

根管充填用 sealer 의 細胞毒性에 관한 研究

서울대학교 齒科大學 齒科保存學敎室

李昇鍾 · 金英海

目 次

- I. 緒 論
- II. 實驗材料 및 實驗方法
 - 가) 實驗材料
 - 나) 實驗方法
- III. 實驗成績
- IV. 總括 및 考案
- V. 結 論
 - 參考文獻
 - 寫眞附錄
 - 英文抄錄

I. 緒 論

根管充填用 sealer 는 “가타과차”와 같은 主充填物質이 根管內를 三次元的으로 密閉하지 못하는 空間이 있을때 이를 充填해 주는 매우 중요한 材料이다. 이러한 根管充填用 sealer 는 組織에 대한 親和力이 좋아야 하고 根管壁에 대한 接着力이 強해서 乖離되지 말아야 하며 硬化증이나 硬化후에 物理的인 體積變化나 組織液에 의한 溶解가 없어야 하며 根管內 適用이 簡便해야 하는 등의 要件을 갖추어야 한다.

지난 十數年동안 根管充填用 sealer 로는 酸化亞鉛丁香油 合劑(Zinc Oxide-Eugenol Paste, 이하 ZOE)를 主劑로 한 여러가지 製劑가 사용 되었다. ZOE sealer 는 깊은 窩洞에서 裹裝材로 사용될때 Prostaglandin 合成을 抑制하며¹⁾ 神經纖維 活性을 鈍化시킴으로써 鎮痛效果를 招來하고²⁾ 抗菌效果를 나타내며³⁾ 좋은 密閉效果를⁴⁾가지는 것으로 報告 되었다. 그러나 ZOE 製劑는 eugenol 成分에 의하여 細胞나 組織에 또한 많은 毒性을 나타내므로⁵⁻⁸⁾

裹裝材가 아닌 組織과 直接 接觸하는 根管充填用 sealer 로써의 使用에 많은 問題點이 提起되어왔다. 이러한 이유로 80年代 初期부터는 水酸化칼슘製劑의 根管充填用 sealer 가 開發되어 使用되고 있다.

水酸化칼슘은 처음에 깊은 窩洞 裹裝의 목적이나 露出된 齒髓의 覆罩에 사용되어 왔다. Brannstroem⁹⁾ 등은 齒髓에 가까운 깊은 窩洞에서는 裹裝材로써 ZOE 를 사용해서는 안되며 반드시 水酸化칼슘을 먼저 사용 하도록 勸하고 있다. 露出된 齒髓에 대한 水酸化칼슘의 效能에 대한 실험에서 여러 研究들은¹⁰⁻¹⁶⁾ 水酸化칼슘이 ZOE 보다 良質의 二次象牙質을 生成하였다고 報告 하고 있다.

이러한 水酸化칼슘의 作用을 Messer¹⁷⁾ 등과 Tagger⁶⁰⁾ 등은 높은 水素이온 濃度, 칼슘이온의 作用, 抗菌效果 및 DNA 合成의 促進등으로 說明하고 있다.

齒根端組織에 대한 水酸化칼슘의 影響에 관하여는 많은 研究¹⁸⁻²¹⁾가 있었는데 이 중 Holland 등¹⁸⁾은 水酸化칼슘 根管充填用 sealer 인 Sealapex 를 사용했을때 齒根端組織이 閉鎖되는것을 報告했으며 Pitt Ford 등은¹⁹⁾ 역시 Sealapex 를 ZOE 와 比較했을때 優秀한 齒根端의 反應을 보였다라고 報告 하고 있다. 특히 未完成齒根의 閉鎖에 있어서 Smith 등은²²⁻²³⁾ 水酸化칼슘이 다른 材料에 비하여 越等히 좋은 結果를 보였다라고 보고하고 있다. 그 외에도 水酸化칼슘은 齒根外壁의 吸收를 防止 하거나²⁴⁾ 齒根穿孔을 治癒하려는 목적으로²⁵⁾ 사용되고 있다.

Hydroxyapatite 나 calcium phosphate 가 根管充填劑로써의 關心을 끌게 된 것은 極히 最近의 일이다. Hydroxyapatite(이하 HA)는 元來 骨 缺損이나 破壞된 齒槽骨을 回復시키기 위하여 또 義齒 製作時 齒槽骨 높이가 너무 낮은 患者에서 義齒床을 좋

* 본 研究는 1990年度 서울대학교病院 特診研究費의 一部 補助로 이루어졌음.

개하기 위한 齒槽骨 隆起의 목적으로 사용되기 시작하였다²⁶⁻²⁸⁾. Smith²⁹⁾에 의하여 骨 代替物로써 처음 사용된 이래 HA는 強한 壓縮強度와 變質되지 않는 性質 및 體內에서 分解消失되지 않고 結體組織이나 筋肉組織과 직접 附着할 수 있는 등 骨組織과 類似한 性質을 가지고 있으며 免疫學的으로 拒否反應이나 炎症을 惹起하지 않는 등의 理由로³⁰⁾ 臨床에서 많이 試圖되어 왔다. 破壞된 齒槽骨을 回復시키기 위하여 純粹한 HA를 사용한 후 6個月, 1年, 및 3年 동안 觀察한 人體實驗에서 Yukna³¹⁻³³⁾ 등은 HA를 사용한 群이 아무것도 사용하지 않은 對照群에 比하여 優秀한 齒槽骨 治癒效果를 보였으며 HA는 3年の 調査에서 安定된 狀態를 보였음을 보고 하였다. Froum³⁴⁾ Sapkos³⁵⁾ 등은 8個月에 걸친 人體實驗에서 HA는 齒槽骨 治癒에 있어서 거의 炎症反應을 보이지 않았고 組織親和力이 좋았다고 보고 하였다.

Moskow 등은³⁶⁾ 缺損 齒槽骨에 插入된 HA가 結體組織에 의하여 破壞되며 骨組織의 再生과 함께 隣接 齒根部位에 白聖質의 形成이 併發되는 것을 觀察 하였다.

多孔성과 緻密性 HA를 比較한 實驗에서 金³⁷⁾ 및 Kenney³⁸⁾ 등은 多孔性 HA 周圍에 더욱 良好한 新生骨組織의 形成이 일어났음을 報告하였고 Roane 등³⁹⁾은 穿孔된 齒根을 아말감으로 充填한 후 破壞된 骨組織을 HA를 利用해 治療한 후 21個月 間 觀察했을 때 放射線像으로나 臨床적으로 良好한 結果를 報告 하였다. 그러나 이러한 HA는 根管充填用 sealer로 使用할 때 粒子가 너무 굵고 硬化되지 않으며 過充填된 材料가 吸收되지 않는 등의 問題를 가지고 있다. 이러한 HA의 短點을 補完하기 爲하여 最近에는 calcium phosphate 製劑의 根管充填用 sealer의 使用이 試圖되고 있다.

Tri-calcium Phosphate(이하 TCP)는 粒子가 約 2-20 μ m 程度의 크기로 $Ca_3(PO_4)_2$ 의 構造를 가지고 있는 結晶體이다. Shoji⁴⁰⁾와 Brown⁴¹⁾ 등에 의하면 TCP 粉末을 23% Lactic acid polymer, 6% Glycolic acid 및 蒸溜水와 混合 했을 때 X-線 回折檢査에서 數分內로 HA로 變換하는 것을 觀察하였다. 混合된 sealer는 37°C에서 8분만에 硬化되었고 完全硬化後의 壓縮強度는 Brown이 4,500 psi, Shoji는 硬化始作 1時間後 230kg/cm²이 되었다고 보고 하였다. TCP의 HA에 대한 長點은 前述한 대로 硬化가

可能하다는 點 外에 組織에 의하여 吸收되면서 正常的인 骨組織으로 置換될 수 있다는 데에 있다.

Getter 등은⁴²⁾ 여러 種類의 calcium phosphate를 白鼠의 骨內에 埋植했을 때 서서히 吸收되면서 新生骨로 治癒되는 모습을 觀察하였고 Cutright 등⁴³⁾도 역시 TCP가 組織 內에서 炎症反應 없이 잘 收容되었으며 48日間의 觀察에서 約 95%의 TCP가 分解吸收되었음을 보고 하였다. Barney 등도⁴⁴⁾ 缺損된 齒槽骨에 HA와 TCP를 各各 사용했을 때 TCP에서 더욱 빠른 治癒를 보였으며 巨大細胞에 의하여 吸收되어 新生骨에 合併되는 것을 보고 하였다.

