

原 著

## 糖尿病患者の血液が水和塩化銅の結晶成長に与える影響

シバタ タカシ<sup>1)</sup>・コグレミツコ<sup>2)</sup>・イグチトミコ<sup>3)</sup>  
芝田 高志<sup>1)</sup>・小暮美津子<sup>2)</sup>・井口登美子<sup>3)</sup>  
タナカ アケミ<sup>4)</sup>・オガワ トモヤ<sup>5)</sup>  
田中 朱美<sup>4)</sup>・小川 智哉<sup>5)</sup><sup>1)</sup>東京女子医科大学 解剖学 (主任: 永野貞子教授)<sup>2)</sup>同 眼科学, <sup>3)</sup>同 精神医学, <sup>4)</sup>同 附属女性生涯健康センター, <sup>5)</sup>学習院大学 理学部物理学科

(受付 平成10年3月18日)

**Effect of Diabetics' Blood on the Growth of Hydrated Cupric Chloride Crystals from Aqueous Solutions****Takashi SHIBATA<sup>1)</sup>, Mitsuko KOGURE<sup>2)</sup>, Tomiko IGUCHI<sup>3)</sup>,  
Akemi TANAKA<sup>4)</sup> and Tomoya OGAWA<sup>5)</sup>**<sup>1)</sup>Department of Anatomy, <sup>2)</sup>Department of Ophthalmology, <sup>3)</sup>Institute of Women's Health,<sup>4)</sup>Department of Psychiatry, Tokyo Women's Medical college<sup>5)</sup>Department of Physics, Gakushuin University

Dendrites of hydrated cupric chloride crystallized from dihydrated cupric chloride aqueous solutions to which a slight amount of lysed blood from 6 diabetic patients, and 6 healthy persons as controls, was added *in vitro*, were grown in uncovered Petri dishes (100 mm diameter) under conditions of 28°C and 45% relative humidity. Multiple nucleation developed from pure cupric chloride solutions, however, addition of 0.5 vol% blood strongly inhibited nucleation. As a result, radial growth of dendrites formed from an average count of about 1.5 initial growth points (O) per dish was achieved by adding blood. Crystal forms in the shape of convex lens consisting of two dendrite arches near the center of the crystal growth point were observed. Their specific crystal growth forms were divided into three categories according to the longer diameter of the convex lens shape: small (S) < 8 mm, median (M) ≥ 8 mm but < 20 mm, large (L) ≥ 20. S growth forms correlated with serum concentration of blood were generated by the blood of both healthy persons and diabetic patients, whereas M and L forms were specific to diabetic patients according to the results of testing by Student's t-test, because the number of M forms per twelve dishes was 14.2 ± 1.4 when diabetic patients blood was used, versus 2.50 ± 0.63 in the control group, and because the number of L forms was 6.50 ± 0.67 and 0.33 ± 0.13 with diabetic patients' blood and healthy persons' blood respectively. The occurrence of these M and L forms was correlated to the concentrations of HbA<sub>1c</sub>, HbA<sub>1c</sub>, glucose, creatinine, uric acid, platelets, and ceruloplasmin. The above findings show that blood has an inhibitory effect on nucleation of hydrated cupric chloride crystals and that larger convex lens bodies were formed in the presence of hemolysate of diabetic patients rather than normal controls.

## 緒 言

塩化銅二水和物 (CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O) の水溶液に  
0.001~0.5%程度の微量の血液を *in vitro* で添加

し, 水和塩化銅の樹枝状結晶 (デンドライト) を  
成長させると, 血液提供者の疾病の種類に応じて  
特異な結晶成長を遂げることが報告されてい

る<sup>1)~5)</sup>。欧州を中心に60年以上この興味深い現象の研究はなされてきたものの、未だに反応機構は解明されておらず、また我国におけるこの種の研究報告は皆無に近い。

そこで我々はまず、健常者の血液が水和塩化銅の結晶成長に与える影響について研究を行った<sup>6)</sup>。その結果、血液中の窒素基が結晶表面の銅原子に電子の授受を伴った形で化学吸着をしていることをX線光電子分光法(XPS)により明らかにした<sup>6)7)</sup>。また、原子間力顕微鏡(AFM)による表面観察から、血液添加は結晶成長核の生成を抑制する効果があることを確認し<sup>8)9)</sup>、生成したデンドライトの結晶構造解析を行った<sup>10)</sup>。

次いで、我々は糖尿病患者の血液に着目し、デンドライトの形態に与える影響に関するパイロットスタディを試みたので報告する。なお、糖尿病患者の血液を用いた報告は筆者の知る限り過去1例しか見当たらない<sup>3)</sup>。

## 対象および方法

### 1. 対象

糖尿病と診断がなされ、それ以外の合併症がなく治療初期すなわち入院直後で経口剤の投与のみを受けている患者6名〔インスリン非依存型(NIDDM)の女性4名(DM1~4)、同男性1名(DM5)、インスリン依存型(IDDM)の女性1名(DM6)：平均年齢 $55.2 \pm 5.1$ 歳〕および健常者6名〔女性5名(G1~2, G4~6)、男性1名(G3)：平均年齢 $41.2 \pm 4.2$ 歳〕を対象とし、いずれも早朝空腹時に肘静脈から採血した。

### 2. 方法

#### 1) 結晶成長装置の開発

結晶成長に影響を及ぼすと考えられる温度、湿度、空気流の変動、振動などを極力少なくするように種々の工夫をした結晶成長装置の設計・製作を行った(図1)。

この装置は12組の結晶成長容器<sup>11)</sup>を入れた結晶成長槽、温度・湿度など種々のパラメータの制御機器および成長する結晶を観察するために多関節6軸ロボットで移動される画像入力機器(35mmカメラ、ビデオカメラ、実体顕微鏡)、それら全体を統御する3組のパーソナルコンピュータなどの

ハードウェアから構成される。また、前もってプログラムした条件でそれら全体を制御し、制御状態と観察結果が出力される一連のソフトウェアから構成される。

#### 2) 結晶成長

再結晶化により純度を向上させた塩化銅二水和物(Merk ABS AG  $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ )の30.0wt%の水溶液を調整し、これと0.55mlの血液を54.45mlの純水に溶血させたものとを等量混合した(血液の最終的濃度は0.5vol%)。この溶液8.0mlをこの実験に適した形状に加工したテフロン、シリコンのOリング、ガラス円板(平滑なソーダガラス)から構成される直径100mmのシャーレ12個に分注した。但し、このうちの3個のシャーレに関しては分注前にメンブレンフィルター(Millipore Sterifil D-HV 0.45 $\mu\text{m}$  Filter Unit)で溶液を濾過した。これらのシャーレを上記装置内の12組の結晶成長容器にそれぞれ挿入し、温度28°C、湿度45%RH下で水分を蒸発させ結晶を析出・成長させた。本研究では24時間後の写真撮影像に基づきその形態を解析した。

