



A Evaluation of Biological Safety in Risk Management of Conventional Contact Lens Containing Phosphorylcholine

Seung-Kwon Cho^{1,2,*}, Ji-Hoon Park¹, and Gyun-Tack Lim¹

¹Dept. of Polymer Engineering, Chonnam National University, Gwang-Ju 61186, Korea

²Photo Newmaterial Research Center, Geo Medical Co., Ltd, Gwang-Ju 61007, Korea

(Received February 5, 2018: Revised March 9, 2018: Accepted March 14, 2018)

Purpose: The aim of this study is to evaluate the degree of cytotoxic response in terms of risk management by conducting *in vitro* cytotoxicity test as a part of securing the biological safety of soft contact lens containing phosphorylcholine (PC). **Methods:** A hydrogel-type soft contact lens was prepared from 2-HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) as a representative of the basic skeleton of soft contact lenses, and PC as a derivative of phospholipid. As part of ensuring biological safety, the packaging and sterilization process was performed to evaluate the cytotoxicity test, and the test was conducted in the state of the finished product. The cytotoxicity tests were evaluated by extraction method (direct contact), growth inhibition test and agar diffusion test method. **Results:** In the extraction test method, The reagent control and negative control did not show cytotoxicity (Grade 0) and the positive control showed cytotoxicity more than medium (>Grade 2). In qualitative analysis, 10% of Confluent monolayer, 10% of Growth inhibition, 10% of Cells without intracellular granulation, 10% of Rounding, 10% of Lysis and Reactivity of Slight were observed with Grade 1. The effluent of the substance may be said to have very weak reactivity to cultured cells. Cell viability was 106.8% for MTT, 100% for blank test, 2.4% for positive control, and 106.5% for negative control. No cell death or morphological changes were observed in the test group treated with the test substance after 24 hours of incubation by microscopic observation. In the agar diffusion test method, no discoloration zone was observed on the middle layer of the cells to which the test substance was administered, and no cell lysis was observed in the lower part of the specimen. Reactivity zone was not observed in the middle layer of the solvent control and negative control, and the positive control group had a reactivity zone of 0.5 cm or more as expected. **Conclusions:** The biological stability of hydrogel-type soft contact lenses consisting of PC and 2-HEMA was evaluated in terms of risk management in order to achieve the intended performance in the design development process. In addition, no cytotoxic substances have been eluted in the production of corneal epithelium, and no adverse effects due to irritation or immune response on the corneal surface are expected.

Key words: Cytotoxicity, Phosphorylcholine, Soft contact lens

서 론

최근 시력교정, 패션, 치료용 그리고 진단용 등 다양한 목적으로 사용되어지고 있는 콘택트렌즈는 그 사용 인구가 늘어나면서^[1] 상용화를 위한 시장 진입 전 제품 제조업자 측면에서는 그에 대한 안전성 확보가 가장 우선적으로 해결해야 할 과제이며 이를 위해 국내외적으로 관련 규격에 부합되도록 해야 한다.^[2]

콘택트렌즈는 국내외적으로 의료기기(Medical devices)로 분류되어 있어서 해당국의 규정이나 고시에 따라 인허가를 득해야 제품을 시장에 판매할 수 있다.^[3] 의도된 사

용을 위해 적절하게 설계되어진 의료기기인 콘택트렌즈는 사용하기 위해 안전(Safe)해야 한다고 규정되어 있다.^[3] 즉, 의료기기를 사용할 때 사용자에게 부작용을 야기하는 그 어떠한 해로운(Harmful) 물질도 노출되어서는 안 된다는 의미이다.

제품을 제조하는 제조업자를 포함하여 일부 사람들은 직접 첨가제든지 혹은 간접 첨가제든지 FDA(USA) 같은 관리기관에 승인된 소재(Materials)나 의학적 등급(Medical grade)의 소재들로 만들어진 제품들은 관리용역을 포함해서^[4] 생체적합성이 충분하다는 잘못된 인식을 가지고 있다. 여기서 의학적 등급이라 것은 합법적이고 또는 규제적

*Corresponding author: Seung-Kwon Cho, TEL: +82-62-973-0740, E-mail: skcho917@hanmail.net

인 정의는 아니므로 생물학적 안전성 평가와 같은 생체적 합성 시험 결과가 확보되어 있지 않으면 오해의 소지를 가져올 수 있다.

콘택트렌즈는 생체조직인 각막 표면에 접촉하여 사용하는 것으로 국제적인 규격인 ISO10993(혹은 준하는 기준)¹⁵⁾에 따라 신체 접촉의 특성 분류는 표면접촉 의료기기이며, 접촉 부위는 점막, 그리고 접촉 지속기간에 따라 24시간 이하인 경우에는 세포독성시험, 감각성 시험, 자극 또는 피내 반응시험을 실시하여야 한다. 만일 24시간 초과 30일까지 접촉 또는 30일 초과 영구적으로 삽입 및 이식한 경우에는 추가적으로 전신 독성시험(급성시험), 아만성 독성(아급성 독성)시험, 유전 독성시험 그리고 이식 시험을 하여야 한다.^{16,7)}

