

令和元年6月14日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08192

研究課題名（和文）MRIによる非破壊技術を応用したクリーム剤乳化安定性の高精度予測手法の構築

研究課題名（英文）Precise prediction of destabilization kinetics of a pharmaceutical emulsion using magnetic resonance imaging

研究代表者

大貫 義則（Onuki, Yoshinori）

富山大学・大学院医学薬学研究部（薬学）・客員教授

研究者番号：10350224

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：本申請課題では、エマルジョン製剤（スキนครリームなど）の長期保存に伴う乳化安定性を詳細に評価・予測する手法の構築を試みた。検討では、MRIおよび時間温度換算則（TTSP）などの新規技術を活用し、実際の臨床現場で院内製剤として使用されるメントール配合ジフェンヒドラミンクリーム剤の乳化安定性を評価した。MRIによって長期保存に伴うエマルジョン製剤の乳化状態を詳細に評価し、TTSPによる時系列解析を行ったところ、目標を満たす高精度な乳化安定性予測手法の構築に成功した。加えて、本手法を活用することで、試料の乳化安定性についての深い理解が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MRIは医療分野を中心に広く活用されている分子イメージング技術である。また、時間温度換算則（TTSP）は、ある事象の変化に対する時間依存性と温度依存性を等価に扱う経験則であり、化学分野の素材評価などを中心に広く応用されている。本申請課題は、これらの新規手法を製剤物性評価へ応用し、その有用性を示した点で学術的意義は大きい。また、検討に用いた試料は、実際の臨床現場で院内製剤として使用されるメントール配合ジフェンヒドラミンクリーム剤である。申請課題を通して、実用的な知見が数多く得られた。以上より、本研究成果は、今後のエマルジョン製剤の開発に大きく寄与することが期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is the precise prediction of destabilization kinetics of a pharmaceutical emulsion. Magnetic resonance imaging (MRI) and time-temperature superposition principle (TTSP) are cited as a key technology of this study. MRI is a popular molecular imaging method based on the principle of NMR, while TTSP is one of the most useful extrapolation techniques based on the Arrhenius approach. The state of sample emulsions was monitored using magnetic resonance imaging, and then the phase separation behaviors were analyzed by TTSP. This study succeeded in demonstrating these technologies were powerful for this purpose. It enables us to perform a kinetic analysis based on the Arrhenius methodology precisely. This technique can be applied to a wide range of pharmaceutical properties. Thus, we believe the breakthrough findings of this study will bring about great benefits for pharmaceutical research.

研究分野：物理系薬学

キーワード：エマルジョン 製剤安定性 時間温度換算則 MRI スキนครリーム

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Oil-in-water (o/w)型エマルションは、適用部位への塗布が容易で、塗布後の使用感も良いため、外用を目的とした医薬品などに広く利用されている。一方で、エマルションは微細な油滴が水相中に分散する熱力学的に不安定な分散系である。そのため、エマルション製剤の乳化安定性は製剤の安定性に大きな影響を与える。一般的に、o/w型エマルションの劣化挙動として、油滴のクリーミング、フロキュレーション、合一、オストワルド熟成などの過程が知られている。フロキュレーションやクリーミングは可逆的な劣化現象であり、攪拌によって元の分散状態へ戻すことができるものの、ひとたび合一やオストワルド熟成などが生じると、元の分散状態へ戻すことはできない。なお、エマルション製剤の品質(外観や成分均一性など)は、油滴のクリーミングやフロキュレーションなどの軽微な乳化状態の変化によっても著しく損なわれる可能性がある。そのため、エマルション製剤を長期保存した時の乳化安定性の理解は、その処方設計において、有効性と安全性の確保に並ぶ重要な検討課題である。エマルション製剤の長期保存に伴う乳化安定性の理解には、わずかな乳化状態の変化を検出できる高感度かつ高精度な評価手法と、経時的な乳化状態の変化挙動を取り扱える優れた時系列解析手法との融合が必要である。

近年、申請者は、エマルション製剤の乳化状態の評価に、分子イメージング技術の1つである磁気共鳴画像法(MRI)を応用してきている。MRIは、水プロトンの核磁気共鳴現象(nuclear magnetic resonance, NMR)を利用することで非破壊的に検体内部の様子を可視化することができる。さらに、分子の拡散性やプロトンの回転運動などを表わすMRパラメータを用いて画像化を行えば、検体内の水の分子運動性を可視化することも可能である。これまでの研究成果から、申請者は、MRIを応用することで、試料内の微細なクリーミング挙動を非破壊的に観察できることを見出している。従来の乳化状態評価技術に比べ、MRIを活用した本手法は極めて優れている。

