

마이크로 피부침을 이용한 FITC-OVA의 경피흡수

장우영* · 이창래* · 서성미** · 이 봉** · 김문석*** · 강길선**** · 이한구**** · 이해방****

*전북대학교 고분자·나노공학과, **부경대학교 고분자공학과

한국화학연구원 생체의료고분자팀, *디에스엔지

(2005년 7월 20일 접수 · 2005년 8월 8일 재심사 · 2005년 8월 26일 승인)

Transdermal Delivery of FITC-Ovalbumin with Microneedle System

Woo Young Jang*, Chang Rae Lee*, Seong-Mi Seo**, Bong Lee**, Moon Suk Kim***,
Gilson Khang****, Han Gu Lee**** and Hai Bang Lee****

*Department of Polymer Nano-Science and Technology, Chonbuk National University, 664-14, Dukjin, Jeonju 561-756, Korea

**Department of Polymer Engineering, Pukyong National University, 559-1, Yongdang, Pusan 608-739, Korea

***Nanobiomaterials Laboratory, Korea Research Institute of Chemical Technology, P. O. Box 107, Yuseong, Daejeon 305-600, Korea

****DS&G Co. Ltd., 1056, Namhyun, Seoul 151-080, Korea

(Received July 20, 2005 · Revised August 8, 2005 · Accepted August 26, 2005)

ABSTRACT—For transdermal delivery of large molecular drugs such as vaccine and protein drugs, novel microneedle treatment device with roll was designed. The roll dimension is 1.43 cm diameter and 2.8 cm perimeter. Total number of microneedle on the roll is 3,360 with 230 μm height and 740 μm distance. The pore with 150 μm depth and 35 μm diameter on the skin was made by the designed microneedle device. This system could be achieved without pain. The permeation rates of FITC labelled ovalbumin (FITC-OVA, molecular weight : 45,000 g/mol) as a model protein were determined by modified Franz diffusion cells using skins of hairless mice or SD rats which were treated by using microneedle device two or four times. The average penetration fluxes of model protein increased from 674 to 872 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{hr}$ as the number of treatment to make pore increased from two to four times. In conclusion, we confirmed the possibility of using the designed microneedle treatment device for transdermal delivery of the large molecular drugs.

Key words—OVA, FITC, Transdermal, DDS, Microneedle system

약물을 경구투여 할 경우 체내에서 위, 간, 및 소장관내에서 효소에 의한 분해로 인해 약물의 유효량이 흡수되기 어렵다.¹⁻⁵⁾ 이러한 방해 요소들을 피해 쉽게 약물을 투여하기 위한 방법이 주사이다. 그러나 주사는 약물 투여시의 통증을 유발하고 투여 후에도 약물에 의한 동통을 유발하기도 한다. 주사이외의 방법으로는 패취제제이다. 이러한 경피제제를 사용하여 피부를 통하여 약을 주입시키는 것은 우선 위의 부담을 없애고, 위에서의 약물의 분해를 막을 수 있으며, 또 위장에서 흡수된 약이 간에서 초회통과효과를 받는 문제점을 피할 수 있으며, 또 오랫동안 약물의 혈중농도를 일정하게 유지시켜 주는 편리함이 있으므로 큰 관심의 대상이 되고 있다.⁶⁻⁸⁾

그러나 이런 관심에도 불구하고 연구가 시작된지 30 여년이 지난 지금에 이르러서도 극히 제한된 수의 약물만이 경

피제제로 개발되었을 뿐이다. 그 이유는 피부는 매우 우수한 보호막이어서 쉽게 약물을 통과시키지 않기 때문에 이러한 제제로 활용할 수 있는 약물은 극히 제한적일 수밖에 없다는 것이다. 이에 약물의 피부 침투력을 증가시키기 위한 연구들이 수행되었으며 그 결과 화학적/지질 침투증진제 개발,^{9,10)} 이온영동이나 전기영동 등의 전기장을 응용하는 방법,^{11,12)} 초음파 또는 광과장 효과 등을 이용한 압력과장 등을 이용한 방법^{13,14)}들이 개발되었다. 서로 다른 메커니즘에도 불구하고 이러한 방법들은 피부의 각질을 통과할 수 있는 충분히 큰 구멍을 생성시킨다는 것이다.¹⁵⁻¹⁹⁾ 이러한 방법들 외에 마이크로 피부침을 이용한 방법이 있는데 최근에는 실리콘이나 금속으로 제조된 마이크로 피부침을 피부 내에 삽입하여 피부에 마이크로 크기의 구멍을 만들어 약물의 피부 침투에 관한 연구가 진행되어 왔다.²⁰⁾ 이 방법들과 더불어 나노미터 크기의 약물이나 일반적으로 피부를 통해 주입하기 힘들었던 단백질 및 백신 등의 약물을 저장하거나 투여할 수 있는 수단인 패취, 하이드로젤, 및 연고제제 형태

