

흰쥐의 섬유아세포 L-929를 이용한 새로운 Soft Contact Lens 소재의 생물안전성 검증

유영현 · 남주형 · 김병길 · 김순복¹ · 문익재² · 김종필² · 서영배*

경북대학교 자연과학대학 생명공학부

¹(주)미광콘택트렌즈, ²(주)웰진

Biosafety of the New Soft Contact Lens Materials in the Fibroblast L-929 Cell Line. You, Young-Hyun, Joo-Hyeung Nam, Bieong-Kil Kim, Soon bok Kim¹, Ik-Jae Moon², Jong-Pil Kim², and Young-Bae Seu*. Department of Microbiology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea. ¹Migwang Contact Lens, Gyeongsan 712-881, Korea ²WelGENE Inc., Daegu 704-230, Korea – In this study, we polymerized new materials for soft contact lens using HEMA (2-hydroxyethyl methacrylate) which is the based-monomer of soft contact lens, EGDMA (ethylene glycol dimethacrylate) as cross linkage agent, and the new additives of *mono*-ester or *di*-ester derived from itaconic acid commercially produced by the fermentation of *Asp. itaconicus*. New polymer materials for soft contact lens were synthesized with the mixture of HEMA and *mono*- or *di*-ester at different ratios and presented to a good water content and oxygen transmissibility (Dk/L) values. In case of polymerization with HEMA and *mono*-ester (15%), the water content and oxygen transmissibility of contact lens were found to be good values at 57.6% and 28.5 Dk respectively. The mixture of HEMA and *mono*-ester is more excellent than HEMA/*di*-ester in the water content and oxygen transmissibility. The toxicity of new contact lens materials were confirmed in the fibroblast L-929 cell line using a agar overlay test and a growth inhibition test with the extract solution of contact lens.

Key words : Itaconic acid, soft contact lens, fibroblast L-929, agar overlay test, growth inhibition test

서 론

Soft contact lens는 친수성 폴리머로써 일반적으로 모노머 HEMA(2-hydroxyethyl methacrylate)를 주소재로 사용하여 다른 NVP(N-vinyl pyrrolidone), EDMA(ethylene dimethacrylate), MA(allyl methacrylate) 등을 사용하여 함수율, 산소투과도 등을 높이고 있으며 HEMA는 친수성 monomer로 가장 많이 사용되고 있으며 함수율이 38% 정도인 동일 중합체이다[4, 8, 9]. Contact lens 소재용 polymer의 각종 monomer들은 기본적으로 acrylic acid를 기본골격으로 한 유도체들과 이의 이성체인 2-methylacrylic acid를 기본 골격으로 하는 HEMA(hydroxyethyl methacrylate)를 비롯하여 이의 변형체 등이 대부분이다[2]. Soft contact lens의 중요한 요소인 함수율(water content)과 산소투과도(oxygen transmissibility : Dk/L)를 높인 기능성렌즈를 만들기 위하여 많은 연구와 소재의 개발이 계속 되고 있으며, 이들 주된 두 기능은 monomer의 화학구조에 따라 유래되며 서로 상반되는 성질을 나타낸다. 즉, 일반적으로 함수율을 높인 구조는

산소투과도가 떨어지며 산소투과도를 높인 구조는 함수율이 떨어지는 경향이다. 최근 이러한 화학적, 물리적 성질 등을 충족시키는 렌즈가 생산되고 있지만 이렇게 생산되는 렌즈도 장시간 사용 시에 각막에 많은 영향을 끼칠 수 있기 때문에 콘택트렌즈를 사용할 때 주의해야 한다. 안구와 같이 민감한 부위에 착용되는 콘택트렌즈용 생체재료의 경우 광학적 안정성과 함께 높은 함수율과 산소투과도, 생체친화성과 안전성이 요구되는데, HEMA(hydroxyethyl methacrylate)와 같은 기존 소재는 광학특성은 우수하지만 착용시의 이질감과 단백질 흡착 및 안구질환과 관계되는 상당한 문제점이 지적되고 있으며[6, 11, 12], 각막부종과 세포독성 등으로 나타나는 안질환등에 많은 영향을 줄 수 있다. 그리고 렌즈용출액에 대한 세포의 독성에 관한 연구는 잘 이루어지고 있지 않으나 국내에서도 1999년 3월부터 이 검사를 시행하도록 고시하여 현재 시행중이다[5].

