

산화철 조영제의 생체 안정성 평가

문덕수¹, 김영곤¹, 신승훈¹, 권일근¹, 김용희², 서진석³, 김 만⁴,
인제대학교 의용공학과¹, 한국과학기술연구원², 연세대학교 진단방사선과³
주식회사 고탐 신소재 연구개발팀⁴

Evaluation of Biostability of the Iron Oxide MRI Contrast Agent

D.S.Moon¹, Y.K.Kim¹, S.H.Shin¹, I.K.Kwon¹, Y.H.Kim², J.S.Seo³, M.Kim⁴ Dept. of Biomedical Engineering Inje Univ.¹, Korea Institute of Science and Technology(KIST)², Dept. of Radiology Yonsei Univ.³, Kohap Cooperation⁴

Abstract

Biostabilities of the iron oxide MRI contrast agent were evaluated using the cytotoxicity test and the animal test. Six experimental groups (35, 17, 5, 3.4, 1.7, 0.9 mg of iron oxide/10ml) and a control group were prepared for the cytotoxicity test. The cell count of higher concentration than 5 mg/10ml become decrease significantly after 4-days incubation. Iron oxide was injected into the right vein of the two fully grown rabbits with the concentration of 0.5 or 0.9mg/kg of body weight respectively. Blood samples were collected and analyzed in turn after 30min, 1, 2, 4, 8, 16, 30, 60, 90days injection. The body temperature and weight of rabbits were measured simultaneously. The result of blood and serum analyses and the body temperature shows that there was no significant variation with respect to the sampling term and the dosage within this experimental conditions.

I. 서론

현재 자기공명영상 (Magnetic Resonance Image, MRI)촬영시 사용되는 대부분의 조영제(Dimeglumine Gadopentetate et al)는 뛰어난 안정성과 병변부위 진단의 정확성을 가지고 있지만 그러나 약 3mm이하의 미세한 종양부위 판별능력에 있어서는 진단의 정확성이 떨어지는 것으로 나타나있다.^[1-3] 그러나 산화철(iron Oxide) 조영제는 기존 조영제와 달리 자성을 띠고 있는 미세한 산화철 입자가 병변부위의 정상조직에 선택적으로 투여되어 정상조직의 비균일 국부자장을 가중시켜 양성자 이완시간을 짧게 하여 병변조직과의 신호강도 차이를 크게 만들기 때문에 미세한 병변부위의 진단에 있어서 기존 조영제를 사용할 보다 정확성을 높이게된다.^[3-7]

본 연구는 본 연구팀이 제조하고 MRI 성능이 평가된 산화철계 조영제의 생체적합성과 임상적용 가능성을 평가하기 위해서 세포배양실험, 혈액과 혈액 성분분석을 3개월간의 토끼 사육을 통해 생리적 평형 상태를 측정하는 방법으로 안정성평가를 실시하였다.

II. 실험방법

본 실험에 사용된 자성유체(Magnetic Fluid, MF)는 입자의 크기가 5-9 nm인 산화철 입자들을 화학적으로 수용액에 분산시키고 농축하여 밀도를 1.25g/ml로 유지한 자성분말의 분산용액이다. 산화철조영제의 생체적합성을 평가하기 위하여 세포배양시험, 실험동물의 혈액분석실험, 혈청성분분석실험, 체온변화, 체중변화등을 3개월 동안 조사하였다. 세포배양실험은 배지(α -MEM)용액에 산화철 조영제와 탈이온수를 희석하여 산화철조영제의 농도(mg/10ml)가 세포배지에 대해서 각각 0.9, 1.7, 3.4, 5, 17, 35가 되도록 6종류의 시료를 준비하였다.

