

치과재료의 피부 감작성 평가를 위한 용출 시험 및 용출물 분석

양송이¹, 이은정², 김광만², 권재성^{2,3*}

¹건양대학교 치위생학과

²연세대학교 치과생체재료공학교실 및 연구소

³연세대학교 BK21 창의치의학융합 교육연구단

Extraction Test and Extracts Analysis of Dental Materials Products for Skin Sensitization Test

Song-Yi Yang¹, Eun-Jung Lee^{1,2}, Kwang-Mahn Kim^{1,2}, Jae-Sung Kwon^{1,2,3*}

¹Department of Dental Hygiene, Konyang University, Daejeon, Republic of Korea

²Department and Research Institute of Dental Biomaterials and Bioengineering,
Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Republic of Korea

³BK21 FOUR Project, Yonsei University College of Dentistry, Seoul, Republic of Korea

ABSTRACT. Skin sensitization is important test of biological evaluation in dental materials, where it is one of the frequently carried out test along with cytotoxicity and irritation test. The preparations of test materials and both positive and negative control materials are very important factor during the process of the test, while the extraction process of these materials are also need to be considered as most of the dental materials are extracted for the use as the test materials in skin sensitization test. This research focused on preparation of positive and negative materials, and also the actual dental materials made from metal or ceramics. Prepared materials were then extracted in appropriate solvent, extract temperature and durations. Finally, extracted liquids were analyzed for appearance, pH and chemical components in the extracted chemical. It is expected that provision of such extract method for dental materials along with preparation method of positive and negative control materials and analyses of them, would be helpful to both manufacturer and reviewer. They will provide improvements for medical device safety control, which would then linked to improvements of competencies in evaluators as well as providing safety for public health as the system would enhance safety of primary consumer, medical professionals, as well as final consumer of public.

KEY WORDS: Dental materials, Skin sensitization, Extraction, Reference material

Received: 07 February 2022

Revised: 26 December 2022

Accepted: 26 December 2022

* Corresponding author: Jae-Sung Kwon
Department and Research Institute of Dental Biomaterials
and Bioengineering, Yonsei University College of Dentistry,
Seoul, 03722, Republic of Korea
Tel: +82-2-2228-3081
E-mail: jkwon@yuhs.ac

서론

의료기기는 인체에 직·간접적으로 접촉하여 단기간 혹은 장기간 동안 영향을 미치기 때문에 모든 잠재적 생물학적 위해 요소에 대하여 고려되어야 한다(Reeve and Baldrick, 2017). 이에 제조사 및 수입사들은 의료기기 제조 및 수입 품목허가를 위하여 ‘의료기기법’과 그에 따른 ‘의료기기법 시행령’ 및 ‘의료기기법 시행규칙’에 따라 제품에 대한 기술문서를 준비하고, 필요한 시험검사평가를 진행하도록 되어 있다. 더불어 인체에 접촉하는 의료기기의 안전성 확보를 위해서는 식품의약품안전처 고시 ‘의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격’에 기반한 시험 검사를 실시하여야 하고, 심사 기관 및 인·허가 기관은 해당 내용에 따라 심사 및 인·허가 업무를 수행한다(식품의약품안전처, 2020).

의료기기는 식품의약품안전처 고시 ‘의료기기 품목 및 품목별 등급에 관한 규정’에 따라 ‘(A) 기구·기계’, ‘(B) 의료용품’, ‘(C) 치과재료’, ‘(D) 체외진단용 시약’(2020년 5월 1일, 삭제됨), 그리고 ‘(E) 소프트웨어’로 분류되며(식품의약품안전처, 2021), 많은 수의 치과재료는 구강 내에서 반 영구적으로 점막 및 치아와 직접 접촉하여 사용되므로 생물학적 안전에 관한 평가에 있어서 신중을 가해야 한다.

구강 내 점막 또는 치아와 장기간 접촉하는 ‘표면접촉 의료기기’, 치아의 상아질과 접촉하는 ‘체내외연결 의료기기’, 치조골에 이식하여 적용하는 ‘이식 의료기기’는 이들의 생물학적 영향을 평가하기 위해 세포독성, 감작성, 자극성, 유전독성, 전신독성뿐 아니라 이식시험 등이 요구된다(식품의약품안전처, 2020; ISO 10993-1, 2018). 이 가운데 ‘의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격’에 소개된 ‘피부감작성시험 (skin sensitization test)’ 항목은 시험동물모델을 이용하여 의료기기 및 원자재 또는 이들의 용출물에 대한 접촉 감작성의 잠재성을 추정한다. 특히나 용출물에 대한 감작성 평가는 미량의 잠재적 용해물에 대한 노출이나 접촉 조차도 알레르기나 감각 반응으로 귀결될 수 있다고 보기 때문에 직접 혹은 간접적으로 접촉되는 모든 형태의 치과의료기기에 공통적으로 적용하고 있다(Syed et al., 2015; Wiltshire et al., 1996).

하지만 생물학적 영향을 평가하기 위해 실험을 당하는 시험동물모델에게는 극심한 물리적, 심리적 고통뿐 아니라 비인도적인 처우와 동물실험의 유효성에 대한 문제 제기 등으로 실험동물에 대한 윤리적 고려가 중요한 문제로 인식되고 있어 미국 및 유럽을 포함한 선

진국을 중심으로 불필요한 동물의 희생을 줄이거나 동물실험에 있어서 고등 동물보다는 고통을 적게 느낄 수 있는 대체 방법 연구가 활발히 진행되고 있다(Browne, 1994; Gerberick et al., 2005; Vinardell and Mitjans, 2008). 이러한 움직임은 화장품, 의약품 산업을 넘어 의료기기 분야까지 확대되었고, 특히나 의료기기에 대한 동물실험대체법의 필요성이 점차 중요한 사안으로 두각 되고 있다(De Jong et al., 2018). 현재 ‘ISO 10993-10 Biological evaluation of medical devices - Part 10: Tests for irritation and skin sensitization’에 대한 표준을 관리하는 국제표준 기술위원회(Technical Committee, TC) ISO/TC 194 Biological and clinical evaluation of medical devices의 Working group에서는 피부감작성 시험에 대한 동물대체시험법에 높은 관심을 보이고 있으며, 동물실험 없이 감작성을 평가할 수 있는 대체법 활성화를 지원하고 있다(ISO 10993-10, 2010).

