

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：32641

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25540014

研究課題名(和文)毛髪中微量元素の医学利用を可能にするための統計学的対策

研究課題名(英文)Statistical measure to enhance medical applications of hair minerals

研究代表者

中村 剛 (NAKAMURA, Tsuyoshi)

中央大学・理工学部・その他

研究者番号：80039586

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：毛髪ミネラル量測定値の医学・疫学への応用に必要な統計学的諸問題の解決を目的とする。具体的には、PIXE法により測定された毛髪中の32種類の元素量の統計学的特性を調査する。206名の毛髪サンプルから、1人につき2検体作成し、元素ごとに2回の差の分布を調査したところ、3種類の元素を除いて、近似的に正規分布に従うことを発見した。この事実は測定誤差が偶然誤差であること、従って測定値自体は妥当性(validity)を有することが検証された。次に2回の平均値の分布は既存のパラメトリック分布で近似可能なことを確認した。以上の結果は毛髪ミネラル量の疫学医学での利用を推進することが期待される

研究成果の概要(英文)：The object of the study is to develop a method to solve the statistical difficulties associated with the mineral amounts in hairs measured by PIXE method. We collected two samples from each of 206 6-years old children from which we obtained two independent measurements for each child. For 29 out of 32 minerals, it was confirmed that the differences between the two measurements for the subjects approximately follow a normal distribution, indicating that the errors in hair mineral measurements are random, and therefore the mean of the two measurements are valid. Further, the mean of the two measurements approximately follows a known parametric distribution. The results will enhance the use of hair minerals in medicine and epidemiology.

研究分野：生物統計学

キーワード：毛髪ミネラル 微量元素 個人内分散

1. 研究開始当初の背景

毛髪は、米国環境保護庁(EPA)が生体の有害ミネラル汚染度測定に有効な組織細胞として利用している (Jenkins, D.W., “ Biological Monitoring of Toxic Trace Metals ” EPA-600/3-80-089,1980)。尿は、排出物の測定であり、血液は、排出されるか貯蔵器官に送られる前の一時的に体内循環中の成分を測ることになる。毛髪は次の様な点において理想的な検体と考えられている。

1. 毛髪はすべての生体内の重要なミネラル成分の蓄積を示す。
  2. 毛髪内のミネラルは、生活環境に存在する元素含有量に比例する傾向がある。
  3. 採集・保存・運搬が容易である。
  4. 繰り返し採集することも可能である。
- さらに、毛髪は血液からの排泄物を日々記憶させた磁気テープで約 0.4mm/day で伸びる (PIXE の医学・生物学・環境科学への応用: <http://pixe.qse.tohoku.ac.jp/bio.html>) ので、過去の体内ミネラル量を遡って推定することも可能にする。

現在、微量元素を測る標準検査法は ICP-MS( Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry ) とされている。しかし、1 回の分析に 150 本程度の毛髪が必要で、大人でも肉体的、精神的負担が大きいとされ、産後 1 か月の乳児では毛髪が極端に少ないこともあるので困難でもある。米国医学会による最近の調査では、商業ベースで行われている毛髪ミネラル測定法の精度は低く再現性は乏しいと結論されている ( Seidel et al. “ Assessment of commercial laboratories performing hair mineral analysis ”, JAMA. Jan 3;285(1):67-72 ,2001)。また、一人の毛髪ミネラル量 (銅、セレン、亜鉛、アルミニウム、カドニウム、鉛) を 20 年以上に亘って測定した結果、バラツキが大きいので、医学的利用は困難と結論された (Klevay et al. European Journal of Clinical Nutrition , 2004)。実際、ヒ素中毒、人工透析、特殊なガンなどの特別な健康状態では毛髪中の特定のミネラルを測定することがなされているが、健康人集団の毛髪ミネラル測定が実施されることは稀である。BIO-PIXE Conference (仙台、2012)でも毛髪ミネラル量のバラツキは 1 本の毛髪内でも大きいので、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。微量元素 (trace elements またはミネラル) はビタミンやホルモンのように生体制御に不可欠な物質として機能しており、全ての病気や生体現象と何らかの因果関係があり、体内の微量元素の測定で物質代謝異常を察知し病気を予見することができるはずである (日本微量元素学会)。しかしながら、微量元素と生体現象の関連は生命科学の未踏査領域であり、治療・予防に応用されるまでには幾つもの解決すべき問題がある。

