

교정용 접착제의 세포독성에 관한 실험적 연구

서울대학교 치과대학 치과교정학교실

사명희 · 양원식

목 차

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험결과
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고 문헌
- 영문 초록

I. 서 론

교정용 접착제는 Newman²⁹⁾이 에폭시 레진으로 교정장치를 치아법랑질에 직접 접착하려고 시도한 이래 여러 학자들의 노력으로 교정임상에 도입되어 지속적인 개량과 발전을 거듭한 결과 현재는 널리 사용되고 있다^{27,29,33)}. 좋은 교정용 접착제의 조건으로는 크기(dimension)의 안정성, 법랑질에 용이하게 침투할 수 있는 유동성, 뛰어난 강도, 임상적 편리성등을 들 수 있지만³²⁾ 교정용 접착제는 장기간 구강내 점막이나 치은등의 생체조직과 접촉하므로 생체와도 높은 친화성을 가져야 하겠다. 교정용 접착제의 생체친화성은 세포독성검사, Ames' 검사, Styles 세포변형검사, 점막자극검사, 감각 검사, 피부 독성검사를 통해 평가할 수 있다⁴²⁾. 특히 세포배양법은 새로운 재료나 개량된 재료의 임상 적용을 위해 사용하는

초기검사의 하나로 널리 사용되고 있다^{10,13,15,19,21,37,39)}.

그동안 많은 연구는 교정용 접착제의 기계적 강도나 치아와의 접착력등 물리적 성질에 초점을 두고 이루어져 왔으며 생물학적 측면에 대해서는 이해가 부족하여 최근에 와서야 비로서 관심을 갖고 연구되었다^{3,45,46)}.

Athas²⁾과 Fredericks¹¹⁾는 Ames'검사, Spot검사로 중합된 복합체 및 교정용 접착제 성분의 발암 가능성을 측정하여 단량체 용액이 발암 가능한 화학물질을 포함할 수 있음을 보여 주었다.

Davidson⁸⁾은 시판 사용되는 교정용 접착제와 그 성분의 독성을 hamster에서 생체실험하였는데 "no-mix"계통의 교정용 접착제 중 액체성분이 헤파의 점막과 접촉시 조직반응을 유발하였다고 하였다.

Terhune⁴⁶⁾은 실험실적 세포배양 한천배지법을 이용하여 여러 교정용 접착제의 상대적 독성을 측정 비교하였으며 최근 Tell⁴⁵⁾은 같은 방법을 이용하여 교정용 접착제의 장기적인 세포독성을 측정하였다. 이들은 생체염색법을 이용하여 세포성장 억제영역(zone of inhibition)을 측정한 결과 실험한 모든 교정용 접착제가 중합 직후 세포독성을 보이며 시간경과에 따라 감소하지만 Orthomite를 제외한 모든 실험군에서 중합 2년후에도 독성을 측정할 수 있었다고 하였다.

이와 같이 이전의 생체 내 및 생체 외 실험을 통하여 교정용 접착제는 미약하거나 중 정도의 세포독성을 보이며^{45,46)} 연조직에 손상을 줄 수 있고⁴⁾ 강력한 감각제로 작용할 수 있으며⁴⁴⁾ 발암 가능성이 있음이 밝혀졌다. 또한 계속적인 신제품의 등장과 함께 생체적합성 평가의 중요성은 강조되고 있으며 이를 측정할 수 있는 신속하고 고도의 신뢰성을 지닌 방법이 요구된다⁴⁷⁾. 따라서 교정용 접착제는 임상가로서 교정용 접착제의 잠재적 독성에 관한 지식을 갖고 특성반응을 식별할 수 있어야 하겠으며 가능한 독성이 낮은 재료를 선택해야 하겠다.

이에 저자는 사람의 치은 섬유아세포를 배양하고 교정용 접착제를 처리한 후 ³H-thymidine 결합 정도로 교정용 접착제가 DNA 합성에 미치는 영향을 평가함으로써 현재 사용되고 있는 교정용 접착제들의 세포독성을 비교 평가하기 위해 본 실험을 실시하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 치은 섬유아세포의 배양

1) 1차 배양

교정치료를 위해 10세 여아의 제 1 소구치를 발치하면서 발치와 주위의 치은을 절제하였다. 절제한 치은은 40% FBS(fetal bovine serum, GIBCO Co., U.S.A.)와 20% 항생제(penicillin G, streptomycin, amphotericin B 포함, GIBCO Co., U.S.A.)가 첨가된 α -MEM(α -minimum essential medium, L-glutamine 포함, GIBCO Co., U.S.A.)에서 3회 세척하였다. 세척된 치은조직을 60mm 세포배양용 Petri dish(Corning Co., U.S.A.)로 옮기고 건조되지 않도록 주의하면서 No.15 scalpel 2개를 이용하여 1mm²로 세절하였다. 세절한 치은조직은 조직의 가장자리가 잘 부착되도록 주의하면서 dish에 잘 퍼놓은 후 pipette을 이용하여 각 dish당 2ml의 배양액을 주입하여 37°C, 5% CO₂, 습도 100% 배양기(Model-8409C, Vision Co., U.S.A.)에서 배양하였다. 배양액으로는 10% FBS와 1%

항생제를 첨가한 α -MEM을 사용하였고 단일 세포층이 형성될 때까지 3일 간격으로 교환해주었다.

