

Brompton Mixture の微生物汚染対策

尾家重治, 高浜清子, 弘長恭三, 神代 昭

山口大学医学部附属病院薬剤部*

Control Method for Microbial Contamination of Brompton Mixture

SHIGEHARU OIE, KIYOKO TAKAHAMA, KYOZO HIRONAGA, and AKIRA KOSHIRO

Department of Pharmacy, Yamaguchi University Hospital*

(Received April 11, 1988)

Brompton mixture has been widely used for cancer patients to control pain. This mixture originally consists of morphine HCl, cocaine HCl, simple syrup, ethyl alcohol, chloroform and water. In Japan, chloroform is omitted and ethyl alcohol is occasionally removed from the original prescription. Because this mixture is a medicine for cancer patients, great attention should be paid to microbial contamination. But it has not been investigated on the preservative efficacy of Brompton mixture, yet. Thus, the preservative efficacy of Brompton mixture was studied.

Brompton mixtures with various compositions were challenged with 1×10^6 cells/ml each of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* or *Pseudomonas aeruginosa* or 1×10^5 cells/ml of *Candida albicans* or 1×10^5 spores/ml of *Aspergillus niger*. Samples were taken on day 1, 2, 7, 14 and 28 during storage at 25°C for determining viable counts of the organisms. The preservative efficacy of Brompton mixture was assessed by a slightly modified British Pharmacopoeia (B.P.) standard; The number of *S. aureus*, *E. coli* and *P. aeruginosa* recovered per ml is reduced by less than 10^3 within forty-eight hours of challenge, and there is no increase thereafter. The number of *C. albicans* recovered per ml is reduced by less than 10^2 within fourteen days of challenge, and there is no increase thereafter. In the case of *A. niger*, there is no budding of spores during twenty-eight days of challenge.

The modified B.P. standard was achieved by Brompton mixtures containing ethyl alcohol at concentrations above 8%, but not by mixtures containing no or less than 5% of ethyl alcohol. Then, the effect of preservative agents, parahydroxybenzoates on these inadequately preserved mixtures was studied. The modified B.P. standard was achieved by mixtures with 0.06% methylparaben, 0.03% ethylparaben and 0.01% propylparaben, but not 0.05% ethylparaben or 0.09% methylparaben and 0.01% propylparaben.

It is desired that Brompton mixtures containing no or less than 5% ethyl alcohol should include 0.06% methylparaben, 0.03% ethylparaben and 0.01% propylparaben for protecting microbial contamination.

Keywords—Brompton mixture; morphine; ethyl alcohol; microorganism; contamination; parahydroxybenzoate; preservative

緒 言

英国の Brompton Chest Hospital にその名を由来する Brompton mixture (以下 BM 液と略す) は、癌性

疼痛に対する内用鎮痛剤として、わが国でも広く用いられている。

BM 液の英国での当初の処方箋は、Fig. 1 (a) に示すように、モルヒネ、コカイン、エタノール、単シロップ、クロロホルム及び水より成っていた。これらの成分のうち、エタノール及びクロロホルムは保存剤であり¹⁻³⁾、また単シロップもこれら保存剤との併用で BM 液の防腐

* 宇部市小串1144; 1144, Kogushi, Ube-shi, 755 Japan

morphine HCl	morphine HCl	morphine HCl
cocaine HCl	cocaine HCl	cocaine HCl
ethanol	ethanol	simple syrup
simple syrup	simple syrup	
chloroform		
(a)	(b)	(c)

Fig.1. The Compositions of Brompton mixture in England (a) and Japan (b, c)

効果の増強に寄与⁴⁾していると推定される。したがって、本処方⁵⁾のBM液では、経口剤として好ましくない微生物汚染は生じないと思われる。しかしながら、わが国では近年クロロホルムを内用液剤の成分として用いなくなっている⁶⁾ので、BM液にクロロホルムを加えない⁷⁾うえ (Fig. 1 (b)), 最近、味覚や刺激性などの点^{2,5,6)}から、エタノールを除いた処方も増加してきた (Fig. 1 (c))。このことは、BM液の交付から服薬終了までの微生物汚染を懸念させるものである。一方、BM液を服用する患者は易感染状態にあるので、本液の高濃度汚染や、緑膿菌などの菌による汚染は避けなければならない。

