

PIXE 法による毛髪ミネラル分類の妥当性および ステンレス鋼の測定値への影響について

片岡恒史¹、山田知美²、世良耕一郎³、高辻俊宏⁴、中村 剛⁵、野瀬善明⁶

¹東京医科歯科大学
113-8510 東京都文京区湯島 1-5-45

²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

³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

⁴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

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。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、6 年後の 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。サンプルサイズ

を十分に確保できなかったため、追加調査においては、1人の毛髪を2回測定して個人内バラツキを評価・補正することで、統計学的検出力を上げるための対策を検討してきた。

具体的には、アトピー性皮膚炎との関連が認められたストロンチウムについて、計測値を真値（頭髪全体の平均値）と測定誤差（個人内分散）に分解することにより、個人内分散を取り除いたリスク推定値を求めた²。さらに、誤差の大きさと原因を明らかにするため、個人内分散を①スペクトル分析に伴う誤差（物理的計測誤差）と、②毛髪の採取位置による誤差および③PIXEビームの照射位置による誤差（②と③を合わせて「純粋な個人内分散」と呼ぶ）に分解することも試みた³。しかし、ミネラル毎に統計学的特性は様々で、同じ方法を画一的に全ミネラルに適用することは困難である為、32種類のミネラル毎の測定値の分布特性に基づいて4つに分類する方法を提案した⁴。

本研究の目的は、先行研究で提案された分類方法を、先行研究とは異なる条件下で測定したデータに適用することにより、提案法の妥当性を検証することである。

2 方法

2.1 調査対象

平成17年11月～平成18年11月に福岡市内で出産・誕生した母子のうち、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ている。毛髪ミネラル量測定可能な限界として1000組（2000人）を募り、13施設の産婦人科と77施設の小児科の協力により実施された。結果として、1036組から同意が得られ、そのうち10か月健診を受診した母子は834組（80.5%）であった。6年後の追跡調査では、追跡率は約25%（6歳児209例）であった。

2.2 毛髪の採取・標本作製および毛髪ミネラル量の測定条件

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本採取された。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6本以上を目安としている。

各医療機関から九州大学内の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、長崎大学では、毛髪をアルコール消毒後、根元からの長さを約2cm長に揃えてカットし、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測定用検体が作製された。

検体は岩手医科大学サイクロトロンセンターに送付し、先行研究とは異なる測定条件下でPIXE法により、毛髪中の32種類のミネラル量を得た^{5,6}。異なる測定条件とは、ファラデーカップの終端にあるPIXEビームストッパーの役割を果たす高純度グラファイトを外し、PIXEビームがステンレス板に照射された状態を指す。

この条件下で測定されたデータを、「ステンレスデータ」と呼ぶ。また通常の条件下で測定された先行研究のデータを、「先行研究データ」と呼ぶ。

2.3 32種類のミネラルの分類（統計学的対策法）

32種類のミネラルの分類を行うために、以下の(1)(2)(3)を確認し、毛髪中の32種類のミネラルを4つに分類をする⁴。先行研究データについての分類結果を以下に示す。

(A群) S、Cl、K、Ca、Ti、Fe、Cu、Zn、Br

(B群) Na、Si、Sr、Pb

(C群) Se、Hg、Cr、Ni

(D群) Mg、Al、P、V、Mn、Co、Ga、As、Rb、Mo、Nb、Ag、Cd、I、Ba

- (1) 変数変換（対数変換/ルート変換/無変換）を施した後、2回の測定値の散布図を描き、線形回帰が可能かを確認する。また、ヒストグラムを作成し、特定の分布に近似できるかどうかを決定する。
- (2) 2回の測定値の差のヒストグラムを作成し、正規分布に従うかを確認する。正規分布に従えば、ランダム誤差と看做することができる。

ここで、誤差（2回の測定値の差）が正規分布に従うミネラルについてのみ、以下の計算を行う。満たさない場合は、D群に分類する。

- (3) 個人間分散 σ_f^2 と個人内分散 σ_l^2 を算出する。個人内分散をさらにスペクトル分析に伴う誤差（物理的計測誤差） e_{ij} と位置による誤差（純粋な個人内分散） σ_l^2 に分解し、誤差の原因を確認する。全体の誤差のうち、物理的計測誤差 e_{ij} の割合が小さいミネラルはA群に分類する。物理的計測誤差 e_{ij} の割合が大きいミネラルは、(1)の結果、特定の分布に近似できればB群に、分布が特定できなければC群に分類する。

