

**Table 2. DBH Genotype and Allele Frequencies in Hypertensive and Normotensive Subjects**

Genotype and allele	Genotype frequency		<i>p</i> value	OR	95% CI
	Normotensive	Hypertensive			
DBH genotypes					
CC (%)	378 (69.1)	184 (66.9)	0.52*	0.90*	0.66–1.23*
CT (%)	153 (28.0)	86 (31.3)			
TT (%)	16 (2.9)	5 (1.8)			
DBH alleles					
C (%)	907 (83.1)	454 (82.5)	0.78	0.96	0.73–1.26
T (%)	185 (16.9)	96 (17.5)			

\**p* value, OR and 95% CI are for CC vs. CT+TT. DBH, dopamine- $\beta$ -hydroxylase; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

**Table 3. Logistic Regression Model of FPG in the Association with Hypertension According to DBH Genotype**

Genotype	Coefficient	Constant	<i>p</i> value for regression	OR	95% CI	<i>p</i> value for interaction
CC	3.12	-15.14	$5.4 \times 10^{-6}$	22.59	5.90–86.55	0.0086
CT+TT	0.20	-1.53	0.82	1.22	0.22–6.78	

DBH, dopamine- $\beta$ -hydroxylase; FPG, fasting plasma glucose; OR, odds ratio; CI, confidence interval.

## Results

### Association of DBH -1021C/T Polymorphism with Hypertension

A total of 822 Japanese individuals from the Hyogo region were categorized as hypertensive or normotensive and genotyped for the DBH -1021C/T polymorphism (Tables 1 and 2). The relative frequencies of the CC, CT and TT genotypes were 68%, 29% and 3%, respectively. The allele frequencies were 83% and 17% for the C and T alleles, respectively. These results are consistent with the Hardy-Weinberg equilibrium ( $p > 0.25$ ). Because of the relatively small number of subjects with the TT genotype, we analyzed differences between subjects with the CC genotype and those with the CT and TT genotypes. Statistical analysis failed to show a significant difference in the frequencies of the alleles ( $p = 0.52$ ) and genotypes ( $p = 0.78$  for CC vs. CT+TT) between the hypertensive and normotensive subjects (Table 2).

### Interaction of DBH -1021C/T Polymorphism with FBS in the Association with Hypertension

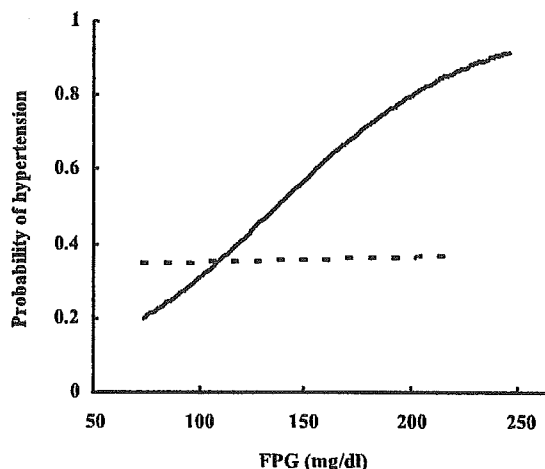
We next analyzed possible interactions of the DBH -1021C/T polymorphism with confounding factors in the association with hypertension in logistic regression models, because the development of hypertension is attributable at least partly to gene-environmental interactions. The DBH -1021C/T polymorphism did not interact with sex, age, body mass index (BMI), plasma total cholesterol, high density lipoprotein (HDL)-cholesterol, or TG. In contrast, the DBH -1021C/T

polymorphism significantly interacted with FPG ( $p = 0.0086$ ) (Table 3). The interaction was significant even after adjustment for sex and age ( $p = 0.014$ ), and for sex, age, BMI, plasma total cholesterol, HDL-cholesterol, and TG ( $p = 0.031$ ). Subjects with the CC genotype showed a steeper increase in probability of hypertension with FPG than those with the CT and TT genotypes (Fig. 1).

Because the distribution of logarithmically transformed FPG was still slightly skewed, we also examined this interaction using stratification of FPG by quartiles (first quartile <94 mg/dl, second quartile 94 to 99 mg/dl, third quartile 100 to 106 mg/dl, and fourth quartile >106 mg/dl). Consequently, the *p* value for the interaction was 0.014. The *p* value was 0.019 after adjustment for sex and age, and 0.037 after adjustment for sex, age, BMI, plasma total cholesterol, HDL-cholesterol, and TG. Moreover, stratified analyses showed that subjects with the CT and TT genotypes had a significantly higher probability of hypertension than those with the CC genotype in the first quartile (FPG <94 mg/dl) ( $p = 0.0056$ ; OR=2.58, 95% CI=1.32–5.05, where OR indicates odds ratio and 95% CI indicates 95% confidence interval).

### Interaction of DBH -1021C/T Polymorphism with FBS in the Association with Blood Pressure

We next analyzed possible interactions of the DBH -1021C/T polymorphism with FPG in the association with blood pressure in general linear models. Analysis only of subjects not on current antihypertensive treatment showed that the DBH -1021C/T polymorphism significantly interacted with FPG ( $p = 0.045$ ) in the association with DBP (Table 4). The *p* value was 0.056 after adjustment for sex and age, and 0.055 after



**Fig. 1.** Genotype-specific regression slopes of hypertension on FPG. The simple line indicates the CC genotype; the dotted line indicates the CT and TT genotypes. The regression between FPG and the probability of having hypertension in subjects with the CC genotype was represented by the equation:  $y = \exp(0.02241x - 3.028) / \{1 + \exp(0.02241x - 3.028)\}$ . The equation was:  $y = \exp(0.00064x - 0.685) / \{1 + \exp(0.00064x - 0.685)\}$ ; in subjects with the CT and TT genotypes. Subjects with the CC genotype showed a steeper slope than those with the CT and TT genotypes ( $p = 0.0086$ ).

adjustment for sex, age, BMI, plasma total cholesterol, HDL-cholesterol, and TG. Subjects with the CC genotype showed a steeper increase in blood pressure levels with FPG than those with the CT and TT genotypes (Fig. 2b). A similar trend of interaction was shown in the association with SBP ( $p = 0.057$ ) (Table 4 and Fig. 2a). The  $p$  value was 0.092 after adjustment for sex and age, and 0.087 after adjustment for sex, age, BMI, plasma total cholesterol, HDL-cholesterol, and TG.

Analyses of the interaction using stratification of FPG by quartiles (first quartile <94 mg/dl, second quartile 94 to 98 mg/dl, third quartile 99 to 106 mg/dl, and fourth quartile >106 mg/dl) showed that the  $p$  value for the interaction was 0.089 for SBP and 0.025 for DBP. The  $p$  value was 0.091 for SBP and 0.033 for DBP after adjustment for sex and age. The  $p$  value was 0.10 for SBP and 0.035 for DBP after adjustment for sex, age, BMI, plasma total cholesterol, HDL-cholesterol, and TG.

## Discussion

The present study provided evidence for the interaction between the DBH -1021C/T polymorphism and FPG in the association with hypertension in a large Japanese population. There was also a marginally significant trend suggesting the presence of an interaction between the DBH -1021C/T polymorphism and FPG in the association with blood pressure. This lack of significance was possibly due to the unstable

nature of blood pressure (19). In addition, the inclusion or exclusion of subjects who were receiving antihypertensive treatment influenced the distribution of blood pressure, and blood pressure readings before the start of antihypertensive medication were not available for 118 hypertensive subjects in our population.

In theory, the DBH -1021C/T polymorphism might be associated with hypertension, because this polymorphism is associated with plasma DBH activity (17, 18) and plasma DBH activity is associated with hypertension (11, 12). However, in practice, the present study failed to show a significant association between the DBH -1021C/T polymorphism and hypertension. This failure was possibly due to the interaction between the DBH -1021C/T polymorphism and FPG in the association with hypertension. However, evidence for this possibility is insufficient, because data on plasma DBH activity were not available in our population. In addition, the previous reports showing that the DBH -1021C/T polymorphism is associated with plasma DBH activity did not analyze the interaction between the DBH -1021C/T polymorphism and FPG in the association with plasma DBH activity (17, 18).

Supporting the interaction between the DBH gene and FPG, there is biological evidence showing that glucose and other sugars induce an increase of DBH (24). Indeed, rats with experimental diabetes have increased plasma DBH activity (25). Thus, the most important physiological influence on plasma DBH activity is considered to be the plasma glucose level (26). In addition, DBH-containing neurons in the hindbrain that innervate the hypothalamus have been implicated in the feeding response to glucose deprivation (27). In humans, the difference in sympathetic response to glucose ingestion related to family history of hypertension suggests the existence of genetic factors influencing the sympathetic response to glucose ingestion (28). The DBH gene may be one such genetic factor.

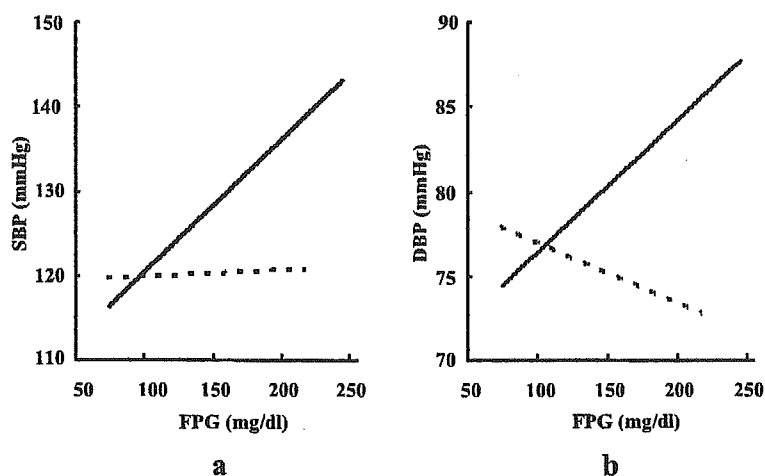
The precise mechanism of the interaction between the DBH -1021C/T polymorphism and FPG in the association with hypertension remains elusive; a simple explanation may be that the CC genotype or a genotype in linkage disequilibrium with it might produce a controlled amount of DBH in association with the plasma glucose level, leading to increased blood pressure. In contrast, the CT and TT genotypes or genotypes in linkage disequilibrium with them might produce a constant amount of DBH irrespective of the plasma glucose level, leading to relatively stable blood pressure. This explanation may be in line with the observation in a previous study that all 19 chimpanzees were homozygous for the C allele (29).

