

糖尿病患者における頭髪中微量元素と  
窒素及び炭素安定同位体比の分析

－臨床応用をめざして－

平成 30 年度

北海道医療大学大学院薬学研究科

堀田 洋平

## 略語表

BMI	:	body mass index (体格指数)
eGFR	:	estimate glomerular filtration rate (推定糸球体濾過量)
GFR	:	glomerular filtration rate (糸球体濾過量)
HbA1c	:	hemoglobin A1c (ヘモグロビン A1c)
ROS	:	reactive oxygen species (活性酸素)
SOD	:	superoxide dismutase (スーパーオキシドジスムターゼ)

## **Abstract**

### **Objective**

Essential and non-essential elements in the scalp hair of diabetic subjects were compared with those of control subjects, and the correlations among those levels and HbA1c or estimated glomerular filtration rate (eGFR) were investigated.

Assessment of diabetics was investigated by quantification of essential elements and stable isotope ratios of carbon ( $\delta^{13}\text{C}$ ) and nitrogen ( $\delta^{15}\text{N}$ ) in the scalp hair, and the factors most related to the onset of diabetes identified by statistical analysis.

### **Methods**

Essential elements and  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values in the hair of diabetics and controls were quantified using ICP-MS and IR-MS.

### **Results and Conclusion**

The levels of Zn, Cu and Cr in the diabetic subjects ( $\text{HbA1c} \geq 7$ ) were significantly lower than those in the control subjects. The concentrations of not only Zn, Cu and Cr but also Fe decreased significantly with increases in HbA1c, and that of Mg tended to decrease. In contrast, the concentration of As tended to increase with increases in HbA1c. The eGFR, calculated from serum creatine concentration, was positively correlated with HbA1c, in spite of diabetic nephropathy. The eGFR of diabetic subjects could lead to overestimations of the glomerular filtration rate.

The Ca, Mg and Na concentrations in female controls were higher than those in male controls. Irrespective of gender, the N and K concentrations in diabetics were higher than those in controls, while the Ca, Mg, Zn, Cu, Cr and Fe concentrations in diabetics were lower than those in controls. The  $\delta^{13}\text{C}$  value was significantly lower in male diabetics than in male controls. The Ca, Mg, Cr and Fe concentrations in males were positively correlated to the  $\delta^{13}\text{C}$  value and negatively correlated to the HbA1c value, whereas the Ca, Zn and Fe concentrations in females were positively correlated to the  $\delta^{13}\text{C}$  value, with no correlations to HbA1c value. Whether the subject was a diabetic or not could be determined on the basis of Zn, Cr and Na concentrations for males and Zn and Fe concentrations for females.

## 目次

序論 .....	1
第1章 糖尿病患者と健常人の頭髪中元素の比較	
第1節 緒言 .....	7
第2節 実験方法	
第1項 試料 .....	8
第2項 測定方法 .....	10
第3項 解析方法 .....	11
第3節 結果 .....	14
第4節 考察 .....	17
第2章 糖尿病患者と健常人の頭髪中の元素濃度及び安定同位体比の多変量 解析	
第1節 緒言 .....	21
第2節 実験方法	
第1項 試料 .....	23
第2項 測定方法 .....	26
第3項 データの解析方法 .....	26
第3節 結果	
第1項 糖尿病患者と健常人の頭髪中の安定同位体比と元素濃度 .....	31
第2項 主成分分析 .....	32
第3項 多重ロジスティック回帰分析 .....	33
第4節 考察 .....	36
総括 .....	40
謝辞 .....	42
引用文献 .....	43

## 序論

糖尿病は高血糖を主徴とする慢性の代謝障害である。国民健康・栄養調査（2016）によると、我が国の糖尿病患者は約 1000 万人、予備軍を併せると 2000 万人と推定されている。糖尿病は 1 型糖尿病、2 型糖尿病、その他の病型に分類され、1 型糖尿病は先天的又は後天的に膵臓の  $\beta$  細胞が破壊されることによるインスリンの分泌不全が原因である。そのため治療にはインスリンが用いられ、強化インスリン療法が基本となる。2 型糖尿病は、インスリンの分泌低下とインスリン抵抗性により生じた糖代謝異常が原因である。

1) 糖尿病患者は高血糖により種々の慢性合併症を発症するが、その合併症は大きく細小血管障害と大血管障害に分類される。細小血管障害には、糖尿病の三大合併症である糖尿病性腎症、糖尿病性網膜症及び末梢神経障害などがあり、大血管障害には心筋梗塞、脳梗塞、末梢動脈疾患などがある。糖尿病の重要な検査項目の 1 つに HbA1c 値がある。HbA1c 値は赤血球に含まれるヘモグロビンに糖が結合した糖化蛋白量であり、過去 1~2 ヶ月の平均血糖値を表す。HbA1c 値は血糖値のスクリーニングや血糖コントロールの指標として診断に用いられる。<sup>2)</sup> 日本糖尿病学会では合併症予防のための管理目標値として、HbA1c 値を 7%未満にすることを推奨している。<sup>2)</sup> 推定糸球体濾過率 (eGFR) は、糸球体濾過率 (GFR) に代わる腎機能の簡便な指標として、腎症のスクリーニングに汎用されている。GFR (eGFR) は、糖尿病の進行に伴って一般的には減少するが、糖尿病性腎症の初期には、過剰濾過 (hyperfiltration) を呈する場合が多い。<sup>3,4)</sup>

細小血管障害や大血管障害の発症や増悪には、活性酸素 (ROS) が関与する。<sup>5)</sup> 高血糖により ROS が増加すると、酸化ストレスが惹起される。その結果、糖尿病などの慢性疾患が引き起こされ、さらには網膜症や腎症などの合併症の原因となる。<sup>6)</sup> ROS の 1 つであるスーパーオキシドアニオンラジカルは、スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により過酸化水素に代謝され、過酸化水素はさらにカタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼにより代謝を受けて無毒化される (Fig. 1)。SOD は Zn、Cu あるいは Mn を補因子として含み、カタラーゼとグルタチオンペルオキシダーゼは Fe と

Se をそれぞれ補因子として含む。<sup>7)</sup> これらの酵素は産生した ROS を無毒化することで酸化ストレスを軽減する。一方、Fe や Cu が生体内に過剰に存在すると、これらを触媒とするフェントン反応が進行し、この反応により過酸化水素から毒性の高いヒドロキシラジカルが産生することから、酸化ストレスが増加する。<sup>7)</sup>

微量元素は ROS の消去の他に、インスリンの生合成と分泌及びその感受性と抵抗性にも深く関与する (Fig. 1)。微量元素の欠乏は耐糖能異常を引き起こし、さらに糖尿病合併症の進展に関与する。<sup>8,9)</sup> インスリン抵抗性とは組織のインスリン感受性が低下した状態であり、Cr や Mg の欠乏はインスリン抵抗性を惹起する。<sup>8,10)</sup> Cr<sup>3+</sup>はインスリン作用に必要なオリゴペプチドであるクロモジュリンに結合し、インスリン受容体のチロシンキナーゼを活性化させることで血糖値を下げる。<sup>11)</sup> 一方、Zn はインスリンの生合成に関与するとともに、膵臓の β 細胞に貯蔵されているインスリンを安定化に関与する。<sup>12)</sup> また、Zn は膵臓の β 細胞からのインスリン分泌と肝臓での代謝にも重要な役割を担っている。<sup>12)</sup> 即ち、Zn は亜鉛トランスポーター (ZnT8) により膵臓の β 細胞からインスリンと共に分泌され、分泌された Zn は肝臓でのインスリンの代謝を抑制することで、末梢血中のインスリン濃度を高く維持する。<sup>13)</sup> Mn もインスリンの合成や分泌に必要であり、糖代謝に関与する。<sup>8,14)</sup> Doddigarla ら<sup>6)</sup> は糖尿病患者の血清中の Cr、Zn、Mg 濃度及び SOD 活性を測定し、HbA1c 値と Cr 濃度あるいは SOD 活性との間に、負の相関があると報告している。

糖尿病の発症には、Fig. 1 に示した元素 (Zn、Cu、Cr、Fe、Mn、Se 及び V) の他に Ca、Mg などの元素と関連することが報告されている。<sup>8,9,14-20)</sup> これらの他にも糖尿病と微量元素に関する研究報告があるが、そのなかで糖尿病患者の頭髪中 Mg、Zn 及び Cr 濃度が、健常人よりも低いとする報告が多い。<sup>21)</sup> また、糖尿病患者の頭髪中の Pb、Cd、As などの有害元素濃度が健常人よりも高く、これらの有害元素濃度と糖尿病の発症との間に何らかの関連が示唆されている。<sup>17)</sup>

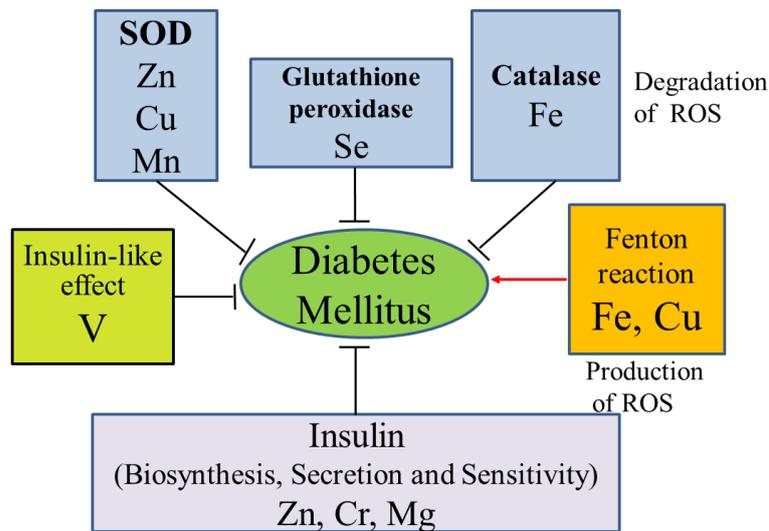


Fig. 1. Relation between Trace Elements and Diabetes Mellitus.

ヒトの頭髪は簡便かつ非侵襲的に採取でき、頭髪中の成分は生物化学的に安定である。血液や尿から得られる情報は主に採血・採尿時の生体情報であるが、頭髪は1ヶ月に1cm程度伸長することから、頭髪からは血液や尿より長い期間の生体情報を得ることが可能である。<sup>21,22)</sup> 即ち頭髪は慢性的な生体情報を得ることができる生体試料であり、微量元素や後述の安定同位体を測定することにより、栄養状態の推定や覚せい剤乱用などの診断に利用されている。<sup>21-28)</sup> 近年、頭髪成分の分析は、糖尿病、小児自閉症、心疾患、一部の癌などの診断への応用が検討されている。<sup>21)</sup>

頭髪中のCaとMg濃度は男性よりも女性で高く、その他の頭髪中の元素についても性差が報告されている。<sup>29,30)</sup> 一方、糖尿病の発症率は男性が女性よりも高い。<sup>31,32)</sup> 頭髪中元素濃度の性差が糖尿病発症の性差と関連することが予想された。しかし、糖尿病患者の頭髪中元素濃度を男性と女性を分けて調査した報告はこれまで見当たらない。

自然界における質量数の多い安定同位体の存在比は著しく小さい。ベレムナイトの化石 (Pee-Dee Belemnite: PDB) が炭素安定同位体の国際基準物質として利用されるが、含有する<sup>13</sup>Cはわずか1.1056%で、残りの

98.8944%は  $^{12}\text{C}$  である。一方、窒素安定同位体の国際標準物質は、大気中の窒素ガスであるが、含有する  $^{15}\text{N}$  は 0.3663%で、残りの 99.6337%は  $^{14}\text{N}$  である。このため、これらを同位体比 ( $R: ^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ ,  $^{15}\text{N}/^{14}\text{N}$ ) で表記した場合には値が極めて小さく、物質間での同位体比の差が分かりにくい。この微小な差を分かりやすくするため、目的とする試料中の安定同位体比は下記のように国際標準物質との相対千分率(‰)とし、対象とする質量数の大きい同位体の元素記号に  $\delta$  をつけて、 $\delta^{13}\text{C}$  や  $\delta^{15}\text{N}$  などと表記する。

$$\delta^{15}\text{N} = [ \text{試料中の } (^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) / \text{標準物質中の } (^{15}\text{N}/^{14}\text{N}) - 1 ] \times 1000$$

$$\delta^{13}\text{C} = [ \text{試料中の } (^{13}\text{C}/^{12}\text{C}) / \text{標準物質中の } (^{13}\text{C}/^{12}\text{C}) - 1 ] \times 1000$$

ヒトを中心にした食物連鎖と窒素安定同位体比 ( $\delta^{15}\text{N}$ ) と炭素安定同位体比 ( $\delta^{13}\text{C}$ ) の関係を Fig. 2 に示す。生産者である植物の  $\delta^{15}\text{N}$  値は最も低く、栄養段階が上がるに伴い  $\delta^{15}\text{N}$  値は増加する。植物の  $\delta^{13}\text{C}$  値は光合成の違いにより、米や麦などに代表される C3 植物と、トウモロコシやキャッサバなどに代表される C4 植物に分類され、両者の  $\delta^{13}\text{C}$  値は大きく異なる。<sup>33-35)</sup> 一般に、 $\delta^{15}\text{N}$  値は食物連鎖の上位ほど高くなるが、 $\delta^{13}\text{C}$  値はあまり変化しない。家畜は草食動物 (一次消費者) であり、その栄養段階は植物より一段階高く、畜肉、牛乳、鶏卵などの  $\delta^{15}\text{N}$  値も植物より高い。魚は陸上の動物と比べて食物連鎖の位置が高く、それを捕食する海生哺乳類はさらに高い。<sup>33,34)</sup> ヒトを対象とした研究では採取しやすい頭髪中の  $\delta^{13}\text{C}$  と  $\delta^{15}\text{N}$  を測定することが多く、その  $\delta^{13}\text{C}$  値と  $\delta^{15}\text{N}$  値は食事内容により変化する。タンパク質、特に魚を多食するヒトの  $\delta^{15}\text{N}$  値は高く、<sup>33,36)</sup> 低タンパク食のベジタリアンの  $\delta^{13}\text{C}$  値と  $\delta^{15}\text{N}$  値は共に低く、<sup>36-39)</sup> トウモロコシなどの C4 植物とその加工食品を多食するヒトの  $\delta^{13}\text{C}$  値は高い。<sup>26,39)</sup> また、高カロリー食を摂るヒトの  $\delta^{13}\text{C}$  値は比較的高く、拒食症や飢餓等により窒素バランスが負のヒトの  $\delta^{15}\text{N}$  値は高く、 $\delta^{13}\text{C}$  値は低い。<sup>22,40,41)</sup> Patel ら<sup>42)</sup> は、糖尿病患者の食事内容の嗜好から、血清中の  $\delta^{13}\text{C}$  値は低く、 $\delta^{15}\text{N}$  値は高いと推測しているが、これまで糖尿病患者頭髪の  $\delta^{13}\text{C}$  値と  $\delta^{15}\text{N}$  値を実

