

## 微量元素量測定値の変動の特性と難病・難問との関連解析 のための統計モデル

中村 剛<sup>1</sup>、山田知美<sup>2</sup>、後藤祥子<sup>3</sup>、世良耕一郎<sup>4</sup>、

Todd Saunders<sup>5</sup>、高辻俊宏<sup>1</sup>、牧江俊雄<sup>6</sup>、野瀬善明<sup>7</sup>

<sup>1</sup>長崎大学水産・環境科学研究科

852-8521 長崎市文教町 1-14

<sup>2</sup>大阪大学医学部附属病院

565-0871 大阪市吹田区山田丘

<sup>3</sup>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、<sup>4</sup>岩手医科大学サイクロトロンセンター

020-0603 滝沢市留が森 348-58

<sup>5</sup>長崎大学大学院医学系研究科

852-8523 長崎市坂本 1 丁目 12-4

<sup>6</sup>鈴鹿病院臨床研究部

513-0004 三重県鈴鹿市加佐登 3 丁目 2-1

<sup>7</sup>九州大学医学部

812-8582 福岡市東区馬出 3-1-1

### 1 はじめに

生体内微量元素の測定が原因不明の難病解明並びに生体に関する難問解決の鍵と考える。動植物は微生物活動により養分を吸収し生命を維持し、微生物はミネラルを栄養に活動している。戦前はミネラルを含む動植物の排泄物等が肥料として植物に摂り込まれ、それを動植物が摂取し排泄するというミネラル循環が成立していた。ところが化学肥料が有機肥料に取って代わることで、窒素、リン酸、カリウム以外のミネラルが循環しなくなり、さらに、様々な農薬が物質循環に必要な微生物も殺している。その結果、生命維持活動に必須の微量元素のミネラルは急激に減少した。科学技術庁による野菜果物の調査によると、1952 年から 2001 年にかけて、ほうれん草、ニンジン、みかん、りんご等のビタミンあるいは鉄分は 50%程度減少している。

一方で、原因も治療法も予防法も不明の疾病が急増している。厚労省による指定難病は 2009 年に 56 疾患、2012 年には 130 疾患、2018 年には 331 疾患に増加した。世界中では 5,000-7,000 の疾患があるといわれている<sup>1</sup>。Biomedical research が難病のメカニズム解明に役立ち、予防・治療のヒントを与えることが考えら

れる<sup>1</sup>。急激なミネラル循環量の減少と難病の増加とは関連があるという仮説を検証することがPIXEによる毛髪ミネラル量測定値を用いた研究の動機であった。難病とミネラルに関するBiomedical研究に有効な統計モデルとして、多変量回帰、症例対照法、Mechanisticモデルについて実例をもとに解説する。

毛髪ミネラルを統計モデルで解析するには、微量元素測定値の変動（バラツキ）の特性を解明し、その影響を考慮した解析・解釈法開発が必須課題である。一貫して実施してきた実証的研究成果として、微量元素測定値の変動の個人内変動と個人間変動への分解と統計モデル構成のための汎用的方法を紹介する。

## 2 統計学的方法

### 2.1 多変量回帰

アトピー性皮膚炎（AD）は戦後先進国に急増し、原因も治療法も不明である。2005年にADと毛髪ミネラル量との関連調査を開始した。平成17年度福岡市乳幼児健診事業に組み込む形でコホート調査を計画した。福岡市医師会・九州大学医学部が中心となり企画され、2000年3月に倫理委員会に承認され開始された。誕生後1ヶ月と10ヶ月の福岡市乳幼児健診時に小児科医・産婦人科医による呼びかけに応じた母子（約1000対）の毛髪ミネラル量測定が岩手医科大学サイクロトロンセンターにて実施され、20010年3月に完了した。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か月時点でのアトピー性皮膚炎発症との関連を、遺伝（家族歴）と食習慣の影響を考慮した多変量解析を用いて解析した<sup>2</sup>。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、それとは独立にストロンチウムとセレンの有意性が認められた。家族歴のみでの予測式では相対危険度2.5であったが、両ミネラルを加味した予測式は相対危険度を4.2に向上させた。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。

