

### C 【研究結果】

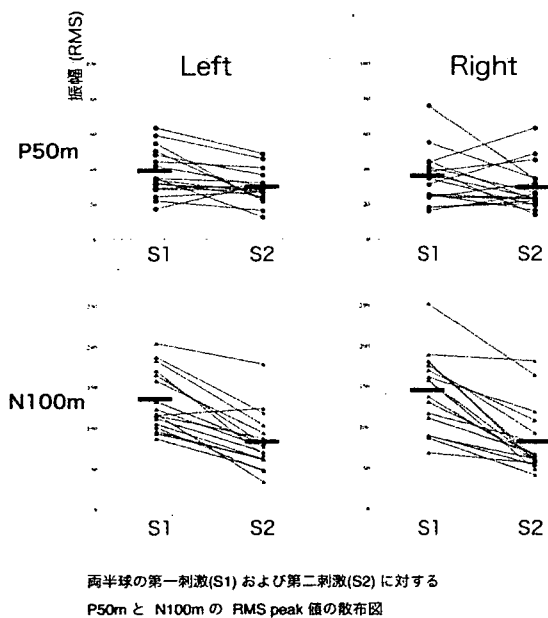
現時点での経過報告 (2008年1月22日現在)

<被験者数>

正常者	: 40人
統合失調症	: 26人
双極性障害	: 14人

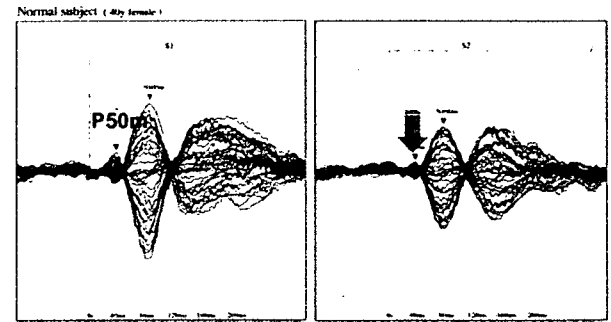
正常者において2連発音語音に対する聴覚誘発磁場を測定し解析したところ、左右両半球の聴覚野においてS1に対してS2のP50mの振幅が小さく有意に抑制されていることがわかっている (Hirano et al, 2008 *in press*)。

Fig1.

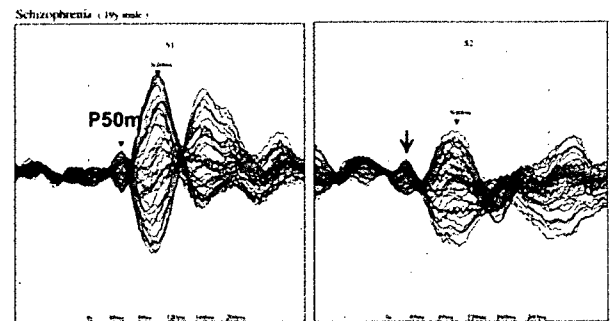


以下にそれぞれの対象者における聴覚誘発磁場の一例を提示する。図は上から正常者、統合失調症、双極性障害の順である。

正常者



統合失調症



双極性障害

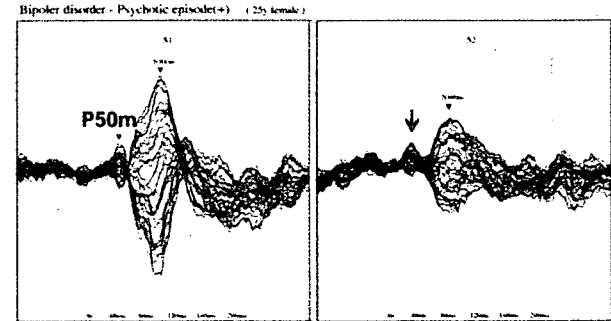


Fig2.

上記の各図において、連続音語音を提示して記録した聴覚誘発磁場 P50mは、正常者では S2 が S1 に対して大きく抑制されているのに比べ、統合失調症および双極性障害では S2 と S1 の差が少なくその抑制度が小さいことがわかる。

以下は P50m とより後期の成分である N100m のそれぞれの電源を推定 MRI に重ねた図である。

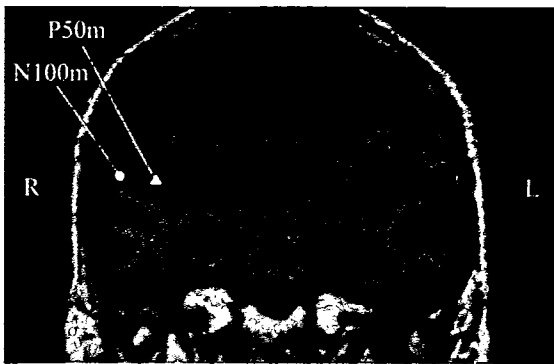


Fig3.

【結果 -統合失調症について-】

26人の統合失調症患者と28人の正常対象者との比較では、統合失調症患者において、左半球のP50m gating ratio が有意に高く(p=0.001)、右半球のP50mには有意差を認めなかった。

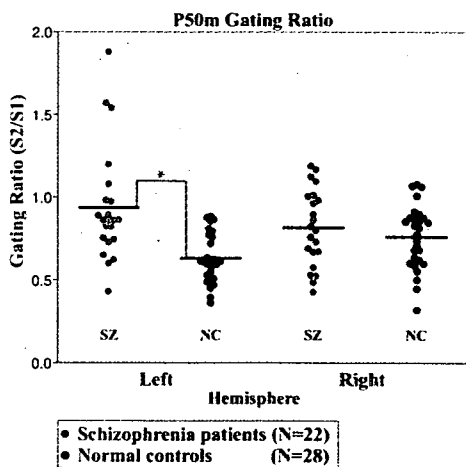


Fig4.

また症状との関連をみると、右半球の gating ratio と SANS 合計点が有意な正の相関を示し、左半球の gating ratio と SANS の幻聴のスコアが有意な正の相関を示した(Fig 5)。

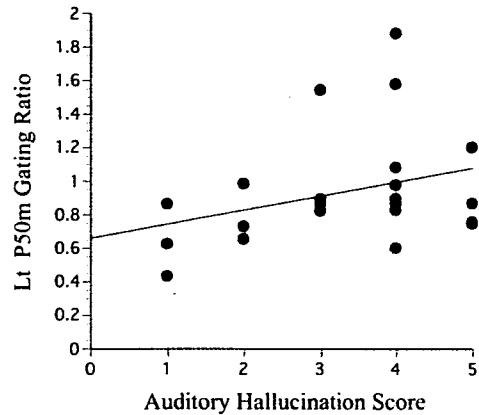


Fig5.

さらに、右半球の gating ratio と SANS Total スコアが有意な正の相関を示した(Fig6)。

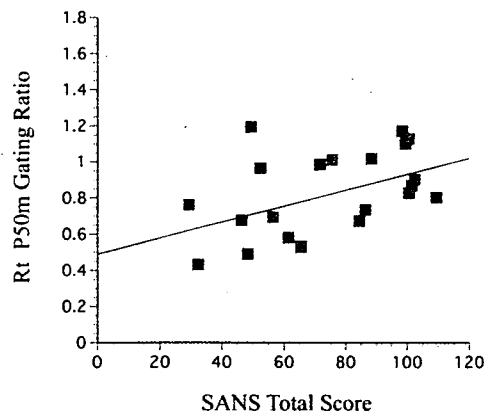
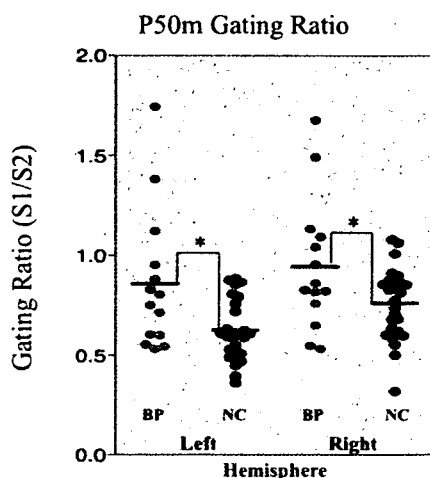


Fig6.

【結果 -双極性障害について-】

14人の双極性障害者と26人の正常対象者との比較では、双極性障害者において P50m gating ratio が左右両半球で有意に高い(左: p=0.03、右: p=0.03)という結果が得られた(Fig7)。



- Bipolar disorder (N=14)
- Normal controls (N=26)

Fig7.