Gruninger 등은⁴⁵⁾ 硬化 TCP sealer의 細胞 및 組織에 대한 反應을 보기 위하여 人間 赤血球와 guinea pig의 皮膚를 사용한 결과 硬化 TCP sealer는 毒性이나 遺傳因子의 變異를 招來하지 않았으며 guinea pig 皮膚下 組織에도 별다른 副作用이 없었다고 보고 하고 있다.

露出된 齒髓에 대한 反應에서 Jean 등은⁴⁶⁾ 50%의 TCP와 50%의 HA 混合劑가 TCP만 사용하거나 水酸化칼슘을 사용했을 때 보다 優秀한 反應을 나타냈다고 보고 하였다. 二次象牙質에 의한 治癒에 있어서 50% TCP와 50% HA 混合劑는 다른 實驗群보다 더 빠른 二次象牙質 形成能力을 보였고 質의인 面에서도 均一하게 良質의 象牙細管이 TCP에 接觸된 面에서 生成 되었음을 觀察 하였다. 切斷된 齒髓에 대한 實驗에서 梁은⁴⁷⁾ TCP, HA 모두에서 二次象牙質의 形成을 볼 수 없었으나 TCP 實驗群이 HA 보다는 殘存齒髓의 炎症反應이 적었으며 시간이 지나면서 石灰化構造物 形成이 있었음을 觀察하였다.

穿孔齒根 周圍의 齒髓組織에 대한 TCP의 影響에 관한 動物實驗에서 Himel 등은⁴⁸⁾ 水酸化칼슘 및 Teflon disc와 比較했을 때 TCP에서 優秀한 組織의 反應을 보였고 水酸化칼슘 實驗群에서 가장 많은 骨破壞가 있었음을 보고 하였다.

齒根端組織에 대한 研究에서 Choheyeb 등은⁴⁹⁾ TCP sealer가 根管用 sealer로써 適合하다는 것을 보고한 바 있고 崔⁵⁰⁾ 역시 根管充填用 sealer로 TCP와 Vitapex(水酸化칼슘 製劑)를 사용 했을 때 TCP 實驗群에서 보다 많은 骨 增殖을 보였음을 보고 하였다.

Calcium phosphate의 根管充填用 sealer로써의

密閉 효과를 調査하기 위하여 Krell⁵¹⁾ 등은 拔去된 齒牙에서 硬化 TCP sealer 와 Grossman Sealer(ZOE 製劑)를 充填한 후 1日, 1週, 및 7週만에 走査 電子顯微鏡 下에서 比較 하였을 때 齒根端 閉鎖, 象牙細管 閉鎖, 癒着, 粘着 및 形態의 으로 別다른 差異가 없는 것으로 報告하였다. 한편, 같은 材料를 사용하여 1% methylene blue 에 2週間 保管하여 切斷한 후 色素의 浸透를 보았을 때 TCP sealer 에서 有意할만한 色素浸透가 있었음을 觀察하였다. 그러나 그들은 이러한 結果가 TCP 自體의 吸濕性에 의한 것으로 臨床에서 根管充填用 sealer 로 使用 하는데는 支障이 없다는 意見을 表示하였다⁵²⁾. Sugawara⁵³⁾ 등도 calcium phosphate 와 Grossman Sealer 를 같은 方法으로 充填한 후 蒸溜水와 色素에 各 1週日씩 沈澱시켜 觀察한 結果 calcium phosphate 에서 훨씬 良好한 齒根端密閉를 보였고 이러한 密閉 효과를 左右 하는데는 粒子의 크기, 粉末對 溶液의 比率, 및 色素에 넣기전 的 硬化程度 등이 關與 된다고 提示하고 있다.

이상과 같이 根管充填 HA · TCP sealer 에 대한 物理的인 實驗과 動物 및 人體에 대한 研究는 廣範圍하게 遂行되어왔으나 培養된 細胞 上에서 毒性이나 細胞에 대한 影響을 調査한 研究는 거의 없다. 따라서 본 실험은 商品으로 開發된 TCP · HA 混合根管充填 sealer 의 細胞에 대한 影響을 培養된 細胞 上에서 水酸化칼슘 製劑 및 ZOE 製劑의 根管充填 sealer 와 比較하기 爲하여 施行 되었다.

II. 實驗材料 및 方法

가) 實驗材料

根管充填用 sealer :

sealer 는 다음의 4가지 種類를 使用 하였다.

1. Apatite Root Sealer I

Hydroxyapatite 와 Tricalcium phosphate 의 混合劑 Sankin 社, 日本

2. Apatite Root Sealer II

Apatite Root Sealer I 成分에 30% Iodine 添加

Sankin 社, 日本

3. Sealapex

水酸化칼슘 製劑

Kerr Co., USA

4. Roth Sealer

Lee Pharmaceutical Co., USA

sealer 抽出液 分離 :

4 種의 根管充填用 sealer 를 各各 製造會社의 指示대로 1gm 内外가 되도록 混合하여 細胞培養用 plate(12-well plate)에 넣고 (Fig 2) 즉시 1.5cc 의 蒸溜水를 添加하여 24時間 동안 37°C 組織培養器에 保管한 후 上層部 溶液을 收去 遠心分離하여 實驗溶液으로 使用 하였다. 微生物 濾過를 위하여 0.3μ 直徑의 濾過器에서 濾過한 후 培養液과 混合하여 1/2, 1/4, 및 1/8 稀釋液을 만들었다. 이때 原來의 抽出液이 蒸溜水인 點을 勘案해서 正常濃度보다 2培로 濃縮된 培養液과 同量의 抽出液을 混合함으로써 抽出溶液의 1/2稀釋을 만들고 여기에서 다시 1/4 및 1/8稀釋液을 만들었다.

細胞의 準備 및 反應度 檢定 :

實驗에 使用된 細胞는 c3H/An 마우스에서 分離된 L929纖維芽細胞로써 延世大學校 微生物學教室에서 繼代培養되고 있는 것을 使用하였다. 細胞는 10% 牛胎兒血清, 100 units/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin, 0.2ug/ml fungizone 이 含有된 MEM 培地에서 75cm² 培養플라스크를 使用하여 培養하였다.

細胞에 대한 影響은 MTT (Methyl-Thiazole-Tetrazolium Bromide) 檢定法을 利用하여 測定하였다. MTT 檢定法은 1983년 Mosmann⁵⁴⁾에 의해 開發된 것으로 살아있는 細胞의 mitochondrial dehydrogenase 에 의해 MTT가 還元되어 靑色の formazan 結晶을 形成하는 것을 利用한 方法으로 여기에 溶解劑를 넣고 分光分析機로 吸光度를 測定하여 間接的으로 細胞의 活性度를 判斷하는 方法이다. 이 方法은 細胞毒性, 細胞增殖 및 細胞의 活性度 등을 測定할 수 있으며 短期間내에 많은 量을 機械를 利用하여 處理할 수 있고 半自動的으로 結果를 分析할 수 있는 등의 長點이 있다.

우선 細胞의 增殖速度를 알아보기 爲하여 培養된 細胞를 0.05% Trypsin-EDTA 로 37°C에서 5분間 處理하여 洗滌한 後 10% 牛胎兒血清, 100units/ml penicillin, 100ug/ml streptomycin, 0.2ul/ml fungizone 이 含有된 MEM 培地에 2ml當 2,500, 5,000, 10,000, 15,000, 20,000 및 30,000 개씩의 細胞가 되도록 맞춘 후 이 細胞 浮遊液을 96 well-culture

Data from "Growth curve of L 929"

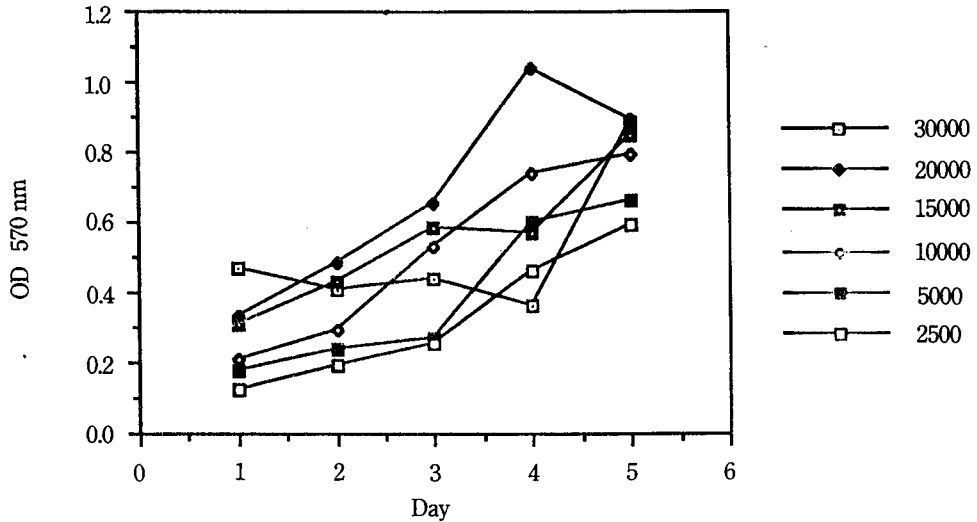


plate (Costar, Cambridge, MA)에 분株하여 37°C 5% CO₂ 恒溫器에서 5日間 培養하면서 매일 MTT 檢定을 實施하여 細胞增殖의 程度를 測定하였다. 이 中 3日까지 比例成長을 보인 15,000 개를 實驗에 사용 하였다(Fig 1).