際に測定した報告は見当たらない。本研究は、糖尿病患者における頭髮中元素と  $\delta^{13}\text{C}$  値と  $\delta^{15}\text{N}$  値を測定し、糖尿病の診断や病状の評価などの臨床応用を目指した。

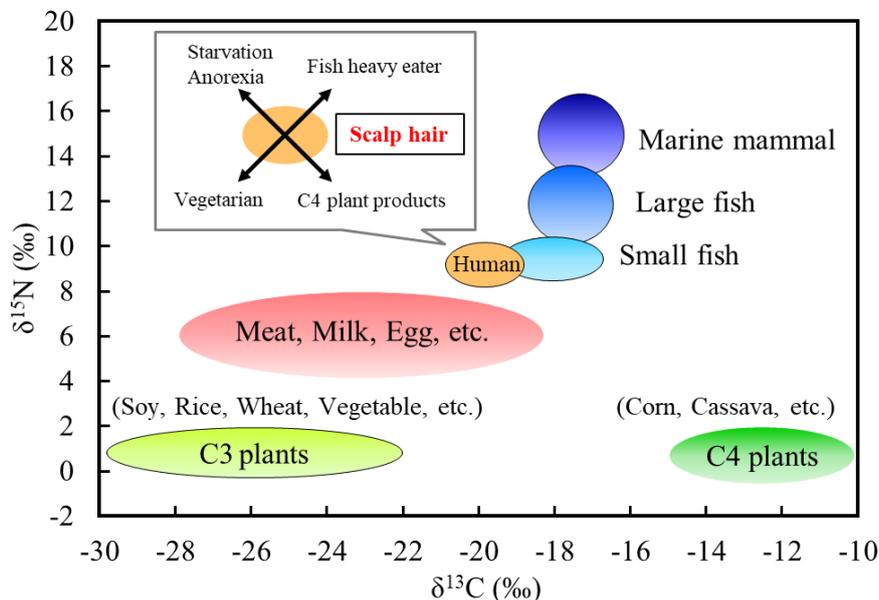


Fig. 2. Schema of Food Web and Foods Affecting the Stable Isotope Ratios of Carbon and Nitrogen in the Scalp Hair (Quoted from Hayasaka et al., 2017) .

本研究の第 1 章では、日本人の糖尿病患者と健常人の頭髮中に含まれる 12 元素を測定し、HbA1c 値と各元素濃度との関係を調査した。その結果 Zn などの必須元素濃度と HbA1c 値の間に有意な負の相関が認められた。<sup>43)</sup>

第 2 章では日本人の糖尿病患者と健常人の頭髮中の 15 元素濃度と  $\delta^{13}\text{C}$  値及び  $\delta^{15}\text{N}$  値を測定し、その結果を男性と女性に分けて、HbA1c 値、各元素濃度、 $\delta^{13}\text{C}$  値及び  $\delta^{15}\text{N}$  値の間における相関を調査した。また、これらの多変量解析を行い、その結果から糖尿病の発症に最も関連する元素は Zn であると推定した。さらに多重ロジスティック回帰分析により、糖尿病患者であるのか、あるいは健常人（非糖尿病）であるのかを、男性の場合では Zn、Cr 及び Na 濃度により、女性の場合では Zn と Fe 濃度により、高い確率で判別した。<sup>44)</sup>

以下、これらの結果について論述する。

## 第1章 糖尿病患者と健常人の頭髪中元素の比較

### 第1節 緒言

糖尿病は、インスリン分泌能の低下やインスリン抵抗性などによる高血糖状態を主徴とする疾病である。高血糖により産生される ROS が膵臓の  $\beta$  細胞の障害やインスリン抵抗性を惹起し、<sup>45)</sup> ROS はさらに大血管障害や細小血管障害などの合併症を惹起する。<sup>6)</sup> 微量元素は、ROS の代謝・消去やインスリンの生合成、分泌、及び感受性に関与する (Fig. 1)。<sup>8-14)</sup> 血糖値の日内変動が大きいほど ROS の産生が増加し、<sup>46)</sup> 合併症が進行する。<sup>47)</sup> 合併症予防のためには血糖コントロールが重要であり、その指標として HbA1c 値が用いられる。<sup>2)</sup>

先行研究において、糖尿病患者の頭髪中の Ca、Mg、Cr、Zn 及び Mn 濃度が健常人と比べて低いことが報告されているが、<sup>21)</sup> 日本人を対象とした詳細な研究報告は見当たらない。また、血糖値の指標である HbA1c 値と頭髪中の各微量元素濃度との相関について調べた報告も見当たらない。そこで、本章では糖尿病患者における HbA1c 値と頭髪中の種々の微量元素濃度との相関について検討した。

糖尿病の合併症の一つである糖尿病性腎症は、微量アルブミン尿を呈した後、顕性蛋白尿期を経て、末期腎不全に至る。<sup>48)</sup> この過程で GFR は低下し、その値が 30 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> 未満になると腎不全となる。GFR を推定する簡便な指標として、臨床では、血清クレアチニン値、体重及び性別から求める eGFR が汎用されている。多くの糖尿病患者の場合、微量アルブミン尿を呈するより以前の糖尿病初期において、一過性の GFR (eGFR) の上昇が惹起され (過剰濾過; hyperfiltration)、<sup>3,4)</sup> GFR は顕著に増加する場合がある (約 125~140mL/min/1.73 m<sup>2</sup>)。<sup>3)</sup> このため、微量アルブミン尿を呈しているにも関わらず、hyperfiltration の影響を受けて、eGFR 値の低下が認められない場合が多い。このため日本糖尿病学会及び日本腎臓学会では、糖尿病の初期から尿アルブミンの定期的な測定による腎機能評価を推奨している。本章では eGFR 値と HbA1c 値との関係について検討し、さらに hyperfiltration についても調査した。<sup>43)</sup>

## 第2節 実験方法

### 第1項 試料

糖尿病患者 45 人（男性 29 人、女性 16 人）の頭髪は、2009 年から 2016 年の期間に北海道と東京都で採取した（Table 1）。これらの患者のうち 2 名の女性が 1 型糖尿病患者であった（H37 と RF14JJ）。患者の平均年齢、BMI、HbA1c 値及び eGFR はそれぞれ  $66.3 \pm 11.9$  歳、 $24.9 \pm 4.8$  kg/m<sup>2</sup>、 $8.89 \pm 2.32\%$ 、 $77.7 \pm 29.7$  mL/min/1.73 m<sup>2</sup>であった。

健常人 59 人（男性 24 人、女性 35 人）の頭髪は 2009 年 11 月から 2015 年 11 月の期間に、北海道、青森、宮城、岩手県と東京都で採取し、その平均年齢は  $61.2 \pm 15.7$  歳であった。なお 15 人の健常人の HbA1c 値は  $5.2 \pm 0.4\%$  であった。残りの健常人の HbA1c 値は不明であったが、HbA1c 値と頭髪成分との相関を求める際には、男性は 5.2%、女性は 5.3%と仮定した。<sup>49)</sup> 頭髪試料はできるだけ頭皮に近い部分から採取し、紙またはポリエチレンバッグに入れて、測定まで室温で保存した。<sup>27,36)</sup> なお、本研究は北海道医療大学薬学研究科（No.15P004）と日鋼記念病院（No.80）の倫理審査委員会において承認された。

Table 1. Information of Diabetic Patients.

	Patient	Gender	Age	Height (cm)	Weight (kg)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	HbA1c (%)	eGFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )
1	YHDM2	M	39	176	74	24.0	8.3	110.5
2	RF14Y	M	36	160	67	26.2	14.4	148.1
3	RF14A	M	75	160	59	23.0	8.7	51.1
4	RF14B	M	54	147	43	19.9	8.2	116.4
5	RF14C	F	69	153	84	35.9	8.3	69.3
6	RF14G	F	55	154	78	32.9	13.8	108.7
7	RF14H	F	59	161	88	33.9	11.8	99.3
8	RF14I	M	43	176	106	34.2	8.6	78.7
9	RF14L	F	56	152	65	28.1	9.9	110.9
10	RF14N	M	70	171	70	23.9	8.3	43.7
11	RF14O	M	55	163	73	27.5	8.2	105.5
12	RF14P	F	84	149	65	29.3	8.8	37.7
13	RF14R	M	77	163	58	21.8	11.3	12.7
14	RF14S	M	61	174	70	23.1	12.9	116.7
15	RF14T	F	83	159	85	33.6	8.1	45.3
16	RF14U	F	49	158	52	20.8	10.1	107.2
17	RF14V	M	40	168	71	25.2	9.6	129.4
18	RF14W	M	65	157	57	23.1	8.0	80.2
19	RF14X	M	67	163	59	22.2	8.7	49.8
20	RF14Z	M	66	160	65	25.4	10.2	98.3
21	RF14AA	M	47	168	75	26.6	12.0	69.6
22	RF14CC	F	66	152	60	25.9	9.8	140.2
23	RF14FF	M	76	155	83	34.5	9.4	58.4
24	RF14GG	M	56	177	91	29.3	7.8	44.7
25	H31	M	50	168	72	17.7	7.5	N
26	DIM1	M	69	165	67	24.6	6.6	56.3
27	DIM3	F	66	150	58	25.8	6.7	84.5
28	DIM4	M	67	147	62	28.7	6.9	N
29	RF14D	F	79	148	53	24.2	6.7	85.5
30	HDM2	F	65	147	48	22.2	6.8	N
31	YHDM3	M	86	164	63	23.4	6.6	44.3
32	YHDM4	F	62	158	62	24.8	6.5	78.1
33	H34	F	66	145	50	23.8	6.4	N
34	YHDM1	M	75	156	57	23.4	6.2	23.0
35	H30	M	56	170	74	19.4	6.2	N
36	YHDM6	M	67	165	63	23.1	6.2	67.6
37	HDM1	M	77	162	68	25.9	6.2	N
38	H37	F	80	158	45	18.0	8.5	59.3
39	RF14HH	M	52	167	66	23.7	12.7	95.2
40	RF14II	F	73	148	37	16.8	14.3	82.1
41	RF14JJ	F	75	159	50	20.0	7.9	92.7
42	RF14KK	M	75	159	54	21.5	14.3	103.9
43	RF14LL	M	85	158	44	17.6	8.2	71.1
44	RF14MM	M	84	159	57	22.6	7.5	71.4
45	RF14NN	M	71	173	73	24.3	11.0	84.3
		Mean	66.3	159.6	64.7	24.9	8.89	77.7
		SD	11.9	8.4	14.0	4.8	2.32	29.7

N: not available.

## 第 2 項 測定方法

採取した頭髪はクロロホルム/メタノール混液 (2:1 v/v) で洗浄・脱脂した。頭髪 (30~40mg) は 100°C で 1 時間かけて硝酸 (関東化学、日本) で分解し、この分解液中に含まれる 12 種類の元素を誘導結合プラズマ質量分析 (Agilent-7700 ICP-MS、Agilent Technology, Santa Clare, CA, USA) を用いて一斉分析した。各元素の回収率は、頭髪の認証標準物質である NIES (Human hair No. 13) と NCS (Human hair No.ZC81002b) を用いて求めたが、それぞれ 76.7~105% (Table 2) と 76.3~114% (Table 3) の範囲であった。なお、Table 2 と Table 3 には第 2 章で測定結果を示す Se、Na 及び K の回収率も含めて示した。

Table 2. Results of the Analysis of the Human Hair Reference Material NIES No. 13.

Element	Certified values ( $\mu\text{g/g}$ )	Measured values* ( $\mu\text{g/g}$ )	Recovery (%)
Na	61000	58147	95.0
K	1790	1610	90.0
Mg	160	146	91.3
Ca	820	816	99.5
V	0.27	0.292	108
Mn	3.9	3.83	98.2
Fe	140	140	100
Cu	15.3 $\pm$ 1.3	15.2	99.3
Zn	172 $\pm$ 11	152	88.4
As	0.10	0.105	105
Cd	0.23 $\pm$ 0.03	0.21	91.3
Hg	4.42 $\pm$ 0.20	3.39	76.7
Pb	4.6 $\pm$ 0.4	4.89	106

\*Average of three determinations.

Table 3. Results of the Analysis of the Human Hair Reference Material NCS ZC81002b.

Element	Certified values ( $\mu\text{g/g}$ )	Measured values* ( $\mu\text{g/g}$ )	Recovery (%)
Na	445000	434763	98.0
K	14400	14037	97.1
Mg	248 $\pm$ 14	244	98.4
Ca	1537 $\pm$ 66	1573	102
V	0.089	0.101	114
Cr	8.74 $\pm$ 1.0	9.01	103
Mn	3.83 $\pm$ 0.39	3.43	89.6
Fe	160 $\pm$ 16	169	106
Cu	33.6 $\pm$ 2.3	33.9	101
Zn	191 $\pm$ 16	181	94.8
Se	590	645	109
As	0.198 $\pm$ 0.023	0.217	110
Cd	0.072 $\pm$ 0.010	0.053	73.6
Hg	1.06 $\pm$ 0.28	0.923	87.1

\*Average of three determinations.

