

## 구강점막 상피세포에 대한 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성

연세대학교 치과대학 보철학교실, 연세대학교 치과대학 병리학교실\*

최영진 · 육종인\* · 정문규

### I. 서 론

1920년대말 주조용 비귀금속 합금이 치과에 도입된 이래로 그 사용 빈도와 영역이 넓어지고 있다. 초기에 치과 주조용 비귀금속 합금은 의치의 framework으로 사용되어 왔으나 근래에는 고정성 도재소부 국소의치나 고정성 국소의치 등의 광범위한 수복 영역에서 사용되고 있다. 이러한 양상은 기술의 발전에 따른 주조용 비귀금속 합금의 물성의 향상과 귀금속의 가격 상승 등의 경제적 요인으로 더욱 가속화되고 있다<sup>1,2)</sup>. 그러나 치과 주조용 비귀금속 합금의 성분, 특히 니켈, 크롬, 코발트 등은 알르레기성 피부질환, 폐질환 등을 일으키며 특히 발암물질로 알려져 있다<sup>3-6)</sup>. 치과 주조용 비귀금속 합금의 생체 위해성에 대한 보고로는 Wood<sup>7)</sup>, Hubler<sup>8)</sup>, Fernandez<sup>9)</sup> 등이 코발트-크롬 합금으로 제작된 의치에 의한 구강점막의 과민증을 보고하였고, Kalkwarf<sup>10)</sup>, Lamster<sup>11)</sup>, Haberman<sup>12)</sup> 등이 치과 주조용 비귀금속 합금을 사용한 도재소부 가공의치를 장착한 환자에서의 치은과민증을 보고하였다. 이러한 치과 주조용 비귀금속 합금의 생체 위해성은 이들로 제작한 수복물에서 구성 성분이 구강내에서 유리되어 인체로 흡수되기 때문이다.

de Melo 등은 국소의치에서 타액으로 유리되는 크롬, 코발트의 양을 측정하였고<sup>13)</sup>, Bergman 등은 치과 주조용 비귀금속 합금을 동물체내에 매식한 후 심장, 폐, 간 등의 중요 장기에서 니켈이 검출됨을 보고하였다<sup>14)</sup>. Bumgardner 등<sup>15,16)</sup>, Tai 등<sup>17)</sup>, Wataha

등<sup>18,19)</sup>은 치과 주조용 비귀금속 합금의 구성 성분이 세포배양액으로 유리됨을 보고하였다. 이러한 합금 구성 성분의 유리는 합금 자체의 구성 성분 비율<sup>20)</sup>, 표면 처리 상태<sup>21)</sup>, 상(phase)<sup>22)</sup>, 교합마모<sup>17)</sup> 등에 영향을 받는다.

치과 주조용 합금 또는 그 구성 성분의 세포독성 실험에서는 다양한 세포종류와 여러 가지 실험모형, 평가방법이 이용되고 있다. Woody<sup>23)</sup>는 L929와 Hela cell을 이용한 한천중층(agar overaly)법으로 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성을 측정하였고, Niemi와 Hensten-Pettersen<sup>24)</sup>은 NCTC 2544(established human epithelial cell line)를 사용한 한천중층법을 이용해 Ag-Pd-Cu 합금의 세포독성을 보고하였으며, Craig와 Hanks<sup>24,25)</sup>는 치과 주조용 합금의 세포독성을 Balb/c 3T3 세포를 이용한 직접 접촉법(direct contact method)으로 세포증식정도, 광학농도이용법, 육안 관찰법등의 평가법을 사용하여 측정하였다. Naji 등<sup>21)</sup>은 사람 치조골세포와 치은 섬유모세포를 이용해 코발트-크롬 합금의 세포독성을 측정하였고, Bumgardner 등<sup>15,16)</sup>은 사람 치은 섬유모세포에 대한 니켈-크롬 합금의 세포독성을 trypan blue와 3H-thymidine uptake, 현미경적 구조, 세포 에너지 대사를 이용해 보고하였다.

그러나 합금들과 그 구성성분들의 세포독성에 대한 실험 결과는 각 실험에 사용된 세포의 종류와 상태, 실험 방법의 상이성 때문에 일치된 결과를 보이지 않았다<sup>26-30)</sup>. 세포독성 실험에 사용되는 세포들은 크게 확립세포주(established cell line)와 일차 배양

세포들로 구별할 수 있다. 확립세포주는 일관된 결과를 얻을 수 있고 구하기 쉽다는 장점이 있으나, 정상 세포와는 다른 생물학적 특성을 가지고 있으며<sup>26,27)</sup>, 또한 동일물질에 대한 세포독성 실험에서도 사용된 확립세포주의 종류에 따라 상이한 결과를 보이고 있다<sup>30)</sup>. 또한 치과 재료에 의한 세포독성 실험에 적합한 세포를 찾기 위한 연구들은 그 주안점을 독성에 민감한 세포를 찾는 데 두어왔으나 그 결과는 임상에서의 결과와 일치하지 않을 때가 많았다. 이러한 문제점 때문에 최근에는 정상세포에 가까운 생물학적 특성을 보이는 생체에서 채득한 일차 배양 세포를 이용한 세포독성 실험이 이루어지고 있다. 국제 표준 규격(ISO/TR, 1984)에서는 실험실에서의 세포독성 검사에 확립세포주의 사용을 인정하고 있으나 많은 학자들이 검사의 의의를 높이기 위해서는 실험물질과 관련이 깊은 조직의 일차 배양 세포를 이용한 검사가 필요하다고 주장하고 있다<sup>21,27,31-35)</sup>.

일반적으로 치과 주조용 합금의 세포독성 실험에는 확립세포주가 주로 사용되어 왔고, 근래에는 사람 치은 섬유모세포를 이용하고 있다. 그러나 구강 내에서 치과 주조용 합금이 직접 접촉하는 세포는 구강점막 상피세포이며, 이 구강점막 상피세포는 치은 섬유모세포와는 성장형태, 효소활성, 그리고 조직의 특성과 자극에 대한 반응이 다르다<sup>35,36)</sup>. 따라서 치과 주조용 합금의 세포독성 실험을 임상조건과 유사하게 하기 위해서는 생체에서 얻은 구강점막 상피를 이용하는 것이 좋을 것으로 사료된다. 이에 본 연구에서는 구강내에서 수복물과 직접 접촉하는 일차 배양 구강점막 상피세포와 염화니켈, 국내에서 사용되고 있는 치과 주조용 비귀금속 합금을 이용해 1) 세포 배양액으로 유리되는 합금 구성 성분의 유리량을 atomic absorption spectrometry로 측정하고, 2) 염화니켈과 합금의 세포독성을 측정한 후, 3) 유리된 금속 이온의 유리량과 염화니켈, 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성을 비교 분석하여, 일차 배양 구강 점막 상피세포의 세포독성 실험 세포로서의 가

능성과 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성을 알아 보았다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 연구 재료

#### 1) 합금 시편

치과 주조용 비귀금속 합금은 국내에서 사용되고 있는 금관용 니켈-크롬 합금인 New crown (Ruby Dental, Japan)과 CB-80 Soft (Sankin Co. Japan), 국소의치용 코발트-크롬 합금인 Regalloy (Dentsply, USA)를 사용하였다(Table 1). 니켈-크롬 합금은 베릴리움이 함유되지 않은 합금들 중 니켈의 함유량이 많은 합금과 니켈의 함유량이 적은 합금을 선택하였고, 코발트-크롬 합금은 많이 사용되고 있는 조성을 가진 합금을 선택하였다.

