

PIXE 法によるミネラル量測定値の個人内変動の リスク解析への影響と対策について

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大阪大学大学院医学系研究科
565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-2

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
020-0603 岩手県滝沢市留が森 348-58

⁴岩手医大サイクロトロンセンター
020-0603 岩手県滝沢市留が森 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

アトピー性皮膚炎の病因と予防策を探索することを目的として、平成 17 年に福岡市乳幼児健診事業に組み込む形でコホート調査を開始した。そして、生後あるいは産後 1 か月時点における 32 種類の毛髪ミネラル量と、生後 10 か月までのアトピー性皮膚炎発症との関連を統計学的に解析し、アトピー発症予測モデルを構築した¹⁾²⁾。アトピー性皮膚炎の発症に最も強く影響するのは遺伝的要因（家族病歴）であったが、家族病歴とは独立に 2 つの微量ミネラル（ストロンチウムとセレン）の有意性が認められ、毛髪ミネラルの医学利用への可能性を示す結果が得られた。

この初期調査において、アトピー性皮膚炎の発症を予測するロジスティックモデルは感度 66%、特異度 70%

であったが、さらなる発症予測精度の向上を目指して、昨年、6歳になった子供たちの追跡調査を行った。834組の母子のうち、追加調査への協力が得られたのは209組(25%)であった。

医学・疫学研究では、研究デザイン、サンプルサイズ等を事前に計画することが重要である。研究目的を達成するために必要なサンプルサイズは、群内と群間の分散比に依存する。群内のバラツキが大きければ、群間のバラツキを検出するのは困難であり、その場合はサンプルサイズを大きくする等の対策が必要となる。

PIXE (particle induced X-ray emission) 法による毛髪ミネラル測定値においては、バラツキの原因は主に、物理的測定誤差、毛髪の採取部位、照射位置と言われている。これらのうち採取部位と照射位置の違いは、同一個体内でのバラツキ(分散)を意味する。

追加調査では追跡率が25%と低く、サンプルサイズを十分に確保できなかった。そこで我々は、測定の信頼度を上げるための統計的な手法を考案することを試みた。

測定値の信頼性を検討する際には、“信頼係数 λ = 真値の個人間バラツキ / 観測値の個人間バラツキ = 個人間バラツキ / (個人内バラツキ + 個人間バラツキ)”を用いるのが一般的である。また、線形回帰モデルでは、回帰係数 $\hat{\beta}$ は λ 倍低めに推定されることはよく知られている³⁾。従って、 $\beta = \hat{\beta} / \lambda$ を真の不偏推定値とされている。しかし、ロジスティックモデルではこのように単純な補正法は存在しない⁴⁾。

本研究の目的は、初期調査834例のデータにおいて、個人内バラツキにより減衰したリスク推定値(回帰係数)を補正することである。これによりミネラル量と発症リスクとの正しい関連が得られる。

まずは、初期調査でアトピー性皮膚炎との有意な関連が認められたストロンチウム(Sr)について検討したので、その結果を報告する。

2 方法

2.1 対象

追加調査の6歳児209例について、2つの毛髪検体を作製した。採取部位の指定は行わなかったが、2つの検体は、採取された毛髪の根元からの距離を揃えて作製した。

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法により、毛髪中の32種類のミネラル量を得た^{5) 6)}。

2.2 個人内バラツキの推定

まず、検出限界値未満の扱いを決定し、回帰モデルの適用が可能となるよう変換を施す。

子供の人数を m とし、 i 番目の子供から得られた1回目と2回目の測定値を、それぞれ X_{1i} 、 X_{2i} とするとき、

$$X_{1i} = Z_i + \varepsilon_{1i}, X_{2i} = Z_i + \varepsilon_{2i} \quad \text{ただし、} \varepsilon_{1i}, \varepsilon_{2i} \sim N(0, \sigma_e^2)$$