### 第 3 項 解析方法

測定結果は平均 $\pm$ 標準偏差 (S.D.) として示した。有意差検定は、Student's t-test 又は Welch's t-test により行った。なお、危険率 5%未満を持って有意とし、外れ値は Smirnov-Grubbs 検定にて検出した (Fig. 3a 及び 3b)。

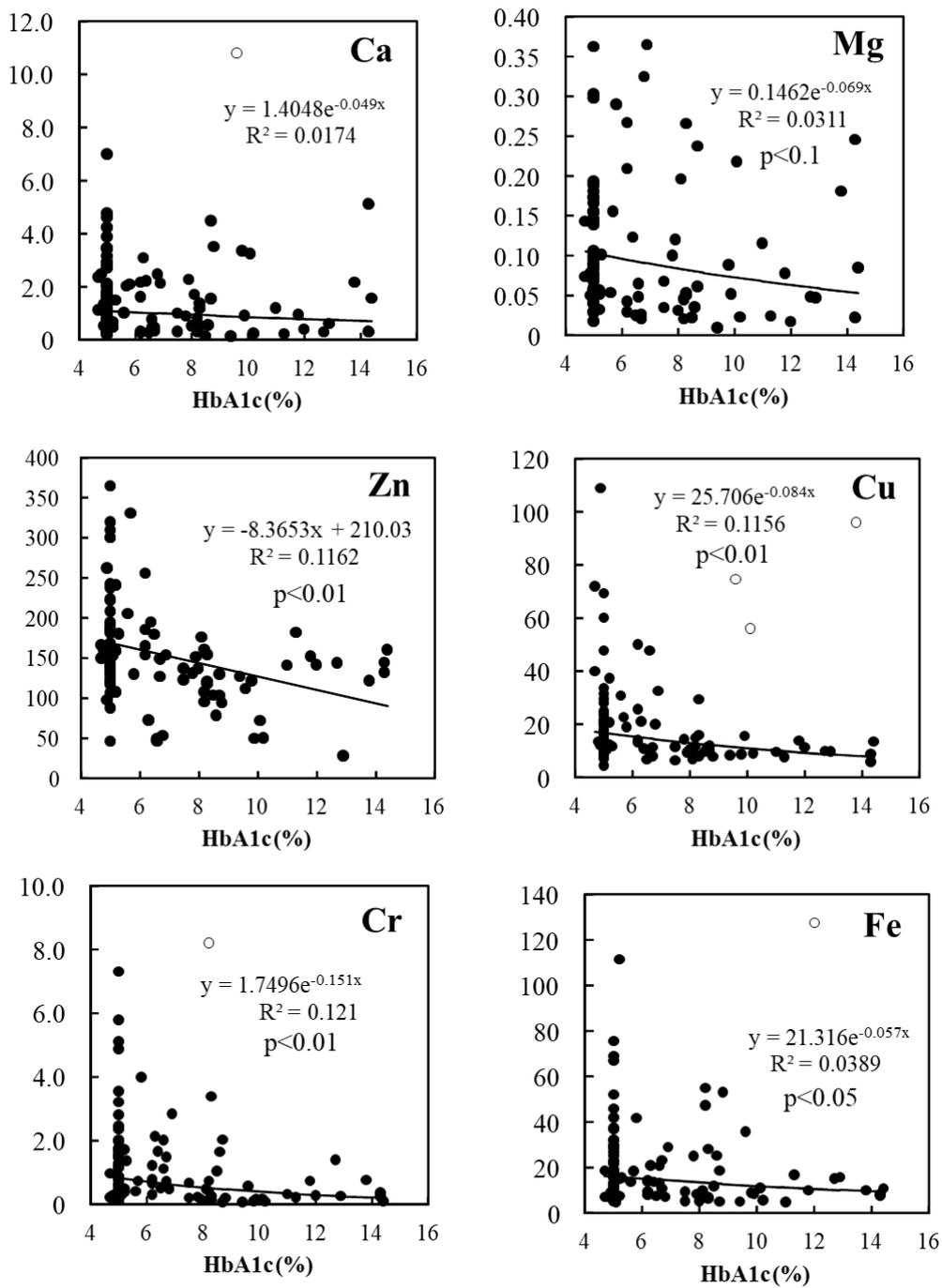


Fig. 3a. Correlation between HbA1c and Essential and Non-essential Elements in the Scalp Hair.

The data of Ca and Mg were expressed by mg/g and those of other elements were expressed by  $\mu\text{g/g}$ . The data shown by open circles were excluded in the calculation of regression analysis.

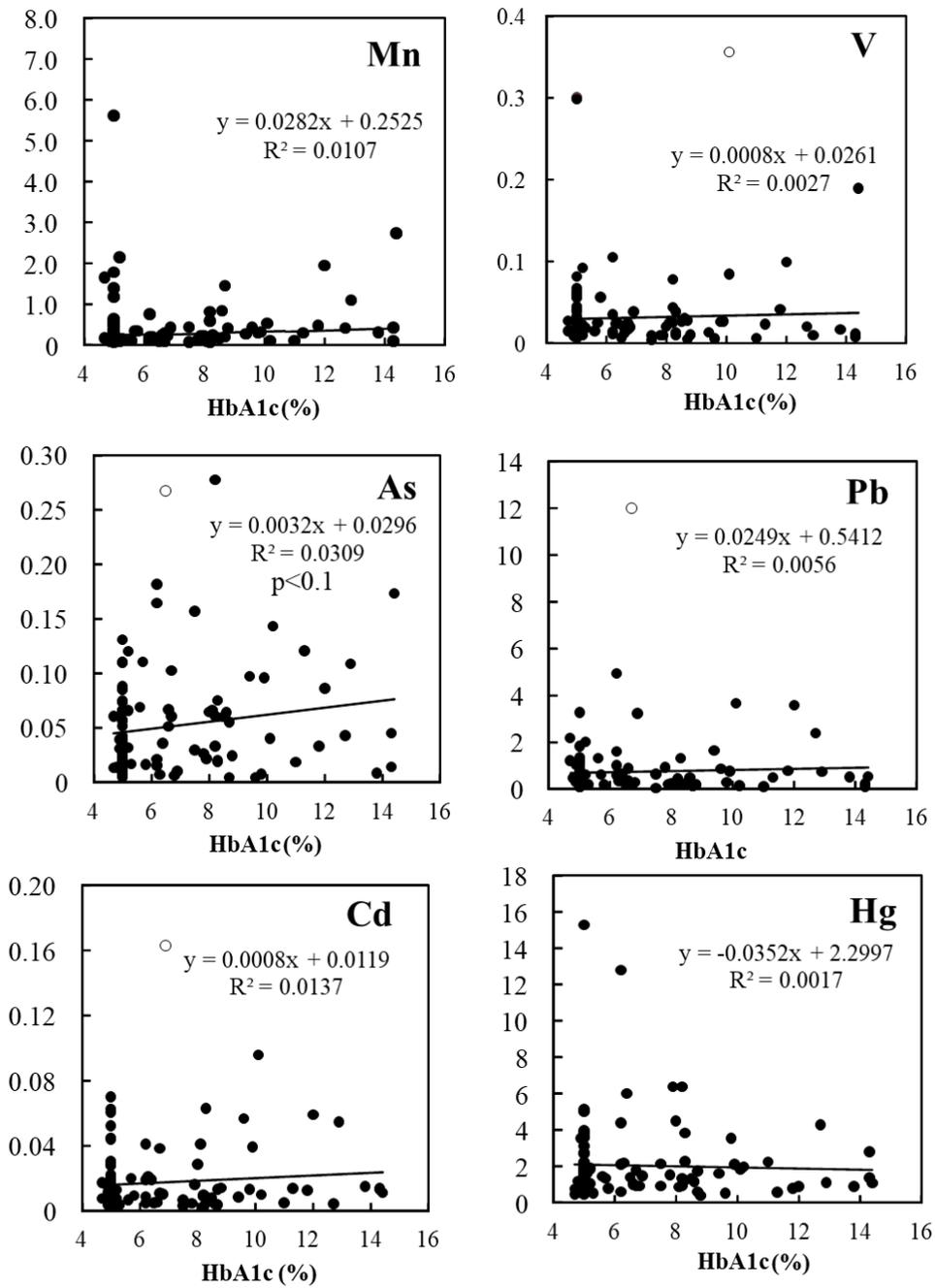


Fig. 3b. Correlation between HbA1c and Essential and Non-essential Elements in the Scalp Hair.

The data are expressed by  $\mu\text{g/g}$ . The data shown by open circles were excluded in the calculation of regression analysis.

### 第3節 結果

Table 4 に、糖尿病患者の頭髪中の元素濃度を HbA1c 値が 7%未満 (n=12) と 7%以上 (n=33) に分けて示す。HbA1c 値が 7%以上の糖尿病患者の Zn 濃度 (n=33)、Cu 濃度 (n=30) 及び Cr 濃度 (n=32) はそれぞれ健常人 (n=59) の場合より有意に低かった ( $p<0.05$ )。なお、Zn 濃度は、HbA1c 値が 7%未満の患者においても、健常人より有意に低かった ( $p<0.05$ )。

Fig. 3a と Fig. 3b に健常人及び糖尿病患者の頭髪中の各微量元素濃度と HbA1c 値の相関を示す。HbA1c 値の増加に伴い Zn 濃度は直線的に減少し、Cu、Cr 及び Fe 濃度は、指数関数的に減少した (Fig. 3a,  $p<0.01$  又は  $p<0.05$ )。また、Mg 濃度は HbA1c 値の増加に伴い減少傾向を示した (Fig. 3a,  $p<0.10$ )。有害元素である As 濃度は、HbA1c 値の増加に伴い増加する傾向が認められた (Fig. 3b,  $p<0.10$ )。一方、Ca、Mn、V、Pb、Cd 及び Hg 濃度と HbA1c 値との間には相関が認められなかった。結果を図に示さないが、Ca 濃度と Mg 濃度の比 (Ca/Mg) 及び Zn 濃度と Cu 濃度の比 (Zn/Cu) は、それぞれ  $13.4\pm 6.5$ 、 $10.5\pm 5.6$  であり、これらの比と HbA1c 値の間にも相関は認められなかった。また、eGFR 値と Zn、Cu、Cr、Fe あるいは Mg 濃度との間にも相関は認められなかった。

糖尿病患者 39 人の eGFR 値は  $12.7 \text{ mL/min/1.73m}^2$  から  $148 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  の広い範囲に分散していたが、その平均値は  $77.7\pm 29.7 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  であり、基準値である  $90 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  以下であった。しかし、HbA1c 値と eGFR 値の間には有意な正の相関が認められた (Fig. 4,  $p<0.01$ )。eGFR 値が高い上位 3 人 ( $148$ 、 $140$  及び  $129 \text{ mL/min/1.73m}^2$ ) の糖尿病患者の HbA1c 値は  $14.4$ 、 $9.8$  及び  $9.6\%$  と高値であり、HbA1c 値の高い患者に hyperfiltration が認められたことが原因である。

Table 5 に eGFR 値が既知である糖尿病患者 39 人の Chronic Kidney Disease (CKD) ステージを示す。そのうち 27 人の eGFR 値は  $60 \text{ mL/min/1.73 m}^2$  以上であり、ほとんどの患者が正常又は軽度低下 (G1 又は G2) に分類された。

Table 4. Analytical Results of Elements in the Hair from the Control and Diabetic Subjects.

Element	Control subjects	Diabetes	
		HbA1c < 7	HbA1c ≥ 7
Ca	1.64±1.36 (n=59)	1.11±0.91 (n=12)	1.31±1.31 (n=32)
Mg	0.18±0.21 (n=59)	0.13±0.13 (n=12)	0.13±0.19 (n=33)
Zn	176±66 (n=59)	124±51* (n=12)	123±38* (n=33)
Cu	21.4±18.3 (n=59)	20.9±15.2 (n=12)	11.1±4.4* (n=30)
Fe	22.2±20.0 (n=59)	14.3±6.8 (n=12)	15.8±14.0 (n=32)
Cr	1.41±1.50 (n=59)	1.15±0.74 (n=12)	0.55±0.70* (n=32)
Mn	0.46±0.81 (n=58)	0.24±0.19 (n=12)	0.46±0.81 (n=33)
V	0.03±0.04 (n=58)	0.03±0.03 (n=12)	0.03±0.04 (n=32)
As	0.04±0.03 (n=59)	0.07±0.06 (n=11)	0.06±0.06 (n=33)
Cd	0.02±0.02 (n=59)	0.02±0.01 (n=11)	0.02±0.02 (n=33)
Hg	1.96±2.14 (n=59)	2.88±3.52 (n=12)	1.98±1.55 (n=33)
Pb	0.62±0.58 (n=59)	1.26±1.50 (n=11)	0.69±0.90 (n=33)

The data for Ca and Mg are expressed as mg/g and those for the other elements as by µg/g.

\* Significantly different from the control subjects (p<0.05).

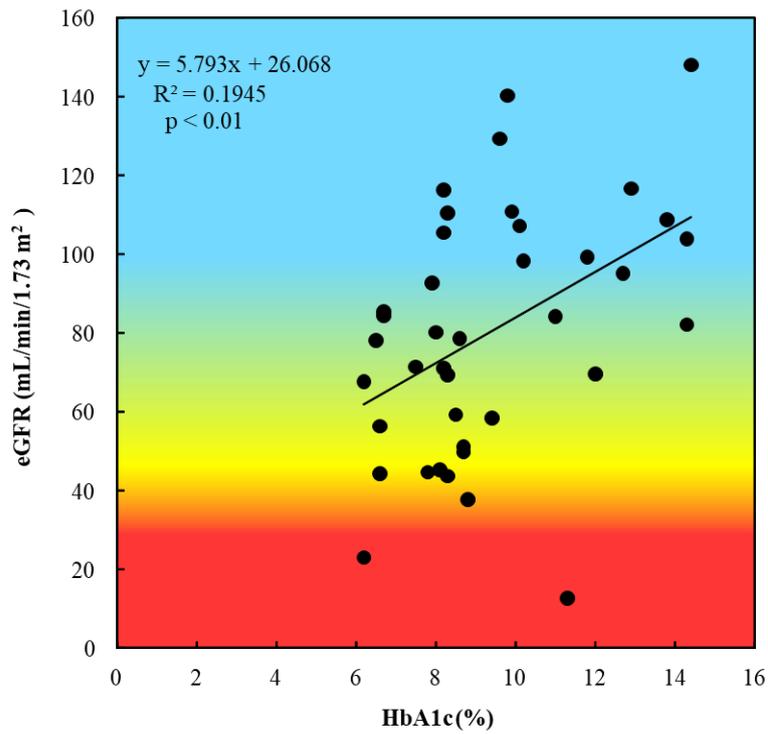


Fig. 4. Correlation between HbA1c and eGFR.

Table 5. Stages of Chronic Kidney Disease of Diabetic Subjects in this Study (n=39) ..

