

擬似体液を用いた in vitro 実験による

貝類外骨格での CC 結晶化の pH 条件の解明

石川県立金沢泉丘高等学校理数科

田村 光司郎 塚口 寛太郎 橋 孟 東 仁盛 三輪 葉太郎

要旨

貝類をはじめとする多くの無脊椎動物の外骨格を構成するのは炭酸カルシウム(以下 CC)の結晶ないしは非晶質であり、その材料となるのは体液中に存在する Ca^{2+} である。しかしながら貝殻を構成する物質の結晶化の条件および過程の詳細は依然として未解明である。

貝類体内における CC 結晶化の条件について、現時点では特に有力な仮説が 2 つ存在する。1 つ目は結晶化時に体液の pH が急上昇するというもの、2 つ目は結晶化時に体液内のイオン濃度が急上昇するというものである。これらの仮説を踏まえて、本研究では以下の 2 点の解明を目的とした。1 つ目は貝類体内での CC 結晶化に際して必要となる pH 上昇について、2 つ目は体液の濃度が上昇した際の結晶化 pH の変化である。

これらを解明するために、我々は貝類体液を模した擬似体液を作成し、擬似体液の pH を炭酸アンモニウム法を用いて上昇させ、結晶化の起こる pH を記録した。

実験の結果、結晶化時に体液濃度の上昇はないと仮定すると結晶化は pH 9.34 付近で起こること、そして体液の濃度が上昇したからと言って結晶化に必要な pH が低くなる、この場合では中性に近づくとは限らないということが分かった。

結論として、CC の結晶化と結晶化 pH の間には密接な関係があることがわかったほか、 Ca^{2+} 以外の無機イオンが CC 結晶化に何らかの影響を及ぼしていることが示唆される。

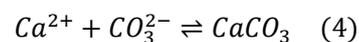
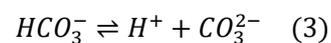
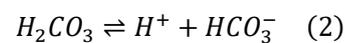
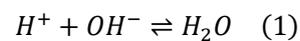
1. 研究背景・目的

貝類外骨格の主成分は炭酸カルシウムの結晶である。これは、貝類体内から分泌された体液において、炭酸カルシウムが結晶化することで生成するが、結晶化の細かい条件やプロセスについては、未解明な点が多い。また、貝類の 1 種であるアコヤガイにおいては、外骨格中に、アラゴナイトとカルサイトという結晶構造の異なる 2 種類の炭酸カルシウム結晶を含み、微量であるが炭酸カルシウムのアモルファスも含むが、各結晶構造の生成条件等についても未解明な点が多い。

貝類外骨格において炭酸カルシウムが結晶化するきっかけとして、一般的に認められてい

る仮説は大きく 2 つある。1 つ目は結晶化時に体液の pH が急上昇するというもの、2 つ目は結晶化時に体液の濃度が急上昇するというものだ。

1 つ目の仮説についてであるが、体液中においては、以下の 4 つの化学反応が平衡状態にある。(1)から順に、水の電離平衡、炭酸の 1 段階目の電離平衡、炭酸の 2 段階目の電離平衡、炭酸カルシウムの溶解平衡である。



体液中の pH が上昇、つまり OH^- の濃度が上昇すると、Le Chatelier の原理に従って上の化学平衡が移動する。まず、(1)が右に偏り、 H^+ の減少によって(2)が右に偏る。これによって HCO_3^- が増加するので、(3)が右に偏り、 CO_3^{2-} が増加することによって、(4)が右に偏り、炭酸カルシウム CaCO_3 が結晶化・析出する。

2 つ目の仮説については上の(4)に注目する。貝類体液中には Ca^{2+} が存在し、体液濃度が上昇すると Ca^{2+} の濃度が上昇する。それによって(4)が右に偏ると、炭酸カルシウムが析出する。貝類体内においては、これら 2 つの仮説のいずれか、もしくは両方が実現され、結晶化が起きているとの見方が有力である。

これらの仮説を踏まえて、我々は以下の 2 点を解明することを目的とした。1 つ目は、貝類体内において結晶化が起こるには、具体的にどの程度の pH 上昇が必要なのか、2 つ目は、体液濃度が上昇すると、結晶化に必要な pH はどのように変化するのかということである。

