

생체의 실험을 이용한 근관충전용 Sealer의 세포독성에 관한 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학교실

이상탁 · 이정식

목 차

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
- 참고문헌
- 사진부도
- 영문초록

I. 서 론

근관치료시 실패의 주된 원인은 불완전한 근관 충전에 있다¹⁾. 그러나 gutta-percha 나 silver-cone 같은 주충전제만으로는 근관을 삼차원적으로 밀폐시킬 수 없어, 근관벽과 주충전제사이의 공간을 폐쇄시키는 근관충전용 sealer 의 사용이 필수적이다.

근관충전용 sealer 에는 전통적으로 zinc oxide eugenol(이하 ZOE) 계통의 sealer 가 널리 사용되고 있으며, 레진 및 수산화칼슘계통, 그리고 hydroxyapatite, calciumphosphate, tricalciumphosphate 같은 ceramic 계통의 sealer 들도 개발되어 사용되고 있다.

ZOE 는 치수와 차아주위조직에 진통 및 진정효과, 항균효과가 있고 밀폐능력이 우수하여, 치과에서 이장제, 임시충전재, 근관충전용 sealer 및 구강연조직팩등으로 많이 사용되고 있으나 조직에 위해작용도 있는 것으로 알려져 있다. ZOE 가 두꺼운 잔존 상아질층에 의해 치수와 차단되어 있을 경우 치수손상은 미약하나²⁻⁵⁾, 와동이 깊을 경우나

직접 조직이나 세포에 적용될 때에는 심한 염증반응과 세포독성을 나타낸다⁴⁻⁹⁾. ZOE 계통 sealer 의 조직친화성이 양호했었다는 Pitt Ford 와 Rowe¹⁰⁾ 의 관찰보고도 있으나 대부분 세포독성이 강함을 보고하고 있다¹¹⁻¹³⁾.

레진 계통의 sealer 는 ZOE 계통의 sealer 에 비해 물리적 성질이 우수하며, 특히 epoxy 레진이 주성분인 AH26 은 상아질벽에 접착하는 성질이 있어 근관폐쇄효과가 우수하다는 많은 보고가 있으며¹⁴⁻¹⁷⁾, AH26 의 세포독성에 대해서 Yesilsoy¹⁸⁾와 Nakamura 등¹¹⁾은 서로 상반된 결과를 보고한 바 있고, 또 혼합 직후에는 매우 강한 세포독성을 보이거나 시간이 경과함에 따라 독성이 감소하는 것으로 여러학자^{12,13,19)}들이 보고하고 있다.

Hydroxyapatite 는 압축강도가 강하고 변질 분해되지 않으며, 근육과 섬유조직 및 신생골이 부착될 수 있는 골과 매우 유사한 성질을 지니고 있고 면역반응을 유발시키지 않아²⁰⁾ 의치상의 개선을 위하여 치조골을 높이는 골대용물로서 사용되며²¹⁻²³⁾, 파괴된 치조골의 회복을 위한 매식체로서 사용되고 있다²⁴⁻³⁰⁾. 치밀성의 순수한 hydroxyapatite 인 Durapatite 를 파괴된 치조골에 사용했을 때 Yukna 등²⁷⁻²⁹⁾은 임상적으로 우수한 치료효과를 관찰하였고, Moskow 와 Lubarr²⁵⁾, 그리고 Froum 등²⁶⁾은 조직학적 검사에서 치주조직에 대한 친화성이 좋고 결체조직에 둘러싸여 있음을 관찰하였으나 신생골 형성의 증거는 발견하지 못했다. 그러나 Sapkos³⁰⁾는 hydroxyapatite 에 나란히 신생골이 형성됨을 관찰하였으며, kenny 등²⁴⁾은 다공성 hydroxyapatite 로 치조골파괴부위를 처치한 결과 세공을 중심으로 신생골이 형성됨을 관찰하였으며, Roane 과 Bene-

* 본연구 논문은 서울대학교병원 1989년도 특진연구비에 의하여 이루어졌음.

nati³²⁾는 치근천공시 파괴된 골조직에 hydroxyapatite로 처치한 결과가 양호하였음을 보고하였다.

Tricalciumphosphate는 hydroxyapatite에 비해 조직내에서의 흡수가 빠르며 골조직으로 대치될 수 있다. Tricalciumphosphate를 파괴시킨 생쥐의 골조직에 매식한결과, Cutright 등³²⁾은 조직친화성이 우수하며, 분해되어 골형성을 위한 무기염으로 작용한다고 보고하였고, Getter 등³³⁾은 혈병으로 채워진 경우와 유사한 속도로 골조직이 치유됨을 관찰하여 조직에 대한 친화성이 우수하며 거의 정상적인 osteogenesis를 유발시킨다고 보고하였다. Barney 등³⁴⁾은 tricalciumphosphate와 hydroxyapatite를 개의 파괴시킨 치조골에 매식시켜 비교한 결과, tricalciumphosphate는 거대세포와 포식세포에 의해 분해흡수되며 신생골의 기질 일부로서 작용하여 빠른 치유과정을 보임을 관찰하였으나, hydroxyapatite는 거의 거의분해흡수가 일어나지 않은 채 결체 조직에 잘 둘러싸여 있고 신생골형성이 거의 없음을 관찰하였다. Jean 등³⁵⁾은 치수에 적용시 tricalciumphosphate와 hydroxyapatite를 50%씩 혼합한 경우에서 수산화칼슘보다 빠른 속도로 두꺼운 정상적인 구조의 이차상아질이 형성됨을 관찰하였으나, 양³⁶⁾은 수산화칼슘의 경우 이차상아질을 관찰하였으나 tricalciumphosphate와 hydroxyapatite의 경우에는 관찰하지 못했다고 보고한 바 있다. Himel 등³⁷⁾은 개의 치수관을 천공시킨 부위를 수산화칼슘과 tricalciumphosphate를 적용시킨 결과, 수산화칼슘이 심한 조직파괴양상을 보였으나 tricalciumphosphate는 비교적 양호한 조직 반응을 보였다고 보고하였고, Sinai 등³⁸⁾은 생쥐의 치수관을 천공시켜 관찰한 바 tricalciumphosphate를 적용시킨 결과가 Cavit을 적용시킨 결과에 비해 염증반응에 있어 우수한 효과가 있었음을 관찰하였다.

Brown과 Chow³⁹⁾는 calciumphosphate 시멘트를 노출된 치근에 적용시킨 결과 상아세관내로 침투되어 hydroxyapatite로 형성되어 이것이 상아세관을 폐쇄시킨다고 보고하였으며, Krell과 Welfel⁴⁰⁾ 그리고 Chohayeb 등⁴¹⁾은 calciumphosphate 시멘트가 Grossman's sealer와 유사한 근관폐쇄능력을 보임을 관찰하였고, Sugawara 등⁴²⁾은 색소를 침투시킨 결과 Grossman's sealer에 비해 근관폐쇄효과가 우수하였음을 보고한 바 있으며, Gruninger 등⁴³⁾은

calciumphosphate 시멘트의 조직친화력이 우수함을 관찰보고한 바 있다.

그외 이차상아질생성능력과 치수조직회복능력이 우수하다⁴⁵⁻⁵⁰⁾고 알려진 수산화칼슘을 주성분으로 한 근관충전용 sealer는 미완성치근에 대한 근단공폐쇄효과가 우수한 것으로 보고되었고⁵⁰⁻⁵²⁾, 치근흡수나 치근천공시 이의 치료목적으로 사용되고 있다⁵³⁾.

근관치료후 치근단에서 일어나는 조직변화는 기구조작, 감염 그리고 근관치료에 사용한 재료자체의 독성에 의해 발생되며, 생체내 실험으로는 이런 변수들을 조절할 수 없으므로, 재료의 독성을 평가하기 위해서는 생체내 실험뿐만아니라 생체외 실험이 필수적이며 가장 보편적인 방법이 세포배양을 이용하여 세포반응을 측정하는 세포독성검사이다⁵⁴⁾. 세포독성검사는 비교적 간단하고, 생물학적인 반응이 빠르고 예민하며, 재현성이 있고 산술적 평가가 가능하여 새로운 재료의 독성검사와 독성물질의 확인 및 제품의 생물학적 품질관리에 적합하다⁵⁵⁾.

배양에 이용되는 세포는 직접 인체나 동물에서 채취하여 배양하기도 하나 시간이 많이 소요되며 배양 때마다 성질이 달라질 수 있으므로, 쉽게 이용할 수 있고 성질이 일정한 chick embryo fibroblast, L cell, HeLa cell 같은 Established cell lines들이 많이 사용되고 있으며⁵⁶⁾, 세포독성의 평가방법도 여러가지가 개발되어 사용되고 있으나, Hensten-Pettersen과 Helgeland⁷⁾는 세포독성검사방법에 따라 결과에 약간의 차이가 있음을 관찰보고하였다.

이에 저자는 근래 많이 사용되고 있는 근관충전용 sealer인 Tubliseal, AH26, Apatite Root Canal Sealer I 및 Apatite Root Canal Sealer II의 세포독성을 비교 평가하기 위하여 생쥐의 섬유모세포인 L929를 배양세포로 사용하여 세포수산정에 의한 세포증식도 검사 및 세포생존률시험, Agar overlay 시험으로 neutral red 염색법에 의한 세포막투과도 변화측정, 그리고 Millipore filter 기법에 의한 succinate dehydrogenase(SDH)의 활성도검사로 세포독성검사를 실시하고 그 결과를 통계학적으로 비교 연구한 바 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 실험방법

1. 시편제작

실험에 사용된 재료는 Tubliseal(ZOE 제재, Sybron-Kerr co. USA), AH26(epoxy resin 제재, DeTrey AG co. 스위스), Apatite Root Canal Sealer I (hydroxyapatite 와 tricalciumphosphate 혼합제재, Sankin co. 일본), Apatite Root Canal Sealer II (Apatite Root Canal Sealer I 성분 30% iodine 첨가, Sankin co. 일본) 등이었다. 내경 14mm의 조직배양용 원심분리관(Corning co.)과 millipore filter 기법을 위한 내경 7mm의 pipette(Corning co.)을 diamond wheel로 잘라내어 Homosol 용액에서 초음파세척기로 30분간 세척하고 다시 증류수로 세척한 후, 건조시켜 각 재료의 mold로 사용하였다. 각 재료는 혼합 후 mold에 넣어 7일간 경화시켜 실험에 사용하였으며, 음성대조군(negative control)은 성형실리콘을, 양성대조군(positive control)은 구리판을 14mm와 7mm의 직경과 1mm의 두께의 원반으로 잘라내어 사용하였다. 실험재료는 ethylen oxide gas 소독을 하였다.

2. 세포배양

ATCC(American type culture collection)에서 공급받은 냉동보관된 L929 정상생쥐섬유모세포를 녹인 뒤 5회 이상 계대배양한 후 실험에 사용하였다. 세포는 10% Horse serum(Giebco co. USA), 10mM HEPES(hydroxyl ethyl piperazine ethane sulfonic acid, Giebco co.), 100unit/ml penicilline(Giebco co.), 100ug/ml streptomycine(Giebco co.) 이 함유된 minimum essential medium(MEM)(Giebco co.)으로 세포를 5% O₂, 97%의 습도의 조건을 갖춘 37°C의 배양기에서 배양하였다.

3. 실험방법

1) 세포증식도 및 세포생존률검사

5×10^4 cell/ml의 세포가 배양된 60mm의 배양접시(Corning co.)에 한개의 실험재료를 넣고 배양한 후 2일, 4일, 6일째에 배양접시를 0.05% trypsin 및 0.53mM ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)(Giebco co.)를 함유한 Ca, Mg-free Hanks Balanced Salt Solution(HBSS)(Giebco co.)으로 처리하여 세포를 바닥에서 떼어낸 후, 1200rpm으로 원심분

리하여 세포를 3회 수세농축시킨 뒤 0.25-1ml의 MEM 용액에 부유시키고, 동량의 0.5% trypan blue 용액과 섞어 반응시킨 후, 15분이 지난 뒤 Hemocytometer로 위상차현미경하에서 증식된 총세포수 및 trypan blue로 염색된 죽은 세포를 세었다. 각 실험재료는 10개의 시편을 조사하였다.

