

MRIと時間温度換算則を応用した エマルジョン化粧品の高精度乳化安定性予測

富山大学大学院医学薬学研究部 (薬学)

大貫 義則

The time-temperature superposition principle (TTSP) was applied to the destabilization kinetics of an emulsion. A cream preparation that is clinically used for the treatment of dermatological diseases was tested as the model emulsion. After storage at temperatures ranging from 30 to 45 °C for designated periods, the emulsion state was monitored using magnetic resonance imaging, and then the phase separation behaviors observed were analyzed according to the Arrhenius approach applying TTSP. The Arrhenius plot showed a biphasic change around 35 °C, indicating that the separation behaviors of the sample were substantially changed between the lower (30–35 °C) and higher (35–45 °C) temperature ranges. This study also monitored the coalescence behavior using a backscattered light measurement. The experiment verified that the destabilization was initiated by coalescence of oil droplets and then it eventually led to obvious phase separation via creaming. Furthermore, we note the coalescence kinetics agreed well with the phase separation kinetics. Therefore, in the case of the sample emulsion, the coalescence behavior has a dominant influence on the destabilization process. This study offers a profound insight into the destabilization process of pharmaceutical emulsions and demonstrates the promising applicability of TTSP to pharmaceutical research.

1. 緒言

エマルジョンは互いに混じり合わない2成分以上の液体の一方を微粒子(分散相)として他方の液体(連続相)中に分散させた多相系であり、医薬品や化粧品の基剤として広く利用されている¹⁾。熱力学的に不安定であり、不安定化機構には油相と水相の比重差によって生じるクリーミング、粒子間に働く引力によって生じる凝集・合一、オストワルド熟成と呼ばれる分散相の分子拡散などを経て、最終的に分散相と連続相の2相に分離してしまう。なお、スキנקリームなどのエマルジョン製剤においては、クリーミングなどの軽微で可逆的な変化であっても、製品の品質(外観や有効成分の含量均一性など)を、著しく損なう恐れがある。そのため、エマルジョン製剤の設計において、優れた保存安定性を確保することは、有効性と安全性の確保に並ぶ重要な課題である。エマルジョン製剤の長期保存安定性を正確に理解するためには、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と考えられる。

エマルジョンの保存安定性評価手法としては、最も簡便な目視による評価の他に、粒子径測定法、動的光散乱法、濁度法などの様々な手法が提案されている。また、当

教室ではこれまでに、エマルジョン製品の保存安定性を非破壊的かつ高感度に評価するため、核磁気共鳴画像法(magnetic resonance imaging, MRI)を応用した新規エマルジョン製剤の評価方法を構築してきた^{2,3)}。MRIは核磁気共鳴(nuclear magnetic resonance, NMR)現象の原理を応用した分子イメージング技術であり、分子運動性を反映するMRパラメーター(T_1 および T_2 緩和時間や、拡散係数など)を用いて画像化すると、検体内部に含まれる水分子などの分子運動性を可視化することも可能である。MRIを応用した新規評価手法は、容器内部で起こるクリーム剤本来の劣化挙動を非破壊的に可視化できる点や、劣化挙動に対する感度が目視観察と比較して良好であるといった点において、他の評価手法よりも優れている。以上のような研究によって、エマルジョン製剤の保存安定性評価手法は、要求を十分に満たすレベルの手法が構築されつつある。

一方で、エマルジ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。一般的にエマルジョンの長期保存安定性を予測したい場合、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°Cなど)でエマルジ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ジョンの不安定化挙動を扱う解析手法が構築されていないため、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である。

以上の背景から、本論文ではエマルジョンの高精度な長期保存安定性予測を目指し、高温保存および遠心分離法を利用した加速試験による乳化状態の変化挙動について速度論的な解析を試みた。なお、速度論的な解析を行うために、本研究では時系列データ解析手法の1つである時間-温度



Precise prediction of the kinetic analysis of destabilization of pharmaceutical emulsions using magnetic resonance imaging and time-temperature superposition principle

Yoshinori Onuki

Graduate School of Medical and Pharmaceutical Science, University of Toyama

換算則 (time-temperature superposition principal, TTSP) に着目した。TTSPは、ある事象に対する時間と温度の影響が等価であることを前提とした経験則である^{4,5)}。高分子素材の機械的および電氣的緩和挙動の解析にしばしば用いられる。温度依存性を示す事象の経時的変化について、速度定数を求めずに、アレニウスプロットを用いた解析を行えるなどの利点がある。これまでに高分子素材などの素材化学の分野では、経時的な物性変化を評価するために盛んに用いられてきた。エマルジョンの劣化挙動はTTSPが活用できると考えられるものの、今のところ製剤物性評価への応用例は極めて限られている⁶⁾。そこで、我々はTTSPを応用してエマルジョン製剤の保存安定性を詳細に評価することとした。

