

치과용 가타퍼차 포인트의 세포독성

박윤정⁴, 진강식^{1,2,3}, 이상배^{1,4}, 김경남^{1,2,3,4}, 이용근^{1,2,3,4}, 김광만^{1,2,3,4*}

¹연세대학교 치과대학 치과생체재료공학교실 및 연구소, ²BK21,

³구강악안면경조직재생연구센터, ⁴치과의료기기시험평가센터

Cytotoxicity of dental guttapercha point

Yoon-Jeong Park⁴, Kang-Sik Jin^{1,2,3}, Sang-Bae Lee^{1,4}, Kyoung-Nam Kim^{1,2,3,4}, Yong-Keun Lee^{1,2,3,4}, Kwang-Mahn Kim^{1,2,3,4*}

¹Department & Research Institute of Dental Biomaterials & Bioengineering, ²Brain Korea 21 Project,

³Research Center for Orofacial Hard Tissue Regeneration,

⁴Yonsei Dental Devices Testing & Evaluation Center, Yonsei University College of Dentistry

(Received: Jun. 11, 2009; Revised: Jun. 11, 2009; Accepted: Jun. 11, 2009)

ABSTRACT

The purpose of this study was to evaluate cytotoxicity of dental guttapercha point. Agar diffusion method was used for cytotoxicity evaluation according to ISO 7405:2008(E). Dental guttapercha point and the ingredients of guttapercha point were investigated for their cytotoxicity. Dental guttapercha point were mainly consisted with polyisoprene and zinc oxide. Dental guttapercha point represented moderate cytotoxicity, and zinc oxide represented severe cytotoxicity. However, polyisoprene represented non cytotoxicity. In conclusion, the moderate cytotoxicity of dental guttapercha point is likely due to zinc oxide.

KEY WORDS: cytotoxicity, dental guttapercha point, polyisoprene, zinc oxide

서론

근관치료에서 가장 필수적인 치과재료는 근관충전재로서 가타퍼차 포인트가 대표적이다. 근관충전용 가타퍼차 포인트는 구타(Gutta) 나무의 분비물에서 얻은 구타페르카라는 트랜스-1,4-폴리이소프렌에 산화아연을 혼합한 복합 물질을 다양한 크기의 콘 포인트(corn point) 형태로 제작한 것이다. 이때 산화아연은 바람직한 물성과 방사선 불투과성을 위하여 첨가되는데, 무게비로 약 60%가 함유된다.

치과재료도 생체재료이므로 생체적합성이 매우 중요하다. 생체적합성을 평가하는데 여러 가지의 시험항목이 적용될 수 있는데, 그 첫 번째로 시도해 볼 수 있는 것은 실험실적 시험인 세포독성시험이다. 고형의 생체재료는 한천을 재료와 세포 사이의 격리벽으로 사용하는 한천중층 시험법을 주로 사용하고 있다. 가타퍼차 포인트는 치근관 내에 영구적으로 이식되어 유지되는 의료기기로서 생체적

합성이 중요한 요구 성질인 바, 본 연구에서는 치과용 가타퍼차 포인트의 세포독성을 알아보기 위하여 연구를 시행하였고, 이와 더불어 가타퍼차 포인트를 구성하는 주요 구성 성분인 Polyisoprene과 산화아연에 대해서 한천중층 시험을 통한 세포독성평가를 시행하였다.

연구재료 및 방법

1. 연구재료

본 연구에 사용된 재료는 Table 1과 같다.

Table 1. Materials used in this study

Group	Materials	Manufacturer
Guttapercha point	Guttapercha plate	Metabiomed
Raw materials	Polyisoprene, cis	Sigma-Aldrich
	Zinc oxide	Sigma-Aldrich
Control (+)	Latex Glove	
Control (-)	Slide Glass	

* 서울특별시 서대문구 성산로 250, 우편번호 120-752, 연세대학교 치과대학 구강과학연구소, 김광만

* 본 연구는 연세대학교 치과대학 2007년도 교수연구비(과제번호 6-2006-0061)에 의하여 이루어졌음.

2. 연구방법

1) 시편제작

(주)메타바이오메드로부터 가타퍼차 포인트의 원료로 사용하는 판상을 제공받아 10 mm × 10 mm × 1 mm의 크기로 잘라서 시편을 제작하였다. 주원료로서 poly-isoprene, cis 는 고품상으로 10 mm × 10 mm × 1 mm의 크기로 잘라서 시편을 제작하였고, 산화아연은 분말상으로 10 mm × 10 mm × 1 mm의 teflon mould에 채워서 시편을 제작하였다. 양성대조군은 천연라텍스를 10 mm × 10 mm × 1 mm로 절단하여 사용하였고, 음성대조군은 슬라이드 글라스를 10 mm × 10 mm × 1 mm로 절단하여 사용하였다. 산화아연을 제외한 모든 시편은 제작 후 세포독성 실험에 들어가기 앞서 EO gas 소독을 시행하였다.