한편 ISO TC 194/WG 11 (Allowable limits for leachable substances)에서는 의료기기로부터 용출되는 물질의 허용 한도를 결정하는 방법과 적합한 한도를 산정하여 용해물과 관련 있는 생물학적 위험 평가를 다룬다(ISO 10993-17, 2002). 의료기기는 임상적으로 사용되는 동안 위대한 용해물이 방출되어 인체에 손상을 줄 수 있는 가능성을 내포하기 때문에 노출 한도를 확립하여 의료기기에 대한 생물학적 위험 평가를 실시해야 한다. 어떠한 상황에서도 임상적으로 사용하기로 안전한 것으로 간주되기 위해서는 의료기기의 사용에서 유래되는 유익성과 위해 요소의 특성과 같은 다수의 인자들을 파악해야 하며, 이 가운데 용해물 평가를 위한 의료기기의 용출 조건은 임상적 사용 동안 발생할 수 있는 용출을 모방하거나 잠재적 위해성을 충분히 측정할 수 있는 타당한 조건을 사용할 수 있다. 따라서 용출 시간, 온도, 비율, 용출 매체 등의 조건과 영향을 신중하게 고려하여야 한다(ISO 10993-12, 2021). 그러나 금속 및 세라믹을 포함한 치과재료의 피부감작성시험을 위한 의료기기의 용출법은 매우 다양하며, 현재 각 소재에 적합한 용매, 용출 온도, 용출 시간 등의 조건 설정과 구성 성분 분석에 대한 전문적인 연구는 부족한 실정이다.

따라서 본 연구의 목적은 치과재료 중 구강 점막 및 치아에 장기간으로 다빈도 또는 지속 접촉할 수 있는 대표적인 품목과 음성 및 양성 대조 후보 물질을 선택하여 용출 시험 및 용출액 분석을 진행하고, 용출액을 구성하는 화학 물질의 정보를 바탕으로 생물학적 독성을 정량 및 정성적으로 분석하여 추후 치과재료의 피

부감작성시험 동물대체시험법 기반 마련을 위한 기초 자료를 제공함에 있다.

재료 및 방법

1. 연구 재료

본 연구에서는 구강 내 조직에 표면 접촉 및 이식하여 사용하는 대표적인 치과재료 6종(치과주조용귀금속합금, 메탈세라믹용귀금속합금, 절삭가공용치과도재, 교정용금속브라켓, 치과용임플란트고정체, 치과용어태치먼트)과 의료기기의 생물학적 안전성 평가 시 음성 대조군 후보로 고려되는 폴리에틸렌(polyethylene) 및 알루미늄(alumina) 재질의 물질을 선택하였다. 더불어 유지놀이(eugenol)이 포함된 치과용 시멘트와 니켈(nickel)이 포함된 합금도 양성 후보 물질로서 선택하였다(Table 1).

2. 연구방법

1) 시편준비

6종의 대표적인 치과재료(치과주조용귀금속합금, 메탈세라믹용귀금속합금, 절삭가공용치과도재, 교정용금속브라켓, 치과용임플란트고정체, 치과용어태치먼트) 시편을 준비하기 위해 저울을 이용하여 각 제품의 무게를 측정하였다. 이때 절삭가공용치과도재의 경우, 제조사의 지시 사항에 따라 1550°C에서 소결 후 소결된 시편의 무게를 측정하였다.

양성 및 음성 대조군의 후보 물질로 고려되는 재료 중 Nickel 201 sheet, Polyethylene sheet 및 알루미늄 재질의 물질은 가로 10 mm, 세로 10 mm, 두께

0.5 mm 이하의 정사각형 형태로 준비하여 시편의 표면적을 계산하였고, 유지놀이 포함된 치과용 시멘트는 분말과 액을 1:2의 비율로 개량 후 플라스틱 스파툴라를 이용하여 균일한 혼합물이 될 때까지 혼합하였다. 그리고 폴리에스터 필름으로 덮인 슬라이드 글라스에 테플론 소재의 몰드를 올린 뒤 혼합된 재료를 지름 10 mm, 깊이 1 mm 몰드 안에 채운 후, 폴리에스터 필름과 슬라이드 글라스로 덮고 클램프를 이용하여 조여 주었다. 중합이 완료된 시편은 몰드로부터 분리 후 무게를 계산하였다.

2) 용출

준비된 시편을 용출하기 위하여 극성 용출 용매로는 생리식염수(JW Pharmaceutical Co., Korea)를, 비극성 용출 용매로는 acetone (SIGMA-ALDRICH Co., MO, USA)과 olive oil (SIGMA-ALDRICH Co., MO, USA)을 4:1의 부피비로 혼합한 혼합물로 준비하였다.

이후 치과주조용귀금속합금, 메탈세라믹용귀금속합금, 절삭가공용치과도재, 교정용금속브라켓, 치과용임플란트고정체, 치과용어태치먼트 시편은 0.2 g/mL의 비율로 고압멸균기(Autoclave 40L, Sejong Plus, Korea)를 이용해 (121 ± 1)°C에서 (1 ± 0.1) 시간 동안 용출을 시행하였고, Nickel 201 sheet, 알루미늄 재질의 시편은 6 cm²/mL의 비율로 (121 ± 1)°C에서 (1 ± 0.1) 시간 동안 용출을 시행하였다. Polyethylene sheet 시편은 6 cm²/mL의 비율로 (37 ± 1)°C에서 (72 ± 2) 시간 동안 용출을 시행하였고, 유지놀이 포함된 치과용 시멘트 시편은 0.2 g/mL의 비율로 (37 ± 1)°C에서 (72 ± 2) 시간 동안 용출을 시행하였다. 이와 함께 치과재료, 그리고 양성 및 양성 후보 물질이 포함되어 있지 않은 극성 및 비극성 용매에 대하여도

