

유화법과 분무법에 의해 제조된 경구백신용 알긴산 마이크로스피어의 평가

장 혁 · 지웅길 · 맹필재* · 황성주†

충남대학교 약학대학, *자연과학대학 미생물학과
(2001년 10월 10일 접수)

Evaluation of Alginate Microspheres Prepared by Emulsion and Spray Method for Oral Vaccine Delivery System

Ge Jiang, Ung Kil Jee, Pil-Jae Maeng* and Sung-Joo Hwang†

College of Pharmacy, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

*Department of Microbiology, College of Natural Science, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

(Received October 10, 2001)

ABSTRACT—Alginate microspheres, containing fluorescein isothiocyanate-bovine serum albumin (FITC-BSA) or green fluorescent protein (GFP) were prepared and used as a model drug to develop the oral vaccine delivery system. The alginate microspheres were coated with poly-L-lysine or chitosan. Two methods, w/o-emulsion and spray, were used to prepare alginate microspheres. To optimize preparation conditions, effects of several factors on the particle size and particle morphology of microsphere, and loading efficiency of model antigen were investigated. In both preparation methods, the particle size and the loading efficiency were enhanced when the concentration of sodium alginate increased. In the w/o-emulsion preparation method, as the concentration of Span 80 was increased from 0.5% to 2%, the particle size was decreased, but the loading efficiency was increased. The higher the emulsification speed was, the smaller the particle size and loading efficiency were. The concentration of calcium chloride did not show any effect on the particle size and loading efficiency. In the spray preparation method, the particle size was increased as the nozzle pressure (from 1 kgf/m² to 3 kgf/m²) and spray rate was raised. Increasing calcium chloride concentration (< 7%) decreased the particle size, in contrast to no effect of calcium chloride concentration on the w/o-emulsion preparation method. Alginate microspheres prepared by two methods were different in the particle size and loading efficiency, the particle size of microspheres prepared by the spray method was about 2-6 μm, larger than that prepared by the w/o emulsion method (about 2 μm), and the loading efficiency was also higher with spray method. Furthermore, drying process for the microspheres prepared by the spray was simpler and easier, compared with the w/o emulsion preparation. Therefore, the spray method was chosen to prepare alginate microspheres for further experiments. Release pattern of FITC-BSA in alginate microspheres was evaluated in simulated intestinal fluid and PBS (phosphate buffered saline). Dissolution rate of FITC-BSA from alginate/chitosan microsphere was lower than that from alginate microsphere and alginate/poly-L-lysine microsphere. By confocal laser scanning microscope, it was revealed that alginate/FITC-poly-L-lysine microspheres were present in close apposition epithelium of the Peyer's patches of rabbits following inoculation into lumen of intestine, which proved that microspheres could be taken up by Peyer's patch. In conclusion, it is suggested that alginate microsphere prepared by spray method, showing a particle size of < 10 μm and a high loading efficiency, can be used as a model drug for the development of oral vaccine delivery system.

Keywords—Alginate microsphere, FITC-BSA, GFP, Emulsion method, Spray method, Poly-L-lysine, Chitosan, Peyer's patch

현재 대부분의 백신은 주사로 투여되고 있다. 그 이유는 경구로 투여할 경우 백신제제에 함유된 항원들이 자발적으로 분해되거나, 효소에 의해 분해될 수 있으며, 분자량이 큰 펩타이드나 단백질이므로 흡수가 불량하기 때문이다.^{1,2)} 백

신을 주사로 투여할 경우에는 주사로 인한 쇼크 등의 부작용을 일으킬 수 있으며 또한 adjuvant로서 인산알루미늄 등이 주로 사용되고 투여 후에는 체액성면역 (humoral immunity)이 유도되는데 이렇게 유도된 항체들은 병원체의 주요 감염경로인 점막표면에는 도달되지 않는다고 알려져 있다. 한편, 경구등의 점막부위로 백신을 투여하였을 때 여러 점막 부위(MALT, mucosa-associated lymphoid tissue)에 작용하

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 041)821-5922, E-mail : sjhwang@cnu.ac.kr

여 점액성면역(mucosal immunity)이 유도된다. 이러한 점액성 면역에 의해 생성되는 secretory IgA (sIgA)는 세균이나 바이러스 등이 점막에 부착하는 것을 막고, 숙주에 해로운 바이러스나 독소를 중화하는 역할을 하여 병원체의 침입을 면역학적으로 방어할 수 있는 최전선이다.^{3,4)} 또한 경구용 백신은 주사제에 비하여 환자의 복약 순응도가 높고 주사로 인한 부작용을 최소화 할 수 있는 장점이 있다. 최근 발표에 의하면 항원을 10 μm 이하의 마이크로스피어의 형태로 경구 투여할 경우 위 장관에서 항원이 분해되거나 손상되지 않는다면 Peyer's patch(PP)⁵⁾에 흡수되어 점액성 면역을 유도할 수 있다는 사실이 보고되었다.^{3,6)} 그러나 백신으로 사용되는 항원은 제조과정 중에서 유기용매나 열에 의하여 활성을 잃을 수 있으므로 봉입효율이 높으면서 PP에 잘 흡수될 수 있는 마이크로스피어형 항원 수송체의 제조방법을 개발하는 데는 많은 문제점이 있다. 예를 들면 gelatin과 알부민 마이크로스피어 제조과정에서는 ether, formaldehyde, glutaraldehyde, terephthaloyl chloride 등 가교제를 사용하거나 열변성을 이용하여 마이크로스피어를 제조한다.^{7,8)} 또한 poly(*d,l*-lactide), poly(glycolic acid)와 poly(ϵ -caprolactone) 마이크로스피어의 제조에는 용매증발법이 이용되는데 이 제조과정에서는 methylene chloride와 hexafluoroacetone sesquihydrate 등을 용매로 사용하여 polymer를 용해한다.⁹⁻¹¹⁾ 이들 제조과정에서 항원 활성이 손상 될 수 있어서 항체생성이 방해되고 세포독성을 일으킬 수 있다.¹²⁾

저자 등¹³⁾은 분무법에 의한 GFP 함유 마이크로스피어의 제조방법에 대한 기초적인 연구를 보고한 바 있으며, 기존에 사용되고 있는 유화법에 의한 알긴산 마이크로스피어와 비교 연구하였고, 알긴산 마이크로스피어에 추가로 poly-L-lysine 이나 키토산(chitosan)으로 코팅하여 Peyer's Patch에 흡수되는 가를 확인하여 그 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

시약 및 기기

사용된 시약으로는 fluorescein isothiocyanate-bovine serum albumin (FITC-BSA) (A-9771, Sigma Chemical Co., USA), green fluorescent protein (GFP) (Supplied by Professor Maeng, Department of Microbiology, Chungnam National University), ovalbumin (A-7641, Sigma Chemical Co., USA), poly-L-lysine (P-0879, Sigma Chemical Co., USA), poly-L-lysine-FITC (P-3543, Sigma Chemical Co., USA), water-soluble chitosan (Jakwang, Co. Ltd., Korea), calcium chloride (Duksan Pure Chemical Co. Ltd., Korea), sodium

alginate (Junsei Chemical Co. Ltd., Japan), acetic acid (Junsei Chemical Co. Ltd., Japan), trisodium citrate (Junsei Chemical Co. Ltd., Japan), sodium phosphate dibasic (Duksan Pure Chemicals Co. Ltd., Korea), citric acid (Showa Chemicals Inc., Japan), Span 80 (Duksan Pharmaceutical Co., Ltd., Korea), soybean oil (Sigma Chemical Co., USA) 등을 사용하였다.

실험에 사용된 주요 기기로는 Biomixer(Model X1030D, CAT Co., Eberstaadt, Germany), Spray system HS 9901 (Han Sheng Co. Ltd. Korea), Scanning electron microscope(ESI-SX-40, Japan), Particle size analyzer(Microtrac-X100, Microtrac[®], Honeywell, USA), High speed refrigerated centrifuge(Mega 17R, Hanil Science Industrial Co., Ltd., Korea), Fluorescent photometer(Jasco FP-750, Japan), Confocal microscope(TCS. NT, Leica Co., Germany), Microtome(CM185, Leica Co., Germany), Microplate reader (Molecular Device, USA), Bio-Dis extended release tester (Vankel Industries, Inc. USA), Air atomizing nozzle(Prona RA-C2, Spraying Systems Co., USA), Microplate strip washer(Bio-Tek instruments, USA), Membrane filtration system(Millipore., Bedford, Mass., USA) 등이 있다.

실험동물

실험에 사용한 동물은 체중 2.0~2.4 kg의 건강한 수컷 Albino 토끼를 삼육실험동물연구소(경기도 오산시)로 부터 구입하였으며 동물실험실에서 7일 이상 실험실 환경에 적응시킨 후 사용하였다. 이 때 동물 사육조건은 온도 20~23°C, 상대습도 55±5%, 명암교대시간 12시간을 유지하였으며 실험 중을 제외하고는 고형사료와 물을 충분히 공급하였다.

마이크로스피어의 제조

제조과정 중에 항원에 손상을 줄 수 있는 유기용매나 열을 사용하지 않고 봉입효율이 높으면서 PP에 잘 흡수될 수 있는 10 μm 이하의 마이크로스피어형 항원수송체를 개발하기 위해 본 실험에서는 유화법과 분무법을 사용하였다.

알긴산 마이크로스피어의 제조방법은 기존의 유화제 제조 기술을 응용한 것으로서, 그 제조공정을 단계별로 나누어 보면 1) 유화(emulsification), 2) cross-linking, 3) 분리, 4) 세척, 5) 건조 등의 단위조작으로 구성되어 있다.^{14,15)} 즉, 알긴산나트륨과 약물을 녹인 수용액을 제조하고 이 수용액을 적당한 식물유에 가하여 w/o emulsion을 제조하였다. 그 후 이 emulsion에 가교제인 염화칼슘용액을 가하여 알긴산 마이크로스피어를 형성시켰다.

분무법에서 제조공정을 단계별로 나누어 보면 1) 분무용액(알긴산나트륨 + 항원)제조, 2) 분무, 3) cross-linking, 4) 분리, 5) 세척, 6) 건조 등의 단위조작으로 구성되어 있다.¹²⁾ 즉, 알긴산나트륨과 모델 항원을 물에 용해시켜 이 용액을 자석교반기로 일정한 속도로 교반 중인 염화칼슘용액에 spray 노즐로 미세하게 분무하여 마이크로스피어를 제조하였다. 제조된 마이크로스피어 현탁액을 원심분리한 후 먼저 물로 여분의 가교제인 염화칼슘용액을 세척하여 제거하고 에탄올로 세척한 다음 상온에서 감압건조하여 알긴산나트륨 마이크로스피어를 제조하였다. 이 두 가지 방법에서는 염화칼슘용액 중의 Ca²⁺와 알긴산나트륨 분자간의 상호작용으로 알긴산나트륨 분자들이 cross-linking되어 hydrogel을 형성하는 원리를 이용하였다.

이러한 방법을 이용하여 10 μm 이하의 마이크로스피어형 항원 수송체의 최적 제조조건을 얻기 위하여 마이크로스피어의 특성에 영향을 줄 것으로 예상되는 조건들을 변화시키면서 아래와 같은 실험을 행하였다.

