

韓國人 胸骨皮質骨內的 Calcium 卄 Phosphorus의 定量的 分析

梨花女子大學校 醫科大學 整形外科學教室

姜 忠 男

= ABSTRACT =

Quantitative Analysis of Inorganic Calcium and Phosphorus in the Cortical Bone of Human Sternum

Chung Nam Kang

Department of Orthopaedic Surgery, College of Medicine, Ewha Womans University

The most striking and obvious difference between the bony skeleton and all of the other forms of connective tissue is that it is the only member of this class to contain inorganic mineral deposits within its extracellular matrix space at almost all stages of its normal development. In actuality, bone mineral is an integral part of bone tissue having individual physical and chemical properties that directly affect those of the tissue as whole

So a precise knowledge of the quantitative relationships between the constituents of bone is essential to understand such important matters as the chemistry of calcification, bone as reservoir, the nature of metabolic bone disorders, and the mode of action of parathyroid hormone, thyrocalcitonin, vitamins, sex and adrenal steroids.

Therefore, author performed the quantitative analysis of the inorganic calcium and phosphorus in the cortical bone of sternum from the twenty korean people and the following results are obtained;

- 1) In the cortex of sternum, the total contents of inorganic calcium phosphate are 44.4% in male and 44.15% in female.
- 2) Calcium deposited in the cortex of sternum is 27.15% (SD±2.01) in male and 27.11% (SD±1.67) in female and also, phosphorus being 17.25% (SD±1.27) in male and being 17.05% (SD±1.53) in female
- 3) Molar calcium to phosphorus ratio is 1.57:1 and 1.59:1 in male and female, respectively.

緒 論

人體 骨骼系의 基本成分인 結體組織은 膠原質 (collagen), 無機質 (mineral), proteoglycan 等 細胞外基質 (extracellular matrix) 成分의 構成比에 따라 特殊한 物理的 내지는 生物學的 性狀을 나타내는 骨, 軟骨 및 靱帶組織으로 分化되면서 構造物 非同質性을 나타내게 된다. 주로 膠原質로 構成된 dense fibrous connective tissue 인 靱帶는 人體 骨骼系의 張力 (tensile force) 을 유지하는 機能을 발휘하는 반면에 膠原質, 無機質 및 proteoglycan 等 細胞外基質 成分의 化學的 造成을 달리하여 形成되는 骨 및 軟骨組織은 全 骨骼에 面相磨擦力 (shearing force) 및 張力 뿐만 아니라 抗壓迫力 (anti-compression force) 等の 機能을 나타낸다. 이러한 各 組織들은 不活性 物質로 形成된 단순한 物理的 構造物이 아닌 成長과 復元을 계속하는 活性組織으로서 蛋白質 및 無機質代謝와 밀접한 關係를 유지하고 있다. 따라서 骨骼系를 構成하는 各 組織의 化學的 成分에 대한 精確한 知識을 파악하는 것은 骨 石灰化過程, 代謝性 骨疾患의 病因 및 副甲狀腺ホルモン, thyrocalcitonin, 비타민, 副腎 steroid의 作用機轉을 이해하는데 필수적 要件으로 간주된다. 그러나 韓國인에서 骨組織內에 함유된 calcium, phosphorus 等の 無機質 含量에 대한 연구가 다소 미흡한점을 감안하여 著者는 韓國人의 胸骨에서 骨皮質內 calcium과 phosphorus의 含量을 定量하였다.

材料 및 方法

韓國人에서 外傷性 出血로 死亡한 11例, 心疾患으로 死亡한 5例, 室息死 2例, 子宮外妊娠과 乳幼兒病候群

으로 死亡한 各 1例씩에서 胸骨皮質 切片을 채취하여 alcohol: ether (1:2) 混合溶液에서 24時間 동안 處理하여 脂肪成分을 제거하고 100℃에서 24時間 건조시킨 후 다음과 같은 方法으로 calcium과 phosphorus를 定量하였다.