Table 1. Test materials used in this study

Classification	Code	Test material	Brand name and manufacturer
Dental materials	A	Precious metal for casting alloy	UnitG-80, Unident, Korea
	B	Noble metal alloys for metal-ceramic restorations	V-classic, Cendres+Metaux SA, Switzerland
	C	Milling ceramic block	Rainbow high shine, 9810A2, Dentium, Korea
	D	Orthodontic metal bracket	Yes Bracket, Hubit, Korea
	E	Dental implant fixture	AnyRidge, Megagen Implant, Korea
	F	Dental attachment	MAGFIT, Aichi Steel, Japan
Negative control materials	G	High density polyethylene sheet	-
	H	Alumina disk	-
Positive control materials	I	Zinc oxide-eugenol cement	IRM, Dentsply, USA
	J	Nickel 201 sheet	-

동일한 조건을 가하여 공시험액(blank)을 준비하였다.

3) 용출액 분석

6종의 치과재료, 음성 및 양성 후보 물질 시편에 대한 용출액을 평가하기 위하여 이물질이나 불순물의 여부를 육안으로 관찰하였고, 디지털 pH 측정기(pH meter, Orion 4 star, Thermo Fisher Scientific Inc., Singapore)를 이용하여 용출 전과 후의 pH를 측정하였다.

이후 본 연구에 사용된 6종의 치과재료, 음성 및 양성 후보 물질 등의 특성을 고려하여 용출액의 성분 분석을 진행하였다. 금속 및 기타 이온의 방출을 예상할 수 있는 물질의 경우에는 Inductively Coupled Plasma - Mass Spectrometer (ICP-MS 7900, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)를 사용하여 해당 금속 및 기타 이온의 정량적/정성적 평가를 진행하였고, 고분자 및 기타 화학 물질의 용출이 예상되는 물질의 경우에는 Gas Chromatography - Mass Spectrometer (GC-MS 7890B-5977A, Agilent Technologies, Santa Clara, California, USA)를 이용하여 용출액의 정량적/정성적 평가를 진행하였다.

결과

1. 육안평가

Figure 1은 6종의 치과재료, 음성 및 양성 후보 물질의 극성 및 비극성 용출물에 대한 성상 관찰 이미지로, 유지놀이 포함된 치과용 시멘트의 비극성 용출물에서 용출액의 색이 탁해지고 부유물이 존재하는 것을 확인할 수 있었다. 반면, 유지놀이 포함된 치과용 시멘트의 비극성 용출물을 제외한 모든 시편의 극성 및 비극성 용출액은 색이 변하였거나 부유물이 존재하지 않았다.

2. 용출물의 pH 평가

극성 용매로 사용된 생리식염수의 용출 전 pH는 5.22로서 약산성의 pH를 보였으나, 치과재료 시편과 동일한 용출 조건을 가한 공시험액의 pH는 7.16으로 용출 전 대비 상승된 pH 값을 나타내었다(Table 2). 그리고 치과재료 시편을 각각의 용출 조건에 따라 용출 후 pH를 측정된 결과, 치과구조용귀금속합금 시편에 대한 극성 용출물의 pH는 7.16, 메탈세라믹용귀금속합금 시편에 대한 극성 용출물의 pH는 7.43, 절삭

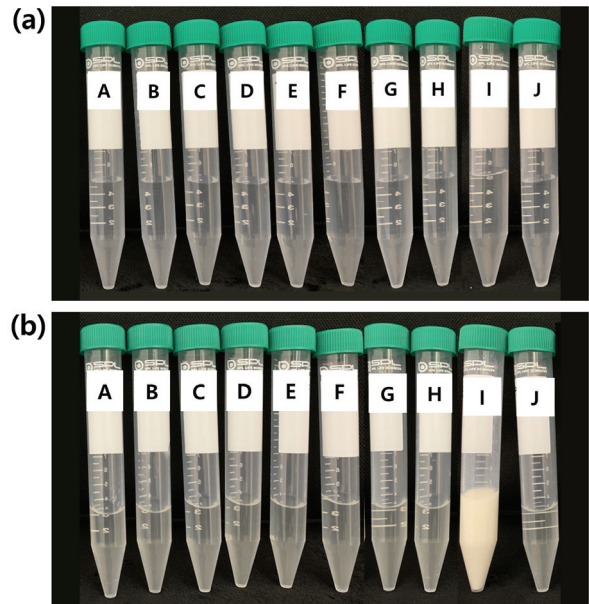


Fig. 1. Appearance of polar (a) and non-polar (b) extracts for test specimens

가공용치과도재 시편에 대한 극성 용출물의 pH는 7.14, 교정용금속브라켓 시편에 대한 극성 용출물의 pH는 8.15, 치과용임플란트고정체 시편에 대한 극성 용출물의 pH는 7.51, 치과용어태치먼트 시편에 대한 극성 용출물의 pH는 7.53으로 모든 시편에 대한 극성 용출물의 pH는 7에 가까운 중성을 나타내었다.

음성 및 양성 후보 물질의 극성 용출물에 대한 pH를 측정된 결과, high density polyethylene sheet 시편에 대한 극성 용출물의 pH는 6.84, 알루미늄 시편에 대한 극성 용출물의 pH는 7.82, 유지놀이 포함된 치과용 시멘트 시편에 대한 극성 용출물의 pH는 6.89, 그리고 Nickel 201 sheet 시편에 대한 극성 용출물의 pH는 7.00으로 측정되었다.

반면, 치과재료의 비극성 용출액, 비극성 용매의 공시험액, 음성 및 양성 후보 물질의 비극성 용출액에 대한 pH는 본 연구에서 사용된 pH 측정기로 측정이 불가능 하였다.

