

# 數種 齒科 修復用 複合레진의 細胞毒性에 關한 實驗的 研究

서울대학교 齒科大學 齒科保存學教室

明濟謹 · 李鳴鍾

## AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE CYTOTOXICITY OF SEVERAL COMPOSITE RESINS

Jae-Keun Myoung, D.D.S., M.S.D., Myoung-Jong Lee, D.D.S., Ph.D.

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

### — Abstract —

This study was conducted to evaluate the influence of 5 microfilled composite resin to fibroblast cultivated from human pulp (age 13).

Each composite resin was manually mixed and filled in cylinder. Resin filled cylinders were placed in dishes (35mm in diameter) containing 3 ml of  $\alpha$ -MEM. Filters (pore size 0.22  $\mu$ m) to simulate dentin were also placed between the bottom of cylinder and the dish floor. Then stored in 5% CO<sub>2</sub> containing incubator for 1 and 2 weeks at the temperature 36.6 C.

The results analysed after 1 and 2 weeks were as follows:

1. Experimental group except group 2, 2 weeks incubation cases showed the cytotoxicity compared to the control group in cell count.
2. After 2 week-incubation of group 1 and group 4, cell count was more decreased than 1 week cases and cytotoxicity seemed to be constantly influenced to the cell multiplication.
3. The cell growth rate of 1 week incubation in group 3 and group 5 was similar to the control group and recognized the cytotoxicities of these groups were mild.
4. The cell multiplication rate of 2 week incubation cases in group 2 was greater than control group.

## - 目 次 -

- I. 緒 論
- II. 實驗材料 및 方法
- III. 實驗成績
- IV. 考 案
- V. 結 論
- 參考文獻
- 寫眞附圖
- 英文抄錄

### I. 緒 論

齒科 修復用 레진은 Bowen 에 의해 考案되어진 以後 그 臨床의 適用範圍가 더욱 넓어지고 構造에 있어서도 좋은 物性を 갖는 修復材料로 發展되었다.

레진을 비롯한 齒科用 材料의 生體適合性 評價는 必須의인 것이다! 많은 材料 특히 修復物은 象牙質, 齒髓組織이나 齒周組織등 生體組織과 長期間 接觸된 狀態로 存在하게 되므로 이러한 材料가 惹起시킬 수 있는 生物學的 毒性에 對한 研究는 먼저 試驗管内에서의 生物學的 檢査後 動物의 齒牙 및 隣接軟組織을 對象으로한 檢査를 臨床에서의 觀察을 通하여 評價되어야 한다.<sup>20</sup> 複合레진에 對한 齒髓反應의 研究도 많은 學者들에 의해 이루어져 初期 研究에서는 齒髓損傷의 原因으로 레진 自体의 化學的 刺戟으로 因하여 생긴 造象牙細胞 突起內的 破壞物이 象牙細管에 侵透, 齒髓에 到達하여 나타나는 炎症樣相에 關心을 기울였다.<sup>2,3,4)</sup>

그러나 Zander<sup>8)</sup>는 自家重合레진에 의한 齒髓反應의 原因으로 레진의 収縮으로 因한 邊緣漏出과 細菌의 侵透라고 主張하였다. Brännström과 Nyborg<sup>5,6,7)</sup>등도 齒質과 修復物 사이에 細菌의 出現을 報告하여 이 細菌들에 의해 齒髓刺戟이 發生된다고 하였으며 複合레진 自体는 無害하다고 主張하였다.

한편 Mjör<sup>9,10)</sup>는 細菌의 出現과 炎症의 程度

사이에는 直接的인 關係가 없다고 하였고 Quist<sup>11,12)</sup>는 充填物의 邊緣漏出部에 나타나는 細菌에 대한 臨床의 重要性을 明確하게 糾明하지 못했다고 主張하였고 다른 研究에서는 複合레진 自体와 細菌의 複合的인 原因을 報告하였다.

이러한 修復用複合레진의 齒髓反應은 大体로 "in-use test"에 의해 評價되어 왔는데 이 方法은 人間이나 動物의 齒牙에 人爲的으로 窩洞을 形成한 後 修復物을 充填하여 一定期間이 經過함에 따라 나타나는 齒髓組織의 組織學的 或은 病理學的 變化를 觀察함으로써 齒科用 材料의 毒性을 分析하게 된다! 그러나 이 方法에는 여러가지의 限界點을 갖고 있다. 實驗動物의 健康狀態등 環境의 差異, 窩洞形成 時 操作過程의 差異 및 이때 發生하는 熱, 第二象牙質의 形成, 窩洞形成 後 象牙質에 殘存하는 smear layer<sup>13,14)</sup> 특히 殘存齒質의 두께<sup>15,16)</sup> 修復物과 窩洞壁사이의 邊緣漏出等이 齒髓反應에 影響을 미치게 된다.

이와같이 修復物의 体内實驗에 의한 評價는 多少 主觀的이며 實驗條件이나 期間에 따라 多樣하게 나타날 수 있으므로 修復材料의 生體組織에 對한 生物學的 反應을 評價하는데 客觀性을 賦與하기 위하여 實驗條件이나 調查方法을 標準化하기 위한 研究가 繼續되어 왔다.<sup>17,18,19,20)</sup> 今世紀 初以來 体外에서 哺乳動物의 細胞가 培養되어왔으나 藥劑의 效果를 評價하기 위해 培養된 細胞를 使用한 것은 最近의 일이며 이 方法은 初期에는 藥理學的 研究에 利用되어 왔다.<sup>21)</sup>

生體 外에서의 細胞毒性檢査는 새로운 材料나 혹은 改良된 材料의 臨床의 適用을 위해서 一般的으로 實行되는 檢査方法이며 이러한 方法은 生物學的 反應이 빠르며, 銳敏하고 再現性이 있으며 細胞毒性의 算術的인 評價를 할 수 있다. 한편 齒科分野에서는 1955年 Kawahara와 Shiota<sup>24)</sup>등이 chick embryo heart 細胞를 利用하여 齒科用 金屬類와 레진등이 纖維芽細胞에 미치는 影響을 報告한 이래 齒科材料의 生物學的 適合性 檢査의 標準化를 規定하는데 細胞培養法이 利用되었다.

Gerstner<sup>22)</sup>가 人間齒髓組織 成分의 培養方法

을 記述하였고 Das<sup>23)</sup>는 齒科材料의 細胞毒性을 測定키 爲하여 人間의 齒髓組織을 利用한 培養法을 使用하였다. 齒髓는 纖維芽細胞와 細胞外 基質로 構成되는 結締組織이다. 齒髓組織 周邊部에 있는 造象牙細胞는 高度로 分化된 細胞이므로 培養이 어려운 反面 纖維芽細胞는 比較的 培養이 容易하며 外部刺戟에 對해 細胞分裂, 結締組織의 基質合成, 組織의 吸收速度 等を 變化시키는 性質을 갖고 있으므로 纖維芽細胞가 細胞培養에 廣範圍하게 利用되었다.

Tyas와 Browne<sup>26)</sup>은 齒科用材料가 일으키는 細胞損傷의 生物學的 評價를 体外에서 여러가지 方法으로 施行하였으며 Guess<sup>27)</sup> 등에 의해 考案된 寒天平板法은 藥劑의 細胞毒性을 評價하는 標準화된 方法으로 確認되고 있다.

