한국정보전자통신기술학회논문지(jkiiect)'24-10, Vol.17 No.5
논문 24-17-05-389 http://dx.doi.org/10.17661/jkiiect.2024.17.5.389

체외충격파치료기 카트리지의 L-929 세포를 통한 인체접촉부의 세포독성시험

김준태*, 윤세진*, 박소현*, 김경아**, 조재현***, 정진형****

Cytotoxicity test on human contact area with L-929 cells using extracorporeal shock wave therapy cartridge

Jun-tae Kim*, Se-jin Yoon*, So-hyun Park*, Kyung-ah Kim**, Jae-hyun Jo***, Jin-hyoung Jeong****

요 약 본 연구는 체외충격파치료기(ESWT : Extracorporeal ShockWave Therapy) 카트리지부를 시료로 사용하여 의료기기 안전성 평가 기준인 GLP(Good Laboratory Practice)에 관한 시험 중 실험물질 인체접촉부위 용출물에 대해 L-929 세포를 이용하여 세포독성 유무를 확인하기 위하여 실시하였다. 실험물질 및 대조물질은 10% FBS가 포함된 1xMEM 배양액으로 37±1℃에서 24±2시간 용출하였다. L929 세포에 실험물질 용출액(시험군), 음성대조물질 용출액(음성대조군), 양성대조물질 용출액(양성대조군), 공시험액 용출액(용매대조군)을 적용하여 37±1℃, 5±1% Co2 배양기에서 48±2시간 배양하였다. 현미경으로 세포반응을 관찰한 결과 공시험액 용출액 및 음성대조물질 용출액을 적용한 세포는 0 등급, 양성대조물질 용출액을 적용한 세포는 4등급, 시험물질 용출액을 적용한 세포는 0 등급으로 나타났다. 세포계수를 통한 정량적 평가를 한 결과 공시험액 용출액 대비 음성대조물질 용출액을 적용한 세포는 106.28%, 양성대조물질 용출액을 적용한 세포는 0.00%, 시험물질 용출액을 적용한 세포는 99.58%의 세포생존율이 측정되었다. 따라서 음성 및 양성대조군의 결과를 확인하였을 때 시험과정은 적합하였으며, 정성적인 평가 방법에서 2등급 미만이고, 정량적인 평가 방법에서도 세포 생존율은 70% 이상이므로 세포독성을 유발하지 않는 것으로 판단된다.

Abstract This study was conducted to determine the cytotoxicity of the extracts from the human body contact area of the test substance during a test on the Good Laboratory Practice (GLP), which is the medical device safety evaluation standard, using the extracorporeal shock wave therapy (ESWT) cartridge as a sample, using L-929 cells. The test and control substances were extracted with 1xMEM culture medium containing 10% FBS at 37±1℃ for 24±2 hours. The test substance extract (test group), negative control substance extract (negative control group), positive control substance extract (positive control group), and blank test solution extract (solvent control group) were applied to L929 cells and cultured for 48±2 hours in a 37±1℃, 5±1% CO2 incubator. As a result of observing cell reactions under a microscope, the cells to which the blank test solution extract and negative control substance extract were applied were grade 0, the cells to which the positive control substance extract was applied were grade 4, and the cells to which the test substance extract was applied were grade 0. As a result of quantitative evaluation through cell counting, the cell viability rate of the cells to which the negative control substance extract was applied was 106.28% compared to the blank test solution extract, the cells to which the positive control substance extract was applied were 0.00%, and the cells to which the test substance extract was applied were 99.58%. Therefore, when the results of the negative and positive control groups were confirmed, the test process was appropriate, and it was determined that it did not cause cytotoxicity because the qualitative evaluation method was less than grade 2 and the quantitative evaluation method showed a cell viability rate of more than 70%.

