역충전재의 생체적합성에 관한 연구

임 미 경
원광대학교 치과대학 치과보존학교실

ABSTRACT

BIOCOMPATIBILITY OF RETROGRADE FILLING MATERIALS

Mi-Kyung Im, D.D.S., M.S.D., Ph.D
Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang university

The properties of ideal retrograde filling materials include the ability to seal the root canal system in three dimensions and well tolerated by periradicular tissues. Biocompatibility testing has been done mainly with cytotoxicity tests using cell culture. Little attention has been paid to the potential adverse infulence on the inflammatory and immune reaction in the periapical tissue. The purpose of this study was to investigate the effects of retrograde filling materials on human mononuclear cells in vitro. Freshly mixed and set specimens from six materials (Z100, Tetric Ceram, Fuji Ⅱ, Fuji Ⅱ LC, F2000, Compoglass Flow, and ZOE) were eluated with cell culture medium for 24 hours. Cytotoxic effects of these extracts were evaluated by determining cell viability and enzyme activity using MTT and lactate dehydrogenase(LD). The production of inflammatoy bone resorptive cytokine, TNF-α was measured from human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) exposed to the extracts by means of Endogen Human TNF-α ELISA kit (Wobrun, MA, U.S.A.).

Eluates and diluted (1 : 10) eluates with cell culture medium from freshly mixed Fuji Ⅱ had cytotoxic effects on mononuclear cells using MTT and LD. However, eluates from set Fuji Ⅱ were not cytotoxic. Eluates form set ZOE exhibited cytotoxicity with LD test. TNF-α levels were high in eluates from freshly mixed Fuji II and Z100. Diluted eluates from freshly mixed Z100 and F2000 stimulated the production of TNF-α. However, there were no significant difference in TNF-α levels compared to controls.

These results indicate that some materials could possibly stimulate bone resorption in the periapical tissue by means of the production of bone resorptive cytokine.

Key words : Biocompatibility, Cytotoxity, Retrograde filling materials, TNF-α

Ⅰ. 서 론

근관 치료가 실패하면 재근관치료를 시도하지만 이러한 시도 역시 성공적이지 못하거나 적응증이 되지 않는 경우는 외과적인 접근 방법을 시도하게 된다. 치근단 수술에서 역충전 와동을 형성한 후 역충전재를 사용하여 충전하게 되는데, 이상적인 역충전재가 구비해야 할 성질에 관하여는 Gartner와 Dorn 등[1]이 제시하였다. 이상적인 역충전재는 근관계의 근첨 부분을 완벽하게 폐쇄해야 하며 염증 반응을 유발하지 않고 치근단 조직에서 유지되어야 하며 습기에 의해 손상되지 않고 체적 안정성이 있으면서 부식하지 않고 전기화학적인 활성이 없어야 한다. 또한 치아 및 치근단 조직에 변색을 유발하지 않고 다루기 쉽고 방사선 불투과성이 있으면서 치아와 결합해야 한다고 하였다. 그러나 아직도 이러한 요구 조건을 모두 만족시키는 역충전재는 없다. 아말감은 역충전재로서 가장 오래 사용되어 왔으나, 수은을

※ 이 연구는 1999학년도 원광대학교 교비 연구비 지원에 의하여 이루어짐

방출할 가능성이 있으며 부식 반응 및 지연 팽창과 변연 누출과 같은 단점이 있다[2]. Super EBA와 IRM이 아말감에 비하여 임상적으로 더 우수한 결과를 보이며, 현재 역충전재로서 자주 사용되고 있다[3]. 또한 아말감과 글라스아이오노머 시멘트를 비교한 임상 연구에서 글라스아이오노머 시멘트가 더욱 우수한 결과를 보였다[4]. 이외에도 gutta-percha, Cavit, polycarboxylate 시멘트, 콤포지트 레진 및 최근에 개발된 mineral trioxide aggregate (MTA) 등 여러 가지 재료가 사용되고 있다[5].

역충전재의 독성에 관한 연구는 세포 배양을 이용한 실험실내 실험 및 동물에 매식하는 실험 등 다양한 연구가 계속되어 왔다. 일반적으로 세포 독성 검사는 세포 배양을 통하여 실험실에서 생체 적합성을 결정하는 주요한 요소이다. 동물 실험과 비교시 생체내 실험이 조건을 통제하기가 쉽다. 또한 실험실 방법이 단순하고 비용이 저렴하여 생체 재료의 기본적인 생물학적인 성상을 결정하는데 적합하다[6]. 여러 가지 세포주와 구강에서 일차 배양한 세포를 대상으로 근관 치료에서 사용되는 재료의 용출액 및 고형 상태로 세포 독성을 평가하는 연구가 이루어져 왔다[7-9].

Cytokine은 여러 종류의 세포에서 자극을 받은 후 분비되는 분자량이 적은 당단백질로서 다른 세포를 활성화시킬 수 있다. Cytokine은 세포내에 저장되지 않으며 국소적으로 생성되는 반감기가 짧은 물질로서 강력하며 세포 표면의 수용기와 반응하여 세포의 RNA 및 단백질의 합성에 영향을 미친다. Tumor necrosis factor (TNF)는 생물학적인 기능이 유사한 TNF-α와 TNF-β로 구성되어 있다. TNF-α는 주로 대식 세포에서 생성되는 반면, TNF-β는 활성화된 림프구에서 생성되며 이들은 모두 골 흡수를 강력하게 촉진할 뿐만 아니라 콜라겐의 합성을 억제한다[10]. TNF는 치근단 치주염이 있는 치아의 치근단 조직의 삼출액에서 검출되었다[11]. 또한 쥐를 이용한 실험에서 치근단 병소가 만성인 경우보다 급성인 경우에서 골을 흡수하는 활성이 더욱 강하게 나타나며 이 활성은 IL-1과 TNF로 추정되는 cytokine이 원인이라고 하였다[12].