3. 용출물 내 성분분석

ICP-MS와 GC-MS 장비를 이용하여 6종의 치과재료, 음성 및 양성 후보 물질 시편에 대한 용출액 성분을 분석한 결과 Table 3과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

Table 2. pH results of extracts solution

		Code	Polar solution	Non-polar solution
Before extraction		-	5.22	Not detected
Blank		-	7.16	Not detected
After extraction	Dental materials	A	7.16	Not detected
		B	7.43	Not detected
		C	7.14	Not detected
		D	8.15	Not detected
		E	7.51	Not detected
		F	7.53	Not detected
	Negative control materials	G	6.84	Not detected
		H	7.82	Not detected
	Positive control materials	I	6.89	Not detected
		J	7.09	Not detected

Table 3. Extracts analysis of dental materials

(Unit: µg/L)

Code	A		B		C		D		E		F	
	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP	P	NP
Extraction vehicle												
B	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	6783.512	2624.604
Si	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	15828.985	6642.561
Ti	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	84.731	127.636	ND	ND
Cr	ND	ND	ND	ND	ND	ND	19.056	17.437	ND	ND	37.078	31.197
Mn	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	322.970	172.487
Fe	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1546.220	721.630
Co	ND	ND	ND	ND	ND	ND	22.660	6.782	ND	ND	8.738	19.457
Ni	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.164	4.380	ND	ND	111.591	23.044
Cu	ND	ND	27.764	130.884	ND	ND	163.439	222.865	ND	ND	ND	ND
Zn	ND	ND	294.306	253.122	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Zr	ND	ND	ND	ND	15.603	12.090	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Mo	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.315	6.987	ND	ND	2.320	3.212
Ru	ND	ND	0.575	0.487	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Pd	ND	ND	5.100	4.896	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Ag	0.190	14.203	1.432	0.735	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
In	ND	ND	17.373	14.881	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Sn	ND	ND	13.406	35.410	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Nd	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.561	0.939
Dy	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.085	0.009
Ir	ND	ND	2.122	1.239	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Au	31.648	57.177	19.070	8.379	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

P: Polar; NP: Non-polar, ND: Not detected

1) 치과주조용귀금속합금

치과주조용귀금속합금을 용출한 결과, 극성 및 비극성 용출액 모두에서 Au가 Ag보다 많은 양이 용출되었다. 극성용매에서 용출한 용출액의 경우 Au의 농도가 31.648 µg/L, Ag의 농도가 0.190 µg/L로 검출되었다. 비극성용매에서 용출한 용출액의 경우 Au의 농도가 57.177 µg/L, Ag의 경우 14.203 µg/L로 극성 용매에 용출된 농도보다 높은 양상을 나타내었다.

2) 메탈세라믹용귀금속합금

메탈세라믹용귀금속합금을 용출한 결과, 극성 용출액에서 Zn (294.306 µg/L) > Cu (27.764 µg/L) > Au (19.070 µg/L) > In (17.373 µg/L) > Sn (13.406 µg/L) > Pd (5.100 µg/L) > Ir (2.122 µg/L) > Ag (1.432 µg/L) > Ru (0.575 µg/L) 순의 농도로 검출되었고, 비극성 용출액에서는 Zn (253.122 µg/L) > Cu (130.884 µg/L) > Sn (35.410 µg/L) > In (14.881 µg/L) > Au (8.379 µg/L) > Pd (4.896 µg/L) > Ir (1.239 µg/L) > Ag (0.735 µg/L) > Ru (0.487 µg/L) 순의 농도로 검출되었다.

3) 절삭가공용치과도재

절삭가공용치과도재를 용출한 결과, 극성 및 비극성 용출액 모두에서 Zr이 검출되었고, 극성 용출액에서 검출된 Zr의 농도는 15.603 µg/L, 비극성 용출액에서 검출된 Zr의 농도는 12.090 µg/L로 비슷한 수준의 농도가 검출되었다.

4) 교정용금속브라켓

교정용금속브라켓을 용출한 결과, 극성 용매에서 용출한 용출액의 경우 각 물질의 농도는 Cu (163.439 µg/L) > Co (22.660 µg/L) > Cr (19.056 µg/L) > Ni (4.164 µg/L) > Mo (3.315 µg/L) 순의 농도로 검출되었고, 비극성용매에서 용출한 용출액의 경우 Cu (222.865 µg/L) > Cr (17.437 µg/L) > Co (6.782 µg/L) > Mo (6.987 µg/L) > Ni (4.380 µg/L) 순의 농도로 검출되었다.

5) 치과용임플란트고정체

치과용임플란트고정체를 용출한 결과, 극성 및 비극성 용출액 모두에서 Ti가 검출되었고, 극성 용출액의 경우 Ti의 농도는 84.731 µg/L, 비극성 용출액의 경우 127.636 µg/L의 농도가 검출되었다.

6) 치과용어태치먼트

치과용어태치먼트를 용출한 결과, 극성 용출액에서 Si (15828.985 µg/L) > B (6783.512 µg/L) > Fe (1546.220 µg/L) > Mn (322.970 µg/L) > Ni (111.591 µg/L) > Cr (37.078 µg/L) > Co (8.738 µg/L) > Mo (2.320 µg/L) > Nd (0.561 µg/L) > Dy (0.085 µg/L) 순으로 검출되었고, 비극성 용출액의 경우 Si (6642.561 µg/L) > B (2624.604 µg/L) > Fe (721.630 µg/L) > Mn (172.487 µg/L) > Cr (31.197 µg/L) > Ni (23.044 µg/L) > Co (19.457 µg/L) > Mo (3.212 µg/L) > Nd (0.939 µg/L) > Dy (0.009 µg/L) 순으로 검출되었다.

7) Zinc oxide-eugenol cement

유지놀이 포함된 치과용 시멘트를 용출한 결과, 극성 용출액 내 유지놀의 농도는 437.33 µg/mL, 비극성 용출액 내 유지놀의 농도는 26921.69 µg/mL로서 비극성용매에서 더 많은 유지놀의 농도가 측정되었다.