모든 細胞毒性의 試驗에서는 試片과 培養된 細胞의 接觸方法이 重要的 要素이며<sup>21)</sup> 大部分의 齒科材料는 水溶性이 아니므로 細胞 혹은 細胞培養液과 試片을 物理적으로 直接 接觸시키거나 이 둘 사이에 透過性을 갖는 中間媒体를 넣어 間接적으로 接觸시키는 方法을 擇하여 實驗한다. 培養細胞가 試片과 寒天層으로 分離되었다면 寒天이 毒性物質의 成分을 吸收하거나 擴散을 妨害할 수 있으므로<sup>27)</sup> 最近에는 Millipore filter를 使用하거나<sup>21, 30, 31, 32, 33, 43)</sup> 보다 臨牀的 狀況과 類似하게 하기 위하여 象牙質粉末<sup>34)</sup> 이나 象牙質片<sup>35)</sup>을 使用하기도 한다. 이러한 細胞毒性을 測定하기 위한 評價方法은 細胞數의 算定<sup>28, 36, 37)</sup> 이나 DNA分析<sup>28)</sup>, 乳酸鹽 算出<sup>38)</sup> 에 의한 細胞成長率의 測定과 細胞의 酸素攝取에 의한 細胞呼吸量 測定法<sup>39)</sup>, 放射性 同位元素의 放出<sup>40)</sup> 이나 染色<sup>41, 42)</sup>에 의한 細胞膜의 透過度 變化 測定法, 細胞의 形態學的 變化의 顯微鏡的 觀察<sup>25)</sup>, 糖原代謝의 變化 調查, 絲粒體 酵素의 組織化學的 機械 分析<sup>36)</sup> 등의 方法이 單獨 혹은 複合적으로 使用된다.

이에 著者는 複合레진의 生體適合性을 보다 客觀적으로 評價하기 위하여 人體 齒牙의 齒髓에서 纖維芽細胞를 生體外 培養하여 細胞數算定에 의한 細胞成長測定法으로 레진의 細胞毒性을 測定한바 多少의 知見을 얻었기에 報告하는 바이다.

## II. 實驗材料 및 方法

### 1. 細胞의 培養

#### 1) 一次 培養

修復用 複合레진의 細胞毒性을 測定하기 위한 齒髓組織의 纖維芽細胞는 矯正治療를 위한 13세 男兒의 病變이 없는 小臼齒를 拔齒하여 齒髓組織을 細胞培養한 후 利用하였다.

齒牙는 拔去한 즉시 生理食鹽水로 洗滌한 後 消毒된 #700 bur와 cutter를 利用하여 破切한 후 No.15 scalpel로 齒髓를 摘出하였다. 4% Fetal Bovine Serum(FBS:GIBCO, Co., U. S. A), 150 $\mu$ g/100ml Fungizone(GIBCO, Co., U. S. A), Penicillin-Streptomycin(10,000 units/ml penicillin G sodium, 10,000mcg/ml streptomycin sulfate; GIBCO, Co., U. S. A) 등을 含有한 Dulbecco's modified Eagle's Medium을 넣은 60mm petridish(Corning Co., U. S. A)에 摘出した 齒髓를 3回 洗滌 後 培養液인  $\alpha$ -MEM으로 옮겨 No.15 scalpel 2개를 使用하여 약 1~2mm<sup>3</sup>이 되도록 細分하였다. 細分된 齒髓組織을 25cm<sup>2</sup>의 培養用 flask(Bellco, U. S. A)에 넣은 後 濕度 90% 溫度 36.6 $^{\circ}$ C, 炭酸가스 濃度 5%의 培養器에 10分間 넣어 組織片이 flask의 內面에 附着되도록 하였다. 이후 flask에 15ml의 培養液을 添加하여 隔日로 培養液을 交換하였다.

#### 2) 二次 培養

二次 培養을 위하여 培養用 flask內에 있는 培養液을 除去한 후 0.25% Trypsin-EDTA(GIBCO, Co., U. S. A)을 5ml 넣고 1分間 放置하여 細胞를 分離시키고 36.6 $^{\circ}$ C, 5% 炭酸가스培養器에 10分間 넣었다. 이에 다시 培養液 5ml를 넣고 pipette을 利用하여 flask의 基底部에 부착된 細胞를 分離하였다. 0.25% Trypsin-EDTA를 完全히 除去하기 위하여 1600

rpm의 遠心分離器를 利用하여 10分間 遠心分離한 後 5 ml의 培養液을 넣고 細胞浮遊液을 만들어 또 다른 25cm<sup>2</sup> 培養用 flask에 分注한 後 36.6°C 5% 炭酸가스培養器에 培養하였다. 같은 方法으로 7回 繼代 培養하여 實驗에 利用하였다.

## 2. 實驗材料

本 實驗에서는 市販되고 있는 5 種類의 化學重合複合레진을 製造會社의 指示대로 混合, 使用하였다. (Table 1)

Table 1. Composite resin employed

Material	Manufacturer
BIS-FIL	Bisco, U.S.A.
COMPACT	Svedia, SWEDEN
CLEARFIL	Kuraray, Co. JAPAN
MICROREST	G-C Dent Ind, JAPAN
HIPOL	Bupyoung, KOREA

## 3. 試片 製作

齒科修復用 化學重合複合레진 5種을 各各 混合하여 內徑이 8mm, 높이가 8mm인 glass ring (GIBCO. Co., U. S. A)에 各各 넣어 試片을 製作하였다.

## 4. 細胞毒性的 實驗方法

繼代培養한 纖維芽細胞는 0.25% Trypsin-E-DTA로 處理한 後 遠心分離하여 5ml의 培養液을 넣고 pipette을 利用하여 細胞浮遊液을 만들었다. Pasteur pipette으로 약 20 $\mu$ l 를 취한 後 血球計算器를 使用하여 細胞密度가 4  $\times$  10<sup>4</sup> cells/ml가 되도록 한 後 이를 內徑 35ml Petri dish에 3ml씩 分注한 後 0.22 $\mu$ m의 細孔크기를 갖는 microfilter를 培養접시의 中央에 위치시키고 製作된 試片이 完全히 硬化되기 前에 filter위에 올려놓았다.

實驗材料를 混合하여 넣은 試片을 實驗群으로 하고, 實驗材料가 들어 있지 않은 glass ring만 올려 놓은 것을 對照群으로 하여 各各 1週, 2週 後에 對照群과 實驗群의 細胞數와 細胞形態를 比較 檢討하였다.

## 5. 細胞數 算定

細胞培養 1週, 2週에 細胞數를 算定키 위하여 Petri dish의 培養液을 除去하고 0.25% Trypsin으로 細胞를 浮遊시킨 後 0.2% Trypan Blue(GIBCO. Co., U. S. A)로 生體染色하고 Pasteur pipette으로 20 $\mu$ l 를 취하여 血球計算器로 顯微鏡下에서 100배로 觀察하여 細胞數를 算定하였다. 또한 實驗材料에 의한 細胞의 形態學的 變化를 調查하기 위하여 Petri dish를 位相差 顯微鏡下에서 100배로 觀察하였다.

算定된 細胞數를 統計處理하여 細胞數가 正規 分布에 接近하도록 常用對數로 交換한 後 分散 分析(ANOVA)하여 實驗群間에 差異가 있나를 檢定하고 實驗群間의 個別比較를 爲해 Scheffee 檢定을 實施하고 生存細胞增殖率(Vital Cell Multiplication Efficiency)과 對照群에 對한 相對增殖度(Relative Growth Rate; RG·R)을 얻어 細胞毒性指數를 使用하여 結果를 判定하였다. (Table 2)

Table 2. 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 成績

細胞培養에 의한 對照群과 實驗群에서의 增殖된 細胞數 算定과 形態 變化의 觀察을 通해서 다음과 같은 成績를 얻었다.