나) 實驗方法 :

實驗 1 : sealer 間의 毒性 比較

4 種의 根管充填用 sealer 를 3개의 다른 濃度 即 1/2, 1/4, 및 1/8 稀釋에서 比較 하였다. 細胞는 豫備實驗에서 等比의 成長을 보인 15,000 개를 0.2 ml의 培養液에 浮遊시켜 96-well plate 에 分株하고 (Fig 3) 各各의 sealer 에서 分離 稀釋된 抽出液을 1.8ml 씩 細胞分株된 well 에 添加한 後 37°C 培養器에서 24時間 동안 培養하였다.

培養이 끝난後 磷酸生理食鹽水에 溶解한 MTT 溶液(Sigma 社, St. Louis, USA, 1mg/ml) 50μl 를 各 well 에 넣고 4時間동안 培養한 後 MTT 溶液을 버리고 formazan 結晶을 溶解시키기 爲하여 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)를 50μl 씩 添加하였다. Plate 를 잘 흔든 後 ELIZA READER (Bio-tek Instruments, Inc., Model EL 308)로 570nm 에서 吸光度를 測定 하였다. 對照群을 爲해 每 實驗마다 4個씩 實驗 溶液이 들어있지 않은 MEM 培養液 well(control)을 包含 시켰다. 모든 實驗結果는 對照群에 대한 百分率로 計算 하였다.

$$\text{細胞 活性度 (\%)} = \frac{\text{實驗 well 的 吸光度}}{\text{對照 well 的 吸光度}} \times 100$$

實驗 well 의 數는 各 郡當 12個씩으로 하였고 統計處理를 爲하여 Mann-Whitney U test 를 施行하였다.

實驗 2 : 各 sealer 內 抽出液 稀釋 間의 比較

混合된 根管充填用 sealer 가 齒根端組織과 接觸하는데 있어서 齒根端으로 부터 가까운 部位와 멀리 떨어진 部位와는 sealer 遊離成分의 濃度가 달라질 것이고 이러한 濃度差異에 따라 組織의 反應도 다르게 될 것이다. 이러한 sealer 抽出液의 濃度差에 따른 細胞의 反應을 調査하기 爲하여 實驗 1에서 얻어진 結果를 各 sealer 別로 세가지 다른 濃度 즉 1/2, 1/4, 및 1/8 稀釋에서 比較하였다.

實驗 3 : sealer 硬化時間에 따른 差異 比較

根管充填용 sealer 는 齒根端組織과 接觸할 때 時間이 經過함에 따라 硬化된다. 이러한 sealer 의 硬化가 齒根端組織에 어떻게 影響을 미치는지 알아보기 爲하여 세가지 다른 硬化時間 即 混合後 即時, 混合後 1日 및 7日을 使用하여 比較하였다.

抽出物 分離는 實驗 1에서와 같고 단지 混合된 sealer 에 蒸溜水를 添加하는 時間을 1日後 및 7日後로 달리 하여 모든 稀釋群에서 施行 하였다.

實驗 4 : 培養時間 間的 比較

sealer 抽出液이 細胞와 接觸할 때 接觸하는 時間經過가 細胞에 대하여 어떻게 作用하는지를 調査하기 위하여 각 稀釋群에서 3日 培養한 結果를 1日 培養群과 比較하였다.

I. 實驗成績

實驗 1 : sealer 間的 毒性 比較

四種의 根管充塡用 sealer Apatite I, Apatite II, Sealapex, 및 Roth sealer 를 각각 1/2, 1/4, 및 1/8 稀釋群에서 比較하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

먼저 1/2 稀釋群 內的 比較는 다음과 같다(Table 1).

Apatite I 과 II 는 對照群과 比較할 때 各各 45.6% 및 47%의 細胞活性을 보였고 (Fig 4) Sealapex 와 Roth sealer 는 各各 12.19%, 12.58%로 낮은 細胞의 活性度를 보였다(Fig 5,6). Apatite I 과 Apatite II 사이 또 Sealapex 와 Roth 사이에는 統計的인 有意差가 없었으며 두개의 Apatite 群과 Sealapex, Roth 사이에는 各各 有意差가 있었다.

1/4 稀釋에서는 역시 Apatite I 과 Apatite II 에서 各各 66.2%, 70.0%로 良好한 細胞活性을 보였으며 Sealapex 는 39.6%로 Roth 의 19.0%에 비해 有意할 만한 差異를 보였다. Apatite I 과 II 사이에는 역시 有意差가 없었으며 1/2 稀釋群과 마찬가지로 두개의 Apatite I, II 群과 두개의 Sealapex, Roth 群 사이에 各各의 有意差가 있었다.

1/8 稀釋群에서는 Apatite I 77.5%, Apatite II 85.9 %의 比較的 높은 細胞의 活性을 보였으며(fig 7) Sealapex 에서는 64.9%로 Apatite I 및 II 와 有意差가 없었다.

Roth sealer 는 여전히 49.9%의 낮은 數值로 Apatite I, II, 및 Sealapex 등 다른 根管充塡用 sealer 와 比較할 때 統計學的으로 有意할 程度의 差異를 보였다.

實驗 2 : 各 sealer 內 抽出液 稀釋 間的 比較

sealer 로 부터 遊離되는 成分의 程度에 따른 組織의 反應을 推定하기 위하여 各各의 sealer 內에서 다른 稀釋 即 1/2, 1/4, 및 1/8 稀釋 間的 差異를 24時間 培養에서 觀察 하였다.

一般的으로 4 個群 모두에서 稀釋이 弱해질 수록 높은 細胞의 活性度를 보였다(Table 2).

統計的인 有意差는 Apatite I 및 II 에서 1/2 稀釋 群이 다른 稀釋群에 比하여 뚜렷 했지만 1/4 과 1/8 稀釋群 사이에는 意味가 없었다.

Sealapex 群에서는 1/2, 1/4, 및 1/8 서로간에 모두 有意差가 있었으며 Roth 群에서는 1/2 과 1/4 모두에서 細胞活性이 낮았고 1/8 稀釋에서만 有意하게 活性度가 上昇된 것을 보였다.

實驗 3 : sealer 硬化時間에 따른 差異

硬化가 進行되면서 組織에 미치는 影響을 推定하기 위하여 4 種의 各 根管充塡用 sealer 를 세가지 다른 硬化時間 即 混合後即時, 1日, 및 7日 硬化에서 比較 하였다. 모든 比較는 各 稀釋間에서 施行되었다(Table 3).

Apatite I 에서는 硬化時間이 經過됨에 따라 細胞活性이 有意할 만큼 增加되었고 Apatite II 에서는 1/2 稀釋 1日 및 7日 硬化와 1/4 稀釋 7日 硬化에서 多少 活性度가 떨어지는 것을 보였으나 統計的인 有意差는 없었다. Sealapex 는 即時硬化에서 낮은 細胞活性을 보였고 Roth sealer 에서는 即時 및 1日

(Table 1) <Comparison of Root Canal Sealers>

Dilution \ Sealer	Apatite I	Apatite II	Sealapex	Roth
1/2	* 45.6 ± 4.1	* 47.0 ± 18.9	@ 12.2 ± 4.5	@ 12.6 ± 1.5
1/4	* 66.2 ± 3.8	* 7.0 ± 3.0	# 39.6 ± 2.6	@ 19.0 ± 3.2
1/8	* 77.5 ± 4.3	* 85.9 ± 9.9	* 64.9 ± 2.7	@ 36.0 ± 4.0

Average ± SE

In each dilution, identical symbols (*, @, #) between the sealers show no statistical difference. (p=0.05 level)

