

[Jpn. J. Hosp. Pharm.]
 一般論文
 19(6) 487 - 492 (1993)]

ポビドンヨードシュガー配合塩化リゾチーム軟膏の安定性†¹

外間惟夫†², 大城 進†², 藤本勝喜†², 芳原準男†², 野中薫雄†³

琉球大学医学部附属病院薬剤部†²

琉球大学医学部皮膚科学教室†³

Stability of Lysozyme Chloride Ointment Mixed with Povidone-Iodine Sugar†¹

NOBUO HOKAMA†², SUSUMU OHSHIRO†², KATSUYOSHI FUJIMOTO†²,
 NORIO HOBARA†², SHIGEO NONAKA†³

Hospital Pharmacy†², Department of Dermatology†³, Faculty of Medicine,
 University of the Ryukyus

(Received April 9, 1993)
 (Accepted July 28, 1993)

Compatibility of lysozyme chloride ointment (Reflap® ointment, LO) was studied using two kinds of povidone-iodine sugar ointments. One was povidone-iodine sugar ointment (PSG), which was prepared in the hospital pharmacy, and the other was U-pasta KOWA ointment (UPK) which is available on the commercial market. In this study, LO was mixed with PSG or UPK in a 3:1 ratio by weight. Lysozyme (LZ) activity and the residual percentage of available iodine were determined in the mixtures over a 28-day period, and the change in LZ was also investigated using SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

No changes were observed in LZ activity and LZ molecular weight in the mixtures, while the available iodine dramatically decreased with time in a dark location at room temperature. On the other hand, in a dark place at 5°C, the residual percentages of available iodine were maintained above 90% in PSG-LO stored for 14 days after mixing and in UPK-LO stored for 28 days after mixing. From the above results, it was concluded that PSG-LO remained compatible up to 14 days, and UPK-LO for at least 28 days at 5°C.

Keywords—lysozyme chloride ointment; Reflap® ointment; povidone-iodine sugar ointment; U-pasta KOWA ointment; compatibility of ointment; lysozyme activity; available iodine; SDS-polyacrylamide gel electrophoresis.

緒 言

ポビドンヨードシュガー軟膏はポビドンヨード (PI) の優れた殺菌作用と白糖の創傷治癒作用を併せ持った褥瘡治療剤で、イソジンシュガー軟膏という名称で白糖とポビドンヨードゲル (PG) やポビドンヨード液 (PS) を主原料として調製され

†¹ 本報の一部は日本薬学会第 112 年会 (福岡, 1992 年 3 月) で発表。

†^{2,3} 沖縄県中頭郡西原町字上原 207; 207, Aza Ue-hara, Nishihara-cho, Nakagami-gun, Okinawa, 903-01 Japan

ており、最近ユーパスタコーワ軟膏 (UPK) という名称で市販もされている製剤である。一方、塩化リゾチーム軟膏 (LO) は塩化リゾチーム (LZ) を 5% 含有し、肉芽形成や上皮化促進作用等をもつ皮膚潰瘍治療薬である。

ポビドンヨードシュガー配合 LO はこれらの相乗効果を期待し二剤をさらに 1:3 に練合した院内製剤で、この有用性が野口ら¹⁾ によって報告されて以来、褥瘡治療薬として注目され、当院でも処方されている。

しかし最近、LO の主成分である LZ が PG との 1:1 の配合で著しく失活することが報告²⁾ され、これらを主原料とするポビドンヨードシュガー配合 LO の安定性が懸念された。そこで今回、その安定性を検討し若干の知見が得られたので報告する。

実 験 の 部

1. 原料および試薬

LO としてリフラップ軟膏 (日本化薬, Lot No.51605) を、PG としてイソジンゲル (10%PI 含有, 明治製菓, ADT526) を、PS としてイソジン液 (10%PI 含有, 明治製菓, ADL582) を、その他の配合原料として UPK (興和, X1654I1 F), 日局白糖 (鈴粉末薬品, RAYKR ハト 1), 日局単シロップ (藤沢アストラ, 485RKK), 日局