유화법을 이용한 알긴산마이크로스피어의 제조 - 유화법을 이용하여 모델 항원이 함유된 알긴산마이크로스피어를 제조하였다. 즉, FITC-BSA (10 mg/ml) 1 ml를 1.25~1.75%(w/w) 알긴산나트륨수용액 3 g에 가하여 용해시켰다. 이 용액을 Span 80이 함유된 soybean oil 16 g에 가하여 5분 동안 vortexing한 후 즉시 homogenizer로 5분 동안 일정한 속도로 교반하여 A 유화액을 제조하였다. Span 80이 함유된 soybean oil 4 g에 3~7% 염화칼슘용액 1 ml를 가하고 vortexing하여 B 유화액을 제조하고, 제조한 A 유화액을

100 ml 비이커에 넣어 glass stirrer가 장착된 기계 교반기로 약 2500 rpm이 되도록 교반하면서 제조한 B 유화액을 파스퇴르 피펫을 이용하여 6분간 서서히 가한 후 4시간동안 교반하면서 경화시켰다. 이 액을 원심분리(9500 rpm 10분)하여 상정액을 제거하고 에탄올 10 ml로 각각 3회씩 세척한 다음 pH 5.0 citrate/phosphate buffer로 2회 세척한 후 이 완충용액을 가하여 전체량이 10 ml로 만들어 4°C에 보관하였다. 이러한 제조과정은 Figure 1에 나타내었으며, 그 제조조건은 Table I에 요약하였다.

Table I-Process Conditions of FITC-BSA Microspheres Prepared by Emulsion Method

Sample No.	Emulsification speed (rpm)	Concentration of sodium alginate (% w/w)	Concentration of Span 80 (% w/w)	Concentration of CaCl ₂ (% w/w)
A1-1	10,000	1.75%	0.5	5
A1-2	10,000	1.75%	1	5
A1-2	10,000	1.75%	2	5
A1-3	10,000	1.75%	4	5
A2-1	5,000	1.75%	2	5
A2-2	10,000	1.75%	2	5
A2-3	15,000	1.75%	2	5
A3-1	10,000	1.75%	2	3
A3-2	10,000	1.75%	2	5
A3-3	10,000	1.75%	2	7
A4-1	10,000	1.25%	2	5
A4-2	10,000	1.50%	2	5
A4-3	10,000	1.75%	2	5

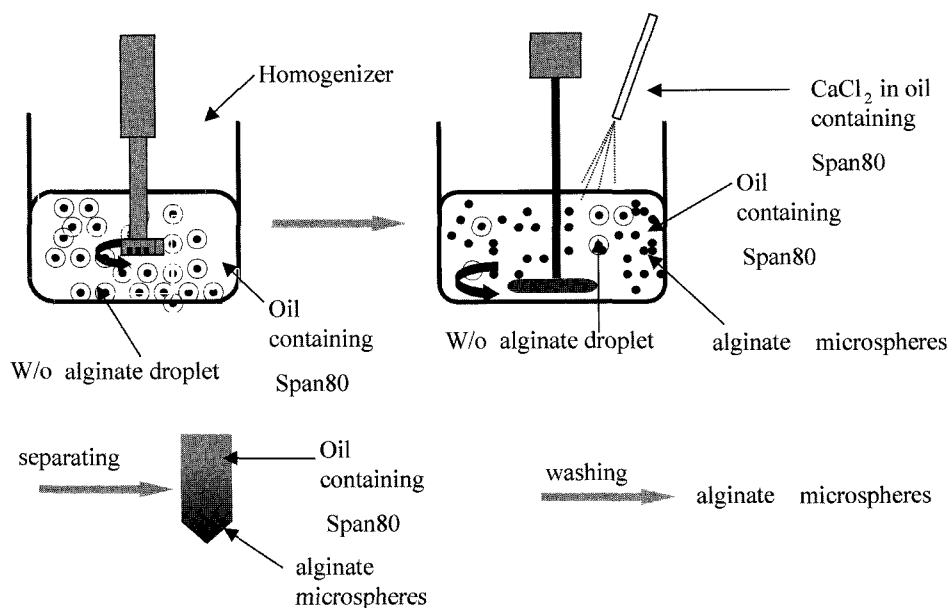


Figure 1-Emulsion method for the preparation of alginate microspheres.

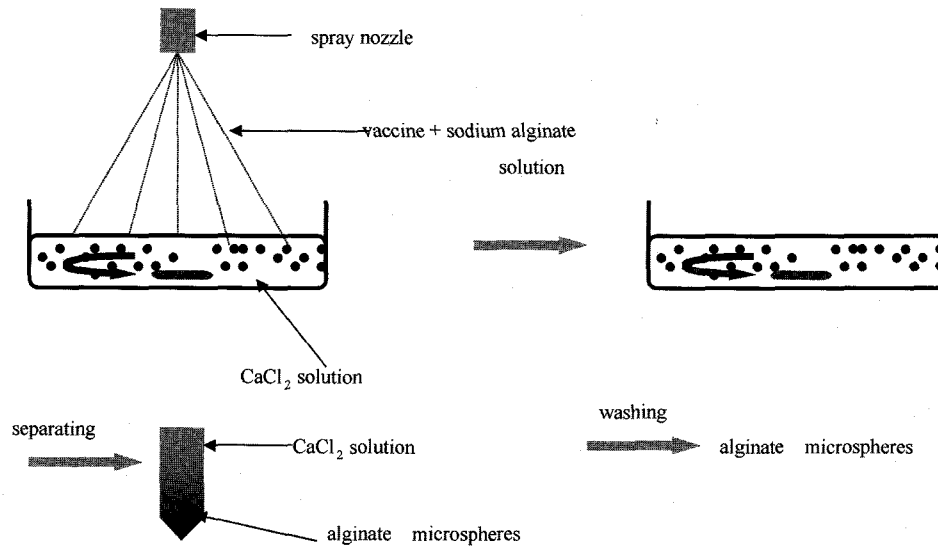


Figure 2—Spray method for preparation of alginate microsphere.

Table II—Process Conditions of Microspheres Prepared by Spray Method

Sample	Nozzle pressure (kgf/cm ²)	Concentration of CaCl ₂ (% w/w)	Spraying rate (ml/min)
B1-1	1	5	1.50
B1-2	2	5	1.50
B1-3	3	5	1.50
B1-4	4	5	1.50
B2-1	3	3	1.50
B2-2	3	5	1.50
B2-3	3	7	1.50
B3-1	3	5	0.75
B3-2	3	5	1.50
B3-3	3	5	3.00

분무법을 이용한 마이크로스피어의 제조 - 분무법은 1% 알긴산나트륨 용액 20 ml를 자석교반기로 일정한 속도로 교반 중인 염화칼슘용액 80 ml에 분무하여 마이크로스피어를 제조하였다. 제조된 마이크로스피어를 분리한 다음 에탄올로 세척하여 상온에서 감압 건조하였다. Figure 2는 분무법을 이용한 알긴산 마이크로스피어의 제조 과정이며, Table II에는 그 제조조건을 나타내었다.

모델 항원으로서 FITC-BSA 및 GFP 함유 마이크로스피어의 제조 - 앞의 실험을 통하여 최적 B3-1 조건으로 모델 항원인 FITC-BSA(10 mg/ml)나 GFP(3.4 mg/ml)를 각각 사용하여 알긴산나트륨의 농도를 0.5%, 1.0% 및 1.5%로 변화시키면서 마이크로스피어를 제조하였다. 분무액으로는 알긴산나트륨 용액 19 ml와 모델 항원 1 ml를 혼합하여 제조였다. 5% 염화칼슘용액 80 ml를 500 ml 비커에 넣고 일정한 속도

로 교반하면서 분무액을 이 용액에 분무하여 마이크로스피어를 제조하였다. 제조된 마이크로스피어를 에탄올로 세척한 후 상온에서 감압 건조하였다.

여기서 녹색형광 단백질 GFP는 해파리가 만드는데, 장파장의 자외선을 흡수하여 510 nm의 녹색의 형광을 발산하는 단백질이다. 이러한 단백질은 특히 구조 손상 시에는 형광을 나타내지 않기 때문에¹⁶⁾ 본 실험에서 구조 손상 여부를 알아보기 위해 사용하였다.

FITC-BSA 함유 알긴산/키토산 및 알긴산/poly-L-lysine 마이크로스피어의 제조

알긴산 마이크로스피어에 함유된 항원의 안정성을 높이고 위장관에서 방출을 억제하기 위해 본 실험에서는 알긴산나트륨과 키토산 또는 poly-L-lysine간의 이온결합을 이용하여 항원이 함유된 알긴산 마이크로스피어를 코팅하였다.

알긴산/키토산 마이크로스피어의 제조 - 최적의 노즐 압력 (3 kgf/cm²), 염화칼슘의 농도(5% w/w) 그리고 노즐의 분사 속도(0.75 ml/min)를 제조조건으로 하였으며 분무상은 1% 알긴산나트륨용액 19 ml와 FITC-BSA 1 ml(10 mg/ml)의 혼합 용액으로 하였다. 이 상을 분사속도 0.75 ml/min으로 5%(w/w) 염화칼슘용액 79 ml에 분무하여 마이크로스피어를 제조하였다. 현탁된 알긴산 마이크로스피어를 5000 rpm로 5분 동안 원심 분리하여 상정액(5% 염화칼슘용액)을 따라낸 후 증류수로 3회 세척하고 이것을 0.2% 키토산 용액(0.2 mM acetic acid, pH=4.59) 100 ml에 가하여 일정한 속도로 1시간 동안 교반하였다. 1시간 후 5000 rpm으로 5분 동안 원심 분리하여 상정액을 따라낸 후 에탄올로 3회 세척하여 상온

에서 건조하였다.

알긴산/poly-L-lysine 마이크로스피어 제조 - 알긴산 마이크로스피어는 동일한 과정으로 제조되었다. 현탁된 마이크로스피어를 5000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상정액(5% 염화칼슘용액)을 따라낸 후 물로 3회 세척한 후 여기에 10 ml의 물을 가하고 vortex하였다. 여기에 0.2% poly-L-lysine 용액 10 ml를 가하여 5분간 vortex하고 이 액을 다시 3000 rpm으로 3분동안 원심 분리하여 상정액을 따라내고 에탄올로 3회 세척하여 상온에서 건조하였다.

마이크로스피어의 입자도 측정

마이크로스피어를 5% (w/w)염화칼슘용액 일정량에 현탁시켜 particle size analyzer를 이용하여 입자 크기를 분석하였다. 분석결과는 수 분포의 평균입자경과 입자분포의 표준편차로 나타내었다. 두 방법에서 얻은 입자 크기분포의 다분산성(polydispersity)은 다음 식으로 부터 SPAN factor¹⁷⁾를 구하였다.

$$SPAN = \frac{D_{90\%} - D_{10\%}}{D_{50\%}}$$

여기서, $D_{90\%}$, $D_{50\%}$ 및 $D_{10\%}$ 는 입자의 크기가 작은 쪽에서부터 누적하여 각각 90%, 50%, 및 10%가 될 때의 마이크로스피어의 직경을 나타낸 것이다. SPAN 값이 높으면 넓은 입자도의 분포와 높은 다분산성을 나타냈다.¹⁸⁾

FITC-BSA 함유 마이크로스피어의 봉입효율측정

제조된 FITC-BSA 함유 마이크로스피어의 현탁액을 5000 rpm에서 약 5분간 원심 분리하여 상정액을 버리고 citrate/phosphate buffer, pH 5.0을 가해 총부피를 10 ml로 한 후 2분간 교반하였다. 이 현탁액 1 ml 취하여 5000 rpm에서 약 5분간 원심 분리하고 상정액을 버린 후 0.2 M trisodium citrate용액을 가하여 총 3.5 ml가 되게 하고 1시간동안 혼합하여 완전히 용해시킨다. 형광분광광도계(excitation 파장 490 nm, emission 파장 520 nm)로 측정하였다.

