

平成6年度～平成8年度文部省科学研究費補助
(試験研究B(2) 現 基盤研究A(2))
研究成果報告書

血液結晶化法による病気診断システムの開発研究

(課題番号 06559014)



平成10年3月

研究代表者 芝田 高志
(東京女子医科大学医学部解剖学教室)

平成6年度～平成8年度文部省科学研究費補助
(試験研究B(2) 現 基盤研究A(2))
研究成果報告書

血液結晶化法による病気診断システムの開発研究
(課題番号 06559014)

平成10年3月

研究代表者 芝田 高志
(東京女子医科大学医学部解剖学教室)

研究組織

研究代表者 : 芝田 高志 (東京女子医科大学 医学部 解剖学教室)
研究分担者 : 小川 智哉 (学習院大学 理学部 物理学科)
研究分担者 : 田中 朱美 (東京女子医科大学 医学部 精神医学教室)
研究分担者 : 井口登美子 (東京女子医科大学 付属女性生涯健康センター)
研究分担者 : 小暮美津子 (東京女子医科大学 医学部 眼科学教室)

研究費

平成6年度	14,500 千円
平成7年度	1,500 千円
平成8年度	1,400 千円
合計	17,400 千円

研究発表

(1) 掲載論文

芝田高志, 小暮美津子, 井口登美子, 田中朱美, 小川智哉, 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, 東京女子医科大学雑誌 68 (6,7) (1998). 印刷中.

Takashi SHIBATA, Yuich TAKAKUWA, Akemi TANAKA, Mitsuko KOGURE, Tomiko IGUCHI, Hiroshi OBATA, Kei FURIYA, Ryukoh SHIRASAKA and Tomoya OGAWA, 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), J. Tokyo Wom Med Coll 68 (6-7) (1998). in press.

芝田高志, 小暮美津子, 井口登美子, 田中朱美, 松本寿美子, 永野貞子, 小川智哉, 3×4個のシャーレを恒温恒湿槽に保持し、随意に指定のシャーレ内を撮影し収録するシステムー血液を微量に添加した水溶液から成長する水和塩化銅結晶の成長形態を指標とした病気診断ー, 医科器械学 (1998). 投稿中.

T. Shibata, Y. Takakuwa, A. Tanaka, I. Tomiko, M. Kogure and T. Ogawa, Doping effect of human blood on surface of cupric chloride dendrites grown from aqueous solutions. *J. Crystal Growth* 167 (1996) 716-718.

T. Shibata, R. Shirasaka, T. Ogawa, Y. Takakuwa, K. Furiya, A. Tanaka, M. Kogure and H. Obata, Effect of human blood addition on dendritic growth of cupric chloride crystals in aqueous solutions. *J. Crystal Growth* 142 (1994) 147-155.

(2) □頭発表

T. Shibata, Crystallographic configurations of hydrated cupric chloride crystals grown from aqueous solutions with a small amount of diabetic blood added. International Meeting of Crystallization of cupric chloride under additives; Theoretical aspects, medical and agricultural food applications, Paris, June 22, 1998 (仏政府主催 招待□演 20min 予定) .

T. Shibata, Physical mechanism of crystal growth under impurities and crystal structure of hydrated cupric chloride. International Meeting of Crystallization of cupric chloride under additives; Theoretical aspects, medical and agricultural food applications, Paris , June 22, 1998 (仏政府主催 招待□演 90min 予定) .

T. Shibata, Y. Takakuwa, A. Tanaka, M. Kogure, H. Obata, R. Shirasaka, K. Furiya and T. Ogawa, Effect of Human Blood on Structural Changes of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dendrites?, The 11th International Conference on Crystal Growth (ICCGXI), The Hague, The Netherlands, June.18-23, 1995.

T. Shibata, Y. Takakuwa, A. Tanaka, M. Kogure, H. Obata, R. Shirasaka, K. Furiya and T. Ogawa, The Effect of Blood on Structural Changes of $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dendrites (Invited Talk), The 4th Eurasia Conference on Chemical Sciences (IV EuAsC2S), Kuala Lumpur, Malaysia, Dec.17-21, 1994.

目 次

はしがき	1
Abstract	2
緒 言	4
緒言の参考文献	6
第1章 結晶化病気診断システムの設計・試作	11
第1章の緒言	13
1.1 方法	14
1.1.1 結晶成長の制御・解析システム	14
1) 結晶成長系	
2) 観察・計測系と多関節6軸ロボット	
3) 動画記録系	
4) 画像入出力系	
5) 結晶像解析系	
1.1.2 結晶の析出	20
1.1.3 血液の分析と統計処理	20
1.2 結果	20
1.2.1 システムの製作	20
1) 結晶成長系	
2) 観察・計測系と多関節6軸ロボット	
3) 動画記録系と画像入出力系	
4) 結晶像解析系	
1.2.2 結晶の成長	24

1.3. 考察	25
1.4. 結論	27
第1章の参考文献	28
第2章 結晶化と結晶構造解析	29
第2章の緒言	31
2.1 Introduction	36
2.2 Method	37
2.2.1 Preparation of blue and green crystals	37
2.2.2 Single crystal X-ray diffraction analysis	37
1) Data collection	
2) Structure solution and its refinement	
2.2.3 Differential scanning calorimetry (DSC)	43
2.3 Results	43
2.3.1 Crystal Growth	43
2.3.2 Crystal Structures	44
2.3.3 Thermal behavior	44
2.4 Discussion	45
2.4.1 Crystal Growth	45
2.4.2 Crystal Structures	54
2.4.3 Thermal Behavior	54
2.4.4 Effects of blood on crystalline structures	55
2.5 Conclusions	56
References of chapter 2	58

第3章 結晶化と巨視的結晶形態解析	61
第3章の緒言	63
3.1 対象	64
3.2 方法	64
3.2.1 結晶成長装置の開発	64
3.2.2 結晶成長	64
3.2.3 血液の分析	65
3.2.4 統計処理	65
3.3 結果	65
3.3.1 健常者と糖尿病患者に共通した結晶成長	65
3.3.2 健常者に固有な結晶像	69
3.3.3 糖尿病患者に固有な結晶像	70
3.3.4 血液の分析結果と統計的解析	70
3.4 考察	76
3.5 結論	79
第3章の参考文献	80
 第4章 総合結論	 81
 謝 辞	 85

はしがき

宇宙の物質は3態すなわち、気体・液体・固体に分類される。そのうちの固体は結晶質と非晶質（アモルファス）に大別される。我々の周辺を見回すと、至るところに結晶が見られ、また生活にも非常に密接した役割を果たしている。例えば電子素子のLSI、ICやトランジスターは半導体の単結晶から構成され、腕時計の軸受にルビーが、時を刻むのは水晶振動子、電子ライターの点火素子は結晶の piezo 効果を利用したものであり、工業製品の中には必ずと言ってよいほど見つけられる。女性を魅きつける宝石の類も結晶であるが、装飾用のものよりもはるかに多量のダイヤモンドが研磨材として用いられている。これらの工業技術の基盤を支えてきた結晶育成は先達により活発に行われてきたので、基本的な結晶成長理論はある程度確立しつつあると言えよう。

しかし、生体中での結晶成長現象に関する本格的な研究はまだ始まって歴史が浅い。例えば、大腿骨内部の海綿構造は最小限の素材で負荷方向に最大強度が発揮される構造になっている。耳石は重力を感知するための結晶で聴覚器に組み込まれている。このように骨などの硬組織は生体内では合目的な結晶成長を遂げる。この骨の溶解は骨粗鬆症と呼ばれ、Ca以外に女性ホルモンやビタミンDの減少で起るとされている。一方、歯石や結石などの結晶が体内で発生すると病気として感知されるが、これらも生体内の結晶成長である。我々はこのようなバイオクリスタリゼーション（またはバイオミネラリゼーション）が対象とするであろう分野を一般の結晶成長の範疇に属する *in vitro* で生体成分が共存する結晶成長を解明する研究として行ってきた。この研究分野はバイオクリスタリゼーションの研究が発展するための基盤となる。本報告はこの成果に基づいている。

終わりに1998年6月ヨーロッパで同様な研究をしている学者と私が中心となり、仏政府およびモンペリエ大学医学部の支援を得てパリで第1回国際会議を開催する運びとなった。ここで、私は2時間程、招待口演をする予定である。このような成果を得ることができたのも、この科学研究費による所が多であったことを明記し感謝する。

1998年3月28日

東京女子医科大学 芝田高志

Abstract

An attempt was made to design and manufacture a system that enables 3×4 array of Petri dishes to be optically monitored and weight changes and pH distributions to be measured while maintaining them at constant temperature and humidity. Observations and measurements of one to twelve Petri dishes with any expanded scale and at any time intervals can be made continuously or intermittently with a 35 mm camera and/or video camera. Transporting the dishes and moving the measurement equipment, taking photographs, and making measurements are fully computer controlled, in addition to environmental parameters such as temperature, humidity, and air flow rate.

We have tried using this system to make diagnoses based on morphological changes in the shapes of crystals grown in dihydrated cupric chloride aqueous solutions to which a slight amount of lysed human blood, which contains a great deal of information of living body, has been added. Statistically significant differences between dendrites grown in the presence of a slight amount of lysed blood from 6 diabetic patients and 6 healthy persons as control groups were observed. 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 HbA1, HbA1c, 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.

Green crystals grown from pure dihydrated cupric chloride solution were easily transformed to blue because of their instability, while green crystals grown with blood had rather long life-times because of their stability, thereby maintaining the green color. Crystal structures of the four specimens, i.e., blue and green crystals grown from pure dihydrated cupric chloride aqueous solutions and from solutions to which a small amount of human blood had been added, were determined by single crystal X-ray diffraction analysis and their thermal behaviors were determined by differential scanning calorimetry (DSC). Differences among averaged crystalline structures determined by the X-ray diffraction method have not been recognized, however, while enormous differences have been demonstrated by DSC. The X-ray analysis and DSC results suggest that residual water with excess dihydration* results in disorder in the crystals. It is speculated that there are some structural differences between green crystals grown with and without blood. The above findings indicate that blood has an enormous effect on the growth of hydrated cupric chloride crystals.

* Note: In the case of 2.5 hydration residual water means 0.5. Blue stable dihydrated cupric chloride has 2 water molecules.

緒 言

動脈と静脈により体内循環している血液は非常に多くの生体情報を含んでいる。すなわち消化・吸収された栄養分（ビタミン、ミネラル、糖分、脂質、蛋白質など）、代謝生成物と老廃物、酸素や二酸化炭素、抗原と免疫機構によるその抗体、内分泌系によるホルモン、リンパ系からのリンパ液、病態によって分泌される特定微量成分などである。少し下品な例えであるが、いわば上下水道の役割を同時にしており様々な成分が含まれる。従って、臨床診断ではこの情報の宝庫、血液は必ずと言ってよい程、検査の対象となる。必然的に分析項目は多岐に亙り、特殊な項目を除き自動分析装置によるルーチンの分析も行われている。いずれの検査法においても血球の形態観察を除き、すべて生体関連化学物質の定性・定量分析である。

一方、結晶学の分野では、古くから結晶が成長する雰囲気、結晶の晶癖や晶相が異なることが知られている¹⁾。例えば、雪の結晶が様々な形態をとるのは、温度と過飽和度によると報告されている²⁾。また、Pbを添加してKClの結晶を成長させると、その濃度に依存して現れる形態および表面の形状が変化する³⁾。このように析出する結晶が溶質から受ける影響、換言すると、溶液の特徴を抽出する能力を医学に応用しようと云うのが、本研究の目的である。例えば、子宮から分泌される頸管粘液を乾燥させると、その中に含まれる塩がエストロゲン濃度上昇に伴い樹枝状の結晶として成長し、逆にプロゲステロンによって結晶成長が阻害される。この現象は排卵周期の予測や妊娠の診断に用いられたことがある⁴⁾。この敏感な晶癖の性質を利用した研究に以下のものがある。すなわち、微量の血液を塩化銅の水溶液に添加し、水和塩化銅の結晶を成長させると、図 1 に示すように疾病の種類に応じて結晶の成長形態が異なるとの報告があった⁵⁾。Selawryらは心臓の僧帽弁奇形では八角形、子宮筋腫では凸レンズを二分した形、糖尿病では凸レンズ、肺結核では五角形の中に十字形、癌ではデンドライトの成長方向に垂直に交叉した形等々が観察されたと報告している⁵⁾。彼らは数万例という膨大な研究データに基づき、疾病の種類に応じて結晶の成長形態が異なると云う結論を導いた。筆者らはこの結論の追認から実験を始めた。

豊富な生体情報を有している血液には、必ず未だ発見されていない重要な因子が含まれているに違いない。この新しい情報を引き出すことに成功すれば、

人類の福祉に貢献することになろう。微量の血液を添加した無機塩の水溶液から、塩の結晶を成長させると疾病の種類に関係して結晶の成長形態が異なるというこの機構を解明し、結晶成長を指標に生体情報を抽出する新しい方法論を開拓したいと幾つかの研究を行ってきた^{6~9)}。すなわち、結晶の形態変化を指標として（生体）情報を抽出する学問を発展させることによる新しい方法論の開拓である。

図 2 に本研究の概要を示した。この研究に必要なシステムの設計と製作を行い（第1章）、次いで、塩化銅二水和物の水溶液からの結晶化の条件を決定し、血液を添加した水和塩化銅が成長環境により晶癖のみを変えるのか、あるいは結晶構造の変化（分子構造の変化）を伴う変化をするのかを単結晶X線構造解析（XRD）、示差走査熱分析（DSC）、X線光電子分光（XPS）などにより明らかにする研究を行った（第2章）。第3章で、糖尿病との関連に着目し結晶成長を試みた。巨視的視点から解析し糖尿病患者と健常者群との間で異なった結晶成長像をとらえることができた。この際、約90項目の血液の成分を定量分析し、これとの相関を明らかにした。第4章で総合的な結論を述べた。

緒言の参考文献

- 1) 砂川一郎：多面体結晶のモルフォロジー。『結晶成長ハンドブック』（日本結晶成長学会編, pp.1152）, p.210-215, 共立出版, 東京（1995）
- 2) U. Nakaya: Snow Crystals, Natural and Artificial, Harvard Univ. Press, Cambridge (1954) pp.510.
- 3) M. Bienfait, R. Boistelle and R. Kern: in Adsorption et Croissance Cristalline, C. N. R. S. (1965) 515, 577.
- 4) 柚木祥三郎, 新撰産科学 改訂第2版, p.19-21, 金原出版, 東京（1957）
- 5) Selawry A und Selawry O: Die Kupferchlorid-Krystallisation in Naturwissenschaft und Medizin. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1957)
- 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。臨床検査38: 972-973, 1994
- 8) 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。長寿科学総合研究 8: 178-181, 1995
- 9) 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