白色ワセリン (保栄薬工, 159ROP) を使用した。

また、LO から LZ のみを除いた LO 基剤 (ワセリン, 流動パラフィン) を主体とした乳剤性基剤に添加物としてステアリルアルコール, セタノール, メチル, エチル, プロピルパラベンを含有。日立化成, U713B) と PI (明治製菓, 30-0710) は供与品を使用した。LZ 力価測定用基質は *Micrococcus Luteus* (生化学工業, P88603) を、LZ (ナカライテスク, M2B3562), その他の試薬はすべて市販特級品を使用した。

2. 各軟膏剤の調製

各処方を Table 1 に示したが、院内製剤のポビドンヨードシュガー軟膏 1 (PSG) ならびに、市販の UPK を LO と 1:3 の重量比で練合しそれぞれ PSG-LO (No.2) と UPK-LO (No.3) を調製した。次に PSG-LO から白糖と単シロップを除き代わりに白色ワセリンを加え PGV-LO (No.4) とした。さらに単シロップを含まないポビドンヨードシュガー軟膏 2 (PSS) を用いて PSS-LO (No.6) を調製した。また PG と LO を 1:1 の重量比で練合し PG-LO とした。

練合には軟膏ベラと磁器製軟膏板を使用し、ポリプロピレン製軟膏壺 (馬野化学) に入れ、室温あるいは冷所 (5°C) で 28 日間遮光保存し実験に供した。

Table 1. The Recipe for Mixed Ointment

No.1 PI ^{a)} Sugar Ointment 1 (PSG)		No.4 LZ Ointment Mixed with PI Gel and White Petrolatum (PGV-LO)	
Rp) PI Gel	90g	Rp) PI Gel	6.43g
Powdered Sugar	200g	White Petrolatum	18.57g
Simple Syrup	60g	LZ Ointment	75g
No.2 LZ ^{b)} Ointment Mixed with PI Sugar Ointment 1 (PSG-LO)		No.5 PI Sugar Ointment 2 (PSS)	
Rp) PI Sugar Ointment 1	25g	Rp) PI Gel	90g
LZ Ointment	75g	Powdered Sugar	310g
No.3 LZ Ointment Mixed with PI (U-Pasta KOWA) Ointment (UPK-LO)		PI Solution	28ml
Rp) U-Pasta KOWA Ointment	25g	No.6 LZ Ointment Mixed with PI Sugar Ointment 2 (PSS-LO)	
LZ Ointment	75g	Rp) PI Sugar Ointment 2	25g
		LZ Ointment	75g

a) PI, povidone-iodine. b) LZ, lysozyme chloride.

3. pH 値の測定

2本の共栓試験管に各軟膏剤 2.5g を入れクロロホルム 2.5ml で懸濁し、更に蒸留水 10ml を加え、15分間激しく振とう後、遠心分離 (3000rpm $\times$ 10min) し水層を合わせて pH メータ (堀場, F-7) で測定した。

4. LZ 活性測定

各軟膏剤の LZ 25mg 相当量を正確に秤量しクロロホルム 2ml で懸濁後、これに pH 6.2 リン酸塩緩衝液 10ml を加え20分間激しく振り混ぜた後、遠心分離 (3000rpm $\times$ 10min) する。この上澄液をあらかじめ緩衝液で浸したろ紙を用いてろ過し、以上の操作を3回繰り返し器具を緩衝液で洗い、抽出液と合わせてこれを緩衝液で正確に 50ml とし試料液とする。そして吸光度法³⁾により測定し、残存率は練合前を 100% とした相対値で示した。

5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

装置はアトー製電気泳動装置 (AE-6200型) を用い、Laemmli の方法⁴⁾ に準じて行った。ゲル濃度 17.5%、架橋度 2.6% のゲルスラブを作成し、1レーンあたりタンパク量として 3.75 μ g を積層し、ブロムフェノールブルーをマーカー色素とし 30mA の通電量で泳動を行った。その後、0.25% コマジープリリアントブルーを含むエタノール-酢酸-水 (9:2:9) 混液でタンパク固定と同時に染色を行い、まずエタノール-酢酸-水 (25:8:65) 混液で、次いでエタノール-酢酸-水 (2:3:25) 混液で脱色を行った。対照には LZ (分子量 14,300) を、分子量マーカーには牛血清アルブミン (分子量 66,000) およびウマ心筋チトクロム C (分子量 12,400) をそれぞれ用いた。

