

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790615

研究課題名(和文)毛髪ミネラルとアトピー性皮膚炎との関連調査 - 6年後の追跡 -

研究課題名(英文) Cohort study for prevention of atopic dermatitis using hair mineral contents

研究代表者

山田 知美 (Yamada, Tomomi)

大阪大学・医学(系)研究科(研究院)・寄附講座准教授

研究者番号：60363371

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：福岡市で出産した母子834組の毛髪中のミネラル32種類をproton-induced x-ray emission (PIXE)法により測定し、産後および生後1か月の母子の毛髪から、生後10か月時点でのアトピー性皮膚炎発症を予測するモデルを構築した。本研究は6年後の追跡調査であるが、6歳児の毛髪は1人につき2回測定したところ、個人内分散(測定誤差)による推定値の減衰が確認された。本研究の成果は、測定誤差を考慮した毛髪PIXEの統計解析法を提案できたことである。提案法を用いた統計解析を実施するためには、1人につき2回の測定値を得る必要があるため、現在、産後および生後1か月の残余毛髪を測定している。

研究成果の概要(英文)：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 more extensively statistically analyze their hair mineral amounts for intra-individual variations as well as to confirm associations between hair minerals and AD. As a result we succeeded in creating a statistical technique correcting for measurement errors of hair minerals.

研究分野：生物統計学

キーワード：ミネラル アトピー性皮膚炎 PIXE分析 測定誤差 個人内分散 TES法 SIMEX法

1. 研究開始当初の背景

(1) 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。Nurmatovらはメタ分析により、特定のミネラルの過不足とアレルギー疾患との関連を示唆する結果を総括しているが、それらの研究デザインの質は低く疫学的なエビデンスは弱いと述べている¹⁾。また、アトピーの遺伝的・免疫学的メカニズムに関する研究は進められているものの、予防法や治療法の確立には至っていない。

(2) そこで本研究グループは、「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。平成17年11月～平成18年11月に福岡市で出産した母子を対象に、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(以下、初期調査と呼ぶ)。

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。毛髪の測定はPIXE (proton-induced x-ray emission : X線発光分光)法²⁾を用いて実施し、32種類のミネラル測定値を得た。PIXE法は0.5cm以上の毛髪が最低1本あれば測定できるので、毛髪の少ない乳幼児も対象とすることが可能となる。

初期調査のデータを統計解析した結果、生後10か月時の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(Sr)とセレン(Se))の有意性が認められ、Journal of Trace Elementに掲載された³⁾。

(3) 一方、ミネラル量の測定にはかなりの誤差が含まれるとの報告もある。BIO-PIXE Conference(仙台、2012)においても、毛髪ミネラル量のバラツキは大きく、科学的利用を可能にする有効な対策の必要性が議論された。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. 研究の目的

初期調査の参加者をコホート集団として6年後の追跡調査を行うことにより、毛髪ミネラルとアトピー発症の因果関係について、よ

り正確な推定を行うことが本研究の目的である。

ミネラル量の測定やアトピー診断の判定にはかなりの誤差が含まれることが予想される。追跡できた症例と出来なかった症例の選択バイアスも無視できない。これらの誤差やバイアスを考慮したうえで、初期調査で作成した予測モデルの精度を確認すると共に、より精度の良い数理モデルの構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) データの収集:

『初期調査の解析結果報告』のパンフレットを初期調査に協力してくださった1036組の母子のご自宅に郵送する。1か月健診と10か月健診の双方を受診した834組には『追加調査の依頼文書』を同封し、追加調査への協力を依頼する。追加調査の内容は、生後6年間のアトピーの罹患歴に関するアンケートと、6本程度の毛髪採取である。資料は、初期調査の際に付与した匿名化番号のみで管理する。

(2) 毛髪ミネラル量の計測:

