

唾液成分の個体内/個体間変動による濃度分布

高橋征三¹、荻野孝史²、山口行治³

1 日本女子大学理学部物質生物科学科 2 国立精神・神経センター 神経研究所
3 実行データサイエンス(株)

Distribution of concentrations in salivary metabolites caused by intra-/inter-subject variations.

Seizo Takahashi¹, Takashi Ogino² and Yukiharu Yamaguchi³

1. Dept. Chem.& Biol. Sci., Japan Women's Univ. 2 Inst. Neuroscience, NCNP
3 Jikko Data Science. Inc.

Morning saliva before rising was collected from healthy young adult females to investigate the variation of metabolite concentrations by ¹H-NMR. The concentrations of most metabolites obeyed neither normal nor lognormal distributions. Fitting to inverse-Gaussian distribution was also unsuccessful. Thus the Box-Cox transformation was performed to make the data normal. It gave the average Box-Cox coefficient as 0.17±0.02. The value of 0.2 was adequate enough to an approximate coefficient for the analyses of metabolites in question of unknown distribution. The transformation reduces the apparent intra/inter subject variations.

我々は唾液の代謝物成分のなかから月経周期に応じた周期的変動を探索する目的で、¹H-NMRにより代謝物濃度の同時定量を試みてきた。唾液はその大部分が体内に再吸収される外分泌液で、血液と尿の中間的性格をもつにもかかわらず、臨床診断にはほとんど使われていない。その理由は、唾液成分が種々の外的、内的要因で大きく変動し、有意な生理的变化を抽出することが極めて難しいからである。

一般に薬物応答には個体間/個体内変動があり、そのメカニズムは分っていない。唾液は、神経支配を受けて血中から選択的に唾液腺を通して口腔に放出されるので、投与薬物が血液から組織に輸送されるメカニズムに酷似していると考えられる。ヒトへの臨床開発において、標的組織中の薬物濃度を適切に評価する手段がない現在、唾液代謝物濃度の研究は、薬物の血中濃度と組織内濃度の関係、ならびに薬物応答の個体間/個体内変動について、なんらかの洞察を与えるものと期待される。

「実験」2名の健康な若年女性を選び、起床直後の唾液を毎日30日間採取したもの、および基礎体温の高温期と低温期に1日4回採取したのものを使った。起床直後の唾液は-40℃で長期保存し、使用前に室温で解凍して、サリベット™から遠心抽出した。測定には水信号を抑制する複合パルス列を考案して、Bruker AMX-400WBを用い、295Kで測定した。データ解析には統計解析ソフトJMP、STATAおよびPLS_ToolboxとMATLABプログラムMATNMRおよび自作プログラムを使用した。

キーワード 濃度分布、代謝物質、唾液、正規分布、個体変動

たかはし せいぞう、おぎの たかし、やまぐち ゆきはる

「結果と考察」

信号強度は吸収スペクトルを Voigt 曲線でフィットして求めた。分裂ピークは他と重なる成分を極力除外するために任意の狭い領域を選択し、ベースラインは直線で評価した。スペクトルの位相補正はマニュアルで行った。位相補正の誤差による強度評価の揺らぎはせいぜい数%以内であり、今回の解析結果には直接影響しない。

得られた代謝成分の強度データをヒストグラムにして描くと、最大値やピークの広がり物質ごとに違ったが、大多数が次式に示す正規分布と対数正規分布の中間の分布パターンを示した。正規分布は確率変数 x の確率分布から平均 μ 、分散 σ^2 が定まる。

$$N(x; \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma} \exp\left\{-\frac{(x-\mu)^2}{2\sigma^2}\right\} \quad -\infty < x < \infty$$

一方、対数正規分布は次式で定義され、同様に μ 、 σ が得られる。ここで得られる μ は相乗平均値であり、正規分布から得られる相加平均値 μ より小さい値として評価される。

$$LgN(x; \mu, \sigma) = \frac{1}{\sqrt{2\pi} \sigma x} \exp\left\{-\frac{(\ln x - \mu)^2}{2\sigma^2}\right\} \quad x > 0$$