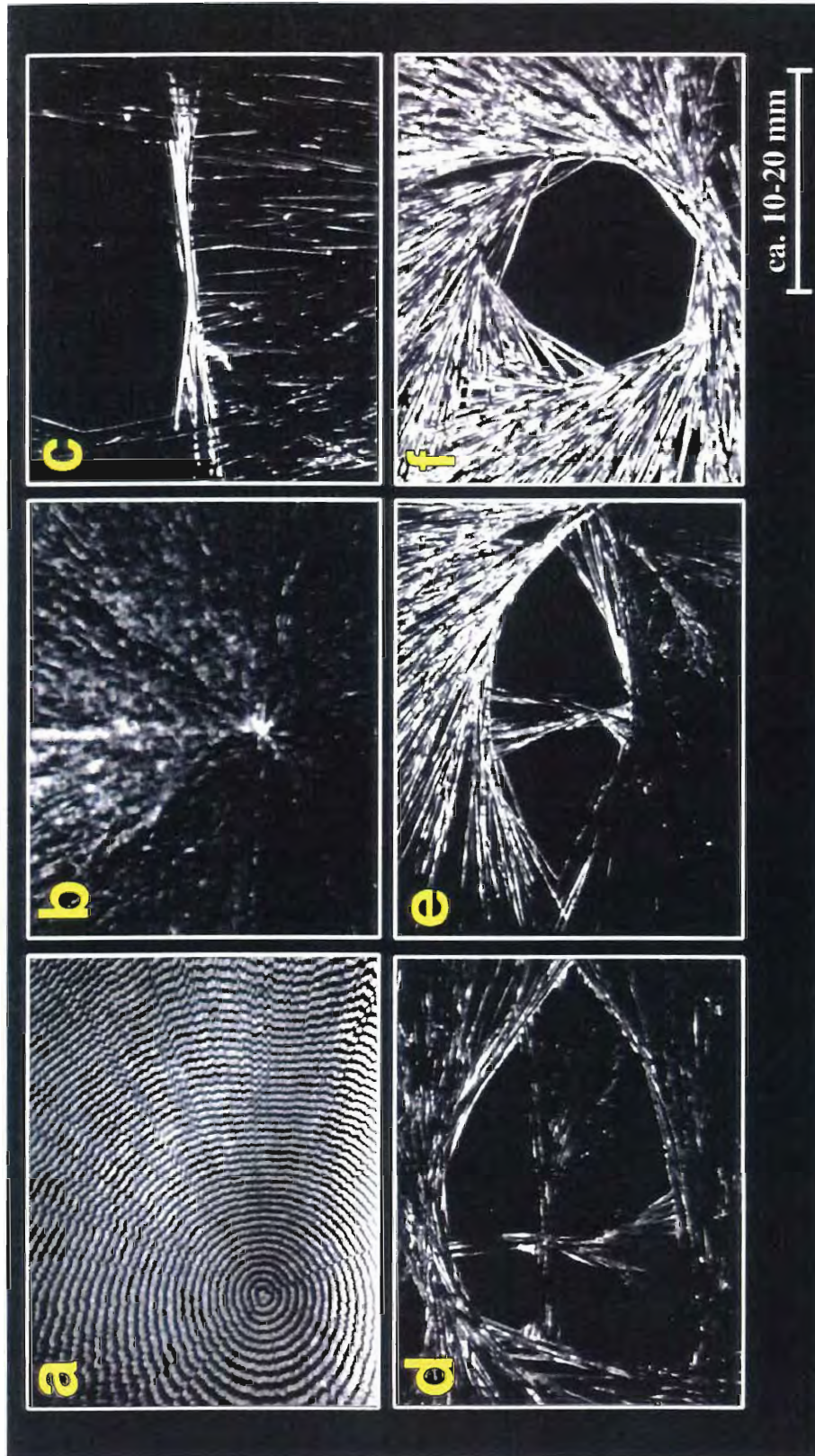


図 1 塩化銅二水和物水溶液に微量の血液等を添加して成長させた水和塩化銅の結晶像 (A. und O. Selawry)⁵⁾

a: エフェドリン, b: 健常者, c: 胃癌, d: 肺結核, e: 子宮筋腫, f: 心臓僧帽弁奇形

システムの設計・製作

結晶成長系



計測・観察機器



- 全て製作
- 市販のものをベースに改造・開発したもの
- * 市販の組合せ

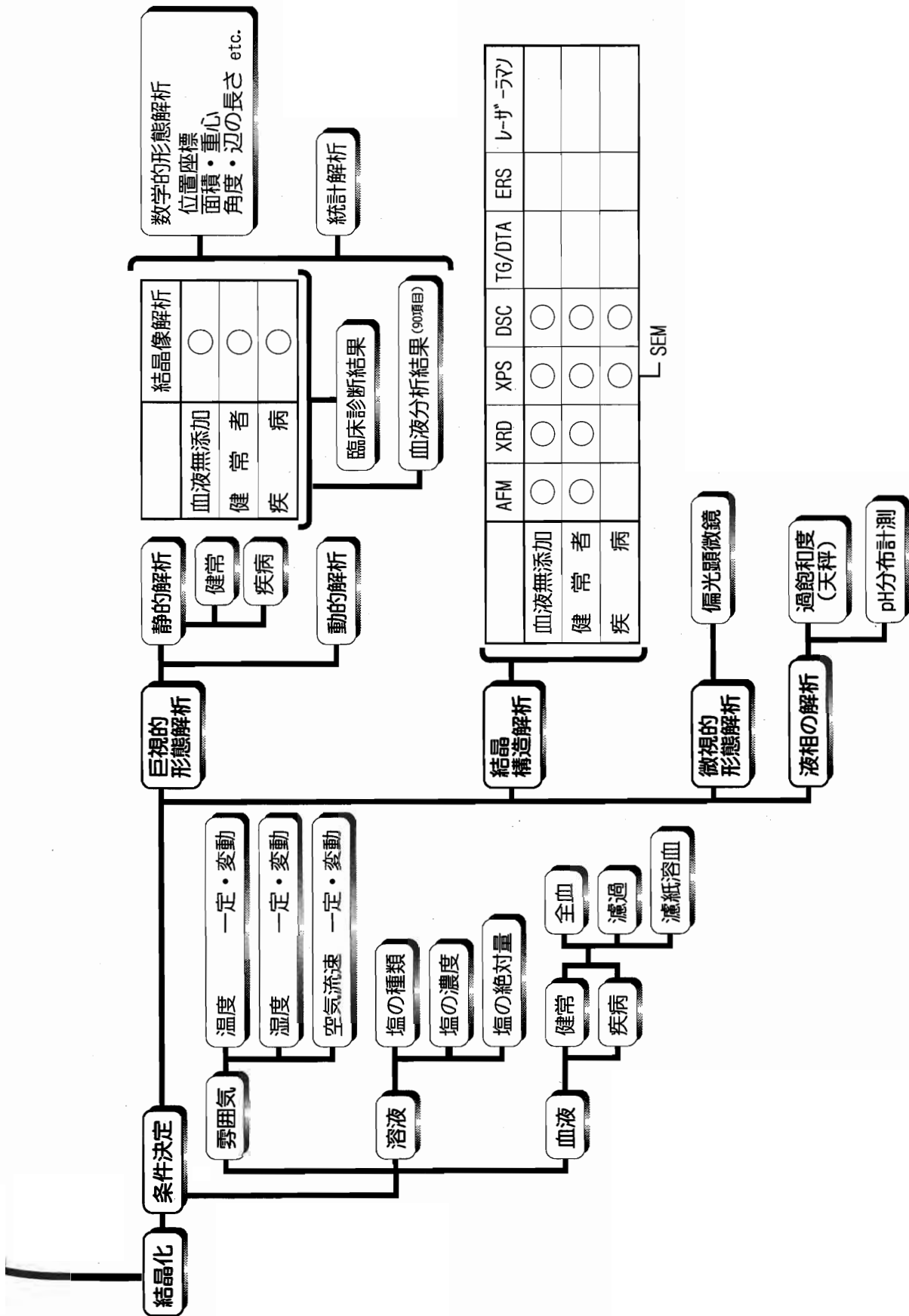


図 2 本研究の概念図

第 1 章

第1章 結晶化病気診断システムの設計・試作¹⁻¹⁾

第1章の緒言

結晶は成長環境の影響を敏感に受けやすい。従って厳密な制御環境下で研究をすることが必要不可欠である。埋め込み式の床ヒーターを設置した数m³の小部屋に湿度調節のために水をはった容器を置き、水平なガラスの上に設置した10個程度のシャーレで結晶化を行う設備がPfeiffer¹⁻²⁾、Selawryら¹⁻³⁾、Knijpena, Ballivet, Amonsら¹⁻⁴⁾によって用いられた(図1.1a)。この装置は我々の研究の原点と言うべき要素を備えてはいるが人力に頼るところが多く、このため応答性が悪くなり実験を行うには不便であった。その後Nickel¹⁻⁵⁾はモーターで空気を循環する装置を考案した。Selawryらの装置を仮に第一世代の結晶化装置と呼ぶことにすれば、これ以降の装置は第二世代と呼べよう。Barthらは電気制御の空調器を備えた成長装置を製作した¹⁻⁶⁾。結晶成長槽内の空気を均一にするために、壁沿いに天井から吹込む空気を下方に導き、床付近のダクトから回収する。振動の影響をなくすためにコンクリートのブロックが設置されている(図 1.1b)。Barthらはこの装置により癌患者の血液を用いた研究を¹⁻⁷⁾、Cocudeらは珪肺の研究を報告している¹⁻⁶⁾。Pivaらは図 1.1cに示す装置により、7種類の臓器別の患者の血液を用い、複数の血清が特異な結晶成長に関与していることを報告した¹⁻⁸⁾。電話ボックスのような形状の結晶成長槽の内部は、幾つかの孔の開けられたガラス板の下方から上方に向かって空気が流れ、その上に溶液の入ったシャーレを設置する構造である。第一世代のものは人が中で作業できるような高さがあり、BarthやPivaらのも均一な空気流を得るために槽の背が高く、空調機からの振動を防ぐために槽が独立構造になっているのが特徴である。

時を同じく筆者らは温度と湿度をPID制御し、空調機と防振台の上の反応槽を独立させ、槽内に光源を設置し、上面に研磨した大きなパイレックスガラスを備えた背の低い装置を製作した^{1-9, 1-10)}(図 1.1d)。この装置の特徴は、結晶成長の過程を観察・写真記録できることにある。また、槽内気流は強制循環させながらもシャーレ近傍の空気の流れを出来るだけなくす工夫をした。しか

し、熱対流による空気流を防止することは不可能で、これによる結晶成長条件の変動という点が未解決のままになっている。

そこで、それらの問題を解決する恒温槽を作り、発生したデンドライトの観察を客観的にするため、コンピュータによる形状抽出と、これから得られたデータを統計処理する方法を検討した。まず、臨床診断結果と血液の成分の定量分析結果（テキストデータ）をコンピュータに入力する。次にその血液を用いて結晶化を行い、発生したデンドライトの形態を画像データとして入力し、コンピュータにより特徴を抽出する。これら3者の相関を解析し、データベース化を行う。これにより、デンドライトの成長機構を解析する。最終目的はここで得られたデータベースに基づき、疾病の診断を行うシステムの開発研究を試みることである。まず、結晶成長の経時変化の観察をするため、槽の中で結晶成長に好ましい均一なエアカーテンを作る工夫をし、安定した結晶成長を実現した。また、多関節6軸ロボットを用いた観察と記録と計測および画像処理をすべてコンピュータで行い制御するハード・ソフトウェアを構築した。

1.1 方法

1.1.1 結晶成長の制御・解析システム

システム全体の概要を図 1.2 に示す。このシステムは、1) 結晶を指定した状態で成長させる結晶成長系とそれを制御し成長環境を記録するコンピュータ、2) 結晶成長時の様子を撮影する観察・計測系とそれらを移動させる多関節6軸ロボットおよびロボット制御用コンピュータ、3) 成長を動画で記録する動画記録系、4) 画像入出力処理用コンピュータ、5) 収集した結晶の成長形態を解析しデータベースとして収録する結晶成長形態解析用コンピュータから構成される。ここで言うコンピュータとはパーソナルコンピュータ（以下PC）を示す。

1) 結晶成長系

結晶成長系は、12個の結晶成長容器^{11)~14)}を入れた結晶成長槽、温度・湿度・循環する空気の流速を調整する空調装置（ヘパフィルター内蔵）、これらを制御する2台の温・湿度調節器（Tokai, K-1500EE）と循環用ファ

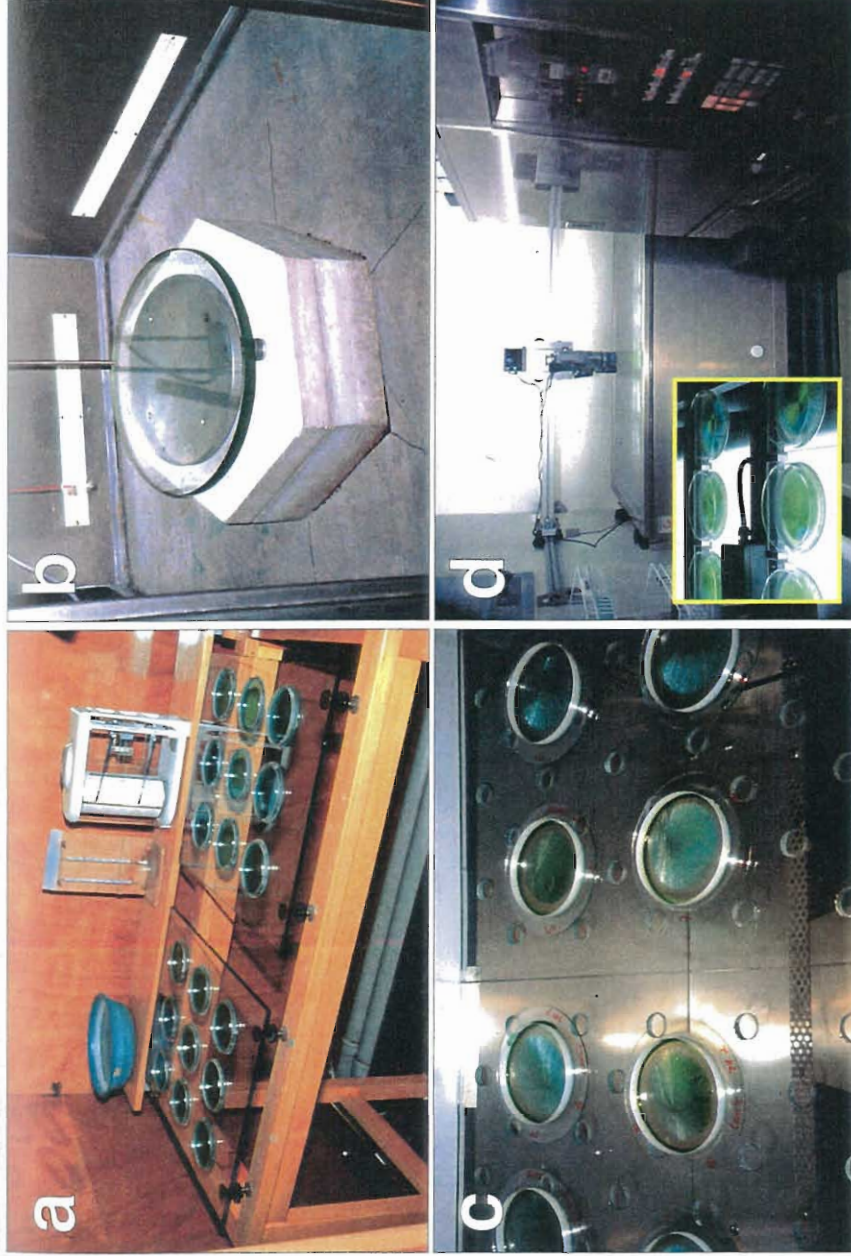


図 1.1 今までに製作された結晶成長装置

a: Pfeiffer (独), Selawry (独), Knijpenga (スイス), Ballivet (仏), Amonse (蘭) : 床ヒーターの中に水平なガラス板を設置し、その上にシャーレを置く。湿度に関しては水をはった桶を置くか、加湿器を用いる。時定数の大きい装置であるため、安定しているもの、なりゆき任せの要素があり、温度・湿度を変化させるには半日仕事となる。写真はKnijpenga (スイス) の装置。
 b: Barth (仏) : 電気制御の空調器を備え、結晶成長槽内の空気を均一にするために、六角形の部屋の壁沿いに天井から吹込む空気を下方に導き、床付近のダクトから回収する。振動の影響をなくするためにコンクリートのブロックが設置されている。
 c: Piva (仏) : 電話ボックスのような形状の結晶成長槽の内部は、幾つかの孔の開けられたガラス板の下方から上方に向かって空気が流れ、その上に溶液の入ったシャーレを設置する構造である。空調機は独立している。
 d: 芝田 (日本) : 中央 ; 上面から観察できる恒温湿槽とビデオカメラ。防振台の上に設置。ガラス厚 10mmの光学研磨パイレックスガラスを通して、内部の経時変化を観察することができる特徴がある。5×5個の光学研磨石英シャーレ (直径100mm) を設置できる。蛍光灯による透過照明が可能。右側 ; PID制御恒温湿空調機器および電気制御系。(1991年筆者ら作製、1992年改造)

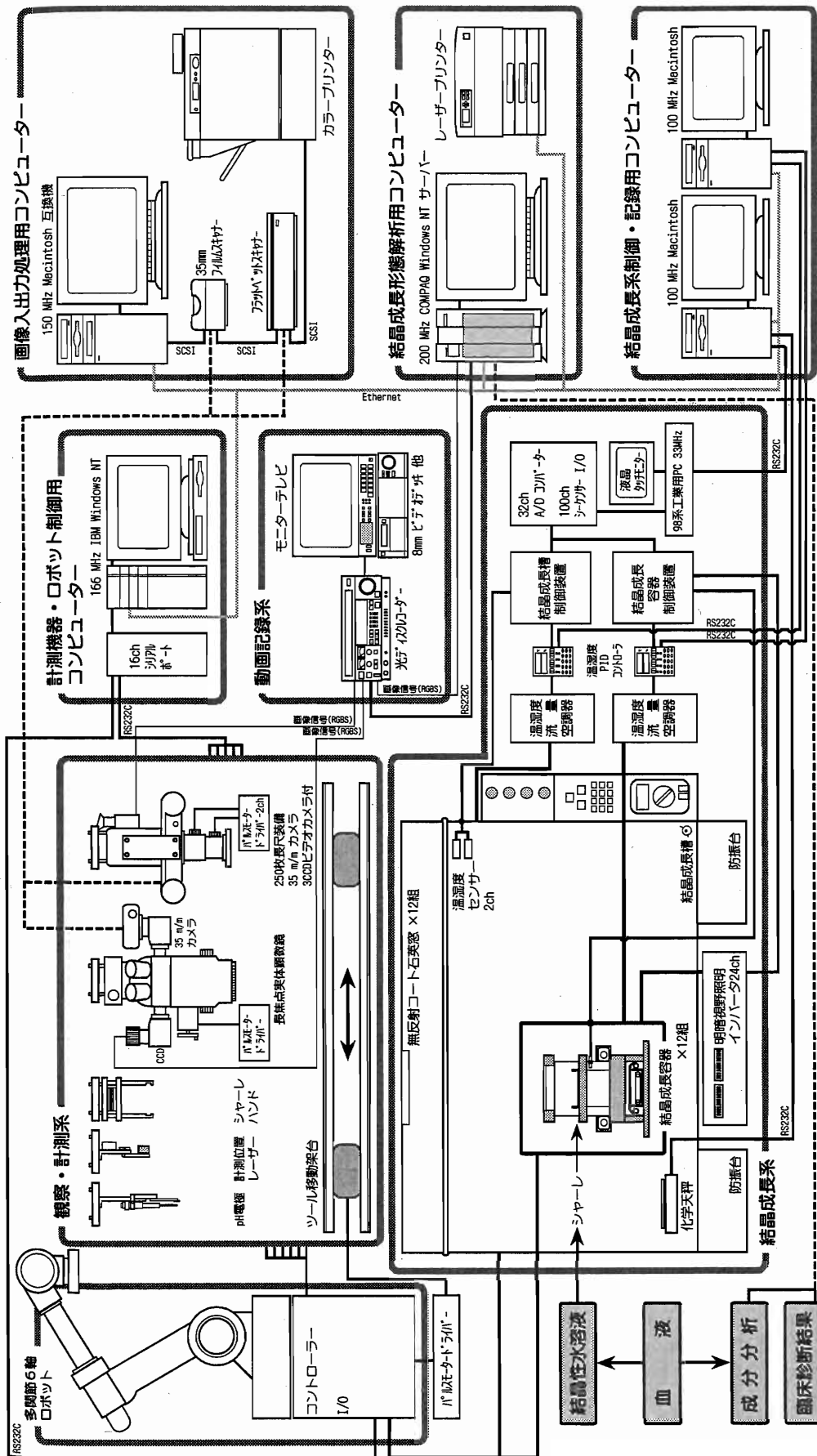


図 1.2 本研究により設計・製作したシステムの概要図

- 1) 結晶を指定した状態で成長させる結晶成長系とそれを制御し成長環境を記録するコンピュータ、2) 結晶成長時の様子を撮影する観察・計測系とそれらを移動させる多関節6軸ロボットおよびロボット制御用コンピュータ、3) 成長を動画で記録する動画記録系、4) 画像入出力処理用コンピュータ、5) 収集した結晶の成長形態を解析しデータベースとして記録する結晶成長形態解析用コンピュータおよび各々のソフトウェアから構成される。患者の診断結果と血液の成分分析結果、その血液による結晶像の相関を解析し、逆に結晶像から病気の診断への応用を可能とさせる研究用の試験装置。

ンのインバーターなど電気系制御装置一式からなる。このシステムはマニュアル動作の他に、オンライン動作として、動作状態等をモニターし、スイッチ類を一括処理できるようにしたA/Dコンバータとシーケンサーを介したPC (Contec, Panel-PC(98) 33MHz, FA-PAC) の2系統から構成した。温・湿度調節器とそのPCは2台のPC (Power Machintosh 8100 AV/100MHz) と通信することにより、電源のタイマー動作および温度・湿度・流速をそれぞれ独立かつ任意の関数でプログラム運転ができ、運転状態が記録できるように設計した。

結晶成長容器は耐薬品性に優れ、シャーレの水平がとれ、かつ周囲に均一なエアカーテンが形成されるように工夫し、明視野透過照明および暗視野間接照明ができるようにした¹²⁻¹³⁾。蛍光灯のフリッカーをなくすために、数万Hzのインバーターを作り、照射強度の16段階変更ができるようにした。槽内部には結晶成長容器を上下するジャッキを内蔵した。結晶成長容器は、槽外での使用もできるように内外でのコネクタの接続を可能とした。例えば、光や磁場照射下での使用ができる。また、溶液の重量減少を計測するための化学天秤を結晶成長容器に組み込み、PCを介して測定した。