최근에 충전재로서 도입되어 사용되는 콤포머는 이 재료에 대한 평가가 아직 미흡한 실정이며, 다른 충전재와 비교하여 생체 적합성을 비교한 연구도 광범위하게 이루어지지 않았다. 역충전재로 사용되는 재료의 생체 적합성의 평가를 위해서는 현재 일반적으로 사용되는 세포를 이용한 독성 검사 뿐 아니라 치근단 조직에 분포하는 혈관 세포 및 조직 세포가 유발할 수도 있는 염증 및 면역 반응에 대한 평가도 동시에 이루어져야 할 것이다. 기존의 세포 독성에 대한 연구는 대부분 세포주나 치수 및 치주인대에서 분리된 세포에 대하여 이루어져 왔으며 인체의 면역 반응을 총괄적으로 조절하는 단핵구 세포에 대하여는 연구되지 않았다. 이에 본 연구는 화학 중합형 글라스 아이오노머 시멘트와 레진 강화형 글라스아이오노머 시멘트 및 두 종류의 광중합형 레진과 두 종류의 콤포머와 zinc oxide eugenol cement (ZOE) 등 7가지 종류를 대상으로 하여 사람의 말초 혈액에서 분리된 단핵구 세포에 대하여 이들 재료가 나타내는 세포 독성 및 cytokine인 TNF-α의 생성에 미치는 영향을 연구하고자 하였다.

Ⅱ. 실험 재료 및 방법

1. 역충전재 추출액의 준비

화학 중합형 글라스 아이오노머 시멘트인 GC Fuji Ⅱ (GC Corporation, Japan), 광중합형 레진 강화형 글라스아이오노머 시멘트인 Fuji Ⅱ LC (GC Corporation, Japan), 광중합형 콤포짓트인 Z100 (3M Dental Products, U.S.A.)와 Tetric Ceram (Vivadent Ets, Liechtenstien), 콤포머인 F2000 (3M Dental Products, U.S.A.)과 Compoglass Flow (Vivadent Ets, Liechtenstien)와 zinc oxide eugenol cement (ZOE) 등 7종류의 역충전재를 대상으로 하였다. 각 재료를 제조 회사의 지시에 따라 24-well plate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 높이가 1mm가 되도록 혼합하였으며, 광중합형은 광중합기를 이용하여 중합시켰다. 이들 재료를 혼합한 즉시군 (즉시군)과 24시간 동안 37℃, 5% CO_2 세포배양기에서 경화시킨 군 (경화군)으로 분류하였다. 세포배양배지 (minimal essential medium, Gibco BRL Life Technologies, Madison, U.S.A.)로 각 재료의 추출 용액을 준비하였는데, 즉시군은 혼합한 직후에, 경화군은 24시간 동안 세포배양기에서 보관한 후에 각각 세포 배양배지를 well당 2ml을 첨가하였다. 세포 배양 배지가 첨가된 24-well plate를 세포배양기에 24시간 동안 보관하여 각 재료의 추출액을 준비한 후 syringe filter (0.45㎛, Nunc, Roskilde, Denmark)로 여과하였다. 즉시군 실험 용액과 경화군 실험 용액은 원액을 실험 용액으로 사용하거나, 필요한 경우 세포배양배지를 이용하여 10배로 희석한 후 실험 용액으로 사용하였다. 역충전재 추출액 대신 동량의 세포배양배지를 첨가하여 대조군으로 하였다.

2. 말초혈액 단핵구의 분리

세 명의 자원자로부터 약 20mL씩 채혈하여, 방부제가 들어있지 않은 heparin (20units/mL blood)튜브에 넣고 잘 혼합하였다. 생리식염수를 동량 섞어 혈액을 희석한 후 비중(s.g.)이 1.077인 Ficoll-Paque (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)이 든 원추형 튜브에 2 : 1의 비율로 중첩하였다. 1,500rpm에서 30분간 원심분리한 후 Ficoll-

Paque보다 윗층에 형성된 단핵구층을 Pasteur 피펫을 이용하여 조심스럽게 분리하였다. MEM 배지(Gibco BRL Life Technologies, Madison, U.S.A.)를 이용하여 2회 세척한 후 hemocytometer (Cambridge Instruments Inc., Buffalo, U.S.A.)를 이용하여 세포수를 5×10^6/mL로 조정하였다.

3. 세포 독성의 측정

1) MTT를 이용한 단핵구의 세포 활성 측정

준비한 말초혈액 단핵구를 96-well microplate (Nunc, Roskilde, Denmark)에 100㎕씩 분주하여 각 well당 세포수가 5×10^5/mL가 되도록 하였다. 7종류의 충전재 추출액을 즉시군과 24시간 경화군에 각각 50㎕씩 분주하였다. 대조군은 충전재에 노출되지 않은 RPMI 1640 배지를 사용하였다. 37℃ CO_2 배양기에서 24시간동안 배양한 후, MTT 용액 (5mg/mL in PBS)을 well당 20㎕씩 넣었다. 37℃ CO_2 배양기에서 4시간동안 반응시킨 후 상청액을 버리고 DMSO (dimethyl sulfoxide)를 50㎕씩 넣어 결정화된 tetrazolium을 용해시켜 반응을 중지시켰다. ELISA Reader (Dynatech Laboratories Inc., Model MR700, Chantilly, VA)를 이용하여 540nm 단파장에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도가 낮을수록 세포 생존도가 낮고, 반대로 흡광도가 높을수록 세포의 생존도가 높아 충전재 추출액의 세포독성이 약한 것으로 판단하였다.