본 연구에서는 *Asp. itaconicus*, *Asp. terreus*에서 생산되는 itaconic acid의 고부가가치화의 일환으로 itaconic acid[3]로부터 합성한 ester계 monomer들을 additive로 사용하여 HEMA(2-hydroxyethyl methacrylate)와 혼합하여 열중합으로 soft contact lens를 제조하였다. 일반적으로 itaconic acid는 유기산으로 두 개의 카르복실 그룹과 메틸렌 그룹간의 결합을 이용하여 이합체나 올리고머 등의 고분자로 중합되는

*Corresponding author

Tel: 82-53-950-5380, Fax: 82-53-955-5522

E-mail: ybseu@knu.ac.kr

특성을 가지고 있으며 폴리에스테르수지나 N-치환 파이롤리딘 등 고분자 물질의 중요한 전구체로 사용되고 있다[1,10]. Itaconic acid를 이용하여 합성한 ester계 monomer들을 신규 additive로 사용하여 새롭게 제조한 폴리머 soft contact lens들이 우수한 흡수율과 산소투과도 값을 나타내었기에 이들 소재들이 눈의 각막에 미치는 영향과 콘택트렌즈로서 적합한지 확인하기 위하여 독성에 관한 실험을 실시하였다. 제조한 콘택트렌즈와 렌즈용출액을 사용하여 흰쥐의 섬유아세포 L-929[7]를 사용하여 한천배지에서 한천중층시험(agar overlay test)과 세포의 성장저해시험(growth inhibition test)을 식품의약품안전청(KFDA)의 고시 기준에 따라 조사하였다.

신규 폴리머소재의 콘택트렌즈 제작에 사용된 itaconic acid계 ester 유도체들은 H_2SO_4 촉매 하에 itaconic acid와 isopropyl alcohol의 탈수반응으로 합성하였으며(Fig. 1), 합성한 mono-ester 1과 di-ester 2는 H^1 -NMR(400 MHz)로 확인하였다. HEMA와 Itaconic acid계 ester의 monomer를 additive로 사용하여 합성한 soft contact lens의 조성은 Table 1에 나타내었으며, contact lens의 가장 기본 물질인 HEMA와 itaconic acid로부터 합성한 ester계 monomer들 간의 결합이 잘 되도록 가교제(cross linking agent)인 EGDMA(ethylene glycol dimethacrylate)를 0.5% 혼합하였으며, 개시제로 α - α -azobis계 화합물 0.3%의 첨가제와 mono-ester 1과 di-ester 2를 각각 2.5%, 5%, 7.5%, 10%, 15%의 조성

비로 모두 10개의 sample을 준비하였고, 상온에서 혼합한 뒤, $100^\circ C$ 에서 열중합으로 soft contact lens를 제조 하였다.