2) 観察・計測系と多関節6軸ロボット

溶液から結晶が成長する過程および析出完了後の状態を観察し計測するため、ビデオカメラ付き35 mmカメラ (Penta Cam VSC3000, Nikon F4 長尺仕様)、35 mmカメラ (Contax 167MT) と CCDカメラ (Nikon / Hitachi CCD Color) を備えた手術用実体顕微鏡 (Carl Zeiss)、pHを測定するための細かいガラス電極 (Mettler Delta 350) とそれを溶液に挿入するための液面検出センサー (Omron E3X-A11)、シャーレを結晶成長容器に装着するためのハンド、槽や結晶成長容器の位置を確認しロボットの位置座標を補正するためのレーザー距離計 (Keyence LB-62)、図には示さなかったが8 mmビデオカメラ (Sony 3CCD Pro) や35 mm一眼レフカメラ (Minolta α 7xi) など、それぞれにロボットの先端アームとチャッキングするためのハンドを付けた。それら計測機器はツール移動機構により必要に応じてロボットの装脱着位置まで移動できるようにした。オートチェンジ機構により、それらの観察・計測器のうちの1つが多関節6軸ロボットで反応槽の上空もしくは内部を3次元的に移動できるようにした。なお、ビデオカメラ付き35 mmカメラ

にはマクロレンズ (Nikon AF Zoom Micro Nikkor ED70-180 mm) を付け、そのズームとフォーカスおよび実体顕微鏡の上下微動はパルスモータ駆動とした。

多関節6軸ロボット本体には市販のものを用い (NACHI ROBOT SC15 AR, (株) 不二越)、腕の先端のハンド等の製作および必要なI/Oの接続を行った。ティーチペンダントによる移動動作の教示ではなく、コントローラをPC (IBM Aptiva 166MHz 64MRAM, HD 2.8G, Microsoft Windows NT Ver. 4.0) と双方向通信し、PCからの指示により指定位置に移動できるよう指令の中心をPCにおいた。なぜなら、ロボットのコントローラでは通信機能をもった計測機器と連動させることができないためである。

結晶成長系制御・記録用PC (Power Machintosh 8100LC/100MHz) には市販の計測制御ソフトであるLabVIEW Full Development System Version 3.1.1J (National Instruments) をカスタマイズして用いた。計測機器・ロボット制御用PCは、計測機器とロボット制御の他、蓋の開閉などの機械的操作系などシステムのかなりの部分を制御するためにソフトウェアはVisual C++ Development System 5.0 と Visual Basic 5.0 (Microsoft) で制作し、プログラムは5万行を越えた。これは前もって任意の設定を行い制御状態と観察結果が出力される構造になっている。

3) 動画記録系

結晶の成長を記録する装置として、8 mm ビデオデッキと光ディスクレコーダー (Sony LVR3000) を使用し、動画の撮影はPC (IBM Aptiva) から任意設定でのコマ撮りを行い解析用PCに送った。

4) 画像入出力系

35 mm フィルムは現像後、フィルムスキャナー (Polascan 35) もしくはフラットベットスキャナ (Nikon Scantouch) により画像入出力処理用PC (Machintosh 互換機 150MHz, 278M RAM, HD 4G) に入力し、解析用PCに送った。

5) 結晶像解析系

成長した結晶像は制作メーカーにカスタマイズを依頼した市販の医学系画像解析ソフトウェア (Ratoc 社制) により、PC (Compac Proliant 2500,

Pentium Pro 200MHz, HD 17.2G, Microsoft Windows NT Server 4.0) 上で解析を試みた。指定した位置座標等がSILKファイル形式で出力される構造にした。

1.1.2 結晶の析出

多くの疾病の中から糖尿病に着目し、結晶化を試みた。合併症がない患者6名（女性5名、男性1名、平均年齢 55.2 ± 5.1 歳）および健常者6名（女性5名、男性1名、平均年齢 41.2 ± 4.2 歳）の肘静脈から早朝空腹時に採血した。

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 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ）の水溶液に、純水で溶血させた血液を添加し、塩化銅二水和物と血液の最終濃度が、それぞれ約 15.0 wt%と0.5 vol%になるように調整した。この溶液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100 mmのシャーレ12個に各8mlずつ分注し、温度28℃、湿度45%RH下で水分を蒸発させ結晶を析出・成長させた。

1.1.3 血液の分析と統計処理

健常者群と患者群に於いて出現した特異な結晶成長形態の有意性を見いだすために、90項目に及ぶ血液成分分析を行い、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。

1.2 結果

1.2.1 システムの製作

図 1.3 に示す装置を設計・製作した。

1) 結晶成長系

湿度および空気の流量の応答性は良かったが、温度の追従性は悪かった。静止圧力が大きい結晶成長容器内空気の循環にはターボファンを用い、槽内空気の循環にはシロッコファンを使用した。高圧になると加熱式加湿器

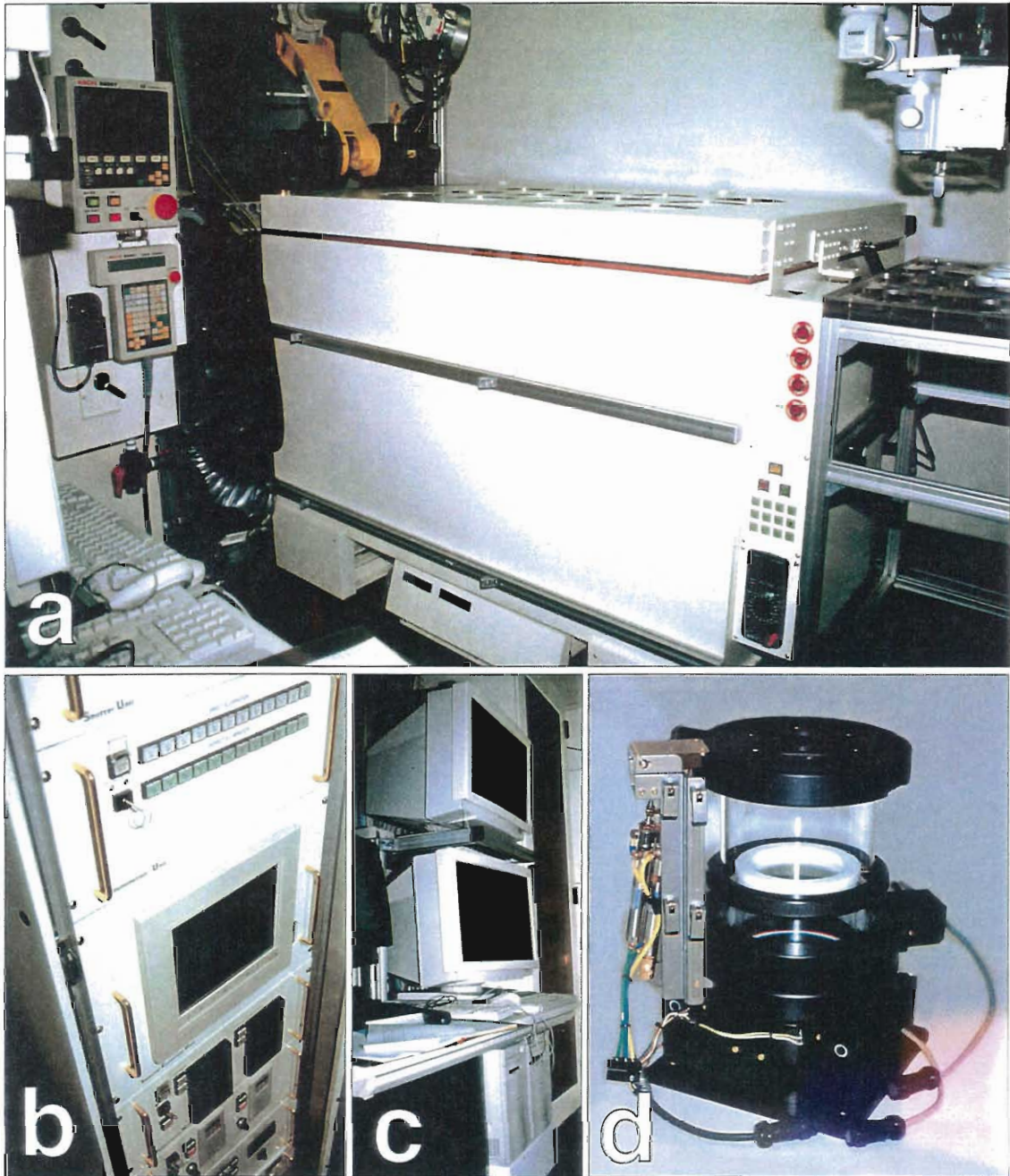


図 1.3 本研究により設計・製作したシステム

- a: 結晶成長槽（中央）、多関節6軸ロボットと空調機の一部（左）、観察・制御装置（右）
- b: 結晶成長系の電気制御装置の一部。中央がパネルPC。
- c: 結晶成長系を制御し成長環境を記録するPC（右）とロボット制御用PC（左）。
- d: 結晶成長容器。以前に製作したものの一部改良。

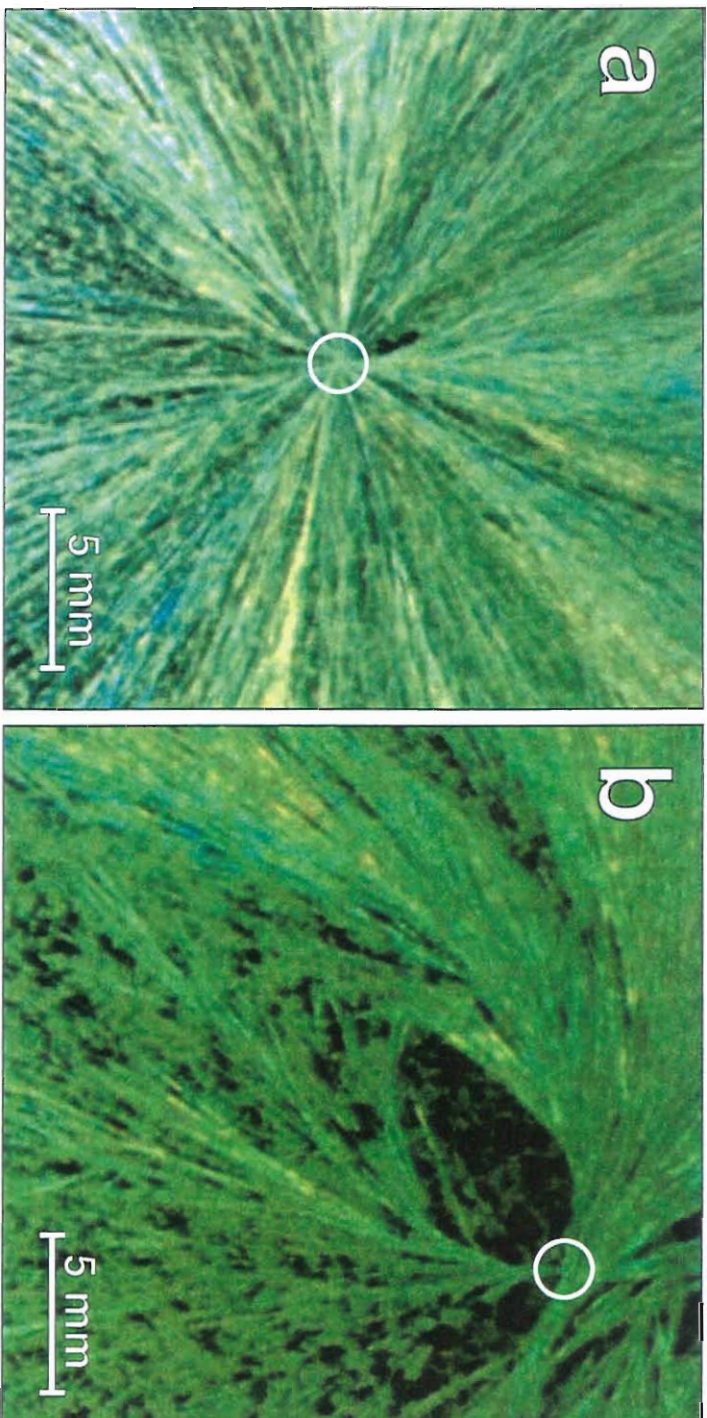


図 1.4 血液を添加し成長させた水和塩化銅の結晶像

- a:** 健康者。成長中心核（O印）から放射状にチソドライトが成長しつつある。
- b:** 糖尿病患者。チソドライトの成長中心核（O印）近傍に2つの弧状のチソドライトの重ね合せによる凸リンズ状の形態が観察される。凸リンズ状の形態の長軸が8mm以上20mm未満の発生個数は12個のシャーシ当たり患者群（6名）では14.2±1.4、健康者群（6名）では2.5±0.63、20mm以上は前者で6.50±0.67、後者で0.33±0.13であり統計的に有意差が示された。

のパンの水が吹き出ることがあったがバイパス回路により改善された。空気の流れは各々12個の結晶成長容器内でほぼ均一とみなせた。化学天秤から得られる重量変化は順調にパソコンに取込むことができた。槽および結晶成長容器の蓋の開閉などの機械的操作系はエアシリンダーで問題なく動作した。エアシリンダーの残余空気は槽内の汚染防止のために外部に排気した。

電気制御系とオンラインさせた結晶成長系制御・記録用PCには市販の計測制御ソフトウェアを購入しカスタマイズしたが、動作が確認されているPower Mac用のRS422増設PCIバスボードの入手が不可能であったため、3つのシリアルポートを確保するために2台のMacintoshを用いることになってしまった。1台のPCで運転プログラムの転送を行い、もう1台で運転結果のデータ収集を行わせて情報を分散処理した。温・湿度センサーは各結晶成長容器に1つずつ、槽には2つ設置し、マトリクススイッチおよびPCにて任意に2台の温湿度調節器への入力が行えるようにした。

2) 観察・計測系と多関節6軸ロボット

ハンドに取り付けたそれぞれの観察・計測機器類は滞りなく動作した。位置を検出するレーザー変位計のマーカは光沢のある金属表面（SUS上にAuメッキし透明エポキシ焼付塗装をしたもの）では検出できず、つや消し加工した樹脂に変更した。

ビデオカメラ付き35 mmカメラの撮影倍率を稼ぐために28-200 mmのズームレンズに2枚のマクロレンズを装着して撮影したが、十分な被写界深度が得られなかった。しかし、70-180 mm全域マクロレンズに変えることでかなり鮮明な映像を得た。

ロボット自体には先端R1軸の回転方向を指定するコマンドがなく、単に最短角度の方向に廻る設計であり、場合によっては同一方向にR1軸が回転し続けてしまう。この問題を解決するために絶対座標を持たせ、回転角度と回転方向の両方を指定できるようにPC内に特別のプログラムを作成した。

C言語とVisual Basicで製作したソフトウェアは、ほぼ快適に動作した。

3) 動画記録系と画像入出力系

結晶成長過程を記録する光ディスクレコーダは、640×480画素と荒いため、詳細な解析には35 mmフィルムによる映像（20～48 MB）を用いた。

4) 結晶像解析系

成長した結晶の形態解析のために、市販の医学系画像解析ソフトウェアのカスタマイズを依頼したが、CCDカメラからの640×480画素程度の画像処理を対象として16 bitで開発されたものであるため、32 bit用に変更したものの、実空間で数 cm の移動に数分を要す程、動作が極めて遅い上、元の画像の鮮明さを画面上に表現できず、使用に耐えなかった。

1.2.2 結晶の成長

健常者および糖尿病患者の血液を添加して成長させた水和塩化銅の多結晶体の代表例を図 1.4 a,b に示す。いずれも、シャーレの結晶成長核近傍の一部（成長途中）を拡大撮影した像を示したが、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 1.4 a 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主であった。一方、糖尿病患者の血液を添加した場合は、図 1.4 b に示すように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。この凸レンズ状の形態を示すデンドライトを、長軸の長さで 8 mm 未満 (**S**)、8 mm 以上 20 mm 未満 (**M**)、20 mm 以上 (**L**) の3種類に分類し、同一の血液で同時に結晶成長させた12個のシャーレ中出现した個数の合計を集計した。その結果、**S** の出現頻度は健常者群と糖尿病患者群とでは同程度で、血清蛋白分画、平均赤血球容積、平均赤血球血色素量、血小板数との相関が認められた。一方、**M** の発生個数は 12 個のシャーレ当たり患者群では 14.2 ± 1.4 、健常者群では 2.5 ± 0.63 、**L** は前者で 6.50 ± 0.67 、後者で 0.33 ± 0.13 で、t 検定の結果、健常者群と糖尿病患者群の間で有意差が存在し、相関解析から糖尿病の重症度と比例関係にあることが明らかとなった。この**M**や**L**で示される糖尿病に特異な形態はHbA1、HbA1c、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伴い発生頻度の増加傾向が認められた。

なお、血液無添加の塩化銅水溶液から成長した結晶の場合には、青い結晶のみが析出したが、血液を添加して成長させた系では青と緑色の結晶が混在した。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。

1.3. 考察

我々の設計・製作した装置（図 1.3）では、従来から問題視された熱対流による空気の流れをエアカーテン状にすることで解決し、針状かつ等方的に結晶を成長させることができた。さらに欧州の装置ではシャーレの上に約1~1.5 mの空洞を作り、これで気流の調整を行う方式であるため、その場測定が不可能であった。しかし、図 1.3 d に示す結晶成長容器では、それらの距離を約1/5に縮めることに成功し、これによって図 1.3 a のように外部からの撮影が可能となった。

結晶を均一な照度と発熱量の少ない光源で照明するために蛍光灯を用い、空調系には高出力の冷凍機を使用した。容器の熱容量が大きく蓄熱により応答性が低下するため、発熱量のより少ない光源に変えるか、外部に光源を設置し、光ファイバーによる光の導入などを検討している。

多関節6軸ロボットにはシリアルポート（双方向通信機能）付の量産品を用いたが、出荷時のハードウェアの不備の他、ロボット内部の制御ソフトウェアのバグによりPCを介すると異常動作を起し、製造メーカーは原因究明と改修に長期間を要した。なお、ロボットはコントローラを中心に動作させる方式になっており、I/Oポートのリレーによる単純なスイッチの On/Off 制御は可能であるが、ラボラトリーオートメーションとして、シリアルポートをもった機器との連携動作ができないため複雑な構造となった。さらに、ロボットのコントローラのCPU（またはロボット言語のソフトウェア）が律速となり、1つの位置座標を転送するに約5秒もの時間を要するなど、通信による動作には残念ながらまだまだ問題が多い。

