https://doi.org/10.4047/jkap.2018.56.4.391

지르코니아의 생체적합성에 대한 연구: *In vitro* 실험 문헌 고찰

서다원[1] · 김영균[2] · 이양진[3]*

[1]서울대학교 치의학대학원, [2]분당서울대병원 구강악안면외과, [3]분당서울대병원 치과보철과

A review of biocompatibility of zirconia: *In vitro* experiment

Da-Won Suh[1], Young-Kyun Kim[2], Yang-Jin Yi[3]*

[1]School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea,

[2]Department of Oral & Maxillofacial Surgery, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea,

[3]Department of Prosthodontics, Seoul National University Bundang Hospital, Seongnam, School of Dentistry, Seoul National University, Seoul, Republic of Korea

Increasing demands for zirconia material in clinics, assessment of biocompatibility of zirconia is essential. In this article, a review of *in vitro* studies of zirconia compatibility was performed. Zirconia showed great biocompatibility at *in vitro* studies with various cell lines such as fibroblasts, osteoblasts, and lymphocytes. Many studies reported that zirconia caused no cytotoxicity or mutation. Zirconia also showed less bacterial adhesion. There were no adverse effects except for small reduced strength with *in vitro* study mimicking long-term exposure of body fluid. According to the study with ostoblast-like cells, zirconia could regulate genes of immunity, molecular transport, and cell cycle. Such gene regulating was considered as one of the reasons of zirconia biocompatibility. With biocompatibility of zirconia powders, *in vitro* studies had controversial conclusions. It seems that zirconia powders might have cytotoxicity. *(J Korean Acad Prosthodont 2018;56:391-5)*

Keywords: Biocompatibility; Cytotoxicity; Zirconia

서론

효과적인 치아 수복에 있어서, 재료에 대한 연구는 큰 비중을 차지한다. 심미적 치료에 대한 수요증가와 맞물려 치과용 도재는 빠르게 발전해 온 치과재료 중 하나이며 보다 높은 기계적 물성을 가지는 치과용 세라믹 제료를 개발하는 과정에서 지르코니아가 개발되었다. 지르코니아는 지르코니움(zirconium)의 산화물이자 다결정체 물질이다. 지르코니아는 현존하는 세라믹 중 가장 높은 굽힘강도와 파괴인성을 가지고 있으며, 이러한 우수한 기계적 물성은 상전이를 통한 강화에서 이루어진다.[1,2]

지르코니아의 생체적합성을 검증하는 *in vitro* 실험은 실험적 기술과 기계의 발전 필요성으로 인해 *in vivo* 실험보다 상대적으로 늦게 시행되었다.[3] Fibroblast, osteoblast, macrophage 등 다양한 세포들에 대한 지르코니아의 생체적합성이 검증되었으며, 여러 가지 상에 따른 지르코니아의 생체적합성도 연구되었다. 이 연구는 그 동안 이루어진 지르코니아 연구 중 블록과 분말에 대한 결과를 구분하여, 성상의 차이가 생체적합성의 차이로 나타나는지 여부를 중심으로 고찰하였다.

**Corresponding Author: Yang-Jin Yi*
Department of Prosthodontics, Seoul National University Bundang Hospital
82 Gumi-ro 173-gil, Bundang-gu, Seongnam 13620, Republic of Korea
+82 (0)31 787 7546: e-mail, navydent@snubh.org
Article history: Received September 19, 2018 / Last Revision October 10, 2018 / Accepted October 19, 2018

ⓒ 2018 The Korean Academy of Prosthodontics
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

재료 및 방법

지르코니아의 생체적합성에 대해 Pubmed 및 Google scholar에서 'zirconia, biocompatibility'를 keyword로 검색하여 전체 문헌을 이용 가능한 경우(full text available)로 한정하여 연구를 진행하였다. 해당 논문의 'related citation' 목록에서 필요한 경우 문헌을 추가하여 연구를 진행하였다. 고전적인 *in vitro* 연구를 포함시기기 위해서 발간연도는 한정하지 않았다.

