

Chitosan Cross-linked Collagen-GAG Matrix(CCGM)의 독성학적 고찰

이해열 · 김동환 · 조 현 · 안병옥 · 강수형* · 김원배
동아제약(주) 연구소

Toxicological Evaluation of Chitosan Cross-linked Collagen-GAG Matrix (CCGM) *In vitro* and *In vivo*

Haeyul Lee, Dong Hwan Kim, Hyun Cho, Byoung Ok Ahn,
Soo Hyung Kang* and Won Bae Kim

Research Laboratories, Dong-A Pharm. Co., Ltd., 47-5, Sanggal-ri, Kiheung-up,
Yongin-si, Kyunggi-do 449-900, Korea
(Received October 1, 1999)
(Accepted February 10, 2000)

ABSTRACT : Chitosan cross-linked collagen-glycosaminoglycan (CCGM) is an artificial skin substitute made to form a sponge like three dimensional matrix. It can be used to facilitate reconstruction of dermal tissue when applied on large wounds such as severe burns. In order to study the toxicological effects of CCGM the cytotoxicity, local irritation and skin sensitization test were carried out according to the standards of ISO 10993. In the cytotoxicity test utilizing LDH and MTT test, both the CCGM and its extract had no toxicity to Balb/c 3T3 cells. The local irritation test on rabbit skin demonstrated that CCGM did not promote any harmful reaction when directly applied on skin. In addition, it did not elicit any allergic reaction in the guinea pig maximization test. Based on these results, it is suggested that CCGM is a material without cytotoxicity, local irritation and allergenicity.

Key Words : Collagen, Chitosan, GAG, Cytotoxicity test, Local irritation test, Skin sensitization test

I. 서 론

중증화상의 경우 노출된 환부의 과도한 체액손실과 감염이 사망의 주요 원인이 된다. 임상에서 이러한 환자를 치료하는 방법으로 손상피부 조직을 제거하고 창상부위에 공여피부를 이식하는 방법이 사용되어 생존율을 향상시키고 입원기간을 크게 단축하였다(Gray 등, 1982, Echinard 등, 1982). 이식에 사용되는 공여피부로는 자신의 피부조직이 가장 이상적이지만 광범위한 화상의 경우에는 적용하기가 힘들고 피부공여부위에도 추가외상이 발생하게 된다(Wolfe 등, 1983; Hallock, 1992). 또한 자가이식술 (autograft)의 경우 일반적으로 피부공여부위를 최소화하기 위해 mesh graft를 사용하게 되는데, 이로 인해 창상부위에 mesh 형태의 반흔이 생성되는 외관상의 문제점을 수반한다. 따라서, 광범위한 화상을 효과적으로 치료하기 위해서 다량으로 공급될 수 있는 피부대체물질(skin substitute)

의 개발이 요구되어왔다.

피부대체물질은 크게 다른 사람의 피부나 동물의 피부 등의 천연 피부조직과 collagen 등의 재료로 제작된 인공 피부대체물질로 분류할 수 있으며, 표피부분이 없이 진피의 역할만을 대신하는 경우 진피대체물질(dermal substitute)로 구분한다. 다른 사람(allograft)이나 동물(xenograft)의 피부 조직을 이식하는 방법은 조직거부반응으로 인해 일시적인 효과밖에 나타내지 못하며 감염의 위험성이 문제점으로 지적되고 있다(Hansbrough 등, 1998) 사체피부를 처리하여 세포성분을 제거한 진피대체물질은 면역반응도 적고 피부 재건에 비교적 효과적인 것으로 보고되어 있지만(Cuono 등, 1987) 공여 사체피부를 공급받는다는 어려움이 많다. 또한, Gallico 등(1984)은 환자의 피부에서 keratinocyte를 분리, 증식시켜 표피를 재생시키는 방법을 제시하였으나, 표피세포 배양과 이식기술이 숙련된 기술을 요할 뿐 아니라 낮은 이식 성공률과 이식부위의 수축 등의 단점들 때문에 보편적인 치료법으로 사용되지 않고 있다.

최근에는 피부손상 부위에 도포하여 영구적인 피부재건

*To whom correspondence should be addressed

을 유도할 수 있는 인공 피부대체물질에 대한 연구가 진행되어왔다. Collagen과 glycosaminoglycan(GAG)을 glutaraldehyde를 이용해 cross-linking시킨 피부대체물질이 개발되어(Yannas와 Burke, 1980; Burke 등, 1981) 이것을 진피층으로 하고 표피층에는 일시적으로 silicone resin을 덮어 삼출액의 소실과 세균의 침입을 막아 진피의 증식을 유도한 다음 3~4주 후 표피층의 silicone resin을 떼어내고 증식시킨 환자의 표피조직을 창상부위에 이식하여 치유하는 방법이 개발되었다. 그러나 cross-linking을 위해 사용되는 glutaraldehyde는 세포에 독성작용을 나타내어 이것을 제거하는 작업이 필요한 단점이 있다.

이러한 단점을 보완하기 위해 Collombel 등(1989)은 bovine collagen type I, type III 및 GAG를 chitosan을 사용하여 cross-linking시킨 chitosan-cross-linked collagen-GAG matrix(CCGM)이란 피부대체물질을 개발하였다. Cross-linking 재료로 사용된 chitosan은 생체적합 물질로서 유용한 생물학적 활성을 갖는 것으로 알려져 있고(Muzzarelli 등, 1989), GAG와 복합체를 형성하였을 때 가수분해를 감소시켜 주고 세포의 부착과 분화 혹은 창상치유를 촉진시켜주는 작용이 있는 것으로 알려져 있다(Denuziere 등, 1998).