2) Agar Overlay 시험

Hensten-Pettersen과 Helgeland⁷⁾의 방법에 따라 60mm의 배양접시에 1.25×10^6 cell/ml의 세포를 24시간 배양한 후, 5%의 fetal bovine serum이 함유된 1.5% Type II Agarose-Basal minimum Eagle medium 3ml로 세포위에 agarose 층을 형성한 후, 0.01% neutral red(Giebco co.) 용액 3ml를 부어 세포를 염색한 후, agarose 층위에 시편을 1-2개 올려놓고 24시간 배양하였다. 배양한 끝난 시험배양접시는 위상차현미경하에서 Mohammed 등¹³⁾의 판별기준에 따라 세포내 neutral red의 염색정도에 따른 Zone index 및 Lysis index를 판정한 후 세포독성도 판정기준에 따라 세포독성도를 산출하였다. 각 실험재료 마다 6개의 시편을 조사하였다.

3) Millipore filter 기법

Wennberg⁵⁷⁾의 방법에 따라 60mm의 배양접시에 직경 47mm, 0.45 μ m의 세공크기를 갖는 millipore filter(Millipore co.)를 넣고 그 위에 9×10^6 cell/ml의 세포를 24시간 배양한 후, 1.5% agar-MEM(10% fetal bovine serum, 10mM HEPES buffer, 100 unit/ml penicilline, 100ug/ml streptomycin 포함용액)의 agar 층 위에 millipore filter의 세포면이 닿도록 접착시켜 올려 놓았다. 그리고 millipore filter 위에 다시 시편을 3개씩 놓고 2시간 배양 후, 시편을 제거하고 agar에서 millipore filter를 분리해낸 다음 tetrazolium 염 기법으로 filter의 succinate dehydrogenase에 대한 효소염색을 시행하고 Wennberg⁵⁸⁾의 판별기준에 따라 세포독성을 측정하였다.

4) 통계처리

통계처리는 one-way analysis of variance로 분석하여 95%의 신뢰도로 음성대조군에 대한 실험재료값의 유의성을 판정하였다.

III. 실험성적

1. 세포증식도 및 세포생존률검사

실험시편의 존재하에서의 섬유모세포의 증식도에 있어서 음성대조군에서는 세포수가 2일, 4일, 6일째에 각각 11.9×10^4 , 26.6×10^4 , 70.0×10^4 cell/ml로 시간이 경과함에 따라 증식하였으며, Tubliseal 군에서는 2일째 4.9×10^4 cell/ml로 세포수가 오히려 감소했으며 그 뒤 4일, 6일째 각각 8.0×10^4 , 16.0×10^4 cell/ml로 현저히 억제된 증식상을 보였고, AH26 군에서는 2일째 1.9×10^4 cell/ml로 거의 모든 세포가 없어졌으며 4일, 6일째 각각 3.4×10^4 , 5.3×10^4 cell/ml로 아주 미약한 증식상을 보였으며, Apatite Root Canal Sealer I 군에서는 2일, 4일, 6일째 각각 6.1×10^4 , 11.7×10^4 , 50.7×10^4 cell/ml로 음성대조군에 비해서는 억제된 양상이지만 다른 실험군에 비해서는 상당히 양호한 증식상을 보였고, Apatite Root Canal Sealer II 군에서는 2일째, 9.34×10^4 cell/ml로 다른 실험군에 비해 세포수가 많았으나, 4일째 3.9×10^4 cell/ml로 2일째에 비해 오히려 감소하였으며, 6일째 8.34×10^4 cell/ml로 아주 미약한

증식상을 보였다. 양성대조군에 있어서는 2일, 4일, 6일째 각각 3.18×10^4 , 2.6×10^4 , 2.9×10^4 cell/ml로 증식상을 보이지 않았다(Table 1, Fig 1).

총세포수와 생존한 세포수(총세포수에서 Trypan blue에 의해 염색된 죽은세포수를 뺀 수)의 비율인 세포생존률에 있어서 음성대조군에서는 2일, 4일, 6일째 각각 90.1%, 93.2%, 96.6% 였으며 Tubliseal 군에서는 2일, 4일, 6일째 각각 63.0%, 63.9%, 78.1%로 음성대조군에 비해 저조하였으나 조금씩 증가하였고, AH26 군에서는 2일째 23.8%로 대부분의 세포가 죽은 세포였으나, 4일, 6일째, 81.7%, 95.1%로 세포의 생존률이 급격히 증가하였으며, Apatite Root Canal Sealer I 군에서는 2일, 4일, 6일째 각각 80.6%, 89.4%, 94.8%로 음성대조군과 유사한 생존률을 보였으며, Apatite Root Canal Sealer II 군에서는 2일째 18.3%로 거의 모든 세포가 죽은 상태였으나, 4일, 6일째 75.3%, 86.7%로 점점 증가하였다. 양성대조군에서는 2일, 4일, 6일째 살아있는 세포를 발견할 수 없었다(Table 2).

Table 1. Results of cell growth test($\times 10^4$)

시편\배양일	2	4	6
실리콘	11.9 \pm 2.83	26.6 \pm 4.9	70.0 \pm 3.5
Tubliseal	4.09 \pm 0.65*	8.0 \pm 3.1*	16.0 \pm 2.1*
AH26	1.90 \pm 0.47*	3.4 \pm 1.1*	5.3 \pm 1.5*
Apatite I	6.10 \pm 0.76*	11.7 \pm 3.6*	50.7 \pm 5.7*
Apatite II	9.34 \pm 0.94*	3.9 \pm 1.4*	8.3 \pm 1.0*
구리	3.18 \pm 0.53*	2.6 \pm 0.5*	2.9 \pm 0.5*

mean \pm S.D. *p<0.05

◎Apatite I : Apatite Root Canal Sealer I

◎Apatite II : Apatite Root Canal Sealer II

Table 2. Results of cell survival test (%)

시편\배양일	2	4	6
실리콘	90.1 \pm 5.2	93.2 \pm 3.9	96.6 \pm 1.0
Tubliseal	63.0 \pm 5.0*	63.9 \pm 10.5*	78.1 \pm 7.7*
AH26	23.8 \pm 9.1*	81.7 \pm 10.7*	95.1 \pm 3.6*
Apatite I	80.6 \pm 2.6*	89.4 \pm 7.0*	94.8 \pm 1.9*
Apatite II	18.3 \pm 3.1*	75.3 \pm 11.4*	86.7 \pm 2.8*
구리	0.0 \pm 0.0*	0.0 \pm 0.0*	0.0 \pm 0.0*

mean \pm S.D. *p<0.05

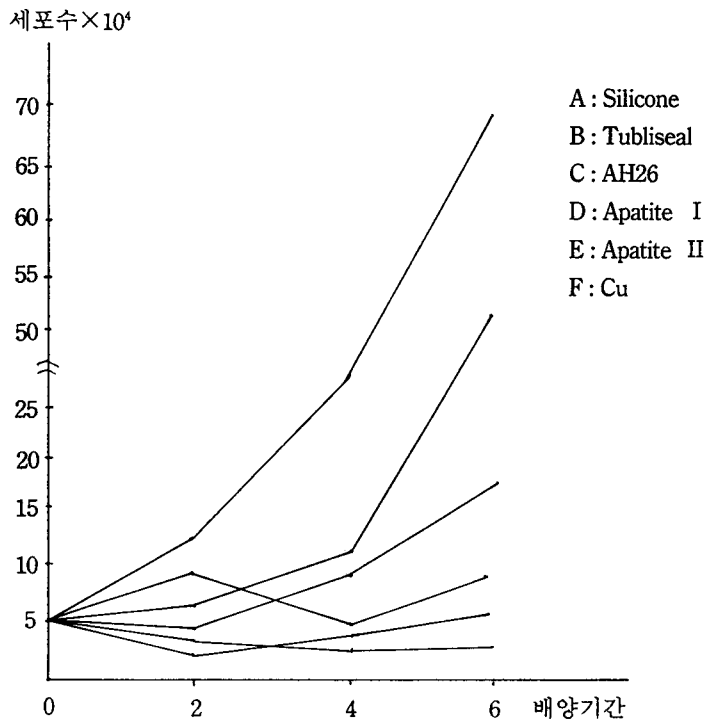


Fig 1. Figure of cell growth rate of all experimental groups

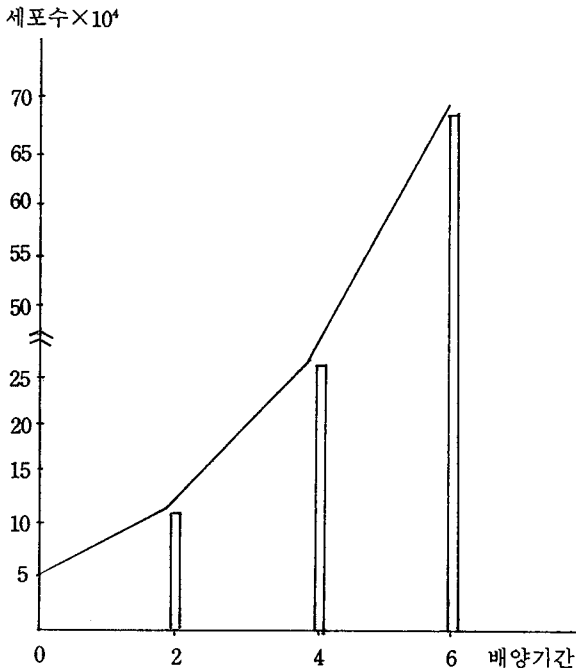


Fig 2. Figure of cell growth rate and cell survival ratio of silicon group

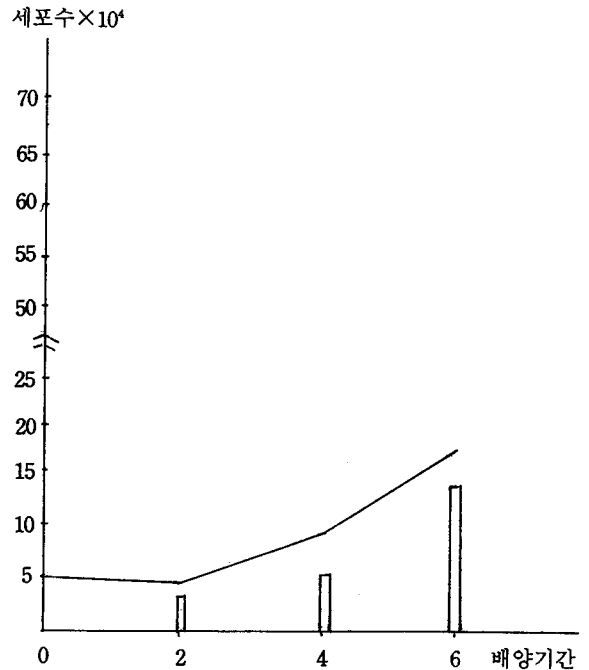


Fig 3. Figure of cell growth rate and cell survival ratio of Tubliseal group.

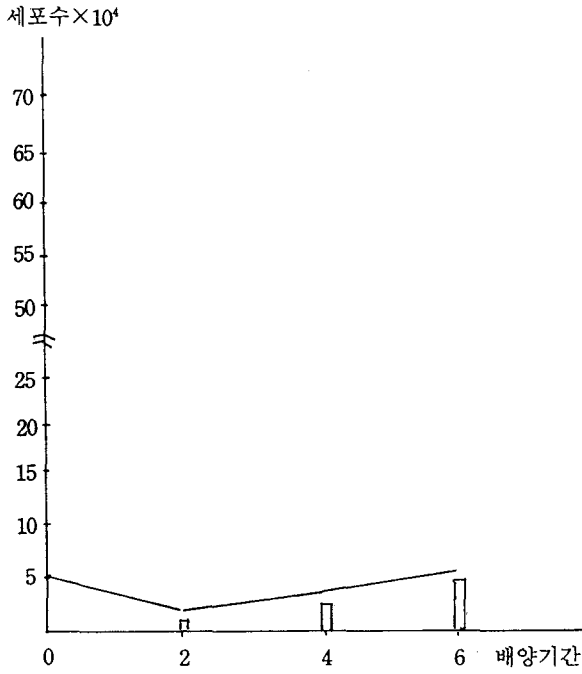


Fig 4. Figure of cell growth rate and cell survival ratio of AH26 group.