2) LDH 수준 측정을 이용한 세포의 효소 활성 측정

열에 의해 불활성화된 세균에 노출된 말초혈액 단핵구 상층액의 LDH 활성도를 자동화학분석기 (Hitachi 747 autoanalyzer, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다. LDH 활성도는 다음 화학식에 작용하는 효소의 활성(activity)를 측정하는 것인데, LDH가 높을수록 세포의 생존도(viability)가 낮다고 볼 수 있다. 검사 원리는 pH 9.0에서 Lactic acid는 LDH의 존재하에서 pyruvic acid로 되고, 이때 NAD가 NADH로 되면서 340nm에서 흡광도가 상승한다. 이 흡광도의 변화량을 측정하여 LDH의 활성을 구한다.

$$\text{Lactic Acid} + \text{NAD} \xrightarrow{\text{LDH}} \text{Pyruvic Acid} + \text{NADH}$$

시약은 상품화된 Daiichi (Tokyo, Japan)사 제품을 사용하였다.

4. TNF-α수준 측정을 이용한 cytokine형성 유발 능력의 측정

Endogen Human TNF-α ELISA 킷 (Wobrun, MA)을 이용하여 샌드위치 방법으로 TNF-α를 측정하였다. TNF-alpha ELISA는 먼저 충전재 추출액에 24시간 동안 노출된 단핵구 상층액 50㎕를 단클론성 IL-8 항체가 코팅된 microwell에 접종하고 동시에 biotinlyated antibody 50㎕를 각 well에 넣었다. 실온에서 2시간동안 방치한 후 3회 세척하고, streptavidin-HRP 희석액을 100㎕씩 넣은 후 실온에서 30분간 반응시켰다. 세척 후 TMB 기질용액을 100㎕씩 넣고 실온에서 30분간 발색시킨 후, stop 용액 100㎕를 넣어 발색반응을 종료시켰다. 30분이내에 ELISA Reader (Dynatech Laboratories Inc., Model MR700, Chantilly, VA)를 이용하여 450nm 단파장에서 흡광도를 측정하였다. 표준농도의 흡광도 (Fig. 1)와 비교하여, 각 시료의 TNF-α농도를 구하였다.

5. 통계 분석

대조군 및 실험군의 흡광도와 LD 수준 및 TNF-α 농도의 차이는 $p = 0.05$ 수준에서 SPSS통계 프로그램의 one-way ANOVA를 이용하였다.

Ⅲ. 실험 성적

즉시군의 용액에 노출된 단핵구 세포의 생활력을 MTT 측정법을 이용하여 검사한 결과 대조군에 비하여 자가중합형 글라스아이오노머와 레진 강화형 글라스아이오노머와 F2000 및 ZOE의 흡광도가 유의하게 낮아 세포독성을 나타내었다. 콤포짓트 레진인 Z100과 Tetric Ceram은 대조군과 비교시 흡광도에서 유의한 차이를 보이지 않아서 세포독성이 없었다. 또한 Compomer인 Compoglass Flow도 대조군에 비하여 흡광도에서 유의한 차이가 나타나지 않았다(Fig. 1). Fig. 2는 경화군에 노출된 단핵구 세포의 MTT 측정의 결과로서 ZOE를 제외하면 모든 재료에서 대조군과 비교시 흡광도의 차이가 인정되지 않아 경화군 용액은 단핵구 세포에 독성을 보이지 않았다.

Fig. 3은 즉시군 용액을 세포배양배지로 1 : 10으로 희석한 후 단핵구 세포에 첨가한 경우이다. 화학 중합형 글라스아이오모머가 낮은 흡광도 수치를 나타내었으나 대조군 및 기타 재료들과 유의한 차이는 나타나지 않았다. Fig. 4에서는 경화군 용액을 세포배양배지로 1 : 10으로 희석하여 단핵구 세포와 반응시킨 결과이다. 레진 강화형 글라스아이오노머의 흡광도값이 대조군보다 높게 나타냈으나 이들간의 통계학적인 차이는 없었으며, 다른 모든 재료에서도 대조군

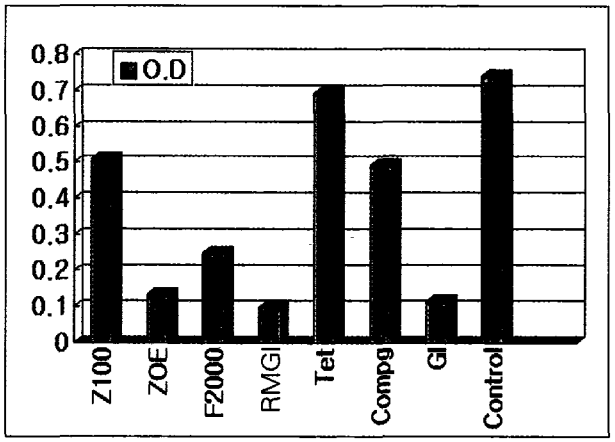

Fig. 1. Optical density of MTT test with human mononuclear cells exposed to eluates from freshly mixed retrograde filling materials.

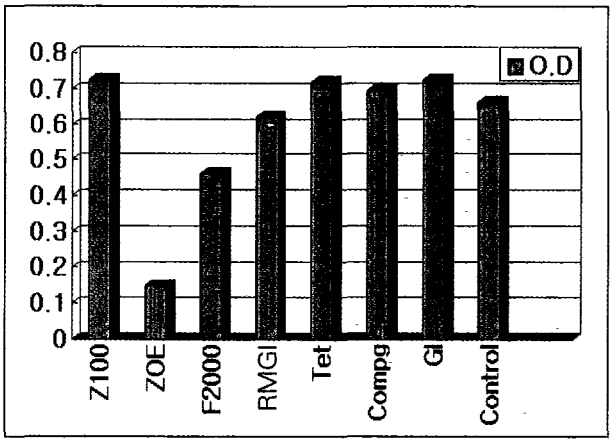

Fig. 2. Optical density of MTT test with human mononuclear cells exposed to eluates from set retrograde filling materials.