†본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
Tel : 063)270-2336, E-mail : gskhang@chonbuk.ac.kr

등이 연구되었고 이를 이용하여 거대 분자의 약물 등을 체내로 전달시킬 수 있게 되었다.²¹⁻³⁴⁾

이 실험에서는 위의 방법들과 유사한 방법으로 다양한 크기의 약물분자가 충분히 통과할만한 크기의 구멍을 피부에 생성시킬 수 있는 연속적 마이크로 피부침 시스템을 고안하였다. 일반적으로 항원특성이 좋고 백신 약물의 모델 항원으로 자주 쓰이는 오발부민(OVA)을 이용하여 향후 백신 약물의 실험을 위한 전 단계의 실험을 수행하게 되었다. FITC-오발부민을 이용하여 피부 투과량을 측정하였고 형광현미경을 통하여 시간에 따른 약물투과 침투현상을 확인하여 본 연구 시스템의 경피전달 시스템으로의 가능성을 확인하려 하였다.

실험 방법

시약 및 기구

OVA(분자량 : 45,000 g/mole, grade, 순도 98%)와 형광 치오아이소시아네이트(FITC : 순도 약 90%)는 Sigma-Aldrich Chem. Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였고 한외여과막(MWCO : 12,000~14,000 g/mole, Spectra/Por[®])은 Spectrum Laboratories Inc.(Rancho Dominguez, CA, USA)의 것을 사용하였다. 형광 분광계(F-4500, Hitachi, Japan)를 이용하여 농도와 투과량을 측정하였다. 연속적 마이

크로 피부침 시스템(Figure 1)은 롤러형태의 모양으로 제작되었으며 이것을 사용하여 무모생쥐와 SD 쥐의 피부를 처리하였다. 약물의 피부통과를 측정하는 확산셀은 내부 부피가 5 mL인 Franz 형태의 것을 제작하여 사용하였다(Figure 2).

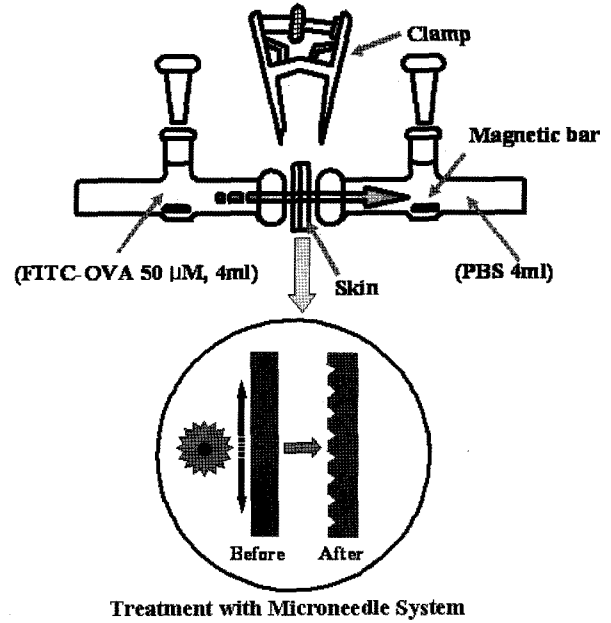


Figure 2—Schematic diagram of modified Franz diffusion cell for flux experiment.