1) Calcium 分析法¹⁾

前 處理된 1gm을 精確히 平量하여 試料를 완전히 分解시킨 후 250ml의 蒸溜水로 稀釋시켰다. 여기에 HClO₄ 2ml를 加하여 NO₃⁻와 Cl⁻를 제거한 후 이 용액 50ml를 取하여 200ml Beaker에 옮긴 후 다시 蒸溜水 100ml를 加하고 methyl-orange 指示藥 2~3방울을 點滴한 후 이 溶液이 黃色으로 變할때 까지 稀釋된 NH₄OH를 加하고 다시 acetic acid로 용액이 赤色으로 變할때 까지 點滴한 후 60~70℃로 다시 加熱하였다. 加熱한 용액에 6% ammonium oxalate 용액 50ml를 加하여 30분동안 방치한 후 이 용액을 5 C filter paper를 이용하여 沈澱物을 얻고 Cl⁻이온이 완전히 除去될때 까지 100℃ 이상의 蒸溜水로 洗滌하였다. 沈澱物을 beaker에 옮겨담고 50% H₂SO₄ 10ml와 蒸溜水 100ml를 加하여 沈澱物을 완전히 溶解시킨 후 다시 5 A filter paper를 使用하여 沈澱物을 여과한 후 60~70℃를 유지하면서 0.1N KMNO₄ 標準 溶液으로 적정하였다. 이때 變色範圍는 無色에서 鮮紅色으로 變할때를 終點점으로 하여 定量하였으며, 그 定量를 %로 表示하였다.

2) Phosphorus 分析法²⁾

前 處理된 試料 1gm을 精確히 平量하여 250ml 용량의 beaker에 담고 conc. HNO₃와 Conc. HCl 各 10ml를 加하여 完全 分解시킨 후 蒸溜水 250ml를 加하여 稀釋시켰다. 이 溶液에 HClO₄ 2~3ml를 加하여 NO₃⁻와 Cl⁻를 완전히 除去한 후 50ml를 取하여 200

Table 1. Age, sex and cause of death related to individual case

Sample No.	Age	Cause of death	Sample No.	Age	Cause of death
M-1	9/12	Sudden infantile death syndrome	F-1	3	Hemoperitoneum
M-2	4	Cerebral hemorrhage traumatic	F-2	5	Hemothorax
M-3	17	Hemothorax	F-3	16	Hanging
M-4	20	Myocardial infarction	F-4	21	Hemothorax
M-5	32	Drowning	F-5	26	Ectopic pregnancy
M-6	37	Cerebral hemorrhage traumatic	F-6	28	Hemopericardium
M-7	41	Myocardial infarction	F-7	32	Myocardial infarction
M-8	48	Myocardial infarction	F-8	43	Myocardial infarction
M-9	54	Hemoperitoneum	F-9	57	Cerebral hemorrhage traumatic
M-10	65	Cerebral hemorrhage traumatic	F-10	76	Traffic accident

Table 2. Analytic results (%) of inorganic calcium and phosphorus in the cortical bone of male sternum

	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6	M-7	M-8	M-9	M-10	Mean	SD
Calcium	22.81	27.22	28.78	26.91	27.20	28.32	28.87	28.01	24.53	28.85	27.15	± 2.01
Phosphorus	14.42	16.85	18.20	17.32	17.20	19.32	17.54	17.20	16.50	17.97	17.25	± 1.27
Total Ca & P	37.23	44.07	46.98	44.23	44.40	47.64	46.41	45.21	41.03	46.82		

Table 3. Analytic results (%) of inorganic calcium and phosphorus in the cortical bone of female sternum

	M-1	M-2	M-3	M-4	M-5	M-6	M-7	M-8	M-9	M-10	Mean	SD
Calcium	22.71	27.70	28.24	29.71	27.71	27.50	26.32	26.66	27.25	27.30	27.11	± 1.67
Phosphorus	15.15	16.14	17.62	18.15	16.50	19.20	17.80	15.47	17.69	16.80	17.05	± 1.53
Total Ca & P	38.86	43.84	45.86	47.86	44.21	46.70	44.12	42.13	44.94	44.10		