Alternatively, depending on the genotype, glucose level could influence plasma insulin level, which in turn could influence blood pressure. However, the previous observation that insulin administration lowered plasma glucose level, but not plasma DBH activity, challenges this possibility (24). Moreover, in humans, activation of the sympathetic nervous

**Table 4. General Linear Model for Regression of FPG in the Association with Blood Pressure According to DBH Genotype**

BP	Genotype (n)	Coefficient	Constant	p value for regression	Determination coefficient	p value for interaction
SBP	CC (562)	12.1	23.5	0.00016	0.035	0.057
	CT+TT (260)	2.9	106.7	0.75	0.00056	
DBP	CC (562)	11.8	22.1	0.0034	0.021	0.045
	CT+TT (260)	-3.1	91.0	0.65	0.0011	

FPG, fasting plasma glucose; DBH, dopamine- $\beta$ -hydroxylase; BP, blood pressure; SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure.



**Fig. 2.** Genotypic variations in the relationship between FPG and blood pressure. *a:* The simple line indicates the CC genotype; the dotted line indicates the CT and TT genotypes. The regression between FPG and SBP in subjects with the CC genotype was represented by the equation:  $y = 0.1558x + 104.71$ . The equation was:  $y = 0.0071x + 119.15$ ; in subjects with the CT and TT genotypes. Subjects with the CC genotype showed a steeper slope than those with the CT and TT genotypes ( $p = 0.057$ ). *b:* The simple line indicates the CC genotype; the dotted line indicates the CT and TT genotypes. The regression between FPG and DBP in subjects with the CC genotype was represented by the equation:  $y = 0.16x - 4.53$ . The equation was:  $y = 0.22x - 6.10$ ; in subjects with the CT and TT genotypes. Subjects with the CC genotype showed a steeper slope than those with the CT and TT genotypes ( $p = 0.045$ ).

system is related to plasma glucose level but not hyperinsulinemia or insulin hypersecretion in essential hypertension (30). However, because the etiology of hypertension, the effects of glucose, and the regulation of the sympathetic nervous system are all complicated, the above explanation remains completely speculative. Epidemiological studies in large populations with information on plasma DBH activity and plasma insulin level as well as biological studies could test this hypothesis.

With respect to the possible functionality of the DBH -1021C/T polymorphism, transient-transfection assays of the reporter gene construct in human neuroblastoma cell lines designed to assess whether this polymorphism directly alters transcriptional activation of the DBH gene have been negative to date (31, 32). In this context, we found that a 19 bp sequence containing the DBH -1021C/T polymorphism (CCCTCAGTCTACTTGYGGG, where Y indicates the C/T

polymorphism) includes two palindromic non-canonical E boxes separated by 5 bps, and closely resembles the glucose response element of the L-type pyruvate kinase gene (33). The DBH -1021C/T polymorphism resides in a critical 6-bp area. This suggests that the DBH -1021C/T polymorphism may alter the responsiveness to glucose, consistent with the interaction between the polymorphism and FPG, although direct molecular evidence is lacking.

In conclusion, the present study revealed a significant interaction between the DBH -1021C/T polymorphism and FPG in the pathogenesis of hypertension in a large Japanese population. This interaction was partly supported by other epidemiological and molecular biological evidence. Despite several limitations of this study, if our findings are confirmed, they could be helpful in conducting further molecular and biological studies on the relationship among glucose metabolism, the sympathetic nervous system, and hypertension.

## References

- Kario K, Hoshida S, Umeda Y, *et al*: Angiotensinogen and angiotensin-converting enzyme genotypes, and day and night blood pressures in elderly Japanese hypertensives. *Hypertens Res* 1999; **22**: 95–103.
- Matsubara M, Sato T, Nishimura T, *et al*: CYP11B2 polymorphisms and home blood pressure in a population-based cohort in Japanese: the Ohasama study. *Hypertens Res* 2004; **27**: 1–6.
- Shioji K, Kokubo Y, Mannami T, *et al*: Association between hypertension and the  $\alpha$ -adducin,  $\beta$ 1-adrenoreceptor, and G-protein  $\beta$ 3 subunit genes in the Japanese population; the Suita study. *Hypertens Res* 2004; **27**: 31–37.
- Yamagishi K, Iso H, Tanigawa T, Cui R, Kudo M, Shimamoto T: High sodium intake strengthens the association between angiotensinogen T174M polymorphism and blood pressure levels among lean men and women: a community-based study. *Hypertens Res* 2004; **27**: 53–60.
- Tanaka C, Kamide K, Takiuchi S, Kawano Y, Miyata T: Evaluation of the Lys198Asn and -134delA genetic polymorphisms of the endothelin-1 gene. *Hypertens Res* 2004; **27**: 367–371.
- Sica DA: The importance of the sympathetic nervous system and systolic hypertension in patients with hypertension: benefits in treating patients with increased cardiovascular risk. *Blood Press Monit* 2000; **5** (Suppl 2): S19–S25.
- Esler M, Rumantir M, Kaye D, Lambert G: The sympathetic neurobiology of essential hypertension: disparate influences of obesity, stress, and noradrenergic transporter dysfunction? *Am J Hypertens* 2001; **14**: 139S–146S.
- Robertson D, Haile V, Perry SE, Robertson RM, Phillips JA 3rd, Biaggioni I: Dopamine beta-hydroxylase deficiency. A genetic disorder of cardiovascular regulation. *Hypertension* 1991; **18**: 1–8.
- Weinshilboum R, Axelrod J: Serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Circ Res* 1971; **28**: 307–315.
- Weinshilboum RM: Serum dopamine-beta-hydroxylase. *Pharmacol Rev* 1978; **30**: 133–166.
- Aoki K, Tazumi K, Takikawa K: Serum dopamine-beta-hydroxylase activity in essential hypertension and in chronic renal failure with hypertension. *Jpn Circ J* 1975; **39**: 1111–1114.
- Iseki F, Kuchii M, Nishio I, Masuyama Y: The evaluation of plasma dopamine beta-hydroxylase activity in essential and secondary hypertension. *Jpn Heart J* 1979; **20**: 307–320.
- Cubeddu LX, Davila J, Zschaek D, Barbella YR, Ordaz P, Dominguez J: Cerebrospinal fluid and plasma dopamine-beta-hydroxylase activity in human hypertension. *Hypertension* 1981; **3**: 448–455.
- Ohlstein EH, Kruse LI, Ezekiel M, *et al*: Cardiovascular effects of a new potent dopamine beta-hydroxylase inhibitor in spontaneously hypertensive rats. *J Pharmacol Exp Ther* 1987; **241**: 554–559.
- Stanley WC, Lee K, Johnson LG, Whiting RL, Eglen RM, Hegde SS: Cardiovascular effects of nepicastat (RS-25560-197), a novel dopamine beta-hydroxylase inhibitor. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998; **31**: 963–970.
- Kobayashi K, Kurosawa Y, Fujita K, Nagatsu T: Human dopamine beta-hydroxylase gene: two mRNA types having different 3'-terminal regions are produced through alternative polyadenylation. *Nucleic Acids Res* 1989; **17**: 1089–1102.
- Zabetian CP, Anderson GM, Buxbaum SG, *et al*: A quantitative-trait analysis of human plasma-dopamine beta-hydroxylase activity: evidence for a major functional polymorphism at the DBH locus. *Am J Hum Genet* 2001; **68**: 515–522.
- Kohnke MD, Zabetian CP, Anderson GM, *et al*: A genotype-controlled analysis of plasma dopamine beta-hydroxylase in healthy and alcoholic subjects: evidence for alcohol-related differences in noradrenergic function. *Biol Psychiatry* 2002; **52**: 1151–1158.
- Jin JJ, Nakura J, Wu Z, *et al*: Association of endothelin-1 gene variant with hypertension. *Hypertension* 2003; **41**: 163–167.
- Holloway JW, Beghe B, Turner S, Hinks LJ, Day IN, Howell WM: Comparison of three methods for single nucleotide polymorphism typing for DNA bank studies: sequence-specific oligonucleotide probe hybridisation, TaqMan liquid phase hybridisation, and microplate array diagonal gel electrophoresis (MADGE). *Hum Mutat* 1999; **14**: 340–347.
- Ishikawa K, Baba S, Katsuya T, *et al*: T+31C polymorphism of angiotensinogen gene and essential hypertension. *Hypertension* 2001; **37**: 281–285.
- Nordfors L, Jansson M, Sandberg G, *et al*: Large-scale genotyping of single nucleotide polymorphisms by Pyrosequencing trade mark and validation against the 5' nuclease (Taqman<sup>®</sup>) assay. *Hum Mutat* 2002; **19**: 395–401.
- de Kok JB, Wiegerinck ET, Giesendorf BA, Swinkels DW: Rapid genotyping of single nucleotide polymorphisms using novel minor groove binding DNA oligonucleotides (MGB probes). *Hum Mutat* 2002; **19**: 554–559.
- Munoz A, Serrano C, Garcia-Estan J, Quesada T, Miras Portugal MT: Effect of diabetic hyperglycemia and other sugars on plasma dopamine-beta-hydroxylase activity. *Diabetes* 1984; **33**: 1127–1132.
- Schmidt RE, Geller DM, Johnson EM Jr: Characterization of increased plasma dopamine-beta-hydroxylase activity in rats with experimental diabetes. *Diabetes* 1981; **30**: 416–423.
- Munoz JA, Garcia-Estan J, Salom MG, Quesada T, Miras Portugal MT: Sympathoadrenal activity and plasma glucose effects on plasma dopamine-beta-hydroxylase levels in rats. *Clin Chim Acta* 1985; **152**: 243–252.
- Ritter S, Bugarith K, Dinh TT: Immunotoxic destruction of distinct catecholamine subgroups produces selective impairment of glucoregulatory responses and neuronal activation. *J Comp Neurol* 2001; **432**: 197–216.
- Masuo K, Mikami H, Ogihara T, Tuck ML: Differences in insulin and sympathetic responses to glucose ingestion due to family history of hypertension. *Am J Hypertens* 1996; **9**: 739–745.
- Healy DG, Abou-Sleiman PM, Ozawa T, *et al*: A functional polymorphism regulating dopamine beta-hydroxylase influences against Parkinson's disease. *Ann Neurol* 2004; **55**: 443–446.
- Sechi LA, Catena C, Zingaro L, De Carli S, Bartoli E: Hypertension and abnormalities of carbohydrate metabolism possible role of the sympathetic nervous system. *Am J Hypertens* 1997; **10**: 678–682.

