

효과적 *in vitro* 항비듬 측정법으로서의 Skin Disk Diffusion Method(SDDM)

서 경 희, 신 계 호, 신 문 삼, 김 종 일, 서 성 환
(주)태평양 기술 연구원

초록

항비듬 샴푸에 대한 비중이 증가되는 현 샴푸시장에서 항비듬력을 측정할 수 있는 간단한 *in vitro* 실험법의 요구가 증대되고 있다. 기존의 항비듬력의 측정을 위하여 사용되고 있는 방법으로는 *Pityrosporum ovale*에 대한 MIC test와 halo test가 널리 쓰이고 있으나, *Pityrosporum* 배지의 자체 탁도 때문에 균의 성장 여부를 육안으로 관찰하기 어렵고, 종이 디스크와 두피와의 차이에 의하여 실제 사용과 효과가 다르다는 단점이 있었다. 저자들은 임상 실험을 거치기 전 간단히 항비듬력을 측정 할 수 있는 *in vitro* 방법으로 skin disk diffusion method (SDDM)를 개발하였다. SDDM에서는 종이 디스크 대신 기니픽의 피부 조직을 사용하고, 항비듬 제제의 처리 후 세척 단계를 포함시켜 실제 사용과의 차이를 줄였다. SDDM의 유용성을 확인하기 위하여 항비듬 제제로 2.0% ketoconazole, 분산된 상태의 zinc pyrithion(ZPT ; 0.1-1.0%), 분자화 기술로 활성을 높인 ZPT (0.1-1.0%)에 대해 기존의 *in vitro* 시험법과 함께 항비듬력을 측정하였다. 결과는 SDDM 시험에서만 2.0% ketoconazole 제제와 분자화된 0.5% ZPT 제제의 억제대가 비슷한 것으로 나타나 임상 시험에서 두 제제 모두 비듬에 대해 개선 효과가 있었으며 항 비듬 효과에 차이가 없다는 결과와 일치하였다. 본시험의 결과로 SDDM이 항비듬 샴푸와 같은 wash-off 제품의 효능 측정에 간단하고 효과적인 적절한 *in vitro* 시험법으로 생각되어 SDDM 시험과 임상 시험결과를 소개한다.

서론

지루피부염(Seborrheic dermatitis)은 만성경과를 보이는 습진으로서 피지의 분

비가 왕성한 두피, 얼굴 및 몸통 상부의 피부에서 발생하며 임상 양상은 유성(oily type)인 경우로부터 홍반성 인설이 있는 발진이나 건선과 유사한 염증성 반점이 있는 것까지 매우 다양하다. 이런 지루피부염¹ 경미하지만 매우 흔한 형태가 건성 비강진 혹은 비듬인데, 증상은 일반적으로 염증 소견 없이² 건성의 쌀겨 모양의 번들번들한 인설이 특징적이며 가려움과 심한 경우 염증을 동반하기도 한다.³ 비듬의 원인은 피지의 과다분비가 주원인이고, 호르몬의 불균형, 두피 세포의 과다증식, 또한 가족력이 있는 경우가 많아 유전적 소인도 과거부터 자주 강조되어 왔고, 피부에 상주하는 진균의 일종인 *Pityrosporum ovale*도⁴ 중요한 역할을 하며, 긴장이나 스트레스와 같은 정신적 장애에 의해 악화되기도 한다. 증상 정도가 다양하여 여러 가지 치료 방법이 이용되고 있는데, 지방이 적게 함유된 음식 섭취, selenium sulfide, ketoconazole, zinc pyrithion을 함유한 샴푸로 세척하거나 스테로이드 제제의 로션, 용액, gel을 바르기도 한다.⁵

Zinc pyrithion(ZPT)은 *Aspergillus flavus*가 만드는 항생물질인 aspergillic acid의 유도체로서 1950년대 중반에 합성되어 항균제로 사용되어 왔다.⁵ ZPT는 antikeratinolytic 물질로 간주되고,⁶ membrane transport, macromolecular synthesis, 세포 구조와 기능에 영향을 미치고, chelating effect⁷와 pH gradient에 변화를 일으켜⁸ 항균 작용이 있는 것으로 생각되며 최근 들어 시판중인 여러 항비듬 샴푸에 함유되어 비듬에 효과가 있음이 알려지고 있다.⁹

