

근관 충전용 시멘트의 치주인대 섬유아세포 독성에 관한 연구

경희대학교 치과대학 보존학교실

이광희 · 최호영 · 민병순 · 박상진 · 최기운

목 차

- I. 서 론
- II. 실험재료 및 방법
- III. 실험성적
- IV. 총괄 및 고안
- V. 결 론
 - 참고 문헌
 - 논문사진부도
 - 영문 초록

I. 서 론

근관 충전은 주로 gutta-percha나 silver point와 같은 고형재를 사용하므로 근관벽과 근관 충전재 사이의 작은 틈 또는 측방관 및 부근관을 밀폐하기 위하여 근관 충전용 시멘트를 함께 사용하여야 한다¹⁾. 근관 충전용 시멘트는 근관 충전재간의 합착을 위한 결합제의 역할과 근관벽의 요철부위를 충전하며 윤활작용이 있어 근관 충전재의 삽입이 용이하도록 한다. 그밖에 임상적용시 유동성과 생물학적 적합성 및 치질과의 접착성이 우수하고 용해성이 적어야 하며, 치아를 변색시키지 않고, 항균성과 방사선 불투과성이 있어야 한다²⁾.

근관 충전용 시멘트는 산화아연과 유지놀이 주 구성성분이며, 방사선 불투과성 물질, 항균

제 및 치질 접착성분이 첨가되어 있고 epoxy resin, 수산화 칼슘등이 함유되어 있는 제재도 있다.

산화아연 유지놀제재 Tubliseal은 혼합이 용이하고 윤활작용이 우수하며 치아를 변색시키지 않는 장점이 있으나 경화시간이 짧아 조작이 어려우며, 특히 습기하에서는 더욱 빨리 경화되며 조직액과 접촉시는 건조와 수축이 일어나 근관벽과의 긴밀성이 상실되어 근관 폐쇄효과가 감소하고, 근관치료의 실패시 용해가 불가능하여 근관으로 부터 제거가 어려워진다³⁾. Wilson과 Batchelor⁴⁾, Hume⁵⁾, Meryon과 Jakeman⁶⁾ 및 Nakamura등⁷⁾은 산화아연 유지놀제재는 조직배양 또는 동물실험에서 독성을 나타낸다고 보고하였고, Seltzer⁸⁾도 유지놀이 감각의 잠재성이 있으므로 피부 접촉에 주의해야 한다고 보고하였다. N2역시 산화아연 유지놀제재로서 formaldehyde, hydrocortisone등이 포함된 paste형태이며 근관의 소독과 충전재로 병행하여 사용할 수 있으나⁹⁾, Yesilsoy와 Feigal⁹⁾ 및 Rappaport등¹⁰⁾은 조직에 대한 독성이 있음을 보고하였고, Grossman¹¹⁾은 근관 폐쇄효과가 낮다고 보고하였다.

Epoxy resin제재 AH26은 hexamethylene tetramine이 함유되어 접착성이 우수하고 습기에 민감하지 않으며 용해도가 낮기 때문에 근관 폐쇄효과가 우수하다¹¹⁻¹⁴⁾. 그러나 Yesilsoy

와 Feigal⁹⁾, Rappaport등¹⁰⁾은 세포에 대한 독성이 미약함을 보고한 반면, Nakamura등⁷⁾은 세포독성이 크다고 보고하여 상반된 결과를 보고하였다. Block등¹⁵⁾은 동물실험에서 AH26이 항체반응을 야기시킴을 관찰하였고, Tamse등¹⁶⁾은 하악신경이 마비된 증례를 보고하였다. Tagger와 Tagger¹⁷⁾는 2개월 동안의 피하 매식 실험에서 AH26이 산화아연 유지놀제재보다 염증반응이 미약하다고 보고하여 생체반응이 다양하게 나타남을 알 수 있다.

수산화 칼슘제재 Sealapex는 Ghose등¹⁸⁾, Holland와 Souza¹⁹⁾ 및 Soares등²⁰⁾의 보고에 의하면 근침에서 calcific barrier(석회화 층)의 형성을 촉진시킨다고 하였으며, Alexander와 Gordon²¹⁾, Hovland와 Dumsha²²⁾, Lim과 Tidmarsh²³⁾ 및 Sleder등²⁴⁾은 봉쇄능력도 우수한 것으로 보고하였고, Zmener²⁵⁾와 Pitt Ford²⁶⁾는 생체 적합성이 양호하다고 보고하였다.

