

10종의 치과용 합금의 세포독성평가

진강식, 이용근, 김경남, 김광만*

연세대학교 치과대학 치과생체재료공학교실 및 연구소, 연세대학교 치과대학 구강과학연구소, 두뇌한국 21 연세치의학 사업단

Cytotoxicity Test of 10 Commercial Dental Alloy

Kang-Sik Jin, Yong-Keun Lee, Kyoung-Nam Kim, Kwang-Mahn Kim*

Department and Research Institute of Dental Biomaterials and Bioengineering, Oral Science Research Center, Brain Korea 21 Project, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Korea

(Received: Jan. 24, 2009; Accepted: Mar. 4, 2009)

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate cytotoxicity of 10 commercial dental alloy. Agar diffusion method was used for cytotoxicity evaluation method. Agar diffusion test was followed ISO 10993-5:1999(E). Total 10 commercial dental alloy was assessed. 7 porcelain fused to metal gold alloy, 1 class II gold alloy, 1 class III gold alloy, and 1 silver alloy for soldering were used as test group. The result of this study shows that all study group didn't represent any cytotoxicity. This result shows that these 10 commercial dental alloy have safety in agar overlay test.

KEY WORDS: cytotoxicity, dental alloy, agar diffusion test, agar overlay test

서론

치과용 합금은 교정용 선재에서부터 납착용 합금, 수복용 합금에 이르기까지 넓은 영역에서 사용되고 있다. 과거의 치과생체재료의 특성 평가에는 기계적 성질이나 물성에 국한되어 있었으나, 최근에는 그에 못지않게 생체재료의 생물학적 특성이 중시되고 있다. 치과 주조용 합금 또는 그 성분의 세포독성 실험에서는 다양한 세포종류와 여러 가지 실험모형 평가 방법이 이용되고 있다. 그 방법에는 L929와 Hela cell을 이용한 한천중층 방법(Woody 등, 1977)과 NCTC 2544(established human epithelial cell line)를 사용한 한천중층법(Niemi 등, 1985), Bald/c 3T3세포를 이용한 직접 접촉법(direct contact method)으로 세포증식정도, 광학농도이용법, 육안 관찰법 등의 평가법 등이 있다(Craig 등, 1990). 또한 니켈-크롬 합금의 세포독성을 trypan blue와 3H-thymidine 흡수법을 이용하여 측정하는 방법도 보고되었다(Bumgardner 등, 1995). 치과용 귀금속 합금의 경우 대부분 세포독성이 낮은 수준이라고 알려져 있지만, 용도별로 치과재료의

세포독성의 차이가 존재하는지 알아보기 위하여 연구를 시행하였다. 본 연구에서는 10종의 치과용 합금을 용도별로 분류한 후, 각 합금에 대해서 L929 세포를 이용한 한천중층시험을 통한 세포독성평가를 시행하였다.

재료 및 방법

1) 시편제작

제조자가 제공한 시편을 가로와 세로 5 mm×5 mm의 크기로 자른 후, 날카로운 면을 주수연마기(Ecomet III, Buehler, Canada)를 통해 800 grit silicon carbide paper로 연마하였다. 양성대조군은 라텍스를 5 mm×5 mm로 절단하여 사용하였고, 음성대조군은 다이아몬드 유리 절단용 칼을 이용하여 슬라이드 글라스(Marienfeld, Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Germany)를 5 mm×5 mm로 절단하여 사용하였다. 모든 시편은 제작 후 세포독성 실험에 들어가기에 앞서 EO gas 소독을 시행하였다.

2) 세포배양

한국세포주은행으로부터 분양받은 L929(Mouse-fibroblast)를 사용하였다. 세포의 배지는 RPMI1640(Welgene, Korea)을 사용하였고, Medium에 10% FBS(Welgene, Korea)를 첨가하여 petri-dish(REF 351029, BD falcon,

* 서울시 서대문구 성산로 250, 연세의료원 치과대학 505호 치과생체재료공학교실, 김광만

* 이 논문은 2009년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국과학재단의 지원을 받아 수행된 연구임(No. R13-2003-013-04001-0).