#### AD家族歴のみ

		AD発生			
		Yes	No	計	
AD家族歴	有り	17	173	190	陽性的中率 8.90%
	無し	24	620	644	陰性的中率 96.30%
	計	41	793	834	
		感受性41.5%	特異性78.2%		相対危険度 2.5

#### AD家族歴にミネラルを加えた予測式

		AD発生			
		Yes	No	計	
AD家族歴+Se+Sr	リスク大	27	234	261	陽性的中率 10.30%
	リスク小	14	559	573	陰性的中率 97.60%
	計	41	793	834	
		感受性65.9%	特異性70.5%		相対危険度 4.2

この初期調査の6年後に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、209組（25%）が追加調査に参加した。このデータを用いてミネラル量測定値のバラツキを解析する。

### 2.2 症例対照研究

ロンドンでは1920年頃から男性の肺がん患者が急増し、10万人あたり死亡率が30年には4だったのが35年に35と急増した。1940年からは女性の肺がん患者も急増した。それまでは肺がんは稀な疾患で、煙草も1900年から普及し始めたが、社会環境も大きく変化した時代でもあったため、原因も予防法も不明であった。医師のRichard Dollと経済学士のBradford Hillはロンドンの病院の肺がん患者709名の一人一人について性年齢の一致する肺がん以外の患者を対にして、入院前の煙草の喫煙本数を調査し、1950年にBritish

Medical Journal に症例対照研究の結果を発表した。

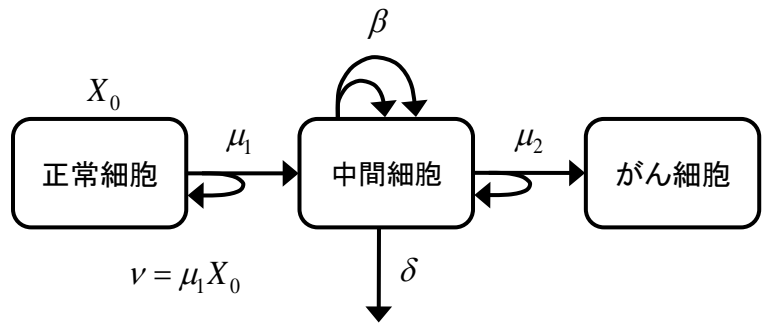
	煙草本数/日						Total
	0	1-4	4月14日	15-24	25-49	50+	
肺がん	2	33	250	196	136	32	649
他疾患	27	55	293	190	71	13	649
Odds比	1	8.1	11.5	13.9	25.9	33.2	

肺がんは稀な症例なので Odds 比は近似的に相対危険度に等しい。本数が増えるにつれて Odds 比が急激に増加している。この頃から煙草と肺がんの関連に関する研究が急激に増加した。信頼できると判断された 30 の症例対照研究と 7 のコホート研究の結果をもとに審議した結果、米国公衆衛生局長は 1964 年に「煙草は肺がんの原因」であることを認めた。これにより、煙草は健康に良いと宣伝して普及に努めたたばこ会社は 4 兆円余りの罰金を支払わされた。

症例対照研究では、例えば特定の難病の患者 100 名の各人について 3 名程度の性年齢の同じくするその難病以外の病人または健康人を抽出し、遡って生活環境や食習慣を調査し、比較することでリスク要因を洗い出す。遡って調査するためには、記憶や資料に頼ることになる。しかし毛髪ミネラルなら、毛髪を採取させてもらえば根元からの距離で凡その時期のミネラル量が分かるという、他の要因調査ではありえない大きな利点がある。