なる測定誤差モデルを仮定する。ここで、 Z_i は i 番目の子供の真値で、全ての毛髪ミネラル量の平均値と定義する。また、 σ_e^2 は個人内バラツキを表し、 $\sigma_e^2 = \sum_{i=1}^m (X_{1i} - X_{2i})^2 / 2 \cdot m$ で推定される。

一方、信頼係数 λ は $V(Z) / V(X) = V(Z) / \{V(Z) + \sigma_e^2\} = \{V(X) - \sigma_e^2\} / V(X)$ と定義される。ただし、 $V(Z)$ は個人間バラツキ、 $V(X)$ は X_1 と X_2 の込みにした分散を表す。

信頼係数 λ は母集団からの無作為標本においては一定⁷⁾という性質を利用すると、834例での個人内バラツキ σ_e^2 を求めることが出来る。具体的には、追加調査209例の観測値から得られた $V(X_{209})$ と σ_e^2 、および初

期調査 834 例の観測値から得られた $V(X_{834})$ を用いて、 $\sigma_E^2 : V(X_{209}) = \sigma_E^2 : V(X_{834})$ を解く。

2.3 シミュレーション

TES (True-Equivalent Sample) 法⁷⁾を用いる。TES 法とは、観測値から個人内バラツキ (2.2 で求めた σ_E^2) を取り除いた真値相当分布を推定し、その分布を用いてリスク推定のシミュレーションを行う手法である。

2.3.1 真値相当分布の推定

アトピー群と非アトピー群の分布は、平均値のみが異なり、分散は等しい (込みの分散) とする。このとき、アトピー群の真値を Z_A 、観測値を X_A 、非アトピー群の真値を Z_N 、観測値を X_N とすると、

$$E(Z_A) = E(X_A), \quad E(Z_N) = E(X_N)$$

が成り立ち、また両群において、

$$V(X_{834}) = V(Z) + \sigma_E^2 \text{ より、} V(Z) = V(X_{834}) - \sigma_E^2$$

が成り立つ。

$E(Z_A)$ 、 $E(Z_N)$ 、 $V(Z)$ をもとに、分布を特定するパラメータ (たとえばワイブル分布の場合は、尺度 α と形状 β の 2 つのパラメータ) を、アトピー群、非アトピー群についてそれぞれ求める。

2.3.2 True Equivalent Sample の生成とリスク推定

- ① 2.3.1 で求めたアトピー群の真値相当分布から 41 個、非アトピー群の真値相当分布から 793 個の乱数を発生させ、834 個から成るデータセット Z^* (True Equivalent Sample) を生成する。
- ② ロジスティックモデル $\text{logit}(Z^*) = \alpha + \beta Z^*$ の最尤推定量 β_{Z^*} を算出する。
- ①②を 500 回繰り返し、得られた β_{Z^*} の分布と平均値を求める。

2.3.3 Observed Equivalent Sample の生成と妥当性の検証

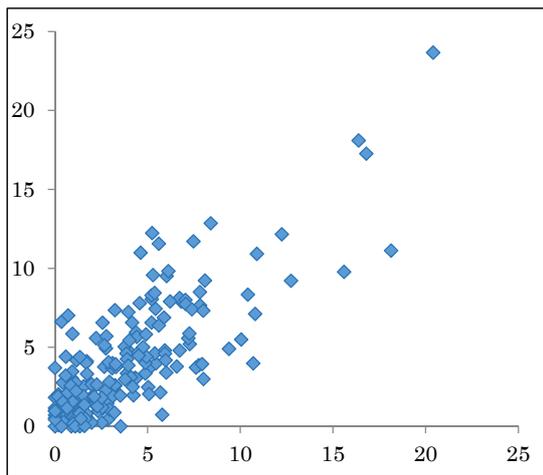
- ① $X^* = Z^* + \varepsilon$, $\varepsilon \sim N(0, \sigma_E^2)$ を、アトピー群および非アトピー群それぞれから生成する (Observed Equivalent Sample)。
- ② ロジスティックモデル $\text{logit}(X^*) = \alpha + \beta X^*$ の最尤推定量 β_{X^*} を算出する。
- ①②を 500 回繰り返し、得られた β_{X^*} の分布と平均値を求める。

