

文 献

- 1) Mizushima Y *et al* : Tissue distribution and anti-inflammatory activity of corticosteroids incorporated in lipid emulsion. *Ann Rheum Dis* **41** : 263-267, 1982
- 2) Niwa T *et al* : Preparation of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D, L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J Control Release* **25** : 89-98, 1993
- 3) Ishihara T *et al* : The role of zinc in formulation of PLGA/PLA nanoparticles encapsulating betamethasone phosphate and its release profiles. *J Control Release* (submitted)
- 4) 石原務ほか : ナノ微粒子製剤の開発とその DDS への応用. *Pharm Tech Japan* **20** : 2621-2627, 2004
- 5) Higaki M *et al* : Treatment of experimental arthritis with PLGA nanoparticles encapsulating betamethasone sodium phosphate. *Ann Rheum Dis* (in press)

も反応し、カルシウムを中心としたシグナル経路を活性化する蛋白質であるといえる。今後、これら細胞レベルの知見をもとに *in vivo* における生理学的な意義が明らかにされていくと期待される。

- 1) Clapham, D.: TRP channel as cellular sensors. *Nature*, 426: 517-524, 2003.
- 2) Hara, Y. et al.: LTRPC2  $Ca^{2+}$

-permeable channel activated by changes in redox status confers susceptibility to cell death. *Mol. Cell.*, 9: 163-173, 2002.

沼賀拓郎, 片野正展, 森 泰生 / Takuro NUMAGA, Masahiro KATANO and Yasuo MORI

岡崎国立共同研究機構生理学研究所液性情報部門, 京都大学大学院工学研究科合成・生物化学専攻分子生物化学分野

薬理学・毒理学

## 新規ステロイド DDS 製剤 PLAG/PLA ナノスフェア

Corticosteroid-loading PLA-nanosphere

ステロイド剤はその抗炎症作用により関節リウマチなど広く臨床で利用されているが、副作用が多く使用には十分な注意が必要である。現在、ステロイドの DDS 製剤としてリポ製剤(リメタゾン)がすでに臨床適用されている。この製剤は投与量の低減を可能としているが、十分な持続性を有さない。著者らは、リン酸ベタメタゾン (BP) を封入した PLGA/PLA ナノスフェアを独自の手法により開発してきた。そこで実験的炎症モデルを用いることで、このナノスフェアの抗炎症作用の評価を行い、DDS 製剤としての有用性を検討した。

### PLGA/PLA ナノスフェアの徐放作用とターゲティング作用

マクロファージは貪食細胞であり、炎症部位に多く存在することが知られている。そこでマウス腹腔マクロファージを用い、ナノスフェアが徐放作用を有するかを調べるため、ローダミン封入ナノスフェアを取り込ませた。その結果、7日後においてもなおローダミンの蛍光が観察され、徐放作用を有することが示唆された。また、関節リウマチモデルとしてよく使用

されるアジュバント関節炎モデル(ラット)を用い、ナノスフェアがターゲティング作用を有するかを調べるため、ローダミン封入ナノスフェアを静脈内投与した。その後、アジュバントを投与した左後足の凍結切片を作製し、蛍光顕微鏡により観察した。また、対照としてローダミン溶液を静脈内投与した。その結果、ローダミン溶液では強い蛍光は観察されなかったが、ローダミン封入ナノスフェアで強い蛍光が観察されターゲティング作用を有することが示唆された(図1)。

### 実験的炎症モデル動物を用いた抗炎症作用

実際の薬物の効果を調べるためには動物実験が必須である。そこで、関節リウマチモデルのひとつであるタイプIIコラーゲン誘導関節炎モデル(マウス)での抗炎症作用を調べた。BP(30 $\mu$ g)封入ナノスフェアの単回投与は BP(30 $\mu$ g)単独2回投与と比較し、投与3~4日目で有意に低下した。また、BP封入ナノスフェアは投与前に比較し、投与4日目より有意に低下し、その作用はすくなくとも6日目まで持続した。また、アジュバント関節炎モデル(ラット)を用い、BP封入ナノスフェアの抗炎症作用を水置換法(ラット左後足容積)で測定した。その結果、投与1日目において BP(100 $\mu$ g)封入ナノスフェアの単回投与は、BP(300 $\mu$ g)単回投与と同等の抗炎症作用を示した。また、BP(100 $\mu$ g)封入ナノスフェアの抗炎症作用はすくなくとも1週間持続し、BP(300 $\mu$ g)単回投与やリポ製剤(リメタゾン)に比べ、有意に強い抗炎症作用を持続することがわかった(図2)。