BM液の微生物汚染防止に関する報告の見あたらない現状において、われわれは各種組成のBM液の防腐効果を調べ、また防腐効果不十分な場合のパラベン添加についての検討を行ったので報告する。

実験材料と方法

1. 使用菌株

Staphylococcus aureus 209P, *Escherichia coli* NIHJ JC-2, *Pseudomonas aeruginosa* IFO3919, *Candida albicans* IFO1386 及び *Aspergillus niger* IFO 4407 の計5株を用いた。これら菌株はいずれも財団法人発酵化学研究所より購入した。

2. 使用薬剤

塩酸モルヒネ及び塩酸コカイン (いずれも武田薬品工業⁸⁾製) は、山口大学でBM液の調製に用いているものと同じ処方の次に示すような10%の散剤を製して実験に供した。

10%塩酸モルヒネ散	
塩酸モルヒネ	10 g
0.1%青色1号乳糖	2 g
乳 糖	適量
全量	100 g
10%塩酸コカイン散	
塩酸コカイン	10 g
0.1%赤色106号乳糖	2 g
乳 糖	適量
全量	100 g

なお、青色1号及び赤色106号はいずれも東京化成⁹⁾製を、乳糖は吉田製薬¹⁰⁾製のものを用了。

パラオキシ安息香酸メチルエステル、パラオキシ安息香酸エチルエステル及びパラオキシ安息香酸プロピルエステル (以下、それぞれメチルパラベン、エチルパラベン及びプロピルパラベンと略す) は半井化学¹¹⁾の試薬特級を用いた。また、エタノールは関東化学¹²⁾の試薬特級 (99.5%)、単シロップは丸石製薬¹³⁾製の局方品、または水は滅菌精製水 (光製薬) を用了。

なお、以下の報文中の単シロップの濃度表示は、上記の日局単シロップを100%とみなして表した。

3. Brompton mixture の処方

Table 1 に示した1)~10)の処方のBM液を調製した。これらは繁用されているBM液処方である。

4. パラベン添加 Brompton mixture の処方

用いたパラベン溶液は5%エチルパラベン、9%メチルパラベン+1%プロピルパラベン、及び6%メチルパラベン+3%エチルパラベン+1%プロピルパラベンの3種である。これらのパラベン溶液の調製は、所定量のパラベンにエタノールを加えて全量100mlとした。

パラベン添加BM液の調製は、上記パラベン溶液 0.1 ml を、防腐効果をまったく示さなかった Table 1 の10) 処方 (モルヒネ、コカイン及び水) のBM液 9.8ml に加えて行った。これらに菌液 0.1ml を加えるので、パラベン濃度はBM液中でそれぞれ 1/100 となる。

Table 1. The Compounds of Brompton Mixture Used

Mixture No.	1)	2)	3)	4)	5)	6)	7)	8)	9)	10)
Constitute										
Morphine HCl	100mg	"	"	"	"	"	"	"	"	"
Cocaine HCl	50mg	"	"	"	"	"	"	"	"	"
Ethanol	12.5ml	12.5ml	10ml	10ml	8ml	8ml	5ml	5ml	—	—
Simple syrup	25ml	—	25ml	—	25ml	—	25ml	—	25ml	—
Water ad.	100ml	"	"	"	"	"	"	"	"	"

5. 試験液の調製

S. aureus, *E. coli* 及び *P. aeruginosa* ではトリプチケースソイ・アガル® (BBL, USA) で 30°C, 24時間培養の菌体を白金耳でかき取り, 生理食塩液で約 10⁸個/ml の菌液を調製した. *C. albicans* ではサブロー寒天培地で 30°C, 48時間培養後約 10⁷個/ml の菌液を調製した. また, *A. niger* ではサブロー寒天培地で 25°C, 7日間培養の菌体を生理食塩液に懸濁し, これを滅菌ガーゼでろ過して約 10⁷ 個/ml の孢子懸濁液を得た.

