

PIXE 法を用いた毛髪ミネラル量測定値における個人内変動の特性

山田知美¹、片岡恒史²、高辻俊宏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

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

³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

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、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て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、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。追跡率が低く、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。

個人内分散が大きいことは多くの文献で指摘されており、我々は、対策法の一つとして、計測値を真値（頭髪全体の平均値）と測定誤差（個人内分散）に分解し、個人内分散を除外したミネラルの純粋な効果を推定する方法（True Equivalent Sample Method: TES法）を開発した。TES法を、初期調査でアトピーとの関連が示唆されたSrに適用したところ、個人内バラツキによるリスク推定値（回帰係数）の減衰が確認され、妥当性も検証できた³⁾⁴⁾。さらに、誤差の大きさと原因を明らかにするため、個人内分散を物理誤差と純粋な個人内分散に分解することも試みた⁵⁾。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他のミネラルにも適用することは困難である。毛髪ミネラルがさらに治療・予防に広く応用されるためには、各ミネラルの個人内変動の特性を明らかにし、リスク推定の精度を上げるための対策が求められる。

毛髪PIXEの医学・疫学への有効利用を目指して、今回は、Sr以外のミネラルについても、測定値のバラツキの原因と各ミネラルの分布特性の検討を行う。32種類のミネラルを、測定値の信頼性および分布特性に基づいて分類し、統計解析における取扱いを提案することが、本研究の目的である。

2 方法

2.1 対象

追加調査の6歳児209例について、1人につき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tronセンターに送付し、PIXE (particle induced X-ray emission) 法により、毛髪中の32種類のミネラル量を得た⁶⁾⁷⁾。

2.2 測定値と誤差の分布特性

TES法は、ランダム誤差の仮定と観測値の分布の特定がポイントとなるので、まず、(i) 2回の測定値の分布が、変数変換により線形モデルに適合するか、(ii) 2回の測定値の差が正規分布に従うかを確認する。もし正規分布に従えばランダム誤差と看做すことができ、測定値の分布も特定できるので、2回の平均値のヒストグラムを作成して分布を特定する。2回の測定値の差が正規分布に従わない場合は、四分位点に基づくカテゴリー化を行い、マクネマー検定にて誤差の偶然性を確認する。

次に、測定誤差の原因を探るため、測定誤差（個人内分散）を“物理的な誤差分散”と“純粋な個人内分散（頭髪の位置による分散）”に分解する。

32種類のミネラルそれぞれについて分布の特性を纏め、毛髪PIXEの統計解析における取扱いを提案する。

2.3 誤差の分解

PIXE法による毛髪ミネラル測定値において、バラツキの原因は主に、物理的誤差（最小二乗法の fitting error）、毛髪の採取部位（1人の頭での異なる場所）、照射位置（1本の毛髪での異なる位置）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）を意味し、位置による分散または純粋な個人内分散と呼ぶこととする。

X_{ij} を、 i 番目の子供の j 番目の検体 ($j=1, 2$) の測定値、 X_{ij} の物理的誤差分散を v_{ij}^2 とすると、

$X_{ij} = \mu_i + \varepsilon_{ij} + e_{ij}$ (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、 μ_i : 真値 (i 番目の子供の全頭髪の平均)

$\sigma_i^2 = V(\mu_i)$: 個人間分散

$\sigma_L^2 = V(\varepsilon_{ij})$: 位置による分散 (純粋な個人内分散)

e_{ij} : X_{ij} の物理的誤差

$v_{ij}^2 = V(e_{ij})$ の不偏分散

とする。このとき、個人内分散 σ_f^2 は $V(e_{ij}) + V(\varepsilon_{ij})$ となる。

$D_i = X_{i1} - X_{i2}$ が近似的に正規分布に従うとき、それぞれの分散は以下の式にて算出される⁵⁾。

D_i の物理誤差分散は $v_{i1}^2 + v_{i2}^2$ 。ただし、 $X_{ij} = \sqrt{\tilde{X}_{ij}}$ のとき $v_{ij} = \frac{\tilde{v}_{ij}}{4\tilde{X}_{ij}}$ 、 $X_{ij} = \ln(\tilde{X}_{ij})$ のとき $v_{ij} = \frac{\tilde{v}_{ij}}{\tilde{X}_{ij}^2}$ 。

