PIXE 分析による毛髪ミネラル量とアトピー性皮膚炎発症との関連調査

山田知美[1]、高辻俊宏[2]、後藤祥子[3]、世良耕一郎[4]、中村 剛[5]、 野瀬善明[6]

[1]三重大学大学院医学系研究科
514-8507 三重県津市江戸橋 2-174

[2]長崎大学大学院水産・環境科学総合研究科
852-8521　長崎市文教町 1-14

[3]日本アイソトープ協会仁科記念サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

[4]岩手医大サイクロトロンセンター
020-0173 岩手県岩手郡滝沢村滝沢留が森 348-58

[5]中央大学理工学部
112-8551 東京都文京区春日 1-13-27

[6]熊本保健科学大学
861-5533 熊本県熊本市北区和泉町 325

1　はじめに

アトピー性皮膚炎は、工業先進国で増加の一途を辿る原因不詳の乳幼児に頻発する慢性疾患である。先進国特有の疾患でしかも近年増加を続けていることから、アレルギー体質と共に金属や工業化合物による環境汚染が重要な鍵を握っていると考えられている。

Nurmatov らはメタ分析により、有害なミネラルの過剰摂取や必須ミネラルの摂取不足とアレルギー疾患との関連を示唆する結果を示唆しているが、それらの研究デザインの質が低いので疫学的なエビデンスは弱いと述べている [1)]。

また、アトピー性皮膚炎の遺伝的・免疫学的メカニズムに関する研究は進められているものの [2)]、予防法や治療法の確立には至っていない。

そこで本研究は、母子の健康増進に 20 年以上に亘り貢献してきた福岡市の乳幼児健診事業に組み込む形で、アトピー性皮膚炎の病因と予防策を探索することを目的として実施した。生後 1 か月健診（産婦人科にて行われる）と 10 か月健診（小児科医により行われる）に、必要な検査を追加することにより、因果関係の探索を可能とするコホートデザインを設計した。アトピー性皮膚炎の診断は 10 か月健診において小児科医により成された。

体内ミネラル量を推定するマーカーとして、毛髪中ミネラル量を用いる。従来、体内ミネラル量の指標としては血液または尿が用いられてきた。しかしそれらは、検体採取時点から数日前までのミネラル量を反映するので、数ヶ月から数年前までのミネラル量との因果関係を研究する上ではあまり有効とはいえない[3,4]。一方、血中ミネラルは血中濃度に応じて毛髪に排泄され、一端毛髪に排泄されたミネラルはそこに固定され、血中や空気中に排泄されることはない。月1cm程度の率で伸びるので、毛髪ミネラル濃度は血中ミネラル量の経時的変動を記録することが報告されている[4,5]。毛髪は被検者に侵襲を与えることなく容易に採取でき、長期間保存しても変質しない。また、毛髪は血液や尿の約10～50倍のミネラルを含んでいることからも、体内のミネラル蓄積量の推定には都合が良い。

本研究の目的と研究デザインの全体像を図1に示す。まずは、体内のミネラル量が妊娠中の食習慣や生活習慣を反映することを前提として、「アトピー性皮膚炎に罹患する体質が母体内で形成されているかどうか」を検討した。

健常な母子の毛髪ミネラルの分布や測定の精度については、これまで第1報から第4報として報告してきた[6-9]。今回は、これら予備的解析の集大成として疫学応用を試み、アトピーリスク予測式を構成したので、その結果を報告する[10]。

