

図1 疼痛伝達経路と主な先制鎮痛の標的部位

このような中枢性感作を抑制する試みは、侵害刺激の開始前に鎮痛療法の処置を行う「先制鎮痛」として知られていた<sup>2)</sup>。この先制鎮痛の概念は、1900年代前半、Crile<sup>3)</sup>によって最初に提唱され、その後1983年に、Woolfら<sup>4)</sup>によって動物実験モデルで証明されるようになり、様々な外科的手術後に生じる術後痛をやわらげるために、臨床でもこの療法が使用されるようになった<sup>2,5-8)</sup>。実際、臨床の場合において、その症状などによって先制鎮痛の有用性にはいくつかの議論が論じられているにもかかわらず、入院期間や術後合併症の減少および生活の質の改善の点から多大な経済的利点が存在すると考えられている<sup>9)</sup>。この先制鎮痛の標的は、局所麻酔薬、神経ブロックや硬膜外ブロックなどによる神経遮断、モルヒネなどの鎮痛薬の使用、NMDA受容体拮抗薬による疼痛伝達経路の遮断などが考えられている<sup>2,7-9)</sup>(図1)。代表的な

鎮痛薬であるモルヒネや他のオピオイド鎮痛薬による先制鎮痛効果は古くから研究されており、臨床と前臨床試験の両方において手術前投与によって術後痛を改善することが報告されている<sup>10-12)</sup>。さらに近年の研究では、モルヒネをはじめとしたオピオイド鎮痛薬が、実験動物モデルにおける疼痛の中枢性感作を防ぐことが実証されている<sup>13)</sup>。

## 2. 下行性抑制機構を介する モルヒネ先制鎮痛

筆者らは、神経障害モデルマウスを用いて、モルヒネの先制鎮痛の責任部位が脊髄より上位、すなわち、脳にその標的が存在することを明らかにした<sup>14)</sup>。坐骨神経障害モデルマウスを用いて、神経障害処置30分前にモルヒネの全身投与を行ったところ、その後続く慢性疼痛

の形成は抑制された。しかしながら、神経障害30分後にモルヒネ投与を行ったマウスにおいては、神経障害性疼痛は抑制されなかった。一方、モルヒネの脳室内投与および脊髄腔内投与をそれぞれ行ったところ、脳室内投与においては顕著に慢性痛の形成を抑制したにもかかわらず、脊髄くも膜下腔内投与を行ったマウスにおいては有意な抑制効果は観察されなかった。そこで、このモルヒネの作用点を明らかにするために、モルヒネ全身投与と同時にMOPの拮抗薬であるナロキソンを脳室内に投与しておくと、モルヒネの先制鎮痛作用は抑制され、一方、脊髄くも膜下腔内にナロキソンを投与しても抑制効果はなかった。これらの結果から、モルヒネによる先制鎮痛の主な標的は脳内にあることが示唆される。モルヒネは下行性のセロトニン神経系あるいはノルアドレナリン神経系の活性化によって、脊髄レベルで疼痛伝達を抑制していると考えられており<sup>15,16)</sup>、実際にこのモルヒネ先制鎮痛は非選択性5-HTアンタゴニストのメチセルギドおよびノルアドレナリン受容体アンタゴニストのフェントラミンの脊髄くも膜下腔内への投与により遮断された。興味深いことは、5-HT再取り込み阻害薬であるフルオキシセチンおよび $\alpha_2$ アゴニストのクロニジンも前投与しても同様な先制鎮痛が観察されたことである。すなわち、オピオイドを介した下行性抑制系賦活化機構によらなくても、脊髄レベルでノルアドレナリンやセロトニン作用を増強することで同様の先制鎮痛効果が認められたことになる。さらに、筆者らは、生化学的な実験においても先制鎮痛の効果を証明している。神経障害後の脊髄後角において観察される神経発火のマーカー遺伝子である*c-fos*や中枢性感作に関与することが知られているPKC $\gamma$ の発現上昇も、モルヒネ、クロニジンおよびフルオキシセチンの前投与によって、ほぼ完全に抑制された<sup>17,18)</sup>。

### 3. 神経障害誘発性LPA合成とモルヒネ先制鎮痛の抑制

著者らは、強い痛み刺激が脊髄後角において神経障害性誘発因子LPA産生を誘導し、その産生されたLPAが逆行性シグナルとして神経障害性疼痛の代表的な分子機構であるDRGでのCav $\alpha_2\delta_1$ の発現上昇および後根神経での脱髄、脊髄後角におけるPKC $\gamma$ の発現上昇を誘導することを見出している<sup>19-22)</sup>。LPA<sub>1/3</sub>受容体の拮抗薬を用いた薬理学的実験において、神経障害の2~3時間後におけるLPAシグナリングの阻害は、その後、長期に続く神経障害性疼痛を抑制するので、初期に産生されるLPAが神経障害性疼痛を誘導することを示唆している<sup>23)</sup>。

そこで、筆者らは、モルヒネの先制鎮痛がLPAの合成系に関連しているかを検討するために以下の実験を行った。

#### 1) 神経障害誘発性LPA産生の定量

筆者らは、LPAを高感度に定量できるバイオアッセイ法を確立し、この方法を用いてLPAの定量を行ったところ、実際に神経障害3時間後を最大値として、LPA産生が障害側の脊髄と後根神経において増加することを明らかにした<sup>24)</sup>。また、LPAは体液中ではリゾホスホリパーゼD(LPLD)活性を持つオートタキシン(ATX)によって、リゾホスファチジルコリン(LPC)から産生されることが知られているが<sup>25,26)</sup>、ATX遺伝子欠損マウスにおいては、このLPA産生は有意に抑制され、したがって、神経障害時にATXを介してLPAが産生されたと考えられる。

#### 2) 脊髄切片培養を用いた疼痛刺激によるLPA産生の定量

脊髄切片培養を用いた*in vitro*の実験におい

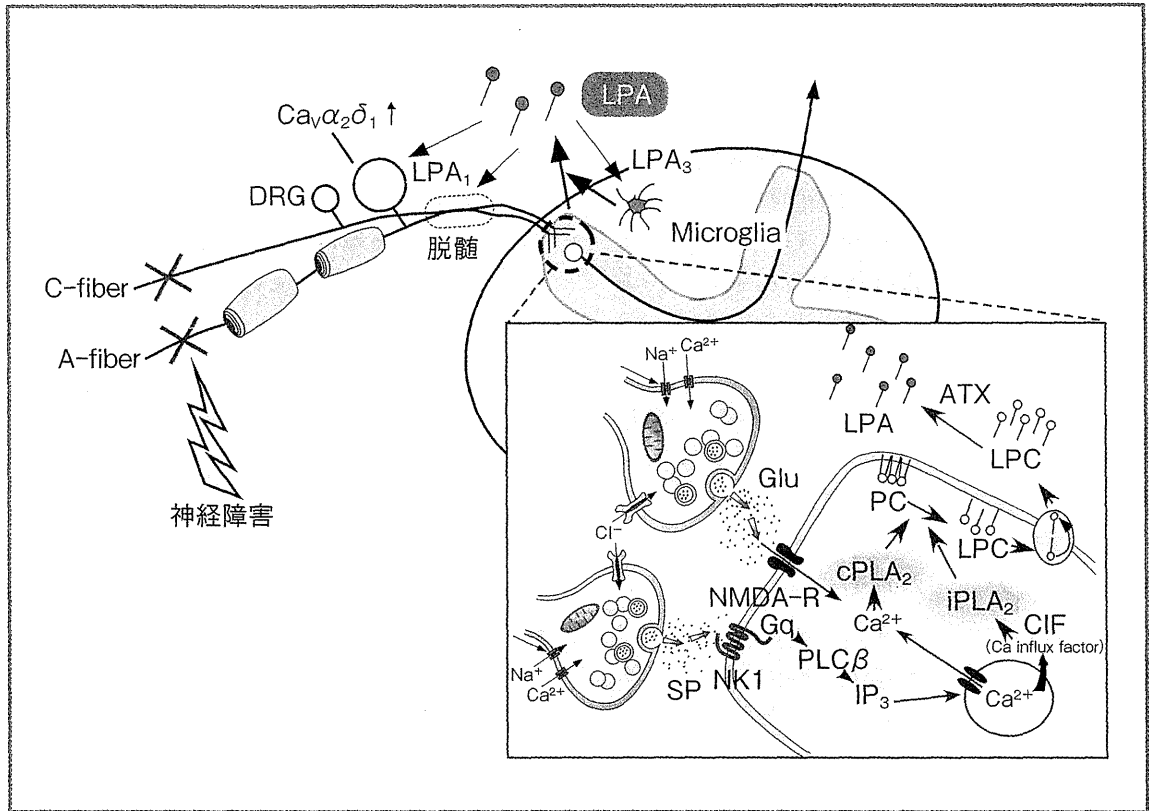


図2 痛み刺激によるLPC/LPA産生

強度な知覚神経刺激によって、伝達物質であるサブスタンスP (SP) およびグルタミン酸 (Glu) が同時に放出され、それぞれサブスタンスP受容体 (NK1) およびグルタミン酸受容体 (NMDA-R) を活性化する。その下流において、cPLA<sub>2</sub>はCa流入により活性化され、iPLA<sub>2</sub>は過剰刺激による小胞体 (ER) 内Ca枯渇に伴い遊離されるCIF (calcium influx factor) により、活性化される。cPLA<sub>2</sub>およびiPLA<sub>2</sub>は、細胞膜の構成成分であるホスファチジルコリン (PC) のsn-2位のアシル基を加水分解して、リゾホスファチジルコリン (LPC) を生成する。細胞外に放出されたLPCは、脳脊髄液中に存在するオートタキシン (ATX) によってLPAへと変換され、脊髄のミクログリアおよびLPA<sub>3</sub>受容体を介して自身の産生を増強している。神経障害およびPLA<sub>2</sub>によって増加したLPAは、逆行性シグナルとして神経障害性疼痛の分子基盤であるCavα<sub>2</sub>δ<sub>1</sub>の発現上昇や有髄線維の脱髄を誘発する

