

이장재의 세포독성에 관한 실험적 연구

서울대학교 치과대학 치과보존학 교실

김정혜 · 김영해

- 목 차 -

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

I. 서 론

치수의 보호와 와동형태의 수정을 목적으로 치수에 화학적, 생물학적으로 손상을 주지 않으며, 수복체에 의한 온도자극 및 충전재자체의 자극물이 치수에 도달하지 못하도록 차단하고, 약물적 효과를 기대하기 위하여 여러 이장재들이 개발 사용되어 왔다¹⁾. 그러나 이장재의 생물학적 성질에 관하여서는 아직 그 이해가 부족하여, 치과용 충전후 치수의 손상에 관한 논란이 제기되고 있다^{2,3)}.

Zinc oxide-eugenol 시멘트는 수복치과에서 널리 사용되는 재료로써 임시 충전재, 이장재 및 임시접착재 등의 용도로 상아질에 직접 사용되어 있다. Zinc oxide-eugenol 시멘트의 생물학적 특성을 평가하기 위해 생체의 실험으로써 Das⁴⁾는 세포배양후 현미경관찰을 통해 Zinc oxide-eugenol이 세포에 매우 유해한 것으로 보고하였으며, Imai⁵⁾은 한천배지 방법

을 이용하여 1~1.25mm두께의 한천배지에서, 매우 강한 세포독성이 있음을 보고하였고, Hensten-Pettersen과 Helgeland⁶⁾는 4가지의 다른 세포배양법을 사용하여 Zinc oxide-eugenol이 세포에 직접 적용될 경우 강한 세포독성이 나타남을 보고하였다. 그러나 Hume⁷⁾은 발거한 치아에 와동을 형성하고 Zinc oxide-eugenol을 충전한 후 Zinc oxide-eugenol의 성분이 함유된 배양액으로 세포배양을 한 후, 무해한 것으로 보고하였다. 이외에 Seltzer와 Bender⁸⁾는 치수에 대해, Beagrie 등⁹⁾은 결체조직에 Brodin과 Otavik¹⁰⁾는 신경 세포에 적용한 경우 독성이 나타났음을 보고하였다. 또한 Avery¹¹⁾는 Zinc oxide-eugenol이 2차 상아질을 거의 형성하지 않으며, 와동바닥에 염증세포가 잔존해 있음을 보고하였다.

Calcium hydroxide 제제는 치수조직과 접촉하고 있는 상아질의 수복을 촉진시켜 주므로 치수노출부위나 깊은 와동에 이장재로 쓰이고 있다^{12,13)}.

Calcium hyeroxide 제제는 입자형이거나 혹은 호재형 어느 것이나 치수조직이 노출된 경우 회복을 촉진시켜주는 작용이 있음이 보고된 바 있다^{12,13,14,15,16)}. Torneck과 Wagner¹⁷⁾는 이장재를 하지않은 아말감 와동에서 세포의 증식이 더욱 많음을 보고하였다. 또한 Das⁴⁾도 Calcium hyeroxide 제재로 처리한 경우 주위에 모세혈관이 풍부히 나타나는 것으로 미루어 치수조직에 독성이 없는 것으로 발표하였다. 그러나 Tronstad와 Mjör¹⁸⁾, Avery¹¹⁾는

* 본 연구는 1989年度 서울대학교 病院 特診研究費로 充當되었음.

Calcium hydroxide가 노출된 염증치수의 회복에 유익한 작용이 없는 것으로 보고하였으며, Stanley와 Lundy¹⁴⁾ 그리고 Avery¹¹⁾는 일부의 Calcium hydroxide 제제가 치수노출시 이차상아질을 유도하지 못한다고 발표하였다. 또 Avery¹¹⁾는 대부분의 Calcium hydroxide 제제가 초기에는 심한 반응을 일으키나, 잠시후 반응이 줄어들면서 이차상아질을 형성하는 것으로 보고하였다.

한편 Glass ionomer 제제는 polyacrylic acid를 사용함으로써 치수에 대한 독성이 적고, 불소이온이 함유되어 있는 특성을 가지고 있으나 Tovas등¹⁹⁾의 생체내 연구에서는 Zinc oxide-eugend보다 치수에 대한 자극이 더 강한 것으로 나타났으며, Klotzer²⁰⁾는 원숭이를 이용한 실험에서 중등도의 심한 치수반응이 나타남을 보고하였다. 생체의 실험으로써 Kawahara등²¹⁾은 ASPA와 Fuji ionomer 시멘트를 사용하여 4일간 노출시킨 경우 세포성장이 억제되었으며, 4일후에 성장은 대조군과 유사한 것으로 보고하였다. 또 Hanks등²²⁾은 Fuji ionomer 시멘트가 심한 세포용해를 초래하며, succinic dehydrogenase 활성을 억제한다고 보고하였다.

이러한 이장재 및 치과수복용 재료의 생물학적인 고찰은 물리적 성질의 고찰과 함께 중요한 연구과제로, 임상적으로 적용할 수 있는가의 여부를 판정하는데 도움이 된다. 생물학적인 검사로는 사람치아나 혹은 동물치아의 조직학적 연구를 실시하거나, 수복용재료를 골조직이나 연조직에 매식하여 조직반응을 검사, 혹은 생체외에서 세포배양을 하여 직접 세포와 재료를 접촉시킴으로써 세포독성을 평가할 수 있다.

용법검사는 사람치아나 혹은 동물치아에 인위적으로 와동을 형성한 뒤 수복물을 충전하여 일정기간이 경과한 후, 치수조직의 조직학적 혹은 병리학적인 변화를 관찰하여 재료의 독성을 분석하게 된다²³⁾. 그러나 이 방법은 실험동물의 건강상태등 실험환경의 차이, 와동형성시 조작과정의 차이 및 와동형성 후 상아질에 잔존하는 오염층, 잔존치질의 두께^{24,25,26)}등의 차

이로 한계점을 갖고 있다^{23,26)}. 또한 수복물과 와동사이에 형성되는 간격에의 세균오염, 와동기저부와 수복물사의 관계가 많이 논쟁이 되어 왔다^{17,30)}.

1959년 Mitche³¹⁾에 의해 처음 시작된 매식 방법은 수복용 재료를 골조직이나 연조직에 매식하여 조직반응을 검사하는 방법으로 사용되어 왔다. 그러나 재료의 가능한 독성성분이 재료를 삽입하기 전에 화학적으로 결합하거나 증발되므로 반대결과를 나타낼 수 있는 단점이 있다.

생체외에서의 세포독성검사는 새로운 재료나 혹은 개량된 재료의 임상적 적용을 위해서, 일반적으로 시행되는 초기검사로서, 생물학적 반응이 빠르며, 예민하고, 재현성이 있으며, 세포독성이 산술적인 평가를 할 수 있다. 생체외 실험방법으로서 세포배양을 이용한 세포독성의 평가는^{32,33)} 세포수 산정^{6,34)}, DNA분석³⁵⁾ 등에 의한 세포성장율의 측정과 세포의 형태학적 변화의 현미경적 관찰³⁶⁾, 과당생산측정³⁷⁾, 당화 측정^{6,38)} 조직화학적 분석에 의한 세포내 소기관의 효소기능측정^{39,40,43,42)} 등에 의해 이루어진다⁶⁾.

