

体で、不活性化体に変換されたのち腎臓から排泄されるため、ropiniroleと同様に腎機能低下の影響は受けにくい。海外での治験ではパーキンソン病の初期、進行期ともに運動症状の改善が報告されている<sup>17,18)</sup>。貼付剤ということで、嚥下困難な患者や、消化管手術前後など経口摂取不能の場合は、他剤には変えがたい有用性がある。一方、当然貼付による局所反応が心配されるが、悪心などと同程度あるいはそれ以下の頻度で認容性は高いようである。

## 文 献

- 1) Parkinson Study Group. Levodopa and the progression of Parkinson's disease. *N Engl J Med.* 2004 ; 351 : 2498-508.
- 2) Parkinson Study Group. Dopamine transporter brain imaging to assess the effects of pramipexole vs levodopa on Parkinson's disease progression. *JAMA.* 2002 ; 287 : 1653-61.
- 3) Whone AL, Watts RL, Stoessl AJ, et al. Slower progression of early Parkinson's disease with ropinirole versus levodopa : the REAL-PET study. *Ann Neurol.* 2003 ; 54 : 93-101.
- 4) Parkinson Study Group. A controlled, randomized, delayed-start study of rasagiline in early Parkinson disease. *Arch Neurol.* 2004 ; 61 : 561-6.
- 5) Goetz CG, Poewe W, Rascol O, et al. Evidence-based medical review update : pharmacological and surgical treatments of Parkinson's disease : 2001-2004. *Mov Disord.* 2005 ; 20 : 523-39.
- 6) Pahwa R, Factor SA, Lyons KE, et al. Practice parameter : treatment of Parkinson disease with motor fluctuations and dyskinesia (an evidence-based review). *Neurology.* 2006 ; 66 : 983-95.
- 7) Mizuno Y, Yanagisawa N, Kuno S, et al. Randomized, double-blind study of pramipexole with placebo and bromocriptine in advanced Parkinson's disease. *Mov Disord.* 2003 ; 18 : 1149-56.
- 8) Kaye CM, Nicholls B. Clinical pharmacokinetics of ropinirole. *Clin Pharmacokinet.* 2000 ; 39 : 243-54.
- 9) Etmann M, Gill S, Samii A. Comparison of the risk of adverse events with pramipexole and ropinirole in patients with Parkinson's disease : a metaanalysis. *Drug Saf.* 2003 ; 26 : 439-44.
- 10) Heikkinen H, Varhe A, Laine T, et al. Entacapone improves the availability of l-dopa in plasma by decreasing its peripheral metabolism independent of l-dopa/carbidopa dose. *Br J Clin Pharmacol.* 2002 ; 54 : 363-71.
- 11) Poewe WH, Deuschl G, Gordin A, et al. Efficacy and safety of entacapone in Parkinson's disease patients with suboptimal levodopa response : a 6-month randomized placebo-controlled double-blind study in Germany and Austria (Celomen study). *Acta Neurol Scand.* 2002 ; 105 : 245-55.
- 12) Rascol O, Brooks DJ, Melamed E, et al. Rasagiline as an adjunct to levodopa in patients with Parkinson's disease and motor fluctuations (LARGO, lasting effect in adjunct therapy with rasagiline given once daily study) : a randomized, double-blind, parallel-group trial. *Lancet.* 2005 ; 365 : 947-54.
- 13) Murata M, Horiuchi E, Kanazawa I. Zonisamide has beneficial effects on Parkinson's disease patients. *Neurosci Res.* 2001 ; 41 : 397-9.
- 14) Murata M, Hasegawa K, Kanazawa I, et al. Zonisamide improves motor function in Parkinson disease : a randomized, double-blind study. *Neurology.* in press.
- 15) Murata M. Novel therapeutic effects of the anti-convulsant, zonisamide, on Parkinson's disease. *Curr Pharm Des.* 2004 ; 10 : 687-93.
- 16) Miyazaki I, Asanuma M, Diaz-Corrales J, et al. Protective effects of a novel anti-parkinsonian agent zonisamide on dopamine quinone-related neurotoxicity. *Mov Disord.* 2006 ; 21 suppl 15 : 513.
- 17) The Parkinson Study Group. A controlled trial of rotigotine monotherapy in early Parkinson's disease. *Arch Neurol.* 2003 ; 60 : 1721-8.
- 18) Reynolds NA, Wellington K, Easthope SE. Rotigotine : in Parkinson's disease. *CNS Drugs.* 2005 ; 19 : 973-81.

## む す び

パーキンソン病の治療薬は次々に開発されている。時に新たな薬剤への期待が大きすぎて従来の薬剤の効果を過小評価してしまうこともあり、薬剤の評価には時代背景も大きく関与することを思い知らされている。臨床家としてはそれぞれの薬剤の薬理学的性質を十分理解したうえで、治験など大規模研究の結果とともに、目の前の患者さんでの効果をよく見極め、個々の患者さんに最適な薬剤を選択していく必要がある。

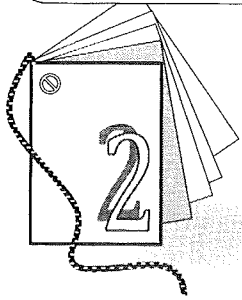
基礎講座

老年精神医学研究の進め方と発表の仕方②

## 研究デザインの妥当性

米本直裕・山田光彦

## 基礎講座：老年精神医学研究の進め方と発表の仕方



## 研究デザインの妥当性

国立精神・神経センター精神保健研究所老人精神保健部 米本直裕, 山田光彦

## はじめに

人間を対象とする研究では、細胞や動物での実験とは異なり、倫理的かつ物理的な限界から、繰り返し実験を行うことがむずかしい。なかには、観察のみが可能で試験的な介入を行うことさえむずかしい場合もある。また、研究対象者への介入には限界があり、対象者へのリスクを考え、仮説から検証に向かって段階的に研究を進める必要がある。さらに、ヒトでは、測定指標の個体間、個体内のばらつきも大きく、環境要因などの影響も無視できない。老年精神医学研究もその例外ではない。したがって、より真実に近い研究結果を得るためには、当初から、誤差 (error) の存在を認識し、この誤差をなるべく少なくするためのさまざまな工夫を研究計画に盛り込んでおく必要がある。

## I. 偶然誤差と系統誤差

誤差には大きく分けて2つの種類がある。1つは偶然誤差 (random error)、もう1つは系統誤差 (systematic error) である。偶然誤差とは標的となる母集団からサンプリングする際に起こる誤差であり、通常、その研究における対象者数と対象者のばらつきによって影響される。系統誤差は、サンプリングにおいて、何らかのある要因が引き起こす偏りであり、バイアス (bias) と呼ばれるものである。

偶然誤差と系統誤差の違いを簡単に説明してみよう。研究の対象者数を無限大に増やしたとして、ゼロになる誤差が偶然誤差である。一方、系統誤差は、研究の対象者数をいくら増やしても影響を受けずに依然として残る誤差である。系統誤差の存在を十分に認識しておかないと簡単に誤った結論が導き出されてしまう危険性が高い。

## 〈例1〉高齢男性の平均体重の調査

ごく簡単な例として、ある町の高齢男性の平均体重を調査する研究を考えてみよう。その町は人口100万人で、そのうち高齢男性は10万人いる。そこで、住民票からランダムに抽出した100人の高齢男性を対象に、同一型の体重計を複数用い測定することに決めたとする。これによって、100人の測定値の平均値を用いて、この町の高齢男性の平均体重を推定することが可能になる。この推定値に対する誤差はなにから起こるだろうか。測定値は機器ごとの違い、測定場所、測定を行った時間帯や測定者によって異なるかもしれない。たとえば測定のとときに、どのような場所に体重計を置いていたかは偶然誤差に影響するであろう。この誤差は測定値が高くなることもあれば、低くなることもあるが、誤差を平均すれば高すぎることも低すぎることもないだろう。もしサンプルサイズを100から1,000とか10,000と増やしていけば、このような誤差の影響はほとんどなくなっていく。測定した高齢男性の平均体重と、その町の高齢男性全員の平均体重とを比較してみると、測定のサンプルサイズが大きくなればなるほど誤差がゼロになることがわかっている。しかし、サンプルサ

イズを増やしても、影響を受けない誤差もある。たとえば、測定に使用した体重計は、まちがってはじめてからマイナス1 kgに設定されており、すべての体重は、実際より1 kg少なく測定されていたかもしれない。この誤差はどれだけ対象者数を増やしたとしても減らすことはできない。また、ある施設では体重計の少数点を切り上げて計測したが、他の施設では切り下げて計測したとする。このような場合に生じる誤差も、対象者数が増えたからといって減らすことができない系統誤差となる。

偶然誤差は統計学的検定、推定によって対処されるが、系統誤差は研究デザインや交絡の調整などの解析により対処することになる。解析の段階での系統誤差への対応はある程度は可能であるが、実際には「後付け」の対応であり、限界がある。したがって、系統誤差をなるべく少なくするための対応は、研究デザイン（データのサンプリング、測定の方法）計画の段階において十分に検討し、実施することが重要となる。

