

I-4. 有害化学物質による生体影響評価指標の検討

有害化学物質に曝露された場合の人体影響に関して、昨年度は、芳香族ニトロ・アミノ化合物（アニリン、ニトロベンゼン、パラニトロクロルベンゼン等）による血液中のメトヘモグロビン（Met-Hb）量測定について報告した。今年度は、1) 殺虫剤としてよく使用される有機りん剤やカーバメイト剤によるコリンエステラーゼ（Ch-E）活性の抑制をみるための血中 Ch-E の測定法と、2) 遺伝子損傷への影響をみる場合の、白血球中 DNA 損傷量の指標となる 8-ohdG の測定法および当該指標を測定することの有効性について文献的検討をした結果を報告する。

I-4-1) 赤血球および血漿コリンエステラーゼ活性の測定

コリンエステラーゼ（Ch-E）は化学的神経伝達物質であるアセチルコリンを分解する酵素である。Ch-E の作用を阻害する物質として、有機りん剤およびカーバメイト剤がよく知られている。これらの物質が体内に入ると、Ch-E 活性が抑制され、神経の過度の興奮状態が起こる。

Ch-E にはアセチルコリンを特異的に分解するアセチルコリンエステラーゼ（ACh-E or true Ch-E）と種々のコリンエステルを分解する非特異的コリンエステラーゼ（pseudo Ch-E）がある。ACh-E は主に神経系および赤血球中に存在し、pseudo Ch-E は血漿中に存在する。血漿中の pseudo Ch-E は臨床検査において、肝機能検査として測定されており、一般的にはこれを Ch-E と呼んでいる。

有機りん剤やカーバメイト剤は ACh-E 活性および pseudo Ch-E 活性ともに抑制するので、これらの物質の曝露および影響の指標としては赤血球 Ch-E および血漿 Ch-E ともに有用である。しかし、血漿 Ch-E 活性は肝機能障害によっても低下するので、これらの物質による健康被害危機発生時の検査としては両者を測定することが望ましい。

血漿 Ch-E の測定については、臨床検査で一般的に行われており、種々の方法が開発され、測定キットが市販されている。しかし、これらのキットには使用期限があり、緊急時に備えてストックすることは困難である。また、測定キットが迅速に入手できない場合も考えられる。赤血球 Ch-E については測定キットは市販されていない。したがって、ここでは特殊な試薬や機器を必要としないで、比較的簡単に両者が測定できる Michel 法について記す。

1. Michel 法による赤血球および血漿コリンエステラーゼ測定法

①測定原理

Ch-E によって基質のアセチルコリンが加水分解されると酢酸が遊離する。この酢酸によって緩衝液の pH が低下する。この pH の低下の程度を pH メーターを用いて測定する。

②試薬

- a) バルビタールナトリウム
- b) 第一りん酸カリウム
- c) 塩化カリウム
- d) 0.1M 塩酸

- e) 塩化ナトリウム
- f) 塩化アセチルコリン (0.1g 入りアンプル; 第一製薬よりオピソートの商品名で販売)

③試薬の調整

1) 緩衝液(pH=8.1)

バルビタールナトリウム 1.2371g、第一りん酸カリウム 0.5446g、塩化カリウム 44.730g を約 900ml の蒸留水 (イオン交換水) に溶かし、約 38ml の 0.1mol 塩酸で pH8.1(25°C) にし、全量を 1L とする。

【血漿 Ch-E 測定用には、バルビタールナトリウム 1.2371g、第一りん酸カリウム 0.1361g、塩化ナトリウム 17.535g を約 900ml の蒸留水 (イオン交換水) に溶かし、0.1mol 塩酸で pH8.0(25°C) にし、全量を 1L とする】

2) アセチルコリン液 (0.11M)

塩化アセチルコリン 0.1g 入りのアンプル 1 本を 5ml の蒸留水に溶解する (濃度は 0.11M)。

【血漿 Ch-E 測定用には、塩化アセチルコリン 0.1g 入りのアンプル 3 本を 10ml の蒸留水に溶解する (濃度は 0.165M)】

3) サポニン液(0.01%)

サポニン 0.01g を 100ml の蒸留水に溶解する (0.01%)。

4) 塩化ナトリウム溶液 (0.9%)

塩化ナトリウム 4.5g を蒸留水に溶かして 500ml とする。

5) 硫酸エゼリン溶液 (50mg/50ml)

硫酸エゼリン 50mg を 50ml の蒸留水に溶解する。

④機器

- 1) ヘパリン加採血管 (市販の真空採血管, 採血量 2ml)
- 2) 試験管(16mm×105mm)

- 3) マイクロピペット
- 4) pH メーター(試験管内の液の pH が測定できる電極を使用)
- 5) 恒温槽 (37°C)
- 6) 遠心分離機

⑤測定操作

a. 採血と赤血球の洗浄

- 1) ヘパリン加採血管に血液 2ml を採血し、よく混和する。
- 2) 3000rpm で 15 分遠心し、上清を除去する (血漿 ch-E を測定するときはこれを使用する)。
- 3) 0.9% 塩化ナトリウム溶液を適量加え血球を浮遊させた後 3000rpm で 15 分遠心し、上清を除去する (赤血球の洗浄)。
- 4) 上記 3) の操作を繰り返す。

b. 測定

- 5) 0.01% サポニン溶液 1.5ml を試験管にとる。
- 6) マイクロピペットを用いて 4) の赤血球層 0.04ml を加え、混和する (ピペットに付着した血液を希釈液で洗いだす)。
- 7) 溶血を確認してから、緩衝液を 1.5ml 加える。
- 8) 37°C の恒温槽に入れ、約 15 分後に pH を測定する (pH₁)。
- 9) アセチルコリン液を 30 μ l 加え、混和する。
- 10) 正確に 60 分後にエゼリン液を 50 μ l 加え、混和する (エゼリン液を加えない場合は、正確に 60 分後の pH を測定する)。
- 11) 出来るだけ早く pH を測定する (pH₂)。
- 12) Δ pH を求める (Δ pH=pH₁-pH₂)。

【血漿 Ch-E 測定は、血漿用緩衝液および

血漿用アセチルコリン液を用い、サポニン液の代わりに蒸留水を用いて、上記測定法に準じて行う】

⑥測定法の検討

1) 測定値の再現性

同一サンプルを上記方法によって 6 回測定した。その結果を表 1 に示す。 Δ pH の測定値は 0.89~0.92 に分布し、平均値が 0.905、標準偏差が 0.010 で、変動係数 (CV) は 1.16 とよい再現性を示した。

表 1. Michell による赤血球 cH-E 活性測定の見直し

No.	基質添加前の pH	60 分後の pH	Δ pH
1	7.79	6.88	0.91
2	7.80	6.88	0.92
3	7.81	6.90	0.91
4	7.81	6.92	0.89
5	7.81	6.91	0.90
6	7.81	6.91	0.90
平均値			0.905
標準偏差			0.010
CV			1.16

2) エゼリン添加後の pH の変化

反応停止剤である硫酸エゼリン溶液の添加後 37°C での pH の変化を図 1 に示す (同一検体での 5 回測定の前平均値および標準偏差)。pH は時間と共にわずかに低下した。添加後 15 分ではほとんど変化は見られず、30 分後には 0.01、45 分後には 0.02、60 分後には 0.04 低下した。

