

콘택트렌즈용 다목적용액 (MPS)의 세포증식저해 및 실험용 토끼 각막에 미치는 영향

고은경*, 채수철, 박수경, 김덕송, 이종빈
전남대학교 자연과학대학 생물학과

The Cytotoxicity and Effect on the Experimental Rabbit Cornea of Soft Contact Lens Multi-Purpose Solution (MPS)

Eun Gyeong Koh*, Soo Chul Chae, Su Kyoung Park,
Deok Song Kim and Jong Bin Lee

Department of Biology, College of Natural Science, Chonnam National University, Gwangju, Korea

(Received July 18, 2006; Accepted September 15, 2006)

ABSTRACT

The purpose of this study is to find out how soft contact lens multi-purpose solution (MPS), often used for medical treatment, effects the inhibition on cell growth and research the result of using MPS, suspected to damage eye cells, on rabbit eye's corneal epithelium and endothelium tissue. In this treatise, ReNu[®] (Baush & Lomb, USA), Opti-free express[®] (Alcon, USA), Free-sol plus[®] (Hanamedicon, Korea) had been selected among the MPS. After culturing L929 cell line, cell growth inhibition rate was measured by MTT assay, and by making Hematoxylin and Eosin stain specimen, the morphology was observed by optical microscope. In the In vivo experiment, 9 white rabbit eyes (18 eyes) were classified into 3 groups. The experimental group is left eyes (9 eyes) of rabbit, and MPS were dropped; however, the control group, the right eyes (9 eyes), were only used a saline solution without preservatives. After the dropping within the period, the cornea surface of rabbit eyes were stained by Rose bengal and observed. To figure out the changes of the corneal epithelium and endothelium tissue scanning electron microscopy (SEM) has been used. As the result, the rate of cell growth inhibition was 54%, 73% and 36%, respectively. Morphological changes represented that the shape has been changed into oval or round shape and those are not considered as a common formation of L929 cell line. When it comes to staining Rose bengal, each experiment group was stained red which is not shown in controls. The polygonal mosaic pattern of a corneal epithelium was disturbed in the picture taken by SEM; furthermore, the shape of the corneal endothelium was irregular.

In conclusion, as we consider antimicrobial effect and the safety on living cells, it is necessary that we should improve concentration of preservatives and study continuously to develop a new preservatives without a toxic effect on the cornea surface.

Key words : Rabbit cornea, Cytotoxicity, Soft contact lens Multi-Purpose Solution (MPS), Preservatives

* Correspondence should be addressed to Eun Gyeong Ko, Department of Biology, College of Natural Science, Chonnam National University, Gwangju, Korea. Ph.: (062) 530-3395, FAX: (062) 530-0306, E-mail: juba07@hanmail.net

서 론

콘택트렌즈는 시력교정 및 광학적 우수성과 외관의 미용상, 그리고 활동적인 생활에서의 안정성 등의 이점으로 안경보다 선호되고 있으며 우리나라도 착용자가 지속적으로 증가하고 있는 추세이다. 따라서 무엇보다도 장시간 동안 눈에 직접 접촉하는 콘택트렌즈와 콘택트렌즈의 관리용액의 안정성에 대한 중요성도 대두되고 있다. 콘택트렌즈의 관리체계는 세척 (cleaning), 헹굼 (rinsing), 소독 (disinfection), 보존 (storage), 보습 (rewets) 및 매주 1회 이상의 단백질제거 (protein remover) 과정이 있다. 초기에는 각 과정에 따라 다른 관리용액을 사용하였으나 최근에는 이 모든 과정을 동시에 해결할 수 있는 다목적용액 (multi-purpose solution, MPS)을 이용하는 착용자가 대부분이다. 최근에는 노립 (no rub) 제품까지 등장하여 문지르지 않고 담긴 상태로만 소독 보관하여 사용할 수 있는 초간편 렌즈관리제로서 각광받고 있다. 이러한 다목적용액은 초기의 다단계 세정액에 비해 소독효과가 떨어진다는 점은 있지만 렌즈관리체계를 간편하게 만들고 특히 순응도가 낮은 환자에게 렌즈관리를 보다 효율적으로 할 수 있게 한다.

그러나 렌즈 관리 시 착용자의 부주의한 관리소홀로 인해 여러 가지 미생물 감염을 일으킬 수 있다. 요즘 특히 대두되고 있는 감염성 안질환 중에서 가시아메바 (acanthamoeba) 각막염이나 곰팡이성 각막염은 비교적 드문 안질환으로 콘택트렌즈 사용자에게 종종 발병하며 초기에 정확하게 진단하지 못할 경우 심한 시력저하나 통증을 동반할 뿐 아니라 각막천공이나 실명까지 초래할 수 있는 치명적인 질환이다 (Stehr-green et al., 1989). 이러한 감염 등에 대해 MPS는 다른 콘택트렌즈 관리용액과 마찬가지로 미생물의 성장과 증식 및 대사를 억제시키는 작용이 필요하므로 공통적으로 보존제 (preservatives)가 첨가되고 있다. 일반적으로 MPS의 성분은 계면활성제 (surfactant), 항미생물제 (antimicrobial agent)나 보존제, 그리고 부가적인 구성요소로 삼투압조절제 (osmolality adjusting agent), 완충제 (buffers), 칼슘제거제 (chelating agent), 단백질제거제, 점도증강제 (viscosity enhancing agent) 등이 있

다. 이러한 구성성분 중에서 특히 세포의 증식에 영향을 미칠 수 있는 성분은 주로 보존제와 소독제 (disinfectant)이다. 이상적인 보존제의 사용은 우리 눈에 세포독성을 미치지 않는 최소농도로 항미생물에 대한 최대효과를 발휘하는 것이라고 할 수 있다. 이에 다양한 보존제 종류의 항미생물 효과에 대한 많은 연구들이 이루어지고 있으나 이러한 보존제 성분이 우리 눈의 세포독성에 영향을 미치는 연구는 미미한 실정이다.

이에 본 연구는 시중에서 유통되고 있는 MPS를 생취섬유아세포인 L929 세포주에 처리하여 세포증식저해 검사를 실시하고 저해율이 높은 MPS 제품을 선별하여 세포수준에서 독성을 평가하고 형태학적 변화는 광학현미경을 이용하여 관찰하였다. 이 결과를 기준으로 *in vivo* 실험으로는 실험토끼 눈에 점안 후 각막상피 (epithelium) 및 내피 (endothelium)의 조직학적 변화를 주사전자현미경 (scanning electron microscopy, SEM)으로 비교 관찰하여 MPS의 안정성에 대한 중요성을 제시하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 세포배양

본 실험에서 사용된 세포는 L929 세포주를 사용하였다. L929 세포주는 minimum essential medium alpha medium (Gibco, USA)에 10%의 우태아혈청 (fetal bovine serum : Gibco, USA)과 fungizone (30 µL/mL) 및 antibiotics (10 µL/mL)를 첨가해 사용하였다. 세포 배양은 25 cm²의 배양용 flask (Nunc, Denmark)에 일정량의 배양액을 넣어 37°C, 5% CO₂로 조정된 CO₂ 항온기 (Forma, USA)에서 배양하였고, 배양액은 3일마다 교환하였다. 배양한 세포를 0.25% trypsin-EDTA (Ethylene Diamine Tetraacetic Acid)를 처리하여 세포를 부유 시킨 다음 혈구계산기 (hemocytometer)로 세포수를 계수한 후 5 × 10³ cell/mL 세포를 96-well plate (Nunc, Denmark)에 200 µL/well 분주해 세포가 60~70% 정도 채워졌을 때 다목적용액 (MPS)을 배양액의 용적에 대해 25%의 농도로 48시간 동안 처리하여 세포증식의 저해 정도를 조사하였다.