2) 2차 배양

Petri dish 내의 배양액을 제거하고 HBSS(Hank's buffered salt solution, GIBCO Co., U.S.A.)로 2회 세척하였다. 부착된 세포를 분리하기 위하여 HBSS를 제거하고 0.25% Trypsin-EDTA(GIBCO Co., U.S.A.)를 dish당 2ml씩 넣고 3분간 bench상에서 방치한 후 Pasteur pipette을 이용해서 dish에 부착된 잔여세포를 기계적으로 분리시키고 원심분리용 시험관으로 옮겨서 37°C, 1,200 rpm으로 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 원심분리를 이용해서 HBSS로 2회 세척한 후 배양액을 넣고 세포부유액을 만들어 60mm Petri dish에 분주하였다. 분주 비율은 1:3 내지 1:4로 하였으며 같은 방법으로 5회 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

2. 실험재료

실험에는 화학 중합형 교정용 접착제인 Concise, Mono-lok, Ortho-One, Super C 4 종과 광중합형 교정용 접착제인 Transbond 1 종을 사용하였다(표 1).

3. 시편제작

각 접착제는 제조회사의 지시대로 혼합하여 즉시 내경 5mm, 외경 7mm, 높이 4mm의 유리관에 넣고 초기경화된 직후 유리관을 깨서 균일한 크기의 시편을 얻었다⁴⁸⁾. 각 접착제당 9개의 시편을 만들어 3개는 1% 항생제가 첨가된 α -MEM에 넣고 37°C에서 7일간 유지하였으며 3개는 경화 후 즉시, 그리고 나머지는 ethylene oxide로 소독하여 2주가 지난 후에 실험하였다.

표 1. 교정용 접착제

상품명	제조회사	
Concise	Unitek/3M	2 paste-2 primer system
Mono-lok	Rocky Mountain Orthodontics	no-mix paste-primer system
Ortho-One	Bisco	no-mix paste-primer system
Super C	Amco	powder-liquid system
Transbond	Unitek/3M	light-curing system

4. 세포독성의 실험

계대배양한 치은 섬유아세포를 0.25% Trypsin-EDTA 용액으로 처리한 후 원심분리하여 배양액으로 세포부유액을 만들었다. 표준 혈구계산방법을 이용하여 2.5×10^4 cells/well 이 되도록 microtest plate well(Nunc, Denmark)에 옮겨 10% FBS가 포함된 1ml 배양액에서 배양하였다. 다음 날 배양액을 교환하고 이틀째 되는 날 배양액을 제거해서 HBSS로 세척하였다.

세척한 치은 섬유아세포에는 각 실험시편을 7일간 넣어 두었던 배양액 1ml/well씩을 첨가하거나 경화직후 혹은 경화하고 2주가 경과한 시편을 세포층에 접촉시키고 신선한 배양액을 1ml씩 첨가하였다. 이들은 37°, 5% CO₂, 습도 100% 배양기에서 24시간 배양하였으며 배양종료 2시간 전에 5μCi/well의 [Methyl-³H] thymidine(specific activity 83Ci/mmol; Amersham Corp., U.S.A.)을 첨가시켜 표

지하였다⁴⁹⁾. 24시간 배양이 끝난 후 5% ice-cold TCA(trichloroacetic acid) 3ml로 10분씩 3회에 걸쳐 고정하고 0.5N NaOH 용액 1ml로 37°C에서 30분간 DNA를 녹여 Liquid Scintillation Counter(Beckman LS 5000TA, Beckman Instruments Inc., U.S.A.)로 측정하였다.

III. 실험결과

5회 계대배양한 사람의 치은 섬유아세포에 5종의 교정용 접착제를 처리하고 Liquid Scintillation Counter로 측정된 ³H-thymidine 결합량은 표 2와 같았다. 이를 아래 식에 의해 접착제를 처리하지 않은 대조군에 대한 백분율로 바꾸어 DNA 합성 억제정도를 나타냈다(표 3)(그림 1).

또한 SPSS(statistical package of social science)를 사용하여 Duncan's Mutiple Range Test로 대조군 및 각 접착제를 비교한(p<0.

$$\frac{\text{대조군의 } ^3\text{H-thymidine 결합량(counts/min)} - \text{실험군의 } ^3\text{H-thymidine 결합량(counts/min)}}{\text{대조군의 } ^3\text{H-thymidine 결합량(counts/min)}} \times 100$$

표 2. 치은 섬유아세포의 ³H-thymidine 결합량(counts/min)

	접착제를 1주간 넣어둔 배양액 (Mean±S.E.)	경화 직후의 접착제 (Mean±S.E.)	경화 2주 경과한 접착제 (Mean±S.E.)
대조군	1388.33± 87.42	1388.33± 87.42	1388.33± 87.42
Concise	1213.33±410.26	790.00± 50.00	1500.00±243.31
Mono-lok	1060.00±237.98	923.33±299.02	1076.67±237.51
Ortho-One	1633.33±264.22	1406.67±203.42	1760.00±650.92
Super C	753.33±122.38	780.00± 55.08	786.67±233.12
Transbond	676.67±123.47	753.33±115.66	896.67±115.66

표 3. 대조군과 비교시 DNA합성의 억제정도(%)

	접착제를 1주간 넣어둔 배양액	경화 직후의 접착제	경화 2주 경과한 접착제
Concise	14.0	43.1	-8.0
Mono-lok	23.6	33.5	22.4
Ortho-One	-17.6	-1.3	-26.8
Super C	45.7	36.6	36.1
Transbond	51.3	45.7	28.9