8) Nickel 201 sheet

Nickel 201 sheet를 용출한 결과, 극성 용출액 내 Ni는 614.326 µg/mL, 비극성 용출액 내 Ni는 145.622 µg/mL로서 극성용매에서 용출한 용출액이 비극성용매에서 용출한 용출액보다 약 3.8배 더 높게 측정되었다.

토의

치과재료를 포함한 모든 의료기기에 동물대체시험법을 적용하기 위해서는 시험시스템이 제대로 작동하고 있다는 것을 입증할 수 있는 음성 및 양성 대조군과 함께 완제품의 대표적인 검체 또는 완제품과 동일한 방식으로 처리된 원자재 및 이들의 용출물에 대한 시험이 필요하다(Coleman et al., 2018; Petersen et al., 2021). 이때 용출 조건은 완제품의 특성 및 시험 목적에 적합한 것이어야 하고, 여러 면에서 제품의 사용 조건을 적절하게 과장할 수 있는 표준화된 방법에 준하여 수행되어야 한다(식품의약품안전처, 2020). 피부감작성시험은 치과재료의 생물학적 안전성을 평가하기 위해 세포독성 및 자극성시험과 함께 빈번하게 고려되는 시험 평가 항목 중 하나이다. 피부감작성시험을 진행함에 있어 치과재료의 시험물질 제작 방법과 양성 및 음성 대조군의 형태는 매우 중요한 요소이며, 대부분의 치과재료는 용출 과정을 통해 얻은 용출물을 생물학적 안전성 평가의 시험물질로 사용하기 때문에

용출법 확립에 대한 고려가 필요하다. 이에 본 연구에서는 치과재료 중 구강 점막 및 치아에 지속 접촉할 수 있는 대표적인 품목과 양성 및 음성 대조군 후보 물질을 선택하여 용출 시험 및 용출액 분석을 진행하고, 용출액을 구성하는 화학 물질의 정보를 바탕으로 생물학적 독성을 정량 및 정성적으로 분석하여 추후 치과재료에 대한 피부감작성시험의 동물대체시험법 기반 마련을 위한 기초 자료를 제공하고자 하였다.

본 연구에서는 OECD 가이드라인에서 제시된 감작성 물질, 국제표준 'ISO 10993-12 Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials' 및 '의료기기 생물학적 안전에 관한 공통기준규격 - 제11장 검체 준비와 표준물질'의 내용을 바탕으로 양성 및 음성 대조군 후보 물질을 탐색하였다. 해당 가이드라인, 표준, 공통기준규격에서는 감작성 평가에 필요한 양성 및 음성 대조물질에 대하여 제시하고 있지 않기 때문에 세포독성 시험 및 이식시험의 음성 대조군인 polyethylene과 alumina 재질의 물질을 피부감작성시험의 음성 대조군 후보 물질로 선정하였다. 양성 대조군 후보 물질로는 감작성을 유발한다고 알려진 치과재료 가운데 유지놀 및 니켈 성분이 함유된 재료를 피부감작성시험의 동물대체시험법 기반 마련을 위한 대조 물질을 선정하였다(Wiltshire et al., 1996).

이후 선정된 재료의 용출 결과에 영향을 미칠 수 있는 요소로서 용출 시간, 온도, 비율, 용매, 원자재의 상평형 등을 고려하였고, 구강 점막 및 치아에 장기간으로 다빈도 또는 지속 접촉할 수 있는 대표적인 치과재료들에 대한 용출 방법을 선정하였다. 이러한 재료들의 용출 방법은 주변 조건에 의해 화학적 변화가 일어나지 않으면서 용출 시간을 단축할 수 있는 조건을 탐색하였고, 본 연구에 사용되는 치과재료 소재는 금속 또는 세라믹 소재로서 제품의 용해 온도가 모두 1,000°C 이상이며, 121°C의 고압 환경에서 용해되거나 화학적 변화를 일으킬 가능성이 매우 낮으므로 (121 ± 1)°C 에서 (1 ± 0.1) 시간 동안 용출하는 방법을 선정하여 진행하였다. 또한 양성 대조군 후보물질 중 니켈이 포함된 합금과 음성 대조군 후보 물질인 알루미늄 재료의 경우 고온에서 안정성이 높아 (121 ± 1)°C 에서 (1 ± 0.1) 시간 동안 용출하는 방법을 선택하였다. 반면 고온에서 안정성이 떨어지는 것으로 알려진 유지놀이 포함된 치과용 시멘트와 음성 대조군 후보 물질인 폴리에틸렌 재질의 물질은 (37 ± 1)°C 에서 (72 ± 2) 시간 동안 용출을 진행하였다. 용출 용매의 선정에는 가이드라인, 표준, 공통기준규격에

따라, 극성 용매로는 polarity가 높고 생체 용액과 유사한 생리식염수를, 비극성 용매로는 acetone : olive oil (4:1 v/v)를 선정하였다. 용출 비율은 국제표준 'ISO 10993-12 Biological evaluation of medical devices - Part 12: Sample preparation and reference materials'와 국내 기준규격 '의료기기 생물학적 안전에 관한 공통기준규격 - 제11장 검체 준비와 표준물질'에서 명시한 내용에 따라, 정형화 되어 있는 물질의 경우 두께를 측정하고 표면적을 계산하여 용출을 진행하였고, 비정형화되어 있거나 표면적의 계산이 힘든 물질의 경우는 무게비로 용출을 진행하였다.

모든 실험 재료에 대한 극성 용출액에서는 이물질과 불순물 등이 관찰되지 않았고, pH 결과값은 중성에 가까웠으며, 이는 'ISO 10993-10 Biological evaluation of medical devices - Part 10: Test for irritation and skin sensitization'에서 제시하는 생물학적 시험 제외 조건(재료의 pH가 11.5 이상 또는 2.0 이하의 경우 시험을 하지 않도록 권고)에 해당하지 않으므로 본 연구에서 사용된 용출물은 안전성 평가를 하는데 적합한 근거자료가 될 수 있다. 한편, 비극성 용매로 용출한 양성 대조 후보 물질, 음성 대조 후보 물질 및 시험 물질의 용출액은 화학적 특성상 본 연구에서 사용된 pH 측정기로 측정이 불가하였다.