최근 콘택트렌즈 착용자들은 하루 종일 착용해도 안전하고 편안한 착용감이 유지되기를 원한다. 그러나 착용자에 따라서는 중도에 콘택트렌즈 착용을 포기하는 상황들이 발생하며 그 이후로는 콘택트렌즈 착용을 두려워하는 경우들도 발생한다. 많은 임상연구자들은 이러한 가장 큰 이유는 각막 표면과 콘택트렌즈와의 표면 습윤성 때문일 것이라고 주장 하고 있다.¹⁸⁾

콘택트렌즈 표면에 라이조자임을 포함한 단백질 같은 침착물들이 생겨서 표면 습윤성이 감소될 수 있고, 렌즈 표면의 수분과의 친화력이 낮아 상대적으로 렌즈 표면에 건조감을 야기시키는 요인들로 인해 표면 습윤성이 낮아질 것이라고 보고되고 있다.¹⁹⁾

그래서 최근에는 콘택트렌즈 물성 거동,¹⁰⁾ 생체재료의 표면개질화 관점에서 적용 및 응용되고 있는 소재로서 생체 세포막과 유사한 분자구조를 갖고 있는 포스포틸콜린(Phosphorylcholine, PC) 성분이 관심의 대상이 되고 있다. 이는 친수성을 지니면서 동시에 전기적으로 중성인 성질로, 생체의학 분야에서 혈전 생성 억제 기능, 단백질 흡착 억제 기능, 다양한 생체적합성 특성 등에 우수한 효과로 알려지면서 다양한 표면처리 기술로 응용되어 왔다. 더 나아가 화장품의 기능성 향상, 콘택트렌즈 케어 등 그 사용범위가 넓어지면서 많은 연구자들에게 연구개발의 대상이 되어왔다.¹¹⁻¹³⁾

본 연구에서는 친수성이 높고 전기적으로 중성인 성질을 지닌 포스포틸콜린 첨가제를 2-HEMA(2-Hydroxyethyl methacrylate)과 가교된 하이드로겔 형태의 콘택트렌즈 시료를 제작하였다. 제작된 시료를 용출시켜 검체액으로 하고 용출법, 한천확산시험(Agar diffusion test), 그리고 세포의 성장저해시험인 증식저해시험(MTT test)을 식품의약품안전처 고시인 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격에 따라 *in vitro* 세포독성시험 평가를 통해 세포독성 반응의 정도를 파악하여 생물학적 안전성을 확보하고

자 하는데 그 목적이 있다.

대상 및 방법

1. 시약 및 재료

시험물질로 수용성 망상구조를 지닌 하이드로겔 형태의 소프트콘택트렌즈 시료를 제조하기 위해 HEMA(2-Hydroxyethyl Methacrylate)는 고순도 제품인 BX-HEMA-PC(BIMAX,USA)를 구매하여 정제과정 없이 그대로 사용하였으며, 열중합 반응에 필요한 개시제로는 AIBN(2,2'-Azobisisobutyronitrile)을 JUNSEI(JAPAN)에서 구입하여 사용하였다. 고분자간에 가교역할을 하는 가교제로는 가장 일반적인 EGDMA(Ethylene Glycol Dimethacrylate)를 TCI (JAPAN)에서 구입하여 그대로 사용하였다. 하이드로겔 형태의 소프트콘택트렌즈 시료에 표면습윤성을 강화하고, 수분과 친화력이 높으며 중성적 성질을 지니며 콘택트렌즈 물성의 개질화를 위해 첨가한 포스포틸콜린 소재는 Sigma aldrich(USA)에서 구입하여 시료를 제작하였다.

용출법에 사용되는 배지 및 부형제(Medium and vehicle)는 10% serum(제조사:Gibco)으로 구성된 1×MEM (Minimum essential medium)과 혈청(Serum) House serum(제조사Gibco)을 사용하였다. 음성대조물질(Negative control)은 High Density Polyethylene Film (제조사:Hatano Research Institute)이고, 양성대조물질(Positive control)은 ZDEC PolyurethanFilm (제조사:Hatano Research Institute)으로 사용하였다.

시험계에서 시험세포주는 NCTC Clone 929 (L-929)(공급원:ATCC,USA)를 사용하였으며, 시험계의 선택사유는 이 세포는 세포독성시험에 있어서 화학물질에 대한 감수성이 높은 것으로 알려져 있으며 세포독성시험과 관련된 자료가 풍부하기 때문에 선정하였다.

MTT방식에서 부형제(Vehicle)는 멸균생리식염수(제조사:대한약품공업(주))를 사용하였으며, 배지 I(Medium I)는 20% horse serum(제조사:Gibco)으로 구성된 2×MEM이며, 배지 II(Medium II)는 10% serum(제조사:Gibco)으로 구성된 1×MEM를 사용하였다. 혈청은 Horse serum(제조사:Gibco)으로 보관조건 -15 ~ -20°C에서 보관하였다.

음성대조물질 명칭은 High Density Polyethylene Film (제조사:Hatano Research Institute), 양성대조물질은 ZDEC Polyurethan Film(제조사: Hatano Research Institute)을 사용하였다.