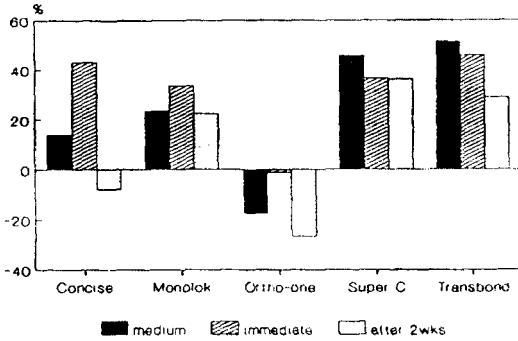


그림 1. DNA 합성 억제

05) 결과는 다음과 같았다.

(1) 접착제를 넣어 1주간 유지한 배양액

접착제를 처리하지 않은 대조군과 차이를 나타내는 접착제는 없었으나 Transbond와 Super C는 Ortho-One보다 DNA합성을 저하시켰다.

(2) 초기 경화 직후의 접착제

Super C, Transbond, Concise는 대조군과 비교시 DNA합성을 저하시켰으며 Ortho-One보다도 DNA합성을 저하시켰다.

(3) 경화 후 2주 경과된 접착제

대조군과 차이를 보이는 접착제는 없었고 접착제 상호간에도 DNA합성 차이를 나타내지 않았다.

IV. 총괄 및 고안

대환장치는 오랫동안 치아에 고정장치를 부착시켜 고정력을 전달하는 수단으로 이용되었으나 1965년 Newman²⁹⁾이 산부식술로 에폭시 레진을 이용하여 plastic bracket을 치아에 직접 접착하려고 처음 시도된 이후 Newman³⁰⁾, Miura등²⁷⁾이 아크릴릭 레진을 이용한 접착방법을 개발하면서 고정임상에 도입된 직접접착술은 지속적인 접착제의 개발과 함께 임상에서 보편적으로 사용되기에 이르렀다^{54,55,56)}.

치과재료의 물리적, 화학적, 기계적 검사는 최소한 70여년 동안 행해진 반면 생물학적 검사는 뒤늦게서야 그 중요성이 인식되었다. 이런 검사들은 급성, 아급성, 만성 3단계로 나누어 하게되는데³⁾ 통상 치과재료의 생체친화성 평가에서는 동물에게 실험재료를 투여하여 그 반응을 알아보는 것이었다. 그러나 세포배양술이 발달함에 따라 1955년 Grand와 Kawahara가 재료독성검사를 위한 새로운 방법으로 이용하게 되었으며 최초로 독성검사 결과를 보고하였다. 이후 세포독성검사는 생물학적 평가의 초기검사에 포함되어 약품이나 재료가 생체에 미치는 작용을 실험실내에서 세포배양 및 조직배양을 통해 평가하게 되었으며³⁶⁾ 대부분의 치과재료에도 응용되었다⁴²⁾.

생체 외 실험인 세포배양법은 정확하게 실험조건을 부여할 수 있고, 재현성이 높으며, 배양세포가 염증반응 면역반응 신경 호르몬 조절 등에 의한 영향을 받지 않으므로 자극물에 대하여 순수한 반응을 나타내고⁵²⁾, 환경변화에 빠르게 반응하며²⁸⁾, 양적 측정이 용이하여 통계적 평가가 가능하고, 비교적 저렴하며, 세포

를 무한히 공급할 수 있다는 등의 장점이 있다^{28,52,53,57}).

이와 같이 세포배양법으로 세포독성을 측정하는 데는 세포 수 산정^{15,16,20}, DNA 분석에 의한 세포 성장률 측정^{23,43,49}, 세포의 형태학적 변화에 대한 현미경적 관찰^{22,52}, 세포의 산소섭취에 의한 세포호흡량 측정¹⁷, 염색이나 방사성 동위원소 방출에 의한 세포막투과도의 변화 측정^{5,25,38,39,40}, 당질대사의 변화 측정¹⁵, 조직화학적 분석에 의한 효소의 기능 측정^{14,15,57}등을 이용하고 있다.

그러나 가장 효율적인 방법에 대해서는 연구자들간에도 이견이 있다.

Hensten-Pettersen, Helgeland¹⁵은 4가지 세포배양법을 비교한 결과 Autian³¹이 기술한 한천배지방법과 이미 실험재료에 노출시킨 배지에서 세포성장을 평가하는 방법이 정확한 독성 지수라고 결론지었고 Leirskar와 Helgeland²⁴는 시편 인접부보다 시편 표면에서의 세포성장이 더 예민한 척도임을 제안하였으며 Dillingharm⁹은 여러가지 방법의 결과에 근거한 총계적 지수를 사용하는 것이 가장 믿을만하다고 하였다.

한편 Wennberg⁴⁹는 세포의 DNA 합성을 측정하는 것은 조직배양계에서 대사 활동을 평가하는 일반적 방법으로 DNA는 교체하지 않으므로 전구 물질이 DNA 분자에 결합되는 것은 이 분자 합성의 표시로 생각할 수 있다고 하였다. Thymidine은 DNA의 특정 전구 물질로서 세포분열 전에 DNA에 결합되므로 방사성 thymidine이 핵내로 유입되는 것은 DNA 합성 측정에 이용할 수 있다고 하였다. 그는 최초로 독성의 측정기준으로 DNA 합성 변화를 이용하였으며 liquid scintillation을 써서 삼중수소로 표지된 thymidine의 결합을 측정하였다. 그는 이 방법이 간단하며 빠르고 편리하여 많은 일련의 검사들을 단순화시킨다고 하였다.

