

## 치아회분의 세포독성 및 과민성 검사

김영균 · 김수관\* · 이장희\*\*

분당제생병원 구강악안면외과  
 조선대학교 치과대학 구강악안면외과학교실\*  
 구강미생물학교실\*\*

## Abstract

## CYTOTOXICITY AND HYPERSENSITIVITY TEST OF TOOTHASH

Young-Kyun Kim., Su-Gwan Kim. DDS. MSD. PhD.\*, Jang-Hee Lee\*\*

*Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Pundang Jesaeng Hospital, DMC**Department of Oral and Maxillofacial Surgery\*, Dept. of Oral Microbiology\*\***College of Dentistry, Chosun University\*\**

The purpose of this study was to determine the cytotoxicity and hypersensitivity of toothash which we developed. As a result of a cell toxicity experiment to use MTT assay, there were no differences between toothash group and control group. The cytotoxicity was thought to be absent. Particular allergic reaction did not appear compared with the control group in toothash group.

**Key words** : Cytotoxicity, Hypersensitivity, Toothash

## I. 서 론

수많은 다양한 이식재들이 골이식술에 사용되고 있다. 환자로부터 채취한 자가골이 가장 이상적이며, 다른 이식재들과 비교하였을 때 표준(standard) 역할을 한다. 자가골은 골결손부에 최적의 이식재료로 골형성능이 가장 우수하다. 그러나 치유기간 중에 부하가 가해지면, 개조(remodeling)하고 있는 이식골과의 골유착이 파괴될 수 있으며 제2의 외과적 술식이 필요하다는 단점이 있다. 공여부는 장골능, 하악지, 상악결절, 하악 정중부 등에서 분말이나 조각, 절편 등의 다양한 형태로 사용할 수 있다. 다양한 인공 골대체재료들이 골결손부의 수복을 위해 사용되고 있으며 공여부에 대한 수술이 불필요하고 이식 후 흡수가 적고 이용하기가 쉽다는 장점이 있으며, 단점으로는 이식 후 유동성, 압출(extrusion)과 감염의 위험성이 있다.

저자 등이 수년 전부터 연구해온 치아 회분말은 폐기 처리되는 적출물인 발치된 치아들을 재활용함으로써 향후 언젠가는 환경오염의 주범이 될 수 있으며, 의료 적출물의 처리가 상당히 강화되고 있는 상황에서 환경오염을 방지하고 제작 단가를 감소시킬 수 있는 일거양득의 효과를 얻을 수 있다. 또한 제조 방법이 간단하여 개인적으로 제작하여 보관, 사용할 수 있을 것이다. 즉 가격이 저렴하고 생체친화성이 있는 이식재료를 개발한다면 현재 시판되고 있는 타 제품보다 더 나은 경쟁력을 가지면서 쉽게 사용이 가능할 것으로 생각된다. 분말형 매식재의 유동성을 해결하고자 수많은 방법들이 소개되어 왔으나 만족스럽지 못하였고, 첨가물질을 이용하여 유지력을 향상시키기 위한 연구가 시행되기에 이르렀으며, 치과용 도제, 조직접착제, 그리고 치과용 연석고 등이 사용되기도 하였다. 저자 등은 인접 골조직과 유합이 잘 되고 생체 적합성이 있으면서 흡수성이며 가격이

본 연구는 보건복지부 보건의료기술연구개발사업(HMP-00-B-20507-0191)의 지원에 의하여 이루어진 것임.

저렴하면서 골전도 능력이 있는 치아회분말과 치과용 연석 고를 적정 비율로 혼합함으로써 생체 이식재료로 사용할 수 있는 타당성과 유효성을 확인하게 되었다. 1992년부터 발 치 후 폐기 처리되는 치아들을 이용하여 구강악안면 경조직 결손 수복을 위한 생체재료 개발을 위해 체계적인 연구를 시행하여 왔으며 최근 특허 취득(치아석고 및 그 제조방법, 특허 제 0261034호, 2000. 4. 15) 후 현재 식품의약품 안 정청의 허가 하에 상품화를 위한 임상 전단계 시험을 준비 중에 있다. 치아석고(toothplaster)는 발거된 치아들을 세 척한 후 900~1200℃의 고온에서 90~120분간 회화한 후 분쇄하여 불순물을 제거하고 균일한 입자 크기의 치아회분 을 제조한 후 이식 재료의 유동성을 방지하기 위해 석고 (calcium sulfate)와 적정 비율로 혼합함으로써 골결손부 수복에 이용할 수 있는 생체재료이다. 생체재료 개발을 위 한 일단계 기초 실험에 해당되는 세포독성 및 과민성 시험 은 상품화 직전 식품의약품 안정청에 근거 자료를 제출해야 하며 그 정당성을 심사 받아야 한다. 따라서 과거에 진행하 여 안정성과 유효성을 확인하였던 독성 및 과민성 실험을 정리하여 보고하고자 한다.