부분절제한 랫드의 피부에 CCGM을 적용한 시험결과(Damour 등, 1989). 적용 후 2주 이내에 손상피부 기저층에 부착되었고 접촉면에 초기 염증소견과 함께 염증세포의 침윤을 촉진시켰다. 그 후 fibroblast가 유주되면서 새로운 collagen fiber의 생성이 이루어졌고, 3~4주 경에는 축적된 collagen의 양이 증가됨에 따라 손상부위에 혈관이 재생되었다. 반면 염증반응은 경감되었고 육아조직 형성이나 특이한 독성은 관찰되지 않았다. 이상의 보고들로 미루어 볼 때 CCGM은 심한 화상이나 피부손상시 간편하게 적용할 수 있으며 치유 후의 반흔도 최소화시킬 수 있는 피부대체물질로 사료된다.

본 연구에서는 Collombel 등(1989)이 제시한 방법으로 제작된 CCGM의 광범위한 임상활용 가능성을 타진하기 위하여 안전성평가의 일환으로 세포독성, 국소자극성, 및 피부감작성시험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

본 시험에 사용된 CCGM은 동아제약(주)이 개발 중인 창상치료용 진피대체물질로서 chitosan으로 cross-linked된 collagen-GAG의 다공성 sponge 형태이다. 각 시험에는 방사선 멸균 포장된 4 mm 두께의 CCGM sheet를 필요한 크기로 절단하여 사용하였다.

2. 실험동물

모든 실험동물의 관리는 동아제약(주) 연구소의 "실험동물사육 및 시험에 관한 표준작업 지침서(SOP/ANC, 1994)에 준하여 실시하였다. 국소자극성시험에는 2.5~3.0 kg의 웅성 New Zealand White계 토끼를 연암축산에서 구입하여 사용하였으며, 피부감작성시험에는 자성의 Hartley guinea pig(350~450 g)을 삼육실험동물에서 공급받아 사용하였다. 실험동물은 시험 개시 전 1주간 순화사육을 실시하였으며, 시험기간 중 사육환경은 통상적인 조건(온도 23±2°C, 습도 60±10%)을 유지하였고 사료와 물은 자유급식시켰다.

3. 세포독성 시험

세포독성 시험은 ISO 10993-5의 Test for Cytotoxicity (AAMI, 1997)에 준하여 CCGM의 추출액에 의한 세포독성과 직접접촉에 의한 세포독성을 측정하였다. 세포를 일정기간 CCGM의 추출액 또는 직접접촉 방법에 따라 노출시킨 다음, MTT(3-[4,5-Dimethyl thiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 시험법과 LDH(Lactate dehydrogenase) 시험법을 적용하여 세포사멸율과 세포증식율을 산출하여 시험물질의 세포독성을 평가하였다.

1) 세포배양

세포독성 시험에는 Balb/c 3T3 clone A31 mouse embryonic fibroblast(American Type Culture Collection, USA) 세포주를 사용하였다. 세포 계대배양과 MTT 시험에서는 10% newborn calf serum을 포함한 Delbecco's modified Eagle's medium(DMEM)을 사용하였으며, LDH 시험에는 배지 내 LDH 농도가 낮은 Fibroblast Growth Medium(FGM)(Clonetics, USA)을 배지로 사용하였다.

2) 시험군의 구성

세포독성시험시 대조물질은 ISO 10993-12(Association for the Advancement of Medical Instrumentation(AAMI), 1997)에 추천된 high-density polyethylene(USP)을 음성대조군으로, Organotin polyvinyl chloride(PVC)(Portex, UK)를 양성대조군으로 사용하였다. 또한, 배양액에 아무런 처치를 하지 않은 무처리 대조군은 세포의 형태학적인 변화를 비교 관찰하는데 사용되었다. 시험시료와 대조군시료는 각각 1×1 cm 크기로 세절하여 방사선멸균 후 사용하였으며, 각 시험군 당 3매의 plate를 사용하였다. CCGM은 배양배지에 적셔서 사용하였다.

3) 시험방법

가. 추출액에 의한 세포독성 시험

각 시료의 추출액은 ISO 10993-5의 추출방법에 따라 CCGM이 적용되는 임상 상황과 유사한 환경에서 인도록 하였다. 즉, 세절한 시험재료를 배지에 1 cm²/ml 되도록 screw cap plastic 관에 넣고 밀전하여 37°C CO₂ incubator에서 24 시간 정치하여 추출액을 얻었다. 계대배양한 세포는 trypsin 처리하여 단리세포를 조제하고, 35 mm 배양용기에 10⁵ cells를 포함한 세포현탁액을 분주하였다. 하룻밤 배양 후 상장액을 제거하고 추출액 2 ml로 교체하여 3일간 배양한 후 광학현미경 상에서 세포의 일반적인 morphology의 변화와 vacuolization, 부유세포 존재 및 lysis 여부를 관찰하였다.

나. 직접접촉에 의한 세포독성 시험

추출액을 이용한 방법과 동일하게 단리세포를 35 mm 배양용기에 분주하고 하룻밤 동안 배양하였다. 1×1 cm 크기의 CCGM 또는 대조군 시료를 배양용기의 한쪽에 놓고 시료가 유동하지 않도록 stainless steel ring으로 시료를 고정시켰다. 3일간 배양하고 위에서와 같이 세포의 주요 변화를 관찰하였다.

4) 평가방법

가. LDH 시험법

배양이 완료된 후, 배지 상장액 1 ml를 microcentrifuge tube에 넣고 250×g로 3 분간 원심분리하였다. 상장액 100 μl를 96 well plate에 분주한 다음 LDH Cytotoxicity Detection Kit(Boehringer Mannheim, Germany)의 reaction solution mix 100 μl를 가하고 제조사의 사용법에 따라 차광 상태에서 10분간 상온 반응시킨 다음 흡광도(OD490)를 측정하였다. 측정치를 토대로 각 시험군의 평균치를 얻어 시험물질의 상대적 세포사멸율을 산출하였으며, 시험물질의 측정치가 음성대조군보다 낮은 경우 세포독성이 없는 것으로 간주하였다.

