

を主訴とする人も少なくない。本人が困っている問題に協働的に取り組む姿勢が極めて大切であり、治療関係の構築と維持にも促進的に作用する。

ケース・フォーミュレーション：患者の抱えている問題を、認知—感情—行動—生理—環境の因子に分け、認知モデルにしたがって図式化していく過程である。患者の症状や問題を認知モデルに沿って理解することで、情報の共有化がはかられ、協働作業的に問題解決に向けた取り組みを行うことが可能となる。

ノーマライゼーション：サイコーススに対する認知療法において重要視されている技法のひとつである。症状の異常性にのみ着眼して事態を破局的に捉えてしまいがちな患者に対して、苦痛を真摯に受け止めながらも、適切な情報や客観的事例を提供することにより、正常体験との連続性を強調して症状をより柔軟に捉えられるように促すものである。

別の見方を試す：患者は時に、体験や症状について誤った解釈をしたり非機能的な信念に囚われてしまうことがある。この場合には、これらに代わる考え方や解釈を患者が見付けられるように「支持する証拠探し」「反証探し」などの技法を用いて別の見方を試すことができるように取り組む。

安全行動への介入：破局的状況を回避するための対処法として安全行動をとることは、不安障害と同様にARMSにおいても見られる。安全行動は、患者の誤った思い込みなどの非機能的な解釈を持続させ、慢性化させる方向に作用することも多いため介入が必要となる。無理のない、効果的な行動実験を計画・実行することで問題の解決が促される場合がある。

中核信念へのアプローチ：認知療法ではその人の基底的な信念のことを中核信念と呼ぶが、ARMSでは「自分は人と違っている」「自分はおかしい、変わっている」という中核信念が見られることが多い。この信念そのものの修正が必ずしも必要となるわけではないが、患者がそのような信念を持つにいたった個人的体験やその意味を治療中に同定し理解していく過程は重要とされてい

る。

再発予防：治療の終盤では、再発予防に向けた取り組みを行うことが望ましい。治療で用いたケース・フォーミュレーションを用いるなどして治療全体を振り返り、早期徴候の同定や症状が再出現した場合の対処方法などについて確認することが役立つ。

5) 実際の適用

治療はできるだけ構造化された形式で進めることが望ましいが、その一方で、患者の特性にあわせた柔軟性を保持することも重要である。ARMSの一部がサイコーススに移行することは確かであるが、その他の多くの患者はサイコーススに発展することがないという現実をふまえておくことが大切である。

実際の治療では、PLEsに焦点化した介入を行わずとも、本人が困っている問題を取り扱う過程で抑うつや不安など情緒面での問題が解決することに伴い、PLEsが消滅していく例も多い。介入対象をPLEsに限局することなく、苦痛を伴う症状や主要な問題を解決するための手段として、認知行動的アプローチを柔軟に活用することが必要である。また、進路や就労の問題が併存することは非常に多いため、問題解決的技法を用いて本人に働きかけを行うこともある。必要に応じて家族や学校関係者との相談を行うこともあるが、環境に対する働きかけは治療全体の流れを大きく転換することもあるため、この側面への支援を常に意識しておく必要がある。

6) 症例

10代女性。クラス替えで男女混合になった頃から「男子から何か言われているような気がする」と感じはじめ、徐々に男子から「悪口を言われている」と恐怖感を抱くようになった。その後数ヶ月の間には、学校で「周りの声が気になる。全部自分のことを言っているような感じがする」などの体験が頻回に出現し、当初は学校場面に限定されていた被害念慮や注察感は学校以外の場面にも広がり、通りがかりの人から理由もなく見られる感じや、悪く言われる感じがするようになった。学校は休みがちとなるが、自宅にいても「登校し

ないと勉強が遅れる」,「休むと友だちがいなくなるのでは」という心配が浮かび,気分が沈んだり,気持ちが落ち着かなくなることが多くなった。このため近医からの紹介を受けて,統合失調症疑いということでSAFEクリニックを受診した。

インテイク面接によりARMSと診断され,3回目の診察から主治医診察と併行して心理士による認知行動療法セッションを開始した。

面接の初期には,本人自身の主観的な問題リストをもとに目標立てを行い『学校に行っても辛くないようにすること』を目標として共有することにした。本人が苦手としており困っている“授業中の場面”を具体的に上げ,ケース・フォーミュレーションを協働で作る作業を繰り返した。問題指向的な方向で治療が進んでいるのかを確認するために,本人からのフィードバックを適宜得ながら治療を進めた。

ケース・フォーミュレーションを進めるうち徐々に「だれ一人からも嫌われたくない」という中核信念が抽出されるようになった。この中核信念について検討を重ねていくうちに,『『だれからも嫌われたくない』という気持ちが強くあるので,ちょっとでも揺らぐような出来事があると『みんなから嫌われてる』と不安になり心配になったり』ことが課題であったことに自ら気付くようになり,この点を問題として同定し直すこととなった。

自分や周囲に対して別の見方を試すことができるように「客観的に考えてみる」「親友が同じ立場だったらどう助言するか」「どんな根拠があるか」といった形で認知再構成を進める作業により“根拠のない推論”を行い過ぎていたことを自覚するにいった。また,これらの介入と同時に,適応的思考,ストレス・マネジメント,生活時間スケジュールなどの介入を,本人の興味関心や面接状況に応じて適宜取り入れ,構造化した面接の中でも柔軟な対応を心がけた。また,直近に起こった出来事によって精神的に動揺している場合には,支持的にサポートする時間を確保することもあった。

学校へもどるための試みは何度か挑戦したが,

現在の本人にはハードルが高いという結論にいたり,転校という形を選択した。新しい学校では継続的に登校することが可能となり,精神症状の悪化も認めなくなったため,受診から5ヵ月で心理士による介入はいったん終結とした。症状の再発や,問題が起こった場合は早めに相談することを本人および母と約束したうえで,主治医による治療もいったん終結となった。

本例の治療では,ケース・フォーミュレーションや認知再構成を用いた思考の検討,苦痛を感じている事柄に対する感情的支持,学校を変えという環境への働きかけなど,さまざまな要素が混在していたため,どの要素が奏功したのかは断言できない。ただ,困っている問題を解決するために協働的に作業する,本人の能力を引き出すように支援するという治療者の姿勢維持が,治療関係維持や受診行動に良い影響を与えることができたのではと考えている。本人からの「すごいことを勉強できたと思う,普通じゃ教えてくれないことを勉強できた」という最終回の感想からは,“自分の考え方の悪いクセ”への気付きとこれに関連した問題を乗り越えることができたことへの自信が回復を促したものと推測された。

おわりに

思春期から青年期にかけての時期は,多くの精神疾患の最初の徴候が出はじめる時期である。早期の軽症段階の時期に,問題を先送りするのではなく,予防的な視点から早期介入を推進していく意義は極めて高いと考えられる。早期介入に適した支援を検討するうえで,認知行動的アプローチを用いた心理学的介入は重要な役割を果たすことができるだろう。今後,若者の精神疾患に対する早期介入に対する理解と関心がますます高まっていくことに期待したい。

文 献

- 1) Nishida A, Tanii H, Nishimura Y, Kajiki N, Inoue K, Okada M, Sasaki T, Okazaki Y : Associations between psychotic-like experiences and mental health status and other psychopathologies among

- japanese early teens. *Schizophr Res* 2008 ; 99 : 125-133.
- 2) Yung AR, Nelson B, Thompson AD, Wood SJ : Should a "Risk syndrome for Psychosis" be included in the DSMV? *Schizophr Res* 2010 ; 120 : 7-15
- 3) 松本和紀 : 早期精神病の早期介入に向けた新たなアプローチ—アットリスク精神状態／前駆期を中心に. *精神医学* 2007 ; 49 : 342-353.
- 4) French P, Morrison AP : Early detection and cognitive therapy for people at high risk of developing psychosis - a treatment approach. Chichester, John Wiley & Sons, Ltd, 2004.
- 5) Miyakoshi T, Matsumoto K, Ito F, Ohmuro N, Matsuoka H : Application of the comprehensive assessment of at-risk mental states (caarms) to the japanese population: Reliability and validity of the japanese version of the caarms. *Early Intervention in Psychiatry* 2009 ; 3 : 123-130.
- (付記) 倫理的配慮にもとづき、提示症例には一部改変を加えている。

■第 28 回日本社会精神医学会：シンポジウムⅦ 思春期の精神病理—大規模疫学調査から—

長崎市の中学生を対象とした精神病様症状体験の調査

今村 明¹⁾, 中澤紀子¹⁾, 西田淳志²⁾, 木下裕久¹⁾, 岡崎祐士³⁾, 小澤寛樹¹⁾

はじめに

精神病様症状体験 (psychotic-like experiences; PLEs) とは、幻声、幻視等の幻覚や思考被察知妄想、関係妄想、注察妄想等の妄想 (あるいは念慮) を体験することを言い、精神疾患の罹患者だけではなく、一般人口中でも一定の割合で見られることが知られている³⁰⁾。近年、若年者の PLEs の疫学研究が、イギリス、オーストラリア、ニュージーランド、オランダ、日本等で行われている^{5, 11, 13, 17, 19)}。これまでの疫学研究によると、思春期・青年期に何らかの PLEs を体験したことのある者は、後の統合失調症関連障害や、それ以外の精神科的疾患の発症率が高くなる可能性がある^{10, 15)}。New Zealand の出生コホート研究においては 11 歳時の子どものうち約 15% が PLEs を体験しており、それらは体験していない群に比べて統合失調症の発症率が著しく高い (非体験群の 16 倍) こと、また、成人期の不適応が 90% に認められたことが報告されている¹⁸⁾。

日本においては、Nishida ら¹⁷⁾が三重県津市において 12 歳から 15 歳までの子ども約 5,200 名を対象に PLEs をもつ子どもの割合、関連要因を探索する大規模疫学調査を実施した。その結果、約 15% の子どもが PLEs があつたこと、そのうちの 6 割が精神的な不調を抱えていることが示唆された。また、PLEs は衝動的暴力行為、衝動的自傷行為、希死念慮、集団場面での過度な緊張、といった他の思春期精神病理項目と有意な関連が認められた。

我々はこの津市での研究結果を再確認し、PLEs を持つ子どもの臨床的特徴をさらに深く調べることを重要であると考え、長崎市の中学生を対象に津市と同規模の疫学調査を行った。調査項目については津市で施行されたものに加え、若年者の行動面・情緒面の自己記入式評価表で、世界的に最もよく使用されているものの一つと思われるユース・セルフレポート (Youth Self-Report; YSR) の一部を使用した。今回はスペースの関係で、統合失調症関連障害の予測因子として特に重要と思われる「注意の問題」^{22, 26)}「社会性の問題」^{25, 24)}の 2 つのカテゴリーのみを採用した。この「社会性の問題」「注意の問題」は、広汎性発達障害 (PDD) や注意欠陥/多動性障害 (AD/HD) の行動特徴の一部を反映しているとも考えられるものでもある^{7, 9)}。

本研究では、①日本における PLEs を持つ子どもの割合を再確認すると共に、②PLEs と社会性や注意の問題との関係についても検討する。

対象と方法

対象は長崎市内の公立中学校に通う中学生 (12 歳～15 歳) である。2008 年 1 月中旬～下旬に長

英文タイトル: A large scale survey of psychotic-like experiences among junior high school students in Nagasaki city

著者連絡先: 今村 明 (長崎大学大学院医歯薬学総合研究科精神神経科学教室)

〒 852-8501 長崎県長崎市坂本 1 丁目 7-1

E-mail: f1042@cc.nagasaki-u.ac.jp

Corresponding author: Imamura Akira

Department of Neuropsychiatry, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences
1-7-1, Sakamoto, Nagasaki-shi, Nagasaki-ken, Japan

1) 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科精神神経科学教室

Neriko Nakazawa, Hirohisa Kinoshita, Hiroki Ozawa;
Department of Neuropsychiatry, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Sciences

2) 東京都精神医学総合研究所統合失調症研究チーム

Atsushi Nishida; Department of Schizophrenia Research, Tokyo Institute of Psychiatry,