生体内における無機結晶の生成について実態を明らかにすることは、人体内での結石の抑制などに応用できると考えられ、本研究は社会的にも有意義であると考えられる。

2. 研究手法

以下に示す 3 つの実験を行った。

2-1. 実験 1

実験①の目的は、貝類体内において結晶化が起こるために必要な pH 上昇の解明である。実験の手法は以下に示すとおりである。

I. 擬似体液の作成

本来我々は擬似体液として貝類の体液を完全に再現した水溶液を作成することを考えていたが、動物の体液内の有機物は再現するにはあまりにも複雑であるため再現は不可能と判断し、無機成分のみの再現とした。したがって本研究において体液中の有機物が炭酸カルシウムの結晶化に及ぼす影響は考慮しないもの

とする。

先行研究により貝類の体液の無機成分は海水とほぼ一致することが知られているため、我々は擬似体液の組成、つまり各無機イオン濃度の比は海水と概ね同じになるようにした。また前述の通り、擬似体液の濃度、つまり水の量に対するイオン量の比は結晶化時に急上昇する可能性が提唱されているが、実験 1 においてはこの可能性を考慮しないこととする。つまり、実験 1 における擬似体液は、組成・濃度ともに海水を再現したものである。なお、実験 1 において解明することをここで整理し直すと、結晶化時に、貝類体液の組成及び濃度が海水と同じであるとするならば、炭酸カルシウム結晶化のためにどの程度の pH 上昇が必要かということになる。

海水中に存在する無機イオンのうち特に高濃度であるカルシウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、カリウムイオン、塩化物イオン、硫酸イオン、炭酸イオンが適正量溶液に含まれるよう、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム 6 水和物、硫酸ナトリウム、塩化カルシウム 2 水和物、塩化カリウムを溶質として使用し、最後に溶媒として蒸留水を加えて体積を 100 mL に調整した。実験 1 で用いた溶液の組成を以下に示す。(図 1)

図 1

	質量/g	物質量/mol
海水	100.00	
NaCl	2.24	0.0383
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.49	0.0024
Na_2SO_4	0.24	0.0017
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.14	0.0010
KCl	0.07	0.0010
$(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$	40.00	0.5128
H_2O	96.81	5.3784

II. 溶液の pH 上昇

実験において疑似体液の pH を上昇させる際、先行研究に従い、炭酸アンモニウムガス法を用いた。これは、炭酸アンモニウムの固体と溶液を同一の容器内に密閉し、炭酸アンモニウムから発生したアンモニアが溶液に溶解することによって、溶液の pH が上昇するという手法である。実験においては、炭酸アンモニウムを 40.0 g 用い、以下の写真のように溶液とともに密閉した。なお、密閉容器としてはパラフィルムで蓋をした 1000 mL ビーカーを用いた。

III. pH の測定

pH の測定のためには pH メーターを用いた。pH メーターを溶液に差し込んだ上で系を密閉し、密閉から 2 分 30 秒ごとに pH を測定し、記録した。(図 2)

IV. 結晶化の確認

炭酸カルシウム結晶が生成すると、溶液表面が白濁する(図 3)。この白濁を以て結晶化が起こったと判断し、結晶化が起こった際の pH を記録した。

図 2



図 3



2-2. 実験 2

実験 2 の目的は、体液濃度が上昇すると、結晶化に必要な pH はどのように変化するかを調べることである。実験の手法は以下に示すとおりである。

I. 疑似体液の作成

組成が実験 1 で用いたものと等しく、濃度が異なる 4 種類の疑似体液を作成した。用いた溶液の濃度は、実験 1 で用いたものの、0.67 倍、1.00 倍、1.23 倍、1.50 倍の 4 種類である。その組成を以下に示す(図 4, 5, 6, 7)。

図 4

	質量/g	物質量/mol
海水	100.00	
NaCl	1.49	0.0255
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.33	0.0016
Na ₂ SO ₄	0.16	0.0011
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.10	0.0007
KCl	0.05	0.0006
(NH ₄) ₂ CO ₃	40.00	0.5128
H ₂ O	97.88	5.4376

図 5

	質量/g	物質量/mol
海水	100.00	
NaCl	2.24	0.0383
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.49	0.0024
Na ₂ SO ₄	0.24	0.0017
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.14	0.0010
KCl	0.07	0.0010
(NH ₄) ₂ CO ₃	40.00	0.5128
H ₂ O	96.81	5.3784