3) 緩衝液の酢酸による滴定

緩衝液の緩衝能が、緩衝液の調整ごとに異なることが誤差の原因となると考えられる。緩衝液に 0.1M 酢酸を段階的に加え、pH を測定した。添加酢酸量と緩衝液の pH との関係を図 2 に示す。その関係式は図 2 の 2 次式で

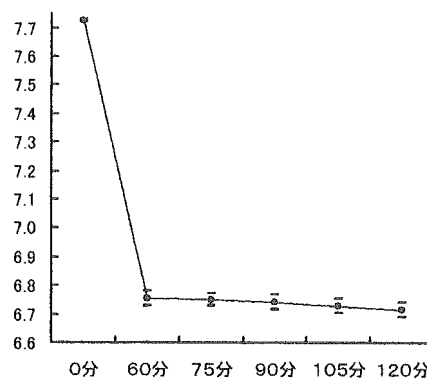


図 1. エゼリン添加後の pH の変化

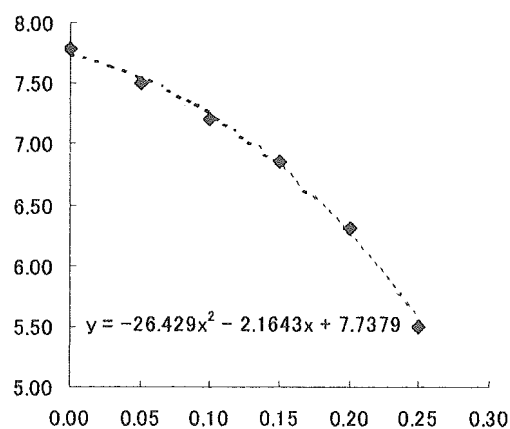


図 2. 緩衝液の pH と添加酢酸量の関係

示された。

[注意事項]

1. 基質液添加後正確に 60 分後に pH を測定すれば反応停止液を使用する必要はない。多数の検体を処理する必要があるときには、反応停止液を使用すれば便利である。その場合にも、反応停止液添加後 15 分以内に測定することが望ましい。

2. 同一緩衝液を用いて測定すれば、よい再現性が得られるが、異なる緩衝液を使用した場合には誤差が生じる。緩衝液による誤差を補正するためには、使用のつど 0.1M 酢酸で緩衝液を滴定して補正するか、酢酸の生成量で表すのが望ましい。

⑦正常値 (上田・石堂による平均±SDと範囲)

a)血漿 Ch-E 活性値

Δ pH 0.776 ± 0.08 (0.30~1.30)

b)赤血球 Ch-E 活性値

Δ pH 0.783 ± 0.09 (0.30~1.30)

なお、赤血球および血漿コリンエステラーゼ活性測定法としては、上記のほかに Voss and Sachsse による DTNB 法変法が有用である。

文献

- 1) 田重孝, 土屋健三郎 監修・編集: 職業病 健診手技 写真による解説, 興生社 (1972)
- 2) 上田喜一, 平木 潔 編集: 農薬中毒 基礎と臨床, 南江堂 (1978)
- 3) Guenther Voss and Klaus Sachsse: Red Cell and Plasma Cholinesterase Activities in Microsamples of Human and Animal Blood Determination Simultaneously by a Modified Acetylthiocholine/DTNB Procedure, Toxicology and Applied Pharmacology, 16 (1970)

I-4-2) 遺伝子損傷の指標としての 8-ohdG の測定

(要約) 活性酸素の生成が毒性の原因と考えられている化学物質などによる中毒症状の経過を観察するために、白血球 DNA 中 8-ohdG (8-oxo-2'-deoxyguanosine) 量を測定することは、活性酸素による影響を調べるよい指標となることが考えられる。ここでは、①血液 (白血球) 中の DNA 抽出法 (採集した 7 ml の血液から白血球を分離し「DNA エキストラクターWB キット」(和光純薬) を用いメーカー推奨操作法の 2 倍量で抽出することによって良好な DNA を得ることができる)、②8-ohdG の測定法、に加えて、③文献調査により遺伝子損傷指標としての 8-ohdG の測定の有効性の検討を行った。砒酸、ベンゼン、臭素酸塩、石綿、第 I 鉄塩などの中毒で 8-ohdG が増加する可能性が示唆された。パラコート (除草剤) は活性酸素による障害が主要な毒性機序であるが、投与後の時期によっては 8-ohdG の増加が認められないことが報告されていた。

8-ohdG (8-oxo-2'-deoxyguanosine) は 8-oxo-guanine と 2'-deoxyribose が結合したものである。遺伝子の本体である DNA は活性酸素によって DNA 鎖切断や DNA 塩基の修飾を受ける。8-oxo-guanine (8-oxoG) は guanine が活性酸素 (水酸ラジカルや一重項酸素) との反応で生じる修飾塩基の 1 つであり、ほかの塩基に由来する修飾塩基を含め生じる修飾塩基の 60% を占める主要な生成物である¹⁾。

8-oxoG や 8-ohdG は高速液体クロマトグラフィーと電気化学的検出器によって 80 pmol でも測定することができ、DNA 中 guanine の 100 万個に 1 個の 8-oxoG が生じても検出することができる。すなわち、活性酸素による DNA 損傷を感度よく測定する指標となる。

したがって、化学物質による中毒反応が、その物質が活性酸素を発生させることに起因する場合、被害者の中毒状態を観察する感度のよい指標となることが期待できる。

8-ohdG の測定の過程は、(1)被検者の血液や

臓器から DNA を抽出、(2)DNA の酵素的分解 (高分子 DNA をヌクレオシドに分解)、(3)高速液体クロマトグラフィー・電気化学的検出器による測定である。この過程の問題点は、(1)、(2)の過程で大気・水中の酸素により 8-ohdG が生成し、測定結果が不明瞭になることである。細胞や臓器から DNA を抽出する方法は基本的にタンパク分解酵素と界面活性剤で細胞を溶解し、エタノール沈殿によって DNA を取り出す。この際、不純物として糖質、未分解タンパク質や RNA が混入してくるために、RNA 分解酵素処理やフェノール処理を含んでいる。特にフェノール処理の過程で酸化されたフェノールが DNA を酸化する可能性が懸念される。近年、フェノールを用いない方法が開発された²⁾こともあり、この問題について検討され、本方法によって DNA を精製するとフェノール処理を含む方法の 1/10 程度の値になることが示された³⁾。本方法は全血液から DNA を抽出するキットとして和光純薬 (大阪市) から全血中 DNA 抽出用 DNA エキストラクターWB キットとして発売されているが、本キットの方法通りでは 8-ohdG の測定に十分な量の DNA を抽出するためにはコストが高くなるため、若干の検討が必要である。

私たちは既にフェノールを用いる方法によって DNA を抽出し、8-ohdG を測定していたが、細胞溶解反応はアルゴンガス雰囲気中でおこない、フェノールに抗酸化剤を加えること、フェノールの保存条件、フェノール処理温度などを改良することで従来法よりは低い値を得ることに成功していた。

本報告では、1. 全血中 DNA 抽出用 DNA エキストラクターWB キットを用いた DNA 抽出法の検討を先に述べ、2. 白血球 DNA 中 8-ohdG 測定法、3. 8-ohdG が増加させる化学物質についての報告をまとめた。