나. MTT 시험법

MTT 시험법은 기존에 사용된 방법(Carmicheal 등, 1987)을 응용하여 실시하였다. 추출액 또는 직접접촉에 의한 방법으로 배양이 완료된 후, 배지 1 ml를 제거하고 신선배지에 MTT(Sigma Co.)를 2 mg/ml 농도로 녹인 용액을 1 ml 가하였다. 4시간 동안 CO₂ incubator에서 반응하고 상장액을 제거하였다. DMSO 2 ml를 첨가하여 formazan 결정을 용해시키고 microplate reader를 이용하여 검액의 흡광도(OD540)를 측정하였다. 측정치를 토대로 각 시험군의 평균치를 얻어 시험물질군의 상대적 세포성장율을 산출하였으며, 시험물질의 측정치가 음성대조군에 비해 높은 경우 세포성장율이 100%인 것으로 간주하였다.

4. 국소자극성시험

국소자극성시험은 ISO 10993-10의 skin irritation test

(AAMI, 1997)에 준하여 실시하였고, 대조물질로는 Ridoar gauze(Sungkwang Pharm. Co. Ltd.)를 사용하였다.

1) 시험방법

시험실시 하루 전 6마리 토끼의 배부 피부를 전기제모기를 이용하여 제모하고 다음날 CCGM과 대조물질인 Ridoar gauze를 25×25 mm의 크기로 잘라서 제모한 배부에 각각 2개소씩 24시간 폐쇄적용하였다. CCGM은 미온수에 적셔 습윤상태로 적용하였으며 vaseline이 첨가된 Ridoar gauze는 직접적용하였다. 시험물질 제거 시는 적용 부위를 유성펜으로 표시하고 미온수로 30초간 세척하였다.

2) 관찰 및 평가

시험물질 제거 후 1, 24, 48, 72시간에 시험물질 적용 부위를 관찰하여 발적 및 부종정도를 Table 1에 따라 점수화하고 적용부위 2개소의 점수를 평균하여 기록하였다. 평가는 ISO 10993-10에 따라 24, 48 및 72시간에서의 피부 반응지수(primary irritation index, PII)를 사용하였다(Table 1). 즉, 각각의 동물에 대해 관찰시간대별 측정값인 primary irritation score에서 각 시간대의 평균 score를 얻어 전 동물의 평균값인 PII를 구하고 이 값에 따라 시험물

Table 1. Classification system for skin reaction

Reaction	Numerical Grading
1) Erythema and eschar formation	
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well-defined erythema	2
Moderate erythema	3
Severe erythema (beet-redness) to eschar formation preventing grading of erythema	4
2) Edema formation	
No edema	0
Very slight edema (barely perceptible)	1
Well-defined edema (edges of area well-defined by definite raising)	2
Moderate edema (raised approximately 1 mm)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond area of exposure)	4
Total possible score for irritation	8

Table 2. Initation response categories in the rabbit

Response category	Mean score (PII ^a)
Non-irritating	0 to 0.5
Mild irritating	0.6 to 2.0
Moderately irritating	2.1 to 5.0
Severely irritating	> 5.1

^aprimary irritation index

Table 3. Experimental design for maximization test of CCGM

Group	Drug	No. of animal	Intradermal induction (0.1 ml)	Topical induction (0.2 ml)	Test materials			
					challenge (0.1 ml)			
					LT	LB	RT	RB
Negative control	-	5	-	-	5% CCGM in DMSO	DMSO	0.1% DNCB in vaseline	Untreated
Vehicle control	DMSO	5	DMSO	DMSO	DMSO	DMSO	Untreated	Untreated
CCGM in DMSO	CCGM in DMSO	10	1% CCGM in DMSO	5% CCGM in DMSO	5% CCGM in DMSO	1% CCGM in DMSO	0.2% CCGM in DMSO	Untreated
CCGM in saline	CCGM in saline	10	1% CCGM in saline	5% CCGM in saline	5% CCGM in saline	1% CCGM in saline	0.2% CCGM in saline	Untreated
Positive control	DNCB	5	0.1% DNCB in olive oil	1% DNCB in vaseline	0.1% DNCB in vaseline	0.1% DNCB in vaseline	Untreated	Untreated

CCGM, Chitosan Cross-linked Collagen-GAG Matrix; DMSO dimethylsulfoxide; LT, left top; LB, left bottom; RT, right top; RB, right bottom.

질의 피부자극성 정도를 평가하였다(Table 2). 또한 피부 반응이 나타나는 경우 자극반응의 최대값과 이때의 시간 등을 기록하였다.

5. 피부감작성시험

피부감작성시험은 ISO 10993-10의 maximization sensitization test(AAMI, 1997)에 준하여 실시하였다. 시험군은 Table 3과 같이 구성하였다. 시험물질인 CCGM은 기용성이 아니므로 dimethylsulfoxide 혹은 saline을 첨가하여 약 사발에 미세하게 갈아서 현탁액상태로 적용하였다. 양성대조물질로 2, 4-dinitrochlorobenzene(DNCB, Sigma Chemical Co., USA)을 사용하였다.