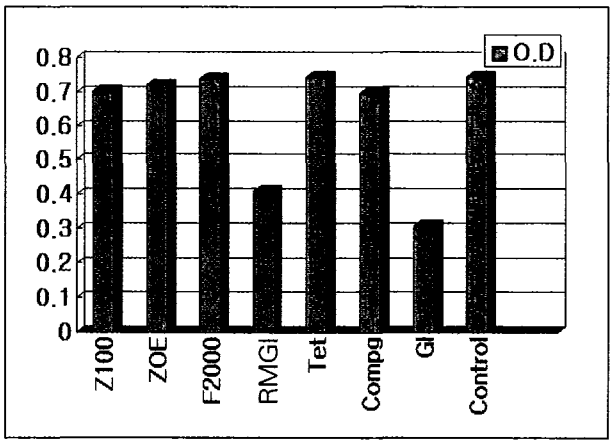

Fig. 3. Optical density of MTT test with human mononuclear cells exposed to eluates(1:10 diluted) from freshly mixed retrograde filling materials.

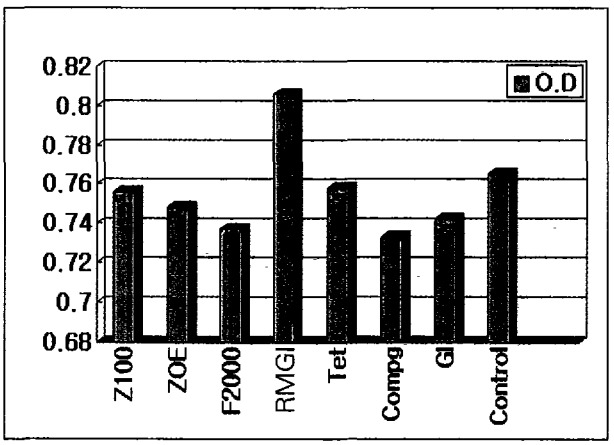

Fig. 4. Optical density of MTT test with human mononuclear cells exposed to eluates(1:10 diluted) from set retrograde filling materials.

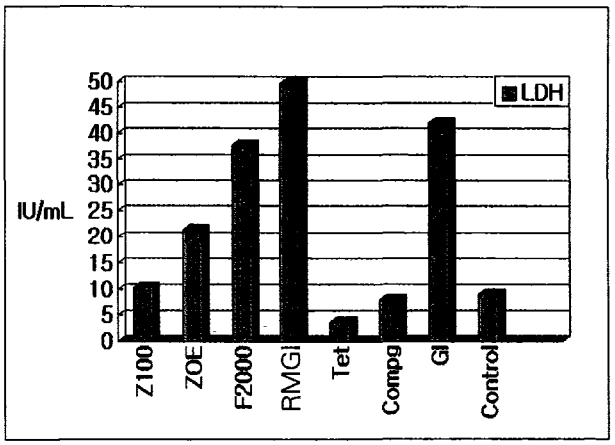

Fig. 5. Lactate dehydrogenase levels of human mononuclear cells exposed to eluates from freshly mixed retrograde filling materials.

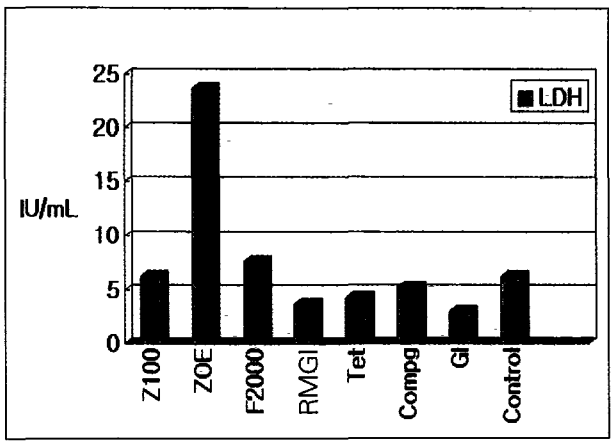

Fig. 6. Lactate dehydrogenase levels of human mononuclear cells exposed to eluates from set retrograde filling materials.

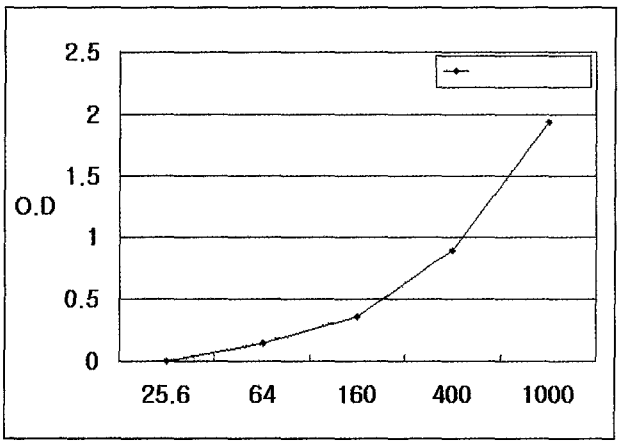

Fig. 7. Standard curve of optical density(O.D) according to TNF-alpha level.

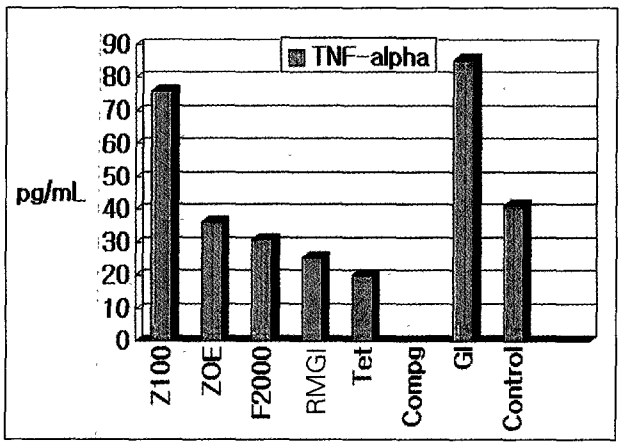

Fig. 8. TNF-alpha level of human mononuclear cells exposed to eluates from freshly mixed retrograde filling materials.