봉입효율(A)의 계산은 아래의 식을 이용하였다. 여기서 C_s 는 0.2 M trisodium citrate buffer 용액에 녹아 있는 FITC-BSA 함유 마이크로스피어의 농도이고, C_{ST} 는 표준액의 농도로서 FITC-BSA(10 mg/ml) 1 ml에 해당하는 농도이다.

$$A(\%) = \frac{C_s}{C_{ST}} \times 100$$

GFP 함유 마이크로스피어의 봉입효율 측정

제조된 GFP 함유 microsphere의 현탁액을 3500 rpm에서

약 15 min간 원심분리하여 상정용액을 형광광도기(Jasco FP-750, Japan)로 excitation 파장 488 nm, emission 파장 510 nm에서 intensity를 측정하였다. 봉입효율(A)의 계산방법은 아래 식으로 계산한다. 여기서 C_s 는 제조된 GFP 함유 microsphere 현탁액의 상정액 농도이고, 표준액은 3.4 mg/ml 농도의 GFP용액 1 ml를 5% CaCl₂ 100 ml에 희석한 용액($C_{ST} = 34 \mu\text{g/ml}$)을 사용하였다.¹³⁾

$$A(\%) = \frac{C_{ST} - X_s}{C_s} \times 100$$

제조된 GFP(3.4 mg/ml)함유 마이크로스피어의 현탁액을 3500 rpm에서 약 15분간 원심 분리하여 상정액을 형광분광광도계로 측정하였다. 봉입효율은 위의 식으로 계산하였다.

FITC-BSA 함유 마이크로스피어의 함량

검량선 작성 - FITC-BSA(10 mg/ml) 1 ml를 취하여 0.2 M trisodium citrate 용액으로 단계 희석하여 각각 10, 20, 40, 60, 80 $\mu\text{g/ml}$ 의 표준 용액을 제조하고 형광분광광도계로 측정하여 검량선을 작성하였다.

함량 측정 - 건조된 FITC-BSA 함유 알긴산, 알긴산/poly-L-lysine과 알긴산/키토산마이크로스피어를 각각 0.1 g 취하여 0.2 M trisodium citrate 100 ml에 가한 후 교반하여 용해시켰다. 이 용액을 0.45 μm Millipore filter로 여과한 후 즉시 형광분광광도계로 측정하여 함량을 분석하였다.

FITC-BSA 함유 마이크로스피어의 형태

입자의 형태와 표면 구조를 검토하기 위하여 제조된 FITC-BSA 함유 마이크로스피어를 주사형 전자 현미경으로 관찰하였다. 시료를 금 증착기(IB-3 ion coater)에 넣고 진공도 0.15 torr 및 고전압(800-1500 V, 8 mA)하에서 5분간 순금으로 입자 표면을 피복하여 촬영용 시료로 하였다. 이 후 시료를 주사형 전자 현미경 본체 내에 고정시키고 15 kV에서 적당한 배율로 입자표면을 관찰하였다.

FITC-BSA 함유 마이크로스피어의 방출 실험

알긴산, 알긴산/poly-L-lysine과 알긴산/키토산 마이크로스피어에 함유된 FITC-BSA가 인공위액, 인공장액과 PBS(phosphate buffer saline)에서 방출되는 양상과 마이크로스피어의 안정성을 관찰하기 위해서 다음과 같은 실험을 수행하였다.

검량선 작성 - FITC-BSA(10 mg/ml) 1 ml를 취하여 인공장액, PBS으로 희석하여 각각 2.5, 5, 10, 20, 40, 60, 80

µg/ml의 표준 용액을 제조하여 형광분광광도계로 측정하여 검량선을 작성하였다.

방출실험 - USP XXII 제3법 기준에 해당되는 BIO-DIS Extended Release Tester를 사용하여 시험액으로 인공위액, 인공장액과 pH 7.4 PBS (KP VII) 각각 100 ml씩 용기에 채운 후 온도가 37±0.5°C로 맞추고 왕복 수는 매분 30회로 유지시켰다. 각 sample tube에 0.1 g의 마이크로스피어를 취하고 바닥을 filter paper 및 160 mesh(74 µm)의 철망으로 막아 마이크로스피어가 밖으로 빠져나가는 것을 방지하였다. 인공위액 및 장액에서는 각각 15분, 30분, 1, 2, 3, 4, 6, 8시간마다 3 ml 취하고 PBS에서는 4, 6, 8, 10, 22, 34, 50, 100시간마다 3 ml씩 취하여 용액을 0.45 µm Millipore filter로 여과한 후 즉시 형광분광광도계로 측정하였다.

방출률 계산 - 시간마다 시료를 같은 양 취한 후 동등량을 보충한 경우에 용출된 농도는 아래와 같은 방정식으로 계산하였다.

$$C_{corr,n} = C_{read,n} \frac{3}{100} \sum_{s=1}^{n-1} C_{uncorr,s}$$

여기에서 $C_{corr,n}$ 는 시간 t에 해당하는 sample의 농도이며 $C_{read,n}$ 는 t 시간에 측정된 농도이다. $\sum_{s=1}^{n-1} C_{uncorr,s}$ 는 t 시간 전까지 측정된 농도의 합이다.¹⁹⁾

PP에서 마이크로스피어의 흡수

분무법을 이용하여 제조된 마이크로스피어가 토기 회장의 PP에서 흡수 될 수 있는지 확인하기 위해서 FITC가 표지된 마이크로스피어를 제조하여 아래와 같은 실험하였다.

알긴산/FITC-poly-L-lysine 마이크로스피어의 제조 - 1% 알긴산 나트륨용액 21 ml를 분무액을 제조하였다. 5% 염화칼슘용액 79 ml를 일정한 속도로 교반하면서 분무액을 분무하여 마이크로스피어를 제조하였다. 현탁된 마이크로스피어를 5000 rpm으로 5분간 원심 분리하여 상정액(5% 염화칼슘용액)을 따라낸 후 물로 3회 세척하여 10 ml의 물로 희석한 후 vortex한다. 이 현탁액에 0.2% FITC-poly-L-lysine(분자량 15,000-30,000) 용액 10 ml를 가하여 5분 동안 vortexing한 후 5000 rpm으로 5분간 원심 분리하였다. 제조된 마이크로스피어를 1×10⁹개 입자가 되도록 PBS 용액으로 8 ml 희석하여 다음 실험에 사용하였다.

마이크로스피어 투여방법 - 2.0~2.4 kg의 토기를 1일간 절식시킨 후 마취제(urethane 900 mg/kg α-chloralose 80 mg/kg) 3 ml를 복강 주사하여 마취시켰다. 토기의 복강을 절개하여 회장을 찾아내어 PP 부위를 확인했다. PP가 포함된 회장의 한 부분을 실험 대상으로 하여 양쪽을 실로 묶었다. 미

리 준비된 마이크로스피어의 PBS 용액 8 ml(1×10⁹)를 묶어 둔 회장의 내부로 주사하였다. 흡수촉진을 위해 10분 간격으로 주사한 부위를 가볍게 마사지해주고 약 1시간 뒤에 묶어 둔 부위를 토기에서 적출하였다. 이 과정은 Figure 7에 사진으로 나타내었다.

Cryosection - 적출한 토기 회장의 내부에 잔존하는 마이크로스피어를 완전히 제거하기 위해 PBS로 3번 세척한 후 -70°C 급냉시킨 다음 specimen chuck에 올려놓고 PP에 있는 회장 전체를 OCT compound로 block을 만들어 -21°C의 microtome chamber 내에서 고정시켰다. 이것을 칼날과 수직이 되도록 고정시켜 10 µm로 잘라서 slide glass에 붙여서 Confocal microscope로 관찰하였다.

염색 - Spray 방법을 이용해 제조한 입자가 PP에 흡수되는 정도를 확인하기 위해 FITC-poly-L-lysine으로 코팅한 알긴산마이크로스피어를 사용하였다. 그러나 이 입자가 정확히 PP로 흡수되었는지 확인할 필요가 있어 Hematoxylin-eosin 염색법을 사용하여 흡수된 마이크로스피어의 위치를 확인하였다.

Hansen's hematoxylin 용액제조 - 1) Hematoxylin 1 g을 취하여 무수에탄올 10 ml에 녹여서 병에 넣고 밀폐하였다. 2) 칼리명반(potassium alum) 20 g을 증류수 200 ml에 희석한 후 가온하면서 용해시키고 냉각 후에 여과하였다. 3) 과망간산칼륨 1 g을 16 ml 증류수에 용해시켰다. 24시간 후 1), 2)를 혼합하고 다시 3)을 3 ml 가하여 교반하면서 1분간 가열한 다음 냉각 후 여과하였다.

Eosin 용액제조 - Eosin 1 g을 취하여 50% 에탄올 60 ml와 증류수 100 ml에 각각 용해시켰다. 염색할 때 0.1% 또는 그 이하로 희석하여 사용하였다.

Hematoxylin - eosin 염색방법 - 회장 조직 절편을 xylitol, 100%, 90%, 80% 에탄올, 증류수에 순서대로 각각 5분씩 담근 후 hematoxylin으로 10분간 염색한 뒤 즉시 수세하고 eosin으로 염색하였다. 다시 2분간 수세 후 건조하였다.

결과 및 고찰

유화법을 이용한 알긴산마이크로스피어의 제조

유화법으로 제조된 알긴산마이크로스피어의 제조에 있어서 계면활성제가 중요한 역할을 한다고 알려져 있다.¹⁵⁾ poly(L-lactic acid) 마이크로스피어,²⁰⁻²²⁾ poly(dl-lactide) 마이크로스피어,^{23,24)} poly(lactide-co-glycolide) microparticle²⁵⁾ 및 알긴산 마이크로스피어²⁶⁾ 등의 제조에서 사용된 emulsifier의 종류와 농도가 입자의 크기, 모양, 약물의 봉입효율에 미치는 영향에 대하여 보고되어 있다.

따라서 본 연구는 알긴산나트륨과 수용성 모델 항원인 FITC-BSA 일정량을 취하여 물에 투명하게 용해된 수용액을 제조하고 이 수용액을 유화제를 포함한 적당한 식물유에 가한 다음 homogenizer로 교반하여 w/o 형태의 유제를 형성하였다. 이 유제에 염화칼슘용액을 가하여 알긴산마이크로스피어를 경화시킨 뒤에 과량의 식물유는 유기용매로 세척하여 제거시키고 건조하였다. 이러한 제조과정을 통하여 마이크로스피어의 크기, 모양, 봉입효율에 영향을 미칠 수 있는 인자는 식물유에 포함된 유화제의 농도, homogenizer의 회전속도, 알긴산나트륨의 농도와 염화칼슘의 농도에 대하여 검토하였다. 그리고 이러한 제조과정에서 식물유를 사용하지 않고 식물유를 사용하였으며, 둘째 수용성 vaccine은 식물유에 용해되지 않으므로 봉입효율을 높일 수 있기 때문이다.