#### D 【考察】

当研究では、脳磁図を用いて、双極性障害 14 名、統合失調症 26 名における声刺激に対する感覚フィルタリング機構を調べ正常対象者と比較検討した。声刺激として言語音[a]を用い、37 チャンネルの脳磁図により、両側聴覚野のペア声刺激に対する P50m (刺激後 50 ミリ秒付近に出現する反応) を測定した。

統合失調症患者では正常対象者に比べ、左半球優位に声に対する感覚フィルタリング機能障害があり、左半球での機能障害が重い人ほど幻聴が顕著であることが示唆された。さらに、右半球のフィルタリング機能障害と陰性症状が関連することが示唆された。

一方、双極性障害者では正常対象者に比べ、両側性に声に対する感覚フィルタリング機能の障害があることが示唆された。

つまり、脳磁図検査と音刺激に連続言語音を用いた当実験においては、脳波における先行研究と同様に、正常者に比べ統合失調症と双極性

障害では P50m の抑制度が低く、その抑制機能の障害は異なる半球パターン(統合失調症は左半球が障害・双極性障害は両半球が障害)を示した。言い換えると、双極性障害では、統合失調症と部分的に類似した言語音に対する感覚フィルタリング機能の障害を呈しており、両者は生物学的に類似した基盤を共有している可能性が高いと考えられる。さらに統合失調症においては、左右の抑制度の障害の程度がそれぞれ幻聴や陰性症状と関連することが示唆され、症状評価への応用も期待し得ると思われる。

今後はより詳細な病状評価や神経心理学的検査との相関を求め、分子遺伝学的解析結果との相関を解析し、各疾患群における生物学的な病態の解明を推し進め、診断や治療予測への応用を目指す。

#### E 【結論】

我々は、感覚フィルタリング機構の指標である P50 抑制度の検索において、脳磁図を用いてペア声刺激を提示することで、双極性障害および統合失調症を対象に言語音に対する聴覚誘発磁場 P50m の測定を行い、感覚フィルタリング機構の評価を進めた。脳波に比べより優れた空間分解能を有し脳磁図を用いることで、音刺激に対する左右半球の反応の違いや電源の推定を行うことができた。さらに連続音刺激に声刺激を使用することで、感覚情報として重要である言語音に対する感覚フィルタリング機構障害の解明を進めることができた。このペア声刺激を用いた P50m の検索により、類似した病像を呈することがある双極性障害と統合失調症

の感覚フィルタリング機構障害に対するより詳細な評価が可能であり、生物学的基盤に基づいたさらなる病態解明が進むことが予想される。最終的には、他の縦断的な症状評価、神経心理学的検査、分子遺伝学的解析とのさらなる包括的な解析を行うことで、エンドフェノタイプとしての重要な生物学的マーカーを同定し、病態解明、包括的な診断への応用が期待できる。

## F 【健康危険情報】

特記事項なし

## G 【研究発表】

### 【1. 論文発表】

Hirano Y, Onitsuka T, Kuroki T, Matsuki Y, Hirano S, Maekawa T, Kanba S: Auditory sensory gating to human voice: a preliminary MEG study. *Psychiatry Res Neuroimaging. In press.*

Hirano S, Onitsuka T, Kuroki T, Yokota K, Higuchi T 2006. 11. 18, 東京.

Watanabe K, Nakamura J, Kanba S: Attitude of patients with mood disorder toward clinical trials in Japan. *J Clin Psychopharmacol. 27: 93-94, 2007.*

平野羊嗣, 鬼塚俊明, 神庭重信: 音に対する感覚フィルタリング機構. *臨床脳波*, 49: 56-64, 2007

鬼塚俊明, 神庭重信: 双極性障害の脳画像.

*臨床精神医学*, 35: 1433-1438, 2006

平野昭吾, 鬼塚俊明, 神庭重信: 統合失調症のMEG研究. *精神科*, 9: 200-204, 2006

大林長二, 鬼塚俊明: リチウムの病相予防作用. *脳* 2 1.10:68-73, 2007.

鬼塚俊明, 平野昭吾, 平野羊嗣, 大林長二, 前川敏彦, 神庭重信: 統合失調症者の社会脳機能-顔・声認知-. *認知神経科学*. 印刷中.

### 【2. 学会発表】

平野羊嗣, 鬼塚利明, 平野昭吾, 前川敏彦, 神庭重信: 連続言語音を用いた誘発磁場の検討: 聴覚刺激の感覚フィルタリング機構. 第35回日本臨床神経生理学会学術大会.

2005. 11. 30-12. 2, 福岡

鬼塚俊明: Bipolar Disorder と統合失調症の共通性を探る-脳画像学の側面から-(シンポジウム). 第5回 Bipolar Disorder 研究会.

鬼塚俊明: 精神疾患と脳波(ミニレクチャー): 第393回福岡臨床と脳波懇話会 2006. 12. 20, 福岡.

平野羊嗣, 平野昭吾, 大林長二, 前川敏彦, 鬼塚俊明, 神庭重信: 統合失調症の声に対する感覚フィルタリング機能障害; MEG を用いた検討: 精神疾患と認知機能研究会 2007. 11. 3, 東京.

### 【3. 書籍】

鬼塚俊明：米国精神医学会治療ガイドライン、  
双極性障害（第2版）（訳、分担）。米国精神  
医学会治療ガイドラインコンペンディウム（佐  
藤光源、樋口輝彦、井上新平監訳）、医学書院、  
東京、2006.

鬼塚俊明：顔認知と精神疾患. TEXT 精神医学  
（第3版）。加藤進昌、神庭重信編、南山堂、  
東京、pp 12-13、2007.

鬼塚俊明：脳構造と精神現象. TEXT 精神医学  
（第3版）。加藤進昌、神庭重信編、南山堂、  
東京、pp 223、2007.

鬼塚俊明：脳機能と精神現象. TEXT 精神医学  
（第3版）。加藤進昌、神庭重信編、南山堂、  
東京、pp 234-235、2007.

鬼塚俊明：MEG（脳磁図）。キーワード精神第  
4版。樋口輝彦、神庭重信、染矢俊幸、宮岡等  
編、先端医学社、東京、pp 224-225、2007.

鬼塚俊明：Bipolar Disorder と統合失調症の  
共通性を探る-脳画像の側面から-。Bipolar  
Disorder 5. Bipolar Disorder 研究会編。ア  
ルタ出版、東京、pp 109-114、2007.

### H 【知的財産権の出願・登録状況】

特記事項なし

厚生労働科学研究補助金（こころの健康科学研究事業）  
分担研究報告書

事象関連電位を用いた双極性障害の視覚情報処理に関する研究

分担研究者 飛松 省三 九州大学大学院医学研究院臨床神経生理学 教授

分担研究者 前川 敏彦 九州大学病院精神科神経科 助教

**研究要旨**

**目的** 双極性障害では、付随症状として感覚情報処理障害が指摘されている。双極性障害は診断面接以外の有力な診断ツールがないので、精神症状だけではなく感覚情報処理障害を客観的に評価することで診断精度を向上させられる可能性がある。本研究では、事象関連電位の一成分である視覚性ミスマッチ陰性電位（v-MMN）を指標として双極性障害の視覚情報自動処理過程の障害の有無を明らかにし、疾患の補助診断あるいは病態評価検査への応用を目的とする。

**方法** 対象は双極性障害患者群、健常成人群各 30 人の予定である。実験前にインフォームドコンセントを行い文書にて同意を得た。被験者は防音された暗室の中のリクライニングチェアに座り、イヤホンからの物語に注意集中しながら前方の 20 インチモニター画面中心を固視するように指示された。モニター画面には 2 種類の白黒風車模様刺激 {標準刺激 (S)、逸脱刺激 (D)} と白色円形刺激 {標的刺激 (T)} がランダムに呈示され、T でボタンを押すように指示された。ボタン押しの正答率、反応時間、物語の内容に関する質問紙により被験者の注意の方向を確認した。128 チャンネル高密度脳波計を用いて頭皮上より脳波を記録し、刺激毎に加算平均を行い、D に対する反応から S に対する反応を引算することで v-MMN を抽出した。

**結果** 現時点で双極性障害群 9 人、健常者群 14 人の v-MMN を記録・解析した。質問紙の正答率は双極性障害群 85.5%、健常者群 96.1%であった。ボタン押しの正答率と反応時間は双極性障害群の方が低いパフォーマンスを示した。V-MMN は潜時、分布の違いから MMN1 と MMN2 の二つのサブコンポーネントに分けられ、双極性障害群と健常者群間で MMN1、MMN2 の潜時、MMN2 の振幅には有意差はなかったが、MMN1 振幅は双極性障害群では有意に低下していた。

**考察** 両群とも物語の筋を追っていくことが可能であったが、ボタン押しでは、双極性障害群の方が健常者群よりもパフォーマンスが低下していた。これは、疾患自体のために注意資源が減少しているか、あるいは内服薬の影響が考えられた。両群とも v-MMN は誘発されたが、双極性障害群の方が減衰していた。双極性障害では気分が安定している時期でも自動的な視覚情報処理過程の異常が遷延していることを示唆された。