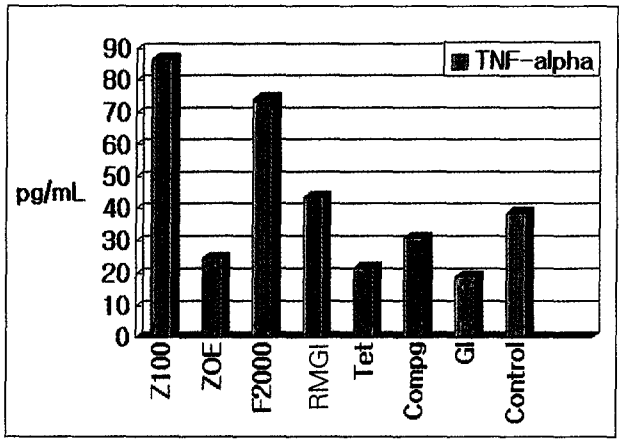

Fig. 9. TNF-alpha level of human mononuclear cells exposed to eluates(1:10 diluted) from freshly mixed retrograde filling materials.

과 비교시 유의한 흡광도의 차이가 없어서 이들 용액은 단핵구 세포에 독성을 보이지 않았다.

Fig. 5는 즉시군 용액을 단핵구 세포에 노출시킨 후 LD 수준을 측정한 결과이다. 화학 중합형 글라스아이오노머와 레진 강화형 글라스아이오노머 및 F2000이 대조군에 비하여 LD수치가 유의하게 높아서 세포독성이 강함을 나타내었다. 콤포머인 F2000과 Compoglass Flow를 비교시 F2000의 LD값이 Compoglass Flow에 비하여 높았으나 유의한 차이는 인정되지 않았다. 콤포짓트 레진인 Z100과 Tetric Ceram 및 ZOE는 대조군과 비교시 차이가 없어서 세포독성이 없는 것으로 나타났다. Fig. 6은 경화군 용액에 단핵구 세포를 노출시킨 후 LD수준을 측정한 결과이다. 대조군과 비교시 ZOE만이 대조군과 비교시 LD값이 가장 높아서 세포 독성을 보였고 나머지 재료들은 세포독성을 나타내지 않았다.

Fig. 7은 단핵구 세포가 분비한 TNF-α의 농도를 결정하기 위한 표준곡선이다. TNF-α의 즉시군 용액에 단핵구 세포를 노출시킨 후 단핵구 세포가 분비한 TNF-α의 농도는 Fig. 8과 같다. 대조군에서도 40pg/mL의 TNF-α의 분비가 관찰되었다. Compoglass Flow에서는 TNF-α가 분비되지 않았으며 Z100과 화학중합형 글라스아이오노머에서 대조군과 비교시 상대적으로 많은 양의 TNF-α가 분비되었으나, 대조군과 비교시 유의한 차이가 나타나지 않았다. Fig. 9는 즉시군 용액을 세포배양액으로 희석시킨 후에 단핵구와 반응시켜 단핵구 세포가 분비한 TNF-α의 농도를 나타낸 결과이다. Z100과 F2000이 대조군과 비교시 상대적으로 많은 양의 TNF-α가 분비되었으나, 대조군과 비교시 유의한 차이가 나타나지 않았다.

Ⅳ. 총괄 및 고찰

미국 표준 연구소 (American National Standards Institute) 및 미국치과의사협회 (American Dental Association)등은 근관 치료에서 사용하는 재료의 생체 적합성을 평가하는 방법으로 실험실내 방법을 추천하여 왔으며 이러한 지침에 따라 세포 독성 검사는 이들 재료를 임상에 사용하기 전에 시행하는 초기 검사 방법으로 적용되어 동물을 이용한 생체내 실험의 필요성을 감소시켰다[13]. Kimura는 아연을 포함한 아말감 및 포함하지 않은 아말감을 역충전재로서 사용한 결과 모두 심한 염증 반응을 관찰하였다[14]. Pissiotis 등은 아말감과 Ketac Silver를 비교하면 아말감이 더 강한 세포독성을 보인다고 하였다[15]. Torabinejad 등에 의하면 세포 독성의 실험에 사용한 방법에 따라서 MTA와 혼합한 직후나 경화된 아말감의 세포 독

성의 순위가 달라진다고 보고하였다[16]. 또한 콤포머인 Dyract를 토끼의 골 내부에 이식하여 생체 적합성을 평가한 실험에서 Dyract는 Super EBA와 유사한 정도로 생체 적합성이 우수하다고 하였다[17]. Osario 등은 근관 치료에 사용하는 여러 가지 재료를 대상으로 MTT로 세포의 생활력을 측정하는 방법과 crystal violet로 세포 독성을 측정하였다. 이 중 역충전재로서 실험 대상으로 한 재료는 아말감과 Gallium GF2 및 Ketac silver와 MTA였으며, MTA는 세포 독성을 전혀 보이지 않았고 Gallium F2는 세포 독성을 거의 나타내지 않았으며, Ketac silver와 Super-EBA 및 아말감은 강한 세포 독성을 나타낸다고 보고하면서 MTA를 가장 우수한 역충전재로서 Gallium GF2를 추후 역충전재로 사용시 우수한 재료로서 보고하였다[18]. 한편 Makkawy 등은 천공의 치료에 사용하는 재료에 대한 세포 독성을 평가하였는데, 두 가지 레진 강화형 글라스아이오노머 시멘트와 아말감을 비교하였다. 아말감이 대조군 및 두 가지 레진 강화형 글라스아이오노머 시멘트와 비교시 유의하게 세포의 생활력을 감소시켜 천공의 치료시에는 아말감보다는 글라스아이오노머 시멘트를 사용하는 것을 추천하였다[19]. 그러나, 여러 연구에서 보고된 세포 독성의 실험 결과를 상호 비교하기는 어렵다. 그 이유는 사용한 세포의 유형, 세포와 재료를 접촉시킨 방법 및 노출시간과 같은 실험 조건이 각각 다르고 이에 따라 결과가 달라지기 때문이다[20].