一方で、エマルション製剤の長期保存安定性を予測する手法については、これまでにほとんど研究が行われておらず、十分な予測手法が確立されたとは言い難い。長期保存に伴う安定性予測のための一般的な手法として、加速試験が適用される。最も容易な加速試験は高温加速試験と呼ばれる高温条件(例えば40℃など)でエマルションを保存し評価する方法である。しかし、現時点では、これら加速試験で得られたエマルションの不安定化挙動を扱う解析手法が構築されておらず、得られたデータから試料の長期保存安定性を定量的に予測することは極めて困難な状況である。

2. 研究の目的

上記の背景から、本研究では、MRIおよび時間温度換算則(TTSP)を活用して、エマルション製剤の長期保存に伴う乳化安定性変化の高精度予測を試みた。TTSPは、ある事象の変化に対する時間依存性と温度依存性を等価に扱う経験則であり、反応速度定数を求めることなくArrhenius式による速度論的な解析が可能であり、化学分野などを中心に広く応用されている。本検討では、メントール配合ジフェンヒドラミンクリームを選択し、高温保存に伴う相分離挙動を詳細に評価することとした。なお、本試料は、実際の臨床現場で慢性腎臓病に伴う掻痒症の治療のための院内製剤として広く使用されている。薬効面での評価は高いものの、保存安定性に課題があることが指摘されている製剤である。検討では、試料の高温加速試験を実施し、経時的な相分離の挙動をMRIによって観察した。そして、MRI画像からTTSPによる時系列解析を行った。

3. 研究の方法

<試料の調製> 試料の処方をTable1に記す。既知量の清涼物質を溶解したエタノール溶液を調製し、それを市販のジフェンヒドラミンクリーム(レスタミンコーワクリーム1%, 興和株式会社)へ加え混合することで試料とした。

<MRIおよびTTSPを応用した相分離挙動の時系列解析> 調製した試料について様々な温度(30-45℃)での高温加速試験を実施した。試料は経時的に取り出して、MRI画像の撮像を行った。画像から相分離した下層面積を算出し、TTSPによる時系列解析を行った。大まかな解析手順として、最初に、各保存温度における特性値(下層面積)と対数時間との関係をプロットした。続いて、そのようにして得た曲線の1つをマスターカーブに設定し、マスターカーブに重なるよう、他の保存温度の曲線を水平移動した。なお、この時の時間軸上の水平移動量はシフトファクター(a_T)と呼ばれ、 a_T と測定温度の関係から、(1)式によってアレニウスプロットを作成し、活性化エネルギーの測定や相分離挙動の予測を行った。

Table 1. Formulation of the menthol and diphenhydramine cream.

Components	Weight (%)
Menthol-containing ethanol solution	14
l-Menthol	7.0
Thymol	0.40
Mentha oil	0.90
10% Camphor in ethanol	5.2
Ethanol	0.50
Diphenhydramine Cream	86

$$\ln k = \ln A - \left(\frac{E_a}{RT} \right) \quad (1)$$

4. 研究成果

4.1. MRI および TTSP によるエマルジョン製剤の相分離挙動解析

調製した試料を異なる温度で保存した時の試料のMRI画像 (T_2 強調画像)をFig. 1に示す。MRI画像から、すべての保存条件下で相分離が観察された。なお、過去の研究から、上層はクリーム相、下層は水相である。得られた画像から、本試料は保存温度の上昇に伴い相分離が促進するといった温度依存性が確認され、TTSPが適用できることが示された。そこで、TTSPによる時系列解析を実施した。

Fig. 2は、TTSPによる解析結果である。Fig. 1の画像から試料下部の水相面積を算出し、それを相分離の度合いの指標とした。Fig. 2aで示した様々な温度での下層面積の成長曲線のうち、45°Cの結果を解析の基準となるマスターカーブに設定した。Fig. 2bは45°Cの回帰曲線と a_T を用いて水平移動した各温度のプロットである。各温度の結果は水平移動によって45°Cのマスターカーブに収束しており、このことから、本試料の相分離挙動評価はTTSPによって適切に評価できることが示された。このようにして得た a_T と温度との関係からアレニウスプロットを作成した(Fig. 2c)。なお、作成されたアレニウスプロットは、35°C付近を境に二相性を示した。そのため、本試料の相分離挙動は高温側(35-45°C)と低温側(30-35°C)で異なることが見いだされた。相分離挙動の見かけの活性化エネルギーを算出したところ、高温領域(35-45°C)では89.1 kJ/mol、低温領域(30-35°C)では416 kJ/molであり、高温領域で試料を保存すると、相分離が顕著に進むことが明らかになった。