## II. 研究デザインの種類

### 1. 探索的・仮説生成型研究と検証型研究

研究は目的に応じて、探索的・仮説生成型研究と検証型研究がある。探索的・仮説生成型研究とは、新しい仮説を作り出す、もしくは既存の仮説をより強い仮説へと強化する目的の研究である。症例集積 (case series)、後向き研究 (retrospective study) や前向き研究 (prospective study) といった観察研究はこれに当たる。検証型研究とは、ある仮説に対しての検証を行う実験、介入研究であり、ランダム化比較試験 (randomized controlled trial ; RCT) と呼ばれるデザインがある。それぞれ研究の目的によって研究デザインは異なる。

### 2. 観察研究

観察研究 (observational study) には、コホート研究 (cohort study)、ケースコントロール研究 (case-control study) などがある。コホートとは

「特定の目的のために選ばれた個人の集団で、ある一定期間追跡されるもの」である。コホート研究は、1つもしくは2つ以上のコホートでの疾患の発症、死亡等の有無を測定する研究で、コホート集団の関心のある曝露 (exposure)、非曝露と疾病の発症、死亡等の有無を比較する。曝露には、喫煙や飲酒、薬剤の投与などの治療もあれば、遺伝子もあるかもしれない。一見単純に思えるコホート研究であるが、だれが追跡対象か、どうやってなにをもって疾病等の発症数を数えるのか、など実際はかなり複雑な準備が必要である。

ケースコントロール研究は、あるコホートのうち、疾患を発症した者と、元のコホートから標本抽出されたコントロールとの比較である。コントロールの抽出方法にはさまざまな方法があるが、抽出は曝露状況と無関係に行われなければならない。ケースコントロール研究にも、コホート内ケースコントロール研究 (nested case-control study)、前向きケースコントロール研究、ケースコホート研究 (case-cohort study)、ケースクロスオーバー研究 (case-crossover study) など、さまざまな研究デザインが開発されており、条件さえあえば効率的に研究を行うことができる。発症のきわめてまれな疾患の研究でケースコントロール研究は有効である。ケースコントロール研究では、直接リスク比 (risk ratio) を計算できないため、オッズ比 (odds ratio) を計算するが、ケースコホート研究ではリスク比を推定することも可能である<sup>12)</sup>。

### 3. 介入研究

介入研究は、コホート研究の一種である。コホート研究では曝露の割り当てはランダムではないが、ランダム化比較試験では曝露をランダムに割り当てることとなる。介入研究は、ある疾患の発症や死亡といった患者の予後指標、アウトカム (outcome) に対して、どの治療法がよいかを検証する場合に用いられる場合が多い。ランダム化比較試験を行う前段階の仮説生成型研究として、過去の成績などのヒストリカルコントロールを用

いた（比較群のない）単群の介入試験を行う場合もある。介入研究は臨床試験（clinical trials）と呼ばれる場合もある。

### Ⅲ. 研究デザインの妥当性

研究デザインの妥当性には、内的妥当性と、外的妥当性がある。内的妥当性には、比較の妥当性（もしくは比較可能性〈comparability〉）、対象の妥当性、追跡の妥当性、測定の妥当性、解析の妥当性の5つがある。研究デザインは、まず内的妥当性を高めるための十分な検討をすることが必要である。

#### 1. 比較の妥当性

比較の妥当性とは、比較する2つの要因が比較してよい条件に整っているかかどうかという妥当性である。たとえば、2つの治療を比較する場合、同じような患者に2つの別の治療をしているとは考えにくい。通常の診療では、治療の適用は、患者の状態、重症度などと関連している決定しているはずであるので、当然2つの治療を受ける患者の背景は異なっている可能性が高い。このような状況で2群を比較することが妥当であろうか。比較をする場合、比較したい要因以外に、2つの対象者の背景が揃っていなければ妥当な比較であるとはいえないだろう。比較の妥当性とは対照群の設定方法の妥当性でもある。この妥当性が担保されない限り、交絡（confounding）と呼ばれるバイアスから逃れることができない。

交絡の定義とは①リスク要因（結果〈死亡、発症〉と関連している）である、②曝露（治療）と関連している要因である、③曝露（治療）と結果（死亡、発症）の時間関係の間にある変数（中間変数）でない、つまり、その要因が曝露の結果ではない、である<sup>12)</sup>。

たとえば、「日常の運動の程度の違いがアルツハイマー病の発症に影響するか」を検討する場合、年齢は交絡因子となるだろう。年齢はアルツハイマー病発症のリスク要因であり、日常の運動の程度とも関連しているだろう。日常の運動の程度に

よって、年齢が進むことはあるはずがない。ほかに、遺伝子、食事や肥満度指数（body mass index; BMI）などは交絡因子であるだろうか。

さらに注意すべき点は、その要因が「いつ」の時点で測定されたかである。曝露よりあとの時点で測定されたものは、直接でなくても間接的に曝露の効果による結果を含むものであるかもしれない。このような間接的に曝露の効果を受けている要因は、交絡因子ではなく、中間変数である。中間変数を交絡として調整してしまうと、かえってバイアスの影響を受けた結果になってしまうので注意が必要である。

ランダム化を行わない観察研究においては、交絡がない、ということは保証されない。よって、観察研究の解析においては、多変量解析などによる交絡の調整の解析を行う必要がある。比較の妥当性を確保する研究デザインが、ランダム化比較試験である。ランダム化という操作によって、比較の妥当性を確保しているのである。

ランダム化とは、比較する要因を対象者に対してランダムに割り当てる方法である。割り当ては乱数を用いて行われる。曜日や月、来院の偶数奇数で割り当てることは、乱数ではないのでランダム化ではない。ランダム化は1つのある集団を同一の特性をもつ2つ以上の群に分割することであり、いわばクローンを作るようなものである。ランダム化されてできた群は、それぞれ測定可能な要因も測定不可能な要因も平均的にリスク要因がすべて均等となり、最も比較の妥当性が高い群を作成することができる。ランダム化が最も比較の妥当性を高める理由は、測定されている要因に関しても、未測定の要因に関しても、平均的に要因が揃えられることである。解析では、未測定の交絡要因に関しては対応できない。ゆえに、ランダム化が強力な方法なのである。

ただし、ランダム化を実施さえすれば交絡がないということを保証するわけではない。たとえランダム化を行ったとしてもサンプルサイズが小さければ、群間の不均衡（性別や年齢がたまたま揃

わなないこと) が起こりうる。一方、十分な大きさのサンプルサイズであればその可能性は限りなく低くなる。

交絡の調整を行うデザインには、限定化 (restriction) やマッチング (matching) がある。限定化とは、交絡となる変数が同じ値の人たちだけを対象として限定した研究を実施することである。たとえば、性別で交絡することがすでに明らかなのであれば、女性 (あるいは男性) だけを対象とした研究を実施することである。マッチングは性別や年齢などの条件を揃えてコントロール (比較・対照群) を選定する方法である。マッチングはコホート研究やケースコントロール研究で用いることが可能であるが、それぞれ意味が異なり、解析方法も特別なので、実際にマッチングを用いた研究を実施する場合には十分な注意が必要である<sup>13)</sup>。

交絡は、測定されている要因に関しては解析で調整することが可能である。調整の方法には、層別化 (stratification) や回帰モデル (regression model) などがある。近年では傾向スコア法 (propensity score)<sup>1,13)</sup> や IPW 法 (inverse probability weight) を用いた調整法も用いられる<sup>13)</sup>。

## 2. 対象の妥当性

対象の妥当性とは、研究対象者の適格基準、除外基準と関連している。対象者の選択や研究の参加が系統的に偏ってしまうと、選択バイアス (selection bias) が発生する。選択バイアスがあるかどうかは、研究の対象から外れてしまった者のデータを収集しておかない限り正確に判断することができない。しかし、研究の対象外のデータ収集は実施されない場合が多いため、推測に基づき判断せざるを得ない場合が多い。

また、適格基準や除外基準の定義が不明確であれば、実際の調査対象のなかにそれ以外の者が混ざってしまい、本来調査対象とするべきであった対象者のデータとの間に偏りが生まれることになる。

## 〈例 2〉高齢者のうつ病の調査

ある町における高齢者のうつ病の有病割合を調査する場合を考えてみよう。まず、パイロット試験として、ボランティアとして公募した住民を対象にうつ病のスクリーニングテストを実施した。この調査で得られた結果は、本来調査したかった「その町でのうつ病の有病割合」を反映しているものであろうか。ここで、選択バイアスの影響について注意する必要がある。ボランティアでうつ病の調査に参加した者は、そうでない者に比べて、メンタルヘルスに関心のある者かもしれない。本人もしくは知人、家族にリスクの高い者がいるかもしれない。調査に参加するだけの意欲と体力のある者かもしれない。このような、実際に調査した対象者の特性の偏りは、影響の程度を正確に評価することは困難であるものの、バイアスとして必ず解析結果に影響を与える。こうした選択バイアスは、調査で使用したうつ病のスクリーニング法の性能とはまったく無関係である。選択バイアスへの対策として、スクリーニング法や診断法の開発研究には、ランダム化比較試験を用いることが推奨され、多くの研究で実施されている<sup>13)</sup>。