치근단 질환의 확산을 일으키는 치근단 조직의 면역 및 염증 반응에 관한 연구 중 근래에는 이들 반응의 매개체인 cytokine을 중심으로 연구가 이루어지고 Kawashima와 Stashenko 등은 쥐에서 실험적을 치근단 병소를 유발시킨 후에 IL-1과 TNF-α를 포함한 10가지 종류의 cytokine의 발현을 조사하여 이들 cytokine중 IL-1과 TNF-α 단백질 및 mRNA의 발현이 다른 cytotokine에 비하여 강하게 발현됨을 보고하였다[21]. 또한 면역결핍을 유전적으로 유도한 쥐를 이용한 실험을 통하여 특정 면역 세포의 기능이 치근단 질환의 생성과 확산에 미치는 효과가 보고되고 있다[22]. Fouad는 B임파구 및 T임파구의 기능이 결핍된 scid 쥐와 정상적인 쥐를 대상으로 하여 치수를 노출시킨 후 치수의 괴사 및 치근단 질환이 생성되는 양상과 IL-α와 TNF-α의 발현을 비교한 결과 이들 구 군간에 차이가 없음을 보고하면서, 치근단 조직의 질환의 진행은 임파구의 기능과 무관하다고 하였다[23]. 이 결과는 골이 흡수되는 치근단 질환의 진행에 B임파구 및 T임파구가 결정적인 역할을 하지는 않는다는 것을 의미하는 결과이다.

각 역충전재를 혼합한 즉시 세포배양배지를 첨가하고 24시간 추출한 후 즉시군 용액으로 사용하여 단핵구에 반응시켜 MTT로 세포의 생활력을 검사한 결과 자가 중합형 글라스아이오노머와 레진 강화형 글라스아이오노머 및 ZOE 및 F2000의 세포 생활력이 유의하게 낮았다. 세포배양배지에는 pH의 표식자가 있어서 세포배양배지를 첨가하는 순간에 배지의 색이 홍색에서 노란색으로 변하는 것으로 보아 이들 재료의 초기 산도가 높은 것이 이들의 세포 독성의 한 원인이 될 수 있는 것으로 보인다. 또한 ZOE의 경우는 eugenol로 인한 독성을 나타내므로 다른 재료의 세포 독성의 실험시 독성이 있는 재료로서의 대조군으로 사용되는 것으로 미루어 이들 두 가지 글라스아이오노머의 경우 혼합한 직후에는 상당한 독성이 있음을 시사한다. 이에 비하여 콤포짓트 레진인 Z100과 Tetric Ceram은 세포 독성을 보이지 않아서 레진은 세포배양배지에 추출되는 독성 물질은 포함하지 않은 것으로 사료된다. 이들 재료들을 24시간 경화시킨 후 추출액을 단핵구 세포에 첨가한 후 MTT 검사를 한 결과 ZOE를 제외하면 모두 세포 독성이 나타나지 않았다. 이는 혼합 직후에는 독성이 있는 재료라도 일단 경화가 되면 독성을 보이지 않으므로 임상에서 이들 재료를 사용할 때 생활 조직에 지속적인 자극을 주지는 않음을 의미한다. 한편 혼합 직후의 재료들에서 추출한 용액을 세포배양배지로 1 : 10으로 희석하여 단핵구와 반응시키면 화학중합형 글라스아이오노머의 MTT의 흡광도만이 대조군 및 기타 재료들과 비교시 50% 정도의 값을 보여 단핵구에 대한 세포 독성을 보였다. 이는 1 : 10으로 희석하면 ZOE와 F2000의 독성이 없어서 글라스아이오노머가 다른 재료에 비하여 혼합 직후에는 상당히 독성이 강함을 의미한다. 경화군을 1 : 10으로 희석하여 세포 독성을 검사하면 모든 재료가 세포적합성을 나타내어 재료가 경화되고 치근단 조직에 접촉되어 희석되면 이들이 모두 안전하다고 볼 수 있다.

세포 독성의 다른 측정 방법으로 즉시군 추출 용액을 단핵구 세포에 노출시켜서 LD수준을 측정한 경우에는 2종류의 글라스아이오노머 및 F2000이 유의한 독성을 보였다. 이 결과를 MTT 측정법을 이용한 결과와 비교하면 MTT방법에서는 F2000이 독성을 보이지 않은 반면, LD측정법에서는 강한 독성을 보였고 MTT에서는 강한 세포 독성을 나타낸 ZOE가 LD측정 방법에서는 중등도의 독성 순위를 보여서 측정 방법에 따라 독성 발현의 정도에 차이가 있음을 시사하였다. 또한 경화군 추출액으로 LD를 이용하여 세포 독성을 검사하면 ZOE만이 대조군에 비하여 강한 독성을 보였는데, 이 결과는 MTT를 이용한 방법과 일치하였다. 따라서 충전재의 세포 독성의 실험결과는 재료의 준비 방법, 경화 여부 및 실험에 사용한 세포 독성의 충전 방법에 따라서도 달라질 수 있다. 따라서 새로운 재료의 세포 독성을 시험하고자 할 때에는 한 가지 측정 방법에만 절대적으로 의존하지 말고 다양한 실험 방법을 사용하여 여러 가지 방법으로 재료의 시편을 준비해야 할 것이다. 또한 이러한 여러 가지 실험방법을 시행한 후 공통적으로 독성이 발현되는 재료들에 대하여 다시 독성을 유발하는 원인 물질을 찾아내려는 노력도 필요할 것이다.