3) 東京都立松沢病院

Yuji Okazaki; Tokyo Metropolitan Matsuzawa Hospital

崎市内の9校の公立の中学校の生徒約5,374名を対象に研究者ら作成の無記名自記入式「こころとからだの健康アンケート」による一斉調査依頼を行った。生徒は自分の所属学級で調査に参加した。

本研究は長崎大学倫理委員会の承認を得て施行したものである。倫理的配慮として、調査用紙は匿名で提出（個人が特定されることはない）、参加したくない場合には白紙で提出、調査用紙は封筒に入れて提出（学校関係者が見ることは不可）とした。

倫理委員会の承認を得た後、長崎県教育委員会に調査実施を依頼し、承諾を得て、長崎市での実施を決定した。その後、長崎市教育委員会と交渉を行い、実施可能な9校の公立中学校を選択した。その9校には調査依頼を個別に行い、各校長の承諾を得た後、各校長に同意書の提出を依頼した。校長の同意書が提出された後、各学校に保護者向けの研究説明を文書を用いて行った。質問がある保護者がいた場合は、研究者に直接問い合わせることとした。保護者への調査説明文配布から約2週間後より、各学校で調査を実施した。調査実施期間を約3週間設定し、その間で各学校の都合がつく時間に約30分の実施時間を設定してもらった。

各教室での実施に関しては具体的な手順を書面にて示し、また、各学級の担任教諭には教示文を配布し、教室で読み上げてもらった。したがって全ての生徒が調査参加の前に同じ説明を受けた。教示文では、①匿名性は保たれること、②参加したくない場合は白紙のまま封筒に入れて提出してよいこと、③学校の関係者が回答を見ることはないこと、を伝えた。

質問紙は津市の調査で使用されたものをもとに新たな質問項目を加えて作成した。質問紙の構成は以下の通りである。

- (a) PLEs
- (b) GHQ-12 (the 12-item General Health Questionnaire) : これにより精神的健康度を評価した。
- (c) YSR
- (d) その他: 性別、年齢、学年、家族構成、身長、

体重、いじめや虐待の問題、摂食の問題など我々が追加した項目は(c)と(d)の一部である。主要な項目のみ以下に述べる。

PLEsはthe schizophrenia section of the Diagnostic Interview Schedule for Children (DISC-C)⁴⁾から4項目を使用した。以下にそれを示す。

- (1) 「超能力などによって、自分の心の中をだれかに読み取られたことがありましたか？」
- (2) 「テレビやラジオから、あなただけにメッセージや暗号が送られてきたことがありましたか？」
- (3) 「だれかに後をつけられたり、こっそり話を聞かれたりされていると感じたことがありましたか？」
- (4) 「他の人には聞こえない「声」を聞いたことがありましたか？」

これら4項目の回答形式は“あった”、“あったかもしれない”、“なかった”とし、“あった”、“あったかもしれない”と答えた場合、PLEs得点1点を与え、PLEs得点1点以上の場合PLEs群、0点の場合非PLEs群とした。

GHQ-12は、12項目の質問からなる自己記入式の精神的な健康度ををはかるスクリーニングツールである。日本語版の妥当性、信頼性は十分に検討されている⁵⁾。精神的な健康度が低いほど得点が高くなる。今回の方法で得点の範囲は0～12であり、本研究においてはGHQ-12の得点が4点以上の者を低メンタルヘルス群とした^{2,10)}。

YSRはAchenbachが開発した子どもを8つの情緒面・行動面からとらえることができる自己記入式のチェックリストである^{1,11)}。世界的に広く普及しており、各国で標準化が進み、各々でその使用がなされている。8つの側面とは、ひきこもり尺度、身体的訴え尺度、不安/抑うつ尺度、社会性の問題尺度、思考の問題尺度、注意の問題尺度、非行の行動尺度、攻撃的行動尺度である。それぞれの尺度は合計得点に応じて臨床域、境界域、健常域に分けられる。我々はYSRの日本語版から2つの下位尺度、注意の問題の項目、社会性の問題の項目、計15項目を抜粋し、使用した。

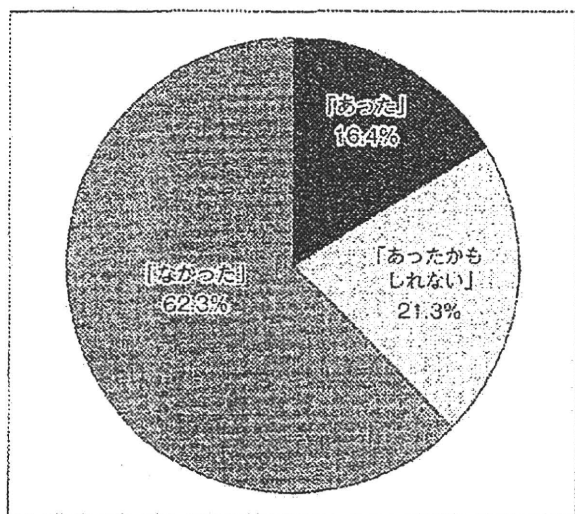


図1 PLEs についての回答の結果

「あった」: 1項目以上「(症状が) あった」と回答した被検者
 「あったかもしれない」: 上記の被検者以外で1項目以上「(症状が) あったかもしれない」と回答した被検者
 「なかった」: すべての項目に「(症状が) なかった」と回答した被検者

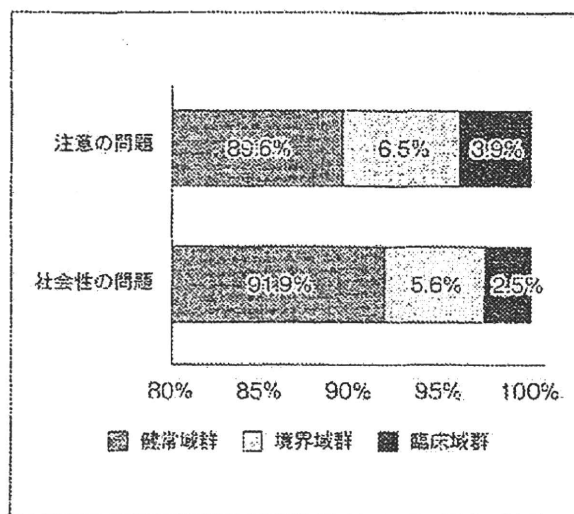


図2 YSRの社会性の問題と注意の問題の各群の比率

(左から健康域群、境界域群、臨床域群)

これらの項目の回答形式は“あてはまらない”, “ややまたはときどきあてはまる”, “よくあてはまる”であり, 得点化する際は“あてはまらない”は0点, “ややまたはときどきあてはまる”は1点, “よくあてはまる”は2点とした。

「注意の問題」は得点の範囲は0～18点であり, 14点以上が臨床域, 12～13点が境界域, 11点以下が健康域となる。「社会性の問題」は得点の範囲は0～16点であり, 11点以上が臨床域, 9～10点が境界域, 8点以下が健康域となる。

我々はそれぞれの項目の関連を調べるために, 性と学年を統制してロジスティック回帰分析を行った。すべての統計解析はSPSS ver. 16.0 for Windows (SPSS Japan Inc.) を用いて行った。

結果

依頼を行った9つの公立中学校 (5,374名) 全てで調査を実施した。調査当日397名の生徒が欠席 (そのうち71名が1カ月以上の欠席者) であった。参加拒否が32名 (0.6%) であり, 最終的に4,864名 (90.5%) の回答が解析対象となった。男子2,429名, 女子2,435名であった。

PLEs項目の回答についての結果を図1に示す。4項目のうち, 一項目以上の項目において“あった”と答えた者は16.4% (797名) であった。内訳は男子386名, 女子435名であった。

GHQ-12による低メンタルヘルス群は2,070人 (42.6%) であった。

PLEsを従属変数としてロジスティック回帰分析を行い, 低メンタルヘルス群との関連を調べたところ, オッズ比2.98 (95%信頼区間2.53 - 3.50) で有意な関連があった ($p < 0.001$)。この結果より, 低メンタルヘルス群に属するものはPLEsを持ちやすいことが示された。

YSRの社会性の問題と注意の問題の結果を図2に示す。境界域群と臨床域群を合わせると8.1%は社会性の問題が, 10.4%は注意の問題がある可能性が示された。

次に, YSRの社会性の問題, 注意の問題それぞれの臨床域において, GHQ-12の結果を従属変数としてロジスティック回帰分析を行ったところ, 社会性の問題でオッズ比7.16 (95%信頼区間5.70 - 9.75), 注意の問題はオッズ比5.23 (95%信頼区間4.20 - 6.51) と臨床域群は低メンタルヘルス群に属しやすかった。

また、YSRの社会性の問題の臨床域群、注意の問題の臨床域群それぞれにおいて、PLEsの結果を従属変数としてロジスティック回帰分析を行ったところ、社会性の問題ではオッズ比2.45(95%信頼区間1.95-3.09)、注意の問題ではオッズ比2.52(95%信頼区間2.04-3.10)とYSRで臨床域となる対象者はPLEs群に属しやすいことがわかった。

考 察

われわれは、長崎市において約5,000名の公立中学校に通う中学生の心理的行動的問題(PLEsを含む)について調査を行った。このような大規模な調査は、本邦における西田らの調査を除き、世界的に例のないものである。

GHQ-12の結果40%以上が低メンタルヘルス群に属していた。また学年が上がるにつれて低メンタルヘルス群の率は高くなった。津市の調査においても同様の結果が報告されている。

PLEsを持つ子どもの頻度は16.4%であり、津市での調査で示された15.2%に近い結果であった。また、項目ごとにみると、「声が聞こえる」「後をつけられたり、こっそり話を聞かれたりする」「心の中を読み取られる」「テレビやラジオからメッセージが送られる」の順であった。これらの順序も津市の調査と同じであった。

このように今回の我々の結果は、津市の調査結果と非常に高い類似性を示した。長崎市の方がPLEsの保有率と低メンタルヘルス群の頻度が若干大きかったが、これは調査を行った時期の違い(津市では8月の夏休み前、長崎では1月の3学期初め)や津市と長崎市の環境的差異(長崎市が津市に対して比較的都市化されており、人口密度も高いこと)等が関与した可能性がある。

YSRの項目については8.1%が社会性の問題を、10.4%が注意の問題を有している可能性があることが示唆された。臨床域群はそれぞれ高率に低メンタルヘルス群に属することが示され、またPLEs体験群と有意な関連がみられた。このことは、

社会性や注意の問題を持つ中学生が、精神的に著しく低レベルの健康状態にあり、かつPLEsを体験することも多いことを示唆している。社会性の問題、注意の問題は統合失調症の前駆症状とも考えられ^{3, 8, 14, 15, 16, 22, 24)}、これらの項目もPLEsと同様に今後の精神疾患発症の予測因子として検討すべきと思われる。

またYSRの各項目は、それぞれ発達障害の症状を反映している可能性がある。Hoekstraら⁹⁾はYSRの社会性の問題の項目によってAQ(the Autism-spectrum Quotient) scoresを予測することが可能だと報告している。Doyleら⁷⁾はYSRの注意の問題とAD/HD診断のための構成面接の結果とで有意な関連があったと報告している。このためこれらの項目は、発達障害を直接診断できる訳ではないが、少なくともその傾向を評価することはできる尺度であると思われる。従って、社会性の問題がある子どもの中にはPDDの子どもが含まれていることも考えられ、また注意の問題がある群にはAD/HDが含まれる可能性がある。近年、発達障害の子どもが早期に発見されなかったことで、いじめや虐待にあい、二次障害として様々な精神疾患を発症することが報告されており²¹⁾、また自閉症スペクトラムに関しては、統合失調症の発症率が一般人口よりも高いことが知られている¹⁹⁾。今回の研究結果は、発達障害の傾向をもつ子どもへの早期の対応の重要性も示唆しているものと考ええる。

謝 辞

今回の研究でご協力いただいた長崎県教育委員会、長崎市教育委員会、中学校の関係者の方々および保護者、学生の皆様へお礼申し上げます。また日本語版ユース・セルフレポート(ASEBA(Achenbach System of Empirically Based Assessment)による)の使用にあたってご許可を頂いたCAMHA(Child and Adolescent Mental Health Associates; 児童思春期精神保健研究会)の関係者の皆様へ感謝いたします。