#### 2) 세포 배양 배지

연구에 사용된 배지는 3가지 종류를 사용하였으며, P 배지는 치과 주조용 비귀금속 합금의 구성 성분 유리량 측정에 사용하였고, F 배지는 Mouse fibroblast 3T3 feeder 세포를 배양하는 데 사용하였으며, E 배지는 구강점막 상피세포의 배양에 사용하였다. 각 배지의 구성은 다음과 같다 (Table 2).

### 2. 연구 방법

#### 1) 합금 시편 제작

치과 주조용 비귀금속 합금의 구성 성분 유리 실험에 사용된 금속 시편은 24 gauge casting sheet wax를 이용해 지름 60mm 의 원반 형태의 납형을 제작하였다. 이 납형들을 인산염계 매물제인 Dentivest (Sinjin, Younginooop, Korea)를 이용해 제조회사의 지시에 따라 매물한 후, 소환, 주조하였다. 주조된 시편은 sandblast 후 green stone wheel,

Table 1. Composition of alloys

Alloys\Elements	Ni	Co	Cr	Cu	Mn	Sn	Mo	Si	Trace
New crown	73		8	10		5		4	Fe
CB-80 Soft	56.5		10	15	15				Al, Si, Ti
Regalloy		62.5	27				5.5		Si

point로 finishing하고 rubber wheel과 point를 이용해 연마후 felt wheel로 tripoli 와 rouge를 사용해 연마하였다. 연마한 시편은 xylene, 알코홀, 멸균증류수를 이용해 각각 10분간 초음파 세척한 후 가압 멸균 소독을 시행하였다. 치과 주조용 비귀금속 합금의 구성 성분 유리 실험에 사용된 금속 시편은 각 합금 당 5개씩 제작하였다.

치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성에 사용된 금속 시편은 10×10×1mm의 크기의 형태로 납형을 제작하여 전술한 바와 같이 제작, 연마하였고, 합금 시편은 각 합금 당 3개씩 제작하였다.

2) 치과 주조용 비귀금속 합금의 구성 성분 유리량 측정

소독한 각 시편을 15ml P 배지의 petridish에 담근 후 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 배양기에서 24시간 보관하였다. Petridish에서 합금 시편을 제거한 후 용액을 polyethylene tube (Corning, U.S.A.)에 옮겨 담은 다음 atomic absorption spectromery(Varian SpectrAA-300, Australia)를 이용해 시편에서 유리되는 니켈, 코발트, 크롬의 농도를 측정하였다. 이 시편을 전술한 바와 같이 연마후, 같은 방법으로 48시간, 72시간 보관 후 atomic absorption spectrometry를 시행하였다. 이 때 대조군으로는 금속을 넣지 않은 P 배지를 사용하였다. 니켈과 코발트는 불꽃법을 사용하여 측정하였고, 크롬은 비불꽃법을 사용하였으며 측정

조건은 Table 3과 같다. 이 측정치를 다른 연구에서의 측정과 비교하기 위해 ppm 단위를  $\mu M$ ,  $\mu g/cm^2$ 으로 환산하였다.

3) 구강점막 상피세포의 일차 배양

상피세포의 배양은 다른 결체조직에 비해 까다로운 조건이 필요하며, 현재 상피를 배양하는 방법으로는 low-calcium serum-free media를 사용하는 방법과 mouse 3T3 fibroblast feeder를 이용하는 방법이 있다<sup>37)</sup>. 그 중 mouse fibroblast feeder를 이용한 배양법은 상피세포만을 선택적으로 배양할 수 있고, feeder 세포로부터 제공되는 다양한 성장인자로 인해 세포수가 적어도 colony를 잘 형성하는 장점이 있어<sup>38)</sup>, 이번 연구에서는 mouse 3T3 fibroblast를 이용한 상피세포를 배양하는 방법을 사용하였다.

가) Feeder layer 제조

백서 섬유모세포에서 유래한 NIH 3T3 fibroblast를 F 배지에서 배양하여 80~90%정도가 되면 8 $\mu g/ml$  mitomycin C(Sigma Chemical co., St. Louis, U.S.A.)를 넣고 37℃에서 1시간 30분 동안 처리하였다. Phosphate buffered saline(PBS)로 세척하고 trypsin/EDTA(GIBCO BRL, Grand Island, N.Y., U.S.A.) 처리하여 각 배양 접시에 5×10<sup>5</sup>/100mm dish 개의 세포를 분주하여 일차 배양에 이용하였다.

나) 구강점막 상피세포의 일차 배양

구강점막 상피 조직은 제 3 대구치 발거시 염증이 없는 부위를 채득하여 일차 배양하였다. 조직은 PBS로 3 회 이상 세척하고, 1 - 2mm 크기로 잘게 잘라 0.15% collagenase-dispase (Boehringer Mannheim, Germany)를 30분간 처리하였다. 입체 현미경하에서 상피와 결체조직을 핀셋으로 분리한 후 상피는 0.25% trypsin/versene 용액에 15분간 처리하여 원심분리하였다. 상피세포를 모아 feeder

Table 2. Constituents of each media

Constituents	Type of media		
	P	F	E
1) DMEM	*	*	*
2) F-12 Nutrient mixture	*	*	*
3) 0.07g/l NaHCO <sub>3</sub>	*	*	*
4) 0.475g/l L-glutamine	*	*	*
5) 10% FBS		*	*
6) Ampicillin		*	*
7) 0.4 $\mu g/ml$ hydrocortison			*
8) 5 $\mu g/ml$ inaulin			*
9) 0.1 $\mu g/ml$ cholera toxin			*
10) 5 $\mu g/ml$ human transferrin			*
11) 2 $\mu g/ml$ 3'-5-triido-L-t hyronine			*
12) 5ng/ml human epidermal growth factor			*

Table 3. Conditions for atomic absorption analysis

Element	Ni	Co	Cr
Wavelength	232.0nm	240.7nm	357.9nm
Slit width	0.2nm	0.2nm	0.2nm
Detection limit	0.1ppm	0.1ppm	2ppb

layer에 분주하였고 배지는 E 배지를 이용하였다. 배지는 3일마다 교환해 주며, 70~80% 풍성하게 자라면 냉동 보관 또는 계대 배양을 하였다.