なお、濾過によりメンブレンフィルターに残留した生成物は、X線光電子分光法(XPS: JEOL JPS9000MX)による元素分析の他、Au-Pdを蒸着し(HITACHI E-1030 Ion Sputter)、走査型電子顕微鏡(FE-SEM Hitachi S-4700)による形態の観察を行った。

#### 3) 血液の分析

採血した血液に関して、表1に示す項目の分析を行った。

#### 4) 統計処理

健常者群と患者群との間に有意差のある血液成分を見出すためにt検定(Microsoft Excel)を行った。健常者群および患者群各6名の成長した結晶の形態はその長軸の直径から8mm未満(S)、8mm以上20mm未満(M)、20mm以上(L)の3種に分類し、各々の発生頻度と血液成分の分析値の大きさとの相関を見出すために、SAS(statistic analysis system)により相関係数の算出とその有意性の検定を行った。また、t検定においては健常者群と患者群の発生頻度の和を用い、その発生頻

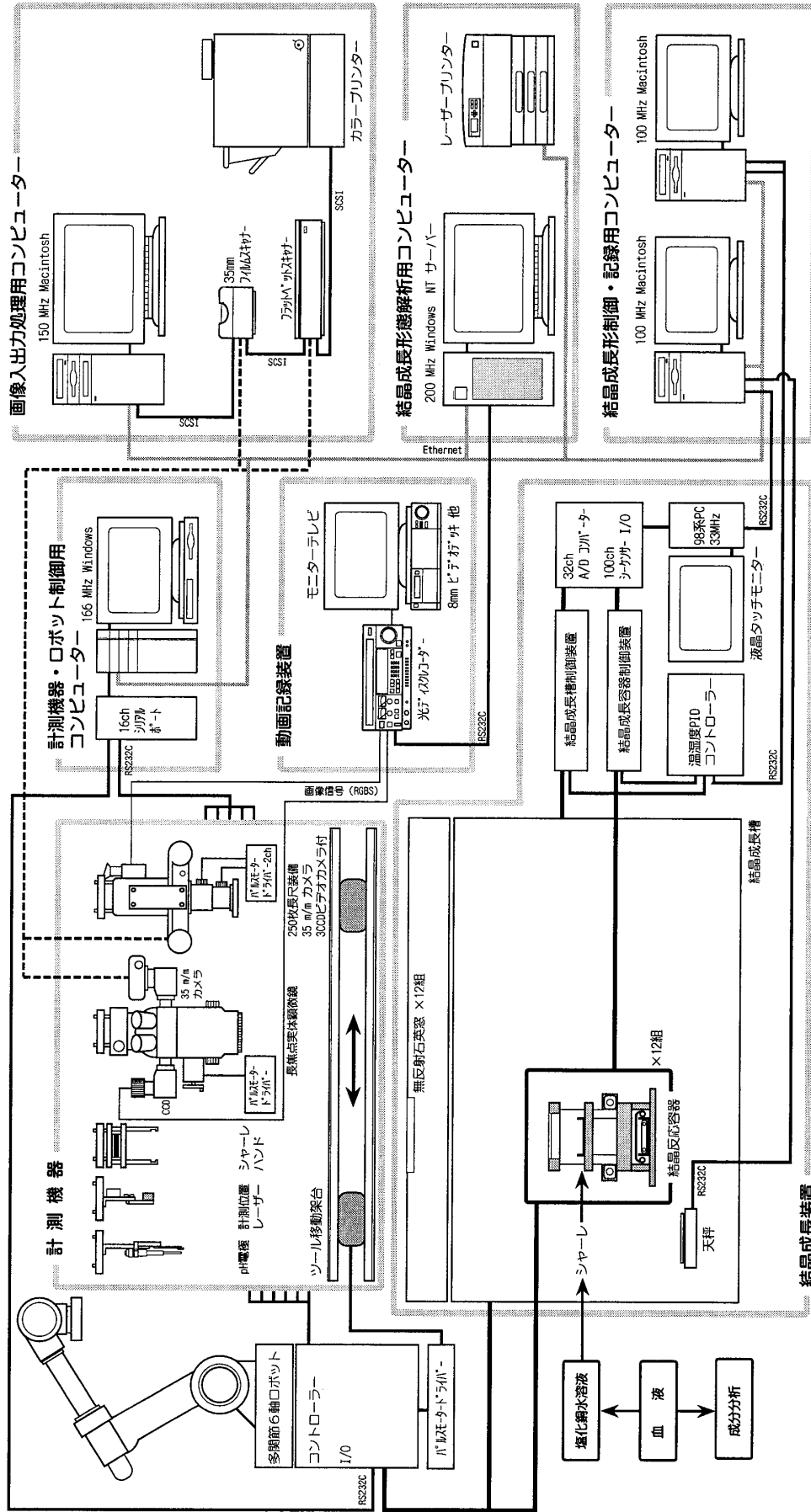


図1 製作した結晶成長装置の構成図

表1 血液分析項目

検査大項目	小項目
血糖コントロール指標	ヘモグロビン A <sub>1</sub> (HbA <sub>1</sub> ), ヘモグロビン A <sub>1c</sub> (HbA <sub>1c</sub> ), 空腹時血糖値 (Glu)
膵臓機能	インスリン (IRI), トリプシン (Trypsin)
血清蛋白	総蛋白 (TP), 蛋白分画 (Alb, $\alpha_1$ -G, $\alpha_2$ -G, $\beta$ -G, $\gamma$ -G, A/G 比)
アミノ酸	フィブリノーゲン (fibrinogen), セルロプラスミン (Cp) 41種類のアミノ酸の定量分析 Taurine, Phosphoethanolamine, Urea, Aspartic acid, Hydroxyproline, Threonine, Serine, Asparagine, Glutamic acid, Glutamine, Sarcosine, $\alpha$ -Aminobutyric acid, Proline, Glycine, Alanine, Citrulline, $\alpha$ -Aminobutyric acid, Valine, Cystine, Cystathionine, Methionine, Isoleucine, Leucine, Tyrosine, Phenylalanine, $\gamma$ -Amino $\beta$ -hydroxybutyric acid, $\beta$ -Alanine, $\gamma$ -Aminobutyric acid, Homocystine, $\beta$ -Amino-iso-butyric acid, Monoethanolamine, Histidine, 3-Methylhistidine, 1-Methylhistidine, Carnosine, Anserine, Tryptophan, Hydroxylysine, Ornithine, Lysine, Arginine, 総アミノ酸 (Total AA, NEAA, EAA, BCAA, EAA/NEAA, BCAA/Total AA, フィッシャー比)