### おわりに

ステロイド封入 PLGA/PLA ナ

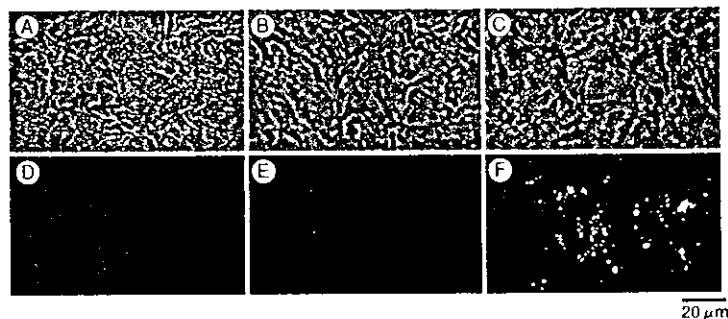


図1 ナノスフェアの炎症部位のターゲティング作用

アジュバント関節炎モデル(ラット)の炎症部位はローダミン封入ナノスフェアの投与により強い蛍光を観察した。

A, B, C: 位相差像(A: 生理食塩水投与, B: ローダミン溶液投与, C: ローダミン封入ナノスフェア投与)。

D, E, F: 蛍光像(D: 生理食塩水投与, E: ローダミン溶液投与, F: ローダミン封入ナノスフェア投与)。

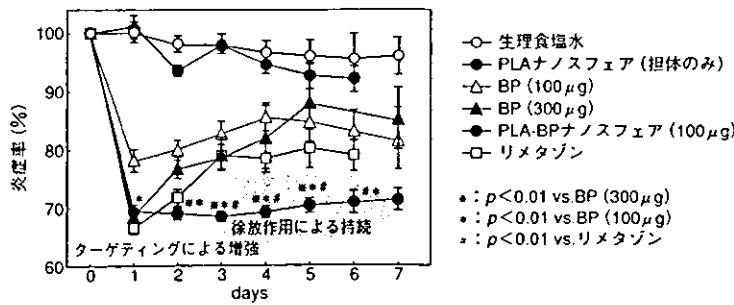


図2 アジュバント関節炎におけるBP封入ナノスフェアによる抗炎症作用

アジュバント関節炎モデル(ラット)の炎症は、BP未封入ナノスフェアの投与において抑制されなかった。各薬物投与群は投与1日目でBP未封入ナノスフェアに対し、有意に足の腫れを低下させた。BPナノスフェアの抗炎症作用はすくなくとも1週間以上持続した。また、BPナノスフェア(100 μg)投与1日目の抗炎症作用は、BP(300 μg)投与(フリー)の作用と同等の効果を示した。

ノスフェアの強力で持続的な抗炎症作用は、ターゲティング作用と徐放作用をあわせもつことが示唆された。この製剤は従来の製剤に比べ、投与量と投与頻度の減少が可能で、臨床で用いられれば著しく有用であると考えられる。

今回のこの結果のほとんどは東京慈恵会医科大学 DDS 研究所で行った研究である。

出雲信夫<sup>1</sup>、石原 務<sup>2</sup> /  
Nobuo IZUMO and Tsutomu ISHIHARA  
第一薬科大学薬理学教室<sup>1</sup>、東京慈恵会医科大学 DDS 研究所<sup>2</sup>

循環器内科学

心筋細胞におけるオートファジー

Autophagy in cardiac myocytes

アポトーシスが元来生体にとって不要な細胞を除去する生理的現象であるのに比べ、オートファジーも元来、不要な細胞内小器官のターンオーバーのために同じ細胞内のリソソームが細胞内小器官を貪食し、リサイクルする生理的現象である。しかし、オートファジーの異常により細胞自身が死に至るという“autophagic cell death”という細胞死の概念が最近注目を浴びている。これは、アポトーシスに続く第2の programmed cell death ともよばれ<sup>1)</sup>、神経細胞や心筋細胞など最終分化細胞に生じやすいとされ、とくに神経変性疾患での関与が従来報告されてきた。形態学的にはリソソームの細胞内小器官の貪食像である autophago-

some とよばれる空胞変性(vacuolar degeneration)が特徴的であり、空胞には変性したミトコンドリア像やミエリン様構造物がみられる。リソソーム蛋白分解酵素の cathepsin 群は、リソソーム内での貪食や、細胞内に漏出して細胞質での蛋白分解に重要な役割を果たしている。