고찰

1. 지르코니아 블록의 생체적합성

Josset 등[4]은 human osteoblast cell을 통해서 지르코니아와 알루미나의 생체적합성을 비교하였다. Osteoblast의 생존률을 통해 세포독성을 판단하였으며, 지르코니아 및 알루미나 모두 세포독성은 발견되지 않았다. 지르코니아와 알루미나 모두 일반 배지에서 배양한 경우와 동일한 osteoblast의 증식 및 단백질 합성정도를 보였다. 또한 광학현미경과 전자현미경을 통해 관찰한 결과, osteoblast와 시편 사이의 긴밀한 접촉도 확인하였으며, 면역형광법을 통해 osteoblast의 세포외기질의 형성도 확인하였다. Josset 등은 최종적으로 지르코니아와 알루미나가 osteoblast에 대한 생체적합성을 가진다는 결론을 내렸다. Fassina 등[5]은 지르코니아와 lymphocyte 사이의 생체적합성을 연구하였다. Gel supported precipitation (GSP) 방법을 이용해 Ca-PSZ를 제작하였으며, 이들의 생체적합성을 살펴보았다. Inhibition 3H Thimidine Uptake Test를 통해 human lymphocyte와의 생체적합성을 실험하였으며, 지르코니아에 대한 세포독성을 관찰할 수 없었다. Silva 등[6]은 지르코니아, hydroxyapatitie (HA) 및 지르코니아-HA composite의 생체적합성을 살펴보았다. Near-confluent monolayers of cell line L-929와 함께 24시간 배양한 뒤 세포독성 여부를 관찰하였다. 모든 시편에 대해 세포독성, 세포변형 등의 이상이 관찰되지 않았다. 이처럼 다양한 세포에 대해 지르코니아 블록은 뛰어난 생체적합성을 보이는 것으로 결론지을 수 있다.

DNA microarray는 다량의 특정 유전자들이 어느 정도 발현하고 있는지를 빠르게 알 수 있는 방법이다. 살펴보고자 하는 유전자들의 특정부분과 상보적으로 결합할 수 있는 probe를 가지고 있어, probe에 결합하는 유전자의 양을 형광학적으로 알려준다. Carinci 등[7]은 지르코니아의 생체적합성을 심층적으로 분석하고자 osteoblast-like cell (MG-63)을 지르코니아와 같이 배양하였을 때, 유전자 발현정도의 변화를 DNA microarray를 통해 살펴보았다. 지르코니아는 MG-63 cell의 여러 유전자들의 발현을 변화시켰는데, 특히 면역반응, 물질이동, 세포주기조절에 관여하는 유전자들이 조절되었다. 면역반응의 조절은 지르코니아를 자기물질로 인지하기 위한 메커니즘의 일종으로 생각된다. 또한 지르코니아는 물질이동, 세포주기조절에 작용하는 유전자를 조절하여, 세포외물질의 전환속도를 조절하거나 osteoblast 분열을 촉진하는 결과를 나타낼 것으로 생각된다.

지르코니아는 장기간 방치되거나, 수분에 노출될 경우 aging이 발생하여 정방정에서 단사정으로의 상전이가 발생한다.[1,2] Garvie 등[8]은 이러한 지르코니아의 aging이 생체조건하에서 발생하는 지에 대해 연구하였다. 연구진은 magnesia-partially stabilized zirconia (Mg-PSZ)를 이용한 실험을 통해, 체액에서 장기간 노출되었을 때의 기계적 특성 변화를 살펴보았다. 체액조건의 aging을 모방하기 위해 Mg-PSZ 시편을 끓는 0.9 wt% 생리식염수에 1000시간 노출하였으며, 노출전후의 물리적 성질을 비교하였다. 그 결과, 시편의 미세구조, 표면 거칠기, 밀도에 차이가 없었다. 처리 후에 단사정상의 소량 증가가 관찰되었으며, 기계적 강도는 6 - 14% 감소하였다고 하였다. 이러한 기계적 강도의 감소는 응력부식에 의한 결함크기 증가가 원인으로 연구진은 생각하였다.

