

마이크로니들시스템을 이용한 부펙사막의 경피전달

모종현 · 김윤태 · 박정수 · 이준희 · 이태원* · 강길선[†] · 이종문 · 이한구* · 이해방**

전북대학교 BK21 고분자 BIN 융합 사업팀
561-756 전북 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14
*(주)대화제약 중앙연구소
151-802 서울시 관악구 남현동 1056-17
**한국화학연구원 융합바이오기술연구센터
305-600 대전시 유성구 장동 100
(2007년 11월 28일 접수, 2007년 12월 29일 채택)

Transdermal Delivery of Bufexamac using Microneedle System

Jong Hyun Mo, Yun Tae Kim, Jung Soo Park, Jun Hee Lee, Tae-Wan Lee*, Gilson Khang[†],
John Moon Rhee, Han-Koo Lee* and Hai Bang Lee**

BK21 Polymer BIN Fusion Res. Team, Chonbuk National University, 664-14, 1-ga Deokjin-dong, Deokjin-gu, Jeonju, Jeonbuk 561-756, Korea

*Research Center, Daehwa Pharm. Co. Ltd., 1056-17 Namhyun-dong, Gwanak-gu, Seoul 151-802, Korea

**Fusion Bio Research Center, KRICT, 100 Jang-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-600, Korea

(Received 28 November 2007; accepted 29 December 2007)

요 약

아토피의 치료를 위해 사용되는 부펙사막은 연고제 형태로 사용되는 약물이다. 부펙사막은 피부 장벽효과에 의해 실제 전달되는 양은 매우 적다. 이러한 문제를 갖는 부펙사막의 피부전달 효율을 증가시키기 위하여 마이크로니들을 이용해 피부처리를 실시하였다. 약물의 피부투과량과 피부에서 약물의 전달형태를 알아보기 위하여 부펙사막에 FITC를 결합시켰으며 이를 포함하는 하이드로겔을 제조하여 피부에 도포하였다. 약물의 피부투과량을 확인하기 위해서 형광분광계를 사용하여 분석하였으며 약물의 전달형태를 확인하기 위하여 형광필터가 장착된 마이크로현미경을 사용하였다. 실험결과 마이크로니들로 처리된 피부에서 부펙사막의 피부투과량이 대조군에 비해 5~20배 이상 증가되었으며 마이크로니들 처리횟수가 증가함에 따라서 더 크게 증가될 수 있음을 확인하였다.

Abstract – Bufexamac which was used for treatment of atopic dermatitis is the drug which was made as the ointment. However, penetration rate of bufexamac was very low for the barrier effect of stratum corneum. Microneedle was used to increase transdermal delivery rate of the bufexamac. We tried to conjugate bufexamac and FITC for the detection of penetration rate of bufexamac. FITC-bufexamac was mixed in hydrogel for the treatment skin surface. Fluorescent spectrophotometer was used to analysis the concentration of FITC-bufexamac. Microscope using fluorescent filter was used to capture the image about location of FITC-bufexamac in the skin. We confirmed that permeation rate of bufexamac was increased with the treatment by microneedle and was increased by the increasing number treatment of microneedle.

Key words: Bufexamac, FITC, Microneedle, Hydrogel, Skin

1. 서 론

아토피 피부염은 피부에 가려움 및 습진 등의 증상이 나타나는 질병으로 신체의 내/외성적인 요인, 유전적인 요인, 면역학적인 요인 및 환경적인 요인들에 의해서 발생한다고 알려져 있으나 확실하게 발병원인은 밝혀지지 않았지만 피부의 보호막 성질에 문제가 발생하기 때문이라고 알려져 있다[1, 2]. 아토피 피부염을 치료하기 위

한 약물전달 방법으로서 경구투여용 제제인 정제 및 캡슐은 위장관의 연동운동과 pH 변화에 따른 약물방출의 조절이 어렵고 간 대사에 의한 약물의 생체이용률이 감소하는 문제가 존재한다[3-11]. 따라서 경구투여에서 발생하는 문제를 피하는 방법으로 약물의 간 대사를 피하고 치료 효율을 증가시키기 위하여 경피약물전달방법이 이용되고 있다[12].

본 연구에서는 모델약물로 사용된 부펙사막(Fig. 1)은 아토피성피부염, 급성습진, 접촉피부염, 대상포진, 피부염, 입 주위 피부염을 치료하기 위해 이용되며 난용성약물이지만 소염진통효과가 우수하고 비스테로이드형 약물이기 때문에 인체에 부담감을 줄여줄 수 있어

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: gskhang@chonbuk.ac.kr

[‡]이 논문은 약물전달기술 분야 특집 논문입니다.

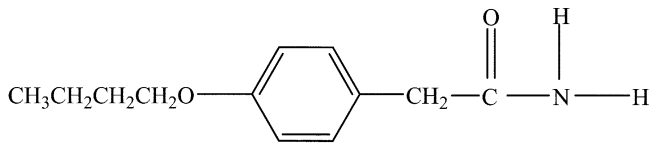


Fig. 1. The structure of bufexamac.