Stage	Kidney function	GFR (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )	Number of patients (see Table 1)
G1	Normal or high	≥ 90	15
G2	Mildly decrease	60~90	12
G3a	Mildly to moderately decrease	45~59	6
G3b	Moderately to severely decrease	30~44	4
G4	Severely decrease	15~29	1
G5	Kidney failure	< 15	1

#### 第4節 考察

先行研究により、糖尿病の発症は、Zn、Cr、Cu、Mn 及び Mg などの必須微量元素の欠乏と関連することが示唆されている。<sup>8,9)</sup> 今回、著者は日本人の糖尿病患者の頭髪中の微量元素を測定し、HbA1c 値と Zn、Cu、Cr 及び Fe 濃度との間に有意な負の相関があり ( $p < 0.01$  又は  $p < 0.05$ )、HbA1c 値と Mg 濃度との間にも弱い負の相関 ( $p < 0.10$ ) があることを初めて示した。即ち、日本人の糖尿病患者の場合、Zn、Cr、Mg、Cu 及び Fe が不足していることが考えられる。これらの結果から、日本人の糖尿病発症には、インスリン生合成・分泌・感受性の低下と ROS の消去不全の両方が関係していると推察される (Fig. 1 参照)。特に注目すべきは Zn 濃度であり、HbA1c 値が 7%以下の糖尿病患者でも健常人より低い値を示した。このことから Zn の欠乏が糖尿病の発症と最も関連していると考えられる。この点については第2章の結果を参照されたい。

糖尿病患者では頭髪及び血液中の Zn、Cr 及び Mg 濃度が健常人より有意に低く、これらの元素の尿中濃度は健常人より有意に高いと報告されている。<sup>14)</sup> また、糖尿病患者の血漿及び赤血球中の Zn と Mg 濃度が健常人より低く、Zn と Mg の尿中排泄量が健常人より多いと報告されている。<sup>9)</sup> さらに糖尿病を実験的に発症させたマウスでは Cr の尿中排泄量が多いと報告されている。<sup>50)</sup> これらの報告より、糖尿病患者で認められた頭髪中の Zn、Cr 及び Mg 濃度の低値 (Fig. 3a) は、これらの元素の尿中排泄量の増加を反映した結果と考えられる。糖尿病患者では頭髪中の Ca 濃度が低く、尿中への Ca 排泄量が高いと報告されているが、<sup>17)</sup> 本研究では HbA1c 値の増加に伴う頭髪中 Ca 濃度の低下は認められなかった (Fig. 3a)。

糖尿病患者 (n=30) の頭髪中の Cu 濃度は、健常人と比べて有意に低く (Table 4)、HbA1c 値の増加とともに減少した (Fig. 3a)。Taneja ら<sup>15)</sup> は糖尿病患者の頭髪中の Cu 濃度は健常人よりも低い、Cu の尿中排泄量はほぼ同じと報告している。一方、Kazi ら<sup>14)</sup> は糖尿病患者の頭髪中と尿中の Cu 濃度は健常人よりもわずかに高いと報告しており、本研究結果と異なる。糖尿病患者の頭髪中の Cu 濃度とその尿中排泄量について、さらなる検討が必要である。

頭髪中の Fe 濃度は HbA1c 値の増加とともに減少したが (Fig. 3a)、糖尿病患者の頭髪中 Mn 濃度は健常人とほぼ同じであり、HbA1c 値との相関も認められなかった (Fig. 3b)。この結果と対照的に、Kazi ら<sup>14)</sup> は糖尿病患者の頭髪中 Fe 濃度は健常人よりも高く、その尿中排泄量は低いと報告している。また、糖尿病患者の頭髪中 Mn 濃度は健常人よりも低いと報告している。相反するこれらの結果の理由は不明である。

日本人を対象とした本研究において、頭髪中の Fe と Cu 濃度は健常人より低く、両元素の欠乏による ROS の消去不全が糖尿病の発症や進行に関係していることが考えられる。一方、Kazi ら<sup>14)</sup> はパキスタン人の糖尿病患者の頭髪中 Fe と Cu 濃度は健常人より高いと報告している。この結果から、高濃度の Fe と Cu の存在下で、毒性の高いヒドロキシルラジカルが産生し、その産生が糖尿病の発症とその進行を促進していると推察される。

糖尿病の治療薬として無機 V 化合物や有機 V 化合物を対象とした研究と治験が行われている。<sup>52)</sup> 本研究では糖尿病患者の頭髪中の V 濃度は健常人の場合と差が認められなかった。このことから、日本人の場合には、V 欠乏と糖尿病の発症との関連はないと思われる。

本研究 (Table 4) において、有害元素である As、Cd、Hg 及び Pb の頭髪中濃度は、糖尿病患者と健常人とで差が認められなかったが、As 濃度は HbA1c 値の増加とともに増加する傾向が認められた (Fig. 3b,  $p < 0.10$ )。Afridi ら<sup>17)</sup> は、糖尿病患者の頭髪、血液及び尿中 As、Cd 及び Pb 濃度は健常人よりも高く、これらの元素の毒性が糖尿病の発症に何らかの影響を与える可能性を示唆している。

本研究で調査した 45 名の糖尿病患者のうち、2 人の女性が 1 型糖尿病患者であった。その 2 人の 1 型糖尿病患者の各元素濃度は 2 型糖尿病患者の平均的な値であった (Table 4)。Viktorínová ら<sup>18)</sup> は 1 型糖尿病 (n=11) と 2 型糖尿病 (n=25) の患者間で血漿中 Cu、Zn 及び Mg 濃度に差がないと報告している。さらにインスリンを投与している 2 型糖尿病患者と経口糖尿病薬を服用している 2 型糖尿病患者との間に、これらの元素の血漿中濃度に有意差がないと報告している。

健常人の頭髪中微量元素濃度は加齢により変化し、性差も報告されている

が、<sup>29,30,53,54</sup> 糖尿病患者を対象としたこれらの研究報告は少ない。<sup>21,55</sup> さらに、糖尿病の合併症である腎障害や高血圧が頭髪中微量元素濃度に影響を与えることも考えられる。<sup>17,55-57</sup> 年齢及び性別に加えて、腎障害や高血圧の有無に注目し、頭髪中微量元素の変化を詳細に調査する必要がある。

糖尿病において、血糖コントロールが不良であると HbA1c 値が高くなり、糖尿病性腎症が進行し、一般的には GFR (eGFR) は減少する。しかし、今回の調査では、HbA1c 値と eGFR 値の間には有意な正の相関が認められ (Fig. 4)、HbA1c 値が高い患者の eGFR 値は高かった。即ち、糖尿病の初期においてよく認められる hyperfiltration が、なぜか HbA1c 値の高い患者に認められた。本研究で調査した糖尿患者の罹病期間は不明であったため、残念ながら、さらなる解析ができなかった。今後、糖尿病の罹病期間と hyperfiltration との関係についてのさらなる研究が必要である。

糖尿病性腎症の診断は、アルブミン尿の程度を基にして病期が分類されており、eGFR を指標とした検査では腎症の進行を的確に判定することができない (Table 6)。多くの初期糖尿病患者において hyperfiltration が惹起されるため、糖尿病の早期から微量アルブミン尿による腎機能評価を定期的に行うことが必要である。

先行研究<sup>14)</sup>の結果から、糖尿病患者の Zn、Cr や Mg 濃度などの低下は、これらの元素の尿中排泄量の増加によると考えられる。今後、これらの元素の尿中排泄量の増加と GFR 値の変化との関係についての研究が必要である。

Table 6. Classification of Diabetic Nephropathy.

Stage	Urinary albumin (mg/g·Cr) or urinary protein (g/g·Cr)	GFR (eGFR) (mL/min/1.73 m <sup>2</sup> )
Stage 1 (prenephropathy)	Normoalbuminuria (<30)	≥ 30
Stage 2 (incipient nephropathy)	Microalbuminuria (30~299)	≥ 30
Stage 3 (overt nephropathy)	Macroalbuminuria (≥300) or Persistent proteinuria (≥0.5)	≥ 30
Stage 4 (kidney failure)	Any albuminuria/ proteinuria status	< 30
Stage 5 (dialysis therapy)	Any status on continued dialysis therapy	

*J. Japan Diab. Soc.*, 57(7), 529-534 (2014)

## 第2章 糖尿病患者と健常人の頭髪中の元素濃度及び安定同位体比の多変量解析

### 第1節 緒言

必須微量元素である Ca、Mg、Zn、Cu 及び Mn の頭髪中濃度は、一般に健康な男性は女性より低く、有害元素である Pb、Cd 及び As 濃度は男性が高いと報告されている。<sup>14,29,30)</sup> 一方、糖尿病の発症率は男性が女性よりも高い。<sup>58)</sup> 前章で、糖尿病患者の頭髪中の Zn、Cu 及び Cr 濃度が健常人より低いことを明らかにしたが、この結果をさらに男性と女性に分けて調査する必要が考えられた。

糖尿病患者の頭髪中の Na と K 濃度は、健常人より高いと報告されている。<sup>16)</sup> メタボリックシンドロームは糖尿病の危険因子であるが、同患者の場合でも頭髪中の Na と K 濃度は健常人より高いと報告されている。<sup>23)</sup> 日本人の糖尿病患者の頭髪中の Na と K 濃度について、性差を含めた検証が必要である。Se は ROS を代謝するペルオキシダーゼの補因子であり、その欠乏は酸化ストレスを介した糖尿病や合併症の発症に関与すると考えられる (Fig. 1)。しかし、日本人の頭髪中の Se 濃度と糖尿病の関係については明らかでない。そこで本章では、前章で測定した頭髪中の 12 種類の元素の他に Na、K 及び Se を追加して測定し、さらに検討した。

2型糖尿病の発症には、遺伝的要因の他に過食などの生活環境因子が関係する。糖尿病治療の基本は、食事療法と運動療法であり、糖尿病患者は、何らかの食事制限をしていることが多い。そのため、疾病による代謝異常や食事内容を反映する頭髪中の  $\delta^{13}\text{C}$  値及び  $\delta^{15}\text{N}$  値は健常人と異なることが予想されるが、これまで糖尿病患者の頭髪中の  $\delta^{13}\text{C}$  値及び  $\delta^{15}\text{N}$  値を健常人と比較した報告はない。

本章では、糖尿病患者と健常人の頭髪を採取し、Na、K 及び Se を含む 10 種類の必須元素 (Na、K、Ca、Mg、Zn、Cu、Cr、Fe、Mn、Se) 及び 5 種類の非必須元素 (V、As、Cd、Hg、Pb)、さらに  $\delta^{13}\text{C}$  及び  $\delta^{15}\text{N}$  を測定し、これらの測定値間の相関を男性と女性に分けて検討した。また、測定した各種元素濃度の多変量解析を行い、糖尿病患者であるか、あるいは、健常

人（非糖尿病）であるかの判別を行った。さらに糖尿病の発症に強く関連する元素の特定を試みた。<sup>44)</sup>

## 第2節 実験方法

### 第1項 試料

糖尿病患者 42 人（男性 27 人、女性 15 人）の頭髪は 2009 年から 2016 年の期間に北海道と東京都で採取したもので、これらの患者は第 1 章の糖尿病患者 38 人を含んでいる（Table 7）。健常人 54 人の頭髪（男性 23 人、女性 31 人）は第 1 章で示した 59 人から選択した。これらの糖尿病患者と健常人の頭髪中の 15 種類の元素濃度と  $\delta^{13}\text{C}$  値及び  $\delta^{15}\text{N}$  値を測定した。

糖尿病患者の平均年齢、BMI 及び HbA1c 値は、男性ではそれぞれ  $66.1 \pm 13.2$  歳、 $24.5 \pm 3.8 \text{ kg/m}^2$ 、 $9.0 \pm 2.3\%$ 、女性では  $68.0 \pm 8.5$  歳、 $26.5 \pm 6.0 \text{ kg/m}^2$ 、 $9.0 \pm 2.6\%$ であり、これらの項目に性差は認められなかった（Table 8）。男性 8 人の糖尿病患者と女性 7 名の糖尿病患者の BMI は基準値の上限である  $25 \text{ kg/m}^2$  を越え（最も高い患者は  $35.9 \text{ kg/m}^2$ ）、1 人の女性糖尿病患者の BMI ( $16.8 \text{ kg/m}^2$ ) は基準値下限である  $18.5 \text{ kg/m}^2$  以下であった。男性 2 人と女性 1 人の糖尿病患者の HbA1c 値は 14% を越えていた。

健常人の平均年齢は、男性で  $56.3 \pm 14.3$  歳、女性  $63.4 \pm 16.0$  歳であった。健常人の BMI は不明であったが、外見から、全ての健常人は基準値内 ( $18.5 \sim 25 \text{ kg/m}^2$ ) にあると判断した。また、HbA1c 値が不明な健常人の場合は、男性で 5.2%、女性では 5.3% と仮定した。<sup>43,50)</sup>

Table 7. Information of Diabetic Patients.

	Patient	Gender	Age	Height (cm)	Weight (kg)	BMI (kg/m <sup>2</sup> )	HbA1c (%)
1	YHDM2	M	39	176	74	24.0	8.3
2	RF14Y	M	36	160	67	26.2	14.4
3	RF14A	M	75	160	59	23.0	8.7
4	RF14C	F	69	153	84	35.9	8.3
5	RF14G	F	55	154	78	32.9	13.8
6	RF14H	F	59	161	88	33.9	11.8
7	RF14I	M	43	176	106	34.2	8.6
8	RF14L	F	56	152	65	28.1	9.9
9	RF14N	M	70	171	70	23.9	8.3
10	RF14O	M	55	163	73	27.5	8.2
11	RF14R	M	77	163	58	21.8	11.3
12	RF14S	M	61	174	70	23.1	12.9
13	RF14T	F	83	159	85	33.6	8.1
14	RF14W	M	65	157	57	23.1	8.0
15	RF14X	M	67	163	59	22.2	8.7
16	RF14Z	M	66	160	65	25.4	10.2
17	RF14CC	F	66	152	60	25.9	9.8
18	RF14FF	M	76	155	83	34.5	9.4
19	RF14GG	M	56	177	91	29.3	7.8
20	H31	M	50	168	72	17.7	7.5
21	DIM1	M	69	165	67	24.6	6.6
22	DIM3	F	66	150	58	25.8	6.7
23	DIM4	M	67	147	62	28.7	6.9
24	RF14D	F	79	148	53	24.2	6.7
25	HDM2	F	65	147	48	22.2	6.8
26	YHDM4	F	62	158	62	24.8	6.5
27	H34	F	66	145	50	23.8	6.4
28	YHDM1	M	75	156	57	23.4	6.2
29	YHDM6	M	67	165	63	23.1	6.2
30	HDM1	M	77	162	68	25.9	6.2
31	H37	F	80	158	45	18.0	8.5
32	RF14HH	M	52	167	66	23.7	12.7
33	RF14II	F	73	148	37	16.8	14.3
34	RF14JJ	F	75	159	50	20.0	7.9
35	RF14KK	M	75	159	54	21.5	14.3
36	RF14LL	M	85	158	44	17.6	8.2
37	RF14MM	M	84	159	57	22.6	7.5
38	RF14NN	M	71	173	73	24.3	11.0
39	RF14OO	F	66	152	54	23.4	9.8
40	RF14QQ	M	82	160	51	19.9	7.7
41	RF14RR	M	70	161	55	21.3	8.3
42	RF14SS	M	74	168	61	21.6	8.7
		Mean	66.8	160.0	64.3	24.8	9.0
		SD	11.7	8.3	13.9	4.8	2.4

Table 8. Analytical Results for Elements in the Scalp Hair from the Control and Diabetic Subjects.

