

## Benzalkonium Chloride 및 점안제에 의한 각막상피세포의 장벽기능 변화

이종화 · 김기산

### = 요 약 =

대부분의 점안제에 포함되어 있는 Benzalkonium chloride(BAC)의 농도에 따른, 그리고 흔히 사용하는 점안제에 의한 각막상피세포의 장벽기능 손상을 알아보기 위해 백색토끼 35마리 70안을 사용하여 BAC의 농도 0.001%, 0.01%, 0.05% 및 0.1%의 용액과, ofloxacin 제제(Tarivid®, Octacin®, Ofloxacin®), fluorometholone 제제(Fumelon®, Fluorometholone®), 인공누액제(Tears Naturale®, Tears Naturale II®, Tears Naturale Free®)에 각막을 노출시킨 후 5, 6-carboxyfluorescein(CF) 용액을 이용하여 각막상피세포의 투과성을 측정하였다. Balanced salt solution에 노출시킨 것을 대조군으로 하였다. BAC 농도가 증가할수록 각막상피세포 투과성이 증가하였다. Tarivid®와 Ofloxacin®군에서 보다 Octacin®군에서 약 5배 이상 투과성이 증가하였다 ( $p<0.01$ ). Fluorometholone®군에서 Fumelon®군 보다 낮은 투과성을 보였으나 통계학적으로 의의있는 차이가 없었으며 ( $p>0.05$ ), 인공누액제중에서는 Tears Naturale®가 가장 높은 투과성 증가를 보였고 Tears Naturale II®나 Tears Naturale Free®에서는 대조군과 유의한 차이는 보이지 않았다 ( $p>0.1$ ). 이상의 결과로 BAC의 농도가 높을수록 각막상피세포의 손상이 심하며 BAC를 함유하는 일반적인 점안제에 의해서도 각막상피세포의 손상이 유발되었음을 알 수 있었고 이러한 점안제의 장기적 사용시에는 특별한 주의가 요할 것으로 생각된다(한안지 36:1655~1661, 1995).

### = Abstract =

## The Changes in the Corneal Epithelial Barrier by Benzalkonium Chloride and Commonly used Eyedrops

Jong Hwa Lee, M.D., Ki San Kim, M.D.

<접수일 : 1995년 6월 30일, 심사통과일 : 1995년 8월 24일>

계명대학교 의과대학 안과학교실

Department of Ophthalmology, School of Medicine, Kemyung University, Taegu, Korea

본 논문의 요지는 1995년 제74차 대한안과학회 춘계학술대회에서 구연 발표되었음.

본 논문의 일부는 계명대학교 동산의료원 의과학연구소의 연구비 보조로 이루어졌음.

To evaluate the corneal epithelial barrier after exposure to Benzalkonium chloride(BAC) or commonly used eyedrops, we measured corneal uptake of 5, 6-carboxyfluorescein(CF) applied to the corneal epithelium of the albino rabbits(70 eyes). Four BAC solutions(0.001%, 0.01%, 0.05%, 0.1%), ofloxacin solutions (Tarivid®, Octacin®, Ofloxacin®), fluorometholone solutions(Fumelon®, Fluorometholone®), artificial tear solutions(Tears Naturale®, Tears Naturale II®, Tears Naturale Free®) were evaluated. Balanced salt solution was used in control group. As the concentration of BAC increased, corneal epithelial permeability increased. In Octacin® group, corneal epithelial permeability increased about 5 times more than in Tarivid® and Ofloxacin® groups( $p<0.01$ ). Fluorometholone® group showed less increased permeability than in Fumelon® group, but there was no statistical difference between them( $p>0.05$ ). Tears Naturale® showed the highest permeability among artificial tear solutions and there were no statistical differences between Tears Naturale II®, Tears Naturale Free® and control group( $p>0.1$ ). This study showed that the higher concentration of BAC, the more damages to the barrier function of the corneal epithelium, and that clinically used eyedrops containing BAC made destructive influences on the corneal epithelial integrity(J Korean Ophthalmol Soc 36:1655~1661, 1995).