文 献

- 1) Achenbach, T.: Integrative Guide for the 1991 CBCL/4-18, YSR, & TRF Profiles. University of Vermont, Department of Psychiatry, Burlington, 1991
- 2) 荒木田美香子, 高橋佐和子, 青柳美樹他: 中学生の精神的健康状態とその要因に関する検討. 小児保健研究 62: 667-679, 2003
- 3) Cannon, T.D., Cadenhead, K., Cornblatt, B., et al.: Prediction of psychosis in youth at high clinical risk: a multisite longitudinal study in North America. *Arch Gen Psychiatry* 65: 28-37, 2008
- 4) Costello, A., Edelbrock, C., Kalas, R., et al.: NIMH Diagnostic Interview Schedule for Children: Child Version, National Institute of Mental Health, Rockville, MD, 1982
- 5) Dhossche, D., Ferdinand, R., van der Ende, J., et al.: Diagnostic outcome of self-reported hallucinations in a community sample of adolescents. *Psychol Med* 32: 619-627, 2002
- 6) Doi, Y., Minowa, M.: Factor structure of the 12-item General Health Questionnaire in the Japanese general adult population. *Psychiatry and clinical neurosciences* 57: 347-456, 2003
- 7) Doyle, R., Mick, E., Biederman, J.: Convergence between the Achenbach youth self-report and structured diagnostic interview diagnoses in ADHD and non-ADHD youth. *J nervous and mental disease* 195: 350-352, 2007
- 8) Häfner, H., Maurer, K., Ruhrmann, S., et al.: Early detection and secondary prevention of psychosis: facts and visions. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 254: 117-28, 2004
- 9) Hoekstra, R. A., Bartels, M., Hudziak, J. J., et al.: Genetic and Environmental Covariation Between Autistic Traits and Behavioral Problems. *Twin Research and Human Genetics* 10: 853-860, 2007
- 10) Kaneita, Y., Ohida, T., Osaki, Y., et al.: Association Between Mental Health Status and Sleep Status Among Adolescents in Japan: a nationwide Cross-Sectional Survey. *J. Clin. Psychiatry* 68: 1426-1435, 2007
- 11) Kim-Cohen, J., Caspi, A., Moffitt, T. E., et al.: Prior juvenile diagnoses in adults with mental disorders: developmental follow-back of a prospective-longitudinal cohort. *Arch. Gen. Psychiatry* 60: 709-717, 2003
- 12) 倉本英彦, 上林靖子, 中田洋二郎, 他: Youth Self Report (YSR) 日本語版の標準化の試み: YSR 問題因子尺度を中心に. 児童精神医学とその近接領域 40: 329-344, 1999
- 13) Laurens, K. R., Hodgins, S., Maughan, B., et al.: Community screening for psychotic-like experiences and other putative antecedents of schizophrenia in children aged 9-12 years. *Schizophr Res* 90: 130-146, 2007
- 14) Laurens, K.R., West, S.A., Murray, R.M., et al.: Psychotic-like experiences and other antecedents of schizophrenia in children aged 9-12 years: a comparison of ethnic and migrant groups in the United Kingdom. *Psychol Med* 38: 1103-1111, 2008
- 15) Lencz, T., Smith, C.W., Auther, A., et al.: Nonspecific and attenuated negative symptoms in patients at clinical high-risk for schizophrenia. *Schizophr Res* 68: 37-48, 2004
- 16) Mirsky, A.F., Ingraham, L.J., Kugelmass, S.: Neuropsychological assessment of attention and its pathology in the Israeli cohort. *Schizophr Bull* 21: 193-204, 1995
- 17) Nishida, A., Tanii, H., Nishimura, Y., et al.: Associations between psychotic-like experiences and mental health status and other psychopathologies among Japanese early teens. *Schizophr Res* 99: 303-318, 2007
- 18) Poulton, R., Caspi, A., Moffitt, T. E., et al.: Children's self-reported psychotic symptoms and adult schizophreniform disorder: a 15-year longitudinal study. *Arch. Gen. Psychiatry* 57: 1053-1058, 2000
- 19) Rapoport, J., Alex Chavez, B.S., Greenstein, D., et al.: Autism Spectrum Disorders and Childhood-Onset Schizophrenia: Clinical and Biological Contributions to a Relation Revisited *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry* 48: 10-18, 2009
- 20) van Os, J., Linscott, R.J., Myin-Germeys, I., Delespaul, P., Krabbendam, L.: A systematic review and meta-analysis of the psychosis continuum: evidence for a psychosis proneness-persistence-impairment model of psychotic disorder. *Psychol Med* 39(2): 179-195, 2009
- 21) 吉川 徹: 二次障害. 日本臨牀, 65: 464-469, 2007
- 22) Yung, A.R., Stanford, C., Cosgrave, E., et al.: Testing the Ultra High Risk (prodromal) criteria for the prediction of psychosis in a clinical sample of young people. *Schizophr Res* 84: 57-66, 2006
- 23) Yung, A.R., Phillips, L.J., Yuen, H.P., et al.: Psychosis prediction: 12-month follow up of a high-risk ("prodromal") group. *Schizophr Res* 60: 21-32, 2003
- 24) Welham, J., Scott, J., Williams, G., et al.: Emotional and behavioural antecedents of young adults who screen positive for non-affective psychosis: a 21-year birth cohort study. *Psychol Med* 39: 625-634, 2009

精神疾患のコピー数解析*

小野 慎 治**** 今 村 明** 中 根 秀 之***

Key Words : copy number variation (CNV), DNA microarray, neuropsychiatric conditions, homologous recombination, non-homologous end joining

はじめに

2003年に完了したヒトゲノム計画は、情報技術(IT)の大きな助力を得てわれわれに数多の情報をもたらした。現在、ゲノム情報はデータベース化されウェブサイトで誰でも閲覧が可能で、その情報は研究だけでなく臨床にも広く利用されている。ITのさらなる進歩により、(今がまさに過渡期かもしれない)ゲノム解析技術は飛躍的な進歩を遂げ、これまで知りえなかった事象が次々とその姿を露わにしている。ゲノムのコピー数という概念もそのうちの一つであり、ある領域に着目した場合、通常両親から1つずつもらって2つの同領域(2コピー)を持っていると考えられてきた。しかし、その領域が重複していたり、欠失していたりするとそれぞれ3コピー(もしくは4コピーかそれ以上)、1コピー(もしくは0コピー)とカウントされ、この領域に遺伝子が含まれていたりする場合、その遺伝子の発現にも影響を与え、個体差や疾患発症に

寄与するというものである。

2004年にSebatら¹⁾、Iafrateら²⁾の報告によりコピー数変異(copy number variation ; CNV)は健常人にも数多く、そして、広範囲の領域に存在していることが明らかとなった。そして2006年、Redonら³⁾の報告によりゲノム上の12~15%はコピー数多型が占めていることがわかり、これら多型はSNP (single nucleotide polymorphism ; 一塩基多型)と並んで民族間や個人間の多様性に関与していると考えられている。また、トロント大学によってコピー数多型のデータベース(Database of Genomic Variants ; <http://projects.tcag.ca/variation/>)が構築、更新されているが、まだその全貌を明らかにするまでには至っていない。

コピー数の解析技術

何をさしおいても、近年のゲノム研究において重要な役割を担っているのがDNAマイクロアレイである。コピー数解析にもその効果は絶大であり、ゲノムワイドに俯瞰、検出可能なツールである。マイクロアレイには複数社の製品があるが、それぞれ特性が異なる。以下、私見も挟んで申し訳ないが、主たるマイクロアレイの概要を説明したい。

Affymetrix社やIllumina社から提供されている

* Brain Science ㉞—Copy number analysis in neurodevelopmental disorders.

** Shinji ONO, M.D. & Akira IMAMURA, M.D, Ph.D.: 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻展開医療科学講座精神神経科学(☎852-8520 長崎県長崎市坂本1-7-1) ; Department of Neuropsychiatry, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki 852-8520, Japan.

*** Hideyuki NAKANE, M.D, Ph.D.: 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科医療科学専攻リハビリテーション科学講座精神障害リハビリテーション学分野 ; Department of Occupational Therapy, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki, Japan.

**** 兼 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科放射線医療科学専攻人類遺伝学 ; Department of Human Genetics, Nagasaki University Graduate School of Biomedical Science, Nagasaki, Japan.

SNP arrayは、コピー数解析用のプローブとともにgenotypeを特定できるSNPプローブを搭載しているのがその大きな特徴である。SNPプローブから割り出されるgenotypeを基にLOH (loss of heterozygosity)を検出することも可能であり、コピー数解析の結果と合わせてUPD (uniparental disomy)の検出も容易に行うことができる。ただし、解析に関して重大な責務を負っているgenotypeのクラスタリングつまりAAやBBのhomoなのかABのheteroなのかの判断—においては、その振り分けに多くのサンプルを必要とし、現在も多くの施設で開発、改良が施されているものの、信頼性を高めている段階であるというのが現状である。解析に用いる対照群の選択も非常に重要な要素であり、HapMap projectから民族ごとの正常対照群を入手することができるようになってきている。

一方、Agilent社、Roche社(NimbleGen)から提供されているマイクロアレイはコピー数解析に特化したマイクロアレイで、テストサンプルとリファレンスサンプルを異なる蛍光で競合ハイブリダイズすることにより、対照1,対象1のわかりやすく、そして、信頼度の高い情報を得ることができる。ただ、この手法も対照の選択によりまったく異なったデータになってしまう。もう一つの大きな特徴として、この2社のアレイは誰でも簡単に調べたい領域のみをカスタムしたアレイをオーダーすることが可能ということである。まずはゲノムワイドで俯瞰的に観察したのち、絞られた領域により多くのプローブを載せたスライドを作成し、細かい領域をみていくという戦略が可能である。

現在は、以上に紹介したマイクロアレイがコピー数解析の主流であるが、近年、次世代シーケンサーが複数社から開発されている。これらの機種は主に広領域のシーケンシングを目的とした技術であるが、その工程としてゲノムを断片化し、*in vitro*でライブラリを構築、アレイ上で高並列化を行うため、断片化したリードの深さ(重なり)によってコピー数を測定することが可能である。これまでのマイクロアレイよりさらに正確なブレイクポイントの検出が可能で次世代シーケンサーも、今後のコピー数解

析の主たる部分を担うものと思われる。

精神疾患におけるCNVの関与

精神疾患の原因は単一でないことが多く、環境要因も含めた多因子が関与していると思われる。統合失調症や自閉症には遺伝的関与が存在していることは、双生児研究や養子研究により明らかであるが、関与している遺伝子はいまだ不明なところが多い。精神疾患においてコピー数の関与が知られることになったのは、verocardio-facial syndromeやDeGeorge syndromeの原因として知られていた22番染色体長腕の一部であるq11.2の欠失(deletion)、つまり22q11.2欠失症候群によってである。この欠失症候群は25%の割合で精神遅滞や統合失調症を含めた精神症状、症候群を呈することが知られ、このことから原因としてdosage-sensitiveな*TBX1*遺伝子が関与していることがわかった⁴。

以下に、疾患別に分けた主な精神疾患に関連したCNVを述べる。一覧をまとめたものが表1⁵である。

1. 自閉症

ブラダー・ウィリー症候群とアンジェルマン症候群の責任領域である15q11-33は、前述2疾患が欠失によりそれぞれ父性、母性アレル(allele; 対立遺伝子)を欠くことで生じることは知られていたが、Bundeyら⁶は1994年に、ある自閉症児でこの領域の母性アレルが重複していることを報告し、この現象が自閉症を誘発していると推測した。その後も同領域に関しては多数の報告がなされており、自閉症児の1~3%に母性アレルの重複がみられるといわれている。なお、この領域については、Nakataniら⁷が2009年6月Cell誌にモデルマウスを作製したことを報告している。Durandら⁸は、2007年に自閉症児の中に22q13.3領域*SHANK3*遺伝子欠失が存在していることを報告した。その後もこの遺伝子、領域の欠失は複数の報告があり、2003年のSebatら⁹の大規模な*de novo* CNV報告でも同領域が同定されている。Xp22.3に存在する*NLGN4*遺伝子もさまざまなCNVの報告がある。この遺伝子と自閉症の関係が最初に報告されたのは2003年のJamainら¹⁰によってであるが、この報告はフレームシフ