이러한 세포배양법은 각 세포군의 이름과 종으로 정확히 분별되며, 배양액은 주로 화학적으로 규정되어 있으므로 세포환경을 정확히 재현할 수 있고, 배양된 세포는 복잡한 생체계의 부분이 아니므로 자극원에 대한 반응이 생체의 염증반응, 면역반응, 혹은 호르몬 조절등에 의해 변화되지 않고, 환경변화에 빠르게 반응하며, 나타난 반응을 쉽게 양적으로 측정할 수 있고, 배양세포는 비교적 저렴하며, 세포의 공급을 무한히 할 수 있는 장점이 있다²⁶⁾. 배양에 사용하는 세포는 인체조직이나 동물에서 채취하며, 자극에 예민하게 반응하고 성장이 용이한 세포를 주로 이용하고 된다. 충전재의 세포독성검사를 위해서는 주로 섬유아세포가 선택된다. 치수는 섬유아세포와 세포의 기질로 이루어지는 결합조직으로, 이중 조상아세포는 고도로 분화된 세포이므로 배양이 어려운 반면, 섬유아세포는 치수의 대사과정에서 중요한 역할을 하고, 외부자극에 대해 세포분열, 결합

조직의 기질합성, 조직의 흡수속도등을 변화시키는 성질을 가지고 있다^{8,43)}.

이에 저자는 치과에서 널리 사용되는 이장재의 치수반응을 알아보기 위하여 인체치아의 치수에서 섬유아세포를 생체외에서 배양하여 세포수 산정에 의한 세포성장 측정법으로 이장재에 대한 세포독성검사를 실시하고 그 결과를 통계학적으로 비교연구한 바 있기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 세포배양

1) 1차배양

생체외에서 섬유아세포를 배양하기 위하여 13세 남아에서 교정치료를 위해 발거한 정상소구치를 발거 즉시 생리적 식염수로 세척한 후 치수장축을 따라 zO.700 fissure bur로 평행하게 소와를 형성한 후 소독된 절단기로 치아를 파절시켰다. 가능한 치수조직에 직접적 손상을 주지 않도록 하면서 No.15 Scalpel로 치수를 제거하였다. 배양액으로는 α -MEM에 4% Fetal Bovine serum(FBS : GIBCO, Co., U.S.A.), 2%100,000 unit Penicillin and 100 mg Streptomycin(GIBCO, Co., U.S.A.)을 혼합하여 사용하였다.

제거한 치수조직을 정상보다 Penicillin과 Streptomycin이 15배 정도 많이 함유된 배양액으로 35mm petri dish(Corning Co., U.S.A.)에서 3회 세척한 후, 정상배양액이 담긴 35mm petri dish에서 No.15 Scalpel 2개를 이용하여 1mm³정도의 크기로 치수를 세절하였다. 세절된 치수조직을 25cm²크기의 배양용 flask(Bellco, Vineland, U.S.A.)에 넣은 후, 온도 36.68, 습도 90% 조건하에서 5% CO₂ 배양기에 배양용 flask를 수직으로 넣어 섬유아조직세포가 flask에 부착하도록 하였다. 10분 후 1ml의 배양액을 넣은 후 18~24시간 배양한 후 세포가 자란 뒤 3~5일에 한번씩 5ml의 배양액을 교환하여 2주간 배양하였다.

2) 2차배양

배양용 flask에 있는 배양액을 제거한 후, flask에 부착된 세포를 분리하기 위해 0.25% Trypsin(GIBCO Co., U.S.A.)을 2ml넣고 bench상에서 1분간 방치한 후, Trypsin 용액을 제거한 후 5% CO₂ 배양기에서 19분간 배양하였다. 배양액을 5ml넣고 pipette을 이용하여 배양기에 부착된 세포를 분리하였다. Trypsin용액을 완전히 제거하기 위해 온도 37°C, 1,500rpm의 원심분리기를 이용하여 10분간 원심분리한 후 상층배양액을 제거한 후, 다시 배양액 5ml을 넣고 세포부유액을 만들어 75cm²의 배양용 flask로 분주하였다. 같은 방법으로 10회 계대배양하여 실험에 이용하였다.

2. 실험재료

실험재료는 이장재로서 Zinc oxide-eugenol 시멘트, Cavitec®, Dycal®, Life®, Dentin cement, Base cement를 사용하였으며, 다음(Table I)과 같이 6개 실험군으로 분류하였으며, 각각의 재료는 제조회사의 지시대로 혼합, 사용하였다.

3. 시편제작

치과이장재인 각 6종의 재료를 내경이 8 mm, 높이가 8mm인 glass ring(GIBCO, Co., U.S.A.)에 각각 혼합하여 넣어 시편을 제작하였다.

4. 세포독성의 실험

계대배양한 섬유아세포를 0.25% Trypsin용액으로 처리한 후, 원심분리하여 5ml 배양액을 넣고 pipette을 이용하여 세포밀도가 약 8×10⁴cells/ml이 되도록 세포부유액을 만든 후, 이를 35mm petri dish에 3ml씩 분주한 후 0.22 μ m의 millipore microfilter를 dish중앙에 위치시키고 제작된 시편이 완전히 경화되기 전

Table 1. Materials of Experimental Groups

Group	Kinds	Brands (P/L)	Remark	
		국전산화아연	국전원료약품상사	
1	Zinc oxide - eugenol	eugenol (3/1)	Sultan chemists, Inc.	U.S.A.
2		Cavitec	KERR	U.S.A.
3	Calcium hydroxide	Dycal	L.D. Cauk	U.S.A.
4		Life	KERR	U.S.A.
5	Glass ionomer	Base cement (2.6/1)	Shofu	Japan
6		Dentin cement (2.2/1)	G.C.	Japan

에 filter위에 올려놓았다. 실험재료를 혼합하지 않은 glass ring을 대조군으로 하고 6개의 실험재료로 제작한 시편을 실험군으로 하여 배양 5일, 10일 후에 대조군과 실험군의 세포수와 세포형태를 비교 관찰하였다.

5. 세포수 산정 및 세포형태 관찰

세포배양 5일, 10일 후 세포수를 산정하기 위하여 petri dish의 배양액과 시편, filter를 제거한 후 0.25% Trypsin으로 세포를 계대배양시와 같은 방법으로 분리시킨 후, 다시 1ml의 배양액을 넣고 0.2% Trypan Blue (GIBCO. Co., U.S.A.)로 생체염색하여 Pasteur Pipette으로 20 μ l를 취하여 혈구계산기로 현미경하에서 100배로 관찰하여, 세포수를 산정하고, 세포의 생존도를 관찰하였다. 또한 실험재료에 의한 세포의 형태학적 변화를 관찰하기 위해 세포배양 5일, 10일 후에 petri dish를 도립위상차 현미경하에서 100배로 관찰하여 각 시편간의 세포반응을 비교 검토하였다.

산정된 세포수를 통계처리하여 세포수가 정상분포에 접근하도록 상용대수로 변환한 뒤 분산분석(ANOVA)하여 대조군 및 실험군간에 차이가 있나를 검증한 후, 실험군간에 개별비교를 위해 Scheffe 검증을 실시하였으며 생존세포 증식율(Vital Cell Multiplication Efficiency)과 대조군에 대한 상대성 세포증식도(Relative Growth Rate : R G R)를 얻었다.

III. 실험결과

1. 대조군

세포배양 5일후 세포는 방추형의 세포로 나타나며, Petri dish의 기저부에 단일세포층을 형성하기 시작하였으나 세포사이에 간격을 유지하고 있다(Fig. 2). 세포배양 10일후에는 세포는 복합층을 형성하였으며, 세포의 형태가 구분되기 어려울 정도로 밀집되고, 섬유아세포의 특징적인 파상형태를 나타내었다(Fig. 3).

세포수는 배양시작시에 7.0 \times 10⁴cells/ml이 배양 5일후에는 (17.67 \pm 2.48) \times 10⁴cells/ml, 배양 10일후에는 (62.05 \pm 7.56) \times 10⁴cells/ml로서(Table II) 배양시작시의 세포수에 비해 각각 2.52배, 3.51배로 증가되었으며 총세포증식율은 8.86으로 나타났다(Table IV).

