



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

치의학 박사 학위논문

상아질 접착제의 세포독성
평가방법에 관한 연구

A study on the cytotoxicity evaluation
method of dentin bonding agents

2014년 2월

서울대학교 대학원
치 의 과 학 과 치 과 생 체 재 료 과 학 전 공
김 경 환

상아질 접착제의 세포독성
평가방법에 관한 연구

A study on the cytotoxicity evaluation
method of dentin bonding agents

지도교수 양 형 철
이 논문을 치의학 박사 학위논문으로 제출함

2013년 10월

서울대학교 대학원
치위과학과 치과생체재료과학 전공
김 경 환

김경환의 박사학위논문을 인준함
2013년 12월

위 원 장 _____ (인)

부 위 원 장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

요 약 (국문초록)

1. 연구목적

상아질 접착제는 상아질과 수복용 복합레진간의 견고한 접착을 얻고 접착파괴를 일으키는 미세누출을 최소화하기 위해 사용되고 있다. 상아질 접착제는 완전한 중합이 불가능하므로 중합과정에서 필연적으로 미중합 레진단량체가 발생하게 된다. 미중합 레진 단량체는 상아세관을 통해 치수세포에 영향을 줄 수 있으므로 레진 단량체의 중합은 접착강도와 생체적합성의 측면에서 매우 중요하다고 볼 수 있다. 기존의 연구결과들은 실제 임상에서 상아질 접착제가 치수세포에 대한 위해 없이 널리 사용되는 것에 반해 높은 세포독성 결과를 보고하고 있다. 이는 기존의 상아질 접착제의 세포독성 평가방법이 상아질 접착제의 세포독성을 과대평가할 가능성이 있다는 점을 시사한다. 상아질 접착제는 실제 임상 조건에서 상부에 수복용 복합레진이 접착되어 사용된다. 이와 같은 조건에서는 상아질 접착제의 중합도에 변화가 나타날 것으로 예상되며 상아질 접착제의 산소 저해층 (oxygen inhibition layer)을 감소시켜 결과적으로 미중합 레진단량체가 감소하여 세포독성의 감소로 이어질 것으로 판단된다. 본 연구의 목적은 상아질 접착제와 접착되는 수복용 복합레진과 산소 저해층이 상아질 접착제의 세포 독성에 미치는 영향을 규명하여 임상에서 상아질 접착제가 사용되는 환경을 효과적으로 반영한 상아질 접착제의 세포독성 평가방법을 개발하는 것이다.

2. 재료 및 방법

본 연구에서 사용된 상아질 접착제는 4세대에서 7세대의 제품인 Adper Scotchbond Multipurpose Plus (3M ESPE, St Paul, MN, USA), Adper Single Bond 2 (3M ESPE), Prime & Bond NT (Dentsply De Trey, Konstanz, Germany), Clearfil SE Bond (Kuraray Medical Inc. Osaka, Japan), One-Up Bond F Plus (Tokuyama Corporation, Tokyo, Japan) 그리고 iBond (Heraeus Kulzer, Hanau, Germany)이며 수복용 복합레진은 Ceram X (Dentsply)를 사용하였다. 세포독성 시험을 수행하기 위해 L929 정상생쥐섬유모세포 (mice fibroblasts)를 배양하였다. 상아질 접착제의 세포독성 평가를 위해 종래의 방법인 추출법 (연속 희석법)을 수행하였으며, 수복용 복합레진과 산소 저해층의 영향을 평가하기 위해 수복용 복합레진 디스크와 접촉된 상아질 접착제 시편을 제작하고 이를 추출하는 방식의 변형된 한천 확산법을 시행하였다. 수복용 레진이 상아질 접착제의 중합도에 미치는 영향을 평가하기 위해 미중합된 수복용 레진 또는 기중합된 수복용 레진 디스크 상부에 도포한 상아질 접착제의 표면 경도를 비커스 표면경도 측정법에 따라 측정하였다. 또한 상아질 접착제의 초기 염증 반응을 파악하기 위하여 mouse 피하 이식시험을 시행하였다.

3. 결과

연속 희석법 시험결과 모든 상아질 접착제의 추출액은 희석하지 않은 상태에서 세포활성을 완전히 저해하였다. 용매를 건조 시킨 후 수행한 실험결과로 나타난 세포독성은 Adper Scotchbond

Multipurpose plus, Clearfil SE bond, One-up Bond F plus, Prime & Bond NT, Adper Single Bond 2 그리고 iBond 순서로 낮아지는 결과를 보였다. 임상조건을 고려한 변형된 한천 확산법 시험 결과 대부분의 상아질 접착제의 세포 독성을 현저히 낮췄다. 수복용 레진과 산소 저해층의 유무가 상아질 접착제의 세포독성에 미치는 정도는 접착제의 종류에 따라 달랐다. 수복용 복합레진의 중합에 따른 상아질 접착제의 중합도 변화를 확인하기 위해 비커스 표면경도 시험을 수행하였다. 시험 결과 수복용 복합레진의 중합에 따른 상아질 접착제의 표면경도의 상승 결과를 통해 수복용 복합레진의 중합이 상아질 접착제의 중합도를 향상시킨다는 점을 간접적으로 확인하였으며 표면 경도의 증가량은 Adper Scotchbond Multipurpose Plus, Clearfil SE Bond, Adper Single Bond 2 그리고 Prime & Bond NT의 순서이다. Mouse 이식 시험결과에서 음성대조군에 비해 상아질 접착제의 염증 반응이 관찰되었으나 그 차이가 두드러지게 나타나지 않았다. 상기의 결과로 판단해 볼 때 종래의 상아질 접착제에 대한 세포독성시험법(추출법)은 생체 내에서의 세포독성을 과대평가하는 것으로 판단되며, 본 연구에서 제안하고 있는 방법 (임상유사조건)은 상아질 접착제가 실제 임상에서 사용되는 조건을 효과적으로 반영하는 평가방법으로 판단된다.

주요어 : 상아질 접착제, 세포독성, 수복용 레진, 산소 저해층, 표면 경도

학 번 : 2010 - 31212

목 차

1. 서론

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

2.2 세포 배양

2.3 연속 희석법을 이용한 세포독성 시험

2.4 한천 확산법을 이용한 세포독성 시험

2.5 비커스 표면경도 시험

2.6 Mouse 피하 이식시험

3. 결과

3.1 연속 희석법을 이용한 세포독성 시험결과

3.2 한천 확산법을 이용한 세포독성 시험결과

3.3 비커스 표면경도 시험결과

3.4 Mouse 피하 이식시험 결과

4. 고찰

5. 결론

6. 참고문헌

1. 서론

범랑질은 96%이상이 매우 광화된 조직으로 이루어져 있으며 산부식 과정을 통해 레진계 치과재료와 미세기계적으로 견고한 결합을 이룰 수 있다 [1]. 하지만 상아질의 경우 상당 부분이 물과 유기물로 이루어져 있어 상아질과 수복용 복합레진의 견고한 접착을 이루기는 매우 어려우며 세심한 전처리 과정이 필요하다 [2]. 오랜 기간에 걸친 상아질 접착제의 개발과 발전으로 인해 상아질에 대한 수복용 복합레진의 접착 또한 비약적인 발전이 이루어졌다. 상아질 접착제에는 소수성 레진 단량체가 포함되어 있다. 소수성 레진 단량체는 상아질 접착제의 중합과정에서 중합이 진행됨에 따라 점차 감소하나 완전한 중합은 불가능하기 때문에 일정 부분은 미중합된 상태로 잔류하게 된다. 이와 같이 접착과정에서 발생하는 미중합 레진단량체는 상아세관을 통해 치수세포에 영향을 줄 수 있으므로 레진단량체의 중합은 접착강도와 생체적합성의 측면에서 매우 중요하다고 볼 수 있다. 많은 연구자들이 상아질 접착제의 세포독성에 대한 연구를 수행하였는데 Chen 등(2003)은 상아질 접착제를 배지로 직접 희석하여 세포를 희석액으로 배양한 후 3-(4,5 - dimethylthiazol - 2 -yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay를 수행하여 상아질 접착제의 세포독성을 평가하였다. 시험에 사용된 상아질 접착제는 Syntac Sprint (Ivoclar-Vivadent), Prime & Bond NT (Dentsply) 그리고 Single Bond (3M ESPE)이며 1:1000으로 희석된 상아질 접착제의 모든 결과에서 음성대조군의 40% 이하의 세포활성을 보고하였다 [3]. Hashieh 등(1999)은 One step (Bisco) 등의 상아질 접착제에 대해 희석액으로 배양 후 MTT assay를 수행하였으며 1:100 이하 희석 시료에 대

한 시험 결과에서 거의 모든 세포의 활성이 소실됨을 보고하였다 [4]. 이외에도 기존의 많은 연구결과들은 임상에서 다양한 상아질 접착제의 치수세포에 대한 독성을 보고하고 있다 [5-7]. 직접치수복조술 시행시 상아질 접착제의 사용이 염증반응을 일으킨다는 점을 근거로 상아질 접착제의 세포독성에 대해 보고하고 있다 [8-13]. 하지만 실제 치과임상에서 상아질 접착제가 치아에 대한 실질적인 부작용 없이 널리 사용되고 있다는 점은 상아질 접착제의 독성을 평가하는 통상적인 *in vitro* 실험이 치수세포에 미치는 상아질 접착제의 위험성을 과대평가할 가능성이 있다는 점을 시사한다. 상아질 접착제의 독성평가에 있어 임상 조건을 보다 잘 반영한 시험법인 상아질 격리시험 (dentin barrier system)이 있다. 상아질 격리시험을 이용한 연구에서 상아질의 두께 증가에 따른 상아질 접착제의 세포독성 감소에 관한 연구결과들이 보고되었다 [14-16]. Meryon 등(1990)은 주로 AH26 (Dentsply), sealapex (SybronEndo) 등의 root canal sealer에 대한 상아질 격리시험을 수행하였는데 상아질의 존재 하에서 두드러진 독성감소를 보고하였다 [17]. Ulker 등 (2009)은 주로 레진 시멘트 (Rely X Unicem Clicker (3M ESPE), MaxCem (KERR), Panavia F 2.0 (Kuraray), BisCem (Bisco), Bistite II DC (Tokuyama)에 대한 세포독성 시험을 수행하였는데 상아질 격리시험에서 시험결과 MaxCem (Kerr)이 음성대조군에 근사한 세포독성 결과를 보고하였다 [18]. Vajrabhaya 등(2003)은 Syntac Single Component (Ivoclar-Vivadent), Prime & Bond 2.1 (Dentsply), Single Bond (3M ESPE) 및 One Up Bond F (Tokuyama)에 대한 상아질 격리시험을 수행하여 60%에서 93%의 세포 활성 결과를 보고하였다 [19]. 상아질 격리시험은 치수세포의 환경을 모사하기 위해 평가하고자 하는 대상 세포와 상아질 접착제 사이에 상아질 시편을 위치시키는 방법을 사용한다. 이와

같은 조건에서 상아질 접착제의 독성은 상아질 시편에 의해 위의 연구 결과 ([14-19])에서 알 수 있듯이 세포독성이 격감하는 결과를 보이며 이는 상아질이 치수세포에 해를 주는 화학성분의 자유로운 확산을 저해하는 보호 장벽의 역할을 한다는 점을 보여준다. 따라서, 실제 임상조건에서 적정한 두께의 상아질이 존재한다면 치수세포에 대한 상아질 접착제의 독성은 최소화 된다고 예상할 수 있다 [20, 21]. 하지만 상아질 격벽의 존재 하에서도 여전히 상당 수준의 치수세포에 대한 독성을 나타내는 상아질 접착제가 존재한다 [22, 23]. 실제 임상에서는 이와 같이 상아질 격리시험에서 높은 독성을 나타낸 상아질 접착제의 경우에도 상아질 접착제에 의한 치수세포 손상에 연관된 임상증례는 보고되지 않고 있으며 이는 상아질 격리시험에서도 여전히 상아질 접착제의 치수 독성이 과대평가될 수 있다고 점을 의미한다.

본 연구에서는 상아질 접착제의 세포독성을 평가함에 있어 상아질 접착제가 임상에서 사용되는 조건을 최대한 고려하기 위해 수복용 복합레진의 존재와 산소 저해층 (Oxygen inhibition layer)에 대한 영향을 고려하였다. 치과 임상에서 치아 수복시 상아질 접착제는 상아질 표면에 도포되며 접착된 상아질 접착제의 상부에 수복용 복합레진이 위치하게 된다. 상아질 접착제와 수복용 레진은 동일한 기전의 중합이 이루어지므로 상아질 접착제 상부에 놓인 수복용 레진의 중합은 상아질 접착제의 중합을 증가시킬 것이다. 거기에 더해 수복용 복합레진은 다량의 미중합 레진 단량체를 가지는 상아질 접착제의 산소 저해층의 차단효과를 가질 것으로 판단된다. 복합레진은 중합이 진행될 때 산소와 접촉하게 되면 복합레진의 반응기가 산소와 반응하게 되어 중합이 불완전해지는 산소 저해층이 형성된다. 이러한 산소 저해층은 불완전한 중합을 야기하여 결과적으로 미중합 레진단량체의 양을 증가시키게 될 것이다. 상아질 접착

제의 중합과정에 있어 산소 저해층을 차단하거나 감소시킨다면 결과적으로 레진단량체의 양은 감소할 것이며 이는 세포독성의 감소로 나타날 것으로 판단된다. Koqa 등 (2011)은 소의 하악전치에 대해 상아질 접착제의 산소 저해층의 영향에 대한 연구를 수행하였는데 산소 저해층이 배제된 경우에서 보다 향상한 접착 강도를 보고하였다 [24]. 수복용 복합레진의 독성에 관한 기존의 연구결과에서 수복용 레진이 상아질 접착제의 세포독성에 미치는 영향이 직접적으로 명시되지 않았으나 수복용 레진과 결합된 상아질 접착제가 수복용 레진의 세포독성에 영향을 주지 않은 것으로 나타났다 [25].