1. 末梢血白血球 DNA 抽出法の検討

8-ohdG の測定には約 100 μ g の DNA が必要で、

血液 7ml から抽出する。「全血中 DNA 抽出用 DNA エキストラクターWB キット」は血液 0.5 ml から抽出する。

分離した白血球から本キットを用い DNA を抽出する場合、何 ml に相当する血液から DNA を抽出できるか検討した。

7ml の抗凝固剤 (Na-EDTA) 入り真空採血管で採集した血液をリンパ球分離液に上層して遠心することにより白血球を分離し STE (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA pH8.0) に懸濁して用いた。細胞数は 5.4×10^6 /ml 全血であった。

白血球懸濁液を全血 0.5 ml ~ 4.5 ml 相当量、1.5 ml チューブに入れ微量高速遠心機を用いて 10,000 xg で 20 秒間遠心して上清を除き、溶解液 1.0 ml を加えてチューブを上下逆さにして混合した。以後キット添付方法に従い DNA を抽出した。得られた DNA 量を分光光度計 (A260nm) を用いて定量した (表 1)。全血 2.0 ml ~ 3.0 ml 相当白血球までは 0.5 ml 相当量より収率が増加した。調べた 4.5ml 相当量までは 0.5 ml 相当量の収率より下がることなく DNA を抽出することができた。また、A260nm/280nm で求めた DNA の純度も変化なかった。

表 1 0.5 ml 全血液から DNA を抽出する方法に従った場合の白血球 DNA の抽出率

全血相当量 (ml)	総 DNA 量 (μ g)	収 率 (μ g/ml 全血)
0.5	10.9	21.8
1.0	26.9	26.9
2.0	64.8	32.4
2.5	79.5	31.8
3.0	95.5	31.8
3.5	104	29.9
4.0	112	28.0
4.5	131	29.1

2. 白血球 DNA 中 8-ohdG 測定

本法は 4 つの過程からなっている。

- (1) 血液から白血球の分離
- (2) 白血球から DNA の抽出
- (3) DNA の酵素的分解
- (4) 8-ohdG の高速液体クロマトグラフィー/電気化学的検出器による定量
(3, 4 は葛西らの方法⁴⁾に従った。)

(1) 血液から白血球の分離

試薬など

- ・ Polymorphprep (Nycomed)
- ・ 採血チューブ (Na-EDTA)
- ・ S T E (0.1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH8.0), 1 mM EDTA)

操作

- ① Polymorphprep 3.5 ml を 15 ml プラスチックチューブにとる。
- ② 7 ml 血液 (Na-EDTA 入り真空採血管で採血) を Polymorphprep 液の上に静かに入れる (上層する)。チューブの底から Polymorphprep 液、血液の順に層をなしている。2 液を混合しないように注意する。
- ③ 低速遠心機を用いて 25°C、1700rpm (450-500 x g)、35 分間遠心する。チューブの底から赤血球、Poly-morphprep 層、血漿層に分離し、Poly-morphprep 層と血漿層の間に Fraction 1 (多型核白血球が主成分)、Poly-morphprep 層の中に Fraction 2 (単核球が主成分) が浮遊している。
- ④ Fraction 1 および Fraction 2 を 15 ml プラスチックチューブにとる。
- ⑤ 氷冷 S T E 加えて 10 ml にする。ゆっくり上下にして攪はんする。
- ⑥ 4°C、3000 rpm で 10 分間遠心し、上清を捨てる。

- ⑦1 ml 氷冷 STE で再懸濁する。2.2 ml tube に移す。
 ⑧超低温槽 (-80°C) に保存する。

(2) 白血球から DNA の抽出

試薬など

- ・全血中 DNA 抽出用 DNA エキストラクターWB キット (和光純薬) を使用。その内容は以下。
 - 溶解液
 - 酵素反応液
 - よう化ナトリウム溶液
 - 洗浄液 (A)
 - 洗浄液 (B)
 - タンパク分解酵素溶液 (-20°C保存)
 - イソプロピルアルコール
 - 滅菌蒸留水
- ・恒温水槽 (37°C)

操作

- ①冷凍保存している試料を水 (室温) に浸けとがす。直ちに氷令する。
- ②4°C1500rpm で 20 秒間遠心し、上清を除く。
- ③溶解液を 2.0 ml 加え、マイクロチューブミキサーで 30 秒混合する。細胞が懸濁するようになる。
- ④4°C1500rpm で 20 秒間遠心し、上清を除く。
- ⑤ ③④を 1 回繰り返す。
- ⑥酵素反応液 400 μ l とタンパク分解酵素液 20 μ l を加えて混合し、37°Cで1時間保温する (途中 2-3 回軽く混合する)。
- ⑦よう化ナトリウム溶液を 600 μ l 加えて混合する。
- ⑧イソプロピルアルコールを 1.0 ml 加えて、白い綿状の DNA が完全に見えてくるまで混合する。
- ⑨室温 15000rpm で 10 分間遠心し、上清を充分除く。
- ⑩洗浄液 (A) を 2 ml 加え、沈査が器壁から剥

がれる程度に混合する。

- ⑪室温 15000rpm で 5 分間遠心し、上清を除く。
- ⑫洗浄液 (B) を 2 ml 加え、沈査が器壁から剥がれる程度に混合する。
- ⑬室温 15000rpm で 5 分間遠心し、上清を除く。
- ⑭70%エタノールを 1 ml 加え超低温槽 (-80°C) に保存する。

(3) DNA の酵素的分解

DNA を Nuclease P1 で nucleotide に分解し、bacterial Alkaline phosphatase で脱リン酸して、nucleoside にする。

試薬など

- ・Nuclease P1 (Yamasa) 1000U/ml 水 4°Cで保存 (1年は安定)
- ・1 M NaAc (酢酸ナトリウム) (pH5.3)
- ・1 M Tris-HCl (pH8.0)
- ・Alkaline phosphatase (E. coli) (宝酒造)

操作

- ①70%エタノールで保存していた DNA を遠心 (1500rpm 5 min)、Ethanol を捨て、減圧下で軽く乾燥。
- ② 50 μ l H₂O を加え溶かす。
- ③熱変性 : 95°C 3 分間加熱後、氷につけて急冷し数分置く。
- ④1 μ l NaOAc,
4 μ l NucleaseP1 (8U)
を加え 37°Cで 1 時間保温する。
- ⑤上の反応液に
1 M Tris-HCl 8 μ l
Alkaline Phosphatase (E. coli) 2 μ l
を加えて 55°C 30 分間保温する。
- ⑥15,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を新しい 1.5 ml チューブに入れる。測定まで氷上で保存する。

(4) 8-ohdG の高速液体クロマトグラフィー/
電気化学的検出器による定量

8-hydroxydeoxyguanosine 10 ng/ml
(A245nm のモル吸光係数 $1.23 \times 10^4/M$ 、あ
るいは A293nm のモル吸光係数 $1.03 \times 10^4/M$
として定量する)

注入量 40 μ l

試薬・機器など

- ・ 溶離液 (水は全て MilliQ water を用いる。)

1 M KH_2PO_4 50 ml

Methanol (液クロ用) 100 ml

MilliQ water で 1 L にメスアップする。

流速 0.8 ml/min

- ・ 検出器

分光光度計 UV260 nm (レンジ 2.0)

電気化学検出器 (BAS CC4+LC4B、カーボ

ングラフィット作用電極、Potential

+600mV, Range 50nA)