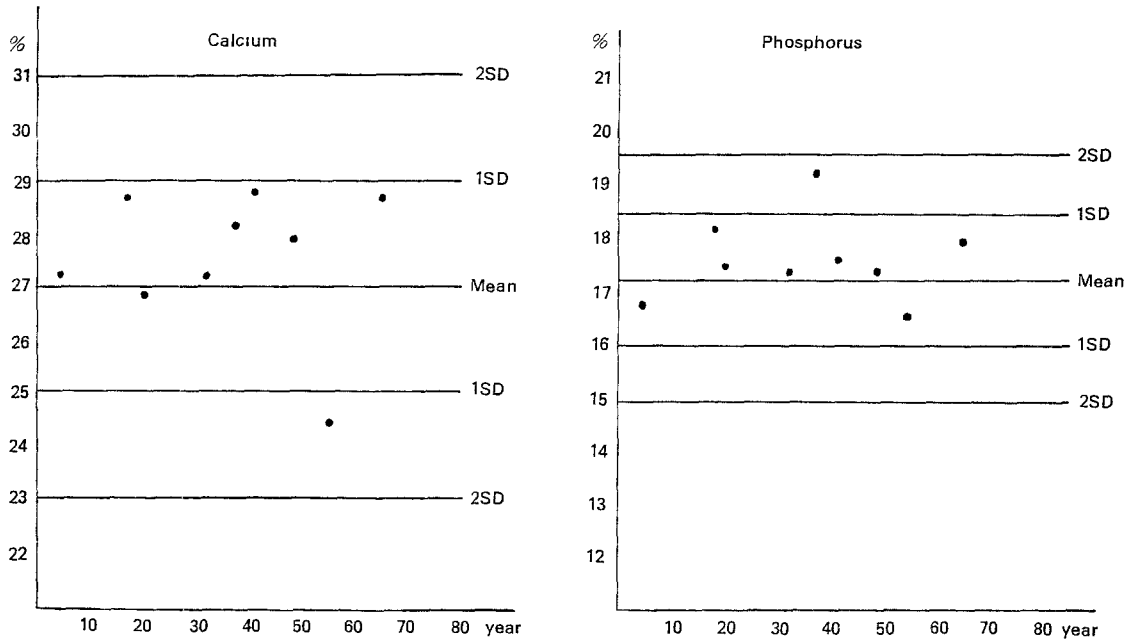


Fig. 1. Dispersion of inorganic calcium and phosphorus contents in the cortical bone of male sternum.

ml용량의 beaker에 옮겨담고 蒸溜水 100 ml를 추가하여 稀釋하고 여기에 citric acid-molybdate용액 25 ml를 加한 후 다시 quinoline용액 12.5ml를 서서히 點滴하였다. 완전히 混合된 이 용액을 80~90℃로 加熱한 후 5分間 방치하여 沈澱物을 形成시키고, 이 沈澱物을 glass filter를 利用하여 얻은후 다시 100℃ 이상의 蒸溜水로 5회 이상 洗滌하였다. 洗滌한 沈澱物을 250℃에서 1時間동안 乾燥시키고 다시 desiccator에서 冷却시킨후 glass filter에 의해서 濾過되지 않은沈

澱物을 測定하여 그 定量值를 %로 表示하였다.

結 果

變死者 20例의 胸骨에서 皮質骨 切片에 대한 calcium과 phosphorus의 化學的 定量分析 結果는 表2, 3에서 보는 바와 같다. 즉 男性 胸骨에서 總 calcium-phosphorus의 量은 44.4%이며 calcium의 平均値는 27.25% (SD±2.01), phosphorus의 平均値는 17.25

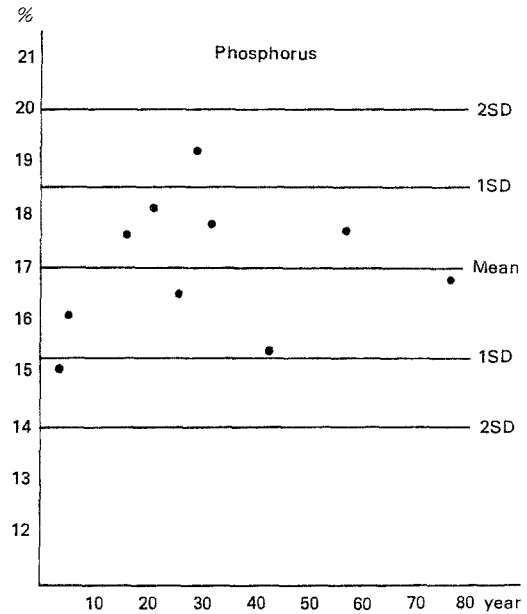
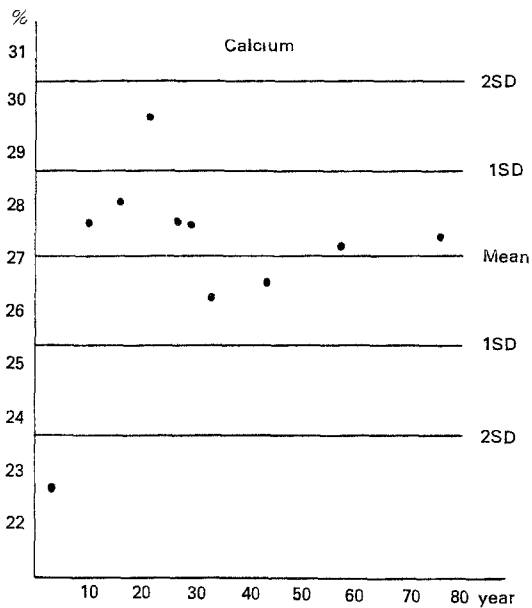


Fig. 2. Dispersion of inorganic calcium and phosphorus contents in the cortical bone of Female sternum.

