経口メチルセルロース液剤のゲル化に及ぼす保存温度の影響

下山哲哉, 宮城由莉子, 伊藤邦彦, 小林道也*

Effect of Storage Temperature on Gelation of Oral Methylcellulose Formulation

Tetsuya Shimoyama, Yuriko Miyagi, Kunihiro Itoh, and Michiya Kobayashi*

Department of Pharmaceutics (Clinical Pharmaceutics), School of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences University of Hokkaido; 1757 Kanazawa, Tobetsu-cho, Ishikari-gun, Hokkaido 061-0293, Japan.

(Received January 7, 2013; Accepted March 12, 2013)

Heating a methylcellulose solution forms a thermal-reversible hydrogel. After the hydrogel forms, its properties change according to its temperature. However, the effects of heating this solution during storage and then cooling it are unclear. We investigated the effects of this heating and cooling on rheological and drug release characteristics. We prepared samples of methylcellulose solution (2% methylcellulose and 20% D-sorbitol) and examined them under two conditions: 1) storage for 24 hours at 4 to 30°C, 2) storage for 24 hours at 4 to 50°C, then cooling to 4°C and maintained for 4 hours. We performed rheological investigations of viscosity, gelation temperature and gel strength, and examined the drug release characteristics by using a diffusion cell method with acetaminophen as the model drug. It was found that as the storage temperature rose, the methylcellulose solution increased in viscosity and the gelation temperature and gel strength changed. During storage at 30°C, the amount of drug released by the solution increased and the diffusion coefficient was high. When cooled to 4°C, the solution recovered its viscosity, gelation temperature, gel strength and drug release characteristics, regardless of the previous storage temperature. These results clarify that although the rheological and drug release characteristics of methylcellulose solution change with changes in storage temperature, the original characteristics are recovered after the solution is cooled to 4°C and maintained at that temperature for four hours.

Key words—methylcellulose; gelation; storage temperature; drug release

緒 言

メチルセルロースは、セルロースを構成するグルコース残基の水酸基を化学的にメチル化した半合成高分子で、食品や医薬品の増粘剤、懸濁化剤及びコーティング剤としても広く用いられている。メチルセルロース水溶液は低温ではゾル状態で、メチルセルロース分子と水和している。しかし、温度の上昇によって、メチルセルロース分子は段階的に水和水を失い、メチル基置換度の高い疎水性領域で分子間の会合が起こる。その結果、メチルセルロース分子が凝集して、粘度及び濁度の急激な上昇を経てゲル化する。¹⁻⁴⁾ メチルセルロース水溶液のゲル化温度は 50–55°C で、^{5,6)} そのままでは体温でゲル化しない。しかし、塩析力の高い無機塩⁷⁻⁹⁾あるいは糖アルコール¹⁰⁾の添加により、メチルセルロース分子の

脱水和が促進され、メチルセルロース水溶液のゲル化温度を体温 (37°C) 以下まで低下させることも可能である。わかもと製薬¹¹⁾では、メチルセルロースマクロゴール 4000-クエン酸ナトリウム混合系を用いて、ヒト体温でゲル化するリズモン® TG 点眼液、^{11,12)} 及びオフロキサシンゲル化点眼液 0.3% 「わかもと」¹³⁾を上市している。これらの点眼液は投与前にはゾル状態であるが、眼表面温度でゲル化することにより、薬物徐放性や結膜囊内の滞留性が向上している。

われわれは先に、2% メチルセルロース水溶液に糖アルコールの 1 つで、矯味剤としても用いられる D-ソルビトールを 20% 添加すると、メチルセルロース分子の脱水和が促進され、ゲル化温度が体温以下に低下する特性を応用し、^{10,14)} 胃内で温度 (体温) に応答してゲル化することにより薬物放出を制御する経口徐放性液剤の設計を行ってきた。¹⁴⁻¹⁶⁾ 本液剤は加温に伴いゲル化することから、保存時及び服用時の温度によって異なる物性を示すことが推測

The authors declare no conflict of interest.