直列に配管する。

- ・ カラム

ODS 25 cm (Merck Hibar LichroCART

250-4)

カラム温度 50°C

- ・ 標準

deoxyguanosine (dG) 0.1 mg/ml

操作

① 試料 40 μ l を注入し 260nm の吸光度で正常
なヌクレオシド量を定量する。電気化学的検
出器で 8-ohdG を定量する。

② 計算

(試料 8-ohdG ピーク面積/標準 8-ohdG ピー
ク面積) / (試料 dG ピーク面積/標準 dG ピー
ク面積) = 8-ohdG/10⁵dG として表現する。

3. 生体に 8-ohdG を増加させると考えられ
る化学物質に関する報告のまとめ

報告のまとめを表 2 に示す。まとめた報告に
は、試験管内実験の結果、動物実験の結果、疫
学調査の結果などが含まれている。試験管内実

表 2. 生体に 8-ohdG を増加させると考えらる化学物質に関する報告のまとめ

物質名	材料	結果 (8-ohdG 量)	文献番 号
3,4-dichloro-2'5'-dihydroxy-biphenyl (1・2 塩化ビフェニール代謝物)	試験管内。精製 DNA と二塩化銅	8-ohdG 量が 10 倍増加。低塩素 PCB の代謝 (酸化) 過程に活性酸素が生 成することを示唆。	4
ニッケル (二価)	試験管内。精製 DNA と SH 化合物	8-ohdG 量が増加。Ni (II) と生体内 SH 化合物の反応で活性酸素が生成する ことを示唆。	5
ベンゼン	マウス (200 mg/kg)	骨髄細胞 DNA の 8-ohdG 量が 2.8 倍増 加。	6
2,4,6-trinitrotoluene	雄ラット	精子 DNA の 8-ohdG 量が増加。精巣と 複睪丸の精子が減少。	7
都市大気 (コペンハーゲン)	疫学調査 (非喫煙 バス運転手)	都市中心部を走行する運転手の方が 郊外走行より有意に高い尿中 8-ohdG	8

		量。勤務日と休日では差がなかった。	
銅 (II)	アメリカチヌ <i>Sparus aurata</i>	肝臓：増加が見られなかった。	9
パラコート (除草剤)	アメリカチヌ (<i>Sparus aurata</i>)	肝臓：増加が見られなかった。鰓： 8-24時間後に増加、48時間後に減少。	9
マラチオン (殺虫剤)	アメリカチヌ (<i>Sparus aurata</i>)	肝臓：増加が見られなかった。	9
ディルドリン (殺虫剤)	アメリカチヌ (<i>Sparus aurata</i>)	肝臓：増加が見られた。	9
塩化第一鉄	ラット 腹腔内 投与	腎臓・副睾丸精子：増加、精巣・肝 臓：変化なし。尿中 8-ohdG が増加。	10
o-phenylphenol 代謝物 (抗菌防黴剤)	ヒト培養細胞	phenyl-1,4-benzoquinone phenyl-hydroquinone 共に 8-ohdG を 増加させた (PBQ>PHQ)	11
珪酸含有鉱物粉塵	疫学調査 (退職炭 坑夫)	末梢血リンパ球 DNA 中 8-ohdG を測 定。塵肺症の有無にかかわらず累積 被曝量と 8-ohdG 量が相関。対照群に 比べ有意に高値を示した。	12
di-n-butyl phthalate	ラット (妊娠 7 日 から出産 17 日後 まで餌に混合し て投与)	雄仔の肝 DNA に増加が見られた。腎 では減少、精巣は変化がなかった。 体重・臓器重量に影響しなかった。	13
di-n-butyl phthalate	ラット (生後 25-34 日の間、餌 に混合して投与)	肝臓・腎臓・精巣 DNA 中 8-ohdG 量に 変化なし。体重・臓器重量は減少、 精細管の萎縮が観察された。	13
ベンゼン	phorbol エステル 前処理マウス骨 髄細胞、ヒトリン パ球、ヒト好中球	3 種の細胞ともベンゼン処理により 8-ohdG が 2 倍前後に増加。	14
臭素酸カリウム (KBrO3)	ラット 腹腔内 投与 (100 mg/kg)	24 時間後腎臓 DNA 中 8-ohdG が約 2 倍に増加。腎ミトコンドリア DNA は わずかに増加の傾向。その他脂質過 酸化、酸化型 GSH が増加。	15
2-nitropropane	ラット 腹腔内 投与 (100 mg/kg)	骨髄細胞 DNA の 8-ohdG 量が 5 倍増加。 DNA 切断量 (コメットアッセイ) も増 加。	16

p-dichlorobenzene	ラット 経口投 与 (300 mg/kg / 日を 13 週間、そ の後腎臓ガンブ ロモーターを 39 週間投与)	腎臓 DNA の 8-ohdG 増加は認められな かった。がんも認められなかった。 P-dichlorobenzene は腎臓ガンイニ シエーターとして作用しない。	17
dimethylarsinic acid (砒酸代謝物)	マウスに経口投 与	皮膚・肺・肝・膀胱 DNA 中、および 尿中の 8-ohdG を増加させた。	18
石綿	疫学調査 (石綿被 曝労働者延べ 1380名、対照 214 名)	636 名の石綿工場労働者を対象に 3 年間調査。末梢血白血球 DNA 中の 8-ohdG は対照と比較して 3 年とも有 意に高かった (約 1.7 倍)	19
2,3,7,8-tetrachloro dibenzo-p-dioxin	ラット雌 経口 投与 (隔週に 1 回 33 週間、総量 1.4μg/kg)	肝臓 DNA 中の 8-ohdG が増加した。56 日令に卵巣切除をしたものは増加し なかった。活性酸素発生にエストラ ジオールが寄与の可能性示唆。	20

件の結果は直ちに、生体内で染色体 DNA 中 8-ohdG の増加を示しているとは考えられない。化学物質の代謝による活性酸素の発生部位と細胞核に距離があること、8-ohdG の生成に特定の条件が必要で、動物実験の結果と矛盾する場合があるためである。試験管内実験の結果と動物実験の結果が共に DNA 中 8-ohdG の増加を示している場合、ヒトでも同様な結果を導く場合が考えられる。ヒト特に臨床的検査で用いることの出来る試料は、白血球 DNA 中あるいは尿中 8-ohdG が一般的であるが、動物の結果で示されたように臓器特異性を持つ化合物中毒の場合に感度よく経過を観察する方法となるかについては、疫学調査結果を待つ必要がある。

4. 文 献

- 1) Aruoma, O. I., Halliwell, B., Gajewski, E. and Dizdaroglu, M. (1989) Damage to the bases in DNA induced by hydrogen peroxide and ferric ion chelates. *J. Biol. Chem.*, 264, 20509-20512.
- 2) Wang, L., Hirayasu, K., Ishizawa, M. and Kobayashi, Y. (1994) Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucl. Acid Res.*, 22, 1774-1775.
- 3) Helbock, H. J. et al (1998) DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxo-guanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 288-293.
- 4) Kasai, H., and Nishimura, S. (1984) Hydroxylation of deoxyguanosine at C-8 position by ascorbic acid and other reducing agents. *Nucleic Acids Res.* 12, 2137-2145
- 5) Oakley, G. G., Devanaboyina, U., Robertson, L. W., Gupta, R. C. (1996) Oxidative DNA damage induced by activation of poly-chlorinated biphenyls (PCBs): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem. Res.*