6. 生菌数の測定

各種処方の BM 液 9.9ml に 5 種の菌液のそれぞれ 0.1 ml をチャレンジし, 25°C で 1, 2, 7, 14 及び 28 日後に生菌数を希釈法により測定した. 生菌数測定用培地としては, それぞれの菌の増菌用培地と同一のものをを用いた. しかし, パラベン添加 BM 液が試験液の場合は, パラベンを不活化するため, 細菌では SCDLP 寒天培地, 真菌では GPLP 寒天培地(いずれも日本製薬㈱製)を用いた. なお, 生菌数測定の際, 生菌数が 12.5% エタノール, 25% 単シロップ及び両者の存在によって影響を受けないことを, *S. aureus* を用いて確認した.

7. 防腐効果の判定

わが国には内用液剤の防腐効果の規定はないので, *A. niger* 以外は British Pharmacopoeia (B.P. 1980) の規定⁷⁾ を用いた. すなわち, 「細菌では 48 時間目までにチャレンジ菌が 0.1% 以下に減少, 以後増加を認めない. 真菌では 14 日目までに 1% 以下となつて, 以後増加を認めない.」*A. niger* に対しては, B.P. の規定はやや厳しすぎるとの意見もあり⁸⁾, 28 日目まで出芽しなければ

ば適とした. なお, 出芽の有無は肉眼で判定した.

したがって, *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* 及び *C. albicans* では, B.P. の規定に合致した場合, また *A. niger* では出芽しない場合にそれぞれ「防腐効果は十分」とした. これら 5 種の菌すべてに対し防腐効果が十分な内用液剤は, 通常の取扱いであれば, 服用期間中に何ら微生物学的な問題は生じないと推定される. なお, BM 液の処方日数は 7 日以内が多い.

結 果

1. 各種 Brompton mixture 中での微生物の動態

S. aureus では Table 1 の 8), 9) 及び 10) の処方で, チャレンジ菌が 48 時間目までに 0.1% 以下にならず防腐効果は不十分であったが, その他の処方では効果は十分であった. すなわち, エタノールが 8% 以上, またはエタノール 5% + 単シロップ 25% が含まれていれば BM 液の防腐効果は十分であった.

E. coli では *S. aureus* の場合と同様で, 8), 9), 10) の処方で防腐効果は不十分であった.

P. aeruginosa では Table 2 に示したように, 7), 8), 9) 及び 10) の処方で防腐効果は不十分であったが, その他の処方では効果は十分であった. すなわち, エタノールが 8% 以上含まれていれば単シロップの有無にかかわらず防腐効果は十分であった.

C. albicans では処方 7), 8), 9) 及び 10) で, チャレンジ菌が 14 日目までに 1% 以下とならず防腐効果は不十分であったが, 他の処方では効果は十分であった.

A. niger では, 処方 8), 9) 及び 10) で, チャレンジ

Table 2. Survival of *Pseudomonas aeruginosa* in Various Kinds of Brompton Mixture during Storage at 25°C

Mixture No.	Ethanol(%)	Syrup(%)	Percentage(%) of inoculum surviving after:				
			0	1 day	2 days	7 days	14 days
1)	12.5	25	100	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
2)	12.5	—	100	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
3)	10	25	100	< 0.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
4)	10	—	100	0.6	< 0.1	< 0.1	< 0.1
5)	8	25	100	2.1	< 0.1	< 0.1	< 0.1
6)	8	—	100	9.3	< 0.1	< 0.1	< 0.1
7)	5	25	100	20.7	1.2	< 0.1	< 0.1
8)	5	—	100	28.7	6.0	< 0.1	< 0.1
9)	—	25	100	40.7	41.6	16.2	26.8
10)	—	—	100	19.4	28.7	60.1	69.4

Brompton mixtures contain morphine HCl(1mg/ml) and cocain HCl(0.5mg/ml) with or without ethanol and syrup.

Inoculum size: 10⁶ viable cells/ml in test solution.