心臓におけるオートファジー

以前より、培養心筋細胞が低栄養や低酸素状態にさらされると autophagic cell death がみられることが知られている<sup>2)</sup>。Danon 病はオートファジーに必要な蛋白のうち Lamp-2 の先天性異常を有するが、本疾患では心筋細胞に auto-

phagic cell death がみられ、心不全に陥る<sup>3,4)</sup>。最近、拡張型心筋症、弁膜症、高血圧性心疾患などによるヒト不全心において、autophagic cell death に特徴的な心筋細胞死の存在が報告されている<sup>5-8)</sup>。重要な点は、その頻度がアポトーシス細胞の頻度よりも数10倍から100倍程度高いことである。

ハムスターでは心筋症の病態を呈するいくつかのストレインがみられ、ヒト心筋症のモデルとして有用である。多くのモデルでは若年期より心筋細胞の脱落がはじまり進行性に多発性の脱落巣が形成され、線維化が著明となり、心拡大、心収縮力の低下をきたして心不全死に至る。しかし、これらのモデルにおける心筋細胞死の様式については不明な点が多く、心筋細胞死の様式は現在まで明らかにされていない。著者らは心筋症ハムスターのうち δ-sarcoglycan の遺伝子異常を呈する UM-X 7.1 系統において、高頻度に心筋細胞のオートファジーがみられることを見出した(図1)。δ-sarcoglycan の遺伝子異常による心筋症はヒトでも報告されている。

心臓におけるオートファジーの意義

心筋細胞のオートファジーによ

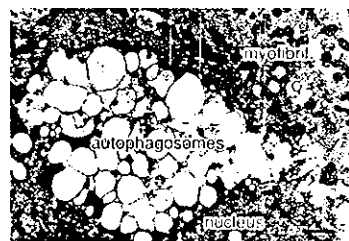


図1 UM-X 7.1 系統ハムスターの心臓にみられた心筋細胞のオートファジー

Autophagosome 内には変性したミトコンドリア、ミエリン様構造物がみられる。スケールバー: 1 μm。

# 徐放性ナノ微粒子製剤の開発

石原 務 東京慈恵医科大学 DDS 研究所



1992年東京工業大学生命理工学部生体分子工学科を卒業後、同大学院生命理工学研究科バイオテクノロジー専攻に進学、1997年“核酸キャリアとしての機能性ナノパーティクルの開発”のテーマにて博士(工学)の学位を取得。同年より日本学術振興会特別研究員として同大学に勤務。この間、テキサス大学 South Western Medical Centerにて David Corey 氏のもと、ペプチド核酸およびペプチド-DNA コンジュゲートによるアンチジーン効果の研究に従事。LTT 研究所(現 LTT バイオファーマ社)勤務を経て、2001年より東京慈恵医科大学 DDS 研究所助手として、抗炎症作用を有するナノ微粒子製剤の開発に取り組んでいる。

(いしはら つとむ)

DDS を目指した医薬品のキャリアとしては、高分子・ミセル・リポソーム・マイクロ/ナノ微粒子などが利用されているが、そのなかでも PLGA に代表される生分解性高分子からなる微粒子製剤は、薬物の放出速度を制御でき、かつ血中などで薬物を比較的安定に坦持することができるという利点を有している。筆者は、研究室に配属されて以来 DDS 製剤の研究開発を行い、主としてナノ微粒子の開発に従事してきた。当初行っていた研究は、肝実質細胞へのターゲティングを目指した PLGA ナノ微粒子の開発であり、表面をポリビニルベンジルラクトノアミド(PVLA)という側鎖にガラクトースを有するポリマーで修飾することにより、*in vitro* および *in vivo* でナノ微粒子が特異的に肝実質細胞に取り込まれることを明らかにした<sup>1,2)</sup>。また、渡米していた期間には、ペプチド核酸などオリゴ核酸分子の医薬品として可能性を探究し<sup>3,4)</sup>、遺伝子デリバリーを目指し核酸分子を坦持できる多層型 PLGA ナノ微粒子の開発も行ってきた<sup>5,6)</sup>。

東京慈恵医科大学 DDS 研究所所長である水島 裕先生は、薬物を溶解したコアの油液とレシチンの表面層からなる微粒子(リポ製剤、リピッドマイクロソフェア)を開発し、この製剤が血中投与により炎症部位や血管障害部位の血管内皮細胞・マクロファージに集積することを見だし