て、強い一次求心性神経刺激を擬似する目的でサブスタンスPとグルタミン酸の両方を加えると、ATX存在下でLPAを産生することを明らかにした<sup>27)</sup>。特筆すべきことは、サブスタンスPやグルタミン酸をそれぞれ単独で加えても、LPAは産生されないため、LPAは神経障害などの強い刺激や複合の刺激が同時に脊髄に入力した時のみに産生されることを示唆している<sup>27)</sup>(図2)。

### 3) LPA誘発性LPA産生機構

また興味深いことに、脊髄くも膜下腔内またはATX存在下の脊髄切片培養にLPAを加えると、LPA産生が増加することを見出ししている。このLPA誘発性LPA産生のメカニズムにおいて、ミクログリアの活性化やLPA<sub>3</sub>の活性化が関与することを明らかにしている。一方、ミクログリアの阻害薬を神経障害前投与することにより、LPA産生が抑制され、神経障害性疼痛の形成を阻害するが、障害2日目以降

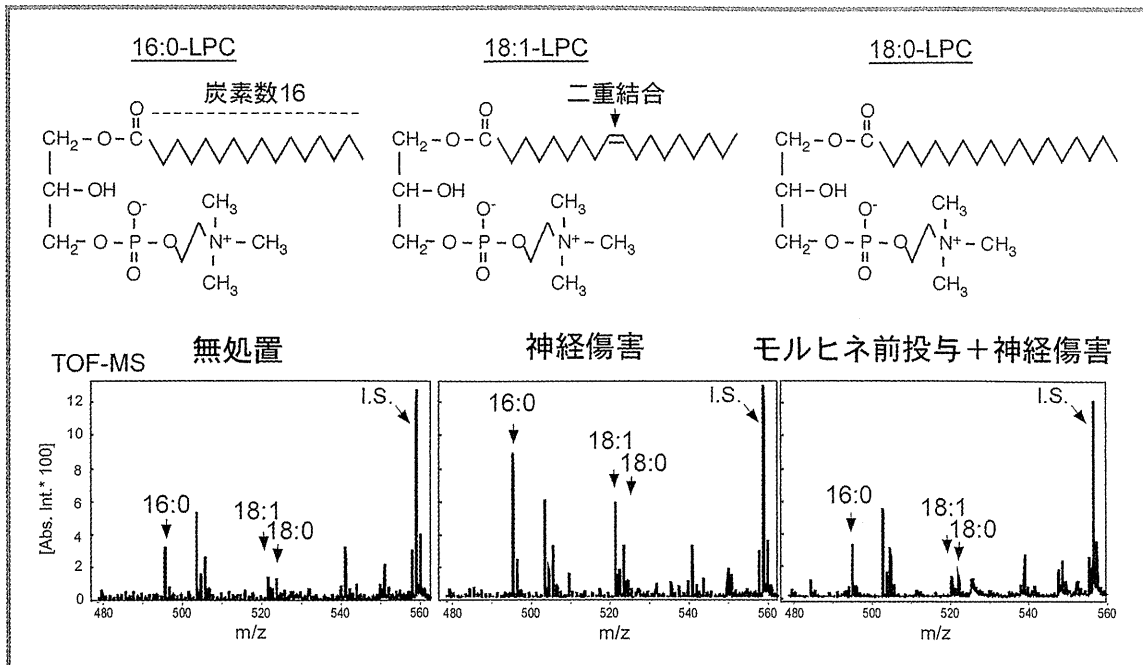


図3 LPC分子種と神経障害誘発性LPC増加

に投与しても神経障害性疼痛を抑制しなかった。このことから、神経障害後すぐに生じるミクログリアを介したLPA産生増幅機構が神経障害性疼痛の記憶機構に重要であると考えられる。

#### 4) LPC分子種の同定

LPAやLPCは、脂肪酸の長さや不飽和の数によって複数の分子種が存在しており、分子種によってLPA受容体やATXへの結合能が異なることが知られている<sup>28,29</sup>。LPAは酸性リン脂質であり、MS解析には高濃度を必要とするため、筆者らは、LPCを簡便かつ高感度に定量できる方法を確立した<sup>30</sup>。この方法を用いて、神経障害後の脊髄のLPCの定量を行ったところ、神経障害75分後において、脂肪酸がパルミチン酸(16:0、炭素数16で二重結合0という意味)、ステアリン酸(18:0)およびオレイン酸(18:1)のLPCが上昇していた<sup>30</sup>(図3)。これらのLPCは主にPLA<sub>2</sub>の活性によって、ホスファチジルコリン(PC)から産生さ

れるリゾリン脂質であり、実際にcPLA<sub>2</sub>やiPLA<sub>2</sub>阻害薬の前投与によって神経障害疼痛の形成やLPA産生が抑制されるという知見と一致している<sup>24</sup>。さらに、ATX遺伝子ヘテロ欠損マウスにおいてはこれらのLPC産生ピークは、120分後にシフトし、LPC量も増加していたので、神経障害によって産生されたLPCは75~120分の間にATXによってLPAへと転換されることを示唆している。

#### 5) モルヒネ先制鎮痛によるLPA合成系の抑制

モルヒネを神経障害前に脳室内投与しておくと、神経障害によって産生される16:0-, 18:0-および18:1-LPC産生増加はほぼ完全に抑制され、その他のピークについては有意な変化は観察されなかった<sup>30</sup>。すなわち、モルヒネ先制鎮痛のメカニズムは、脊髄後角における痛み入力を遮断し、LPC/LPA産生を抑制することで、記憶性の神経障害性疼痛を遮断したことを示唆している。

おわりに

今回、先制鎮痛のメカニズムについて、神経障害誘発性のLPA合成系を抑制するという形で明らかにした。別の言い方をすると、LPA産生は強度の痛み刺激により生じ、それが慢性疼痛という一種の記憶機構を形成する上で重要であることを明らかにした。脊髄で産生されたLPAは、それ自身の産生を増強するようなフィードフォワード機構を介して、痛みの悪循環に関与していることが示唆されているので<sup>20,31)</sup>、今後、痛み刺激やLPA自身によって産生されるLPAのメカニズムをより詳細に明らかにしていく必要がある。一方、慢性痛の記憶形成には上位脳への関与が示唆されているが、このような脊髄におけるフィードフォワード機構の分子基盤を基に上位脳への研究に取り組む必要がある。

本研究が、今後の慢性痛研究の基盤となり、世界的な基礎研究活動の活性化を促し、痛みのコントロールが万人において可能になることを願う次第である。

文献

- 1) Woolf CJ, Salter MW: Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. *Science* 288(5472): 1765-1769, 2000
- 2) Kissin I: Preemptive analgesia. *Anesthesiology* 93: 1138-1143, 2000
- 3) Crile GW: II. The identity of cause of aseptic wound fever and so-called post-operative hyperthyroidism and their prevention. *Ann Surg* 57: 648-652, 1913
- 4) Woolf CJ: Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. *Nature* 306(5944): 686-688, 1983
- 5) Filos KS, Vagianos CE: Pre-emptive analgesia: How important is it in clinical reality? *Eur Surg Res* 31: 122-132, 1999
- 6) Farris DA, Fiedler MA: Preemptive analgesia applied to postoperative pain management. *AANA J* 69: 223-228, 2001
- 7) Kelly DJ, Ahmad M, Brull SJ: Preemptive an-

- algnesia II: Recent advances and current trends. *Can J Anaesth* 48: 1091-1101, 2001
- 8) Moiniche S, Kehlet H, Dahl JB: A qualitative and quantitative systematic review of preemptive analgesia for postoperative pain relief: The role of timing of analgesia. *Anesthesiology* 96: 725-741, 2002
- 9) Gottschalk A, Smith DS: New concepts in acute pain therapy: Preemptive analgesia. *Am Fam Physician* 63: 1979-1984, 2001
- 10) Richmond CE, Bromley LM, Woolf CJ: Preoperative morphine pre-empted postoperative pain. *Lancet* 342(8863): 73-75, 1993
- 11) Abram SE, Yaksh TL: Morphine, but not inhalation anesthesia, blocks post-injury facilitation: The role of preemptive suppression of afferent transmission. *Anesthesiology* 78: 713-721, 1993
- 12) Reichert JA, Daughters RS, Rivard R, et al: Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. *Pain* 89: 221-227, 2001
- 13) Sandkuhler J, Ruscheweyh R: Opioids and central sensitization: I. Preemptive analgesia. *Eur J Pain* 9: 145-148, 2005
- 14) Rashid MH, Ueda H: Pre-injury administration of morphine prevents development of neuropathic hyperalgesia through activation of descending monoaminergic mechanisms in the spinal cord in mice. *Molecular Pain* 1: 19, 2005
- 15) Bourgoin S, Pohl M, Mauborgne A, et al: Monoaminergic control of the release of calcitonin gene-related peptide and substance P-like materials from rat spinal cord slices. *Neuropharmacology* 32: 633-640, 1993
- 16) Levine JD, Fields HL, Basbaum AI: Peptides and the primary afferent nociceptor. *J Neurosci* 13: 2273-2286, 1993
- 17) Mao J, Price DD, Phillips LL, et al: Increases in protein kinase C $\gamma$  immunoreactivity in the spinal cord dorsal horn of rats with painful mononeuropathy. *Neurosci Lett* 198: 75-78, 1995
- 18) Miletic V, Bowen KK, Miletic G: Loose ligation of the rat sciatic nerve is accompanied by changes in the subcellular content of protein kinase C $\beta$  II and  $\gamma$  in the spinal dorsal horn. *Neurosci Lett* 288: 199-202, 2000
- 19) Inoue M, Rashid MH, Fujita R, et al: Initiation of neuropathic pain requires lysophosphatidic