Table 3. Growth of *Aspergillus niger* in Various Kinds of Brompton Mixture during Storage at 25°C

Mixture No.	Ethanol(%)	Syrup(%)	1 day	2 days	7 days	14days	28days
1)	12.5	25	— ^a	—	—	—	—
2)	12.5	—	—	—	—	—	—
3)	10	25	—	—	—	—	—
4)	10	—	—	—	—	—	—
5)	8	25	—	—	—	—	—
6)	8	—	—	—	—	—	—
7)	5	25	—	—	—	—	—
8)	5	—	—	—	—	+ ^b	+
9)	—	25	—	+	+	+	+
10)	—	—	—	—	+	+	+

Inoculum size; 10⁵ spores/ml in test solution.—^a: No growth, +^b: Growth

胞子が14日目までに発芽して防腐効果不十分であったが、他の処方では28日目まで発芽せず効果は十分であった (Table 3).

以上、BM 液に 8 %以上のエタノールが含まれていれば、用いた 5 種の菌すべてに対し防腐効果は十分であった。

2. パラベン添加 Brompton mixture 中での微生物の動態

S. aureus では 0.05% エチルパラベン、0.09% メチル + 0.1% プロピルパラベン、または 0.06% メチル + 0.03% エチル + 0.01% プロピルパラベンのいずれかを添加した処方 10) の BM 液はすべて、48 時間目までにチャレンジ菌は 0.1% 以下となり以後増加を認めなかった (Table 4). *E. coli* 及び *P. aeruginosa* も *S. aureus* と同様であった。したがって、*S. aureus*, *E. coli* 及び *P. aeruginosa* に対しては、3 種類の組合せのパラベン添加 BM

液の防腐効果はいずれも十分であった。

Table 5 に示したように、*C. albicans* に対しては、0.05% エチルパラベン添加 BM 液では 14 日目にチャレンジ菌の 81% が生存しており、その防腐効果は不十分であった。0.09% メチル + 0.01% プロピルパラベン添加 BM 液では、14 日目にチャレンジ菌の 1.8% が生存しており、B.P. の規定の 1 % 以下にやや及ばないとはいえ、ほぼ満足できる防腐効果を示した。一方、0.06% メチル + 0.03% エチル + 0.01% プロピルパラベン添加 BM 液では、14 日目でチャレンジ菌は 1 % 以下となった。すなわち、*C. albicans* に対しては、0.06% メチル + 0.03% エチル + 0.01% プロピルパラベン添加 BM 液が十分な防腐効果を示し、また、0.09% メチル + 0.01% プロピルパラベン添加もほぼ満足できる防腐効果を示した。

A. niger では、3 種類の組合せのパラベン添加 BM 液いずれでも、チャレンジ胞子は 28 日目まで発芽しなかつ

Table 4. Effect of Parahydroxybenzoates in Brompton Mixture on *Staphylococcus aureus* during Storage at 25°C

Parahydroxybenzoates in Brompton mixture	Percentage(%) of surviving cells after:				
	0	1 day	2 days	7 days	14days
0.05% ethylparaben	100	0.3	<0.1	<0.1	<0.1
0.09% methylparaben + 0.01% propylparaben	100	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
0.06% methylparaben + 0.03% ethylparaben + 0.01% propylparaben	100	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

Brompton mixtures contain morphine HCl(1mg/ml) and cocain HCl(0.5mg/ml) with parahydroxybenzoates.

Inoculum size; 10⁶ viable cells/ml in test solution.

Table 5. Effect of Parahydroxybenzoates in Brompton Mixture on *Candida albicans* during Storage at 25°C

Parahydroxybenzoates in Brompton mixture	Percentage(%) of surviving cells after:					
	0	1 day	2 days	7 days	14days	28days
0.05% ethylparaben	100	93.6	95.4	76.5	81.0	13.5
0.09% methylparaben + 0.01% propylparaben	100	103.6	94.5	31.3	1.8	< 1.0
0.06% methylparaben + 0.03% ethylparaben + 0.01% propylparaben	100	99.0	31.5	< 1.0	< 1.0	< 1.0

Inoculum size; 10^5 viable cells/ml in test solution.