2. 실험군

1) 제1군(Zinc oxide eugenol cement ; 산화아연-eugenol)

세포배양 5일 후 죽은 세포들이 많이 나타나고 나머지 세포는 정상형으로 나타나고 그 수는 극히 적었다(Fig. 4). 세포배양 10일 후 죽은 세포들은 드물게 나타났지만, 세포수는 매우 적었고, 정상형과 방추형의 세포들이 함

게 나타났다(Fig. 5).

세포수는 배양 5일 후에 $(4.13 \pm 1.39) \times 10^4$ cells/ml, 배양 10일후에는 $(4.32 \pm 1.61) \times 10^4$ cells/ml로서(Table II) 배양 시작시의 세포수보다도 오히려 적게 나타났으며, 세포증식율은 5일에 0.59, 10일에 1.04이었고 총세포증식율은 0.62로서(TableIV) 오히려 세포수의 감소를 보였다. 또한 대조군에 대한 상대성 세포증식도도 배양 5일과 10일에 각각 23.37, 6.96으로 나타났다(Table V).

2) 제2군(Zinc oxide eugenol cement ; Cavitec)

세포배양 5일 후의 세포형태는 방추형이 주로 나타났으며, 죽은 세포가 세포 사이사이에

나타났다(Fig. 6). 배양 10일 후에 세포형태는 방추형으로 나타났으며 죽은 세포가 간혹 나타났다(Fig. 7).

세포수는 배양 5일 후에 $(8.35 \pm 2.81) \times 10^4$ cells/ml, 10일 후에 $(10.08 \pm 5.10) \times 10^4$ cells/ml이며(Table II) 세포증식율은 각각 1.19, 1.20이고 총세포 증식율은 1.44로(Table II) 대조군에 비하여 세포의 증식이 매우 둔화되었음을 나타내었다. 상대성 세포증식도는 배양 5일에 47.26, 배양 10일에 16.24로 배양 10일에 더욱 현저한 감소를 나타내었다(Table V).

3) 제3군(Calium hydroxide ; Dycal)

세포배양 5일에 세포형태는 정상형으로 일부에서는 접촉되어 성장방향이 전환되거나 억제

Table 2. Effect of cavity liners upon cell multiplication of cultured fibroblast ($\times 10^4$ cells/ml)

Group	initial cell	5 days	10 days
Control	7.0	17.67 \pm 2.48	62.05 \pm 7.56
Experimental 1	7.0	4.13 \pm 1.39	4.32 \pm 1.61
2	7.0	8.35 \pm 2.81	10.08 \pm 5.10
3	7.0	13.56 \pm 3.89	34.75 \pm 8.85
4	7.0	11.46 \pm 3.32	21.92 \pm 6.18
5	7.0	13.73 \pm 3.73	36.68 \pm 5.20
6	7.0	13.58 \pm 3.90	66.95 \pm 24.09

mean \pm S.D.

Table 3. Base 10 logarithmic transformed mean cell counts of cultured fibroblast of Experimental groups.

Group	initial cell	5 days	10 days
Control	0.85	1.24 \pm 0.64	1.79 \pm 0.06
Experimental 1	0.85	0.60 \pm 0.13	0.60 \pm 0.17
2	0.85	0.90 \pm 0.15	0.94 \pm 0.24
3	0.85	1.11 \pm 0.14	1.52 \pm 0.13
4	0.85	1.04 \pm 0.13	1.32 \pm 0.14
5	0.85	1.12 \pm 0.11	1.56 \pm 0.06
6	0.85	1.12 \pm 0.12	1.80 \pm 0.15

mean \pm S.D.

되는 현상을 관찰할 수 있으며(Fig. 8), 배양 10일에서는 Petri dish 기저부에 단일세포층을 이루어 성장하였고, 세포형태는 방추형을 나타내었다(Fig. 9).

세포수는 배양 5일 후에 $(13.56 \pm 3.89) \times 10^4$ cells/ml, 배양 10일 후에 $(34.75 \pm 8.8.5) \times 10^4$ cells/ml로 (Table II) 세포성장율은 각각 1.94, 2.56으로 비교적 성장이 활발하였으며, 총 세포성장율은 4.95로 나타났었다(Table IV). 상대성 세포증식도는 5일에 76.74, 10일에 56.00으로 나타났었다(Table V).

4) 제4군(Calcium hydroxide ; Life)

세포배양 5일 후 세포형태는 돌기가 뚜렷한 정상형으로 나타났으며(Fig. 10) 10일 후에는 가늘고 긴 방추형의 형태를 보이나, 죽은 세포가 드물게 나타남을 보였다(Fig. 11).

세포수는 5일에 $(11.45 \pm 3.31) \times 10^4$ cells/ml, 10일에 $(21.92 \pm 6.18) \times 10^4$ cells/ml로 (Table II) 세포증식율은 각각 1.64, 1.91이고, 총세포증식율은 3.13이었다(Table IV). 상대성 세포증식도는 5일에 64.80, 10일에 35.33으로 시간 경과에 따라 세포증식이 감소하였다(Table V).

5) 제5군(Glass ionomer ; Base Cement)

세포배양 5일 후 세포형태는 정상형으로 세포밀도는 대조군보다 조금 감소되어 나타났었다(Fig. 12). 10일 후에는 방추형과 정상형이 혼합되어 나타나면서 단일세포층을 이루기 시작하였으며, 일부에서는 세포사이에 간격이 남아있기도 하였다(Fig. 13).

세포수는 5일에 $(13.73 \pm 3.73) \times 10^4$ cells/ml, 10일에 $(36.68 \pm 5.20) \times 10^4$ cells/ml로 (Table II) 세포증식율은 각각 1.96, 2.67이었으며 총 세포증식율은 5.24로 나타났었다(Table IV). 상대성 세포증식도는 5일에 77.70, 10일에 59.38로 나타났었다(Table V).

6) 제6군(Glass ionomer ; Dentin Cement)

세포배양 5일 후 세포형태는 정상형으로 나타났으며 세포밀도는 조금 감소되어 나타났었다

(Fig. 14). 10일후에는 세포의 성장이 급증하여 복합층을 보이며 세포의 형태구분이 어려울 정도로 조밀하게 분포되어 나타났었다(Fig. 15).

세포수는 5일에 $(13.58 \pm 3.90) \times 10^4$ cells/ml이고 10일에는 $(66.95 \pm 24.90) \times 10^4$ cells/ml로 (Table II) 세포증식율은 각각 1.94, 4.93이며 총세포 증식율은 9.55로 대조군보다 높은 증식율을 나타내었다(Table IV). 상대성 증식도는 5일에 76.85, 10일에 107.89로 세포의 증식이 많았음을 나타내었다(Table V).

세포배양 5일, 10일 후에 산정한 세포수를 통계처리할 때 그 변화량이 커서 정상분포의 가정이 불가능하므로 세포수를 상용대수로 변환하였다(Table III). 변환된 세포수를 이용하여 대조군과 실험군간의 차이 및 세포배양 5일, 10일 후 생존 세포수에 대한 각 실험군간의 통계적 차이가 있나를 확인하기 위하여 분산분석(ANOVA)을 실시하였던 바 유의한 차이가 인정되었다($df_1=6$, $df_2=161$, $F=70.3658$, $P<0.01$). Scheffe검정을 실시하였던 바 세포배양 5일 후의 Zinc oxide-eugenol 시멘트는 다른 실험군 및 대조군과 비교한 결과 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다($P<0.05$). Cavitec은 제1군을 제외한 다른 실험군 및 대조군에 대해 유의한 차이를 나타내었다. 그외에 Dycal, Life는 대조군과만 유의성있는 차이를 나타내었다. 배양 10일에서는 Zinc oxide-eugenol 시멘트와 Cavitec이 5일에서의 결과와 같이 다른 실험군 및 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으며, dentin cement는 대조군과만 유의한 차이를 보이지 않았다.

