DPCP로 유발된 알레르기성 염증을 이용한 국소제제 항염작용의 평가

서울대학교 의과대학 피부과학교실, 약리학교실*

서대현, 문승현, 이현승, 장인진*, 신상구*, 은희철

= Abstract =

Evaluation of Topical Agents' Anti-inflammatory Activity on Experimentally Induced Allergic Contact Dermatitis by Diphenylcyclopropenone (DPCP)

Dae Hun Suh, M.D., Seung Hyun Moon, M.D., Hyun Seung Lee, M.D.,
In Jin Jang, M.D.*, Sang Goo Shin, M.D.*, Hee Chul Eun, M.D.

Department of Dermatology, Department of Pharmacology,
Seoul National University College of Medicine, Seoul, Korea*

Background : Several methods were introduced to evaluate the anti-inflammatory efficacy of topical drugs. However, none of them was quite satisfactory. This study was designed to evaluate anti-inflammatory efficacy of topical agents and develop the standardized method for comparison among preparations.

Methods : In healthy volunteers allergic contact dermatitis was provoked by DPCP(diphenylcyclopropenone) and the lesions were treated twice daily with two topical agents(0.25% desoxymethasone, 1% diclofenac cream) for ten days without occlusion. Severity of inflammation were assessed daily by visual scoring, transepidermal water loss(TEWL), laser Doppler flowmeter(LDF) and dermaspectrometer during the period.

Results : Desoxymethasone significantly improved the clinical evolution in comparison with diclofenac cream and the untreated control. The results of TEWL and LDF measurement revealed good correlation with visual scoring.

---

*본 연구는 1997년 보건복지부 주관 보건의료기술연구개발사업의 일환인 약물 임상평가개발기술 개발 연구비 보조에 의해 이루어졌음.

교신저자 : 은희철

소 속 : 서울대학교 의과대학 피부과학교실

주 소 : 서울시 종로구 연건동 28 ☎ 110-744

전화 : 02) 760-2418 FAX : 02) 742-7344

Conclusion : The potency of topical preparations could be assessed using experimentally induced allergic contact dermatitis. This evaluation method can be usefully employed to assess topical anti-inflammatory activity.

Key words : Topical · Anti-inflammatory · DPCP · Evaluation.

서 론

피부 질환의 치료를 위해 사용되는 국소제제의 효능 (efficacy) 평가는 약제의 개발 단계에서 효과적인 약제의 선정, 유효농도의 결정 등을 위하여 필수적일 뿐만 아니라 약물의 약력학적 특성 등의 기초적인 연구를 위해서도 매우 중요하다. 현재까지 항염작용을 목적으로 사용되는 국소제제는 스테로이드가 거의 전부라고 할 수 있으며, 이의 효력 (potency)을 평가하기 위해서 vasoconstriction assay가 주로 사용되고 있다.^{1,2)} 국소 스테로이드제제에 의한 피부 혈관수축은 아직 그 기전이 명확하게 밝혀져 있지는 않으나, 일반적으로 약제의 항염작용과 비례하는 것으로 알려져 있다.^{3,4,5)} 그러나, 실제의 임상 질환에 대한 약제의 효능을 반영하지 못하는 경우도 있다고 보고되어 있으며^{6,7)} 스테로이드제제 이외의 약물에서는 적용할 수 없는 한계와 문제점을 가지고 있다.

이러한 문제점을 해결하기 위하여 염증에 대한 효과를 직접 평가하기 위한 여러 가지 방법들이 사용된 바 있으나, 아직까지 항염효과를 측정하기 위한 방법으로 확실히 표준화된 방법은 없다. 이에 저자들은 diphenylcyclopropanone (DPCP)으로 유발된 알레르기성 염증에 대한 국소제제의 항염효과를 알아보고자 연구를 시행하였다. 본 연구는 정상 자원자를 대상으로 시행한 실험으로서 객관적이고 변별력 있는 항염 효과의 평가 방법을 개발하고자 하였다.

연구대상 및 방법

1. 연구 대상

DPCP에 감작된 14명을 대상으로 하였다. 20세

이상의 신체 건강한 남자로 시험전에 모든 대상자에서 실험과정과 일어날 수 있는 피부반응을 설명하고 이에 대한 서면동의를 받았다.