그리고 한천확산시험에서 배지 I(Medium I)은 20% horse serum으로 구성된 2×MEM, powder(제조사:Gibco), 배지 II(Medium II)는 10% horse serum(제조사:Gibco)으로 구성된 1×MEM이며, 혈청은 Horse serum(제조사:Gibco)이며 보관조건 -15 ~ -20°C에서 보관하여 사용하였다.

2. 실험방법

1) 하이드로겔 형태의 소프트콘택트렌즈 시료 제작

콘택트렌즈 시료를 제작하기 위해 HEMA, PC 및 개시제와 가교제를 물 비로 구성하여 혼합한 후 상온에서 2시간동안 교반한 후 열중합을 이용하여 곡률형태의 시료를 제작하였다. 본 연구에서 사용하는 하이드로겔 형태의 소프트콘택트렌즈는 소프트상태까지 수화되고 멸균까지 수행된 완제품상태로 평가하였다.

하이드로겔 형태의 콘택트렌즈 형상을 위해 Male과 Female로 구성된 플라스틱 캐비티를 사용하여 일정한 두께가 형성되도록 열중합으로 고분자반응 및 성형시켰다. 중합이 완료된 콘택트렌즈 시료는 0.9% 생리식염수에 24시간동안 하이드레이션 시켰으며, 미반응 물질 제거를 위해 추출과정을 걸쳤다. 추출과정이 완료된 시료를 가지고 외관 및 형상, 지름, 두께, 곡률반경 등 기본적인 규격 검사, 엣지 형상을 포함한 외관 검사를 수행한 후 제품의 위험관리 측면에서 리스크를 최소화하기 위해 포장 후 멸균공정을 거친 완제품으로 세포독성시험을 평가하였다.

2) 평가 방법

(1) 용출법

고형의 시험물질(하이드로겔 콘택트렌즈)을 세포에 적용하기 위하여 10% 혈청이 첨가된 MEM배지를 이용하여 용출하는 방식으로 검액을 조제하였다. 시험물질 4g 당 10% 혈청이 첨가된 MEM배지 20 mL의 비율로 무균적으로 조작 후, (37±1)°C에서 (24±2)시간 동안 (5±1)% CO₂ 인큐베이터 내에서 용출하고 이 액을 검액으로 사용하였다. 이 검액을 직접 세포에 접촉시킴으로써 시험물질의 용출액이 세포에 나타내는 영향을 현미경 상에서 관찰하였다. 용매대조군의 경우 시험물질을 제외한 MEM배지를 시험물질과 동일한 용출조건으로 용출하였다. 용출용매로 사용된 10% 혈청이 첨가된 MEM배지는 시험물질이 인체에 적용되는 상황과 가장 유사한 생리적 상황을 유지하기 위하여 선정하였다. 음성대조군 및 양성대조군은 제조사

(Hatano Research Institute)의 세포독성시험 방법에 근거하여 1 g 당 1 × MEM배지 10 mL의 비율로 (37±1)°C에서 (24±2)시간 동안 (5±1)% CO₂ 인큐베이터에서 용출하여 사용하였다. 시험물질은 조제 후 24시간 내에 시험에 사용하였다.

시험계에서 시험세포주는 NCTC Clone 929(L-929) (공급원:ATCC (American Type Culture Collection, USA)를 사용하였으며, 배양조건으로는 배양액:10% Horse serum 및 항생제[Penicillin (100 Units/mL)/Streptomycin (100 µg/mL)]를 포함하는 Minimum Essential Medium (pH 7.4), 조건: (5±1)% CO₂, (37±1)°C에서 배양하여 3 ~ 4일마다 계대하였다.

시험방법으로 먼저 정성분석이 있는데 단층 배양된 세포에 트립신 (Trypsin/EDTA)을 처리하여 세포농도가 1 mL 당 10⁵개가 되도록 조정하고 약 10 cm²의 6 well plate (35 mm/well)에 2 mL 씩 접종하였다. 24시간동안 배양하여 단층 배양이 된 well을 선택하고 각각의 시험군 및 대조군으로 표기한 다음 배지를 제거하였다. 이후 시험물질 용출액, 용매대조군, 음성대조군 및 양성 대조군을 3개의 선택한 well에 2 mL씩 투여하고 (5±1)% CO₂, (37±1)°C에서 48시간동안 배양하였다. 배양 후, 현미경 상으로(100×) 세포의 용해나 형태를 관찰하였다.

다음으로는 정량분석으로 세포의 용해나 형태를 관찰한 후, 트립신 (Trypsin/EDTA)을 처리하여 세포를 플레이트에서 떼어낸 후 각 시험군에서의 생세포를 계수하였다.

세포독성의 판단은 다음과 같이 진행하였다. 세포의 균일한 단층 (Confluent monolayer)이 존재하는 경우에는 (+), 존재하지 않는 경우에는 (-)로 표현하였다. 배양된 각 well의 세포 용해도와 세포의 형태적 변화 정도를 기록하였다. 또한 음성대조군과 시험군의 배지의 색도 비교하여 관찰하였다. 배지의 색이 노란색으로 변하는 경우 배지가 용출물에 의해 산성으로 변하였다고 판단하고, 심홍색이나 보라색으로 변하는 경우 배지가 염기성으로 변하였다고 판단하였다.