しかし、我々が改造したカメラ類の重量は10 kg程度であり、それらの重量物を繰り返し移動させ撮影を行うことと、pHの分布の測定など、0.1 mm 程度の位置精度を要求する場合には、ロボットを用いたラボラトリーオートメーションで実行することは極めて有用である。

画像入出力系に関しては特に問題は生じなかった。PCに大容量のメモリーやハードディスク、アクセラレータボードを装着すると、42 MB程度の画像であっても、撮影した映像の入出力は秒単位の時間しか要しなかった。

また、撮影した結晶の形態像の解析を行うソフトウェアに関しては、先に述べた通り、性能が優れず実用的ではなかったため、本報告では目測によるレン

ズ状の結晶形態の算出に基づく結果を紹介するにとどめる。最終的には自動的に形態の特色を抽出するソフトウェアの開発を行いたいと考えている。

糖尿病患者の血液を添加した場合には、健常者のと比較し、統計的に有意に異なった結晶像が得られたため、今後、様々な疾病を対象とした研究を行い、特定の疾病により固有の結晶像が形成されるかを検討する。

ここでは、システムの設計とその製作にあたり、ネジの防食表面処理からソフトウェアの設計など、システムインテグレーションの全域にわたり行った。このような努力は一般的には必ずしも研究者が自ら行う必要はないかもしれないが、装置の設計と製作に際しての注意点を参考までに述べる。

まず第一に、仕様説明書の記載や製造あるいは販売担当者の見通しが必ずしも正しいとは限らないと云うことである。今回使用した外国製のデジタルテスターの通信機能は全く動作しなかった。大手メーカーの量産ロボットであっても、購入段階の性能では使い物にならなかった。特注の空調機も契約時の性能には至らなかった。従って、装置の購入にあたり、問題が発生した場合の対応と責任の所在、改修期間等、万一の場合を想定した綿密な契約書を作成すべきである。

ソフトウェアの外注開発には値段があってもないようなものである。開発者の能力により作業時間やプログラムの性能は100倍も1000倍も異なり、その性能はコストに比例しない。

ソフトウェアを1から開発することは手間と経費の点から無駄な場合もあるが、あまり市場に出回っていないソフトウェアをカスタマイズすることは割高な上、不備への対応も必ずしも良くない。一般的に他人のプログラムの修正は容易ではなく、プログラマーが中途退職した場合、バグの改修やバージョンアップなどの点で十分なサポートが得られない状態になりかねない。従って、逆に1から開発した方が優れていることもあり得る。

最後にコンピュータ業界は販売戦略にのみ力を注ぎ、商品の完動前に次期商品の販売を開始し、それ以前の機種をサポートを打切る傾向にある。ハードとソフトウェアが別の企業により開発されているため、責任の所在が不明確になりかねない。ハードウェアの性能向上は目覚ましいが、短期間で販売価値が半減するケースも多々生じる。従って、ソフトウェア間、ハードウェア間およびハードウェアとソフトウェア間のハンドシエイクの問題に関し、システムインテグレータには限らない努力と神通力が要求される。該当する学会や専門機関の規格化等の整備が進み、諸問題が解決されることを切望する次第である。

1.4. 結論

血液を添加した無機塩の結晶成長と言うベクトル量を指標とし生体情報を抽出、病気診断を試みるシステムの開発研究として、3×4個のシャーレを恒温恒湿槽に保持する結晶成長装置一式、これらのシャーレ内を光学的に観察するためのカメラ等を移動させる多関節6軸ロボットと観察・計測系、動画記録系、収集した結晶の成長形態を解析しデータベースとして収録する結晶成長形態解析系、画像入出力処理用系などすべてがコンピュータで制御されるシステムの設計・製作を試みた。このシステムを用いて、生体情報を豊富に含むヒトの血液を微量に添加した結晶性物質の水溶液から成長させたその塩の結晶の形態変化を解析し、病気の診断を試みた。パイロットスタディとして健常者群と糖尿病患者群の血液を用い、水和塩化銅のデンドライトの成長を比較したところ、両者の間で明らかに統計的有意差が示され、この機器の有用性が示された。今後、この装置を更に改良し、様々な疾病での研究および反応機構解明の研究をデザインし、結晶成長を指標にベクトル量抽出により、生体の情報を抽出する研究に挑みたい。

第1章の参考文献

- 1-1) 芝田高志、小暮美津子、井口登美子ほか：3×4個のシャーレを恒温恒湿槽に保持し、随意に指定のシャーレ内を撮影し収録するシステム —血液を微量に添加した水溶液から成長する水和塩化銅結晶の成長形態を指標とした病気診断—, 医科器械学, 1998, 印刷中.
- 1-2) Pfeiffer E: Kristalle. Orient-Occident-Verlag, Stuttgart (1930).
- 1-3) Nickel E: Die Reproduzierbarkeit der Sogenannten Empfindlichen Kupferchloridkristallisation. Bull Soc frib Sci Nat 57 : 65-179 , 1967-68.
- 1-4) 芝田高志：外国への日本人研究者派遣事業研究実績報告書, 平成5年度厚生科学研究費補助金 長寿科学総合研究推進事業研究報告集, 1994. 11 : 282-285.
- 1-5) Selawry A und Selawry O: Die Kupferchlorid-Krystallisation in Naturwissenschaft und Medizin. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1957).
- 1-6) 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.
- 1-7) Barth JG: Empfindliche Kristallisation. Krebs und Präkanzerose. Elemente der Naturwissenschaft 52: 42-50,1990.
- 1-8) 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.
- 1-9) 芝田高志、小幡 裕、小暮美津子ほか：血液結晶化法による老人病の診断および重症度・治療効果判定、早期発見に関する研究, 平成4年度厚生省長寿科学総合研究費研究発表会抄録集, 1993: 337-338.
- 1-10) 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, 臨床検査, 1994, 38: 972-973.
- 1-11) 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, 長寿科学総合研究, 1995, 8 : 178-181.
- 1-12) 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, 長寿科学総合研究, 1995, 8 : 182-188.
- 1-13) 芝田高志、高桑雄一、田中朱美ほか：平成6年度厚生省長寿科学総合研究費研究発表会抄録集、血液結晶化法による老人性疾患の診断に関する研究, 1995: 392-393.
- 1-14) 芝田高志、高桑雄一、田中朱美ほか：平成6年度厚生省厚生科学研究費補助金長寿科学総合研究平成6年度研究報告要約集、血液結晶化法による老人性疾患の診断に関する研究, 1995.3: 365.

第 2 章

第2章 結晶化と結晶構造解析

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)²⁻¹⁾

第2章の緒言

従来の研究ではヒト血液を添加して水和塩化銅の結晶を成長させると二水和物の結晶が成長すると考えられてきた。しかし、溶血液を溶媒として水和塩化銅の結晶を成長させる場合、結晶構造の変化なしに水和塩化銅の外形のみが変化するのか、分子構造に何らかの変化をもたらすのか、あるいは結晶中に血液が不純物として入込むと云う微視的な研究を行うのが第一歩と考えられる。

図 2.1 に血液無添加溶液から水和塩化銅を成長させた場合と、健常者の血液を添加して成長させた場合の結晶成長の様子と原子間力顕微鏡 (AFM) による表面観察の結果を示した。純粋な水和塩化銅を成長させると、図 2.1 a₁ のように無数の核を伴った結晶が成長するが、一つ一つの針状晶の長さは極めて短い。しかし、結晶核はシャーレ全体に分布せずコロニー状を呈した。一方、溶媒に血液が含まれた場合、ある一つの成長核から放射状のデンドライトが成長した (図 2.1 b₁, 詳細は第3章参照)。血液の添加は無秩序な核の発生を抑制し、結果的に長い針状晶が成長した。このことはAFMの像からも明らかである (図 2.1 a₂, b₂)²⁻²⁾。純粋な塩水和化銅は二水和物であることが熱重量分析 (TG/DTA) により明らかとなった。しかし、血液を添加したデンドライトでは、青と緑の2色の結晶が析出した。青色の結晶は二水和物であったが、緑のものは2.5程度の過剰な水和数を示した。この構造の水和塩化銅は従来知られていなかった²⁻³⁾。また、図 2.2 に示すようにX線光電子分光 (XPS) を用いた深さ方向の分析により、結晶表面には血液中の蛋白質起源の窒素基を含む成分が化学吸着していることが明らかとなった²⁻⁴⁾。

本章では、純粋な塩化銅二水和物および健常者の血液を添加し成長させた水

和塩化銅二水和物の青と緑色の結晶の構造を単結X線構造解析によって決定し、示差熱分析(DSC)によって、結晶構造の温度による変化を追究した。以下、英文で報告する。

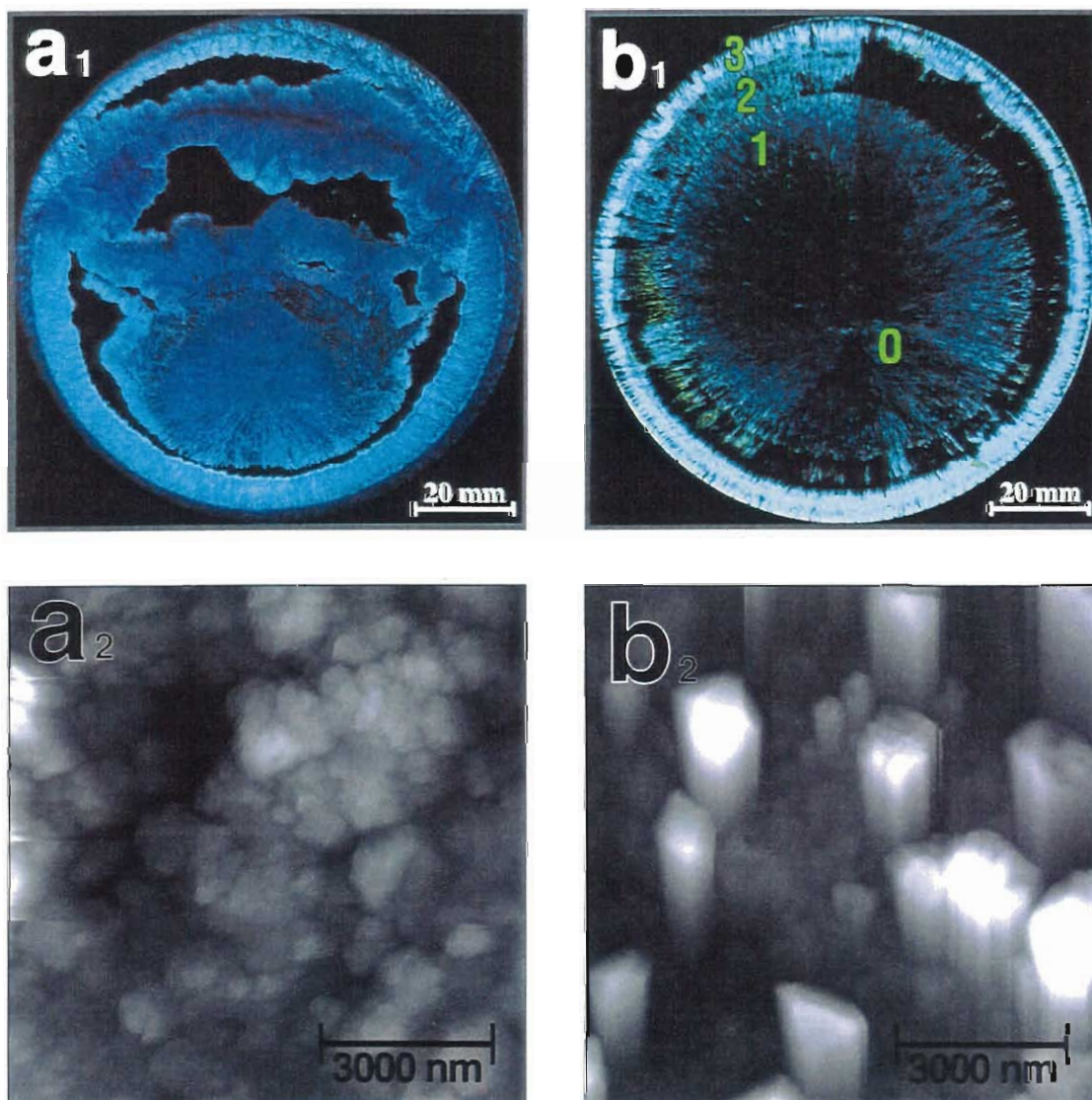


図 2.1 塩化銅二水和物の水溶液ならびにそれに血液を添加した水溶液から成長させた水和塩化銅の結晶²⁻²⁾

- a₁** : 塩化銅二水和物の水溶液から光学研磨した石英製シャーレ中で成長させた水和塩化銅の結晶。無数の核を伴った結晶が成長する。
- a₂** : **a₁**の原子間力顕微鏡像 (AC modulated mode of AFM)。多数の結晶成長核が発生している。
- b₁** : 健常者の血液を添加した塩化銅二水和物の水溶液から成長させた水和塩化銅の結晶。ある1つの成長核(0)から放射状のデンドライトが3層の同心円状に成長した。
- b₂** : **b₁**の原子間力顕微鏡像 (AC modulated mode of AFM)。核形成が抑制され数少ない結晶錐が成長している。

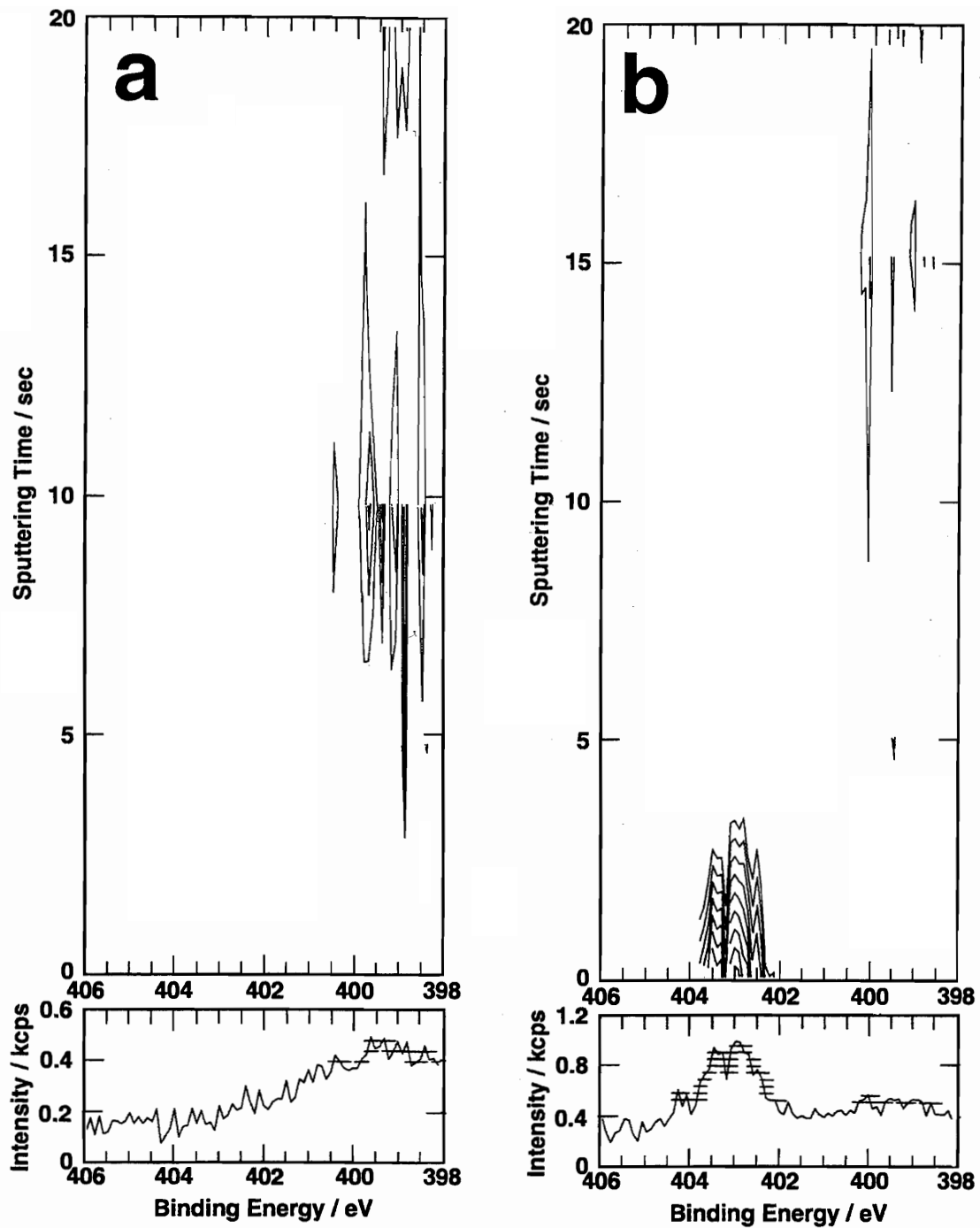


図 2.2 XPSの深さプロファイル 窒素(N1s_{1/2})²⁻⁴⁾

x軸に結合エネルギー, y軸にArスパッタリングの時間(sec) すなわち試料の深さを, z軸には信号強度すなわち濃度を示した。

- a: 純粋な塩化銅二水和物の水溶液から成長させた結晶。窒素すなわち蛋白質類は全く検出されない。
- b: 脳血管型老人性痴呆症患者(MID)の血液を微量に添加した塩化銅二水和物の水溶液から成長させた結晶。窒素すなわち血液中の蛋白質類が表面に吸着している。

2.1 Introduction

Changes in the growth pattern of dendritic cupric chloride crystals according to the disease of the patient whose blood was added, in a small amount, to the aqueous solutions have long been recognized, i.e. since first reported by Pfeifer²⁻⁵⁾. Detailed specific crystal growth, in terms of morphology, with a variety of diseases has been studied by Selawry and Selawry²⁻⁶⁾. Nickel also reported by produces a specific dendritic crystal growth²⁻⁷⁾ and Cocude et al recently studied Silicosis²⁻⁸⁾. Koopmans discussed about malignant tumor²⁻⁹⁾ and Barth reported that a specific form due to tumors was detectable significantly earlier (before illness onset) than the standard diagnosis could be made²⁻¹⁰⁾. Piva et al pointed out that some crystallization patterns correlated with variations in different serum proteins²⁻¹¹⁾. We have found the specific dendritic crystal growth patterns of diabetics and healthy subjects to differ significantly and have analyzed the correlation between pattern frequencies and nearly 90 different blood components²⁻¹²⁾. We have also attempted to elucidate the mechanism of this anomalous crystal growth by employing physical chemistry because few studies have taken this approach. X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) shows that nitrogen (N) of blood proteins is chemisorbed to copper (Cu) atoms of hydrated cupric chloride exchanging their electrons on the surfaces of the dendrites²⁻¹³⁾. An atomic force microscopy (AFM) study showed nucleation of dendrites to be remarkably restricted by the existence of blood²⁻¹⁴⁾.

