

III-7

薬物依存における再使用抑制薬の探索

池田和隆

薬物依存の現状

薬物依存は、患者本人にとって精神医学的に深刻な問題であるだけでなく、社会にとっても、通り魔事件の誘発や暴力団の資金源となるなど、極めて深刻な問題である。特に最近では、若年層を中心に、違法ドラッグ（いわゆる脱法ドラッグ）と呼ばれる様々な新規薬物が都市部で蔓延し始めている¹⁾。

世界的にみても薬物依存は極めて深刻な状況である。全人類の1%が、アンフェタミン型中枢刺激薬〔アンフェタミンやメタンフェタミンのほか、MDMA (methylenedioxymethamphetamine) 類を含む〕、オピオイド（モルヒネ、ヘロインなど）またはコカインを使用しており、大麻に関しては、全人類の4%が使用していることが、World Drug Report 2006で報告されている²⁾。これに対し、日本では薬物依存問題が比較的小さいとされている。実際、日本においてアンフェタミン型中枢刺激薬使用者が全国民の0.4%、大麻使用者が0.1%、オピオイド使用者が0.1%、コカイン使用者が0.03%である。しかし、日本では特に強い精神病症状の発現と依存性をもつメタンフェタミンが蔓延しており、覚せい剤取締法違反者は2004年度新受刑者のうち男子18.1%（窃盗に次ぐ2位）、女子35.4%（1位）を占めている³⁾。また、近年の急速な国際化により、近い将来、日本における薬物依存問題はより複雑化、深刻化すると考えられる。

薬物依存治療の現状

薬物によって快感が引き起こされることが、薬物依存の原因である⁴⁾。薬物による快感は、耐性が急速に形成されるので、継続使用で強い快感を得ようとする、1回の使用量が次第に増えていく。特に覚せい剤乱用の場合は、アルコールやオピオイドの乱用と違い、精神依存に比べて身体依存は軽いものの、幻覚や妄想が発現しやすいという特徴をもつ。また、薬を止めていても急に「自然再燃」が起きて、幻覚・妄想などの精神病症状が現れたり、強い渴望感に襲われることがある。少量の覚せい剤で精神病症状が現れるようになる、逆耐性現象も特徴である。

薬物依存は精神病症状を伴うことから、日本の精神科医療現場では、精神病症状の治療が中心であり、薬に対する渴望感の治療など、再使用を抑制する治療は不十分である⁵⁾。また、薬物依存治療を行う医療施設や依存治療を専門とする医療従事者が少ないことも大きな問題である。薬物依存患者が他の精神疾患患者に悪影響を与える心配や、医療スタッフの躊躇などのため、一般の市中病院での薬物依存患者の受入は限られたものとなっている。結果的に、松沢病院、下総精神医療センター、武蔵病院などの専門治療病院に患者が集中し過ぎており、十分な治療体制を整えるには至っていない。海外では定番である薬物依存重症度の客観的評価も、日本ではほとんど行われていな