31. Zabetian CP, Buxbaum SG, Elston RC, *et al*: The structure of linkage disequilibrium at the DBH locus strongly influences the magnitude of association between diallelic markers and plasma dopamine beta-hydroxylase activity. *Am J Hum Genet* 2003; **72**: 1389–1400.
32. Cubells JF, Zabetian CP: Human genetics of plasma dopamine beta-hydroxylase activity: applications to research in psychiatry and neurology. *Psychopharmacology (Berl)* 2004; **174**: 463–476.
33. Vaulont S, Vasseur-Cognet M, Kahn A: Glucose regulation of gene transcription. *J Biol Chem* 2000; **275**: 31555–31558.

## [原著論文]

## 超高齢者用認知機能評価尺度の開発

増井幸恵<sup>\*1</sup>・権藤恭之<sup>\*2</sup>・稲垣宏樹<sup>\*3</sup>・広瀬信義<sup>\*4</sup>

\*1 東京都老人総合研究所福祉と生活ケア研究チーム客員研究員, \*2 東京都老人総合研究所福祉と生活ケア研究チーム

\*3 東京都老人総合研究所自立促進と介護予防研究チーム, \*4 慶應義塾大学医学部内科(老年内科)

## 抄録

超高齢者の認知機能を第三者の観察によって評定する尺度を作成した。対象者は東京23区在住の100歳以上高齢者233人であった。対象者の日常生活の様子をよく知る家族や施設職員によって尺度の評定が行われた。項目反応理論を用いて、19項目の完全版と10項目版の短縮版を構成した。尺度の信頼性は高かった( $\alpha = 0.94, 0.87$ )。MMSEの得点との相関も高く( $r = 0.85, 0.83$ )、妥当性も高いことが示された。また、MMSEでは測定不可能な低いレベルの認知機能をもつ者にも適用できること、視聴覚障害の影響も少ないことが示された。本尺度は応答困難や視聴覚障害で認知テストの実施が困難な超高齢者にも簡便に実施できるため、面接調査のみならず郵送調査や電話調査での活用が期待される。

Key words: 超高齢者, 認知機能, 尺度構成, 項目反応理論

老年精神医学雑誌 16: 837-845, 2005

## 序 論

近年、超高齢者の認知機能に関する研究が報告されるようになってきた。これらの研究はおもに、①超高齢者の認知症の有病率の把握および②超高齢者の全体的な認知能力の把握の2つの面から行われている。前者に関しては医療費や福祉費用の予測に、後者に関しては、超高齢者層の社会的機能や社会的貢献の程度を予測するうえで重要な情報を提供するものである。

たとえば、超高齢者の代表とされる100歳以上高齢者(以下、百寿者)の認知症の有病率に関する研究については、近年では母集団に基づく調査も行われている。デンマークで行われた研究<sup>1)</sup>では51%(207人中105人)が、また、アメリカで行われた研究<sup>15)</sup>では68%(34人中23人)が軽度以上の認知症であることが報告されている。しかし、認知症の判定基準にはCDR (Clinical Dementia

Rating)<sup>16)</sup>やDSM-IVなどの専門家の観察による詳細な臨床診断が用いられるため、より大きなサイズのサンプルを対象とした場合には労力的にも経済的にも非常に大きなコストが必要となる。

一方、知能検査(WAIS)の下位検査や記憶課題、認知症のスクリーニング検査などの認知テストを用いて認知機能を検討する研究も多い。このタイプの研究では、超高齢者の認知機能をより詳細に記述することが可能である。しかし、先行研究で用いられてきたテスト課題は超高齢者に対しては実施困難になることが多い。MMSE (Mini-Mental State Examination)<sup>17)</sup>を用いて百寿者の認知機能を検討した研究<sup>1)</sup>では、全対象者の約65%でいずれかの項目が実施できなかったと報告されている。

本研究の目的は、これまで用いられてきた認知症の臨床診断や認知テストとは異なる他者評定による行動チェックリストを用いた簡便な認知機能の評価尺度を作成することである。より簡便な評価尺度を開発することにより、母集団に基づいた比較的大規模なサンプルに対する調査の実施もよ

(受付日 2005年3月15日)

Yukie Masui, Yasuyuki Gondo, Hiroki Inagaki, Nobuyoshi Hirose

\*1 〒173-0015 東京都板橋区栄町35-2

り容易になると考える。

今回は、虚弱が著しく進行した超高齢者の認知機能の特徴に考慮して尺度構成を行う。まず、超高齢者に多い視力・聴力の低下<sup>4,10)</sup>や四肢の機能不全による影響が減少するよう尺度構成を行う。視聴覚機能の低下についてはMMSEの得点に影響することが報告されている<sup>1,7)</sup>。この問題点については、他者評定を用い、かつ、尺度項目に視聴覚機能の影響が少ないものを採択することにより解決されるであろう。

次に、超高齢者における認知機能の個人差の大きさに対応した評価尺度を構成する。東京在住の百寿者高齢者を対象としてMMSEを実施した研究<sup>6,9)</sup>ではMMSE得点が0点だった者は16.3%と高い割合を示していた。また、得点分布も一様であり、分散が大きいことが示された。このようなMMSEが0点だった対象者がすべての認知能力を消失しているわけではない。ケアのコストを軽減し、対象者のQOLを高めるケアを提供するためにも、対象者の残存機能を詳細に測定するツールが必要である。そのためには、従来の尺度よりも難易度の低い項目を導入し、より低いレベルの認知機能に対しても測定可能な尺度を構成することが求められる。そのため、今回は、きわめて認知機能の低下した状態に対応する項目から高度に認知機能が保たれた状態までに対応する項目まで幅広く取り入れるよう配慮する。

本研究では、項目反応理論を用いて尺度を構成し、その信頼性と妥当性を検討する。尺度の妥当性の検討については、まずMMSEとの併存的妥当性を検討する。次に上記に述べた、①視聴覚障害などの機能的不能によりMMSE完全実施が困難な対象者を適切に評価できるか、②MMSEで測定不能なより低いレベルの認知機能に対しても序列化できるか、について検討する。さらに、本研究では尺度の短縮版も作成する。超高齢者に対する大規模サンプルの調査では、テストの項目数が小さいほうが調査デザインおよび回答者の回答のしやすさの両側面から好ましいと考えるからである。

尺度の開発は項目反応理論 (Item Response Theory) に基づいて行う。項目反応理論は古典的テスト理論と並ぶテスト理論のひとつであり、各テスト項目の難易度や対象者の能力に関するパラメータをモデルとして設定し、実際の反応からこれらのパラメータを推測する。推定されたパラメータは標本の特性に依存しないため、異なる集団にテストを行った場合でも個人の能力値を直接的に比較できる。

また、項目反応理論に基づくテスト構成においては、推定された各テスト項目のパラメータを用いてテスト項目を適宜組み合わせることにより、項目は異なるが難易度の等しいテストや難易度の異なるテストを容易に構成でき、それぞれのテストにより推定された能力値を一次元上で評価することが可能となる。したがって、個人差が大きい超高齢者を対象として認知機能を測定する場合においても、複数の垂直テストを設けることで、少ない項目数で精度の高い評定を行うことが可能となる。本研究ではこれらの点を踏まえ、項目反応理論を用いて尺度を構成することとした。

## I. 研究1：他者評定法による認知機能評価尺度の構成とその信頼性および妥当性の検討

### 1. 方法

#### 1) 対象者

本研究の対象者は、東京百寿者調査<sup>9)</sup>に参加し、その後のフォローアップ調査に協力が得られた超高齢者である。

東京百寿者調査における対象者を説明する。東京百寿者調査は東京都23区に在住の百寿者を対象に行った。2000年9月現在で100歳以上の者、および2000年9月から2002年3月までの期間中に100歳に到達した者を対象とした。まず、東京都23区すべての区を対象地区とし、各区役所で住民基本台帳を閲覧し、97歳以上の登録者を無作為に抽出した。次に、厚生省発刊2000年度および、2001年度全国高齢者名簿と照合したところ、上記期間中に100歳に到達していたと推定さ

れた1,785人中1,194人(66.9%)が抽出された。この全員に調査参加依頼を郵送し、802人から返答があり、うち513人から調査参加の同意を得た(参加率43.0%)。うち209人に対して郵送調査のみを行い、304人には郵送調査後に訪問調査を実施した。

今回の調査対象者は、東京百寿者調査より1年以降に行われた対象者の生存や現在の健康状態の把握を目的とするフォローアップ調査に参加した233人(男性36人、女性197人)であった。平均年齢は102.19歳(SD = 1.59, 範囲: 100 ~ 108歳)であった。このうち60人(男性7人、女性53人)は第1回の東京百寿者調査においてMMSEを実施していた。

## 2) 認知機能評価尺度の項目作成

項目の作成は、東京百寿者調査に参加した心理学者3人が行った。項目は、MMSE、NMスケール(N式老年者用精神状態尺度)<sup>12)</sup>、CDR、GDS(Global Deterioration Scale)<sup>14)</sup>などのおもに高齢者を対象とした認知機能を測定する尺度の項目や判定基準を参考にし、かつ超高齢者の日常生活のなかで観察可能な知的活動を問うものとした。

