

120名 (DSPS 82名、N-24 38名)、及び正常コントロール 118名から静脈血を採取し、ゲノムDNAを抽出している。また、季節性感情障害(SAD)患者 22名からも血液サンプルを得ている。

遺伝子多型解析；*Per3* 遺伝子の翻訳領域を含む全 21 エクソン及び *Clock* 遺伝子の全翻訳領域を含む全 20 エクソンについて PCR-SSCP (Single-strand conformation polymorphism) 法によって多型の有無を検索した。*hPer3* 遺伝子については 25 組計 50 本の primer を、*hClock* 遺伝子については 24 組計 48 本の primer を作成し (表 2)、SSCP 法に使用した。その後の解析により、*Clock* 遺伝子解析用 primer pair 18b のうち Forward primer の 3' 末端に相当する Thymine が Cytosine に変化する多型が被験者から見いだされたため、それぞれの多型に相当する primer を作製し、双方を解析に使用した。ゲノム DNA を鋳型に上記 primer を用いて PCR 法を行い、SSCP 法によって多型の有無を検出し、PCR 産物の直接シーケンス法によって多型の位置を確定した。SSCP 法ではグリセロールを含むゲル、含まないゲルの 2 通りで電気泳動を行い、多型の見逃しを最小限にした。また、今年度からより高速・大量に多型解析を進めるため、D-HPLC 法による多型検索も開始した。D-HPLC 法では、homozygote の見逃しを防ぐため、多型を含まないコントロールサンプ

ルを同量加えたもの、加えないものの双方で多型解析を行った

Exon	Forward primer (5'-3')	PCR 産物の長さ
2	ctg tga taa cat ata gta ttt ata gac cat tat tct aat agt gc	251
3	tca ctt tag tat tgc tgt tgc cac ata gct ttt gga aat cat	219
4	aac att gta tta aac tac ttg tg act aat gct ttg aga gtc tgl tc	265
5	gtt gga gta tgc cac taa tat gat att aag tca ccc tgl gat	198
6	ttc tgt cct gca aaa tac ttt agc tct gat tcc tac ccc ttt	272
7	gtc tct tga atc att gaa gtt gca aaa gga tag tgc tac tga	231
8	act ttt atg atc tta ctt tat tca ctg ata ttc aaa cat cta	283
9	ctg tgc tct taa aga cat aga taa tga ctc ata gcc att cca	311
10	gac cat gac tta ttt tta tat aaa tgg gaa cag gtt tca aag tc	283
11	ccc ccc caa agt tta ttt cta ctt agt acc tat cat ttc agg	266
12	gat agc ttt tgg tta aaa aac atc ata gga tgl tac agt aat	270
13	ttg tgt agc aca tag caa ata ttg agt ttc atc ttt tat tgg	267
14	tct ctg aac tga acc aca aga ttg atg aga aat gct gat ata	273
15	cta atg ctc ttc tga ttt tgt tg aga ttt aga tca ttt ttc ccc tc	197
16	atg tat ggg aat gag aat cac gca att tat cat att caa ata	188
17	gtt ata ctg ctt act ttt cat aaa tgt gaa tgg gat gct ttg	286
18a	tta atg ctc att ctt ctt ttc act ctg taa agt ctg ttg ttg	260
18b	act ttc ttc tgg aaa ttc atc act ctc aat act ata ctt tct	300
19a	tgc cac ttc ttt ctc tgl cat ata cta gat gga atc tgg acc	256
19b	atc tct acc cag tca gac aca g caa att att gtt ttc taa tca	231
20a	tta ggt aag tat tta ctc cac gtc tgt gac tgl tgc tgt tgt	228
20b	gtc aac aac ttg tga cca aat atg aaa gta aat gag ttt gaa	291
21	ggg agt aaa gca atg ctg cat tct gag taa ctc tta atg ggc	282
3'-UTR	tcc agc agt ttc atg aga tgc gag gtc att tca tag ctg agc	221

表 2. *Clock* 遺伝子の SSCP 解析に使用した primer の配列

それぞれの exon 番号は、Steeves らの報告 (1999) に基づいた。

領域	核酸配列の変化	アミノ酸配列の変化
Intron 1	128+22(G→A)	none
Exon2	195(C→T)	none
Intron 6	794-20insT	none
Intron 6	794-15(T→G)	none
Intron 7	872+53(T→C)	none
Intron 8	980-16delTTA	none
Exon11	1258(G→A)	V420M
Exon11	1338(T→C)	none
Exon15	1881(G→A)	none
Exon15	1940(T→G)	V647G
Exon17	2259(G→A)	none
Exon17	2415(C→T)	none
Exon17	2484(A→G)	none
Exon17	2590(C→G)	P864A
Exon17	2616(G→A)	none
Exon18	2934(C→T)	none
Exon18	del (3031-3084nt)	del (1011-1028aa)
Exon18	3110(T→C)	M1037T
Exon20	3473(A→G)	H1158R
Intron 20	3549+19(G→A)	none

表 3. ヒト *Per3* 遺伝子の多型

C. 研究結果

Per3 遺伝子からは計 20 個の多型を検出した (表 3)。うち 6 個がミスセンス多型だった。ミスセンス多型の遺伝子上の位置を図 1 に示す。6 個のミスセンス多型について全被験者を対象に解析を行ったところ、うち 5 個は複数の被験者に認められた。その 5 個のミスセンス多型は組み合わせにより、計 4 種類のハプロタイプを形成していた。それぞれのハプロタイプの頻度を調べたところ、H4 ハプロタイプが正常被験者と比較し、

DSPS 群で約 7 倍の頻度で見出された (表 4) ($P=0.0055$, Bonferroni's correction $P=0.033$)。

従って H4 ハプロタイプが DSPS 発症の危険因子になっていると考えられた。H4 ハプロタイプは [G647, P864, 4-repeat, T1037, R1158] の 5 種類のミスセンス多型の組み合わせだが、[G647, R1158] の 2 個は H4 ハプロタイプのみ存在した。各 PER 蛋白サブタイプ、異なる脊椎動物種間で PER 蛋白のアミノ酸配列を比較したところ、V647 はその配列が良く保存されており、その多型である V647G が PER3 蛋白の機能変化をもたらしている可能性が高いと考えられた (図 2)。V647 は Casein Kinase I epsilon (CK I ϵ) 結合部位と推測されていた領域に存在していた。

その後症例数が増加したため、[G647, R1158] 多型について改めて頻度を調べたが、やはり DSPS に高頻度で認められる傾向は変わらず、発症の危険因子となっていることが確認された (表 5)。

更に、日照時間の影響、光照射が有効であることなどから概日リズムの関与が想定されている季節性感情障害 (SAD) を対象に [G647, R1158] 多型の頻度を調べた。まだ症例数は少ないものの、DSPS と同様、同多型の頻度が正常コントロールに比較して高く ($P=0.013$, Bonferroni's correction $P=0.039$)、一部の SAD の発症にも同多型が関与してい