図 6

	質量/g	物質量/mol
海水	100.00	
NaCl	2.74	0.0469
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.60	0.0030
Na ₂ SO ₄	0.30	0.0021
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.18	0.0012
KCl	0.09	0.0012
(NH ₄) ₂ CO ₃	40.00	0.5128
H ₂ O	96.09	5.3385

図 7

	質量/g	物質量/mol
海水	100.00	
NaCl	3.36	0.0574
MgCl ₂ · 6H ₂ O	0.48	0.0024
Na ₂ SO ₄	0.37	0.0026
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.16	0.0011
KCl	0.11	0.0015
(NH ₄) ₂ CO ₃	4.00	0.0513
H ₂ O	95.52	5.3067

II. 溶液の pH 上昇

実験 1 と同様に、炭酸アンモニウムガス法を用いた。

III. pH の測定

実験 1 と同様な手法で、各溶液について結晶

化に必要な pH を測定した。

IV. 結晶化の確認

実験 1 と同様に確認した。

2-3. 観察

実験 1,2 において、生成した結晶構造を調べたものを、観察とした。実験の具体的な手法や観察において注目した点は以下に示すとおりである。

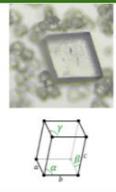
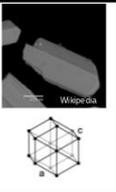
I. 観察手法

観察では生成した結晶を光学顕微鏡を用いて観察した。倍率は 60 倍、150 倍、600 倍であり、後述の結果の写真は 150 倍で観察したものである。

II. 炭酸カルシウムの結晶構造

観察において注目したのは、得られた炭酸カルシウムの結晶構造である。炭酸カルシウムの結晶構造については、以下の表に示すような 3 通りが存在し(図 8)、これらに加えて、不定形(アモルファス)も存在する。

図 8

			
	アラゴナイト (あられ石)	カルサイト (方解石)	バテライト (ファーテル石)
結晶構造	直方晶系	三方晶系	六方晶系
結晶面の角度	90°	72°	60°/ 90°

3. 仮説

各実験および考察における仮説は以下のとおりである。

2-1. 実験 1

生体内での現象故に、結晶化の際の pH が、生物への害が非常に大きい強塩基性、つまり 8.5 以上になるとは考えにくい。

2-2. 実験 2

体液濃度が上昇すると、前述した化学平衡の理論から考えて、結晶化に必要な pH 上昇は小さくなると考えられる。つまり、結晶化 pH は、体液濃度が大きくなるほど中性である 7.00 に近づくと予想される。

2-3. 観察

疑似体液の組成は実際と近いものであると考えられるため、アコヤガイ等の貝類体内で実際存在する、アラゴナイトやカルサイトが生成すると予想される。

4. 結果

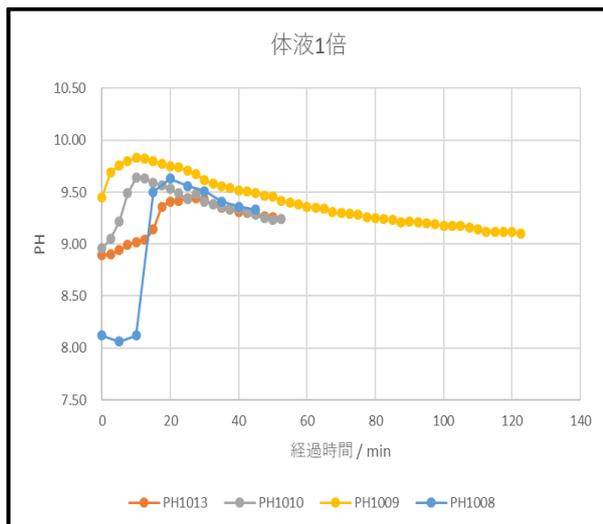
各実験および観察における結果は以下のとおりである。

2-1. 実験 1

以下に示したグラフ(図 8)は、測定開始からの時間と、系の pH の関係を表したものである。複数の試行において挙動が概ね一致していることがわかる。

結晶化時の pH の平均を取ると、pH 9.34 となる。

図 9



(注:凡例中の 4 桁の数字は日付、以下同様)