서 주로 아토피 피부염을 치료하기 위한 약물로 사용되고 있다[13]. 이러한 부펙사막을 이용한 제제로는 복합제와 단일제로 나뉘어 이용되며 단일제로는 닥터아토프림®(보령제약), 더모큐어연고®(동국제약), 아토키어연고®(한국슈벨제약), 퓨어케어연고®(대화제약)가 있으며 복합제로는 광동마스투에스연고®(광동제약), 마스비스연고®(보람제약)가 판매되고 있다.

본 연구에서는 경피투과약물전달을 위한 방법으로 연고제가 아닌 마이크로니들을 이용하여 피부투과도를 증가시키고자 하였다. 전보에서 마이크로니들을 이용하여 오발부민 및 인슐린 피부투과시투과도가 증가됨을 확인하였다[14-23]. 따라서 본 연구에서는 전보의 결과를 바탕으로 마이크로니들의 처리가 저분자량약물인 부펙사막의 피부투과도에 어떻게 영향을 미치는지를 관찰하였다. 약물의 피부투과량과 피부투과 이미지 측정을 위하여 부펙사막에 fluorescence isothiocyanate(FITC)를 결합시켜 이용하였으며 일반적인 경피투과실험에서 사용되는 무모쥐(hairless mouse)[24]의 피부에 마이크로니들의 처리 횟수를 달리하여 처리 횟수에 따른 피부투과도를 형광분광광도계와 형광현미경을 이용하여 측정하였다.

2. 실험

2-1. 시약 및 재료

본 연구에서 모델 약물로써 이용한 부펙사막은 분자량이 223.3 g/mol이며 Sigma-Aldrich Co.,(St. Louis, MO, USA)에서 구입을 하여 사용하였고, 약물의 분석을 위해서 사용되는 FITC(≥90%)는 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하여 사용하였다. 하이드로겔의 재료로써 사용되는 카보폴 940NF는 Noveon, Inc.,(Cleveland, USA)에서 구입하였다. 카보폴의 첨가제인 트리에탄올아민(≥98%)은 Sigma-Aldrich Co.에서 구입하였다. 약물의 여과를 위한 투석막(MWCO: 1,000 g/mol, 500 g/mol, Spectra/Por®)은 Spectrum Lab. Inc.(Rancho Dominguez, CA, USA)에서 구입하였다.

2-2. 마이크로니들

실험에 사용된 마이크로니들(Fig. 2)은 직경이 1.43 cm이며 길이가 2.8 cm인 원통형 막대에 마이크로 크기의 니들을 장착하였다. 이는 레이저에칭에 의해서 만들어진 니들이 위치되어 있는 원형 스테인리스 강판과 그보다 작은 반경을 가지는 원형 스테인리스 강판의 2가지를 준비하고 이들을 서로 교차적으로 겹쳐지도록 연결하여 제작하였다(Table 1). 이렇게 제작된 마이크로니들은 피부에 1회 이상 반복적인 처리가 가능하며, 사용 후 간편한 소독 및 세척을 통해서 재사용이 가능하였다.

2-3. 피부 전처리

실험에 사용되는 피부는 무모쥐(type SKH, 6주령, Orient Co., Ltd., Korea)의 것을 사용하였으며 구입한 후 사용하기 하루 전에 머리 부분과 다리 부분사이의 피부 중 복부 및 등 피부를 모두 적출

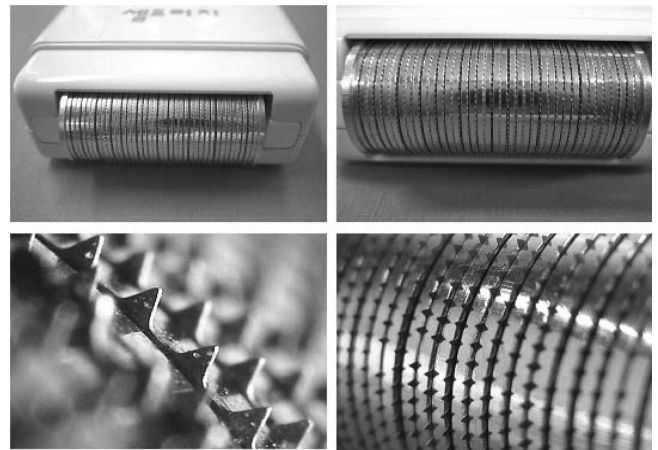
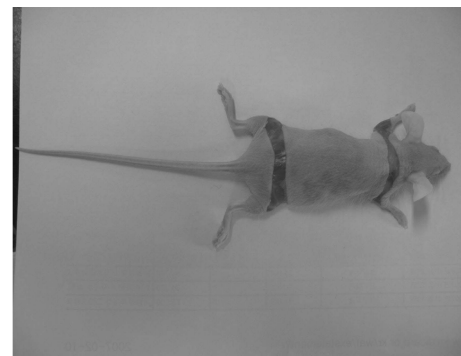


Fig. 2. The structure of microneedle system.