メントール配合ジフェンヒドラミンクリームは、市販ジフェンヒドラミンクリームにメントールなどの清涼物質を配合したクリーム剤であり、慢性腎臓病に伴う掻痒症の治療のために院内製剤として広く処方されている。本製剤は、患者からの薬効面での評価は高いものの、その一方で、我々の過去の検討から保存安定性に課題があることが指摘されている^{7,8)}。そこで、本研究では、この相分離挙動をTTSPによって詳細に評価することとした。検討では、調製した試料を異なる温度で保存し、経時的に試料のMRI画像を撮像した。そして、MRI画像によって観察される相分離挙動にTTSPを適用し、本製剤の相分離機構について詳細な評価を行った。さらに、本研究ではスタビリティーテスターを用いて試料中の油滴の合一挙動を評価し、本製剤の相分離機構への関与についても詳細な検討を行った。

2. 方法

2.1. 試料および試薬

レスタミンコーワクリーム1%は興和株式会社 (Aichi, Japan) より購入したものをを用いた。*d*-カンフルは小堺製薬株式会社 (Tokyo, Japan) より購入したものをを用いた。エタノールはヤクハン製薬株式会社 (Hokkaido, Japan) より購入したものをを用いた。*l*-メントール、チモールはマイラン製薬株式会社 (Tokyo, Japan) より購入したものをを用いた。

2.2. メントール配合ジフェンヒドラミンクリームの調製

メントール配合ジフェンヒドラミンクリームの処方 Table 1 に示した。まず *d*-カンフルを 30% 溶解させたエタノール溶液を調製した。続いて、メントール溶液は *l*-メントール、チモール、ハッカ油および *d*-カンフルを 30% 溶解させたエタノール溶液をそれぞれ全量の 7、0.4、0.9 および 1.75% となるよう調製し、処方に対して全量が 14% となるようエタノールを加え調製した。最後にメントール溶液およびレスタミンコーワクリーム 1% の混合比

Table 1 Formulation of the menthol and diphenhydramine cream.

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

が 14:86 となるよう秤量し、ハイブリッドミキサー (Model HM-500; Keyence, Osaka, Japan) を用いて自転 800rpm、公転 2,000rpm で 5 分間混合した。

2.3. MRIを用いた相分離挙動の観察

調製した試料を 1mL ずつアシストチューブに分注し、恒温器 (Mini Incubator MI-100/G; Yonezawa Inc, Shizuoka, Japan) で任意の時間保存した。保存温度は 30、33、35、38、40、43 および 45℃ とした。経時的に試料を取り出し、核磁気共鳴装置 (MR mini SA; DS Pharma Biomedical Co., Ltd, Osaka, Japan) を用いて T_2 強調画像を作成した。繰り返し時間 (repetition time; TR) を 2,000ms、エコー時間 (time to echo; TE) を 89ms、撮像視野 (field of view; FOV) を $60 \times 60 \text{ mm}^2$ 、マトリックスサイズを 128×256 、積算回数を 1 回、スライス厚を 1mm に設定した。撮像した T_2 強調画像を基に、メントール配合ジフェンヒドラミンクリーム中の水相の比率を算出した。画像処理には Image j (Bethesda, MD, USA) を用いた。

2.4. スタビリティーテスターを用いた合一挙動の観察

メントール配合ジフェンヒドラミンクリームの合一挙動は、スタビリティーテスター (ST-1; Eko instruments, Tokyo, Japan) を用いて測定した。スタビリティーテスターはレーザー光 ($\lambda=870 \text{ nm}$) を試料に照射し、その透過光および後方散乱光強度の経時的変化から、エマルジョンの分散安定性を評価可能である。試料をおよそ 7mL ずつサンプル管に分注し、30、33、35、38、40、43 および 45℃ の条件下において、任意の時間間隔で測定した。

2.5. 光学顕微鏡による粒子観察

モデル試料の乳化粒子の状態を観察するために、35℃ で 0、50 および 100 分間保存した試料の一部を採取し、光学顕微鏡 (VHX-700FSP1344; Keyence, Tokyo, Japan) を用いて観察を行った。

