

## Nicotinic acid *N*-oxide를 이용한 항콜레스테롤 연고의 경피 투과 특성

정덕채<sup>†</sup> · 김규원

시립인천대학교 자연과학대학 화학과  
(2008년 1월 28일 접수 ; 2008년 6월 3일 채택)

### Transdermal Permeation Characteristics of Anti Cholesterol Ointment using Nicotinic acid *N*-oxide

Duck-Chae Jung<sup>†</sup> · Kyu-Won Kim

Department of Chemistry, University of Incheon, Incheon, 402-749, Korea  
(Received January 28, 2008 ; Accepted June 3, 2008)

**Abstracts** : Transdermal therapeutic system(TTS) is often used as the method of drug dosage into the epidermic skin. Natural polymer were selected as ointment material of TTS. We investigated the permeation of natural polymer ointment containing drug in rat skin using horizontal membrane cell model. Permeation properties of materials were investigated for water-soluble drug such as Nicotinic acid *N*-oxide *in vitro*. These results showed that skin permeation rate of drug across the composite was mainly dependent on the property of ointment base and drug. Proper selection of the polymeric materials which resemble and enhance properties of the delivering drug was found to be important in controlling the skin permeation rate. This result suggests a possible use of natural polymer ointment base as TTS of antihyperlipoproteinemic agent.

Key words : Transdermal therapeutic system, Nicotinic acid *N*-oxide, skin permeation rate antihyperlipoproteinemic agent

### 1. 서 론

고지단백혈증(hyperlipoproteinemia)이란 혈액 내에 콜레스테롤이나 중성지방이 정상보다 높은 상태이며 자체는 아무런 증상이 없으나 합병증 때문에 여러 문제를 야기한다. 합병증으로는 관상동맥에 동맥경화를 유발하여 협심증, 심

근경색 등을 일으키며 뇌혈관 동맥경화증으로 인한 뇌졸중 등이 있다. 고지단백혈증은 원발성과 속발성으로 구분할 수 있다. 속발성 고지단백혈증은 당뇨병, 갑상선 기능저하 또는 과도한 알코올 섭취와 같은 대사장애의 합병증이다. 원발성 고지단백혈증은 두개의 주요한 군으로 나눌 수 있다. 단일 유전자 결손에 의한 것과 환경적 요인과 다수의 미묘한 유전인자들이 복합되어 야기되는 것이다<sup>1)</sup>. 수용성인 고지단백혈증 제제인 Nicotinic acid *N*-oxide는 1955년에 개

<sup>†</sup>주저자 (e-mail : dcjung@incheon.ac.kr)

발되었는데 Nicotinic acid N-oxide의 지질저하 작용은 비타민인 nicotinamide에는 없으며 이 물질의 비타민으로서의 역할과는 아무런 관계가 없다. Nicotinic acid N-oxide는 대부분의 고지단백혈증 치료에 유용하나 부작용 빈발 때문에 사용이 제한되고 있다<sup>2)</sup>. Nicotinic acid N-oxide의 경구투여시에 부작용으로는 구토, 설사, 소화 불량과 같은 위장 장애도 흔하며 소화성 궤양도 보고된 바 있으며 경구 과다 복용시에 안면과 신체 상부에 심한 피부 발적과 소양증을 일으킨다.

한편, 약물의 피부투과 경로는 털구멍, 피지선 및 각질 일부 등의 피부 부속기관을 투과하는 경로와 표피층을 투과하는 경로로 크게 나누는데<sup>3)</sup>, 약물 물성에 따라 각 투과경로의 기여도는 다르다. 일반적으로 부속 기관에서의 흡수는 빠르지만 그 유효 면적은 전체의 0.1% 정도에 불과하다<sup>4)</sup>. 따라서 부속기관 투과경로의 기여는 약물투여 후 초기단계에서는 크지만 시간이 지나면 작아져서 각질층 투과경로의 기여도가 증대한다. 피부에 투여된 약물의 대부분은 각질층에서부터 표피를 거쳐 흡수된다. 각질층의 투과경로는 젤라틴으로 채워진 각질세포의 실질을 통과하는 경로와, 지질로 채워진 세포의 간극을 통과하는 경로로 나뉘지만 엄밀하게 구별하는 것은 어렵다. 각질층을 투과한 약물은 살아있는 표피 및 진피의 상층부를 통하여 맥관계로 들어간다. 이들 층은 각질층에 비해 장벽으로서의 기능을 한다. 피부투여된 약물은 표피를 투과한 후 진피 상부에서 전신 순환계로 이행하기 때문에, 약물대사 부위로는 특히 표피가 중요하다. 표피에는 콜레스테롤과 지질성분의 합성효소계가 존재한다<sup>5)</sup>. 일반적으로 진피보다 표피에서 호흡 활동이 왕성하고 효소활성도 진피보다 표피에서 높다.

