

マウスを用いたオピオイド系違法薬物の催奇形性に関する予備調査

長谷川 悠子^a, 安藤 弘^{bc}, 久保 喜一^b, 北條 幹^a, 鈴木 仁^a, 猪又 明子^d, 守安 貴子^d

東京都は、平成 17 年からこれまでに多くの危険ドラッグに含まれる成分を知事指定薬物として規制しており、東京都健康安全研究センターでは未規制薬物を知事指定薬物として規制するための評価資料として生体影響試験を実施してきた。

オピオイド系薬物の中で、フェンタニル系薬物及び非フェンタニル系であるベンズイミダゾール系薬物が近年北米などで中毒者が増加しており、東京都でも知事指定薬物として規制する薬物が増加している。

知事指定薬物として指定するための生体影響試験には生殖発生毒性は含まれないことから、今回違法薬物の生殖発生毒性を調べるためにオピオイド系違法薬物の催奇形性試験をマウスで実施した。

フェンタニル系薬物の 4Cl-iBF を 0.0 (対照), 0.37, 1.1 及び 3.3 mg/kg 体重/日で、同じくフェンタニル系薬物の 4F-iBF 及び *p*-Methoxybutyrylfentanyl とベンズイミダゾール系薬物の Isotonitazene を 3.3 mg/kg 体重/日で妊娠 7 日目から 12 日目のマウス母体に連続 6 日間腹腔内投与し、妊娠 18 日目に妊娠に関する指標と母体及び胎児への影響を検査した。

全群で妊娠黄体数、着床数、胎児数等の生殖発生毒性の指標及び外表奇形は対照群と比較し有意な増加は認められなかった。いっぽう、胎児体重の減少が Isotonitazene 投与群で見られた。骨格奇形は今回調査した 4 種類すべての被験物質で対照群と比較し腰肋が有意に増加し、Isotonitazene ではその他に頭蓋骨形成遅延、胸骨核の縮小など化骨遅延が見られた。違法薬物の催奇形性試験はこれまで報告が少なく、貴重な情報提供となる。

キーワード: 危険ドラッグ, オピオイド, フェンタニル, 催奇形性試験, 4Cl-iBF, 4F-iBF, *p*-Methoxybutyrylfentanyl, Isotonitazene, マウス

はじめに

東京都は、平成 17 年からこれまでに多くの危険ドラッグに含まれる成分を知事指定薬物として規制しており、東京都健康安全研究センターは未規制薬物を知事指定薬物として規制するための評価資料として生体影響試験を実施してきた。

オピオイド系危険ドラッグには、フェンタニル系とベンズイミダゾール系などいくつかの種類がある。フェンタニル系の薬物は、医療用疼痛緩和薬や麻酔補助剤として用いられているフェンタニルの構造を一部変えたものである。その作用はモルヒネの 50~100 倍、ヘロインの 20~50 倍とも言われている¹⁾。またベンズイミダゾール系である Isotonitazene は、1957 年に最初に報告された鎮痛剤の Etonitazene の構造を一部変えたもので、フェンタニル系薬物よりさらに強い作用を持っている²⁾。

これらのオピオイド系危険ドラッグは単品で使用されるだけでなく、他の麻薬、覚せい剤や危険ドラッグと混合して使用されることもあり、特に北米でここ数十年、急激に濫用が増加し³⁾、中毒者の過剰摂取による死亡が社会問題となっている。これに比例して当センターでもオピオイド系の違法薬物の生体影響試験の実施が増加し、東京都で知事指定薬物として規制されるものが増加している⁴⁾。

使用者の中には妊婦も含まれていると考えられる。オピオイド系薬物は胎盤通過作用も報告されており^{5,6)} 胎児への影響の可能性は高いが、フェンタニル系及びその他のオピオイド系違法薬物の催奇形性は報告が少ない。

知事指定薬物として指定するための生体影響試験には生殖発生毒性は含まれないことから、今回フェンタニル系薬物 3 種類とベンズイミダゾール系薬物 1 種類のオピオイド系違法薬物の生殖発生毒性を調べるため、催奇形性試験をマウスで実施し、それぞれの薬物の生体影響を比較したので結果を報告する。

実験方法

1. 実験動物及び飼育条件

日本チャールスリバー株式会社から Crlj:CD1 (ICR) マウスを 4 週齢で購入し、1 匹/ケージに収容し、室温 23±2 °C、相対湿度 55±5 %、照明 12 時間/日の飼育室で餌と水を自由に摂取させ、7 から 13 週齢 (体重 20 から 34 g) に達した発育良好なものを選び試験に供した。飼育及び動物実験は当センター動物実験実施規程に基づいて、動物実験委員会の事前審査及び承認を受け、その管理の下実施された。

^a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科 (当時)

^c 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科 (現所属)

