

## 참치뼈로부터 제조한 Hydroxyapatite 소결체의 햄스터에 대한 구강점막자극시험

김세권\* · 박표잠

부경대학교 화학과

### Evaluation of Mucous Membrane Irritation by Hydroxyapatite Sinter Produced from Tuna Bone in Syrian Hamsters

Se-Kwon Kim\* and Pyo-Jam Park

Department of Chemistry, Pukyong National University, Pusan 608-737, Korea

#### Abstract

In order to evaluate the safety of hydroxyapatite sinter produced from tuna bone in Syrian hamsters, oral mucous membrane irritation test was carried out. Oral mucous membrane irritation test was infected in Syrian hamsters as dose of 5 g/kg BW with hydroxyapatite sinter under pentobarbital sodium anesthesia. Each animal's left cheek pouch was everted, and the samples were loosely placed at the bottom of the pouch with a double-suture technique for 14 days. Hamsters of control group were treated without inserting the hydroxylapatite sinter. Any abnormal clinical signs in both cheek pouches of control and treatment group were not observed for 14 days. There were no significant differences in body weight changes between hamsters of control and treatment group. Therefore, it suggests that hydroxyapatite sinter produced from tuna bone has no particular changes of oral mucous membrane irritation in Syrian hamsters.

**Key Words** – Mucous membrane, hydroxyapatite, tuna bone, hamster.

#### 서 론

생체이식재료 (bio-implant materials)는 신체의 노후화, 질병 및 교통사고 등으로 손상을 입은 신체기관의 기능을 대신하거나, 원래의 기능으로 수복할 수 있는 물질들을 총칭하는 것으로 최근 치과용 치아, 정형외과용 뼈 등으로 사용이 기대되어 이에 관한 연구가 활발하게 이루어지고 있다[3,9,11-13]. 그러나, 이러한 생체이식재료들은 생명의 유지, 연장 또는 특정 기능의 활성화 등 인체의 각종 생리 현상과 직접적으로 연관이 있기 때문에 그 안전성 문제가

매우 중요하다. 따라서 치과재료와 인공뼈 등의 신소재를 개발한 국가들 사이에서는 안전성 확보를 위한 연구가 활발하게 이루어지고 있다. 이러한 치과재료의 독성에 관한 체계적인 연구는 1963년 미국 치과의사협회 (American National Standard/American Dental Association, ANS/ADA)가 충전재 독성에 관한 연구모임을 만들어, 1973년 치과재료의 생물학적 특성의 평가 방법을 권고한 것이 시초이다. 미국치과의사협회와 국제치과연맹에서 치과재료의 생물학적 평가를 각 단계로 나누어 특성에 맞게 규정하고 있는데 비교적 접근 가능한 방법으로는 1차적인 것이 용혈성시험, Ames test, 경구독성시험 등이 있고 2차적인 것이 구강점막자극시험, 감각성시험 등이 있다.

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel · 82-51-620-6375, Fax · 82-51-628-8147  
E-mail : sknkim@mail.pknu.ac.kr

치과재료를 사용한 구강점막자극시험에 대한 연구로는 Piliero 등[15]이 합금 (alloy)을 2×6 mm cylinder 형태로 만들어 햄스터를 마취한 뒤 협낭에 봉합하여 14일간 삽입시킨 후 육안 및 조직학적 변화를 살펴보고, Roy 등[16]은 합금을 원형 디스크 (직경 6 mm, 두께 1 mm)로 만들어 햄스터를 마취한 후 협낭의 바닥에 14일간 이식하여 조직학적 병변을 살펴보았다.

현재, 미국치과의사협회에서 권고하는 구강점막자극시험은 시료를 적절한 크기로 만들어 14일간 부착하여 구강점막의 변화를 조직학적 검사로 관찰하도록 되어 있는데 시험방법으로는 ANS/ADA[1,2]의 방법을 근간으로 분말시료의 특성을 충분히 고려하기 위하여 Piliero 등[15]과 Roy 등[16]의 방법을 변형한 것으로 햄스터 협낭에 시료를 주입한 후 봉합시켜 14일간 유지하여 육안 및 조직학적 변화를 살펴보는 것이다.