세포배양 10일 후의 결과에서, 대조군에 대한 각 실험군의 시간경과에 따른 세포성장애 대한 유의성 여부를 알기위해 이원분산분석을 실시하였던 바 대조군 및 실험군간에서 유의한 차이가 인정되었다($P<0.01$). 또 대조군 및 각 실험군에서 세포배양 5일, 10일간의 세포성장애 의한 차이가 인정되었다($P<0.01$).

Table 4. Cell multiplication efficiency (CME).

Group	5 days	C M E*	
		10 days	General**
Control	2.52	3.51	8.86
Experimental 1	0.59	1.04	0.62
2	1.19	1.20	1.44
3	1.94	2.56	4.95
4	1.64	1.91	3.13
5	1.91	2.67	5.24
6	1.94	4.93	9.55

* CME = $\frac{\text{Mean number of living cell in successive culture days}}{\text{Mean number of living cell in previous culture days}}$

** General CME = $\frac{\text{Mean number of living cell in the 2nd culture day}}{\text{Mean number of initial living cell}}$

Table 5. Relative growth rate (RGR).

Group	R G R*	
	5 days	10 days
Control	100	100
Experimental 1	23.37	6.95
2	47.26	16.24
3	76.74	56.00
4	64.80	35.33
5	77.70	59.38
6	76.85	107.89

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

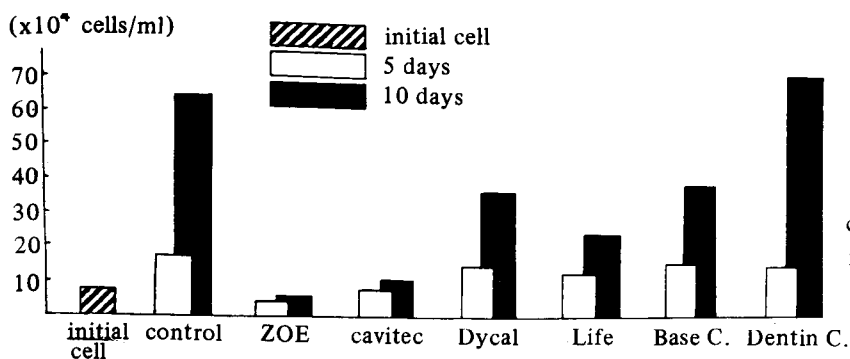


Fig. 1. Effect of cavity liners upon cell multiplication of cultured human fibroblasts.

IV. 총괄 및 고찰

치과에서 사용되는 와동이장재로서 널리 사용되고 있는 zinc oxide-eugenol은 약리작용 및 절연작용을 보이는 이장재, 임시 및 영구접착제, 임시충전재, 그리고 구강외과와 치주과에서 사용되는 연조직팩, 그리고 근관치료시 치근관 sealer 등의 용도로 사용되고 있다. James와 Diffenbach⁴⁾는 가건치아에 와동을 형성한 뒤 수복하지 않은 와동과 zinc oxide-eugenol로 수복한 와동에서 치수의 조직학적 상태를 비교한 결과 zinc oxide-eugenol로 충전한 와동에서는 충전하지 않은 와동에서 나타나는 심한 반응이 전혀 나타나지 않음을 보고하고, zinc oxide-eugenol을 다른 종류의 충전재아래에 사용하는 이장재나 임시충전재로 사용함으로써 치수와 상아질을 보호할 수 있다고 하였다. 그러나 Glass와 Zander⁵⁾는 노출된 건전치수에 Zinc oxide-eugenol과 Calcium hydroxide paste를 적용시킨 후 zinc oxide-eugenol에서는 노출부위에 만성염증이 계속됨을 보고하였다. 이에 대해 Beagrie⁶⁾, Mjör⁷⁾, Hensten-Pettersen과 Helgeland⁸⁾, Das⁹⁾, Wennberg 등¹⁰⁾은 생체외에서 세포배양법을 사용하여 zinc oxide-eugenol의 세포독성을 연구한 결과 비교적 심한 세포독성반응이 나타난다고 보고하였다.

이에 본 실험에서는 zinc oxide-eugenol제재로서 실험 제1군과 제2군에서 모두 세포성장억제 반응을 보였으며, 특히 5일과 10일의 제1군과 10일의 제2군에서는 심한 세포성장억제반응이 관찰되었다. 이는 zinc oxide-eugenol의 성분중 하나인 eugenol의 작용에 의한 것으로 사료된다. 즉 zinc oxide-eugenol은 소량의 물이 과량의 zinc oxide를 가수분해시켜 zinc hydroxide를 형성하고, 여기에 다시 eugenol이 zinc hydroxide와 결합하여 zinc eugenolate를 형성한 후 물은 방출하게 된다. 그러나 이 때 형성된 zinc eugenolate는 매우 불안정하고 약한 결합으로 과량의 물에 의해

이 결합이 분해되어 eugenol이 방출되고 불용성 zinc hydroxide가 형성된다. 이때 방출된 eugenol이 재료의 약리작용 및 독성 작용을 결정짓게 된다^{45,46)} 이렇게 방출된 eugenol은 $10^{-5} \sim 10^{-2}$ mol/l 범위에서는 prostaglandin synthetase를 억제하여 염증반응을 감소시키기도 하나, Lindqvist와 Otteskon⁴⁷⁾는 0.67mM의 eugenol을 넣고 세포배양시킨 후에는 대조세포의 4%가, 4mM의 eugenol을 사용한 경우는 모든 세포가 죽게 됨을 보고 하였다. Brodin과 Örstavik¹⁰⁾, Trowbridge 등⁴⁸⁾, Kozam⁴⁹⁾은 Zinc oxide-eugenol이 감각세포활동을 억제시킨다고 보고하였다. 또 Hume^{50,51)}은 포유동물세포의 호흡을 억제함을 보고하였으며 Hume⁵²⁾은 가역적인 혈관확장제로 작용함을 보고하였다.

이와같이 eugenol은 농도에 따라 다양한 작용을 보이게 되나 본 실험에서는 가수분해되어 방출된 eugenol이 세포에 직접 작용하게 되므로 세포성장이 현저히 억제된 것으로 사료된다. 제1군의 경우는 zinc oxide분말과 eugenol이 용액을 비교적 eugenol의 양이 많은 3:1의 비로 혼합하여 사용하였으므로 eugenol의 방출이 paste형태로 된 제2군의 경우보다 많았을 것으로 사료된다. 따라서 제1군에서 보다 심한 세포성장억제작용이 나타남을 알 수 있었다. Valle²⁾이 발표한 eugenol에 대한 zinc oxide이 양이 적을수록 치수조직의 호흡률이 감소됨을 보인다는 보고와 같은 맥락에서 생각될 수 있으나 깊은 관련은 없는 것으로 생각되며, 아직 zinc oxide-eugenol에 대한 정확한 연구는 발표되지 않고 있다.

또한 zinc oxide-eugenol의 독성은 zinc oxide-eugenol에서 방출되는 zinc이온에 의해서도 영향을 받게된다⁵³⁾. 배양 하루후에는 방출된 zinc이온의 비가 적으므로 초기 zinc oxide-eugenol의 독성에는 영향을 미치지 못하고, 2주 후에는 zinc이온의 비가 상당히 증가됨으로써 재료의 세포독성에 부분적으로 작용한다⁵⁴⁾. 그러나 zinc oxide-eugenol시멘트가 생체외에서 강한 독성을 보이는 것은 주로 eugenol성분에 기인하는 것으로 사료된다.