表1 CNVが関与している精神神経疾患

疾患名	遺伝子	遺伝子座	コピー数
自閉症	<i>SHANK3</i>	22q13	欠失
自閉症スペクトラム障害	<i>NLGN4</i>	Xp22.33	欠失
		16p11.2	欠失もしくは重複
	<i>PCDH10</i>	4q28.3	ホモ欠失
	<i>NHE9</i>	3q24	ホモ欠失
		15q11-q13	母性重複
双極性障害	<i>GSK3β</i>	3q13.3	重複
Rett症候群	<i>MECP2</i>	Xq28	欠失
統合失調症	<i>ERBB4</i>	2q34	欠失
	<i>SLC1A3</i>	5p13.3	欠失
	<i>RAPGEF4</i>	2q31.2	欠失
	<i>CIT</i>	12q24	重複
		1q21.1, 15q11.2 and 15q13.3	欠失もしくは重複
トゥレット症候群		17p11.2	微小欠失(一症例)
	<i>NLGN4</i>	Xp22.33	欠失(一家系)

(文献⁹⁾Table 1より改変)

トの症例報告であった。2008年Lawson-Yuenら¹²⁾は、*NLGN4*遺伝子のヘミ接合性欠失を一人の自閉症児に見つけ、この遺伝子のコピー数変化も自閉症の発症に関与している可能性があることがわかった。Weissら¹³⁾は、2008年に2,000名超の自閉症患者を対象に複数社のマイクロアレイを用いて検討した結果、16p11.2領域の重複が自閉症に関与していることをNew England Journal of Medicine誌に報告した。ただこの重複領域は有意差があるものの、患者群全体の1%以下にしかみられないレアなものであった。Morrowら¹⁴⁾は、2008年に独特なアプローチで自閉症の候補遺伝子を同定した。彼らは中東の近親婚家系に自閉症が多発していることに注目して、劣性遺伝病の側面を持つ自閉症に対しその近親婚家系を用いてLOHを割り出し、家系ごとにhomozygosity mappingを行い、その中から患者にしか存在しないホモ欠失領域が*NHE9*遺伝子と*PCDH10*遺伝子に存在していることを示した。

2. 統合失調症

Walshら¹⁵⁾は、2008年4月に18歳以上発症の患者群76名、18歳以下発症の患者群150名、そして対照群268名に分け、それらの群を対象にIllumina社とRoche社NimbleGenアレイを用いてコピー数を検出した。そのコピー数変化のある領域からCNVによって断絶される遺伝子に着目、つまり、それぞれのブレイクポイントに遺伝子を含んで

いるもののみを抽出しその差を検討した。結果として若年発症群は20%、成人発症群は15%、対照群は5%と有意に患者群に多く、しかも、若年発症群にさらに多いという結果を示した。また、これらブレイクポイント上に存在する遺伝子はすべて脳の発達に重要なネットワーク上にあることを示している。さらにこの論文では、ある患者*ERBB4*と*SLC1A3*の欠失、特に後者ではfusion遺伝子が存在することをシークエンシングで確認している。続いてXuら¹⁶⁾は、孤発例152名の患者群と正常対照群159名をAffymetrix社SNP arrayを用いてコピー数解析を行い、孤発例は*de novo*のCNVが対照群に比べて約8倍も多く存在することを示した。またこの論文で、*RAPGEF4*遺伝子の欠失と*CIT*遺伝子の重複が関与することも明らかになった。自閉症の責任領域として知られていた16p11.2領域は、その微細領域の重複と統合失調症との関係が2009年11月Nature Genetics誌上でMcCarthyら¹⁷⁾によって示された。

3. その他の精神発達障害

双極性障害単体でのコピー数解析は少なく、多くの論文は統合失調症と合わせてのものである。知るところ単体では*GSK3β*のコピー数増という論文¹⁸⁾が唯一であり、双極性障害の治療薬であるリチウムは作用機序として*GSK3β*の抑制作用を持つから、この結果は薬理作用と矛盾しないものとなった。

Rett症候群は99.5%孤発例の10,000~15,000人の女兒に1人の発生率を持つ進行性の神経疾患で精神と運動機能の発達障害、常同行為、そして、本症特有の手もみ動作を特徴とする。その責任遺伝子としてMECP2遺伝子が知られているが、この遺伝子はメチル化遺伝子制御機構の中核をなすことで知られる。よって、この遺伝子が制御している下流の遺伝子が存在すると考えるのが妥当であるが、まだ詳細な発症機序はつかめていない。

トゥレット症候群では17p11.2²⁰¹そしてNLGN4遺伝子²⁰²の微小欠失が報告されているが、いずれも1報告のみである。

4. CNV研究の今後

疾患に関係する変異といえばこれまで点変異が知られてきたが、これまで精神疾患は点変異ではその全貌を説明できなかったこともあり、ここ数年の間盛んにCNV研究が行われている。また、統合失調症、双極性障害、自閉症は共通の候補領域を複数持っていることから、類似の神経発達脆弱性を有しているのではないかと推測されている²⁰³。ただ共通であるものの、一方は重複で一方は欠失といった対極の関係にある候補領域もあり²⁰⁴、その影響にはまだ不明なところが多い。

CNVの形成機序

われわれ人類のDNAは2本鎖であることは周知の事実であるが、1本鎖よりも損傷を受けた際の修復に有利である。しかし、その2本が同時に損傷を受けてしまうことはよくあることで、その際に修復機構が働くことになる。その修復機構のうち広く知られているのが、相同組換え(homologous recombination; HR)と非相同末端再結合(non-homologous end joining; NHEJ)の2つである。相同組換え(HR)とは切断部の修復に鋳型としてまったく同一のものか、もしくはよく似た配列を利用している。しかしながら、ヒトゲノムはよく似た配列を持つ領域が多く(low copy repeats; LCR)、組換えの際に重複、欠失、逆位などが起こりうる²⁰⁵。実際、ヒトゲノム上にはある遺伝子と同じような配列の関連遺伝子(paralogous gene)や偽遺伝子(pseudogene)が数

多くあり、その痕跡を垣間見ることができる。これらの事象の多くは無害、有益なものであるが、ときに疾患に結びつく重複や欠失を起こしうる。一方、非相同末端再結合(NHEJ)はその名のとおり切断された断端をつなぐものであるが、変異や欠失が生じやすい²⁰⁶。ヒトゲノム上の多くを占めるのは遺伝子でない領域であるので、その多くは問題とならないことが多いとされている。このような機序でCNVは生じていると考えられる。

まとめ

自閉症と統合失調症を中心に精神神経疾患についてのコピー数変異(copy number variation; CNV)研究について概説した。また、CNV研究を支えるツールやCNVを発生せしめる機序についても触れた。近年のCNV研究から、これら精神神経疾患の候補遺伝子や病態が明らかになりつつある。この2疾患は神経成長などをつかさどる遺伝子のCNVが原因として多くあげられており、また、オーバーラップする原因遺伝子が複数あることから似たような発症機序を持つのではないかと推測されている。しかしながら、この点についてはまだ不明な点が多く、今後の研究が待たれるところである。

「最も強い者が生き残るのではなく、
最も賢い者が生き延びるでもない。

唯一生き残るのは、変化できる者である。」

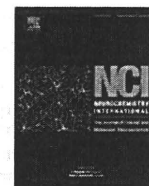
昨年生誕200周年を迎えたチャールズ・ダーウィンの言葉である。われわれは太古から変化を遂げながら環境に適応し現在に至っている。ヒトのゲノムを紐解くと、そこにはさまざまな外来遺伝子を取り入れた進化の痕跡が横たわっており、今回話題にあげたCNVもその一端を担っている。生存のための進化を促すCNVにより有利になることもあるその一方で、引き起こされる疾患があるという事象から、われわれは進化するためにゲノム不安定性を有さなければならず、その代償として疾患を課せられているのかもしれない。

文 献

- 1) Sebat J, Lakshmi B, Troge J, et al. Large-scale copy

- number polymorphism in the human genome. *Science* 2004 ; 305 : 525-8.
- 2) Iafrate AJ, Feuk L, Rivera MN, et al. Detection of large-scale variation in the human genome. *Nat Genet* 2004 ; 36 : 949-51.
 - 3) Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, et al. Global variation in copy number in the human genome. *Nature* 2006 ; 444 : 444-54.
 - 4) Carelle-Calmels N, Saugier-Veber P, Girard-Lemaire F, et al. Genetic compensation in a human genomic disorder. *N Engl J Med* 2009 ; 360 : 1211-6.
 - 5) Cook EH, Scherer SW. Copy-number variations associated with neuropsychiatric conditions. *Nature* 2008 ; 455 : 919-23.
 - 6) Bunday S, Hardy C, Vickers S, et al. Duplication of the 15q11-13 region in a patient with autism, epilepsy and ataxia. *Dev Med Child Neurol* 1994 ; 36 : 736-42.
 - 7) Nakatani J, Tamada K, Hatanaka F, et al. Abnormal behavior in a chromosome-engineered mouse model for human 15q11-13 duplication seen in autism. *Cell* 2009 ; 137 : 1235-46.
 - 8) Durand CM, Betancur C, Boeckers TM, et al. Mutations in the gene encoding the synaptic scaffolding protein SHANK3 are associated with autism spectrum disorders. *Nat Genet* 2007 ; 39 : 25-7.
 - 9) Sebat J, Lakshmi B, Malhotra D, et al. Strong association of de novo copy number mutations with autism. *Science* 2007 ; 316 : 445-9.
 - 10) Jamain S, Quach H, Betancur C, et al. Mutations of the X-linked genes encoding neuroligins NLGN3 and NLGN4 are associated with autism. *Nat Genet* 2003 ; 34 : 27-9.
 - 11) Lawson-Yuen A, Saldivar JS, Sommer S, et al. Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet* 2008 ; 16 : 614-8.
 - 12) Weiss LA, Shen Y, Korn JM, et al. Association between microdeletion and microduplication at 16p11.2 and autism. *N Engl J Med* 2008 ; 358 : 667-75.
 - 13) Morrow EM, Yoo SY, Flavell SW, et al. Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science* 2008 ; 321 : 218-23.
 - 14) Walsh T, McClellan JM, McCarthy SE, et al. Rare structural variants disrupt multiple genes in neurodevelopmental pathways in schizophrenia. *Science* 2008 ; 320 : 539-43.
 - 15) Xu B, Roos JL, Levy S, van Rensburg EJ, et al. Strong association of de novo copy number mutations with sporadic schizophrenia. *Nat Genet* 2008 ; 40 : 880-5.
 - 16) McCarthy SE, Makarov V, Kirov G, et al. Microduplications of 16p11.2 are associated with schizophrenia. *Nat Genet* 2009 ; 41 : 1223-7.
 - 17) Lachman HM, Pedrosa E, Petruolo OA, et al. Increase in GSK3beta gene copy number variation in bipolar disorder. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2007 ; 144B : 259-65.
 - 18) Shelley BP, Robertson MM, Turk J. An individual with Gilles de la Tourette syndrome and Smith-Magenis microdeletion syndrome : is chromosome 17p11.2 a candidate region for Tourette syndrome putative susceptibility genes? *J Intellect Disabil Res* 2007 ; 51 : 620-4.
 - 19) Lawson-Yuen A, Saldivar JS, Sommer S, et al. Familial deletion within NLGN4 associated with autism and Tourette syndrome. *Eur J Hum Genet* 2008 ; 16 : 614-8.
 - 20) Burbach JP, van der Zwaag B. Contact in the genetics of autism and schizophrenia. *Trends Neurosci* 2009 ; 32 : 69-72.
 - 21) Crespi B, Stead P, Elliot M, et al. Comparative genomics of autism and schizophrenia. *PNAS* 2010 ; 107 : 1736-41.
 - 22) Lee JA, Lupski JR. Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron* 2006 ; 52 : 103-21.
 - 23) Stankiewicz P, Lupski JR. Structural variation in the human genome and its role in disease. *Annu Rev Med* 2010 ; 61 : 437-55.