個人内分散 σ_f^2 は $(2n)^{-1} \sum_{i=1}^n D_i^2 = (2n)^{-1} \sum_{i=1}^n (X_{i1} - X_{i2})^2$ 。

位置による分散 σ_L^2 は $\sigma_L^2 \cong (2n)^{-1} \sum_{i=1}^n \{(X_{i1} - X_{i2})^2 - (v_{i1}^2 + v_{i2}^2)\}$ 。

2回の平均値 $Y_i = \frac{X_{i1} + X_{i2}}{2}$ について、個人間分散 σ_i^2 は $\sigma_i^2 \cong (n-1)^{-1} \sum_{i=1}^n \{(Y_i - \bar{Y})^2 - \sigma_f^2/2\}$ 。

3 結果

ミネラルはそれぞれに独特の医学的意義を有するが、統計学的特性はよく類似しており、統計解析の観点からは、4つのカテゴリーに分類することが有効であることが分かった (図1)。

(A群) S, Zn, Ca, K, Fe, Cu, Si, Cl, Ti, Br

(B群) Na, Sr, Pb

(C群) Se, Hg, Cr, Ni

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

A群は、測定値が0 (検出限界未満) になることは稀で、個人の独立な2回の測定値の散布図がラッパ型になるので、対数変換または平方根変換 (ただし、検出限界値0.1未満は0.1とする) を施すことにより、近似的に線形回帰モデルに従う。測定値の差は正規分布に従い、測定値とともに得られる物理誤差推定値は、測定値に比して小さく、個人内分散を物理誤差分散と頭髪の位置による分散に分解できる。さらに個人間分散の特定もでき、TES法の適用が可能である。

A群の代表として、Cuの結果を図2に示す。対数変換を施すと、2回の平均値における個人間分散は0.2751、個人内分散は0.0137となった。さらに個人内分散を分解すると、物理誤差分散は0.0034、頭髪の位置による分散は0.0103と算出された。個人内分散に対して個人間分散が約20倍と大きく、物理誤差推定値は測定値に比して約1/10と小さい。

A群の他のミネラルについては2回の測定値の散布図と差のヒストグラムを図3に示す。

B群は、方法2.2に記載した(i)(ii)は満たすものの、測定値が小さく、物理誤差推定値が測定値に比して大きいので、誤差の分解は困難なミネラルとしてA群と区別した。2回の測定値の散布図と2回の差および平均値のヒストグラムを図4に示す。外れ値を除外すれば、方法2.2の(i)(ii)を満たすが、個人内分散と個人間分散は、 \sqrt{Na} では5.09と6.35、 \sqrt{Sr} では0.18と0.54、 \sqrt{Pb} では0.28と0.16とそれぞれ算出され、個人内分散に対する個人間分散がA群に比べてかなり小さい。

C群のミネラルについては、個々の測定値は個人内分散が大き過ぎるので信頼できないが、平均回帰現象

がみられたため、2回の平均値は信頼できると結論付けた。

C群の代表として、Hgの結果を図5に示す。2回の測定値の差は正規分布に従い、平均値の分布も特定できたが、線形回帰モデルには従わず、個人内分散1.33に対して個人間分散4.12は約3倍と、A群に比べると小さい。また、物理的誤差が大きく、位置による分散の推定は不可能であった。

C群の他のミネラルについては2回の測定値の散布図を図6に示す。アトピーとの関連が示唆されたSeについては、より詳細な結果を図中に示した。散布図に見られる三角形は平均回帰現象を示し、1回目と2回目の各測定値では分布の特定は困難であったが、2回の平均値はワイブル分布に従うことが確認できた。

D群は、対象症例の25%以上が検出限界未満のミネラルで、連続量に基づく統計解析は困難である。四分位点に基づくカテゴリー化の有用性について今後検討する予定であるが、医学的観点からの意義と合わせた検討が必要と考える。半数以上から検出されたAl, Ga, Rb, Mo, Mgについて、分割表と検定結果を図7に示す。いずれも有意差は認められなかった。