- acid receptor signaling. *Nature medicine* 10 : 712-718, 2004
- 20) Ueda H: Lysophosphatidic acid as the initiator of neuropathic pain. *Biol Pharm Bull* 34 : 1154-1158, 2011
- 21) Ueda H: Molecular mechanisms of neuropathic pain-phenotypic switch and initiation mechanisms. *Pharmacol Therapeutics* 109 : 57-77, 2006
- 22) Ueda H: Peripheral mechanisms of neuropathic pain: Involvement of lysophosphatidic acid receptor-mediated demyelination. *Molecular pain* 4 : 11, 2008
- 23) Ma L, Matsumoto M, Xie W, et al: Evidence for lysophosphatidic acid 1 receptor signaling in the early phase of neuropathic pain mechanisms in experiments using Ki-16425, a lysophosphatidic acid 1 receptor antagonist. *J Neurochem* 109 : 603-610, 2009
- 24) Ma L, Uchida H, Nagai J, et al: Evidence for de novo synthesis of lysophosphatidic acid in the spinal cord through phospholipase A2 and autotaxin in nerve injury-induced neuropathic pain. *J Pharmacol Exp Ther* 333 : 540-546, 2010
- 25) Tokumura A: Physiological and pathophysiological roles of lysophosphatidic acids produced by secretory lysophospholipase D in body fluids. *Biochimica et Biophysica Acta* 1582 : 18-25, 2002
- 26) Aoki J, Inoue A, Okudaira S: Two pathways for lysophosphatidic acid production. *Biochimica et Biophysica Acta* 1781 : 513-518, 2008
- 27) Inoue M, Ma L, Aoki J, et al: Simultaneous stimulation of spinal NK1 and NMDA receptors produces LPC which undergoes ATX-mediated conversion to LPA, an initiator of neuropathic pain. *J Neurochem* 107 : 1556-1565, 2008
- 28) Nishimasu H, Okudaira S, Hama K, et al: Crystal structure of autotaxin and insight into GPCR activation by lipid mediators. *Nat Struct Mol Biol* 18 : 205-212, 2011
- 29) Hama K, Aoki J: LPA3, a unique G protein-coupled receptor for lysophosphatidic acid. *Prog Lipid Res* 49 : 335-342, 2010
- 30) Nagai J, Ueda H: Pre-emptive morphine treatment abolishes nerve injury-induced lysophospholipid synthesis in mass spectrometrical analysis. *J Neurochem* 118 : 256-265, 2011
- 31) Ma L, Uchida H, Nagai J, et al: Lysophosphatidic acid-3 receptor-mediated feed-forward production of lysophosphatidic acid: An initiator of nerve injury-induced neuropathic pain. *Molecular Pain* 5 : 64, 2009

※ ※ ※

# 線維筋痛症の薬物療法

第一薬科大学 助教 (薬剤設計学講座)  
長崎大学 教授 (大学院 分子薬理学分野)

にしより  
西依  
うえだ  
植田  
みちこ  
倫子  
ひろし  
弘師

~~~~~  
線維筋痛症は、全身に伴う激しい痛みが少なくとも3ヶ月以上の長期間持続する難治性疼痛疾患である。国内においても推定200万人以上の発症率が報告されており、決して少なくない罹患率である。しかしながら、発症原因は不明で血液検査やバイタルサインに異常が認められず、見た目にも判別の難しい症状である事から、線維筋痛症として診断される事の困難さが問題となっている。そこで近年、線維筋痛症学会を中心に、様々なガイドラインの制定・治療方針等が臨床医師、患者、コメディカル医療スタッフ、研究者らにより検討されており今後の進展が期待されている。

本疾患の重大な問題点は、コントロールが非常に難しい疼痛症状である。一般的に炎症や組織損傷に伴う痛みの多くは原因が治癒されるとともに消失する。これらは発症原因が明らかであるために予防・対処が容易であり、症状が慢性化する事は少ない。一方で線維筋痛症に認められる突如発症型の痛みに対しては、治療のターゲットが不明で、薬物・非薬物療法があくまでも対症療法的に試みられる傾向であった。そこで本稿では本疾患で多く使用される鎮痛薬、鎮痛補助薬を例に薬理学的観点から線維筋痛症の病態を考察する。



個人の病態に最適の治療を行うための薬理学的アプローチである。日本における線維筋痛症ガイドラインでは、病態の特異性ごとに部類分けし、それぞれに適した治療法を提案している。

## 1) 筋肉緊張亢進型 (I型)

筋緊張亢進とは、安静状態に『つっぱった感じ(痙縮)』、『手足のこわばり(固縮)』を誘発する状態を主にいう。痛みを転じる原因としては筋や筋以外の組織の損傷や病変に伴う場合、また不安などの精神ストレスによる場合が考えられる。そのためI型にはストレスに伴うような過敏性腸症候群を併発しているケースも多く含まれる。薬物療法にはこれらの筋緊張および筋肥大に対して弛緩作用を持つ抗けいれん薬などが推奨される。また、薬物外療法として筋緊張緩和を目的とした運動療法が行われる事が多い。

## 2) 筋附着部炎型 (II型)

線維筋痛症は炎症を伴わない病態と言われているが、線維筋痛症として確定診断された患者の一部で附着部炎を認める症例も報告されている。一般的に、筋肉は慢性的な機械的負荷に対して損傷と修復を繰り返す中で慢性炎症を生じ、これに伴い痛みを生じる。そのためII型の治療には主に炎症を抑えるための抗炎症薬やTNF阻害剤、抗リウマチ薬が用いられる。

## 3) うつ状態身体性症状型 (III型)

I型、II型では局所の筋肉に痛みが強いのに対し

## 1. 線維筋痛症の病態分類と疼痛治療アプローチ

~~~~~  
一般的に鎮痛薬に分類される薬物には抗炎症薬やモルヒネなどの麻薬性鎮痛薬があげられる。近年では抗うつ薬やガバペンチン、プレギャバリンにおいても鎮痛作用が認められ、補助薬としての使用頻度が高くなっている。これらの薬剤は単一で処方される事は少なく、各々低用量で多剤併用するのが一般的である。これは副作用を最小限に抑えた上、患者

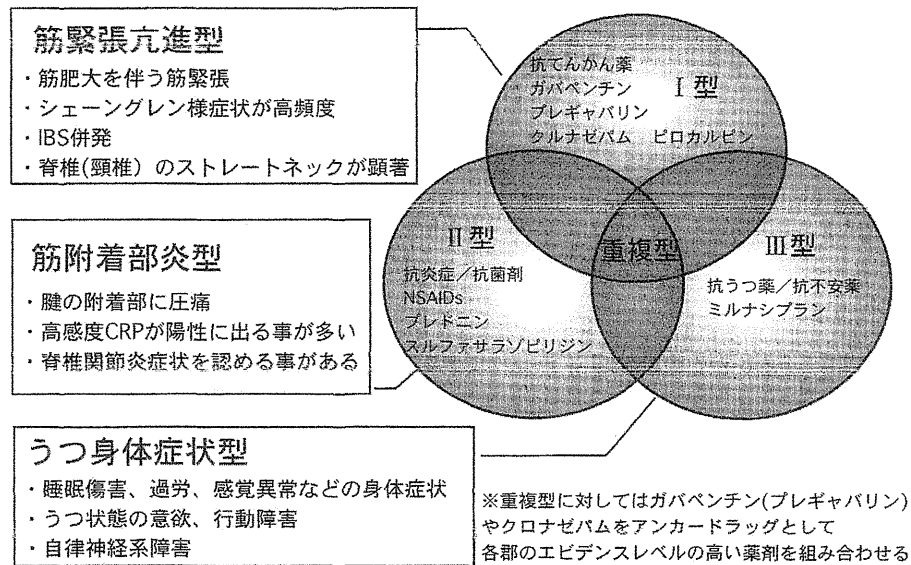


図 日本線維筋痛症診療ガイドライン2009より改変

て、全身性に痛みを生じるタイプの多くが情動由来のⅢ型に含まれる。線維筋痛症では、発症の背景の多くに幼少時の生活環境に大きな精神ストレスのトラウマを抱えているケースが多く報告され発症のリスクファクターとして注目されている。また上記で示した筋痛病態のような筋肉に異常も認められず、診断そのものが困難であることから、潜在的患者は報告されている罹患率よりも多い事が推定される。Ⅲ型には抗うつ薬が有効な例が多いが治療の程度は個人差が大きく、安定した特効薬というよりはむしろ個人に効果的な種を探索しながら慎重に用いられる事が多い。またこの他に、精神を安定化する目的で抗不安薬や睡眠薬が用いられる。

#### 4) 重複型

上記の分類1~3それぞれを重複している患者は全体の25%と言われている。重症度レベルが高い症例が多い。ガバペンチン、プレガバリンをアンカードラッグとして上記の薬物と組み合わせる事が一般的である。

## 2. 鎮痛薬の基礎メカニズム

上記1で示したように同じ線維筋痛症の診断名であっても病態的には様々な分類に分けられることから、患者個人に対応した薬物治療が重要となる。近年では、鎮痛薬に分類されていないが、鎮痛補助薬として効果を示すものが多く使用されている。これ

