

의치상 레진의 세포독성에 관한 연구

서울대학교 치과대학 치과보철학교실

김성균 · 장익태 · 허성주 ·곽재영

I. 서 론

애크릴릭 레진은 치의학 특히 임상 보철 분야에서 오랫동안 사용되어 왔으며 그에 따라 물리적 성질이나 생체적합성의 측면에서 현재까지 개선되어 오고 있는 치과 재료의 하나이다. 현재 다양한 종류의 레진들이 소개되어 오고 있다. 애크릴릭 레진은 중합체인 polymethyl methacrylate와 단량체인 methyl methacrylate의 반응물로 이루어지며 주로 의치상용 레진으로 이용되고 있다.

의치상 레진에 대한 연구는 강도, 용해도 등의 물리적 성질의 개선과 세포독성, 미생물 부착 등과 같은 생체 친화성의 향상이 주를 이룬다. 애크릴릭 레진의 생체 적합성을 평가하기 위해 세포 배양법이 지난 40년 동안 이용되어져 왔다. 세포 배양법에 의해 나타난 결과를 평가하기 위해 세포성장, 세포용해, 대사 활성 등 다양한 방법들을 사용하여 왔으며, 세포와 시편의 관계 역시 직접 접촉을 통한 방법과 한천 등을 이용한 간접 접촉 등 다양한 방법을 사용하였다. 현재 많은 실험법이 이용되고 있으나 방법에 따른 결과는 서로 다르게 보고되고 있으며 사용하는 세포와 농도에 대해서도 다양한 의견이 제시 되었다.¹⁾

세포 배양법을 이용한 치과용 재료의 생체 적합성 평가는 동물실험이나 사용시험 방법 (usage test)에 따라 다른 결과를 보일 수 있음에도 불구하고, 실험과정이 간편하며 재현성이 있고 저렴하며 동물실험의 대체법으로 적당하다는 이유로 선호되어 왔다. 특히 세포 배양법은 새로운 재료에

대한 독성 관찰과 독성 물질 파악에 적당한 방법이라고 보고되었다.²⁾

애크릴릭 레진을 사용한 의치 장착 후 종종 구내염이 발생하는 것을 볼 수 있다. 의치 구내염의 원인으로는 캔디다 균에 의한 감염이나 잘 맞지 않는 의치, 교합 부조화가 주로 지적된다. 적은 빈도이기는 하지만 의치상 재료에 대한 과민반응으로도 같은 증상이 발생할 수 있으며 의치상으로부터 유리되는 독성물질에 대한 국소적 영향에 의한 것으로 지적되기도 한다.³⁻⁵⁾ 많은 연구에서 애크릴릭 레진으로부터 유리되어 나오는 요소들이 구강조직에 자극이나 염증, 알러지 반응을 일으킬 수 있다고 지적하였고 이러한 부작용을 방지하기 위해 자극적인 물질이 구강점막이나 타액으로 유리되기 전에 제거하는 것이 바람직하다고 하였다.⁶⁻⁹⁾

온성된 의치상이라 할지라도 잔존 단량체나 formaldehyde, methacrylic acid, benzoic acid 등의 독성물질이 유리된다고 알려져 있다.¹⁰⁾ 의치상에서 유리되는 물질은 사용한 재료나 온성 방법에 따라 차이가 나타나며 열중합 레진에서는 잔량 단량체가 통상적으로 0.5% 내외인 반면 자가중합 레진에서는 5%까지 높게 나타나며 중합이 불완전할 경우에도 높게 나타난다고 보고되었다.^{6,11)}

Sheridan 등과 Cimpan 등은 열중합 레진과 자가중합 레진의 세포독성을 측정하였는데 실험한 모든 레진에서 독성이 나타났으며 특히 자가중합 레진이 더 강한 독성을 나타냈다고 보고하였다.^{12,13)} Baker 등은 열중합 레진보다 자가중합 레진 의치상을 장착한 환자의 타액에서 더 많은

methyl methacrylate가 검출되었다고 보고하였다.⁹⁾

그러나 Vallitu와 Ekstrand는 열중합 및 자가중합 레진의 세포독성을 한천 확산법으로 평가한 결과 독성은 나타나지 않았다고 보고하였다.¹⁴⁾ Hensen-Pettersen 등은 애크릴릭 레진이 세포성장장에 미치는 영향을 연구하였는데 성장 방해가 관찰되지 않았다고 보고 하였다.¹⁵⁾

최근 애크릴릭 레진의 중합 수축을 감소시키기 위해 레진의 단량체에 polyhedraloligosilsesquioxane (POSS) 분자를 첨가한 polymeric nanocomposite가 개발되었다. 이 레진은 기존의 애크릴릭 레진에 비해 열에 대한 안정성과 기계적 강도면에서 증가된 물성을 보여주었다.¹⁶⁾

이 연구의 목적은 수중 의치상 레진의 세포독성에 대해 연구하고 시간이 지남에 따라 독성물질이 유리되어 나옴으로써 나타나는 세포독성의 변화를 조사하는 것이다. 또한 의치상 레진의 돌연변이 유발 효과 (mutagenicity)에 관해 평가하는 것이다.

II. 연구 재료 및 방법

1. 연구 재료

시편 제작을 위해 4종의 애크릴릭 의치상 레진을 사용하였으며 실험군은 모두 4군으로 나누었다 (Table I).

- 제1군 : 열중합 의치상 레진 (Luciton 199[®])
- 제2군 : 단량체에 POSS 분자를 첨가한 열중합 의치상 레진 (POSS resin)
- 제3군 : 자가중합 의치상 레진 (Repair Acrylic[®])
- 제4군 : 직접 이장용 자가중합 의치상 레진 (Tokuso Rebase[®]).

지름 10mm, 높이 2mm의 실리콘 원판을 만들고 통상적인 의치 제작 과정에 따라 치과용 석고를 사용해 플라스크에 매몰하였다. 만들어진 몰드에서 실리콘 원판을 제거 후 남겨진 음형에 애크릴릭 레진을 제조회사의 지시대로 혼합하여 온성하였다. 2mm 높이로 시편을 제작한 이유는 의치의 평균적인 두께이며 완전한 온성을 이룰 수 있고 시편이 용출용매에 완전히 침지되게 하기 위해서이다. 온성된 각 레진 시편을 석고 모형에서 분리하고 얇게 스며 나온 예리한 부분을 제거하였다. 자외선 소독기를 사용하여 20분씩 조사해 양 면을 소독하였다

2. 연구 방법

(1) 대사 분석 (Metabolic assays)

시편 침지

시간에 따른 독성의 변화를 보기 위하여 24시간과 72시간 증류수에 침지한 시편과 중합 직후의 시편을 제작하였다. 4종의 레진에서 각 25개씩의 시편을 제작하여 상온의 증류수에 72시간 침지시켰으며 (72시간 침지), 침지 시작 48시간 후 다시 각 25개씩의 레진 시편을 제작하여 24시간 침지시켰다 (24시간 침지). 침지 시작 72시간 후 다시 각 25개씩의 레진 시편을 제작하여 침지시켜 두었던 시편과 함께 용출시켰다. 각 조건당 25개의 시편을 제작하였으며 레진의 종류별로 75개, 실험당 300개의 레진 시편을 제작하였다.