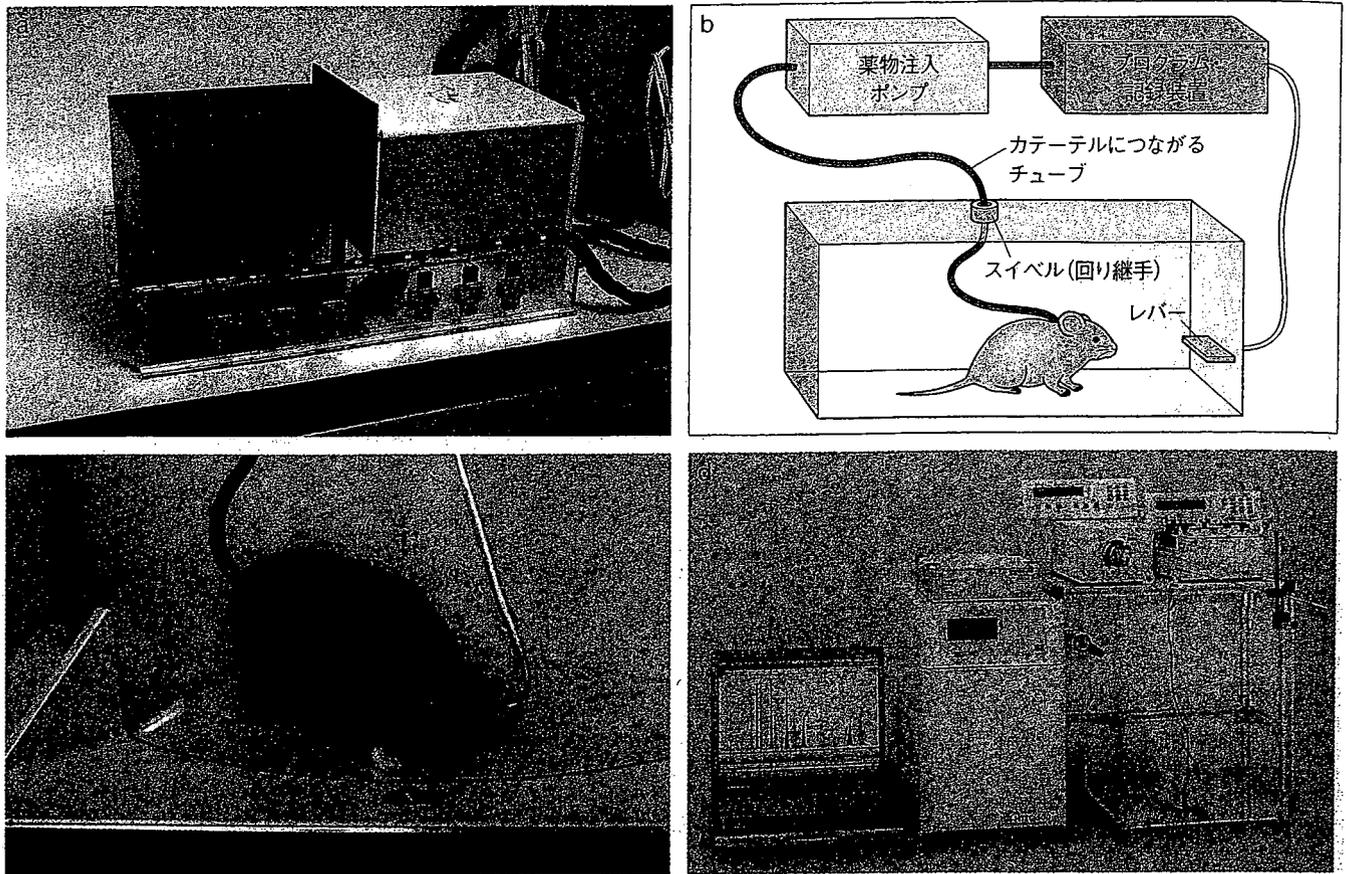


図1 行動薬理的薬物依存研究方法の例

- a: 薬物条件付け場所嗜好性試験 (drug conditioned place preference test).
- b: 静脈内薬物自己投与試験 (drug self-administration test).
- c: 脳内自己刺激試験 (intracranial self stimulation test).
- d: 脳内微量透析法 (microdialysis).

い。さらに、依存自体は治療で治すのではなく、患者本人が解決すべきものであると考える人々が、医療従事者も含めて多い。このような治療体制のために、薬物の再使用率は極めて高い。

薬物依存基礎メカニズムの研究手法

薬物依存は、人間だけでなく、マウスやラットなどでも起こる。しかもヒトで依存性をもつ薬物のほとんどが、これらの動物でも依存性をもつ。つまり、ヒトと他の動物とで薬物依存のメカニズムはほとんど共通すると考えられることから、薬物依存の基礎メカニズムを研究するうえで動物実験は極めて有効である。特に近年では、遺伝子組み換え技術により、特定の蛋白質の機能を消失させたり改変させることが可能となった。実際、様々

な薬物依存関連遺伝子の欠損マウスや遺伝子改変マウスが作製され、解析されている。また、図1に示すように、薬物依存状態を動物の行動テストによって解析する手法も各種確立されてきた。以下に、これらのマウスと行動解析法により明らかになった薬物依存基礎メカニズムの一部を紹介し、再使用を抑える薬物の候補を挙げる(表1)。

1. 薬物嗜好性におけるセロトニンシステムの役割

覚せい剤(メタンフェタミンおよびアンフェタミン)やコカインは、主にドーパミントランスポーターに作用することでドーパミン神経伝達を亢進させて、強い依存性を発揮すると考えられてきた。しかし、曾良らは、ドーパミントランスポーターをもたないマウスでも、コカインに対する嗜

表1. 薬物依存の候補治療薬の例

薬物名	作用機序	主な動物実験結果
フルオキセチン	セロトニン取り込み阻害 GIRK チャネル阻害	メタンフェタミン嗜好性抑制
パロキセチン	セロトニン取り込み阻害 GIRK チャネル阻害	メタンフェタミン嗜好性抑制
ブプレノルフィン	オピオイド受容体部分作動薬	μ オピオイド受容体を介さない報酬効果有
イフェンプロジル	NMDA 受容体チャネル阻害 GIRK チャネル阻害	モルヒネ嗜好性抑制 メタンフェタミン嗜好性抑制
ドネベジル	アセチルコリンエステラーゼ阻害	モルヒネ嗜好性抑制 コカイン嗜好性抑制

好性を示すことを明らかにした^{6,7)}。さらに、ドーパミントランスポーターとセロトニントランスポーターを両方とももたないマウスでは、コカインに対する嗜好性が消失することも明らかにした⁸⁾。しかも、ドーパミントランスポーターがない状況では、セロトニントランスポーターの発現量が半分になるだけでコカインに対する嗜好性が消失する。このことから、ドーパミンシステムだけでなく、セロトニンシステムも、薬物依存において重要な役割を果たしていることが考えられる。また、セロトニンシステムに影響する薬物は、薬物依存治療薬の候補として考えられる。

当研究チームでは、選択的セロトニントランスポーター阻害薬であるフルオキセチン（商品名：プロザック）のメタンフェタミン効果に対する影響を調べた⁹⁾。その結果、フルオキセチン投与により、メタンフェタミンに対する嗜好性とメタンフェタミンによる行動感作の両者ともに抑制されることが明らかになった。したがって、フルオキセチンは、覚せい剤再使用抑制薬の候補と考えられる。

2. 薬物嗜好性におけるオピオイドシステムの役割

モルヒネやヘロインなどオピオイド性の薬物は、生体内のオピオイドシステムに作用して報酬効果を発揮する。オピオイド受容体には μ , δ , κ の3種類があるが、その中で μ オピオイド受容体

がオピオイドの強い報酬効果を生み出していることが、遺伝子欠損マウスの研究から明らかになった^{10,11)}。しかも、 μ オピオイド受容体欠損マウスでは、アルコール、コカイン、大麻など、オピオイド性薬物以外の薬物への嗜好性も減弱していることが報告されている¹²⁾。また、当研究チームでは、覚せい剤連続投与により、前頭前野の μ オピオイド受容体量が減少し、その後にフルオキセチンを投与すると回復することを見いだしている¹³⁾。これらの結果より、オピオイド受容体拮抗薬やオピオイド受容体部分作動薬が、オピオイド性薬物以外の薬物に対する依存においても、治療薬の候補となることが考えられる。