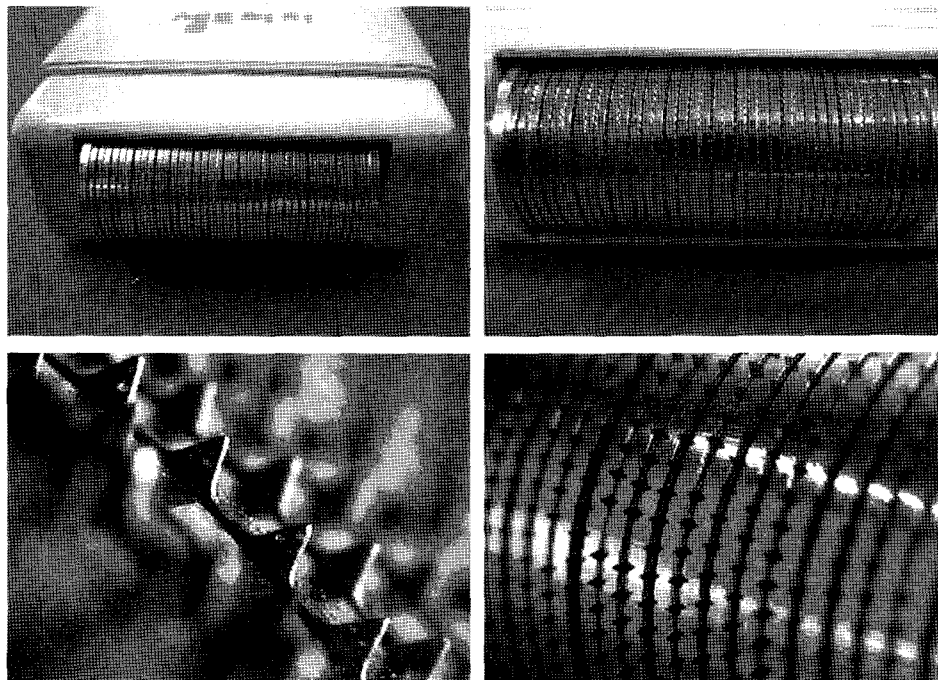


Figure 1—Pictures of role type microneedle system with successive treatment for the skin.

실험동물의 피부 채취 및 전처리

무모생쥐(암컷, 6 주령)와 SD 쥐(수컷, 5 주령)는 오리엔트(Korea)에서 주문하여 사용하였으며 개체 차이를 알아보기 위하여 두 종류의 피부를 채취하여 실험을 실시하였다. 각각의 실험동물을 에테르로 마취시킨 다음 피부를 채취하였는데 SD 쥐의 경우에는 제모기를 이용하여 털을 제거한 후 피부를 채취 하였다. 조건을 동일하게 하기위하여 피부를 하루 동안 냉동시킨 후 실험에 사용할 때에는 30분 상온에서 해동한 후 0.9% NaCl 수용액에 30분 동안 등장시켜 투과 실험에 사용하였다. 등장을 하는 이유는 개체차에 의한 오차를 줄이고자 한 것으로 피부내의 조직에 동일한 조건을 갖추기 위함이었다.

FITC로 라벨링된 OVA 제조 및 정량

OVA가 PBS에 잘 용해되나 과량의 OVA를 용해시키기 위해서는 한정된 양을 여러 번 나누어 용해시켜야 하므로 진탕기에 넣고 0.5 g씩 30분 동안 진탕시켜 5 g(1 mM)의 OVA를 100 mL의 PBS에 용해시켰다(1 mM). 용해된 OVA 용액에 FITC 0.039 g(1 mM)을 10 mL의 PBS(1 mM)에 녹인 용액과 혼합하여 4°C에서 교반하면서 암실에서 하루 동안 반응시켰다. 미반응된 FITC를 제거하기 위하여 반응물을 10,000 g/mole 이하의 분자량 분리가 가능한 한외 여과막으로 2일간 투석시킨 후 용기에 넣어 빛을 차단하여 2일 동안 동결건조 하여 4.5 g의 FITC-OVA를 얻었다.^{35,36} 제조된 FITC-OVA 1.1347 g을 50 mL의 PBS에 녹여 500 µM의 용액을 만들고 실험에 사용한 FITC-OVA 용액은 이를 다시 희석하여 50 µM의 용액으로 만들어 실험에 사용하였으며 실험 모식도는 Figure 2에 나타내었다. 50 µM의 FITC-OVA 용액을 각 0.005, 0.05, 0.5, 5 및 50 µM로 농도 차이를 두어 형광분광계로 농도를 측정 후 기준 값을 정하였다.

연속적 마이크로 피부침 시스템을 이용한 피부처리

쥐의 피부에 마이크로 피부침 시스템을 이용하여 적정 압력을 주어 구멍을 낸 후 현미경을 이용하여 구멍의 크기를 측정하였다. 피부처리 횟수는 0, 2 및 4회로 정하였고 전처리가 끝난 상태의 피부를 flux 실험 전에 마이크로 피부침 시스템을 이용하여 피부처리를 하였다.

FITC-OVA의 피부 투과 형광 이미지 분석

각각의 피부 샘플 6개씩에 마이크로 피부침 시스템을 이용하여 2회의 처리과정을 거친 후 Franz 확산셀을 이용하여 15, 30, 60, 90, 120 및 180분 동안 FITC-OVA를 투과시켰다. 이 피부 샘플을 슬라이드로 만들어 형광 현미경을 이

용하여 시간의 경과에 따른 FITC-OVA의 피부 투과 이미지를 관찰하였다.