	Control subjects	Diabetic subjects
<b>Number<sup>a</sup></b>	Total n=54 Male n=23 Female n=31	Total n=42 Male n=27 Female n=15
<b>Age (yr)</b>	60.4±15.6 Male 56.3±14.3 Female 63.4±16.0	66.8±11.5 Male 66.1±13.2 Female 68.0±8.5
<b>BMI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	NA	25.2±4.7 Male 24.5±3.8 Female 26.5±6.0
<b>HbA1c (%)</b>	5.2 ± 0.5 (n=14) Male 5.2±0.4 (n=4) Female 5.3±0.5 (n=10)	9.0 ± 2.4 Male 9.0±2.3 Female 9.0±2.6
<b>δ<sup>13</sup>C (‰)</b>	-19.3 ± 0.7 Male -19.0±0.8 <sup>A</sup> Female -19.4±0.6 <sup>AB</sup>	-19.7 ± 0.6 <sup>**</sup> Male -19.6±0.7 <sup>B</sup> Female -19.8±0.4 <sup>B</sup>
<b>δ<sup>15</sup>N (‰)</b>	9.2 ± 0.5 Male 9.3±0.4 <sup>A</sup> Female 9.1±0.5 <sup>A</sup>	9.3 ± 0.8 Male 9.1±0.8 <sup>A</sup> Female 9.6±0.8 <sup>A</sup>
<b>Na (mg/g)</b>	0.36 ± 0.49 Male 0.22±0.15 <sup>A</sup> Female 0.47±0.61 <sup>AB</sup>	0.67 ± 0.57 <sup>**</sup> Male 0.66±0.61 <sup>B</sup> Female 0.70±0.53 <sup>B</sup>
<b>K (mg/g)</b>	0.19 ± 0.20 Male 0.16±0.13 <sup>A</sup> Female 0.21±0.24 <sup>A</sup>	0.27 ± 0.26 <sup>*</sup> Male 0.27±0.29 <sup>A</sup> Female 0.27±0.22 <sup>A</sup>
<b>Ca (mg/g)</b>	1.70 ± 1.37 Male 1.12±0.68 <sup>AB</sup> Female 2.13±1.59 <sup>B</sup>	1.20 ± 1.23 <sup>**</sup> Male 0.84±0.92 <sup>A</sup> Female 1.84±1.46 <sup>B</sup>
<b>Mg (mg/g)</b>	0.179 ± 0.218 Male 0.094±0.055 <sup>AB</sup> Female 0.243±0.269 <sup>B</sup>	0.097 ± 0.099 <sup>**</sup> Male 0.080±0.087 <sup>A</sup> Female 0.128±0.113 <sup>AB</sup>
<b>Zn (µg/g)</b>	184 ± 62 Male 187±44 <sup>A</sup> Female 183±73 <sup>A</sup>	124 ± 36 <sup>**</sup> Male 132±37 <sup>B</sup> Female 110±31 <sup>B</sup>
<b>Cu (µg/g)</b>	22.3 ± 18.9 Male 21.0±17.2 <sup>A</sup> Female 23.2±20.2 <sup>A</sup>	13.7 ± 14.3 <sup>**</sup> Male 12.1±6.7 <sup>B</sup> Female 16.7±22.3 <sup>AB</sup>
<b>Cr (µg/g)</b>	1.44 ± 1.57 Male 1.42±1.77 <sup>A</sup> Female 1.45±1.43 <sup>A</sup>	0.69 ± 0.78 <sup>**</sup> Male 0.62±0.75 <sup>B</sup> Female 0.81±0.85 <sup>AB</sup>
<b>Fe (µg/g)</b>	22.5 ± 20.7 Male 23.0±24.5 <sup>A</sup> Female 22.1±17.8 <sup>A</sup>	12.9 ± 8.5 <sup>**</sup> Male 13.3±9.7 <sup>A</sup> Female 12.2±6.1 <sup>A</sup>
<b>Mn (µg/g)</b>	0.95 ± 3.62 Male 0.57±1.17 <sup>A</sup> Female 1.23±4.69 <sup>A</sup>	1.46 ± 7.09 Male 0.43±0.57 <sup>A</sup> Female 3.30±11.9 <sup>A</sup>
<b>V (µg/g)</b>	0.033 ± 0.042 Male 0.031±0.024 <sup>A</sup> Female 0.035±0.052 <sup>A</sup>	0.024 ± 0.031 <sup>*</sup> Male 0.025±0.038 <sup>A</sup> Female 0.022±0.010 <sup>A</sup>
<b>Se (µg/g)</b>	0.71 ± 0.36 Male 0.87±0.19 <sup>A</sup> Female 0.59±0.41 <sup>B</sup>	0.68 ± 0.38 Male 0.69±0.24 <sup>AB</sup> Female 0.67±0.56 <sup>B</sup>
<b>As (µg/g)</b>	0.043 ± 0.033 Male 0.062±0.033 <sup>A</sup> Female 0.029±0.025 <sup>B</sup>	0.076 ± 0.071 Male 0.088±0.071 <sup>A</sup> Female 0.054±0.067 <sup>AB</sup>
<b>Cd (µg/g)</b>	0.016 ± 0.015 Male 0.012±0.011 <sup>A</sup> Female 0.020±0.017 <sup>A</sup>	0.019 ± 0.027 Male 0.019±0.033 <sup>A</sup> Female 0.020±0.014 <sup>A</sup>
<b>Hg (µg/g)</b>	1.85 ± 2.12 Male 2.50±2.94 <sup>A</sup> Female 1.37±1.03 <sup>B</sup>	2.15 ± 1.60 Male 2.12±1.49 <sup>AB</sup> Female 2.19±1.83 <sup>AB</sup>
<b>Pb (µg/g)</b>	0.593 ± 0.483 Male 0.632±0.521 <sup>A</sup> Female 0.565±0.459 <sup>A</sup>	0.960 ± 1.988 Male 0.795±1.112 <sup>A</sup> Female 1.258±3.021 <sup>A</sup>

<sup>a</sup>Numbers of Control and DM subjects except for HbA1c of Control subject. Significantly different from Control subject (\*p<0.05, \*\*p<0.01). Different letters (A and B) indicate the significantly different among the four sites. (p<0.05, Turkey-Kramer).

## 第 2 項 測定方法

### 1) 頭髪中元素濃度の測定

頭髪中の元素濃度の測定は第 1 章に準じて ICP-MS による一斉分析を行ったが、その際に Na、K 及び Se の測定を加えた。

### 2) 頭髪中安定同位体比の測定

採取した頭髪は、クロロホルム/メタノール混液 (2:1 v/v) で洗浄・脱脂した後、細断した。 $\delta^{13}\text{C}$  と  $\delta^{15}\text{N}$  の測定は、元素分析/同位体比質量分析計 (EA/IRMS) にて測定した。測定には元素分析計 (EA1108, Fisons, Roano, Milan, Italy) と質量分析計 (Delta S, Finnigan, MAT, Bremen, Germany) を使用した。なお、京都大学生態学研究センターが  $\delta^{13}\text{C}$  値と  $\delta^{15}\text{N}$  値を保証した CERKU-1, -2 及び -5 を標準物質として用いた。なおそれぞれの標準物質の  $\delta^{13}\text{C}$  値と  $\delta^{15}\text{N}$  値の変動係数 (C.V.) は 0.2% 以下であった。<sup>59)</sup>

## 第 3 項 データの解析方法

頭髪中の 15 種類の元素濃度及び  $\delta^{13}\text{C}$  値と  $\delta^{15}\text{N}$  値の測定結果は、平均値  $\pm\text{SD}$  として表した。頭髪中の微量元素濃度は一般に対数正規分布を示すことから、<sup>29,60)</sup> 対数変換を行った後、有意差検定を行った。また、糖尿病の発症との関連が予想された頭髪中の 8 元素濃度 (Na、K、Ca、Mg、Zn、Cu、Cr 及び Fe)、HbA1c 値、 $\delta^{13}\text{C}$  値及び  $\delta^{15}\text{N}$  値の間の相関係数を求めた (Table 9)。この 8 元素濃度の測定結果は、性差を考慮して、箱ひげ図で表した (Fig. 5)。

上記の 8 元素濃度について、主成分分析 (バリマックス回転) を行い、そのコンポーネントスコアの有意差検定を行った (Table 10)。またコンポーネントスコアと  $\delta^{13}\text{C}$  値あるいは  $\delta^{15}\text{N}$  値の間の相関係数を求めた。さらに、頭髪中元素濃度により糖尿病であるか否かを多重ロジスティック回帰分析を用いて判別した。健常人と糖尿病患者の目的変数を 0 と 1 とし、8 元素濃度 (対数值) を説明変数とし、ステップワイズ変数増減法 (尤度比) により説明変数を選択した。選択した説明変数同士に強い相関 (多重共線性) がある場合には適切な結果が得られないため、説明変数間の相関を調べてこの

ことを検査した。

統計解析は、Statcel 2(Excel アドインソフトウェア ; OMS、日本) と SPSS Statistics 25 ; Statistical Package for Social Science Inc, Illinois, USA) を使用し、有意差検定には Student's t-test、Welch's t-test 又は Tukey-Kramer test を用いた。なお、危険率は 5%未満をもって有意差ありとした。相関係数は、Pearson 積率相関係数を用いた。

Table 9. Correlation Matrix of Eight Elements, Stable Isotope Ratios of Carbon and Nitrogen and HbA1c in Males and Females.

Males

	Na	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Cr	Fe	HbA1c	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Na	1	<b>0.543</b>	-0.081	-0.103	-0.169	-0.177	0.003	0.102	<b>0.296</b>	-0.021	0.128
K	<b>0.543</b>	1	-0.174	-0.239	-0.170	-0.146	-0.209	-0.122	0.210	-0.084	-0.045
Ca	-0.081	-0.174	1	<b>0.829</b>	0.240	<b>0.596</b>	<b>0.299</b>	0.124	<b>-0.280</b>	<b>0.339</b>	0.070
Mg	-0.103	-0.239	<b>0.829</b>	1	<b>0.353</b>	<b>0.468</b>	<b>0.327</b>	0.134	<b>-0.301</b>	<b>0.315</b>	0.099
Zn	-0.169	-0.170	0.240	<b>0.353</b>	1	0.226	0.274	0.179	<b>-0.390</b>	0.113	-0.064
Cu	-0.177	-0.146	<b>0.596</b>	<b>0.468</b>	0.226	1	0.247	0.129	<b>-0.403</b>	0.214	0.223
Cr	0.003	-0.209	<b>0.299</b>	<b>0.327</b>	0.274	0.247	1	<b>0.712</b>	<b>-0.393</b>	<b>0.371</b>	<b>0.403</b>
Fe	0.102	-0.122	0.124	0.134	0.179	0.129	<b>0.712</b>	1	-0.228	<b>0.360</b>	0.245
HbA1c	<b>0.296</b>	0.210	<b>-0.280</b>	<b>-0.301</b>	<b>-0.390</b>	<b>-0.403</b>	<b>-0.393</b>	-0.228	1	<b>-0.369</b>	-0.142
$\delta^{13}\text{C}$	-0.021	-0.084	<b>0.339</b>	<b>0.315</b>	0.113	0.214	<b>0.371</b>	<b>0.360</b>	<b>-0.369</b>	1	<b>0.471</b>
$\delta^{15}\text{N}$	0.128	-0.045	0.070	0.099	-0.064	0.223	<b>0.403</b>	0.245	-0.142	<b>0.471</b>	1

The bold numbers indicate the significant correlations ( $p < 0.05$ ) .

Females

	Na	K	Ca	Mg	Zn	Cu	Cr	Fe	HbA1c	$\delta^{13}\text{C}$	$\delta^{15}\text{N}$
Na	1	<b>0.718</b>	<b>0.304</b>	<b>0.405</b>	-0.230	-0.078	0.012	0.063	<b>0.366</b>	-0.127	0.138
K	<b>0.718</b>	1	0.148	0.178	-0.108	0.006	-0.074	0.031	<b>0.347</b>	0.046	-0.065
Ca	<b>0.304</b>	0.148	1	<b>0.850</b>	<b>0.388</b>	0.168	0.010	0.034	0.083	<b>0.299</b>	0.228
Mg	<b>0.405</b>	0.178	<b>0.850</b>	1	<b>0.426</b>	0.182	-0.053	-0.023	-0.048	-0.187	0.108
Zn	-0.230	-0.108	<b>0.388</b>	<b>0.426</b>	1	0.059	-0.176	-0.037	<b>-0.376</b>	<b>0.394</b>	-0.108
Cu	-0.078	0.006	0.168	0.182	0.059	1	0.215	0.145	-0.127	0.053	-0.084
Cr	0.012	-0.074	0.010	-0.053	-0.176	0.215	1	<b>0.789</b>	-0.226	0.196	-0.053
Fe	0.063	0.031	0.034	-0.023	-0.037	0.145	<b>0.789</b>	1	-0.256	<b>0.304</b>	-0.003
HbA1c	<b>0.366</b>	<b>0.347</b>	0.083	-0.048	<b>-0.376</b>	-0.127	-0.226	-0.256	1	-0.189	0.116
$\delta^{13}\text{C}$	-0.127	0.046	<b>0.299</b>	0.187	<b>0.394</b>	0.053	0.196	<b>0.304</b>	-0.189	1	-0.082
$\delta^{15}\text{N}$	0.138	-0.065	0.228	0.108	-0.108	-0.084	-0.053	-0.003	0.116	-0.082	1

The bold numbers indicate the significant correlations ( $p < 0.05$ ) .

Table 10. Principal Component Analysis for Eight Elements in the Hair of the Males and Females.

Males

		1st component	2nd component	3rd component	4th component
Eigen value		2.30	1.75	1.55	1.01
Contribution (%)		28.75	21.88	19.41	12.63
Eigen vector	Na	0.052	0.104	<b>0.583</b>	-0.024
	K	0.037	-0.102	<b>0.577</b>	0.133
	Ca	<b>0.456</b>	-0.057	0.070	-0.118
	Mg	<b>0.381</b>	-0.057	0.051	0.070
	Zn	-0.112	-0.066	0.060	<b>1.040</b>
	Cu	<b>0.366</b>	-0.034	-0.014	-0.147
	Cr	-0.012	<b>0.511</b>	-0.015	-0.028
	Fe	-0.099	<b>0.578</b>	0.020	-0.078
Average of component score	Control	0.28±0.85	0.27±1.07	-0.34±0.71	0.46±0.64
	DM	-0.24±1.07#	-0.22±0.89#	-0.29±1.13**	-0.39±1.09**
Correlation with component score and $\delta^{13}\text{C}$	r	0.296*	0.351*	-0.015	0.019
Correlation with component score and $\delta^{15}\text{N}$	r	0.134	0.353*	0.051	-0.140

Difference of component scores between control and DM (#p<0.10, \*p<0.05, \*\*p<0.01) .

Females

		1st component	2nd component	3rd component	4th component
Eigen value		2.15	1.90	1.81	1.02
Contribution (%)		26.93	23.76	22.59	12.71
Eigen vector	Na	0.009	<b>0.487</b>	0.025	-0.079
	K	-0.068	<b>0.473</b>	-0.051	0.054
	Ca	<b>0.406</b>	0.041	0.045	0.002
	Mg	<b>0.401</b>	0.075	0.000	0.028
	Zn	<b>0.397</b>	-0.271	-0.012	-0.165
	Cu	-0.061	-0.004	-0.079	<b>0.998</b>
	Cr	-0.008	-0.023	<b>0.520</b>	0.000
	Fe	0.046	-0.012	<b>0.544</b>	-0.135
	Average of component score	Control	0.25±0.96	-0.26±1.03	0.16±1.10
DM		-0.52±0.91*	0.54±0.68**	-0.33±0.68#	-0.26±0.99
Correlation with component score and $\delta^{13}\text{C}$	r	0.357*	-0.129	0.266#	-0.035
Correlation with component score and $\delta^{15}\text{N}$	r	0.104	0.085	-0.004	-0.076

Difference of component scores between control and DM (#p<0.10, \*p<0.05, \*\*p<0.01) .