기존의 항비듬력의 측정을 위하여 사용되고 있는 방법으로는 *Pityrosporum ovale*에 대한 Minimum inhibition concentration(MIC) test와 Halo test가 널리 쓰이고 있으나, MIC test의 경우 *P. ovale*의 배지인 *Pityrosporum* 배지의 자체 탁도 때문에 균의 성장 여부를 육안으로 관찰하기 어렵다는 단점이 있었으며, halo test의 경우 사용되는 종이 디스크와 두피와의 차이에 의하여 실제 사용과 효과가 다르다는 단점이 있었다. 항비듬 샴푸에 대한 비중이 증가되는 현 샴푸시장을 고려해 볼 때, 항비듬 제제의 항비듬력을 측정할 수 있는 간단한 *in vitro* 실험법 요구가 증대되고 있으며, 저자들은 임상 실험의 번거로운 단계를 거치기 전 좀 더 간단히 항비듬력을 측정 할 수 있는 *in vitro* 방법으로 잔류 항비듬력을 측정하는 skin disk diffusion method (SDDM)를 개발하게 되었다.

재료 및 방법

1. *In vitro* test

1) 약제 및 시험 균주

시료는 Dispersion ZPT, Molecular ZPT, ketoconazole 및 약제 함유 샴푸로 실험하였고, 실험에 사용한 균주는 American Type Culture Collection에서 분양 받은 *Pityrosporum ovale* ATCC 12087을 사용하였다.

2) 배지

배지는 bacteriological peptone 0.1%, glucose 0.5%, yeast extract 0.01%, ox bile 0.4%, glycerol 0.1%, glyceryl monostearate 0.05%, 10% whole-fat cow's milk 1%로 이루어진 *P. ovale* 배지를 사용하였으며, 한천 배지일 경우 1.2%의 bactoagar를 첨가하였다.

3) 디스크 제작

피부 디스크는 calf skin disk 제조 방법(CIBA-Geigy)을 응용하여 기니픽의 복부 피부를 박피, 제모하고, CaO, Ca(OH)₂, sodium sulfide, ammonium sulfate등으로 liming, deliming과정을 반복하여 직경 12 mm 디스크로 만들어 사용하였고, paper disk는 filter paper(ADVANTEC, Japan)를 동일 직경으로 만들어 사용하였다.

4) 전배양 및 접종

*P. ovale*의 1차 전배양은 *P. ovale* 액체 배지를 사용하여 37°C에서 48시간 배양하였고, 이를 10⁵-10⁶ cfu/ml되도록 *P. ovale* 한천 배지에 접종하여 bio-assay dish(243 x 243 x 18 mm, Falcon, U.S.A)에 두께 3-5 mm 정도로 먼저 굳혀 놓은 SD agar 배지 위에 부어서 고체 평판배지를 만들었다.

5) MIC test (Broth dilution method)

Dispersion ZPT, Molecular ZPT, Ketoconazole을 시료로 하였고, *P. ovale* 균을

배양배지에서 37°C, 48 시간 전배양한 후, 시료를 배지에 serial dilution하여 준비하고, 전배양한 균액을 10^5 - 10^6 cell/ml 이 되도록 접종하였다. 37°C에서 48시간 배양한 후 현미경으로 미생물 증식 여부를 확인하여, 균이 증식되지 않는 최소 농도를 MIC로 결정하였다.

6) Halo test(Disk diffusion method)

종이 디스크와 피부디스크의 두께와 무게가 동일한 것을 골라 70% ethanol에 30분간 담귀 멸균을 한 뒤 여분의 ethanol을 증발시켜 건조시키고 멸균수에 1시간 담구어 수화시켰다. 수화시킨 디스크는 거름종이로 물기를 제거한 뒤 1/3로 희석한 샴푸 용액에 3분 동안 담귀 흡착 시켰고, 거름종이 사이에 넣어 여분의 샴푸를 제거한 뒤 *P. ovale*이 접종되어있는 고체 평판배지에 올려놓고 핀셋으로 밀착 시켰다. 4°C에서 16-18시간 확산 처리한 후 37°C에서 48시간 배양하고 억제대의 크기를 측정하였다.

7) Wash-off test(Paper disk method와 SDDM)

Halo test 와 동일한 방법으로 실행했으며, 희석한 샴푸 용액에 3분 동안 담귀 흡착시킨 후 디스크를 꺼내어 흐르는 물(300 ml/min)에 20초간 씻어내는 wash-off 단계를 첨가하였다.

2. 임상 시험

21-47세의 비듬 있는 성인 44명(남-30명, 여-14명)을 대상으로 0.5% molecular ZPT 함유 샴푸(덴트롤 닥터, 태평양), 2.0% dispersion ZPT 함유 샴푸, 2.0% ketoconazole 함유 의약품의 항비듬 효과를 비교 실험하였다. 임상 시험전 2주간 일반 샴푸(항비듬 제제 비함유)로 주 3회 머리를 감게 하였으며, 각 제품을 주 2-3회, 4주간 사용한 후 2주마다 비듬 무게, clinical scoring, 설문조사로 항비듬 효과를 측정하였다. 통계 처리 방법은 비듬 무게 측정의 경우 Bonferroni test를, clinical scoring일 경우 Wilcox signed rank test와 Kruskal-Wallis test를 사용하였다.