Table 1. The specification of microneedle system

Part of microneedle system	Value
Diameter	1.43 cm
Length	2.8 cm
Radius	0.75 cm
Surface area	12.58 cm ²
Number of total needle	3,360 ea
Height of needle	230 μm
Line interval	740 μm
Number of needle per line	93 ea
Distance between needle	580 μm
Total needle per line	36 ea
Needle tip diameter	56 μm



(a)



(b)

Fig. 3. The skin incision image of hairless mouse, (a) dorsal skin and (b) abdominal skin.

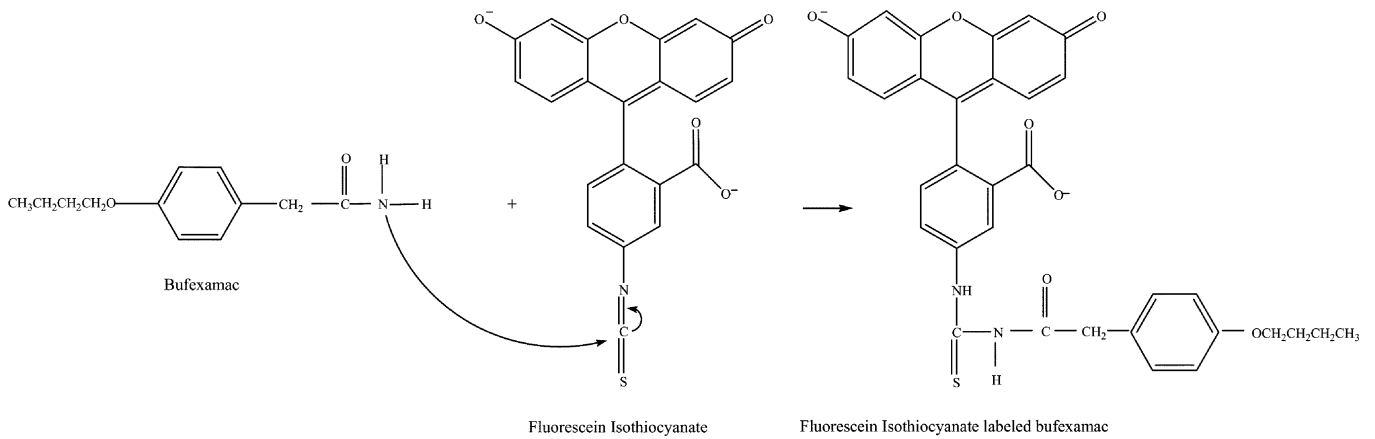


Fig. 4. Reaction of FITC and drug conjugation.

하여 사용하기 전까지 -4 °C에서 냉동보관 하였다(Fig. 3).

2-4. FITC와 부펙사막의 라벨링

Fig. 1에서 확인한 바와 같이 부펙사막은 끝부분에 NH- 그룹을 가지고 있다. 따라서 Fig. 4에서와 같이 FITC에서 반응성이 큰 말단부에 위치한 -C- 부분과 부펙사막의 NH- 그룹은 서로간의 결합이 가능하다. 부펙사막과 FITC의 결합을 위하여 용매로는 10 mL 디메틸설폭사이드를 사용하였다. 이에 부펙사막 0.5 mg을 넣어서 완전히 혼합하였으며 혼합된 액체는 4 °C의 냉암소에 보관하여 완전히 빛을 차단하였다. 약 10분정도 지난 후 FITC를 0.6 mg을 첨가하고 혼합용액이 담겨진 플라스크는 부펙사막과 FITC의 결합이 완전하게 이루어지도록 24시간 동안 혼합해 주었다. 이후, 용액은 투석막에 넣어 남아있는 부펙사막 및 FITC를 완전하게 3차 증류수를 이용하여 제거하여 주었다. 그 후, DMSO의 잔여량을 제거하기 위하여 감압건조기내에서 6시간 이상 건조하였고 재차 동결건조기를 이용하여 건조하여 사용시까지 FITC-부펙사막은 4 °C의 냉암소에 보관하였다.

2-5. 하이드로겔의 제조

하이드로겔의 제조를 위하여 3 g의 카보폴 940 NF를 인산염완충용액(PBS, pH 7.4) 10 mL에 넣어 완전하게 분산시켜 주었다. 분산된 겔에 FITC-부펙사막을 0.05 mg을 넣어서 다시 분산시켜 주었다. 약물이 분산된 겔은 점도의 증가를 위해서 10 v/v% 트리에탄올아민 1 mL을 넣어 주었다. 마지막으로 준비된 겔은 숙성을 위해서 20~24시간 동안 4 °C 냉암소에 보관하였다.