2.6. TTSPによる解析

MRI およびスタビリティーテスターによって得られた測

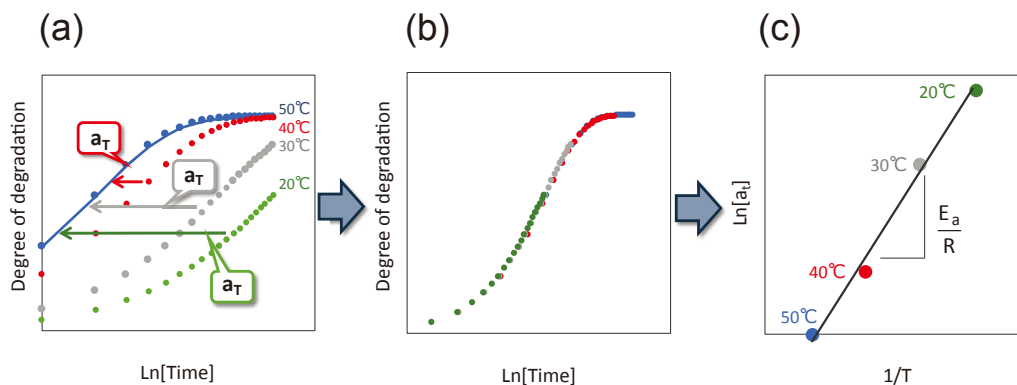


Fig. 1 Flow chart of TTSP. (a) The value of shift factor (a_T) at various temperature was calculated from the difference between the regression curves at reference temperature and the measured degree of degradation. (b) Time-course model of degree of degradation superposed with the regression curves at 50°C using the a_T value. (c) Typical example of Arrhenius plot using the a_T of the TTSP.

定結果に対しTTSP4, 5を適用した。TTSPによる解析手順を大まかに記す。例えば、様々な保存温度で保存した時の事象変化を測定した場合、まず、Fig. 1(a)のように特性値-対数時間の曲線として表す。続いて、これらの曲線の1つをマスターカーブとして設定し、このマスターカーブに重なるように他の曲線を水平移動し、1つの曲線を作成する(Fig. 1(b))。

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、以下の式(1)によって表される。

$$a_T = \frac{t_{ref}}{t_T} \dots \dots (1)$$

ここで、 t_{ref} は基準とした温度 (T_{ref}) での時間で、 t_T は任意の温度 (T) で同様の特性値を得るのに必要な時間である。なお、一般的にシフトファクターと測定温度の関係は、アレニウス式(2)として表すことができる。

$$\ln k = \ln A - \left(\frac{E_a}{RT} \right) \dots \dots (2)$$

ここで、 k は反応の速度定数、 A は頻度因子、 E_a は見かけの活性化エネルギー、 R は気体定数および T は絶対温度を表す。なお、式(1)、(2)を組み合わせると、シフトファクターは式(3)と定義される。

$$a_T = \exp \left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T_{ref}} - \frac{1}{T} \right) \right] \dots \dots (3)$$

ここで、 T_{ref} および T は絶対温度である。式(3)から、シフトファクターの対数と絶対温度の逆数の間に存在する直線の傾きから、見かけの活性化エネルギーを算出することや、任意の保存温度におけるシフトファクターを算出することが可能である(Fig. 1(c))。

T_{ref} を45°Cとした。マスターカーブから各プロットの水平移動量を算出し、各プロットの平均水平移動量を a_T とした。得られた a_T の対数値と絶対温度の逆数からアレニウスプロットを作成した。

3. 結果

3.1. TTSPによるメントール配合ジフェンヒドラミンクリーム の相分離挙動解析

本研究では、調製したメントール配合ジフェンヒドラミンクリームを異なる温度で保存し、経時的に試料の T_2 強調画像を撮像して、それらの相分離挙動を観察した(Fig. 2)。撮像した画像から、すべての実験条件下で相分離が観察された。なお、我々の過去の研究から、上層はクリーム相、下層は水およびエタノールで構成された水相を示している⁷⁾。本試料を45°Cで保存した場合、4時間以内に明らかな相分離が観察された一方で、30°Cで保存した場合、相分離が生じるのに要した期間はおよそ3日であった。このように、本試料の相分離挙動には保存温度依存性が確認されたため、TTSPによる詳細な解析を行うこととした。

Fig. 3(a)は、Fig. 2の結果から得られた各保存温度における、試料の水相面積の比率と時間の関係を表している。45°Cで保存した場合で水相面積の比率の最大値が観察されたため、45°Cを基準温度 T_{ref} とした。Fig. 3(b)は45°Cの回帰直線と a_T を用いて水平移動した各温度のプロットを示した。各温度のデータは45°Cのマスターカーブに収束しており、得られた a_T の妥当性が示された。 a_T の対数に対して各温度の逆数をプロットすることでアレニウスプロットを作成した(Fig. 3(c))。作成し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ことから、メントール配合ジフェンヒドラミンクリーム の相分離機構は高温側(35~45°C)と低温側(30~35°C)で異なることが示唆された。回帰直線の傾きから相分離挙動の見かけの活性化エネルギーを算出すると、35~45°Cでは89.1kJ/mol、30~35°Cでは416kJ/molであった。よって、低温側での保存と高温側での保存ではおよそ330kJ/molほど見かけの活性化エネルギーの差が存在すること明らかとなった。

