

## 국제표준화기구 기준에 의한 의료기기용 하이드로겔의 세포독성 평가

김현기 · 김예태 · 조양하<sup>1</sup> · 노혜원<sup>1</sup> · 김민아<sup>1</sup> · 김소연<sup>2</sup> · 허강무<sup>2</sup> · 박정숙<sup>†</sup>

충남대학교 약학대학, <sup>1</sup>식품의약품안전청 의료기기 기준과, <sup>2</sup>충남대학교 공과대학  
(2009년 3월 25일 접수 · 2009년 3월 31일 수정 · 2009년 4월 1일 승인)

## Cytotoxicity Evaluation on Hydrogels for Medical Devices based on the International Organization for Standardization

Hyun-Ki Kim, Ye-Tae Kim, Yang Ha Cho<sup>1</sup>, Hye-Won Roh<sup>1</sup>, Min-A Kim<sup>1</sup>,  
So Yeon Kim<sup>2</sup>, Kang Moo Huh<sup>2</sup> and Jeong-Sook Park<sup>†</sup>

College of Pharmacy, Chungnam National University,

<sup>1</sup>Medical Device Standardization Division, Korea Food and Drug Administration,

<sup>2</sup>College of Engineering, Chungnam National University

(Received March 25, 2009 · Revised March 31, 2009 · Accepted April 1, 2009)

**ABSTRACT**—Hydrogels for medical devices such as hydrophilic dressing, moisturizing healing band, hydrophilic intravenous catheter and soft contact lens were evaluated for their cytotoxicity according to the International Organization for Standardization (ISO) procedures. To test indirect cytotoxicity of hydrogel products, dissolution medium and dissolution condition were selected based on the guideline for medical devices. Cytotoxicity was low in all the case of hydrogel products. Soft contact lens showed no significant difference in dissolution between complete medium and saline. Currently, there is no specific guideline to test hydrogel for medical devices in Korea with consideration of characteristics of hydrogel. Thus, proper method of cytotoxicity evaluation should be selected depending on the characteristics and usages of hydrogels for medical devices.

**Key words**—Hydrogel, International Organization for Standardization, Medical devices, Cytotoxicity

하이드로겔은 친수성 고분자들이 삼차원적으로 가교화된 조성으로, 다량의 물을 함유할 수 있는 특징이 있다. 하이드로겔은 판(slab)형, 미립자(microparticles), 나노입자(nanoparticles), 코팅제, 필름 등과 같은 다양한 형태로 제조할 수 있을 뿐만 아니라, 생체적합성이 우수하여 다량의 물을 흡수한 상태에서는 생체의 조직과 유사한 거동을 나타내기 때문에 응용범위가 광범위하여 실험실과 임상에서 널리 적용되고 있다.<sup>1,2</sup> 최근 하이드로겔이 의료분야에서 중요한 물질로 떠오르면서 그 응용범위가 진단기구, 치료기구, 카테터와 같은 삽입기구,<sup>3</sup> 바이오센서, 인공피부, 약물수송체, 콘택트 렌즈에 이르기까지 매우 다양해졌다.<sup>4-6</sup> 이러한 하이드로겔은 생체적합성이 우수하여 의료기기의 중요한 부분을 차지하며 다양한 관련 제품들이 개발되고 있으며, 인체에 직접 적용되기 때문에 그 안전성을 필수적으로 확보해야 한다.

현재 하이드로겔의 안전성은 의료기기에 사용되는 하이드

로겔에 대한 특별한 규정이 없기 때문에 의료기기의 안전성 시험에 준하여 실시하여야 한다.<sup>7</sup> 의료기기의 안전성 시험은 초기평가시험으로 세포독성시험, 감작성시험, 자극성시험(피내반응성시험), 급성전신독성시험, 아급성독성시험, 유전독성시험, 이식시험, 혈액적합성시험이 있으며, 추가적인 평가시험으로는 만성독성시험, 발암성시험, 생식독성시험, 생분해성시험이 있다.<sup>8</sup>

국제표준화기구(International Organization for Standardization, ISO)에서는 의료기기의 세포독성을 세포수, 형태, 세포활성 등 여러 측정지표에 의거하여 규정하고 있다.<sup>9</sup> 그러나 시험하고자 하는 물질, 세포의 종류, 시험법 등에 따라 서로 다른 결과를 얻을 수도 있다.<sup>10</sup>