(Table 2) <Comparison of dilutions>

Dilution \ Sealer	1/2	1/4	1/8
Apatite I	@ 45.6 ± 4.1	* 66.2 ± 3.8	* 77.5 ± 4.3
Apatite II	@ 47.0 ± 18.9	* 70.0 ± 3.0	* 85.9 ± 9.9
sealapex	@ 12.2 ± 4.5	# 39.6 ± 2.6	* 64.9 ± 2.7
Roth	@ 12.6 ± 1.5	@ 19.0 ± 3.2	* 36.0 ± 4.0

Average ± SE

In each dilution, identical symbols (*, @, #) between the sealers show no statistical difference. (p=0.05 level)

(Table 3) Comparison of Setting Time

(Table 3-1) <1/2 Dilution>

Setting Time \ Sealer	Immediate	1 day	7 days
Apatite I	@ 45.6 ± 4.1	* 66.1 ± 9.2	* 57.4 ± 5.6
Apatite II	47.0 ± 18.9	32.2 ± 1.5	36.7 ± 1.4
sealapex	@ 12.2 ± 4.5	* 17.2 ± 4.3	* 18.1 ± 4.0
Roth	@ 12.6 ± 1.5	@ 13.0 ± 2.1	* 20.0 ± 5.0

(Table 3-2) <1/4 Dilution>

Setting Time \ Sealer	Immediate	1 day	7 days
Apatite I	@ 66.2 ± 3.8	* 78.3 ± 2.8	* 81.9 ± 3.6
Apatite II	@ 70.0 ± 3.0	80.7 ± 5.6	62.5 ± 5.1
sealapex	@ 39.6 ± 2.6	* 50.8 ± 3.9	* 54.2 ± 1.9
Roth	@ 19.0 ± 3.2	@ 14.3 ± 0.7	* 22.5 ± 2.2

(Table 3-3) <1/8 Dilution>

Setting Time \ Sealer	Immediate	1 day	7 days
Apatite I	@ 77.5 ± 4.3	* 95.4 ± 6.0	* 87.0 ± 7.3
Apatite II	85.9 ± 9.9	82.5 ± 7.9	81.4 ± 10.4
sealapex	@ 64.9 ± 2.7	@ 70.3 ± 2.4	* 80.0 ± 4.0
Roth	@ 36.0 ± 4.0	* 49.9 ± 6.1	* 52.7 ± 8.6

Average ± SE

In each dilution, identical symbols (*, @, #) between the sealers show no statistical difference. (p=0.05 level)

硬化에서 7日硬化와 比較할 때 有意할 만한 差異를 보였다.

實驗 4: 培養時間 間的 比較

細胞를 抽出液과 接觸 시킨후 培養시킨 時間에 따른 差異가 있는지를 조사하기 위하여 各各의 sea-

ler를 各 稀釋群에서 比較 하였다.

Apatite I 및 II 群에서는 1/4 및 1/8 稀釋에서 培養時間이 增加함에 따라 높은 細胞活性을 보였으나 1/2 稀釋에서는 오히려 活性이 抑制되는 것을 보였다(Table 4).

(Table 4) Comparison of Culture Periods

(Table 4-1) <1/2 Dilution>

Sealer \ Period	1 day	3 days
Apatite I	* 45.6 ± 4.1	@ 31.6 ± 5.7
Apatite II	* 47.0 ± 18.9	@ 27.3 ± 3.6
Sealapex	12.2 ± 4.5	5.5 ± 2.8
Roth	12.6 ± 1.5	8.9 ± 2.3

(Table 4-2) <1/4 Dilution>

Sealer \ Period	1 day	3 days
Apatite I	@ 66.2 ± 3.8	* 83.5 ± 4.6
Apatite II	70.0 ± 3.0	77.2 ± 5.6
Sealapex	* 39.6 ± 2.6	@ 8.7 ± 2.8
Roth	* 19.0 ± 3.2	@ 6.8 ± 1.9

(Table 4-3) <1/8 Dilution>

Sealer \ Period	1 day	3 days
Apatite I	@ 77.5 ± 4.3	* 101.9 ± 7.4
Apatite II	85.9 ± 9.9	99.0 ± 8.2
Sealapex	* 64.9 ± 2.7	@ 38.4 ± 7.1
Roth	36.0 ± 4.0	27.1 ± 2.6

Average ± SE

In each dilution, identical symbols (*, @, #) between the sealers show no statistical difference. (p=0.05 level)

Sealapex는 1/2 희釋에서 모두 細胞活性이 抑制 되었으나 1/4 및 1/8 희釋에서는 3日間 培養에서 顯著히 活性度가 떨어지는 結果를 보였다. Roth sealer는 培養時間이 길어짐에 따라 活性度가 떨어지는 傾向을 보였는데 이는 1/4 희釋에서 顯著히 나타났다.

IV. 總括 및 考案

Apatite 實驗群은 水酸化칼슘 製劑인 Sealapex 나 ZOE製劑인 Roth sealer 보다 細胞에 대한 毒性이 적은 것으로 나타났다. 특히 Roth는 Apatite 群과 比較할 때 큰 細胞毒性을 보였고 이는 모든 희釋

群에서 同一하게 나타났다. Sealapex는 희釋이 됨에 따라 細胞에 대한 毒性이 줄어드는 것을 보였고 1/8 희釋群에서는 Apatite 군과 統計的인 有意差가 없었다(p=0.453). 이러한 材料間의 差異는 材料自體의 毒性과 pH 때문에 推測된다.

一般的으로 HA와 TCP는 組織에 대한 毒性이 거의 없는 것으로 報告되고 있다^{30-33, 42-45}. 이것은 多分히 材料自體가 가지는 不活性度에 基因한 것으로 HA는 組織 內에서 거의 吸收되지 않거나 서서히 吸收되는 것으로 알려져 있다⁴⁰. 이에 比較하여 TCP는 8-16週 以內에 巨大細胞에 의해 吸收되거나 新生骨形成에 併合되는 것으로 觀察되었고 이러한 吸收性 때문에 HA보다 異物反應이 적고 優秀한 骨 治癒效果를 보인다고 報告되고 있다^{42, 44}.

本 實驗에서는 HA와 TCP가 混合된 形態의 製品화된 sealer를 사용 했는데 이는 HA의 不活不變性和 TCP에 의한 硬化效果를 함께 얻기 위함이다. 이러한 HA-TCP 混合劑는 Jean等⁴⁶에 의해 動物齒牙에서 齒牙覆罩物로 사용된 바 있는데 다른 TCP sealer나 水酸化칼슘에 比較하여 優秀한 二次象牙質形成을 보여 本 實驗과 一致 하였다.

Apatite I과 II 사이에는 별 差異가 없었고 이는 Apatite II에 含有된 Iodine 成分이 24時間 培養에서 細胞의 活性에 影響을 미치지 않았기 때문으로 思料된다.

Sealapex 群에서는 Apatite 群과 比較할 때 顯著히 細胞活性이 줄어든 것을 볼 수 있었고 이는 아마도 Sealapex의 높은 pH 때문이 아닌가 推測된다. 抽出液을 濾過한 후 測定한 pH를 보아도 Sealapex에서는 다른 sealer 군과 比較할 때 越等히 pH가 높은 것을 볼 수 있다(Table 5).

(Table 5) <pH>

Sealer \ Time	Immediate	1 day	7 days
Apatite I	6.25	6.22	6.00
Apatite II	5.91	6.17	5.96
Sealapex	10.11	8.66	8.17
Roth	8.42	7.90	8.15

이러한 높은 pH는 細胞와 直接 接觸할 때 細胞膜에 作用하여 細胞의 活性을 低下시킬 수 있다.

Torneck⁵⁵⁾에 의하면 水酸化칼슘의 作用機轉으로 칼슘이온이 細胞内の adenosine triphosphatase 作用을 增進시키고 DNA 合成을 促進하는가 하면 OH⁻이온에 의해 周圍組織의 pH가 上昇되는 등을 들고 있고 이때 水酸化칼슘의 適切な 濃도가 매우 重要하다고 하였다. 그는 培養細胞를 利用한 實驗中 두가지 다른 濃度上에서 DNA가 合成되는 率을 觀察하였고 0.25ml 濃度에서는 對照群보다 높은 合成을 보인 反面 0.5ml 濃度에서는 오히려 活性度가 低下되는 것을 觀察하였다.