らの薬物を処方する時は、患者に使用目的が疼痛緩和である旨を十分に説明する必要性が求められる。

### 1) 抗炎症薬

抗炎症薬とは、浮腫・紅斑・疼痛・発熱などの炎症症状を抑制する薬物でステロイド性と非ステロイド性に大きく分けられる。ステロイド性抗炎症薬は生体膜を通過後にグルココルチコイド受容体蛋白質と結合し、様々な遺伝子発現を調節する。抗炎症作用は、プロスタグランジン類やロイコトリエン類の合成に重要なホスホリパーゼA2の直接的・間接的抑制誘導の他、免疫機能抑制などによる。非ステロイド性抗炎症薬は一般的な筋骨格系の痛みに対する第一選択薬として処方される事が多い。シクロオキシゲナーゼを阻害し、痛みの生理活性物質であるプロスタグランジン類の産生を抑制する他、直接抗炎症作用を有するとの報告もある。天井効果があるために、増量しても作用持続は延長するが一定以上の鎮痛効果は認められない場合がある。線維筋痛症では炎症を伴わない症例が多い事から、有用性が低い事が懸念される。

### 2) オピオイド

オピオイドは一般的にがん性疼痛に使用され、慢性の非がん性疼痛に対しては使用される事は少ない。その理由としては、薬物乱用の誤った知識による偏見や、適切な使用法や副作用に関する理解度が低い事があげられる。しかしながら、正確な知識を



もって使用すれば最も強力な鎮痛薬である。ただし線維筋痛症では、有効であった例も一部報告されているものの効果が低い事が懸念される報告が多いようである<sup>1-4)</sup>。オピオイド作用と抗うつ作用を有するトラマドール（商品名：トラマール）には有効例が報告されているが個人差が大きく、いずれにせよ詳細は明らかでない<sup>5)</sup>。

### 3) 抗てんかん薬、抗けいれん薬

I型に多く使用される抗てんかん薬は、筋弛緩作用および鎮痛作用を目的に使用される<sup>6)</sup>。カルバマゼピン（商品名：テグレート）は三環系抗うつ薬に構造が近似した化合物であり、筋弛緩作用、抗躁作用、鎮痛作用を有する。三叉神経痛に適応のある唯一の抗てんかん薬である事から、疼痛目的に使用される頻度が最も多い。主な作用機序は、電位依存性のナトリウムチャネル遮断作用で、知覚神経のA $\delta$ 線維、C線維の過剰興奮に対して自発性発火を抑制（発火頻度依存性遮断）する。クロナゼパム（商品名：リボトリール、ランドセン）は、抑制系GABA神経伝達の増強と考えられており、構造がベンゾジアゼピン系に類似する事から抗不安作用、筋弛緩作用も有する。近年、神経因性疼痛においてバルプロ酸（商品名：デパケン）のHDAC（ヒストン脱アセチル化酵素）阻害による鎮痛効果が注目されているが線維筋痛症における効果は不明である。

### 4) ガバペンチン、プレギャバリン

ガバペンチン（商品名：ガバペン）はGABAと類似構造をもつ抗てんかん薬の一種であるが、GABA神経を介する神経伝達系よりむしろカルシウムチャネル $\alpha$ 2 $\delta$ -サブユニットにおける効果が主である。近年では帯状疱疹後神経痛や糖尿病性ニューロパシーのような神経障害性疼痛の第一選択薬として鎮痛効果が期待されている。類似薬としてのプレギャバリン（商品名：リリカ）は2010年に神経障害性疼痛に対する保険適応薬として処方が可能となった。線維筋痛症においても高い鎮痛効果を示した例が比較的多く報告されている<sup>7-10)</sup>。これらをアンカードラッグとして他の薬物を併用する事が多い。

### 5) 抗うつ薬

抗うつ薬は、主にIII型疾患に多く用いられる。うつや不安症状を併発している症例が多いため、これ

らを軽減する目的もあるが、抗うつ薬自身のもつ鎮痛効果が線維筋痛症患者においては有効な例が報告されているためであると考えられる<sup>11-13)</sup>。抗うつ薬は三環系、四環系、SNRI（セロトニン・ノルアドレナリン再取り込み阻害薬）、SSRI（選択的セロトニン再取り込み阻害薬）と、海外では新たにNaSSA（ノルアドレナリン作動性・特異的セロトニン作動性）が発売されており国内でもあらたな治療手段の一つとして期待されている。一般的には副作用を最小限にするために少量から投薬を開始し、増量していく。アミトリプチリン（商品名：トリプタノール）やイミプラミン（商品名：トフラニール）のような三環系あるいは四環系ミアンセリン（商品名：テトラミド）などの鎮痛効果は、セロトニン・ノルアドレナリンの再取り込み阻害作用の他、 $\alpha$ 1受容体遮断作用、ナトリウムチャネル遮断作用、カルシウムチャネル遮断作用、NMDA受容体拮抗作用などが関与する可能性が報告されている。

これに対し、ミルナシプラン（商品名：トレドミン）に代表されるSNRIやSSRI（パロキセチン（商品名：パキシル）、フルボキサミン（商品名：ルボックス））は神経接合部のセロトニン・ノルアドレナリンの再取り込みを阻害する事により効果を示すが、シナプス後膜の受容体には直接親和性をもたないため、抗コリン作用などの副作用が少ない。抗うつ薬はそれぞれ特徴ある薬理作用を持つため、効果を認めない場合には他の抗うつ薬で治療にあたる。効果のある薬剤には個人差があるため、どの薬理作用が効果を示したのかは不明であるが、臨床経験的に治療には積極的に用いられ効果のあった例も多数報告されている。

### 6) 抗不安薬・睡眠薬

抗不安薬および睡眠薬は直接的な鎮痛効果というより主に鎮静目的で用いられる事が多い。線維筋痛症の場合、特にIII型患者に不眠症状によるQOL（生活の質）の低下が知られている。不安やうつ症状は痛みと密接に関連しているため、軽度の線維筋痛症患者には、この不快な情動を緩和する事で痛みが軽減する例もあるようである。

### 7) その他

ノイロトロピン（商品名：ノイロトロピン）は、明確な作用機序は不明であるが疼痛制御機構である

表 線維筋痛症に使用される薬物一覧

	一般名	商品名
抗うつ薬	イミプラミン	トフラニール
	アミトリプチリン	トリプタノール
	セルトラリン	ジェイゾロフト
	ミルナシبران	トレドミン
	フルボキサミン	ルボックス
	パロキセチン	パキシル
	ナリメチン	ナリメチン
抗てんかん薬	ガバペンチン	ガバペン
	プレガバリン	リリカ
	カルバマゼピン	テグレートール
	クロナゼパム	リボトリール
	バルプロ酸	デパケン
オピオイド 関連薬	モルヒネ	モルヒネ
	トラマドール	トラマール
	ナルトレキサン	

	一般名	商品名
抗不安薬 ・睡眠薬	アルプラゾラム	ソラナックス
	エチゾラム	デバス
	ゾルピデム	マイスリー
	フルニトラゼパム	ロヒブノール
	ゾピクロン	アモバン
	トリアゾラム	ハルシオン
	ロラゼパム	ワイパックス
抗炎症薬	アスピリン	アスピリン
	イブプロフェン	イブプロフェン
	ナプロキセン	ナイキサン
	ロキソプロフェン	ロキソニン
	インドメタシン	インフリー
	ジクロフェナク	ボルタレン
	コキシブ	コキシブ
抗リウマチ薬	サラゾスルファ ピリジン	アザルフィジン
	メトトレキサート	メトトレキサート
その他	ノイロトロピン	ノイロトロピン
	ケタミン	ケタミン

下行性抑制系を賦活化する事で鎮痛作用を示すと考えられている<sup>14)</sup>。錠剤で処方される事もあるが、多くの場合静脈注射あるいはトリガーポイント注射が行われる事があるようである。その他に、海外の報告であるがNMDA拮抗作用のもつケタミンが有効であった例が報告されている<sup>15,16)</sup>。神経興奮に関与するNMDA受容体に作用し、痛みにもなう神経興奮を抑制するためと考えられているが、詳細は不明である。しかしケタミンは副作用や乱用の恐れから使用頻度は低い。同様にNMDA拮抗作用をもつ薬物にデキストロメトルファン(商品名:メジコン)なども知られている。デキストロメトルファンをオピオイドと併用する事で、少量のオピオイドが有効である事が報告されている<sup>17)</sup>。

### 3. 科学的根拠に基づく新たな治療戦略

これまで線維筋痛症における治療は、経験的な薬物療法で得られた情報によるものであった。一般的に新薬の開発や治療薬のスクリーニングではヒトを対象とする前に細胞や実験動物における検証がなさ

れる。しかしながら線維筋痛症は組織損傷や炎症とは異なる特殊な病態であり、それらの動物モデルでは応用できなかった。線維筋痛症病態モデルとしては、筋痛モデル<sup>18)</sup> やストレスを繰り返し曝露する事で痛みを発症するJ型様モデル(ICSモデル)が提案されている<sup>19)</sup>。

薬理的解析としてこれらのモデルに対してモルヒネを投与した場合、筋痛モデルでは高用量のモルヒネに有効な鎮痛効果が報告されている<sup>2)</sup>。一方、ストレス性のICSモデルではモルヒネの効果は無効で<sup>20)</sup>、臨床効果を反映している。この事によりモルヒネの作用機序に及ぼす影響が発症要因の違いにより異なる可能性が考えられる。ICSモデルにおいては特に中枢(脳室内)における鎮痛効果が極端に低く、異常機構として下降性抑制系に関連するセロトニン神経系の減弱を認めている。近年、臨床研究において標的因子としてのセロトニンの重要性を裏付ける科学的根拠になりうると考えられる。

また、治療効果が高いとされるガバペンチンは筋痛モデルおよびICSモデルともに有効な鎮痛効果を示す事が明らかにされている<sup>21)</sup>。ICSモデルでは少量でも鎮痛効果を示し、特に中枢に投与すると鎮