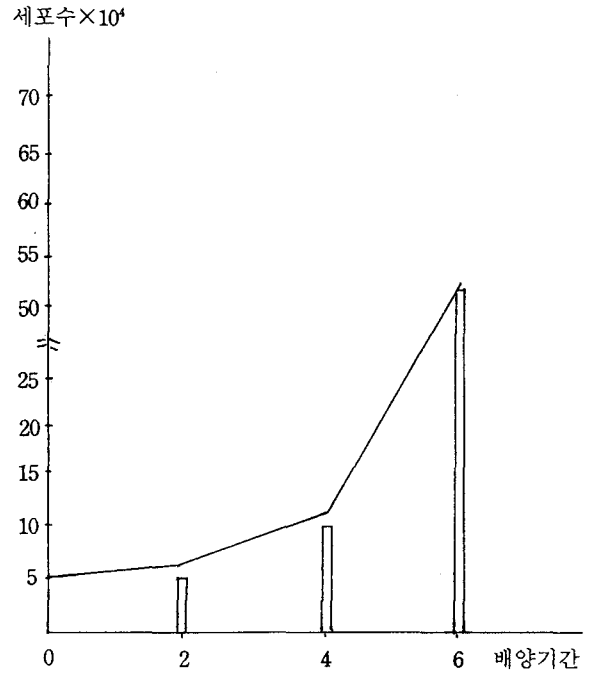


Fig 5. Figure of cell growth rate and cell survival ratio of Apatite I group

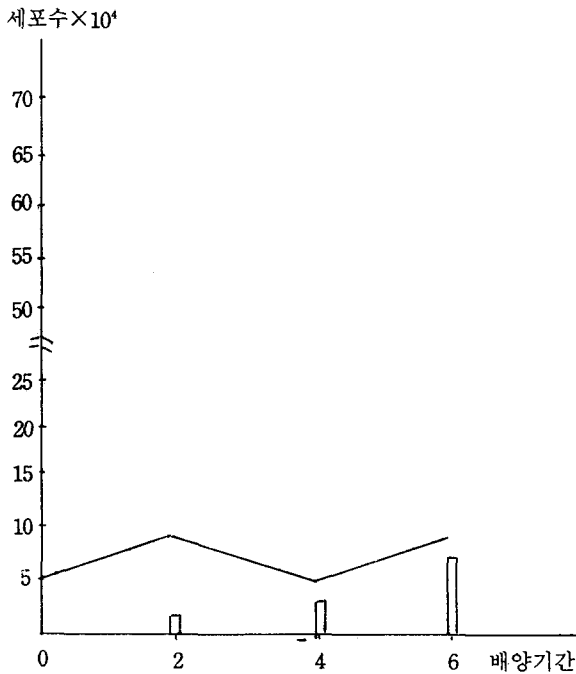


Fig 6. Figure of cell growth rate and cell survival ratio of Apatite II group

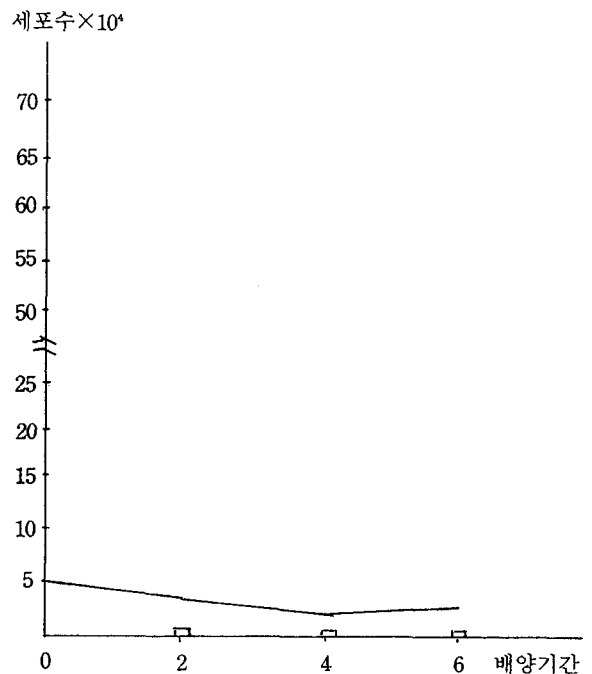


Fig 7. Figure of cell growth rate and cell survival ratio of copper group.

2. Ager overlay 시험

Neutral red 에 의해 염색된 세포의 탈색과 탈색된 세포의 용해를 위상차현미경하에서 검사한 결과, 음성대조군에서는 탈색과 용해조건이 관찰되지 않았으며, Tubliseal 군에서는 시료에서 15mm까지 탈색되었으며 탈색된 모든 세포가 용해조건을 보였고, AH26 군에서는 15mm까지 변색을 보였으나 염색상이 잔존하였고, 3mm까지는 모든 세포가 탈색조건을 보였으며 탈색된 세포의 10%가 용해조건을 보였다. 한편 Apatite Root Canal Sealer I 에서는 15mm까지 변색을 보였으나 염색상이 잔존하였고, 2mm까지는 모든 세포가 탈색되었고 탈색된 모든 세포는 용해조건을 보였다. Apatite Root Canal Sealer II 군에서는 Tubliseal 군의 경우와 같이 15mm까지 탈색되었으며 탈색된 모든 세포가 용해조건을 보였다. 양성대조군에는 13mm까지 탈색되었으며 탈색된 모든 세포가 용해조건을 보였다.

탈색은 모든세포내의 neutral red 염색이 완전히 소실되는 경우에 탈색된 것으로 판정하였으며, 세포용해는 음성 대조군에 비해 세포경계가 불명확한 경우를 세포용해로 판정하였다.

이상의 결과를 Mohammed 등¹³⁾의 판정기준(Table 4, 5, 6)에 적용한 결과 AH26 은 미약한 세포독성을 보였고, Apatite Root Canal Sealer I 은 중등도의 세포독성을 보였으며, Tubliseal 과 Apatite Root Canal Sealer II 는 심한 세포독성을 보였다 (Table 3).

3. Millipore filter 기법

Millipore 여과지위에 시편을 올려놓고 tetrazolium 염 기법으로 succinate dehydrogenase(SDH)의 활성을 염색성의 변화로 검색한 결과 Apatite Root Canal Sealer I 과 Apatite Root Canal Sealer II 군은

음성대조군과 마찬가지로 염색성의 변화가 없었고, Tubliseal 과 AH26 군에서는 시편 바로 아래 부위에만 염색이 안되었으며, 양성대조군의 경우 직경 10mm의 염색 안된 부위를 나타내었다. 이 결과를

Table 4. Zone index criteria for agar overlay test

0	시편주위 및 시편하에 탈색부위가 발견되지 않는 경우
1	시편하에만 탈색부위가 발견되는 경우
2	시편주위로 5mm 이내까지 탈색된 경우
3	시편주위로 10mm 이내까지 탈색된 경우
4	시편주위로 10mm 이상 탈색되었으나 전체 plate 가 탈색되지 않은 경우
5	전체 plate 가 탈색된 경우

Table 5. Lysis index criteria for agar overlay test

0	세포용해가 일어나지 않은 경우
1	zone 의 20%이내가 용해된 경우
2	zone 의 20-40%가 용해된 경우
3	zone 의 40-60%가 용해된 경우
4	zone 의 60-80%가 용해된 경우
5	zone 의 80%이상인 용해된 경우

Table 6. Response index (Zone index/Lysis index) and cytotoxicity

세포독성	Response index
0	0/0
mild	1/1-1/5, 2/1
moderate	2/2-2/5, 3/1-3/5, 4/1-4/3
severe	4/4, 4/5, 5/1-5/5

Table 3. Results of agar overlay test

시편\index	zone index	lysis index	response index	세포독성
실리콘	0	0	0	0
Tubliseal	4	5	4/5	severe
AH26	2	1	2/1	mild
Apatite I	2	5	2/5	moderate
Apatite II	4	5	4/5	severe
구리	4	5	4/5	severe

Wenberg⁵⁷⁾의 판별기준(Table 8)에 적용한 결과 Apatite Root Canal Sealer I 과 apatite Root Canal Sealer II 군은 SDH의 활성화에 영향을 미치지 않아 세포독성이 없었고, Tubliseal 과 AH26 군은 미약한 세포독성을 보였다(Table 7).

Table 7. Results of millipore filter test

시편\점수	점수	세포독성
실리콘	0	0
Tubliseal	1	mild
AH26	1	mild
Apatite I	0	0
Apatite II	0	0
구리	2	moderate

Table 8. Cytotoxicity criteria for millipore filter test

점수	세포독성
0	음성대조군과 염색도 차이가 없는 경우
1	직경 7mm 이내에 염색도가 떨어지거나 염색이 안된 부위가 생긴 경우
2	직경 7-11mm의 염색 안된 부위가 생긴 경우
3	직경 11mm 이상의 염색 안된 부위가 생긴 경우

(시편의 직경 : 7mm)

Table 9. Results of three experimental methods

	세포증식도검사	Agar overlay시험	Millipore filter기법
실리콘	0	0	0
Tubliseal	severe	severe	mild
AH26	severe	mild	mild
Apatite I	mild	moderate	0
Apatite II	severe	severe	0
구리	severe	severe	moderate

IV. 총괄 및 고안

근관폐쇄에 필수적인 근관충전용 sealer는 직접 또는 간접으로 치근단주위조직에 영향을 미치므로 임상적 사용을 위해 이런 재료들의 물리적, 기계적 성질뿐만 아니라 생물학적인 적합성을 확립하여야 하며 이를 위한 여러가지 검사방법이 소개되어 왔는데 체내실험과 생체의실험으로 대별된다.

체내실험은 실험조건이나 기간에 따라 결과가 다양하게 나타날 수 있고, 산술적 또는 객관적인 평가가 힘들어 생체조직의 생물학적 반응을 평가하는데 객관성을 부여하기 위해 실험조건과 조사방법의 표준화를 위한 노력이 계속되어 왔다⁵⁸⁾.

세포배양을 이용하여 실험재료에 대한 세포변화를 분석함으로써 독성을 평가하는 생체의 세포독성검사는 표준화되어 있어 평가에 객관성이 있으며, 실험에 영향을 미치는 여러변수들의 조절이

가능하고, 비교적 간단하며, 생물학적 반응이 빠르고 예민하며, 정확하게 재현될 수 있을 뿐만 아니라 결과의 산술적 평가가 가능한 장점을 지니고 있어^{54,55)} 처음에는 화학약품과 약제의 효과를 평가하는 약리학적 연구에 이용되어 오다가⁵⁷⁾ 1955년 Kawahara와 Shiota⁵⁹⁾에 의해 치과분야에 처음 소개되었으며, 그 후 치과재료의 생물학적 적합성 검사의 표준화를 규정하는데 이용되고 있다.

치과재료의 세포독성을 측정하기 위한 평가방법으로 세포수산정^{8,11)}이나 DNA 분석^{12,19,49)} 및 단백질합성량산출에 의한 세포성장률측정법, 세포의 형태학적 변화의 현미경적 관찰^{8,12)}, 세포의 산소 섭취량⁶⁰⁾이나 이산화탄소방출량에 의한 세포호흡률측정법, 방사선동위원소의 방출⁷⁾이나 염색¹³⁾에 의한 세포막의 투과도변화측정법, 사립체효소의 조직화학적기계분석^{7,10)}, 당원대사의 변화조사등이 사용되고 있다.

세포배양법에 있어 배양세포의 선택이 중요한 요소중의 하나이다. 치수조직과 치근단주위조직에서 흔히 볼수 있는 세포는 섬유모세포와 조상아세포, 그리고 조골세포인데 조상아세포와 조골세포는 매우 특수한 세포이며 고도로 분화되어 있어 배양이 힘든 반면, 섬유모세포는 쉽게 배양되며, 비교적 분화가 덜된 세포로서 외부자극에 대해 세포분열을 하고 결체조직의 기질을 합성하며, 조직의 흡수속도등을 변화시키는 성질을 지니고 있어⁶¹⁾ 치과재료의 독성검사에서 가장 많이 사용되고 있다. 이러한 세포는 인체나 동물에서 직접 채취하여 배양할 수 있으나 배양에 시간이 걸리며, 배양 때마다 성질이 변할 수 있기 때문에 성질이 일정하고 쉽게 사용할 수 있는 여러종류의 세포주들이 만들어져 있고 세포배양법과 실험목적에 따라 구별되어 사용된다⁶²⁾.