구강 내 재료에 세균부착이 잘 일어날수록 불리한 치주반응이 나타난다. 따라서 지르코니아의 생체적합성을 고려하는데 있어 세균부착의 평가는 중요하다. Rimondini 등[9]은 특정 세균의 지르코니아와 티타늄에 대한 부착정도를 비교하였다. *Streptococcus mutans, S. sanguis, Actinomyces viscosus, A. naeslundii, Porphyromonas gingivalis*을 각각 지르코니아, 티타늄 시편과 함께 배양하였다. *S. mutans*는 지르코니아에 더 잘 부착하였으며, *S. sanguis*는 티타늄에 더 잘 부착하였다. 나머지 세균에는 차이를 보이지 않았다. 뒤에서 살펴볼 *in vivo*의 연구와 종합하면 임상적으로 지르코니아는 상대적으로 티타늄에 비해 세균부착이 덜 일어난다고 할 수 있다.

지르코니아의 유전자에 대한 영향도 보고되었다. Covacci 등[10]은 PSZ의 돌연변이 및 암 유발 가능성에 대해서 평가하였다. 높은 순도의 Y-PSZ와 fibroblast를 이용해 실험하였으며, ouabain 저항성을 가지는 gene을 돌연변이 테스트로 이용하였다. Y-PSZ의 돌연변이율이 아무런 처리를 하지 않은 배지와 동일한 것으로 나타났으며, 이는 Y-PSZ가 유전자에 대해 안전한 재료라는 것을 나타낸다.

2. 지르코니아 분말의 생체적합성

블록 형태의 지르코니아가 *in vitro* 실험에서 다양한 세포에 대해 뛰어난 생체적합성을 보인 것과는 다르게, 분말 형태의 지르코니아는 연구마다 다소 상이한 결과를 보여주었다. Ito 등[11]은 Y-PSZ 분말과 티타늄 합금 분말의 세포독성을 비교하였다. 실험은 L929 murine fibroblast cell로 진행되었으며, 티타늄 분말보다 Y-PSZ의 분말이 세포분열을 더 강하게 저해하는 것으로 나타났다. 이러한 세포독성은 0.22 μm 크기 미만의 분말이 주원인으로 지목되었다. 응력부식으로 인해 나타나는 무정형 지르코니아 분말(5 - 20 nm 크기)이 주된 세포독성의 원인으로 분석되었다.

