報 文

Pluronic F-68 を用いた安定なリポソームの調製とその特性

佐々木一郎*・鈴木 正*・石井 文由**・緒方 宏泰**

* 株式会社コーセー研究所 (〒174 東京都板橋区小豆沢 1-18-4)

** 明治薬科大学 (〒188 東京都田無市谷戸町 1-22-1)

Preparation and Properties of Liposomes Stabilized with Pluronic F-68

Ichiro SASAKI, Tadashi SUZUKI, Fumiyoshi ISHII, and Hiroyasu OGATA

* Research Laboratory, KOSÉ Corporation

(1-18-4, Azusawa, Itabashi-ku, Tokyo, 〒174)

** Meiji College of Pharmacy

(1-22-1, Yato-cho, Tanashi-shi, Tokyo, 〒188)

Sterically stabilized liposomes were produced by incorporation a poly(oxyethylene) poly(oxypropylene) block copolymer (Pluronic F-68) into the lipid bilayer using a high-pressure homogenizer. Mean vesicle size of liposomes incorporating Pluronic F-68 greatly decreased from 480 nm to 110 nm with minor change in marker entrapment after passing three times through the high-pressure homogenizer. Liposomes stabilized with Pluronic F-68 were characterized with respect to entrapment efficiency, vesicle size and surface charge. Entrapment efficiency of a marker increased with Pluronic F-68 content, and was maximum at 0.13 (% wt/vol)-Pluronic F-68. In particle size and surface charge, no change was noted with increase in Pluronic F-68 content. Surface charge decreased slightly for liposomes incorporating Pluronic F-68, compared to those coated with Pluronic F-68. Pluronic F-68 is thus distributed between the bilayer and/or inner phase of liposomes as well as the liposome surface. Liposomes stabilized with Pluronic F-68 were significantly stable in calcium and fetal bovine serum (FBS) solution at 37°C compared with Pluronic F-68-free liposomes. The incorporation of Pluronic F-68 into the bilayer caused significant increase in ^{31}P -NMR line width. Pluronic F-68 is thus shown to stabilize liposomes by restricting phospholipid motion in the bilayer.

1 緒 言

リポソームがドラッグキャリアーとして注目されて以来、すでに20年以上が経過している。リポソームはドラッグキャリアーとしての多くの生物学的要求性を満たしているが、内包物の収率および *in vivo*, *in vitro* における製剤的安定性が非常に低いなど今だに多くの課題が残されている。近年、これらの問題を改善するための、ひとつの方法として、高分子によるリポソーム表面のコーティングが行われてきた。水溶性高分子でリポソーム表面をコーティングすることにより標的部位への指向性向上¹⁾、立体的安定性の向上²⁾および細網内皮系の回避³⁾などの多くの機能を付与することが可能である。その中で最近、高分子量の両親媒性物質であるポリ(オキ

シエチレン)-ポリ(オキシプロピレン) ブロックポリマー (POE-POP ブロックポリマー) をコロイド粒子のコーティング剤として応用する試みが多くなされている。POE-POP ブロックポリマーは毒性が低く、また、生体適合性が非常に高いとされている⁴⁾。さらに、POE-POP ブロックポリマーでコーティングしたコロイド粒子を生体に投与した場合、肝臓やひ(脾)臓などの細網内皮系への取り込みは低下し、他の組織への移行性が高くなるなど製剤的な有用性は非常に高い⁵⁾。そこで本実験では、POE-POP ブロックポリマーをリポソーム膜内部に組み込むことにより、その物理化学的特性を検討した。さらに、POE-POP ブロックポリマーによるリポソームの安定化機構を ^{31}P -NMR 測定により考察した。

連絡者: 佐々木一郎

2 実験方法

2.1 試 薬

リボソームの構成成分である水素添加精製卵黄レシチン (IV=18), および POE-POP ブロックポリマー (Pluronic F-68 : 平均分子量=8750, 総分子中 EO 重量%=80) は, それぞれ旭化成工業株式会社および旭電化工業株式会社から供与された。また, コレステロールは和光純薬工業株式会社より購入し, そのまま使用した。マーカー物質である 3,3'-ビス [N,N'-ジ (カルボキシメチル) アミノメチル] フルオレセイン (カルセイン) は和光純薬工業株式会社のもを Wallach ら⁶⁾の方法で精製後使用した。