### 2.3 Mechanistic モデル

正常細胞ががん細胞に変化する過程を確率過程で表現したモデルを発がんモデルという。two-stage 発がんモデルは、「正常細胞は突然変異と増殖を経てがん細胞に変化する」という分子生物学上の知見を Moolgavkar (1979) が確率過程で表現したものであり、医学・毒性学・疫学で広く受け入れられている。正常細胞、中間細胞、がん細胞という細胞の 3 つの状態と単位時間当たりの遷移率を示す 4 つのパラメータ  $\mu_1$ ,  $\beta$ ,  $\delta$ ,  $\mu_2$  を仮定する。正常細胞は第 1 変異率  $\mu_1$  で中間細胞に変異する。中間細胞は増殖率  $\beta$  で 2 つの中間細胞に増殖、死滅率  $\delta$  で死滅、第 2 変異率  $\mu_2$  で 1 つの中間細胞と 1 つのがん細胞に分裂、という 3 種の変化を起こす。がん細胞は比較的短時間で腫瘍に成長するため、がん細胞の発生をもって腫瘍発生とみなす。正常細胞の数  $X_0$  は一定とし、正常細胞全体が一つの中間細胞を生み出す率を  $\nu = \mu_1 X_0$  で示す。



	0		1		10		100	
Day	他	癌	他	癌	他	癌	他	癌
165	1							
255							1	
285					1		1	
315							2	
345			2		1		4	
375	2						2	
405			1		2		2	1
435	3		2		2		1	
465	5		1		3		1	1
495	2		3				2	1
525	3		2		1		2	1
555	6		6		5		3	3
585	8		1		3		1	1
615	5		4		5		2	1
645	15		4		6	1	5	3
675	5		3		3			2
705	6		4		2	1		1
725			1				1	1
730	22	3	15	1	7	7	2	2
Total	83	3	49	1	41	9	32	18

Kociba (1978) はラット (n=236) ヘダイオキシン (TCDD) を 2 年間食餌により摂取させ、死亡時の剖検及び組織診断所見により死因が確認された。摂取量は 0、1、10、100 pg/kg/day の 4 種とした。死因が肝細胞がんまたは腺腫による死亡を主イベント、それ以外の死因を競合イベントとする。236 例中 30 例に主イベントが観察された。その内訳を表に示す。表の生存時間データに最も適合する変異率、増殖率などのパラメータを推定する。

4パラメータは同定不能なので、生物学上重要な、全変異率  $\rho = \nu\mu_2$  と実質増殖率  $\psi = \beta - \delta - \mu_2$  を推定する。

線量効果モデル

$$\begin{aligned} \log\psi &= \log\psi_0 + \log\psi\_b D && \text{増殖効果} \\ \log\rho &= \log\rho_0 + \log\rho\_b D && \text{変異効果} \end{aligned}$$

を仮定する。推定結果を表に示す。

	$\log\psi_0$	$\log\psi\_b$	$\log\rho_0$	$\log\rho\_b$
$\log D$	-3.976	0.075	-24.68	-
(se)	-0.122	-0.016	-1.4	-

Dioxin は変異率を高めず、中間細胞の増殖率  $\log\psi$  を  $e^{0.075}=1.08/\text{pg}$  の率で高めると結論した。

次に米国が 1970~92 に宇宙生活に備えるためアルゴンヌ研究所にて実施した放射線照射実験 (JANUS 計画) のデータを解析する。マウス 40000 匹がコントロール、 $^{60}\text{Co}$  によるガンマ ( $\gamma$ ) 線または 0.85 MeV の核分裂中性子 ( $n$ ) 線の全身照射を、1 回照射または分割照射 (週 1 回 60 週) し、死亡時に剖検し死因を確定した。詳細は省略し推定結果を示す<sup>3</sup>。

	$\log\psi\_a$	$\log\psi\_b$	$\log\rho\_a$	$\log\rho\_b$
(a) $\gamma$ 線/単一	-4.834	-	-17.00	0.001991
(b) $\gamma$ 線/分割	-4.761	-	-17.33	0.001157
(c) $n$ 線	-4.894	-	-16.79	0.02335

結論は、放射線の発がん効果は変異率の増大による。また中性子線の  $\gamma$  線にたいする生物効果比 (*limiting RBE*) は  $0.0234/0.0012=20$  と計算される。この値は放射線生物物理学的に妥当な値である。