2) 세포배양

한국세포주은행으로부터 분양받은 L929(Mouse-fibroblast)를 사용하였다. 10% FBS(fetal bovine serum) RPMI 1640을 배지로 사용하였고, petri-dish에 cell suspension(1×10^6 cells/ml)을 분주한 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에 배양하여 petri-dish의 면적에 80% 이상이 되도록 배양하였다.

3) 한천중층시험

시험 시작 전에 세포의 배양상태를 현미경으로 확인한 후 배양액을 제거하였다. 10% FBS가 포함된 2배 농도의 RPMI 1640와 3% Agar 용액을 동량 혼합(RPMI 1640 (2X) : 3% Agar 5 : 5)하여 petri-dish당 약 10 ml를 부었다. Agar와 배지의 혼합액이 굳으면, DPBS(Dulbecco's phosphate buffer solution)와 Neutral Red 혼합액(99.7 : 0.3)을 0.22 µm Filter로 거른 후, petri-dish당 약 10 ml 정도 주입하였다. 은박지로 petri-dish를 밀폐한 상태로 20분 정도 항온기(37°C)에서 보관하여 염색하였다. 염색 여부를 확인한 후 염색액을 제거하고, DPBS로 세척하여 잔류 염색액을 완전히 제거하였다.

한천 위에 양성대조군, 음성대조군 및 시험군 시편을 조심스럽게 위치시킨 후, 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 각 시험군당 4개씩의 petri-dish를 사용하였다. 24시간 후 백색 종이 위에 petri-dish를 올려놓고 Table 2에 따라, 염색이 사라진 탈색부위를 측정

하여 탈색지수(decolorization index)를 측정하였고, Table 3에 따라 탈색된 부위 세포의 용해정도를 현미경으로 관찰하여 용해지수(lysis index)를 측정하였다. 4개 측정값의 중앙값을 구한 후, 각각의 세포반응(cell response)을 기록하고 Table 4에 따라 세포독성을 해석하였다.

Table 2. Decolorization index

Decolorization index	Description
0	No decolorization detectable
1	Decolorization only under the test substance
2	Decolorization decolorization not greater than 5.0 mm from the test substance
3	Decolorization decolorization not greater than 10.0 mm from the test substance
4	Decolorization decolorization greater than 10.0 mm from the test substance
5	The total culture is decolorized

Table 3. Lysis index

Lysis index	Description of decolorization zone
0	No cell lysis detectable
1	Less than 20% cell lysis
2	20% to 40% cell lysis
3	>40% to <60% cell lysis
4	60% to 80% cell lysis
5	More than 80% cell lysis

Table 4. Cell response and cytotoxicity

Scale	Cell response	Interpretation
0	0	Noncytotoxic
1	1	Mildly cytotoxic
2	2 ~ 3	Moderately cytotoxic
3	4 ~ 5	Severely cytotoxic

graded separately for decolorization index and lysis index

결과

Guttapercha point, 원료물질로서의 isoprene, 산화아연, 양성대조군, 음성대조군의 탈색지수, 용해지수 및 세포반응도는 Table 5와 같았고 그 양상은 Figure. 1, 2와 같았다.

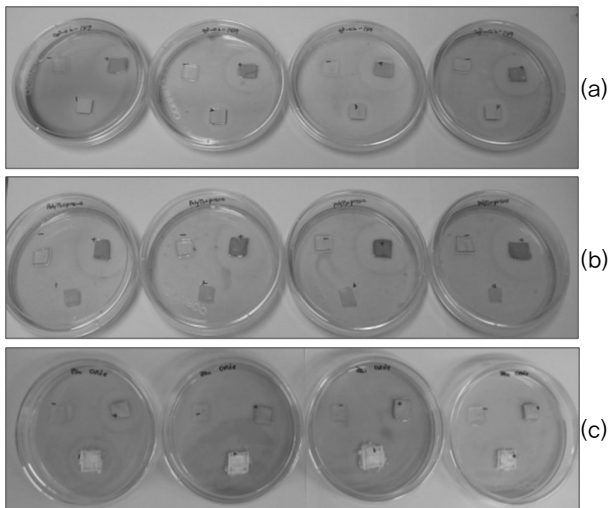


Figure 1. Decolorization results of agar overlay cytotoxicity test; negative control, positive control and test specimen(clockwise from left up to mid down); (a) guttapercha point; (b) polyisoprene; (c) zinc oxide.

따라서 Table 5에 따르면 원료물질인 polyisoprene과 음성대조군은 non cytotoxic이고, 원료물질인 산화아연과 양성대조군은 severely cytotoxic이었으며, 근관 충전용 가타퍼차 포인트는 moderately cytotoxic을 보였다.