毛髪ミネラルの医学利用を妨げている最

大の要因はミネラル量測定値の再現性の悪さである。Seidel et al. (JAMA. 2001 67-72)、Kempson et al. (Chemical Society Reviews 2011 3915-3940)、Namkoong et al. (Ann Dermatol. 2013 67-72)、Mikulewicz et al. (Environmental Toxicology and Pharmacology 2013 1077-1086)、Dulgaszek et al. ([Trace Elements and Electrolytes](#) 2014 131-140)は一貫して再現性が低いので医学利用には慎重であらねばならないと述べていることから、過去 15 年にわたり測定精度の向上が不十分であったことを示している。

2. 研究の目的

本申請は毛髪ミネラル量測定値の医学・疫学への応用に必要な統計学的諸問題の解決を目的とする。具体的には、PIXE (particle induced X-ray emission)法により測定された毛髪中の 32 種類の元素 (下図)

記号	名	記号	名
Al	アルミニウム	As	ヒ素
Si	ケイ素	Se	セレン
S	硫黄	Br	臭素
K	カリウム	Sr	ストロンチウム
Ca	カルシウム	Y	イットリウム
Ti	チタン	Zr	ジルコニウム
V	バナジウム	Ag	銀
Cr	クロム	Cd	カドミウム
Mg	マグネシウム	Sn	スズ
Mn	マンガン	I	ヨウ素
Fe	鉄	Ba	バリウム
Co	コバルト	Eu	ユウロピウム
Ni	ニッケル	Hg	水銀
Cu	銅	Tl	タリウム
Zn	亜鉛	Pb	鉛

の個人内及び個人間バラツキなどの統計学的基礎情報を得るための実験計画を立て、実際にデータ収集と統計分析を行うことで、微量元素量測定値の信頼度を研究に必要な水準にまで高めるための汎用的対策を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

平成 17 年にアトピー性皮膚炎 (アトピー) 発症と毛髪ミネラル量との関連解析を目的として、ポランティア研究グループ (九州大学・長崎大学・岩手医科大学・福岡市産婦人科医会および小児科医会) を立ち上げ、福岡市に居住し、1 ヶ月乳幼児検診を受診し、産婦人科開業医の呼びかけに応じた 1036 対の母子から毛髪数本をハサミで採取した。さらに小児科医による 10 か月検診時にも毛髪を採取できかつアトピーか否かの診断の確定した 834 対を対象として、アトピーとミネラルの関連を解析した。毛髪検体は全て岩手医科大学サイクロトロンセンターにて PIXE 法によりミネラル量を測定された。統計解析の結果、10 か月児のアトピー発症に最も強く影響するのは家族歴 (遺伝的要因) であるが、家族歴とは独立に 1 か月検診時に採取された

母子毛髪中の Se と Sr が有意なアトピー発症予測因子として検出された。これらの因子を用いて、世界で初めてアトピー発症確率の予測式を Journal of Trace Elements in Medicine and Biology に投稿した。Refereeからは、

“ the choice of a large number of elements is excellent, since this is the only way to really find out what minerals are really important for the onset of AD. This has rarely been done ” .

“ There is so much to learn about minerals and diseases from HNA (Hair Nutrient Analysis). This article is a good example of what can be done in the future in this topic, HNA. A large number of diseases could be diagnosed at an early stage from HNA ” .

“ The article is very important, since diagnostics on 1 month old children for Ad can be made ” .

と高い評価を受けて Accept された。

先行研究成功の主な理由として、全医師が統一的診断基準に基づき診断したこと、834 名という大勢の母子の毛髪ミネラル量を測定できたことにある。毛髪採取と診断は九大医学部と福岡医師会の、検体作成とデータ管理は長崎大学の、そして毛髪ミネラル量測定は岩手医科大学のボランティアによった。用いたミネラルの一覧を表に示す。

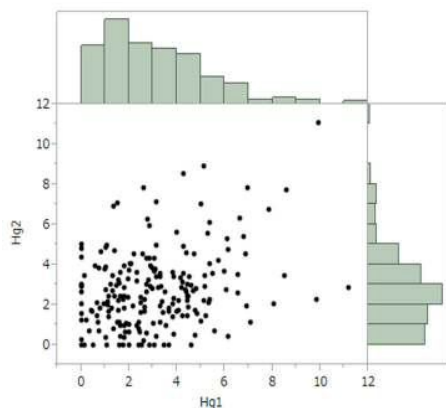
以上の先行研究の成果は、毛髪ミネラル量測定値は単に誤差が大きいだけであることを示唆する。そこで、精度と再現性を確認するために、コホート集団追跡開始 6 年後に 6 歳になったコホート研究参加者の内再度毛髪サンプルを提供してくれた 206 名の児童から、一人につき 2 検体作成し、PIXE にて測定した結果を用いて、32 種類のミネラル全てについての精度の確認と、再現性確保のための方法を開発することが本研究の目的である。

