

(Jpn. J. Hosp. Pharm.)
23(6): 539-547 (1997)

含嗽用アロプリノール液に使用する保存剤の検討

杉山 正, 山添喜久雄, 中村光浩, 堀内 正, 片桐義博*

岐阜大学医学部附属病院薬剤部†

Study on Preservatives for Allopurinol Gargle

TADASHI SUGIYAMA, KIKUO YAMAZOE, MITSUHIRO NAKAMURA,

TADASHI HORIUCHI and YOSHIHIRO KATAGIRI*

Department of Pharmacy, Gifu University Hospital†

(Received February 14, 1997)
(Accepted August 13, 1997)

For the prevention or treatment of stomatitis caused by anticancer agents, allopurinol gargle has been used at Gifu University Hospital. The allopurinol gargle has been prepared by dispersing powdered allopurinol tablets and sodium carboxymethylcellulose into water for injection. As the result of examination of microbial contamination of the allopurinol gargle administered to a patient, *Acinetobacter calcoaceticus var. anitratus*, *Burkholderia pickettii* or *Candida albicans* were isolated. Benzoic acid (BA), sodium dehydroacetate (DA) and ethyl-*p*-hydroxybenzoate (EP) were used as preservatives for allopurinol gargle. Allopurinol gargles containing 0.05% of BA, 0.1% of BA, 0.05% of DA, 0.1% of DA or 0.05% of EP were prepared and antimicrobial activities against strains isolated from allopurinol gargles and those from clinical specimens were assessed based on the criteria for topical preparations in British Pharmacopoeia. Among the allopurinol gargles prepared, only allopurinol gargle containing 0.1% of BA had antimicrobial activity against all strains at storage conditions of 25°C and 37°C. The allopurinol gargle containing 0.1% of BA did not demonstrate sufficient antimicrobial activity at 4°C. The BA added to allopurinol gargles had no influence on either the stability of allopurinol or on the inhibition of xanthine oxidase by allopurinol. No growth of organisms appeared in the remaining allopurinol gargle containing 0.1% of BA used by the patient.

These findings suggest that the addition of BA at the concentration of 0.1% is suitable for allopurinol gargle.

Key words — allopurinol gargle, stomatitis, preservatives, benzoic acid, antimicrobial activity, stability, xanthine oxidase

緒 言

抗癌剤投与による副作用のうち口内炎は患者の

quality of life に大きな影響を及ぼす。抗癌剤による口内炎の予防および治療に対してアロプリノールの含嗽療法の有用性が報告されている¹⁻⁵⁾。癌化学療法を受けている患者は易感染状態にあると考えられることから、含嗽用アロプリノール液(以

† 岐阜市司町40-40, Tsukasa-machi, Gifu-shi, 500
Japan

下, アロプリノール液)は微生物によって汚染されていないことが必要である。しかし, 院内製剤されたアロプリノール液は調製後の保管中に微生物汚染を受けること^{5,6)}, あるいは患者に交付された後の使用中に微生物汚染を受けることが報告されている^{7,8)}。

尾家らはアロプリノール液にパラオキシ安息香酸エステルを組合せた保存剤を加えた場合には微生物汚染が認められなかったと報告している⁷⁾。しかし, アロプリノール液の保存剤としてパラオキシ安息香酸エステル類以外の保存剤について検討した報告はない。また, 保存剤を添加したアロプリノール液の保管条件について検討した報告はない。保存剤は液性あるいは保存容器の材質によって効果が異なることが知られており⁹⁾, 保存剤の選択では種類の異なった複数の保存剤から最適なものを選ぶのが望ましいと考えられる。また, 保存剤の抗微生物効果は保管する温度により異なることが知られており^{10,11)}, 保管条件についても検討することが必要である。今回, 院内製剤したアロプリノール液の微生物汚染を防止するために各種保存剤を添加し, その抗微生物効果およびアロプリノールの安定性に及ぼす影響を検討した。また, 保存剤を添加したアロプリノール液の保管温度について検討した。さらに, アロプリノールの口内炎に対する作用の一つと考えられているキササンチンオキシダーゼ (XOD) 阻害作用に及ぼす影響を検討した。

方 法

1. アロプリノール液の調製

アロプリノールとしてザイロリック[®]100mg錠 (日本ウエルカム) 5錠を粉碎し, カルボキシメチルセルロースナトリウム (丸石製薬) 5gとともにホモジナイザー (ULTRA-TURRAX T25, IKA-LABORTECHNIK) を用いて注射用水500mlに懸濁して調製した。また, 保存剤として安息香酸 (BA) を0.05% (w/v) および0.1% (w/v), デヒドロ酢酸ナトリウム (DA) を0.05% (w/v) およ

