

報 文

ヒザラガイの歯に濃集した鉄の X 線吸収微細構造法による状態分析

沼子 千弥^{®*}, 中 井 泉^{**}, 石井 紀明^{***}, 高野 穆一郎^{*}

(1995 年 5 月 25 日受付)

(1995 年 7 月 20 日審査終了)

ヒザラガイは、鉄を高濃度に濃集した歯を形成し、この歯が磁性を持つことからユニークな存在として注目されている。鉄を濃集した歯は基底膜の上に約 70 対存在し、その成熟過程で形状が変化するが、本研究ではそれに伴う鉄の化学形の変化を調べるためにシンクロトロン放射光を利用する X 線吸収微細構造 (XAFS) 法を適用した。X 線回折の測定からは結晶成分としては磁鉄鉱のみが検出され、更に X 線プローブマイクロアナリシス (EPMA) により鉄は歯の先端部から腹側にかけての摂餌面に局在していることが確認された。蛍光 XAFS 測定の結果、歯の形成初期の段階では鉄は三価の非晶質酸化水酸化物 (FeOOH) として沈着され、その後部分的に還元を受け二価と三価の混合した磁鉄鉱 (Fe_3O_4) を形成してゆくことが明らかとなった。又、ヒザラガイの歯は成熟過程において、褐色、灰色、赤色、黒色と 4 段階の変色を示すが、歯に含まれる鉄の状態もこれに伴い変化しており、歯の外観と鉄の化学形に相関があることが分かった。

1 緒 言

生物界には特定の元素を特定の器官に濃集する、いわゆる生体濃縮現象がしばしば観察される。例えばホヤは血液中にバナジウムを、ヒザラガイやカサガイは歯の中に十万 ppm もの鉄を濃集することで知られている。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やカサガイのほか例を見ない。特にヒザラガイはその歯に磁性があることで 20 世紀初頭から生物学者の興味を引いている。

ヒザラガイ [Photo. 1, (a)] の鉄の濃集した歯は有機質の基底膜の上に約 70 対付着していて、これらを合わせて歯舌と呼ぶ [Photo. 1, (b)]。歯舌の先端部の歯は摂餌に使用されるのに十分な硬度を持っているが、その反対側に位置する歯舌のう(嚢)という部分では常に新しい歯が形成されており、この未成熟な歯は表面が非常に粗く硬度も低い。歯舌嚢で形成された歯は基底膜と共に徐々に口のほうに押し出されてゆく。その過程で成熟が進み、最初は褐色であった歯の色は灰色、赤色、そして

最終的には黒色へと変化してゆく [Photo. 1, (d)~(g)]。Kim らはこの色の変化の順に歯の成熟段階を Stage I から Stage IV まで分類している¹⁾²⁾。

このようなヒザラガイの歯の形状の変化に伴う鉄の化学形の変化を X 線回折法や電子線回折法などを用いて研究した例があり、これらの研究では歯の中に存在する鉄の結晶質成分が磁鉄鉱 (Fe_3O_4) や酸化水酸化鉄 (α -, γ - FeOOH)、Ferrihydrite ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) のような状態であることが示された¹⁾²⁾。しかし、生体内で細胞から鉄の沈着が起こる際、突然結晶質の物質が生成することは想像しにくく、むしろ非晶質物質を前駆体として徐々に結晶成長が行われると考えるほうが妥当である。ヒザラガイの歯の生成初期段階でどのような化学形の鉄が沈着しているのか、又その後歯の成熟に伴いどのように鉄の状態が変化してゆくのか、そのプロセスを明らかにすることを目的に、本研究では歯の結晶成分を X 線回折法により同定し、非晶質成分と結晶成分の双方に関して X 線吸収微細構造法 (X-ray absorption fine structure, XAFS 法)³⁾ でバルク分析を行った。XAFS 法は気体・液体・固体といった試料の状態にかかわらず測定を行うことが可能で、しかも目的の元素を選択的に分析できることから、本研究のような幾つかの元素が混在する非晶質物質の状態分析には非常に有力である。更に歯の構成元素の種類とその二次元分布を明らかにするため