결과

1. *In vitro* test

1) *P. ovale*에 대한 MIC

ZPT의 *P. ovale*에 대한 MIC는 1-8 $\mu\text{g/ml}$ 이며, ketoconazole은 0.1-1 $\mu\text{g/ml}$ 로 ZPT에 비해 MIC가 낮았다. Molecular type의 ZPT가 Dispersion type의 ZPT보다 MIC가 낮아서, 분자화 기술에 의한 항 비듬력의 증가가 기대되는 결과이다 (Table 1).

2) Halo test 및 wash-off test 결과

Paper disk halo test 결과 ZPT 농도 증가에 따라 억제대 크기가 약간 커졌지만 뚜렷하지 않았고, skin disk의 halo test 결과에서는 molecular ZPT 시료의 농도증가에 따른 억제대 크기의 증가가 나타나지 않았으며, 두 결과에서 모두 ketoconazole 제제의 억제효과가 가장 높았다(Fig. 1, Fig. 2).

Wash-off 시험의 경우 paper disk 시험에서는 dispersion type의 ZPT 만이 paper disk에 잔존하여 억제대가 나타났(Fig. 1, Fig. 2). 이것은 paper disk가 특정 물질(dispersion type ZPT)과 친화력을 가지기 때문으로 보이며 실제 피부와는 차이가 있으리라 생각되었다. SDDM 시험에서는 dispersion type ZPT 샴푸, molecular type ZPT 샴푸 모두 농도에 따른 억제대 증가가 뚜렷하였고, molecular type ZPT 샴푸의 항균력이 높은 것으로 나타났으며, molecular type ZPT 0.5% 함유 샴푸의 항비듬균 효과가 ketoconazole 2.0% 제제와 비슷한 것으로 나타났.

Table 1. The value of the minimum inhibitory concentration of antidandruff agents against *P. ovale*.

시료	MIC ($\mu\text{g/ml}$)
ZPT : Dispersion type	3-8
ZPT : Molecular type	1-2
Ketoconazole	0.1-1

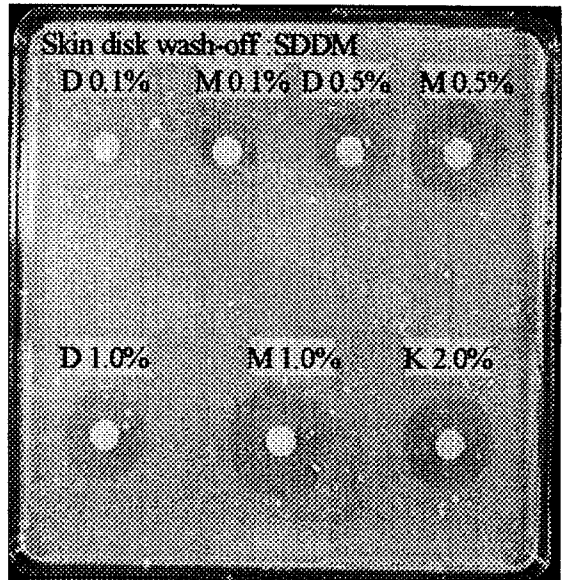
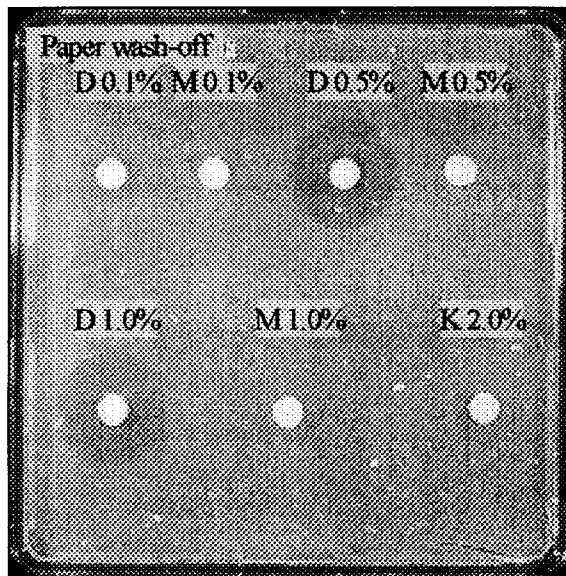
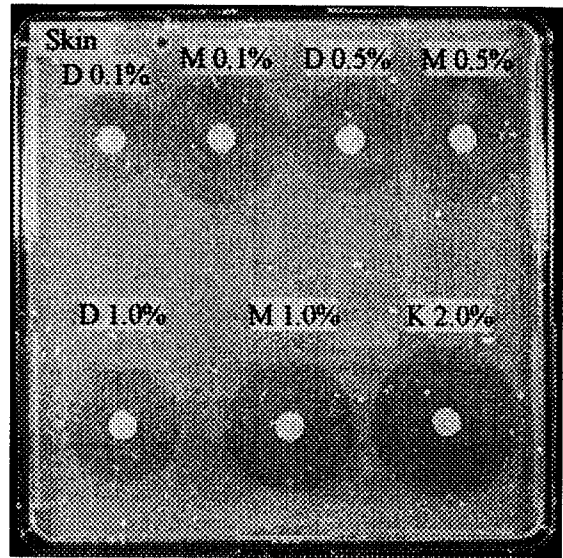
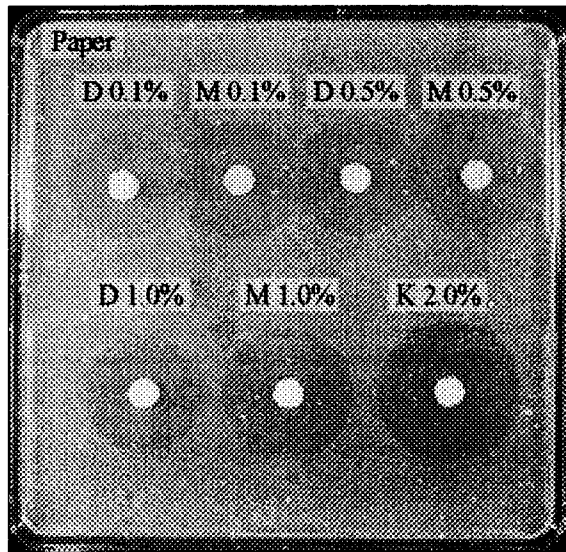