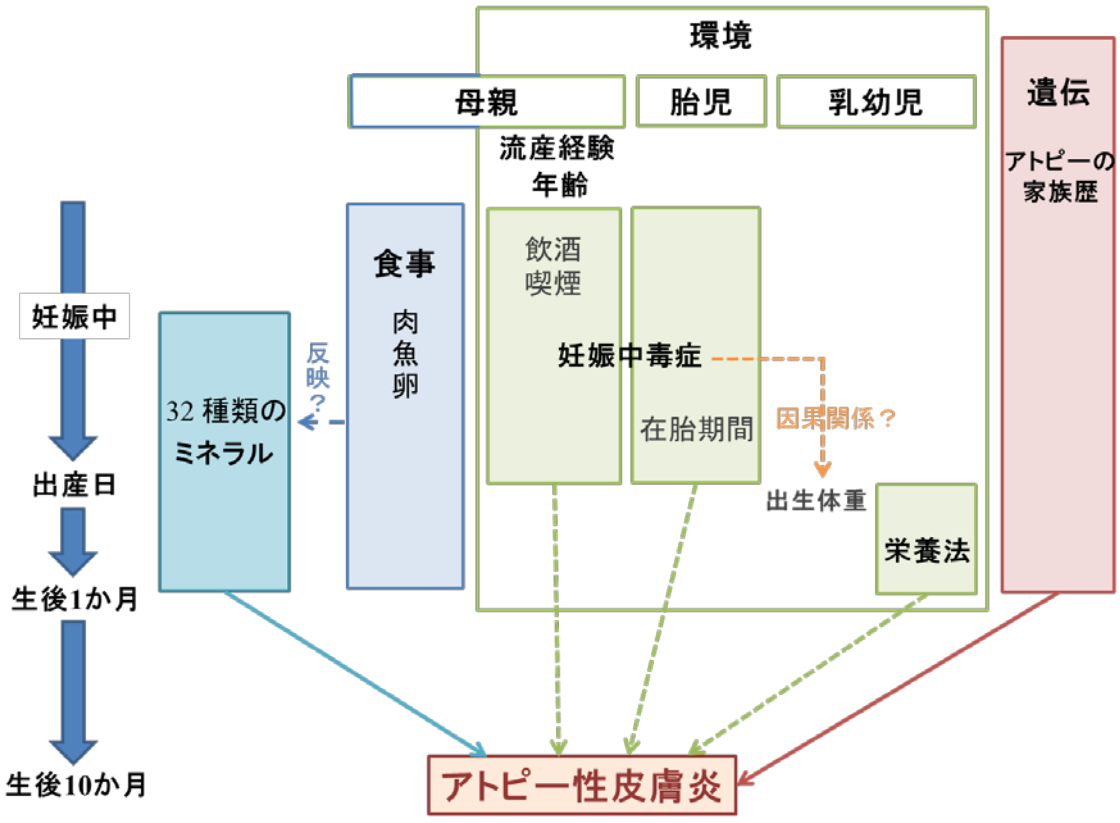


図1：研究デザインの全体像（2005年3月に九州大学医学研究院等倫理委員会にて承認）

2　方法

2.1　調査対象

福岡市医師会乳幼児健康診断の1か月健診と10か月健診双方を受診し、同意文書により調査協力が得られた母子を対象とした。　12施設の産婦人科と77施設の小児科の協力のもとで行った。

2.2　調査項目

本研究で扱うデータは、福岡市方式乳幼児健診票と、健診の際に採取した毛髪中のミネラルデータ、食習慣や家族病歴等に関するアンケートの記録である。

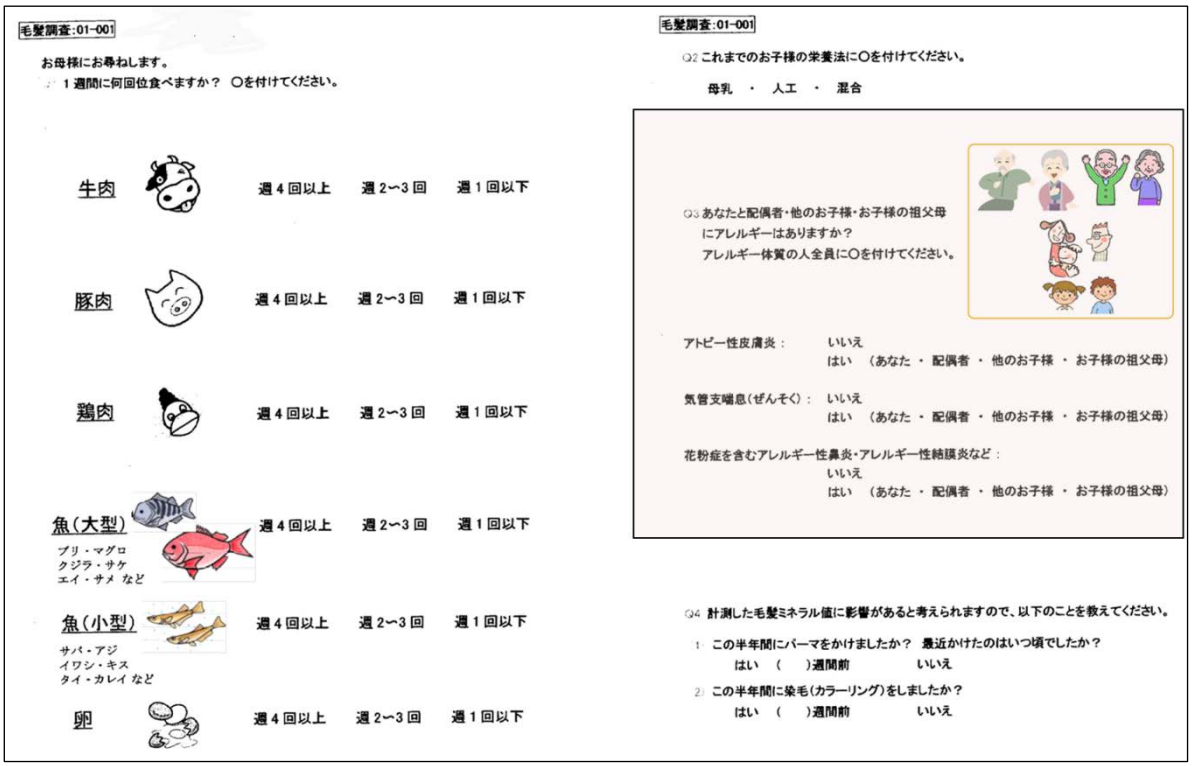
福岡市方式乳幼児健診は、母親が記載する受診票とアンケート、医師が記載する診査結果票から成る用紙を用いて行われ、その内容は、身体発育値、診察所見など、妊娠中の母の健康状態、育児感情、育児支援の実態、喫煙、飲酒、母親の嗜好など、100 項目以上から成る。