Gordon 等⁵⁶⁾도 pH가 12로 올라갈 때 pH 10.2나 正常보다 lactic dehydrogenase 및 alkaline phosphatase 등의 酵素活性이 顯著히 낮아지는 것으로 이를 뒷바침 하고 있다. 本 實驗에서도 稀釋이 됨에 따라 細胞活性이 增加되는 것을 보였으나 對照群보다 더 높은 數値를 보이지는 못하는 것으로 보아 이것이 낮은 濃度の 水酸化칼슘에 의한 促進作用이라기 보다는 단지 抽出液이 域值以下로 稀釋되었던 結果로 보는것이 妥當할 것 같다. 著者は 豫備實驗을 하는 過程에서 Sealapex 抽出物을 1/16까지 稀釋한 結果 對照群과 거의 비슷한 程度의 細胞活性을 觀察한 바 있다. 그러나 Roth를 除外한 다른 群에서도 비슷한 結果를 얻은것으로 보아 위의 結果는 단지 1/16稀釋이라는 낮은 濃도가 細胞에 대하여 影響을 주지 못할 程度의 弱한 稀釋때문이었던 것으로 思料된다.

生體實驗에서는 一般的으로 높은 pH가 組織에 대하여 良好한 反應을 나타낸 것으로 報告되고 있다^{12, 16, 17, 22, 24)}. Tagger 등¹⁶⁾은 pH 10-11의 Life와 pH 7의 Reolit를 露出된 齒髓에서 比較하였을때 Life에서 越等히 優秀한 二次象牙質形成을 보였으며 이는 多分히 Life의 높은 pH에서 起因되었다고 主張하고 있다. 그러나 Hanks⁵⁷⁾와 Patterson¹⁴⁾등은 商品화된 水酸化칼슘 製劑의 sealer에 包含된 다른 物質 即 catalyst, mineral oil, 및 resin 등이 組織에 대하여 炎症反應을 惹起한다고 主張하였고 Zmener²⁰⁾等은 動物實驗에서 Sealapex 周圍에 噴食作用이 크게 일어나는 것을 確認 하였으며 이는 Sealapex 내의 titanium dioxide 粒子 때문인 것으로 생각된다.

Messer¹⁷⁾와 Fairbourn 等은⁵⁸⁾ 水酸化칼슘의 抗菌 效果와 接觸된 組織의 壞死가 二次象牙質形成에 있어서 促進劑 役割을 한다고 報告하고 있어 培

養細胞에 關한 強한 毒性이 반드시 生體에서 바람직 하지 못한 結果를 招來한다고 볼수는 없겠다⁵⁹⁾. Roth sealer에서는 豫測 대로 상당한 細胞의 毒性을 보였다. 이는 주로 Roth sealer의 높은 溶解性과 이에 따른 eugenol 成分의 遊離에서 起因되는 것으로 思料된다⁶²⁾. Eugenol은 象牙質 위에 使用될 때 象牙細管을 통하여 齒髓內로 徐徐히 浸透되어 prostaglandin 合成을 抑制하고¹⁾ 知覺神經興奮을 抑制함으로써 鎮痛效果를 가져오고²⁾ 또한 抗菌作用을 가지고 있기 때문에³⁾ 窩洞裏裝劑으로써 重要한 役割을 하고 있다. 그러나 濕한 組織과 接觸하게 되면 eugenol의 遊離는 훨씬 빨라지게 되어 細胞를 損傷시킬 充分한 濃도를 가지게 된다^{4, 6)}. Meryon⁵⁾도 培養細胞를 ZOE와 直接 接觸시켰을때 象牙質 細片에 의해 分離시켜 接觸시킨 實驗群에 比하여 有意할 程度의 細胞毒性을 보였음을 報告하고 있다. pH測定의 結果를 보면 (Table 5) Roth sealer의 pH는 平均 8.2 内外로 Roth의 毒性은 遊離된 eugenol에서 起因된 것으로 思料된다.

根管充填用 sealer가 어느 程度의 範圍로 齒根 端組織에 影響을 미치는가를 알아보기 위하여 抽出液을 세가지 다른 稀釋 1/2, 1/4, 및 1/8에서 比較해 보았다. 물론 이러한 稀釋이 곧 生體 내에서의 距離를 바로 意味하지는 않지만 sealer의 毒性範圍를 間接적으로 比較 推定하기 爲함이었다.

Apatite I, II는 1/2 稀釋에서만 細胞의 抑制가 觀察되었고 이는 1/4 및 1/8 稀釋과 比較할 때 有意差가 있었다(p<0.05). 即 高濃度인 1/2 稀釋에서만 細胞에 影響이 있었는데 이는 Apatite sealer의 細胞에 대한 影響이 sealer와 直接 接觸하는 가까운 齒根端組織에 限定된다는 推定을 可能하게 한다.

Sealapex 群에서는 1/2, 1/4, 및 1/8 稀釋의 모든 群 사이에 有意差가 있었으며 이는 Apatite 群과 比較할 때 어느 程度의 距離까지는 一定한 比率로 組織에 대하여 影響을 줄 수 있다는 것을 意味 하지만 1/8稀釋에서 이미 Apatite 群과 有意差가 없었던것으로 미루어 影響의 範圍는 그다지 크지 않을 것으로 思料된다.

Roth sealer는 1/2, 1/4, 및 1/8 稀釋 모두에서 組織活性의 抑制를 보였고 1/8 稀釋에서 多少 細胞活性이 回復 되기는 하였으나 다른 sealer와 比較할 때 有意差가 있는것으로 보아 齒根端으로부터 상당한 距離까지 影響을 미치는 것으로 이는 Mer-

yon⁵⁾의 實驗報告와도 一致한다.

根管充填用 sealer 는 時間이 經過하면서 硬化가 進行되고 齒根端組織에 대한 影響 또한 달라지게 된다. 本實驗에서는 硬化時間을 混合 即時, 1日 硬化, 및 7日 硬化로 나누어 比較해 보았는데 Apatite I에서는 豫測한 바와 같이 混合 即時群에서 1日 및 7日 硬化群보다 낮은 細胞活性을 보여 TCP와 미처 反應하지 못한 lactic acid polymer와 glycolic acid 成分이 遊離되어 細胞에 影響을 미쳤으리라 推測된다.

Apatite II에서는 그러나 混合 即時와 硬化後 間에 有意差가 없었고 特히 1/2 稀釋群에서는 Apatite I 群에 比해서 全般的으로 낮은 活性度를 보이며 이는 Apatite II內的 iodine 成分이 繼續 遊離 됨으로써 影響을 미치지 않았는가 推測된다.

Sealapex에서도 역시 混合 即時群에서 낮은 細胞活性을 보였다. Tagger⁶¹⁾와 Caicedo⁶¹⁾ 등은 根管 充填 sealer 에 대한 流動學的 實驗에서 Sealapex가 다른 sealer 에 비하여 吸濕性이 強하여 蒸溜水에 分解 시켰을때 두 時間 만에 各各 最高置의 Ca^{++} 과 OH^{-} 이온이 遊離되었던 것을 觀察하였다. Sealapex의 pH를 보면 (Table 5) 混合 即時가 10.11로 硬化後인 8.66 및 8.17 보다 훨씬 높은 數値를 보여 混合 即時群의 細胞에 대한 抑制는 높은 pH 때문이라는 것을 알 수 있다.

Roth에서는 全般的으로 낮은 細胞活性을 보였고 이는 前述한 바와 같이 eugenol의 影響에 의한 것으로 생각된다. 이러한 抑制效果는 特히 1/2과 1/4 稀釋群에서 뚜렷했으며 混合 即時群에서 다른 硬化時間群과 比較할 때 有意할 만한 抑制를 보여 ZOE sealer 는 混合後 적어도 하루까지는 상당한 毒性을 發揮하는 것으로 思料된다.

抽出液이 細胞에 미치는 長期的인 影響을 알아보기 위하여 모든 群에서 3日間 培養한 成績을 보면 1/2 稀釋을 除外한 Apatite I, II에서는 時間이 經過함에 따라 더 많은 細胞의 活性을 나타내었고 Sealapex와 Roth에서는 全般的으로 活性度가 顯著히 떨어지는 것을 볼 수 있었다. 特히 1/4 및 1/8 희석 Apatite I에서는 細胞活性의 增加가 有意할 程度로 나타났으나($p=0.012$) 增加의 幅이 對照群보다 높지는 못한 것으로 미루어 Apatite sealer 에 의해 細胞活性이 더욱 亢進되었다고 보기는 힘들것 같다. 또한 Apatite I, II 모두 1/2 稀釋에서는 3日間

培養에서 顯著히 낮은 細胞活性을 보여 역시 Apatite sealer 도 가까운 部位에서는 細胞活性을 抑制하는 것을 알 수 있다.