Fig. 1. Halo test Results.

D : Dispersion ZPT, M : Molecular ZPT, K : Ketoconazole

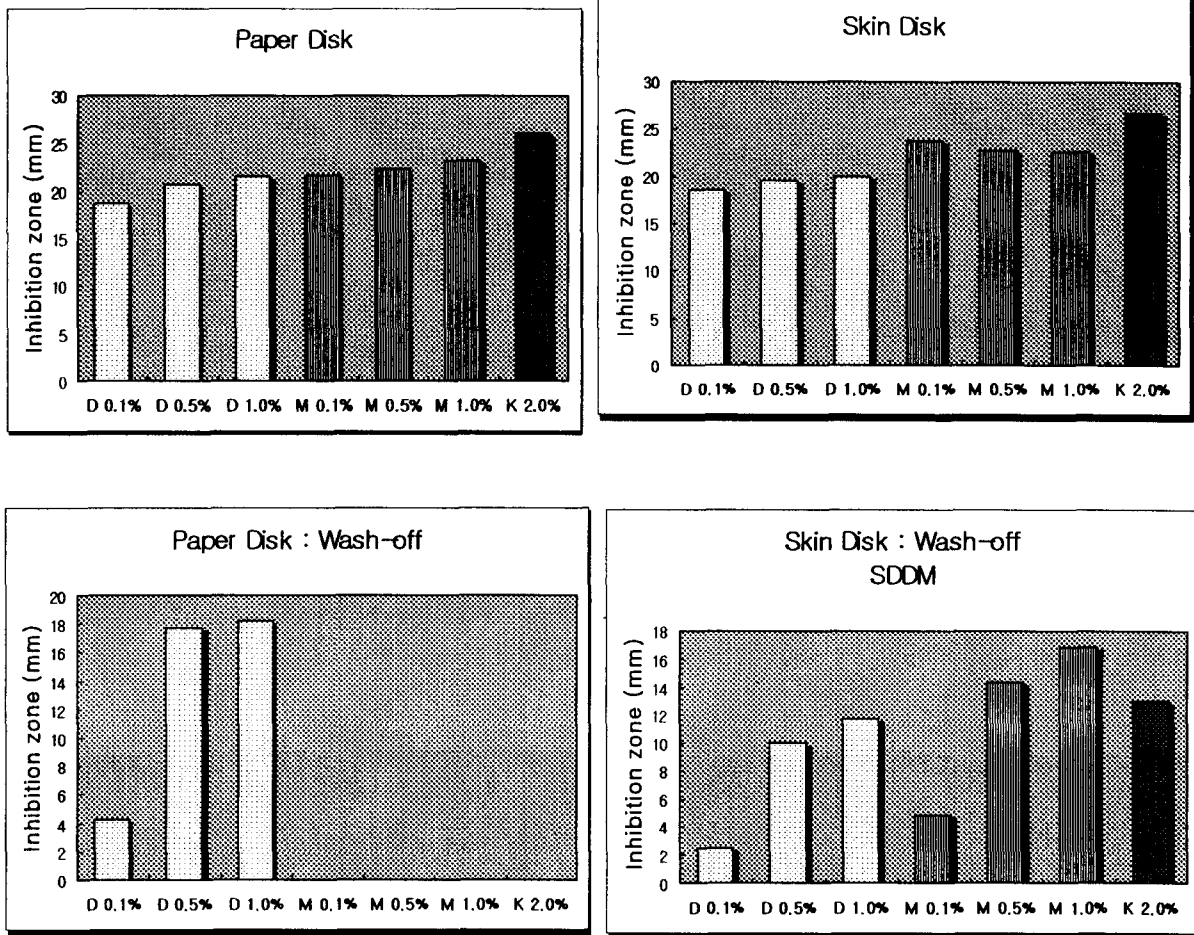


Fig. 2. Halo test results, Graph.

D : Dispersion ZPT, M : Molecular ZPT, K : Ketoconazole

2. 임상 시험 결과

(1) 비듬 무게 측정

덴트를 닥터 샴푸, 2.0% dispersion ZPT 샴푸, 2.0% ketoconazole 제제 등 3개 시료에 대한 4주간 임상 결과 squama quantity는 세 가지 시료 모두 유의하게 감소하여 효과가 있었던 것으로 생각되었다(Table 2, Fig. 3). 덴트를 닥터 샴푸의 경우 14일 후 피검자의 47%만이 인설 무게가 감소하여 비듬량 차이가 없었고 (평균 0.3 ± 1.2 mg), 28일 후에는 피검자의 87%의 인설 무게가 감소하여 비듬량이 감소(3.6 ± 0.8 mg)한 것으로 나타났다. Dispersion ZPT 2.0% 샴푸의 경우