唾液成分の代謝物濃度の中央値は常に相加平均値と相乗平均値の中間に位置した。しかもヒストグラムを対数正規分布と正規分布を混合してフィッティングすることは難しいことが分った。

1915年に Schrödinger と Smoluchowski は独立に、正にドリフトするブラウン運動の最初の通過時間が逆正規分布することを発見した。唾液の場合、ランダムな時間にパルス的に分泌した代謝物質が、一定速度で一定長の唾液腺をブラウン運動で拡散しながら通過し、最初に口腔に到達した濃度分布と考えれば、逆正規分布の可能性は十分にあると考えた。次式に示す逆正規分布は、2つのパラメータでひずみの違う分布を対数正規分布よりも柔軟にフィットできる特徴があり、正規分布と同様に加法則が成り立つなど対数正規分布より好ましい性質をもっている。

$$IG(x; \mu, \lambda) = \sqrt{\frac{\lambda}{2\pi}} x^{-3/2} \exp\left\{-\frac{\lambda(x-\mu)^2}{2\mu^2 x}\right\} \quad x, \mu, \lambda > 0$$

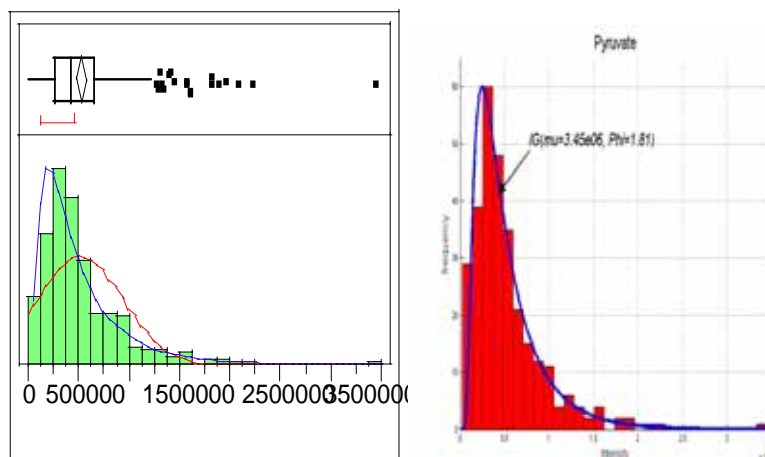


Fig. 1 Histogram of Pyruvate Concentration in Saliva

Curves are fitted to the Normal, Log-Normal(Left), and inverse Gaussian.Distributions(Right). Note that the Log-Normal and inverse Gaussian Distributions underestimate the pyruvate concentration, and that hardly fit the concentrations nearby zero.

逆正規分布で一連のデータを解析した結果、期待どおり対数正規分布より適用範囲が広いが、必ずしも結果は好ましくないことが分った。たとえば図 1(右)に示すように、ゼロ濃度近傍の立ち上がり部分では対数正規分布のほうが優れている場合がある。さらに濃度ゼロでは定義されないという本質的な困難があるため、必ずしも代謝物濃度の解析に適していないと考えられる。そこでひずみ率など 3 番目のパラメータを入れる代わりに変数変換で正規化することを試みた。

たとえば図 1 に示したピルビン酸のデータを Box-Cox 変換して 0.214 ± 0.056 のべき乗をとると、図 2 (左)に示すように正規化できる。このようにして得た Box-Cox 係数の平均は 0.18 ± 0.02 であった。したがって正規分布する物質が観測される可能性は無視でき、対数正規分布からも系統的にずれていると結論された。複雑系のネットワーク理論は、自律的に存在し、他の物質によるフィードバック制御を受けない物質は正規分布し、鎖状に連なった複雑な代謝系をなす物質は対数正規分布すると主張する。実験結果は、観測される代謝系はそれらの中間にあることを意味する。