痛効果の持続性を認めている。中枢移行性の高い類似薬の開発へ応用するだけでなく、中枢性機構および作用点のカルシウムチャンネルに着目する事で、線維筋痛症の原因解明に対する手掛かりになりうるのではないかと考えられる。

線維筋痛症はその病態の特異性が今まで不明な点が多かったが、上記2に示すような薬物療法が積極的に行われている。しかし、その個体差が大きいいため慎重な治療計画の設計が必要である。また、オピオイドや抗うつ薬などの特殊な薬物をはじめとして多剤併用療法をおこなう際には、各専門医との連携によつて的確な治療をおこなう事が重要である。効果的と考えられる薬物の中に線維筋痛症に適応とされる薬物はなく、それぞれの薬物を保険適応内で服用するためには併発症状に対する治療という名目を用いるのが現状であるようだが、動物モデルを用いた科学的エビデンスを臨床にフィードバックする事で今後線維筋痛症適応の薬物が増える可能性期待される。また、臨床研究で遺伝子多型解析や脳内fMRI、SPECT画像解析などによる中枢機構の異常が報告されているようにこれらのターゲット領域をさらに分析し基礎研究と連携する事で、より有効性の高い治療方針の確立が期待される。


【引用文献】

- 1) Harris RE et al: Decreased central mu-opioid receptor availability in fibromyalgia. *J Neurosci*, 27(37): 2007
- 2) Nielsen AN et al: Pharmacological characterisation of acid-induced muscle allodynia in rats. *Eur J Pharmacol*, 487(1-3): 2004
- 3) Sluka KA et al: Chronic muscle pain induced by repeated acid injection is reversed by spinally administered mu- and delta-, but not kappa-, opioid receptor agonists. *J Pharmacol Exp Ther*, 302(3): 2002
- 4) Furuta S et al: Subdiaphragmatic vagotomy promotes nociceptive sensitivity of deep tissue in rats. *Neuroscience*, 164(3):
- 5) Ngian GS et al: The use of opioids in fibromyalgia. *Int J Rheum Dis*, 14(1):6-11.
- 6) Maizels M and McCarberg B: Antidepressants and antiepileptic drugs for chronic non-cancer pain. *Am Fam Physician*, 71(3): 2005.
- 7) Arnold LM et al: Gabapentin in the treatment of fibromyalgia: a randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial. *Arthritis Rheum*, 56(4): 2007
- 8) Crofford LJ et al: Pregabalin for the treatment of fibromyalgia syndrome: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 52(4): 2005
- 9) Tzellos TG et al: Gabapentin and pregabalin in the treatment of fibromyalgia: a systematic review and a meta-analysis. *J Clin Pharm Ther*, 35(6)
- 10) Hauser W et al: Treatment of fibromyalgia syndrome with gabapentin and pregabalin—a meta-analysis of randomized controlled trials. *Pain*, 145(1-2): 2009
- 11) Rao SG and Bennett RM: Pharmacological therapies in fibromyalgia. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 17(4): 2003
- 12) Gendreau RM et al: Efficacy of milnacipran in patients with fibromyalgia. *J Rheumatol*, 32(10): 2005
- 13) U稿ylerN and W H, C. S: A systematic review on the effectiveness of treatment with antidepressants in fibromyalgia syndrome. *Arthritis and rheumatism*, 59(9): 2008
- 14) Toda K and Tobimatsu Y: Efficacy of neurotrophin in fibromyalgia: a case report. *Pain Med*, 9(4): 2008
- 15) Sorensen J et al: Pain analysis in patients with fibromyalgia. Effects of intravenous morphine, lidocaine, and ketamine. *Scand J Rheumatol*, 24(6): 1995
- 16) Graven-Nielsen T et al: Ketamine reduces muscle pain, temporal summation, and referred pain in fibromyalgia patients. *Pain*, 85(3): 2000
- 17) Ali SM et al: Tramadol for pain relief in children undergoing adenotonsillectomy: a comparison with dextromethorphan. *Laryngoscope*, 118(9): 2008
- 18) Sluka KA et al: Unilateral intramuscular injections of acidic saline produce a bilateral, long-lasting hyperalgesia. *Muscle Nerve*, 24(1): 2001
- 19) Nishiyori M and Ueda H: Prolonged gabapentin analgesia in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Molecular pain*, 4(52): 2008
- 20) Nishiyori M et al: Absence of morphine analgesia and its underlying descending serotonergic activation in an experimental mouse model of fibromyalgia. *Neurosci Lett*, 472(3): 2010
- 21) Yokoyama T et al: Pregabalin reduces muscle and cutaneous hyperalgesia in two models of chronic muscle pain in rats. *J Pain*, 8(5): 2007

**神経障害性疼痛  
薬物療法ガイドライン**

【編集】 日本ペインクリニック学会神経障害性疼痛薬物療法ガイドライン作成ワーキンググループ  
B5判・104頁・定価(本体1,200円+税)  
ISBN: 978-4-88003-856-1

痛みの診療に携わるすべての医療従事者を対象とした、日本ペインクリニック学会編集の本邦発の神経障害性疼痛に対する薬物療法ガイドライン




JSPC  
神経障害性疼痛  
薬物療法ガイドライン  
The Japanese Society for  
Pharmacological Management of  
Neurological Pain

---

**自分で「痛み」を管理しよう  
慢性痛に順応する積極的取り組み**

【監訳】 坂本篤裕 日本医科大学麻酔科学講座 主任教授  
河原裕泰 日本医科大学付属病院麻酔科 病院講師  
A5判・280頁・定価(本体3,200円+税)  
ISBN: 978-4-88003-230-6

疼痛関連医療従事者の簿帳となるとともに、患者自身の痛みへの理解と患者自ら痛みを管理しようとするモチベーションを高めるための書



MANAGE YOUR PAIN  
自分で「痛み」を管理しよう  
慢性痛に順応する積極的取り組み

〒109-0047 東京都港区南麻布2丁目8番18号  
電話 (03)3788-3315 FAX (03)3788-3096  
URL: <http://www.sshinko.com> E-mail: [info@sshinko.com](mailto:info@sshinko.com)

真興交易(株)医書出版部

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

Y. Takamatsu<sup>1</sup>, H. Yamamoto<sup>1</sup>, Y. Hagino<sup>1</sup>, A. Markou<sup>2</sup> and K. Ikeda<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Psychobiology, Tokyo Institute of Psychiatry, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, Japan;

<sup>2</sup>Department of Psychiatry, School of Medicine, University of California San Diego, 9500 Gilman Drive, La Jolla, San Diego, CA 92093-0603, USA

**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<sup>+</sup> (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:** Conditioned place preference, Fluvoxamine, Methamphetamine, Mice, Paroxetine, Serotonin transporter.

## INTRODUCTION

Methamphetamine (METH) is abused in 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 abuse [3] 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 cocaine [4] 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<sup>®</sup>) and fluvoxamine (Lubox<sup>®</sup> or Depromel<sup>®</sup>) 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 ± 2°C and 55 ± 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 Hoffman and Beninger [9] with some modifications. We used a two-compartment Plexiglas chamber (Neuroscience Inc., Osaka, Japan). One compartment (17.5 × 15 × 17.5 cm: width × length × 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

\*Address correspondence to this author at the Division of Psychobiology, Tokyo Institute of Psychiatry, 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, Japan; Tel: +81-3-3304-5701, ext. 508; Fax: +81-3-3329-8035; E-mail: ikeda-kz@igakuken.or.jp

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 ( $n = 14\text{--}26$  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 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.

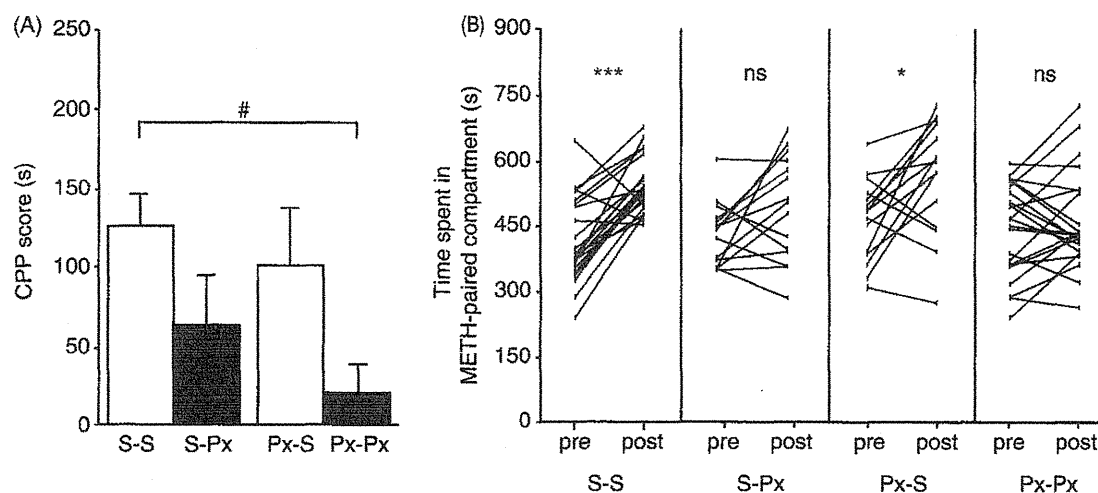
## RESULTS

### Effects of Paroxetine on METH CPP

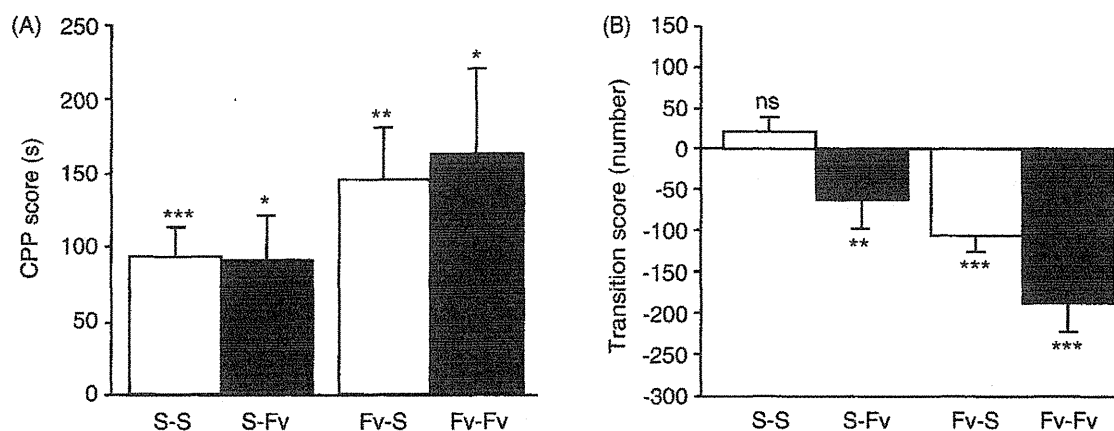
The two-way ANOVA revealed that mice treated with paroxetine during the test phase exhibited decreased CPP scores compared to mice treated with saline during the test phase ( $F_{1,72} = 7.888$ ,  $P < 0.01$ ), whereas mice treated with paroxetine during the conditioning phase did not differ significantly 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