(SD±1.27)로서 calcium:phosphorus의 構成比는 1.57:1이었다. 한편 女性 胸骨에서 總 calcium-phosphorus의 量은 44.16%이며 calcium의 平均値는 27.11% (SD±1.67)이고 phosphorus의 平均値는 17.05% (SD±1.53)으로서 calcium:phosphorus의 構成比는 1.53:1이었다.

그림 1과 2는 calcium과 phosphorus 定量値의 散布度를 나타낸 것으로서 F-1(女性, 3歲)의 胸骨에서 分析한 calcium 値는 22.71%, phosphorus 値는 15.15%였고, M-1(男性, 9/12歲)에서는 calcium 値가 22.81%, phosphorus 値가 14.42%로서 3歲 이하에서는 定量한 calcium과 phosphorus 値가 2SD 範圍밖이었으나 나머지 18例에서는 calcium과 phosphorus의 定量値가 2SD(two-standard deviation) 範圍內였다.

考 察

骨格系를 形成하는 骨組織은 骨芽細胞, 骨細胞, 破骨細胞 및 軟骨細胞等 細胞成分과 細胞外成分인 骨基質(bone matrix)로 構成되어 있음은 주지의 사실이다. 骨組織은 人體의 다른 組織과 比較해 볼때 가장 현저한 差異點은 膠原質, proteoglycan 같은 有機質成分의 結合에 의해서 形成된 類骨組織(osteoid tissue)에 calcium, phosphorus 등의 無機質이 침착하여 독특한 形態의 構造物을 形成할 뿐만 아니라 骨細胞와 骨

基質成分의 相互作用에 의하여 成長, 模型(modeling) 再形成(remodeling) 및 復元(repair)을 끊임없이 하는 活性組織이 點이다.

骨基質의 化學的 造成을 볼때 有機質成分은 $(\alpha_1)_2 \alpha_2$ 의 形態로 存在하는 第1型 膠原質(type 1 collagen)이 대부분이고³⁾, 非膠原質性 有機質成分인 proteoglycan이 細胞外基質內에 多量 存在한다. 이成分은 hyaluronic acid가 核心部를 形成하고 그 側鎖部(side chain)에 chondroitin sulfate, keratin sulfate 등 sulfated glycosamine 物質을 갖고있는 mucosaccharide 類로서 test-tube brush 樣 形態를 取하여 gel 樣의 強度를 나타낸다⁴⁾. 그러므로 第1型 膠原質에 多糖質成分인 proteoglycan이 結合하여 類骨(osteoid)을 形成하고 여기에 calcium, phosphorus 등의 無機質成分이 침착하여 強度를 갖는 骨組織으로 形成되게 된다. 骨組織중에서 無機質成分은 90~95%가 calcium-phosphate salt와 結合되어 있고 나머지 약1%는 Na^+ , K^+ , Mg^{++} , 및 Cl^- 이온이다⁵⁾⁶⁾⁷⁾. Calcium-phosphate salt를 X-Ray diffraction 法⁸⁾, electron spin resonance spectroscopy⁹⁾, 赤外線分光比色法(infrared spectrophotometry) 등¹⁰⁾의 特殊한 方法으로 分析한 結果 三次元的 元子構造(three-dimensional atom configuration)를 갖는 結晶体인 hydroxyapatite [$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$]와 無定型 calcium-phosphate(amorphous calcium phosphate) 形態로 存在하고 있음이 밝혀졌고, Robinson과 Watson¹¹⁾¹²⁾ 등도 骨基質