1) 감작

피내감작유도 처리를 위해 시험개시 24시간 전에 guinea pig의 전갑골 주변을 전기제모기(Oster Co.)를 사용하여 제모한 다음 2x4 cm의 감작유도 부위를 유성펜으로 표시하였다. 감작유도 부위 중 상위 좌우측에는 Freund's Complete Adjuvant(FCA)와 증류수를 1:1로 유화한 용액을, 중간 좌우측에는 시험물질을, 하위 좌우측에는 FCA와 시험물질을 1:1로 유화한 용액을 좌우 각각 0.1 ml씩 피하 투여 하였다. 무처치 대조군에는 아무런 처치를 하지 않았다. 피내감작유도 6일 후 투여부위를 관찰하여 자극이 없으면 10% sodium lauryl sulfate in petrolatum(SLS)을 24시간 개방 적용하였다. 24시간 뒤 피부감작유도를 위하여 피내감작유도 부위에 시험물질 0.2 ml을 2x4 cm² 크기의 여과지에 도포하여 48시간 동안 폐쇄 적용하였다. 무처치 대조군에는 아무런 처치를 하지 않았다.

2) 야기

피부감작유도 후 2주 째에 미리 제모한 측복부 좌우측

상하 4개 부위에 Table 3에 따라 각각의 시험물질 0.1 ml씩을 2x2 cm²의 여과지에 도포하여 24시간 폐쇄 적용하였다.

3) 관찰

폐쇄 적용한 여과지를 제거한 후 24, 48 및 72시간에 적용부위 각각의 피부반응을 Table 4에 따라 관찰하여 점수화하고, 마지막 관찰 후 적용부위에 대한 병리조직학적 관찰을 실시하였다(Fisher와 Cooke, 1958).

4) 평가

평가는 ISO 10993-10에 따라서 실시하였다. 즉, 용매대조군에서의 관찰결과가 grade 1 미만일 때 시험물질의 결과가 grade 1 이상이면 감작성이 있는 물질로 판단하였으며 용매대조군에서의 관찰결과가 grade 1 이상일 때는 시

Table 4. Classification system for skin reaction of maximization test (according to ISO 10993-10)

Reaction	Numerical grading
Erythema and eschar formation	
No erythema	0
Slight erythema	1
Well-defined erythema	2
Moderate erythema	3
Severe erythema to slight eschar formation	3
Edema formation	
No edema	0
Slight edema	1
Well-defined edema	2
Moderate edema	3
Severe edema	4

notes

- Other adverse changes at the skin sites shall be recorded and reported
- For the purposes of standardization, the grading system has been modified for the original method

힘물질치러군의 grade가 용매대조군 중 가장 심한 동물의 grade 보다 높은 경우에 감작성이 있는 물질로 판단하였다.

III. 결 과

1. 세포독성 시험

Balb/c 3T3 세포를 추출액 또는 직접접촉에 의한 세포 독성 시험법에 따라 CCGM에 3일간 노출시켜 배양한 다음 광학현미경 상에서 세포의 형태학적 변화를 관찰하였다. Fig. 1에 나타난 것처럼 아무런 처리를 하지 않은 세포(Fig. 1A)와 음성대조군(Fig. 1B)에 비하여 CCGM에 노출된 시험군(Fig. 1D)에서 어떠한 세포 형태의 변화도 관찰되지 않았다. 전반적인 세포의 형태에서뿐만 아니라 세포의 세부 구조에서도 공포화 현상 등의 유의한 변화가 관

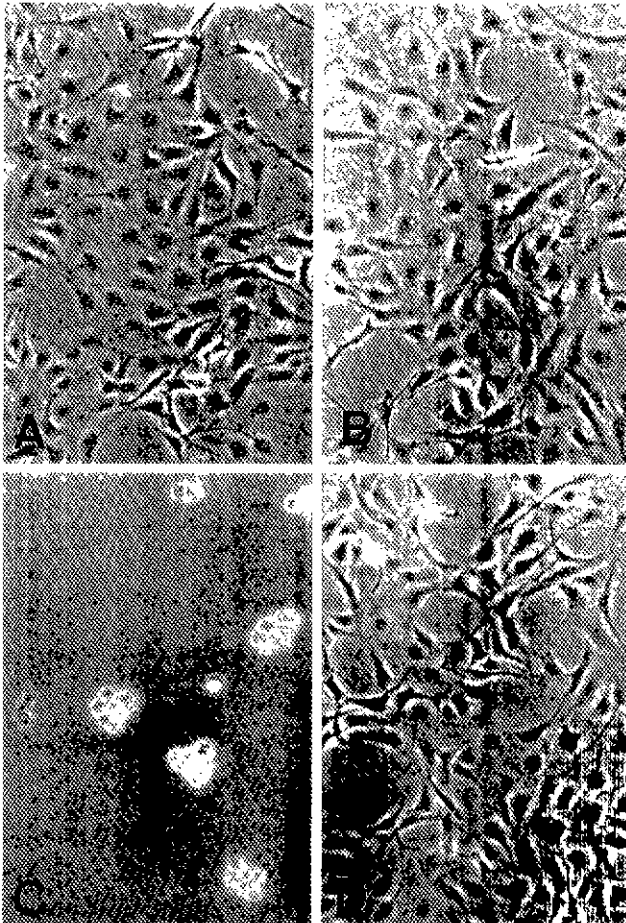


Fig. 1. Microscopic observation of cell morphology after cytotoxicity test. Balb 3T3 cells exposed with the extract of negative control (B) and CCGM (D) showed no significant morphologic change compared to the non-treated cells (A) whereas cells exposed with the extract of positive control (C) were completely detached from the culture dish surface. Similar observations were made in the direct contact experiment.

찰되지 않았다. 반면, 양성대조군의 경우 거의 모든 세포가 배양액에 부유하고 있는 것이 확인되었다(Fig. 1C). 이와 같은 결과는 추출액을 가한 경우와 직접접촉에 의한 시험 모두에서 동일하게 관찰되었다.