본 실험에 사용된 calcium hydroxide제제는 깊은 와동이나, 치수의 노출이 있는 와동, 치수복탁재료로서 사용되어지고 있다. 이는 Calcium hydroxide가 치수조직 노출부위의 회복을 촉진시켜 주기때문이다. 이는 용해된 Calcium hydroxide가 강한 알칼리성을 나타냄으로써 노출된 치수조직에 직접 가해질 경우 표면괴사를 일으킨 후, 상아질 유사경조직을 형성하여 치수조직을 보호하게 된다^{13,16)}.

Torneck 과 Wagner¹⁷⁾는 Calcium hydroxide이장재가 치수의 회복을 자극하며 세포분화를 촉진시킨다고 보고하였다. 이러한 작용은 국소적인 조직 pH와 Ca이온과 관련되는 것으로 생각하며 이들이 세포의 대사작용을 자극한다고 보고하였다.

본 실험에서 실험 제3군인 Dycal은 배양 5일 후에는 상대성장 지수가 76, 75, 배양 10일에는 56.00으로 비교적 미약하거나 보통의 독성을 보이는데 비하여, 실험 제4군인 Life는 배양 5일에는 64.80으로 보통의 독성을 보였으나 실험 10일에는 35.33으로 중등도의 독성을 나타내었다. 이에 비해 Das⁴⁾는 Zinc oxide-eugenol paste, 슝, 은, Calcium hydroxide, 그리고 gutta percha를 사용하여 세포배양 후 염색하여 조직학적으로 관찰한 결과, Calcium hydroxide는 슝, 은 등과 함께 독성이 없이 세포의 성장이 활발한 것으로 보고하였다. 그러나 Spanberg⁵⁵⁾는 Calcium hydroxide paste가 독성물질을 방출하여 세포성장을 억제한다고 보고하였다. 이에 대해 Torneck등⁵⁶⁾은 Calcium hydroxide의 약리작용에 대해 언급하면서, 세포분열을 촉진시키고, adenosine triphosphatase를 활성화시켜 상아질이나 골조직같은 경조직의 경화작용을 촉진시키고, 염증부위의 pH를 조절하여 세포분열과 기질경화에 좋은 조건을 형성하나, hydroxyl이온의 농도가 너무 높고 직접 생체 조직과 접촉하게 되면 세포활성을 억제하고 생체활동을 정지시킬 수도 있다고 보고하였다. 또한 Calcium hydroxide가 와동이장재로서 상아질과 접촉하는 경우 치수에 도달하는 Ca과 OH이온의 농도는 여러 내적 및 외적원인에 대해 변화되므로 실제 임

상에서와의 반응과 차이가 올 수 있다. 내적 원인으로는 3차상아질의 존재나 상아질 경화에 따라 Ca이온 확산정도에 차이가 올 수 있다⁵⁷⁾. 외적인자로는 와동형성시 오염층이 형성되어 상아세관의 입구가 막히거나 사용된 Calcium hydroxide제제의 종류와 물리적 형태에 의해 변화될 수 있다⁵⁸⁾. 또 치수자체의 내적 회복능력에 의해서도 영향을 받게 된다.

또 Hanks등²²⁾의 연구에서 나타난 바와 같이 Dycal, Life등의 Calcium hydroxide제제로 배양한 경우, 재료를 넣지 않은 대조군보다는 모두 성장률이 낮음을 알 수 있었다. 이는 Calcium hydroxide제제의 초기 강한 알칼리성에 기인한다. Dycal의 경우는 Hanks등²²⁾, Tribstad등⁵⁹⁾의 연구에서 나타난 바와 같이 단백질 합성에 심한 억제효과를 나타낸다. 이는 Dycal내에 촉매제로 사용되는 ethyl toluene sulfouamide가 함유되어 세포막 투과도를 증가시킴으로써 세포호흡을 감소시키기 때문이다⁶⁰⁾. Life 또한 ethyl toluene sulfonamide를 가지고 있으므로 독성을 보이거나 Dycal보다는 밀도가 높고, 또 경화가 빠르므로 반응에 차이를 보이게 된다. 본 실험에서는 Dycal과 Life 사이의 결과가 오히려 반대로 나타났다. 이는 세포자체 성장기능의 차이, 배양법의 차이, 사용재료자체 및 처리방법, 그리고 세포수 측정 방법 등의 오차에 의해 기인된 것으로 사료된다.

Calcium hydroxide는 강한 알칼리성으로 세포배양법에 의한 배양시, 직접 Calcium hydroxide제제가 접촉된 경우는 본 실험 및 Hanks등²²⁾, Spanberg등⁵⁵⁾의 연구에서와 같이 세포독성을 보이지만 Hume⁶¹⁾의 치아와 동형성법에 의한 배양에서는 Calcium hydroxide로 이장한 후 resin을 충전한 군이 이장재 처리없이 resin만 충전한 경우보다 독성이 감소됨을 보이고 있다. 이와 같이 배양방법에 따라서도 세포독성의 차이를 보일 뿐만 아니라, 실제 구강내의 치수노출부위에 적용한 경우 Calcium hydroxide가 표층의 괴사를 일으키고, 조상아 세포를 부분적으로 hydroxyl이온에 노출되게 함으로써 상아기질을 합성하는 것으로 생각되

고 있다. 또한 용해성이 높은 Calcium hydroxide제제 주위에는 알칼리성이 높아져 혈액으로 부터 공급되는 Ca이온과 P이온을 이용하여 조직의 경화에 기여하는 것으로 생각된다²²⁾. 따라서 직접 세포접촉에 의한 세포배양법의 실험에서는 강한 알칼리성으로 세포의 성장이 억제되지만, 임상 적용시에는 치수의 내재적 요인과 함께 알칼리성이 오히려 조직의 경화를 촉진시켜 괴사조직과 와동을 치수로 부터 분리시킴으로써 치수의 생명력을 유지할 수 있도록 해 줌을 알 수 있다.

Glass ionomer시멘트는 Wilson과 Kent에 의해 1969년에 처음 개발된 이래로 분말은 SiO₂와 Al₂O₃의 유리분말로 주로 구성되어 있으며 용액은 polyacrylic acid용액으로 되어있다. 이 용액이 유리분말 표면을 부식시켜 방출된 금속이온과 서로 결합함으로써 불용성의 gel을 형성한다. 특히 polyacrylic acid는 분자량이 커서 상아세관내로 침투가 되지 않으므로 산에 대해 안정성이 있고 불소가 함유되어 있으므로 항우식작용이 있고, 열팽창률이 낮으며, 치질에 직접 결합하여 미세누출을 막을 수 있는 장점을 가지고 있다. Dahl과 Tronstad⁶²⁾의 연구에 의하면 생체의 세포배양에서는 비록 재료를 혼합한 시간과 접촉시킨 시간사이가 길수록 독성은 감소되나, 세포독성이 있는 것으로 나타났다. 24시간 경화시킨 후 접촉시킨 경우는 오랫동안 접촉을 시켜도 독성이 없는 것으로 나타났다. 또한 생체내 실험에서는 충전 8일 후 미약한 염증반응이 나타남을 보고하였다. Hanks등²²⁾의 연구에 의하면 ASPA와 Fuji ionomer시멘트는 세포성장을 4일간 억제하였으며, 4일후부터는 성장속도가 대조군과 유사하였음을 보고하였다.