Hydrated cupric chloride dendrites were grown from pure aqueous solutions to which a small amount of human blood had been added. Both blue and green crystals were grown. Green crystals obtained from pure solutions were unstable and transformed to be stable blue condition, while green crystals grown after blood addition were rather stable and maintained the green color for a longer time. Thus, there are few studies, to our knowledge, on the structure or physical properties of green dendrites due to their short life-times, spanning their appearance in saturated green solution until they become blue dendrites, in pure solution, despite the green crystals also being a basic inorganic substance. Nevertheless, blue and green crystals exist at the same time when grown from blood-added solutions. Previous researchers have thus been assumed that the two structures are the same. We have shown, by thermal analysis, that the hydration numbers differ between the two²⁻¹³⁾.

We describe herein the detailed crystalline structures of both crystals, from pure solutions and blood-added solutions, based on the single crystal X-ray diffraction method²⁻¹⁵⁾ and differential scanning calorimetry (DSC).

2.2 Method

2.2.1 Preparation of blue and green crystals

Whole blood, 550 μ l or 110 μ l, obtained from the antecubital veins of healthy adults was hemolyzed in 54.45 ml or 54.89 ml of pure water. Dihydrated cupric chloride (Merck ABS AG in the case of DSC, Wako Chemicals in the case of X-ray diffraction) was recrystallized to obtain a higher quality. The hemolyzed solution was added to 55.00 ml of a 30.0 wt% cupric chloride aqueous solution which had been filtered through a membrane with a pore diameter of 0.1 μ m, prepared from the above recrystals; the mixture was then stirred and 8 ml were distributed into a vessel (uncovered petri dish)²⁻¹²⁾.

Growth of the green and blue hydrated cupric chloride dendrites occurred as water evaporated from the aqueous solution under conditions of 28 °C and 45 %RH in our specially designed computer controlled crystal growth system²⁻¹⁶⁾. In addition, the corresponding crystals were both obtained from pure aqueous solution without blood addition.

2.2.2 Single crystal X-ray diffraction analysis

1) Data collection

Detailed data collection and reduction state of each specimen by X-ray diffraction analysis are shown in **Tables 2.1a** and **b**. A single dendritic crystal of each specimen was sealed in a glass capillary to prevent water evaporation. The approximate dimensions of the crystal are shown in **Table 2.1a**. All measurements were made with a 4 axis diffractometer (Rigaku AFC5R) with graphite monochromated Mo-K α radiation and a 12 kW rotating anode generator. Cell

constants and an orientation matrix for data collection, obtained from a least-squares refinement using the setting angles of 25 carefully centered reflections corresponded to a primitive orthorhombic cell. Lattice parameters and range of 2θ are shown in **Table 2.1 a**. For $Z=2$ and F.W. =170.48, the calculated density is 2.52 g/cm^3 . Based on the systematic absences of :

$$h0l: h+l \neq 2n$$

$$hk0: h \neq 2n$$

packing considerations, a statistical analysis of intensity distribution, and the successful solution and refinement of the structure, the space group was determined to be:

Pmna (#53)

Detailed intensity measurements of each specimen are listed in **Table 2.1 b**. The data were collected at room temperature ($23 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$) using the ω - 2θ scan technique to a maximum 2θ value of 60.0 or 74.8 degrees. Omega scans of several intense reflections, made prior to data collection, had an average width at half-height of 0.22 degrees with a take-off angle of 6.0 degrees. Scans were made at a speed of 16.0 degrees / min or 4.0 degrees / min in omega. The weak reflections ($I < 10.0 \sigma(I)$) were rescanned (maximum of 5 or 7 scans) and the counts were accumulated to ensure good counting statistics. Stationary background counts were recorded on each side of the reflection. The ratio of peak counting time to background counting time was 2:1. The diameter of the incident beam collimator was 1.0 mm, the crystal to detector distance 258 mm, and the detector aperture 6.0×6.0 mm (horizontal \times vertical). A total of over 400 reflections was collected. The intensities of three representative reflections were measured at a 150 reflection interval. Decay correction was not applied. The linear absorption coefficient, μ , for Mo-K α radiation is 58.7 cm^{-1} or 58.8 cm^{-1} . An empirical absorption correction using the program DIFABS²⁻¹⁷⁾ was applied. The data were corrected for Lorentz and polarization effects. A correction for secondary extinction was applied.

2) Structure solution and its refinement

Detailed structure solution and refinement are listed in **Table 2.1 c**. The structure was determined by direct methods²⁻¹⁸⁾ and expanded using Fourier techniques²⁻¹⁹⁾.

	Standard Blue	Standard Green	Blue crystal grown with blood	Green crystal grown with blood
Empirical Formula	CuCl ₂ O ₂ H ₄			
Formula Weight	170.48			
Crystal Color, Habit	blue, prismatic	green, prismatic	blue, prismatic	green, prismatic
Crystal Dimensions (mm)	0.40 × 0.15 × 0.10	0.35 × 0.15 × 0.10	0.30 × 0.08 × 0.05	0.30 × 0.08 × 0.05
Crystal System	orthorhombic			
Lattice Type	Primitive			
Number of Reflections Used for Unit Cell Determination (2θ range)	25 (48.5 - 54.7°)	25 (48.5 - 53.8°)	25 (40.1 - 50.88°)	25 (28.2 - 47.2°)
Omega Scan Peak Width at Half-height	0.22°			
Lattice Parameters	a = 8.090(2)Å b = 3.749(2)Å c = 7.412(2)Å V = 224.8(2)Å ³	a = 8.093(1)Å b = 3.748(2)Å c = 7.413(1)Å V = 224.9(2)Å ³	a = 8.084(2)Å b = 3.745(1)Å c = 7.411(1)Å V = 224.4(1)Å ³	a = 8.0844(9)Å b = 3.745(1)Å c = 7.412(1)Å V = 224.4(1)Å ³
Space Group	Pmna (#53)			
Z value	2			
D_{calc} (g/cm³)	2.518	2.518	2.523	2.523
F₀₀₀	166.00			
μ(MoKα) (cm⁻¹)	58.73	58.72	58.85	58.84

Table 2.1 Detailed data collection and reduction state of each specimen by X-ray diffraction analysis. a; Crystal Data

	Standard Blue	Standard Green	Blue crystal grown with blood	Green crystal grown with blood
Diffractometer	Rigaku AFC5R			
Radiation	MoK α ($\lambda = 0.71069\text{\AA}$) graphite monochromated			
Attenuator	Zr foil (factors + 1.00, 3.44, 11.81, 39.86)			
Take-off Angle	6.0°			
Detector Aperture	6.0 mm horizontal 6.0 mm vertical			
Crystal to Detector Distance	258 mm			
Temperature	23.0 °C			
Scan Type	ω -2 θ			
Scan Rate	16.0° / min (in ω) up to 5 scans	16.0° / min (in ω) up to 5 scans	4.0° / min (in ω) up to 7 scans	4.0° / min (in ω) up to 6 scans
Scan Width	(1.68 + 0.30 tan θ)°	(1.73 + 0.30 tan θ)°	(1.52 + 0.30 tan θ)°	(1.05 + 0.30 tan θ)°
2θ_{max}	60.0°	74.8°	60.0°	60.0°
Number of Total Reflections Measured	430	1389 Unique : 731 ($R_{int} = 0.082$)	430	430
Corrections				
Lorentz-polarization Absorption	trans. factors : 0.9333-1.0462	trans. factors : 0.9314-1.0554	trans. factors : 0.9099-1.1578	trans. factors : 0.8889-1.0823
Secondary Extinction	coefficient : 3.34467e-05	coefficient : 2.06846e-05	coefficient : 3.10701e-05	coefficient : 8.22403e-05

Table 2.1 Detailed data collection and reduction state of each specimen by X-ray diffraction analysis. b; Intensity Measurements

	Standard Blue	Standard Green	Blue crystal grown with blood	Green crystal grown with blood
Structure Solution	Direct Methods (SHELX86)			
Refinement	Full-matrix least-squares			
Function Minimized	$\Sigma w (Fo - Fc)^2$			
Least Squares Weights	$\frac{1}{\sigma^2(Fo)} = \frac{4Fo^2}{\sigma^2(Fo^2)}$			
p-factor	0.04			
Anomalous Dispersion	All non-hydrogen atoms			
Number Observations (I > 3.00 $\sigma(I)$)	309	301	303	287
Number Variables	17			
Reflection / Parameter	18.18	17.71	17.82	16.88
Residuals : R ; Rw	0.023 ; 0.029	0.025 ; 0.032	0.028 ; 0.035	0.028 ; 0.033
Goodness of Fit Indicator	1.14	1.23	1.41	1.27
Max Shift / Error in Final Cycle	0.01	0.00	0.01	0.00
Maximum peak in Final Diff. map ($e^-/\text{\AA}^3$)	0.29	0.49	0.59	0.48
Minimum peak in Final Diff. map ($e^-/\text{\AA}^3$)	-0.30	-0.47	-0.34	-0.44

Table 2.1 Detailed data collection and reduction state of each specimen by X-ray diffraction analysis. c; Structure Solution and Refinement

The non-hydrogen atoms were refined anisotropically. Hydrogen atoms were included but not refined. The final cycle of full-matrix least-squares refinement²⁻²⁰⁾ was based on about 300 observed reflections ($I > 3.00 \sigma(I)$) and 17 variable parameters, and converged (largest parameter was 0.01 or 0.00 times its esd) with unweighted and weighted agreement factors of :

$$R = \Sigma | |F_o| - |F_c| | / \Sigma |F_o|$$

$$Rw = (\Sigma w (|F_o| - |F_c|)^2 / \Sigma w F_o^2)^{1/2}$$

where $w = 1 / \{ \sigma^2(F_o) \} = 4F_o^2 / \{ \sigma^2(F_o^2) \}$
 $\sigma^2(F_o^2) = \{ S^2(C + R^2B) + (pF_o^2)^2 \} / Lp^2$
 S : scan rate
 C : total integrated peak count
 R : ratio of scan time to background counting time
 B : total background count
 Lp : Lorentz-polarization factor
 p : p-factor

The standard deviation of an observation of unit weight²⁻²¹⁾ :

$$\{ \Sigma w (|F_o| - |F_c|)^2 / (N_o - N_v) \}^{1/2}$$

where N_o : number of observations
 N_v : number of variables

is presented in **Table 2.1c** as a goodness of fit indicator. The weighting scheme was based on statistical considerations and included a factor ($p=0.040$) to down weight the intense reflections. Plots of $\Sigma w (|F_o| - |F_c|)^2$ versus FO , reflection order in data collection, $\sin \theta/\lambda$ and various classes of indices showed no unusual trends. The maximal and minimal peaks on the final difference Fourier map are also described in **Table 2.1c**. Neutral atom scattering factors were taken from Cromer and Waber²⁻²⁰⁾. Anomalous dispersion effects were included in F_{calc} ²⁻²¹⁾; the values for $\Delta f'$ and $\Delta f''$ were those of Creagh and McAuley²⁻²²⁾. The values for the mass attenuation coefficients were those of Creagh and Hubbel²⁻²³⁾. All calculations were performed using the teXsan²⁻²⁴⁾ crystallographic software package of Molecular Structure Corporation.

2.2.3 Differential scanning calorimetry (DSC)

The DSC (Rigaku Thermoplus DSC 8240) measurement was performed between -140 °C and 40 °C by liquid nitrogen cooling, with a rising ratio 5 °C/min. As the standard Al-pan for DSC was not suitable for hydrated cupric chloride in the reaction between copper and aluminum, we manufactured pure Au-pans with caps for this purpose. Twenty milligrams of each specimen were placed in a pan. The pan was then completely sealed with a cap by the press machine. About 37.5 mg of Al were used as a reference for DSC.

Green dendrites grown in the presence of blood for DSC measurement were sampled from the nucleation center of the radial dendrites in the Petri dish. Blue crystals were also sampled from a nearby region.

2.3 Results

2.3.1 Crystal Growth

The blue color of an aqueous solution of cupric chloride changed to green according to the increase in the concentration of the solution with on going water evaporation. Hydrated green cupric chloride crystals precipitated in this green solution after saturation. Multiple nucleations developed from pure cupric chloride solutions and the crystals were initially green with adequate moisture, however, shortly thereafter all of the crystals became blue due to water evaporation. The hydration number determined by thermogravimetry (TG/DTA) of these blue crystals is 2.0, as previously reported²⁻¹³⁾.

However, addition of a small amount of blood strongly inhibited nucleation. As a result, the radial growth of dendrites formed from an average count of 1.33 ± 0.05 initial growth points per dish with blood addition²⁻¹²⁾. Green and blue crystals coexisted in a dish.

2.3.2 Crystal Structures

Crystallographic parameters of both blue and green crystals grown from pure solution and blood-added solution are summarized in **Table 2.1 a**. Atomic coordinates and *Biso/Beq* are shown in **Table 2.2**, anisotropic displacement parameters in **Table 2.3**, selected bond lengths in **Table 2.4** and bond angles in **Table 2.5**.

Here *Beq*:

$$Beq=8/3\pi^2(U_{11}(aa^*)^2+U_{22}(bb^*)^2+U_{33}(cc^*)^2+2U_{12}aa^*bb^*\cos\gamma+2U_{13}aa^*cc^*\cos\beta+2U_{23}bb^*cc^*\cos\alpha)$$

As shown in **Table 2.1 a**, blue and green crystals have the same crystalline structure, regardless of the presence or absence of blood. The only discrepancy is a slight volume differences of about 0.2%, i.e. in lattice volumes, between crystals grown from pure and blood-added solutions. An ORTEP drawing of a unit cell and a molecule, determined by X-ray diffraction, of a blue crystal grown from pure solution are shown in **Fig. 2.3** and **Fig. 2.4** respectively. A pair of chlorine atoms bonds to a copper atom and a pair of oxygen atoms originating from 2 water molecules coordinates to the copper in the perpendicular direction in the same plane. The green crystal has the same structure.

2.3.3 Thermal behavior

The results of DSC of both blue and green crystals grown from pure solutions and blood-added solutions are shown in **Figs. 2.5 a-d**. There are no significant peaks from blue dendritic crystals in either solution except an exotherm peak **d** corresponds to a rising temperature (initiation temperature of the reaction) of -43.7 °C with a maximal temperature of -38.8 °C (**d**) as in **Figs. 2.5 a** and **b**. Expanded illustrations from **Figs. 2.5 a** and **b** are shown in **Figs. 2.6 a'** and **b'**. The small fluctuations are noises produced by the blank measurement except a very small peak near -40°C in **Fig. 2.6 a'**.

On the other hand, the green dendrites grown from pure solution show a very broad spectrum (**Fig. 2.5 c**). There are two specific thermic changes, near -110.2°C(*a*₁) and -96.2°C(*a*₂), in **Fig. 2.5 c**. There are also two exotherm peaks: peak (*b*₁) corresponds

to a rising temperature of -76.6°C with a maximal temperature of -71.1°C and peak (b_2) to a rising temperature of -54.3°C with a maximal temperature of -45.3°C . Furthermore, there are two endotherm peaks: the peak (c_1) corresponds to a rising temperature of -39.3°C with a maximal temperature of -33.1°C , (this peak also has a shoulder peak at -35.9°C) and peak (c_2) to a rising temperature of -29.7°C with a maximal temperature of -24.1°C .

In the case of green dendrites grown from blood-added solution, there is a specific thermic change near -111.2°C (a_1), and there is an exotherm peak (b_1) which corresponds a rising temperature of -76.1°C with a maximal temperature of -70.5°C . There is also an endothermic peak (c_1) which corresponds a rising temperature of -40.1°C with a maximal temperature of -36.8°C in **Fig. 2.5d**.

The DSC result which are based only on whole blood and pure water are shown in **Figs. 2.7a and b** respectively. Whole blood has an endothermic peak corresponding to a rising temperature of -2.3°C and a maximal temperature of 10.3°C and pure water has an endothermic peak corresponding to a rising temperature of 0.1°C and a maximal temperature of 13.6°C .

2.4 Discussion

2.4.1 Crystal Growth

As pure green hydrated crystals are unstable, they immediately change to stable dihydrated blue crystals. However, green crystals grown from blood-added solution stay green for a long time. This appears to be due to the surface of the crystal being covered with blood proteins and lipids which prevent water evaporation from the crystals. Multiple nucleations developed from pure cupric chloride solutions, while the addition of 0.5 vol% blood strongly inhibited nucleation. As a result, radial growth of dendrites formed from an average count of about 1.33 ± 0.05 initial growth points per dish was achieved by adding blood.