2. 세포독성 검정

1) MTT assay

MTT assay는 Mosmann (1983)의 방법에 따라 시행하였다. MTT (3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide : Sigma, USA) assay는 세포소기관 중 미토콘드리아의 효소 (succinate dehydrogenase)의 활성도를 조사해 세포활성을 측정하는 방법으로 용해성 노란색에 불용성의 보라색 MTT tetrazolium이 succinate dehydrogenase에 의해 불용성의 보라색 MTT formazan으로 환원되는 정도를 흡광도로 측정하는 방법으로 trypan blue에 의한 dye-exclusion 방법보다 민감하여 세포사 진행과정의 초기 시점에서 세포의 생존율을 보다 정확히 측정할 수 있는 장점이 있다.

L929 세포주를 5×10^3 cells/mL 세포 수로 계수한 다음 96-well plate에 200 μ L씩 분주하여 24시간 동안 배양하고 MPS가 포함된 배양액으로 교환하고 48시간 추가 배양하였다. 배양액을 MTT 200 μ g/mL가 포함된 배양액으로 교환하고 3시간 반응시켰다. 3시간 후 배양액을 버리고 DMSO (dimethylsulfoxide : Sigma, USA)를 200 μ L/well씩을 넣어 15분간 실온 방치하여 푸른색 결정인 formazan을 용해시킨 후 ELISA plate reader (Bio-Tech, USA)로 570 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과 비교하였다 (Francois & Rita, 1986).

2) 세포독성 검정

세포독성의 검정 기준은 호주의 뉴 사우스 웨일즈 (New South Wales) 대학의 부설 CRCERT (NSW, Australia)에서 시행한 세포증식저해 염색법을 사용한 잠재 독성 평가 보고서를 기준으로 하였다 (Stephan & Ulrike, 1993; Lynn, 1997). MPS를 48시간 처리하여

MTT 비색검정인 세포증식 저해율이 30% 이상이면 독성이 있는 것으로 판정하고 대조군은 배양액을 처리하였다.

3. 실험동물

본 동물실험은 식품의약품안전청의 기준에 준하여 실험을 실시하였으며, 모든 실험동물은 Guide for the Care and Use of Laboratory Animals [Department of Healty, Education, and Welfare Publication (National Institute of Health) 85-23, 1985]에 준하여 취급하였다.

각막과 외안부에 이상이 없는 성숙한 실험용토끼 (2.5~3.0 kg), New Zealand White Rabbit (Damool Science, Daejeon) 9 마리를 구입하였다. 사육 환경은 온도 $18 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $60 \pm 10\%$, 환기 회수는 11~12회/hr, 조명은 12 hr/day를 유지하였다. 이를 기준으로 본 대학 동물 사육실에서, 사료는 다몰사이언스 (Damool Science, Daejeon)에서 공급받은 실험동물용 사료로 음용수와 함께 자유로이 섭취토록 하여 2주일 동안 순응기간을 거친 후 실험을 실시하였다. 실험동물은 개별적으로 수용하여 개체구분을 실시하였으며, 모든 실험동물은 실험물질의 점안 하루 전 안저검사기로 안구를 검사하여 이상이 없는 실험동물만 선별하여 사용하였다.

1) 실험동물의 구분

실험용토끼 9마리 (18안)를 대상으로 하여 토끼의 좌안에는 각각 ReNu[®] (3안), Opti-free express[®] (3안), Free-sol plus[®] (3안)를 처리한 실험군과 음성 대조군으로 우안 (9안)에는 보존제가 포함되지 않은 0.9% 멸균 생리식염수를 점안한 대조군으로 각각 분류하였다.

Table 1. Composition of MPS substitutes treated in this study

MPSs	Constituent
ReNu [®] (Bausch & Lomb, USA)	Sodium chloride, polyhexamethylene biguanide (PHMB) , boric acid, sodium borate, hydranate, edetate disodium (EDTA), sterile isotonic solution
Opti-free express [®] (Alcon, USA)	Sodium chloride, citrate, tetric 1304, AMP-95, boric acid, sorbitol, edetate disodium, polyquad (polyquaternium-I) 0.001% and Aldox (myristamidopropyl dimethylamine) 0.0005%
Free-sol plus [®] (Hanamedicon, Korea)	Polyhexamethylene biguanide hydrochloride (PHMB) 20%, etidronate tetra sodium, poloxamer 188

2) 실험물질

(1) 실험물질

현재 시판중인 MPS를 제품별 ReNu® (Baush & Lomb, USA), Opti-free express® (Alcon, USA), Free-sol plus® (Hanamedicon, Korea)를 시중에서 구입하여 사용하였다. 제품별 구성성분은 다음과 같다(Table 1).

(2) 투여방법

실험용토끼의 아래눈꺼풀을 당겨 컵모양을 형성시키고, 0.1 mL를 결막낭에 점적하고 약 1초간 눈을 감은 상태로 유지시켰다. *In vivo* 실험으로는 실험용토끼 9마리 (18안)를 대상으로 3군으로 분류하여 좌안에는 각 MPS 제품(9안), 우안(9안)은 대조군으로 보존제가 포함되지 않은 0.9% 멸균생리식염수를 100 µL/1회, 3회/1일, 14일 동안 점안하였다.

4. 세포형태 조사

1) 육안관찰 (Rose bengal staining)

Rose bengal staining은 각막의 고사된 상피 세포에 선택적으로 염색되는 생체 염색 방법이다. 0.25% Rose bengal (Sigma, USA) 용액을 이용하여 실험용 토끼눈의 결막 위쪽에 점적하여 염색액이 골고루 퍼지도록 염색한 후 대조군과 MPS를 14일간 점안한 후의 각막의 손상된 상태를 디지털 카메라 (Sony P-100, Japan)로 촬영하였다.

2) 광학현미경 관찰

(1) 위상차현미경

48시간 동안 배양하였다가 도립 위상차 현미경 (Nikon TS-100, Japan)으로 세포형태를 200배로 관찰하고 사진 촬영을 실시하였다.