배양세포의 증식저해시험을 위해 콘택트렌즈 36 cm^2 를 주 사용 증류수 6 mL를 넣은 밀봉시험관에 넣고, $37^\circ C$ 에서 24 시간 추출하여 추출액을 조제 하였다. 흰쥐의 섬유아세포(L-929) 세포를 Eagle 배양액으로 단층배양 후에 트립신을 처리 하여 세포농도가 1 mL당 10^6 개가 되도록 세포 현탁액을 만들었다. 추출액 및 2배 농도의 Eagle 배양액을 동량 혼합한 것을 대조배양액으로 하였다. 세포 현탁액 0.2 mL(2×10^5 개 세포)씩을 15개의 시험관에 주입한 다음 그중 5개(처리군)에는 추출액처리배양액을 2 mL씩 넣고 다른 10개(반응개시시의 대조군 및 72시간 대조군)의 시험관에는 대조배양액을 2 mL씩 첨가 하였다. 대조 배양액을 넣은 시험관중 5개를 곧 원심 분리하여 배양액을 제거한 후, 세포를 pH 7.0 인산완충생리 식염주사액으로 재현탁 시켰다. 현탁액을 다시 두 번 원심 분리 하여 세포를 씻은 다음 $4^\circ C$ 에서 보존하여 반응 개시시의 대조군으로 사용했다. 처리군 및 72시간 대조군의 10개 시험관은 5% 탄산가스배양 장치를 사용하여 $37^\circ C$ 에서 72시간 배양했으며 배양 후에 pH 7.0 인산완충생리식염주사액 2 mL를 사용하여 가만히 단층을 세 번 씻어 내어 처리군 및 72시간 대조군으로 사용했다. 대조군 및 처리군의 시험관을 가지고 세포를 파괴한 후 총 단백질 함량을 비색법으로 정량했다. 각 군의 시험관의 흡광도를 측정

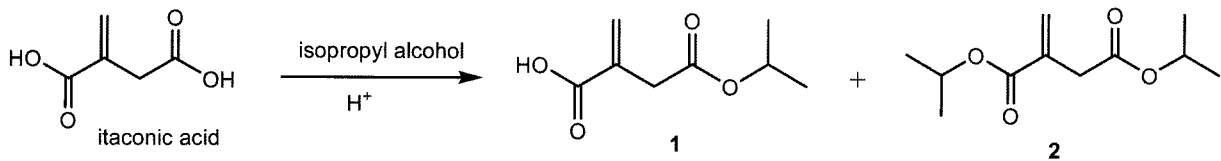


Fig. 1. Synthesis of monomer-esters from itaconic acid. The synthesis of 1 (4-isopropoxy-2-methylene-4-oxobutanoic acid) and 2 (diisopropyl 2-methylenesuccinate) using esterification of itaconic acid.

Table 1. Monomer compositions of the contact lens materials.

<p>a)</p> <p>2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)</p>	<p>1</p> <p>4-isopropoxy-2-methylene-4-oxobutanoic acid</p>	<p>Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)</p>
<p>b)</p> <p>2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA)</p>	<p>2</p> <p>diisopropyl 2-methylenesuccinate</p>	<p>Ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)</p>

a) The constituent polymerization of contact lens, monomer 1(4-isopropoxy-2-methylene-4-oxobutanoic acid) included.

b) The constituent polymerization of contact lens, monomer 2(diisopropyl 2-methylenesuccinate) included.

하고 각 균의 평균 흡광도를 구한 후 세포증식저해율을 확인하였다.

한천중층시험에서 흰쥐의 섬유아세포 L-929세포는 일반적으로 어떤 물질의 독성을 판단할 때 기준이 되는 세포로서 한국식품의약품안전청과 외국의 연구소에서 독성 평가시에 사용되는 세포주이다. Eagle MEM 배양액(10% FBS)에 1 mL당 5×10^5 의 세포농도로 조제한 흰쥐의 섬유아세포액(L-929)을 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 배양 접시의 액체 성분을 흡입 제거 후 Eagle 배양액에 한천을 1.5% 넣은 것을 약 12 mL씩 배양접시에 중층 하였다. 이 한천 평판 위에 0.02% 뉴트럴레드·인산완충생리식염주사액 3 mL를 넣은 다음 5% 탄산가스장치를 사용하여 37°C에서 2~3시간 배양하였다. 배양 후 과량의 염색액을 제거하고 다시 5% 탄산가스배양장치를 사용하여 37°C에서 4시간 배양하였다. 배양 후 세포가 충분히 색소를 흡수한 평판을 2개씩 사용하여 각 평판 위에 콘택트렌즈와 양성대조 및 음성대조 1개씩을 한천배지 위에 올려놓았다. 양성대조는

NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)를 직경 8 mm의 원형여과지에 1매당 30~50 μg 을 적신 것을 사용하였다. 음성대조는 양성대조에 사용한 똑같은 여과생리 식염주사액을 적신 것을 사용하였고 이 평판을 5% 탄산가스배양장치를 써서 37°C에서 24시간 배양 하였다. 배양세포의 반응은 배양 접시를 백색의 배경에서 관찰할 때 적색으로 염색된 세포가 검체의 밑 부분 및 주변에서 염색성이 저하되어 있는가에 의하여 판정하도록 했으며 Fig. 2에 나타내었다. 그리고 식품의약품안전청에서 고시한 판정으로 양성대조와 음성대조가 정확할 때 다음의 판정에 의하여 4개의 검체 모두가 용해지수는 0, 지대지수는 1이하여야 한다고 고시를 하고 있다. 용해도가 관찰 되지 않을 경우 용해지수는 0으로 탈색 zone은 검체의 바로 밑 부분의 영역에 해당할 때 지대지수는 1로서 나타낸다. 이 실험으로 용해지수는 0과 지대지수는 1로 확인 되었으며 식품의약품안전청 고시 기준에 적합한 것으로 나타났다.

배양세포의 증식저해시험은 세계 각국에서 법적으로 이

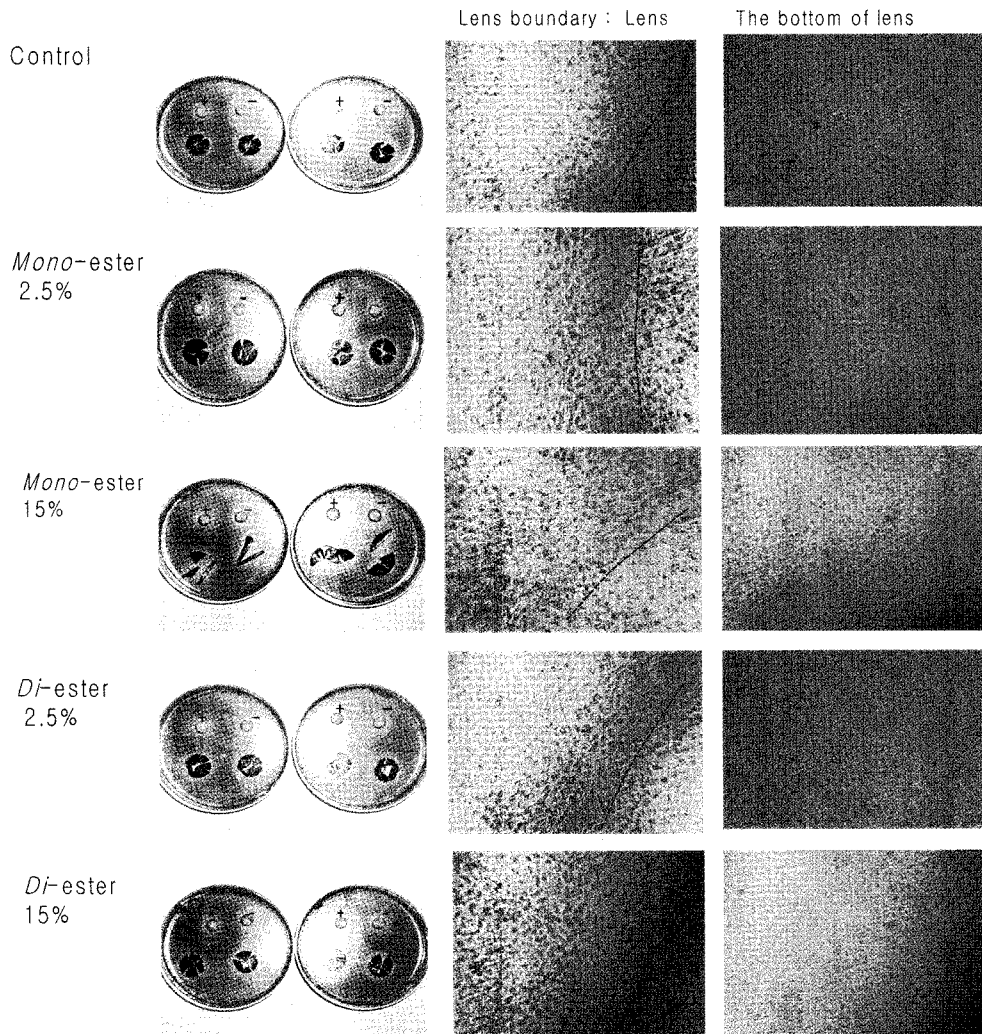


Fig. 2. The activity test on L-929 for agar overlay test. The confirmation of biosafety of new contact lens using fibroblast L-929 cell line. +, NTG(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine). -, 0.9% Normal saline.

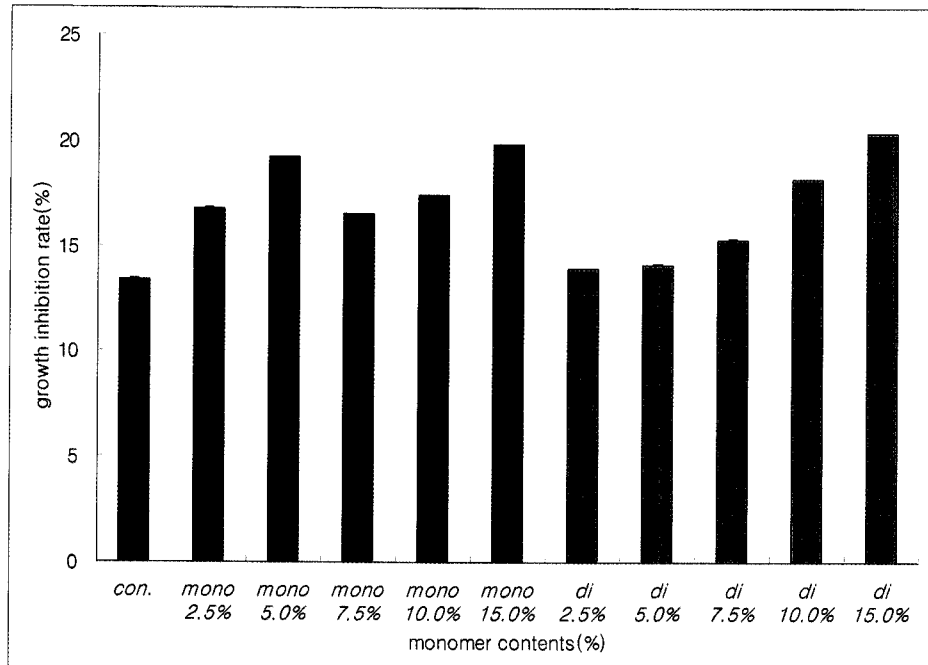


Fig. 3. The growth inhibition rate of mono-ester and di-ester. The toxicity of new contact lens materials were confirmed in the fibroblast L-929 cell line using a growth inhibition test with the extract solution of contact lens (mono-ester and di-ester).