る可能性が示された (表 5)。

hClock 遺伝子についても翻訳領域を含む全エクソンを対象に解析を行い、ミスセンス多型 2 個 (R533Q, H542R) 及びサイレント多型 1 個の計 3 個の多型を

新たに見いだした (図 3)。R533Q 多型はコントロールの 1 人から、H542R 多型は DSPS の 2 人及びコントロールの 2 人から見出されたが、それぞれ頻度が少なく、概日リズム障害との相関は見出され

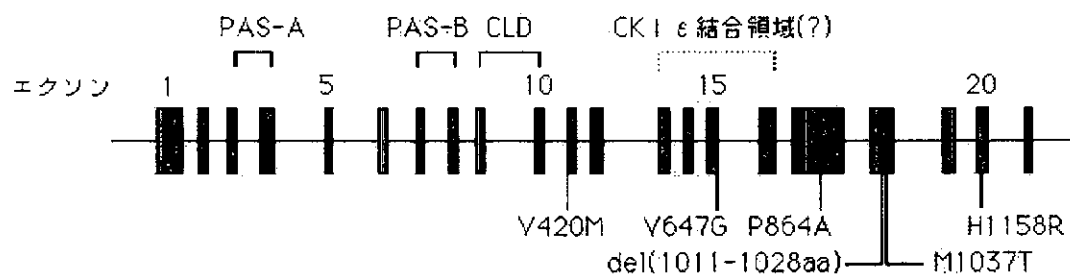


図 1. ヒト *Per3* 遺伝子のゲノム構造及び多型の位置

CLD; cytoplasmic localization domain

ハプロタイプ	保有者の頻度 (%)		
	DSPS	N-24	Controls
H1[V647, P864, 4-repeat, M1037, H1158]	40/ 48 (83.3)	28/30 (93.3)	89/100 (89.0)
H2[V647, P864, 5-repeat, M1037, H1158]	16/48 (33.3)	7/30 (23.3)	34/100 (34.0)
H3[V647, A864, 4-repeat, T1037, H1158]	7/48 (14.6)	10/30 (33.3)	19/100 (19.0)
H4[G647, P864, 4-repeat, T1037, R1158]	7/48 (14.6) *	1/30 (3.3)	2/100 (2.0)

表 4. *Per3* 遺伝子多型保有者の頻度

*P=0.0055, Bonferroni's correction P=0.033.

	保有者の頻度(%)			
	DSPS	N=24	SAD	Controls
[G647.	10/60	2/38 (5.3)	4/21*	3/110 (2.7)

表 5. 疾患群及びコントロール群での *Per3* 遺伝子 [G647, R1158] 多型保有者の頻度

§P=0.0019, Bonferroni's correction P=0.0056.

* P=0.013, Bonferroni's correction P=0.039.

なかった。既に活動パターンの朝型・夜型と相関していると報告されている 3' 非翻訳領域の T3111C 多型についても解析を行ったところ、DSPS では正常コントロール群に比較し頻度が少ない傾向が認められた (表 6) (P= 0.0152.

Bonferroni's correction P= 0.061)。

D. 考察

我々が *Per3* 遺伝子多型を報告したほぼ同時期に、米国から、家族性 ASPS の 1 家系では *Per2* 遺伝子の S662G 変異が原因であるとの報告が出された (Toh et al., 2001)。*Per2* 遺伝子の S662G 変異は CK I ε 結合領域に存在し、S662 が CK I ε によるリン酸化を受けるアミノ酸の一つであることが示された (図 2)。我々の見出した *Per3* 遺伝子の V647G 多型は CK I ε によりリン酸化を受ける Serine の 5 残基 C 末端側に存在した (図 2)。リン酸化を行う酵素は標的アミノ酸のみでなく、その周囲の配列をも認識してリン

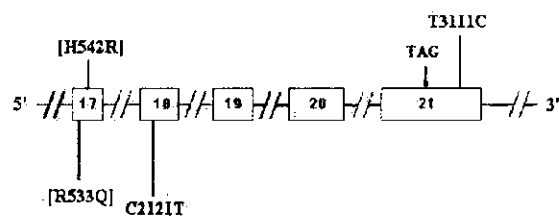


図 2. 脊椎動物の *PER* 蛋白各サブタイプ間でのアミノ酸配列の比較

* ; CK I ε によるリン酸化の標的になると推測されるアミノ酸残基。

矢印は、それぞれ ASPS, DSPS への関与が見出された多型を示す。

		* * * * *
ヒト	PER1	LANKA ESVAUSUTSQC SFSSTIUHUG DKKPP
ヒト	PER2	LPGKA ESVAUSLTSQC SYSSTIUHUG DKKPP
		↓
		G
ヒト	PER3	LSTAM LSLGSGISQC GVSSTIUHUP PPETA
		↓
		G
マウス	PER1	LANKA ESVAUSUTSQC SFSSTIUHUG DKKPP
マウス	PER2	LPGKA ESVAUSLTSQC GVSSTIUHUG DKKPP
マウス	PER3	LSTAR LSVRSGISQC SCSSTSGHAP FLQSE
ラット	PER2	LPGKA ESVAUSLTSQC SYSSTIUHUG DKKPP
ウズラ	PER2	LPGKP ESVAUSLTSQC SYSSTIUHUG DKKPP
ウズラ	PER3	LSNKS PSVAUSATSQC SYSSTIUHUP HPSE
アフリカツメガエル	PER2	LGAKA ESVAUSFTSHC SYSSTIUHUG DKKLP
ゼブラフィッシュ	PER3	LSTER MSVAUSUTSQC SYSSTIUHUP OPSE

図 3. ヒト *Clock* 遺伝子の多型の位置

四角の中の数字は exon 番号を示す

Subject	N	Alleles (%)	
		T	C
DSPS	59	103	15
N-24	37	61	13
Control	109	166	52

表 6. ヒト *Clock* 遺伝子 T3111C 多型の allele 頻度

*P= 0.0152. Bonferroni's correction
P= 0.061.