Key Words : ESWT(Extracorporeal ShockWave Therapy), Toxicity test, GLP(Good Labotory Practice), Non-clinical trial

This research was supported by "Regional Innovation Strategy (RIS)" through the National Research Foundation of Korea(NRF) funded by the Ministry of Education(MOE)(2021RIS-001)

*Corporate R&D Center REMEDSNB., Co., Ltd: Gyeonggi-do, Korea
**College of Medicine, Chungbuk National University, ChungJu, Korea
***Deoartment of Bio-medical Engineering, Catholic Kwandong University, Gangneung, Korea
****Corresponding Author : Deoartment of Biomedical IT, Catholic Kwandong University, Gangneung, Korea (wlsgud0201@cku.ac.kr)
Received August 25, 2024 Revised October 16, 2024 Accepted October 29, 2024

Ⅰ. 서 론

GLP(Good Laboratory Practice : 비임상시험관리기준)는 의약품, 의료기기 등 화학물질의 독성시험, 감작성 시험 등 시험과정 및 결과에 대한 신뢰성을 보증하기 위한 제도이다.

이러한 GLP 규제는 특히 의료기기에서 인체접촉에 관한 규제를 통해 의료기기의 안전성을 확보하고 있는 추세이다[1, 7].

국내에서는 식품의약품안전청 주관으로 이와 같은 규제를 규격화 하였으며, 인체에 접촉하는 의료기기의 생체적합성 시험을 필수적으로 진행하고 이에 따른 안전성이 확보된 성적서를 제출해야 한다[1, 6].

이러한 규격 및 절차는 환자를 치료하기 위해 의료기기가 환자의 신체에 접촉하여 발생하는 환경적 요인으로 피부발진, 원자재 신체 접촉부에 의한 외부 감염, 알레르기성 반응 등을 방지하기 위함이며, 병을 고치기 위해 받은 치료로 또 다른 병을 발생시키는 것을 방지하기 위함이다.

이러한 GLP 규제는 국내뿐 아니라 해외(유럽 의료기기 규정 MDR : Medical Device Regulation, 미국 FDA : FOOD and Drug 등) 에서도 규격 및 규제를 통하여 인체에 접촉하는 의료기기의 허가를 관리하고 있으며, 최소한의 전임상동물을 이용한 동물실험을 권고하고 있다[2, 7].

이러한 동물실험을 통해 피부감작성, 피내반응, 독성 등이 치료를 위한 의료기기에서 야기시킬 수 있는지에 관하여 실험을 진행하고 있으며, 이러한 실험들은 경제협력개발기구(Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD)의 회원국 및 MAD(Mutual Acceptance of Data) 체결국 간의 상호인정을 통하여 진행되고 있다.

본 연구에서는 통증치료를 위해 개발된 체외충격파 의료기기의 인체에 직접적으로 접촉되는 리니어(Linear) 프로브(Probe)에 적용되는 겔패드(Gel-Pad)의 비닐커버를 사용하여 GLP 규격 시험의 L929 세포를 이용한 세포독성시험을 진행하였다.

Ⅱ. 재료 및 방법

세포독성 시험을 위하여 시험용 시료 ESWT 리니어 프로브에 사용되는 겔패드 비닐(원재료) 1개와 L929세포를 이용하여 식품의약품안전처 고시 제2018-93호 비임상시험관리기준에 따라 진행하였다[6].

1. 시험재료

시험 재료의 피부에 직접적으로 닿는 부위인 리니어 프로브 카트리지 중 인체접촉부인 겔패드를 사용하였으며, 겔패드의 경우 인체접촉을 직접적으로 하는 겔패드의 비닐막을 원재료 형태로 사용했으며, 그림1과 같은 규격으로 선정을 하였다.

그림 1. 체외충격파치료기 리니어 프로브 카트리지 겔패드 인체접촉부 원재료[3, 4]

Fig. 1. Extracorporeal shock wave therapy device linear probe gel pad human contact vinyl raw material

2. 사용 세포

L-929 세포를 이용한 세포독성시험은 ISO 10993-5 : 2009에 따라 의료기기의 세포독성평가에 널리 사용되어 독성학적 기초자료가 충분히 축적되어 있어서 시행결과 해석 및 평가가 용이하여 선택하였다[3, 4, 5].

3. 시험 준비

시험물질의 인체접촉 부위를 멸균된 용기에 담고, 표 1과 같이 용출용매를 첨가하여 항온수조에서 용출을 진행하였다.