北海道医療大学薬学部薬剤学講座 (臨床薬剤学)

*e-mail: platypus@hoku-iryo-u.ac.jp

される。前述のメチルセルロース点眼液のインタビューフォームには「しゃ光、10°C以下に保存」^{11,13)}添付文書には、「本剤は熱応答ゲル製剤のため、室温中に放置するとゲル化することがあるので、本剤がゲル化した場合は冷蔵庫等で冷却してから点眼すること」^{17,18)}と記載されている。したがって、われわれが設計したメチルセルロース液剤も同様に、保存温度には十分な注意が必要であることが考えられる。

メチルセルロース分子の温度による凝集には3段階があることが知られており、低い温度から順に、ゾル状態、一時的な凝集状態、ゲル状態に分類される。¹⁹⁾メチルセルロース分子の凝集状態は温度によって異なることから、メチルセルロース液剤は調製後の温度変化により、形成するゲルの性質も変化することが予想される。このことは、患者が本剤を保管あるいは携帯するときの温度変化、また服用時の温度により、粘度や胃内でゲル化した際の薬物徐放性が変化する可能性が考えられるが、詳細に検討した報告はない。そこで、本研究ではメチルセルロース液剤の保存温度が及ぼすレオロジー的性質及び液剤からの薬物放出への影響について評価し、本剤の保存上の注意点を明らかにすることを目的とした。

方 法

1. 実験材料 メチルセルロース (MCE-400, Lot. 7105564, 粘度グレード 400 mPa・s) は、信越化学工業㈱より供与されたものを使用した。アセトアミノフェン (ピリナジン®末) は、長生堂製薬㈱より購入したものを使用した。D-ソルビトールは、和光純薬工業㈱より購入したものを使用した。その他実験に供した試薬は市販特級規格以上のものを使用した。

2. 液剤の調製 2/3容の超純水中にD-ソルビトールを溶解し、70–80°Cに加温した後にメチルセルロースを加え、均一に分散するまで攪拌した。その後、50°Cで1時間、さらに氷冷下で1時間攪拌してメチルセルロースを完全に溶解し、最後に超純水を加えて容積を調整した。薬物 (アセトアミノフェン) を含有する液剤は、50°Cで攪拌する時点でアセトアミノフェンを添加して溶解し、以下同様に調製した。最終濃度はメチルセルロース 2.0% (w/v)、D-ソルビトール 20% (w/v)、及びアセトアミ

ノフェン 1% (w/v) である。

3. 液剤の保存条件 インキュベータ (MIR-153, 三洋電機㈱) 中、4, 10, 15, 20, 25, 30°Cで24時間静置したメチルセルロース液剤、及び10, 15, 20, 25, 30, 37, 50°Cで24時間静置した後、4°Cで4時間冷却した液剤を実験に用いた。

4. 粘度の測定 E型粘度計 (TV-20H, model E, 東機産業㈱) にコーン・ロータ (1°34'×R24) を取り付けて測定した。メチルセルロース液剤 (薬物非添加) 1 mLをロータ内に注入し、20°Cで30分静置後、回転速度 6, 12, 30, 60 rpm (ずり速度 22.89, 45.96, 114.9, 228.9 s⁻¹) における粘度をそれぞれ測定した。なお、30分の静置により、いずれの温度条件の試料も 20±0.5°C以内になっていることを確認した。

5. ゲル化温度の測定 音叉型振動式粘度計 (SV-10, ㈱エー・アンド・デイ) を用いて測定した。4°Cに冷却したメチルセルロース液剤 (薬物非添加) 10 mLを、恒温循環装置 (NCB-1200, 東京理化工業㈱) を用いて、液剤が60°Cになるまで加温した。液剤の温度上昇により変化する粘度を経時的に測定し、粘度が減少から増加に転じる変曲点の温度をゲル化温度とした。

6. ゲルの破断強度解析 試料のゲルは、各保存温度で24時間静置したメチルセルロース液剤 (薬物非添加) 8 mLを容量 10 mL (内径 33 mm, 高さ 10 mm) のシャーレに入れ、インキュベータ (MIR-153, 三洋電機㈱) 中、37°Cで24時間静置して調製した。破断強度解析は、レオメーター (RHEOMETER CR-500DX, ㈱サン科学) を用いて行った。試料のゲルが入ったシャーレを試料台に載せ、直径 2.0 cm のプランジャーを用い、試料台の上昇速度は 60 mm/min で測定した。試験開始後、ゲルが破断されて応力 (stress) が大きく低下する点における荷重をゲル強度とした。また、プランジャーが移動した距離を、試料の厚みで除して歪み (strain) とした。