본 연구의 목적은 상아질 접착제와 접착되는 수복용 복합레진과 산소 저해층이 상아질 접착제의 세포 독성에 미치는 영향을 규명하여 임상에서 상아질 접착제가 사용되는 환경을 최대한 반영한 상아질 접착제의 세포독성 평가방법을 개발하는 것이다. 이를 위해 본 연구에서는 상아질 접착제의 세포독성 평가를 위해 종래의 방법인 추출법(연속 희석법)을 통해 상아질 접착제만의 독성을 평가하고, 수복용 복합레진과 산소 저해층의 영향을 평가하기 위해 수복용 복합레진 디스크와 접촉된 상아질 접착제 시편을 제작하고 이를 추출하여 변형된 한천 확산법을 시행하였다. 수복용 레진이 상아질 접착제의 중합도에 미치는 영향을 평가하기 위해 미중합된 수복용 레진 또는 기중합된 수복용 레진 디스크 상부에 도포한 상아질 접착제의 표면 경도를 비커스 표면경도 측정법에 따라 측정하였다. 더하여 상아질 접착제의 초기 염증 반응을 파악하기 위하여 mouse 피하 이식시험을 시행하여 조직학적 평가를 시행하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험재료

현재 치과 임상에서는 매우 다양한 종류의 상아질 접착제가 사용되고 있으며 상아질 접착제는 개발된 시기와 표면조절제(etchant), 접착강화제(primer), 접착제(bonding)의 구성방법에 따라 1세대에서 7세대로 분류될 수 있다. 본 연구에 사용된 상아질 접착제의 제원을 Table 1에 도시하였다. 본 연구에서는 현재는 거의 사용되지 않고 있는 1세대에서 3세대의 상아질 접착제를 배제하고 4세대에서 7세대의 제품인 Adper Scotchbond Multipurpose Plus (3M ESPE, St Paul, MN, USA), Adper Single Bond 2 (3M ESPE), Prime & Bond NT (Dentsply De Trey, Konstanz, Germany), Clearfil SE Bond (Kuraray Medical Inc. Osaka, Japan), One-Up Bond F Plus (Tokuyama Corporation, Tokyo, Japan) 그리고 iBond (Heraeus Kulzer, Hanau, Germany)를 사용하였다. 본 연구에 사용된 수복용 레진은 Ceram X (Dentsply)를 사용하였다. 본 연구실에서의 이전 연구결과, Ceram X는 중합 후 세포독성을 보이지 않았다.

Table 1. Dentin Bonding agents used in this study

Product	Photo	Composition	Manufacturer
Adper Scotchbond Multipurpose Plus		Bisphenol a-diglycidyl ether dimethacrylate (Bis-GMA), 2-hydroxyethyl methacrylate (HEMA), glycerol 1,3-dimethacrylate, copolymer of acrylic and itagonic acids, diurethane dimethacrylate, water, ethanol	3M ESPE, St. Paul, MN, USA
Adper Single Bond 2		Bis-GMA, HEMA, dimethacrylate, fluoride, amines, silica, water, ethanol	3M ESPE, St. Paul, MN, USA
Prime & Bond NT		Dipentaerythritol penta acrylate (PENTA), urethane dimethacrylate (UDMA), cetylamine hydrofluoride, silica, acetone	Dentsply De Trey, Konstanz, Germany
Clearfil SE Bond		<Primer> 10-Methacryloyloxydecyl dihydrogen phosphate (MDP), (HEMA), DL-camphorquinone, N,N-diethanol-p-touidine, water <Bond> MDP, Bis-GMA, hydrophobic dimethacrylate, HEMA, di-camphorquinone, N,N-diethanol-p-touidine, silica	Kuraray Medical Inc.Osaka, Japan
One-Up Bond F Plus		<Bonding Agent A> Methacryloylalkyl acid phosphate, multi-functional methacrylic monomers, photo-initiator <Bonding Agent B> Methyl methacrylate (MMA), HEMA, fluoro-aluminosilicate glass, photo-initiator, dye-sensitizer, borate derivate, water	Tokuyama Corporation, Tokyo, Japan
iBond		UDMA, 4-methacryloxyethyltrimellitic anhydride (4-META), glutaraldehyde, photo-initiator, stabilizer, acetone, water	Heraeus Kulzer, Hanau, Germany

2.2 세포배양

세포독성 시험을 위해 American Type Culture Collection (ATCC; Rockville, MD, USA)에서 구입한 L929 정상생쥐섬유모세포 (mice fibroblasts)를 ISO 10993-5 (Tests for cytotoxicity, in vitro method)에 의거하여 사용하였다. L929 cell은 10% (v/v) fetal bovine serum (FBS) 과 antibiotic solution (100 U ml⁻¹ of penicillin-G and 100 µg ml⁻¹ streptomycin)으로 처리된 DMEM (Dulbecco's modified Eagle's minimum essential medium)에서 37°C (5% CO₂/95% air) 조건으로 배양 하였다. DMEM과 FBS (Lot. No. 0000185451)는 GIBCO사 (Carlsbad, CA, USA)와 Lonza사 (Basel, Switzerland)에서 각각 구입하였다.

2.3 연속 희석법을 이용한 세포독성 시험

본 연구에서는 연속 희석법 (serial dilution test)을 통해 수복용 복합레진의 영향이 없는 상아질 접착제만의 세포독성을 측정하였다. 상아질 접착제에 함유된 용매 (solvent)의 독성 영향을 고려하기 위해 용매를 건조한 그룹과 용매를 건조하지 않은 그룹으로 분류하여 시험을 진행하였다. 글래스 디스크 (지름 5 mm, 두께 2 mm) 표면에 상아질 접착제 5µl를 도포하고 상아질 접착제의 특성에 따라 광조사는 20초를 실시하였다. 광조사의 조건으로서 출력은 300 mW/cm², 광조사 거리는 1 mm 이하, 각도는 90°. 상아질 접착제가 도포된 한쪽면만 시행하였다. 6 cm²/ml의 표면적비 (시료/추출용매)로 37±2 °C에서 24시간 동안 추출하고 추출액을 여과 멸균하고 L929 정상생쥐섬유모세포 0.8×10⁵ cells/ml이 되도록 96-well plate에서 24시간 배양하였다. 초기 추출액을 연속 희석 (serial dilution ; 2배, 4배, 8배, 16배, 32배, 64배)하여 well 당 200µl의 희석액으로 24시간

세포 배양하였다. Cell viability 측정은 Cell Count Kit-8 (WST-8; Dojindo Laboratories, Gumamoto, Japan)을 사용하였다. 24시간 배양된 세포를 WST-8로 1시간 동안 처리한 이후 plate reader (Sunrise; TECAN, Salzburg, Austria)를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상아질 접착제를 도포하지 않은 글래스 디스크를 음성대조군으로 설정하여 시험을 수행하였다. 세포 활성 (cell viability)은 음성대조군에 대한 백분율로 표시하였으며 추출액의 희석농도 (%)에 대한 각 흡광도로부터 LC (lethal concentration)₅₀을 구하여 세포독성 정도를 비교하였다.

2.4. 한천 확산법을 이용한 세포독성 시험

한천 확산법 (agar diffusion test)을 시행하기 위해 L929 세포를 10 mm 세포배양용기에 1.3×10^5 cells/ml의 농도로 24시간 배양하였다. 121°C에서 15분간 멸균한 3% 한천용액과 2X DMEM 배지를 동일한 양으로 섞어 세포 배양용기의 배지를 제거한 후 중층하였다. 한천이 굳은 후 시편과 시편사이 간격이 최소 2 cm 이상 떨어지도록 시편을 배치하여 24시간 배양하였다. 세포배양용기에 시편의 위치를 표시하고 시편을 제거하였다. 0.02% neutral red 용액 3 ml를 넣어 4시간동안 배양하고 neutral red 용액을 제거 후 clear zone의 크기를 측정하고 각 배양세포를 현미경으로 관찰하여 세포독성을 평가하였다. 위의 시험과정에 적용된 시편은 수복용 복합레진의 중합과 산소 저해층의 영향을 고려한 상아질 접착제의 세포독성 시험을 수행하기 위해 다음의 Fig. 1 과 Table 2에 도시한 바와 같이 다섯 가지 시험 조건 (조건 A, B, C, D 그리고 E)을 설정하였다. 첫 번째 조건(조건 A)은 양성대조군으로 상아질 접착제 $5\mu\text{l}$ 를 글래스 디스크 (직경 5mm, 높이 2mm)에 도포 후 상아질 접착제면을 중합 후에 상아질 접착제면이 한천에 접촉하도록 유리 디스크를 한천 배지에 위치시켰다. 두 번째 조건 (조건 B)은 실제 임상에서 상아질 접착제가 사용되는 조건에

유사한 조건을 재현하기 위하여 상아질 접착제를 polypropylene (PP) 필름 면에 도포하고 중합 후 테프론 몰드 (5mm 직경, 2mm 높이)에 중합되지 않은 레진을 중합된 상아질 접착제와 접촉시켜 상아질 접착제와 접촉하지 않은 레진면을 중합시킨 후 테프론 몰드에서 레진 디스크를 분리하였다. 본 연구에서 사용된 수복용 레진은 2절에 명시한 바와 같이 Ceram X를 사용하였다. 분리된 레진 디스크는 상아질 접착제면이 한천 배지에 접촉하도록 위치시켜 한천 확산법 시험을 수행하였다. PP 필름면에 위치해 있던 상아질 접착제가 레진 디스크로 이동하는지 여부에 대한 확인을 위해 field emission scanning electron microscopy (JSM-6500F, JEOL, Japan)을 수행하여 이를 확인하였다. 나머지 시험조건은 수복용 레진의 중합과 산소 저해층 (oxygen inhibition layer)의 영향을 고려하기 위해 다음과 같이 분류하였다. 세 번째 조건 (조건 C)은 산소저해층을 남기고 수복용 복합레진의 중합 영향을 고려하는 것으로 상아질 접착제가 미중합된 수복용 레진면에 직접 도포된 후 상아질 접착제면과 수복용 레진면을 각각 중합하였다. 상아질 접착제의 중합 과정에서 PP 필름을 통해서만 공기중에 접촉되는 조건 B와 달리 조건 C의 경우 상아질 접착제는 공기중에 완전히 노출된 상태로 있게 된다. 따라서 조건 C의 경우 상아질 접착제면에 상대적으로 많은 산소 저해층이 형성될 것으로 예상되었다. 네 번째 조건 (조건 D)은 산소저해층을 차단하고 수복용 복합레진의 중합영향을 고려하는 것으로 PP 필름위에 상아질 접착제를 도포 후에 미중합된 수복용 레진 디스크를 접촉시킨 뒤 조건 C와 동일하게 상아질 접착제면과 수복용 레진면을 각각 중합하였다. 조건 D의 경우 조건 C와 비교하여 산소저해층은 감소하고 나머지 조건은 동일하다고 볼 수 있다. 다섯 번째 조건 (조건 E)은 산소저해층을 차단하고 수복용 복합레진의 중합에 대한 영향 또한 배제한 경우로 PP 필름위에 상아질 접착제를 위치시키고 미리 중합된 수복용 레진디스크를 접촉시킨 후 상아질 접착제면을 중합시킨 후 필름을 제거하였다.