이 중 가장 우선적으로 시행할 수 있는 것이 세포독성시험으로 하이드로겔의 안전성을 평가하는 기초 자료로 사용할 수 있다. 의료기기의 안전성을 평가하는 세포독성시험은 크게 직접접촉법과 용출시험법으로 나눌 수 있다.<sup>11</sup> 일반적인 고분자 또는 의료기기의 세포독성에 사용되는 직접접촉법은 세포층에 검사시료를 직접 위치하도록 하여 배양하

<sup>†</sup>본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로  
Tel : 042)821-5932, E-mail : eicosa@cnu.ac.kr

로 하이드로겔처럼 물을 흡수하는 성질을 나타내는 물질의 경우, 세포배양에 필요한 배지를 모두 흡수하기 때문에 정확한 세포독성을 평가하기 어렵다. 반면 용출시험법은 검사대상물의 잠재적인 독성의 위험성을 알아보기 위하여 임상 사용시의 조건을 최대한 고려하여 용출하게 되는데, 용출액으로 혈청을 포함한 배지, 혈청을 포함하지 않는 배지, 생리 식염수, 기타 적절한 용매 중 하나 이상을 선택하여 37°C에서 24시간 이상 용출하는 것이 일반적이다.

2007년도에 개정된 국제표준화기구(ISO) 규정에 의하면 용출시험법에서 용출액을 제조하는 조건은 Table I과 같다.<sup>12)</sup> 그러나, 현재 식품의약품안전청의 고시에서 의료기기에 관해서만 규정하고 있으며, 의료기기에 사용되는 하이드로겔에 대한 규정이 없으므로 본 단보에서는 최근 개정된 국제표준화기구 규정에 의거하여 용출시험법으로 의료용 하이드로겔의 세포독성시험을 수행함으로써 의료기기용 하이드로겔의 안전성 시험에 관한 기초자료를 제시하고자 한다.

## 실험 방법

### 시약 및 기기

의료기기에 사용되는 하이드로겔의 시험물질로서 시판제품 중 친수성드레싱제(Hydrogel-Absorber<sup>®</sup>, 대일제약(주), 한국), 습윤밴드첨부제(마테카솔플러스밴드, 동국제약(주), 한국), 혈관내 튜브카테타(Angiocath Plus<sup>™</sup>, 벡톤디킨슨코리아(주), 한국), 소프트콘택트렌즈(Focus Dailies<sup>®</sup>, Ciba Vision GmbH, 독일)를 선정하여 구입하였다. 세포독성 평가를 위해 사용한 fetal bovine serum(FBS) 및 Dulbecco's modified Eagle Medium(DMEM)은 Gibco BRL(NY, 미국)에서, 그리고 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide(MTT)는 Sigma Aldrich Co.(St. Louis, MO, 미국)에서 구입하여 사용하였다. 기타 용매와 시약은 시판 제품 중 시약급 이상을 사용하였다.

### 세포주 배양

하이드로겔의 세포독성을 측정하기 위하여 사람 간암 세포주인 HepG2 세포(Korean Cell Line Bank, 서울, 한국)를 사용하였다. 세포주는 10% FBS, penicillin 10000 U/mL(Gibco BRL), streptomycin 10 mg/mL(Gibco BRL)을 함유하는 DMEM 배지를 사용하여 plastic culture dish에서 37°C, 5% CO<sub>2</sub>의 조건에서 24시간 동안 배양하였다.