Kim 등[7]은 참치뼈로부터 천연 hydroxyapatite를 추출하고 이를 이용하여 건식법 및 습식법으로 hydroxyapatite 세라믹 복합체를 합성하여 그 특성을 검토한 결과, 이들의 결정상, 미세구조, 강도, 인공체액에서의 생체친화성 및 피하독성시험 등에서 우수한 결과를 얻어 화학적으로 합성한 hydroxyapatite의 대체물질로 사용이 가능할 것으로 판단되었다[4,6-8,14].

따라서 본 연구에서는 치과용 재료로서 적용이 기대되는 참치뼈에서 제조한 hydroxyapatite 소결체에 대한 안전성 평가의 일환으로 구강점막자극효과를 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

참치뼈는 (주)동원산업 (창원)의 수산가공 공장에서 참치의 어육가공 처리 후 남은 어뼈를 구입하여 사용하였다.

### 시험물질의 제조

시험물질로 사용한 Hydroxyapatite 소결체는 강도가 가장 우수한 것으로 Kim 등[7]의 방법에 따라 참치뼈를 1% NaOH 수용액에 첨가한 후 80℃에서 7시간 반응시켜 참치뼈에 포함되어 있는 유기물 등을 제거한 후, 2시간 흐르는 물에서 수세하여 건조하였다. 이를 850℃ (전기로, 동원이화학, 부산)에서 3시간 하소 (calcination)하여 추출한 hy-

droxyapatite를 체가름 (200 mesh, 75 μm)하여 3일 동안 습식밀링 (wet milling)한 다음, 1350℃에서 3시간 소결한 시편을 분쇄하여 사용하였다.

### 실험동물 및 사육환경

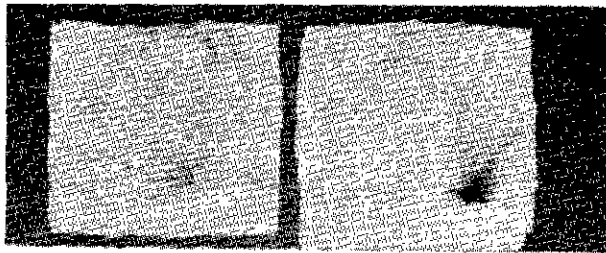
삼육실험동물 연구소 (오산)에서 입수한 5~6주령의 Syrian 햄스터를 1주간 순화시킨 후 건강하고 발육양호한 14마리의 동물을 군간 체중이 고르게 배치한 후 대조군 및 참치뼈 유래의 hydroxyapatite 소결체 용량군으로 군당 수컷 7마리씩 분리하였다. 실험개시시의 체중범위는 110~130 g이었다. 실험기간중의 사육환경은 온도 23±2℃, 습도 50±20% 및 12시간 조명 (P.M. 7:00~A.M. 7:00)이었으며, 사료는 실험동물용 펠릿사료 (삼양사료주식회사, 천안)를 사용하였고, 물은 상수도수를 자유 섭취시켰다.

### 구강점막자극 시험

Syrian 햄스터를 예비실험을 통하여 적정기간 충분히 마취될 수 있는 농도인 90 mg/kg BW의 pentobarbital sodium으로 마취한 후 왼쪽 협낭 (cheek pouch)을 조심스럽게 끌어 당겨 생리식염수로 세정한 뒤 체중 kg당 5 g의 hydroxyapatite 소결체 시료를 협낭의 맨 밑바닥에 놓이도록 하여 시료가 들어갈 수 있도록 주머니를 만든 뒤 Fehland intestinal forceps로 고정시켜 멸균된 견제 봉합사 (Silk No. 1)를 사용하여 simple continuous suture[10]로 일단 봉합한 후 다시 continuous everting matters suture [10]로 이중봉합 (double suture)을 실시하였다. 대조군도 7마리의 햄스터를 이용하여 hydroxyapatite 소결체 분말을 넣지 않고 생리식염수만을 투여한 후 동일한 처치를 실시하였다. 14일간 체중 및 임상 증상의 변화를 관찰하고 14일 후에 pentobarbital sodium으로 안락사 시킨 후 시료와 접촉된 협낭을 조심스럽게 끌어당겨 육안적으로 병변유무를 확인한 다음 협낭을 절제하고 고르게 편 뒤 10% buffered formalin에 고정시켜 탈수, 파라핀 포매 등의 일반적인 조직처리과정을 거친 다음 4~5 μm 두께의 파라핀 절편을 만들어 Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색을 실시한 후 광학현미경 (Nicon Co., Japan)으로 관찰하였다.