もし、 X^* の分布が実際の観測値 X の分布に類似していれば、 Z^* の分布の妥当性が示唆され、 β_{X^*} と β_{Z^*} は、それぞれ β_X と β_Z に漸近的に等しくなる。アトピー群および非アトピー群それぞれから、大きさ 2000 の X^* を生成し、分布の類似性の確認も行う。

3 結果

3.1 Sr の観測分布

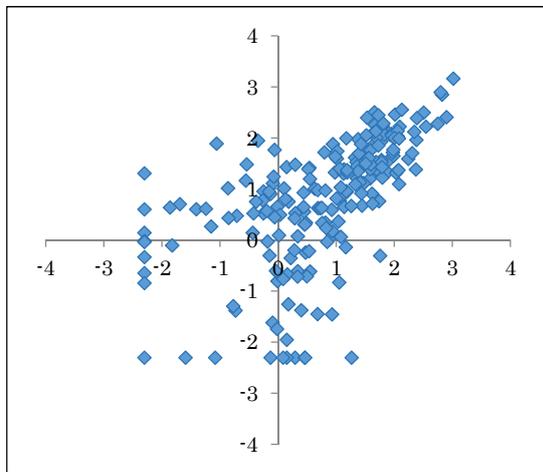
図1(a)は、追加調査の209例における1回目と2回目のSr観測値の散布図である。右に裾を引く分布をしているので対数変換を施し、その分布を図1(b)に示した。バラツキが値に依存し、正の値($1 < Sr$)でのバラツキに比