FITC-OVA의 피부 투과 분석

각각의 실험동물의 피부를 전처리한 후 피부 샘플수를 3으로 하여 마이크로 피부침 시스템을 이용하여 각각 0, 2, 및 4회씩 처리하였다. 이를 1.5 cm×1.5 cm 정도로 취한 다음 Franz 확산셀에 부착하였고 반대쪽은 다른 Franz 확산셀을 마주보도록 위치하였다. 이후 한쪽에는 50 µM의 FITC-OVA를 4 mL 넣고 다른 한쪽에는 PBS(pH=7.4) 4 mL을 넣은 후 37°C 인큐베이터에서 2시간 간격으로 12시간 동안 시료를 채취하였다. 얻어진 시료는 분석셀에 1 mL씩 취하여 형광분광계를 이용하여 측정하였다. FITC-OVA의 flux 분석을 위한 형광분광계의 여기파장은 495 nm, 방출파장은 520 nm로 고정하였고, 측정하기 위한 시료의 양은 1 mL이었다.

결과 및 고찰

연속적 마이크로 피부침 시스템 특징 및 처리 후 구멍크기 확인

실험에서 사용한 마이크로 피부침 시스템은 Figure 1과 같은 형태로 마이크로 피부침 시스템에 부착된 롤러는 원통형의 모양을 하고 있으며 Table I에 나타난 것과 같이 직경은 1.43 cm이고 길이는 2.8 cm이다. 또한 롤러에 있는 전체 톱니수는 3360개이며 톱니 하나의 높이는 230 µm로써 날카로운 탑 정상부분의 직경은 56 µm이다. 이 시스템은 롤러형태를 가지므로 편평한 형태와는 달리 연속적으로 피부처리가 가능하다는 장점이 있다. 또한 톱니부분만 탈착이 가능하므로 하나의 샘플처리 후 멸균·소독하여 다른 샘플을 계속해서 처

Table I—Specification of Microneedle System

Microneedle system (role part)	Value
Diameter	1.43 cm
Length	2.8 cm
Radius	0.75 cm
Surface area	12.58 cm ²
Number of total needle	3360 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 per	267 ea
Needle tip diameter	56 µm

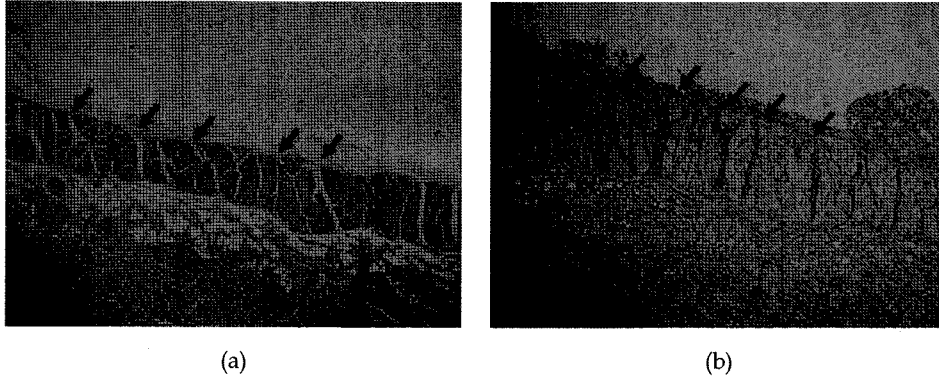


Figure 3—Microphotographs of SD rats skin treated with microneedle system (arrow : perforated skin by microneedle) : (a) H&E staining (×100), (b) none staining (×100).

리 할 수 있다. 이 마이크로 피부침 시스템을 사용하여 쥐의 피부에 구멍을 낸 후 조직을 고정시켜 현미경으로 SD 쥐 피부의 구멍 크기를 측정하였다. 마이크로 피부침 시스템이 침투 되는 평균 깊이는 약 150 μm, 각 구멍들의 평균 크기는 약 35 μm이었으며 일정한 간격을 유지하였다(Figure 3).

FITC-OVA 피부 투과의 형광학적 분석

각각의 피부 샘플을 이용하여 확인한 결과 Figures 4

및 5와 같이 나타났다. Figure 4는 무모생쥐의 FITC-OVA의 형광현미경 이미지로써 시간이 경과함에 따라 마이크로 피부침 시스템으로 처리한 구멍을 통하여 점차적으로 FITC-OVA의 침투가 이루어짐을 확인할 수 있었다. Figure 5는 SD 쥐의 형광현미경 이미지로 역시 시간에 따라 FITC-OVA의 점차적인 침투가 이루어졌음을 확인할 수 있었다. 두 경우 모두 마이크로 피부침 시스템으로 2회의 처리과정을 거쳤으며 이 과정으로 생긴 각질층의 구멍을 통