용매대조군(공시험액)은 시험물질의 용출조건과 동일하되, 시험물질을 넣지 않은 공시험액으로 하였다.

음성대조군, 양성대조군 용출조건은 제조사

(Hatano Research Institute)의 세포독성 시험 용출 조건에 따라 용출하였다.

표 1. 시험물질 용출 조건
Table 1. Test substance elution conditions

구분	첨가량	용출조건	용매
시험 물질군	시험물질 6 cm^2당 용매 1mL 비율	37±1℃, 24±2시간, 50r/min 교반	1 x MEM 배양액
용매 대조군 (공시험액)	시험물질 첨가하지 않은 용매	37±1℃, 24±2시간, 50r/min 교반	1 x MEM 배양액
음성 대조군	음성대조물질 2g 당 용매 20 mL 비율	37±1℃, 24±2시간, 50r/min 교반	1 x MEM 배양액
양성 대조군	양성대조물질 2g 당 용매 20 mL 비율	37±1℃, 24±2시간, 50r/min 교반	1 x MEM 배양액

구분	시험물질 첨가량	용매량
시험군	60.0 cm^2	10.0 mL
용매대조군 (공시험액)	NA	7.0 mL
음성대조군	0.731 g	7.0 mL
양성대조군	0.738 g	7.0 mL

* NA : Not Applicable

표 1의 조건에 따라 용출을 실시한 후, 용출액의 성상을 확인한 결과는 표2와 같다.

표 2. 용출액의 성상
Table 2. Properties of the solution

구분	색상		부유물		투명도	
	용출 전	용출 후	용출 전	용출 후	용출 전	용출 후
시험 물질군	Pink	N	없음	N	투명	N
용매 대조군 (공시 험액)	Pink	N	없음	N	투명	N
음성 대조군	Pink	N	없음	N	투명	N
양성 대조군	Pink	N	없음	N	투명	N

* N : No changed

4. 시험방법

4.1 세포배양

6 well plate의 각각의 well에 약 1.0 x 10^5 cell/mL 이 되도록 세포가 포함된 1 x MEM 배양액을 2mL씩 분주하였다. 각 군별 3개의 well을 사용하였다. 37±1℃, 5±1% Co2 배양기에서 24±2 시간 배양한 후 현미경을 이용하여 세포의 단층배양상태를 관찰하였으며 세포단층이 80% confluency 이상임을 확인하여 시험이 사용하였다.

4.2 시험계의 식별

6 well plate 위에 유성펜으로 시험번호와 군명을 기입하였다.

4.3 시험물질의 처리

각 well의 배양액을 제거한 후 공시험액 용출액, 시험물질 용출액, 양성대조물질 용출액, 음성대조물질 용출액을 군별 3개의 well에 각 2mL씩 처리하였다. 37±1℃, 5±1% Co2 배양기에서 48±2 시간동안 배양하였다.

4.4 세포독성의 결정

4.4.1 정성적 평가(세포의 형태학적 관찰)

각배양후 현미경을 이용하여 세포형태, 액포생성, 분리, 세포용해 및 세포막 상태 등을 관찰하였다. 관찰결과는 아래에 따라 등급을 판정하였다.

4.4.2 정량적 평가(세포 계수)

정성적인 평가 후 정량적인 평가를 진행하였다. Trypsin EDTA를 각 well에 처리하여 37±1℃, 5±1% Co2 배양기에서 약 5분간 배양한 후 세포를 떼어내 부유시켜 세포를 계수하였다.

4.5 세포독성의 판정기준

4.5.1 정성적 평가(세포의 형태학적 관찰) 판정기준

판정 등급이 2등급 이하일 경우 시험물질 용출액에 세포독성이 없는 것으로 판정하였다.