毛髪ミネラルの計測にはPIXE法を用いる。PIXE測定用標本は、毛髪をアルコール消毒し、約2cm長にカットした後、プレートに貼り付けて作製する。作製した標本は岩手医科大学サイクロトロンセンターに送付し、毛髪中の32種類のミネラル量を計測する。PIXE分析結果は、世良氏により開発されたソフトウェア⁴⁾を用いて解析する。

(3) データベースの構築:

PIXE分析結果とアンケート情報を連結し、初期調査のデータベースに組み込む。

(4) 統計解析:

幼児の毛髪中のミネラル分布と、生後1か月～10か月～6年の経時的なミネラル量の変化を要約する。また、測定誤差や選択バイアスを考慮したうえで、アトピーの発症や治療と毛髪ミネラル量との関係を表す統計モデルを構築する。

(5) 測定誤差の検討:

測定値の信頼性を検討する際には、“信頼係数 λ = 真値の個人間分散 / 観測値の個人間分散 = 個人間分散 / (個人内分散 + 個人間分散)”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。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。そこで、測定誤差により減衰したリスク推定値を補正するための新たな統計手法を開発する。

また、測定誤差の原因と量を明確にするため、誤差の分解を行う。まず、(i) 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し、もし正規分布に従えばランダム誤差と看做することができ、測定値の分布

も特定できるので、測定誤差（個人内分散）を“物理的誤差分散”と“純粋な個人内分散（頭髮の位置による分散）”に分解する。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検討する。

誤差の検討は 32 種類ミネラルそれぞれについて行う。各ミネラルの特性を纏め、毛髪 PIXE の統計解析における取扱いを提案する。

(6) 調査協力母子への結果報告：解析結果をお知らせするためのパンフレットを作成し、協力者の自宅に郵送する。

4. 研究成果

(1) 追跡症例のアトピー発症状況：

834 組中、協力が得られたのは 209 組（追跡率 25%）で、10 か月時点でアトピーと診断された子供の追跡率は 30% (12/41)、非アトピーの子供の追跡率は 25% (197/793) であった。6 歳までにアトピーを発症したことがあると回答したのは 16%で、日本の 6 歳児について報告されている値と大きくは異ならなかった。アトピーの発症状況を表 1 に示す。

(表 1)

生後10か月	6歳時まで	N
アトピー	アトピー	10
アトピー	治癒	2
非アトピー	アトピー	22
非アトピー	非アトピー	175
計		209

(2) 測定誤差の検討：

追跡率が25%と低かったので、209人全員について、2つのPIXE測定用標本を作製し、1人につき2つの測定値を得た。症例数不足に伴う検出力の低下を補うためにも、アトピー発症モデルを検討する前に、まずは測定誤差の検討を優先して行うこととした。

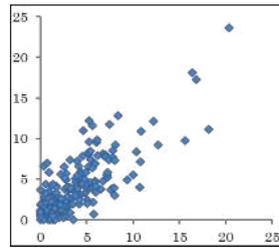
Simulation and Extrapolation method (SIME X法)⁵⁾と、今回独自に考案したTrue Equivalent Method (TES法)⁶⁾を、初期調査でアトピー発症との有意な関連がみられたSrに適用したので、その結果を報告する。

① Sr の観測分布（6 歳児 209 例）：

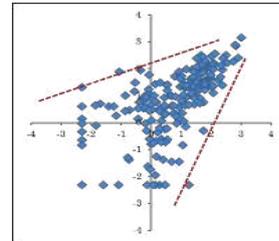
図 1 (a)は、追加調査の 209 例における 1 回目と 2 回目の Sr 観測値の散布図である。右に裾を引く分布をしているので対数変換を施し、その分布を図 1 (b)に示した。バラツキが値に依存し、正の値($1 < Sr$)でのバラツキに比べて負の値 ($0 < Sr < 1$) のバラツキが強調されている。従って、回帰モデルの適用は困難である。一方、図 1 (c)は平方根変換を施した場合の散布図であるが、バラツキが値に依存していない。対数変換での問題点が改善された。