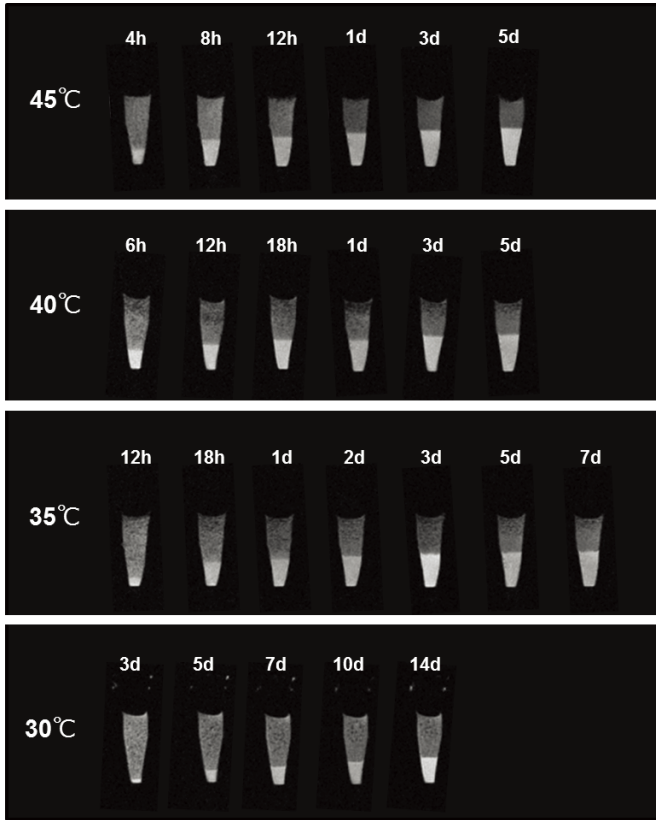


Fig. 2 Continuous monitoring of the phase separation of the menthol-diphenhydramine cream

The test creams were stored at different temperatures ranging from 30°C to 45°C, and then their T_2 weighted images (T_2 WIs) were acquired at designated intervals using MRI. The acquisition parameters were as follows; TR=2000ms, TE=89ms, FOV=60 X 60mm², matrix size=128 X 256, number of excitation=1 and slice thickness=1mm.