USA)에 세포를 5×10^4 /ml 만큼 분주한 후, 37°C, 95% 공기, 5% CO₂ 배양기에 배양하여 24시간 후 petri-dish의 면적에 80% 이상이 되도록 배양하였다.

3) 한천중층시험

시험 시작 전에 배지의 단층배양과 그 형태를 현미경으로 확인하였다. 배양액을 제거한 후, FBS가 포함된 RPMI와 Agar 혼합액(RPMI : Agar = 5 : 5, FBS는 RPMI의 약 5%) petri-dish당 약 10 ml 분주하였다. Agar와 배지의 혼합액이 굳으면, PBS(Welgene, Korea)와 Neutral Red (Sigma, St Louis, MO, USA), 혼합액(99.7 : 0.3)을 filter로 거른 후, filter를 통과한 용액을 세포의 염색을 위해 petri-dish당 약 5 ml 정도 주입하였다. 은박지로 petri-dish를 밀폐 후 40분 정도 항온기(37°C)에서 보관하였다.

40분 후, 염색 여부를 확인한 후 염색약 제거한 후에, PBS를 일회 더 주입하여 염색약을 완전히 제거하였다.

염색이 된 세포와 한천 위에 petri-dish 당 양성대조군 시편, 음성대조군 시편, 시험군 시편 2개를 조심스럽게 위치시킨 후, 24시간 동안 항온기에 37°C의 조건으로 배양한다. 24시간 후 세포사진을 육안 사진과 현미경 사진으로 촬영한다.

4) 세포독성의 측정 기준

시편 주위의 배지에서 염색이 사라진 탈색부위를 백색 종이 위에 놓고 측정하여, 탈색지수(zone index)를 측정하였고, 탈색된 세포의 용해정도를 현미경으로 관찰하여, 용해지수(lysis index)를 측정하였다. 반응지수(response Index)를 “탈색지수 / 용해지수”로 기록하였다.

Table 1. 10종의 합금의 분류와 상품명

Group	Product	Company	Remark
porcelain fused to metal gold alloy	Esterticor Helvetica	Cendres & Metaux SA	
	Herador SG	Heraeus Kulzer GmbH	
	Aquarius Hard	Ivoclar Vivadent	
	JP-II	Jensen Industries	
	PX premium Bio	PX Dental SA	
	V-Gnathos Plus	Metaux Precieux SA Metalor	
	Biogold plus	Elephant Dental B.V	
class II gold alloy	Biocclus 4	Degudent GmbH	
class III gold alloy	Argenco 58	The Argen Corporation	
silver alloy for soldering	Silver solder	Dentaurum	
positive control			rubber latex
negative control			slide glass

Table 2. 탈색범위지수(Zone Index)

Zone Index	Description
0	변색된 부분이 없음
1	시험 물질 하방에서만 변색
2	시험 물질로부터 5 mm 이내의 zone
3	시험 물질로부터 10 mm 이내의 zone
4	시험 물질로부터 10 mm 이상의 zone
5	전체 배양이 탈색

Table 3. 용해지수(Lysis Index)

Lysis index	Description
0	세포 사멸이 관찰되지 않음
1	세포 사멸이 20% 이하
2	세포 사멸이 20%~40%
3	세포 사멸이 40%~60%
4	세포 사멸이 60%~80%
5	세포 사멸이 80% 이상

Table 4. 반응지수(Response Index)

Scale	Cell response	Interpretation
0	0/0	비세포 독성
1	1/1	경미한 세포 독성
2	2/2 - 3/3	중등도 세포 독성
3	4/4 - 5/5	심한 세포 독성