**結論** 高密度脳波計を用いて双極性障害患者の視覚ミスマッチ陰性電位を記録した。双極性障害患者は視覚情報自動処理異常の可能性が示唆された。年齢、服薬量を考慮してさらに被験者を増やして解析をする必要がある。

## A. 研究目的

ヒトは知覚することができる全ての情報を受容し処理できるわけではなく、情報（刺激）の物理的特性に応じて選択的処理を行っている。例えば聴覚では、ヒトの可聴域は個人差や年齢差もあるが大体 20~20000 Hz であり、視覚では可視光域は短波長側が 360~400 nm、長波長側が 760~830 nm である。この機構は、必要な情報だけを選択的に入力、処理することで大脳の処理効率を上げるという観点から合理的である。さらに、このような感覚情報フィルタリング機構は、末梢感覚器レベルだけではなく、さらに上位の大脳皮質レベル、高次脳機能レベルでも備わっていると考えられている。つまり選択的に入力された感覚情報は受容された神経細胞の発火によって電気信号に変換され、符号化、統合化、表象化という下位中枢から上位中枢へとボトムアップに処理されていく過程でより重要な情報が先行して処理され、重要度の低い情報は遅れて並行処理される、あるいは処理が終了する。この重要度の判定には、情報の強度や奇異度といった刺激自体の物理特性と共に、記憶や注意といった上位からのトップダウンの調整を受ける（図 1）。

しかしながら、全ての情報に注意を向けて、逐一意識下で重要度判定をしていくのは情報の入力速度に情報処理が追いつかず合理的ではなく、危機回避場面での無意識的な反射を例に考えてもなんらかの無意識下の情報処理がなされていることは直観的に明らかである。つまり、大脳に入力された感覚情報は前注意（自動）的に選別され（自動処理過程）、重要な情

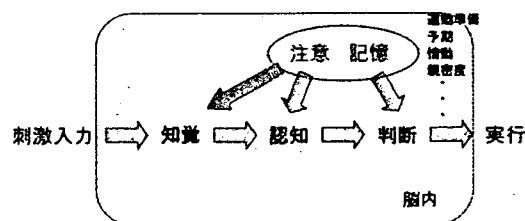
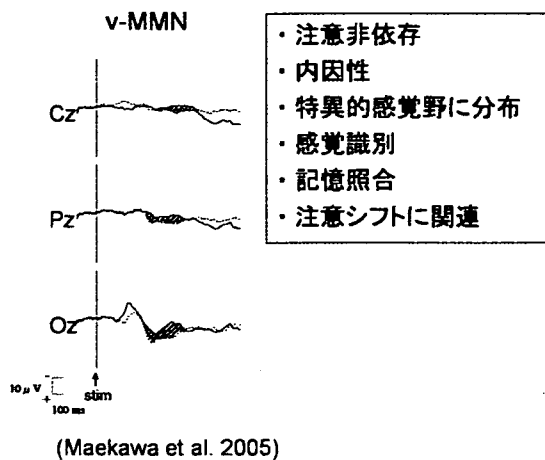


図 1 感覚情報の脳内処理過程模式図

すでに入力部の感覚器でも刺激情報はフィルタリング処理を受けているが、脳内でも記憶や受動的注意（involuntary attention）あるいは前注意的処理（pre-attentive processing）と呼ばれる自動的な働きによって自分に重要な情報に対して能動的注意（voluntary attention）を向けることが可能になる。例えば、多様な音が混じり合っていて聴こえてくる騒々しいパーティー会場の中で自分の名前を呼ぶ者がいると、その声は周囲の声や雑音よりやや小さくても、明瞭に聞き取ることが出来る。これは心理学ではカクテルパーティー効果と呼ばれ、記憶や価値観といった上位機構が聴覚情報処理を調整している事実（top down modulation）の 1 例と考えられている。さらに、皇帝ペンギンの子供は仲間の群れの雑音の中で親の鳴き声や羽音に反応し、親からはぐれることがないことから、皇帝ペンギンにもカクテルパーティー効果があると言われている。この異種動物間共通の事実からはヒトに限らず生物の生存にはこの機能が必須であることが示唆される。

報のみに注意が向けられ処理されている（注意処理過程）と考えられる。事象関連電位（event-related potential: ERP）では前者はミスマッチ陰性電位（mismatch negativity: MMN）、後者は P300 に反映される。これまで視覚性 MMN（visual mismatch negativity: v-MMN）の存在には異論があったが、我々は v-MMN の機能特性をはじめて明らかにした（図 2）。



**図 2 視覚性ミスマッチ陰性電位 (v-MMN) の特性** 聴覚ではよく検討されている MMN だが、これまで視覚についてはその存在すら議論があった。我々は先行研究において今回の研究でも用いている風車模様刺激によって後頭部 (Oz) を最大として刺激呈示後約 150~300ms に v-MMN (斜線部) が誘発できることを確認し、v-MMN の機能特性を検討した。その結果、v-MMN は非注意依存性、内因性、視覚関連領域に分布、感覚識別、記憶照合、注意シフト関連などの特性を持つことを証明した。

双極性障害や統合失調症のような内因性精神疾患では以前より、注意障害、認知障害と共に付随症状として感覚情報処理障害が指摘されている。例えば、急性期において、幻聴、幻視、異常体感知覚などの幻覚は入力される感覚情報の処理障害が末梢感覚器から高次脳機能までのいずれかのレベルで起こっているものと考えられる。また、精神症状がある程度改善した慢性期においても、聴覚過敏や光線過敏、過敏知覚などが見られる場合は、感覚情報処理障害は遷延していると考えられる。内因性精神疾患の原因、機序は不明で診断面接以外の有力

な診断ツールがないので、精神症状だけではなく付随症状の感覚情報処理障害を客観的に評価することで診断精度を向上させられる可能性がある。ERP 研究では P300 を計測して内因性精神疾患の注意処理過程の異常が報告されているが、v-MMN を用いた視覚情報自動処理過程の障害の有無は明らかでない。本研究では、v-MMN を指標として双極性障害の視覚情報自動処理過程の障害の有無を明らかにし、疾患の補助診断あるいは病態評価検査への応用を目的とする。

## B. 研究方法

### B-1. 対象

対象は当科治療中で SCID を用いて双極性障害と診断された 20~60 歳の患者群 30 人と精神疾患や神経疾患の既往のない 20~60 歳の健常者群 30 人の予定である。実験参加前には、インフォームドコンセントを行い文書にて同意を得た。

(倫理面への配慮) 本研究はヒトを対象とした臨床研究であり、臨床研究に関する倫理指針に則り研究を計画し遂行している。3 省庁合同指針に基づいた研究計画書を九州大学臨床研究等倫理委員会に提出し、承認を得ている。被験者にはインフォームドコンセントを行い、文書にて同意を得ている。個人情報とは特定できないように匿名化され、個人情報管理責任者が管理している。

### B-2. 視覚実験条件

被験者は防音された暗室の中のリクライニングチェアに座り、イヤホンからの物語に注意集中しながら前方の 20 インチ



モニター画面中心を固視するように指示された。正面のモニター画面中心には視角 5.8 度の 2 種類の白黒風車模様刺激 {標準刺激 (S)、逸脱刺激 (D)} と同じ大きさの白色円形刺激 {標的刺激 (T)} が刺激呈示時間 200 ms、刺激間隔 800 ms、8 : 1 : 1 の割合でランダムに呈示され、T でボタンを押すように指示された。行動指標として、T に対するボタン押しの正答率、反応時間を計測し、実験終了時に物語の内容に関する質問紙 (4 者択一、10 問) により被験者の注意が物語の内容と T の同定に向いていたことを確認した。実験中は高密度脳波計を用いて頭皮上 128 箇所から持続して脳波を記録した (図 3)。

### B-3. 記録と解析

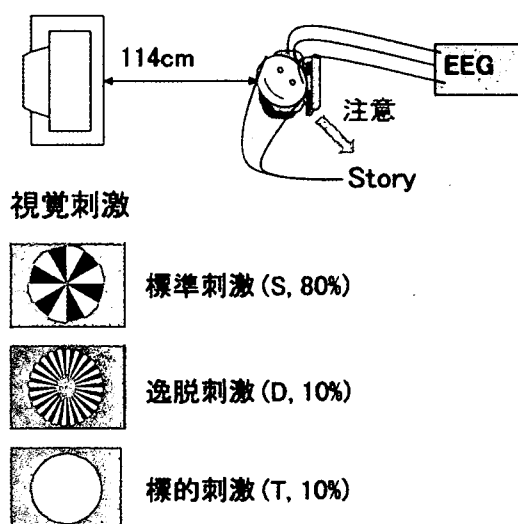
高密度脳波計を用いて頭皮上 128 箇所からサンプリング周波数 500 Hz、バンドパス 0.05~200 Hz で脳波を測定した (図 4)。得られたデータはオフラインでデジタルフィルタを用いて 1~30 Hz にフィルタリングした後、刺激ごとに加算平均を行い、D に対する ERP から S に対する ERP を引算して  $v$ -MMN を抽出し、その大きさ、潜時、分布を双極性障害群・健常者群間で比較検討した (図 5)。

### C. 研究結果

現時点で、記録は双極性障害群 9 人 (女性 4 人、男性 5 人、21~59 (42.8) 歳、全員右利き)、健常者群 14 人 (女性 12 人、男性 2 人、20~51 (37.5) 歳、全員右利き) の記録・解析を終了した。

### C-1. 行動指標

物語の内容に対する質問紙の正答率は、双極性障害群 85.5%、健常者群 96.1%、T に対するボタン押しの正答率は、双極性障害群 87.4%、健常者群 93.3%、反応時間は双極性障害群 473.3 ms、健常者群 393.6%であった。参考データとして同様の条件で行った統合失調症群 16 人の結果も示した (表 1)。