発癌は2段階の変異が重なった場合に起こるといふ仮説を立証し利用する為に TSCE モデルが開発された。TSCE モデルはパラメータが生物医学的意味を有する点が重回帰や Cox 回帰モデル等の経験モデルと異なる。それ故、統計学を知らない医師や生物学者でも、モデルの妥当性の判断と推定値の意味は直ちに理解できる。このモデルによる毛髪ミネラルと難病との関連解析は難病のメカニズム解明に有効と思われる。

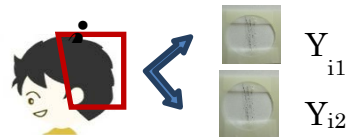
統計モデルの説明変数に測定誤差があるときに、それを無視した解析を行うと、パラメータ推定値が減衰するだけでなく、測定誤差が大きいときは正の関連があるときに負の関連があるという逆転した推定結果を与えることすらある。精密な解析が必要な時ほど、測定誤差の大きさと分布を考慮したモデルを構成する必要がある。そこで、毛髪ミネラルの測定誤差と分布を調べた結果の一部を記す。

### 3 毛髪ミネラルの統計的性質

#### 3.1 測定誤差の特性

毛髪ミネラルの測定誤差の原因は次の3つが考えられる：

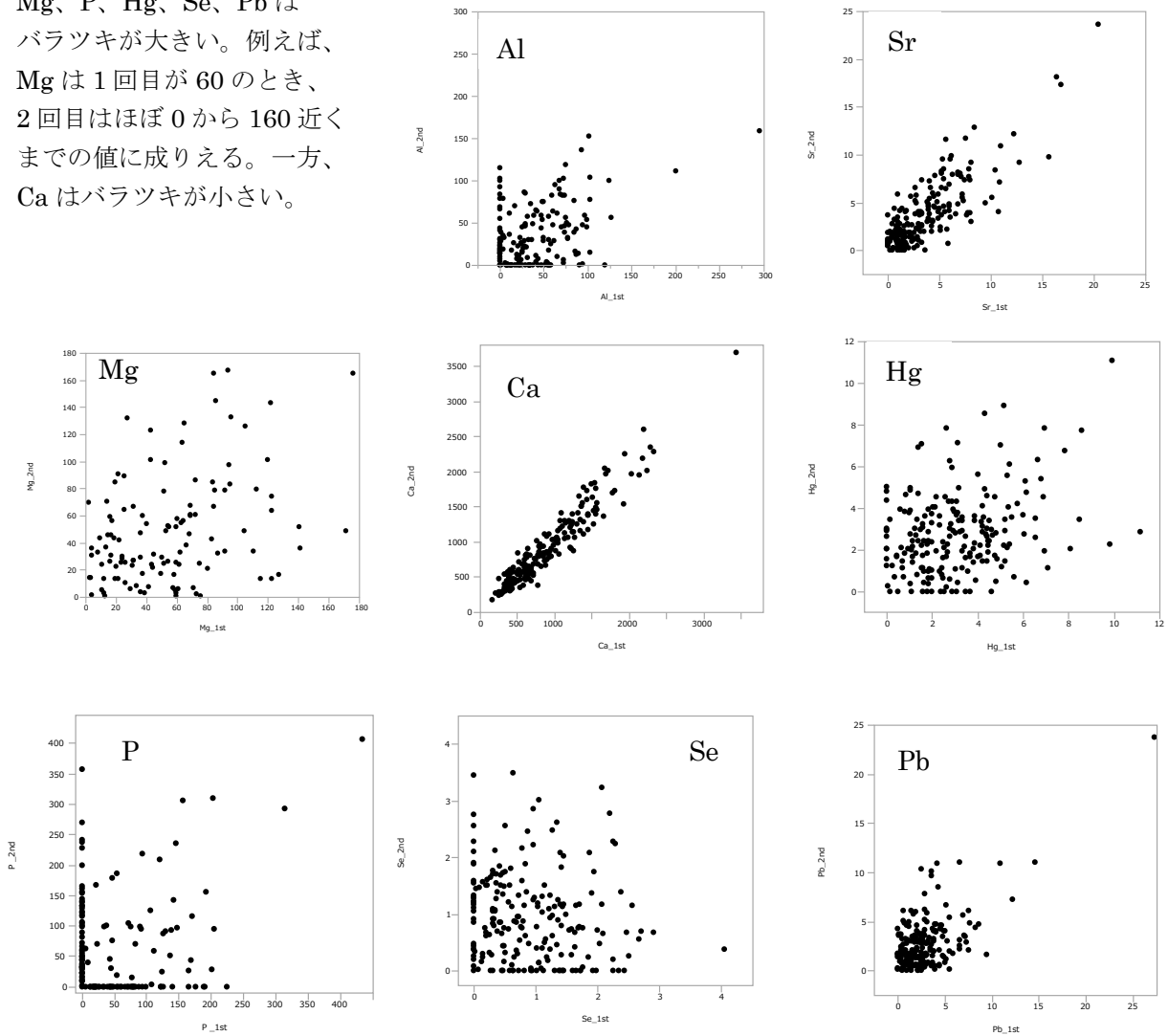
- ① 物理的測定誤差
- ② 毛髪の採取部位 (頭での位置)
- ③ PIXE 測定位置 (毛髪の根元と毛先の間の位置)



