟過程で歯の外観、特に歯の表面の色が変化することが観察され、最初は褐色 (h) であった歯の色は灰色 (g)、赤色 (f)、そして最終的には黒色 (e) へと変化してゆく (Photo. 1.1)。Lowenstam や Kim らはこの変色の順に、歯の成熟段階を Stage I から Stage IV まで分類している (45, 46)。

通常ヒトのような哺乳動物の歯は歯肉の中で徐々に成熟を受け、完成された形で生えてくる。よって歯の形成過程を研究する際には、様々な年齢の動物から各成熟段階の歯を採取する必要があるが、この方法では、動物の個体差の影響も大きく、成熟過程を正確にたどることが難しい。これに対してヒザラガイは、年齢に関わらず常に新しい歯を形成していて、しかも口で使用されるに至るまでのすべての成熟段階の歯を 70～80 列の細かさで一本の歯舌上に保持している。よってヒザラガイの歯舌を使用すれば、一個体の試料について段階的に成熟過程を観察することができ、また個体差による歯の成熟速度のばらつきの問題も回避することができる。脊椎動物と無脊椎動物では歯の形成過程に差があることは考えられるが、生体鉱物化現象として無機塩で構成される歯の形成メカニズムを研究する際に、このようなヒザラガイの歯舌は格好の研究材料であるといえる。さらにヒトの歯を構成する主要成分であるアルカリ土類金属のカルシウムは 2 価のイオンであり、ほとんどの無機塩の中で酸化数の変化はみられないのに対し、ヒザラガイの歯の主要構成成分が遷移金属元素の鉄であることも、成熟に伴う歯の構成成分の状態変化を追跡する上での利点になっている。

1.2.2 ヒザラガイの歯舌に関する先行研究

前述の Jones の報告以降は、歯舌形成や化学的組成などの海外における研究は、セイヨウカサガイ *Patella vulgata* とトゲトゲヒザラガイの一種である *Acanthopleura hirtosa* の 2 種類の貝を中心に行われてきている。これは日本近海と比較して西欧諸国のヒザラガイ類やカサガイ類の分布が乏しく、研究対象として取り扱うことのできる種類が限定されていることが最も大きな理由であると考えられる。こういった海外のグループの中で Lowenstam らは特に歯の構成物質を同定するために X 線回折法を適用し、結晶成分として magnetite (Fe_3O_4), goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$), lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$) などが存在すること、また歯の形状の変化により形成段階をいくつかの Stage に分類できることなどを報告している⁴⁵⁾。さらにその後イギリスの S. Mann とオーストラリアの J. Webb の研究グループが歯舌形成に関して X 線回折・電子線回折法⁴⁶⁾に加え鉄の状態分析法として有力な Mössbauer 分光法を導入し、カサガイの歯に含まれる鉄の状態分析を行う一方、歯を形成している周辺の細胞や組織との関連について、生物学的なアプローチを行っている^{39, 47)}。この Lowenstam, Mann, Webb らがヒザラガイ類やカサガイ類の歯に濃集した鉄の化学分析を最も集中して行っている研究グループである。とくに Webb は、論文ではカサガイ類の歯舌に関する Mössbauer 分光法の研究成果を中心にまとめているが、学会ではヒザラガイ類の歯舌に関する研究報告も行っており、事実上この歯舌に濃集した鉄の状態分析の第一人者である。

一方、日本においては、これまでヒザラガイ類の歯舌の鉄に注目し研究を行ったグループは意外に少ない。魚類の歯の形成に関する研究を行い、日本における生体鉱物化現象研究の草分け的な存在であった須賀は、魚類の歯との比較という意味で、ニシキヒザラガイ (*Onithochiton hirasei*) の歯について EPMA により Ca, P, Mg, Fe, F の 2 次元元素分析を行っている⁵¹⁻⁵³⁾。また前田と溝田は、ヒザラガイの歯舌に対し Mössbauer 分光法での状態分析を行い、歯の成熟過程で鉄の状態が変化してゆくことと、結晶の前駆体として Ferrihydrite ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) が存在することなどを示唆した^{31, 32, 48)}。

1.3 本研究の研究目的

前述のX線回折法や電子線回折法などを用いた研究は、ヒザラガイの歯の構成物質を同定したという意味で重要であり、これらにより歯の形成メカニズム並びに鉱物化プロセスについていくつかの提案がなされた。また、これまでの研究の中では、ヒザラガイが歯の中に結晶質の magnetite(Fe_3O_4) や goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$), lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$) を形成してゆくにあたって、その前駆体として Ferrihydrite ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) のような鉱物種が存在することが指摘されてきた^{31, 32, 39, 44-48})。しかし、生体という穏やかな環境下でいったん固相に固定された物質が他の物質へと変化するようなことが、容易に起こり得るであろうか。また生体内という血液や細胞質、組織液などの水や有機物を多く含む環境から鉄の沈着が起こる際、突然無機質の結晶が生成することは想像に難く、むしろ非晶質物質の前駆体やタンパクの膜などの結晶生成の場が形成された後に、徐々に結晶成長が行われると考えるほうが妥当ではないだろうか。この様な疑問に対して従来の研究では、歯の形成初期の未成熟な歯がどの様な鉄の成分を沈着させているのか、また回折法では検出が困難である非晶質成分が存在するか否かに関しては推測の域を越えておらず、これらを明らかにすることが要求されていた。

いくつかの先行研究の中で歯の中の鉄の状態分析に使用されてきた Mössbauer 分光法は、結晶質・非晶質に関わらず分析を行える、優れた分析法である。しかし、ヒザラガイの歯の研究においては magnetite の存在が目立ちすぎて、その他の成分についてのあまり検討が行われていなかったこと、またこれまで Mössbauer 分光法を主に使用していた研究者は物理・化学分野の人間で、成熟度の異なる歯を形態から分別して測定を行うなど生物学的手法を導入していないなど、アプローチの仕方の上で改善されるべき問題点も少なくなかった。これを受けて本研究では生物学や古生物学の分野の研究者とヒザラガイの歯の成熟過程や歯舌の採取法など、試料に関する十分な議論を行ったうえで、物質化学的な分析手法をこの試料に対して適用し、長年明らかにされてなかったヒザラガイの歯の形成プロセスを解明することを目的に研究を進めた。

研究の方法としては、まずヒザラガイの歯に対して従来用いられてきた X 線回折法を同様に適用し、先行研究との結果の差違について検討を行った。またヒザラガ

イの歯の元素分析や赤外吸収スペクトル測定には、従来のバルク分析をより発展させ、2次元の空間分解能を持ったX線マイクロプローブアナライザー(EPMA)とSEM/EDS分析、そして顕微赤外分光法を用い、試料の形態と1:1対応した化学分析を行った。

研究の中心となるヒザラガイの歯の中に含まれる鉄の状態分析には、Mössbauer分光法を用いると同時に、Mössbauer分光法と同様に結晶質・非晶質といった試料の状態によらず非破壊状態分析を行うことが可能で、しかもMössbauer分光法にはない2次元分解能を有するX線吸収微細構造法(X-ray Absorption Fine Structure; XAFS)⁵⁴⁾を導入した。このように、現在用いられている鉄の非破壊状態分析法として最も優れていると考えられるMössbauer分光法とXAFS法を組み合わせることにより、ヒザラガイの歯の形成に伴う鉄の化学状態の変化を明らかにすることを試みた。

しかし、通常これらの状態分析法は、純粋な鉄化合物や触媒、錯体といった単一成分の試料の分析に適用することが多く、生体試料のような複雑な系に対しどの程度適用することが可能かを検討することが必要であった。このため特にXAFS法に関しては、2種類の標準試料を一定比率で混合したモデル化合物を調製し、多成分系の試料のスペクトルの形状に関する検討を行った。そして最終的に、以上の多角的な分析より得られた結果を総合し、ヒザラガイの歯の形成メカニズムについて考察した。

これまで行ってきた研究内容について、本論文では、以下のような構成で成果をまとめた。第二章では、試料の採取と本研究で行った各分析の目的、試料調製、測定法について詳述した。このなかでMössbauer分光法とXAFS法については、その解析法についても記載した。第三章では、各分析の結果と考察をそれぞれ順を追って記載した。第四章は、まとめと結言である。また付録として巻末にEXAFS解析の詳細と参考文献リストを添付した。

第2章 実験

2.1 試料

序論で述べたように、ヒザラガイには多数の亜種が存在するので、これらの種の中で歯舌の比較を行う必要があった。しかしヒザラガイの種のカテゴリを行うためには、形態学・生態学等の高度な専門知識を必要とするので、本研究ではヒザラガイ類のカテゴリに関して造詣の深い塚越 汐（東京大学資料館）によって採取及びカテゴリアされたヒザラガイの亜種 12 種類を試料とすることにした。Table 2.1 に試料の和名・学名・採取地のリストを示す。すべての試料は採取後アルコールに固定し保存した。また石井紀明（放医研）によって採取されたリュウキュウヒザラガイも XAFS 測定に利用した。

本研究で用いたヒザラガイの亜種の中で体長及び歯と歯舌が最も大型であった和名ヒザラガイ（学名 *Acanthopleura japonica*）は、太平洋岸に広く分布する最も一般的な種である。生物試料を取り扱うときには、生物の個体差を相殺するため測定に使用する個体数を多くする配慮が必要であるが、この点に関してヒザラガイは多数の試料を採取可能という利点があった。また大きな歯舌を持っているので、顕微鏡下での歯の分別等の試料調製の作業が行いやすいという利点も兼ね備えていた。これらを受け本研究では、集中して分析を行う種としてこのヒザラガイを選択し、追加の採集を行った。以下本稿においてヒザラガイという名称は *Acanthopleura japonica* の和名としてのみ用い、多板綱一般を指す名称としてはヒザラガイ類を用いる。

ヒザラガイは、神奈川県油壺湾の潮間帯でおよそ 100 個体を採取した。歯舌はヒザラガイの口球塊から取り出し、一旦アルコールで固定した後、風乾し測定に用いた。歯舌長には個体差があったので、摘出した歯舌の中から成体のものと見なすことのできる全長 18mm ~ 25mm 程度の歯舌を選択し各種分析に用いた。

成熟度の異なる歯は、Lowenstam や Kim らが行った、歯の表面の呈色からカテゴリアする方法に従い、光学顕微鏡で観察しながら、歯舌囊付近の最も未成熟な褐色の歯から、灰色、赤色、黒色と、ステンレスの針と刃を用いて歯舌から分別した。褐色の歯から灰色、また灰色から赤色への変化は非常に明瞭であり、この境界は容易に分けることができたが (Photo. 1.3)、赤色から黒色の歯への変色は曖昧で、はっきりとした境をつけることが困難であった。よって灰色から赤色へ変色した直後から口の方に向かって 8 列分の歯を赤色の歯として取り扱った (Fig. 2.1)。

Table 2.1 測定に用いたヒザラガイ類

学名	和名 (採集地)
Lepidopleurina 亜目	
<i>Leptochiton diomedea</i>	フカツメヒザラガイ (由比沖 300m 沈木)
<i>Leptochiton belknapi</i>	シンカイサメハダヒザラガイ*
<i>Leptochiton</i> sp. 東大	東大ドレッジ (三浦半島, 城ヶ島沖)
Ischnochitonina 亜目	
<i>Acanthopleura japonica</i>	ヒザラガイ (油壺湾、小網代湾)
<i>Lepidozona corenica</i>	ヤスリヒザラガイ (能登半島・小木、礫下)
<i>Lepidozona amabilis</i>	アカヤスリヒザラガイ (城ヶ島沖)
<i>Ischnochiton comptus</i>	ウスヒザラガイ (房総半島・小湊、礫下)
<i>Ischnochiton boninensis</i>	ホソウスヒザラガイ (房総半島・小湊、礫下)
<i>Mopalia retifera</i>	ヒゲヒザラガイ (房総半島・小湊、礫下)
Acanthochitonina 亜目	
<i>Acanthochiton dissimilis</i>	ビロードヒザラガイ (薩摩半島・坊ノ岬)
<i>Notoplax squamopleura</i>	コケラヒザラガイ (城ヶ島沖)
<i>Craspedochiton (Spongychiton) pyramidalis</i>	ミツカドヒザラガイ

*海洋研の採取した試料、比較のために提供していただいた。

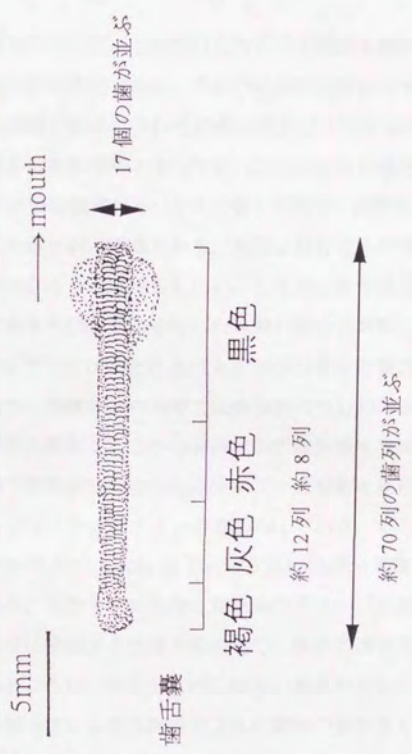


Fig. 2.1 ヒザラガイの菌舌上での菌の色の变化

2.2 X線プローブマイクロアナライザー (EPMA) による2次元元素分析

試料の性質を知るために、その試料に含まれる構成元素の種類とその量を知る元素分析は欠かせないプロセスである。そのため分析化学の中で定量分析は中心的な存在であった。科学技術の発達につれその検出限界はすでに ppt レベルにまで至り、元素を高感度に定量する事が可能となったが、このような定量分析法の大部分は試料を溶解する前処理が必要な全分析(バルク分析)であり、試料の組織構造に合わせた空間分解能を持った元素分析は困難である。実際に分析する試料が均質なものである場合にはバルク分析でなんら問題は生じないが、生体試料や岩石・鉱物・地球環境試料のように非均一で特有の組織構造を有した試料の場合、試料の構造を壊さずに形態と1:1対応した分析データが得られることが元素分析の必要条件となる。

この様な理由で、地球科学の分野で元素分析の中心的方法として用いられているのが、電子線を試料に照射しそこから発生する特性X線を検出することで物質の定量分析を行う分析電子顕微鏡法、さらにエネルギー分解能を高めた波長分散型検出器を用いるX線プローブマイクロアナリシス(EPMA)である。電子線は磁場によって集光することが容易であるので、1 μ m以下という高い空間分解能で局所の元素分析を行うことが可能である。しかも試料表面に電子線のダメージはあるものの、固体試料ならば試料表面を平滑に研磨する程度の前処理で、試料の構造そのままの非破壊分析を行うことができるところに、他の分析法にはない利点がある。

本研究で取り扱っている生体試料のように試料の量を多く入手することが困難である場合、このような非破壊分析法は強力な手法であり、しかも試料の組織と元素分布の関係を調べる上でも望ましい方法である。そこで本研究ではEPMAを用いて元素分析を行い、ヒザラガイの歯に含まれる元素の種類とそれらの2次元分布を調べた。

2.2.1 試料調製および測定

EPMAによる分析を行う際、試料は鏡面に研磨し、平滑に調製されたものが望ましい。よって、基底膜に付着したままの形で歯を樹脂に包埋し、研磨により歯の中心(正中線)を通る内部の縦断面を得た。ヒザラガイの歯舌はFig. 2.1で示したように色ごとに4分割した。樹脂はBuehler社製の20-8124番を用い塑硬剤20-8126番と

混合し、歯舌を覆うように型に流し込み、歯舌を固定した。完全に硬化した樹脂は600番から2000番までのサンドペーパーで研磨してゆき、歯の正中線を通る縦断面が露出したところで、粒径 $1.0\mu\text{m}$ と $0.3\mu\text{m}$ のアルミナの研磨剤で順次鏡面研磨を行った。研磨後は蒸留水で表面を洗浄し、乾燥させた後炭素蒸着を施して、測定に用いた。また歯の横断面についても同様の試料調製を行い、元素の2次元分布を測定した。EPMAの元素分析の結果サンドペーパーの研磨剤及びアルミナに相当する元素は検出されず、これらの研磨剤の試料への汚染の心配はないものと考えた。

二次元元素マッピングは日本電子製のJCMA-733mkIIを用いて行った。加速電圧15kV、電流値 1.2×10^{-7} Aの測定条件で電子線のビーム径を $1\mu\text{m}$ 程度に絞り、 $1\mu\text{m}$ ステップでXY両方向に試料を走査して測定を行うことより、元素の二次元分布像を得た。また得られた分析値はJCMA-773kIIに付属のコンピュータシステムにより強度別に16色の段階で表示する2次元の画像に変換し、マップ図を得た。

2.3 赤外吸収分光法 (FT-IR 法) による分析

無機塩の同定を行う場合、そこに含まれる陰イオンや構造水のような赤外吸収を示す化学種の情報を得ることは効果的である。そこで生体無機鉱物であるヒザラガイの歯に対して赤外吸収スペクトルの測定を行った。

透過法で赤外吸収スペクトルの測定を行う場合、KBrのような赤外に対して透明な物質をバインダーとし、光路に対し適当な透過率を与える濃度の試料を均質に保持するため錠剤に成形し測定を行うのが最も一般的な方法である。このバルク法ではデータベースも豊富な上に、FT-IRが普及してからはその精度や分解能も一段と向上し、均質な組成の系についてはルーチン測定が簡便に行うことができる。しかし、歯の内部に鉄の多い黒色の部分とカルシウムの多い半透明の部分が混在し、特有の組織を形成しているヒザラガイの歯の場合、試料を破壊しバルクで測定することにより、試料に含まれる物質の空間的な情報が失われてしまう。そこで、ヒザラガイの歯に対しては、通常のバルク分析を行うと同時に、FT-IRと顕微鏡を組み合わせることで、空間分解能を持たせた顕微赤外分光光度計も本試料の分析に導入し、約 $30\mu\text{m}$ の分解能で赤外吸収スペクトルの測定を試みた。

2.3.1 試料調製および測定

バルク分析には、最も成熟した黒色の歯を数個基底膜から分離し、粉碎した後 KBr 粉末と混合、その後加圧成形により 10mmφ のディスク状に成形したものをを用いた。また歯の内部で、鉄の多い部分とその他の部分を区別して測定を行うために、EPMA で調製した試料と同様に、いったん樹脂包埋し、表面を研磨することで内部を出した試料を用いて顕微赤外分光光度計により測定を行った。

バルクでの赤外吸光スペクトル測定には日本分光製フーリエ変換赤外分光光度計 FT/IR-5000 を用いた。スペクトルは $400\text{-}4000\text{cm}^{-1}$ の範囲を平均 4cm^{-1} の分解能で走査することにより得た。

また、微小部の赤外吸収スペクトル測定には日本分光製顕微フーリエ変換赤外分光光度計 Janssen を用いた。測定は反射モードで行い、測定スペクトル KK 変換⁵⁵⁾ する事により、透過スペクトルと等価なスペクトルを得た。

一般に反射型の赤外吸収スペクトルには、主に屈折率の違いを原因として以下の3つの現象が起こり、結果として正しいスペクトルが得られないことが知られている⁵⁵⁾。第一に、屈折率の高い試料に入射した赤外光は反射する成分（入射角によっては全反射する成分）と試料にしみ込む成分とに分かれるが、このしみ込みの深さが波長に比例するので、試料への吸収の強さも波長に比例してしまう。すなわち、低波数側のピーク強度が高波数側のピーク強度よりも相対的に大きくなって現れる現象がみられる。第二に、試料の屈折率が吸収波数の前後で変化する、いわゆる屈折率の分散現象により、反射法での吸収位置は透過法の吸収位置よりも低波数側へシフトし、ピークの相対強度も変化することが知られている。さらに水平偏光と垂直偏光のしみ込みの深さが異なるので、無配向の試料でも垂直偏光と平行偏光で吸光度が異なるという第三の現象も観察される。

これらの要素を考慮しシミュレーションを行い、反射スペクトルを透過スペクトルと等価なものに変換するのが Kramer-Kronig(KK) 積分である⁵⁵⁾。反射スペクトルはそのままでは、定性・定量的な用途に使用するのは困難であるが、この KK 変換を用いて分析に耐えうる透過型のデータに変換するのが、現在もっとも一般的に利用されている手法である。本研究では実測データから KK 変換を行う操作は、測定装置に付属のソフトウェアによりコンピュータ上で行った。

2.4 粉末X線回折法による歯に含まれる結晶質成分の同定

第1章で述べたように、これまでのヒザラガイの歯舌に関する先行研究では中心的な手法としてX線回折法が用いられてきた。よって本研究でも歯の中にどのような結晶成分が存在するのか、また歯の成熟に伴い結晶質成分がどのように変化してゆくかなどを明らかにするために、粉末X線回折法による測定を行った。

2.4.1 試料調製及び測定

試料は個体差の影響を軽減するため3個体分の歯舌を用いた。それぞれ歯舌について、顕微鏡下で最も成熟した先端部から8列分ずつ歯舌を切断した後 (Fig. 2.2)、有機質の基底膜から歯をステンレスの針で分離した。3個体分が分離できた段階で、各部を乳鉢で粉碎した後、無反射石英板上に試料を塗布し測定を行った。

粉末X線データ測定には、マックスサイエンス社の MXP³型粉末X線回折装置を用いた。また、測定の際にはCu K α 線とグラフアイト・モノクロメーターを用いて、1 deg/minの走査速度で $2\theta = 4^\circ$ から 80° まで走査を行った。

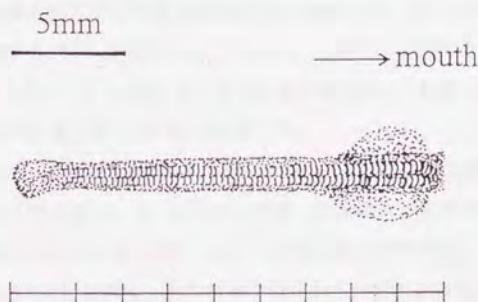


Fig. 2.2 粉末X線回折法に使用したヒザラガイの歯舌

2.5 走査型電子顕微鏡 (SEM) による歯の表面の元素分析

EPMA は試料に含まれる元素の分析を精度良く行うことができるが、試料の条件として平滑に鏡面研磨されていることが必要である。よってヒザラガイの歯の内部の2次元元素分布の測定に EPMA を用いた。

一方、歯の成熟に伴う歯の色の変化が観察されるのは歯の背中側の表面のみであり、この歯の表面の構成元素についても分析を行う必要があった。そこで、分析精度は低下するが、湾曲した歯の表面でも元素分析を行うことができる走査型電子顕微鏡 (SEM) とエネルギー分散型 X 線検出器 (EDS) を組み合わせた SEM/EDS 法により、ヒザラガイの歯の表面を覆う物質の元素分析を行った。

2.5.1 試料調製および測定

褐色・灰色・赤色・黒色の歯 (Fig. 2.1) をそれぞれ顕微鏡下で基底膜から分離した。これらの歯は、両面粘着テープを貼ったスライドガラスの粘着面にピンセットで静置させてゆき、様々な角度から観察が行えるように歯を固定した。さらに照射した電子線の熱で粘着テープが膨張し試料が動いてしまう危険性があったので、粘着テープに接着剤を薄く塗布して歯を完全に固定した。こうして調製した試料に対し真空蒸着装置を用いて炭素蒸着を施し、測定試料とした。

測定には日本電子製の走査型電子顕微鏡 JSM 840 を用いた。加速電圧は 15kV でフィラメントに 1.0×10^{-9} A 電流を流し、発生した電子線を試料上で走査することにより、SEM 像を得た。また SEM 像と同時に組成像 (BEI) の撮影も行い、試料中で電子線の反射率の高い重元素を含む部分を調べた。

さらに観察している試料表面約 50 カ所について EDS による元素分析を行った。実試料の元素分析を行う前に、Co を平滑に研磨した標準試料により検出系および解析システムのキャリブレーションを行った。また実試料、標準試料ともに分析は電子顕微鏡の倍率を 40000 倍に上げて、その倍率で電子線が走査する領域について行った。EDS により得られた特性 X 線強度のデータから、装置に付属のコンピュータ解析システムで、試料に含まれる重量元素比を換算し、これを定量値とした。

2.6 Mössbauer 分光法による歯に含まれる鉄の状態分析

Mössbauer 分光法は試料中の元素の化学形を非破壊で分析できる代表的な状態分析法である。特に鉄の状態分析には威力を発揮し、さらに試料中に混在する異なった鉄の化学種の存在量比を定量的に求めることのできる現在唯一の分析法であるという点で、他にはない特色を持っている。このため、これまで報告されているヒザラガイの歯舌や走磁性細菌の体内に濃集した鉄に関する先行研究では、状態分析法としてX線回折法とともに Mössbauer 分光法が用いられてきた。そこで本研究でもこの Mössbauer 分光法を用い、ヒザラガイの歯の成熟に伴う鉄の状態変化について調べた。

2.6.1 試料調製

Mössbauer スペクトル測定のためには試料の量が十分必要であったので、神奈川県油壺湾の潮間帯に生息するヒザラガイ約 70 個体分の歯舌を摘出し、アルコールで固定したものを測定に使用した。成熟度の異なる歯のスペクトルを比較するため、この 70 個体分の歯舌をすべて顕微鏡下で Fig. 2.1 の様に褐色（歯舌嚢を含む）、灰色・赤色・黒色の試料に分離し、ポリエチレン袋に封入した。さらに試料を 13mmφ の円形の真鍮製のホルダーに保持し Mössbauer 測定を行った。

また比較のため、組成・構造が既知である無機の鉄化合物として、レアメタリック社製高純度試薬 Fe_3O_4 、天然鉱物の magnetite も室温の測定に用いた。これらの試料はいずれも粉末 X 線回折法にてその結晶形が逆スピネル構造を持つ magnetite に相当すること、またその他には不純物が混在していないことを確認した後、測定に使用した。さらに、生体の中に存在する鉄の貯蔵タンパクとして知られている ferritin の測定も行った。ferritin がどのような物質であるかについては、第 3 章の 3.5.2 項で詳しく述べる。ferritin は生化学用試薬（和光製）として市販のものをを用いた。これは水溶液の形であったので 13mmφ 口径のアクリルホルダーに約 2ml の試料を封入し、液体窒素で凍結して測定を行った。この温度にあわせて、ヒザラガイの歯のうち最も成熟した黒色の歯のスペクトルも液体窒素温度で測定した。

2.6.2 測定およびデータ解析

Mössbauer スペクトルの測定は透過法で、AUSTIN SCIENCE 製 S-600 型スペクトルメーターに、 γ 線源として 1.1GBq の $^{57}\text{Co/Rh}$ マトリックス線源を用いて、室温及び液体窒素温度において行った。この線源を 10m/s の速度で試料に対して水平線上に振動させ、試料を透過してきた γ 線を Xe-CO₂ 密封型比例計数管を用いて計測した。その後信号をマルチチャンネルアナライザーで 1024 チャンネルの速度軸に振り分け、縦軸に各速度の計数値を置くことで Mössbauer スペクトルを得た。低温の測定はクライオクーラーを用いて液体窒素温度で行った。

得られたデータの個々のピークの形状をローレンツ型の曲線として、その線形結合による最小自乗カーブフィッティングをコンピューターで行い、相対強度、異性体シフト、四極子分裂、内部磁場の 4 つのパラメーターを算出した。解析の際横軸のドップラー速度軸の補正並びに異性体シフトの基準として α -Fe 箔の測定データを用いた。

2.7 XAFS 法による歯に含まれる鉄の状態分析

電磁波の一種である X線は物質中の電子のいろいろな運動と相互作用して吸収を受け、Fig. 2.3 に示すような過程を取るが、X線の吸収確率は、物質またはX線のエネルギーにより大きく変化する。そこでX線のエネルギーを連続的に変化させながら試料に照射し、入射X線強度 I_0 と透過X線強度 I の計測を行い、X線のエネルギーを横軸に、X線の吸光係数 $\mu = \ln(I_0/I)$ を縦軸にプロットすると、試料に固有のX線吸収スペクトルが得られる (Fig. 2.4 (a))。

X線吸収スペクトルを測定すると、吸収元素のイオン化エネルギーに対応するエネルギーで急激に吸収が増大し、これより高いエネルギーのX線が吸収されると内殻電子が光電子として放出される。このエネルギー位置をX線吸収端 (edge) と呼ぶ。各原子には K,L,M 殻電子に対応する吸収端がいくつか存在し、各X線吸収端のエネルギーは元素に固有のものである (Fig. 2.4 (b))。さらにX線吸収スペクトルを詳細に調べてみると Fig. 2.4 (a) のようにX線吸収端の高エネルギー側 100 ~ 1000eV にわたり微細な振動構造が見れる。この振動構造は吸収元素の存在状態を反映し形状が異なる

るので、この振動の解析により、多成分物質中において特定の元素のみを選択してその状態・構造を決定することが可能となる。これを分析法として応用したのが、X線吸収微細構造法 (X-ray Absorption Fine Structure, XAFS) である。なおこのスペクトル上に観察される微細構造のうちX線吸収端前後約150eVの領域の構造と吸収端より数十 eV 以上高エネルギー側に現れる振動構造とはその成因や解析法が異なるため、前者をX線吸収端近傍構造 (X-ray Absorption Near Edge Structure, XANES)、また後者を広域X線吸収微細構造 (Extended X-ray Absorption Fine Structure, EXAFS) と呼ぶ。XAFSはこの両者をまとめた総称である⁵⁴⁾。

こうした微細構造の存在は1920年代から知られており、その原因について様々な議論がなされてきた⁵⁶⁻⁵⁸⁾。現在ではEXAFSについては、X線の吸収に伴い放出された光電子波が球面波として発散してゆく際に、吸収原子近傍に存在する他の原子により光電子が散乱され、発散してゆく光電子波と散乱により戻ってくる光電子波とが干渉を起こし、その結果として遷移モーメントに変化が生じ、X線吸収スペクトル上に微細構造が生じるとされている (Fig. 2.5 (a))。光電子波の散乱能は元素によって異なり、また吸収原子の周りに存在する原子の数・距離などで波の干渉が異なってくるので、この仮定に基づきEXAFSの波を解析することにより、吸収原子周りの原子種、配位数、結合距離を含む局所構造を決定することができる。そして球面波の散乱が起きるのは1回だけであるという近似 (一回散乱近似) を用い、さらにEXAFS振動をsin波で近似することにより、フーリエ変換を用いてEXAFS振動を直接視覚に訴える動径分布関数へ変換し原子配置を求める解析法をStern, Sayers, Lytleらが発表した^{59, 60)}。また、その数年後にスタンフォード大学の軌道放射光施設において定量的な解析に耐える高精度の測定データが得られるようになったことから、構造解析の手法として爆発的に普及し始めた。

一方XANESはEXAFSとは趣が異なる。吸収端近傍のエネルギーのX線吸収により電子はFig. 2.5 (b)のように、原子内の高いエネルギー束縛状態またはイオン化準位のすぐ上の準連続状態に遷移する。どちらの状態も原子の配置やポテンシャルの変化に敏感であるので、XANESは吸収原子の電子状態やその周囲の局所構造、特に配位対称性を強く反映する。従って、XANESからは価数などの電子状態に関する情報が得られ、構造についても結合角などEXAFSと相補的な情報を与える潜在能力を

持っている。しかし、1 回散乱近似を用いることのできる EXAFS とは異なり、XANES に相当するエネルギー領域の X 線は波長が長いため多重散乱を起こし解析が複雑になるなどの問題が生じ、これらの問題に応じて様々な近似を行い量子力学的な計算の結果と対応させたり、あるいは定性的に類似物質とのスペクトルの比較に用いられるにとどまっている。