### 통계학적 처리

시험결과는 Student t-test를 이용하여 대조값과 비교, 분석하였다. 전 항목에 대하여 P<0.05의 수준에서 유의성을



Hydroxyapatite Control

Fig. 1. Gross finding of oral mucosa of cheek pouch in hamster which was implanted with hydroxyapatite sinter for 14 days.

검증하였다.

### 결과 및 고찰

Hydroxyapatite 소결체 분말처리군 및 대조군에서 실험 기간에 걸쳐 봉합에 따른 증상을 관찰한 결과, 시료 투입에 따른 생세포의 거부반응 및 임상증상의 특이한 반응은 관찰되지 않았다 (Fig. 1). 또한, hydroxyapatite 소결체 분말을 처리한 군의 평균체중에서도 대조군과 비교하여 유의적인 변화는 나타나지 않았다 (Table 1).

14일 후에 구강점막을 육안적으로 관찰한 결과 발적 및 부종형성 등의 특별한 병변은 관찰할 수 없었으며, 병리조직학적 검사에서도 궤양형성 (ulceration), 표피비후증 (acanthosis), 각질증식증 (hyperkeratosis), 각화항진 (hyperkeratonization), 공포형성 (vesicle formation), 염증세포 침윤, 출혈 및 혈관 확장 등을 살펴보았으나, 대조군 및 hydroxyapatite 소결체 분말 처리군 모두에서 이상현상을 관찰할 수 없었다 (Fig. 2, 3). 다만 시료 처리군 및 대조군에서 봉합에 의해 점막이 천공된 부위에서는 점막의 손상, 점막 밑조직 및 근육층에 걸쳐서 염증세포의 침윤이 관찰 (Fig. 2, 3)되었는데, 이 현상은 봉합부위에서만 나타나고

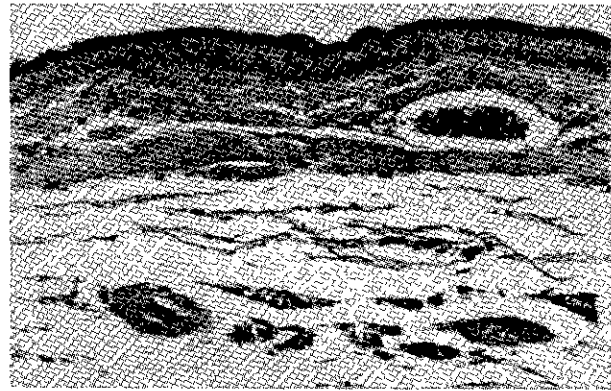


Fig. 2. Histopathological lesion of oral mucosa of cheek pouch in hamster which was implanted with saline solution for 14 days (H & E stain,  $\times 40$ ).



Fig. 3. Histopathological lesion of oral mucosa of cheek pouch in hamster which was implanted with hydroxyapatite sinter for 14 days (H & E stain,  $\times 4$ ).

투여부위에서는 나타나지 않은 것으로 보아 레진 처리에 의한 반응은 아닌 것으로 판단되었다.