#### 4 . 研究成果

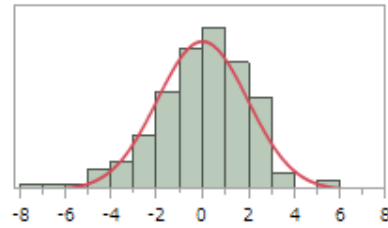
206 名の毛髪サンプルから、一人につき 2 検体作成し、PIXE にて 32 種類のミネラル量を測定した。結果

##### 4.1 測定誤差が偶然誤差であるかの検証

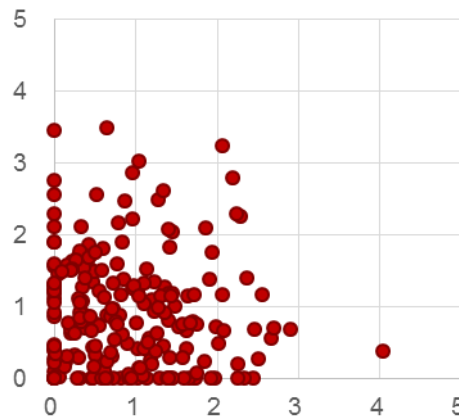
2 つの測定値の差が正規分布に従うならば、測定誤差は偶然誤差と考えられる。例えば、水銀 (Hg) の 2 回の散佈図を以下に示す。



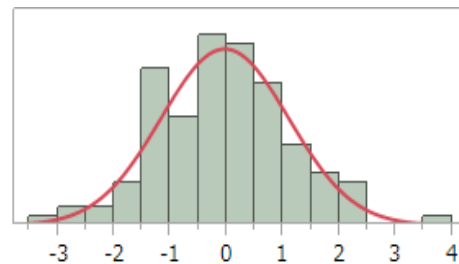
かなり再現性の低いことがみてとれる。実際 1 回目に 5 以下の値については 2 回目に 0 になることもあるし、その逆も起きている。しかしながら、2 回の差のヒストグラム (下図)



をみると、近似的に正規分布に従っている。同様の解析をさらに微量の Se について実施した結果を次図に示す

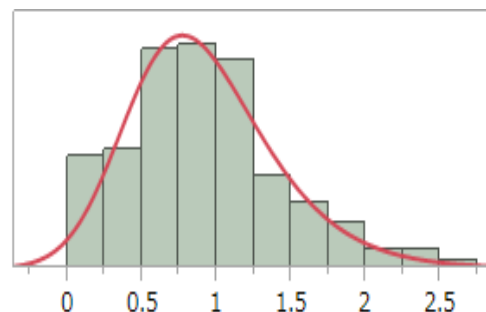


水銀以上に再現性が乏しく見える。実際大部分は 3 以下であり、1 回目が 2 でも、2 回目は 0 近いし、その逆も同様である。しかしながら、差のヒストグラムは以下の図で示される。これは近似的に正規分布である。

