

生體外 纖維芽細胞 培養法을 利用한 合着性
시멘트의 毒性 評價에 關한 研究

서울대학교 齒科大學 齒科保存學教室

孟亨烈 · 權赫春

**A STUDY OF THE CYTOTOXICITY OF DENTAL CEMENTS
ON HUMAN FIBROBLAST IN VITRO**

Hyung-Yull Maing, D.D.S., M.S.D., and Hyuk-Choon Kwon, D.D.S., Ph. D.

Department of Operative Dentistry, College of Dentistry, Seoul National University.

— Abstract —

The purpose of the study was to evaluate the cytotoxic effects of polycarboxylate cements and zinc phosphate cements in vitro. Human fibroblasts were cultured in α -MEM, and each cement was manually mixed and filled in glass ring cylinder (8x8mm in diameter, in height.) Cement filled cylinders were placed in the center of the dish (35mm in diameter) containing 3ml of α -MEM. Millipore filters to simulate dentinal barrier were also placed between the cylinder and the dish, then stored in 5% CO₂ containing chamber for 1 and 2 weeks at the temperature of 36.6°C.

The results of the experiments were analyzed by counting the cells in the period of one week and two weeks respectively, and were assessed by calculating the cell multiplication rate and the relative growth rate. The experimental groups and the control group were compared.

The results of the study were summarized as follows.

1. Durelone brand of the polycarboxylate cements showed marked cytotoxicity after one week, but after two weeks the toxicity decreased remarkably. Poly-F brand exhibited moderate cytotoxicity after one week, but after two weeks the toxicity slightly decreased. HY-BOND brand was weakly cytotoxic after one week, but after two weeks the toxicity became significant.

2. The cytotoxicity of the zinc phosphate cements was negligible after one week, but after two weeks Lee Smith brand revealed considerable cytotoxicity.
3. In general, the zinc phosphate cements were less cytotoxic than the polycarboxylate cements.

- 目 次 -

- I. 緒 論
- II. 實驗材料 및 方法
- III. 實驗結果
- IV. 總括 및 考按
- V. 結 論
- 參考文獻
- 英文抄錄
- 寫眞附圖

I. 緒 論

齒科領域에서 널리 사용되고 있는 합착성 시멘트는 修復物の 裝着이나 窩洞의 裏裝材, 矯正用 밴드의 合着 等 여러가지 用度로 利用되어 왔다. 이러한 시멘트는 口腔 內에서 維持力이 크고 咬合壓에 견딜 수 있으며 또한 齒髓에 刺戟이 最少化하도록 長期間 開發되어 왔다. 一般적으로 시멘트는 齒髓保護劑가 없이 깊은 窩洞에 使用될 때 齒髓에 損傷을 惹起할 수 있다고 報告하였다.^{1, 2)}

Polycarboxylate 시멘트는 1968年 Smith³⁾ 에 의해서 紹介되었으며 齒髓에 刺戟性이 적고 齒質과 物理·化學적으로 結合할 수 있는 材料이며 zinc phosphate 시멘트보다 齒髓에 刺戟이 적고 物理的 性質은 類似하나 齒質과의 接着度는 오히려 優秀하다고 알려졌으며⁴⁾ 生體 適應度는 zinc oxide eugenol 시멘트와 同一하거나 혹은 더욱 輕微한 齒髓反應을 나타내고^{5, 6, 7, 8, 9)} 殘存象牙質의 두께와 關係없이 齒髓에 無害하다고 報告하였다.¹⁰⁾ Safer等⁷⁾은 齒髓露出時 polycarboxylate 시멘트는 初期에 약간의 炎症反應을 誘發하지만 곧 齒髓組織에 얇은 纖維層

이 나타나며 빠른 期間 內에 治癒되었다고 報告하였으며 Spangberg⁶⁾는 polycarboxylate 시멘트의 細胞毒性檢査에서 初期에는 毒性反應이 나타나지만 약 1時間 後부터 毒性이 減少하며 zinc oxide eugenol 시멘트보다 顯著하게 毒性이 적게 나타난다고 發表하였다. 그外 Langeland¹¹⁾, Barnes & Turner¹²⁾, Langeland等¹³⁾도 polycarboxylate 시멘트는 다른 시멘트에 비해 적은 毒性이 나타난다고 報告하였다.

이에 비해 zinc phosphate 시멘트는 操作이 容易하고 아주 優秀한 物理的 性質을 갖고 있으며 合着性 시멘트로서 廣範圍하게 使用되어 왔다. 그러나 이 시멘트는 酸에 대한 溶解度가 높고 齒質과 物理적으로만 結合하며 混合時 液으로 使用하는 phosphoric acid에서 나타나는 높은 酸度에 의해 齒髓에 刺戟이 큰 것으로 알려져 왔다.^{1, 2, 14)} Zinc phosphate 시멘트는 初期에 매우 낮은 pH를 나타내며 硬化 後에도 약 6~12時間 동안 酸度を 계속 維持하고 있다.¹⁴⁾ 이러한 酸은 象牙細管內의 組織液에 影響을 주어 齒髓에 炎症을 誘發시킬 수 있다. 그러나 Massler¹⁵⁾는 이러한 酸의 量이 적을 경우 곧 中性化되므로 齒髓刺戟은 繼續되지 않고 齒髓에는 回復象牙質의 形成을 促進시킬 수 있다고 報告하였으며 깊은 窩洞에서 zinc phosphate 시멘트의 量이 많을 때 齒髓에 대한 刺戟이 增加해 심한 疼痛과 함께 齒髓에 損傷이 나타날 수 있으므로 반드시 齒髓保護劑가 必要하다고 하였다. Kawahara等¹⁶⁾도 시멘트의 刺戟을 防止하기 위해 齒髓保護劑의 必要性을 主張하였다. 그러나 Brännström & Nyborg¹⁷⁾는 窩洞을 洗滌劑로 닦아내어 無菌狀態로 만든 後 zinc phosphate 시멘트를 使用時 이 시멘트는 齒髓에 無害하다고 主張하였으며 窩洞에 殘存하는 細菌과 邊緣漏出에 의해서 齒髓反應이 나타난다고 報告하였다. 또 Brännström¹⁸⁾은 zinc phosphate 시멘트가 齒髓露出時에도 細菌이 存在하지 않은

면 齒髓에 刺戟이 나타나지 않는다고 發表하였다.

齒科用 시멘트를 包含한 一般的인 修復材料의 評價에서 生物學的 考察은 物理的 性質에 대한 考察과 함께 重要한 研究 對象이 되어왔다. 修復材料가 象牙質과 齒髓에 대해 미치는 影響을 生物學的인 面에서 檢査함으로써 臨床的으로 適用할 수 있는가의 與否를 判定하는 데에 도움이 된다. 生物學的 檢査는 사람齒牙나 혹은 動物齒牙의 組織學的 研究로 實施하고 間接的인 方法으로는 修復用 材料를 骨組織이나 軟組織에 埋植하여 組織反應을 檢査하거나 生體外에서 細胞培養을 하여 直接 細胞와 材料를 接觸시켜 細胞毒性檢査를 함으로써 評價할 수 있다.