에는 14일 후 71% 피검자의 인설 무게가 감소하여 비듬량이 감소(3.6 ± 1.4 mg)하였고, 28일 후에는 92% 피검자의 인설 무게가 감소하여 비듬량이 감소(5.6 ± 1.4 mg)한 것으로 나타났다. Ketoconazole 2.0% 제제의 경우 14일 후 83% 피검자의 인설 무게가 감소하여 비듬량이 감소(2.3 ± 1.1 mg)하였고, 28일 후 93% 피검자의 인설 무게가 감소하여 비듬량이 감소(3.4 ± 0.8 mg)한 것으로 나타나, 세 제품 모두 28일 사용 후 인설의 양이 감소하였고, 세 제품간 유의차는 없었다.

Table 2. Dandruff weighing

	Mean \pm SEM (in mg)		
	D0	D14	D28
D	5.3 ± 0.7	5.0 ± 0.8	1.7 ± 0.5
H	8.2 ± 1.5	4.6 ± 0.9	2.5 ± 0.8
N	4.8 ± 0.6	2.5 ± 0.7	1.3 ± 0.5

Dandruff Weighing

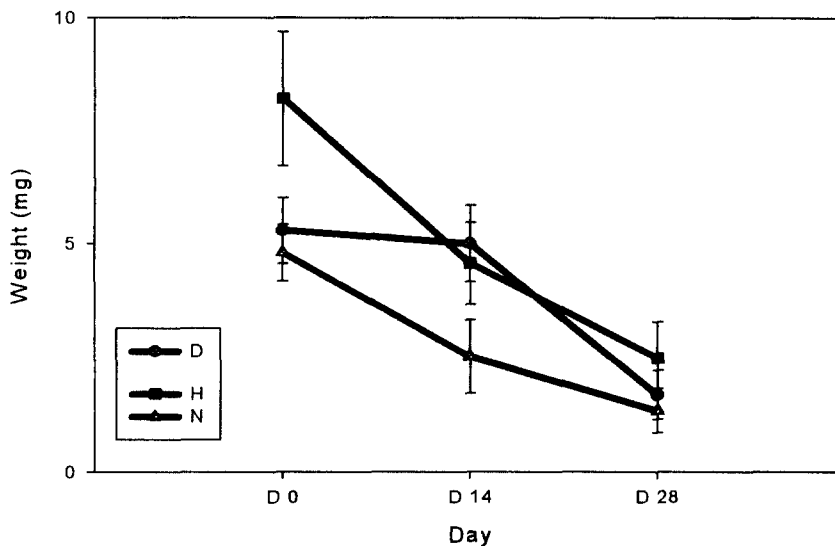


Fig. 3. Dandruff weighing.