치과생체재료의 기계적 성질이나 물성에 관해서는 오래 전부터 그 중요성이 인식되어 이에 대한 평가방법이 70여 년간 시행되어온 반면 생물학적 평가는 최근에 들어서 시

Table 1. The changes of body weight in Syrian hamsters treated with hydroxyapatite sinter produced from tuna bone

Group	Dose (g/kg)	Days				
		0	3	6	9	14
Hydroxyapatite sinter	5	124.3 $\pm$ 8.67	123.8 $\pm$ 10.5	124.1 $\pm$ 11.5	125.2 $\pm$ 12.8	126.3 $\pm$ 12.9
Control		125.1 $\pm$ 9.75	124.9 $\pm$ 10.4	125.2 $\pm$ 11.4	126.2 $\pm$ 12.8	127.9 $\pm$ 13.1

Values are mean $\pm$ SD (n=7).

All values in the same column are not significantly different at 5% level.

작되었다[17]. 미국치과의사협회[1,2]에서 권고하는 치과재료의 1차적 시험방법으로는 세포독성시험 (cytotoxicity), 용혈성시험 (hemolysis), Ames test, 급성독성시험 (경구, 복강내 투여) 및 급성흡입독성시험 등이 있으며, 2차적 시험 방법으로는 구강점막자극시험, 피하이식독성시험 (subcutaneous implantation toxicity test), 피부감작성시험 (skin sensitization test), 반복노출에 따른 경피독성시험, 골내이식독성시험 (implantation test in bone) 등이 있다. 국내에서도 Yoon 등[18]은 수종의 치과용 합금을 이용하여 세포독성시험을 실시하였고, Kim 등[5]은 수종의 결합용 레진을 이용하여 소핵시험 (micronucleus test) 등을 실시한 결과, 이상현상을 발견하지 못하였다고 보고하였다.

또한, Piliero 등[15]은 미국치과의사협회가 정한 type II 금속합금을 이용하여 햄스터에서의 구강점막자극시험을 관찰한 결과, 처리한 합금에 의한 조직의 부작용은 관찰되지 않았으나, 봉합에 의하여 구강점막에 표피각층화 (Keratinization) 현상과 염증세포의 침윤이 나타났다고 하였으며, Roy 등[16]은 1979년 미국치과의사협회에서 권고하는 방법을 좀 더 개선하기 위하여 새로운 double suture technique 과 soft collar를 사용하여 14일간의 치과재료 보존율 (retention rate)을 높였다고 보고하였다.

이상의 결과로부터 참치뼈로부터 유래된 hydroxyapatite 소결체는 햄스터의 구강점막시험에서 부작용이 없는 안전한 제제로 판단된다.

## 요 약

참치뼈로부터 제조한 hydroxyapatite 소결체의 치과용 재료로서의 안전성 평가를 위하여 구강점막자극시험을 실시하였다. 구강점막자극시험은 Syrian 햄스터를 이용하여 시료를 14일간 자극이 가해지도록 봉합하여 대조군과 비교한 결과, 시료 처리군 및 대조군 처리에 의한 일반증상의 변화는 나타나지 않았으며 구강점막에서도 시료투여로 인한 특이한 변화는 관찰되지 않았다. 따라서 참치뼈로부터 유래한 hydroxyapatite 소결체는 생체내에서 부작용이 없는 안전한 제제로 판단된다.