2.2 リボソームの調製法

リボソームの調製は前報^{7),8)}に従って行った。すなわち, 水素添加精製卵黄レシチン (IV=18) およびコレステロールを重量比 8.8 : 1.2 で塩化メチレンに溶解し, これに一定濃度のカルセインおよび各種濃度の Pluronic F-68 を含んだ水相を加え, 一次乳化を行い W/O 型エマルジョンを得た。得られた W/O 型エマルジョンを直ちに水相に注入し, 55℃ で 90 min 二次乳化を行った。W/O 型エマルジョンを注入後, 水相中では W/O/W 型エマルジョンが形成され, その後溶媒 (塩化メチレン) の蒸発とともに Large Unilamella Vesicle (LUV リボソーム) が形成される。得られた LUV リボソームをさらに微粒化するため, 高圧ホモジナイザーであるゴーリン 15 M-8 TA (APV Gaulin, Inc.) を内部圧 6000 psi (0.07 kg/cm²) で使用し, サンプルを得た。

2.3 リボソームの保持率の測定

マーカーの保持率は限外濾過膜 (分画分子量 100,000, 日本ミリポア工業株式会社) により, 内包されなかった外相のマーカーを分離し, 次式より求めた。なお, マーカーの全濃度は *n*-プロピルアルコールでリボソームを完全に溶解することによって求めた。

$$\text{保持率 (\%)} = (C_t - C_0) / C_t \times 100$$

C_t : カルセイン全濃度

C_0 : 外相中のカルセイン濃度

ここで, C_t は系における (すなわち, リボソーム内外相中に存在する) カルセインの全濃度 (% , wt/vol), また, C_0 はリボソームの外相中のカルセインの濃度 (% , wt/vol) を示す。

2.4 リボソームの粒径およびゼータ電位測定

調製したリボソームの粒径およびゼータ電位はそれぞれコールターナノサイザー N 4 (コールターエレクトロニクス) および ELS-800 (大塚電子株式会社) によって測定した。

2.5 リボソームサスペンションの濁度測定

塩化カルシウム (和光純薬工業株式会社) および牛胎児血清 (FBS, Hazleton) 存在下で, リボソームサスペンションの濁度変化を濁度計 (Type SEP-PT-201, 日本精密光学株式会社) にて測定し, その安定性を評価した。リボソームサスペンションの濁度は 37℃ で 10 min インキュベーションした後測定し, 以下の式より相対濁度として求めた。

$$RT = T_t / T_0$$

T_t : 10 min 後の濁度

T_0 : 各サンプルの初期濁度

ここで, T_t は塩化カルシウムあるいは FBS 添加 10 min 後におけるリボソームサスペンションの濁度, また, T_0 は塩化カルシウムあるいは FBS 添加直後におけるリボソームサスペンションの濁度を示す。

2.6 ³¹P-NMR の測定

³¹P-NMR スペクトルは GX-270 (JEOL) で測定した。分析モードはプロトンデカップリングを行い, 共鳴周波数 109.4 MHz, パルス角 90°, パルス繰り返し時間 4.5 s, 積算回数 20,000 回, データポイント 18.2 K, 温度 35℃ で測定した。

3 結果および考察

3.1 リボソームのマーカー保持率および粒径に対する高圧ホモジナイザーの処理回数の影響

Juliano ら⁹⁾は Small Unilamella Vesicle (SUV) をウサギに投与したところ Large Multi lamella Vesicle (LMV) よりも血中からの消失速度が遅く, それが粒径に依存することを報告した。また, Khattab ら¹⁰⁾は炎症部位におけるリボソームの取り込みが最も高かったのは, 粒径が 100 nm 付近のものであることを示した。ドラッグキャリアーとしてのリボソームの粒径をコントロールすることは, ドラッグデリバリーシステムへの適用あるいは製剤の物理的安定性において非常に重要なことである。そこで, Microencapsulation Vesicle 法⁷⁾によって得られたリボソームをさらに微粒化するために高圧ホモジナイザーを用い, その調製条件について検討を行った。Fig.-1 に Pluronic F-68 添加 (0.13 %, wt/vol) および未添加リボソームにおけるマーカー保持率に対する高圧ホモジナイザーの処理回数の影響を示した。処理回数の増加にともない両者ともマーカー保持率は低下した。しかし, Pluronic F-68 添加リボソームは処理回数 3 回以内で, マーカーの漏出はほとんどなく, 10 回以上においても約 15 % のマーカー保持率を示した。Jamshaid ら¹¹⁾はリボソームの表面を POE-POP ブロックポリマーでコーティングしたとき, 表面に吸着した POE-POP ブロックポリマーが脂質二重層に貫入することで脂質の配向を乱し, マーカーの漏出を促進することを報告した。しかし, 本調製法で

Open and closed symbols represent liposomes with (0.13 % wt/vol) and without Pluronic F-68, respectively.