세포독성을 수치화하기 위해 시험방법에 따라 배양이 완료된 다음 LDH 시험법과 MTT 시험법으로 세포사멸율과 증식율을 조사하였다. 각 시험은 lactate dehydrogenase 또는 mitochondrial succinic dehydrogenase 등의 효소에 의해 기질이 대사되면서 발생하는 염색물질의 양이 흡광도로 측정되는 것이므로, 시험 당시의 반응시간에 따라 측정값이 다를 수 있다. 따라서, 시험간의 절대측정치보다 각 시험별 측정치를 대조군과 비교하여 상대적인 세포사멸율과 세포증식율을 산출하였다. LDH 시험에서는 CCGM이 음성대조군보다 오히려 약간 낮은 측정치를 보여 CCGM의 추출액과 직접접촉이 세포 살상에 아무런 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(Table 5A). 또한, MTT 시험법에서는 음성대조군과 유사하거나 다소 높은 측정 평균치를 기록하여 CCGM이 세포 성장을 저해하지 않는 것으로 확인되었다(Table 5B).

2. 국소자극성시험

CCGM의 토끼에 대한 국소자극성시험을 ISO 10993-10에 따라서 실시한 결과 CCGM은 토끼의 피부에 대해 어떠한 자극반응도 나타내지 않았으며(Fig. 2). 시험물질 제거 후 24, 48, 72 h에 시험물질 적용부위를 관찰한 결과 PII 값은 0으로 나타났다(Table 6). 그러나 대조물질로 사용한 Ridoar Gauze의 경우에는 적용부위의 피부에 발적 및 부종 소견이 관찰되었고(Fig. 2), PII 값은 1.11로 약한 자극성이 있는 물질로 판단되었다. 또한 Ridoar gauze는

Table 5. Cytotoxicity of CCGM with Extract and by Direct Contact
A Measurement of cell mortality by LDH assay

Group	with Extract (OD ₄₉₀)	by Direct contact (OD ₄₉₀)
a) Negative control	0.979±0.017	0.511±0.021
b) Positive control	1.564±0.046	1.627±0.033
c) CCGM	0.930±0.039	0.437±0.016
Relative cell mortality (%) =100×(c-a)/(b-a)	0%	0%

B Measurement of cell growth by MTT assay

Group	with Extract (OD ₅₄₀)	by Direct contact (OD ₅₄₀)
a) Negative control	1.526±0.081	0.950±0.127
b) Positive control	0.044±0.001	0.280±0.023
c) CCGM	1.560±0.168	0.984±0.112
Relative cell viability (%) =100×(c-b)/(a-b)	100%	100%

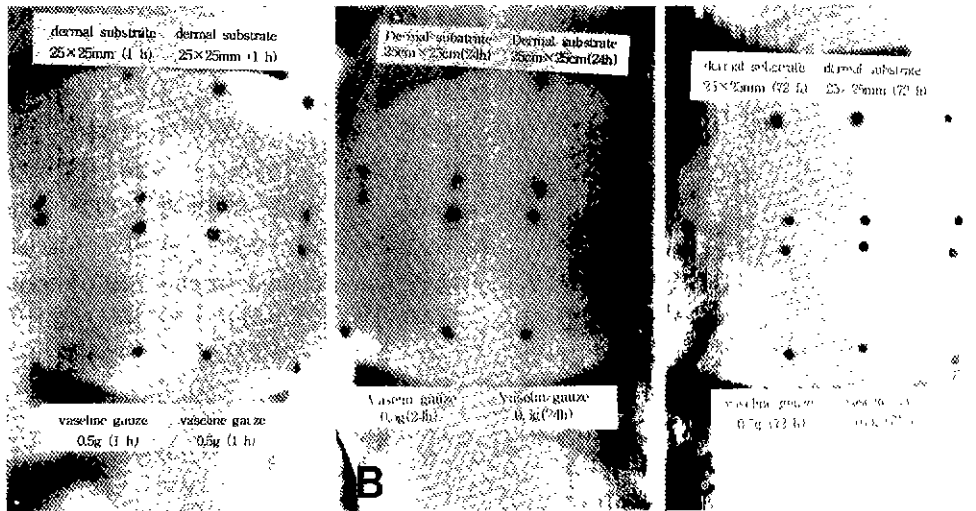


Fig. 2. Primary skin irritation induced by CCGM (upper area) and Ridoar gauze (lower area). The features of rabbit skin 1 hr (A), 24 hrs (B), and 72 hrs (C) after application show no skin reaction by CCGM, but Ridoar gauze induced redness and edema which persisted until 72 hrs after application.

Table 6. Skin irritation of CCGM and vaseline gauze

Material	Animal No.	Primary irritation scores				Mean Score ^{b)}	PII ^{c)}	Evaluation
		1 hr ^{a)}	24 hr	48 hr	72hr			
CCGM	1	0	0	0	0	0	0	No Irritating
	2	0	0	0	0	0		
	3	0	0	0	0	0		
	4	0	0	0	0	0		
	5	0	0	0	0	0		
	6	0	0	0	0	0		
Ridoar Gauze	1	2.5	1.5	1	0.5	1.00	1.11	Mild Irritating
	2	4	2	2	1.5	1.83		
	3	1.5	1	0.5	0	0.50		
	4	1.5	1	1	0	0.67		
	5	3.5	2	1.5	1	1.50		
	6	3	2	1	0.5	1.17		

^{a)}Hours after removal of test material.

^{b)}Mean of Skin irritation scores of 24 hr, 48 hr and 72 hr.

^{c)}Primary Irritation Index.