尚、誤差の分解方法は付録に記す。

3 結果

ステンレスデータについて方法 (1) (2) (3) を確認し、毛髪中の32種類のミネラルを分類した結果を以下に示す。

(A群) S、Cl、K、Ca、Ti、Cr、Fe、Ni、Cu、Zn、Br

(B群) Na、Si、Co、Sr、Pb

(C群) Se、Hg、Mo、Mn

(D群) Mg、Al、P、V、Ga、As、Rb、Nb、Ag、Cd、I、Ba

この報告では、A群よりCa、Cr、Fe、Ni、Cu、Zn、B群よりNa、Si、Co、Sr、Pb、C群よりSe、Hg、Mo、Mnのミネラルについて報告する。

方法(1)と(2)の結果を、A群については図1 (A) に、B群については図1 (B) に、C群については図1 (C) に示した。

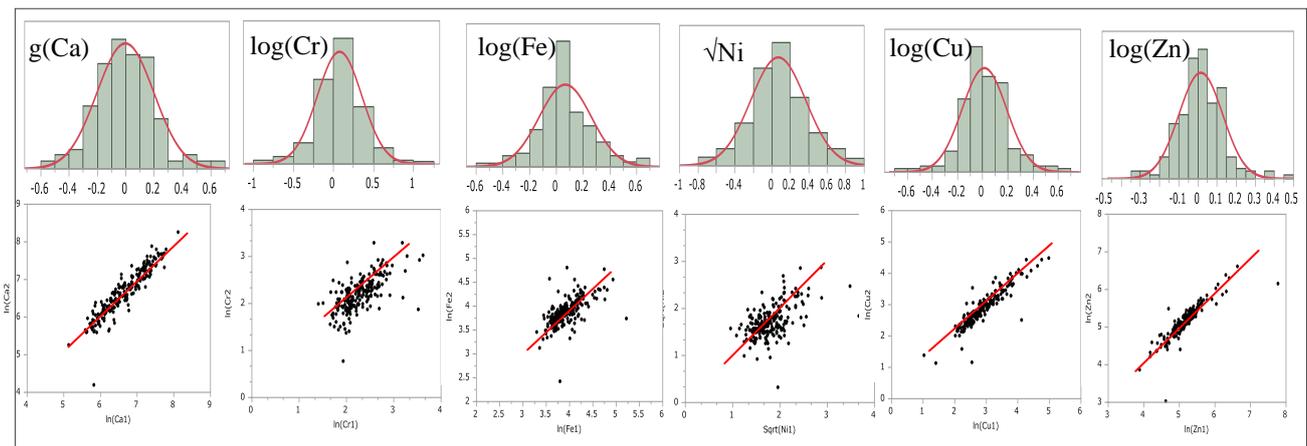


図1 (A) : ステンレスデータにおける A 群の変数変換後の分布（上段：2回の差のヒストグラム、下段：1回目の測定値（横軸）と2回目の測定値（縦軸）散布図）

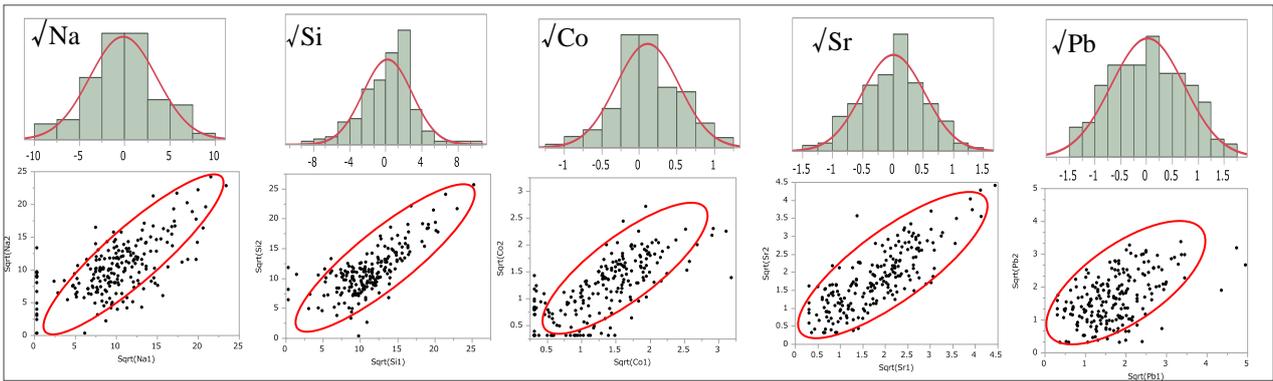


図 1 (B) : ステンレスデータにおける B 群の変数変換後の分布 (上段 : 2 回の差のヒストグラム、下段 : 1 回目の測定値 (横軸) と 2 回目の測定値 (縦軸) 散布図)