当研究チームでは、 μ オピオイド受容体欠損マウスを用いることで、オピオイド受容体部分作動薬であるブプレノルフィン（商品名：レバタン）の作用機序を明らかにした¹⁴⁾。ブプレノルフィンは、 μ オピオイド受容体を介することで強い鎮痛を引き起こすが、この薬物の報酬効果は μ オピオイド受容体非存在下でも残存した。 μ オピオイド受容体を介さずに報酬効果を発揮するブプレノルフィンは、薬物依存の治療に役立つ可能性が考えられる。

3. 薬物嗜好性におけるアセチルコリンシステムの役割

線条体における運動の制御において、ドーパミンシステムとアセチルコリンシステムのバランス

が重要であることはよく知られている。似たようなメカニズムが、側坐核における報酬の制御においても提案されている¹⁵⁾。中西らは、アセチルコリンの分解酵素であるアセチルコリンエステラーゼを阻害するドネペジル（商品名：アリセプト）が、モルヒネやコカインに対する嗜好性を減弱させることを見いだした。当研究チームでは、ドネペジルが、コカインに対する嗜好性やコカインによる行動感作を抑制するが、メタンフェタミンに対する嗜好性やメタンフェタミンによる行動感作には有意な効果をもたないことを見いだした¹⁶⁾。アセチルコリンエステラーゼ阻害剤は、一部の依存性薬物の治療に有効である可能性が考えられる。

4. 薬物嗜好性における GIRK チャネルの役割

G 蛋白活性型内向き整流性カリウム (GIRK) チャネルは、 $G_{i/o}$ 蛋白によって活性化されるチャネルであり、オピオイド、ドーパミン、セロトニンなど多くの神経伝達物質の細胞内情報伝達を担う分子の一つとして、極めて重要である^{17, 18)}。筆者らは、GIRK チャネルに異常をもつウィーバーミュータントマウスの解析により、GIRK チャネルがモルヒネやエタノールの鎮痛効果において決定的な役割を果たすことを見いだした^{19, 20)}。また、興味深いことに、GIRK チャネル欠損マウスでは、コカインの自己投与が消失することも示されている²¹⁾。したがって、GIRK チャネル阻害薬は、薬物依存治療薬の候補として期待できる。

筆者らは、選択的セロトニン取り込み阻害剤に分類されているフルオキセチン、パロキセチン（商品名：パキシル）、フルボキサミン（商品名：デプロメール、ルボックス）のうち、フルオキセチンとパロキセチンは GIRK チャネル阻害能をもち、フルボキサミンはもたないことを見いだしている²²⁻²⁵⁾。また、NMDA 受容体チャネル阻害薬として知られるイフェンプロジル（商品名：セロクラール）も GIRK チャネル阻害能をもつ²⁶⁾。興味深いことに、これらの GIRK チャネル阻害能をもつ

薬物には、薬物嗜好性を減弱させる効果が見いだされている^{27, 28)}。

評価法

1. 依存重症度評価法

依存治療薬の効果を判定するなど、薬物依存治療を改善するためには、依存患者の重症度を客観的に把握する必要がある。欧米では、嗜癖重症度指標 (addiction severity index : ASI)²⁹⁾ が普及しているのに対して、日本では医師の経験的判断に依存する部分が多い。東京都精神医学総合研究所では、早くから斉藤らが ASI とその取扱書の日本語版を準備し、普及につとめてきたが³⁰⁾、残念ながら臨床現場ではほとんど用いられることはなかった。

ASI は 1980 年にアメリカで作成された成人用依存重症度評価指標として開発された構造化面接であり、その後改訂を繰り返し、現在は第 5 版である³¹⁾。この指標は、包括的な評価システムであり、一般情報 7、医学的状态 11、雇用・生計状態 24、アルコール・薬物使用 27、法的状態 30、家族・人間関係 26、精神医学的状态 26、の計 7 領域にわたる合計 151 からなる患者への質問項目と、面接者による評価項目で構成される。初回の面接では約 1 時間を要するが、フォローアップ調査では、質問項目数が少ないことや患者の慣れなどにより約 30 分で終了する。重症度の評定には、面接者による 10 段階評価と、患者の現在の状態を尋ねる項目を中心に算出される合成得点 (コンボジットスコア) の 2 種類が用いられ、これにより患者の状態を多角的な見地から定量的に把握することが可能となっている。欧米では、ASI の結果を参照しながら、患者、医師、カウンセラーなどの関係者一同が相談することで、個々の患者に対応した治療・介入プログラムを組み立てている。

当研究チームでは、嗜癖行動研究チームの妹尾榮一研究員らとともに、ASI の日本語版 (ASI-J)

の再整備に取り組み、薬物依存患者 100 名以上からデータを収集して解析を行い、本指標の標準化を完了した^{32, 33)}。ASI-J およびそのマニュアルは当研究所ホームページ (<http://www.prit.go.jp/Ja/PTokyo/TMolecpsy/index.html>) から無償でダウンロードできる。現在 ASI-J は、病院だけでなく、刑務所でも試験的な実施が始まっており、今後、病院、警察、刑務所、自助グループ施設などが連携して薬物依存問題に対処するうえで、共通のアセスメントツールとして効果を発揮することが期待される。

2. 再使用危険度評価法

患者の状態を多面的に把握するうえで ASI は優れているが、再使用危険度の把握に関しては、ASI だけでは不十分である。アメリカでは簡便な自己記入式検査である依存重症度尺度 (severity of dependence scale : SDS)^{34, 35)} が開発されているが、日本では普及していない。文化的背景や状況によって相違が生じると予想される再使用危険度を把握するためには、日本の薬物依存の現状を十分反映した評価尺度を独自に開発する必要があると考えられる。

そこで当研究チームおよび嗜癮行動研究チームでは、日本の薬物依存治療の専門家によるディスカッションなどにより決定された 48 項目の質問で構成される、刺激薬物再使用リスク評価尺度 (stimulant relapse risk scale : SRRS) を開発し、100 名の薬物依存患者に本尺度を実施し、その標準化を完了した³⁶⁾。解析の結果、SRRS の質問項目のうち 30 は、5 つの下位尺度に分類できることが明