2. 방 법

(1) 감작(sensitization)

70% ethanol에 용해된 0.1% DPCP 0.1ml을 상완에 도포한 후 2주후에 반응을 관찰하여 홍반 등의 염증반응을 보인 경우를 감작된 것으로 판단하였다.

(2) 염증의 유발

감작된 자원자를 대상으로 등에 3개의 철폍을 부착하여 염증을 유발하였다. 감작 용액의 100분의 1 농도인 0.001% DPCP 60 μ l 를 large Finn chamber에 담아 2일간 부착하였다.

(3) 국소 치료

DPCP 철폍을 제거하고 2일 후부터 두 개의 부위에 각각 0.25% desoxymethasone 연고(Esperson®, 한독약품)와 1% diclofenac 크림 (Voltaren®, 한국 Searle CIBA-GEIGY)을 도포하였고, 한 부위는 control로 아무것도 바르지 않았다. 10일동안 매일 2번씩 도포하였고, 지름 2cm의 원안에 100 μ l 를 문질러 바르도록 하였다. 약제의 정량은 Microman pipette®(Gilson Medical Electronics, France)를 이용하여 하였다.

(4) 염증 반응의 평가

10일간 약물을 도포하면서 일요일(제4일)을 제외하고 매일 염증반응의 정도를 평가하였다. 이는 육안적 평가와 3가지의 비침습적인 방법으로 측정하였다.

1) 육안적 평가(visual scoring) : ICDRG(International Contact Dermatitis Research Group)의 기준⁸⁾을 이용하여 다음과 같이 4단계로 등급을 정하였다.

- 1 : 경미한 홍반 (faint erythema only ; ?+)
- 2 : 구진 또는 부종을 동반한 홍반 (erythema, infiltrations, possibly papules ; +)
- 3 : 홍반, 부종, 구진, 소수포 (erythema, infiltration, papules, vesicles ; ++)
- 4 : 심한 홍반 및 부종, 대수포 (intense erythema and infiltration and coalescing vesicles ; +++)

2) 경피적 수분손실(transdermal water loss, 이하 TEWL이라 약함)

Evaporimeter EP1®(Servomed, Sweden)을 이용하여 측정하였다. 측정하기 전에 자원자를 30분 이상 안정시킨 후 소식자(probe)를 측정 부위 피부에 접촉하여 측정하였다. 실내온도는 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 를 유지하였고, 습도는 $35 \pm 2\%$ 를 유지하였다.

3) 피부 혈류량 (Laser Doppler flowmetry, 이하 LDF라 약함)

Laser Doppler flowmeter PF4002®(Perimed, Sweden)을 이용하여 피부혈류량을 측정하였다. LDF 측정은 자원자를 안정시킨후 똑바로 앉드린 자세에서 소식자를 측정부위에 테이프로 고정하여 측정치를 얻었다.

4)홍반지수 (erythema index, 이하 EI라 약함)

DermaSpectrometer®(Cortex technology, Denmark)를 이용하여 홍반의 정도를 측정하였다. 이것은 측정에 사용하는 optical window를 피부에 대고 버튼을 눌러 나오는 수치를 기록하였다.

(5) 통계적 분석

세 그룹에서 각각 측정일 및 전체적인 경과에 따라 측정치의 변화를 알아보고 세 그룹간의 유의한 차이가 있는지를 알아보기 위해 ANOVA, repeated measure ANOVA, MANOVA를 이용하였다. P value

Fig. 1. The results of visual scoring in treated groups compared control group ($p < 0.05$, repeated measure ANOVA).

Fig. 2. The results of TEWL measurement in treated groups with control group ($p < 0.001$, repeated measure ANOVA).

가 0.05 미만인 경우를 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

DPCP로 유발된 염증은 대상자 14명중 10명에서 시험에 적당한 2점 이상의 염증반응이 나타났으며 4명에서는 세 부위에서 비슷한 정도의 염증반응이 유발되지 않거나, 염증의 정도가 경미하여 시험에서 제외하였다. 이후 측정된 10일간의 염증반응의 변화는 육안적 평가, TEWL, LDF의 세가지 측정방법에서 비교적 비슷한 양상을 나타내었는데 1~2일째는 다소 중증도가 증가하는 양상을 보였고, 이후에 점차 감소하여 회복되는 양상을 보였다(Fig. 1, 2, 3). DermaSpectrometer로 측정된 EI는 나머지 세가지 측정방법과는 다르게 시험 기간동안 현저한 측정치의 변화를 보이지 않았다(Fig. 4).