* * *



Olanzapine increases cell mitotic activity and oligodendrocyte-lineage cells in the hypothalamus

Takahira Yamauchi^a, Kouko Tatsumi^b, Manabu Makinodan^a, Sohei Kimoto^a, Michihiro Toritsuka^a, Hiroaki Okuda^b, Toshifumi Kishimoto^a, Akio Wanaka^{b,*}

^a Department of Psychiatry, Nara Medical University Faculty of Medicine, 840 Shijo-cho, Kashihara City, Nara 634-8521, Japan

^b Department of Anatomy and Neuroscience, Nara Medical University Faculty of Medicine, 840 Shijo-cho, Kashihara City, Nara 634-8521, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 6 November 2009
Received in revised form 30 June 2010
Accepted 12 July 2010
Available online 17 July 2010

Keywords:

Oligodendrocyte
Antipsychotic drug
Weight gain
Cell proliferation

ABSTRACT

Weight gain is increasingly recognized as an unwanted side effect of atypical antipsychotic drugs. To explore the mechanisms underlying this side effect, we examined the effects of olanzapine, an atypical antipsychotic drug, on cellular proliferation and differentiation in the adult mouse hypothalamus. A 6-week treatment with olanzapine resulted in a significant increase in body weight. The sizes and numbers of olanzapine-treated mouse adipocytes were significantly larger than those of control mice. No significant differences were observed in the levels of blood insulin, cholesterol, triglyceride, leptin, and ghrelin among olanzapine-, haloperidol-treated and control mice with an exception that adiponectin was significantly higher in olanzapine group than control group. Body temperature and the level of uncoupling protein 2 were also comparable between the olanzapine-treated and control groups. We found that the treatment increased BrdU-incorporating cell numbers in the hypothalamus, while the same regimen with haloperidol or control had little effect on cellular proliferation. Double-labeling immunohistochemistry revealed that the majority of the BrdU-positive cells were also Olig2- or APC-positive, indicating that oligodendrocyte-lineage cells were generated in response to olanzapine treatment. Enhancement of hypothalamic cellular proliferation after intracerebroventricular infusion of cytosine arabinoside coincided with elevated food intake and weight gain. These findings suggest a possible link between gliogenesis in the hypothalamus and weight gain following olanzapine treatment.

© 2010 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Atypical antipsychotic drugs are widely used as a first-line treatment for schizophrenia due to their efficacy and their fewer side effects, such as extrapyramidal symptoms, in comparison with typical antipsychotic drugs. However, unanticipated side effects of atypical antipsychotic drugs, including weight gain and hyperlipidemia, are emerging (Wirshing, 2001; Hedenmalm et al., 2002). Weight gain induced by atypical antipsychotic drugs correlates with morbidity, mortality and quality of life (Green et al., 2000). Moreover, weight gain may interfere with compliance, which could lead to relapse of psychosis. Of the atypical antipsychotic drugs, olanzapine induces the greatest weight gain in humans (Allison et al., 1999; Consensus Statement, 2004; Lieberman et al., 2005). In rodents, many reports have shown that weight gain is induced by olanzapine treatment (Cope et al., 2005; Cooper et al., 2005). Such weight gain has been attributed to increased body fat

(Eder et al., 2001; Graham et al., 2005), and a recent study reported that antipsychotic treatment of rats with olanzapine interferes with lipolytic activities and increases fat deposition (Minet-Ringuet et al., 2007). However, the mechanisms underlying fat deposition induced by atypical antipsychotic drugs remain unclear (Baptista et al., 2004; Consensus Statement, 2004).

Neurogenesis in the adult brain occurs in well-known regions such as the subventricular zone of the lateral ventricles and the subgranular zone of the hippocampus formation (Gage, 2000). Several recent reports indicate that neuroproliferative potency in the adult extends to other brain regions including the hypothalamus (Magavi et al., 2000; Pencea et al., 2001). Kokoeva et al. (2005) reported that newborn neurons in the hypothalamus are involved in controlling body weight and energy metabolism; they also observed newborn oligodendrocytes in the adult hypothalamus. We therefore hypothesized that such newborn hypothalamic cells might also be implicated in olanzapine-induced body weight gain. To test this hypothesis, we examined the effects of orally administered olanzapine on the behavior of newborn cells in the hypothalamus using double-labeling immunohistochemistry for BrdU and cellular markers.

* Corresponding author. Tel.: +81 744 22 3051; fax: +81 744 29 8825.
E-mail address: akiow@naramed-u.ac.jp (A. Wanaka).

2. Materials and methods

2.1. Animals and experimental procedure

Female C57BL/6J mice aged 10 weeks were housed singly with an artificial 12:12-h light–dark cycle (lights on at 8 am). Food and water were available *ad libitum* throughout the experiment. After a 1-week adaptation to the laboratory conditions, mice received either olanzapine or haloperidol for 8 weeks. The drugs were mixed with normal diet (CE2) (Clea Japan, Tokyo, Japan), and 20% sucrose was added to the food to enhance appetite. Mice were individually housed and their body weight was measured at the beginning of the 2nd, 4th, 6th, and 8th weeks. Food intake was measured for 3 consecutive days at the beginning of 1st, 2nd, 4th, and 8th week after the beginning of olanzapine or haloperidol treatment.

For the manipulation experiments of hypothalamic cellular proliferation, after a week adaptation to the laboratory conditions, mice were fed with the diets mixed with 20% sucrose. For intracerebroventricular (icv) surgery, mice were anesthetized with pentobarbital and a steel cannula (BRAIN INFUSION KIT 3, Alzet) was stereotactically inserted into the right lateral ventricle (anterior–0.3 mm, lateral+1.0 mm to bregma and dorsoventral–2.5 mm below skull). The cannula was connected to a micro-osmotic pump (model 1002 flow rate 0.25 μ l/h, 14 days, Alzet) via a 33 mm long vinyl tubing (inner diameter 1.22 mm, Alzet) filled with artificial cerebrospinal fluid (aCSF). This length was chosen to allow 2 days before the pump content reaches to the ventricular system. Each pump was filled with aCSF alone (Control group), or aCSF containing anti-mitotic agent, cytosine arabinoside (Ara-C, 6.6 μ g/ μ l, Sigma). Mice were housed singly and monitored for body weight and food intake. Twenty-three cannulated mice were divided into two groups; one group (13 mice) is infused with Ara-C in aCSF for 2 weeks and infusion solution was changed to aCSF for next 2 weeks. Control group (10 mice) is infused with aCSF for 4 weeks. The body weight was measured at the beginning of the 1st, 2nd, 3rd and 4th week for both groups. Food intake was measured daily in the 3rd and 4th week for both groups and average daily food intake was calculated. To examine the cellular proliferation, both groups received BrdU in drinking water (1 mg/1 ml) for the last 2 weeks. All animal protocols for this experiment were approved by the Animal Care Committee of Nara Medical University in accordance with the policies established in the NIH *Guide for the care and use of laboratory animals*.

2.2. Spontaneous motor activity

To evaluate the sedative effects of olanzapine or haloperidol, we measured spontaneous motor activity using a Supermex (Muromachi Kikai, Tokyo, Japan) (Masuo et al., 1997), which consists of a sensor monitor mounted above a Plexiglas cage to detect changes in heat across multiple zones of the cage through an array of Fresnel lenses. Body heat radiated by the animal was detected by the sensor head of the monitor, which contains paired infrared pyroelectric detectors. In this manner, the system allowed the monitoring and counting of all spontaneous movements. Measurement was done for 30 min, between 20:00 and 8:00 in the sound-attenuated Plexiglas cage, which was kept under dim light. All counts were automatically summated and recorded every minute.

2.3. Blood chemistry and energy expenditure examination

The metabolites and hormones related to energy balance were measured as follows.

Mice were divided into three groups (olanzapine, haloperidol, and control; each group contains seven mice). After 8-week treatment with drug, the mice were sacrificed by dislodging the neck vertebrae and blood was collected from the abdominal aorta.

For insulin and leptin, quantitation of serum hormones was performed with enzyme-linked immunoassay kits provided by Shibayagi (Gunma, Japan). Enzyme-linked immunoassay kits for active ghrelin and desacyl ghrelin was obtained from SCETI K.K., Tokyo, Japan. Serum adiponectin was examined with enzyme-linked immunoassay provided by Otsuka Pharmaceutical Co. Tokyo, Japan. These assays were performed according to manufacturers' instructions. Total cholesterol and triglyceride were measured with test kits provided by Wako Chemical Industry, Osaka, Japan. Whole blood glucose was measured with a Medisafe blood glucose detection kit (Terumo, Tokyo, Japan).

Body temperature of the mice was measured with electric thermometer (BAT-7001H, Physitemp Instruments Inc., NJ, USA) in the rectus.

The level of mitochondrial uncoupling protein 2 of white adipose tissue was examined by Western blotting using anti-UCP2 (rabbit polyclonal antibody, 1:1000, LifeSpan BioSciences Inc., WA, USA). The intensities of the positive bands were semi-quantitated with NIH ImageJ software and standardized by dividing with that of bands detected with anti-Actin (mouse monoclonal antibody, 1:5000, Millipore, Tokyo, Japan).

2.4. Tissue processing and antibodies

After 8 weeks of olanzapine or haloperidol treatment, mice were administered bromodeoxyuridine (BrdU) (1 mg/ml, *p.o.*) in their drinking water for the next 10 days, and then sacrificed. After perfusion with 4% paraformaldehyde (PFA) in phosphate buffer, brains and abdominal white adipose tissues were removed and

postfixed with 4% PFA overnight (~12 h) at 4 °C. The tissues were washed in PBS solution including 30% sucrose and snap-frozen. Frozen sections of 20 μ m thickness were cut and stored at –20 °C.

Brain sections were immunostained using the following primary antibodies and working concentrations: anti-BrdU (rat monoclonal antibody; 1:200, Serotec, Kidlington, UK), anti-Olig2 (rabbit monoclonal antibody; 1:100, IBL, Gunma, Japan), anti-NG2 (rat monoclonal antibody; 1:200, Millipore), anti-NeuN (mouse monoclonal antibody; 1:400, Millipore), anti-APC (mouse monoclonal antibody; 1:500, Calbiochem, Darmstadt, Germany), and anti-GFAP (rabbit polyclonal, DAKO; 1:5000, DAKO, Tokyo, Japan). Single- and double-stained sections were visualized with Alexa Fluor 488- or Alexa Fluor 546-conjugated secondary antibodies (1:1000, Invitrogen, Eugene, OR). Sections of adipose tissues were stained with hematoxylin and eosin and cell size was determined (see below).

2.5. Double-labeling immunohistochemistry

BrdU immunostaining was performed as previously described (Tatsumi et al., 2008). Briefly, sections were first incubated in sodium citrate buffer for 10 min at 90 °C, washed in distilled water, incubated in 2N HCl at 37 °C for 10 min, and washed three times in PBS for 10 min. Sections were then incubated with anti-BrdU antibodies in blocking buffer (5% bovine serum albumin, BSA/PBS) overnight at 4 °C. Sections were washed and incubated with biotin-conjugated anti-rabbit IgG (1:200, Vector Laboratories) for 1 h at 37 °C. After washing, the sections were processed using a standard Vectastain ABC kit (Vector). Staining was visualized with diaminobenzidine (DAB, Vector) as a chromogenic agent.

For double staining, sections were incubated in sodium citrate buffer for 10 min at 90 °C, after washing, and incubated overnight at 4 °C with one of the following primary antibodies: Olig2, NG2, NeuN, APC, GFAP. Sections were washed and incubated with Streptavidin in 5% BSA/PBS for 1 h at room temperature. After washing, the sections were treated with secondary antibodies for 1 h at room temperature, washed in PBS, incubated in 2N HCl for 10 min at 37 °C, and washed three times in PBS for 10 min. Sections were then incubated with anti-BrdU antibodies in 5% BSA/PBS overnight at 4 °C. Sections were washed in PBS, and then applied secondary antibodies for 1 h at room temperature and visualized by confocal microscopy (Olympus, Tokyo, Japan).