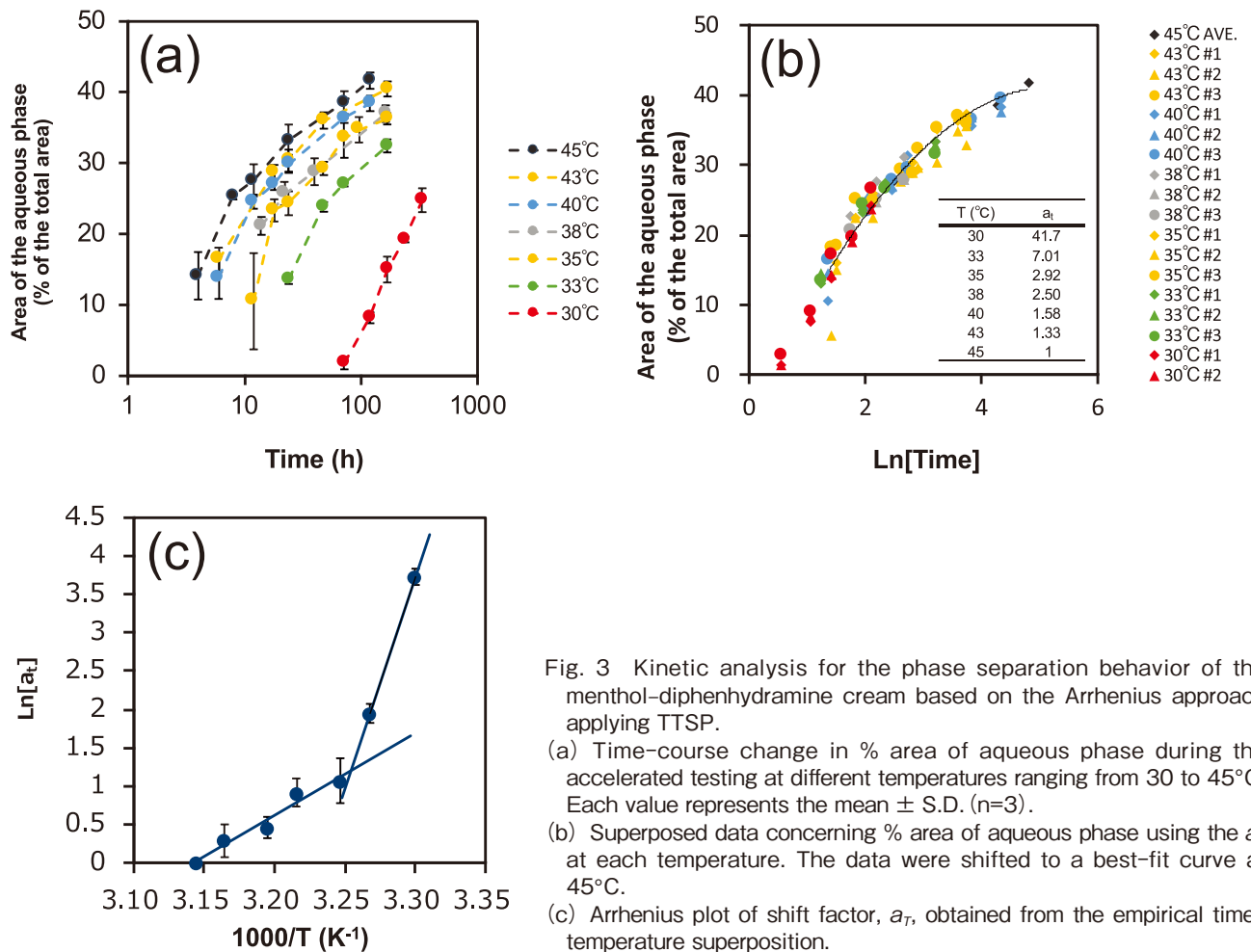


Fig. 3 Kinetic analysis for the phase separation behavior of the menthol-diphenhydramine cream based on the Arrhenius approach applying TTSP.

- (a) Time-course change in % area of aqueous phase during the accelerated testing at different temperatures ranging from 30 to 45°C. Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).
- (b) Superposed data concerning % area of aqueous phase using the a_T at each temperature. The data were shifted to a best-fit curve at 45°C.
- (c) Arrhenius plot of shift factor, a_T , obtained from the empirical time-temperature superposition.

3. 2. 保存温度の上昇に伴うメントール配合ジフェンヒドラミンクリームの相分離機構の変化

3. 1. の結果から、実験した温度範囲 (30 ~ 45℃) では、試料の乳化状態の変化挙動には異なる 2 つの機構が存在する可能性が示された。本製剤の不安定化は、油滴の上方への移動によって生じるクリーミングが主な原因であると考えられる。クリーミング速度はストークスの式 (5) で表すことができる¹⁾。

$$v = 2r^2 (\rho - \rho_0) g / 9\eta \dots (5)$$

ここで、 v はクリーミング速度、 r は粒子径、 ρ_0 は連続相の密度、 ρ は分散相の密度、 η は粘度、 g は重量加速度を示す。ストークスの式によると、クリーミングを防ぐ方法として平均粒子径の減少、連続相と分散相間の密度差の減少および連続相の粘度の増加が挙げられる。特に、エマルション中の油滴径がその安定性に大きく影響することがよく知られている。本実験における温度変化によって、連続相と分散相間の密度差および連続相の粘度の変化はほとんどないと考えられるものの、油滴の粒子径は大きく変化する可能性が考えられる。すなわち、35℃ 付近を境に油滴の合一挙動が変化し、その結果として相分離機構が変化し

たと考えた。

そこで、本検討では、スタビリティーテスターを用いて、試料中の油滴の合一挙動を詳細に評価することとした。スタビリティーテスターは多重光散乱現象を用いて試料の分散および保存安定性を評価する装置である。Fig. 4 は 30, 35, 40 および 45℃ で保存した時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されており、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、後方散乱光強度がベースラインに並行に低下した。その後、30 および 35℃ 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. 4)。実験開始直後のベースラインの低下は油滴の合一を、また、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と考えられる。事実、35℃ での保存試料について顕微鏡による油滴観察を行ったところ、ベースラインの低下のみが観察