(図 1) Sr の散布図

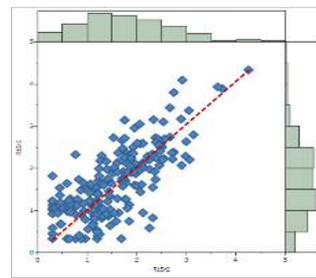
(a) 観測値



(b) 対数変換

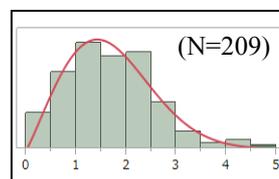


(c) 平方根変換



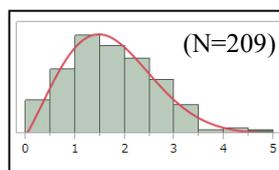
(図 2) \sqrt{Sr} の観測値の分布

追跡調査 1 回目



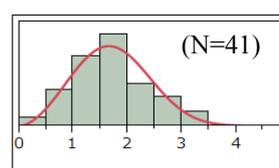
観測値の平均: 1.698
観測値の分散: 0.730
尺度 α : 1.92
形状 β : 2.10
ワイブル平均: 1.699
ワイブル分散: 0.722

追跡調査 2 回目



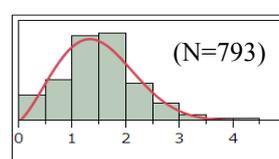
観測値の平均: 1.747
観測値の分散: 0.755
尺度 α : 1.97
形状 β : 2.12
ワイブル平均: 1.747
ワイブル分散: 0.750

初期調査アトピー群



観測値の平均: 1.734
観測値の分散: 0.461
尺度 α : 1.95
形状 β : 2.77
ワイブル平均: 1.733
ワイブル分散: 0.457

初期調査非アトピー群



観測値の平均: 1.497
観測値の分散: 0.466
尺度 α : 1.69
形状 β : 2.31
ワイブル平均: 1.495
ワイブル分散: 0.472

図2に \sqrt{Sr} のヒストグラムを示す。上から順に、追跡調査の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。

② \sqrt{Sr} の誤差分散の推定：

子供の人数を m とし、 i 番目の子供から得られた \sqrt{Sr} の 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、

$X_{1i} = Z_1 + \varepsilon_{1i}, X_{2i} = Z_2 + \varepsilon_{2i}, \varepsilon_{1i}, \varepsilon_{2i} \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$ 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、頭髮全体の毛髪ミネラル量の平均値と定義する。また、 σ_ε^2 は個人内分散を表し $\sigma_\varepsilon^2 = \sum_{i=1}^m (X_{1i} - X_{2i})^2 / 2 \cdot m$ で推定される。

一方、信頼係数 λ は、 $V(Z)/V(X) = V(Z)/(V(Z) + \sigma_\varepsilon^2)$ と定義される。ただし、 $V(Z)$ は個人間分散、 $V(X)$ は X_1 と X_2 の込みにした分散を表す。

追加調査の 209 例での個人内分散 σ_ε^2 は 0.19、込みの分散は 0.75 と算出され、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く、初期調査 834 例の個人内分散 σ_ε^2 は 0.12 となる。

③ \sqrt{Sr} の測定誤差の補正：

初期調査の 834 例において、アトピー発症予測モデル $\text{logit}(\sqrt{Sr}) = \alpha + \beta\sqrt{Sr}$ の回帰係数 β_X は、0.47 (相対危険度 1.6) と推定された。測定誤差がリスク推定に与える影響力と、その影響の補正について、2通りのアプローチで検討したので、それらの方法と結果を紹介する。

(A) SIMEX法：

(i) Simulation step:

$\theta = 0, 0.5, 1, 1.5, 2$ について、834 個の $X(\theta) = X + \theta\varepsilon, \varepsilon \sim N(0, 0.12)$ を発生させると、 $\text{logit}(X(\theta)) = \alpha + \beta X(\theta)$ の最尤推定値 $\hat{\beta}$ は以下ようになった。