脂質	総脂質 (TL), 総コレステロール (Tcho)
生体色素	ビリルビン分画 (直接・間接)
含有窒素成分	尿素窒素 (UN), クレアチニン (Cr), クレアチン (Creatine), 尿酸 (UA)
電解質	ナトリウム (Na), カリウム (K), カルシウム (Ca), マグネシウム (Mg), リン (P), 塩素 (Cl)
金属	血清鉄 (Fe), 総鉄結合能 (TIBC), 不飽和鉄結合能 (UIBC), 血清銅 (Cu)
ポルフィリン	プロトポルフィリン
甲状腺機能	血清総サイロキシン (T4)
血球算定	白血球数 (WBC), 赤血球数 (RBC), 血色素量 (Hb), ヘマトクリット値 (Ht), 平均赤血球容積 (MCV), 平均赤血球血色素量 (MCH), 平均赤血球血色素濃度 (MCHC), 血小板数 (blood platelet)
血液像	白血球分類 (Stab, Seg, Eosin, Baso, Mono, Lympho, Size, Colr, Shape), 赤血球形態

度の平均値を境に上下の2群に分類し、血液成分との検定を試みた。なお、データはいずれも正規分布に従うものと仮定し、平均値には標準誤差 (SE 値) を付記した。

## 結 果

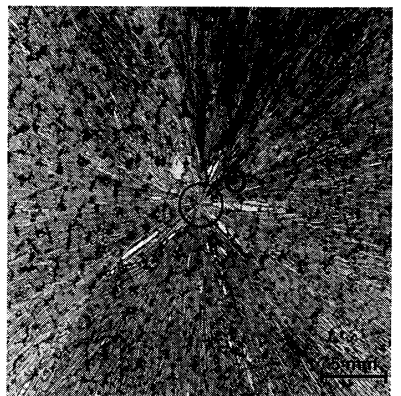
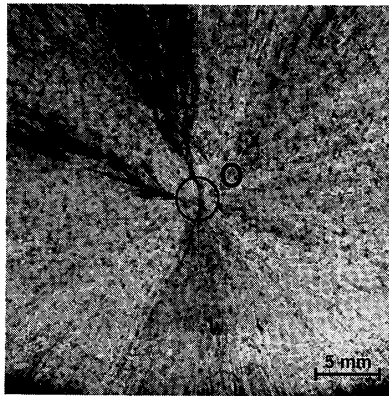
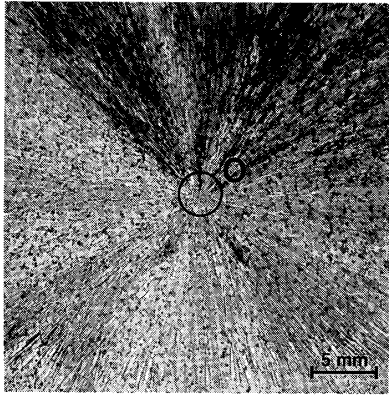
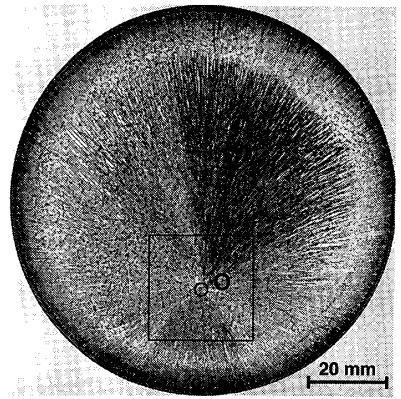
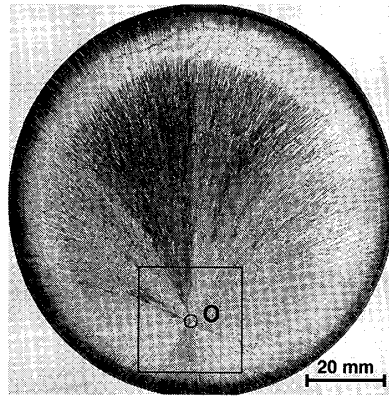
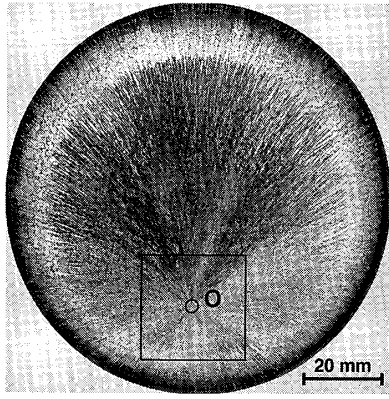
### 1. 健常者と糖尿病患者に共通した結晶成長

健常者群 (G1~6) および糖尿病患者群 (DM1~6) の血液を添加して成長させた時に得られた代表的な結晶像を、各3例ずつ図2にシャーレの全景 (上段) と拡大図 (下段) で示した。図2から明らかなように、健常者・糖尿病患者を問わず血液を添加した試料では、1点もしくは数点を中心核 (O) としシャーレの端から1cm程度内側の領域にわたり直径約8cmの放射状デンドライトが成長した。血液の添加濃度が0.5vol%では、成長の中心核の数は健常者群は $1.33 \pm 0.05$ ・糖尿病患者群は $1.71 \pm 0.17$ であった。このデンドライトは溶液をシャーレに注入後7~9時間で析出を開始し、主要な形態は1時間程度で完成した。図2

には水分が完全に蒸発した24時間後に撮影したものを示した。

添加血液の最適値を見つけるために予備実験を行ったところ、血液濃度の上昇に伴い発生する中心核の数が1個に収束する傾向にあり、逆に濃度の減少に伴い多核の傾向を示した。このような血液濃度の効果は0.001vol%の低濃度まで観察されたが、本研究では0.5vol%の添加濃度を採用した。