項目作成においては、現在の視聴覚機能の程度の影響が少ないことを考慮した。また、超高齢者における認知機能の個人差の大きさを考慮し、非常に単純な知的活動(何らかの方法でこちらから働きかければ反応することができる)から、高度に機能が保たれた超高齢者にみられる知的活動(日常的にしている仕事や家事がある)まで、幅広くカバーするように項目を作成した。このように作成された項目のなかから21項目を選定し項目プールとし、今回の尺度(表1)とした。

## 3) 調査手続き

フォローアップ調査は郵送で行った。調査項目は、①この1年で対象者の心身の状態に変化があったか(「はい」「いいえ」の2件法により評定)、②認知機能評価尺度(「はい」「いいえ」の2件法により回答)の2つであった。これらは、対象者の家族や対象者が現在在住している施設の職員など、対象者の現在の状態をよく知る者によって評

定された。評定者の内訳は対象者の家族が199人、対象者が居住する施設職員31人、ヘルパーなど対象者をよく知る非血縁者が3人であった。

項目反応理論に基づく分析では、「はい」を1、「いいえ」を0として分析を行った。分析にはScientific Software International社のBILOG-MG3を用いた。また、尺度の一因子性確認のためのカテゴリカル変数による探索的因子分析はMuthen & Muthen社のMplusを用いた。

## 2. 結果と考察

### 1) 項目分析と一因子性の確認

各項目について通過率および尺度の合計得点との双列相関係数を求めた(表1)。その結果、双列相関係数が低い2項目を項目プールから省いた。

尺度の一因子性を確認するために、残った19項目でカテゴリカル変数を用いた探索的因子分析を行った。第1因子の寄与率は73.3%、第2因子の寄与率は6.4%、第3因子の寄与率は4.2%となり、強い一因子構造が示された。

### 2) 項目母数、被験者母数の推定と認知機能評価尺度の特性

残った19項目に対して項目母数の推定を行った。モデルは2母数ロジスティックモデルを用いた。表1に各項目の識別力と困難度を示す。識別力の平均値は1.95、範囲は1.22 ~ 2.93であり、高い識別力を示していた。また、困難度の平均値は0.005、範囲は-1.36 ~ 1.26であった。困難度指標においては極端な値を示す項目はなかった。

図1、図2に尺度の合計得点と対象者の推定された特性値の分布を示した。尺度の合計得点では横に広い分布を示していたが、推定特性値の分布は正規分布に近い分布であり、特性値の平均は-0.06(分散 = 0.93)であった。しかし、推定特性値の下限および上限で人数が多少増加しており、推定特性値の床打ちおよび天井効果が観察された。

図3は認知機能評価尺度全体のテスト情報曲線である。情報量のピークは推定特性値が0.1であり、ここを頂点としてほぼ左右対称の山型をなしている。これは平均的な能力の対象者を測定する場合に最も測定精度が高くなることを示している。



表1 認知機能評価尺度の項目の通過率、合計得点との双列相関係数、および識別力と困難度

項目	通過率	合計得点との双列相関係数	識別力	困難度
あいさつされると、あいさつを返すことができる	0.88	0.48	2.08	-1.36
喜怒哀楽といった感情の表出がある*	0.78	0.53	1.22	-1.05
他人に感謝やねぎらいのことばをかけることができる*	0.80	0.53	1.54	-1.05
自分の年齢がだいたい正しくわかっている	0.62	0.72	2.41	-0.35
過去の楽しかった思い出話ができる	0.57	0.66	1.55	-0.23
自分の生年月日が正しく言える*	0.57	0.70	1.82	-0.22
過去のつらい思い出話ができる*	0.52	0.66	1.53	-0.08
人前では身なりに気を遣うことができる	0.52	0.70	1.79	-0.07
いまの季節がわかっている*	0.51	0.75	2.47	-0.04
自分のおもな身内の現在の年齢や住んでいる場所がだいたい正しくわかっている	0.45	0.76	2.93	0.10
テレビやラジオのニュースの内容がだいたい理解できる*	0.44	0.71	2.06	0.14
人の相談にのったり、自分の意見を言うことができる	0.39	0.73	2.35	0.27
テレビやラジオのスイッチやチャンネルを自分で操作する	0.39	0.65	1.68	0.28
自分のものを自分なりに整理整頓している*	0.37	0.70	2.12	0.30
数日前の出来事をだいたい憶えている*	0.39	0.65	1.84	0.37
本や雑誌などを読んで、内容を理解できる	0.35	0.70	2.26	0.37
簡単なつり銭の計算といったお金の計算ができる*	0.35	0.67	1.82	0.39
安心して、留守番をまかせることができる	0.16	0.47	1.58	1.07
日常的にしている仕事や家事がある*	0.11	0.42	1.97	1.26
何らかの方法でこちらから働きかければ反応することができる**	0.95	0.18	-	-
異性を意識したようなふるまいをすることがある**	0.24	0.25	-	-

\* 短縮版にも採用された項目 (10項目), \*\* 項目分析により項目プールから省かれた項目 (2項目)

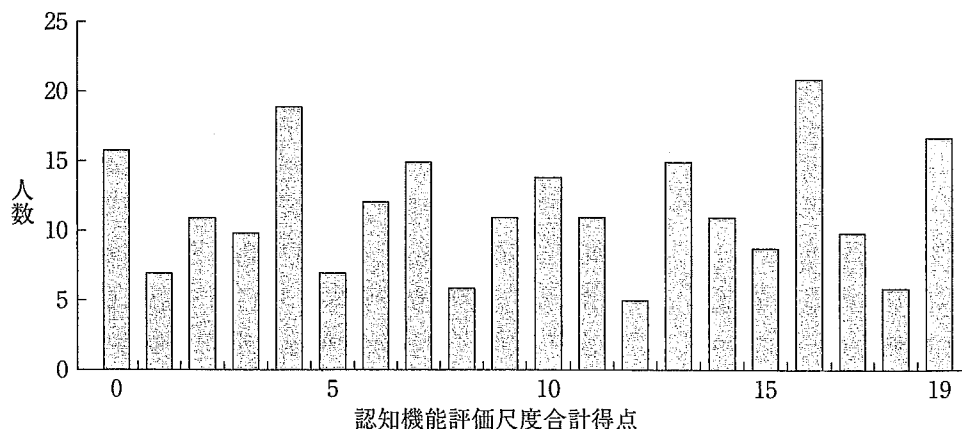


図1 認知機能評価尺度合計得点の分布

### 3) 認知機能評価尺度の信頼性の検討

上記の手続きで構成した認知機能尺度の記述統計量および信頼性係数(クロンバックの $\alpha$ )を表2に示した。信頼性係数は0.94で十分に高いことが示された。

### 4) 認知機能評価尺度の妥当性の検討

次に認知機能評価尺度の妥当性の検討を行った。

第1回の東京百寿者調査においてMMSEを実施しており、かつ、今回のフォローアップ調査において、第1回調査から心身機能に変化がなかったと評定された対象者を抽出した( $n = 60$ )。これらの対象者について第1回調査時のMMSE得点と認知機能評価尺度の合計得点との相関を求めた。MMSE得点と認知機能評価尺度合計得点の間には

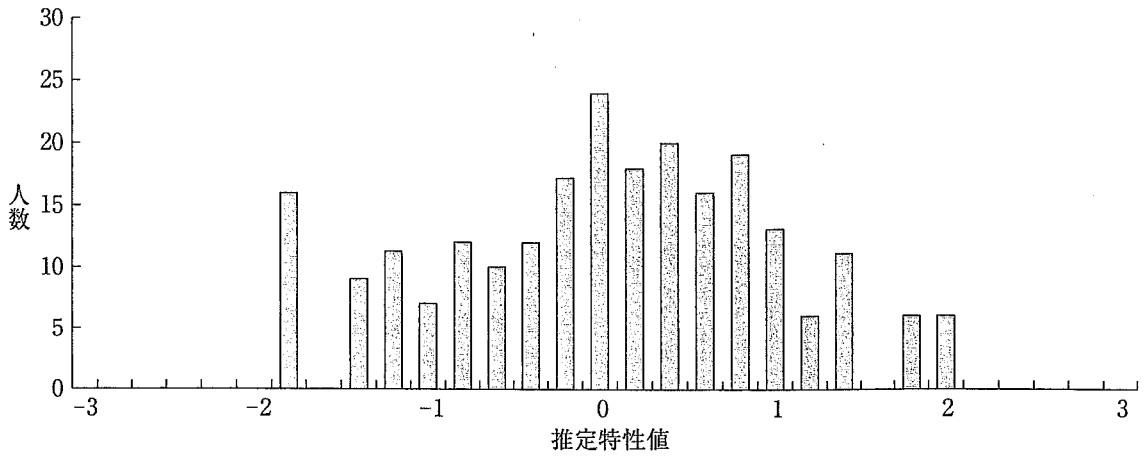


図2 認知機能評価尺度による推定特性値の分布

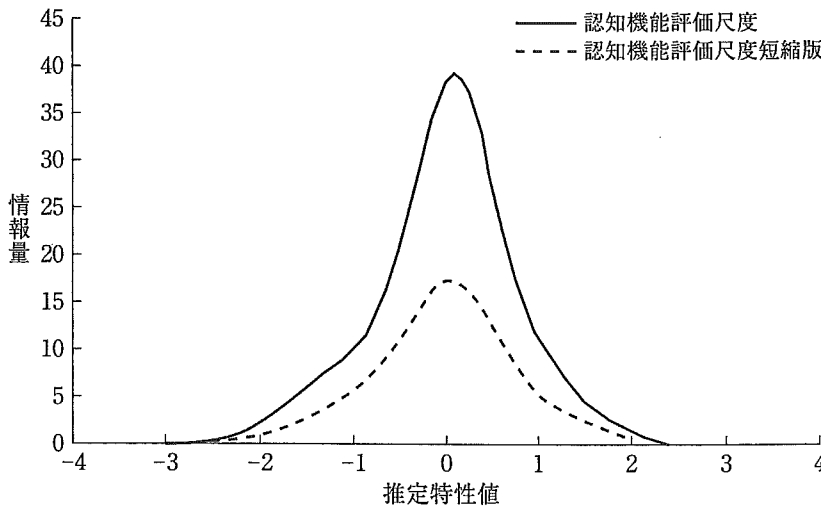


図3 認知機能評価尺度、認知機能評価尺度短縮版のテスト情報曲線

表2 認知機能評価尺度と短縮版の尺度特性

	認知機能評価尺度	短縮版
項目数	19	10
平均尺度得点	9.17	4.87
(SD)	6.04	3.18
クロンバックの $\alpha$	0.94	0.87
識別力平均値	1.95	1.84
(範囲)	1.22~2.93	1.22~2.47
困難度平均値	0.005	0.001
(範囲)	-1.36~1.26	-1.05~1.26
1項目あたりの情報量	2.06	1.72

非常に高い正の相関が示された ( $r = 0.85, p < 0.01$ ). このことは認知機能評価尺度が MMSE との併存的妥当性を有していることを示唆している.