#### 1. 對照群

培養 1週에는 球形으로 浮遊된 細胞는 時間이 經過함에 따라 Petri dish의 基底部에 着床하여 紡錘形으로 變化하고 單一細胞層을 形成하였다. 또한 星狀形의 細胞도 나타났다. (Fig. 1)

培養 2週에는 細胞의 密度가 더욱 稠密하게 나타나며 細胞配列은 大體적으로 一定한 樣相을 띠었으며 細胞의 形態를 觀察하기는 어렵다.

(Fig. 2)

對照群의 細胞數는 1週에  $(30.70 \pm 1.21) \times 10^4$  cells/ml, 2週에  $(56.90 \pm 11.63) \times 10^4$  cells/ml로 實驗 始作때의 細胞數  $12 \times 10^4$  cells/ml에 比하여 각각 2.56倍, 4.74倍로 增加하였다. (Table 3) 細胞增殖率은 1週에 2.56 2週에 1.85로 時間이 經過함에 따라 細胞增殖은 점차 鈍化됨을 보여 주었다. (Table 4).

#### 2. 實驗群

##### 1) GROUP 1.

培養 1週째에 BIS FIL을 試片으로 使用한 경우 試片周圍의 細胞形態와 細胞增殖樣相은 對

照群의 경우와 많은 差異를 보여 全般的으로 細胞密度의 減少가 보이며 多數의 變性壞死된 圓形의 細胞가 浮遊되고 試片으로부터 멀리 떨어진 周邊部의 細胞形態는 紡錘形으로 比較的 正常形態를 나타내었다. (Fig. 3)

培養 2週에는 1週보다 細胞密度가 더욱 減少하여 正常인 形態를 갖춘 星狀形의 細胞가 遠心部에 드물게 보였다. (Fig. 4).

細胞數는 培養 1週에  $(4.50 \pm 2.04) \times 10^4$  cells/ml, 培養 2週에  $(3.18 \pm 1.10) \times 10^4$  cells/ml로 實驗 初의  $12 \times 10^4$  cells/ml 보다 減少하였고 細胞增殖率은 時間이 經過함에 따라 계속 減少하였다.

相對細胞增殖度는 培養 1週, 2週에 各各 14.

Table 4. Cell multiplication efficiency (CME)

Group	CME	
	1 week	2 weeks
CONTROL	2.56	4.74
GROUP 1	0.37	0.27
GROUP 2	0.57	2.33
GROUP 3	1.05	1.43
GROUP 4	0.54	0.18
GROUP 5	1.72	2.12

Mean number of living cell in successive culture day

\*CME =

Mean number of living cell in start culture day

Table 3. Effect of composite resins upon cell multiplication of cultured fibroblast ( $\times 10^4$  cell/ml)

	Number of cells		
	Start	1 week	2 weeks
CONTROL	12	$30.70 \pm 1.21$	$56.90 \pm 11.63$
GROUP 1:	12	$4.50 \pm 2.04$	$3.18 \pm 1.10$
GROUP 2:	12	$6.95 \pm 1.57$	$28.04 \pm 4.92$
GROUP 3:	12	$12.65 \pm 4.06$	$17.17 \pm 3.80$
GROUP 4:	12	$6.50 \pm 2.96$	$2.25 \pm 1.15$
GROUP 5:	12	$20.65 \pm 6.70$	$25.48 \pm 6.45$

\*GROUP 1: BISFIL, GROUP 2: COMPACT, GROUP 3: CLEARFIL, GROUP 4: MICROREST, GROUP 5: HIPOL

66, 5.59를 나타냈다.

2) GROUP 2.

培養 1週째는 GROUP 1과 별 차이없이 多數의 壞死된 細胞가 나타났다. (Fig. 5) 2週째는 細胞密度가 全般的으로 增加하고 細胞形態는 星狀形의 形態로 보이고 細胞突起가 뚜렷하게 나타난다. (Fig. 6)

細胞數는 培養 1週에  $(6.95 \pm 1.57) \times 10^4$  cells/ml, 2週에  $(28.04 \pm 4.92) \times 10^4$  cells/ml로 나타났고 細胞增殖率은 0.57, 2.33으로 1週後에는 減少하였던 增殖率이 2週後에는 급격히 增加하여 實驗 初보다 2.33배의 細胞數 增加를 보여줬다.

相對細胞增殖度는 22.64, 49.28을 各各 나타내 各其 對照群에 比해 1週째는 아주 낮게 나타났으나 2週째는 增加하였다. (Table 5)

Table 5. Relative Growth Rate (RGR)

Group	RGR	
	1 week	2 weeks
CONTROL	100	100
GROUP 1	14.66	5.59
GROUP 2	22.64	49.28
GROUP 3	41.20	30.16
GROUP 4	21.17	3.96
GROUP 5	67.26	44.78

Mean number of living cell in respective specimen

$$*RGR = \frac{\text{Mean number of living cell in respective specimen}}{\text{Mean number of living cell in normal control}}$$

3) GROUP 3.

培養 1週에 細胞樣相은 對照群에 比해 顯著히 細胞密度가 減少하고 若干의 變性된 圓形細胞가 試片周圍에 나타난다(Fig. 7). 2週째는 1週와 樣相이 類似하게 나타나며 단지 細胞密度가 多少 增加한 相으로 나타났다(Fig. 8).

細胞數는 1週에  $(12.65 \pm 4.06) \times 10^4$  cells/ml, 2週에  $(17.17 \pm 3.80) \times 10^4$  cells/ml로 나타났으며 細胞增殖率은 各各 1.05, 1.43으로 實驗 初보

다 약간의 增加를 보였다. 相對細胞增殖度는 41.20, 30.16으로 對照群에 比해 낮게 나타났다.

4) GROUP 4.

培養 1週에 星狀形의 細胞가 對照群에 比해 細胞密度가 顯著히 減少된 樣相으로 觀察되었으며 多數의 變性壞死된 圓形細胞가 試片周圍에 出現하였다(Fig. 9). 培養 2週에도 正常的인 形態를 갖춘 細胞가 드물게 觀察되었으며 細胞突起도 더욱 가늘고 긴 形態를 보이고 있었다(Fig. 10).

細胞數는 1週에  $(6.50 \pm 2.96) \times 10^4$  cells/ml, 2週에  $(2.25 \pm 1.15) \times 10^4$  cells/ml로 算定되었고 細胞增殖率은 時間이 經過함에 따라 점차 鈍化되었으며 相對細胞增殖度는 21.17, 3.96으로 對照群에 比해 아주 낮게 나타났다.

5) GROUP 5.

培養 1週에 細胞增殖樣相은 對照群에 比해 調密하지 못하고 드물게 變性壞死된 圓形 細胞가 浮遊된 狀態로 觀察되었다. (Fig. 11). 培養 2週에는 1週에 比해 若干 細胞密度가 增加하고 細胞像은 1週像과 類似하게 나타났다(Fig. 12).

細胞數는 1週에  $(20.65 \pm 6.70) \times 10^4$  cells/ml, 2週에  $(25.48 \pm 6.45) \times 10^4$  cells/ml이었고 細胞增殖率은 時間이 經過함에 따라 多少 鈍化되며 相對細胞增殖度는 各其 對照群에 對해 67.26, 44.78을 나타냈다.