び0.1% (w/v), パラオキシ安息香酸エチル (EP) を0.05% (w/v) となるようにアロプリノール液にそれぞれ添加した。調製はクリーンベンチ内で行った。

2. 微生物汚染検査

調製直後および患者投与後に回収した保存剤無添加の含漱用アロプリノール残液を試料とした。試料0.1mlを培養し, 生育したコロニーの有無から微生物汚染の有無を判定した。培地は, 細菌用として羊血液寒天培地 (日本ベクトン・ディキンソン), 真菌用としてカンジダ寒天培地 (ニッスイ) を用いた。培養の温度および時間は, 細菌の場合36°Cにおいて24時間, 真菌の場合30°Cにおいて48時間とした。菌種の同定は培養後のコロニーを純培養し, 自動細菌検出装置 (VITEK systems, bio Merieux) を用いて行った。

3. 保存剤の抗微生物試験

微生物汚染検査においてアロプリノール液から分離された菌株, ならびに本院の臨床材料から分離された Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Serratia marcescens* および *Candida albicans* を供試菌とした。

供試菌を $10^5 \sim 10^7$ CFU/mlに調整し, それぞれ50 μ lを保存剤添加アロプリノール液5mlに加えたものを試験液とした。試験液から経時的にサンプリングを行い, 保存剤に接触後の生菌数を測定した。生菌数は生理食塩液を用いて10倍段階希釈法により測定した。培地は細菌用としてSCDLP寒天培地 (日本製薬), 真菌用としてGPLP寒天培地 (日本製薬) を用いた。培養は微生物汚染検査の場合と同条件で行った。また, BA0.1%添加アロプリノール液を4°C, 25°Cおよび37°Cで保管したのものについて同様に生菌数を測定した。

保存剤の効果判定は英国薬局方の局所用製剤の規定¹²⁾を準用した。すなわち, 「細菌では接種した菌が2日後に0.1%以下に減少し, 7日以降28日後まで検出されないこと, 真菌では接種した菌が14日後に1%以下に減少し, 28日後まで増加し

ないこと」に従って判定した。

4. アロプリノール含量

保存剤無添加およびBAを0.1%添加したアロプリノール液を4℃、25℃および37℃において28日間保管したものを試料とした。試料0.5mlに、内部標準物質としてヒポキサンチン（和光純薬）の0.02M水酸化ナトリウム溶液（1mg/ml）0.25mlおよび0.1M水酸化ナトリウム溶液0.1mlを加え、精製水を用いて25mlに希釈した。アロプリノール含量は米国薬局方¹³⁾に準じ高速液体クロマトグラフ（HPLC）法により測定した。

HPLC条件：検出波長、254nm；カラム、Cosmosil 5 C₈（250mm×4.6mm I.D.、ナカライテスク）；カラム温度、40℃；移動相、0.05Mリン酸二水素カリウム（pH6.5）：アセトニトリル（99：1）；流速、1.2ml/min。

5. XOD阻害活性の測定

BAのXOD阻害活性はニトロブルーテトラゾリウム（NBT）法¹⁴⁾により測定した。試料溶液として保存剤無添加およびBA0.1%添加のアロプリノール液を用いた。50mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5）2mlに0.75mM NBT溶液100 μ lと試料溶液10 μ lを加え、さらに7.5mMキサンチン溶液100 μ lと1.93units/ml XOD溶液10 μ lを加え、50mMトリス塩酸緩衝液（pH7.5）にて全量を3mlにした。25℃において20分間振とうした後6mM塩化第二銅溶液100 μ lを加えて反応を停止した。

反応終了後、反応液を遠心分離しその上清について560nmの吸光度を測定し、アロプリノール標準品のXOD阻害活性をコントロールとし、試料溶液の阻害活性と比較した。

6. 保存剤添加の効果

BAを0.1%添加したアロプリノール液を500ml調製してポリプロピレン製の滅菌済投薬ビン（大島硝子）に入れ、1日3回、1回20ml、7日分の用法で患者に交付した。7日後に残液を回収し微生物汚染の有無を検査した。

結 果

1. 微生物汚染検査

調製直後のアロプリノール液では微生物汚染は認められなかった。本院病棟に入院中の患者14名に投与された後に回収した保存剤無添加のアロプリノール残液の微生物汚染検査の結果をTable 1に示した。回収残液27検体のうち、患者3名5検体に微生物汚染が認められた。菌種同定の結果それらは、*Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratu*s, *Burkholderia pickettii* および *Candida albicans* であった。

2. 保存剤の抗微生物試験

アロプリノール液から検出された菌株に対する保存剤の抗微生物効果をFig. 1に示した。*A. calcoaceticus* var. *anitratu*s に対してはBAを0.05%および0.1%添加した場合、*B. pickettii* に対して

Table 1. Microbial Contamination in Allopurinol Gargle Administered to Patients

Patient	Sample	Isolate
A	No. 1	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> *
	No. 2	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> *
	No. 3	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> *, <i>Candida albicans</i>
B	No. 4	<i>Acinetobacter calcoaceticus</i> *
C	No. 5	<i>Burkholderia pickettii</i>

Twenty-seven samples obtained from fourteen patients were tested.