MMSE 得点が 0 点だった者 ( $n = 21$ ) の認知機能

能評価尺度得点の分布を図4に示した. 得点の範囲は 0~14 点であり, 0 点も 3 人いたが, 1~4 点までの間に約 77% の対象者が分布していた. このことは, 本尺度によって MMSE では不可能だった低いレベルの認知機能の序列化が可能であることを示している.

視聴覚の障害や実施中の疲労により MMSE の全項目実施が不可能であった対象者を本尺度で測定した場合の特徴を検討した. 東京百寿者調査では, 上記の理由で MMSE を全項目実施できなかった対象者が 22 人存在した. このうち今回のフォローアップ調査に参加した者は 12 人であり, かつ前回の調査時から心身の状態に変化がなかった者は 7 人 (以下, MMSE 不完答群: 男性 2 人,

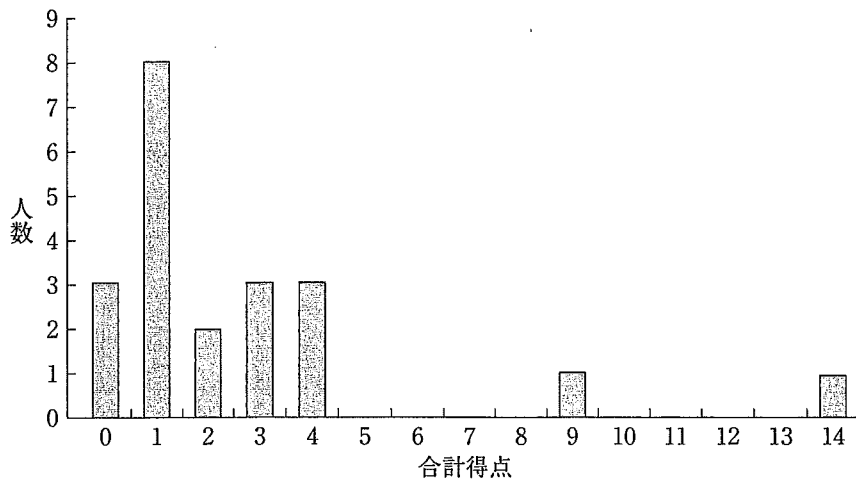


図4 MMSEが0点だった者 (N=21) の認知機能評価尺度合計得点の分布

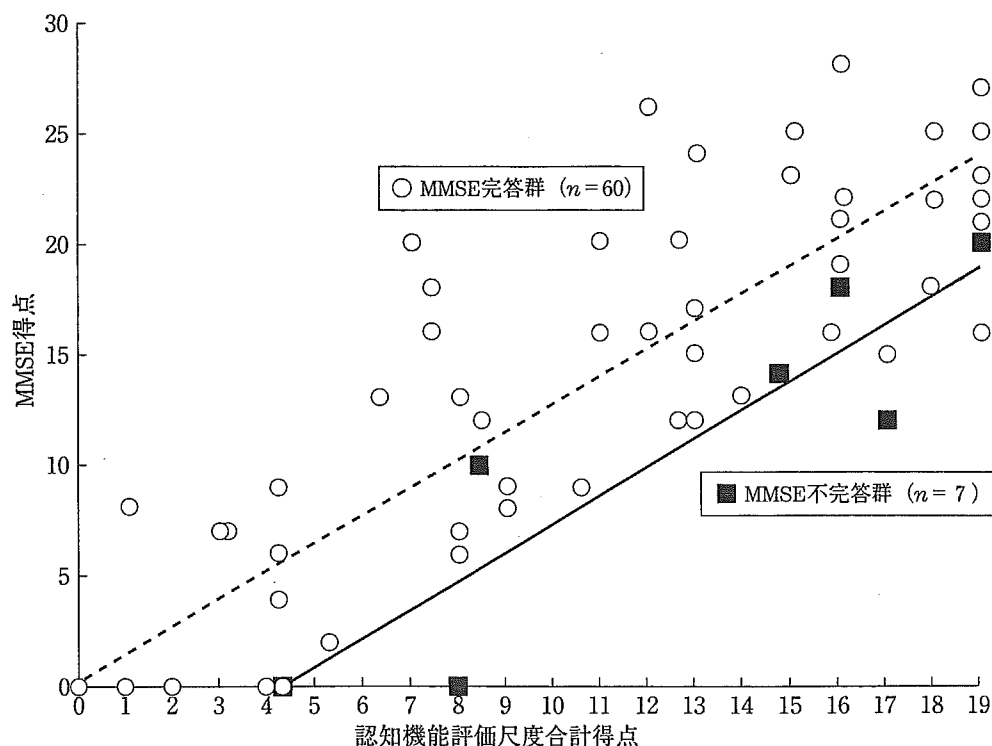


図5 MMSE不完答群の修正したMMSE得点と認知機能評価尺度合計得点の関係

女性5人)であった。

この7人について実施可能であったMMSE項目の合計得点をもとに、完答したと仮定した場合のMMSE得点を算出した(修正MMSE得点=実施可能であったMMSE項目の合計点÷回答項目数×全項目数(30))。この修正MMSE得点と認知機能評価尺度の散布図と回帰直線を図5に示した(図中の■印:n=7)。同じ図上にMMSEを完答できた者(MMSE完答群, 図中○印:n=

60)についても同様に示した。この図より、認知機能評価尺度の得点と同じであっても、MMSE不完答群の修正MMSE得点はMMSE完答群よりも低いことがわかる。つまり、認知機能評価尺度を基準とすると、MMSEはMMSE不完答群の認知機能を過小評価しているといえる。言い換えれば、認知機能評価尺度の利用により、機能的不能でMMSEを完答できない対象者に対してより適切な評価が可能であることを示唆している。

以上の結果から、今回の認知機能評価尺度は、超高齢者の認知機能の測定において、機能的に回答不能などでMMSEの完全実施が不可能な対象者に対しても適切な評定が可能であること、かつ能力の低い対象者についてMMSEよりも詳細な測定が可能である尺度であることが示された。

## II. 研究2：認知機能評価尺度短縮版の作成

### 1. 目的と方法

上記で構成した認知機能評価尺度の項目プールを利用して短縮版を作成する。短縮版においても、難易度と精度を19項目版（以下、完全版）と同程度にするために、困難度と識別力の平均値が完全版に近くなるよう10項目を選定した。

### 2. 結果と考察

表1に選定された10項目を示す。10項目の識別力の平均値は1.84（範囲：1.22～2.47）、困難度の平均値は0.001（範囲：-1.05～1.26）であった。

図3に短縮版のテスト情報曲線を示す。短縮版においても最も情報量が高くなるのは特性値が0.1付近であり、完全版と同じであった。また、推定特性値の-1未満、1以上では標準誤差が大きくなる点も同じであった。一方、情報量ピーク時の1項目あたりの情報量を両者で比較すると、完全版が2.06、短縮版は1.72となり、短縮版のテスト精度はやや劣る結果となった。

完全版と短縮版の合計得点のピアソン相関係数は0.97 ( $p < 0.01$ ,  $n = 233$ )であり、両者の相関はきわめて高いことが示された。

1回目の東京百寿者研究の調査から対象者の認知機能に変化がなかったと評定された対象者 ( $n = 60$ ) について、短縮版の合計得点と1回目調査時のMMSE得点との相関を求めた。その結果、MMSEとの相関は0.83 ( $p < 0.01$ ) とほぼ完全版と同程度の相関が確認された。これらの結果は、認知機能評価尺度短縮版も完全版の認知機能尺度とほぼ同様の特性をもつことを示している。

## III. 全体論議

本研究の目的は、超高齢者の認知機能の一般的なレベルを測定するための尺度を構成することであった。まず、超高齢者に対する面接調査経験が豊富な心理学者が、超高齢者の日常生活場面でよく出現すると考えられる認知的行動、21項目のプールを作成した。これを対象者の家族または居住する施設の職員が評定した。尺度の構成は項目反応理論を用いて行い、最終的に19項目からなる認知機能評価尺度を作成した。

項目反応理論による分析により、本尺度は平均的なレベルの認知機能をもつ対象者の測定において最も精度がよく、本研究の対象者の認知機能のレベルに適した尺度であることが示された。尺度の妥当性に関して、対象者の約1年前のMMSE得点との相関を調べたところ、0.8以上と非常に高いことが示された。このことから、認知機能評価尺度とMMSEの併存的妥当性が確認された。さらに、MMSEでは測定できない低レベルの認知機能をもつ対象者についても序列化できること、視聴覚障害などによりMMSEが完答できなかった対象者の認知機能も適切に測定できることが示された。また、認知機能尺度の短縮版も構成し、完全版よりやや測定精度は低下するものの、ほぼ同様の特性をもつことが示された。