Table 6. Base 10 logarithmic transformed mean cell counts of cultured fibroblast of experiment group

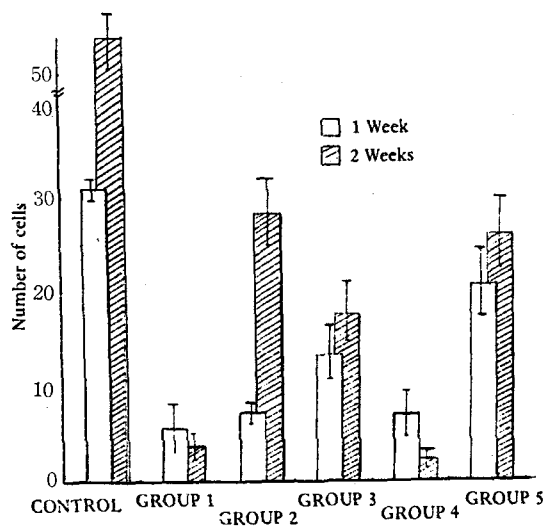
Group	Number of cells		
	Start	1 week	2 week
CONTROL	5.08	5.47±0.09	5.74±0.08
GROUP 1	5.08	4.60±0.22	4.47±0.17
GROUP 2	5.08	4.83±0.10	5.44±0.07
GROUP 3	5.08	5.08±0.13	5.22±0.09
GROUP 4	5.08	4.77±0.19	4.35±0.18
GROUP 5	5.08	5.29±0.13	5.39±0.09

細胞毒性指數에 의해 判別한 各群의 細胞毒性은 Table 7과 같다.

**Table 7.** Mean Score of cytotoxicity reduced from RGR values

Group	1 week	2 week
CONTROL		
GROUP 1	++++	++++
GROUP 2	++++	++++
GROUP 3	+++	+++
GROUP 4	++++	++++
GROUP 5	++	+++

各實驗群과 對照群의 培養 1週, 2週 後의 細胞增殖數는 다음 Graph와 같다.



**Graph:** Number of cells after 1 and 2 weeks culture with 5 composites.

#### IV. 考 案

二次 世界大戰 以後 自然産 材料보다 物性이 뛰어난 새로운 合成物質이 많이 生産되어 齒科分野에서도 많은 새로운 合成材料가 誕生하게 되었다. 이러한 새로운 齒科材料의 生物學的 適合性을 評價하기 위하여는 材料自体 및 構成成分에 對한 体外實驗 및 動物齒牙組織을 對象으로

한 調査를 거친 뒤 長期間의 臨床實驗이 必要하다.

修復用 複合레진을 最近 齒科에서 unfilled methylmethacrylate 레진이나 silicate cement 보다 優秀한 特性和 審美性때문에 이들을 代身하여 널리 使用되고 있으나 充填時 裏裝이 充分치 않으면 齒髓炎을 惹起할 수 있으므로 毒性을 갖는 修復物로 區分돼 있다.<sup>48</sup>

複合레진의 生物學的 適合性을 檢査하기 위해 酸腐蝕, 裏裝材의 使用如否, 邊緣漏出과 이에 浸透한 細菌이 齒髓에 미치는 影響等을 主要로 研究하였다. 特히 레진이 齒髓反應을 일으킬 때 邊緣漏出과 殘存齒質量이 미치는 影響에 대해서는 아직 論難이 많다. 數年동안 phosphoric acid가 silicate와 zinc phosphate cement가 나타내는 毒性의 原因이라고 生覺된 것처럼 初期 複合레진에 있는 methacrylic acid 역시 齒髓刺戟의 主要原因이라고 여겨져 왔다. 그러나 methacrylic acid를 減少시키거나 除去하여 pH를 中性으로 만든 複合레진 역시 刺戟性이 減少되지 않고 齒髓病巢를 惹起하였다. Kapsimalis<sup>49</sup>는 epoxy resin과 methylmethacrylate가 HeLa 細胞培養實驗에서 細胞毒性을 나타내지 않는다고 報告하였다.

Zander<sup>8</sup>가 邊緣漏出과 이에 浸透한 細菌이 齒髓에 미치는 影響을 記述한 이래 많은 研究가 行해져<sup>5,6,7</sup> 充填後 레진의 收縮으로 因한 邊緣漏出發生과 細菌의 浸透를 報告하였고 Bergenholtze<sup>50,51</sup>는 邊緣漏出에 出現하는 細菌이 齒髓에 炎症을 일으킨다고 主張하였다. Brännström Nordenvall<sup>52</sup> 등은 레진 充填時 齒髓刺戟의 唯一한 原因은 細菌이고 細菌의 浸透가 없는 邊緣漏出은 無害하다고한 反面 Mjör와 Kaum<sup>53</sup>는 齒冠部 象牙細管을 細菌에 露出시켜도 齒髓에 炎症을 일으키지 않거나 輕微한 反應을 誘發한다고 報告하여 細菌 浸透와 炎症 사이에는 直接的인 聯關이 없다고 主張하였다.

한편 Fusayama<sup>54</sup>는 細菌이 齒髓反應과는 無關하고 齒髓刺戟을 遮斷할 수 있는 主된 方法은 象牙細管의 完全한 閉鎖라고 主張하였다. Stanley<sup>55</sup>는 複合레진의 各成分이 個別的으로 齒髓에 미치는 影響을 調査하여 各各의 成分은 毒性

이 거의 없음을 報告하였고 Ronald<sup>55</sup>는 複合레진의 各成分은 個別的으로는 毒性을 나타내지 않지만 混入하거나 硬化되는 동안 複合의 作用하여 刺戟을 나타낸다고 主張하였다.

齒科用 레진修復物은 다른 藥材와 달리 齒髓와 直接 接觸하지 않고 象牙質에 의해서 齒髓와 間接 接觸된 狀態로 窩洞內에 存在하게 된다. 象牙細管內에 齒髓로부터 나온 造象牙細胞突起가 있다하더라도 이것이 刺戟으로 인해 齒髓에 어떠한 影響을 주는지 分明치 않으므로 殘存齒質의 量과 齒髓反應의 程度나 樣相사이의 關係에 對해 研究가 行해져 Baume과 Fiore-Donno<sup>56</sup>는 殘存齒質의 두께가 1.0mm以下일 때만 齒髓에 심한 病巢가 發生한다고 하였으며 Stanley<sup>57</sup> 등은 殘存齒質의 두께가 1mm 以上되어도 silicate cement과 같은 材料는 齒髓病巢를 일으킨다고 主張하였다. Pashley<sup>15,16</sup>는 齒科修復材의 毒性에 殘存齒質의 量이 미치는 役割을 分明치 않지만 毒性分子의 侵透에 妨害物로서 作用한다고 하고 Meryon<sup>58</sup>은 象牙質이 여러 材料의 毒性和 反應하거나 結合하여 齒髓反應에 影響을 미친다고 報告하였다.

이와같이 体内 實驗은 그 評價의 主觀性 및 毒性의 量的表現과 再現性의 어려움 때문에 齒科材料의 生物學的 標準化 및 適格審査를 위하여 지난 30여년간 細胞培養法이 널리 使用되고 있다.<sup>59</sup> 哺乳動物의 細胞培養은 初期에는 解剖學, 生理學, 生化學, 微生物學, 免疫學等 基礎分野에서 細胞構造나 複製, 再生機能 및 細胞代謝의 研究에 利用되어 오다가 最近에는 材料의 毒性效果의 量的測定을 研究하는 學者들의 注目を 받기 시작했다. 特히 材料가 組織과 直接 接觸하는 根管學이나 殘存齒質을 通해 齒髓와 材料가 間接 接觸하는 保存學에서 活潑히 研究가 進行되어 왔다.