Table 5. Results of agar overlay test

Group	decolorization index	lysis index	cell response
Guttapercha point	2	4	2/4
Raw materials polyisoprene	0	0	0/0
zinc oxide	4	5	4/5
Control (+)	4	5	4/5
(-)	0	0	0/0

총괄 및 고찰

가타퍼차는 폴리이소프렌(polyisoprene) 중합체의 총칭으로 시스-1,4결합과 트랜스-1,4결합한 중합체가 주체이다. 다른 종류로는 1,2결합과 3,4결합의 중합체가 있다. 헤비어브라질리엔시스(Heveabrsiliensis)라는 고무나무의 분비물로부터 얻은 천연고무의 주요 성분은 시스-1,4-폴리이소프렌이고, 발라타(Balata)와 구타(Gutta) 나무의 분비물에서 얻은 구타페르카라는 고무는 트랜스-1,4-폴리이소프렌이 주요 성분이다. 이 시스와 트랜스의 상위(相違)는 그 물성에도 영향을 미치는데 천연고무는

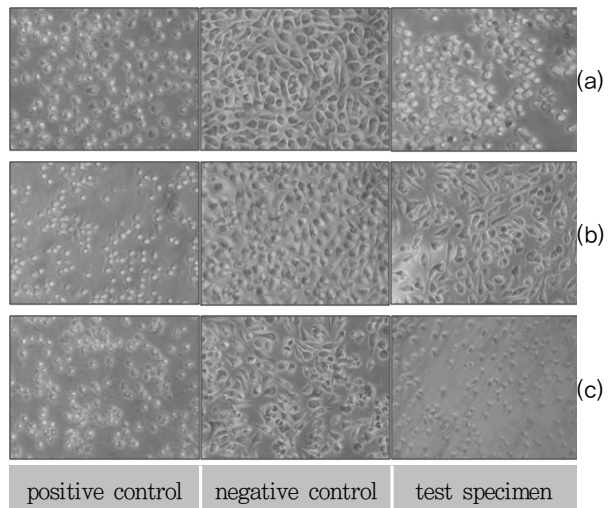


Figure 2. Lysis results of agar overlay cytotoxicity test: (a) guttapercha point; (b) polyisoprene; (c) zinc oxide.

매우 큰 고무탄성을 가지고 있는 반면 구타페르카(가타퍼차)는 탄성을 가지고 있지 않다. 찌꺼리형 촉매 또는 알킬리튬을 사용하는 용액중합으로는 시스형이 합성되고, 양이온중합으로는 트랜스형이 합성된다. 시스와 트랜스의 1,4-폴리이소프렌을 화학적으로 합성할 수도 있다. 갈색~적갈색의 덩어리로, 25~30℃에서 부드럽게 되고 100℃에서 분해를 시작한다. 검(gum)의 기본 원료로 사용된다.

산화아연(zinc oxide)은 산소와 아연의 화합물로서, 분자량은 81.4이고, 녹는점은 가압하에서 1,975℃이다. 천연에서는 홍아연석으로 산출되고, 옥살산아연 (ZnCO)를 400℃에서 열분해하거나 염기성탄산아연(ZnCO · 3Zn(OH))을 열분해하여 만든다. 공업적으로는 금속아연을 연소시켜서 만든다. 순수한 것은 상온에서 무색의 결정(홍아연석은 육방정계) 또는 분말이다. 백색 안료로서 페인트·그림물감 등으로 사용되고, 시멘트·에나멜·유탁(乳濁) 유리 등의 원료로 사용되기도 하며, 고무충전제 등에도 사용된다. 입자가 고운 상질(上質)의 것은 의약품·화장품·치과충전제로서 이용되고 있다. 특히 치과재료로서 다양한 분야에서 사용되며, 전통적으로 치과용 시멘트의 주원료로 사용되어 왔다.

1960년대에 이르러 치과재료의 생물학적 특성에 대한 중요성을 소개하면서, 치과재료의 생물학적 특성은 재료 평가에 필수적인 부분으로 점차 인식되기 시작하였다(Ryge, 1961). 그에 따라 구강 내에서 나타날 수 있는 생물학적 반응을 검사하는 시험방법에 대한 연구가 활발해

졌는데, 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. 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.