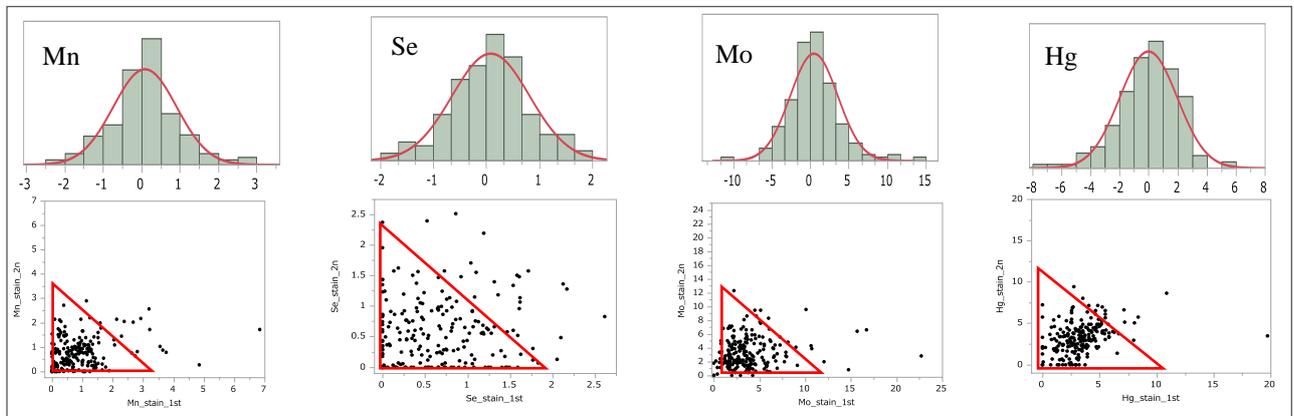


図 1 (C) : ステンレスデータにおける C 群の変数変換後の分布 (上段 : 2 回の差のヒストグラム、下段 : 1 回目の測定値 (横軸) と 2 回目の測定値 (縦軸) 散布図)

いずれも、差のヒストグラムが正規分布に近似できる様子が分かる。

散布図については、A 群は線形回帰が可能であり (図 1 の赤い直線を参照)、B 群はややバラツキが大きい楕円状になっている (図 2 の赤い楕円を参照)。C 群は、平均回帰現象が見られた (図 3 の赤い三角形を参照) 7。

方法(3)の結果を、A 群については図 2 (A) と表 1 に、B 群については図 2 (B) に、C 群については図 2 (C) に示した。

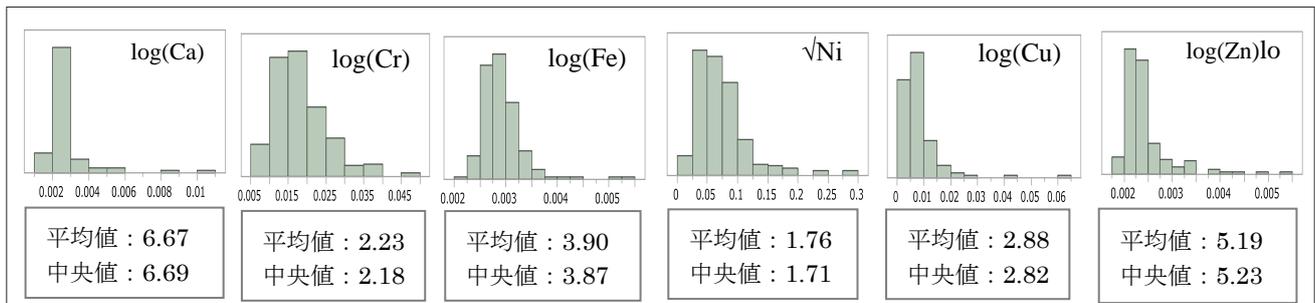


図2 (A) : A群のスペクトル分布に伴う誤差のヒストグラム (ステンレスデータ)