## 〈例 3〉定期検診データを活用した研究

会社等で実施されている定期検診データを活用した研究を実施する場合にも、選択バイアスの影響に注意する必要がある。ある特定の職域を対象とした研究において、その職域における疾患の発症割合と一般集団の発症割合とを比較した報告がなされることがある。しかし、このような比較は期せずして選択バイアスの影響を受けている可能性があるため注意が必要である。ある職業集団を対象としたデータには、疾病の症状や前駆症状のためにすでに退職してしまった者の情報がもともと除かれてしまっている可能性が高い。つまり、健康で勤務が可能な者だけが、その職業集団に含まれている可能性が高く、これは健康労働者効果 (healthy worker effect) と呼ばれる。このバイアスの影響を避ける一つの方法として、特定の職業と曝露やリスクが異なる別の職業の集団を比較す

る場合がある。健康労働者効果は次の追跡の妥当性の議論においても注意が必要である。

### 3. 追跡の妥当性

ランダム化比較試験やコホート研究のように、対象者の予後（アウトカム）を調べる場合には、対象者を追跡することになる。対象者を十分な期間追跡することができればよいが、しばしば脱落（drop out）して、追跡不明となってしまう。とくに、状態の悪い者、もしくはよい者だけが追跡できないとすると、それは研究結果に重大な影響を与える。人年法（person-year method）に基づいた研究のデザインでは、特段の理由によらない打ち切り（censoring）であれば許容されるが、状態が悪化した（もしくはよくなった）から脱落するような、情報を伴った打ち切りであれば、その妥当性は担保できないだろう。またあまりに脱落が多く、十分な期間が追跡できていない場合には、当然、追跡の妥当性に疑問が残るはずである。

### 4. 測定の妥当性

研究対象の測定についても、バイアスが発症する場合がある。これは、情報バイアス（information bias）と呼ばれる。なかでも、カテゴリ尺度で測定した場合の情報の系統的な誤りを誤分類（misclassified）と呼ぶ。分類のまちがいによって、本来曝露している者がそうでない者に、発症している者がそうでない者になってしまう誤りである。誤分類は発症の仕組みの種類として differential と non-differential に分けられる。疾病の発症や曝露の有無と関連して誤分類を起こしているとすれば、differential であり、そうでないならば、non-differential である。

#### 〈例4〉高齢者の食事とうつ病発症についての調査

たとえば、高齢者を対象に、食事における  $\omega 3$  脂肪酸の高摂取の有無とうつ病発症について検討する場合を考えてみる。高摂取群か低摂取群かは、摂取量から基準値を設けて、高低の2群に分類することとする。その際に、測定誤差が生じて、どちらかに誤って分類されることが起こりうる。本

当は高摂取でないが、低摂取群になる場合もあれば、低摂取にもかかわらず、高摂取群に分類されることもある。この誤分類がうつ病の発症と関連していなければ、これは non-differential である。non-differential な誤分類は、多くの場合、効果を薄める、つまり、差がないという結果に導く方向にバイアスがかかっていることが知られている<sup>12,13)</sup>。

ケースコントロール研究などの後向き研究で起こるのが、思い出しバイアス（recall bias）と呼ばれるものである。これは differential な誤分類である。すでに疾病が発症したあとに、インタビュー調査などで過去の曝露情報を調査する場合に起こる。「疾患を発症した者」は、発症原因や思い当たる背景、曝露について詳しく思い出し、それが疾患の発症と関連して考えるかもしれない。ところが、コントロールである「その疾患が発症していない者」は、過去の曝露状況をそれほど詳しく思い出せないかもしれない。このように思い出し方に違いが生まれるだろうことは容易に想像できる。思い出しバイアスをできるかぎり防ぐために、正確に偏りなく記憶をたどれるように質問法を工夫する、面接調査だけでなく、過去に記録された診療録など別の情報源からも情報から得るという方法もある。このような differential な誤分類は効果を過大評価することも、過小評価することもありうる<sup>12,13)</sup>。

### 5. 解析の妥当性

どのような研究であろうと、収集されたデータについて研究デザインにあった解析が行わなければ、妥当な結果を得ることはできない。データの種類、分布等のデータの性質、研究デザインによって解析方法は異なる。たとえば、平均値で比較することが妥当でないデータに対して、平均値の差の比較の解析を行ったとしても、その結果は不適切である。研究デザインと解析方法は常にセットであり、事前に研究計画書に記載するべきである。また、解析も解析計画書を作成してから実施する。近年では、とくに介入研究では、後付けの解析や不都合なデータの隠蔽を防ぐため、臨床試

験登録により、あらかじめ解析するアウトカムを提示する義務があり、また論文投稿の際に、解析計画書の提出を要求する雑誌までみられるようになってきた。収集したデータを事後的に処理し、都合のよい結果のみを創出しようとすることは慎むべきである。

#### 6. 外的妥当性、一般化可能性

一方、内的妥当性が高まったとしても、その結果が現実の臨床場面に適用できなければ意味がない。この妥当性を、外部妥当性、一般化可能性 (generalizability) と呼ぶ。とくに治験等の介入試験では、日常臨床としては適用となるであろう対象者が、リスクが高いため、研究のレベルでは除外される場合も少なくない。うつ病研究でも、希死念慮の高い者を対象者から除外して実施されることが多い。また、研究結果を、ある程度似た他の集団に外挿する必要がある場合もあるであろう。その場合には、研究結果の解釈には十分な注意が必要である。このような研究結果と日常臨床との間にギャップを埋めるため、次のステップとして、日常臨床に近いかたちで実施する実務的 (pragmatic) な試験を実施する必要がある。

#### 7. 研究デザインの種類とエビデンスレベル

研究デザインの種類によって、得られる研究結果の妥当性は異なっている。EBM (evidence based medicine) においてよく語られ、アメリカ AHRQ (Agency for Healthcare Research and Quality) や Oxford Centre for Evidence-based Medicine などが提示しているエビデンス (evidence) のレベルとはこれを指しており、多くの場合、バイアスがある可能性の程度をもって示されている。ただし、小規模なランダム化比較試験よりも、適切にデザインされた前向き数万例の大規模なコホート研究のほうがむしろ真実に近い結果を反映している場合もありうる。そのため、「研究の質」をエビデンスのレベルのみをもってして判断することには限界があり、個々の研究で研究の妥当性を評価する必要がある。

#### IV. 継時データの研究とデータの欠測

老年精神医学の領域でよく用いられる研究デザインに、継時データの研究がある。これはコホート研究、もしくはランダム化比較試験において、時間経過に伴う変化を評価する研究デザインである。継時データの研究では、個人1人ひとりが、決められた時点ごとに、繰り返しデータ測定 (repeated measures) される。臨床家にとっては、ある期間の患者の健康状態の推移を追跡することが必要である。また、患者に対する治療がたった一度で終了することはまれである。よって、継時データの研究におけるアウトカムに関する情報は、研究開始前および研究期間中のいくつかの時点で測定される必要がある。このような継時データを用いた研究は、精神医学研究の多くの領域で、とくに重要なデザインとなっている<sup>3)</sup>。

しかし、このような研究デザインでは、データの欠測が生じやすい。ある対象者が脱落すればそれ以降のデータはいっさい入手できない。また、すべての対象者を決まった時点で測定できない場合もある。ある1時点のデータが1つでも欠測しているからといって安易に解析対象から除いてしまうことは、対象者数を減らし、さらにバイアスを発生させることになる。たとえば、抗うつ薬の臨床試験の脱落の割合は3か月の治療期間で30~40%以上にもなるといわれている<sup>3)</sup>。脱落や欠測値の数が少なかったとしても、予後の最も悪い者ばかりのデータが脱落・欠測しているとか、逆に予後がよい者ばかり脱落・欠測していれば、最終的な解析結果に大きな影響があるであろう。そのため、欠測値を含むデータの取り扱いには十分な注意が必要である<sup>2,3,5,6,8-10)</sup>。Rubinは、データの欠測を、その発生の仕方によって、完全にランダムな欠測 (MCAR)、ランダムな欠測 (MAR)、無視できない欠測 (non-ignorable missing) に分類した<sup>3,6)</sup>。患者の脱落やデータの欠測が及ぼす影響については、この分類を基に考えると理解しやすい。



### 1. 完全にランダムな欠測

完全にランダムな欠測 (missing complete at random; MCAR) は、以前に観察した値にも、欠測の値にも、どちらの値にも依存しない確率で起こる欠測である。結果として、観察された(欠測でない)値は、全体の対象者の単純なランダムサンプルと同じことになる。ありそうな例としては、実験室での測定で、試験管を落としたために測定できなくなったとか、研究対象者の偶然の事故死、もしくは、別の地域への異動などがある。継時データにおいて、部分的に起こる欠測値、たとえば、患者が一時的な理由(たとえば、遊びに行ったため)により来院しなかった場合などは、完全にランダムな欠測を考えるのに理にかなった仮定である。この種の欠測は結果にほとんど影響を与えないが、本当にランダムな欠測であるかはどうか、かなり強い仮定である。

### 2. ランダムな欠測

ランダムな欠測 (missing at random; MAR) とは、欠測が過去に観測されていたアウトカムに依存した確率で起こる種類の欠測である。ここでの欠測は観察されたデータだけに依存する。もし同じ背景要因をもち、特定の時点まで、またそれを含む時点で、アウトカムが同じであるなら、その時間に残っている対象者の特徴の分布と、特定の時点で脱落した者の特徴の分布は同じはずである。このタイプの欠測の例として、アウトカムが収縮期血圧である降圧薬の例がある。この研究では、対象者の血圧が高くなりすぎたとき、研究から除外するとしている。参加者が脱落するまえに、脱落時点の血圧が観察されている。これは血圧の値に依存しているので、欠測のメカニズムは完全にランダムな欠測ではないが、ランダムな欠測である。観察されたデータの一部だけに依存して欠測しているからである<sup>3)</sup>。もう1つ、BMIを測定した研究の例を紹介する。BMI測定値の欠測は、介入期間に体重が増えたか減ったかどうにかかわらず、早期に来院した者でBMIが高い者は、面倒くさがって、あとの来院時に測定をしたがらな