**Fig. (1).** Effects of paroxetine on CPP for METH in mice. (A) Reduction of METH CPP by paroxetine (Px) pretreatment. Mice were pretreated with saline (S) in both the conditioning and CPP test phases (S-S), paroxetine only in the CPP test phase (S-Px), paroxetine only in the conditioning phase (Px-S), and paroxetine in both the conditioning and the CPP test phases (Px-Px). 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 pre-conditioning phase (Day 2). The CPP score of the Px-Px group was significantly lower than that of the S-S group ( $^{\#}P < 0.05$ ). (B) Comparison of time spent in the conditioned compartment before and after conditioning in the four groups. There was a significant CPP in the S-S and Px-S groups, but not in the S-Px and Px-Px groups (when paroxetine was administered in the CPP test phase).  $***P < 0.001$ ,  $*P < 0.05$ , ns: not significant ( $P > 0.05$ ).



**Fig. (2).** Effects of fluvoxamine on CPP for METH and on transitions between compartments. (A) Lack of a significant effect of fluvoxamine (Fv) on METH CPP. Mice were pretreated with saline in both the conditioning and the CPP test phases (S-S), fluvoxamine only in the CPP test phase (S-Fv), fluvoxamine only in the conditioning phase (Fv-S), and fluvoxamine in both the conditioning and the CPP test phases (Fv-Fv). There was a significant CPP in all groups. Fluvoxamine pretreatment in the conditioning phase and/or the CPP test phase failed to inhibit METH CPP (pre- and post-conditioning preference test results were analyzed with paired *t*-tests,  $***P < 0.001$ ,  $**P < 0.01$ ,  $*P < 0.05$ ). (B) Decreases in transitions between the compartments by fluvoxamine pretreatment. There were significant decreases in transitions in the S-Fv, Fv-S, and Fv-Fv groups, but not in the S-S group [number of transitions in the pre- and post-conditioning phases was analyzed with paired *t*-tests,  $***P < 0.001$ ,  $**P < 0.01$ , ns: not significant ( $P > 0.05$ )]. 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 phase (Day 2).

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 colleagues [16] reported that paroxetine also inhibits the function of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> (GIRK) channels. It is intriguing that paroxetine and fluoxetine, but not fluvoxamine, inhibit GIRK channels [16-18]. Various G protein-coupled receptors (such as M2 muscarinic,  $\alpha_2$  adrenergic, D<sub>2</sub> dopaminergic, 5-HT<sub>1A</sub>, opioid, nociceptin/orphanin FQ, and A<sub>1</sub> adenosine) activate GIRK channels [19-22] 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 [22]. 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 colleagues [26] also have reported that ifenprodil, a cerebral vasodilator which inhibits morphine CPP [27], also inhibits the function of GIRK channels. Morgan and colleagues [28] 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/fluvoxamine treated group during the CPP test phase (101.4 ± 85.3, mean ± SEM) 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.

In conclusion, we found that paroxetine, but not fluvoxamine, inhibited METH CPP in mice. Although further pre-clinical 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, H19-iyaku-023, 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).

## ABBREVIATIONS

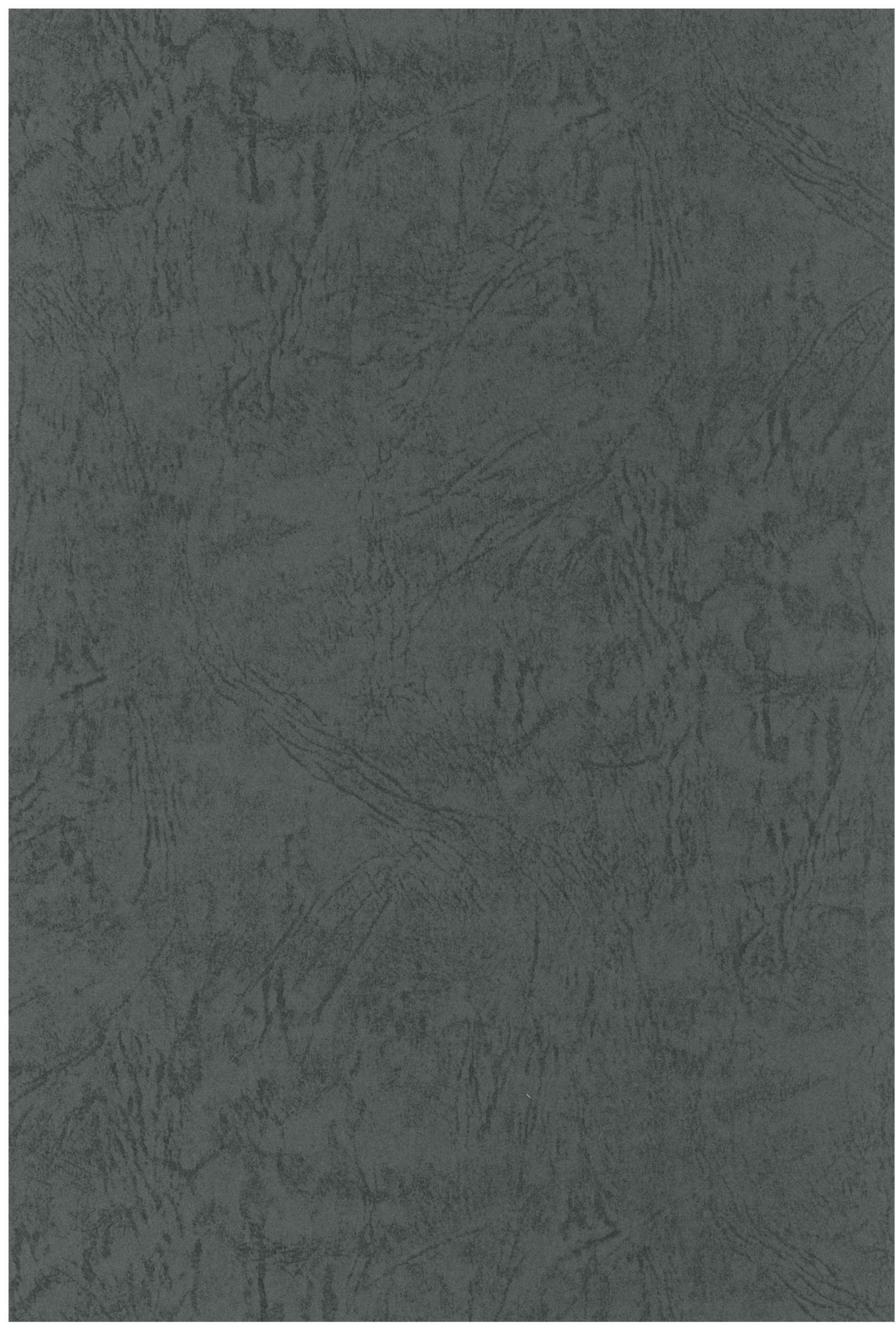
ANOVA	=	Analysis of variance
CPP	=	Conditioned place preference
DAT	=	Dopamine transporter
GIRK	=	G protein-activated inwardly rectifying K <sup>+</sup>
METH	=	Methamphetamine
n.s.	=	Not significant
SERT	=	Serotonin transporter
SSRI	=	Selective serotonin reuptake inhibitor

## REFERENCES

- [1] United Nations International Drug Control Programme. *World drug report 2005*. Oxford University Press: New York, 2005.
- [2] Ujike, H. Stimulant-induced psychosis and schizophrenia: the role of sensitization. *Curr. Psychiatry Rep.*, 2002, 4, 177-184.
- [3] National Institute on Drug Abuse. *Methamphetamine abuse and addiction (Research report series, NIH pub. no. 98-4210)*. National Institute on Drug Abuse: Bethesda, 2002.
- [4] Sora, I.; Wichems, C.; Takahashi, N.; Li, X.F.; Zeng, Z.; Recay, R.; Lesch, K.P.; Murphy, D.L.; Uhl, G.R. Cocaine reward models: conditioned place preference can be established in dopamine- and in serotonin-transporter knockout mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1998, 95, 7699-7704.
- [5] Rocha, B.A.; Fumagalli, F.; Gainetdinov, R.R.; Jones, S.R.; Ator, R.; Giros, B.; Miller, G.W.; Caron, M.G. Cocaine self-administration in dopamine-transporter knockout mice. *Nat. Neurosci.*, 1998, 1, 132-137.
- [6] Sora, I.; Hall, F.S.; Andrews, A.M.; Itokawa, M.; Li, X.F.; Wei, H.B.; Wichems, C.; Lesch, K.P.; Murphy, D.L.; Uhl, G.R. Molecular mechanisms of cocaine reward: combined dopamine and serotonin transporter knockouts eliminate cocaine place preference. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2001, 98, 5300-5305.
- [7] Shen, H.W.; Hagino, Y.; Kobayashi, H.; Shinohara, K.; Ikeda, K.; Yamamoto, H.; Yamamoto, T.; Lesch, K.P.; Murphy, D.L.; Hall, F.S.; Uhl, G.R.; Sora, I. Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by *in vivo* microdialysis in mice