본 연구에서는 경구투여시에 약물 부작용이 심한 수용성 항고지단백혈증제제의 피부투과 가능성을 확인하고자 천연고분자를 이용하여 기제를 제조하고 이에 약물로서 수용성인 Nicotinic acid N-oxide을 첨가하여 연고형태의 피부투과제제를 제조하였다. 이에 대한 적용으로 흰쥐의 피부를 적출하여 *in vitro*에서 약물 함유량에 따른 변화 및 *in vivo*에서의 혈액학적 변화 등을 연구하여 경피투여제제로서의 가능성을 연구하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 시약 및 기기

피부 투과실험의 연고기제로 사용된 천연고분자로서 chitosan, algin, karaya gum 및 xanthan gum은 Sigma사의 시약을 사용하였으며 수용성 항고지단백혈증제제로서 Nicotinic acid N-oxide는 Aldrich사제 특급시약을 사용하였다. 연고기제를 제조하는데 사용한 용매로서는 Millipore사의 Milli-Q reagent water system을 사용하여 처리한 탈이온수를 자외선으로 24시간 멸균 처리하여 사용하였다. *In vitro* 실험에서의 대체혈장용액은 인산염 완충 용액으로서 Sigma사의 phosphate buffered saline(이하 PBS)을 이용하여 pH 7.4로 제조하였으며 기타 실험에 사용한 에탄올, 초산 등의 용매는 국산용매를 재증류하여 사용하였다. *In vivo* 실험에서의 기체 도포 전후 흰쥐에 대한 혈액학적분석은 자동혈구계산기(Technicon co., H1-system, USA)를 사용하였다.

### 2.2. 흰쥐의 사육조건 및 적용

실험동물은 (주)대한실험동물센터에서 4주된 Specific Pathogen Free(SPF) 수컷 SD계 100~150g의 흰쥐를 분양 받아서 온도 23±3°C, 습도 50±5%, 환기 10회/1일, 12시간 주기 명암 교대 및 조도 150~300Lux의 환경조건<sup>6)</sup>에서 일주일간 순화시켰으며 이때, 먹이와 음용수 섭취는 배합사료와 일반 수도수를 음용수로 실험동물인 흰쥐에 자유로이 공급하였다. 또한 모든 실험동물에 대하여 매일 임상증상 및 사망유무를 관찰하였고 식이, 음용수 섭취량 및 체중도는 일정하게 매일 측정하였다. 건강한 동물을 선택하여 *in vitro*에서의 피부투과 실험을 위해 막으로 사용할 흰쥐의 피부를 적출하였다. 흰쥐는 클로로포름을 사용하여 마취하였고, 털을 제거하고 70% 알코올로 소독한 후 멸균된 수술용 가로, 세로 각각 5.0cm로 절개하여 피부를 적출하였으며, 적출한 피부를 실험을 위해 전보<sup>7)</sup>에서와 같이 아크릴로 자체 제작한 수평막 셀 실험장치 중앙에 고정시킨 후 실험을 진행하였다.

*In vivo*에서의 기체 도포전후의 혈액학적 검사를 위하여 흰쥐를 부검일 오전부터 절식시킨 후 경추 탈구법으로 희생시킨 다음 혈액을 심장에서 채혈하고 자동혈구계산기를 이용하여

백혈구수(WBC), 적혈구수(RBC), 혈색소량(HGB), 적혈구용적(HCT) 및 혈소판수(PLT) 등을 측정하였다.

### 2.3. 피부투과제제의 제조

피부투과제제 제조시 용매(150ml)에 각각의 천연고분자 양과 약물의 양을 일정하게 취하여 각각 용해시켰다. 그러나 키토산은 탈이온수에 만든 용해성을 나타내지 않으므로 2.0% 초산수 용액으로 제조하여 용해시켰다. 이때, 각각 수용액상에서 점성을 나타내므로 기계식 교반기를 사용하여 일정시간 동안 균일하게 용해되도록 하였다. 이때 수용성 약물의 함량을 10wt%, 20wt%로 하여 피부투과제제를 제조하여 실험을 진행하였으며 제조한 피부투과제제의 조성에 대해서 Table 1에 나타내었으며 제조한 피부투과제제는 밀봉하여 사용할 때까지 PE병에 보관하였다.