らかになった。また、SRRS 合計得点およびいくつかの下位尺度得点によって 3 か月後の再使用を予測できる可能性が示唆された。SRRS も上記ホームページからダウンロードできる。当研究チームでは、SRRS の実施と同時に、患者の主観的な渴望感を評価する visual analogue scale (VAS) を用いて、実施時および実施前 2 週間についての渴望感を評価するほか、服用している治療薬や薬物仲間との接触頻度などの周辺情報についても収録しており、再使用を予測するシステムとして、上記の質問を総合した relapse risk index (RRI) を構築している。薬物依存患者の再使用危険度を把握して治療に生かすほか、薬物依存治療薬の効果を評価するうえでも役立つことが期待される。

薬物依存再発抑制薬の探索

薬物依存再発抑制薬を見い出すためには、まず薬物依存の基礎的なメカニズムをできる限り明らかにする必要がある。遺伝子欠損マウスなどを用いた先端的な手法を組み込むことが重要であろう。次に、この基礎研究で得られた知見から、渴望感を抑制する治療薬の候補をリストアップし、その候補薬の治療効果をまず動物で検討することで、効率的に選定を進めることができる。そして、ASI-J や SRRS を用いてこれらの薬物のヒトでの効果を検証することで、より有効な薬物を科学的に見い出すことができると考えられる。薬物依存再発抑制薬は、薬物依存治療プログラムを画期的に改善させるものと期待される。

献辞

本稿で取り上げた研究は、松下先生が東京都精神医学総合研究所所長として 2002 年に開始した、所を挙げて推進しているプロジェクトの一つです。現在も、大都市東京における心の健康危機管理プロジェクト (飛鳥井望リーダー) の主要課題の一つとして継続しています。当研究チームでは、それまで主に行動薬理学的、分子生物学的研究手法を用いていましたが、このプロジェクトを中心的に進めることになり、他の研究チームと連携して、臨床医学的、心理学的な手法も導入することとなりました。最近重視されている基礎研究から臨床研究へのトラ

ンスレーショナル研究にいち早く携わることができたことに、心より感謝しております。松沢病院院長と精神研
所長を兼務されていた松下先生にご支援いただいたことが、このような基礎研究と臨床研究の融合を進めるう
えで大きな支えでした。

なお、本稿で紹介した研究の多くは、当研究チームのメンバー（山本秀子、高松幸雄、萩野洋子、大谷保和、
笠井慎也、西澤大輔、繁田悦宏、塩月寛美、岩田健、原口彩子、長谷川準子、亀ヶ谷悦子、曾良一郎、山本敏文、
小林徹、岩橋和彦、林田真和、土井永史、阪木有紀子、中川礼子、巽国子、田村浩平、陳文雪、井手聡一郎、高
橋雄大、韓文華、石橋曜子、和賀央子、芹田由紀、山口和子、山本一美）、および、嗜癮行動研究チーム、都立松
沢病院、国立精神・神経センターほか、多くの協力施設のメンバーが行ったものです。

文献

1. 厚生労働科学研究費補助金（医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究推進事業）. 依存性薬物および未
規制薬物による神経毒性と精神病の発現機序に関する研究. 平成 17 年度総括研究報告書（主任研究者：鍋島俊隆）.
2. United Nations Office for Drug Control and Crime Prevention edit. World Drug Report 2006. New York: Oxford University Press;
2006.
3. 法務省法務総合研究所, 編. 平成 17 年版犯罪白書. 東京: 財務省印刷局; 2005.
4. 池田和隆, 山本秀子. アルコールと麻薬と覚せい剤. 生体の科学 2005; 56: 45-50.
5. 池田和隆, 山本秀子ほか. 覚せい剤依存治療に向けた新展開. 精神医学 2004; 46: 893-8.
6. Sora I, Wichems C, Takahashi N, et al. Cocaine reward models: Conditioned place preference can be established in dopamine- and
in serotonin-transporter knockout mice. Proc Natl Acad Sci USA 1998; 95: 7699-704.
7. Rocha BA, Fumagalli F, Gainetdinov RR, et al. Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. Nat Neurosci
1998; 1: 132-7.
8. Sora I, Hall FS, Andrews AM, et al. Molecular mechanisms of cocaine reward: Combined dopamine and serotonin transporter
knockouts eliminate cocaine place preference. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 5300-5.
9. Takamatsu Y, Yamamoto H, Ogai Y, et al. Fluoxetine as a potential pharmacotherapy for methamphetamine dependence: Studies in
mice. Ann NY Acad Sci 2006; 1074: 295-302.
10. Sora I, Takahashi N, Funada M, et al. Opiate receptor knockout mice define mu receptor roles in endogenous nociceptive responses
and morphine-induced analgesia. Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 1544-9.
11. Matthes HW, Maldonado R, Simonin F, et al. Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice
lacking the mu-opioid-receptor gene. Nature 1996; 383: 819-23.
12. Contet C, Kieffer BL, Befort K. Mu opioid receptor: A gateway to drug addiction. Curr Opin Neurobiol 2004; 14: 370-8.
13. Yamamoto H, Kamegaya E, Takamatsu Y, et al. Prolonged changes in expression of genes underlying methamphetamine abuse. In:
Toolanay GH, editor. New Research on Methamphetamine Abuse. New York: Nova Science Publishers; 2007. p. 149-82.
14. Ide S, Minami M, Satoh M, et al. Buprenorphine antinociception is abolished, but naloxone-sensitive reward is retained, in mu-
opioid receptor knockout mice. Neuropsychopharmacology 2004; 29: 1656-63.
15. Hikida T, Kitabatake Y, Pastan I, et al. Acetylcholine enhancement in the nucleus accumbens prevents addictive behaviors of cocaine
and morphine. Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 6169-73.
16. Takamatsu Y, Yamanishi Y, Hagino Y, et al. Differential effects of donepezil on methamphetamine and cocaine dependencies. Ann NY
Acad Sci 2006; 1074: 418-26.
17. Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, et al. Molecular mechanisms of analgesia induced by opioids and ethanol: Is the GIRK channel
one of the keys? Neurosci Res 2002; 44: 121-31.
18. Kobayashi T, Ikeda K. G protein-activated inwardly rectifying potassium channels as potential therapeutic targets. Current
Pharmaceutical Design 2006; 12 (34): 4513-23.
19. Kobayashi T, Ikeda K, Kojima H, et al. Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels. Nat Neurosci 1999; 2:
1091-7.
20. Ikeda K, Kobayashi T, Kumanishi T, et al. Involvement of G-protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels in opioid-
induced analgesia. Neurosci Res 2000; 38: 113-6.
21. Morgan AD, Carroll ME, Loth AK, et al. Decreased cocaine self-administration in Kir3 potassium channel subunit knockout mice.
Neuropsychopharmacology 2003; 28: 932-8.
22. Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by fluoxetine (Prozac). Br J
Pharmacol 2003; 138: 1119-28.
23. Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by various antidepressant
drugs. Neuropsychopharmacology 2004; 29: 1841-51.
24. Takahashi T, Kobayashi T, Ozaki M, et al. G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channel inhibition and rescue of weaver mouse