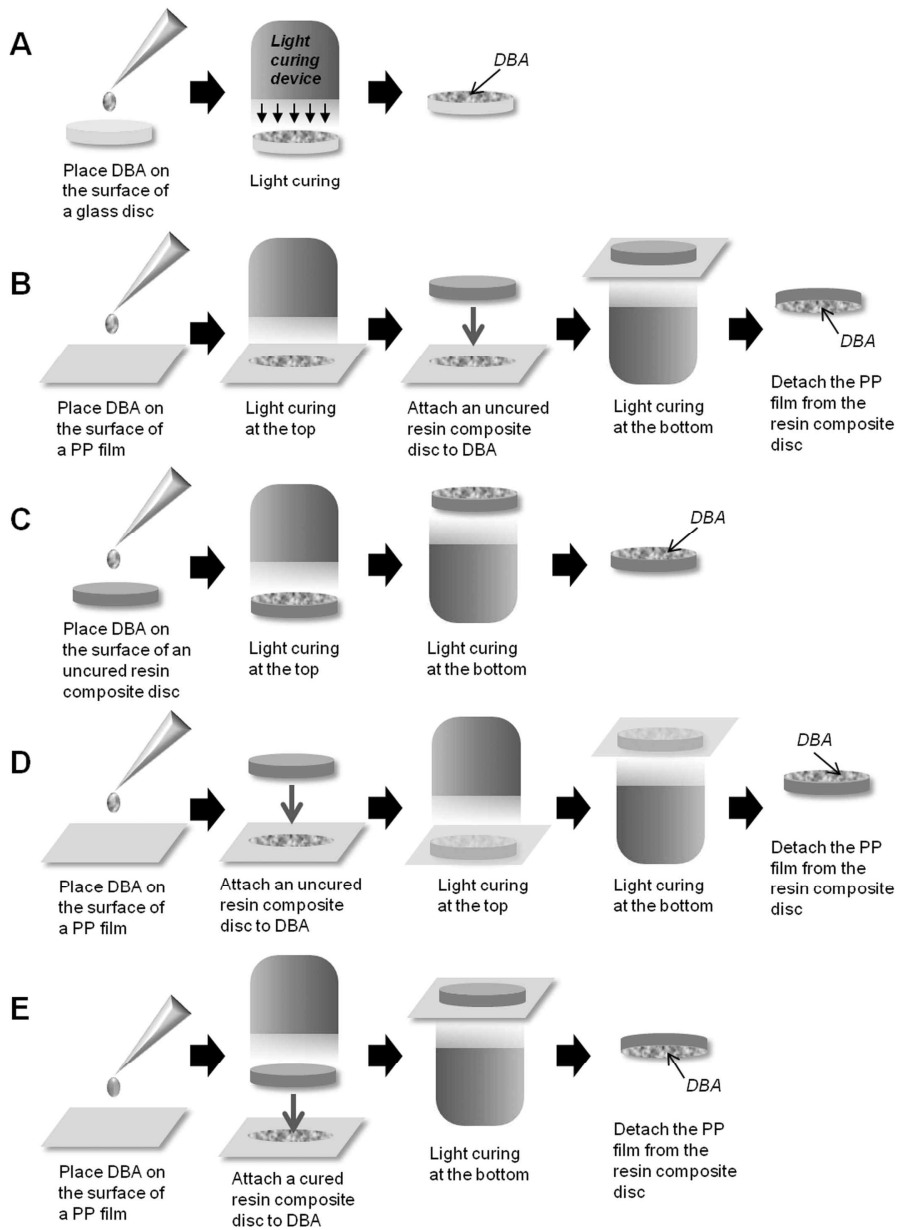


Figure 1. Schematic diagram of the preparation of test samples for agar overlay cytotoxicity tests. DBA, dentin bonding agent

Table 2. Conditions for the agar overlay cytotoxicity test of dentin bonding agents

Test conditions	Application of DBA ¹	Location of DBA in the curing step	RRC ² curing step
A: Glass disk	Onto glass disc	On glass disc	
B: Similar to clinical condition	Onto PP ³ film	On PP film (before attachment to an RRC disc)	After attachment of DAB to RRC disc (DAB located between PP film and RRC disc at the RRC curing step)
C: Affected by polymerization of RRC, sufficient oxygen environment	Onto uncured RRC disc	On uncured RRC disc (in open-air environment)	After curing of DAB on RRC disc
D: Affected by polymerization of RRC, limited oxygen environment	Onto PP film	Between PP film and uncured RRC disc (after attachment to uncured RRC disc)	After curing of DAB (DAB located between PP film and RRC disc at the RRC curing step)
E: Unaffected by polymerization of RRC, limited oxygen environment	Onto PP film	Between PP film and pre-cured RRC disc (after attachment to pre-cured RRC disc)	Before attachment of DAB to RRC disc

¹DBA : Dentin bonding agent

²RRC : Restorative resin composite

³PP: Polypropylene

다음의 Fig. 2에 상아질 접착제의 세포독성시험에 사용된 테프론 몰드와 글래스 디스크, 본 시험에서 사용된 수복용 레진 Ceram X을 도시하였다.

Figure 2. Photographs of teflon mold, glass disk and composite resin used in this study



2.5 비커스 표면경도시험

수복용 복합레진의 중합은 인접한 상아질 접착제의 중합도를 향상시킬 것으로 판단되며 이를 확인하기 위해서는 상아질 접착제의 중합도 측정하여야 한다. 상아질 접착제의 중합도를 파악하기 위해서는 Fourier Transform Infrared spectroscopy (FT-IR)과 같은 화학적 분석법을 적용하여야 한다. 본 연구에서는 상아질 접착제를 수복용 레진 디스크에 접착하여 추출하므로 상아질 접착제를 별도로 분리하기가 불가능하여 비커스 표면경도 (Vickers hardness) 시험을 통해 이를 간접적으로 평가하였다. 상아질 접착제는 PP 필름에 도포하여 10초간 중합한 후 미리 중합된 또는 중합되지 않은 수복용 복합레진 (Ceram X) 디스크에 접착된다. 이후 수복용 복합레진 디스크는 20초간 중합된다. PP 필름을 제거한 뒤 상아질 접착제의 표면 경도를 비커스 시험법에 따라 Vickers micro hardness tester (HMV-2, Shimadzu, Kyoto Japan)를 사용하여 측정하였다. 하중조건은 $98.07 \text{ mN } 10^{-1} \text{ s}$ 를 적용하였다.

2.6 Mouse 피하 이식시험

상아질 접착제의 염증발현을 관찰하기 위해 mouse 피하 이식시험을 수행하였다. 본 시험은 Prime & Bond NT, Adper Single Bond 2 그리고 iBond에 대해 수행하였다. 상아질 접착제를 도포한 teflon tube (inner diameter : 1mm, length : 4mm)를 mouse 피하에 삽입하고 1주일 뒤 튜브 주위의 조직을 염색 및 관찰하였으며 음성대조군 (control)으로 상아질 접착제를 도포하지 않은 멸균 처리된 teflon tube를 사용하였다. 피하 이식방법은 ISO 10993-6 (Biological evaluation of medical devices-Part 6: Tests for local effects after implantation)을 참조하였다 [26]. 시험 결과에 대한 염증반응 정도는 식약처 및 ASTM 등 국내외 표준 규격에서 준용하고 있는 등급체계 (Table 3)를 적용하였다 [27]. 각각의 조직염색사진 결과에 대해 세 개의 구역 (A, B, C)을 선정하여 구역 내의 다형핵 백혈구 세포 (polymorphonuclear leukocyte), 임파구 (lymphocyte) 등의 수를 측정하였고 평균치를 산정하여 아래의 Table 3에 따라 염증반응의 등급을 결정하였다. 일반적으로 2등급까지는 미약한 염증반응 (mild)으로, 3등급 이상은 중증도 이상의 염증반응 (moderate)으로 구분될 수 있다.

Table 3. Histological evaluation (type of cell / response)

type of cell/response	grade				
	0	1	2	3	4
polymorphonuclear leukocyte	0	rare, 1-5	5-10	sever infiltration	packed
lymphocyte	0	rare, 1-5	5-10	sever infiltration	packed
plasma cell	0	rare, 1-5	5-10	sever infiltration	packed
macrophage	0	rare, 1-5	5-10	sever infiltration	packed
giant cell	0	rare, 1-2	3-5	sever infiltration	packed
necrosis	0	minimal	mild	moderate	severe

2.7 통계분석

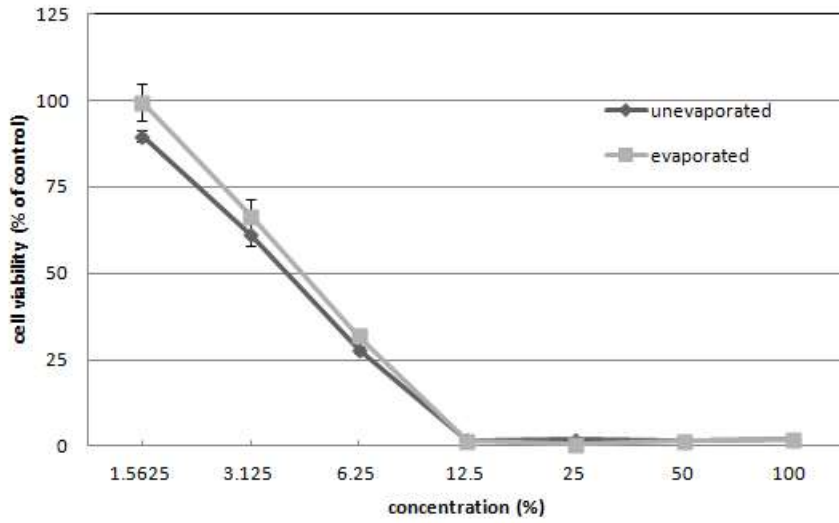
글래스 디스크 시험조건인 조건 A와 임상 유사 조건인 조건 B의 세포독성 시험 결과를 t-test를 통해 비교하였다. 조건 D는 조건 C, 조건 E와의 비교를 통해 수복용 복합레진의 중합과 산소 저해층이 상아질 접착제의 세포독성에 미치는 영향을 분석하고자 하였다. 비커스 표면경도 시험은 수복용 복합레진을 미중합한 경우와 미리 중합한 경우를 서로 비교하였으며 $p=0.05$ 수준에서 시행하였다.

3. 결과

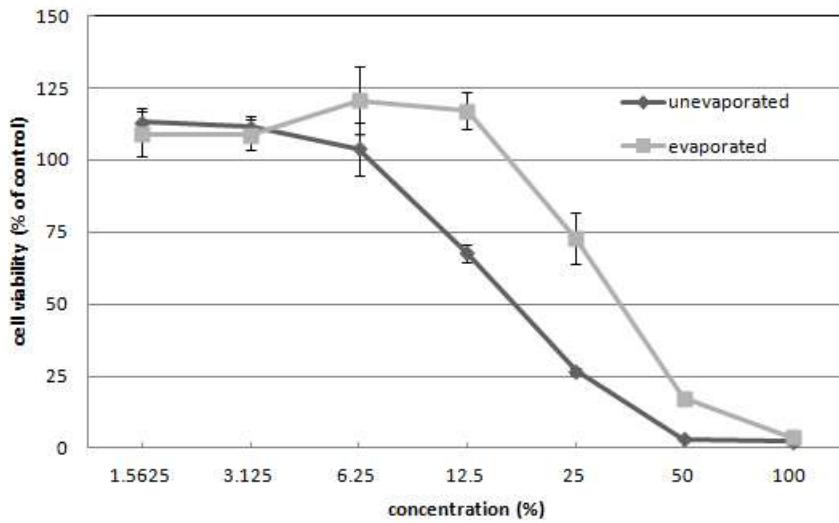
3.1. 연속 희석법(serial dilution)을 이용한 세포독성 시험결과

용매의 독성영향을 고려하기 위해 용매를 건조시킨 경우와 건조시키지 않은 경우에 대하여 각각 시험을 수행하였다. 연속 희석법 시험결과를 Fig. 3에 도시하였다. 결과값은 triplicate experiments의 평균값과 각각의 희석농도에서의 음성대조군에 대한 백분율로 표시하였다. 오차막대는 표준오차를 의미한다.

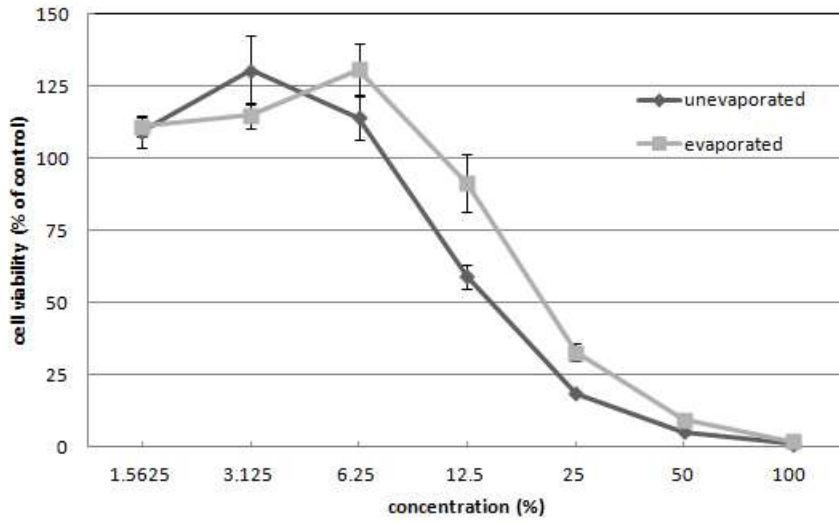
Fig. 3에 나타난 바와 같이 상아질 접착제 추출액으로 시험한 결과 모든 상아질 접착제 추출액은 희석하지 않은 상태에서 세포활성을 완전히 저해하였다. Fig. 3의 결과에서 cell viability가 50%가 되는 희석농도를 그래프상에서 확인하여 각각의 상아질 접착제에 대한 LC_{50} (%)을 아래의 Table 4에 명시하였다. 모든 상아질 접착제에서 용매를 건조시킨 후 세포독성은 감소하였고 One-up bond F plus와 Adper Single Bond 2에서 가장 큰 감소를 보여주었는데 LC_{50} 은 One-up bond F plus와 Adper Single Bond 2에서 건조 전에 비해 건조 후에 각각 3.7배와 1.9배로 증가하였다. 용매를 건조하지 않은 경우 LC_{50} 을 기준으로 세포독성은 Adper Scotchbond Multipurpose Plus > One-Up Bond F Plus > Clearfil SE bond > Prime & Bond NT > Adper Single Bond 2 > iBond의 순서이다. 용매를 건조시킨 후의 세포독성은 Adper Scotchbond Multipurpose Plus > Clearfil SE bond > One-Up Bond F Plus > Prime & Bond NT > Adper Single Bond 2 > iBond 순서로 낮아지는 결과를 보였다.