본 실험에서는 실험 제5군인 Base cement는 상대성장지수가 배양 5일에 77.70, 10일에 59.38이었고, Dentin cement는 각각 76.85, 107.89로 다른 실험군에 비해 세포성장이 활발하였음을 보여주고 있다. Glass ionomer의 분말성분을 SiO₂, Al₂O₃, CaF₂와 Na₃AlF₆로 구성되어 있으며, 분말에서 Al³⁺, Ca²⁺, Na⁺ 금속이온이 용액으로 유리되지만 이들 이온은

모두 생체세포나 조직에 자극성이 없거나, 독성이 없는 것으로 보고된 바 있다²¹⁾. 또한 유리 성분의 SiO₂도 독성이 없으므로 Gaass ionomer에서 세포성장이 억제된 것은 wn로 액체성분인 polyacrylic acid에 의한 것으로 사료된다. 또 Crisp등⁶³⁾은 ASPA에서 불소가 유출되는 연구를 통해 분말대 용액의 비가 증가될 수록 재료로부터 구성성분의 유출이 감소됨을 보고하였다. Tobias등¹⁹⁾도 분말대 용액의 비가 1.2:1인 경우 3:1인 경우보다 생체내 실험에서 더 큰 치수반응을 관찰하였음을 보고하였다. Base cement의 표준조도는 2.6:1이고 Dentin cement는 2.2:1이므로 Dentin cement에서 세포성장이 더욱 억제되는 것으로 예상되나, 본 실험에서는 실험 일까지는 예상과 같이 Base cement의 성장이 좀더 활발하였으나, 이에 유의성있는 차이는 없으며, 실험 10일에서는 오히려 Dentin cement에서 세포성장이 활발하였는데 이는 Dentin cement의 경화시간이 3분 45초로 Base cement의 4분 30초에 비해 짧고 증류수에 대한 용해도가 0.05%로 낮음으로 배양 10일에서 세포성장이 더욱 활발한 것으로 사료된다. Kawahara²¹⁾등은 혼합 후 경화과정에서 Glass ionomer의 독성이 점차 감소되며, 특히 경화 후에는 독성이 사라짐을 보고하였다.

본 실험에서는 실험 5일에서 zinc oxide-eugenol시멘트를 다른 실험군 및 대조군과 비교한 결과 모두 통계적으로 유의한 차이를 보였다(P<0.05). 결국 zinc oxide-eugenol시멘트가 가장 독성이 강한 것으로 나타났으며 Cavitec 또한 제1군보다는 독성이 약하나 다른 실험군 및 대조군에 대해 유의성있는 차이를 보였다. 또 실험 10일에서는 5일의 결과와 달리 Dycal과 Base cement는 서로 유의한 차이를 보이지 않았으며, Dentin cement는 대조군과만 유의한 차이를 보이지 않았다. 실험에서 나타난 결과를 보면 zinc oxide-eugenol시멘트 > Cavitec > Life > Dycal, Base cement > Dentin cement의 순으로 세포 독성이 강함이 나타났다.

Hants등²²⁾은 glass ionomer, zinc oxide

-eugenol, zinc polyacrylate, zinc phosphate, BIS-GMA등을 비교하면서 glass ionomer는 배양시 세포 독성효과를 일으키지 않았으나 zinc oxide-eugenol은 세포독성을 보였다고 보고하였다. 또 특히 zinc oxide-eugenol의 경우 생체내 용법검사와 생체의 세포배양법간에 상이한 차이를 보인다고 보고하였다. 그들은 zinc oxide-eugenol이 세균오염시 Chemotaxis를 막을 수 있다고 하였다. 그러나 단순한 세포독성검사를 이루어 질 수 없으므로 생체내 실험과 생체의 실험간에 차이가 발생된다고 발표하였다. Imai등⁵⁾은 7가지 치과용시멘트의 생물학적 효과를 비교하면서 한천배지방법을 이용하여 한천의 두께가 1~2.5 mm일때 zinc oxide-eugenol이 가장 높은 세포독성을 나타낸 것으로 보고하였다. 또 한천의 두께가 두꺼워질수록 zinc oxide-eugenol의 독성은 감소되는 것으로 보고하였다. Hume⁷⁾은 새로운 치아 와동형성법을 이용하여 zinc oxide-eugenol의 독성이 없음을 보고하였고, 독성을 보인 Acrylic resin에 Calcium hydroxide로 이장한 경우, 독성이 감소됨을 보고하였다. 실제 임상에서와 유사하게 독소성분이 투과할 수 있는 상아질을 매개시킨 실험방법을 사용하였다고 보고하였다. 이와 같이 일반적으로 세포와 가능한 독성물질이 직접 접촉하는 실험에서는 zinc oxide-eugenol이 가장 독성이 큰 것으로 나타났다.

또한 생물학적 평가방법에 따라 그 결과가 차이를 나타낼 수 있다고 사료된다. Mjör등³⁸⁾은 치아수복용 재료의 치수반응을 검사하기 위해 ⁵¹Cr의 확산을 이용한 세포배양법, 근육내 매식법, 치아에 와동을 형성하여 치수반응을 관찰하는 용법검사 등을 이용하여 zinc oxide-eugenol시멘트, silicate시멘트, composite등을 검사한 결과 zinc oxide-eugenol시멘트의 독성은 배양방법에 따라 각각 다르게 나타남을 발표하였다. 또 Hensten-Pettersen과 Helgeland⁶⁾, Wennberg등⁴¹⁾, Meryon등³⁹⁾, Hanks등²²⁾도 생물학적 검사에서 한 종류의 재료에 대해 그 방법에 따라 다른 결과를 보인다고 보고하였다.

차이를 보이는 중요한 요인 중의 하나는 이 재재와 치수사이에 관계된 상아질에 의한 것으로, 상아질은 많은 분자의 투과에 대한 확산 장애물로 작용하며 또한 세포독성에 관계되는 일부성분은 상아질과 작용하여 결합하기도 한다⁶⁴⁾. 실험시 세포와 재료가 직접 접촉하게 될 경우 재료에 대한 세포반응에 영향을 주어 실험평가에 차이를 보이게 되므로 Hensten-Pettersen과 Helgeland는 실험재료와 세포사이에 한천을 위치시켜 직접적인 접촉을 피하게 하였으며, Imai등⁵⁾은 한천배지를 이용하여 상아세관내의 조직액과 성성분이 유사해지도록 한천의 두께와 serum의 농도를 변화 실험하였다. 이외에 상아질 분말을 개입시키거나, 와동형성법⁶¹⁾, Millipore filter방법⁴¹⁾들이 생체내 실험과 연관성을 이루기위한 노력이 계속되고 있다. 본 실험에서도 세포와 재료간의 직접적인 접촉을 막기위해 모공크기가 0.22 μ m인 filter를 개입시켜 재료의 압력이 직접 미치지 못하고 다른 유해한 물리적 효과가 미치지 않도록 고려하였다.

또한 오염층도 중요한 요소로 작용하는 것으로 사료된다. Tobias등¹⁹⁾은 재료를 충전하기 전 acid conditioner로 처리한 경우, 처리하지 않은 경우보다 염증성 변화가 더 크게 나타남을 보고하였다. 산에 의한 직접적 독성작용도 하나의 요소가 될 수 있으나, 상아세관의 와동쪽 끝을 막고 있는 오염층이 제거됨으로서 치수에 자국이 더욱 커지게 되는 것으로 사료된다. 생체내 실험에선서는 재료와 와동벽사이에 있는 미세누출 또한 치수에 자국을 일으키게 됨으로 실험재료의 세포독성평가에 혼란을 초래하게 된다 단백질 또한 상아질의 보호역할을 하는 것으로 생각된다. Imai등⁵⁾은 한천을 이용한 실험에서 혈청농도가 증가함에 따라 zinc oxide-eugenol의 독성이 감소됨을 보고하면서, 이는 eugenol이 한천내 단백질과 결합하기 때문이라고 발표하였다. 또 생체내에서는 상아세관내의 dentinal fluid를 밀어내는 치수내 압력으로 eugenol이 치수로 침투되는 것을 막기도 한다⁶⁵⁾.