### 국제표준기구 기준에 의한 하이드로겔의 용출물 제조

하이드로겔의 용해 및 화학 구조의 변화 없이 잠재적인

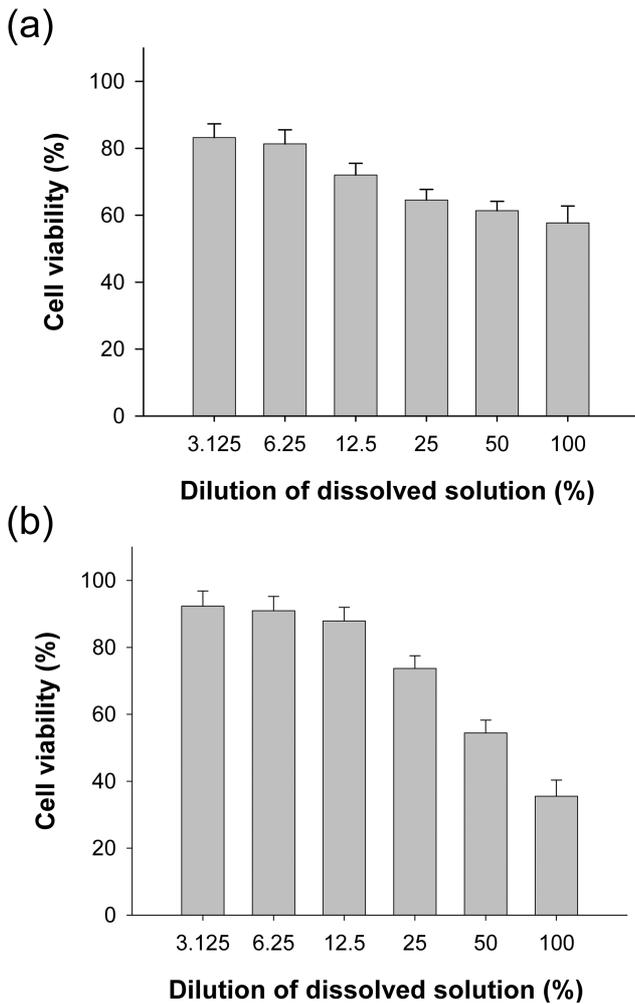
Table I-Suitable Extraction Ratios for Test Materials of Various Thicknesses<sup>12)</sup>

Thickness (mm)	Extraction ratio (surface area/volume)±10%	Examples of material
< 0.5	6 cm <sup>2</sup> /mL	Film, sheet, tubing wall
0.5-1.0	3 cm <sup>2</sup> /mL	Tubing wall, slab, small molded items
> 1.0	1.25 cm <sup>2</sup> /mL	Large molded item(s)
Irregular shape of solid medical devices	0.2 g/mL	Powder, pellet, foam, non-absorbent, molded items
Irregular shape of porous medical devices (low density of raw material)	0.1 g/mL	Membrane

독성을 평가하기 위한 세포독성 시험을 수행하기 위하여 하이드로겔의 용출물을 제조하였다. 용출을 수행하기 전에 UV를 15분간 조사하여, 멸균상태를 유지하였으며, 용출액 제조도 무균 상태에서 진행하여 감염에 의한 세포독성을 배제하고자 하였다.<sup>13)</sup> 용출액으로는 세포주 배양에 사용한 것과 동일하게 혈청을 함유한 배지를 사용하였고, 소프트콘택트렌즈의 경우 보관 및 취급시 생리식염수를 자주 사용하기 때문에 용출액으로 혈청을 함유한 배지 외에 생리식염수를 선정하였다. 용출액과 시료의 비율은 ISO 10993-12의 규정에 따라 각 제품의 하이드로겔 부분의 두께를 Digimatic caliper (Mitutoyo Co., 일본)로 측정하여 Table I로부터 용출비율을 선정하였으며,<sup>12)</sup> 용출은 37±2°C에서 48시간 동안 별도의 교반없이 정적인 상태로 수행하였다.

### 세포독성시험

하이드로겔의 세포독성을 평가하기 위해 MTT assay를 실시하였다. HepG2 세포를 plate에서 하루 정도 배양한 후에 세포수를 측정하여 96-well plate에 1×10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 세포를 분주하고 하루 정도 배양하였다.<sup>13)</sup> 세포가 어느 정도 자란 후 배지를 제거하고 하이드로겔 용출액을 배지로 적절히 희석하여 희석물 200 µL를 96 well에 가해 주었다. 37°C에서 24시간 배양 후, 배지를 다시 제거하고 각 well마다 100 µL의 MTT 용액(5 mg/mL)을 가해 주었다. 37°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 MTT 용액을 제거하고, 각 well에 MTT solubilization solution 100 µL을 가하였다. 실온에서 30분 정도 방치한 후 Microplate reader (Sunrise, Tecan Trading, 스위스)로 570 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 각 실험은 모두 4회 반복 수행하였다. 흡광도를 측정한다



**Figure 1**—Cytotoxicity of hydrogel for hydrophilic dressing product (a) and moisturizing healing band (b) by ISO method. Each value represents the mean±s.d. (n=4).