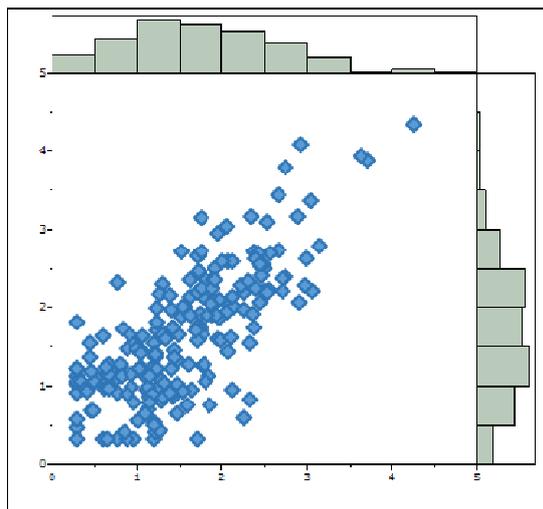
(a) 観測値

べて負の値 ($0 < Sr < 1$) のバラツキが協調されている。従って、回帰モデルの適用は困難である。

一方、図1(c)は平方根変換を施した場合の散布図であるが、バラツキが値に依存していない。対数変換での問題点が改善された。

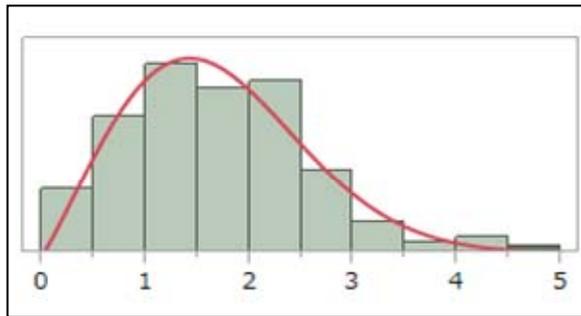


(b) 対数変換

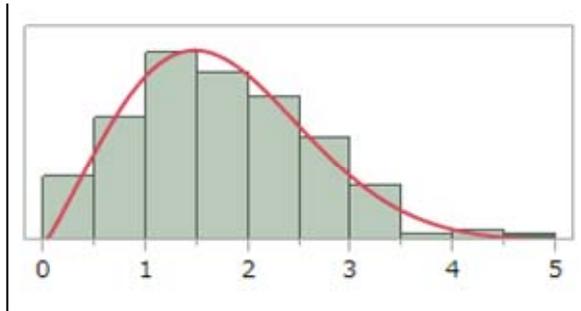


(c) 平方根変換

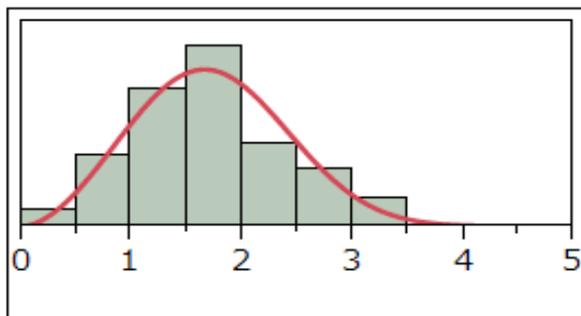
図 1 : Sr の散布図



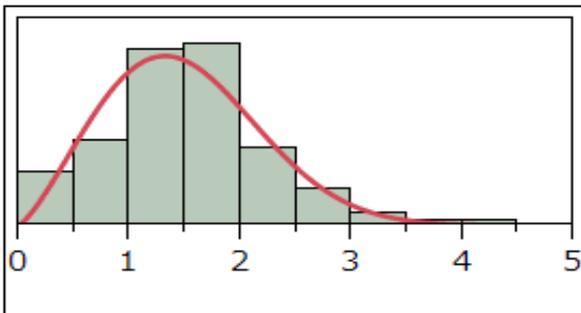
1回目 (n=209)
 観測値の平均: 1.698
 観測値の分散: 0.730
 尺度パラメータ α : 1.92
 形状パラメータ β : 2.10
 ワイブル平均: 1.699
 ワイブル分散: 0.722



2回目 (n=209)
 観測値の平均: 1.747
 観測値の分散: 0.755
 尺度パラメータ α : 1.97
 形状パラメータ β : 2.12
 ワイブル平均: 1.747
 ワイブル分散: 0.750



アトピー群 (n=41)
 観測値の平均: 1.734
 観測値の分散: 0.461
 尺度パラメータ α : 1.95
 形状パラメータ β : 2.77
 ワイブル平均: 1.733
 ワイブル分散: 0.457



非アトピー群 (n=793)
 観測値の平均: 1.497
 観測値の分散: 0.466
 尺度パラメータ α : 1.69
 形状パラメータ β : 2.31
 ワイブル平均: 1.495
 ワイブル分散: 0.472

図2: \sqrt{Sr} の観測値の分布

図2 に \sqrt{Sr} のヒストグラムを示す。上から順に、追加調査の1回目、2回目、初期調査のアトピー群、非アトピー群の結果を並べた。これらにワイブル分布を当てはめた結果、パラメータから計算される平均値と分散は、観測値から計算された平均値と分散に良く一致している。いずれの群においても、 \sqrt{Sr} はワイブル分布に従うと考えられる。

3.2 個人内バラツキの推定

追加調査の 209 例での個人内バラツキ σ_e^2 は 0.19、込みの分散 $V(X_{209})$ は 0.75 と算出された。従って、信頼係数 λ は 0.74 となる。追加調査の 209 例は初期調査 834 例からのサンプルなので、信頼係数は一定と

いう原理に基づき、 $0.19 : 0.75 = \sigma_E^2 : 0.47$ を解くと、 $\sigma_E^2 = 0.12$ となる。

3.3 シミュレーション

初期調査 834 例において、アトピー発症予測のためのロジスティックモデル $\text{logit}(\sqrt{Sr}) = \alpha + \beta\sqrt{Sr}$ の回帰係数 β_X は、0.47 と推定された。回帰係数の指数変換値 1.6 はオッズ比を表すが、アトピー発症はおよそ 5% と稀なので、それは相対危険度に相当する。