* *Acinetobacter calcoaceticus* var. *anitratu*s

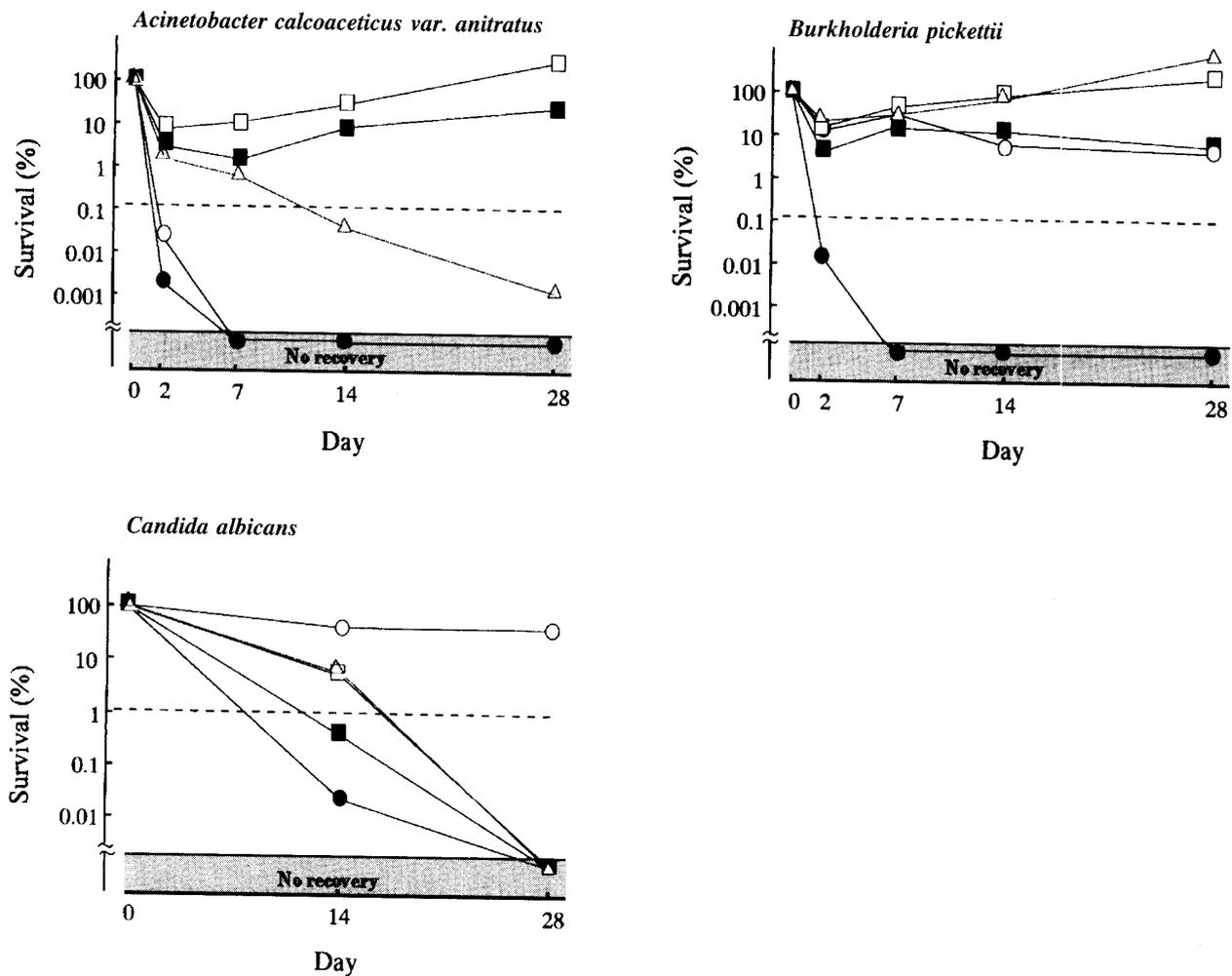


Fig. 1. Survival of Microorganisms Isolated from Allopurinol Gargle after Exposure to Various Preservatives

○; Benzoic acid (BA) 0.05%, ●; BA 0.1%, □; Sodium dehydroacetate (DA) 0.05%,
 ■; DA 0.1%, △; Ethyl-*p*-hydroxybenzoate (EP) 0.05%

Each point represents the mean of four experiments.