용출

용출은 소독된 각 튜브에 4ml의 용출용매와 침지를 마친 레진 시편 5개를 넣어서 준비하였다. 용출용매는 Alpha-Minimum Essential Medium (Gibco-BRL, Grand Island, NY)에 1% an-

Table I. Specifications of the materials used in the fabrication of test specimens

Group	Brand name	Type	Manufacturer
1	Luciton 199	Heat	Dentsply International, Inc. York, Pa, U.S.A.
2	POSS resin	Heat	J&J Dental Co., Seoul, Korea
3	Repair Acrylic	Auto	Lang Dental MFG. Co. Inc. Wheeling, Illinois, U.S.A.
4	Tokuso Rebase	Auto	Tokuyama Corp. Shibuya-ku, Tokyo, Japan

tibiotic-antimycotic mixture와 5% fetal bovine serum (FBS) (Gibco-BRL)을 첨가한 배양액을 사용하였다. 튜브를 plate rocker (300rpm)에 위치시키고 24시간을 용출시켰다. 시간별 침지에서 얻어진 레진당 25개의 시편에서 5개씩을 하나의 튜브에 침하하여 각 조건별로 5개의 용출액 (eluates)을 준비하였다 (N=5). 중합 직후, 24시간, 72시간 침지한 4종의 레진에서 총 60개의 용출액을 추출하였다. 에크릴릭 레진과 용출용매 간의 접촉비율은 2.75cm²/ml 이었다.

세포 배양

세포는 human gingival fibroblast를 사용하였다. 치주 치료 중에 적출한 생검 조직으로부터 explant culture method를 이용하여 primary human gingival fibroblasts를 추출하였다. 배양액은 1% antibiotic-antimycotic mixture와 10% FBS를 첨가한 α -MEM 배양액을 사용하였다. 내부 공기중의 CO₂ 농도가 5%로 유지되는 세포배양 항온기 (5% CO₂/95% air, 37°C 항온기)에서 37°C로 배양하였다. 충분한 배양 후 세포들을 96-well plate에 각 well당 3000 세포씩 옮겼으며 200 μ l 배양액을 넣어서 24시간동안 배양하였다.

분광 분석법 (Spectrophotometric method)

24시간 세포 배양 후 96-well plate에서 배양액을 제거한 후 100 μ l 씩의 용출액으로 대체하였다. 각각의 용출튜브에서 3회 용출액을 추출하여 3개의 well에 각각 넣었다.

용출액이 없는 순수한 배양액을 대조군으로 사용하였다. 5% CO₂/95% air, 37°C 항온기에서 24시간 동안 배양하였다.

분광 분석법 (Spectrophotometric method)은 cellular mitochondrial function을 측정함으로써 세포독성을 평가하는 방법이다. 세포내 대사를 통해 tetrazolium salt가 formazan으로 전환하는데 이를 분광기로 측정하여 세포의 대사 활성도를 평가하는 방법이다.

24시간 배양 후 MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)/succinate solution (CellTiter 96 Assay; Promega Corp., Madison, Wis)을 각 well 당 25 μ l 씩 넣어

4시간 배양 후 흡입하고 Dimethylsulfoxide를 넣은 후 분광기 (Model ETY-96, Toyo instruments Inc., Japan)를 사용해 550nm의 파장으로 흡광도를 측정하였다. 각각의 흡광도를 측정하여 대조군과의 비교 백분율로 나타내었다.

이상의 전체적인 실험과정을 2회 반복한 결과 두 실험군간에 통계적으로 일치하는 경향을 나타내었다 (p=0.91).

(2) 한천 확산법 (Agar overlay test)

시편 침지

시간에 따른 독성의 변화를 보기 위하여 24시간과 72시간 증류수에 침지한 시편과 중합 직후의 시편을 제작하였다. 4종의 의치상 레진에서 각 3개씩의 시편을 제작하여 상온의 증류수에 72시간 침지시켰으며, 침지 시작 48시간 후 다시 각 3개씩의 레진 시편을 제작하여 침지시켰다. 침지 시작 72시간 후 각 레진에서 시편 3개씩을 제작하여 침지시켜 두었던 시편과 함께 실험하였다. 각 조건당 3개의 시편을 제작하였으며 레진 종류별로 9개, 총 36개의 시편을 제작하였다.

세포배양과 독성실험

세포주로는 mouse fibroblast cells (L929)를 이용하였다. 실험은 International Standards Organization (ISO) Technical Report 7405-1997¹⁷에 따라 시행하였다. 60×10mm 플라스틱 배양용기 (Costar, Cambridge, Mass)에 5×10⁵ 개의 세포를 넣었다. 배양액은 1% antibiotic-antimycotic mixture와 10% FBS를 첨가한 Dulbecco's Modified Eagles Medium (Gibco-BRL) 배양액을 사용하였다. 5% CO₂/95% air, 37°C 항온기에서 2일간 배양 후 충분한 세포층이 형성되었을 때 배양액을 제거하고 5ml의 1% agarose (FMC Corp., Rockland, Maine)를 함유한 배양액을 넣었다. Agarose가 굳은 후 에크릴릭 레진 시편들을 한천 표면위에 위치시키고 5% CO₂/95% air 항온기를 사용해 37°C에서 24시간 배양하였다.

양성대조 재료로는 polyvinylchloride를 사용하였다. 24시간 후 0.01% 뉴트럴레드를 사용해 37°C에서 15분간 염색하였다. 광학 현미경을 이용해 세포 변화와 용해도를 검사하였다 (40×). 결과는

Table II. Definition of zone/lysis index values

Index	Description of zone
Zone index	
0	No detectable zone around or under sample
1	Zone limited to area under sample
2	Zone not greater than 0.5 cm in extension from sample
3	Zone not greater than 1 cm in extension from sample
4	Zone greater than 1 cm in extension from sample, but not involving entire plate
5	Zone involving entire plate
Lysis index	
0	No observable lysis
1	Up to 20% of zone lysed
2	20% -40% of zone lysed
3	40% -60% of zone lysed
4	60% -80% of zone lysed
5	Over 80% lysed within zone

Table II의 zone index 와 lysis index로 표기하였다. 아크릴릭 레진의 종류와 실험 조건별로 3회 시행하였다.