* 東京大学教養学部: 153 東京都目黒区駒場 3-8-1

** 東京理科大学理学部: 162 東京都新宿区神楽坂 1-3

*** 科学技術庁放射線医学総合研究所海洋放射生態学研究部: 311-12 茨城県ひたちなか市磯崎町 3609

X線プローブマイクロアナリシス (EPMA) を用いた。

2 実験方法

2.1 試料

今回の実験に用いたヒザラガイ (*Acanthopleura japonica*) は神奈川県のお油壺湾で採取された。歯舌はヒザラガイの口球塊から取り出し、いったんアルコールで固定した後、風乾して、各種測定用試料とした。こうして採取した歯舌のうち、測定には全長 2 cm 程度のものを使用した。

又、XAFS 測定の際には、レアメタリクス製高純度試薬の金属鉄 (Fe metal)、酸化鉄 (Fe_2O_3)、鉱物の黄鉄鉱 (Pyrite, FeS_2)、磁鉄鉱 (Magnetite, Fe_3O_4)、針鉄鉱 (Goethite, FeOOH)、Strengite ($\text{FePO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) を構造・組成が既知である標準試料として使用した。

2.2 EPMA による二次元元素マッピング

日本電子製の JCMA-733 mkII を用いて二次元元素マッピングを行った。歯舌は樹脂に包埋し、研磨により歯の中心を通る内部の断面を得た。この試料に炭素蒸着を施したものを測定に用いた。加速電圧 15 kV、電流値 1.2×10^{-7} A の測定条件で電子線のビーム径を 1 μm 程度に絞り、1 μm ステップで XY 両方向に試料を走査して測定を行うことにより、元素の二次元分布像を得た。

2.3 粉末 X 線回折法

粉末 X 線データ測定には、マックスサイエンス製の MXP³ 型粉末 X 線回折装置を用いた。3 個体分の歯舌のそれぞれ最も成熟した先端部から 8 対分ずつ歯を分離し、めのう乳鉢で粉碎した後、無反射石英板上に試料を塗布し測定を行った。又、測定の際には $\text{Cu K}\alpha$ 線とグラファイト・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。

2.4 XAFS 法

2.4.1 XAFS 法について XAFS 法は、X 線吸収スペクトルの吸収端の高エネルギー側のスペクトル上に現れる振動構造から吸収原子の局所構造を解析する方法である³⁾。X 線吸収端とは X 線の吸収係数が急激に増加する部分を指す。この X 線吸収端の前後 50 eV のスペクトルの微細構造は吸収原子の価数やその周りの配位対称性などに対して敏感に形状が変化するので、X 線吸収端近傍構造 (XANES) と呼び状態分析に用いられる。

2.4.2 XAFS 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。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、ビームはスリットで 4 mm $\times$ 1 mm のく形サイズに調整した。更に白色光を Si (111) モノクロメーターで単色化し、 $2\theta = 16.2586^\circ$ から 15.9126° まで 0.002° 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。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。又、測定は室温で Lytle 型検出器⁴⁾を用いる蛍光法で行った。標準試料はそれぞれ窒化ホウ素と混合したものを 10 mm ϕ の disk 状に成形し測定に用いた。一方、歯舌はそのままポリエチレンの袋の中に保持し、非破壊の状態歯舌上の歯を成熟部から未成熟にかけて 1 mm ステップで測定した。

2.4.3 データ解析 測定で得られた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手順で、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 X 線のエネルギー (keV) に対しプロットすることにより、測定データそのまゝ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に対し Victreen の式⁵⁾を適用することで補外し、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うち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、更に最も高い吸収係数ですべての吸収係数を割ることにより、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。

3 結果

3.1 EPMA による二次元元素マッピングの結果

まず二次元元素マッピングの前段階で、ヒザラガイの歯の構成元素を調べるため定性分析を行った結果、歯の内部には鉄のみが存在する場所と、カルシウム・リン・マグネシウムを主成分とし鉄はほとんど存在しない箇所があることが分かった。この 4 元素以外は EPMA ではその存在が確認されなかったため、これらの元素に関して二次元元素マッピングを行った。その結果を Fig. 1 に示す。