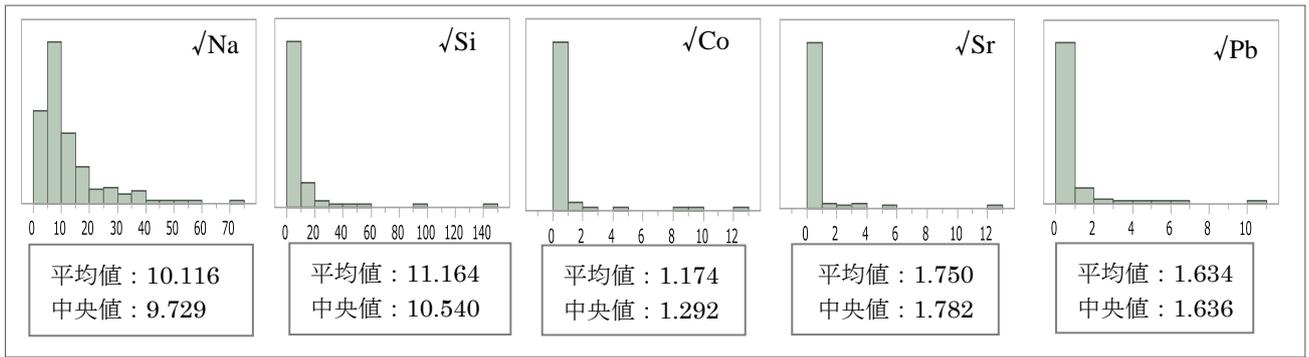


図 2 (B) : B 群のスペクトル分析に伴う誤差のヒストグラム (ステンレスデータ)

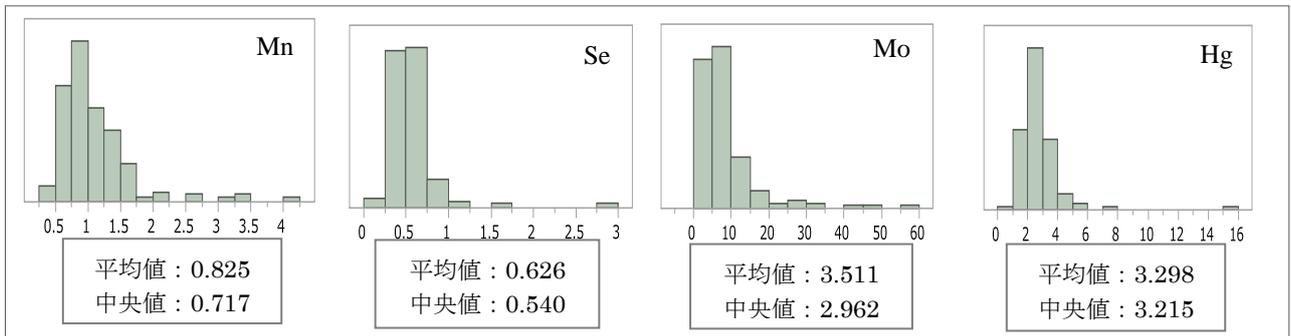


図 2 (C) : C 群のスペクトル分析に伴う誤差のヒストグラム (ステンレスデータ)

スペクトル誤差の大小を評価する際の参考のために、図中には、各ミネラルの測定値の平均値と中央値を記した。

図 2 (A) について、測定値の代表値とヒストグラムの横軸の数値を比べると、スペクトル分析に伴う誤差が測定値に比して小さいことが分かる。

表 1 : A 群における誤差の分解 (ステンレスデータ)

元素	個人間分散	個人内分散 (i)+(ii)	スペクトル解析誤差 (i)	位置による誤差 (ii)
Ca	0.322	0.035	0.001	0.034
Cr	0.082	0.051	0.009	0.042
Fe	0.050	0.035	0.002	0.034
Ni	0.074	0.058	0.023	0.036
Cu	0.284	0.029	0.004	0.025
Zn	0.152	0.022	0.001	0.021

表 1 には、A 群に分類されたミネラルの誤差の分解結果をまとめた。たとえば Cu では、全体の誤差（総分散）0.313（100%）に対して、個人間分散が 0.284（90.7%）で個人内分散が 0.029（9.3%）、信頼係数 λ は 0.907 と計算される。また、個人内分散のうち、スペクトル誤差分散が 13.8%、位置による誤差分散（純粋な個人内分散）が 86.2%である。従って Cu は、個人内分散に比して個人間分散が大きく、信頼係数が大

きい。また、スペクトル誤差が測定値に比して小さいだけではなく、測定誤差の中でも、位置による分散（純粋な個人内分散）に比してもスペクトル誤差は小さいという結果が得られ、Cu は測定値の信頼性が高いと言える。A 群に分類された 10 個ミネラルは、ほぼ同様の傾向が伺える。

一方、図 2 (B) と図 2 (C) では、測定値の平均値および中央値に比べてヒストグラムの横軸の数値が大きいので、スペクトル分析に伴う誤差が測定値に比して大きいことが分かる。実際、B 群や C 群のミネラルに誤差の分解を試みると、位置による誤差分散（純粋な個人内分散）の算出が困難であり、測定値の信頼性が低いことを示唆している。このようなミネラルについては、たとえば 2 回測定して、その平均値を解析に用いる等の対策を取るのが望ましい。

方法(2)で2回の測定値の差が正規分布に従わない場合はD群に分類したが、D群は、測定値が検出限界未満の数が全体の25%以上と1/4以上の人からは殆ど検出されないミネラルであった（表2）。D群のミネラルの検出限界未満の割合は、Ag、Cd、I、Baでは100%となり、誰からも検出されなかった。