かった、と考えたとする。この場合、その欠測はランダムな欠測であるが、完全にランダムな欠測ではない<sup>3)</sup>。

### 3. 無視できない欠測

最後の無視できない欠測 (non-ignorable missing, しばしば情報をもった欠測といわれる) は、測定していない値に依存した確率で起こる種類の欠測である。これは、患者から観察されたアウトカムが、系統的に通常より高かったり低かったりする場合において、観察データが欠測する場合を指す。現実的には、おそらく対象者の状態が悪くなったり、よくなったりしていることに関連しているであろう。たとえば、低所得者もしくは超高所得者インタビューで個人の収入に関して回答したがない、ということがある。ほかにありそうな例は、対象者の血圧があまりにも高くなったりすると、この値は観察されなくなったり、耐えられないくらいの痛みになると、関連する痛みの値は記録されていなかった、などがある。上で紹介したBMIの例では、最後の外来から体重がさらに増えていたら、対象者が測定をより避けがちになるとすれば、そのデータの欠測は無視できない欠測となる。この種類の欠測値が含まれているデータは扱うことはきわめてむずかしい<sup>3)</sup>。

欠測値の補填に関しては、古くから欠測値の最終観察値で補填するLOCF法 (last observation carried forward) がよく用いられてきたが、近年、これは推奨されるべき方法ではないと指摘されている<sup>7)</sup>。データ欠測の分類等によって、混合効果モデル (mixed effect models) や多重補填法 (multiple imputation)、感度解析 (sensitive analysis) などの解析方法が開発されており、臨床論文でも多く用いられるようになってきている<sup>3,7,10,13)</sup>。

### おわりに

老年精神医学研究にかかわらず、どのような臨床研究にも、その妥当性を損なわせるさまざまバイアスが入り込む余地がある。そして、このよう

なバイアスは、研究デザインの工夫でしか対処できないものがほとんどである。老年精神医学領域において、質の高い臨床研究成果を生み出すためには、研究デザインの妥当性について事前に入念に検討し、研究計画書や手順書を作成し、その中に盛り込んでおく必要がある。さらに、前述したとおり、脱落や欠測の影響についても事前に十分に検討しておく必要がある。

欧米では、臨床研究をより効率的かつ実務的に実施するため、個別の研究目的に応じた、より複雑な研究デザインが用いられるようになってきた<sup>4,11)</sup>。研究デザインが複雑になればなるほど、妥当性の検討もデータ解析もより複雑なものとなる。研究計画の立案段階から、臨床研究方法論の専門家、生物統計家らと共同作業することが必要であろう。現在実施を計画している研究デザインの妥当性に疑問がある場合には、それが解決されるまでは研究を開始すべきではないだろう。

## 文 献

- 1) Bartak A, Spreeuwenberg MD, Andrea H, Busschbach JJ, et al.: The use of propensity score methods in psychotherapy research ; A practical application. *Psychother Psychosom*, **78** (1) : 26-34 (2009).
- 2) Ekstrom D, Quade D, Golden RN : Statistical analysis of repeated measures in psychiatric research. *Arch Gen Psychiatry*, **47** (8) : 770-772 (1990).
- 3) Everitt BS, Wessely S : Clinical trials in psychiatry. 2nd edition, Wiley-Interscience, West Sussex (2008).
- 4) Gelenberg AJ, Thase ME, Meyer RE, Goodwin FK, et al.: The history and current state of antidepressant clinical trial design ; A call to action for proof-of-concept studies. *J Clin Psychiatry*, **69** (10) : 1513-1528 (2008).
- 5) Gibbons RD, Hedeker D, Elkin I, Waternaux C, et al.: Some conceptual and statistical issues in analysis of longitudinal psychiatric data ; Application to the NIMH treatment of Depression Collaborative Research Program dataset. *Arch Gen Psychiatry*, **50** (9) : 739-750 (1993).
- 6) Gueorguieva R, Krystal JH : Move over ANOVA ; Progress in analyzing repeated-measures data and its reflection in papers published in the Archives of General Psychiatry. *Arch Gen Psychiatry*, **61** (3) : 310-317 (2004).
- 7) Hamer RM, Simpson PM : Last observation carried forward versus mixed models in the analysis of psychiatric clinical trials. *Am J Psychiatry*, **166** (6) : 639-641 (2009).
- 8) Houck PR, Mazumdar S, Koru-Sengul T, Tang G, et al.: Estimating treatment effects from longitudinal clinical trial data with missing values ; Comparative analyses using different methods. *Psychiatry Res*, **129** (2) : 209-215 (2004).
- 9) Lavori P : ANOVA, MANOVA, my black hen ; Comments on repeated measures. *Arch Gen Psychiatry*, **47** (8) : 775-778 (1990).
- 10) Mazumdar S, Tang G, Houck PR, Dew MA, et al.: Statistical analysis of longitudinal psychiatric data with dropouts. *J Psychiatr Res*, **41** (12) : 1032-1041 (2007).
- 11) Murphy SA, Oslin DW, Rush AJ, Zhu J ; MCATS : Methodological challenges in constructing effective treatment sequences for chronic psychiatric disorders. *Neuropsychopharmacology*, **32** (2) : 257-262 (2007).
- 12) Rothman KJ : Epidemiology an introduction. Oxford University Press, New York (2002). (Rothman KJ, 矢野栄二, 橋本英樹訳 : ロスマンの疫学 ; 科学的思考への誘い, 篠原出版新社, 東京, 2004)
- 13) Rothman KJ, Greenland S, Lash TL : Modern epidemiology. Lippincott Williams & Wilkins, (2007).

## Regular Article

## Misalignments of rest–activity rhythms in inpatients with schizophrenia

Manami Kodaka, PhD,<sup>1\*</sup> Satoshi Tanaka, MD, PhD,<sup>1,2,3</sup> Madoka Takahara, PhD,<sup>1,4</sup>  
 Atsuko Inamoto, MD, PhD,<sup>3</sup> Shuichiro Shirakawa, PhD,<sup>1</sup> Masatoshi Inagaki, MD, PhD,<sup>1,5</sup>  
 Nobumasa Kato, MD, PhD<sup>3</sup> and Mitsuhiko Yamada, MD, PhD<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Psychogeriatrics and <sup>5</sup>Center for Suicide Prevention, National Institute of Mental Health, National Center of Neurology and Psychiatry, <sup>2</sup>Komagino Hospital, <sup>3</sup>Department of Psychiatry, Showa University Karasuyama Hospital, Tokyo, and <sup>4</sup>Research Center of Brain and Oral Science, Kanagawa Dental College, Kanagawa, Japan

**Aims:** Rest–activity rhythms of human beings generally synchronize to a 24-h time cue. Very few detailed research studies have examined rest–activity rhythms in patients with schizophrenia. The present study aimed to explore (i) rest–activity rhythms in patients with schizophrenia, and (ii) factors relevant to their rhythm characteristics.

**Methods:** We selected only inpatients for this research, because the time cue for inpatients was considered more standardized than that of outpatients. Sixteen inpatients with schizophrenia wore an ActiTrac accelerometer-based activity monitor (IM Systems Inc., Baltimore, USA) for eight consecutive days to measure their activity. We used a  $\chi^2$  periodogram to compute rest–activity rhythms from the activity data, whereby the  $\chi^2$  value amplitude was regarded as an index of regularity. We conducted non-parametric tests to identify factors relevant to rhythm cycles and patterns.

**Results:** Half of the participants exhibited prolonged rest–activity cycles, and 25% also had irregular rest–activity patterns defined by insufficient  $\chi^2$  value amplitude, even though they were clearly under a 24-h time cue. Participants with misaligned rest–activity rhythms had attended daytime non-medical treatment programs less frequently, and had received more anti-anxiety/hypnotic medications than those with proper rhythms.

**Conclusion:** Changes in rest–activity rhythms by optimizing pharmacological and non-pharmacological treatment could improve social adjustment or quality of life in patients with schizophrenia.

**Key words:** circadian rhythm, diazepam, inpatients, schizophrenia, social adjustment.

FOR INDIVIDUALS WITH schizophrenia, improving social adjustment is a major challenge. In the clinical setting, mental health practitioners have met many patients whose impaired social adjustment seemed to be associated with misaligned rest–activity

rhythms. While some studies have observed misaligned rhythms, very few research studies have examined rest–activity rhythms in patients with schizophrenia in great detail.

Several previous studies investigated the relationship between schizophrenia and misaligned circadian rest–activity rhythms. Motor activity levels in non-medicated patients with schizophrenia were significantly lower than those observed in healthy subjects.<sup>1</sup> Older patients with schizophrenia stayed in bed longer, reported lower quality night-time sleep, slept more during the day, and had less robust circadian rhythms than age- and gender-matched

\*Correspondence: Manami Kodaka, PhD, Department of Psychogeriatrics, National Institute of Mental Health, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1 Ogawahigashi-machi, Kodaira, Tokyo 187-8553, Japan. Email: mkodaka@ncnp.go.jp  
 Received 5 June 2009; revised 1 October 2009; accepted 27 October 2009.