Fig.-1 Effect of number of shear applications through the high pressure homogenizer on calcein entrapment in liposomes.

得られたリポソームは一次乳化時に Pluronic F-68 を添加することにより, Pluronic F-68 はリポソームの表面のみならず内水相および脂質二重層間にも存在していると考えられる。その結果, リポソーム中の脂質の配向を乱さず, 膜強度が高められ, 内包されたマーカーの透過性が低下したのであろう。また, Pluronic F-68 は親水性の高い (HLB=16) 界面活性剤であるため, 二次乳化時の W/O エマルジョンの水系への分散性を高めることで, W/O/W エマルジョン形成時における内包物質の漏出を低下させたと考えられる。一方, Pluronic F-68 未添加リポソームではマーカーの漏出は著しく, 処理回数 5 回以上で保持したマーカーはほとんど漏出した。なお, 処理回数 3 および 5 回の Pluronic F-68 添加および未添加リポソームの粒径は各々 120, 125 nm および 85, 98 nm であった。また, Pluronic F-68 へのマーカーの特異的な吸着およびミセル内部への取り込みは観察されなかった。

Fig.-1 におけるマーカー保持率とリポソームの平均粒径の関係を Fig.-2 に示す。リポソームの平均粒径が小さくなるにつれてマーカーの保持率は低下した。特に, 粒径が 120~130 nm 以下になるとマーカーの漏出は著しくなった。Vemuri ら¹²⁾は高圧ホモジナイザー (マイクロフルイダイザー) を用いたリポソームの調製法を報告したが, 彼らも本実験の結果とほぼ同様にリポソームの平均粒径が 200 nm 以下になるとマーカーの保持率が著しく減少することを示した。以上の結果より, 以下の実験には高圧ホモジナイザー処理を 3 回行ったも

Open and closed symbols represent liposomes with (0.13 % wt/vol) and without Pluronic F-68, respectively.

Fig.-2 Relationship between calcein entrapment and particle diameter.

Liposomes were prepared by passing through the high pressure homogenizer at three times.

Fig.-3 Effect of Pluronic F-68 concentration in liposomes on calcein entrapment.

のをサンプルとした。

3・2 リポソームのマーカー保持率, 粒径およびゼータ電位に及ぼす Pluronic F-68 添加濃度の影響

マーカーの保持率に対する Pluronic F-68 の添加濃度の影響を Fig.-3 に示す。Pluronic F-68 の添加濃度が増すにつれて, マーカーの保持率は増加し, 添加量 0.13 (% wt/vol) で最大値を示した。これは Pluronic F-68 を添加することによりリポソーム膜の物理的安定

Open and closed symbols represent liposomes at 3 and no passes through the high pressure homogenizer, respectively.

Fig.-4 Effect of Pluronic F-68 concentration in liposomes on particle diameter.

性が高まり、高圧ホモジナイザー処理時におけるマーカーの漏出が低下したためだと考えられる。また、Pluronic F-68 の添加量が 0.13 (% wt/vol) 以上においてマーカーの保持率が低下するのは、Jamshaid ら¹¹⁾ の報告結果と同様に Pluronic F-68 が可溶化などの理由により脂質の配向を乱すためだと考えられる。

高圧ホモジナイザー処理後におけるリポソームの粒径に対する Pluronic F-68 の添加濃度の影響を Fig.-4 に示す。リポソームの粒径は Pluronic F-68 の濃度によらず 110 nm の付近で一定値を示した。Pluronic F-68 添加 (0.13 %, wt/vol) リポソームの高圧ホモジナイザー処理前の粒径は約 480 nm であり、高圧ホモジナイザーで処理することにより著しく粒径を小さくすることが可能であった。