(2) Hematoxylin & Eosin (H&E) staining

H&E staining을 위해 세포는 6-well plate에 멸균된 plastic Thermanox® cover slips (Nunc, USA)를 넣은 후 그 위에 세포를 배양하였다. MPS를 24시간 처리한 후, 처리용액을 제거한 뒤 plastic Thermanox® cover slip만 떼어내었다. 형태학적 관찰을 위해 70% 에탄올에서 10분 동안 고정된 후 핵과 세포질을 H&E stain으로 대조 염색하였다. 염색 후 알코올 탈수과정을 통

해 투명화 과정을 거친 후 canada balsam (Sigma, USA)으로 봉입하여 영구표본을 제작하였다. H&E stain으로 염색된 세포는 광학현미경 (Olympus CH40, Japan) 하에서 관찰 (×200)하여 핵 응축 (pyknotic nuclei) 또는 세포자연사 소체 (apoptotic body)로 보이는 세포들을 촬영하였다.

3) 주사전자현미경 관찰

농도별로 처리한 실험용 토끼눈의 형태적 검사를 위해 가토를 고정틀에 고정 후 근이완제인 2% xylazine® (Bayer Korea, Korea) 1 mL와 전신마취제인 ketamine hydrochloride® (Yuhan Corporation, Korea) 1 mL를 섞어서 토끼의 대퇴부에 근육주사 하였다. 안구를 적출한 후 각막을 2.5% glutaraldehyde 용액 (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4, 4°C)에서 2시간 전고정한 후 0.1 M cacodylate buffer로 20분간 3회에 걸쳐 세척한 후, 4°C에서 1% osmium tetroxide (0.1 M cacodylate buffer, pH 7.4)로 실온에서 2시간 정도 후고정하고, 후고정하여 산화된 시료들을 일련의 50~100%의 graded ethyl alcohol series로 탈수시킨 뒤 isoamyl acetate로 20분간 치환하여 이후 liquid CO₂에 의한 임계점건조 (CPD: critical point drying) 과정을 거쳐 aluminum stub에 고정하고 약 10 nm의 gold ion particle로 coating시켜서 DSM 940A 주사전자현미경 (Hitachi S-4300형, Japan)으로 각막 상피와 내피의 조직표면을 촬영하여 관찰하였다.

결 과

1. 세포독성 검증

1) MTT assay

MPS를 L929 세포주에 배양액의 25% 농도로 96-well plate에서 48시간 동안 배양한 후 처리하여 대조군과 비교한 결과에서는 세포증식 저해가 각각 (A) 54%, (B) 73%, (C) 36%로 세포증식 저해가 30%를 넘는 것으로 나타났다 (Fig. 1).

2. 세포형태 조사

1) 광학현미경에 의한 세포형태 조사

L929 세포주에 MPS를 농도별로 48시간 처리한 후

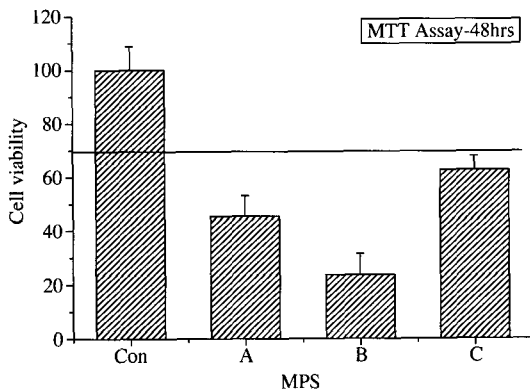


Fig. 1. Cytotoxicity of MPSs on L929 cell line assessed with the MTT assay at 48 hrs. Control, (A) ReNu®, (B) Opti-free express®, (C) Free-sol plus®

도립 위상차 현미경을 이용하여 $\times 200$ 로 관찰하였다. 대조군과 달리 MPS 처리군은 세포형태가 고착된 L929 세포주의 일반적인 모양인 방추사 형태가 점차 타원형 또는 원형 모양으로 위축되었고, 부착성세포인데 반해 액상으로 상층부에 부유하였다. 특히, 고착되어 있는 세포의 밀도는 Opti-free express®, ReNu®, Free-sol plus® 순으로 감소하였다(Fig. 2).

2) H&E Staining 후 광학현미경에 의한 세포형태 조사

H&E staining은 세포자연사를 판정하기 위하여 사용되는 고전적인 방법으로서 핵(nucleus)과 세포질(cytoplasm)을 대조 염색하여 세포 전체적인 형태를 관찰하기가 용이한 방법이다.

H&E staining 결과, 대조군에서는 핵의 모양대로 둥글게 염색되었고 핵과 세포질의 구분이 되었으며, L929 세포주의 일반적인 모양인 방추형의 세포형태도 그대로 염색되었다. 각 MPS 처리군은 Opti-free express®, ReNu®, Free-sol plus® 순으로 세포형태변화가 있었으며 특히, Opti-free express®, ReNu®는 섬유아세포의 특징인 방추형에서 타원형 또는 원형의 형태로 위축되고 핵의 응축과 분절화양상을 관찰할 수 있었다(Fig. 3).

3. Rose bengal staining

실험 시작 전에 0.25% Rose bengal로 염색한 결과

모든 실험동물의 각막은 정상상태로 관찰되었고, 각 제품의 MPS를 14일간 점안한 후 0.25% Rose bengal staining하여 각막 표면을 관찰한 결과, 각막상피 조직 세포의 부분적인 탈락 및 괴사가 일어났음을 알 수 있었다(Fig. 4).

4. 주사전자현미경 관찰

정상각막에 각각의 MPS를 투여한 후, 채취한 실험용토끼의 각막상피와 내피를 주사전자현미경(SEM)을 이용하여 각각 500, 1,000, 3,000배의 확대배율로 관찰하였다.

1) 각막상피(epithelium)

각막상피세포층은 비각질화된 중층편평상피세포층으로 이루어진 구조로, 대조군의 각막조직은 세포의 탈락이 없었으며 단면형태의 다각형 모자이크 배열(polygonal mosaic)로 균일한 세포모양과 세포 간 경계가 명확하게 나타나 있어 정상적인 형태를 띠고 있으며 세포막의 파괴나 세포의 탈락 등은 찾아 볼 수 없었다. 그리고 미세융모(microvilli)의 탈락 없이 미세주름(microplicae)도 잘 보존되어 있음을 볼 수 있다.

반면에 ReNu®, Opti-free express®와 Free-sol plus®를 처리한 각막상피를 각각 $\times 500$ (Fig. 5A, B, C), $\times 1,000$ (Fig. 6A, B, C), $\times 3,000$ (Fig. 7A, B, C)배로 관찰한 결과는 모두 비슷한 양상의 형태로 나타났는데 중층의 편평한 층이 여러 겹 벗겨진 형태로 각질화된 모습이 나타났고, 다각형 모자이크배열 형태의 균일도가 많이 감소하였으며, 표면에 세포돌기와 미세융모들이 불규칙하게 분포하였고, 조직세포의 손상으로 인한 세포간극의 변형 및 중층편평상피층의 다각형 형태가 소실된 것으로 관찰되었다.

2) 각막내피(endothelium)

대조군은 세포의 탈락이나 손상이 전혀 없이 내피 조직의 특징적인 형태인 육각형의 구조가 상대적으로 많이 관찰되었다.