(3) 돌연변이 유발 분석 (Mutagenesis assays)

용출

4종의 아크릴릭 레진에서 중합된 직후의 레진 시편만을 이용해 용출하였다. 용출은 소독된 각각의 튜브에 4ml의 용출용매를 넣고 5개씩의 레진 시편을 넣어서 준비하였다. 용출용매는 D-MEM에 1% antibiotic-antimycotic mixture와 10% FBS를 첨가한 배양액을 사용하였다. 튜브를 plate rocker (300rpm)에 위치시키고 24시간 용출시켰다. 아크릴릭 레진과 용출용매 간의 접촉비율은 2.75cm²/ml 이었다.

세포배양

세포주로는 mouse fibroblast cells (L929)를 이용하였다. 배양액은 1% antibiotic-antimycotic mixture와 10% FBS가 첨가된 D-MEM 을 사용하였고 5% CO₂/95% air, 37℃ 항온기에서 37℃로 배양하였다. 세포들을 24-well plate에 각 well 당 1×10⁴ 세포씩 옮겼으며 1ml 배양액을 넣어서 24시간동안 배양하였다.

돌연변이 유발 분석

24시간 배양 후 24-well plate에서 배양액을 제거한 후 1ml의 용출액으로 대체하였다. 각각의 용출튜브에서 8회씩 추출하여 각각을 다른 well에 넣었다.

용출액이 없는 순수한 배양액을 대조군으로 사용하였다. 5% CO₂/95% air, 37℃ 항온기에서 15일 동안 배양하여 위상차 현미경으로 관찰하였다.

돌연변이 유발 분석이란 돌연변이 발생의 정도를 측정하는 방법으로 화학적 요소가 세포의 DNA를 손상시켜 다음 세대로 유전이 되는 상태를 유발하는 정도를 측정하는 방법이다. Soft agar assay에서의 수치는 agar 상에 형성된 군체의 숫자이며 이것은 부착성장세포가 부착성장을 하지 않게 됨으로써 돌연변이가 유발되었다는 사실을 확인하는 방법이다.

각 아크릴릭 레진별로 8회 실험하였다.

3. 통계처리

4종의 아크릴릭 레진의 통계차를 검정하기 위하여 분산분석 (one-way ANOVA)을 이용하였고 사후 검정을 위해 Duncan test를 이용하였다. 돌연변이 유발 분석에서 대조군과 4종의 레진간의 통계를 검정하기 위하여, 비모수검정 (Mann-Whitney U test)을 이용하여 통계적 차이를 확인

하였고 T-test도 동시에 시행하여 통계적 차이를 확인하였다 ($p < .05$).

III. 연구결과

1. 대사 분석 (Metabolic assays)

각 실험군의 대사 분석법에 의한 결과는 Table III 및 Figure 1과 같다.

중합된 직후의 아크릴릭 레진간의 세포독성은 제4군이 제1군, 제2군, 제3군에 비해 유의할만하게 높게 나타났으며, 제3군은 제2군에 비해 유의하게 높게 나타났다. 제1군과 제3군 사이와 제1군과 제2군 사이에는 유의한 차이가 없었다. 증류수에 24시간 침지한 아크릴릭 레진의 세포독성에서는 제4군이 제1군, 제2군, 제3군에 비해 유의할만하게 높게 나타났으며, 제3군은 제1군과 제2군에 비해 유의하게 높게 나타났다. 제1군과 제2군은 유의한 차이가 없었다. 증류수에 72시간 침지한 아크릴릭 레진의 세포독성에서는 제4군이 제1군, 제2군, 제3군에 비해 유의할만하게 높게 나타났으며, 제3군은 제1군과 제2군에 비해 유의하게 높게 나타났다. 제1군과 제2군은 유의한 차이가 없었다.

광학 현미경으로 관찰한 결과 중합 직후의 제4군 용출 실험에서는 대조군과 비교하여 섬유모세포의 손상으로 인한 세포돌기의 수축을 관찰할 수 있었다 (Figs. 2, 3). 72시간 침지 후의 제2군 용출 실험에서는 방추형의 세포돌기를 갖는 정상적인 섬유모세포의 증식을 관찰하였다 (Fig. 4).

Table III. The results of metabolic assay on the cytotoxicity of denture base resins

Group	Fresh	24hrs. Immersion		72hrs. Immersion	
1	73.55±10.36	83.05±13.49*	98.87±15.29**		
2	77.21±12.49	85.71±9.03*	100.99±12.87**		
3	69.72±11.36	75.78±10.08	91.62±15.04**		
4	51.49±8.28	59.23±9.47*	80.42±9.29**		

* Significant difference from fresh specimens

** Significant difference from 24 hrs. immersion specimens

72시간 침지한 레진 시편의 세포독성 실험에서 제1군과 제2군의 세포 대사 활성도는 대조군과 일치하는 경향을 보였다.

72시간 침지 시편의 용출 실험에서 전자 현미경으로 세포를 관찰한 결과 제1군과 제2군은 잘 발달된 RER, Golgi apparatus, secretory vesicles 등 전형적인 섬유모세포의 소견을 보였다 (Figs. 5, 6, 7).

제3군에서는 잘 발달된 RER과 Golgi apparatus 등이 관찰되었으나 대조군에 비해 다수의 lysosome이 관찰되는 소견을 보였다 (Fig. 8). 제4군은 대조군에 비해 RER의 수가 감소되고 다수의 lysosome이 관찰되는 소견을 보였다 (Fig. 9).

각 실험군에서 중합된 직후와 24시간, 72시간 침지 후의 세포독성을 비교한 결과, 제1군과 제2군, 제4군은 시간이 지남에 따라 세포의 대사 활성도가 유의하게 증가하는 일치된 경향을 보여주었다 (Fig. 10). 제3군은 72시간 침지시킨 시편에서 유의하게 높은 세포 활성도를 보였다.

세포독성에 대한 열중합 레진과 자가중합 레진의 비교는 Table IV 및 Figure 11과 같다. 아크릴릭 레진의 세포독성은 중합된 직후와 24시간 증류수에 침지 후, 72시간 침지 후의 모두에서 자가중합 레진이 열중합 레진에 비해 유의하게 높은 세포독성을 보였다.

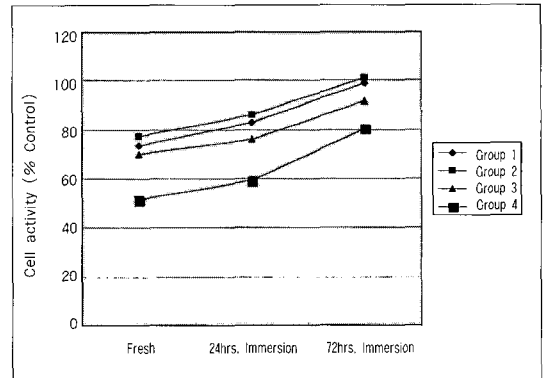


Fig. 1. Response of gingival cells to eluates from denture base resins. Hrs. indicate length of time that resin specimens were soaked in distilled water.