2-6. 마이크로니들 처리 및 생체의 방출거동

준비한 무모 쥐의 피부는 실험시작 20분전에 상온에서 해동해 주고, 이를 0.9 % 소금물에서 수화시켜 주었다. 수화된 피부는 마이크로니들에 의해서 처리되지 않은 그룹과 2회 및 4회 처리한 그룹의 3가지 형태로 준비되었는데, 피부는 모두 2x2 cm²의 면적으로 잘라 각 그룹 당 세 개씩(n=3)을 준비하였다. 피부에 대한 마이크로니들의 처리 및 하이드로겔의 도포는 Fig. 5에서의 과정으로 진행되었는데, 준비된 피부는 (a)와 같이 평평한 스트로폼에 밀착시켜 주고 (b)의 형태로 피부의 각질층에 마이크로니들을 이용하여 처리하였다. 마이크로니들에 의해서 처리된 피부의 각질층은 (c)와 같이 마

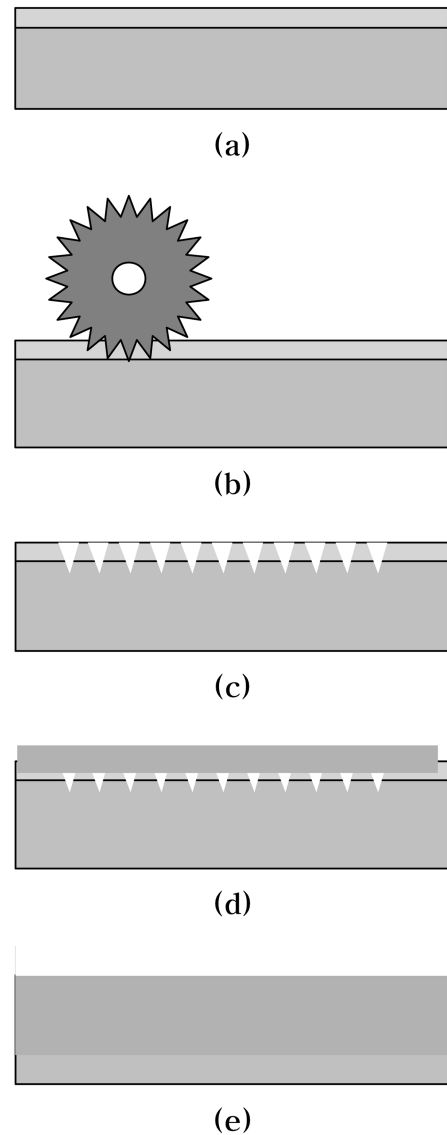


Fig. 5. Procedure of treatment of skin by microneedle system and absorption of hydrogel through skin. (a) prepared skin, (b) treatment on the skin by using microneedle, (c) holes of skin surface, (d) application of hydrogel skin surface with holes, (e) absorption of hydrogel in skin through holes.

이크로니들에 의해서 공극이 형성되었다. 공극이 형성된 피부에는 (d)와 같이 하이드로겔을 도포하여 주었다. 하이드로겔이 도포된 후 약물은 (e)와 같이 피부내로 확산되었다.

3가지 그룹의 피부는 프란츠확산셀의 도너 부분에 위치시켜주었고, 프란츠확산셀의 내부에는 신선한 PBS 4 mL을 넣어주었다. 이후에 리셉터 부분을 마개를 이용하여 막아주고 암실처리가 된 37 °C 인큐베이터 안에 넣어주었다. 방출실험은 총 12시간동안 2시간 간격으로 2 mL의 PBS를 채취하고, 프란츠 확산셀에 남아있는 2 mL을 제거한 후 신선한 PBS 4 mL을 넣어주는 방식으로 진행되었다. 방출결과의 측정을 위하여 형광분광광도계(fluorescent spectrophotometer, Hitachi : ex. 495 nm, em. 520 nm)를 사용하였다.

2-7. 처리한 피부의 형광 및 H&E 이미지 확인

피부의 표면에서 마이크로니들에 의해서 생성된 공극의 유무 및 부폐사막의 침투형태를 확인하기 위하여 마이크로현미경(Nikon Clipse TE2000-U, Nikon Inc., Melville, NY, USA)을 이용하여 형광필터를 장착한 후 100배 배율로 마이크로 니들에 의해서 2회 처리된 피부를 방출 실험 2시간과 12시간 후 형광이미지를 촬영하였다. 또한, 마이크로니들에 의해서 생성된 공극의 시간에 따른 변화와 피부내부의 형태를 조직학적인 방법으로 확인하기 위하여, 실험 2시간과 12시간 후 2회 처리된 피부조직을 무수알코올에 12시간 고정하고 일련의 조직처리과정을 통해서 파라핀 블록을 제작하여 3 μm로 박절하여 슬라이드에 고정한 뒤 헤마톡실린과 에오신으로 각각 핵과 세포질을 염색하여 마이크로현미경으로 H&E 이미지를 촬영하였다. 형광 필터는 FITC가 포함된 약물 및 그 자체를 녹색을 띠는 이미지로써 나타내게 되는데 이를 이용하면 피부에 FITC가 포함된 약물이 확산된 형태 및 마이크로니들의 영향을 받아 피부가 변형된 형태를 확인할 수 있다[25].