- Toxicol., 9, 1285-92.
- 6) Oikawa, S., Hiraku, Y., Fujiwara, T., Saito, I., Kawanishi, S. (2002) Site-Specific Hydroxylation at Poly-guanosine in Double-Stranded DNA by Nickel(II) in the Presence of SH Compounds: Comparison with Singlet Oxygen-Induced DNA Damage. *Chem. Res. Toxicol.* 15, 1017-22.
 - 7) Tuo, J., Deng, X., Loft, S. and Poulsen, H.E. (1999) Dexamethasone ameliorates oxidative DNA damage induced by benzene and LPS in mouse bone marrow. *Free Radic. Res.* 30, 29-36
 - 8) Homma-Takeda, S., Hiraku, Y., Ohkuma, Y., Oikawa, S., Murata, M., Ogawa, K., Iwamuro, T., Li, S., Sun, G.F., Kumagai, Y., Shimojo, N. and Kawanishi, S. (2002) 2,4,6-trinitrotoluene-induced reproductive toxicity via oxidative DNA damage by its metabolite. *Free Radic. Res.* 36, 555-66
 - 9) Loft, S., Poulsen, H.E., Vistisen, K., Knudsen, L.E. (1999) Increased urinary excretion of 8-oxo-2'-deoxyguanosine, a biomarker of oxidative DNA damage, in urban bus drivers. *Mutat. Res.*, 441, 11-19
 - 10) Rodríguez-Ariza, A., Alhama, J., D'Amico, F.M., López-Barea, J. (1999) Content of 8-oxodG in chromosomal DNA of Sparus aurata fish as biomarker of oxidative stress and environmental pollution. *Mutat. Res.*, 438, 97-107
 - 11) Wellejus, A., Poulsen, H.E., Loft, S. (2000) Iron-induced oxidative DNA damage in rat sperm cells in vivo and in vitro. *Free Radic. Res.*, 32, 75-83
 - 12) Murata, M., Moriya, K., Inoue, S. and Kawanishi, S. (1999) Oxidative damage to cellular and isolated DNA by metabolites of a fungicide ortho-phenylphenol. *Carcinogenesis*, 20, 851-857
 - 13) Schins, R.P., Schilderman, P.A., Borm, P.J. (1995) Oxidative DNA damage in peripheral blood lymphocytes of coal workers. *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 67, 153-157
 - 14) Wellejus, A., Dalgaard, M., Loft, S. (2002) Oxidative DNA damage in male Wistar rats exposed to di-n-butyl phthalate. *J Toxicol. Environ. Health*, 65, 813-824
 - 15) Tuo, J., Loft, S., Poulsen, H.E. (1999) Enhanced benzene-induced DNA damage in PMA-stimulated cells in vitro and in LPS-treated animals. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 801-808
 - 16) Chipman, J.K., Davies, J.E., Parsons, J.L., Nair, J., O'Neill, G., Fawell, J.K. (1998) DNA oxidation by potassium bromate; a direct mechanism or linked to lipid peroxidation? *Toxicology*, 126, 93-102
 - 17) Deng, X.S., Tuo, J., Poulsen, H.E., Loft, S. (1997) 2-Nitropropane-induced DNA damage in rat bone marrow. *Mutat. Res.* 391, 165-169
 - 18) Umemura, T., Kodama, Y., Kurokawa, Y., Williams, G.M. (2000) Lack of oxidative DNA damage or initiation of carcinogenesis in the kidneys of male F344 rats given subchronic exposure to p-dichlorobenzene (pDCB) at a carcinogenic dose. *Arch. Toxicol.* 74, 54-59
 - 19) Yamanaka, K., Takabayashi, F., Mizoi, M., An, Y., Hasegawa, A., Okada, S. (2001) Oral exposure of dimethylarsinic acid, a main metabolite of inorganic arsenics, in mice

- leads to an increase in 8-oxo-2'-deoxyguanosine level, specifically in the target organs for arsenic carcinogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 287, 66-70
- 20) Marczynski, B., Rozynek, P., Schlosser, S., Raithel, H. J. and Baur, X. (2000) Levels of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in DNA of white blood cells from workers highly exposed to asbestos in Germany. *Mutat. Res.* 468, 195-202
- 21) Tritscher, A.M., Seacat, A.M., Yager, J. D., Groopman, J.D., Miller, B.D., Bell, D., Sutter, T.R., Lucier, G.W. (1996) Increased oxidative DNA damage in liver of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin treated intact but not ovariectomized rats. *Cancer Lett.* 98, 219-225

II. 健康被害危機事例対応における疫学調査の活用

- O157:H7 感染症集団発生を想定した疫学調査指針 -

平成 13 年度の研究報告書では、感染症および食中毒分野の健康被害危機事例として、新興感染症である O157:H7 感染症集団発生をとりあげ、過去の事例に対する米国とわが国の対応を比較検討することにより、地方行政機関の課題について疫学的観点より考察した。

本年度は、今後わが国で同様の事例が発生した際に、case-control study を実施することが可能となるような疫学調査指針を作成した。まず、case-control study を実施するにあたり最低限必要となる疫学原理を提示した。また、わが国での O157:H7 感染症集団発生事例を 2 例想定し、各事例について疫学調査実施要綱および質問票の作成を行った。

これまでわが国で疫学調査が活発に行われていなかった背景には、疫学調査の有用性に対する理解が不十分であったこと、また疫学調査を実施する際に必要となる基本的知識が充分浸透していなかったことなどが考えられる。前年度および本年度の研究結果をふまえ、今後わが国での事例発生時に実際に疫学調査を実施することが、本研究の最終的な目標である。

A. 目的

平成 13 年度の研究報告書では、感染症および食中毒分野の健康被害危機事例に対する米国とわが国の対応を比較検討することにより、地方保健医療行政機関の今後の課題について疫学的観点より考察した。

感染症および食中毒分野の健康被害危機事例に関してみると、CDC を中心とする米国の各種公衆衛生研究機関で採用されている疫学調査デザインは、case-control study の手法がほとんどである。従って本年度は、今後わが国で同様の事例が発生した際に、迅速かつ的確に case-control study を実施することが可能となるような疫学調査指針の作成を目的とした。

B. 方法

まず、case-control study を実施するにあ

たり最低限必要となる疫学原理を提示した。

また、わが国での O157:H7 感染症集団発生事例を 2 例想定し、各事例について疫学調査実施要綱および質問票の作成を行った。

C. 結果

C-1. 疫学基本原理

膨大な疫学原理のすべてを本稿で総括することは不可能であるので、ここでは case-control study を実施するにあたり最低限必要となる疫学基本原理のみを抜粋して提示した。

1. 疫学とは

John M. Last らにより編集された疫学辞典 (A Dictionary of Epidemiology) によると、疫学は以下のように定義されている。

“疫学とは、特定の集団における健康関連事

象の分布および規定要因を研究する学問であり、その結果は健康問題を管理するために適用されるものである。”

米国で発生した過去の O157:H7 感染症に関しても、前年度の報告書で述べた如く、CDC を中心とした公衆衛生機関により数多くの疫学調査が実施されてきた。O157:H7 感染症集団発生の原因を同定し、さらなる被害の拡大を予防するため、疫学は多大な貢献を果たしてきたといえよう。

2. 疫学の基本的事項

(1) 曝露要因 (exposure)、結果 (outcome)、交絡要因 (confounder)