이 方法에 의한 細胞毒性의 程度는 細胞成長測定이나 細胞膜透過性 變化測定 등으로 評價된다. Spanberg<sup>60</sup>는 細胞毒性 評價를 위한 細胞數算定法이 必要하다고 하였고 Helgeland<sup>61</sup>는 細胞內 DNA 및 蛋白質의 直接抽出에 의한 含量을 細胞毒性의 指標로서 利用하였으며 Wennberg<sup>62</sup>은 蛋白質 含量을 測定하여 細胞數 算定法과 相互關係가 있음을 報告하였다. Spannberg<sup>63</sup>는 齒科

材料의 毒性을 評價하기 위하여 放射性同位元素를 利用한 標識傷害試驗法으로 <sup>51</sup>Cr의 放出에 의하여 細胞損傷의 客觀的인 量的測定이 可能하다고 하였다. Brunner<sup>64</sup>는 細胞毒性 評價時 細胞數算定法과 放射性同位元素標識傷害試驗이 相互 關聯性이 있음을 報告하였으나 Hensten-Pettersson과 Helgeland<sup>36</sup>는 測定 方法에 따라 細胞毒性의 差異가 나타날 수 있으므로 齒科材料의 相對的인 細胞毒性比較에는 正確한 記述이 必要된다고 하였다. 本 實驗에서는 試驗管內에서 細胞培養을 通하여 그동안 國內에서 使用되어 온 化學重合複合레진 中 BISFIL, COMPACT, CLEARFIL, MICROREST, HIPOL을 利用하여 細胞數算定法에 의한 細胞成長度를 測定하여 細胞毒性의 評價를 實行하였다.

体外 實驗에서는 한 種類의 細胞만을 使用하므로 組織과 關聯이 있는 여러 細胞의 相互作用에 의한 代謝作用, 炎症作用, 免疫學的 反應을 避할 수 있었다. 實際로 修復物에 對한 組織反應에 關與하는 相互作用 要素는 藥材를 身體의 다른 部分에 移植했을 때에 비해 아주 적으므로 代謝作用과 免疫學的 相互作用에는 거의 影響을 받지 않는다. Tyas<sup>65</sup>는 오히려 이러한 相互作用의 排除가 實驗細胞의 名稱과 種類를 알 수 있고 迅速한 定量測定이 可能하다고 하였다. 齒髓組織은 周邊部의 造象牙細胞와 中心部의 纖維亞細胞 및 細胞外 基質로 構成되 있는 特異한 結締組織이다. 高度로 分化된 造象牙細胞는 培養이 어려우므로 培養實驗에 使用되는 細胞는 大部分 纖維芽細胞이다. 本 實驗에서는 人間齒牙의 齒髓組織에서 纖維芽細胞만을 培養하여 複合레진의 細胞毒性 測定에 利用하였다.

齒科材料는 藥에 비해 매우 낮은 溶解度를 나타내므로 細胞毒性 評價를 위한 實驗에서 方法上의 差異가 생기게 된다. 대부분의 齒科材料는 複合成分을 混入하여 半固形이나 固形의 狀態로 硬化된다. 따라서 材料가 나타내는 毒性은 그 硬化機傳이나 試驗時의 狀態에 따라 크게 左右된다. 体外細胞毒性實驗에서 使用되는 齒科材料의 狀態에 對해서는 特別한 規定이 없으므로 材料가 臨床에서 使用되는 狀態가 基準이 되고 있다. 즉 修復物이나 印象材는 混入한 即時 試驗해야



하고 鑄造金屬 등은 硬化가 完全히 끝난 狀態에서 試驗해야 한다<sup>37)</sup>. 本 實驗에서 複合레진을 混合한 即時 glass ring에 넣어 培養細胞와 filter를 사이에 두고 間接 接觸시켜 細胞毒性을 評價하였다.

Rees<sup>51)</sup>는 試驗材料의 化學的 造成에 對한 理解없이 毒性을 評價하는 것은 바람직하지 못하지만 實際로 市販하는 材料는 各 成分이 빠르게 改良, 變化되므로 各 造成에 對한 理解가 어렵다고 하였고 Hensten-Petterson<sup>62)</sup> 등은 材料의 어떤 成分은 特定成分下에서 그 性質이 增加하거나 減少한다고 하였으며 Ruyter<sup>63)</sup>는 硬化作用은 本來에는 없었던 새로운 合成체를 만들거나 特定化合物의 破壞를 일으킨다고 하였다. 本 實驗에서 各 群에 有意한 差異가 認定되는 것은 monomer等 成分自體에 의한 것이라기 보다는 各 成分 構成比에 따른 硬化時의 混合體의 差異에 의한 것이라 思料된다.

齒科用 材料의 細胞毒性을 알아보기 위한 適格 審査로서 細胞培養法에 의한 結果는 때로는 体内實驗의 結果와 相互 關聯性이 없을때가 있다. 特히 zinc oxide eugenol cement의 경우 体内實驗에서와는 달리 体外培養實驗에서는 심한 毒性을 나타내고<sup>64)</sup> Hensten-Petterson과 Helgeland<sup>36)</sup>는 体外實驗에서 silicate cement가 細胞毒性이 적다고 보고하였다. 이에 對해 Wennberg<sup>65)</sup>는 實驗이 너무 敏感하여 意味없는 結果를 나타내기도 한다고 實驗方法을 더욱 臨牀的 狀況과 近접시킬 것을 主張하였다. Spanberg와 Lange-land<sup>44)</sup>는 이러한 差異는 組織液에 의한 溶解 및 吸收度의 差異, 貪食作用 및 炎症反應의 程度에 따라 影響을 받으므로 体外實驗에 材料毒性의 正確한 評價를 위해 体内實驗이 必要하다고 하였다.

材料毒性評價를 위한 適格審査로서 細胞培養法의 無分別한 使用은 그 材料를 實際 齒牙에 使用할 때 나타날 수 있는 齒髓反應을 잘못 豫測할 수 있다. 그러나 細胞培養法은 濫用을 피하고 臨牀的 狀況을 考慮하는 한 齒科材料의 生物學的 適合性을 알아보는데 매우 有用한 方法이다.<sup>36,44)</sup>

47-66)

体外實驗을 適格審査 이상으로 使用하려면 材料를 使用하는 모든 實驗條件을 될수 있는한 臨牀

的 條件과 類似하게 해야 한다. 細胞培養法에서 修復物의 細胞毒性 評價에 影響을 미치는 重要한 要素中 하나는 試片과 細胞層이 接觸하는 面의 크기이다. 같은 量의 材料를 使用하여도 培養細胞와 接觸하는 面이 增加하면 그에 따라 毒性이 顯著히 增加한다. Meryon<sup>67)</sup>은 表面積이 毒性에 많은 影響을 주는 反面 材料의 量은 影響力이 크지 않아서 量이 增加하여도 表面積이 같으면 毒性은 크게 增加하지 않는다고 하였다. 단 zinc oxide eugenol cement과 glass ionomer는 例外이다. 本 實驗에서는 各 實驗群間 正確한 比較를 위하여 內徑이 8mm, 높이가 8mm인 同一한 glass ring를 使用하여 培養細胞層과 試片이 接觸하는 面積과 量을 一定하게 하였다.