^d 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

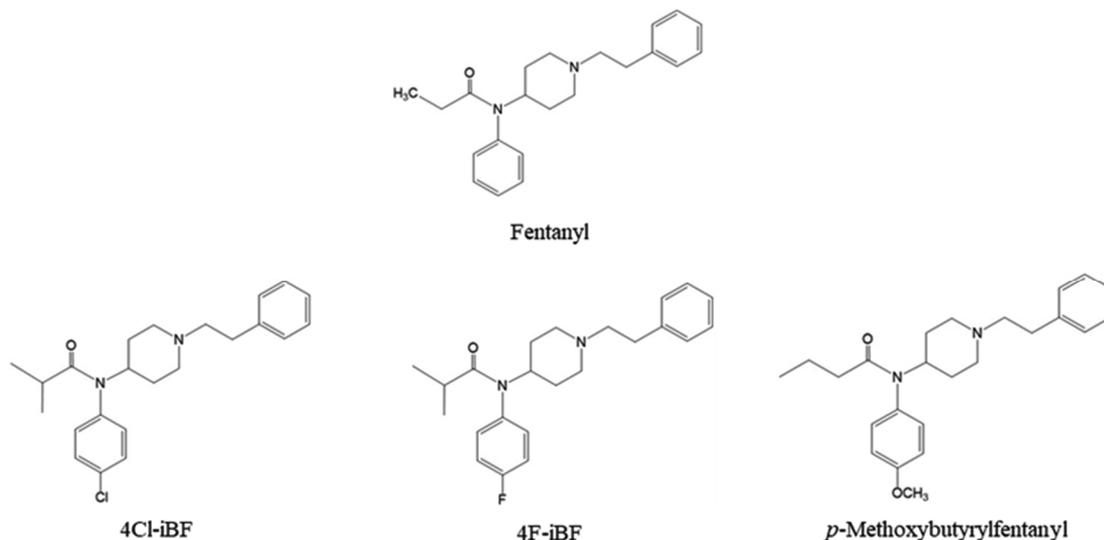


Fig. 1-1. Structural Formula of Illegal Fentanyl Drugs

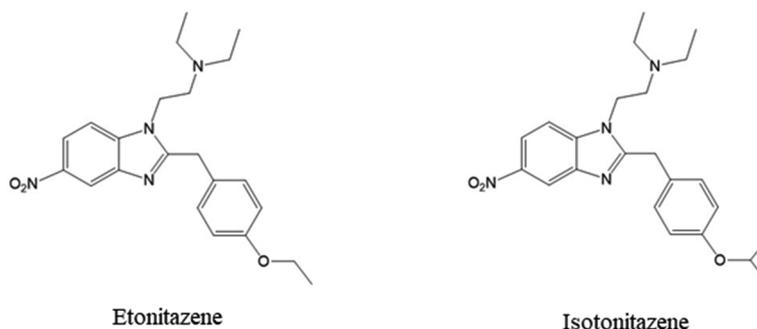


Fig. 1-2. Structural Formula of Illegal Non-Fentanyl Drugs

2. 被験物質及び投与濃度

1) 4Cl-iBF

化学構造をFig. 1-1に示した。4Cl-iBF（以下Clとする）は株式会社ナードで合成された塩酸塩、純度98%以上のものを使用し、緩衝生理食塩水（大塚製薬株式会社）に溶解したものを使用した。用量設定は、事前の予備試験の結果から、Clでは公比3でそれぞれ低用量0.37 mg（以下（L）とする）、中用量 1.1 mg（以下（M）とする）、高用量3.3 mg（以下（H）とする）/kg体重/日の3用量とした。

2) 4F-iBF, p-Methoxybutyrylfentanyl, Isotonitazene

化学構造は Fig. 1-1 及び 1-2 に示すとおりで、4F-iBF（以下 F とする）及び p-Methoxybutyrylfentanyl（以下 P とする）は株式会社ナードで合成された塩酸塩、純度 98% 以上のものを緩衝生理食塩水に溶解し、使用した。Isotonitazene（以下 I とする）は Cayman Chemical 社から購入した純度 98% 以上のものを使用し、溶解補助剤として Kolliphor®ELP（Sigma-Aldrich 社）25% (v/v) を緩衝生理食塩水に溶解し、使用した。これら 3 薬物の投与用量は高用

量（H）のみとして試験を行った。対照群には緩衝生理食塩水を使用した。

3. 実験

マウスに医薬品のフェンタニルを投与した既報^{7,8)}を参考に、膣栓の認められた日を妊娠 0 日目として、妊娠 7 日目から 12 日目の連続 6 日間、腹腔内投与を 1 日 1 回行った。体重及び摂餌量の測定と一般症状観察を毎日行った。

妊娠 18 日目に母体をイソフルラン吸入麻酔下、後腹大動脈からの採血により安楽死させた後直ちに開腹した。子宮内を観察し、着床痕、死亡児頻度（早・後期）、胎児数を数えた。胎児については体重測定、性の判別、外表異常の観察を行い、また母体については卵巣の黄体数を数え、肝臓、腎臓、脾臓、卵巣の重量測定と肉眼的異常の有無を検索した。新鮮血の白血球数（WBC）、赤血球数（RBC）、ヘモグロビン値（HGB）及びヘマトクリット値（HCT）、赤血球恒数（MCV, MCH, MCHC）、血小板数（PLT）を自動血球計測装置（sysmex 社：pocH-100iV）で計数した。

胎児は95% エタノールで1週間以上固定後, 5%水酸化カリウム水溶液で24時間, 5%水酸化カリウム0.002% アリザリンレッドで24時間, 50%グリセリン水溶液処理し骨格染色を行い, 実体顕微鏡で骨格異常の有無を観察した.

4. 統計処理

対照群との比較には多重比較検定のDunnett's test 及びSteel's test を用い, 投与群間の比較にはTukey-Kramer method 及びSteel-Dwass method, 確率の検定はFisher's exact test を使用した. 有意水準は5% 未満とした.

結 果

1. 母体に係る所見

1) 4Cl-iBF : 投与用量による反応性 母体の体重増加率をFig. 2 に, 母体摂餌量をFig. 3 に示す. どちらも対照群との間に推計統計学的有意差は認められなかった.

母体の投与後の一般状態は, 投与直後から濃度依存的にやや自発運動が対照群と比較し増加したが, 投与30分を過ぎると対照群より自発運動が減少し, 鎮静傾眠傾向が見られた. その後2時間を過ぎると対照群と変わらない状態になった. これらの症状はすべての薬物投与群で経日的に減少傾向にあったものの, 投与期間中の6日間全日, 投与したすべての母体マウスで確認された.