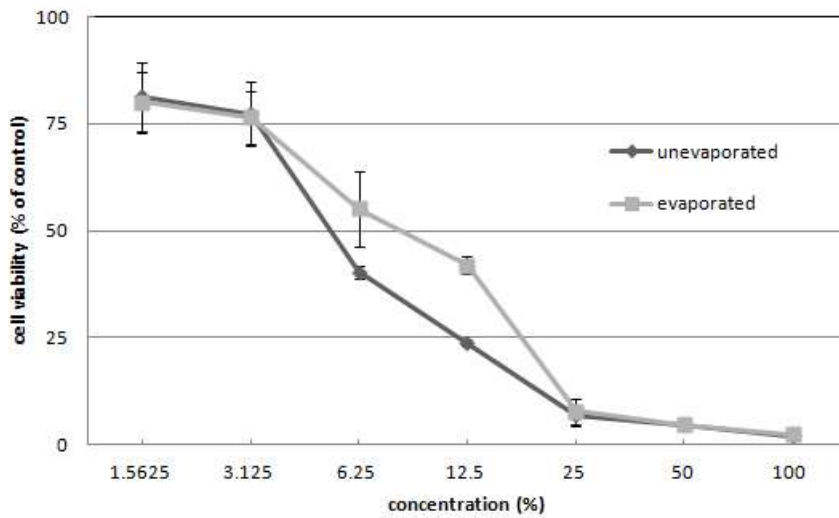
(a) Cell viability of Adper Scotchbond Multipurpose plus in serial dilution test



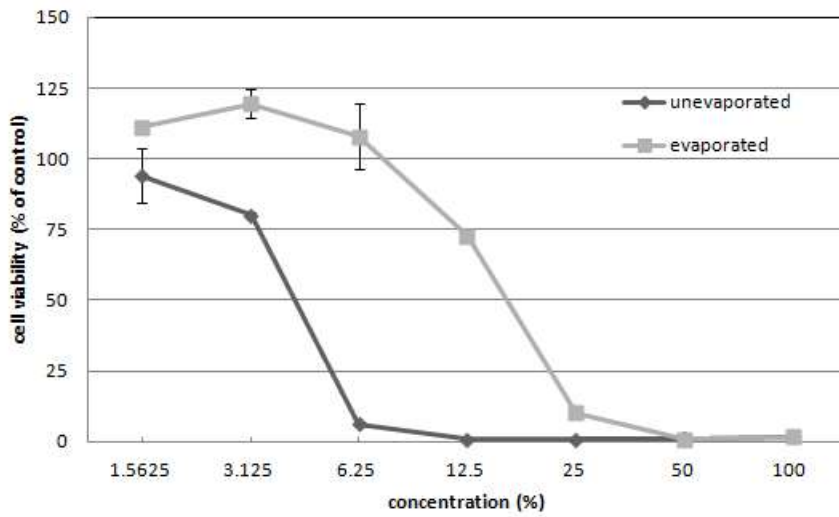
(b) Cell viability of Adper Single Bond 2 in serial dilution test



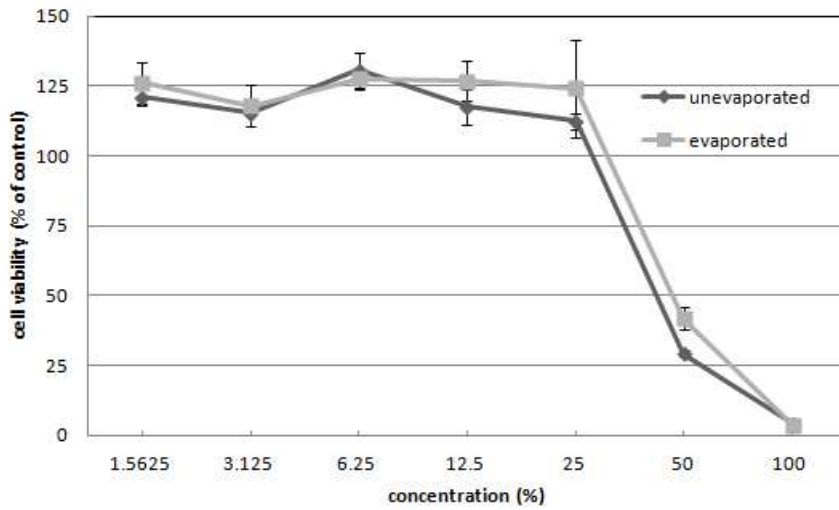
(c) Cell viability of Prime & Bond NT in serial dilution test



(d) Cell viability of Clearfil SE Bond in serial dilution test



(e) Cell viability of One-Up Bond F Plus in serial dilution test



(f) Cell viability of iBond in serial dilution test

Figure 3. Cell viability was assessed by serial dilution method. Each value and error bar represents the mean \pm SD of triplicate experiments. *Significant difference at $p < 0.05$. (a) Adper Scotchbond Multi-Purpose ; (b) Adper Single Bond 2; (c) Prime & Bond NT; (d) Clearfil-SE Bond; (e) One-Up Bond F Plus; (f) iBond.

Table 4. LC₅₀ obtained from serial dilution cytotoxicity tests

Dentin bonding agent	LC ₅₀ (%)	
	unevaporated	evaporated
Adper Scotchbond Multipurpose Plus	4.1	5.2
Adper Single Bond 2	18.3	35.6
Prime & Bond NT	15.4	21.1
Clearfil SE Bond	5.8	9.4
One-Up Bond F Plus	4.8	17.6
iBond	44.7	47.0

3.2 한천 확산법을 이용한 세포독성 시험결과

다섯 가지 시험 조건에서 수행한 한천 확산법 시험 결과를 Fig. 4에 도시하였다. Inhibition zone을 육안으로 관찰하고 clear zone width를 측정 한 후 (Fig. 4 (i) (iii)), 레진 디스크 주변부의 세포 염색정도는 현미경하에서 다시 확인하였다 (Fig. 4 (ii)). Neutral red에 의해 염색되지 않은 부분, 즉 레진 디스크로부터 inhibition zone 경계선까지의 거리 (clear zone width)로 세포독성의 정도를 나타내었다.

조건 A의 결과에서는 Adper Scotchbond Multipurpose Plus가 가장 높은 세포독성을 나타내었고 One-Up Bond F Plus, Prime & Bond NT, Clearfil SE bond의 순서로 낮아졌으며 iBond와 Adper Single Bond 2는 유사한 수준으로 낮게 나타났다. 조건 B의 경우 실제 임상에서 상아질 접착제를 사용하는 조건에 가장 부합하는 조건으로 clear zone의 크기가 두드러지게 감소한 것을 알 수 있다. Adper Single Bond 2를 제외한 모든 상아질 접착제의 결과에서 조건 A와 조건 B사이 통계적으로 유의성 있는 차이를 나타내었다. 수복용 복합레진의 중합 영향과 산소 저해층의 감소 영향 중 어느 부분이 상아질 접착제의 세포독성 감소에 보다 기여하였는지를 판단하기 위해 조건 C, D 그리고 E를 수행하였다. 조건 C에서의 상아질 접착제의 세포독성 감소는 수복용 복합레진의 중합이 영향을 주었다고 볼 수 있다. 반면 조건 E의 세포독성 감소는 산소 저해층 영향의 중요성을 보여준다. 조건 D의 경우 수복용 복합레진의 중합과 산소 저해층의 감소라는 두 가지 요소 모두가 세포독성 감소에 기여하였다. 각각의 상아질 접착제마다 두 가지 요소의 영향에 따른 세포독성 감소 정도가 다양하였다. Prime & Bond NT의 경우 조건 C에서 clear zone이 감소하였고, 조건 D와 조건 E에서 두드러진 결과 차이를 나타내었다. Clearfil SE

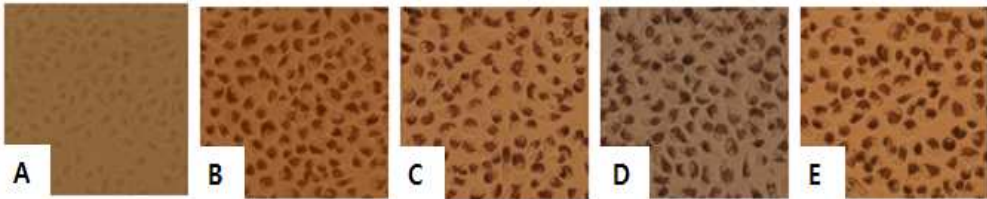
bond와 One-Up Bond F Plus의 경우 clear zone의 크기가 조건 D에서만 조건 B에 근사한 정도로 감소하였다. Adper Scotchbond Multipurpose Plus의 경우 조건 C와 E의 세포독성이 조건 D에 근사하게 감소하였다. 조건 C에서의 clear zone의 두드러진 감소는 산소 저해층이 Adper Scotchbond Multipurpose Plus의 세포독성에 연관성이 낮음을 시사한다. Adper Scotchbond Multipurpose Plus의 조건 E의 결과에 비추어볼 때 미리 중합된 수복용 복합레진의 경우에도 상아질 접착제의 세포독성을 감소시키는데 기여함을 알 수 있다. 따라서 Adper Scotchbond Multipurpose Plus의 경우 산소 저해층의 유무에 관계없이 수복용 복합레진이 세포독성에 영향을 주었으며 이는 수복용 복합레진이 미리 중합된 경우에도 마찬가지로 결과를 보여주었다.

결과적으로 임상 조건을 모사한 조건 B와 유사한 조건 C에서의 세포독성시험은 대부분의 상아질 접착제의 세포 독성을 현저히 낮췄다. 수복용 레진과 산소 저해층의 유무가 상아질 접착제의 세포독성에 미치는 영향은 접착제의 종류에 따라 달랐다. 조건 C를 제외한 PP 필름을 사용한 상기의 시험 결과들은 PP 필름 상의 상아질 접착제가 PP 필름에서 수복용 복합레진으로 이동하여 간다는 것을 전제로 한다. 이러한 이동을 전자현미경(SEM, scanning electron microscopy)으로 확인하였으며 이를 Fig. 5에 도시하였다. Fig. 5A는 상아질 접착제가 도포되기 전의 PP 필름의 표면으로 1000배 확대 시에도 매끈한 상태를 보여준다. Fig. 5B는 수복용 복합레진 디스크의 표면으로 필러를 함유하고 있어 다소 거칠고 불균일한 상태를 나타낸다. C1, D1, E1, F1, G1 그리고 H1은 각각 PP 필름에 도포된 상아질 접착제가 광중합된 후의 상태를 나타낸다. Adper Scotchbond Multipurpose Plus, Adper Single Bond 2, Prime & Bond NT 그리고

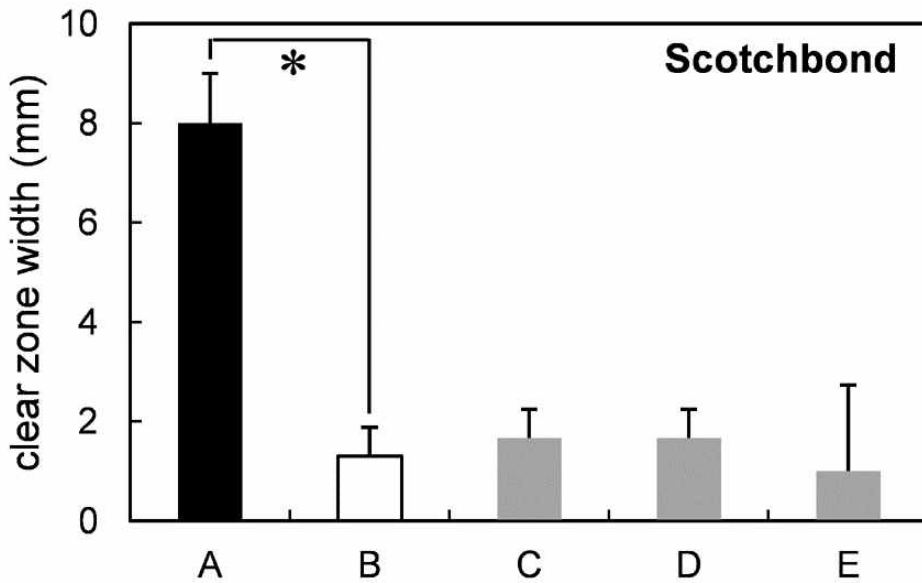
iBond는 매끈하고 굴곡있는 표면을 나타내었다. 이와 같은 주름은 electron beam의 회전애 따른 것으로 판단된다. Clearfil SE bond와 One-Up Bond F Plus는 평평하지만 다소 흐릿한 상을 나타낸다. C2, D2, E2, F2, G2 그리고 H2는 레진 디스크로부터 PP 필름을 분리시킨 후의 PP 필름면을 나타내는데 Fig. 5A와 같이 매끈한 면을 보이고 있어 필름에 도포된 상아질 접착제가 레진 디스크로 이동되었음을 확인할 수 있다. C3, D3, E3, F3, G3 그리고 H3는 접착되었던 PP 필름이 분리된 이후 레진 디스크 표면을 나타내는데 Fig. 5B에서 나타난 수복용 복합레진의 거친 면은 사라진 상태를 보인다.