## II. 연구재료 및 방법

### 1. 세포독성 실험(MTT Assay)

Hella cell을 10,000/well/100μ로 DMEM/10% FCS 에 현탁하여 96-w plate에 넣어 24시간 배양한 후 0, 0.001, 0.01, 0.1, 1.0, 10.0mg/ml 농도로 DMEM/10% FCS에 현탁시킨 치아회분 용액 100μ를 첨가하여 24시간 동안 배양하였다. 또한 치아회분을 100mg/ml 로 37℃에서 10일 동안 침출한 후 그 상층액을 원액 또는 10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>, 10<sup>5</sup>로 희석하여 100μ를 첨가하였다. 110μ의 medium을 제거한 후 20μ의 MTT (5mg/ml, Sigma)를 넣고 4시간 동안 배양한 후 100μ의 0.04N HCl/iso-propanol을 첨가하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 2. 과민성 검사 (Hypersensitivity test, allergen test)

Guinea pig 20마리를 대상으로 대조군 10마리는 첫날 인 산완충용액 0.1ml를 투여하고 6일 후 치아회분 용액 0.1ml 을 투여하여 1일 후 관찰하였으며 실험군 10마리는 첫날 치 아회분 용액을 투여하고 6일후 다시 치아회분 용액을 투여 하여 1일 후 관찰하였다. 실험동물은 Ketamine/xylazine solution을 근주하여 전신마취한 후 등쪽의 털을 깎은 후에 상기 용액을 피하주사하였다. 치아회분 용액은 미리 준비한 치아회분을 인산완충용액에 잘 현탁시켜 제조하였다. 6일 후 투여 시엔 첫날 주사한 부위와는 멀리 떨어진 곳에 피하

주사하고, 이 때 상태를 육안으로 관찰한 후 사진을 촬영하 였다. 1일 경과한 후 대조군 및 실험군의 피하 주사 부위를 재관찰하였으며 발적 정도, 경결(induration) 유무 등의 발 현 여부를 조사하여 알리지 반응 발생을 평가하였다.

## III. 연구성적

### 1. 독성실험(Fig. 1)

치아회분을 넣지 않은 군을 대조군으로 하였으며 대조군 의 흡광도를 기준으로 보았을 때 치아회분을 원액, 10배, 100배, 1000배 등 10배로 순차로 희석한 다음 세포 배양 액에 첨가하여 24시간 배양 후, MTT assay 혼합액을 각각 의 well에 첨가하여 4~24시간 배양후 540nm의 파장으로 맞춘 ELISA reader로 읽었다. Y축의 값은 540nm에서의 흡광도를 나타낸 것으로 대조군의 값을 기준으로 (이때 에 러바는 triplicate로 시행한 SD값), 세포의 증식이 많이 되 면 값이 높게 나오며, 세포의 증식이 적게 되면 값이 적게 나오기 때문에, 대조군의 값을 기준으로 보아, 유의성이 있 게 적은 값이 나오면, 세포의 증식을 억제한 것이기 때문에 세포에 대한 독성이 있는 것으로 판명한다. 따라서 본 실험 에서는 그래프에서 보는 것처럼 치아회분을 첨가하여 세포 를 배양하였을 때 대조군에 비해 유의성이 없게 나오기 때 문에 세포 독성이 없는 것으로 판단되었다.