二次元元素分布図により、摂餌に用いられる歯の先端から腹の部分に鉄が濃集し、カルシウム・リン・マグネシウムが濃集したリン酸カルシウムをマトリックスとする部分は歯の背中の部分に分布していることを明らかにした。両者の境界線は鮮明で、双方に渡る元素の移動の

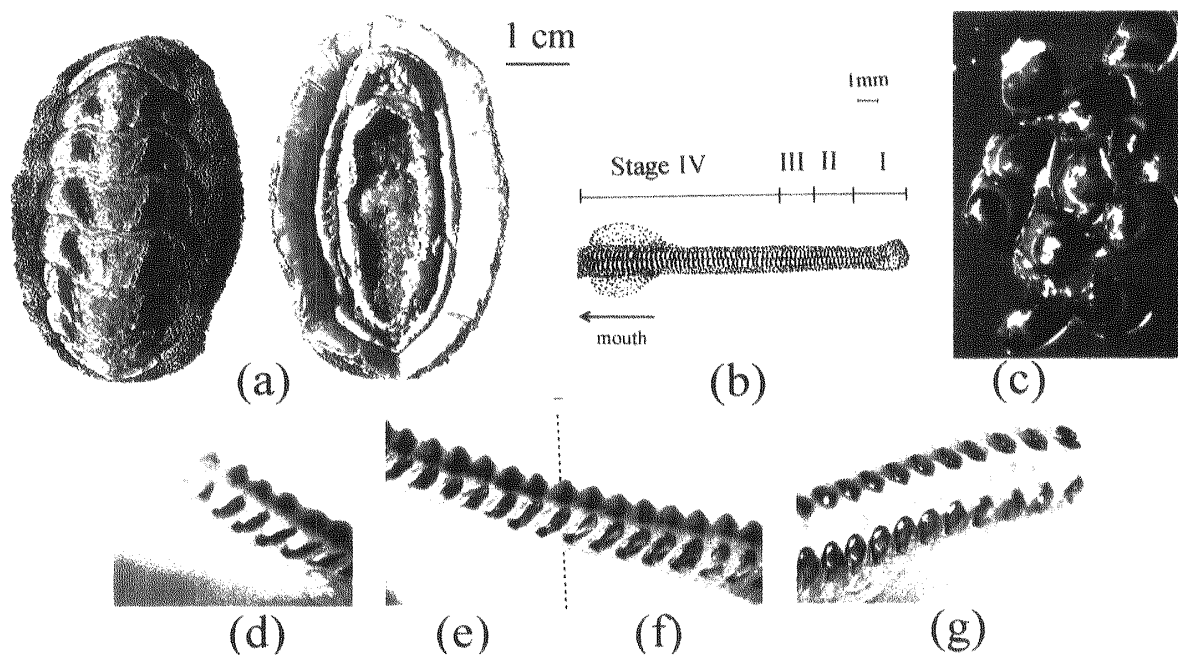


Photo 1 Optical microscopic images of chiton *A. japonica*, its radula and teeth

(a) the shape of chiton *A. japonica*; (b) the radula of chiton; (c) the teeth of chiton (red teeth); (d) Stage I: brown teeth; (e) Stage II: gray teeth; (f) Stage III: red teeth; (g) Stage IV: black teeth