Table 1. Qualitative morphological grading of cytotoxicity of extracts

Grade	Reactivity	Conditions of all cultures
1	None	Discrete intracytoplasmatic granules, no cell lysis, no reduction of cell growth.
2	Slight	Not more than 20% of the cells are round, loosely attached and without intracytoplasmatic granules, or show changes in morphology; occasional lysed cells are present; only slight growth inhibition observable.
3	Mild	Not more than 50% of the cells are round, devoid of intracytoplasmatic granules, no extensive cell lysis; not more than 50% growth inhibition observable.
4	Moderate	Not more than 70% of the cell layers contain rounded cells or are lysed; cell layers not completely destroyed, but more than 50% growth inhibition observable.
5	Severe	Nearly complete or complete destruction of the cell layers.

세포독성시험의 최종적 결과 판독은 다음의 식품의약품 안전처 고시 제2014-115호, 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격, ISO 10993-5에서 제시한 Table 1에 따라 실시하였다.

(2) 증식저해시험(MTT cytotoxicity test)

고형의 시험물질을 세포에 적용하기 위해 시험물질 4g 당 생리식염수 20 mL의 비율로 (70±2)°C에서 (24±2)시간 동안 용출하였다. 이후 혈청이 첨가된 2×MEM 배지와 동량 섞은 다음 이 액을 검액으로 사용하였다. 용매대조군(Blank)의 경우 시험물질을 제외한 생리식염수를 시험물질과 동일한 용출조건으로 용출한 후 혈청이 첨가된 2×MEM 배지와 동량 섞어 사용하였다. 음성 대조군, 양성 대조군은 제조사(Hatano Research Institute)의 세포독성시험 방법에 근거하여 1 g 당 1×MEM배지 10 mL의 비율로 (37±1)°C에서 24시간동안 (5±1)% CO₂ 인큐베이터에서 용출하여 사용하였다. 검액들은 조제 후 24시간 내에 시험에 사용하였다. 이 검액을 직접 세포에 접촉시킴으로써 시험물질의 용출액이 세포에 어떤 영향을 미치는지 MTT 방식으로 관찰하였다.

시험계의 시험세포주는 NCTC Clone 929(L-929)(공급원 ATCC(American Type Culture Collection, USA)사용하였다. 배양조건으로 배양액:10% horse serum 및 항생제 [Penicillin (100 Units/mL)/Streptomycin (100 µg/mL)]를 포함하는 MEM(pH 7.4), 조건:(5±1)% CO₂, (37±1)°C에서 배양하여 3~4일마다 계대하였다.

시험방법으로 단층 배양된 세포에 트립신(Trypsin/EDTA)을 처리하여 세포농도가 1 mL당 10⁵개가 되도록 조정하고 96 well plate에 100 µL 씩 (1.0×10⁴ cells/well) 접종하였다. 접종 후 24시간 동안 배양하여 단층 배양이 된 well을 선택하고 각각의 시험군 및 대조군으로 표기한 다음 배지를 제거하였다. 각각의 검액을 6개의 선택된 well에 100 µL 씩 처리하고 (5±1)% CO₂, (37±1)°C에서 24시간 동안 배양하였다. 음성대조군, 양성대조군, 용매대조군(Blank) 또한 동일한 방법으로 처리하여 배양하였다. 배양 후, 배지를 제거하고 MTT 1 mg/mL이 포함된 배양액을 50 µL/well씩 처리한 후 다시 2시간 동안 배양하였다. 이후 배양액을 제거하고 isopropanol을 각각의 well에 100 µL 씩 넣어 formazan을 용해한 후 microplate reader를 이용하여 570 nm (Reference 650 nm)에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교 조사하였다.

세포독성의 판단은 다음과 같다. MTT cytotoxicity로부터 얻은 시험물질을 처리한 군의 optical density(OD) 값과 용매대조군의 OD값을 비교하여 세포의 생존율 (Cell viability)을 구하고 세포 생존율이 용매대조군 대비 70% 미만으로 감소한 경우 세포독성이 있다고 판단한다.

세포독성시험의 세포 생존율(%)은 다음의 식품의약품안전처고시 제2014-115호, MTT cytotoxicity test, 다음 식에 따라 계산하였다.

$$Viability(\%) = \frac{100 \times O}{OD_5}$$

OD_{570e} : 시험물질을 처리한 군의 OD값

OD_{576b} : 용매대조군으로 배양액만 처리한 군(Blank)의 OD값

시험의 유효성 입증을 위해, 용매대조군의 OD값은 최소 0.2 이상이어야 하며, 음성 대조군에서는 세포독성을 나타내지 않아야 한다. 양성 대조군은 세포 생존율이 용매대조군의 70% 이하이어야 하고 중간 이상의 세포독성을 나타내어야 한다. 또한 대조 액이 예상했던 결과를 나타내지 않을 경우 재시험을 실시한다.