表 2 : D 群の検出限界未満数の割合

元素	1 回目の検出限界未満の割合	2 回目の検出限界未満の割合
Mg	55%	51%
Al	48%	49%
P	48%	45%
V	74%	72%
Ga	88%	91%
As	61%	60%
Rb	37%	33%
Nb	54%	45%

先行研究データの分類結果とステンレスデータの分類結果を比べると、Cr、Ni、Mo、Mn、Coが異なる群に分類され、それらのミネラルでは測定値の増加および検出限界未満数の減少がみられた。Feについては、同じ分類であったが、測定値の大幅な増加がみられた。

さらに、それぞれのデータの 2 回の測定値の平均値のヒストグラムを比較すると、Fe、Cr、Ni、Mo、Mn、Co で変化が見えられる。Fe の平均値は 16.815 から 51.728、Cr は 0.919 から 9.976、Ni は 0.837 から 3.120、Mn は 0.106 から 0.825、Co は 0.186 から 1.813、Mo は 0.659 から 3.511 へと、大きく増加していた。A 群の平均値のヒストグラムの比較を図 3 (A)、B 群を図 3 (B)、C 群を図 3 (C) に示す。

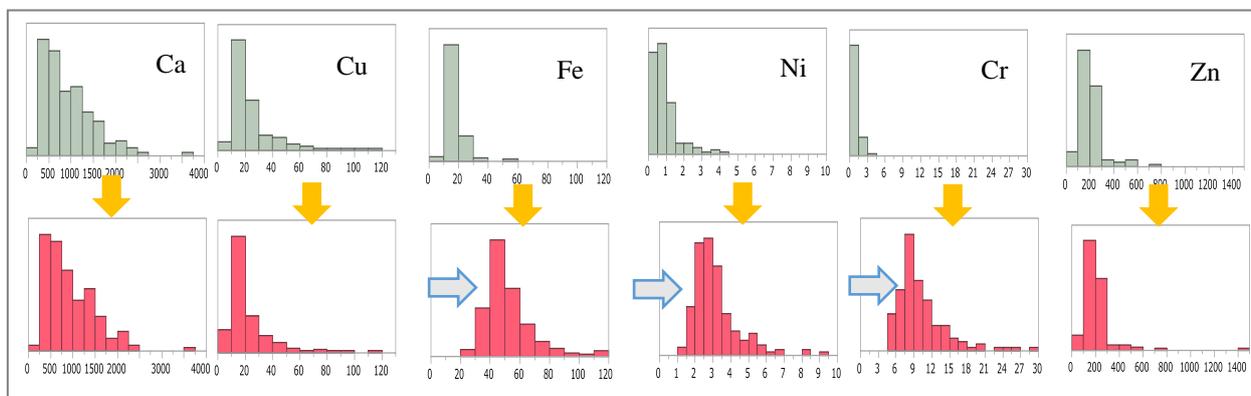


図 3 (A) : A 群の平均値のヒストグラムの比較

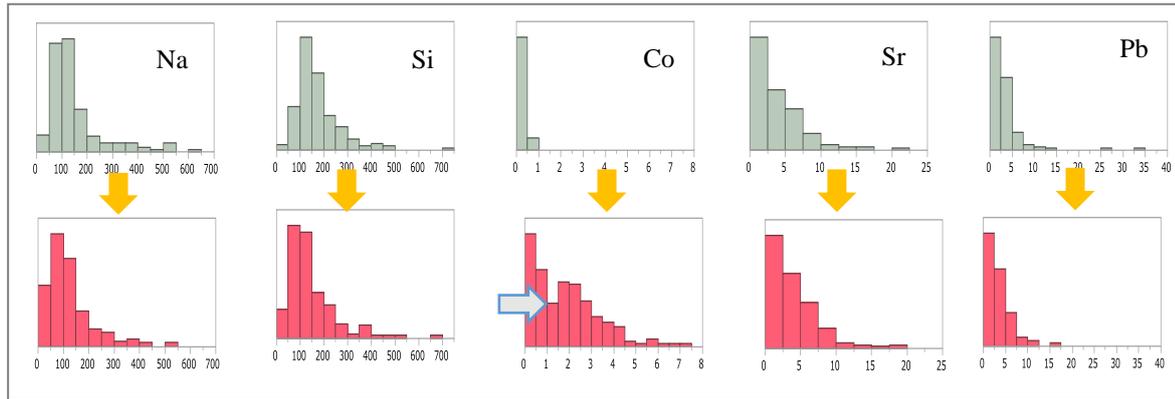


図 3 (B) : B 群の平均値のヒストグラムの比較

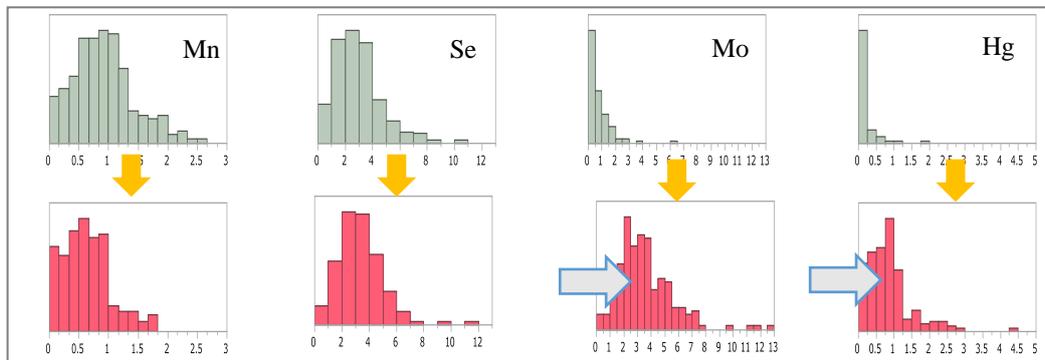


図 3 (C) : C 群の平均値のヒストグラムの比較

2 回の測定値の平均値の分布に変化が見られなかったミネラルのうち、Ca、Cu、Zn について、横軸を先行研究データ（通常測定条件）、縦軸をステンレスデータとした散布図を図 4 に示した。Ca、Cu、Zn にはきれいな正の相関関係がみられる。2 回の測定値の平均値で分布に変化が見られた 6 ミネラル (Fe、Ni、Cr、Mn、Co、Mo) については、同様の散布図を図 5 に示したが、相関関係は崩れ、ステンレスデータで値が大きくなっていることが分かる。