一般的으로 사람齒牙나 動物齒牙에 形成된 窩洞에 修復材料를 充填하여 一定期間 後에 齒髓의 組織學的 變化를 觀察함으로써 齒科用 修復材料의 毒性을 分析하게 된다. 그러나 이 方法에는 여러가지 限界點을 갖고있다.^{9, 20} 實驗 環境의 差異가 存在하고 結果의 算術的 혹은 客觀的 評價가 困難하며 窩洞 形成의 方法 等の 差異를 調節할 수 없다. 특히 殘存象牙質의 두께, 窩洞 形成 後 象牙質에 殘存하는 smear layer, 邊緣漏出 등은 齒髓에 큰 影響을 미치지만 이러한 限界點에도 불구하고 複雜한 齒髓反應을 規明하는 研究에는 有用한 方法으로 利用되어 왔다. 修復物과 窩洞壁 사이에 形成되는 間隔에의 細菌感染, 窩洞 基底部와 修復物 사이에서의 細菌增殖 等 邊緣漏出에 의한 齒髓反應에 대해서는 많은 研究가 이루어지고 있으며^{1, 10, 17, 18, 21} 이러한 細菌의 存在와 齒髓의 炎症과의 關係는 많은 論爭이 되어왔다.^{22, 23, 24}

齒科用 修復材料에 대한 生物學的 檢査方法으로 生體外 實驗方法이 利用될 수 있다. 細胞培養을 利用하여 材料의 毒性에 대한 細胞變化를 分析함으로써 毒性을 評價하게 된다.^{25, 26} 이러한 細胞毒性의 評價는 여러가지 方法으로 測定할 수 있다.^{27, 28} 細胞數의 算定²⁹과 細胞分裂의 觀察³⁰ 및 DNA의 分析³⁶ 등에 의한 細胞成長率의 測定, 細胞의 形態學的 變化의 顯微鏡的 觀察²⁹, 酸素消費量²⁸ 및 糖原代謝의

變化 觀察³¹, 放射性 同位元素를 利用한 細胞膜 透過度의 變化 測定^{27, 33}, 細胞內의 小器官의 酵素 機能 分析³² 등으로 評價한다.

生體外에서의 細胞毒性檢査는 새로운 材料나 혹은 變形된 材料의 臨床的 適用을 위해 一般的으로 行해지는 檢査方法이며 이 方法은 生物學的 反應이 빠르고 銳敏하며 實驗結果의 再現性이 있고 細胞毒性의 算術的 評價가 可能하다.

細胞培養法을 利用한 細胞毒性檢査에는 주로 한 種類의 細胞를 利用하게 되며¹⁹ 만약 여러 種類의 細胞를 利用하면 細胞 사이에서 나타나는 代謝作用, 炎症 및 免疫反應 等 生體反應이 細胞毒性檢査에 影響을 미치기 때문이다. 培養에 使用하는 細胞는 人體組織 혹은 動物에서 採取하고 刺戟에 銳敏하게 反應하는 細胞를 利用하며 주로 纖維芽細胞를 選擇한다. 齒髓는 纖維芽細胞와 細胞外 基質로 이루어지는 結合組織이며 이 纖維芽細胞는 齒髓의 代謝過程에서 重要한 役割을 하고 外部刺戟에 대해 細胞分裂, 結合組織의 基質合成, 組織의 吸收速度 等を 變化시킴으로서 反應을 나타낸다.³⁴ 纖維芽細胞를 生體外에서 培養하여 여러 種類의 齒科用 修復材料의 毒性을 檢査하여 修復材料의 臨床的 應用을 위해 많은 努力을 기울여 왔다.

이에 著者는 人體齒牙의 齒髓에서 纖維芽細胞를 生體外에서 培養하여 一般的으로 廣範圍하게 使用하는 polycarboxylate시멘트와 zinc-phosphate시멘트에 대한 齒髓反應을 알아보기 위하여 이들 시멘트에 대한 細胞毒性檢査를 實施한 바 多少의 知見을 얻었기에 報告하는 바이다.

II. 實驗材料 및 方法

1. 實驗材料

生體外에서 纖維芽細胞를 培養하기 위하여 13歲 男兒에서 矯正治療를 위해 拔去한 正常 小臼齒를 拔齒 即時 生理的 食鹽水로 洗滌한 後 齒牙 長軸에 平行하게 小窩를 形成하고 消毒된

切斷機를 利用하여 齒牙를 破切시켰다. 可能한 限 齒髓에 直接的 損傷을 주지 않도록 하면서 No. 15 Scalpel로 齒髓를 除去하였다.

實驗材料는 zinc phosphate시멘트와 polycarboxylate시멘트를 各 3種씩 使用하였으며 다음 <Table I>과 같이 6個의 實驗群으로 分類하였다. 各 材料는 製造會社의 指示대로 混合, 使用하였다.

2. 纖維芽細胞의 培養

1) 1次 培養

實驗에 必要한 細胞를 培養하기 위하여 培養液인 α -MEM에 4% Fetal Bovine Serum (FBS: GIBCO, CO., U. S. A.), 100,000 unit Penicillin & 100mg Streptomycin (GIBCO, Co., U. S. A.), 150 μ g/100mg Fungizone (GIBCO, Co., U. S. A.)을 混合하여 使用하였다. 拔髓된 齒髓를 Fetal Bovine Serum, Penicillin & Streptomycin, Fungizone이 通常보다 약 10배 정도 높은 培養法으로 60mm Petri dish (Corning Co., U. S. A.)에서 3回 洗滌後, 通常의 培養液으로 옮겨 No.15 Scalpel 2개를 利用하여 1mm³ 정도의 크기로 齒髓를 細切하였다. 細切된 齒髓組織을 25cm² 크기의 培養用 flask (Bellco, Vineland, U. S. A.)에 넣은 後 濕度 90%, 溫度 36.6°C 條件 下에서의 5% CO₂

培養器에 培養用 flask를 垂直으로 넣어서 纖維芽細胞가 flask에 附着하도록 하였다. 10分 後 5ml의 培養液을 넣은 다음 1週日間 培養하였으며 2日 間隙으로 培養液을 交換하였다.

2) 2次 培養

培養用 flask에 있는 培養液을 除去한 後 flask에 附着된 細胞를 分離하기 爲해 EDTA 가 包含된 0.25% Trypsin (GIBCO Co., U. S. A.)을 2ml 넣고 bench 上에서 1分間 放置한 다음 다시 Trypsin을 除去한 後 5% CO₂培養器에서 10分間 保管하였다. 培養液을 5ml 넣고 pipette을 利用하여 培養用 flask의 基部에 附着된 細胞를 分離하였다. 分離된 細胞를 溫度 37°C, 1500rpm으로 10分間 遠心分離한 後 上層部의 培養液을 完全히 除去하고 다시 培養液을 5ml 넣어 pipette을 利用하여 細胞浮遊液을 만든 後 75cm²의 培養用 flask로 分注하였다. 같은 方法으로 7回 繼代培養하여 實驗에 利用하였다.

3. 試片 製作

各 3種의 zinc phosphate시멘트와 polycarboxylate시멘트의 試片製作은 內徑이 8mm, 높이가 8mm인 琉璃管 (GIBCO Co., U. S. A.)에 上記 材料를 混合하여 넣어 試片을 製作하였다.

Table I. Materials of Experimental Groups

Group	Kinds	Brands	Manufactures		P/L (g)
1	Polycarboxylate	HY-BOND	SHOFU	Japan	60/40
2	Cement	Poly-F	Detrey/Dentsply	England	90/30
3		DURELONE	ESPE	W. Germany	60/40
4	Zinc Phosphate	LEE SMITH	Teledyne	U.S.A.	32/17.5
5	Cement	Fleck's	Mizzy	U.S.A.	29/15
6		Drala	DRALA Dental-KG	W. Germany	90/50

4. 細胞毒性的 實驗

繼代培養한 纖維芽細胞를 35mm Petri dish 에 細胞密度가 4×10^4 cells/ml 인 細胞浮遊液을 3 ml 씩 分注한 뒤 (12×10^4 cells/3 ml), 細孔 크기가 $0.22 \mu\text{m}$ 인 millipore microfilter 를 培養 접시의 中央에 넣고 製作된 試片을 microfilter 위에 올려 놓았다.