コロイド粒子の表面電荷を測定することにより、粒子表面の状態および電氣的安定性を評価することができる。そこで、リポソームの表面電位 (ゼータ電位) に対する Pluronic F-68 の添加量の影響を検討した。その結果を Fig.-5 に示す。リポソームのゼータ電位の絶対値は Pluronic F-68 の添加により、わずかに減少した。このゼータ電位の変化は、Pluronic F-68 がリポソーム表面に配向することにより、滑り面が外側へシフトしたことに基づくと考えられる。Kays¹³⁾ および Illum ら¹⁴⁾ もポリスチレンラテックス表面に種々の POE-POP ブロックポリマーを吸着させたときのゼータ電位を測定した。彼らはゼータ電位の絶対値が POE-POP ブロックポリマーの吸着層の厚さに比例し

Open and closed symbols represent liposomes incorporating Pluronic F-68 into the lipid bilayer and coating the surface with Pluronic F-68, respectively.

Fig.-5 Effect of Pluronic F-68 concentration on zeta potential.

低下することを明示した。また、リポソーム表面を Pluronic F-68 (0.13 %, wt/vol) でコーティングした系のゼータ電位の絶対値は、Pluronic F-68 (0.13 %, wt/vol) をリポソーム内部に組み込んだ系よりも低い値を示した。これらのことから、本調製法では Pluronic F-68 はリポソーム表面のみならず、内部にも組み込まれていることが示唆された。

3.3 リポソームの安定性に対するカルシウムイオンおよび血清の影響

電解質あるいはタンパク質はコロイド粒子の凝集を促進することが知られている。負電荷を帯びたコロイド粒子の凝集は、カチオンの吸着により表面電荷が中和されたり¹⁵⁾、多価金属イオン^{16), 17)} あるいは血清タンパク^{18), 19)} の介在により粒子間に橋かけが形成されることで引き起こされる。このことはドラッグデリバリーシステムへの応用、また、電解質あるいはタンパク質等を含有する製剤においては重要な問題となる。そこで今回は、2 価金属イオンのカルシウムおよび FBS 存在下におけるリポソームの安定性に対し、Pluronic F-68 の添加効果を濁度を測定することにより評価した。その結果を Figs.-6 および 7 に示す。Fig.-6 より、カルシウムイオン濃度が高まるにつれてリポソームサスペンションの濁度は増加した。濁度の増加は粒径の増大に基づくため、粒子同士の凝集が促進されたことを意味している。これはカルシウムイオンがリポソーム表面に吸着するこ

とにより、電気二重層が圧縮され、粒子間の反発力が失われたためと考えられる。一方、Pluronic F-68 を添加した系では、カルシウムイオン存在下においても、リポソームの凝集は著しく抑制された。

Fig.-7 より、FBS 10 % 添加までの Pluronic F-68 添加および未添加リポソームにおける水溶液中での挙動は一致している。さらに、FBS 10 % 以上において両者とも濁度の増加が観察された。また、Pluronic F-68 未

Relative turbidity after incubated for 10 min at 37 °C was plotted against the final calcium concentration. Open and closed symbols represent liposomes with (0.13 % wt/vol) and without Pluronic F-68, respectively.

Fig.-6 Relative turbidity of liposome suspension vs. calcium concentration.

Relative turbidity after incubated for 10 min at 37 °C was plotted against the final FBS concentration. Open and closed symbols represent liposomes with (0.13 % wt/vol) and without Pluronic F-68, respectively.

Fig.-7 Relative turbidity of liposome suspension vs. FBS concentration.

添加リポソームサスペンションの濁度は急激に変化しているが、Pluronic F-68 添加リポソームサスペンションでは FBS 20 % 以上でプラトーになった。これらの現象は次のように考えられる。まず、FBS 濃度が低いとき (10 % 以下)、血清タンパク等がリポソーム表面へ吸着する。FBS 濃度が高まるにつれて吸着したタンパク同志の相互作用 (疎水結合、水素結合および van der Waals 力) により、粒子間の凝集を引き起こす。血清中に含まれる高密度リポタンパクはリポソーム中の脂質を取り込む¹⁹⁾ことによって凝集を促進すると報告されている。したがって、FBS 濃度がさらに高まると吸着分子の浸透圧効果あるいは二重層中への貫入等によりリン脂質の配向が乱され、リポソームの凝集、合一が促進されるのであろう。Pluronic F-68 添加リポソームの濁度変化はプラトーになっていることから、この凝集は表面に吸着したタンパク同志の相互作用によるものと考えられる。