제거 후 1시간 경과 시 최대의 자극 반응을 나타내었으며 점차 그 정도가 낮아지는 것으로 나타났다.

3. 피부감작성시험

피부감작성시험은 ISO 10993-10에 따라 실시하였으며 CCGM의 현탁용매로 DMSO와 saline을 각각 사용하였다. 피부감작성시험 결과, Table 7에 요약하여 나타난 것처럼 DMSO를 현탁용매로 사용한 경우 CCGM의 농도에 관계없이 1.1에서 2.0 정도의 피부반응이 발생하였지만 CCGM을 saline에 현탁시켰을 때는 5% 농도에서도 아무런 피부반응이 관찰되지 않았다. 감작성이 시험을 진행한

Table 7. Evaluation of skin reactions for maximization test of CCGM or dinitrochlorobenzene

Group	Induction	Challenge	Mean score of skin reactions		
			24 h	48 h	72 h
Negative control		5% CCGM in DMSO	1.6	2.0	2.4
		DMSO	1.8	1.8	2.2
		0.1% DNCB	0	0	0.2
		Untreated	0	0	0
Vehicle control	DMSO	DMSO	1.8	1.6	2.4
		Untreated	0	0	0
CCGM in DMSO	1% CCGM	5% CCGM	1.1	1.4	1.8
		1% CCGM	1.6	1.5	1.9
		0.2% CCGM	1.2	1.5	2.0
		Untreated	0	0	0
CCGM in saline	1% CCGM	5% CCGM	0	0	0
		1% CCGM	0	0	0
		0.2% CCGM	0	0	0
		Untreated	0	0	0
Positive control	DNCB	0.1% DNCB	2.1	1.8	2.3
		Untreated	0	0	0

CCGM, Chitosan Cross-linked Collagen-GAG Matrix. DMSO, dimethylsulfoxide; DNCB, dinitrochlorobenzene

음성대조군에서는 DMSO에 현탁시킨 5% CCGM로 야기시킨 경우의 피부반응은 24, 48 및 72시간에 각각 1.6, 2.0, 2.4로 나타났으며 DMSO만을 사용하였을 때에도 각각 1.8, 1.8, 2.2로 나타났다. 또한 DMSO를 감작과 야기에 사용한 용매대조군의 경우는 각각 1.8, 1.6, 2.4 등으로 나타나 DMSO를 야기에 사용한 경우는 모두 1.6에서 2.4 정도의 피부반응이 발생함을 알 수 있었다. 한편 양성대조군에서는 감작시키지 않은 경우는 아무런 반응이 나타나

지 않았으나 DNCB로 감작하였을 경우는 24, 48 및 72시간에 관찰한 결과 2.1, 1.8 및 2.3 정도의 피부반응을 관찰할 수 있었다.

야기부위에 대한 조직학적 검사결과 양성대조군에서는 epidermis에 mononuclear cell 이 주로 출현하며 공포화와 낭포형성 등의 전형적인 allergic dermatitis의 소견이 관찰되었으나 시험군은 CCGM의 농도와 상관없이 DMSO control 처치군을 포함한 모든 DMSO 적용군에서 dermis에 polymorphonuclear cell과 mononuclear cell 이 함께 증가하고 epidermis로 침입하지는 않는 등의 급성화농적 염증소견이 관찰되었고 염증소견의 정도는 모든 DMSO 적용군에서 유사하게 나타났다.

IV. 고 찰

본 연구에서 사용된 CCGM과 같은 진피대체물 또는 피부대체물은 손상된 피부표면에 직접 접촉하게 되므로 세포에 대한 직접적인 독성을 갖거나 적용부위에서의 자극성이나 감작성이 있을 경우 임상사용상의 심각한 문제가 발생할 수 있다. 따라서 본 연구는 *in vitro*에서 세포를 CCGM 또는 그 추출물에 노출시켜 세포독성을 조사하고, 실험동물에서 일차피부자극성 및 피부감작성 시험을 통하여 국소자극성, 감작성 등의 유무를 검토하고자 하였다.

피부대체물은 현행법상 의료용구에 해당하며 인체조직 및 기능대체품으로 분류된다(식품의약품안전청 고시 제 1999-2호). 의료용구의 생물학적 안전성에 관한 시험은 세포독성, 감작성, 자극성 등의 주요 독성시험과 이급성독성, 유전독성 등이 각각의 의료용구의 성격에 따라 선택적으로 요구된다(식품의약품안전청 고시 제 1999-13호). 이러한 의료용구의 구분과 시험규정은 ISO 표준법 규정과도 유사한 것으로 의료용구의 안전성 시험의 기본지침이 된다. 그러나, ISO 표준법이 ISO 10993에서 의료용구의 생물학적 측면의 시험방법을 규정하는 반면, 국내규정에는 의약품등의 독성시험기준(식품안전청 고시 제 1998-116호) 이외에 의료용구를 대상으로 한 시험규정이 확정되어 있지 않다. 다만 “인체내 삽입의료용구의 생체내 안전성 평가기준을 위한 조사연구”(김정구 등, 1995)에서 ISO 10993 표준법을 고려하여 기초적인 전임상 독성시험 가이드라인이 제시된 바 있다. 따라서, 본 연구에서는 ISO 10993 표준법에 따라 모든 시험을 실시하였다.