Table 1. Composition of Transderma Experimental for Nicotinic acid N-oxide

	Natural polymer [%]	Nicotinic acid N-oxide [%]
Chitosan	90	10
	80	20
Algin	90	10
	80	20
Karaya gum	90	10
	80	20
Xanthan gum	90	10
	80	20

### 2.4. *In vitro*에서의 투과

천연고분자의 종류에 따라서 동일 조건으로 제조된 피부투과제제를 *in vitro*에서의 실험을 위해 막으로 사용할 흰쥐의 등쪽 피부를 가로, 세로 각각 5.0cm로 절개하여 그대로 적출하였다. 투과가 진행되는 동안 투과정도는 UV를 사용하여 분광광도법으로 측정하였으며 시료 3.0ml를 채취한 후 바로 동량의 PBS를 넣어 sink condition을 유지하였다. 채취된 시료는 그대로 millipore filter(pore size : 0.2 $\mu$ m)로 여과한 후 2ml를 UV 셀에 넣고 약물의 최대흡수파

장( $\lambda_{max}$ )인 260nm에서 측정하였으며 각 실험은 3회 실시하여 전보<sup>7)</sup>에서 보고한 투과속도계산법에 의하여 계산하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 1. *In vitro*에서의 피부투과

약물의 함량변화에 따른 실험 중 10wt%일 때의 결과를 Fig. 1에 나타내었으며 lag time을 제외한 함량변화 결과분포를 Fig. 2에 나타내었다. 또한 실험결과로서 얻어진  $J_s$ 와 lag time을 Table 2에 나타내었다. 수용성 약물인 Nicotinic acid N-oxide를 사용하여 *in vitro*에서 진행한 투과 실험에서의 투과양상을 보면 약물의 함량이 많아짐에 따라 투과속도가 빠르게 나타났다. Fig. 1에서와 같이 약물의 함량이 10wt%였을 때 키토산의 lag time과 투과속도는 4.16hr과 0.117 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/h, 알긴의 lag time과 투과속도는 4.32hr과 0.103 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/h, karaya gum의 lag time과 투과속도는 3.74hr과 0.102 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/h 및 xanthan gum의 lag time과 투과속도는 5.04hr과 0.139 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/h으로 계산되었다. 약물의 함량을 20wt%로 하였을 때는 키토산의 lag time과 투과속도는 3.11hr과 0.126 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/h, 알긴의 lag time과 투과속도는 4.15hr과 0.119 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/h, karaya gum의 lag time과 투과속도는 2.89hr과 0.114 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/h 및 xanthan gum의 lag time과 투과속도는 3.52hr과 0.143 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>/h으로 계산되었다. 투과속도 계산결과, chitosan과 xanthan gum의 경우가 algin이나 karaya gum의 경우보다 빠른 속도를 보였고 약물의 함량이 많은 경우가 그렇지 않은 경우보다 투과속도가 상대적으로 빠르게 나타났다.

기제간의 비교에서는 키토산과 xanthan gum이 karaya gum과 알긴보다 전반적으로 빠른 투과도를 나타내었다. 특히 키토산보다 xanthan gum이 대체적으로 빠른 약물 투과도를 나타내었는데 이러한 현상은 Speer<sup>8)</sup>의 보고에서와 같이 xanthan gum의 구조가 지닌 우수한 의사가소성(pseudoplastic)에 의하여 이러한 의사가소성이 피부와 접촉시 약물의 유동성을 증가시켜 주기 때문이라 생각된다.

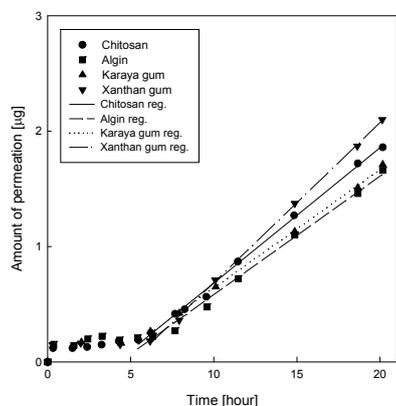


Fig. 1. Amount of 10wt% Nicotinic acid N-oxide release versus time for natural polymers.