4.2. 相分離機構の解明

4.1の結果から、本試料の相分離挙動は低温側と高温側で異なることが示されたため、その理由を考察した。本製剤の場合、まず、油滴が上方へ移動するクリーミングが生じ、そのことが顕著な相分離を引き起こすと考えられる。なお、クリーミングは、ストークス式で表される。ストークス式では、クリーミングに寄与する因子として油滴の粒子径、連続相と分散相間の密度差および連続相の粘度が挙げられる。これらの因子のうち、試料の相分離が35°C付近を境に変化した原因として、申請者は、粒子径の関与に着目した。すなわち、試料中の油滴の合一挙動は35°Cを境に著しく変化し、これによって高温側と低温側とで異なる相分離挙動が観察されたと考察した。そこでこの考察を検証するために、続いての検討では後方散乱光強度測定によって各保存温度における経時的な油滴の合一挙動の観察を行った。

スタビリティータスターは多重光散乱現象を用いてエマルジョンの乳化状態を評価する装置である。試料部に内蔵された検出器がサンプル時間ごとに試料を鉛直方向に測定することで、経時的な乳化状態の変化を評価することができる。Fig. 3a-dは30、35、40および45°Cで保存したときの試料の後方散乱光強度の経時的な変化を示している。縦軸は測定開始時の値を0%とした場合の後方散乱光強度の変化率を示し、横軸は試料の高さ方向の位置を示す。各サンプリング時間は、カラースケールで表しており、赤および紫のプロファイルはそれぞれ初期値および実験終点の測定結果に対応する。いずれの試料においても、実験開始直後は、後方散乱光強度のベースラインが並行に低下し、その後、30および35°Cといった低温保存の試料では、それぞれおよそ18時間後および2時間40分後から、試料底部の後方散乱光強度が急激に低下した(Fig. 3)。なお、実験開始直後のベースラインの低下は油滴の合一を、その後の急激な後方散乱光強度の低下は相分離が開始したことを示している。そこで、実験開始直後から相分離が

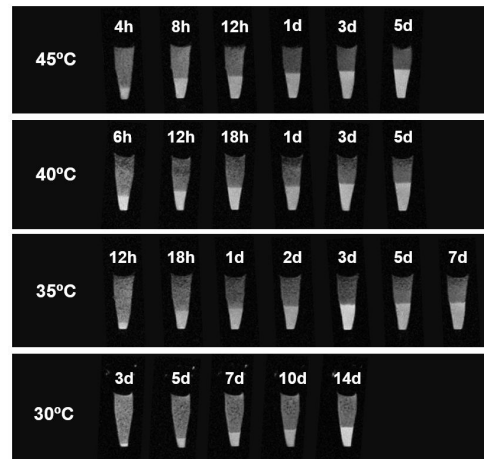


Fig.1. Continuous monitoring of the phase separation of pharmaceutical emulsion using MRI.

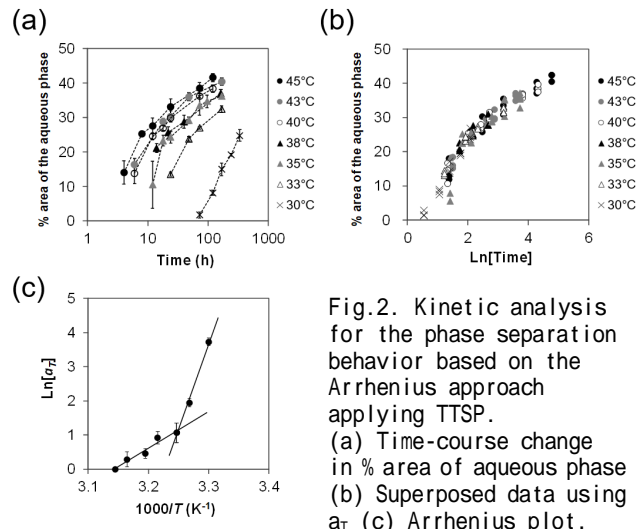


Fig.2. Kinetic analysis for the phase separation behavior based on the Arrhenius approach applying TTSP. (a) Time-course change in % area of aqueous phase (b) Superposed data using a_T (c) Arrhenius plot.