(3) 한천확산시험(Agar diffusion test)

시험물질은 무균적으로 준비하여 바로 사용하였다. 음성대조군 및 양성대조군은 1.0 cm × 1.0 cm의 크기로 잘라서 사용하였다.

시험계에서 시험세포주는 NCTC Clone 929 (L-929)(공급원:ATCC) 를 사용하였다. 배양조건으로 배양액:10% horse serum 및 항생제 [Penicillin (100 Units/mL)/Streptomycin (100 µg/mL)]를 포함하는 MEM(pH 7.4), 조건:(5±1)% CO₂, (37±1)°C에서 배양하여 3~4일마다 계대하였다.

시험방법은 단층 배양된 세포에 트립신(Trypsin/EDTA)을 처리하여 세포농도가 1 mL당 10⁵개가 되도록 조정하고 약 10 cm²의 6 well plate (35 mm/well)에 2 mL 씩 접종하였다. 24시간 동안 배양하여 단층 배양이 된 well을 선택하고 각각의 시험군 및 대조군으로 표기한 다음 배지를 제거하고 2×MEM 배양액과 3% 한천을 1:1로 혼합하여 2 mL 씩 배양접시에 증중하였다. 고형화된 평판에 시험물질과 양성 및 음성대조를 각각 3개의 well에 올려놓았다. 이 평판을 (5±1)% CO₂, (37±1)°C에서 48시간 배양 후 현미경으로 세포를 관찰하였다. 이후 검체를 제거하고

Table 2. Reactivity grades for agar and filter diffusion test and direct contact test

Grade	Reactivity	Description of reactivity zone
0	None	No detectable zone around or under specimen
1	Slight	Some malformed or degenerated cells under specimen
2	Mild	Zone limited to area under specimen
3	Moderate	Zone extending specimen size up to 1.0 cm
4	Severe	Zone extending farther than 1.0 cm beyond specimen

Neutral red를 사용하여 염색성의 저하를 관찰하였다.

세포독성시험의 최종적 결과 판독은 다음의 식품의약품 안전처고시 제2014-115호, 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격, ISO 10993-5에서 제시한 다음의 Table 2에 따라 실시하였다.

시험의 유효성 입증을 위해 용매대조군과 음성대조군은 세포독성을 나타내지 않아야 하고(세포독성등급 0), 양성대조군은 중간 이상의 세포독성을 나타내야 한다(> 세포독성등급 2). 각 대조군이 예상했던 결과를 나타내지 않거나 3개의 시험군에서 서로 다른 결과가 관찰되었을 때에는 재시험을 실시한다.

결과 및 고찰

1. 용출법

시험의 유효성 입증을 위해, 용매대조군과 음성대조군은 세포독성을 나타내지 않아야 하고(Grade 0), 양성대조군은 중간 이상의 세포독성을 나타내어야 한다(>Grade 2). 각 대조군이 예상했던 결과를 나타내지 않거나 3개의 시험군에서 서로 다른 결과가 관찰되었을 때에는 재시험을 실시한다.

세포의 형태적 변화나 용해정도를 나타낸 정성분석 결과는 Table 3에 나타났다. 시험물질의 용출물이 투여된 세포에서 배양 후 균일한 단층은 유지되었으나 약 10%의 증식저해가 관찰되었다. 따라서 시험물질의 용출물은 배양 세포에 대해 아주 미약한 반응성이 있다고 볼 수 있다. 또한 생세포의 계수를 통해 정량분석을 실시해 본 결과, 시

험물질의 용출물이 살아있는 세포 수에 아주 미약하게 영향을 미치는 것을 확인할 수 있었다(Table 4).

용매대조군 및 음성대조군 역시 배양세포에 대해 독성을 나타내지 않았으며, 양성대조군은 예상했던 대로 전체 세포의 75% 이상에서 세포독성을 야기하였다.

본 시험의 시험조건 하에서 시험물질의 MEM 용출물은 배양배지의 산성도를 변화시키지 않는 것으로 판단되지만 마우스 섬유아세포에 아주 미약한 증식저해를 나타내는 것으로 보인다(Table 3, 4).

따라서 본 시험에 사용된 시험물질의 용출물은 아주 미약한 세포독성이 있는 것으로 사료되고, 식품의약품안전처 고시 제2014-115호, 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격의 세포독성 판단기준에 따라 세포독성등급 1(Slightly cytotoxic)로 판단된다. 또한 Grade 2(Mild) 이하

Table 4. Results of quantitative analysis

	Result of cell counting (cells/mL)			
	Test group	Reagent control	Negative control	Positive control
1	6.1×10^5	7.3×10^5	7.1×10^5	0
2	6.5×10^5	6.8×10^5	7.0×10^5	0
3	5.9×10^5	7.1×10^5	6.8×10^5	0
Average	6.2×10^5	7.1×10^5	7.0×10^5	0
RCC* (%)	87.3	100.0	98.6	0.0

RCC(Relative cell counting, %) = $\frac{\text{Cell number of testgroup}}{\text{Cell number reagent control group}} \times 100$