- motor functions by antidepressants. *Neurosci Res* 2006; 54: 104-11.
25. Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by the antidepressant paroxetine. *J Pharmacol Sci* 2006; 102: 278-87.
 26. Kobayashi T, Washiyama K, Ikeda K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by ifenprodil. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31: 516-24.
 27. Takamatsu Y, Yamamoto H, Hagino Y, et al. The selective serotonin reuptake inhibitor paroxetine, but not fluvoxamine, decreases methamphetamine conditioned place preference in mice. *Ann NY Acad Sci* (in press).
 28. Suzuki T, Kato H, Tsuda M, et al. Effects of the non-competitive NMDA receptor antagonist ifenprodil on the morphine-induced place preference in mice. *Life Sci* 1999; 64: PL151-6.
 29. McLellan AT, Luborsky L, Woody GE, et al. An improved diagnostic evaluation instrument for substance abuse patients. The Addiction Severity Index. *J Nerv Ment Dis* 1980; 168: 26-33.
 30. 齊藤学, 妹尾栄一, 手塚一朗ほか. ASI (Addiction Severity Index) のわが国における適合性に関する研究. *日本嗜癮行動学会誌* 1993; 10: 306-9.
 31. McLellan AT, Kushner H, Metzger D, et al. The Fifth Edition of the Addiction Severity Index. *J Subst Abuse Treat* 1992; 9: 199-213.
 32. Senoo E, Ogai Y, Haraguchi A, et al. Reliability and validity of the Japanese version of the Addiction Severity Index (ASI-J). *Jpn J Alcohol & Drug Dependence* 2006; 41: 368-79.
 33. 大谷保和, 原口彩子, 近藤あゆみほか. 覚せい剤依存治療における渴望感制御の重要性: 評価法の構築と候補治療薬の探索に向けて. *日本神経精神薬理学雑誌* 2005; 25: 227-33.
 34. Gossop M, Griffiths P, Powis B, et al. Severity of dependence and route of administration of heroin, cocaine and amphetamines. *Br J Addict* 1992; 87: 1527-36.
 35. 和田清. 医師用症状評価尺度—アルコール依存・薬物依存. *臨床精神医学* (増刊号: 精神科臨床検査法マニュアル) 1996; 48-52.
 36. Ogai Y, Haraguchi A, Kondo A, et al. Development and validation of the stimulant relapse risk scale for drug abusers in Japan. *Drug Alcohol Depend* 2007; 88: 174-81.

The Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Paroxetine, but not Fluvoxamine, Decreases Methamphetamine Conditioned Place Preference in Mice

Running title: Paroxetine, but not fluvoxamine, decreases methamphetamine CPP

YUKIO TAKAMATSU,^a HIDEKO YAMAMOTO,^a YOKO HAGINO,^a ATHINA MARKOU,^b
KAZUTAKA IKEDA^a

^a*Division of Psychobiology, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo 156-8585, Japan.*

^b*Department of Psychiatry, School of Medicine, University of California San Diego, La Jolla, California 92093-0603, USA*

Address for correspondence: Kazutaka Ikeda, Division of Psychobiology, Tokyo Institute of Psychiatry, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, Japan. Voice: +81-3-3304-5701, ext. 508; fax: +81-3-3329-8035; e-mail: ikedak@prit.go.jp

ABSTRACT: Monoamine transporters are the main targets of methamphetamine (METH). Recently, we showed that fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), decreased METH conditioned place preference (CPP), suggesting that serotonin transporter (SERT) inhibition reduces the rewarding effects of METH. To further test this hypothesis, in the present study we investigated the effects of additional SSRIs, paroxetine and fluvoxamine, on METH CPP in C57BL/6J mice. In the CPP test, pretreatment with 20 mg/kg paroxetine abolished the CPP for METH, whereas pretreatment with 100 mg/kg fluvoxamine prior to administration of METH failed to inhibit METH CPP. These results suggest that paroxetine, a medication widely used to treat depression, may be a useful tool for treating METH dependence. Further, these data suggest that molecules other than the SERT [such as G protein-activated inwardly rectifying K⁺ (GIRK) channels] whose activities are modulated by paroxetine and fluoxetine, but not by fluvoxamine, are involved in reducing METH CPP by paroxetine and fluoxetine.