**Key Words :** Benzalkonium chloride, Corneal epithelial barrier, Eyedrops.

일반적으로 안과에서는 안질환의 치료 또는 예방을 목적으로 많은 종류의 국소점안제를 사용하고 있다. 그러나 점안제의 과용으로 인한 부작용도 적지 않아 오히려 안구 표면질환(ocular surface disorder)을 악화시킬 수도 있는데 이는 점안제들의 이온성분, pH, 삼투압, 보존제 등의 이상으로 야기될 수 있다. 점안제에는 용액의 안정성과 항균력을 증가시키기 위하여 대부분의 경우 보존제가 포함되어 있다. 가장 흔하게 사용되는 보존제인 benzalkonium chloride(BAC)는 강력한 양이온 세제효과를 가진 각막상피세포의 손상을 일으킨다고 알려져 있는데 이러한 여러가지 약제 및 보존제들에 의한 각막상피세포의 손상에 대하여는 여러 보고가 있다. BAC와 thimerosal 등의 보존제와 약제에 노출된 각막상피세포의 주사전자현미경적 소견<sup>1)</sup>, 상용되는 점안제에 노출후 토끼 각막의 전기생리학적 연구<sup>2)</sup>, 배양된 각막상피세포에 대한 보존제의 세포독성에 관한 연구<sup>3)</sup> 등이 보고된 바 있다.

그러나 위에 기술된 보고에서 사용된 연구방법들은 정량적인 자료를 제시하지 못하고 있다. 이에 저자들은 BAC 농도에 따른 각막상피세포의 장벽기능 손상 정도와 여러가지 점안제에 의한 각막상피세포

의 장벽기능 변화를 알아보기 위해 5,6-Carboxyfluorescein을 이용하여 각막상피세포의 투과성을 정량적으로 측정하고 비교분석하였다.

## 대상 및 방법

본 실험에서 사용한 benzalkonium chloride(BAC) (Janssen Chimica, Belgium)는 상온에서 Balanced salt solution(BSS) (Alcon Laboratories, Inc., Fort Worth, TX, USA)에 용해시켜 0.1%, 0.01%, 0.05%와 0.001%의 농도로 만들어 사용하였으며, 점안제는 항생제군, 스테로이드제제군과 인공누액군으로 구분하여 사용하였다. 항생제군은 ofloxacin을 주성분으로 하는 Ofloxacin®(삼일제약, 한국), Tarivid®(삼천제약, 일본)과 Octacin®(참제약, 한국)을 사용하였는데 각각 보존제로써 0.025%, 0.025% 및 0.03% 농도의 BAC가 포함되어 있으며, 스테로이드제제군은 fluorometholone을 주성분으로 하는 Fumelon®(한림제약, 한국)과 Fluorometholone®(삼일제약, 한국)을 사용하였는데 두 점안제 모두 보존제로써 0.01% 농도의 BAC가 포함되어 있다. 인공누액제군은 Tears

— 이종화 외 : 각막상피세포의 장벽기능 —

Naturale®(Alcon-Couvreur, Puurs, Belgium), Tears Naturale I®(Alcon Inc., Humacao, USA)와 Tears Naturale Free®(Alcon Inc., Humacao, USA)를 사용하였는데, Tears Naturale®에는 보존제인 BAC가 0.01%의 농도로 포함되어 있으며, Tears Naturale I®에는 보존제로써 Polyquad®(polyquaternium-1)가 0.001%의 농도로 포함되어 있고, Tears Naturale Free®에는 보존제가 포함되어 있지 않았다(Table 1). 그리고 대조군은 BSS용액을 사용하였다.