2.6. Quantification and statistical analysis

Total BrdU-positive (BrdU+) cells and BrdU+/cell marker+ double-positive cells were counted in hypothalamic sections of olanzapine-treated and control mice. Care was taken to minimize counting bias; serial sections (20 μ m thick) that encompassed the entire hypothalamus (Bregma–1.22 mm to Bregma–2.30 mm) were cut on a cryostat, and 6 sections at regular intervals (120 μ m) were picked up and double-labeled for BrdU and cell markers. The person who counted the numbers of BrdU+ and BrdU+/cell marker+ cells was blind to which sections were olanzapine-treated and which were not. The ratios of BrdU+/cell marker+ to total BrdU+ cells were calculated.

In the cellular mitosis manipulation using Ara-C, the numbers of BrdU+ cells in the hypothalamic sections of Ara-C-treated and control aCSF-infused mice were counted as described above and subjected to statistical analysis.

To address the effects of olanzapine or haloperidol on white adipose tissue, 30 adipose cells were randomly chosen from sections of each olanzapine-treated, haloperidol-treated and control mouse by an examiner who was blind to the identities of the sections (see above), and the circumferences of these cells were measured using FLVFS-LS image processing software (Olympus Co. Ltd., Tokyo, Japan). To estimate whether adipose cell number is increased or not, 50 mg (wet weight) white adipose tissue was collected from olanzapine-, haloperidol-treated and control mice and genomic DNA was extracted with standard molecular biology procedures. DNA contents were measured with absorbance of ultraviolet at 260 nm wavelength.

All data in the present study showed normal distribution and no variation by the Kolmogorov–Smirnov test and the *F*-test, respectively. The differences between groups (three brains in each group) were determined with one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test (*p* < 0.05 defining significance), except for two-paired histological data which were analyzed by Student's *t*-test (*p* < 0.05 defining significance).

3. Results

3.1. Effects of olanzapine or haloperidol treatment on body weight and food intake

Body weight increase was significantly greater in olanzapine-treated mice than in both control and haloperidol-treated mice after the 6th week (Fig. 1A). Food intake was significantly higher in olanzapine-treated mice than in control mice only at the 1st week, but was higher than in haloperidol-treated mice at all time points (Fig. 1B).

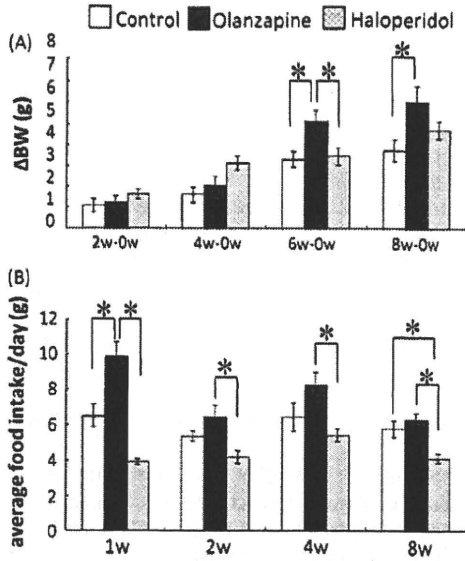


Fig. 1. Effect of antipsychotics treatment on body weight and food intake in mice. Δ BW was significantly greater in olanzapine-treated mice compared to control at the 6th ($p < 0.05$) and 8th ($p < 0.02$) weeks, and compared to haloperidol-treated mice at the 6th week ($p < 0.03$) (A). Food intake was significantly higher in olanzapine-treated mice than in control mice only at the 1st week ($p < 0.01$), but was higher than in haloperidol-treated mice at all time points ($p < 0.02$) (B). Data are shown as mean \pm SE (olanzapine-treated group: $n = 10$; control group: $n = 10$; haloperidol-treated group: $n = 10$). Δ BW = Body weight at 2nd, 4th, 6th and 8th week – body weight at week 0.

3.2. Effects of olanzapine or haloperidol treatment on voluntary movement

To assess the sedative effect of antipsychotic drugs, we measured voluntary movement of mice using the Supermex

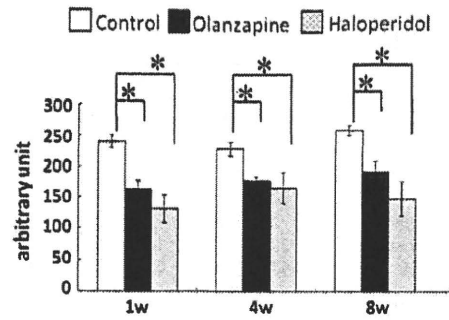


Fig. 2. Effects of antipsychotics treatment on voluntary movement in mice. The voluntary movements of olanzapine- and haloperidol-treated mice, which were comparable throughout, were significantly fewer than those of control mice at each period ($p < 0.001$). Data are shown as mean \pm SE (olanzapine-treated group: $n = 10$; control group: $n = 10$; haloperidol-treated group: $n = 10$).

system. The voluntary movements of olanzapine- or haloperidol-treated mice were significantly fewer than those of control mice during each period (Fig. 2). It was notable that the voluntary movements of olanzapine- and haloperidol-treated mice were at comparable levels throughout the experiment.

3.3. Effects of olanzapine treatment on the size and numbers of adipocytes

We dissected white adipose tissues from the abdomen of control, olanzapine-treated and haloperidol-treated mice and made tissue sections (Fig. 3A–C) to measure the mean circumference of adipose cells. We found that the mean circumference of adipose cells in olanzapine-treated mice was significantly greater than that of control mice (Fig. 3D, $p < 0.05$). The mean circumference of adipose cells in haloperidol-treated mice was between olanzapine group and control group and did not show significant

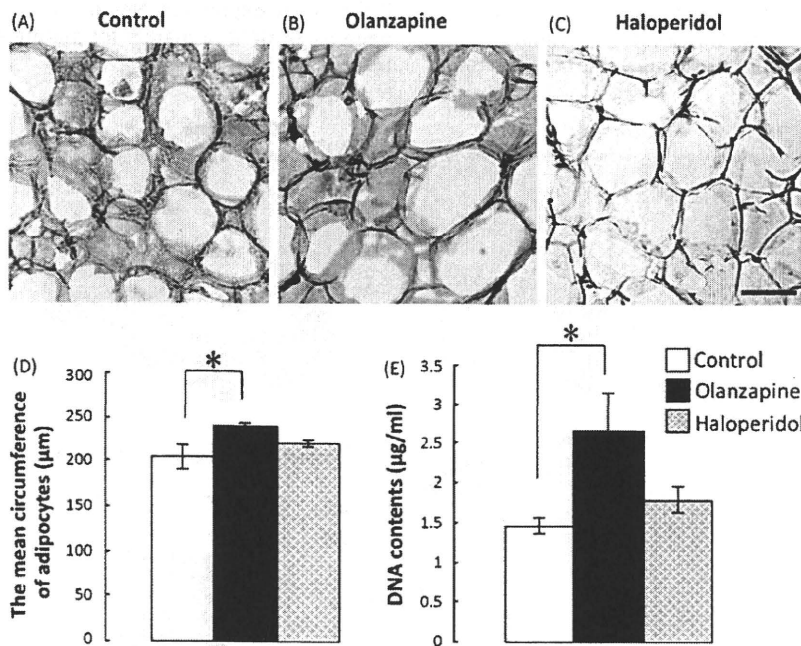


Fig. 3. Representative photomicrographs showing abdominal white adipose tissues of control mice (A), olanzapine-treated (B) and haloperidol-treated mice (C). The mean circumference of adipocytes in mice treated with olanzapine was significantly greater than that in control mice (D) ($p < 0.05$), but that of haloperidol-treated group was not significantly different from either olanzapine-treated or control groups. Data are shown as mean \pm SE (olanzapine-treated group: $n = 7$; control group: $n = 7$; haloperidol-treated group: $n = 7$). Scale bar = 30 μ m in (C) is also for (A) and (B). DNA contents of white adipose tissues were measured for these three groups. The DNA content of olanzapine-treated mice was significantly larger than that of control mice, while the DNA content of haloperidol-treated mice was between olanzapine and control groups and did not show significant difference to either groups (E). Data are shown as mean \pm SE (each group contain 7 mice).

Table 1
Blood chemistry and energy expenditure data.

	Control	Haloperidol	Olanzapine
Glucose (mg/dL)	243.9 ± 26.2	241.4 ± 17.2	244.1 ± 24.4
Cholesterol (mg/dL)	142.8 ± 2.3	138.6 ± 4.0	139.6 ± 2.9
Triglyceride (mg/dL)	226.7 ± 5.4	207.7 ± 9.7	214.0 ± 10.8
Insulin (mg/dL)	28.5 ± 2.0	25.5 ± 2.5	35.9 ± 7.2
Leptin (μIU/ml)	96.4 ± 6.6	86.1 ± 8.3	121.5 ± 24.5
Adiponectin (ng/ml)	2.7 ± 0.10	3.0 ± 0.06	3.3 ± 0.10
Active ghrelin (fmol/ml)	128.1 ± 13.2	167.0 ± 24.2	135.4 ± 24.3
Desacyl ghrelin (fmol/ml)	642.6 ± 120.3	612.4 ± 79.6	647.6 ± 97.9
Rectal temperature (°C)			
0-week	35.6 ± 0.23	35.7 ± 0.23	36.0 ± 0.28
4-week	37.0 ± 0.10	37.1 ± 0.07	36.8 ± 0.07
8-week	36.5 ± 0.08	36.3 ± 0.11	36.4 ± 0.21
UCP2 level (arbitrary unit)	0.77 ± 0.07	0.38 ± 0.05	0.87 ± 0.15 ^{**}

The data are expressed as mean ± SE ($n=7$). Other than the adiponectin and UCP2 level, no data showed statistical significance between three groups.

^{*} Statistical significance against to control value, but not to haloperidol value ($p < 0.01$).

^{**} Statistical significance against to haloperidol value, but not to control value ($p < 0.05$).

difference to either groups (Fig. 3D). We also checked genomic DNA contents of white adipose tissue of olanzapine-, haloperidol-treated and control mice. DNA content per 1 g wet tissue in the olanzapine-treated mice was significantly larger than that of the control mice (Fig. 3E, $p < 0.05$). DNA content of haloperidol-treated mice was between those of olanzapine-treated mice and control and there was no significant difference to either groups (Fig. 3E).

3.4. Effects of olanzapine treatment on the metabolites and hormones related energy balance and body temperature

To test whether olanzapine may affect glucose, lipid metabolisms or hormone balance, we measured representative metabolites and hormones in the blood of olanzapine-, haloperidol-treated, and control mice. The data were summarized in Table 1; Blood glucose, triglyceride, cholesterol was not significantly different between three groups. The levels of insulin, leptin, activated and desacyl ghrelin were also comparable between three

groups. Only adiponectin showed significant increase in the olanzapine-treated mice as compared to the control group. The adiponectin level of haloperidol group was between olanzapine and control groups and did not reach significant difference to either group (Table 1).

Average rectal temperatures of the three groups were at comparable level (Table 1).

Mitochondrial UCP2 was examined in the white adipose tissues of three groups with Western blotting. There was no significant difference in UCP2 levels standardized by beta-actin between olanzapine-treated and control groups (Table 1). Haloperidol-treated group showed significantly lower UCP2 level, suggesting that the sedative effects of haloperidol may reduce energy expenditure.

3.5. The number of BrdU-positive cells in the hypothalamus

Colonial sections at the level of the arcuate nucleus showed no obvious differences in overall structure between olanzapine-treated and control mice (data not shown). We found BrdU-positive (BrdU+) cells in the hypothalamus after 10 days administration of BrdU in drinking water (Fig. 4A). The number of BrdU+ cells in the hypothalamus was significantly greater in olanzapine-treated mice than in haloperidol-treated or control mice (Fig. 4B).

3.6. The phenotypes of newborn cells in the hypothalamus of olanzapine-treated mice

We next explored the phenotype of BrdU+ cells in the hypothalamus, using double immunofluorescence of BrdU and cell markers combined with confocal microscopy on hypothalamic sections. Double labeling with an antibody against Olig2 and NG2, a marker for oligodendrocyte progenitors, or APC, a marker for mature oligodendrocytes, indicated that a substantial number of hypothalamic BrdU+ cells take oligodendrocyte-lineage fate (Fig. 5A–C, respectively). In contrast, we detected no hypothalamic BrdU+ cells expressing NeuN, which is a marker for mature neurons, or GFAP, a marker for mature astrocytes (Fig. 5D and E, respectively).