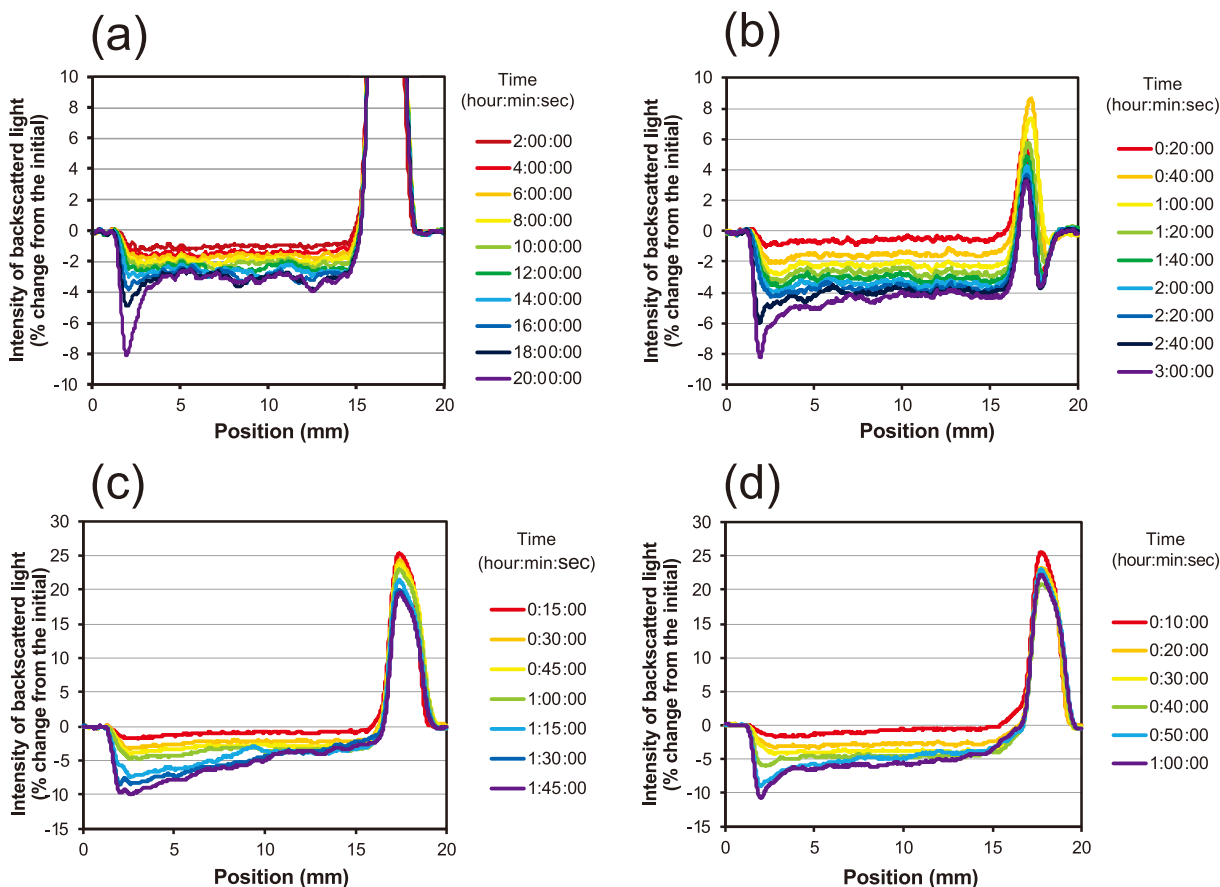


Fig. 4 Changes in backscattering profiles of the menthol-diphenhydramine cream during the accelerated testing at (a) 30°C, (b) 35°C, (c) 40°C, and (d) 45°C. The X-axis represents the position of the sample bottle; the position “0” corresponds to the bottom of the sample. Line profiles measured at different times are color-coded: the initial and the last sampling times correspond to red and purple lines, respectively.

された100分後までの試料からは、時間の経過と共に油滴径は増大し、合一が進んでいる様子を確認することができた (Fig. 5)。一方で、高温保存 (40 および 45°C) では実験時間が短かったため急激な後方散乱光強度の低下は観察されなかったものの、油滴の合一に伴うベースラインの低下に続き、徐々に試料底部から上部にかけて勾配が観察された。これは合一した粒子が上方へ移動したことに起因しており、試料底部で油滴密度が減少し、相分離が開始したことを示している。

以上の検討結果から、スタビリティーテスターによって試料中の油滴の合一挙動を評価できることが示された。

Fig. 3で観察された低温領域と高温領域における相分離挙動の相違には油滴の合一挙動が深く関与していると考えられる。そこで、続いての検討では、両者の関係について詳細な検討を行った。Fig. 6(a)に、相分離が観察されるまでの試料中間部分の後方散乱光強度の変化を示した。すなわち、このグラフの後方散乱光強度の低下は、合一が進み、油滴径が増大していく様子を表している。結果より、後方散乱光強度の低下は温度依存的であり、45°Cの時に最も速やかな後方散乱光強度の低下が観察された。したがって、保存温度の上昇に伴って油滴の合一速度が増大している様子が確認された。