酸化を行うことが知られており、V647G 多型は CK I ϵ による基質の認識に影響し、PER3 蛋白のリン酸化に変化をもたらすのではないかと推測された。

PER1/2/3 や BMAL1, CRY1/2 などの蛋白は CK I ϵ や CK I δ によってリン酸化を受け、機能変化が生じる。PER3 蛋白の場合、リン酸化を受けると細胞質から細胞核内へと移行しやすくなり、また、蛋白の不安定性が増して分解されやすくなる。PER3 蛋白は細胞質から細胞核内に移行すると、概日リズム形成のフィードバックループで重要な役割を果たす

BMAL1/CLOCK 複合体による転写を阻害することが知られており、核内移行性や安定性の変化により概日リズムの形成・維持に変化を生じる可能性は高い。或いは、PER3 蛋白は、中枢のリズム発振機構が他の遺伝子転写を制御する際の仲介役を果たしているという仮説もあり、生体時計と睡眠・覚醒周期の結合に関与しているのかもしれない。今後、V647G 多型により PER3 蛋白のリン酸化に変化が生じる

か、確認する必要がある。

SAD は日照時間と発症との関係、光照射療法により改善するなど、概日リズムの関与が想定されている疾患だが、DSPS と同様、V647G 多型の頻度が高かったことは、その病態生理に概日リズムが何らかの役割を果たしていることが示唆されており、興味深い。但し、まだ症例数が少ないため、更に多くの症例を対象に調べていく必要がある。

ヒト *Clock* 遺伝子の多型に関しては、既に Katzenberg らが 3' 非翻訳領域の T3111C 多型が活動パターンの朝型・夜型と相関していると報告しているため、我々が独自に見出したミスセンス多型の他、T3111C 多型についても頻度を調べた。T3111C 多型は夜型の活動パターンと相関していると報告されているため、DSPS で頻度が高いと推測されたが、結果は、DSPS 群でむしろ頻度が少ない (P= 0.0152. Bonferroni's correction P= 0.061) 傾向が認められ、逆の結果となった。DSPS では、夜間のメラトニン血中濃度がピークを示す時刻や、深部体温が最低になる時刻など体内時計の位相を表す指標と、朝の覚醒時刻という睡眠覚醒リズムを反映する指標までの時間が延長していると報告されている (Uchiyama et al., 2000)。一方、朝型の活動パターンを示すヒトでも同様の現象が報告されており、朝型のヒトと DSPS 患者の間に共通の生理学的特徴が存在することが示されている。

Clock 遺伝子の T3111C 多型はこのような生理学的特徴を反映しているのかもしれない。

T3111C 多型は 3' 非翻訳領域にあり、アミノ酸配列に変化をもたらさないが、マウスとヒトとでほぼ 100%配列が保存されている領域であり、遺伝子の転写や mRNA の安定性に関与しているのかもしれない。*Clock* 遺伝子内や近傍に真の原因となる多型が別に存在し、T3111C 多型はその多型と連鎖不平衡にある可能性も否定できない。

今後も生体時計関連遺伝子の多型解析、機能解析を続けることで、ヒトの概日リズムの理解が進むのみならず、心筋梗塞など発症時刻に日周リズムを示す疾患の病態についても洞察が得られると期待される。

この研究は多施設共同研究であり、多くの研究者の協力のもとに行われている。以下に参加各施設及び研究者のリストを掲載する。

高橋清久（国立精神神経センター）
 内山真、渋井佳代、金圭子（国立精神神経センター・精神保健研究所精神生理部）
 梶村尚史、加藤昌明、渡辺剛、中島亨、堀達（国立精神神経センター・武蔵病院）
 亀井雄一、工藤吉尚（国立精神神経センター・国府台病院）
 山田尚登、尾関祐二、大川匡子（滋賀医科大学医学部）

三島和夫（秋田大学医学部）

井上雄一（順天堂大学医学部）

尾崎紀夫、北島剛司（藤田保健衛生大学医学部）

南光進一郎（帝京大学医学部精神神経科）

佐々木司（東京大学保健管理センター）

石田直理雄（通産省工業技術院・生命研）

長瀬隆弘、小原収（かずさ DNA 研究所）

長尾真理子（埼玉県立精神保健総合センター）

吉村公雄（国立ガンセンターがん情報研究部）

岩瀬利郎、池田正明、豊嶋良一、野村正彦、山内俊雄（埼玉医科大学医学部）

（順不同）

E. 結論

生体時計関連遺伝子である *hPer3* 遺伝子の [G647, R1158] 多型が DSPS 発症の危険因子であることを見出した。また、SAD の発症にも関わっている可能性がある。*hClock* 遺伝子の T3111C 多型は DSPS 群で保有率が少なく、既に報告されていた活動パターンの朝型・夜型のみでなく、概日リズム障害の発症にも影響を与えていると思われる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Toshio Iwase, Naofumi Kajimura, Makoto Uchiyama, Takashi Ebisawa, Kimio Yoshimura, Yuichi Kamei, Kayo Shibui, Keiko Kim, Yoshinao Kudo, Masaaki Katoh, Tsuyoshi Watanabe, Toru Nakajima, Yuji Ozeki, Mariko Sugishita, Toru Hori, Masaaki Ikeda, Ryoichi Toyoshima, Yuichi Inoue, Naoto Yamada, Kazuo Mishima, Masahiko Nomura, Norio Ozaki, Masako Okawa, Kiyohisa Takahashi, and Toshio Yamauchi. (2002) Mutation screening of the human *Clock* gene in circadian rhythm sleep disorders. *Psychiatry Research*, 109, 121-128.
2. Makoto Uchiyama, Kayo Shibui, Tatsuro Hayakawa, Yuichi Kamei, Takashi Ebisawa, Hirokuni Tagaya, Masako Okawa, and Kiyohisa Takahashi. (2002) Larger phase angle between sleep propensity and melatonin rhythms in sighted humans with non-24-hour sleep-wake syndrome. *Sleep*, 25, 83-88.
3. Hakuei Yamashita, Tetsushi Kazawa, Yukiko Minatogawa, Takashi Ebisawa, and Toshio Yamauchi. (2001) Time course of hepatic cytochrome P450 subfamily induction by chronic carbamazepine administration in rats. *Int J Neuropsychopharmacol.*, in press.
4. Takashi Ebisawa, Makoto Uchiyama,

- Naofumi Kajimura, Kazuo Mishima, Yuichi Kamei, Masaaki Katoh, Tsuyoshi Watanabe, Masanori Sekimoto, Kayo Shibui, Keiko Kim, Yoshinao Kudo, Yuji Ozeki, Mariko Sugishita, Ryoichi Toyoshima, Yuichi Inoue, Naoto Yamada, Takahiro Nagase, Norio Ozaki, Osamu Ohara, Norio Ishida, Masako Okawa, Kiyohisa Takahashi, and Toshio Yamauchi. (2001) Association of structural polymorphisms in the human *period3* gene with delayed sleep phase syndrome. *EMBO Reports*, 2, 342-346.
5. 海老沢尚 (2001) 生体リズム障害と睡眠異常の分子医学、現代医療、Vol.33、No.11、126-131.
 6. 海老澤尚 (2001) 睡眠覚醒リズム障害の遺伝子解析、神経研究の進歩、第45巻、第5号、840-846.
 7. 池田正明、海老澤尚 (2001) 概日リズム障害と時計遺伝子、分子精神医学、Vol.1, No.5, 31-38.