앞서에서와 같이 생체내 실험과 생체의 실험

사이에 상호연관성이 부족한 것으로 나타나고 있다. 그러나 치과재료의 초기검사로서, 비용이 많이 들고 시행에 어려움이 있는 용법검사를 매년 시행하기는 불가능하므로 가능한 생체내 실험에서와 같은 결과를 얻을 수 있는 조직배양법등과 같은 저렴하고 용이한 생체의 실험방법을 개발함이 필요하리라 사료된다. 따라서 생체의 실험의 구성에 잔존 상아질의 역할을 부여하며 재료는 혼합 즉시 실험에 사용하고, 임상에서와 가능한 유사한 재료의 표면적을 유지하도록 조절함이 필요하리라 생각된다. 또한 실험세포의 선택 및 세포독성의 측정방법에도 많은 개선이 있어야 할 것으로 사료된다.

V. 결 론

임상에서 사용되는 Zinc oxide-eugenol(국원료약품상사, Sultan Chemists Inc.), Cavitec(KERR), Dycal(L.D. Caulk), Life(KERR), Base cement(Shofu), Dentin cement(G.C.) 등의 세포독성을 평가하기 위하여 생체외에서 치수의 섬유아세포를 α -MEM에서 배양 후 각 재료를 배양하여 5일 및 10일 후에 증감을 관찰하였다. 이때 각 대조군 및 실험군마다 세포수는 7.0×10^4 cells/ml이었고 다음과 같은 결과이었다.

1. Zinc oxide-eugenol은 5일에 $(4.13 \pm 1.39) \times 10^4$ cells/ml이었고, 10일에는 세포수가, $(4.32 \pm 1.61) \times 10^4$ cells/ml로 세포수가 초기보다 오히려 감소하였다.

2. Cavitec는 세포수가 5일에 $(8.35 \pm 2.81) \times 10^4$ cells/ml이었고, 10일에는 $(10.08 \pm 5.10) \times 10^4$ cells/ml로 세포성장이 매우 미약하였다.

3. Dycal은 세포수가 5일에 $(13.56 \pm 3.89) \times 10^4$ cells/ml이었고, 10일에는 $(34.75 \pm 8.85) \times 10^4$ cells/ml로 비교적 세포의 성장이 활발하였다.

4. Life는 세포수가 5일에 $(11.46 \pm 3.32) \times 10^4$ cells/ml, 10일에는 $(21.92 \pm 6.18) \times 10^4$ cells/ml로 세포의 성장률은 5일과 10일에 각

각 64.80%, 35.33%로 나타났다.

5. Base cement는 5일에 세포수가 $(13.73 \pm 3.73) \times 10^4$ cells/ml, 10일에는 $(36.68 \pm 5.20) \times 10^4$ cells/ml로 비교적 세포의 성장이 활발하였다.

6. Dentin cement는 5일에 세포수가 $(13.58 \pm 3.90) \times 10^4$ cells/ml, 10일에는 $(66.95 \pm 24.09) \times 10^4$ cell/ml로 세포성장이 매우 활발하였다.

7. Zinc oxide-eugenol 군의 세포성장이 Calcium hydroxide 군이나 Glass ionomer 군보다 유의성있게 억제됨을 관찰하였다($P < 0.05$).

REFERENCES

1. Clifford M. Sturdevant: The Art and Science and Operative Dentistry. 2nd edition, p. 101 - p. 102, 1985.
2. Valle, G.F., Taintor, J.F., and Marsh, C.L.: The effect of varying liquid-to-powder ratio to zinc oxide and eugenol of rat pulpal respiration, J. of Ends. 6(1): 400-404, 1980.
3. Brannstrom, M. and Nyborg H.: Pulpal protection by a cavity liner applied as a thin film beneath deep silicate restorations. J. Dent. Res., 50: 90-95, 1971.
4. Das, S.: Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. Oral Surg. 52:76-84, 1981.
5. 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: 1024-1027, 1981.
6. Hensten - Pattersen, 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.
7. Hume, W.R.: An analysis of the release and the diffusion through dentin of eugenol from zinc oxide-eugenol mixtures. *J. Dent. Res.* 63 (6) 881-884, June, 1984.
 8. Seltzer, S. and Bender, I.B.: *The Dental pulp*. Philadelphia: Lippincott, p. 266, 1975.
 9. Beagrie, G.S., Main, J.H.P., and Smith, D.C.: Inflammatory reaction evoked by zinc polyacrylate and zinc eugenolate cements. A comparison, *Br. Dent. J.* 132: 351-357, 1972.
 10. Brodin, P. & Orstavik, D.: Effects of therapeutic and pulp protecting materials on nerve transmission in vitro. *Scand. J. Dent. Res.*, 91:46-50, 1982.
 11. Avery, J.K.: Response of the pulp and dentin to contact with filling materials. *J. Dent. Res.*, 54:188-B197, 1975.
 12. Zander, H.A.: Reaction of the pulp to $\text{Ca}(\text{OH})_2$. *J. Dent. Res.*, 18:373-379, 1939.
 13. Glass, R.L., and Zander, H.A.: Pulp healing, *J. Dent. Res.*, 28:97-107, 1949.
 14. Stanley, H.R. and Lundy, T.: Dycal therapy for pulp exposures. *Oral Surg.* 34:818-827, 1972.
 15. Troustad, L.: Reaction of exposed pulp to Dycal treatment, *Oral Surg.*, 38: 945-953, 1974.
 16. Schroder: A 2-year follow-up of primary molars pulpotomized with a gentle technique and capped with $\text{Ca}(\text{OH})_2$, *Scan. J. Dent.*, 86:173-178, 1978.
 17. Torneck, C.D., and Wagner, D.: The effect of calcium hydroxide cavity liner on early cell division in the pulp subsequent to cavity preparation and restoration. *J. of Endo.*, 6(9). 719-723, 1980.
 18. Tronstad, L., & Mjor, I.A.: Capping of the inflamed pulp, *Oral Surg.* 34:477-485, 1972.
 19. Tobias, R.S., Browne, R.M., Plant, C.G., and Ingram, D.V.: Pulpal response to a glass ionomer cement. *Brit. Dent. J.* 144:345-340, 1978.
 20. Klotzer, W.T.: Pulp reactions to a glass ionomer cement, *J. Dent. Res.*, 54:678, 1979.
 21. Kawahara, H. Imanishi, Y. and Oshima, H.: Biological Evaluation on glass ionomer cement, *J. Dent. Res.* 58(3): 1080-1086, 1979.
 22. Hanks, C.T., Bergenholz, G., and Kim, J.S.: Protein synthesis in vitro, in the presence of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ - containing pulp-capping medicaments, *J. of Oral Path.*, 12:356-365, 1983.
 23. Brown, R.M.: The in vitro assessment of the cytotoxicity of dental materials - does it have a role? *Int. Endo. J.* 21:50-58, 1988.
 24. Pashley, D.H., Michelich, B. and Kehl, T.: Dentin permeability; effects of smear layer removal. *Pro. Dent.*, 46:531-537, 1981.
 25. Pashley, D.H.: Smear layer; physiological conditions. *Operative Dentistry, Supplement 3*: 13-29, 1984.
 26. Tyas, M.J.: Biological testing of dental restorative materials. *J. of Oral Rehabilitation*, 4: 275-290, 1977.
 27. 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.
 28. Brannstrom, M., and Nyborg, H.: Bacterial growth and pulpal changes under inlays cemented with zinc phosphate cement and