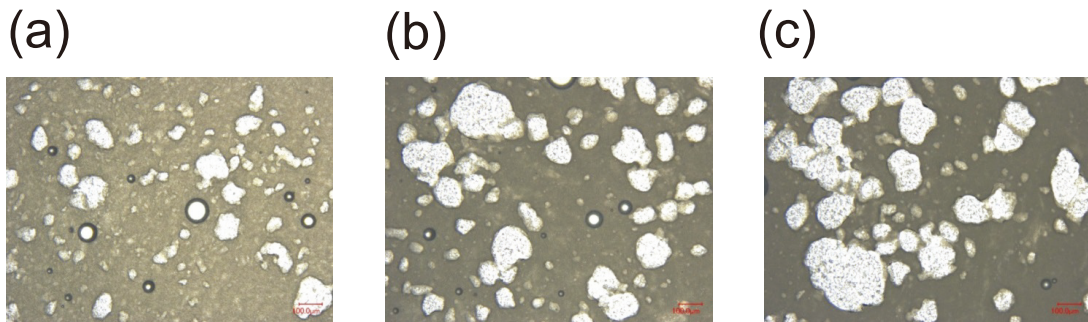


Fig. 5 Microscopic images of droplets dispersing in emulsions stored at 35°C for (a) 0 min, (b) 50 min and (c) 100 min (250× magnification).

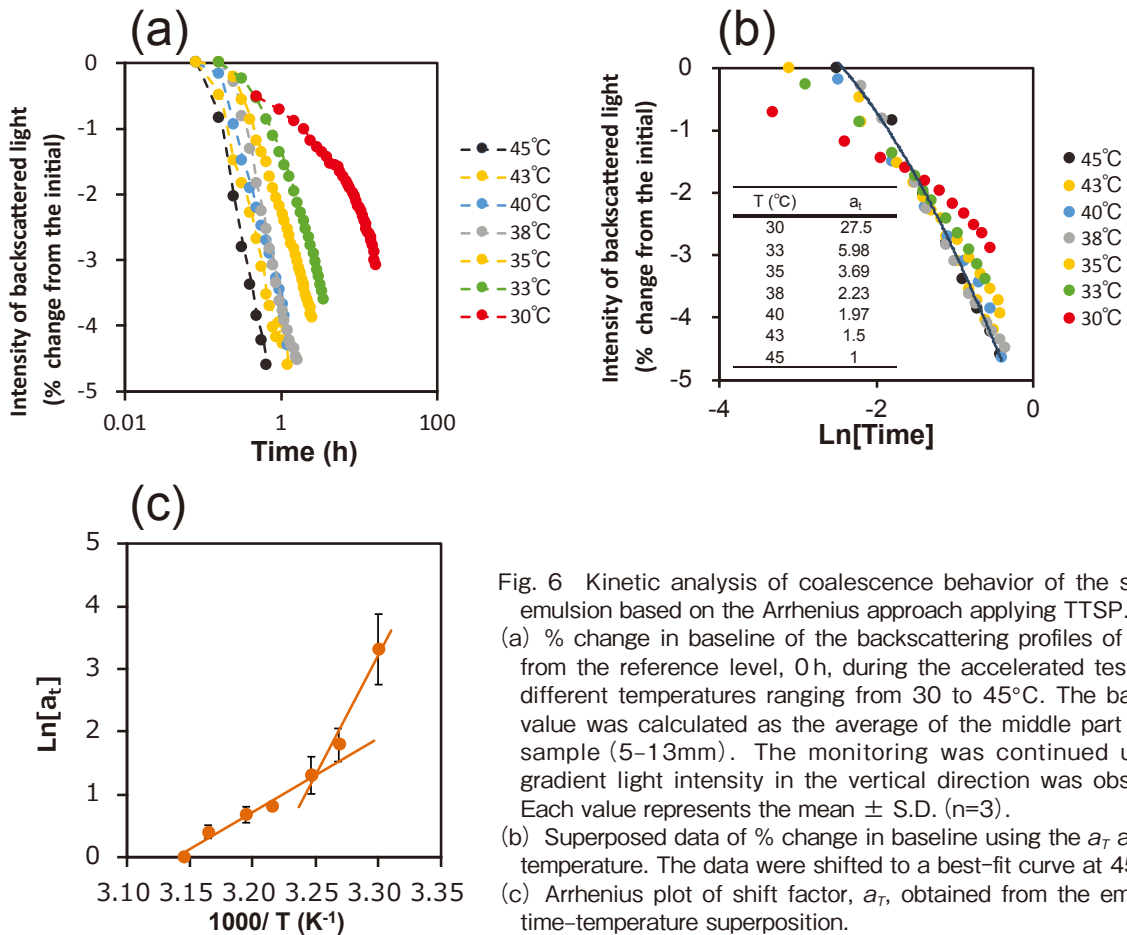


Fig. 6 Kinetic analysis of coalescence behavior of the sample emulsion based on the Arrhenius approach applying TTSP.