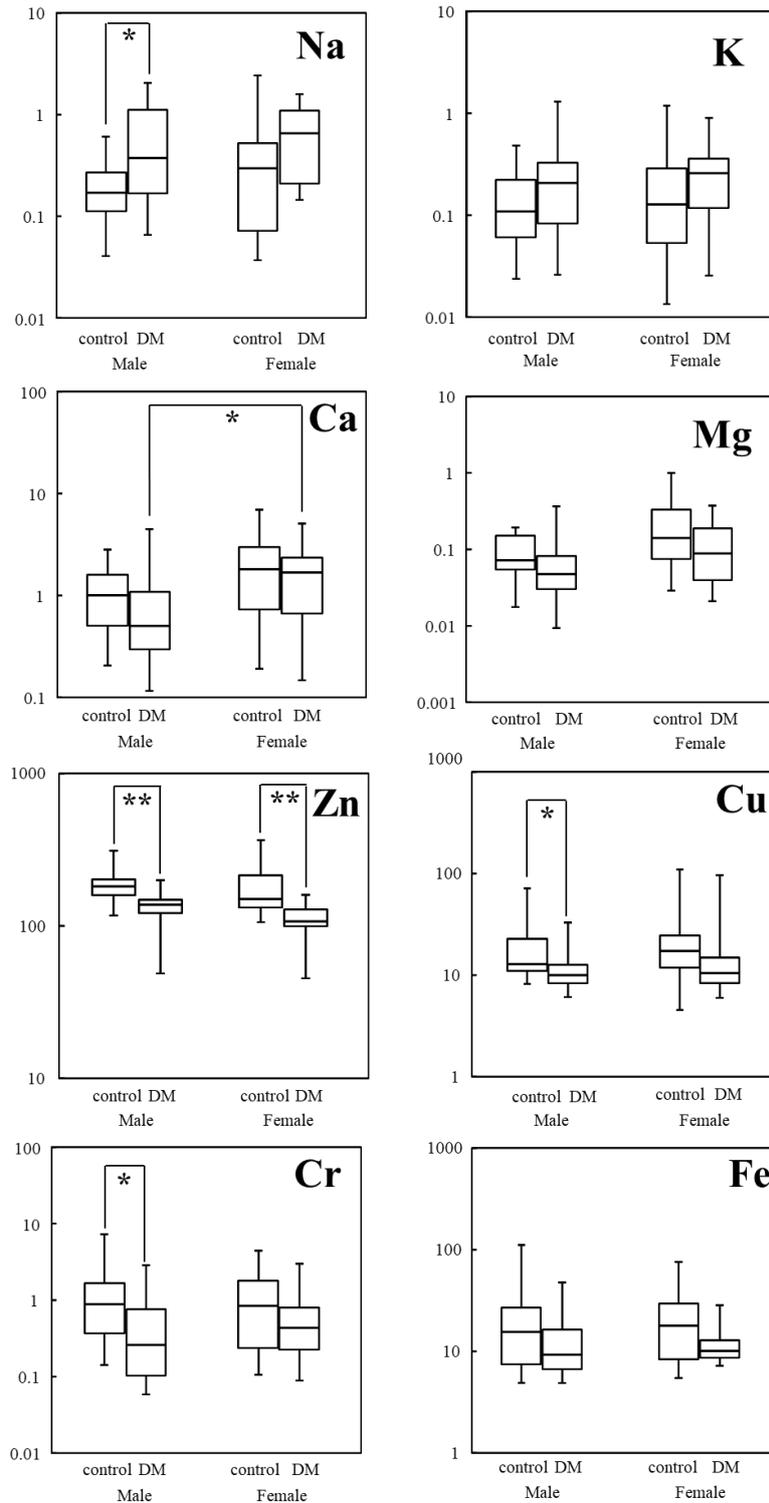


Fig. 5. Analytical Results of Na, K, Ca, Mg, Zn, Cu, Cr and Fe Concentrations in the Scalp Hair of Control and Diabetics (DM). The vertical axis was expressed by mg/g or µg/g. see Table 8. \*p<0.05, \*\*p<0.01.

### 第3節 結果

#### 第1項 糖尿病患者と健常人の頭髪中の安定同位体比と元素濃度

糖尿病患者の  $\delta^{13}\text{C}$  値 ( $-19.7\pm 0.6\text{‰}$ ,  $n=42$ ) は健常人 ( $-19.3\pm 0.7\text{‰}$ ,  $n=54$ ) よりも有意に低かった (Table 8,  $p<0.01$ )。男性の  $\delta^{13}\text{C}$  値は、健常人 ( $-19.0\pm 0.8\text{‰}$ ,  $n=23$ ) より糖尿病患者 ( $-19.6\pm 0.7\text{‰}$ ,  $n=27$ ) が有意に低く ( $p<0.05$ )、女性の  $\delta^{13}\text{C}$  値は、健常人 ( $-19.4\pm 0.6\text{‰}$ ,  $n=31$ ) より糖尿病患者 ( $-19.8\pm 0.4\text{‰}$ ,  $n=15$ ) がわずかに低かった。

一方、糖尿病患者の  $\delta^{15}\text{N}$  値 ( $9.3\pm 0.8$ ,  $n=42$ ) は健常人 ( $9.2\pm 0.5$ ,  $n=54$ ) とほぼ等しかった。男性の  $\delta^{15}\text{N}$  値は、健常人 ( $9.3\pm 0.4\text{‰}$ ,  $n=23$ ) と糖尿病患者 ( $9.1\pm 0.8\text{‰}$ ,  $n=27$ ) でほぼ等しかった。一方、女性の  $\delta^{15}\text{N}$  値は、健常人 ( $9.1\pm 0.5\text{‰}$ ,  $n=31$ ) より糖尿病患者 ( $9.6\pm 0.8\text{‰}$ ,  $n=15$ ) がわずかに高かった。

健常人と糖尿病患者の頭髪中の 15 元素濃度の分析結果を Table 8 に示し、糖尿病の発症に関連すると思われる 8 元素を、男性と女性に分けて、箱ひげ図で表した (Fig. 5)。

男性、女性のいずれの場合でも、糖尿病患者の Na と K 濃度はそれぞれ健常人よりも高い値を示し、特に男性の Na 濃度の場合には有意に高い値であった ( $p<0.05$ )。糖尿病患者の Ca、Mg、Zn、Cu、Cr 及び Fe 濃度は健常人よりも低く、特に男性と女性の Zn 濃度 ( $p<0.05$ )、さらに男性の Cu 濃度と Cr 濃度 ( $p<0.05$ ) は健常人よりも有意に低かった。また、健常人と糖尿病患者の Na、Ca 及び Mg 濃度は、男性よりも女性でわずかに高い値を示した。

結果を箱ひげ図に示していないが、健常人の Se、As 及び Hg 濃度は、男性が女性よりも有意に高かった (Table 8,  $p<0.05$ )。しかし、健常人と糖尿病患者の間では、男性と女性のいずれの場合にも、有意差は認められなかった。

Table 9 に健常人と糖尿病患者の HbA1c 値、 $\delta^{13}\text{C}$  値、 $\delta^{15}\text{N}$  値及び 8 元素濃度の相関行列を示した。男性と女性のいずれの場合にも、Na-K 濃度間 ( $p<0.01$ )、Ca-Mg 濃度間 ( $p<0.01$ )、Cr-Fe 濃度間 ( $p<0.01$ ) で有意な正の相関が認められた。さらに男性では Ca-Cu 濃度間 ( $p<0.01$ )、Ca-Cr 濃

度間 ( $p<0.05$ )、Mg-Zn 濃度間 ( $p<0.05$ )、Mg-Cu 濃度間 ( $p<0.01$ ) 及び Mg-Cr 濃度間 ( $p<0.05$ ) で有意な正の相関が認められ、女性では Ca-Na 濃度間 ( $p<0.05$ )、Ca-Mg 濃度間 ( $p<0.01$ ) 及び Mg-Zn 濃度間 ( $p<0.01$ ) で有意な正の相関が認められた。男性の HbA1c 値は Na 濃度 ( $p<0.05$ ) 及び K 濃度 ( $p=0.143$ ) との間に正の相関が認められたが、Ca 濃度 ( $p<0.05$ )、Mg 濃度  $p<0.05$ 、Zn 濃度 ( $p<0.01$ )、Cu 濃度 ( $p<0.01$ )、Cr 濃度 ( $p<0.01$ ) 及び Fe 濃度 ( $p=0.112$ ) との間には負の相関が認められた。一方、女性の HbA1c 値は Na 濃度 ( $p<0.05$ ) 及び K 濃度 ( $p<0.05$ ) と有意な正の相関を示したが、Zn 濃度 ( $p<0.01$ ) 及び Fe 濃度 ( $p<0.10$ ) とは負の相関を示した。男性の  $\delta^{13}\text{C}$  値は、Ca 濃度 ( $p<0.05$ )、Mg 濃度 ( $p<0.05$ )、Cr 濃度 ( $p<0.01$ ) 及び Fe 濃度 ( $p<0.05$ ) と有意な正の相関を示したが、女性の  $\delta^{13}\text{C}$  値は Ca 濃度 ( $p<0.05$ )、Zn 濃度 ( $p<0.01$ ) 及び Fe 濃度 ( $p<0.05$ ) と有意な正の相関を示した。男性の  $\delta^{15}\text{N}$  値と Cr 濃度との間には有意な相関 ( $p<0.01$ ) が認められたが、女性の場合には相関が認められなかった。

## 第 2 項 主成分分析

健康人と糖尿病患者の 8 元素濃度の主成分分析を男性と女性に分けて行った (Table 10)。男性と女性のいずれの場合でも、第 4 成分までの固有値は 1 以上であり、第 4 成分までの累積寄与率は男性で 82.7%、女性で 86.0% であった。

固有ベクトルが 0.3 以上のものを主成分とした。男性の場合、第 1 成分の主成分は Ca、Mg 及び Cu 濃度、第 2 成分の主成分は Cr と Fe 濃度、第 3 成分の主成分は Na と K 濃度、第 4 成分の主成分は Zn 濃度であった。男性糖尿病患者の第 3 成分と第 4 成分のコンポーネントスコアは健康な男性の場合と比べて、それぞれ有意に異なった ( $p<0.05$  又は  $p<0.01$ )。男性の糖尿病患者と健康人の  $\delta^{13}\text{C}$  値を合わせて解析したところ、その  $\delta^{13}\text{C}$  値は第 1 成分と第 2 成分のコンポーネントスコアとそれぞれ有意に相関し ( $p<0.05$ )、 $\delta^{15}\text{N}$  値は第 2 成分のコンポーネントスコアと有意に相関した ( $p<0.05$ )。一方、女性では、第 1 成分の主成分は Ca、Mg 及び Zn 濃度、第 2 成分の主成分は Na と K 濃度、第 3 成分の主成分は Cr と Fe 濃度、第 4 成分の主成

分は Cu 濃度であった。女性糖尿病患者の第 1 成分と第 2 成分のコンポーネントスコアはそれぞれ健常な女性の場合と有意に異なった ( $p < 0.05$ )。女性の糖尿病患者と健常人の  $\delta^{13}\text{C}$  値を合わせて解析したところ、その  $\delta^{13}\text{C}$  値は第 1 成分のコンポーネントスコアと有意な正の相関を示し ( $p < 0.05$ )、第 3 成分とも弱い相関 ( $p < 0.10$ ) が認められたが、第 2 成分及び第 4 成分と  $\delta^{13}\text{C}$  値の間には相関が見られなかった。一方、 $\delta^{15}\text{N}$  値と第 1 成分から第 4 成分の各コンポーネントスコア間には相関は認められなかった。

### 第 3 項 多重ロジスティック回帰分析

8 元素濃度 (対数値) を説明変数としてステップワイズ変数増減法による多重ロジスティック回帰分析を行い、糖尿病と最も関連する元素を検索し、糖尿病患者であるか、あるいは健常人 (非糖尿病) であるかを判別した (Table 11)。この結果、男性では Cr、Ma 及び Zn 濃度 (対数値) が選択され ( $\chi^2$  検定,  $p < 0.01$ )、女性では Fe 及び Zn 濃度が選択された ( $\chi^2$  検定,  $p < 0.01$ )。各説明変数のオッズ比及びオッズ比の 95%信頼区間を Table 11 に示した。モデル  $\chi^2$  値は男女ともに有意 ( $p < 0.01$ ) であり、各説明変数も有意 ( $p < 0.05$ ) であった。なお、各説明変数の間には強い相関 ( $|r| > 0.9$ 、Table 9) が認められなかったことから、各説明変数間に多重共線性は存在しなかった。即ち説明変数の選択は適切であった。なお、8 元素濃度に  $\delta^{13}\text{C}$  値と  $\delta^{15}\text{N}$  値を加えて回帰分析をした場合でも、同じ元素が選択された。

$$\text{男性 score} = -3.465 \times [\text{Cr}] + 4.746 \times [\text{Na}] - 21.329 \times [\text{Zn}] + 95.097$$

$$\text{女性 score} = -4.459 \times [\text{Fe}] - 19.064 \times [\text{Zn}] + 115.244$$

$$\text{判別式 } p = 1 / (1 + \exp(-1 \times \text{score}))$$

男性と女性のいずれの score の式にも Zn 濃度が含まれており、そのオッズ比はいずれもほぼゼロであった。男性の場合、Zn 濃度の係数 (絶対値) は Cr 濃度と Na 濃度の係数よりもはるかに大きく、女性の場合でも Zn の係数は Fe 濃度の係数よりもはるかに大きかった。これらの結果は Zn 濃度が判別に大きく寄与していることを示している。ホスマー・レメショウによ

る回帰モデルの適合性の検定結果は、男性が  $p=0.250$ 、女性が  $p=0.329$  であり、いずれも良好であった。また、実測値に対して予測値が $\pm 3SD$ を超えるような外れ値は存在しなかった。

Score の値を判別式に代入して求めた  $p$  値が  $0.5$  より大きい場合には糖尿病患者、一方、小さい場合には健常人と判別される。男性の健常人と糖尿病患者の正判別率はそれぞれ  $87\%$  と  $89\%$  (平均的中率  $88.0\%$ ) であり、女性の健常人と糖尿病患者の正判別率はそれぞれ  $90\%$  と  $87\%$  (平均的中率  $89.1\%$ ) であり、いずれも良好な判別率であった。

Table 11. Multiple Logistic Regression Analysis.

Males

	Partial regression	p-value	Odds ratio	95% Confidence interval	
	coefficient	(p)		Lower limit	Upper limit
Cr	-3.465	0.018	0.031	0.002	0.545
Na	4.746	0.009	115.079	3.274	4045.269
Zn	-21.329	0.005	0.000	0.000	0.002
Constant	95.097	0.015			

Model  $\chi^2$  test (p<0.01).