내에 無定型 calcium-phosphate가 存在한다는 사실을 報告하면서 이 無定型 calcium-phosphate는 hydroxyapatite의 아주 작은 結晶体이거나 그렇지 않으면 whitlockite (β -Ca₃(PO₄)₂), brushite (CaHPO₄·2H₂O) 혹은 otacalcium phosphate의 微細結晶体 形態로 存在하기 때문에 X-ray diffraction, electron diffraction 法에 포착되지 않는 것으로 說明하고 있다. 한편 Termine과 Posner¹³⁾ 및 Posner 등¹⁴⁾은 生後 3日 된 흰쥐의 脛骨에서 無機質 成分을 分析한 結果 hydroxyapatite가 33%, 無定型 calcium phosphate가 67%인 반면, 生後 80日된 흰쥐에서는 hydroxyapatite가 37%였다고 報告하면서 無定型 calcium-phosphate는 hydrated tricalcium phosphate [Ca₃(PO₄)₂·xH₂O]와 그 化學的 性狀이 類似한 不安定性 化合物로서 pH, 溫度, 이온強度 (ionic strength), HPO₄⁻ 量의 變化에 따라 그 物理化學的 性狀이 쉽게 變하며 骨形成 過程에서 骨組織內 分子環境 (molecular environment)이 高 calcium 濃度, 中性 또는 整基性 pH, 低 이온強度 및 P₂O₇⁻⁴, F⁻, Mg⁺⁺, CO₃⁻² 이온의 存在下에서는 骨組織內 有機質 成分이 類骨을 形成한 후 calcium과 phosphorus는 化學적으로 不安定한 無定型 calcium phosphate 形態로 沈着하지만 高 HPO₄⁻ 濃度, 酸性 pH, 低 이온強度, 低透電定數 (low dielectric constant), 高溫 등으로 分子環境이 전환되면 無定型 calcium phosphate는 微細結晶体인 brushite (CaHPO₄·2H₂O), whitlockite (β -Ca₃(PO₄)₂), calcite (CaCO₃) 같은 apatite樣化合物로 점차 전환되었다가 最終적으로 hydroxyapatite 結晶体가 形成된다고 하였다.

前述한 바와 같이 膠原質과 proteoglycan이 結合하여 類骨을 形成한 후 骨石灰化 過程에서 無機質 成分인 calcium과 phosphorus이완은 無定型 calcium phosphate 形態로 沈着되고 骨組織內 分子環境 條件에 따라 最終적으로 hydroxyapatite 結晶体가 形成되는 骨石灰化 過程을 고려하여 著者は 韓國人에서 채취한 胸骨皮質 切片을 酸性 酸度下에서 加熱 處理하여 無機質 成分을 hydroxyapatite 形態로 전환시킨 후 calcium과 phosphorus 量을 化學적으로 定量하였다.

胸骨皮質內 함유되어 있는 總 calcium-phosphorus 量은 男子가 44.4%, 女子가 44.16%였고 calcium 量은 男子에서 27.15% (SD±2.01), 女子에서 27.11% (SD±1.67)였다. 한편 phosphorus 量은 男子에서 17.25% (SD±1.27), 女子에서 17.05% (SD±1.53)로 性別에 의한 差異는 없었다. Biltz 등¹⁵⁾은 同一年令群의 成人 大腿骨皮質을 分析한 結果 calcium 量은 25.69%, phosphorus가 11.26%라고 報告하면서 性別에 따른

calcium과 phosphorus 量에는 差異가 없다고 하였으나, Woodard¹⁶⁾, gowsey¹⁷⁾는 骨組織內 calcium과 phosphorus 量은 年令, 性別 및 骨種類에 따라 差異가 있음을 밝히고 있다. 한편 Wuthier¹⁸⁾은 軟骨化 骨化 (enchondral ossification)가 進行되고 있는 胎兒의 脛骨에서 皮質骨, 海綿質骨, 石灰化된 軟骨部를 分離하여 皮質骨內 calcium 量은 22.82 (SD±0.23), phosphorus는 10.98% (SD±0.07)이었고, 海綿質骨은 calcium이 23.39% (SD±0.17) phosphorus 11.51% (SD±0.11)였으며, 石灰化 軟骨에서는 calcium이 22.12% (SD±0.13), phosphorus가 11.13% (SD 0.09)로 成長骨에서는 calcium과 phosphorus 量이 다소 감소된다고 報告하였다. 著者の 分析結果에서도 M-1 (男, 9/12歲)과 F-1 (女, 3歲)경우에 calcium 量이 각각 22.81%와 22.71%로 2SD 範圍 밖에 있으며, 5歲 이상의 18例에서는 모두가 2SD 範圍內 임을 알수가 있다. 한편 胸骨皮質內 calcium:phosphorus의 構成比는 男子에서 1.57:1, 女子에서 1.59:1로서 人体 骨組織 뿐만 아니라 脊椎動物의 骨組織內에서 calcium:phosphorus의 構成比가 1.67:1 이상이라고 報告한 Pellegrino 등¹⁸⁾의 分析結果와 큰 차이가 없었다.