3. 결과 및 고찰

3-1. 마이크로니들의 처리 횟수에 따른 약물의 방출경향

전보[18, 22, 23]에서는 단백질약물인 오발부민과 인슐린을 이용한 경피투과 실험을 실시하였다. 단백질약물의 경피투과를 위하여 마이크로니들을 사용하였으며 분자량이 낮은 약물이 피부투과율이 더 높다는 결과를 얻을 수 있었다. 이것은 분자량이 작은 약물의 경우 표면적이 작기 때문에 마이크로니들 처리에 의하여 형성된 피부 공극에 의하여 약물이 피부를 투과하기가 더 용이하기 때문이었다. 또한 하이드로겔을 이용하여 약물방출을 실시하였을 경우 하이드로겔에 의한 약물의 확산이 더 활발히 일어나기 때문에 더 빠르고 높은 약물의 피부투과율을 갖는 것을 확인하였다.

이러한 결과를 기초로 하여 마이크로니들의 처리 횟수에 따른 FITC가 결합된 부폐사막의 피부투과 농도를 측정된 결과는 Fig. 6에 제시하였다. 세 그룹에서 시간이 지남에 따라 피부투과량이 점차 증가되는 것을 확인할 수 있었다. FITC-부폐사막은 마이크로니들에 의해서 처리된 피부에 적용하여도 시간에 따라서 일정한 약물 방출결과를 기대할 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 마이크로니들을 처리하지 않은 대조군에서 약물의 방출량은 크지 않았지만 마이크로니들을 2회 처리한 그룹(2R)은 5배 정도의 증가를 보였고 4회 처리한 그룹(4R)은 20배 정도의 증가를 확인하여 피부처리 횟수를 증가시킬수록 큰 투과량을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로

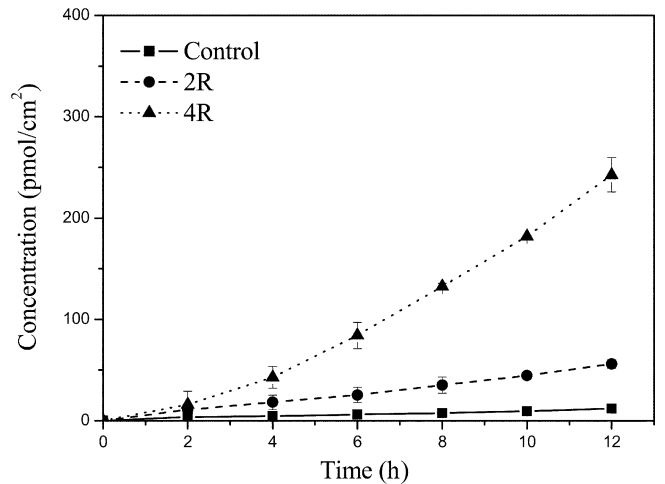
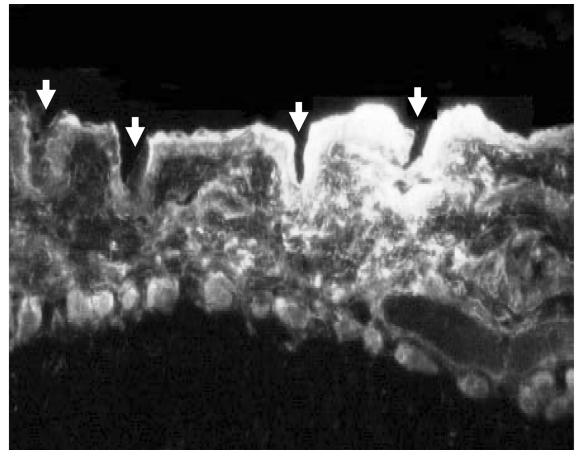
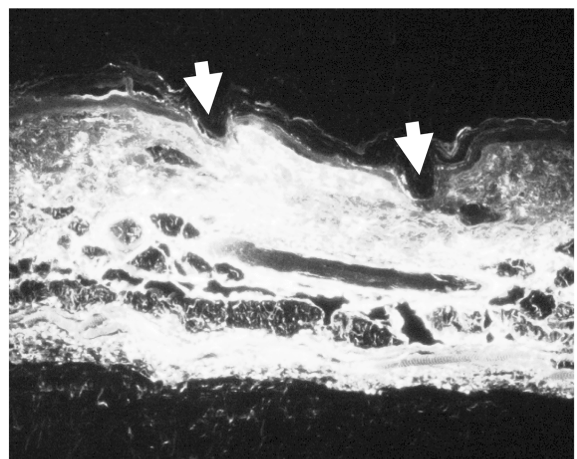


Fig. 6. Skin permeated concentration of FITC-bufexamac (Control : non treated microneedle, 2R : 2 times treatment and 4R : 4 times treatment of microneedle).