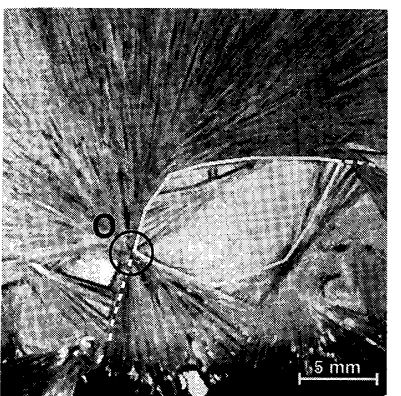
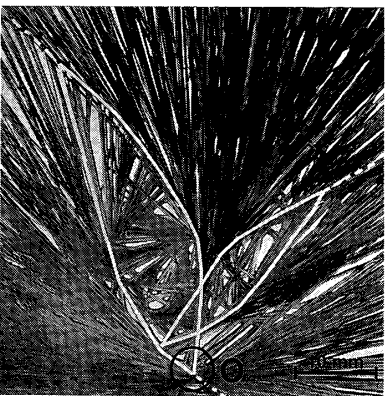
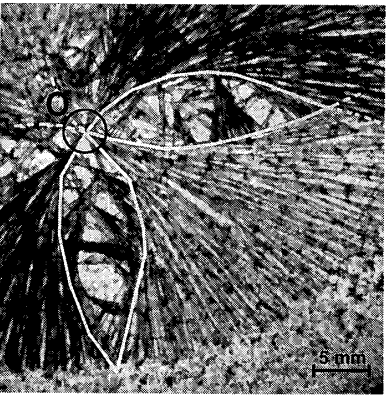
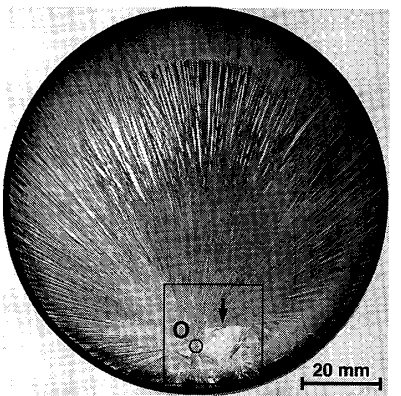
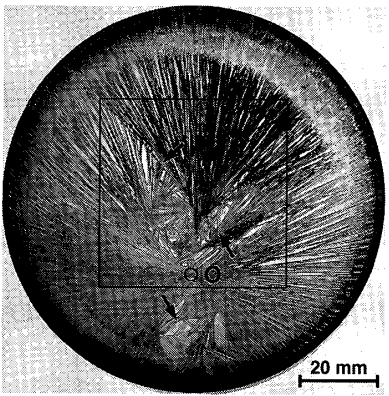
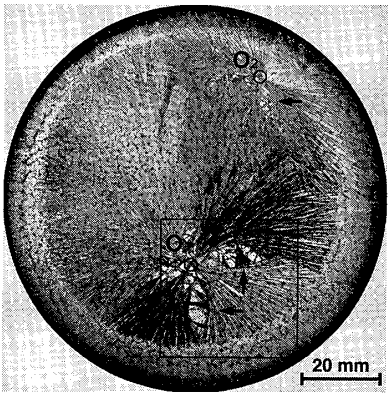
0.1vol%以上の血液濃度では溶血液と塩化銅水溶液を混合した際に図2のG1~3およびDM1に見られるように褐色の沈殿が生成した。この沈殿をメンブレンフィルターで濾過・除去し、濾液のみで結晶化したのが図2 DM2, DM3である。未濾過と濾過試料を比較すると、濾液からはデンドライトに発生する樹枝の密度 (1点から成長する針状結晶の数) は減少し、1本1本の針状結晶の太さと長さが増加した。しかし、濾過した場合であっても水分の蒸発に伴い僅かの褐色沈殿が生成している。この沈殿の重量はもとの塩化銅の重量と比較し、わずか0.26%程度であり、XPSによる



**G1**

**G2**

**G3**



**DM1**

**DM2**

**DM3**

图 2

解析の結果、銅、塩素、炭素、酸素、窒素を含む有機金属化合物であった。FE-SEM で数万倍に拡大しても結晶の形状は観察されず、極めて微細な粒子の集合体であった。

なお、血液無添加の塩化銅水溶液からの結晶成長の場合には青い結晶が析出したが、血液を添加し成長させた系では青と緑色の結晶が観察された。この結晶の色の違いによる結晶構造に関しては別に報告した<sup>10)</sup>。

## 2. 健常者に固有な結晶像

健常者の血液を添加した溶液から成長した結晶像では、図2のG1~3に示すように、秩序的に成長した放射状のデンドライトが観察された。中心核近傍に若干のレンズ状の形態が出現したが、その大きさはSに分類される数mm程度であった(図2 G3拡大図)。

## 3. 糖尿病患者に固有な結晶像

一方、図2のDM1~3に示すように糖尿病患者の血液を添加した場合は、放射状のデンドライトの成長中心核近傍に、2つの弧状のデンドライトの重ね合せによる凸レンズ状の形態に結晶が成長した。凸レンズ状の内部は相似で、入れ子のように非常に薄い結晶が成長し、肉眼的には空洞に見える場合と(DM3)、双晶の集合している場合(DM1, DM2)があった。この凸レンズ状の形態の長軸の長さを8mm未満(S)、8mm以上20mm未満(M)、20mm以上(L)の3種類に大きさで分類し、同一の血液で同時に結晶成長させた12個のシャーレ中に出現した個数の合計を図3に示す。健常者(G1~3)ではSの出現頻度はゼロではないが、糖尿病患者(DM1~3)でも明らかにM

やLに属す大きなレンズ状のデンドライトの発生頻度が高いことがわかる。

## 4. 血液の分析結果と統計的解析

健常者群および糖尿病患者群の血液検査項目のうちt検定により両者間に有意差のあった項目を表2に示す。HbA<sub>1c</sub>、HbA<sub>1c</sub>、空腹時血糖値、尿酸をはじめ糖尿病と関連の深い項目が抽出された。また、健常・糖尿病を問わずL、M、Sのそれぞれの発生頻度と血液成分の定量値との間で有意差の認められ、グラフ化し外れ値のないことを確認した項目の相関係数とその有意性の検定を表3に示す。表3からLとMに共通し非常に高い相関を示す因子として、HbA<sub>1c</sub>、HbA<sub>1c</sub>、血糖、尿酸、クレアチニンがあげられる。血小板に関してはLにおいてかなり高い相関( $R_L=0.0032$ )を示している。Sの発生に関しては、A/G比、Alb、 $\alpha_1$ -G、 $\alpha_2$ -G、 $\gamma$ -Gなどの血清蛋白質の組成および血小板数、MCH、MCVなどが影響した。表のうち\*を記した幾つかのものは、発生頻度と血液成分の濃度との関係を図4に図示し、外れ値の少ないことを示した。HbA<sub>1c</sub>や血糖値の増加、すなわち糖尿病の重症度の増加によりLやMの発生頻度が増加していることがわかる。L、M、S別で健常者群と患者群の発生頻度の和の平均値を境に上下2群に分類し、血液成分の検定を行い、有意なものを表4に示す。