Desoxymethasone 연고로 치료한 부위에서 대조군과 diclofenac 도포부위에 비해 현저히 빠른 속도로 염증의 정도가 경감되었다. 관찰 기간 동안의 이리

Fig. 3. The results of LDF measurement in treated groups compared with control group ($p < 0.05$, repeated measure ANOVA)

Fig. 4. The results of erythema index in treated groups compared with control group ($p > 0.05$, repeated measure ANOVA).

한 전체적인 차이는 TEWL 측정과 LDF, 육안적 평가에서 통계적으로 뚜렷하게 나타났다(각각 $p < 0.001$, $p < 0.05$, $p < 0.05$). DermaSpectrometer로 측정한 결과에서는 세 그룹간의 유의한 차이를 알아낼 수 없었다($p > 0.05$). 각 측정일의 결과를 ANOVA를 이용하여 분석한 결과 TEWL과 LDF는 제 5일부터 유의한 차이를 보였고, 육안적 평가는 제 8일부터 유의한 차이를 나타내었다. TEWL 측정에서는 세 그룹간에 모두 유의한 차이가 있었으나, LDF와 육안적 평가에서는 desoxymethasone이 나머지 두 그룹과 유의한 차이를 보이는 것으로 나타났을 뿐 diclofenac을 바른군과 대조군 간에 유의한 차이는 나타나지 않았다.

고 찰

저자들은 이 연구에서 인위적으로 유발된 알레르기성 접촉피부염에 대한 국소제제의 효능을 평가할 수 있는 방법을 개발하고자 하였다. 현재까지 vasocon-

striction assay가 국소스테로이드의 효력 평가에 있어서 표준화된 방법으로 쓰이고 있으나, 실제 임상 질환에 대한 효력 평가를 완전히 대체할 수는 없을 것으로 생각된다. 스테로이드 제제를 비롯한 국소약제의 항염 효과에 대한 평가 방법으로는 매우 다양한 방법이 소개되어왔다^{9,10}. 알레르기성 염증을 이용한 방법은 크게 두 가지로 나누어질 수 있는데, 첫째는 철폐 시험 이전에 국소제제를 도포함으로써 염증의 억제 효과를 보는 것이고^{11,12}, 다른 한 가지는 염증을 일으킨 후에 회복에 대한 효과를 보는 것이다^{13,14,15}. 실제 항염제의 효능 평가를 위해서는 두 번째 방법이 적당하다고 사료된다. 이와 같은 실험모델에서 일차적으로 염증의 유발이 중요한데 이전의 연구에서 이러한 염증을 유발하는 방법으로는 철폐점사를 통해 니켈(nickel), Rhus 등에 대한 접촉피부염을 유발하여 이에 대한 영향을 평가한 연구들이 보고된 바 있다^{13,14,16}. 또한, DNCB를 이용하여 시행한 실험이 이와 같은 목적의 효능 평가에 적당하다고 보고한 연구자도 있었다¹⁵. 이번에 사용한 DPCP는 Rhus나 니켈에 비해 더욱 강력한 감작제(sensitizer)로 감작을 유발할 수 있고, DNCB와는 달리 돌연변이유발성(mutagenicity)이 보고되어 있지 않다. 따라서, DPCP가 항염제 평가를 위한 염증 유발에 좋은 모델이라고 생각한다. 위의 실험 과정에서 한번 도포하였을 때 약 89%에서 감작을 일으킬 수 있었고, 염증 유발은 각각의 피험자마다 세 부위에 철폐점사를 사용하여 약 71%에서 세 부위 모두 적절한 염증이 유발되었다. 이는 기존의 보고와 비슷한 결과로 생각된다¹⁷. 항원의 종류와 함께 철폐 시험의 방법이 중요한데 니켈과 colophony 등의 항원을 이용한 이전의 연구에서 24시간만 철폐를 부착한 보고도 있으나¹⁸, 예비실험에서 24시간 철폐점사로는 염증이 유발되지 않는 경우가 많아서 48시간 철폐시험을 시행하였다.