Field: Neurophysiology and psychophysiology

comparison subjects without psychiatric disorders.<sup>2</sup> Wulff *et al.*<sup>3</sup> reported a case study of a patient with schizophrenia for whom the period of rest–activity rhythm was longer than 24 h. Patients with higher cognitive function and milder psychiatric symptoms were reportedly more alert during the day and had fewer awakenings during the night.<sup>4</sup> Boivin<sup>5</sup> also published a review of studies, which reported misaligned sleep–wake rhythms and endocrine disturbances in schizophrenic patients.

Other studies have examined how medication might influence rest–activity rhythms in patients with schizophrenia. For non-medicated patients with lower activity levels than healthy subjects, administration of antipsychotics further lowered the amount of activity.<sup>1</sup> Patients on risperidone experienced longer sleep periods during the day and night compared to patients on haloperidol.<sup>1</sup> Finally, patients treated with clozapine had well-ordered rest–activity rhythms compared to those treated with typical neuroleptics.<sup>6</sup>

A particular aim of the present study was to ascertain whether any patients might exhibit misaligned rest–activity rhythms in a controlled environment. We therefore selected only inpatients for this research, as inpatient time cues are generally more standardized than that of outpatients. We conducted a case series study with our recruited cohort of inpatients with schizophrenia, and determined (i) rest–activity rhythms of patients with schizophrenia, and (ii) factors relevant to their rhythm characteristics.

## METHODS

### Participants

All participants were patients with schizophrenia hospitalized in a psychiatric unit. We selected inpatients as study participants to improve the validity of the study, as their waking, sleeping, and eating times were regulated in the inpatient ward. We surmised that this regulation would create less variation in time cues influencing rest–activity rhythms than if we had selected people living outside the hospital.

Participant eligibility criteria comprised the following:

- 1 diagnosis of schizophrenia was based on the DSM-IV;
- 2 the patient received inpatient treatment at a psychiatric hospital;

- 3 the patient had a history of schizophrenia longer than 10 years;
- 4 they were over 20 years of age;
- 5 they had been hospitalized for more than one month, and were considered to be stable by an attending psychiatrist;
- 6 they had not changed their main antipsychotic drugs or sleep inducers for at least one month prior to study initiation; and
- 7 they were able to understand the study description and provide informed consent.

Exclusion criteria were as follows:

- 1 the patient had major neuropsychiatric or physical complications; and
- 2 study participation was deemed undesirable by an attending psychiatrist.

A total of 21 patients agreed to participate in the present study. Four retracted their consent during the study, and one did not complete the rhythm measurements due to an anticipated change in hospitals. The final analysis included data collected from 16 patients.

### Demographic and clinical characteristics of participants

Table 1 presents demographic and clinical characteristics of participants. Ten participants were on atypical antipsychotics (quetiapine fumarate, risperidone, olanzapine, aripiprazole, or combinations of these), three were on typical antipsychotics (haloperidol), and three were on combinations of atypical (quetiapine or risperidone) and typical (haloperidol) antipsychotics. No participants were being treated for illnesses other than psychiatric illness. One participant stayed out of the hospital overnight during the measurement period.

### Ethics and informed consent

All patients received a detailed written explanation of the study. After researchers explained the study information to them and guaranteed preservation of their anonymity, they were asked to provide their informed consent and acknowledge their adequate understanding of the study. This study was approved by the ethics committee at Showa University School of Medicine, Japan and conducted in accordance with

**Table 1.** Demographic and clinical characteristics (*n* = 16)

	Median	Min.	Max.
Age (years)	55.5	30	73
Number of years since the first visit	31.0	4	56
BPRS scores (total)	63.0	48	73
BPRS scores (positive symptoms)	12.0	8	15
BPRS scores (negative symptoms)	12.0	10	15
PSQI scores	5.0	3	13
CP equivalencies (mg)	1050.0	100.0	2967.0
Biperiden equivalencies (mg)	2.8	0	9.0
Diazepam equivalencies (mg)	7.5	0	23.3
Daytime non-medical treatment (times/month)	5.0	1	12
Morning exercise (times/month)	4.0	0	30
Caffeinated drinks (cups/day)	4.3	0	11
	<i>n</i>	%	
Sex, male	8	50.0	
Smokers	6	37.5	
Types of schizophrenia (DSM-IV)			
Unspecified	1	6.2	
Catatonic	1	6.2	
Disorganized	3	18.8	
Paranoid	11	68.8	

BPRS, Brief Psychiatric Rating Scale; CP, chlorpromazine; PSQI, Pittsburgh Sleep Quality Index.

the provisions of the 1995 version of the Declaration of Helsinki (as revised in 2004).

### Measurement of rest–activity rhythms

An ActiTrac accelerometer-based activity monitor (IM Systems Inc., Baltimore, USA)<sup>7</sup> was used to measure participant activity. Participants wore the ActiTrac on the non-dominant wrist for eight consecutive days and removed it only to bathe. Participant rest–activity rhythms were then computed from the obtained activity data.

### Other measurements

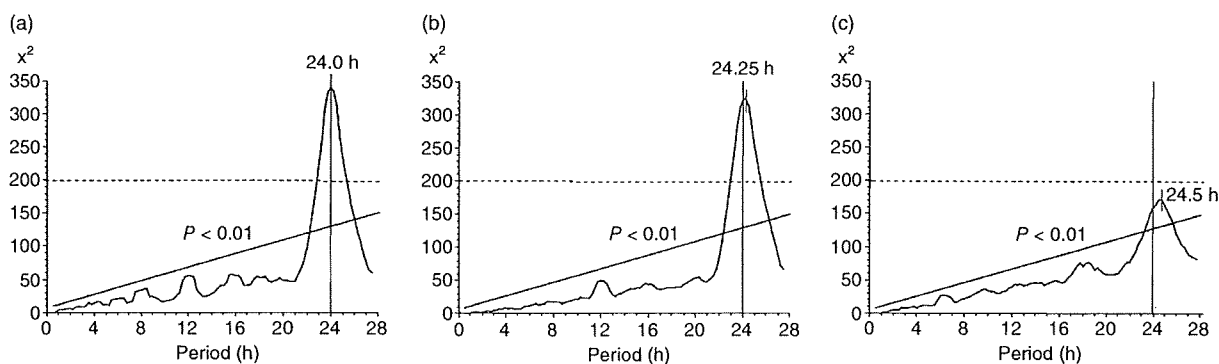
Trained psychiatrists conducted the clinical diagnosis of participants based on the DSM-IV. Each participant's attending psychiatrist evaluated psychiatric symptom severity using the Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS)<sup>8</sup> (the Japanese version of BPRS<sup>9</sup>). Participants assessed their subjective sleep quality according to the Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI)<sup>10</sup> (the Japanese version of PSQI<sup>11</sup>). We

collected medical information for each participant from their medical charts, and demographic data and information pertaining to the number of daytime non-medical treatment and morning exercise programs attended per month from their nursing records. Chlorpromazine (CP) equivalencies,<sup>12,13</sup> biperiden equivalencies,<sup>13</sup> and diazepam equivalencies<sup>13</sup> were calculated for doses of antipsychotic drugs taken daily by participants. Participants also provided information regarding the number of cigarettes they smoked and caffeinated drinks they consumed per day. Participant smoking or ingestion of caffeinated drinks was not regulated during the study.

### Data analysis

The  $\chi^2$  periodogram<sup>14</sup> was applied to activity data to compute rest–activity rhythms. Amplitude of the  $\chi^2$  value was regarded as an index of regularity, and if it was below 200, we operationally assumed that there was no regular pattern. As rest–activity cycles are generally synchronized to 24 h, those longer than 24 h were considered prolonged.

We used the Mann–Whitney *U*-test and the Kruskal–Wallis *H*-test to examine variables associated with rhythm characteristics. The Mann–Whitney *U*-test compared the groups with proper versus prolonged cycles and the groups with regular versus irregular patterns. The Kruskal–Wallis *H*-test compared three groups: (i) participants with proper rest–activity circadian rhythms ('Group 1,' *n* = 8); (ii) those with regular patterns but with prolonged cycles ('Group 2,' *n* = 4); and (iii) those with prolonged cycles as well as irregular patterns ('Group 3,' *n* = 4). We compared median age, number of years since the first visit, severity of symptoms, quality of sleep, antipsychotic doses, number of daytime non-medical treatment programs and exercise programs attended per month, and the amount of caffeinated drinks taken per day. We used the Mann–Whitney *U*-test with a Bonferroni correction as a post-hoc multiple comparison test to analyze the results from the Kruskal–Wallis *H*-test. A *P*-value < 0.017 was considered statistically significant. The  $\chi^2$ -test was used to examine the correlations between rhythm characteristics and participant sex or cigarette smoking. We employed *P* < 0.05 as a significance level for a two-tailed test. SPSS (ver.16.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) statistical package was used for data analyses.