한편 試片과 培養細胞層間의 接觸方法도 重要한 要素이어서 單一細胞層의 위에 直接 試片을 올려 놓거나<sup>29, 29)</sup> 試片에 直接 培養細胞를 移植하는 境遇<sup>28)</sup>도 있다. 또한 試片과 培養細胞를 寒天層으로 分離하는 境遇는 寒天이 毒性物質을 吸收하거나 結合할 수 있으므로 Imai<sup>66)</sup> 등은 寒天의 두께, 血清의 含有與否를 調節하여 여러가지 毒性을 보다 正確히 測定할 수 있다고 하였다. 最近에는 많은 學者들이<sup>30), 31), 32), 33)</sup> 培養細胞와 試片이 最適의 接觸을 위해 millipore filter 方法을 主張하였다.

millipore filter는 cellulous acetate와 cellulose nitrate의 混合體로 Wennberg<sup>68)</sup> 등은 最適의 細胞成長을 얻기 위하여는 細孔의 크기가  $0.45\mu\text{m}$ 가 第一 適當하고  $1.25\mu\text{m}$ 이상 크면 細胞突起가 細孔內로 成長하여 細胞와 材料間의 直接 接觸이 일어나 溶解되지 않는 毒性도 細胞에 影響을 끼친다고 主張하였다. 本 實驗에서는 細孔의 크기가  $0.22\mu\text{m}$ 인 filter를 使用하여 培養細胞層이 試片과 直接 接觸하는 것을 防止하여 直接 影響을 미치지 못하게 하였다.

本 實驗에서 細胞培養後 1, 2週의 細胞數는 그 數值가 커서 正規分布假定이 至難하므로 細胞數를 常用對數로 換算하였다. 換算된 細胞數를 利用하여 對照群과 實驗群 사이 및 各 實驗群間의 1週, 2週後, 生存細胞數에 對해 統計學的 差異가 있나를 確認하기 위하여 分散分析(A-NOVA)를 實施하였던 바 有意한 差異가 認定되

었다. ( $df_1=6, df_2=140, F=25.9123, P(0.01)$ ) 또한 Scheffee 檢定을 適用하여 培養 1週後 結果에서 對照群과 實驗群 間에 有意한 差異가 認定되었으며 ( $P<0.05$ ) 各 實驗群 間에서도 有意한 差異가 認定되었다. 培養 2週 後 結果에서 時間의 經過에 따른 細胞成長에 有意한 差異를 確認하기 爲하여 2 원分散分析을 實施하였던 바 各 實驗群에서 時間經過와 細胞成長에 의한 差異가 認定되었다. ( $P<0.01$ )

實驗 1 群의 培養 1 週에 細胞數는  $(4.50 \pm 2.04) \times 10^4 \text{ cells/ml}$  이었으나 培養 2 週에  $(3.18 \pm 1.10) \times 10^4 \text{ cells/ml}$  로 減少하고 實驗 4 群의 細胞數는 培養 1 週에  $(6.50 \pm 2.96) \times 10^4 \text{ cells/ml}$  이었으나 培養 2 週에  $(2.25 \pm 1.15) \times 10^4 \text{ cells/ml}$  로 減少하여 培養期間에 增加함에 따라 細胞數는 더욱 減少하여 試片의 細胞毒性이 持續됨을 보여주었다. 實驗 3 群의 境遇 培養 1 週에  $(12.65 \pm 4.06) \times 10^4 \text{ cells/ml}$  이던 細胞數가 培養 2 週에  $(17.17 \pm 3.80) \times 10^4 \text{ cells/ml}$  로 增加하고 實驗 5 群에서 培養 1 週에  $(20.65 \pm 6.70) \times 10^4 \text{ cells/ml}$  이던 細胞數가 培養 2 週에  $(25.48 \pm 6.45) \times 10^4 \text{ cells/ml}$  로 增加하여 細胞毒性이 多少 減少됨을 보여주었다. 實驗 3 群은 培養 1 週에  $(6.95 \pm 1.57) \times 10^4 \text{ cells/ml}$  이던 細胞數가 2 週 後에  $(28.04 \pm 4.92) \times 10^4 \text{ cells/ml}$  로 나타나 細胞數 增加率이 對照群보다 높게 나타나 細胞毒性이 激減되었음을 나타냈다.

全般的으로 各 實驗群에서 細胞數는 培養 1 週에 對照群에 비해 顯著的 減少한 보여 細胞毒性 있음을 보여 주었다. 各 實驗群의 細胞毒性은 培養 1 週 後는 1 群, 4 群, 2 群, 3 群, 5 群의 順으로 나타났고 培養 2 週 後는 4 群, 1 群, 3 群, 5 群, 2 群의 順으로 나타났다.

이와 같은 研究에서 이들 材料가 臨床에서 使用되었을 때 나타나는 生物學的 反應과 一致한다고 볼 수는 없으나 藥材의 臨床的인 使用前에 이루어져야 할 有用하고 客觀的인 毒性評價方法이라고 思料되어 各 複合레진에 對한 化學的 毒性 外에 變異性이나 發癌性과 같은 生物學的 評價, 成分分析 및 各 成分의 相互作用에 對한 研究가 試圖되어야 할 것으로 思料된다.

## V. 結 論

市販되고 있는 5 種의 齒科 修復用 化學重合 複合레진을 使用하여 細胞培養法을 利用, 生物學的 適合性を 評價하기 爲하여 人體의 齒髓組織에서 纖維芽細胞를  $\alpha$ -MEM으로 培養한 後 1 週, 2 週에 各 細胞數를 算定하여 對照群과 實驗群을 比較 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. 2 群 2 週境遇 以外的 實驗群은 對照群에 비해 細胞數의 增加率이 減少됨이 觀察되어 細胞毒性이 있음을 認知하였다.

2. 1 群과 4 群은 培養 1 週보다 培養 2 週에 細胞數가 더욱 減少하여 細胞毒性이 持續됨을 보였다.

3. 3 群과 5 群은 1 週 培養 後 細胞增加率 이 對照群과 類似하여 細胞毒性이 微弱하였음을 認知하였다.

4. 2 群은 培養 2 週에 細胞數가 急激히 增加하여 對照群의 細胞增加率보다 높았음을 認知하였다.

## REFERENCE

1. Brown R.M.: The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental anactrials—does it have a role? *Int. Endo J.* 21: 50-58, 1988.
2. Langeland, L.K., Guttuso, J., Jerme, E.R., and Langeland, K.: Histological and clinical: Comparison of addent with silicate cements and cold-curing materials. *JADA* 72: 373-384, 1966.
3. Stanley, H.R., Swerdlow, H., and Buonocore, M.G.: Pulp reactions to anterior restoration materials. *JADA* 75: 132-141, 1967.
4. Rao, S.R.: Pulp response in the rhesus monkey to composite dental restorative