KEYWORDS: methamphetamine; paroxetine; fluvoxamine; serotonin transporter; conditioned place preference; mice

INTRODUCTION

Methamphetamine (METH) is abused worldwide.¹ In Japan, the number of people arrested for METH possession or use is approximately 100 times higher than those arrested for cocaine, opioids, or cannabis. Further, METH frequently induces psychotic states with symptoms similar to those seen in paranoid schizophrenia.² Such psychotic states are treated primarily in hospitals resulting in high medical costs. Thus, there is great need for the discovery of new medications for METH abuse³ because the current treatments are mostly oriented toward the treatment of psychosis with no treatments available to prevent relapse to METH abuse.

The dopamine transporter (DAT) is the main target for METH and cocaine. However, mice lacking the DAT show conditioned place preference (CPP) to cocaine⁴ and self-administer cocaine.⁵ Interestingly, heterozygous and homozygous serotonin transporter (SERT) knockout mice that also have a homozygous knockout of the DAT do not exhibit cocaine CPP.⁶ Cocaine administration leads to increases in extracellular dopamine concentration in the striatum of DAT knockout mice but not of DAT/SERT double knockout mice.⁷ Taken together, these reports suggest that SERT inhibition may decrease METH and cocaine CPP.

Recently, we showed that fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRI), abolished METH CPP when METH was administered during both the development and expression phases of the CPP procedure, supporting the hypothesis that SERT inhibition decreased the rewarding effects of METH.⁸ To further test this hypothesis, in the present study we investigated the effects of the SSRIs paroxetine (Paxil[®]) and fluvoxamine (Luvox[®] or Depromel[®]) on METH CPP.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Male C57BL/6J mice (8-10 weeks old) were purchased from CLEA Japan, Inc. (Tokyo, Japan) and were housed for 1-2 weeks before the experiments began in an animal facility maintained at $22 \pm 2^\circ\text{C}$ and $55 \pm 5\%$ relative humidity under a 12/12 h light/dark cycle with lights on at 8:00 am. Food and water were available *ad libitum*. All behavioral testing was conducted during the light phase. The experimental procedures and housing conditions were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of the Tokyo Institute of Psychiatry, and all animals were cared for and treated humanely in accordance with our institutional animal experimentation guidelines.

Conditioned Place Preference (CPP) Test

The CPP test was performed according to the method of Coffman and Beninger⁹ with some modifications. We used a two-compartment Mexiglas chamber (K euroscience Inc., I saka, Japan). One compartment ($17.5 \times 15 \times 17.5$ cm: width \times length \times height) was black with a smooth floor, and the other compartment was of the same dimensions, but with a white textured floor. This two-compartment chamber was located in a sound- and light-attenuated box under conditions of dim illumination (approximately 40 lux) to reduce bias toward either compartment.¹⁰ Mice were assigned randomly to the treatment groups (see below).

On day 1, the mice ($n = 14-26$ per group) were allowed to freely explore the two

compartments for 15 min. On Day 2, the mice again were allowed to explore the two compartments freely for 15 min, and the time spent in each compartment and the number of transitions between compartments were measured. Conditioning sessions then were conducted once daily for 4 consecutive days (Days 5-8). For the Day 5 conditioning session, mice were intraperitoneally (i.p.) injected with saline or SSRI (20 mg/kg paroxetine or 100 mg/kg fluvoxamine) 60 min before injection with METH (2 mg/kg, i.p.). Immediately after METH administration, mice were confined to the black or white compartment for 50 min. On Day 6, the mice were pretreated with the same solution (saline or SSRI, i.p.) 60 min before a saline injection. Immediately after the saline injection, mice were confined to the opposite compartment for 50 min. On Days 7 and 8, the same conditioning as on Days 5 and 6 was repeated. On Day 9, the mice were pretreated with saline or SSRI (20 mg/kg paroxetine or 100 mg/kg fluvoxamine, i.p.), and 60 min later were allowed to freely explore the two compartments for 15 min without METH injection. The time spent in each compartment and the number of transitions between compartments were measured. In summary, there were a total of eight groups in this experiment corresponding to the four pretreatments (paroxetine, fluvoxamine, saline; there were two saline groups that were run concurrently with the paroxetine and fluvoxamine groups) and the two phases of the experiment during which they were pretreated with the drug (conditioning days 5-8 or test day 9). The CPP score was defined as the time spent in the drug-paired compartment during the CPP test phase (Day 9) minus the time spent in the same compartment during the preconditioning exploratory phase (Day 2). The transition score was defined as the number of transitions during the CPP test phase (Day 9) minus the number of transitions during the preconditioning exploratory phase (Day 2).

Drugs

Methamphetamine hydrochloride was purchased from Dainippon Pharmaceutical (Osaka, Japan). Paroxetine maleate and fluvoxamine maleate were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and TOCRIS (Hung Road, Bristol, UK), respectively. All drugs were dissolved in saline. Drugs and vehicle were administered i.p. in a volume of 0.1 ml/10 g body weight. All drug doses are reported as salt.

Statistical Analyses

The CPP and transition scores of mice pretreated with saline or SSRI during the conditioning and CPP test phases were subjected to a two-way analysis of variance (ANOVA). The ANOVA had two between-subjects factors, each with two levels (saline/SSRI pretreatment in the conditioning phase and saline/SSRI pretreatment in the CPP test phase). Two separate ANOVAs were conducted on the paroxetine and fluvoxamine data. Similar ANOVAs were conducted on the transition scores. The CPP scores from the paroxetine experiment were subjected to a one-way ANOVA followed by *post hoc* comparisons with the Scheffe test. In this ANOVA, there were four levels corresponding to the four treatment conditions (saline in both the conditioning and the CPP test phases, pretreatment with paroxetine only in the conditioning phase, pretreatment with paroxetine only in the CPP test phase, pretreatment with paroxetine in both the conditioning and the CPP test phases). For the CPP data, the durations of time that the mice spent in the METH-paired compartment before and after conditioning were compared using paired *t*-tests for each group. For the transition data, the number of transitions

between the METH-paired compartment and the saline-paired compartment before and after conditioning were compared using paired *t*-tests for each group. The level of significance was set at 0.05.