10 か月健診票には皮膚の異常に関する項目もあるが、主要評価項目であるアトピー性皮膚炎に関しては、日本皮膚科学会「アトピー性皮膚炎定義・診断基準」[11] に基づき、湿疹とは区別して厳密に診断した。

通常の健診に追加する作業は、1 枚のアンケートの記入と、母子からの 3〜6 本の毛髪採取である。

アンケートでは、食習慣に関する簡単な質問（食物の摂食頻度を3段階で回答）と、アトピー性皮膚炎発症のリスクファクターと考えられるアレルギー疾患の家族歴（両親・兄弟・祖父母）、およびミネラルの測定値に影響を与える可能性がある毛髪の美容処置（パーマ・カラーリング）について尋ねた（図2）。

今回の報告では、10か月健診時のアトピー性皮膚炎の診断を応答変数、1か月健診時の検査成績と毛髪モネラル量をリスク要因として統計解析を行った。


毛髪調査:01-001

お母様にお尋ねします。

1 週間に何回位食べますか？ ○を付けてください。

牛肉　週４回以上　週２〜３回　週１回以下

豚肉　週４回以上　週２〜３回　週１回以下

鶏肉　週４回以上　週２〜３回　週１回以下

魚（大型）　ブリ・マグロ　クジラ・サケ　エイ・サメ など　週４回以上　週２〜３回　週１回以下

魚（小型）　サバ・アジ　イワシ・キス　タイ・カレイ など　週４回以上　週２〜３回　週１回以下

卵　週４回以上　週２〜３回　週１回以下

毛髪調査:01-001

Q2 これまでのお子様の栄養法に○を付けてください。

母乳　・　人工　・　混合

Q3 あなたと配偶者・他のお子様・お子様の祖父母にアレルギーはありますか？
アレルギー体質の人全員に○を付けてください。

アトピー性皮膚炎：　いいえ　はい　（あなた ・ 配偶者 ・ 他のお子様 ・ お子様の祖父母）

気管支喘息（ぜんそく）：　いいえ　はい　（あなた ・ 配偶者 ・ 他のお子様 ・ お子様の祖父母）

花粉症を含むアレルギー性鼻炎・アレルギー性結膜炎など：　いいえ　はい　（あなた ・ 配偶者 ・ 他のお子様 ・ お子様の祖父母）

Q4 計測した毛髪ミネラル値に影響があると考えられますので、以下のことを教えてください。

1. この半年間にパーマをかけましたか？　最近かけたのはいつ頃でしたか？
　はい　（　）週間前　　いいえ

2. この半年間に染毛（カラーリング）をしましたか？
　はい　（　）週間前　　いいえ

図2:アンケート

2.3　毛髪の採取・標本作製・ミネラル量の測定

毛髪ミネラルの計測にはproton-induced x-ray emission（PIXE分析：X線発光分光）[12] を用いた。PIXE分析は、環境科学・工学・医学・考古学等の幅広い分野で利用されている微量元素分析法である。少量の毛髪から高感度に、多元素同時分析が非破壊で出来る。