このように XANES は未解決な問題を抱えているものの、ここから得られる情報の重要性は EXAFS に匹敵し、時としては非常に強力なツールと成り得る。試料がいくつかの化学種の混合物である天然物試料が好例である。X 線吸収スペクトルには加有成性があるので、試料が混合物の場合には XANES であれ EXAFS であれ各成分の和の形で振動が現れる⁹²⁾。よって EXAFS 解析を行うにはこれらを単成分に分離するか、もしくは何らかの方法で化学種の混在比を得て、計算により EXAFS 振動を再現し、そこから解を得る方法を取らなくてはならない。しかし現在のところ、化学種ごとの存在比を算出できる分析法はほとんどなく、実際問題として混合物の試料は EXAFS 解析には用いることができない状態である。これと比較して、XANES は定性的ではあるが、混合物であっても純物質同様の情報を得ることができる。生体試料のように混合物である可能性が高い試料を取り扱う際にはきわめて効果的な手法である。

この他 XAFS の特長としては、原子内の光電子の放出に関わる X 線吸収を観察しているので、測定試料に原子配列の長距離秩序は必要なく、気体・液体・固体のあらゆる状態の試料の測定が可能であることが挙げられる。これまでの固体の構造解析法は X 線や電子線の回折現象を利用した回折法が中心であったので、原子配列の長距離秩序が存在する結晶質の試料にのみ適用することができなかった。これに対して XAFS 法を用いることで溶液や非晶質物質の構造解析が可能になったので、現在 XAFS 法は、ガラスに含まれる成分の局所構造解析^{61, 62)}、触媒の表面に吸着した原子の局所構造解析⁶³⁾、溶液の中の錯体の構造解析といった多方面の研究に利用されている^{64, 65)}。また、生物試料に対する適用も増加してきており、ホヤの体液中のバナドサイトが存在するバナジウムの状態分析⁶⁶⁾ やタンパク質の活性部位に存在する金属元素の局所構造解⁶⁷⁻⁶⁹⁾ といったような XAFS 法の特性を活かした研究が盛んに行われてきている。さらに X 線による試料のダメージは他の分光法と比較して小さいので、試料を非破壊で状態分析が行えることも、XAFS 法の大きな特長である。

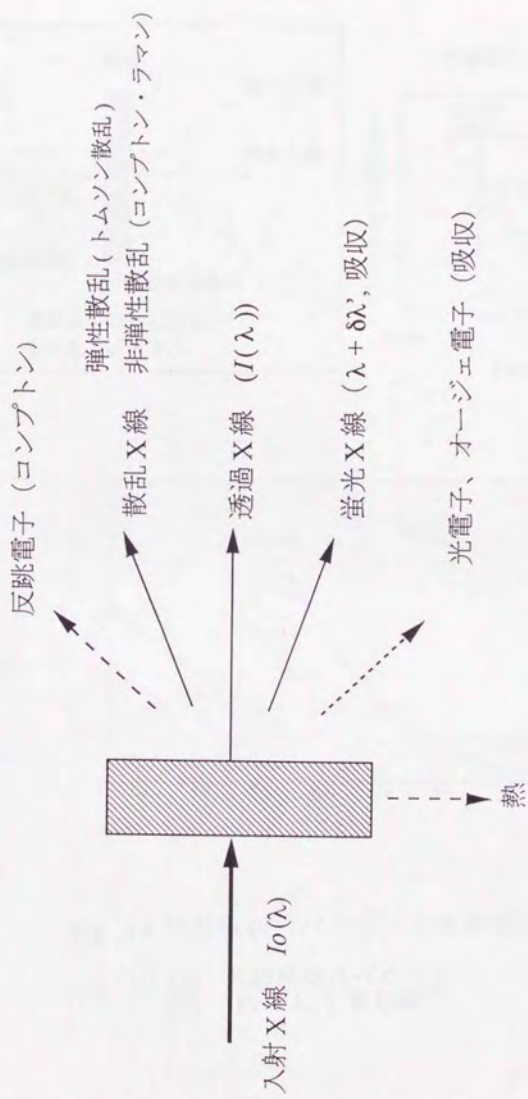
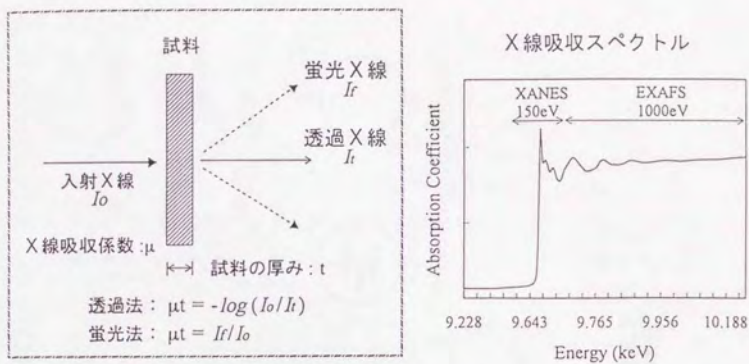


Fig. 2.3 X線と物質の相互作用によって生じる諸過程⁵⁴⁾

(a)



(b)

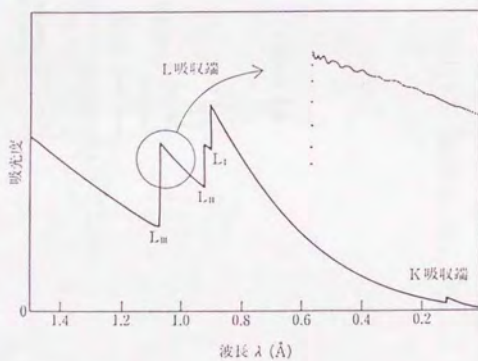


Fig. 2.4 X線吸収スペクトルとX線吸収端

- (a) X線吸収スペクトル
- (b) PtのK, L吸収端^{5,4)}

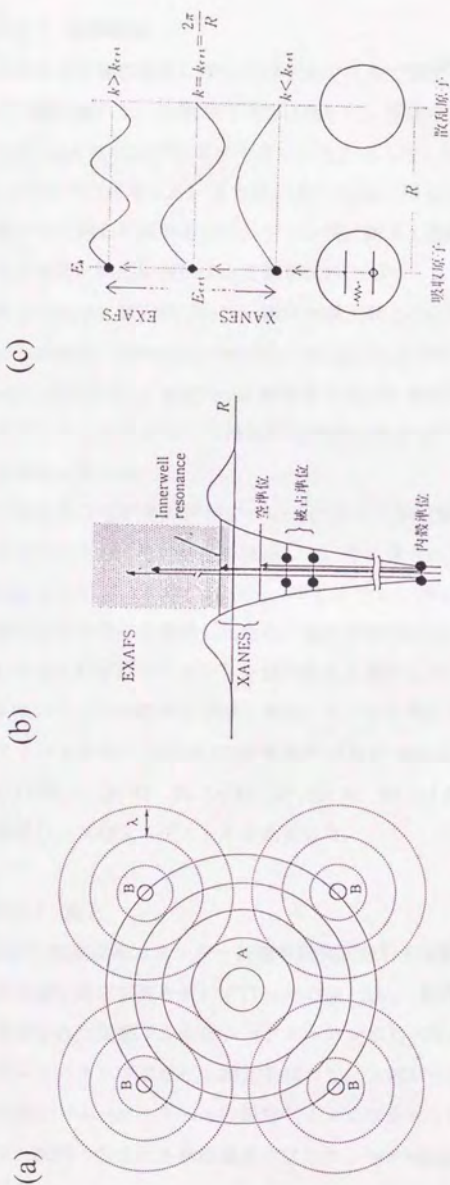


Fig. 2.5 EXAFS, XANES の起源
 (a) EXAFS の起源 A: 吸収原子、B: 最近接の散乱原子
 (b) XANES 起源⁵⁴⁾、(c) 内殻電子のエネルギ準位

2.7.1 試料調製

ヒザラガイ類の歯舌に関してはアルコールで固定していた試料をそのままポリエチレンの袋に封入し、非破壊で測定に用いた。測定によっては封入に用いたポリエチレン上に1mmステップのガイドラインを記入して、それにあわせ歯舌の中の各部を1mmステップで測定した。また色の異なる歯の測定を行う際には、あらかじめ光学顕微鏡下で分類した試料をポリエチレン袋に封入し測定試料とした (Fig. 2.1)。

また構造・組成が既知である標準試料として、レアメタリック社製高純度試薬の金属鉄 (Fe metal)、酸化鉄 (Fe_2O_3)、酸化水酸化鉄 ($\gamma\text{-FeOOH}$) と天然鉱物の pyrite (FeS_2)、magnetite (Fe_3O_4)、goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$)、akaganeite ($\beta\text{-FeOOH}$)、lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$)、0.03mol/l 硝酸鉄 (III) ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$) 水溶液と ferritin 水溶液をヒザラガイの歯と同様の条件で測定した。また合成して得られた水酸化鉄 ($\text{Fe}(\text{OH})_3$) のコロイド状の沈殿も比較のため測定に用いた。

これらのうち固体の試料についてはすべて測定前に粉末 X 線回折により化合物の同定を行いさらにその純度を確認した。その後それぞれ窒化ホウ素と混合したものを10mm ϕ のディスク状に成形し、ポリエチレン袋に封入して測定に用いた。溶液は濾紙に含ませ厚みを調節したもの、また沈殿試料はメンブレンフィルターに捕集させたものをそれぞれポリエチレン袋に封入し測定に用いた。

またいくつかの鉄の化学種が混在していると考えられるヒザラガイの歯の複雑なスペクトルを解釈するために、標準試料である magnetite と $\gamma\text{-FeOOH}$ を重量 % 比で、各々 (a) 100 : 0, (b) 80 : 20, (c) 60 : 40, (d) 40 : 60, (e) 20 : 80, (f) 0 : 100 に混合した試料を作成し、XAFS スペクトルを測定した。

2.7.2 測定

XAFS 測定は高エネルギー物理学研究所放射光実験施設 (Photon Factory) BL7C に常設の XAFS 測定装置を用いて行った (Fig. 2.6)。線源は 2.5 GeV のストレージリングに蓄積された陽電子からのシンクロトロン放射光を用い、白色光を Si(111) 2 結晶モノクロメーターで単色化し測定を行った。入射ビームは 45° に傾けた試料台に固定した試料上で 4 mm \times 1 mm の矩形サイズになるように、スリットで調整した。計測時間は、試料に含まれる鉄の濃度に応じて 1 ~ 8 s/point の範囲で設定した。

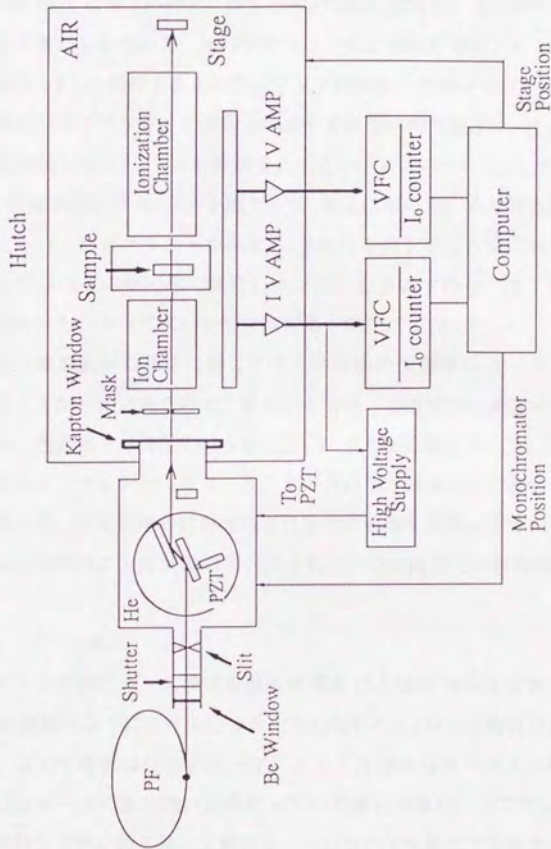


Fig. 2.6 高エネルギー物理学研究所放射光実験施設 BL7C の構成

測定は、モノクロメータの角度を $2\theta = 17.2580^\circ$ から 14.1126° まで走査させ行ったが、この範囲を全部で4ブロックに分割し、それぞれ 0.02° , 0.002° , 0.004° , 0.015° ステップで走査することにより Fe K 吸収端近傍のスペクトルを得た。特に第2ブロック (16.2586° から 15.9126° まで) は XANES 領域に相当し、XANES スペクトルの比較を行う上で重要であるので、本研究ではこの角度領域でのモノクロメータのエネルギー分解能の $1/2$ に相当する 0.002° ステップの細かさで測定を行った。

実試料であるヒザラガイの歯舌と関連する標準試料の測定は、Lytle 型検出器⁸¹⁾を用いる蛍光法で行った。I₀を計測するイオンチェンバーには N₂ ガスを、If を計測する Lytle 型検出器には Ar ガスを流入させ、測定に用いた。また弾性散乱やコンプトン散乱によるバックグラウンドを除去し、S/B 比を向上させた質の高いデータを得るため、Lytle 型検出器の検出窓の直前にマンガン化合物で作られたフィルターを設置して測定を行った。すべて XAFS 測定は常温・常圧下で行った。

一方混合標準試料の測定に関しては、混合物の X 線吸収スペクトルに与える影響を調べることが目的であるので、蛍光法と併せて透過法での測定も行い、両者を比較検討した。透過法での測定を行う際には、I 用の検出器として N₂ と Ar の混合ガスを流入したイオンチェンバーを用いた。また透過法と蛍光法では測定に適した試料濃度が異なるので、蛍光法用の試料では自己吸収の影響を無視できる程度に希釈し、透過法の場合には試料による X 線の吸収が 2 程度になる濃度で試料調製を行った。

2.7.3 データ解析

スペクトルの解析は、X 線吸収端近傍構造 (XANES) 領域と広域 X 線吸収微細構造 (EXAFS) 領域の 2 つに分けて行った。XANES と EXAFS の解析法ははまだ発展途上にあり、XAFS 解析は研究グループによって X 線吸収スペクトルからの XAFS の抽出および各データの取り扱いが異なっている場合が多い。そこで本稿では EXAFS 解析の標準的な方法を順を追って解説し、そのなかで本研究で取り扱っているデータ処理法を記載した。これらはまとめて付録として巻末に添付した。

また XANES は 2.7 で述べたように定量的な解析が困難な部分であるので、本研究では標準試料と実試料のスペクトルの定性的な比較を行うことを主とした。この比較のため、独自のデータ処理を行っているので、次にその方法について詳しく述べる。

2.7.3.1 XANES 領域のデータ処理

XANES 領域のスペクトルについては、X線吸収スペクトルから抽出した XANES スペクトルの規格化及び微分スペクトルの算出という2つのデータ処理を行った。以下に手順を示す。

第一に XANES スペクトルの比較を行うために、強度の異なる測定データに対し以下のように、コンピュータを用いた数値上の操作による規格化を行った。まず入射の X線強度 I_0 と蛍光 X線強度 I より得た吸収係数 I/I_0 を入射 X線のエネルギー (keV) に対しプロットする事により、測定データそのままのスペクトルを得た。次に測定データに含まれるバックグラウンドを、X線吸収端前の部分のデータを最小自乗法により巻末付録の式(4)の Victreen の式^{8,2)} にフィットさせ吸収端以降の高エネルギー領域へ補外し、測定データから差し引いた。そして、得られた差スペクトルの中で最も低い吸収係数をスペクトル内のすべての測定点から差し引き、最も高い吸収係数であるすべての測定点を割ることにより、吸収係数の最小が 0、最大が 1 になる規格化 XANES スペクトルを得た。微分スペクトルはこの規格化 XANES スペクトルのデータ点について cubic-spline 法によりなめらかな曲線を補間し、この曲線に対し実際の測定点のエネルギー位置での接線の傾きを算出することにより得た。

さらに規格化 XANES スペクトルを用いて議論するため、スペクトルを特徴づける X線吸収端位置やプレエッジピーク位置、また微分ピーク位置などを求めた。まず試料の純度が X線回折により確認されている標準試料のスペクトルでは、スペクトルに対し微分の操作を施し得られた 1 次微分スペクトルの中の最も大きな極大点をそのスペクトルの吸収端とした。また混合物である可能性もある実試料については、スペクトルの吸収係数が急激に増大する 7.112 ~ 7.130 keV 付近で規格化した吸収係数が 0.5 になる点のエネルギー位置をそのスペクトルの吸収端とした。しかし吸収端や微分スペクトルの吸収極大はスペクトルの変化が大きい場所なので、データ点のみでは点の間隔が広がってしまい吸収端位置や微分ピーク位置、プレエッジピーク位置などを正確に求めるのが困難である。そこで本研究では XANES スペクトルと微分スペクトル中の 4 点のデータに対してそれぞれ Lagrange 補間法を適用し、中間の 2 点間のみを補間し曲線を作成する方法でデータ点の 1/10 の間隔を持った補間データを作成し、これらからピーク位置等を読みとりスペクトルの解釈を行った。

第3章 結果及び考察

3.1 X線プローブマイクロアナライザー (EPMA) による2次元元素分析

3.1.1 定性分析

Photo. 3.1 (a)にEPMAの測定に用いた試料のうち、最も成熟した歯である黒色の歯の光学顕微鏡写真を示す。研磨によって露出した歯の正中線を通る縦断面を観察すると、写真に示された通り、歯の摂餌面に相当する腹側は、不透明で黒く光沢を持った物質が存在し、歯の背面は半透明で薄く褐色を帯びた物質で構成されていることがわかる。この全く異なった様相を示す2種類の物質の構成元素を調べるため、2次元元素マッピングの前段階として、それぞれの部分に対してEPMAによる定性分析を行った。その結果をFig. 3.1に示す。

定性分析の結果は、歯の摂餌面に相当する黒色の部分にはFeのみが存在し(Fig. 3.1 (a))、片や半透明な背面はCa, P, Mgを主成分としFeはほとんど存在しない物質で構成されていることを示している(Fig. 3.1 (b))。この定性分析には酸素のような軽元素を計測するための分光結晶を使用していないので、酸素やフッ素が存在するかどうかの知見は得られなかった。しかし重元素については、ヒザラガイの歯の中にはこれら4元素以外は検出されず、歯舌を構成する主要元素はFe, Ca, P, Mgであると推定された。そこでこの4元素に着目し、2次元元素マッピングを行った。

3.1.2 ヒザラガイの歯のEPMAによる2次元元素分析

Fig. 3.2にヒザラガイの灰色・赤色・黒色の歯の縦断面に対して2次元元素マッピングを行った結果を、Fig. 3.3に灰色・赤色の歯の横断面についての結果を示す。

まずFig. 3.2の黒色の歯の2次元元素分布をみると、鉄は摂餌の時に歯が直接食物や岩場などに接触する歯の先端から腹の部分にかけて濃集している。これはPhoto. 3.1で観察された黒色の材質の分布と1:1で対応している。一方、歯の背中にはカルシウムとリンが濃集した、リン酸カルシウムのような物質が充填されていることが明らかとなった。この結果より、ヒザラガイの歯に濃集された鉄が最も強度を必要とする先端部に分布することで、柔らかいリン酸カルシウムを保護するような役割を担っていることが予想された。また両者の境界は鮮明で、双方に渡る元素の移動のこん跡は見られないことから、双方の形成機構は独立していることが推察された。

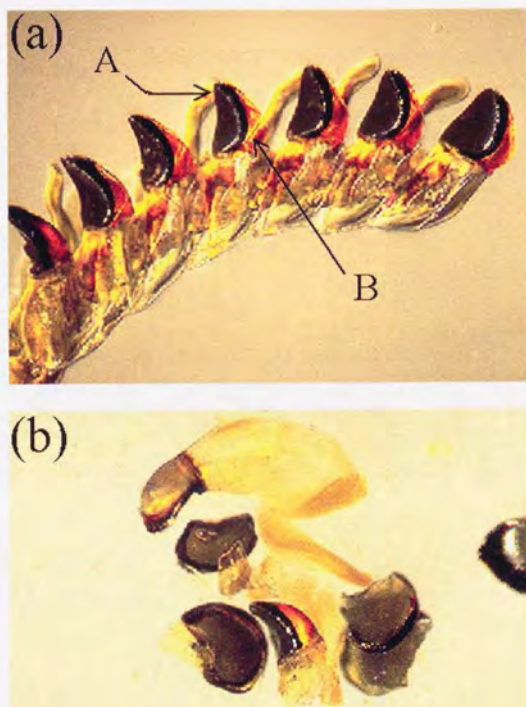


Photo. 3.1 EPMAとSEM/EDS分析に使用した
ヒザラガイの歯の試料の光学顕微鏡像

(a) 2次元元素マッピングのために歯舌を樹脂
包埋し研磨により縦断面を出した試料

(b) SEM/EDS分析のために基底膜から分離
した歯の試料

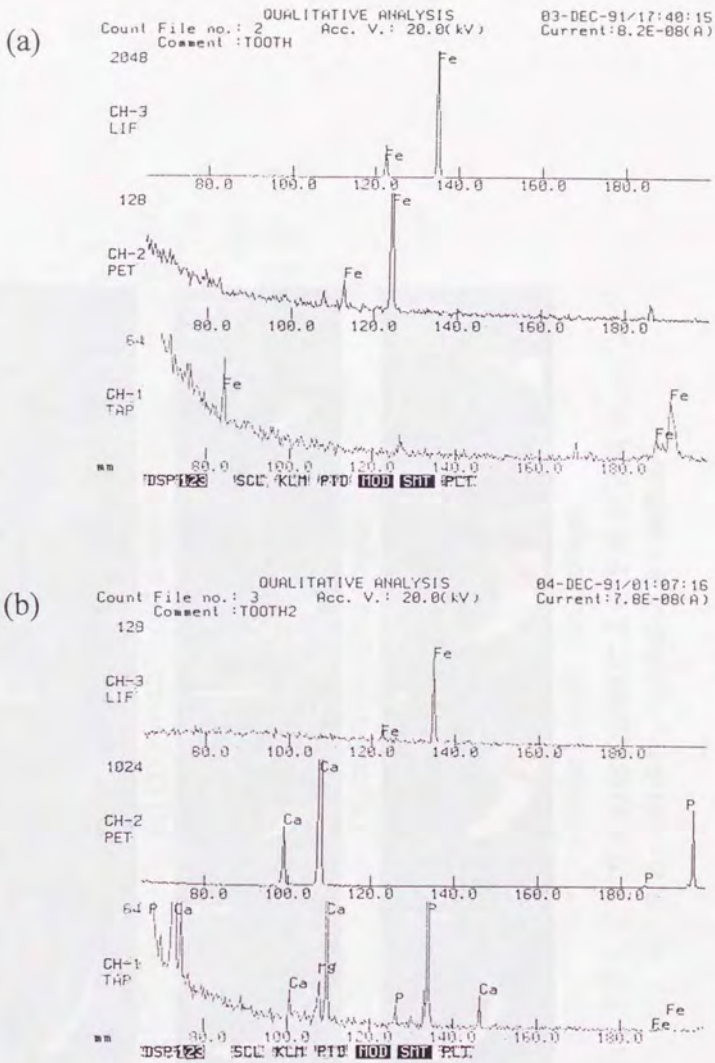


Fig. 3.1 EPMA によるヒザラガイの黒色の歯の定性分析の結果
 (a) 黒色の光沢のある部分、(b) 半透明な部分

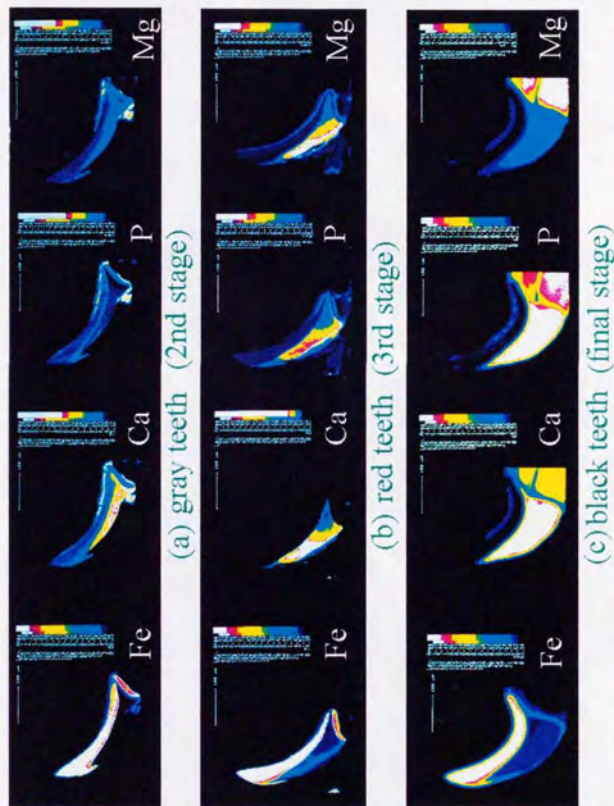


Fig. 3.2 ヒザラガイの歯のEPMAによる2次元元素マッピング
 (a) 灰色、(b) 赤色、(c) 黒色の歯の歯の縦断面

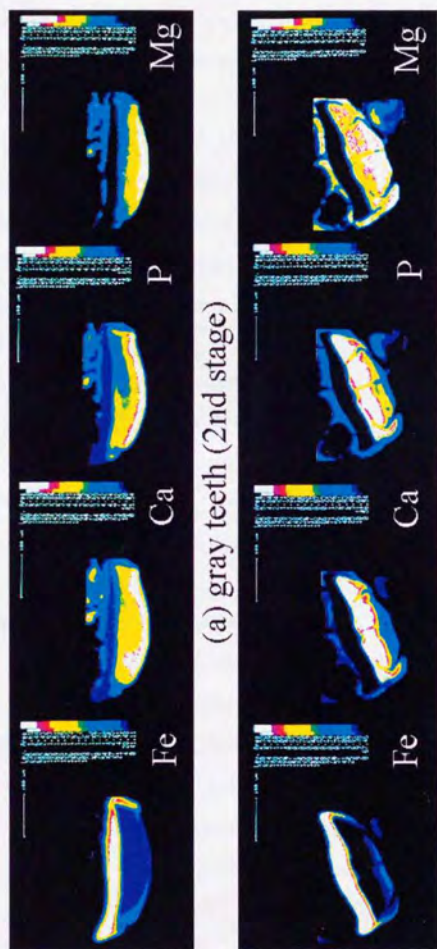


Fig. 3.3 ヒザラガイの歯のEPMAによる2次元元素マッピング

(a) 灰色、(b) 赤色の歯の横断面

次に、成熟度の異なる歯について各元素の2次元分布を比較してみる。4つの元素のうち鉄は、未成熟な灰色の歯の段階ですでに歯の形を成して摂餌面に沿うように濃集され、以後少しずつ厚みを増して黒色の歯に至る。これに対して、カルシウムやリンは灰色の歯にはほとんど見られず、その後、赤色、黒色と歯の成熟度が上がるにつれて、歯の背中側に徐々に蓄積されていく様子がうかがえる。マグネシウムは定性分析ではリン酸カルシウム質の部分からもわずかに検出されているが、すべての成熟度の歯において微量成分であり、むしろ歯の根本ある基底膜側に多く存在している。またマグネシウムの分布と有機質で構成されている歯の表面の膜や基底膜の分布が一致することから、マグネシウムは歯の形成に関連する細胞や有機物中に存在していて、無機質の歯の方にはあまり取り込まれないことがわかった。Fig. 3.3の横断面のマッピングからもほぼ同様の傾向が観察された。以上から、(1)歯の中の鉄の濃集過程とリン酸カルシウム質の集積過程がそれぞれ独立していること、また(2)マグネシウムは有機物の部分に多く分布すること、などが明らかとなった。

加えて、鉄の濃集部にも鉄濃度の異なる2つの部分(白色の部分と濃い桃色の部分)が存在していることが確認された。これらについては、ヒザラガイと同じウスヒザラガイ亜目に属するリュウキュウヒザラガイ *Acanthopleura loochooana*の歯に対して石井らが行ったEPMAによる2次元元素分析の結果からも、歯の摂餌面に分布する鉄の濃集部に、同様な鉄濃度の異なる2つの部分の存在が確認されている^{8,3)}。さらに石井らは、鉄と同時に酸素の分布も測定しており、この2つの部分うち白色で示された部分の鉄:酸素の量比が半定量的にはほぼ Fe_3O_4 の組成と一致する一方、桃色で示されている部分の組成は $FeOOH$ 相当になることを明らかにした^{8,3)}。リュウキュウヒザラガイとヒザラガイは同じ亜目に属するので、歯の構成成分も類似していることが期待された。しかし同じ亜目に属するヒザラガイ類であっても歯の組成や元素分布が変化する可能性は大きいので、さらにもう一種類、同じウスヒザラガイ亜目に属するヤスリヒザラガイ *Lepidozona corenica*の歯についても、EPMAによる2次元元素マッピングを試みた。測定は酸素の測定も同時に行うことのできるシステムを持つ(株)日本電子データムに委託して行った。また測定には最も成熟した、黒色の歯を使用した。その結果のうちFeの2次元分布をFig. 3.4に、Mg, Ca, P, Oの4元素の分布をFig. 3.5に示す。

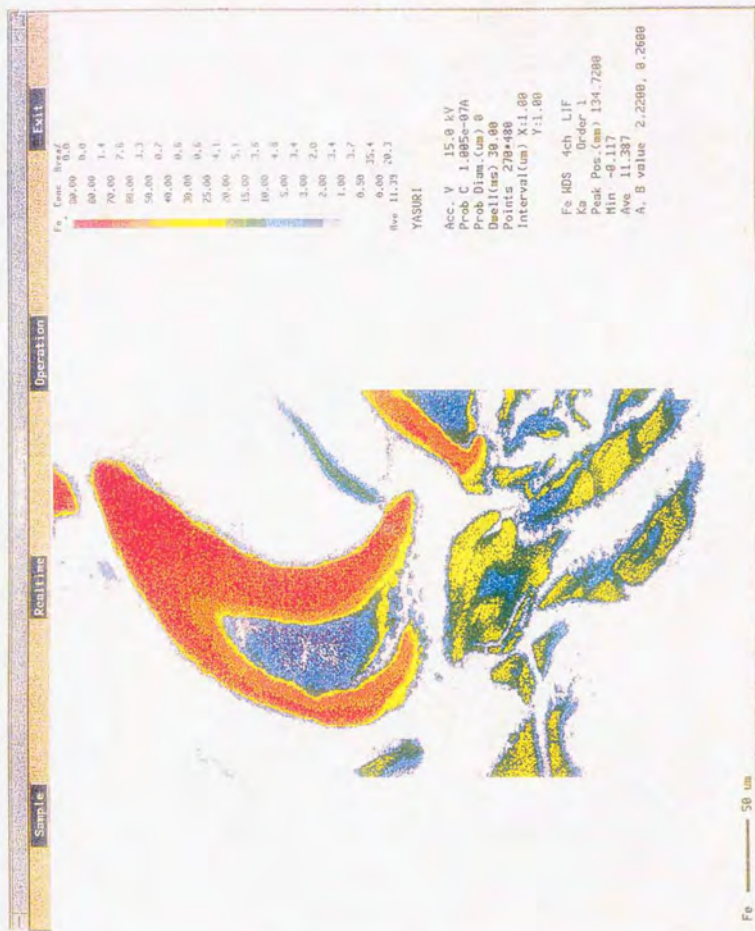


Fig. 3.4 ヤスリヒザラガイの成熟した黒色の菌のEPMAによる2次元元素マッピング (Feの分布)