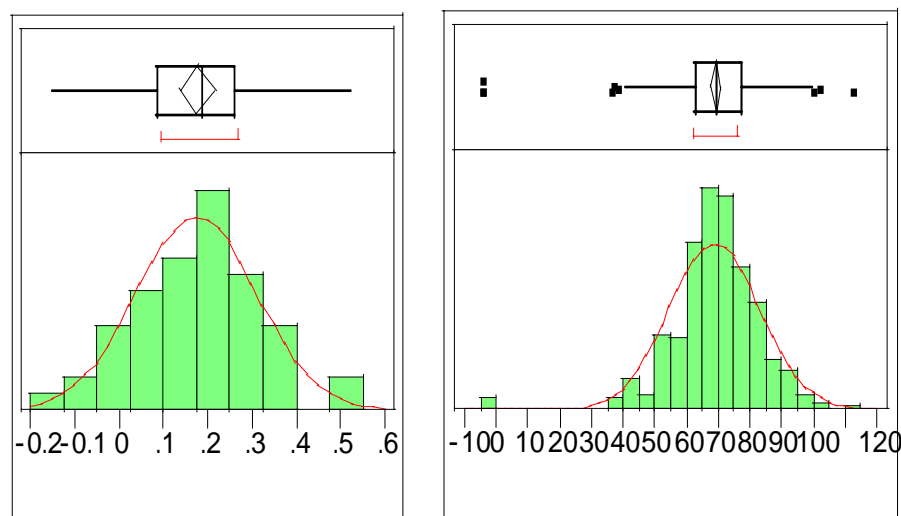


Fig. 2 (Left) Pyruvate Distribution of Concentration after the Box-Cox Transformation with the coefficient $= 0.214 \pm 0.056$. (Right) Distribution of Box-Cox Coefficients for all metabolites

今回の結果から、生体物質の濃度の評価において、従来のいわゆる平均濃度の求め方は、系統的なずれにより、分散成分の混入が無視できないため、個体差変動を過大評価していた可能性を示唆する。また観測値を正規分布させるためのスケール変換係数、つまり Box-Cox 係数とスケール変換後の平均濃度に対応する Box-Cox 定数の対数との間の直線関係の中に、下に凸の系統的なズレが認められた(図 3)。そこで Box-Cox 定数のスケール逆変換から得られた、代謝物濃度の平均値に相当する値と、Box-Cox 係数との相関を調べたところ、ゆるい正の相関が見出された。この結果は、高濃度の代謝物質ほど対数正規分布から離れることを意味する。

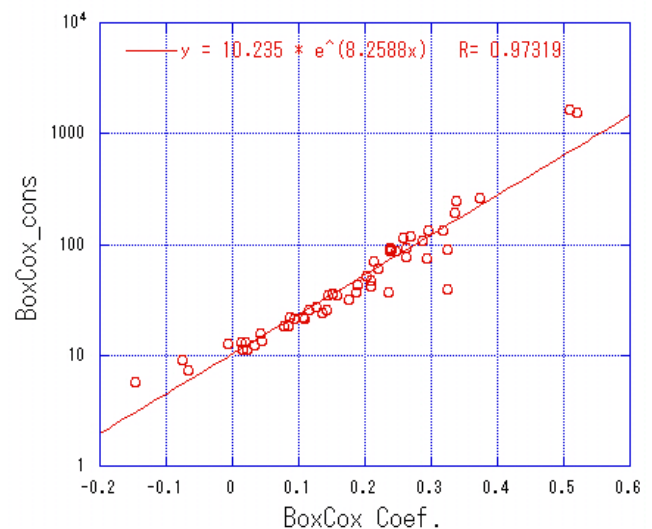


Fig 3 Correlation between the Box-Cox Coefficients and Logarithmic Constants

もし Box-Cox 係数の大きさが代謝制御ネットワークの長さや複雑さに関係しているならば、濃度の高い代謝物質は比較的少数の代謝制御系から構成されること、および濃度の低い代謝物質ほど精密に制御され、濃度の揺らぎは小さいことが示唆される。