はBAを0.1%添加した場合, *C. albicans* に対してはBAを0.1%添加した場合およびDAを0.1%添加した場合に英国薬局方の規定を充たす抗微生物効果が認められた。

本院の臨床分離菌株に対する保存剤の抗微生物効果をFig. 2に示した。MRSAに対してはBAを0.1%添加した場合(4検体中3検体), *B. cepacia* および *S. marcescens* に対してはBAを0.1%添加した場合, *P. aeruginosa* に対してはBAを0.05%および0.1%添加した場合, *C. albicans* に対してはBAを0.1%添加した場合およびDAを0.1%添加した場合に英国薬局方の規定を充たす

抗微生物効果が認められた。

BA 0.1%添加したアロプリノール液を4℃, 25℃および37℃で保管した場合の抗微生物効果をFig. 3およびFig. 4に示した。保管温度25℃および37℃ではいずれの菌種に対しても英国薬局方の規定を充たす抗微生物効果が認められた。しかし, 4℃では十分な抗微生物効果は認められなかった。

3. アロプリノール含量

アロプリノールの安定性に及ぼすBAの影響をTable 2に示した。4℃, 25℃および37℃いずれの保管温度においてもBA 0.1%添加アロプリ

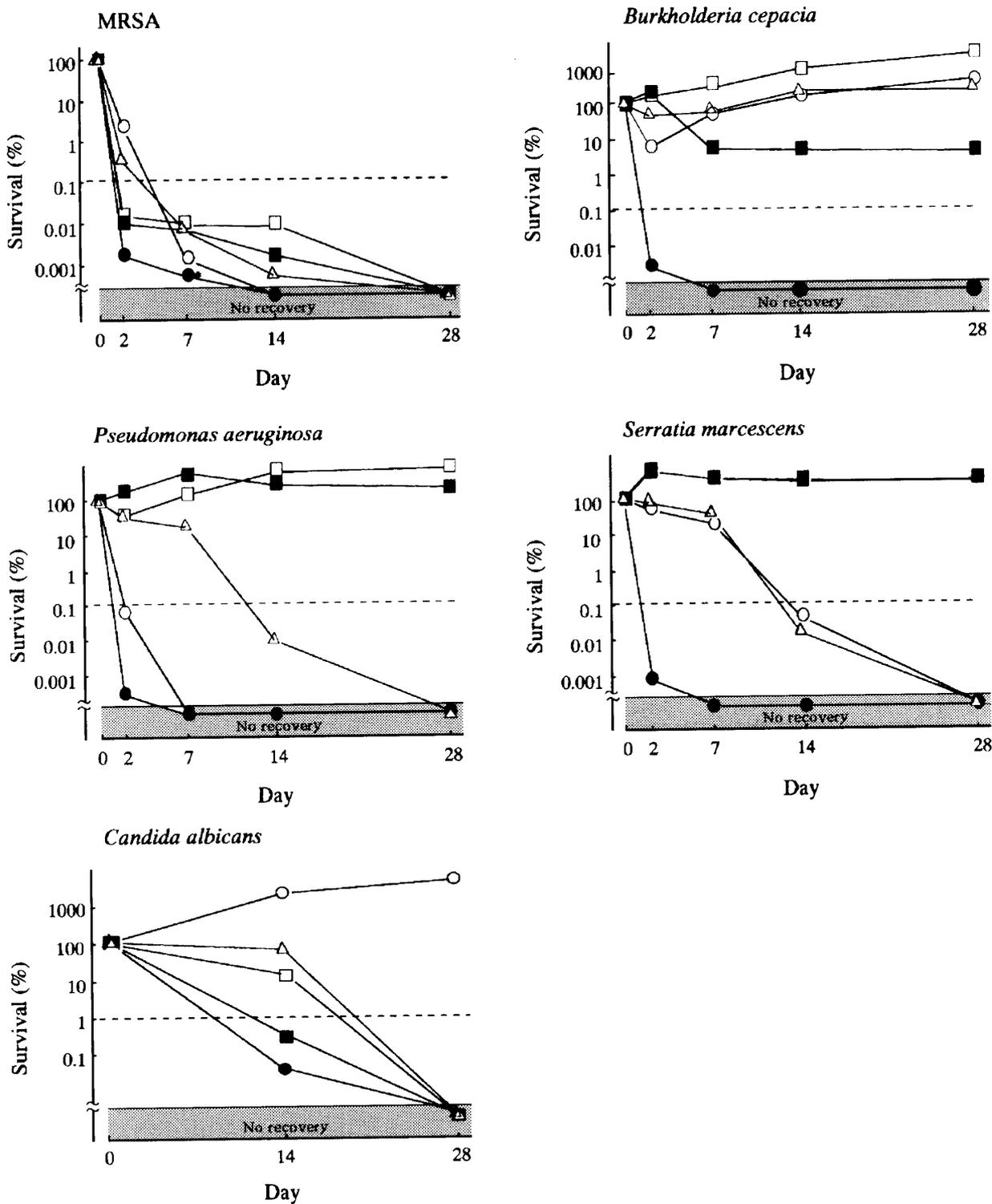


Fig. 2. Survival of Microorganisms Isolated from Clinical Specimens after Exposure to Various Preservatives

○ ; BA 0.05%, ● ; BA 0.1%, □ ; DA 0.05%, ■ ; DA 0.1%, △ ; EP 0.05%

Each point represents the mean of four experiments.

*Three out of four experiments represent no recovery.

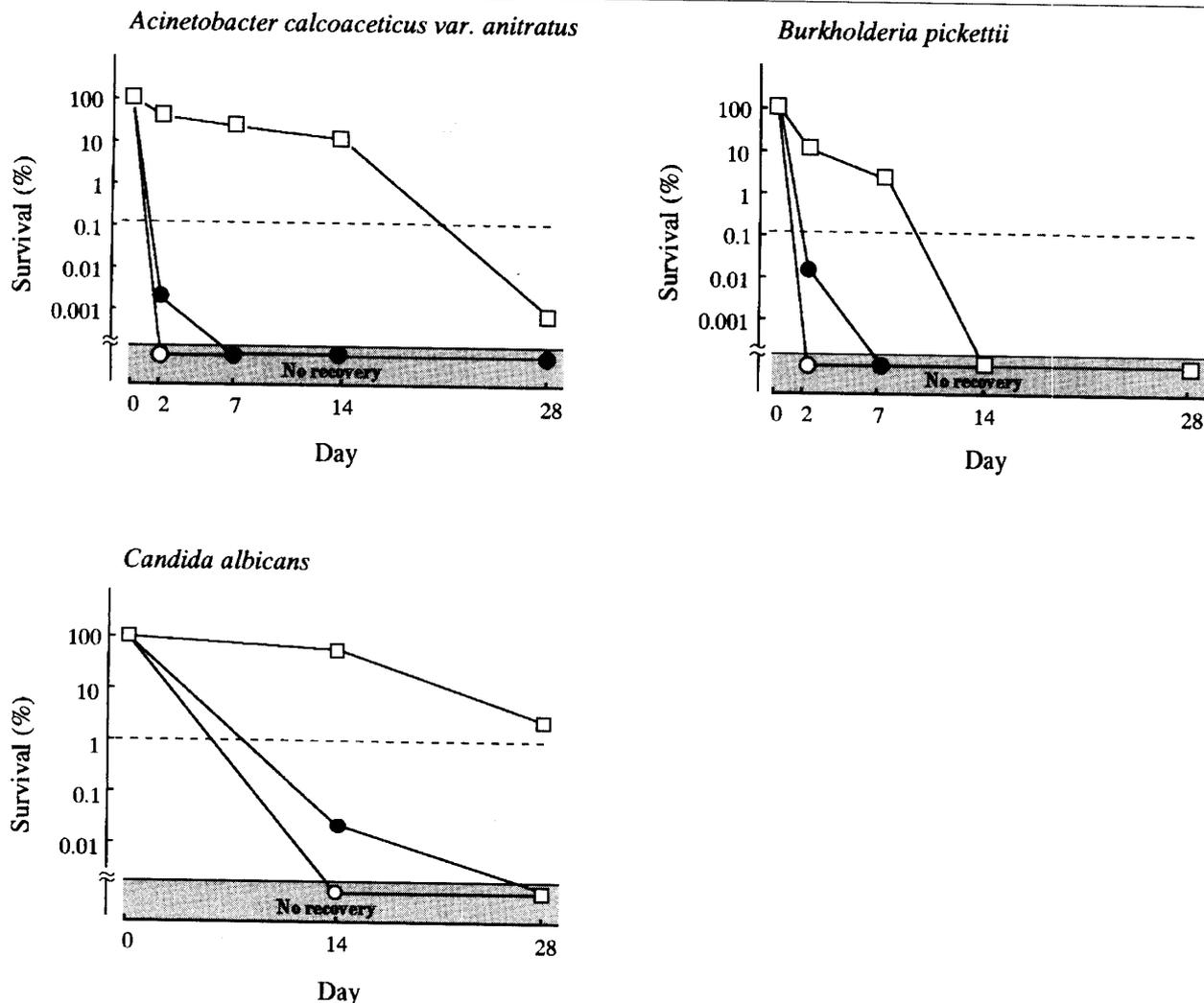


Fig. 3. Survival of Microorganisms Isolated from Allopurinol Gargle after Exposure to 0.1% Berzoic Acid

○; 37°C, ●; 25°C, □; 4°C

Each point represents the mean of four experiments.