**図 3 実験条件** 被験者は防音された暗室で 20 インチモニター画面の 114 cm 正面に置かれたリクライニングチェアに座り、両耳イヤホンから聞こえる物語の内容に注意を向けるようにする。同時に、モニター画面中心から視角 5.8 度の 2 種類の白黒風車模様 {標準刺激 (S)、逸脱刺激 (D)} と同じ大きさの白色円形刺激 {標的刺激 (T)} がそれぞれ、刺激呈示時間 200 ms、刺激間隔 800 ms、8 : 1 : 1 の割合でランダムに呈示され、T が呈示された時にボタンを押すように指示された。行動指標として、T に対するボタン押しの正答率、反応時間を計測し、実験終了時に物語の内容に関する質問紙 (4 者択一、10 問) により被験者の注意が物語の内容と T の同定に向いていたことを確認した。実験中は高密度脳波計を用いて頭皮上 128 箇所から持続して脳波を記録した。

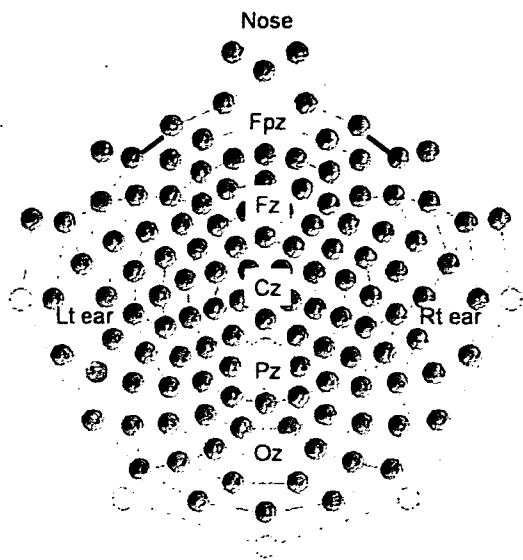


図4 高密度脳波計の頭皮上のセンサー位置 頭皮上 128 箇所からサンプリング周波数 500 Hz、バンドパス 0.05~200 Hz で脳波を測定した。得られたデータはオフラインでデジタルフィルタを用いて 1~30 Hz にフィルタリングした。

### C-2. 脳波解析結果

脳波解析の結果は図6に示した。ERP波形は各群とも刺激呈示後 150~320 ms ではSに対する反応よりもDに対する反応の方が陰性にシフトしていた(v-MMN)。V-MMNは二つの頂点を含んでおり、これらは潜時や頭皮上分布が異なっていたので早期成分をMMN1、後期成分をMMN2として

分けて解析した。BP群とNC群を比較すると、MMN1はやや潜時が短く(189.2 vs. 198.4 ms)、振幅は有意に小さかった(0.18 vs. 0.85  $\mu$ V)。MMN2は潜時が延長していた(293.3 vs. 279.9 ms)、振幅が低下していた(0.90 vs. 1.71  $\mu$ V)が、有意差はなかった。

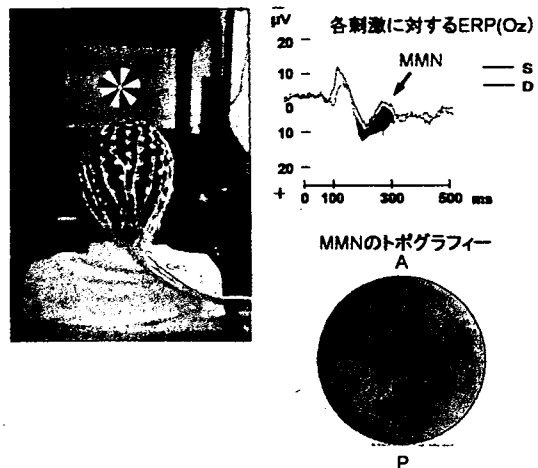
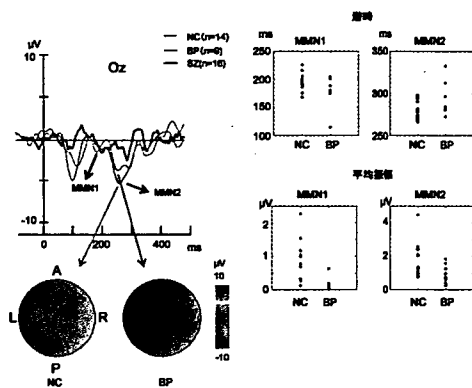


図5 高密度脳波計を用いた実験風景と健常者の脳波解析波形 被験者は128個の電極の付いたセンサーネットを装着した状態でモニター画面の正面に腰掛けた。実験中は持続して脳波記録を行った(図左)。記録された脳波は刺激の種類ごとに別々に加算平均され、Dに対する反応(水色線)からSに対する反応(オレンジ線)を引算することでv-MMNを抽出した(図右上斜線部)。若年健常者では反応は後頭視覚領域に局限していた(図右下青色部)。

	物語内容の正答率(%)	Tに対するボタン押し	
		正答率(%)	反応時間(ms)
健常者群 (n=14)	96.4 $\pm$ 10.3	93.4 $\pm$ 3.6	393.6 $\pm$ 40.9
双極性障害群 (n=10)	83.4 $\pm$ 19.7	91.6 $\pm$ 5.9	429.3 $\pm$ 75.9
統合失調症群 (n=16)	70.0 $\pm$ 31.6	93.0 $\pm$ 10.0	451.8 $\pm$ 85.9

表1 健常者群と双極性障害群の行動指標結果。物語内容についての質問紙の正答率は双極性群 83.4%、健常者群 96.4%であり、実験中物語を聞いていたと考えられたが、Tに対するボタン押しの正答率と反応時間は患者群の方が低いパフォーマンスを示した。統合失調症群では質問紙の正答率やボタン押しのパフォーマンスが健常者群よりも低く、注意配分がうまくできないあ

るいは、注意資源が足りないことが推測された。



**図 6 双極性障害群と健常者群の v-MMN の結果**

左 upper 段は Oz における各被験者群 (健常者群 (NC), 双極性障害群 (BP), 統合失調症群 (SZ)) に対する全平均 ERP 引算波形 (D に対する反応から S に対する反応を引算した)。3 群とも刺激呈示後 150~320 ms には陰性電位 (v-MMN) を認めた。v-MMN は潜時と頭皮上分布の異なる二つのピークを認めたため、早期成分を MMN1、後期成分を MMN2 として別々に解析した。BP 群の v-MMN (水色線) は NC 群の v-MMN (桃色線) よりも小さかったが、SZ 群の v-MMN (黒色線) よりはおおきかった。上段左は健常者群、左下段には MMN2 ピークの頭皮上トポグラフィーマップを示した。NC 群 (左) は後頭部と前頭部に陰性電位を認めたが、BP 群 (右) では後頭部に低い陰性電位分布を認めた。図右は MMN1、MMN2 の潜時、振幅に対する BP 群、NC 群の散布図。BP 群は MMN1 潜時では NC 群よりも短かったが、MMN2 潜時はばらばらだった。平均振幅では BP 群の MMN1 は有意に低振幅であったが、MMN2 では差はなかった。

#### D. 考察

今回の報告では、双極性障害群 9 人、健常者群 14 人に対して記録・解析を終了した。現時点での解析では、行動指標では双極性障害群は健常者群よりも T に対するボタン押しのパフォーマンスが劣っていた。脳波解析では、両群共に v-MMN

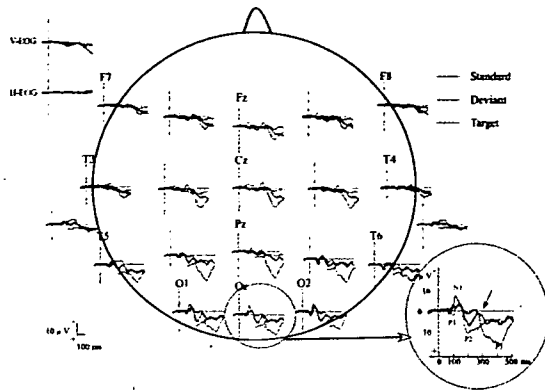
が誘発されたが、双極性障害群の方が減衰していた。以下に別の研究でわれわれが行った慢性期統合失調症群 18 人 (男性 15 人、女性 3 人、21~54 (35.8) 歳、左利き 1 人) の結果と比較しながら考察する。

#### D-1. 行動指標

物語の内容について 83.4%、健常者群では 2 人が 96.4%であった (表 1)。しかし、全体としては両群とも実験中は物語の筋を追っていくことが可能であったと考えられた。また、T に対するボタン押しの正答率と反応時間では、双極性障害群の方が健常者群よりもややパフォーマンスが低下している可能性が示唆された (BP 群: 正答率 91.6%、反応時間 429.3 ms、NC 群: 正答率 93.4%、反応時間 393.6 ms)。これは、双極性障害群の疾患自体のために注意資源が減少しているか、あるいは内服薬の影響の可能性が考えられた。