모든 세포독성검사에 있어 배양세포와 실험재료 사이의 충분한 접촉이 또한 매우 중요한 요소이다. 대부분의 치과재료는 수용성이 아니어서 시편과 세포 또는 배양액을 직접 물리적으로 접촉시키거나, 시편과 세포 또는 배양액 사이에 투과성의 중간매체를 넣어 간접적으로 접촉시켜 가능한 충분한 접촉이 이루어지게 하여야한다⁶³⁾.

Mohammed 등¹³⁾은 실험재료가 세포와 직접 접촉하지 않고 한천층을 통해 배양세포로 독성물질이 확산되어 영향을 미치는 agar overlay 시험의 조건이 근관충전물질이 직접 세포와 접촉되지 않고 용해물질이 근관에서 치근단주위조직으로 확산되는 상황과 유사하여 근관충전용 sealer의 독성평가에 특히 적합하다고 하였다. 한편 Yesilsoy와 Robert¹⁴⁾는 agar를 중간매체로 하여 실험재료와 세포를 간접적으로 접촉시킬 경우 agar가 시편에서 유리된 독성물질을 흡수하거나 독성물질의 확산을 방해할 수 있으며, 배양세포와 시편을 직접 접촉시킬 경우에는 충분한 접촉은 이루어지나 재료의 압력등 물리적인 성질이 세포반응에 영향을 미칠 수 있으며, millipore filter로 분리시키면 시편의 물리적 영향을 배제하면서 agar에 비해 시편과 세포사이의 접촉이 우수하다고 하였다. 그러나 여과지가 독성물질의 확산속도에 영향을 미칠 수도 있을 것으로 사료된다.

이에 최근 임상에서 일반적으로 많이 사용되고 있는 근관충전용 sealer인 Tubliseal, AH26과 최

근에 개발된 Apatite Root Canal Sealer I, Apatite Root Canal Sealer II를 각각 제조회사의 지시대로 혼합한 뒤 7일간 경화시켜 시편을 제작하였으며 성형실리콘을 음성대조군으로, 구리판을 양성대조군으로 하여 생쥐섬유모세포(L929)를 이용하여 상기한 3가지 방법으로 시편과 섬유모세포와의 친화성에 관해 조사하였다.

세포증식도 및 세포생존률검사에서 모든 실험군이 음성대조군(Fig 2)에 비해 증식도와 생존률이 낮아 모두 세포독성을 보였다. Tubliseal 군은 2일째 세포수가 처음보다 감소하였으나 4일, 6일째 미약하나마 꾸준한 증식상을 보였고 세포생존률도 조금씩 증가하였다(Fig 3). AH26 군은 2일째 세포수가 현저히 감소했으며 생존률도 아주 낮았고, 4일, 6일째까지 세포의 증식은 극히 미약했으나 생존률은 매우 높아져 있어, 2일째까지 일시에 많은 양의 독성물질이 방출되어 많은 세포가 사멸되었으나 그뒤 방출되는 독성물질의 양이 줄어 세포를 사멸시키지 못하고 증식만 억제하는 영향을 미치는 것으로 사료된다(Fig 4). Apatite Root Canal Sealer I 군은 다른실험군에 비해 양호한 세포증식과 생존률을 보여 세포독성이 비교적 미약한 것으로 나타났다(Fig 5). Apatite Root Canal Sealer II 군은 2일째 다른 실험군에 비해 비교적 세포수가 많았으나 세포의 생존률은 극히 낮았다. 또한 4일째는 2일째에 비해 오히려 세포수는 감소하였으나 세포의 생존률은 많이 증가하였고, 6일째 미약하나마 세포의 증식상을 보여 독성물질이 주로 2일 전후에 세포에 많은 영향을 미친 것으로 추측된다(Fig 6). 음성대조군의 경우 2일째 세포수가 현저히 감소하였고 4일, 6일째까지 증식상을 보이지 않았으며 2일, 4일, 6일까지 살아있는 세포는 발견할 수 없었다(Fig 7). 이상에서 Apatite Root Canal Sealer I 군은 비교적 낮은 독성을 보였고, Tubliseal과 AH26 군, 그리고 Apatite Root Canal Sealer II 군은 심한 세포독성을 보였다.

한편 neutral red 염색에 의한 세포막의 투과도 변화를 조사한 agar overlay 시험에서 AH26 군은 시료에서 3mm까지 모든 세포의 탈색소견을 보였으며 탈색된 세포의 10%가 용해소견을 보여 비교적 세포독성이 낮은 것으로 나타났으며, Apatite Root Canal Sealer I 군은 2mm까지 모든 세포가 탈색되었으며 탈색된 모든 세포는 용해소견을 보여 중

등도의 세포독성을 나타내었고, Tubliseal 군과 Apatite Root Canal Sealer II 군에서는 15mm까지 모든 세포가 탈색되었으며 탈색된 모든 세포는 용해 소견을 보여 음성대조군과 마찬가지로 심한 세포 독성을 나타내었다.

Agar overlay 시험에서 AH26 군이 세포증식도 및 생존률검사와 millipore filter 기법에서와 달리 다른 실험군에 비해 비교적 낮은 세포독성을 보인 것은 Yesilsoy와 Robert⁶⁵⁾가 주장한 바와 같이 agar 층이 AH26에서 방출된 독성물질을 흡수 또는 독성물질의 확산을 방해하였기 때문인 것으로 사료된다.

한편 millipore filter 기법으로 SDH의 활성의 변화를 측정함으로써 세포독성을 검사한 결과, Apatite Root Canal Sealer I 군과 Apatite Root Canal Sealer II 군에서는 음성대조군과 염색정도의 차이가 발견되지 않아 세포독성이 없는 것으로 나타났다. Tubliseal 군과 AH26 군은 시편 아래부위에 서만 염색도가 억제되어 있거나 염색이 안된 양상을 보여 낮은 세포독성이 있는 것으로 나타났다.

이와같이 Tubliseal은 millipore filter 기법에서는 미약한 세포독성을 나타내었고 세포증식도 및 생존률검사와 agar overlay 시험에서는 심한 세포독성을 나타내었으며 AH26은 millipore filter 기법과 agar overlay 시험에서 비교적 미약한 세포독성을 나타내었고 세포증식도 및 생존률검사에서는 심한 세포독성을 보였으며, Apatite Root Canal Sealer I은 millipore filter 기법에서는 세포독성을 보이지 않았고 세포증식도 및 생존률검사에서는 미약한 세포독성을, agar overlay 시험에서는 중등도의 세포독성을 보였으며, Apatite Root Canal Sealer II는 millipore filter 기법에서는 세포독성을 보이지 않았고 세포증식도 및 생존률검사와 agar overlay 시험에서는 심한 세포독성을 보였다(Table 9). 이상의 결과를 종합적으로 분석해 볼 때 Apatite Root Canal Sealer I과 Apatite Root Canal Sealer II가 Tubliseal과 AH26에 비해 세포독성이 낮으며, Apatite Root Canal Sealer I은 Apatite Root Canal Sealer II보다 낮으며, Tubliseal과 AH26의 세포독성은 비슷한 것으로 사료된다.

ZOE의 약리작용 및 독성은 ZOE 성분중의 하나인 eugenol의 농도에 따라 나타난다. 소량의 수분이 zinc-oxide를 가수분해시켜 형성된 zinc hydroxide에 eugenol이 결합되어 zinc eugenolate가

형성되고 수분이 방출되며, 이 수분과 zinc oxide의 반응이 다시 일어나 계속된다. zinc eugenolate는 불안정하여 과량의 수분에 의해 가수분해되어 불용성의 zinc hydroxide가 형성되면서 eugenol이 방출된다. 그러므로 사용할 수 있는 수분의 양이 eugenol 방출의 주요 결정요소이며 ZOE 표면의 eugenol이 고갈됨에 따라 eugenol 방출량은 점점 떨어진다. ZOE가 상아질과 접촉시는 상아질을 통해 비교적 일정한 농도로 수개월 또는 수년간에 걸쳐 eugenol이 방출되어 약리작용을 나타내나, 수분이 많은 조직과 접촉시는 eugenol이 일시에 많이 방출되어 세포와 조직에 손상을 줄 수 있는 농도가 된다⁶²⁾. Eugenol은 저농도에서 prostaglandin생성을 억제하여 염증반응을 감소시키며 감각신경활성을 억제시켜 진통작용을 나타내며⁶³⁾ 가역적으로 혈관을 확장시켜주기도 하고⁶⁴⁾, 10^{-3} mol/l 이상의 농도에서는 여러 구강미생물에 대한 살균효과가 있고⁶⁵⁾, 또한 포유동물의 세포를 죽이는 세포독성을 나타낸다⁶⁶⁾. Mohammed 등²⁾과 Watts와 Paterson⁴⁾은 실험동물의 와동에 ZOE를 충전하였을 때 잔존 상아질층이 있는 경우 치수손상을 발견하지 못했고, Hume³⁾은 ZOE와 치수사이의 상아질층이 eugenol 통과에 하나의 장벽이 되어 치수에 도달하는 eugenol은 독성을 나타내지 않는 농도가 된다고 보고하였으며, Meryon⁵⁾은 model cavity system을 이용하여 잔존 상아질층이 두꺼울수록 상아질 아래층의 용액에서 발견되는 eugenol의 양이 감소함을 관찰하였다. 그러나 Brännström과 Nyborg⁶⁾는 사람의 치아에서 잔존 상아질층이 있음에도 치수 조직에 염증이 유발됨을 관찰하여 깊은 와동에서는 노출된 상아세관을 수산화칼슘이나 다른 이장재로 보호한 뒤 ZOE를 충전하라고 권하고 있다. Watts와 Paterson⁴⁾은 ZOE가 쥐의 치수조직에 직접 적용되었을 때 심한 치수염증을 관찰하였고, Brannante⁷⁾는 개의 치근천공부위를 ZOE로 처치하였을 때 심한 염증반응과 함께 농양, 치조골흡수등을 관찰하였으며, Das⁸⁾와 Hensten-Petersen과 Helgeland⁷⁾는 세포독성검사를 실시한 바 ZOE의 세포독성이 심함을 관찰보고한 바 있다. 이런 ZOE의 독성은 전술한 바와 같이 ZOE에서 가수분해된 eugenol에 의해 발생하나, Meryon과 Jakeman⁶⁶⁾은 ZOE에서 zinc 이온의 방출량을 측정한 결과 혼합후 하루 동안에 0.69ppm, 14일 뒤엔 26.88ppm을 관

찰하여 ZOE의 지속적인 세포독성에 zinc가 관련될 수 있다고 주장하였다.

ZOE가 주성분인 Tubliseal에 대한 세포독성검사에서 Nakamura 등¹¹⁾과 Matsumoto 등¹²⁾은 혼합직후와 경화된 뒤 모두 상당한 세포독성을 나타냄을 관찰하여 본 실험과 유사한 결과를 보고하였고, Mohammad¹³⁾는 혼합직후에는 상당한 독성을 나타내나 96시간 경화된 뒤에는 미약한 독성을 나타냄을 관찰하였다.

AH26의 물리적 특성에 관한 McComb와 Smith¹⁴⁾는 강도가 강하고 흐름이 좋아 근관내 삽입이 용이하며 상아질벽에 대한 접착력이 우수하다고 보고하였고, Gentleman 등¹⁵⁾도 상아질에 대한 부착력이 ZOE계통의 sealer에 비해 아주 우수함을 관찰하였으며, Fogel¹⁶⁾은 AH26의 근단공폐쇄능력이 뛰어난 것을 관찰보고하였다.

AH26의 세포독성에 관하여 Yesilsoy와 Feigal¹⁸⁾은 L929와 사람의 치수세포로 millipore filter 기법으로 검사한 바, Tubliseal에 비해 독성이 낮음을 관찰하였으나, Nakamura 등¹¹⁾은 세포수산정법에 의한 검사에서 아주 심한 세포독성을 관찰하였고, Kettering과 Torabinejad¹⁹⁾도 DNA 분석법으로 같은 결과를 관찰한 바 본 실험의 결과와 일치하였다. Mohammad¹³⁾는 agar overlay 시험으로 혼합직후에는 강한 독성을 보이나 96시간 경과후에는 비교적 약한 세포독성을 관찰한 바 있고, Matsumoto¹²⁾ 역시 DNA 분석법을 통해 같은 결과를 관찰 보고하면서 AH26의 세포독성은 경화촉진제에 의한 것이며 혼합 직후와 경화된 뒤의 독성차이는 독성물질 양의 차이 때문이라고 주장하였다.