#### 4) 염화니켈 (NiCl<sub>2</sub>)의 세포독성 측정

일차 배양 구강점막 상피세포를 0.125% trypsin-EDTA로 처리하여 바닥에서 분리한 후 원심분리하여 모은 후 24 well plate (Falcon, U.S.A.)에 1×10<sup>4</sup>의 상피세포와 함께 3×10<sup>4</sup>의 feeder 세포를 포함시켜 배양하였다. 상피 배양 배지는 E 배지를 이용하였고 세포가 바닥에 부착하도록 24시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 방치한 후, 배지에 염화니켈이 각각 40 μM, 80 μM, 160 μM, 320 μM, 640 μM이 되도록 투여하였다. 염화니켈이 포함되지 않은 배지를 실험 대조군으로 하였고, 니켈을 투입한 시점을 0시간으로 하여 24시간, 48시간, 72시간, 96시간에 MTT 분석하여 대조군에 대한 상대적인 세포수를 측정하였으며, 각 농도에 대한 동일한 실험을 8회 반복하였다. MTT 분석은 각 well의 배지를 모두 제거한 후 0.5 mg MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenylterazolium bromide) 용액을 각 well 당 1 ml씩 첨가하여 5% CO<sub>2</sub>, 37℃ 배양기에 3시간 추가 배양하고 MTT 용액을 제거하였다. 1ml의 DMSO를 첨가하여 세포질 내에 형성된 crystal을 완전히 녹인 후 자외선 흡광분석기에서 570nm의 파장으로 흡수도를 측정하였다. 각 농도의 상대적인 세포수에 대한 일차함수 분산 분포를 검정하여 니켈의 농도에 따른 세포독성 정도를 수식화 하였고, 각 시간에 대조군에 비해 50%의 성장 억제를 보이는 농도 inhibitory concentration 50(IC<sub>50</sub>)와, 25%의 성장 억제를 보이는 농도 inhibitory concentration 25(IC<sub>25</sub>)을 구하였다.

#### 5) 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성 측정

일차 배양 구강점막 상피세포를 0.125% trypsin-EDTA로 처리하여 바닥에서 분리한 후 원심분리하여 모은 후 12 well plate (Falcon, U.S.A.)에 2×10<sup>4</sup>의 세포가 되도록 분주하였고, 이때 feeder 세포는 각 well 당 3×10<sup>4</sup>을 포함시켜 배양하였다. 상피세포 배양은 E 배지를 이용하였고 세포가 바닥에 부착하도록 24시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 방치하였다. 그 후 각 금속을 상피세포 상부에 위치시켰으며

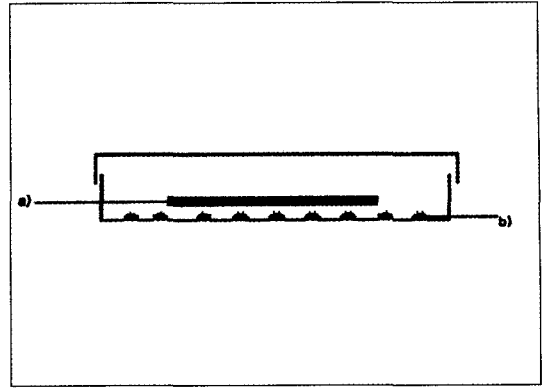


Fig. 1. Diagram showing a specimen and cells.  
a) specimen, b) cells

(Fig. 1), 실험 절편을 투입한 시점을 0시간으로 하여 24시간, 48시간, 72시간, 96시간에 전술한 방법과 같은 MTT 분석하여 대조군에 대한 상대적인 세포수를 측정하였고, 각 합금에 대한 동일한 실험을 6회 반복하였다. 이 때 세포독성이 없다고 알려진 ceramic (Duceram, Germany) 절편을 동일한 크기로 제작하여 대조군으로 사용하였다

#### 6) 통계 처리

치과 주조용 비귀금속 합금의 구성 성분의 유리량 측정 실험에서 각 합금의 구성 성분의 시간대별 유리량의 차는 oneway ANOVA를 이용해 통계학적 유의차를 검증하였고, 니켈의 합금간의 유리량의 차는 independent-t test로, 크롬의 합금간의 유리량의 차는 oneway ANOVA를 이용해 통계학적 유의차를 검증하였다. 염화니켈에 의한 세포독성 측정 실험에서의 시간대별, 농도별 상대적 세포수의 통계학적 유의차와 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성 측정 실험에서의 시간대별, 합금별 상대적 세포수의 통계학적 유의차는 oneway ANOVA를 이용해 검증하였다. 모든 oneway ANOVA 검증에서 Post Hoc Test 는 Scheffe 씨법을 이용하였다.

### Ⅲ. 연구 결과

#### 1) 치과 주조용 비귀금속 합금의 구성 성분 유리량 측정

치과 주조용 비귀금속 합금의 구성성분의 유리량은 Table 4와 같다. 니켈은 대조군에서는 검출되지

Table 4. Amounts of element release

Alloy \ Element Time Unit		Ni, Co : ppm & $\mu\text{M}$ Cr : ppb & nM								
		Ni			Co			Cr		
		24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr	24 hr	48 hr	72 hr
Control	ppm/ppb	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	7.60	7.20	7.60
	$\mu\text{M}/\text{nM}$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	146.15	138.46	146.15
	$\text{ng}/\text{cm}^2$	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.02	0.02	0.02
New crown	ppm/ppb	3.83 $\pm 1.2$	4.62 $\pm 0.48$	4.79 $\pm 1.6$	-	-	-	10.79 $\pm 0.9$	14.02 $\pm 0.6$	10.45 $\pm 1.7$
	$\mu\text{M}/\text{nM}$	65.15 $\pm 19.9$	78.75 $\pm 8.1$	81.57 $\pm 27.6$	-	-	-	207.49 $\pm 18$	269.68 $\pm 31$	200.99 $\pm 2$
	$\text{ng}/\text{cm}^2$	9.95 $\pm 3.0$	12.02 $\pm 1.2$	12.45 $\pm 4.2$	-	-	-	0.03 $\pm 0.002$	0.04 $\pm 0.004$	0.03 $\pm 0.004$
CB-80 Soft	ppm/ppb	1.11 $\pm 0.3$	1.37 $\pm 0.2$	1.65 $\pm 0.6$	-	-	-	9.34 $\pm 0.6$	11.41 $\pm 1.9$	11.75 $\pm 2.6$
	$\mu\text{M}/\text{nM}$	18.85 $\pm 5.1$	23.40 $\pm 3.3$	28.03 $\pm 10.0$	-	-	-	179.57 $\pm 12.2$	219.41 $\pm 37.6$	225.99 $\pm 49.5$
	$\text{ng}/\text{cm}^2$	2.88 $\pm 0.8$	3.57 $\pm 0.5$	4.28 $\pm 1.5$	-	-	-	0.02 $\pm 0.002$	0.03 $\pm 0.005$	0.03 $\pm 0.007$
Regalloy	ppm/ppb	-	-	-	0.85 $\pm 0.1$	0.96 $\pm 0.2$	0.88 $\pm 0.4$	9.31 $\pm 0.1$	8.53 $\pm 0.5$	8.64 $\pm 1.2$
	$\mu\text{M}/\text{nM}$	-	-	-	14.38 $\pm 2.3$	16.36 $\pm 3.7$	15.01 $\pm 6.6$	179.11 $\pm 2.1$	164.07 $\pm 9.4$	166.15 $\pm 23.8$
	$\text{ng}/\text{cm}^2$	-	-	-	2.20 $\pm 0.4$	2.51 $\pm 0.6$	2.30 $\pm 1.0$	0.02 $\pm 0$	0.02 $\pm 0.001$	0.02 $\pm 0.003$

않았고, New crown, CB-80 Soft에서 24시간까지 각각 3.83, 1.11 ppm이 검출되었으나, 그 후 단위시간당 유리량은 시간이 증가함에 따라 감소하였다. 니켈 유리량의 급속한 차이는 New crown이 CB-80 Soft에 비하여 모든 시간에서 3배정도 많은 유리량을 보였다. 코발트는 대조군에서 검출되지 않았고, 24시간에 0.85 ppm의 유리를 보였으나 그 후의 단위시간당 유리량은 시간이 증가함에 따라 감소하였다. 크롬은 모든 합금에서 니켈과 코발트에 비하여 미량 검출되었다(Table 4, Fig. 2).