Hume⁶¹은 암시야 현미경으로 ³H-thymidine 이용을 중단한 상태의 섬유아 세포를 관찰하여 세포 수의 감소와 작고 둥근 세포 형태 및 많은 과립 함유물을 보았다고 하였다.

Shenker³⁴과 Stevens⁴³은 이 방법으로 *Actinobacillus actinomycetemcomitans*의 수용성 sonic 추출물이 치은 섬유아세포의 성장을 억제하는 것을 밝혔으며 DNA 합성의 억제는 직접 세포 수를 제어 산정한 세포성장 감소나 RNA 합성 감소와 비례한다고 하였다. Larjava²³은 섬유아세포 성장은 thymidine 이용을 결정함으로써 기록할 수 있다고 하였으며 이 방법을 이용하여 *Bacteroides gingivalis*의 추출물이 치은 섬유아세포의 성장을 억제함을 보였다.

이와 같이 세포성장 측정은 여러 가지 방법으로 할 수 있으나 본 실험에서는 미세한 독성 영향까지 측정하기 위해 ³H-thymidine을 사용하여 DNA 합성을 기록하는 방법을 택하였다.

세포배양법에 사용되는 세포는 인체조직이나 동물에서 채취하며 자극에 예민하게 반응하고 성장이 용이한 세포를 주로 이용하는데 특히 섬유아세포는 고도로 분화된 결합 조직을 구성하고 있으며 비교적 배양이 용이하여 독성검사에 자주 이용되고 있다. 세포배양을 이용한 독성검사에 사용하는 세포선택에 대해서는 이견이 있어 왔다.

Browne⁴은 세포 종류가 결과에 영향을 준다는 증거는 부족하다고 하였으나 최근 Arenholt¹¹는 최종 관심이 있는 세포와 가장 유사한 세포를 사용하도록 제안하였다. 또한 세포 전환(transformation)이 일어나고 cell line으로 확립되는 동안 많은 세포막 특성이 바뀌어 정상 이배체세포와 차이가 있으므로 계대수가 적은 세포가 독성연구에 더 적당하다는 주장이 늘고 있다. 교정용 접촉제는 교정치료 기간 중 구강 내 치은이나 점막, 혀등과 접촉하게 되므로 본 실험에서는 이들 조직의 주된 구성세포인 섬유아세포를 5회 계대배양하여 사용하였다.

또한 세포배양을 이용한 모든 재료의 세포독성검사에서는 배양세포와 실험재료 간의 적절한 접촉이 중요하며 접촉면에서 상호작용을 연구해야 한다³. 대부분의 치과재료는 수용성이 아니므로 시편을 세포나 세포배양액과 물리적으로 직접 접촉시키거나 이들사이에 투과성의

중간매체를 넣고 간접 접촉시켜 연구되었다^{41,57)}.

교정용 접착제는 구강에서 치면에 부착되고 타액에 둘러싸여 치은이나 점막등의 조직과 직접 접촉하게 되므로 본 시험에서는 접착제의 시편을 배양된 세포층에 직접 접촉시키는 방법과 접착제 시편에서 1주일간 유출된 물질을 함유한 배양액으로 세포를 배양하는 방법을 택하였다.

교정용 접착제가 가진 생체친화성에 관한 문헌은 적으나 다른 치과재료의 독성에 관해서는 생체 내, 생체 외 실험 및 사례 보고가 있었다.

Spanberg³⁹⁾는 치근과 충전재가 HeLa cell에 미치는 영향을 세포 수를 산정하여 세포 성장률을 측정했고 전치부 수복재료와 폴리카복실레이트 시멘트의 세포 독성을 ⁵¹Cr 방출량으로 측정하였다⁴⁰⁾. Sisca³⁵⁾는 에폭시 레진, methyl methacrylate, 도재, 폴리우레탄, 실리콘 및 금속에 대한 배양세포의 괴립 정도, 세포질 붕괴, 단일세포층 형성도, 세포성장의 시편으로의 근접도, 세포의 원형화 정도 등을 관찰 보고하였다.

Imai¹⁹⁾는 한천배지방법으로 복합수지를 포함하는 7가지 시멘트의 생물학적 영향을 관찰하였다. Hanks¹⁴⁾은 사람의 치근막 섬유아세포 및 생쥐의 섬유아세포에 치과용 시멘트를 처리하여 위상차 현미경으로 관찰하였고, succinic dehydrogenase 활성도를 측정하였다. Kapsimalis²⁰⁾는 에폭시 레진의 독성을 평가하여 alumina가 충전된 에폭시 레진이 세포성장을 억제한다고 보고하였다. Stungis⁴⁴⁾는 아크릴릭 레진에 대한 과민반응 사례를 보고하였다. Kasten²¹⁾은 세포 수 산정법으로 사람의 치은 상피세포에 대한 불소 유리(fluoride releasing)레진의 생체 친화성을 검사하여 허용 범위 내에 있다고 하였다. Caughman⁶⁾은 치은 섬유아 세포와 구강 상피 세포를 배양하여 형태적 변화를 관찰하였고 대사에 미치는 영향을 측정하여 복합수지와 glass ionomer의 생체친화성을 평가하였다. 한편 Hensten¹⁶⁾은 복합수지가 세포 성장에 분명한 억제효과가 있으나 포도당소비율과 젖산형성은 대조군보다

높았다고 보고하였다.