위의 결과에서 염증의 회복과정에 국소제제가 미치는 영향을 알아볼 수 있었으며, 10일간의 도포기간중 약 5일간 도포한 후부터 TEWL 및 LDF 측정에서 치료군간에 유의한 차이를 보였고, 육안적 평가로는

8일째부터 유의한 차이가 나타나기 시작했다. 기존의 연구에서 첩포시험후 72시간 혹은 4일 동안만^{14,15)} 효능을 평가하였는데 본 실험에서는 기존의 보고보다는 훨씬 긴 10일간 연속적으로 염증의 추이를 관찰하였다. 오랜 시간 동안의 추이를 관찰함으로써 여러 측정방법을 이용했을 때 항염제들의 효과 차이를 볼 수 있는 시점이 언제인가를 알아보는 좋은 자료가 되었다고 생각한다. 강력한 국소 스테로이드인 desoxymethasone을 도포하였을 경우에도 10일째에 1+ 정도의 염증이 남아 있었고, 도포시작후 시간이 경과함에 따라 좀더 대조군과 치료군 사이의 임상적 차이가 커지므로, 5일내에 시험을 중단하고 효능을 판정하기보다 10일 정도 계속하는 것이 알레르기성 접촉피부염에 대한 항염제의 효과를 알아보는 변별력있고 효과적인 방법이라고 생각한다.

저자들이 사용한 측정 방법은 모두 4가지인데 기존의 보고와 같이 TEWL과 LDF은 육안적 평가와 함께 염증의 정도를 잘 반영하였으나, EI는 염증의 정도를 잘 반영하지 못하였다. 이는 저자들이 보호크림의 평가에 대해 이들 기구를 이용했을 때의 연구 결과와 같았다¹⁹⁾. Queille-Roussel 등은 니켈에 의한 접촉피부염을 유발한 후 TEWL, LDF와 colorimeter를 이용하여 국소제제의 효능을 평가하였고, 이러한 방법이 육안적 평가와 좋은 상관 관계를 보였다고 보고하였다¹⁴⁾. 이후 연구에서 high frequency ultrasound를 이용하여 피부의 두께를 측정하는 것이 좀더 효과적인 방법이라고 보고한 연구자들도 있다^{20,21)}. 이 실험에서 알 수 있듯이 TEWL과 LDF가 염증의 중증도 평가에도 사용될 수 있을 것으로 생각된다. 위의 실험에서 강한 효력을 가진 desoxymethasone은 항염작용이 검증되었으나, 국소 도포용 NSAID에 대해 알려진 바와 같이 NSAID인 diclofenac은 알레르기성 염증에 대해 효과가 없었다¹⁴⁾.

이러한 실험 모델은 vasoconstriction assay에 비해 수행하기가 매우 어려운 단점이 있다. 그러나, 국소 스테로이드제제의 효력을 분류하는데 있어서도 vasoconstriction assay만으로는 불완전하다고

사료되기 때문에 다른 실험 모델을 병용하는 것이 바람직한 것으로 주장되었다²¹⁾. 향후 다양한 실험 모델의 개발과 표준화된 방법의 확립이 필요하다고 생각한다.

요 약

연구배경 :

국소제제의 항염 작용을 평가하기 위한 방법이 소개되었지만, 객관적이고 표준화된 방법이 확립되어 있지는 않다. 저자들은 두 가지 국소제제의 항염효과를 평가하고, 이를 통해 객관적이고 변별력 있는 평가 방법을 개발하고자 연구를 시행하였다.

방 법 :

DPCP에 감작된 대상자에서 이를 이용하여 인위적으로 접촉피부염을 유발한 후에 0.25% desoxymethasone연고와 0.1% diclofenac크림을 10일간 하루 두 번씩 도포하면서 염증에 대한 효과를 평가하였다. 염증반응의 중증도는 육안적 평가와 함께 비침습적인 측정 기구를 이용하여 경피적 수분 손실량 (TEWL), 피부 혈류량(LDF), 홍반지수(EI)를 측정하였다.

결 과 :

강력한 국소 스테로이드제제인 desoxymethasone은 염증의 회복에 효과가 있었고, diclofenac 크림은 효과가 없는 것으로 나타났다. 객관적 측정 방법들 중에서 경피적 수분 손실량과 피부 혈류량은 육안적 평가와 우수한 상관 관계를 보였다.

결 론 :

유발된 알레르기성 접촉피부염을 이용하여 항염효과를 평가할 수 있었다. 이 실험과 같은 방법은 향후 스테로이드제제를 비롯한 국소제제의 항염 효능 평가에 응용될 수 있을 것으로 생각된다.