毛髪は、酒精綿で拭いたハサミを用いて、根本近くから3~6本採取した。母親については、うなじ部分から、毛髪の長さが5cm程度なら6本、10cm程度なら4本、15cm程度なら3本を目安とし、乳児については、採取部位は指定せず、測定に必要な2cm以上の毛髪を6本以上採取した。各医療機関から事務局に郵送された毛髪は、連結可能匿名化を行い長崎大学に送付した。長崎大学では、毛髪をアルコール消毒後、約2cm長にカットし、重なり合わないよう平行に3本以上プレートに貼り付けてPIXE測定用検体を作製した。

検体は岩手医科大学サイクロトロンセンターに送付し、PIXE法による分析を行った。PIXE分析結果は世良氏により開発されたソフトウェア[13), 14)] を用いて解析され、毛髪中32種類のミネラル濃度が得られた。

2.4　統計解析

アトピー性皮膚炎と関連の強いミネラルを、ロジスティックモデルを用いて同定した。その際、非正規分布のミネラルや未検出割合が（全体の2.5割以上と）高いミネラルについては、対数変換・平方根変換・4段階のカテゴリー分類のうち、最善と思われる変換を施した。また、アトピー性皮膚炎の家族歴（両親・兄弟姉妹・祖父母のいずれかにアトピー性皮膚炎が存在するか）を、重要な共変量と考えモデルに加えた。

家族歴を調整したロジスティック回帰分析の結果有意（$P<0.05$）となったミネラルについて、母子それぞれの濃度とアトピー発症との関連を分析し、アトピーの予測に一層有効な合成変数を構成した。さらに、モデルの予測能力を評価するためにReceiver operating characteristic curve (ROC) 分析を行った。

アトピー性皮膚炎の発症と環境要因（背景および胎児の発育環境）との関連は、マンテル・ヘンツェル検定法と家族歴を調整したロジスティックモデルとを用いて解析した。

統計解析には、SAS 9.1.3を用いた。

3　結果

3.1　調査対象

平成17年11月～平成18年11月に、調査協力施設の産婦人科にて1か月健診を受診した母子1036組から同意が得られた。そのうち10か月健診を受診した母子は842組（81.3%）であった。アトピー性皮膚炎の診断結果が不明な7名と、アトピー性皮膚炎の家族歴について回答が得られなかった1名を除外し、最終的に834組（1668人）を本研究の解析対象とした。生後10か月時にアトピー性皮膚炎と診断されたのは、834例中41例（4.91%）であった。

3.2　調査対象者の背景因子および発育環境因子

1か月健診票の中から、調査対象者の背景因子と胎児の発育環境因子を選び出した（表1）。妊娠中に異常が確認された例は、出血が3.4%、妊娠中毒症が0.9%、糖尿病が0.4%と少なかった。アトピー性皮膚炎との関連を検討した結果、家族歴で調整して5%有意となった因子は無かった。

表1:アトピー性皮膚炎発症と健診項目との関係

	対象者全員		10か月健診でアトピーでないと診断		10か月健診でアトピーと診断		P値*
	N		N		N		
母親の年齢	830	30.70±4.35	789	30.70±4.33	41	30.71±4.76	0.921
流産経験	133	15.95	126	15.89	7	17.07	0.840
妊娠中の経過							
正常	729	91.58	689	91.26	40	97.56	0.157
出血	27	3.39	26	3.44	1	2.44	0.729
妊娠中毒症	7	0.88	7	0.93	0	0	0.536
糖尿病	3	0.38	3	0.4	0	0	0.686
妊娠中の喫煙	48	5.76	47	5.93	1	2.44	0.350
妊娠中の飲酒	319	38.48	301	38.2	18	43.9	0.465
在胎週数	831	39.08±1.35	790	39.06±1.35	41	39.44±1.21	0.077
性別 男	411	49.28	387	48.8	24	58.54	0.224
女	423	50.72	406	51.2	17	41.46	
出生体重	812	3038±342	771	3039±345	41	3016±288	0.774
栄養法							
母乳	529	63.51	499	63.01	30	73.17	0.389
ミルク	18	2.16	17	2.15	1	2.44	
混合	286	34.33	276	34.85	10	24.39	