- epoxylite CBA 9080 *J. Prosthet. Dent.*, 31: 556-565, 1974.
29. Brannstrom, 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.
 30. Arannstrom, 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.
 31. Mitchell, D.F.: The irritational qualities of dental materials. *J. Am. Dent. Assoc.* 59: 954-966, 1
 32. Spanberg, L.: Kinetic and cantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg., Oral Med., and Oral Path.*, 35: 389-401, 1973.
 33. Kawahara, H., Yamagumi, A., and Nakamura, M.: Biological testing of dental materials by means of tissue culture. *Int. Dent. J.*, 18:443-467, 1968.
 34. Spanberg, L.: Biological effect of root canal filling material 1. Media for the investigation of the toxic effect of water-soluble substance on human cells, in vitro. *Odontol. Revy*, 20: 123-132, 1969.
 35. 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: 120-133, 1972.
 36. Kawahara, H., Nakamura, M., Yamagami, A., and Nakamiski, T.: Cellular response to dental amalgam in vitro. *J. Dent. Res.*, 54: 394, 1975.
 37. Helgeland, K. and 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: 206-212, 1972.
 38. 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: 124-129, 1977.
 39. Meryon, S.D., Stephen, P.G., Browne, R.M.: A modification of the millipore method for screening restorative materials. *Int. Endo. J.* 15: 197-202, 1982.
 40. Tronstad, L., Hasselgren, G., and Wennberg, A.: Material cytotoxicity evaluation using cells cultured on millipore filters and enzyme cytochemical technique. *IADR* 56: A119, 1977.
 41. Wennberg, A. and Hasselgren, G.: A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. *J. of Biomed. Mat. Res.* 13: 109-120, 1979.
 42. Wennberg, A.: Biological evaluation of root canal sealers using in vitro and in vivo methods. *J. of Endo.* 6: 784-787, 1980.
 43. Sharp, J.A.: An Introduction to Animal Tissue Culture, The Institute of Biology's Studies in Biology, No. 82, 1978.
 44. James, V. and Diffenbach, G.: Prevention of histopathologic changes in young dog's teeth by the use of zinc oxide and eugenol. *J. Am. Dent. Assoc.* 29: 583-592, 1942.
 45. Wilson, A.D. and Batchelor, R.P.: Zinc Oxide-eugenol cements II. Study of erosion and disintegration. *J. Dent. Res.*, 49: 593-598, 1970.
 46. Hume, W.R.: The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide eugenol. *J. Am. Dent. Assoc.* 113: 789-791, 1986.
 47. Lindquist, L. and Otteskog, P.: Eugenol; Liberation from dental materials and effect on human diploid fibroblast cells. *Scand.*

- J. Dent. Res., 88: 552-556, 1980.
48. Trowbridge, Edall and Panopoulos.: Effect of ZOE and calcium hydroxide on intradental nerve activity. J. of Endo. 8(9); 403-406, 1982.
 49. Kozam, G., and Newark: The effect of eugenol on nerve transmission. Oral Surg. 44(5); 799-805, 1977.
 50. Hume, W.R., Veaco, N. Becker, R.: Concentration-dependent depression of cellular respiration by eugenol, J. Dent. Res. 61: 202 (Abstracts of Paper), 1982.
 51. Hume, W.R.: Effect of eugenol on respiration and division in human pulp, mouse fibroblasts, living cells in vitro. J. Dent. Res. 63: 1262-1265, 1984.
 52. Hume, W.R.: Effect of eugenol on constrictor responses in blood vessels of the rabbit ear. J. Dent. Res. 62(9); 1013-1015, 1983.
 53. Meryon, S. and Jakerman, K.: The effects in vitro of zinc released from dental restorative materials. Int. Endo. J. 18: 191-198, 1985.
 54. Wennberg, A., and Hasselgren, G.: Cytotoxicity evaluation of temporary filling materials. Int. Endo. J. 14: 121-124, 1981.
 55. Spanberg, L.: Biological effect of root canal filling material. 2. Effect in vitro of water-soluble components of root canal filling materials on Hela cells. Odont. Revy. 20: 133-145, 1969.
 56. Torneck, C.D., Moe, H. and Howley, T.P.: The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. J. of Endo. 9(4); 131-136, 1983.
 57. Greenhill, J.D. and Pashley, D.H.: The effect of desensitizing agents on the hydraulic conductance of human dentin in vitro, 60: 686-698, 1981.
 58. Brannstrom, M., Nordenwall, K.J., and Glantz P.O.: The effect of EDTA-containing surface active solutions on the morphology of prepared dentin in vivo study. J. Dent. Res. 59: 1127-1131, 1980.
 59. Tronstad, L., Hasselgren, G. and Wennberg, A.: Cytotoxicity of calcium hydroxide-containing materials and their solubility as pulp capping agents. J. Dent. Res. 57 (Sp. Issue A): p. 385, 1978.
 60. Pitt Ford, T.R.: Pulpal response to Procal for capping exposures in dog's teeth. J. Br. Endo. Soc., 12(2); 67-72, 1979.
 61. Hume, W.R.: A new technique for screening chemical toxicity to the pulp of dental restorative materials and procedures. J. of Dent. Res., 64: 1322-1325, 1985.
 62. Dahl, B.L. and Tronstad, L.: Biological tests of an experimental glass ionomer (silicopolyacrylate) cement. J. of Oral. Reh. 3: 19-24, 1976.
 63. Crisp, S., Ferner, A.J., Lewis, B.G., and Wilson, A.D.: Properties of Improved glass ionomer cement formulations. J. Dentistry, 3: 125-130, 1975.
 64. Meryon, S.D.: The influence of dentine on the in vitro cytotoxicity testing of dental restorative materials. J. of Biomed. Mat. Res. 18: 771-779, 1984.
 65. Meryon, S.D.: An in vitro study of factors contributing to the blandness of ZOE preparations in vivo. Int. endo. J. 21: 200-204.

– ABSTRACT –

AN EXPERIMENTAL STUDY ON THE CYTOTOXICITY OF CAVITY LINERS

Jeong Hye Kim, D.D.S., Yung Hai Kim, D.D.S., M.S.D., Ph. D.)

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

The purpose of this study was to evaluate the cytotoxic effects of 6 cavity liners in vitro. Human fibroblasts were cultured in α -MEM and each liner was manually mixed and filled in glass ring cylinder (8x8mm in diameter, in height). The cylinders filled with the liners were placed in the center of the dish (35mm in diameter) containing 3ml of α -MEM. Millipore filters (pore size 0.22 μ m) to simulate dentin barrier were also placed between the bottom of cylinder and the dish. Then the culture dishes were stored in 5% CO₂ containing incubator for 5 and 10 days at the temperature of 36.6°C.

The results of the experiments were analyzed by counting the cells in the period of 5 and 10 days respectively, and were assessed by calculating the cell multiplication rate and the relative growth rate. The experiemntal groups and the control group were compared statistically.

The results of the study were summarized as follows:

1. The cell number of Zinc oxide-eugenol was $(4.13 \pm 1.31) \times 10^4$ cells/ml at 5 days and $(4.32 \pm 1.61) \times 10^4$ cells/ml at 10 days.
2. The cell number of Cavitec was $(8.35 \pm 2.87 \times 10^4)$ cells/ml and $(10.08 \pm 5.10) \times 10^4$ cells/ml at 5 and 10 days respectively.
3. The cell number of Dycal was $(13.56 \pm 3.89) \times 10^4$ cells/ml at 5 days and $(34.75 \pm 8.85) \times 10^4$ cells/ml at 10 days.
4. The cell number of life was $(11.46 \pm 3.32) \times 10^4$ cells/ml and $(21.92 \pm 6.18) \times 10^4$ cells/ml at 5 and 10 days.
5. The cell numberof Base cement was $(13.73 \pm 3.73) \times 10^4$ cells/ml and $(36.68 \pm 5.20) \times 10^4$ cells/ml at 5 and 10 days.
6. The cell number of Dentin cement was $(13.58 \pm 3.90) \times 10$ cells/ml and $(66.95 \pm 24.09) \times 10$ cells/ml at 5 and 10 days.
7. The cell multiplication rate of zinc oxide-eugenol cements was significantly less than that of the calcium hydroxide and glass ionomer cement. ($P < 0.05$)