표 3. 용출물 세포독성의 정성적 형태학적 등급
Table 3. Qualitative morphological grading of exudate cytotoxicity

등급	반응도	배양세포의 상태
0	없음 (None)	세포질내 과립의 분리, 세포용해 없음, 성장의 저해 없음.
1	아주미약 (Slight)	세포의 모양이 둥글게 되고, 느슨하게 부착되어 있으며, 세포질 내 과립이 소실되었거나, 형태에 변화를 보인 세포가 20%를 넘지 않음. 때때로 용해된 세포가 존재하고, 약간의 성장 저해가 관찰됨.
2	미약 (Mild)	세포의 모양이 둥글게 되고, 세포질 내 과립이 소실된 세포가 50%를 넘지 않고, 광범위한 세포 용해는 보이지 않음, 세포의 성장 저해가 50%를 넘지 않음.
3	중증도 (Moderate)	세포의 모양이 둥글게 되었으나 용해된 세포가 70%를 넘지 않음. 세포층이 완전히 파괴되지는 않았으나 50% 이상의 성장 저해를 보임.
4	심함 (Severe)	세포층이 거의 또는 완전히 파괴됨.

4.5.2 정량적 평가(세포계수) 판정기준

용매대조군과 비교하여 세포의 양을 아래와 같이 계산하였다.

$$\text{RCC (Relative cell count) \%} = \frac{\text{시험물질군의 세포수 (cells/mL)}}{\text{용매대조군의 세포수 (cells/mL)}} \times 100$$

수식 1. 정량적 세포계수 판정 식
Formula. 1. Quantitative cell counting formula

생존율이 용매대조군의 70% 미만(<70%)으로 감소되는 경우, 이는 잠재적으로 세포독성이 있는 것으로 판정하였다[8].

4.6 시험의 적합성 판정기준

반복시험 결과간 차이가 명백한 경우, 그 시험은 부적절하거나 유효하지 않으므로 시험을 반복수행하거나 다른 시험방법을 사용한다.

음성, 양성대조군의 시험에서 예상되는 반응 (음성대조군은 1등급 이하, 양성 대조군은 3 등급 이상)을 나타내지 않으면 전체시험을 반복한다.

실험기간 동안 1일 1회 주기로 동물의 사망 및 빈사, 일반증상 관찰을 수행하였으며, 시험검체 및 대조물질을 약 4시간 동안 적용 후, 첩포를 제거하고 평가 방법에 따라 24±2, 48±2, 72±2 시간 후의 각 적용부위의 평가 점수를 누계하고 산출하는 것으로 평가한다.

Ⅲ. 결과

24±2시간, 48±2시간, 72±2시간 관찰결과만을 계산에 이용하였다.

표 4. 정성적 평가(세포의 형태학적 관찰) 시험결과
Table 4. Qualitative evaluation (morphological observation of cells) test results

시험 물질	증식 포화 상태	원형 세포 비율	세포질 내 과립을 포함하지 않는 세포의 비율	용해도	반응	등급
음성 대조군(1)	(+)	0	0	0	None	0
음성 대조군(2)	(+)	0	0	0	None	0
음성 대조군(3)	(+)	0	0	0	None	0
양성 대조군(1)	(−)	100	100	100	Severe	4
양성 대조군(2)	(−)	100	100	100	Severe	4
양성 대조군(3)	(−)	100	100	100	Severe	4
용매 대조군(1)	(+)	0	0	0	None	0
용매 대조군(2)	(+)	0	0	0	None	0
용매 대조군(3)	(+)	0	0	0	None	0
시험 물질군(1)	(+)	0	0	0	None	0
시험 물질군(2)	(+)	0	0	0	None	0
시험 물질군(3)	(+)	0	0	0	None	0

(a) (+) : Present, (−) : Absent

정성적 평가에서는 양성대조군에서만 4등급의 형상발현과 원형세포비율, 세포질내 과립을 포함하지 않는 세포의 비율, 용해도, 반응에서 L-929세포가 독성에 의해 이상이 생겼음을 확인 하였다.