Table 5. 10종의 합금 한천중층시험 결과

Group	Product	Zone Index	Lysis Index	Response Index	Scale
porcelain fused to metal gold alloy	Esterticor Helvetica	0	0	0/0	0
	class II gold alloy	0	0	0/0	0
	class III gold alloy	0	0	0/0	0
	silver alloy for soldering	0	0	0/0	0
	positive control	0	0	0/0	0
	negative control	0	0	0/0	0
	Biogold plus	0	0	0/0	0
class II gold alloy	Biocculus 4	0	0	0/0	0
class III gold alloy	Argenco 58	0	0	0/0	0
silver alloy for soldering	Dentaurum	0	0	0/0	0
positive control	Rubber Latex	4	5	4/5	3
negative control	Slide glass	0	0	0/0	0

결과

치과용 합금의 탈색지수, 용해지수, 반응지수를 측정하
 결과는 Table 5와 같다.

다음과 같이 10종 모두의 합금에서 세포독성을 나타내
 지 않았으며, 음성대조군에서도 세포독성을 나타내지 않

았다. 양성대조군은 severely cytotoxicity를 나타내었다.

고찰

1960년대에 이르러 치과재료의 생물학적 특성에 대한

중요성이 소개되면서, 치과재료의 생물학적 특성은 재료 평가에 필수적인 부분으로 점차 인식되기 시작하였다 (Ryge, 1961). 그 후에 구강 내에서 나타날 수 있는 생물학적 반응을 검사하는 시험방법에 대한 연구가 활발해졌는데, 치과재료의 생물학적 성질을 고찰하는 데 있어 생체 내 실험은 실험조건이나 기간에 따라 결과가 다양하게 나타날 수 있고 객관적인 평가가 힘들어 실험조건과 조사방법의 표준화를 시행하여 생물학적 반응의 객관성을 부여하기 위한 많은 노력이 계속되어 왔다. 치과 생체재료의 생물학적 평가 시험 항목은 제1군, 제2군 및 제3군의 3단계로 구분할 수 있는데, 제1군은 세포차원에서 행할 수 있는 시험이고, 제2군은 생명을 가지고 있는 개체, 제3군은 치과생체재료를 실제 목적대로 사용하고 결과를 평가하여, 안전성과 유효성을 평가하는 시험이다(ISO, 1997). 세포독성 검사는 1군의 시험으로써 실험방법이 간단하며, 재현성이 높고, 정확한 결과를 얻을 수 있기 때문에, 다량의 시편을 평가할 수 있는 경제적이고 표준화가 가능한 실험방법이다(Craig, 2002). 표준화된 세포를 배양하여 실험재료에 대한 세포변화를 분석함으로써 독성을 평가하는 생체의 세포독성 검사는 평가에 객관성이 있으며 비교적 간단하고 반응이 빠르고 예민하며, 재현이 가능하고 결과의 산술적 평가가 가능한 장점을 지니고 있으므로 신제품의 생물학적 성질 평가 또는 1차적 독성검사로써 적합한 방법이며, 독성성분의 증명 및 확인에도 사용되고 있다.

본 실험에서 사용된 한천중층법은 한천을 통해 재료가 확산되기 때문에 재료의 독성뿐만 아니라 독성물질의 확산도 평가가 가능하며(Mohammad 등, 1978) 한천의 (Kawahara haruyuki, 1978) 한 임상조건과 유사해야 한다는 연구가 있다(Imai 등, 1982). 세포배양을 이용한 세포독성 검사는 배양세포와 실험재료 간의 적절한 접촉이 중요하며 접촉면의 상호작용도 연구해야 한다. 대부분 치과 생체재료는 비수용성이므로 시편을 세포나 세포배양액과 직접 접촉시키거나 이들 사이에 투과성 중간매체를 넣고 간접 접촉시키는 방법이 연구되었다. 본 실험에 사용한 치과용 합금은 치은과 직접 접촉하지만 그 유출물이 상피를 통과하여 섬유아세포와 반응하므로 한천배지법을 선택하였다(윤숙진, 1992).