2. 学会発表

1. Takashi Ebisawa (2002.3.15) Human clock gene and circadian disorders, 睡眠に関する国際セミナー、東京 (シンポジスト) .
2. 海老澤尚、三島和夫、佐々木司、内山真、梶村尚史、長尾眞理子、南光進一郎、大川匡子、高橋清久、山内俊雄 (2001年11月14日) 季節性感情障害における

hPer3 遺伝子多型の解析、第 8 回日本時間生物学会、山口。

3. Takashi Ebisawa (2001. 9. 29-10. 1)

Polymorphisms in the human clock-related genes associated with circadian rhythm sleep disorders, International Symposium on Molecular Clock, Kobe-Awaji2001, Awaji (シンポジスト)。

4. Toshio Iwase, Naofumi Kajimura, Makoto Uchiyama, Takashi Ebisawa, Kimio Yoshimura, Yuichi Kamei, Kayo Shibui, Keiko Kim, Yoshinao Kudo, Masaaki Katoh, Tsuyoshi Watanabe, Toru Nakajima, Yuji Ozeki, Mariko Sugishita, Toru Hori, Masaaki Ikeda, Ryoichi Toyoshima, Yuichi Inoue, Naoto Yamada, Kazuo Mishima, Masahiko Nomura, Norio Ozaki, Masako Okawa, Kiyohisa Takahashi, and Toshio Yamauchi (2001. 9. 29-10. 1) Mutation screening of the human *Clock* gene in circadian rhythm sleep disorders, International Symposium on Molecular Clock, Kobe-Awaji2001, Awaji.

5. 海老沢尚、内山真、梶村尚史、三島和夫、亀井雄一、加藤昌明、渡辺剛、関本正規、渋井佳代、金圭子、工藤吉尚、尾関祐二、杉下真理子、豊嶋良一、井上雄一、山田尚登、長瀬隆弘、尾崎紀夫、小原収、石田直理雄、大川匡子、高橋清久、山内俊雄 (2001 年 9 月 27 日) 睡眠

覚醒リズム障害とヒト *period3* 遺伝子多型との相関、第 24 回日本神経科学・第 44 回日本神経化学合同大会、京都。

6. Takashi Ebisawa, Makoto Uchiyama, Naofumi Kajimura, Kazuo Mishima, Yuichi Kamei, Masaaki Katoh, Tsuyoshi Watanabe, Masanori Sekimoto, Kayo Shibui, Keiko Kim, Yoshinao Kudo, Yuji Ozeki, Mariko Sugishita, Ryoichi Toyoshima, Yuichi Inoue, Naoto Yamada, Takahiro Nagase, Norio Ozaki, Osamu Ohara, Norio Ishida, Masako Okawa, Kiyohisa Takahashi, and Toshio Yamauchi (2001 年 8 月 5-10 日)

Association of structural polymorphisms in the human *period3* gene with delayed sleep phase syndrome, Gordon Research Conference : Chronobiology, Rhode Island, USA.

7. 海老沢尚、内山真、梶村尚史、三島和夫、亀井雄一、加藤昌明、渡辺剛、関本正規、渋井佳代、金圭子、工藤吉尚、尾関祐二、杉下真理子、豊嶋良一、井上雄一、山田尚登、長瀬隆弘、尾崎紀夫、小原収、石田直理雄、大川匡子、高橋清久、山内俊雄 (2001 年 6 月 28 日) 睡眠相後退症候群と相関のあるヒト *period3* 遺伝子多型、日本睡眠学会第 26 回定期学術集会、東京。

8. 岩瀬利郎、梶村尚史、内山真、海老沢尚、吉村公雄、亀井雄一、渋井佳代、金圭子、工藤吉尚、加藤昌明、渡辺剛、

関本正規、尾関祐二、杉下真理子、豊嶋良一、井上雄一、山田尚登、三島和夫、尾崎紀夫、大川匡子、高橋清久、山内俊雄 (2001年6月28日) 睡眠覚醒リズム障害におけるヒト *Clock* 遺伝子多型のスクリーニング、日本睡眠学会第26回定期学術集会、東京.

9. 海老沢尚、内山真、梶村尚史、三島和夫、亀井雄一、加藤昌明、渡辺剛、関本正規、渋井佳代、金圭子、工藤吉尚、尾関祐二、杉下真理子、豊嶋良一、井上雄一、山田尚登、長瀬隆弘、尾崎紀夫、小原収、石田直理雄、大川匡子、高橋清久、山内俊雄 (2001年4月12日) 睡眠覚醒リズム障害とヒト *period3* 遺伝子多型との相関、第23回日本生物学的精神医学会、長崎.

10. 山下博栄、加沢鉄士、湊川文子、海老沢尚、山内俊雄 (2001年4月12日) カルバマゼピン長期投与によるチトクローム P450 サブタイプの変化的変化、第23回日本生物学的精神医学会、長崎.

厚生科学研究費補助金（脳科学研究事業）

分担研究報告書

ヒト睡眠・生体リズム障害の病態と治療予防法開発に関する基盤研究

分担研究者 山田尚登 滋賀医科大学精神医学講座 助教授

研究要旨

ヒト生体リズム異常の病態解明及び新たな治療法を開発するために、概日リズム睡眠障害における光同調機構について検討を加えた。まず、概日リズム睡眠障害の患者で、メラトニンの抑制率を指標として光に対する反応性を検討した。また、高齢者において見られる生体リズム異常の病態を検討するために、高齢者においてもメラトニン抑制率を指標として光に対する反応性を検討した。その結果、概日リズム睡眠障害では光に対する過感受性が認められた。高齢者においても光に対する感受性は低下しておらず、高齢者において認められる生体リズムの振幅の低下は視交差上核からの出力系以降の問題であることが推定された。また、日中の光が夜間の睡眠に如何に影響を与えるかを観察し、日中の高照度照射は日中の活動量には影響を与えないが、夜間の活動量を有意に減少させることを示した。更に、概日リズム睡眠障害患者において時間遺伝子の一つである hper 遺伝子の検討を行い、いくつかの変異を発見した。患者と正常被験者間で変異の割合に有意な差は見られなかったが、この変異は一般人においてクロノタイプ（朝方・夕方指向性）と関連していることを明らかにした。更に、睡眠関連物質として近年注目を集めているオレキシンの血液中濃度の概日リズムを一般人において調べ、血液中オレキシンが概日リズムを示すことを示した。

A. 研究目的

ヒトにおける生体リズム異常に関連する疾患の病態解明及び新たな治療法を開発するために、①概日リズム睡眠障害及び高齢者における光同調機構について検討した。また、日中の光が夜

間の睡眠に与える影響に関しても調べた。更に、②概日リズム睡眠障害患者において時間遺伝子 hper 遺伝子異常の検討を行った。また、③睡眠関連物質として近年注目を集めているオレキシンの血液中濃度の概日リズム変化を一

一般人において調べた。

①光同調機構に関する検討では、

- 1 光照射が生体におよぼす影響、
 - 2 光によるメラトニンの抑制を指標にした概日リズム睡眠障害における光感受性、
 - 3 光によるメラトニンの抑制を指標とした加齢に伴う光感受性の変化、
 - 4 日中の光が夜間の睡眠に与える影響、
- の4点について調べた。