체중 2~3kg의 백색 토끼 35마리 70안을 대상으로 하였다. 각 검사 대상 점안제 당 무작위로 5안씩을 배정하고 10안은 대조군으로 하였다. 먼저 pentobarbital sodium을 과량 정맥주사하여 (80mg/kg)

Table 1. Eyedrops and their preservatives

Eyedrops	Preservatives
Ofloxacin solutions	
Tarivid	BAC 0.025%
Ofloxacin	BAC 0.025%
Octacin	BAC 0.03%
Fluorometholone solutions	
Fumelon	BAC 0.01%
Fluorometholone	BAC 0.01%
Artificial tear solutions	
Tears Naturale	BAC 0.01%
Tears Naturale I	Polyquad 0.001%
Tears Naturale Free	—

BAC : benzalkonium chloride

토끼를 회생시킨 후 각막상피가 다치지 않게 조심스럽게 안구를 적출하였다. 각각의 점안제 혹은 BAC 용액을 2ml 넣은 5ml의 비이커에 안구를 넣고 각막 부위가 점안제 혹은 BAC용액에 15분간 접촉하게 한 다음 꺼내어 BSS로 충분히 세척하였다. 그후 2 ml의  $2.7 \times 10^{-3}$ M의 5, 6-Carboxyfluorescein (CF) (Eastman Kodak company, Rochester, NY, USA)용액이 담긴 5ml의 비이커에 안구를 넣고 각막 부위를 CF용액에 5분간 접촉시키게 한 다음 꺼내어 다시 BSS로 충분히 세척하였다. 10mm Trehpine를 이용하여 각막 부위를 절제해 낸 후 수술용 스폰지(Merocel, Mystic, CONN, USA)로 각막을 조심스럽게 건조시킨 다음 각막실질내로 침투된 CF 용액이 용이하게 BSS 용액으로 빠져 나올 수 있도록 gill knife를 사용하여 각막 내피세포를 제거하였다. 각 각막의 무게(wet weight)를 측정하고, 20ml의 BSS에 넣어 40°C에서 48시간 동안 투석시킨 다음, 그 투석액을 Fluorometer(Farrand MK-2A, Valhalla, NY, USA)를 이용하여 투석액내의 CF 농도를 측정하고, 각막실질에 흡수된 전체 CF(n mole/gm of wet cornea) 양을 계산하였다. 본 실험에서 얻은 자료의 통계처리는 nonparametric test인 ANOVA를 사용하였다.

## 결 과

BAC 농도에 따른 각막상피세포의 투과성은, BSS를 사용한 대조군에서 106nM/gm이었으며,

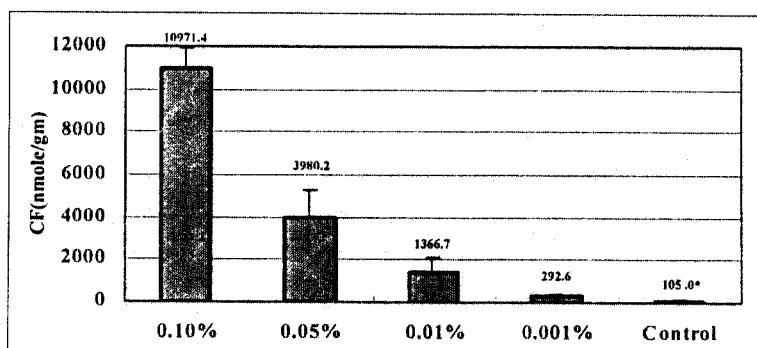


Fig. 1. Corneal uptake of carboxyfluorescein(CF) by different concentrations of benzalkonium chloride.