6. 有効ヨウ素量測定

各軟膏剤から、0.5% KI 添加リン酸塩緩衝液 (pH 6.2) を用いて LZ 活性測定と同様の方法で3回抽出し、洗浄液と抽出液を合わせたものを試験液とし、ヨウ素定量法⁵⁾に従って滴定 (対照はポビドンヨード配合 LO 基剤) した。ここで得られた配合直後の値を 100% とし、それ以降を残存率として表した。

結果および考察

1. 各軟膏剤の外観変化および pH 値

PSG-LO, UPK-LO を室温で遮光保存したものについて経日的に外観変化, pH 値を測定した。まず PSG-LO の外観を調べると、7日後より徐々に退色し、28日後には明らかな全体の退色と共に内側がより白色になる二層分離現象が観察された。また pH 値は Table 2 に示したようにほとんど変動しなかった。

次に、UPK は精製白糖 70%、PI を 3% 含有し PSG より安定性に優れている⁶⁾ とされているが、この外観変化を調べた。両者を配合した直後の段階で若干水分が漏出したような状態となるが、その後28日まで2層分離等の大きな変化は観察されなかった。色調は14日後より徐々に退色したが、PSG-LO よりはその度合いは小さかった。また pH 値は若干、酸性側へのシフトが認められた (Table 2)。

2. 各軟膏剤の LZ 活性

各軟膏剤の LZ 活性を測定した結果を Table 3 に示した。PSG-LO の LZ 活性は28日後でも 90% 以上が残存しており、UPK-LO も全く低下が見られず、これらは並木ら²⁾の結果に基づいた予想に反して安定であることが判明した。

一般に、糖にはタンパク安定化作用があることが知られており、PSG-LO でこれが LZ の失活を防止している可能性が考えられた。このことを調べるため白糖を除いた PGV-LO の LZ 活性について検討したが、PSG-LO とほぼ同じ結果を示し、白糖が LZ の安定化に寄与している事実は認められなかった。

Table 2. pH Values of Mixed Ointments during Storage at Room Temperature for 14 Days

Mixed ointment	pH value				
	Initial	1 day	3 days	7 days	14 days
PSG-LO	4.61	4.58	4.47	4.40	4.66
UPK-LO	5.02	4.79	4.86	4.84	4.71

n=3.

Table 3. Residual Percentage of Lysozyme Activities in Mixed Ointments during Storage at Room Temperature for 28 Days

Mixed ointment	Lysozyme activity (%)				
	Initial	7 days	14 days	21 days	28 days
PSG-LO	97.7	99.7	100.1	95.1	91.2
UPK-LO	104.4	104.0	110.0	105.0	112.1
PGV-LO	93.4	106.0	91.4	87.0	90.8

n=3.

3. 各軟膏剤の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動

PG-LO (1:1) においては LZ 活性の著しい低下が報告²⁾されており、著者らの追加実験でも 1.0% の残存率となった。しかし、上記の結果では PSG-LO, UPK-LO の LZ 活性は混合後 28 日でも低下しなかった。そこで PG-LO での LZ