면역세포에 대한 지르코니아 분말의 세포독성도 보고되었

다. Catelas 등[12]은 지르코니아 분말이 macrophage에 미치는 영향에 대해서 살펴보았다. 이들은 다양한 크기와 농도의 알루미나, 지르코니아 분말을 mouse macrophage cell에 24시간 처리한 뒤 세포사멸 여부를 살펴보았다. 알루미나, 지르코니아 분말 및 대조군으로 사용된 high density polyethylene 분말 사이에는 차이가 없이 세포독성이 관찰되었다. 알루미나, 지르코니아 분말의 크기, 농도가 증가할수록 macrophage의 세포사멸도 증가하였는데, 이러한 경향은 macrophage당 150개 분말의 농도, 1.3 μm의 크기까지만 나타났다. 이러한 결과를 통해 Catelas 연구진은 세라믹 분말에 의한 골흡수의 가능성이 존재한다고 지적하였다. Li 등[13]은 구강환경에서 마모 및 부식으로 인해 세라믹이 분말형태로 존재할 수 있음을 지적하며, 분말형태의 세라믹에 대한 독성연구가 필요하다고 주장하였다. 이에 따라 다양한 세라믹 분말에 대한 세포독성 연구를 진행하였으며, 일부 실험에 대해 지르코니아의 세포독성이 나타났다. 총 5가지 종류의 세라믹(TCP, HA, Y-PSZ, 알루미나, CZP)에 대해 실험하였으며, CZP는 Y-PSZ 분말을 hot isostatic pressing을 통해 입자크기를 키운 것이다. Human oral fibroblast를 통해 colony forming efficiency (CFE), netural red (NR) uptake, MTT reduction을 진행하였다. 대부분의 경우 세라믹 분말은 세포독성을 보이지 않는 것으로 나타났다. 세 개의 세포독성 실험 중 CFE test가 가장 세라믹에 대해 민감하게 반응하였다, 이는 CFE test가 초기 세포밀도가 상대적으로 낮아 세라믹분말에 더 많이 노출되었기 때문으로 생각하였다. CFE test에서는 Y-PSZ가 가장 큰 독성을 보였으며, TCP, CZP는 낮은 농도에서는 독성이 없었으나 고농도에서는 농도에 비례하게 독성이 증가하였다. 일반적으로 세포독성은 방출되는 이온, 작은 분말에 의해서 일어나는데, 입자 크기가 큰 CZP는 상대적으로 표면적이 작아 독성이 감소한 것으로 생각된다. CFE test를 제외한 다른 실험에서는 세포독성이 발견되지 않았다. Nkamgueu 등[14]은 지르코니아와 알루미나 분말이 macrophage에 미치는 영향을 분석하였다. 지르코니아 분말에서 세포독성이 발견되었으나, 알루미나 분말보다는 적은 것으로 나타났다. Nkamgueu 연구진은 성숙한 macrophage를 얻기 위해 human blood monocyte에 granulocyte macrophage-colony-stimulating factor를 처리하였다. X-ray microanalysis of ultrathin freeze-dried section을 통해 세포내의 화학적 조성, 특히 나트륨과 칼륨의 농도를 살펴보았다. 또한, flow cytometry를 통해 macrophage의 식세포 활동과 세포호흡에 대해 살펴보았다. 지르코니아와 알루미나 시편을 이용한 경우 모두에서 칼륨/나트륨 비율의 감소가 관찰되었으며, 이는 세포활성의 감소를 의미한다. 또한 둘 모두에서 식세포활동 및 세포호흡의 감소가 관찰되었다. 모든 경우 지르코니아의 감소폭이 알루미나보다 적게 나와, 알루미나에 비해 지르코니아의 생체적합성이 더 뛰어난 것으로 나타났다. 이처럼 다양한 연구에서 일부 혹은 전체 조건에 대해 지르코니아 분말의 세포독성이 보고되었다.

이러한 연구들과는 상반되게 지르코니아 분말이 세포독성이 가지지 않는다는 보고도 다수 존재한다. Dion 등[15]은 다양한 세라믹 분말의 세포독성에 대해 실험하였으며, 세포독성이 존재하지 않는다는 결론을 도출하였다. 3T3 Balb/c permanent cell, human umbilical venous endothelial cell을 통해 세포생존 및 분화 등을 관찰한 결과, Y-PSZ를 포함한 모든 세라믹 분말에 대해서 세포독성을 관찰할 수 없었다. Lohmann 등[16] 역시 앞과 유사한 결과를 보고하였다. 연구진은 지르코니아, 알루미나 및 polymethyl methacrylate (PMMA) 분말이 osteoblast에 미치는 영향에 대해 연구하였다. 세포는 각각의 분말 하에서 24시간 동안 배양되었고, 증식, ALP 활성도, PGE_2 생성 정도를 살펴보았다. 지르코니아 분말의 경우 세포증식, ALP 활성, PGE_2 생성 모두 농도에 따라 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 이전의 농도에 따라 세포독성이 증가했다는 보고와는 완전히 상반되는 결과이다. Sterner 등은 알루미나, 지르코니아 및 티타늄 분말을 이용하여 macrophage-like cell (MLC)에 대한 생체적합성을 살펴보았으며, ELISA assay를 통해 TNFα 활성도를 측정하였다.[17] 높은 TNFα 수치는 MLC에 의한 염증반응을 의미한다. 티타늄(8 - 17배), 알루미나(4배)가 높은 TNFα 수치를 보이는 것과 달리, 지르코니아는 TNFα의 상승을 관찰할 수 없었다. 즉, 지르코니아 분말은 염증반응을 유발하지 않는 것으로 나타났다.