②概日リズム睡眠障害における時間遺伝子の検討では、

- 5 概日リズム睡眠障害におけるhper遺伝子異常を調べ、一般人におけるクロノタイプとの関連性を調べた。

③オレキシンの概日リズムの検討では、

- 6 健常被験者の血液中オレキシンの概日リズムを調べた。

① 光同調機構光の検討

1 光照射が生体におよぼす影響

光照射が生体におよぼす影響には、メラトニン分泌抑制作用とメラトニン分泌リズムの位相への影響がある。1980年、Lewyらは2500ルクスの高照度光暴露が生体においてメラトニン分泌を抑制することを初めて報告した。また、1988年のBrainardらや1996年のMcIntyerらは、低照度でもメラトニンの産成を抑制し、かつ、分泌が抑制さ

れる量は照度に依存していると報告した。一方、光照射が生体の体温変化に与える影響については、1993年にMyersらによる異なる照度間で有意な差は認めないという報告や、Foretらによる1000ルクスの高照度においては体温を上昇させるとの報告等、未だ一致した見解を得るには至っていない。

我々は健常者に対して異なる照度の光を照射し、光の照度とメラトニン分泌の抑制率との関連を検討した。更に、光照射によるメラトニンの変化と深部体温の変化との関連を検討した。

2 概日リズム睡眠障害における光感受性

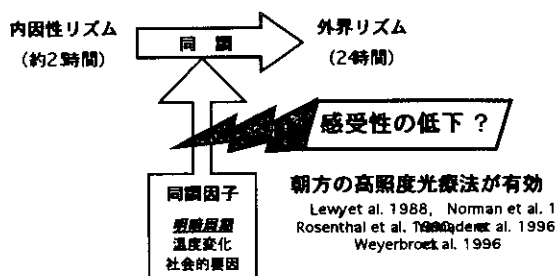
この障害は、患者の睡眠覚醒リズムと社会的な望ましい睡眠覚醒リズムとの間のずれによって引き起こされる睡眠障害の一群と定義されている。代表的な疾患として睡眠相後退症候群（Delayed Sleep Phase Syndrome, DSPS）がある。本疾患は、外界の24時間周期への同調がうまく行われず、睡眠相が望ましい時刻から遅れて固定した状態が慢性的に続き、睡眠相を前進させることが困難になり引き起こされる。睡眠の長さや構造は健常者とはあまり変わらない。患者は勤務・登校などのスケジュールに同調するために無理に起床するために、結果として慢性的な睡眠時間の短縮を招き過度の眠気・頭重感・食思不振・易疲労感・集

中困難などを呈する。遅刻といった社会的な不適応によって二次的に抑うつ気分・自信喪失・意欲低下に至ることも多い。通常ヒトは、生体時計を明暗、温度、心理社会的な要因などの様々な同調因子によって、24時間より長い内因性の周期を外界の24時間周期に同調させている。DSPSは外界の明暗周期への同調がうまく行われなために生じており、その原因として外界の同調因子に対する感受性の低下が推定されてきた(図1)。

一方、同調因子の一つである高照度光は、その照射時刻に応じて生体時計の位相を前進させたり後退させたりする作用を有するが、高照度光療法の治療有効性は DSPS 患者でも同調因子を強めることにより外的環境に同調させ得ることを示している。しかし、これまで DSPS において同調因子に対する感受性の低下を実際に調べた報告はない。

そこで、DSPS 患者において同調因子の一つである光に対するメラトニンの分泌抑制を指標として、同調因子に対する感受性を調べた。

図1



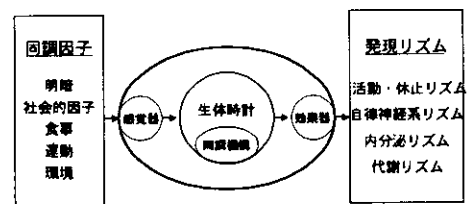
3 メラトニンを指標とした加齢に伴う光感

受性の変化

加齢により睡眠やその他の生体リズムの変化が起こる。具体的なものには、

- 1) 睡眠障害
- 2) 体温リズムの変化
- 3) ホルモンリズムの変化がある。

図2



その原因として睡眠・覚醒中枢の器質の変化に加えて、睡眠・覚醒リズムの振幅減少および位相前進が認められることから概日リズム機構(図2)の機能変化が関与している可能性が示唆されている。しかし、これまで外界からの同調因子である光に対する感受性の加齢変化については検討されたことがない。そこで、光照射に対するメラトニンの分泌抑制を指標として、健常人において加齢による光感受性に関して若年者と比較検討を行った。

4 日中の光が夜間の睡眠に与える影響について

日中の光は、覚醒度を上げることが知られている。本研究では、夜間の睡眠を改善するために日中の光暴露が有効ではないかと考えて、午前中に高照

度光を暴露し、夜間の活動量を測定した。

②概日リズム睡眠障害における時間遺伝子

5 概日リズム睡眠障害における hper 遺伝子

睡眠覚醒リズムをはじめとして、全ての生体機能は内因性のサーカディアンリズムを示す。近年、このサーカディアンリズムの産生に関与する生物時計の分子機構が次第に明らかにされ、ショウジョウバエの時計遺伝子である *period* の人ホモログ *hper* が同定された。睡眠障害のなかでサーカディアンリズムの障害がその病因に深く関与すると考えられる疾患に概日リズム睡眠障害（睡眠相前進症候群、睡眠相後退症候群、非24時間睡眠覚醒障害）がある。今回我々は、概日リズム睡眠障害の患者において *hper* の遺伝子配列を検討し、更に、多型と睡眠習慣の関連を健常被験者において調べてみた。

③血液中オレキシンの概日リズム

6 血液中オレキシンの概日リズムの検討

睡眠関連物質であるオレキシンの概日リズムの検討を行った。これまでオレキシンの薬理作用として摂食行動の賦活、常同行動の顕在化、血中コルチコステロンの増加などの他に覚醒レベ

ルの上昇が報告されている。また、ナルコレプシー関連物質として注目されている。しかし、睡眠・覚醒リズムに対する影響やオレキシン自体の分泌リズムについては報告例が少ない。そこで、われわれは正常被験者における血中オレキシンの経時的变化を明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

①光同調機構

1 光照射が生体におよぼす影響

対象は滋賀県内在住の健常男子 5 名・年齢は 27 歳から 40 歳・平均年齢は 33.6 歳±6.6 歳であった。

19 時に夕食を摂取させ、これ以後、安静を保ち、20 時に直腸温測定用のプローブを挿入した。21 時より 5 時間、10 ルクス以下の条件下で睡眠をとり、翌朝午前 2 時に起床させ、2 時間光を照射した。照度は 500, 1000, 2500, 5000 ルクスの 4 段階で、1 人当たり 4 回、各照度実験の間少なくとも 1 週間以上間隔をあけて行った。照射終了後、午前 4 時から 2 時間、50 ルクス以下の暗条件にし、午前 6 時に測定を終了した。実験中は常に室温を 25 度に保ち、被験者は午前 2 時以降の覚醒時間中はソファーに座らせ、常に座位を保持させた。メラトニン測定のため唾液を 30 分間隔で採取し、採取後は直ちに遠心分離し、測定まで -80 度で保存した。測定はブルマン社製のラジオイムノア