- materials in unlined cavities. *Oral Surg.* 31: 676-688, 1971.
5. Brännström, M and Nyborg, H.: The presence of bacteria in cavities filled with silicate cement and composite resin materials. *Swed. Dent. J.* 64: 149-155, 1971.
  6. Brännström, M. and Nyborg, H.: Pulp Reaction to composite resin restorations. *J. Pros. Dent.* 17: 181-189, 1972.
  7. Brännström, M. and Nyborg H: Cavity treatment with a microbicidal fluoride solution: Growth of bacteria and effect on the pulp. *J. Pro. Dent.* 30: 301-310 1973.
  8. Zander, H.A.: Effect of self-curing resins on the dental pulp. *Oral Surg.* 4: 1563. 1951.
  9. Mjör. I.A.: The penetration of bacteria into experimentally exposed human coronal dentin. *Scand. J. Dent. Res.* 82: 191. 1974.
  10. Mjör, I.A.: Histologic demonstration of bacteria subjacent to dental restorations. *Scand J. Dent. Res.* 85: 169. 1977.
  11. Quist J., Quist. V. and Lambjerg-hansen, H.: Bacteria in cavities beneath intermediary base materials. *Scand. J. Dent Res.* 85: 313, 1977.
  12. Quist, V: Pulp response in human teeth to tooth colored filling materials. *Scand. J. Dent. Res.* 83: 54. 1975.
  13. Eriksen, H.M.: Pulpal response of monkeys to a composite resin cement *J. Dent. Res.* 53, 565-570, 1974.
  14. Tobias, R.S., Browne, R.M., Plant, C.G. & Ingram, D.V.: Pulpal response to a glass ionomer cement. *British Dental Journal*, 144, 345-350, 1978.
  15. Pashley, D.H., Michelich, B. & Kehl, T. Dentine permeability: effects of smear layer removal *Pro. Dent.*, 46, 531-537, 1981.
  16. Pashley, D.H.: Smear layer: Physiological conditions. *Operative Dentistry, Supplement* 3, 13-29, 1984.
  17. Autian, J.: General toxicity and screening tests for dental materials. *Int. Dent. J.*, 24- 235-250, 1974.
  18. American Dental Association: Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials. *JADA* 84: 382-397, 1972.
  19. Lewis, R.D. Coffey, J. Block, R.M. and Hirsh, J: Systemic distribution of <sup>14</sup>C Paraformaldehyde incorporated within formocresol following pulpotomies in dogs. *J. Dent. Res.* 57: 287, 1978.
  20. Stanford J.Q.: Recommended Standard Practices for Biological Evaluation of Dental Materials. *Int Dent J* 30: 140-188, 1980.
  21. Wennberg A.: In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials - the millipore filter method. *Int. Endo. J.* 21: 67-71, 1988.
  22. Gerstner H.: Tissue culture of pulpal elements. *Oral Surg* 32: 473-486, 1971.
  23. Das S.: Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. *Oral Surg.* 52: 76-84, 1981.
  24. Kawahara, H., Shiota, M. & Yamakawa, Y.: Studies on the effect of dental materials upon the mesenchymal cells in tissue culture. *J. Osaka, Odonto. Society*, 18: 342-348, 1955.
  25. Kawahara H., Imanishi, Y. & Oshima, H Biological evaluation on glass ionomer cement *J. Dent, Res*, 58, 1080-1086, 1979.
  26. Tyas, M.J, & Browne R.M.: Biological testing of dental restorative materials. *J. Oral Reha.* 4: 275-290, 1977.

27. Guess, W.L., Rosenbluth S.A., Schmid, B. & Autian J.: Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayer. *J. Pharm. Sci.* 54: 1545-1547, 1965.
28. Leirskar J. 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: 120-33, 1972.
29. Rosenbluth SA, Weddington GR, Guess WL Autian J.: Tissue culture method for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice *J. Pharm Sci* 54: 156-9, 1965.
30. Tronstad L. Hasselgren G Wennberg A.: Material cytotoxicity evaluation using cells cultured on millipore filters and enzyme cytochemical technique. *ADR* 56;A 119, 1977.
31. Wennberg A.: Biological evaluation of root canal sealers using in and in vivo methods *J. Endodon.* 6: 784-87, 1980.
32. Tronstad L. Wennberg A. Hasselgren G.: Screening tests for Materials. *J. Endodon.* 4: 304-7, 1978.
33. Tronstad L. Wennberg A.: In vitro assessment of toxicity of materials. *Int Endo J.* 13: 131-87, 1980.
34. Meryon, S.D., Jakemal, KJ. & Browne, R.M.: Penetration in vitro of human and ferret dentine by three bacterial species in relation to their potential role in pulpal inflammation. *Int. Endo. J.* 19: 213-220, 1986.
35. Meryon, S.D.: The influence of dentine on the in vitro cytotoxicity testing of dental restorative materials. *J. Biome. Mat. Res.* 18: 771-779, 1984.
36. Hensten-Patterson A., and Helgeland K.: Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques *Scand J. Dent Res.* 85: 291-6, 1977.
37. Hensten-Pettersen, A., and Helgeland, K.: Sensitivity of different human cell lines in the biologic evaluation of dental resinbased materials. *Scand. J. Dent. Res.*, 89: 102-107. 1981.
38. Helgeland K. Leirskar J.: A further testing of the effect of dental material on growth and adhesion of animal cells in vitro. *Scand J. Dent. Res.* 80: 206-12, 1972.
39. Hume, W.R.: Effect of eugenol on respiration and division in human pulp, mouse fibroblasts, liver cells in vitro. *J. Dent. Res.*, 63: 1262-1265, 1984.
40. Brunner, K.T., Mauer, J., Cerottini, J.C., and Chpuis, B: Quantitative assay of the lytic action of immune lymphoid cells on <sup>51</sup>Cr -labelled allogenic target cells in vitro: Inhibition by isoantibody and by drugs. *Immunology.*, 14: 181-196, 1968.
41. Guess WL, Rosenbluth SA Schmiat B, Autian J.: Agar diffusion method for toxicity screening of plastics on cultured cell monolayers. *J. pharm Sci.* 54: 1545-7, 1965.
42. Mohammad AR. Mincer HH. Younis O, Dillingham E, Siskin M.: Cytotoxicity evaluation of root canal sealers by the tissue culture agar overlay technique *Oral Surg* 1978. 45: 768-73.
43. Meryon, S.D., Stephen, P. G., Browne, R.-M.: A modification of the millipore method for screening restorative materials. *Int Endodon J* 15: 197-202, 1982.
44. Spanberg, L., and Langeland, K.: Biologic effect of dental materials. I. Toxicity of root canal filling materials on HaLa cells in vitro. *Oral Surg* 35: 402-214, 1973.
45. Stanley H.R., Going, R.E., and Chauncey,