6 歳児 209 人の毛髪を 2 か所から採取し PIXE で測定することで一人から 2 つの測定値を得た。

医学で重要な 8 つのミネラルについて、散布図を示す。  
ミネラル毎の特性が見られる。

Mg、P、Hg、Se、Pb は  
バラツキが大きい。例えば、  
Mg は 1 回目が 60 のとき、  
2 回目はほぼ 0 から 160 近く  
までの値に成りえる。一方、  
Ca はバラツキが小さい。



### 3.2 測定誤差の統計モデル

誤差の定義をするには真値の定義が必要である。

定義と記号

真値 : 頭髪全体の平均値  $\mu$

実測値 : 真値+誤差  $Y=\mu+\varepsilon$

モデル :  $Y_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij}$ 、 $\varepsilon_{ij} \sim N(0, \sigma^2)$

モデルが正しければ 2 回の測定値の差は

$$Y_{i1} - Y_{i2} = \varepsilon_{i1} - \varepsilon_{i2} \sim N(0, 2\sigma^2)$$

となるので、正規分布に従う。そこで、差の分布を求めた。但し、 $Y_{i1}=Y_{i2}=0$  のときはその測定値の差は用いない。0 は検出限界未満ということを意味しており、検出限界未満での測定誤差を分析することに意味があるとは思えない。ここでの測定誤差の解析は少なくとも 1 回は 0 で無い測定値についてである。