최근에 개발된 콤포머는 아직 물성이나 생체 적합성에 대한 평가가 미흡한 실정이다. 콤포머는 레진과 글라스아이오노머의 성분을 모두 포함하고 있는 재료이나 레진에 글라스아이오노머의 성분이 부가된 재료로 볼 수 있으므로 연구자는 이 재료의 생체적합성이 레진과 글라스아이모노머의 중간 정도에 해당할 것으로 예측하였다. 본 실험의 결과 F2000은 즉시군의 원액을 MTT와 LD를 이용한 2가지 측정 방법에서 모두 세포 독성을 보인 반면, Complglass Flow는 항상 세포 독성을 보이지 않았다. 이는 F2000의 생체 적합성이 좀 더 글라스아이오노머와 유사한 반면 Compoglass Flow는 레진에 가까움을 시사한다.

Foud[23]의 연구 결과에서 B임파구 및 T임파구가 결핍된 쥐에서도 정상적인 쥐와 마찬가지로 치수 노출 후 치수 괴사 및 치근단 질환이 발생하고 동일한 속도로 진행되므로 임파구가 치근단 질환의 기시 및 진행을 총괄하는 세포가 아니라는 것이다. 또한 이 연구에서 중요한 점은 골을 흡수하는 성질을 가진 cytokine인 IL-1α와 TNF-α가 정상쥐 뿐 아니라 면역 결핍쥐에서도 같은 정도로 발현되었다는 것이다. Foud의 실험에 사용된 *scid* 쥐의 다른 기관에서의 대식세포는 정상적인 형태와 기능을 가지며 특이적인 면역 반응을 나타낼 수 없음에도 불구하고 MHC-Ⅱ 항원을 발현한다. 또한 세균의 감염시 IL-1α와 TNF-α를 분비한다[24]. 이는 치근단 질환에서 특이적인 면역 반응이 부재한 상황에서도 비특이적인 염증 반응에 의하여 치근단 질환이 진행되어 골이 흡수됨을 의미한다. 이러한 비특이적인 염증 반응에서는 단핵구 및 대식 세포가 이 반응을 유발하고 지속시키므로 단핵구가 치근단 질환에서 임파구보다는 상대적으로 더욱 결정적인 역할을 한다고 볼 수 있다.

즉시군 용액을 단핵구와 반응시켜 TNF-α의 수준을 검사하면 대조군에서도 약 40pg/mL 정도의 TNF-α가 분비되어 단핵구가 혈관에서 분리되어 실험실에서 사용되는 실험과정동안 안정화되지 않아서 실험 자체가 단핵구에 자극이 됨을 보였다. 대조군에 비하여 화학중합형 글라스아이오노머와 Z100의 즉시군 용액은 대조군과 비교시 통계적으로 유의한차이는 없었으나, 2배 이상의 TNF-α을 분비하여 이들 재료가 치근단 조직의 면역반응을 기시할 수 있음을 암시하였다. 이에 비하여 Compoglass Flow는 TNF-α의 합성이 거의 일어나지 않아 이 cytokine의 생성을 억제하는 비정상적인 면역 반응을 치근단 조직에 유발할 수 있음을 암시하였다. 이 즉시군 용액을 1 : 10으로 희석하여 단핵구와 반응시켜 분비된 TNF-α의 농도를 측정하면 Z100은 희석에도 불구하고 대조군에 비하여 여전히 약 2배 이상의 TNF-α를 분비하였다.

이 결과는 Z100은 희석이 된다고 하더라고 치근단 조직에서 면역 반응을 활성화시킬 수 있음을 의미한다. 또한 원액에서는 대조군과 차이가 없었던 F2000의 추출액이 희석되면 대조군에 비하여 유의하게 TNF-α의 합성을 촉진함을 보였다. 이는 F2000의 용출 성분 중 희석된 어떤 성분이 단핵구에 TNF-α의 합성을 촉진시킬 수도 있음을 나타낸다. 이와 같은 결과는 TNF-α가 치근단 조직에서 골을 흡수하는 성질을 가진 cytokine으로 알려져 있으므로 TNF-α의 합성을 촉진하는 재료를 치근단 조직과 직접 접촉하는 역충전재로 사용하는 것은 바람직하지 않을 것으로 사료된다.

MTT와 LD를 이용한 역충전재의 세포 독성의 결과와 TNF-α의 수준을 측정한 면역 활성의 결과를 종합하여 보면, 세포 독성을 강하게 보이는 재료가 반드시 치근단 조직에서 면역이나 염증 반응을 활발히 일으키는 재료가 아닐 수도 있다는 것이다. 즉 세포 독성을 나타내는 대표적인 재료로 알려져 있는 ZOE는 단핵구에 대한 면역 활성이 약한 반면, 두 가지 측정 방법에서 세포 독성을 전혀 보이지 않았던 Z100이 혼합 직후 및 희석하여도 강한 면역 활성을 보였다. 또한 세포 독성은 재료가 경화되고 또 희석됨에 따라 감소되는 일반적인 성향을 갖는 반면, 면역 활성은 용출액에 유리된 특정 성분의 특정 농도에 따라 증가하기도 하고 감소하기도 하는 다양성을 지닌다는 것을 시사한다. 따라서 이들 재료를 치근단 조직과 직접 접촉하는 역충전재로서 사용하고자 할 때나 새로운 재료를 개발하여 역충전재로서 사용하고자 할 때에는 세포 독성 연구뿐만 아니라 이들 재료가 치근단 조직에서 단핵구 세포를 포함한 혈관 세포를 통하여 면역 체계에 미칠 수 있는 영향을 종합적으로 평가하고 검토해야 할 것으로 사료된다.