6 個의 實驗材料를 混合하여 넣은 試片을 實驗群으로 하고 빈 琉璃管만 올려 놓은 것을 對照群으로 하여 培養 1 週日, 2 週日 後에 對照群과 實驗群을 比較 觀察하였다.

5. 細胞數 算定 및 細胞形態의 觀察

細胞培養 1 週日, 2 週日 後의 細胞數를 算定하기 위하여 petri dish 의 培養液을 除去하고 0.25% Trypsin 으로 細胞를 分離시킨 後 다시 1 ml 의 培養液을 넣고 0.2% Trypan blue (GIBCO Co., U. S. A.) 로 生體染色하여 細胞의 生存度를 觀察하였으며 Pasteur pipette 으로 20 μl 를 取하여 Hemocytometer 로 顯微鏡 下에서 100 倍로 觀察하여 細胞數를 算定하였다. 各 實驗材料에 대한 形態學的 變化를 觀察하기 위하여 細胞培養 1 週日, 2 週日 後에 petri dish 를 倒立位相差 顯微鏡 下에서 100 倍로 觀察한 後 各 試片間의 細胞反應을 比較 檢討하였다.

算定된 細胞數를 統計處理하여 細胞數가 正常分布에 接近하도록 常用代數로 變換한 後 分散分析 (ANOVA) 하여 實驗群間에 差異가 있나를 檢證한 後 實驗群間에 個別比較를 위해 Scheffé 檢證을 實施하였으며 生存細胞 增殖率 (Vital Cell Multiplication Efficiency) 과 對照群에 對한 相對性 細胞增殖度 (Relative Growth Rate; RGR) 를 얻어 Kawahara³⁵⁾ 에 의한 細胞毒性指數 (Table II) 에 의해 結果를 判定하였다.

Table II. Definition and Classification of cytotoxic scores based on relative growth rate (RGR).

RGR (%)	Score	Classification
100	-	None
75-99	+	Weak
50-74	++	Moderate
25-49	+++	Marked
1-24	++++	Strong
0	+++++	Extreme

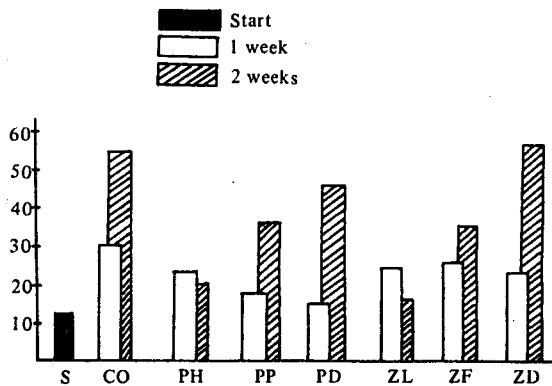
III. 實驗 結果

對照群과 各 實驗群의 細胞培養 結果 增殖된 細胞數의 算定 및 細胞增殖率, 細胞形態의 顯微鏡의 觀察의 結果는 다음과 같다.

1. 對照群

細胞培養 1 週日 後에 細胞는 petri dish 의 基底部에 單一細胞層을 形成하였으며 細胞의 形態는 주로 紡錘形의 細胞가 나타나고 細胞 사이에 壞死된 細胞가 약간 存在하고 있다 (Fig. 2). 細胞培養 2 週日 後의 細胞는 거의 複合層을 形成하듯이 나타났으며 細胞의 形態는 觀察하기 어려울 程度로 細胞가 密集되어 나타났다 (Fig. 3).

細胞數는 培養 始作 時 12×10^4 cells/ml 이 培養 1 週日 後에는 $(30.0 \pm 6.1) \times 10^4$ cells/ml, 培養 2 週日 後에는 $(53.2 \pm 8.4) \times 10^4$ cells/ml 로서 (Table III, Fig. 1) 培養 始作 時의 細胞數에 비해 各各 2.5 倍, 1.77 倍로 增加되었으며 時間이 經過함에 따라 增殖率은 鈍化되었고 總細胞增殖率은 4.43 으로 나타났다 (Table V).



S : Start
 CO : Control
 PH : Polycarboxylate cement , BOND
 PP : Polycarboxylate cement , Poly-F
 PD : Polycarboxylate cement , Durelone
 ZL : Zinc-phosphate cement , Lee Smith
 ZF : Zinc-phosphate cement , Fleck's
 ZD : Zinc-phosphate cement , Drala

Fig. 1. Effect of dental cements upon cell multiplication of cultured human fibroblast.

Table III. Effect of dental cements upon cell multiplication of cultured fibroblast (x 10⁴ cells/ml)

Group	Start	1 Week	2 Weeks
Control	12.0	30.05 ± 6.15	53.20 ± 8.45
Experimental 1	12.0	25.85 ± 6.10	20.75 ± 4.65
2	12.0	18.80 ± 4.50	34.29 ± 6.85
3	12.0	13.05 ± 4.85	46.72 ± 6.12
4	12.0	24.80 ± 4.24	14.80 ± 2.59
5	12.0	26.30 ± 5.09	33.17 ± 6.62
6	12.0	22.86 ± 3.52	55.58 ± 7.56

Mean ± S.D.

Table IV. Base 10 logarithmic transformed mean cell counts of cultured fibroblast of experimental groups.

Group	Start	1 Week	2 Weeks
Control	5.08	5.46 ± 0.10	5.72 ± 0.07
Experimental 1	5.08	5.40 ± 0.12	5.31 ± 0.10
2	5.08	5.26 ± 0.11	5.53 ± 0.09
3	5.08	5.08 ± 0.18	5.67 ± 0.06
4	5.08	5.39 ± 0.08	5.16 ± 0.08
5	5.08	5.41 ± 0.09	5.51 ± 0.09
6	5.08	5.35 ± 0.07	5.74 ± 0.06

Mean ± S.D.

Table V. Cell multiplication efficiency (CME)

Group	CME*		
	1 week	2 weeks	General**
Control	2.50	1.77	4.43
Experimental 1	2.15	0.80	1.73
2	1.57	1.82	2.86
3	1.09	3.58	3.89
4	2.07	0.60	1.23
5	2.18	1.26	2.76
6	1.91	2.43	4.63

* CME = Mean number of living cell in successive culture days

Mean number of living cell in previous culture days

** General = Mean number of living cell in the CME

Mean number of living cell in the 2nd culture week

Mean number of living cell in the start

2. 実験群

1) 第1群(Polycarboxylate cement; HY-BOND)

細胞培養 1 週日後의 細胞形態는 對照群과 거의 類似하게 나타났으며 細胞密度는 對照群에 비해 약간 減少함을 보였다(Fig. 4). 細胞培養 2 週日後에 細胞密度는 더욱 減少하여 나타나며 細胞形態는 星狀形을 보이고 細胞突起가 뚜렷하게 나타났다(Fig. 5).

細胞數는 培養 1 週日後에 $(25.8 \pm 6.1) \times 10^4$ cells/ml, 2 週日後는 $(20.7 \pm 4.6) \times 10^4$ cells/ml이며 (Table III, Fig. 1) 細胞增殖率은 各各 2.15, 0.80 이고 總細胞增殖率은 1.73으로 (Table V) 對照群에 비하여 顯著하게 減少되었으며 時間 經過에 따라 增殖率은 크게 減少하였다. 對照群에 對한 相對性細胞增殖率은 培養 1 週日, 2 週日後에 各各 86.02, 39.00으로 나

타났으며 (Table VI) 培養 2 週日後에는 아주 顯著的한 減少를 보이고 있다.

Table VI. Relative growth rate (RGR).