ノール液の含量は、28日後においても保存剤無添加のアロプリノール液の含量と差は認められなかった。

4. XOD 阻害活性

BAのアロプリノールのXOD阻害活性に及ぼす影響をTable 3に示した。保存剤無添加およびBA 0.1%添加のアロプリノール液のXOD阻害活性は、コントロールのXOD阻害活性と差は認められなかった。

5. 保存剤添加の効果

患者4名に投与後のBA 0.1%添加アロプリノール回収残液4検体からはいずれも菌は検出さ

れなかった。

考 察

癌化学療法時にみられる口内炎の予防および治療に対して、アロプリノール液による含嗽が有効であることが報告されている¹⁻⁵⁾。しかし、調製後の保管中あるいは患者の使用中に微生物汚染を受けやすいことが報告されている⁵⁻⁸⁾。尾家らは患者が使用を終了したアロプリノール液からブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌および真菌を検出している⁷⁾。本院のアロプリノール液においてもブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌である *A. calcoaceticus*

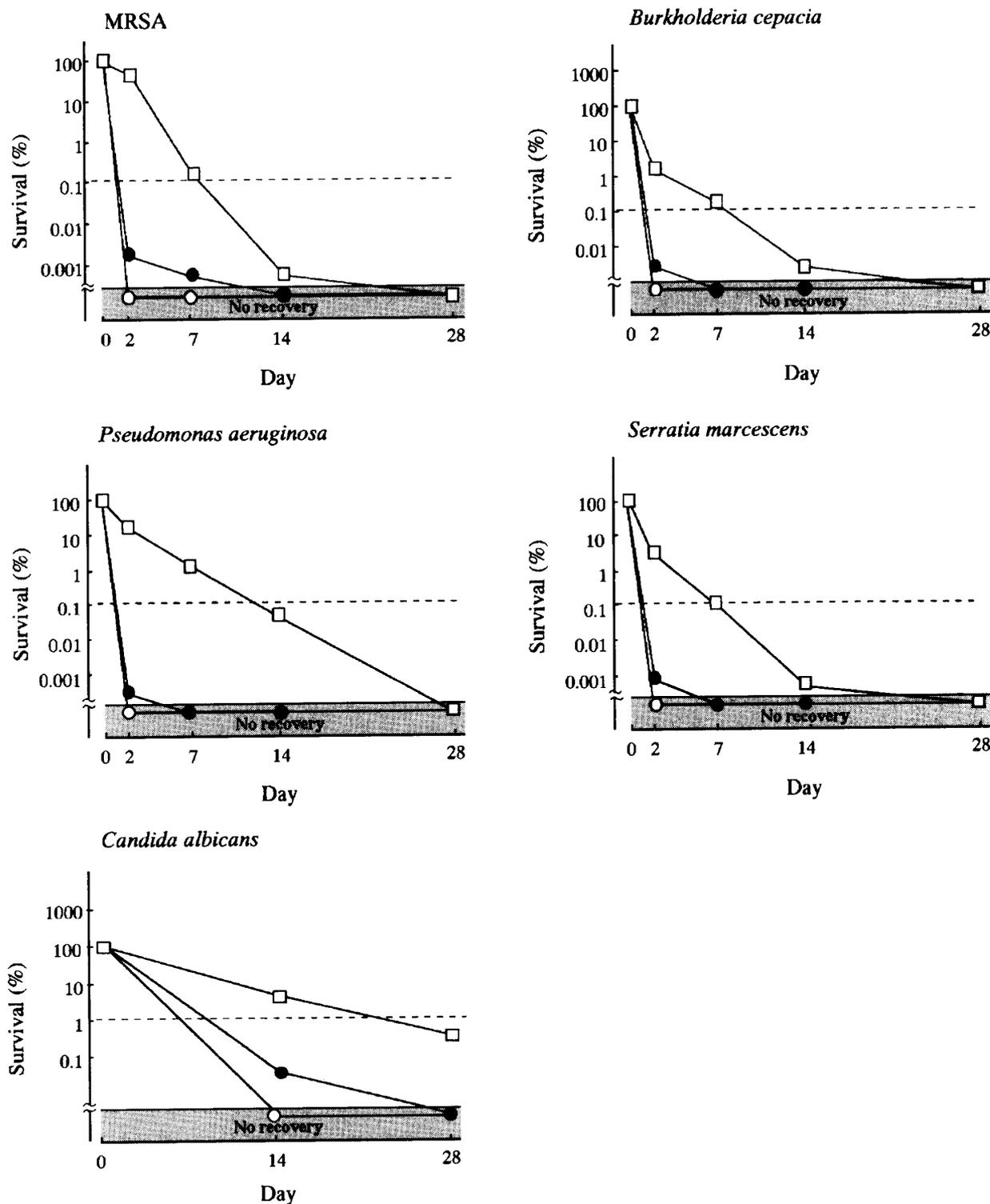


Fig. 4. Survival of Microorganism Isolated from Clinical Specimens after Exposure to 0.1% Benzoic Acid
 ○; 37°C, ●; 25°C, □; 4°C
 Each point represents the mean of four experiments.

var. anitratus, B. pickettii および真菌の C. albicans による微生物汚染が認められた。今回のアロプリ

ノール液の微生物汚染は、調製直後のアロプリノール液からは微生物は検出されなかったこと、

Table 2. Remaining Percentage of Allopurinol in Gargle Stored for 28 Days

Preservative	Temperature (°C)		
	4	25	37
None	98.8 ± 2.7	97.0 ± 1.5	97.1 ± 3.8
BA 0.1%	99.4 ± 4.4	97.3 ± 0.7	97.2 ± 3.0

Each value represents the mean ± S.D. of five experiments.

Table 3. Effect of Benzoic Acid on Inhibition of Xanthine Oxidase by Allopurinol

Sample	Inhibition (% of control) ^{a)}
Allopurinol gargle	99.8 ± 1.4
Allopurinol gargle + 0.1% BA	101.0 ± 2.5