Hydroxyapatite는 조직에 대한 친화성이 우수하고 재료자체가 불활성이며 조직내에서 흡수가 거의 일어나지 않는다. Barney 등³⁴⁾은 Hydroxyapatite를 개의 치조골에 매식한 결과 결체조직에 의해 둘러싸여 있고 거대다핵세포를 관찰하여 Hydroxyapatite의 흡수가능성에 대하여 추측하였을 뿐, 흡수상이나 신생골의 형성은 관찰하지 못했다. 이와 같이 Hydroxyapatite는 조직에 대한 독성은 거의 없으나 조직내에서 흡수가 거의 일어나지 않고 경화가 되지 않아 단독으로 근관충전용 sealer로 사용하기는 적합하지 않다⁶⁷⁾.

Tricalciumphosphate는 조직에 대한 친화성이 좋으며 거대세포와 포식세포에 의해 분해되어 빨리

흡수되고, 분해된 tricalciumphosphate 일부는 신생골의 기질로서 작용하여 거의 정상적인 골조직치유를 유발시킨다고 알려져 있고³²⁻³⁴⁾, Shoji⁶⁷⁾와 Brown과 Chow³⁹⁾는 α -tricalciumphosphate 분말을 lactic acid polymer나 glycolic acid 그리고 증류수로 혼합할 때 수분만에 경화되어 Hydroxyapatite로 변하는 것을 관찰하였다.

Apatite Root Canal Sealer I은 불활불변성의 Hydroxyapatite와 경화 가능한 Tricalciumphosphate를 혼합한 제제로서 이⁶⁸⁾의 실험에서 수산화칼슘 또는 ZOE계통의 sealer에 비해 세포독성이 현저히 낮음이 관찰되었으며, 본 실험에서도 레진 및 ZOE계통의 sealer에 비해 세포독성이 낮았다.

Apatite Root Canal Sealer II는 Apatite Root Canal Sealer I에 iodine을 첨가한 제품으로 이⁶⁸⁾의 실험에서와 같이 본 실험에서도 Apatite Root Canal Sealer I보다 세포독성이 강함이 관찰되었는데, 이는 iodine의 방출로 인한 것으로 사료된다.

본 실험에서 대조군으로 성형실리콘과 구리판을 사용하였다. 성형실리콘은 독성이 없는 것으로 알려져 있고, 본 실험에서도 확인되었다. 구리는 배양액내에 단백질이 존재하면 이온화가 촉진된다고 알려져 있고, 용출된 구리이온은 세포막을 투과하여 세포원형질내로 침투함으로써 세포핵 또는 세포내 존재하는 여러 효소에 영향을 주어 세포내의 대사기구에 작용함으로써 세포를 변형 또는 위축시키고 끝내 사멸시키는 것으로 알려져 있으며⁶⁹⁾, 본 실험에서도 2일째부터 생존세포를 관찰할 수 없었다.

Hensten-Petersen과 Hegeland⁷⁾은 4가지의 서로 다른 세포배양법으로 silicate 세멘트와 복합레진 그리고 ZOE의 세포독성을 연구한 결과, 재료마다 상대적인 세포독성이 측정방법에 따라 다른 결과를 보임을 관찰한 바 있는데, 본 실험에서도 같은 결과가 나타난 바, 이는 각 재료의 독성물질이 달라 세포에 미치는 기전의 차이에서 나타난 것으로 사료되며, 재료의 독성은 여러가지 측정방법에 의한 결과를 다각적으로 분석 검토하여 종합적인 평가를 내는 것이 바람직하다고 생각된다.

단일세포를 사용하는 생체의 실험에서와는 달리 체내에서의 재료와 조직사이의 상호관계는 조직내 원래 있거나, 조직으로 이동해 온 여러 세포들의 생물학적 상호작용에 의해 나타나는 대사반응, 염

증반응 및 면역반응등으로 이루어져 있고, 임상에서 과충전되지않는 한 치근단주위조직과 근관충전용 sealer 사이의 접촉이 아주 작아, 본실험의 결과가 임상적으로 사용했을 때 나타나는 결과와 일치할 수 없겠지만 실험재료의 상대적인 독성평가가 임상적 의미를 부여하는데 도움이 될 수 있다고 사료되며, 앞으로 서로 다른 측정방법에 의해 나타난 결과들 사이와, 또한 생체내 실험의 결과와 상호연관성이 이루어지도록 세포독성의 측정방법에 많은 개선이 필요할 것으로 사료된다.

V. 결 론

최근에 임상에서 많이 사용되고 있는 근관충전용 sealer 인 Tubliseal, AH26, Apatite Root Canal Sealer I 및 Apatite Root Canal Sealer II의 독성을 비교 평가하기 위하여 이 sealer 들을 혼합후 7일간 경화시켜 시편으로 사용하였으며, 성형실리콘과 구리판을 각각 음성대조시료, 양성대조시료로 하여, 생쥐섬유모세포(L929)를 이용한 세포배양법으로 세포증식도 및 세포생존률 검사를 2일, 4일 및 6일 간격으로 실시하였고, Agar overlay 시험을 통해 neutral red 염색법으로 세포막투과도 검사를 실시하였으며, millipore filter 기법으로 succinate dehydrogenase 활성을 측정하여 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 세포증식도 및 세포생존률 검사에서 모든 실험군이 음성대조군에 비해 섬유모세포의 증식이 억제되어 있어 세포독성을 나타내었으며, 그중 Apatite Root Canal Sealer I 은 비교적 양호한 증식을 보여 낮은 세포독성을 보였으며, Tubliseal, AH26 및 Apatite Root Canal Sealer II는 현저히 억제된 증식상을 보여 심한 세포독성을 나타내었다.

2. Agar overlay 시험을 통한 세포막투과도 검사에서 모든 실험군이 세포독성을 나타내었으며, AH 26은 비교적 미약한 세포독성을, Apatite Root Canal Sealer I 은 중등도의 세포독성을, Tubliseal 과 Apatite Root Canal Sealer II는 심한 세포독성을 나타내었다.

3. Millipore filter 기법에 의한 succinate dehydrogenase 활성도 검사에서 Apatite Root Canal Sealer

I 과 Apatite Root Canal Sealer II는 세포독성을 나타내지 않았으며, Tubliseal 과 AH26은 미약한 세포독성을 보였다.

참 고 문 헌

1. Ingle J.I. and Beveridge E.E. : Endodontics. Philadelphia : Lee & Febiger, 2nd ed : p216, 1976.
2. Mohammed Y.R., Huysen G.V., and Boyd D.A. : Filling base materials and the unexposed and exposed tooth pulp. J Pros Dent 11 : 503-512, 1961.
3. Hume W.R. : An analysis of the release and the diffusion through dentine of eugenol from zinc oxid - eugenol mixture. J Dent Res 63 : 881-884, 1987
4. Watts A. & Paterson R.C. : Pulpal response to a zinc oxide - eugenol cement. Int Endo J 20 : 86, 1987.
5. Meryon S.D. : An in vitro study of factors contributing to the blandness of zinc oxide - eugenol preparations in vitro. Int Endo J 21 : 200-204, 1988
6. Brännstörn M. and Nyborg H. : Pulp reaction to a temporary zinc oxide - eugenol cement. J Pros Dent 35 : 185-191, 1976.
7. Hensten - Petersen A. and Hegeland K. : Evaluation of biologic effect of dental materials using four different cell culture technique. Scand J Dent Res 85 : 291-296, 1977
8. Das S. : Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. Oral Surg. 52 : 76-84, 1981
9. Bramante C.M. and Berbert A. : Root perforation dressed with calcium hydroxide or zinc oxide - eugenol. J Endodon 13 : 392-395, 1987
10. Pitt Ford T.R. and Rowe A.H.R. : A new root canal sealer based on calcium hydroxide. J Endodon 15 : 286-289, 1989
11. Nakamura H., Sakakibara F., Matsumoto Y., Hirano S., Hayakawa H., Sakai K., Yip M. : Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. J Endodon 12 : 156-160, 1986.

12. Matsumoto K., Inoue K., Matsumoto A. : The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. *J Endodon* 15 : 60 - 67, 1989
13. Mohammed A.R., Mincer H.H., Younis O., Dillingham E. and Siskin M. : Cytotoxicity evaluation of root canal sealers by the tissue culture agar overlay technique. *Oral Surg.* 45 : 768 - 77, 1978
14. McComb D. and Smith D.C. : Comparison of physical properties of polycarboxylate - based and conventional root canal sealers. *J Endodon* 2 : 228 - 235, 1976.
15. Gentlemam B.H. and ElDeeb M.E. : Adhesion of sealer cement to dentine with and without the smear layer. *J Endodon* 17 : 15 - 20, 1991
16. Fogel B.B. : A comparative study of five materials for use in filling root canal spaces. *Oral Surg.* 43 : 284 - 299, 1977
17. Lim K.C. and Tidmarsh B.G. : The sealing ability of Sealapex compared with AH26. *J Endodon* 12 : 564 - 566, 1986
18. Yesilsoy C. and Feigal R.J. : Effect of endodontic materials on cell viability across standard pore size filters. *J Endodon* 11 : 401 - 407, 1985
19. Kettering J.D. and Torabinejad M. : Cytotoxicity of root canal sealers : a study using HeLa cells and fibroblasts. *Int Endo J* 17 : 60 - 66, 1984
20. Bhaskar S.N., Cutright D.E., Knapp M.J., Beasley J.D., Perez B. and Driskell T.D. : Tissue reaction to intrabony ceramic implants. *Oral Surg.* 31 : 282 - 289, 1971
21. ElDeeb M. : Comparison of three methods of stabilization of particulate hydroxyapatite for augmentation of the mandibular ridge. *J Oral Maxillofac Surg* 46 : 758 - 766, 1988
22. Frame J.W., Rout P.G.J. and Browne R.M. : Ridge augmentation using solid and porous hydroxyapatite particles with and without autogenous bone or plaster. *J Oral Maxillofac Surg* 45 : 771 - 777, 1987.
23. Bach D.E., Downs R.H., Muller J.T. and Nespeca J.A. : Hydroxyapatite mandibular augmentation technique : A review of splint modification. *J Pros Dent* 59 : 64 - 68, 1988
24. Kenny E.B., Lekovic V., Saferreira J.C., Han T., Dimitrijevic B. and Carranza F.A. : Bone formation within porous hydroxyapatite implants in human periodontal defects. *J Periodontol* 57 : 76 - 83, 1986.
25. Moskow B.S. and Lubarr A. : Histological assessment of human periodontal defect after Durapatite ceramic implant. *J Periodontol* 54 : 455 - 462, 1983.
26. Froum S.J., Kushner L., Scopp I.W. and Stahl S.S. : Human clinical and histologic responses to Durapatite implants in intraosseous lesions. Case report. *J. Periodontol* 53 : 680 - 689, 1981
27. Rabalais M.L., Yukna R.A. and Mayer E.T. : Evaluation of Durapatite ceramic as an alloplastic implant in periodontal osseous defects. I. Initial six - month results : *J Periodontol* 52 : 680 - 689, 1981.
28. Yukna R.A., Harrison B.G., Caudill R.F., Evans G.H., Mayer E.T. and Miller S. : Evaluation of Durapatite ceramic as an alloplastic implant in periodontal osseous defects. II. twelve - month reentry results. *J. Periodontol* 56 : 540 - 547, 1985.
29. Yukna R.A., Mayer E.T. and Brite D.V. : Longitudinal evaluation of Durapatite ceramic as an alloplastic implant in periodontal osseous defects after 3 years. *J. Periodontol* 55 : 633 - 637, 1984.
30. Sapkos S.W. : The use of periograft in periodontal defects, histologic findings. *J. Periodontol* 57 : 7 - 132, 1986
31. Roane J.B. and Benenati F.W. : Successful management of a perforated mandibular molar using amalgam and hydroxyapatite., *J Endodon* 13 : 400 - 404, 1987
32. Cutright D.E., Bhaskar S.N., Brady J.M., Getter L. and Posey W.R. : Reaction of bone to tricalciumphosphate ceramic pellets. *Oral Surg.* 33 : 850 - 856, 1972
33. Getter L., Bhaskar S.N., Cutright D.E., Peřez B., Brady J.M., Driskell T.D. and O'Hara M.J. : Three biogradable calcium phosphate slurry implant in bone. *J Oral Surg.* 30 : 263 - 268, 1972