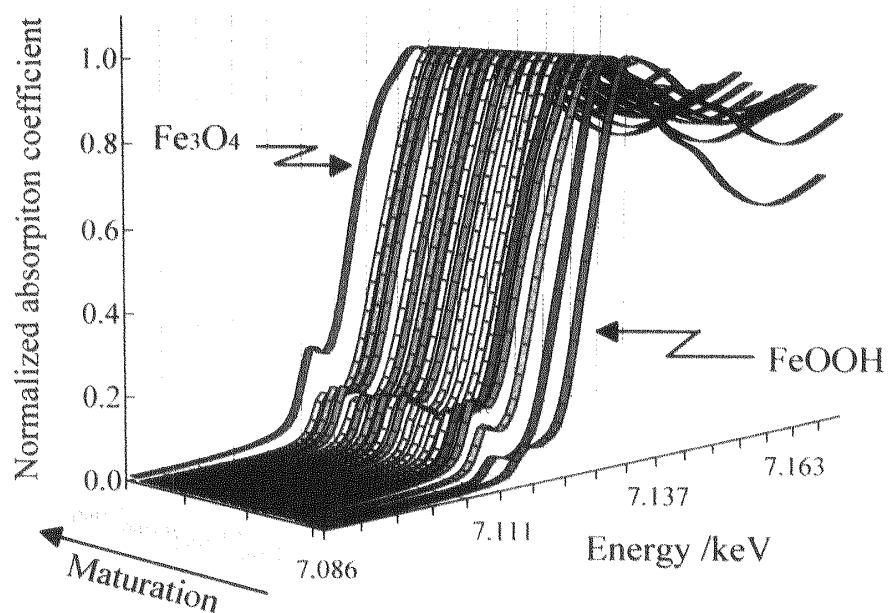


Fig. 4 Normalized three-dimensional Fe K-XANES spectra of goethite, magnetite and the teeth of chiton in different parts on a radula

The teeth mature from part 17 to part 1.