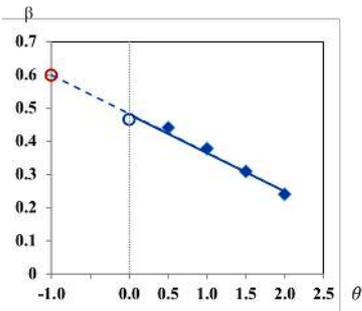
θ	0	0.5	1	1.5	2
$\hat{\beta}$	0.47	0.44	0.38	0.31	0.24

$X(0)$ は観測データ、 $X(-1)$ は真値を表す。

(ii) Extrapolation Step:

線形外挿すると、誤差を取り除いた回帰係数の推定値 (SIMEX 推定値) は 0.60 となった (図 3)。 $\theta=0$ のときは $\beta_X = 0.47$ であるので、リスク推定値の減衰が認められる。

(図 3)



(B) TES法：

TES 法とは、観測値から個人内分散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。

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 (込みの分散) は等しいと仮定すると、

$E(Z)=E(X), V(X)=V(Z)+\sigma_\varepsilon^2$ が成り立つ。

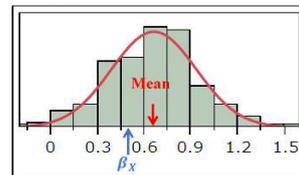
今、 $\sigma_\varepsilon^2=0.12, V(X)=0.47$ より、 $V(Z)=0.35$ となり、これらの平均と分散を持つワイブル分布のパラメータは、アトピー群では尺度パラメータ $\alpha=1.93$ 、形状パラメータ $\beta=3.24$ 、非アトピー群では尺度パラメータ $\alpha=1.68$ 、形状パラメータ $\beta=2.75$ と算出される。

この真値相当分布 (True Equivalent Sample) から乱数を発生させて、 $\text{logit}(Z^*) = \alpha + \beta Z^*$ の最尤推定量 $\hat{\beta}_{Z^*}$ を求める。

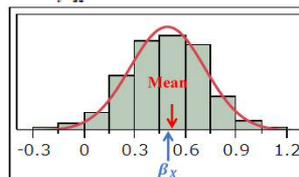
また、真値にランダム誤差を付加した観測値相当分布 (Observed Equivalent Sample) $X^* = Z^* + \varepsilon, \varepsilon \sim N(0, \sigma_\varepsilon^2)$ から乱数を発生させて $\text{logit}(X^*) = \alpha + \beta X^*$ の最尤推定量 $\hat{\beta}_{X^*}$ を求め、観測データから得られた推定値と比較する。

それぞれを 500 回繰り返したとき、 $\hat{\beta}_{Z^*}$ の 500 個の平均値は 0.66 と推定され、 $\hat{\beta}_{X^*} = 0.47$ であったので、推定値の減衰が認められる (図 4 (a))。 $\hat{\beta}_{X^*}$ の 500 個の平均値は 0.49 と算出され、 $\hat{\beta}_X = 0.47$ に近い値となった (図 4 (b))。

(図4) (a) $\hat{\beta}_{Z^*}$ のヒストグラム



(b) $\hat{\beta}_{X^*}$ のヒストグラム

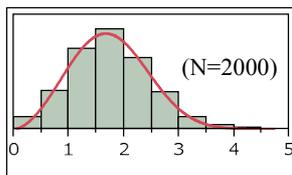


また、Observed Equivalent Sample X^* のヒストグラム (図5) は、図2に示した観測データに近い分布をしている。このことは、TES法

の妥当性を示している。

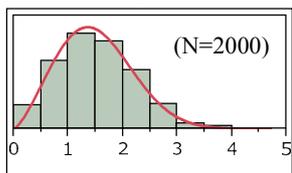
(図 5)