観察されるまでの後方散乱光強度のベースラインの変化を油滴の合一度合いと見なして4.1と同様の評価を行った(Fig.4)。解析の結果合一挙動から作成したアレニウスプロット(Fig.4c)も35 付近を境に二相性を示した。この結果から、本試料の相分離において、35 付近を境に油滴の合一挙動が変化したことが明らかとなった。なお、作成した合一挙動のアレニウスプロットから得られた見かけの活性化エネルギーは、35 - 45 では97.9 kJ/mol、30 - 35 では318 kJ/molであった。これらの値はMRIを用いた相分離挙動の解析で得られた値(35 - 45 では89.1 kJ/mol、30 - 35 では416 kJ/mol)と類似した。このことより、本試料の相分離挙動は、試料中の油滴の合一挙動に強く支配されていると結論付けた。

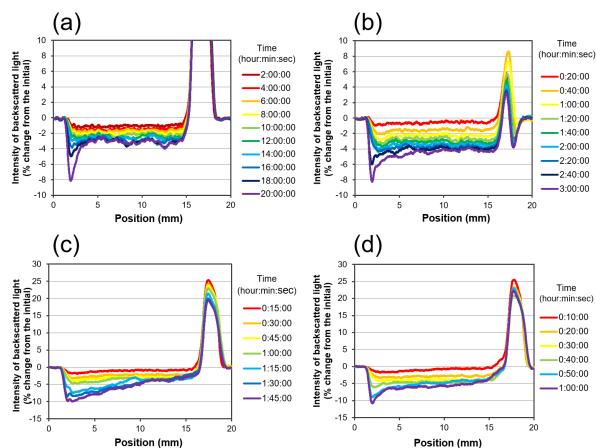


Fig.3. Changes in backscattering of the pharmaceutical emulsion during the accelerated testing at (a) 30 °C, (b) 35 °C, (c) 40 °C, and (d) 45 °C.

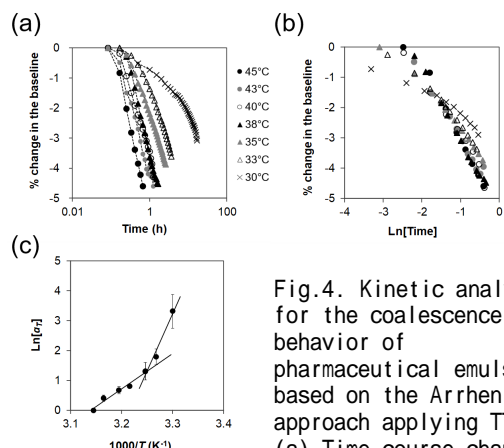


Fig.4. Kinetic analysis for the coalescence behavior of pharmaceutical emulsion based on the Arrhenius approach applying TTSP. (a) Time-course change in % area of aqueous phase (b) Superposed data using Ln[Time] (c) Ln[eta] vs 1000/T (K⁻¹)

本研究成果から、MRI および TTSP を活用することでエマルション製剤の乳化安定性を詳細に評価することができた。相分離機構が同じ範囲であれば本手法によってエマルション製剤の相分離挙動を予測することは可能である。さらに、解析結果から、エマルション製剤の安定化機構をより深く議論することもできる。本手法は、エマルションに限らず、様々な製品物性の評価に応用可能であると考えられる。そのため、今後、様々な用途でのさらなる応用が期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

1. Tsuji, T., Mochizuki, K., Okada, K., Hayashi, Y., Obata, Y., Takayama, K., Onuki, Y., Time-temperature superposition principle for the kinetic analysis of destabilization of pharmaceutical emulsions, *Int. J. Pharm.*, 563 (2019) 406-412.
2. Okada, K., Hirai, D., Kumada, S., Kosugi, A., Hayashi, Y., Onuki, Y., ¹H NMR relaxation study to evaluate the crystalline state of active pharmaceutical ingredients containing solid dosage forms using time domain NMR, *J. Pharm. Sci.*, 108 (2019) 451-456.
3. Ito, T., Okada, K., Leong, K. H., Hirai, D., Hayashi, Y., Kumada, S., Kosugi, A., Onuki, Y., A time-domain NMR study of the state of water in wet granules with different fillers and its contribution to the wet granulation process and to the characteristics of granules, *Chem. Pharm. Bull.* 67 (2019) 271-276.
4. Okada, K., Hirai, D., Hayashi, Y., Kumada, S., Kosugi, A., Onuki, Y., A novel approach to evaluate amorphous-to-crystalline transformation of active pharmaceutical ingredients in solid dispersion using time-domain NMR, *Chem. Pharm. Bull.* 67 (2019) 265-270.
5. Yokokawa, M., Setoyama, H., Okada, K., Hayashi, Y., Machida, Y., Onuki, Y., Obata,