세포독성 시험에서는 Balb/c 3T3 세포를 이용하여 *in vitro* 상에서 CCGM이 세포에 미치는 영향을 조사하였다. 시험결과, CCGM을 첨가하거나 추출액을 적용하였을 때 세포의 형태적인 변화를 일으키지 않았으며, LDH와 MTT 시험에서 음성대조군과 유사한 결과를 보여 세포에 미치는 독성이 없는 것으로 나타났다. Damour 등(1988)은 CCGM

에 대한 생물학적 적합성 시험에서 사람의 keratinocyte와 fibroblast를 이용하여 이와 유사한 결과를 얻어 CCGM이 사람 세포에 대해서도 세포독성이 없음을 보고하였다. 또한 CCGM의 원료물질인 collagen, chitosan, GAG 등은 천연 생물물질로서 창상치료(Mian 등, 1992)나 치과재료(Muzzarelli 등, 1989)로 사용된 바 있으며 특별한 독성을 나타내지 않았다. 특히 이들 물질은 extracellular matrix의 구성물질로 세포의 응착, 증식, 분화 등에 관여하고(Palmieri, 1992) 면역활성과 항미생물 작용이 있는 것으로 알려져 있다(Muzzarelli 등, 1988).

CCGM의 정상피부에 대한 국소자극성시험결과 토끼의 피부에 대해 어떠한 자극반응도 나타내지 않았으며 PII 값은 0으로 나타나 CCGM은 피부에 적용 시 발적이나 부종 등과 같은 부작용 없이 사용할 수 있는 것으로 사료된다. 그러나 대조물질로 사용한 Ridoar gauze의 경우에는 시험물질 제거 후 1, 24, 48, 72시간에 시험물질 적용부위를 관찰한 결과, 1시간 경과 시는 피부에 중등도의 자극을 나타내었으며 그 이후 점차 반응이 약해져서 이 물질의 PII 값은 1.11로 관찰되었다. 이것으로 보아 CCGM은 창상치유를 목적으로 시판되고 있는 Ridoar gauze 보다도 자극성이 없는 물질로 사료된다.

피부감작성시험에서는 불용성물질의 피부투과를 향상시키기 위한 용매로 ethanol/water, ethanol/saline, polyethylene glycol 400, dimethylsulfoxide(DMSO), propanone (acetone), methanol, chloroform, dilute surfactant, mineral oil 등을 사용할 수 있다(ISO 10993-10, 1997). Kempainen 등(1992)은 lipophilic red tide toxin의 skin layer에 대한 투과성을 향상시키기 위해 methanol, water, DMSO 등을 용매로 사용한 결과 methanol과 water의 경우 적용약물 중 2.3 및 6.2%만이 피부를 투과하였으나 100% DMSO를 용매로 사용한 경우는 적용약물의 26%를 투과시켜 methanol에 비해 10배 이상의 투과성 증대 효과를 나타낸다고 보고하였다.

본시험에서는 시험물질을 최대한 투과시킨 다음 그 감작성을 조사하기 위해 DMSO를 용매로 선정하였다. 또한 DMSO에 의한 일차피부자극과 시험물질에 의한 감작성을 구분하기 위해 용매 대조군을 두었으며 saline을 용매로 사용한 시험제도 설정하였다. 시험결과 시험물질을 DMSO에 현탁시킨 시험계에서는 CCGM의 농도에 상관없이 1.1에서 2.0정도의 피부반응을 나타내었으며, 감작과 야기에 DMSO만을 사용한 부위나 야기 시에만 DMSO를 적용한 용매대조군의 피부반응평점은 1.6에서 2.4 정도로 관찰되었다. 용매대조군에서의 피부반응평점이 1.0 이상일 때는 시험물질처리군의 피부반응평점이 용매대조군 중 가장 심한 반응을 보인 동물의 평점보다 높을 경우에 감작성이 있는 물질로 판단하므로, CCGM은 DMSO에 현탁시 감작성

은 없는 물질로 판단되었다. 또한 시험물질을 saline에 현탁시킨 시험계에서도 피부반응이 전혀 나타나지 않아 피부감작성이 없는 물질로 판단할 수 있었다. DMSO를 용매로 사용한 시험계에서의 피부반응은 용매에 의한 일차피부자극에 기인한 것으로 사료되며 이러한 DMSO의 피부일차자극성은 여러 연구자들에 의해서도 밝혀진 바 있다 (Zesch, 1983; Lashmar 등, 1989). Lashmar 등(1989)은 18종의 피부투과 증강제의 피부자극성을 시험한 결과 DMSO를 포함한 8개 이상의 물질이 피부에 자극성이 있으며 조직학적 변화를 유도한다고 보고하였다. 본시험에서의 조직학적 검사결과에서도 DNCB를 이용한 양성대조군에서 나타나는 epidermis에 mononuclear cell의 출현과 공포화, 낭포형성등의 전형적인 allergic dermatitis의 소견이 CCGM을 DMSO에 현탁시킨 시험군과 용매대조군에서는 관찰되지 않아 DMSO를 용매로 사용한 시험계에서의 피부반응은 피부일차자극성에 의한 것이라는 것을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 동아제약(주)에서 개발중인 CCGM의 임상활용 가능성을 알아보고자 세포독성, 국소자극성, 피부감작성시험을 ISO 규정에 따라 실시하였으며 이상의 결과로 보아 CCGM는 세포독성이 없고 적용부위에 특이한 부작용을 나타내지 않으며 피부감작성도 없는 물질로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 통상산업부 공업기반기술개발사업의 연구비 지원으로 이루어졌으며 이에 감사 드린다.