(\*p=0.001 compared to benzalkonium chloride 0.001% solution)

0.001% BAC에서는 292nM/gm, 0.01% BAC에서는 1366nM/gm, 0.05% BAC에서는 3980nM/gm, 그리고 0.1% BAC에서는 10971nM/gm이었다. BAC 농도가 증가할수록 각막상피세포의 투과성이 증가하였으며, 저농도인 0.001%의 BAC 용액에서도 BSS의 대조군에 비해 통계학적으로 유의한 증가를 보였다( $p=0.001$ ) (Fig. 1).

ofloxacin을 함유한 항생제 점안제를 사용한 경우는 0.025%의 BAC가 포함된 Tarivid®와 Ofloxacin®에 의한 각막상피세포의 투과성은 각각 484nM/gm과 357nM/gm으로 두 군간에는 통계학적으로 의의있는 차이는 보이지 않았으나( $p>0.1$ ),

대조군보다는 높았으며( $p<0.005$ ), 0.03%의 BAC가 포함된 Octacin®은 2383nM/gm으로 다른 군에 비하여 높은 상피세포의 투과성을 나타내었으며 이는 통계학적으로 유의하였다( $p<0.001$ ) (Fig. 2).

fluorometholone을 함유한 스테로이드성 점안제인 Fumelon®과 Fluorometholone®은 두군 모두 보존제로써 0.01% 농도의 BAC가 포함되어 있으며, 각막상피세포의 투과성 정도는 Fumelon®군에서 421nM/gm이었고, Fluorometholone®군은 120nM/gm이었다. Fumelon®군에서 Fluorometholone®군보다 더 높은 각막상피세포의 투과성을 보이지만 두 군간의 차이는 통계학적으로는 유의

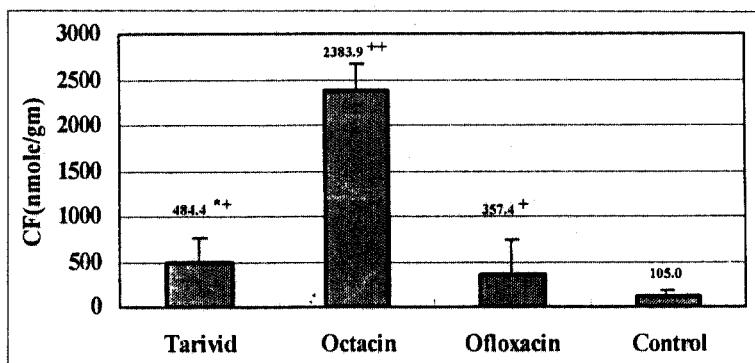


Fig. 2. Corneal uptake of carboxyfluorescein(CF) by ofloxacin solutions.

(\*P>0.1 compared to Ofloxacin, +p<0.05 compared to Control, ++p<0.001 compared to Tarivid and Ofloxacin)

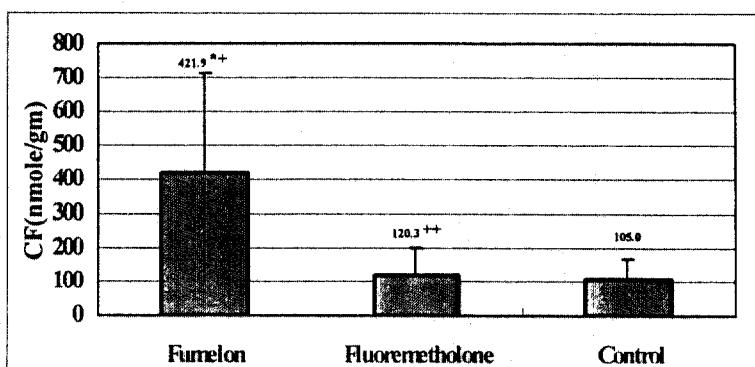


Fig. 3. Corneal uptake of carboxyfluorescein(CF) by fluorometholone solutions.