以上の結果は、今回作成した認知機能評価尺度が、心身虚弱によりMMSEなどの認知テストが実施できないことが多い超高齢者の認知機能の高さを適切に測定できることを示唆している。

本尺度は対象者の家族や対象者が居住している施設の職員によって評定されたのにもかかわらず、MMSEと十分に高い相関をもっていた。このことは、郵送調査のように対象者に直接面接できない調査形態であっても、十分な精度と妥当性をもって対象者の認知機能を測定できることを示している。また、近年では、対象者の参加率を高めるために電話調査が用いられることもあるが、この場合調査項目が短く簡便であることが求められる<sup>5)</sup>。今回の10項目の短縮版は非常に短時間で実施可

能であり、特に適していると考えられる。

最後に、本尺度の問題点について考察する。第一に、併存妥当性の検討方法に関する問題である。本研究では、フォローアップ調査において心身状態が前回の調査時と変化がないと評定された対象者に対して、第1回調査時に施行したMMSE得点と現在の認知機能尺度の得点との相関を求めることにより妥当性の検討を行った。つまり、2つの尺度は同時期に測定されたものではない。しかし、36人の百寿者を対象としてMMSEを1.5年間隔で実施した研究<sup>11)</sup>では、ほとんどの被験者でMMSE得点に変動がなかったと報告されている。本研究においても調査の間隔が約1年であることから、心身状態に大きな変化がなかったと評定された対象者についてはMMSEにも変動がないと考えても問題はないと考えられる。

第二に、内容妥当性の問題である。本尺度は認知機能の全般的なレベルを測定することを目的としており一因子構造の尺度である。これは、知能や認知機能の構造については多因子から構成されるという従来の知能理論<sup>2)</sup>とは異なるものである。しかし、超高齢者においては、知能の構造は脱分化の方向性を示し、下位因子に対する一般知能gの影響力が強くなることが示されている<sup>13)</sup>。したがって、本尺度も超高齢者に対する認知機能の評価尺度としては問題がないと考える。

第三は測定範囲の問題である。今回の認知機能評価尺度は超高齢者の認知機能を測定することを目的として作成された。しかし、推定能力値の天井効果が多少あり、高い能力を維持している対象者の測定には難度が不足していることが示唆された。しかし、本尺度は項目反応理論によって構成されているため、より難度の高い項目を作成し、今回の尺度との等化を行うことでより高い能力の対象者にも対応できるようになる。また、この手続きにより、より若い高齢者の認知能力の測定にも利用できる。今後は、高齢者から超高齢者に至るまで1つの次元上で認知能力を測定できる可能性も開かれるであろう。

## 文 献

- 1) Andersen-Ranberg K, Vasegaard L, Jeune B : Dementia is not inevitable ; A population-based study of Danish centenarians. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, **56** (3) : 152-159 (2001).
- 2) Cattell RB : Theory of fluid and crystallized intelligence ; A critical experiment. *J Educ Psychol*, **54** (1) : 1-22 (1963).
- 3) Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR : 'Mini mental state' ; A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res*, **12** (3) : 189-198 (1975).
- 4) 権藤恭之, 広瀬信義, 増井幸恵 : 百寿者研究からわかった長寿者の現状と要因. *日本の科学者*, **39** (2) : 10-15 (2004).
- 5) Herzog AR, Wallace RB : Measures of cognitive functioning in the AHEAD Study. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, **52** : 37-48 (1997).
- 6) 広瀬信義, 権藤恭之, 鈴木 信, 脇田康志ほか : 平成13年度厚生科学研究費補助金(長寿科学総合研究事業)総括・分担研究報告書「百寿者の多面的検討とその国際比較」. 慶應義塾大学医学部老年内科, 東京(2001).
- 7) Holtsberg PA, Poon LW, Noble CA, Martin P : Mini-Mental State Exam status of community-dwelling cognitively intact centenarians. *Int Psychogeriatr*, **7** (3) : 417-427 (1995).
- 8) Hughes CP, Berg L, Danziger WL, Coben LA, et al. : A new clinical scale for the staging of dementia. *Br J Psychiatry*, **140** : 566-572 (1982).
- 9) 稲垣宏樹, 権藤恭之 : 百寿者のバイオメカニズム ; 機能的側面とサクセスフル・エイジング. *バイオメカニズム学会誌*, **27** (1) : 18-22 (2003).
- 10) 健康・体力づくり事業財団 : 「全国100歳老人の1/2サンプルの横断的研究」報告 長寿大国ニッポンにおける百寿者のくらし. 健康・体力づくり事業財団, 東京(2002).
- 11) Kliegel M, Moor C, Rott C : Cognitive status and development in the oldest old ; A longitudinal analysis from the Heidelberg Centenarian Study. *Arch Gerontol Geriatr*, **39** (2) : 143-156 (2004).
- 12) 小林敏子, 播口之朗, 西村 健, 武田雅俊ほか : 行動観察による痴呆患者の精神状態評価尺度(NMスケール)および日常生活動作能力尺度(N-ADL)の作成. *臨床精神医学*, **17** (11) : 1653-1668 (1988).
- 13) Lindenberger U, Baltes PB : Intellectual functioning in old and very old age ; Cross-sectional results from the Berlin Aging Study. *Psychol Aging*,

- 12 (3) : 410-432 (1997).
- 14) Reisberg B, Ferris SH, de Leon MJ, Crook T : The Global Deterioration Scale for assessment of primary degenerative dementia. *Am J Psychiatry*, 139 (9) : 1136-1139 (1982).
- 15) Silver MH, Jilinskaia E, Perls TT : Cognitive functional status of age-confirmed centenarians in a population-based study. *J Gerontol B Psychol Sci Soc Sci*, 56 (3) : 134-140 (2001).

## Development of Oldest-Old version of Cognitive Assessment Questionnaire based on item response theory

Yukie Masui \*<sup>1</sup>, Yasuyuki Gondo \*<sup>2</sup>, Hiroki Inagaki \*<sup>3</sup>, Nobuyoshi Hirose \*<sup>4</sup>

\* 1 *Human Care Research Team, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology*

\* 2 *Human Care Research Team, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology*

\* 3 *Research Team for Promotion Independence of the Elderly, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology*

\* 4 *Department of Geriatric Medicine, Keio University School of Medicine*

We developed a questionnaire to measure the cognitive function of the oldest old. The questionnaire consisted of items designed to clarify the daily activity of the participants, and was distributed to the family members or care staff of 233 centenarians. The 19-item full form scale and the 10-item short form scale were composed on the basis of item response theory (IRT). Both scales were satisfactorily reliable ( $\alpha = 0.94$  and  $0.87$ ) and higher correlations with the MMSE (Mini-Mental State Examination) ( $r = 0.85$  and  $0.83$ ) suggested satisfactory concurrent validity. This questionnaire was able to evaluate the functional level of participants inferior to the lower limit assessable by the MMSE, and in addition was not affected by vision or hearing impairment. These results suggest that the scales are practicable for evaluating the cognitive function of the oldest old regardless of the participants' health, vision, and hearing condition, or the type of participation such as a visit, mail, or phone survey.

**Key words** : oldest old, cognitive function, questionnaire, test validity, item response theory

# Mitochondrial Genome Variation in Eastern Asia and the Peopling of Japan

Masashi Tanaka,<sup>1,15</sup> Vicente M. Cabrera,<sup>2</sup> Ana M. González,<sup>2</sup>  
 José M. Larruga,<sup>2</sup> Takeshi Takeyasu,<sup>1,3</sup> Noriyuki Fuku,<sup>1,4</sup> Li-Jun Guo,<sup>1,3</sup> Raita Hirose,<sup>1</sup>  
 Yasunori Fujita,<sup>1</sup> Miyuki Kurata,<sup>1</sup> Ken-ichi Shinoda,<sup>5</sup> Kazuo Umetsu,<sup>6</sup> Yoshiji Yamada,<sup>7,1</sup>  
 Yoshiharu Oshida,<sup>3</sup> Yuzo Sato,<sup>3</sup> Nobutaka Hattori,<sup>8</sup> Yoshikuni Mizuno,<sup>8</sup>  
 Yasumichi Arai,<sup>10</sup> Nobuyoshi Hirose,<sup>10</sup> Shigeo Ohta,<sup>11</sup> Osamu Ogawa,<sup>9</sup>  
 Yasushi Tanaka,<sup>9</sup> Ryuzo Kawamori,<sup>9</sup> Masayo Shamoto-Nagai,<sup>1,4,12</sup>  
 Wakako Maruyama,<sup>12</sup> Hiroshi Shimokata,<sup>13</sup> Ryota Suzuki,<sup>14</sup>  
 and Hidetoshi Shimodaira<sup>14</sup>

<sup>1</sup>Department of Gene Therapy, Gifu International Institute of Biotechnology, Kakamigahara, Gifu 504-0838, Japan; <sup>2</sup>Department of Genetics, Faculty of Biology, University of La Laguna, Tenerife 38271, Spain; <sup>3</sup>Department of Sports Medicine, Graduate School of Medicine, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan; <sup>4</sup>Japan Science and Technology Agency, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan; <sup>5</sup>Department of Anthropology, National Science Museum, Tokyo 169-0073, Japan; <sup>6</sup>Department of Forensic Medicine, Yamagata University School of Medicine, Yamagata 990-9585, Japan; <sup>7</sup>Department of Human Functional Genomics, Life Science Research Center, Mie University, Tsu-shi, Mie 514-8507, Japan; <sup>8</sup>Department of Neurology and <sup>9</sup>Department of Medicine, Metabolism and Endocrinology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo 113-8421, Japan; <sup>10</sup>Department of Geriatric Medicine, Keio University School of Medicine, Tokyo 160-8582, Japan; <sup>11</sup>Department of Biochemistry and Cell Biology, Institute of Gerontology, Nihon Medical School, Kawasaki 211-8533, Japan; <sup>12</sup>Laboratory of Biochemistry and Metabolism, Department of Basic Gerontology, and <sup>13</sup>Department of Epidemiology, National Institute for Longevity Sciences, Obu 474-8522, Japan; <sup>14</sup>Department of Mathematical and Computing Sciences, Tokyo Institute of Technology, Tokyo 152-8552, Japan