D : Dantrol doctor, 0.5% molecular ZPT product

H : 2.0% dispersion ZPT product,

N : 2.0% ketoconazole product

(2) Clinical scoring

Table 3. Clinical score (0 : 없음 - 5 : 두피 전체에 비듬 존재).

Score(Mean ± SEM)	D(-15)	D 0	D 14	D 28
D	3.3 ± 0.1	3.5 ± 0.3	1.7 ± 0.3	1.5 ± 0.2
H	3.8 ± 0.2	3.9 ± 0.2	1.8 ± 0.3	1.4 ± 0.3
N	3.1 ± 0.1	3.1 ± 0.2	1.7 ± 0.2	1.3 ± 0.2

세 제품 모두 사용 14일 이내에 비듬 개선 효과가 있는 것으로 확인되었고 시료간 효과의 유의한 차이는 없었다(Table 3, Fig. 4). 그 외에 주관적인 설문 조사에서도 대부분의 피검자들이 제품 사용 14-28일 후 비듬이 감소하는 것으로 나타났다.

한편 videomicroscopic visualization에서도 세 시료 모두 28일 사용 후 인설이 감소하였고, 시료간 차이는 없는 것으로 보였다(Fig. 5).

Clinical evaluation of Dandruff

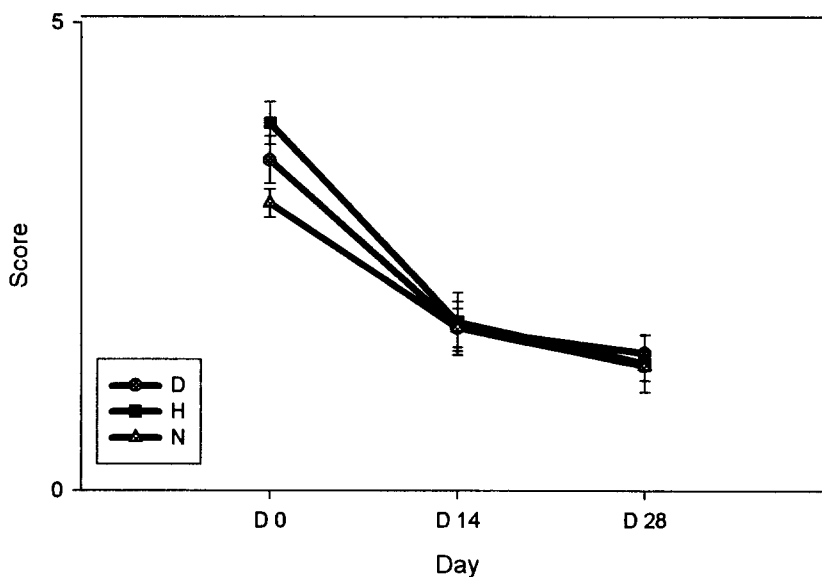


Fig. 4. Clinical evaluation of dandruff.

D : 0.5% molecular ZPT product, H : 2.0% dispersion ZPT product,
N : 2.0% ketoconazole product