(\*p>0.05 compared to Fluorometholone, +p<0.05 compared to Control, ++p>0.1 compared to Control)

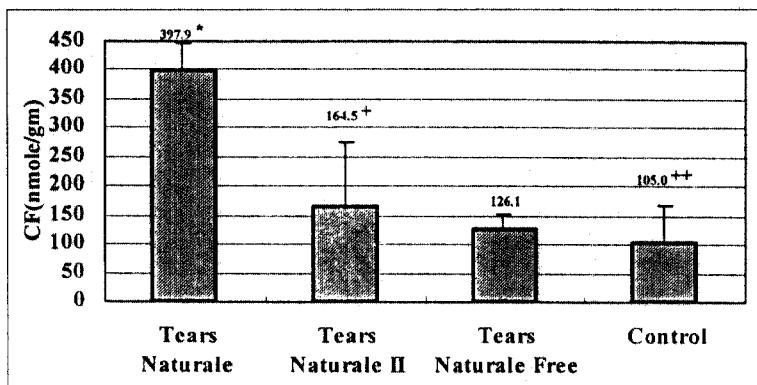


Fig. 4. Corneal uptake of carboxyfluorescein(CF) by artificial tear solutions.

(\*p<0.005 compared to other artificial tear solutions, +p>0.1 compared to Tears Naturale Free, ++p>0.1 compared to Tears Naturale II and Tears Naturale Free)

성을 보이지 않았다( $p>0.05$ ) (Fig. 3). 그러나 대조군과 비교해 보면 Fumelon®군과는 의의있는 차이가 있었지만( $p<0.05$ ), Fluorometholone®군과는 차이가 없었다( $p>0.1$ ).

인공누액제에 의한 각막상피세포의 투과성은, 0.01% 농도의 BAC가 포함되어 있는 Tears Naturale®는 397nM/gm, 보존제로써 Polyquad® 0.001%가 포함된 Tears Naturale II®는 164nM/gm, 보존제가 포함되어 있지않는 Tears Naturale Free®는 126nM/gm이었는데, Tears Naturale®군에서 다른 두 인공누액제보다 통계학적으로 의의 있는 투과성의 증가를 보였다( $p<0.005$ ). Tears Naturale Free®에서는 Tears Naturale II®보다 낮은 투과성을 보였으나 통계학적으로 유의하지는 않았고( $p>0.1$ ), 또한 이 두군과 BSS만을 사용한 대조군과의 투과성의 차이 역시 통계학적으로 유의하지 않았다( $p>0.1$ ) (Fig. 4).

## 고 찰

안과에서는 치료 또는 예방의 목적으로 여러가지 점안제를 국소적으로 투여하는 경우가 많다. 그러나 점안제의 과용 또는 오용으로 인한 여러 부작용이 발생 할 수도 있어 오히려 안구표면질환(ocular surface disorder)을 유발할 수도 있다. 대부분의

점안제에는 보존제로써 benzalkonium chloride, chlorhexidine digluconate, polyquaternium-1, thimerosal 등이 함유되어 있다. 각막상피의 표층세포들은 tight junction을 형성하여 각막의 내충과 누액총사이에 반투파막을 이루고 있는데<sup>4</sup> 전자현미경적 및 전기생리학적 연구에 의하면 BAC는 각막의 표층상피세포를 탈락시키거나, tight junction을 파괴시킴으로써 각막상피세포의 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있다<sup>2,5)</sup>.

본 연구에서는 각막상피세포의 tight junction의 완전함을 보기위해 5,6-carboxy-fluorescein(CF)을 사용하였는데 이 CF는 carboxyl기를 갖고 있기 때문에 sodium fluorescein보다 친수성을 가져, sodium fluorescein이 세포막을 통과할 수 있는데 반하여 CF는 소지성(lipophobic)이기 때문에 세포막을 통과하지 못하고 세포간 사이(pericellular space)로만 투과되기 때문에 각막상피세포의 장벽기능 측정시 sodium fluorescein보다 더 유효하다고 하였으며<sup>6,7)</sup> Bernal과 Ubels<sup>5)</sup>는 각막상피세포의 손상 정도는 각막에 의한 5,6-CF의 흡수량에 비례한다고 하였다.