アトピー群



観測値の平均: 1.75
観測値の分散: 0.467
尺度 α : 1.96
形状 β : 2.77
ワイブル平均: 1.75
ワイブル分散: 0.468

非アトピー群



観測値の平均: 1.51
観測値の分散: 0.466
尺度 α : 1.70
形状 β : 2.39
ワイブル平均: 1.50
ワイブル分散: 0.472

分布を仮定せずに適用できる SIMEX 法に対して、TES 法は分布を仮定する必要があるが、観測値と観測値相当分布の類似性を確認することにより妥当性が検証できるという点で優れている。

TES 法では、観測値の分布の特定とランダム誤差の仮定がポイントとなる。

(3) 32 種類のミネラルの分類と取扱い:

32 種類のミネラルについて、観測値の分布、および誤差の分布と大きさを検討し、さらに、測定誤差の原因を探るため、誤差の分解を試みた。ミネラルはそれぞれに独自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判明した。

(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

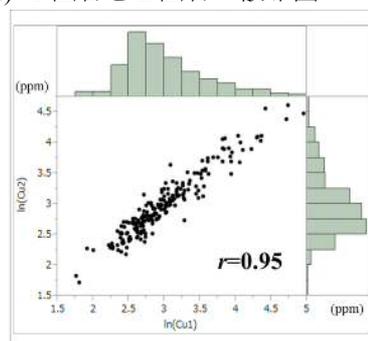
A 群は、測定値が 0 (検出限界未満) になることは稀で、個人の独立な 2 回の測定値の散布図がラッパ型になるので、対数変換または平方根変換 (ただし、検出限界値 0.1 未満は 0.1 とする) を施すことにより、近似的に線形回帰モデルに従う。また測定値とともに得られる物理誤差推定値は、測定値に比して小さく、個人内分散を物理誤差分散と頭髮の位置による分散に分解できる。さらに個人間分布の特定もでき、TES 法の適用が可能である。B 群は、方法 (5) に記載した (i) (ii) は満たすものの、測定値が小さく、物理誤差推定値が測定値に比して大きいので、誤差の分解は困難なミネラルとして A 群と区別した。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した。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。

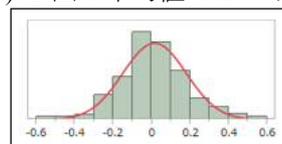
A 群、C 群の代表として、それぞれ Cu と Se の結果を図 6 および図 7 に示す。

(図 6) $\ln(\text{Cu})$:

(a) 1 回目と 2 回目の散布図

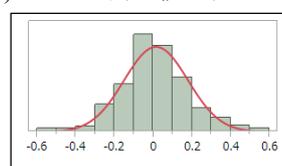


(b) 2 回の平均値のヒストグラム



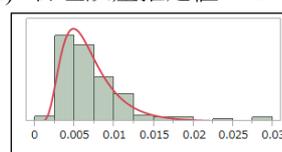
対数正規分布
Kolmogorov test:
P=0.08 (N=203)

(c) 2 回の測定値の差のヒストグラム



正規分布
Shapiro-Wilk test:
P=0.09 (N=203)

(d) 物理誤差推定値のヒストグラム



対数正規分布
Kolmogorov test:
P=0.15 (N=203)

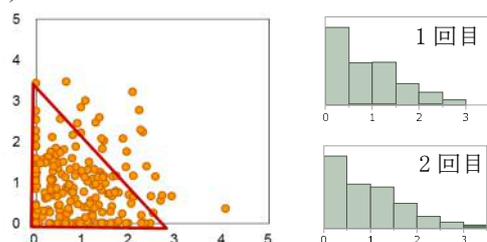
$\ln(\text{Cu})$ について、2 回の平均値における個人間分散= 0.2751、個人内分散= 0.0137 となった。さらに個人内分散を分解すると、物理誤差分散= 0.0034、頭髮の位置による分散= 0.0103 と算出された。個人内分散に対して個人間分散が約 20 倍と大きく、物理誤差推定値は測定値に比して約 1/10 と小さい。