2) 염화니켈의 세포독성

40 $\mu\text{M}$ , 80 $\mu\text{M}$ 의 농도에서는 24시간에서 대조군과 통계학적 유의차가 없는 상대적 세포수를 보였으며 48시간 이후의 시간에서는 대조군보다 높은 상대적 세포수를 보였다. 160 $\mu\text{M}$ 에서는 48시간에서 대조군보다 높은 상대적 세포수를 보였고 그외 다른 시간

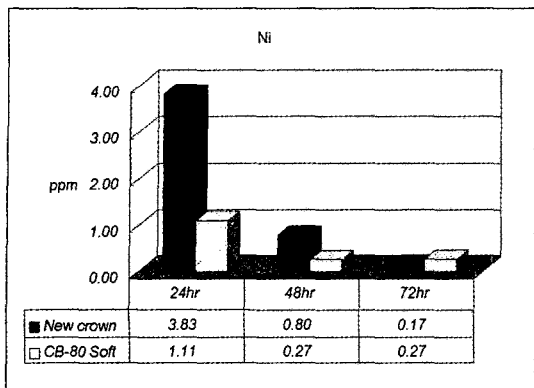
에서 대조군과 통계학적 유의차가 없는 상대적 세포수를 보였다. 320 $\mu\text{M}$ 에서는 48시간 이후 대조군보다 낮은 상대적 세포수를 보였다. 640 $\mu\text{M}$ 에서는 모든 시간에서 대조군보다 낮은 상대적 세포수를 보였다 (Fig. 3). 니켈이온의 농도에 따른 상대적 세포수의 일차함수 분산분포는 Fig. 4와 같고 여기서 구한 IC<sub>25</sub>와 IC<sub>50</sub>은 Table 5와 같다.

3) 치과 구조용 비귀금속 합금의 세포독성

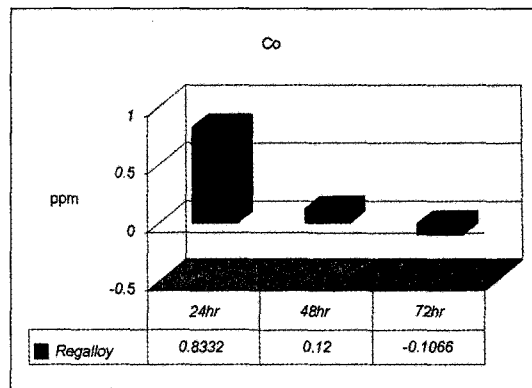
New crown은 48시간에 현저한 상대적 세포수의 증가를 보였고, 72시간, 96시간에 급격한 감소를 보였다.

CB-80 Soft는 24시간에 상대적 세포수의 감소를 보이다, 48시간에 증가를 보인 후, 대조군과 차이를 보이지 않는다.

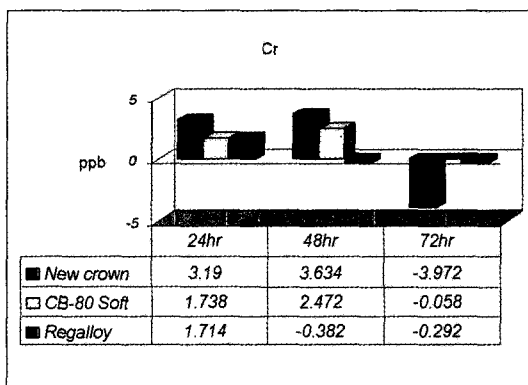
Regalloy는 72시간에 최저의 상대적 세포수를 보이며, 96시간에서는 대조군과 차이를 보이지 않는다



(a)



(b)



(c)

Fig. 2. Amounts of element release per Unit time.  
a):Nickel, b):Cobalt, c):Chromium

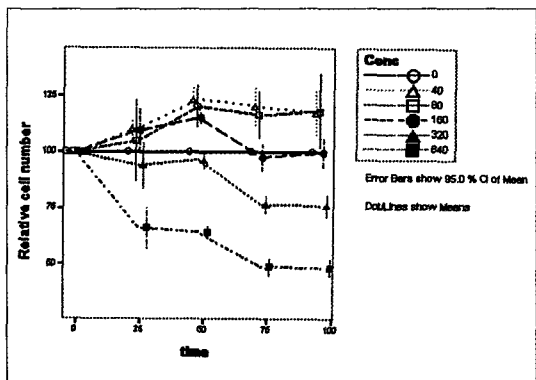


Fig. 3. The effect of concentration of nickel chloride to relative cell number of oral keratinocytes

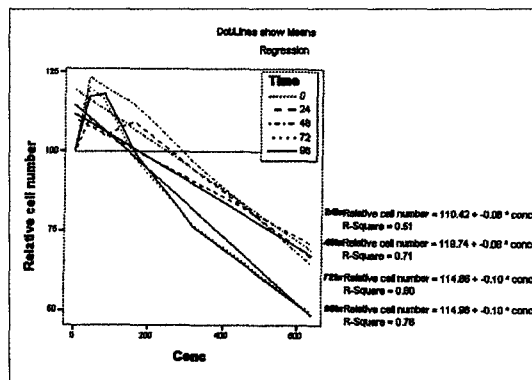


Fig. 4. Regression lines and equations of nickel chloride at each time

Table 5. Inhibitory concentration of nickel chloride to oral keratinocytes

IC\Time	24hr	48hr	72hr	92hr
IC <sub>25</sub>	569.39	560.90	383.27	380.76
IC <sub>50</sub>	971.32	874.34	623.65	618.86

(Fig. 5).

#### IV. 총괄 및 고찰

치과 주조용 비귀금속 합금으로 수복물을 제작하여 구강내에 장착하면 수복물의 표면에서 전해질인 타액과 합금의 구성 성분 사이의 전기화학적 반응이 일어나 금속 이온이 유리되며, 유리된 금속 이온은 organometallic complex를 형성하여 구강 점막으로 흡수되거나, 타액에 유리되어 인체 각 부위로 이동하게 된다<sup>3)</sup>. 이렇게 유리되는 치과 주조용 비귀금속 합금의 성분은 니켈, 크롬, 코발트이며, 이들은 세포독성과 과민반응을 일으키며, 암을 유발시키는 물질로 알려져 있다. 니켈은 주위 환경에 널리 분포하고, 인체 내에서는 argininase를 활성화시키는 등의 작용을 하는 중요한 성분이지만 다량의 니켈은 독성물질, allergen, 발암물질로 알려져 있다. Jacobsen<sup>39)</sup>은 2.5 ppm정도의 니켈도 구강점막 상피세포에 세포독성을 나타낼 수 있다 하였고, 112 ppm정도의 양이면 patch test에 양성 반응을 일으킬 수 있다<sup>6)</sup>. 니켈은 세포내로 이동하면 RNA나 단백질과 결합하여 세포대사를 방해하고 세포를 괴사에 이르게 한다. 코발트는 vitamin B12의 주요구성성분으로 인체의 필수요소이다. 그러나 다량의 코발트는 세포핵과 미토콘드리아에 축적되고, 이렇게 축적된 코발트는 DNA, RNA의 대사에 영향을 미치고, 세포내 산화작용을 억제하며, 암세포의 형성을 유도한다<sup>40)</sup>. Kawata 등<sup>41)</sup>, Naji 등<sup>21)</sup>, Hanawa 등<sup>41)</sup>, Bearden 등<sup>43)</sup>은 코발트가 강한 세포독성을 보인다고 하였다. 크롬은 유기 물질에 널리 분포해있고, insulin의 보조인자로 작용을 한다. 체액과 반응하면 Cr<sup>6+</sup>나 Cr<sup>3+</sup>의 두 형태로 유리가 되고 Cr<sup>6+</sup>은 강한 발암 물질이며 적혈구나 백혈구에 의해 흡수가 되며 Cr<sup>3+</sup>은 혈장 단백질과 결합을 한다.