(i) inhibition zone of dentin bonding agent (circle means the position of glass disk or resin disk)



(ii) neutral red-stained cells adjacent to dentin bonding agent

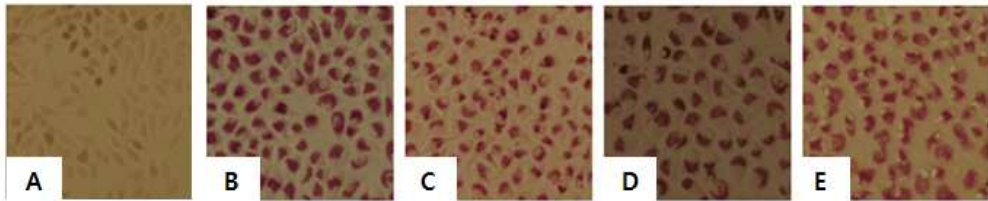


(iii) clear zone width

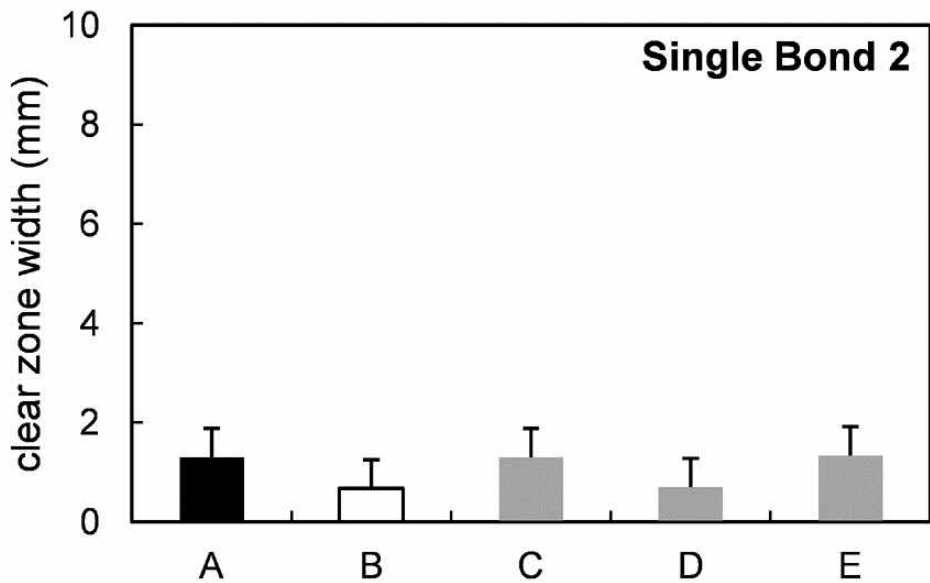
(a) Adper Scotchbond Multipurpose Plus



(i) inhibition zone of dentin bonding agent (circle means the position of glass disk or resin disk)

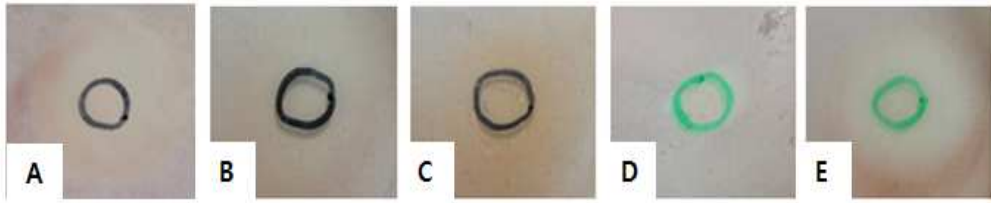


(ii) neutral red-stained cells adjacent to dentin bonding agent

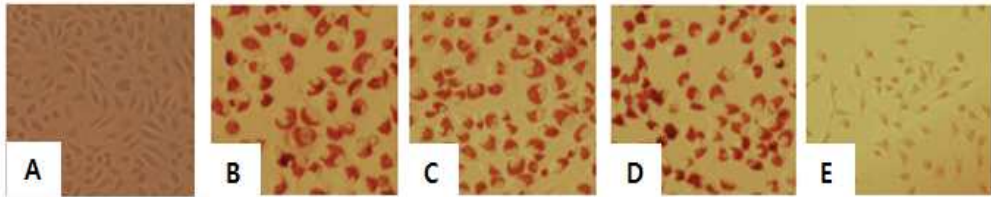


(iii) clear zone width

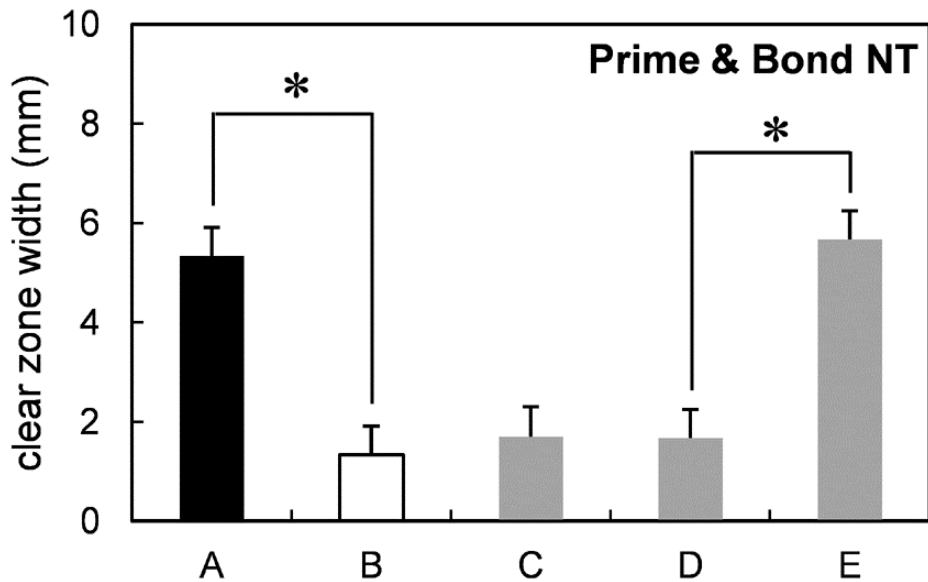
(b) Adper Single Bond 2



(i) inhibition zone of dentin bonding agent (circle means the position of glass disk or resin disk)



(ii) neutral red-stained cells adjacent to dentin bonding agent

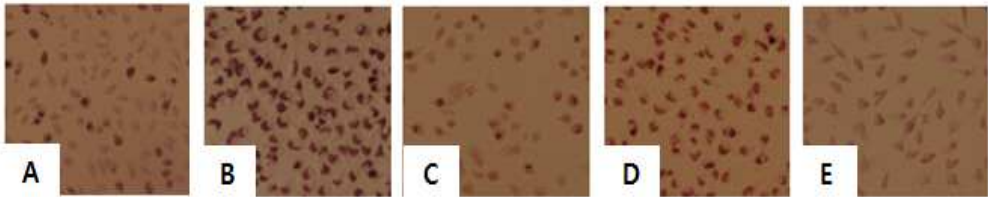


(iii) clear zone width

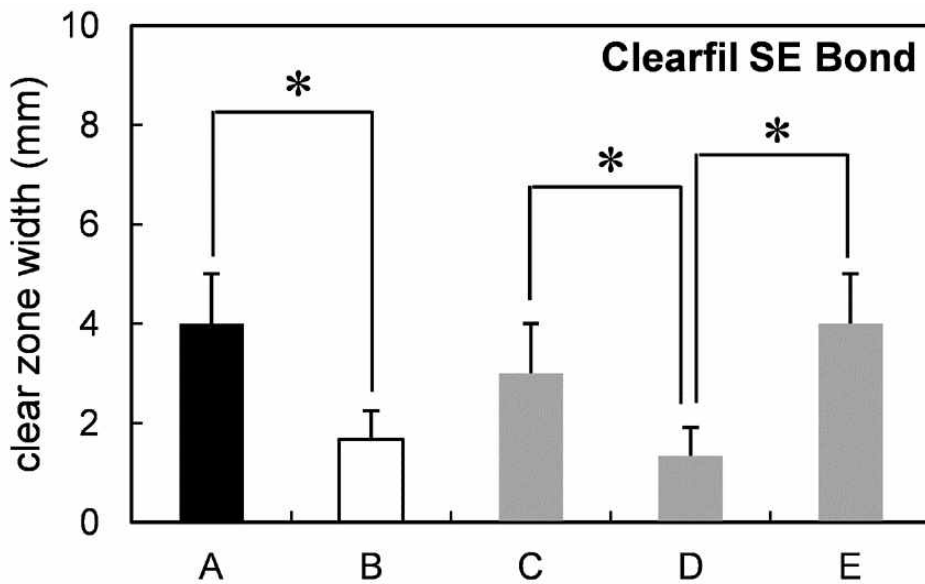
(c) Prime & Bond NT



(i) inhibition zone of dentin bonding agent (circle means the position of glass disk or resin disk)

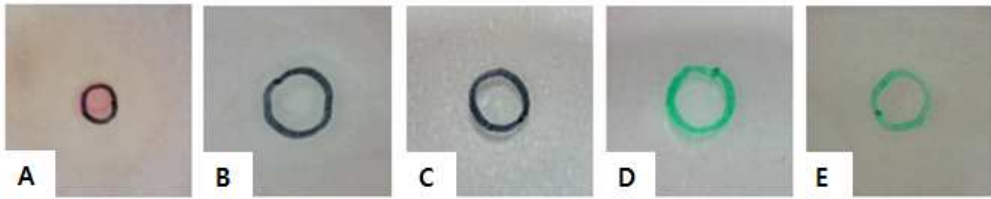


(ii) neutral red-stained cells adjacent to dentin bonding agent

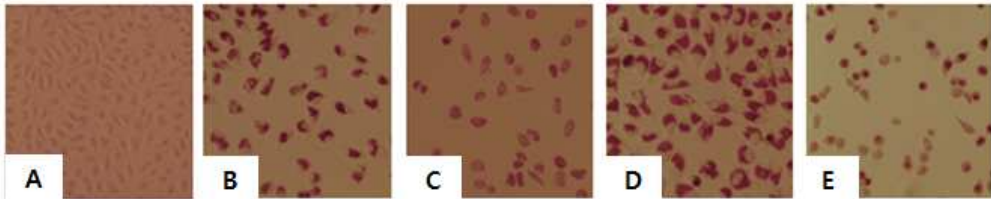


(iii) clear zone width

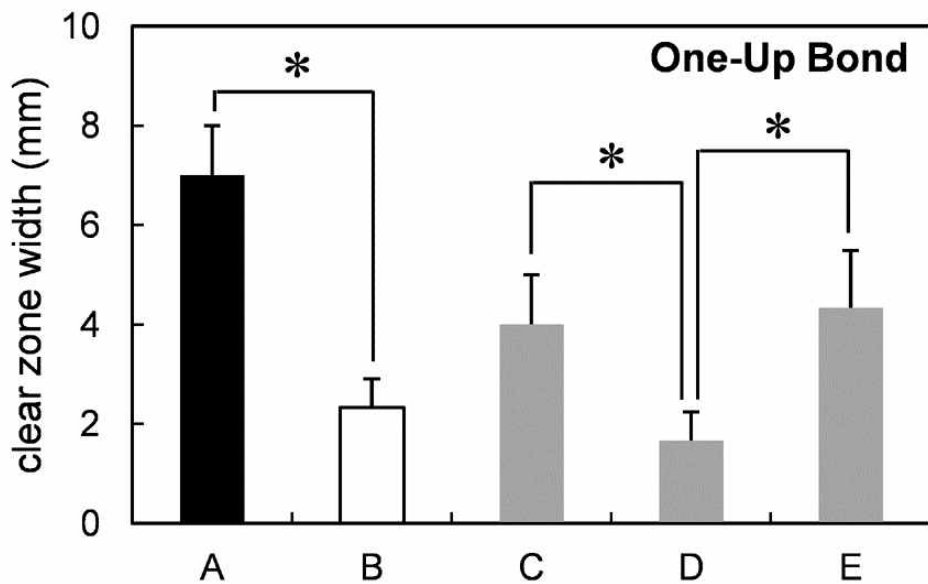
(d) Clearfil SE Bond



(i) inhibition zone of dentin bonding agent (circle means the position of glass disk or resin disk)