종합하자면, 지르코니아 분말에 대한 생체적합성에 대해서 확정적으로 결론을 내릴 수는 없지만, 블록 형태와 달리 어느 정도 세포독성을 가지는 것으로 간주된다. 이처럼 같은 지르코니아 분말에 대해 상이한 세포독성 결과가 나타나는 이유는, 세포분말의 형성방법, 배지 조건, 세포의 특성 등이 다르게 때문으로 생각된다. 실제로 생체적합성을 시험하는 데에 있어, 같은 형상의 재료를 이용해도 실험실의 조건에 따라 그 결과가 상이하게 나타나는 것이 관찰된다.[18]

결론

대다수의 문헌에서 지르코니아는 여러 세포, 동물들에 대해 높은 생체적합성을 가지고 있다고 보고된다. 지르코니아 블록은 fibroblast, osteoblast, 면역세포 등에 대해 세포독성 및 돌연변이를 유발하지 않으며, 특히 osteoblast와의 긴밀한 접촉이 관찰되었다. 지르코니아의 분말이 가지는 세포독성에 대해서는 연구들이 상이한 결론을 내고 있으며, 어느 정도 세포독성을 가지는 것으로 생각된다. 따라서 기공과정에서 발생하는 지르코니아 분말이나 지르코니아의 마모 혹은 피로로 발생하는 분말은 지르코니아에 대한 염증반응을 야기할 위험이 있다고 할 수 있다.

ORCID

Da-Won Suh *https://orcid.org/0000-0002-2806-5573*
Young-Kyun Kim *https://orcid.org/0000-0002-7268-3870*
Yang-Jin Yi *https://orcid.org/0000-0001-8341-4759*

References

1. Kosmac T, Oblak C, Jevnikar P, Funduk N, Marion L. The effect of surface grinding and sandblasting on flexural strength and reliability of Y-TZP zirconia ceramic. Dent Mater 1999;15:426-33.
2. Al-Amleh B, Lyons K, Swain M. Clinical trials in zirconia: a systematic review. J Oral Rehabil 2010;37:641-52.
3. Manicone PF, Rossi Iommetti P, Raffaelli L, Paolantonio M, Rossi G, Berardi D, Perfetti G. Biological considerations on the use of zirconia for dental devices. Int J Immunopathol Pharmacol 2007;20:9-12.
4. Josset Y, Oum'Hamed Z, Zarrinpour A, Lorenzato M, Adnet JJ, Laurent-Maquin D. In vitro reactions of human osteoblasts in culture with zirconia and alumina ceramics. J Biomed Mater Res 1999;47:481-93.
5. Fassina P, Zaghini N, Bukat A, Piconi C, Greco F, Piantelli S. Yttria and calcia partially stabilized zirconia for biomedical applications. In: Ravaglioli A., Krajewski A, eds. Bioceramics and the human body. Netherlands; Springer; 1992. p. 223-9.
6. Silva VV, Lameiras FS, Lobato ZI. Biological reactivity of zirconia-hydroxyapatite composites. J Biomed Mater Res 2002;63:583-90.
7. Carinci F, Pezzetti F, Volinia S, Francioso F, Arcelli D, Farina E, Piattelli A. Zirconium oxide: analysis of MG63 osteoblast-like cell response by means of a microarray technology. Biomaterials 2004;25:215-28.
8. Garvie RC, Urbani C, Kennedy DR, McNeuer JC. Biocompatibility of Magnesia Partially Stabilized Zirconia (Mg-PSZ) Ceramics. J Mater Sci 1984;19:3224-8.
9. Rimondini L, Cerroni L, Carrassi A, Torricelli P. Bacterial colonization of zirconia ceramic surfaces: an in vitro and in vivo study. Int J Oral Maxillofac Implants 2002;17:793-8.
10. Covacci V, Bruzzese N, Maccauro G, Andreassi C, Ricci GA, Piconi C, Marmo E, Burger W, Cittadini A. In vitro evaluation of the mutagenic and carcinogenic power of high purity zirconia ceramic. Biomaterials 1999;20:371-6.
11. Ito A, Tateishi T, Niwa S, Tange S. In-vitro evaluation of the cytocompatibility of wear particles generated by UHMWPE/zirconia friction. Clin Mater 1993;12:203-9.
12. Catelas I, Petit A, Zukor DJ, Marchand R, Yahia L, Huk OL. Induction of macrophage apoptosis by ceramic and polyethylene particles in vitro. Biomaterials 1999;20:625-30.
13. Li J, Liu Y, Hermansson L, Söremark R. Evaluation of biocompatibility of various ceramic powders with human fibroblasts in vitro. Clin Mater 1993;12:197-201.
14. Nkamgueu EM, Adnet JJ, Bernard J, Zierold K, Kilian L, Jallot E, Benhayoune H, Bonhomme P. In vitro effects of zirconia and alumina particles on human blood monocyte-derived macrophages: X-ray microanalysis and flow cytometric studies. J Biomed Mater Res 2000;52:587-94.
15. Dion I, Rouais F, Baquey C, Lahaye M, Salmon R, Trut L, Cazorla JP, Huong PV, Monties JR, Havlik P. Physico-chemistry and cytotoxicity of ceramics: part I: characterization of ceramic powders. J Mater Sci Mater Med 1997;8:325-32.
16. Lohmann CH, Dean DD, Köster G, Casasola D, Buchhorn GH, Fink U, Schwartz Z, Boyan BD. Ceramic and PMMA particles differentially affect osteoblast phenotype. Biomaterials 2002;23:1855-63.
17. Sterner T, Schütze N, Saxler G, Jakob F, Rader CP. Effects of clinically relevant alumina ceramic, zirconia ceramic and titanium particles of different sizes and concentrations on TNF-alpha release in a human macrophage cell line. Biomed Tech (Berl) 2004;49:340-4.
18. Tateishi T, Ushida T, Aoki H. Round robin test for standardization of biocompatibility test procedure by cell culture method. Adv Biomater 1992;10:89-97.