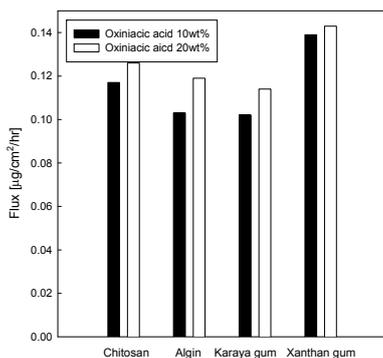


Fig. 2. Comparison of skin permeation distribution by change of contents of Nicotinic acid N-oxide.

## 2. *In vivo*에서의 피부투과

*In vitro* 실험을 통해서 최적 조성의 처방 및 투과실험을 수행하더라도 *in vivo*와의 상관성 및 예측이 없다면 실제 적용이 어렵다. 또한 실제 실험동물 적용을 통해 투과정도 및 피부 독성학 특성인 자극성, allergy 유무 등을 확인한 후 생체에서의 안전성과 약물 동태학적 특성을 연구하여야 한다. *In vitro*에서 약물에 대해 빠른 투과 결과를 보인 키토산, xanthan gum 기제를 선택하여 *in vivo*에서 실험을 진행하였다. 방법으로서 제모한 흰쥐의 피부에 1일 오전, 오후 일정시간에 피부투과제제를 도포하였다. 3일간 도포한 후 혈액 검사, 조직학적 검사를 통해 *in vivo*에서의 결과를 해석하였다. 실험 동안의 체중 변화를 Fig. 3에 나타내었는데 증체량은 대조군에서 가장 높았으나 실험군과의 유의한 ( $P < 0.05$ ) 차이는 인정되지 않았으며, 키토산군에서 체중의 증가가 미미하였다. 이러한 이유는 피부에 대한 육안적 관찰 결과에서 일부 키토산군에서 피부 발적 현상이 나타났는데 이러한 인자들이 증체량에 어떤 자극 또는 영향을 미쳤기 때문이라 생각된다.

육안적 관찰로서 실험기간 중 사망한 흰쥐는 없었으며, 대조군을 포함한 모든 군에서 유의한 임상 증상은 발견되지 않았으며, 일부의 키토산군에서 약간의 피부발적과 같은 홍반 현상이 나타났는데 이는 기제 제조시에 용매로 첨가했던 초산의 영향인 것으로 생각되어진다. 따라서 실제 피부투과제제에 적용시 이러한 문제점을 고려해야 할 것으로 생각되었다.

Table 2. Permeation Parameters of Transdermal Nicotinic acid N-oxide through Rat Skin

Formulation	Permeation parameters			
	$J_s(\mu\text{g}/\text{cm}^2/\text{hr})^a$	$T_L(\text{hr})^b$	$D(\text{cm}^2/\text{hr} \times 10^4)^c$	
10wt%	Chitosan	0.117	4.16	4.85
	Algin	0.103	4.32	4.67
	Karaya gum	0.102	3.74	5.39
	Xanthan gum	0.139	5.04	4.01
20wt%	Chitosan	0.126	3.11	6.49
	Algin	0.119	4.15	4.86
	Karaya gum	0.114	2.89	6.98
	Xanthan gum	0.143	3.52	5.73

a)  $J_s$  : steady-state flux, b)  $T_L$  : lag time, c)  $D$  : diffusivity coefficient

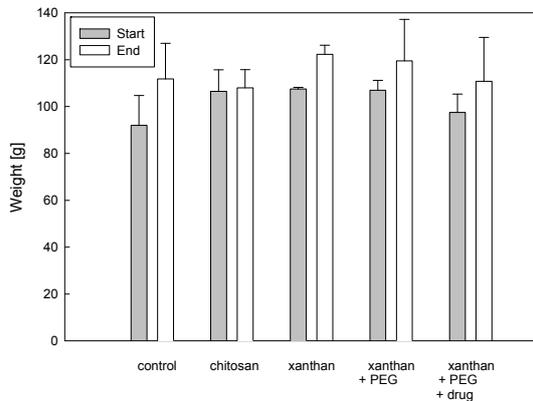


Fig. 3. Body weight change during experimental periods.

다음으로 피부투과제제의 *in vivo* 실험에서의 혈액학적 소견을 Table 3과 4에 나타내었다. Table 3의 혈액학적 분석결과, 일반적으로 흰쥐의 백혈구(WBC), 적혈구(RBC), 헤모글로빈(HGB), 혈구용적(HCT), 평균 적혈구 용적(MCV), 평균 적혈구 혈색소량(MCH), 평균 적혈구 혈색소 농도(MCHC) 및 혈소판수(PLT) 등이 대조군을 포함한 모든 실험군에서 모두 정상 범위를 나타내었다.