Table 3. Results of qualitative analysis

Well	Confluent monolayer	% Growth inhibition	% Cells without intracellular granulation	% Rounding	% Lysis	Reactivity	Grade
Test(1)	(+)	10	10	10	10	Slight	1
Test(2)	(+)	10	10	10	10	Slight	1
Test(3)	(+)	10	10	10	10	Slight	1
Negative control(1)	(+)	0	0	0	0	None	0
Negative control(2)	(+)	0	0	0	0	None	0
Negative control(3)	(+)	0	0	0	0	None	0
Reagent control(1)	(+)	0	0	0	0	None	0
Reagent control(2)	(+)	0	0	0	0	None	0
Reagent control(3)	(+)	0	0	0	0	None	0
Positive control(1)	(-)	100	100	100	100	Severe	4
Positive control(2)	(-)	100	100	100	100	Severe	4
Positive control(3)	(-)	100	100	100	100	Severe	4

(+):present, (-):absent

Table 5. Results of cytotoxicity test

Treatment	OD 570 nm (Reference 650 nm)						Mean	Relative cell viability (%)
	1	2	3	4	5	6		
Blank	0.629	0.604	0.639	0.543	0.567	0.532	0.5857	100.0
Test article	0.660	0.630	0.640	0.636	0.580	0.608	0.6257	106.8
Positive control	0.009	0.014	0.018	0.018	0.016	0.010	0.0142	2.4
Negative control	0.629	0.625	0.649	0.626	0.583	0.632	0.6240	106.5

이어야 하는 일반적 의료기기의 세포독성 시험기준에도 시험물질은 부합하는 것으로 보인다. 용매대조군, 음성대조군 및 양성대조군의 시험결과는 예상했던 바와 같아 본 시험 결과의 유효성을 입증하였다.

2. 증식저해시험(MTT cytotoxicity test)

본 시험의 결과로 MTT test에 의한 세포 생존율은 Table 5에 나타내었다. 시험물질의 검액 조제 시 특이한 사항은 관찰되지 않았으며, 시험물질이 투여된 배지의 pH 변화도 관찰되지 않았다. 24시간 배양 후 시험물질이 처리된 시험군에서의 현미경 관찰 시 세포의 사멸 및 세포의 형태적 변화는 관찰되지 않았다. 용매대조군 및 음성대조군 역시 현미경 관찰 시 배양세포에 대해 독성을 나타내지 않았으며, 양성대조군은 예상했던 대로 심한 세포독성을 야기하였다.

MTT test는 세포의 대사활성능을 통하여 세포의 생존율을 측정하는 방식으로 용해 가능한 황색 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid)가 Mitochondria 내에서 succinate dehydrogenase에 의해 불용성의 청색 MTT formazan으로 환원되는 정도를 흡광도로 측정하는 방법으로 일반적인 세포독성의 정량적 시험에 쓰이는 보편적인 시험 방법 중의 하나이다.

본 시험 조건 하에서 시험물질의 용출액은 용매대조군 대비 100%의 세포 생존율(Cell viability)을 나타내는 것으로 확인되었으며, 식품의약품안전처고시 제2014-115호, 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격에서 제시하는 세포독성 판단기준(세포 생존율 70% 이상)에 부합하는 것으로 보인다.

용매대조군, 음성대조군 및 양성대조군의 시험결과는 예상했던 바와 같아 본 시험 결과의 유효성을 입증하였다.

3. 한천확산시험(Agar diffusion test)

한천확산시험에 의한 세포독성시험의 최종적 결과 판독은 다음의 식품의약품안전처고시 제2014-115호, 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격, ISO 10993-5에서 제시한 다음의 Table 2에 따라 실시하였다.

Table 6. Results of cytotoxicity (Agar) test

Test article /Control	Reactivity zone (mm)	Reactivity	Cytotoxicity grade	
Test article	(1)	0	None	0
	(2)	0	None	0
	(3)	0	None	0
Negative control	(1)	0	None	0
	(2)	0	None	0
	(3)	0	None	0
Blank	(1)	0	None	0
	(2)	0	None	0
	(3)	0	None	0
Positive control	(1)	6	Moderate	3
	(2)	6	Moderate	3
	(3)	6	Moderate	3

시험의 유효성 입증을 위해 용매대조군과 음성대조군은 세포독성을 나타내지 않아야 하고(세포독성등급 0), 양성대조군은 중간 이상의 세포독성을 나타내야 한다(>세포독성등급 2). 각 대조군이 예상했던 결과를 나타내지 않거나 3개의 시험군에서 서로 다른 결과가 관찰되었을 때에는 재시험을 실시한다.

결과는 시험에 있어서 탈색 zone의 상태와 용해의 정도는 Table 6에 나타내었다. 3개의 시험물질이 투여된 세포의 중층 상에서 탈색 zone은 관찰되지 않았으며, 검체 아래 부분에서의 세포용해 정도도 관찰되지 않았다. 따라서 시험물질은 본 시험환경 상에서 배양세포에 대한 반응성이 없다고 볼 수 있다.

용매대조군과 음성대조군은 중층 상으로 Reactivity zone이 관찰되지 않았으며, 양성대조군은 예상했던 대로 0.5 cm 이상의 Reactivity zone이 관찰되었다.