Females

	Partial regression	p-value	Odds ratio	95% Confidence interval	
	coefficient	(p)		Lower limit	Upper limit
Fe	-4.459	0.028	0.012	0.000	0.619
Zn	-19.064	0.010	0.000	0.000	0.011
Constant	115.244	0.006			

Model  $\chi^2$  test (p<0.01).

#### 第4節 考察

糖尿病患者の頭髪中 Ca、Mg、Zn、Cu、Cr 及び Fe 濃度は、性別にかかわらず健常人より低かった (Table 8 と Fig. 5)。これらの結果は、男性と女性を分けずに検討した前章の結果とほぼ一致した。糖尿病患者で認められたこれらの元素濃度の減少は、糖尿病の発症と増悪に関係すると思われる。

健常者の頭髪中の Na と K 濃度は、男性よりも女性の方がそれぞれ高い値であった。糖尿病患者の頭髪中の Na と K 濃度は、男性、女性のいずれの場合も、健常人より高かった。この Na と K 濃度の増加も糖尿病の発症と関係すると思われる。糖尿病患者の頭髪中の Na と K 濃度に関する報告は少ないが、Skalnaya and Demidov の女性を調査対象とした報告で、<sup>16)</sup> 糖尿病患者と肥満患者の頭髪中 Na 及び K 濃度は健常人よりも有意に高く、Ca、Mg 及び Zn 濃度は有意に低いと報告している。

男性において、頭髪中の Na 濃度は HbA1c 値と正の相関 ( $p < 0.05$ ) を示したが、Ca 濃度 ( $p < 0.05$ )、Mg 濃度 ( $p < 0.05$ )、Zn 濃度 ( $p < 0.01$ )、Cu 濃度 ( $p < 0.01$ ) 及び Cr 濃度 ( $p < 0.01$ ) は HbA1c 値と負の相関を示した (Table 9)。一方、女性においては、Na 濃度と K 濃度は HbA1c 値と正の相関 ( $p < 0.05$ ) を示し、Zn 濃度とは負の相関 ( $p < 0.01$ ) を示した (Table 9)。これらの相関は、糖尿病患者の頭髪中の Na と K 濃度が健常人より高く、Ca、Mg、Zn、Cu、Cr 及び Fe 濃度が低い結果を反映していると思われる。前章 (Fig. 3a) では、HbA1c 値の増加に伴う頭髪中 Ca 濃度の低下は認められなかったが、男性と女性に分けて検討した本章では、男性の Ca 濃度と HbA1c 値の間に有意な負の相関が認められた (Table 9)。これは、糖尿病患者の頭髪中 Ca 濃度に性差が存在するためと考えられる。著者は本研究において糖尿病患者の頭髪中の Na 濃度と HbA1c 値の間に正の相関があり、HbA1c 値と Zn 濃度などの微量元素との間に負の相関があることを初めて明らかにした。

男性及び女性のいずれの場合でも、Na-K 濃度間、Ca-Mg 濃度間、Cr-Fe 濃度間に強い相関が認められた (Table 9,  $p < 0.01$ )。これまで Na-K 濃度の相関と Ca-Mg 濃度の相関についての多くの報告があるが、Cr-Fe 濃度の相関に関する報告は見当たらない。なぜ頭髪中の Cr 濃度と Fe 濃度が正の相関を示すのか、その理由は不明である。これらの強い相関に加えて、男性で

は、Ca、Mg、Zn、Cu、Cr 及び Fe 濃度間でいくつかの有意な相関が見られ ( $p < 0.05$ )、女性ではこれらの元素間で弱い相関が認められた。ポーランド人の頭髪中の 33 元素を分析した Chojnacka らの調査<sup>61)</sup> (男性、女性合わせて 83 人で K は測定していない) では、Na 濃度と他の必須元素濃度間には有意な相関はなく、Ca、Mg、Zn 及び Cu 濃度の間にはいくつかの弱い相関が認められる。<sup>61)</sup> 本研究の相関は健常人に糖尿病患者を加え、それを男性と女性を分けて得られたもので、Chojnacka ら<sup>61)</sup> の健常人を対象とした調査とは調査方法が異なる。さらに、彼らは性差を考慮していないこと、また人種による違いなども相違の原因として挙げられる。

著者は糖尿病患者において、男性の  $\delta^{13}\text{C}$  値と HbA1c 値の間に有意な相関があること、男性の  $\delta^{13}\text{C}$  値 と Ca、Mg、Cr 及び Fe 濃度の間に有意な相関があることを初めて明らかにした。それに加えて健常な日本人女性の方が男性より Na、K 及び Ca 濃度が高い傾向があることを明らかとしたが、これらの性差は 25 年前に発表された Kamakura<sup>29)</sup> の結果と一致する。本研究はさらに健常人と糖尿病患者の頭髪中元素濃度と  $\delta^{13}\text{C}$  値には、性差があることを明らかにした。

主成分分析により、頭髪中の 8 元素は第 1 成分から第 4 成分にグループ化された。コンポーネントスコアの有意差検定から、男性では Ca、Mg、Cu、Na、K 及び Zn 濃度が糖尿病と関連が深く、女性では Ca、Mg、Zn、Na 及び K 濃度が糖尿病と関連が深いことが示された (Table 10)。また、主成分分析のコンポーネントスコアと安定同位体比の相関を検討した結果から、男性の  $\delta^{13}\text{C}$  値は Ca、Mg、Cu、Cr 及び Fe 濃度と関連し、女性の  $\delta^{13}\text{C}$  値は Ca、Mg 及び Zn 濃度と関連することが推定された。主成分分析によるこの結果は、Table 9 に示した 8 元素濃度と  $\delta^{13}\text{C}$  値との間の相関結果とほぼ一致した。主成分分析の結果から、Na と K 濃度は糖尿病患者で高く、Ca、Mg、Cu、及び Zn 濃度は低いことが確認された。

メタボリックシンドロームは糖尿病の危険因子の一つである。Park ら<sup>23)</sup> は、韓国人のメタボリックシンドローム患者の頭髪中必須元素を測定した。即ち、メタボリックシンドローム患者の Na と K 濃度は健常人よりも有意に高いが、Ca、Mg、Zn 及び Cu 濃度は有意に低いと報告した。その後、別

の韓国の研究グループがメタボリックシンドローム患者の頭髮中  $\delta^{13}\text{C}$  値と  $\delta^{15}\text{N}$  値を測定した。<sup>25)</sup> 即ち、韓国のメタボリックシンドローム患者の頭髮中  $\delta^{15}\text{N}$  値は健常人よりも僅かではあるが有意に高く ( $11.68\pm 0.92\%$  と  $11.53\pm 0.81\%$ ,  $p<0.05$ )、 $\delta^{13}\text{C}$  値はほぼ同じであると報告した ( $-20.46\pm 0.92\%$  と  $-20.37\pm 0.87\%$ )。本研究において認められた糖尿病患者と健常人の必須元素の相違 (Table 8) は、韓国人のメタボリックシンドローム患者と健常人との相違と類似していた。しかし、本研究において認められた糖尿病患者と健常人の  $\delta^{13}\text{C}$  値と  $\delta^{15}\text{N}$  値の相違は、韓国の場合とは異なった。この相違の原因として、人種差のみではなく、韓国の調査は性差を考慮していないことなどが挙げられる。

日本の健常人の  $\delta^{13}\text{C}$  値及び  $\delta^{15}\text{N}$  値は (Table 8)、韓国の健常人を対象とした研究結果<sup>25)</sup> と異なった。これは、頭髮中  $\delta^{13}\text{C}$  値及び  $\delta^{15}\text{N}$  値は疾患だけでなく、食べ物の嗜好や地理的要因が影響を与えるからである。<sup>24,36,61,63)</sup> 正確な結論を得るためには、性別や年齢などを調整した厳密な調査が必要である。近年報告された日本人の大規模調査 (男性 539 名、女性 766 名) の結果は本研究結果と類似しているが、男性と女性の  $\delta^{13}\text{C}$  値及び  $\delta^{15}\text{N}$  値は僅かではあるが有意に異なっている。<sup>63)</sup>

男性及び女性の Zn 濃度は健常人よりも糖尿病患者で有意に低く (Table 8)、箱ひげ図における Zn 濃度の SD は他の元素より小さかった (Fig. 5)。判別式における Zn 濃度の係数が最も大きく、オッズ比が非常に小さいため、Zn が糖尿病の判別に最も影響を与えている。前章では、HbA1c 値が 7% 未満である軽症の糖尿病患者においても Zn 濃度の有意な低下が認められた。この結果からも Zn 濃度の減少が糖尿病の発症に最も関連していることが示唆される。Jansen ら<sup>64)</sup> は、Zn と糖尿病の関係をメタ解析し、Zn の補給が血糖値と HbA1c 値を低下させ、Zn が慢性代謝障害における血糖調節に寄与することを示唆している。<sup>65)</sup> さらに、Zn、Cu、Cr 及び Mg 濃度を調査したメタ解析では、2 型糖尿病患者の血中の Zn 濃度が低いことを報告している。<sup>66)</sup>

健常な男性の頭髮中 Hg 濃度は健常な女性よりも有意に高かった (Table 8)。日本人は、魚の摂取量が多いため、諸外国に比べて頭髮中の Hg 濃度が

高値を示し、男性は女性より魚の摂取量が多いため、その Hg 濃度が高いと考えられている。<sup>24,29,36)</sup> 一方、健常な男性の頭髪中 Se 濃度は健常な女性よりも有意に高かった (Table 8)。Hg と Se は体中で低毒性の複合体を形成する<sup>67)</sup> ため、Hg 濃度と関連して、男性の Se 濃度が高いと考えられる。一方、糖尿病患者の頭髪中の Pb、Cd 及び As 濃度は、健常人よりも高いと報告されている<sup>17)</sup> が、本研究では大きな差は認められなかった (Table 8)。

## 総括

以下に本研究で得られた研究結果をまとめる。

1. HbA1c 値が 7%以上の糖尿病患者の頭髮中 Zn、Cu、及び Cr 濃度は、健常人と比べて有意に低かった。Zn 濃度は HbA1c 値 7%未満の患者においても、健常人よりも有意に低かった。
2. 頭髮中 Zn、Cu、Cr、Fe 及び Mg 濃度は HbA1c 値の増加に伴い直線的、又は指数関数的に減少した。この結果から日本人の糖尿病発症には、インスリン合成・分泌・感受性低下及び ROS の消去不全の両方が関与していると考えられる。
3. 糖尿病患者の HbA1c 値と eGFR の間には、予想に反して正の相関が認められた。糖尿病の発症初期に多く認められる hyperfiltration が、HbA1c 値が高い患者に多く認められたからである。この結果から、eGFR のみでは腎症の病期を正確に判定することはできず、糖尿病の早期から微量アルブミン尿の測定が必要と考えられる。
4. 糖尿病患者の Na と K 濃度は性別に関わらず健常人よりも高く、Ca、Mg、Zn、Cu、Cr 及び Fe 濃度は健常人よりも低かった。男性の  $\delta^{13}\text{C}$  値では、Ca、Mg、Cr 及び Fe 濃度と正の相関を示し、HbA1c 値とは負の相関を示した。一方、女性においては、 $\delta^{13}\text{C}$  値は Ca、Zn 及び Fe 濃度と正の相関を示したが、HbA1c 値とは相関が認められず、男性の場合と異なった。
5. 多重ロジスティック回帰分析により、男性では Zn、Cr 及び Na 濃度、女性では Zn 及び Fe 濃度を含む式により、糖尿病であるか否かの判別を行った。その判別的中率は男性では 88.0%、女性では 89.1%と高く、いずれの場合でも Zn 濃度が判別的中率に大きく寄与していた。

本研究は、ヒト頭髪中元素、 $\delta^{13}\text{C}$  値及び  $\delta^{15}\text{N}$  値を測定することにより、糖尿病の診断、血糖コントロールの状況及び栄養状態を評価できる可能性を示している。頭髪は採取や保管が簡便であり、頭髪から得られた情報は血液や尿と比べて長期的なものである。今後、糖尿病予備軍における頭髪中元素濃度と  $\delta^{13}\text{C}$  値及び  $\delta^{15}\text{N}$  値をさらに調査し、糖尿病の発症予防、早期発見、治療などに繋げたい。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究遂行において終始熱心なご指導並びに助言を賜りました北海道医療大学大学院薬学研究科基盤薬学系 遠藤 哲也准教授に心より深謝いたします。

また、終始有益なご助言、ご支援を賜りました北海道医療大学薬学部実務薬学講座病院薬学 木村 治講師に深く感謝いたします。

さらに、本論文の主査として論文をご精読頂き、また発表の際の座長としてご助言、ご指導を賜りました北海道医療大学大学院基盤薬学系 吉村 昭毅教授に厚く感謝申し上げます。

加えて、本論文の副査として、多くのご助言をいただきました北海道医療大学大学院薬学研究科基盤薬学系 村井 毅教授並びに北海道医療大学大学院臨床薬学系 平野 剛教授に深く感謝申し上げます。

平成 31 年 3 月

北海道医療大学大学院薬学研究科 堀田 洋平

## 引用文献

- 1) Olokoba A.B., Obateru O.A., Olokoba L.B., Type 2 Diabetes Mellitus: A Review of Current Trends. *Oman Med. J.*, **27**, 269–273 (2012).
- 2) Treatment Guide for diabetes 2016–2017 edited by Japan Diabetes Society.  
〈 [http://www.fa.kyorin.co.jp/jds/uploads/Treatment\\_Guide\\_for\\_Diabetes\\_2016-2017.pdf](http://www.fa.kyorin.co.jp/jds/uploads/Treatment_Guide_for_Diabetes_2016-2017.pdf)〉
- 3) Jerums G., Premaratne E., Panagiotopoulos S., MacIsaac R.J. The clinical significance of hyperfiltration in diabetes. *Diabetologia*, **53**, 2093–2104 (2010).
- 4) Tonneijck L., Muskiet M.H., Smits M.M., van Bommel E.J., Heerspink H.J., van Raalte D.H., Joles J.A., Glomerular hyperfiltration in diabetes: Mechanisms, clinical significance, and treatment. *J. Am. Soc. Nephrol.*, **28**, 1023–1039 (2017).
- 5) Giacco F., Brownlee M., Oxidative stress and diabetic complications. *Circ. Res.*, **107**, 1058–1070 (2010).
- 6) Doddigarla Z., Parwez I., Ahmad J., Correlation of serum chromium, zinc, magnesium and SOD levels with HbA1c in type 2 diabetes: A cross sectional analysis. *Diabetes Metab. Syndr.*, **10**, S126–S129 (2016).
- 7) 田中芳明, 小林英史, 浅川貴博, 八木実, Immunonutrition における各種免疫修飾成分の役割. *外科治療*, **94**, 687–694 (2006)
- 8) Mooradian A.D., Failla M., Hoogerf B., Maryniuk M., Wyle-Rosett J. Selected vitamins and minerals in diabetes. *Diabetes Care*, **17**, 464–479 (1994).
- 9) Chen M.D., Lin P.Y., Tsou C.T., Wang J.J., Lin W.H., Selected metals status in patients with noninsulin-dependent diabetes mellitus. *Biol. Trace Elem. Res.*, **50**, 119–124 (1995).
- 10) Huerta M.G., Roemmich J.N., Kington M.L., Bovbjerg V.E., Weltman A.L., Holmes V.F., Patrie J.T., Rogol A.D., Nadler J.L., Magnesium deficiency is associated with insulin resistance in obese children. *Diabetes Care*, **28**, 1175–1181 (2005).