図1  
2回の測定値の  
差の分布

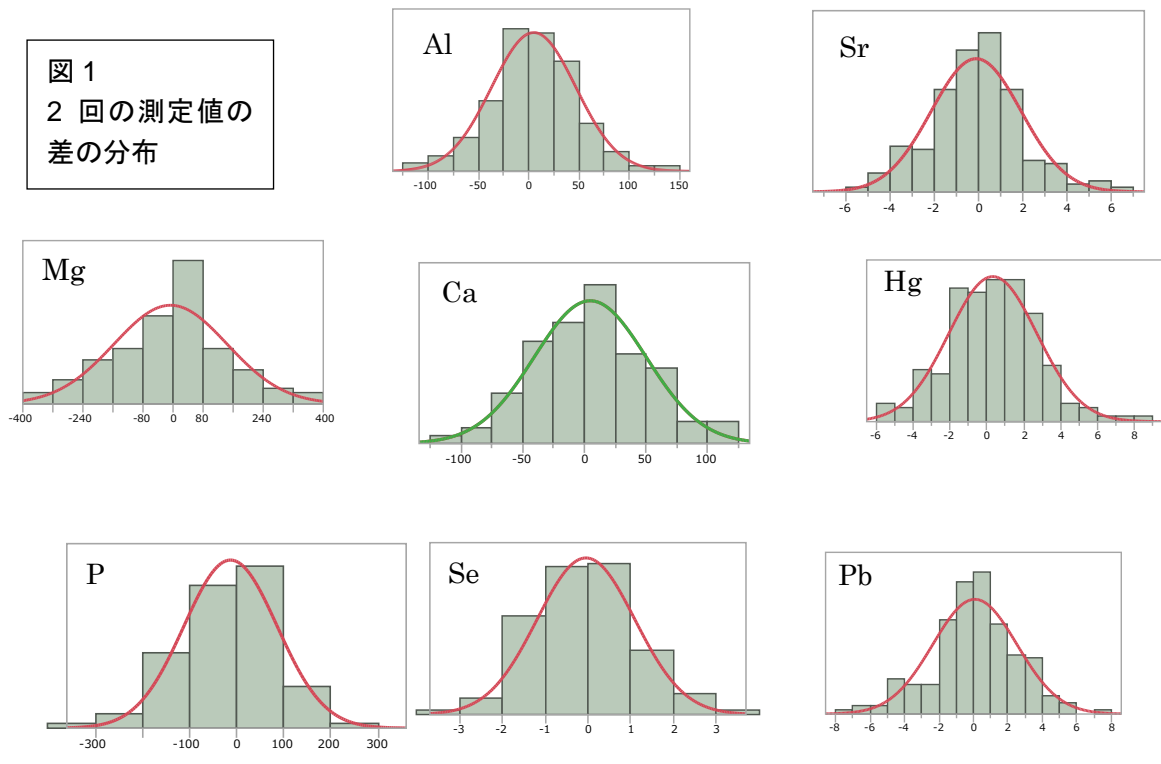
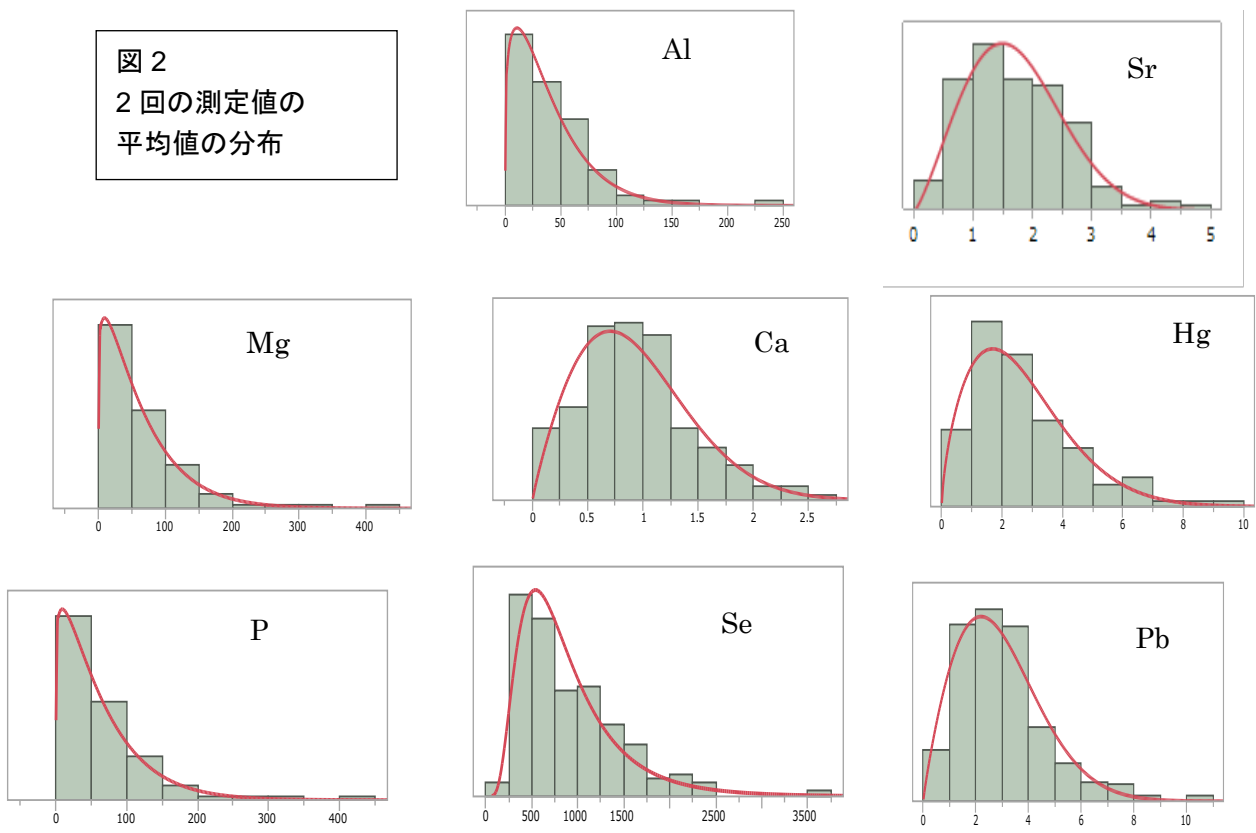


