

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08733

研究課題名(和文)毛髪ミネラルを用いたアトピー性皮膚炎発症予測モデルの改良

研究課題名(英文)On Intra-Individual Variations in Hair Minerals Measured by PIXE in relation to Epidemiological Risk Assessment of Atopic Dermatitis

研究代表者

山田 知美(YAMADA, TOMOMI)

大阪大学・医学部附属病院・特任教授

研究者番号：60363371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、2005年に福岡市乳幼児健診事業の一環として開始した、生後10か月時点におけるアトピー性皮膚炎の発症と生後または産後1か月の母子の毛髪中のミネラル量との因果関係調査(初期調査)の継続的研究である。毛髪ミネラル計測値には、かなりの誤差(毛髪採取部位やX線照射位置に伴う個体内のバラツキ)が含まれることが分かったので、測定値のバラツキの特性を解明し、その影響を考慮した解析・解積法を開発した。その結果、統計モデルに基づく検討が可能となった。10年前に採取した毛髪の残余検体を再測定することにより、初期調査で構築したアトピー性皮膚炎発症予測モデルの大幅な改良に成功した。

研究成果の概要(英文)：In 2005, we conducted a cohort study of 834-mother-infant pairs to determine the relationship between hair minerals of mother and infant at one-month after birth and the onset of atopic dermatitis (AD) of infant at ten-months after birth. Six years after the initial research, we have sampled 209 six year-old children from the original cohort and noticed there were large variations in measurements of hair minerals measured by the particle induced X-ray emission method. Investigating the statistical nature of the variations, we found that the most intra-individual variations in hair mineral measurements were normal random errors. Furthermore, inter-individual variations are approximated by ordinary parametric distributions. In other words, those variations are statistically tractable, or controllable. In conclusion, we have developed a method for the prediction of AD at 10 month after birth using two specimens of hair from each subject which outperforms the results of initial research.

研究分野：生物統計学

キーワード：測定誤差 毛髪PIXE アトピー性皮膚炎

1. 研究開始当初の背景

アトピー性皮膚炎(アトピー)は工業先進国で増加の一途を辿る原因不詳の乳幼児慢性疾患である。そこで「体内の有害ミネラル蓄積量」⇒「乳幼児健康異常」という仮説を立て、疫学的アプローチにより、アトピーの病因と予防策を探索することを目的として、平成17年にコホート調査を開始した。体内ミネラル量を推定するマーカーとしては、毛髪中のミネラル量を用いた。毛髪採取は比較的容易であることと、ミネラルは体内ミネラル濃度に応じて毛髪中に排出され、しかも1か月に1cmずつ伸びることから、長期にわたる体内ミネラル量推定に最適の生体マーカーと考えられ、米国環境保護庁(US-EPA)も推奨している。

平成17年11月～平成18年11月に福岡市で出産した約1000組の母子を対象として、乳幼児健診(生後1か月と10か月)の際に毛髪採取と簡単なアンケートを追加し、アトピーの診断は10か月健診時に小児科医が行った(初期調査)。平成24年には、初期調査の解析対象者834組をコホート集団とした追跡調査を行い、生後6年間のアトピーの罹患歴を調査した。

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発症との関連を、遺伝(家族病歴)と食習慣の影響を考慮した多変量モデルにより解析した結果、アトピー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た²⁾。家族病歴のみでのアトピー発症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(表1)。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。

(表1)

FH	アトピー発症		計	PPV 8.9%	NPV 96.3%
	Yes	No			
有	17	173	190		
無	24	620	644		
計	41	793	834		
	感度 41.5%	特異度 78.2%		RR 2.5	

FH Sr Se	アトピー発症		計	PPV 10.3%	NPV 97.6%
	Yes	No			
リスク大	27	234	261		
リスク小	14	559	573		
計	41	793	834		
	感度 65.9%	特異度 70.5%		RR 4.2	

※ FH: Family History (家族病歴)
 PPV: Positive Predictive Value
 NPV: Negative Predictive Value
 RR: Relative Risk

しかし、ミネラル量の測定にはかなりの誤差(バラツキ)が含まれる事が分かり、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・解釈法の開発が必須である。