(ii) neutral red-stained cells adjacent to dentin bonding agent

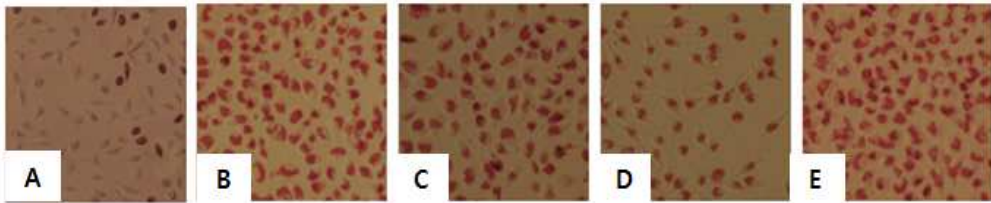


(iii) clear zone width

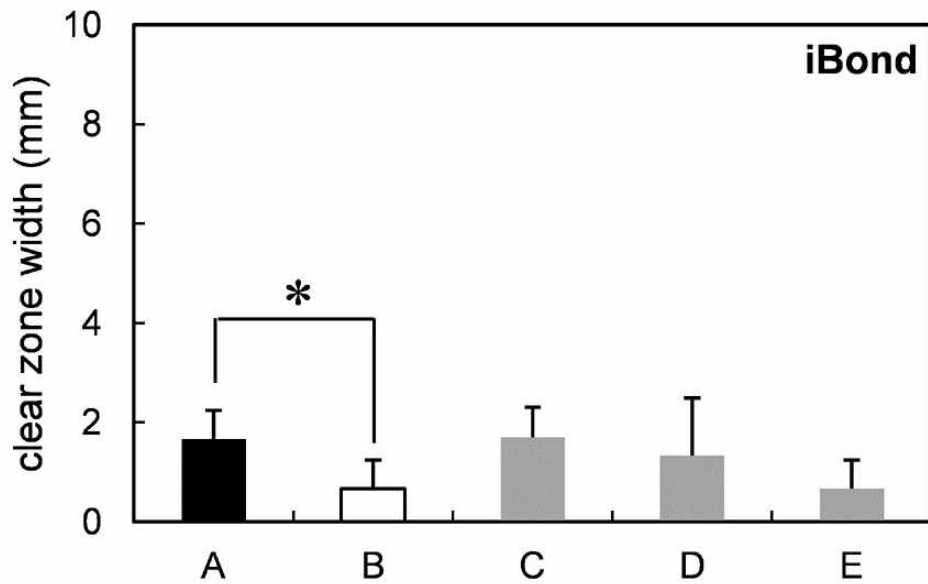
(e) One-Up Bond F Plus



(i) inhibition zone of dentin bonding agent (circle means the position of glass disk or resin disk)



(ii) neutral red-stained cells adjacent to dentin bonding agent



(iii) clear zone width

(f) iBond

Figure 4. Effects of composite resins on the cytotoxicity of dentin bonding agents. Preparation of the test samples and light curing were performed according to the test conditions in Table 2. A, B, C, D and E in (i), (ii), (iii) means test conditions in Table 2. Cytotoxicity of the test samples was assessed by agar overlay method. Each value and error bar represents the mean \pm SD of triplicate experiments. *Significant difference at $p < 0.05$. (a) Adper Scotchbond Multi-Purpose; (b) Adper Single Bond 2; (c) Prime & Bond NT; (d) Clearfil-SE Bond; (e) One-UP Bond F Plus; (f) iBond. (i) inhibition zone of dentin bonding agent (circle means the position of glass disk or resin disk), (ii) neutral red-stained cells adjacent to dentin bonding agent, (iii) clear zone width.

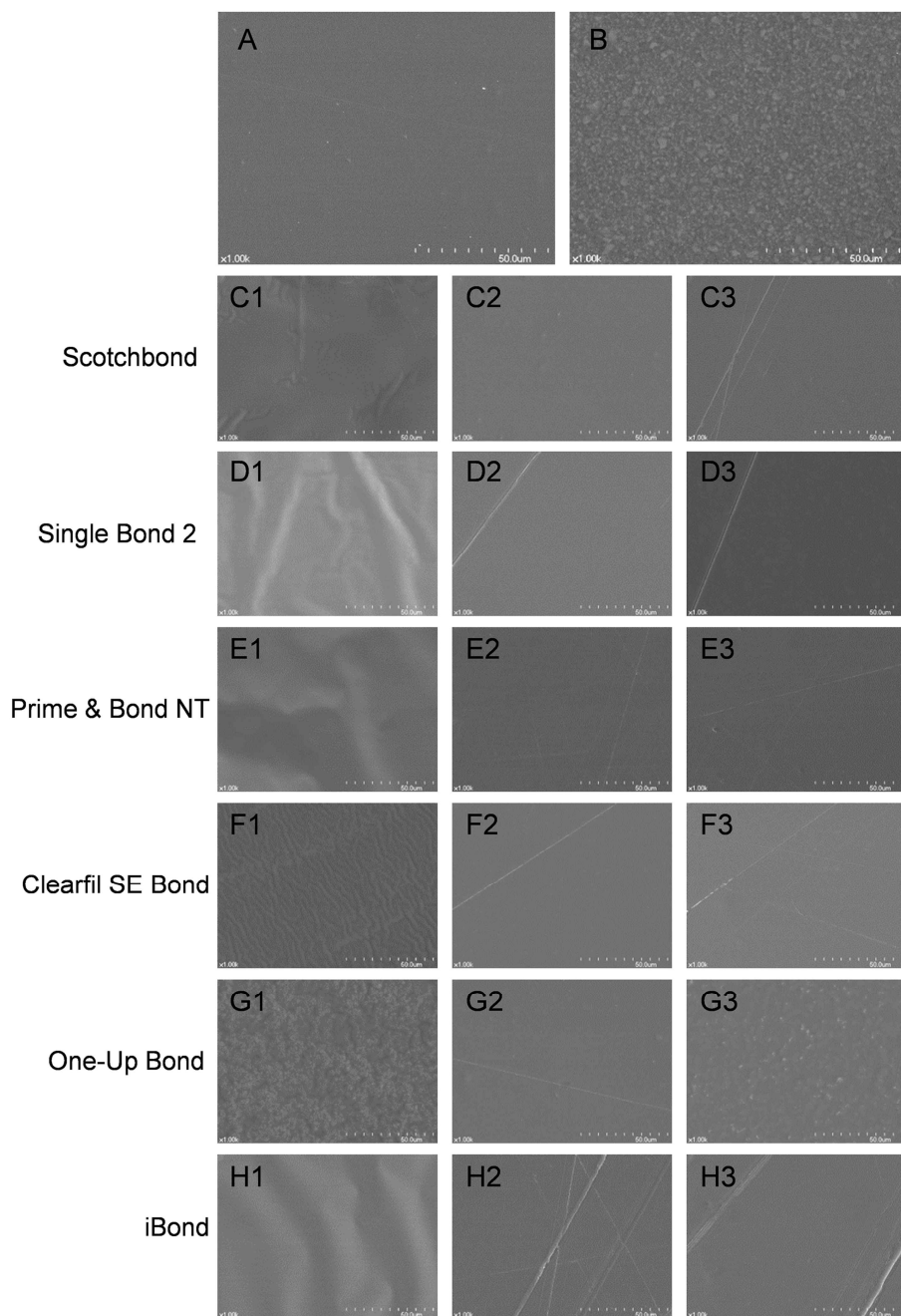


Figure 5. SEM images of the bonding agents on PP films and resin composites. A clean PP film (A) was covered with bonding agents,

air-dried, cured, and analyzed with SEM (C1-H1). The PP films were laid on composite resins to position the bonding agents between the PP films and resin composites. Opposite sides of the composite resins were irradiated for light curing. After removing the PP films, the surface of the detached PP films (C2-H2) and composite resins (C3-H3) were observed. Panel B is a surface of cured composite resins without bonding agents.

3.3 상아질 접착제의 비커스 표면경도 시험결과

비커스 경도시험은 상아질 접착제가 미리 20초간 중합 (pre-cured)된 수복용 복합레진 디스크와 접촉 후 중합되는 경우와 중합되지 않은 수복용 복합레진과 접촉 후 중합 (post-cured)되는 두 가지 경우를 서로 비교하였다. 위의 두 가지 경우에 있어 수복용 복합레진은 미리 중합하는 경우 총 40초의 광조사를 하게 되며, 상아질 접착제와 접촉 후에 중합하는 경우는 20초의 광조사를 하게 된다. 20초와 40초의 광조사 시간 차이가 수복용 레진의 표면경도에 미치는 영향을 확인하기 위해 각각의 조사시간에 대한 표면경도시험을 수행한 결과 오차범위 이내에서 일치하는 결과를 보였다. 비커스 표면경도 시험결과를 Fig. 6 (pre-cured, dark column; post-cured, grey column)에 도시하였다. One-Up Bond F Plus와 iBond의 경우 심한 편차를 나타내었고 표면 물성이 일정하지 못한 양상을 나타내어 비커스 표면 경도를 측정하기에 적합하지 않았다. 수복용 복합레진이 미리 중합된 경우 (dark column)에는 Prime & Bond NT, Adper Single Bond 2, Clearfil SE Bond 그리고 Adper Scotchbond Multipurpose Plus에서 각각 19.3, 5.6, 4.3, 2.1의 표면경도를 나타내었다. 수복용 복합레진이 상아질 접착제와 접촉한 이후에 중합된 경우 (grey column)는 Prime & Bond NT, Clearfil SE Bond, Adper Scotchbond Multipurpose Plus 그리고 Adper Single Bond 2에서 각각 22.6, 10.7, 10.3, 9.8로 나타났다. 미리 중합된 경우 (dark column)에 비해서 표면 경도가 모두 증가하는 결과를 나타냈는데 변화량은 Adper Scotchbond Multipurpose Plus > Clearfil SE Bond > Adper Single Bond 2 > Prime & Bond NT의 순서이다.

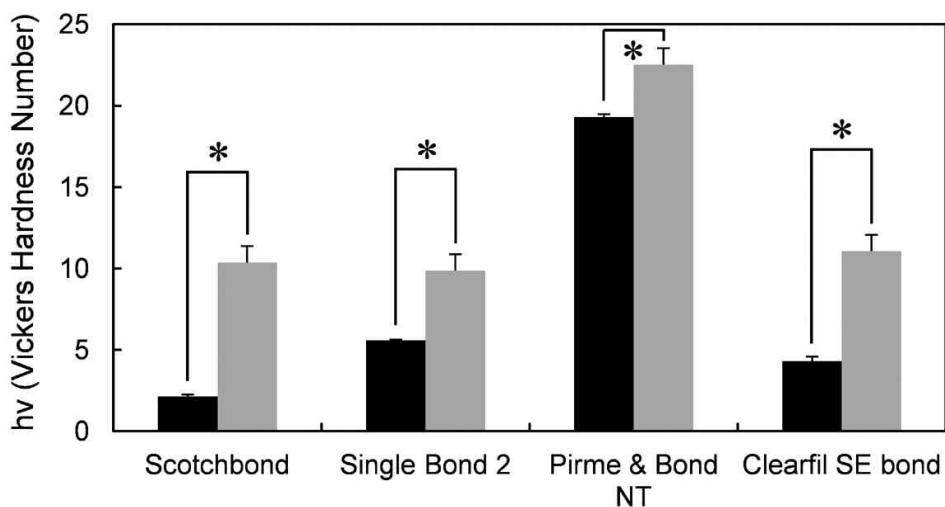
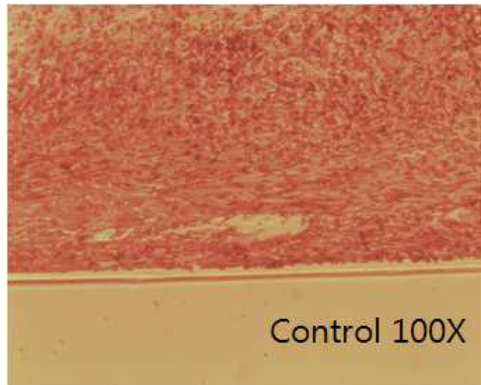


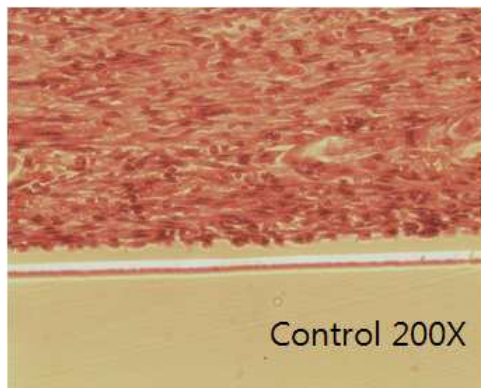
Figure 6. Vickers hardness number of dentin bonding agents on pre-cured (dark column) and post-cured (grey column) resin composites. Bonding agents on the PP films were transferred to pre-cured and uncured resin composites, and composite resin were irradiated on opposite sides. After removing the PP films, the surface hardness of the bonding agents were measured with a Vickers hardness tester. Each value and error bar represents the mean \pm SD of triplicate experiments. *Significant difference at $p < 0.05$.

3.4 Mouse 피하 이식시험 결과

음성 대조군 (control), Prime & Bond NT, Adper Single Bond 2 그리고 iBond 의 이식시험 결과로 얻어진 조직 염색사진 (100X, 200X)과 분석 결과를 아래의 Fig. 7에 도시하였다. Table 3에 따른 염증반응에 대한 등급 (grade)을 각각의 염증세포에 대해 Fig. 7 (b), (d), (f), (h)에 명시하였다. 다형핵 백혈구세포와 임파구는 음성대조군에서 ‘아주 미약 (minimal)’한 정도의 염증반응 (1등급)이 나타났으며, Prime & Bond NT, Adper Single Bond 2 및 iBond에서는 2등급 (mild)의 반응을 보였다. 대식세포 (macrophage)의 경우, Prime & Bond NT와 iBond에서 관찰되었으나 Single Bond 2에서는 관찰되지 않았다. 모든 상아질 접착제의 결과에서 거대세포 (giant cell)이나 괴사 (necrosis)는 관찰되지 않았다.