***: アトピー性皮膚炎家族歴で調整したP値**

3.3　毛髪ミネラル量とアトピー性皮膚炎発症との関係

母子共に5%未満の人にしか検出されなかったCdとBaは、解析から除外した。

表2 は、アトピー性皮膚炎の発症を目的変数とし、アトピー性皮膚炎の家族歴と毛髪ミネラル濃度を説明変数としたロジスティック回帰分析の結果である。B.xxは乳児のミネラルを、M.xx は母親のミネラルを表す。遺伝要因を調整して5%有意となったミネラルは、B.SrとB.Seであった。これらは、母親についてもP値が10%程度と低かった。Srについては母子の対数の差（すなわち比の対数）、Seについては母子の4分割スコアの和を構成すれば、アトピー性皮膚炎発症の判別に、より一層有効であることが示唆された（図3、表3）。

また、家族歴に関して、母親と兄弟姉妹がアトピー性皮膚炎かどうかは有意なリスクファクターであったが、父親との間には有意な関連は認められなかった（表3）。

表2：アトピー性皮膚炎発症と30種類の毛髪ミネラルとの関係

P値#	子	母
<0.05	Sr, Se	
0.05～0.10	Na, Cl	Se, Si, Al
0.10～0.20	Br, Rb, Al, K, Pb	Sr, Cr
0.20～1.00	Mn, As, Co, Cu, Mg, Ca, Mo, Zn, S, Si, V, Fe, Ag, P, I, Ni, Ti, Nb, Hg, Ga, Cr	Br, Mg, Ni, Na, Rb, V, As, Nb, Co, Zn, S, Ca, Mn, Ga, Pb, K, P, Hg, Cu, I, Fe, Ag, Cl, Mo, Ti