### 2. 과민성 실험

첫날 인산완충용액을 주사한 대조군과 치아회분 용액을 주사한 실험군에서 6일 후 치아회분 용액을 피하주사한 직 후 소견에서 발적, 경결 등의 알리지 반응이 나타나지 않았 으며, 1일 경과 후 대조군과 실험군 모두 피하주사한 부위 에서 알리지 반응 소견이 관찰되지 않았다. 이러한 임상 소

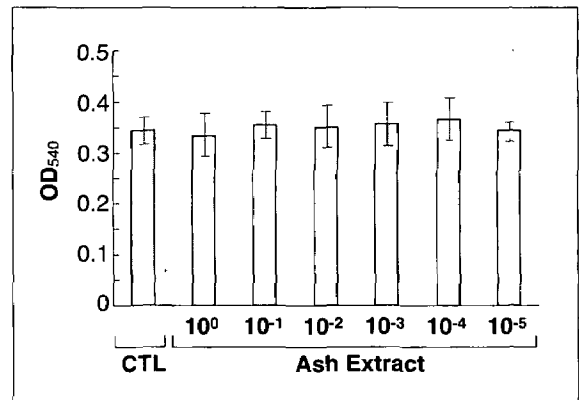


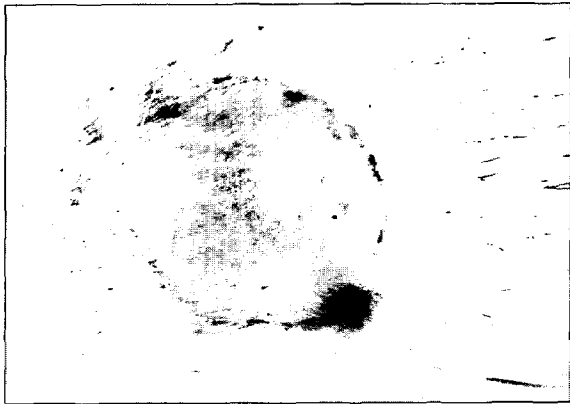
Fig. 1. Diagram of cytotoxicity test. CTL: control.



**Fig. 2.** Control group. 0.1 ml of Buffered phosphoric acid solution was injected subcutaneously at first day. Appearance of skin after toothash solution was injected subcutaneously at 6th day was non-specific.



**Fig 3.** Control group. The appearance of skin the next day after 0.1 ml of toothash solution was injected subcutaneously was non-specific.



**Fig. 4.** Experimental group. The first day toothash solution was injected subcutaneously. The appearance of the skin which toothash solution was reinjected after 6 days was nonspecific.



**Fig. 5.** The appearance of a passage 1 day afterward toothash solution was injected at 6th day in experimental group. There were no specific skin reactions.

견을 바탕으로 볼 때 실험군은 대조군에 비해 특이한 알러지 반응이 나타나지 않았다고 결론지을 수 있다. 즉 치아회분은 cell-mediated immune response(delayed-type hypersensitivity, DTH)를 유발시키지 않았다(Fig. 2, 3, 4, 5).

#### Ⅳ. 총괄 및 고찰

경조직 결손 수복을 위해 상품화되어 사용되고 있는 재료들은 탈회냉동건조골(demineralized freeze dried bone, DFDB), 수산화인회석(hydroxyapatite), Bioglass, HTR, BioOss, Calcium sulfate(Capset) 등이 있으며 각각의 재료들은 모두 장단점을 갖고 있고 각각의 제조회사에서는 나름대로의 유효성을 강조하고 있으며 임상의 들의 선

호도에 따라 선택되어 사용되고 있다. 치아석고는 1992년 개발이 시작되어 다양한 실험 과정을 거쳐 안정성과 유효성이 입증되었으며 일부 환자들의 동의하에 임상 실험이 시행되어 양호한 성적을 얻기도 하였다<sup>1-10)</sup>. 치아석고는 주성분이 hydroxyapatite인 치아회분과 주성분이 calcium sulfate hemihydrate인 석고를 무게비 2 : 1로 혼합한 재료로서 생체 친화성이 있는 골전도성 매식재료이며 생리식염수로 혼합한 후 경화되면서 매식 재료의 유동성을 최소화할 수 있으며 매식 후 시간이 경과하면서 서서히 흡수될 수 있는 물질이다. 또한 기존의 상품화되어 사용되고 있는 수산화인회석과 거의 유사한 성능을 발휘하며 calcium sulfate 제품(Capset)과 경쟁할 수 있으며 오히려 다양한 임상 분야에 적용할 수 있는 장점이 있다. 치아석고가 임상에 사용될 수 있는 분야는 국소적인 경조직 결손부 수복, 임플란트

식립 후 노출된 표면의 피개, 조직유도재생술 등이며 타 생체재료와 함께 사용할 수도 있고 자가골 이식과 동시에 사용하면 상호 장점을 증강시키면서 아주 유용한 효과를 발휘할 수 있다".