치과 주조용 비귀금속 합금 구성 성분의 유리양은 합금의 조성, 표면의 처리상태, 합금의 상(phase), 교

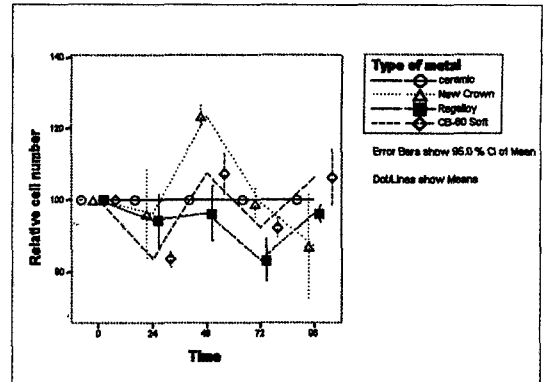


Fig. 5. The effects of alloys to relative cell number of oral keratinocytes

합 마모(occlusal wear), 등에 의해 영향을 받는다. 니켈-크롬, 코발트-크롬 합금에서 크롬의 양은 크롬화합물을 주성분으로 하는 부식 방지막 형성에 영향을 준다. Brune<sup>44)</sup>은 코발트-크롬 합금에서 크롬과 코발트의 유리 양상이 시간의 흐름에 따라 그 유리되는 비율이 급격히 감소하며 이는 부식 방지막의 형성에 기인한다고 하였다. Covington<sup>45)</sup>은 치과 주조용 비귀금속 합금의 구성 성분이 타액으로 유리되는 양을 분석하는 실험에서 유리된 베릴리움의 농도가 다른 성분에 비해 매우 높은 것을 발견하였으며 이 원인을 전체 구성비에 대한 표면에서의 베릴리움의 농도가 높기 때문이라 하였다. Naji 등<sup>21)</sup>은 표면이 거친 합금은 전해질과 접촉했을 때 표면적의 증가와 더불어 crevice corrosion이 증가하여 금속이온의 유리량을 증가시킨다고 하였고, Niemi와 Hensten-Pettersen<sup>22)</sup>은 Ag-Pd-Cu 합금의 실험에서 단상(single phase) Cu-Pd 합금은 낮은 세포독성을 보이는데 반하여 다상(multiphase) Ag-Pd-Cu 합금은 높은 세포독성을 보인다고 보고하였다. Tai<sup>17)</sup>는 치과 주조용 비귀금속 합금으로 제작한 금관으로 교합마모 실험을 하였을 때 금속 이온의 유리량이 증가함을 보고하였다. Bumguardner<sup>15)</sup>는 니켈-크롬 합금에서 72시간동안 0.19 ppm에서 0.343 ppm의 니켈 이온이 세포 배양액으로 유리됨을 보고하였고, Covington<sup>45)</sup>은 120일 동안의 유리 실험에서 합금의 종류에 따라 0.98 ppm에서 45.4 ppm의 니켈의 유리가 검출되었음을 보고하였다. 이런 다양한 범위의 유리는 합금의 조성, 처리방법, 사용한 용액의 종류 등에 의한 것

로 사료된다. 이번 금속 유리 실험에서 니켈의 유리량은 72시간에서 New crown 은 4.77 ppm, CB-80 Soft는 1.68ppm의 유리가 있었다. 이 유리량의 차이는 두 금속의 조성에 의한 차이로 생각된다. 그러나 사용한 합금들의 니켈 함량의 차이는 16.5% 인데 반하여 유리량은 약 3배의 차이를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 니켈의 유리량차이는 니켈 함량의 차이에 비례하지 않는 것을 알 수 있으며, 합금의 표면에 안정된 부식 방지막을 형성하여 다른 이온의 유리를 억제하는 크롬, 망간 등의 금속이온 함량에 영향을 받음을 알 수 있다. 코발트의 유리는 24시간에 0.85 ppm의 유리가 있었으나 그 후의 유리의 증가는 보이지 않았는데 이는 합금 표면에서의 크롬의 부식 방지막의 형성 때문으로 사료가 된다. 크롬은 모든 실험 합금에서 니켈, 코발트에 비해 1/1000정도의 미량이 검출되었으며 이는 Park<sup>46)</sup>, Bumguardner<sup>45)</sup>의 결과와 일치한다.

세포독성 실험에서는 주로 확립세포주들을 사용하였으며 이는 이들이 배양하기 쉽고 일관된 결과를 얻을 수 있기 때문이라 하였다. 그러나 동일한 확립 세포주에서도 실험에 사용된 배양액의 차이, 계대 배양시 선택하는 세포에 따라 다른 증식 속도를 보일 수 있고, 계대 배양의 횟수에 따라서도 다른 세포독성 결과를 보일 수 있다<sup>29,30)</sup>는 보고가 있으며, 이 세포들은 인체내의 세포들과는 다른 증식속도와 대사 양상, 독성에 대한 반응을 보인다<sup>39,40,47)</sup>. 또한 상이한 세포를 이용한 세포독성 실험들은 결과의 비교를 어렵게 하며, 체내에서의 실험물질에 의한 세포독성 정도를 알 수 없게 만든다. 그리고 최근 사람 섬유모세포의 배양이 쉬워지면서 이를 이용한 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성 실험이 많이 이루어지고 있으나<sup>27)</sup>, 사람의 섬유모 세포와 구강내에서 치과 주조용 비귀금속 합금이 접촉하는 구강점막 세포는 성장 특성, 독성에 대한 반응에 뚜렷한 차이를 보인다<sup>36)</sup>. 따라서 구강내에서 치과 주조용 비귀금속 합금이 접촉하는 조직이며 유리된 금속이온에 대한 일차 물리적 방어막인 구강점막 세포를 이용하여 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성 실험을 하는 것이 구강내에서의 반응 정도와 좀 더 유사한 결과를 얻을 있을 것으로 생각되어 본 연구에서는 일차 배양된 구강점막 상피세포를 이용해 니켈-크롬, 코발트-크롬 합금의 세포독성을 측정하였고, 상피세포의 일차

배양 방법으로는 상피세포만을 선택적으로 배양할 수 있고, feeder 세포로부터 제공되는 다양한 성장인자로 인해 세포수가 적어도 colony를 잘 형성하는 장점이 있는 mouse 3T3 fibroblast를 이용한 상피세포를 배양하는 방법을 사용하였다.