アトピー群と非アトピー群の分布は、平均値のみが異なり、分散は等しい（込みの分散）と仮定したので、図 2 より、 \sqrt{Sr} の真値の平均は、アトピー群で $E(Z_A) = 1.73$ 、非アトピー群で $E(Z_N) = 1.50$ となる。また、 $\sigma_E^2 = 0.12$ および $V(X_{834}) = 0.47$ より、アトピー群と非アトピー群に共通の分散は $V(Z) = 0.47 - 0.12 = 0.35$ と計算される。これらの平均と分散を持つワイブル分布のパラメータを算出すると、アトピー群では尺度パラメータ $\alpha=1.93$ 、形状パラメータ $\beta=3.24$ となり、非アトピー群では尺度パラメータ $\alpha=1.68$ 、形状パラメータ $\beta=2.75$ となった。

3.3.1 真値相当分布に対するロジスティック回帰係数の推定値

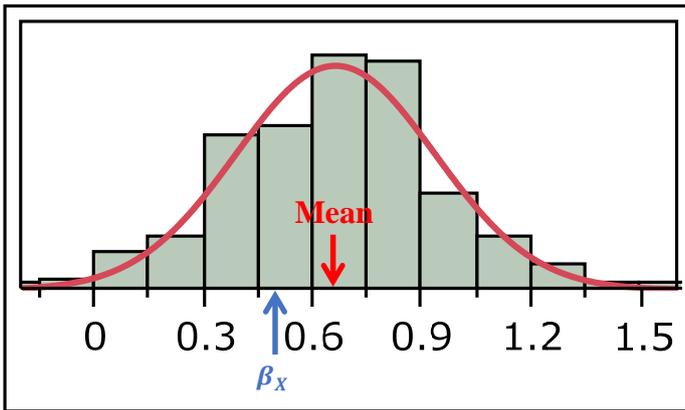


図 3 に、500 個の True Equivalent Sample Z^* から求めた回帰係数 β_{Z^*} のヒストグラムを示す。個人内バラツキ $\sigma_E^2 = 0.12$ を取り除いた正確な推定値は、 β_{Z^*} の平均値 0.66 と推定される。

$\beta_X = 0.47$ より、推定値の減衰が認められる。

図 3: β_{Z^*} のヒストグラム

3.3.2 観測値相当分布に対するロジスティック回帰係数の推定値

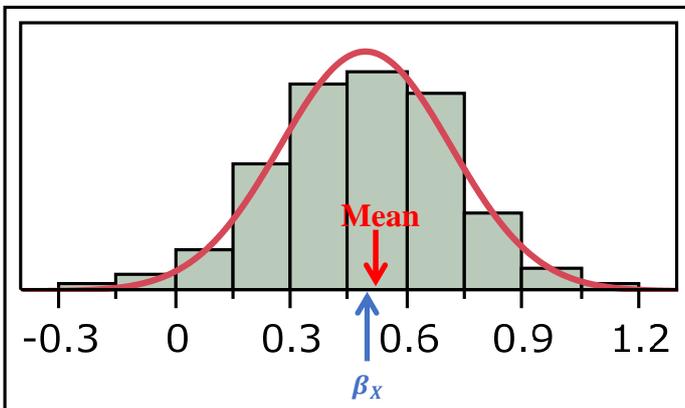


図 4 に、500 個の Observed Equivalent Sample X^* から求めた回帰係数 β_{X^*} のヒストグラムを示す。 β_{X^*} の平均値は 0.49 と算出され、 $\beta_X = 0.47$ に近い値となった。