た。すなわち、*A. niger* に対しては、3種類の組合せのパラベン添加BM液の防腐効果はいずれも十分であった。

以上、5種すべての菌に対し、0.06%メチル+0.03%エチル+0.01%プロピルパラベン添加BM液は十分な防腐効果を示し、0.09%メチル+0.01%プロピルパラベン添加BM液もほぼ満足できる防腐効果を示した。

考 察

急性白血病患者の感染症の約半数は、病院環境から患者に定着した菌に由来したとの報告がある⁹⁾。この報告が示すように、病院環境から患者への *Serratia*, *Klebsiella* などの菌の定着防止は重要である。このような定着を生じさせる外部要因としては、医療従事者の手からの伝播¹⁰⁻¹²⁾ や、ネブライザーや加湿器の水^{13,14)}、食物^{15,16)}、経腸栄養剤^{17,18)}、及び医薬品^{19,20)} などの微生物汚染があげられる。このうち、医薬品汚染による定着の例では、 10^4 個/mlの緑膿菌で汚染されたペパーミント水を7日間服用した患者に、ペパーミント水由来の緑膿菌の腸管定着が生じたとの報告がある²⁰⁾。このように、医薬品汚染により定着を生じることがあり、緑膿菌などの定着が生じた場合には感染症発症に至る可能性が高い⁹⁾。

医薬品の中で微生物汚染を受けやすい剤形としては液剤があげられる²¹⁾。このうち、BM液は癌患者に投与されるのであるから、その微生物汚染には特に注意が払われるべきであろう。しかし、BM液の防腐効果の検討はなされていないのが現状である。そこで、著者らはまず各種処方法のBM液の防腐効果を調べたところ、BM液に8%以上のエタノールが含まれていれば防腐効果は十分であった。エタノールが短時間で殺菌効果を示すには40%以上の濃度が必要であるが²²⁾、長時間接触での殺菌効果は8%という低濃度で得られた。エタノールの8～

12.5%濃度は、BM液のみならず、他の院内調製される内用液剤の防腐にも適用できると思われる。

エタノールを含まないか、または5%エタノール含有のBM液は、防腐効果が不十分であった。そこで、モルヒネ、コカイン及び水からなるBM液を用いてパラベン添加の効果を検討した。パラベンを選んだ理由は、医薬品に添加されることが多く、またシロップ剤の保存剤として最適とされている²³⁾からである。

わが国で、内用液剤の院内調製時に繁用されているパラベン濃度は、エチルパラベンの0.04～0.05%である。しかし、著者らは0.026%メチル+0.014%プロピルパラベン含有の点眼用溶解液Bが緑膿菌の増殖を支持することを報告し²⁴⁾、またパラベン総濃度はすくなくとも0.08%以上にすべきとの報告がある²³⁾。これらの報告から判断すると、エチルパラベンの0.04～0.05%濃度は低すぎる。さらに、パラベンは難溶性で結晶を析出しやすいので、単独で用いるより互いの溶解度を減じないメチル、エチル及びプロピルパラベンの組合せで用いる方がよい^{25,26)}。また、併用した場合の抗菌力は相加または相乗的となる²⁵⁾。これらのことから、エチルパラベン単独で用いるのは理に合わない。したがって、BM液へのパラベン添加試験には、0.05%エチルパラベン単独の他に、0.09%メチル+0.01%プロピル、0.06%メチル+0.03%エチル+0.01%プロピルパラベンをを用いた。

これら3種類の組合せのパラベン添加BM液のうち、0.06%メチル+0.03%エチル+0.01%プロピルパラベンが十分な防腐効果を示し、0.09%メチル+0.01%プロピルパラベンもほぼ満足できる防腐効果を示した。これらの組合せのパラベン総濃度0.1%は、食品で許容されているパラベン総濃度0.2%以下²⁷⁾ (英国) または0.1%以下²⁸⁾ (米国) という基準を満たしている。また、パラベンの許容1日摂取量は0～10mg/kg²⁷⁾ であるが、上記のパラベン組合せを含有するBM液を1日40ml服用し

た場合、パラベン¹⁾の1日摂取量は40mgとなり、1日摂取量の点からも問題ない。

わが国の薬局では、市販の内用液剤を高度に希釈する場合や、保存剤を含まない内用液剤を院内で調製した場合に、製した内用液剤にエチルパラベンを0.04~0.05%濃度になるように加えることが多い。しかし本実験により、微生物にとって栄養が不十分なBM液でさえ、0.05%エチルパラベンの防腐効果は不十分であった。したがって、BM液以外の内用液剤にパラベンを添加する場合も、0.05%エチルパラベンでは不十分と推定され、0.06%メチル+0.03%エチル+0.01%プロピルパラベン、または0.09%メチル+0.01%プロピルパラベンの使用が推奨される。