Danilewicz-Stysiak⁷⁾은 methyl methacrylate가 가진 독성의 역치와 최저 치사농도를 측정하였고 Welch⁴⁸⁾는 골 접착제의 단량체인 methyl methacrylate가 세포의 정상적 세포 작용을 감소시킨다고 하였다. White⁵⁰⁾는 L929 치은 섬유아세포를 배양해 교정용 금속의 생체친화성을 측정하여 실험한 결과 교정용 금속은 세포병적(cytopathologic) 영향을 나타내지 않았다고 하였다.

교정용 접착제의 생체친화성에 대한 연구로는 교정용 접착제의 단량체가 발암 가능한 화학 물질을 함유할 수 있음을 제시한 Kubinski⁴⁶⁾를 비롯하여 Fredericks¹¹⁾과 Athas²²⁾은 Ames' 검사와 Spot 검사를 통하여 중합된 복합체 및 교정용 접착제 성분의 발암 가능성을 측정하여, 단량체 용액이 발암 가능한 화학물질을 포함할 수 있다고 하였다. 한편 Miller²⁶⁾은 교정용 접착제 및 그 촉매제로 인해 배양세포의 DNA와 단백질의 구조가 변할 수 있다고 하였다.

Davidson⁸⁾은 시판 사용되는 교정용 접착제와 그 성분의 독성을 hamster에서 생체 실험하였는데 "no-mix"계통의 교정용 접착제 중액체성분이 hamster 협낭 점막과 접촉시 조직의 염증반응을 유발시켰다고 하였다.

Terhune⁴⁶⁾은 실험실적 세포배양한천배지 방법을 이용하여 여러 가지의 일반적인 교정용 접착제의 상대적 독성을 측정 비교하였는데 "no mix"계통의 교정용 접착제의 활성제는 100%의 세포치사를 가져올 정도로 높은 독성을 갖고 있다고 하였다. 최근 Tell⁴⁵⁾은 같은 방법으로 교정용 접착제의 중합 직후부터 중합 후 2년까지 장기적인 세포독성검사를 측정하였다. 이들은 생체염색을 하고 세포성장 억제영역(zone of inhibition)을 측정한 결과 실험한 모든 교정용 접착제가 중합 직후 세포독성을 보이며 시간 경과에 따라 감소하지만 Orthomite를 제외한 모든 실험군에서 중합한 지 2년 후에도 독성을 측정할 수 있었다고 하였다. 그들은 중합 후 여분의 접착제를 제거할 것과 특히 치은 하부와 치간부등 구강조직과 긴밀히

접촉되는 부위에서의 사용에 주의하고 적당량만 사용토록 하며 활성제는 산부식된 치아와 bracket에 한해 적용할 것을 권했다.

본 실험에서 중합 직후 세포에 접촉시킨 Transbond, Super C, Concise는 대조군과 비교시 DNA 합성에서 유의한 저하를 보였다. 이는 Ortho-One보다도 유의하게 저하된 것으로 Transbond와 Super C는 1주일 간 넣어둔 배양액으로 실험한 경우에서도 Ortho-One보다 DNA 합성을 저하시켰다. 이런 세포의 DNA 합성 저하는 곧 세포성장이 억제되었음을 보여주는 것으로 물리력에 의한 손상같은 요소를 제외하면 재료로부터 유출된 물질이 인접한 세포에 끼친 영향으로 해석된다. 교정용 접착제의 중합은 불완전하여 자가중합 복합수지의 경우 전환정도는 52 내지 75%에 달하고 충전재와 밀봉재(sealant)가 미반응 물질의 절반을 차지하는 것으로 밝혀져 있다⁶⁾. Thompson⁴⁷⁾은 중합된 교정용 접착제로부터 여러 수용액 내로 미중합 물질이 유출될 수 있으며 이는 유기 용제일수록 높아서 5% ethanol-용액에서는 48시간 내에 최대 총 중량의 14%까지 용해된다고 하였다. 교정용 접착제로부터의 유출 성분이 정확히 알려져 있지는 않으나 Autian³⁾에 의하면 잔여 단량체 활성제 억제제 dimethyl paratoluidine 등이 중합체로부터 빠져나올 수 있다고 한다. Terhune⁴⁸⁾은 각 성분의 독성을 비교한 결과 액상 활성제가 휘발성분으로 가장 독성이 크고 밀봉재는 장기간 지속적인 독성을 나타낸다고 하였다. Zachrisson⁵¹⁾은 산소가 밀봉재 중합에 강력한 방해효과를 미쳐, 적외선 분광검사에서 많은 미반응 methacrylate가 남아 있었다고 하였다. 한편 Hanks⁴⁴⁾는 임상에서 보고되는 bis-GMA계 복합수지에 대한 만성 독성은 불완전 경화로 인한 산물이거나 물질의 중합에서 생기는 새로운 독성산물인 것 같다고 하였다. Øysæd³¹⁾은 치과용 복합수지로 부터 formaldehyde 유출을 측정 한 논문에서 가수성 분해와 산화는 복합수지에서 다른 분해산물의 유출을 가져올 수 있으며, 중합된 상태에서 미반응 단량체 개시제 안정제와 같은 낮은 분자량

의 첨가물이 유출될 수 있다고 하였다.