## 考 察

血液無添加の塩化銅水溶液から結晶を成長させた場合、多数の成長中心核ができ、各々のデンドライトの長さは数mmにも至らない。このため小さな無数の結晶が重なり合って不規則な形に析出

図2 血液を添加し成長させた水和塩化銅の結晶像

健常者および糖尿病患者の血液を0.5vol%添加した代表的結果3例を示す。上段がシャーレの全景、下段が中心核近傍の拡大図。

G1~3: 健常者。成長中心核(O)から放射状にデンドライトが成長している。G3の中心核近傍に小さな凸レンズ状の形態(S)が観察されるものの、特異的な形態は観察されない。DM1~3: 糖尿病患者。デンドライトの成長中心核近傍に2つの弧状のデンドライトの重ね合せによる凸レンズ状の形態が観察される(図中の白線部)。成長の途中ではこの形態の中には結晶が存在しないが、24時間後の観察では、内部に双晶として結晶が成長したり(DM1, 2)、入れ子のように相似形の形態が内部に観察される(DM3)。

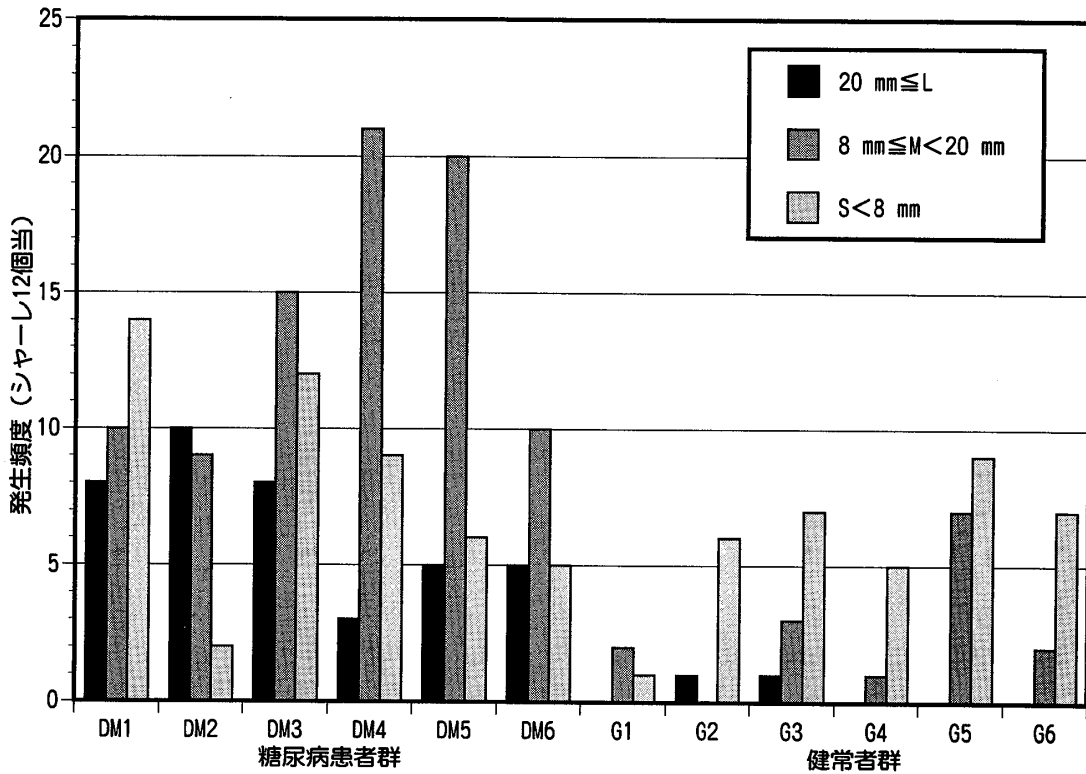


図3 健常者 (G1~6) および糖尿病患者 (DM1~6) 各6例の血液を添加して成長させた水和塩化銅のデンドライトに発生する特異な結晶成長 (凸レンズ状の形態) の大きさ別頻度  
y軸の凸レンズ状の形態の発生頻度はシャーレ12個当たりの総和個数で表示し, x軸は凸レンズ状の形態の長軸の長さにより8mm未満 (S), 8mm以上20mm未満 (M), 20mm以上 (L) の3種類に分類した。

する<sup>8)</sup>。一方, 健常者群・糖尿病患者群を問わず, 血液の添加によりデンドライト発生核は1個もしくは数個に減少するため大きなデンドライトが成長した。このことは血液が塩化銅の核の生成を抑制していることを示すものと思われる。この核発生抑制効果のため1本の塩化銅デンドライトは血液無添加の場合の数千倍の体積にまで成長している。すなわち血液の添加は結晶成長に大きな影響を及ぼすことが明らかである。

添加血液の効果は0.001vol%という低濃度から認められ, 添加濃度の上昇に伴い結晶成長中心核は無数から1~2個に収束する傾向にあった。今回の研究では Selawry ら<sup>3)</sup>の約5倍の濃度 (0.5 vol%) を採用したが, これは発生する中心核数を確実に減らし, 解析の煩雑さを避けるためである。

添加血液の量を増加させるとシャーレ全域に分布する褐色の沈殿が生成する。これらは XPS と FE-SEM 像から血液成分と銅化合物の極微細粒

子であることがわかった。従って, 過剰に血液を添加しても結晶成長へ与える影響力は頭打ちになると考えられた。しかし, 予想に反し褐色の沈殿を除去しない場合と比較し, 濾過して結晶化させた場合には, デンドライトの密度が減少し, 各々の針状結晶の体積 (c軸方向の長さとおc面内の太さ) が増加するという結果が観察された。微細粒子であるために起きる物理的効果であるか, 沈殿が液相と平衡状態にあり化学的に影響を及ぼすのか, 2つの機構が考えられるが, 原因究明には更に研究が必要である。

糖尿病患者の血液を添加した場合, 放射状のデンドライトをベースにして凸レンズ状の形態に結晶が成長し (図2), Selawry ら<sup>3)</sup>の1例報告と類似した形態が得られた。透過光による映像からはわかり難いが, 実際の結晶像からはそれらの形態を判断することは容易である。これら糖尿病に固有な形態が成長核の近傍に出現するという興味深