**Figure 1.** Rest-activity rhythm profiles. Examples of rest-activity rhythm profiles computed by  $\chi^2$  periodogram for participants with (a) proper circadian rhythms, (b) regular rest-activity patterns but prolonged cycles, and (c) prolonged cycles and irregular rest-activity patterns.

**RESULTS**

**Descriptive data of rest-activity rhythms**

$\chi^2$  periodogram analysis revealed that half of the participants exhibited prolonged (longer than 24 h) rest-activity cycles. Of the eight with prolonged cycles, four (25% of the total) also had irregular rest-activity patterns defined by insufficient  $\chi^2$  value amplitudes. Figure 1 shows examples of rest-activity rhythm profiles of participants with (a) proper circadian rhythms, (b) regular rest-activity patterns but prolonged cycles, and (c) prolonged cycles and irregular rest-activity patterns.

**Correlations between rhythm characteristics and other variables**

Table 2 presents differences in the 12 variables between the groups with proper versus prolonged rest-activity cycles. The median diazepam-equivalent dose was significantly higher among participants with prolonged cycles than those with 24-h cycles. Patients with prolonged cycles had attended significantly fewer non-medical treatments than those with proper cycles. We observed no significant differences in other variables between these two groups. Rest-activity cycles did not differ significantly by sex ( $\chi^2=4.0$ , d.f. = 1,  $P=0.05$ ). Of the eight participants

**Table 2.** Factors relevant to rest-activity cycles

	Proper cycle <i>n</i> = 8	Prolonged cycle <i>n</i> = 8	<i>U</i>	<i>P</i>
	Median			
Age (years)	55	56	27.5	0.64
Number of years since the first visit	34.5	28	24.0	0.40
BPRS scores (total)	63	63	31.0	0.92
BPRS scores (positive symptoms)	12.5	12	30.5	0.87
BPRS scores (negative symptoms)	12	12	28.0	0.66
PSQI scores	5.5	5	25.5	0.48
CP equivalencies (mg)	1537.5	950	18.5	0.16
Biperiden equivalencies (mg)	2.75	2.5	30.5	0.87
Diazepam equivalencies (mg)	5	17.5	9.5	0.02
Daytime non-medical treatment (times/month)	6.5	2.5	8.5	0.01
Morning exercise (times/month)	14.5	1.5	16.5	0.10
Caffeinated drinks (cups/day)	3.5	4.25	28.0	0.67

Mann-Whitney *U*-test. BPRS, Brief Psychiatric Rating Scale; CP, chlorpromazine; PSQI, Pittsburgh Sleep Quality Index.

Table 3. Factors relevant to rest–activity patterns

	Regular pattern	Irregular pattern	U	P
	n = 12	n = 4		
	Median			
Age (years)	55	56.5	18.0	0.47
Number of years since the first visit	30	31.5	23.5	0.95
BPRS scores (total)	63	64	19.5	0.58
BPRS scores (positive symptoms)	12	12	23.5	0.95
BPRS scores (negative symptoms)	12	12	20.0	0.62
PSQI scores	5	4	16.0	0.32
CP equivalencies (mg)	1087.5	775	15.0	0.27
Biperiden equivalencies (mg)	2.45	5.5	8.5	0.06
Diazepam equivalencies (mg)	5	20	5.0	0.02
Daytime non-medical treatment (times/month)	5.5	2.5	8.0	0.05
Morning exercise (times/month)	14.5	1.5	9.0	0.06
Caffeinated drinks (cups/day)	4	5	21.5	0.76

Mann–Whitney U-test. BPRS, Brief Psychiatric Rating Scale; CP, chlorpromazine; PSQI, Pittsburgh Sleep Quality Index.

with proper cycles, two were male (25%), while six (75%) of the eight with prolonged cycles were male. We observed no significant differences in rest–activity cycles between smokers and non-smokers either ( $\chi^2=0$ , d.f. = 1,  $P=1.00$ ). Three (37.5%) of the eight with proper cycles were smokers, while three (37.5%) of the eight with prolonged cycles were smokers.

Table 3 shows differences in the 12 variables between the groups with regular versus irregular rest–activity patterns. Median diazepam-equivalent dose was significantly higher among the participants with irregular patterns than those with regular patterns. Medians of other variables did not differ significantly between groups. We observed no significant differences in the regularity of rest–activity patterns between sexes ( $\chi^2=0$ , d.f. = 1,  $P=1.00$ ). Six (50%) of the twelve with regular patterns were male, and two (50%) of the four with irregular patterns were male. Rest–activity cycles did not differ significantly between smokers and non-smokers either ( $\chi^2=3.2$ , d.f. = 1,  $P=0.07$ ), in that six (50%) of the twelve with regular patterns were smokers, and none of the four with irregular patterns were smokers.

Finally, the Kruskal–Wallis  $H$ -test revealed that the median diazepam-equivalent dose and attendance at daytime non-medical treatment programs differed significantly among the three groups ( $\chi^2=7.172$ , d.f. = 2,  $P=0.03$ ;  $\chi^2=6.596$ , d.f. = 2,  $P=0.04$ ). According to the Mann–Whitney  $U$ -test results, the median diazepam-equivalent dose was significantly

higher ( $U=1.00$ ,  $P=0.008$ ) in Group 3 (median = 20.0 mg) than in Group 1 (median = 5.0 mg). Significant differences were not observed for median values of other variables.

## DISCUSSION

Half of the participants had rest–activity cycles longer than 24 h, and a quarter had irregular rhythm patterns (amplitudes of  $\chi^2$  values <200). Compared to those with 24-h cycles or those with regular rhythm patterns, participants with misaligned rest–activity rhythms had taken more anti-anxiety/hypnotic medications. They also attended daytime non-medical treatment programs less frequently.

In a previous study, Wirz-Justice *et al.* reported that participants with relatively moderate symptoms of schizophrenia (BPRS score: 27–64) were synchronized to the 24-h time cue.<sup>6</sup> In the present study, half of the participants, whose symptoms were relatively severe (BPRS score: 50–70), exhibited misaligned rest–activity rhythms. It follows therefore that an association exists between psychiatric symptoms and misaligned rhythms. In the present study, however, BPRS scores were not significantly associated with rest–activity rhythms. This may be due to the narrow range and higher BPRS scores of participants in this study. A wider range of BPRS scores might reveal a significant association with rhythm patterns and cycles.

Our findings of irregular rest-activity patterns in patients with schizophrenia are consistent with those of previous studies. Wirz-Justice *et al.*<sup>6</sup> reported that two out of seven patients had irregular rest-activity patterns. Other studies have reported on individuals with schizophrenia who had irregular rhythm patterns as measured by the number of daytime naps and the amount of interrupted nighttime sleep.<sup>2,4</sup> The present study confirms that patients with schizophrenia possess misaligned rest-activity rhythms.

Participants with prolonged cycles or irregular patterns of rest-activity rhythms had attended daytime non-medical treatment programs less frequently than those with proper cycles or regular rhythm patterns. They had also taken more anti-anxiety/hypnotic medications than those with proper cycles or regular patterns. Although we cannot identify cause-and-effect correlations between rhythm characteristics and anti-anxiety/hypnotic medications or non-medical treatment programs, future studies should address these items for potential targets of intervention.

In addition to the possibility of treatments affecting rest-activity rhythms, we speculate that the disease itself might be associated with misaligned rhythms. This could be addressed in future studies by comparing rhythms exhibited by patients with schizophrenia with those of healthy control subjects. Moreover, due to the lack of a control group, we cannot conclude that our findings are particular to people with schizophrenia and not so for people with other mental disorders.

A serious limitation of this study was that the sample size was very small. Although we found no significant associations between rest-activity rhythms and CP equivalents, biperiden equivalents, morning exercise, sex, and cigarette smoking, the *P*-values for the significance of the correlations between these variables and rest-activity rhythms were approximately 0.1 or even close to 0.05. This might have been due to a type II error caused by the small sample size. Future studies should use a larger number of subjects in order to further examine possible factors relevant to rest-activity rhythms. A few noteworthy limitations of our study are that it was a cross-sectional study with a small number of participants; some patients had been on relatively high doses of antipsychotic medications; and most participants suffered from relatively severe symptoms.

One advantage of the present study is that we examined differences in measured variables between

groups of people with different rest-activity rhythm characteristics. In addition, as all participants were hospitalized, their time cues were well-regulated.

We conclude that optimization of pharmacological and non-pharmacological treatments could lead to changes in rest-activity rhythms. These may, in turn, improve social adjustment or quality of life for patients with schizophrenia.

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr Haruhisa Ohta and Dr Ryo Akita (Department of Psychiatry, Showa University Karasuyama Hospital), and all the staff of the Department of Nursing, Showa University Karasuyama Hospital, involved in this project, for their assistance.

Funding for this study was provided by the Grant-in-Aid for Scientific Research from the Ministry of Health, Labor and Welfare of Japan [H17-Shougai-Ippan-008].