Group	RGR*	
	1	2 Weeks
Control	100	100
Experimental 1	86.02	39.00
2	62.56	64.45
3	43.43	87.81
4	82.53	27.82
5	87.52	62.35
6	76.07	104.47

* RGR = Mean number of living cell in respective specimen

Mean number of living cell in normal control

2) 第2群(Polycarboxylate cement; Poly-F)

細胞培養 1 週日後의 細胞形態는 星狀形으로 나타나며 細胞密度는 對照群에 비해 減少하였고 細胞의 突起가 서로 接觸되어 나타났다. (Fig. 6). 培養 2 週日後의 細胞形態는 주로 紡錘形으로 보이고 細胞密度는 거의 對照群과 類似하게 나타났다(Fig. 7).

細胞數는 培養 1 週日後에 $(18.8 \pm 4.5) \times 10^4$ cells/ml, 2 週日後에 $(34.2 \pm 6.8) \times 10^4$ cells/ml이며 (Table III, Fig. 1) 細胞增殖率은 各各 1.57, 1.82이고 總細胞增殖率은 2.86으로 (Table V) 對照群에 비하여 減少된 增殖率을 보이고 時間 經過에 따라 增殖率이 약간 增加되었다. 相對性細胞增殖率은 培養 1 週日 2 週日後에 各各 62.56, 64.45로 나타났으며 培養 1 週日, 2 週日後 모두 顯著的한 減少를 보였다. (Table IV).

3) 第3群(Polycarboxylate cement; Durelone)

細胞培養 1 週日後의 細胞形態는 星狀形을

나타내며 細胞密度는 對照群에 비해 顯著한 減少를 보이고 細胞突起가 길게 나타났다(Fig. 8) 培養 2週日 後의 細胞形態는 對照群과 類似하게 나타나며 細胞密度는 매우 顯著하게 增加하여 複合細胞層으로 나타났다(Fig. 9).

細胞數는 培養 1週日 後에 $(13.0 \pm 4.8) \times 10^4$ cells/ml, 2週日 後에 $(46.7 \pm 6.1) \times 10^4$ cells/ml이며 (Table III, Fig. 1) 細胞增殖率은 各各 1.09, 3.58이고 總細胞增殖率은 3.89로서 (Table V) 對照群과 類似하게 나타났고 時間 經過에 따른 增殖率은 顯著하게 增加하였다. 相對性細胞增殖度는 培養 1週日, 2週日 後에 各各 43.43, 87.81로 나타났으며 培養 1週日 後에는 매우 顯著한 減少를 보였다 (Table IV).

4) 第4群(Zinc phosphate cement; Lee Smith)

細胞培養 1週日 後의 細胞形態와 細胞密度는 實驗 第1群과 類似하게 나타났으며 (Fig. 10) 培養 2週日 後의 細胞形態는 星狀形으로 나타났고 細胞密度는 顯著하게 減少하였으며 細胞突起는 길게 나타났다 (Fig. 11).

細胞數는 培養 1週日 後에 $(24.8 \pm 4.2) \times 10^4$ cells/ml, 2週日 後에 $(14.8 \pm 2.5) \times 10^4$ cells/ml이며 (Table III, Fig. 1) 細胞增殖率은 各各 2.07, 0.60이고 總細胞增殖率은 1.23으로 (Table V) 對照群에 비해 매우 顯著하게 減少하였고 時間 經過에 따른 增殖率도 顯著하게 減少하였다. 相對性細胞增殖度는 培養 1週日, 2週日 後에 各各 82.53, 27.82로 나타났으며 培養 2週日 後에는 매우 顯著한 減少를 보였다 (Table VI).

5) 第5群(Zinc phosphate cement; Fleck's)

細胞培養 1週日 後의 細胞形態는 주로 紡錘形으로 나타났으며 細胞密度는 對照群에 비해 약간 減少하였다 (Fig. 12). 培養 2週日 後에는 細胞密度가 약간 增加하였으며 다른 變化는 나타나지 않았다 (Fig. 13).

細胞數는 培養 1週日 後에 $(26.3 \pm 5.0) \times 10^4$ cells/ml, 2週日 後에 $(33.1 \pm 1.6) \times 10^4$ cells/ml이며 (Table III, Fig. 1) 細胞增殖率은 各各 2.18, 2.16이고 總細胞增殖率은 2.76으로 (Ta-

ble V) 對照群에 비해 減少된 增殖率이 나타났고 時間 經過에 따른 增殖率은 약간 增加하였다. 相對性增殖度는 培養 1週日, 2週日 後에 各各 87.52, 62.35로 나타났으며 培養 2週日 後에는 減少를 보였다 (Table VI).

6) 第6群(Zinc phosphate cement; Drala)

細胞培養 1週日 後의 細胞形態는 주로 星狀形이 나타났고, 서로 細胞突起가 接觸되어 나타났으며 細胞密度는 對照群보다 약간 減少되었다 (Fig. 14). 培養 2週日 後에는 細胞密度가 顯著하게 增加하여 複合細胞層으로 나타났다 (Fig. 15).

細胞數는 培養 1週日 後에 $(22.8 \pm 3.5) \times 10^4$ cells/ml, 2週日 後에 $(55.5 \pm 7.5) \times 10^4$ cells/ml이며 (Table III, Fig. 1) 細胞增殖率은 各各 1.91, 2.43이고 總細胞增殖率은 4.63으로 (Table V) 對照群과 類似한 增殖率을 보이며 時間 經過에 따른 增殖는 顯著하게 增加하였다. 相對性細胞增殖度는 培養 1週日, 2週日 後에 各各 76.07, 104.47로 나타나며 培養 2週日 後에는 약간 增加를 보였다 (Table VI).

細胞培養 1週日, 2週日 後에 算定한 細胞數를 統計處理할 때 그 變化量이 커서 正常分布의 假定이 不可能하므로 細胞數를 常用代數로 變換하였다 (Table IV). 變換된 細胞數를 利用하여 對照群과 實驗群間의 差異 및 細胞培養 1週日, 2週日 後 生存 細胞數에 대한 各 實驗群間의 統計的 差異가 있나를 確認하기 위하여 分散分析 (ANOVA)을 實施하였던 바 有意한 差異가 認定되었다. ($df^1=6$, $df^2=140$, $F=25.9123$, $P<0.01$) 事後比較로서 Scheffee 檢定을 適用하였던 바 細胞培養 1週日 後의 結果에서, 對照群에 대해 實驗 第2群과 第3群에서 有意한 判定이 認定되었으며 ($P<0.05$) 그 외 實驗群과 對照群, 實驗 第2, 3群과 다른 實驗群 사이에서는 有意한 差異를 發見할 수 없었다. 細胞培養 2週日 後의 結果에서, 對照群에 대한 各 實驗群의 時間 經過에 따른 細胞成長에 대한 有意性 如否를 알기 위해 二元分散分析을 實施하였던 바 對照群 및 實驗群間에서 有意한 差異가 認定되었다 ($P<0.01$). 또 對照群 및 各 實驗群에서 細胞培養 1週日, 2週日

問의 細胞成長에 의한 差異가 認定되었다 ($P < 0.01$).

Table VII. Mean scores of cytotoxicity reduced from RGR values.

Experimental Group	1 Week	2 Weeks
1	+	+++
2	++	++
3	+++	+
4	+	+++
5	+	++
6	+	-

IV. 總括 및 考按

齒科 修復用 材料의 物理的 및 機械的 性質을 檢査하는 方法이 開發되면서 이러한 材料를 臨牀的으로 使用하기 위하여 生物學的 檢査를 並行하고 있으며 修復材料의 齒髓에 대한 生物學的 安定性을 確立하기 위해 여러가지 檢査方法이 紹介되어 왔다. 本 研究은 廣範圍하게 使用하는 合着性 시멘트인 polycarboxylate 시멘트와 zinc phosphate 시멘트가 齒髓에 미치는 影響을 細胞培養을 通過 材料의 毒性을 分析 評價하였다.