#: アトピー家族歴で調整したP値

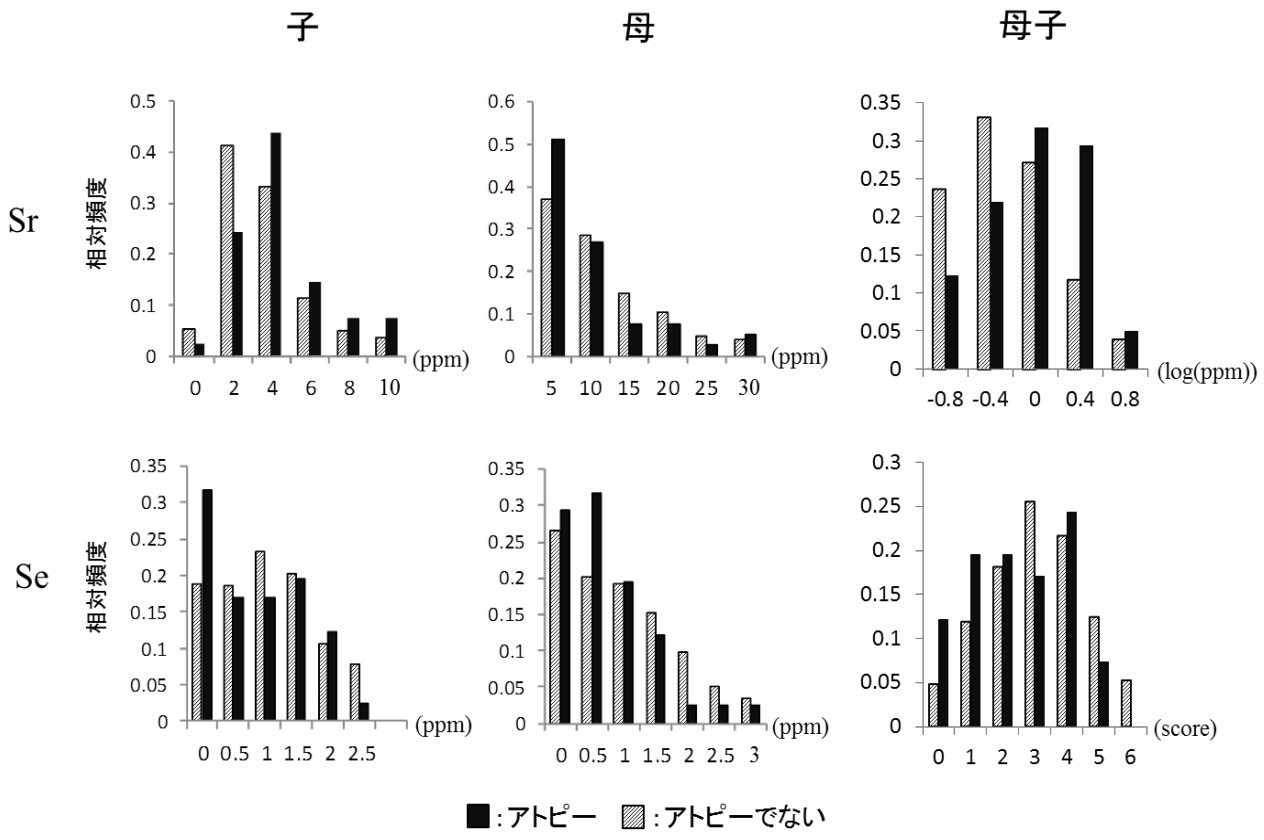


図3:SrとSeの分布

表3:アトピー性皮膚炎発症とSr, Seとの関係

変数	単変量解析	アトピー性皮膚炎の家族歴で調整した場合		
	P値	回帰係数	標準誤差	P値
アトピー性皮膚炎の家族歴				
家族の誰か	0.001			
母親	0.009			
父親	0.138			
兄弟姉妹	0.002			
祖父母	0.391			
B.Sr（対数変換）	0.032	0.52	0.23	0.023
M.Sr（対数変換）	0.110	−0.27	0.17	0.115
log(B.Sr) − log(M.Sr)	0.006	0.42	0.15	0.005
B.Se（4段階）	0.054	−0.31	0.16	0.048
M.Se（4段階）	0.102	−0.27	0.15	0.062
B.Se + M.Se	0.011	−0.30	0.11	0.006

SrとSeの合成変数および家族歴の3要因を用いてアトピー性皮膚炎発症を予測する式は、

$$log\frac{P(X)}{1-p(X)} = -2.17 + 1.19 \times 家族歴 + 0.44 \times D_log(Sr) - 0.30 \times Sum(Se)$$

ただし、家族歴 $= \begin{cases} 1 \text{（父母・兄弟姉妹・祖父母のうち誰かがアトピー）} \\ 0 \text{（父母・兄弟姉妹・祖父母の全員アトピーでない）} \end{cases}$

$D_log(Sr) = \log(B.Sr) - \log(M.Sr)$,

$Sum(Sr) = Q(B.Se) + Q(M.Se)$, （Q(x)は四分位数に基づくカテゴリー変量）

と導かれた。感度（アトピー症例をアトピーと正しく判定する割合）は65.9%、陽性的中率（アトピーと判定されたうち実際にアトピーを発症した割合）は10.3%、陰性的中率（アトピーではないと判定されたうち実際にアトピーを発症しなかった割合）は97.6%であった（図4）。アトピーの家族歴のみでモデルを構成した場合の感度は41.5%であるが、SrとSeの毛髪ミネラル情報を追加すると、感度は65.9%となり、相対危険度も2.4から4.2に上がっている（表4）。

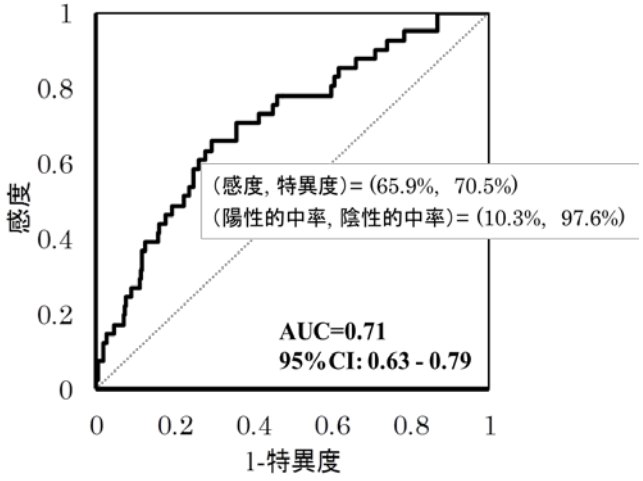


図4:ROC曲線

表 4:

(a) アトピーの家族歴のみを説明変数とした場合

		アトピー性皮膚炎発症			
		発症	非発症	計	
家族歴	有	17	173	190	PPV 8.90%
	無	24	620	644	NPV 96.30%
	計	41	793	834	
		感度 41.50%	特異度 78.20%		RR=2.4