(a)



(b)

Fig. 7. The cross-section image of epidermis, (a) after 2 h, (b) after 12 h (magnification: × 100).

로 마이크로니들을 사용하면 피부에 형성된 미세공극에 의하여 약물의 피부투과도가 증가된다는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 4회 처리한 그룹이 2회 처리한 그룹에 비해서 4배 이상 증

가하는 것을 볼 수 있었으며 이는 피부에 마이크로니들을 처리함에 따라서 일정한 피부면적당 만들어지는 공극의 수가 증가되기 때문이며 같은 지점을 2회 이상 처리하게 되었을 때는 그 공극의 크기가 처음의 크기에 비해서 더욱 커지게 되어 피부의 복원 기능을 저하시키기 때문으로 사료된다[27-28].

3-2. 형광 및 H&E 이미지 확인

마이크로니들을 이용하여 2회 처리한 그룹의 피부를 생체의 방출 실험 시작 후 2시간과 12시간 후에 측정한 형광 현미경 사진을 Fig. 7에 제시하였다. (a)와 (b)에서 보이는 것처럼 윗부분의 녹색에 옅고 굴곡이 많은 부분이 각질층이며, 아랫부분이 진피층이라는 것을 형성된 피부 공극에 의하여 확인할 수 있었다.

Fig. 7의 (a)와 (b) 모두에서 약물이 피부의 내부까지 전달되어 피부가 전체적으로 녹색을 띠는 것을 볼 수 있었으며, 실험 2시간 후인 (a)의 경우 화살표가 위치한 부분에서 형성된 날카로운 골 모양에서 마이크로니들에 의하여 각질층에 확실한 공극을 형성하였음을 알 수 있었고 12시간 후인 (b)의 경우 골 모양이 날카롭지 않게 변화된 것을 알 수 있었다. 또한, (a)의 경우 피부표면의 골 모양 주변으로 진한 녹색이 나타나며 (b)의 경우 피부표면의 골 모양으로부터 피부의 중앙부분으로 진한 녹색을 띠는 것을 볼 수 있었는데 이를 통하여 약물이 마이크로니들에 의해서 형성된 공극 및 각질층을

통해서 피부내부로 이동한 후 확산에 의해서 넓게 흡수되었다는 것과 마이크로니들에 의해 형성된 피부공극을 통해서 좀 더 많은 양의 약물을 전달할 수 있음을 확인하였다. Fig. 8에는 대부분의 조직학적 분석에 사용되는 방법으로 보라색으로 핵을 염색하고 세포질 및 섬유소를 분홍색으로 염색함으로써 핵의 변성유무, 세포의 분화형태 및 그것을 포함하는 담체에 대한 구조적 형태에 대한 것을 확인할 수 있는 방법[26]으로 사용되는 H&E 사진을 통하여 마이크로니들에 의해서 형성된 공극의 시간에 따른 변화와 피부내부의 형태를 확인하였는데, 실험 2시간 후인 (a)에서 화살표가 위치한 부분에 깊은 골이 발견되어 Fig. 7의 (a) 같이 피부표면에 마이크로니들에 의해서 확실한 공극이 형성되었음을 알 수 있었고 12시간 후인 (b)에서는 화살표 부분에서 피부표면방향으로의 공극이 대부분 사라지고 피부내부에 작은 공극의 흔적만이 남아 있어 시간이 지남에 따라 공극의 크기가 줄어든다는 것을 확인하였다. 이는 피부에 상처가 발생하게 되었을 때 시간이 지남에 따라 피부의 복원이 일어나기 때문인 것으로 사료된다[27-28]. 피부를 통한 약물의 전달은 세포간 투과경로, 세포내 투과경로, 땀샘 및 모낭을 이용하여 약물을 전달시킬 수 있는데 각질세포의 친유성성질에 의하여 많은 제약을 받고 있다. 그러나 마이크로니들을 이용하게 되면 완전한 피부공극을 형성시키므로 각질세포의 친유성성질을 피할 수 있으므로 경피약물전달에 더 용이할 수 있음을 Fig. 7의 형광 및 Fig. 8의 H&E 사진을 통하여 확인할 수 있었다.