- lacking dopamine and/or serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*, **2004**, *29*, 1790-1799.
- [8] Takamatsu, Y.; Yamamoto, H.; Ogai, Y.; Hagino, Y.; Markou, A.; Ikeda, K. Fluoxetine as a potential pharmacotherapy for methamphetamine dependence: studies in mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **2006**, *1074*, 295-302.
- [9] Hoffman, D.C.; Beninger, R.J. Preferential stimulation of D1 or D2 receptors disrupts food-rewarded operant responding in rats. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **1989**, *34*, 923-925.
- [10] Ide, S.; Minami, M.; Satoh, M.; Uhl, G.R.; Sora, I.; Ikeda, K. Buprenorphine antinociception is abolished, but naloxone-sensitive reward is retained, in mu-opioid receptor knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, **2004**, *29*, 1656-1663.
- [11] Stanton, T.; Bolden-Watson, C.; Cusack, B.; Richelson, E. Antagonism of the five cloned human muscarinic cholinergic receptors expressed in CHO-K1 cells by antidepressants and antihistamines. *Biochem. Pharmacol.*, **1993**, *45*, 2352-2354.
- [12] Fryer, J.D.; Lukas, R.J. Antidepressants noncompetitively inhibit nicotinic acetylcholine receptor function. *J. Neurochem.*, **1999**, *72*, 1117-1124.
- [13] Maertens, C.; Droogmans, G.; Verbesselt, R.; Nilius, B. Block of volume-regulated anion channels by selective serotonin reuptake inhibitors. *Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.*, **2002**, *366*, 158-165.
- [14] Pariante, C.M.; Makoff, A.; Lovestone, S.; Feroli, S.; Heyden, A.; Miller A.H.; Kerwin, R.W. Antidepressants enhance glucocorticoid receptor function *in vitro* by modulating the membrane steroid transporters. *Br. J. Pharmacol.*, **2001**, *134*, 1335-1343.
- [15] Finkel, M.S.; Laghriss-Thode, F.; Pollock, B.G.; Rong, J. Paroxetine is a novel nitric oxide synthase inhibitor. *Psychopharmacol. Bull.*, **1996**, *32*, 653-658.
- [16] Kobayashi, T.; Washiyama, K.; Ikeda, K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by the antidepressant paroxetine. *J. Pharmacol. Sci.*, **2006**, *102*, 278-287.
- [17] Kobayashi, T.; Washiyama, K.; Ikeda, K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by fluoxetine (Prozac). *Br. J. Pharmacol.*, **2003**, *139*, 1119-1128.
- [18] Kobayashi, T.; Washiyama, K.; Ikeda, K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by various antidepressant drugs. *Neuropsychopharmacology*, **2004**, *29*, 1841-1851.
- [19] Ikeda, K.; Kobayashi, T.; Ichikawa, T.; Usui, H.; Abe, S.; Kumanishi, T. Comparison of the three mouse G-protein-activated K<sup>+</sup> (GIRK) channels and functional couplings of the opioid receptors with the GIRK1 channel. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **1996**, *801*, 95-109.
- [20] Ikeda, K.; Kobayashi, T.; Ichikawa, T.; Usui, H.; Kumanishi, T. Functional couplings of the δ- and the κ-opioid receptors with the G-protein-activated K<sup>+</sup> channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1995**, *208*, 302-308.
- [21] Ikeda, K.; Kobayashi, T.; Ichikawa, T.; Kumanishi, T.; Kishida, H.; Ryoji, Y.; Manabe, T. Functional coupling of the nociceptin /orphanin FQ receptor with the G-protein-activated K<sup>+</sup> (GIRK) channel. *Mol. Brain Res.*, **1997**, *45*, 117-126.
- [22] North, R.A. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. *Br. J. Pharmacol.*, **1989**, *98*, 13-28.
- [23] Reuveny, E.; Slesinger, P.A.; Inglese, J.; Morales, J.M.; Iniguez-Lluhi, J.A.; Lefkowitz, R.J.; Bourne, H.; Jan, Y.; Jan, L.Y. Activation of the cloned muscarinic potassium channel by G protein βγ subunits. *Nature*, **1994**, *370*, 143-146.
- [24] Kobayashi, T.; Ikeda, K.; Kojima, H.; Niki, H.; Yano, R.; Yoshiooka, T.; Kumanishi, T. Ethanol opens G-protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels. *Nat. Neurosci.*, **1999**, *2*, 1091-1097.
- [25] Lewohl, J.M.; Wilson, W.R.; Mayfield, R.D.; Brozowski, S.J.; Morrisett, R.A.; Harris, R.A. G-protein-coupled inwardly rectifying potassium channels are targets of alcohol action. *Nat. Neurosci.*, **1999**, *2*, 1084-1090.
- [26] Kobayashi, T.; Washiyama, K.; Ikeda, K. Inhibition of G protein-activated inwardly rectifying K<sup>+</sup> channels by ifenprodil. *Neuropsychopharmacology*, **2006**, *31*, 516-524.
- [27] Suzuki, T.; Kato, H.; Tsuda, M.; Suzuki, H.; Misawa, M. Effects of the non-competitive NMDA receptor antagonist ifenprodil on the morphine-induced place preference in mice. *Life Sci.*, **1999**, *64*, 151-156.
- [28] Morgan, A.D.; Carroll, M.E.; Stoffel, M.; Wickman, K. Decreased cocaine self-administration in Kir3 potassium channel subunit knockout mice. *Neuropsychopharmacology*, **2003**, *28*, 932-938.
- [29] Ago, Y.; Harasawa, T.; Itoh, S.; Nakamura, S.; Baba, A.; Matsuda, T. Antidepressant-like effect of coadministration of sulpiride and fluvoxamine in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, **2005**, *520*, 86-90.





第3次対がん総合戦略研究事業

「がん性疼痛患者のQOL向上のための橋渡し研究連携拠点の構築」

平成23年度

研究成果の刊行物・別冊

# Effects of MDMA on Extracellular Dopamine and Serotonin Levels in Mice Lacking Dopamine and/or Serotonin Transporters

Y. Hagino<sup>a</sup>, Y. Takamatsu<sup>a</sup>, H. Yamamoto<sup>a</sup>, T. Iwamura<sup>b</sup>, D. L. Murphy<sup>c</sup>, G. R. Uhl<sup>d</sup>, I. Sora<sup>e</sup> and K. Ikeda<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Division of Psychobiology, Tokyo Institute of Psychiatry, Tokyo 156-8585, Japan; <sup>b</sup>Faculty of Pharmaceutical Sciences, Matsuyama University, Matsuyama 790-8578, Japan; <sup>c</sup>Laboratory of Clinical Science, National Institute of Mental Health, National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA; <sup>d</sup>Molecular Neurobiology Branch, Intramural Research Program, National Institute on Drug Abuse, National Institutes of Health, Baltimore, Maryland, USA; <sup>e</sup>Department of Biological Psychiatry, Tohoku University Graduate School of Medicine, Sendai 980-8574, Japan

**Abstract:** 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA) has both stimulatory and hallucinogenic properties which make its psychoactive effects unique and different from those of typical psychostimulant and hallucinogenic agents. The present study investigated the effects of MDMA on extracellular dopamine (DA<sub>ex</sub>) and serotonin (5-HT<sub>ex</sub>) levels in the striatum and prefrontal cortex (PFC) using *in vivo* microdialysis techniques in mice lacking DA transporters (DAT) and/or 5-HT transporters (SERT). Subcutaneous injection of MDMA (3, 10 mg/kg) significantly increased striatal DA<sub>ex</sub> in wild-type mice, SERT knockout mice, and DAT knockout mice, but not in DAT/SERT double-knockout mice. The MDMA-induced increase in striatal DA<sub>ex</sub> in SERT knockout mice was significantly less than in wildtype mice. In the PFC, MDMA dose-dependently increased DA<sub>ex</sub> levels in wildtype, DAT knockout, SERT knockout and DAT/SERT double-knockout mice to a similar extent. In contrast, MDMA markedly increased 5-HT<sub>ex</sub> in wildtype and DAT knockout mice and slightly increased 5-HT<sub>ex</sub> in SERT-KO and DAT/SERT double-knockout mice. The results confirm that MDMA acts at both DAT and SERT and increases DA<sub>ex</sub> and 5-HT<sub>ex</sub>.

**Keywords:** MDMA, serotonin transporter, dopamine transporter, knockout, microdialysis.

## INTRODUCTION

3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA, street name: ecstasy) exhibits both stimulatory and hallucinogenic properties which make its psychoactive effects unique and different from those of typical hallucinogens or psychostimulants. Under *in vitro* conditions, MDMA has been shown to increase the release of dopamine (DA), serotonin (5-HT), and norepinephrine (NE) from brain slices and prevent the reuptake of DA, 5-HT, and NE into brain synaptosomes [1-4]. MDMA binds with higher affinity to the 5-HT transporter (SERT) than to the DA transporter (DAT) [5, 6] and produces a greater release of 5-HT than DA [7-9].