시험을 반드시 하도록 규정하고 있으며 국내에서도 한국 식품의약품안전청에서 1999년 3월부터 이 검사를 시행하도록 고시하여 현재 시행중이다. Control은 M사의 제품을 사용하였으며 HEMA에 새로운 첨가제로 mono-ester 2.5%~15%가 첨가된 콘택트렌즈와 di-ester 2.5%~15%까지 모두 10개의 콘택트렌즈를 배양세포의 증식저해시험에 수행하였고 Fig. 3에 나타내었다. Soft contact lens는 29% 미만의 저해율을 나타내면 콘택트렌즈로서 안전성이 인정된다. 전반적으로 합성해서 만든 itaconic acid계 monomer의 비율이 높아질수록 세포의 성장저해율이 높게 나타나고 있지만 20% 미만으로 나타났다.

이상에서 기존에 널리 이용되는 monomer인 HEMA에 새로운 첨가제로 itaconic acid로부터 합성한 ester계 monomer를 새로운 additive로 사용하여 열중합반응으로 제작한 우수한 함수율과 산소투과도 값을 가지는 신규 콘택트렌즈 소재의 생체적합성 조사를 위하여 한천중층시험(agar overlay test)과 세포의 성장저해시험(growth inhibition test)을 수행한 결과 한천중층시험에서는 용해지수 0, 지대지수 1로 나타났으며 성장저해시험에서는 mono-ester 중합렌즈의 경우에 16.5%~19.8%의 저해율과 di-ester 중합렌즈의 경우에 13.9%~20.3%의 저해율을 나타냈다. 용해지수와 지대지수에서 식품의약품안전청 고시 기준에 의거할 때 콘택트렌즈로서 안전한 것으로 나타났으며 세포의 성장저해시험에서는 모두 29%미만으로 확인되어 soft contact lens로서 안전성을 확인 할 수 있었으며 앞으로 콘택트렌즈에 사용될 신소재로서의 개발 가능성을 보여 주었다.

감사의 글

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술재단의 지역혁신인력양성사업으로 수행된 연구 결과임.

REFERENCES

- Bressler, E. and S. Braun. 2000. Conversion of citric acid to itaconic acid in a novel liquid membrane bioreactor. *J. Chem. technol. Biotechnol.* **75**: 66-72.
- Caroline, C.S. Karlgard, D K. Sarkar, L. W. Jones, and K. T. Leung, 2004. Drying methods for XPS analysis of pure Vision™, Focus Night&Day™ and conventional hydrogel contact lenses. *A. Surface Science.* **230**: 106-114.
- Chung, S. Y. and J. I. Rhee. 2002. Production and monitoring of itaconic acid from starchy materials, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**: 477-483.
- IACLE, 1997. The IACLE Contact lens course, Module 2, 5.
- Kim, J. H., J. S. Seong, K. C. Yoo, Y. Yoon, M. S. Ra, and J. B. Lee. 1999. Comparison of contact lenses and storage solution for cytotoxic potential using a cell growth inhibition assay. *J. Korean Oph. Opt. Soc.* **4**: 81-86.
- Lai, T. C., Wilson, A. C. and Zantos, S. G. 1993. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology. 4th ed., *John Wiley.* New York. **7**: 192-218.
- Park, J. h., S. K. Ju, J. S. Park, Y. K. Park, M. H. Kang and K. H. You. 2004. The effect of overexpression of rat clusterin in L929 fibroblasts. *J. Microbiol. biotechnol.* **14**:

- 1333-1337.
8. P. White. 1994. *Contact lens spectrum*. Nov 31-44.
 9. P. White and C. Scott. 1999. *Contact lens Spectrum* Suppl. 7.
 10. Reddy, C. S. and K., R. P. Singh, 2002. Enhanced production of itaconic acid from corn starch and market refuse fruits by genetically manipulated *Aspergillus terreus* SKR 10, *Bioresour. Tech.* **85**: 69-71.
 11. Refojo, M. F. 1996. Polymeric Materials encyclopedia. *CRC Press*, New York, **2**: 1504-1509.
 12. Ruben, M. and Guillon, M., 1994. *Contact Lens Practice*, *Chapman & Hall Medical*. London.

(Received Dec. 13, 2008/Accepted March 3, 2009)