본 실험에서 접착제 간 독성의 차이는 각 접착제 제조과정의 상이점 및 각 제품특성과 무관하지 않은 것으로 생각되나 이를 밝히는 데는 앞으로 더 많은 연구가 있어야겠다. 앞서 Spanberg³⁷⁾는 재료의 일반적 구성이 같더라도 원료의 순도와 성분의 화학반응 완료정도가 독성에 있어 결정적으로 중요하다고 하였다. 또한, Hume과 Lassy¹⁸⁾는 복합수지간에 상당한 독성의 차이가 있어 비친수성일수록 독성이 낮았음을 보고하면서 복합수지 표면과 물 간의 상호 작용이 레진독성에 영향을 줄 수 있음을 시사하였다. 이전의 연구에서는 no-mix계통 접착제의 액체성분이 독성을 갖고 있고 allergy 반응도 보고되었으나 본 실험에서 Mono-lok과 Ortho-One은 세포성장에 큰 억제효과를 주지않아 이런 주장과는 상이하였다. 오히려 Ortho-One은 유의한 정도에 달하지는 않았으나 DNA 합성을 촉진시켰는데 그동안 제품의 개선이 있었음을 감안해야겠으며 앞으로 더 연구가 필요하다고 생각된다.

Transbond는 심미적 측면에서 ceramic bracket사용 증가와 함께 관심을 모은 광중합성 접착제로 가시광선에 의해 활성화되는 α -diketone과 amine 계통의 촉매제를 갖고 있는데 광중합의 조작용은 재료성질에 변수로 작용할 수 있다.

또한 Super C는 분말-액체형으로 공급되고 있으며 "brush-on"술식으로 치아에 적용하게 되어 있고 wet-contact에 의한 결합을 제품의 특성으로 하고 있다.

중합 22주 경과 후 실험에서는 대조군 뿐만 아니라 접착제 상호 간에도 DNA 합성의 차이가 없었으며 경화 직후의 접착제보다 DNA 합성에 미치는 영향이 감소하였다. 이는 중합 이후 시간 경과에 따라 독성이 감소했다고 한 Tell⁴⁵⁾의 연구와 일치한다.

본 실험을 중합하면 현재 임상에서 사용되는 교정용 접착제는 중합 직후에는 배양세포 성장을 억제하는 영향을 미칠 수 있으나 2주후에는 거의 영향을 주지 않으며 각 제품간 제조과정과 중합반응의 차이로 그 정도에 차이가 있다

고 하겠다. 그러나 생체 외 독성 실험의 결과는 순전히 세포단계의 반응으로서 이는 생체 외 실험의 한계이며 그 반응은 세포생존이나 대사작용의 차이에 인한 것이기 때문에 이전의 연구에서 지적되었듯이 생체와 생체 외 실험간에 일치성이 부족하므로 그 결과를 실제 임상에서의 독성유무로 직접 해석하는 데는 주의가 필요하다. 그러나 이런 세포독성 실험은 생체적합성이 높은 교정용 접착제의 개발과 개선에 기여하며 앞으로도 꾸준히 연구되어야 할 것으로 생각한다.

V. 결 론

5종의 교정용 접착제 (Concise, Mono-lok, Ortho-One, Super C, Transbond)의 세포독성을 비교평가하기 위해 사람의 치은 섬유아세포를 배양하고 접착제를 작용시킨 후 ^3H -thymidine 결합량을 측정하여 DNA 합성에 미치는 교정용 접착제의 세포독성에 대해 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 7일간 접착제를 넣어두었던 배양액을 사용한 실험에서 Super C와 Transbond는 Ortho-One보다 유의하게 DNA 합성을 저하시켰다.
2. 접착제를 혼합한 직후 실험한 결과 Concise, Super C, Transbond는 접착제를 처리하지 않은 대조군보다 유의하게 DNA 합성을 저하시켰다.
3. 접착제를 혼합한 직후 실험한 결과 Concise, Super C, Transbond는 Ortho-One보다 유의하게 DNA 합성을 저하시켰다.
4. 혼합한 지 2주 경과된 접착제를 실험한 결과 대조군 및 각 접착제간 DNA 합성에 있어서 유의한 차이는 없었다.

REFERENCES

1. Arenholt-Bindslev D., Bleeg H.: Characterization of two types of human oral fibroblasts and buccal mucosa fibroblasts, *Intern Endo. J.*, 23:84-91, 1990.
2. Athas W.F., Gutzke G.E., Kubinski Z.O. Kubinski H.: In vitro studies on the carcinogenic potential of orthodontic bonding materials, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 3: 401-410, 1979.
3. Autian J.: General toxicity and screening tests for dental materials, *Intern. Dent. J.*, 24(2) 235-250, 1974.
4. Browne R.M., Tyas M.J.: Biological testing of dental restorative materials in vitro — a review, *J. Oral Rehabil.*, 6:365-374, 1979.
5. Brunner K.T., Manuel J., Gerottini J.C., Chapuis B.: Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on ^{51}Cr -labelled allogenic target cells in vitro; inhibition by isoantibody and by drugs, *Immun.*, 14:181-196, 1968.
6. Caughman W.F., Caughman G.B., Dominy W.T., Schuster G.S.: Glass ionomer and composite resin cements; effects on the oral cells, *J. Prosthet. Dent.*, 63:513-521, 1990.
7. Danilewicz-Stysiak Z.: Experimental investigations on the cytotoxic nature of methyl methacrylate, *J. Prosthet. Dent.*, 44: 13-16, 1980.
8. Davidson W.M., Sheinis E.M., Shepherd S.R.: Tissue reaction to orthodontic adhesives, *Am. J. Orthod.*, 82:502-507, 1982.
9. Dillingham E.O., Webb N., Lawrence W.H., Autian J.: Biologic evaluation of polymers, *J. Biomed. Master Res.*, 9:569-596, 1975.
10. Feigal R.J., Yesilsoy C., Messer H.H., Nelson J.: Differential sensitivity of normal human

- pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge, *Archs Oral Biol.*, 30:609-613, 1985.
11. Fredericks H.E.: Mutagenic potential of orthodontic bonding materials, *Am. J. Orthod.*, 80:316-324, 1981.
 12. Freshney R.I.: Culture of animal cells a manual of basic technique 2nd edition, Alan R. Liss Inc., 1987.
 13. Guess W.L., Rosenbluth S.A., Schmiat B., Autian J.: Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers, *J. Pharm. Sci.*, 54:1545-1547, 1965.
 14. Hanks C.T., Anderson M., Craig R.G.: Cytotoxic effects of dental cements on two cell culture systems, *J. Oral Pathol.*, 10: 101-112, 1981.
 15. Hensten-Pettersen A., Helgeland K.: Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques, *Scand. J. Dent. Res.*, 85:291-296, 1977.
 16. Hensten-Pettersen A., Helgeland K.: Sensitivity of different human cell lines in the biologic evaluation of dental resin based material, *Scand. J. Dent. Res.*, 89:102-107, 1981.
 17. Hume W.R.: Effect of engenol on respiration and division in human pulp mouse fibroblasts and liver cells in vitro, *J. Dent. Res.*, 63(II):1262-1265, 1984.
 18. Hume W.R., Kassey W.: Hydrophobic composite resins are less cytotoxic, *J. Dent. Res.*, 67:263, 1988.
 19. Imai Y., Watanabe A., Chang R.I., Masuhara E.: Evaluation of the biologic effects of dental materials using a new cell culture technique, *J. Dent. Res.*, 61(8):1024-1027, 1982.
 20. Kapsimalis P.: Toxicity studies of cured epoxy resins, *J. Dent. Res.*, 39:1072, 1960.
 21. Kasten F.H., Fineda L.F., Schneider P.E., Pauls H.R., Foster T.A.: Biocompatibility testing of an experimental fluoride releasing resin using human gingival epithelial cells in vitro, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 25:57-62, 1989.
 22. Kawahara H., Imanish Y., Oshima H.: Biologic evaluation on glass ionomer cement, *J. Dent. Res.*, 58:1080-1086, 1979.
 23. Larjava H., Uitto V., Eerola E., Haapasalo M.: Inhibition of gingival fibroblast growth by *Bacteroides gingivalis*, *Infect. & Immun.*, 55:201-205, 1987.
 24. Leirskar J. & Helgeland K.: A methodologic study of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro, *Scand. J. Dent. Res.*, 80:120-133, 1972.
 25. McIntire L.V.: Biomaterials toxicology In; guidelines for blood-material interactions report of the national heart lung and blood institute working group U.S. Dept. of health service national Institutes of health, NIH Publication, 1985.
 26. Miller E.G., Thompson L.R., Zimmerman E.R., Bowles W.H.: In vivo studies on the carcinogenic potential of an orthodontic bonding resin, *Am. J. Orthod.*, 86:342-346, 1984.
 27. Miura F., Nakagawa K., Masuhara E.: New direct bonding system for plastic brackets, *Am. J. Orthod.*, 59:335-361, 1971.
 28. Mohammad A.D., Mincer H.H., Osama Younis, Dillingham E., Siskin M.: Cytotoxicity evaluation of root canal sealers by the tissue culture-agar overlay technique, *Oral Surg.*, 45:768-773, 1978.
 29. Newman G.V.: Epoxy adhesives for orthodontic attachments; progress report, *Am. J.*