## 감사의 글

본 연구는 1995년 농림수산부 기술개발사업 중 현장애로

기술개발 사업비의 지원에 의하여 수행된 연구결과 일부이며, 연구비를 지원해 준 농림수산부에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. American national standard/American dental association document No. 41 for recommended practices for biological evaluation of dental materials, 1979.
2. American national standard/American dental association specification No. 5 for dental casting alloys, 1979.
3. Caulier, H., J. P. C. M. Waerden, Y. C. G. J. Paquay, J. G. C. Wolke, W. Kalk, I. Naert and J. A. Jansen. 1995. Effect of calcium phosphate (Ca-P) coatings on trabecular bone response: A histological study. *J. Biomed. Mater. Res.* **29**, 1061-1069.
4. Choi, J. S., C. K. Lee, Y. J. Jeon, H. G. Byun and S. K. Kim. 1999. Properties of the ceramic composites and glass-ceramics prepared by using the natural hydroxyapatite derived from tuna bone. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **10**, 394-399.
5. Kim, C. W., Y. K. Lee, S. J. Yoon and H. R. Jeon. 1992. A study on the mutagenicity of some dental bonding resins and dentin bonding agents by micronucleus test. *J. Kor. Res. Soc. Dent. Mat.* **19**, 85-94.
6. Kim, S. K., C. K. Lee, H. G. Byun, Y. J. Jeon, E. H. Lee and J. S. Choi. 1997. Synthesis and biocompatibility of the hydroxyapatite ceramic composites from tuna bone (I)-The sintering properties of hydroxyapatite and hydroxyapatite-containing wollastonite crushed with dry milling process. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **8**, 994-999.
7. Kim, S. K., J. S. Choi, C. K. Lee, H. G. Byun, Y. J. Jeon and E. H. Lee. 1997. Synthesis and biocompatibility of the hydroxyapatite ceramic composites from tuna bone (II)-The sintering properties of hydroxyapatite treated with wet milling process. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **8**, 1000-1005.
8. Kim, S. K., J. S. Choi, C. K. Lee, H. G. Byun, Y. J. Jeon, E. H. Lee and I. Y. Park. 1998. Synthesis and biocompatibility of the hydroxyapatite ceramic composites from tuna bone (III)-SEM photographs of bonding properties between hydroxyapatite ceramics composites in the simulated body fluid. *J. Kor. Ind. Eng. Chem.* **9**, 322-329.
9. Kim, Y. S., H. Y. Ko, J. T. Song and S. H. Choi. 1990. Study on the biocompatibility of hydroxyapatite

- bioceramics (II): Behavior in simulated body fluid and biocompatibility. *J. Kor. Ceramic Soc.* **27**, 721-728.
10. Knecht, C. D., A. R. Allen, D. J. Williams and J. H. Johnson. 1987. *Fundamental technique in veterinary surgery*. 3rd Eds., W. B. Saunders Company, Philadelphia, PA.
  11. Ko, H. Y., Y. S. Kim, J. T. Song and S. H. Choi. 1990. Study on the biocompatibility of hydroxyapatite bioceramics (I): Bonding between hydroxyapatite bioceramics in simulated body fluid. *J. Kor. Ceramic Soc.* **27**, 311-320.
  12. Kokubo, T., M. Shigematsu, Y. Nagashima, M. Tashiro, T. Nakamura, T. Yamamuro and S. Higashi. 1982. Apatite and wollastonite-containing glass-ceramics for prosthetic application. *Bull. Inst. Chem. Res.* **60**, 3-4.
  13. Kokubo, T., S. Ito, M. Shigematsu and T. Yamamuro. 1985. Mechanical properties of a new type of apatite-containing glass-ceramic for prosthetic application. *J. Mater. Sci.* **20**, 2001-2004.
  14. Lee, C. K., J. S. Choi, Y. J. Jeon, H. G. Byun and S. K. Kim. 1997. The properties of natural hydroxyapatite isolated from tuna bone. *J. Kor. Fisher. Soc.* **30**, 652-659.
  15. Piliero, S. J., M. Licalzi, L. Pental, J. A. Poliero, E. G. Kaufman, A. Schulman and D. A. Willigan. 1979. Biocompatibility evaluation of casting alloy in hamsters. *J. Prosthetic Dent.* **41**, 220-223.
  16. Roy, M. and H. I. Whishe. 1986. Establishment of improved implantation technique for hamster mucous membrane irritation testing. *J. Sent. Res.* **65**, 1365-1370.
  17. Stanford, J. W. 1982. Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int. Dent. J.* **30**, 140-188.
  18. Yoon, S. J. and C. W. Kim. 1992. A study on the cytotoxicity evaluation of some dental alloys. *J. Kor. Res. Soc. Dent. Mat.* **19**, 151-165.