今回の結果から、代謝物濃度分布は Box-Cox 係数としては非常に狭い範囲にあることが分かったので、濃度分布未知の生体成分の評価には、濃度の約 0.2 乗というスケール変換で正規化し、通常の統計解析をすれば、ほとんどの場合に系統誤差を避けることができると期待される。

系統誤差の一例として、図 4 に正規分布、対数正規分布、Box-Cox 変換による統計解析の結果を示す。統計分布を無視して統計解析すると、たとえばピルビン酸の代謝に及ぼす影響は、乳酸がピルビン酸の濃度を増大させる効果があり、酢酸より乳酸のほうが効果が大きいと推論されるが、じつは乳酸の効果は酢酸と同じかやや小さく、しかもピルビン酸の濃度を押し下げる方向に働くらしい。図の例では、対数正規分布するとした場合と、Box-Cox 変換による結果がほぼ一致した。おそらく強度の 0.2 乗と対数値で構成される強度分布の違いを検出できるほどデータの質が良くないのであろう。その意味で、対数正規分布による過去の統計解析結果に大きな間違いはないのかもしれない。

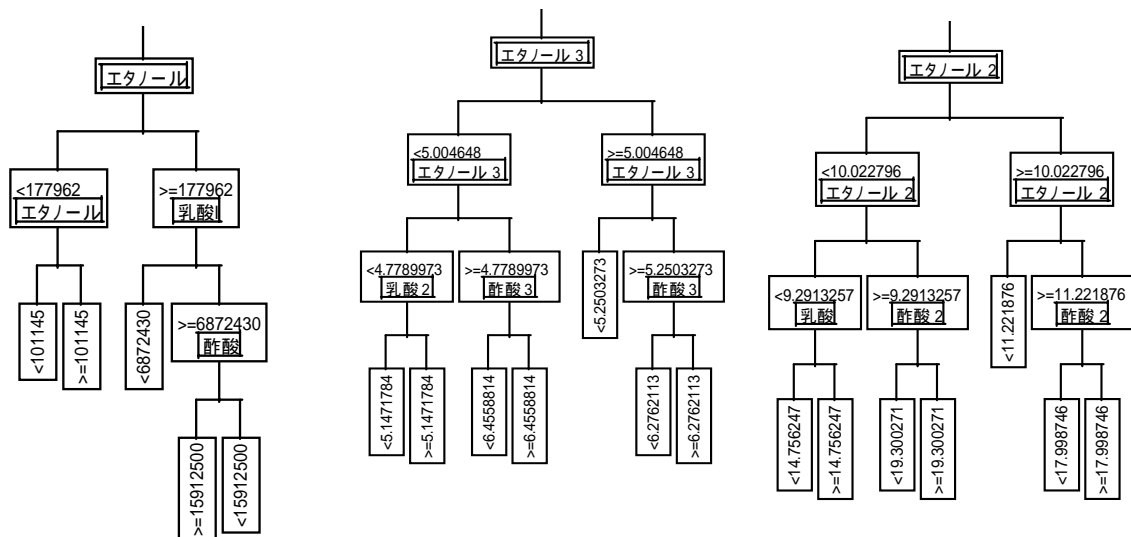


Fig. 4 Partition of Pyruvate Data against Ethanol, Lactate and Acetate.

Data are used intact intensities (Left), logarithmic intensities (Center) and involved intensities using power of 0.2 (Right). It corresponds to make the assumption of Normal Distribution, Log-Normal Distribution, and Normal Distribution after the Box-Cox transformation, respectively. The calculation under a normal distribution underestimates the contribution of Ethanol while overestimate that of Lactate. The latter two cases get similar results because of the difference in intensity distribution are rather small.