후 다음의 식을 이용하여 세포생존율을 계산하여 세포독성을 판정하였다.

$$\text{세포생존율}(\%) = (\text{Abs}_{\text{test}}/\text{Abs}_{\text{control}}) \times 100$$

**통계처리**

모든 데이터는 평균 값±표준편차(s.d.)로 나타내었으며, 소프트콘택트렌즈 용출액에 따른 세포독성의 유의성 검정은 t-test를 적용하여 p<0.05일 때 유의성이 있다고 판단하였다.

**결과 및 고찰**

국제표준화기구에서는 용출액으로 혈청을 함유한 배지, 혈청을 함유하지 않는 배지, 생리식염수, 기타 적절한 용매 중 하나 또는 그 이상을 사용하도록 권장한다. 구입한 하이드로

겔 제품의 경우 대부분 인체나 혈액에 직접 접촉되므로 용출액으로 혈청을 함유한 배지를 사용하였다. 또한 용출 조건은 37±2°C에서 최소 24시간 이상, 50±2°C에서 72±2시간, 70±2°C에서 24±2시간, 121±2°C에서 1±0.2시간의 네 가지 조건 중 선정할 수 있으며, 혈청이 포함된 배지를 용출에 사용하는 경우에는 37±2°C에서 최소 24시간 이상의 용출 조건만을 적용할 수 있으므로 본 실험에서는 37±2°C에서 48시간 동안 별도의 교반없이 정적인 상태로 용출을 수행하였다.

친수성드레싱제와 습윤밴드칩부제는 두께가 각각 0.44 mm와 0.33 mm이므로, Table I로부터 두께와 원재료의 형태를 고려하여 6 cm<sup>2</sup>/mL의 용출 비율을 선정하였다. 친수성드레싱제의 하이드로겔 부분을 용출시킨 경우, 세포 독성은 용출원액(610 mg/mL)과 2배, 4배, 8배, 16배, 32배 희석액을 HepG2 세포에 넣어주었을 때 각각 57.7%, 61.4%, 64.5%, 72.0%, 81.4%, 83.2%의 세포 생존율을 나타내었다(Figure 1a). 습윤밴드 칩부제의 하이드로겔 부분을 용출시킨 경우의 세포 독성은 용출원액(680 mg/mL)과 2배, 4배, 8배, 16배, 32배 희석액을 HepG2 세포에 가해주었을 때 각각 35.5%, 54.4%, 73.7%, 87.9%, 91.0%, 92.3%의 세포 생존율을 나타내었다(Figure 1b). 두 시료 모두 용출원액 및 2배, 4배 희석액에서의 세포생존율은 낮게 나타났다. 본 실험에서 용출원액은 친수성드레싱제의 경우 610 mg/mL의 농도이며 습윤밴드 칩부제의 경우 680 mg/mL이므로, 세포독성 실험시 32배 희석액의 농도는 각각 19 mg/mL, 21 mg/mL이다. 이는 Geever 등<sup>14)</sup>의 연구에서 사용한 최고농도 25 mg/mL에 가까운 농도이므로 본 용출액이 고농도임을 고려할 때 본 하이드로겔 시료의 세포독성은 매우 낮은 것으로 사료된다.

친수성혈관카테터는 두께가 0.5 mm이하이고, 튜브형이므로 Table I을 참조하여 6 cm<sup>2</sup>/mL의 용출 비율을 선정하였다. 혈관카테터 중 혈액에 직접 접촉되는 부분만 절단하여 표면적을 산출하고 용출비율에 해당되는 부피의 배지를 가하여 용출하였다. 혈관카테터의 하이드로겔 부분을 용출시킨 경우, 세포 독성은 용출원액과 2배, 4배, 8배, 16배, 32배 희석액을 HepG2 세포에 넣어주었을 때 세포독성은 각각 83.2%, 87.1%, 89.4%, 92.9%, 100.7%, 101.8%의 세포 생존율을 나타내었다(Figure 2). 기관지용 튜브 4 g을 20 mL의 배지에 추출하거나, 비노기용 카테터 2 g을 20 mL의 배지에 24시간 추출하여 세포독성을 시험한 결과에서도 독성이 낮게 나타났다.<sup>15)</sup> 본 실험에서는 추출시간을 48시간으로 하였으나 세포독성은 거의 나타나지 않았다.