	Atom	x	y	z	Beq
	Cu (1)	0.0000	0.0000	0.0000	1.64 (1)
Standard	Cl (1)	0.0000	0.3800 (2)	0.24013 (8)	1.78 (1)
Blue	O (1)	0.2394 (3)	0.0000	0.0000	2.64 (5)
	H (1)	0.2812	0.1044	0.0672	2.6000
	Cu (1)	0.0000	0.0000	0.0000	1.56 (1)
Standard	Cl (1)	0.0000	0.3801 (3)	0.23996 (10)	1.72 (2)
Green	O (1)	0.2400 (4)	0.0000	0.0000	2.52 (6)
	H (1)	0.2946	0.1461	0.0701	2.5000
Blue crystal	Cu (1)	0.0000	0.0000	0.0000	1.43 (1)
grown with	Cl (1)	0.0000	0.3796 (3)	0.2399 (1)	1.57 (2)
blood	O (1)	0.2393 (4)	0.0000	0.0000	2.37 (2)
	H (1)	0.2912	0.1125	0.4730	2.4000
Green crystal	Cu (1)	0.0000	0.0000	0.0000	1.62 (2)
grown with	Cl (1)	0.0000	0.3799 (3)	0.2400 (1)	1.76 (2)
blood	O (1)	0.2397 (4)	0.0000	0.0000	2.61 (7)
	H (1)	0.2869	0.1122	0.0585	2.6000

Table 2.2 Atomic coordinates and *B_{iso}* / *B_{eq}*

$$B_{eq} = 8/3\pi^2(U_{11}(aa^*)^2 + U_{22}(bb^*)^2 + U_{33}(cc^*)^2 + 2U_{12}aa^*bb^*\cos\gamma + 2U_{13}aa^*cc^*\cos\beta + 2U_{23}bb^*cc^*\cos\alpha)$$

Atom	U11	U22	U33	U12	U13	U23
Standard						
Cu (1)	0.0182 (3)	0.0223 (3)	0.0217 (3)	0.0000	0.0000	- 0.0057 (2)
Blue						
Cl (1)	0.0272 (4)	0.0197 (4)	0.0209 (3)	0.0000	0.0000	- 0.0025 (3)
O (1)	0.021 (1)	0.048 (2)	0.031 (1)	0.0000	0.0000	- 0.019 (1)
Standard						
Cu (1)	0.0172 (3)	0.0217 (4)	0.0205 (3)	0.0000	0.0000	- 0.0057 (2)
Green						
Cl (1)	0.0259 (4)	0.0196 (5)	0.0197 (4)	0.0000	0.0000	- 0.0027 (3)
O (1)	0.018 (1)	0.047 (2)	0.03 (1)	0.0000	0.0000	- 0.017 (1)
Blue crystal						
Cu (1)	0.0150 (3)	0.0200 (4)	0.0194 (4)	0.0000	0.0000	- 0.0057 (2)
grown with						
Cl (1)	0.0243 (4)	0.0171 (5)	0.0183 (4)	0.0000	0.0000	- 0.0026 (3)
blood						
O (1)	0.016 (1)	0.043 (2)	0.031 (2)	0.0000	0.0000	- 0.019 (1)
Green crystal						
Cu (1)	0.0174 (4)	0.0225 (4)	0.0216 (4)	0.0000	0.0000	- 0.0055 (2)
grown with						
Cl (1)	0.0267 (5)	0.0199 (5)	0.0203 (4)	0.0000	0.0000	- 0.0023 (4)
blood						
O (1)	0.02 (1)	0.047 (2)	0.032 (2)	0.0000	0.0000	- 0.019 (1)

Table 2.3 Anisotropic displacement parameters

Atom	Distance			
	Standard Blue	Standard Green	Blue crystal grown with blood	Green crystal grown with blood
Cu (1) - Cl (1)	2.2798 (8)	2.2791 (9)	2.2767 (8)	2.278 (1)
Cu (1) - O (1)	1.937 (3)	1.942 (3)	1.935 (3)	1.937 (3)
O (1) - H (1)	0.72	0.87	0.69	0.71

Table 2.4 Selected bond lengths

Atom	Angle			
	Standard Blue	Standard Green	Blue crystal grown with blood	Green crystal grown with blood
Cl (1) - Cu (1) - Cl (1)	180.0	180.0	180.0	180.0
Cl (1) - Cu (1) - O (1)	90.0	90.0	90.0	90.0
O (1) - Cu (1) - O (1)	180.0	180.0	180.0	180.0
Cu (1) - O (1) - H (1)	118.1	120.3	127.4	122.3
H (1) - O (1) - H (1)	123.8	119.3	105.2	115.4

Table 2.5 Selected bond angles (°)

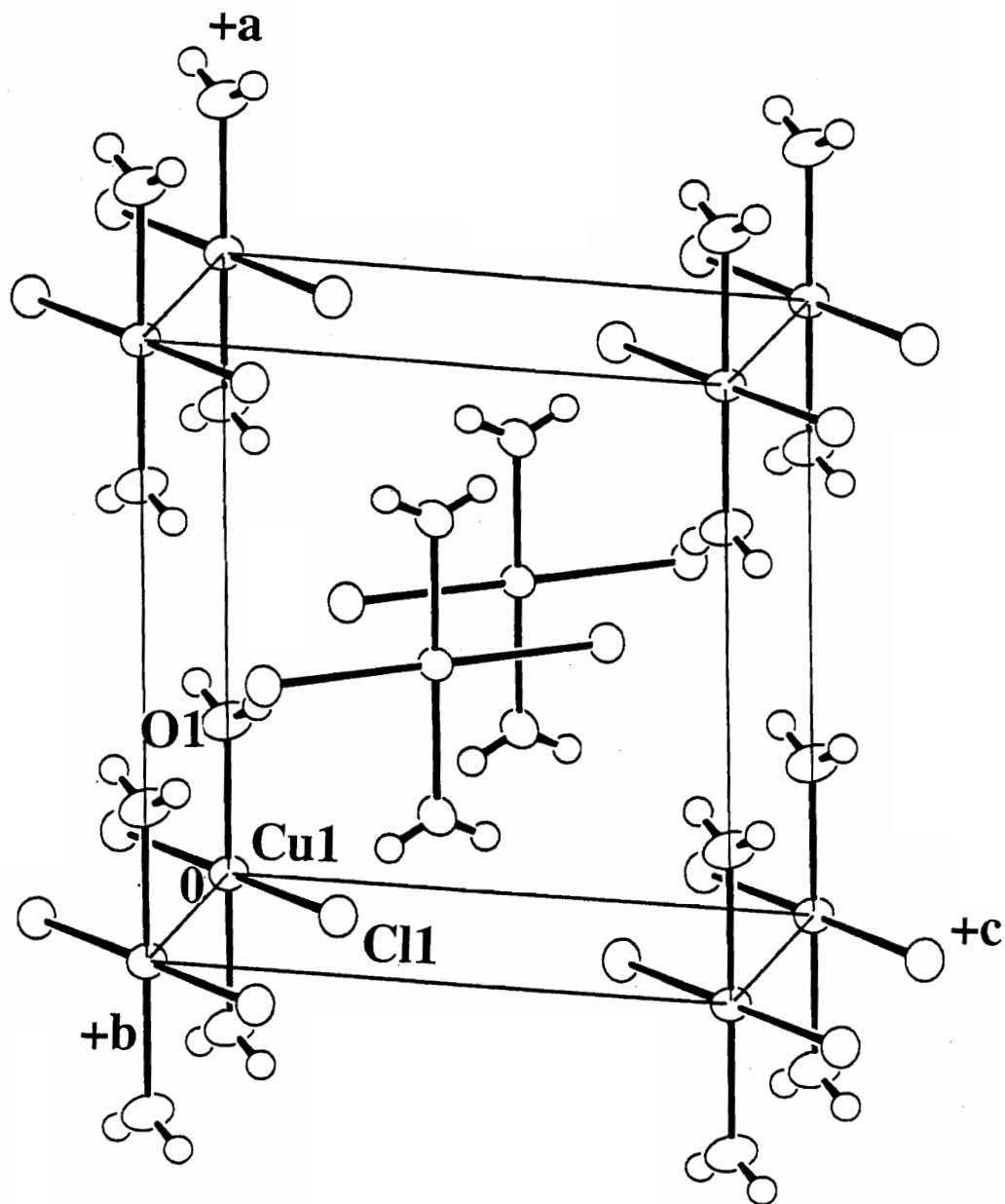


Fig. 2.3 An ORTEP drawing of a unit cell determined by X-ray diffraction, of a blue crystal grown from pure solution

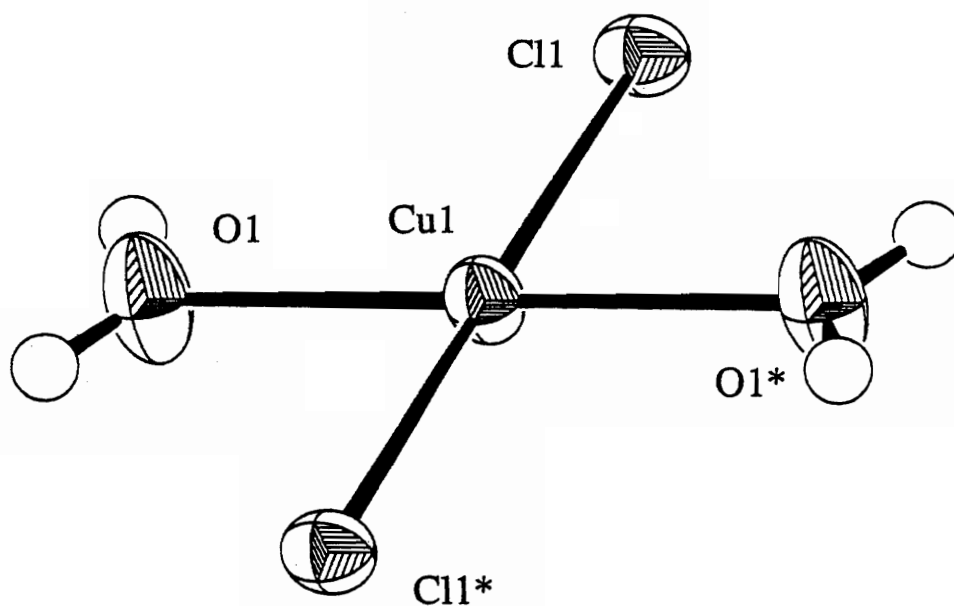


Fig. 2.4 An ORTEP drawing of a molecule determined by X-ray diffraction of a blue crystal grown from pure solution

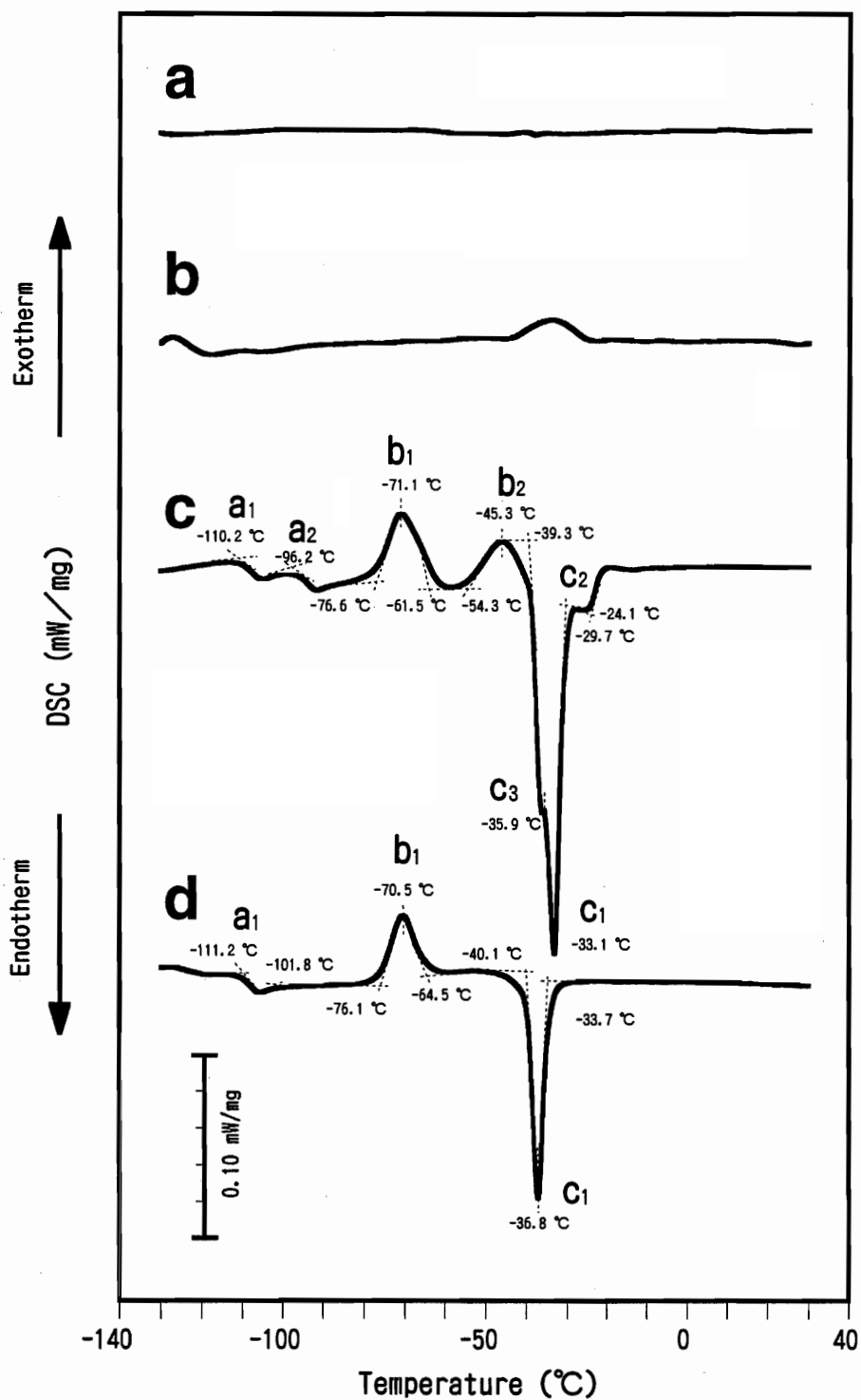


Fig. 2.5 DSC heating curves of blue and green hydrated cupric chloride

a: Blue dendrites (dihydrated cupric chloride) grown from pure dihydrated cupric chloride aqueous solutions. **b:** Blue dendrites of hydrated cupric chloride crystallized from dihydrated cupric chloride aqueous solutions to which 0.5 vol% blood had been added. **c:** Green dendrites of hydrated cupric chloride crystallized from pure aqueous solutions. **d:** Green dendrites of hydrated cupric chloride crystallized from dihydrated cupric chloride aqueous solutions to which 0.5 vol% blood had been added.

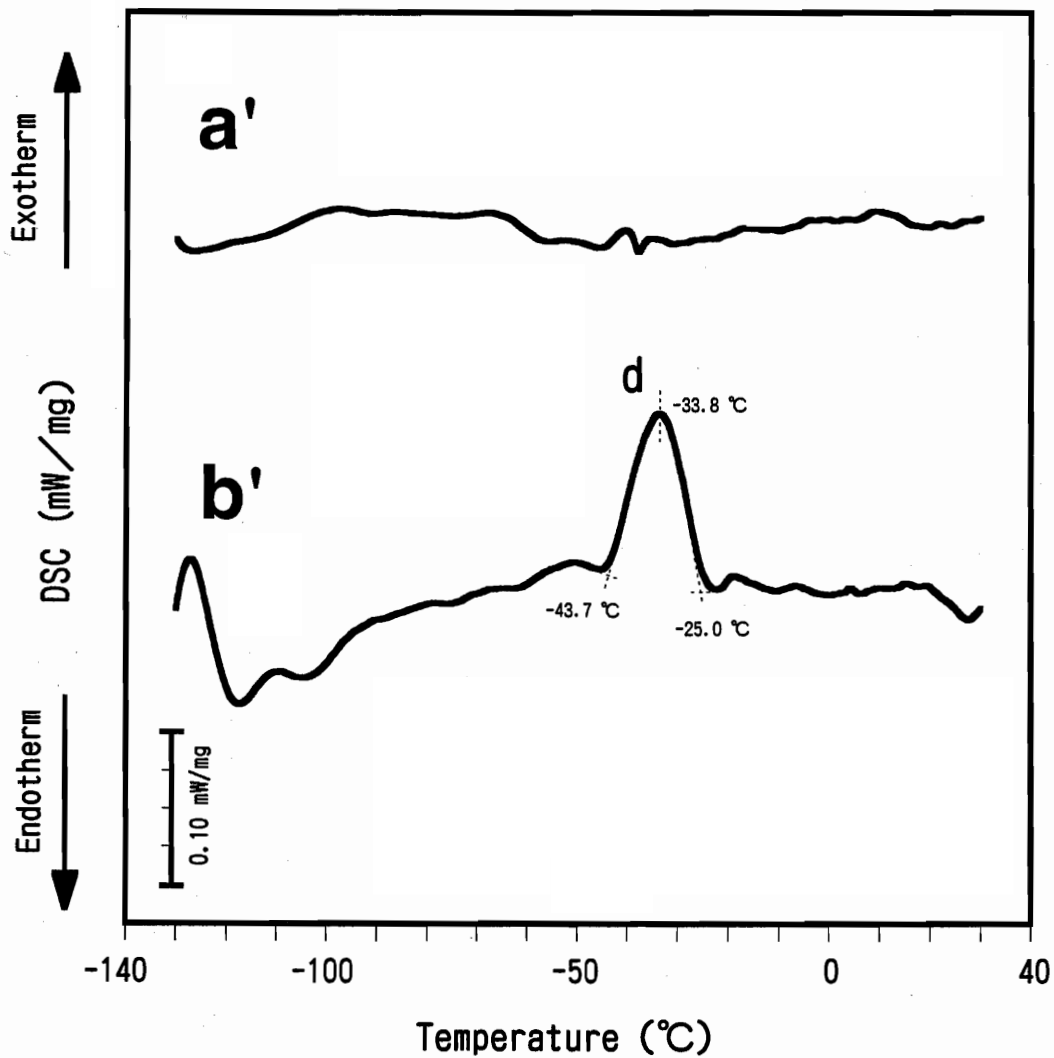


Fig. 2.6 DSC heating curves of blue hydrated cupric chloride

Expanded figures of Fig. 2.5 a and b.

a: Blue dendrites (dihydrated cupric chloride) grown from pure dihydrated cupric chloride aqueous solutions. **b:** Blue dendrites of hydrated cupric chloride crystallized from dihydrated cupric chloride aqueous solutions to which 0.5 vol% blood had been added.