た。そしてすでに薬物として PGE<sub>1</sub> を用いたリプル(三菱ウェルファーマ)・バルクス(大正製薬)やステロイドを用いたリメタゾン(三菱ウェルファーマ)が臨床利用されている。しかしながら、リポ製剤は、コア部に油液を用いているために薬物の徐放作用が低く、疾病・薬物の種類によっては使用上制約を受けてしまう。そこで、水島先生のもと、筆者は臨床応用を見据え① 生体内で安定・安全で、② 薬物徐放機能と③ ターゲティング機能を兼ね備えた静脈注射用ナノ微粒子型製剤の開発に携わるようになった。

基礎研究のレベルでは、さまざまなナノ微粒子の開発が行われてきたが、実際に製品化を考慮すると、薬物封入率の低さ、薬物の初期バースト、微粒子の低い分散安定性や多段階に及ぶ製造/精製過程などといった問題点が存在していた。筆者は、このような諸問題を克服するため、リン酸基を有する水溶性低分子化合物が亜鉛イオン存在下で疎水化されやすいことを利用し、亜鉛イオンで疎水化させたリン酸ベタメサゾン(BP)と PLGA をアセトン中に溶解し、レシチンや界面活性剤を分散(または溶解)した水中に滴下する溶媒拡散法<sup>7)</sup>によりナノ微粒子を調製した(図1)。

その結果、① アセトン量などを変えることにより 80~300 nm のナノ微粒子が任意に得られること、② ナノ微粒子に対し最大 8 重量%まで

# 若手研究者のひろば

本欄は DDS 研究に携わる若手研究者の自己紹介を兼ねて日頃の研究内容、研究成果を広くアピールする欄です。人選は本誌編集委員、および DDS 学会役員の推薦によります。

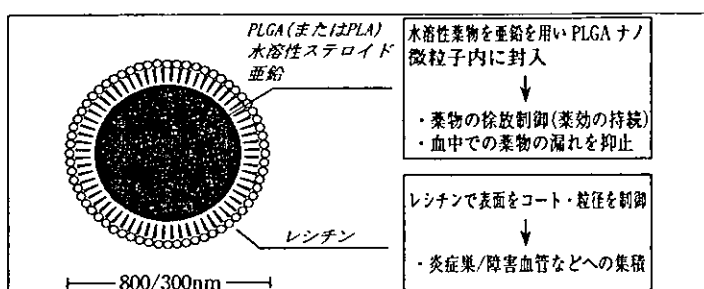


図 1 水溶性ステロイドを封入した徐放性ナノ微粒子製剤

BP を封入できること、③ 凍結乾燥処理時にショ糖を混合しておくことでナノ微粒子の分散安定性が維持され BP の初期バーストも抑制できることなどが明らかになった。また、この調製法は、低速の攪拌器以外のいかなる乳化装置も必要がないうえに精製も限外濾過やファイバー透析により可能であるので、工業的にもきわめて簡便な調製法であるといえる。ナノ微粒子の希釈血清中での薬物放出挙動を検討したところ、O/W 型液中乾燥法で調製したナノ微粒子<sup>8)</sup>では数日で薬物が全放出されたのに対し、本方法で調製したナノ微粒子では、20日にわたる BP の徐放挙動を示した。さらに、このナノ微粒子が *in vitro* でマクロファージに顕著に取り込まれること、そして、細胞内に取り込まれたナノ微粒子から細胞外(培地中)に BP が1週間にわたり徐放されていることがわかった。

また、ICP 発光分析によりナノ微粒子内の亜鉛量を定量したところ、ナノ微粒子内の BP 量が増加するの

に伴いナノ微粒子内の亜鉛量も増加すること、および、異なる分子量の PLGA と亜鉛のみでナノ微粒子を調製すると分子量の大きい PLGA で調製したナノ微粒子のほうが亜鉛含量が少ないことがわかった。よって、亜鉛の役割としては、BP の沈殿形成を誘導するのに加え、おそらく亜鉛が PLGA 末端のカルボキシル基と相互作用することで、ナノ微粒子の形成に寄与していると思われる。

アジュバンド関節炎ラットに蛍光プローブを封入したナノ微粒子を静注し、2時間後に炎症部位の切片像を顕微鏡観察した結果、100~200 nm 程度の粒径のナノ微粒子が炎症部位に集積しやすいことがわかった。さらに、アジュバンド関節炎ラットでの BP 封入ナノ微粒子の抗炎症作用を検討したところ、投与1日後には、BP のみを投与したラットにくらべ BP 封入ナノ微粒子を投与したラットで有意に足浮腫の強い収縮が認められた。また、BP のみ、または臨床利用されているリメタゾンを