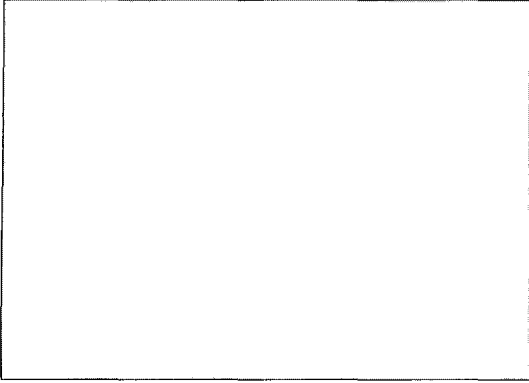


Fig. 2. Photomicrographs of cultured fibroblasts under application of control ($\times 100$).

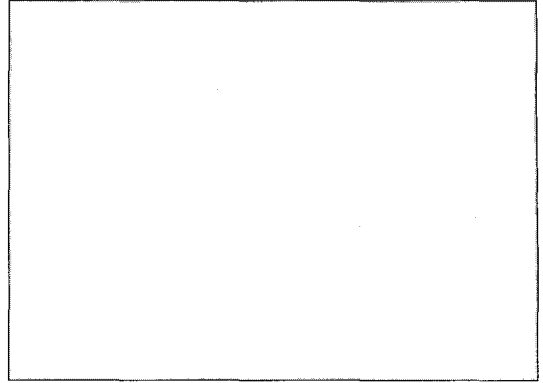


Fig. 3. Photomicrographs of cultured fibroblasts under application of eluates from fresh Group 4 specimens ($\times 100$).

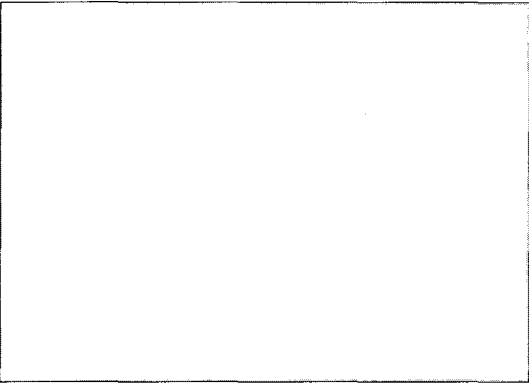


Fig. 4. Photomicrographs of cultured fibroblasts under application of eluates from Group 2 specimens after 72hrs. water immersion ($\times 100$).



Fig. 5. Electron micrographs of cultured fibroblasts under application of control ($\times 5000$).



Fig. 6. Electron micrographs of cultured fibroblasts under application of eluates from Group 1 specimens after 72hrs. water immersion ($\times 5000$).

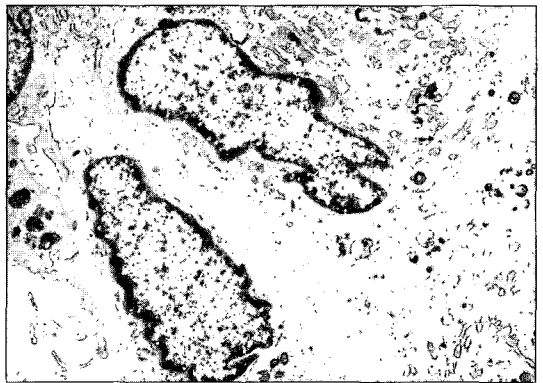


Fig. 7. Electron micrographs of cultured fibroblasts under application of eluates from Group 2 specimens after 72hrs. water immersion ($\times 5000$).

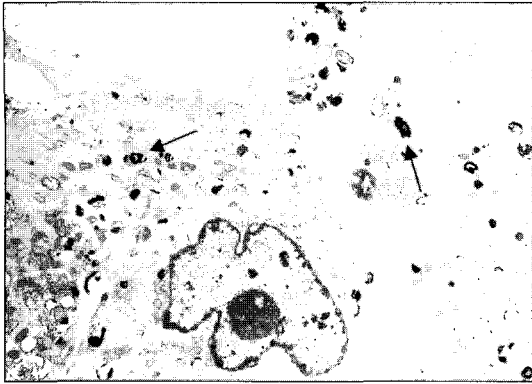


Fig. 8. Electron micrographs of cultured fibroblasts under application of eluates from Group 3 specimens after 72hrs. water immersion ($\times 5000$). Arrows indicate lysosomes.

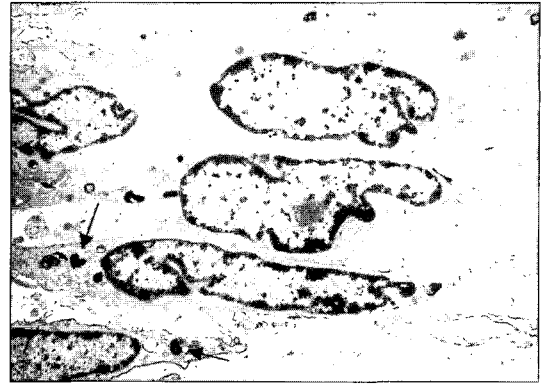


Fig. 9. Electron micrographs of cultured fibroblasts under application of eluates from Group 4 specimens after 72hrs. water immersion ($\times 5000$). Arrows indicate lysosomes.

Table IV. The results of metabolic assay on the cytotoxicity of denture base resins

Acrylic Resin	Fresh	24hrs. Immersion	72hrs. Immersion
Heat polymerizing	75.38 \pm 11.53	84.38 \pm 11.46*	99.93 \pm 14.05**
Auto polymerizing	60.61 \pm 13.48	67.51 \pm 12.79*	86.02 \pm 13.62**

* Significant difference from fresh specimens

** Significant difference from 24 hrs. immersion specimens

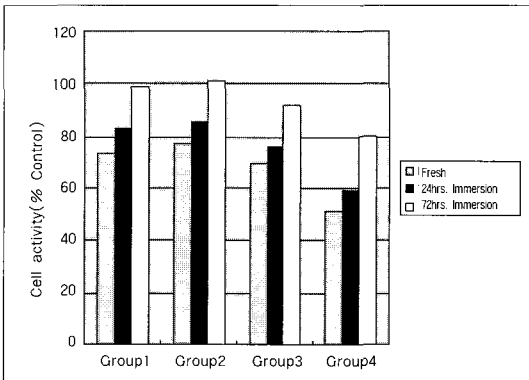


Fig. 10. Response of gingival cells to eluates from fresh, 24hrs. and 72hrs. water immersion.

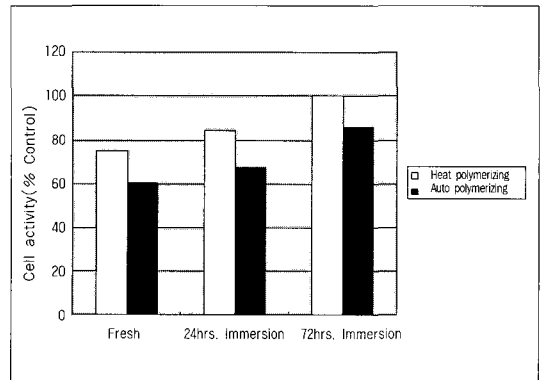


Fig. 11. Response of gingival cells to eluates from denture base resins.