Sealapex 나 Roth 에 있어서 培養時間이 經過함에 따라 活性度가 떨어지는 것은 材料自體가 가지는 毒性이 3日 동안 繼續해서 細胞에 作用 했기 때문인 것으로 即, 첫 하루 동안은 어느 程度 견딜수 있었던 細胞들이 3日間 培養에서는 毒性限界를 이기지 못하여 結局 壞死되게 되었다고 생각된다. Roth의 eugenol 에 의한 毒性은 前述한 바와 같고 Sealapex가 長期培養에서 더 큰 毒性을 보인 것은 Sealapex 抽出物 中の 어떠한 成分이 細胞에 대하여 否定的인 影響을 미친 것으로 이것이 단지 높은 pH 때문인지⁵⁶⁾ 또는 Sealapex 내의 다른 添加物 때문인지는^{14, 57)} 確實하지 않다.

根管充填用 sealer 의 影響을 研究하는데 있어서 培養細胞를 使用하는 理由는 生體實驗을 했을때 齒根端의 反應이 器具操作에 의한 刺戟, 組織의 炎症反應 및 個體마다 다른 炎症에 대한 反應 등에 의하여 影響받는 것을 排除하기 위함이다⁶³⁾.

細胞檢證에서 使用되어온 方法중 agar overlay test⁶⁴⁾ 및 ^{51}Cr release test⁶⁵⁾ 등은 주로 急激한 細胞 毒性을 보기위한 것으로 細胞에 대한 增殖效果를 觀察하는 데에는 약간의 問題가 있는 것으로 指摘되고 있다⁶⁶⁾. 細胞의 毒性 및 增殖效果를 같이 觀察할 수 있는 實驗法으로는 放射線同位元素를 利用하여 DNA 合成 및 蛋白質 合成 등 細胞의 代謝를 보는 方法이 있겠으나 放射能物質을 保管 處理하는 問題가 있어 培養用器에 直接 또는 milli-pore 관⁶⁷⁾을 통하여 間接적으로 實驗物質을 添加하여 細胞의 反應을 顯微鏡으로 觀察하는 方法이 가장 널리 사용되고 있다⁶⁸⁻⁷²⁾.

本 實驗에서 使用한 MTT 檢證法은 實驗物質이 細胞와 接觸했을때 細胞內 mitochondrial dehydrogenase 의 活性度를 測定 함으로써 細胞의 活性을 計測하는 方法으로^{54, 73)} 實驗後 細胞를 收穫하거나 洗滌할 必要가 없고 短時間 內에 많은 試料를 同時에 處理할 수 있고 分析이 機械에서 自動적으로 이루어 짐으로써 實驗者의 偏見이 排除될 수 있는 등의 長點을 가지고 있다. 原理는 實驗物質과 接觸된 細胞에 MTT를 添加하면 活性度가 있는 生活細胞의 mitochondrial dehydrogenase 에 의하여 MTT가 還元되어 靑色の formazan 結晶을 生成한다

(Fig 8,9). MTT添加후 4시간이 經過하면 DMSO (Dimethyl Sulfoxide)로 溶解시켜 靑色의 程度를 分光分析機에서 機械的으로 測定한다. 이 方法은 生物學 分野에서 抗癌劑의 毒性研究에 많이 使用되고 있으며⁷⁴⁾ 最近 柳⁷⁵⁾에 의하여 齒齦 裂溝內 細菌의 抽出物이 細胞에 미치는 影響研究에 使用된 바 있다.

細胞毒性研究에 있어서 實驗材를 어떻게 準備하는 것이 生體에서와 가장 類似한가 하는것에 대한 解答은 아직 없는 것 같다. 만일 材料自體가 水溶性이라면 比較的 손쉽게 試驗材의 모든 成分을 抽出할 수 있겠지만 試驗材가 非水溶性이거나 溶解되는데 長時間이 所要된다면 極히 一部成分만이 細胞에 影響을 주게될 것이다. 이러한 觀點에서 Spangberg⁷²⁾ 등은 根管用 sealer를 ethanol이나 chloroform 등의 化學物質에 溶解시켜 試驗하기도 하지만 結論的으로 이러한 人工的인 試料準備는 材料全體의 毒性을 오히려 誤導할 수 있으며 材料中 特性成分에 대한 研究에나 有用하다고 보고하고 있다.

根管充填用 sealer가 齒根端組織과 接觸하면 組織液에 의하여 溶解吸收될 수 있는 成分이 먼저 影響을 주게된다. 本 實驗에서는 sealer 내 어느 特定한 成分보다는 一定한 時間內에 溶解될 수 있는 部分에 대한 影響을 比較하기 위한 目的이었으므로 抽出物分離의 方法을 使用하였다. 抽出物分離를 위하여 蒸溜水를 使用한 理由는 化學的인 影響⁶⁰⁾이나 抽出을 하기위한 1日間 恒溫器 保管時 發生될 수 있는 感染의 可能性을 排除하기 위함이었다.

V. 結 論

四種의 다른 根管充填用 sealer Apatite I, Apatite II, Sealapex, 및 Roth sealer의 細胞에 대한 毒性을 株細胞(L929) 培養에서 比較한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. Apatite I 및 II는 Sealapex나 Roth에 比하여 낮은 細胞毒性을 보였다.
2. 모든 實驗群에서 稀釋이 될 수록 毒性이 減少되는 것을 보였으나 Roth sealer는 1/4 稀釋까지 細胞의 活性이 抑制된 狀態였고 1/8 稀釋에서는 약간 回復되었으나 다른 實驗群에 比하면 顯著히 低調한 狀態였다.

3. 硬化時間 間에는 Apatite I과 Sealapex에서 混合 即時群에서 가장 큰 細胞毒性을 보였고 Apatite II는 硬化時間과 無關하였다. Roth sealer는 모든 硬化時間帶에서 顯著히 높은 細胞毒性을 보였다.
4. 培養시간의 差異에 다른 細胞活性의 比較에서 Apatite I은 72시간 培養에서 顯著히 活性을 보였고 Apatite II에서는 變化가 없었으며 Sealapex와 Roth群에서는 顯著히 減少하는 것을 볼 수 있었다.