본 시험에서 7종의 도재 소부용 금합금과 1종의 제2형 금합금, 1종의 제3형 금합금 그리고 1종의 납착용 은합금의 세포독성을 평가하기 위하여 한천중층법을 이용한 L929 mouse fibroblast에 대한 시험을 행하였다. 시험

시료의 조성이나 용도에 관계없이 모든 시험군에서 세포독성은 나타나지 않았다. 금속의 세포독성은 주기율표와 상관지어 생각해 볼 수 있는데, 제2족의 Be, Mg, Ca, Cd, Sr, Zn 등은 강력한 세포독성을 나타내며, 제3족의 Al, In, Ga나, 제4족의 Si, Ti, Zr, Sn 등은 세포독성을 나타내지 않는다, 또한 같은 족 내에서도, 원자량이 큰 금속은 세포독성을 나타내지 않으며, 원자량이 작은 금속은 세포독성을 나타내지 않는 경향이 있다. 1족의 Cu, 5족의 V, As, Sb, 8족의 Fe, Co 등은 세포독성을 나타내는 반면, 1족의 Au, 5족의 Ta, 8족의 Pd, Pt 등은 세포독성이 없는 것으로 알려져 있다(Kawahara haruyuki, 1978). 우리가 독성시험을 시행한 시료들은 Au와 Ag가 주종을 이루는 귀금속 합금들로서 금속 모재 자체도 세포독성이 없으며, 실제로 이들의 합금도 세포독성이 없음을 알 수 있다. 이로써 최근에 시판되고 있는 시중의 치과용 귀금속 합금은 세포독성 측면에서 볼 때 안정적이라고 볼 수 있다. 하지만 세포독성 실험은 생체 외에서 세포 영역에서 이루어진 시험이므로 환자에게 적용했을 때 임상적으로 나타날 수 있는 생물학적인 반응과 일치한다고 보기는 힘들다. 그렇기 때문에 치과용 생체재료에 대해서 세포영역의 실험과 더욱 상관관계가 있는 연구가 시행되어야 할 것이다.

결론

현재 시판되고 있는 7종의 도재 소부용 금합금과 1종의 제2형 금합금, 1종의 제3형 금합금 그리고 1종의 납착용 은합금의 세포독성을 한천중층법을 통하여 평가한 결과 10종 모두에서도 미약한 세포독성도 나타내지 않았다.

참고문헌

1. 윤숙진(1992). 수중 치과용 합금의 세포독성 평가에 관한 연구. 대한치과기재학회지 19권:151-162.
2. Bumgardner, J. D. and L. C. Lucas(1995). Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys. *Journal of dental research* 74:1521-1527.
3. Craig, R. G.(2002). Restorative dental materials.
4. Craig, R. G. and C. T. Hanks(1990). Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *Journal of dental research* 69:1539-1542.

5. Imai, Y., A. Watanabe, et al.(1982). Evaluation of the biologic effects of dental materials using a new cell culture technique. *Journal of dental research* 61:1024-1027.
6. ISO(1997) ISO 7405 : Dentistry-Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry - Test method for dental materials
7. Kawahara haruyuki, N. m.(1978). 生體織からみた - 組織界面の現象. *化學總說* 21:13-34.
8. Mohammad, A. R., H. H. Mincer, et al.(1978). Cytotoxicity evaluation of root canal sealers by the tissue culture-agar overlay technique. *Oral surgery, oral medicine and oral pathology* 45:768-73.
9. Niemi, L. and A. Hensten-Petterse(1985). In vitro cytotoxicity of Ag-Pd-Cu-based casting alloys. *Journal of biomedical materials research* 19:549-61.
10. Ryge(1961). Review of dental materials research. *The Journal of the American Dental Association* 62:519-26.
11. Woody, R. D., E. F. Huget, et al.(1977). Apparent cytotoxicity of base metal casting alloys. *Journal of dental research* 56:739-43.