2. 한천 확산법 (Agar overlay test)

각 아크릴릭 레진의 한천 확산법에 의한 세포독성은 Table V와 같다. 양성대조 재료로 사용된

PVC에서는 1-4의 zone-lysis index를 나타냈다. 제1군은 중합된 직후 1-2, 24시간 침지 후 1-3, 72시간 침지 후 1-2의 값을 나타냈다. 제2군은 중합된 직후 2-1, 24시간 침지 후 1-0, 72시간 침지 후

Table V. Cytotoxicity of denture base resins by agar overlay test

Zi - Li	Fresh	24hrs. Immersion	72hrs. Immersion
Group 1	1 - 2	1 - 3	1 - 2
Group 2	2 - 1	1 - 0	1 - 0
Group 3	2 - 3	1 - 3	1 - 3
Group 4	2 - 4	1 - 3	1 - 4

Zi = zone index, Li = lysis index

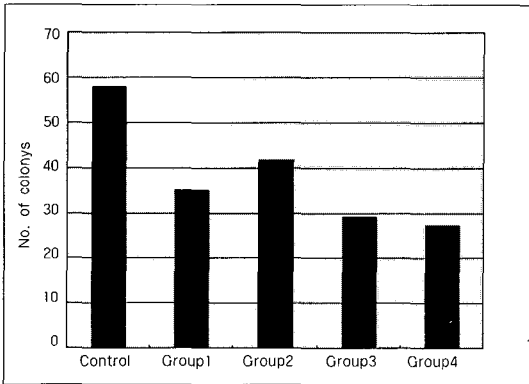


Fig. 12. The results of mutagenesis assay on denture base resins.

1-0로 시간이 지남에 따라 세포독성이 줄어드는 경향을 보였고, 24시간과 72시간 침지된 시편에서는 세포 용해가 관찰되지 않았다. 제3군은 중합된 직후 2-3, 24시간 침지 후 1-3, 72시간 침지 후 1-3으로 zone index가 중합된 직후보다 줄어들었다. 제4군은 중합된 직후 2-4, 24시간 침지 후 1-3, 72시간 침지 후 1-4로 zone index가 중합된 직후보다 줄어들었다. 제3군과 제4군이 제1군과 제2군에 비해 세포독성이 높게 나타나는 경향을 보였다.

3. 돌연변이 유발 분석 (Mutagenesis assays)

돌연변이에 의해 형성된 균체 수는 순수한 배양액을 사용한 대조군의 경우 58 ± 9.73 의 값을 나타냈다 (Table VI, Fig. 12). 제1군은 34.88 ± 7.79 , 제2군은 41.63 ± 6.82 , 제3군은 29.13 ± 5.33 , 제4군은 27.25 ± 3.60 의 값을 나타내었다. 4종의 아크릴릭 레진 모두에서 대조군보다 유의한 낮은 값

Table VI. The results of mutagenesis assay on denture base resins

Group	Mutagenicity
Control	58.00 ± 9.73
1	$34.88 \pm 7.79^*$
2	$41.63 \pm 6.82^*$
3	$29.13 \pm 5.33^*$
4	$27.25 \pm 3.61^*$

* Significant difference from control

을 나타냈다.

대조군의 값은 세포주 (L929) 자체의 자발적 형질변환 비율을 나타내는 것으로 본 연구에서는 레진을 넣은 경우보다 높은 값을 보였다. 이는 아크릴릭 레진의 독성에 의한 결과로 보이는데 레진에서 유리된 독성물질이 생성된 균체의 성장을 방해한 것으로 보인다.

IV. 총 괄

의치상 레진으로부터 formaldehyde, methyl methacrylate, methacrylic acid, benzoic acid 등의 다양한 종류의 독성물질이 유리되어 나오는 것으로 알려져 있다. 단량체는 항원으로 작용할 수 있고 보철물내의 잔존 단량체는 피부나 구강점막에 반응을 유발한다고 보고되고 있다.^{9,18)} 잔존단량체의 양은 의치상 레진의 종류, 온성법, 온성기간, 레진의 두께에 영향을 받는다고 한다.^{19,20)} 단량체가 다량체로 100% 전환하는 것은 거의 불가능하며 중합 후 잔류하는 미반응 단량체를 구성하는 분자들은 타액이나 다른 용매로 유출될 수 있다. 자가중합 아크릴릭 레진의 잔존 단량체는 96%가 처음 7일에 유리된다고 하였고 나머지 4%는 30일까지 유리되어 나온다고 하였다.²¹⁾ Baker 등은 의치상 레진에서 유출되는 methyl methacrylate의 대부분이 1시간 안에 일어난다고 하였다.⁹⁾ Sadamori 등은 잔류 단량체가 의치사용 후 7년까지 관찰된다고 보고하였다.²²⁾ Ruyter는 의치에서 formaldehyde가 유리되어 나온다고 하였고 Oysaed 등은 의치온성 후 115일 후에도 관찰된다고 하였다.^{23,24)} Lefebvre 등은 구강내 환경에서는 독성물질이 유리되어 나올 수 있으며 의치접촉 부위

에서 떨어진 곳에 영향을 미칠 수 있다고 하였다. 따라서 영양 부족이나 투약 환자에게 있어서 감염이나 염증이 있는 점막에 나타나는 특이한 반응의 이유가 될 수 있다고 하였다.¹⁰⁾

레진에서 유출되는 잔존단량체 등은 피부와 구강점막, 상아질, 치수, 골과 연조직으로 흡수되어 세포독성 반응에 관여할 수 있는데 이 방출에 대하여 직접적, 간접적 증거가 있다. 간접적으로 접촉성 피부염, 손끝의 색 변화, 알러지 반응과 구강내 작열감등이 있고, 직접적으로 중합한 레진 성분 재료를 비 수용성과 수용성 용매로 추출하여 조성을 분석한 결과 미반응 단량체를 검출할 수 있었다.²⁵⁾ 신체내에 유리된 잔존 단량체는 타액에 의해 이동되어 종국에는 배설되게 된다. 애크릴릭 레진에 의해 알러지 반응이 유발되기 위해서는 잔존 단량체가 정상범위 이상으로 타액에 누출되어 구강점막으로 운반되거나 연하에 의해 소화기내로 흡수되어야 한다.⁹⁾ 그러나 애크릴릭 레진에서 단량체가 매우 긴 시간동안 나오기는 하지만 양이 적어서 발견하기는 힘들다고 보고하였다.²⁶⁾ 그러나 의치 하방에서는 구강 점막으로 유리되어 나오는 methyl methacrylate의 양이 다른 곳보다 높을 수 있으며 일부의 경우 의치가 직접 접촉하고 있는 구강점막에 축적되어 반응을 유발할 수 있다. 이는 개개인의 타액 분비와 단량체에 대한 면역체계의 영향을 받는다고 보고하였다.²⁷⁾ Methyl methacrylate 외에도 다른 종류의 독성 물질이 유리되어 나오는데 formaldehyde의 경우 methyl methacrylate 보다 적은 양으로도 높은 독성을 유발할 수 있다고 보고 되어지고 있다.^{28,29)} 의치를 환자에 장착하기 전 물에 담가 잔류 단량체를 제거하는 것이 바람직하다.^{9,10,18)} 그러나 초기의 잔류 단량체의 양이 많을 경우에는 물에 담가 두더라도 유의할만한 농도의 단량체가 의치내에 존재한다고 하였다.⁷⁾ 따라서 의치 상 레진의 온성을 완전히 이루는 것이 바람직하다.