Se について、図 7 の散布図に見られる三角形は、平均回帰現象を示している。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った。

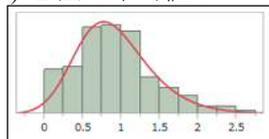
以上のことから、毛髪は常に 2 回測定し、線形モデルへの適合と差の正規性を確認後、統計解析には 2 回の平均値を用いるのが良いと結論付けた。

(図7) Se :

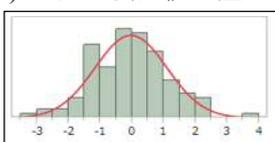
(a) 1回目と2回目の散布図



(b) 2回の平均値のヒストグラム



(c) 2回の測定値の差のヒストグラム



(4) 今後の展望 :

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考える。

本研究成果を受けて、現在、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か月時の残余毛髪を使ってPIXE分析を行っている。「毛髪ミネラルとアトピー発症との関連調査」の結論は先送りとなったが、現在計測中のデータが揃えば、2回の測定値を用いて、乳幼児のアトピー発症予測モデルの改良を行い、その結果は調査協力母子へのパンフレットおよび学術誌等にて報告する。

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期待している研究者との交流を深めることで、一層の研究推進に繋げたい。

<引用文献>

- 1) Nurmatov U, et al. Nutrients and foods for the primary prevention of asthma and allergy: Systematic review and meta-analysis. *J Allergy Clin Immunol*, 2010.
- 2) HAIR TISSUE MINERAL ANALYSIS An Emergent Diagnostic Technique. Jeffrey Bland Ph.D. THORNSONS PUBLISHERS INC. New York, 1984.
- 3) 5. [雑誌論文] ②
- 4) Sera K, et al. Quantitative Analysis of Untreated Bio-samples. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B150, 226-233, 1999.
- 5) Cook JR, Stefanski LA: Simulation-Extrapolation Estimation in Parametric Measurement Error Models. *J. Am.*

Statist. Assoc 89 (428), 1314-1328, 1994

6) 5. [図書] ①

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Yamada T, Kataoka K, Saunders T, Nakamura T, (+3). Statistical Investigation of the Random Variations in PIXE Hair Analysis. *IJPIXE*, in press. 査読有.
- ② Yamada T, Saunders T, Kuroda S, Sera K, Nakamura T, Takatsuji T, Hara T, Nose Y, (+ 2 groups). *J Trace Elem Med Biol*. 27: 126-131, 2013. 査読有.
DOI: 10.1016/j.jtemb.2012.08.003.

[学会発表等] (計 8 件)

- ① T. Yamada, T Nakamura, et al. Decomposition of Hair Mineral Variations into Intra-individual, Inter-individual and Physical Variations. 6th *International Conference on Risk Analysis*, Barcelona, Spain. May 27-29, 2015.
- ② 山田知美, 片岡恒史, 中村剛 他. 「PIXE法による毛髪ミネラル測定値の個人内変動と測定誤差に関する統計学的対策」. 第30回PIXEシンポジウム, 岩手医科大学(岩手), 2014.10.22-24.
- ③ T. Yamada, T. Nakamura, et al. Modelling Intra-Individual Variations in Hair Minerals Measured by PIXE for Relative Risk Analysis. *ISBIS/ISI Committee on Risk Analysis Satellite Meeting*. Hong Kong, China. August 23-24, 2013.
- ④ Yamada T, Saunders T, Nakamura T, et al. On Intra-Individual Variations in Hair Minerals Measured by PIXE in relation to Epidemiological Risk Assessment of Atopic Dermatitis. 5th *International Conference on Risk Analysis*. Tomar, Portugal. May.30-Jun 1, 2013.

[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)

6. 研究組織

研究代表者

山田 知美 (YAMADA, Tomomi)

大阪大学・医学系研究科・寄附講座准教授

研究者番号 : 60363371