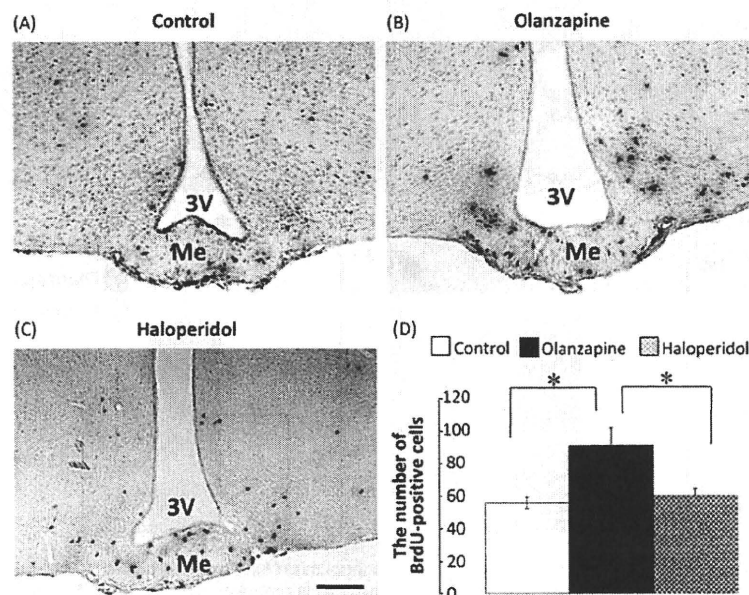


Fig. 4. BrdU-labeled cells in coronal sections of the hypothalamus at the level of the arcuate nucleus (A). The number of BrdU-positive cells in the hypothalamus was significantly higher in olanzapine-treated mice than in haloperidol-treated mice ($p < 0.05$), or control mice (B). Data are shown as mean ± SE (olanzapine-treated group: $n = 11$; control group: $n = 12$; haloperidol-treated group: $n = 8$). Scale bar = 300 μm in (C). 3V: third ventricle; Me: median eminence.

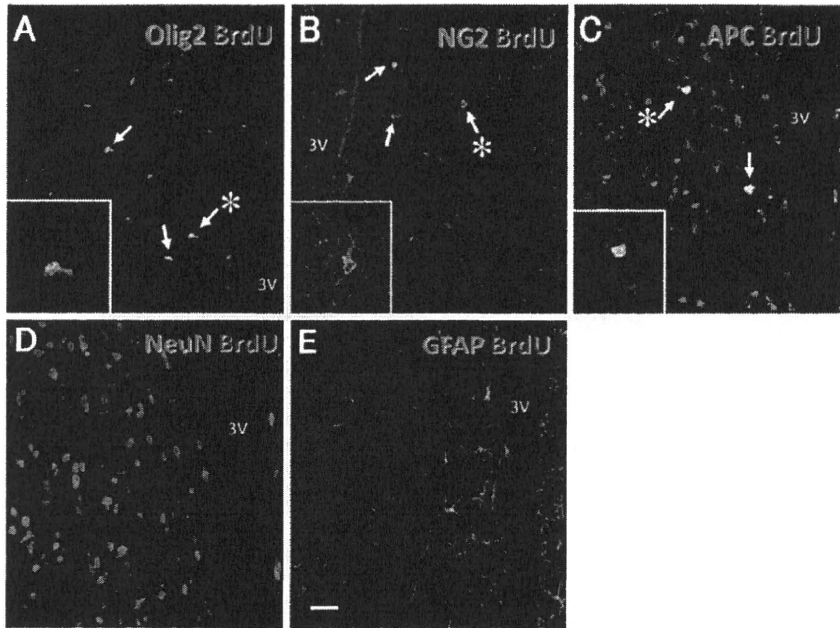


Fig. 5. Fates of newborn cells in the hypothalamus of olanzapine-treated mice. (A–E) Representative confocal images of cells doubly stained with anti-BrdU/Olig2 (A), anti-BrdU/NG2 (B), anti-BrdU/APC (C), anti-BrdU/NeuN (D), and anti-BrdU/GFAP antibodies (E). Some BrdU+ cells co-expressed Olig2, NG2, APC (A–C, arrows), but none co-expressed either NeuN (D) or GFAP (E). Insets show higher magnifications of double-labeled cells (*). Sale bar = 20 μm in (E). 3V: third ventricle.

3.7. Quantitative analysis of oligodendrocyte-lineage cells in the hypothalamus of mice treated with olanzapine

We next examined the oligodendrocytic differentiation of newborn cells in the hypothalamus of mice treated with olanzapine. BrdU dissolved in distilled water (1 mg/ml × 14 days; from P70 to P84) was administered in drinking water. The mice

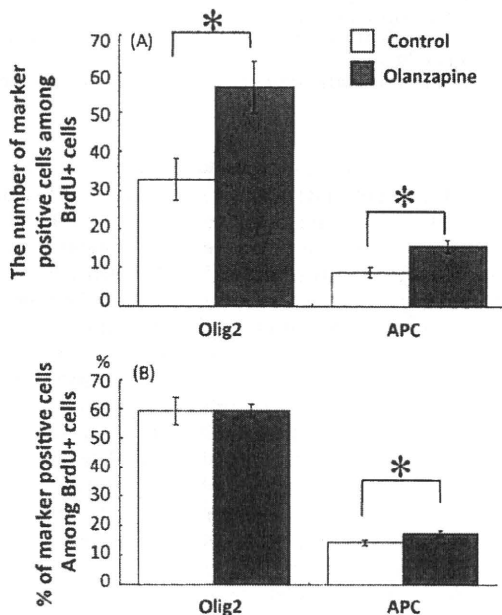


Fig. 6. The number of Olig2+/BrdU+ and APC+/BrdU+ cells in the hypothalamus 21 days after BrdU administration for 14 days increased significantly in olanzapine-treated mice (A) ($p < 0.05$). The ratio of APC+/BrdU+ to total BrdU+ cells, but not of Olig2+/BrdU+ to total BrdU+ cells, in the hypothalamus increased significantly in olanzapine-treated mice compared to control mice ($p < 0.05$). Data are shown as mean ± SE (olanzapine-treated group: $n = 5$; control group: $n = 5$).

were sacrificed 21 days after BrdU administration, and we then performed double labeling of brain sections with anti-BrdU and anti-Olig2 or anti-APC antibodies. The number of Olig2+BrdU+, APC+BrdU+ cells in the hypothalamus was significantly higher in olanzapine-treated than in untreated mice (Fig. 6A). The ratio of APC+BrdU+/total BrdU+, but not Olig2+BrdU+/total BrdU+ cells, in the hypothalamus was also significantly higher in the olanzapine-treated mice (Fig. 6B). These results indicate that olanzapine treatment enhanced the differentiation of immature glial progenitors to oligodendrocyte-lineage cells.

3.8. Enhanced cellular proliferation in the hypothalamus coincided with elevated food intake and weight increase

To test the relationship between hypothalamic cellular proliferation and body weight increase, we tried to manipulate cellular mitosis by following the method reported previously (Doetsch et al., 1999). They showed that progenitors in the adult subventricular zone quickly regenerate after intracerebroventricular administration of anti-mitotic drug. In the present study, we infused Ara-C into the lateral ventricle for 2 weeks. In the following 2 weeks, we detected quick increase (regeneration) of mitotic cells in the hypothalamic area of the Ara-C-treated group (Fig. 7A and A') compared to the control aCSF-infused group (Fig. 7B and B'). Although this phenomenon was unexpected, we reproducibly observed significantly larger number of BrdU-positive cells in 13 mice treated with Ara-C (Fig. 7C). When we measured the food intake and body weight change of these two groups, the Ara-C treated mice gained more weight (Fig. 7D) and intook significantly more food (Fig. 7E) than the control group after cessation of Ara-C treatment.

4. Discussion

We observed an increase in the numbers of newborn cells differentiating to the oligodendrocytic lineage but not the neuronal lineage in the hypothalamus of olanzapine-treated mice. This

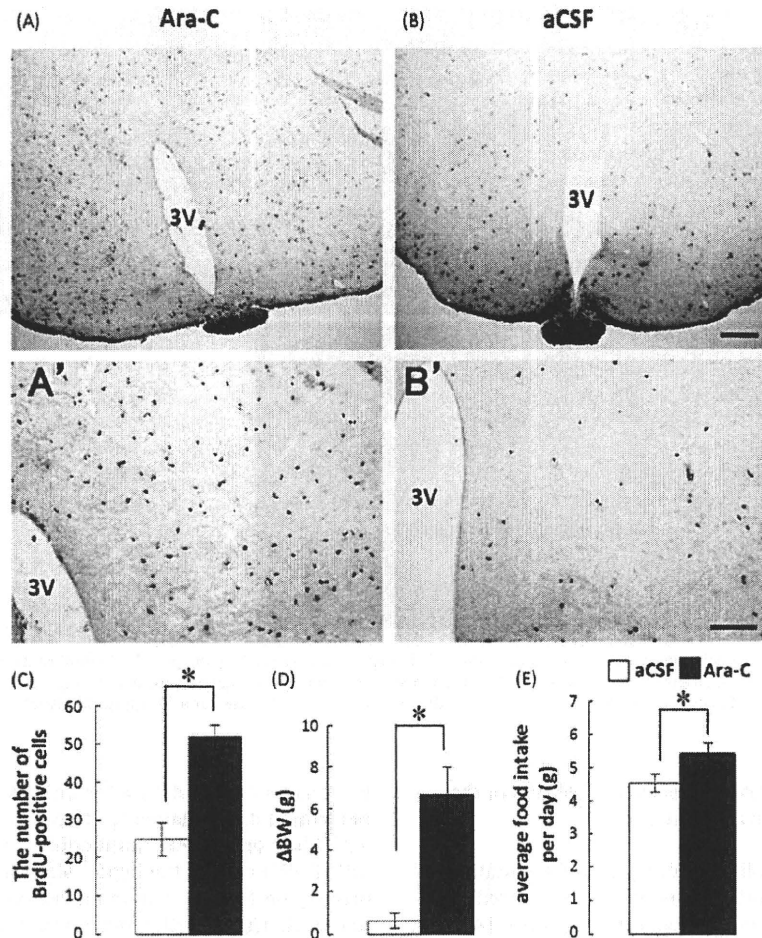


Fig. 7. Ara-C infusion intracerebroventricularly for 2 weeks resulted in significant progenitor proliferation in the following 2 weeks. (A) Representative figure of the hypothalamic section of Ara-C infused mice. (A') Higher magnification of (A) showing periventricular to lateral hypothalamic regions. (B) Representative figure of the hypothalamic section of control aCSF-infused mice. (B') Higher magnification of (B). Note that the BrdU-labeled nuclei were more in Ara-C treated mice than control. Bar in (B) is also for (A) and indicates 300 μm . Bar in (B') is also for (A') and indicates 100 μm . 3V = the third ventricle. (C) Quantitative analysis of BrdU-positive cells in the hypothalamus indicated that there was a statistical significance between aCSF-infused and Ara-C-infused mice. (D) ΔBW is body weight difference between the end of the 2nd and 4th week. Significant weight gain was observed in the Ara-C-treated mice as compared to the control. (E) Average daily food intake was significantly larger in the Ara-C-treated mice than in the control aCSF-treated mice.

increase may be associated with body weight gain after olanzapine treatment. Research on adult neurogenesis has so far mainly focused on the subventricular zone of the lateral ventricles and subgranular zone of the hippocampal dentate gyrus. It was reported that olanzapine treatment increases cell proliferation in the hippocampus and prefrontal cortex of adult rats, and that the newborn cells express an oligodendrocyte marker in the prefrontal cortex (Kodama et al., 2004). Several lines of evidence have implicated oligodendrocyte abnormalities in schizophrenia (Hof et al., 2002; Tkachev et al., 2003; Byne et al., 2006). Negative symptoms and cognitive impairment in schizophrenia are thought to be associated with oligodendrocyte abnormalities and white matter abnormalities (Hof et al., 2003; Wexler et al., 2009). It is considered that olanzapine can improve negative symptoms and cognitive impairments of schizophrenia patients (Sharma et al., 2003; Leucht et al., 2009). The increase of oligodendrocyte-lineage cells caused by olanzapine, reported here, may play distinct roles in different brain regions. In the prefrontal cortex and hippocampus, it may improve negative symptoms and cognitive impairment, whereas in the hypothalamus it may influence energy balance regulation.