A. 입자도 분석

Span 80의 농도에 의한 영향 - 유화 속도를 10,000 rpm으로 하고 내상과 외상의 비를 1:4(w/w)로, 유화액 조제시 염화칼슘의 농도를 5%(w/w), 유화액의 양을 5g으로 각각 고정시킨 조건에서 유화제로서 사용된 Span 80의 농도를 0.5, 1, 2, 4%(w/w)로 변화시키면서 마이크로스피어를 제조하였다. Table III에서 보는 바와 같이 Span 80의 농도를

Table III-Particles Size Distribution of Alginate Microsphere with Various Process Variables in Emulsion Method

Sample	Variables	Number distribution (μm)			SPAN*
		10%	50%	90%	
Concentration of Span 80					
A1-1	0.5%	4.52	6.64	10.7	0.85
A1-2	1%	2.47	4.86	8.89	1.32
A1-3	2%	1.04	1.36	2.37	0.98
A1-4	4%	0.89	1.26	2.19	1.03
Emulsification Speed					
A2-1	10,000 rpm	1.04	1.36	2.24	0.88
A2-2	15,000 rpm	0.98	1.30	2.14	0.89
A2-3	20,000 rpm	0.88	1.24	2.20	1.06
Concentration of CaCl₂					
A3-1	3%	0.89	1.26	2.27	1.09
A3-2	5%	1.04	1.36	2.37	0.98
A3-3	7%	1.23	1.39	2.53	0.93
Sodium alginate					
1-SAL1.25%	3 g	1.14	1.33	2.31	0.87
2-SAL1.50%	3 g	1.04	1.30	2.33	0.99
3-SAL1.75%	3 g	1.04	1.33	2.32	0.96

*: polydispersity

0.5, 1, 2, 4%(w/w)로 변화시켰을 때 제조된 마이크로스피어 수 분포의 평균입자경(n=3, mean±S.D.)은 각각 6.64±0.08, 4.86±0.06, 1.36±0.01과 1.26±0.04 μm로 나타났다. 식물유 중에 분산되어 있는 FITC-BSA와 알긴산나트륨의 혼합액은 Span 80에 의해 미세한 입자로 분산된 상에 5%(w/w) 염화칼슘 유화액을 첨가했을 때 Span 80의 농도가 0.5%(w/w)일 때에는 현저하게 크게 응집된 둥근 모양의 마이크로스피어가 형성되었다. 그 중 일부는 구형의 모양을 잃으면서 깨어져 있었는데, 이것은 최소한의 Span 80의 농도가 0.5%(w/w)일 때 균일한 분산물의 형성에는 적당하지만, 구형을 형성하기 어려웠고 입자가 크므로 파괴되는 현상이 일어났다. 그러므로 균일한 작은 입자의 형성을 위해서는 더 높은 농도의 계면활성제가 필요하다고 생각된다. Span 80의 농도가 1.0%(w/w)일 때에는 마이크로스피어 입자를 육안으로 확인할 수 있었으나, 2.0%(w/w)과 4.0%(w/w)에서는 마이크로스피어 입자가 매우 작아서 우유처럼 유백색으로 보였다. 이 결과는 Wan 등이 발표한 결과¹⁵⁾와 유사하였다.

결과적으로 Span 80의 농도가 2.0%(w/w)까지 증가할 때 마이크로스피어 입자의 크기가 작아지지만, 농도가 4.0%(w/w)일 때에는 2.0%(w/w)와 비슷한 크기의 마이크로스피어가 형성되는 듯하다. 결과는 이러한 조건에서 2% Span 80의 농도가 매우 적당하다. 이상의 결과를 Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의수준 5% 처리한 결과를 보면 Span 80의 농도가 0.5%(w/w)에서 2%(w/w)로 증가하면 입자의 크기가 감소한다고 할 수 있고 Span 80의 농도가 2%(w/w)에서 4%(w/w)로 증가 시에는 입자도가 현저하게 감소되지는 않았다.

유화속도에 의한 영향 - 유화제로서 Span 80의 농도를 2%(w/w)로, 내상과 외상의 비를 1:4(w/w)로, 유화액 조제시 염화칼슘의 농도를 5%(w/w), 유화액의 양을 5g으로 각각 고정시킨 조건에서 유화속도를 10,000, 15,000, 20,000 rpm으로 변화시켰을 때 제조된 마이크로스피어 수 분포의 평균 입자경(n=3, mean±S.D.)은 각각 1.36±0.02, 1.30±0.02, 1.24±0.04 μm로 나타났다. 이는 Cho 등이 발표한 논문²⁷⁾의 결과와 비슷하다(Table III). 유화 속도가 5000 rpm씩 증가하면 입자도가 감소하는 경향을 보였다. Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의수준 5% 처리한 결과를 보면 유화 속도가 10,000 rpm에서 20,000 rpm로 증가하면 제조된 마이크로스피어의 크기도 1.36 μm에서 1.24 μm로 감소하였다.

염화칼슘농도에 의한 영향 - 유화 속도를 10,000 rpm으로 내상과 외상의 비를 1:4(w/w)로, 유화제인 Span 80의 농도를 2%(w/w)로 각각 고정된 조건에서 유화액 조제시 사용한 염화칼슘의 농도를 3, 5, 7%(w/w)로 변화시키면서 제조된

마이크로스피어 수 분포의 평균입자경($n=3$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$)은 각각 1.26 ± 0.03 , 1.36 ± 0.02 , $1.39 \pm 0.02 \mu\text{m}$ 로 나타났다 (Table III). 가교제로 사용된 염화칼슘의 농도가 너무 낮으면 구형인 마이크로스피어를 형성하기는 하지만 균일한 크기의 입자를 형성하지 않고 입자도 간의 편차가 크며, 농도가 너무 높으면 식물유층내의 구형 마이크로스피어 사이에 응집이 일어나는 경향이 있기 때문에 입자가 커질 것으로 생각된다. 이것은 7%(w/w) 보다 높은 염화칼슘의 농도를 사용하면 두상의 표면에 Ca^{++} 의 농도가 빨리 증가하기 때문에 입자사이 응집이 형성된다.²⁷⁾ Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의수준 5% 처리한 결과를 보면 염화칼슘농도가 3%(w/w)에서 5%(w/w)로 증가할 때 입자도가 증가하고, 5%(w/w)에서 7%(w/w)로 증가할 때에는 입자의 크기가 비슷함을 보여주었다.

알긴산나트륨 농도에 의한 영향 - 유화 속도를 10,000 rpm으로, 내상과 외상의 비를 1:4(w/w)로, 유화제인 Span 80의 농도를 2%(w/w)로, 유화액 중 염화칼슘의 농도를 5%(w/w)로 각각 고정시킨 조건에서 알긴산의 농도를 각각 1.25, 1.50과 1.75%(w/w)로 변화시켜 제조된 마이크로스피어 수 분포의 평균입자경($n=3$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$)은 각각 1.33 ± 0.07 , 1.30 ± 0.04 , $1.33 \pm 0.02 \mu\text{m}$ 로 나타내었다 (Table III). 알긴산나트륨의 농도가 1.25%(w/w)에서 1.75%(w/w)로 증가할 때 입자의 크기에는 큰 변화가 없었다. 알긴산나트륨의 농도가 증가하면 알긴산나트륨용액의 점도가 증가하기 때문에 입자의 크기가 증가한다는 보고^{25,28,29)}가 있으나, 이 제조조건에서는 큰 영향이 없었다.

B. FITC-BSA 함유한 알긴산마이크로스피어의 봉입효율

Span 80 농도에 의한 영향 - Span 80의 농도를 각각 0.5, 1, 2와 4%로 변화시키면서 제조된 알긴산마이크로스피어의 FITC-BSA 봉입효율($n=3$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$)은 각각 5.16 ± 0.15 , 7.80 ± 0.10 , 16.94 ± 0.35 와 $2.38 \pm 0.05\%$ 로 나타났다. Span의 농도가 0.5%(w/w)에서 2%(w/w)로 증가할 때 FITC-BSA 봉입효율은 5.2%에서 16.9%로 증가하는 양상을 나타냈다. 그러나 Span 80의 농도가 2%(w/w)에서 4%(w/w)로 증가 시 FITC-BSA 봉입효율은 16.9%에서 2.3%로 급격히 감소하는 양상을 나타냈다. 이것은 Span 80의 농도 4%(w/w) 조건에서 w/o형 유화제를 제조할 때 알긴산 용액에 있는 FITC-BSA가 식물유층으로 많이 분산된 것이라고 생각된다.¹⁵⁾ Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의수준 5% 처리한 결과를 보면 Span 80의 농도 0.5%(w/w)에서 2%(w/w)로 증가할 때 FITC-BSA 봉입효율은 감소하였다. 또한 Span 80의 농도 2%(w/w)에서 4%(w/w)로 증가할 때

FITC-BSA 봉입효율은 급격히 감소하였다.

유화속도에 의한 영향 - 유화속도가 각각 10,000, 15,000과 20,000 rpm으로 변화시키면서 제조된 알긴산마이크로스피어의 FITC-BSA 봉입효율($n=3$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$)은 각각 16.94 ± 0.35 , 15.10 ± 0.13 과 $14.05 \pm 0.11\%$ 로 나타났다. 유화 속도를 10,000 rpm에서 15,000 rpm으로 증가시켰을 때 FITC-BSA 봉입효율이 16.9에서 14.05%로 감소하였다. 이것은 유화속도가 증가할 수록 알긴산용액에 있는 일부 FITC-BSA가 식물유층으로 분산되는 양이 증가하는 것으로 생각된다. Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의수준 5% 처리한 결과를 보면 유화속도 10,000 rpm에서 20,000 rpm으로 증가할 때 봉입효율이 감소하였다.

염화칼슘 농도에 의한 영향 - 염화칼슘의 농도를 각각 3, 5 및 7%(w/w)로 변화시키면서 제조된 알긴산 마이크로스피어의 FITC-BSA 봉입효율($n=3$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$)은 각각 16.66 ± 0.39 , 16.9 ± 0.35 와 $16.49 \pm 0.40\%$ 로 나타났다. 이 실험 결과 염화칼슘의 농도가 3%(w/w)에서 7%(w/w)로 증가할 때 FITC-BSA 봉입효율은 비슷한 양상을 나타냈다. 이것은 가교제로 사용된 염화칼슘의 농도가 3%(w/w)에서 7%(w/w)로 증가함에 따라 식물유층 내의 구형 마이크로스피어의 표면에 대한 경화정도는 증가하였으나 FITC-BSA 봉입효율에는 영향이 없는 것으로 나타났다. Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의수준 5% 처리한 결과를 보면 염화칼슘 농도가 3%(w/w)에서 7%(w/w)로 증가할 때 봉입효율은 비슷하였다.