표 5. 정량적 평가(세포계수) 시험결과
Table 5. Quantitative evaluation (cell counting) test results

구분	음성 대조군	양성 대조군	용매 대조군	시험 물질군
1	1.1×10^6	0	9.8×10^5	9.9×10^5
2	9.6×10^5	0	9.4×10^5	9.8×10^5
3	1.1×10^6	0	1.1×10^6	1.0×10^6
평균	1.1×10^6	0	1.0×10^6	9.9
RCC. (%)[(a)]	106.28	0.00	100.00	99.58

Ⅳ. 고 찰

현재 개발중인 체외충격파 치료기의 인체접촉부위에서 용해되어 나올 수 있는 물질에 대하여 L-929 세포를 이용하여 GLP 시험의 세포독성시험을 실시하였다.

음성대조군 및 용매대조군은 모두 0 등급, 양성대조군은 모두 4 등급, 시험물질군은 모두 0 등급으로 나타나 반복시험 결과간 차이가 없었고 예상되는 반응이 나타났으므로 이 시험은 유효한 시험으로 판정하였다.

정성적 평가(세포의 형태학적 관찰)의 경우 현미경 관찰을 진행하였으며, 관찰 결과 음성대조군 및 용매대조군은 세포질내 과립의 분리, 세포 용해가 없었으며, 세포 성장의 저해가 없었으므로 0 등급으로 나타났고, 양성대조군은 세포층이 거의 파괴 되었으므로 4 등급으로 나타났다.

시험물질군은 세포질내 과립의 분리 및 세포 용해가 없고, 세포 성장의 저해가 없으므로 세포독성 반응등급 0 등급으로 나타났다.

정량적 평가(세포계수)의 경우 공시험액 용출액 대비 음성대조물질 용출액을 적용한 세포는 106.28%, 양성대조물질 용출액을 적용한 세포는 0.00%, 시험물질 용출액을 적용한 세포는 99.58%의 세포 생존율이 측정되었다.

음성 및 양성대조군의 결과를 확인하였을 때 시험과정은 적합하였으며, 시험결과를 종합한 결과 체외충격파치료기의 인체적합부를 시료를 바탕으로 한 시험물질 용출액은 정성적인 평가 방법에서 2 등급 미만이고, 정량적인 평가 방법에서도 세포 생존율이 70% 이상이므로 세포독성을 유발하지 않는 것으로 판단된다[9].

현재 국내·외 의료기기 개발 및 제조에서 확인해야 하는 부분 중 가장 큰 비율을 차지하는 것은 바로 인체 접합부에 대한 생체적합성 평가 및 이에 따른 안전성 평가로 여겨진다.

특히, 이러한 생체적합성 평가는 개발단계에서부터 규격에 대한 고찰 및 연구가 필요하며, 이러한 고찰 및 연구는 개발되는 의료기기에 대한 신뢰성을 줄 수 있을 뿐만 아니라 환자가 치료를 받는 의료기기로부터 또 다른 감염의 원인으로 인하여 질병을 얻는 것을 방지하기 위함이다.

본 연구에서 시행한 의료기기 독성시험의 경우 환자를 치료하기위한 의료기기의 직접적인 인체접촉부 원재료를 통하여 규격에 맞는 시험을 진행하였다.

이러한 의료기기 시험 규제[10]는 앞으로 더욱 강하게 될 것이며, 연구자들은 이에 맞춰 의료기기 규격 및 안전성 시험 등에도 관심을 두고 연구를 진행해야 할 것으로 생각된다.

REFERENCES

[1] Ministry of Food and Drug Safety Notice No. 2018-93 (2018.11.21.) Non-clinical test management standard
[2] OECD Principles of Good Laboratory Practice(as revised in 1997), ENV/MC/CHEM(98)17
[3] ISO 10993-23 :2021, Biological Evaluation of Medical Devices - Part 23 : Tests for irritation, 7.2 Animal irritation test by skin exposure
[4] ISO 10993-12 : 2021, Biological Evaluation of Medical Devices - Part 12 : Sample Preparation and reference materials
[5] ISO 10993-2 : 2006, Biological Evaluation of Medical Devices - Part 2 : Animal welfare requirements.
[6] Ministry of Food and Drug Safety Notice No. 2018-93 Emergency Test Management Standard
[7] OECD Principles of Good Laboratory Practice(as revised in 1997), ENV/MC/ CHEM(98)17
[8] Helin Räägel, Audrey Turley, Trevor Fish,