本 實驗은 化學量 (mineral stoichiometry)의 側面에서 骨無機質 成分을 分析한 結果이므로 骨無機質 成分을 分析한 結果이므로 無機質 成分의 分子構造學的 側面과 骨組織內 有機質 成分에 대한 骨無機質의 分子學的 相關性에 대한 研究가 더욱 進行되어야 할 것으로 思料된다.

結 論

韓國人 變死體에서 外傷性 出血로 死亡한 11例, 心疾患으로 死亡한 5例, 窒息死 2例 및 子宮外妊娠과 乳幼兒病候群 (sudden infantile death syndrome)으로 死亡한 各 1例씩에서 胸骨皮質을 채취하여 骨無機質 成分인 calcium과 phosphorus에 대한 化學的 定量을 하여 다음과 같은 分析結果를 얻었다.

1) 胸骨皮質內 總 calcium-phosphorus 量은 男子에서 44.40%, 女子에서 44.15%였다.

2) 胸骨皮質內 calcium 量은 男子에서 27.15% (SD±2.01), 女子에서 27.11% (SD±1.67)이며, phosphorus 量은 男子에서 17.25 (SD±1.27), 女子에서는 17.05% (SD±1.53)이었다.

3) 胸骨皮質內 calcium:phosphorus의 構成比는 男子에서 1.57:1, 女子에서는 1.59:1이었다.

REFERENCES

- 1) Koithott IH and Sandell EB: Quantitative Chemical analysis, 4th ed Meekan Bruckenstein P : 617 - 630, 1980
- 2) Welcher FJ: Standard Method of Chemical analysis. 6th Edi, Vol 2 part B 1982, p. 1490 - 1497.
- 3) Robbins SL and Cotran RS: Pathologic basis of Disease, 3rd Edi, WB Saunders Co, 1984, p 257 - 258.
- 4) Teitelbaum SL and Bullough PG: The pathophysiology of bone and joint Disease. Amer J Pathology 1979; 96: 283.
- 5) Armstrong WD and Singer L: Composition and constitution of the Mineral Phase of bone Clin Orthop 1965; 38: 179.
- 6) Eastoe JE: The chemical composition of bone in long, C (Edi): Biochemist's Handbook, Princeton Van Nostrand 1961, p. 715.
- 7) Woodard HQ: The composition of Human cortical bone. Clin Orthop 1964; 37: 187.
- 8) Harper RA and Posner AS: Measurement of non-crystalline calcium phosphate in bone mineral. Proc Soc Exp Biol Med 1966; 122 : 137
- 9) Termine JD, Puelmann J and Posner AS: Electron Spin resonance study of irradiated bone and its constituents. Arch Biochem Biophys 1967; 122: 318
- 10) Termine JD and Posner AS: Infrared analysis of rat bone: A dependency of amorphous and Crystalline mineral fraction Science 1966 153: 1523.
- 11) Robinson RA: An electron microscope study of the crystalline inorganic component of bone and its relationship to the organic matrix. J Bone Joint Surg, 1952; 34: 389.
- 12) Robinson RA and Watson MZ: Collagen - crystal relationship in bone as seen in the electron microscope Anat Rec 1952, 114: 383.
- 13) Termine JD and Posner AS. Calcium phosphate formation in vitro. I. Factors affecting initial phase separation, Arch Biochem Biophys 1970; 140: 307.
- 14) Termine JD, Peckauskas RA and Posner AS: Calcium phosphate formation in vitro Effects of environment on amorphous-crystalline formation, Arch Biochem Biophys. 1970, 140: 318.
- 15) Bilty RM, and Pellegrino ED: The chemical anatomy of bone. I. A comparative study of bone composition in sixteen vertebrates. J Bone Joint Surgery 1969. 51A: 456.
- 16) Woodard HQ: The elementary composition of Human cortical bone, Health phys 1962; 8: 513.
- 17) Jowsey J: Age and species differences in bone cornell Vet 1968; 58: 74
- 18) Pellegrino ED and Bilty RM: Bone carbonate and the Ca to P Molar Ratio Science 1968; 219: 1261.