コレステロールはリポソームに対し膜透過性や流動性を低下させることが知られているが^{20),21)}, Figs.-6 および 7 より、コレステロールの添加のみでは電解質中での安定性は不充分であった。コロイド粒子における分散安定性の要因のひとつに水和層の状態が挙げられる。Pluronic F-68 は高分子量の親水基であるポリエチレンオキシド鎖を有しており、これが、リポソーム表面に張り出すことにより、安定な水和状態を保っていると考えられる。また、Napper ら²²⁾も Pluronic 系非イオン界面活性剤によるコロイド粒子の安定化は、ポリエチレンオキシド鎖の分子量に依存すると報告している。これらのことから、電解質あるいはタンパク存在下におけるリポソームの安定性向上は、リポソーム表面に張り出した POE 鎖が表面の親水性を高め、また、高分子量であることから保護コロイドとして働いていることによるであろう。

3・4 ³¹P-NMR による Pluronic F-68 含有リポソームの評価

NMR は分子構造や分子の運動性に関する情報を非侵襲的に得ることができる。NMR では原子の磁気異方性による線幅の変化が顕著に観察できることから、コロイド粒子の界面における特定分子の環境を知ることができる有用な手段であると考えられる。Wu ら²³⁾は ¹H-NMR によりリポソーム中のホスファチジルコリン head group の運動性を、さらに、Chiba ら²⁴⁾は ³¹P-NMR を用いてエマルション界面におけるリン脂質の動的状態を評価している。また、すでに、³¹P-NMR スペクトルの形によりリン脂質の相状態を評価できることも報告されている²⁵⁾。そこで、Pluronic F-68 によるリポソームの安定化効果を ³¹P-NMR 測定によって検討した。その結果を Fig.-8 に示す。得られた ³¹P-NMR

The arrows indicate the spectra linewidths.

Fig.-8 109.4 MHz ^{31}P -NMR spectra obtained at 35°C from a) liposome with 0.13 (% wt/vol) Pluronic F-68 ; b) Pluronic F-68 free liposome.

スペクトルは低磁場側に肩のある非対象形を示し、脂質二重層構造を有していることがわかる。 ^{31}P -NMR スペクトルの各線幅は Pluronic F-68 を添加した系の方が広がった。 ^{31}P -NMR スペクトルの線幅は分子の運動性を示すものであることから、Pluronic F-68 を添加したことによる線幅の増加はリン脂質の head group の運動性を抑制したことを意味する。

Berden²⁶⁾ らはリポソームの ^{31}P -NMR における線幅が温度に依存していることを報告した。すなわち、相転移温度以下における半値幅は広く、温度が上昇するにしたがって狭くなることを示した。また、Fenske ら²⁷⁾ も低密度リポプロテインのリン脂質とヘパリンとの不溶性コンプレックス形成に伴い半値幅が増加することを示した。これらのことから、Pluronic F-68 を組み込むことによる安定性の向上はリン脂質間のパッキング状態が密になり、リン脂質の head group の運動性が抑制されたためだと考えられる。これらのことより、Pluronic F-68 による膜流動性の抑制効果はコレステロール様の効果もあると考えられるが、リポソーム内部での配向状態を分子構造上次のように考察した。コレステロールはリン脂質のアシル鎖間で疎水的相互作用により結合し^{28), 29)}、くさび状に配向している。一方、Pluronic F-68 の構造は両末端に親水基の POE 鎖、中央に疎水基の POP 鎖からなる。この POP 鎖がリポソームの疎水部に平面的に配向し、さらに、それらが網目状に分布していると考えられる。

また、Takeoka ら³⁰⁾ はオリゴ糖脂肪酸エステルをリポソームに組み込むことにより相転移温度が上昇し、そ

の結果、内包物の漏出を抑制したことを示した。彼らはオリゴ糖脂肪酸エステルによるリポソームの安定化は、リン脂質間のパッキング状態が高められたためだと報告している。このことは我々の結果を示唆するものである。

本知見より高分子量の界面活性剤 (Pluronic F-68) をリポソームに組み込むことにより物理的に安定なリポソームを調製できることがわかった。このことはリポソームの製剤的な具現化に有用な情報となり得ると考えられる。

(平成 5 年 (1993 年) 10 月 13 日受理)