ReNu®를 처리한 각막내피는 확대배율 500배로 관찰했을 때, 전체적으로 조직표면의 일부가 주름져 있으며(Figs. 8A, 10A), 확대배율 1,000배, 3,000배로 확대관찰한 결과 육각형의 특징적인 각막내피 구조가 파

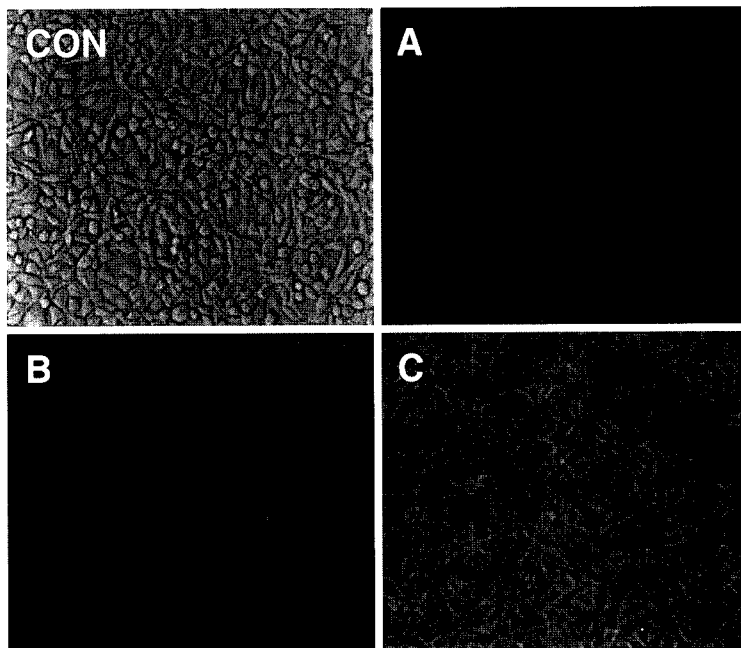


Fig. 2. Inverted phase-contrast microscopic photographs of the L929 cell line grown on the control medium and MPSs after exposed for 48 hrs ($\times 200$). Control, (A) Renu[®], (B) Opti-free[®], (C) Free-sol plus[®]

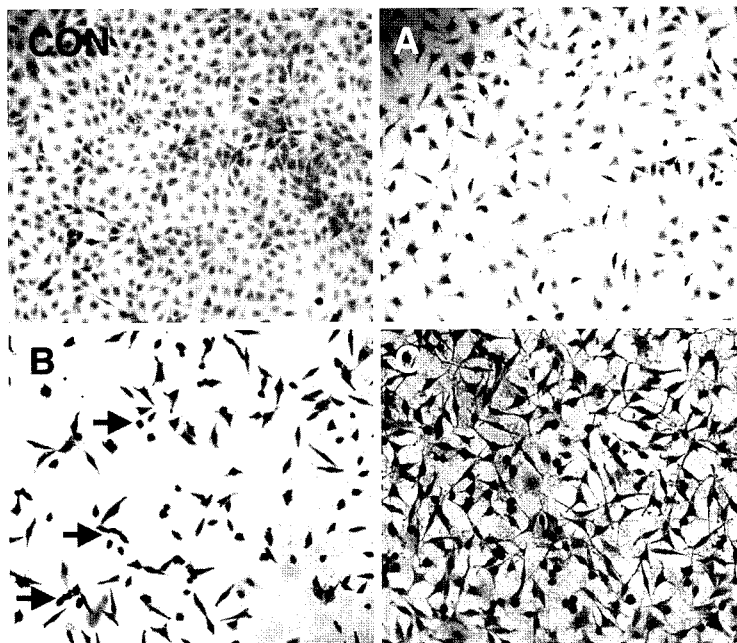


Fig. 3. H&E staining of cultured L929 cell line treated on the control medium and MPSs after exposed for 48 hrs ($\times 200$). Control, (A) Renu[®], (B) Opti-free[®], (C) Free-sol plus[®]. Arrow shows apoptotic cell characterized by chromatin condensation and nuclear fragmentation.

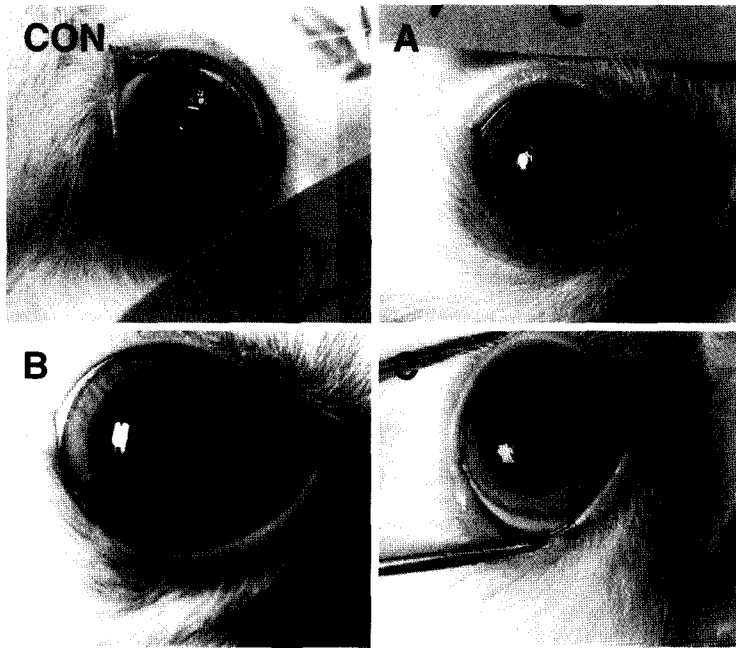


Fig. 4. Digital camera photographs of rabbit cornea by Rose bengal staining. Control, (A) Renu[®], (B) Opti-free[®], (C) Free-sol plus[®]

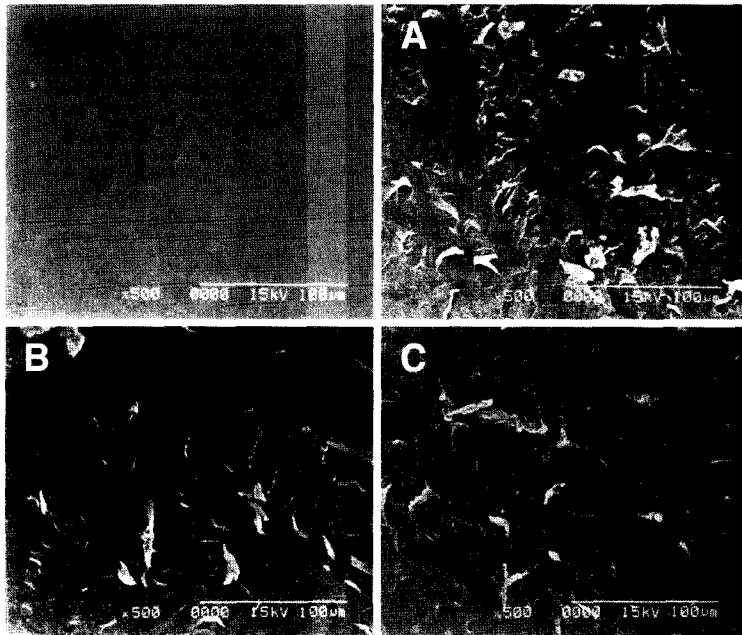


Fig. 5. Scanning electron micrographs of corneal epithelium of the rabbits ($\times 500$). Control, (A) Renu[®], (B) Opti-free[®], (C) Free-sol plus[®]. Epithelium show regular ploygonal mosaic pattern and numerous microvilli, tight cell junction in control, but epithelium in (A), (B), (C) show damaged epithelial polyonal architecture and intercellular junction.