(a) % change in baseline of the backscattering profiles of Fig. 4 from the reference level, 0h, during the accelerated testing at different temperatures ranging from 30 to 45°C. The baseline value was calculated as the average of the middle part of the sample (5–13mm). The monitoring was continued until a gradient light intensity in the vertical direction was observed. Each value represents the mean \pm S.D. (n=3).

(b) Superposed data of % change in baseline using the a_T at each temperature. The data were shifted to a best-fit curve at 45°C.

(c) Arrhenius plot of shift factor, a_T , obtained from the empirical time-temperature superposition.

続いて、Fig. 6(a)で得られた油滴の合一挙動についてTTSPによる解析を試みた。相分離挙動の場合と同様に45℃を T_{ref} として選択し、各保存温度における a_T を算出した。Fig. 6(b)は、45℃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を示した。33～43℃のプロットは、45℃のマスターカーブによく収束しており、 a_T の妥当性が示された。一方で、30℃のプロットは、マスターカーブと若干異なる挙動を示した。これは、測定開始時の後方散乱光強度の低下が比較的緩やかだったため、 a_T のばらつきが増大したことが原因と考えられる。Fig. 6(c)はアレニウスプロットおよびその回帰直線を示す。合一挙動から作成したアレニウスプロットも35℃付近を境に二相性を示した。この検討によって、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、回帰直線の傾きから合一挙動の見かけの活性化エネルギーを算出すると、35～45℃では97.9kJ/mol、30～35℃では318kJ/molであった。この活性化エネルギーの値はMRIを用いた相分離挙動の解析で得られた値と類似した。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。

4. 総括

本研究では、慢性腎臓病に伴う掻痒症の治療のために院内製剤として用いられるメントール配合ジフェンヒドラミンクリーム製の製剤安定性をより深く理解するため、MRIおよびスタビリティテスターなどを活用して相分離挙動を評価し、さらにTTSPによる時系列解析を行った。本研究成果によってTTSPによる時系列解析がエマルション製剤の製剤安定性を評価する上で非常に有用であることが明らかになった。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。

謝辞

本研究の遂行にあたり、多大なるご支援をいただきました

た公益財団法人コスメトロジー研究振興財団に心より感謝申し上げます。

(引用文献)

- 1) Aulton, M.E., Taylor, K.M.G., 2013, Aulton's Pharmaceutics: The Design and Manufacture of Medicines, Elsevier, Edinburgh.
- 2) Onuki, Y., Horita, A., Kuribayashi, H., Okuno, Y., Obata, Y., Takayama, K., 2014, Non-destructive monitoring of creaming of oil-in-water emulsion-based formulations using magnetic resonance imaging, Drug Dev Ind Pharm, 40, 937-943.
- 3) Onuki, Y., Kida, C., Funatani, C., Hayashi, Y., Takayama, K., 2016, MRI as a promising tool for evaluation of the stability of cosmetic emulsions, Int J Cosmet Sci, 38, 272-278.
- 4) Ding, H.-Z., Wang, Z.D., 2007, Time-temperature superposition method for predicting the permanence of paper by extrapolating accelerated ageing data to ambient conditions, Cellulose, 14, 171-181.
- 5) Alwis, K.G.N.C., Burgoyne, C.J., 2006, Time-temperature superposition to determine the stress-rupture of aramid fibres, Appl Compos Mater, 13, 249-264.
- 6) Mochizuki, K., Takayama, K., 2014, Prediction of color changes using the time-temperature superposition principle in liquid formulations, Chem Pharm Bull, 62, 1225-1230.
- 7) Onuki, Y., Machida, Y., Yokawa, T., Seike, C., Sakurai, S., Takayama, K., 2015, Magnetic resonance imaging study on the physical stability of menthol and diphenhydramine cream for the treatment of chronic kidney disease-associated pruritus, Chem Pharm Bull, 63, 457-462.
- 8) Onuki, Y., Yokokawa, M., Utsumi, S., Obata, Y., Machida, Y., Seike, C., Hayashi, Y., Takayama, K., 2016, Effect of surfactants and thickeners on the stability of menthol-diphenhydramine cream identified by magnetic resonance imaging, Chem Pharm Bull, 64, 1616-1621.