애크릴릭 레진의 온성은 여러 가지 방법이 있는데 Koda 등은 온성 방법에 관계없이 Methyl methacrylate와 methacrylic acid, benzoic acid가 유리되어 나오며 자가중합 레진의 경우 높게 나타난다고 보고하였다.²⁰⁾ 점막에 반응을 유발하기 위해서는 적어도 2%의 잔존단량체가 필요하며 이는 대부분의 열중합 애크릴릭 레진에서는 일어나지

않는다고 하였다.³⁰⁾

이 실험에서는 레진이 중합된 직후와 24시간 증류수에 침지 후, 72시간 침지 후의 경우 모두에서 자가중합 레진이 열중합 레진에 비해 세포독성이 높게 나타났다. 각 애크릴릭 레진에서는 Luciton 199와 POSS resin이 비슷한 세포활성도를 나타내었으며 Tokuso Rebase가 가장 낮은 세포활성도를 보여주었다. 72시간 침지시켜 둔 레진을 이용한 실험에서 Luciton 199와 POSS resin의 세포활성도는 대조군과 일치하는 경향을 보여주었다. 열중합 레진을 사용한 의치의 경우 환자에게 장착하기 전 제작하여 3일동안 물에 담가 둔다면 세포독성의 측면에서는 도움이 될 것으로 보인다.

임상에서 치과용 레진을 선택하는 것은 물성과 생체적합성 평가에 기초해야 하며 단지 비용에 의해서만 동기부여가 되어서는 안된다. 장기간의 사용을 위해서는 뛰어난 물성을 보여야 할 뿐만 아니라 우수한 생체적합성을 가져야 한다. 통상적 치과 재료의 경우 초기 노출시에 부작용이 많이 일어난다.²⁾ 단량체의 세포독성 기전은 잘 알려져 있지 않다. 세포대사의 변화¹⁹⁾, cytokine 생성³¹⁾, 세포막 용해 등의 여러 가지 확설이 있다. 세포손상은 노출되는 물질에 대한 농도와 시간에 의존해 나타난다. 세포손상의 가장 초기 증상은 lysosomal membrane과 mitochondrial membrane의 투과성 변화이며 적당한 marker enzyme를 사용하면 알아낼 수 있다고 보고하였다.³²⁾

생체적합성을 측정하는 것은 여러 가지 방법이 있으며 임상의 모든 상황에 부합되는 방법으로 행해져야 한다. 생체적합성을 임상적 사용 전에 평가하는 것은 통상적으로 체외시험 방법, 체내시험 방법, 사용시험 방법의 3단계를 통해 이루어진다. 이중 체외시험 방법은 재료와 직접적 혹은 간접적인 접촉이 되도록 하여 세포를 배양해야 한다. 체외시험 방법이 반드시 임상상황에 부합되지는 않는다. 그러나 체외시험 방법은 혼란변수의 영향을 최소화 함으로써 간단하게 세포독성을 평가하는 방법을 제공한다고 보고 하였다.¹²⁾ 체외시험 방법은 치과용 재료의 생체적합성 조사에 매우 중요한 역할을 하며 일부의 경우 동물 실험을 앞지르기도 한다.³³⁾ Rosenbluth 등은 플라스틱 재료의 독성 평가 시 세포배양 분석이 가장 적합하다고 하였다.³⁴⁾

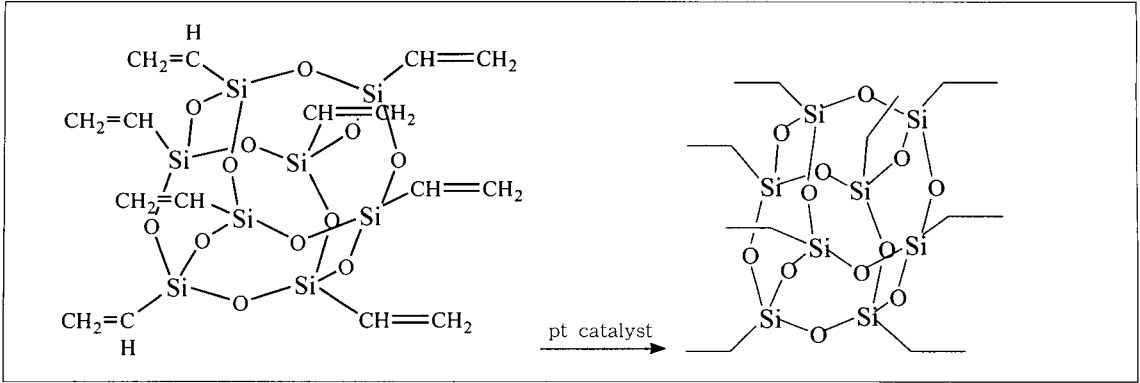


Fig. 13. The basic scheme of the PMMA/MMA copolymerization with POSS.

Caughman 등은 이러한 재료의 생물학적 영향을 평가하기 위해 체의 대사 분석이 적합하며 결과는 세포 종류와 기원에 따라 다른 양상을 보인다고 하였다.³⁵⁾

한천 확산법은 정확한 독성 측정법이라고 보고 하였으나 시편의 주변부보다 표면에서 자라는 세포가 더 민감한 반응을 나타낸다고 하였다.¹⁴⁾ 대사 분석법은 cellular dehydrogenase의 활성도를 측정하는 방법으로, 이 효소는 MTT (tetrazolium salt)를 insoluble formazan compound로 전환시킨다. 독성이 있어 cellular dehydrogenase가 불활성화 된다면 formazan을 형성하지 못하기 때문에 세포 실험을 통해 생성된 formazan 양을 측정하면 세포의 대사 활성도를 측정할 수 있다. 대사 분석법은 대사 효소계의 직접적인 반응을 반영하므로 보다 민감한 분석법이라 할 수 있다.¹⁰⁾ 대사 분석법의 장점은 간단하며 결과를 빠르게 알 수 있고 정확하며 방사선 동위원소의 사용이 필요 없다는 점 등이다. 따라서 다양한 치과용 재료의 독성 평가가 유용하다고 보고되었다.³⁶⁾