4 考察

32種類のミネラルを、統計学的特性に基づき4つのカテゴリーに分類した。また、毛髪ミネラル測定値のバラツキを、個人間分散と個人内分散（測定誤差）に分解し、誤差に比して測定値が大きいミネラルについては、さらに“個人内分散”を“位置による分散”と“物理的誤差”に分解することで、誤差の大きさと原因の検討を行った。測定値が小さい微量元素については、精密さには欠けるが同様の検討を行ったところ、誤差の分解は困難であっても測定値や誤差の分布が特定できるというケースも発見された。測定値が0（すなわち検出限界未満）という症例が過半数を占めるミネラルについては、医学的観点からの意義と合わせた検討が必要であり、今後の課題も残るが、研究開始時には混沌としていた毛髪ミネラル量の統計学的特性の一端を解明できたことは、毛髪ミネラルの医学・疫学での利用を強力に推進する画期的成果と言える。

結論として、毛髪は常に1人から2箇所を測定し、線形モデルへの適合と差の正規性を確認後、統計解析には2回の平均値を用いることを提案する。特にHgやSeなどの微量元素では平均回帰現象が見られるので、2回の測定は必須と考える。

本研究の結果を受けて、現在、6年後の追跡調査に協力が得られた209組の母子の生後または産後1か月の残余毛髪を使ってPIXE分析を行っている。現在計測中のデータが揃えば、2回の測定値を用いて、乳幼児のアトピー性皮膚炎発症予測モデルの改良を行う予定である。

また、アトピーの他にも、本研究成果の具体的分野での応用法を明らかにし、今後、毛髪ミネラルの医学・疫学での利用を計画している研究者との交流を深めることにより、一層の研究促進を期待する。