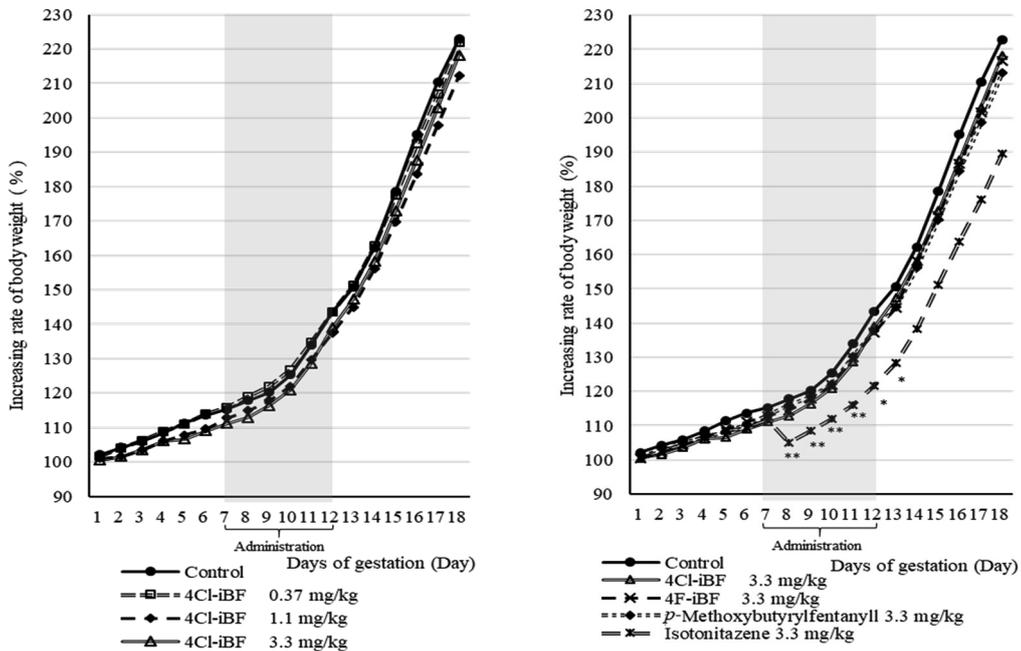


Fig. 2. Increasing Rates of Body Weight with Pair-Feeding (* P < 0.05 ** P < 0.01)

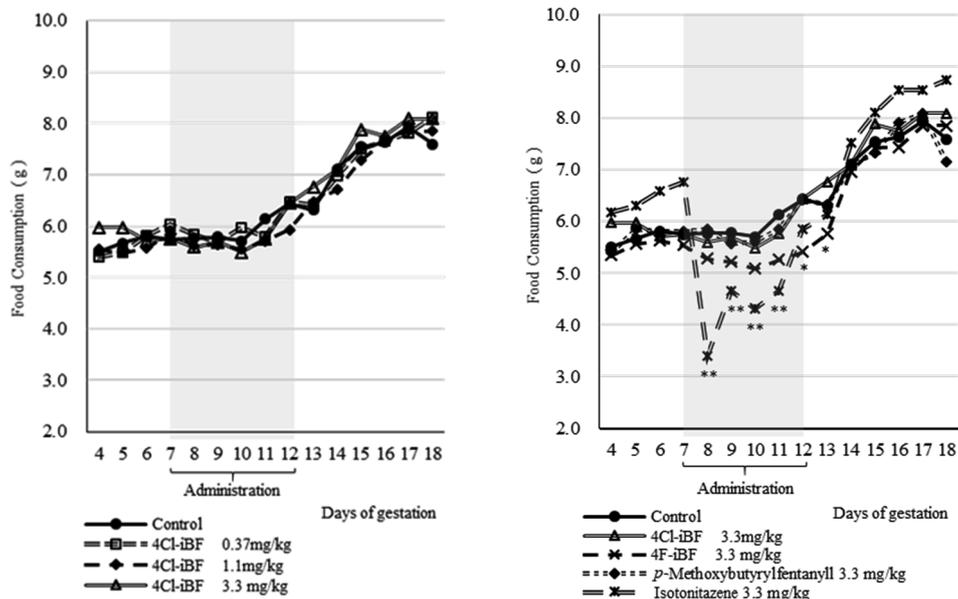


Fig. 3. Food Consumption with Pair-Feeding (* P < 0.05 ** P < 0.01)

Table 1-1. Relative Organ Weight and Hematological Examination Data from Mother Mice (Mean ± SD)

Material mg/kg bw/day	Control 0.0	4Cl-iBF			
		0.37 (L)	1.1 (M)	3.3 (H)	
Number of mother mice	15	15	12	12	
Liver (%)	4.62±0.68	4.59±0.31	4.47±0.30	4.47±0.22	
Kidney (%)	Right	0.37±0.04	0.40±0.07	0.41±0.09	0.39±0.03
	Left	0.35±0.05	0.37±0.06	0.36±0.01	0.35±0.03
	Total	0.72±0.09	0.78±0.12	0.78±0.12	0.74±0.05
Spleen (%)	0.24±0.05	0.25±0.07	0.25±0.04	0.25±0.04	
Ovary (%) total	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	
WBC (x10 ² /μL)	51.0±16.3	51.8±21.0	49.5±9.8	53.1±15.1	
RBC (x10 ⁴ /μL)	732.6±119.1	767.5±74.1	770.9±58.4	781.7±47.8	
HGB (g/dL)	12.0±2.0	12.7±1.4	12.7±0.8	12.8±0.8	
HCT (%)	39.1±6.6	41.1±4.2	41.5±2.5	42.5±3.1	
MCV (fL)	53.4±2.0	53.6±1.5	53.9±1.7	54.3±1.1	
MCH (pg)	16.3±0.6	16.5±0.6	16.5±0.6	16.4±0.4	
MCHC (g/dL)	30.6±0.5	30.8±0.6	30.5±0.49	30.2±0.7	
PLT (x10 ⁴ /μL)	137.9±31.7	133.8±25.5	133.9±17.5	146.9±15.1	

Abbreviation: WBC ; white blood cells, RBC ; red blood cells, HGB ; hemoglobin HCT ; hematocrit, MCV ; mean corpuscular volume, MCH ; mean corpuscular hemoglobin, MCHC ; mean corpuscular hemoglobin concentration, PLT ; platelets
 [Statistical analysis] Relative Organ Weight date : Dunnett-test, Hematological Examination data : Steel-test

Table 1-2. Relative Organ Weight and Hematological Examination Data from Mother Mice (Mean ± SD)