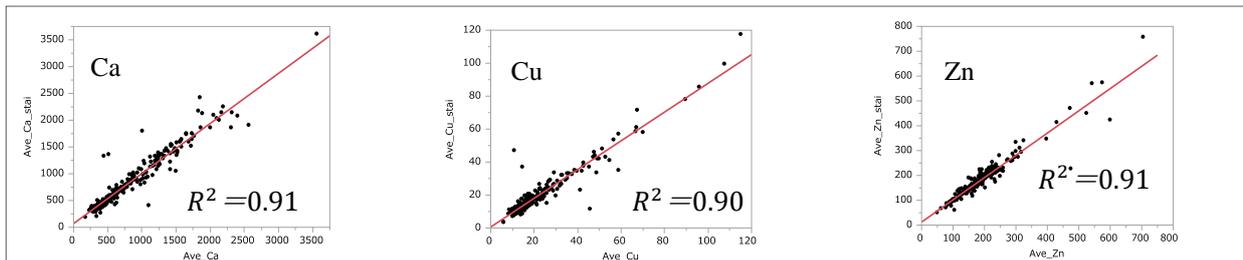


図 4 : 先行研究データの 2 回の測定値の平均値（横軸）とステンレスデータの 2 回の測定値の平均値（縦軸）の散布図

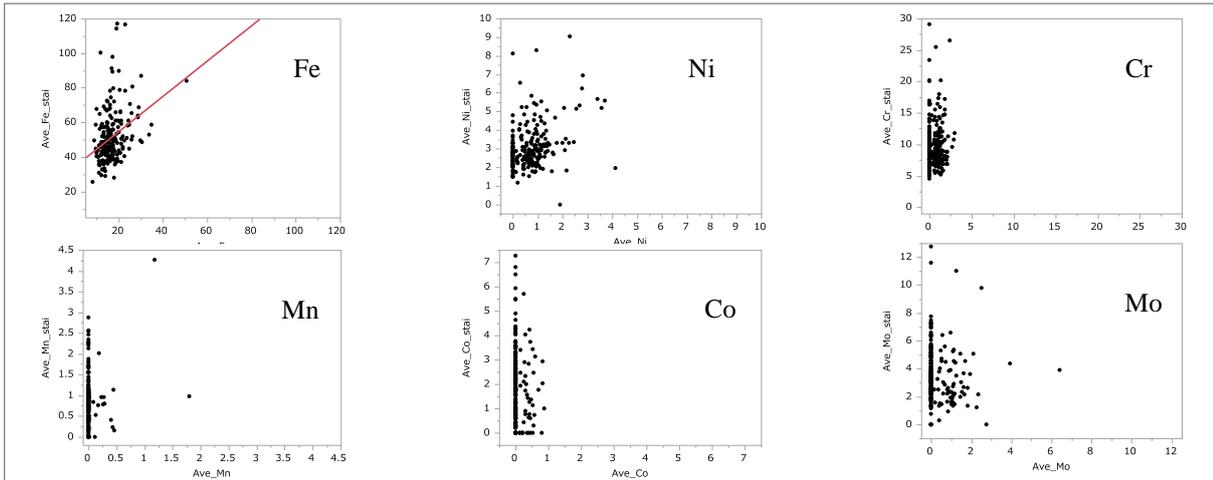


図 5：先行研究データの 2 回の測定値の平均値（横軸）とステンレスデータの 2 回の測定値の平均値の（縦軸）の散布図

また検出限界未満の数については、Fe は変化なく 0 のままであったが、Cr と Ni が 0（全例から検出された）となり、Mn・Co・Mo についても大幅な減少が見られ、3 つのミネラルで検出限界未満数の割合が約 10% 以下となった（表 3）。

表 3：検出限界未満数の割合の比較表

元素	先行研究		ステンレスデータ	
	1 回目の検出限界未満の割合	2 回目の検出限界未満の割合	1 回目の検出限界未満の割合	2 回目の検出限界未満の割合
Fe	0%	0%	0%	0%
Ni	12%	12%	0%	0%
Cr	22%	17%	0%	0%
Mn	76%	78%	6%	7%
Co	55%	52%	10%	12%
Mo	41%	45%	2%	2%

これら 6 個のミネラルは、ステンレス鋼の主な成分元素と一致した。その他 26 個のミネラルについては、分類結果の違いは見られなかった。

4 考察

PIXEビームがステンレス鋼に照射された影響と考えられる違いだけが検出された今回の結果は、ミネラル分類方法の妥当性を示唆していると考えられる。PIXE分析による毛髪ミネラルの統計解析のために提案した分類方法が有効に機能したことが確認できた。

5 付録 (測定誤差の分解)

PIXE 法による毛髪ミネラル測定値を X_{ij} とし、 i 番目の子供 ($i=1, \dots, n$) の j 番目の検体 ($j=1, 2$) とすると、 $X_{ij} = \mu_i + \delta_{ij}$ と表される。ただし、 μ_i は真値 (その分散 $V(\mu_i)$ は個人間分散 σ_i^2) を表し、 δ_{ij} はランダム誤差とする。すなわち、真値 μ_i からの測定誤差 δ_{ij} は、 $E(\delta_{ij}) = 0$, $V(\delta_{ij}) = \sigma_j^2$ (σ_j^2 は個人内分散) を満たす。