알긴산나트륨 농도에 의한 영향 - 알긴산나트륨 수용액의 농도를 각각 1.25, 1.50 및 1.75%(w/w)로 변화시키면서 제조된 알긴산 마이크로스피어의 FITC-BSA 봉입효율($n=3$, $\text{mean} \pm \text{S.D.}$)은 각각 15.21 ± 0.25 , 15.88 ± 0.35 와 $16.94 \pm 0.40\%$ 로 나타났다. 이 실험에서 알긴산나트륨의 농도를 1.25%(w/w)에서 1.75%(w/w)로 증가하여 제조하였을 때 FITC-BSA 봉입효율은 15.21%에서 16.94%로 증가하였다. 이것은 알긴산나트륨의 농도 증가하면 알긴산나트륨용액 점도가 증가하므로 비례적으로 봉입효율이 증가하는 것으로 생각된다. Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의수준 5% 처리한 결과를 보면 알긴산나트륨의 농도가 1.25%(w/w)에서 1.75%(w/w)로 증가할 때 봉입효율은 약 1.7%로 증가하였다.

앞의 실험을 관찰한 결과 w/o형 유화법을 이용한 FITC-BSA함유된 마이크로스피어의 최적 제조조건은 알긴산나트륨의 농도가 1.75%(w/w), 유화속도는 10,000 rpm, Span 80의 농도는 2%(w/w)와 가교제인 칼슘용액의 농도는 5%(w/w)이다.

Table IV—*Particles Size Distribution of Alginate Microsphere with Various Process Variables by Spray Method*

Sample	Process Variables	Number distribution (μm)			SPAN*
		10%	50%	90%	
Nozzle Pressure					
B1-1	1 kgf/cm ²	7.02	11.55	26.12	1.65
B1-2	2 kgf/cm ²	6.40	10.28	21.99	1.52
B1-3	3 kgf/cm ²	4.50	7.16	18.06	1.89
B1-4	4 kgf/cm ²	5.32	7.37	18.39	1.77
Calcium chloride					
B3-1	3%	5.31	10.25	25.62	1.98
B3-2	5%	4.50	7.16	18.06	1.89
B3-3	7%	4.31	6.96	16.05	1.69
Spraying Rate					
B3-1	0.75 ml/min	3.77	6.12	14.34	1.73
B3-2	1.50 ml/min	4.50	7.16	18.06	1.89
B3-3	3.00 ml/min	5.23	9.33	21.32	1.72

*: polydispersity

분무법을 이용한 마이크로스피어의 제조

마이크로스피어 크기를 최소로 하는 제조 조건을 얻기 위해서 노즐 압력, 염화칼슘의 농도 그리고 노즐의 속도를 각각 변화시키면서 마이크로스피어를 제조하였다. 제조된 마이크로스피어는 particle size analyser를 이용하여 입자 크기를 분석하고 그래프로 나타내어 필요한 크기의 마이크로스피어의 제조 조건을 설계하였다.

노즐 압력에 의한 영향 - 노즐의 분사속도를 1.50 ml/min, 염화칼슘용액의 농도를 5%(w/w)로 고정시킨 조건에서 노즐의 분사압력을 1, 2, 3 및 4 kgf/cm²로 변화시키면서 제조한 마이크로스피어 수 분포의 평균입자경(n=3, mean±S.D.)은 각각 11.6±0.24, 10.28±0.14, 7.16±0.05와 7.37±0.17 μm로 나타났다(Table IV). 즉, 압력이 1 kgf/cm²에서 3 kgf/cm²로 증가할 때 입자 크기가 감소하였고, 3 kgf/cm²에서 4 kgf/cm²로 증가할 때 입자 크기가 비슷하게 나타났다. 이것은 알긴산나트륨의 농도 1.0%(w/w), 노즐의 분사속도 1.50 ml/min와 염화칼슘의 농도 5%(w/w) 제조조건에서 압력이 증가할수록 입자도가 작아졌지만 3 kgf/cm²부터 매 1 kgf/cm²씩 증가시켰을 때 입자도가 더 이상 작아지지 않고 거의 일정하였다. Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의수준 5% 처리한 결과를 보면 노즐의 압력이 1 kgf/cm²에서 3 kgf/cm²로 증가할 때 입자도가 증가하였다. 노즐의 압력이 3 kgf/cm²에서 4 kgf/cm²로 증가할 때 입자도가 비슷하였다.

염화칼슘의 농도에 의한 영향 - 노즐압력은 3 kgf/cm², 노즐 분사속도를 1.5 ml/min으로 고정시킨 조건에서 염화칼슘의 농도를 각각 3, 5 및 7%(w/w)로 변화시키면서 제조한

마이크로스피어 수 분포의 평균입자경(n=3, mean±S.D.)은 각각 10.3±0.62, 7.16±0.05와 6.63±0.23 μm로 나타났다(Table IV). 이 결과를 보면 염화칼슘의 농도가 증가할수록 입자도가 감소했지만 염화칼슘의 농도 7%(w/w)이상에선 응집된 마이크로스피어가 많이 존재하였다. 또한, 입자 분포 곡선이 binodal형태를 나타내는 것으로도 확인할 수 있었다. Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의 수준 5% 처리한 결과를 보면 염화칼슘의 농도를 각각 3%(w/w)에서 7%(w/w)까지 증가할 때 입자도가 감소하였다.

노즐 분사속도에 의한 영향 - 노즐 압력을 3 kgf/cm²로 고정시킨 조건에서 노즐 분사속도를 0.75, 1.50 및 3.00 ml/min으로 변화시키면서 제조한 마이크로스피어 수 분포의 평균입자경(n=3, mean±S.D.)은 각각 6.12±0.09, 7.19±0.05와 9.12±0.28 μm로 나타났다(Table IV). 즉 노즐 분사속도가 0.75 ml/min에서 3.00 ml/min으로 증가할수록 입자도가 증가하였다. 이는 Kwok 등이 1991년에 발표한 결과¹²⁾와 비슷하다. Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의수준 5% 처리한 결과를 보면 노즐 분사속도가 0.7 ml/min에서 3.00 ml/min으로 증가할수록 입자도가 증가하였다. 위의 실험 결과를 바탕으로 해서 분무법으로서 노즐 압력 3 kgf/cm², 염화칼슘의 농도 5%(w/w)와 노즐 분사 속도 0.75 ml/min을 최적의 제조 조건으로 선택하여 FITC-BSA 함유 마이크로스피어를 제조하였다.

FITC-BSA 및 GFP함유 알긴산마이크로스피어의 평가

분무법으로 제조된 마이크로스피어의 현탁액을 일정량 취하여 particle size analyser로 입자 크기를 분석하였다. 알긴산나트륨의 농도를 각각 0.5, 1과 1.5%(w/w)로 변화시키면서 제조된 FITC-BSA 함유 마이크로스피어 수 분포의 평균입자경(n=3, mean±S.D.)은 각각 8.24±0.28, 8.90±0.04 및 10.87±0.16 μm로 나타났으며, GFP 함유 마이크로스피어 수 분포의 평균입자경(n=3, mean±S.D.)은 각각 7.23±0.563, 8.16±0.469 및 9.45±0.356 μm로 나타났다(Table V). 이것은 알긴산나트륨의 농도가 증가할수록 입자 크기가 증가했지만 알긴산나트륨의 농도가 1.5%(w/w) 이상이면 알긴산나트륨용액의 점도가 높아서 분무하기가 어렵고 10 μm 보다 큰 입자도 상당수 있음을 알 수 있었다.¹²⁾ Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의수준 5% 처리한 결과를 보면 알긴산나트륨의 농도가 0.5%(w/w)에서 1.5%(w/w)로 증가할 때 입자크기가 모델 항원의 종류와 상관없이 증가하였다.

제조된 FITC-BSA 함유 마이크로스피어의 현탁액을 3500 rpm으로 약 15분간 원심분리하여 분리된 상정액을 일정량을 취하여 그 즉시 형광분광광도계로 측정하여 계산한 결과 알

Table V—Particle Size Distribution of FITC-BSA and GFP-containing Alginate Microsphere with Various Concentrations of Sodium Alginate

Sample	Concentration & volume sodium alginate (% w/w)	Number distribution (μm)			SPAN*
		10%	50%	90%	
FITC-BSA microsphere					
1-SAL0.5%	0.5%, 19 ml	5.44	8.24	17.22	1.43
2-SAL1.0%	1.0%, 19 ml	5.63	8.90	19.98	1.61
3-SAL1.5%	1.5%, 19 ml	6.49	10.87	23.19	1.53
GFP microsphere					
1-SAL0.5%	0.5%, 19 ml	4.70	7.23	16.02	1.57
2-SAL1.0%	1.0%, 19 ml	5.23	8.16	19.18	1.71
3-SAL1.5%	1.5%, 19 ml	6.25	9.45	21.29	1.59

*: polydispersity

Table VI—Comparison of Alginate Microspheres Prepared by Two Methods

	Spray method	Emulsion method
Particle sizes (μm)		
wet particle	6.12 ± 0.09	1.35 ± 0.02
dry particle	2-6	-
Loading efficiency(%)	78.78 ± 2.20	16.94 ± 0.40
Harvesting products	easy	difficult
Preparation method	easy	difficult

긴산나트륨의 농도가 0.5, 1.0 및 1.5%(w/w)일 때 봉입효율(n=3, mean±S.D.)은 각각 66.06±1.00%, 78.78±2.20% 및 88.3±1.34%로 나타났다. 또한, 제조된 GFP 함유 마이크로스피어는 형광분광광도계로 측정하여 계산한 봉입효율(n=3, mean±S.D.)은 알긴산나트륨의 농도가 0.5, 1.0 및 1.5%(w/w)일 때 각각 61.9±0.51%, 71.0±0.47% 및 81.3±0.65%로 나타났다. Duncan's 다중검정법을 이용하여 유의수준 5% 처리한 결과를 보면 알긴산나트륨의 농도가 0.5%(w/w)에서 1.5%(w/w)로 증가할 때 봉입효율이 증가하였다. 알긴산나트륨의 농도가 0.5%(w/w)증가할 때마다의 FITC-BSA 및 GFP의 봉입효율은 약 10%씩 증가하는 양상을 나타냈다. 또한 알긴산마이크로스피어의 FITC-BSA 봉입효율은 알긴산마이크로스피어의 GFP 봉입효율 보다 약간 높지만 큰 차이가 없었다. 이러한 결과에서 알 수 있듯이 본 실험에서 사용된 방법으로 경구용 백신 수송체를 제조하면 그 제조과정 중에는 항원이 손상되지 않는 것으로 사료된다.