새로운 의약품이나 생체 이식 재료 등이 개발되어 상품화하기 직전에 안전성과 유효성을 심사하기 위해 식품의약품안전청에 제출해야 하는 자료들은 다음과 같다.

- 1) 기원 또는 발견 및 개발경위에 관한 자료
- 2) 구조결정, 물리화학적 성질 및 생물학적 성질에 관한 자료
- 3) 안정성에 관한 자료
- 4) 독성에 관한 자료
- 5) 약리작용에 관한 자료
- 6) 임상시험성적에 관한 자료
- 7) 외국의 사용현황 등에 관한 자료
- 8) 국내 유사제품과의 비교검토 및 당해 의약품 등의 특성에 관한 자료
- 9) 기타 임상시험의 실시를 위하여 필요한 자료

생체재료의 안전성 시험은 임상전단계에서 미생물, 배양세포, 실험 동물 등을 이용하여 여러가지 실험을 행함으로써 이루어진다. 독성 및 과민성 실험은 반드시 거쳐야 하는 임상 전단계 실험으로서 의약품 안전성시험관리기준에 의하여 실험하여야 하며 대학 또는 연구기관 등 국내외의 전문기관에서 시험한 것으로서 그 내용을 검토하여 타당하다고 인정할 수 있는 자료를 제공해야 한다. 본 연구의 실험은 조선대학교 미생물학교실에서 실시되었으며 세포독성을 위해 사용한 실험은 대표적으로 사용하는 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-(2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)를 이용한 Cell proliferation kit (Roche, Mannheim, Germany)를 사용하여 시행하였다. 세포독성 검사는 반드시 필요한 초기 검사로서 세포의 생존력 혹은 대사 변화를 평가하게 된다. 세포 독성은 생체에서 염증 반응 혹은 섬유화와 같은 조직 반응을 유발하게 된다<sup>2)</sup>.

골대체재료의 안정성 시험은 제 1 단계 초기검사, 제 2 단계 동물실험 그리고 제 3 단계 임상전단계 검사로 대별할 수 있다. 이중 세포독성검사와 알러지(과민성) 검사는 초기 검사에 해당되는 평가법으로서 인체에 이식되는 골대체재료의 임상 시험 전에 반드시 이루어져야 하는 검사법이라 하겠다<sup>3)</sup>. 세포독성실험에 어떤 특정 세포를 사용해야 한다는 제한은 없으며 NCTC2544(인간 피부상피세포), BHK-21(햄스터 신장세포), 3T3(생쥐 섬유아세포) 등을 사용한 치과재료의 독성 평가에 대한 보고가 있었다. 박 등<sup>14)</sup>은 한천충배지시험법과 세포형태변화를 이용하여 치과용 임플란트의 세포독성 검사를 시행하여 안정성을 확인한 바 있다. 저자 등의 실험에선 Hela cell을 이용한 MTT assay를 사용하였다.

지연형 과민반응(Delayed-type hypersensitivity, DTH)은 세포중개의 면역반응(cell-mediated immune response)을 측정하는 대표적인 in vitro assay로서 주로 사람이나 guinea pig를 대상으로 시행한다. 증감 주기(sensitization period)는 보통 6일 정도이고 이 기간에 antigen-specific cells이 생성되어 모든 임파조직으로 이동되며 항원을 재차 투여하면 그 부위에 DTH 반응을 야기한다. Tuberculin-induced delayed type hypersensitivity와 allergen-induced late phase responses는 antigen-specific T cells에 의해 증개되는 지연형 과민반응의 대표적인 2가지 유형의 피부 염증반응이다<sup>15)</sup>. 최초로 언급된 DTH 반응은 tuberculin antigen에 의한 반응에 국한되었지만 점차 세균과 바이러스 항원에 대한 세포 중개반응, 순수 단백질에 대한 반응 그리고 동종이식에 대한 숙주 반응으로 확장되었다. DTH skin test는 항원에 이미 노출되었는지를 평가하기 위해 사용되며 소량의 항원을 피하부에 주입한 후 24~72시간 내에 경결(induration), 종창 그리고 병소부에 단핵세포 침윤이 발생하는지를 평가하게 된다<sup>16-18)</sup>. 본 연구에서 시행된 과민성 실험은 guinea pig의 피부 반응을 육안으로 관찰함으로써 지연형 과민반응을 평가하는 방법이었으며 특히 과민성 반응이 나타나지 않았다.