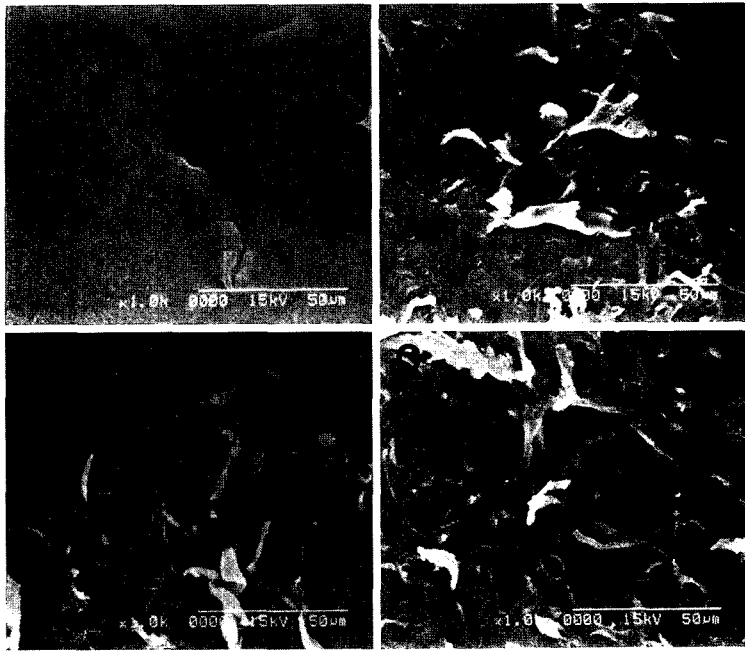


Fig. 6. Scanning electron micrographs of corneal epithelium of the rabbits ($\times 1,000$). Control, (A) Renu[®], (B) Opti-free[®], (C) Free-sol plus[®]

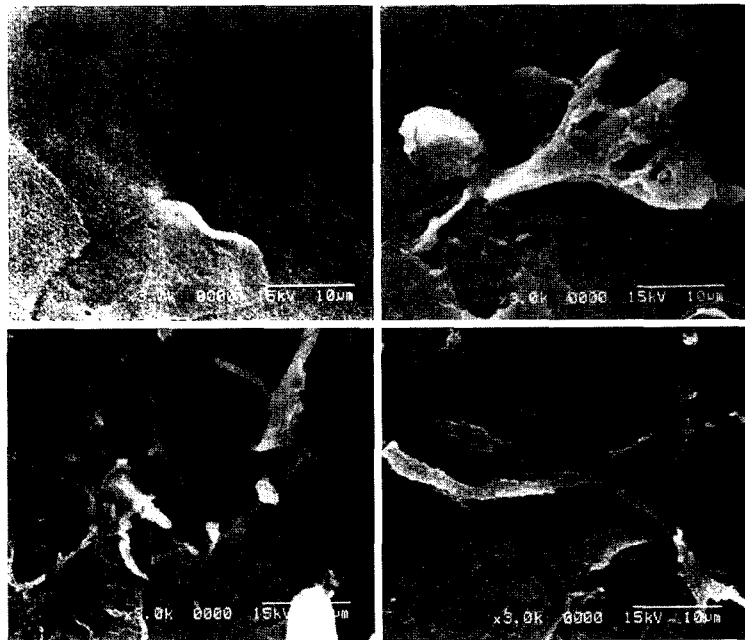


Fig. 7. Scanning electron micrographs of corneal epithelium of the rabbits ($\times 3,000$). Control, (A) Renu[®], (B) Opti-free[®], (C) Free-sol plus[®]

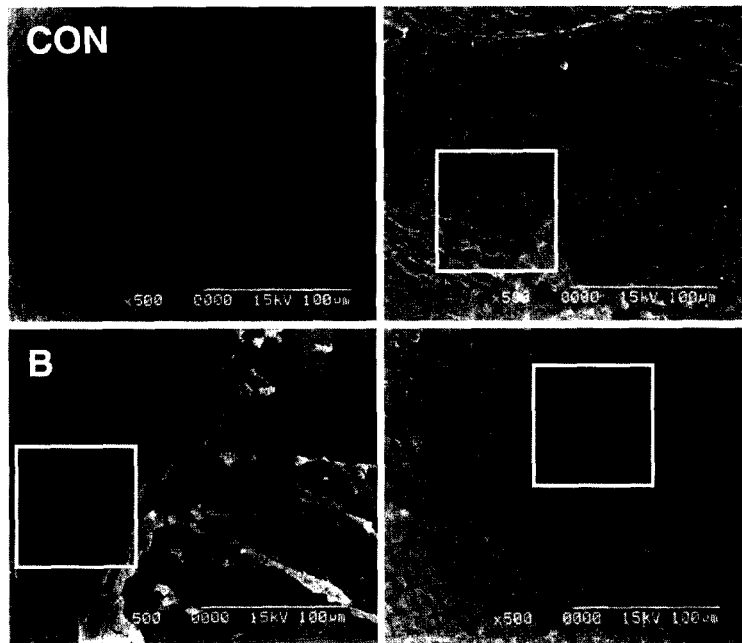


Fig. 8. Scanning electron micrographs of corneal endothelium of the rabbits ($\times 500$). Control, (A) Renu[®], (B) Opti-free[®], (C) Free-sol plus[®]. Endothelium show regular hexagonal mosaic pattern in control, but endothelium in (A), (B), (C) show damaged endothelial hexagonal architecture.