To construct an East Asia mitochondrial DNA (mtDNA) phylogeny, we sequenced the complete mitochondrial genomes of 672 Japanese individuals ([http://www.glib.or.jp/mtsnp/index\\_e.html](http://www.glib.or.jp/mtsnp/index_e.html)). This allowed us to perform a phylogenetic analysis with a pool of 942 Asiatic sequences. New clades and subclades emerged from the Japanese data. On the basis of this unequivocal phylogeny, we classified 4713 Asian partial mitochondrial sequences, with <10% ambiguity. Applying population and phylogeographic methods, we used these sequences to shed light on the controversial issue of the peopling of Japan. Population-based comparisons confirmed that present-day Japanese have their closest genetic affinity to northern Asian populations, especially to Koreans, which finding is congruent with the proposed Continental gene flow to Japan after the Yayoi period. This phylogeographic approach unraveled a high degree of differentiation in Paleolithic Japanese. Ancient southern and northern migrations were detected based on the existence of basic M and N lineages in Ryukyuan and Ainu. Direct connections with Tibet, parallel to those found for the Y-chromosome, were also apparent. Furthermore, the highest diversity found in Japan for some derived clades suggests that Japan could be included in an area of migratory expansion to Continental Asia. All the theories that have been proposed up to now to explain the peopling of Japan seem insufficient to accommodate fully this complex picture.

[Supplemental material is available online at [www.genome.org](http://www.genome.org).]

Recent analysis of global mitochondrial DNA diversity in humans based on complete mtDNA sequences has provided compelling evidence of a human mtDNA origin in Africa (Ingman et al. 2000). Less than 100,000 years ago, at least two mtDNA human lineages began to rapidly spread from Africa to the Old World (Maca-Meyer et al. 2001). The archaeological records attest that humans reached Japan, at the eastern edge of Asia, around

<sup>15</sup>Corresponding author.

E-MAIL [mtanaka@glib.or.jp](mailto:mtanaka@glib.or.jp); FAX 81-583-71-4412.

Article and publication are at <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.2286304>.

30,000 years ago (Glover 1980). At that time, Japan was connected to the Continent by both northern and southern land bridges, enabling two migratory routes. As early as 13,000 years ago, pottery appeared in Japan and Siberia for the first time in the world (Shiraishi 2002). Subsequent technical improvements gave rise to the Japanese Neolithic period known as the Jomon period, in which the population growth was considerable. Later, Continental people arrived in Japan from the Korean peninsula, initiating the Yayoi period, with this migration reaching its maximum at the beginning of the first millennium.

With this archaeological framework in mind, it was of an

thropological interest to us to know whether the modern Japanese are the result of an admixture between the Paleolithic-Neolithic aborigines and more recent immigrant populations, whether the indigenous population gradually evolved to give rise to the modern Japanese, with subsequent colonizations having strong cultural influences but only minor demographic impact, or even whether the late Neolithic waves entirely replaced the indigenous residents. Morphometric data obtained from the remains of Japanese Paleolithic people are more in accordance with a southern origin for these first immigrants. Subsequent morphological studies on modern indigenous (northern Ainu and southern Ryukyans) and mainland Japanese favored an admixture model in which the former would be descendants of the Paleolithic Japanese and the latter derived from the Continental immigrants who gave rise to the Yayoi period (Hanihara 1991). Genetic analysis using classical markers assigned a definitive northern origin to the Upper Paleolithic inhabitants of Japan; but whereas some authors favored a homogeneous background for all modern Japanese (Nei 1995), others claimed that although Upper Paleolithic and Yayoi period immigrants had probably a northern Asian origin, they were genetically differentiated (Omoto and Saitou 1997). The application of molecular markers to define maternal and paternal lineages to the peopling of Japan confirmed the dual admixture model but added some interesting novelties. For example, the study of Y-chromosome markers led to the discovery of remarkable Korean and Tibetan influences on the Japanese population (Hammer and Horai 1995); and mtDNA HVS-I sequences also confirmed the Korean input (Horai et al. 1996) and closer affinities of the Japanese to Tibetans than to southern Asians (Qian et al. 2001). In quantitative estimations of maternal admixture, it was found that ~65% of the mainland Japanese gene pool was derived from Continental gene flow after the Yayoi period. However, the indigenous Ainu from the northern island of Hokkaido and the Ryukyans from southern Okinawa showed <20% Continental specificity, pointing to them as the most probable descendants of the Jomon people. The fact that these indigenous groups were, in turn, genetically well differentiated indicated a notable degree of heterogeneity and/or isolation among the early Japanese immigrants (Horai et al. 1996). However, two handicaps of these studies are the incomplete representation of Asian populations and the relatively small sample size of those analyzed, which weakens the reliance on the relative affinities found by genetic distance methods (Helgason et al. 2001). For mtDNA there are currently enough HVI/HVII data from eastern Asia, including Japan, to test the validity of the above-mentioned results. However, these sequences have been assorted into different clades following different insufficient criteria or even have not been classified at all. Furthermore, the phylogenetic confidence of results based only on sequences from the noncoding region (HVI, HVII) has been recently questioned (Bandelt et al. 2000). This is mainly due to the frequent occurrence of parallel mutations in independent lineages that confuse the correct classification, a source of error that is increased because the basal motif in the noncoding region for the two macrolinesages that expanded throughout Asia is the same (16223). In addition, as the noncoding region has not evolved at a constant rate across all human lineages, it is considered inappropriate to use this region for dating evolutionary events (Ingman et al. 2000; Finnilä et al. 2001).

To make reliable use of this important source of available data on the mtDNA noncoding region to contrast the maternal structure and to determine the most probable origin of the modern Japanese, we have undertaken the following approach: First, we used a set of complete mtDNA sequences of 672 Japanese individuals to create a phylogenetic network (Bandelt et al. 1999) that related them to other complete sequences, already pub-

lished, belonging to the major haplogroups proposed by others (Torroni et al. 1992, 1996; Macaulay et al. 1999; Yao et al. 2002a). Discriminative positions in the noncoding region, defining additional Asian subhaplogroups, were then used to further classify 766 previously published Japanese partial sequences. For this purpose we also included other unambiguously assorted sequence data reported by other research groups (Derbeneva et al. 2002b; Yao et al. 2002a). These HVI sequences thus pooled were then compared with other published Asian sequences. Finally, using all of these classified sequences, we tested the relative affinities of modern Japanese and Continental Asians using global distance methods and phylogeographic approaches framed at different age levels.

## RESULTS

### Eastern Asia Phylogeny Based on Complete mtDNA Sequences

The phylogenetic network constructed with the complete mtDNA sequences fully coincides with those previously published at worldwide (Maca-Meyer et al. 2001; Herrnstadt et al. 2002) or regional scale (Kong et al. 2003). Moreover, their main branches are well supported by high bootstrap values on a neighbor-joining tree (Supplemental material, condensed by more than 40% bootstrap values).

From the L3 African trunk, two early branches came out of Africa and radiated extensively, originating superhaplogroups M and N, which were defined by the basic mutations depicted in Figures 1A and 2, respectively. Representatives of both superhaplogroups reached Japan. The construction of these phylogenetic trees by using our Japanese complete sequences and other published Asian sequences (Table 1) resulted in a better definition of the known haplogroups and in the identification of new clades at different phylogenetic levels. Characteristic HVI motifs and diagnostic RFLPs in the coding region, and coalescence ages for these haplogroups and subhaplogroups are given in Supplemental Tables A and B. To contribute to the unification of the mitochondrial nomenclature, we revised the previously proposed haplogroups by adding the following new information.

### Subdivisions Within Macrohaplogroup M

#### Haplogroup D

Haplogroup D has been defined by the specific RFLP - 5176 AluI (Torroni et al. 1992). Studies on Native American HVI sequences permitted further subdivision of D into subgroups D1 by mutation 16325 and D2 by mutation 16271 (Forster et al. 1996). Additional subdivisions into subhaplogroups D4 and D5 have been proposed for Asian lineages (Yao et al. 2002a). These investigators characterized D4 by position 3010. Two additional mutations, 8414 and 14668, have been proposed to define D4 (Fig. 1B; Kivisild et al. 2002). Whereas these two latter mutations seem to be rare events, 3010 has also been independently detected in haplogroups H and J. A new branch at the same phylogenetic level as D4 and D5 has been detected in Japan (Fig. 1B). It is characterized by mutations 709, 1719, 3714, and 12654 and was named D6. The subdivision of D4 into subgroups D4a and D4b was proposed on the basis of the distinctive mutational motif 152, 3206, 14979, and 16129 for the first and 10181 and 16319 for the second (Kivisild et al. 2002). Both subclades have been detected in our Japanese sample. From our data it can be deduced that mutation 8473 is also basal for D4a. In relation to D4b it seems that its ancestral branch is defined by the 8020 substitution (Fig. 1B). Consequently, the D4b subgroup proposed by Yao et al. (2002a) should be renamed D4b1 harboring 15440 and 15951 as additional basic mutations. A new subgroup character-