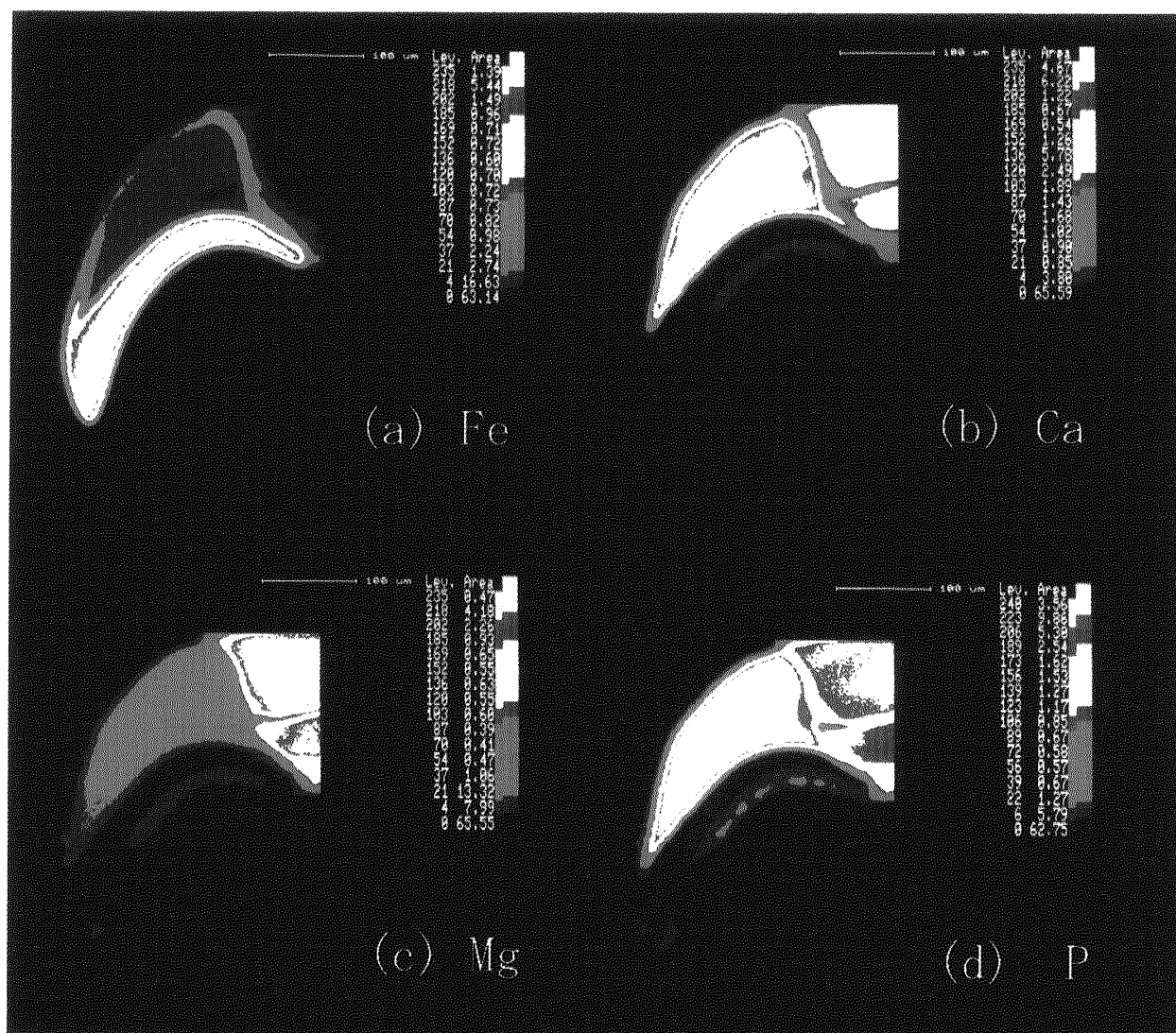


Fig. 1 Two dimensional distribution of some elements in a tooth of chiton by EPMA
(a) Fe; (b) Ca; (c) Mg; (d) P

こん跡が見られないことから、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が示唆された。更に鉄の濃集部にも鉄濃度の異なる二つの部分が存在していることも確認され、この鉄の濃度差はそこに存在している鉄の化学種の差異を反映しているものと考えられた。

3・2 粉末 X 線回折の結果

Fig. 2 にヒザラガイの歯の粉末 X 線回折の結果を示す。歯舌上のいずれの部分のプロフィールからも磁鉄鉱に相当するピークが検出されたが、もう一つの主成分であるリン酸カルシウムのピークは検出されず、結晶成分としては磁鉄鉱のみが存在することが明らかとなった。又

歯舌内の比較では、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。

3・3 XAFS 測定の結果

3・3・1 歯に含まれる鉄の化学形の決定 Fig. 3 は、ヒザラガイの成熟部、未成熟部の歯と、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。標準試料のスペクトルから明らかなように、金属鉄、磁鉄鉱 ($\text{Fe}^{+2}\text{Fe}^{+3}_2\text{O}_4$)、酸化鉄 ($\text{Fe}^{+3}_2\text{O}_3$) と、試料に含まれる鉄の酸化数が高くなるにつれてスペクトルが高エ