バラツキの原因は主に、①物理的計測誤差、②毛髪の採取部位(1人の頭での異なる場所)、③PIXEの照射位置(1本の毛髪での異なる位置)と言われているが、②③に比べると①は小さい。

②と③は個人内でのバラツキなので、追跡調査では一人につき2回測定を行い、2回の測定値の差を用いて個人内変動の大きさと原因を検討してきた³⁾。毛髪ミネラルを疫学的リスク推定に有効に用いるためには、測定値の個人内変動と個人間変動を量的に評価することが必須であり、そのためには毛髪を2箇所採取して独立に測定されたミネラル計測値が必要となる。

そこで本研究では、生後または産後1か月時点に採取した毛髪の残余検体を利用することにより、初期調査で構築したアトピー発症予測モデルの改良を行う。

2. 研究の目的

毛髪ミネラル測定値の変動(バラツキ)の個人内変動と個人間変動への分解、及び統計モデル構成のための汎用的方法を開発し、乳幼児のアトピー発症予測モデルに適用する。

3. 研究の方法

(1) 毛髪ミネラルの統計的性質の解明:

追跡調査(209症例418検体)のデータを用いて、ミネラル毎の特性を纏め、毛髪ミネラルの統計解析における取扱いを提案する。

32種類のミネラルそれぞれについて、2回の測定値の差を分析し、誤差がランダムか否かを確認する。誤差がランダムであれば、統計モデルの利用が可能となるので、測定値の変動を個人内変動と個人間変動に分解する。

(2) 毛髪ミネラル量の計測:

追跡調査で協力が得られた母子209組を対象を絞り、生後1か月時点で採取した毛髪の残余検体から新たに測定用標本を作製し、proton-induced x-ray emission (PIXE: X線発光分光)法¹⁾を用いて、32種類のミネラル濃度の計測を行う。

(3) アトピー発症予測モデルの構築:

ミネラル測定値の個人内変動を考慮してロジスティックモデルを構築する。ROC

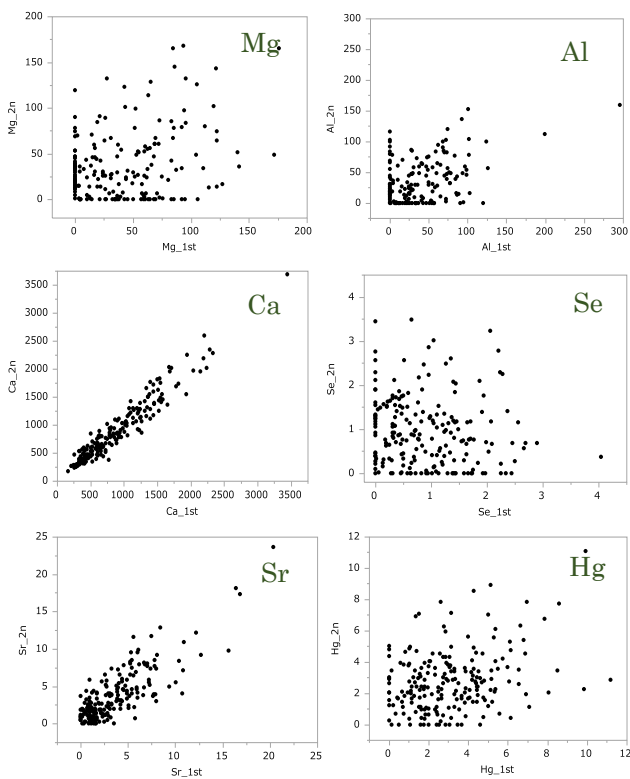
(Receiver Operating Characteristic)分析により、初期調査で構築したモデルとの比較を行う。

4. 研究成果

(1) 毛髪ミネラルの統計的性質

① 測定誤差の特性：

追跡調査では、6歳児209例の毛髪を2箇所から採取し、1人につき2つのPIXE測定値を得た。医学で重要な6つのミネラルについて、散布図を示す(図1)。



(図1)