投与した場合には、投与後一時的に腫れが収縮し2日目で降徐々に腫れが増大していくが、BP 封入ナノ微粒子では、少なくとも1週間にわたり有意に腫れが抑制されつづけた。よって、ナノ微粒子が従来の製剤にくらべ高い抗炎症作用を有することが明らかになった。さらに、タイプII コラーゲン誘導関節炎マウスでもナノ微粒子が同様に持続性のある高い抗炎症作用を有することがわかった。

以上より、このナノ微粒子製剤は新規の抗炎症薬として臨床利用が期待できる。また、今後は、この手法によりプロスタノイドや抗がん剤などを用い、他の疾患に対するナノ微粒子製剤も開発していきたいと考えている。

## 文献

- 1) Maruyama A et al.: Biomaterials 15(13): 1035-1042, 1994.
- 2) Shibuya I et al.: Hepatology 32(6): 1300-1308, 2000.
- 3) Ishihara T, Corey DR: J Amer Chem Soc 121: 2012-2020, 1999.
- 4) Ishihara T, Corey DR: Nucleic Acid Symp Ser 42: 141-142, 1999.
- 5) Maruyama A et al.: Bioconjugate Chem 8: 735-742, 1998.
- 6) 石原 務・他: Drug Delivery System 15(2): 106-112, 2000.
- 7) 石原 務・他: 出願特許「徐放性ターゲティングを目的とした静脈注射用ナノ粒子製剤」, 特願 2003-084695 号.
- 8) 石原 務・他: 出願特許「静脈注射用組成物、その製造法およびその製剤」, 特願 2002-159190 号.

Drug-incorporating calcium carbonate nanoparticles for a new delivery system

Y. Ueno, H. Futagawa, Y. Takagi, A. Ueno, Y. Mizushima\*

Institute of DDS, Jikei University School of Medicine

3-25-8, Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo 105-8461, Japan

\* Corresponding author    Tel.: +81-3-5733-7390; fax: +81-3-5733-7397

*E-mail address* : mizushima@jikei.ac.jp (Y. Mizushima)

## Abstract

We devised a simple method for incorporating drugs into solid calcium carbonate nanoparticles (nano-CaCO<sub>3</sub>). The size of nano-CaCO<sub>3</sub> was controlled by mixing speed. Washing the nanoparticles released little incorporated drug but much drug that was adsorbed on the surface. In an *in vitro* releasing test, granulocyte colony-stimulating factor incorporated in nano-CaCO<sub>3</sub> was chemically stable and released very slowly. Subcutaneous injection of nano-CaCO<sub>3</sub> incorporating betamethasone phosphate resulted in a smaller initial increase in plasma concentration and a subsequent sustained release in compared with betamethasone phosphate solution. Nano-CaCO<sub>3</sub> may be useful to deliver hydrophilic drugs and bioactive proteins.

Key words: nanoparticle, calcium carbonate, CaCO<sub>3</sub>, DDS, sustained release.

## 1. Introduction

Many micro and nanoparticles, mostly organic [1] and some inorganic [1,2] have been studied for the use in drug delivery systems(DDS). We developed a lipid nanoparticle of prostaglandin E<sub>1</sub> that has been used in clinic for last 15 years [3]. However, the use of drug incorporating CaCO<sub>3</sub> nanoparticles (nano-CaCO<sub>3</sub>) has not been reported in DDS studies. Calcium carbonate (CaCO<sub>3</sub>), calcium phosphate (Ca(H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>), tricalcium phosphate (Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) and hydroxyapatite (Ca<sub>5</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>OH) have been used in DDS [4,5]. Above all, CaCO<sub>3</sub> was reported to be useful as an intranasal carrier of insulin and hydrophilic compounds, because of its easy production and slow biodegradability [6,7,8]. In these reports, however, drugs or bioactive proteins were adsorbed on the surface of solid particles or porous CaCO<sub>3</sub> material. In these cases, the binding of the adsorbed drugs to CaCO<sub>3</sub> was not strong, which may result in insufficient sustained release or targeting.

In this study, we devised a simple method to incorporate hydrophilic drugs and bioactive proteins into nano-CaCO<sub>3</sub> and to regulate the size of the particles. The sustained release of drugs from the particles was confirmed both *in vitro* and *in vivo* experiments.



## 2. Materials and methods

### 2.1. Materials

Erythropoietin and granulocyte-colony stimulating factor (G-CSF) were kind gifts from Chugai Pharmaceutical Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Betamethasone sodium phosphate (BSP) was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). Male Sprague-Dawley rats were obtained from SLC Experimental Animals (Shizuoka, Japan) at 7 weeks of age. The body weights of rats at the time of experiments ranged from 186 to 230 g. The animal experiments were conducted in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals of Jikei University School of Medicine.