Ⅴ. 결 론

치근단 조직에 직접 접촉되는 역충전재가 치근단 조직에 미치는 영향을 연구하고자 사람의 말초 혈액에서 분리된 단핵구 세포에 대하여 이들 재료가 나타내는 세포 독성과 치근단에서 골 형성을 촉진하는 cytokine인 TNF-α의 생성을 조사하였다. 화학 중합형 글라스 아이오노머 시멘트인 GC Fuji Ⅱ (GC Corporation, Japan), 광중합형 레진 강화형 글라스아이오노머 시멘트인 Fuji Ⅱ LC (GC Corporation, Japan), 광중합형 콤포짓트인 Z100 (3M Dental Products, U.S.A.)와 Tetric Ceram (Vivadent Ets, Liechtenstien), 콤포머인 F2000 (3M Dental Products, USA)과 Compoglass Flow (Vivadent Ets, Liechtenstien), 및 zinc oxide eugenol cement (ZOE) 등 7종류의 역충전재를 대상으로 하였다. 화학 중합형 글라스아이오노머인 Fuji Ⅱ는 혼합한 즉시 세포 배양 배지로 추출한 용액 (즉시군) 및 10배로 희석한 용액에 대하여 MTT 및 LD검사에서 모두 세포 독성을 나타냈다. 그러나 24시간 동안 경화시킨 후 추출한 용액 (경화군)에서는 세포 독성이 없었다. ZOE는 경화군에서 단핵구에 대하여 세포 독성을 나타냈다. 즉시군 화

학 중합형 글라스아이오노머와 레진인 Z100은 대조군에 비하여 단핵구에 대하여 TNF-α의 분비를 증가시켰다. 즉시군은 1 : 10으로 희석한 경우에는 Z100과 콤포머인 F2000에서 TNF-α의 수준이 높았다. 그러나 이들 TNF-α의 수준은 대조군과 비교시 유의한 차이가 없었다.

재료의 세포 독성은 실험하는 방법 및 재료의 준비 방법에 따라서도 달라질 수 있으며, 세포 독성 실험에서 독성을 나타내지 않는 재료일지라도 cytokine의 합성을 촉진하여 면역이나 염증 반응을 유발하여 치근단 조직에 자극을 줄 가능성을 배제할 수 없음을 시사한다.

참 고 문 헌

1. Gartner A and Dorns S: Advances in endodontic surgery, Dent Clin North Am 36:357-78, 1992.
2. Frank A, Glick DH, Paterson SS and Weine FS: Long-term evaluation of surgically placed amalgam fillings, J Endodon 18:391-8, 1992.
3. Jou Y-T and Pert C: Is there a best retrograde filling materials? Dent Clin North Am 41:555-61, 1997.
4. Jesslen P, Zetterqvist L and Heimdahl A: Long-term results of amalgam versus glass-ionomer cement as apical sealant after apicoectomy. Oral Surg Oral Med Oral Pathol 79:101-3, 1995.
5. Torabinejad M, Watson TF and Pitt Ford TR: The sealing ability of a mineral trioxide aggregate as a root canal filling material, J Endodon 19:591-5, 1993.
6. Beltes P, Koulaouzidou E, Kououla V, and Kortsaris AH: In vitro evaluation of the cytotoxicity of calcium hydroxide-based root canal sealers, Endodon Dent Traumatol 11:245-9, 1995.
7. Al-Nazhan S, and Spangberg S: Morphological cell changes due to chemical toxicity of a dental materials: an electron microscopical study on human periodontal ligament fibroblasts and L929 cells, J Endodon 16:129-34, 1990.
8. Matsumoto K, InoueK and Matusmoto A: The effect of newly developed root canal sealers on rat pulp cells in primary culture. J Endodon 15:60-7, 1989.
9. Barbosa SV, Burkhard DH and Spangberg: Cytotoxic effects of gutta-percha solvents. J Endodon 20:6-9, 1994.
10. Torabinejad M: Mediators of acute and chronic periradicular lesions, Oral Surg 78:511-5, 1994.
11. Safavi K and Rossomado L: TNF identified in periapical tissue exudates of teeth with apical periodontitis, J Endodon 17:12-6, 1991.
12. Stashenko P, Yu SM and Wang CY: Kinetics of immune cell and bone resorptive response to endodontic infections, J Endodon 18:422-5, 1992.
13. ANSI/ADA. American National Standards Institute/ American Dental Association, Specification No.41 in Biological Evaluation of Dental Materials. June 1979.
14. Kimua JT: comparative analysis of zinc and non-zinc alloys used in retrograde endodontic surgery. Part 1: apical seal and tissue reaction, J Endodon 8: 359-63, 1982.
15. Pissiotis E, Sapounas G, Spangberg LSW: Silver glass ionomer cement as a retrograde filling materials: a study in vitro, J Endodon 17:225-229, 1991.
16. Torabinejad M. Hong CU, Pitt Ford TR and Kettering JD: Cytotoxicity of four root end filling materials, J Endodon 21:489-92, 1995.
17. Pertot WJ, Stephan G, Tardieu C and Proust JP: Comparison of the intraosseous biocompatibility of Dyract and Super EBA by implantation into the femur of rabbits, J Endodon 23: 315-9, 1997.
18. Osorio RM, Hefti A, Vertucci FJ and Shawley AL: Cytotoxicity of endodontic materials, J Endodon 24: 91-6, 1998.
19. Makkawy H-A M, Koka S, Lavin MT and Ewoldsen NO: Cytotoxicity of root perforation repair materials, J Endodon 24: 477-9, 1998.
20. Spangberg L: In vitro assessment of the toxicity of endodontic materials, Int Endod J 14:27-34, 1981.
21. Kawashima N and Stashenko P: Expression of bone-resorptive and regulatory cytokines in murine periapcial inflammation, Arch Oral Biol 44:55-66, 1999.
22. Tani N, Kuchiba K, Osada T, and Watanabe Y: Effect of T-cell deficiency on the formation in periapical lesion in mice: Histological comparison between periapical lesion formation in BALB/c and BALB/c nu/nu mice, J Endodon 21:195-9, 1995.
23. Foud AF: IL-1α and TNF-α expression in early periapical lesions of normal and immunodeficient mice, J Dent Res 76:1548-54, 1997.
24. Bancroft GJ, Sheehan KC, Schreiber RD and Unanue ER: Tumor necrosis factor is involved in the T cell independent pathway of macrophage activation in *scid* mice. J Immunol 143:127-130, 1989.