2-2. 実験 2

以下のグラフは各濃度の疑似体液について、

測定開始からの時間と、系の pH の関係を表したものである(図 9, 10, 11, 12)。

図 10

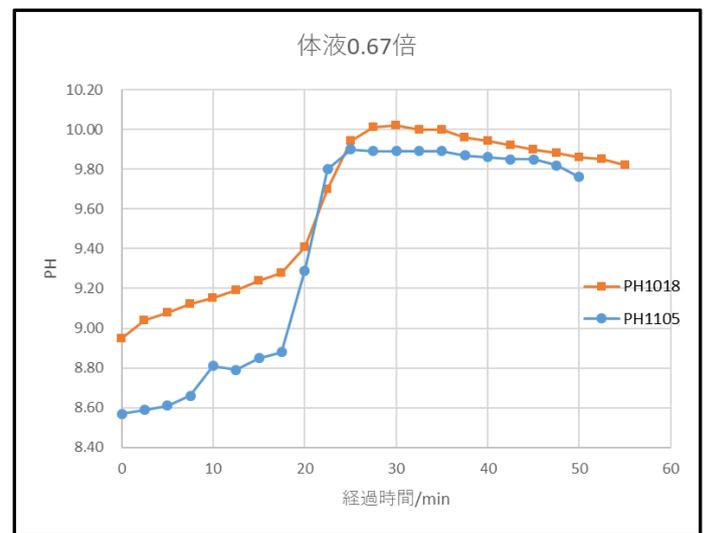


図 11

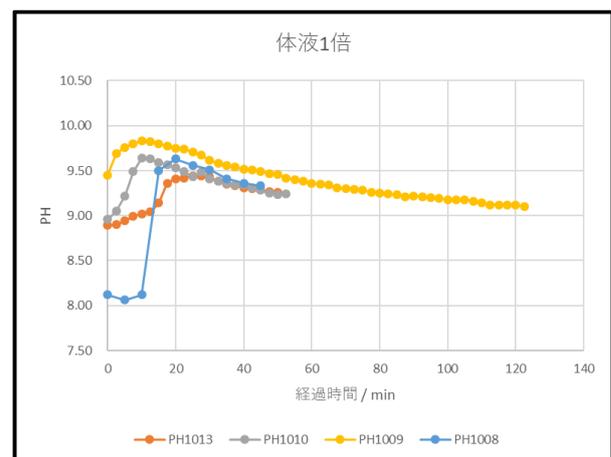


図 12

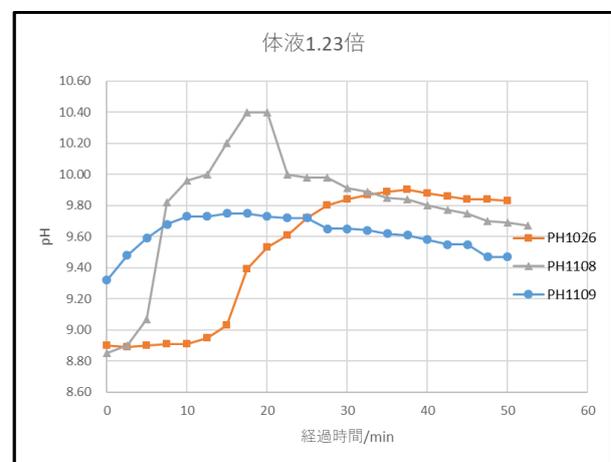
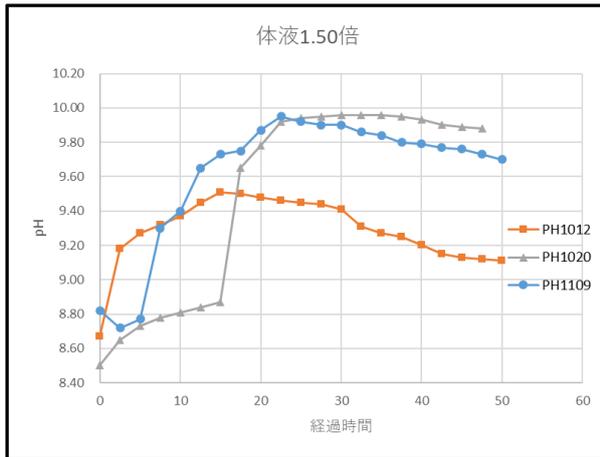