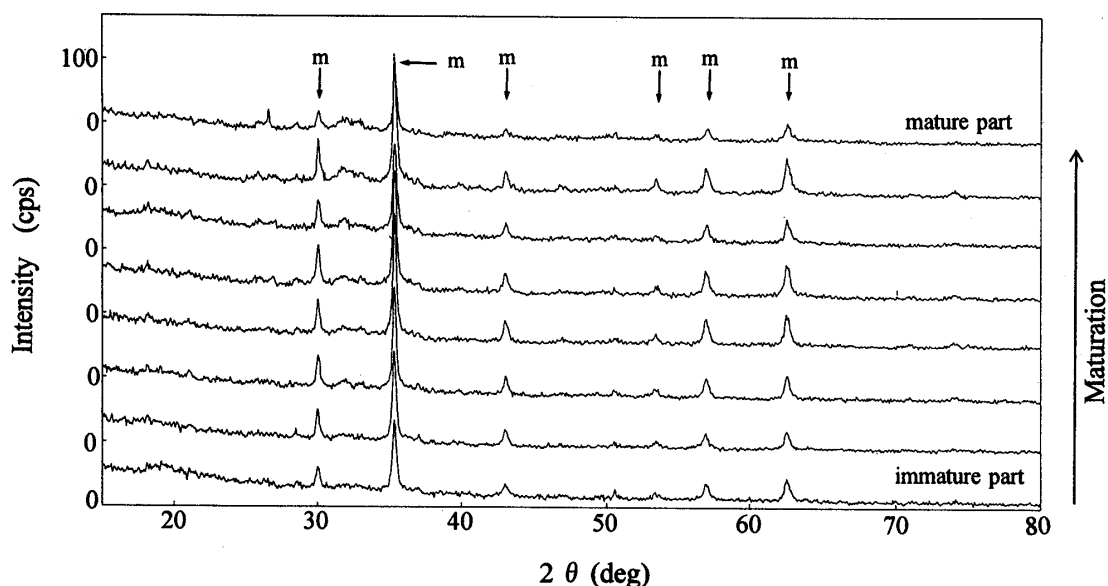


Fig. 2 X-ray powder diffraction pattern of the teeth of chiton

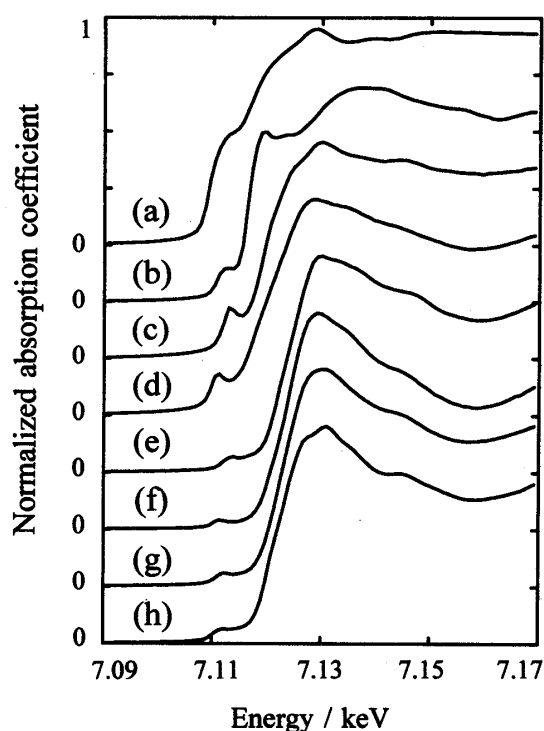


Fig. 3 Normalized Fe K-XANES spectra of standard materials and the teeth of chiton

(a) Fe metal; (b) pyrite; (c) magnetite; (d) black mature teeth of chiton; (e) goethite; (f) brown immature teeth of chiton; (g) strengite; (h) hematite

エネルギー側へシフトすることが観察される。ヒザラガイの歯の間で比較すると、未成熟の歯のスペクトルの吸収

端位置が FeOOH や Fe_2O_3 といった三価の鉄の化合物とほぼ一致しているのに対して、成熟した歯では二価と三価の鉄を含む Fe_3O_4 とほぼ同様なケミカルシフトを示すことが分かる。又、スペクトル全体の形状を比較すると、未成熟の歯と FeOOH 、成熟した歯と Fe_3O_4 がよく一致している。

更に吸収端前にしばしば現れるプレッジピークの比較からも試料中の鉄の存在状態を推察することが可能である。プレッジピークは通常は非許容である $1s \rightarrow 3d$ 遷移に相当する吸収で、その強度は中心金属周りの配位対称性の低下に伴い増大することが知られている⁶⁾⁷⁾。 Fe_3O_4 と FeOOH のプレッジピークを比較すると対称性の低い Fe_3O_4 のほうが強度が大きくなっており、ヒザラガイの歯では成熟した歯のほうが大きくなっている。ここからも、成熟した歯の中に含まれる鉄は未成熟な歯とは大きく異なり Fe_3O_4 の状態に近いことが分かる。以上の結果から、ヒザラガイの歯に含まれる鉄の酸化状態や化学形は歯の成熟度の違いによって変化し、未成熟な歯では FeOOH 、成熟した歯では Fe_3O_4 に類似していることが明らかとなった。

3.3.2 ヒザラガイの歯舌上での各部の XANES スペクトルの比較

Fig. 4 は、ヒザラガイの歯舌を成熟部から 1 mm ステップで測定を行って得られたスペクトルを順に並べたもので、part 1 が最も成熟した部分、part 17 が最も未成熟な部分である。各スペクトルのプレッジピークの強度に着目して比較すると、まず最も未成熟な part 17 から 3 本目の part 15 にかけて急激に

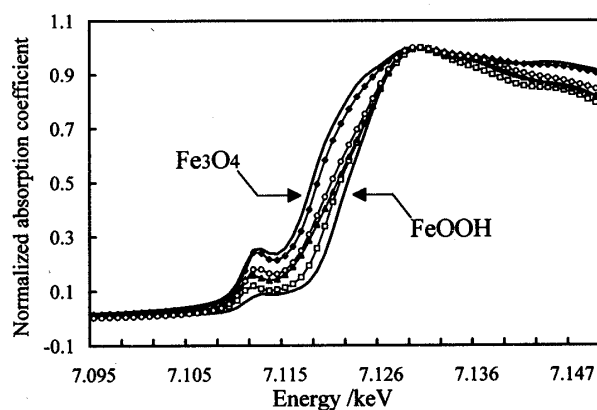


Fig. 5 Normalized Fe K-XANES spectra of the standard minerals (goethite, magnetite) and the teeth of chiton with different stages of maturation