- 11) Vincent J.B., Recent advances in the nutritional biochemistry of trivalent chromium. *P. Nutr. Soc.*, **63**, 41–47 (2004).
- 12) Kinlaw W.B., Levine A.S., Morley J.E., Silvis S.E., McClain C.J., Abnormal zinc metabolism in type II diabetes mellitus. *Am. J. Med.*, **75**, 273–277 (1983).
- 13) Tamaki M., Fujimoto Y., Hara A., Uchida T., Tamura Y., Takeno K., Kawaguchi M., Watanabe T., Ogihara T., Fukunaka A., Shimizu T., Mita T., Kanazawa A., Imaizumi M.O., Abe T., Kiyonari H., Hojyo S., Fukada T., Kawauchi T., Nagamatsu S., Hirano T., Kawamori R., Watada H., The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *J. Clin. Invest.*, **123**, 4513–4524 (2013).
- 14) Kazi T.G., Afridi H.I., Kazi N., Jamali M.K., Arain M.B., Jalbani N., Kandhro G.A., Copper, chromium, manganese, iron, nickel, and zinc levels in biological samples of diabetes mellitus patients. *Biol. Trace Elem. Res.*, **122**, 1–18 (2008).
- 15) Taneja S.K., Mahajan M., Gupta S., Singh K.P., Assessment of copper and zinc status in hair and urine of young women descendants of NIDDM parents. *Biol. Trace Elem. Res.*, **62**, 255–264 (1998).
- 16) Skalnaya M.G., Demidov V.A., Hair trace element contents in women with obesity and type 2 diabetes. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **21**, 59–61 (2007).
- 17) Afridi H.I., Kazi T.G., Kazi N., Jamali M.K., Arain M.B., Jalbani N., Sarfaraz R.A., Shah A., Kandhro G.A., Shah A.Q., Baig J.A., Potassium, calcium, magnesium, and sodium levels in biological samples of hypertensive and nonhypertensive diabetes mellitus patients. *Biol. Trace Elem. Res.*, **124**, 206–224 (2008).
- 18) Viktorínová A., Toserová E., Krizko M., Duracková Z., Altered metabolism of copper, zinc, and magnesium is associated with increased levels of glycated hemoglobin in patients with diabetes mellitus. *Metabolism*, **58**, 1477–1482 (2009).
- 19) Wiernsperger N., Rapin J.R., Trace elements in glucometabolic disorders: an update *Diabetol. Metab. Syndr.*, **2**, 1–9 (2010).

- 20) Basaki M., Saeb M., Nazifi S., Shamsaei A., Zinc, copper, iron, and chromium concentrations in young patients with type 2 diabetes mellitus. *Biol. Trace Elem. Res.*, **148**, 161–164 (2012).
- 21) Wołowiec P., Michalak I., Chojnacka K., Mikulewicz M., Hair analysis in health assessment. *Clin. Chim. Acta.*, **419**, 139–171 (2013).
- 22) Petzke K.J., Fuller B.T., Metges C.C., Advance in natural stable isotope ratio analysis of human hair to determine nutritional and metabolic status. *Curr. Opin. Clin. Metab. Care*, **13**, 532–540 (2010).
- 23) Park S.B., Choi S.W., Nam A.Y., Hair tissue mineral analysis and metabolic syndrome. *Biol. Trace Elem. Res.*, **130**, 218–28 (2009).
- 24) Endo T., Haraguchi K., High mercury levels in hair samples from residents of Taiji, a Japanese whaling town. *Mar. Pollut. Bull.*, **60**, 743–747 (2010).
- 25) Park J.K., Ahn S.V., Kim M.K., Lee K.S., Koh S.B., Bong Y.S., The association between carbon and nitrogen stable isotope ratios of human hair and metabolic syndrome. *Clin. Chim. Acta.*, **450**, 72–77 (2015).
- 26) Endo T., Hayasaka M., Ogasawara H., Hotta Y., Kimura O., Petzke K.J., Correlation between mercury concentration, and stable isotope ratios of carbon and nitrogen of amino acids in scalp hair from whale meat eaters and heavy fish eaters. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **31**, 745–752 (2017).
- 27) Hayasaka M., Ogasawara H., Hotta Y., Tsukagoshi K., Kimura O., Kura T., Tarumi T., Muramatsu H., Endo T., Nutritional assessment using stable isotope ratios of carbon and nitrogen in the scalp hair of geriatric patients who received enteral and parenteral nutrition formulas. *Clin. Nutr.*, **36**, 1661–1668 (2017).
- 28) 中島憲一郎, 乱用薬物の毛髪分析, *分析化学*, 2008, **57**, 783–799.
- 29) Kamakura M., A study of the characteristics of trace elements in the hair of Japanese. Reference values and element patterns for determining normal levels. *Nihon Eiseigaku Zasshi*, **38**, 823–38 (1983).
- 30) Chojnacka K., Michalak I., Zielińska A., Górecka H., Górecki H., Inter-relationship between elements in human hair: The effect of gender.

- Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **73**, 2022–2028 (2010).
- 31) Kuzuya T. Prevalence of diabetes mellitus in Japan compiled from literature. *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **24**, S15–S21 (1994).
- 32) Diabetes in the UK 2010: Key statistics on diabetes.  
〈[https://www.diabetes.org.uk/resources-s3/2017-11/diabetes\\_in\\_the\\_uk\\_2010.pdf](https://www.diabetes.org.uk/resources-s3/2017-11/diabetes_in_the_uk_2010.pdf)〉 .
- 33) O'Brien D.M., Stable isotope ratios as biomarkers of diet for health research. *Annu. Rev. Nutr.*, **35**, 565–594 (2015).
- 34) Kelly J.F., Stable isotopes of carbon and nitrogen in the study of avian and mammalian trophic ecology. *Can. J. Zool.*, **78**, 1–27 (2000).
- 35) Tokui N., Minari Y., Kusunoki K., Yoshimura T., Yamamoto T., Minagawa M., Evaluation of dietary intake using carbon and nitrogen isotope analysis of human hair of Chinese living in southern part of China. *J. UOEH*, **22**, 219–228 (2000).
- 36) Endo T., Hayasaka M., Ogasawara H., Kimura O., Kotaki Y., Haraguchi K., Relationships among mercury concentration, and stable isotope ratios of carbon and nitrogen in the scalp hair of residents from seven countries: Effects of marine fish and C4 plants consumption. *PLoS One*, **10**, e0128149 (2015).
- 37) Buchardt B., Bunch V., Helin P., Fingernails and diet: Stable isotope signatures of a marine hunting community from modern Uummannaq, North Greenland. *Chem. Geol.*, **244**, 316–329 (2007).
- 38) Thompson A.H., Chesson L.A., Podlesak D.W., Bowen G.J., Cerling T.E., Ehleringer J.R., Stable isotope analysis of modern human hair collected from Asia (China, India, Mongolia, and Pakistan). *Am. J. Phys. Anthropol.*, **141**, 440–451 (2010).
- 39) Nardoto G.B., Silva S., Kendall C., Ehleringer J.R., Chesson L.A., Ferraz E.S.B., Moreira M.Z., Ometto J.P.H.B., Martinelli L.A., Geographical patterns of human diet derived from stable-isotope analysis of fingernails. *Am. J. Phys. Anthropol.*, **131**, 137–146 (2006).
- 40) Fuller B.T., Fuller J.L., Sage N.E., Harris D.A., O'Connell T.C., Hedges R.E.,

Nitrogen balance and  $\delta^{15}\text{N}$ : why you're not what you eat during pregnancy. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **18**, 2889–2896 (2004).

- 41) Mekota A.M., Grupe G., Ufer S., Cuntz U., Identifying starvation episodes using stable isotopes in hair. *Rechtsmedizin*, **19**, 431–440 (2009).
- 42) Patel P.S., Cooper A.J., O'Connell T.C., Kuhnle G.G., Kneale C.K., Mulligan A.M., Luben R.N., Brage S., Khaw K.T., Wareham N.J., Forouhi N.G., Serum carbon and nitrogen stable isotopes as potential biomarkers of dietary intake and their relation with incident type 2 diabetes: the EPIC-Norfolk study. *Am. J. Clin. Nutr.*, **100**, 708–718(2014).
- 43) Hotta Y., Fujino R., Kimura O., Endo T., Essential and non-essential elements in scalp hair of diabetics: Correlations with glycated hemoglobin (HbA1c). *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 1034–1039 (2018).
- 44) Hotta Y., Fujino R., Kimura O., Fujii Y., Haraguchi K., Endo T., Assessment of diabetics by the quantification of essential elements and stable isotope ratios of carbon and nitrogen in scalp hair. *Obes. Med.*, **15**, 100113 (2019).
- 45) Kajimoto Y., Kaneto H., Role of oxidative stress in pancreatic  $\beta$ -cell dysfunction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1011**, 168–176 (2004).
- 46) Monnier L., Mas E., Ginet C., Michel F., Villon L., Cristol J.P., Colette C., Activation of oxidative stress by acute glucose fluctuations compared with sustained chronic hyperglycemia in patients with type 2 diabetes. *J.A.M.A.*, **295**, 1681–1685 (2006).
- 47) Xu F., Zhao LH., Su JB., Chen T., Wang XQ., Chen JF., Wu G., Jin Y., Wang XH. The relationship between glycemic variability and diabetic peripheral neuropathy in type 2 diabetes with well-controlled HbA1c. *Diabetol. Metab. Syndr.*, **6(1)**, 139–145 (2014).
- 48) Remuzzi G., Bunigni A., Remuzzi A., Mechanisms of progression and regression of renal lesions of chronic nephropathies and diabetes. *J. Clin. Invest.* 116(2), 288–296 (2006).
- 49) Hallowell B., Gutteridge., J.M.C., “Free Radicals in Biology and Medicine”.

- Oxford University Press*, 888p (1985).
- 50) Ono M., Nishigaki Y., Fasting plasma glucose and glycosylated hemoglobin levels in mass screening. *J.A.R.M.*, **49**, 137–141 (2000).
- 51) Mita Y., Ishihara K., Ishiguro M., Takeda M., Hattori R., Murakami K., Yamada A., Yasumoto K., Elevated urinary Cr loss induces a reduction in renal Cr concentration and the negative Cr balance in streptozotocin-induced diabetic mice. *J. Nutr. Sci. Vitaminol*, **54**, 303–308 (2008).
- 52) Thompson K.H., Orvig C., Vanadium in diabetes: 100 years from phase 0 to phase I. *J. Inorg. Biochem.*, **100**, 1925–1935 (2006).
- 53) Yasuda H., Yoneshiro T., Yoshida K., Shibasaki T., Ishii T., Tsutsui T., High toxic metal levels in scalp hair of infants and children. *Biomed. Res. Trace Element*, **16**, 39–45 (2005).
- 54) Skalnaya M.G., Tinkov A.A., Demidov V.A., Serebryansky E.P., Nikonorov A.A., Skalny A.V., Age-related differences in hair trace elements: a cross-sectional study in Orenburg, Russia. *Ann. Hum. Biol.*, **18**, (2015).
- 55) Afridi H.I., Kazi T.G., Kazi N.G., Jamali M.K., Arain M.B., Sirajuddin, Baig J.A., Kandhro G.A., Wadhwa S.K., Shah A.Q., Baig J.A., Evaluation of cadmium, lead, nickel and zinc status in biological samples of smokers and nonsmokers hypertensive patients. *J. Hum. Hypertens*, **24**, 34–43 (2010).
- 56) Ochi A., Ishimura E., Tsujimoto Y., Kakiya R., Tabata T., Mori K., Shoji T., Yasuda H., Nishizawa Y., Inaba M., Trace elements in the hair of hemodialysis patients. *Biol. Trace Elem. Res.*, **143**, 825–834 (2011).
- 57) Długaszek M., Szopa M., Rzeszotarski J., Karbowski P., Magnesium, calcium and trace elements distribution in serum, erythrocytes, and hair of patients with chronic renal failure. *Magnes. Res.*, **21**, 109–117 (2008).
- 58) National Health and Nutrition Examination Survey  
<<https://www.cdc.gov/nchs/nhanes/index.htm>>
- 59) Endo T., Kimura O., Ohta C., Koga N., Kato Y., Fujii Y., Haraguchi K., Metal concentrations in the liver and stable isotope ratios of carbon and nitrogen in the muscle of silvertip shark (*Carcharhinus albimarginatus*) culled off Ishigaki

- Island, Japan: changes with growth. *PLoS One*, **11**, e0147797 (2016).
- 60) Usuda K., Kono K., Dote T., Shimizu T., Tominaga M., Koizumi C., Nakase E., Toshina Y., Iwai J., Kawasaki T., Akashi M., Log-normal distribution of the trace element data results from a mixture of stochastic input and deterministic internal dynamics. *Biol. Trace Elem. Res.*, **86**, 45–54 (2002).
- 61) Chojnacka K., Górecka H., Chojnacka A., Górecki H., Inter-element interaction in Human hair. *Environ. Toxicol. Pharmacol.*, **20**, 368–374 (2005).
- 62) Hülsemann F., Lehn C., Schneider S., Jackson G., Hill S., Rossmann A., Scheid N., Dunn P.J., Flenker U., Schänzer W., Global spatial distributions of nitrogen and carbon stable isotope ratios of modern human hair. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **29**, 2111–2121 (2015).
- 63) Kusaka S., Ishimaru E., Hyodo F., Gakuhari T., Yoneda M., Yumoto T., Tayasu I., Homogeneous diet of contemporary Japanese inferred from stable isotope ratios of hair. *Sci. Rep.*, **6**, 33122 (2016).
- 64) Jansen J., Karges W., Rink L., Zinc and diabetes-clinical links and molecular mechanisms. *J. Nutr. Biochem.*, **20**, 399–417 (2009).
- 65) Capdor J., Foster M., Petocz P., Samman S. Zinc and glycemic control: A meta-analysis of randomised placebo controlled supplementation trials in humans. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, **27**, 137–142 (2013).
- 66) Sanjeevi, N., Freeland-Graves J., Beretvas S.N., Sachdev P.K., Trace element status in type 2 diabetes: A meta-analysis. *J. Clin. Diagn. Res.*, **12**, OE01–OE08 (2018).
- 67) Yoneda S., Suzuki K.T., Equimolar Hg-Se complex binds to selenoprotein P. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **231**, 7–11 (1997).