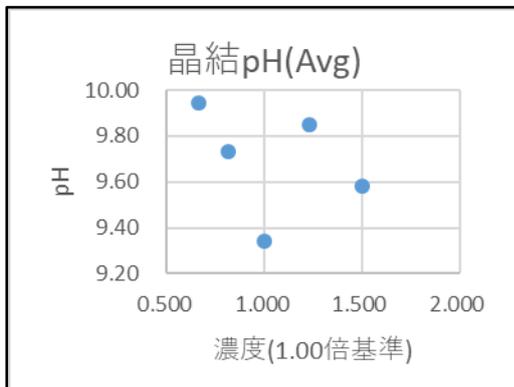
図 13



各濃度について、複数の試行において挙動が概ね一致していることがわかる。

溶液の濃度と、各濃度における結晶化時の pH の平均の関係をグラフにすると、以下のようになる(図 13)。

図 14



2-3. 観察 3

実験 1、実験 2 の両方において、実際に観察された結晶を光学顕微鏡で観察してみると、生成した結晶はビーカーの表面と下部の両方において丸い形をしていた。また、ビーカーの上部の結晶は比較的大きさが小さく、底の方へ近づくほど、それらの小さくて丸い形をした結晶が集まってできた、大きめのものになっていた(図 14, 15)。

図 15

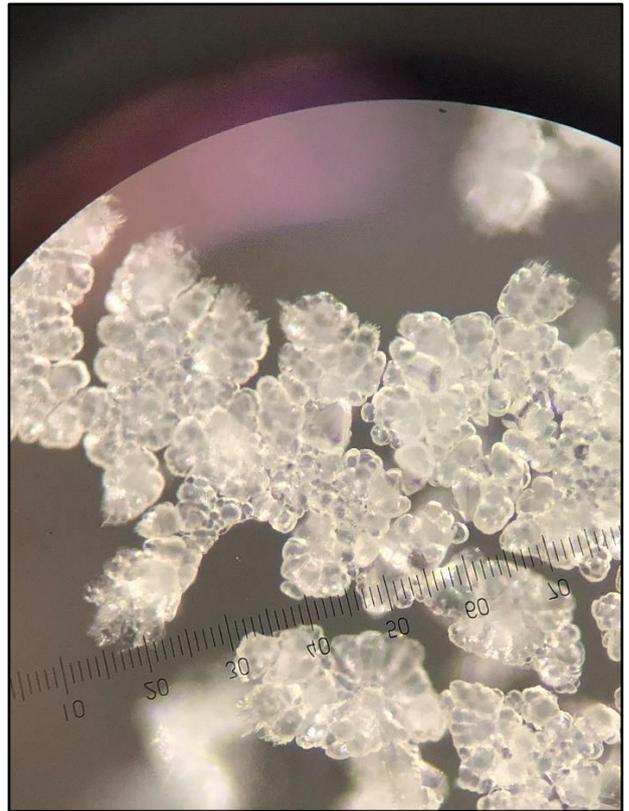
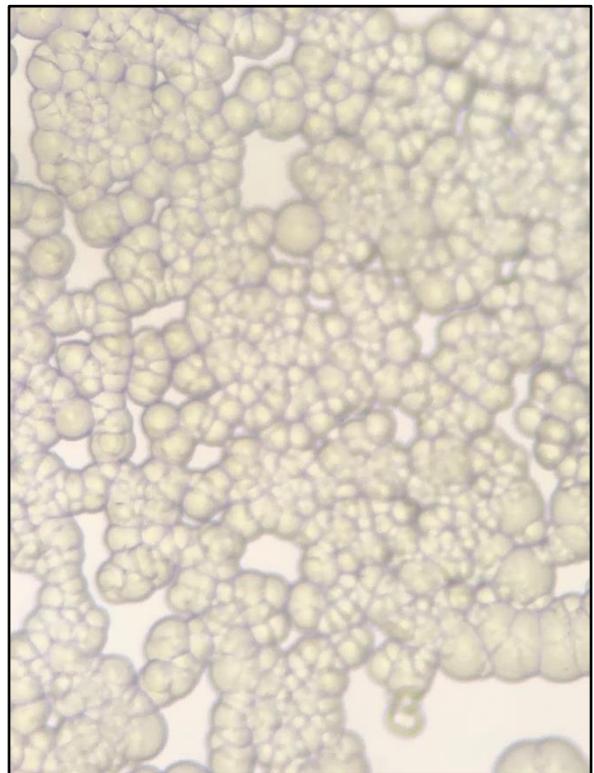