□: brown teeth; ◆: gray teeth; ▲: red teeth; ○: black teeth

プレッジピークの強度が増加し、part 15 の強度は Fe_3O_4 に匹敵する。次に part 15 と part 12 の間でプレッジピーク強度の減少に伴いスペクトルは高エネルギー側にシフトしており、いったん鉄が酸化を受けることが分かる。その後はプレッジピークは細かな増減を繰り返し、最終的には FeOOH と Fe_3O_4 のほぼ中間の強度に落ち着く。これらのスペクトルの比較により、歯の形成初期の時点では三価の FeOOH に近い状態で濃集された鉄が、成熟が始まると同時にまず Fe_3O_4 と同様な二価と三価の混合物に変化し、その後は三価との鉄の割合が増減するという、複雑な状態変化を受けていることが分かった。興味深いことに、最も酸化的なケミカルシフトを示す part 17 は Kim らが分類した Stage I の未成熟部の歯に相当し、最も還元的なスペクトルを示す part 15 は Stage II の灰色の歯に、その直後で酸化を受けた part 12 は Stage III の赤い色の歯に、そして part 12 から part 1 にかけてのスペクトルは Stage IV の黒色の歯にそれぞれ対応する。歯に含まれる鉄の状態変化と、歯の色の変化を基準に設けられた成熟段階が良い対応を示したことから、両者の間にはなんらかの相関があることが示唆された。

3.3.3 歯の着色状況により分類したヒザラガイの歯の XANES スペクトル Fig. 5 は光学顕微鏡下で色を基準に 4 種類に分類した歯に対して、Fe K-XANES スペクトルを測定したものである。ここでも未成熟部の歯に含まれる鉄が最も酸化数が高く三価の鉄とほぼ同じケミカルシフトを示すのに対し、灰色の歯が最も低価数で Fe_3O_4 に近い状態であることが示されている。赤い歯と成熟した黒色の歯はいずれも FeOOH と Fe_3O_4 の

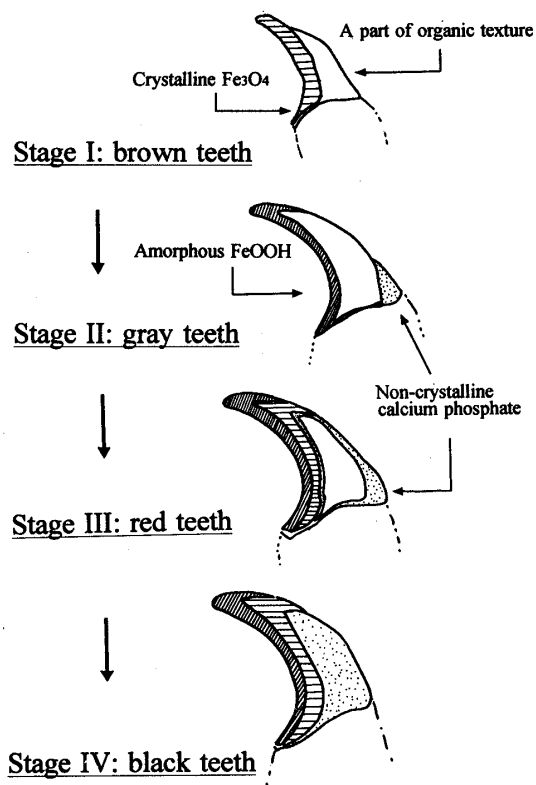


Fig. 6 Developing stages of the teeth of chiton

ほぼ中間のケミカルシフトを示すが、赤い歯のほうがやや酸化的である。以上 4 種類の歯のスペクトルがすべて FeOOH と Fe_3O_4 の間のエネルギー位置にあることから、いずれの成熟度の歯でもこの二つの化学形の鉄が混在しており、両者の混合比によりスペクトルのシフトが変化すると推定される。3.2 で述べたように、X 線回折法によりすべての成熟段階の歯において結晶質の磁鉄鉱が存在することが確認されていることからこの推論は支持され、更に XAFS の結果より、X 線回折では検出されなかった非晶質の鉄の成分が FeOOH に近い化学形を持つ物質であると特定できた。