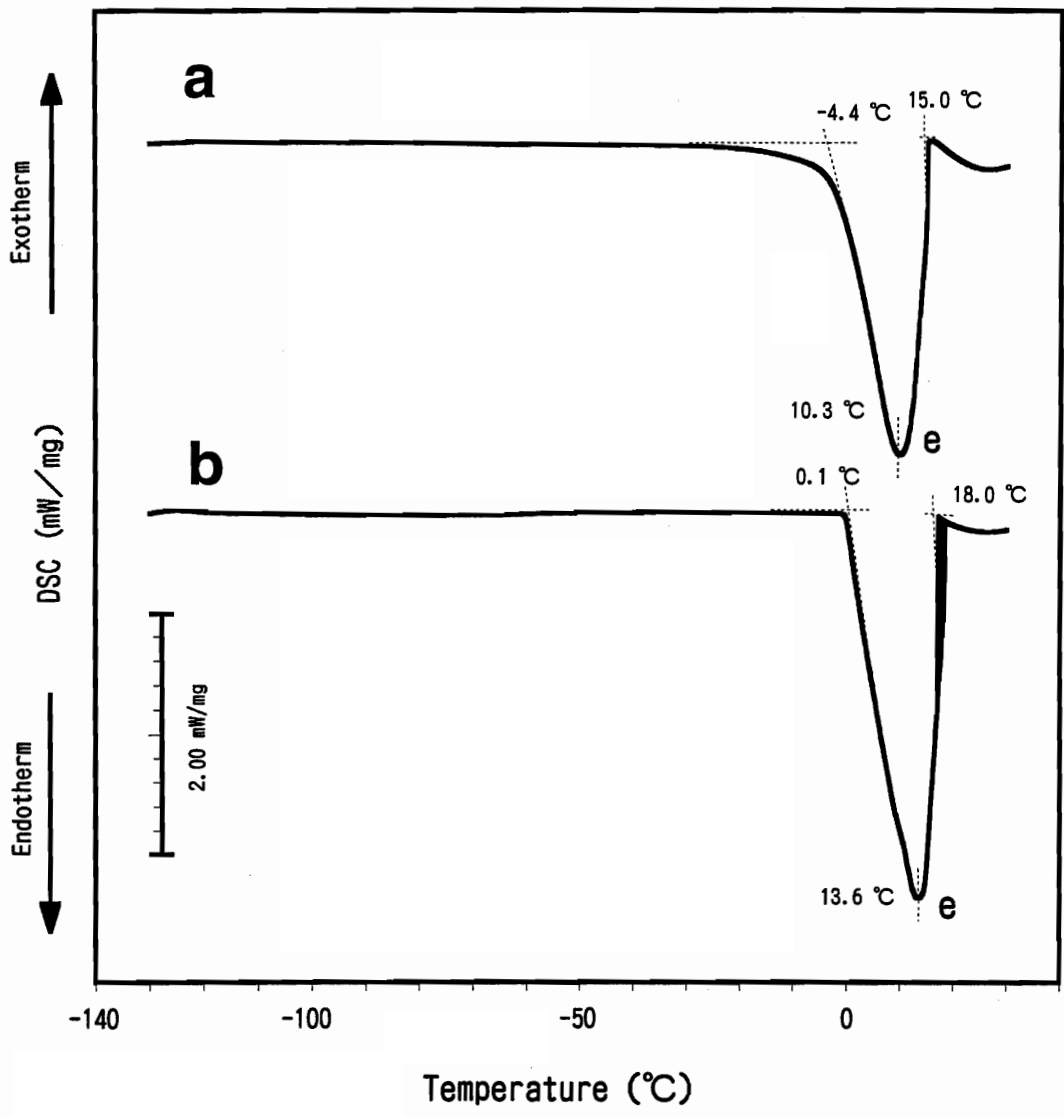


Fig. 2.7 DSC heating curves of blood and pure water

a: Whole blood from a healthy subject. b: Pure water

2.4.2 Crystal Structures

From the crystallographical parameters summarized in **Tables 2.1** through **2.5**, the 4 types of specimens showed quite similar structures on X-ray diffraction analysis. Therefore, representative results of ORTEP drawing of a unit cell and a molecule are shown in **Figs.2.3** and **2.4** using a blue crystal grown from pure solution. The existence of dihydrated cupric chloride has been known for more than 100 years²⁻²⁵⁾. Thus many X-ray diffraction analyses have been performed²⁻²⁶⁾. The results obtained with blue crystals are in good agreement with those of Engberg²⁻²⁶⁾. A slight volume difference of about 0.2%, i.e. in lattice volume, is recognizable between crystals grown from pure and blood-added solutions. As this difference is very small, it is difficult for us to judge its significance. Nevertheless, it is known that the hydration number of green crystals is more than 2.0 (about 2.5), based on a previously reported thermogravimetry study²⁻¹³⁾.

The X-ray data suggest that there is no difference between blue and green crystals and that both crystals are dihydrated. The calculation of van der Waals diameter suggests that there is no space for residual water molecules in the lattice that has been determined. Given the discrepant results, we concluded that residual water, i.e. a hydration number exceeding 2, results in a disordered amorphous state that makes detection by the X-ray diffraction method impossible.

2.4.3 Thermal Behavior

In the DSC spectrum of crystals (**Figs.2.5 a-d** and **Figs. 2.6a-b**), the peaks do not depend on the blood itself because the spectrum of blood (**Fig. 2.7a**) or expanded illustration from **Fig. 2.7a** has only one peak, i.e. the endothermic peak of melting ice at -4.4°C which occurs at the freezing point depression.

There is a very small exothermic peak near -40°C for blue dendrites in **Fig. 2.6a'**. Thus means that there is a little structural change near -40°C . The exothermic peak **d** of blue crystals from blood-added solution in **Fig. 2.6b'** is not originated from blood but from structural changes of the crystal structure. It seems that blood has an enhancement effect of changing crystal structures of blue dendritic crystals.

On the other hand, the green dendrites grown from pure solution show a very broad spectrum (**Fig. 2.5c**). In green crystals grown under blood-added conditions, two specific thermic changes, near -110.6°C (**a₁**) and -96.9°C (**a₂**) as shown in **Fig. 2.5c**, appear to represent the glass transition temperature (T_m). At the lower T_m , the specimen is in the glass condition, and at a higher T_m , it becomes a crystal structure. The integrated area of the peak is small, i.e. the structural change might involve only a part of the whole structure.

We speculate suppose that the two exothermic peaks where **b₂** blends are due to crystallization and that the large **c₁** and **c₂** peaks represent melting of the crystalline form. At the higher melting temperature, crystal structures are in disorder as compared to the lower temperatures. The shoulder peak at -36.2°C is a reproducible, but this phenomenon requires further study.

In the case of green dendrites grown from blood-added solution, there is a specific thermic change near -111.2°C (**a₁**) due to the glass transition T_m , and there is an exotherm peak (**b₁**) of crystallization, as shown in **Fig. 2.5d**, and also an endothermic peak (**c₁**) which is the melting peak. There are no peaks of **a₂**, **b₂**, **c₂** and **c₃** in the case of dendrites in blood-added solution. Comparing the two DSC spectra shown in **Fig. 2.5c** and **Fig. 2.5d**, suggested that **b₁** correlates with **c₁** and **b₂** with **c₂**.

It is very interesting that the number of peaks differs between pure green crystals and those grown with blood. However, data are insufficient to draw conclusions regarding this observation. It is also noteworthy that there is a reproducible shift of 3.7°C between the **c₁** peaks in **Fig. 2.5c** and **5d**.

2.4.4 Effects of blood on crystalline structures

The structure of green dendrites is clearly different from that of blue dendrites, based on the results of DSC, though there are no differences by the X-ray diffraction method. X-ray diffraction below -70°C where the crystallization reaction (**b₁** in **Fig. 2.5c** and **d**) occurs dose create some differences between blue and green dendrites.

The green crystal does not have residual water in the form free water because, if the residual water is in the free water form which can be absorbed on the surface of the

dendrites or exist among the crystalline structures, the melting peak on DSC would be near 0 °C (Fig. 2.7b), i.e. an endothermic reaction. However, there are no corresponding peaks in Figs. 2.5 c and d. This means that the residual water must be a bound water molecule²⁻²⁷⁾, the thermal vibration of which is controlled in the crystals and contained in the crystal, in a disordered state, e.g. an amorphous state. The reason there have been few studies on this green crystal, despite this substance being familiar to some researchers, is apparently its short life-time, under conditions in which the green dendrites are grown from pure aqueous solutions they are unstable. The surfaces of green crystals grown with a small amount of blood, e. g. 0.001 vol% to 0.5 vol%, in the solution must be covered with blood proteins and/or lipids which maintain moisture.

We are now attempting to analyze the effects of patients' blood²⁻¹²⁾. We have recently found that dendrites of hydrated cupric chloride crystallized from dihydrated cupric chloride aqueous solutions, to which a small amount of blood from diabetic patients had been added *in vitro* and grown in uncovered Petri dishes, formed crystals in the shape of a convex lens consisting of two dendrite arches near the center of the crystal growth point. The crystal growth form was specific to diabetic patients according to the results of a student's t-test comparison with the control group. The occurrence of the forms was dependent on the concentrations of HbA1, HbA1c, glucose, creatinine, uric acid, platelets, and ceruloplasmin. Further study is planned.

2.5 Conclusions

As remarkable differences between blue and green hydrated cupric chloride dendrites are demonstrated by DSC, despite few structural differences between the crystals having been demonstrated by four axis goniometry using the single crystal X-ray diffraction method, it is suggested from the above observations that residual water in a green crystal, contrast to the dihydration of a blue crystal, results in a disordered crystalline structure. In spite of the green dendrites grown from pure aqueous solutions being short lived, those grown from a solution to which a small amount of human blood had been added maintained a meta-stable condition. As the thermal behavior measured by DSC of

unstable green dendrites is different from that of relatively stable green dendrites, there seems to be little difference between the two in crystalline structure. The above findings show that blood has an enormous effect on the growth of hydrated cupric chloride crystals.

References of chapter 2

- 2-1) 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). submitted to J Tokyo Wom Med Coll 6,7: (1998)
- 2-2) 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
- 2-3) 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
- 2-4) 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, 長寿科学総合研究, 1995, 8 : 182-188.
- 2-5) Pfeiffer E: Kristalle. Orient-Occident-Verlag, Stuttgart (1930)
- 2-6) Selawry A und Selawry O: Die Kupferchlorid-Krystallisation in Naturwissenschaft und Medizin. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1957)
- 2-7) Nickel E: Die Reproduzierbarkeit der Sogenannten Empfindlichen Kupferchloridkristallisation. Bull Soc frib Sci Nat 57 : 65-179 , 1967-68
- 2-8) 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
- 2-9) Koopmans A : Pfeiffersche Blutkristallisation und Malignom-Bereitschaft. Elemente der Naturwissenschaft 52: 28-35, 1990
- 2-10) Barth JG : Empfindliche Kristallisation. Krebs und Präkanzerose.Elemente der Naturwissenschaft 52: 42-50, 1990
- 2-11) 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
- 2-12) Shibata T, Kogure M, IGUCHI T et al: Effect of diabetics' blood on the growth of hydrated cupric chloride crystals from aqueous solutions. submitted to J Tokyo Wom Med Coll 6: (1998)
- 2-13) 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
- 2-14) Shibata T, Takakuwa Y, Tanaka A et al: Doping effect of human blood on surface microstructure of cupric chloride dendrites grown from aqueous solutions. J Crystal Growth 167: 716-718, 1996
- 2-15) SHIBATA T, TAKAKUWA Y, TANAKA A et al: Effect of Human Blood on Change of Chemical Structure and Morphology of Cupric Chloride Dendrites. In ICCGX Abstracts The 11th International Conference on Crystal Growth, p.377, The Hague (1995).
- 2-16) SHIBATA T, KOGURE M, IGUCHI T et al: 投稿中 1998
- 2-17) WALKER N: DIFABS: An empirical absorption correction program. Acta Cryst A39: 158-166, 1983
- 2-18) SHELDRICK GM: SHELXS86. In Crystallographic Computing 3 (SHELDRICK GM, KRUGER C and GODDARD R eds) pp 175-189, Oxford University Press, (1985)
- 2-19) BEURSKENS PT, ADMIRAAL G, BEURSKENS G et al: DIRDIF92. The DIRDIF program system, Technical Report of the Crystallography Laboratory, University of Nijmegen, The Netherlands (1992)

- 2-20) CROMER DT, WABER JT: Table 2.2 A In International Tables for X-ray Crystallography Vol IV ,The Kynoch Press, England (1974)
- 2-21) IBERS JA, HAMILTON WC: Acta Crystallogr 17:781, 1964
- 2-22) CREAGH DC, McAULEY WJ: Table 4.2.6.8 In International Tables for Crystallography Vol C (WILSON AJC ed) pp 219-222, Kluwer Academic Publishers, Boston, (1992)
- 2-23) CREAGH DC, HUBBELL JH: Table 4.2.4.3 In International Tables for Crystallography Vol C (WILSON AJC ed) pp 200-206, Kluwer Academic Publishers, Boston, (1992)
- 2-24) teXsan: Crystal Structure Analysis Package, Molecular Structure Corporation (1985 & 1992)
- 2-25) MELLOR JW: Chapter 16. Cupric Chloride In A Comprehensive Treaties on Inorganic Chemistry Vol III pp168-191, Longmans, Green ANd Co., London (1923).
- 2-26) ENGBERG Å: An X-ray Refinement of the Crystal Structure of Copper (II) Chloride Dihydrate. ACTA Chem Scand 24:3510-3526, 1970
- 2-27) OHSAKA A: Water in Biological Systems. Application of Thermal Analysis to the Study of Water in Animal Tissues in Pathophysiological State. : 14-20, 19//

第 3 章

第3章 結晶化と巨視的結晶形態解析

第3章の緒言

塩化銅二水和物 ($\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 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^{3-1~3-5)}。Selawryらは健常者では主として放射状の樹枝状の結晶のみが成長し、僧帽弁奇形では八角形、肺結核では五角形の中に十字形、癌では成長方向に垂直に交差した形態など疾病による特異な形態がそのベースの放射状の成長に加わるとしている。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。

我々は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³⁻⁶⁾。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³⁻⁶⁾³⁻⁷⁾。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³⁻⁸⁾³⁻⁹⁾、生成したデンドライトの結晶構造解析を行った³⁻¹⁰⁾。

そこで、巨視的結晶形態解析を行うために、我々は第1章で述べたシステムにより、糖尿病患者の血液を添加した溶液から発生したデンドライトの形態について考察した。なお、糖尿病患者の血液を用いた報告は筆者の知る限り SelawryらおよびPivaらによる過去 2 例しか見当たらない³⁻³⁾³⁻⁵⁾。約90項目におよぶ血液成分分析と結晶像の相関を追究したところ、幾つかの成分に関して相関が認められたので報告する。

3.1 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 ± 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 ± 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。

3.2 方法

3.2.1 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（第1章 図 1.2, 1.3）。この装置は12組の結晶成長容器³¹¹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（35 mm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。

3.2.2 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30.0 wt%の水溶液を調整し、これと0.55 mlの血液を50.0 ml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0.5 vol%）。この溶液8.0 ml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100 mm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℃、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。

3.2.3 血液の分析

採血した血液に関して、表 3.1 に示す項目の分析を行った。

3.2.4 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8 mm未満（**S**）、8 mm以上20 mm未満（**M**）、20 mm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。

3.3 結果

3.3.1 健常者と糖尿病患者に共通した結晶成長

健常者群（**G1～G6**）および糖尿病患者群（**DM1～DM6**）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 3.1 にシャーレの全景（上段）と拡大図（下段）で示した。図 3.1 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

検査大項目	小項目
血糖コントロール指標	ヘモグロビンA1 (HbA1)、ヘモグロビンA1c (HbA1c) 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, α 1-G, α 2-G, β -G, γ -G, A/G比)、 フィブリノーゲン (fibrinogen)、セルロプラスミン (Cp)
アミノ酸	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, α -Aminobutyric acid, Proline, Glycine, Alanine, Citrulline, Valine, Cystine, α -Aminobutyric acid, Cystathionine, Methionine, Isoleucine, Leucine, Tyrosine, Phenylalanine, γ -Amino β -hydroxybutyric acid, β -Alanine, γ -Aminobutyric acid, Homocystine, β -Amino-iso-butyric acid, Lysine, Monoethanolamine, Histidine, 3-Methylhistidine, 1-Methylhistidine, Carnosine, Anserine, Tryptophan, Hydroxylysine, Ornithine, 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)、 リン (P)、マグネシウム (Mg)、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

表 3.1 血液分析項目

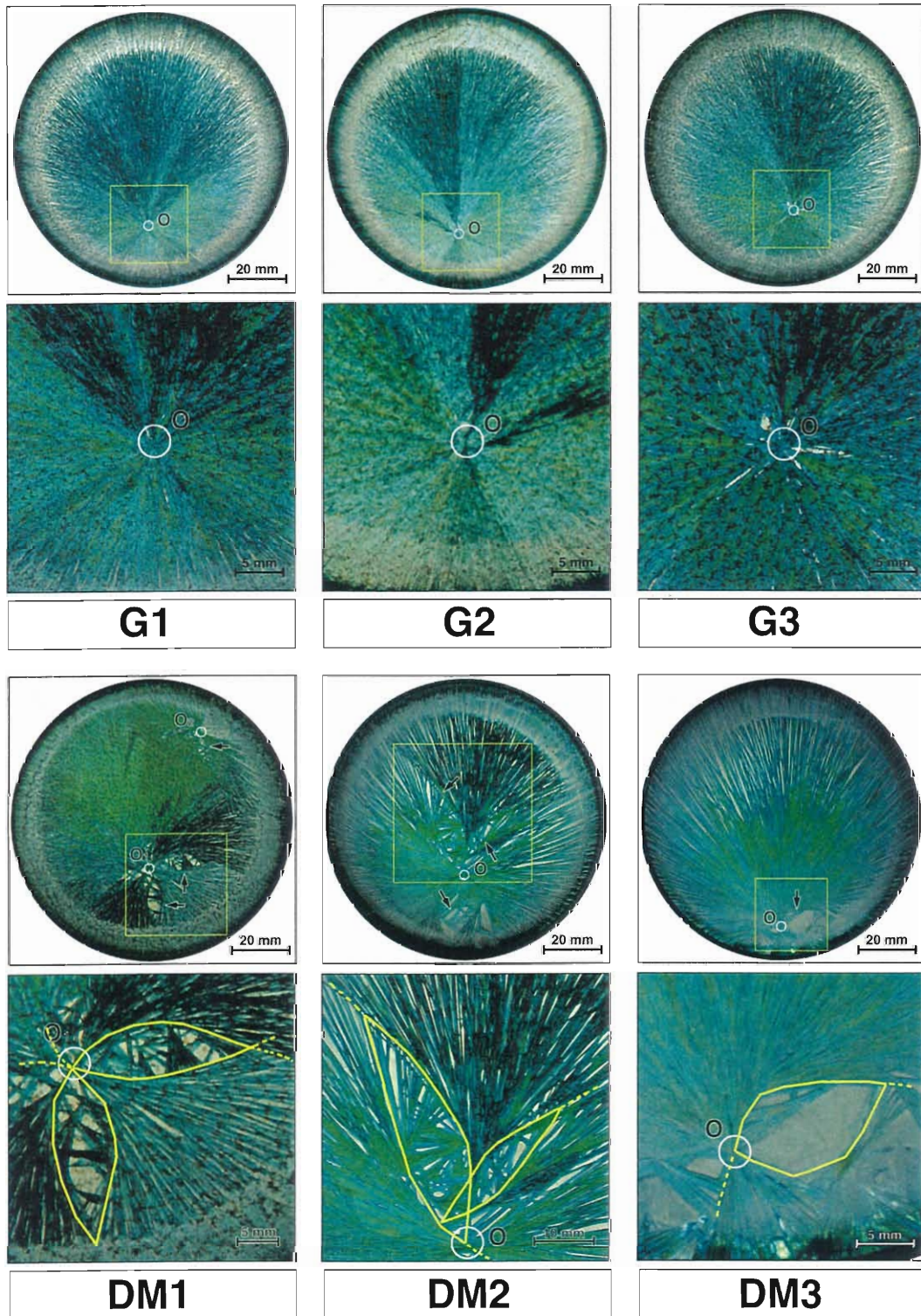


図 3.1 血液を添加し成長させた水和塩化銅の結晶像

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~G3: 健常者。成長中心核 (O) から放射状に dendrite 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~DM3: 糖尿病患者。Dendrite の成長中心核近傍に2つの弧状の dendrite の重ね合わ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)。