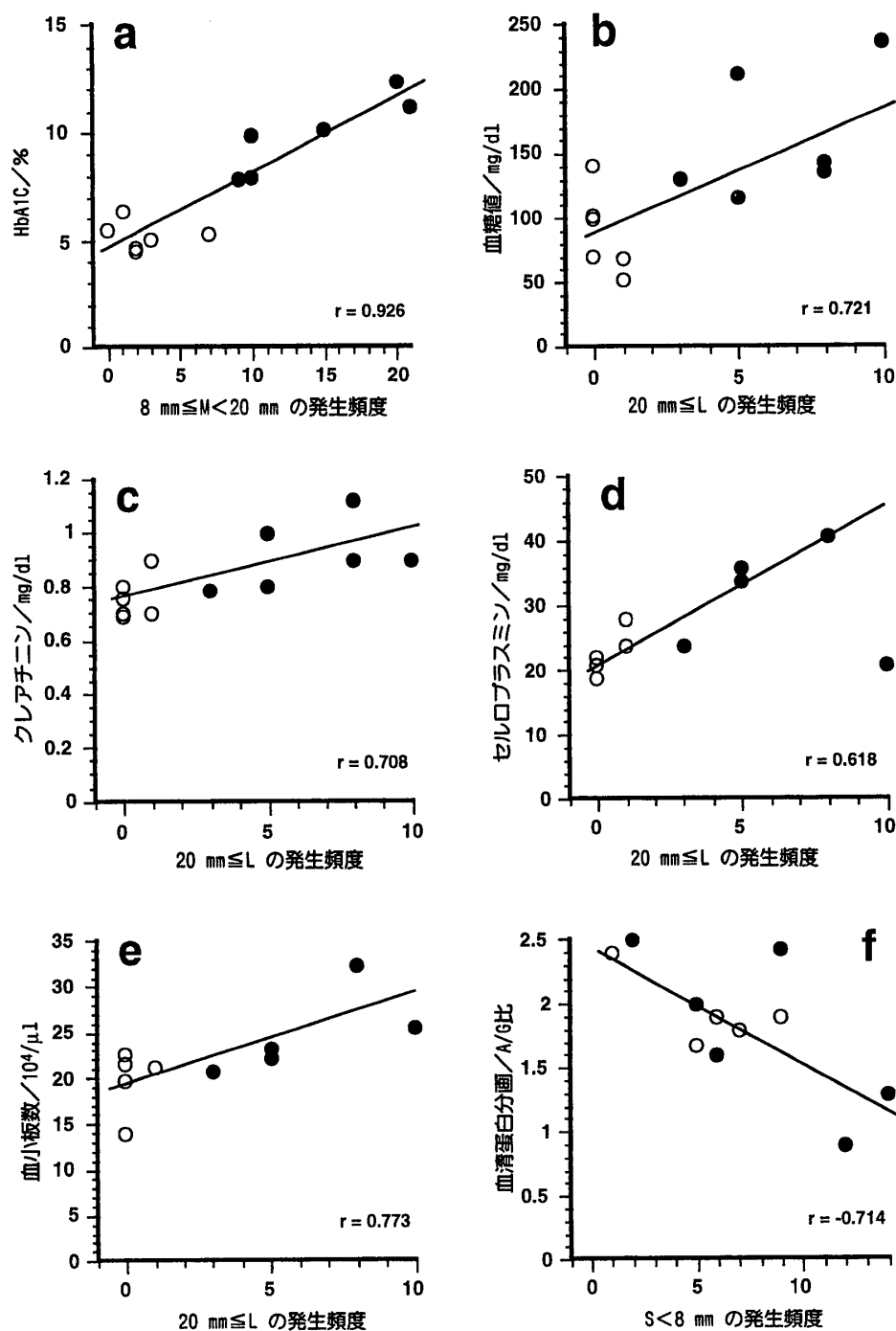


図4 特異な形態の発生頻度と相関の認められた血液成分の関係

L, M, S の発生頻度と相関の認められた血液成分の関係の1例を示す。

○：健常者，●：糖尿病患者。

a：HbA<sub>1c</sub>濃度とMの発生頻度関係。HbA<sub>1c</sub>濃度の上昇に伴い発生頻度が直線的に増加する。b：空腹時血糖値とLの発生頻度の関係。c：クレアチニン濃度とLの発生頻度の関係。d：セルロプラスミン濃度とLの発生頻度の関係。e：血小板数とLの発生頻度の関係。f：血清蛋白A/G比とSの発生頻度の関係。Albの濃度増加により発生頻度は減少し、 $\gamma$ -G、 $\alpha_1$ -G、 $\alpha_2$ -Gの増加により発生頻度は増加する。従って、A/G比の増加に伴い発生頻度は減少する。

い知見を得ることができ、パイロットスタディとしては良き結果が得られたと思われる。

図3から健常者群と患者群との間で8mm未満(S)の小さな形態に関しては有意差がないが、8



mm 以上20mm 未満 (M) および20mm 以上 (L) では顕著な有意差が示された。

図2のDM3からわかるように凸レンズ状の形態の内部にもさらに薄い凸レンズ状の形態が成長する場合もあり、DM1やDM2では双晶の内部に凸レンズ状の結晶が成長している。これは凸レンズ状の形態の中に取り残されてしまった飽和溶液から新たな塩化銅の結晶が析出するために形態を複雑化してしまうように思われる。実際、結晶の成長の過程をビデオカメラでコマ撮りしたところ、当初は綺麗な1つの凸レンズ状の形態が形成されるが、途中で内部に結晶が成長していくところが観察された。凸レンズ状の形態の内部に取り残された溶液にも同様の力が加わっており、相似形のデンドライトが次々に形成されることは興味深い。種々の成長条件を制御することで、より単純な形態を形成させることができると思われる。

XPSによる我々の研究から結晶表面にN基が化学吸着していることが明らかとなっていることから、表1に示す血液分析の項目は糖尿病に関連する蛋白質およびアミノ酸を中心とした分析項目を選択した。

膵臓のランゲルハンス島β細胞から分泌されるポリペプチドホルモンであるインスリンは患者群と健常群の間で有意差が認められなかったことから、凸レンズ状の発生因子として除外できる

ものと思われる。血糖(グルコース)に関しては、図4から血糖値が比較的高い健常者の検体においても、M、Lの発生頻度が低いことから除外できる。血清鉄はβ<sub>1</sub>-グロブリンに属する分子量80,000の鉄結合性蛋白であるトランスフェリン(Tf)と多くが結合し存在している。生体内の鉄の2/3はヘモグロビンとして、1/3弱が貯蔵鉄として肝臓や脾臓に存在する<sup>12)</sup>。この鉄結合性蛋白が塩化銅の表面に吸着し晶相を変化させている可能性を考慮し、分析項目に加えたが、S、M、Lの発生との相関は得られなかった。通常、患者群では鉄の濃度は減少しているはずであるが、ここでは逆に患者群は正常値範囲内ではあるが、いずれも健常者群と比較し高値の傾向を示した。