착상시킬 세포(HEPA-1C1C7)를 세포배양기 (CO₂ Incubator)에서 2일간 배양한 후 6개의 10ml 세포배양접시에 세포의 수가 각각 2×10^5 cell/10ml가 되도록 착상시킨 다음 희석시킨 각 배지에 6종류의 산화철 조영제를 각각 투여하고 산화철 조영제를 투여하지 않은 대조군을 두었다. 산화철 조영제를 투여한후 4일 동안 세포를 세포배양기에서 배양하면서 12시간 간격으로 위상차현미경($\times 40$)을 이용하여 관찰하고 사진촬영을 실시하였다. 배양 4일 후에 각 시험군의 세포 수를 측정하였다. 그리고 산화철 조영제의 장기간의 생체적합성과 안정성을 평가하기 위해서 다음과 같은 조건으로 동물실험을 실시하였다. 실험용 동물로는 동일조건으로 한달 이상 사육된 성숙한 수컷 토끼 2마리를 사용하였다. 각각의 토끼는 엽산 케타민(50mg/ml, 케타라, 유한양행)을 근육주사 하여 전신 마취한 후 토끼 체중에 대해서 각각 0.5mg/kg 과 0.9mg/kg 농도의 산화철 조영제를 토끼의 대퇴골

정맥을 통해서 2분간 정맥주사를 실시하여 투여하였다. 산화철 조영제를 투여하기 전 두 마리 토끼의 혈액과 혈청성분 분석을 실시하여 대조군으로 사용하였다. 0.5mg과 0.9mg의 산화철 조형제를 두 마리의 토끼들에게 각각 투여후 동일한 조건으로 3개월간 토끼를 사육하면서 투여후 30분, 1일, 2일, 4일, 8일, 16일, 30일, 60일, 90일의 시간간격으로 혈액을 채취하여 Thosiba 30FR, Nova Plus를 이용하여 혈청분석(Na, K, Cl, TCO₂, GAP, T-BIL, D-BIL, I-BIL, ALB, T-RPO, GLOBU, A/G)과 Shimazu 1500을 이용하여 혈액분석(WBC, RBC, HGB, MCV, MCH, MCHC, PLT)을 실시하였고 체온과 체중변화를 기록하였다.

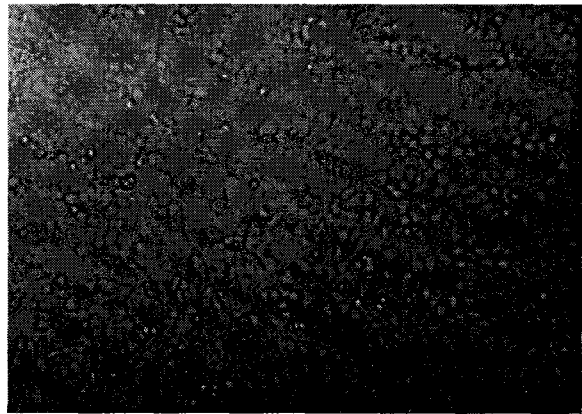
III. 실험결과 및 고찰

4일간 세포 배양된 7종류의 시료에 대하여 증식된 세포수를 측정된 결과를 표 1에 요약하였다.

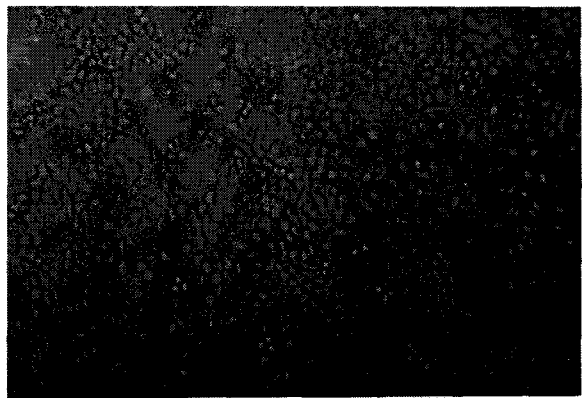
Table 1. Cell count of the experimental and control after 4days incubation.