4. 결 론

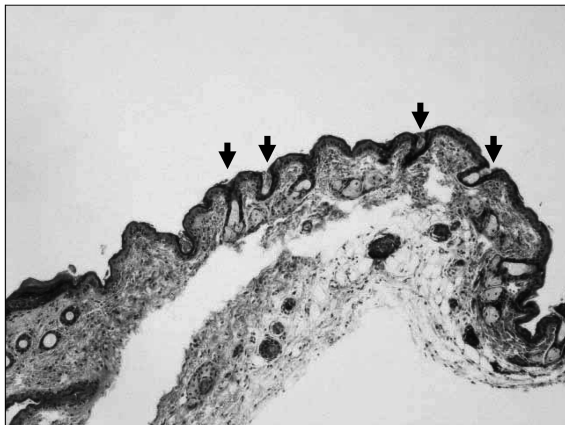
부핵사막은 아토피의 치료를 위해서 사용되는 약물로써 크림이나 연고제의 형태로 만들어지는데 피부 장벽효과에 의해 피부투과도가 매우 낮은 문제가 있다. 이러한 문제를 해결하기 위해 본고에서 마이크로니들을 사용하여 피부처리 횟수에 따라서 부핵사막의 피부투과도가 증가될 수 있음을 확인하였다. 또한, 마이크로니들의 처리 횟수가 증가할수록 더욱 많은 양의 부핵사막이 방출되는 것으로 보아 마이크로니들의 처리 횟수를 증가시킬 필요성이 있음을 알 수도 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 피부전달을 위해서 마이크로니들을 사용하면 약물의 사용량을 줄일 수 있는 가능성을 확인할 수 있었다. 현재 마이크로니들의 수회 처리 후 약물의 피부투과도와 표면 손상도의 상관관계를 확인하는 실험을 진행 중이다.

감 사

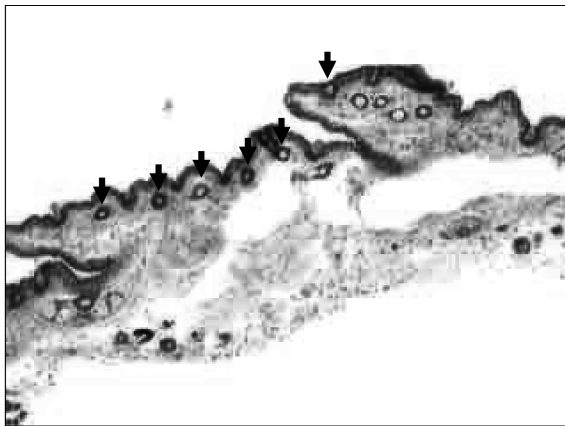
본 연구는 산업자원부 차세대성장동력사업(KMOCIE, 10016551)의 지원으로 이루어져 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Mihara, K., Kuratani, K., Matsuim, T., Nakamura, M. and Yokota, K., "Vital Role of the Itch-scratch Response in Development of Spontaneous Dermatitis in NC/Nga Mice"; *Br. J. Dermatol.*, **151**, 335-345(2004).
2. Homey, B., Steinhoff, M., Ruzicka, T. and Leung, D. Y., "Cytokines and Chemokines Orchestrate Atopic Skin Inflammation"; *J. Allergy Clin. Immunol.*, **118**, 178-189(2006).
3. Lee, H. B., Khang, G. and Lee, J. H., "CRC Biomedical Engi-



(a)



(b)

Fig. 8. Photographs of histochemical staining for H&E, (a) after 2 h, (b) after 12 h (magnification: × 100).