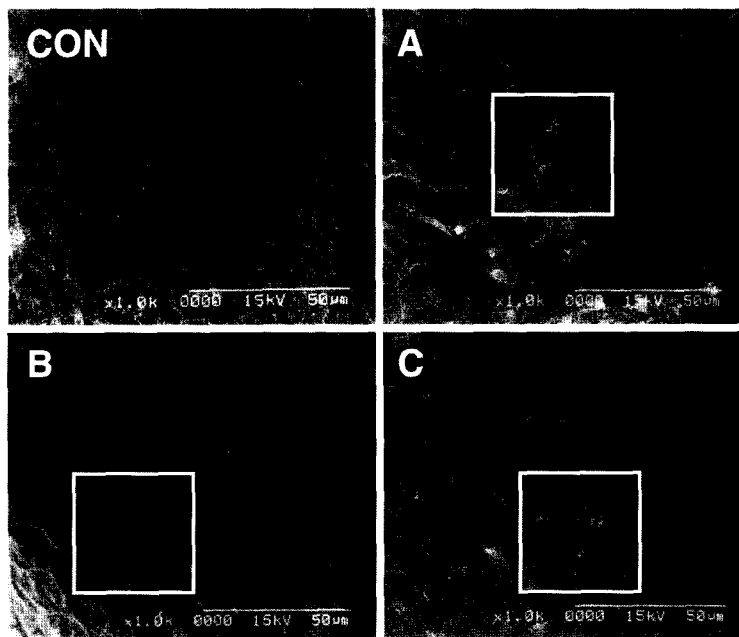


Fig. 9. Scanning electron micrographs of corneal endothelium of the rabbits ($\times 1,000$). Control, (A) Renu[®], (B) Opti-free[®], (C) Free-sol plus[®]

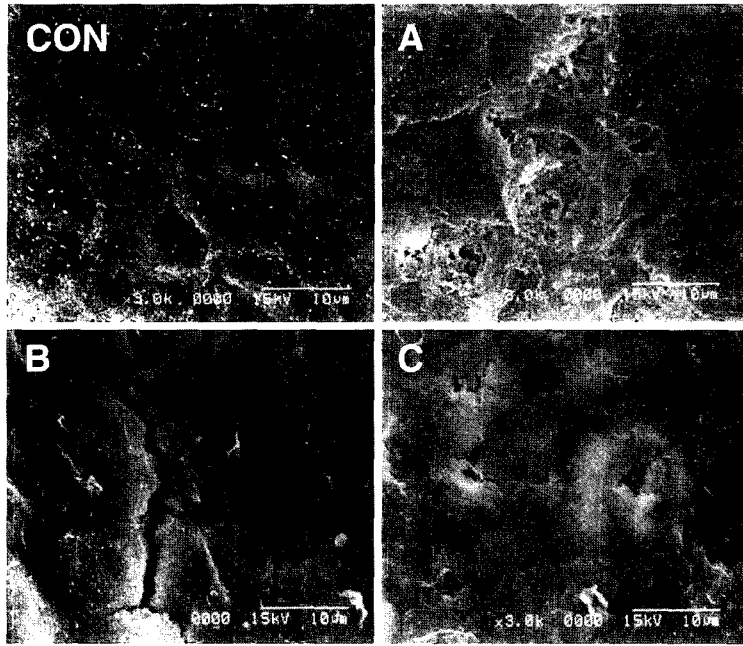


Fig. 10. Scanning electron micrographs of corneal endothelium of the rabbits ($\times 3,000$). Control, (A) Renu[®], (B) Opti-free[®], (C) Free-sol plus[®]

괴되고 세포질의 손상을 관찰할 수 있었다(Fig. 9A). 특히 세포생존율이 가장 낮았던 Opti-free express[®]를 처리한 각막의 조직표면은 확대배율 500배로 관찰한 결과 부분적으로 조직면이 한쪽으로 치우쳐 밀리면서 벗겨지고(Fig. 8B) 방수와 각막실질간의 샘 장벽(liaky barrier)으로서 중요한 역할을 하는 세포간극이 손상된 것을 확대관찰을 통해 알 수 있었다(Figs. 9B, 10B).

Free-sol plus[®] 처리군에서는 500배로 관찰한 결과, 전체적인 조직의 배열은 일정하였으나 확대배율 1,000배, 3,000배로 관찰했을 때 각막의 내피조직 세포표면의 손상이 관찰되었다(Figs. 8C, 9C, 10C).

고 찰

콘택트렌즈는 최근 시력교정용 뿐 아니라 청소년과 젊은 여성들 사이에서 미용칼라 및 미용홍채 콘택트 렌즈 등의 발달로 착용인구는 계속적으로 급증하고 있는 추세이다. 그러나 콘택트렌즈 및 콘택트렌즈 관

리용액 등의 관리 소홀과 부주의로 인해 감염성 각막염 등으로부터 위협받고 있다. 특히, 1976년에 인체의 각막에서의 감염이 처음 보고 된 가시아메바 각막염은 콘택트렌즈 사용자에서 흔한 감염성 각막염으로 최근에는 외상이나 다른 원인 없이도 발병되는 경우가 있으며, 발병 위험인자는 렌즈의 부적절한 소독, 소독제 관리의 소홀, 1회용 렌즈의 잘못된 사용, 그리고 수영장에서의 렌즈 착용 등이 원인이 될 수 있으며 가시아메바가 오염된 물이 눈에 들어간 경우에도 발병할 수 있다고 보고 되고 있다(Duguid et al., 1997). 이에 따라 콘택트렌즈 관리용액의 항미생물(antimicrobial) 작용에 대한 중요성은 크게 대두되고 있다. 여러 가지 콘택트렌즈 관리 용액 중에서 가장 손쉽게 널리 사용되고 있는 MPS는 다양한 보존제를 포함하여 항미생물 효과를 나타내고 있다. 하지만, MPS는 우리 눈에 직접 접촉하므로 각막이나 결막에 미치는 독성이 없어야 한다. 그러나 일반 안경사들의 임상경험에서 많은 콘택트렌즈 착용자가 보존제 등의 기타성분에 따라 개인적인 차이를 보였지만 일부 제품의

MPS를 직접 눈에 넣거나 보존한 렌즈를 바로 꺼내어 눈에 착용 할 경우 찌르는 듯한 통증이나 작열감, 충혈, 눈물흘림, 시야흐림 등을 느낀다고 한다. 미국의 경우, US pharmacopoeia (USP)나 Federal Food Drug Administration (FDA)에서는 보존제가 접촉하는 조직에는 독성효과를 유발하지 않아야 한다고 규정하고 있다(Tripathi et al., 1992). 보존제는 관리용액에 첨가될 때 갖춰야 할 기본 요건들이 있는데, Remington's Pharmaceutical Sciences (Gennaro, 1985)에서는 다음과 같은 조건을 들고 있다. 첫째 광범위 영역에서의 항균작용을 나타내야 하며, 둘째 작용의 신속성이 이뤄지고 지속성이 유지되어야 하며, 셋째 알레르기 반응이나 자극 및 독성이 없어야 하고, 넷째 포함된 다른 화합물 상호간의 화합적으로 안정된 상태를 유지하며, 마지막으로 화합물이 잘 용해되어야 한다는 것이다. 또한 점안제가 아닌 관리용액에 첨가될 때의 보존제는 렌즈에 흡수되지 않아야 하고 렌즈 자체에 물리적 변형이나 변수 불안정성, 자극이나 독성반응의 원인이 되어서는 안 된다. 일반적으로 사용되고 있는 보존제의 종류로는 benzalkonium chloride (BAC), chlorobutanol, benzyl alcohol, sorbic acid, polyquaternium, isopropanol, chlorohexidine (CHX), chlorine system, thimerosal, polyhexamethylene biguanide (PHMB), polyquad, hydrogen peroxide (H₂O₂), polyquaternium과 myristamidopropyl dimethylamine (MAPD) 등이 있다. 그 중 현재 가장 널리 이용되는 합성보존제인 polyhexamethylene biguanide (PHMB)는 세포 증식 저해 및 임상적으로도 각막막에 자극감을 주는 등 여러 가지 부작용을 야기하고 있다. 본 연구에서 조사된 MPS 제품 중에서 ReNu[®]와 Free-sol plus[®]는 PHMB를 사용하였으며, Opti-free express[®]는 polyquaternium-1과 ALDOX[™] (myristamidopropyl dimethylamine, MAPD)의 보존제 성분을 사용하고 있다.