測定値の分散 $V(X_{ij})$ 、すなわち総分散を σ_k^2 とすると、総分散 = 個人間分散 + 個人内分散であるから、 $\sigma_k^2 = \sigma_i^2 + \sigma_j^2$ が成り立つ。

さらに、個人内分散 σ_j^2 を、①の「物理的計測誤 e_{ij} 」と、②および③の「位置による誤差 ε_{ij} 」に分解することにより、原因となる誤差の大きさを検討することが可能となる。これらの誤差は互いに独立とすると、

$X_{ij} = \mu_i + \delta_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij} + e_{ij}$ (すなわち、測定値 = 真値 + 位置による誤差 + 物理的誤差) が成り立つ。ただし、誤差は正規分布に従うとする。すなわち、 $V(e_{ij})$ の不偏分散を v_{ij}^2 、位置による誤差の分散を σ_L^2 と表すと、 $e_{ij} \sim N(0, v_{ij}^2)$ 、 $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma_L^2)$ を満たす。このとき、 $V(\delta_{ij}) = \sigma_j^2 = \sigma_L^2 + v_{ij}^2$ が成り立つ。

σ_j^2 、 σ_L^2 、 σ_i^2 、 v_{ij}^2 の計算式は、以下のように導かれる。

大数の法則より、

$$(2n)^{-1} \sum_{i=1}^n D_i^2 = (2n)^{-1} \sum_{i=1}^n (\delta_{i1} - \delta_{i2})^2 \cong \sigma_j^2 \quad (1)$$

が成り立つ。

$E[(\varepsilon_{i1} - \varepsilon_{i2})^2] = \sigma_L^2$ 、 $E[(e_{i1} - e_{i2})^2] = v_{i1}^2 + v_{i2}^2$ 、 $E[(\varepsilon_{i1} - \varepsilon_{i2})(e_{i1} - e_{i2})] = 0$ なので、

$$(2n)^{-1} \sum_{i=1}^n D_i^2 \cong \sigma_L^2 + (2n)^{-1} \sum_{i=1}^n (v_{i1} - v_{i2})^2$$