본 시험의 시험조건 하에서 시험물질은 마우스 섬유아 세포의 어떠한 용해나 독성을 나타내지 않는 것으로 보인다. 따라서 본 시험에 사용된 시험물질은 세포독성이 없는 것으로 사료되고, 식품의약품안전처고시 제2014-115호의 세포독성시험 판단기준에 따라 세포독성등급 0(Noncytotoxic)으로 판단된다. 또한 세포독성 등급 2(Mildly cytotoxic) 이하이

어야 하는 일반적 의료기기의 세포독성 시험기준에도 시험물질은 부합하는 것으로 보인다.

용매대조군, 음성대조군, 및 양성대조군의 시험결과는 예상했던 바와 같아 본 시험 결과의 유효성을 입증하였다.

결 론

본 연구에서는 친수성이 높고 전기적으로 중성의 성질을 지닌 포스포릴콜린 소재를 2-HEMA에 첨가하여 하이드로겔 형태의 소프트콘택트렌즈를 포장 후 멸균공정까지 마친 완제품 상태로 제작하였으며 이를 시험물질로 하였다. 제작한 소프트콘택트렌즈는 의료기기로서 위험관리 측면의 생물학적 안전성 확보 차원에서 용출법, 증식저해시험 그리고 한천확산시험법으로 세포독성시험을 실시하였다.

용출법에서는 본 시험의 시험조건 하에서 시험물질의 MEM 용출물은 배양배지의 산성도를 변화시키지 않는 것으로 판단되지만 마우스 섬유아세포에 아주 미약한 증식저해를 나타내는 것으로 보였다. 따라서 본 시험에 사용된 시험물질의 용출물은 아주 미약한 세포독성이 있는 것으로 사료되고, 식품의약품안전처 고시 제2014-115호, 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격의 세포독성 판단기준에 따라 세포독성등급 1(Slightly cytotoxic)로 판단된다. 또한 Grade 2(Mild) 이하이어야 하는 일반적 의료기기의 세포독성 시험기준에도 시험물질은 부합하는 것으로 보인다. 용매대조군, 음성대조군 및 양성대조군의 시험결과는 예상했던 바와 같아 본 시험 결과의 유효성을 입증하였다.

증식저해시험에서는 시험물질의 용출액은 용매대조군 대비 100%의 세포 생존율(Cell viability)을 나타내는 것으로 확인되었으며, 식품의약품안전처고시 제2014-115호, 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격에서 제시하는 세포독성 판단기준(세포 생존율 70% 이상)에 부합하는 것으로 확인되었다.

한천확산시험법으로는 시험물질은 마우스 섬유아세포의 어떠한 용해나 독성을 나타내지 않는 것으로 보였다. 따라서 본 시험에 사용된 시험물질은 세포독성이 없는 것으로 사료되고, 식품의약품안전처고시 제2014-115호의 세포독성시험 판단기준에 따라 세포독성등급 0 (Noncytotoxic)으로 판단된다. 또한 세포독성 등급 2 (Mildly cytotoxic) 이하이어야 하는 일반적 의료기기의 세포독성 시험기준에도 시험물질은 부합하는 것으로 확인되었다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 설계 개발과정에서 의도된 성능을 구현하기 위해 포스포릴콜린 소재와 2-HEMA로 이루어진 하이드로겔형태의 소프트콘택트렌즈의 생물학적 안전성은 위험관리 측면에서 검토 시 그리고 이를 제품화하는데 있어서 세포독성을 유발하는 물질이 용출되지

않았으며 각막 표면에 자극성이나 면역반응에 따른 부작용은 발생하지 않을 것으로 사료된다.