例えば、O157:H7 感染症の集団発生が認められた場合、あるファーストフードのチェーン店で販売されていたハンバーガー摂食が原因として疑われたとしよう。この場合、次のような関連を解明すべく疫学調査が行われる。

ハンバーガー摂食 → O157:H7 感染症

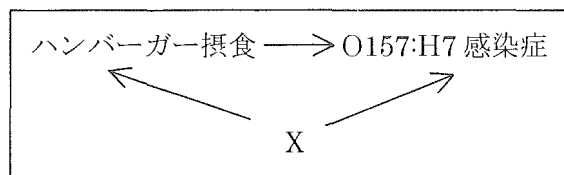
上記のような例では、“ハンバーガー摂食”が「曝露要因 (exposure)」、 “O157:H7 感染症” が「結果 (outcome)」となる。

「曝露要因」とは、疾病発生やその他の健康関連事象発生の増加または減少と関連する可能性のある要因である。いわゆる「リスク要因」という用語は、曝露要因とほぼ同義であると考えるよい。曝露要因が作用することにより発生する疾病、健康状態、健康関連事象、死亡などが「結果」にあたる。

疫学調査では、上記のように、まず観察された事象から曝露要因と結果を明確に定義し、これから調査すべき関連を仮定することが第一段階である。この仮定を「仮説 (hypothesis)」といい、仮説に基づいて曝露要因と結果に関するさまざまな情報を収集する。しかし、情報収集はこれだけでは不十分

である。

次のような関連を考えてみよう。



ここで、新たに“X”という第3の要因を加えた。“X”は、結果の有無にかかわらず曝露と関連し、また曝露の有無にかかわらず結果とも関連するような要因である。このような場合、仮に曝露要因 (ハンバーガー摂食) と結果 (O157:H7 感染症) の間に関連が認められたとしても、それは要因“X”による見かけ上の関連である可能性がある。

上記のように、曝露要因とも結果とも関連する第3の要因を「交絡要因 (confounder)」という。交絡を生じうる要因は、調査対象となっている曝露や結果に応じてさまざまであるが、疫学においては、性、年齢、居住地、社会経済状況は、常に交絡要因として考慮しなければならない。

疫学調査を実施する際には、曝露要因、結果、交絡要因という3つの要素に関する情報の収集が不可欠である。

(2) 疫学研究デザイン

仮説により提示された関連が真実であるかどうかを調査するため、さまざまな疫学研究デザインが存在する (表1)。

表1 疫学研究デザイン

1. 介入研究 (interventional study)
2. 観察研究 (observational study)
 - ・ コーホート研究 (cohort study)
 - ・ 症例・対照研究 (case-control study)
 - ・ 横断研究 (cross-sectional survey)

以下、過去の O157:H7 感染症集団発生に関するほとんどの疫学調査で採用されてきた、

症例・対照研究 (case-control study) に焦点をあてて疫学理論を述べることにする。

(3) 症例・対照研究 (case-control study) とオッズ比 (odds ratio、OR)

特定の疾病を有する者 (症例: case) と、その疾病を有しない者 (対照: control) をまず同定し、case 群と control 群の間に過去の曝露要因の頻度について比較をおこなうデザインである (図 1)。case 群と control 群の間で、ある曝露要因の頻度が異なれば、その曝露要因が対象疾病の発症または予防に関連していると推測することができる。

表 1 で示した各疫学研究デザインでは、解析により「相対危険度 (relative risk)」という曝露効果の指標 (effect measure) が得られる。これは「曝露をうけていない場合と比較して、曝露をうけた場合に何倍多く対象疾病に罹りやすいか」という指標であり、曝露と結果の関連の大きさを示す。いわゆる“リスクが大きい”とは、疫学では相対危険度が大きいことを意味する。case-control study で得られる「オッズ比 (odds ratio、OR)」は、相対危険度の近似値である。

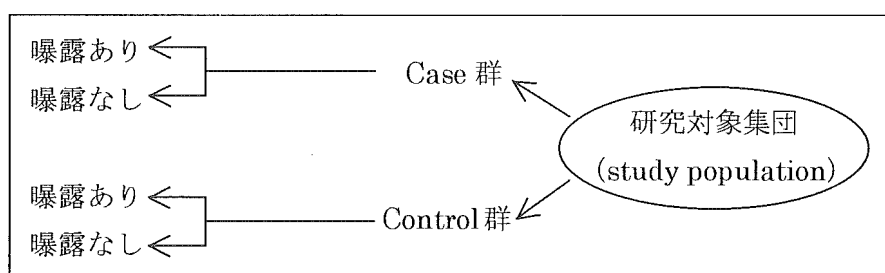
OR とは、「control 群と比較したとき、case 群がある要因に何倍多く曝露されたか」を示す指標であり、ある曝露要因の疾病に対するリスクの指標として用いられる。OR が 1 より大きい値の場合は、その曝露要因が疾病のリスクを上昇させる要因 (つまりリスク要因)

である可能性を示し、逆に OR が 1 より小さい値の場合は、疾病のリスクを低下させる要因 (つまり予防要因) である可能性を示す。なお、OR が 1 の場合は、「その曝露要因は結果と関連がない (つまり、リスク要因であるとも予防要因であるともいえない)」と結論付けられる。

通常、effect measure は単独の調査で得られた点推定値 (point estimation) であり、偶然による値の変動、つまり偶然誤差 (random error) の存在の可能性を常に伴う。random error の大きさを考慮する方法として古くから使用されてきたのが統計学的有意性の検定であり、いわゆる「P 値 (P-value)」の算出がこれに相当する。しかし現在では、「effect measure が偶然により得られたものであるかどうか」を判定することよりも、「effect measure の大きさを推定し、その精度を評価すること」に重要性がおかれている。後者のための統計学的手法が「信頼区間 (confidence interval、CI)」を算出することである (区間推定、interval estimation)。

OR などの effect measure を示す際にはその信頼区間と P 値を併記し、effect measure がとりうる大きさの範囲および精度と偶然性についての解釈を行う。信頼区間と P 値の概念は統計学的理論もふまえて説明する必要があるため若干複雑なものとなるが、結果の解釈の際に非常に重要となるので、次項の「補足 1~3」に述べる。

図 1 case-control study の概要



補足 1. P 値 (P-value)

「曝露と結果の間に関連がない」とする仮説を「帰無仮説 (null hypothesis)」というが、P 値は、調査により得られた effect measure と帰無仮説の整合性を統計学的に検定した尺度である。すなわち、P 値が小さいほど帰無仮説に反する論拠 (つまり「曝露と結果の間に関連がある」という論拠) が強固なものとなり、「得られた effect measure が偶然によるものである可能性は低い、すなわち関連は有意なものである」と解釈することができる。

通常、P 値が 0.05 より小さければ「関連は有意である」と解釈され、逆に P 値が 0.05 より大きければ「関連は有意でない」と解釈されることが多い。この「0.05」という値は「有意水準 (significance level)」とよばれ、「 α 」で表示される。有意水準 α は、「帰無仮説が正しい場合、誤ってそれに反してしまう確率」を意味し、 $\alpha=0.05$ (すなわち 5%) の場合はその確率が小さいながらも 5%は存在することを示唆する。なお、有意水準 α は任意に設定される値であり、 $\alpha=0.1$ または $\alpha=0.01$ といった値が採用されることもある。