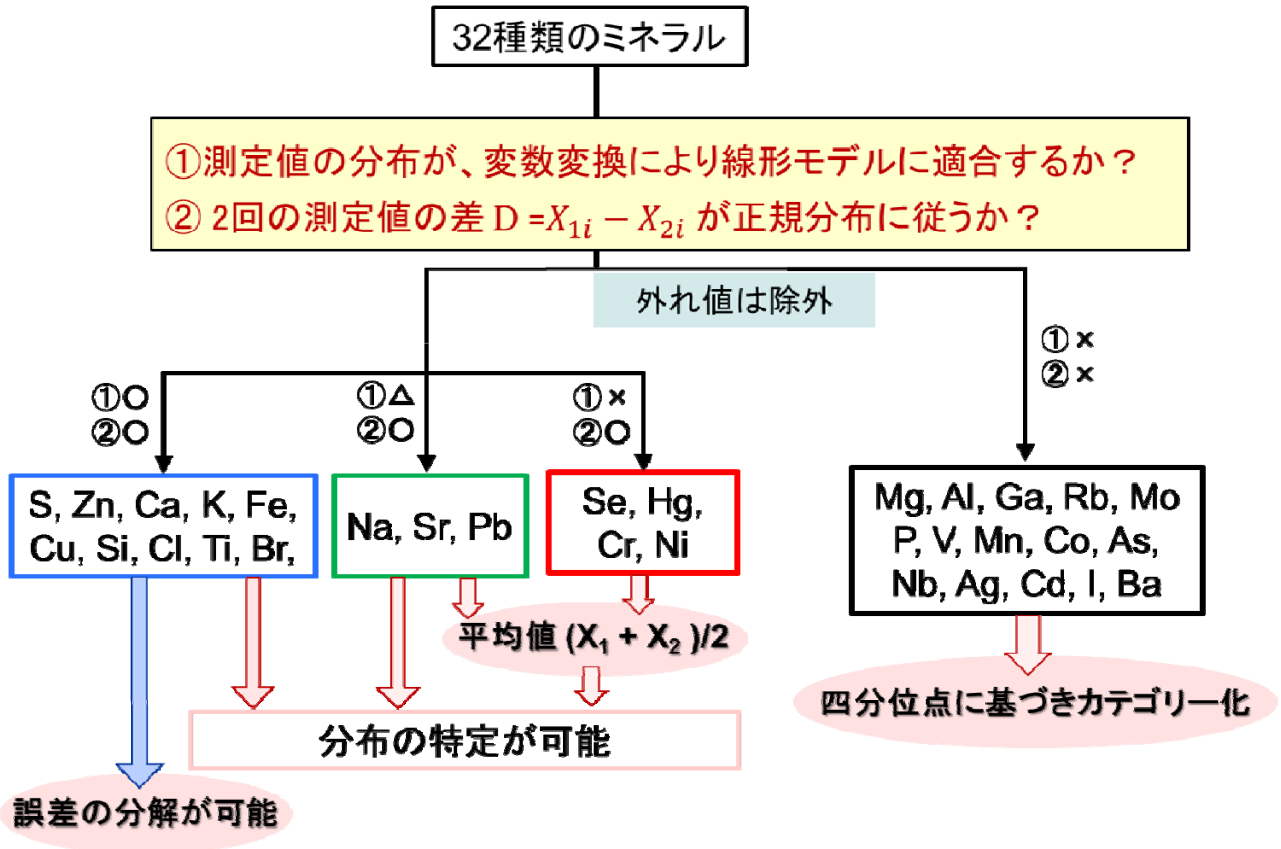
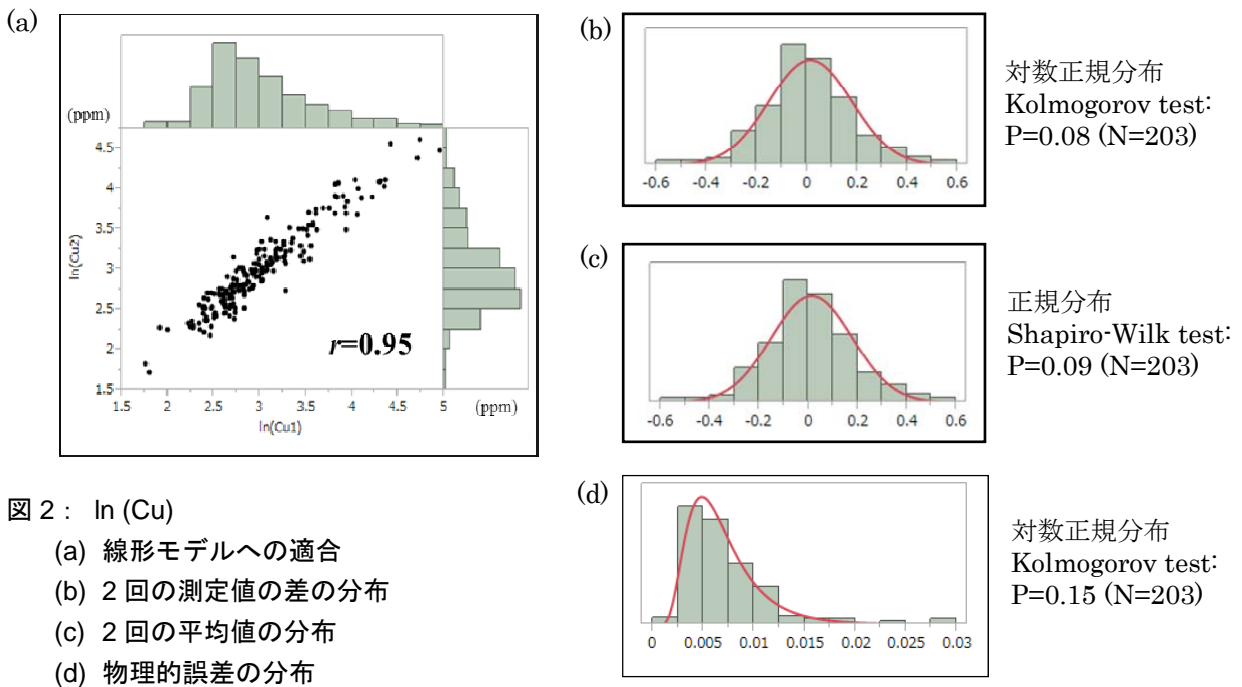