(○) としシャーレの端から1 cm程度内側の領域にわたり直径約8 cmの放射状デンドライトが成長した。血液の添加濃度が0.5 vol%では成長の中心核の数は健常者群は 1.33 ± 0.05 ・糖尿患者群は 1.71 ± 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 3.1 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0.001 vol%の低濃度まで観察されたが、本研究では0.5 vol%の添加濃度を採用した。

0.1 vol%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 3.1 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 3.1 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³⁻¹⁰⁾。

3.3.2 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 3.1 のG1~G3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 3.1 G3 拡大図）。

3.3.3 糖尿病患者に固有な結晶像

一方、**図 3.1** 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以下**(S)**、8mm以上20mm以下**(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 3.2**に示す。健常者**(G1~G3)**では**S**の出現頻度はゼロではないが、糖尿病患者**(DM1~DM3)**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の頻度が高いことがわかる。

3.3.4 血液の分析結果と統計的解析

健常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 3.2**に示す。HbA1、HbA1c、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 3.3**に示す。**表 3.3**から**L**と**M**に共通し非常に高い相関を示す因子として、HbA1、HbA1c、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、 α_1 -G、 α_2 -G、 γ -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 3.3**に図示し、外れ値の少ないことを示した。HbA1c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 3.4**に示す。

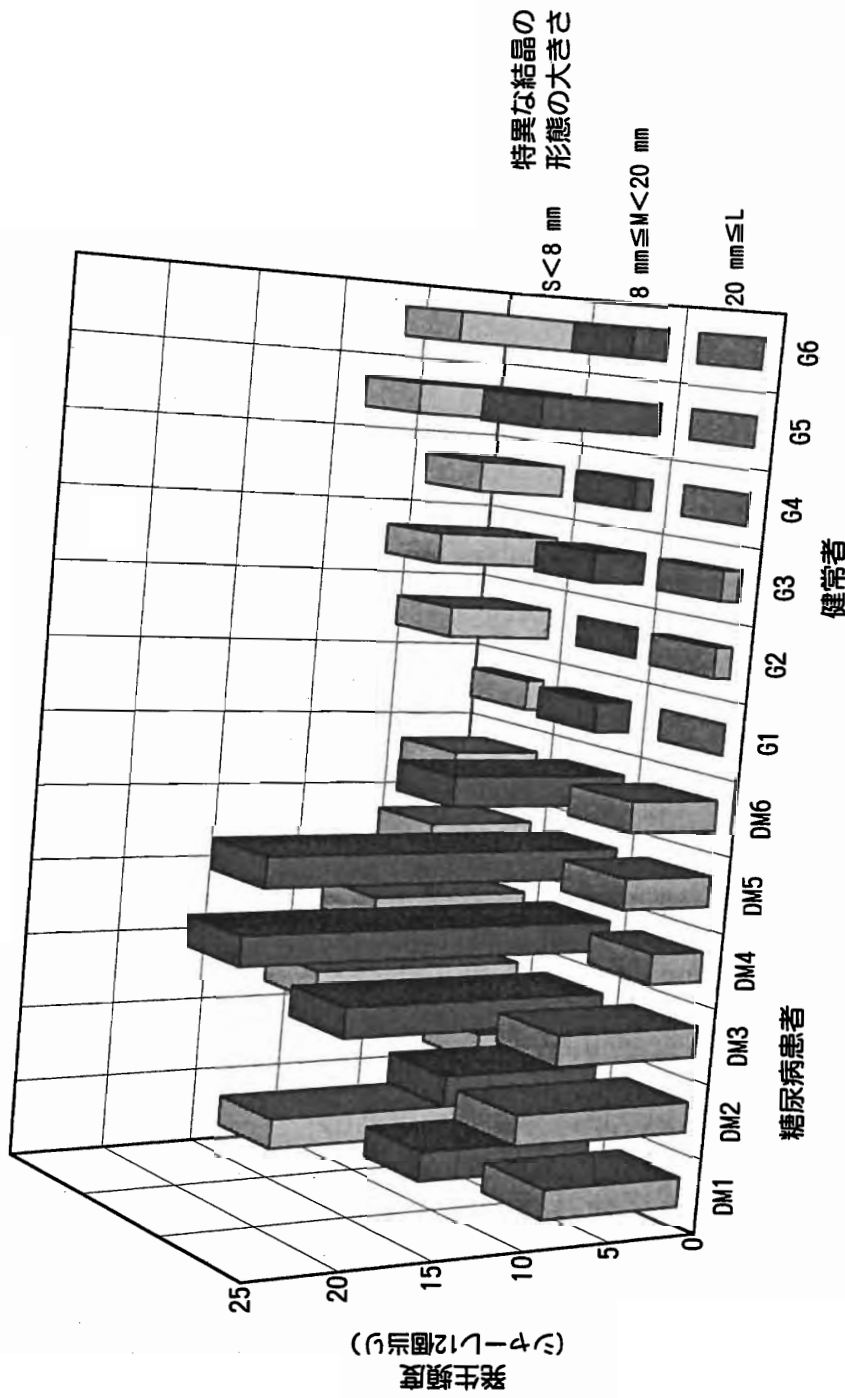


図 3.2 健常者 (G1~6) および糖尿病患者 (DM1~6) 各6例の血液を添加して成長させた水和塩化銅のデンドライトに発生する特異な結晶成長 (凸レンズ状の形態) の大きさ別頻度

z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、y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。

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A1c (%)	ヘモグロビンA1c (%)	11.7 ± 1.0	6.2 ± 0.4	0.0007
		ヘモグロビンA1c (%)	9.9 ± 0.8	5.2 ± 0.3	0.0008
		空腹時血糖値 (mg/dl)	163 ± 22.0	89.3 ± 14.1	0.0190
血清蛋白	セルロブラスミン (mg/dl)	セルロブラスミン (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
含有窒素成分	尿酸 (mg/dl)	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
アミノ酸分析	3-Methylhistidine (nmol/ml)	3-Methylhistidine (nmol/ml)	3.2 ± 1.2	0 ± 0.0	0.0334
		Urea (nmol/ml)	4759.2 ± 707.9	2813.9 ± 573.7	0.0687
	Lysine (nmol/ml)	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
血球算定	血小板数 (10 ⁴ /μl)	26.1 ± 2.3	20.1 ± 1.4	0.0972	

表 3.2 血液分析項目のうち健常者と糖尿病患者群で有意差の認められた項目

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。

—以下は、それに次ぐもの。

レンズ型の大きさ	血液分析項目	相関係数	有意性
20 mm ≤ L	HbA1	0.588	0.0443
	HbA1c	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
8 mm ≤ M < 20 mm	HbA1	0.939	0.0001
	HbA1c *	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 < 8 mm	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 1-G	-0.609	0.0355
	α 2-G	0.614	0.0338
	γ -G	0.697	0.0118
	A/G *	-0.714	0.0090

表 3.3 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

*は図4にグラフを示した。8 mm ≤ M < 20 mm に関しては5%以上のものも若干記した。

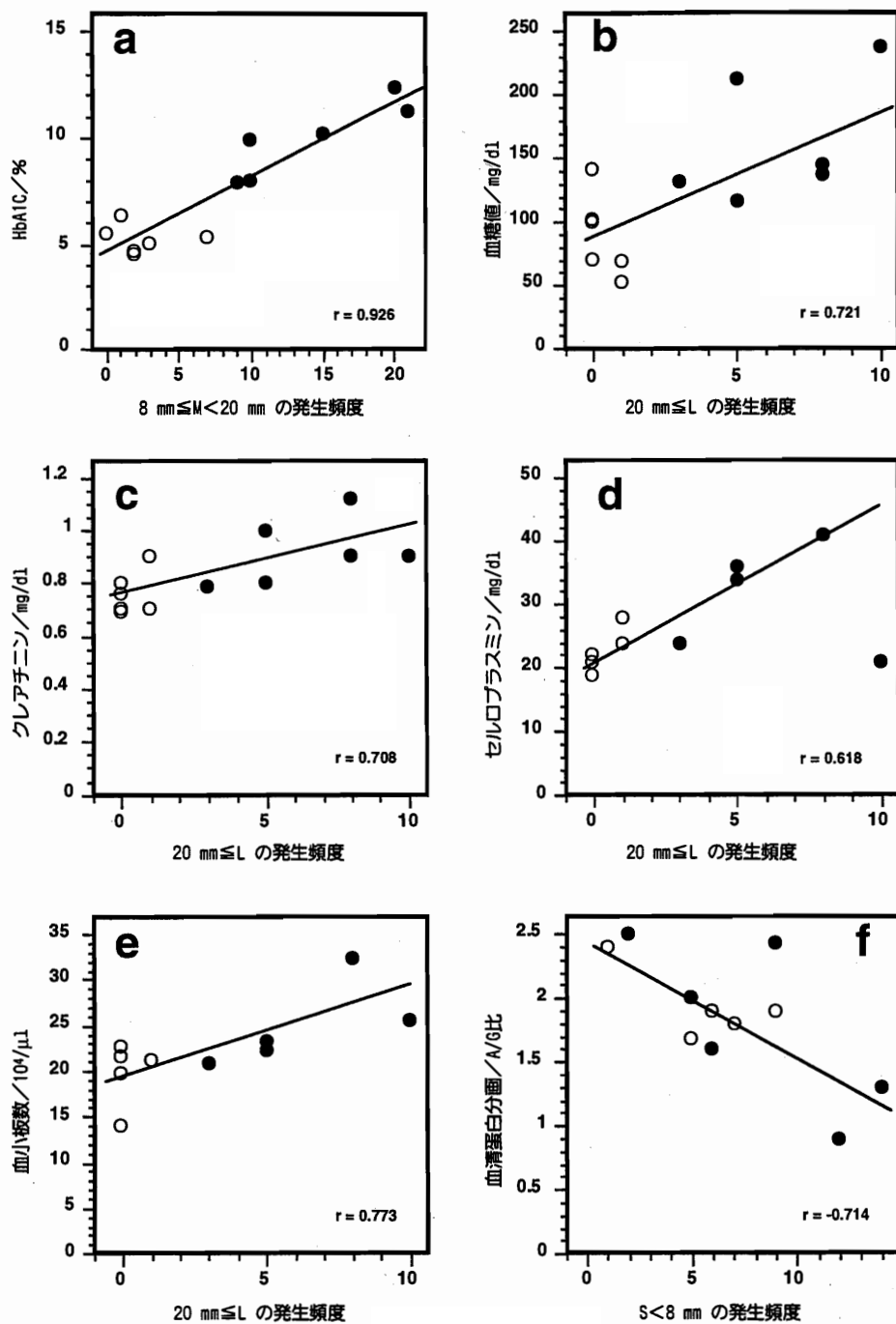


図 3.3 特異な形態の発生頻度と相関の認められた血液成分の関係

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: HbA1c濃度とMの発生頻度関係。HbA1c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。A1bの濃度増加により発生頻度は減少し、 γ -G、 α 1-G、 α 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。

レンズ型の大きさ	血液分析項目	t検定
20 mm ≤ 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
8 mm ≤ M < 20 mm	HbA1	0.0015
	HbA1C	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 < 8 mm	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

表 3.4 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

ここでは健常者群と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。

3.4 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する^{3,8)}。一方、健常群・糖尿病群を問わず、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0.001 vol%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^{3,3)}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軸方向の長さとおよび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 3.1)、Selawryら^{3,3)} Pivaら^{3,5)}の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 3.2 から健常群と患者群との間で8 mm以下(S)の小さな形態に関しては有意差がないが、8 mm以上20 mm(M)以下および20 mm以上(L)では顕著な有意差が示された。

図 3.1 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 2 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 3.1 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 3.3 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β1-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膵臓に存在する³⁾¹²⁾。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、いずれも健常群と比較し高値の傾向を示した。

一方、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あることから³⁾¹¹⁾、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。

今回、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 3.2 に示した

ように健常者群と患者群の血液間ではHbA1c、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 3.3）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HbA1c、HbA1c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 3.3 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 3.3 a, bから明らかのように、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20 mm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 3.3、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。

今回は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1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、本研究を発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1つの方法と我々は考えている。

臨床的な観点からは、この手法により極く僅かの血液により病気の診断が可能となれば患者の負担を大幅に軽減することが可能であり、臨床的意義にもつながるものと思われる。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

を逃げる事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。

3.5 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、0.5 vol% 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 8 mm 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、8 mm 以上 20 mm 未満（**M**）、20 mm 以上（**L**）のものは、HbA1、HbA1c、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 ± 1.4 、健常者群では 2.5 ± 0.63 、**L**は前者で 6.50 ± 0.67 、後者で 0.33 ± 0.13 であり、それぞれ検定の結果、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。

第3章の参考文献

- 3-1) Pfeiffer E: Kristalle. Orient-Occident-Verlag, Stuttgart (1930)
- 3-2) Nickel E: Die Reproduzierbarkeit der Sogenannten Empfindlichen Kupferchloridkristallisation. Bull Soc frib Sci Nat 57 : 65-179 , 1967-68
- 3-3) Selawry A und Selawry O: Die Kupferchlorid-Krystallisation in Naturwissenschaft und Medizin. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart (1957)
- 3-4) 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
- 3-5) 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
- 3-6) 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
- 3-7) 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. 臨床検査38: 972-973, 1994
- 3-8) 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
- 3-9) 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. 長寿科学総合研究 8 : 178-181, 1995
- 3-10) 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). submitted to J Tokyo Wom Med Coll 6,7: (1998)
- 3-11) 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. 長寿科学総合研究 8 : 182-188, 1995
- 3-12) 近藤俊之：SRL臨床検査ハンドブック.SRL, 東京 (1996)

第 4 章

第4章 総合結論

結晶の外形（晶癖）は環境の影響を受けるが分子構造は変わらない。血液を添加した水溶液から結晶を成長させ、添加した血液に含まれる現在までに知られている以外の特徴を抽出することが出来れば、医学の進歩に多少の貢献はできるであろう。塩化銅二水和物水溶液に微量の血液を添加し、水分を蒸発させながら析出させた水和塩化銅の形態が疾病に依存するとの指摘がヨーロッパにあるので、我々は追試をかねてそのメカニズムを追究している。

本研究で糖尿病を選んだ理由は、我国での糖尿病患者数は約600万人と推定され、さらに増加の傾向にあるからである。ここでは血液成分のうち糖尿病に関連のある項目のうち、含有窒素成分を中心に約90項目におよぶ定量分析を行い、結晶成長に与える因子との相関関係を解析した。

実験結果の信頼度を向上するためには、数多くの試料が必要となる。ここでは、 $3 \times 4 = 12$ 個の試料を同時に測定できるように工夫した結晶成長槽を作った。この結晶育成槽では、結晶成長過程の記録と計測と解析とがコンピュータにより行える。このため、短期間で過去の研究例との比較・検討をすることができた。しかし、第1章で述べた如く、温度の追従性には多少の難があった。また、結晶像の解析に時間を要することが明らかになった。これらは今後の研究課題として残った。

ここでは、塩化銅二水和物の水溶液に健常者と糖尿病患者の各6名から採った血液を *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、その形態（ハビット）を観察した。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、0.5 vol% の血液を添加しただけで、核生成は大幅に抑制され、健常者・糖尿病患者群を問わず一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。原子間力顕微鏡による表面観察の結果、無添加水溶液から成長した塩化銅二水和物の表面には微細な錐体構造が多数みられたが、溶媒中に血液を添加した場合には数少ない錐体が成長しており、巨視的（数10 mm）のみならず微視的（数100 nm）視点から明瞭な差異が認められた。

糖尿病患者から採取した血液を添加した溶液から成長したデンドライトでは、成長中心核近傍に、2つの弧状のデンドライトが重ね合わさり凸レンズ状の特異な形態が観察された。この際、長軸の直径が8 mm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た。この傾向は血液提供者が健常者・糖尿病患者の場合を問わず観察された。一方、8 mm以上20 mm未満 (**M**)、20 mm以上 (**L**) のものは、HbA1、HbA1c、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に依存し発生頻度が増加する傾向が認められた。**M**の発生個数は同時に実験した12個のシャーレ当たり患者群では 14.2 ± 1.4 、健常者群では 2.5 ± 0.63 、**L**は前者で 6.50 ± 0.67 、後者で 0.33 ± 0.13 であった。それぞれを定格 (t) 検定した結果、健常者・糖尿病患者群の間で有意差が存在し、重症度とには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が成長することが明らかとなった。

この研究の過程に於て、水和塩化銅の水和数に関して新しい知見を見いだした。即ち、この緑色の水和塩化銅は、安定した青色の2水塩とX線構造解析上は同一の構造であるものの、熱重量分析からは過剰の構造水が検出された。これから、付着水分子は格子中に含まれることが明らかとなった。XPSの深さ分析から、血液中の蛋白質が結晶表面と電子の授受を伴った化学吸着していることが示された。結晶内部の蛋白質の検出量が減少し結晶表面が関与しているように思われる。

以上、本研究により、水和塩化銅の結晶は血液を添加した水溶液中で成長させると、そ血液提供者の疾病の影響を受け成長形態を変えることが明らかとなった。本手法を発展させることで病気診断システムに応用することが可能と思われる、生体情報抽出に有用な方法論であることが示された。結晶析出機構の解明と共に今後、残された問題点の解決に挑みたい。

謝 辞

本研究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記し、ここに感謝の意を表す。なお、この研究の一部は厚生省長寿科学総合研究（94B1102）によって支援されたことを付記し、重ねて感謝の意を表す。

さらに著者の一人小川智哉は、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感謝の意を表す。糖尿病患者の採血では本学糖尿病センター 岩本安彦主任所長、三浦順之助練生助手を始め糖尿病センターの諸先生方に、健常者の採血では同大解剖学教室 松田隆子助手に、統計解析では同大衛生学公衆衛生学教室の清水 悟助手に協力戴いた。X線構造解析ではリガクX線研究所 城 勇始氏、熱分析では（株）リガクの岸 證氏、高橋太一郎氏に、原子間力顕微鏡では、（株）オリンパスの今井英輔氏にご尽力戴いた。

さらに慶應義塾大学理工学部 岸 富也教授、美浦 隆教授、同大機械科実習室 相原今朝雄氏、同大中央試験所 高岡義彦氏、テクノブレインズ 小石川 篤代表、精研硝子 戸井田邦夫代表取締役、日鉄エレックス 澄川清志氏、カーネルコンピュータ 河上 順司氏、宮津製作所 橋田嘉昭工場長、東洋インキ 中野 勝氏、子浩法律事務所 小林浩平弁護士、本学解剖学教室 松本寿美子研究補助員のご尽力を頂戴した。

なお、ご支援戴いた本学吉岡博光理事長、故吉岡守正学長、高倉公朋学長、解剖学教室 永野貞子教授、久保田くら名誉教授、降矢けい名誉教授、学習院 小野田三男名誉教授を始め本研究の遂行は諸氏の方々のご指導の賜物である。ここに心から御礼申し上げる次第である。

1998年3月28日

東京女子医科大学 芝田高志