Group	Concentration of MF (mg/10ml)	Cell count (10 ⁵ cells/10ml)
A	0.9	18.1
B	1.7	18.1
C	3.4	17.2
D	5	14.6
E	17.5	15.3
F	35	13.1
G	control	21

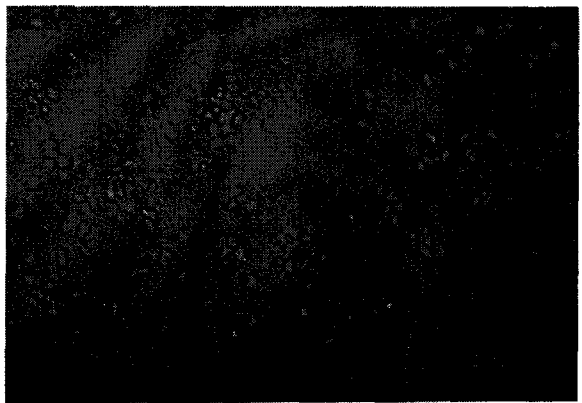
표 1에서 나타나듯 산화철의 농도가 배지에 대해서 각각 0.9, 1.7, 3.4mg/10ml로 희석하여 투여한 배지의 세포수는 대조군의 세포수와 유의차가 없는 것으로 평가되었으나 5, 17.5, 35mg/10ml로 희석하여 투여한 배지에서 세포수는 대조군에 비해서 약 20% 정도 적게 나타났다. 그리고 그림 1은 4일간의 세포 배양 후 현미경사진촬영을 이용한 배지속의 세포의 수와 형태를 보여주고 있다. 그림4-(a)는 대조군 시료의 배지속의 세포수와 형태를 보여주고 있다. 그림 4-(b)는 0.9mg/10ml를 투여한 시료의 배지속의 세포를 보여주고 있으며 세포수에 있어서 대조군과 거의 유의차가 없는 것으로 나타나있다. 반면 그림 4-(c)는 17.5mg/10ml를 투여한 시료의 배지속 세포들로 대조군에 비해 세포수가 상당히 떨어지는 것을 볼 수 있다. 이러한 결과들로 볼 때 5mg/ml이상의 농도로 산화철 조영제 투여할 경우 산화철 조형제는 세포(HEPA-1C1C7)의 성장에 영향을 미쳐 세포배양의 결과 세포수를 감소시켰다고 판단된다. 3개월간의 동물실험결과 나타난 산화철조형제를 투여한 토끼들의 시간대별 혈액과 혈청성분의 변화와 체온, 체중의 변화를 표 2에서 보여주고 있다.



(a) Control



(b) 0.9mg/10ml



(c) 35mg/10ml

Figure 1. Photographs of incubated cell of two experimental and a control groups after 4days

표 2에서 보는 바와 같이 각각 시간대별의 WBC, RBC, HGB, MCV, MCH, MCHC의 혈액성분 분석의 결과는 대조군의 혈액성분 분석의 수치와 거의 유의차 없이 일정하게 나타났다. 그러나 PLT가 시간이 경과함에 따라서 큰 폭의 차이를 보이는 것은 산화철조형제에 의한 영향이 아니라 실험 방법상의 에러

에 의한 것으로 밝혀졌다. 또한 각각 시간대별의 Na, K, Cl, TCO₂, GAP, T-BIL, D-BIL, I-BIL, ALB, T-RPO, GLOBU, A/G의 혈청성분 분석의 결과도 대조군의 분석결과와 유의차가 없이 나타났다. 이러한 분석결과들로 미루어 본 실험에서 선택한 0.5mg/kg과 0.9mg/kg의 농도범위에서 산화철 조영제를 토끼에 투여하더라도 3개월 기간동안은 혈액과 혈청성분에 미치는 영향은 있다고 볼 수 없다. 또한 0.5mg/kg을 투여한 토끼의 혈액과 혈청분석의 결과와 0.9mg/kg를 투여한 토끼의 혈액과 혈청분석 결과가 유의차가 없게 나타났다. 체온측정 결과도 시간의 경과에 따라 변화가 없게 나타났으며 체중은 시간의 경과에 따라 일정하게 증가함을 보여주었다.