図 16



5. 考察

各実験および観察の結果について、考察は以

下のとおりである。

2-1. 実験1

結晶化 pH の平均は 9.34 であったが、この実験においては、次のような不定性が考えられる。炭酸アンモニウムガス法において系の pH は徐々に上昇するが、系が真に結晶化に必要な pH に達していたとしても、結晶が目視で確認できるまで成長するには時間がかかるため、結晶化を目視で確認した pH よりも、結晶化に必要な真の pH は低いと考えられる。

これより、実験1より考えられることとしては、貝類体内における結晶化時に、体液の濃度上昇がないとしたとき、結晶化が起こるには、体液の pH が 9.34 程度まで上昇すれば良いというものになる。

2-2. 実験2

溶液中の Ca^{2+} にのみ注目して化学平衡の理論を考えると、溶液の濃度が上昇すると、結晶化に必要な pH は中性に近づくと予想されたが、結果から、すべての濃度の範囲でこのことが成り立つわけではないとわかる。具体的には、体液濃度がある値よりも高くなると、結晶化に必要な pH は高くなるのがわかる。

この理由については、以下のように考察した。体液の濃度が上昇すると、 Ca^{2+} の濃度はもちろん上昇するが、他の無機イオン濃度も同時に上昇する。このことから我々は、 Ca^{2+} 以外の無機イオンが、何らかの形で炭酸カルシウムの結晶化を阻害しているのではないかと考えた。

なお前述の通り、特定の有機化合物に関しては炭酸カルシウムの結晶化を阻害することが報告されているが、無機イオンに関しては、未だそのような報告がない。

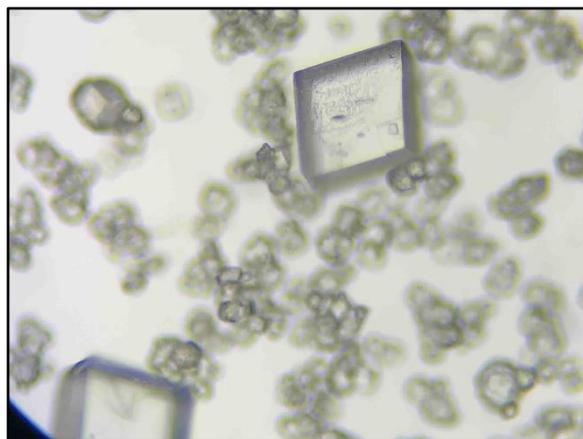
2-3. 観察

アラゴナイトは斜方晶系、カルサイトは六方晶系であるが、実験1、実験2の両方で生成した結晶が丸い形をしていたため、これらはアラゴナイトやカルサイトではないと考えられる。

これらは不定形もしくはバテライトの可能性がある。

実験1の前に行った予備実験で、実験1で用いた擬似体液の代わりに塩化カルシウム水溶液を用いた実験を行った。この時に生成した結晶は明らかに角を持つカルサイト、アラゴナイトであった(図16)。

図 17



従って擬似体液内の無機イオンが結晶化する形に何らかの影響を与え、炭酸カルシウムが不定型やバテライトになったとも考えられる。

6. 結論

貝類体内における結晶化時に、体液の濃度上昇がないとしたとき、結晶化が起こるには、体液の pH が 9.34 程度まで上昇すれば良いとわかった。

また、体液濃度が大きいほど結晶化が起こりやすいとは限らず、 Ca^{2+} 以外の無機イオンが、炭酸カルシウムの結晶化を阻害している可能性があることが明らかになった。

本研究における人工的な結晶化の再現においては、炭酸カルシウムの結晶構造として、バテライトや不定形が見られ、無機イオンが炭酸カルシウムの結晶構造に対して影響をあたえている可能性も明らかになった。

7. 今後の課題

Ca^{2+} 以外の無機イオンのみの濃度を変えた

実験を行い、無機イオンの結晶化阻害について明らかにしたい。結晶構造と無機イオン濃度についても明らかにしたい。

8. 参考文献

[1] 横尾直樹, 鈴木道生, 鍵裕之, 小暮敏弘, アコヤガイ幼生貝殻における炭酸カルシウム相について. 日本地質学会大会要旨. 2011
他多数

[2] 沼子千弥, 山口力也, 箕村知子, 小藤吉郎, ナメクジ類の軟体部におけるカルシウムの分布 VENUS. 1965. No.24, p67-71

[3] 沼子千弥, 山口力也, 箕村知子, 小藤吉郎. 貝類の貝殻を構成するカルサイト・アラゴナイトの研究, 日本鉱物学会年会要旨, 2003
他多数