図1： 32種類のミネラルの分類



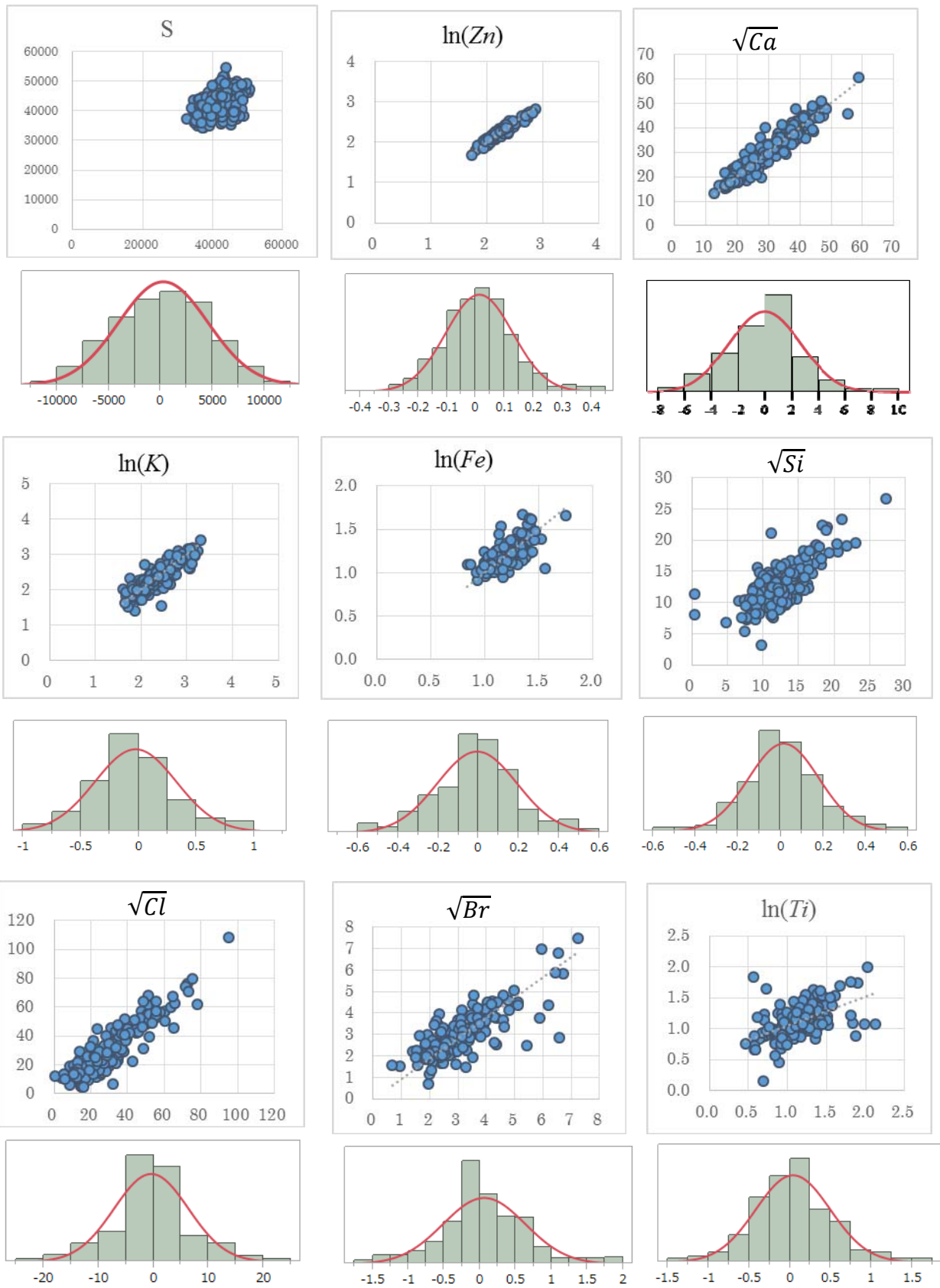


図3：A群に分類されたミネラルの2回の測定値の散布図と差のヒストグラム

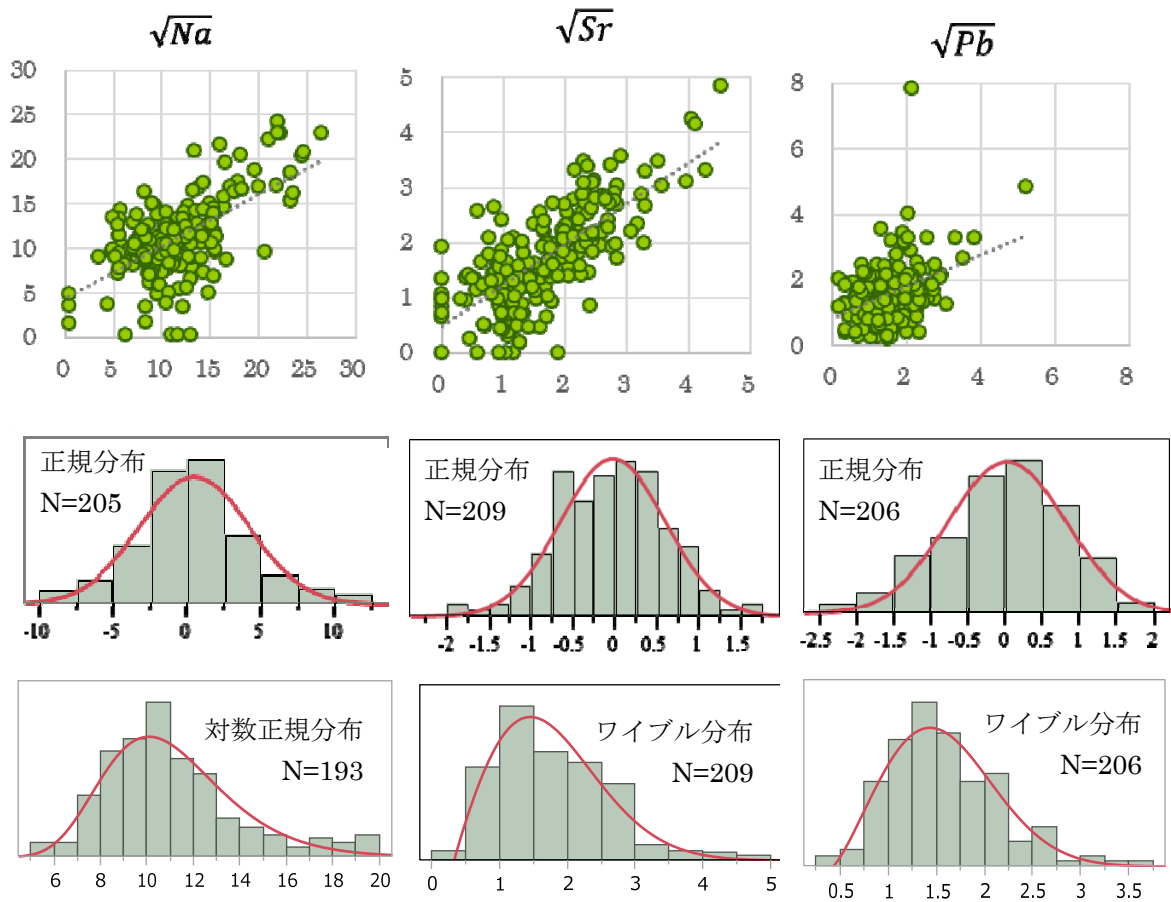


図4：B群に分類されたミネラルの分布
 (上段) 2回の測定値の散布図 (中段) 2回の差のヒストグラム (下段) 2回の平均値のヒストグラム

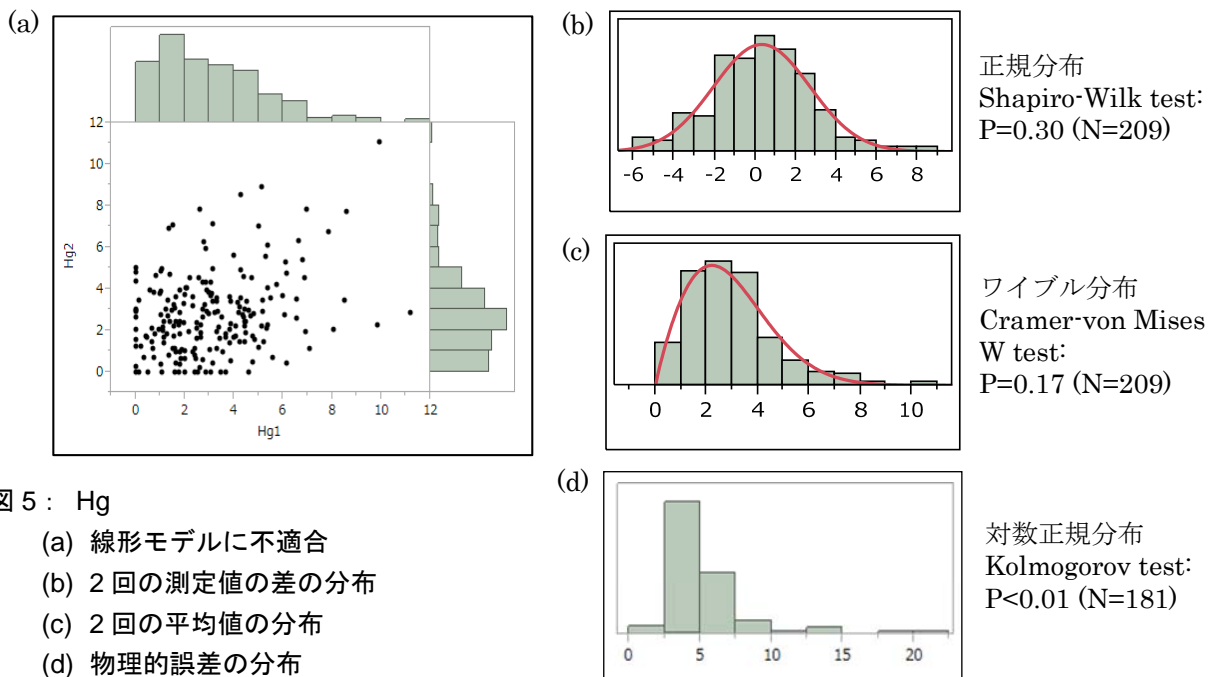


図5：Hg
 (a) 線形モデルに不適合
 (b) 2回の測定値の差の分布
 (c) 2回の平均値の分布
 (d) 物理的誤差の分布

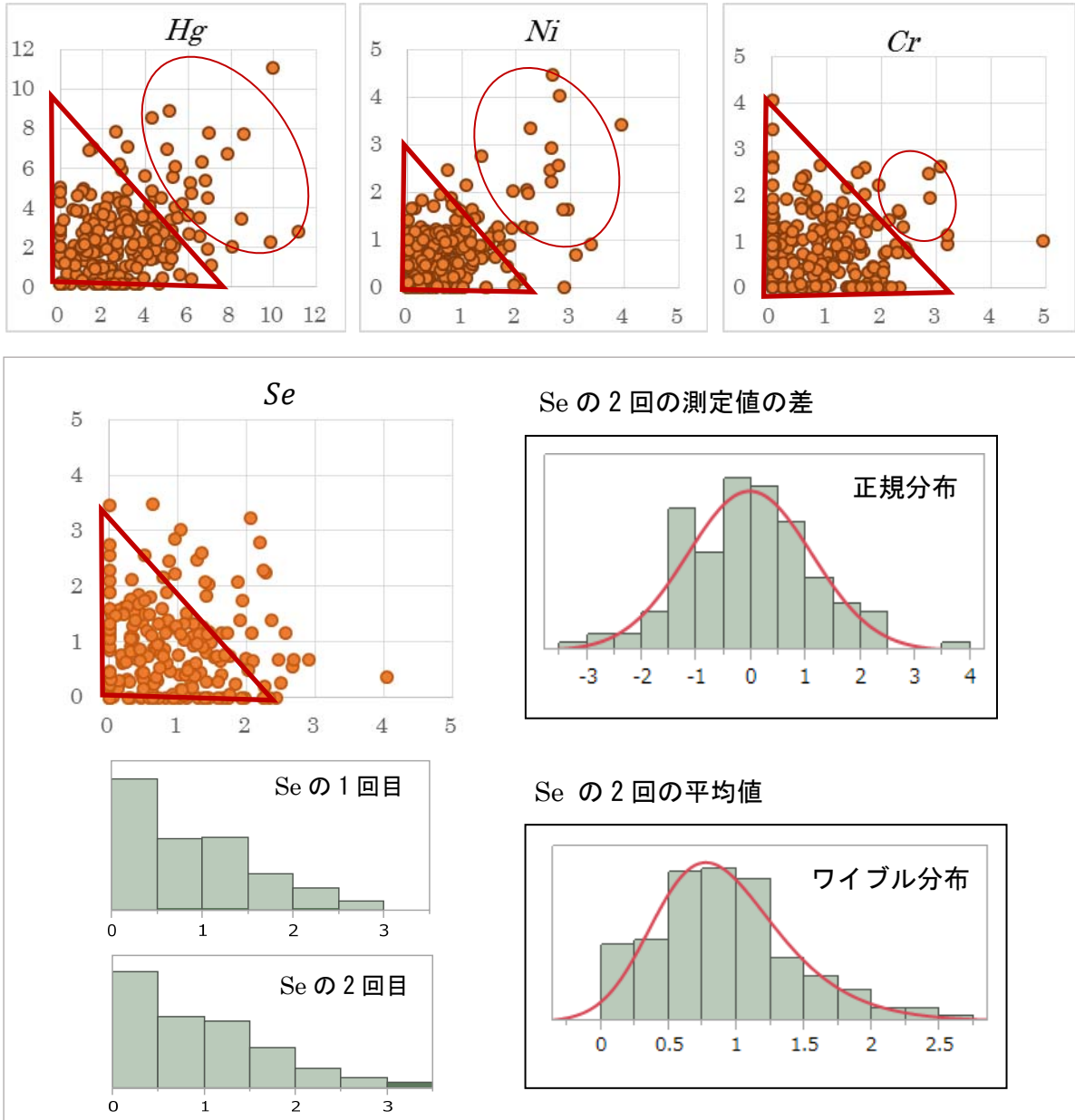


図6：C群に分類されたミネラルの2回の測定値の散布図

	<u>Mg</u>				<u>Al</u>				<u>Ga</u>				<u>Rb</u>				<u>Mo</u>			
	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
0	21	16	15	5	48	7	12	9	24	12	11	7	30	6	23	22	38	5	22	20
1	10	21	10	7	12	5	9	3	14	13	14	10	10	4	5	5	13	0	5	2
2	13	22	11	6	13	9	16	14	15	10	14	13	22	7	13	10	22	1	14	15
3	9	8	15	20	5	6	15	26	6	11	13	22	20	6	11	15	23	3	11	15
	$\chi^2 = 11.09$				$\chi^2 = 3.53$				$\chi^2 = 1.56$				$\chi^2 = 1.59$				$\chi^2 = 7.25$			
	$p = 0.09$				$p = 0.74$				$p = 0.96$				$p = 0.95$				$p = 0.30$			

図7：D群のうち、中央値が0より大きいミネラルについて、1回目と2回目の分割表(0:最小値~25%値, 1:25%値~中央値, 2:中央値~75%値, 3:75%値~最大値)とマクネマー検定の結果