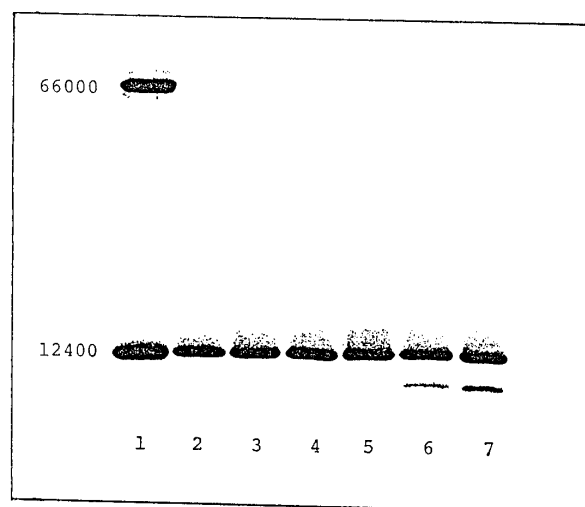


Fig. 1. SDS-Polyacrylamide Gel Electrophoresis of LZ in the Mixtures

Lane ; (1) Bovine serum albumin (upper) and horse heart cytochrome c (lower), (2) Authentic standard of LZ, (3) LO, (4) PSG-LO after 28 days of storage, (5) UPK-LO after 28 days of storage, (6) Povidone-iodine Gel (PG)-LO (1:1) immediately after mixing, (7) PG-LO (1:1) after 28 days of storage.

失活機構を明らかにし、PSG-LO, UPK-LO との違いを調べるため SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行った (Fig. 1).

PG-LO の配合直後の電気泳動像は低分子量側に新たなバンドが観察され、LZ 分子鎖の切断が明らかとなった。また、このバンドは経時的に濃くなる傾向が認められた。

Hartdegen ら⁷⁾ はヨウ素と LZ を反応させた時に見られる LZ 活性の低下は、ヨウ素による LZ 分子中のトリプトファン残基の酸化、修飾が原因であると報告している。しかしアミノ酸残基の変化のみでは分子量の変動を説明できず、さらに激烈な反応が進行して LZ 分子鎖の切断が起こったものと推察された。

一方、PSG-LO, UPK-LO の 28 日後の電気泳動像では LZ は共に単一バンドを示し、LZ 活性の結果を支持しており、安定であることが確認された。

4. 各軟膏剤の有効ヨウ素量

最初 LZ 測定法に準じて PI の抽出を試みたが、PSG-LO, UPK-LO とともにリン酸緩衝液には殆ど抽出されず、抽出法を検討したところ 0.5% KI 添加リン酸緩衝液を使用することにより PSG-LO で 68.1%, UPK-LO で 93.7% の PI が抽出された。本定量法で配合直後の有効ヨウ素量を求めたところ、いずれの配合剤も約 20% の低下が観察された。ここではポビドンヨードシュガー軟膏と LO 基剤を同様に練合して抽出の対照としており抽出方法が低下の原因とは考えられないこと、対照と配合剤との違いは LZ の有無しかないこと、そして実際に LZ 25mg, PI 4.29mg を緩衝液 20ml に溶解し、室温光曝下で 3 時間攪拌すると有効ヨウ素量が 72.7% に低下したのが観察された事実から考えて、これは定量操作時に同時に抽出された LZ がヨウ素と反応したための低下と判断し、まず配合と同時に有効ヨウ素量を求め、それを 100% としてそれ以降の残存率を算出した。

PSG-LO の有効ヨウ素量の残存率は Table 4 に示したように室温保存下で 14 日後には 27.8% と急激に低下し、また UPK-LO は 14 日後には 74.8% に低下した。ポビドンヨードシュガー軟膏の処

Table 4. Residual Percentage of Available Iodine in Mixed Ointments during Storage at Room Temperature for 14 Days

Mixed ointment	Available iodine (%) ^{a)}			
	1 day	3 days	7 days	14 days
PSG-LO	73.7	58.1	42.0	27.8
UPK-LO	91.6	85.3	85.2	74.8
PSS-LO	83.1	65.6	50.6	37.0
PGV-LO	73.7	51.4	39.3	31.7

a) The values immediately after mixing were calculated as 100%. n=3.