Polycarboxylate 시멘트는 phosphate 系統의 시멘트가 갖는 物理的 強度와 zinc oxide eugenol 시멘트가 갖는 生物學的 適應性을 結合하여 開發된 材料이다. 이 材料는 粉末 狀態의 zinc oxide와 液으로 使用하는 polyacrylic acid의 反應으로 硬化하며 zinc oxide는 10% Magnesium oxide와 tin oxide를 包含하고 少量의 silica, alumina, bismuth salt가 添加된다.³⁶⁾ 또 4~5% stannous fluoride나 tannic acid를 包含시킬 수 도있다. 一般的으로 polycarboxylate 시멘트의 生物學的 親和力은 아주 優秀하다.³⁷⁾ 이는 硬化後 殘存 monomer가 最少로 存在하므로 齒髓에 對한 影響은 아주 적으며 오히려 zinc oxide eugenol 시멘트

보다 적게 나타나기도 한다.^{8,9)} 이는 시멘트의 硬化時 初期에 나타나는 毒性이 顯著히 減少하는 등 주로 內的인 毒性이 적기 때문이다. 한편 硬化時 pH가 急激히 增加하고 象牙細管內 組織液에 含有되어있는 calcium과 蛋白質에 結合하는 ion을 含有하며 이러한 ion과 材料의 高分子에 의해서 polyacrylic acid의 擴散을 抑制하여 中性化되어 毒性이 減少된다.³⁷⁾

本 實驗에서 3種의 polycarboxylate 시멘트中 實驗 第2群과 3群은 培養 1週日 後의 細胞成長이 對照群에 비해 抑制되었으나 培養 2週日 後에는 細胞成長率이 對照群과 類似하거나 그 以上の 成長率을 보여주었다. 實驗 第1群은 培養 1週日 後에 對照群과 類似的한 細胞成長을 나타내었으나 培養 2週日 後에는 顯著한 細胞成長의 抑制를 나타내었다. 培養實驗에서 粉末狀態의 zinc oxide와 polyacrylic acid가 混合되어 反應이 일어날 때 zinc ion이 培養液으로 分散된다고 하였으며 Kawahara 등²⁶⁾은 이렇게 分散된 zinc ion과 metallic zinc는 培養液에서 顯著한 毒性을 나타냈고 이는 硬化되지 않은 polycarboxylate 시멘트의 zinc ion과 酸이 培養液으로 擴散되는 것이 毒性의 原因이라고 報告했으며 이후 酸이 中化되면서 材料의 毒性이 減少됨을 보였다고 하였다. 또 Spangberg 등⁶⁾은 生體外에서 細胞培養을 利用하여 polycarboxylate 시멘트의 細胞毒性을 檢査하였다. 放射性 同位元素인 ⁵¹Cr을 利用하여 細胞膜의 透過度를 測定함으로써 材料의 毒性을 評價한 結果, 混合 直後에 약간의 細胞毒性이 나타났으나 곧 毒性이 減少하였으며 이는 zinc oxide eugenol 시멘트보다 毒性이 적게 나타났다고 發表함으로써 polycarboxylate 시멘트는 窩洞의 裏裝材로도 使用할 수 있다고 主張하였다. Spangberg²⁵⁾는 材料에 抗齶蝕性을 付與하기 위해 包含된 弗素 ion은 細胞에 毒性을 미칠 수 있다고 發表했으며 Spangberg & Nazhan³⁵⁾은 pH와 弗素, zinc ion이 細胞毒性和의 關係에 대해서, 낮은 pH와 弗素 그리고 zinc ion은 細胞成長에 抑制效果를 보이며 細胞培養時 zinc ion은 培養

液으로 계속 分散되어 顯著的 毒性을 나타낸다고 發表하였다. 또한 Kawahara等¹⁶⁾은 이미 硬化된 시멘트에서도 zinc ion이 계속 擴散되어 細胞는 細胞質의 收縮 等の 毒性反應이 나타나며 Crisp³⁸⁾는 水分 속에서 polycarboxylate시멘트의 zinc ion의 擴散을 證明하기 위해 化學的 方法으로 分析하기도 하였다. 本 實驗 第2 群과 第3 群의 結果에서 培養 初期에 나타난 細胞毒性은 zinc ion과 酸의 擴散에 의한 것으로 推定되며 이후 細胞毒性이 減少됨을 나타내었다. 이는 Kawahara¹⁶⁾의 研究 報告와 類似하다고 思料되며 Spangberg⁶⁾의 報告에 비해 初期 毒性이 매우 심하게 나타난 것은 實驗方法에 있어서 細胞毒性의 測定方法 差異에서 起因한다고 思料된다. 그러나 實驗 第1 群의 結果에서 培養 2 週日 後에 오히려 細胞毒性이 더욱 심하게 나타났다. 이에 使用된 HY-BOND시멘트에는 抗齶蝕 效果를 위해 弗素와 tannic acid가 添加되었으므로 이 시멘트에 包含된 zinc ion, 弗素, 酸에 의해 細胞毒性이 持續적으로 나타난 것으로 推定되며 이러한 結果는 Spangberg²⁵⁾의 報告에 付 合되는 것으로 思料된다. 또 實驗 第2 群의 Poly-F시멘트에도 弗素가 含有되어 있는 바 HY-BOND 實驗群과의 細胞毒性 差異는 HY-BOND시멘트에 含有된 tannic acid, zinc ion 및 弗素가 서로 複合되어 細胞毒性에 影響을 준 것으로 思料된다.

本 實驗에 利用된 zinc phosphate 시멘트는 一般的으로 臨床에서 廣範圍하게 使用되고 있다. Zinc phosphate시멘트는 混合 後 2 分에 pH가 1.6으로 매우 높은 酸度를 보이고 硬化 1 時間 後에도 pH가 4 以下の 酸度를 보이며¹⁴⁾ 이러한 酸度에 의해서 zinc phosphate 시멘트는 齒髓에 刺戟性이 큰 것으로 報告되고 있다. zinc phosphate시멘트를 利用하여 修復物을 裝着할 때 酸度에 의한 刺戟 및 象牙細管 内の 組織液이 參透壓에 의해서 變化가 일어나 齒髓를 刺戟함으로써 疼痛을 느끼며 또 裝着時 시멘트에 의해서 Hyaluric壓力에 의해 齒髓에 刺戟을 줄 수 있다고 하였다.³⁹⁾ 그러나 少量의 zinc phosphate시멘트를 使

用時 이러한 酸은 곧 象牙細管 内の 組織液에 의해 中性化되어 刺戟은 계속되지 않으며 곧이어 回復過程이 일어난다. 오히려 이러한 刺戟은 回復象牙質의 形成을 促進시킬 수 있다. 하지만 깊은 窩洞에서 시멘트의 두께를 크게 하여 使用할 境遇 露出된 象牙細管을 통해 刺戟이 傳達되어 甚한 疼痛이나 혹은 深刻한 齒髓損傷을 招來하게 되므로 반드시 齒髓 保護劑가 必要하다. 그러나 Imai等⁴⁰⁾은 zinc phosphate시멘트의 齒髓에 대한 刺戟은 酸에 의한 것이 아니고 粉末에 包含되어 있는 無幾質 成分에 의한 것이라고 發表하였으며 이 研究에서 silicate시멘트와 zinc phosphate 시멘트는 같은 phosphoric acid를 液으로 使用하지만 silicate시멘트는 큰 毒性을 보이는 反而 zinc phosphate시멘트는 比較的 낮은 細胞毒性을 나타내었다고 하였다. 이것은 silicate 시멘트에 包含되어 있는 弗素가 細胞毒性에 큰 影響을 미치며 또한 낮은 pH도 이와함께 影響을 미치게 된다고 하였다.⁴¹⁾ 또한 phosphoric acid에는 反應의 媒介體로서 0~9%의 zinc ion이 包含되어 있으며 Spangberg等³⁵⁾은 이러한 zinc ion이 낮은 pH 및 弗素와 함께 細胞毒性에 큰 影響을 줄 수 있다고 報告하였다.