(i) magnification of 100 times

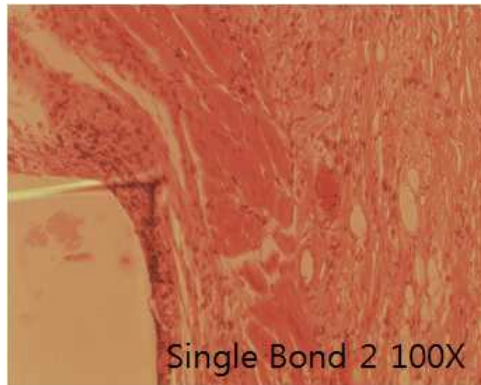


(i) magnification of 200 times

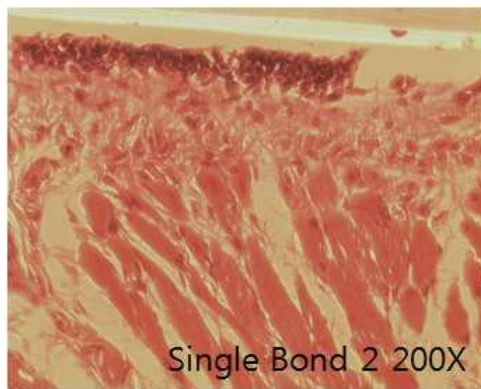
(a) Photomicrographs of histological specimen (Control)

	A	B	C	mean of A, B, C	grade
polymorphonuclear leukocyte	5	6	1	4	1
lymphocyte	5	5	1	3.7	1
plasma cell	0	0	0	0	0
macrophage	0	0	0	0	0
giant cell	0	0	0	0	0
necrosis	0	0	0	0	0

(b) Analysis of mouse implantation result in control



(i) magnification of 100 times

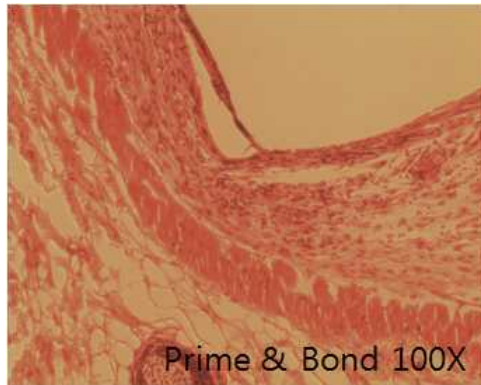


(i) magnification of 200 times

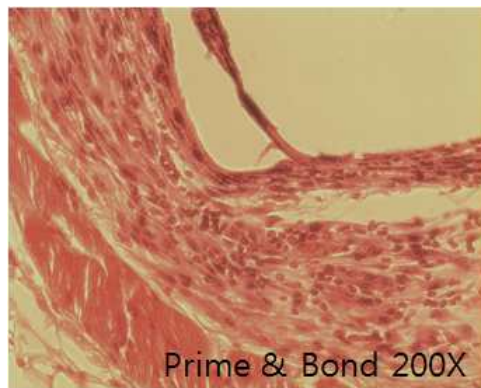
(c) Photomicrographs of histological specimen (Adper Single Bond 2)

	A	B	C	mean of A, B, C	grade
polymorphonuclear leukocyte	7	7	8	7.3	2
lymphocyte	10	5	2	5.7	2
plasma cell	0	0	0	0	0
macrophage	0	0	0	0	0
giant cell	0	0	0	0	0
necrosis	0	0	0	0	0

(d) Analysis of mouse implantation result in Adper Single Bond 2



(i) magnification of 100 times

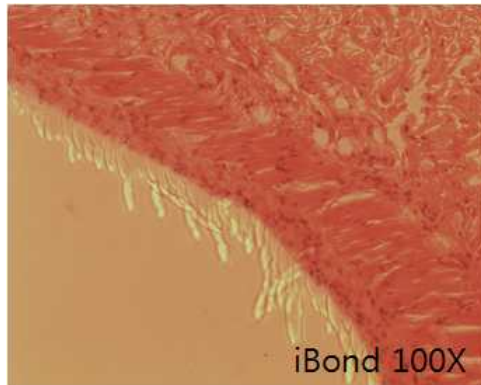


(ii) magnification of 200 times

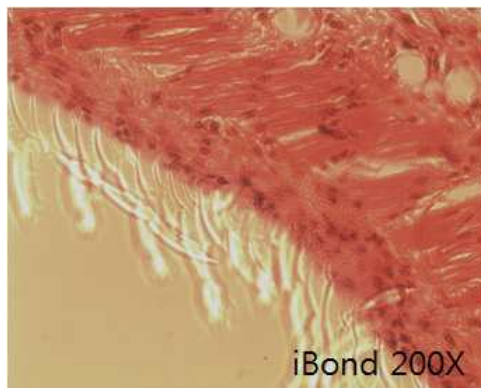
(e) Photomicrographs of histological specimen (Prime & Bond NT)

	A	B	C	mean of A, B, C	grade
polymorphonuclear leukocyte	10	11	3	8	2
lymphocyte	8	3	6	5.7	2
plasma cell	0	0	0	0	0
macrophage	4	0	2	2	1
giant cell	0	0	0	0	0
necrosis	0	0	0	0	0

(f) Analysis of mouse implantation result in Prime & Bond NT



(i) magnification of 100 times



(i) magnification of 200 times

(g) Photomicrographs of histological specimen (iBond)

	A	B	C	mean of A, B, C	grade
polymorphonuclear leukocyte	8	4	9	7	2
lymphocyte	8	6	7	7	2
plasma cell	0	0	0	0	0
macrophage	4	0	0	1.3	1
giant cell	0	0	0	0	0
necrosis	0	0	0	0	0

(h) Analysis of mouse implantation result in iBond

Figure 7. Photomicrographs of histological specimen and analyses of mouse implantation tests. (a) Photomicrographs of histological specimen (Control); (b) Analysis of mouse implantation result in control; (c) Photomicrographs of histological specimen (Adper Single Bond 2); (d) Analysis of mouse implantation result in Adper Single Bond 2; (e) Photomicrographs of histological specimen (Prime & Bond NT); (f) Analysis of mouse implantation result in Prime & Bond NT; (g) Photomicrographs of histological specimen (iBond); (h) Analysis of mouse implantation result in iBond. A, B, C in (b), (d), (f), (h) means three different regions of interest.

4. 고찰

Triethylene glycol dimethacrylate나 2-hydroxyethyl methacrylate와 같은 레진 단량체는 세포 내 산화 환원 조절 물질인 glutathione을 고갈시켜 세포내 산화스트레스를 유발시켜 세포 독성을 일으키는 것으로 알려져 있다 [28, 29]. 상아질 접착제 또한 세포내 glutathione을 감소시키는 것으로 보고되고 있다 [30]. 상아질 접착제의 세포독성이 주로 레진 단량체에 기인하며, 상아질 접착제의 세포 독성은 항산화제 (anti-oxidants)에 의해 감소된다는 것이 보고되고 있다 [31, 32]. 레진을 함유한 재료의 레진 단량체의 방출 정도는 중합도에 크게 좌우된다고 판단된다. 그러므로 상아질 접착제의 세포독성은 주로 불완전한 중합에 기인하며, 이는 다량의 레진 단량체를 유리시킨다. 하지만 일반적으로 치과 임상에서 사용되듯이 상아질 접착제 상부에 놓이는 수복용 레진의 중합에 의해 상아질 접착제의 중합도는 보다 높아질 수 있다.

수복용 복합레진의 영향을 고려하지 않은 연속 희석법과 한천 확산법의 조건 A의 결과가 동일하게 나타나지는 않았으나 Adper Scotchbond Multipurpose Plus가 가장 높은 세포독성 결과를 보이고 iBond가 가장 낮은 세포독성을 보였다. 상아질 접착제의 세포독성은 각각의 상아질 접착제의 중합도의 차이와 더불어 함유하고 있는 레진 단량체의 종류 및 함유량에 좌우될 수 있다. 최근 연구결과에서 다양한 종류의 레진 단량체 가운데 bisphenol A glycidyl methacrylate (Bis-GMA)가 세포독성의 주된 원인 물질인 것으로 보고되었는데 Adper Scotchbond Multipurpose Plus가 Adper Single Bond 2, Clearfil SE bond에 비해 상대적으로 높은 농도의 Bis-GMA가 검출되었다 [33]. 이와 같은 연구 결과로 미루어 볼 때 본 연구에서 나타난 Adper Scotchbond Multipurpose

Plus의 높은 세포독성 결과가 Bis-GMA 함량과 연관된다고 판단된다.

수복용 복합레진의 상아질 접착제의 세포독성에 대한 영향을 규명하기 위해 Table 2에 명시한 바와 같이 다양한 조건을 고려한 시험을 수행하였다. Fig. 4에 도시한 바와 같이 조건 A와 임상 조건을 모사한 조건 B의 결과를 비교할 때 Adper Single Bond 2를 제외한 모든 경우에서 상아질과 접착된 수복용 복합레진은 상아질 접착제의 세포 독성을 감소시켰다. 이와 같은 결과는 수복용 레진디스크와 PP 필름을 통해 상아질 접착제의 중합도를 향상시켜 세포 독성 감소 결과로 이어진 것으로 판단된다. 수복용 복합레진의 중합영향을 고려하기 위해 조건 D와 조건 E를 서로 비교하였으며 Prime & Bond NT, Clearfil SE bond 그리고 One-Up Bond F Plus에서 통계적으로 유의성 있게 조건 D에서 낮은 세포독성 결과를 보였다. 하지만 Adper Scotchbond Multipurpose Plus의 경우 조건 E에서도 세포독성은 감소하였으며 조건 A와 비교하여 수복용 복합레진 디스크를 적용한 모든 경우 (조건 B, C, D 그리고 E)에서 세포독성이 급감하였다.

수복용 복합레진이 상아질 접착제의 중합을 향상시키는 효과에 더해 본 연구에서는 상아질 접착제의 세포독성을 평가함에 있어 산소 저해층을 고려하였다. 종래의 세포독성 평가방법에서 상아질 접착제가 세포나 한천과 접촉하기 전이나 추출되기 전에 공기층에 노출된다. 따라서 상아질 접착제의 표면은 산소 저해층으로 인해 미중합된 채 남아있게 되고 많은 레진 단량체를 함유하게 된다 [34]. 산소 저해층의 레진 단량체는 레진의 물리 화학적 특성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 치아 수복시 상아질 접착제는 상아질면에 도포되어 중합되고 그 위에 수복용 레진이 더해지게 된다. 결과적으로 산소 저해층은 상아질면이 아닌 수복용 레진과 상아질 접착제 사이에 형성되게 된다. 수복용 레진이 상아질 접착제의 중합에 미

치는 영향을 고려할 때 산소 저해층은 상아질 접착제 상부에 놓이는 수복용 복합레진의 중합에 따라 대부분 소실될 것으로 예상된다. 앞서 기술한 임상유사조건을 재현하기 위한 실험에서 PP 필름이 상아질을 대신하였다. PP 필름이 산소투과를 차단하므로 산소 저해층의 발생은 최소화되고 세포독성은 줄어들 것으로 예상된다. 실험조건 C와 D에서 통계적으로 유의성 있는 차이를 보여준 Clearfil SE bond와 One-Up Bond F Plus만이 산소 저해층의 영향에 따라 세포독성 차이를 보였다. Prime & Bond NT에서는 산소저해층의 차단에 따른 독성감소의 결과는 나타나지 않았다.

본 연구에서는 상아질 접착제의 세포독성이 수복용 레진의 중합에 따라 이루어지는 추가적인 상아질 접착제의 중합에 따라 감소된다는 결론을 도출하였다. 수복용 레진의 중합이 상아질 접착제의 중합을 향상시키는지 여부에 대한 평가를 위해 상아질 접착제와 수복용 레진의 분리가 불가능하므로 FT-IR 등의 화학적 평가법을 대신하여 상아질 접착제의 표면경도를 측정하였다. Fig. 6에 도시된 바와 같이 4개의 상아질 접착제는 기중합된 레진에서 다양한 비커스 경도 결과를 나타내었다. 비커스 시험결과는 기중합된 레진디스크를 사용한 경우와 비교하여 미중합된 레진 디스크를 적용한 모든 경우에 표면 경도는 증가하였으며 Adper Scotchbond Multipurpose Plus의 경우에서 가장 높은 표면 경도 증가를 보였다. 상아질 접착제의 표면경도 증가량을 통해 세포독성 감소를 정량적으로 예측할 수는 없으나 이는 상아질 접착제의 중합도의 향상을 간접적으로 확인하는 결과이며 미중합 레진 단량체의 감소로 이어질 것이라고 판단된다. 따라서 수복용 레진의 중합반응은 상아질 접착제와의 계면을 통해 전파되는 것으로 예상되며 이는 레진 단량체의 유출을 감소시켜 주어 상아질 접착제의 세포독성을 감소시키는 결과를 가져올 것으로 판단된다.

Mouse 피하 이식시험결과 다형핵 백혈구세포와 임파구에 대해 Prime & Bond NT, Adper Single Bond 2 및 iBond에서 2등급 (mild)의 반응을 보였으며 거대세포 (giant cell)이나 괴사 (necrosis)는 관찰되지 않았다. 이와 같은 결과는 mouse 피하 이식이라는 시험 조건이 상아질 접착제가 실제 임상에서 적용되는 치수강보다는 상대적으로 개방된 조건이므로 보다 심한 염증반응이 발생되지 않은 것으로 판단된다.