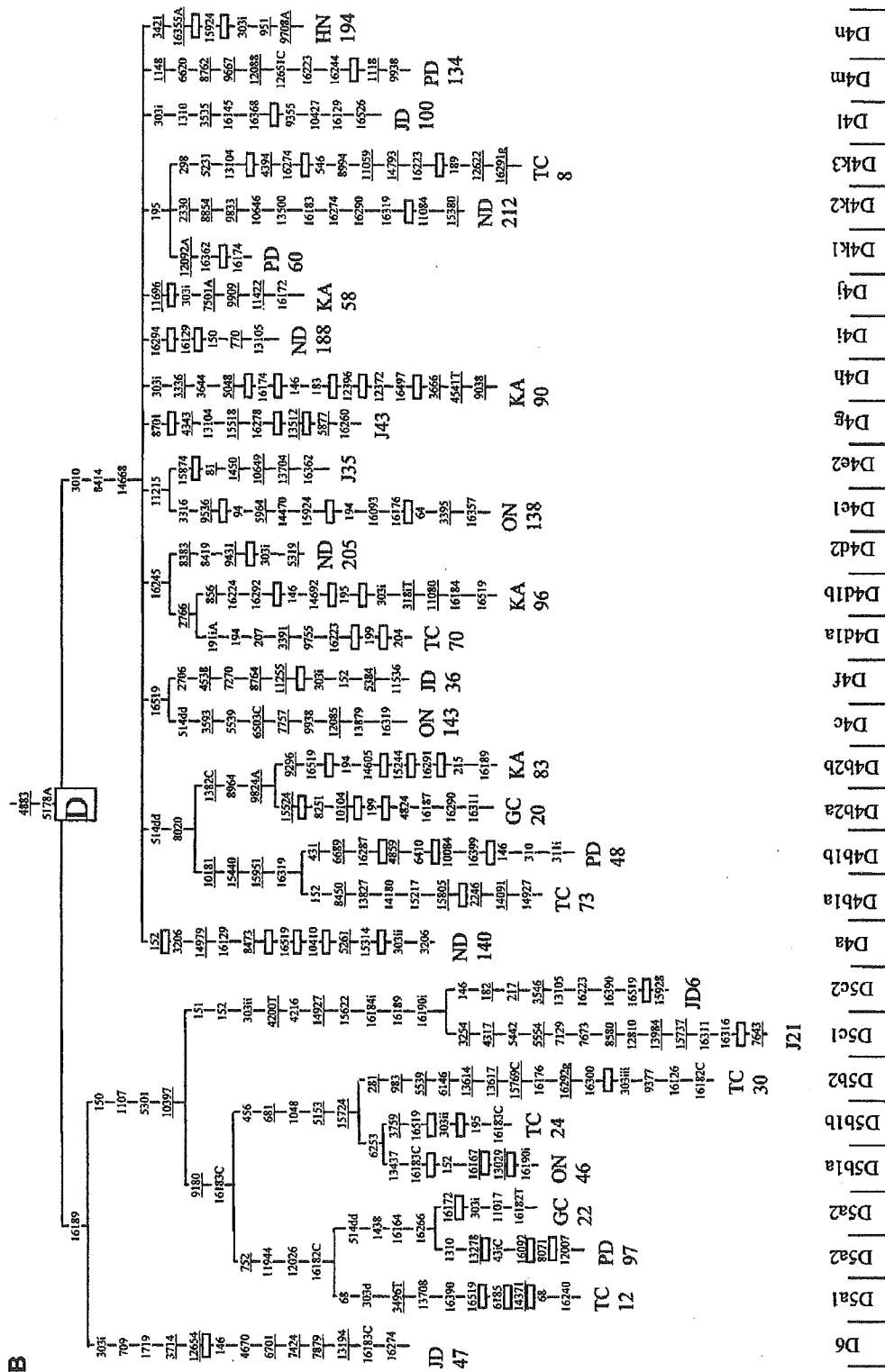


Figure 1 Phylogenetic tree, based on complete mtDNA sequences, for macrohaplogroup M in general (A) and for subhaplogroup D (B) in particular. Subject origins are given in Table 1. The numbers along the links refer to nucleotide positions, arbitrarily written in ascending order. Open boxes are nodes from which other (not shown) sequences branch. A, C, G, and T indicate transversions; whereas "d" indicates deletions and "T" insertions. Nonrecurrent mutations are underlined.



**Table 1.** List of Individuals Used to Build Up the Networks Shown in Figures 1 and 2

Sample	Haplogroup	Origin	References
PD32	M12	Japanese	This work
HN152	M11	Japanese	This work
M1 <sub>2</sub>	M1	Jordanian	Maca-Meyer et al. 2001
J18	M10a	Japanese	This work
ON96	M10b	Japanese	This work
ND168	M7a2	Japanese	This work
PD56	M7a1b	Japanese	This work
ON17	M7a1a	Japanese	This work
ND165	M7b2	Japanese	This work
TC77	M7c	Japanese	This work
HN231	M8a1	Japanese	This work
ND18	M8a2a	Japanese	This work
J30	M8a2	Japanese	This work
KO61	Z1	Koryac	Ingman and Gyllensten 2003
PD47	Z2	Japanese	This work
JD21	Z3	Japanese	This work
TC46	Z4	Japanese	This work
ON27	Z5	Japanese	This work
TC52	C1	Japanese	This work
6979	C4a	Evenki	Ingman et al. 2000
6970	C4B	Buryat	Ingman et al. 2000
HN177	C5	Japanese	This work
F170	E	Philippine	Ingman and Gyllensten 2003
ND208	G4a	Japanese	This work
HN248	G3	Japanese	This work
HN246	G2a2	Japanese	This work
J20	G2a1c	Japanese	This work
JD40	G2a1b	Japanese	This work
KA14	G2a1a	Japanese	This work
KA10	G2a1a	Japanese	This work
JD11	G2a1a	Japanese	This work
J15	G1a1	Japanese	This work
ON127	G1a2	Japanese	This work
J9	M9a1	Japanese	This work
JD41	M9a2a	Japanese	This work
PD11	M9a2b	Japanese	This work
JD47	D6	Japanese	This work
TC12	D5a2	Japanese	This work
PD97	D5a1a	Japanese	This work
GC22	D5a1b	Japanese	This work
ON46	D5b1a	Japanese	This work
TC24	D5b1b	Japanese	This work
TC30	D5b2	Japanese	This work
J21	D5c1	Japanese	This work
JD6	D5c2	Japanese	This work
ND140	D4a	Japanese	This work
TC73	D4b1a	Japanese	This work
PD48	D4b1b	Japanese	This work
GC20	D4b2a	Japanese	This work
KA83	D4b2b	Japanese	This work
ON143	D4c	Japanese	This work
JD36	D4f	Japanese	This work
TC70	D4d1a	Japanese	This work
KA96	D4d1b	Japanese	This work
ND205	D4d2	Japanese	This work
ON138	D4e1	Japanese	This work
J35	D4e2	Japanese	This work
J43	D4g	Japanese	This work
KA90	D4h	Japanese	This work
ND188	D4i	Japanese	This work
KA58	D4j	Japanese	This work
PD60	D4k1	Japanese	This work
ND212	D4k2	Japanese	This work
TC8	D4k3	Japanese	This work
JD100	D4l	Japanese	This work
PD134	D4m	Japanese	This work
HN194	D4n	Japanese	This work
ND41	F4a	Japanese	This work
TW96	F4b	Indigenous Taiwanese	Ingman and Gyllensten 2003

(continued)

**Table 1.** Continued

Sample	Haplogroup	Origin	References
XJ8451	F3	Chinese	Kong et al. 2003
KA1	F2a	Japanese	This work
ON123	F1c	Japanese	This work
TC20	F1a1	Japanese	This work
TC69	F1b3	Japanese	This work
KA70	F1b2	Japanese	This work
ND214	F1b1a	Japanese	This work
TC4	B5a	Japanese	This work
TC14	B5b1a	Japanese	This work
ON42	B5b3	Japanese	This work
PD33	B5b2	Japanese	This work
HN153	B4a1	Japanese	This work
JD73	B4a2	Japanese	This work
JD101	B4b1a1	Japanese	This work
ON22	B4b1b	Japanese	This work
HN238	B4d	Japanese	This work
PD139	B4e	Japanese	This work
7011	B4c2	Uzbek	Ingman et al. 2000
ON104	B4c1a	Japanese	This work
JD106	B4c1b1	Japanese	This work
ON39	B4c1c1	Japanese	This work
JD62	B4f	Japanese	This work
rCR5	H2	English	Andrews et al. 1999
N1b	N1b	Jordanian	Maca-Meyer et al. 2001
ON67	A1a1a	Japanese	This work
ND218	A1a	Japanese	This work
PD26	A1b1	Japanese	This work
JD57	A1c	Japanese	This work
6971	A2a	Chukchi	Ingman et al. 2000
KA21	A2	Japanese	This work
ON125	A2	Japanese	This work
ND28	A3	Japanese	This work
TC48	A4	Japanese	This work
J42	A5	Japanese	This work
TC2	N9a1	Japanese	This work
HN186	N9a2a1	Japanese	This work
ON34	N9a2b	Japanese	This work
JD79	N9a2c	Japanese	This work
JD85	N9b1c	Japanese	This work
JD15	N9b1	Japanese	This work
KA92	N9b1b	Japanese	This work
ND153	N9b1a	Japanese	This work
KA97	Y1b	Japanese	This work
HN249	Y2	Japanese	This work

ized by 1382C, 8964, and 9824A mutations and named D4b2, is represented by lineages GC20 and KA83 in Figure 1B. Furthermore, 12 new branches at the same phylogenetic level as sub-haplogroups D4a and D4b can be identified in the network. Accordingly, they have been successively named from D4c to D4n. On the other hand, D5 was defined by mutations 150, 10397, and 16189 (Yao et al. 2002a); however, 16189 is not present in all D5 lineages. We have named D5a and D5b those lineages that share this mutation and 9180 and D5c those lacking them. Consequently, we propose to rename D5a of Yao et al. (2002a) as D5a1. Additional mutations (1107 and 5301) define D5 (Fig. 1B), as has been recently confirmed (Kong et al. 2003). Of the four mutations at the basal branch of this group, 10397 seems to be a unique event; and the group can be diagnosed by the RFLP polymorphism +10396 BsrI. Recently, the phylogeny of haplogroup D has been revised in the light of complete sequences from Aleuts (Derbeneva et al. 2002b). By comparing their nomenclature to ours, it is possible to equate their D2 lineage to our D4e1 and their D3 lineage to our D4b1. As a total, D is the most abundant haplogroup in people of central and eastern Asia including mainland Japanese but not in the Ainu and Ryukyuan. However, the geographic distributions of some subhaplogroups are peculiar.