## REFERENCES

- 1 Apiquian R, Fresán A, Muñoz-Delgado J, Kiang M, Ulloa RE, Kapur S. Variations of rest-activity rhythm and sleep-wake in schizophrenic patients versus healthy subjects: An actigraphic comparative study. *Biol. Rhythm. Res.* 2008; 39: 69–78.
- 2 Martin JL, Jeste DV, Ancoli-Israel S. Older schizophrenia patients have more disrupted sleep and circadian rhythms than age-matched comparison subjects. *J. Psychiatr. Res.* 2005; 39: 251–259.
- 3 Wulff K, Joyce E, Middleton B, Dijk D-J, Foster RG. The suitability of actigraphy, diary data, and urinary melatonin profiles for quantitative assessment of sleep disturbances in schizophrenia: A case report. *Chronobiol. Int.* 2006; 23: 485–495.
- 4 Martin J, Jeste DV, Caligiuri MP, Patterson T, Heaton R, Ancoli-Israel S. Actigraphic estimates of circadian rhythms and sleep/wake in older schizophrenia patients. *Schizophr. Res.* 2001; 47: 77–86.
- 5 Boivin DB. Influence of sleep-wake and circadian rhythm disturbances in psychiatric disorders. *J. Psychiatry Neurosci.* 2000; 25: 446–458.
- 6 Wirz-Justice A, Haug H-J, Cajochen C. Disturbed circadian rest-activity cycles in schizophrenia patients: An effect of drugs? *Schizophr. Bull.* 2001; 27: 497–502.
- 7 Ruiz PJG, Bernardos VS. Evaluation of ActiTrac® (ambulatory activity monitor) in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 2008; 270: 67–69.
- 8 Overall JE, Gorham DR. The brief psychiatric rating scale. *Psychol. Rep.* 1962; 10: 799–812.

© 2009 The Authors

Journal compilation © 2009 Japanese Society of Psychiatry and Neurology



- 9 Miyata R, Fujii Y, Inagaki A, Inada T, Yagi G. Reliability of the Japanese version of Brief Psychiatric Rating Scale (BPRS). *Clin. Eval.* 1995; 23: 357–367 (in Japanese).
- 10 Buysse DJ, Reynolds CF, Monk TH, Berman SR, Kupfer DJ. The Pittsburgh Sleep Quality Index (PSQI): An instrument for psychiatric practice and research. *Psychiatry Res.* 1989; 28: 193–213.
- 11 Doi Y, Minowa M, Uchiyama M, Okawa M. Development of the Pittsburgh Sleep Quality Index Japanese version. *Seishinka-chiryogaku* 1998; 13: 755–763 (in Japanese).
- 12 Inagaki A, Inada T. Dose equivalence of psychotropic drugs: Part XXI Dose equivalence of novel antipsychotics: Blonanserin. *Rinsyo-seishin-yakuri* 2008; 11: 887–890 (in Japanese).
- 13 Inagaki A, Inada T, Fujii Y *et al.* *Kouseishinyaku no Toukai-kansan*. Seiwa Syoten, Tokyo, 1999 (in Japanese).
- 14 Sokolove PG, Bushell WN. The chi square periodogram: Its utility for analysis of circadian rhythms. *J. Theor. Biol.* 1978; 72: 131–160.

## Neuroserpin is expressed in early stage of neurogenesis in adult rat hippocampus

Misa Yamada<sup>a</sup>, Kou Takahashi<sup>a</sup>, Wataru Ukai<sup>b</sup>, Eri Hashimoto<sup>b</sup>, Toshikazu Saito<sup>b</sup> and Mitsuhiko Yamada<sup>a</sup>

In the adult rat hippocampal formation, neurogenesis occurs in the dentate gyrus subgranular zone (SGZ). We used laser capture microdissection and an antidepressant-related genes microarray to analyze gene expression profiles of cells from the SGZ and from the outermost granule cell layer. Of the differentially expressed genes in the SGZ, we focused on neuroserpin, which is highly expressed in the adult rat SGZ. Neuroserpin immunoreactivity was present in cells positive for NeuN (postmitotic cell marker) and Tuj1 (immature neuron marker) but not in cells positive for calbindin (mature neuron marker). Although neuroserpin is expressed during late stage of neurogenesis in development, our results suggest that neuroserpin may play some

roles in early stage of neurogenesis in adult rat hippocampus. *NeuroReport* 21:138–142 © 2010 Wolters Kluwer Health | Lippincott Williams & Wilkins.

*NeuroReport* 2010, 21:138–142

**Keywords:** laser capture microdissection, microarray, neurogenesis, serine protease inhibitor, tissue-type plasminogen activator

<sup>a</sup>Department of Psychogeriatrics, National Institute of Mental Health, National Center of Neurology and Psychiatry, Tokyo and <sup>b</sup>Department of Neuropsychiatry, Sapporo Medical University, School of Medicine, Sapporo, Japan

Correspondence to Dr Mitsuhiko Yamada, MD, PhD, Department of Psychogeriatrics, National Institute of Mental Health, National Center of Neurology and Psychiatry, 4-1-1, Ogawahigasimachi, Kodaira, Tokyo 187-8553, Japan  
Tel: +81 42 341 2711; fax: +81 42 346 1994; e-mail: mitsu@ncnp.go.jp

Received 2 November 2009 accepted 5 November 2009

### Introduction

In adult hippocampal neurogenesis, neuronal progenitor cells located in the subgranular zone (SGZ) of the dentate gyrus proliferate and differentiate into neurons. After these new granule cells mature, extending their axons and dendrites, they seem to integrate functionally into existing hippocampal circuitry. Adult neurogenesis is tightly regulated and influenced by various environmental, endocrine, and pharmacological stimuli. For example, aging and psychosocial stress decrease neurogenesis in the hippocampus [1–3]. By contrast, enriched environments and exercise increase neurogenesis in adults [4,5]. Similarly, SGZ neurogenesis is decreased in an animal model of stress-related disorders [3], but increased in hippocampal-dependent models of learning [6]. Interestingly, both chronic antidepressant treatment and electroconvulsive treatment (ECT) used clinically to treat depressed patients increase the generation of new neurons in the SGZ of adults [7–9]. However, the mechanism underlying adult neurogenesis remains unknown.

In this study, we used laser capture microdissection (LCM) to separate the SGZ from the outermost portion of the granule cell layer (GCL) in rat brain sections. We then analyzed the gene expression profiles of cells in the SGZ and outermost GCL using our original cDNA microarray [10] to identify molecules important for adult neurogenesis. This cDNA microarray is spotted with 707 cDNA fragments, representing genes whose expression in rat brain is affected by chronic antidepressant (imipramine and sertraline) treatment [11–14]. We identified several genes whose expression was altered in cells from the SGZ

compared with those in the outermost GCL. Of the genes showing differential expression in the SGZ, we focused on neuroserpin, which is highly expressed in the SGZ of adult rat hippocampus.

### Methods

#### Experimental animals

Male Sprague–Dawley rats (aged 7–10 weeks; Sankyo Labo Service Co., Tokyo, Japan) were housed and maintained under standard conditions in a 12 h light/dark cycle and with free access to food and water. All studies using animals were carried out in accordance with animal protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of National Center of Neurology and Psychiatry.

#### Laser capture microdissection

Rats were killed by decapitation, and the brains were removed and immediately frozen in liquid nitrogen. Coronal, 15 µm-thick sections at the level between –3.30 mm and –4.52 mm from Bregma were cut on a cryostat (Carl Zeiss, Inc., Oberkochen, Germany). Every sixth section was mounted on slides. The sections were stained with a HistoGene LCM Frozen Section Staining Kit (Arcturus; Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA). LCM was carried out with a PixCell II system (Arcturus; Molecular Devices). RNA was extracted from the microdissected hippocampal tissue and purified with a Pico Pure RNA Isolation Kit (Takara, Shiga, Japan) according to the manufacturer's instructions. Independent two-round amplifications of purified RNA were performed using the RiboAmp RNA Amplification Kit

(Takara) for generating amplified RNA (aRNA). Five independent aRNAs from each sample were pooled and used for the microarray analyses.

#### Microarray analysis

Microarray analysis was carried out as described earlier [10]. Briefly, fluorescent-labeled probes were made by converting 3 µg of aRNA from the SGZ and outermost GCL to cDNA in the presence of Cy-3-dUTP or Cy-5-dUTP, respectively. Hybridization of the probes to the cDNA microarray was performed competitively and in duplicate. After hybridization, each slide was scanned with a GMS418 Array Scanner (Affymetrix, Santa Clara, California, USA). Gene expression levels were analyzed using ImaGene software (Bio-Discovery Ltd., Swansea, UK).

#### BrdU administration

Cells dividing during the S phase of mitosis were labeled by administering 75 mg of 5-bromo-2-deoxyuridine to rats (BrdU; Sigma Chemical Co., St Louis, Missouri, USA). Animals were killed 2 h after BrdU administration.

#### Immunohistochemistry

Rats to be used for immunohistochemical analysis were transcardially perfused with 4% paraformaldehyde (Sigma Chemical) in 0.1 M phosphate buffer (PB, pH 7.2). The brains were removed and postfixed in 20% sucrose, 4% paraformaldehyde in 0.1 M PB for 2 days at 4°C. Free-floating coronal sections were fixed again in 4% (w/v) paraformaldehyde in 0.1 M PB and rinsed in 0.1 M phosphate-buffered saline (PBS).