ッセイ・キットを用いて測定した。直腸温は、1分間隔で測定した。

(倫理面への配慮)

実験前に、実験の内容・目的・方法などについて説明し、文書による同意を得た。

2 概日リズム睡眠障害における光感受性

対象は、滋賀医科大学医学部附属病院精神科神経科を受診し、睡眠障害国際分類に基づいて診断された DSPPS 患者 15 名 (女性 4 名・男性 11 名) および、性別・年齢を一致させた正常被検者 15 名である。

実験は 2 つのセッションにより構成されており、第 1 セッション (各被験者における頂点位相の時刻の検索) と第 2 セッション (光によるメラトニン分泌の抑制) は、2 週間の間隔をあけて行った。

第 1 セッション: 被検者によって生体時計の位相が異なるので、各被験者に同じサーカディアン時刻に光を照射するため、各被験者のメラトニンリズムの頂点時刻を求めた。特に、DSPPS 患者のメラトニンリズムの位相は健常者に比較して大きく後退しているため、この時刻を予め調整する必要があった。21:00 より翌朝 06:00 までの 10 ルクス以下の条件下で睡眠をとらせ、その間 60 分間隔で血液採取を行った。ラジオイムノアッセイによりメラトニンの測

定を行い、メラトニンリズムの頂点時刻を求めた。

第 2 セッション: 第 1 セッションで得られたメラトニン頂点時刻の 2 時間前から頂点時刻に至る 2 時間の間 1000 lux の光を照射し、この間メラトニン測定のための唾液を 30 分間隔で採取した。第 1 セッションと異なり、唾液を用いたのは被検者の侵襲を軽減するためであり、唾液中メラトニンの値が血清中メラトニンの値を十分反映していることは既に確認されていた。

メラトニンの基礎値の個人差が大きいため、光によるメラトニンの抑制の比較は測定開始時点の値を基準にして、その後の低下を百分率に換算した値を用いた。

(倫理面への配慮)

すべての被検者に対して研究の趣旨について十分に説明し、研究に対する同意を得た後に研究を開始した。本研究は滋賀医科大学倫理委員会の審査承認を得ている。

3 メラトニンを指標とした加齢に伴う光感受性の変化

健常男性被検者 16 名 (若年者群・高齢者群それぞれ 8 名ずつ) を対象とした。若年者群の平均年齢は 25.0 歳 (SD=2.67)、高齢者群の平均年齢は 65.0 歳 (SD=2.56)。すべての被検者は精神疾患および眼科疾患の合併がないことを実験前に確認している。方法は前項 2

と同様なプロトコールを用いた。

(倫理面への配慮)

すべての被検者に対して研究の趣旨について十分に説明し、研究に対する同意を得た後に研究を開始した。本研究は滋賀医科大学倫理委員会の審査承認を得ている。

4 日中の光が夜間の睡眠に及ぼす影響

滋賀医科大学附属病院精神科神経科入院中の躁うつ病の患者12名に午前9時から12時まで4000ルクスの高照度光を1週間照射し、アクチワッチにてその期間の活動量を測定した。実験はクロスオーバーにて行われた。

(倫理面への配慮)

すべての被検者に対して研究の趣旨について十分に説明し、研究に対する同意を得た後に研究を開始した。本研究は滋賀医科大学倫理委員会の審査承認を得ている。

②概日リズム睡眠障害における時間遺伝子

5 概日リズム睡眠障害におけるhper遺伝子

10名の概日リズム睡眠障害患者より末梢血の採血を行い、PBMCs (peripheral blood mononuclear cells) を収集した。mRNAを抽出しRT-PCR方を用いてcDNAを作成し、hper1遺伝子を増幅した。cDNAの翻訳領域の遺伝子配列を調べ、これまで報告されている配列 (rigui) と比

較した結果、5個所の変異を検出した。

その中で、アミノ酸の置換を伴う個所が存在したため、次に12名の睡眠相後退症候群患者及び5名の非24時間睡眠覚醒障害患者及び20名の健常被験者に対してアミノ酸置換が見られた部位に関してのみ遺伝子配列を解析した。また、20名の健常被験者に対して、19項目のHorne-Ostberg朝方夕方尺度を施行した。

(倫理面への配慮)

すべての被検者に対して研究の趣旨について十分に説明し、研究に対する同意を得た後に研究を開始した。本研究は滋賀医科大学倫理委員会の審査承認を得ている。

③血液中オレキシンの概日リズム

6 血液中オレキシンの概日リズムの検討

同意の得られた7名の健康被験者においてLD条件下(12:12)に隔離し、3時間ごとに24時間、7ml採血し、オレキシンの血中濃度の概日リズムを検討した。採取された検体はRIAを用いて測定した。統計検定にはone-way ANOVAを用いた。

(倫理面への配慮)

すべての被検者に対して研究の趣旨について十分に説明し、研究に対する同意を得た後に研究を開始した。本研究は滋賀医科大学倫理委員会の審査承認を得ている。

認を得ている。

C. 研究結果

①光同調機構

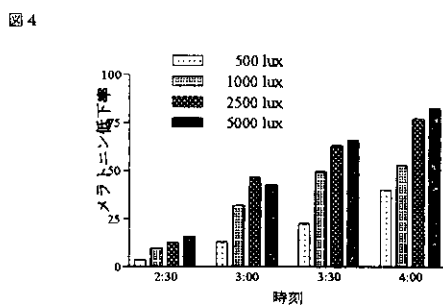
1 光照射が生体におよぼす影響

結果を図4に示す。照度別に5人の被検者のメラトニン濃度平均をグラフに表している。経過時間を横軸にし、メラトニンの値は個人差があるため、測定開始時点つまり午前2時の値をゼロとして、その後の低下を百分率で縦軸に表示している。低下率の算出式は図3に示している。

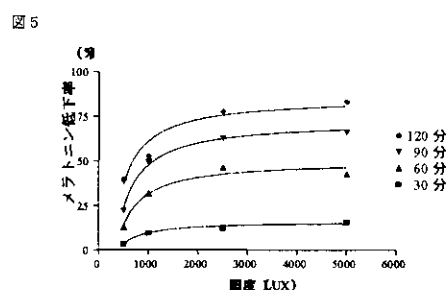
図3

$$\frac{\text{午前2時のメラトニン値} - \text{各時刻のメラトニン値}}{\text{午前2時のメラトニン値}} \times 100 \quad (\%)$$