本 實驗의 zinc phosphate시멘트를 使用한 實驗 第4 群, 5 群, 6 群에서 細胞培養 1 週日 後에 算定된 細胞數를 統計處理할 때 細胞數를 常用代數로 變換시켜 統計的 意義를 確認하기 위한 分散分析을 한 結果 對照群과 實驗群間에 有意한 差異가 認定되지 않았으므로 實驗 第4 群, 5 群, 6 群의 細胞增殖은 對照群과 類似한 結果를 나타내어 細胞增殖의 抑制가 없는 것으로 나타났다. 또 培養 2 週日 後의 結果에서 實驗 第5 群과 6 群은 對照群과 類似한 細胞增殖을 나타냈다. 이는 Imai等⁴⁰⁾의 研究 結果와 同一한 所見을 나타냈으며 窩洞 内の 細菌 存在 및 邊緣漏出에 의해 齒髓反應을 誘發한다고 主張하는 Brännström¹⁸⁾의 用法檢査(USAGE TEST)의 結果와 一致됨을 보여주었다. 그러나 實驗 第4 群에서 培養 2 週日 後의 細胞增殖은 顯著하게 抑制되었음을 나타냈다. 이는

시멘트의 낮은 pH와 zinc ion이 培養液으로 持續的인 擴散을 하면서 Lee Smith 시멘트의 粉末에 包含되어 있는 無機質 成分의 差異와 實驗時 材料의 操作過程에서 差異가 있기 때문에 큰 細胞毒性이 나타난 것으로 思料된다. 이는 Imai⁴⁰와 相異한 結果를 나타내지만 Tronstad⁴³의 研究 報告와 類似한 所見을 보이고 있다. Hasselgren等⁴²은 筋肉內에 實驗材料를 埋植하여 生體 毒性檢査를 하여 筋肉의 酸化酵素의 活動力을 測定함으로써 材料의 毒性을 評價하였던 바 zinc phosphate 시멘트는 酸化酵素의 活動力을 抑制함으로써 細胞毒性을 나타낸다고 主張하였고 Tronstad等⁴³도 zinc phosphate의 毒性이 millipore filter를 透過하여 細胞의 酸化酵素의 活動力을 抑制한다고 發表하였다. 그러나 Imai⁴⁰는 細胞培養法을 利用하여 zinc phosphate시멘트의 生物學的 影響을 研究하고 이를 生體內에서의 研究와 比較 檢討하였던 바 zinc phosphate 시멘트는 細胞培養에서 毒性이 거의 없었으나 齒髓反應은 初期 炎症反應을 招來했다고 發表했다.

一般的으로 生體實驗을 통해 polycarboxylate시멘트는 齒髓에 無害한 材料로 評價되고 있으며 zinc phosphate시멘트는 齒髓에 刺戟을 주는 材料로 알려졌다. 그러나 本 實驗의 細胞培養을 利用한 生體外方法에서의 結果는 오히려 polycarboxylate시멘트가 zinc phosphate시멘트보다 細胞毒性이 큰 것으로 나타났다. 즉 臨床的으로 評價되는 polycarboxylate시멘트와 zinc phosphate시멘트의 生物學的 評價와 反對의 結果를 얻었다. 이렇게 材料의 生物學的 評價는 研究하는 方法에 따라 그 結果가 差異를 나타낼 수 있다고 思料된다. Mjör等³³은 齒科 修復用 材料의 齒髓反應을 檢査하기 위해 一般的으로 對照群에 使用되는 zinc oxide eugenol시멘트를 서로 다른 3가지 方法으로, 즉 ⁵¹Cr의 擴散을 利用한 細胞培養法, 筋肉內 埋植法, 齒牙에 窩洞을 形成하여 齒髓反應을 觀察하는 用法檢査 등을 利用한 實驗에서 zinc oxide eugenol 시멘트의 毒性은 各各 다르게 나타났다. 細胞培養法에

서 시멘트의 毒性이 가장 크게 나타났으나 用法檢査에서는 가장 적은 毒性을 나타냈다고 發表하였다. 또 Mjör等³³, Hensten-Petersen²⁷, Spangberg等⁶, Imai⁴⁰, Hegeland & Leirskar等⁴⁴도 生物學的 檢査에서 한 種類의 材料에 對해 그 方法에 따라 다른 結果를 보인다고 報告하였다. 이러한 差異는, 齒牙에 存在하는 象牙質에 起因된다고 思料된다. 生體外 細胞毒性檢査에서 象牙質 役割을 하는 材料를 使用함으로써 새로운 研究 方法이 提示되어 왔다. 實驗時 細胞와 材料의 接觸은 아주 重要하며 單一細胞層 위에 實驗材料를 올려 놓음으로써 이러한 接觸이 이루어진다고 하였으며⁴⁵ 細胞와 材料가 直接 接觸하게 될 경우 材料에 대한 細胞反應에 影響을 주어 實驗에 대한 評價가 複雜하게 된다. Hensten-Petersen²⁷은 實驗材料와 細胞 사이에 寒天을 位置시켜 直接的인 接觸을 피하게 하였으며 Imai⁴⁰는 象牙細管內의 組織液과 成分이 비슷해지도록 하기 위해 寒天의 두께와 serum의 濃度를 變化시켰다. 그러나 이 實驗方法에서는 材料에서 分散되는 毒性物質의 成分이 寒天으로 吸收 擴散되어 細胞의 反應을 正確하게 評價하기 힘들므로 最近 細胞와 材料 사이에 millipore filter를 使用하는 方法이 紹介되어 直接的인 接觸을 피하게 하였으며 象牙質 粉末 및 齒牙窩洞 形成法이 提示되는 등 生體內의 實驗과 生體外 實驗과의 聯關性을 이루기 위한 勞力이 繼續되고 있다.

Truelove等⁸에 의하면 窩洞 形成後 存在하는 smear layer는 齒髓에 큰 影憲을 미칠 수 있다고 하였으며 이 smear layer는 약 2~5 μ 두께를 가지고 주로 齒質殘沙와 細菌으로 構成되어 있고 이 layer를 除去하지 않으면 充填物 下에서 細菌이 增殖하여 toxin分泌 등으로 因해 齒髓에 炎症을 誘發하게 된다고 報告하였으며 Brännström¹⁰은 窩洞의 基底部分과 象牙細管內에서 細菌의 存在를 確認하였고 만약 細菌이 없는 경우 zinc phosphate 시멘트의 使用時에 齒髓反應이 나타나지 않았다고 하였다. 또 Brännström & Nyborg¹⁷은 窩洞 形成後 殘存하는 細菌이나 邊緣漏出에

의한 細菌減染이 齒髓反應을 招來한다고 報告하는 等 細菌과 齒髓反應의 關係를 究明하려는 研究가 繼續되었다. 이와같이 材料의 毒性 評價에서 實驗方法에 따른 相異한 結果의 相互 關聯性을 위한 研究가 이루어지고 있다.