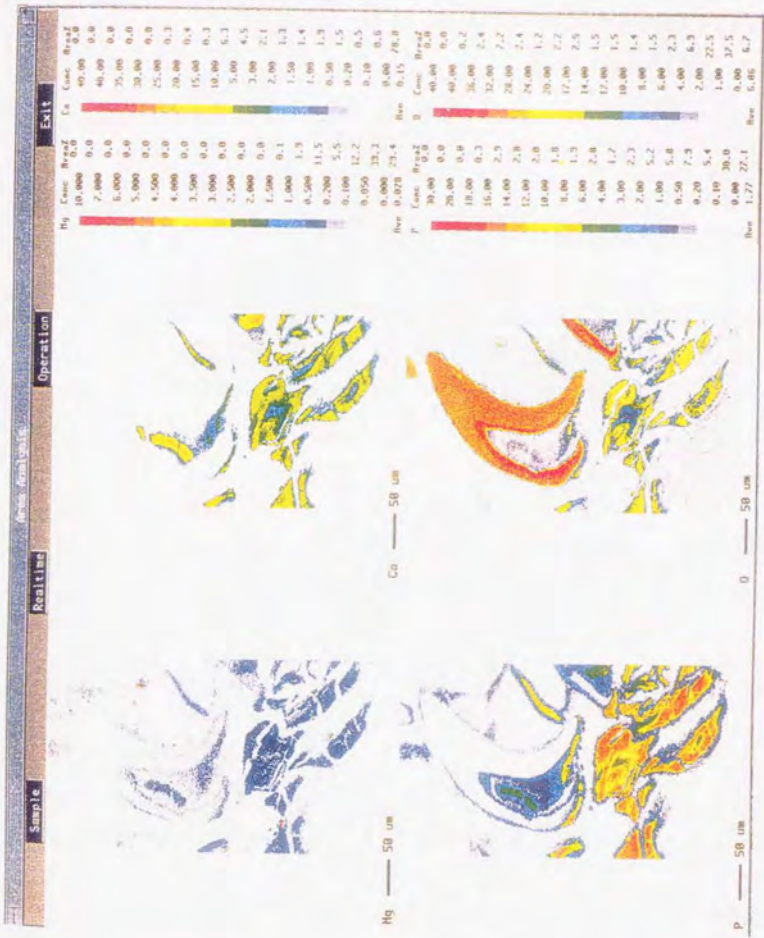


Fig. 3.5 ヤスリヒザラガイの成熟した黒色の菌のEPMAによる2次元元素マッピング (Mg, Ca, P, Oの分布)

ヤスリヒザラガイの歯でもヒザラガイと同様に鉄濃度の異なる2つの部分の存在が認められた (Fig. 3.4, 赤色と橙色の部分)。また歯の中の濃集領域と同じ領域に酸素も濃集していることが Fig. 3.5 からうかがえる。すなわち、ヤスリヒザラガイの歯の中に濃集した鉄が金属鉄ではなく酸素と化合物を形成していることが示唆された。

両者の濃度を詳しく見てみると、鉄濃度が70~80%と高い部分(赤色)では、酸素濃度は相対的に低く28~32%(橙色)となっている一方、鉄濃度が50~60%とやや低い橙色の部分では、相対的に酸素濃度が高くなり32%以上の赤色を示していた。

鉄の酸化物や酸化水酸化物中でのFe:Oの重量%比を理想組成から算出すると、 Fe_3O_4 では72:28、 Fe_2O_3 では70:30、 FeOOH では63:37になる。従ってヤスリヒザラガイの鉄濃集部のなかの鉄濃度の高い部分は Fe_3O_4 または Fe_2O_3 に相当し、鉄濃度の低い部分は FeOOH かそれよりも鉄の相対量が低い水酸化鉄のような組成を有していると考えられた。この見解は石井のリユウキュウヒザラガイのものとも一致する。同じ亜目に属する2種類のヒザラガイ類で歯の中の鉄の構成成分に共通点が見いだせたので、ヒザラガイについても鉄濃集部の中で鉄濃度の高い部分は Fe_3O_4 、鉄濃度の低い部分は FeOOH かより鉄の相対量の低い化合物で構成されていると推察した。

これに対し、歯の内部での鉄濃集部やリン酸カルシウムをマトリクスとする部分の分布状態については、ヤスリヒザラガイとヒザラガイでは大きく異なることが、本研究のマッピングにより明らかとなった。摂餌面のみ鉄が濃集しているヒザラガイに対して、ヤスリヒザラガイでは歯全体を鉄が覆っているような構造になっている (Fig. 3.2, Fig. 3.4)。またヒザラガイでは歯の背面をCaとPを主成分とする物質が大きく覆っていたが、ヤスリヒザラガイの歯の中にはCaとPを濃集した部分は非常に小さく、ヒトの歯の歯髄に相当する歯の中の空間にわずかに存在するだけである (Fig. 3.2, Fig. 3.5)。石井らの報告ではリユウキュウヒザラガイの歯の内部の2次元元素分布はヒザラガイに類似しており、摂餌面への鉄の濃集が顕著なことから、背面にCaとPの濃集が認められることを述べている。従ってこの3者間の比較では、ヤスリヒザラガイが独特の分布を示していることになる。

前述の通り、ヒザラガイの歯の中で最も強度を必要とする先端部に、比較的硬度の高い酸化鉄が分布することは、背面の柔らかいリン酸カルシウムを保護する意味でも酸化鉄を集中的に摂餌に使用することができるという意味でも合理的である。しか

し、ヤスリヒザラガイの場合、その歯の中にはリン酸カルシウムの蓄積は認められず、歯の中心部は EPMA では検出される元素の少ない有機質が充填されていると考えられた。ヤスリヒザラガイの歯では、リン酸カルシウムより硬度の低い有機質を保護するため、鉄が歯の表面全体を覆うような形になったのかもしれない。

なぜヒザラガイの同亜目種間でこのような大きな歯の組織の違いが見られるのか。摂餌器官である歯舌及び歯の形態の変化を促す最も大きい要素は、生物が主として摂取する食物の種類にあると考えられる。例えば岩場に付着した藻類を主食とするアユの歯は先端が丸みを帯びていてヘラのような形状を持っている。これにより藻類を効率的に掻き取ることに可能となっている。一方サメの歯は獲物を捕らえるため鋭くとがった形をしている。このように食性の明らかとなっている動物については、歯の形状が食性に大きく影響を受け変化していることがよく知られている。しかし、ヒザラガイ類についてはまだその食性を特定するための生物学的研究が進行中であり、また歯の形状も Photo. 1.2 に示したように先端が3つに分裂しているものやカギ状のものなど多様であることが知られている。よってこういったヒザラガイ類の食性と歯の組織・形態の間に関連があるかについてはこれからの研究課題であるといえる。

以上をまとめると、EPMA の 2 次元元素マッピングにより、(1) ヒザラガイの歯の摂餌面には Fe_3O_4 や FeOOH の組成を持つ鉄化合物のみが、背面にはリン酸カルシウムが独立して濃集されていること、(2) ヒザラガイ類の種類によって歯の構成元素の 2 次元分布に違いが見られること、が明らかとなった。

これまでの本研究以外に EPMA の 2 次元元素マッピングをヒザラガイ類の歯舌に適用したものは、石井らの行ったリュウキュウヒザラガイのみである。よって、ヒザラガイ類の種の違いが歯の元素分布にも現れることを明示したのは、2 つの種類ヒザラガイの歯に対して 2 次元元素マッピングを行った本研究がはじめてであると思われる。EPMA の 2 次元元素マッピングは物質科学の分野で多く使用されているが、生物分野での研究において使用されることはほとんどなかった。この点で本研究では、物質化学的手法を生体試料の分析に応用することが、新たな角度から生体鉱物の特徴を捕らえるために有効であることを証明し得たと考える。

3.2 粉末X線回折法による歯に含まれる結晶質の同定

Fig. 3.6 にヒザラガイの歯の粉末X線回折の結果を示す。測定を行った試料のうち、歯が形成される歯舌囊の部分では結晶成分に相当する回折ピークが全く得られなかったので、Fig. 3.6 には次の成熟段階である灰色の歯から順に8列分ずつ口の方に至るまで並べてX線プロファイルと比較した。

灰色の歯から実際に摂餌に使用される完成された歯に至るまで、すべてのプロファイルに結晶成分のピークが検出された。それらのほとんどが magnetite と同定された (Fig. 3.6, m で示したピーク) が、 $2\theta = 26.52^\circ$ ($d = 3.354 \text{ \AA}$) や 50.37° ($d = 1.812 \text{ \AA}$) に magnetite とは帰属されないピークがわずかに現れた。鉄の酸化物や酸化水酸化物をはじめとして EPMA で検出された Fe, Ca, P, Mg の4種類の主要構成元素から推測される無機塩についてこれらのピークに相当する物質を検索したが、この2つのみからは物質を同定することができなかった。特にヒザラガイの歯のもう一つの主成分であるリン酸カルシウム系列の物質にはこれらピークに相当するものがなく、最終的にリン酸カルシウムはX線的に非晶質であることが明らかとなった。また、歯舌囊で歯の形成初期に蓄積される物質もX線的に非晶質の物質であることがわかった。この同定ができなかった2つのピークについては今後検討を加えていくつもりである。

さらにX線プロファイルを歯の成熟に従い比較すると、未成熟部から歯の成熟度が上がるにつれて磁鉄鉱に相当するピークの強度がやや増加する傾向が見られた。測定には同じ数の歯を使用しているので、ヒザラガイの歯の成熟に伴い結晶質の磁鉄鉱の絶対量が増加する傾向があることが示唆された。

以上、粉末X線回折法分析の結果より、(1) 歯の形成初期には非晶質の成分が蓄積される、(2) 灰色の歯から最も成熟した歯に至るまですべての歯の中に結晶成分として magnetite が存在する、(3) 歯の主要構成成分であるリン酸カルシウムはX線的に非晶質であることが明らかとなった。

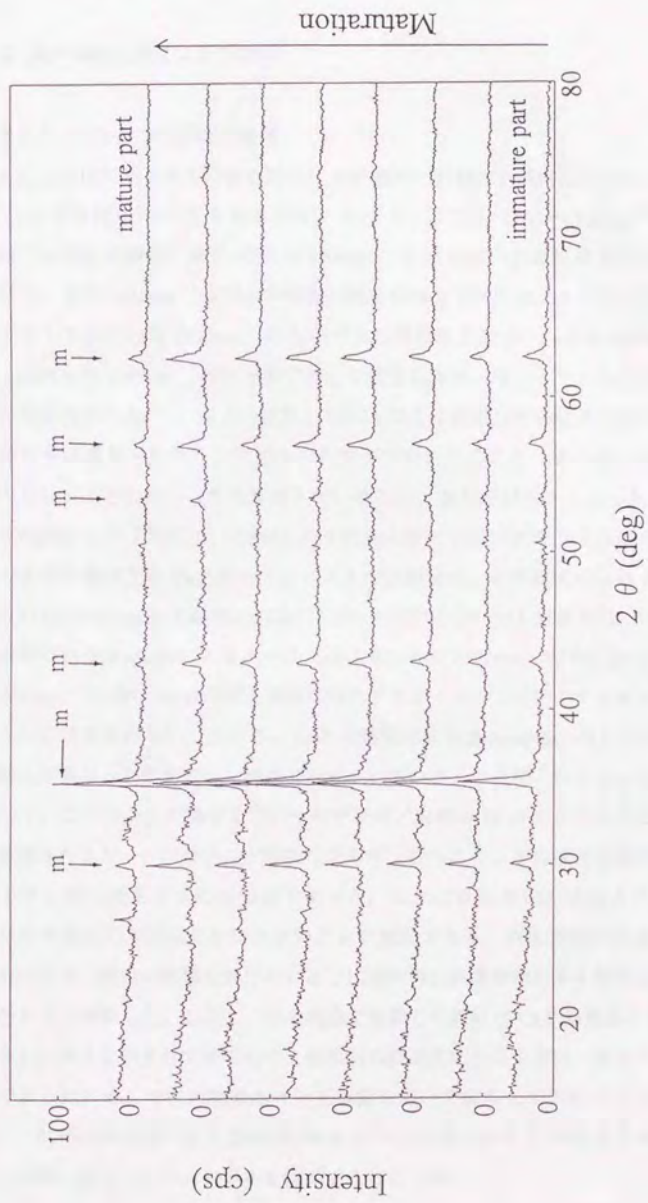


Fig. 3.6 粉末X線回折によるヒザラガイの歯の分析

3.3 赤外吸収分光法による分析

3.3.1 バルクでの分析の結果

Fig. 3.7 にヒザラガイの歯を粉碎し KBr 錠剤に調製した試料について、バルクで測定した赤外吸収スペクトルを示す。スペクトルには $1100 \sim 950\text{cm}^{-1}$ と $600 \sim 550\text{cm}^{-1}$ に PO_4 の吸収、また $3750 \sim 2000\text{cm}^{-1}$ には H_2O の吸収に相当するピークが見られた。また 1650cm^{-1} 付近の中程度の強度を持つピークは、タンパク質に特有のピークとして知られる 1650cm^{-1} のものである可能性と同時に、水の 1670cm^{-1} 、または CaHPO_4 の 1640cm^{-1} のピークである可能性もあり、はっきりとした帰属を行うことができなかった⁵⁵⁾。以上の結果と EPMA による元素分析の結果を併せて考えると、歯の中に濃集されたリンは PO_4 の化学形で存在すること、また歯の構成物質は EPMA では検出されなかった水を含んでいること、などが明らかとなった。IR スペクトルの測定を行う前には、EPMA の 2 次元元素マッピングで示されたヒザラガイの歯の背面を構成する Ca-P をマトリクスとする物質は、その組成からヒトの歯と同じように hydroxyapatite $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})$ に近い成分ではないかと推測をしていた。しかし、通常の hydroxyapatite の IR スペクトルに見られる 3590cm^{-1} の OH bond の伸縮振動、 630cm^{-1} の OH bond の変角振動に相当するピークが、このヒザラガイの歯のスペクトルには見られない。よって、Ca-P の濃集部は hydroxyapatite のように OH を含む鉱物とは異なった形態のリン酸塩で形成されていることも明らかとなった。

一方、このバルクで測定を行ったヒザラガイの歯の IR スペクトル上には鉄化合物に帰属されるピークはほとんど現れておらず、従ってここから鉄化合物中に存在する陰イオン種を推定するのは困難であった。これは鉄化合物の吸収よりも PO_4 や H_2O の赤外吸収の方がはるかに大きいことが原因であり、鉄化合物の知見のみを得るためにはリン酸塩の影響を受けないように選択的に鉄濃集部のみを採取し測定する必要があると判断した。しかし、歯を乳鉢で粉碎した際には Ca-P 濃集部と Fe 濃集部は接合したまま分割されてゆくので、物理的に鉄濃集部のみを選択・採取することは困難であった。そこで次に顕微赤外分光装置を用いて試料上で入射ビームを $20\mu\text{m}\phi$ に絞り、試料は非破壊のまま空間的に試料中の Ca-P 濃集部と Fe 濃集部を選択することで、各部の独立したスペクトルを測定することを試みた。

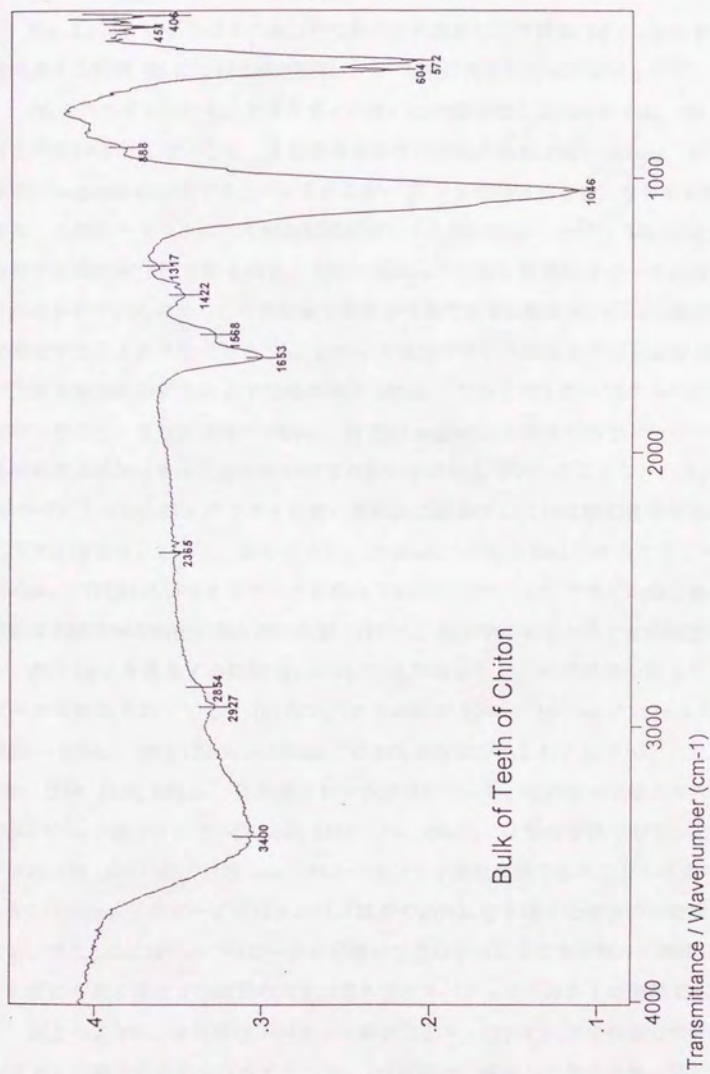


Fig. 3.7 ヒザラガイの歯のIRスペクトル(バルク測定)

3.3.2 顕微赤外分光法による分析

Fig. 3.8 に、ヒザラガイの歯の中で鉄のみが濃集した摂餌面 (a) と Ca・P をマトリクスとする背面 (b) について赤外吸収スペクトルの測定を行った結果を示す。

(a) のスペクトルから、ヒザラガイの歯の鉄の濃集部には PO_4 や H_2O , OH のような化学種は存在しないこと、また強度は小さいが低波数側 $850 \sim 950\text{cm}^{-1}$ 付近にわずかに magnetite に起因すると考えられるピーク⁸⁴⁾ が存在すること、などがわかった。また、このスペクトルには有機物起源のピークも現れなかった⁸⁵⁾。試料が金属の酸化物や酸化水酸化物である場合、 $400 \sim 500\text{cm}^{-1}$ 付近に特徴的なピークが現れることが知られているので、この領域まで測定が可能である装置を用いれば、鉄の化学形を推定することが可能である⁸⁴⁾。しかし本研究で用いた顕微赤外分光装置では、その光源と検出器の特性により低波数側は 650cm^{-1} 付近までしかスペクトルが得られなかったこと、さらに $850 \sim 950\text{cm}^{-1}$ 付近の magnetite と考えられるピークについても微細構造がはっきりしないため同定の決め手にならなかったことなどから、結局、IR スペクトルからはヒザラガイの歯の摂餌面に濃集されている鉄の化学形を決定するまでには至らなかった。少なくとも、 3500cm^{-1} 付近の H_2O に相当するピークや、 3590cm^{-1} の OH に相当するピークが現れていないので、ヒザラガイの歯に濃集された鉄は水酸化物や酸化水酸化物の状態ではなく、酸化物の形をとることが推測された。

次に Ca・P を濃集する背面 (b) について見てみると、バルク測定の時より明瞭にピークが検出されている。(b) のスペクトルには $3750 \sim 2000\text{cm}^{-1}$ に H_2O の吸収、 $1100 \sim 950\text{cm}^{-1}$ および $600 \sim 550\text{cm}^{-1}$ に PO_4 の吸収が見られる他にも、 1650 , 1570 , 1420 , 1380 , 1320 , 880cm^{-1} に明瞭なピークが現れている。生体試料で検出されることの多いシュウ酸カルシウムは 1640 , 1380 , 1320 , 790cm^{-1} に吸収を持つので、上記のピークのうち 1650 , 1380 , 1320cm^{-1} の3つはシュウ酸塩起源であることも考えられた。しかし 1640cm^{-1} のピークにはタンパク質や CaHPO_4 など様々な帰属の可能性があること、また 1420 , 880cm^{-1} のピークの帰属ができなかったことなど種々の理由により、この歯の背面を構成する物質の同定は赤外吸収スペクトルのみからは困難であった。

以上のように、赤外吸収スペクトル測定により、(1) Ca・P を濃集した背面でリンは PO_4 の様な化学形で存在すること、(2) 摂餌面に濃集した鉄は水酸化物や酸化水酸化物の様な状態ではないこと、が明らかとなった。

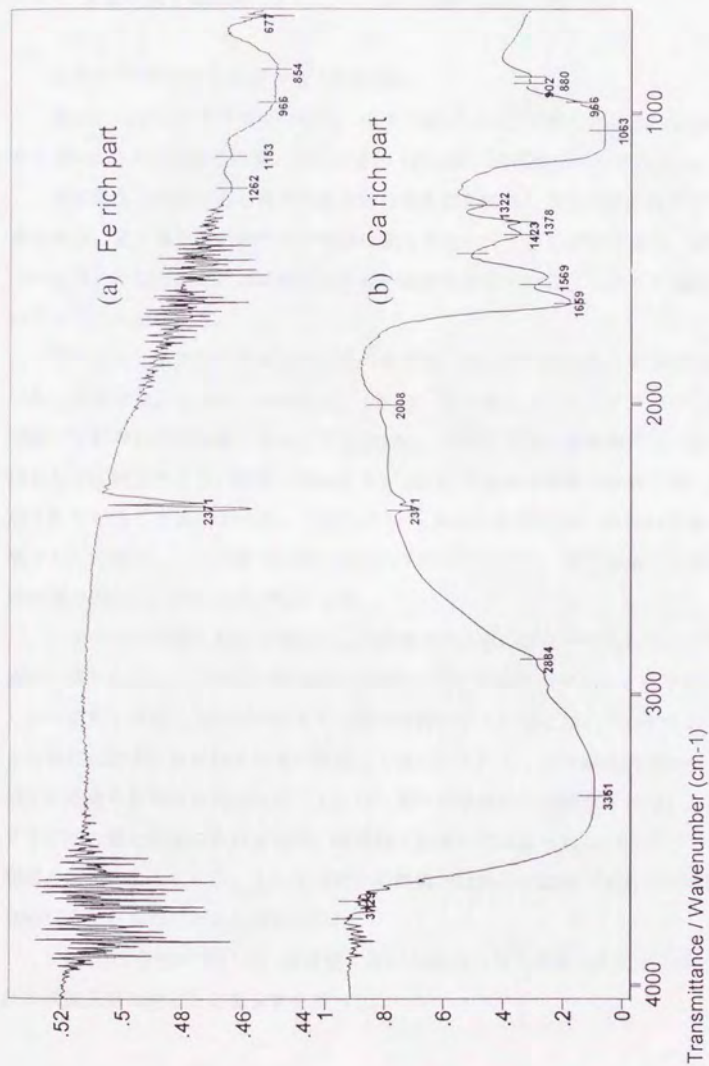


Fig. 3.8 顕微赤外分光法によるヒザラガイの歯のIRスペクトル
(a) 鉄の濃集部 (b) カルシウムの濃集部

3.4 走査型電子顕微鏡によるヒザラガイの歯の表面の元素分析

3.4.1 ヒザラガイの歯の電子顕微鏡像

Photo. 3.2 にヒザラガイの褐色、灰色の歯について撮影した SEM 像と組成像を、また Photo. 3.3 には赤色の歯と黒色の歯の SEM 像と組成像をそれぞれ示す。

まず最も未成熟である褐色の歯を含む歯舌囊を観察したその組成像を見てみると、歯の表面に電子線の反射率の高い部分は全く見られず、歯の表面全体が、歯を固定するのに用いた接着剤とほぼ同様の電子線の反射率を示す物質、つまり有機物で形成されていることがわかる。

それに対して次の成熟段階の灰色の歯では、歯の中央部にある細長い突起の部分で高い反射率を示す物質 (Photo. 3.2, (d)-A)、歯の縁に添って三日月状に分布するやや低い反射率を示す物質 (Photo. 3.2, (d)-B)、さらに下部の基底膜に近い方に広がるほとんど反射を示さない物質 (Photo. 3.2, (d)-C) の合計 3 種類の物質で歯の表面が構成されていることがわかった。これらのうち A の反射率の高い物質の分布は歯の成熟とともに増大し、赤い歯では歯の表面の 7 割近くになり、黒色の歯に至るとほぼ全面を覆い尽くすことが分かる (Photo. 3.3)。

ヒザラガイの歯において着色および成熟に伴う色の変化が見られるのは歯の背中側の一部であり、この部分の構成成分が変色に伴い変化してゆくことを予想していた。しかし、最も成熟した黒色の歯とその前の段階の赤色の歯について比較を行うと両者とも着色部の表面は反射率の高い物質 A で覆われていて、光学顕微鏡でははっきりと観察できる歯の表面の模様 (Photo. 1.3) は、電子顕微鏡的には観察されない。よってヒザラガイの歯の表面の色の变化は、組成像では量の差が見られないほどのごく微量な物質の変化によるものか、もしくは電子顕微鏡では検出が困難である有機物起源の着色物質によるものであると推測された。

次に EDS 分析を用いて、組成像で違いが認められた物質 A,B,C についてそれぞれの構成元素の同定と定量分析を行った。

SEM 像



組成像



Photo 3.2 走査型電子顕微鏡によるヒザラガイの菌の SEM 像と組成像 (a)(b) 褐色の菌、(c)(d) 灰色の菌

SEM 像



組成像



Photo 3.3 走査型電子顕微鏡によるヒザラガイの菌の SEM 像と組成像 (a)(b) 赤色の菌、(c)(d) 黒色の菌

3.4.2 歯の表面の元素分析

Fig. 3.9 に歯の表面に存在する元素について EDS を用いて分析した結果を示す。

まず、歯舌囊の表面を覆っていた物質は Fe, Ca, P, Mg といった EPMA で検出された主要元素はもとより、Al, K, S など通常生体に多く存在する元素も一切検出されなかった。よって、この物質の構成成分は有機物であることが確認された。

次に灰色の歯の表面について調べてみたところ、Photo 3.2 (d) に見られた最も反射率の高い A の部分からは Fe のみが検出され、やや低い反射率の B の部分は Ca, P が多くわずかに Fe が含まれているような物質、さらに反射率の低い部分 C は歯舌囊と同様に有機物から成り立つことが明らかとなった。また定量分析の結果として、A の部分が最も検出効率が高く、検出された元素の含有量の和が 60 ~ 70% であるのに対して、B では 40 ~ 50%、C では 5% 以下になっている。このように含有元素量の和が 100% にならない理由としては、分析試料であるヒザラガイの歯の表面が湾曲しているので平滑な Co の表面を基準にエネルギー更正をした EDS での検出はおのずと不正確なものになっている可能性と、EDS で検出が困難である水や有機物などが混在している可能性の、2つが考えられた。

また、同様の元素分析を赤色、黒色の歯についても行ってみたところ、反射率の高い部分は両方の歯とも灰色の歯の A と同様の定量値を示した。よって、歯の成熟に伴う歯の表面の構成材料の質的な変化はほとんどなく、Fe を主成分とする物質がその量のみを増し歯の表面を覆ってゆくという興味深い結果を得た。

これらの結果から、組成像の観察で違いが現れたヒザラガイの歯の表面の構成物質は EDS の分析からもその組成の違いが明らかとなり、1点1点電子ビームを照射し、極微小な領域に関して元素分析を行う EDS と対照的に、広範な領域の様々な材料の分布を試料の形状と 1 : 1 対応した形で観察できる 2 次元組成像による観察がヒザラガイの歯の状態を知る上で有力であることがわかった。

以上 SEM/EDS 分析により、(1) ヒザラガイの歯の表面には組成の異なる 3 種類の物質が存在し、(2) その中で最も鉄の含有量の高い物質が、歯の成熟とともに歯の表面を覆っていくこと、などが明らかとなった。



Fig. 3.9 SEM/EDSによるヒザラガイの歯の表面の元素分析

3.5 Mössbauer 分光法によるヒザラガイの歯に含まれる鉄の状態分析

3.5.1 室温で測定したヒザラガイの歯と標準試料の Mössbauer スペクトル

ヒザラガイの歯の中に含まれる鉄が、歯の成熟に従い、また歯の色調が変化してゆくに従いどのような状態で存在するのかを調べるために、まず 70 個体分の歯舌を Fig. 2 に示したように褐色、灰色、赤色、黒色の成熟度の異なる部分に分離した試料を用いて、室温と液体窒素温度での Mössbauer 測定を試みた。しかし、歯舌嚢を含む褐色な歯では鉄の含有量が低く、70 個体分を使用してもなお Mössbauer 測定の検出限界以下であった。そこで、褐色の歯を除いた灰色、赤色、黒色の歯について、スペクトルデータを得た。同時にヒザラガイの歯と比較を行うため、非生物系で生成した磁鉄鉱として、市販の試薬である Fe_3O_4 (以下 Fe_3O_4 reagent と表記) と天然鉱物の magnetite (以下 magnetite mineral と表記) のスペクトルも測定した。Fig. 3.10 に、室温で測定し得られたヒザラガイの灰色・赤色・黒色の歯と Fe_3O_4 reagent, magnetite mineral の Mössbauer スペクトルを、Table 3.1 にこれらのスペクトルに対し最小自乗フィッティングによる解析から得られた Mössbauer パラメーターを示す。

逆スピネル構造を持つ magnetite [$\text{Fe}^{2+}\text{Fe}^{3+}_2\text{O}_4$] の中には、六配位の Fe^{2+} 、六配位の Fe^{3+} 、四配位の Fe^{3+} と、環境の異なる鉄のサイトが 3 種類あり、本来ならばこれらを反映した 3 つのピークが独立して Mössbauer スペクトル上に現れてくる。ところが実際には、これらのうち六配位の Fe^{2+} と六配位の Fe^{3+} の間で電子ホッピングが起こり、Mössbauer 測定の時間分解能ではこの瞬間瞬間に交換する Fe^{2+} と Fe^{3+} の環境を区別することができず、両者からのピークは平均化され 1 つのピークとなって現れてしまうことが知られている。そのため本来は 3 組現れるはずの sextet は 2 組しか現れず、理想組成を持つ magnetite で、四配位の Fe^{3+} に起因するピーク (Isomer shift 0.32mm/s) の相対強度を 1 とすると六配位の鉄のサイト (Isomer shift 0.63mm/s) はその 2 倍の相対強度のピークとして出現する。

標準試料の Fe_3O_4 reagent と magnetite mineral のスペクトルにはいずれも 2 組の sextet が現れているが (Fig. 3.10)、それぞれのスペクトルにおいて sextet の相対強度が異なっており、magnetite mineral ではほぼ理想組成の四配位サイト 33% : 六配位サイト 66% になっている一方、 Fe_3O_4 reagent では両者の相対量が逆転し四配位サイ

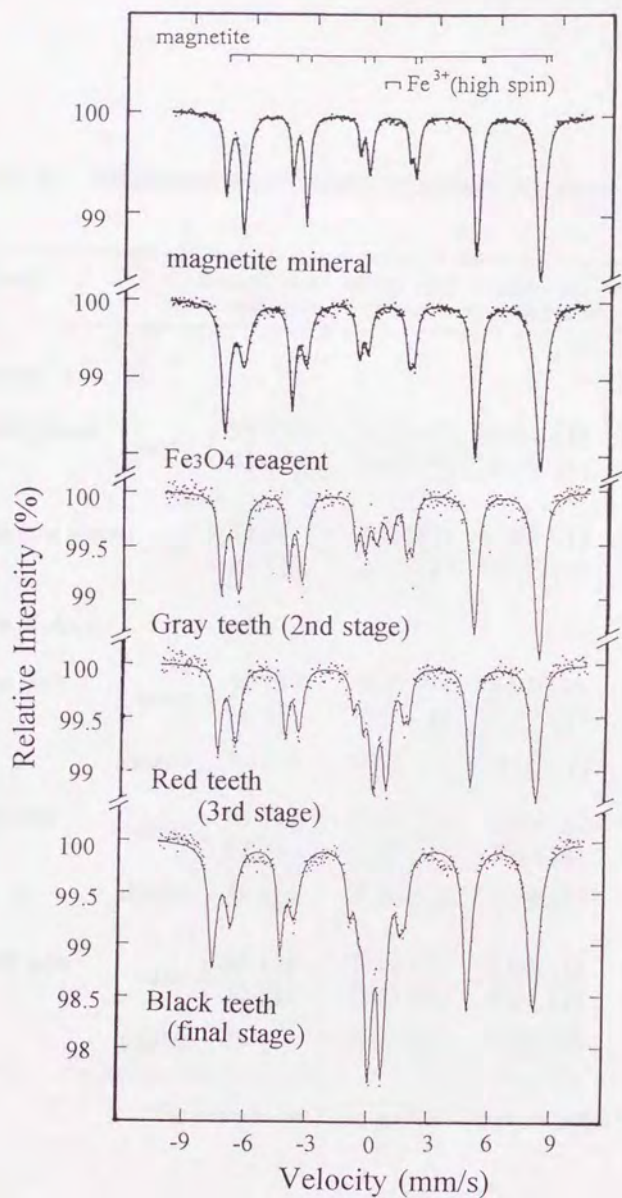


Fig. 3.10 標準試料とヒザラガイの灰色、赤色、黒色の歯の室温での Mössbauer スペクトル

Table 3.1 標準試料とヒザラガイの歯の Mössbauer パラメーター (室温)

Sample	Relative peak area (%)	Isomer shift (mm/s)	Quadrupole splitting (mm/s)	Internal magnetic field (kOe)	
<i>Standard</i>					
Fe ₃ O ₄ reagent	sextet {	59 (1)	0.30 (1)	-0.04 (1)	488 (1)
		41 (1)	0.67 (1)	0.02 (1)	452 (1)
Magnetite mineral	sextet {	34 (1)	0.32 (1)	-0.06 (1)	488 (1)
		66 (1)	0.63 (1)	0.03 (1)	455 (1)
<i>Teeth of chiton</i>					
Gray teeth	sextet {	34 (1)	0.32 (1)	-0.05 (1)	486 (1)
		56 (1)	0.61 (1)	0.03 (1)	454 (1)
	doublet	10 (1)	0.37 (1)	0.68 (2)	-
Red teeth	sextet {	33 (1)	0.32 (1)	0.04 (1)	489 (1)
		42 (1)	0.63 (1)	0.03 (1)	456 (1)
	doublet	25 (1)	0.38 (1)	0.64 (1)	-
Black teeth	sextet {	35 (1)	0.31 (1)	0.02 (1)	490 (1)
		37 (1)	0.62 (1)	0.02 (2)	455 (1)
	doublet	29 (1)	0.39 (1)	0.66 (1)	-

*The errors in the least significant figure are given in parentheses.