Material mg/kg bw/day	Control 0.0	4Cl-iBF 3.3 (H)	4F-iBF 3.3 (H)	<i>p</i> -Methoxybutyryl fentanyl 3.3 (H)	Isotonitazene 3.3 (H)	
						Number of mother mice
Liver (%)	4.62±0.68	4.47±0.22	4.57±0.29	4.59±0.41	5.28±0.50 ^{*†‡§§}	
Kidney (%)	Right	0.37±0.04	0.39±0.03	0.40±0.03	0.37±0.07	0.43±0.04
	Left	0.35±0.05	0.35±0.03	0.37±0.04	0.39±0.11	0.41±0.05
	Total	0.72±0.09 [§]	0.74±0.05	0.77±0.07	0.84±0.13 [*]	0.84±0.08
Spleen (%)	0.24±0.05	0.25±0.04	0.24±0.08	0.22±0.05	0.23±0.05	
Ovary (%) total	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.01	0.03±0.02	
WBC (x10 ² /μL)	51.0±16.3	53.1±15.1	44.0±13.4	49.4±14.3	40.6±17.3	
RBC (x10 ⁴ /μL)	732.6±119.1 [§]	781.7±47.8	783.0±50.0	831.8±54.0 [*]	706.4±36.5 ^{†‡§§}	
HGB (g/dL)	12.0±2.0	12.8±0.8	12.6±0.7	13.0±0.9	11.2±0.6 ^{†‡§§}	
HCT (%)	39.1±6.6	42.5±3.1	42.4±2.4	43.7±2.8	38.0±2.0 ^{†‡§§}	
MCV (fL)	53.4±2.0	54.3±1.1	54.3±1.5	52.6±1.9	53.8±2.1	
MCH (pg)	16.3±0.6	16.4±0.4	16.2±0.4	15.6±0.7	15.9±0.8	
MCHC (g/dL)	30.6±0.5	30.2±0.7	29.8±0.4	29.7±1.1	29.6±0.8	
PLT (x10 ⁴ /μL)	137.9±31.7	146.8±15.1	143.1±21.4	147.5±10.1	156.9±18.9	

[Statistical analysis] Relative Organ Weight date : Tukey-Kramer method, Hematological Examination data : Steel-Dwass method
 Control vs. ; * P < 0.05, ** P < 0.01 / 4Cl-iBF vs. ; † P < 0.05, ‡ P < 0.01 / 4F-iBF vs. ; ‡ P < 0.05, †† P < 0.01
p-Methoxybutyrylfentanyl vs. ; § P < 0.05, §§ P < 0.01 / Isotonitazene vs. ; || P < 0.05, |||| P < 0.01

剖検時、肉眼的に腎臓の色が対照群に比べやや淡褐色に変化している母体がCI (M) 群 (母体数8/12), CI (H) 群 (4/12) で確認されたが、相対臓器重量や血液学所見に対照群との有意な差は認められなかった。

血液学的所見をTable 1-1 に示す。CI (L), CI (M), CI (H) 群と対照群との間に推計統計学的有意差は認められなかった。

2) 4Cl-iBF, 4F-iBF 及び *p*-Methoxybutyrylfentanyl, Isotonitazene : 投与薬物による反応性

母体の体重増加率を Fig.2 に示す。妊娠0日目の体重を100とした体重増加率は、フェンタニル系のCI (H) 群, F (H), P (H) 群と対照群との間に推計統計学的有意差は認められなかったが、ベンズイミダゾール系のI (H) 群は投与期間中、有意に減少した。

摂餌量を Fig. 3 に示す。フェンタニル系のF (H) 群では6日間の投与期間中、後半の11日目と12日目に有意に減少し、I (H) 群では投与期間中の前半の7日目から10日目の4日間で有意に減少した。

母体の投与後の一般状態の変化は、フェンタニル系のP (H) 群は、CI (H) と同じように投与直後から濃度依存的にやや自発運動が対照群と比較し増加したが、投与30分を過ぎると対照群より自発運動が減少し、鎮静傾眠傾向が認められた。その後2時間を過ぎると対照群と変わらない状態になった。

同じくフェンタニル系のF (H) 群では他のフェンタニル系よりさらに強い自発運動の増加、眼裂、眼球突出、挙尾、異常姿勢が確認されたが、その後2時間を過ぎると対照群と変わらない状態になった。

ベンズイミダゾール系のI (H) 群では投与直後から強いカタレプシー、呼吸抑制、ケージ内での旋回、自発運動の増加、眼裂、眼球突出、挙尾が見られ、経時的にやや減少したものの投与2時間後でも持続した。

剖検時、肉眼的に腎臓の色が対照群に比べやや淡褐色に変化している母体がF (H) 群 (母体数4/12), I (H) 群 (1/12) で確認された。さらにP (H) 群では左右腎臓の相対臓器重量が対照群と比較して有意に増加した。

肝臓に白斑の見られた母体がF (H) 群 (1/12), I (H) 群 (1/8) で確認され、さらにI (H) 群では肝臓の相対臓器重量が対照群及び他の被験物質群すべてと比較して有意に減少した。他にもP (H) 群では肺に赤色点を認める母体 (3/15) が確認された。

血液学的所見をTable 1-2 に示す。薬物の系統の違い (フェンタニル系・イミダゾール系) や構造の違いによる生体影響を評価するために、投与薬物毎に群間比較を行った。CI (H) 及びF (H), I (H) 群の投与群と対照群との間に推計統計学的有意差は認められなかったが、P (H) 群で総赤血球数 (RBC) が対照群と比較し有意に増加した。また、ベンズイミダゾール系のI群では、フェンタニル系のCI, F, P群と比較し、RBC, HGB, HCTがそれぞれ有意に減少した。ただしHGB, HCTの数値の変化は生

理学的変化の範囲内と考えられる。

2. 胎児に係る所見

1) 4Cl-iBF : 投与用量による反応性

(1) 妊娠の成立 妊娠 (着床) を確認した母体はCI (L) 群13/15 (86.7%), CI (M) 群12/12 (100%), CI(H)群12/12 (100%), 対照である緩衝生理食塩水群10/12 (83.3%) で妊娠成立した母体すべてに胎児を認めた。