한편, 백혈구 중 무과립 백혈구인 단핵구(monocyte)와 림프구(lymphocyte)는 이물처리

와 면역기능을 하며 과립 백혈구인 호산구(eosinophil), 호중구(neutrophil) 및 호염기구는 식균, 혈액 응고, 면역 기능 및 살균 작용을 하는 것으로 알려져 있으며 특히 호산구는 피부, 소화기 및 기도 등의 내벽에 위치하여 외부로부터 들어오는 독성 물질을 해독하는데 중요 역할을 하며 피부 allergy 질환 등이 있으면 상당히 증가한다고 알려져 있다. Table 4에 나타난 백혈구 감별 검사결과에서 호중구는 정상 범위가 9~25%,  $1.10 \sim 4.0 \times 10^3/\mu\text{L}$ 로서<sup>9)</sup> 대부분의 실험군이 정상범위 내에 있지만 일부 실험군에서 유의한( $P < 0.05$ ) 결과도 보였으나 비교적 정상 범위에는 속하는 것으로 나타났다. 호산구는 정상 범위를 0.0~0.6%,  $0.03 \sim 0.06 \times 10^3/\mu\text{L}$ 로, 호염기구는 0.0~1.0%,  $0.1 \sim 0.15 \times 10^3/\mu\text{L}$ 로 보고<sup>10,11)</sup>하고 있으나, 본 실험에서는 xanthan gum+Nicotinic acid N-oxide 실험군에서 유의한( $P < 0.05$ ) 결과를 보였지만 대체로 모든 천연고분자 실험군에서 정상 범위에 있는 결과를 나타내었다. 일부 실험군에서 호산구가 유의한( $P < 0.05$ ) 결과를 나타낸 것은 호산구의 역할이 이물질 침입에 대한 해독작용인데 빠른 투과속도를 나타낸 실험군이 피부를 통하여 투과됨으로써 나타나는 일시적 호산구의 증가 때문이라 생각된다. 이와 같이 혈액학적 검사 결과 천연고분자 기체들이 비교적 생체에 대한

Table 3. Effects of Transdermal Agents on Hematological Components in Rats Treated with Chitosan and Xanthan

Group	WBC <sup>a</sup> [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]	RBC <sup>b</sup> [ $\times 10^6/\mu\text{l}$ ]	HGB <sup>c</sup> [g/dL]	HCT <sup>d</sup> [%]	MCV <sup>e</sup> [fL]	MCH <sup>f</sup> [pg]	MCHC <sup>g</sup> [g/dL]	PLT <sup>h</sup> [ $\times 10^3/\mu\text{l}$ ]
Normal Range	7.3~12.7	7.2~8.5	14.0~15.6	41.1~51.1	52.6~65.4	16.5~21.3	30.3~34.7	367~573
Control	9.2±1.9	7.52±0.8	14.3±0.1	45.55±5.1	62.7±5.4	19.4±0.7	31.1±0.9	417±60
Chitosan	9.0±1.6	8.20±0.4	14.1±0.4	50.45±3.5	61.0±5.0	20.2±0.7	31.8±1.1	423±34
Xanthan gum	9.3±0.4	8.01±0.0	14.3±1.7	49.3±2.8*	60.9±4.8	18.9±0.1	32.4±1.5	431±29
Xanthan gum + Nicotinic acid N-oxide	7.8±0.8	7.88±0.1	13.6±0.2	45.65±3.2	58.4±1.7	19.3±0.8	31.5±0.4*	369±83

The values expressed as a mean±SD (n=15)

\* Statistically different from control group( $P < 0.05$ )

a : white blood cell, b : red blood cell, c : hemoglobin d : hematocrit, e : mean corpuscular volume, f : mean corpuscular hemoglobin, g : mean corpuscular hemoglobin concentration, h : platelet

Table 4. Effects of Transdermal Agents, Chitosan, Xanthan, PEG 600, and Clofibrate on WBC Components in Rats