方には数種類が知られているが、原料に糖として単シロップを使用すると単シロップが約1/3量の水分を含むため、白糖が転化糖に移行し易く PI が不安定になるという報告⁸⁾が見られた。PSGは原料に単シロップを使用しており、今回の有効ヨウ素量低下はこれに起因している可能性も考えられた。また反対に PI 製剤として PS を使用すると PS 中の緩衝剤が軟膏の酸化を抑え、白糖と PI が安定化することも報告⁸⁾されている。そこで各施設で繁用されている5種のポビドンヨードシュガー軟膏のうち、最も安定と報告⁸⁾されている PG, PS と白糖を原料としたポビドンヨードシュガー軟膏2 (PSS) を用いて PSS-LO を調製し、この有効ヨウ素量を測定したが、PSG-LO とほぼ同じ結果を示し、処方の違いによる差異は認められなかった。

次に有効ヨウ素量低下の原因のひとつとして、白糖が LZ により加水分解を受け転化糖を生じ、この還元作用により PI が分解する可能性⁹⁾が考えられた。そこで、白糖無しの PGV-LO を検討したが、Table 4 に示したように PSG-LO とほとんど同じ結果となった。したがって有効ヨウ素量低下の原因は、PI から遊離したヨウ素が LZ 分子に付加した結果と推察される。また、PG-LO (1:1) ではヨウ素活性は安定で LZ 活性が著しく低下した報告²⁾がみられるが、今回逆の結果が得られたのは PSG-LO 中の PG 対 LO の配合

Table 5. Residual Percentage of Available Iodine in Mixed Ointments during Storage at 5°C for 28 Days

Mixed ointment	Available iodine (%) ^{a)}				
	1 day	7 days	14 days	21 days	28 days
PSG-LO	99.3	94.3	92.7	83.8	81.5
UPK-LO	97.3	97.3	99.1	93.5	94.7

a) The values immediately after mixing were calculated as 100%. n=3.

比が 1:11.7, UPK-LO では 1:10.0 (PI:LZ 比) と PG-LO とは 10 倍以上も異なっており、この配合比の違いが主な原因と考えられ、PI に比して LZ が多量に配合されているため、その一部が PI と反応しても LZ 活性値には影響しなかったと推察された。

以上の結果から、PSG-LO, PSS-LO の遊離ヨウ素に基づく殺菌作用は、室温保存下では調製後急激に低下していることが示唆された。

最後に配合剤を遮光下、冷所 (5°C) に保存して有効ヨウ素量を測定したところ、Table 5 に示したように室温保存下で観察された著しい有効ヨウ素量の低下は、かなり抑制出来ることが判明した。配合可否の判定基準を残存率低下10%以内とすると、冷暗所保存下では PSG-LO は14日、UPK-LO は28日後までは十分使用可能と思われた。

結 論

PSG-LO, UPK-LO の LZ 活性は28日後でも90%以上残存し、また電気泳動像も単一バンドを示し安定であった。しかし、有効ヨウ素量はすべての軟膏剤において経目的に著しい低下がみられた。

冷暗所保存 (5°C) にすると PSG-LO は14日後まで、UPK-LO は少なくとも28日後までの配合剤は安定であった。

謝辞 本研究に際し、試料を提供していただいた日立化成、興和、明治製菓の各社に感謝いたします。

引 用 文 献

- 1) 野口桂一, 入江大祐, 深沢一也, 基礎と臨床, 23 (5), 2000-2004 (1989).
- 2) 並木徳之, 中島知子, 種井美江, 福田雅彦, 高島忠久, 病院薬学, 15(1), 17-22 (1989).
- 3) 厚生省薬務局審査第二課監修, “日本薬局方外医薬品成分規格”, 薬業時報社, 1986. p.115.
- 4) U.K. Laemmli, *Nature*, 277, 680 (1970).
- 5) 日本公定書協会監修, “第十一改正日本薬局方解説書”, 広川書店, 1986, C-1619.
- 6) ユーバスタコーワ概要, 興和株式会社,
- 7) F.J. Hartdegen, J.A. Rupley, *Biochem. Biophys. Acta*, 92, 652-672 (1964).
- 8) 関塚雅之, 小片英美代, 柴田克郎, 真木義次, 薬理と治療, 16(12), 247-254 (1988).
- 9) 高橋修二, 東海林徹, 白石 正, 菅原和信, 医薬品相互作用研究, 8, 45 (1984).