RESULTS

Effects of Paroxetine on METH CPP

The two-way ANOVA revealed that mice treated with paroxetine during the test phase exhibited decreased CPP scores compared to mice treated with saline during the test phase ($F_{1,72} = 7.888, P < 0.01$), whereas mice treated with paroxetine during the conditioning phase did not differ significantly from mice treated with saline during the test phase in the CPP score [$F_{1,72} = 1.704$, not significant (n.s.); FIG. 1A]. There was no statistically significant interaction between the factor saline/paroxetine during the conditioning phase and the factor saline/paroxetine during the CPP test phase ($F_{1,72} = 0.1690$, n.s.), indicating that the important factor was treatment with paroxetine during the expression phase of the experiment. In addition, a one-way ANOVA on the CPP scores was conducted on data for all four groups. The ANOVA showed a significant difference in the CPP scores among these four groups ($F_{3,72} = 3.940, P < 0.05$). The Scheffe *post hoc* test showed that the CPP score of the paroxetine/paroxetine group was significantly lower than that of the saline/saline group ($P < 0.05$). Paired *t*-tests were conducted to compare the duration of time before and after conditioning for each of the four groups (FIG. 1B). Whereas the saline/saline and paroxetine/saline groups spent significantly more time in the METH-paired compartment after conditioning than before conditioning (saline/saline: $n = 23, df$

= 22, $t = -6.050$, $P < 0.001$; paroxetine/saline: $n = 15$, $df = 14$, $t = -2.884$, $P < 0.05$), the saline/paroxetine and paroxetine/paroxetine groups did not show METH CPP (saline/paroxetine: $n = 15$, $df = 14$, $t = -2.033$, n.s.; paroxetine/paroxetine: $n = 23$, $df = 22$, $t = -0.908$, n.s.). Paroxetine pretreatment had no significant effects on the transition scores compared to the saline/saline treatment group (data not shown).

Effects of Fluvoxamine on the METH CPP

The two-way ANOVA revealed that both the factor saline/fluvoxamine pretreatment during the conditioning phase and the factor saline/fluvoxamine pretreatment during the CPP test phase had no effects on CPP scores (conditioning phase: $F_{1,68} = 0.045$, n.s.; CPP test phase: $F_{1,68} = 3.016$, n.s.; FIG. 2A). There was no statistically significant interaction between the two factors ($F_{1,68} = 0.066$, n.s.). Paired t -tests were conducted to compare the duration of time before and after conditioning for each of the four groups. All four groups spent significantly more time in the METH-paired compartment after conditioning than before conditioning (saline/saline: $n = 26$, $df = 25$, $t = -4.541$, $P < 0.001$; saline/fluvoxamine: $n = 14$, $df = 13$, $t = -2.983$, $P < 0.05$; fluvoxamine/saline: $n = 18$, $df = 17$, $t = -3.949$, $P < 0.01$; fluvoxamine/fluvoxamine: $n = 14$, $df = 13$, $t = -2.757$, $P < 0.05$).

The two-way ANOVA revealed that both fluvoxamine pretreatment during the conditioning phase and during the CPP test phase significantly decreased transition scores (conditioning phase: $F_{1,68} = 24.321$, $P < 0.001$; CPP test phase: $F_{1,68} = 10.292$, $P < 0.01$; FIG. 2B). There was no statistically significant interaction between the two factors ($F_{1,68} = 0.007$, n.s.). Paired t -tests were conducted to compare the number of transitions before and after conditioning

for each of the four groups. The S-S group showed no significant differences in the number of transitions before and after conditioning ($n = 26$, $df = 25$, $t = -1.213$, n.s.). However, mice pretreated with fluvoxamine (saline/fluvoxamine, fluvoxamine/saline, fluvoxamine/fluvoxamine) showed significant decreases in the number of transitions after conditioning (saline/fluvoxamine: $n = 14$, $df = 13$, $t = 3.829$, $P < 0.01$; fluvoxamine/saline: $n = 18$, $df = 17$, $t = 5.520$, $P < 0.001$; fluvoxamine/fluvoxamine: $n = 14$, $df = 13$, $t = 6.025$, $P < 0.001$).

DISCUSSION

In the present study, we showed that paroxetine, a widely used medication for treating depression, inhibited METH CPP in mice, similar to the results we reported previously with fluoxetine.⁸ No significant effects of paroxetine on transition scores suggest that the effects of paroxetine on METH CPP are not due to changes in locomotor activity but due to reduction of METH reward and conditioned reward by paroxetine. Based on these findings, it appears worthwhile to investigate the clinical effects of paroxetine on METH abuse. By contrast, the other SSRI tested here, fluvoxamine, did not affect METH CPP. These data demonstrate that there are differences in the effects of SSRIs on METH CPP, suggesting the possibility that molecules other than the SERT are involved in the inhibition of METH CPP by paroxetine and fluoxetine reported here and in our previous study.⁸