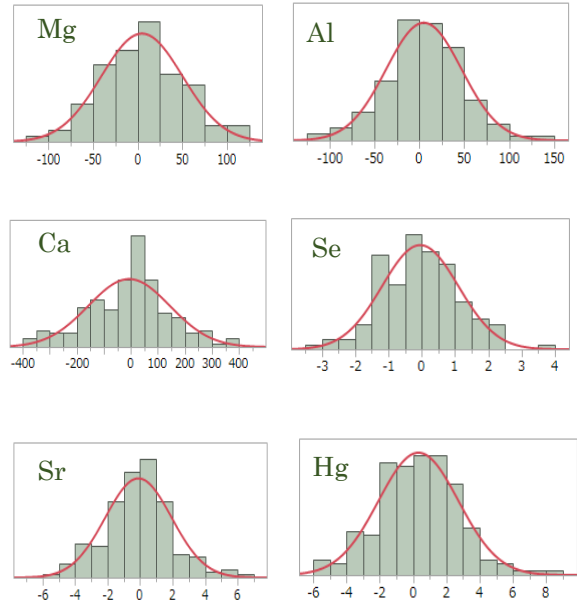
Mg、Se、Hgはバラツキが大きい。例えば、Mgは1回目が60のとき、2回目はほぼ0から160近くまでの値に成り得る。一方、Caはバラツキが小さい。

② 測定誤差の統計モデル：

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 Y_{i1} 、 Y_{i2} とするとき、 $Y_{i1} = \mu_i + \varepsilon_{i1}$ 、 $Y_{i2} = \mu_i + \varepsilon_{i2}$ 、 $\varepsilon_{i1}, \varepsilon_{i2} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$ なる測定誤差モデルを仮定する。ここで、 μ_i は i 番目の子供の真値で、頭髪全体の毛髪ミネラル量の平均値と定義する。また、 σ_ε^2 は個人内分散を表す。

このモデルが正しければ、2回の測定値の差は $Y_{i1} - Y_{i2} = \varepsilon_{i1} - \varepsilon_{i2} \sim N(0, 2\sigma_\varepsilon^2)$ となるので、正規分布に従う。そこで、差の分布を求めた(図2)。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

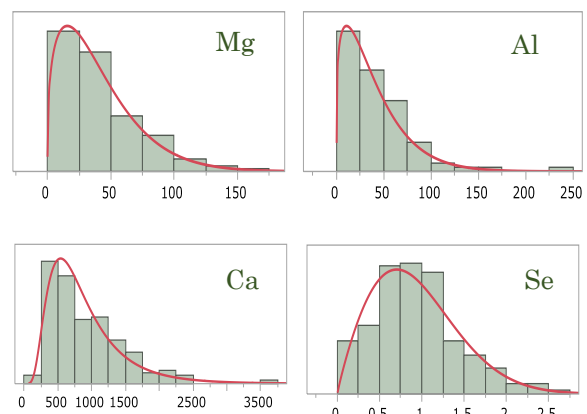
意味しており、検出限界未満での測定誤差を分析することは無意味なので、ここでの検討は、少なくとも1回は0でない測定値が得られた(Detectable)場合に限る。2回とも0のときの0の扱いはミネラル毎に異なる。必須ミネラルならば「異常」であり、有害ミネラルなら「正常」である。

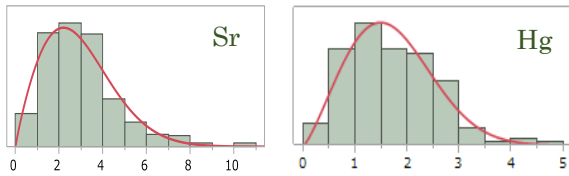


(図2)

6つのミネラルは全て近似的に正規分布に従っている(Validity)。正規性の検定結果は全て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、測定値は上述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 $\bar{Y}_i = (Y_{i1} + Y_{i2})/2$ は分散が半分になるので、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)を確認したところ、全てのミネラルが正規分布またはワイブル分布のいずれかで近似された(但し、対数や平方根等の変数変換を適宜施した)(図3)。共にパラメータを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。





(図 3)

32 種類ミネラルについて、統計的性質を表 2 に纏めた。

(表 2)