メラトニン濃度を従属変数、照度または、経過時間を独立変数として、それぞれ、一元配置分析を行った。まず、照度との関係について、時間の経過と共に有意な低下は認められた。また、経過時間について、2:00および3:00時には、有意な低下は認めなかったが、3:30および4:00において有意な低下を認めた。



この結果を基にし、各時間帯における低下率を縦軸、照度を横軸にし、更にそれらの近似曲線を描くと図5となる。



それぞれの近似曲線の式から(表1)、メラトニン抑制するための最低照度は、30分・60分・90分・120分照射でそれぞれ393ルクス・366ルクス・339ルクス・285ルクスとなった。

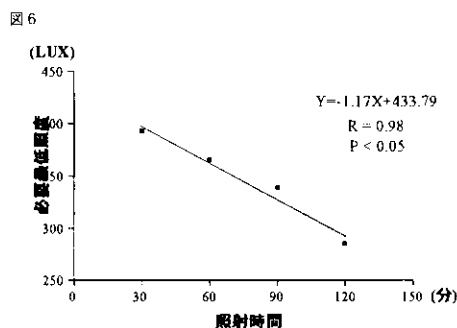
つまり、照射時間が60分の場合366ルクス、同様に120分の場合285ルクス以上あればメラトニンが低下すると推測される。逆に、これ以上低い照度では抑制はされないと予測される。

表1

照射時間	近似曲線式	B1	B0	r	P	最低照度
30分	Y=B1/X+B0	-6334	16.11	0.988	<.05	393 lux
60分	Y=B1/X+B0	-18310	50.03	0.981	<.05	366 lux
90分	Y=B1/X+B0	-24580	72.45	0.998	<.05	339 lux
120分	Y=B1/X+B0	-24400	85.53	0.965	<.05	285 lux

これらの数字を用いて横軸に照射時間、縦軸に予測される必要最低照度としたグラフを図6に示す。図のように

唾液中のメラトニン濃度を抑制する為に必要と予測される最低照度は、その照射時間によって異なるということが明らかとなった。



次に深部体温との関係について表2に示す。統計解析の結果、照度と体温変化・照射時間と体温変化との間には有意な関係は認められなかった。また、全ての照度において、唾液中メラトニン濃度と体温変化との間において有意な関係は認められなかった。

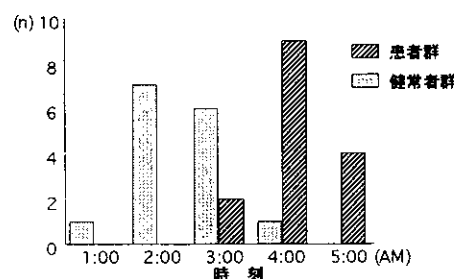
表2

光照射による深部体温への影響	
照度	F=0.292, df= 2, P=0.747 (NS)
照射時間	F=0.845, df= 8, P=0.565 (NS)
交互作用	F=0.146, df=16, P=1.000 (NS)
(ANOVA)	
メラトニンと深部体温との相関関係	
500lux	R=-0.715, P=0.175
1000lux	R=-0.275, P=0.654
2500lux	R=-0.393, P=0.513
(ピアソンの相関係数)	

2 概日リズム睡眠障害における光感受性

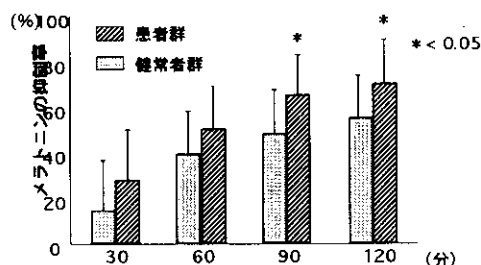
セッション1 (図7) :メラトニンの最高値時刻は健常者群に比較して患者群の方が有意に後退していることが示された(患者群 4.1±0.6 時、健常者群 2.5±0.8 時、P<0.001)。

図7 夜間メラトニンの最高値時刻



セッション2 (図8) :各被験者で光によるメラトニン分泌抑制を repeated measures ANOVA により解析した結果、患者群・正常被検者群共に光照射により唾液中メラトニン濃度は低下し、その抑制率は時間の経過と共に増加した (F=98.4, df=4, P<0.001)。更に、光による唾液中メラトニン濃度の抑制率は患者群の方で有意に高かった (F=5.8, df=1, P<0.05)。

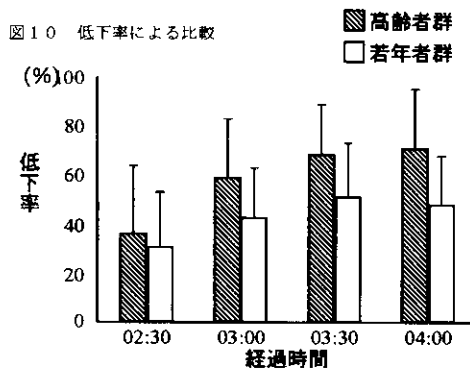
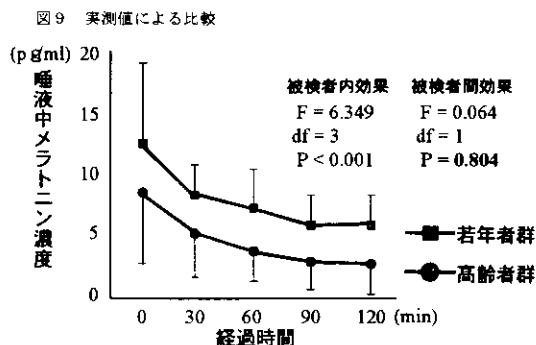
図8 メラトニンの光による抑制率



3 メラトニンを指標とした加齢に伴う光感受性の変化

1000 ルクスの光照射によって唾液中メラトニン濃度は若年者群・高齢者群共に有意に低下し (F=18.17, df=4, P<0.001)、照射2時間ではじめの値から若年者群で 48.2%、高齢者群で 70.7%の低下となった。唾液中メラトニン濃

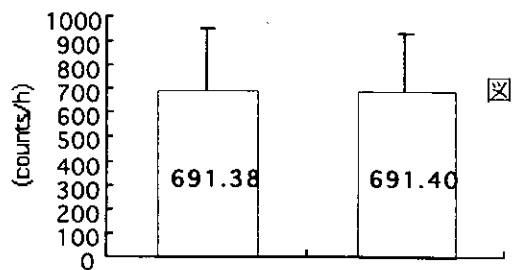
度の低下率は、若年者群に比べて高齢者群の方で有意に高かった (F=4.67, df=1, P<0.05)。