유화법과 분무법의 비교 평가

앞의 두 방법을 이용하여 최적 조건으로 제조된 알긴산마이크로스피어를 비교한 결과 Table VI에서 보는 바와 같이 분무법으로 제조된 알긴산마이크로스피어의 입자 크기는 유

화법에 의한 것 보다 약간 크지만 10 μm 이하였으며, FITC-BSA의 봉입효율은 현저히 높게 나타났다. 이것은 유화법을 이용한 경우에는 계면활성제를 사용하기 때문에 마이크로스피어의 입자크기를 작게 만들 수 있지만, 항원이 친수성과 소수성을 모두가지고 있으므로 대부분의 항원들이 HLB 값이 낮은 Span 80과 결합하여 마이크로스피어의 계면에 흡착되거나 식물유층에 분산되어 봉입효율이 낮아진 것으로 생각된다.³⁰⁾

분무법에서는 식물유와 계면활성제를 전혀 사용하지 않기 때문에 유화법에 비해 마이크로스피어의 회수가 용이하고 건조된 마이크로스피어를 쉽게 얻을 수 있었다. 그러나 유화법에서는 식물유와 계면활성제를 사용하기 때문에 대량의 유기용매로 이를 세척하여도 완전히 제거하기가 어려워져 원심분리 한 후에 잔류된 식물유의 점성에 의해 입자사이에 응집이 일어나 건조해도 응집된 입자가 형성되었다. 이러한 비교를 통하여 본 실험은 분무법을 선택하여 계속 실험하였다.

FITC-BSA 함유 알긴산/poly-L-lysine 및 알긴산/키토산 마이크로스피어의 입자도 및 함량

알긴산/키토산 마이크로스피어의 제조에서 알긴산마이크로스피어가 산성용액에서 β-d-manuronic acid와 α-l-guluronic acid에 의해 마이크로스피어 표면에 음전하를 띠는데 반해 키토산은 β-linked-d-glucosamine에 의한 양전하 때문에 다당류 사이에 이온 결합이 이루어진다.³¹⁾ 또한 알긴산/poly-L-lysine 마이크로스피어의 제조에서 알긴산나트륨 마이크로스피어의 표면의 COO⁻ 때문에 poly-L-lysine의 NH₃⁺와 강한 이온 결합을 하였다. 알긴산/키토산 및 알긴산/poly-L-lysine 마이크로스피어의 입자도는 각각 8.50±0.05과 9.03±0.14 μm로 알긴산 마이크로스피어 보다 약간 큰 것으로 나타났다.

FITC-BSA의 0.2 M sodium citrate buffer에서의 검량선 식(y = 0.718x - 0.0914, r = 0.9989)을 이용하여 마이크로스피어에 있는 FITC-BSA량을 측정된 결과 알긴산, 알긴산/poly-L-lysine과 알긴산/키토산 마이크로스피어에 있는 FITC-BSA의 함량은 마이크로스피어 1 mg당 각각 22.7±0.22, 24.0±0.11 및 26.2±0.08 μg/mg이었다.

FITC-BSA 함유 마이크로스피어의 형태 관찰

Figure 3(A)은 1.0%(w/w) 알긴산나트륨과 5%(w/w) 염화칼슘 및 0.75 ml/min 노즐의 분무속도 조건으로 분무법을 이용하여 제조된 FITC-BSA 함유 알긴산마이크로스피어의 주사전자현미경 사진이며, Figure 3(B)는 Poly-L-lysine로 코팅된 마이크로스피어의 주사전자현미경 사진이고 Figure 3(C)

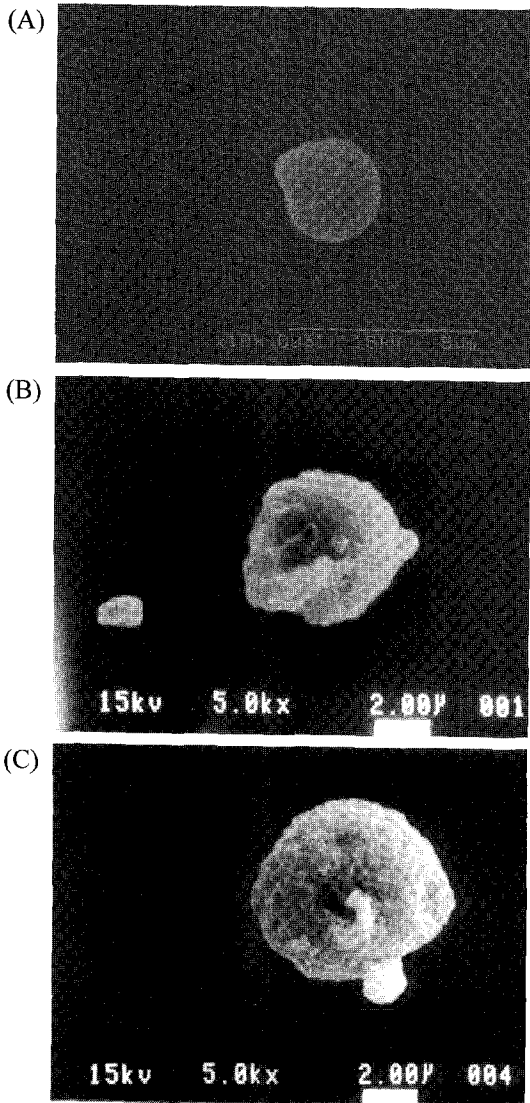


Figure 3—Scanning electron micrograph of alginate microsphere (A), alginate/poly-L-lysine microspheres(B) and alginate/chitosan microspheres(C) containing FITC-BSA.

는 키토산으로 코팅된 마이크로스피어의 주사전자현미경 사진이다. Poly-L-lysine으로 코팅된 마이크로스피어는 입자의 표면이 불규칙하게 흠이 파져 있는 모양이며, 키토산으로 코팅된 마이크로스피어는 표면이 실타래 모양의 키토산으로 둘러싸여 있음을 알 수 있다.

FITC-BSA 함유 마이크로스피어의 방출

인공장액 및 PBS 용액에 측정된 FITC-BSA의 검량선식은 각각 $y = 0.1695x - 0.2371 (r = 0.9979)$ 및 $y = 0.34825x - 0.1148 (r = 0.9998)$ 이었다. Figure 4는 각각 FITC-BSA 함유 알긴산, 알긴산/poly-L-lysine과 알긴산/키토산 마이크로스피어의 인공장액에서 8시간 동안 방출 시험한 결과이다. 코팅

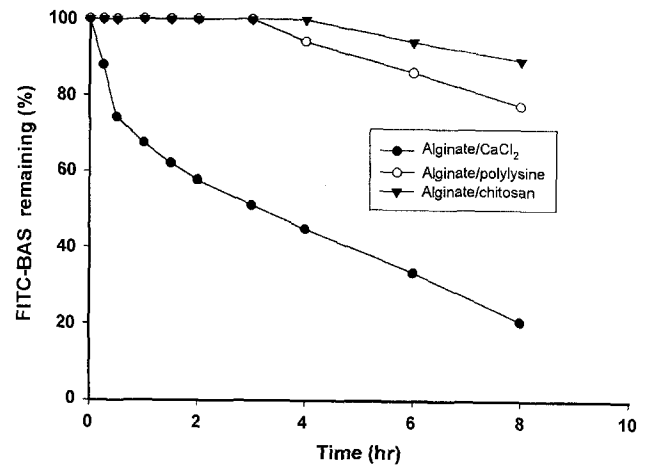


Figure 4—Release profiles of FITC-BSA from uncoated(●), poly-L-lysine coated(○) and chitosan coated microspheres(▼) in simulated intestinal fluid.

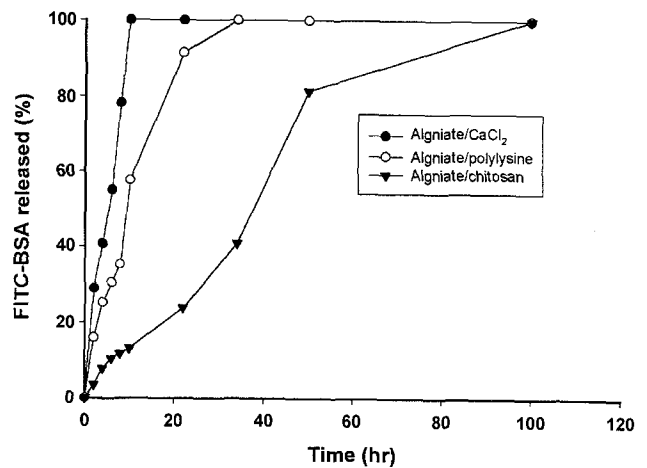


Figure 5—Release profiles of FITC-BSA from uncoated(●), poly-L-lysine-coated(○) and chitosan-coated microspheres(▼) in PBS.

되지 않은 마이크로스피어의 경우에는 8시간 동안 약 80%를 방출하였고 poly-L-lysine으로 코팅된 마이크로스피어의 경우에는 3시간부터 방출을 시작하였고 8시간 후 약 23%를 방출하였다. 키토산으로 코팅된 마이크로스피어의 경우에는 4시간부터 방출을 시작하였고 8시간에 약 11%를 방출하였다. 위액에서는 3종의 마이크로스피어로는 4시간 동안 약물이 방출되지 않았다. 이것은 위의 강산에 의하여 알긴산마이크로스피어 표면이 더 경화된 결과, FITC-BSA가 마이크로스피어로부터 방출을 못한 것으로 사료된다. Figure 5는 PBS에서 100시간 동안 방출되는 양상을 나타내었다. 알긴산 마이크로스피어의 경우에는 10시간에 약 100%가 방출하였고 poly-L-lysine으로 코팅된 마이크로스피어의 경우에는 22시간에 약 90%가 방출되었고 30시간에 100%가 방출되었으

며, 키토산으로 코팅된 마이크로스피어는 22시간에 약 23%가 방출하였고 50시간에 약 80%, 100시간에 100%가 방출하였다. 방출시험 결과, 알긴산/키토산 마이크로스피어가 다른 마이크로스피어 보다 방출이 더 지연되었고 제제의 안정성이 더 좋아 보였다.

앞의 결과에서 알 수 있듯이 코팅을 하지 않은 알긴산 마이크로스피어의 방출시간이 짧은 것은 pH 5 이상의 인산완충액에서 chelating junction의 안정성이 낮기 때문이다.³²⁾ 그러나 알긴산/poly-L-lysine과 알긴산/키토산 마이크로스피어로 부터의 방출이 지연된 것은 인산이온이 polycation salt를 안정화시켰기 때문이다.

Poly-L-lysine은 branched 되어 있어서 알긴산과는 구조가 유사하지 않으나, 키토산과 알긴산은 구조가 유사하기 때문에 두 biopolymer 간의 상호작용이 더 크게 작용하여 chain 간에 강한 인력이 형성되기 때문에 알긴산나트륨/poly-L-lysine 마이크로스피어에 비하여 알긴산/키토산 마이크로스피어의 지속성이 증가된 것으로 사료된다.³³⁾

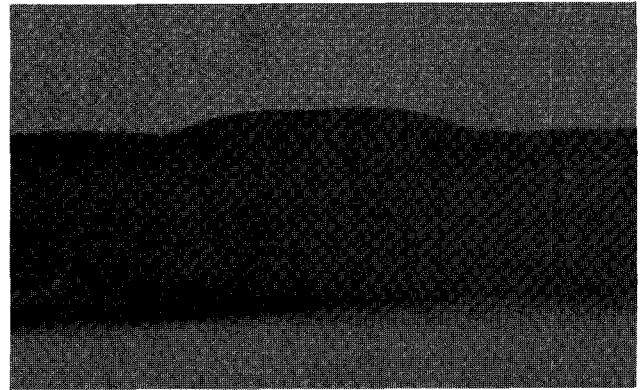
키토산의 존재는 알긴산마이크로스피어에 있는 protein의 제어방출시간을 효과적으로 연장하였다. 이는 두 biopolymer 간의 상호작용이 중요한 역할을 하는 것으로 생각되고, 3차원적인 cross-linked 망상의 형성에 기여하는 ionic interaction은 세 가지 종류가 있다. biopolymer의 반대전하간의 상호작용, calcium 이온과 glucuronic acid와 manuronic acid에 의해 생긴 junction, chain 내의 수소결합 등이 그 원인이라고 생각된다.³⁵⁾

이러한 결과를 보면 알긴산/키토산 마이크로스피어는 위액, 장액과 PBS에서 모두 다른 마이크로스피어에 비하여 안정성은 더 좋은 것으로 생각된다.