(2) 妊娠黄体数, 着床数, 胎児数, 死亡児頻度 (早・後期) 及び性比 妊娠黄体数, 着床数, 胎児数, 死亡児頻度 (早・後期) 及び性比をTable 2-1 に示す。各投与群と対照群及びすべての被験物質投与群間に推計統計学的有意差は認められなかった。

(3) 胎児体重 胎児体重をTable 2-1 に示す。CI (L), CI (M), CI (H) 群では対照群と比較して推計統計学的有意差は認められなかった。

(4) 外表面奇形, 変異 胎児の外表面奇形及び変異をTable 3-1 に示す。CI(L)群では開眼 (Open eye) 1, 脳ヘルニア (Exencephaly) 1, 反足 (Club foot) 1 (母体数13), CI (M) 群では、臍ヘルニア (Omphalocele), 左後肢多指 (Polydactyly), 反足1 (12), CI (H) 群では脳ヘルニア1, 反足1, 皮下内出血 (Petechia) 1 (12) 対照群では多指1 (13) が確認されたがCI (L), (M), (H) 群のすべての群で対照群及びそれぞれの投与群間に推計統計学的に有意差は認められなかった。

(5) 骨格奇形, 変異及び骨化骨進行度 胎児の骨格奇形をTable 4-1 に示す。CI (L) では、胸椎弓分離 (Isolated ossification site of the thoracic vertebral arch) (母体数13), CI (M) では肋骨癒合 (Fused rib) 2, 多指・脛骨の縮小, 胸椎弓分離1 (12), CI (H) では仙骨核体癒合 (Fused lumbar vertebral centra) 1 (12) などが確認されたが、これらは対照群と各投与群間で推計統計学的に有意差は認められなかった。

骨格の変異はCI (M), CI (H) 群で対照群と比較し、有意に腰肋 (Thoracolumbar ribs) が増加した。

2) 4Cl-iBF, 4F-iBF, 及び *p*-Methoxybutyrylfentanyl, Isotonitazene : 投与薬物による反応性

(1) 妊娠の成立 妊娠 (着床) を確認した母体はCI (H) 群12/12 (100%), F (H) 群12/12 (100%), P (H) 群15/16, (93.8%) 及びI (H) 群8/8 (100%), 対照である緩衝生理食塩水群10/12 (83.3%) で妊娠成立した母体すべてに胎児を認めた。

(2) 妊娠黄体数, 着床数, 胎児数, 死亡児頻度 (早・後期) 及び性比 妊娠黄体数, 着床数, 胎児数, 死亡児頻度 (早・後期) 及び性比をTable 2-2 に示す。各投与群と対照群及びすべての被験物質投与群間に推計統計学的有意差は認められなかった。

(3) 胎児体重 胎児体重をTable 2-2 に示す。CI (H) 及びF (H), P (H) 群では対照群と比較して推計統計学的有意差は認められなかった。I (H) 群では対照群と比較

Table 2-1. Prenatal Observation Data for Mice Intraperitoneal Administration Treated with 4Cl-iBF on Days 7-12 of Gestation

Material mg/kg bw/day	Control 0.0	4Cl-iBF		
		0.37 (L)	1.1 (M)	3.3 (H)
a Number of female mice mated	15	15	12	12
b Number of female mice died	0	0	0	0
c Number of female mice gestated	13	13	12	12
d Number of mother mice with live fetuses	13	13	12	12
e Number of corpora luted Mean	13.7 ±2.1	13.9±2.8	12.9±2.1	13.7±1.9
f Number of implants Mean	13.4 ±2.5	13.2±3.4	12.4±1.8	13.3±1.9
g Percent resorption of fetuses (%) #				
total	1.23 ±1.36	0.77±1.09	1.00±1.41	0.92±0.79
1) early	0.69±0.85	0.62±0.77	1.00±1.41	0.75±0.75
2) late	0.54±0.88	0.15±0.38	0	0.17±0.39
h Number of live fetuses	12.1±3.1	12.5±3.6	11.4±2.4	12.3±1.6
i Sex ratio ♂/♀ #	165.5±122.7	131.5±65.9	118.8±83.6	106.0±67.7
j Body weight of live fetuses Mean #				
Male	1.46±0.10	1.46±0.11	1.44±0.12	1.44±0.07
Female	1.40±0.09	1.39±0.13	1.39±0.12	1.40±0.05

a. Number of female mice confirmed for vaginal plug

b. Died cases up to the killed time after copulation

c. Number of female mice with implantation sites

d. Number of dams with more than one living fetus

e-j. Calculated with the dam(d) with living fetus (Mean ± SD)

g-1). Cases showing implanted sites and amorphous germinal mass (Mean ± SD)

g-2). Cases showing the head and limbs (Mean ± SD)

i. (M/F+M)*100 (Mean ± SD)

Value of group was obtained by averaging the percentages of each litter

[Statistical analysis] a-d: Fisher's exact test, e-j : Dunnett test

Table 2-2. Prenatal Observation Data for Mice Intraperitoneal Administration Treated with Illegal 4 Drugs on Days 7-12 of Gestation

Material mg/kg bw/day	Control 0.0	4Cl-iBF	4F-iBF	p-Methoxy butyrfentanyl	Isotonitazene
		3.3 (H)	3.3 (H)	3.3 (H)	3.3 (H)
a Number of female mice mated	15	12	12	16	8
b Number of female mice died	0	0	0	0	0
c Number of female mice gestated	13	12	12	15	8
d Number of mother mice with live fetuses	13	12	12	15	8
e Number of corpora luted	13.7 ±2.1	13.7±1.9	13.3±1.8	14.7±2.7	15.1±1.5
f Number of implants	13.4 ±2.5	13.3±1.9	12.3±1.5	13.1±3.2	13.9±2.1
g Percent resorption of fetuses (%) #					
total	1.2 ±1.4	0.9±0.9	0.9±0.8	1.2±1.1	1.9±1.7
1) early	0.7±0.9	0.8±0.8	0.8±0.7	1.1±1.1	1.8±1.8
2) late	0.5±0.9	0.2±0.4	0.1±0.3	0.1±0.4	0.1±0.4
h Number of live fetuses	12.2±3.1	12.3±1.6	11.3±1.2	12.1±3.5	12.0±2.8
i Sex ratio ♂/♀ #	165.5±122.7	106.0±67.7	109.7±55.7	172.4±168.7	117.9±68.1
j Body weight of live fetuses Mean #					
Male	1.46±0.10	1.44±0.07	1.41±0.10	1.50±0.16	1.28±0.17
Female	1.40±0.09	1.40±0.05	1.38±0.15	1.42±0.15	1.22±0.18