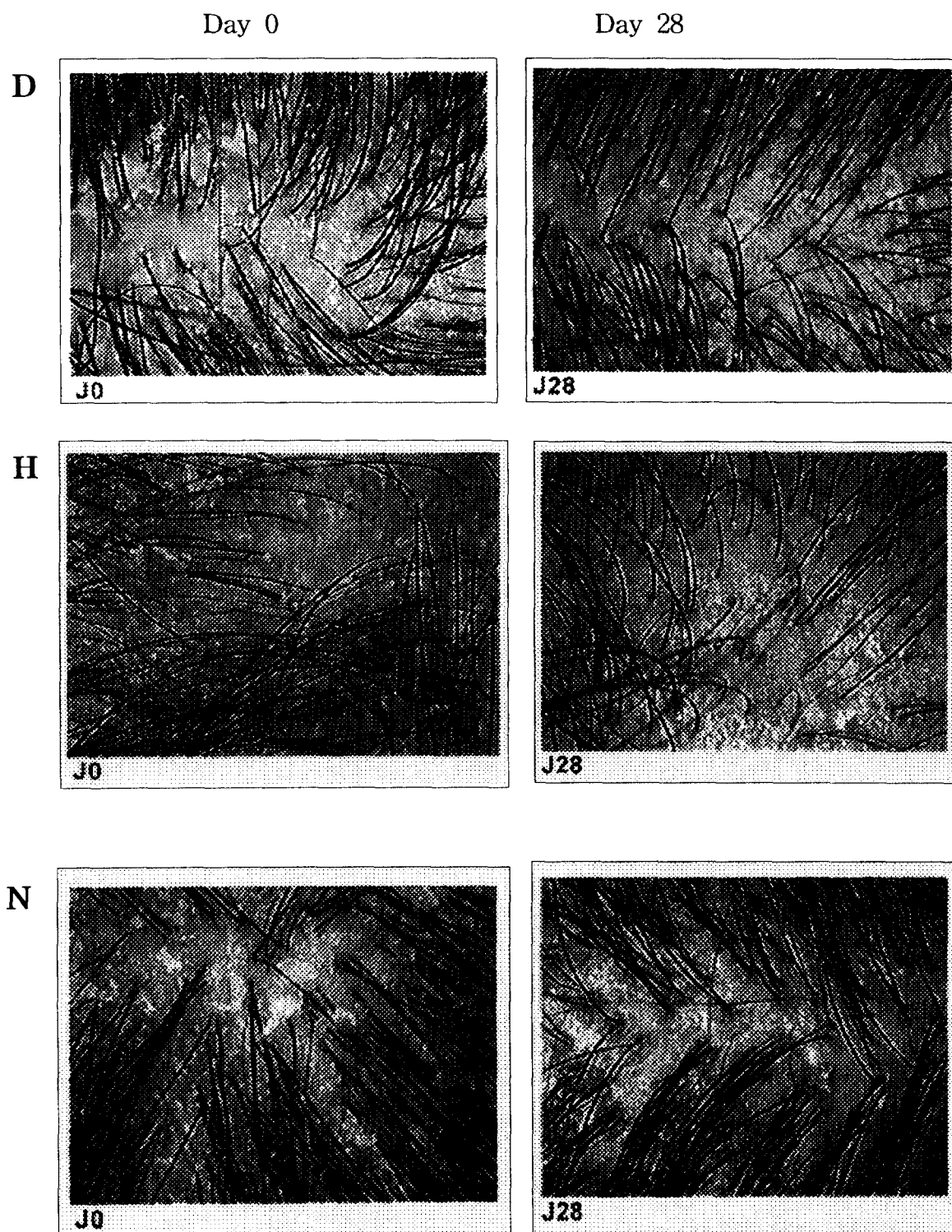


Fig. 5. Videomicroscopic visualization of scalp.

D : 0.5% molecular ZPT product

H : 2.0% dispersion ZPT product

N : 2.0% ketoconazole product

고찰

항비듬 샴푸에 대한 비중이 증가되며 항비듬 제제의 항비듬력을 측정할 수 있는 간단한 *in vitro* 시험법이 요구되고 있다. 기존의 *in vitro* 항비듬력 측정 방법으로는 MIC 측정과 disk diffusion(halo test) 방법이 있었으나, MIC 측정의 경우 *Pityrosporum* 배지의 자체 탁도 때문에 broth dilution 방법으로 균의 증식 여부를 확인하기가 쉽지 않았고, paper disk diffusion 방법의 경우에는 paper와 두피의 차이를 고려할 수 없다는 단점이 있었다. 그리고 두 가지 방법 모두 샴푸와 같은 wash-off 제품 사용 후 피부에 잔존하여 나타나는 항균력은 측정할 수 없어 실제 사용할 때의 효과를 예측하기 어려웠다.

저자들은 번거롭고 비용이 많이 드는 임상시험에 앞서 항비듬 효과를 측정할 수 있는 SDDM 방법을 개발하였고, 다른 *in vitro* 방법과 함께 임상 시험 결과와의 연관성을 비교하였다.

우선 *in vitro* test 결과부터 살펴보면, MIC test를 통해 Ketoconazole이 ZPT에 비하여 MIC가 낮았고, molecular type의 ZPT가 dispersion type의 ZPT보다 낮아서 분자화 기술에 의해 ZPT의 항비듬 활성이 증가함을 확인하였다(Table 1). 이것은 분자화 기술로 ZPT 사용량을 줄이면서도 항비듬 효과를 나타낼 수는 있지만, ketoconazole만큼의 항비듬력을 기대하기는 어려운 결과이다.