(b) 家族歴と毛髪ミネラルを説明変数とした場合

		実際（アトピー性皮膚炎発症）			
		発症	非発症	計	
予測（家族歴+Sr+Se）	発症	27	234	261	PPV 10.30%
	非発症	14	559	573	NPV 97.60%
	計	41	793	834	
		感度 65.90%	特異度 70.50%		RR=4.2

4 考察

アトピー性皮膚炎の予防策を探索する疫学調査を行った。生後 10 か月のアトピー性皮膚炎に関与する要因を、生後 1 か月の健診時に得られたデータから探索するコホート研究により、因果関係を推論した。

疫学調査においては、アンケート方式での自己申告による診断が殆どであるが、バイアスが大きく、しばしば診断の信頼性が問題視される。本調査では、小児科医が日本皮膚科学会「アトピー性皮膚炎定義・診断基準」に基づき、湿疹とは区別して厳密に診断を行ったので、信頼性は高い。

アトピー性皮膚炎のリスクを測るマーカーには、毛髪中のミネラル量を用いた。微量ミネラル元素の測定は ICP-AES 法（誘導結合プラズマ発光分析）や ICP-MS 法（誘導結合プラズマ質量分析）により ppq（parts per quadrillion, 1000 兆分の 1 g）レベルで分析可能だが、これらの化学分析には 0.1g～1.0g の大量の毛髪が必要となる。今回著者らが用いた PIXE 法では、2cm 以上の毛髪が 3 本以上あれば測定は可能であり、PIXE 法は乳幼児の毛髪を測定する唯一の方法といえる。

本調査では、世界で初めて母子の毛髪ミネラル量の分布を得た。PIXE 法による毛髪ミネラル測定値の標準的解釈が定まっていないため、現在著者らは、個体内（毛髪間および毛髪内）のバラツキを考慮した解析も実施中である[15]。個体間と個体内のバラツキをどのように補正するかは、統計解析上の今後の課題である。

本研究により、疫学的にはSrとSeがアトピー性皮膚炎の有力な予測因子であるという所見が得られた。Srは母子で逆の影響を、Seは母子で同様の影響を示しており、それらの合成変数がアトピー性皮膚炎の判別には有効な指標であることを実証した。Seについては、抗酸化力・免疫力を高める働きを持ち、アレルギー疾患との関連性が報告されている[16]。これまでの報告に比べ、精度の良い予測モデルを得ることができた[17]。

現在、初期調査の参加者をコホート集団として、6年後の追跡調査を実施中である。初期調査で作成した予測モデルの精度を確認すると共に、より精度の良い数理モデルを構成できれば、アトピー性皮膚炎原因研究の糸口となることが期待される。

謝辞

本調査に当たり、データ収集へのご協力と、適切なご助言を賜りました、福岡市産婦人科医会、福岡地区小児科医会、福岡市保健福祉局、九州大学医学部小児科の先生方に心より感謝申し上げます。また、試料をご提供くださいました福岡市の1,036組の母子に心より感謝致します。

参考文献

1) Nurmatov U, Devereux G, Sheikh A. Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: systematic review and meta-analysis. J Allergy Clin Immunol 127(3), 724-33.e1-30, 2011.

2) Bieber T. Atopic Dermatitis. N. Engl. J. Med. 358, 1483-1494, 2008.

3) Bland J. Hair tissue mineral analysis: an emergent diagnostic technique. New York: Thorsons Publishers Inc; 1984.

4) Jenkins DW. Biological monitoring of toxic trace metals. US Environmental Protection Agency, EPA-6000/S3-80-90:10, 1981.

5) Gibson RS. Hair as a biopsy material for the assessment of trace element status in infancy. A review. J Hum Nutr 34(6), 405–16, 1980.

6) 絹川直子, 伊藤じゅん, 前田知子, 高辻俊宏, 中村剛, 世良耕一郎, 野瀬善明. PIXEによる福岡市乳幼児健診の毛髪分析（第1報）-母親の出産後1か月及び10か月の比較-, NMCC共同利用研究成果報文集14, 2007.

7) 吉田裕志, 絹川直子, 後藤祥子, 前田知子, 高辻俊宏, 中村剛, 世良耕一郎, 野瀬善明. PIXEによる福岡市乳幼児健診母子の毛髪分析（第2報）母子の出産後1か月及び10か月の比較, NMCC共同利用研究成果報文集15, 2008.