대부분의 수복재는 구강 내에서 장기간 접촉하므로 임상적으로 발생할 수 있는 부작용을 미리 평가하는 것이 필요하다. 통상적으로 치과생체재료의 생체친화성 평가에는 실험동물의 매식반응을 알아보는 것이었는데 세포배양법이 발전함에 따라 대부분의 치과에도 응용되고 있으나 가장 효율적인 방법에 대해서는 아직도 이견이 있다. 세포수 산정 및 균체형성 관찰법, 크롬용출법 및 한천배지법 등을 이용하여 각종 치과용 시멘트의 세포반응을 관찰한 결과에서 와동내 상아질 층을 고려하면, 한천배지법이 가장 적절하고 감수성이 높은 방법이나 세포배양법의 무분별한 사용은 부정확한 판단이 있을 수 있다(Hensten-Pettersen, 1977). 세포독성을 세포의 생존 유무로 평가하는 것은 세포 내의 비가역적인 방법이지만, 세포의 생존이 아닌, 가역적이고 세포 손상 초기에 일어나는 변화를 평가하기 위하여서는 효소활성도 측정법을 이용해야 한다(Tyas MJ, 1988). 또한, 형태나 생존에 근거를 둔 평가는 실제 세포반응의 제한된 정보만을 제공하므로 세포 기능이나 대사에 근거를 둔 적합성 평가가 필요하다(Bumgardner, 1989).

실험재료의 유형은 독성효과를 크게 변화시킬 수 있으며 사용재료 형태대로 이용하는 것이 가장 바람직한 방법이라 할 수 있다(Spangberg, 1988). 세포배양법, 매식법, 치수검사법 등의 방법으로 치과용 시멘트와 콤포지트 레진에 대해 생체적합성을 비교하였는데 세포배양법은 충전재의 검사법으로는 부적당하며 세 가지 방법간의 상관성은 매우 적다(Mjor, 1977). 또한 1차, 2차 및 3차 시험검사에 의한 결과는 상관관계가 없다고 하였다(Craig, 2002).

본 실험에서 사용된 한천중층법은 한천을 통해 재료가 확산되기 때문에 재료의 독성뿐만 아니라 독성물질의 확

산도 평가가 가능하다(Mohammad 등, 1978). 세포배양을 이용한 세포독성 검사는 배양세포와 실험재료 간의 적절한 접촉이 중요하며 접촉면의 상호작용도 연구해야 한다. 대부분 치과생체재료는 비수용성이므로 시편을 세포나 세포배양액과 직접 접촉시키거나 이들 사이에 투과성 중간 매체를 넣고 간접 접촉시키는 방법이 연구되었다.

일반적으로 치근 충전용으로 사용하는 가타퍼차 포인트는 산화아연이 60.54%, 가타퍼치인 polyisoprene이 19.53%로 구성되어 있다. 산화아연은 심한 세포독성을 가지고 있기에 산화아연을 주성분으로 하는 가타퍼차 포인트 역시 중등도의 세포독성을 보였다. 그러나 산화아연은 심한 세포독성을 보임에도 불구하고 과거부터 치과재료로서 뿐만 아니라 일반 의료용 재료로서 널리 사용되어 왔다. 따라서 세포독성 시험만을 가지고, 재료의 사용을 제한하는 방향이 아닌, 생체 내 시험을 추가로 시행하여, 그 재료의 생체적합성을 평가하여야 할 것이다.

결론

근관용 충전용 가타퍼차 포인트는 중등도의 세포독성을 나타냈으며, 이는 주성분 가운데 polyisoprene이 세포독성을 보이지 않은 것으로 미루어 볼 때, 심한 세포독성을 보인 산화아연에 기인한 것으로 사료된다.

참고문헌

1. Bumgardner JD(1989). Toxicity of copper-based dental alloys in cell culture. *J Biomed Mater Res* 23(10):1103-14.
2. Bumgardner JD, Lucas LC(1995). Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys. *J Dent Res* 74:1521-7.
3. Craig RG(2002). Restorative dental materials. 11th ed. Mosby p.125-157
4. Craig RG, Hanks CT(1990). Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests. *J Dent Res* 69:1539-42.
5. Hensten-Pettersen A, Helgeland K(1977). Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand J Dent Res* 85(4):291-6.
6. ISO 7405(2008). Dentistry-Biological evaluation of medical devices used in dentistry, International Organization for Standards

7. Mjör(1977). Biologic evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture techniques, implantation tests and pulp studies. *Int Dent J* 2;27(2):124-9.
8. Mohammad AR, Mincer HH(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, Hensten-Petterse A(1985). In vitro cytotoxicity of Ag-Pd-Cu-based casting alloys. *J Biomedl Mater Res* 19:549-61.
10. Ryge(1961). Review of dental materials research. *J Am Dent Assoc* 62:519-26.
11. Spangberg(1988). The importance of material preparation for the expression of cytotoxicity during in vitro evaluation of biomaterials. *J Endod* 14(5):247-50
12. Tyas MJ(1988). Quantitative enzyme cytochemistry in the in vitro biocompatibility testing of dental materials. *Int Endod J* 21(2):106-12
13. Woody RD, Huget EF(1977). Apparent cytotoxicity of base metal casting alloys. *J Dent Res* 56:739-43.