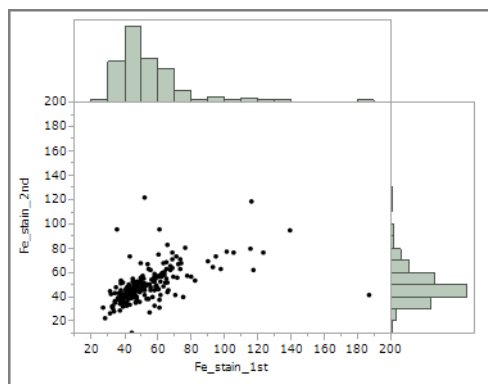


さらに 2 回の平均値の分布を求めると (下図) となる。

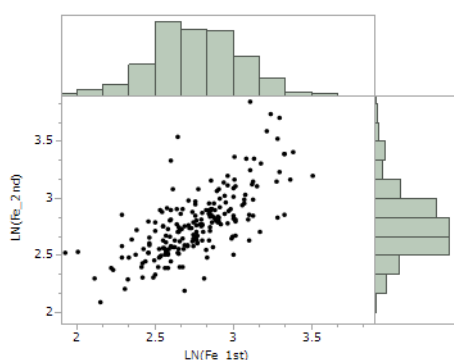
これは近似的にワイブル分布に従う。



ミネラルによっては変数変換が必要である。



はFe(鉄)の散布図であるが、値が大きい程バラツキが大きくなる傾向がみられる。対数変換すると



と近似的に線形回帰モデル(誤差分散一定)に従う。

以上のことから、上記文献において再現性が低いので医学利用は困難とされたHGは、単に測定誤差が、測定値に比して大きいだけであり、独立に測定した複数の測定値の平均値を用いるならば、医学でも十分な精度を確保し、利用可能なことを示唆している。同様の結果は約70%のミネラルについて成立することを確認した。残りのミネラルは、極めて微量につき、半分近くが検出限界以下のため2回とも0とされているので、差も70となるため、差の分布の尖り度が大きすぎて正規分布とならない。

その対策として、2回とも0(検出限界以下)の測定値は誤差の評価解析から除外することにした。検出限界以下の測定値の測定誤差を評価することは無意味と考えた。

その結果、全てのミネラルについて差の分布は近似的に正規分布を成すことを確認した。

そこで、2回の平均値の分布を既存のパラメトリック分布で近似することを試みた結果、数個の例外を除いて、正規分布、対数正規分布、ワイブル分布のいずれかで近似出来ることを確認した。これらのミネラルをTractableと名付けた。一方、Tractableでない数種類のミネラルについては、自然界には存在しない有害ミネラルであるか、またはX線スペクトル分析で上位にある大量ミネラルの影響を受けて不安定になった可能性のあることが考えられる。

以上の結果をまとめると、毛髪ミネラル量を疫学医学で利用するときには、対象集団全員から必ず2つ(またはそれ以上)の独立な検体を用意し、それらの差が正規分布に従うかどうかを確認する。差が正規分に従う時は、それら2回の平均値を利用する。そうで無い時は、それらのミネラル量は信用できないので、集団全体の検査を再度実施する。

また、Tractableなミネラルについては正常値の設定や研究上必要な標本サイズの計算も可能となるので、疫学医学での応用を推進することが期待される。

## 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 4 件)

- 1) Sera, K., Goto, S., Takahashi, C., Saitoh, Y., Kinoshita, K., and Matsumasa, M.: Quantitative analysis of small bio-samples of nearly 1  $\mu\text{g.}$ , Vol.24, No. 3&4, 161-176, 2014
- 2) Yamada T., Kataoka K, Saunders T, Sera K., Takatsuji T, Nakamura T., Nose Y: Statistical Investigation into Random Variations in PIXE Hair Analysis., Intl. Journal of PIXE 25 (1&2), 73-84, 2015.
- 3) Yamada T., Saunders T, Sera K., Nakamura T., Nose Y: On Intra-Individual Variations in Hair Minerals Measured by PIXE in relation to Epidemiological Risk Assessment of Atopic Dermatitis. Biometrie und Medizinische Informatik Greifswalder Seminarberichte, 2015
- 4) 山田知美, 片岡恒史, 高辻俊宏, 世良耕一郎, 中村 剛, 野瀬善明: 「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」NMCC共同利用研究成果報文集 21, 107-116, 2016.

〔学会発表〕(計 3 件)

- 1) Yamada T., Kataoka K, Saunders T, Sera K., Takatsuji T, Nakamura T. and Nose Y: Decomposition of Hair Mineral Variations into Intra-individual, Inter-individual and Physical Variations. ICRA6 and RISK 2015 Conference. 2015.5.27~29.

- 2) 片岡恒史、山田知美、世良耕一郎、高辻俊宏、中村剛、野瀬善明、「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、高崎原子力機構、2015.10.28-30.
- 3) 世良耕一郎、「過去 20 年にわたる一般健康者毛髪分析結果」第 31 回 PIXE シンポジウム、高崎原子力機構、2015.10.28-30.

〔図書〕(計 1 件)

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

### (1) 研究代表者

中村 剛 (NAKAMURA, Tsuyoshi)

中央大学・理工学部・教授

研究者番号：80039586

### (2) 研究分担者

世良耕一郎 (SERA, kouichirou)

岩手医科大学・医学部・教授

研究者番号：00230855

山田知美 (YAMADA, Tomomi)

大阪大学・医学部付属病院・准教授

研究者番号：60363371

牧江俊雄 (MAKIE, Toshio)

国立循環器病研究センター・その他部局

当・研究員

研究者番号：80435891

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：