본 실험에서 BAC의 농도 0.001%에서도 각막상피세포의 투과성이 대조군에 비해 증가하였고, BAC의 농도가 증가함에 따라 각막상피세포의 투과성이 증가하는 것으로 나타났는데, 이는 14C-

inulin을 이용하여 각막상피세포 투과성을 측정한 Keller 등<sup>8</sup>의 결과와 비슷하였다. 고농도인 0.1%에서 저농도인 0.001%보다 약 35배정도 각막상피세포의 투과성 증가를 보여주고 있으며, 0.01%에서도 0.001%와 비교하여 약 4배 증가되었는데, 보통 점안제에는 BAC가 0.01% 이상의 농도가 들어 있으므로 점안제 과용시의 각막상피세포의 손상을 짐작할 수 있다(Fig. 1). Tonjum<sup>9</sup>에 의하면 tight junctional complexes의 파괴로 인해 각막상피세포의 세포간극(intercellular space)에 누액층이 접근하여 각막실질과 각막내피층에 비교적 낮은 저항의 경로(low-resistance pathway)가 형성됨으로써 더 많은 각막상피세포 투과성이 증가된다고 하였다. Van Zutphen 등<sup>10</sup>에 의하면 세포 원형질막의 두층의 지질층으로 직접 BAC가 분자차이율(molecular intercalation)됨으로써 표층세포의 원형질막의 변화가 일어나 각막상피세포의 투과성 증가가 일어난다고 하였다. BAC에 의한 각막상피세포의 구조적 변화는 투여후 5분에서 15분사이에 일어나는데, 각막상피의 표층세포들 사이의 장벽기능 손상에 의해 한층에서 세층의 표층세포들이 탈락된다고 알려져 있다<sup>11</sup>. 본 연구에서는 각막을 BAC나 다른 검사대상 점안제에 15분간 접촉시켰는데 이는 점안제를 한방울 점안하면 안구표면에 머무르는 시간(retention time)이 1분에서 수시간되는 점을 감안하면 충분한 시간이라고 생각된다.

BAC 0.03%의 Octacin®군이 BAC 0.025%인 Tarivid®군과 Ofloxacin®군 보다 약 5배 정도의 각막상피세포의 투과성 증가를 보였으며, fluoro-metholone군에서 Fumelon®과 Fluorometholone® 두군 모두 보존제로써 0.03%의 BAC가 포함되어 있지만 Fumelon®군에서 Fluorometholone® 군 보다 높은 각막상피세포의 투과성 증가를 보였다. 이렇게 BAC 농도가 같거나 높도 차이가 적음에도 불구하고 투과성의 차이를 보이는 것은 각 점안제가 포함하는 이온성분, 계면활성제, pH와 삼투압 등과 같은 구성성분의 특성들이나 제조과정에서의 잘못으로 각막상피세포의 투과성에 영향을 줄 수 있기 때문이라고 생각된다.

인공누액군에서 보존제로써 BAC가 포함된 Tears Naturale®가 보존제 polyquaternium-1이 포함

된 Tears naturale II®와 보존제가 포함되어 있지 않은 Tears Naturale Free®에 비하여 높은 각막상피세포의 투과성을 보였는데 보존제의 일종인 polyquaternium-1은 BAC에 비하여 각막상피세포에 손상을 덜 주는 것으로 알려져 있다<sup>12</sup>. Stern 등<sup>13</sup>에 의하면 토끼 각막상피세포의 전자현미경적 연구에서 glutathione bicarbonate Ringer solution 내의 0.001%의 polyquaternium-1에 60분간 노출된 토끼의 각막상피세포는 각막상피의 표층세포의 주부를 분리시키는 적은 변화만을 유발한다고 하였다. 또한 보존제가 포함되어 있지 않은 점안제가 보존제가 포함되어 있는 점안제에 비하여 각막상피세포에 손상을 덜 준다고 보고하고 있다<sup>14</sup>. 본 연구에서는 보존제가 포함되어 있지 않은 Tears Naturale Free®가 가장 낮은 각막상피세포의 투과성 증가를 보였으나, polyquaternium-1이 들어있는 Tears Naturale II®와는 통계학적으로 유의한 차이는 없었다( $p>0.1$ ). 이는 본 실험에서 각막이 점안제에 노출되는 시간이 15분이었는데 좀 더 오래 점안제에 노출시킨다면 두군간의 차이를 볼 수 있었지 않을까 생각된다.