[Statistical analysis] a-d : Fisher's exact test, e-j : Tukey-Kramer method

し雌雄の胎児体重で、P (H) 群と比較し雌の胎児体重が有意に減少した。

(4) 外表奇形, 変異 胎児の外表奇形, 変異を Table 3-2 に示す。Cl (H) 群では脳ヘルニア 1, 反足 1, 皮下内出血 1 (母体数 12), P (H) 群では反足 1 (15), F (H) 群では外表奇形は確認されなかった。I (H) 群では開眼 1, 少指 1, 反足 1, 皮下内出血 2 (8) が見られた。対照群では多

指 1 (13) が確認された。Cl (H) 及び F (H), P (H), I (H) 群のすべての群で対照群及びそれぞれの投与群間に推計統計学的に有意差は認められなかった。

(5) 骨格奇形, 変異及び化骨進行度 胎児の骨格奇形を Table 4-2 に示す。Cl (H) 仙骨核体癒合 1 (母体数 12), F (H) 胸骨分節配列異常, I (H) 少指 1, 鎖骨形成不全 1 (8) などが確認されたが、対照群各々の投与群間で推計

Table 3-1. External Observation Data for Mice Intraperitoneal Administration Treated with 4Cl-iBF on Days 7-12 of Gestation

Material	mg/kg bw/day	Control	4Cl-iBF		
			0.0	0.37 (L)	1.1 (M)
k	Number of fetuses examined	158	163	137	147
l	Malformation Percent malformation # (%)	1.3±4.6	2.9±7.1	0.8±2.6	2.1±5.4
m	Type & number of affected				
	1) Exencephaly	0	1	0	1
	2) Open eye	0	1	0	0
	3) Omphalocele	0	0	1	0
	4) Polydactyly	1	0	1	0
n	Other anomalies Percent anomalies # (%)	0.51±0.02	2.49±0.05	0	1.31±0.03
	1) Club foot	0	4	0	1
	2) Petechia	1	0	0	1

n. Direction anomalies of tail and limbs, hematoma, edema and others (Mean ± SD)

Value of group was obtained by averaging the percentages of each litter

[Statistical analysis] l: Steel test, m,n : Fisher's exact test

Table 3-2. External Observation Data for Mice Intraperitoneal Administration Treated with Illegal 4 Drugs on Days 7-12 of Gestation

Material	mg/kg bw/day	Control	4Cl-iBF	4F-iBF	<i>p</i> -Methoxybutyryl fentanyl	Isotonitazene
k	Number of fetuses examined	158	147	136	182	98
l	Malformation Percent malformation # (%)	1.3±4.6	2.1±5.4	0	1.0±2.6	5.1±5.9
m	Type & number of affected					
	1) Exencephaly	0	0	0	1	1
	2) Open eye	0	0	0	0	0
	3) Omphalocele	1	0	0	0	0
	4) Polydactyly	0	0	0	0	1
n	Other anomalies Percent anomalies # (%)	0.51±0.02	1.31±0.03	0	0.51±0.02	3.04±0.04
	1) Club foot	0	1	0	1	1
	2) Petechia	1	1	0	0	2

[Statistical analysis] l, n : Steel-Dwss method, m,n-1, 2) : Fisher's exact test

統計学的に有意差は認められなかった。

骨格の変異は Cl (H), F (H), P (H), I (H) 4 群すべてで対照群と比較し、有意に腰肋が増加した。

さらにI (H) 群では頭骨形成遅延 (Unossified Skull) が対照群及びP群と比較し有意に増加し、胸骨核の縮小

(Accessory of sternebra) が対照群と比較し増加し、化骨進行度の低下が予想される。また頸肋 (Cervical rib) 及び腰椎数異常 (Absent & Supernumerary lumbar vertebrae) がP群と比較し有意に増加した。

考 察

母体の投与後の一般状態の症状はすべての投与群で経日的に減少傾向にあったものの、投与期間中の6日間において、投与したすべての母体マウスで確認された。これらの症状は予備試験で雌の Crl:CD1 (ICR) マウス 8 週齢に 1.1 mg/kg, 11.1 mg/kg, 27.5 mg/kg 体重を腹腔内に投与した時の行動観察の結果と類似傾向にあった^{9,10)}。

母体剖検時、肉眼的所見の肝臓の白斑や Cl, F 及び I 群

での腎臓の色の淡褐色変化や肺の出血などは被験物質の影響によるものと考えられる¹¹⁾。

今回の被験物質である Cl, F 及び P はフェンタニル系違法薬物であり、フェンタニルと構造的にかなり類似している。Sprague-Dawley ラットにフェンタニルを妊娠前及び妊娠中の2週間持続投与した試験では催奇形性は確認されなかったが¹¹⁾、JBT/Jd マウスにフェンタニルを 12~16 mg/kg 皮下投与した試験では、胚に脳ヘルニアや脊髄のねじれ、脳室の拡大などがわずかに確認されている¹²⁾。さらにマウスとラットにフェンタニルを投与 (0.08, 0.15, 0.3 mg/kg 体重/日) した試験ではマウスの外表異常で口蓋裂、開眼が、骨格では肋骨、胸椎骨の奇形が、ラットで頸骨、尾椎骨の奇形の発生を予測する結果が報告されている⁷⁾。

今回使用した Cl 群では腰肋が対照群と比較し有意に増加した。さらに有意差は認められなかったものの、開眼、脳ヘルニア、反足などの外表が、骨格では肋骨の分岐、胸椎弓の分離、腰椎核分離などが数例確認され、既報⁷⁾で報告されている研究結果とも類似していた。しかし同じハロ