### 2.2. Incorporation and absorption of betamethasone phosphate into or on nano-CaCO<sub>3</sub>

Bethamethasone phosphate (BP) was incorporated into calcium carbonate nanoparticles (nano-CaCO<sub>3</sub>) by the following method: 650  $\mu$ l of 5M CaCl<sub>2</sub> and 375  $\mu$ l of 5% BSP were gently mixed for 10 min, and then 2.5 ml of 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> was added and stirred gently or vigorously for 10 min. After the addition of 5 ml of distilled water and discarding the large particles of nano-CaCO<sub>3</sub> which were precipitated without

centrifugation, the suspension was centrifuged (2000 rpm, 5 min), and the supernatant and precipitate were separated. The amount of BP in the supernatant and precipitate was measured respectively with HPLC, after dissolving the  $\text{CaCO}_3$  with 0.5M EDTA (pH 7.5). The fabricated nano- $\text{CaCO}_3$  containing BP were used for *in vitro* and *in vivo* experiments. We tested with different ratio in mole of  $\text{CaCl}_2/\text{Na}_2\text{CO}_3$  at 1/1.6, 1/1.3, 1, 1.3, 1.6 and observed that the incorporation rate was highest at the ratio of 1.3, and used the ratio in this study.

To study the adsorption of BP, we mixed 650  $\mu\text{l}$  of 5M  $\text{CaCl}_2$  and 2.5 ml of 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  and stirred gently or vigorously, according to desired particle size, and nano- $\text{CaCO}_3$  were formed. After the particles were washed with 5 ml of distilled water, 375  $\mu\text{l}$  of 5% BSP was added and stirred to adsorb BP. The resulting suspension was centrifuged (2000 rpm, 5 min), and the amount of BP in the precipitate was determined by the method described above.

### *2.3. Incorporation and adsorption of erythropoietin in or on nano- $\text{CaCO}_3$*

Erythropoietin was incorporated into nano- $\text{CaCO}_3$  by mixing 650  $\mu\text{l}$  of 5M  $\text{CaCl}_2$  and 125  $\mu\text{l}$  of 1 mg/ml erythropoietin, and then by adding 2.5 ml of 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  stirring gently for 10 min at room temperature. After the addition of 5 ml of distilled water, the

suspension was divided into 2 parts and centrifuged (2000 rpm, 5 min). One part was used for the measurement of erythropoietin, and the other part was washed by 0.9 ml of 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> twice to eliminate the adsorbed erythropoietin on the nano-CaCO<sub>3</sub>. The both samples were dissolved by adding 1N HCl, and the amount of incorporated erythropoietin in the nano-CaCO<sub>3</sub> was measured with an ELISA kit (Toyobo Co., Ltd., Osaka, Japan).

In the adsorption experiment with erythropoietin, 650  $\mu$ l of 5M CaCl<sub>2</sub> and 2.5 ml of 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> were mixed and stirred initially, and nano-CaCO<sub>3</sub> were formed. Next, the particles were washed by 5 ml of distilled water and 125  $\mu$ l of 1 mg/ml erythropoietin was added and stirred to adsorb the erythropoietin. The resulting suspension was divided into 2 parts and centrifuged (2000 rpm, 5 min). The obtained precipitate of 1 part was used for the measurement of erythropoietin, and that of the other part was washed twice by 0.9 ml of 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. The amount of erythropoietin of each part was determined by the method described above.

#### *2.4. Particle size*

Particle size of the prepared nano-CaCO<sub>3</sub> was measured with a laser light scattering method by using a fiber-optics particle analyzer (FPAR-1000, Otsuka

Electronics Co., Ltd, Osaka, Japan). The measurement was performed in triplicate, and the median size and range of distribution were obtained.