소프트콘택트렌즈의 경우 박막의 형태를 띄고 있으며 두께가 0.5 mm이하이므로, Table I을 참조하여 6 cm<sup>2</sup>/mL의 용출 비율을 선정하였다. 소프트콘택트렌즈는 안구에 직접

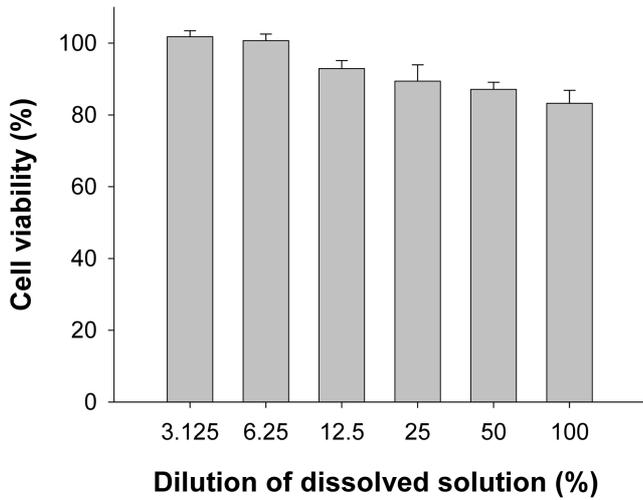


Figure 2—Cytotoxicity of hydrogel for hydrophilic intravenous catheter by ISO method. Each value represents the mean±s.d. (n=4).

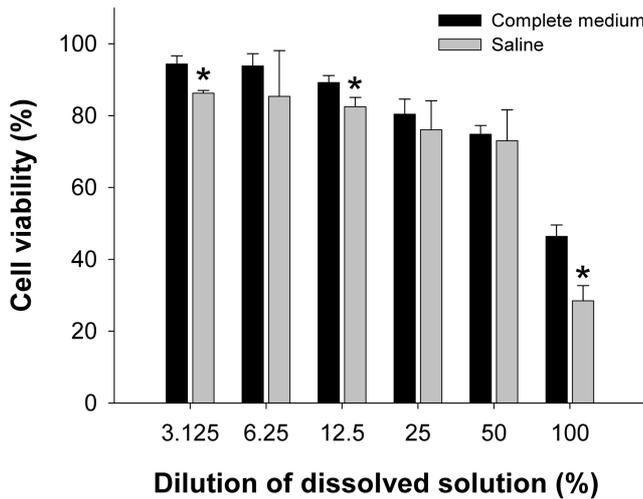


Figure 3—Cytotoxicity of hydrogel for soft contact lens by ISO method. Each value represents the mean±s.d. (n=4). \*p<0.05, saline as a dissolution medium compared to complete medium.

닿기 때문에 용출액으로 혈청을 함유한 배지를 선정하였으며, 보관 및 취급시 생리식염수를 자주 사용하기 때문에 용출액으로 생리식염수를 추가로 선정하였다. 소프트콘택트렌즈의 배지 용출액에 대한 세포독성은 용출원액, 2배, 4배, 8배, 16배, 32배 희석액을 가하였을 때 각각 46.4%, 74.8%, 80.4%, 89.2%, 93.8%, 94.4%의 세포 생존율을 나타내었다 (Figure 3). 소프트콘택트렌즈를 생리식염수에서 용출시킨 경우에 용출원액과 2배, 4배, 8배, 16배, 32배 희석액을 세포에 가해주었을 때 각각 28.4%, 73.0%, 76.1%, 82.5%, 85.4%, 86.3%의 세포 생존율을 나타내었다(Figure 3). 생리식염수를 용출액으로 선정한 경우, 용출원액, 8배, 32배 희

석액을 세포에 가해주었을 때 배지 용출액과 유의적인 차이 (p<0.05)를 나타내었다. 그러나, 8배, 32배 희석액에서는 모두 80% 이상의 세포생존율을 나타내었고, 용출원액의 경우 세포생존에 필요한 배지가 포함되지 않았기 때문에 낮은 세포생존율을 나타낸 것으로 용출물 자체의 독성에 의한 것으로 보기 어렵다. 따라서 소프트콘택트렌즈는 용출액의 종류에 관계없이 높은 세포생존율을 나타내었기 때문에 본 시험 방법에 따르면 세포독성이 낮은 것으로 평가된다.