図2  
2回の測定値の  
平均値の分布



2回とも0のときの、0の扱いは元素毎に異なる。必須ミネラルならば「異常」であり、有害ミネラルならば「正常」である。

図1に2回の測定値の差の分布を示す。8つのミネラルは全て近似的に正規分布に従っている。正規性の検定結果は全て正規性の帰無仮説を棄却しなかった ( $p>0.05$ )。この結果は測定誤差（個人内のバラツキ）が偶然誤差であり、測定値は上のモデル式を満たすことを示唆している。

このことから、平均値  $\bar{Y}_i = (Y_{i1} + Y_{i2}) / 2$  はより真値に近い値となる。そこで、平均値の分布（個人間分布）を求めた（図2）。全て対数正規分布またはワイブル分布で近似された。ともにパラメータを2つしか持たない単純な分布で、扱いやすい（Tractable）分布である。ここまでの統計解析のまとめを表に示す。

	Y>0	%	変換	正規	除 %		Y>0	%	変換	正規	除 %
Na	209	100%		206	1.40%	Co	150	72%		150	0.00%
Mg	188	90%		186	1.10%	Ni	202	97%		199	1.50%
Al	161	77%		161	0.00%	Cu	209	100%	log	206	1.40%
Si	209	100%		208	0.50%	Zn	209	100%		203	2.90%
P	143	68%		141	1.40%	Ga	185	89%		184	0.50%
S	209	100%		209	0.00%	As	145	69%		143	1.40%
Cl	209	100%		193	7.70%	Se	205	98%		205	0.00%
K	209	100%	log	202	3.30%	Br	209	100%		197	5.70%
Ca	209	100%		200	4.30%	Rb	179	86%		170	5.00%
Ti	209	100%	log	203	2.90%	Sr	208	100%		203	2.40%
V	144	69%		144	0.00%	Nb	144	69%		140	2.80%
Cr	203	97%		202	0.50%	Mo	171	82%		168	1.80%
Mn	81	39%		79	2.50%	Hg	205	98%		205	0.00%
Fe	209	100%		198	5.30%	Pb	209	100%		205	1.90%

### 3.3 個人内分散と個人間分散

個人内分散は観察値と真値との差の分散で、測定誤差と理解される。一方、個人間分散は集団における真値の分散である。主要元素、微量元素、局微量元素から2つずつ選び、両分散と分散比を求めた。分散比が大きいほど、処置の効果を検出しやすい。主要元素は全て分散比が20以上と大きい。一方、FeとPbは3.1以下とかなり小さい。

ある処置は毛髪Pbを1程度減少させる効果があるとするとき、有意差を得るための実験計画を考える。

元素	中央値	個人間分散	個人内分散	分散比
Ca	791	274000	11000	25
Cl	773	1078000	50000	21.6
Cu	18.2	90.3	3.58	25
Fe	15.8	14.1	4.57	3.1
Sr	2.74	9.54	2.12	4.5
Pb	2.35	4.69	3.05	1.5