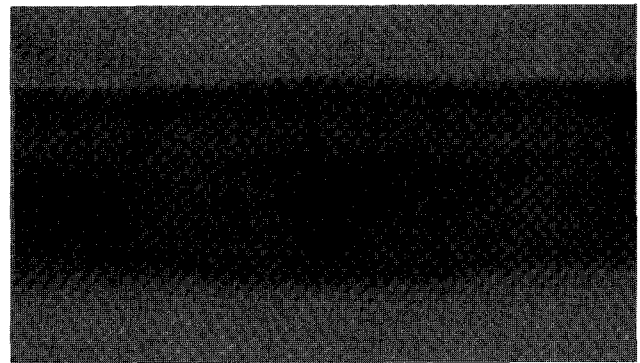
마이크로스피어의 PP 흡수

입자도, 입자표면의 특성, 동물종류, 동물의 나이와 투여량 등, 많은 생리학적, 물리학적 요인들이 입자가 장의 PP를 통한 흡수에 영향을 미친다고 보고되었다.^{34,35)} 그리고 흡수가 되지 않는 최대 마이크로스피어의 입자 크기에 대한 결정은 동일한 동물 종의 연구에서조차 다른 결과를 나타낸다. 이러한 결과를 나타내는 이유는 현미경측정,³⁶⁻³⁸⁾ flow cytometry,³⁹⁾ tissue dissociation^{36,40-42)} 등과 같은 측정 방법의 차이에 기인하는 것으로 사료된다.

또한 Eldridge 등⁴³⁾에 따르면 입자도가 5-10 μm 범위내에 있는 마이크로스피어는 lamina propria에 머물러 있고 1-5 μm 범위의 입자는 소낭(follicle)에 있다는 것을 보고하였다. 또 다른 연구자들은 PLGA 마이크로스피어의 입자도를 1-10 μm 범위 내로 하였을 때 동물(토끼)의 PP에 흡수됨을 관



(A)



(B)

Figure 6—Image of a rabbit ileal Peyer's patch.

찰하였다.⁴⁴⁾ 많은 연구자들은 생화학적 실험방법을 통하여 마이크로스피어의 PP를 통한 흡수 연구를 보고하였다.^{45,46)} 그러나 이러한 방법은 처리과정이 복잡하고 비용이 많이 들므로 본 연구에서는 처리과정이 간편하고 경제적인 방법을 사용하였다. 즉, 10 μm 이하 알긴산마이크로스피어를 FITC 형광을 붙인 poly-L-lysine으로 코팅하여 토끼 회장의 PP에서의 흡수를 관찰하였다. Figure 6은 PP를 확인 할 수 있는 토끼 회장의 외관 사진이다. Figure 6(A)은 토끼 회장의 측면사진으로서 볼록한 부분이 PP이며, 이를 위에서 관찰할 때 Figure 6(B)에서는 보는 바와 같이 장방형의 형태를 나타내고 있다. Figure 7에서 A는 정상 회장조직의 형광현미경사진이고 B와 C의 오른쪽 그림은 회장의 서로 다른 부위에서 조직 염색후의 전자현미경사진이며 왼쪽그림은 각각의 동일 부위의 형광현미경사진으로서 PP의 follicle에 입자가 흡수된 것을 보여준다. 이 결과는 Eldridge 등의 보고⁴⁶⁾에서 1-5 μm 입자가 흡수됨이 보고되었고 D는 회장 villi의 조직염색사진과 형광현미경사진으로 villi에 흡수된 입자를 관찰할 수 있다. 이 결과는 Eldridge 등의 보고⁴⁶⁾에서 5-10 μm 입자가 흡수됨이 보고되었다. 이러한 관찰결과는 본 실험에서 제조된 알긴산 마이크로스피어는 PP에 흡수가능성이 있다고 판단할 수 있다.

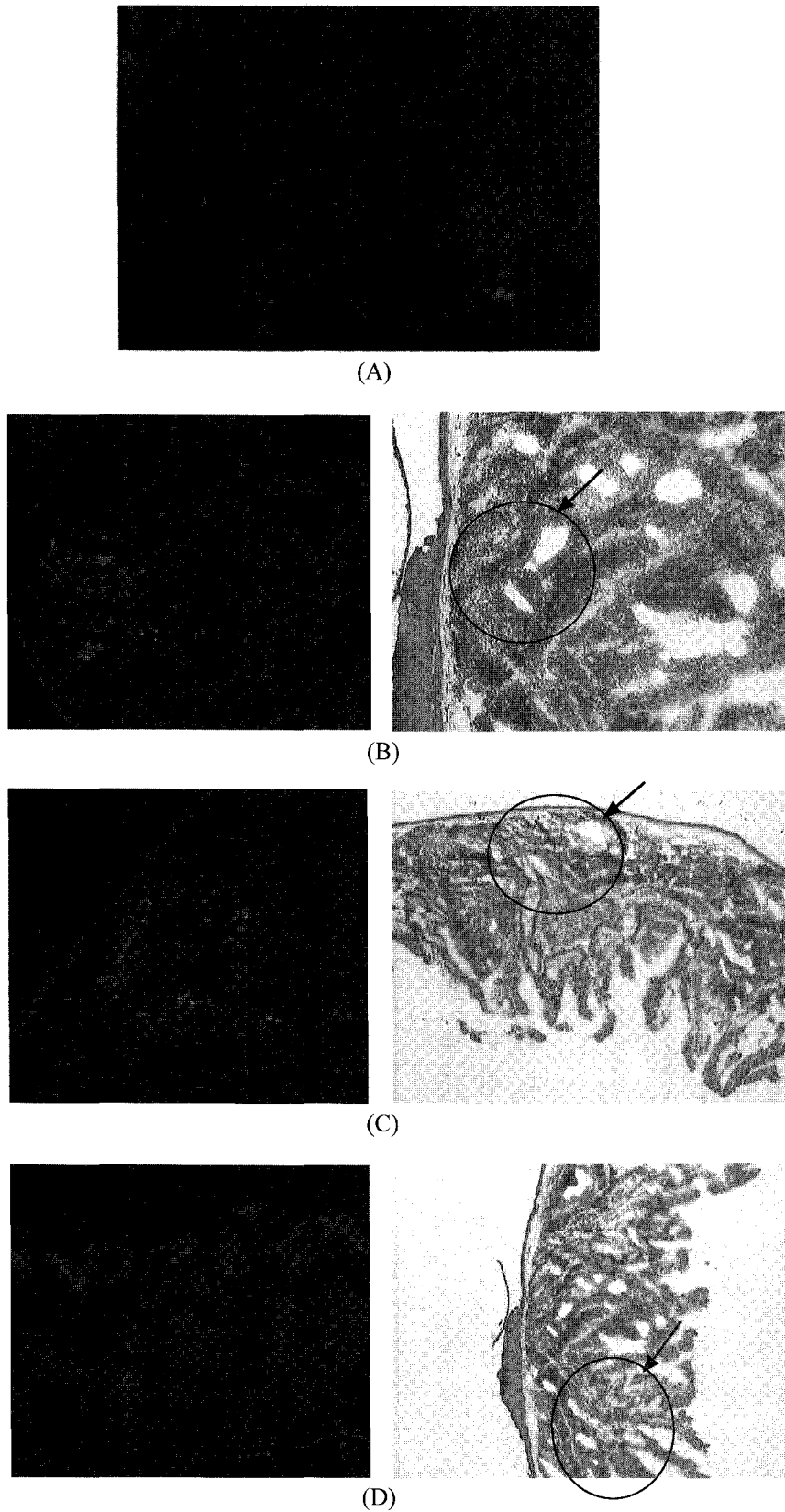


Figure 7—Image by confocal microscope and histological stain obtained of cryosections of rabbit ileal Peyer's patch segment. (A) Control; (B), (C) Follicle; (D) Villi.

결론

FITC-BSA 및 GFP를 모델 항원으로 하여 알긴산 마이크로스피어를 제조하였으며, 이 마이크로스피어를 poly-L-lysine 이나 키토산으로 코팅하였다. 마이크로스피어는 유화법과 분무법을 이용하여 제조하였으며, 항원의 봉입효율, 입자크기, 항원방출양상 및 Peyer's patch에서의 흡수 정도를 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 유화법을 이용하여 마이크로스피어를 제조한 결과, Span 80의 농도가 0.5% 및 1.0%일 때에는 흡윤된 마이크로스피어의 평균입자도가 6.64 μm 및 4.86 μm 이었으나, Span 80의 농도가 2%(w/w) 보다 높을 때에는 평균입자도가 1.2~1.4 μm 범위로 비슷하게 나타났다.

2. 유화법을 이용한 마이크로스피어의 봉입효율은 Span 80의 농도가 0.5%에서 2%로 증가함에 따라 증가하였으며, 4%에서는 급격히 감소하였다. 또한 유화속도가 증가할수록 입자도와 봉입효율은 감소하였다. 반대로 알긴산나트륨의 농도를 증가시키면 봉입효율이 증가하였다. 염화칼슘농도는 입자도와 봉입효율에 대해 큰 영향을 미치지 않았다.

3. 분무법을 이용하여 마이크로스피어를 제조한 결과, 흡윤된 마이크로스피어의 평균입자도는 6~12 μm 이었으며, 건조한 마이크로스피어의 입자도는 2-6 μm 범위를 나타내었다. 노즐의 압력이 1 kgf/m²에서 3 kgf/m²로 증가할 때 입자도는 감소하지만, 3 kgf/m² 보다 높으면 입자도는 영향을 받지 않았다. 염화칼슘농도가 증가할수록 입자도가 감소하였고, 7%(w/w) 이상에서는 입자도가 증가하나 전체적으로는 그 크기가 균일하지 않았다. 분무속도가 증가하면 입자도가 증가하였다.

4. 분무법을 이용하여 최적조건으로 제조한 경우 입자도와 항원 봉입효율은 알긴산나트륨의 농도가 증가할수록 입자도와 봉입효율이 증가하였다.

5. 분무법으로 제조된 알긴산마이크로스피어의 입자 크기는 유화법으로 제조된 것 보다 약간 크지만 10 μm 이하였으며, FITC-BSA의 봉입효율은 현저히 높게 나타났다. 그리고 분무법에서는 식물유와 계면활성제를 전혀 사용하지 않기 때문에 유화법에 비해 마이크로스피어의 회수가 용이하고 건조된 마이크로스피어를 쉽게 얻을 수 있었다.