7. In vitro 薬物放出実験 液剤からのアセトアミノフェンの放出実験は、Miyazaki らの方法に従い、拡散セル法により行った。²⁰⁾各セルの容積は 4 mL で、セルロース膜 (Viskase, Inc.) の表面積は 2.67 cm² である。Donor 側には、アセトアミノフェンを含有する液剤を 4 mL, receptor 側には同

量の第十六改正日本薬局方 (JP16) 崩壊試験第 1 液を入れ, 37°C の恒温槽中にて, 60 strokes/min で振とうし, 経時的に receptor 側の試験液を採取した. 試験液中の薬物濃度は分光光度計 (UV-1800, 株式会社島津製作所) を用いて, 244 nm における吸光度を測定して算出した. Receptor 側の試験液は経口投与時を想定して, 開始 1 時間までは崩壊試験第 1 液 (pH 1.2), 引き続き 5 時間は第 2 液 (pH 6.8) を使用し, 合計 6 時間実施した.

ゲルからの累積薬物放出量を半固形製剤からの薬物放出に関する Higuchi の拡散モデル (Eq. 1)²¹⁾により解析し, 拡散定数 D を算出した. ここで, C_0 は薬物の初濃度, Q は単位面積当たりの累積放出薬物量, t は時間である.

$$Q = 2C_0 \left(\frac{Dt}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}} \quad (1)$$

8. 統計学的処理 測定値は, 平均値 ± 標準誤差 (means ± S.E.) で示した. Dunnett の一元配置分散分析及び Student の t 検定により検定を行い, 危険率 5% をもって統計学的に有意とした.

結 果

1. 粘度 20% D-ソルビトールを添加したメチルセルロース水溶液のゲル化温度は 37°C 以下であることから,^{10,14)} 4°C から 30°C の条件で保存した液剤, 並びに 20°C から 50°C の条件で保存後, 4°C に

冷却した液剤について粘度の測定を行った. メチルセルロース液剤は保存温度にかかわらず, ずり速度の増加に伴い粘度が減少する, 非ニュートン流動性を示した (Fig. 1). また, 25°C 及び 30°C で保存したとき, 低ずり速度では, 4°C 及び 20°C で保存したものよりも粘度は高い値を示したが, 高ずり速度では, 同程度の値を示した [Fig. 1(A)]. 一方, 加温後に 4°C に冷却した液剤では, 一度 50°C で保存した液剤は他の液剤と比較して, 若干低い値を示したが, 他の保存温度では, いずれのずり速度においても粘度に大きな変化はみられなかった [Fig. 1(B)].

2. ゲル化温度 15°C から 25°C の条件で保存したメチルセルロース液剤のゲル化温度は, 4°C で保存したものと比較して有意に高い値を示したが, 30°C で保存したものでは, 4°C で保存したものと同程度の値まで低下し, その差は認められなかった (Fig. 2). 一方, 加温後に 4°C まで冷却したメチルセルロース液剤は, 保存温度にかかわらず, ゲル化温度に変化は認められなかった.

3. ゲルの破断強度解析 メチルセルロース液剤から調製したゲルの強度は, 保存温度を 4°C から 20°C とした条件では温度の上昇に伴って増大したが, 25°C 及び 30°C ではゲルの強度は低下した [Fig. 3(A)]. 一方, 加温後に冷却したメチルセルロース液剤のゲル強度には, 大きな変化は認められ

Fig. 1. Effect of Storage Temperature on Shear-rate-dependent Viscosity at 20°C for Methylcellulose Formulation Stored at (A) (●) 4°C, (■) 20°C, (▼) 25°C, and (▲) 30°C, (B) (●) 4°C, (□) 20°C, (△) 30°C, (▽) 37°C, and (◇) 50°C for 24 h, then Cooled to 4°C for 4 h

Values are means ± S.E. of 3 determinations, but most of the error bars are hidden behind the symbols.

ず、応力-ひずみ曲線の原点近傍の傾きはほぼ等しく、同様の弾性を示した [Fig. 3(B)].