V. 參 考 文 獻

1. Dewhirst F.E.: Structure - activity relationships for inhibition of prostaglandin cyclooxygenase by phenolic compounds. Prostaglandins 20:209-222, 1980.
2. Brodin P. and Oerstavik D.: Effects of therapeutic and pulp protecting materials on nerve transmission in vitro. Scand J Dent Res, 91:46-450, 1983.
3. Newman M.G., Hulem C., Colgate J., and Anselmo C.: Antibacterial susceptibility of plaque bacteria. J Dent Res. 58:1722-1732, 1979.
4. 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
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. Hume W.R.: Effect of eugenol on respiration and division in human pulp, mouse fibroblasts and liver cells in vitro. J Dent Res 63:1262-1265, 1984.
7. Hensten-Petersen A. and Helgeland K.: Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. Scand J Dent Res 85:291-296, 1977
8. 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.
9. Branstrom M., and Nyborg H. : Pulp reaction to a temporary zinc oxide - eugenol cement. *J Pros Dent* 35 : 185 - 191, 1976
 10. Stanley H.R., and Lundy T. : Dycal therapy for pulp exposures. *Oral Surg* 34 : 818 - 827, 1972.
 11. Fitzgerald M. : Cellular mechanics of dentinal bridge repair using 3H - thymidine. *J Dent Res* 58 : special issue D, 2198 - 2206, 1979.
 12. Heys D.R., Heys R.J., Cox C.F., and Avery J.K. : The response of four calcium hydroxides on monkey pulps. *J Oral path* vol 9, 372 - 379, 1980.
 13. Negm M., Grant A., and Combe E. : Clinical and histologic study of human pulpal response to new cements containing calcium hydroxide. *Oral Surg* 50 : 462 - 471, 1980.
 14. Paterson R.C., Radford J.R., Watts A. : The response of the rat molar pulp to two proprietary calcium hydroxide preparations. *Brit Dent J* 151 : 184 - 186, 1981.
 15. Watts A., and Paterson R.C. : A comparison of pulp responses to two different materials in the dog and the rat. *Oral Surg* 52 : 648 - 652, 1981.
 16. Tagger M., and Tagger E. : Pulp capping in monkeys with Reolit and Life, two calcium hydroxides bases with different pH. *J Endodon* 11 : 394 - 400, 1985.
 17. Messer H. : Calcium hydroxide : Is there a biological basis for its use in dentistry? . *Northwest Dent* March - April : 13 - 17, 1983.
 18. Holland R. and deSouza V. : Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endodon* 11 : 535 - 543, 1985.
 19. Pitt Ford T.R., and Rowe A.H.R. : A new root canal sealer based on calcium hydroxide. *J Endodon* 15 : 286 - 289, 1989.
 20. Zmener O., Guglielmotti M.B., and Cabrini R.L. : Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers : A quantitative study in the subcutaneous connective tissue of the rat. *J Endodon* 14 : 229 : 235, 1988.
 21. Soares I., Goldberg F., Massone E.J., and Soares I.M. : Periapical tissue response to two calcium hydroxide - containing endodontic sealers. *J Endodon* 16 : 166 - 169, 1990.
 22. 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.
 23. Ghose L.J., Baghdady V.S., and Hikmat Y.M. : Apexification of immature apices of pulpless permanent anterior teeth with calcium hydroxide. *J Endodon* 13 : 285 - 290, 1987.
 24. Tronstad L., Andreason J.O., Hasselgren G., Kristerson L., and Riis I. : pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endodon* 7 : 17 - 21, 1981.
 25. Bramante C.M., and Berbert A. : Root perforations dressed with calcium hydroxide or zinc oxide and eugenol. *J Endodon* 13 : 392 - 395, 1987.
 26. Bach D.E., Downs R.H., Muller J.T., and Nespeca J.A. : Hydroxyapatite mandibular augmentation techniques : A review and splint modification. *J Pros Dent* 59 : 164 - 168, 1988.
 27. Frame J.W., Rout P.G.J., and Browne R.M. : Ridge augmentation using solid and porous hydroxylapatite particles with and without autogenous bone or plaster. *J Oral Maxillofac Surg* 45 : 771 - 777, 1987.
 28. ElDeeb M. : Comparison of three methods of stabilization of particulate hydroxylapatite for augmentation of the mandibular ridge. *J Oral Maxillofac surg* 46 : 758 - 766, 1988.
 29. Smith L. : Ceramic plastic material as a bone substitute. *Arch Surg* 87 : 653, 1963.
 30. 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.
 31. 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.
32. 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.
 33. 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.
 34. Froum S.J., Kushner L., Scopp L.W., and Stahl S.S. : Human clinical and histologic responses to durapatite implants in intraosseous lesions. Case report. J Periodontol 53 : 719 - 725, 1982.
 35. Sapkos S.W. : The use of Periograf in periodontal defects, histologic findings. J Periodontol 57 : 7 - 13, 1986.
 36. Moskow B.S., and Lubarr A. : Histological assessment of human periodontal defect after durapatite cement implant. J periodontol 54 : 455 - 462, 1983.
 37. 金相煥 : 치밀성 hydroxyapatite 와 다공성 replamineform hydroxyapatite 가 치근분지부 병소치유에 미치는 영향에 대한 실험적 연구. 연세대학교 대학원 박사학위 논문, 1988
 38. Kenney E.B., Iekovic V., Sa Ferreira 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.
 39. Roane J.B., and Benenati F.W. : Successful management of a perforated mandibular molar using amalgam and hydroxylapatite. J Endodon 13 : 400 - 404, 1987.
 40. Shoji S., Ishikawa J., Ebina T., Yamaki K., and Horiuchi H. : Application of α -tricalcium phosphate ceramics (α -TCP) to endodontics. Tohoku University, Dentistry article (1021) 253, November, 1984.
 41. Brown W.E., and Chow L.C. : A new calcium phosphate setting cement. J Dent Res 62 : 672, 1983.
 42. Getter L., Bhaskar S.N., Cutright D.E., Perez B., Brady J.M., Driskell T.D., and O'Hara M.J. Three biogradable calcium phosphate slurry implants in bone. J Oral Surg 30 : 263 - 268, 1972.
 43. Cutright D.E., Bhaskar S.N., Brady J.M., Getter L., and Posey W.R. : Reaction of bone to tricalcium phosphate ceramic pellets. Oral Surg 33 : 850 - 856, 1972.
 44. Barney V.C., Levin M.P., and Adams D.F. : Bio-ceramic implants in surgical periodontal defects. J Periodontol 57 : 764 - 770, 1986.
 45. Gruninger S.E., Siew C., Chow L., O'Young A., TS'AO N.K., and Brown W. : Evaluation of the biocompatibility of a new calcium phosphate setting cement. J Dent Res 63 : 200, 1984.
 46. Jean A., Kerebel B., Kerebel LM, Legeros R.Z., and Hamel H. : Effects of various calcium phosphate biomaterials on reparative dentin bridge formation. J Endodon 14 : 83 - 87, 1988.
 47. 梁文奎 : Tricalcium phosphate 와 durapatite 가 齒髓組織에 미치는 影響에 觀한 實驗的 研究. 대한치과보존학회지 9 : 7 - 12, 1983.
 48. Himel V.T., Brady J., and Weir J. : Evaluation of repair of mechanical perforations of the pulp chamber floor using biogradable tricalcium phosphate or calcium hydroxide. J Endodon 11 : 161 - 165, 1985.
 49. Choheyeb A.A., Chow L.C., Tsaknis P.J. : Evaluation of calcium phosphate as a root canal sealer - filler material. J Endodon 13 : 384 - 387, 1987.
 50. 최기운 : Tricalcium phosphate 와 vitapex 가 치근단 조직에 미치는 영향에 관한 실험적 연구. 대한치과보존학회지 14 : 71 - 79, 1989.
 51. Krell K.F., and Wefel J.S. : A calcium phosphate cement root canal sealer - Scanning electron microscopic analysis. J Endodon 10 : 571 - 576, 1984.
 52. Krell K.F., and Madison S. : Comparison of apical leakage in teeth obturated with a calcium phosphate cement or Grossman's cement using lateral condensation. J Endodon 11 : 336 - 339, 1985.
 53. Sugawara A., Chow L.C., Takagi S., and Choheyeb H. : In vitro evaluation of the sealing ability of a calcium phosphate cement when used as a root canal sealer - filler. J Endodon 16 : 162 -

- 165, 1990.
54. Mosmann T. : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Method* 65 : 55 - 63, 1983.
 55. Torneck C.D., Howley T.P. : The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. *J Endodon* 9 : 131 - 136, 1983.
 56. Gordon T.M., Ranly D.M., and Boyan B.D. : The effect of calcium hydroxide on bovine pulp tissue : Variations in pH and calcium concentration. *J Endodon* 11 : 156 - 160, 1985.
 57. Hanks C.T., Bergenholtz G., and Kim J.S. : Protein synthesis in vitro, in the presence of Ca (OH) 2 - containing pulp capping medicaments. *J Oral Path* 12 : 356 - 365, 1983.
 58. Fairbourne D.R., and Charbeneau G.T. : Effect of improved dycal and IRM on bacteria in deep carious lesions. *J Amer Dent Assoc* 100 : 547 - 552, 1980.
 59. Browne R.M. : The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials - does it have a role ? *Int Endo J* 21 : 50 - 58, 1988.
 60. 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.
 61. Caicedo R., and von Fraunhofer J.A. : The properties of endodontic sealer cements. *J Endodon* 14 : 527 - 534, 1988.
 62. McComb D., and Smith D.C. : Comparison of physical properties of polycarboxylate - based and conventional root canal sealers. *J Endodon* 2 : 228 - 235, 1976.
 63. Murphy W.M. : The testing of endodontic materials in vitro. *Int Endo J* 21 : 170 - 177, 1988.
 64. Schmalz G. : Agar overlay method. *Int Endo J* 21 : 59 - 66, 1988.
 65. Spangberg L.S.W., and Al - Nazhan S.A. : The radiochromium release method for evaluation of cytotoxicity in vitro. *Int Endo J* 21 : 72 - 78, 1988.
 66. Hensten - Peterson A. : Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endo J* 21 : 89 - 99, 1988.
 67. Wennberg A. : In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials - the milipore filter method. *Int Endo J* 21 : 67 - 71, 1988.
 68. 孟亨烈, 權赫春 : 生體外 纖維芽細胞 培養法을 이용한 合着性 시멘트의 毒性 評價에 關한 研究. *대한치과보존학회지* 14 : 7 - 20, 1989
 69. 김정혜 : 이장재의 세포독성에 관한 실험적 연구. *서울대학교 대학원 석사학위논문*, 1990.
 70. Kawahara H., Imai K., and Kawahara D. : Photo - pattern analysis and computation in the evaluation of the cytotoxicity of dental materials in vitro. *Int Endo J* 21 : 100 - 105, 1988.
 71. Nakamura H., Sakakibara F., Matsumoto Y., Hirano S., Hayakawa H., Sakai K., and Yip M. : Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. *J Endodon* 12 : 156 - 160, 1986.
 72. Spangberg L., and Pascon E.A. : The importance of material preparation for the expression of cytotoxicity during in vitro evaluation of biomaterials. *J Endodon* 14 : vitro evaluation of biomaterials. *J Endodon* 14 : 247 - 250, 1988.
 73. Tada H., Shiho K., Koyama M., and Tsukamoto K. : An improved colorimetric assay for interleukin 2. *J Immunol Methods* 93 : 157 - 165, 1986.
 74. 심우남 : Pyran copolymer 유도체의 항암세포로써의 효능. *연세대학교 대학원 박사학위 논문*, 1988.
 75. 유윤정 : *Bacteroides gingivalis* 의 세포 추출물이 섬유아세포의 성장에 미치는 영향. *연세대학교 대학원 석사학위논문*, 1990.