다음 paper disk와 기니픽 skin disk를 이용한 halo test 및 wash-off test 결과를 살펴보면 paper disk halo test 결과 ZPT 농도 증가에 따라 억제대 크기가 약간 커졌지만 뚜렷하지 않았고, skin disk의 halo test 결과에서는 molecular ZPT 시료의 농도증가에 따른 억제대 크기의 증가가 나타나지 않았으며, 두 결과에서 모두 ketoconazole의 억제효과가 가장 높았다. Wash-off 시험의 경우 paper disk 시험에서는 dispersion type의 ZPT 만이 paper disk에 잔존하여 억제효과가 나타났고, SDDM 시험에서는 dispersion type ZPT, molecular type ZPT 모두 농도에 따른 억제력 증가가 뚜렷하였고, molecular type ZPT의 항균력이 높은 것으로 나타났으며, 0.5% molecular ZPT의 항균 효과가 ketoconazole 2.0%와 비슷한 것으로 나타나 0.5% molecular ZPT로 1.0% dispersion ZPT 나 2.0% ketoconazole과 동등 또는 그 이상의 항비듬력을 발휘할 수도 있음을 제시하였다.

임상 결과는 덴트를 닥터(molecular type 0.5% ZPT)와 2.0% dispersion ZPT 샴푸, Ketoconazole 2.0% 제제 모두 비듬에 대해 효과가 있었고, 시료간에 유의한 차가 없음($p < 0.01$)을 확인케 하였다. *In vitro* test 가운데 0.5% molecular ZPT 샴푸와 2.0% dispersion ZPT 제제의 항균력이 동등한 결과는 SDDM 결과였는데, SDDM 결과가 임상 시험 결과와 일치하고 있다. 그러나 0.5% dispersion type ZPT 샴푸에 대한 임상시험이 병행되었다면 더욱 일관되게 결과를 비교할 수 있었으리라 생각된다.

Table 4. 항비듬력 측정법 비교

	비교항목	MIC	Shaking-flask	Paper disk	SDDM	임상
비듬 측정	항균력	◎	◎	○	○	×
	피부흡착력	×	×	×	◎	×
	가려움	×	×	×	×	○
	효과 예측	×	×	×	○	◎
실험 측면	수치화	◎	◎	◎	◎	○
	경제성	◎	◎	◎	◎	×
	노동력, 시간	◎	○	◎	○	×
	재현성	◎	◎	◎	◎	○

◎ : 아주 좋음, ○ : 좋음, × : 나쁨

항비듬력을 측정하는 방법들을 Table 4에 정리해 보았다. MIC 방법이나 shaking flask 방법, paper disk diffusion 방법은 항균력 측정과 수치화, 경제성, 재현성 등에서 우수하지만, 피부에 잔존하여 발휘되는 항균력을 측정 할 수 없으며, 임상 시험은 실제 사용에 가장 근접한 결과를 얻을 수 있고, 가려움, 안전성등 *in vitro* 방법으로는 접근할 수 없는 부분까지 측정할 수 있지만, 많은 시간과 노력, 비용이 소모된다는 단점이 있다.

이상의 결과들을 종합해 볼 때 *in vitro* 시험 방법 중 SDDM이 과학적인 피부

잔존 항균력 측정법으로서 임상시험과 유사한 결과를 예측할 수 있는 방법임을 확인 할 수 있었고, 임상 시험에 앞서 샴푸와 같은 wash-off 제품의 항균력 측정 에 간편한 응용을 기대 할 수 있었다.

참고문헌

1. Ackerman A. B. and Kligman A. M., Some observations on dandruff. *J Soc Cosmet Chem*, 1969;20:81-101
2. Hay R. J. and Graham-Brown R. A. C. , Dandruff and seborrhoeic dermatitis : causes and management, *Clinical and Experimental Dermatology*, 1997;22:3-6
3. Kligman A. M., McGinley K. J., Leyden J. J., The nature of dandruff. *J Soc Cosmet Chem* 1976;27:111-139
4. Schmidt A., Malassezia furfur : A fungus belonging to the physiological skin flora and its relevance in skin disorders, *Cutis*, 1997;59:2124
5. McGrath J. and Murphy G. M., The control of seborrhoeic dermatitis and dandruff by antipityrosporal drugs, *Drugs*, 1991;41:178-184
6. Shaw E., Bernstein J., Losee K., Lott W. A., Analogs of aspergillic acid. IV. Substituted 2-bromopyridine-N-oxides and their conversion to cyclic thiohydroxamic acids. *J Am Chem Soc* 1950;72:4362-4364
7. Lott W. A., Show E., Analogs of aspergillic acid. I. The tautomerism of the hydroxypyridine N-oxides. *J Am Chem Soc* 1949;71:67-70
8. Chandler C. J., Segel I. H., Mechanism of the antimicrobial action of pyrrithione; effects on membrane transport, ATP levels, and protein synthesis. *Antimicrob Agents Chemother* 1978;14:60-68
9. Imokawa G, Shimizu H., Okamoto K., Antimicrobial effect of zinc pyrithione. *J Soc cosmet Chem* 1982;33:27-37