One function of the hypothalamus is to regulate energy balance. We examined the levels of blood triglyceride, cholesterol, and

glucose in the olanzapine-, haloperidol-treated mice and in the control (non-treatment) mice (Table 1). These metabolites did not show any significant difference between the groups. In addition, blood insulin, leptin, ghrelin levels were also comparable among three groups (Table 1). Only adiponectin in the olanzapine-treated group showed significant increase as compared to the control, but not to the haloperidol-treated group. These data suggest that 8-week olanzapine treatment did not result in abnormal glucose or lipid metabolism. Consistent with our data, a recent study in human subjects reported that olanzapine treatment increased food intake and body weight without significant energy imbalance or hormone abnormality (Fountain et al., 2010). Interestingly, this study showed an increased level of blood adiponectin that is in accord with our present results. Another study also demonstrated that olanzapine treatment in schizophrenia patients resulted in increased level of adiponectin (Oriot et al., 2008).

We next focused on the newborn cells in the hypothalamus. To assess the mitogenic potency of olanzapine in the hypothalamus, we administered BrdU for 10 days after 8 weeks' exposure of mice to olanzapine. We showed that olanzapine treatment robustly increased cell proliferation in the hypothalamus, with many of the newborn cells taking oligodendrocytic fate, while control or haloperidol treatment did not. Although the present results do

not directly demonstrate the involvement of newborn hypothalamic cells in the weight gain caused by olanzapine treatment, the concurrent increase in cell numbers and differentiation with weight gain suggests a possible link between the two events. To address this issue, we performed manipulation of cell mitosis by infusing anti-mitotic drug, Ara-C, intracerebroventricularly. Our initial aim was to reduce the number of mitotic cells by Ara-C, but unexpectedly, the hypothalamic cellular mitosis was rather enhanced after cessation of Ara-C infusion (Fig. 7A–C). Doetsch et al. (1999) reported that progenitors of the subventricular zone quickly (in several days) regenerate after anti-mitotic drug treatment. This was probably through enhancement of cellular mitosis and the increase of hypothalamic mitotic cells after Ara-C treatment may also be attributed to similar enhancement. The increase of hypothalamic mitotic cells coincided with increase of weight gain and food intake (Fig. 7D and E, respectively), reinforcing the possible link. It should however be noted that the concurrent weight increase may not be direct results of hypothalamic progenitor proliferation. Intracerebroventricular infusion of Ara-C might affect cells other than hypothalamic progenitors. To directly prove the link between hypothalamic cellular proliferation and weight gain, further studies will be required.

We do not know the molecular link(s), if any, between oligodendrocyte progenitors and energy metabolism control by the hypothalamus. One possible candidate for such a link is the neuropeptide galanin, which is synthesized and secreted by oligodendrocyte progenitors (Shen et al., 2003). Galanin is known to positively regulate energy metabolism in the hypothalamus (Tang et al., 1997). Although, again, we do not currently have direct evidence that galanin is involved in weight gain, this issue is of particular interest and could lead to future therapeutic targeting to cure the side effects of olanzapine treatment.

We seldom found newborn cells taking neuronal fate in the present study. This finding appears to be inconsistent with a previous study reporting neurogenic events in the adult hypothalamus (Kokoeva et al., 2005). One possible explanation for this discrepancy is that the hypothalamic subregions focused on by Kokoeva et al. might be different from those examined here, although repeated histological surveys revealed no neuronal differentiation of BrdU+ cells in either olanzapine-treated or control groups. More detailed investigation will be required to clarify this apparent contradiction.

In conclusion, we suggest the possible involvement of oligodendrocyte-lineage cells in olanzapine-induced weight gain. These cells may be important targets for future research and drug development aimed at elucidating the mechanisms underlying olanzapine side effects.

References

- Allison, D., Mentore, J., Heo, M., Chandler, L., Cappelleri, J., Infante, M., Weiden, P., 1999. Antipsychotic-induced weight gain: a comprehensive research synthesis. *Am. J. Psychiatry* 156, 1686–1696.
- Baptista, T., Zarate, J., Joobar, R., Colasante, C., Beaulieu, S., Paez, X., Hernandez, L., 2004. Drug induced weight gain, an impediment to successful pharmacotherapy: focus on antipsychotics. *Curr. Drug Targets* 5, 279–299.
- Byne, W., Kidkardnee, S., Tatusov, A., Yiannoulos, G., Buchsbaum, M.S., Haroutunian, V., 2006. Schizophrenia-associated reduction of neuronal and oligodendrocyte numbers in the anterior principal thalamic nucleus. *Schizophr. Res.* 85, 245–253.
- Consensus Statement, 2004. Consensus development conference on antipsychotic drugs and obesity. *Obes. Res.* 12, 362–368.
- Cooper, G.D., Pickavance, L.C., Wilding, J.P., Halford, J.C., Goudie, A.J., 2005. A parametric analysis of olanzapine-induced weight gain in female rats. *Psychopharmacology (Berl.)* 181, 80–89.
- Cope, M.B., Nagy, T.R., Fernández, J.R., Geary, N., Casey, D.E., Allison, D.B., 2005. Antipsychotic drug-induced weight gain: development of an animal model. *Int. J. Obes. (Lond.)* 29, 607–614.
- Doetsch, F., Garcia-Verdugo, J.M., Alvarez-Buylla, A., 1999. Regeneration of a germinal layer in the adult mammalian brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 11619–11624.
- Eder, U., Mangweth, B., Ebenbichler, C., Weiss, E., Hofer, A., Hummer, M., Kemmler, G., Lechleitner, M., Fleischhacker, W.W., 2001. Association of olanzapine-induced weight gain with an increase in body fat. *Am. J. Psychiatry* 158, 1719–1722.
- Fountaine, R.J., Taylor, A.E., Mancuso, J.P., Greenway, F.L., Byerley, L.O., Smith, S.R., Most, M.M., Fryburg, D.A., 2010. Increased food intake and energy expenditure following administration of olanzapine to healthy men. *Obesity*. doi:10.1038/oby.2010.6 Epub ahead.
- Gage, F.H., 2000. Mammalian neural stem cells. *Science* 287, 1433–1438.
- Graham, K.A., Perkins, D.O., Edwards, L.J., Barrier Jr., R.C., Lieberman, J.A., Harp, J.B., 2005. Effect of olanzapine on body composition and energy expenditure in adults with first-episode psychosis. *Am. J. Psychiatry* 162, 118–123.
- Green, A., Patel, J., Goisman, R., Allison, D., Blackburn, G., 2000. Weight gain from novel antipsychotic drugs: need for action. *Gen. Hosp. Psychiatry* 22, 224–235.
- Hedenmalm, K., Hägg, S., Ståhl, M., Mortimer, O., Spigset, O., 2002. Glucose intolerance with atypical antipsychotics. *Drug Saf.* 25, 1107–1116.
- Hof, P.R., Haroutunian, V., Copland, C., Davis, K.L., Buxbaum, J.D., 2002. Molecular and cellular evidence for an oligodendrocyte abnormality in schizophrenia. *Neurochem. Res.* 27, 1193–1200.
- Hof, P.R., Haroutunian, V., Friedrich Jr., V.L., Byne, W., Buitron, C., Perl, D.P., Davis, K.L., 2003. Loss and altered spatial distribution of oligodendrocytes in the superior frontal gyrus in schizophrenia. *Biol. Psychiatry* 53, 1075–1085.
- Kodama, M., Fujioka, T., Duman, R.S., 2004. Chronic olanzapine or fluoxetine administration increases cell proliferation in hippocampus and prefrontal cortex of adult rat. *Biol. Psychiatry* 56, 570–580.
- Kokoeva, M.V., Yin, H., Flier, J.S., 2005. Neurogenesis in the hypothalamus of adult mice: potential role in energy balance. *Science* 310, 679–683.
- Leucht, S., Corves, C., Arbter, D., Engel, R.R., Li, C., Davis, J.M., 2009. Second-generation versus first-generation antipsychotic drugs for schizophrenia: a meta-analysis. *Lancet* 373, 31–41.
- Lieberman, J.A., Stroup, T.S., McEvoy, J.P., Swartz, M.S., Rosenheck, R.A., Perkins, D.O., Keefe, R.S., Davis, S.M., Davis, C.E., Lebowitz, B.D., Severe, J., Hsiao, J.K., 2005. Clinical Antipsychotic Trials of Intervention Effectiveness (CATIE) Investigators. Effectiveness of antipsychotic drugs in patients with chronic schizophrenia. *N. Engl. J. Med.* 353, 1209–1223.
- Magavi, S.S., Leavitt, B.R., Macklis, J.D., 2000. Induction of neurogenesis in the neocortex of adult mice. *Nature* 405, 951–955.
- Masuo, Y., Matsumoto, Y., Morita, S., Noguchi, J., 1997. A novel method for counting spontaneous motor activity in the rat. *Brain. Res. Brain Res. Protoc.* 1, 321–326.
- Minet-Ringuet, J., Even, P.C., Valet, P., Carpené, C., Visentin, V., Prévot, D., Daviaud, D., Quignard-Boulangé, A., Tomé, D., de Beaurepaire, R., 2007. Alterations of lipid metabolism and gene expression in rat adipocytes during chronic olanzapine treatment. *Mol. Psychiatry* 12, 562–571.
- Oriot, P., Feys, J.L., Mertens de Wilmars, S., Misson, A., Ayache, L., Fagnart, O., Gruson, D., Luts, A., Jamart, J., Hermans, M.P., Buyschaert, M., 2008. Insulin sensitivity, adjusted beta-cell function and adiponectinaemia among lean drug-naïve schizophrenic patients treated with atypical antipsychotic drugs: a nine-month prospective study. *Diabetes Metab.* 34, 490–496.
- Penceva, V., Bingaman, K.D., Wiegand, S.J., Luskin, M.B., 2001. Infusion of brain-derived neurotrophic factor into the lateral ventricle of the adult rat leads to new neurons in the parenchyma of the striatum, septum thalamus, and hypothalamus. *J. Neurosci.* 21, 6706–6717.
- Sharma, T., Hughes, C., Soni, W., Kumari, V., 2003. Cognitive effects of olanzapine and clozapine treatment in chronic schizophrenia. *Psychopharmacology (Berl.)* 169, 398–403.
- Shen, P.J., Larm, J.A., Gundlach, A.L., 2003. Expression and plasticity of galanin systems in cortical neurons, oligodendrocyte progenitors and proliferative zones in normal brain and after spreading depression. *Eur. J. Neurosci.* 18, 1362–1376.
- Tatsumi, K., Takebayashi, H., Manabe, T., Tanaka, K.F., Makinodan, M., Yamauchi, T., Makinodan, E., Matsuyoshi, H., Okuda, H., Ikenaka, K., Wanaka, A., 2008. Genetic fate mapping of Olig2 progenitors in the injured adult cerebral cortex reveals preferential differentiation into astrocytes. *J. Neurosci. Res.* 86, 3494–3502.
- Tang, C., Akabayashi, A., Manitiu, A., Leibowitz, S.F., 1997. Hypothalamic galanin gene expression and peptide levels in relation to circulating insulin: possible role in energy balance. *Neuroendocrinology* 65, 265–275.
- Tkachev, D., Mimmack, M.L., Ryan, M.M., Wayland, M., Freeman, T., Jones, P.B., Starkey, M., Webster, M.J., Yolken, R.H., Bahn, S., 2003. Oligodendrocyte dysfunction in schizophrenia and bipolar disorder. *Lancet* 362, 798–805.
- Wirshing, D.A., 2001. Adverse effects of atypical antipsychotics. *J. Clin. Psychiatry* 62 (Suppl. 21), 7–10.
- Wexler, B.E., Zhu, H., Bell, M.D., Nicholls, S.S., Fulbright, R.K., Gore, J.C., Colibazzi, T., Amat, J., Bansal, R., Peterson, B.S., 2009. Neuropsychological near normality and brain structure abnormality in schizophrenia. *Am. J. Psychiatry* 166, 189–195.