また、血小板数とMの発生頻度との相関は認められないものの(表3)、Lの発生頻度との間には相関があるようにも思われる(表3、表4e)。表2に示した血液分析の結果は、糖尿病患者群では健常者群よりやや高値の血小板数を示しているが、血小板数は糖尿病とは直接関係がない指標といわれており、レンズ状の結晶成長が糖尿病に特異的であるかどうかは目下のところ断定はできない。

さらに、糖尿病とは直接関係しないと考えられるセルロプラスミンは特異な形態との相関が得られた。セルロプラスミンは肝臓のミクロソームで合成され1分子中に数個の銅原子を持つ糖蛋白で

表2 血液分析項目のうち健常者群と糖尿病患者群で有意差の認められた項目

大項目	検査項目 小項目	平均値と標準誤差		t検定
		糖尿病患者群	健常者群	
血糖コントロール指標	ヘモグロビン A <sub>1c</sub> (%)	11.7± 1.0	6.2± 0.4	0.0007
	ヘモグロビン A <sub>1c</sub> (%)	9.9± 0.8	5.2± 0.3	0.0008
	空腹時血糖値(mg/dl)	163.0± 22.0	89.3± 14.1	0.0190
血清蛋白 含有窒素成分	セルロプラスミン(mg/dl)	32.8± 3.8	22.7± 1.4	0.0357
	クレアチン(mg/dl)	0.9± 0.1	0.8± 0.0	0.0106
アミノ酸分析	尿酸(mg/dl)	4.8± 0.3	3.8± 0.2	0.0315
	Citrulline(nmol/ml)	38.7± 4.2	26.5± 2.5	0.0132
	3-Methylhistidine(nmol/ml)	3.2± 1.2	0.0± 0.0	0.0334
	Urea(nmol/ml)	4,759.2±707.9	2,813.9±573.7	0.0687
血球算定	Lysine(nmol/ml)	224.7± 33.9	178.7± 18.5	0.0621
	Tryptophan(nmol/ml)	52.0± 8.6	64.2± 3.4	0.0616
	血小板数(10 <sup>4</sup> /μl)	26.1± 2.3	20.1± 1.4	0.0972

有意と認められた項目(5%以下)の平均値、標準誤差とt検定値を示す。  
点線以下は、それに次ぐもの。

表3 大きさ別に示した特異な形態の発生頻度と各血液成分定量値との相関係数とその有意性

レンズ型の大きさ	血液分析項目	相関係数	有意性
20mm≤L	HbA <sub>1c</sub>	0.588	0.0443
	HbA <sub>1c</sub> *	0.619	0.0318
	空腹時血糖*	0.721	0.0081
	血小板数*	0.773	0.0032
	クレアチニン*	0.708	0.0100
	尿酸	0.692	0.0126
	セルロプラスミン*	0.618	0.0324
8mm≤M<20mm	HbA <sub>1c</sub>	0.939	0.0001
	HbA <sub>1c</sub> *	0.926	0.0001
	クレアチニン	0.577	0.0494
	空腹時血糖	0.628	0.0287
	(血小板数)	0.351	0.2635)
	(尿酸)	0.535	0.0728)
	(セルロプラスミン)	0.492	0.1044)
S<8mm	MCV	-0.635	0.0266
	MCH	-0.600	0.0392
	血小板数	0.702	0.0109
	血清蛋白分画 Alb	-0.742	0.0058
	α <sub>1</sub> -G	-0.609	0.0355
	α <sub>2</sub> -G	0.614	0.0338
	γ-G	0.697	0.0118
A/G*	-0.714	0.0090	

\*は図4にグラフを示した。

8mm≤M<20mm に関しては5%以上のものも( )内に若干記した。

あることから<sup>11)</sup>、塩化銅の表面に影響を与える可能性があり、糖尿病の指標とされてきた因子とは別の成分の本現象への関与も示唆される。

患者群には入院直後もしくは治療初期段階の患者を対象とした。これは、治療効果の影響を無視できるように計画したためであり、表2に示したように健常者群と患者群の血液間ではHbA<sub>1c</sub>、血糖値、セルロプラスミン、クレアチン、尿酸、アミノ酸、血小板数などに有意差が示された。それらの血液成分と、M、Lで表した糖尿病患者において示されるレンズ状形態の発生頻度と相関の認められた血液成分(表3)との間で、かなりの一致項目が認められる。すなわち糖尿病と関連の深いHbA<sub>1c</sub>、HbA<sub>1c</sub>値などの増加に伴いLやMの発生頻度は増加している。一方、表3からSの発生頻度は血清蛋白組成濃度に明らかに依存しており、血小板数、MCH、MCVなどの血算値の若干の影響も認められた。従ってSの発生頻度は糖尿病と

表4 大きさ別に示した特異な形態の発生頻度に対しt検定により有意性を示した血液成分

レンズ型の大きさ	血液分析項目	t検定
20mm≤L	ヘマトクリット	0.0417
	血小板数	0.0009
	トリプシン	0.0352
	クレアチニン	0.0306
	血清銅	0.0501
	アミノ酸分析 Urea	0.0234
	Cystine	0.0099
	3-Methylhistidine	0.0006
8mm≤M<20mm	HbA <sub>1c</sub>	0.0015
	HbA <sub>1c</sub>	0.0017
	総蛋白	0.0163
	アルブミン定量	0.0144
	クレアチニン	0.0363
	アミノ酸分析 Citrulline	0.0047
	Valine	0.0469
	Isoleucine	0.0045
	Leucine	0.0162
	EAA	0.0497
S<8mm	血色素量	0.0261
	ヘマトクリット	0.0321
	アルブミン定量	0.0495
	リン	0.0244
	アミノ酸分析 3-Methylhistidine	0.0275
	Tryptophan	0.0198

ここでは健常者群と糖尿病患者群の発生頻度の和を用い、その発生頻度の平均値を境に上下の2群に分類し、血液成分の検定を試みている。

は無関係であり、L、Mとは異なった発生機序であると解釈される。このLやMなどの大きな形態の発生頻度は図4a、bから明らかなように、糖尿病の重症度に対応しているという興味深い結果が得られた。