一般的으로 生體外實驗에서는 細胞와 材料의 接觸이 最大로 이루어지므로 細胞가 材料에 대해 너무 銳敏한 反應을 나타내어 때로는 相異한 結果가 나올 수 있지만 實驗材料의 臨床的 意味를 付與하는데 도움이 될 수 있다고 思料되며 生體外 實驗方法의 多角的인 分析과 評價를 通해 生體內 實驗과 生體外 實驗 結果의 相互關聯性이 이루어지도록 改善되어야 하며 또 齒科用 修復物의 生物學的 再評價가 行해져야 할 것으로 思料된다.

V. 結 論

臨床에서 사용되는 合着性 시멘트인 polycarboxylate시멘트와 zinc phosphate 시멘트의 細胞毒性을 評價하기 위해 生體外에서 齒髓의 纖維芽細胞를 α -MEM에서 培養 後 各 3種 씩의 polycarboxylate시멘트와 zinc phosphate 시멘트를 混合하여 細胞와 接觸시킨 後 細胞培養을 하였으며 1週日 및 2週日 後에 材料의 細胞毒性을 分析하기 위해 細胞數를 算定하여 對照群 및 實驗群을 比較 檢討한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. Polycarboxylate시멘트 中 Durelone 시멘트는 培養 1週日 後에 심한 細胞毒性을 나타내었으나 培養 2週日 後에는 細胞毒性이 顯著하게 減少하는 傾向을 보였으며 Poly-F 시멘트는 培養 1週日 後에 細胞毒性을 나타냈으며 培養 2週日 後에는 약간의 減少를 보였다. HY-BOND 시멘트는 初期에 輕微한 細胞毒性을 나타냈으나 培養 2週日 後에는 심한 細胞毒性을 나타냈다.

2. Zinc phosphate시멘트는 培養 1週日 後에 모두 細胞毒性을 나타내지 않았으며 이 중 Lee Smith시멘트는 培養 2週日 後의 結果에서 심한 細胞毒性을 나타냈다.

3. 一般的으로 細胞毒性은 zinc phosphate

시멘트가 polycarboxylate시멘트보다 輕微하게 나타냈다.

REFERENCES

1. Watts, A., B.D.S., L.D.S.: Bacterial contamination and the toxicity of silicate and zinc phosphate cements. Brit. Dent. J., 146:7-13, 1979.
2. Thanik, K.D., Boyd, D.A., and Van Huysen, G.: Cavity base materials and the exposed pulp marginal blood vessels. J. Prosthet. Dent., 12:165-171, 1962.
3. Smith, D.C.: A new dental cement. Brit. Dent. J., 124:381, 1968.
4. Plant, C.G.: The effect of polycarboxylate cement on the dental pulp. Brit. Dent. J., 129:424-426, 1970.
5. Beagrie, G.S., Main, J.H.P., and Smith, D.C.: Inflammatory reaction evoked by zinc polyacrylate and zinc eugenate cements a comparison. Brit. Dent. J., 132:351, 1972.
6. Spangberg, L., Rodrigues, H., and Langeland K.: Biologic effects of dental materials: Effect of polycarboxylate cements on HeLa cells in vitro. Oral Surg., 37:113-117, 1974.
7. Safer, D.S., Avery, J.K., and Cox, C.F. Ann Arber, Mich: Histopathologic evaluation of the effects of new polycarboxylate cements on monkey pulps. Oral Surg., 33:966-975, 1972.
8. Truelove, E.L., Mitchell, D.F., and Phillips, R.W.: Biologic evaluation of a carboxylate cement. J. Dent. Res., 50:166, 1971.
9. Jendresen, M.D., and Trowbridge, H.O.: Biologic and physical properties of a zinc polycarboxylate cement. J. Prosthet. Dent., 28:264-271, 1972.
10. Brännström, M., and Nyborg, H.: Bacterial growth and pulpal changes under inlays

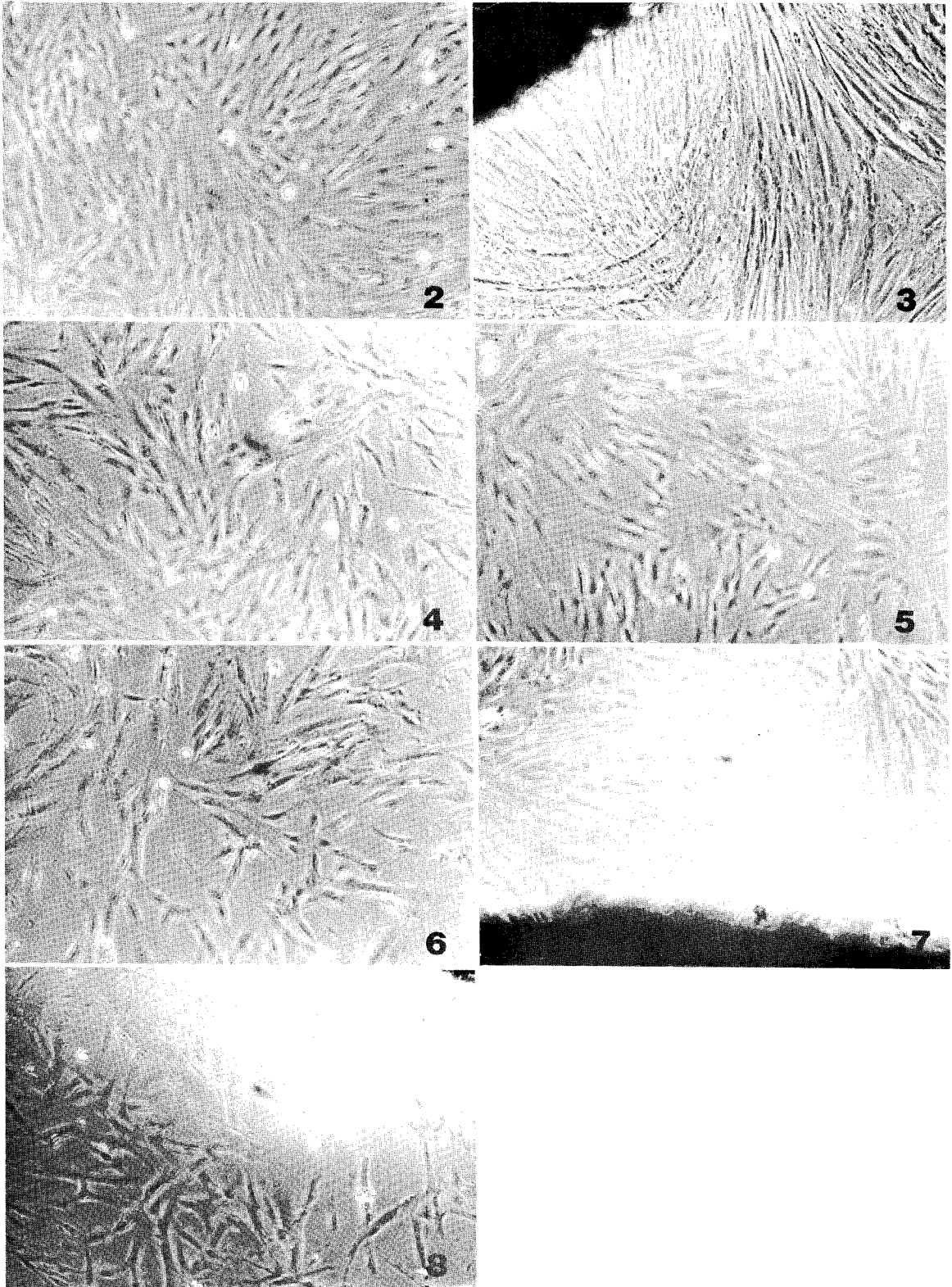
- cemented with zinc phosphate cement and Epoxylyte CBA 9080. *J. Prosthet. Dent.*, 31:556-565, 1974.
11. Langeland, K.: Criteria for biologic evaluation of anterior tooth filling materials. *Int. Dent. J.*, 17:405-440, 1967.
 12. Barnes, D.S., and Turner, E.P.: Initial response of human pulp to zinc polycarboxylate cement. *J. Can. Dent. Assoc.*, 37:265-266, 1971.
 13. Langeland, L.K., Walton, R.E., Rodrigues, H.H., Dowden, W.E., and Langeland, K.: Pulpal response to combination polycarboxylate cement and composite resin. *J. Dent. Res.*, 51:143, Abstr. 283, 1972.
 14. Plant, C.G., and Tyas, M.: Lining materials with special reference to Dropsin. *Brit. Dent. J.*, 128:486, 1970.
 15. Massler, M.: Biologic considerations in the selection and use of restorative materials. *Dent. Clin. Nort. Am.*, 132-147, 1965.
 16. Kawahara, H., Imanishi, Y., and Oshima, H.: Biological evaluation on glass ionomer cement. *J. Dent. Res.*, 58(3):1080-1086, 1979.
 17. Brännström, M., and Nyborg, H.: Pulpal reaction to polycarboxylate and zinc phosphate cements used with inlays in deep cavity preparation. *J. Am. Dent. Assoc.*, 94:308-310, 1977.
 18. Brännström, M., Vojinovic, O., and Nordenvall, K.J.: Bacterial and pulpal reaction under silicate cement restoration. *J. Prosthet. Dent.*, 41:290-294, 1979.
 19. Brownse, R.M.: The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials-does it have a role? *Int. Endod. J.*, 21:50-78, 1988.
 20. Tyas, M.J., and Browne, R.M.: Biological testing of dental restorative materials. *J. Oral Rehabil.*, 4:275, 1977.
 21. Hansen, H.P., and Brunn, C.: Long-term pulp reaction to silicate cement with an intradental control *Scand. J. Res.*, 79:422, 1971.
 22. Brännström, M., and Nyborg, H.: Cavity treatment with a microbicidal fluoride solution; Growth of bacteria and effect on the pulp. *J. Prosthet. Dent.*, 30:303-310, 1973.
 23. Brännström, M., and Nordenvall, K.J.: Bacterial penetration, pulpal reaction and the inner surface of Concise enamel bond-composite fillings in etched and unetched cavities. *J. Dent. Res.*, 57:3, 1978.
 24. Mejare, B., Mejare, I., and Edwardsson, S.: Microbial marginal leakage and composite fillings studied with and anaerobic technic. *J. Dent. Res.* 56A:176, 1977. (IADR Abst. No. 534).
 25. Spangberg, L.: Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg.*, 35:389-401, 1973.
 26. Kawahara, H., Yamaguchi, A., and Nakamura, M.: Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int. Dent. J.*, 18:443-467, 1968.
 27. Hensten-Pettersen, 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.
 28. Yesilsoy, A., and Robert, J.: Effects of endodontic materials on cell viability across standard pore size filters. *J. Endod.*, 11:401-406, 1985.
 29. Kawahara, H., Nakamura, M., Yamagami, A., and Nakamishi, T.: Cellular response to dental amalgam in vitro. *J. Dent. Res.*, 54:394, 1975.