	Detectability		Validity		Tractability	
	Positive pairs (%)		Valid pairs	除 %	平均値の分布形状	除 %
Na	209 (100%)		206	1%	正規	12%
Mg	188 (90%)		186	1%	ワイブル	0%
Al	161 (77%)		161	0%	ワイブル	0%
Si	209 (100%)		208	0%	対数正規	0%
P	143 (68%)		141	1%	ワイブル	0%
S	209 (100%)		209	0%	正規	0%
Cl	209 (100%)		193	8%	対数正規	0%
K	209 (100%)		180	14%	二重対数正規	0%
Ca	209 (100%)		200	4%	対数正規	0%
Ti	209 (100%)		183	12%	二重対数正規	0%
V	144 (69%)		144	0%	ワイブル	0%
Cr	203 (97%)		202	0%	平方根正規	0%
Mn	81 (39%)		79	2%	ワイブル	0%
Fe	209 (100%)		198	5%	対数正規	0%
Co	150 (72%)		150	0%	平方根正規	0%
Ni	202 (97%)		199	1%	ワイブル	2%
Cu	209 (100%)		186	11%	二重対数正規	0%
Zn	209 (100%)		203	3%	正規	2%
Ga	185 (89%)		184	1%	ワイブル	0%
As	145 (69%)		143	1%	ワイブル	0%
Se	205 (98%)		205	0%	ワイブル	0%
Br	209 (100%)		197	6%	対数正規	0%
Rb	179 (86%)		170	5%	ワイブル	0%
Sr	208 (100%)		203	2%	平方根ワイブル	0%
Nb	144 (69%)		140	3%	ワイブル	0%
Mo	171 (82%)		168	2%	ワイブル	0%
Ag	0 (0%)		-	-	-	-
Cd	0 (0%)		-	-	-	-
I	0 (0%)		-	-	-	-
Ba	0 (0%)		-	-	-	-
Hg	205 (98%)		205	0%	ワイブル	0%
Pb	209 (100%)		205	2%	ワイブル	1%

③ 個人内分散と個人内分散：

個人内分散は、観察値と真値との差の分散であり、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、極微量元素から 2 つずつ選び、両分散と分散比を求めた (表 3)。

分散比が大きいほど、介入の効果を検出し易く、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 以下と小さい。

(表 3)

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

(2) アトピー発症予測モデルの改良

上述した毛髪ミネラルの統計的性質を、乳幼児のアトピー発症予測モデルに応用する。

① 解析対象症例：

生後 1 か月の乳児の毛髪は、少量で、細く、短いため、測定用の検体作製が困難な症例もあった。試料の目視およびスペクトルとの比較により、PIXE 測定値の信頼性を 4 段階 (信頼性が高・中・低・要注意) に分類したところ、信頼性が低いまたは要注意となった毛髪は、乳児が 39 検体、母親が 5 検体であった。残余毛髪が 0 本のため測定不能であった乳児 5 例と合わせて除外し、162 を本研究の解析対象とした。そのうち、10 か月健診時にアトピーと診断されたのは 10 例 (6.2%) であった。

② ロジスティック回帰モデル：

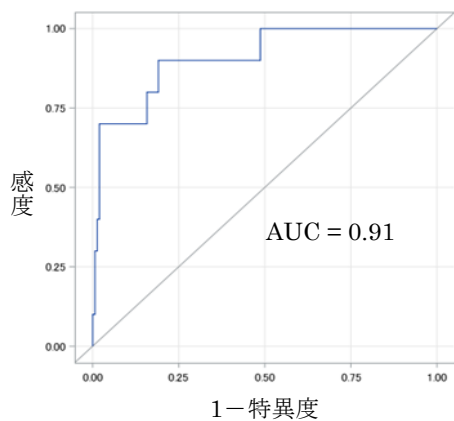
まず、初期調査で有意性が確認された Sr と Se について、2 回の平均値を用いて初期調査と同様の予測モデルを構築した。症例数が少ないので有意差は認められなかったが、ROC 曲線の AUC (Area under the curve) は 0.75 となり、初期調査の 0.71 を上回った。

次に、全ミネラルについて、ステップワイズ法を用いてアトピー発症予測モデルを構築した。説明変数の候補には、各ミネラルの分布特性に基づき、変数変換や母子の合成変数も加えた。