すなわち、

$$\sigma_L^2 \cong (2n)^{-1} \sum_{i=1}^n D_i^2 - (2n)^{-1} \sum_{i=1}^n (v_{i1} - v_{i2})^2 \quad (2)$$

が成り立つ。

次に、 i 番目の子供の 2 回の測定値の平均値を Y_i とすると $Y_i = \frac{X_{i1} + X_{i2}}{2}$ と表され、 n 人の平均値は

$\bar{Y} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n Y_i$ となる。また、 Y_i の誤差は $\bar{\delta}_i = \frac{\delta_{i1} + \delta_{i2}}{2}$ となり、 n 人の誤差の平均値は $\bar{\delta} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \bar{\delta}_i$ なので、

$$(n-1)^{-1} \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 = (n-1)^{-1} \sum_{i=1}^n (\mu_i - \bar{\mu})^2 + (n-1)^{-1} \sum_{i=1}^n (\bar{\delta}_i - \bar{\delta})^2$$

が成り立つ。また右辺が漸近的に σ_i^2 と $\frac{\sigma_j^2}{2}$ に等しくなることから、

$$(n-1)^{-1} \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 \cong \sigma_i^2 + \frac{\sigma_j^2}{2}$$

従って、

$$\sigma_i^2 \cong (n-1)^{-1} \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2 - \frac{\sigma_J^2}{2} \quad (3)$$

が成り立つ。

(1) 式により「個人内分散」を、(2) 式により「位置による誤差（純粋な個人内分散）」を、(3) 式により「個人間分散」を、 $v_{i1}^2 + v_{i2}^2$ により「物理計測誤差分散」を算出することができる。ただし、PIXE 測定値に変数変換を施した場合、物理誤差は v_{ij}^2 ではなく、デルタ法を用いて次の \tilde{v}_{ij} のように近似される。

対数変換 ($\tilde{X}_{ij} = \log(X_{ij})$) した場合は、 $\tilde{v}_{ij} = \frac{v_{ij}}{X_{ij}}$ となり、平方根変換 ($\tilde{X}_{ij} = \sqrt{X_{ij}}$) した場合は、 $\tilde{v}_{ij} = \frac{v_{ij}}{4X_{ij}}$ となる³。

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、適切なお助言を賜りました、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) T. Yamada, T. Saunders, T. Nakamura, K. Sera, Y. Nose. "On Intra-Individual Variations in Hair Minerals in relation to Epidemiological Risk Assessment of Atopic Dermatitis", Theory and Practice of Risk Assessment, Ed.: Kitsos C, Oliveira T, Rigas A and Gulati S., Chapter 9, Springer International Publishing Switzerland, 2015
- 3) T. Yamada, K. Kataoka, T. Saunders, K. Sera, T. Takatsuji, T. Nakamura, Y. Nose. "Statistical Investigation into Random Variations in PIXE Hair Analysis", IJPIXE.
- 4) T. Yamada, K. Kataoka, T. Saunders, K. Sera, T. Takatsuji, T. Nakamura, Y. Nose. "Decomposition of Hair Mineral Variations into Intra-individual, Inter-individual and Physical Variations", ICRA6 and RISK 2015 Conference.
- 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) Barnett, A.G., van der Pols, J.C., Dobson, A.J. Regression to the mean: what it is and how to deal with it. Int. J. Epidemiol. 34, 215-220, 2005.

Revalidation for the classification method of hair minerals by PIXE and effect of stainless steel to the PIXE measurements

K. Kataoka¹, T. Yamada², K. Sera³, T. Takatsuji⁴, T. Nakamura⁵ and Y. Nose⁶

¹ Tokyo Medical and Dental University

1-5-45 Yushima, Bunkyo-ku, Tokyo 113-8510, Japan

² Osaka University Graduate School of Medicine

2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871, Japan

³ Cyclotron Research Center, Iwate Medical University

348-58 Tomegamori, Takizawa, Iwate 020-0603, Japan

⁴ Nagasaki University Graduate School of Environmental Studies

1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

⁵ Chuo 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.

Since the hair mineral reflects internal metabolism information like blood, it has been believed with a

use in various fields. The issue of those large variations has been pointed out in many papers about hair minerals. As one of the statistical countermeasure, we decompose the measurement into true or exact value and intra-individual variances. Furthermore, we decompose the intra-individual variances into that due to location and that due to physical calculation to clarify the size and the cause of error³. However, it is difficult to apply the same statistical method uniformly because 32 minerals have various characteristic. Therefore, we suggested a method to classify based on distribution properties of the measurements of 32 minerals⁴.

We have suggested the classification method of 32 minerals. The purpose of this report is to verify validity of the method with applying the data measured under different condition and effect of stainless steel to the measurement.