In addition to SERT inhibition, paroxetine inhibits the function of muscarinic cholinergic receptors,¹¹ nicotinic acetylcholine receptors,¹² volume-related anion channels,¹³ membrane steroid transporters,¹⁴ and nitric oxide synthase.¹⁵ Recently, Kobayashi and colleagues¹⁶ reported that paroxetine also inhibits the function of G protein-activated inwardly

rectifying K^+ (GIRK) channels. It is intriguing that paroxetine and fluoxetine, but not fluvoxamine, inhibit GIRK channels.^{16, 17, 18} Various G protein-coupled receptors (such as M2 muscarinic, α_2 adrenergic, D_2 dopaminergic, 5-HT_{1A}, opioid, nociceptin/orphanin FQ, and A₁ adenosine) activate GIRK channels^{19, 20, 21, 22} through the direct action of G protein subunits.²³ In addition, GIRK channels are activated by ethanol independently of G protein-coupled signaling pathways.^{24, 25} Activation of GIRK channels leads to membrane hyperpolarization.¹⁹ These channels play an important role in the inhibitory regulation of neuronal excitability. Thus, modulators of GIRK channel activity may affect many brain functions. Kobayashi and colleagues²⁶ also have reported that ifenprodil, a cerebral vasodilator which inhibits morphine CPP,²⁷ also inhibits the function of GIRK channels. Morgan and colleagues²⁸ demonstrated that GIRK channel knockout mice exhibited dramatically reduced intravenous self-administration of cocaine. In the present study, we found that paroxetine and fluoxetine, but not fluvoxamine, inhibited METH CPP. These findings, together with the previous findings, suggest that the inhibition of GIRK channels by paroxetine or fluoxetine may be involved in the inhibition of METH CPP by these drugs.

Fluvoxamine administration (60 mg/kg) leads to a significant decrease in spontaneous locomotor activity.²⁹ Consistent with this observation, significant decreases in transition scores were observed in all of the 100 mg/kg fluvoxamine-treated groups compared to the saline/saline-treated group in the present study. The number of transitions of the fluvoxamine-treated group (101.4 \pm 85.3, $P < 0.05$) was the smallest among the four groups in this experiment, but more than 100 transitions indicated adequate locomotion to reveal potential differences in CPP. The lack of effect of fluvoxamine on CPP for methamphetamine is likely to reflect a lack of effect of fluvoxamine on

the rewarding effects of METH rather than being a nonspecific effect of fluvoxamine.

CONCLUSION

We found that paroxetine, but not fluvoxamine, inhibited METH CPP in mice. Although further preclinical studies are needed to elucidate the mechanisms underlying these inhibitory effects of paroxetine on processes relating to METH dependence, it appears worthwhile to investigate the clinical effects of paroxetine on METH abuse. The present results suggest that molecules other than the SERT (such as GIRK channels) are involved in the inhibition of METH CPP by paroxetine and fluoxetine.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Yasukazu Ogai for statistics instruction, Dr. Keiko Matsuoka for animal care, Yukiko Sakaki and Akira Sato for technical assistance, and Michael Arends for editorial assistance. This work was supported by a research grant (17025054) from the MEXT of Japan, by grants (H17-pharmaco-001, H16-iyaku-029, H18-shitei-3) from the MHLW of Japan, and by Japan-U.S. Brain Research Cooperative Program grant from JSPS. AM was supported by a USA National Institute on Drug Abuse grant (R01 DA11946).

REFERENCES

1. United Nations International Drug Control Programme 2005. World drug report 2005. New York: Oxford University Press.
2. Ujike, H. 2002. Stimulant-induced psychosis and schizophrenia: the role of sensitization. *Curr Psychiatry Rep.* 4: 177-184.
3. National Institute on Drug Abuse 2002. Methamphetamine abuse and addiction (Research report series, NIH pub. no. 98-4210). Bethesda MD: National Institute on Drug Abuse.
4. Sora, I., C. Wichems, N. Takahashi, *et al.* 1998. Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7699-7704.
5. Rocha, B. A., F. Fumagalli, R. R. Gainetdinov, *et al.* 1998. Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat Neurosci.* 1: 132-137.
6. Sora, I., F. S. Hall, A. M. Andrews, *et al.* 2001. Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 5300-5305.
7. Ujike, H., Y. Higashi, R. D. D'Shi, *et al.* 2004. Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by in vivo microdialysis in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology* 29: 1790-1799.
8. Takamatsu, Y., H. Yamamoto, Y. Ogai, *et al.* 2006. Fluoxetine as a potential pharmacotherapy for methamphetamine dependence: studies in mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1074: 295-302.
9. Hoffman, D. C. & R. G. Beninger. 1989. Preferential stimulation of D1 or D2 receptors disrupts food-rewarded operant responding in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 34: 923-925.

10. Ide, S., M. Minami, M. Satoh, *et al.* 2004. Buprenorphine antinociception is abolished, but naloxone-sensitive reward is retained, in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology* **29**: 1656-1663.
11. Stanton, T., C. Bolden-Watson, B. Cusack, *et al.* 1993. Antagonism of the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in CHO-K1 cells by antidepressants and antihistaminics. *Biochem. Pharmacol.* **45**: 2352-2354.
12. Fryer, J. D. & R. J. Lukas. 1999. Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. *J. Neurochem.* **72**: 1117-1124.
13. Maertens, C., G. Droogmans, R. Verbesselt, *et al.* 2002. Block of volume-regulated anion channels by selective serotonin reuptake inhibitors. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* **366**: 158-165.
14. Pariante, C. M., A. Makoff, S. Lovestone, *et al.* 2001. Antidepressants enhance glucocorticoid receptor function in vitro by modulating the membrane steroid transporters *Br. J. Pharmacol.* **134**: 1335-1343.
15. Finkel, M. S., F. Laghriss-Thode, B. G. Pollock, *et al.* 1996. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. *Psychopharmacol. Bull.* **32**: 653-658.
16. Kobayashi, T., K. Washiyama & K. Ikeda K. 2006. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by the antidepressant paroxetine. *J. Pharmacol. Sci.* **102**: 278-287.
17. Kobayashi, T., K. Washiyama & K. Ikeda. 2003. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K⁺ channels by fluoxetine (Prozac). *Br. J. Pharmacol.* **139**: 1119-1128.
18. Kobayashi, T., K. Washiyama & K. Ikeda. 2004. Inhibition of G protein-activated inwardly