34. Barney V.C., Levin M.P. and Adams D.F. : Bio-ceramic implants in surgical periodontal defects. *J Periodontol* 57 : 764 - 770, 1986
35. Jean A., Kerebel B., Kerebel L.M., Legeros R.Z. and Hamel H. : Effects of various calciumphosphate biomaterials on reparative dentine bridge formation. *J Endodon* 14 : 83 - 87, 1988
36. 양문규 : Tricalciumphosphate 와 Durapatite 가 치수조직에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. *대한치과보존학회지* 9 : 7 - 12, 1983
37. Himel V.T., Brady J. and Weir J. : Evaluation of repair of mechanical perforations of the pulp chamber floor using biogradable tricalciumphosphate or calcium hydroxide. *J Endodon* 11 : 161 - 165, 1985
38. Sinai I.H., Romea D.J., Morse D.R., Fantasia J. and Furst M.L. : An evaluation of tricalciumphosphate as a treatment for endodontic perforations. *J Endodon* 15 : 399 - 403, 1989
39. Brown W.E. and Chow L.C. : A new calcium phosphate setting cement. *J Dent Res* 62 : 672, 1983
40. Krell K.F. and Welfel J.S. : A calciumphosphate cement root canal sealer - scanning electron microscopic analysis. *J Endodon* 10 : 571 - 576, 1984
41. Chohayeb A.A., Chow L.C. and Tsaknis P.J. : Evaluation of calciumphosphate as a root canal sealer - filler material. *J Endodon* 13 : 384 - 387, 1987
42. Sugawara A., Chow L.C., Takagi S. and Chohayeb H. : In vitro evaluation of the sealing ability of a calciumphosphate cement when used as a root canal sealer - filler. *J Endodon* 16 : 162 - 165, 1990
43. Gruninger S.Z., Siew C., Chow L., O'young A., TSAO N.K. and Brown W. : Evaluation of the biocompatibility of a new calciumphosphate setting cement. *J Dent Res* 63 : 200, 1984
44. Tagger M., Tagger E. : Pulp capping in monkeys with Reolit and Life, two calcium hydroxide bases with different PH. *J Endodon* 11 : 394 - 400, 1985
45. Heys D.R., Heys R.J., Cox C.F. and Avery J.K. : The response of four calcium hydroxides on monkey pulps. *J Oral Patho* 9 : 372 - 379, 1980
46. Stanely H.R. and Lundy T. : Dycal therapy for pulp exposures. *Oral Surg.* 31 : 818 - 827, 1972
47. Negm M., Grant A. and Combe E. : Clinical and histologic study of human pulp response to new cements containing calcium hydroxide. *Oral Surg.* 50 : 462 - 471, 1980
48. Paterson R.C., Radford J.R. and Watts A. : The response of rat molar pulp to proprietary calcium hydroxide preparation. *Brit Dent J* 151 : 184 - 186, 1981
49. Fitzgerald M. : Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H - thymidine. *J Dent Res* 58 : 2198 - 2206, 1979
50. Holland R. and Souza V. : Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endodon* 11 : 535 - 543, 1985.
51. Ghose L.J., Baghdady V.S. and Hikmat Y.M. : Apexification of immature species of pulpless permanent anterior teeth with calcium hydroxide. *J Endodon* 13 : 285 - 290, 1987
52. Smith J.W., Leeb I.J. and Torney D.L. : A comparison of calcium hydroxide and barium hydroxide as agents for inducing apical closure. *J Endodon* 10 : 64 - 70, 1984
53. Tagger M., Tagger E. and Kfir A. : Release of calcium and hydroxyl ions from set endodontic sealers containing calcium hydroxide. *J Endodon* 14 : 588 - 591, 1988
54. Murphy W.M. : The testing of endodontic materials in vitro. *Int Endo J* 21 : 171 - 177, 1988
55. Hensten - Pettersen A. : Comparison of methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endo J* 21 : 89 - 97, 1988
56. Brown R.M. : The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials - does it have a role ? *Int Endo J* 21 : 50 - 58, 1988
57. Wennberg A. : In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials - the millipore filter method. *Int Endo J* 21 : 67 - 71, 1988
58. American dental Association : Recommended standard practice for biological evaluation of dental materials. *JADA* 84 : 382 - 397, 1972

59. Kawahara H, Shiota M. and Yamakawa Y. : Study on the effect of dental materials upon the mesenchymal cells in tissue culture. J Osaka Odonto Society 118 : 342 - 348, 1955
60. Hume W.R. : Effect of eugenol on respiration and division in human pulp, mouse fibroblast and liver cell. J Dent Res 63 : 1262 - 1265, 1984
61. Seltzer S. and Bender I.B. : The dental pulp. Philadelphia : Lippincott. p266, 1975.
62. Hume W.R. : In vitro studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and zinc oxide - eugenol. Int Endo J 21 : 130 - 134, 1988
63. Kozam G. : The effect of eugenol on nerve transmission. Oral Surg. 44 : 799 - 805, 1977
64. Hume W.R. : Effect of eugenol on constrictor responses in blood vessels of the rabbit ear. J Dent Res 62 : 1013 - 1015, 1983
65. Newman M.G., Hulem C., Colgate J. and Anselmo C. : Antibacterial susceptibility of plaque bacteria. J Dent Res 58 : 1722 - 1732, 1979
66. Meryon S.D. and Jakeman K.J. : The effect in vitro of zinc released from dental restorative materials. Int Endo J 18 : 191 - 198, 1985
67. Shoji S., Ishikawa J., Ebina J., Yamaki K. and Horiuchi H. : Application of α -tricalciumphosphate ceramics (α -TCP) to endodontics. Tohoku University Dentistry article (1021) 253, november. 1984
68. 이승중 : 근관충전용 sealer 의 세포독성에 관한 연구. 서울대학교 대학원 박사학위논문, 1990
69. Masayuki K. and Tsugumitsu A. : Studies on the biocompatibility against to commercially available metals of crown on human fibroblasts. J Pedodontics 21(2) : 179 - 185, 1983

Explanation of photographs.

Cell growth and Survival test.

- Fig. 1. Fibroblasts cultured for 2 days in silicone($\times 100$)
- Fig. 2. Fibroblasts cultured for 4 days in silicone($\times 100$)
- Fig. 3. Fibroblasts cultured for 6 days in silicone($\times 100$)
- Fig. 4. Fibroblasts cultured for 2 days in Tubliseal($\times 100$)
- Fig. 5. Fibroblasts cultured for 4 days in Tubliseal($\times 100$)
- Fig. 6. Fibroblasts cultured for 6 days in Tubliseal($\times 100$)
- Fig. 7. Fibroblasts cultured for 2 days in AH26($\times 100$)
- Fig. 8. Fibroblasts cultured for 4 days in AH26($\times 100$)
- Fig. 9. Fibroblasts cultured for 6 days in AH26($\times 100$)
- Fig. 10. Fibroblasts cultured for 2 days in Apatite I ($\times 100$)
- Fig. 11. Fibroblasts cultured for 4 days in Apatite I ($\times 100$)
- Fig. 12. Fibroblasts cultured for 6 days in Apatite I ($\times 100$)
- Fig. 13. Fibroblasts cultured for 2 days in Apatite II ($\times 100$)
- Fig. 14. Fibroblasts cultured for 4 days in Apatite II ($\times 100$)
- Fig. 15. Fibroblasts cultured for 6 days in Apatite II ($\times 100$)
- Fig. 16. Fibroblasts cultured for 2 days in copper($\times 100$)
- Fig. 17. Fibroblasts cultured for 4 days in copper($\times 100$)
- Fig. 18. Fibroblasts cultured for 6 days in copper($\times 100$)

Agar overlay test

- Fig. 19. Photograph of silicone group($\times 40$)
- Fig. 20. Photograph of silicone group($\times 100$)
- Fig. 21. Photograph of Tubliseal group($\times 40$)
- Fig. 22. Photograph of Tubliseal group($\times 100$)
- Fig. 23. Photograph of AH26 group($\times 40$)
- Fig. 24. Photograph of AH26 group($\times 100$)
- Fig. 25. Photograph of Apatite I group($\times 40$)
- Fig. 26. Photograph of Apatite I group($\times 100$)
- Fig. 27. Photograph of Apatite II group($\times 40$)
- Fig. 28. Photograph of Apatite II group($\times 100$)
- Fig. 29. Photograph of copper group($\times 40$)
- Fig. 30. Photograph of copper group($\times 100$)

Millipore Filter test.

- Fig. 31. Photograph of silicone group
- Fig. 32. Photograph of Tubliseal group
- Fig. 33. Photograph of AH26 group
- Fig. 34. Photograph of Apatite I group
- Fig. 35. Photograph of Apatite II group
- Fig. 36. Photograph of copper group

* Apatite I : Apatite Root Canal Sealer I
Apatite II : Apatite Root Canal Sealer II

논문 사진부도 ①

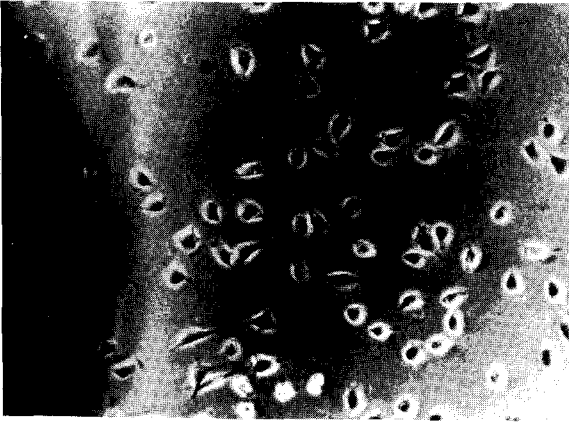


Fig. 1.

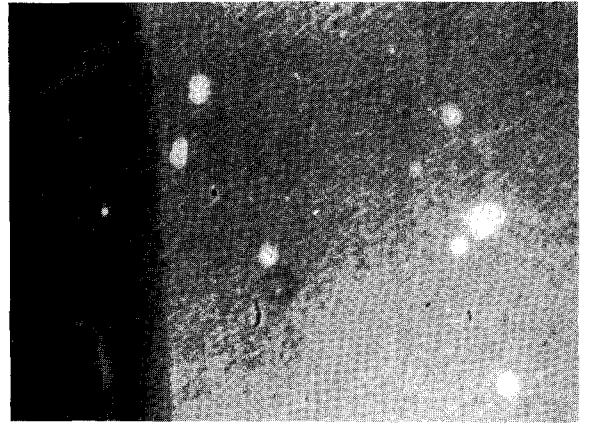


Fig. 4.

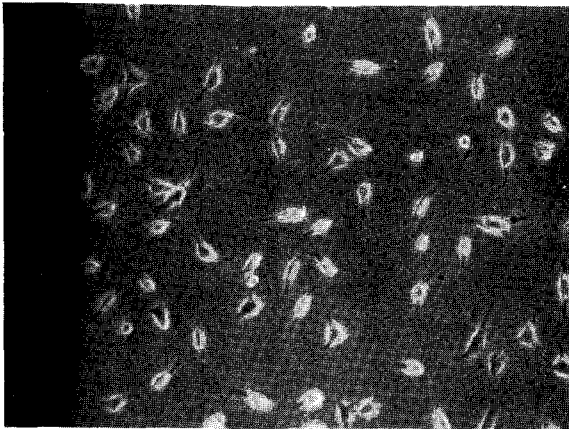


Fig. 2.

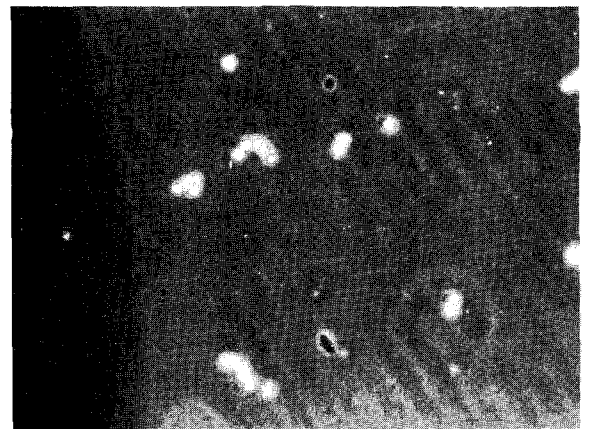


Fig. 5.