4. *In vitro* 薬物放出実験 20°C で保存した液剤は試験開始後セル内でゲルを形成し、保存温度 4

Fig. 2. Effect of Storage Temperature on Gelation Temperature of Methylcellulose Solution without (black bar) and with (white bar) 4-h cooling at 4°C

Values are means $\pm$ S.E. of 3 determinations. ** $p < 0.01$, significantly different from the solution kept at 4°C. †† $p < 0.01$, significantly different from the solution without cooling.

°C と同様の薬物放出挙動を示した。一方、30°C で保存したメチルセルロース液剤も同様にゲルを形成したが、薬物放出量は 4°C で保存したものと比較して若干増加した [Fig. 4(A)]. また、薬物放出量の増大に伴い、保存温度 30°C における拡散定数は、4°C と比較して有意に高い値を示した (Table 1)。一方、ゲル化温度以上である 37°C 及び 50°C に加温後 4°C に冷却したメチルセルロース液剤では、一度ゲル化後、ゾルに再転移したにもかかわらず、終始 4°C で保存した液剤と同様の薬物放出挙動を示した [Fig. 4(B)]. また、拡散定数に差はほとんど認められなかったことから、薬物放出制御能は同等であることが示された (Table 1)。

Table 1. Diffusion Coefficients, D , for *In Vitro* Release of Acetaminophen from Methylcellulose Gel Formulations at 37°C

Storage temperature (°C)	D ($\times 10^{-6}$ cm ² /s)
4	5.42 $\pm$ 0.05
20	5.15 $\pm$ 0.16
30	7.97 $\pm$ 0.80**
37→4	5.98 $\pm$ 0.67
50→4	5.29 $\pm$ 0.15

Values are means $\pm$ S.E. of 4 determinations. ** $p < 0.01$, significantly different from that stored at 4°C.

Fig. 3. Stress-strain Curves of Methylcellulose Gels Prepared at 37°C after 24-h Storage at (A) 4–30°C and (B) 4–50°C Followed by 4-h Cooling at 4°C

Fig. 4. Cumulative *In Vitro* Release of Acetaminophen as a Function of Time from (A) (○) Aqueous Solution and Methylcellulose Gels Stored for 24 h at (●) 4°C, (■) 20°C, and (▲) 30°C, (B) (▽) 37°C, and (◇) 50°C, then Cooled for 4 h at 4°C

Release was into simulated gastric fluid of pH 1.2 for a period of 1 h and subsequently into simulated intestinal fluid of pH 6.8 at 37°C. Values are means $\pm$ S.E. of 4 determinations, but most error bars are hidden behind symbols.

考 察

メチルセルロース水溶液は加温すると、メチルセルロース分子から段階的に水和水が失われ、メチル基置換度の高い疎水性領域で凝集が起こる。さらに温度が上昇すると凝集して、ゲル化する。²²⁾ 一方、加温されたメチルセルロース水溶液は冷却すると、メチルセルロース分子の水和が回復することで、疎水的相互作用は消失し、^{7,23,24)} ゲルはゾルに再転移するとともに、粘度は加温前の状態まで低下する。このメチルセルロースのゾル-ゲル転移には、単にゾル、ゲルだけでなく、メチルセルロース分子の一時的な凝集状態が中間に存在することから、¹⁹⁾ 水溶液の温度変化はゲル化温度や形成するゲルの強度及び弾性になんらかの影響を及ぼすことが考えられる。

はじめに、メチルセルロース液剤の粘度に対する保存温度の影響を検討した。25°C 及び 30°C でメチルセルロース液剤を保存すると、加温によってメチルセルロース分子の凝集が進行したため、低い速度では 4°C で保存した液剤よりも高い粘度を示し、速度の増大に伴って、弱い凝集状態が破壊され、4°C で保存した液剤と同程度の粘度まで低下したと考えられた。一方、加温した液剤を 4°C に冷却したところ、終始 4°C で保存した液剤と同様の粘

性挙動を示した [Fig. 1 (B)]。これは、冷却によってメチルセルロース分子が再水とされ、疎水性領域間の相互作用が消失して加温前のゾル状態に戻ったためと考えられた。^{7,23,24)}