4 日中の光が夜間の睡眠に及ぼす影響

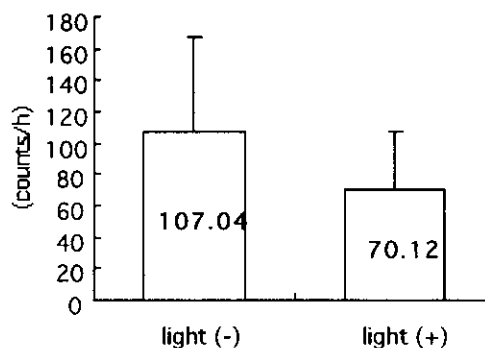
4500ルクスの高照度を1週間午前中に照射した場合と、照射しなかった場合で日中の活動量に優位な差は認められなかった(図11)。一方、日中の光照射は夜間の活動量を有意に減少させることが示された (t = 3.36, P < .01)(図12)。

図11：光照射群 light (+) と非照射群 light (-) の日中の活動量の違い



12：光照 light (-) light (+) 射群

light (+) と非照射群 light (-) の夜間の活動量の違い



②概日リズム睡眠障害における時間遺伝子

5 概日リズム睡眠障害における hper 遺伝子

5 個所の変異を検出した (a826a/c a1828g t2434t/c g2548g/a c3071c/g)。アミノ酸の置換を伴う個所 (c3071c/g, Pro→Ala) が存在したため、次に DSPS 患者及び N24 患者及び健常被験者に対してアミノ酸置換が見られた部位に関してのみ遺伝子配列を解析した。各々の変異の出現頻度に差はなかった。しかしながら、Horne-Ostberg の朝方・夜型尺度を一般被験者に行い hper 変異との関連を検討した結果、この置換が夕方傾向と有意な関連があることが認められた (F = 5.41, df=1, p < 0.05)。

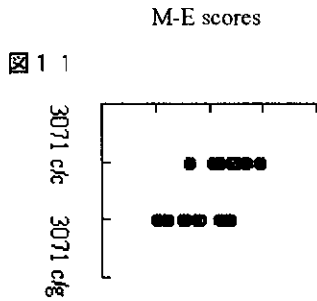


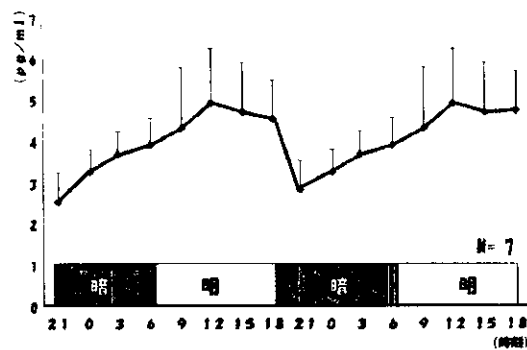
図 11

③血液中オレキシンの概日リズム

6 血液中オレキシンの概日リズムの検討

7名の健常被験者（年齢 24±2.4 歳）のオレキシンの血中濃度には日内変動があり、その値は正午に最高値を示し、21時に最低値を示した（図 13）。

図 13：血液中オレキシン濃度の概日リズム



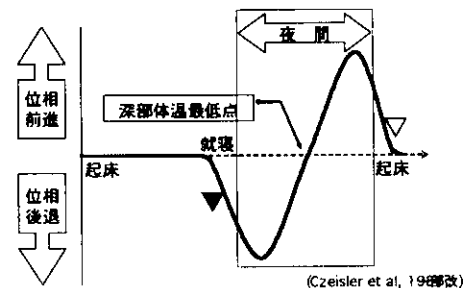
D. 考察

この研究によって唾液中のメラトニン濃度の抑制率は照度依存的に、また、照射時間依存的に抑制されることが確認された。次に唾液中メラトニン濃度を抑制する為に必要な最低照度は、その照射時間によって異なるということが確認された。一方、深部体温の変化には、照度の相違および時間因子との間には明らかな関連は認められなかつ

た。すなわち、体温の変化はメラトニンのみではなく、別の要因も関与しているということが示唆された。

現在、ヒトの睡眠相と光との関係において位相反応曲線が提唱されている。これによると深部体温の最低点を中心として、その前後で光を浴びることによる位相反応が異なるとされている。図 12 に示したように、体温最低点より朝方に光を浴びると位相は前進し、逆に体温最低点より前に光を浴びると位相が後退すると言われている。これまで DSPS の病因として、DSPS 患者では生体時計の位相前進部分（図 1 4 中▽）に異常があり、光などの同調因子に対する感受性が低下しているのではないかと考えられてきた。

図 14 光による位相反応曲線模式図



本研究の結果、光に対するメラトニンの抑制は、健常群と比較して DSPS 患者群の方がむしろ高く、これまでの推測とは逆の結果となった。即ち、DSPS において光に対する過感受性が示唆された。更に、これらに結果から DSPS 患者に見られる睡眠相の後退は、夕方の光による位相の後退が関与している（図 1 4 中▼）のではないかとの可能性が

示唆された。

高齢者群で若年者に比べてメラトニン抑制率がむしろ高かったことから、高齢者における睡眠・覚醒リズムの異常が同調因子の一つである光に対する感受性における低下に由来するものではないことを示している。メラトニン抑制率はむしろ亢進しており、加齢に伴い見られる位相の前進や振幅の低下は時計機構そのものの或いは発現機構の障害によるものと考えられる。

日中の光暴露が日中の活動量を変化させずに、夜間の活動量を変化させたことは、日中の光暴露により夜間の睡眠状態が改善されたことを意味している。

時間遺伝子に関しては、我々が見つけた変異以外にもこれまでに clock の変異が報告されており、これも睡眠習慣と関連性があることが認められている。

オレキシンは睡眠関連物質であり、近年ではナルコレプシーとの関連が注目されている。このオレキシンの血液中濃度に日内変動が見られたことは、今後この測定が睡眠あるいは概日リズム睡眠障害の新たなマーカーとして期待できるかもしれない。

E. 結論

今回の結果から、光環境の調整を行うことで生体リズム異常に基づく睡眠

障害の治療が行えることが明らかになった。更に、朝方夜型に関連する遺伝子が存在する可能性が明らかにされた。

F. 健康危険情報

夕方の光は、あまり浴びない方が入眠に良い可能性が示された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 濱名 優、山田尚登：看護のための最新医学講座 第12巻 第4章 精神疾患をどう理解するか 睡眠と生体リズムの障害 中山書店 pp339-350, 2002
- 2) 山田尚登、青木治亮：うつ病と睡眠障害 一般医のための睡眠臨床ガイドブック (菱川泰夫 監修) 医学書院 pp134-143, 2001
- 3) 山田尚登：睡眠障害の診断・治療 Q&A (株) 診療新社 pp145-159, 2002
- 4) Harusuke Aoki, Yuji Ozeki, Naoto Yamada: Hypersensitivity of Melatonin Suppression in Response to Light in Patients with Delayed Sleep Phase Syndrome. Chronobiology International, 18(2), 263-271, 2001
- 5) Naoto Yamada: Mood disorder and biological rhythm. Recent