참 고 문 헌

1. Gibson JR, Kirsch JM, Darley CR, Burke CA,

- Hanson ME. *An assessment of the relationship between vasoconstrictor assay findings, clinical efficacy and skin thinning effects of a variety of undiluted and diluted corticosteroid preparations.* *Br J Dermatol* 1984;111 (suppl 27):204-212
2. 이병호, 김수남. 시판중인 19종의 국소부신피질호르몬제의 혈관수축능에 관한 연구. *대한피부과학회지* 1979;17:207-213
3. Cornell RC, Stoughton RB. *Correlation of the vasoconstriction assay and clinical activity in psoriasis.* *Arch Dermatol* 1985;121:63-67
4. Smith EW. *Four decades of topical corticosteroid assessment.* *Curr Probl Dermatol* 1995; 22:124-131
5. Ahluwalia A, Flower RJ. *Investigations into the mechanism of vasoconstrictor action of the topical steroid betamethasone-17-valerate in the rat.* *Br J Dermatol* 1993;108:544-548
6. Hepburn DJ, Aeling JL, Weston WL. *A reappraisal of topical steroid potency.* *Pediatr Dermatol* 1996;13:239-245
7. Shah VP, Peck CC, Skelly JP. 'Vasoconstriction' - skin blanching-assay for glucocorticoids-a critique. *Arch Dermatol* 1989;125: 1558-1511
8. Rietschel RL, Fowler JF. *Fisher's contact dermatitis, 4th ed.* Baltimore:Williams & Wilkins, 1995:29
9. Ashworth J. *Potency classification of topical corticosteroids:modern perspectives.* *Acta Derm Venereol(Stockh)* 1989;69(suppl 151): 20-25
10. Goa KL. *Clinical pharmacology and pharmacokinetic properties of topically applied corticosteroids. A review.* *Drugs* 1988; 36(suppl 5):51-61
11. Sukanto H, Nater JP, Bleumink E. *Influence of topically applied corticosteroid on patch test reactions.* *Contact Dermatitis* 1981;7:180-185
12. Surber C, Itin P, Bchner S, Maibach HL. *Effect of a new topical cyclosporin formulation on human allergic contact dermatitis.* *Contact Dermatitis* 1992;26:116-119
13. Kaidbey KH, Kligman AM. *Assay of topical corticosteroids. Efficacy of suppression of experimental Rhus dermatitis in humans.* *Arch Dermatol* 1976;112:808-810
14. Queille-Roussel C, Duteil L, Padilla JM, Poncet M, Czernielewski J. *Objective assessment of topical anti-inflammatory drug activity on experimentally induced nickel contact dermatitis:comparison between visual scoring, colorimetry, laser Doppler velocimetry and transepidermal water loss.* *Skin Pharmacol* 1990;3:248-55
15. Rees JL, Matthews JNS, Friedmann PS. *Quantifying anti-inflammatory agents' potency by measurement of response to dinitrochlorobenzene challenge.* *J Dermatol Sci* 1992;4:1-5
16. Meigel W. *Allergic contact dermatitis-description of a test model for topical anti-inflammatories with particular reference to the leukotriene-C4 antagonist Ro-23-3544.* *Arch Dermatol Res* 1991;283:278-279
17. Naylor MF, Neldner KH, Yarbrough GK, Rosio TJ, Iriondo M, Yeary J. *Contact immunotherapy of resistant warts.* *J Am Acad Dermatol* 1988;19:679-683
18. Crijns MB, Nater JP, van Oostveen F, van der Valk PGM. *Vasoconstrictor and the anti-in-*

- flammatory effects of 7 corticosteroids. Contact Dermatitis* 1984;11:108-111
19. 서대현, 문승현, 김석우, 임정구, 김상덕, 장인진, 신상구, 은희철. 보호크림 효능 평가 방법의 개발과 적용. *임상약리학회지* 1997;5:61-70
20. Seidenari S, Di Nardo A, Giannetti A. Assessment of topical corticosteroid activity on experimentally induced contact dermatitis: Echographic evaluation with binary transformation and image analysis. *Skin Pharmacol* 1993;6:85-91
21. Seidenari S, Di Nardo A, Giannetti A. Parallel intraindividual evaluations of the vasoconstrictory action and the anti-allergic activity of topical corticosteroids. *Exp Dermatol* 1997;6:75-80