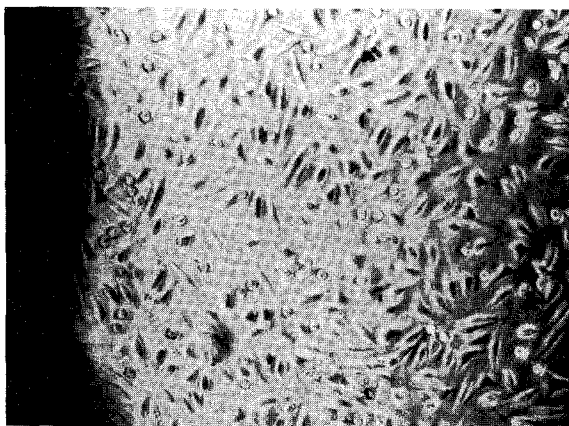


Fig. 3.

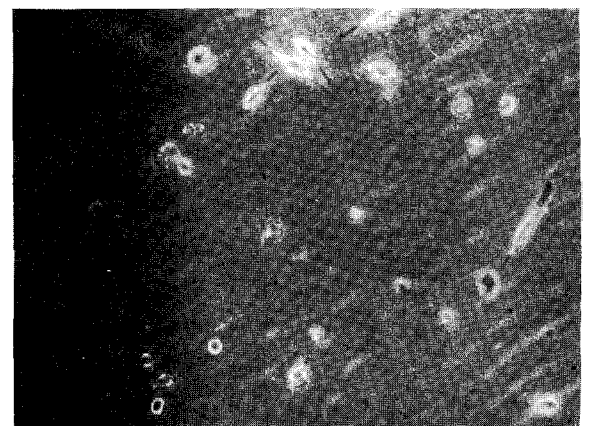


Fig. 6.

논문 사진부도 ②

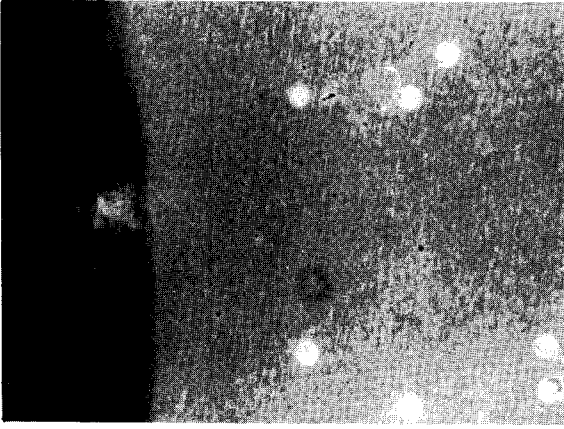


Fig. 7.

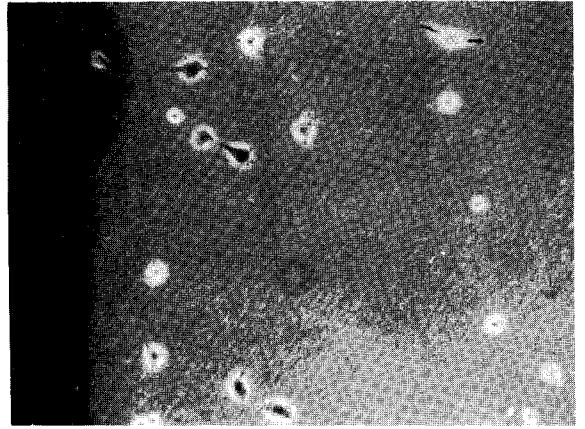


Fig. 10.

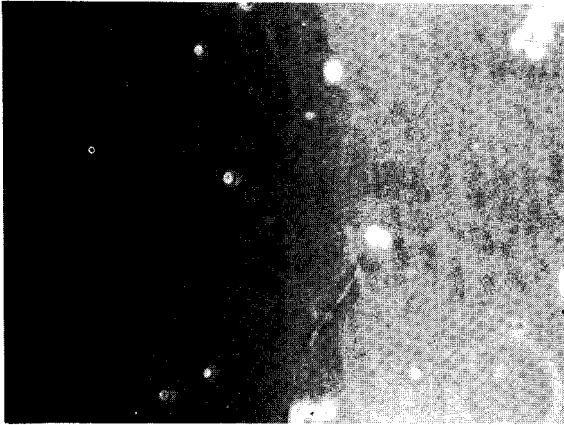


Fig. 8.

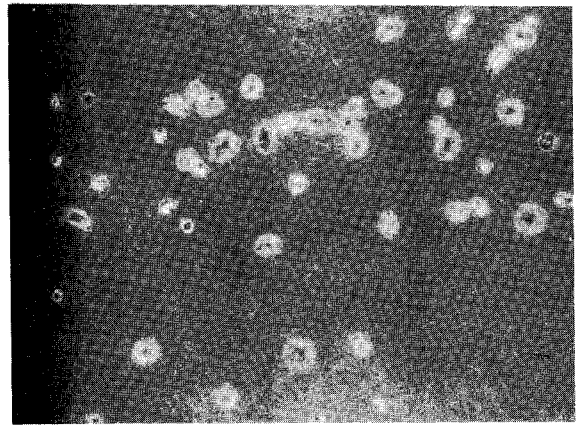


Fig. 11.

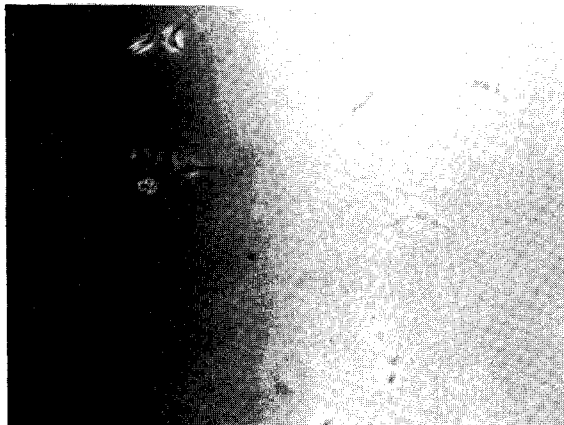


Fig. 9.

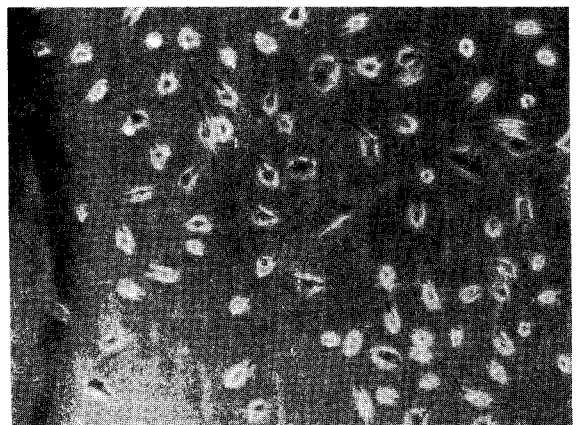


Fig. 12.

논문 사진부도 ③

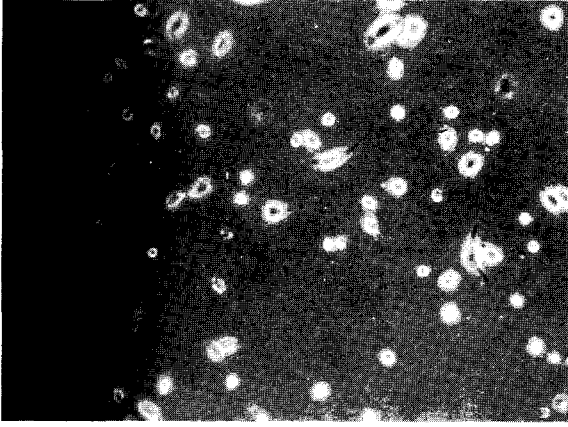


Fig. 13.

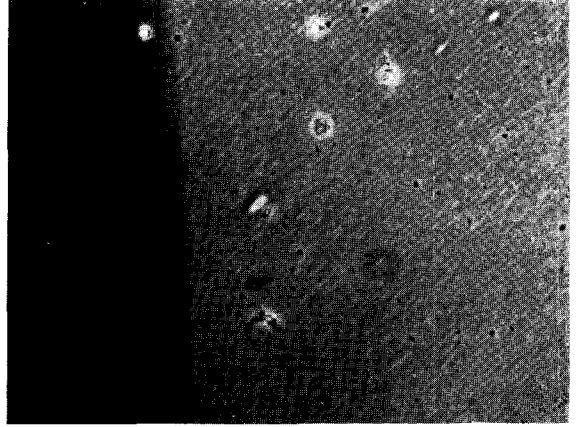


Fig. 16.

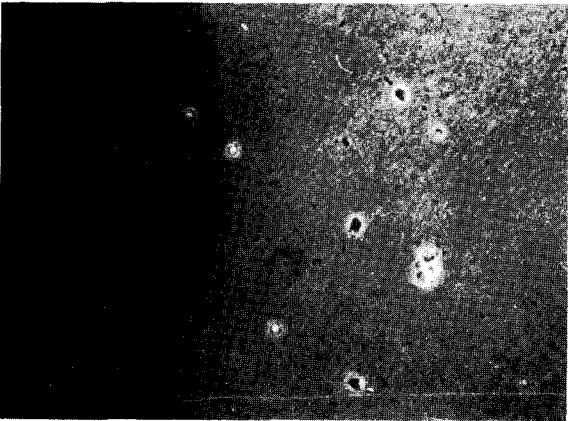


Fig. 14.

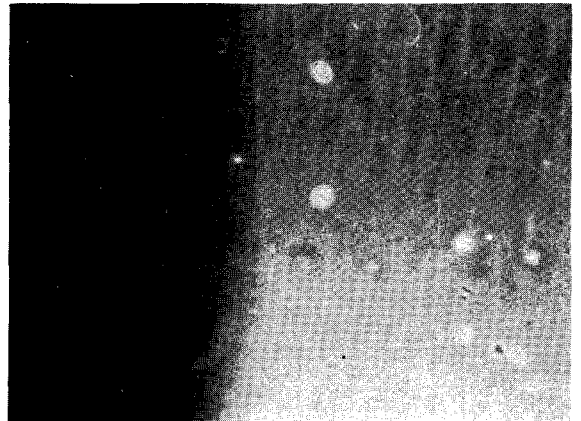


Fig. 17.

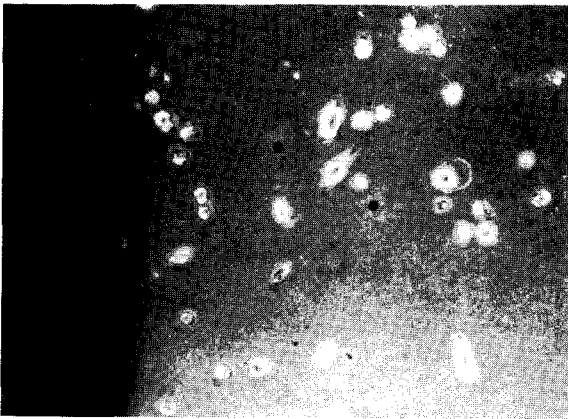


Fig. 15.

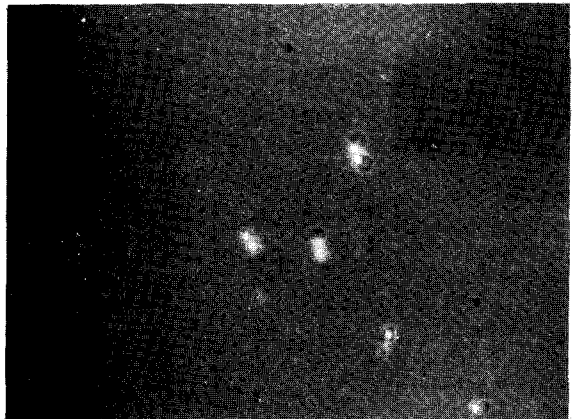


Fig. 18.