Explanations for figures

- Figure 2 : 12 - well plate. From left, Apatite I, Apatite II, Sealapex, and Roth. Total mixture weighed about 1 gram and 1.5cc distilled water was added.
- Figure 3 : 96 - well plate. Each well was filled with 2ml of media containing 15,000 cells and sealer extract. Each plate had one empty well and three normal media wells as controls.
- Figure 4 : Apatite I, 1/2 dilution, 100 \times . Typical fibroblasts(F) and not attached cells(N) are seen.
- Figure 5 : Roth Sealer, 1/2 dilution, 100 \times . Almost all cells appeared to be dead.
- Figure 6 : 300 \times of Figure 5. There was loss of nucleus and shrank cytoplasm with irregular cell border.
- Figure 7 : Apatite II, 1/8 dilution, 100 \times . Cells were multiplied to form double layers. Lower layer cells were so concentrated that they looked like epithelial cells.
- Figure 8 : Control group, 300 \times . One hour after MTT treatment. Formazan crystal just started to develop within the cytoplasm.
- Figure 9 : Same as of Figure 8. 300 \times . Four hours after MTT treatment. Formazan crystal further developed to form needle shape crystals.

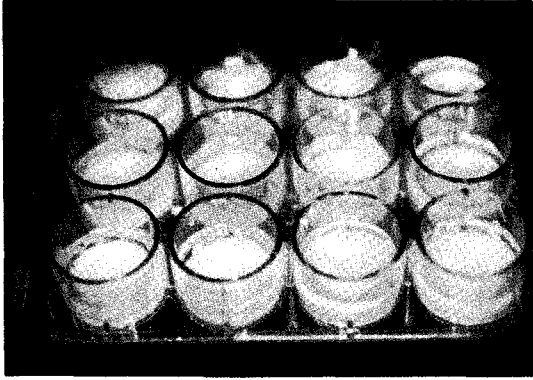


Fig.2

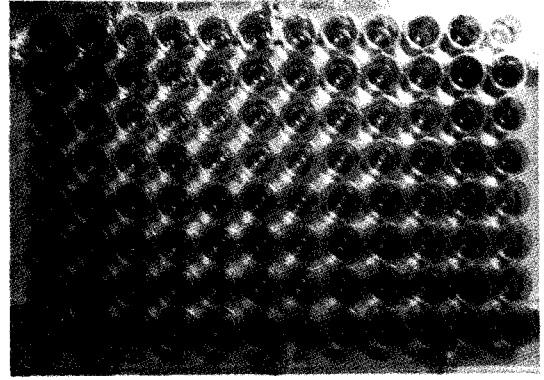


Fig.3

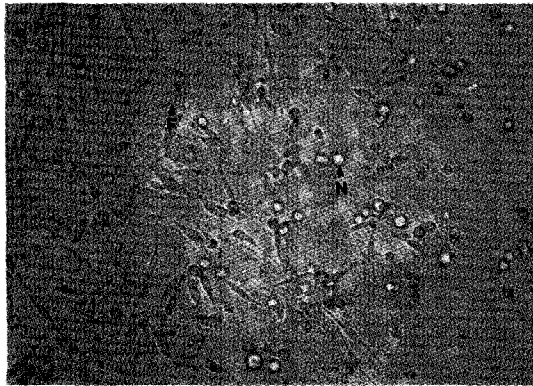


Fig.4

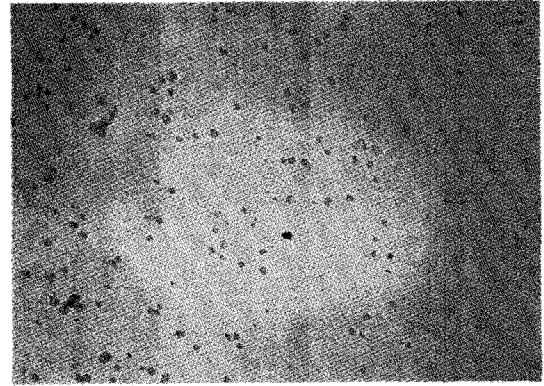


Fig.5

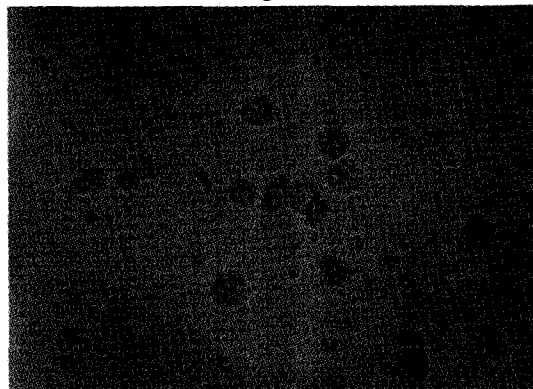


Fig.6

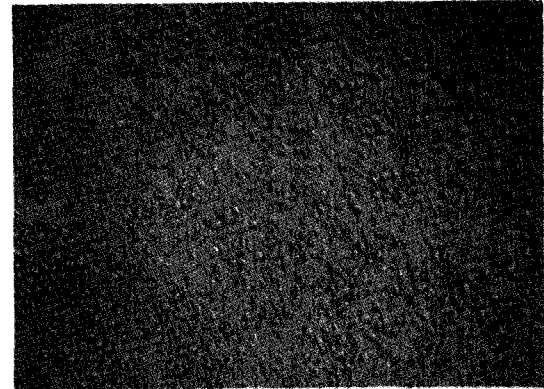


Fig.7

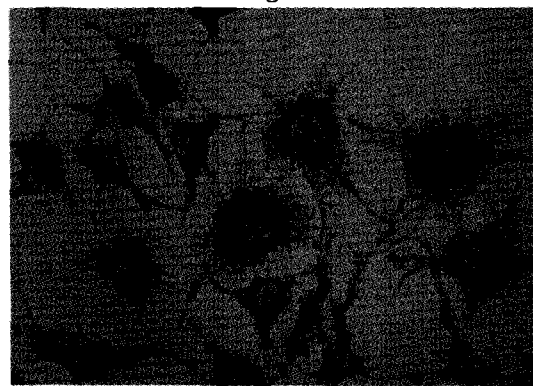


Fig.8



Fig.9

A STUDY ON THE CYTOTOXICITY OF THE ROOT CANAL SEALERS

Seung - Jong Lee, D.D.S., M.S.D., Yung - Hai Kim, D.D.S, Ph.D.

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

Four root canal sealers, Apatite Root Sealer I and II composed mainly of hydroxyapatite/tricalciumphosphate, Sealapex containing calcium hydroxide, and Roth Sealer composed of zinc oxide - eugenol were compared on the culture of L929 fibroblasts.

MTT (Methyl Thiazole Tetrazolium Bromide) colorimetric technique was used to measure the mitochondrial dehydrogenase activity.

Results were as follows :

1. Hydroxyapatite/tricalcium phosphate mixed sealers were significantly less toxic compared with calcium hydroxide and zinc oxide - eugenol type sealers. High pH of the calcium hydroxide sealer and release of eugenol component from the zinc oxide - eugenol type sealer were presumed to be the cause of the toxicity of these two sealers. In no cases, there were more cytoblastic effects in hydroxyapatite/tricalcium phosphate mixed sealers compared to the control groups.
2. In all experimental groups, toxicity was decreased as dilutions were increased. However in zinc oxide - eugenol type sealer the cell activity was weakened for all dilution groups.
3. Regarding the effect of setting time, Apatite I and Sealapex were less toxic as the setting progressed. Apatite II kept constant regardless of the different time elapsed after setting but Roth sealer revealed significantly higher toxicity for all experimental groups.
4. Comparing two different culture periods of 24 hours and 72 hours, Apatite I showed higher cell activities in longer period(72 hours) while Apatite II did not. Sealapex and Roth sealer, however, showed significantly lower cell activities in longer period.

Key words : Root Canal Sealer, Cytotoxicity