## V. 결 론

저자 등이 개발한 골수복 생체재료인 치아회분의 세포독성 및 알러지 반응 검사를 시행한 결과 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. MTT assay를 이용한 세포독성 실험 결과 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으며 세포독성은 없는 것으로 사료되었다.
2. 치아회분은 대조군에 비해 특이한 알러지 반응이 나타나지 않았다.

## 참고문헌

1. Kim YK, Yeo HH: An experimental study on the tissue reaction of toothhash implanted in mandible body of the mature dog. The Journal of Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons. 15: 129, 1993.
2. Kim YK, Yeo HH et al.: Implantation of toothhash combined with plaster of Paris: Experimental study. The Journal of Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons. 16: 122, 1994.
3. Kim YK, Yeo HH: Implantation of toothhash combined with plaster of Paris: Clinical applications. The Journal of Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons. 16: 130, 1994.
4. Kim YK, Yeo HH, Cho JO: The experimental study of implantation combined with toothhash and plaster of Paris

- in the rats: comparison according to the mixing ratio. The Journal of Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons. 18: 26, 1996.
5. Kim YK, Kim SG, Lee MH et al.: An experimental study on the healing process after the implantation of a various bone substitutes in the rats. Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 27: 15, 2001.
  6. Kim YK, Yeo HH et al.: The experimental study on the healing process after the inlay implantation of toothhash-plaster mixture block. The Journal of Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons. 18: 253, 1996.
  7. Kim YK: The experimental study of the implantation of toothhash and plaster of Paris and guided tissue regeneration using lyodura. Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 22: 297, 1996.
  8. Kim YK, Ko YM: Biomechanical study of the calvarial defects after implantation of the toothhash and Plaster in the rat. The Journal of Korean Association of Maxillofacial Plastic and Reconstructive Surgeons. 18: 771, 1996.
  9. Kim YK, Yeo HH: Transmitted electronic microscopic study about the tissue reaction after the implantation of toothhash. Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. 23: 283, 1997.
  10. Kim SG, Yeo HH, Kim YK: Grafting of large defects of the jaws with a particulate dentin-plaster of paris combination. Oral surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 88: 22, 1999.
  11. Kim YK: The development of new biomaterial for restoration of hard tissue defects. The Journal of the Korean Dental Association. 36: 289, 1998.
  12. Freshney RJ: Culture of animal cells. A manual of basic technique. Second edition. Alan R. Liss, Inc., New York. 1987.
  13. ANSI/ADA Document No. 41 for recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. J Am Dent Assoc. 99: 697, 1979.
  14. Park BS, Kim SH et al.: An evaluation of the osseointegration and cytotoxicity using dental implant developed in Korea. The Korean Journal of Oral Anatomy. 20: 53, 1996.
  15. Tsicopoulos A, Fahy O, Tonnel AB: Delayed-type hypersensitivity reactions to nominal protein antigens and to environmental allergens: similarities and differences. Eur J Dermatol. 9: 261, 1999.
  16. Black CA: Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective. Dermatol Online J. 5: 7, 1999.
  17. Katsura Y, Inaba K, Kzumi T, Uesaka I: Cell-mediated and humoral immune responses in mice. II. Sensitizing conditions for delayed-type hypersensitivity. Int Arch Allergy Appl Immunol. 53: 329, 1977.
  18. Moskophidis D, Fang L, Gossmann J et al.: Virus-specific delayed-type hypersensitivity(DTH). Cells mediating lymphocytic choriomeningitis virus-specific DTH reaction in mice. J Immunol. 144: 1926, 1990.

#### 저자 연락처

우편번호 463-774  
경기도 성남시 분당구 서현동 255-2  
분당제생병원 치과 구강악안면외과  
김 영 균

원고 접수일 2001년 7월 30일  
게재 확정일 2001년 8월 8일

#### Reprint Requests

Young-Kyun Kim  
Dept. of OMFS, Bundang Jesaeng General Hospital, DMC  
#255-2, Seohyeon-Dong, Bundang-Gu, Seongnam Si, Gyeonggi-Do, 463-774, Korea.  
Tel. 82-31-779-0731 Fax. 82-31-779-0744  
E-mail : kyk0505@dmc.or.kr

Paper received 30 July 2001  
Paper accepted 8 August 2001