図4: β_{X^*} のヒストグラム

3.3.3 分布の妥当性

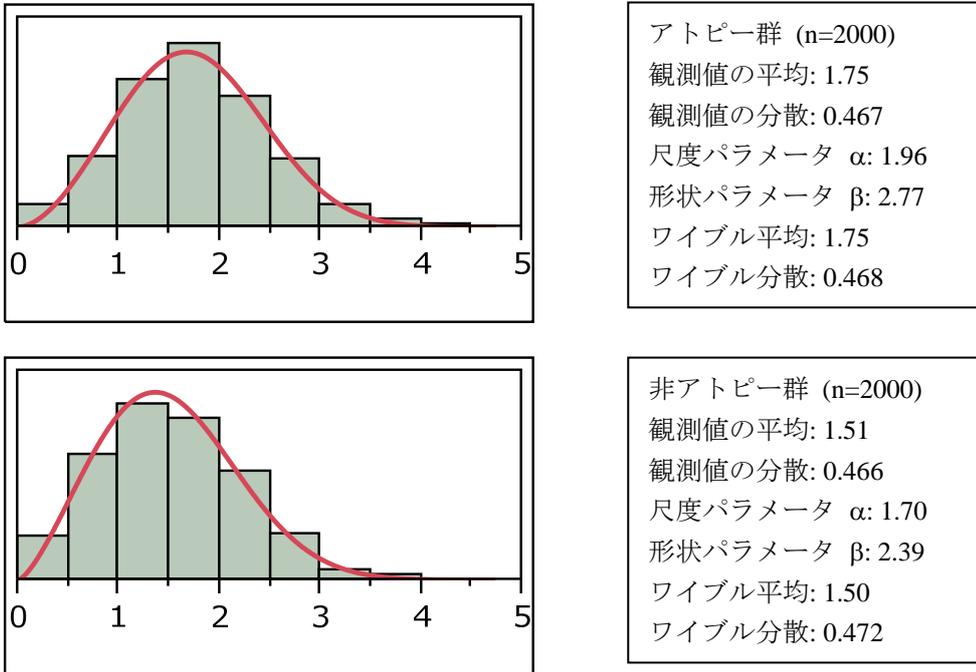


図5: Observed Equivalent Sample X^* のヒストグラム

アトピー群と非アトピー群それぞれについて、真値に乱数 $\varepsilon \sim N(0, 0.12)$ を付加して生成したObserved Equivalent Sample X^* のヒストグラムを図5 に示した。図5 の推定値は、図2 に示した観測データにおける値に近似的に等しい。このことは、TES法の妥当性を示唆している。

4 考察

測定値の個人内バラツキにより減衰したリスク推定値の信頼できる補正法は未開発なので、新たに TES 法を開発しアトピー発症予測に応用した。初期調査 834 例において、アトピー発症予測のためのロジスティックモデル $\text{logit}(\sqrt{Sr}) = \alpha + \beta\sqrt{Sr}$ の回帰係数は 0.47 (相対危険度は 1.60) であったが、個人内バラツキを取り除いた回帰係数を TES 法により推定したところ、0.66 (相対危険度 1.93) となった。誤差を補正した推定値を知ることは、医学研究デザインを設計する際に、特に必要症例数の算出において役立つ。また Sr の平方根が近似的にワイブル分布に従うことの発見は世界初であり、他のミネラルの分布特定への興味を喚起する。

特にアトピー性皮膚炎のような原因不明疾患や難病の研究に対して、毛髪ミネラルを用いた疫学調査の有用性は高いと考えられる。厚生労働省は 2004 年から 5 年間かけて魚や野菜に含まれる水銀、ヒ素などの有害ミネラルの摂取量を調査し、アメリカ NIH は子供の発育に与える環境科学物質の影響を研究するための施設 Center for the Evaluation of risk to Human Reproduction (CERHR)を設置している。環境有害物質の健康影響に関する疫学調査は国家規模でも行われており、ミネラルの医学研究に対する貢献が期待されていることが窺える。