Burstein<sup>15</sup>은 사람의 각막이 토끼의 각막에 비하여 보존제에 의한 상피세포의 투과성 증가가 적게 일어난다고 하였다. 그러나 콘택트렌즈를 착용하든지, 엑시머레이저 근시교정술 시행후에서 처럼 기존의 각막상피세포 손상이 있는 경우나 또는 건성안 치료를 위하여 빈번하게 암연을 점안하는 경우 더 많은 각막상피세포의 손상이 유발될 수 있다. 따라서 점안제를 선택함에 있어 보존제의 함량이나 그 종류 등에 특별한 주의를 가질 필요가 있다. 점안제를 빈번하게 투여하여야 할 경우 polyquaternium-1과 같은 각막상피세포 손상이 적은 보존제가 포함된 점안제를 투여하거나 심한 건성안과 같은 경우 보존제가 포함되어 있지 않는 점안제를 투여하는 것이 바람직하다고 생각되고 또한 불필요한 점안제의 남용은 피하여야 할 것이다.

## REFERENCES

- 1) Pfister RR, Burstein NL : *The effects of the ophthalmic drugs, vehicles and preservatives on corneal epithelium : A scanning electron*

— 이종화 외 : 각막상피세포의 장벽기능 —

- microscope study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 15:246-259, 1976.
- 2) Burstein NL, Klyce SD : *Electrophysiologic and morphologic effects of ophthalmic preparations on rabbit cornea epithelium*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 16:899-911, 1977.
- 3) Imperia PS, Lazarus HM, Botti RE Jr., Lass JH : *An in vitro method for measuring ophthalmic preservative cytotoxicity*. *J Toxicol Cut Ocular Toxicol* 5:309-317, 1986.
- 4) Bernal DL, Ubels JL : *Artificial tear composition and promotion of recovery of the damaged corneal epithelium*. *Cornea* 12:115-120, 1993.
- 5) Bernal DL, Ubels JL : *Quantitative evaluation of the corneal epithelial barrier : effect of artificial tears and preservatives*. *Curr Eye Res* 10:645-656, 1991.
- 6) Grimes PA, Stone RA, Laties AM, Li W : *Carboxyfluorescein : A probe of the blood-ocular barriers with lower membrane permeability than fluorescein*. *Arch Ophthalmol* 100:635-639, 1982.
- 7) Van Zutphen H, Dermal RA, Norman AW, Van Deenen LLM : *The action of polyene antibiotics on lipid bilayer membranes in the presence of several cations and anions*. *Biochem Biophys Acta* 241:310-330, 1971.
- 8) Keller N, Moore D, Carper D, Longwell A : *Increased corneal permeability induced by dual effects of transient tear acidification and effects of benzalkonium chloride*. *Exp Eye Res* 30:203-213, 1980.
- 9) Tonjum AM : *Permeability of rabbit corneal epithelium to horseradish peroxidase after the influence of benzalkonium chloride*. *Acta Ophthalmol* 53:335-347, 1975.
- 10) Stern ME, Edelhauser HF, Krebs SJ, Carney GR, Hiddeeman JW : *A comparison of corneal epithelial and endothelial toxicity of common ophthalmic preservatives*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 24(suppl):156, 1983.
- 11) Burstein NL : *Preservative alteration of corneal permeability in humans and rabbits*. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 25:1453-1457, 1984.