補足 2. 信頼区間 (confidence interval, CI)

effect measure における random error を考慮するもう一つの方法は、effect measure がとりうる値に対応する P 値を算出することである。この方法により、逆に、P 値が特定の有意水準 α を越えるような effect measure の区間を算出することができる。この区間が信頼区間である。

上記のように、信頼区間の幅は任意に設定した有意水準 α に依存する。 $1-\alpha$ を「信頼度 (confidence level)」といい、通常は%で表示される。 $\alpha=0.05$ の場合、confidence level は 95%となる。いわゆる「95%信頼区間 (95% CI)」とは、95%の confidence level で得ら

れた信頼区間のことである。

95%CI の概念をよりわかりやすくとらえるためには、「同じ調査を 100 回繰り返した場合、得られた 100 回の effect measureのうち 95 回は 95%CI の中に含まれる」と考えればよい。例えば「OR=2.5、95%CI: 1.3-4.8」という結果が得られたとすると、同じ調査を 100 回繰り返した場合、そのうち 95 回の調査で得られる OR は 1.3 から 4.8 の範囲に含まれると考えられる。また、信頼区間の幅は random error の大きさにも依存するため、信頼区間の幅が狭いほど effect measure の random error が少ない、つまり精度が高いと解釈できる。このように信頼区間は、effect measure がとりうる大きさと精度に関する概念を併せ持つ。

補足 3. 信頼区間と P 値の関係、

および P-value function (P 値関数)

信頼区間により有意性の判定を行うことも可能である。補足 2 で述べたように、概念上、95%CI と 5%の有意水準で検定した P 値は完全に対応した関係にある。例えば、OR の 95%CI が 1 (つまり「その曝露要因は結果と関連がない」ことを示す値) を含む場合は、P 値は 0.05 より大となり、得られた OR は「有意ではない」と解釈することができる。逆に OR の 95%CI が 1 を含まない場合は、P 値は 0.05 より小となり、得られた OR は「有意である」と解釈することができる。先ほどの「OR=2.5、95%CI: 1.3-4.8」という結果に関しては、P 値が併記されていなくとも、「曝露により疾病のリスクが 2.5 倍上昇し、かつ有意なものである」との解釈が可能である。

しかし、信頼区間を有意性の検定の代理としてのみとらえると、信頼区間の有用性を損なうばかりか、結果を誤って解釈することにつながりかねない。この概念を明確に表現し

たものが、P-value function (P 値関数) である。(図 2-1)。

P-value function とは、ある effect measure のさまざまな confidence level に対応する信頼限界をプロットすることにより得られる関数であり、信頼区間と P 値の関連をも反映する。P-value function における peak の横軸上の値は effect measure の点推定値を示す。P-value function の幅は点推定値の精度を示し、精度が高くなるほど幅が狭くなる。

P-value function から信頼区間を得るためには、右側の縦軸より任意に confidence level を選択して横軸に平行な直線を引き、P-value function との交点の座標を横軸から読み取ればよい。例えば図 2-1 では、相対危険度 3.1 に対する 95%CI は 0.7-13 となる。

一方、P-value function から P 値を得るためには、ある effect measure に対応する左側の縦軸の値を読み取ればよい。有意性の検定を行う場合は帰無仮説との整合性をみるので、相対危険度 1.0 に対応する P 値を読み取る。図 2-1 では、相対危険度 1.0 に対応する P 値は 0.08 であり、5%の有意水準で「関連は有意でない」と解釈できる。

しかし、図 2-1 からうける印象では、曝露と結果に「関連がない」と結論付けるよりも、「(統計学的検定の結果では有意ではないが) 中等度、もしくは強い関連が示唆される」と結論付ける方が妥当な解釈であろう。信頼区間を有意性の検定の代理としてのみとらえると、後者の解釈を見落とすことになる。

図 2-2 に、2 つの調査で得られた P-value function を示す。(a) の結果では、5%の有意水準で関連は有意であるが、相対危険度の点推定値および 95%CI の上限が 1.0 に非常に近いため、関連は小さいといえる。一方 (b) の結果では、有意には到らないものの関連は大きいと解釈できる。また、(b) では P-value function の幅が広いため、より大規模な調査であれば精度が高くなり、有意な関連が得られた可能性もある。しかし、有意性のみに着目した解釈では (b) の結果は保守的にとらえられてしまう。実際、過去の多くの研究にこのような誤った解釈がみられる。

信頼区間は effect measure がとりうる大きさと精度に関する概念を同時に提供するが、P 値ではこれらの概念は得られない。これが、「信頼区間のほうがより情報量が多い」といわれる理由である。

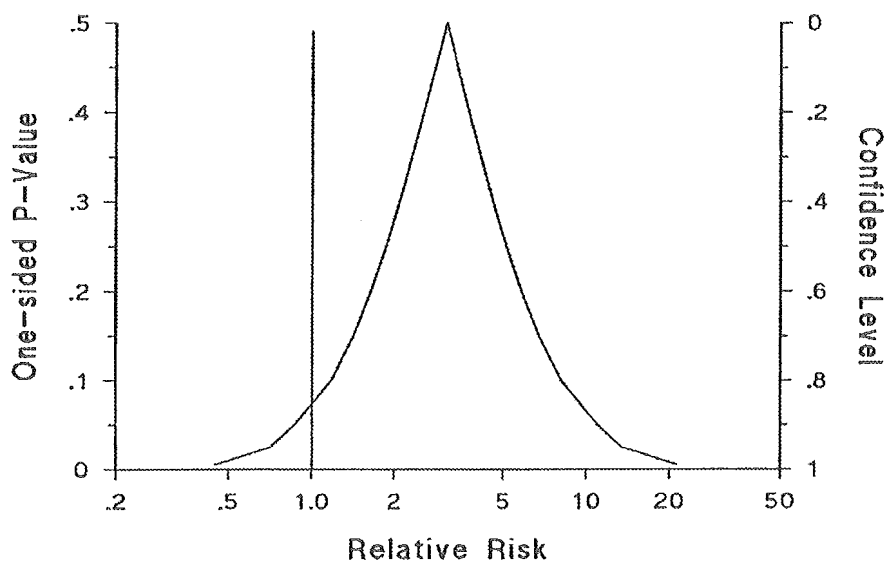


図 2-1 P-value function (仮想データ、相対危険度 3.1)