참고문헌

- Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) (1997): ANSI/AAMI/ISO 10993-5, Tests for cytotoxicity: *in vitro* methods in *Biological Evaluation of Medical Devices*, Association for the Advancement of Medical Instrumentation, Arlington, pp. 69-82.
- Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) (1997): ANSI/AAMI/ISO 10993-10, Tests for irritation and sensitization in *Biological Evaluation of Medical Devices*, Association for the Advancement of Medical Instrumentation, Arlington, pp. 241-276.
- Association for the Advancement of Medical Instrumentation (AAMI) (1997): ANSI/AAMI/ISO 10993-12, Sample preparation and reference materials in *Biological Evaluation of Medical Devices*. Association for the Advancement of Medical Instrumentation, Arlington, pp. 293-308.
- Burke, J.F., Yannas, I.V., Quimby, W.C., Bondoc, C. and Jung, W.K. (1981): Successful use of a physiologically acceptable artificial skin in the treatment of extensive burn injury, *Ann. Surg.*, **194**, 413-428.
- Carmicheal, J., Degraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna, J.D. and Mitchell, J.B. (1987): Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing, *Cancer Res.*, **47**, 936-942.
- Collombel, C., Damour, O., Gagnueu, C., Marichy, I. and Poinsignon, F. (1989): Biomaterials with a base of mixtures of collagen, chitosan and glycosaminoglycans, process for preparing them and their application in human medicine, United States Patent, Patent Number 5,166,187.
- Cuono, C.B., Langdon, R., Birchall, N., Barttelbort, S. and McGuire, J. (1987): Composite autologous-allogenic skin replacement: development and clinical application. *Plast. Reconstr. Surg.*, **80**, 626-637.
- Damour, O., Dantzer, E., Poinsignon, F., Vescovali, C., Marichy, J., Collombel, C. and Echinard, C. (1988): Controles physicochimiques et experimentaux d'un derme artificiel a base de collagene, *Annals of the MBC*, **1**, 196-199.
- Damour, O., Vescovali, C., David, M.F., Marchetti, B., Adhoute, H., Sahabeddin, L. and Collombel, C. (1989): Development of a non-cellular dermis: a step towards a total artificial skin, *Ann. Chir. Plast. Esthet.*, **34(4)**, 346-352.
- Denuziere, A., Ferrier, D., Damour, O. and Domard, A. (1998): Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties, *Biomaterials*, **19**, 1275-1285.
- Echinard, C., Sadjel-Sulkowska, E., Burke, P.A. and Burke, J.F. (1982): The beneficial effects of early excision on clinical response and thymic activity after burn injury, *J. Trauma*, **22**, 560-565.
- Fisher, J.P. and Cooke, R.A. (1958): Experimental toxic and allergic contact dermatitis, *J. Allergy*, **29(5)**, 411-428.
- Gallico, G.G. 3rd, O'Connor, N.E., Compton, C.C., Kehinde, O. and Green, H. (1984): Permanent coverage of large burn wounds with autologous cultured human epithelium, *N. Engl. J. Med.*, **311(7)**, 448-451.
- Gary, D.T., Pine, R.W., Harnar, T.J., Marvin, J.A., Engrav, L.H. and Heimbach, D.M. (1982): Early surgical excision versus conventional therapy in patients with 20 to 40 percent burns. A comparative study, *Am. J. Surg.*, **144(1)**, 76-80.
- Hallock, G.G. (1992): Closure of the ulnar forearm free flap donor site using a local radial forearm flap, *Br. J. Plast. Surg.*, **45**, 94-96.

- Hansbrough, J.M. and Franco, E.S. (1998): Skin replacements. *Clin. Plast. Surg.*, **25(3)**, 407-423.
- Kemppainen, B.W., Mehta, M., Stafford, R. and Riley, R.T. (1992): Effect of vehicle on skin penetration and retention of a lipophilic red tide toxin (PbTx-3), *Toxicon* **30(8)**, 931-935.
- Lashmar, U.T., Hadgraft, J. and Thomas, N. (1989): Topical application of penetration enhancers to the skin of nude mice: a histopathological study. *J. Pharm. Pharmacol.*, **41(2)**, 118-122.
- Mian, M., Beghe, F. and Mian, E. (1992): Collagen as a pharmacological approach in wound healing. *Int. J. Tiss. Reac.*, **XIV**(Suppl.), 1-9.
- Muzzarelli, R., Baldassare, V., Conti, F., Ferrara, P. and Biagini, G. (1988): Biological activity of chitosan: ultrastructural study, *Biomaterials*, **9**, 247-252.
- Muzzarelli, R., Biagini, G., Pugnaroni, A., Filippini, O. and Baldassare, V. (1989): Reconstruction of parodontal tissue with chitosan, *Biomaterials*, **10**, 598-603.
- Palmieri, B. (1992): Heterologous collagen in wound healing: a clinical study. *Int. J. Tiss. Reac.*, **XIV** (Suppl.), 21-25.
- Wolfe, R.A., Roi, L.D., Flora, J.D., Feller, I. and Cornell, R.G. (1983): Mortality differences and speed of wound closure among specialized burn care facilities, *J. Am. Med. Assoc.*, **250**, 763-766.
- Yannas, I. and Burke, J.F. (1980): Design of an artificial skin. I. Basic design principles, *J. Biomed. Mater. Res.*, **14**, 65-81.
- Zesch, A. (1983): Skin irritation by topical drugs, *Derm. Beruf. Umwelt.*, **31(3)**, 73-78.
- 김정구, 조대현, 김준규, 정 용, 박창원, 이윤숙, 류중훈, 김병대, 김부영, 문화회 (1995): 인체내 삼입의료용구의 생체내 안전성 평가기준제정을 위한 조사연구, 국립보건안전연구원보, **8**, 141-167.
- 동아제약(주) 연구소 (1994): 실험동물사육 및 시험에 관한 표준 작업 지침서(SOP/ANC).
- 식품의약품안전청 고시 제 1998-116호(1998): 의약품 등의 독성시험기준.
- 식품의약품안전청 고시 제 1999-13호 (1999): 의약품 등의 안전성 유효성 심사에 관한 규정.
- 식품의약품안전청 고시 제 1999-2호 (1999): 의료용구의 지정 등에 관한 규정.