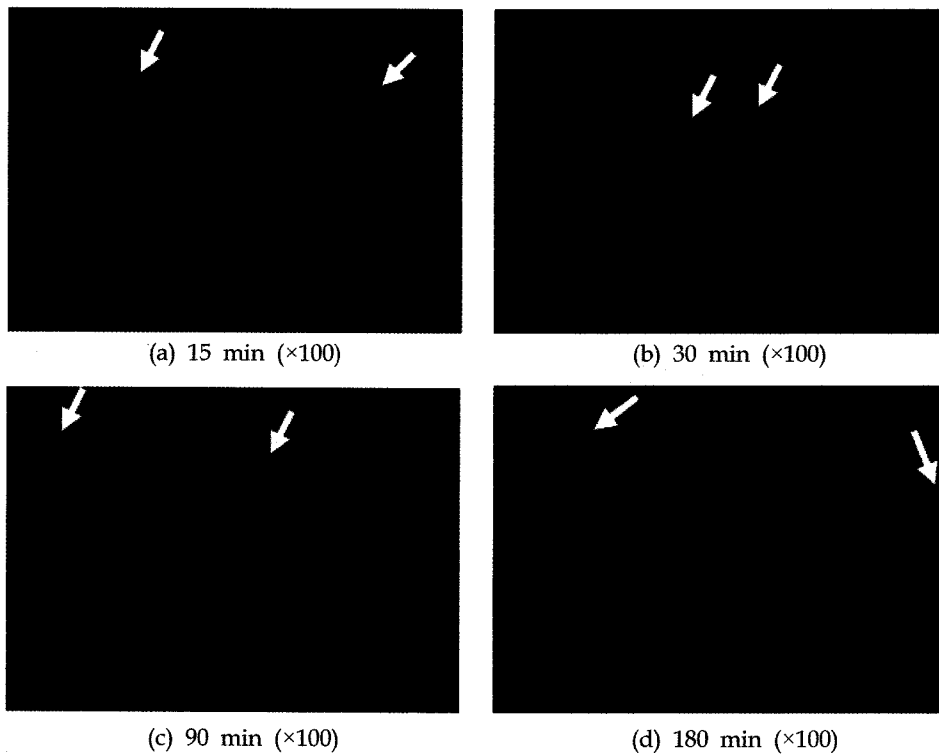


Figure 4—Fluorescence image of hairless mice skin treated with microneedle system (arrow : perforated skin by microneedle) : (a) 15 min (×100), (b) 30 min (×100), (c) 90 min (×100) and (d) 180 min (×100).

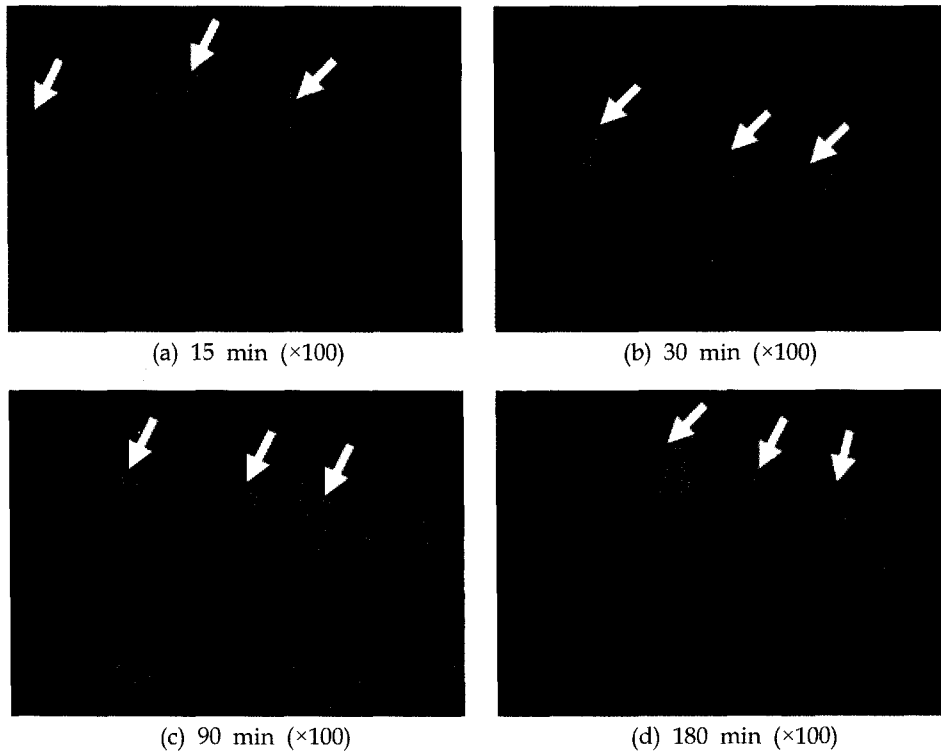


Figure 5—Fluorescence image of SD rats skin treated with microneedle system (arrow : perforated skin by microneedle) : (a) 15 min (×100), (b) 30 min (×100), (c) 90 min (×100) and (d) 180 min (×100).