이상의 동물실험 결과들을 종합하면 0.5mg/kg과 0.9mg/kg의 산화철 조영제 투여후 3개월 동안 토끼는 생리적 평형상태 유지하였다고 평가할 수 있다. 그러나 생체적합성과 임상적용을 위해서는 최적의 투여량의 결정과 다각적으로 장기간에 많은 실험을 반복하여 연구할 필요가 있다고 판단된다.

IV. 결론

세포배양실험결과 본 연구에서 사용된 산화철조영제의 농도를 5mg/ml 이상으로 유지할 경우 배양된 세포(HEPA-C1C17)수는 대조군에 비해서 약 20%정도 감소하였다. 또한 3.4mg/ml 이하의 농도 경우에는 대조군과 유의차가 없었다. 3개월간의 동물실험결과 산화철 조영제의 농도가 0.5mg/kg과 0.9mg/kg일 경우 혈액분석과 혈청분석결과가 대조군과 유의차를 발견할 수 없으므로 생체적합성과 임상적용 가능성이 있다고 판단된다.

V. 참고문헌

- 1). S. Sanjay and D.S. David, "Ferrite particles. A superparamagnetic MR contrast agent for enhanced detection of liver carcinoma", Radiology vol. 162, pp. 217-222, 1987
- 2). J.F. Christian, "Superparamagnetic iron oxide enhanced MR Imaging: Pulse sequence optimization for detection of liver cancer", Radiology, vol. 172, pp. 393-397, 1989
- 3). C.B. Robert, "New direction in the development of MR imaging contrast media", Radiology, vol.183; pp. 1-11, 1992
- 4). D.S. David and W. Ralph, "Superparamagnetic iron oxide : Clinica application as a contrast agent for MR imaging of the liver", Radiology, vol.68, pp. 297-301, 1988
- 5). J.F. Christian, "Superparamagnetic iron oxide enhanced MR imaging", Radiology, vol.172, pp. 393-397, 1989
- 6). T.F. Joseph, "Iron oxide-enhanced MR imaging of the liver and spleen", Am-J-Roentgenol, vol. 155, 943-950, 1990
- 7). 김영곤 문덕수, "산화철조형제의 생체적합성평가" 97 spring meeting of The korean society for biomaterials, pp. 108-109, 1997

Table 2. The results of the serum and the blood analysis with respect to time and magnetic fluid concentrations (A: 0.5mg/kg, B: 0.9mg/kg)