지르코니아의 생체적합성에 대한 연구: *In vitro* 실험 문헌 고찰

서다원[1] · 김영균[2] · 이양진[3]*

[1]서울대학교 치의학대학원, [2]분당서울대병원 구강악안면외과, [3]분당서울대병원 치과보철과

진료실에서 지르코니아의 수요가 증가하고 있음에 따라 지르코니아의 생체적합성에 대한 평가가 필수적이다. 이번 논문에서는 지르코니아의 생체적합성에 대한 문헌 중 *in vitro* 실험에서의 결과를 고찰하였다. Fibroblast, osteoblast, lymphocyte 등 다양한 세포를 이용한 *in vitro* 실험에서 지르코니아 블록은 뛰어난 생체적합성을 보였다. 여러 연구에서 지르코니아에 대한 세포독성 및 돌연변이 유발이 관찰되지 않았으며, 세균부착도 적은 것으로 나타났다. 장기간 체액노출조건을 모방한 *in vitro* 실험에서는 약간의 기계적 강도의 감소 외에는 악영향이 관찰되지 않았다. Osteoblast-like cell을 이용한 연구에서, 지르코니아 블록이 면역반응, 물질이동, 세포주기조절에 관여하는 유전자를 조절하여 생체적합을 높이는 것으로 관찰되었다. 여러 *in vitro* 연구에서 지르코니아 분말의 생체적합성에 대해서는 상이한 보고가 나타나고 있다. 종합적으로 지르코니아 분말은 어느 정도 세포독성을 가지고 있는 것으로 생각된다. *(대한치과보철학회지 2018;56:391-5)*

주요단어: 생체적합성; 세포독성; 지르코니아

**교신저자: 이양진*
13620 경기도 성남시 분당구 구미로 173번길 82 분당서울대병원 치과보철과
031 787 7546: e-mail, navydent@snubh.org
원고접수일: 2018년 9월 19일 / 원고최종수정일: 2018년 10월 10일 / 원고채택일: 2018년 10월 19일

ⓒ 2018 대한치과보철학회
이 글은 크리에이티브 커먼즈 코리아 저작자표시-비영리 3.0 대한민국 라이선스에 따라 이용하실 수 있습니다.