논문 사진부도 ④

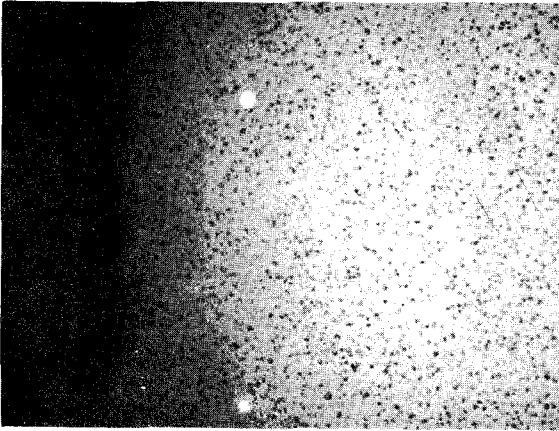


Fig. 19.

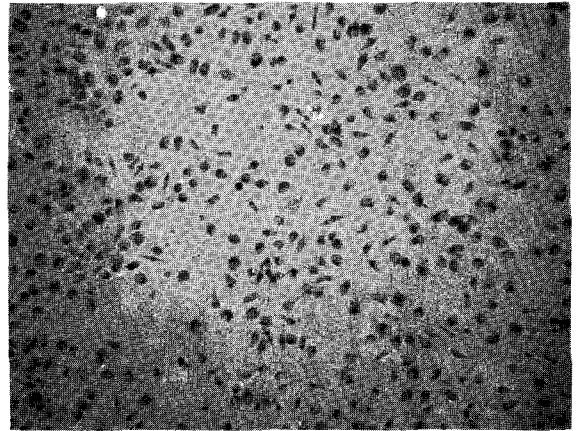


Fig. 20.

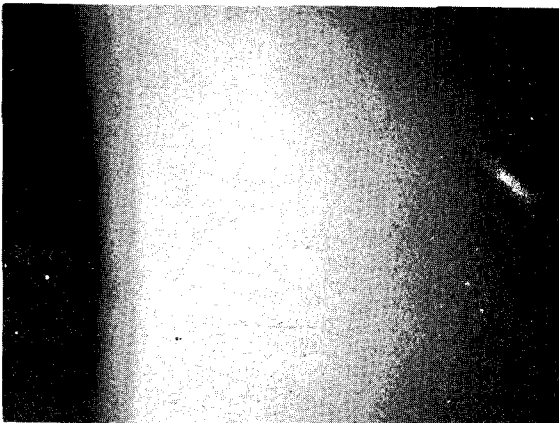


Fig. 21.

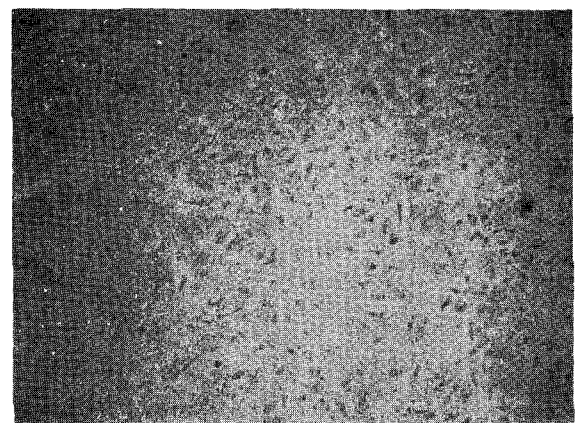


Fig. 22.

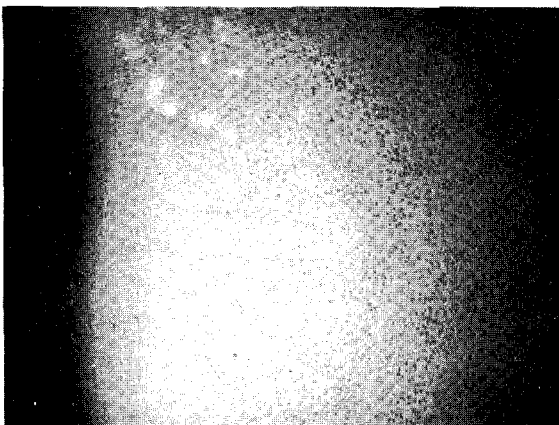


Fig. 23.

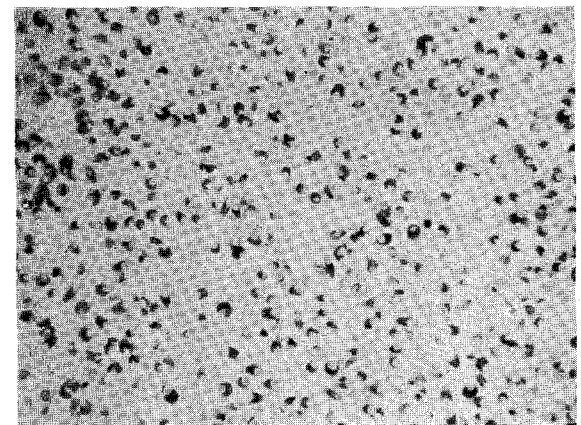


Fig. 24.

논문 사진부도 ⑤

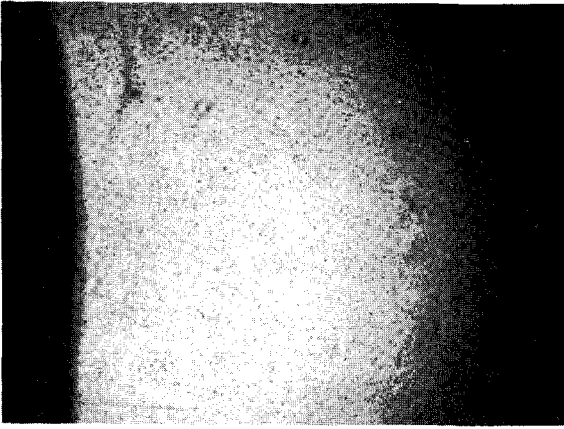


Fig. 25.

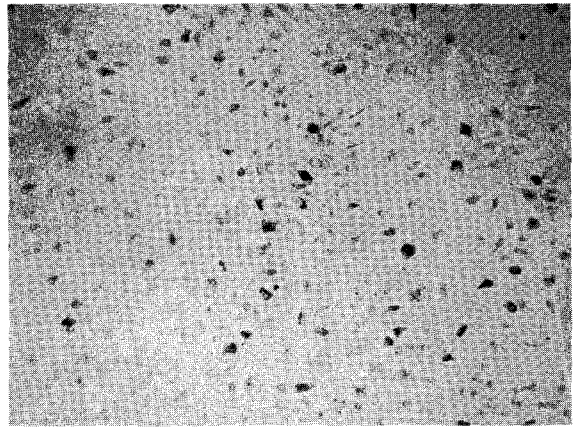


Fig. 26.

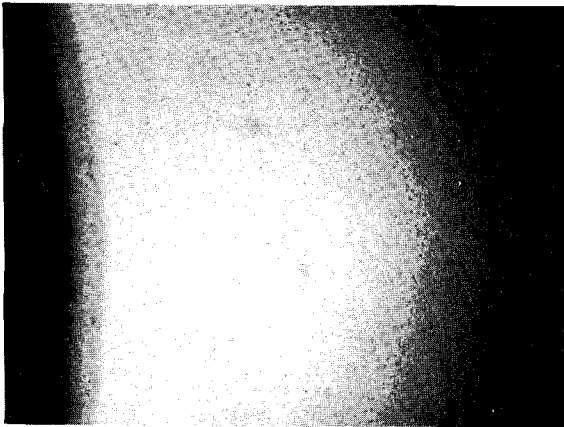


Fig. 27.

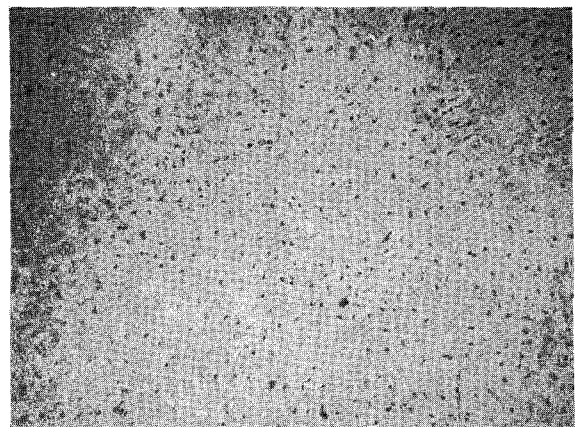


Fig. 28.

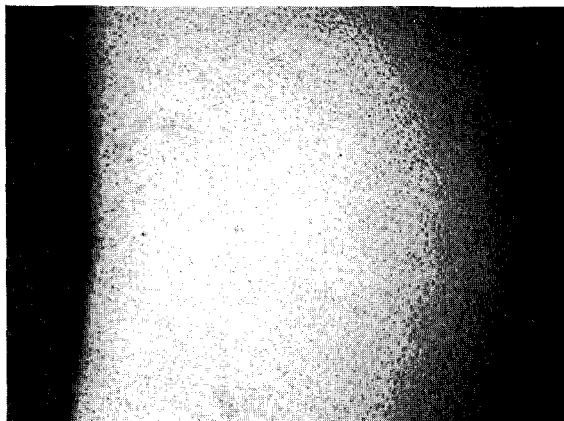


Fig. 29.

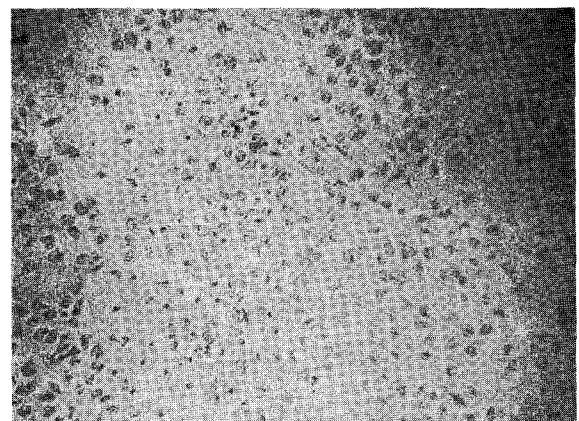


Fig. 30.

논문 사진부도 ⑥



Fig. 31.



Fig. 34.



Fig. 32.



Fig. 35.

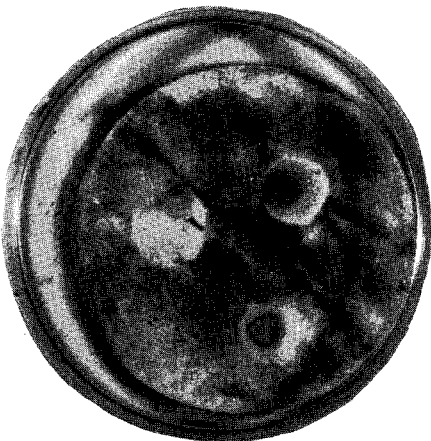


Fig. 33.



Fig. 36.

A STUDY OF THE CYTOTOXICITY OF ROOT CANAL SEALER IN VITRO

Sang-Tag Lee, D.D.S., Chung-Sik Lee, D.D.S., Ph.D.

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University

The purpose of this study was to evaluate the cytotoxicity of four root canal sealers (Tubliseal, AH26, Apatite Root Canal Sealer I, Apatite Root Canal Sealer II) in Vitro.

The root canal sealers were mixed and filled in molds which were 14×1.25 mm in diameter, in height to use for cell counting and agar overlayer method, and 7×1.25 mm for millipore filter method and set for 7 days to use for experiment. Silicone and copper plate were used for negative and positive control respectively.

Using the culture of L929 fibroblast, total cell number and vital cell number were counted and the ratio of vital cell number to total cell number was calculated on 2nd, 4th, 6th experimental day, and the change of cell membrane permeability was tested by agar overlay method, and the succinate dehydrogenase activity was tested by millipore filter method.

The obtained results were as follows.

1. In all experimental groups, the mitotic activity of fibroblast was reduced when compared with that of negative control group, so all experimental groups showed cytotoxicity.

Apatite Root Canal Sealer I group exhibited mild cytotoxicity, and Tubliseal, AH26, Apatite Root Canal Sealer II groups exhibited severe cytotoxicity.

2. In the test of the change of cell membrane permeability by agar overlay method, all experimental groups showed cytotoxicity. AH26 group exhibited mild cytotoxicity, and Apatite Root Canal Sealer I group exhibited moderate cytotoxicity, and Tubliseal and Apatite Root Canal Sealer II group exhibited severe cytotoxicity.

3. In the test of SDH activity by millipore filter method, there was no cytotoxicity in Apatite Root Canal Sealer I and Apatite Root Canal Sealer II group, but Tubliseal and AH26 group showed mild cytotoxicity.