세포독성의 측정 방법에는 세포수나 세포의 성장을 측정하는 법, 세포막 투과도의 변화를 측정하는 법, 세포내 대사를 측정하는 법, 효소 활성도를 측정하는 법 등의 여러 가지 방법이 있다<sup>48)</sup>. 세포수나 세포의 성장을 측정하는 방법은 경제적이고 쉽게 할 수 있으나 연구자의 주관이 개입될 소지가 많고, 세포막 투과도나 세포내의 대사를 측정하는 방법은 방사선 동위 원소를 사용해야하는 어려움이 있다. 따라서 이번 연구에서는 세포독성 측정 방법으로 효소의 활성도를 측정하는 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenylterazolium bromide) 을 이용한 상대적 세포수를 측정하는 방법을 이용하였다<sup>49-51)</sup>. 이 방법은 tetrazolium염을 formazan으로 환원시키는 thiol-containing flavin oxidase의 효소 활성도를 측정하는 방법이며, 형성된 formazan의 양은 well내의 살아있는 세포수와 비례한다<sup>49,50)</sup>. 또한 MTT를 이용한 측정법은 다른 측정법보다 각 well 내의 전체 세포의 활성을 정확하게 측정해낼 수 있으며, 세포 밀도를 객관적으로 평가할 수 있고, 짧은 시간 내에 세포독성을 측정해낼 수 있는 장점이 있다<sup>28)</sup>.

염화니켈의 세포독성에 대한 실험에서 80 $\mu$ M이하의 농도에서 상대적 세포수의 증가가 나타났다. 이러한 현상은 여러 연구자에 의해 관찰이 되었으며<sup>41,43,52)</sup>, Wataha는 이러한 현상이 금속 이온의 저농도 (TC50이하의 농도)에서 관찰되며, 세포들이 독성을 극복하기 위해 나타나는 과정이거나, 독성에 의해 세포내 대사의 균형에 깨어져서 생기는 현상이라 하였다<sup>52)</sup>. 그는 Balb/c 3T3 세포에서의 이러한 현상이 24시간에서 일어남을 관찰하였고 이러한 현상이 15  $\mu$ M정도의 농도에서 나타난다 하였다. 이번 연구에서는 상대적 세포수의 증가가 80 $\mu$ M이하의 농도에서 48시간에 나타났으며 160 $\mu$ M이상의 농도에서는 관찰되지 않았다. 이러한 자극 효과가 나타나는 농도와 시간의 차이는 사용된 세포의 차이에 기인하는 것으로 생각이 된다. 320 $\mu$ M이상의 농도에서는 상대적 세포수의 감소가 관찰되었다. 상이한 실험 세포



를 사용하였을 때 관찰되는 세포독성의 차이를 연구한 실험에서 Wataha<sup>30)</sup>는 니켈의 24시간에서의 IC<sub>25</sub>가 Balb/c 3T3세포에서 110 $\mu$ M, ROS17/28 세포에서 235 $\mu$ M, L929세포에서 220, WI-38세포에서 500 $\mu$ M이상이라 하였다. 이번 연구에서 사용한 일차 배양된 구강점막 상피세포에서 관찰한 24시간에서의 IC<sub>25</sub>는 569 $\mu$ M이었다. 일차 배양 구강점막 상피세포에 대한 염화니켈의 세포독성 실험에서의 자극효과가 나타나는 시간과 농도, 그리고 IC<sub>25</sub>를 다른 종류의 세포를 사용한 실험과 비교할 때 일차 배양 구강점막 상피세포의 니켈에 대한 세포독성 감수성이 낮다는 것을 알 수 있었다.

일차 배양된 사람 구강점막 상피세포에 대한 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성 실험에서 처음 24시간에서는 모든 금속에서 상대적 세포수의 감소가 일어났다. 유리 실험에서 24시간에서의 니켈 이온의 농도가 New crown은 65 $\mu$ M, CB-80 Soft는 18 $\mu$ M이었으며, 염화니켈의 세포독성 실험에서 80 $\mu$ M이하의 농도에서 상대적 세포수의 감소가 없었던 것과 비교하여 볼 때 이러한 상대적 세포수의 감소는 니켈 이온의 독성에 의한 것이 아님을 알 수 있고, 크롬 이온의 유리량도 극소량이었으므로 이러한 감소는 합금내의 다른 구성 성분에 의한 것으로 생각된다. 니켈-크롬 합금에서 48시간에서 상대적 세포수의 급격한 증가가 있었다. 이는 니켈 이온에 의한 세포자극의 결과로 생각된다. New crown이 초기에 CB-80 Soft보다 높은 상대적 세포수를 나타낸 것은 유리되는 니켈 이온의 농도가 빠른 시간 내에 세포를 자극 할 수 있는 농도까지 이르렀기 때문으로 생각된다. New crown의 초기 자극 현상은 48시간에 나타난 후 72시간에 급격한 상대적 세포수의 감소가 나타났다. New crown의 감소 비율이 CB-80 Soft보다 빠르게 나타나는 양상을 보이고 있으며 이러한 경향은 96시간까지 계속된다. CB-80 Soft는 72시간까지 세포수가 감소하다 그 이후 세포수가 증가하는 양상을 보인다. 이러한 니켈-크롬 합금에서의 상대적 세포수의 변화는 CB-80 Soft와 New crown의 니켈 유리량의 차이에서 기인하는 것으로 생각된다. CB-80 Soft와 코발트-크롬 합금은 24시간에서 48시간사이에 변화를 보이지 않다가 72시간이후 다시 세포수의 증가를 보인다. 이것은 합금내의 크롬에 의한 부식 방지막의 형성으로 구성요소의 유리량 감소

와 증가한 세포수로 인한 세포당 유리된 금속 이온수의 감소에 기인한 것으로 생각이 된다. 96시간에서 이번 연구에 사용된 치과 비귀금속 합금들은 대조군인 ceramic과 비교하여 세포독성에 차이를 보이지 않거나(CB-80 Soft, Regalloy)나 미미한 세포독성을 보였다(New crown). 이는 연마된 치과 주조용 비귀금속 합금은 생체친화적이라 한 Craig와 Hanks<sup>24)</sup>의 결과와 일치한다.