30. Spangberg, L.: Biological effects of root canal filling components of root canal filling material on HeLa cells. *Odontol. Revy.*, 20:133-145, 1969.
31. Leirskar, J., and Helgeland, K.: A methodologic study of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro. *Scand. J. Dent. Res.*, 80:120-123, 1972.
32. Tyas, M.J.: A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J. Dent. Res.*, 56(10):1285-1290, 1977.
33. Mjör, I.A., Hensten-Pettersen, A., and Skogedal, O.: Biologic evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture techniques, implantation tests and pulp studies. *Int. Dent. J.*, 27:125-129, 1977.
34. Seltzer, S. and Bender, I.B.: *The dental pulp*. 3rd edition, 1984.
35. Spangberg, L.S.W., and Al-Nazhan, S.A.: The radio-chromium release method for evaluation of cytotoxicity in vitro. *Int. Endod. J.*, 21:72-78, 1988.
36. Bertenshaw, B.W., and Combe, E.C.: Studies on polycarboxylates and related cements. II. Analysis of cement powders. *J. Dent.*, 1: 65, 1972.
37. Smith, D.C.: Composition and characteristics of dental cements, In Smith, D.C., and Williams, D.F. (eds.): *Biocompatibility of dental materials*. Vol. 2, Boca Raton, Florida C.R.C. Press, 1982.
38. Crisp, S., Lewis, B.G., and Wilson, A.D.: Zinc polycarboxylate cements: A chemical study of erosion and its relationship to molecular structure. *J. Dent. Res.*, 55: 299-308, 1976.
39. Hoard, R.J., Caputo, A.A., Contino, R.M., et al.: Intracoronal pressure during crown cementation. *J. Prosthet. Dent.*, 40:520, 1978.
40. Imai, Y., Watanabe, A., Chang, P.I., and Masuhara, E.: Evaluation of the biologic effects of dental materials using a new cell culture technique. *J. Dent. Res.*, 61(8): 1024-1027, 1982.
41. Helgeland, L., and Leirskar, J.: pH and the cytotoxicity of fluoride in an animal cell culture System. *Scand. J. Dent. Res.*, 84: 37-45, 1976.
42. Hasselgren, G., Wennberg, A., and Tronstad, L.: Evaluation of initial tissue response to biomaterials using muscular tissue and enzyme histochemical techniques. *J. Dent. Res.*, 56(A), Abstr. No. 306, 1977.
43. Tronstad, L., Hasselgren, G., and Wennberg, A.: Material toxicity evaluation using cells cultured on millipore filters and enzyme cytochemical techniques. *J. Dent. Res.*, 56(A), Abstr. No. 307, 1977.
44. Helgeland, K., and Leirskar, J.: A further testing of the effect of dental materials on growth and adhesion of animal cells in vitro. *Scand. J. Dent. Res.*, 80:206-212, 1972.
45. Das, S.: Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. *Oral Surg.*, 52:76-84, 1981.
46. Kettering, J.D., and Torabinejad, M.: Cytotoxicity of root canal sealers, a study using HeLa cells and fibroblasts. *Int. Endod. J.*, 17:60-66, 1984.

EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 2.** Fibroblasts cultured for 1 week in control culture. (x100)
- Fig. 3.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in control culture. (x100)
- Fig. 4.** Fibroblasts cultured for 1 week in polycarboxylate cement; HY-BOND (x100)
- Fig. 5.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in polycarboxylate cement; HY-BOND (x100)
- Fig. 6.** Fibroblasts cultured for 1 week in polycarboxylate cement; Poly-F (x100)
- Fig. 7.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in polycarboxylate cement; Poly-F (x100)
- Fig. 8.** Fibroblasts cultured for 1 week in polycarboxylate cement; Durelone (x100)
- Fig. 9.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in polycarboxylate cement; Durelone (x100)
- Fig. 10.** Fibroblasts cultured for 1 week in Zinc phosphate cement; Lee Smith (x100)
- Fig. 11.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in Zinc phosphate cement; Lee Smith (x100)
- Fig. 12.** Fibroblasts cultured for 1 week in Zinc phosphate cement; Fleck's (x 100)
- Fig. 13.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in Zinc phosphate cement; Fleck's (x100)
- Fig. 14.** Fibroblasts cultured for 1 week in Zinc phosphate cement; Drala (x100)
- Fig. 15.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in Zinc phosphate cement; Drala (x100)

논문 사진부도 ①



논문 사진부도 ②