- neering Handbook, 2nd Edition,' **39**, 581-597(2000).
4. Lee, H. B., Khang, G. and Cho, J. C., "In Controlled Drug Delivery: Designing Technologies for the Future," *ACS Symp.*, **752**, 385-394(2000).
 5. Lee, C. R., Kim, M. S., Khang, G., Lee, H. K., Rhee, J. M. and Lee, H. B., "Pressure-Sensitive Adhesives for Transdermal Drug Delivery System," *Tissue Eng. Regen. Med.*, **3**(2), 85-95(2006).
 6. Khang, G., Seong, H. and Lee, H. B., "Sustained Delivery of Drugs with Biodegradable Polymers, In Advanced in Biomaterials and Drug Delivery Systems," Edited by G-H. Hsuie, T. Okano, Y. U. Kim, H-W Sung, N. Yui and K. D. Park, Princeton Inter. Pub. Co. Ltd., Taipei, Taiwan, 537-558(2002).
 7. Ko, J. T., Jung, H. J., Mo, J. H., Cho, J. S., Yuk, S. H., Shin, H. S., Kim, M. S., Rhee, J. M., Lee, H. B. and Khang, G., "The Double-layered Microsphere: Encapsulation of Water-soluble Protein with PLGA," *Key Eng. Mater.*, **342**, 513-516(2007).
 8. Khang, G., Choi, H. S., Rhee, J. M., Yoon, S. C., Cho, J. C. and Lee, H. B., "Controlled Release of Gentamicin Sulfate from PHBV Wafers for the Treatment of Osteomyelitis," *Korea Polymer J.*, **8**(6), 253-250(2000).
 9. Seo, S., Choi, H. S., Lee, D. H., Khang, G., Rhee, J. M., and Lee, H. B., "Characteristics of Nifedipine Loaded PLGA Wafer," *Polymer(Korea)*, **25**, 884-892(2001).
 10. Lee, J. S., An, T. K., Shin, P. K., Chae, G. S., Jeong, J. K., Lee, B., Cho, S. H., Khang, G. and Lee, H. B., "In Vitro Antitumor Activity of BCNU/PLGA Wafer Containing Additives," *Polymer(Korea)*, **27**(3), 217-225(2003).
 11. Khang, G., Ku, J., Lee, B. and Lee, H. B., "Controlled Release of Nifedipine by Osmotic Tablet," *Biomater. Res.*, **4**(1), 20-27(2000).
 12. Hebert, A. A., "Review of Pimecrolimus Cream 1% for the Treatment of Mild to Moderate Atopic Dermatitis," *Clinical Therapeutics*, **28**(12), 1972-1982(2006).
 13. Wolfram, H. W., Ecker, R., Kopp, T., Stuetz, A., Stingl, G. and Elbe-Bu Rger, A., "Pimecrolimus Leads to an Apoptosis-induced Depletion of T Cells But not Langerhans Cells in Patients with Atopic Dermatitis," *J. Allergy. Clin. Immun.*, **115**(6), 1276-1283 (2005).
 14. Raison-Peyron, N., "Hypersensitivity/Intolerance Aux AINS - Multiples Aspects Cliniques? Hypersensitivity/intolerance to NSAID: Multiple Clinical Features?," *Revue Francaise D'allergologie et D'immunologie Clinique*, **47**, 55-59(2007).
 15. Michaels, A. S., Chandrasekaran, S. K. and Shaw, J. E., "Drug Permeation Through Human Skin: Theory and In Vitro Experimental Measurement," *Am. Inst. Chem. Eng. J.*, **21**, 985(1975).
 16. Potts, R. O. and Francoeur, M., "The Influence of Stratum Corneum Morphology on Water Permeability," *J. Invest. Dermatol.*, **96**(4), 495-499(1991).
 17. Rauma, M., Isaksson, T. S. and Johanson, G., "A New Technique to Assay Dermal Absorption of Volatile Chemical In Vitro by Thermal Gravimetric Analysis," *Toxicology In Vitro*, **20**, 1183-1187(2006).
 18. Mo, J. H., Kim, M. S., Khang, G., Lee, T. A., Lee, H. K., Rhee, J. and Lee, H. B., "Transdermal Microneedle for Drug Delivery Applications," *Tissue Eng. Regen. Med.*, **4**(2), 174-278(2007).
 19. Nolan, L. M., Corish, J., Corrigan, O. I. and Fitzpatrick, D., "Combined Effects of Iontophoretic and Chemical Enhancement on Drug Delivery. II. Transport Across Human and Murine Skin," *Int. J. Pharm.*, **341**(1-2), 114-124(2007).
 20. Raders, P., Aubry, M., Friberg, M., Huygens, C. and Koch, T., "Nurses' Views on Ease of Patient Care in Postoperative Pain Management," *Br. J. Nurs.*, **16**(5), 312-317(2007).
 21. Lin, S. Y., "Chronotherapeutic Approach to Design a Thermoresponsive Membrane for Transdermal Drug Delivery," *Curr Drug Deliv.*, **1**(3), 249-263(2004).
 22. Lee, C. R., Kim, M. S., Lee, H. B., Lee, H. K., Rhee, J. M. and Khang, G., "The Effect of Molecular Weight of Drugs on Transdermal Delivery System Using Microneedle Device," *Key Eng. Mater.*, **342-343**, 945-948(2007).
 23. Jang, W. Y., Lee, C. R., Seo, S. M., Lee, B., Kim, M. S., Khang, G., Lee, H. G. and Lee, H. B., "Transdermal Delivery of FITC-Ovalbumin with Microneedle System," *J. Kor. Pharm. Sci.*, **35**(6), 403-409(2005).
 24. Ito, K., Kato, Y., Tsuji, H., Nguyen, H. T., Kubo, Y. and Tsuji, A., "Involvement of Organic Anion Transport System in Transdermal Absorption of Flurbiprofen," *J. Control. Release*, **124**, 60-86(2007).
 25. Schwindling, S. L., Michael, F. and Montenarh, M., "Determination of the Mitotic Index by Microinjection of Fluorescently Labelled Tubulin," *Eur. J. Cell Biol.*, **81**, 169-174(2002).
 26. Kim, S. H., Yun, S. J., Jang, J. W., Kim, M. S., Khang G. and Bang, H. B., "Effects of SIS/PLGA Porous Scaffolds and Muco-scle-Derived Stem Cell on the Formation of Tissue Engineered Bone," *Polymer(Korea)*, **30**(1), 14-21(2006).
 27. Wang, P. M., Cornwell, M., Hill, J. and Prausnitz, M. K., "Precise Microinjection into Skin Using Hollow Microneedles," *J. Invest. Dermatol.*, **126**, 1080-1087(2006).
 28. Martanto, W., Moore, J. S., Couse, T. and Prausnitz M. R., "Mechanism of Fluid Infusion During Microneedle Insertion and Retraction," *J. Control. Release*, **112**, 357-361(2006).