一方、慢性期統合失調症群では、物語の内容についての質問紙の正答率は 70.0 ± 31.6%、T に対するボタン押しの正答率と反応時間はそれぞれ、93.0 ± 10.0%、451.8 ± 85.9ms であったので (表 1)、統合失調症群では T に対するボタン押しのパフォーマンスは双極性障害群と同様に健常者群よりも低下していたが、物語の内容の筋を追うことでは双極性障害群よりもパフォーマンスはさらに低下していた。これは、統合失調症群は注意配分がうまく出来ないかあるいはもともと注意資源自体が双極性障害群よりも少ない可能性が示唆された。また、抗精神病薬な

どの薬物の影響についても検討課題であると考えられた。

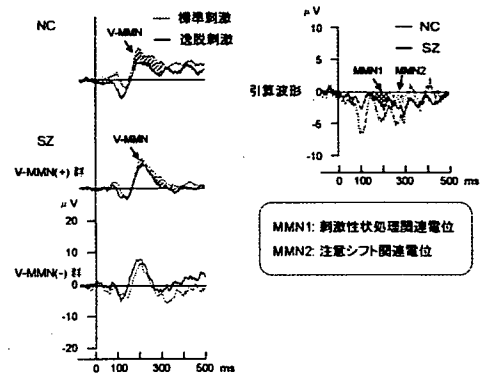


**図7 健常若年成人の v-MMN** 国際 10-20 法に従って頭皮上に 18 個の電極を置いて脳波を記録した。Oz を最大として後頭部、後側頭部では刺激提示後約 150~300 ms の間の D に対する反応 (青線) が S に対する反応 (赤線) よりも図の上方 (陰性) にシフトしている (矢印部)。これは v-MMN の重畳による。ちなみに、T に対する反応 (黒線) では 400 ms 付近に Pz を最大として広範に大きな陽性電位を認めるが、これは P300 (注意関連電位) であり、S や D の波形には認められない。略語: v-EOG; 垂直眼電図、H-EOG; 水平眼電図、LM; 左乳様突起、RM; 右乳様突起。

#### D-2. v-MMN

健常若年成人を対象にした研究では刺激呈示後約 150~300 ms に v-MMN を認め (図 7)。今回の結果では、健常者群、双極性障害群共に刺激呈示後約 150~320 ms に陰性シフトを認めており (図 6 左)、健常若年成人の結果と同様であるが、この成分は健常者群と比較して、双極性障害群では減衰していた。このことから双極性障害では気分が安定している時期でも視覚情報処理障害が遷延しており、注意障害に関与していることが示唆された。さらに、統合失調症群では 12 人では刺激

呈示後約 150~400 ms に v-MMN が誘発されたが、4 人では誘発されなかった (図 8)。V-MMN が誘発された群では、健常若年成人と比較して MMN1、MMN2 の振幅、MMN2 の潜



**図8 v-MMN の全平均波形** 左上段: NC 群の全平均波形。150~300 ms 間で、逸脱刺激に対する反応 (実線) は、標準刺激に対する反応 (点線) 陰性にシフトしており、先行研究では、このシフト (斜線部) は a-MMN と同様の特性を有していた左中段; SZ 群のうち v-MMN が誘発された 12 人の全平均波形。150~400 ms 間で、v-MMN が誘発された。左下段; SZ 群のうち v-MMN が誘発されなかった 4 人の全平均波形。右図; 各群の引算波形。NC 群 (点線), SZ 群 (実線) とともに 150~350 ms 間で二つのピークをもつ v-MMN を認めたが、SZ 群の方が減衰していた、先行研究から、早期成分 (MMN1) は、刺激性状処理関連電位であり、後期成分 (MMN2) は、注意シフト関連電位であることが示唆された。

時に違いはなかったが、MMN1 潜時は健常者群より有意に延長していた。V-MMN が誘発された群と誘発されなかった群では行動指標のパフォーマンスの違いはなく、プロフィールの違いも現時点では不明である。誘発されなかった理由としては、v-MMN に反映される、短期記憶表象自体作られなかった可能性、短期記憶表象は作られたが記憶保持が出来なかった可能性、v-MMN は誘発されたが時間同期性が悪い

ために加算平均波形では消失してしまった可能性などが考えられたが、さらに検討を進める必要があると思われた。

#### E. 結論

高密度脳波計を用いて双極性障害患者の視覚ミスマッチ陰性電位を記録した。双極性障害患者は健常者と比較してv-MMNが減衰しており、視覚情報自動処理の異常の可能性が示唆されたが、その程度は統合失調症患者よりも軽かった。さらに被験者を増やして解析をする必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 前川敏彦, 平野昭吾, 大林長二, 平野羊嗣, 鬼塚俊明, 飛松省三, 神庭重信. ミスマッチ陰性電位を用いた統合失調症の視覚自動処理過程の検討. 臨床脳波, 印刷中.

##### 2. 学会発表

1. T. Maekawa, S. Kanba, S. Tobimatsu. Evidence for visual analogue of auditory mismatch negativity. 2007IEEE/ICME International conference on complex medical engineering, 2007. 5. 23, Beijing.
2. 前川敏彦, 神庭重信, 飛松省三. 視覚ミスマッチ陰性電位における記憶痕跡仮説の検討. 第24回日本脳電磁図トポグラフィー研究会. 2007. 6. 15,

神戸市.

3. 前川敏彦, 角田智哉, 平野羊嗣, 平野昭吾, 大林長二, 吉田猛, 鬼塚俊明, 神庭重信, 飛松省三. 統合失調症における視覚性P300とミスマッチ陰性電位の検討. 第37回日本臨床神経性理学会・学術大会. 2007. 11. 22, 宇都宮市.
4. 角田智哉, 前川敏彦, 平野羊嗣, 平野昭吾, 大林長二, 吉田猛, 鬼塚俊明, 神庭重信, 飛松省三. ミスマッチ陰性電位とP300を用いた双極性障害における視覚認知過程の検討. 第37回日本臨床神経性理学会・学術大会. 2007. 11. 21, 宇都宮市.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### I. 引用文献

1. T. Maekawa, Y. Goto, N. Kinukawa, T. Taniwaki, S. Kanba, S. Tobimatsu. Functional characterization of mismatch negativity to a visual stimulus. Clin Neurophysiol 2005;116:2392-2402.
2. 前川敏彦, 飛松省三. 早わかり誘発電位(4): 事象関連電位とミスマッチ陰性電位. 臨床脳波 47:775-787, 2005.

ヒトドーパミン受容体 D4 遺伝子(DRD4)の遺伝学的構造および日本人統合失調症患者における遺伝学的相関性の欠如について

分担研究者 川崎 弘詔 九州大学大学院医学研究院精神病態医学 講師

研究要旨：DRD4 遺伝子の遺伝学的構造、および疾患対照としての統合失調症における潜在的な遺伝学的影響を明らかにするために、我々は、DRD4 遺伝子上の 4 つの新規 SNP を含めた 27 多型について 216 名の日本人統合失調症患者および 243 名の健常対照者の遺伝子型を決定した。結論として、我々は、日本人集団において DRD4 遺伝子の多型の構造を詳細に報告した。LD 解析により 2 つの小さなブロックが明らかになった。もっとも注目すべき点は本遺伝子全領域にわたり LD が低かったことである。LD 解析により選択された 16 個のタグ・マーカーを用いたハプロタイプ解析では、統合失調症の発症危険性と相関しないことが明らかになった。ドーパミン情報伝達系における DRD4 の生物学的な役割や、48bp リピート多型と相関した機能的効果についての報告にも関わらず、本遺伝子が統合失調症の発症危険性に有意に寄与するということを否定する文献が増加しているが、本報告はこれらの文献の内容と同一のものである。

## A. 研究目的

統合失調症の発症危険性に対するヒトドーパミン受容体 D4（以下 DRD4 とする）遺伝子上の遺伝的多型の関与を検討するために、我々は、日本の九州地方における 216 名の統合失調症患者および 243 名の健常対照者について、27 多型の遺伝解析を実施した。本研究では、22 個の一塩基多型（以下 SNP とする）および 5 個の挿入・欠失多型を調べた。その中には、新規の SNP 4 個および新規の一塩基反復多型 1 個が含まれた。連鎖不平衡（以下 LD とする）解析とハプロタイプ解析によって、DRD4 遺伝子領域では LD が低いことがわかった。単変量解析では、-521C 対立遺伝子（以下アレルとする）をもつ女性は統合失調症の危険性が高いことが示された。しかし、多重仮説検定の補正後では、この有意差は認められなかった。他の多型やハプロタイプでは、統合失調症患者群と健常対照者群間に統計学的有意差は認められなかった。同様に、多変量解析においても統計学的に有意な相関は認められなかった。