BrdU-labeled cells were visualized as described earlier [7], using anti-mouse BrdU antibody (1:1000; Roche, Indianapolis, Indiana, USA) and biotinylated anti-mouse secondary antibody (1:200; Vector Laboratories, Burlingame, California, USA). For localization of neuroserpin, tissue sections (40 µm thick) were permeabilized with

0.1% Triton X-100 in PBS (PBST) for 30 min, treated with PBST containing 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 30 min, and then blocked with PBST containing 1.5% normal goat serum for 1 h. Sections were incubated with antineuroserpin antibody (1:200; Abcom, Cambridge, Massachusetts, USA) overnight at 4°C. After incubation with biotinylated anti-rabbit IgG antibody (1:250; Vector Laboratories) for 30 min at room temperature, sections were incubated with Elite avidin–biotin peroxidase complex according to the manufacturer's instructions (Vector Laboratories). The sections were mounted onto glass slides, and for BrdU-immunostained and neuroserpin-immunostained sections, were counterstained with cresyl violet. The sections were then analyzed with an Olympus IX-70 microscope (Olympus, Tokyo, Japan).

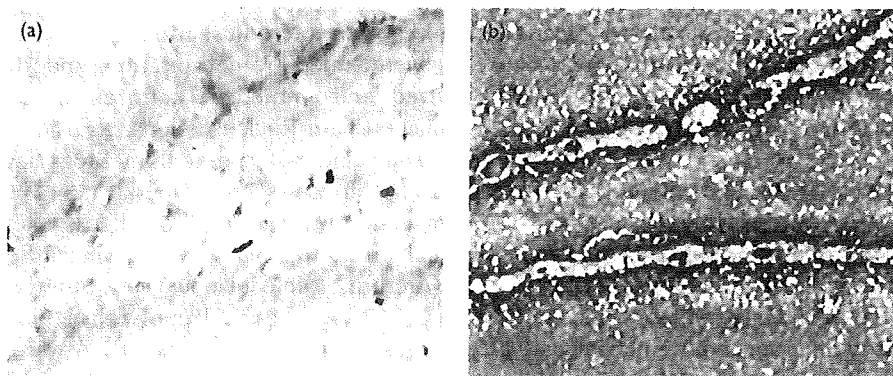
For double immunostaining, sections (40 µm thick) were permeabilized with PBST for 5 min and blocked with PBST containing 1% fetal calf serum for 1 h. The following primary antibodies and final dilutions were used: mouse monoclonal anti-NeuN antibody (1:200, Chemicon, Temecula, California, USA), mouse monoclonal anti-calbindin antibody (1:100, Abcom), mouse monoclonal anti-Tuj-1 antibody (1:200, Covance, Berkeley, California, USA), and rabbit polyclonal antineuroserpin antibody (1:200, Abcom). After incubation with primary antibodies overnight at 4°C, sections were labeled for 1 h with Alexa Fluor 546-labeled anti-mouse IgG (1:500, Invitrogen, San Diego, California, USA) and Alexa Fluor 488-labeled anti-rabbit IgG (1:500, Invitrogen). Fluorescent images were obtained using a Fluoview FV1000 confocal microscopy imaging system (Olympus).

## Results

### Identification of genes differentially expressed in the subgranular zone

In this study, we identified genes that were differentially expressed in cells in the SGZ compared with those in the

Fig. 1



Laser microdissection of rat dentate gyrus, a primary site for ongoing adult neurogenesis. (a) 5-bromo-2-deoxyuridine (BrdU)-positive cells (brown) localized in the subgranular zone (SGZ), the innermost portion of the dentate gyrus granule cell layer (GCL), 2 h after BrdU injection. (b) Image showing the laser cut separating the SGZ from the outermost portion of the GCL.

outermost GCL of the dentate gyrus using LCM and an antidepressant-related genes (ADRG) microarray. As shown in Fig. 1a, neuronal progenitor cells were localized in the SGZ. Fig. 1b shows the dentate GCL after the SGZ was separated by LCM. The genes that were differentially expressed in the SGZ relative to the outermost GCL were selected by using the following criteria: (i) if the gene was called 'present' in more than one side of the samples, and (ii) if the change in expression levels between the two groups (SGZ and outermost GCL) was greater than 30%. As a result, 16 genes – 15 upregulated genes and one downregulated gene – were identified among the 707 genes spotted on the ADRG microarray (Table 1). Interestingly, the fluorescence intensities of

the spots for both ADRG#116 and ADRG#604, both of which were isolated independently and represented rat neuroserpin, were 1.5 and 1.4 times, respectively, greater in the SGZ than in the outermost GCL (Table 1).

#### The expression of rat neuroserpin in subgranular zone

Elevated neuroserpin expression in the SGZ was also confirmed by immunohistochemistry. As shown in Fig. 2a, neuroserpin-positive cells were observed in the SGZ. Some immunoreactive cells were present in the hilus and in the area between the hilus and SGZ. By contrast, no neuroserpin-positive cells were observed in the outermost GCL.

To identify the cell types that express neuroserpin in adult rat hippocampus, we performed double immunostaining for neuroserpin and various neuronal markers (Fig. 2b–d). Neuroserpin expression was observed in postmitotic cells, as neuroserpin immunoreactivity colocalized to cells positive for NeuN, a postmitotic cell marker (Fig. 2b). We also examined the coexpression of neuroserpin and markers for different stages of neuronal differentiation. In the dentate gyrus, neuroserpin expression colocalized with Tuj1, a marker for immature neurons (Fig. 2c). Neuroserpin expression, however, did not colocalize with calbindin, a marker for mature neurons (Fig. 2d).

**Table 1 Genes differentially expressed in SGZ compared with the outermost portion of GCL<sup>a</sup>**

ADRG number	Gene	GeneBank accession number	Fold change	Description
<b>Upregulated genes</b>				
ADRG#468	Gng3	BC029680	1.8	<i>Mus musculus</i> , G protein, $\gamma$ 3 subunit mRNA
ADRG#485	Meg3	BC028971	1.5	<i>Mus musculus</i> GTL2, imprinted maternally expressed untranslated mRNA
ADRG#116	Serpini1	AF193014	1.5	<i>Rattus norvegicus</i> neuroserpin mRNA
ADRG#604	Serpini1	AF193014	1.4	<i>Rattus norvegicus</i> neuroserpin mRNA
ADRG#498	Slc1a	S59158	1.4	Glutamate transporter
ADRG#513	Npc2	AJ515237	1.4	<i>Rattus norvegicus</i> mRNA for epididymal secretory protein 1
ADRG#123	NdrG2	AJ426424	1.3	<i>Rattus norvegicus</i> mRNA for NDRG1 related protein NDRG2a1
ADRG#701	NeuroD6	D44480	1.3	<i>Mus musculus</i> DNA for MATH-2 protein
ADRG#549	Gnao1	M12671	1.3	Rat guanine nucleotide-binding protein G $\alpha$ , $\alpha$ subunit mRNA
ADRG#452	Ptn	M55601	1.3	<i>Rattus norvegicus</i> heparin-binding growth associated molecule mRNA
ADRG#294	Cst3	X16957	1.3	Rat mRNA for the cysteine proteinase inhibitor cystatin C
ADRG#406	Bclaf1	BC034300	1.3	<i>Mus musculus</i> BCL2-associated transcription factor 1, mRNA
ADRG#267	Gria2	M38061	1.3	<i>Rattus norvegicus</i> glutamate receptor (GluR-B) mRNA
ADRG#239	Snhg11	BC028327	1.3	<i>Mus musculus</i> RIKEN cDNA E130013N09 gene, mRNA
ADRG#243	SAC1	AJ245720	1.3	<i>Mus musculus</i> mRNA for suppressor of actin mutations (SAC1 gene)
<b>Downregulated gene</b>				
ADRG#436	Epdr1	BC014708	0.7	<i>Mus musculus</i> ependymin-related protein 1

ADRG, antidepressant-related genes; GCL, granule cell layer of the dentate gyrus; LCM, laser capture microdissection; SGZ, subgranular zone of the dentate gyrus.

<sup>a</sup>The SGZ and outermost portion of GCL were separated by LCM and then subjected to ADRG microarray analysis. The genes that were differentially expressed in the SGZ relative to the outermost GCL were selected by using the following criteria: (i) if the gene was called "present" in more than one side of the samples, (ii) if the change in expression levels between the two groups was greater than 30%.

#### Discussion

In this study, we used LCM to separate the SGZ and outermost portion of the GCL in rat brain sections. We then analyzed the gene expression profiles of the SGZ and outermost GCL with our ADRG cDNA microarray [10] to identify molecules important for adult neurogenesis. We identified 16 genes in the SGZ that were differentially expressed among the 707 genes spotted on the microarray (Table 1). Ploski *et al.* [15] used LCM and Gene Chip microarrays to analyze the expression profile of rat SGZ after chronic ECT. Although the microarrays and method strategies were different, both our group and Ploski's group identified genes for glutamate transporters and a basic helix-loop-helix transcription factor, MATH-2 (NeuroD6), as being differentially expressed in the SGZ.

Neuroserpin is a serine protease inhibitor implicated in the regulation of the extracellular protease tissue-type plasminogen activator, which is involved in processes such as synaptic plasticity, neuronal migration, and axogenesis [16,17]. Knocking out neuroserpin genes in mice leads to the selective reduction of locomotor activity in novel environments, an anxiety-like response on the O-maze, and a neophobic response to novel objects [18]. By contrast, overexpressing neuroserpin in mice leads to reduced center exploration in the open-field test and a neophobic phenotype in the novel object test [18]. These results indicate that neuroserpin plays some role in the regulation of emotional behavior.