シナリオ1：各群から60人、1人5検体用いたとする。総平均値の分散は  $(4.69+3.05/5)/60=0.088$ 。群間差1なので、 $t=1/\sqrt{2*0.088}=2.37$  ( $p<0.05$ ) と有意になる。

シナリオ2：各群から30人、1人10検体用いたとする。総平均値の分散は  $(4.69+3.05/10)/30=0.167$ 。

$t = 1/\sqrt{2 \cdot 0.167} = 1.73$  ( $p > 0.05$ ) と有意にならない。

#### 4 考察

毛髪ミネラルの医学疫学での利用に関するレビュー論文はいくつもあるが、共通するのは、毛髪ミネラル測定値のバラツキが大き過ぎて制御困難、品質管理の標準化が必要、といった厳しい評価と提言である。これらの批判は全て ICP を用いた測定値に付いてであるが、評価法にも問題がある。一人の毛髪を複数検査所に送り、結果を比較し、バラツキが大き過ぎるから、前処理を標準化すべきといった批判が多い。毛髪は血液と違い、測定部位ごとに値がバラつくことを無視している。本研究は PIXE 測定におけるバラツキは前処理とかのシステムチックな原因ではなく、主に測定部位の違いを原因とする偶然誤差であることを明らかにした。偶然誤差なら、個人の検体を増やすことで、精度を高めることが可能である。また個人間分布も 2 つのパラメーターで決まる単純な分布故に実験計画が立てやすい。PIXE による測定誤差は研究デザイン上は扱いやすい。なお、ここで解説した統計解析法は ICP を用いた測定値にも直ちに応用できる。毛髪ミネラル用の多変量回帰、症例対照、メカニスティックモデルを工夫することで、難病・難問への PIXE の貢献が期待される。



Variations in hair mineral measurements and statistical models:  
Studying associations between hair minerals and intractable diseases

T. Nakamura<sup>1</sup>, T. Yamada<sup>2</sup>, S. Goto<sup>3</sup>, K. Sera<sup>4</sup>, Todd Saunders<sup>5</sup>,  
T. Takatsuji<sup>2</sup>, T. Makie<sup>6</sup> and Y. Nose<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Nagasaki University Graduate School of Environmental Studies  
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

<sup>2</sup>Center for Translational and Clinical Research, Osaka University Hospital  
2-2 Ymadaoka, Suita, Osaka 65-0871

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

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

<sup>5</sup>Nagasaki University Graduate School of Medicine  
1-12-4 Sakamoto, Nagasaki 852-8523, Japan

<sup>6</sup>Clinical Research Center, Suzuka Hospital  
3-2-1 Ksato, Suzuka, Mie 513-8501, Japan

<sup>7</sup>Kyushu University Graduate School of Medicine  
3-1-1 Maidashi, Higashiku, Fukuoka, 812-8582, Japan

## Abstract

In vivo measurements of trace elements are considered to be key biomarkers for better understanding of the cause and treatments of intractable diseases. In performing association studies between trace elements and intractable diseases, it is essential to clarify the characteristics of the variations, or fluctuations in the measurements of trace elements and to develop statistical methods that take into account the influence these fluctuations have on results. This clarification along with new statistical methods will lead to more reliable and accurate findings. Results obtained from this study describe the decomposition of the variations in the measurements of the trace elements into intra-individual variations and inter-individual variations. In addition, we will describe multivariate regression models, case control methods, and mechanistic models as examples of generally applicable

statistical methods that can easily make full use of the characteristics of hair minerals, and provide more evidence of relationships between hair mineral concentrations and intractable diseases.

Currently, the cause and treatment of atopic dermatitis are unknown. To examine associations between atopic dermatitis and hair mineral content, we conducted a cohort study with approximately 1,000 babies in Fukuoka City. After adjusting for family history of the disease, the results suggest that Se and Sr concentrations in the mothers and children were significantly associated with atopic dermatitis. This was the first published report to predict the relative risk of the onset of atopic dermatitis. In addition to applications in the medical sciences, PIXE-statistical analysis has been proven effective for distinguishing the origin of materials, including down feathers, vegetables, meats, and wood.