Group	Neutrophil		Lymphocyte		Monocyte		Eosinophil		Basophil	
	%	$[\times 10^3/\mu\text{l}]$	%	$[\times 10^3/\mu\text{l}]$	%	$[\times 10^3/\mu\text{l}]$	%	$[\times 10^3/\mu\text{l}]$	%	$[\times 10^3/\mu\text{l}]$
Normal Range	9~25	1.10~4.0	55.6~83.2	6.30~10.90	0~5.0	0.1~0.4	0~0.6	0.03~0.06	0~1.0	0.1~0.15
Control	15.9±1.3	1.46±0.3	78.6±3.8	7.23±1.9	4.3±2.6	0.39±0.03	0.55±0.21	0.05±0.01	0.7±0.04	0.06±0.03
Chitosan	16.3±2.3	1.80±0.8	72.4±18	7.11±0.1	5.1±0.2	0.40±0.18	0.60±0.99	0.05±0.02	0.6±0.05	0.05±0.01
Xanthan	19.4±3.4	1.91±0.2*	77.9±12	8.01±1.2	4.4±3.1	0.42±0.11	0.65±0.85	0.06±0.02	0.5±0.04	0.05±0.02
Xanthan + Nicotinic acid N-oxide	20.7±1.4	2.32±0.4	74.4±3.1	6.61±0.6	4.1±2.3	0.32±0.02	0.51±0.35	0.05±0.02	0.4±0.05*	0.03±0.01

\* Statistically different from control group ( $P < 0.05$ )

큰 영향이 없는 것으로 나타났으며 이는 생체 적용시 기체에 대한 안전성을 나타내 주는 것이라 생각한다.

#### 4. 결론

천연고분자를 이용하여 기체를 제조하고 이에 약물로서 Nicotinic acid N-oxide을 첨가하여 연고형태의 피부투과제제를 제조하였다. 이에 대한 적용으로 흰쥐의 피부를 적출하여 *in vitro*에서 약물 함유량에 따른 변화 및 *in vivo*에서의 혈액학적 변화 등을 연구하였다.

1. 투과속도 계산결과에서 보면 chitosan과 xanthan gum 기체의 경우가 algin이나 karaya gum의 경우 보다 빠른 속도를 보였고 약물의 함량이 많을수록 피부투과속도가 상대적으로 빠르게 나타났다.
2. 특히 천연고분자 기체중에서 xanthan gum이 대체적으로 빠른 약물 투과도를 나타내었는데 이러한 현상은 xanthan gum의 구조가 지닌 우수한 의사가소성 현상에 의하며 이러한 의사가소성이 피부와 접촉시 약물의 유동성을 증가시켜 주기 때문이라 생각된다.
3. 실험 동안의 체중 변화에서 증체량은 대조군에서 가장 높았으나 실험군과의 유의한( $P < 0.05$ ) 차이는 인정되지 않았으며 키토산군에서 체중의 증가가 미미하였다.

이러한 이유는 피부에 대한 육안적 관찰 결과에서 일부 키토산군에서 홍반과 같은 피부 발적 현상으로 증체량에 어떤 자극 또는 영향을 미쳤기 때문이라 생각된다.

4. 혈액학적 분석결과를 보면 대조군을 포함한 각 실험군에서 모두 정상 범위를 나타내었으며 백혈구 감별 검사결과에서도 대체로 모든 천연고분자 실험군에서 정상 범위에 있는 결과를 나타내었다.

#### 감사의 글

이 연구는 인천대학교 2007년도 자체연구비 지원에 의하여 수행된 것으로 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Seoul National University College of Medicine, "Pharmacology", p. 487, Korea Medical Book, Seoul(2004).
2. W. H. Griffith and J. F. Nye, "The Vitamins", 2nd Ed., Vol. III, p 2, Academic Press, New York(1999).
3. M. Kalz and B. J. Poulsen, "In Handbook of Experimental Pharmacology", Vol. 28,

- p. 103, Academic Press, New York(1991).
4. B. W. Barry, "Dermatological Formulations", p. 95, Marcel Dekker, New York(1993).
  5. U. Tauber, "In Dermal and Transdermal Absorption", p. 133, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart(2004).
  6. Y. S. Lee, "Breeding management and technology, Experiment Zoology", p 238, seoul university publishing department, Seoul(1993).
  7. S. K. Hwang, Transdermal Permeation of Riboflavin in Ointment Bases using Gums and Enhancers, *Kor. J. of Environmental Health Society*, **26(2)**, 91(2000).
  8. R. A. Speers and M. A. Tung, Concentration and Temperature Dependence of Flow Behavior of Xanthan Gum Dispersions, *J. Food Sci.*, **51(1)**, 96(1996).
  9. N. C. Jain, "Cell Immunology", p. 756, Plenum Press, New York(2006).
  10. P. Murphy, "Cell Immunology", p. 228, Plenum Press, New York(2006).
  11. N. C. Jain, "Cell Immunology", Plenum Press, p. 790, New York(2006).