## *2.5 Release studies*

### *2.5.1. Release of G-CSF from nano-CaCO<sub>3</sub> preparation in vitro*

To incorporate G-CSF in nano-CaCO<sub>3</sub>, we mixed 650  $\mu$ l of 5M CaCl<sub>2</sub> and 250  $\mu$ l of 500  $\mu$ g/ml G-CSF, and added 2.5 ml of 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> stirring gently for 10 min. After the addition of 5 ml of distilled water, the suspension was centrifuged (2000 rpm, 5 min) and the supernatant was discarded. The obtained precipitate was resuspended in 12.5 ml of 0.1M Tris-HCl buffer (pH 7.2) containing 1% bovine serum albumin (final concentration of G-CSF was approximately 1 $\mu$ g/ml) and shaken gently for 7 days at room temperature. For the measurement of G-CSF released from the preparations, 0.1 ml of the suspension was withdrawn and replaced with an equal volume of the same buffer. The samples were diluted and centrifuged (2000 rpm, 5 min) and amount of G-CSF in the obtained supernatant was measured with an ELISA kit (Immuno-Biological Laboratories Co., Ltd, Gunma, Japan). These operations were carried out once a day for 7 days. After the final sampling on day 7, the total

suspension was centrifuged and the precipitated nano-CaCO<sub>3</sub> were dissolved by adding 1N HCl and the residual amount of G-CSF was measured. A stability test on free G-CSF was also performed. Fifty µl of 100 µg/ml G-CSF and 4.95 ml of the same buffer were mixed (final G-CSF concentration was 1.0 µg/ml) and shaken simultaneously at room temperature. The amount of G-CSF in the solution (20µl was taken) was measured with the ELISA kit once a day for 7 days.

#### *2.5.2. Release of BP from nano-CaCO<sub>3</sub> preparation in vivo*

We administered 0.5 ml of the BP-incorporated nano-CaCO<sub>3</sub> suspension subcutaneously in rats at a dose of 1 mg/head. As a control, 0.5 ml of aqueous solution of BSP was administered subcutaneously in rats at a dose of 1 mg/head as BP. Blood was sampled via the inferior ophthalmic vein from rats anesthetized with ether before and 0.5, 1, 3, 5, 7, 16, 24 and 48 hours after the administration. BP concentration in plasma was determined by a time-resolved fluoroimmunoassay.

#### *2.6. Statistical analysis*

The data derived from each experimental series are represented as the mean ±

SEM. The data were analyzed by using an ANOVA. Post hoc determination were assessed for statistical significance by using Student's *t* test [9].

### 3. Results

#### *3.1. Loading (incorporation and absorption) of BP in or on nano CaCO<sub>3</sub> and particle size.*

Particle size and loading efficiency of nano-CaCO<sub>3</sub> were examined (Table 1). The diameter of the particles was dependent on mixing speed; gentle stirring (ca. 650 rpm) produced large particles, while vigorous stirring (ca. 1300 rpm) produced small particles. The range of distribution in particle size was narrower in the experiment with vigorous mixing than that with gentle one. The loading efficiency in particles of the both sizes was high and similar in the incorporation experiment. The BP contents in the supernatant by gentle and vigorous stirring was  $8.9\% \pm 1.7\%$  and  $9.4\% \pm 1.3\%$  of the total BP used, respectively. The amount of loading of BP in the adsorption experiment was much lower than that in the incorporation experiment.

#### *3.2. Incorporation and adsorption of erythropoietin in or on nano-CaCO<sub>3</sub>*

The diameter of the particles incorporating or adsorbing erythropoietin was  $105.5 \pm 11.2$  nm and  $128.0 \pm 13.1$  nm, respectively. The influence of washing on the release of erythropoietin was examined (Figure 1). More adsorbed erythropoietin, compared to incorporated erythropoietin, was released after the particles were washed.

### *3.3. Sustained release of G-CSF from nano-CaCO<sub>3</sub> preparation in vitro and stability of G-CSF in the particles and solution.*

The amount of G-CSF released over time from the nano-CaCO<sub>3</sub> was cumulatively plotted in Figure 2. G-CSF was gradually released from the nano-CaCO<sub>3</sub> through 7 days and still remained in the nanoparticles on day 7. The amount (concentration) of G-CSF in the solution on day 7 was even smaller than that in the residue of the nano-CaCO<sub>3</sub>, which indicated that G-CSF was not stable in the solution but was very stable in the nano-CaCO<sub>3</sub>.

### *3.4. Sustained release of BP from nano-CaCO<sub>3</sub> preparation in vivo*

Plasma concentration of BP after the subcutaneous injection of BP-incorporated

nano-CaCO<sub>3</sub> and free BP solution in rats is shown in Figure 3. The nano-CaCO<sub>3</sub> used in the experiment were fabricated by gentle mixing. After the injection of BP solution, the plasma concentration of betamethasone was increased and then decreased steeply. While, after the injection of BP-incorporating nano-CaCO<sub>3</sub>, the degree of initial increase in concentration was low not high and a subsequent sustained release was observed in compared with the betamethasone solution. A significant sustained release was shown 48 hours after the injection. However, an initial burst was observed even with the nano-preparation. It indicates that the release of BP from the nano-particles in subcutaneous tissue was rapid as compared with that in water (Table1) even in the incorporated form.