		Group	Control	30min	1day	2days	4days	8days	15days	30days	60days	90days
B L O O D A N A L Y S I S	WBC ($10^3/\mu\ell$)	A	5.7	6.2	6.8	8.4	9	5.8	7.4	8	9	7.2
		B	5.8	4.1	5.5	6	7.1	4.8	4.3	7.5	7	6
	RBC ($10^6/\mu\ell$)	A	6.43	6.85	5.92	6.33	5.52	5.52	6.73	5.09	7.05	6.59
		B	6.4	6.15	5.76	5.48	5.41	5.35	6.02	4.15	6.04	6.01
	HGB (g/dℓ)	A	14.3	14.4	12.2	13.4	11.4	44.6	14.1	13.4	14.9	13.1
		B	14	13.1	12	11.5	11.2	11.5	12.7	13	13	12
	HCT(%)	A	43.3	44.6	38.1	40.7	35.6	37.7	42.3	26.8	47.9	40.5
		B	43	39	37.6	35.6	35.2	35.9	39.8	23.8	40	35.2
	MCV(fℓ)	A	67.3	65.1	64.4	64.3	64.5	68.3	62.9	52.7	67.9	64.4
		B	67	63.4	65.3	65	65.1	67.1	66.1	52.8	67.1	65.2
	MCH(pg)	A	22.2	21	20.6	21.2	20.7	21	21	26.3	21.1	21
		B	22	21.3	20.8	21	20.7	21.5	21.1	28.8	21.5	20.5
	MCHC	A	33	32.3	32	32.9	32	30.8	33.3	50	31.1	32.2
		B	32	33.6	31.9	32.3	31.8	32	31.9	54.6	32.1	32.7
	PLT ($10^3/\mu\ell$)	A	364	453	301	656	609	419	556	846	356	322
		B	360	241	497	187	540	194	535	942	282	312
S E R U M A N A L Y S I S	Na ⁺ (mmol/ℓ)	A	143	149	144	143	141	144	144	139	143	144
		B	142	138	142	140	139	140	144	140	142	141
	K ⁺ (mmol/ℓ)	A	4.3	4	3.9	3.9	3.9	3.9	4.5	4.4	4.3	4.5
		B	4.2	4.4	3.8	3.8	3.7	3.9	3.9	4.2	4.3	3.9
	Cl ⁻ (mmol/ℓ)	A	103	110	102	101	99	101	100	104	104	103
		B	104	99	104	103	100	104	103	101	104	101
	TCO ₂ (mmol/ℓ)	A	14	22	20	20	25	18	18	20	18	20
		B	15	22	23	20	20	17	17	20	12	20
	GAP	A	30.3	21	25.9	25.9	20.9	28.9	30.5	28	25.3	26.3
		B	30	21.4	18.8	20.8	22.7	22.9	27.9	25.5	30.3	22.4
	T-BIL (mg/dℓ)	A	0.2	0.8	0.8	0.9	0.8	0.6	0.7	1.3	0.2	0.6
		B	0.2	0.7	0.6	0.7	0.7	0.4	0.6	1.2	0.2	0.7
	D-BIL (mg/dℓ)	A	0.1	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1	0.1	0.5	0.1	0.3
		B	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1	0.5	0.1	0.2
	I-BIL (mg/dℓ)	A	0.1	0.6	0.5	0.7	0.6	0.5	0.6	0.8	0.1	0.3
		B	0.1	0.5	0.4	0.5	0.5	0.3	0.5	0.7	0.1	0.5
	GLU (mg/dℓ)	A	248	212	211	206	217	230	192	186	174	164
		B	250	267	217	238	256	306	216	245	213	201
	ALB (g/dℓ)	A	4.1	3.8	3.9	4	3.6	3.7	3.8	3.5	3.7	3.6
		B	4	3.8	3.8	3.9	3.7	3.9	4.3	4.2	3.8	3.9
T-PRO (g/dℓ)	A	6.5	6.2	6.6	6.6	5.9	6	6.3	5.7	5.8	6.1	
	B	6.4	6.1	6	6.2	5.8	6.4	6.9	6.8	5.9	6.2	
GLOBU (g/dℓ)	A	2.4	2.4	2.7	2.6	2.3	2.3	2.5	2.2	2.1	2.2	
	B	2.3	2.3	2.2	2.3	2.1	2.5	2.6	2.6	2.1	2.3	
A/G(%)	A	1.7	1.6	1.4	1.5	1.6	1.6	1.5	1.6	1.8	1.6	
	B	1.8	1.7	1.7	1.7	1.8	1.6	1.7	1.6	1.8	1.7	
Weight(kg)	A	1.85	1.85	1.86	1.9	1.9	1.85	1.84	2.15	2.45	2.62	
	B	2.55	2.55	2.54	2.5	2.45	2.43	2.46	2.45	2.65	2.63	
Temp(°C)	A	38.5	38.6	38.5	38.6	38.4	38.2	38.5	38.5	38.4	38.5	
	B	38.6	38.5	39	38.7	38.6	38.5	38.7	38.4	38.5	38.5	