次に保存温度がゲル化温度に及ぼす影響を評価した。4°C から 30°C の条件で保存したメチルセルロース液剤のゲル化温度を測定したところ、保存温度 15°C から 25°C にかけてゲル化温度が上昇した (Fig. 2)。これらの温度で加温されたメチルセルロース分子は凝集し、この状態からのゲル化には、より大きなエネルギーを要することが示唆された。対して、30°C で保存した場合、4°C と比較して粘度は増大したが [Fig. 1 (A)]、ゲル化温度は変化しなかった。これは 30°C ではメチルセルロース分子はゲル化する前の凝集状態にあるものの、25°C と比べて凝集が進行し、凝集状態からのゲル化に必要なエネルギーが減少した結果、保存温度 4°C の液剤と同程度のゲル化温度を示したと推測された。また、加温後 4°C に冷却した液剤では、保存温度によるゲル化温度の差は認められなかった。これは粘度と同様、冷却によりメチルセルロース分子の凝集が解かれたためと考えられた。

本メチルセルロース液剤は、胃内でゲル化して薬物放出を抑制する。そのため、形成するゲルには、

徐放性の持続及び消化管内滞留性の観点から、ある程度の強度や弾性が求められる。そこで、4°C から 30°C の条件で保存したメチルセルロース液剤から調製したゲルの強度を測定した。4°C から 20°C の条件で保存した液剤から調製したゲルでは、保存温度の上昇に伴い、メチルセルロース液剤のゲル強度は増大したが、保存温度 25°C 及び 30°C ではゲル強度が低下した [Fig. 3 (A)]。4°C から 20°C で保存された液剤は、保存温度の上昇に伴ってメチルセルロース分子の運動性は増大しており、この状態から加温されると、架橋点でより密な凝集が生じ、ゲル化したと考えられた。一方、25°C 及び 30°C で保存した液剤では、先の粘度測定の結果から示唆されたように、メチルセルロース分子は一時的な凝集状態にある。このゲル化に至らない弱い凝集状態から加温されると、メチルセルロースの分子運動が制約されるため、架橋点における分子凝集が不十分になった結果、ゲル強度が低下したと考えられた。一方、加温後 4°C に冷却した液剤から調製したゲルでは、応力-ひずみ曲線に変化がほとんど認められなかったことから [Fig. 3 (B)]、ゲル調製直前の保存温度が、ゲルの強度及び弾性に影響することが示唆された。

最後に、保存温度が液剤からの薬物放出性に及ぼす影響を明らかにするため、薬物放出性を拡散セル法で評価した。保存温度 20°C のメチルセルロース液剤の薬物放出挙動は 4°C で保存したものと同様であったのに対して、保存温度 30°C の液剤では累積薬物放出量、及び拡散定数の増大が確認された [Fig. 4 (A) and Table 1]。保存温度 30°C の液剤では、メチルセルロース分子はゲル化する前の一時的な凝集状態にあり、これが 37°C に加温されると、他の保存条件の液剤に比べて、密度が疎なゲルを形成し、薬物がゲルマトリックス内をより容易に移動したためと考えられる。この薬物放出挙動の変化の程度は、水溶液と比較すると十分に低いものの、経口投与した場合、液剤からの薬物放出性に若干の影響を及ぼすことが示唆された。一方、加温後 4°C に冷却した液剤では、薬物放出挙動に変化は認められなかった [Fig. 4 (B)]。したがって、メチルセルロース液剤からの薬物放出は 30°C における保存時に増大するが、十分に冷却することで薬物放出制御能は回復することが明らかになった。

本研究より、メチルセルロース液剤は薬物徐放性を発揮させるには、4°C から 20°C で保存するのが望ましいが、それ以上の温度で保存した場合も冷蔵庫などで数時間冷却することで、問題なく使用できることが明らかになった。メチルセルロースは温度応答性高分子として、ゾル-ゲル転移を利用した製剤の設計に有用な基剤である。しかし、そのゲル形成性は単なるゾル-ゲル転移によるものではなく、保存温度によっては同じゾル状態であっても、メチルセルロース分子の凝集状態によって、ゲル化した際の物性が変化する。本研究から得られた知見は、メチルセルロース液剤を安全かつ有効な薬物療法に適用する上で重要である。また、患者や医療関係者への製剤の取り扱い方法、製造後の流通及び品質管理などの観点からも、必要不可欠な情報が得られたと考える。