현재, 흡수성 재료나 하이드로콜로이드 등에 대한 표준화된 시험방법이 없으므로 의료기기의 안전성 평가법을 이용하고 있으며 다음과 같은 안이 제시되고 있다. 재료가 흡수하는 용매의 양, 즉 흡수량을 측정하여 재료 2g으로 시험 시료를 만들고, 용출액의 부피가 시료 2g의 흡수량보다 많은 20 mL가 되게 할 것을 권장하고 있다.<sup>12)</sup>

### 결론

의료기기에 적용되는 세포독성시험법을 의료기기용 하이드로겔의 독성시험에 적용하였을 때 모든 제품에 대하여 세포생존율이 높게 나타났다. 또한, 소프트콘택트렌즈의 경우 용출액을 혈청함유 배지와 생리식염수로 달리함에 따라 세포생존율에서 약간의 차이를 나타내었으나 두 값 간의 유의할 만한 차이는 없었다. 현재 일반 의료기기의 안전성 평가를 위해 사용되는 기준을 의료기기용 하이드로겔에 대체로 적용가능하나, 물을 흡수하는 하이드로겔의 특성을 고려하여 용출에 대한 기준을 수립하는 것이 필요할 것으로 사료된다.

### 감사의 말씀

본 연구는 식품의약품안전청의 용역연구개발사업(08142의 로기372)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### 참고문헌

- 1) T. R. Hoare and D. S. Kohane, Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges, *Polymer*, **49**, 1993-2007 (2008).
- 2) S. S. Oh, C. J. Kim, H. S. Kim and Y. H. Shin, Efficacy of hydrogel patch in wound rat model, *J. Kor. Pharm. Sci.*, **39**, 55-58 (2009).
- 3) R. J. Whitbourne, Lubricious hydrophilic coating, resistant to wet abrasion. Patent no. 5,331,027 (1994).
- 4) J. Varshosaz and N. Koopaie, Cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogel: study of swelling and drug release behaviour, *Iran. Polym. J.*, **11**, 123-131 (2002).
- 5) A. Akhgari, H. Afrasiabi Garekani, F. Sadeghi and M.

- Azimaie, Statical optimization of indomethacin pellets coated with pH-dependent methacrylic polymers for possible colonic drug delivery, *Int. J. Pharm.*, **305**, 22-30 (2005).
- 6) D. M. Devine, S. M. Devery, J. G Lyons, L. M. Geever, J. E. Kennedy and C. L. Higginbotham, Multifunctional polyvinylpyrrolidone-polacrylic acid copolymer hydrogels for biomedical applications, *Int. J. Pharm.*, **326**, 50-59 (2006).
- 7) 식품의약품안전청 고시 제2006-32호 (2006.08.02), 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격.
- 8) 식품의약품안전청 의료기기안전국, 의료기기 생물학적 안전성 평가 가이드라인 (2008).
- 9) G Eisenbrand, B. Pool-Zobel, V. Baker, M. Balls, B. J. Blaauboer, A. Boobis, A. Carere, S. Kevekordes, J. C. Lhuguenot, R. Pieters and J. Kleiner, Method of in vitro toxicology, *Food Chem. Toxicol.*, **40**, 193-236 (2002).
- 10) J. Weyermann, D. Lochmann and A. Zimmer, A practical note on the use of cytotoxicity assays, *Int. J. Pharm.*, **288**, 369-376 (2005).
- 11) ISO (International Organization for Standardization) 10993-5. Biological evaluation of medical devices. Part 5: tests for in vitro cytotoxicity (1999).
- 12) ISO (International Organization for Standardization) 10993-12. Biological evaluation of medical devices. Part 12: sample preparation and reference materials (2007).
- 13) G. V. N. Rathna and Gelatin hydrogels: enhanced biocompatibility, drug release and cell viability, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **19**, 2351-2358 (2008).
- 14) L. M. Geever, C. C. Cooney, J. G Lyons, J. E. Kennedy, M. J. D. Nugent, S. Devery and C. L. Higginbotham, Characterisation and controlled drug release from novel drug-loaded hydrogels, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **69**, 1147-1159 (2008).
- 15) G Chaiban, H. Hanna, T. Dvorak and I. Raad, A rapid method of impregnating endotracheal tubes and urinary catheters with gendine: a novel antiseptic agent, *J. Antimicrob. Chemother.*, **55**, 51-56 (2005).