Y., MRI monitoring of the mixed state of admixtures consisting of moisturizing cream and steroid ointment during the mixing process by a revolution/rotation-type hybrid mixer, Chem. Pharm. Bull., 66 (2018) 1078-1082.

6. Ito, T., Kida, C., Okada, K., Ikeda, J., Otomura, K., Hayashi, Y., Obata, Y., Takayama, K., Onuki, Y., Nondestructive monitoring of the dispersion state of titanium dioxide nanoparticles in concentrated suspensions using magnetic resonance imaging, Langmuir, 34 (2018) 12093-12099.

〔学会発表〕(計 11件)

1. 大貫義則、透析掻痒症治療製剤メントール・ジフェンヒドラミン含有クリーム of 製剤安定性評価、日本薬学会 第 139 年会, 2019.3.21-23, 千葉.
2. 大貫義則、MRI の製剤物性評価への応用、日本薬学会 北陸支部第 130 回例会, 2018.11.18, 富山(富山大).
3. 濱口雅史¹、藤井美佳²、山本佳久³、小出達夫⁴、深水啓朗²、林祥弘¹、大貫義則¹(¹富山大薬、²明治薬大、³帝京平成薬大、⁴国衛研) タクロリムス軟膏の高温保存による粘度物性変化と製剤均一性への影響、第 28 回日本医療薬学会年会、2018.11.23 5. 神戸
4. 辻貴大¹、望月晃司²、林祥弘¹、小幡誉子²、高山幸三³、大貫義則¹(¹富山大院・薬、²星薬大、³城西大・薬) 時間圧力換算則 (TSSP) を応用したエマルジョン製剤の長期保存安定性評価、日本薬剤学会 第 33 年会, 2018.5.30-6.1, 静岡
5. 辻貴大¹、望月晃司²、林祥弘¹、小幡誉子²、高山幸三³、大貫義則(¹富山大院薬、²星薬大、³城西大薬)O/W エマルジョンのクリーミング挙動評価における時間圧力換算則 (TSSP) の適用. 日本薬学会 第 138 年会, 2018.3.25-28, 金沢.
6. 大貫義則、MRI を利用した医薬品添加剤の製剤特性に対する作用評価. 第 17 回 医薬品添加剤セミナー. 2018.1.30, 東京, 2018.2.1, 大阪
7. 伊藤輝志¹、池田純子²、林祥弘¹、大貫義則¹(¹富山大、²日本ルフト)、分散液中の微粒子分散状態の可視化を目的とした新規 MRI 技術の構築、日本薬学会 北陸支部第 129 回例会, 2017.11.26, 石川.
8. 大貫義則、製剤物性評価における MRI の有用性、日本粉体工業技術協会 粒子加工技術分科会 講演会, 2017.9.8, 富山
9. 大貫義則、MRI を用いた半固形製剤の製剤物性評価、日本薬剤学会 物性FGセミナー2017, 2017.8.4, 東京.
10. 辻貴大¹、望月晃司²、林祥弘¹、高山幸三²、大貫義則¹(¹富山大、²星薬大)、エマルジョン製剤の相分離挙動予測に対する時間温度換算則の適用性、日本薬剤学会 第 32 年会, 2017.5.11-13, 大宮
11. 辻貴大、林祥弘、大貫義則(富山大院薬) エマルジョン製剤の長期保存安定性予測における時間温度換算則の有用性、日本薬学会 第 137 年会, 2017.3.24-27.宮城.

〔図書〕(計 1件)

1. 大貫義則(分担執筆)、固体医薬品の物性評価(第2版), p199-213,じほう, 2018.

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等 <http://www.pha.u-toyama.ac.jp/pharmtech/index/HOME.html>

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。