薬学雑誌
YAKUGAKU ZASSHI
102 (10) 951-959 (1982)

難溶性医薬品結晶の超微細化方法の開発に関する研究 (第 1 報) オキソリン酸の 微細化効果のポリカーボネートメンブレンろ過法による評価¹⁾

平川善行,* 原田 清
田辺製薬株式会社製品研究所

Studies on Development of the Ultrafine Size Reduction Method of Slightly Soluble Medicinal Crystals. I. Evaluation of Size Reduction Effect for Oxolinic Acid by the Polycarbonate Membrane Filtration¹⁾

YOSHIYUKI HIRAKAWA* and KIYOSHI HARADA

Products Formulation Research Laboratory, Tanabe Seiyaku, Co., Ltd.,
16-89, Kashima 3 chome, Yodogawa-ku, Osaka, 532, Japan

(Received February 22, 1982)

When slightly soluble medicinal crystals are administered orally, their particle size is one of the important factors affecting the bioavailability. Therefore, it was attempted to develop a new technique of particle size reduction, in which the addition of surfactants or polymers at crystallization was examined.

In order to evaluate the size reduction effect for oxolinic acid (OA), the wet sieving method was studied by the use of the polycarbonate membrane filter. This method consists of the following procedures: 1) sonication of suspension more than 10 min, 2) suction filtration of suspension after dilution, 3) measurement of the weight of the residue on each filter by the determination of OA, 4) plots of the cumulative weight of residues on a log-probability paper, followed by calculation of apparent geometric mean diameter on weight basis, 5) regulation of the volume of filtrate according to the particle size of microcrystallines.

It was found that the new method studied enabled to evaluate the size reduction effect easily and accurately.

Keywords—oxolinic acid; ultra-fine size reduction; particle size measuring; polycarbonate membrane filter; sonication; log-normal distribution

主薬を安定に保持すると共にその薬効を的確に発揮させることを目標に製剤化が行われているが、水に難溶性の医薬品においてはその有効性と安全性の面でしばしば問題が指摘される場合が見受けられる。一般に難溶性医薬品においては、その消化管吸収性に重要な影響を及ぼす因子の 1 つとして粒子径が挙げられ、微細化して比表面積を増大させるほど bioavailability が向上することが知られている。²⁾ 従って難溶性医薬品の製剤化においては微細化のプロセスは特に重要である。

ところで医薬品の微細化には、ハンマーミルやボールミルで代表される機械的粉碎法が最も広く用いられているが、微細かつ均一な結晶を得るには繰返し粉碎すると共に篩過、分級するといった煩雑な操作を必要とする。さらにこれらの機械的粉碎法においては、製剤設計上数 μm 以下の超微細結晶が要求されるような場合に適用することは困難な業とされている点、³⁾ また微細化工程における異物や微生物などの混入を避け難い点など、なお多くの問題が残されている。これらの理由により機械的粉碎法によらない種々の微細化方法が研究されているが、⁴⁾ まだ実用化された例はほとんどみられない。そこで著者らは製剤化のプロセスで有効かつ容易に応用できる方法を開発すべく研究を試みた。その結果、水に難溶性で分子内に酸性基を有する医薬品について、これを水酸化ナトリウム等により水溶性の塩として水溶液とし、これに界面活性剤あるいは高分子化合物を添加したのち、適度の攪拌のもとで酸で中和すると極めて微細な結晶が析出することを見出した。⁵⁾ 本方法による微細化

Fig. 1. Chemical Structure of Oxolinic Acid

Fig. 2. Observation of Various Crystallines with Optical Microscope

(1) origin crystallines, (2) mechanical pulverized crystallines by hammer mill, (3) crystallines obtained by new method (without surfactant), (4) crystallines obtained by new method (with surfactant).

を追求していくために、Fig. 1 に示したオキシリン酸（以後、OA と略す）をモデル薬物として取上げた。

ここで種々の OA 結晶について光学顕微鏡観察した結果を Fig. 2 に示す。

未処理結晶 (1) は平均粒子径が $70\ \mu\text{m}$ 程度である。ハンマーミルにより粉碎した結晶 (2) の平均粒子径は $16\ \mu\text{m}$ 程度であり、まだかなり大きな結晶の混在も認められ、均一性が欠如しているのがわかる。本方法に準じたものであるが、微細化助剤としての界面活性剤を添加しない場合に得られた結晶 (3) は $50\ \mu\text{m}$ 程度の針状晶になっている。一方、本方法により微細化された結晶 (4) の場合、光学顕微鏡ではその詳細な観察が不可能なまでに極めて微細 ($1\ \mu\text{m}$ 以下) でかつ均一な結晶になっているのがわかる。このように本方法による微細化効果を評価するには電子顕微鏡レベルで観察しなければならないことがわかった。しかし電子顕微鏡（走査型）法は操作がかなり煩雑であり、今後、微細化に及ぼす種々の要因を追求するにさいし、多数の試料を取扱うには適当な方法とはいえない。そこで本報では、まず OA 結晶の微細化効果を評価するため、ポリカーボネートメンブレンフィルターを用いる一種の湿式ふるい分け法（以後、メンブレンフィルター法と略す）を行い、簡便でしかも精度的にはほぼ満足のいく微細化の評価法について検討したので、以下その詳細を報告する。

実験の部

微細化装置 本実験に用いた微細化装置の概略を Fig. 3 に示す.

500 ml 容量の丸底フラスコに OA 0.2, 1 および 5 w/v% 水溶液 (水酸化ナトリウムで水溶化,⁶⁾ 界面活性剤ポリオキシエチレンヒマシ油誘導体 HCO-60 も同時に溶解) 200 ml を入れ,⁷⁾ 恒温水槽中に固定した. ついで 4 枚羽根の攪拌機 (羽根寸法; 横 15 mm×縦 10 mm×厚さ 2 mm), 塩酸滴加ノズル (内径 4 mm のガラス管) および pH 測定用電極を所定の位置 (攪拌機はフラスコの底部より 10 mm, 塩酸滴加ノズルおよび pH 測定用電極は先端が液面下 90 mm の位置) に装着後, 攪拌を開始した. その後, 定流量ポンプで塩酸溶液を滴加し, pH 4 になれば滴加を直ちに停止した.

使用機器

攪拌機: 東京理科器械製 Chemy-Stirrer B-100 型定流

量ポンプ: 古江サイエンス製微量定流量ポンプ RP-N 型

pH メーター: 日立-堀場製作所製 F-7ss 型

pH 測定用電極: 堀場製作所製複合 pH 電極 No. 6028-10 T 型

試料の作成 Fig. 3 に示した微細化装置を用いて, Table I に示した作製条件によりサンプル No. 1 から No. 12 までの試料を作製した.

走査型電子顕微鏡による平均粒子径の測定 各試料を遠沈管に取り, 3000 rpm で適当な時間遠心分離したのち, 上清を駒込ピペットで除いた. 沈積層をよくかき混ぜ, その微量量をスパーテルに取り, 試料台に薄く均一に塗布した. ついで超真空下 (5×10^{-5} mmHg 以下) で試料にカーボン蒸着および金蒸着を行い, 走査型電顕装置に試料を装着し, 試料により, 3000—10000 倍で観察し, 写真撮影を行った. 得られた写真について Endter の装置を用いて粒子径と個数を計測した.

使用機器

遠心分離機: 佐久間製作所製 90S-2 型

Fig. 3. Schematic Diagram of Experimental Apparatus

1: four blade stirrer, 2: combination electrode, 3: pH meter, 4: variable speed motor, 5: roller pump, 6: hydrochloric acid solution, 7: thermostat bath.

TABLE I. Sample Numbers and Their Experimental Conditions

Sample No.	Experimental conditions	
	OA concentration (w/v%)	Adding rate of 0.25 N HCl (ml/min)
1	0.2	10
2	0.2	25
3	0.2	50
4	0.2	100
5	1	10
6	1	25
7	1	50
8	1	100
9	5	10
10	5	25
11	5	50
12	5	100

Other experimental conditions:

stirring rate; 150 rpm, reaction temperature; 25 °C, HCO-60 concentration; 1 w/v%.

真空蒸着装置：日本電子製 JEE-4B/4C 型

走査型電子顕微鏡：日本電子製 JSM-U-3 型

粒子径測定装置：Karl Zeiss 製 Particle size analyzer

メンブレンフィルター法による微細化効果の評価 試料 10 ml を取り、直径 30 mm、深さ 60 mm のビーカーに入れ、超音波発生器のチップ（直径 25 mm）を挿入し、ビーカーを氷冷しながら sonication した。ついで OA 飽和水溶液で適当な濃度に希釈した。この希釈懸濁液および孔径 3, 1, 0.8, 0.6, 0.4 および $0.2\ \mu\text{m}$ のポリカーボネートメンブレンフィルター（直径 47 mm）で順次減圧吸引ろ過（10—20 mmHg）した各々のろ液を採取し、1 規定水酸化ナトリウムを加えて一定量に希釈した（最終の溶液は 0.1 規定水酸化ナトリウムとなるようにした）。ついで 340 nm の吸光度を測定し OA を定量することによって各メンブレンフィルター上に残留する OA 微細結晶濃度を算出した。

使用機器

超音波発生器：英国 Ultrasonic 社製 AG 350 型、操作条件一周波数 20 kHz、パワー目盛 10

ポリカーボネートメンブレンフィルター：商品名 Nuclepore、米国 General Electric 社製

フィルターホルダー：米国 Millipore 社製 XX 40047-00 型

試薬および試料 OA は自社合成品を使用した。界面活性剤 HCO-60 は市販品（日光ケミカルズ）を使用した。他の試薬類はすべて試薬特級品を用いた。溶媒としての水はイオン交換精製水を蒸留したものを用いた。

結果および考察

I. 走査型電子顕微鏡による平均粒子径測定

顕微鏡法は粒子の形状と大きさを直接観察することができるので、多くの粒子径測定法のうち最も基本的なものとされ、他の間接的測定法の基準と考えられている。⁸⁾ そこでメンブレンフィルター法の確立とその妥当性をみるためにまず走査型電子顕微鏡による測定（以後、電顕法と略す）を行った。Fig. 4 および 5 に代表例としてサンプル No. 1 と No. 12 試料の観察像を示す。

つぎにそれらの粒子径測定結果を対数確率紙上にプロットしたのが Fig. 6 であるが、図示したように良好な直線性を示した。化学的に作られた沈殿物のような粉体では、その粒子径が対数正規分布をなすものがあるといわれているが、⁹⁾ 本微細化法によって得られた結晶粒子群においても対数正規分布をしていることがわかった。50% 径に相当する粒子径を個数基準幾何平均径（geometric mean diameter on number basis, 以後 $\bar{D}_g$ と略す）として各試料より算出し、幾何標準偏差 (σ_g) と共に Table II に示す。

このように電顕法による測定の結果、微細化条件によっては $1\ \mu\text{m}$ 以下にまで微細化されることがわかった。

II. メンブレンフィルター法による微細化効果の評価

電顕法による粒子径測定は操作が非常に煩雑であり、多量の試料を処理するには適当ではない。ところで粒子径測定にはその他に数多くの方法が知られているが、¹⁰⁾ $1\ \mu\text{m}$ 以下の粒子を取扱うにさいして簡便でしかも精度よく微細化の程度を評価する方法として、ポリカーボネートメンブレンフィルター（以後、PC フィルターと略

Fig. 4. Scanning Electron Micrograph of Sample No. 1

Fig. 5. Scanning Electron Micrograph of Sample No. 12

す)を用いる一種の湿式ふるい分け法を考えた。PC フィルターは均一で円筒状の孔をもった完全なスクリーンタイプのフィルターといわれ、この性質を利用して Olson ら,¹¹⁾ Brendzel ら¹²⁾ は種々の粒子径のリポソームのふるい分けを行っている。ところで PC フィルターは 1 cm^2 当り数千万—数億個の孔が開いているが(例えば孔径 $0.8\text{ }\mu\text{m}$ のフィルターでは 10^7 個/ cm^2)、試料中の懸濁粒子の個数が多いと目詰りが発生し、正確な測定ができない。そこで懸濁粒子濃度がほぼ $2 \times 10^{-2}\text{ mg/ml}$ となるように OA 飽和水溶液で希釈し、この希釈懸濁液を孔径 $3-02\text{ }\mu\text{m}$ の PC フィルターで順次ろ過し、ろ液中の全 OA 量(溶存している OA と微細結晶として存在している OA の総和)を定量することによって各フィルター上に残留する微細結晶量を算出することにした。しかし後述するように希釈のみでは一次粒子にまで分散せず、またろ過量によって目詰りが発生するなどの基本的な問題点があり、これらの影響を最小限に止めることを目的として、以下 II-1. sonication による分散効果、II-2. ろ過量と目詰りについて検討した。

II-1. Sonication による分散効果 粒子群が細くなるにつれて単位重量当りの微粒子数は非常に多くなり、微粒子のふるい分けにおいては微粒子群を十分に分散することおよび自重の小さい微粒子のフィルター通過速度を大きくするための工夫が必要であり、¹³⁾ また微粒子群の分散が空気中よりも容易であるため湿式ふるい分け法が用いられ、これらについては詳細な研究結果が報告されている。¹⁴⁾ そこで著者らは微細結晶群の分散に sonication を行い、フィルター通過速度を大きくするために減圧吸引する方法を用いて、sonication による分散効果を調べた。

サンプル No. 1 と No. 12 試料について sonication 時間を種々変えてメンブレンフィルター法により測定し、各フィルター残留率の積算値を対数確率紙上にプロットして示したのが Fig. 7 および 8 である。

サンプル No. 1 試料は sonication なしの場合、 $3\text{ }\mu\text{m}$ 以上の凝集体が多く存在しているのがわかるが、sonication 時間の延長につれて分散され、10 分間以上の sonication によって良好な直線性を示し、対数正規分布となった。一方、サンプル No. 12 試料は $0.8\text{ }\mu\text{m}$ 以下の凝集体が多く存在し、sonication 時間の延長につれて分散し、この場合も 10 分間以上の sonication により良好な直線性を示した。従って微細結晶群の分散には soni-

Fig. 6. log-Probability Plots of Data obtained from Scanning Electron Microscopic Method

—●—: sample No. 1, —○—: sample No. 12.
Solid lines (1) and (2) are converted from number basis to weight basis by Hatch's equation.

TABLE II. Geometric Mean Diameter on Number Basis ($\bar{D}_g$) and Geometric Standard Deviation (σ_g) for Various Samples obtained by Use of the Scanning Electron Microscopic Method

Sample No.	$\bar{D}_g$ (μm)	σ_g	Sample No.	$\bar{D}_g$ (μm)	σ_g
1	1.3	1.6	7	0.28	1.6
2	1.1	1.5	8	0.27	1.3
3	0.97	1.5	9	0.30	1.4
4	0.48	1.8	10	0.35	1.4
5	0.18	1.8	11	0.18	1.3
6	0.31	1.4	12	0.24	1.3

Fig. 7. Effect of Sonication Time on Dispersion of Sample No. 1 Suspension

Sonication time:
 ---○---: 0 s, ---□---: 150 s, ---△---: 300 s,
 ---◆---: 600 s, ---●---: 900 s.

Fig. 8. Effect of Sonication Time on Dispersion of Sample No. 12 Suspension

Sonication time:
 ---○---: 0 s, ---□---: 150 s, ---△---: 300 s,
 ---◆---: 600 s, ---●---: 900 s.

Fig. 9. Effect of Volume of Filtrate on Clogging at Each Pore Size Membrane Filter

—●—: sample No. 1, —○—: sample No. 12.
 Values in the figure represent the pore size of membrane filter.

cation を 10—15 分間行えばよいことがわかった。

II-2. ろ過量と目詰りについて フィルター上に捕捉される微細結晶数が多くなると目詰りが発生する。そこでサンプル No. 1 と No. 12 試料について、sonication を 10 分間行ったのち、希釈懸濁液を作製し、各々の PC フィルターについてろ過量と目詰りの関係を、ろ液の吸光度変化を指標として調べた。その結果を Fig. 9 に示す。

サンプル No. 1 試料の場合、 $1\mu\text{m}$ 前後の微細結晶が数多く存在しているので、孔径 $1\mu\text{m}$ の PC フィルターろ過において、ろ過量 30 ml 付近から吸光度の低下が観察され目詰りの発生しているのがわかる。なおこの現象は吸引ろ過中、ろ過速度の明らかな減少によっても容易に観察された。一方、サンプル No. 12 試料は孔径 $0.2\mu\text{m}$ の PC フィルターろ過において、ろ過量 10 ml でもろ過量 5 ml の場合と比較して顕著な吸光度低下が起こり、目詰りが速やかに

TABLE III. Accuracy of the Measurement by Use of the Membrane Filter Method

Sample No.	Pore size (μm)	Residue on each filter (%) Number of repetitions					R (%) ^{a)}	σ (%) ^{b)}	$\sum R$ (%) ^{c)}	Accuracy of ^{d)} measurement (%)
		1	2	3	4	5				
1	3	4.65	5.50	4.50	3.70	5.28	4.73	0.71	4.73	± 1.76
	1	43.63	42.43	45.26	46.06	46.10	44.70	1.61	49.43	± 4.01
	0.8	13.94	16.28	15.64	15.28	15.37	15.30	0.86	64.73	± 2.12
	0.6	18.29	17.71	17.27	16.99	15.18	17.09	1.17	81.82	± 2.92
	0.4	11.40	10.28	9.98	12.41	8.90	10.59	1.35	92.41	± 3.35
	0.2	8.09	7.57	7.11	5.56	8.72	7.41	1.20	99.82	± 2.97
12	3	3.35	2.91	2.95	2.74	3.75	3.10	0.34	3.10	± 0.84
	1	5.33	6.02	6.29	6.85	6.90	6.28	0.65	9.38	± 1.61
	0.8	2.56	2.52	2.75	3.13	3.75	2.94	0.51	12.32	± 1.27
	0.6	5.92	5.24	5.70	5.48	4.54	5.38	0.53	17.70	± 1.32
	0.4	4.34	5.05	6.48	5.87	5.92	5.53	0.84	23.23	± 2.08

a) mean values of the residue on each filter.

b) standard deviation.

c) cumulative residue percent.

d) 95% confidence limit.

発生することがわかった。このようにサンプル No. 12 試料は超微細結晶群であり、孔径 $0.4 \mu\text{m}$ PC フィルターろ過後のろ液中の粒子濃度は約 $1.8 \times 10^{-2} \text{ mg/ml}$ あり、例えば粒子径 $0.12 \mu\text{m}$ としてその個数を算出すると約 7×10^9 個/ml となり、¹⁵⁾ 少量のろ過量でも目詰りが速やかに発生したものと考えられる。サンプル No. 1 試料では孔径 $0.4 \mu\text{m}$ PC フィルターろ過後のろ液中の粒子濃度は約 $1.5 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$ であり、サンプル No. 12 試料と比較すると 1/10 以下の濃度となり、孔径 $0.2 \mu\text{m}$ PC フィルターろ過において 40 ml ろ過しても吸光度低下は起こらず測定可能であった。

II-3. 測定精度 II-1, II-2 の項で調査した結果、試料を 10—15 分間 sonication し、微細結晶群の粒子径に応じてろ過量を適宜調整することなど本法の操作条件に関する目安がたてられたので、その測定精度について調べた。サンプル No. 1 および No. 12 試料について 5 回繰返し測定を行った結果は、Table III に示すようになり良好な精度であった。

III. 電頭法とメンブレンフィルター法の比較

まず、サンプル No. 1 および No. 12 試料について、電頭法とメンブレンフィルター法の比較を行う。その場合、測定の基準をそろえるため、電頭法の個数基準を Hatch の式により重量基準に変換する。なお Hatch の式は 1) 式で示される。

$$\log \bar{D}'_g = \log \bar{D}_g + 6.908 \log^2 \sigma_g \quad 1)$$

ここで

$\bar{D}'_g$: 重量基準幾何平均径

$\bar{D}_g$: 個数基準幾何平均径

σ_g : 個数基準幾何標準偏差

Fig. 6 の実線 (1), (2) はそれぞれのサンプルにつき個数基準の結果を重量基準へ変換したものである。これと Fig. 7 および 8 のメンブレンフィルター法の直線プロットとを比較する。サンプル No. 1 試料については、全体的にメンブレンフィルター法の方が小さい粒子径として与えられている。この原因としては必ずしも明確ではないが、吸引による水流のために粒子がオリエンテーションを起こしたことも考えられる。また、サンプル No. 12 試料については両法による粒子径分布の幅に大きな差が認められた。これはメンブレンフィルター法における目詰り効果のほか、電頭法の場合の疎大粒子の見落とし効果¹⁶⁾ なども関係しているのではないと思われる。

このように、メンブレンフィルター法は、粒子径測定法としては基本的な問題点をいくつか残してはいるが、

Fig. 10. Correlation between $\bar{D}'_g$ (MF) obtained from Membrane Filter Method and $\bar{D}'_g$ obtained from Scanning Electron Microscopic Method

Numbers in the figure represent the sample No.

ここで一応, Fig. 7, 8 の直線をもとにメンブレンフィルター法による見かけの重量基準幾何平均径を求め, 以下これを $\bar{D}'_g$ (MF) と記することにする. ただし, サンプル No. 12 試料のように超微細結晶群を含む試料については, 目詰り防止のため初期粒子濃度を薄くしてやる必要があるが, その場合, ろ過前後の濃度差が小さくなり, 精度の低下をきたす. そこで分布曲線の作製にあたっては孔径 $0.4 \mu\text{m}$ PC フィルターろ過までのデータを対数確率紙上にプロットし, 補外により $\bar{D}'_g$ (MF) を求めることとした.

Fig. 10 は全試料について電顕法による $\bar{D}'_g$ を縦軸に, 上の方法により求めたメンブレンフィルター法における $\bar{D}'_g$ (MF) を横軸にとったもので, 両者間には比較的良好な直線関係が認められ, 次式のような経験式が成立した.

$$\bar{D}'_g = 2.73 \bar{D}'_g(\text{MF}) + 0.15 \quad (\gamma = 0.97)$$

以上, 本法は現在の段階では精密な粒度分布測定法とはいえないが, 従来電顕法など煩雑な方法で行われていた結晶微細化の程度に関する評価を, 簡便に行う実用的な方法として有用であると思われる.

謝辞 本研究に当り, 御指導・御鞭撻を賜った九州大学薬学部 井口定男教授ならびに田辺製薬株式会社製品研究所長 伊田忠夫博士に深謝致します.

引用文献および注

- 1) 日本薬学会第 101 年会で発表, 熊本, 1981 年 4 月.
- 2) 野上 寿, 加藤百合子, 日薬誌, **7** (薬剤学), 152 (1955); A.J. Glazko, W.A. Dill, *Antibiot. Chemother.*, **8**, 516 (1958); K. Sekiguchi, N. Obi, *Chem. Pharm. Bull.*, **9**, 866 (1961); R.M. Atkinson, C. Bedford, K.J. Child, E.G. Tomich, *Nature* (London), **193**, 588 (1962); G. Bauer, P. Rieckmann, W. Schaumann, *Arzneimittel-Forsch.*, **12**, 487 (1962); 掛見喜一郎, 有田隆一, 大橋 貞, 薬誌, **82**, 1468 (1962); J.D. Dare, *Australian J. Pharm.*, **45**, S-58 (1964); E. Nelson, S. Long, J.G. Wagner, *J. Pharm. Sci.*, **53**, 1224 (1964); J.H. Fincher, J.G. Adams, H.M. Beal, *ibid.*, **54**, 704 (1965); N. Kaneniwa, N. Watari, *Chem. Pharm. Bull.*, **26**, 813 (1978).
- 3) 関口慶二, 材料, **21**, 8 (1972).
- 4) 多数の報告があるが, 例えば Y. Tsuda, M. Kanke, I. Miyachi, K. Maeno, K. Sekiguchi, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 947 (1980); A.P. Lemberger, T. Higuchi, L.W. Busse, D.E. Wurster, *J. Am. Pharm. Assoc.*, **43**, 338 (1954); Y. Kato, M. Kouketsu, *Chem. Pharm. Bull.*, **28**, 968 (1980).
- 5) 特許公報, 昭 49-19746 (1974).
- 6) OA 1 g に対し, 水酸化ナトリウム 0.2 g を添加して溶解した.
- 7) $0.22 \mu\text{m}$ 孔径のメンブレンフィルターにてろ過した溶液を使用した.
- 8) 粉体工学研究会編, “粉体粒度測定法,” 養賢堂, 東京, 1965, p. 27.
- 9) 津田恭介, 野上 寿 (編集代表), “製剤設計法,” 一医薬品開発講座 IX, No. 16—地人書館, 東京, 1971, p. 125.

- 10) 野呂俊一, 薬局, **31**, 195 (1980).
- 11) F. Olson, C.A. Hunt, F.C. Szoka, W.J. Vial, D. Papahadjopoulos, *Biochim. Biophys. Acta*, **557**, 9 (1979).
- 12) A.M. Berndzel, I.F. Miller, *Biochim. Biophys. Acta*, **596**, 129 (1980).
- 13) 日高重助, 三輪茂雄, 粉体と工業, **9**, 29 (1977).
- 14) R.R. Irani, C.F. Callis, *Anal. Chem.*, **31**, 206 (1959); C.M. Funt, A.R. Woolf, *Mater. Res. and Stand.*, **4**, 364 (1964); J.M. Carter, *Bull. Inst. Mining Met. Sect.*, **81**, c113 (1972).
- 15) 粒子を1辺の長さ $0.12\ \mu\text{m}$ の正方体 (OA 結晶の比重 1.55) と仮定して算出した.
- 16) 粉体工学研究会編, “粉体粒度測定法,” 養賢堂, 東京, 1965, p. 53, 288.