Jeralyn Franson, Thor Rollins, Sarah Campbell, Matthew R Jorgensen, “Medical Device Industry Approaches for Addressing Sources of Failing Cytotoxicity Scores”, Journal of Biomedical Instrumentation & Technology, 2021, pp.69-84

[9] Sarah Gruber , Angela Nickel, “Toxic or not toxic? The specifications of the standard ISO 10993-5 are not explicit enough to yield comparable results in the cytotoxicity assessment of an identical medical device”, Journal of Frontiers in Medical Technology, 2023, 01-14pp.

[10] Li W, Zhou J, Xu Y. “Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices”, Journal of Biomed Rep, 2015, 617-20

저자약력

김 준 태 (Jun-tae Kim) **[일반회원]**

- 2016년 2월 가톨릭관동대학교 일반대학원 공학석사
- 2020년 2월 가톨릭관동대학교 공학박사
- 2020년 1월 ~ 현재 : ㈜리메드에스앤비 선임연구원

〈관심분야〉 의용메카트로닉스, 의용기계, 생체역학, Medical Device 임상, 피부생체의료기기

윤 세 진 (Se-jin Yoon) **[일반회원]**

- 2007년 2월 : 인제대학교 일반대학원 졸업(공학박사)
- 2005년 6월 ~ 2021년 7월 : 리메드 연구 부소장
- 2021년 7월 ~ 2023년 12월 : ㈜넥스트큐어 연구소장
- 2024년 1월 ~ 현재 : ㈜리메드에스앤비 연구소장

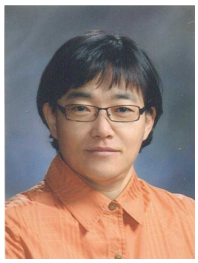
〈관심분야〉 RA, IEC, CE, FDA, 의료기기규격

박 소 현 (So-hyun Park) **[일반회원]**

- 2019년 1월 ~ 현재 : 한림대학교 정보법과학전공(학사)
- 2024년 08월 ~ 현재 : ㈜리메드에스앤비 연구원

〈관심분야〉 RA, QA, IEC, CE, MDR, FDA, 의료기기 규격, 전임상시험

김 경 아 (Kyung-ah Kim) **[일반회원]**



- 1991년 2월 충북대학교 학사
- 1993년 2월 충북대학교 이학석사
- 2001년 8월 충북대학교 공학박사
- 2005년 3월 ~ 현재 : 충북대학교 의과대학 의학과 교수

〈관심분야〉 생체계측, 물리센서, 심폐의료기, 재택의료기

조 재 현 (Jae-hyun Jo) **[정회원]**

- 2015년 2월 : 가톨릭관동대학교 의료공학과 졸업(학사)
- 2017년 2월 : 가톨릭관동대학교 일반대학원 졸업(공학석사)
- 2020년 8월 : 가톨릭관동대학교 일반대학원 졸업(공학박사)
- 2021년 9월 ~ 2022년 3월 : 가톨릭관동대학교 초빙교수
- 2022년 4월 ~ 현재 : 가톨릭관동대학교 의료공학과, 디지털헬스케어전공 조교수

〈관심분야〉 의용메카트로닉스, 디지털 신호처리, 영상처리

정 진 형 (Jin-hyoung Jeong) **[정회원]**

- 2012년 2월 : 가톨릭관동대학교 의료공학과 졸업(학사)
- 2014년 2월 : 가톨릭관동대학교 일반대학원 졸업(공학석사)
- 2017년 8월 : 가톨릭관동대학교 일반대학원 졸업(공학박사)
- 2017년 9월 ~ 2021년 2월 : 가톨릭관동대학교 초빙교수
- 2021년 3월 ~ 현재 : 가톨릭관동대학교 의료IT학과 조교수
- 2024년 3월 ~ 현재 : 가톨릭관동대학교 의료경영학과 조교수

〈관심분야〉 의료 시스템, 데이터 분석, 통신, 인공지능