ゲン類が置換しているF群，官能基の電子吸引性や分岐が違うP群では外表奇形は確認されず，同じような構造であったとしても薬物によって催奇形性への反応性が違うであろう事が予測される結果となった。ただし，I群で確認された頸肋・腰肋などの異常はICR系のマウスで自然発生的に頸肋は23%，腰肋は10.1%確認されている¹⁵⁾ため，今回の結果はそれほど頻度が高いとは考えられない。

今回調査した4種類すべてのオピオイド系違法薬物ではフェンタニルやその他のオピオイドでは確認されていないような重大かつ頻度の高い催奇形性は確認されなかった。今回の調査結果から，違法薬物の構造の違い，投与による行動変化・呼吸抑制，腎臓・肝臓等の母体への影響が異なることが分かった。しかし催奇形性の発現の有無や頻度によりにどのように影響したのかは不明であった。催奇形性の作用機序の解明は難しいと考えられ，今回投与した薬物の胎盤透過性や胎児への移行をはじめ，オピオイド系違法薬物による発生毒性の作用機序に関するデータ蓄積が今後望まれる。違法薬物の催奇形性情報は少なく，重要な知見の提供になるため，今後も調査を進めたい。

ま と め

違法薬物の生殖発生毒性を調べるためにオピオイド系違法薬物の催奇形性試験をマウスで実施した。フェンタニル系の4Cl-iBFは，0.0（対照），0.37，1.1及び3.3 mg/kg体重/日を，フェンタニル系薬物の4F-iBF，*p*-Methoxybutyrylfentanyl及びベンズイミダゾール系のIsotonitazeneは3.3 mg/kg体重/日を妊娠7日目から12日目のマウス母体に連続6日間腹腔内投与し，妊娠18日目に妊娠に関する指標と胎児及び母体への影響を検査した。

p-Methoxybutyrylfentanylを投与した母体において，対照群と比較し赤血球数の増加，腎臓の相対重量比の増加が見られた。Isotonitazeneを投与した母体では投与期間中の摂餌量が減少し，肝臓の相対重量比が減少した。ベンズイミダゾール系薬物のIsotonitazeneでは対照群と比較し，胎児の体重の減少が見られた。骨格奇形は4種類すべてで対照群と比較し腰肋が有意に増加し，Isotonitazeneではさらに頭蓋骨形成不全，胸骨核の縮小，腰椎後椎骨平均数の減少などの化骨遅延が見られた。外表奇形は全群で対照群と比較し有意な増加は認められなかった。

Table 4-1. Skeletal Observation Data for Mice Intraperitoneal Administration Treated with 4Cl-iBF on Days 7-12 of Gestation

	Material mg/kg bw/day	Control			
		0.0	0.37 (L)	1.1 (M)	3.3 (H)
k	Number of fetuses examined	158	163	137	147
o	Malformation				
p	Variation				
	Type & number of fetuses affected				
	1) Isolated ossification site of the thoracic vertebral arch	0	2	1	0
	2) Fused & branched rib	0	0	2	0
	3) Fused lumbar vertebral centra	0	0	0	1
q	Other anomalies				
	1) Unossified Skull	0	1.2±2.8	0	0.8±2.6
	2) Asymmetry of sternebra	10.5±10.2	14.4±13.0	6.7±7.5	15.7±11.6
	3) Accessory of sternebra	1.2±3.0	15.8±3.0	7.1±12.6	4.9±8.5
	4) Cervical rib	17.9±22.9	18.5±14.7	21.4±21.4	24.8±26.4
	5) Thoracolumbar ribs	1.5±5.5	18.7±29.6**	30.2±22.5**	25.0±19.8**
	6) Isolated & branched of atlas & cervical	7.2±11.2	4.0±10.2	7.5±8.3	8.3±8.4
	7) Absent & supernumerary lumbar vertebrae	12.2±17.2	0	0	8.4±14.4
	8) Separated or defectived development sternebrae	1.3±3.2	4.2±7.1	4.7±5.2	13.0±20.2
r	Ossification				
	1) Mean number of ossified fore limb phalanx	2.6±0.5	2.9±0.4	2.8±0.5	2.6±0.3
	2) Mean number of ossified hind limb phalanx	2.6±0.4	2.9±0.6	2.8±0.5	2.5±0.2
	3) Mean number of ossified post lumbar vertebrae	12.0±1.3#	11.2±2.4	12.2±1.4	11.6±1.4

p-2). Cases showing deviation over 1/2 of length of maximum sternal nucleus between left and right nuclei (Mean ± SD)

q-5). Definition of lumbar rib was based on Kimmel and Wilson (Teratology, 8, 309-316, 1973) (Mean ± SD)

r-2). [(Pro.+Mid.)/2] (Mean± SD) r-3). Sum of numbers of ossificated sacral and coccygeal vertebrae (Mean± SD)

Value of group was obtained by averaging the percentages of each litter

[Statistical analysis] o, q, r : Steel test, p : Fisher's exact test / Control vs. : * P < 0.05, ** P < 0.01

Table 4-2. Skeletal Observation Data for Mice Intraperitoneal Administration Treated with Illegal 4 Drugs on Days 7-12 of Gestation