アトピー発症確率を $P(X)$ とすると、

$$\frac{\log(P(X))}{1 - P(X)} = 7.3 + 3.1 \cdot \text{家族病歴} - 5.9 \cdot \log(B.Fe) + 1.4 \cdot \sqrt{B.Sr} - 2.9 \cdot \text{sum}(\sqrt{B.Se} + \sqrt{M.Se}) + 2.0 \cdot \text{sum}(\sqrt{B.Hg} + \sqrt{M.Hg})$$

と表される。ただし家族病歴は、あり=1、なし=0とコード化した。



(図 4)

ROC 曲線は図 4 のようになり、AUC は 0.91 と大幅に向上した。また、感度 70.0%、特異度 91.4%、相対危険度 16.6 と高い値を示し (表 4)、アトピー発症予測確率モデルの改良に成功した。

(表 4)

FH Sr Se	アトピー発症		計			
	Yes	No		PPV	NPV	RR
リスク大	7	13	20	35.0%		
リスク小	3	139	142	97.9%		
計	10	152	162			
	感度	特異度				RR 16.6
	70.0%	91.4%				

(3) 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。その評価法にも問題があり、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。

本研究では、PIXE 測定におけるバラツキは前処理等のシステムチックな原因ではなく、主に測定部位 (採取部位) 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。偶然誤差であれば、個人の検体を増やすことで、精度を高めることが可能となる。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なので、実験計画が立て易い。PIXE による測定誤差は、研究デザイン上は扱い易い。

一貫して実施してきた実証的研究の成果は、アトピーの他にも、幅広い分野で直ちに应用可能であり、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結果であると考え

る。

<引用文献>

- 1) HAIR TISSUE MINERAL ANALYSIS An Emergent Diagnostic Technique. Jeffrey Bland Ph.D. THORSONS PUBLISHERS INC. New York, 1984.
- 2) Yamada T, et al. Cohort Study for Prevention of Atopic Dermatitis using Hair Mineral Contents. J Trace Elem Med Bio 27: 126-131, 2013.
- 3) Yamada T, Sera K, Nakamura T, (+4). Statistical Investigation into Random Variations in PIXE Hair Analysis. International Journal of PIXE 25, 73-84, 2015.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Kataoka K, Yamada T, Sera K, Nakamura T, (+3): Statistical aspects of variations in hair mineral measurements. International Journal of PIXE 26 (3&4), 93-101, 2016.
- ② Yamada T, Sera K, Nakamura T, (+4). Statistical Investigation into Random Variations in PIXE Hair Analysis. International Journal of PIXE 25, 73-84, 2015.

[学会発表] (計 5 件)

- ① Yamada T, Sera K, Nakamura T, et al: Using PIXE method to determine the origin of commercial feathers. 7th International Conference on Risk Analysis. Chicago, IL USA, 2017.5.3~5.
- ② 山田知美, 中村剛 他. 「Using PIXE method to correctly identify down feather production countries」. 第 33 回 PIXE シンポジウム, 京都, 2017.10.19~21.
- ③ 片岡恒史, 山田知美 他. 「PIXE 法による毛髪ミネラル測定値への統計学的アプローチ」. 第 32 回 PIXE シンポジウム, 函館, 2016.11.9~11.
- ④ Yamada T, Sera K, Nakamura T, et al: Decomposition of Hair Mineral Variations into Intra-individual, Inter-individual and Physical Variations. ICRA6 and RISK 2015 Conference. Barcelona, Spain, 2015.5.27~29.
- ⑤ 片岡恒史, 山田知美 他. 「PIXE 法による毛髪ミネラル測定値へのステンレス鋼の影響について」. 第 31 回 PIXE シンポジウム, 高崎, 2015.10.28~30.

[図書] (計 1 件)

- ① Yamada T, Saunders T, Nakamura T, Sera K and Nose Y: 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.

[産業財産権]

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山田 知美 (YAMADA, Tomomi)
大阪大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号：60363371

(2) 研究分担者

中村 剛 (NAKAMURA, Tsuyoshi)
中央大学・理工学部・客員教授
研究者番号：80039586

(3) 研究分担者

世良 耕一郎 (SERA, Koichiro)
岩手医科大学・医学部・教授
研究者番号：00230855

(4) 研究分担者

森 弘行 (MORI, Hiroyuki)
長崎女子短期大学・生活創造学科・教授
研究者番号：30128227

(5) 連携研究者

なし

(6) 研究協力者

なし