### 1. はじめに

統合失調症は、世界中において人口のおよそ 1%が罹患する最も頻度の高い主要な精神障害のひとつである。また、最近では、双極性障害との遺伝学的な連続性も指摘されている。統合失調症を遺伝学的に解析することは、将来的に双極性障害の遺伝学的解析にも貢献することに成ると考えられる。家族研究、双子研究、および養子研究から、統合失調症の病因においては種々の遺伝的要因が重要な役割を果たしていることが強く示唆されるが (Gottesman, 1991; Kendler & Diehl, 1993)、統合失調症の発症へいたる分子生物学的な基盤および病態生理機構はいまだに明らかではない。いくつかの臨床的および薬理学的な証拠が、統合失調症の病理においてドーパミンの神経伝達に関与しているという可能性を示唆している (Willner による総説に基づく, 1997) (Willner, 1997)。いわゆる「ドーパミン仮説」は、ドーパミン受容体アンタゴニストが統合失調症の症状を変化させるという事実および統合失調症患者の線条体、前頭

前野、大脳辺縁系でドーパミン量が変化しているという事実に基づいている。それゆえ、ドーパミン受容体は統合失調症に関連する異常の探索を目的とした遺伝学的研究対象の一つとされてきた。特に、DRD4 遺伝子はドーパミン受容体 D2 ファミリーの一つであるが、統合失調症の有力な候補遺伝子とされてきた。その根拠は、非定型抗精神病薬であるクロザピンが DRD4 に対して比較的高い結合親和性をもつこと (Van Tol et al., 1991)、また、統合失調症患者の死後脳において DRD4 受容体蛋白および DRD4 遺伝子のメッセンジャー・リボ核酸の発現が増加していることである (Seeman, Guan, & Van Tol, 1993; Stefanis, Bresnick, Kerwin, Schofield, & McAllister, 1998)。DRD4 遺伝子は統合失調症以外に、注意欠陥・多動性障害 (以下 ADHD とする) および人格特性としての新奇性追求傾向との関連性において研究されてきた。

DRD4 遺伝子座は多型性に富んでいる (Cichon et al., 1995; Mitsuyasu et al., 2001; Mitsuyasu, Ozawa, Takeda, & Fukumaki, 1999; Okuyama et al., 2000; Paterson et al., 1996; Seaman, Fisher, Chang, & Kidd, 1999; Van Tol et al., 1992; Wang et al., 2004; Wong, Buckle, & Van Tol, 2000)。

種々の多型と統合失調症の遺伝学的相関に関する報告がいくつかの研究者たちによってなされているが、それらの結果を再現しようとする試みは、一般的には成功していない。わずかに 3 つの文献のみが有意な相関の結果を報告している (Okuyama, Ishiguro, Toru, & Arinami, 1999; Weiss, Magert, Cieslak, & Forssmann, 1996; Xing et al., 2003)。統合失調症との相関について解析された多型の中で、-521T/C 多型は統合失調症 (Jonsson et al., 2001; Jonsson, Sedvall, Nothen, & Cichon, 2003; Mitsuyasu et al., 2001; Okuyama et al., 1999; Xing et al., 2003) だけでなく、ADHD (Bellgrove et al., 2005; Kirley et al., 2004; Lowe et al., 2004; Mill et al., 2003) や人格特性 (Bookman, Taylor, Adams-Campbell, & Kittles, 2002; Ekelund,

Suhonen, Jarvelin, Peltonen, & Lichtermann, 2001; Joyce et al., 2003; Lakatos et al., 2002; Lee et al., 2003; Mitsuyasu et al., 2001; Okuyama et al., 2000; Ronai et al., 2001; Strobel et al., 2002; Strobel, Spinath, Angleitner, Riemann, & Lesch, 2003) においても調べられており、最も頻回に研究された多型の一つである。いくつかの研究報告によると、DRD4 遺伝子のエクソン 3 の 48 塩基対 (以下 bp とする) の不完全な縦列反復配列多型 (以下 48-bp VNTR とする) が ADHD および人格特性と関連があると示唆されている (Faraone et al., 2005; Jonsson et al., 2003; Savitz & Ramesar, 2004; Schinka, Letsch, & Crawford, 2002)。しかし、これらの広範囲かつ詳細な研究の結果は一致していない。

以前に我々は日本人における DRD4 遺伝子上流の 9 つの新たな多型について報告した (Mitsuyasu et al., 1999)。我々の研究における -521T/C を含む 5 つの SNP の解析では、208 名の統合失調症患者群および 210 名の健常対照者群のあいだに有意な相関はみられなかった (Mitsuyasu et al., 2001)。

今回、我々は 5' 非翻訳領域にある 120bp 反復配列 (以下 120-bp TR とする) およびエクソン 3 の 48-bp VNTR を含む 27 多型すべてについて、LD およびハプロタイプ解析によって DRD4 遺伝子多型のより詳細な解析をおこなった。本報告では、これらの結果について記述する。統合失調症と DRD4 遺伝子多型の相関を明らかにするために、SNP およびハプロタイプに基づいた相関解析を単変量および多変量統計解析を用いて実施した。

## B. 研究方法

### 2. 材料と方法

#### 2. 1. 研究対象者群

精神疾患の分類と診断の手引き第 4 版 (DSM-IV) の統合失調症の診断基準を満たし、年齢が 18 歳から 82 歳まで (平均年齢  $51.5 \pm 13.7$  歳、男性  $50.5 \pm 14.0$  歳、女性  $52.7 \pm 13.3$  歳) の計 216

名の統合失調症患者（男性 121 名、女性 95 名）を九州北部の 9 病院から集めた。年齢が 30 歳から 71 歳まで（平均年齢  $50.2 \pm 4.6$  歳、男性  $52.1 \pm 1.2$  歳、女性  $47.7 \pm 6.1$  歳）の 243 名の対照者（男性 138 名、女性 105 名）を福岡県内の 3 病院の職員および自衛隊隊員から集めた。患者と対照者の人種はすべて日本人である。統合失調症患者群と対照者群間で平均年齢に有意差はみられなかった。同様に、男性統合失調症群と男性対照者群間、全女性と全男性間、女性統合失調症群と男性統合失調症群間でも平均年齢に有意差はみられなかった。しかし、女性対照者群と男性対照者群間、および、女性患者群と女性対照者群間では平均年齢に有意差をみとめた。女性対照者群の平均年齢は、男性対照者群の平均年齢よりも 4.3 歳低く ( $p < 0.0001$ )、女性統合失調症群よりも 5.0 歳低かった ( $p = 0.001$ )。対照者は、社会経済状態、身体的状態、精神的状態などを質問紙票により収集した情報に基づいて選択された。これらの質問紙票は気質性格質問票 (Cloninger, Svrakic, & Przybeck, 1993)、(Kijima et al., 1996)、ベック抑うつ質問票 (Beck, Ward, & Mendelson, 1961)、状態特性不安検査 (Spielberger, Gorsuch, & Lushene, 1970)、モーズレイ強迫症状評価尺度 (Hodgson & Rachman, 1977)、久里浜式アルコール依存症スクリーニングテスト (Saito & Ikegami, 1978) などの心理検査バッテリーの情報を含む。対照者の選択基準を、(1) 30 歳以上、(2) 精神疾患の既往歴がないこと、(3) 就業して社会適応が良好であること、および (4) 知的問題がないこととした。精神疾患簡易構造化面接 (M. I. N. I) (Sheehan & Lecrubier, 1998) の診断基準を用いて、全ての研究対象者の心理的および身体的状態を評価した。対象者全員には説明と同意を得た。この研究は九州大学大学院医学研究院・ゲノム・遺伝子解析倫理委員会の承認を得て、3 省庁合同のガイドラインに従い実施された。

## 2. 2. 遺伝子型の決定方法

ゲノムのデオキシリボ核酸（以下 DNA とする）は以前記述された方法 (Lahiri & Nurnberger, 1991; Mitsuyasu et al., 2001) により末梢血の白血球から抽出された。遺伝子型の決定実験は、ポリメラーゼ連鎖反応（以下 PCR とする）法および/または直接塩基配列決定法（以下シーケンシング法という）を用いた。PCR で増幅された DNA 断片および PCR のプライマー対は表 1 および図 1 に要約した。120-bp TR および 48-bp VNTR 多型は増幅された各断片の長さを確認することで遺伝子型を決定した。他の 26 個の多型については、PCR で増幅された二つの DNA 断片の塩基配列を決定することにより遺伝子型を決定した。

120-bp TR 多型は既報の PCR に基づく遺伝子型決定法 (Seaman et al., 1999) により決定した。遺伝子型は、429bp 及び 549bp の断片が存在するかどうかによって決定した。

48-bp VNTR の遺伝子型決定は、報告された方法 (Nanko et al., 1993; Van Tol et al., 1992) によって実施された。PCR 産物はアジレント 2100 バイオアナライザ (アジレント・テクノロジー、アメリカ合衆国) で電気泳動を行った。増幅された断片の長さは、48bp に反復回数だけ乗じた数字を 174bp に加算した数字だった。