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、錦戸佐知代様、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) T. Yamada, T. Saunders, S. Kuroda, K. Sera, T. Nakamura, T. Takatsuji, T. Hara, Y. Nose, Fukuoka Assoc. Obstetr. Gynecol. and Pediatr. “Cohort Study for Prevention of Atopic Dermatitis using Hair Mineral Contents”, *J Trace Elem Med Bio*, 27, 126-131 (2013).
- 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) 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).
- 4) 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法によるミネラル量測定値の個人内変動のリスク懐石への影響と対策について, NMCC共同利用研究成果報文集20 (2014).
- 5) T. Yamada, K. Kataoka, T. Saunders, K. Sera, T. Takatsuji, T. Nakamura, Y. Nose. “Statistical Investigation into Random Variations in PIXE Hair Analysis”, *IJPIXE*, in press.
- 6) K. Sera, S. Futatsugawa and K. Matsuda. “Quantitative Analysis of Untreated Bio-samples”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B150, 226-233 (1999).
- 7) K. Sera, S. Futatsugawa and S. Murao, “Quantitative Analysis of Untreated Hair Samples for Monitoring Human Exposure to Heavy Metals”, *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B189, 174-179 (2002).

Standard statistical method for risk analysis using hair minerals measured by PIXE

T.Yamada¹, K. Kataoka², T. Takatsuji³, K. Sera⁴, T. Nakamura⁵ and Y. Nose⁶

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

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

³ Nagasaki University Graduate School of Environmental Studies
1-14 Bunkyo-machi, Nagasaki 852-8521, Japan

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

In 2005, we started a cohort study following 834 mother-infant pairs who were participating in both the national one-month and ten-month health checkups in Fukuoka City. The objective was to determine the association between atopic dermatitis (AD) and 32 identified hair minerals measured by proton induced X-ray emission (PIXE) method. Mineral amounts together with individual AD family history were incorporated into a logistic model to predict the risk of infant AD. In 2011, six years after initial research, we sampled 209 then 6 year-old children from the original cohort to statistically analyze intra-individual variations and to confirm associations between hair minerals and AD. As a result we have succeeded in decomposing hair mineral variations into inter-individual and intra-individual variations for minerals obtained using PIXE. For large volume minerals, further decomposition of intra-individual variations into variations due to locations and physical fitting errors was performed. In this paper, we summarized our recent results. Our suggestion for risk analysis using hair minerals is that always take two hair mineral measurements, confirm the normality of the difference, then use the average of them.