今後は TES 法を Sr 以外のミネラルにも適用することで、毛髪ミネラルを疫学研究に用いる汎用的方法の

開発と普及を目指す。TES法を、PIXE分析を用いた他の研究に活用することも可能と考える。

謝辞

本研究に際して、毛髪ミネラルを計測してくださいました岩手医科大学サイクロトロンセンタースタッフの皆様、計測に伴う作業にご協力くださいました森弘行先生、前田知子様、近藤友梨香様、データ解析にご協力くださいました木下恵先生に、感謝申し上げます。

また、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、および、試料をご提供くださいました福岡市の834組の母子に心より感謝致します。

参考文献

- 1) Yamada T, Saunders T, Kuroda S, Sera K, Nakamura T, Takatsuji T, Hara T, Nose Y, FukuokaAssoc. Obstetr. Gynecol. and Pediatr.. Cohort Study for Prevention of Atopic Dermatitis using Hair Mineral Contents. *J Trace Elem Med Bio* 27: 126-131, 2013.
- 2) 山田知美, 高辻俊宏, 後藤祥子, 世良耕一郎, 中村剛, 野瀬善明. 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, NMCC共同利用研究成果報文集19, 2013.
- 3) Carroll RJ, Ruppert D, Stefanski LA, Crainiceanu CM (1995): *Measurement Error in Nonlinear Models*. Chapman and Hall, London, 1995
- 4) Stefanski LA. Unbiased estimation of a nonlinear function of a normal mean with application to measurement error models. *Comm Statist Theory Methods* 18: 433-4358, 1989.
- 5) Sera K, Futatsugawa S. Personal computer aided data handling and analysis for PIXE. *Nucl Instrum Methods B109/110*, 99-104, 1996.
- 6) Blaauw JL, Campbell JL, Fazinić S, Jakšić M, Orlic I, Van Espen P. The 2000 IAEA intercomparison of PIXE spectrum analysis software. *Nucl Instrum Methods Phys Res B189*, 113-22, 2002.
- 7) Yamada T, Saunders T, Sera K, Nakamura T, Nose Y. On Intra-Individual Variations in Hair Minerals Measured by PIXE in relation to Epidemiological Risk Assessment of Atopic Dermatitis. *Biometrie und Medizinische Informatik Greifswalder Seminarberichte*, 2013

Intra-individual variations in hair minerals measured by PIXE in relation to epidemiological risk assessment of atopic dermatitis

T.Yamada¹, T. Takatsuji², S. Goto³, K. Sera⁴, T. Nakamura⁵ and Y. Nose⁶

¹ Osaka University Graduate School of Medicine,
2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

² Nagasaki University Graduate School of Environmental Studies,
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

³Nishina Memorial Cyclotron Center, Japan Radioisotope Association,
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

⁴Cyclotron Research Center, Iwate Medical University,
348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

⁵Chuo University Graduate School of Science and Engineering
1-13-27 Kasuga, Bunkyo-ku, Tokyo 112-8551, Japan

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

Abstract

Since 2005 we have been conducting a cohort study of 834-mother-infant pairs to determine the association between hair minerals at one month and the onset of atopic dermatitis (AD) at ten months after birth. Thirty-two minerals were measured by PIXE (particle induced X-ray emission) method. Yamada et al.^{1) 2)} described a logistic model with explanatory variables Selenium (Se), Strontium (Sr) and a family history of AD whose performance in predicting the risk of AD was far better than that of any similar study.

In this initial research, we didn't consider the reliability of the measurement, namely intra-individual variations. Statistically, intra-individual variations should attenuate risk estimates if simply ignored. Therefore, we carried out the additional survey for 6-year-old children from our original cohort sample and divided each child's hair to make two specimens for PIXE analysis.

This paper focuses Baby-Sr levels which are not distributed as normal (or lognormal) and require sophisticated modeling of the variations. We develop the "true-equivalent sample (TES)" method and determine the inter-individual distribution as well as the intra-individual variance of Baby-Sr. The TES method appears to be also useful for determining the distribution of other minerals and obtaining an association between minerals and diseases overcoming the intra-individual variations. This will allow the PIXE method to play a more important role in medical and epidemiological research.