이상에서 치과 주조용 비귀금속 합금의 유리의 합금의 조성과 그에 따른 부식 방지막의 형성 정도에 영향을 받음을 알 수 있었고, 염화니켈의 세포독성 실험에서 일차 배양 구강점막 상피세포의 세포독성 감수성이 다른 실험에서 사용된 세포들보다 낮음을 알 수 있었으며, 일차 배양 구강점막 상피세포에 대한 치과 비귀금속 합금의 세포독성 실험에서 사용된 치과 비귀금속 합금은 대조군인 ceramic과 비교하여 세포독성에 차이를 보이지 않거나(CB-80 Soft, Regalloy)나 미미한 세포독성을 보였다(New crown)

## V. 결 론

본 연구에서는 구강내에서 수복물과 직접 접촉하는 일차 배양 구강점막 상피세포와 염화니켈, 국내에서 사용되고 있는 치과 주조용 비귀금속 합금을 이용해 세포 배양액으로 유리된 금속 이온의 유리량과 염화니켈, 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성을 비교 분석하여, 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 니켈-크롬 합금에서의 니켈과 코발트-크롬 합금에서의 코발트의 유리는 24시간까지 현저한 유리량을 보였으나 그 후 단위 시간당 유리량은 감소하는 양상을 보였고, 크롬은 모든 금속에서 미량 유리되었다.
2. 염화니켈을 일차 배양 구강점막 상피세포에 투여하였을 때 40 $\mu$ M, 80 $\mu$ M에서는 24시간 후 대조군에 대한 상대적 세포수의 증가가 나타났고, 160 $\mu$ M에서는 48시간에서만 상대적 세포수의 증가가 관찰되었고, 다른 시간에서는 대조군과 같은 상대적 세포수를 나타내었다. 320 $\mu$ M의 농도에서는 48시간 이전에는 대조군과 같은 상대적 세포수를 나타내었고 48시간 이후에는 상대적 세포수의 감소가 관찰되었으며, 640 $\mu$ M에서는 24시간에서부터 상대적 세포수의 감소가 관찰되었다.

3. 염화니켈의 세포독성 실험에서 일차 배양 구강점막 상피세포의 세포독성 감수성이 다른 실험에서 사용된 세포들보다 낮음을 알 수 있었다.
4. 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성 실험에서 96시간에 CB-80 Soft, Regalloy는 세포독성을 보이지 않았고, New crown은 미미한 독성을 보였다.

위 결과에서 구강내의 세포와 유사한 일차 배양 구강점막 상피세포를 이용한 세포독성 실험이 가능함을 알 수 있었으며, 일차 배양 구강점막 상피세포에 대한 치과 주조용 비귀금속 합금의 96시간에서의 세포독성 실험에서 사용된 치과 주조용 비귀금속 합금의 세포독성은 거의 없음을 알 수 있었다. 앞으로의 치과재료 및 생체 재료의 연구에서 일차 배양 구강점막 상피세포를 이용한 세포독성 실험은 생물학적 적합성이 뛰어난 치과용 재료의 개발에 이용될 수 있을 것으로 생각된다.

#### 참 고 문 헌

1. Anusavice K.J. : Report on base metal alloys for crown and bridge applications : benefits and risks, *J. Am. Dent. Assoc.*, 111:479-483, 1985.
2. Leinfelder, K.F. : An evaluation of casting alloys used for restorative procedures, *J. Am. Dent. Assoc.*, 128:37-45, 1997.
3. Flint, G.N. : A metallurgical approach to metal contact dermatitis, *Contact Dermatitis*, 39:213-221, 1998.
4. Hensten-Pettersen, A., and Jacobsen, N. : Toxic effects of dental materials *Int. Dent. J.*, 41:265-273, 1991.
5. Hensten-Pettersen, A. : Casting alloys: side-effects, *Adv. Dent. Res.*, 6:38-43, 1992.
6. Pierce, L.H., and Goodkind R.J. : A status report of possible risks of base metal alloys and their components, *J. Prosthet. Dent.*, 62:234-237, 1989.
7. Wood, J.F.L. : Mucosal reaction to cobalt-chromium alloy, *Br. Dent. J.*, 136: 423-424, 1974.
8. Hubler, W.R. Jr. and Hubler W.R. Sr. : *Dermatitis from a chromium dental plate, Contact Dermatitis.*, 9:377-383, 1983.
9. Fernandez, J.P., Veron, C., Hilderbrand, H.F., and Martin, P. : Nickel allergy to dental prosthesis, *Contact Dermatitis*, 14:312-317, 1986.
10. Kalkwarf, K.L. : Allergic gingival reaction to esthetic crowns, *Quint. Int.*, 15:741-745, 1984.
11. Lamster, I.B., Kalfus, D.I., Steigerwald, P.J., and Chasens, A.I. : Rapid loss of alveolar bone associated with nonprecious alloy crowns in two patients with nickel hypersensitivity, *J. periodontol.*, 58:486-492, 1987.
12. Haberman, A.L., Pratt, M., and Storrs, F.J. : Contact dermatitis from beryllium in dental alloys, *Contact Dermatitis*, 28:157-162, 1993.
13. deMelo, J.F. Gjerdet N.R., and Erichsen E.S. : Metal release from cobalt-chromium partial-dentures in the mouth, *Acta Odontol. Scand.*, 41:71-74, 1983.
14. Bergman M., Bergnam B., and Soremark R. : Tissue accumulation of nickel released due to electrochemical corrosion of non precious dental casting alloys, *J. Oral. Rehabil.*, 7:325-330, 1980.
15. Bumgardner J.D., and Lucas L.C. : Cellular response to metallic ions released from nickel-chromium dental alloys, *J. Dent. Res.*, 74:1521-1527, 1995.
16. Bumgardner J.D., Doeller J, and Lucas L.C. : Effect of nickel-based dental casting alloys on fibroblast metabolism and ultrastructural organization, *J. Biomed. mater. Res.*, 29:611-617, 1995.
17. Tai, Y. Long, R.D., Goodkind, R.,J., and Douglas, W.H. : Leaching of nickel, chromium, and beryllium ions from base metal alloy in an artificial oral environment, *J. Prosthet. Dent.*, 68:692-697, 1992.