PHMB는 안과적으로 0.00002~0.00005%의 농도로 사용되고 있는데 (Module 5, IACLE, 1997) 수영장 소독제 및 냉방기구의 레지오넬라 (*Legionella*) 감염예방과, 식품산업에서 계면활성제로서, 각막염을 일으키는 진균과 가시아메바에 대한 콘택트렌즈 소독보존제로서, 구강청정제나 섬유의 항균방취가공제로서, *pseudomonas aeruginosa* 예방을 위한 거즈상처 치료제에서,

부화된 계란의 살모넬라 (*Salmonella*) 감염 예방을 위한 처리 등의 광범위한 소독제로서 사용되고 있는 중합체화 된 biguanide이다 (Michael et al., 2004). 또한 그람 양성 및 음성균에 대해 광범위한 효력이 있으며, 중합체 길이에 따라 항균작용이 증가한다 (Gilbert et al., 1990a, b). 대장균 (*E. coli*)의 세포질막에 영향을 미쳐 미토콘드리아 호흡효소 (mitochondrial respiratory enzymes)를 억제하며 (Broxton et al., 1984; Gilbert et al., 1990), 세균의 세포막 인지질층과 작용하며 세포막이 비가역적으로 손상되도록 하여 살균효과를 일으킨다 (Ikeda et al., 1984). PHMB의 효과는 병원성 아메바에 대해서도 연구되어져 왔으며 (Dawson et al., 1983; Kilbington, 1990), 가시아메바 각막염에 병용 혹은 단독 치료제로 평가받고 있다 (Larkin et al., 1992; Ribasi et al., 1995). 그러나 살균효과도 중요하지만 그것보다 우선이 되어야 할 것은 인간에게 그것에 따른 독성이 미치지 않아야 한다는 것이다. PHMB 0.00002~0.00005%의 농도는 항균제로서의 기능은 우수하지만 이 농도는 각막조직에 영향을 줄 수 있는 농도이다. Yoon (1995) 등의 연구에 의하면 시력 보정용 콘택트렌즈 기준 및 시험 방법 (식품의약품안전청 고시 제 1999-18호 (99. 3. 10))과 CRCERT (NSW, Australia)에서 행한 세포증식 저해 염색법을 사용한 잠재독성 평가보고서 기준과 CIVA VISION CORPORATION에서 제시한 기준을 바탕으로 한 세포독성검정평가에서 볼 때 MPS의 보존제 성분은 세포증식 저해율이 있음을 보고 하였고 (Pfister & Burstein, 1976; Robert, 1988) 세포증식 저해율이 높게 나온 제품들에는 특히 PHMB가 포함되어 있어 PHMB가 독성의 원인이 됨을 유추할 수 있다. 본 연구에서도 이 보존제 성분이 포함된 ReNu[®]와 Free-sol plus[®] 제품의 세포수준 평가결과, 증식 저해율이 나타났으며, 백색 가토안의 각막상피 및 내피조직의 형태학적 관찰로 확인할 수 있었다. 각막은 외부로 노출되어 있기 때문에 장기간 동안 콘택트렌즈와 관리용액과의 접촉이 계속되어 각막의 조직학적인 구조에서 제일 바깥층인 상피조직 세포의 증식이 억제되며 생리학적으로 가장 중요한 내피조직의 손상이 유발될 수 있으며, 이는 각막의 생리학적 역할을 방해하는 장애 원인이 되어 심각한 부작용을 나타낼 수 있다 (Ryu et al., 1995). Opti-free express[®]에 사

용된 보존제는 polyquaternium과 ALDOX™의 2가지 살균제를 포함하고 있는데 polyquaternium은 주로 항균작용을 하며, 원생동물(protozoa)에 대해서는 거의 작용하지 않는다고 보고되고 있다(Rosenthal et al., 2000; Codling et al., 2003). Polyquaternium은 새 세대 보존제로서 화장품과 안과용액에서 각광 받고 있는데, 높은 분자량을 가진 4급 암모늄 화합물(Quaternary Ammonium Compound, QAC)로서 큰 분자크기(22.5 nm)로 인해 렌즈 pore(3~5 nm)에 쉽게 침투할 수 없다(Desmond et al., 1988; Michael et al., 2004). 이전의 Alcon사의 제품에서는 이 보존제를 사용했는데 세포 증식의 저해에 별 영향을 미치지 않은 것으로 나타났다. 일반적으로 사용되는 농도 범위는 0.001~0.005% 인데 *in vivo* 실험에서 세포 동력학 운동, 상피세포의 유사분열에 식별할만한 영향을 미치지 않는다고 보고 되지만 이는 세포와 세포사이의 연결을 파괴시키면서 세포내로 침하여 각막의 투과성을 변화시켜 세포형태의 손상을 초래한다고 보고된 바 있다(Caroline et al., 2001).

본 연구에서 세포수준의 증식저해율 및 형태학적 관찰 결과 가장 독성이 크게 나타났으며, 임상적으로도 가장 자극감을 많이 호소했던 Opti-free express® 제품에서는 최근 문제 시 되고 있는 가시아메바 각막염에 대한 탁월한 효과를 가지는 ALDOX™성분이 polyquaternium과 함께 사용하고 있는데 이 성분은 양이온성 amidoamine으로서 stearamidopropyl dimethylamine, *N*-[3-(dimethylamino) propyl] cotadecanamide 또는 *N,N*-dimethyl-*N'*-tetradecanoyl-1,3-propylenediamine으로 알려져 있는 보존제 성분으로 이 제품에 5 mg/L을 포함하고 있다(Reanne et al., 2003). MAPD는 보존제로의 작용에 대한 기전은 아직 정확하게 밝혀지지는 않았지만 항진균(antifungal)과 항원생동물(antiprotozoal)에 대해 뛰어난 효능을 가지고 있다고 보고 되고 있다(Rosenthal et al., 2000; Codling et al., 2003). 그러나 MAPD 성분이 추가된 신제품에서 세포적 수준에서의 증식저해율 검정과 *in vivo* 실험에서 각막 상피와 내피 조직의 형태학적 변화를 관찰한 결과, 저해율이 높았고 형태적 변화도 많은 것으로 관찰되었다.

따라서 보존제의 효능성에 대한 연구와 함께 이 성

분에 대한 세포독성 관련 농도 범위 및 안정성에 대한 연구 또한 지속적으로 이루어져야 하며, 이러한 보존제 성분의 활용에 따른 부작용에 대한 각막세포 차원의 밀도 있는 연구가 필요하다고 생각된다.