便宜上、長軸の長さ20mmを境にLとMを分類したが、それらが同一の発生機構であった場合、LとMは本来分類すべきではない。しかし、表3、4から発生に起因すると推定される成分に若干の差があり、大きさで分類することに意味が存在するのかもしれない。そこで、今後、分類の必要の有無および必要であればその最適値を見出す統計処理を考えたい。また、本報告では単一の因子に関する解析に留めたが、今後、検体数を増加させ多変量解析(偏相関係数)による変数選択を行い複数の因子の同時関与についての解析を行うべき

と思われた。

凸レンズ状の形態の出現頻度を求めたが、他のパターンに関してはその情報を利用していない。将来は一つのシャーレに出現するデンドライトが示すすべてのパターン情報について計測し、合併症等を考慮し統計解析することが、本研究を進展させる上で重要と思われる。

従来の血液分析では各成分を定量分析しスカラー量に還元しているが、本研究による手法においては全身を循環し多くの生体情報を持つ血液から、結晶成長を指標に生体情報をベクトル量として抽出することであり、その意味から全く新しい方法論を開拓する一つの方法と我々は考えている。結晶成長の因子と機構が解明されれば、結晶化装置を非常に簡略化・小型化することも可能である。

本パイロットスタディにより、糖尿病患者の血液添加により特異な結晶成長を遂げることが明らかとなったが、今回、血液分析した項目は含有窒素成分の一部にすぎず、その意味からも特異な形態を生じる因子に関して断言することはできない。今後の課題として以下の研究を行い結晶成長機構の解明・臨床検査への応用へと導きたい。

- 1) 結晶表面に吸着している蛋白質の同定。
- 2) 特異な形態を発生させる成分として今回スクリーニングされた血液成分を添加しての結晶成長。
- 3) 結晶成長の各種パラメータの最適化。
- 4) 特異な形態を示す疾病のスクリーニング。
- 5) 特異な形態の客観的特徴のコンピュータ画像解析による抽出や出現頻度と位置座標などを計測する学術の発展。
- 6) 結晶成長過程の動的解析とそのための統計処理法の開発。

## 結 論

塩化銅二水和物の水溶液に健常者と糖尿病患者各6名の血液を *in vitro* で添加し、水和塩化銅の樹枝状結晶(デンドライト)をシャーレ中で成長させた。血液無添加の状態では無数の成長核が生成するのに対し、0.5vol%の血液の添加により核の生成を大幅に抑制し、基本構造として健常者・

糖尿病患者群を問わず1シャーレ当たり平均1.5個の成長中心核をもつ放射状のデンドライトが成長した。さらに糖尿病患者群ではデンドライトの成長中心核近傍に2つの弧状のデンドライトの重合せによる凸レンズ状の特異な形態が観察された。その長軸の直径が8mm未満(S)のものは血清蛋白分画、MCV, MCH, 血小板数との相関が認められ、健常者・糖尿病患者群を問わず観察された。一方、8mm以上20mm未満(M), 20mm以上(L)のものは、HbA<sub>1c</sub>, HbA<sub>1c</sub>, 血糖値, 尿酸, クレアチニン, 血小板, セルロプラスミンなどの濃度の上昇に依存し発生頻度の増加傾向が認められた。Mの発生個数は12個のシャーレ当たり患者群では $14.2 \pm 1.4$ , 健常者群では $2.5 \pm 0.63$ , Lは前者で $6.50 \pm 0.67$ , 後者で $0.33 \pm 0.13$ であり、それぞれt検定の結果、健常者・糖尿病患者群の間で有意差が存在し、相関解析から重症度と比例関係にあることが明らかとなった。

以上のことから血液は水和塩化銅の結晶成長に大きな影響を与え、健常者と糖尿病患者で異なった形態の結晶成長が起きることが明らかとなった。

著者らは糖尿病患者の血液をご提供下さいました東京女子医科大学糖尿病センター所長 岩本安彦主任教授, 三浦順之助先生, 長瀬紀子先生を始めとする糖尿病センターの諸先生方, 統計解析でお世話になりました衛生学公衆衛生学教室の清水 悟先生に感謝致します。

本研究の一部は文部省科研費試験研究B(現 基盤研究A(2))(No. 06559014)によってなされた研究であることを付記し、ここに感謝の意を表します。さらに本研究の一部は日本学術振興会未来開拓学術研究・原子スケール表面・界面ダイナミクスによって支援されたことを付記し、重ねて感謝の意を表します。

## 文 献

- 1) **Pfeiffer E**: Kristalle. Orient-Occident-Verlag, Stuttgart (1930)
- 2) **Nickel E**: Die Reproduzierbarkeit der Sogenannten Empfindlichen Kupferchloridkristallisation. Bull Soc Frib Sci Natl 57: 65-179, 1967-68
- 3) **Selawry A, Selawry O**: Die Kupferchlorid-

- Krystallisation in Naturwissenschaft und Medizin. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1957)
- 4) **Cocude M, Barth JG, Bruyet B et al**: La pneumoconiose des houilleurs et son suivi Méthode des cristallisations sensibles au banc d'essai. Industrie Minérale Décembre: 41-47, 1992
  - 5) **Piva MT, Lumbroso S, Sieso V et al**: Cupric chloride crystallization with human blood study of pictures obtained in different pathologies. Elemente der Naturwissenschaft 61: 25-39, 1994
  - 6) **Shibata T, Shirasaka R, Ogawa T et al**: Effect of human blood addition on dendritic growth of cupric chloride crystals in aqueous solutions. J Crystal Growth 142: 147-155, 1994
  - 7) **芝田高志, 田中朱美, 小暮美津子ほか**: 血液結晶化法による結晶成長形態に与える疾患血液の影響. 臨検 38: 972-973, 1994
  - 8) **Shibata T, Takakuwa Y, Tanaka A et al**: Doping effect of human blood on surface microstructure of cupric chlorid dendrites grown from aqueous solutions. J Crystal Growth 167: 716-718, 1996
  - 9) **芝田高志**: 血液結晶化法による老人性疾患の診断に関する研究. 長寿科学総研 8: 178-181, 1995
  - 10) **Shibata T, Kogure M, Takakuwa Y et al**: Crystal structures of blue and green hydrated cupric chloride grown from aqueous solutions with and without human blood addition: single crystal X-ray diffraction analysis and differential scanning calorimetry (DSC). 東女医大誌 68(6・7): 358-369, 1998
  - 11) **芝田高志, 高桑雄一, 田中朱美ほか**: 血液結晶化法による老人性疾患の診断に関する研究. 長寿科学総研 8: 182-188, 1995
  - 12) **近藤俊之**: SRL 臨床検査ハンドブック. SRL, 東京 (1996)