치과에서는 유지놀을 산화아연 성분과의 경화 반응을 바탕으로 무치약의 인상, 교합인기 페이스트, 임시 충전재료, 근관 충전 그리고 합착 등 광범위하게 적용된다(Sarrami et al., 2002). 현재까지 유지놀이 포함된 치과재료는 사고 없이 임상에서 사용되어오고 있지만, 일부 유지놀에 민감한 환자에게 적용할 경우 낮은 등급의 국소 반응부터 드물지만 심각한 과민 반응까지도 유발할 수 있어 생체 친화적인 물질로 분류하지 않는다(Sarrami et al., 2002). 이에 양성 대조군 후보 물질인 유지놀이 포함된 치과용 시멘트를 비극성용매에서 용출한 결과, 감작물질(sensitizer)로 알려진 유지놀 성분은 극성용매보다 비극성용매에서 더 많은 양이 용출된 것을 확인할 수 있었다. 2014년 권 등의 연구에 따르면, 산화아연비유지놀시멘트의 경우 산화아연유지놀시멘트에 비하여 낮은 세포독성을 보였다고 하였다. 또한 배양 기간이 증가한 경우 세포독성은 빠르게 감소하여 최종적으로는 독성을 보이지 않는 것으로 보고되고 있다(Kwon et al., 2014). 또다른 선행 연구에서는 2종의 산화아연유지놀시멘트로 연구를 진행하였고, 이들은 2 g의 시멘트(지름 20 mm, 두께 1 mm)를 24시간 동안 증류수에 침적시켜 관찰

한 바 0.57%의 용해도를 보였으며, 분말과 액의 혼합 비율에 따라 최소 0.05%까지 감소하였다(Camps et al., 2004). 이에 상기 문헌에서 접착용 시멘트는 각 성분이 단독으로 사용되지 않고 경화된 형태로 구강 내에 존재하게 되므로 완전히 경화된 상태에서는 용해도가 감소하게 된다고 보고하였다. 본 연구에서 사용된 산화아연유지늘시멘트로부터 3일 동안 0.2 g/mL의 비율로 용출한 결과, 극성 용매와 비극성 용매에서 각각 437.33 µg/mL, 26921.69 µg/mL의 유지늘 성분이 검출되었다. European Chemicals Agency (ECHA)에서는 유지늘 성분의 잠재적 피부 감작성 유발 농도를 10.0% 이상으로 간주하고 있었고, 본 연구에서 검출된 유지늘의 농도는 감작 유발 농도와 비교하여 안전역에 속하므로 해당 용출물로 감작성 평가를 진행할 경우, 어떠한 위해도 보일 수 없을 것으로 추측된다. 따라서 양성 대조물질로서 유지늘이 포함된 치과용 시멘트를 적용할 시에는 고농도의 유지늘 성분이 용출될 수 있는 조건을 고려하여 피부감작성시험 동물대체시험법의 양성대조물질로 활용해야 할 것이다.

니켈은 가철성 국소의치, 고정성 국소의치, 금관 및 일부 교정장치에 사용되는 치과용 합금의 성분으로 알레르기 유발이 가장 높은 금속으로 알려져 있다(Setcos et al., 2006). 본 연구에서 사용된 양성 대조군 후보 물질인 니켈이 포함된 합금을 용출한 결과, 극성 용매와 비극성 용매에서 각각 666.589 µg/L, 173.966 µg/L의 니켈 성분이 검출되었다. 선행 조사에 따르면, 정상인의 니켈 일일섭취량은 3.6 µg/kg/day 내지 6.86 µg/kg/day이다. 또한 니켈이 사람에게 압을 일으키지 않는 일일섭취허용량은 20 µg/kg/day 이하로 보고하고 있다. 이에 본 연구에서 검출된 니켈의 농도는 안전 기준량과 비교하여 위험역에 속하므로 양성 대조물질로서 니켈이 포함된 금속의 용출물 조건을 고려하여 피부감작성시험에 대한 동물대체시험법의 양성 대조 물질로 활용할 수 있을 것으로 사료된다.

본 연구에서 사용된 치과주조용귀금속합금은 제조사에서 Au (gold)와 Ag (silver) 성분을 포함하고 있음을 명시하였고, 해당 제품에 대한 용출물을 분석한 결과 극성 및 비극성 용출액 모두에서 Au가 Ag보다 많은 농도로 검출되었다. 현재까지 Au와 Ag로 인한 감작성 보고는 없었고, Piao 등의 연구에서는 랫드의 간세포에 고용량의 Ag를 적용하였을 경우 비정기적인 DNA 합성이 유발되었다고 보고하였다(Piao et al., 2011). 하지만 해당 연구에서 적용된 Ag 농도와 비교하여, 본 연구 결과에서 도출된 Ag의 농도는 독성 용

량과 비교하여 극히 미량에 해당하므로 생물학적 안전성에 영향을 미치지 않을 것으로 사료된다.

본 연구에서 사용된 치과재료 가운데 메탈세라믹용 귀금속합금은 제조사에서 Zn (zinc), Cu (copper), Au (gold), In (indium), Sn (stannum), Pd (palladium), Ir (iridium), Ag (silver) 등을 포함하고 있음을 명시하였으며, 용출물을 분석한 결과 극성 및 비극성 용출액 모두에서 Zn이 높게 기록되었다. 선행들의 문헌을 검색한 결과, Zn에 대한 감작성 보고는 없었고, 16세의 소년이 이틀 넘게 Zn 원소를 12 g 섭취한 후 졸음, 어지러움, 글씨를 쉽게 읽지 못하였다는 증상이 보고되었다(Murphy, 1970). 하지만 해당 연구에서 적용된 Zn 농도와 비교하여, 본 연구 결과에서 확인된 Zn의 농도는 매우 극미량으로서 인체에 위해 반응을 일으키지 않을 것으로 사료된다. 더불어 비극성용매를 사용한 용출액에서 Cu의 농도가 극성용매를 사용한 용출액보다 높았다. Cu의 경우에도 기존에 감작성에 대한 보고는 없었다. 따라서 본 연구재료에서 용출된 Cu의 농도는 매우 극미량으로서 인체의 알러지 반응에 유의미한 영향을 끼치지 않을 것으로 사료된다.