Material		Control	4Cl-iBF	4F-iBF	p-Methoxybutyryl fentanyl	Isotonitazene
mg/kg bw/day		0.0	3.3 (H)	3.3 (H)	3.3 (H)	3.3 (H)
k	Number of fetuses examined	158	147	136	182	98
o	Malformation Percent malformation (%)	0	0.01±0.02	0.01±0.02	0.01±0.02	0.01±0.03
p	Variation Type & number of fetuses affected					
	1) Isolated ossification site of the thoracic vertebral	0	0	0	0	0
	2) Fused & branched rib	0	0	0	0	0
	3) Fused lumbar vertebral centra	0	1	1	0	0
q	Other anomalies					
	1) Unossified skull	0	0.8±2.6	2.9±7.5	0	5.9±8.1 ^{**†}
	2) Asymmetry of sternebra	10.5±10.2	15.8±11.6	15.8±11.6	12.0±15.6	23.2±12.8
	3) Accessory of sternebra	1.2±3.0	4.9±8.5	2.3±4.0	1.0±2.5	0
	4) Cervical rib	17.9±22.9	24.8±26.44	10.1±10.9 [#]	19.2±22.5	44.6±26.3
	5) Thoracolumbar ribs	1.5±5.5	25.0±19.8	26.3±23.0	16.7±15.1	43.0±30.3
	6) Isolated & branched of atlas & cervical	7.2±11.2	8.3±8.4	5.6±5.8	4.1±5.7	17.1±18.7
	7) Absent & supernumerary lumbar vertebrae	12.2±17.2	8.4±14.4	12.5±14.8	9.1±17.4	0
	8) Separated or defectived development sternebrae	1.3±3.2	13.0±20.2	12.7±26.3	8.8±19.4	24.8±32.5
r	Ossification					
	1) Mean number of ossified fore limb phalanx	2.6±0.5	2.6±0.3	2.7±0.4	2.9±0.5	2.8±0.9
	2) Mean number of ossified hind limb phalanx	2.6±0.4	2.5±0.2	2.6±0.4	2.8±0.6	2.3±1.3
	3) Mean number of ossified post lumbar vertebrae	12.0±1.3	11.6±1.4	12.0±1.3	12.1±1.7	9.9±1.7

[Statistical analysis] o, q, r : Steel-Dwass method, p : Fisher's exact test

Control vs. : * P < 0.05, ** P < 0.01 / 4Cl-iBF vs. : † P < 0.05, †† P < 0.01 / 4F-iBF vs. : ‡ P < 0.05, ‡‡ P < 0.01
p-Methoxybutyrylfentanyl vs. : § P < 0.05, §§ P < 0.01 / Isotonitazene vs. : || P < 0.05, ||| P < 0.01

謝辞 本研究を実施するにあたり、被験物質を分与頂いた東京都福祉保健局健康安全部薬務課に深謝します。

文 献

- 特定営利活動法人日本緩和医療学会, 緩和医療ガイドライン作成委員会 (編集): がん疼痛の薬物療法に関するガイドライン, 第3版, 2020, 金原出版株式会社, 東京
- Blanckaert, P., Cannart, A., Uytendaele, K.V., et al.: *Drug Testing and Analysis*, **12**, 422-430, 2020.
- Latkin, A.C., Dayton, L., Davey-Rothwell, A.M., et al.: *Subst Use Misuse*, **54**, 998-1006, 2019.
- 東京都福祉保健局ホームページ, 危険ドラッグ対策, これまでの調査結果, <https://www.fukushihoken.metro.tokyo.lg.jp/index.htm> (2021年6月21日現在. なお本URLは変更または未梢の可能性ある)
- フェンタニル注射液「ヤンセン」添付文書, ヤンセンファーマ株式会社, 2018改訂.
- 川瀬小百合, 橋一也: 日臨麻会誌, **38**, 542-547, 2018.
- タラモナル®静注文書, 第一三共株式会社, 2020.4改訂.
- 日本医薬品集フォーラム (監修): 日本医薬品集 医療薬, 2009年版, 1715-1716, 2009, 株式会社じほう, 東京.
- 猪又明子, 小野恭司, 小縣昭夫, 他: 東京健安研七年報, **68**, 25-40, 2017.
- 日本先天異常学会用語委員会 (編集): 実験動物発生異常アトラス, 2015, 薬事日報社, 東京.
- 多田幸恵, 高橋 博, 湯澤勝廣, 他: 東京健安研七年報, **67**, 901-907, 2016.
- FUJINAGA, M., STEVENSON, B.J., MAZZE, I.R., *TERATOLOGY*, **34**, 51-57, 1986.
- L.V.H. Martin, A. Jurand: *Anaesthesia*, **47**, 473-476, 1992.
- Harpel, S.H.Jr., Ronald F. Gautieri, R.F.: *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **57**, 1590-1597, September, 1968.
- JURAND, A.: *Develop Growth and Differ*, **22**, 61-78, 1980.
- 安田峯生, 山村英樹, 勝矢珉雄: 日本先天異常学会会報, **4**, 97-98, 1964.

A Preliminary Study for the Teratogenic Effects of Four Illegal Opioids in Mice

Yuko HASEGAWA^a, Hiroshi ANDO^a, Yoshikazu KUBO^a, Motoki HOJO^a, Jin SUZUKI^a, Akiko INOMATA^a and Takako MORIYASU^a

Since 2005, the Tokyo Metropolitan Government has been cracking down on many illegal drugs. The Tokyo Metropolitan Institute of Public Health has also conducted biological effects tests as evaluation materials for regulating unregulated drugs, as designated by the governor. However, these tests do not include teratogenicity. As such, we studied the fetal teratogenic response to four types of illegal opioids in pregnant mice during the critical periods of central nervous system organogenesis.

Mice were given 4Cl-iBF repeated intraperitoneally at 0.37, 1.1, and 3.3 mg/kg body weight /day and 4F-iBF, *p*-methoxybutyrylfentanyl, and isotonitazene at 3.3 mg/kg body weight /day ; this was repeated six times from 7th during gestation to 12th. All fetuses were removed from the uterus on day 18th of gestation, and examined for external and skeletal anomalies.

The group of mothers treated with *p*-methoxybutyrylfentanyl during days 7th–12th of gestation had an increased amount of red blood cells in their blood, and those treated with isotonitazene had a reduced liver weight, compared to the control group.

The group of fetuses treated with isotonitazene had a reduced fetal body weight, compared to the control group, and skeletal malformations in the thoracolumbar ribs were increased with all four drugs types, compared to the control group. Moreover, the group treated with isotonitazene had more delayed ossification (unossified skull and accessory of sternbrae) and cervical rib. However, all types of illegal drugs tested in this study had no effect on external malformation.

Keywords: illegal drug, opioid, fentanyl, teratogenicity, 4Cl-iBF, 4F-iBF, *p*-methoxybutyrylfentanyl, isotonitazene, mice

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan