

# 機能性マイクロカプセルの調製とその特性制御

清山 史朗<sup>1)</sup>・塩盛 弘一郎<sup>2)</sup>・河野 恵宣<sup>3)</sup>・幡手 泰雄<sup>4)</sup>

## Preparation of Highly Functional Microcapsules and Their Function Control

Shiro KIYOYAMA<sup>1)</sup>, Koichiro SHIOMORI<sup>2)</sup>, Yoshinobu KAWANO<sup>3)</sup> and Yasuo Hatate<sup>4)</sup>

### Abstract

Cross-linked poly(styrene-co-divinylbenzene) microcapsules were prepared by in-situ polymerization of styrene and divinylbenzene, and biodegradable polylactic acid microcapsules were prepared by solvent evaporation method. The effects of preparation conditions on the capsule morphology and entrapment efficiency of water-soluble materials in both polymers were investigated. The average diameters of the surface pores and internal hollows were controlled with sub-micron order by changing preparation conditions. Furthermore, the water-soluble materials were entrapped in the biodegradable microcapsule completely by changing preparation conditions. Continuous preparation of (O/W) or (W/O) emulsions and cross-linked microcapsules were also investigated.

Key words :

Cross-linked microcapsules, Biodegradable microcapsules, Structure control, Entrapment efficiency, Continuous preparation, (W/O/W) emulsion

### 1. 緒言

マイクロカプセルとは非常に小さな容器のことであり、容器内部の物質（芯物質）と容器自身である膜（骨格物質）を総称している<sup>1,2)</sup>。芯物質及び骨格物質を選択することで様々な機能をマイクロカプセルに付与することが可能である。その機能として①芯物質の徐放、②芯物質の環境に対する安定化、③反応性物質の隔離、④毒性の軽減、⑤液体の固体化、⑥臭気及び味のマスク等が挙げられる。このような機能性の付加により様々な応用が考案され、多くの分野で利用されている。マイクロカプセルを利用した世界最初の製品は1950年代にアメリカNCR社が開発したノーカーボン紙である。最近では富士写真フィルムが重合法を利用して開発した熱応答性マイクロカプセルを利用した多

くの感熱及び感光記録材料が実用化されている<sup>3)</sup>。1970年代になると化粧品、トイレットリー商品分野への応用が開始され、マイクロカプセルの“空間”を利用した中空マイクロカプセルや多孔質マイクロカプセルが実用化されている<sup>4)</sup>。また食品分野では液中硬化被覆法、相分離法、噴霧乾燥法等を用いて①人工イクラ、②シームレスカプセル、③揚げ物用衣、④粉末油脂、⑤粉末酒等幅広く応用されている<sup>5)</sup>。更に医薬品の分野では副作用の軽減とDDSへの応用から持続性放出型マイクロカプセルが注目を集めている。持続性放出型マイクロカプセルを用いることにより医薬品の血中濃度を長期間一定に保つことが可能となり、反復投与による患者への肉体的精神的苦痛を軽減した治療を行うことができる。

マイクロカプセルはこのように様々な分野で利用されているが、その形態は、(a)単核型、(b)多核型、(c)マトリックス型の3種類に大きく分類され、調製方法や調製条件によってマイクロカプセルの形態を制御することができる<sup>6)</sup>。マイクロカプセルの形態は芯物質の内包特性や徐放特性に影響を与える。単核型では膜

1) 都城高専物質工学科助手

2) 物質環境化学科助教授

3) 物質環境化学科教授

4) 鹿児島大学工学部教授

の一部が崩壊すれば芯物質は漏れだし、長期の徐放は望めない。更に調製段階で膜の崩壊が生じれば内包特性も低下する。マトリックス型では芯物質は膜内に分散するように内包され内包特性は高いが、徐放特性に着目するとマイクロカプセルを形成している膜が分解あるいは崩壊しなければ芯物質は外部へ放出されず徐放特性は低くなる。この2つの欠点をカバーしたのが多核型といえる。芯物質はマイクロカプセル内の小さく分散された水相中で水溶液として内包され、膜の一部が崩壊しても全ての芯物質の放出を防ぐことができる。このような構造上の利点から複合エマルジョンを用いた多核型の微粒子調製に関する研究は多くなされているが、微粒子の構造制御や芯物質内包特性についての研究例は少ない。更にその多くはバッチ式による調製であり、連続的な微粒子調製プロセスに関する研究例は非常に少ない。本研究では①マイクロカプセルの機能である構造の制御、②機能を十分に発揮させるための芯物質の内包特性制御、③実用化に際して重要な因子となる微粒子の連続調製に着目し、マイクロカプセルへの機能性の付与に関する調製法及び連続調製装置とその操作法の開発に関する基礎的知見を得ることを目的とした。

## 2. 架橋中空マイクロカプセルの調製とその特性制御

(W/O/W)エマルジョンの *in-situ* 重合により調製したマイクロカプセル内及び表面には中空及び細孔が形成されるが、その大きさを制御することは容易でなく、それに関する研究もほとんどなされていない。マイクロカプセル内及び表面の中空及び細孔の大きさは充填剤及び分離剤の特性を決定する重要な因子であり、サブミクロンオーダーで制御可能となれば高精度の分離材料としての利用が期待される。本章では(W/O/W)エマルジョン中の有機相内での *in-situ* 重合を用いたマイクロカプセルの調製において、マイクロカプセル内及び表面の中空及び細孔形成及び芯物質内包特性に与える調製条件の影響について検討した。

### 2.1 架橋中空マイクロカプセルの構造制御

#### 2.1.1 実験

##### 2.1.1.1 試薬

芯物質の硝酸カリウムまたは塩化ナトリウムは購入

したものをそのまま使用した。骨格物質のスチレンモノマーは減圧蒸留により精製して用いた。架橋剤のジビニルベンゼン (DVB と略記) は10%水酸化ナトリウム水溶液で洗浄し、重合禁止剤である *t*-ブチルカテコールを除去したものをを用いた。重合開始剤である2,2'-アゾビス(4-メトキシ-2,4-ジバレロニトリル) (ADV N と略記)、希釈剤であるトルエン、分散安定剤のポリビニルアルコール (重合度 500, PVA と略記)、界面活性剤である縮合リシノレイン酸ヘキサグリセリン (有機相に添加, 818SX と略記) 及びドデシル硫酸ナトリウム (外水相に添加, SDS と略記) は購入したものをそのまま使用した。

##### 2.1.1.2 (W/O)及び(W/O/W)エマルジョンの調製

スチレンモノマー、DVB、界面活性剤及びADV N を溶解したトルエン溶液を有機相とし、蒸留水にKNO<sub>3</sub> またはNaClを所定濃度で溶解した水溶液を内水相とした。内水相と有機相を所定の分散相体積分率でホモジナイザー (MASUDA, PH91) に入れ、5,000rpm で10分間攪拌して(W/O)エマルジョンを調製した。更に調製した(W/O)エマルジョンを10分間超音波照射 (Kaijo, AUTO CHASER 300, 300W, 19.5kHz) し、粒径0.5 $\mu$ m以下に微細化した (一次乳化)。一次乳化後、ピーカー内で(W/O)エマルジョンを一定速度で攪拌した。一定時間ごとに分散状態を光学顕微鏡により観察及び写真撮影し、その形状変化より安定性を測定した。安定性の良い(W/O)エマルジョンをSDS及びPVAを所定濃度で添加した外水相に加え、ホモジナイザー中で1,000rpm で3分間攪拌して(W/O/W)エマルジョンを調製した (二次乳化)。(W/O/W)エマルジョンを調製後、光学顕微鏡で観察及び写真撮影し、その形状変化より(W/O/W)エマルジョンの安定性を検討した。(W/O/W)エマルジョン粒径は顕微鏡写真から直接測定した。

##### 2.1.1.3 架橋中空マイクロカプセルの調製

調製した(W/O/W)エマルジョンを丸底型重合反応器に移し、窒素雰囲気下、333K, 100rpm で6時間攪拌してスチレンとDVBの *in-situ* 重合によりマイクロカプセルを調製した。調製したマイクロカプセルは吸引ろ過、水洗浄、減圧乾燥後、光学顕微鏡及び電子顕微鏡により表面及び内部構造を観察した。マイクロカプセル粒径及び微粒子表面に形成された細孔径は顕微鏡写真から直接測定した。

## 2.1.2 結果及び考察

**内水相塩濃度の影響** 内水相中の $\text{KNO}_3$ 濃度を変化させた場合、表面には細孔が形成され、その大きさは $\text{KNO}_3$ 濃度に無関係に一定であった。内部には表面細孔径と同程度の球状中空が形成されており、 $\text{KNO}_3$ 濃度による内部形状の変化は見られなかった。一方、 $\text{KNO}_3$ を添加しない場合には表面は滑らかで細孔は形成されず、内部中空も形成されなかった。 $\text{KNO}_3$ を添加しない場合は骨格形成前に内水相が外水相へ放出されるため表面細孔及び内部中空が形成されないと考えられる。このことから、表面細孔は骨格物質が形成される過程で内水相の外水相への放出により形成され、内部中空はカプセル内に存在した内水相の痕跡であることがわかる。

**希釈剤濃度の影響** トルエン濃度を変化させた場合のマイクロカプセル表面及び断面のSEM写真をFig.2-1に示す。表面細孔の数はトルエン濃度の増加とともに増加した。また表面はトルエン濃度の増加とともに粗く脆くなり、一部崩壊したものが観察された。トルエン濃度の増加により骨格物質量が減少したためである。希釈剤であるトルエン濃度を増加させると骨格物質の形成とトルエンの蒸発が同時に進行し、更にトルエンの蒸発が長期にわたって続くため内水相の移動による細孔形成が促進されたと考えられる。

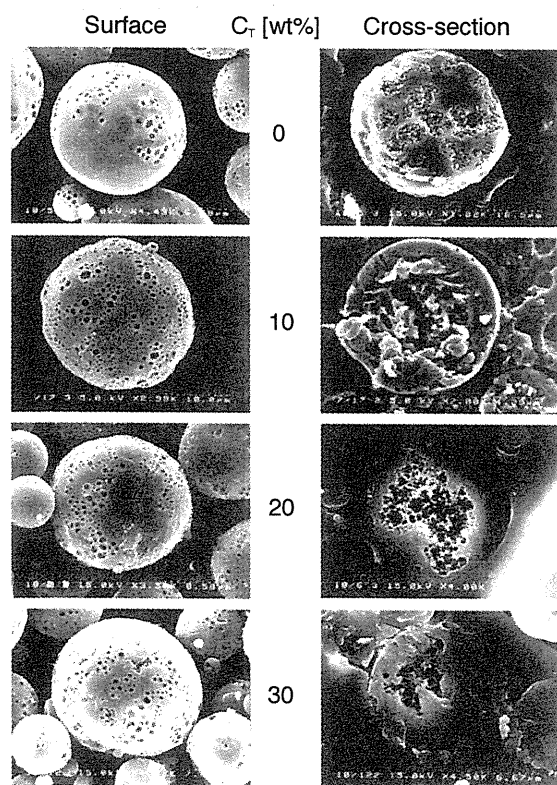


Fig.2-1 SEM photographs of microcapsules prepared at various diluent concentrations in organic phase.

**モノマー比の影響** スチレンに対するDVB添加量の割合(=  $\text{St}/\text{DVB} = R_m$ )を変化させた場合のSEM写真をFig.2-2に示す。細孔数は $R_m$ の増加とともに増加した。内部の中空径は $R_m$ の増加とともにわずかに増加した。DVB量が低い条件では有機相内で架橋されないスチレンモノマーが存在し、且つポリスチレンとなった部分は脆くなるため、内水相の移動と溶媒蒸発による細孔の形成が容易となり表面細孔径及び数が増加したと考えられる。

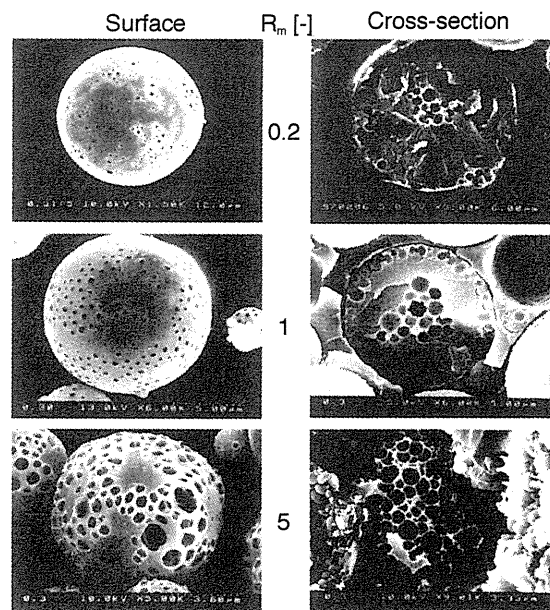


Fig.2-2 SEM photographs of microcapsules prepared at various monomer ratios in organic phase.

**有機相界面活性剤濃度の影響** 818SX濃度を変化させた場合のマイクロカプセル表面及び断面のSEM写真をFig.2-3に示す。818SX濃度の増加とともに表面細孔径は減少し、細孔数は増加した。内部中空の数は818SX濃度の増加とともに増加し、その大きさは表面に形成された細孔と同じであった。818SX濃度の増加により界面張力が低下して微小な(W/O)エマルションが多数調製されたため、表面細孔径及び内部中空径は減少したと考えられる。

## 2.2 イオン性物質内包特性に及ぼす調製条件の影響

### 2.2.1 実験

#### 2.2.1.1 試薬

芯物質にはアスコルビン酸マグネシウム(以後AMgと略記)、分散安定剤にはPVAまたはリン酸三カルシウム(以後TCP10と略記)を使用した。その他の試薬は2.1.1

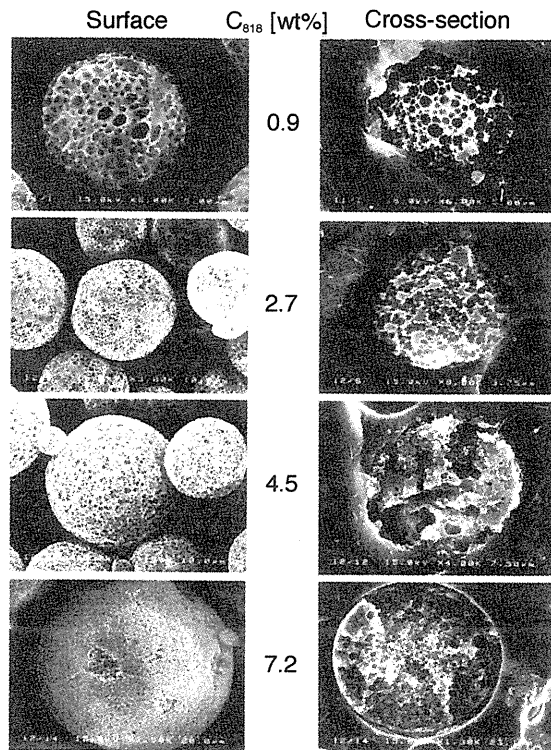


Fig.2-3 SEM photographs of microcapsules prepared at various surfactant concentrations in organic phase.

節で示したものをを用いた。

### 2.2.1.2 架橋中空マイクロカプセルの調製

架橋中空マイクロカプセルの調製は2.1.1.2節及び2.1.1.3節で示した方法と同じ方法で行った。(W/O/W)エマルション粒径及びマイクロカプセル粒径はレーザー回折式粒度分布計 (SHIMADZU SALD2000-A) を用いて測定した。本節では(W/O/W)エマルション及びマイクロカプセルの粒度分布の検討に(2-1)式で定義した変動係数,  $v$  を用いた。

$$v = \frac{\sigma}{D} \quad [-] \quad (2-1)$$

(W/O/W)エマルションを調製後その一部を採取し、ろ過によって(W/O)エマルションと外水相に分離した。外水相中の芯物質濃度を紫外可視吸光度計 (HITACHI, U-3200) を用いて測定し、(W/O/W)エマルション調製時の初期内包率,  $E_i$  を(2-2)式に基づいて求めた。

$$E_f = \frac{M_i - M_o}{M_i} \times 100 \quad [%] \quad (2-2)$$

マイクロカプセル内部に形成された中空の直径は電子顕微鏡写真から直接測定した。マイクロカプセル調製後の芯物質の内包率,  $E$  は in-situ 重合終了後のカプセル内

の芯物質質量 ( $M_i - M_o$ ) と仕込み芯物質質量,  $M_i$  の比として(2-3)式を用いて求めた。

$$E = \frac{M_i - M_o}{M_i} \times 100 \quad [%] \quad (2-3)$$

### 2.2.2 結果及び考察

**外水相塩濃度,  $C_{NaCl,o}$  の影響** イオン性物質内包特性に及ぼす  $C_{NaCl,o}$  の影響を Fig.2-4 に示す。(W/O/W)エマルションへの内包率,  $E_f$  は  $C_{NaCl,o}$  の増加とともに徐々に増加し  $C_{NaCl,o} = 0.3M$  以上において約 90% となった。この現象は両水相間の水の移動によるものである。両水相間における水の移動の概略を Fig.2-5 に示す。外水相塩濃度が小

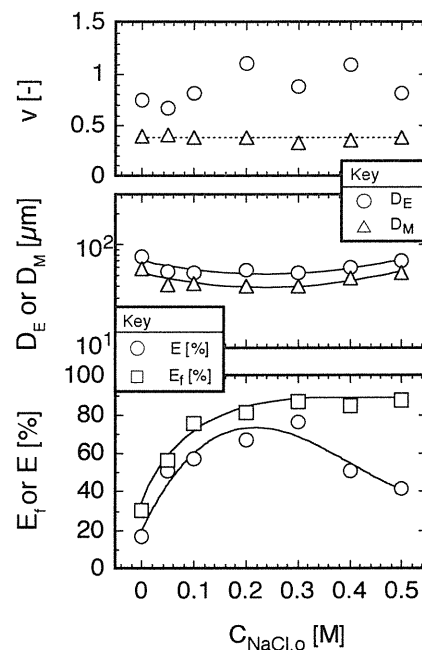


Fig.2-4 Effect of salt concentration in outer aqueous phase on the use of TCP10 as dispersion stabilizer.

さい場合は浸透圧差によって外水相から内水相へ水が移動し、内水相滴径が増加して不安定な状態となる。同時に内水相滴の圧力が増加して内水相が外水相へ放出され易くなる。一方、外水相へ塩を添加すると内水相から外水相へ水が移動して内水相滴が小さくなり安定化する。同時に内水相滴の圧力は減少して内水相が外水相へ放出しにくくなる。このため、 $C_{NaCl,o}$  の増加とともに  $E$  は増加したと考えられる。

マイクロカプセルへの内包率,  $E$  は  $C_{NaCl,o} = 0.3M$  までは  $C_{NaCl,o}$  の増加とともに増加し、それ以上では低下した。 $C_{NaCl,o}$  を変化させた場合のマイクロカプセル表面及び断面の SEM 写真を Fig.2-6 に示す。表面には細孔が存在せず凹凸が形成され、TCP10 の微小粒子の付着が観察され

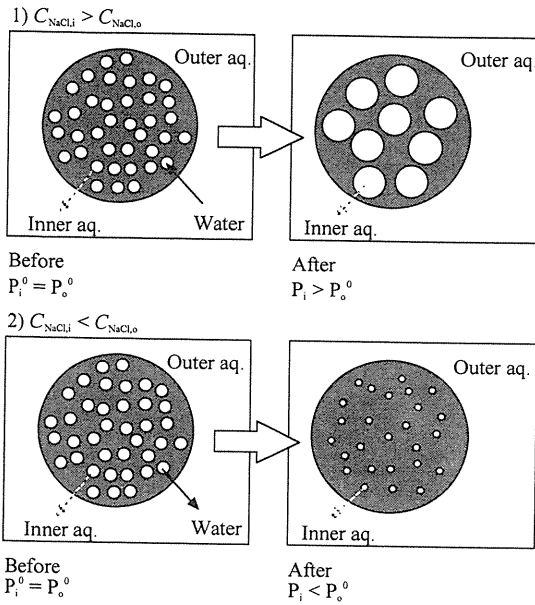


Fig.2-5 Schematic illustration of leakage profiles.

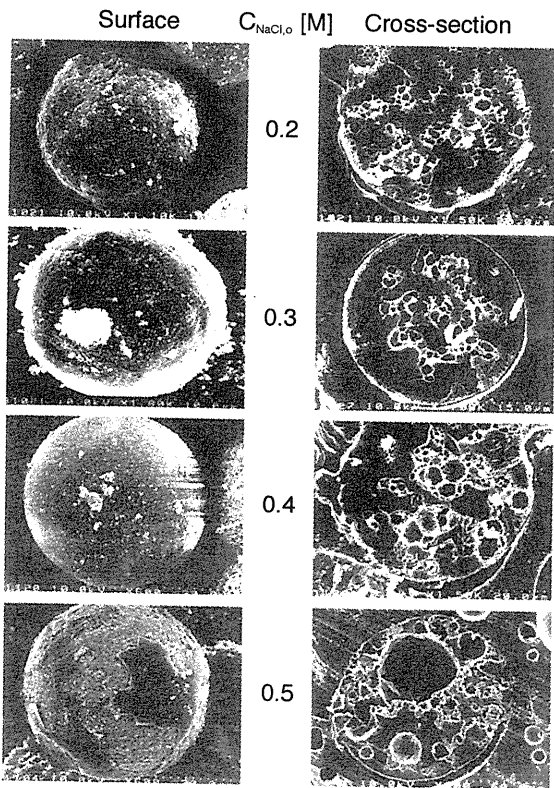


Fig.2-6 SEM photographs of microcapsules prepared at various salt concentrations in outer aqueous phase.

た。内部には大きな中空とともに多数の微小中空が観察され、大きな中空の大きさは $C_{NaCl_o}$ の増加とともに減少傾向にあるが、 $C_{NaCl_o}=0.3M$ を境に増加する傾向が見られた。 $C_{NaCl_o}=0.3M$ で内部滴径が最小となり、(W/O/W)エマルションが重合過程において最も安定となるため $E$ が $C_{NaCl_o}=0.3M$ で最大となり、 $C_{NaCl_o}=0.3M$ 以上では重合過

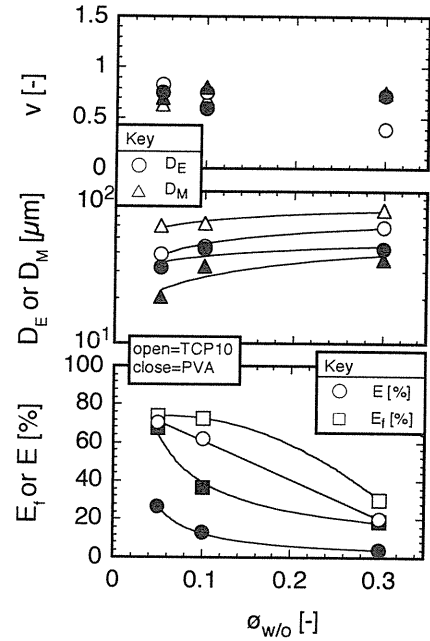


Fig.2-7 Effect of volume fraction of dispersed droplets in (W/O) emulsion.

程で内水相滴の合一が生じたため $E$ が低下したと考えられる。

分散相体積分率、 $\sigma_{w/o}$ の影響 Fig.2-7に分散安定剤にPVAまたはTCP10を用いた場合のイオン性物質内包特性に及ぼす $\sigma_{w/o}$ の影響を示す。 $E_f$ 及び $E$ は $\sigma_{w/o}$ の増加とともに減少した。(W/O/W)エマルション粒径、 $D_E$ 及びマイクロカプセル粒径、 $D_M$ は $\sigma_{w/o}$ の増加とともに増加した。変動係数、 $v$ はいずれの分散安定剤を用いた場合でも $\sigma_{w/o}$ に

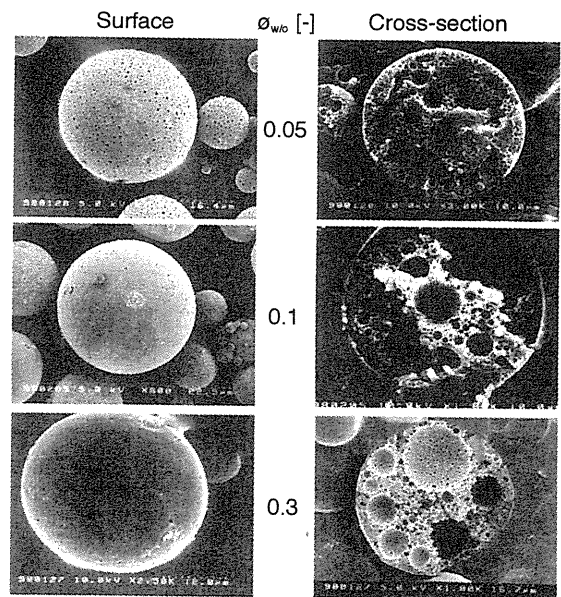


Fig.2-8 SEM photographs of microcapsules prepared at various volume fractions.

無関係に一定であった。PVAを用いた場合のマイクロカプセル表面及び断面のSEM写真をFig.2-8に示す。内部には比較的大きな中空とともに多数の微小中空が形成された。大きな中空の大きさ及び数は $\sigma_{w/o}$ の増加とともに増加した。この結果はTCP10を用いた場合も同様であった。カプセル構造に与える $\sigma_{w/o}$ の影響をFig.2-9に示す。 $\sigma_{w/o}$ が高い場合、(W/O/W)エマルジョン中の内水相滴が多く、内水相滴の接触により滴の合一が起こり、滴径の大きな内水相を内包した(W/O/W)エマルジョンが形成される。滴径の大きな内水相は(W/O/W)エマルジョン内で不安定となり、容易に外水相へ放出される。更に内水相滴の凝集によりカプセル内にチャンネルが形成され、カプセル形成後も漏洩が進行して $E$ が減少したと考えられる。

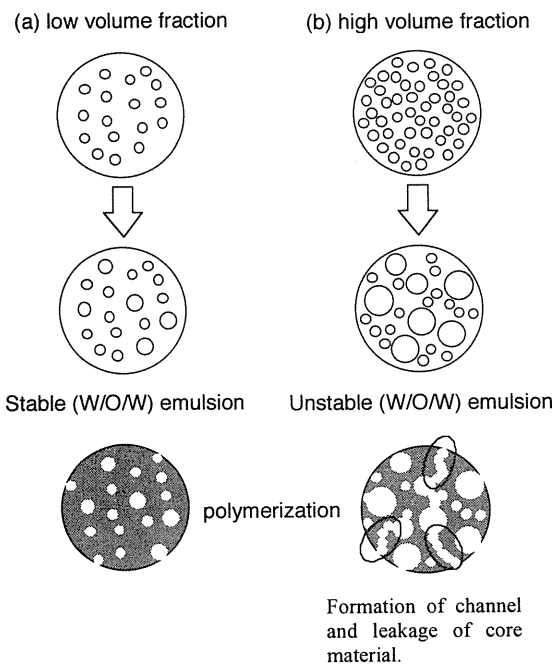


Fig.2-9 Schematic illustration of structure change with various volume fractions.

### 3. 生分解性マイクロカプセルの調製とその特性制御

(W/O/W)エマルジョンを用いたマイクロカプセルの調製における重要な問題点の一つに水溶性芯物質の内包率が低いということが挙げられる<sup>7,8)</sup>。水溶性芯物質の内包率増加に関してこれまでに多くの報告が行われている<sup>8-12)</sup>が、これらの研究で報告された内包率の向上は比較的低内包率の場合が多く更に改善することが必要である。内包物質は高価な試薬であることが多く、外水相へ漏洩

した内包物質の回収は困難であり、内水相中の目的物質の全量をカプセル内に内包させる必要がある。更に内包率の向上はカプセル製造コストの低減にもつながる。本章では、(W/O/W)エマルジョンの液中乾燥法により調製した生分解性マイクロカプセルの形状及び粒径に与える調製条件の影響を検討し、生分解性マイクロカプセルへの水溶性タンパク質の内包制御法の確立を行った。

#### 3.1 実験

##### 3.1.1 試薬

骨格物質にはポリ乳酸系生分解性ポリマー (SHIMADZU, Mw=270,000, 以後 Lacty と略記) を使用した。内水相はプランクトン餌料用の有用タンパク質 (乾燥した卵黄が主成分, オリエンタル酵母(株)より提供) または牛血清アルブミン (Sigma Chem. TypeIV, 以後 BSA と略記) を塩化ナトリウム水溶液または Tris- 緩衝液 (pH=7.5) に溶解したものを用いた。有機溶媒として 1,2-ジクロロエタンを用いた。有機相に添加した界面活性剤には 818SX, 外水相の界面活性剤にはモノラウリン酸デカグリセリン (以後 Q12 と略記), 分散安定剤には PVA を使用した。

##### 3.1.2 生分解性マイクロカプセルの調製方法

内水相水溶液に有機相を所定の分散相体積分率で加え、冷却しながらホモジナイザーを用いて 5,000rpm で 10 分間攪拌して (W/O) エマルジョンを調製した。次に調製した (W/O) エマルジョンを反応器中の外水相へ加え、室温で所定の攪拌速度で 5 分間攪拌して (W/O/W) エマルジョンを調製した。(W/O/W) エマルジョンを調製後、反応器を所定温度に保ち、ダイヤフラムポンプにより吸引しながら溶媒が蒸発するまで攪拌を続けた。溶媒蒸発後、吸引ろ過、水洗し、減圧乾燥した。調製したマイクロカプセルの平均粒径はレーザー回折式粒度分布計を用いて測定した。マイクロカプセルの形状は電子顕微鏡を用いて観察した。芯物質の内包率はカプセル内に内包されたタンパク質量,  $(M_i - M_o)$  と (W/O) エマルジョン調製時に内水相に仕込んだタンパク質量,  $M_i$  との比として (2-3) 式より求めた。

#### 3.2 結果及び考察

分散相体積分率,  $\sigma_{w/o}$  の影響 Fig.3-1 に  $E$ ,  $D_E$  及び  $D_M$  に与える  $\sigma_{w/o}$  の影響を示す。一次乳化後に超音波を照射せず外水相に塩を添加しなかった場合,  $E$  は  $\sigma_{w/o}$  の増加とともに急激に増加し,  $\sigma_{w/o}=0.1$  付近で最大となり,  $\sigma_{w/o}$  が



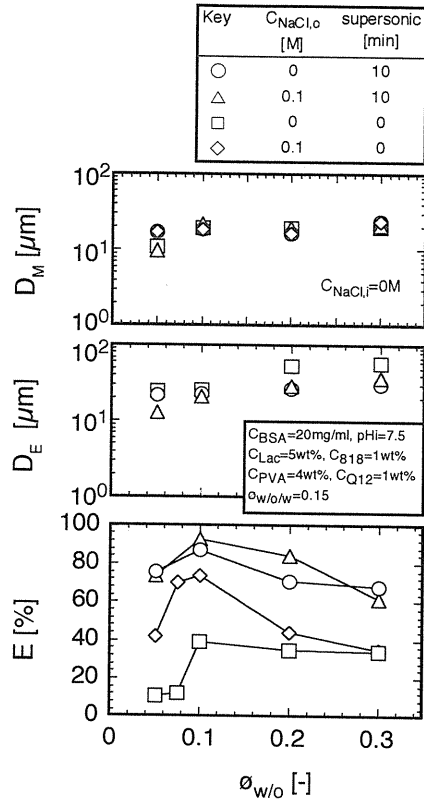


Fig.3-1 Effect of volume fraction of dispersed droplets at various  $C_{NaCl,o}$  with or without supersonic.

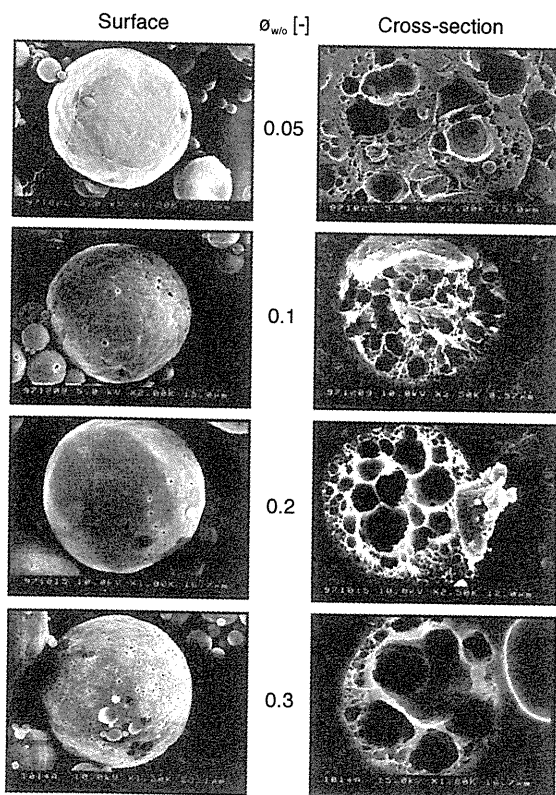


Fig.3-2 SEM photographs of microcapsules prepared at various volume fractions of dispersed droplets.

高くなると緩やかに減少した。外水相に塩を添加した場合、 $E$ は高くなり $\phi_{w/o}$ の増加とともに増加し、 $\phi_{w/o}=0.1$ 付近で最大となった後、緩やかに減少した。 $D_E$ 及び $D_M$ は $\phi_{w/o}$ の増加とともに増加した。 $D_M$ は $D_E$ より幾分小さくなった。一次乳化後、超音波を照射した場合、 $E$ は増加した。 $\phi_{w/o}$ の増加とともに $E$ は増加し、 $\phi_{w/o}$ の時に最大約90%となり、更に $\phi_{w/o}$ を増加させると緩やかに低下した。超音波照射による内水相滴の微細化により内包率は増加し、外水相への塩添加の影響は小さくなった。 $D_E$ 及び $D_M$ は超音波を照射しなかった場合と同様に $\phi_{w/o}$ の増加とともに増加し、 $D_M$ が $D_E$ より小さくなった。 $\phi_{w/o}$ を変化させた場合のマイクロカプセルの表面及び断面のSEM写真をFig.3-2に示す。 $\phi_{w/o}$ が小さいときは表面細孔は形成されていないが、 $\phi_{w/o}$ が増加すると細孔が形成され、その数及び孔径は大きくなった。 $\phi_{w/o}$ の増加とともにカプセル内部に大きな中空が形成され、カプセル壁が薄くなった。 $\phi_{w/o}$ が増加すると内水相の割合が増加して内水相滴の合一が起こりやすく、大きな径の液滴が形成すると同時にカプセル壁の厚みが減少したためである。

外水相添加物濃度、 $C_{Add,o}$ の影響  $E$ 、 $D_E$ 及び $D_M$ に与える $C_{Add,o}$ の影響をFig.3-3に示す。内水相への塩添加と超

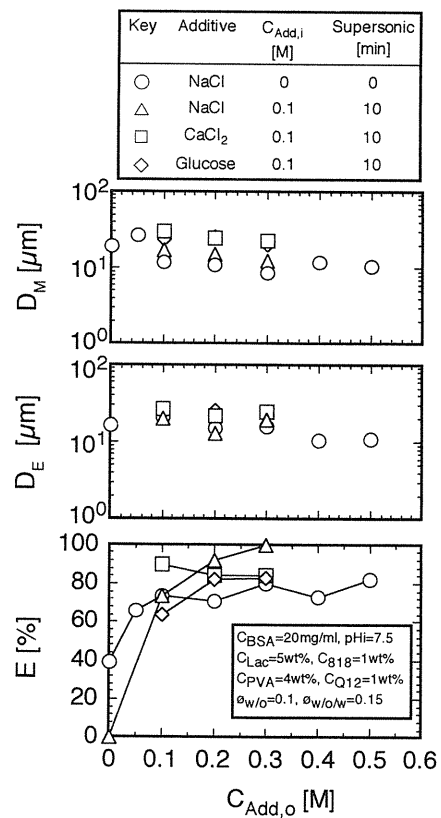


Fig.3-3 Effect of additive concentration in outer aqueous phase at  $C_{Add,i}$  = 0 or 0.1M with or without supersonic.

音波を照射しない場合、 $E$ は外水相のNaCl濃度の増加とともに増加した。 $NaCl$ 濃度の増加とともに $D_E$ は約 $30\mu m$ から約 $10\mu m$ まで減少し、さらに $D_M$ も $20\mu m$ から $10\mu m$ まで減少した。内水相に外水相と同じ物質を $0.1M$ で添加し、一次乳化後超音波を照射した場合、いずれの添加物についても $E$ は $C_{Add,o}$ の増加とともに増加した。特に $C_{NaCl,o}=0.3M$ において、BSAはほぼ $100\%$ 内包された。 $CaCl_2$ を添加した場合は内包率に与える $C_{Add,o}$ の影響は大きく表れなかった。 $D_E$ 及び $D_M$ は $C_{Add,o}$ の増加とともに僅かに減少した。これは $C_{Add,o}$ の増加とともに内水相から外水相への水の移動量が増加し、(W/O/W)エマルジョンの収縮が増加したためである。外水相添加物濃度を変化させた場合のマイクロカプセル断面のSEM写真をFig.3-4に示す。いずれの場合も $C_{Add,o}$ の増加とともに内部中空の大きさが小さくなり、均一に分散していることがわかる。超音波を照射しなかった場合でも同様な結果が得られた。内包率は $CaCl_2$ を添加した場合はほぼ一定であったが、内部構造は大きく異なっている。この場合、イオン強度が大きく水の移動量が大きくなったため $E$ は低下しなかったと考えられる。以上のことから、内水相及び外水相への添加物濃度の影響は両水相間の浸透圧差に起因する水の透過による内水相の膨潤もしくは収縮によって説明でき、浸透圧差による外水相から内水相への水の透過は内包率を高めるためには好ましくないことが明らかとなった。内水相の内包物質濃度の増加による内包率の低下<sup>1)</sup>は、内水相の全溶質濃度の増加によって浸透圧差が大きくなり、外水相から内水相への水の透過が起りやすくなることで説明できる。

内水相添加物濃度、 $C_{Add,i}$ の影響  $E$ 、 $D_E$ 及び $D_M$ に与え

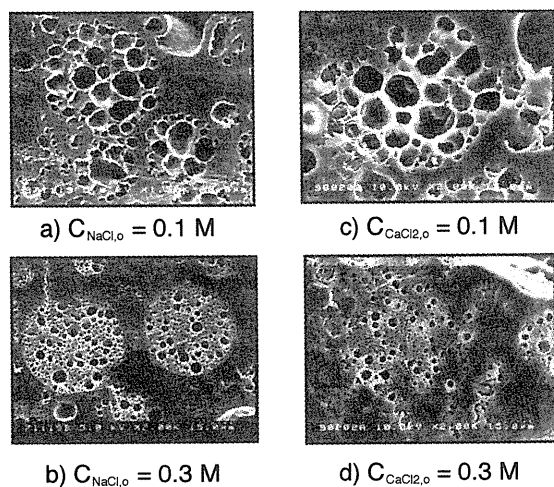


Fig.3-4 Cross-section of microcapsules prepared at  $C_{Add,o}=0.1$  or  $0.3M$ .

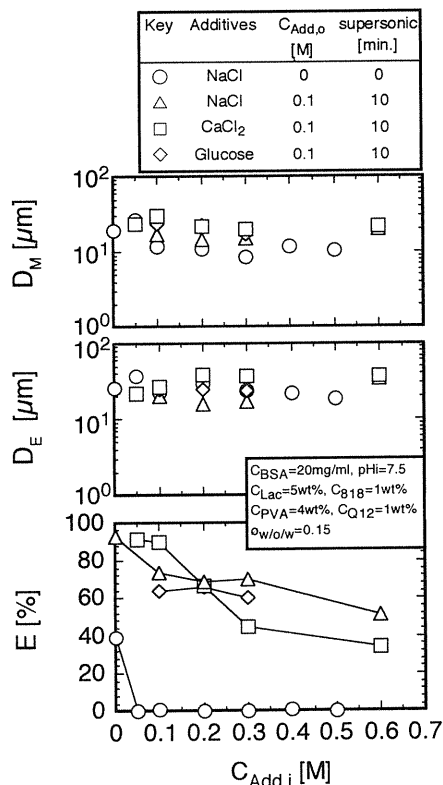


Fig.3-5 Effect of additive concentration in inner aqueous phase at  $C_{Add,o}=0.1$  or  $0.3M$  with or without supersonic.

$C_{Add,i}$ の影響をFig.3-5に示す。外水相に塩を添加せず一次乳化後に超音波を照射しなかった場合、内水相に $NaCl$ を添加すると内包率は急激に低下し、BSAをほとんど内包することが出来なかった。外水相に内水相と同じ物質を $0.1M$ で添加し、一次乳化後に超音波を照射した場合、内水相添加物濃度の増加とともに内包率は大きく低下した。 $CaCl_2$ を添加した場合は $NaCl$ を添加した場合に比べてその低下が大きくなった。この低下の度合いの差はイオン強度の差によるものである。内水相へ $NaCl$ を添加しない場合及び添加した場合のカプセル断面のSEM写真をFig.3-6に示す。 $NaCl$ を添加した場合、内部の中空の大きさは不均一となり、粒子径に比べ大きな中空が多く存在している。添加物として $CaCl_2$ またはグルコースを用いた場合でも内水相の添加物濃度が高くなると内部の中空径は不均一になり、大きな中空が増加した。両水相間の浸透圧差により外水相から内水相へ水が透過し、内水相が膨潤するために内水相滴間の合一が起りやすくなってカプセル壁の厚みが薄くなり、漏出が起りやすくなったと考えられる。



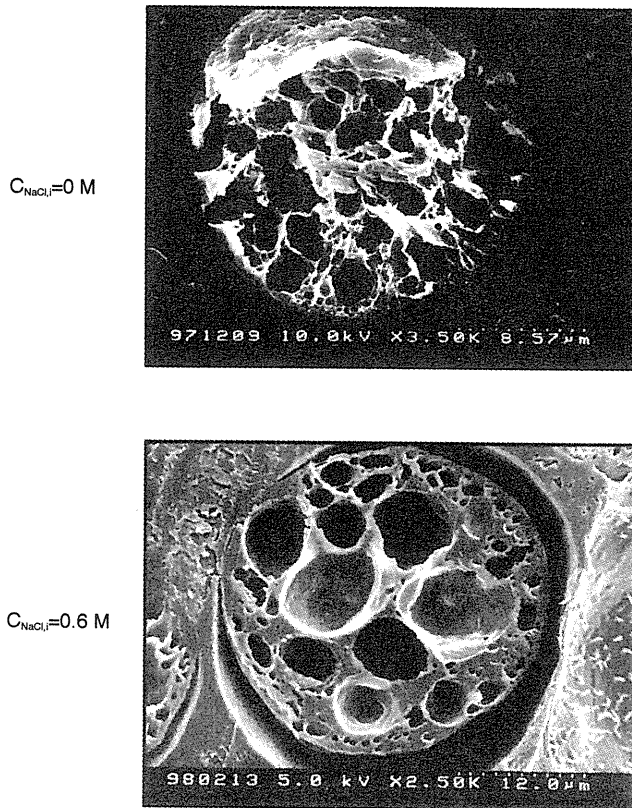


Fig.3-6 Cross-section of microcapsules prepared at  $C_{NaCl_i} = 0$  or 0.6M with supersonic treatment.

#### 4. 機能性微粒子連続調製技術の開発

乳化操作は医薬品、食品、化粧品、洗剤、塗料等の分野で幅広く利用されている。実際の乳化プロセスにおいて乳化器の種類や乳化の対象物質によって様々な問題がある。適用できる溶液粘度が広く、エマルション液滴径の制御を行うことのできる汎用性の高い連続調製型の乳化器は非常に少ない。本章では混合器内に取り付けた攪拌翼を上下に振動させて両相を攪拌する乳化器(パイロディスク)を試作した。この乳化器を用いることによって効率よい混合による液滴径の制御、更に流通連続操作による乳化物の調製が可能である。この連続乳化器を用いてエマルションを調製し、その粒径分布に与える操作条件の影響を検討して乳化特性を明らかにするとともに、平均粒径と操作パラメーターの相関関係式を導出した。更にマイクロカプセル連続調製プロセスの開発を目的とし、振動型連続乳化器と振動型連続重合器を組み合わせた微粒子連続調製プロセスを提案し、マイクロカプセル特性に与える調製条件の影響について検討した。

#### 4.1 振動型連続乳化器の開発及びその乳化特性

##### 4.1.1 実験

##### 4.1.1.1 試薬

各エマルションにおいて次の試薬を用いた。

(O/W)エマルションの調製に際しては、有機相は5wt%テトラグリセリン縮合リシノレイン酸エステル(TGCR)/ケロセン溶液、水相は2wt%PVA水溶液を用いた。一方、(W/O)エマルションの調製には、有機相に5wt%TGCR/ケロセン溶液、水相に蒸留水を用いた。

##### 4.1.1.2 実験装置

パイロディスクの概略をFig.4-1に示す。乳化部は塩化ビニル製であり、内径36.0mm、外径48.0mm、長さ55.0mmの円筒型容器である。乳化器の内部は三段に分かれ、各段にポリ塩化ビニル製の厚さ2.0mmの円盤型で同心円状に二列に孔がつけられたプレート型攪拌翼が取り付けられている。攪拌翼間の間隔は12.0mmであり、乳化器の内容積は43.0m<sup>3</sup>であった。エマルションの調製には攪拌翼の直径、 $d_L$ 、孔の直径、 $d_H$ 及び孔の数、 $n$ を変化させた種々の攪拌翼を使用した。

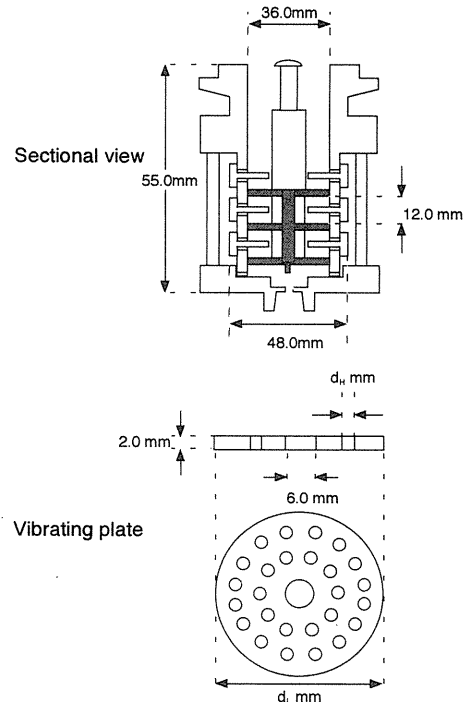


Fig.4-1 Continuous emulsification apparatus.

##### 4.1.1.3 実験方法

有機相と水相は別々のポンプを用いて所定の平均滞留時間及び分散相体積分率になるように所定流量で乳化器

中へ導入した。両相は乳化器下部に取り付けたT字管で合流させ内部に導入した。空気の混入を防ぐため、乳化器上部から液が流出しはじめ、乳化器内が両相で満たされた後に攪拌翼の振動を開始した。調製したエマルションが乳化器上部から流出しはじめ、平均滞留時間の2倍の時間経過後にエマルションを採取した。平均滞留時間の2倍の時間経過後はエマルション粒径の変化は見られなかった。エマルション形状は光学顕微鏡を用いて観察した。エマルション平均粒径及び標準偏差はレーザー回折式粒度分布計を用いて測定した。エマルション粒径の粒度分布は(2-1)式の変動係数を用いて検討した。

4.1.2 結果及び考察

4.1.2.1 乳化特性に与える操作条件の影響

**界面活性剤濃度の影響** エマルション平均粒径に与える界面活性剤濃度の影響を Fig.4-2 に示す。何れのエマルションにおいても平均粒径及び界面活性剤濃度の増加とともに減少した。これは界面活性剤添加により界面張力が減少したためである。また、攪拌翼の振動数の増加とともに平均粒径に及ぼす界面活性剤濃度の影響が小さくなった。

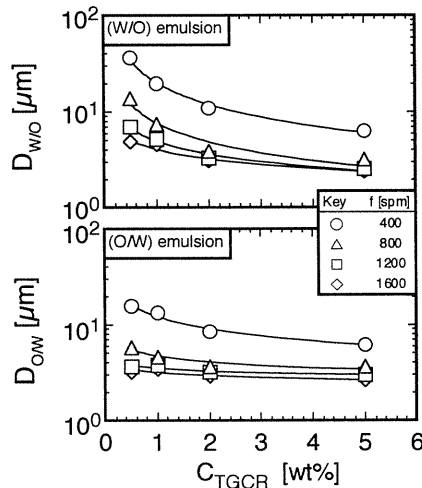


Fig.4-2 Effect of TGCR concentration on the average diameter of (O/W) or (W/O) emulsions.

**分散相体積分率、 $\phi$ の影響** エマルション平均粒径に与える分散相体積分率の影響を Fig.4-3 に示す。(O/W)エマルション粒径、 $D_{ow}$  は $\phi_{ow}$ の増加に無関係に一定であった。従来の回転型攪拌による乳化において、エマルション粒径は分散相体積分率の増加とともに増加する。分散相体積分率の増加による分散液滴の合一速度の増加、連続相内における分散相の乱れ、乳化液の粘度増加等によ

る攪拌効率の低下が原因である<sup>14)</sup>。本研究においても(O/W)エマルションの粘度は分相体積分率の増加とともに増加した。しかし、パイロディスクは乳化部の体積に対し攪拌翼の占める体積の割合が大きく、分散相に加わる剪断力が $\phi_{ow}$ の増加により低下せず十分に攪拌が行われたため粒径変化が無かったと考えられる。一方、(W/O)エマルション粒径、 $D_{wo}$  は $\phi_{wo}$ の増加とともに増加した。(W/O)エマルションの粘度は分相体積分率に無関係にはほぼ一定であり、分散相の合一及び乱れが生じたためと考えられる。

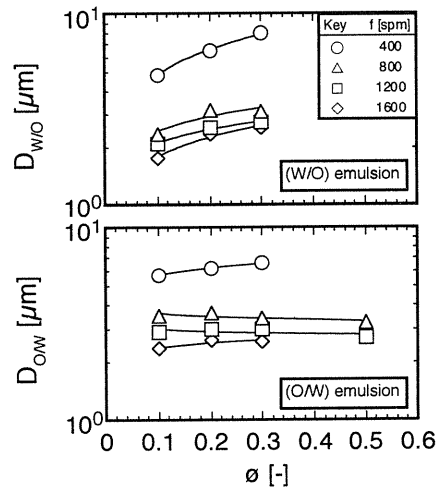


Fig.4-3 Effect of volume fraction of dispersed droplets.

**振動数、 $f$ の影響** エマルション粒径に与える振動翼の振動数、 $f$ の影響を Fig.4-4 に示す。 $D_{ow}$  及び $D_{wo}$  と $f$ との両対数プロットは直線関係で表されることがわかる。 $D_{ow}$  及び $D_{wo}$  は振動数の増加とともに減少した。振動数が増加することで攪拌翼の剪断力が増加し、液滴の分散が促進されたためである。

**攪拌翼直径、 $d_L$  及び攪拌翼孔径、 $d_H$ の影響** エマルションの平均粒径に与える $d_H$ 及び $d_L$ の影響を Fig.4-5 に示す。いずれの振動数においても、 $D_{ow}$  は $d_L$ の増加とともに直線的に減少した。また $d_H$ の増加とともに $D_{ow}$  は増加した。パイロディスクによる乳化は分散相の攪拌翼間での衝突及び攪拌翼を通過する際の粉砕により行われる。攪拌翼直径が大きくなると乳化器内壁と攪拌翼の距離が狭くなり、分散相の粉砕が大きくなる。更に $f$ の増加により攪拌翼間での衝突が大きくなり、粒径の小さなエマルションが調製される。攪拌翼孔径が大きくなると容易に攪拌翼を通過することができ、分散相の粉砕が起こりにくくなる。

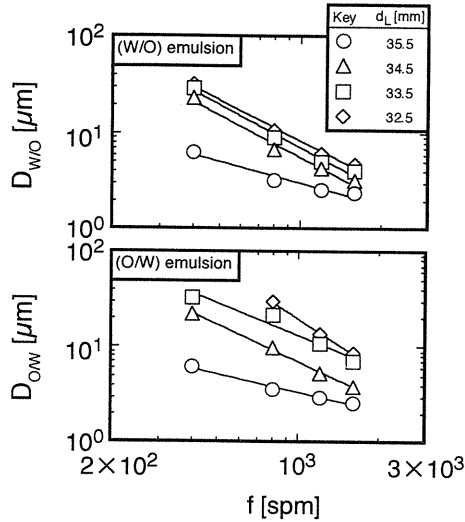


Fig.4-4 Effect of frequency of vibration plate.

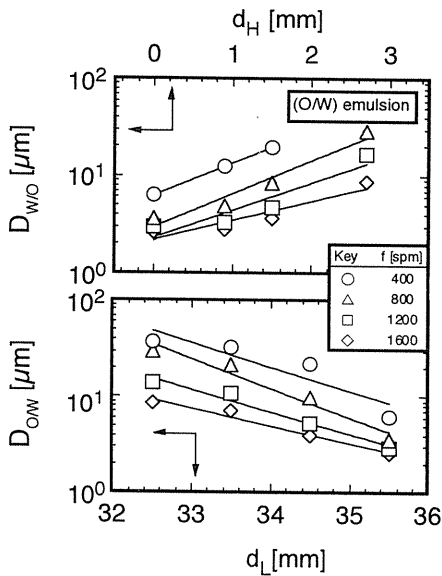


Fig.4-5 Effect of diameter of vibration plate and hole diameter in the vibration plate.

4-1-2-2 操作条件とエマルション平均粒径の相関関係式の導出

Fig.4-4に示したようにエマルション平均粒径と振動数の両対数プロットは直線で表されることから、 $D$ は $f$ を用いて(4-1)式で表される。

$$D = a \cdot f^b \quad [\mu\text{m}] \quad (4-1)$$

$f$ と $D_{O/W}$ 及び $D_{W/O}$ の両対数プロットより得られる直線の勾配と切片より係数 $a$ と乗数 $b$ を求めた。 $d_H$ 、 $d_L$ 及び $n$ を変化させるとエマルションが通過する攪拌翼部分の面積が変化する。これらの攪拌翼形状の違いを統一して考察するために空間面積率、 $R_S$ を乳化器断面積、 $S_R$ 、攪拌翼

面積、 $S_P$ 及びエマルション通過断面積、 $S_V$ を用いて次のように定義した。

$$S_V = S_R - S_P \quad [\text{m}] \quad (4-2)$$

$$R_S = \frac{S_V}{S_R} \quad [-] \quad (4-3)$$

(O/W)エマルションについてすべての実験データの $a_{O/W}$ 及び $b_{O/W}$ を $R_S$ に対してプロットし、Fig.4-6に示す。 $a_{O/W}$ 及び $b_{O/W}$ は攪拌翼の形状に無関係に一つの直線上にプロットされ、この直線関係より $a_{O/W}$ 及び $b_{O/W}$ は以下の式で表された。

$$a_{O/W} = 8.07 \times 10^9 R_S^{4.74} \quad [\mu\text{m}/\text{spm}^{b_{O/W}}] \quad (4-4)$$

$$b_{O/W} = -1.28 \log(R_S) - 2.67 \quad [-] \quad (4-5)$$

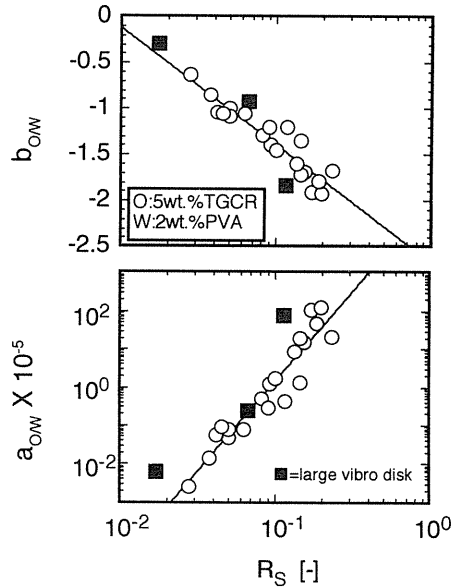


Fig.4-6 Relationship between slope or multiplier and ratio of space area in (O/W) emulsion.

図中の■は内容積200m<sup>l</sup>(内径143.0mm、外径155.0mm、長さ70.0mm)の大型のバイブロディスク乳化器を用いた場合の実験結果である。内容積の異なる乳化器を用いた場合でも同じ直線上にプロットされた。このことから、 $R_S$ を用いることによりスケールの異なる乳化器についてもエマルション粒径を(4-4)及び(4-5)式を用いて推測することが可能である。

(W/O)エマルションについて、すべての実験データの $a_{W/O}$ 及び $b_{W/O}$ を $R_S$ に対してプロットしFig.4-7に示す。 $b_{W/O}$ は $R_S > 0.05$ の領域においてほぼ一定となったが、 $R_S \leq 0.05$ の領域では一定値からのずれが生じた。一定値か

らのずれが生じた  $R_s \leq 0.05$  の領域を持つ攪拌翼を用いて調製した(W/O)エマルション粒径と振動数の両対数プロットは直線からのずれが生じ、 $D=a \cdot f^b$  の関係式が成立しなかった。従って、(W/O)エマルションの場合は  $R_s > 0.05$  の領域について  $a_{w/o}$  を求めた。 $R_s > 0.05$  において、 $a$  は  $R_s$  の増加とともに増加し、攪拌翼の形状に無関係に直線上にプロットされた。得られた直線関係より  $a_{w/o}$  及び  $b_{w/o}$  は以下の式で表された。

$$a_{w/o} = 6.95 \times 10^5 R_s + 5.55 \times 10^4 \quad [\mu\text{m}/\text{spm}^{b_{w/o}}] \quad (4-6)$$

$$b_{w/o} = -1.43 \quad [-] \quad (4-7)$$

以上示したように、パイロディスクを用いて調製したエマルションの平均粒径は攪拌翼の振動数と空間面積率を用いて表されることがわかった。この関係式はパイロディスクの大きさに無関係に適用でき、粒径を任意に制御しながら連続的にエマルションを調製できることを明らかにした。

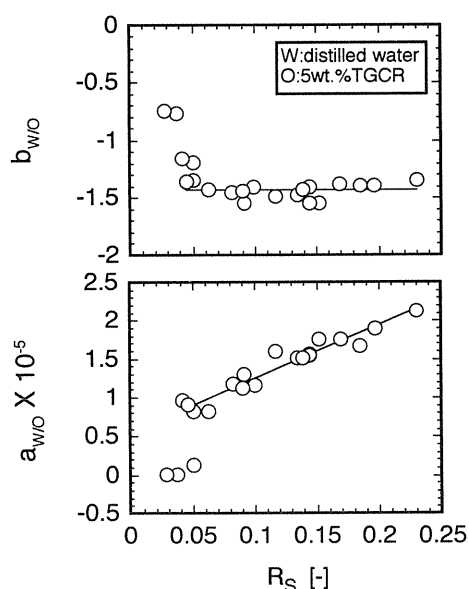


Fig.4-7 Relationship between slope or multiplier and ratio of space area in (W/O) emulsion.

## 4.2 振動型連続微粒子調製装置の開発及びその特性

### 4.2.1 実験

#### 4.2.1.1 試薬

架橋中空マイクロカプセルの連続調製で用いた試薬は2.1.1.1節で示したものを使用した。

### 4.2.1.2 実験装置

振動型連続重合器の詳細をFig.4-8に示す。重合器は直径50.0mm、重合部分高さ335.0mmの円筒型であった。内部には直径13.0mmの攪拌翼が10.0mm間隔で27枚取り付けられ、攪拌翼を設置した状態の内容積は43.0mlであった。この装置はFig.4-1で示した連続乳化器2台と直列に接続され、4本の重合器も直列に接続されている。

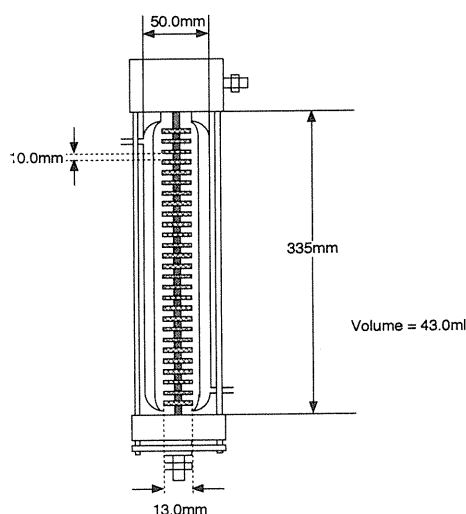


Fig.4-8 Schematic illustration of apparatus for the continuous preparation of microcapsules.

### 4.2.1.3 マイクロカプセル連続調製方法

マイクロカプセル連続調製のフローチャートをFig.4-9に示す。4.1節で示したパイロディスク乳化法により(W/O)エマルションを調製した後、それに超音波を照射して粒径約0.5 $\mu\text{m}$ の(W/O)エマルションを調製した。その(W/O)エマルションと外水相をパイロディスクに導入し、(W/O/W)エマルションを調製した。得られた(W/O/W)エマルションをFig.4-8で示した連続重合器に導入し、4本の重合器に(W/O/W)エマルションを充分満たした後、353Kで6時間加熱してスチレンとDVBのin-situ重合によってマイクロカプセルを調製した。本研究では(W/O/W)エマルションまでを連続調製し、マイクロカプセル調製は反応器内で滞留させる半連続調製法を用いた。調製したマイクロカプセルは反応器下部より抜き出し、吸引ろ過、水洗浄、減圧乾燥後、光学顕微鏡及び電子顕微鏡により表面及び内部構造を観察した。マイクロカプセル粒径はレーザー回折式粒度分布計を用いて測定した。

### 4.2.2 結果及び考察

二次乳化時の振動数、 $f_2$ の影響  $D_E$ 及び $D_M$ に与える $f_2$ の

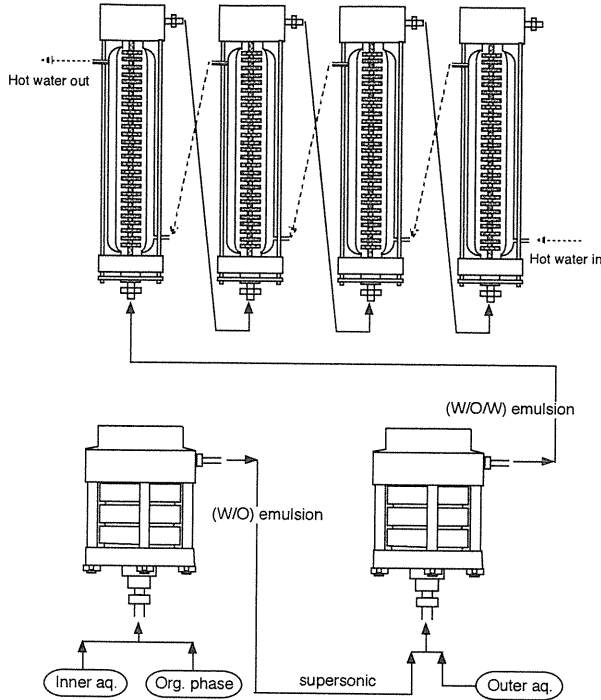


Fig.4-9 The flow chart for the continuous preparation of microcapsules.

影響を Fig.4-10 に示す。  $D_E$  及び  $D_M$  は  $f_2$  の増加とともに減少した。  $f_2$  を変化させた場合のマイクロカプセル表面及び断面の SEM 写真を Fig.4-11 に示す。マイクロカプセル表面には TCP10 微粒子の付着が観察された。マイクロカプセル内部には多数の微小中空とともに比較的大きな中空が形成された。中空の大きさ及び数は  $f_2$  の増加とともに減少した。大きな中空は粒径が大きく不安定な

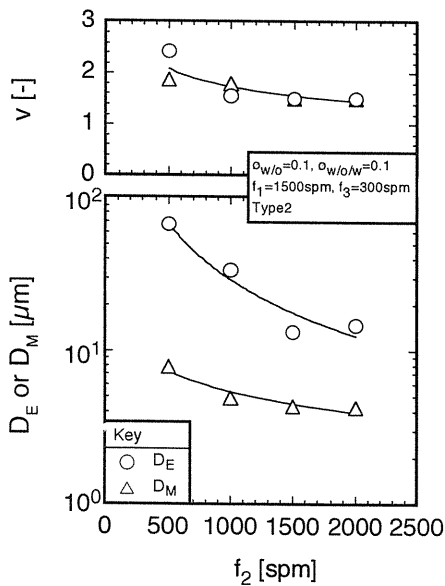


Fig.4-10 Effect of vibration speed in second emulsification.

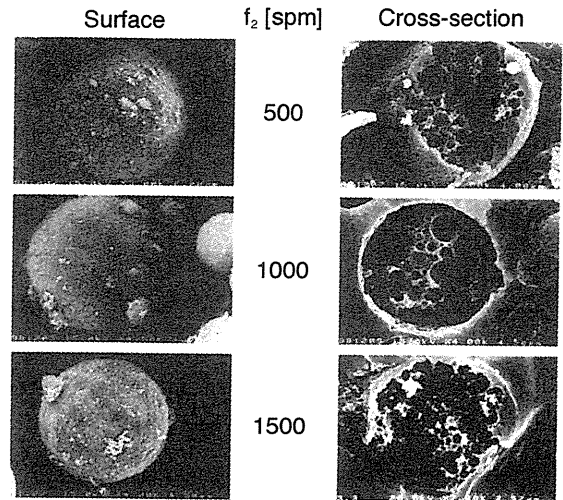


Fig.4-11 SEM photographs of microcapsules prepared at various vibration speeds in second emulsification.

(W/O/W)エマルジョン中の内水相滴の合一によって形成されたものである。

重合管内の振動数,  $f_3$  の影響  $D_M$  に与える  $f_3$  の影響を Fig.4-12 に示す。  $D_M$  は約  $4\mu\text{m}$  と実験誤差内で一定であった。(W/O/W)エマルジョンを重合器に導入後 30 分後の (W/O/W)エマルジョンを採取し光学顕微鏡で観察した。マイクロカプセルの平均粒径と同程度の真球状の固化しつつある (W/O/W)エマルジョンが観察された。(W/O/W)エマルジョンは重合器に導入後、約 30 分程度でカプセルの外層が形成されることわかる。

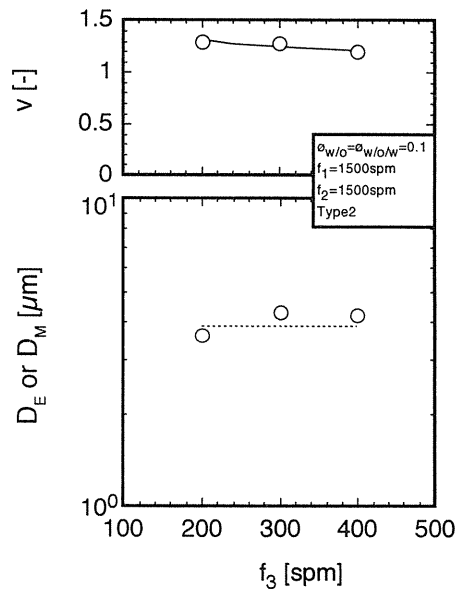


Fig.4-12 Effect of vibration speed in polymerization on the average diameter and variance of microcapsules.

一次乳化の分散相体積分率の影響  $\phi_{w/o}$  及び 818SX 濃

度を変化させた場合のマイクロカプセル内部のSEM写真をFig.4-13に示す。 $\phi_{w/o}$ の増加とともに内部に形成された大きな中空の数及び大きさは増加した。隣接した内部滴同士が合一して大きな中空が形成されたためである。また、界面活性剤濃度の増加により大きな中空の形成が抑制された。これらの結果はバッチ法で調製した場合と同様の結果であった。このことからマイクロカプセルの構造を制御しながら連続的に調製できる可能性を示している。

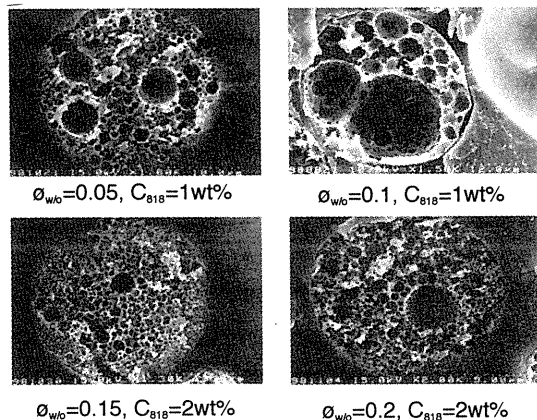


Fig.4-13 SEM photographs of microcapsules prepared at various volume fractions and surfactant concentrations in organic phase.

## 5. 結論

本研究はマイクロカプセルへの機能性の付与に関する調製及び連続調製装置の操作条件に関する基礎的知見を得るために①マイクロカプセルの機能である構造の制御、②機能を十分に発揮させるための芯物質の内包特性制御、③実用化に際して重要な因子となる微粒子連続調製技術の開発について検討したものである。本研究によって得られた成果は以下の通りである。

まず、(W/O/W)エマルジョンの有機相中での *in-situ* 重合によりスチレンを骨格物質としたマイクロカプセルの調製を行い、マイクロカプセル形状、粒径、芯物質内包及び徐放特性に与える調製条件の影響について検討し、以下のことを明らかにした。

1) マイクロカプセル表面細孔は骨格形成時の内水相の外水相への放出によって形成され、内部中空はカプセル内に存在した内水相滴の痕跡であることを明らかにした。更に表面細孔及び内部中空の直径はマイクロカプセル調製条件により任意に制御できることを明らかにした。即ち、①希釈剤濃度の減少による溶媒蒸発量の減少、②架橋剤濃度の増加による膜強度の増加、③有

機相界面活性剤濃度の増加による内水相滴の微細化④一次乳化の分散相体積分率の減少による骨格物質量の増加及び内水相滴の合一の抑制により表面細孔及び内部中空の直径は減少した。

2) イオン性芯物質の内包特性はマイクロカプセル調製条件により制御可能であることを示した。即ち、①内水相と外水相間の浸透圧制御による内水相から外水相への水の移動促進及び内水相滴の微細化、②一次乳化の分散相体積分率の減少による内水相滴の合一の抑制によりイオン性芯物質の内包率は増加した。また(W/O)滴の外表面全体に様に分散安定剤を吸着させることにより安定な(W/O/W)エマルジョンの調製が可能であることを示した。スチレンを骨格とした複合エマルジョン系においてはPVAよりもTCP10を添加した方が内包率は増加した。

次に生分解性プラスチックであるポリ乳酸を骨格物質として(W/O/W)エマルジョンの液中乾燥法により生分解性マイクロカプセルを調製し、その形状及び粒径に与える調製条件の影響を検討するとともに栽培漁業用餌料または牛血清アルブミンを内包した生分解性マイクロカプセルの内包特性に与える調製条件の影響を検討し、以下のことを明らかにした。

1) ポリ乳酸を用いて調製した生分解性マイクロカプセルの構造はマイクロカプセル調製条件により制御可能であることを示した。即ち、①分散相体積分率の減少による内水相滴の合一の抑制及び膜厚の増加、②骨格物質濃度の増加による膜厚の増加、③操作温度及び攪拌速度の増加による溶媒除去速度の増加、④内水相と外水相との浸透圧制御による内水相から外水相への水の移動促進⑤超音波照射による内水相滴の微細化によりマイクロカプセルの内部中空の直径は減少した。

2) タンパク質の内包特性はマイクロカプセル調製条件により制御可能であることを示した。即ち、①内水相と外水相との浸透圧制御による内水相から外水相への水の移動促進及び内水相滴の微細化、②一次乳化の分散相体積分率の減少による内水相滴の合一の抑制、③骨格物質濃度の増加による膜厚の増加、④超音波照射による内水相滴の微細化によりタンパク質の内包率は増加した。

最後に振動攪拌翼を有する連続乳化器を用いて(O/W)及び(W/O)エマルジョンを連続調製し、得られたエマルジョンの粒度分布に与える操作条件の影響を検討した。更に振動型連続乳化器と振動型連続重合器を組み合わせた微粒子連続調製プロセスを提案し、微粒子連続調製プ



ロセスにおけるマイクロカプセル形状及び粒径に与える調製条件及び装置特性について検討し、以下のことを明らかにした。

- 1) 振動型連続乳化器を用いて(O/W)及び(W/O)エマルションを調製する場合、粒径が大きいエマルションを得るためには空間面積率の大きい攪拌翼、粒径が小さいエマルションを得るためには空間面積率の小さい攪拌翼を用いることにより連続的に単分散のエマルションが調製可能であることを示した。
- 2) (O/W)及び(W/O)エマルションの平均粒径を振動数及び空間面積率を変数とした相関関係式で示した。この関係式は内容積の異なる振動型乳化器にも適用でき、任意の粒径のエマルションを連続的に調製できる新規なエマルション調製方法を確立した。
- 3) 振動型連続乳化器と振動型連続重合器を組み合わせた微粒子連続調製プロセスによるマイクロカプセル連続調製操作法を開発した。

マイクロカプセル構造及び芯物質内包特性の制御はマイクロカプセルの機能性に関する重要な因子である。本研究結果で示したマイクロカプセルの調製条件を任意に設定することにより、その構造及び芯物質内包特性を任意に制御することができ、所定の機能性を付加したマイクロカプセルの調製が可能であることを示した。また、従来の回分型の小規模プロセスによる製品の製造単価は高価であり、更に均質な製品の製造が困難であった。本研究で提案した振動型連続乳化器を用いることにより任意の粒径のエマルションを連続的に調製可能であることを示した。また振動型連続乳化器と振動型連続重合器の組み合わせによる微粒子連続調製プロセスの構築によって乳化から重合までの連続操作により機能性微粒子を安価に且つ大量に生産することが可能であることを示した。本研究結果を発展させることにより、地球環境への負荷が少なく高付加価値のマイクロカプセルを連続的且つ安価に生産することが可能となり、環境保全・省エネルギー指向型マイクロカプセルの幅広い分野への利用拡大が期待される。

### 使用記号

C = concentration	[M] or [wt%]
d = diameter	[mm]
D = average diameter	[ $\mu\text{m}$ ]
E = fractional entrapment	[%]
f = frequency	[spm]

M = amount of core material	[g]
R = ratio	[-] or [%]
S = section surface area	[m <sup>2</sup> ]
v = variance	[-]
$\phi$ = volume fraction	[-]
$\sigma$ = standard deviation	[ $\mu\text{m}$ ]
$\mu$ = viscosity	[mPa·s]
<subscript>	
add,i = additives in inner aqueous phase	
add,o = additives in outer aqueous phase	
CaCl <sub>2,o</sub> = CaCl <sub>2</sub> in outer aqueous phase	
E = emulsion	
f = first (entrapment)	
H = hole of plate	
i = inner aqueous phase	
ip = internal pores	
L = plate length	
m = monomer	
M = microcapsule	
n = number of hole in vibrating plate	
NaCl <sub>i</sub> = NaCl in inner aqueous phase	
NaCl <sub>o</sub> = NaCl in outer aqueous phase	
o = outer aqueous phase	
P = vibration plate	
R = reactor	
T = toluene	
W/O = (W/O) emulsion	

### 参考文献

- 1) 近藤保 ; "マイクロカプセル～その機能と応用～," 日本規格協会, 東京 (1991)
- 2) 近藤保, 小石真純 ; "新版マイクロカプセル～その製法・性質・応用～," 三共出版, 東京 (1989)
- 3) 佐野正次郎 ; "記録材料とマイクロカプセル～ノーカーボン紙からフルカラー感熱記録材料まで～," *SUT BULLETIN*, **6**, pp.9-14 (1996)
- 4) 坂元宗寛 ; "化粧品・トイレットリー商品への応用," *SUT BULLETIN*, **6**, pp.15-19 (1996)
- 5) 吉岡俊満 ; "マイクロカプセルの食品への応用," *SUT BULLETIN*, **6**, pp.25-30 (1996)
- 6) Gutcho, M. M. ; "Microcapsules and Microencapsulation Techniques," Noyes Data Co., New Jersey (1976)
- 7) Bodmeier, R. and J. W. McGinity ; "Poly(lactic acid)

- Microspheres Containing Quinidine Base and Quinidine Sulfate Prepared by the Solvent Evaporation Technique.II. Some Process Parameters Influencing The Preparation and Properties of Microspheres," *J. Microencapsulation*, **4**, pp.289-297 (1987)
- 8) Fong, J. W., J. P. Nazanero, J. Pearson and H. V. Maulding ; "Evaluation of Biodegradable Microcapsules Prepared by Solvent Evaporation Process Using Sodium Oleate as Emulsifier," *J. Controlled Release*, **3**, pp.119-130 (1986)
- 9) Bodmeier, R. and J. W. McGinity ; "The Preparation and Evaluation of Drug Poly(DL-lactide) on Drug Release from Biodegradable Poly(DL-lactide) Drug Delivery System," *Inter.J. Pharmaceutics.*, **51**, pp.1-8 (1987)
- 10) Cavalier, M., J. P. Benoit and C. Thies ; "The Formation and Characterization of Hydrocortisone Loaded Poly(d,l-lactide) Microsphere," *J. Pharmacy and Pharmacology*, **38**, pp.249-253 (1986)
- 11) Juni,K., J.Ogata, M.Nakano, T.Ichihara, K.Mori and M.Akagi ; "Preparation and Evaluation in vitro and in vivo of Poly(lactic acid) Microspheres Containing Doxorubicin," *Chem. Pharm. Bull.*, **33**, pp.313-318 (1985)
- 12) Uchida, T., K. Yoshida, A. Ninomiya and S. Goto ; "Optimization of Preparative Conditions for Polylactide(PLA) Microsphere Containing Ovalbmin," *Chem. Pharm. Bull.*, **43**, pp.1569-1573 (1995)
- 13) Ogawa, Y. ; "Controlled Release Microcapsules Dosage From using Biodegradable Polymers Containing a Water Soluble Peptide," *Funtai Kougaku Kaishi*, **27**, pp.534-540 (1990)
- 14) 化学工学協会 : "気泡・液滴・分散工学—基礎と応用—," 槇書店, 東京, p.109 (1982)