본 연구에 사용된 치과용절삭가공용도재는 제조사에서 지르코늄(Zr)이 고함량(99 wt.%)으로 포함되어 있다고 명시한 제품으로, 해당 물질로부터 용출된 Zr 농도를 측정된 결과, 극성 용매에서 용출한 용출액의 경우 Zr이 15.603 ppb, 비극성용매에서 용출한 용출액의 경우 12.090 ppb의 농도가 검출되었다. 치과용 지르코니아는 이온결합과 공유결합의 강한 원자간 결합으로 이루어져 있다. 또한 금속과 다르게 높은 내열성, 불활성, 경도 등의 일반적인 특성을 지니고 있고, 화학적 내구성이 높아 구강 내에서 금속 또는 폴리머에 비하여 안정성이 높다(Maccauro et al., 2011). 따라서 본 치과용절삭가공용도재 용출물 결과에서는 제품 내 Zr 함량 대비 매우 미량의 Zr 농도만이 용출됨을 확인할 수 있었다.

교정용 금속 브라켓은 제조사에서 Cu (copper), Cr (chromium), Co (cobalt), Ni (nickel), Mo (molybdenum)를 포함하고 있다고 명시한 제품으로, 해당 제품의 용출액에 대한 성분을 분석한 결과, 비극성용매에서 용출한 용출액에서 극성용매에서 용출한 용출액보다 Cu의 농도가 약간 높게 나타났다. 그러나 본 연구재료에서 용출된 Cu의 농도는 매우 극미량으로서 인체의 알러지 반응에는 유의미한 영향을 끼치지 않을 것으로 사료된다. 더불어 Co의 경우 극성용매에서 용출한 용출액에서 비극성 용출액 내 농도 보다 높은 농도가 검

출되었다. Co의 감작성에 대한 보고는 없었으나 De Boeck 등의 연구에 따르면 Co는 인간 백혈구에서 DNA 손상을 시킨다는 결과를 보고하였다(De Boeck et al., 2003). 그러나 본 연구에서 용출된 Co는 매우 극미량으로서 인체에 대한 독성 가능성은 극히 낮을 것으로 사료된다.

치과용임플란트고정체는 제조사에서 Ti로 제작되었다고 명시한 제품으로, 해당 물질의 용출액에 대한 Ti 농도를 측정된 결과, 극성 및 비극성 용출액에서 미량의 Ti가 검출되었다. 티타늄계 임플란트의 표면은 안정된 부동태 산화층을 형성하여 구강 내 산도 범위 안에서 우수한 부식 저항성을 갖고 있으며 이에 따라 Ti의 용출이 매우 미량인 것으로 확인되었다. 이러한 부동태 산화층은 화학적으로 불활성에 가깝기 때문에 생체 친화적이며 기존에 감작성에 대한 보고는 없었다(Sidambe, 2014). Browning 등의 연구에 따르면 피부질환치료 및 수술 기구에 티타늄을 사용함으로써 피부나 조직과의 접촉으로는 독성이 없다는 것을 보고하였다(Geetha et al., 2012).

치과용어태치먼트는 제조사에서 Si (silicon), B (boron), Fe (iron), Mn (manganese), Ni (nickel), Cr (chromium), Co (cobalt), Mo (molybdenum), Nd (neodymium), Dy (dysprosium)을 포함하고 있다고 명시한 제품으로, 해당 물질의 용출액 내 각 물질 이온 농도를 측정된 결과, 극성 및 비극성용매에서 용출한 용출액 모두 비교적 높은 농도의 Si가 검출되었다. Si는 원자가전자가 4개인 준금속 원소로 다양한 화학결합을 할 수 있으며 이에 따라 극성 및 비극성용매에서 비교적 쉽게 용출 되었을 것으로 사료된다. B, Fe, Mn의 경우에도 극성 및 비극성용매에서 용출한 용출액 모두에서 비교적 높은 농도로 용출 되었으나, 극성용매에서 더 높은 농도를 기록하였고 이는 해당 물질의 높은 이온화 경향 때문일 것으로 사료된다. B의 경우 감작성에 대한 보고는 없으나, World Health Organization에서 사람에게 대한 boron 노출의 최소 치사량을 경구 노출 시 640 mg/kg, 진피 노출 시 8600 mg/kg으로 보고하였다. 이에 따라 본 연구에서 용출된 boron은 안전 기준과 비교하여 매우 미량으로 인체에 독성을 일으키지 않을 것으로 사료된다. Fe의 경우에도 감작성에 대한 보고는 없으나, 인체에서 철을 과다 섭취 시 세포 손상이나 내분비기관 기능 저하 등의 부작용을 나타낼 수 있다고 보고되었다(Paim et al., 2020). 그러나 본 연구에서 용출된 Fe는 해당 물질의 안전기준 대비 극히 미량으로 확인되어 인체에 독성을 일으키지는 않을 것으로 판단된다. Cr의 경우에도 극성 및

비극성용매에서 용출한 용출액에서 비교적 비슷한 농도로 용출되었고, 이는 앞서 명시한 Cr의 안정화 성질에 따른 것으로 판단된다.