文 献

- 1) M. Takada, T. Yuzuriha, K. Katayama, K. Iwamoto, J. Sunamoto, *Biochim. Biophys. Acta.*, 802, 237 (1984)
- 2) H. Izawa, M. Arakawa, T. Kondo, *Biochim. Biophys. Acta.*, 855, 245 (1986)
- 3) M. Jamshaid, S. Farr, P. Kearney, I. Kellaway, *J. Pharm. Pharmacol.*, 40, 135 P (1988)
- 4) 黒島振重郎, 川上敏晃, 安野 守, 沢口亮三, 田村正秀, 片岡和夫, 久保田宏, 本間伏介, 川村広子, 心臓, 2, 616 (1970)
- 5) L. Illum, S.S. Davis, *FEBS Lett.*, 167, 79 (1984)
- 6) D. Wallach, D. Surgenour, J. Soderberg, E. Delano, *Anal. Chem.*, 31, 456 (1959)
- 7) F. Ishii, A. Takamura, H. Ogata, *J. Dispersion Sci. Tech.*, 9 (1), 1 (1988)
- 8) 佐々木一郎, 鈴木 正, 石井文由, 油化学, 41, 1055 (1992)
- 9) R.L. Juliano, D. Stamp, *Biochim. Biophys. Res. Comm.*, 63, 651 (1975)
- 10) M.A. Khatlab, S.J. Farr, W.G. Love, Ian W. Kellaway, *J. Pharm. Pharmacol.*, 43, 96 P (1991)
- 11) M. Jamshaid, S. Farr, P. Kearney, I. Kellaway, *Int. J. Pharm.*, 48, 125 (1988)
- 12) S. Vemuri, C.D. Yu, V. Wangsatorntanakun, N. Roosddorp, *Drug Development and Industrial Pharm.*, 16, 2243 (1990)
- 13) J.B. Kayes, D.A. Rawlins, *Colloid & Polymer Sci.*, 257, 622 (1979)
- 14) L. Illum, L.O. Jacobsen, R.H. Muller, E. Mak, S.S. Davis, *Biomaterials*, 8, 113 (1987)
- 15) S. Ohki, N. Düzgunes, K. Leonards, *Biochemistry*, 21, 2127 (1982)
- 16) A. Ortiz, J.C. G-Fernandez, *Chem. Phys. Lipids*, 46, 259 (1988)
- 17) J. Lansman, D.H. Haynes, *Biochim. Biophys. Acta.*, 394, 335 (1975)
- 18) F. Bonte, R.L. Juliano, *Chem. Phys. Lipids*, 40, 359 (1986)
- 19) K. Agarwal, A. Bali, C.M. Gupta, *Biochim. Biophys. Acta.*, 856, 36 (1986)
- 20) K. Inoue, *Biochim. Biophys. Acta.*, 339, 390 (1974)
- 21) A. Seelig, J. Seelig, *Biochemistry*, 13, 4839 (1984)
- 22) D.H. Napper, A. Netschey, *J. Colloid Inter. Sci.*,

- 37, 528 (1971)
- 23) W. Wu, S. Leu, C. Hsieh, L. Chi, *Chem. Phys. Lipids*, **58**, 9 (1990)
- 24) K. Chiba, M. Tada, *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 995 (1989)
- 25) P.R. Cullis, M.J. Hope, *Nature*, **271**, 16 (1978)
- 26) J.A. Berden, P.R. Cullis, D.I. Hoult, A.C. McLaughlin, G.K. Radda, R.E. Richards, *FEBS Lett.*, **46**, 55 (1974)
- 27) D.B. Fenske, R.J. Cushley, *Chem. Phys. Lipids*, **54**, 9 (1990)
- 28) W.L. Hubbel, H.M. McConnel, *J. Am. Chem. Soc.*, **93**, 314 (1971)
- 29) A. Darke, E.G. Finer, A.G. Flook, M.C. Philips, *J. Mol. Biol.*, **63**, 265 (1972)
- 30) S. Takeoka, H. Sakai, H. Ohno, K. Yoshimura, E. Tsuchida, *J. Colloid Inter. Sci.*, **152**, 351 (1992)
-

《新刊図書案内》

書 名 : Proceedings of the Third World Conference on Detergents:
A Global Perspective

編 集 : Arno Cahn

発行所 : AOCS Press, PO Box 3489, Champaign, IL 61826-3489, USA
(FAX: 217-351-8091)

発行年 : 1994年

書 式 : Hardbound, 228 pages

I S B N : 0-935315-52-7

価 格 : \$ 120(送料別), \$ 96(AOCS 会員)