26 多型の遺伝子型決定のために、DNA シーケンシング法を利用した。はじめに、各個人のゲノム DNA から二つの DNA 断片 (606-bp および 1160-bp) を PCR で増幅することにより、DNA シーケンシング法のための鋳型が得られた (図 1)。PCR プライマー (表 1) はジェンバンク (GenBank) 登録番号 AC021663 の塩基配列情報に基づいて設計された。606-bp 断片は、 $1\mu\text{M}$  の各プライマー、それぞれが  $0.2\text{mM}$  となるアデニン、グアニン、シトシン、チミンの各デオキシヌクレオチド三リン酸 (以下 dNTP とする) (アマシャム・バイオサイエンス、アメリカ合衆国)、 $50\text{ng}$  の鋳型 DNA、 $0.025\text{U}/\mu\text{l}$  のアンプリタックポリメラーゼ (アプライド・バイオシステムズ、アメリカ合衆国)、 $5.5\text{ng}/\mu\text{l}$  のタックスタート抗体 (クロンテック、アメリカ合衆国)、 $50\text{mM}$  の塩化カリ



ウム、10mMのトリス塩酸(pH8.3)、1.5mMの塩化マグネシウムおよび10%のジメチルスルフォキシド(以下DMSOとする)(和光純薬工業株式会社、日本)を含む10 $\mu$ lの反応溶液で増幅された。反応温度条件は、95 $^{\circ}$ Cで1分間のあとに、変性反応を95 $^{\circ}$ Cで30秒間、アニーリング反応を60 $^{\circ}$ Cで30秒間、伸長反応を72 $^{\circ}$ Cで1分間という過程を40回繰り返した後に、72 $^{\circ}$ Cで5分間保温反応させた。1160-bpの断片は、1 $\mu$ Mの各プライマー、0.2mMのdNTP、50ngの鋳型DNA、0.025U/ $\mu$ lのケーオーディー・ダッシュ・ポリメラーゼ(東洋紡、日本)、ケーオーディー・ダッシュ1xPCRバッファーおよびDMSOを10%含む20 $\mu$ lの反応溶液で増幅された。反応温度条件は、96 $^{\circ}$ Cで1分間のあとに、変性反応を95 $^{\circ}$ Cで30秒間、アニーリング反応を63 $^{\circ}$ Cで2秒間、伸長反応を74 $^{\circ}$ Cで30秒間の過程を33回繰り返した後に、74 $^{\circ}$ Cで5分間保温反応させた。次に、上記二つのDNA断片を26多型の遺伝子型決定のためにシーケンシング法に用いた。まず、鋳型の断片は2単位のシュリンプ・アルカリ・フォスファターゼ(ロッシュ、アメリカ合衆国)と2単位のエクソヌクレアーゼI(ニューイングランドバイオラボ、アメリカ合衆国)により37 $^{\circ}$ Cで1時間反応処理された。2つの酵素活性は80 $^{\circ}$ Cで15分間の熱処理により不活化された。サイクル・シーケンシング反応はビッグ・ダイターミネーター・サイクル・シーケンシング・レディ・リアクション・キット・バージョン・2.0(アプライド・バイオシステムズ、アメリカ合衆国)を使い、説明書に従って、実行した。鋳型断片とプライマー(表1および図1)に合わせて、プロトコールに若干の変更を加えた。伸長反応産物をマルチスクリーン96-ウェル・フィルター・プレート(ミリポア、アメリカ合衆国)で精製した。サンプルの電気泳動およびデータ解析はエービーアイ・プリズム3100および3700DNA分析器(アプライド・バイオシステムズ、アメリカ合衆国)を用いた。すでに報告されている(Mitsuyasu et al., 2001)ように位置-947番目から-156番目までの792-bpの断片をシーケ

ンシングの鋳型として利用した133名については、その領域に関しては重複して遺伝子型を得た。この792-bp断片には、12個の多型(-713C/T、-616G/C、-615A/G、-603del/T、-600G/C、-598G/T、-597(G)2-5、-521T/C、-376C/T、-364A/G、-291C/Tおよび-234C/A)(表1および図1)が含まれており、1160-bpの断片から得られた結果の確認のために使用された。

### 2. 3. 集団遺伝学解析

2種類の多型性(以下バイアレリックとする)を示す多型のハーディ・ワインバーク平衡はカイ二乗検定によって評価した。相(phase)が未決定の遺伝子型データについてLDの係数であるD'およびr<sup>2</sup>をハプロビュー3.2ソフトウェア(以下Haploviewとする)(Barrett, Fry, Maller, & Daly, 2005)を用いて計算した。LDの計算は、バイアレリックマーカーのうち頻度が少ない(以下マイナーとする)アレル頻度が0.01以上であった14多型(120-bp TR、-1217G/del、-1106T/C、-906T/C、-809G/A、-768G/A、-713C/T、-616G/C、-603del/T、-600G/C、-521T/C、-376C/T、-291C/Tおよび12-bp反復)および複数の多型性(マルチアレリック)を示す3多型(-930C/G/T、-597(G)2-5および48-bp VNTR)の合計17多型についておこなった。Haploviewはバイアレリックのデータのみしか扱えないため、我々は、-930C/G/TについてはアレルTをもつ個人を除外し、また、-597(G)2-5についてはアレル(G)2およびアレル(G)5をもつ個人を除外した。同様の理由により、48-bp VNTRについては、4/4、2/4、2/2の遺伝子型をもつ個人のみを計算に含めた。LDブロックはGabrielら(Gabriel et al., 2002)が記述した信頼区間法により決定した。HaploviewのLD解析はこのソフトウェアの信頼区間法を選択することにより実行した。

DRD4遺伝子の4.4kbの領域内のLDブロックを調査して、Haploview内のタガー・ソフトウェア(以下Taggerとする)を使ってタグSNP(ハプロタイプ・タグ・マーカー)を選択した。Tagger

によって、 $r^2$  値が 0.8 以上になるマーカーのみが LD ブロックの一部として選ばれた。

Tagger で選択されたタグ・マーカーはフェイズ・バージョン 2.1 ソフトウェア (以下 PHASE とする) (Stephens & Donnelly, 2003; Stephens, Smith, & Donnelly, 2001) によるハプロタイプ推定に使用された。推定されたハプロタイプの分布は (1) 統合失調症患者全員と対照者群全員、(2) 女性統合失調症群と女性対照者群、(3) 男性統合失調症群と男性対照者群のあいだでそれぞれカイ二乗検定により比較した。

我々は、さらに、ハプロタイプ・トレンド・レグレッション・プログラム (以下 HTR という) (<http://statgen.ncsu.edu/zaykin/htr.html>) (Zaykin et al., 2002) を用いてスライディング・ウインドウ・ハプロタイプ解析を実施した。このプログラムはハプロタイプ頻度を推定して、患者群と対照者群間でハプロタイプの相関解析をスライディング・ウインドウの方法で実施する。本研究では、ウインドウ幅を 2 マーカーから 6 マーカーまでと設定した。

#### 2. 4. 統計学的手法

17 個の多型マーカーの遺伝子型頻度を (1) 統合失調症患者群全員と対照者群全員、(2) 女性統合失調症患者群と女性対照者群、(3) 男性統合失調症患者群と男性対照者群においてカイ二乗検定によって比較した。分割表においては、期待値が 5 以下のセルがある場合、フィッシャーの正確確率検定を用いた。すべての統計検定の有意水準 (アルファ) を両側検定の 0.05 とした。オッズ比 (以下 OR とする) を 95% 信頼区間 (以下 CI とする) とともに計算した。

単変量解析の次に、性別、年齢、および 17 個の多型マーカーを独立変数として、ステップワイズ・ロジスティック回帰分析を実施した。従属変数は統合失調症罹患を 1 とし、対照を 0 とした。

多重仮説検定の補正のために、ボンフェローニ変法を用いた。多重検定が行われているので、通常のボンフェローニ法によれば、アルファ水

準 0.05 は検定の数で割った数字となる。しかし、いくつかの多型のあいだには LD が存在するので、この補正はあきらかに厳格すぎる。それゆえ、我々はボンフェローニ変法 (Nyholt, 2004) を使用した。この方法に従うと、独立したマーカーの有効数が算出されて、ボンフェローニ補正での分母として利用される。ボンフェローニ法に対する別の補正法 (Li & Ji, 2005) も、多型の有効数を計算するために使用された。

統計学的な計算は、ビーエムディーピー統計ソフトウェア (BMDP 統計ソフトウェア、アメリカ合衆国) およびエスピーエスエス 13.0 ジェイ (SPSS ジャパン、日本) を用いた。2×2 以外の分割表の場合は、フィッシャー正確検定を計算するためにスタットイグザクト (サイテルソフトウェア、アメリカ合衆国) を利用した。

我々のサンプル・サイズは、ジー\*パワーソフトウェア (Erdfelder, Faul, & Buchner, 1996) による計算では、有意水準を 0.05、効果量を  $W=0.10$  (小) としたとき、事後の検出力は、0.848 であった。

#### (倫理面への配慮)

血液採取に際しては、文書および口頭にてインフォームド・コンセントを本人および家族 (代諾者) から取得した。この研究は九州大学大学院医学研究院・ゲノム・遺伝子解析倫理委員会の承認を得て、3 省庁合同のガイドラインに従い実施された。