8) 黒田祥平, 今泉宏, 後藤祥子, 山田知美, 高辻俊宏, 中村剛, 世良耕一郎, 野瀬善明. PIXEによる福岡市乳幼児健診母子の毛髪分析（第3報）PIXE測定の精度の調査, NMCC共同利用研究成果報文集16, 2009.

9) Todd Saunders, 黒田祥平, 山田知美, 後藤祥子, 高辻俊宏, 中村剛, 世良耕一郎, 野瀬善明. PIXEによる福岡市乳幼児健診母子の毛髪分析（第4報）PIXE測定の精度の調査, NMCC共同利用研究成果報文集17, 2010.

10) Yamada T, Saunders T, Kuroda S, Sera K, Nakamura T, Takatsuji T, Hara T, Nose Y, Fukuoka Assoc. Obstetr. Gynecol. and Pediatr. Cohort study for prevention of atopic dermatitis using hair mineral contents. J. Trace Elem. Med. Bio. 27, 126-131, 2013.

11) 日本皮膚科学会「アトピー性皮膚炎の定義・診断基準」（日本皮膚科学会雑誌104 (1): 68-69, 1994）

12) PIXE: A Novel Technique for Elemental Analysis. S.A.E. Johansson and J.L. Cambell, John Wiley & Sons, New York (1988)

13) Sera K, Futatsugawa S. Personal computer aided data handling and analysis for PIXE. Nucl Instrum Methods B109/110, 99-104, 1996.

14) Blaauw JL, Campbell JL, Fazini´c S, Jakˇsi ´c M, Orlic I, Van Espen P. The 2000 IAEA intercomparison of PIXE spectrum analysis software. Nucl Instrum Methods Phys Res B189, 113-22, 2002.

15) Saunders T, Kuroda S, Makie T, Sera K, Yamada T, Nakamura T, Nose Y. Effect of biological variability incidental to PIXE-Hair minerals on risk analysis of atopic dermatitis. Biometrie und Medizinische Informatik Greifswalder Seminarberichte 18, 127-139, 2011.

16) Norton RL, Hoffmann PR. Selenium and asthma. Mol Aspects Med 33, 98-106, 2012.

17) Bergmann RL, Edenharter G, Bergmann KE, Guggenmoos-Holzmann I, Forester J, Bauer CP, et al. Predictability of early atopy by cord blood-IgE and parental history. Clin Exp Allergy 27, 752-60, 1997.

Cohort study for prevention of atopic dermatitis using hair mineral contents

T.Yamada[1], T. Takatsuji[2], S. Goto[3], K. Sera[4], T. Nakamura[5] and Y. Nose[6]

[1] Mie University Graduate School of Medicine
2-174 Edobashi, Tsu, Mie 514-8507, Japan

[2] Nagasaki University Graduate School of Environmental Studies
1-14 Bunkyomachi, Nagasaki 852-8521, Japan

[3]Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

[4]Cyclotron Research Center, Iwate Medical University
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0173, Japan

[5] Chuo University Graduate School of Science and Engineering
1-13-27 Kasuga, Bunkyoku, Tokyo 112-8551, Japan

[6] Kumamoto Health Science University Graduate School
325 Izumimachi, Kitaku, Kumamoto 861-5533, Japan

Abstract

We undertook a cohort study to determine the association between hair mineral content and the onset of atopic dermatitis (AD) in infants. Eight hundred and thirty-four mother–infant pairs, who donated hair samples during one and ten-month health checkups, had their samples analyzed by proton induced X-ray emission (PIXE) for 32 mineral concentrations, and these mineral concentration data together with their AD family history were statistically examined for any relationships between them. Results indicated that of all minerals, only selenium (Se) and strontium (Sr) showed statistically significant associations for infants, while the same two elements were only marginally significant for mothers. Se deficiency in either infant or mother increased the AD risk. A Sr deficiency in infants increased AD risk, while the same deficiency in mothers decreased the risk. To predict the probability of AD development using this data, we performed logistic regression analysis, which provided a sensitivity of 65.9%, a specificity of 70.5%, a positive predictive value (PPV) of 10.3%, a negative predictive value (NPV) of 97.6% and a relative risk (RR) of 4.2, all far better than any corresponding figures explicitly mentioned in previously published papers.