대사 분석법과 한천 확산법의 결과 차이는 실험법의 차이와 용출 대 비용출의 차이, 사용한 세포주의 차이에 기인한 것으로 사료된다. 레진과 접촉한 부위에서 독성을 나타내었는데 이는 유리된 물질이 확산되었다기 보다는 접촉면에 고농도로 농축되어 독성반응을 보였다고 할 수 있다. 용출 실험시 독성이 계속된다면 이는 독성물질이 계속 용출되어 나오는 것이므로 한천 확산법에서 zone

index가 크게 나타나야 한다고 볼 수 있다. 이 실험에서는 접촉면에서만 독성을 보였으므로 용출 확산이 많이 일어나지는 않는 것으로 보이며 직접 접촉을 이루는 곳에서만 고농도가 되어 영향을 주는 것으로 사료된다. 용출시험에서는 용출액에 희석되었으므로 강한 독성을 나타내지 못하는 것으로 보인다. 따라서 임상에서는 의치가 접촉하는 점막에는 영향을 나타낼 수도 있으나 타액이나 혈액에 퍼져서 미치는 영향은 적을 것으로 보인다. 또 한천 확산법에서도 시간이 지남에 따라 zone index가 줄어드는 경향을 보여주었다. 대사 분석법의 경우가 결과측정 범위에 대한 민감도가 더 높아 차이를 나타낸 것으로 보인다.

POSS는 3차원의 구조를 갖는 Si/O그룹들로 이루어진 분자로서 세관기능을 갖는 organosilicon monomer (i.e., R₃SiX)들이 hydrolytic condensation을 통해 합성되며, 유기성질 (carbon 함유)과 무기성질 (silicone 함유)을 갖는 분자들의 결합으로 생성된 혼성 화합물을 일컫는다 (Fig. 13).

이 기술의 대표적인 특징은 첫째, 화학적 조성이 silica (SiO₂)와 silicone (R₂SiO)의 혼성 중간체라는 것이다. 둘째로, POSS 분자 자체가 가지는 크기인데, 고분자 치수와 비교할 때 물리적으로 거대하다. 대부분의 고분자 분절 및 coil들과 크기 측면에서 거의 비슷하다. 각 POSS 분자들은 자체 중합이나 다른 고분자 사슬에 POSS 분자를 그래프트하기에 적절한 공유결합성 반응기를 포함하고 있으며 또한 다양한 고분자 시스템과의 용해도와

상용성을 위해 비반응성 기질도 포함하고 있다.¹⁶⁾ POSS 기술은 생물학적 시스템, 약학 분야, 전자공학 분야, 의학 플라스틱 재료, 일반적인 소비자 상품 등 다양한 분야에 응용될 수 있다. 이상과 같이 POSS를 첨가하여 새로 개발한 애크릴릭 레진의 세포독성에 대하여 연구한 결과 POSS 레진은 안정적인 생체적합성이 있음을 보여주었다.

V. 결 론

애크릴릭 의치상 레진을 사용하여 대사 분석법과 한천 확산법을 통해 세포독성을 비교 분석하였고 돌연변이 유발 분석을 통해서 형질 변환율을 조사하였다.

실험군은 모두 4군으로 제1군은 열중합 의치상 레진, 제2군은 POSS 분자를 첨가한 열중합 의치상 레진, 제3군은 자가중합 의치상 레진, 제4군은 직접 이장용 자가중합 의치상 레진으로 나누었다.

애크릴릭 의치상 레진을 통상적인 의치 제작 과정에 따라 제조회사의 지시대로 혼합하여 온성하였다. 시간에 따른 독성의 변화를 보기 위하여 24시간과 72시간 증류수에 침지한 시편과 중합 직후의 시편을 제작하였다.

배양액을 용출용매로 이용하여 레진 시편을 용출시킨 후 순수한 배양액을 대조군으로 이용하여 대사 분석과 돌연변이 유발 분석을 시행 분석하였다. 레진 시편을 이용하여 한천 확산법으로 세포독성을 측정하였다.

본 실험에서 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포독성은 중합된 직후에는 제4군이 유의하게 높게 나타났으며 24시간, 72시간 침지 후에는 제4군, 제3군, 제1군, 제2군 순이었다 ($p < .05$). 제1군과 제2군은 유의한 차이가 없었다.
2. 4종의 애크릴릭 의치상 레진은 시간이 지남에 따라 세포 활성도가 유의하게 증가하였다 ($p < .05$).
3. 자가중합 레진이 열중합 레진에 비해 세포독성이 유의하게 높게 나타났다 ($p < .05$).
4. 돌연변이 유발 분석 결과 4종의 애크릴릭 의치상 레진은 대조군보다 낮은 값을 나타냈다 ($p < .05$).

참고문헌

1. Lee DK, Lee YK, Yoo SK, Kim KJ, Lee HS, Lee KH, Han DS. Development of in vitro evaluation model in dental biocompatibility by non-radioactive materials. *J Oral Biology* 1995;19:129-136.
2. Hensten-Pettersen K, Jacobsen N. Toxic effects of dental materials. *Int Dent J* 1991;41:265-273.
3. Olsen I. Denture stomatitis. *Acta Odontol Scand* 1975;33:41-46.
4. Victorin L, Anneroth G, Fritiof L. Denture stomatitis. A clinical, electronmicroscopic, microradiographic and lightmicroscopic study. *Acta Odontol Scand* 1975;33:299-311.
5. Kaaber S, Thulin H, Nielsen E. Skin sensitivity to denture base materials in the burning mouth syndrom. *Contact Dermatitis* 1979;5:90-96.
6. McCabe JF, Basker RM. Tissue sensitivity to acrylic resin. *Br Dent J* 1976;140:347-350.
7. Guinta JL, Grauer I, Zablotzky N. Allergic contact stomatitis caused by acrylic resin. *J Prosthet Dent* 1979;42:188-190.
8. Bohnenkamp DM. Traumatic stomatitis following an intraoral denture relin: a clinical report. *J Prosthet Dent* 1996;76:113-114.
9. Baker S, Brooks SC, Walker DM. The release of residual monomeric methyl methacrylate from acrylic appliances in the human mouth: An assay for monomer in saliva. *J Dent Res* 1988;67:1295-1299.
10. Lefebvre CA, Kooerndchild KL, Schuster GS. Cytotoxicity of eluates from light-polymerized denture base resins. *J Prosthet Dent* 1994;72:644-650.
11. Bates JF, Stafford GD, Huggett R, Handley