해서 15분 경과 후 각질 층 아래까지 FITC-OVA가 침투해 있었고 30분 후에는 안쪽 진피층까지 침투가 되었다. 90분 후의 그림에서 보듯이 전체 피부에 FITC-OVA가 침투되어 있음을 확인할 수 있었다. 이 결과로 분자량이 큰 단백질이나 펩타이드 약물의 전달이 가능함을 판단할 수 있었다.

FITC-OVA의 피부 투과량 분석

각각의 피부 샘플을 이용하여 FITC-OVA의 투과량을 확인한 결과 무모생쥐와 SD 쥐의 flux가 유사한 형태로 나타났다.(Figures 6 및 7) 초기 로딩한 FITC-OVA의 양은 샘플 당 9.078 mg이었으며 Franz 확산셀에 부착된 쥐 피부의 유효 투과 면적은 1.7671 cm²이고 무모생쥐 피부의 경우 2

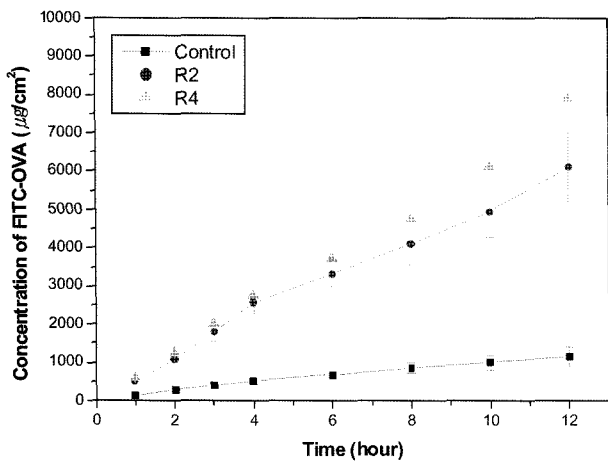


Figure 6—Flux profile of FITC-OVA with hairless mice skin (R2 : 2 times treatment, and R4 : 4 times treatment).

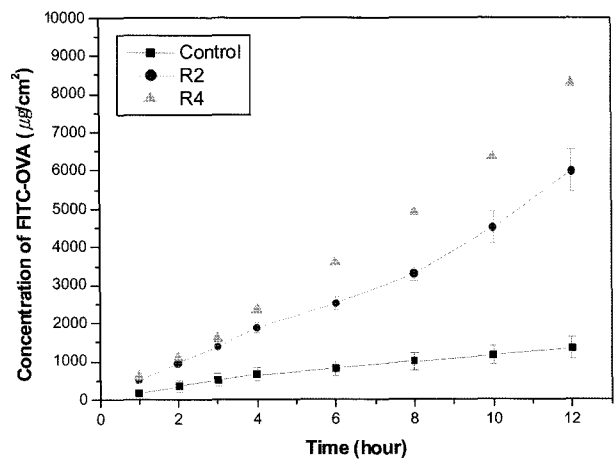


Figure 7—Flux profile of FITC-OVA with SD rats skin (R2 : 2 times treatment, and R4 : 4 times treatment).

시간 동안 투과한 평균 FITC-OVA의 양은 2회 처리했을 때에는 1348 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 4회 처리했을 때에는 1745 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었다. SD rats의 경우는 각각 1321 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, 1830 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ 이었다.

Flux 결과로 볼 때 초기 로딩 양으로부터 FITC-OVA가 무모생쥐의 경우 7.902 mg으로 87%, SD 쥐의 경우 8,288 mg으로 91%가 방출되는 것을 확인하였다. 이로서 마이크로 피부침 시스템으로 4회 처리를 하는 것이 12시간 동안 90%의 방출을 유도 할 수 있으며 4회 이상 처리 할 경우 100% 방출을 유도 할 수 있을 것으로 판단되었다. 또한 무모생쥐와 SD 쥐의 종의 차에 따른 특이적 사항은 관찰되지 않았고 종에 관계없이 마이크로 피부침 시스템을 이용하여 flux를 볼 때 유사한 방출을 유도할 수 있었다.

무모생쥐의 패턴을 보면 초기 4시간 까지 마이크로 피부침 시스템으로 2번, 4번 처리한 경우 FITC-OVA가 빠르게 방출되는 것을 볼 수 있으며 SD 쥐의 경우는 이보다는 약간 느리게 방출 되는 형태를 보이는데 경피투과 실험용으로 보고된 바에 의하면 무모생쥐 피부가 SD 쥐의 피부보다 투과속도가 높으나 투과율에 있어서는 SD 쥐가 무모생쥐 보다 낮은 것으로 나타난 내용과 일치함을 알 수 있었다.