참 고 문 헌

- Broxton P, Woodcock PM, Heatley F, Gilbert P: Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol* 57 : 115-124, 1984.
- Caroline D, Françoise B, Pierre-Jean P: Quarternary Ammonium and Other Preservatives' Contribution in Oxidative Stress and Apoptosis on Chang Conjunctival Cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 42(3) : 642-652, 2001.
- Codling CE, Naillard JY, Russell AD: Asepects of the antimicrobial mechanisms of action of a polyquaternium and an amidoamine. *J Antimicrob Chemother* 51 : 1153-1158, 2003.
- Dawson NM, Brown TJ, Till DG: The effect of baquacil on pathogenic free-living amoebae: NZJ Mar Freshwater Res 17 : 305-311, 1983.
- Desmond FM, Meredith R, Robert T, Lewis W: The IACLE Contact Lens course Module 5 : First Edition, Australia, pp. 37-134, 1988.
- Duguid IGM, Dart JKG, Morlet N, Allan BDS, Matheson M, Ficker L, Tuft S: Outcome of *Acanthamoeba keratitis* treated with Polyhexamethylene Biguanide and Propamidine. *Ophthalmology* 104 : 1587-1592, 1997.
- Francois D, Rita L: Rapid colorimetric assay of cell growth and survival. *J Immunol Methods* 89 : 271-277, 1986.
- Gennaro AR: Remington's Pharmaccutical Sciences, 17th edition, Mack Publishing Co, Pennsylvania 88 : 1159-1160, 1169, 1985.
- Gilbert P, Pemberton D, Wilkinson DE: Barrier properties of the gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. *J Appl Bacteriol* 69 : 585-592, 1990a.
- Gilbert P, Pemberton D, Wilkinson DE: Synergism within polyhexamethylene biguanide biocide formulations. *J Appl Bacteriol* 69 : 593-598, 1990b.

- Ikeda T, Ledwith A, Bamford CH, Hann RA: Interaction of polymeric biguanide biocide with phospholipid membranes. *Biochem Biophys Acta* 769 : 57-66, 1984.
- Kilbington S: Activity of water biocide chemicals and contact lens disinfectants on pathogenic free living amoebae. *Int Biodeterior* 26 : 127-138, 1990.
- Larkin DRP, Kilvington S, Dart JFG: Treatment of Acanthamoeba keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmology* 99 : 185-191, 1992.
- Lynn F: USP extraction of contact lenses in saline. Standard operating procedure. 1997.
- Michael JA, Andrew PM, Graham FW: Cooperativity in the binding of the cationic biocide polyhexamethylene biguanide to nucleic acids. *Biochemical & biophysical Res* 318 : 397-404, 2004.
- Mosmann T: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application of proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2) : 55-63, 1983.
- Pfister RR, Burstein N: The effect of ophthalmic drugs, vehicles, and preservatives on corneal epithelium : A scanning electron microscope study. *Invest Ophthalmol* 15(4) : 246-259, 1976.
- Reanne H, John D and Simon K: Activity of the amidamine myristamidopropyl dimethylamine against keratitis pathogens. *J of Antimicrobial Chemotherapy* 51 : 1415-1418, 2003.
- Ribasi F, Longanesi L, Casolari C: Cytologic diagnosis of Acanthamoeba keratitis. Report at a case with correlative study with indirect immunofluorescence and scanning electron microscopy. *Acta Cytol* 39 : 821-826, 1995.
- Robert B: Lens handling, care and storage. *Contact lens practice*. 568-597, 1988.
- Rosenthal RA, McAnally CL, McNamee LS, Buck SL, Schlitzer RL, Stone RP: Broad spectrum antimicrobial activity of a new multi-purpose disinfecting solution. *CLAO J* 26 : 120-126, 2000.
- Ryu KH, Suk DJ, Oum BS: Effects of hydrogen peroxide on rabbit corneal bioelectric properties. *J Korean Ophthalmol Soc* 36 : 141-152, 1995. (Korean)
- Stehrgreen JK, Bailey TM, Visvesvara GS: The epidemiology of Acanthamoeba keratitis in the United States. *Am J Ophthalmol* 107 : 331-336, 1989.
- Stephan R, Ulrike B: Cytotoxicity assay, Growth inhibition test report. ANAWA, International Bioscience Test 931043 : 1-2, 1993.
- The IACLE contact lens course. MODULE 5, IACLE (International Association of Contact Lens Educators), 70 : 1997.
- Tripathi BJ, Tripathi RC, Kolli SP: Cytotoxicity of ophthalmic preservatives on human corneal epithelium. *Lens & Eye Tox Res* 9(3 & 4) : 361-375, 1992.
- Yoon Y, You GC, Kim JM, Ra MS, Lee JB: The inhibitory effect of multi-purpose solution on HCE and L929 cells. *Korean J Vis Sci* 1 : 81-88, 1999. (Korean)

< 국문 초록 >

본 연구는 시중에서 유통되고 있는 콘택트렌즈 관리용 액인 다목적용액 (multi-purpose solution, MPS)이 세포에 미치는 증식저해도와 실험용 토끼눈의 각막 상피 및 내피조직에 미치는 손상정도를 비교 관찰하고자 시행하였다. MPS는 ReNu® (Bausch & Lomb, USA), Opti-free express® (Alcon, USA), Free-sol plus® (Hanamedicon, Korea)를 사용하였다. 세포증식 저해율은 L929 세포주를 배양 후 MTT assay로 검정하였고, 형태학적으로는 광학 현미경과 Hematoxylin & Eosin staining 표본을 제작하여 관찰하였다. *In vivo* 실험은 백색 가토 9마리(18안)를 3군으로 분류하여 실험군인 좌안(9안)에는 각 MPS 제품을, 대조군인 우안(9안)에는 보존제가 포함되지 않은 멸균생리식염수를 점안하였다. 일정기간 점안 후, 실험용 토끼눈의 각막표면을 Rose bengal로 염색하여 관찰하였고 각막 상피 및 내피조직의 변화는 주사전자현미경 (scanning electron microscopy, SEM)으로 관찰하였다. 세포증식 저해율은 각각 54, 73, 36%로 나타났으며, 형태학적 변화는 L929 세포주의 일반적인 형태와 달리 타원형 또는 원형으로 위축되었다. Rose bengal 염색 결과, 각 실험군은 대조군과 달리 전반적으로 붉게 염색되었고 주사전자현미경 (SEM) 관찰 결과, 각막상피는 다각형 모자이크 (polygonal mosaic) 형태의 균일도가 감소하였고, 각막내피 또한 형태가 불규칙하였으며 섬유아세포만 국소적으로 관찰되었다. 따라서 MPS의 항미생물의 효과와 더불어 생체 세포의 안전성면에서 고려해 볼 때 합성보존제의 농도 개선과 세포독성이 없는 새로운 보존제 개발의 지속적인 연구가 필요할 것으로 판단된다.