6. 인공 위액, 장액 및 PBS액에서 항원 마이크로스피어로 부터의 항원 방출은 인공위액에서는 알긴산, 알긴산/poly-L-lysine 및 알긴산키토산 마이크로스피어 모두 항원이 방출되지 않았고, 장액과 PBS액에서는 알긴산/키토산 마이크로스피어의 방출이 가장 많이 억제되었다.

7. 제조된 알긴산/FITC-poly-L-lysine 마이크로스피어를 토

끼 회장에 투여하여 PP에 대한 흡수실험을 한 결과 마이크로스피어가 PP에 흡수됨을 알 수 있었다.

이상의 연구결과부터 경구용백신 마이크로스피어의 제조는 분무법이 더 양호하였으며 경구투여 제제의 개발 가능성이 있는 것으로 사료된다.

감사의 말씀

이 논문은 1998년도 충남대학교 자체연구비의 지원에 의하여 연구되었으므로 이에 감사드립니다.

문헌

- 1) C.A. Gilligan and A. Li Wan Po, Oral vaccines: design and delivery, *Int. J. Pharm.*, **75**, 1-24 (1991).
- 2) C.A. Gilligan and A. Li Wan Po, Oral enteric vaccine-clinical trials, *J. Clin. Pharm.*, **16**, 309-335 (1991).
- 3) T.L. Bowersock, H. Hogen Esch, M. Suckow, R.E. Porter, R. Jackson, H. Park and K. Park, Oral vaccination with alginate microsphere systems, *J. Control. Rel.*, **39**, 209-220 (1996).
- 4) J. Holmgren and C. Czerkinsky, Cholera as a model for research on mucosal immunity and development of vaccines, *Current Opinion in Immunology*, **4**, 387-391 (1992).
- 5) F.L. Owen, N.F. Pierce, R.T. Apple and W.C. Cray, Jr., M cell transport of *Vibrio cholerae* from the intestinal lumen into Peyer's patches: a mechanism for antigen sampling and for microbial transepithelial migration, *J. Infect. Dis.*, **153**, 1108-1118 (1986).
- 6) P.G. Jenkins, K.A. Howard, N.W. Blackhall, N.W. Thomas and D.T. O'Hagan, Microparticle absorption from the rat intestine, *J. Control. Rel.*, **29**, 339-350 (1994).
- 7) D.R. Burgess and J. E. Carless, Manufacture of gelatin/gelatin coacervate microcapsules, *Int. J. Pharm.*, **27**, 61-70 (1987).
- 8) D.J. Burgess, S.S. Davis, and E. Tomlinson. Potential use of albumin microspheres as a drug delivery system. I. Preparation and in vitro release of steroids. *Int. J. Pharm.*, **39**, 129-136 (1987).
- 9) S. Benita, J.P. Benoit, F. Puisieux, and C. Thies, Characterization of drug-loaded poly(D,L-lactide) microspheres, *J. Pharm. Sci.*, **73**, 1721-1724 (1984).
- 10) T. Sato, M. Kanke, H. Schroeder and P. DeLuca, Porous biodegradable microspheres for controlled drug delivery. I. Assessment of processing conditions and solvent removal techniques, *Pharm. Res.*, **5**, 21-30 (1988).
- 11) S.R. Jameela, N. Suma, and A. Jayakrishnan, Protein release from poly(epsilon-caprolactone) microspheres prepared by melt encapsulation and solvent evaporation techniques - a

- comparative study, *J. Biomater. Sci., Polym. Ed.*, **8**, 457-466 (1997).
- 12) K.K. Kwok, M.J. Groves, and D.J. Burgess, Production of 5-15 diameter alginate-polylysine microspheres by an air-atomization technique, *Pharm. Res.*, **8**, 341-344 (1991).
 - 13) 장혁, 박종필, 박손력, 황성주, 맹필재, 경구용 백신수송체용 GFP 함유 마이크로스피어의 제조 및 평가, *약제학회지*, **30**, 253-258 (2000).
 - 14) A.F. Yapel, Albumin microspheres: heat and chemical stabilization, *Methods in Enzymology*, **112**, 3-18 (1985).
 - 15) L.S.C. Wan, P.W.S. Heng and L.W. Chan, Influence of hydrophile-lipophile balance on alginate microspheres, *Int. J. Pharm.*, **95**, 77-83 (1993).
 - 16) F.G. Prendergast and K.G. Mann, Chemical and physical of Aequorin and the green fluorescent protein isolated from *Aequoea forskalea*, *Biochemistry*, **17**, 3448-3455 (1978).
 - 17) J.J. Torrado, L. Illum and S.S. Davis, Particle size and size distribution of albumin microsphere produced by heat and chemical stabilization, *Int. J. Pharm.*, **51**, 85-90 (1989).
 - 18) S.J. Hwang, M.G. Lee and C.K. Kim, Preparation and *In vitro* release characteristics of hydrophilic albumin microsphere containing methotrexate and methotrexate-human serum albumin conjugates, *Arch. Pharm. Res.*, **15**, 162-168 (1992).
 - 19) C.K. Kim and S.J. Hwang, Microencapsulation of Isoprinisin with ethylcellulose, *Arch. Pharm. Res.*, **14**, 298-304 (1991).
 - 20) N. Wakiyama, K. Juni and M. Nakano, Preparation and evaluation *in vitro* of poly(lactic acid) microsphere containing local anaesthetics, *Chem. Pharm. Bull.*, **29**, 3363-3368 (1981).
 - 21) K. Juni, 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**, 313-318 (1985).
 - 22) R. Bodmeier, and J. W. McGinity, Poly(lactic acid) microspheres containing quinidine base and quinidine sulphate prepared by solvent evaporation technique: II. Some process parameters influencing the preparation and properties of microspheres, *J. Microencapsulation*, **4**, 289-297 (1986).
 - 23) M. Cavalier, J.P. Benoit, and C. Thies, The formation and characterization of hydrocortisone loaded poly(d,l-lactide) microspheres, *J. Pharm. Pharmacol.*, **38**, 249-253 (1986).
 - 24) G. Spenlehauer, M. Veillard and J.P. Benoit, Formation and characterization of cisplatin loaded poly(d,l-lactide) microsphere for chemoembolization, *J. Pharm. Sci.*, **75**, 750-755 (1986).
 - 25) H. Jeffery, S.S. Davis and D.T. O'Hagan, The preparation and characterization of poly(lactide-co-glycolide) microparticles I. Oil-in-water emulsion solvent evaporation, *Int. J. Pharm.*, **77**, 169-175 (1991).
 - 26) D. Lemoine, F. Wauters, S. Bouchendhomme and V. Preat, Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen, *Int. J. Pharm.*, **176**, 9-19 (1998).
 - 27) N.H. Cho, S.Y. Seong, K.H. Chun, Y.H. Kim, I.C. Kwon, B.Y. Ahn and S.Y. Jeong, Novel mucosal immunization with polysaccharide-protein conjugates entrapped in alginate microspheres, *J. Control. Rel.*, **53**, 215-224 (1998).
 - 28) K.P. Lok and C.K. Ober, Particle size control in dispersion polymerization of polystyrene, *Can. J. Chem.*, **63**, 209-216 (1985).
 - 29) A.J. Paine, Dispersion polymerization of styrene in polar solvents. IV. Solvency control of particle size from hydroxypopyl cellulose stabilized polymerization, *J. Polymer Sci.*, **28**, 2485-2500 (1990).
 - 30) S. Magdassi and Y. Vinetsky, In "Microencapsulation Methods and Industrial Applications" (Benita, S. ed.), Marcel Dekker, New York, U.S.A., pp 21-33 (1996).
 - 31) C.K. Kim and E.J. Lee, The controlled release of blue dextran from alginate beads, *Int. J. Pharm.*, **79**, 11-19 (1992).
 - 32) M.M. Daly and D. Knorr, Chitosan-alginate complex coacervate capsule: effects of calcium chloride, plasticizers, and polyelectrolytes on mechanical stability, *Biotech. Progr.*, **4**, 76-81 (1998).
 - 33) L.S. Liu, S.Q. Liu, S.Y. Ng, M. Froix, T. Ohno and J. Heller, Controlled release of interleukin-2 tumour immunotherapy using alginate/chitosan porous microspheres, *J. Control. Rel.*, **43**, 65-74 (1997).
 - 34) D.T. O'Hagan, The intestinal uptake of particles and the implication for drug and antigen delivery, *J. Anat.*, **189**, 477-482 (1996).
 - 35) J. Seifert, B. Haraszti and W. Sass, The influence of age and particle number on absorption of polystyrene particles from rat gut, *J. Anat.*, **189**, 735-743 (1996).
 - 36) W. Sass, H. P. Dreyer and J. Seifert, Rapid insorption of small particles in the gut, *Am. J. Gastroenterol.*, **85**, 255-260 (1990).
 - 37) P.U. Jani, A.T. Florence and D.E. McCarthy, Further histological evidence of the gastrointestinal absorption of polystyrene nanospheres in the rat, *Int. J. Pharm.*, **84**, 245-252 (1992).
 - 38) C. Dange, M. Aprahamian and H. Marchais, Intestinal absorption of PLG microspheres in the rat, *J. Anat.*, **189**, 491-501 (1996).
 - 39) M.W. Smith, N.W. Thomas, P.G. Jenkins, N.G.A. Miller, D. Cremaschi and C. Porta, Selective transport of microparticles across Peyer's patch follicle-associated M cell from mice and rats, *Exp. Physiol.*, **80**, 735-743 (1995).
 - 40) J.P. Ebel, A method for quantifying absorption from the small intestine of the mouse. *Pharm. Res.*, **7**, 848-851 (1990).
 - 41) A.M. LeRay, M. Vert, J.C. Gautier and J.P. Benoit, Fate of [¹⁴C] poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles after intravenous administration to mice, *Int. J. Pharm.*, **106**, 201-211 (1994).
 - 42) G.M. Hodges, E.A. Carr, R.A. Hazzard and K.E. Carr, Uptake and translocation of microparticles in small intestine, *Dig. Dis. Sci.*, **40**, 967-975 (1995).
 - 43) J.H. Eldridge, C.J. Hammond, J.A. Meulbroek, J.K. Staas and T.R. Tice., Controlled vaccine release in the gut-associated lymphoid tissues. Part 1. Orally administered biodegradable

- microspheres target the Peyer's Patches, *J. Control. Rel.*, **11**, 205-214 (1990).
- 44) M.A. Jepson, N.L. Simmons, D.T. O'Hagan and B.H. Hirst, Comparison of poly(DL-lactide-co-glycolide) and polystyrene microsphere targeting to intestinal M-cells, *J. Drug Targeting*, **1**, 245-259 (1993).
- 45) A.T. Florence, A. Hillery, N. Hussain and P. U. Jani, Factor affecting the oral uptake and translocation of polystyrene nanoparticles: Histological and analytical evidence, *J. Drug Targeting*, **3**, 65-70 (1995).
- 46) N. Foster, M. Clark, A.M.A. Jepson. and B.H. Hirst, Ulex europaeus 1 lectin targets microspheres to mouse peyers patch m-cell *in vivo*, *Vaccine*, **16**, 536-541 (1998).
- 45) A.T. Florence, A. Hillery, N. Hussain and P. U. Jani, Factor