- Orthod., 51:901-912, 1965.
30. Newman G.V., Snyder W.H., Wilson C.E.: Acrylic adhesives for bonding attachments to tooth surfaces, *Angle Orthod.*, 38:12-18, 1968.
 31. Øysad H., Ruyter I.Z., Sjøvik Kleven I.J.: Release of formaldehyde from dental composites, *J. Dent. Res.*, 67:1289-1294, 1988.
 32. Proffit W.R.: Contemporary fixed appliances In; Contemporary Orthodontics, St. Louis; C.V. Mosby, 295-296, 1986.
 33. Retief D.H., Dreyer C.J., Gavron G.: The direct bonding of orthodontic attachments to teeth by means of an epoxy resin adhesive, *Am. J. Ortho.*, 58:21-40, 1970.
 34. Shenker B.J., Kushner M.E., Chi-Cherry Tsai: Inhibition of fibroblast proliferation by *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Infect. & Immun.*, 38(2):986-992, 1982.
 35. Sisca R.F., Thonard J.C., Lower D.A., George W.A.: Responses of epithelial-like cells in tissue culture to implant materials, *J. Dent. Res.*, 46:248-252, 1967.
 36. Smith D.C., Williams D.F.: Biocompatibility of dental materials Vol. II Chap. 9 CRC Press, 1982.
 37. Spanberg L.: Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro, *Oral Surg.*, 35:389-401, 1973.
 38. Spanberg L., Langeland K.: Biologic effect of dental material 1. toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro, *Oral Surg.*, 35:402-414, 1973.
 39. Spanberg L., Rodrigues H., Langeland K.: Biologic effects of dental materials 2. toxicity of anterior tooth restorative materials on HeLa cells in vitro, *Oral Surg.*, 36:713-724, 1973.
 40. Spanberg L., Rodrigues H., Langeland K.: Biologic effects of dental materials 4. effect of polycarboxylate cements on HeLa cells in vitro, *Oral Surg.*, 37:113-117, 1974.
 41. Srivastava S., Gorham S.D., Courtney J.M.: Screening of in vitro cytotoxicity by the adhesive film test, *Biomaterials*, 11:133-137, 1990.
 42. Stanley H.R.: Toxicity testing of dental materials, CRC, 1985.
 43. Stevens R.H., Gatewood C., Hammond B.F.: Cytotoxicity of the Bacterium *Actinobacillus actinomycetemcomitans* extracts in human gingival fibroblasts, *Archs Oral Biol.*, 28:981-987, 1983.
 44. Stungis T.E., Fink J.N.: Hypersensitivity to acrylic resin, *J. Prosthet. Dent.*, 22: 425-428, 1969.
 45. Tell R.T., Sydiskis R.J., Issacs R.D., Davidson W.M.: Long-term cytotoxicity of orthodontic direct-bonding adhesives, *Am. J. Ortho.*, 93:19-22, 1988.
 46. Terhune W.F., Sydiskis R.J., Davidson W.M.: In vitro cytotoxicity of orthodontic bonding materials, *Am. J. Ortho.*, 83:501-506, 1983.
 47. Thompson L.R., Miller E.G., Bowles W.H.: Leaching of unpolymerized materials from orthodontic bonding resin, *J. Dent. Res.*, 61: 303 (I.A.D.R.), 1982.
 48. Welch A.B.: Effect of Simplex Liquid Methyl Methacrylate Monomer on Cells, *J. Biomed. Mat. Res.*, 12:775-790, 1978.
 49. Wennberg A.: An in vitro method for toxicity evaluation of water-soluble substances, *Acta. Odont. Scand.*, 34:33-41, 1971.
 50. White J.M., Hanks C.T.: Biocompatibility of orthodontic metals on L929 fibroblast cell cultures, *J. Dent. Res.*, 67:262, 1988.
 51. Zachrisson B.U., Heimgård E., Ruyter I.E., Major I.A.: Problems with sealants for bracket bonding, *Am. J. Orthod.*, 75:641-

649, 1979.

52. 김정혜, 김영해 : 이장재의 세포독성에 관한 실험적 연구, 대한치과보존학회지, 15 : 77-92, 1990.
53. 박선희, 민병순, 최호영, 박상진, 최기운 : Bonding agent의 치수 섬유아세포에 대한 독성 연구, 경희 치대 논문집, 13 : 61-73, 1991.
54. 양원식 : Direct bonding system(DBS)에 있어서의 접착제의 개량에 대해서, 대치교, 5 : 9-10, 1975.
55. 양원식 : Direct bonding system에 대해서, 대치교, 2 : 53-59, 1971.
56. 양원식 : Direct bonding system에 의한 매복치의 교정 치험례, 대치협지, 11 : 171-175, 1973.
57. 이상훈, 손동수 : 소아치과 영역에서 사용되는 유치금속관의 섬유모세포 친화성에 관한 실험적 연구. 대한소아치과학회지, 17 : 33-50, 1990.

— ABSTRACT —

A STUDY ON THE CYTOTOXICITY OF THE ORTHODONTIC BONDING MATERIALS

Myung-Hee Sa, Won Sik Yang

Department of Orthodontics, College of Dentistry, Seoul University

This study was aimed to compare the relative cytotoxicity of the five common orthodontic bonding materials (Concise, Mon-lok, Ortho-One, Super C, Transbond) using cell culture technique. DNA synthesis of the fibroblasts was assessed by ^3H -thymidine uptake to evaluate the effect of the bonding materials on the growth of the cells. The human gingival fibroblasts were explanted from the buccal gingiva of 10 year-old girl and cultured in α -MEM/10% FBS/1% antibiotics medium, 37°C , 5% CO_2 incubator. The gingival fibroblasts were tested with the medium into which the bonding materials had been soaked for 1 week. Or the bonding materials were placed on the cells immediately or 2 weeks after polymerization. After 22 hours, ^3H -thymidine was added into the microtest wells and after 24 hours, the uptake of ^3H -thymidine was determined by liquid scintillation counter.

The results of this study were as follows.

1. DNA synthesis was significantly decreased with Super C and Transbond than Ortho-One, when treated with medium into which the bonding materials had been soaked for 1 week.
2. DNA synthesis was significantly decreased with Concise, Super C and Transbond than control, when treated immediately after polymerization.
3. DNA synthesis was significantly decreased with Concise, Super C and Transbond than Ortho-One, when immediately after polymerization.
4. There was no significant difference in DNA synthesis between the bonding materials, when treated 2 weeks after polymerization.