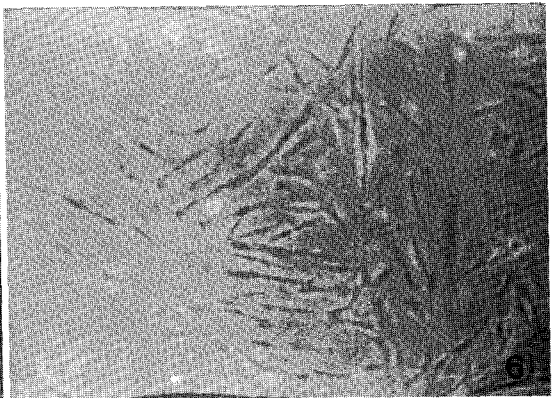
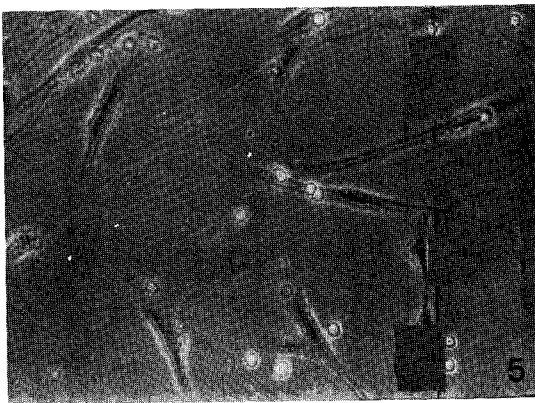
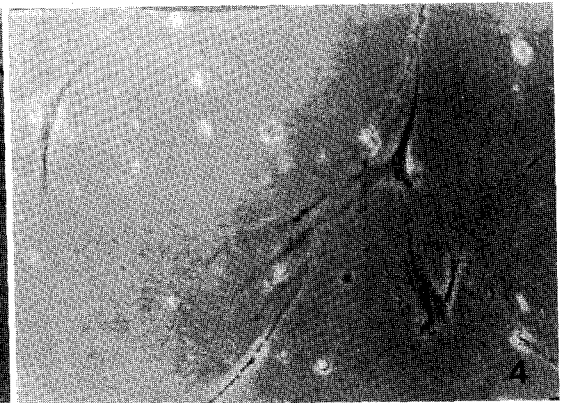
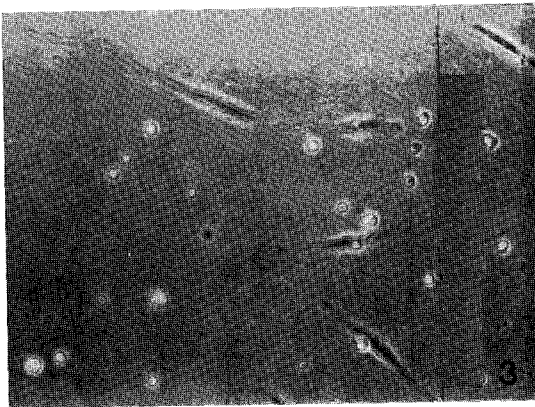
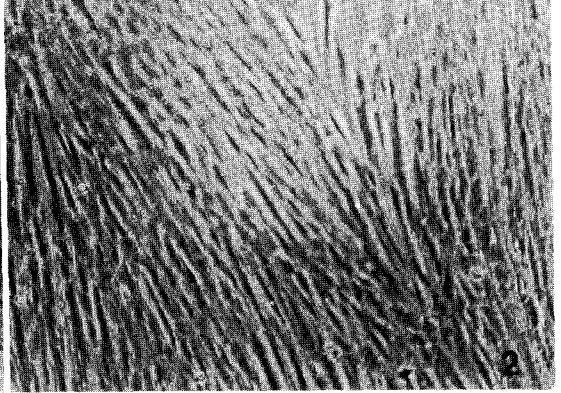
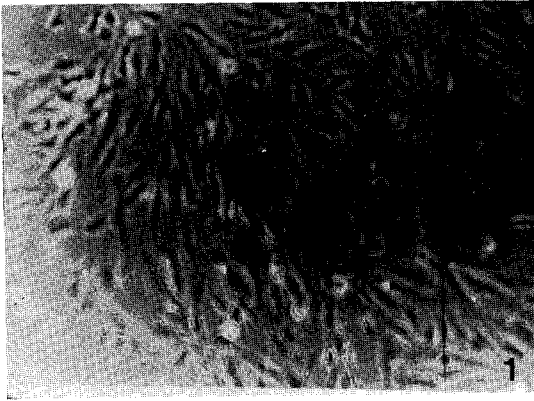
- H.H.: Human Pulp Response to Acid Pretreatment of Dentin and Composite Restoration, *JADA* 91: 817-825, 1975.
46. Stanford J.W.: Recommended standard practices for biological evaluation of dental materials. *Int. Dent. J.* 30: 140-188, 1980.
  47. Kawahara, H., Yamagami, A., and Nakamura, M.: Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int. Dent J.*, 18: 443-467, 1968.
  48. Baume, L. J. and Flore-Donno, G: Response of the Human Pulp to a New Restorative Material. *JADA* 76: 1016-1022, 1968.
  49. Kapsimalis, P.: Toxicity Studies of Cured Epoxy Resins *J. Dent Res.* 89: 1072-1960.
  50. Bergenholtz, G.: Effect of bacterial products on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand. J. Dent. Res.*, 85: 122, 1977.
  51. Bergenholtz, G., and Lindne, J.: Effect of soluble plaque factors on inflammatory reactions in the dental pulp. *Scand. J. Dent. Res.*, 83: 153, 1975.
  52. 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: 3-10, 1978.
  53. Fsayama T: New Concepts in Operative Dentistry, Chicago: Quintessence Publishing Co., 61-156, 1980.
  54. Stanley H. R. & Bowen R.L.: Compatibility of Various Materials with Oral Tissues. II: Pulp responses to composite ingredients *J. Dent. Res.* 58, 1507-1517, 1979.
  55. Ronald J. H.: Biologic considerations of Composite resin. *Nor. Ameri.*, 25: 257-270, 1981.
  56. Stamatii, A.R., Silano, V & Zucco, F. Toxicology investigations with cell culture systems. *Toxicology*, 20, 91-153, 1981.
  57. Henster- Pettersen. A.: Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int. Endo. J.*, 21: 89-99. 1988.
  58. Wennberg A.: An in vitro method for toxicity evaluation of water-soluble substances. *Acta. Odontol. Scand.*, 34: 33-41, 1976.
  59. Spangberg, L.: Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg.*, 35: 389-401, 1973.
  60. Tyas, M.J.: A method for in vitro toxicity testing of dental restorative materials. *J. Dent. Res.*, 56: 1285-1290, 1977.
  61. Rees, D., Wassell, R., Wilson, G & Braden, M.: A chemical analysis of five temporary crown and bridge resins. *J. Dent. Res.*, 66, 835 (Abstract No. 7), 1987.
  62. Hensten Petterson, A., Jacobsen, N. & Jonsen, J.: Mutagenic potential and influence on cell growth of single constituents of dental polymers. *J. Dent Res.*, 57A, 297 (Abstract no. 889, 1978.
  63. Ruyter, I.E.: Release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odontologica Scandinavica*, 38, 17-27, 1980.
  64. Mjor, I.A., Hensten-Pettersen, A. & Skogedal, O.: Biologic evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture techniques, implantation tests and pulp studies. *Int. Dent. J.* 27, 124-129, 1977.
  65. Wennberg, A., Mjor, I.A. & Hensen-Pettersen, A.: Biological evaluation of dental restorative materials-a comparison of different test methods. *J. Bio. Mat.* 17, 23-36, 1983.
  66. 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.: 1024-

67. Meryon, S.D. The influence of surface area on the invitro cytotoxicity of a range of dental materials. *J. Bio. Mat. Res.* 21, 1179-1186, 1987b.
68. Wennberg, A., Hasselgren, G. & Tronsead, L. A method for toxicity screening of bio-materials using cells cultured on milipore filters. *J. Bio. Mat. Res.* 13, 109-129, 1979.

### Explanation of Figures

- Fig. 1.** Fibroblasts cultured for 1 week in control. (x100)
- Fig. 2.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in control. (x100)
- Fig. 3.** Fibroblasts cultured for 1 week in Group 1. (x100)
- Fig. 4.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in Group 1. (x100)
- Fig. 5.** Fibroblasts cultured for 1 week in Group 2. (x100)
- Fig. 6.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in Group 2. (x100)
- Fig. 7.** Fibroblasts cultured for 1 week in Group 2. (x100)
- Fig. 8.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in Group 3. (x100)
- Fig. 9.** Fibroblasts cultured for 1 week in Group 4. (x100)
- Fig. 10.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in Group 4. (x100)
- Fig. 11.** Fibroblasts cultured for 1 week in Group 5. (x100)
- Fig. 12.** Fibroblasts cultured for 2 weeks in Group 5. (x100)

논문 사진부도 ①



논문 사진부도 ②