謝辞 この実験の一部は、科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金（若手研究（B）課題番号 24790165））により行われた。また、メチルセルロースを供与頂いた信越化学工業㈱に深く感謝致します。

REFERENCES

- 1) Nakagawa A., Steiniger F., Richter W., Koschella A., Heinze T., Kamitakahara H., *Langmuir*, **28**, 12609–12618 (2012).
- 2) Haque A., Jones A. K., Richardson R. K., Morris E. R., *Carbohydr. Polym.*, **22**, 291–300 (1993).
- 3) Kobayashi K., Huang C., Lodge T. P., *Macromolecules*, **32**, 7070–7077 (1999).
- 4) Takeuchi M., Kageyama S., Suzuki H., Wada T., Notsu Y., Ishii F., *Colloid Polym. Sci.*, **281**, 1178–1183 (2003).
- 5) Kunisaki N., Sano M., “Food Technology, Food Polysaccharides,” Saiwai Shobo Co., Ltd., Tokyo, 2001, pp. 180–193.
- 6) Feller R. L., Wilt M., “Evaluation of Cellulose Ethers for Conservation,” The Getty Conservation Institute, Marina del Rey, 1990.
- 7) Xu Y., Wang C., Tam K. C., Li L., *Langmuir*, **20**, 646–652 (2004).
- 8) Liang H. F., Hong M. H., Chung C. K., Lin Y. H., Chen C. H., Sung H. W., *Biomacro-*

- molecules*, **5**, 1917–1925 (2004).
- 9) Xu Y., Li L., Zheng P., Lam Y. C., Hu X., *Langmuir*, **20**, 6134–6138 (2004).
 - 10) Levy G., Schwarz T. W., *J. Am. Pharm. Assoc.*, **47**, 44–46 (1958).
 - 11) Interview Form, Rysmon® TG Ophthalmic Solution 0.25%/0.5%, 5th ed., Wakamoto Co., Ltd., 2010.
 - 12) Takeuchi M., *Gekkan Yakuji*, **51**, 1305–1309 (2009).
 - 13) Interview Form, Ofloxacin Gel Forming Ophthalmic Solution 0.3% 「Wakamoto」, 1st ed., Wakamoto Co., Ltd., 2008.
 - 14) Itoh K., Hatakeyama T., Kimura T., Shimoyama T., Miyazaki S., D'Emanuele A., Attwood D., *Chem. Pharm. Bull.*, **58**, 247–249 (2010).
 - 15) Itoh K., Hatakeyama T., Shimoyama T., Miyazaki S., D'Emanuele A., Attwood D., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **37**, 790–797 (2011).
 - 16) Shimoyama T., Itoh K., Kobayashi M., Miyazaki S., D'Emanuele A., Attwood D., *Drug Dev. Ind. Pharm.*, **38**, 952–960 (2012).
 - 17) Package Insert, Rysmon® TG Ophthalmic Solution 0.25%/0.5%, 7th ed., Wakamoto Co., Ltd., 2010.
 - 18) Package Insert, Ofloxacin Gel Forming Ophthalmic Solution 0.3% 「Wakamoto」, 3rd ed., Wakamoto Co., Ltd., 2010.
 - 19) Nishimoto Y., Idaka Y., Shibata K., Aikawa T., *Bunseki Kagaku*, **60**, 223–228 (2011).
 - 20) Miyazaki S., Takeuchi S., Yokouchi C., Takeda M., *Chem. Pharm. Bull.*, **32**, 4205–4208 (1984).
 - 21) Higuchi W. I., *J. Pharm. Sci.*, **51**, 802–804 (1962).
 - 22) Kato T., Yokoyama M., Takahashi A., *Colloid Polym. Sci.*, **256**, 15–21 (1978).
 - 23) Li L., Shan H., Yue Y., Lam C., Tam K. C., Hu X., *Langmuir*, **18**, 7291–7298 (2002).
 - 24) Li L., *Macromolecules*, **35**, 5990–5998 (2002).