*In vivo* microdialysis studies have revealed that systemic injection of MDMA increases extracellular levels of DA and 5-HT in the striatum and prefrontal cortex (PFC) [7, 10-13]. MDMA induces DA release, at least in the striatum, through several mechanisms. For example, the release of DA elicited by MDMA is hypothesized to involve both transporter- [14, 15] and impulse-dependent processes [8]. Additionally, the increased 5-HT function resulting from MDMA-induced 5-HT release has been suggested to stimulate 5-HT<sub>2</sub> receptors, thereby further enhancing DA release [11, 16, 17].

Monoamine transporter knockout (KO) mice provide useful *in vivo* models to analyze the effects of psychoactive drugs. In SERT-KO mice, Begels *et al.* (1998) reported a lack of locomotor-stimulating effects of MDMA [18]. MDMA self-administration is also absent in SERT-KO mice [13]. Moreover, the ability of MDMA administration to induce  $\gamma$ -aminobutyric acid transporter 1 expression in the frontal cortex and midbrain was reduced in SERT-KO mice [19]. In contrast, DAT-KO mice are hyperactive [20, 21] and display perseverative locomotor patterns [22]. MDMA decreases hyperactivity and potentiates the perseverative pattern of locomotor activity in DAT-KO mice [23]. However, the mechanisms underlying these MDMA effects have not been sufficiently elucidated.

To clarify the action of MDMA on the DAT or SERT in the striatum and PFC, we investigated the effects of MDMA on extracellular levels of DA (DA<sub>ex</sub>) and 5-HT (5-HT<sub>ex</sub>) using *in vivo* microdialysis in mice lacking the DAT and/or SERT.

## METHODS

### Animals

Wildtype and DAT-KO mouse littermates from crosses of heterozygous/heterozygous DAT-KO mice on a 129/C57 mixed genetic background served as subjects. SERT-KO and DAT/SERT double-KO mouse littermates from crosses of heterozygous DAT/homozygous SERT knockout mice on a 129/C57 mixed genetic background also served as subjects.

\*Address correspondence to this author at the Division of Psychobiology, Tokyo Institute of Psychiatry 2-1-8 Kamikitazawa, Setagaya-ku, Tokyo 156-8585, Japan; Tel: +81-3-3304-5701 (Ext. 508); Fax: +81-3-3329-8035; E-mail: ikeda-kz@igakuken.or.jp



The experimental procedures and housing conditions were approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of Tokyo Institute of Psychiatry, and all animals were cared for and treated humanely in accordance with our institutional animal experimentation guidelines. Naive adult mice were housed in an animal facility maintained at  $22 \pm 2^\circ\text{C}$  and  $55 \pm 5\%$  relative humidity under a 12 h light/dark cycle with lights on at 8:00 a.m. and off at 8:00 p.m. Food and water were available *ad libitum*. In microdialysis experiments, male and female mice from 10 to 24 weeks old were examined.

### Surgery and Microdialysis Procedure

Mice were stereotaxically implanted, under sodium pentobarbital anesthesia (50 mg/kg, intraperitoneally), with microdialysis probes in the striatum (anterior +0.6 mm, lateral -1.8 mm, ventral -4.0 mm from bregma) or PFC (anterior -2.0 mm, lateral +0.5 mm, ventral -3.0 mm from bregma), according to the atlas of Franklin and Paxinos [24]. Twenty-four hours after implantation, the dialysis experiments were performed in freely-moving animals. Evaluation of  $\text{DA}_{\text{ex}}$  and  $5\text{-HT}_{\text{ex}}$  has been previously described [25]. Basal levels of  $\text{DA}_{\text{ex}}$  and  $5\text{-HT}_{\text{ex}}$  were obtained from average concentrations of three consecutive samples when they were stable.

### Drugs

Drugs were dissolved in saline and administered subcutaneously (s.c.) in a volume of 10 ml/kg. MDMA (3 and 10 mg/kg) was administered after establishment of stable baseline, and the dialysate was continuously collected for 180 min.

### Statistical Analysis

$\text{DA}_{\text{ex}}$  and  $5\text{-HT}_{\text{ex}}$  responses to drugs were expressed as a percentage of basal levels. Areas under the curve (AUC) of  $\text{DA}_{\text{ex}}$  and  $5\text{-HT}_{\text{ex}}$  during the 180 min period after drug administration were calculated as the effects of drugs. AUC values of all groups were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA). Individual *post hoc* comparisons were performed with Fisher's protected least significant difference (PLSD) test. In all cases, the PLSD test was applied for multiple comparisons, and values of  $p < 0.05$  were considered statistically significant. Data were analyzed with Statview J5.0 software (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

## RESULTS

### Baselines of $\text{DA}_{\text{ex}}$ and $5\text{-HT}_{\text{ex}}$ in the Striatum and PFC

The baselines of  $\text{DA}_{\text{ex}}$  and  $5\text{-HT}_{\text{ex}}$  in the striatum and PFC are shown in Table 1. As previously reported [25], baselines of  $\text{DA}_{\text{ex}}$  in the striatum were significantly higher in DAT-KO and DAT/SERT-double KO mice than in wildtype mice (one-way ANOVA;  $F_{3,66} = 37.708$ ,  $p < 0.001$ ). Baselines of  $\text{DA}_{\text{ex}}$  in the PFC were not different between wildtype, DAT-KO, SERT-KO, and DAT/SERT double-KO mice (one-way ANOVA;  $F_{3,76} = 0.291$ ,  $p = 0.832$ ). Baselines of  $5\text{-HT}_{\text{ex}}$  were significantly higher in SERT-KO and DAT/SERT double-KO mice than in wildtype mice in both the striatum (one-way ANOVA;  $F_{3,66} = 37.716$ ,  $p < 0.001$ ) and PFC (one-way ANOVA;  $F_{3,76} = 47.715$ ,  $p < 0.001$ ).

### Effects of MDMA on $\text{DA}_{\text{ex}}$ and $5\text{-HT}_{\text{ex}}$ in the Striatum

MDMA (3 and 10 mg/kg) dose-dependently increased  $\text{DA}_{\text{ex}}$  in wildtype and SERT-KO mice, but not in DAT/SERT double-KO mice (Fig. 1A, B). Two-way ANOVA (drug  $\times$  genotype) of the  $\text{DA}_{\text{ex}}$  AUC calculated during the 180 min posttreatment period revealed significant effects of drug ( $F_{2,58} = 94.751$ ,  $p < 0.001$ ) and genotype ( $F_{3,58} = 26.775$ ,  $p < 0.001$ ) and a significant drug  $\times$  genotype interaction ( $F_{6,58} = 21.352$ ,  $p < 0.001$ ). *Post hoc* comparisons revealed that the effects of MDMA (10 mg/kg) on  $\text{DA}_{\text{ex}}$  in SERT-KO mice was significantly less than in wildtype mice ( $p < 0.001$ ; Fisher's PLSD *post hoc* test). However, DAT-KO mice exhibited significant MDMA (10 mg/kg)-induced increases in  $\text{DA}_{\text{ex}}$  levels ( $p < 0.001$ ; Fisher's PLSD *post hoc* test), increases that were less than in wildtype mice ( $p < 0.001$ ; Fisher's PLSD *post hoc* test). MDMA (3 and 10 mg/kg) dose-dependently increased  $5\text{-HT}_{\text{ex}}$  in wildtype and DAT-KO mice (Fig. 1C, D). Two-way ANOVA (drug  $\times$  genotype) of  $5\text{-HT}_{\text{ex}}$  revealed significant effects of drug ( $F_{2,58} = 23.578$ ,  $p < 0.001$ ) and genotype ( $F_{3,58} = 21.589$ ,  $p < 0.001$ ) and a significant drug  $\times$  genotype interaction ( $F_{6,58} = 7.769$ ,  $p < 0.001$ ). The effects of MDMA (3 and 10 mg/kg) on  $5\text{-HT}_{\text{ex}}$  in DAT-KO mice was significantly higher than in wildtype mice ( $p < 0.05$  and  $p < 0.01$ , respectively; Fisher's PLSD *post hoc* test). When the effects of MDMA were analyzed only in SERT-KO and DAT/SERT double-KO mice, two-way ANOVA (drug  $\times$  genotype) of  $5\text{-HT}_{\text{ex}}$  revealed a significant effect of drug ( $F_{2,25} = 11.858$ ,  $p < 0.001$ ) but no effect of genotype ( $F_{1,25} = 0.492$ ,  $p = 0.489$ ) and no drug  $\times$  genotype interaction ( $F_{2,25} = 2.773$ ,  $p = 0.082$ ). The effects of

**Table 1.** The Baselines (fmol/10 min) of  $\text{DA}_{\text{ex}}$  and  $5\text{-HT}_{\text{ex}}$  in the Striatum and PFC

Genotype	Striatum			PFC		
	n	$\text{DA}_{\text{ex}}$	$5\text{-HT}_{\text{ex}}$	n	$\text{DA}_{\text{ex}}$	$5\text{-HT}_{\text{ex}}$
Wildtype	20	$43.00 \pm 5.15$	$1.24 \pm 0.17$	24	$1.24 \pm 0.18$	$1.87 \pm 0.20$
DAT-KO	19	$486.26 \pm 62.00^{***}$	$1.01 \pm 0.13$	21	$1.16 \pm 0.16$	$1.87 \pm 0.24$
SERT-KO	16	$56.18 \pm 7.44$	$13.07 \pm 1.97^{***}$	16	$1.32 \pm 0.28$	$15.09 \pm 1.73^{***}$
DAT/SERT-KO	15	$596.18 \pm 73.38^{***}$	$15.13 \pm 1.91^{***}$	19	$1.42 \pm 0.22$	$12.21 \pm 1.43^{***}$

Data presented are means  $\pm$  S.E.M. \*\*\* $P < 0.001$  compared to the corresponding wildtype datum.