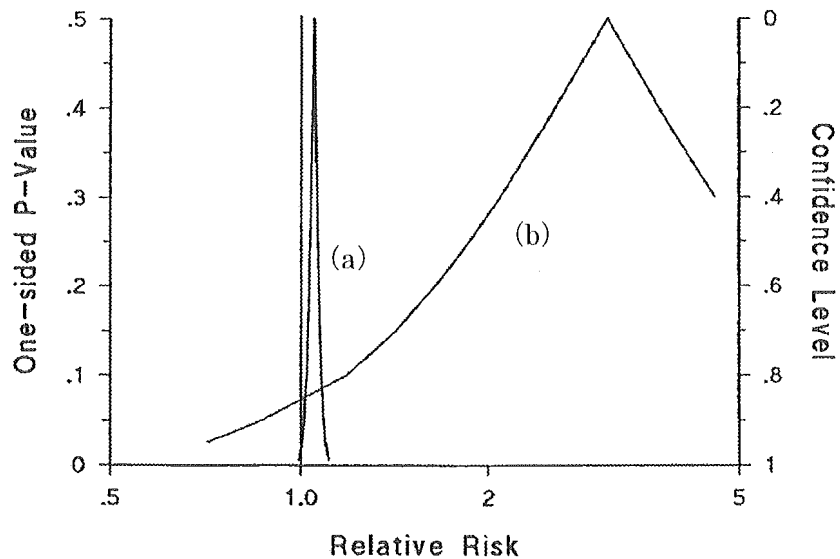


図 2-2 P-value function (仮想データ)
 (a) : 相対危険度 1.05、(b) : 相対危険度 3.1

3. case-control study 実施計画作成の手順

以上の疫学基本事項をふまえ、実際に case-control study を実施する手順を考えてみよう。調査の大きな流れとしては以下のようになる。

- (1) 仮説設定
- (2) 調査デザインの決定
- (3) 調査対象の決定
 - ・ study population (調査対象集団) の定義
 - ・ case の定義
 - ・ control の定義
- (4) 調査方法の決定
- (5) 調査実施
- (6) 解析
- (7) 結果の解釈

実際にこの流れに沿って疫学調査実施計画を作成する際には、得られた結果の妥当性が損なわれないよう、疫学理論の観点から細部にわたり十分な注意を払う必要がある。以下に、調査実施計画作成の際に考慮すべき点を具体的に述べる。

(1) 仮説設定

調査の出発点となる項目である。検証の対象となる仮説を設定し、明確に述べる。設定した仮説が明確でない場合、調査デザインが不十分なものとなり、ひいては結果の解釈にも困難が生じる。

(2) 調査デザインの決定

今回は case-control study デザインを選択するという前提であるが、実際は、(1) で設定した仮説を検証するために最も適切と判断される疫学研究デザインを選択する。

(3) 調査対象の決定

以下、(a)～(c) では調査対象となる study population (調査対象集団)、case、control の定義に関する留意事項を述べる。(d)、(e) では、control の選出方法に関する補足事項について述べる。

(a) study population の定義

仮説に基づいて実際に調査を行う集団または地域を study population という。study

population は、ある特定期間内において、(b) で述べる「case の定義」に該当する“総ての” case を含んでいる集団または地域であることが条件である。

例えば、後述する仮想事例1では、ある町内会で昼食に出された弁当の摂食が O157:H7 感染症集団発生の原因と考えられる事例を想定している。この場合、初期調査の時点で確認された case がいずれも当該町内会に参加した者であるため、「〇月〇日に当該町内会に参加した者」が study population となる。

なお、case が上記のような比較的小規模の集団から発生したことが特定できない場合、例えば大阪市の特定の区や大阪市全域からの発生であるような場合は、「大阪市〇〇区の住民」または「大阪市の住民」が study population となり、調査としてはより大規模なものとなる。このような場合、特定の医療機関の受診者から case と control を選択するといった手法が採用されることもある。この手法では、study population として「当該医療機関の受診者全体」を想定することになり、case-control study の考え方はやや複雑なものとなるので、本稿では説明を省略する。

(b) case の定義

当該調査で case に該当する対象者を選出するために、詳細かつ明確な定義を決定する。実際は、調査により収集された情報から、この定義に沿って対象者が case であるのか control であるのか (case / control status) を決定することになる。case の定義についての留意点を以下に述べる。

- case が「調査対象となる疾病を有していること」が客観的に証明される定義であること
- 「ある特定期間内において、すでに定義した study population から新たに発生し

た case である」ということが明確に述べられていること

case が明確に定義されていない場合、case と control の区別が不明瞭なものとなり、case-control 間の誤分類 (case であるのに control と分類されること、またはその逆) がおこる。このような場合、ある曝露要因に対する OR が得られたとしても、真の OR を過小評価したものとなり、関連を検出し難くなる。

必要であれば case の定義に除外基準をもうけ、調査対象となる疾病と鑑別すべき疾病や、解析に含めることにより結果の解釈が困難となるような疾病を除外する。

(c) control の定義

control についても、case と同様に詳細かつ明確な定義を決定する。以下に留意点を述べる。

- control が「調査対象となる疾病を有していないこと」が客観的に証明される定義であること
- control は、「case が選出された集団 (つまり、すでに定義した study population) から代表性をもって選出されたものである」ということが明確に述べられていること

後者は「study base の原則 (study base principle)」ともいわれ、case-control study を行う際に最も重要となる項目である。study population 以外の集団から control を選出して case-control study を行った場合、選択バイアス (selection bias) という偏りが生じ、調査そのものの妥当性が失われる。selection bias については、「(7) 結果の解釈」の項で詳細に述べる。

(d) control の候補の選出について

後述する仮想事例1のように、study

population が比較的小規模の特定集団である場合は、その集団内の全対象者について調査を行えば、control の定義に該当する対象者を特定することは比較的容易である。

しかし、仮想事例 2 のように、study population が「大阪市〇〇区の住民」または「大阪市の住民」など大規模である場合は、集団内の全対象者について case / control status を調査するのは不可能である。このような場合、study population 内の限定された対象者を選出して control の候補とし、その者に対してのみ case / control status を調査して最終的に control を決定する、という方法がある。以下に、study population から control の候補を選出する方法をいくつか述べる。

① random sampling (無作為抽出)

study population 内の対象者を無作為に抽出する方法である。この方法は、study population 内の全対象者に関する名簿やリストがあらかじめ存在する場合に有効である。例えば、各々の対象者に独自の整理番号を付し、乱数表などを用いて、必要と思われる人数に達するまで対象者の無作為抽出を行う。これにより得られた対象者を control の候補として case / control status を調査し、control を決定する。

なお、あらかじめ全対象者の名簿やリストが存在しない場合は、その作成作業から始めなければならず、膨大な時間と費用がかかるため不適である。また対象者を選出しても、その後調査協力拒否の意向を示す場合なども多く、選択バイアス（「(7) 結果の解釈」の項参照）が生じ、調査そのものの妥当性が失われる危険性がある。

② friend control

case に何人かの友人を指名してもらい、指

名された対象者を control の候補として case / control status を調査し、control を決定する方法である。もちろんこの場合も、その指名された友人は study population 内の対象者の 1 人であることが条件である。

このような対象者は生活習慣を含む多くの点で case と似かよった特性を有する可能性が強いため、あらゆる点で似すぎている危険性がある。つまり、これらを control とした場合、case 群と control 群の間で曝露要因の頻度の差が検出されにくいという可能性がある。

しかし、①とは逆に選出方法が容易であり、かつ調査への協力が得やすいという利点がある。実際に、過去の O157:H7 感染症集団発生リスク要因同定に関する case-control study において、control 候補の選出方法として広く用いられている手法である。

③ relative control および neighborhood control

それぞれ case の親族および隣人から control の候補を選出する方法で、利点および欠点は②に準じる。

(e) matching について

case-control study を実施する場合、matching という手法が行われることがある。

matching とは、交絡要因（つまり曝露以外の要因）に関して case と control を近似させる手法である。しかし、曝露要因とほぼ完全に相関する要因で matching させると、case も control も似かよった曝露状況を有することになり、曝露要因の差を検出できなくなるため注意が必要である。適切な matching を行えば、case 群と control 群の疾病発生状況の違いは、matching させた要因以外の要因に関連して生ずると推測することができる。通常、matching させる要因は、性、年齢、