결 론

본 연구에서는 마이크로 피부침 시스템을 롤러타입으로 연속적이면서 간편하게 처리할 수 있도록 고안하였고 이를 이용하여 오발부민을 모델 단백질약물로 하여 고분자 약물이 피부를 투과하여 체내 전달의 가능성에 대한 연구를 수행하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 마이크로 피부침 시스템은 롤러형태로 되어있어 피부에 연속적이면서 효과적으로 처리할 수 있음을 확인하였다.
2. 마이크로 피부침 시스템을 이용하여 피부에 마이크로 크기의 구멍을 형성시켜 피부투과가 어려운 거대 분자량의 단백질인 오발부민을 90분 이내로 체내에 전달시킬 수 있음을 확인하였다.
3. 쥐의 종류에 관계없이 마이크로 피부침 시스템을 이용하여 피부에 적용한 결과 두께 차에 의한 약간의 유동량 차이만 보일뿐 전체적인 유동패턴은 유사함을 확인하였다.
4. 마이크로 피부침 시스템을 이용하는 것은 투여량이 매우 적으며 계속해서 일정한 혈중농도를 유지할 필요가 있는 약물의 투여 방법으로서 효과적임을 확인하였다.

현재 본 연구에 사용한 마이크로 피부침 시스템을 이용하여 약물의 분자량, 소수성, 친수성 등 약물 물성에 따른 약물의 투과 동태 및 이들의 최적화와 하이드로겔 패취를 접목시킨 새로운 경피 시스템과 다른 형태의 마이크로 피부침

을 고안하여 일회용 패취제형의 연구가 수행중이다.

감사의 말씀

본 연구는 산업자원부의 차세대 성장동력산업(10016551)에 의해 진행되었으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) G. Khang, J.M. Rhee, J.K. Jeong, J.S. Lee, M.S. Kim, S.H. Cho and H.B. Lee, Development of local drug delivery system using biodegradable polymers, *Macromol. Res.*, **11**, 207-223 (2003).
- 2) H.B. Lee and G. Khang, Chap. 1, Perspective for drug delivery system, *In High Efficiency Anticancer Drug using Polymeric Biomaterials*, Edited by H.B. Lee, Munundang Publishing Co., Seoul, 2004, pp 1-18.
- 3) G. Khang, J.M. Rhee and H.B. Lee, Chap. 8, Drug delivery system using osmotic pump, *In High Efficiency Anticancer Drug using Polymeric Biomaterials*, Edited by H.B. Lee, Munundang Publishing Co., Seoul, 2004, pp 135-54.
- 4) G. Khang, J.K. Jeong and J.S. Lee, Chap. 12, Improvement of bioavailability for poorly water soluble drug using polymeric nanovehicles, *In High Efficiency Anticancer Drug using Polymeric Biomaterials*, Edited by H.B. Lee, Munundang Publishing Co., Seoul, 2004, pp 171-85.
- 5) G. Khang, J.K. Jeong, J.K. Lee, J.M. Lee and H.B. Lee, Recent development trends of the improving bioavailability by polymeric nanovehicles of poorly water-soluble drugs, *Polymer Sci. Tech.*, **13**, 342-359 (2002).
- 6) K.D. Hong, Y.S. Ahn, W.Y. Jang, M.S. Kim, S.H. Cho, G. Khang, H.G. Lee and H.B. Lee, Importance of polymeric biomaterials for transdermal delivery, *Polymer Sci. Tech.*, **15**, 132-140 (2004).
- 7) R.L. Bronaugh and H.I. Maibach, *Percutaneous Absorption: Drugs-Cosmetics-Mechanisms-Methodology*, Marcel Dekker, New York (1999).
- 8) E. Touitou, Drug delivery across the skin, *Expert Opin. Biol. Ther.*, **2**, 723-733 (2002).
- 9) B. Barry and A. Williams, Penetration enhancers, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 603-618 (2003).
- 10) G. Cevc, Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 675-711 (2004).
- 11) Y. Kalia and R. Guy, Modeling transdermal drug release, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **48**, 159-172 (2001).
- 12) V. Preat and R. Vanbever, Skin electroporation for transdermal and topical delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 659-674 (2004).
- 13) A. Doukas, Transdermal delivery with a pressure wave, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 559 (2004).
- 14) S. Mitragotri and J. Kost, Low-frequency sonophoresis: a