Final concentrations of allopurinol and benzoic acid in reaction mixture are 3.3 µg/ml.

a) Inhibition was expressed as percentage of control containing authentic allopurinol. Each value represents the mean ± S.D. of four experiments.

微生物汚染例のすべてにおいて患者自身がアロプリノール液を保管して分割使用していたことから患者の使用中に発生したものと考えられる。これらの分離菌種は栄養要求度の低い環境水に常在しており^{15,16)}、院内感染の起炎菌として問題となる。

アロプリノール液の微生物汚染対策として保存剤を添加することが考えられている^{6,7)}。今回、我々は保存剤としてBA、DAおよびEPを、内用液剤に用いられる濃度¹⁷⁾でアロプリノール液に添加して抗微生物効果を検討した。これらのうちBAを0.1%添加した場合にのみ、アロプリノール液から検出された菌株および他の臨床分離株に対して抗微生物効果が認められた。野中らはEPを0.05%添加して調製したアロプリノール液は無菌状態で長期間にわたって保存できると報告している⁶⁾。しかし、チャレンジテストを行った結果ではないため臨床上での抗微生物効果は不明である。尾家らはアロプリノール液の保存剤として3種のパラオキシ安息香酸エステルを組合せた保存剤が英局規定のOral Preparationsの判定基準に適合することを報告している⁷⁾。しかし、アロ

プリノール液は局所用剤であることから、Topical Preparationsの判定基準を適用することが適切であると考えられる。Topical Preparationsに用いる保存剤の抗微生物効果はOral Preparationsの場合よりも強いことが要求されている。したがって、BA 0.1%はパラオキシ安息香酸エステルを組合せた保存剤と同等あるいはそれ以上の抗微生物効果を有するものと考えられる。

BA 0.1%添加のアロプリノール液の抗微生物効果に及ぼす保管温度の影響を検討した結果、25°Cおよび37°Cにおいて良好な抗微生物効果が認められ4°Cでは十分な抗微生物効果は認められなかった。他の製剤においても温度の低下に伴い保存剤の抗微生物効果が減弱した例が報告されており¹⁰⁾、その理由として温度低下に伴う保存剤と菌体との反応低下、菌体内への保存剤の進入・拡散速度の低下が考えられている¹¹⁾。0.1% BA添加アロプリノール液においても同様の理由で低温では十分な抗微生物効果が認められなかったと考えられる。したがって、0.1% BA添加アロプリノール液は冷蔵庫ではなく室温で保管することが必要であると考えられる。

保存剤は良好な抗微生物活性を有するとともに主薬の安定性に対して影響を与えないことが必要である。BA 0.1%添加アロプリノール液は28日後においても含量の低下は認められなかったことから、BAの添加はアロプリノールの安定性に影響を及ぼさないと考えられる。