- RW. Current status of pour type denture base resins. *J Dent* 1977;5:177-189.
12. Sheridan PJ, Koda S, Ewolden NO, Lefebvre CA, Lavin MT. Cytotoxicity of denture base resins. *Int J Prosthodont* 1997;10:73-77.
 13. Cimpan MR, Cressey LI, Halstensen A, Lie SA, Gjertsen BT, Matre R. Patterns of cell death induced by eluates from denture base acrylic resins in U-937 human monoblastoid cells. *Eur J Oral Sci* 2000;108:59-69.
 14. Vallittu PK, Ekstrand K. In vitro cytotoxicity of fibre-polymethyl methacrylate composite used in dentures. *J Oral Rehabil* 1999;26:666-671.
 15. Hensten-Pettersen A, Wictorin L. The cytotoxic effect of denture base polymers. *Acta Odontol Scand* 1981;39:101-106.
 16. Yang HJ, Jang BS, Heo SJ, Han DH, Shim JS, Chang MW. The effects of denture cleansers and disinfectants on the color, surface hardness, surface roughness of denture base resins. *J Korean Acad Prosthodont* 2001;39:105-112.
 17. International Standards Organization. ISO Technical Report 7405-1997. Dentistry-Preclinical evaluation of biocompatibility of medical devices used in dentistry-Test methods for dental materials. Geneva, Switzerland, 1997.
 18. Flecher AM, Purnaveja A, Amin WM, Ritchie GM, Moradians S, Dodd AW. The level of residual monomer in self-curing denture-base materials. *J Dent Res* 1983;62:118-120.
 19. Schuster GS, Marr JC, Knoernschild KL. The effect of pH on the cytotoxicity of eluates from denture base resins. *Int J Prosthodont* 1995;8:122-128.
 20. Koda T, Tsuchiya H, Yamauchi M, Ohtani S, Takagi N, Kawano J. Leachability of denture base acrylic resins in artificial saliva. *Dent Mater* 1990;6:13-16.
 21. Vallittu PK, Miettinen V, Alakuijala P. Residual monomer content and its release into water from denture base materials. *Dent Mater* 1995;11:338-342.
 22. Sadamori S, Kotani H, Hamada T. The usage period of dentures and their residual monomer contents. *J Prosthet Dent* 1992;68:374-376.
 23. Ruyter IE. The release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odontol Scand* 1980;38:17-27.
 24. Oysaed H, Ruyter IE, Sjøvikskleven IJ. Release of formaldehyde in dental composites. *J Dent Res* 1988;67:1289-1294.
 25. Katsuno K, Manabe A, Itoh K, Hisamitsu H, Wakumoto S, Nakayama S, Yoshida T. A delayed hypersensitivity reaction to dentin primer in the guinea-pig. *J Dent* 1995;23:295-300.
 26. Kedjarune U, Charoenworakul N, Koontongkaew S. Release of methyl methacrylate from heat-cured and autopolymerized resins: Cytotoxicity testing related to residual monomer. *Aust Dent J* 1999;44:25-30.
 27. Taira M, Nakao H, Matsumoto T, Takahashi J. Cytotoxic effect of methyl methacrylate on 4 cultured fibroblasts. *Int J Prosthodont* 2000;13:311-315.
 28. Lygre H, Solheim E, Gjerdet NR. Leaching from denture base materials in vitro. *Acta Odontol Scand* 1995;53:75-80.
 29. Tsuchiya H, Yamada K, Akagiri M, Tajima K, Miyazaki T, Takagi N, Itoh U, Sato M. Effect of an ultraviolet light-activated coating material on reduction of the leaching of methyl methacrylate and formaldehyde from denture acrylic resins. *Dent Mater* 1993;12:253-258.
 30. Smith DC. Recent development and

- prospects in dental polymers. *J Prosthet Dent* 1962;12:1066-1078.
31. Liu Y, Loftenius A, Elghazali G, Troye-Blomberg M, Ma S, Ekstrand J. Different regulation of in vitro cytokine production by human blood cells in response to methyl metacrylate. *J Toxicol Environ Health* 1999;56:165-182.
 32. Tyas MJ. Quantitative enzyme cytochemistry in the in vitro biocompatibility testing of dental materials. *Int Endod J* 1988;21:106-112.
 33. Browne RM. The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials-dose it have a role?. *Int Endod J* 1988;21:50-58.
 34. Rosenbluth SA, Weddington GR, Guess WL, Autian J. Tissue culture method for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice. *J Pharm Sci* 1965;54:156-159.
 35. Caughman WF, Caughman GB, Dominy WT, Schuster GS. Glass ionomer and composite resin cements: Effects on oral cells. *J Prosthet Dent* 1990;63:513-521.
 36. Kasugai S, Hasegawa N, Ogura H. Application of the MTT colorimetric assay to measure cytotoxic effects of phenolic compounds on established rat dental pulp cells. *J Dent Res* 1991;70:127-130.

Reprint request to:

Seong-Kyun Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Prosthodontics, Graduate School, Seoul National University

28-1, Yeongun-Dong, Chongno-Gu, Seoul, 110-749, Korea

Tel. 82-2-760-2661

E-mail. implant75@hanmail.net

ABSTRACT

CYTOTOXICITY OF DENTURE BASE RESINS

Seong-Kyun Kim, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Ik-Tae Chang D.D.S., M.S.D., Ph.D.
Seong-Joo Heo, D.D.S., M.S.D., Ph.D., Jai-Young Keak, D.D.S., M.S.D., Ph.D.

Department of Prosthodontics, Graduate School, Seoul National University

The purpose of this study was to investigate the cytotoxicity and mutagenicity of denture base resins. According to manufacturer's instructions, resin specimens were made.

Group 1 : heat-polymerizing acrylic resin (Luciton 199[®])

Group 2 : heat-polymerizing acrylic resin containing polyhedraloligosilsesquioxane(POSS resin)

Group 3 : auto-polymerizing acrylic resin (Repair Acrylic[®])

Group 4 : direct relining auto-polymerizing acrylic resin (Tokuso Rebase[®]).

Fresh specimens, 24 hrs. and 72 hrs. soaked specimens in distilled water were made.

Responses with metabolic assay and mutagenesis assay to eluates from resin specimens were measured. Cultures with medium alone provided controls. Cytotoxicity was assessed with agar overlay test.

The results were as follows:

1. Group 4 showed higher cytotoxicity than Group 1, Group 2 and Group 3 in fresh, 24- and 72-hour immersion cases ($p < .05$). Group 3 showed higher cytotoxicity than Group 2 in fresh cases and showed higher cytotoxicity than Group 1 and Group 2 in 24- and 72-hour immersion cases ($p < .05$). Group 1 and Group 2 showed no significant difference.
2. All acrylic denture base resins showed significant increase of cell activity as immersion time increased ($p < .05$).
3. Auto-polymerizing acrylic denture base resins showed higher cytotoxicity than heat-polymerizing acrylic denture base resins ($p < .05$).
4. All acrylic denture base resins showed lower mutagenicity than controls ($p < .05$).

Key words : Denture base resin, Cytotoxicity, Metabolic assay, Agar overlay test, Mutagenicity