#### **4. Discussion**

In the present study, we devised a simple method of incorporating drugs into nano-CaCO<sub>3</sub> that can be utilized for a delivery system. The incorporating efficiency of drugs was sufficiently high for the practical use in the clinic. It was confirmed in *in vitro* and *in vivo* experiments that the nano-CaCO<sub>3</sub> preparations showed a sustained release of incorporated drugs. Although the experimental reports of drug-adsorbing CaCO<sub>3</sub> particles have been published [6,7,8], the methods of incorporating drugs into CaCO<sub>3</sub>



have not. The incorporated drugs are apparently more effective in DDS than the adsorbed drugs, because  $\text{CaCO}_3$  particles are dissolved very slowly in the body.

In this study, we incorporated drugs with ionic, hydrophilic residues and low molecular weight, such as BP, and bioactive proteins, such as erythropoietin and G-CSF. Our preliminary experiments have shown this method of incorporating drugs to be practicable for low molecular weight compounds with a carboxyl residue, such as retinoic acid, those with a phosphate residue, such as hydrocortisone sodium phosphate, and those with a high molecular weight, such as immunoglobulin G and deoxyribonucleic acid (data not shown). Therefore, this method of incorporation is applicable to various drugs despite their molecular weight.

The diameters of nano- $\text{CaCO}_3$  incorporating BP were varied from 40 to 200 nm by changing the mixing speed (Table 1). Nanoparticles with a size of 50 nm or 200 nm have been reported to accumulate in angiogenic blood vessels [1,10], tumor [11] and inflamed tissues [3,12]. Thus, nano- $\text{CaCO}_3$  with incorporated anti-cancer and anti-inflammatory drugs may demonstrate targeting effects to the specific regions. We have obtained a preliminary result that nano- $\text{CaCO}_3$  accumulated in an inflamed region (data not shown). In addition, nanoparticles with a proper size and chemically appropriate surface properties were reported to penetrate the skin [13] and the blood-brain barrier [14].

Furthermore, the particles with the smallest size in this study (about 40 nm) should be able to avoid phagocytosis by the reticuloendothelial system (RES) or cells [1,15]. Avoiding clearance by the RES is very important in DDS using nanoparticles. Therefore, several attempts such as a modification of particle surface [16] and a use of surface binding of polyethylenglycol (PEG) [2] were made.

The chemical stability of G-CSF was markedly increased with this incorporating method (Fig. 2). As well known, several bioactive proteins are unstable in the solution. We think that nano-CaCO<sub>3</sub> particles are also useful for the treatment with unstable bioactive proteins.

## **5. Conclusion**

The present study describes a simple technology for incorporating drugs with low molecular weight and bioactive proteins into CaCO<sub>3</sub> nanoparticles, which can be used in various kinds of DDS.

## **Acknowledgements**

Authors wish to appreciate Ministry of Health, Labour and Welfare of Japan for the Grant and Ms. M. Hara for her assistance in preparing the manuscript.

## References

- [1] N. Majeti, V. R. Kumar, Nano and microparticles as controlled drug delivery devices, *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 3 (2000) 234-258.
- [2] M. E. Akerman, W. C. Chan, P. Laakkonen, S. N. Bhatia, E. Ruoslahti, Nanocrystal targeting in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99(2002)12617-21.
- [3] Y. Mizushima, Lipo-prostaglandin preparations, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 42(1991)1-6.
- [4] M. Itokazu, T. Sugiyama, T. Ohno, E. Wada, Y. Katagiri, Development of porous apatite ceramic for local delivery of chemotherapeutic agents, *J. Biomed. Mater. Res.* 39(1998)536-538.
- [5] W. Paul, C.P. Sharma, Ceramic drug delivery: a perspective, *J. Biomater. Appl.* 17(2003)253-264.
- [6] S. Haruta, T. Hanafusa, H. Fukase, H. Miyajima, T. Oki, An effective absorption behavior of insulin for diabetic treatment following intranasal delivery using porous spherical calcium carbonate in monkeys and healthy human volunteers, *Diabetes Technol. Ther.* 5(2003)1-9.
- [7] F. Ishikawa, M. Murano, M. Hiraishi, T. Yamaguchi, I. Tamai, A. Tsuji, Insoluble powder formulation as an effective nasal drug delivery system, *Pharm. Res.*