- review, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 589-601 (2004).
- 15) R.H. Champion, J.L. Burton, D.A. Burns and S.M. Breathnach, *Textbook of Dermatology*, Blackwell Science, London (1998).
 - 16) M.S. Gerstel and V.A. Place, Drug delivery device, US Patent No. 3,964,482 (1976).
 - 17) Korea Patent 1993-0000062, Korea Patent 1993-0003115, Korea Patent 1995-0000061, Korea Patent 1996-0004299.
 - 18) B.C. Shin, S.Y. Oh, H.B. Lee, Y.D. Park and K.H. Lee, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **26**, 315 (1996).
 - 19) S. Henry, D. McAllister, M.G. Allen and M.R. Prausnitz, Microfabricated microneedles: a novel method to increase transdermal drug delivery, *J. Pharm. Sci.*, **87**, 922-925 (1998).
 - 20) M.R. Prausnitz, Microneedles for transdermal drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **56**, 581-587 (2004).
 - 21) E.D. Jenner, *Inquiry* (1798) and *The Complete Letters of Lady Mary Wortley Montagu*, ed. R. Halsband, Oxford, Clarendon Press, 1965-7, Vol. 1, pp 338-9.
 - 22) S. Hashmi, P. Ling, G. Hashmi, M. Reed, R. Gaugler and W. Trimmer, Genetic transformation of nematodes using arrays of micromechanical piercing structures, *BioTechniques*, **19**, 766-770 (1995).
 - 23) D.V. McAllister, P.M. Wang, S.P. Davis, J.-H. Park, M.G. Allen and M.R. Prausnitz, Microfabricated needles for transdermal delivery of macromolecules and nanoparticles: fabrication methods and transport studies, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **100**, 13755-137560 (2003).
 - 24) W. Lin, M. Cormier, A. Samiee, A. Griffin, B. Johnson, C. Teng, G.E. Hardee and P. Daddona, Transdermal delivery of antisense oligonucleotides with microprojection patch (Macroflux) technology, *Pharm. Res.*, **18**, 1789-1973 (2001).
 - 25) M. Cormier and P.E. Daddona, Macroflux technology for transdermal delivery of therapeutic proteins and vaccines. In: *Modified-Release Drug Delivery Technology*, M.J. Rathbone, J. Hadgraft and M.S. Roberts, Eds Marcel Dekker, New York, 589-598 (2003).
 - 26) W. Martanto, S. Davis, N. Holiday, J. Wang, H. Gill and M. Prausnitz, Transdermal delivery of insulin using microneedles *in vivo*, *Proceed. Inter. Symp. Controll. Release Bioactive Mater.*, 666 (2003).
 - 27) J.A. Matriano, M. Cormier, J. Johnson, W.A. Young, M. Buttery, K. Nyam and P.E. Daddona, Macroflux microprojection array patch technology: a new and efficient approach for intracutaneous immunization, *Pharm. Res.*, **19**, 63-70 (2002).
 - 28) J.A. Miksza, J.B. Alarcon, J.M. Brittingham, D.E. Sutter, R.J. Pettis and N.G. Harvey, Improved genetic immunization via micromechanical disruption of skin-barrier function and targeted epidermal delivery, *Nat. Med.*, **8**, 415-419 (2002).
 - 29) B. Stoeber, and D. Liepmann, Fluid injection through out-of-plane microneedles, *Proceed. Inter. IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtech. in Medicine and Biology*, 34 (2000).
 - 30) J. Chen and K.D. Wise, A multichannel neural probe for selective chemical delivery at the cellular level, *IEEE Trans. Biomed. Eng.*, **44**, 760-769 (1997).
 - 31) W.H. Smart and K. Subramanian, The use of silicon microfabrication technology in painless blood glucose monitoring, *Diabetes Technol. Ther.*, **2**, 549-559 (2000).
 - 32) S.P. Davis, B.J. Landis, Z.H. Adams, M.G. Allen and M.R. Prausnitz, Insertion of microneedles into skin: measurement and prediction of insertion force and needle fracture force, *J. Biomech.*, **37**, 1155-1163 (2004).
 - 33) S. Kaushik, A.H. Hord, D.D. Denson, D.V. McAllister, S. Smitra, M.G. Allen and M.R. Prausnitz, Lack of pain associated with microfabricated microneedles, *Anesth. Analg.*, **92**, 502-504 (2001).
 - 34) J.-H. Park, M.G. Allen and M.R. Prausnitz, Biodegradable polymer microneedles: Fabrication, mechanics and transdermal drug delivery, *J. Controll. release*, **104**, 51-66 (2005).
 - 35) P.H. Demana, N.M. Davies, B. Berger and T. Rades, Incorporation of ovalbumin into ISCOMs and related colloidal particles prepared by the lipid film hydration method, *Int. J. Pharm.*, **278**, 263-274 (2004).
 - 36) A.H. James and E.S. Penelope, Structure and properties of ovalbumin, *J. Chromatogr. B: Biomed. Sci. Appl.*, **756**, 189-198 (2001).