引用文献

- 1) R. Melzack, B. M. Mount, J. M. Gordon: *CMA J.*, **120**, 435 (1979).
- 2) I. M. Beaumont: *Pharm. J.*, **229**, 39 (1982).
- 3) H. S. Bean: *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **23**, 703 (1972).
- 4) 山下 勝, 深谷伊和男: 愛知食工試年報, **12**, 105 (1971).
- 5) D. D. Glover, T. F. Lowry, M. Ga, A. I. Jacknowitz: *South. Med. J.*, **73**, 278 (1980).
- 6) 間瀬美知子, 町田和子, 村上国男, 古賀良平, 芳賀敏彦, 米田良蔵: 日胸, **38**, 428 (1979).
- 7) S. F. Hartley: "British Pharmacopoeia 1980", London Her Majesty's Stationery office, London, 1980, p. A192.
- 8) W. B. Hugo, A. D. Russel: "Pharmaceutical Microbiology 2nd Ed.", Blackwell Scientific Publication, 1981, p. 200.
- 9) B. C. Schimpff, V. M. Young, W. H. Greene, G. D. Vermeulen, M. R. Moody, P. H. Wiernik: *Ann. Intern. Med.*, **77**, 707 (1972).
- 10) W. W. Williams, J. Mariano, M. Spurrier, H. D. Donnell, R. L. Breckenridge, R. L. Anderson, I. K. Wachsmuth, C. Thornsberry, D. R. Graham, D. W. Thibeault, J. R. Allen: *J. Infect. Dis.*, **150**, 229 (1984).
- 11) K. J. Mutton, L. M. Brady, J. L. Harkness: *J. Hosp. Infect.*, **2**, 85 (1981).
- 12) M. F. Parry, J. H. Hutchinson, N. A. Brown, C. Wu, L. Esteller: *Pediatrics*, **65**, 1105 (1980).
- 13) C. V. Sanders, J. P. Luby, W. G. Johanson, J. A. Barnett, J. P. Sanford: *Ann. Intern. Med.*, **73**, 15 (1970).
- 14) P. W. Smith, R. M. Massanari: *JAMA*, **237**, 795 (1977).
- 15) M. Casewell, I. Phillips: *J. Clin. Pathol.*, **31**, 845 (1978).
- 16) E. M. Cooke, T. Sazegar, A. S. Edmondson, J. C. Brayson, D. Hall: *J. Hyg., Camb.*, **84**, 97 (1980).
- 17) E. G. E. de Vries, N. H. Mulder, B. Houwen, H. G. de Vries-Hospers: *Am. J. Clin. Nutr.*, **35**, 1490 (1982).
- 18) B. A. Baldwin, A. J. Zagoren, N. Rose: *J. Parenter. Enter. Nutr.*, **8**, 30 (1983).
- 19) R. M. Baird, R. A. Shooter: *Br. Med. J.*, **2**, 349 (1976).
- 20) R. A. Shooter, E. M. Cooke, H. Gaya, P. Kumar, N. Patel, M. T. Parker, B. T. Thom, D. R. France: *Lancet*, *i*, 1227 (1969).
- 21) R. Smart, D. F. Spooner: *J. Soc. Cosmet. Chem.*, **23**, 721 (1972).
- 22) 山下 勝, 深谷伊和男: 醗協誌, **33**, 116 (1974).
- 23) A. D. Russell, J. Jenkins, I. H. Harrison: *Adv. Appl. Microbiol.*, **9**, 1 (1967).
- 24) 神代 昭, 尾家重治: 薬剤学, **41**, 119 (1981).
- 25) T. R. Aalto, M. C. Firman, N. E. Rigler: *J. Am. Pharm. Assoc.*, **42**, 449 (1953).
- 26) N. S. Gottfried: *Am. J. Hosp. Pharm.*, **19**, 310 (1962).
- 27) J. E. F. Reynolds ed.: "Martindale The Extra Pharmacopoeia, 28th Ed.", The Pharmaceutical Press, London, 1982, p. 1281.
- 28) M. C. Robach: *Food Technol.*, **34**, 81 (1980).