ト 55% : 六配位サイト 45% になっている (Table 3.1)。また Isomer shift や Quadrupole splitting などの解析値も両者の間で食い違いがある。これらの試料はいずれも X 線回折測定より magnetite に相当する結晶構造を持つことが確認されているので、この様に Mössbauer 分光法より Fe_3O_4 reagent と magnetite mineral の間で結晶サイトの占有率に差があることが示されたことは、非常に興味深い事象である。おそらく天然鉱物と異なり人工合成された高純度試薬の Fe_3O_4 reagent では、その生成過程で不純物を除くためいくつかの工程が取られていて、その影響で試薬の一部が六配位サイトに欠陥が多い結晶構造を有する物質に変化したのではないかと推測される。以上のように、粉末 X 線回折では magnetite と同定されたこの試薬も、Mössbauer 解析により天然の magnetite とは状態が大きく異なることが明らかとなった。

次いでヒザラガイの歯の Mössbauer スペクトルを見てみる。ヒザラガイの 3 種類の歯のスペクトルにはすべて magnetite に相当する 2 組の sextet とその他に常磁性 3 価の high spin の鉄に相当する doublet (スペクトル中央付近) が現れた。各色の歯の 2 組の sextet の Isomer shift や Quadrupole splitting は誤差の範囲内で magnetite mineral のものと一致しており、粉末 X 線回折の結果からも明らかであるように、ヒザラガイの歯に存在する主要な鉄化合物は結晶質の magnetite であることが確認できた。同時に doublet の成分は X 線回折では検出されない非晶質物質であることが推察された。

興味深いことに、灰色から赤色、黒色と歯の成熟度が上がるにつれて、doublet のピークの相対強度が 10%、25%、30% と著しく増加する一方、magnetite のピークの相対強度は 90%、75%、70% と減少していく傾向が見られた。この doublet を示す鉄の成分に関して、室温で doublet のピークを示す lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$) や水酸化鉄などとのスペクトルの比較を行ったが、本研究で用いた無機塩の標準試料の中にはこの doublet と合致するものはなかった。最終的にはこのピークの帰属は、後述の低温実験によってなされた。また実験当初はヒザラガイの歯の成熟に伴い硬度の高い magnetite の結晶が相対的に増加してゆくことが予想されていたので、この非晶質の doublet の成分が成熟と共に増加するという知見は予想に反して非常に興味深かった。

この様に歯の成熟に伴い magnetite の相対量が減少することが明らかとなったが、本研究では一個の歯に含まれる全鉄量を定量していないので、果たして magnetite の絶対量が成熟に従い減少するか否かについては断定することができない。しかし

EPMA での 2 次元元素分析から、歯に含まれる鉄のピーク強度、すなわち微小面積当たりの鉄の密度はどの成熟度の歯でもほぼ一定であるのに対し、鉄の濃集する摂餌面の厚みが歯の成熟に従い大きくなっていくことを経験的に捉えている (Fig. 3.2, 3.3)。また SEM/EDS 分析でも、歯の成熟に伴い鉄含有量の多い物質 (物質 A) が歯の表面を徐々に覆ってゆく傾向が観察された (Photo. 3.2, 3.3)。これらを総合すると、ヒザラガイの歯が成熟してゆく過程で鉄を主成分とする物質の体積が増大することが推測され、これより、magnetite の絶対量もまた歯の成熟に伴い増加すると考えた。

最後に各成熟度の歯の中に存在する magnetite の 2 組の sextet の相対強度を比較してみる。いずれの歯でも Isomer shift 0.32mm/s を示す四配位の Fe^{3+} のサイトに相当するピーク強度は約 34% で変動がないのに対し、Isomer shift 0.63mm/s を示す六配位のサイトの強度は歯の成熟につれて 56, 42, 37% と減少している (Table 3.1)。つまり、magnetite の結晶の中で六配位のサイトから鉄が減少していることを意味する。この六配位サイトの減少と doublet のピーク強度の増加が非常によく対応していることから、この両者の間に何らかの関係があることが示唆された。そこで、ヒザラガイの歯の中の magnetite 生成において Key material になると考えられる doublet の成分を調べるために、次に最も doublet の存在量の大きな黒色の歯について液体窒素温度での Mössbauer 測定を試みた。

3.5.2 液体窒素温度でのヒザラガイの歯と ferritin の Mössbauer スペクトル

ヒザラガイの黒色の歯と同時に、標準試料として、生体の鉄貯蔵タンパクとして知られている ferritin の Mössbauer スペクトルも測定した。液体窒素温度で測定を行ったヒザラガイの黒色の歯と ferritin のスペクトルを Fig. 3.11 に、また解析により得られた Mössbauer パラメーターを Table 3.2 に示す。

Fig. 3.11 においてヒザラガイの歯のスペクトルには、広い線幅を持つ sextet が一組と、大きな強度を持った doublet が一組現れている。もし室温のスペクトルに現れた doublet が lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$) によるものならば、液体窒素温度では sextet に分裂を起こすことが予想されていた。しかし液体窒素温度での測定でもこの成分は doublet のまま現れたので、この doublet の成分は lepidocrocite 構造の物質ではないことがここからも示された。

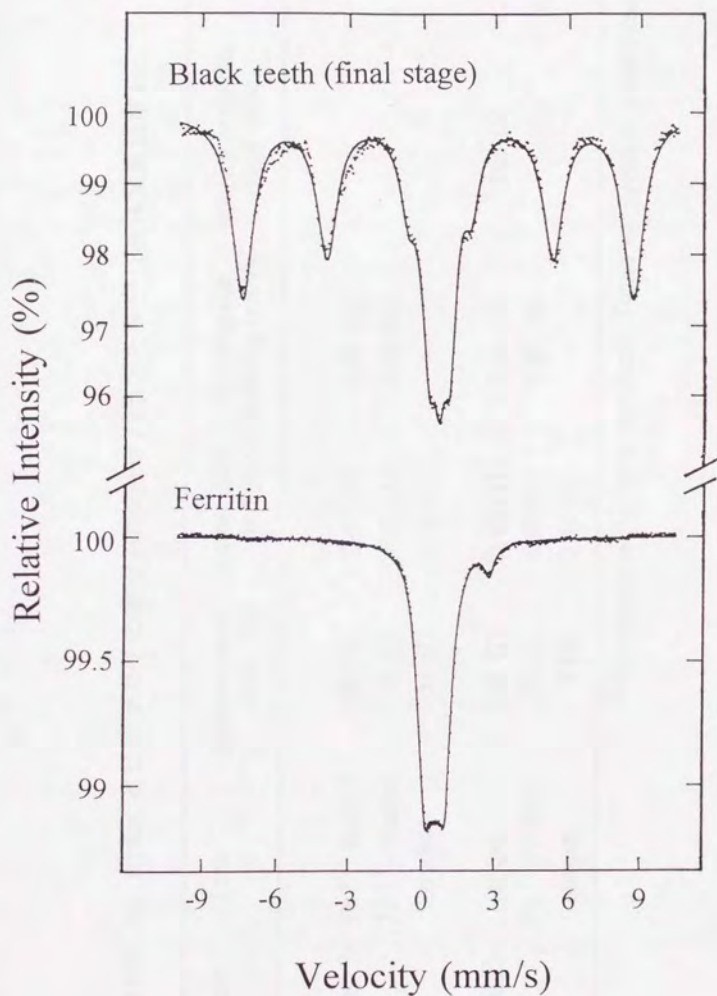


Fig. 3.11 ferritin とヒザラガイの黒色の歯の
液体窒素温度での Mössbauer スペクトル

Table 3.2 ferritin とヒザラガイの歯の Mössbauer パラメーター (液体窒素温度)

Sample	Peak	Relative peak area (%)	Isomer shift (mm/s)	Quadrupole splitting (mm/s)	Internal magnetic field (kOe)
Ferritin	Fe ³⁺ doublet	61 (1)	0.48 (1)	0.88 (1)	-
	Fe ²⁺ doublet	8 (1)	1.25 (1)	3.00 (1)	-
	singlet	31 (1)	0.49 (1)	-	-
Black teeth	sextet	67 (2)	0.48 (1)	0.06 (2)	508 (1)
	Fe ³⁺ doublet	25 (2)	0.49 (1)	0.89 (2)	-
	singlet	7 (2)	0.49 (1)	-	-

*The errors in the least significant figure are given in parentheses.

また室温では2組の sextet に分離して現れる magnetite のスペクトルは低温では両者が重なり線幅の広い sextet になることが知られていることから、ヒザラガイの歯のスペクトルに現れた sextet は magnetite のものに間違いないことが確認できた。

これに対し、水溶性鉄貯蔵タンパクである ferritin の Mössbauer スペクトルには、0mm/s 付近に Fe^{3+} 化合物と考えられる1組の doublet が強く現れるほか、強度が小さく分裂幅が広い Fe^{2+} の doublet が 0 と 3mm/s 付近に1組、さらに Fe^{3+} の doublet の中央部分に重なって現れている singlet が1本の、計3種類の状態の鉄のピークが検出された。ferritin のような生体物質中に含まれる鉄の状態が均一でないことは十分に考えられることであるが、これら3種類の鉄の状態がそれぞれどの様なものであるのかについては現在のところ確定できていない。このうち最も強度が大きい Fe^{3+} の doublet とこれに重なる singlet は、スペクトルの形状と Mössbauer パラメーターの双方が誤差の範囲内でヒザラガイの歯のスペクトルの doublet + singlet と一致した。よって、ヒザラガイの歯の中に存在する doublet の鉄の成分は、ferritin そのものかまたは ferritin と存在状態が類似した鉄化合物であることが推察された。

さて、ferritin は鉄貯蔵タンパクと呼ばれているが、実際にはどのような物質で生体内においてどのような役割を担っているのか、ここで一般的なことについて触れておく。鉄は生体にとって必須元素であり、生命を維持するのになくてはならない元素であるが、もし過剰に生体内に取り込まれた場合には、鉄の毒性という問題が持ち上がってくる。例えば、アフリカのある地域で料理や醸造に鉄の容器を使用するところがあるが、そこでは体の中に鉄が沈着されてしまう鉄沈着症という病気がみられる。この鉄沈着症の直接の原因は、ヒトの体に鉄の排泄機構がないことにある。妊娠や月経のように鉄分の排出が行われる女性については例外として、いったん人体に入った鉄分は排出されることがなく蓄積される一方であることは以外に知られていない事実である。ヒトは成長期までに体に取り込んだ鉄をリサイクルすることで生命活動を維持できるので、成人の食生活において摂取する過剰な鉄分はむしろ体に悪影響を及ぼす。しかし食物から鉄分を除去することが困難であるので、人体は蓄積する一方の鉄の毒性を緩和する対抗手段を執らねばならない。そこで大抵の生物では、元素を吸収する際に選択的に生体に対して親和性の高い化学形のもののみを吸収したり、また吸収後に毒性の低い化学形に変換すること（無毒化作用）を行っている。

ヒトの場合、小腸で吸収される鉄は Fe^{2+} が一般的で、しかもヘム鉄の状態の方が非ヘム鉄の 5～10 倍も吸収されることが知られている⁸⁶⁾。前者の 2 価の鉄が優先的に吸収される現象については、これまでは特別な生理学的機構によるものであると考えられてきたが、現在では単なる $\text{Fe}(\text{OH})_2$ と $\text{Fe}(\text{OH})_3$ の溶解度の違いが影響を与えているということで生物学者の意見が一致しているようである。後者についてはまさに小腸を構成する細胞で吸収元素の化学形による選択が行われている例であり、鉄を効率よく摂取するためにはヘモグロビン、ミオグロビン、シトクロームが多く含まれている(栄養価の高い)肉類が有効であることを証明している。

こうして吸収された鉄は、生体への毒性の少ないトランスフェリンやヘモグロビンのような錯体の形に変換され一時期保持されるが、これだけでは蓄積される一方の鉄を処理しきれない。そこで高等動物では、もっと簡単に効率の良い ferritin の形で蓄えるように進化していると言われている。Fig. 3.12 に ferritin の概念図を示す。

ferritin とは分子量約 444000、外径 120Å、内径 70Å の巨大球状タンパクである。この水溶性鉄貯蔵タンパクは、 $(\text{FeOOH})_8\text{FeOOPO}_3\text{H}_2$ の化学組成を持つ無機コアを 24 個のサブユニットが包み、1 分子あたり最高 4700 の鉄分子を貯蔵している。この無機コアは、一種の水酸化鉄ミセルと見なすことができる。またこの鉄ミセルを指して ferritin と呼ぶこともある。鉄ミセルの周りのタンパク質を含んだ覆いをアポフェリチンと呼んでいる。完成した ferritin 粒子は鉄の供給源ともなることができ、生体系にあるキレートはここから鉄を受け取り、鉄を必要とする場所に運ぶことができる。つまり ferritin とは、生体に障害を及ぼす過剰の無機鉄をタンパク質で包み、無毒化する一方、必要なときにはすぐに使用できる形で無機鉄を高密度に貯蔵する、高機能分子であると考えられる。この ferritin は動物、植物、細菌にわたり広く分布している。本研究で用いた ferritin は市販品であるが、ウマから採取されたものである。

さて、ここでヒザラガイの歯の形成に話を戻す。ヒザラガイの歯のように高濃度に鉄を蓄積し歯を形成するためには、積極的に歯の形成箇所である歯舌囊付近や歯を覆っている膜の部分に鉄を運搬しなければならない。この目的に上記のような特性を持つ ferritin を利用することは、自然であると考えられる。しかしヒザラガイの歯の Mössbauer スペクトルに現れた doublet の成分が ferritin であると仮定すると、無機質であるヒザラガイの歯の中に相対量にして 30% もの ferritin がどこにどのように存在

するかが問題である。ferritin はアポフェリチンの覆いをまとっているのでかさ高く、全体として相当量の体積が歯の中に存在しないと ferritin 起源の鉄は 30% に至らないと思われる。これが doublet の成分を ferritin と断定せず ferritin 様物質と換言した論拠である。これまでの分析では、doublet 成分の正体を確定するのに十分な情報が得られていないが、少なくともこの ferritin という鉄貯蔵タンパク質がヒザラガイの歯にみられる鉄の濃集現象に何らかの関与をしているという示唆を得られた点が、一つの大きな成果である。将来的に、ヒザラガイの歯舌を構成する有機物や歯舌周辺に存在する有機物にも焦点を当て、ヒザラガイの体内に ferritin のような鉄を選択的に貯蔵する物質がどの程度存在するのか、研究を進めてゆきたいと思う。

以上 Mössbauer 分光法による分析結果をまとめると、次のようになる。

- (1) ヒザラガイの灰色・赤色・黒色の歯のスペクトルにはすべて magnetite に相当する 2 組の sextet と常磁性 3 価の high spin の鉄に相当する doublet が見られた。
- (2) 歯の成熟度が、灰色から赤色、黒色と上がるにつれて、3 価の high spin の鉄による doublet のピークの相対強度が 10%、25%、30% と著しく増加し、magnetite のピークの相対強度は 90%、75%、70% と減少する傾向が見られた。
- (3) doublet を示す常磁性 3 価の high spin の鉄化合物は X 線的に非晶質で、鉄貯蔵タンパクの ferritin に類似した物質であることが推察された。

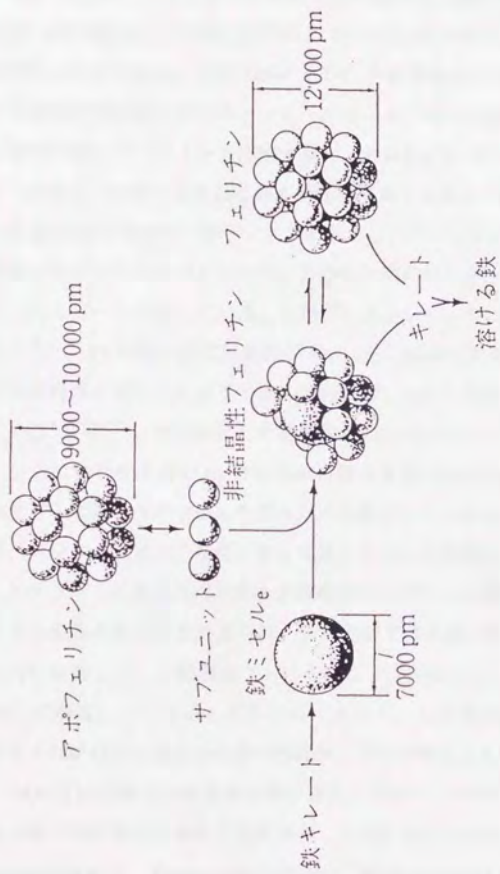


Fig. 3.12 フェリチンの構成プロセスの概念図

タンパク質で構成されるサブユニットが ferritin の中心を形成する鉄ミセルを取り囲み、ferritin を形成する。また生体内のキレートにより、鉄ミセルから鉄が放出される様子も示されている。
 (出典： T. G. Spiro and P. Saltman, *Struct. Bonding* 6, 116 (1969))

3.6 XAFS 法によるヒザラガイの歯に含まれる鉄の状態分析

3.6.1 標準試料とヒザラガイの歯の XANES スペクトルの比較

Fig. 3.13 は、ヒザラガイの全長 2cm の歯舌を、成熟した歯を持つ口側と未成熟な歯を持つ歯舌裏側に 2 分割した試料と、鉄を含む標準試料の Fe K-XANES スペクトルを比較したものである。また Table 3.3 に、各標準試料の XANES スペクトルの特徴を表す X 線吸収端位置とプレエッジピークのエネルギー位置、強度をそれぞれまとめた。

標準試料のスペクトルを比較すると、金属鉄から Fe_3O_4 [$\text{Fe}^{+2}\text{Fe}^{+3}_2\text{O}_4$]、 Fe_2O_3 [$\text{Fe}^{+3}_2\text{O}_3$] と、試料に含まれる鉄の酸化数が高くなるにつれて、X 線吸収端のエネルギー位置が高エネルギー側へシフトすること（ケミカルシフト）が観察される。また金属鉄以外すべてのスペクトルで、X 線吸収端の低エネルギー側にプレエッジピークと呼ばれるピークが現れている。このプレエッジピークは $1s \rightarrow 3d$ 遷移に伴う吸収に相当し⁸⁷⁾、Fe 周囲の配位対称性が Oh （正八面体）であると双極子禁制であるが、配位対称性が 4 配位へと低下するに従い許容となり、その強度が増大することが知られている⁸⁸⁻⁹⁰⁾²⁾。今回測定した標準試料のスペクトルでも、非晶質の $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 沈殿や、さらに対称性の高い O_h 対称の配位構造を持つ水和錯体 [$\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6$]³⁺よりも、4 配位サイトに鉄を含む Fe_3O_4 や歪んだ八面体サイトに鉄を含む Fe_2O_3 のスペクトルの方が、プレエッジピーク強度が著しく高くなることが認められた。

ヒザラガイの歯舌の成熟部と未成熟部のスペクトル間では、X 線吸収端位置とスペクトル全体の形状に差が見られ、未成熟部では 3 価の鉄の化合物 FeOOH と似通っているのに対して、成熟部はプレエッジピークが高く、二価の鉄を含む magnetite (Fe_3O_4) に類似していることがわかる。よって、この XANES スペクトルからも、ヒザラガイの歯の中に含まれる鉄の状態が、その成熟により変化することが確認された。

FeOOH には様々な結晶形の相が存在するので、ヒザラガイの未成熟な歯舌に含まれる鉄の局所構造を推測するために、天然に産する代表的な FeOOH の鉱物として goethite ($\alpha\text{-FeOOH}$)、akaganeite ($\beta\text{-FeOOH}$)、lepidocrocite ($\gamma\text{-FeOOH}$) の 3 種類のスペクトルを測定し、ヒザラガイの歯の成熟部、未成熟部のスペクトルと Fig. 3.14 で比較した。3 つの FeOOH 鉱物のスペクトルは、吸収端のエネルギー位置は一致するものの、スペクトル全体の形状はその結晶構造の差を反映してそれぞれ異なっている。これ

らの中でヒザラガイの未成熟部のスペクトルの形状に最も類似したものは γ -FeOOHであったが、 γ -FeOOHでさえも、ヒザラガイの歯のスペクトルと完全には一致していないことがわかる。この原因は、Mössbauer解析により明らかになったように、ヒザラガイの歯にはMössbauerの検出限界の中で γ -FeOOH構造の化合物が存在しないこと、またmagnetiteとferritin様3価の鉄化合物の少なくとも2種類の鉄の化学種が混在していることにあると考えられる。

一般にX線吸収スペクトルには加成性が成り立ち、混合試料のスペクトルはすべての成分の和として現れてくる⁹²⁾。また、すでに述べたように、Fig. 3.13の標準試料のような単一成分のスペクトルでは、スペクトルのケミカルシフトは試料に含まれる鉄の酸化状態により変化し、そのスペクトルの形状は試料中の鉄の局所構造により変化する。ヒザラガイの歯のような不均質な天然の試料の場合には、後者のような真のケミカルシフトではなく、混在する各成分のX線吸収スペクトルが和になることにより現れた、見かけ上のケミカルシフトや見かけ上のスペクトルの形状の変化の可能性をまず第一に考える必要がある。よって、ヒザラガイの歯舌については、magnetiteの存在量の多い成熟部ではmagnetiteに類似したスペクトルの形状を示し、またmagnetiteよりもferritin様物質の存在量の方が多い未成熟部では、スペクトルの形状が3価の鉄の化合物である γ -FeOOHに類似していると、考えられた。

このようにXANESスペクトルの比較においても、ヒザラガイの歯の中に種類の異なる鉄化合物が混在していること、また成熟度によりその混在の比率が変化することなどが推察された。さらに歯の成熟過程でヒザラガイのXAFSスペクトルがどの様に変化するかを調べるため、Mössbauer測定と同様に、成熟度を反映する歯の呈色によって分類した試料のスペクトルについて次に比較する。

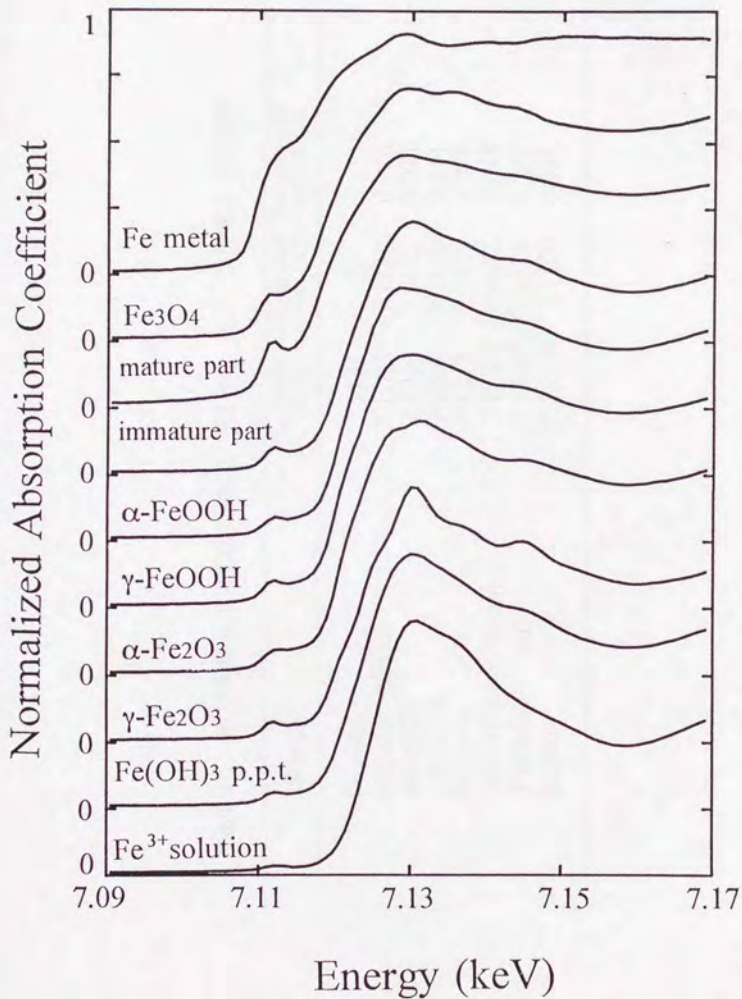


Fig. 3.13 標準試料とヒザラガイの歯舌の XANES スペクトル

Table 3.3 標準試料のX線吸収端位置、プレエッジピーク位置とその強度

Sample	Edge position (keV)	Pre-edge peak position (keV)	Pre-edge height at 7.112keV
Fe metal	7.1131	-	-
magnetite (Fe ₃ O ₄)	7.1188	7.1114	0.178
α-FeOOH	7.1214	7.1122	0.071
γ-FeOOH	7.1205	7.1118	0.111
Fe ₂ O ₃	7.1213	7.1120	0.074
Fe(OH) ₃ precipitation	7.1230	7.1122	0.048
[Fe(H ₂ O) ₆] ³⁺ aq.	7.1246	7.1125	0.022
ferritin	7.1215	7.1120	0.064

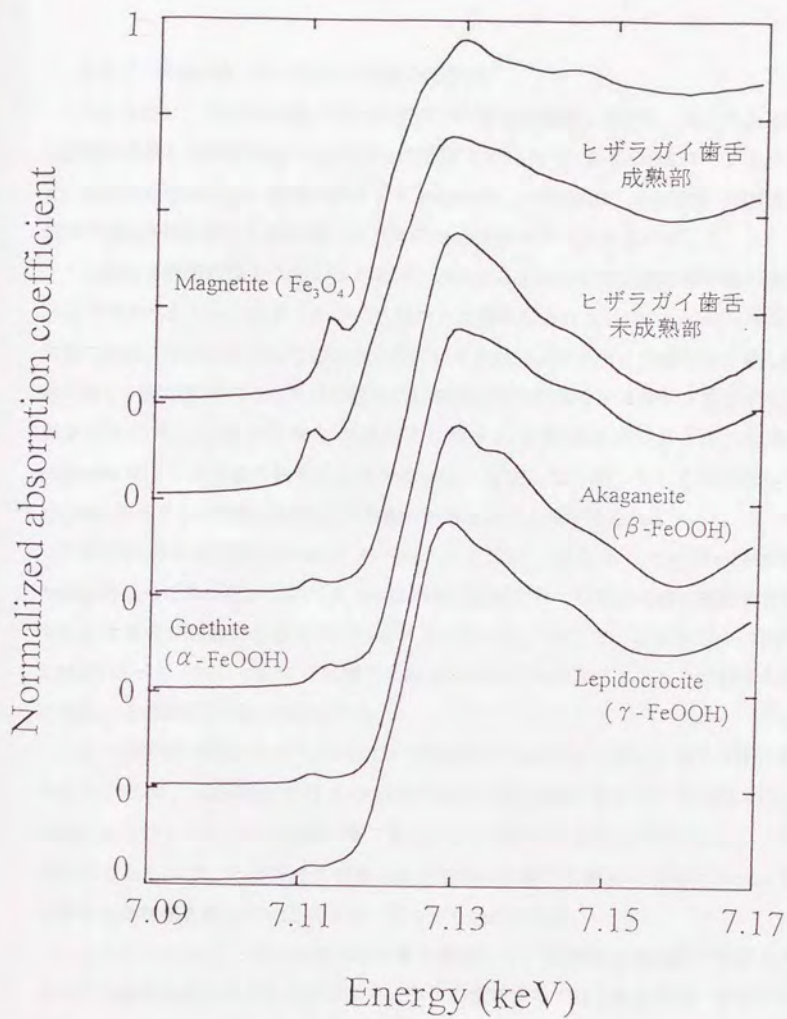


Fig. 3.14 magnetite, FeOOH 鉱物試料とヒザラガイの歯の XANES スペクトル

3.6.2 褐色の歯の中に存在する鉄の化学形

Fig. 3.15 に、光学顕微鏡下でヒザラガイの歯舌を観察しながら、その色を基準に4種類に分別した試料 (Fig. 2.1) に対して測定を行った Fe K-XANES スペクトルを示す。同時に比較のため、標準試料として magnetite、 γ -FeOOH、 $\text{Fe}(\text{OH})_3$ 、 $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 水溶液 ($[\text{Fe}(\text{H}_2\text{O})_6]^{3+}$) と鉄貯蔵タンパクの ferritin のスペクトルも示す。

これら4種類の歯のうち、はじめに、Mössbauer 分光法では鉄の含有量が検出限界以下でスペクトルを得ることができなかつた褐色の歯の XANES スペクトルについて見てみる。褐色の未成熟な歯に含まれている鉄は、ヒザラガイの歯の中で最も酸化数が高く、標準試料のうち3価の鉄を含む試料とほぼ同じケミカルシフトを示すことがまずわかる。これより褐色の歯の中に含まれる鉄はほとんど3価の状態で、magnetite のような2価の鉄を含む化合物が全く存在しないか、もしくは存在しても XANES スペクトルの検出限界以下の量であるという知見が得られた。

標準試料の中で褐色の歯のスペクトルと良い一致を示したのが γ -FeOOH と ferritin の2つであったが、スペクトルの形状の比較だけでは褐色の歯の構成物質がどちらにより近い状態であるのかははっきりしなかつた。そこで、これら3つの試料の XANES スペクトルについて1次微分を施し得られた微分スペクトルを比較する事を試みた。その結果を Fig. 3.16 に示す。

3つの試料の微分スペクトルにはいずれも 7.120keV と 7.123keV の2カ所に極大が見られるが、 γ -FeOOH では 7.120keV のほうが高い値になっているのに対して、ferritin およびヒザラガイの褐色の歯では両方ともほぼ同じ値になっている。この違いは明瞭であるので、ヒザラガイの歯の形成初期に沈着する鉄の化合物は ferritin の方に類似した状態を持っていることが、ここでも確認された。

このようにヒザラガイの未成熟な歯を構成している物質が ferritin に類似しているという確証が得られたものの、まだこれらの情報だけではこれらが同一物質であるとは断定できない。その大きな理由の1つが常温での試料の状態である。褐色のヒザラガイの歯は X 線的に非晶質ではあるが歯の形を形成している固体である一方、XAFS 測定に用いた ferritin は水溶液であり、液体の状態である。そこで、この褐色の歯の構成物質と ferritin 水溶液との物質としての類似点・相違点を捕らえるため、両者の EXAFS 解析を行い、試料に含まれる鉄の周りの局所構造を比較した。

Fig. 3.17に ferritin とヒザラガイの褐色の歯のX線吸収スペクトルから解析して抽出した EXAFS 関数に相当する $\chi(k)$ 曲線 (a) と、さらにフーリエ変換を施すことにより得た鉄周りの動径分布関数 (b) を示す。一般に、 $\chi(k)$ 曲線の振幅は鉄の周りの原子の配位数を、周期は原子間距離を反映するが、ferritin と褐色の歯の EXAFS 振動は振幅・周期・波の形状ともによく一致していることがわかる。唯一異なる部分は $k = 5.5 \text{ \AA}^{-1}$ 付近の波に現れているスプリットである。ferritin では曖昧になっているが、ヒザラガイの褐色の歯ではよく分離している。ここからヒザラガイの褐色の歯を構成する鉄化合物は、EXAFS 振動に明瞭に現れるほど第2配位圏の原子の寄与が大きいたことが推察される。一方、ferritin は鉄ミセルというコロイドの状態で鉄を保持している物質であるため、本来明瞭に現れるべき第2配位圏の影響が小さくなっていると考えられる。

ferritin の第2配位圏の影響の程度は、(b)の動径分布曲線に現れている 2.5 \AA 付近のピーク面積を比較するとよくわかる。Fe-Oに相当する 1 \AA 付近に現れているピーク強度は双方ほぼ同じであるのに対して、第2配位圏に相当する 2.5 \AA 付近のピークの相対面積は ferritin よりもヒザラガイの未成熟な歯の方が大きくなっている。これより、(1)鉄の周りの第1配位圏の局所構造は、褐色の歯と ferritin の間で結合距離・配位数・配位子の種類がともに類似するが、(2)第2配位圏に相当するやや長距離の環境については、ferritin はコロイドのように原子配列が乱れていて、第2配位圏に明確な原子の存在確率を示さない一方、ヒザラガイの褐色の歯の構成物質は、X線的には非晶質でありながらも、第2配位圏付近までは原子配列に秩序があるような短い距離のクラスターを形成している可能性のある物質であることがわかった。

さらに第1配位圏に相当するピークを逆フーリエ変換し、最小自乗カーブフィッティングにより構造パラメーターを算出してみたところ、両者とも鉄の周りに6個の酸素が 1.94 \AA の距離で存在するような局所構造を持つことがわかった。

以上の検討から、ヒザラガイの歯の形成初期に蓄積される鉄化合物は局所的には ferritin と類似する物質であるが、同一物質ではないという知見を得た。

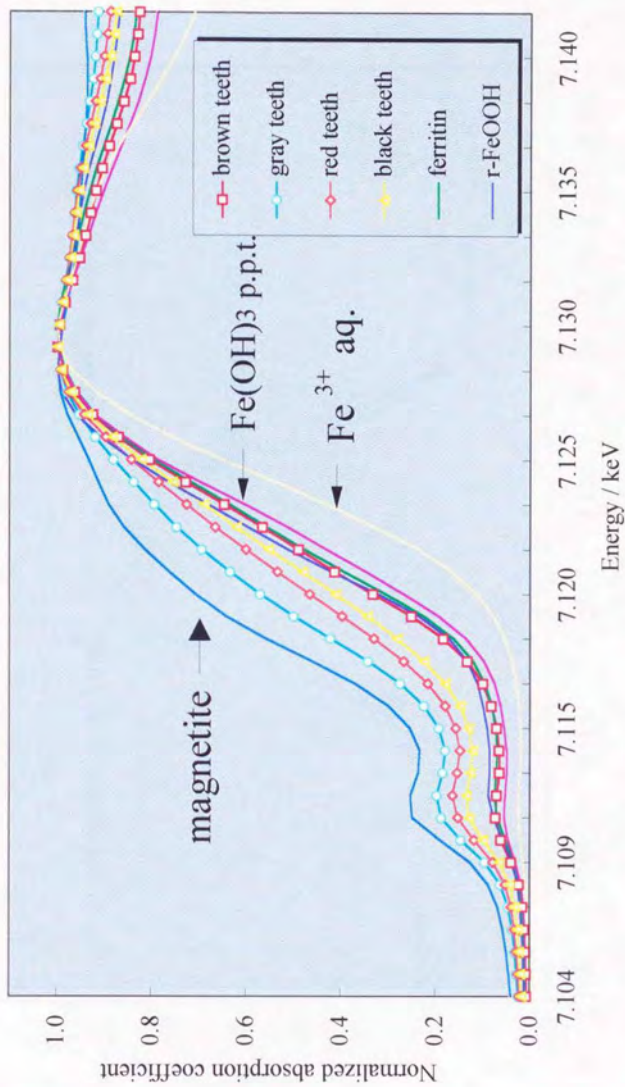


Fig. 3.15 色ごとに分類したヒザラガイの歯と標準試料のFe K-XANESスペクトル

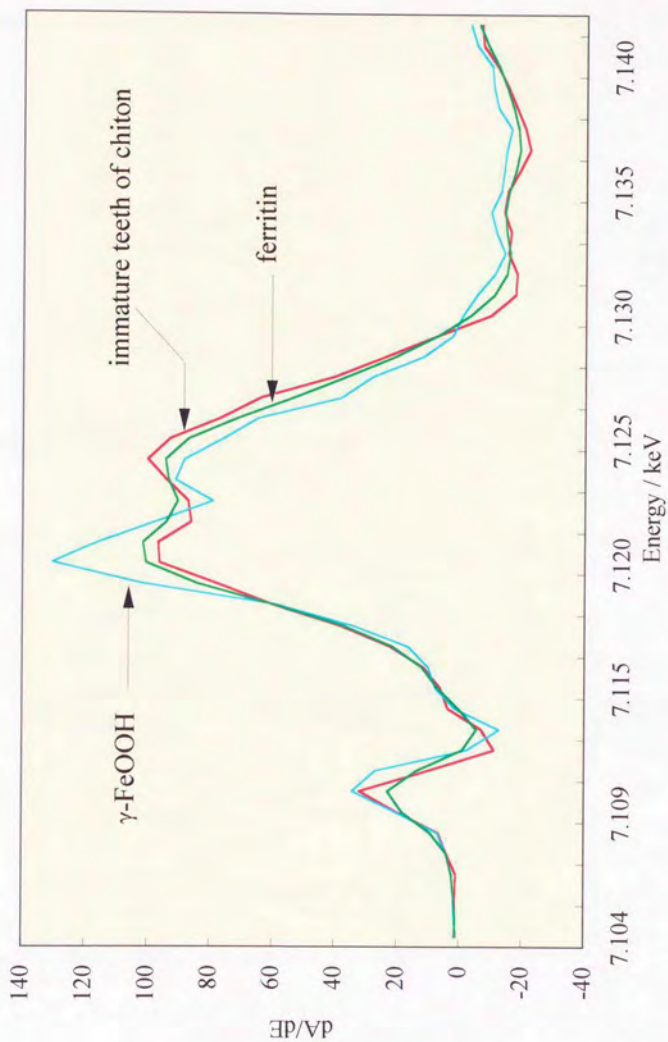


Fig. 3.16 ferritin, $\gamma\text{-FeOOH}$ とヒザラガイの褐色の菌の微分スペクトル

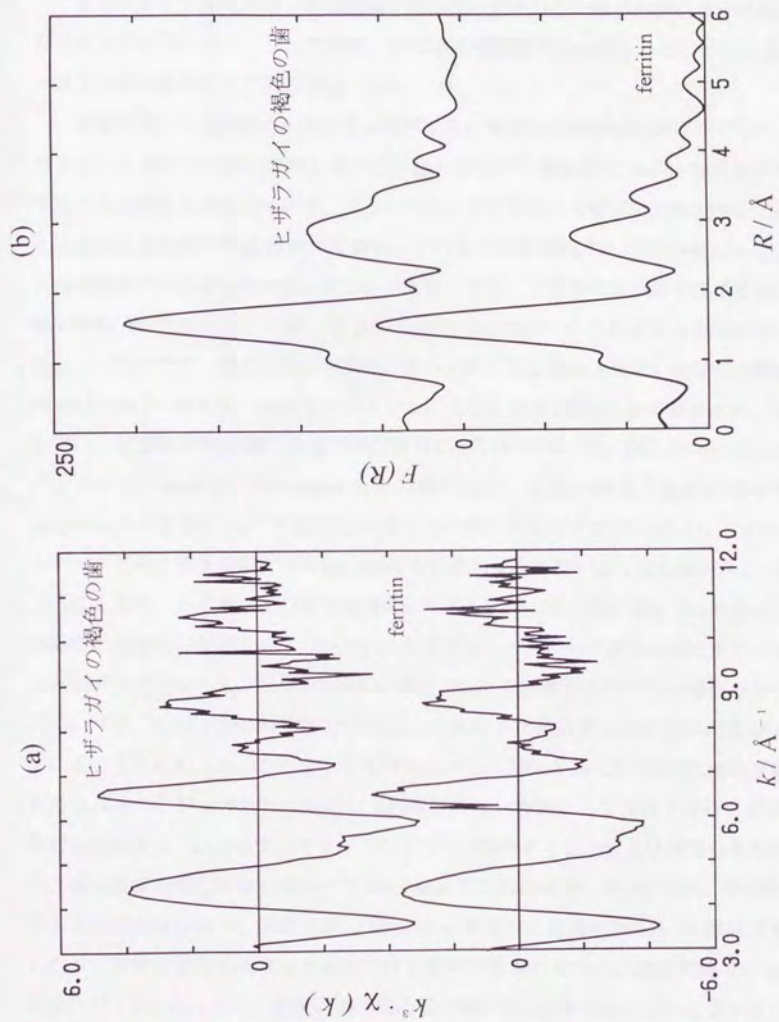


Fig. 3.17 ヒザラガイの褐色の菌と ferritin の $\chi(k)$ 曲線 (a) と
鉄周辺の動径分布関数 (b)

3.6.3 色ごとに分類した4種類の歯のXANESスペクトルの比較

ヒザラガイの歯のうち、形成初期に相当する褐色の歯の構成物質について知見を得ることができたので、ここで再度、4種類の成熟度の異なる歯についてXANESスペクトルの比較を行ってみる (Fig. 3.15)。

前項で述べた Mössbauer 分光法の結果より、褐色の歯の構成元素だけでなく、ヒザラガイの歯の中で最も成熟した黒色の歯のなかにも非晶質の ferritin 様物質が存在することが明らかになっている。これらより、ヒザラガイの歯には形成初期に ferritin によく似た非晶質の鉄化合物が沈着し、その後の成熟過程でもこの物質は magnetite と共に歯の中に存在し続けていることが推察された。この考えを支持する結果が、灰色・赤色・褐色と成熟してゆく各過程の歯の XANES スペクトルから確認された。Fig. 3.15 の中で、褐色の歯から灰色の歯へ成熟が起こるとスペクトルは低価数側の Fe₃O₄ に近いエネルギー位置にシフトする。そして赤色、黒色と歯が完成されてゆくに従い、X 線吸収端位置が3価の鉄化合物に近い高エネルギー側に徐々に戻ってゆく。これらの結果は、Mössbauer 解析で得られた、灰色・赤色・黒色の歯の中の magnetite と非晶質の Fe³⁺ の化合物の混合比の変化とよく合致する (3.5.1)。また、プレッジピーク強度も試料中の magnetite 比が増加するに従い高くなる傾向があった。

以上より、ヒザラガイの歯の XANES スペクトルには、混在する二つの鉄化合物の混在比を反映した、スペクトルのシフトやプレッジピーク高さの変化が見られることが明らかとなった。また Mössbauer 測定では知見が得られなかった褐色の歯の中については、ほぼ 100% の存在比で ferritin に類似した非晶質の鉄化合物が蓄積されていることもわかった。このように XAFS 法から、Mössbauer 分光法と相補的な情報が得られることが示された。さらに XAFS 法では、線源として輝度と平行性が高い放射光を利用しているので、スリットやミラーで集光することにより空間分解能を高め、微小領域の測定が行えるという Mössbauer 分光法にはない利点がある。感度の上でも XAFS 法は有利で、実験室系の Mössbauer 測定では歯舌の試料を 70 個体分も要したが、放射光を用いた XAFS 測定では 1 個体の歯舌のみで十分測定可能で、1mm 程度にビームを絞っても、解析に耐え得る質の高いデータを収集することができた。そこでこの XAFS 法の利点を活かし、次に 1mm という細かい測定ステップで、歯舌上の歯の成熟段階を追ってみることを試みた。

3.6.4 1mm ステップで測定したヒザラガイの歯舌の XANES スペクトル

Fig. 3.18 にヒザラガイの歯舌を最も成熟した先端部から 1mm ステップで測定し得られた XANES スペクトルを示す。ヒザラガイの歯舌上の位置は、歯の形成される歯舌囊のほうから口へ向かって part 1, part 2. と名前を付けた。また歯舌の各部のスペクトルの X 線吸収端位置、プレエッジピーク位置と強度を Table 3.4 に示す。

ヒザラガイの歯舌の中で、歯の形成が始まる歯舌囊の部分に相当する part 1 (Fig. 3.18 赤色) のスペクトルには、他の部分と比較して大きく異なるスペクトルの形状と γ -FeOOH よりも高エネルギー側へのケミカルシフト、さらに強度の低いプレエッジピークが観察された。しかし、より成熟した灰色の歯に相当する part 2 やそれ以降の部分では、すべて magnetite (Fe_3O_4) と lepidocrocite (γ -FeOOH) のスペクトルの間のエネルギー位置にスペクトルが現れ、プレエッジピークも part 1 と比較して強度が高い傾向が見られた。part 1 のスペクトルのプレエッジピーク強度が他の部分に比べ低いということは、3.6.2 で述べたように、歯舌囊で歯の形成のために蓄積された最も初期の構成物質が、ferritin に類似した対称性の高い配位構造を持つ物質であることを反映している。また 3.6.3 で述べたように、ヒザラガイの歯の中の magnetite の存在比とプレエッジピーク強度に相関があると考えられることから、part 1 以降の歯について各スペクトルのプレエッジピークの強度に着目して比較を行った。

まず、灰色の歯に相当する part 2 と part 3 の部分で急激にプレエッジピークの強度が増加し、歯舌の中では最も強度の高いプレエッジピークを示している。その強度は標準試料の magnetite に匹敵するほどであり、ここが最も magnetite の存在比が高い部分であることがわかる。part 4 の歯の呈色は灰色であるが、プレエッジピーク強度は part 3 のそれより低くなっており、magnetite 比が低下しはじめていることがわかる。その後は赤い呈色を見せ始める part 5 から最も成熟した part 17 にわたり、プレエッジピーク強度は細かな増減を繰り返しながら、平均的には γ -FeOOH と Fe_3O_4 のほぼ中間の強度になっていることがわかる。さらにスペクトルのケミカルシフトについても同様の変化が観察され、part 1 (7.1220keV) から part 2, part 3 (7.1192keV) へと急激な低エネルギー側へのシフトが見られた後は、part 16, part 17 (7.1203keV) に至るまで徐々に高エネルギー側へシフトしていることがわかる。ヒザラガイの歯には magnetite と ferritin 様物質の最低 2 種類の鉄化合物が混在していることが既知である

ので、ここで見られたスペクトルのケミカルシフトは、magnetite と ferritin 様の 3 価の鉄の化合物が異なる存在比で共存することによって起こる見かけ上のケミカルシフトであることは、すでに述べた通りである (3.6.1)。

以上より、歯の形成初期の part 1 の部分で濃集を受けている鉄は 3 価の化合物であり、歯の成熟が始まると part 2, part 3 で鉄の大部分が magnetite へと変化し、その後は 3 価の鉄化合物が増加しながら magnetite と共存するという、複雑な鉄の状態変化が歯の成熟過程で行われていることがわかった。また同時に、歯の成熟に伴う歯に含まれる鉄の状態変化を 1mm という高い空間分解能で測定することが XAFS 法を用いることで可能になることが、この結果より示された。

このように XAFS 測定がヒザラガイの歯舌のように組織を有した試料に対して有効であることがわかったが、生体試料の場合、試料の個体差について必ず検討する必要がある。粉末 X 線回折やバルクでの FT-IR スペクトル測定、また Mössbauer 測定の際には、ヒザラガイの歯舌を複数個使用することで試料の個体差の問題を回避した。しかし、この 1mm ステップの XAFS 測定のように高分解能な非破壊状態分析を行う場合には、一回の測定に複数個試料を使用することは測定法の持つ利点を喪失してしまうことになる。そこでヒザラガイ数個体から採取した歯舌試料について一本一本同じ測定を行い、試料の個体差がスペクトルに与える影響や測定の再現性があるかどうか、試料の採取地により鉄の状態が変化するか、などについて順次検討を行った。

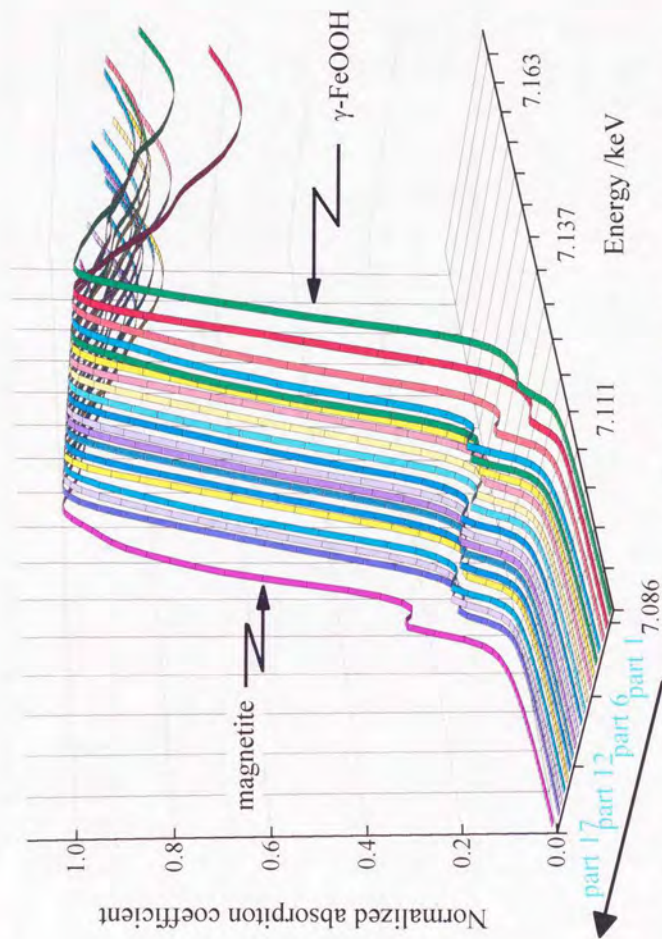


Fig. 3.18 1mmステップで測定したヒザラガイの歯舌のFe K-XANESスペクトル

Table 3.4 ヒザラガイの歯舌のX線吸収端位置、プレッジピーク位置とその強度

Sample	Edge position (keV)	Pre-edge peak position (keV)	Pre-edge height at 7.112keV	Calculated Fe ₃ O ₄ content in the teeth of chiton (%)
ferritin	7.1215	7.1120	0.064	
γ -FeOOH	7.1211	7.1120	0.089	
magnetite	7.1188	7.1114	0.178	
The teeth of chiton part 1	7.1220	7.1114	0.074	-
part 2	7.1192	7.1114	0.179	93
part 4	7.1196	7.1115	0.167	81
part 7	7.1202	7.1120	0.155	69
part 10	7.1208	7.1121	0.135	49
part 13	7.1204	7.1119	0.156	70
part 16	7.1203	7.1117	0.154	68

3.6.5 XAFS 測定で得られるスペクトルの再現性についての検討

まず測定で得られるスペクトルの再現性について検討するために、常温で安定であり長期にわたる XAFS 測定に繰り返し使用可能である、天然鉱物の pyrite (FeS_2) を標準試料とした。測定には、天然鉱物の pyrite の粉末を蛍光 XAFS 測定に適した濃度に BN で希釈することで調製した試料を用いた。また測定条件もすべてのビームタイムでそろえ、モノクロメータの回折角 θ を $16.2586^\circ \sim 15.9126^\circ$ にかけて 0.002° 刻みで分光結晶を 1s/point で走査することにより 174 点の XANES スペクトルを得た。本研究で 1993 年から 1995 年にかけて行った XAFS 測定の際には必ず、この pyrite の XAFS スペクトルを測定し、Fe K-吸収端近傍のスペクトルのキャリブレーションおよびスペクトルの再現性の試験のために用いた。

本稿ではこれらのうち、1995 年 3 月 17 日、4 月 21 日、5 月 25 日の 3 回のビームタイムで測定を行った pyrite のスペクトルを Fig. 3.19 に示した。また、3 月 17 日のスペクトルについては、ビームタイム内で複数回測定を行った pyrite のスペクトルのうち 2 つを 950317 No.1 と 950317 No.2 として示した。

この 3 日分の測定で、pyrite のスペクトルの形状が再現性良く得られていることがわかる。ここに示さなかった他のビームタイムでの pyrite のスペクトルもすべてスペクトルの再現性は良好であった。厳密には 3 日分のスペクトルの間には若干スペクトルの相対強度に差があるが、測定には全く同一の試料を用いているので、これは放射光実験施設で使用しているモノクロメータの状態や検出器の安定性といった実験条件の微妙な変動に起因する誤差であると考えられる。このように、時期が異なるビームタイムについては多少スペクトルの形状が変動しているが、同じビームタイム内 (950317 No.1 と 950317 No.2) では非常に良い一致が見られる。

よってこれらの検討より XAFS 測定の再現性については、同じビームタイム内ならばその変動が無視できるほど良好で、また測定時期が異なるスペクトルについては、これらの変動の幅をあらかじめ pyrite の様な標準試料で確認しておけば、実試料のスペクトルの解釈に問題を与えない程度の範囲であることがわかった。

以上のように、XAFS 測定の再現性についてはその信頼性が確認できたので、次に試料自体が持つ問題点、すなわちヒザラガイの歯舌に含まれる鉄の状態がヒザラガイの個体差や採取地などの環境に影響されるかという点について検討を行った。

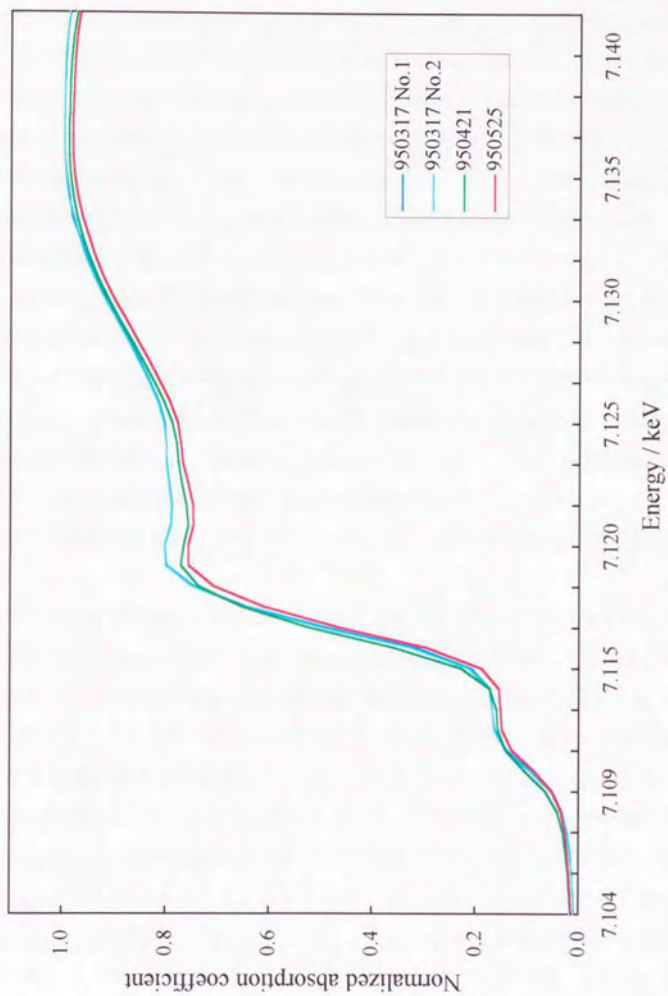


Fig. 3.19 各ビームタイムで測定を行ったPyriteのFe K-XANES スペクトル

3.6.6 ヒザラガイの生息環境の差や個体差の問題に関する検討

まずヒザラガイの生息環境の差が与える影響について以下のように検討を行った。試料としては、神奈川県のお壺湾で採取された全長約 18mm の歯舌と、小網代湾で採取された全長約 26mm 歯舌を用いた。これらの歯舌試料をポリエチレン袋に封入、固定し、4mm × 1mm に整形したビームを 2mm ステップで試料上に照射することで、各試料の非破壊測定を行った。こうして得た XANES スペクトルについて、歯舌上の測定箇所を歯舌囊に近い方から mm 単位で X 軸に、また各部分の XANES スペクトルの X 線吸収端位置を Y 軸にプロットし、Fig. 3.20 のようなグラフを得た。

歯舌の長さには若干の違いがあるものの、両者とも歯舌囊の部分ではスペクトルが 7.122-7.123keV の高エネルギー側に位置し、その後一旦 7.119keV の低エネルギー側に急激にシフトする傾向が見て取れる。7.119keV にシフトする場所は 2 つの試料間で異なっているが、歯舌の全長の違いと対応していると考えられるので、この両者の歯の成熟に伴う鉄の状態変化は、ほぼ同じであると判断した。このような歯舌長の違いは、ヒザラガイの生息地の環境の差やまた年齢差などに基いている。以上より、歯の成熟に伴う鉄の状態変化は、ヒザラガイの生息地・または年齢の違いによらず、同じであることがわかった。

次にヒザラガイの個体差の影響について検討を加えた。試料は小網代湾から採取してきたヒザラガイ 2 個体の歯舌、全長 20mm と 24mm のものを用い、上と同じ方法で比較を行った。その結果を Fig. 3.21 に示す。測定は 1994 年の 3 月 30 日と 11 月 9 日の 2 つのビームタイムで行ったので、実験条件の微妙な差がスペクトルに影響を及ぼし、X 線吸収端位置にわずかなずれが生じていることがわかる。しかし、歯舌囊付近で 7.123-7.124keV の高エネルギー側に位置していたスペクトルが、歯舌囊から 8mm の部分にかけて 7.118-7.119keV の低エネルギー側に大きくシフトする傾向、さらにその後 12mm 付近までゆっくりと高エネルギー側に戻り、あとは大きなシフトが見られないという傾向は両者に共通しており、この 2 つの歯舌試料では良い相関が見られた。これより、同一の採取地点で得られたヒザラガイの歯舌では、個体差によるヒザラガイの歯に含まれる鉄の状態変化への影響は無視できることが明らかとなった。この試料の個体差を無視できるという知見は、採取可能な個体数が少ない試料の測定の際には大きな利点となると思われる。

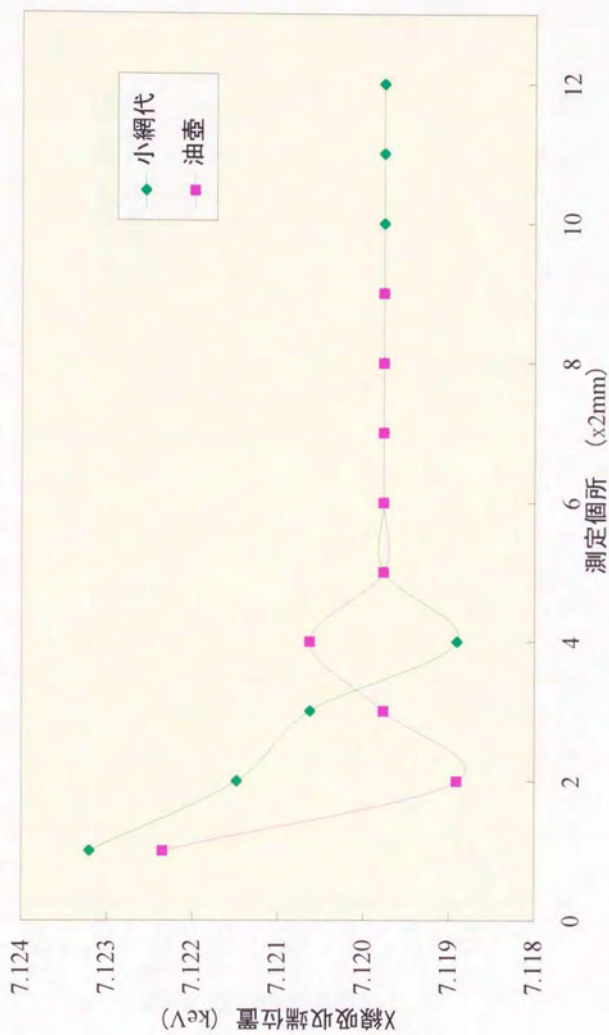


Fig. 3.20 異なる地域で採取されたヒザラガイの歯舌の鉄の状態変化の比較

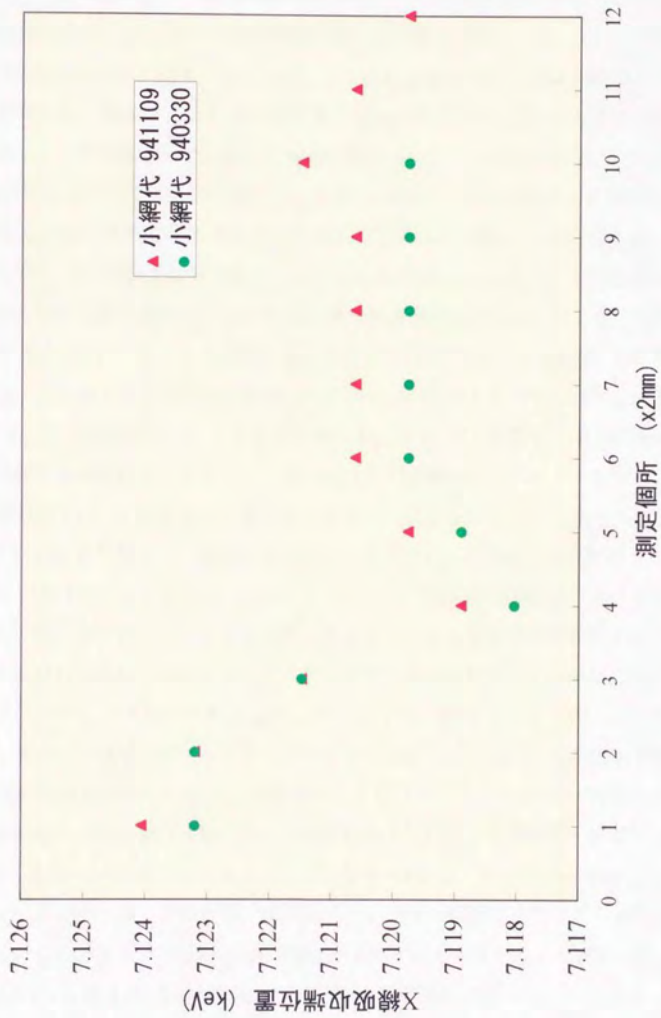


Fig.3.21 ヒザラガイの菌舌上の場所による鉄の状態変化

3.6.7 12種類のヒザラガイ類の歯舌の比較

ここで、様々なヒザラガイ類の亜種の歯舌について XANES スペクトルを測定した結果を比較する。ヒザラガイは本研究で用いた亜種 12 種類 (Table 2.1) の中で最も大きな 20-25mm の歯舌を持っているが、その他の亜種については体長や歯舌長にはばらつきが見られ、最も小さいもので歯舌長が 4mm 程度であった。これを受けてビームをスリットでさらに絞りより微小な領域の測定を行うことを試みたが、ビームの面積を減少させることで S/N 比が低下し、良質なスペクトルを得ることが困難であった。S/N 比の低下を回避するため空間分解能をさらに上げることはあきらめ、ビーム形はヒザラガイの歯舌に用いた 4mm × 1mm に固定し、ヒザラガイ類の亜種の各歯舌試料について歯舌囊を含む未成熟部と残りの成熟部に歯舌を大きく 2 分割し、この両者の XANES スペクトルを比較した。また亜種の歯舌のうち比較的大きな試料については、ヒザラガイと同様に顕微鏡下で歯の色ごとに歯舌を分割したり、歯舌囊から 2mm ステップで測定を行うことも試みた。Fig. 3.22 にヒザラガイ類の亜種の歯舌の未成熟部の XANES スペクトルを、Fig. 3.23 には成熟部のスペクトルを示す。ヒザラガイ類の歯舌の XANES スペクトルは未成熟部・成熟部双方においてスペクトルのシフトや形状がまちまちで、亜種間の系統立った変化を見いだすことが困難であった。

そこで各ヒザラガイの亜種について、各々の未成熟部と成熟部のスペクトルを Fig. 3.24 に示す様に横に並べて比較してみたところ、ヒザラガイ類の歯舌のスペクトルを大きく分けて次の 2 つのグループに分類することができた。1 つめは、未成熟部、成熟部のスペクトルいずれかが magnetite の混在を示す低エネルギー側へのシフトやプレッジピーク強度の増大を示すものである (Type I)。magnetite の生成が顕著なヒザラガイの歯舌はこのタイプに分類される。もう 1 つは、magnetite の様な 2 価の鉄を含む対称性の低い鉄化合物の混在があまり認められず、未成熟部・成熟部のスペクトルともに高エネルギー側にシフトしているもの (Type II) である。興味深いことにこの Type II の中には、未成熟部・成熟部のスペクトルのケミカルシフトが完全に 3 価の化合物ものと重なり、magnetite の混在が全く認められないものも存在した。

Table 2.1 に記した 12 種類のヒザラガイ類と放医研の石井から入手したリュウキュウヒザラガイを加えた計 13 種の亜種について、この基準により Type I と Type II に分類した結果を Table 3.5 に示す。

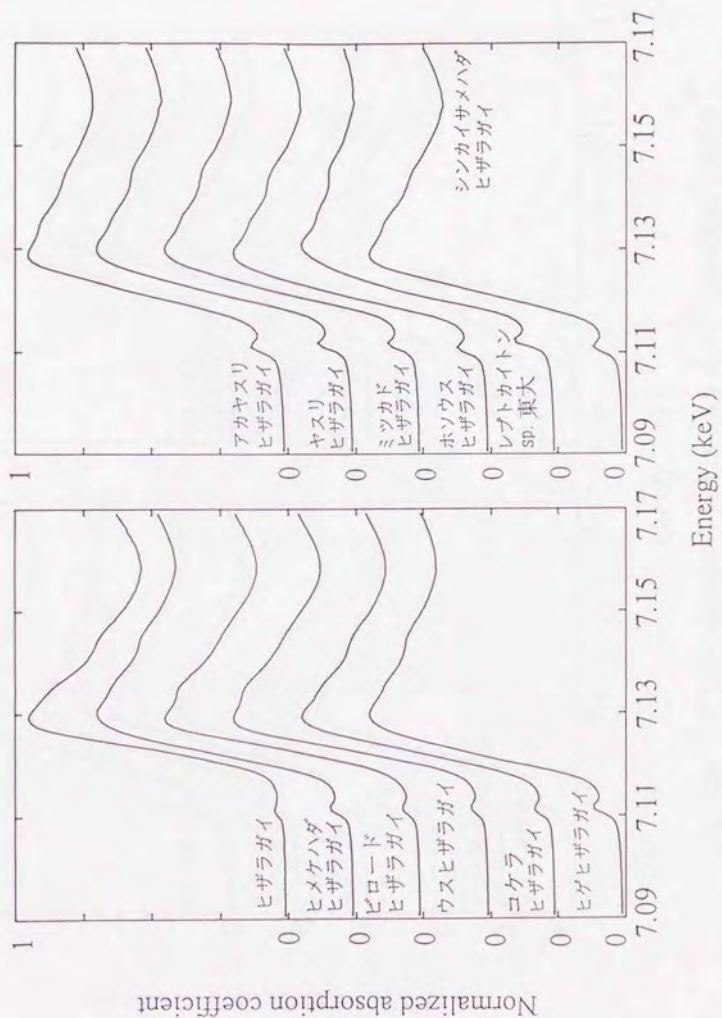


Fig. 3.22 ヒザラガイ類の歯舌のFe K-XANES スペクトルの比較 (未成熟部)

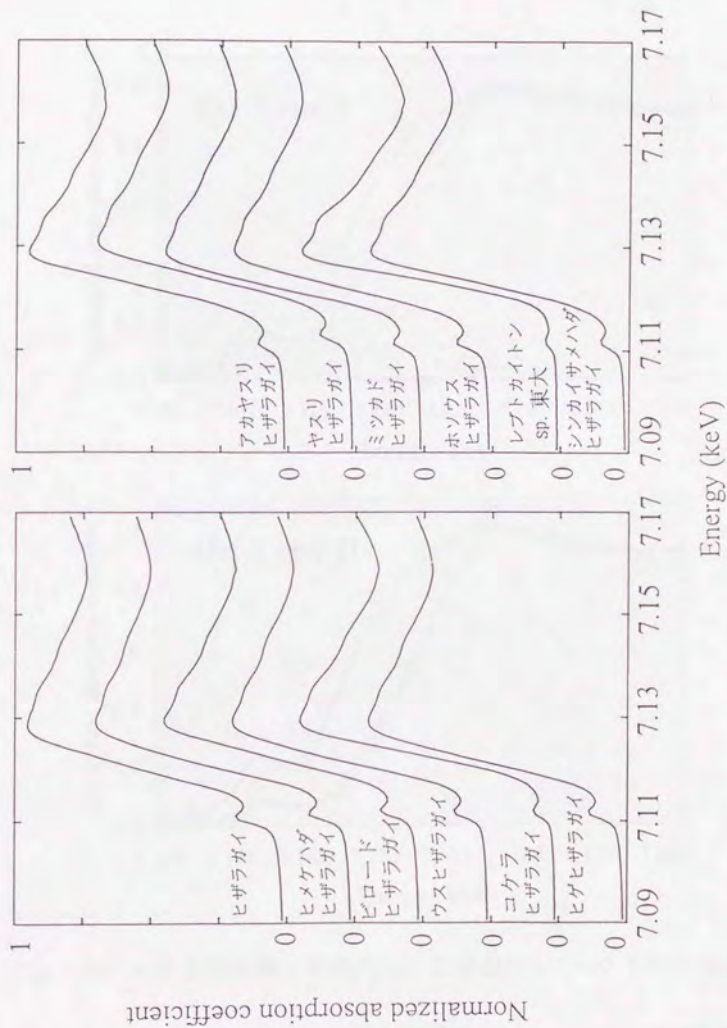


Fig. 3.23 ヒザラガイ類の歯舌の Fe K-XANES スペクトルの比較 (成熟部)

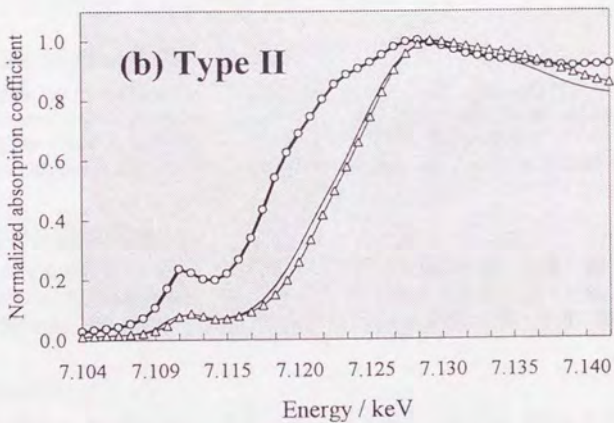
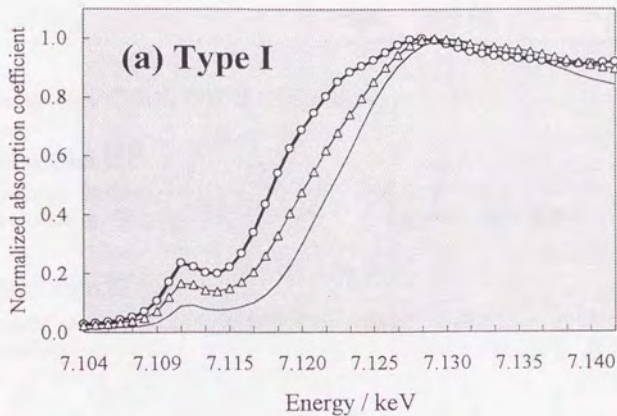


Fig. 3.24 ヒザラガイ類を特徴的付ける XANES スペクトルの傾向

○— magnetite — 歯舌成熟部 △— 歯舌未成熟部

Table 3.5 XANES スペクトルによるヒザラガイ類の分類

学名	和名 (採集地)
Type I : magnetite の生成が顕著であるもの	
<u>Lepidopleurina 亜目</u>	
<i>Leptochiton belknapi</i>	シンカイサメハダヒザラガイ
<i>Leptochiton</i> sp. 東大	東大ドレッジ (三浦半島, 城ヶ島沖)
<u>Ischnochitonina 亜目</u>	
<i>Acanthopleura japonica</i>	ヒザラガイ (油壺, 小網代)
<i>Ischnochiton comptus</i>	ウスヒザラガイ (房総半島・小湊, 磯下)
Type II : magnetite の生成が顕著でないもの	
<u>Acanthochitonina 亜目</u>	
<i>Lepidozona amabilis</i>	アカヤスリヒザラガイ (城ヶ島沖)
<i>Acanthochiton dissimilis</i>	ビロードヒザラガイ (薩摩半島・坊ノ岬)
<i>Notoplax squamopleura</i>	コケラヒザラガイ (城ヶ島沖)
<i>Craspedochiton (Spongichiton) pyramidalis</i>	ミツカドヒザラガイ
<u>Ischnochitonina 亜目</u>	
<i>Mopalia retifera</i>	ヒゲヒザラガイ (房総半島・小湊, 磯下)
<i>Ischnochiton boninensis</i>	ホソウスヒザラガイ (房総半島・小湊, 磯下)
<i>Lepidozona corenica</i>	ヤスリヒザラガイ (能登半島・小木, 磯下)
<u>Lepidopleurina 亜目</u>	
<i>Leptochiton diomedea</i>	フカゾメヒザラガイ (由比沖 300m 沈木)
<i>Leptochiton belknapi</i>	シンカイサメハダヒザラガイ

この結果を見ると、本研究で測定に使用したヒザラガイの亜種 13 種類のうち、XANES スペクトルからは magnetite の存在をはっきりと確認できなかった Type II に属する種類が意外に多いことに気付く。特にケハダヒザラガイ亜目 *Acanthochitonina* に属するものは、すべて Type II に分類されている。しかし、サメハダヒザラガイ亜目 *Lepidopleurina* とウスヒザラガイ亜目 *Ischnochitonina* のものは Type I と Type II の双方に属するものがあるので、現在用いられているヒザラガイの亜目の分類とヒザラガイの歯舌に含まれる鉄の状態との間にはあまり相関がないと判断した。

Type I についてはすでにヒザラガイで細かく検討を加えてきたので、Type II に属するヒザラガイ類の歯舌についてもここでさらに詳しく見てみることにする。まず Type II の中からヤスリヒザラガイについて、その全長約 10mm の歯舌を 1mm ステップごとに 9カ所 XANES スペクトルを測定した。その結果を Fig. 3.25 に示す。歯舌上の測定場所は、歯舌囊の方から part 1, part 2. とした。

ヤスリヒザラガイの歯舌のスペクトルを見てみると、歯舌囊 (part 1) のスペクトルが最も高エネルギー側にシフトしプレッジピーク強度も小さいが、その後のスペクトルではプレッジピーク強度が増加し、やや低エネルギー側にシフトしていることがわかる。これはヒザラガイの歯舌と同様の傾向といえる。しかし、Type I に属するヒザラガイの歯舌のスペクトル (Fig. 3.18) と細かく比較すると、ヒザラガイのスペクトルでは、歯舌囊 (Part 1) から灰色の歯 (part 3) 付近にかけて急激なプレッジピーク強度の増加が見られるが、ヤスリヒザラガイのスペクトルでは、ヒザラガイの灰色の歯のように magnetite のスペクトルに近い強度のプレッジピークを示すスペクトルが見られず、ヒザラガイに比べヤスリヒザラガイの中の鉄の状態変化は緩やかで、あまり magnetite の存在量が多くないことが推察された。

このヤスリヒザラガイは EPMA の 2 次元元素マッピングにより、歯の中の鉄の分布もヒザラガイとは大きく異なることが明らかとなっている (Fig. 3.2-3.5)。このように同じ亜目に属するヒザラガイ類でも歯の中の鉄の分布や化学状態に差違が見られたことは興味深い。将来的に、すべてのヒザラガイの亜種の歯舌について EPMA の 2 次元元素分析や XAFS 法をはじめ多角的な状態分析を行い、歯に存在する鉄の状態について系統立った研究を行う必要があることが、これらの結果から導かれた。

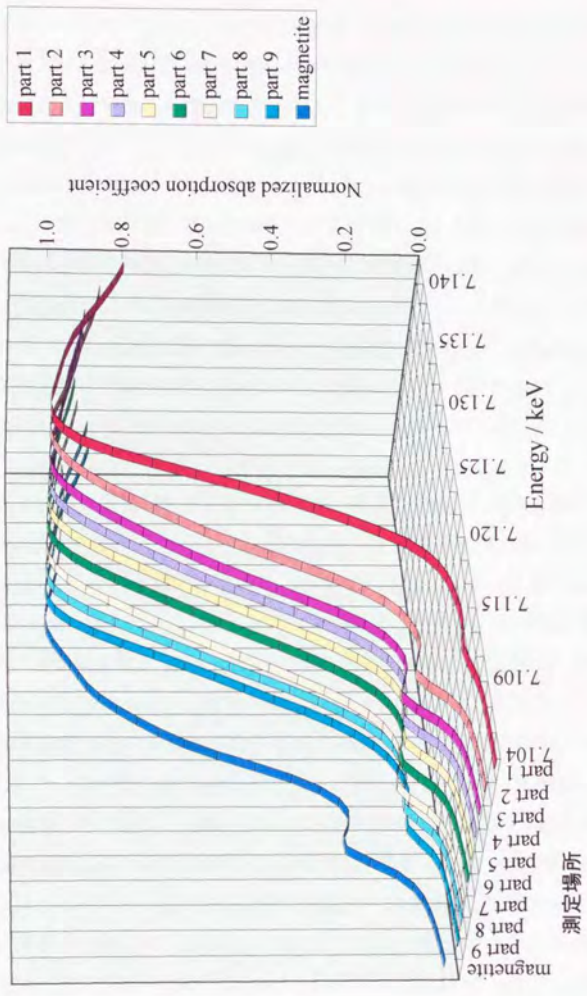


Fig. 3.25 ヤスリヒザラガイの歯舌上を 1 mm ステップで測定した Fe K-XANES spectra

これらヒザラガイ類の歯舌を光学顕微鏡で観察したところ、ヒザラガイ以外の亜種の歯にもヒザラガイと同様な歯の表面の色の変化が見られることが明らかとなった。そこで、この呈色ごとに分類した歯の測定を Type I と Type II に属する亜種についても行い、各成熟段階の歯のスペクトルを magnetite や lepidocrocite と比較した。Type II に属するアカヤスリヒザラガイの歯舌についての測定結果を Fig. 3.26 に示す。また Type I にはこれまで集中して取り扱ってきたヒザラガイが属するが、確認のためもう一種類、リュウキュウヒザラガイの歯について検討した結果を Fig. 3.27 に示す。

ヒザラガイの場合には、最も未成熟な褐色の歯のスペクトルが高エネルギー側に位置し、灰色の歯で magnetite に近い低エネルギー側に急激にシフトした後、赤色・黒色の歯では褐色と灰色の歯の中間のエネルギー位置にスペクトルがシフトする傾向が見られた (Fig. 3.15)。これと全く同じ傾向が Type I に属するリュウキュウヒザラガイのスペクトルにも見られた (Fig. 3.27)。

これに対して Type II のアカヤスリヒザラガイの歯舌では、未成熟な褐色の歯は他と同様に高エネルギー側にシフトしているものの、残りの灰色・赤色・黒色の歯のスペクトルのシフトがすべて同じで、magnetite と lepidocrocite のほぼ中間のエネルギー位置に観察された (Fig. 3.26)。つまり、アカヤスリヒザラガイでは灰色の呈色を示す歯であっても歯に含まれる鉄成分は赤色や黒色の歯に類似した組成になっていて、magnetite の混在比があまり高くないことが明らかとなった。これから、Type I と Type II の違いを特徴づけているのは4つの成熟段階の歯のうち灰色のものであることが明らかとなった。また今回歯の呈色に着目してそのスペクトルの変化の検討を行った全て亜種に共通して、最も未成熟な褐色の歯では鉄は3価の状態が存在すること、赤色・黒色の歯では magnetite と3価の鉄化合物が共存していることが確認された。

以上のように、ヒザラガイ類の亜種の間で歯舌中の鉄の状態変化を比較することにより、(1)ヒザラガイ類には、歯舌の中で灰色の呈色を示す歯における magnetite 生成・蓄積が顕著である種と、あまり magnetite の存在比が高くない種の、2種類が存在する、(2)現在分類されているヒザラガイ類の亜目と(1)のような鉄の状態変化による分類の間に相関が見られない、(3)歯が形成される初期段階でまず3価の鉄化合物が沈着を受ける現象はヒザラガイ類に共通する、などの知見を得ることができた。

これまでヒザラガイ類の歯舌に含まれる鉄の状態変化について亜種間での比較を

行った研究例はなく、ヒザラガイ類の歯の構成成分や元素の分布状況に種による差違があるというこの知見は化学的視点から歯舌という生体鉱物を捉える試みを行った本研究の大きな成果といえる。またヒザラガイ類の中で magnetite の存在が顕著でない歯舌を持つ種類を確認できたのも本研究が初めてである。これまで X 線回折や電子線回折法より magnetite 以外に FeOOH や $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ などの結晶が混存するとの報告はあったが、その存在比に着目した検討はこれまでなされていなかった。その大きな理由として、生物分野での研究者のほとんどにヒザラガイ類の歯に含まれる鉄の大部分は magnetite であるという固定観念が根付いてしまっていることが考えられる。これまでヒザラガイ類の歯舌の研究で多く用いられてきた X 線回折法は物質の同定に大きな威力を誇る手法であるが、結晶構造が極めて類似している化合物の区別は不得手とする。例えばヒザラガイ類の歯の摂餌面において主成分とみなされる magnetite と、共存種として指摘された 3 価の鉄化合物である maghemite ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$) は、共に磁性を有する化合物であるばかりでなく結晶構造も類似しており、通常の X 線回折法からは区別することが困難である。この 2 つの区別には試料に含まれる鉄の価数の情報が必要になるが、価数を知ることのできる方法はほとんどなく、ヒザラガイ類の歯の主成分が本当に magnetite であるかという詳しい検討は現在まで先送りされてきている。この価数の情報に関して本研究で用いた XANES スペクトルはその威力を発揮することができることになる。

XANES スペクトルのシフトにより分類された Type II の歯舌では全体に 3 価の鉄化合物の寄与が多い構成となっているので magnetite よりもむしろ maghemite やその他 3 価の鉄化合物が主要構成成分となっている可能性がある。さらに本研究で測定を行った 13 種類のヒザラガイの亜種の中で Type II に属するものが多数を占めていることを考えあわせると、ヒザラガイ類の歯舌の主要構成成分として magnetite を用いている種類は以外に少なく、むしろ maghemite をはじめとする 3 価の鉄化合物を生成するものの方が一般的である可能性もある。この様な視点でヒザラガイ類全体を眺めると、これまで生体鉱物の研究で集中していた magnetite 以外にも注目すべき鉄化合物が複数存在することが浮かび上がってくる。今後は生物分野においても、鉄の酸化状態についての情報の得られる XAFS 法のような状態分析法を研究の中心に据え、歯舌を構成する鉄の化学形について再検討を行うことが必要になると考えられた。

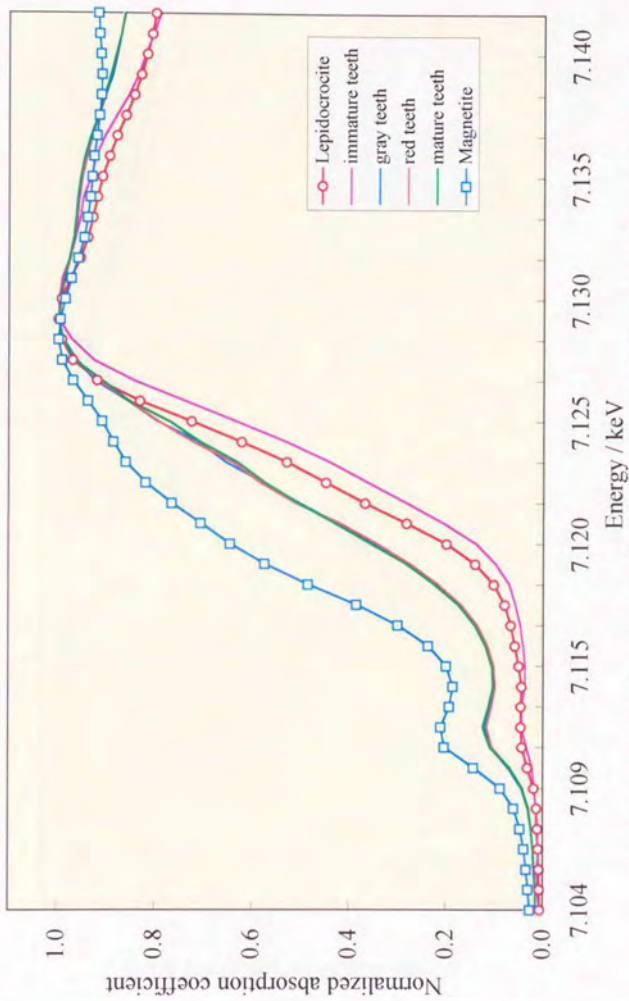


Fig. 3.26 アカヤスリヒザラガイの色別に分類した歯の Fe K- XANES spectra

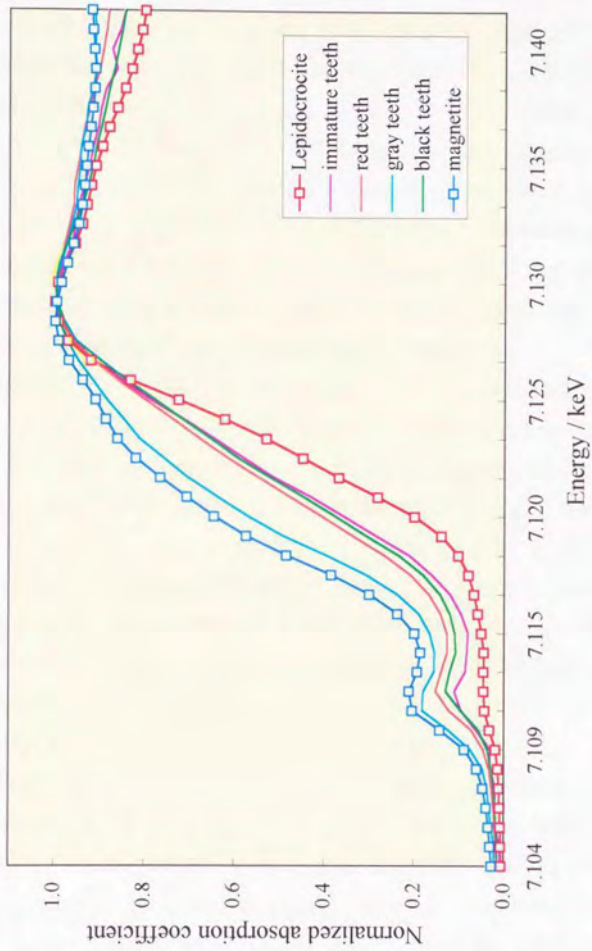


Fig. 3.27 リュウキユヒザラガイの色別に分類した歯のFe K-XANES spectra

3.6.8 XAFS スペクトルの加成性に関する検討

以上の結果より、ヒザラガイの歯の形成初期で濃集される鉄は ferritin 様 Fe^{3+} 化合物の形であり、歯の成熟が始まると鉄の大部分がいったん magnetite へと変化し、その後は ferritin 様物質が増加しながら magnetite と共存するという、複雑な鉄の状態変化が歯の成熟過程で行われていることが明らかとなった。こういった状態の異なる 2 種類の鉄化合物が試料中に混在することによる XANES スペクトルへの影響について、桜井らはモデル解析により XANES スペクトルを計算しその形状の変化について報告している^{9,21}。そこで本研究では、magnetite と ferritin 様 Fe^{3+} 化合物の 2 成分混合物と近似できるヒザラガイの歯舌試料の成分比の推定を試みた。標準試料として ferritin 様鉄化合物のかわりに XANES スペクトルが ferritin と類似した試薬の $\gamma\text{-FeOOH}$ と、鉱物の magnetite とを重量比率 (%) を変えて混合させた試料に対し、ヒザラガイと同様の条件で測定を行った。以後この試料を混合試料と呼ぶ。

また X 線吸収スペクトルの加成性について報告がなされているのは透過法で測定したスペクトルに関するものが中心で、本研究で用いている蛍光法で測定したスペクトルに関する報告はあまり見られなかった。そこで、蛍光法と透過法で測定したスペクトルを比較し、蛍光法でのスペクトルにどの程度加成性が成り立つのかを検討した上で、ヒザラガイの歯舌のような生体試料のスペクトルの解釈を行うことを試みた。

Fig. 3.28 に上述の混合試料の透過法で測定したスペクトルから抽出した規格化 XANES スペクトル (A) と、蛍光法でのスペクトル (B) を示した。Fig. 3.29 には混合試料の $k^3 \cdot \chi(k)$ 曲線を、Fig. 3.30 には混合試料中の鉄周りの動径分布曲線を示す。各混合試料に対し測定を行った中で、透過法で測定した (e) 20 : 80 の試料のデータに原因不明のノイズが入ってしまったので、このスペクトルは比較対象外とした。

さて、Fig. 3.28 の XANES スペクトルを比較すると、透過法・蛍光法ともにスペクトルの形状と質に本質的な違いが見られず、蛍光スペクトルでも十分に使用に耐えることを確認できた。また混合試料間でスペクトルの形状を比較すると、(f) から (a) にかけて magnetite の比率が上がって行くにつれて、プレエッジピークの強度が高くなること、またスペクトルの形状が順次 magnetite に類似してゆく様子が透過法・蛍光法いずれのスペクトルからも伺える。よって、透過法でも蛍光法でも XANES スペクトルには加成性が成り立つことが確かめられた。

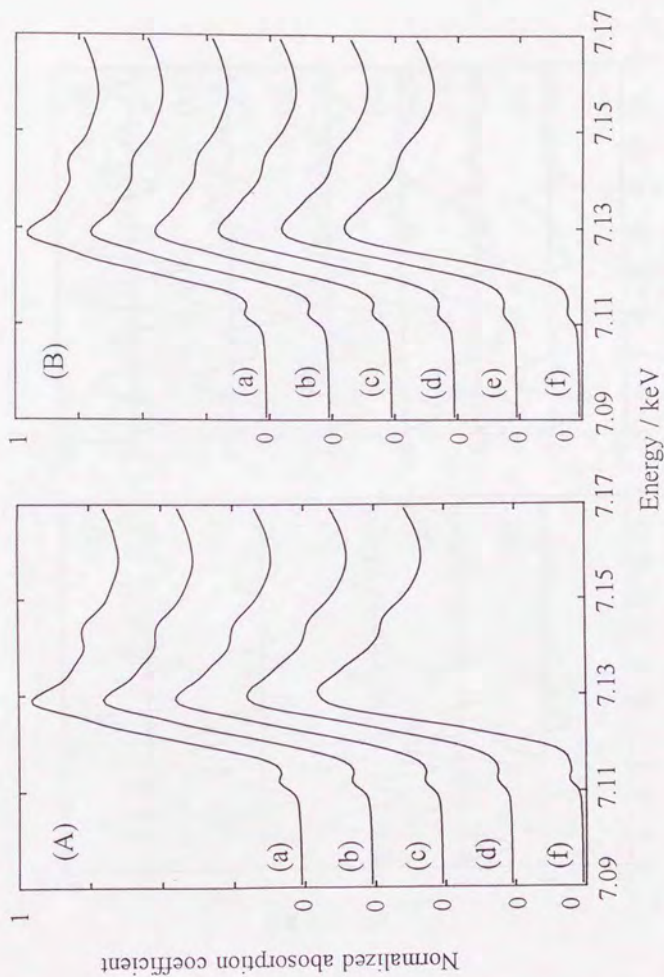


Fig. 3.28 混合試料の Fe K-XANES スペクトル (A) 透過法で測定したもの (B) 蛍光法で測定したもの
 magnetite : γ -FeOOH = (a) 100 : 0, (b) 80 : 20, (c) 60 : 40, (d) 40 : 60, (e) 20 : 80, (f) 0 : 100

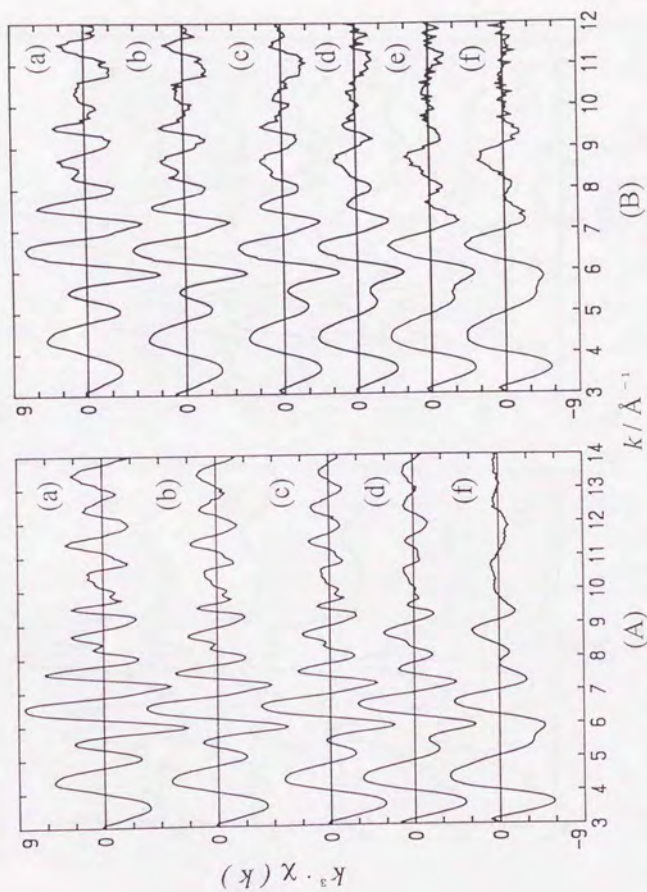


Fig. 3.29 混合試料の $k^3 \cdot \chi(k)$ 曲線 (A) 透過法で測定したもの (B) 蛍光法で測定したもの
 magnetite : γ -FeOOH = (a) 100 : 0, (b) 80 : 20, (c) 60 : 40, (d) 40 : 60, (e) 20 : 80, (f) 0 : 100