3.4 ヒザラガイの歯の形成プロセス

上記の分析結果と光学顕微鏡による歯の観察を統合して、Fig. 6 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、有機質の基底膜に非晶質の FeOOH 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 Fe_3O_4 が増加し、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 では赤色への変化が観察されると同時に非晶質 FeOOH の含有比が増大する。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結晶質 Fe_3O_4 と非晶質 FeOOH が混在した鉄に富んだ部分が分布し、背中のほう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。

この四つの歯について成熟過程の順に比較してみると、Stage II と IV で磁鉄鉱が増加する前に、Stage I と III で非晶質 FeOOH がまず増加していることから、非晶質 FeOOH は磁鉄鉱の結晶化が起こるための前駆体となっている可能性が示唆された。しかしヒザラガイが歯を形成する際にいったん三価の状態を鉄を濃集した後、なぜ一部を還元するという労力を費やし磁鉄鉱の結晶を生産しているのかその理由に関して疑問が残ってい

る。やはりヒザラガイが鉄を濃集し積極的に磁鉄鉱を生産する理由は、磁鉄鉱の持つ磁性とヒザラガイの生態との関係に隠されているように思われる。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的意義を考察していきたい。

文 献

- 1) K. S. Kim, D. J. Macey, J. Webb, S. Mann: *Proc. Roy. Soc. Lond.*, **B237**, 335 (1989).
- 2) J. L. Kirschvink, H. A. Lowenstam: *Earth Planet. Sci. Lett.*, **44**, 193 (1979).
- 3) 宇田川康夫編: “X 線吸収端微細構造—XAFS の測定と解析”, 日本分光学会測定法シリーズ 26, (1993), (学会出版センター).
- 4) 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).
- 5) J. A. Victreen: *J. Appl. Phys.*, **19**, 855 (1948).
- 6) G. A. Waychunas, M. J. Apter, G. E. Brown: *Phys. Chem. Minerals*, **10**, 1 (1983).
- 7) J. Wong, F. W. Lytle, R. P. Messmer, D. H. Maylotte: *Phys. Rev. B*, **30**, 5596 (1984).



Characterization of iron accumulated in the teeth of chiton by X-ray absorption fine structure technique. Chiya NUMAKO*, Izumi NAKAI**, Toshiaki ISHII*** and Bokuichiro TAKANO* (*Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1, Komaba, Meguro-ku, Tokyo 153; **Faculty of Science, Science University of Tokyo, 1-3, Kagurazaka, Shinjuku-ku, Tokyo 162; ***Marine Radioecology, National Institute of Radiological Sciences, 3609, Isozaki, Hitachinaka-shi, Ibaraki 311-12)

The chemical form of iron accumulated in the teeth of chitons was investigated by electron microprobe analysis (EPMA), X-ray diffraction (XRD), X-ray absorption fine structure (XAFS) techniques. Two-dimensional elemental mapping by EPMA showed two distinct parts in a tooth of chiton: an Fe-rich part and a Ca-rich part. The Fe-rich part occupied the sharp edge of the tooth, which is actively used in scratching food, whereas the Ca-rich part was located at the opposite side of the tooth, and contained Ca, P and Mg as major elements. The inner immatured teeth on a radula gradually became matured toward the chiton's mouth, and their color changed in the following order: brown, gray, red and finally black. The results of XRD indicated that a crystalline material in the gray, red and black teeth was magnetite (Fe_3O_4). On the other hand, the Fe K-XANES spectra of each group of teeth showed that FeOOH was another component of the Fe-rich part of the teeth. The spectra suggested that the valency of iron partially changed from Fe(III) to Fe(II) along with the maturation of the teeth. The FeOOH was amorphous to X-rays, and was most likely to be a precursor of crystalline magnetite in the teeth.

(Received May 25, 1995)

(Accepted June 20, 1995)

Keywords

teeth of chiton; XAFS; magnetite; amorphous FeOOH .