18. Wataha, J.C., Craig, R.G., and Hanks, C.T.: The release of elements of dental casting alloys into cell-culture medium, *J. Dent. Res.*, 70: 1014-1018, 1991.
19. Wataha, J.C., Malcolm, C.T., and Hanks, C.T. : Correlation between cytotoxicity and the elements released by dental casting alloys, *Int. J. Prosthodont*, 8:9-14, 1995.
20. M Iders, C., Darwish, M., and Holze, R. : The influence of alloys composition and casting procedure upon the corrosion behavior of dental alloys : an in vitro study, *J. oral Rehabil.*, 23:825-31, 1996.
21. Naji, A., and Harmand, M.F. : Study of the effect of the surface state on the cytocompatibility of a Co-Cr alloys using human osteoblasts and fibroblasts, *J. Biomed. Mater. Res.*, 24:861, 1990.
22. Niemi, L., and Hensten-Pettersen, A. : In vitro cytotoxicity of Ag-Pd-Cu-based casting alloys, *J. Biomed. Mater. Res.*, 19:549-561, 1985.
23. Woody, R.D., Huget, E.F., and Horton, J.E. : Apparent cytotoxicity of base metal casting alloys, *J. Dent. Res.*, 56: 739-743, 1977.
24. Craig, R.G., and Hanks, C.T. :Reaction of fibroblasts to various dental casting alloys, *J. Oral Pathol.*, 17:341-347, 1988.
25. Craig, R.G., and Hanks, C.T.: Cytotoxicity of experimental casting alloys evaluated by cell culture tests, *J. Dent. Res.*, 69:1539-1542, 1990.
26. Brown R.M., Tyas M.J. : Biological testing of dental restorative materials in vitro- a review, *J. Oral. Rehabil.*, 6:365-374, 1979.
27. Browne, R.M. : The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials- does it have a role?, *Int. Endodont. J.*, 21:50-58, 1988.
28. Wataha, J.C., Craig, R.G.,and Hanks, C.T. : Precision of and new methods for testing in vitro alloy cytotoxicity, *Dent. mater.*, 8: 65-71, 1992.
29. Wataha, J.C., Craig, R.G., and Hanks, C.T. : The effect of cell monolayer density on the cytotoxicity of metal lions which are released from dental alloys, *Dent. mater.*, 9: 172-176, 1993.
30. Wataha, J.C., Hanks, C.T., Sun, Z. : Effect of cell line on in vitro metal ion cytotoxicity, *Dent. Mater.*, 10:156-161, 1994.
31. Arenholt-Bindslev D., Jepsen, A., MacCullum, D.K., and Lillie, J.H. : The growth and structure of human oral keratinocytes in culture, *J. invest. Dermatol.*, 88:314-319, 1987.
32. Arenholt-Bindslev D., H rsted-Bindslev P., and Philipsen, H.P. : The toxic effects of two dental materials on human buccal epithelium in vitro and monkey buccal mucosa in vivo, *Scan. J. Dent. Res.*, 95:467-474, 1987.
33. Berstein, A., Bernauer, I., Marx, R., and Geurtsen, W.: Human cell culture studies with dental metallic materials, *Biomater.*, 13:98-100, 1992.
34. MacCallum, D.k., Lillie, J.H., Jepsen, A., and Arenholt-Bindslev D. : The culture of oral epithelium, *Int. Rev. cytol.* 109:313-330, 1987.
35. 정문섭 : 구강에 사용되는 수종의 약제들이 사람 구강섬유모세포와 상피세포에 미치는 세포 독성반응의 비교, 서울대학 박사논문, 1996.
36. Coughman, W.F., Coughman, G.B., Dominy, W.T., and Schuster, G.S. : Glass ionomer and composite resin cement: effects on oral cells, *J. Prosthet. Dent.*, 63:513-521, 1990.
37. Prunieras, M., : Recent advance in epidermal cell cultures, *Arch. Dermatol. Res.* 264:234-247, 1979.
38. Rheinwald, J.G., and Green H. : Serial cultivation of strains of human epidermal keratinocytes: the formation of keratinizing colonies from single cells, *Cell* 6:3331-343, 1975.
39. Jacobsen, N. : Epithelial-like cells in culture derived from human gingiva: response to nickel, *Scand. J. Dent. Res.* , 85:567-574, 1977.
40. Howi, D.W. Roger, S.D., McGee, M.A., and

- Hayers, D.R. : Biologic effects of cobalt chrome in cell and animal models, *Clin. Orthop related Res*, 329S:S217-S232, 1996.
41. Kawata, Y. Shiota, M., Tsutsui, H. et al. : Cytotoxicity of Pd-Co dental casting ferromagnetic alloys, *J. Dent Res.*, 60:1403-1409, 1981.
  42. Hanawa, T., Kaga, M., Itoh, Y., et al : Cytotoxicities of oxides, phosphates and sulphides of metals, *Biomater.*, 13:20-24, 1992.
  43. Bearden, L.J., and Cooke, F.W. : Growth inhibition of cultured fibroblasts by cobalt and nickel, *J. Biomed. Mater. Res.*, 14:289-309, 1980.
  44. Brune D : Mechanisms and kinetics of metal release from dental alloys, *Int. Endodont, J.*, 21:135-142, 1988.
  45. Covington, J.S. McBride, M.A., Slagle, W.F. and Disney, A.L. : Quantization of nickel and beryllium leakage from base metal casting alloys, *J. Prosthet. Dent.*, 54:127-136, 1985.
  46. Park, H.Y., and Shrearer T.R. : In vitro release of nickel and chromium from simulated orthodontic appliances, *Am. J. Orthod.* 84:156-159, 1983.
  47. Schedle, A., Samorapoompicht, P., Rausch-Fan, X.H., et al. : Response of L-929 fibroblasts, human gingival fibroblasts, and human tissue mast cells to various metal cations, *J. Dent. Res*, 74:1513-1520. 1995.
  48. Craig, : *Restorative dental material 10th ed* pp 137-171 C.V Mosby Co, St Louis 1997
  49. Liu, Y., Peterson, D.A., Kimura, H. and Schubert, D. : Mechanism of Cellular 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide(MTT) reduction, *J. Neurochem.*, 69:581-593, 1997.
  50. Morgan, D.M.L. : Tetrazolium(MTT) assay for cellular viability and activity, *Method Mole. biol.*, 79:179-183, 1998.
  51. Mosmann, T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods*, 65:55-63, 1983.
  52. Wataha, J.C., Craig, R.G., and Hanks, C.T. : The in vitro effects of metal cations on eukaryotic cell metabolism, *J. Biomed. Mater. Res*, 25: 1133-1149, 1991.

## ABSTRACT

# CYTOTOXICITY OF DENTAL CAST BASE METAL ALLOYS ON HUMAN ORAL KERATINOCYTES

Young-Jin Choi, D.D.S., M.S.D., Jong-In Yook\*, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Moon-Kyu Chung, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

*Department of Prosthodontics, Department of Oral Pathology\*, College of Dentistry, Yonsei University*

Although many studies on the cytotoxicity of the dental cast base metal alloys and their components have been carried out, the results are rather conflicting because of the different type of cells used and the various experimental procedures taken.

Recently, a number of scientists have claimed that it would be preferable to focus on the use of cells from relevant specific location of the human bodies. Consequently, the primary cultured oral keratinocyte derived from oral mucous along with nickel chloride and several of widely used dental cast base metal alloys (two Ni-Cr alloys and one Co-Cr alloy) in domestic were selected for this study, from which

- 1) The amounts of released metal ions were determined using atomic absorption spectrometry,
- 2) The cytotoxicity of nickel chloride and dental cast base metal alloys was evaluated via MTT assay, and finally,
- 3) The amounts of released metal ions and the cytotoxicity of nickel chloride were correlated with the cytotoxicity of dental cast base metal alloys

And, the results were summarized as follows:

1. Nickel ion from Ni-Cr alloys and Cobalt ion from Co-Cr alloys resulted in maximum releasing rate during first 24 hours, followed by a decrease in releasing rate with time. Chromium ion were found to be minimal in all alloys.
2. In cytotoxic test, with 40 $\mu$ M, 80 $\mu$ M of nickel chloride, there were observed an increase in the relative cell number compared to control samples after 24 hours. With 160 $\mu$ M, there was found to be no difference in the relative cell number with control, except that 48 hour showed a increase in relative cell number. With 320 $\mu$ M, the relative cell number remained constant and decreased after 48 hours, and with 640 $\mu$ M, a continuing decrease in relative cell number was observed throughout test period.
3. The sensitivity of primary cultured oral epithelium to nickel was lower compared to the cells used in other studies.
4. CB-80 Soft and Regalloy showed no cytotoxicity to primary cultured oral epithelium and New crown resulted in a slight cytotoxicity.

In conclusion, it was shown that the primary cultured oral keratinocytes could be applied successfully as testing cells in cytotoxicity test. Furthermore, the dental cast base metal alloys used in this study were found to be biocompatible.

---

**Key words** : Cytotoxicity, Dental cast base metal, Human oral keratinocyte, Nickel chloride