본 연구에서는 수복용 레진을 상아질 접착제와 함께 사용하여 실제 임상 조건을 최대한 반영하고자 하였다. 이를 위해 세포독성이 낮은 수복용 레진과 한천 확산법을 적용하여 수복용 레진에 대해 독립적인 상아질 접착제의 세포독성을 도출하였다. 수복용 레진의 적용은 상아질 접착제의 세포독성을 현저히 감소시켰으며 이는 주로 상아질 접착제에 남아있는 레진 단량체의 추가적인 중합에 기인한 것으로 판단된다.

본 연구에서 나타난 결과는 치과 임상에서와 동물시험 결과에서 상아질 접착제의 낮은 세포독성을 설명할 수 있다고 판단된다. 더하여 본 연구에서 제안한 상아질 접착제의 세포독성 평가 방법은 *in vivo* 또는 임상 조건에 부합하여 보다 정확한 생체적합성 결과를 제공할 것으로 기대된다. 본 연구에서는 수복용 복합레진의 영향만을 고려하였으나 상아질의 장벽 효과로 인한 레진 단량체의 자유로운 이동을 차단하는 효과 또한 많을 것으로 판단된다 [35]. 치수세포에 직접 상아질 접착제를 적용시의 발생하는 염증반응은 상아질의 차단 효과가 생물학적 독성 감소에 중요한 역할을 한다는 점을 보여준다. 따라서 상아질 격리 시스템과 수복용 복합레진이 함께 고려된다면 보다 실제 임상에 가까운 결과를 보여 줄 수 있을 것으로 예상된다.

5. 결론

본 연구에서는 수복용 복합레진이 상아질 접착제의 세포독성을 현저하게 감소시키는 결과를 보여주었다. 상아질 접착제 상부에 위치하는 수복용 복합레진의 중합에 따른 상아질 접착제의 표면 경도 증가는 상아질 접착제의 중합도의 향상과 그에 따른 미중합 레진 단량체의 감소를 의미한다고 볼 수 있다. 이러한 결과는 높은 세포독성을 가지는 상아질 접착제가 치과 임상에서 성공적으로 사용될 수 있는 이유를 설명해준다. 또한 본 연구에서 새로이 제안한 세포독성 평가방법은 상아질 격리시험과 함께 상아질 접착제가 실제 임상에서 사용되는 조건을 효과적으로 반영하는 방법으로 판단된다.

6. 참고문헌

- [1] Li N, Nikaido T, Alireza S, Takagaki T, Chen JH, Tagami J. Phosphoric acid-etching promotes bond strength and formation of acid-base resistant zone on enamel. *Oper Dent* 2013;38:82-90.
- [2] Albert HF. Dentin-resin bonding. *Adept Rep* 1990;1:33-42.
- [3] Chen RS, Liu CC, Tseng WY, Jeng JH, Lin CP. Cytotoxicity of three dentin bonding agents on human dental pulp cells. *J Dent* 2003;31:223-229.
- [4] Hashieh IA, Cosset A, Franquin JC, Camps J. In vitro cytotoxicity of one-step dentin bonding systems. *J Endod* 1999;25:88-92.
- [5] Vajrabhaya LO, Pasasuk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single component dentin bonding agents. *Oper Dent* 2003;28(4): 440-444.
- [6] Karapınar-Kazandağ M, Bayrak OF, Yalvaç ME, Ersev H, Tanalp J, Sahin F, Bayırlı G. Cytotoxicity of 5 endodontic sealers on L929 cell line and human dental pulp cells. *Int Endod J* 2011;44:626-634.
- [7] Yasuda Y, Inuyama H, Maeda H, Akamine A, Nör JE, Saito T. Cytotoxicity of one-step dentin-bonding agents toward dental pulp and odontoblast-like cells. *J Oral Rehabil* 2008;35:940-946.
- [8] Pereira JC, Segala AD, Costa CA. Human pulpal response to direct pulp capping with an adhesive system. *Am J Dent* 2000 Jun;13 (3):139-147.
- [9] Accorinte Mde L, Loguercio AD, Reis A, Muench A, de Araújo VC. Response of human pulp capped with a bonding agent after

bleeding control with hemostatic agents. *Oper Dent.* 2005 Mar-Apr; 30(2):147-155.

- [10] Accorinte Mde L, Loguercio AD, Reis A, Muench A, de Araújo VC. Adverse effects of human pulps after direct pulp capping with the different components from a total-etch, three-step adhesive system. *Dent Mater* 2005;21(7):599-607.
- [11] Kiba H, Hayakawa T, Nakanuma K, Yamazaki M, Yamamoto H. Pulpal reactions to two experimental bonding systems for pulp capping procedures. *J Oral Sci* 2000 Jun;42(2):69-74.
- [12] Costa CAS, Teixeira HM, Nascimento ABL, Hebling J. Biocompatibility of two current adhesive resins. *J Endod* 2000;26: 512-516.
- [13] Cui C, Zhou X, Chen X, Fan M, Bian Z, Chen Z. The adverse effect of self-etching adhesive systems on dental pulp after direct pulp capping. *Quintessence Int* 2009;40:26-34.
- [14] Wiegand A, Caspar C, Becker K, Werner C, Attin T. In vitro cytotoxicity of different self-etching dental adhesive systems. *Schweiz Monatsschr Zahnmed* 2006;116(6):614-621.
- [15] Schmalz G, Schuster U, Koch A, Schweikl H. Cytotoxicity of low pH dentin-bonding agents in a dentin barrier test in vitro. *J Endod.* 2002 Mar;28(3):188-192.
- [16] Galler K, Hiller KA, Ettl T, Schmalz G. Selective influence of dentin thickness upon cytotoxicity of dentin contacting materials. *J Endod* 2005 May; 31(5):396-399.

- [17] Meryon SD, Brook AM. In vitro comparison of the cytotoxicity of twelve endodontic materials using a new technique. *Int Endod J* 1990;23:203-210.
- [18] Ülker HE, Sengün A. Cytotoxicity Evaluation of Self Adhesive Composite Resin Cements by Dentin Barrier Test on 3D Pulp Cells. *Eur J Dent* 2009;3:120-126.
- [19] Vajrabhaya LO, Pasasuk A, Harnirattisai C. Cytotoxicity evaluation of single components dentin bonding agents. *Oper Dent* 2003;28:440-444.
- [20] Bouillaguet S, Virtiliggo M, Wataha J, Ciucchi B. The influence of dentine permeability on cytotoxicity of four dentine bonding systems *in vitro*. *J Oral Rehabil* 1998;25:45-51.
- [21] Kusdemir M, Gunal S, Ozer F, Imazato S, Izutani N, Ebisu S, Blatz MB. Evaluation of cytotoxic effects of six self-etching adhesives with direct and indirect contact tests. *Dent Mater J* 2011; 30:799-805.
- [22] Vajrabhaya L, Korsuwannawong S, Bosl C, Schmalz G. The cytotoxicity of self-etching primer bonding agents in vitro. *Oral Surg Oral Med O* 2009;107:86-90.
- [23] Sengün A, Yalçın M, Ülker HE, Öztürk B, Hakkı SS. Cytotoxicity evaluation of dentin bonding agents by dentin barrier test on 3-dimensional pulp cells. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2011; Sep;112(3):83-88.
- [24] Koça K, Tsuijimoto A, Ishii R, Iino M, Kotaku M, Takamizawa

- T, Tsubota K, Miyazaki M. Influence of oxygen inhibition on the surface free-energy and dentin bonding strength of self-etch adhesives. *Eur J Oral Sci* 2011;119:395-400.
- [25] Franz A, König F, Luca T, Watts DC, Schedle A. Cytotoxic effects of dental bonding substance as a function of degree of conversion. *Dent Mater* 2009;25:232-239.
- [26] ISO 10993-6 : Biological evaluation of medical devices-Part 6 : Tests for local effects after implantation.
- [27] 의료기기의 생물학적 안전에 관한 공통기준규격, 개정 2011. 10.7, 식품의약품안전처, 제2011-58호.144
- [28] Chang H-H, Guo M-K, Kasten FH, Chang M-C, Huang G-F, Wang Y-L, Wang R-S, Jeng J-H. Stimulation of glutathione depletion, ROS production and cell cycle arrest of dental pulp cells and gingival epithelial cells by HEMA. *Biomaterials* 2005;26:745-753.
- [29] Englemann J, Leyhausen G, Leibfritz D, Geurtsen W. Effect of TEGDMA on the intracellular glutathione concentration of human gingival fibroblasts. *J Biomed Mater Res* 2002;63:746-751.
- [30] Huang FM, Li YC, Lee SS, Chang YC. Cytotoxicity of dentine bonding agents on human pulp cells is related to intracellular glutathione levels. *Int Endod J* 2010;43:1091-1097.
- [31] Demirci M, Hiller K-A, Bosl C, Galler K, Schmalz G, Schweikl H. The induction of oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity by dental adhesives. *Dent Mater* 2008;24:362-371.
- [32] Kim NR, Park HC, Kim I, Lim B-S, Yang H-C. In vitro

cytocompatibility of N-acetylcysteine-supplemented dentin bonding agents. J Endod 2010;36:1844-1850.

[33] Park HJ, Son KM, Kwon JH , Park HC, T Zhu, Yang H-C. Effects of Bis-GMA and HEMA on the cytotoxicity of dentin bonding agents. Korean society of dental materials 2013;40(2), 143-152.

[34] Gauthier MA, Stangel I, Ellis TH, Zhu XX. Oxygen inhibition layer in dental resins. J Dent Res 2005;84:725-729.

[35] Subay RK, Demirci M. Pulp tissue reactions to a dentin bonding agents as a direct capping agent. J Endod 2005;31:201-204.

Abstract

A study on the cytotoxicity evaluation method of dentin bonding agents

Kyunghwan Kim, D.D.S., M.S.

Dept. of Dental Biomaterials Science

Graduate School, Seoul National University

1. Purpose

Dentin bonding agents are being used for bonding composite resins to dentin and minimize microleakage which can destruct the adhesion. Because unpolymerized resin monomers in dentin bonding agents can affect dental pulp cells via dentinal tubules, polymerization of bonding agents are important in the view point of biocompatibility. A variety of previous studies has reported that high cytotoxicity of dentin bonding agents although the agents are being used widely in dental clinics. This suggests that the current cytotoxicity evaluation method overestimates the cytotoxicity of dentin bonding agents. In the process of teeth restoration, the bonding agents are being employed in adjacent to composite resins that are expected to affect the polymerization of bonding agents. We hypothesized the composite resins reduced the cytotoxicity of bonding agents by promote resin polymerization. The purpose of this study is to develop a cytotoxicity evaluation method of dentin bonding agents which consider the existence of restorative resin

composites and oxygen inhibition layer.

2. Material and methods.

Dentin bonding agents of fourth to seventh generation were used as follows: Adper Scotchbond Multipurpose Plus (3M ESPE, St Paul, MN, USA), Adper Single Bond 2 (3M ESPE, St Paul, MN, USA), Prime & Bond NT (Dentsply De Trey, Konstanz, Germany), Clearfil SE Bond (Kuraray Medical Inc. Osaka, Japan), One-Up Bond F Plus (Tokuyama Corporation, Tokyo, Japan) and iBond (Heraeus Kulzer, Hanau, Germany). Ceram X (Dentsply) was used as a restorative resin composite. The cytotoxicity of the dentin bonding agents were evaluated by serial dilution and agar overlay methods. For the cytotoxicity test, L929 mice fibroblasts (ATCC, Rockville, MD, USA) were used according to ISO10993-5 (Tests for cytotoxicity, *in vitro* method). In serial dilution test, bonding agents were polymerized on glass discs and extracted with cell culture media. In agar overlay assay, dentin bonding agents were polymerized on cured or uncured resin composite, and the effects of resin composites and oxygen inhibition layer on cytotoxicity were observed. To investigate the effects of restorative resin composites on the polymerization of bonding agents, Vickers hardness of bonding agents was measured on pre-cured or post-cured resin composite discs. Furthermore, mice implantation test performed to observe initial inflammatory reactions.

3. Results

In serial dilution test, cell viability was completely abolished by treatment with the undiluted extracts of all the bonding agents regardless of evaporation. After evaporation and light-curing, the ranking of cytotoxicity based on LC₅₀ was Scotchbond > Clearfil SE Bond > One-Up Bond > Prime&Bond NT > Single Bond 2 > iBond. In agar overlay test, Scotchbond was the most toxic bonding agent, and iBond was the least toxic in all conditions. In the agar overlay tests that mimic clinical situations, cytotoxicity of each dentin bonding agents were severely attenuated. The degree of effects of restorative resin composites and oxygen inhibition layers were various in different bonding agents. Vickers hardness number of all the bonding agents on post-cured resin composites increased significantly compared to values obtained with the pre-cured resin composites. This result suggests that the polymerization of composite resins strengthened the surface hardness of the attached bonding agents through the augmentation of resinous polymerization. Initial inflammatory reactions appeared in sub-epithelial implantation test, but the difference between the tests and negative control groups were not significant. Those results suggest that cytotoxicity of dentin bonding agents were overestimated by the conventional evaluation method. Furthermore, our new evaluation method mimicking clinical situation is expected to evaluate an acting cytotoxicity of dentin bonding agents.

keywords : Dentin bonding agent, cytotoxicity, composite resin, oxygen inhibition layer, surface hardness

Student Number : 2010 - 31212