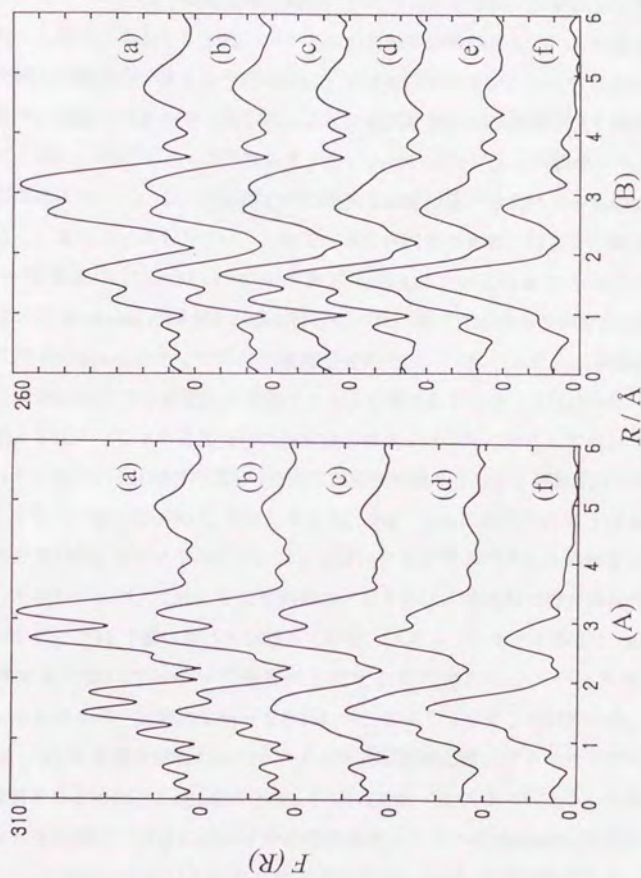


Fig. 3.30 混合試料中の鉄周りの動径分布曲線 (A) 透過法で測定したもの (B) 蛍光法で測定したもの
 magnetite : $\gamma\text{-FeOOH}$ = (a) 100 : 0, (b) 80 : 20, (c) 60 : 40, (d) 40 : 60, (e) 20 : 80, (f) 0 : 100

このスペクトルの加成性は EXAFS 振動にも現れている。Fig. 3.29 の $k^3 \cdot \chi(k)$ 曲線を見てみると透過スペクトル(A)と蛍光スペクトル(B)の両方に、 $4.5 \sim 6.5 \text{ \AA}^{-1}$ の k の範囲の波が (f) から (a) にわたり magnetite の混合比が増大するに従い分裂してゆく様子、また $k^3 \cdot \chi(k)$ 曲線全体の振動の形状や大きさが徐々に変化してゆく様子などがみとれる。しかし、蛍光スペクトルの波は高波数側になるにつれ透過スペクトルと比較して振動が小さくなり相対的にノイズの寄与が大きくなってしまっている。これにより、透過スペクトルで見られるような高波数側の振動構造が全く観察できなくなってしまい、スペクトルの質はあまり良いとはいえない。この影響が Fig. 3.30 の動径分布曲線に現れている。透過法での動径分布曲線に比べ蛍光法でのものはピークの幅が広く、またノイズも大きい。しかし、混合試料感の比較では双方の傾向は同じで、第一近接原子 ($1 \sim 2 \text{ \AA}$) の寄与が第二近接 ($2.5 \sim 3.5 \text{ \AA}$) よりも大きい (f) の $\gamma\text{-FeOOH}$ から magnetite の混合比が高くなるにつれ、第二近接の寄与が著しく増加し、最終的には (a)magnetite 100% で双方の強度が逆転する。これらより、(1)EXAFS 振動に関しては透過法の方が蛍光法よりスペクトルの質が良いこと、(2)しかし、透過法・蛍光法ともにスペクトルに混合物の各成分の寄与が成分比に対応して現れていることが明らかとなり、XANES・EXAFS 共に加成性が成り立つことが証明された。

ここでもう一度、XANES に注目してみる。Fig. 3.28 に見られるように magnetite の混合比と XANES スペクトルのプレッジピーク強度やスペクトルの形状には相関があることがわかるが、これらをより明確にするために、蛍光法で得た混合試料のスペクトルを Fig. 3.31 で横に並べて比較してみた。このように比べてみると、magnetite 比が上昇するに従いプレッジ強度が上昇するだけでなく、スペクトル全体が magnetite のエネルギー位置に向かってきれいにシフトしてゆくことがわかる。

Table 3.6 に各混合試料のスペクトルの X 線吸収端位置、プレッジピーク位置とその強度をまとめた。magnetite 100% と $\gamma\text{-FeOOH}$ 100% のスペクトルを比較すると、逆スピネル構造で 3 価の鉄の半分が四面体サイトにある magnetite の方が、3 価の鉄がすべて対称性の高い 6 配位八面体のサイトにある $\gamma\text{-FeOOH}$ よりも、7.1119 keV に現れるプレッジピーク強度が大きいことがこの数値からもわかる。また、プレッジピーク位置と X 線吸収端位置は両方とも magnetite 比の増大と対応して低エネルギー側にシフトすることも明らかとなった。

これを受けて各混合試料の magnetite の混合比を横軸に、各スペクトルのプレエッジピークの強度を縦軸にプロットしてみたところ、Fig. 3.32 の様な非常に良い相関がみられた。ここからプレエッジピーク強度においても混合成分のスペクトルが和となって現れ、それらの間に加成性が成り立つことを数値として再確認することができた。このような相関は magnetite の混合比に対して X 線吸収端位置をプロットしても得られたが、プレエッジピーク強度のプロットの方が相関係数が高かった。そこで、magnetite の重量比に対してプレエッジピーク強度をプロットしたデータを基に最小自乗法で回帰直線を算出し、これをヒザラガイの歯に含まれている鉄の成分概算に利用することを試みた。この回帰直線の相関係数は $R^2 = 0.9511$ であった。

3.6.9 ヒザラガイの歯に含まれる magnetite の比率の算出

Fig. 3.32 に示した回帰直線を検量線とし、ヒザラガイの歯舌上を 1mm ステップで測定したスペクトルからプレエッジピーク強度を読みとり、各部分での magnetite 含有量を概算した。その結果は Table 3.4 (p. 89) に併せて示した。この中で part 1 は前述のように magnetite をほとんど含まないと考えられたのでこの計算の対象外とした。Table 3.4 に示した magnetite 含有量の計算値は、灰色の歯が存在する part 2 の部分で 93%、それ以降の成熟度の赤色・黒色の歯では平均して 60-70% という結果となり、Mössbauer 解析で得られた灰色の歯が 90%、赤色の歯が 75%、黒色の歯が 70% という値に近い値が得られた。Mössbauer 解析と比較してやや誤差が大きいと考えられるものの、十分使用できるデータであると判断した。このように、最も magnetite が多いところで 93%、最も少ないところで約 50% というように、ヒザラガイの歯の成熟と共に magnetite の含有量が大きく変化していることがより明瞭となった。

このようにヒザラガイの歯の成熟に従い歯の構成成分がどの様に変化しているかを 1mm ステップという高い空間分解能で定量的に示したのは本研究が初めてである。Mössbauer 測定には 70 個体分の歯舌試料が必要であったことを考えると、この結果は本研究で取り扱った生体試料や地球科学試料のように微小で構造を持つ試料の分析に XAFS 法が有力であることを示し、基礎的な検討を十分行えばこれまで XAFS 法が不得意としていた定量的な物質の取り扱いも可能であることを示唆している。よって XAFS の新たな応用につながる重要な知見が得られたと考える。

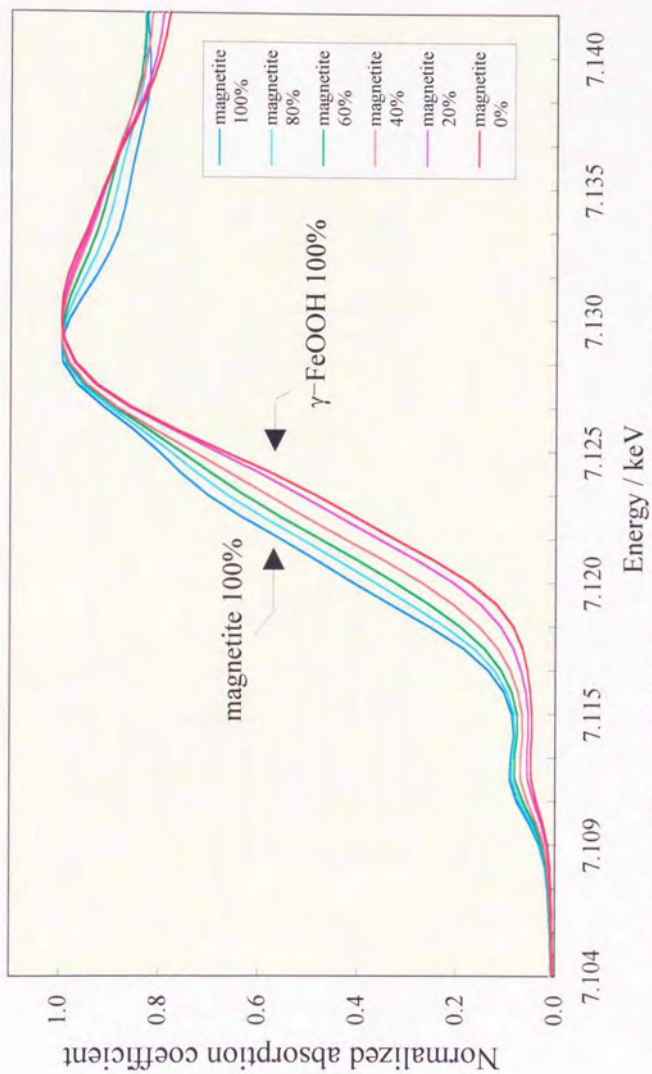


Fig. 3.31 蛍光法で測定したmagnetite - γ -FeOOH 混合試料のFe K-XANES スペクトル

Table 3.6 magnetite - γ -FeOOH 混合試料の X 線吸収端位置、ブレエッジ位置とその強度

Sample	Edge position (keV)	Pre-edge peak position (keV)	Pre-edge height at 7.1112keV
magnetite - γ -FeOOH mixtures			
(a) magnetite 100%	7.1188	7.1114	0.178
(b) magnetite 80%, γ -FeOOH 20%	7.1191	7.1115	0.176
(c) magnetite 60%, γ -FeOOH 40%	7.1200	7.1116	0.134
(d) magnetite 40%, γ -FeOOH 60%	7.1204	7.1115	0.113
(e) magnetite 20%, γ -FeOOH 80%	7.1205	7.1118	0.111
(f) γ -FeOOH 100%	7.1211	7.1120	0.089

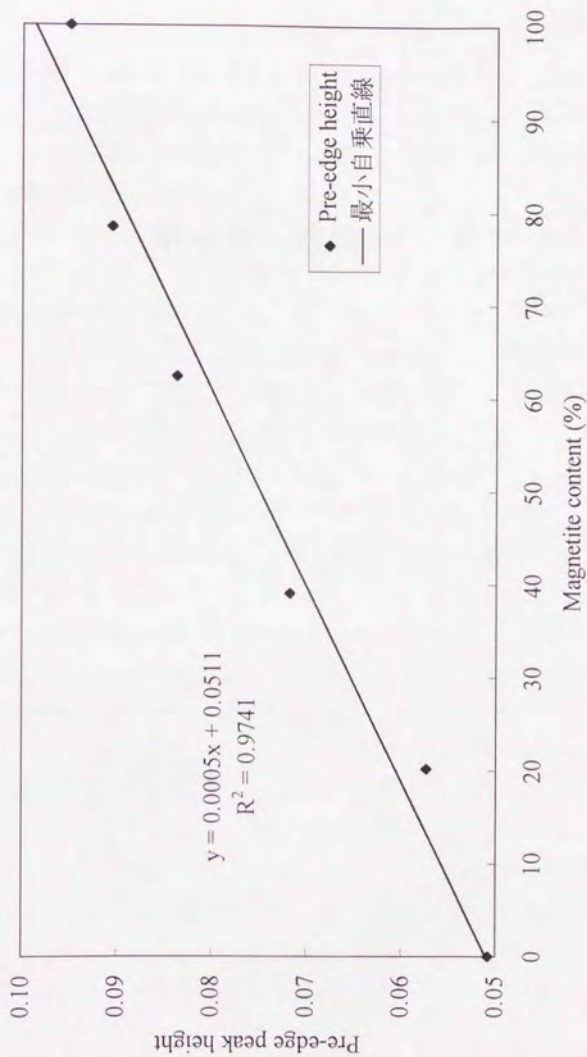


Fig. 3.32 magnetite と γ -FeOOH の混合試料の XANES スペクトルの magnetite 比とプレエッジピーク強度との相関図

第4章 結論

4.1 ヒザラガイの歯の形成プロセス

第3章で得られた分析結果と光学顕微鏡による歯の観察を統合して、Fig. 4.1のような歯の形成メカニズムを推定した。歯の外観で分類した四つの成熟段階は、本研究の鉄の化学形に着目した各種状態分析の結果からもその妥当性が証明されたので、これを基にそれぞれの成熟段階を記載してゆく。

まず Stage I に相当する歯の形成初期段階では、有機質の基底膜に ferritin に類似した非晶質の鉄化合物が濃集し、歯の原型が形成される。この段階ではリン酸カルシウムの歯への濃集は認められない。

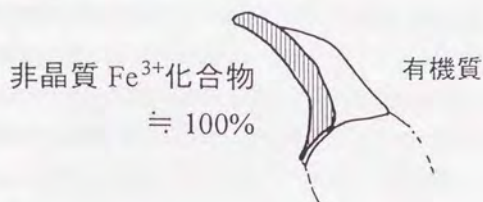
Stage II に入ると歯の外観と強度が著しく変化する。歯の厚みと強度が増し、歯の背中側がなめらかな灰色の着色成分で覆われてくる。鉄の成分としては結晶質の magnetite が全鉄の 90% 近くまで増加し、背面を非晶質のリン酸カルシウムの膜が覆い始めるが、内部には有機質がかなり残っている。

Stage III では歯の背中側の呈色が赤色へ変化するのと同時に非晶質の ferritin 様物質の含有比が増大し始める。リン酸カルシウム膜が背中を覆うのと同時に歯の内部に残っていた有機質が減少してゆく。

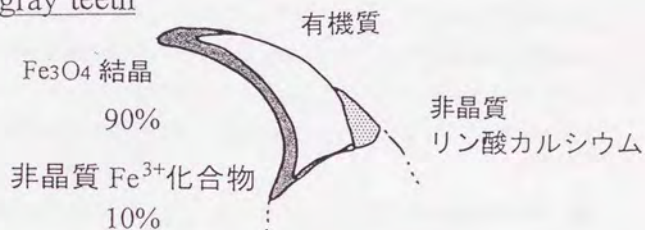
最終段階の Stage IV では、歯の色は黒色に変化し、内部から有機質が消失する。歯の先端から腹の部分にかけて magnetite と ferritin 様物質が混在した鉄に富んだ部分が分布し、背中の方には厚みを増した非晶質リン酸カルシウムが発達している。

この四つの成熟過程すべてにわたり ferritin 様の非晶質の鉄化合物が歯の中に存在し続けるのは興味深い結果であった。この非晶質物質は Stage I の歯の中に存在量が多いことから、magnetite 形成の前駆体であると判断した。magnetite のような鉱物をいきなり細胞内で形成する走磁性細菌とは異なり、効率よく歯の摂餌面に沿って magnetite の生成を行うために、反応の自由度が高く歯の形状を形作るために都合の良い非晶質物質を前駆体として用いているのは合理的であると考えられる。しかし目標の生成物が magnetite であるならば成熟した歯には magnetite のみが存在するはずであり、成熟した歯の中にも ferritin 様非晶質物質が残っているという事実は、この非晶質物質が magnetite の前駆体以上の役割を持っている可能性を示唆している。

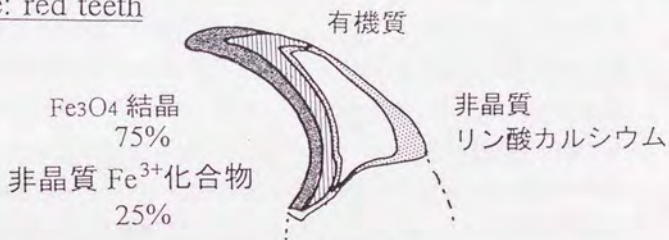
1st. stage: immature teeth



2nd stage: gray teeth



3rd stage: red teeth



Final stage: mature teeth (black teeth)

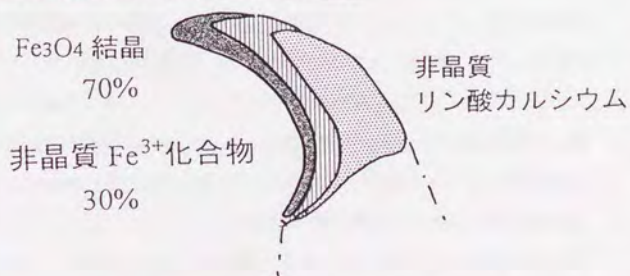


Fig. 4.1 ヒザラガイの歯の形成プロセス

ここで非晶質物質に関して考えられる機能は以下の2点である。まず第一に非晶質物質には劈開がなく柔軟であるので、摂餌の際硬い岩などに接触する歯の摂餌面において、歯が破損することを防ぐショック・アブソーバーとして働くことが期待される。もしヒザラガイが自らの歯を単結晶の磁鉄鉱で形成したとすれば、ある方向に対しては衝撃に強い硬い歯になると思われるが、一方では劈開面に対する応力に弱いもろい歯である側面も付随してしまう。これに対して非晶質は、それ自体では結晶よりも硬度は低い、場合によっては強度は結晶より大きくなる可能性がある。第二に、EPMAの2次元元素マッピングより、FeOOHに相当する組成を持つ鉄化合物の分布領域(Fig. 3.2, Fe, 赤色の部分)がちょうど magnetite を蓄積した摂餌面とリン酸カルシウムをマトリクスとした背面の境界付近に当たることから、この magnetite とリン酸カルシウムという性質が全く異なる2つの物質をつなぐ接着剤のような働きをしている可能性があることも示唆される。

ヒザラガイの歯舌の分析をはじめた当初、全く性質の異なる magnetite とリン酸カルシウムが見事に接合されていることが疑問であった。歯舌を乳鉢で粉碎しても、この2つは分離せずまるで同一の物質であるかのように均一に割れてゆく。また石井らが行った透過型電子顕微鏡での観察からも、両者の境界面に細胞の痕跡や特別な接着物質は見られず、有機物を用いて接合されているのではないことも明らかとなった。ヒザラガイの歯において摂餌面と背面の接合面に接着剤として非晶質の鉄化合物が介在すれば、有機質を利用することなく結晶質の magnetite と非晶質のリン酸カルシウムの双方をなじませることが可能であると考えられ、さらに歯のような無機鉱物にとっては同じ無機質の接合面を形成する方が簡便であると推測された。また、結晶質の magnetite が存在する摂餌面に非晶質の鉄化合物が混在することにより、背面の非晶質のリン酸カルシウムと同じ程度の柔軟さを持った物質になり、衝撃に対しこの2つが分離したり一方のみが磨耗することを防ぐことが可能になると考えられた。以上より、おそらく ferritin 様非晶質鉄化合物は magnetite の微細結晶を包括し非晶質リン酸カルシウムの背面に magnetite を接合する働きをしていると推論することができた。

しかし、ヒザラガイが Stage I において三価の状態では濃集した鉄を、その後還元するという労力を費やしてでも magnetite を選択・合成していることへの根本的な疑問がまだ未解決のまま残っている。天然に産する鉄の酸化物や水酸化物の中で、

FeOOH は一般に針状晶で強度が低く、また $\alpha\text{-Fe}_2\text{O}_3$ や $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ も magnetite よりも強度的に劣る。現段階で考え得る最も硬度の高いものは magnetite である。もしヒザラガイが潮間帯の中で生き残ってゆくに当たり、岩との接触の可能性のある食性のために歯の強度を高める必要があるとすれば、鉄化合物として magnetite を選択するのは妥当であると思われる。あくまで推察の域を出ないが、これまでの研究を通してヒザラガイが鉄を濃集し積極的に magnetite を生成する理由は、磁鉄鉱の持つ磁性よりもやはりその硬度とヒザラガイの食性に根付いているのではないかと考察した。

今後、ヒザラガイの生態を検証しながら、歯が磁鉄鉱を含んでいる生物学意義をさらに検討してゆきたい。また、非晶質物質から magnetite へと物質が変化してゆく様子を化学的見地からさらに詳細に追跡してゆきたい。これらが明らかになった上で始めてヒザラガイの歯という生体鉱物の生成メカニズムが明らかになると考える。

4.2 結言

生体鉱物化現象は、有機質で満ちている細胞から徐々に無機硬組織が生成するという一見矛盾するような現象である。一般に生物の軟組織は、糖やタンパク、アミノ酸など有機物から構成されているので、生物の中にはカニ、エビや昆虫のように、無機鉱物 (calcite) と同時に有機物のキチンやキトサンを利用して硬組織を形成しているものもある。この例からわかるとおり、現在生物が硬組織を形成するため最も一般的に利用している calcite や aragonite, hydroxylapatite といった無機化合物は、有機物・無機物といった膨大な組み合わせが考えられる材料の中から、生物が進化の上で選択して積極的に利用するようになった物質の1つにすぎない。選択によっては有機物も硬組織の材料となり得るのである。

それではなぜ、脊椎動物のほとんどがリン酸カルシウムや炭酸カルシウムといった無機鉱物で骨や歯などの硬組織を形成するようになったのであろうか。なぜ貝類はその殻を無機鉱物で形成するようになったのであろうか。ヒザラガイ類の歯舌でも、酸化鉄やリン酸カルシウムで形成されている歯は17個の歯からなる歯列の中でたった2つのみで、あとの15個は有機質から形成される歯である。なぜすべての歯を無

機鈣物、または有機物で構成することをせず、このように複雑な組織を作り上げているのであろうか。このように硬組織を形成するという作業1つを取り上げても、生物の行っている無機鈣物と有機物の使い分けの根拠や、その制御の方法に関しては、まだまだ我々の理解し得ない、実に複雑な原理が介在しているように思われる。

そして、生物はこの材料の選択に従い、たとえ軟組織とは大きくかけ離れた材料である無機鈣物を構築するためであっても、必要な元素を環境から選択的に取り込み、有機物で構成される生体の中にこの金属イオンやリン酸イオン、炭酸イオンなどを硬組織を形成する場所まで運搬する労力を払って、実に見事な効率で無機鈣物を合成し、硬組織を形成していく。この一連のネットワークがすべて生体の制御下にあることが、生体鈣物化現象が非生物系での無機鈣物形成と大きく異なる点であると考えられる。

このように見事な生体鈣物化現象という無機材料合成法が、これまで物質科学の分野でほとんど研究されてこなかったことは、生体というブラックボックスの中で行われている作業であるという印象が強かったためであるかもしれない。しかし現代はいまやヒトの脳のメカニズムをコンピュータへ応用しようという時代になってきている。これからは、化学や物理、工学といった分野の研究者が、材料合成に関してどんどん生物が行っている手法を学び、より効率の良い方法を模索してゆくような時代になるであろう。そして、研究者の専門分野を越えた歩み寄りと相互の理解が必要であると私は考える。

生物の形態を研究している生物学者は、その熱心な研究活動により、例えば貝が1日にどの程度貝殻を成長させるか、どのような食物から貝殻の材料となるカルシウムを摂取しているか、そしてどのように貝殻を形作ってゆくかについて重要な情報を得ている。一方、鈣物学者や化学者は、炭酸カルシウムやリン酸カルシウムなどの無機塩がどのような結晶形を取りうるか、各結晶形での物性がどのようなものであるかについての造詣が深く、さらにカルシウムなどの陽イオンがどのような有機物とどのように錯形成し、その安定度は環境によりどのように変化するかなどの情報を持っている。しかし、残念なことに現状ではこれらを融合させるような総合科学の分野での研究はまだ始まったばかりである。生物の様に極めて複雑な系を対象とする場合にはすべての探求をたった一人の研究者の手により成し得ることは不可能であり、様々な研究分野の協調こそがこの難解な問題を解決する決め手になると考える。その中で、

化学者の立場でまず第一に行わなくてはならないことは、対象とする生体鉱物の状態を正確に把握することのできるキャラクタリゼーションの手法の確立である。

現在、様々な分析法が開発され様々な研究に用いられ、我々研究者は分析により物質の存在を把握しその同定を行っている。よって、分析法の持つ検出限界が我々が認識できる限界を意味し、分析技術の向上によって、それまで認識されてなかった事象を解明することが可能となってきた。例えば、生物試料が分析対象となる場合、生物が蓄積した元素の濃度分析がほとんどで、状態分析を行った例はまだ少ない。これは ICP-MS のような高感度な定量分析法が近年飛躍的な発展を遂げている一方、試料の質に関する情報を与える状態分析法のなかで高感度のものがほとんど登場していないことに起因すると考える。しかし実際の研究では、生物が蓄積した特定元素がどのような化学状態で体内に存在するか、また生体鉱物試料がどのような物質で構成されているかを知ることは、生体における元素の役割や生体鉱物の生成メカニズムを解明する上で必要不可欠である。

今後、生体内物質や生体鉱物に関する研究は、これまでの量的な研究から質的な研究へと発展することが期待され、非破壊で生体試料に適用可能で、しかも化学種ごとの量比を求めることのできる定量性も兼ね備えた状態分析法の開発がまず第一に必要とされてきている。本研究はこれを受けて、物質科学的な手法を用いて多角的アプローチを行うことにより、歯舌における鉄の状態をマイクロに追跡することができた。鉄の状態分析法の代表格である Mössbauer 分光法は、数種類の鉄化合物が混在しているような試料に対し化学種ごとの成分比を半定量的に算出できる点で、他の状態分析法にはない特長を持っており、本研究でもその有用性を確認できた。一方本研究では、平行性と輝度の高いシンクロトロン放射光を用いた XAFS 法を、Mössbauer 分光法と比較してはるかに感度が高く、さらに入射 X 線を集光することにより空間分解能を上げることが可能で、バルク分析から数 μm 径の微小領域の状態分析へと多様な分析が可能である分析手法として発展させる可能性を見いだした。特に生体試料のような複雑な組織を有する試料の状態分析に XAFS 法が適していることを、一連の研究の中で実証することができた。

現在、さらに高輝度な放射光を利用することのできる大型放射光実験施設の建設が日本の Spring-8 をはじめ世界各地で進んでおり、今後、放射光を利用した XAFS

測定はその測定時間を短縮したり、測定の空間分解能や検出限界、測定可能元素種などを飛躍的に向上させることが可能となるであろう。それに伴い複雑な組織を持ちかつ含有元素濃度が低い生体試料の分析にも XAFS 法の利用が広がってゆくと思われる。さらに、これまで XAFS 法にとって大きなネックであった測定時間が最低 20 分程度かかるという問題に対して、測定時間を短縮し、反応速度の速い反応や不安定な反応中間体を捉えてゆく様々な試みがなされている。特に複雑な生体内の反応を *in situ* で追跡することが可能となれば、我々研究者にとってこれまで black box であった生体内での化学反応を解明する糸口を見いだすことができ、これまで本研究で取り扱ってきた生体鉱物についても最終生成物である歯や腎臓顆粒などだけでなく、その反応過程の中間生成物の状態も知ることが可能となる。この XAFS 法に Mössbauer 分光法のような化学種の量比を決定できる定量性が備われば、ユニークでかつ強力な分析手法となり得ることから、本研究では XAFS 法により微小領域の magnetite と ferritin 様 Fe^{3+} 非晶質物質の存在比を見積もることを検討し、Mössbauer 分光法と相補的な定量性を XAFS 法が持つことを実証した。高空間分解能、高時間分解能、高感度、化学種ごとの定量性すべてを兼ね備えた XAFS 法を活用し、生体鉱物化現象のようなユニークでしかし複雑な生体内での反応を解明するために、この博士課程の研究で築いた研究結果や分析技術を第一歩として、今後さらに研究を発展させてゆきたいと思う。

謝辞

この生体鉱物化現象という化学・生物・鉱物学の境界分野の研究を進めるに当たり、博士課程の3年間で本当に多くの方々の助けをいただきまして、こうして成果をまとめることができました。特に、地質学教室から化学教室に転専攻するという私にとって大きな転機の事態に快く私を受け入れていただき、かかる一切の手続きもお引き受けくださり、その後の2年間常に暖かい励ましのお言葉と丁寧なご指導で私を導いてくださいました高野穆一郎教授には、感謝の言葉もありません。また同じ研究室で私に Mössbauer 分光法での研究をおすすめてくださった松尾基之先生には、お忙しい中、多くの時間を私の分析の指導に当てていただきました。感謝いたします。鈴木勝彦助手には、日常の研究生活の中での有意義な議論で私が気づけなかった新たな見解をご助言いただいたり、実験でお世話になりました。私が、高野研でのすばらしい2年間を送れましたのも、この3人の優秀で温厚なスタッフの方々のおかげです。本当にありがとうございました。

また、博士課程の1年間を過ごさせてくださいました地質学教室の皆様には、私が化学教室へ転専攻した後も以前と全く変わらないご厚意を賜りました。中でも EPMA や SEM などの測定装置の使用継続を許可していただき、3年間にわたり分析のご指導と分析結果の解析の際のご助言をいただきました吉田英人さんには、とても感謝しています。また、ヒザラガイの試料を快く分けていただき、生物分野の知識が少ない私を全面的にサポートしてくださいました東京大学資料館の塚越 汐里さん。ありがとうございました。1年間の短い間でありましたが指導教官として私に数々の機会を与えていただき、特に、顕微赤外装置を使った微小部の赤外吸収スペクトル測定をご指導いただきました。東京大学大学院地質学教室の中島悟助教授には、本当にお世話になりました。私にとって地質学教室に所属していた1年間は、毎日が新鮮な驚きと感動の連続でした。化学とは異なった地質学という学問分野の一端をかいま見ることができたことはおそらく私の一生の糧となると思います。また地質学にとっては全く毛色の違う研究を行っていた私を、暖かく迎え入れてくださり、自分のことのように心配してくださった地質学教室の院生のみなさん。皆さんとの思い出は何者にも代え難いものです。すばらしい時間をありがとうございました。

修士時代より共同研究者として私に数々の機会を与えてくださった放医研の石井紀明先生、石巻専修大の大越健嗣先生。化学の人間である私がこのような興味深いテーマに出会えたのも、また博士課程でも研究を発展させることができたのも、すべて先生方のおかげです。ありがとうございました。

筑波大の学生時代から、5年にわたり XAFS の測定をさせていただきました高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の野村昌治先生にはとてもお世話になりました。また顕微可視測定装置使用を快く許可していただき、貴重なデータを採らせていただきました日本原子力研究所の永野哲志さん、磯部博志さんにも、ここで感謝の言葉を述べさせていただきたいと思います。

また、学部の学生時代から6年もの間未熟な私を導き、化学の研究を1から教えてくださった東京理科大学の中井 泉助教授には、ひとかたならぬご苦勞をおかけいたしましたことをお詫びするとともに感謝いたします。

最後に、一人娘の私の大学院進学に理解を示してくださり、今日に至るまで私を見守り支えてくれた母に、この論文を捧げたいと思います。

1995年 12月 沼子 千弥

付録 : EXAFS 解析

EXAFS の解析は、実測の X 線吸収スペクトルから EXAFS 振動 $\chi(k)$ を抽出し、それを各シェルからの成分に分け、それぞれの周期と振動を調べるという一連の操作により行われている。以下に順を追って述べる。