본 연구는 장기간 및 단기간 동안 구강 점막에 닿는 대표적인 치과재료와 양성 및 음성 대조군 후보물질을 선정하여 극성 및 비극성 용매에서 용출 후 용출액에 대한 성상, pH 그리고 성분 분석을 실시하였다. 그러나 용출액 분석 시 사용되는 장비를 ICP-MS와 GC-MS로 한정하여 측정하였기 때문에, 본 연구 결과로부터 도출된 용출액의 정성 및 정량 분석 결과를 확대 해석하여 결론 내리는 것에는 한계가 있음을 고려해야 한다. 따라서 추후에는 재료의 용매 특성을 고려한 적합한 분석 장비를 선정하고, 실제 임상에서 사용되는 환경 및 조건과 근접한 용출 조건을 고려하여, 다양한 상황에서의 생물학적 안전성에 대한 결과 예측을 위한 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

그럼에도 불구하고 본 연구의 결과는 치과재료의 피부감작성시험을 위한 양성 및 음성 물질의 제작방법과 시험물질의 준비, 그리고 해당 물질들의 용출 조건 설정과 용출물 분석에 대한 전문 기술을 제공할 수 있고, 본 결과를 바탕으로 치과재료의 피부감작성시험 동물대체시험법 확립을 위한 시험 물질, 용출 방법 및 결과 지침서로 활용될 수 있을 것이라 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2017년도 식품의약품안전처의 연구개발비(17182대체연490)로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- 식품의약품안전처 고시 제2020-12호. (2020.2.25.). 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격.
- 식품의약품안전처 고시 제2021-83호. (2021.10.28.). 의료기기 품목 및 품목별 등급에 관한 규정.
- Browne RM. (1994). Animal tests for biocompatibility of dental materials--relevance, advantages and limitations. *J Dent.* 22:S21-24.
- Camps J, Pommel L, Bukiet F, About I. (2004). Influence of the powder/liquid ratio on the properties of zinc oxide-eugenol-based root canal sealers. *Dent Mater.* 20:915-923.
- Coleman KP, Grailer TP, McNamara LR, Rollins BL, Christiano NJ, Kandárová H, De Jong WH. (2018). Preparation of irritant polymer samples for an in vitro round robin study. *Toxicol In Vitro.* 50:401-406.
- De Boeck M, Lombaert N, De Backer S, Finsy R, Lison D,

- Kirsch-Volders M. (2003). In vitro genotoxic effects of different combinations of cobalt and metallic carbide particles. *Mutagenesis*. 18:177-186.
- De Jong WH, Hoffmann S, Lee M, Kandárová H, Pellevoisin C, Haishima Y, Rollins B, Zdawczyk A, Willoughby J, Bachelor M et al. (2018). Round robin study to evaluate the reconstructed human epidermis (rhe) model as an in vitro skin irritation test for detection of irritant activity in medical device extracts. *Toxicol In Vitro*. 50:439-449.
- Geetha C, Sabareeswaran A, Mohanan P. (2012). Pre-clinical evaluation of titanium nitride coated titanium material. *Toxicol Mech Methods*. 22:144-150.
- Gerberick GF, Ryan CA, Kern PS, Schlatter H, Dearman RJ, Kimber I, Patlewicz GY, Basketter DA. (2005). Compilation of historical local lymph node data for evaluation of skin sensitization alternative methods. *Dermatitis*. 16:157-202.
- International Organization for Standardization. (2018). ISO 10993-1:2018, Biological evaluation of medical devices – Evaluation and testing within a risk management process. Geneva: ISO.
- International Organization for Standardization. (2010). ISO 10993-10:2010, Biological evaluation of medical devices – Evaluation and testing within a risk management process. Geneva: ISO.
- International Organization for Standardization. (2021). ISO 10993-12:2021, Biological evaluation of medical devices – Sample preparation and reference materials. Geneva: ISO.
- International Organization for Standardization. (2002). ISO 10993-17:2002, Biological evaluation of medical devices – Establishment of allowable limits for leachable substances. Geneva: ISO.
- Kwon JS, Illeperuma RP, Kim J, Kim KM, Kim KN. (2014). Cytotoxicity evaluation of zinc oxide-eugenol and non-eugenol cements using different fibroblast cell lines. *Acta Odontol Scand*. 72:64-70.
- Maccauro G, Iommetti PR, Raffaelli L, Manicone PF. (2011). Alumina and zirconia ceramic for orthopaedic and dental devices. *Biomaterials applications for Nanomedicine*. 3:485.
- Murphy JV. (1970). Intoxication following ingestion of elemental zinc. *JAMA*. 212:2119-2120.
- Paim TC, Wermuth DP, Bertaco I, Zanatelli C, Naasani LIS, Slaviero M, Driemeier D, Schaeffer L, Wink MR. (2020). Evaluation of in vitro and in vivo biocompatibility of iron produced by powder metallurgy. *Materials Sci Eng C Mater Biol Appl*. 115:111129.
- Petersen EJ, Nguyen A, Brown J, Elliott JT, Clippinger A, Gordon J, Kleinstreuer N, Roesslein M. (2021). Characteristics to consider when selecting a positive control material for an in vitro assay. *Altex*. 38:365-376.
- Piao MJ, Kang KA, Lee IK, Kim HS, Kim S, Choi JY, Choi J, Hyun JW. (2011). Silver nanoparticles induce oxidative cell damage in human liver cells through inhibition of reduced glutathione and induction of mitochondria-involved apoptosis. *Toxicol Lett*. 201:92-100.
- Reeve L, Baldrick P. (2017). Biocompatibility assessments for medical devices - evolving regulatory considerations. *Expert Rev Med Devices*. 14:161-167.
- Sarrami N, Pemberton MN, Thornhill MH, Theaker ED. (2002). Adverse reactions associated with the use of eugenol in dentistry. *Br Dent J*. 193:257-259.
- Setcos JC, Babaei-Mahani A, Silvio LD, Mjör IA, Wilson NH. (2006). The safety of nickel containing dental alloys. *Dent Mater*. 22:1163-1168.
- Sidambe AT. (2014). Biocompatibility of advanced manufactured titanium implants—a review. *Materials*. 7:8168-8188.
- Syed M, Chopra R, Sachdev V. (2015). Allergic reactions to dental materials-a systematic review. *J Clin Diagn Res*. 9:Ze04-09.
- Vinardell MP, Mitjans M. (2008). Alternative methods for eye and skin irritation tests: An overview. *J Pharm Sci*. 97:46-59.
- Wiltshire WA, Ferreira MR, Ligthelm AJ. (1996). Allergies to dental materials. *Quintessence Int*. 27:513-520.