抗癌剤による口内炎の発症機序には不明な点が多いが、抗癌剤によって発生したフリーラジカルによる口腔粘膜の組織破壊に続いて炎症が生ずると考えられている。アロプリノールの口内炎に対する作用機序の一つとしてXODによるフリーラジカル発生の抑制作用が考えられている¹⁸⁾。BA 0.1%添加のアロプリノール液はXOD阻害活性に影響を及ぼさなかった。このことから、BAはアロプリノールの薬効には影響を及ぼさないと考えられる。

患者投与後に回収したBA 0.1%添加アロプリノール液には微生物汚染は認められなかったことから、アロプリノール液の微生物汚染対策としてBA 0.1%添加の有用性が示唆された。また、保存剤を使用する際には安全性について十分に配慮しなければならない。本院におけるアロプリノール液の1日使用量は約60mlである。BA 0.1%添加アロプリノール液を誤飲した場合、BAの摂取量は許容1日摂取量(5 mg/kg以下)¹⁹⁾の範囲内にある。このことから、0.1%BA添加アロプリノール液は安全に使用できるものと考えられる。

謝辞 微生物汚染検査についてご協力いただいた本院中央検査部副臨床検査技師長の澤赫代博士ならびに本院病棟の看護職員諸氏に深謝いたします。

引用文献

- 1) 堂園晴彦, 中村和男, 本屋敏郎, 中村佐知子, 新村亮二, 三輪勝洋, 石橋丸應, 永田行博, 癌と化学療法, **16**, 3449-3451 (1989).
- 2) 神渡幹夫, 堂園晴彦, 永田行博, 産婦人科の実際, **40**, 2099-2101 (1991).
- 3) 藤村隆, 嶋祐一, 沢崎邦広, 巴陵宣彦, 藤田秀春, 穴田栄一郎, 塩田しげる, 癌と化学療法, **18**, 2463-2466 (1991).
- 4) 南出純二, 小泉博義, 小沢幸弘, 深野史靖, 徳永誠, 逢坂由昭, 森脇良太, 癌の臨床, **39**, 1249-1251 (1993).
- 5) 谷名寧子, 室井政子, 丁元鎮, 大谷トミ子, 吉上裕子, 中村順, 真崎規江, 坂上吉一, 病院薬学, **18**, 510-515 (1992).
- 6) 野中範子, 中野美紀, 小坪一哉, 中尾泰史, 大坪健司, 大石了三, 病院薬学, **22**, 409-415 (1996).
- 7) 尾家重治, 山本千恵子, 松岡加津子, 神谷晃, 薬剤学, **56**, 119-125 (1996).
- 8) 桑原敬子, 松永尚, 田崎正信, 森昌斗, 佐賀病薬誌, **24**, 23-27 (1996).
- 9) 調剤指針注解編集委員会編, “調剤指針注解-1997”, 薬事日報社, 東京, 1996, pp.297-299.
- 10) 岸田充広, 寺澤千佳子, 大田博子, 町支臣成, 堀本重紀, 林田静恵, 長尾幸江, 石橋不可止, 高科成良, 医薬ジャーナル, **27**, 548-554 (1991).
- 11) 新谷洋三, 医薬ジャーナル, **22**, 2001-2006 (1986).
- 12) S.F.Harley, “British Pharmacopoeia 1993”, London Her Majesty's Stationery Office, London, 1993, p. A192.
- 13) “USP 23”, UNITED STATES PHARMACOPEIAL CONVENTION, INC., Rockville, MD, 1995, p.45.
- 14) 金田尚志, 植田伸夫編, “過酸化脂質実験法”, 医歯薬出版, 東京, 1980, pp.144-146.
- 15) 松宮良子, 桑原裕子, 奥村悦子, 三輪峰子, 加藤はる, 加藤直樹, 渡邊邦友, 上野一恵, 日環感, **9**, 24-27 (1994).
- 16) 吉沢花子, 山川真理子, 鈴木明子, 西尾淳子, 黒須洋子, 三輪清子, 助川淑子, 小嶋昌子, 日環感, **9**, 28-34 (1994).
- 17) 日本薬剤師会編, “第九改訂 調剤指針”, 薬事日報社, 東京, 1992, p.92.
- 18) 赤沢修吾, 桜井雅温編, “がん化学療法の副作用対策”, 先端医学社, 東京, 1992, pp.215-226.
- 19) J.E.F. Reynolds, “MARTINDALE The Extra Pharmacopoeia 29 th ed.”, The Pharmaceutical Press, London, 1989, pp.1355-1358.