まず解析の第一段階として、エネルギー依存性のある X 線吸収係数 $\mu_d(E)$

$$\mu_d(E) = \ln(I_0(E)/I(E)) \quad (1)$$

からなる実測の X 線吸収スペクトルから、試料の吸収による振動部分 $\mu(k)$ と原子が孤立していると仮想した場合の吸収係数 $\mu_0(k)$ を求めて振動成分 $\chi(k)$ を計算する。この k とは、(2) 式によって光電子のエネルギーを波数に換算したものである。

$$k = [2m(E - E_0)/\hbar^2]^{1/2} \quad (2)$$

このため、まず実測したデータから光路中の空気、 I_0 測定用の電離箱中のガスやセルの窓材の吸収、溶媒や担体の吸収といったすべてのバックグラウンド μ_v を見積もり、

$$\mu(E) = \mu_d(E) - \mu_v(E) \quad (3)$$

によって注目する吸収端だけに関係する吸収係数 μ を求める必要がある。通常はバックグラウンドに関連する物質の種類や濃度・厚さといった実験条件からバックグラウンドの吸収係数を計算することは容易ではない。そこで、目的元素による X 線吸収が行われていないと見なせる X 線吸収端の前の実測の吸収曲線を用い、Victreen の式⁸²⁾ (式 (4)) を最小自乗法でフィットし、それを吸収端以降のエネルギー領域に補外してバックグラウンド $\mu_d(E)$ に相当する曲線を作成した (Fig. 5.1 (a))。ここで μ は吸収係数 ($\ln(I_0/I)$)、 ρ は密度で、 μ/ρ は質量吸収係数である。 α (K-N) は自由電子の散乱断面積を与えるものでクライン-仁科の式として知られている。 λ は X 線の波

長、 N はアヴォガドロ数、 A は原子量である。

$$\mu / \rho = C\lambda^3 - D\lambda^4 + \alpha (K-N) NZ / A \quad (4)$$

本研究ではこの Victreen の式をさらに簡略化し、

$$\mu v = C\lambda^3 - D\lambda^4 + \text{const.} \quad (4)'$$

のような C , D , Const. の計3つのパラメーターをもつ式として最小自乗フィッティングに用いた。

さて、 $\mu_0(k)$ は原子が孤立していると仮想した場合の吸収スペクトルであるので、実験的に求めることは不可能であり、理論から計算できるものでもないため、 $\mu(E)$ から適当に推定するほかにはない。この部分が EXAFS 解析をオペレーター依存の高い解析法とさせている最も大きな原因である。一般的にデータ上で $\mu_0(k)$ を推定する方法には、a) cubic spline 法、b) 適当な多項式で最小自乗カーブフィッティングを行う方法、c) 繰り返しによる平均化を行う移動平均法、および d) これらの組み合わせ、などがある。本研究では b) の方法を用い6次関数で $\mu_0(k)$ を見積もった (Fig. 5.1 (b))。しかしこの方法で推定したものが真の $\mu_0(k)$ である保証はなく、この推定を含む EXAFS 解析全体の妥当性を確認するため、実試料と同様の条件で測定した構造・組成が既知である標準試料の解析も同時に行い、最終的に得られた構造パラメーターが X 線回折法での解析値とどの程度合致するかという検討により解析の信頼性をはかった。

次に、現在エネルギースケールで表されている $\mu(E)$ から、式(2)と式(5)を用いて、光電子の波数を変数とした EXAFS 関数 $\chi(k)$ を算出した (Fig. 5.1 (c))。ここで E_0 は光電子が放出されるしきい値、すなわち X 線吸収端のエネルギー値であり、 E は各測定定点の吸収 X 線のエネルギー値、 m は電子質量、 \hbar はプランク定数 2π である。ここで E_0 については、各スペクトルの X 線吸収端の立ち上がりの部分の変曲点

を 2.7.3.2 で述べる微分スペクトルより決定した。

$$\chi(k) = (\mu(k) - \mu_0(k)) / \mu_0(k) \quad (5)$$

さて、ここで EXAFS から吸収原子の局所構造を解析するために、様々な仮定と量子力学的な光電子波の取り扱いにより導出された、理論的な EXAFS の波の式を示す。これらの導出の過程（1 回散乱平面波近似による）についてはここでは省略し、文献を挙げるに止める⁵⁶⁻⁶⁰⁾。

$$\chi(k) = \sum_i \chi_i(k) \quad (6)$$

$$\chi_i(k) = A_i(k) \cdot \sin(2kR_i + \delta_i(k)) \quad (7)$$

$$A_i(k) = N_i \cdot |f_i(k, \pi)| \cdot \exp(-2(\sigma_i^2 k^2 + R_i/\lambda)) / kR_i^2 \quad (8)$$

$$\delta_i(k) = \delta^a(k) + \delta^b_i(k) - \pi \quad (9)$$

ここで i は殻の番号であり、各殻は中心原子からほぼ同じ距離 R_i にある N_i 個の同種の原子から構成されているものとしている。静的・動的な乱れは Debye-Waller 因子 σ_i 、光電子波の寿命は平均自由行程 λ として考慮に入れている。光電子の運動量 k に依存する $f_i(k, \pi)$ は光電子が周辺源子により散乱されるときに散乱能で後方散乱振幅という。また $\delta_i(k)$ は位相因子であって、中心原子による部分 ($\delta^a(k)$) と散乱原子による部分 ($\delta^b_i(k)$) からなる。後方散乱振幅 $f_i(k, \pi)$ や位相因子 $\delta_i(k)$ は原子または原子対によって決まった関数であり、原子番号によって穏やかに変化する。これらの式は観測される EXAFS 振動 $\chi(k)$ が各殻からの EXAFS 振動の和 $\sum \chi_i(k)$ であり、その各成分は光電子の波数ベクトル k について周期的に変化する部分とその振幅部分とに分けられること、そしてそれぞれが構造パラメータ R_i 、 N_i と式 (7), (8) によって結びつけられていることを意味している。

まず周期からは原子間距離の情報が得られる。もし位相因子 $\delta_i(k)$ が k の一次関数 $\delta_i(k) = a_0k + a_1$ であると近似すれば、式 (7) は

$$\chi_i(k) = A_i(k) \cdot \sin((2R_i + a_0)k + a_i) \quad (7)$$

と表せるので、振動の周期を k_0 とすると $k_0 = \pi / (R_i + a_0/2)$ となる。逆に原子間距離 R_i は $R_i = \pi / k_0 - a_0/2$ である。この式の意味するところは、原子間距離が長いものは EXAFS の振動の周期が短く、EXAFS 振動の波うちの周期は原子間距離に反比例するというものである。 $a_0/2$ は phase shift と呼ばれ、構造既知の類似化合物のデータから決定したものを流用することができ、また理論計算もなされている。本解析では Teo と Lee^{9,11} によって算出された値を解析に用いた。

次に振幅項 A_i からは、まず EXAFS 振動の振幅が配位数 N_i に比例するということがわかる。また式 (8) の $\exp(-2R_i/\lambda) / R_i^2$ という項があるので、中心原子から散乱原子の距離が遠くなるについて EXAFS 振動への寄与は急激に減少することもわかる。この項のために EXAFS は中心原子のごく近傍の局所構造だけを反映することになる。また λ を別の方法で見積もることができれば R_i は周期から決定できるので、次いで振幅の k 依存性のない部分から N を決めることができる。 k に大きく依存するものとしては $f_i(k, \pi)$ と、 $\exp(-2\sigma_i^2 k^2)$ があるので、振幅の k に大きく依存する部分から乱れの因子 σ_i を評価したり、 $f_i(k, \pi)$ の形から隣接原子の種類についての情報を得ることができる。

こうして抽出した波数 (k) 空間の関数である EXAFS 振動 $\chi(k)$ をフーリエ変換を用いて距離 (R) 空間の動径分布関数 (Radial Distribution Function) $\Phi(R)$ (式 (10)) に変換して、各成分を分離するのが次のステップとなる (Fig. 5.1 (d))。

$$\Phi(R) = (2\pi)^{-1/2} \int_{k_{\min}}^{k_{\max}} w(k) k^n \chi(k) \cdot \exp(-2ikR) dk \quad (10)$$

$$w(k) = \begin{cases} [1 - \cos\{\pi(k - k_{\min})/d\}]/2 & k_{\min} < k < k_{\min} + d \\ 1 & k_{\min} + d < k < k_{\max} - d \\ [1 - \cos\{\pi(k_{\max} - k)/d\}]/2 & k_{\max} - d < k < k_{\max} \end{cases} \quad (11)$$

ここで $w(k)$ は有限データである $\chi(k)$ をフーリエ変換するために生じる打ち切り誤差の影響を少なくするために用いた式(11)で表される Hanning 型の窓関数^{9,21)}である。その他窓関数としてガウス関数や Hamming 型の窓関数^{9,21)}などを用いる場合もある。このフーリエ変換の操作において通常は式(8)に表されている分母の k と $f(k, \pi)$ が含む k^{-2} 依存性とを打ち消すために、 $\chi(k)$ に対し k^n ($n=1\sim 3$) の重みをかける。本研究で用いた蛍光 XAFS 法による測定データの場合、透過法でのデータに比べてノイズの成分が多く、通常の解析で用いる k^3 の重み付けでは、 k の大きな領域で EXAFS 振動と同時にノイズも拡大されてしまう危険性がある。そこで標準試料や鉄の含有量の高い試料の場合には k^3 で、鉄の含有量の低い試料のデータ解析ではノイズを押さえる効果の方を重要視して、 k^2 で重み付けを行なった。

さて、複数の元素を含む試料のデータの場合には位相因子の補正をせずにフーリエ変換をするので、動径分布関数上には実際の結合距離より $0.2\sim 0.5\text{\AA}$ 短いところにピークが現れてしまう。そこで正しい構造パラメータを求めるために $\Phi(R)$ 上の個々のピークを取り出し、式(12)の逆フーリエ変換を施して各々の殻からの EXAFS 振動 $\chi_i(k)$ に戻し、抽出した実測データからの EXAFS 振動 $\chi^{\text{obs}}(k)$ と計算で求めた EXAFS 振動 $\chi^{\text{calc}}(k)$ との差(式(14))を最小にするように最小自乗カーブフィッティングにより理論曲線にフィッティングさせることによって $N_i, R, \sigma, \lambda, E_0$ の5つのパラメータを求めた。逆フーリエ変換を行う際には、打ち切り効果を軽減するために式に示した様な窓関数(式(13))を用いた。また最小自乗カーブフィッティングの計算を行うにあたっては後方散乱振幅 $f_i(k, \pi)$ と全位相因子 $\phi_i(k)$ の値が必要であるが、本研究では Teo と Lee が算出したものを用いた^{9,11)}。

$$k^n \chi(k) = (2\pi)^{-1/2} \int_{R_{\min}}^{R_{\max}} w(R) \Phi(R) \cdot \exp(2ikR) dR \quad (12)$$

$$w(R) = \begin{cases} [1 - \cos\{\pi(R - R_{\min})/d\}]/2 & R_{\min} < R < R_{\min} + d \\ 1 & R_{\min} + d < R < R_{\max} - d \\ [1 - \cos\{\pi(R_{\max} - R)/d\}]/2 & R_{\max} - d < R < R_{\max} \end{cases} \quad (13)$$

$$\sum_m k_m^n \{ \chi_m^{\text{obs}}(k_m) - \chi_m^{\text{calc}}(k_m) \}^2 \quad (14)$$

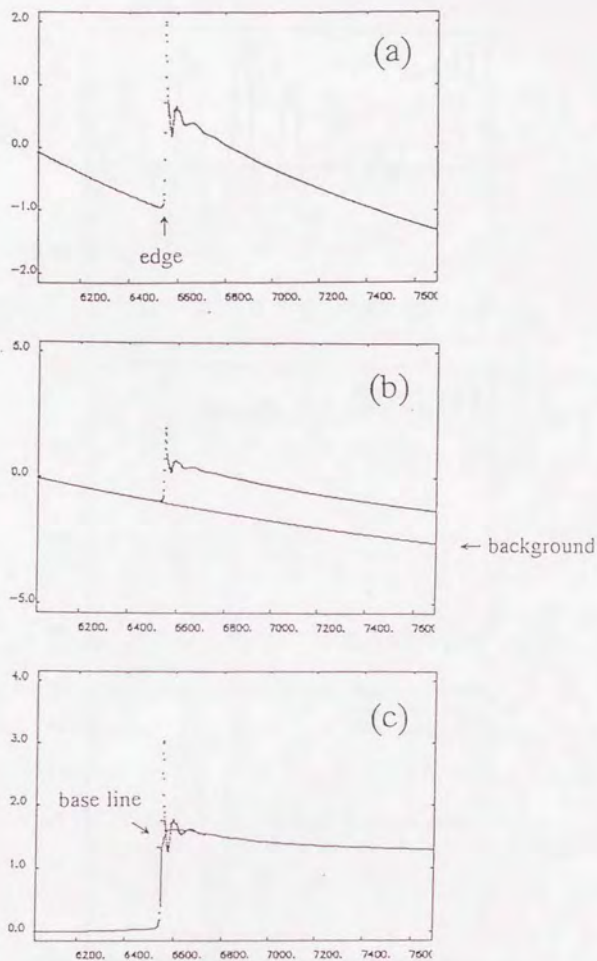


Fig. 5.1 EXAFS 解析の手順 その1

- (a) Mn^{2+} 水溶液の Mn K- 吸収端スペクトル (生データ)
XANES 領域および EXAFS 領域の両方を含んでいる
- (b) Victreeen の式によるなめらかなバックグラウンド吸収曲線の補外
- (c) バックグラウンドを差し引いたスペクトルに対し作成した
6 次の多項式によるベースライン

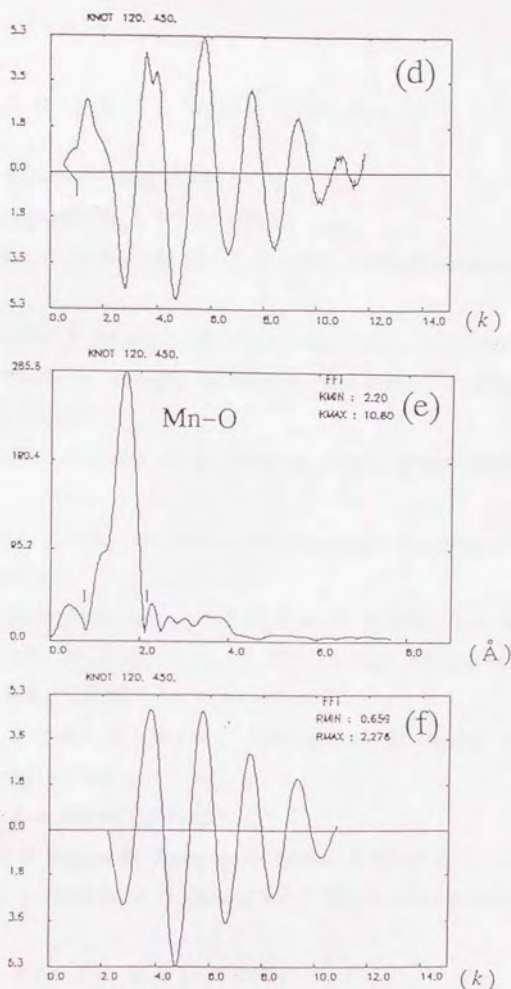


Fig. 5.1 EXAFS 解析の手順 その2

- (d) バックグラウンドを差し引き、波数ベクトル k の関数として EXAFS を抽出した k^3 重み付き $\chi(k)$ 曲線
- (e) $k^3 \cdot \chi(k)$ 曲線をフーリエ変換し得られた Mn 原子周りの動径分布関数
- (f) (e) にみられる 1.7 \AA 付近の Mn-O 結合による第一ピークを逆フーリエ変換し得られた $k^3 \cdot \chi(k)$ 曲線

引用文献

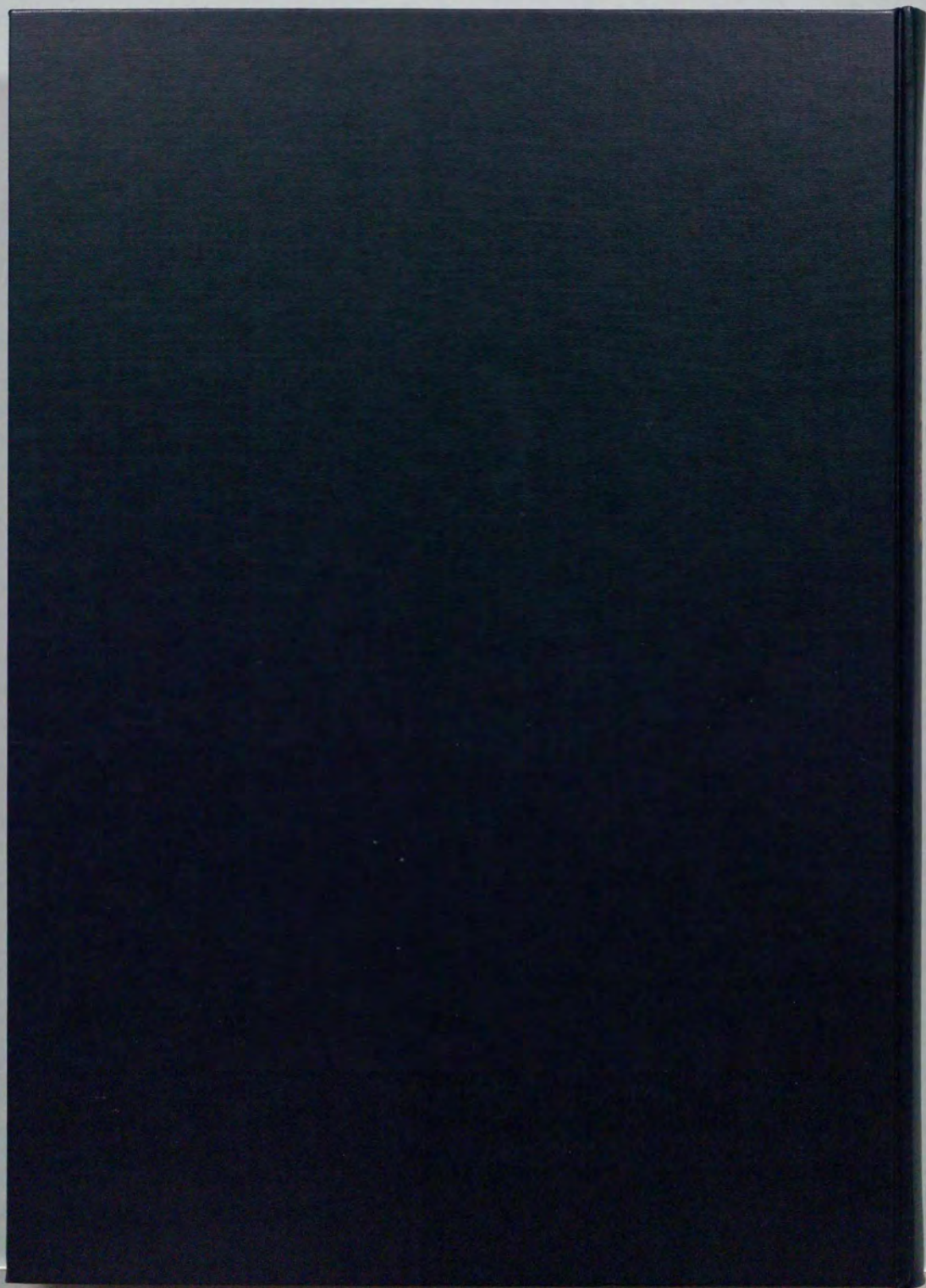
- 1) E. Takahashi, *Kagakutoseibutsu*, 14, 645 (1976).
- 2) H. Michibata, *Seikagaku*, 66, 6, 495-509 (1994).
- 3) T. Ishii, I. Nakai, C. Numako, K. Okoshi, T. Otake, *Naturwissenschaften*, 80, 268-270 (1993).
- 4) I. Nakai, C. Numako, K. Okoshi, T. Ishii, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 32-2, 559-560 (1993)
- 5) T. Ishii, Y. Takaku, M. Ishikawa, M. Matsuba, M. Kurosawa, T. Koyanagi, *Environ. Sci.*, 2 (3), 177-191 (1989).
- 6) T. Ishii, K. Okoshi, T. Otake and M. Nakahara, *Nippon Suisan Gakkaishi* 58 (1992) 1285.
- 7) T. Ishii, K. Ikuta, T. Otake, M. Hara, M. Ishikawa and T. Koyanagi, *Bull. Japan Soc. Sci. Fish* 52 (1986) 147.
- 8) C. Numako, I. Nakai, K. Okoshi, and T. Ishii, Proc. 7th Int. Conf. X-ray Absorption Fine Structure, Kobe, 1992, *Jpn. J. Appl. Phys.* vol. 32 (1993) Suppl. 32-2 pp.556-558
- 9) 沼子千弥、中井泉, 月刊海洋, 25, 10, 653-659 (1993).
- 10) C. Numako, I. Nakai, K. Okoshi, T. Ishii, *Bulletin de l'Institut ocnographique, Monaco*, 14, 1, 105-113 (1994).
- 11) K. Simkiss, *J. Exp. Biol* 94 (1981) 317.
- 12) G. N. Greaves, K. Simkiss, M. Taylor and N. Binsted, *Biochem. J.*, 221 (1984) 855.
- 13) M. G. Taylor, K. Simkiss, G. N. Greaves and J. Harries, *Proc. R. Soc. Lond. B* 234 (1988) 463.
- 14) 小松 啓, セラミックス, 28, 1, 26-31 (1993).
- 15) R. P. Blackmore, *Science*, 190, 24,377-379(1975)
- 16) H. A. Lowenstam, *Science*, 211 1126 (1981).
- 17) S. Mann, R. B. Frankel, R. P. Blackmore, *Nature*, 310, 2, 405-407 (1984).
- 18) T. Matsuda, J. Endo, N. Osakabe, K. Tonomura, T. Arai, *Nature*, 302, 31, 411-412 (1983).
- 19) K. M. Towe, T. T. Moench, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 52, 213-220 (1981).

- 20) F. C. Meldrum, S. Mann, B. R. Heywood, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, *Proc. R. Soc. Lond B*, 251,231-236 (1993).
- 21) F. C. Meldrum, S. Mann, B. R. Heywood, R. B. Frankel, D. A. Bazylinski, *Proc. R. Soc. Lond, B* 251,237-242 (1993)
- 22) T. Matsunaga, S. kamiya, *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 26, 328-332 (1987).
- 23) S. Mann, N. H. C. Speaks, R. P. Blackmore, *Proc. R. Soc. Lond B*, 231, 469-476 (1987)
- 24) S. Mann, N. H. C. Speaks, R. P. Blackmore, *Proc. R. Soc. Lond B*, 231, 477-487 (1987)
- 25) R. B. Frankel, R. P. Blackmore, *J. Magn. Mag. Mater.*, 15-18, 1562-1564 (1980).
- 26) C. Rosenblatt, F. Flavio Torres de Araujo, R. B. Frankel, *J. Appl. Phys*, 53-3, 2727-2729 (1982).
- 27) R. B. Frankel, *Science*, 203, 30, 1355-1356 (1979).
- 28) J. L. Gould, J. L. Kirschvink, K. S. Deffeyes, *Science*, 203, 30, 1355-1356 (1979).
- 29) T. Sakaguchi, J. G. Burgess, T. Matsunaga, *Nature*, 365, 2, 47-49 (1993).
- 30) J. L. Kirschvink, J. L. Gould, *BioSystems*, 13, 181-201 (1981).
- 31) 前田 豊、溝田 学、*固体物理*、19, 1, 52-60 (1984).
- 32) 前田 豊、溝田 学、*生物物理*、24, 4, 219-214 (1984).
- 33) H. L. Veagley, *J. Appl. Phys.*, 18, 1035 (1947).
- 34) H. L. Veagley, *J. Appl. Phys.*, 22, 746 (1951).
- 35) 上田一夫、*電子通信学会誌*、51, 1079 (1981).
- 36) Troschel, *Das Gebiss der Schnecken*, pp. 27-30 (1956).
- 37) Sollas, *Quart. J. micr. Sci. M. S* 51, 115 (1907).
- 38) Janes, *J. Exp. Biol.*, 12, 59-64 (1935).
- 39) S. Mann, C. C. perry, J. Webb, B. Luke, R. J. P. Williams, F. R. S., *Proc. R. Soc. Lond, B* 227, 179-190 (1986).
- 40) T. G. St. Pierre, S. Mann, J. Webb, D. P. E. Dickson, N. W. Runham, R. J. P. Williams, F. R. S., *Proc. R. Soc. Lond, B* 228, 31-42 (1986).
- 41) P. Van der Wal, *J. Ultrastru. Mol. Stru. Res.*, 102, 147-161 (1989).

- 42) H. A. Lowenstam, *Science*, 171, 487-490 (1971).
- 43) H. A. Lowenstam, *Science*, 137, 279-280 (1962).
- 44) H. A. Lowenstam, *Science*, 156, 1373-1375 (1967).
- 45) J. L. Kirschvink, H. A. Lowenstam, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 44, 193-204 (1979).
- 46) K. S. Kim, D. J. Macey, J. Webb, S. Mann, *Proc. R. Soc. Lond.*, B 237, 335 (1989).
- 47) D. J. Macey, J. Webb, L. R. Brooker, *Bulletin de l'Institut ocnographique, Monaco*, 14, 1, 191-197 (1994).
- 48) M. Mizota, Y. Maeda, *Hyperfine Interactions*, 29, 1423-1426 (1986).
- 49) Okoshi, private communications.
- 50) H. Lowenstam, S. Weiner, *On biomineralization*, Oxford University Press, New York. (1989).
- 51) S. Suga, *Tooth Enamel IV*, ed. R. W. Fernhead and S. Suga, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 472-477 (1984).
- 52) S. Suga, Y. Taki, *J. Dent. Res.*, 63, 185 (1984).
- 53) S. Suga, *J. Dent. Res.*, 63, 560 (1984).
- 54) 宇田川康夫 編, *X線吸収微細構造—XAFSの測定と解析*, 日本分光学会測定法シリーズ 26, 学会出版センター (1993).
- 55) 錦田晃一、西尾悦雄, *チャートで見る FT-IR*, 講談社サイエンティフィック (1990).
- 56) L. V. Azaroff, *Rev. mod. Phys.*, 35, 1012 (1963).
- 57) T. Shiraiwa, T. Ishimura, M. Sawada, *J. Phys. Soc. Japan*, 13, 847, (1958).
- 58) 白岩俊男, *応用物理*, 56, 851 (1987).
- 59) D. E. Sayers, E. A. Stern, F. W. Lytle, *Phys. Rev. Lett.*, 27, 2401 (1972).
- 60) E. A. Stern, D. E. Sayers, F. W. Lytle, *Phys. Rev.*, B11, 4836 (1975)
- 61) G. Calas, J. Petiau, *Solid State Commun.*, 48, 7 625-629 (1983).
- 62) D. R. Sandstrom, F. W. Lytle, P. S. P. Wei, R. B. Greggor, J. Wong, P. Schultz, *J. Non-Crystalline Solids*, 41, 201-207 (1980).
- 63) H. Bertagnolli, T. S. Ertel, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 33, 45-66 (1994).
- 64) K. Ozutsumi, T. Kawashima, *Polyhedron*, 11, 2, 169-175 (1992).

- 65) K. Ozutsumi, Y. Uchida, T. Kawashima, *Anal. Sci.*, 6, 573-577 (1990).
- 66) T. D. Tullius, W. O. Gillum, R. M. K. Carlson, K. O. Hodgson, *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 5670 (1980).
- 67) 佐藤文俊、飯塚哲太郎、城宜嗣、桑原裕司、山口博隆、大柳宏之、*放射光*, 4, 2, 151-156 (1991).
- 68) D. P. Diakun, L. Fairall, A. Klug, *Nature*, 328, 18, 25, 698-699 (1986).
- 69) I. Sagi, M. R. Chance, *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 8061-8066 (1992).
- 70) R. C. Holz, S. P. Salowe, C. K. Smith, G. C. Cuca, L. Que, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 9611-9614 (1992).
- 71) M. D. Wirt, M. Kumar, S. W. Ragsdale, M. R. Chance, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 2146-2150 (1993).
- 72) C. Bagyinka, J. P. Whitehead, M. J. Maroney, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 3576-3585 (1993).
- 73) A. E. True, R. C. Scarrow, C. R. Randall, R. C. Holz, L. Que, Jr., *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 4246-4255 (1993).
- 74) E. Nordlander, S. C. Lee, W. Cen, Z. Y. Wu, C. R. Natoli, A. Di, Cicco, A. Filipponi, B. Hedman, K. O. Hodgson, R. H. Holm, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 5549-5558 (1993).
- 75) J. P. Whitehead, R. J. Gurbiel, C. Bagyinka, B. M. Hoffman, M. J. Maroney, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 5629-5635 (1993).
- 76) R. A. Scott, S. Wang, M. K. Eidness, A. Kriauciunas, C. A. Frolik, *V. J. Chem. Biochemistry*, 31, 4596-4601 (1992).
- 77) A. M. Orville, V. J. Chen, A. Kriauciunas, M. R. Harpel, B. G. Fox, E. Munck, J. D. Lipscomb, *Biochemistry*, 31, 4602-4612 (1992).
- 78) C. R. Randall, Y. Zang, A. E. True, L. Que, Jr., J. M. Charnock, D. Garner, *Biochemistry*, 32, 6664-6673 (1993).
- 79) C. T. Dameron, G. N. George, P. Arnold, V. Santhangopalan, D. R. Winge, *Biochemistry*, 32, 7294-7301 (1993).
- 80) L. M. Van der Heijdt, M. C. Feiters, S. Navaratnam, H. F. Noling, C. Hermes, G. A. Veldink, J. F. G. Vliegthart, *Eur. J. Biochem.*, 207, 793-802 (1992).

- 81) F. W. Lytle, R. B. Gregor, D. R. Sandstrom, E. C. Marques, J. Wong, C. L. Spiro, G. P. Huffman, F. E. Huggins : *Nucl. Instrum. Methods*, 226, 542 (1984).
- 82) J. A. Victreen, *J. Appl. Phys.*, 19, 855 (1948).
- 83) T. Ishii, private communications.
- 84) A. Raman, B. Kuban, A. Razvan, *Corros. Sci.*, 32, 12, 1295-1306 (1991).
- 85) A. Baumer, M. Ganteaume, W. E. Klee, *Bull. Mineral.*, 108, 145-152 (1985).
- 86) D. Naris, A. B. Beskorovainy, *Biochemistry of Nonheme Iron*, Chap. 3, Plenum Press, New York (1980).
- 87) G. A. Waychunas, M. J. Apter, G. E. Brown, *Phys. Chem. Minerals*, 10, 1 (1983)
- 88) J. Wong, F. W. Lytle, R. P. Messmer, D. H. Maylotte, *Phys. Rev. B*, 30, 5596 (1984)
- 89) K. Sakurai, A. Iida and Y. Gohshi, *Anal. Sci.*, 4, 37 (1988).
- 90) 桜井健次, *日本金属学会会報*, 32, 5, 323 (1993)
- 91) B. K. Teo, P. A. Lee, A. L. Simons, *J. Am. Chem. Soc.*, 99, 3856 (1977).
- 92) F. J. Herris, *Proc. IEEE*, 66, 1, 51-83 (1978).



inches
cm 1 2 3 4 5 6 7 8

Kodak Color Control Patches

© Kodak, 2007 TM: Kodak



Kodak Gray Scale



© Kodak, 2007 TM: Kodak

A 1 2 3 4 5 6 M 8 9 10 11 12 13 14 15 B 17 18 19