REFERENCES

- [1] Kim TH, Sung AY. Study on the current standardization status in contact lens field. *J Korean Ophthalmic Opt Soc.* 2006;11(4):351-355.
- [2] Tsuchiya T, Arai T, Ohhashi J, Imai K, Kojima H, Miyamoto S. Rabbit eye irritation caused by wearing toxic contact lenses and their cytotoxicities: in vivo/in vitro correlation study using standard reference materials. *J Biomed Mater Res.* 1993;27(7):885-893.
- [3] Official Journal of the European Union. Regulation of the European Parliament and of the Council, 2017. [http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ENG/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0745&from=EN\(20 March 2018\).](http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ENG/TXT/PDF/?uri=CELEX:32017R0745&from=EN(20 March 2018).)
- [4] Ko EG, Na MS, Lee JB. Cytotoxicity of clone 1-5C-4 cell lines and effect on rabbit cornea by soft contact lens multi-purpose solution (MPS). *J Korean Ophthalmic Opt Soc.* 2007;12(3):19-25.
- [5] ISO(International Organization for Standardization). ISO 10993-1:2009, Biological evaluation of medical devices-Part 1: Evaluation and testing within a risk management process, 2009. [https://www.iso.org/standard/44908.html\(20 March 2018\).](https://www.iso.org/standard/44908.html(20 March 2018).)
- [6] MFDS(Ministry of Food and Drug Safety, Korea). General Standard for Biological Safety of Medical Devices No.2014-115, 2014. [http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=1013&seq=8299&cmd=v\(20 March 2018\).](http://www.mfds.go.kr/index.do?mid=1013&seq=8299&cmd=v(20 March 2018).)
- [7] ISO(International Organization for Standardization). ISO 10993-5:2009, Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity, 2009. [https://www.iso.org/standard/36406.html\(20 March 2018\).](https://www.iso.org/standard/36406.html(20 March 2018).)
- [8] Chalmers RL, Begley CG. Use Your Ears to Identify Lens Related Dryness, 2005. [https://www.clspectrum.com/issues/2005/august-2005/use-your-ears-to-identify-lens-related-dryness\(20 March 2018\).](https://www.clspectrum.com/issues/2005/august-2005/use-your-ears-to-identify-lens-related-dryness(20 March 2018).)
- [9] Lee KJ, Kang YS. The amounts of protein deposits influenced by contact lens material and evaluation of the cleaning efficacy by care solution. *Korean J Vis Sci.* 2005;7(1):85-94.
- [10] Cho SK. Physical properties variation mobilities related to monomer concentration percent between P(2-hydroxyethyl methacrylate) used in the materials of soft contact lens and hydrophilic/hydrophobic materials. MS Thesis. Chonnam National University, Gwangju. 2002;8.
- [11] Hayward JA, Lee DC, Chapman D. Recent studies of biomembranes and phospholipid polymers. *Front Membr Res Agric.* 1985.
- [12] Lewis AL, Stratford PW. A versatile phosphorylcholine-based coating for enhancement of medical devices. UKSB First Annual Conference.
- [13] Yianni JP. Making PVC more biocompatible. *Med Device Technol.* 1995;6(7):20-26.

포스포릴콜린 소재가 첨가된 컨벤셔널 콘택트렌즈의 위험관리 측면에서의 생물학적 안전성 평가

조승권^{1,2,*}, 박지훈¹, 임균택¹

¹전남대학교 고분자공학과, 광주광역시 61186

²지오메디칼 광신소재기술연구소, 광주광역시 61007

투고일(2018년 2월 5일), 수정일(2018년 3월 9일), 게재확정일(2018년 3월 14일)

목적: 본 연구에서는 포스포릴콜린 소재가 첨가된 소프트콘택트렌즈의 생물학적 안전성 확보 일환으로 in vitro 세포독성시험을 수행하여 위험관리 측면에서 세포독성반응의 정도를 평가하여 안전성을 확보하고자 하는데 목적이 있다. **방법:** 2-HEMA(2-Hydroxy ethyl methacrylate)성분과 포스포리피드의 유도체인 포스포릴콜린(PC)로 하이드로겔 형태의 소프트콘택트렌즈를 제작하였다. 생물학적 안전성 확보 일환으로 세포독성시험을 평가하기 위해 포장 및 멸균 공정까지 수행하여 완제품 상태에서 시험을 실시하였다. 세포독성시험은 용출법, 증식저해시험 및 한천확산시험법으로 평가하였다. **결과:** 용출법 시험에서는 용매대조군(Reagent control)과 음성대조군(Negative control)은 세포독성을 나타내지 아니하였으며(Grade 0), 양성대조군(Positive control)도 중간 이상의 세포독성을 나타냈다(>Grade 2). 정성분석 결과에서는 Confluent monolayer는 (+), Growth inhibitions는 10%, intracellular granulation이 없는 Cells는 10%, Rounding은 10%, Lysis는 10%, Reactivity는 Slight로 관찰되었으며, Grade는 1로 관찰됨으로써 시험물질의 용출물은 배양세포에 대해 아주 미약한 반응성이 있다고 할 수 있다. MTT방법에서는 세포 생존율이 시험물질에서는 106.8%, 공시험액은 100%, 양성대조군은 2.4%, 그리고 음성대조군은 106.5%로 확인되었다. 24시간 배양 후 시험물질이 처리된 시험군에서의 현미경 관찰 시 세포의 사멸 및 세포의 형태적 변화는 관찰되지 않았다. 한천확산시험법에서는 시험물질이 투여된 세포의 중층 상에서 탈색 zone은 관찰되지 않았으며, 검체 아래 부분에서의 세포용해 정도도 관찰되지 않았다. 용매대조군과 음성대조군은 중층 상으로 Reactivity zone이 관찰되지 않았으며, 양성대조군은 예상했던 대로 0.5 cm 이상의 Reactivity zone이 관찰되었다. **결론:** 본 연구과정에서 도출했던 이상의 결과를 종합해 볼 때 설계 개발과정에서 의도된 성능을 구현하기 위해 포스포릴콜린 소재와 2-HEMA로 이루어진 하이드로겔 형태의 소프트콘택트렌즈의 생물학적 안전성은 위험관리 측면에서 검토시 그리고 이를 제품화하는데 있어서 세포독성을 유발하는 물질이 용출되지 않았으며 각막 표면에 자극성이나 면역반응에 따른 부작용은 발생하지 않을 것으로 사료된다.

주제어: 세포독성시험, 포스포릴콜린, 소프트콘택트렌즈