### C. 研究結果

3. 1. 多型の同定および遺伝子型の決定  
図 1 は DRD4 遺伝子の遺伝学的構造および報告された多型の位置を示している (表 2 参照)。我々は約 4.9 キロ bp (以下 kbp とする) の範囲に含まれる 28 SNP および 6 個の反復・欠失多型を含む 34 多型に関する情報を収集した。ディーブスニップ (以下 dbSNP とする) (Sherry, Ward, & Sirotkin, 1999)、ジェイスニップ (JSNP) (Haga, Yamada, Ohnishi, Nakamura, & Tanaka, 2002; Hirakawa et al., 2002)、他の文献および我々の実験からデータを得た。図 1 に示すように、

エクソン1の3'側末端から1.5kbpから始まる約1.8kbpの領域には22個のSNPを含む合計27多型が存在する。この多型の分布密度は、ゲノム全体でのSNPの平均分布密度(0.827SNPs/kbp (dbSNP)あるいは1.91kbp/SNP (Sachidanandam et al., 2001))と比較すると12.2SNP/kbpと非常に密度が高い。我々が本研究において遺伝子型を決定したDRD4遺伝子上の27多型の要約を表2に示した。これらの多型には4個の新規のSNP (-1102G/A、-930C/G/T、-598G/T および-234C/A) および一塩基反復多型 (-597(G)2-5)が含まれる。-597(G)2-5多型は、従来データベース上で-602G/delあるいは-602(G)8-9と報告されていた(Mitsuyasu et al., 2001; Mitsuyasu et al., 1999; Okuyama et al., 2000)。本実験において-602(G)7アレルと-602(G)10アレルが同定された。さらに、-598G/Tという新規のSNPが-602(G)7-10の中に同定された。そのため、-602(G)8-9多型はグアニン・ヌクレオチドが2回から5回まで反復する多型(-597(G)2-5)、-598G/T、およびその上流側の変異のない4つのグアニン・ヌクレオチド配列の組み合わせとみられる。それゆえ我々は-602G/delあるいは-602(G)8-9のかわりに、-597(G)2-5という表記を提案する。-598G/TはdbSNPデータベースに-598G/A/delとして登録されているが、我々の研究では-598Gと-598T遺伝子型だけ示された。このため、我々はこのSNPを新規として分類した。

本研究においては各多型間の関連性を理解するために、新規の4つのSNPを含めたこれらの多型に、従来からよく研究されている120-bp TR および48-bp VNTRを追加し、解析を行った。120-bp TRはエクソン1の5'末端から5'側上流0.8kbpに位置している。48-bp VNTRはエクソン3上に位置している。ハプロタイプ解析によると、48-bp VNTRの4回繰り返しアレルは近傍の2つのSNP(IVS3(+43)A/GとIVS3(-32)C/G)と強く連鎖していることが報告されている(Ding et al., 2002)ことより、我々は本遺伝子における3'側領域の多型の代表マーカーとし

て48-bp VNTR多型を選択した。

27多型について遺伝子型を決定した(エクソン1の13bp欠失が技術的問題のため解析できなかった)。21個のSNPはバイアレリックのSNP(置換19、挿入・欠失2)であり、1個のSNPが3種類の多型を示す(トリアレリック)多型であった。5個のSNP(-1123C/T、-615A/G、-364A/G、-11C/Tおよび+31G/C)は今回の対象では多型性は認められなかった(モノモルフィック)。21bp欠失に関しても同定できなかった。4つのマーカー(-1102G/A、-598G/T、-234C/Aおよび-128G/T)は対象群内でマイナー・アレルが1つのみ(シングルトン)しか観察されなかった。これらの多型は疾患の関連の解析には用いなかった。48-bp VNTRの7回反復は日本人集団においては非常に稀であった。4/7のヘテロ接合体はわずかに4名のみ観察されただけだった。バイアレリック多型の遺伝子型の分布はハーディ・ワインバーグ平衡に一致していた(データは示されていない)。

### 3. 2. 統合失調症との関連

統合失調症の発症の危険に対する多型の影響を評価するために、17多型について単変量および多変量解析を行った。とくに、既知の12SNP(-1217G/del、-1106T/C、-906T/C、-809G/A、-768G/A、-713C/T、-616G/C、-603del/T、-600G/C、-521T/C、-376C/Tおよび-291C/T)および3つの反復多型(120-bp TR、12-bp反復および48-bp VNTR)および新規の2多型(-930C/G/Tおよび-597(G)2-5)を解析した。単変量解析の結果を表2に示す。

統合失調症患者群と対照者群間の比較においては、多重仮説検定の補正前でさえも統計学的に有意差を示す多型は認められなかった(表2)。女性の統合失調症患者と女性対照者を比較した場合、一多重仮説検定の補正前においては、-713C/T(p=0.049)と-521T/C(p=0.046、表2)において統計学的な有意差を認めた。-713C/Tの場合、マイナー・アレル頻度が極めて低かった(女性統合失調症患者では0.02、女性対照者群

では0)。統合失調症患者群では4名のヘテロ接合体がみられた(マイナー・アレルのホモ接合体はみられなかった)のに対して、女性対照者群ではヘテロ接合体は0名であった。女性対照者群よりも女性統合失調症患者においてアレル-521Cの頻度が高かった( $p=0.034$ , OR:1.58, 95%CI: 1.06-2.37)。遺伝子型T/Tを基準とした場合に各遺伝子型のORを比較すると、T/CのORは2.11(95%CI: 1.10-4.07)であり、C/CのORは2.33(95%CI: 1.01-5.38)であった。もし、-521Cアレルが優性遺伝の形式の場合、遺伝子型C/CおよびT/Cの女性群のORは、遺伝子型T/Tをもつ女性群に対して2.17(95%CI: 1.17-4.04,  $p=0.021$ )となる。しかし、ボンフェローニ補正あるいはLDを考慮した緩やかな修正ボンフェローニ補正(Li & Ji, 2005; Nyholt, 2004)を適用した場合、これらの結果は有意ではなくなった。

男性群においては、多重検定の補正以前でも、統合失調症患者群と対照者群間に有意差は認められなかった(表2)。同様に、ステップワイズ・ロジスティック回帰解析では、多型と統合失調症のあいだに有意な相関は認められなかった。統合失調症の発症に対する個々の多型の影響を同定できなかったため、我々は次にDRD4のハプロタイプが統合失調症の発症危険性に影響するかを検討した。ハプロタイプ推定のソフトウェアを使用する前に、他の多型と強いLDにある多型を最初に除去しておくことが有効である。したがって、我々は17多型の全ての組み合わせにおいてLD係数 $D'$ と相関係数 $r^2$ を決定した(図2および表3)。

国際ハップマップ・プロジェクトのDRD4のデータには、日本人で多型性を示すわずか5個のSNP(rs3758653(5'側上流領域)、rs3889692(エクソン3)、rs11246226、rs936465、rs4331145(3'側下流領域))しか含まれていない。これらのSNPをHaploviewで解析した。下流側の3SNPを含む1つのLDブロックがつけられただけだった。ハップマップの残りの2SNP(rs3758653(本研究では-906T/C)および

rs3889692(本研究では遺伝子型は決定していない))と他のSNPは相関性がみられなかった( $r^2$ 値は0.024-0.061)。この結果はDRD4遺伝子全体にわたってLDが低いことを示している。我々は、DRD4遺伝子の4.4kbpの領域のLD解析と、HaploviewのTaggarによるタグ・マーカー選択のために、我々の遺伝子型のデータを使用した。2つの小さなLDブロックが同定された。1つは-1217G/delと-1106T/Cとの間( $D'=0.98$ ,  $r^2=0.59$ )にみられ、もう1つは-291C/Tと12bp反復多型の間( $D'=0.96$ ,  $r^2=0.86$ )にみられた。他の多型では非常に弱い相関しかみられなかった( $r^2<0.8$ )。しかし、-376C/Tと48-bp VNTRは比較的高い相関係数を示した( $r^2=0.78$ )。そのため、DRD4遺伝子でLDが低いという結果として、我々は独立した多型の数を17から16へ減らすことしかできなかった。

48-bp VNTR多型は-376C/Tと強い相関を示したが( $D'=0.91$ ,  $r^2=0.78$ )、120-bp TRから12-bp欠失までの領域の他の多型とは高い相関 $r^2$ 値は示さなかった(表3)。120-bp TRと-906T/Cとのあいだの $D'$ 値( $D'=0.91$ )および120-bp TRと-291C/Tとのあいだの $D'$ 値( $D'=0.90$ )は0.90以上であった。しかし、それぞれに対応する $r^2$ 値が0.80未満であり、これらの多型は既にセクション2. 材料と方法において記述したように多型を除去する我々の基準に適合しなかったため、除外できなかった。

16マーカーを用いると、PHASEでは、合計136種類のハプロタイプが推定された。我々はアレル頻度が0.01以上のハプロタイプ20種類の分布を、(1)全対象、(2)女性群、および(3)男性群について統合失調症群と対照群間で比較した。カイ二乗検定によりハプロタイプ頻度を解析した場合、統計学的な有意差はみられなかった。16のタグ・マーカーを用いたウィンドウ幅が2から6までのスライディング・ウィンドウ解析では、多重検定の補正前であっても、統合失調症患者群と対照群間に統計学的な有意差は示されなかった。図3はスライディング・ウィンドウの幅が2と3の場合の解析結果を示し