근관 치료 실패의 주된 원인은 근관의 불완전한 밀폐이며 완벽하게 근관이 밀폐되었다도 사용된 근관 충전용 시멘트는 치근단 조직과 직접 접촉되기 때문에 치근단 조직에 자극을 준다. 근관 충전용 시멘트의 독성은 생체내 실험과 생체의 실험으로 평가되며, 생체내 실험은 기구조작이나 감염 또는 개체의 반응차이에 따라 영향을 받기 때문에 근관 충전용 시멘트 자체의 독성을 평가하기 위해서는 생체의 실험이 필수적이다.

생체의 실험방법중 세포배양법이 가장 많이 사용되며, 이때 이용되는 세포는 생체와 유사한 환경을 제공하기 위한 세포를 사용하는 것이 바람직 하다. 치근단 주위에 존재하는 세포중 주로 섬유아세포와 조골세포가 근관충전용

시멘트에 의해 접촉되어 반응을 나타내며, 이 중 섬유아세포는 미분화된 상태로 배양이 용이하기 때문에 세포배양 실험에 많이 사용된다²⁷⁾

이에 저자는 임상조건과 유사한 실험조건을 갖추기 위하여 사람의 치주인대 섬유아세포를 배양하여 근관 충전용 시멘트 Tubliseal, N2, AH26 및 Sealapex등을 혼합직후 세포에 접촉시켜 Succinate dehydrogenase(SDH)효소의 활성도, ⁵¹Chromium(⁵¹Cr) 방출량, 세포수 산정과 생존율 및 ¹⁴C-leucine 결합율을 관찰하여 세포독성을 평가한 결과 다소의 지견을 얻었기에 보고하는 바이다.

II. 실험재료 및 방법

1. 실험 재료

본 실험에 사용된 근관 충전용 시멘트는 Tubliseal(TS, 산화아연 유지놀제재), N2(N2, Formaldehyde 유지놀제재), AH26(AH, Epoxy resin제재) 및 Sealapex(SP, 수산화 칼슘제재)의 4종류를 사용하였다 (Table 1. 참조).

2. 세포 배양

본 실험에 이용된 세포는 사람의 정상 치주인대 섬유아세포로, 교정 치료목적으로 발거한 치아를 Penicillin-Streptomycin이 첨가된 세포 배양액(Dulbeco's Modified Eagle's Medium : DMEM)에 넣어 즉시 실험실로 운반한 후 phosphate buffered saline(PBS, pH 7.4)으로 3회 세척하고 Collagenase(Gibco,

Table 1. Root canal sealers used in this study

Materials	Group	Batch No.	Manufacturer
Tubliseal	TS	3604-00340	Kerr, USA
N2 (Universal)	N2	1091, 1101	AGSA, Switzerland
AH26	AH	910621	DeTrey, Switzerland
Sealapex	SP	3604-18432	Kerr, USA

Grand Island, NY. USA, 1mg/ml)가 5ml 담겨있는 시험관에 넣고 37°C shaking water bath에서 30분간 보관하였다. 치주인대 조직으로부터 분리된 섬유아세포를 PBS용액으로 3회 세척하고 Fetal Calf Serum(FCS, Gibco, Grand Island, NY. USA)이 10%되게 첨가된 DMEM 배양액 10ml에 재부유시켜 세포배양관(Culture flask, 75cm² Costar, Cambridge, MA 02139, USA)에 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 주 2-3회 배양액을 교체하면서 치주인대 섬유아세포가 단층을 형성할 때까지 배양하였다. 세포가 단층을 형성하면 배양액을 제거하고 PBS용액으로 세포를 세척한 다음 0.05% Trypsin-0.01% EDTA(Gibco, Grand Island, NY. USA) 용액으로 처리하여 치주인대 섬유아세포를 분리하였다. 분리된 세포는 1:10으로 2차계대 배양하고, 2차 배양에서 세포가 단층을 형성하면 0.05% Trypsin-0.01% EDTA로 처리하여 세포를 분리하여 -196°C 액체 질소에 넣어 보관하고, 각각의 실험은 상기의 냉동 보존된 세포를 해동(thawing)시켜 3차 배양한 세포를 이용하였다.

3. 실험 방법

(1) 대조군: 근관 충전용 시멘트를 적용시키지 않고 세포만 배양하였다.

(2) 실험군: 근관 충전용 시멘트의 적용에 따라 Tubliseal 적용의 경우 TS군, N2적용의 경우 N2군, AH26 적용의 경우 AH군 그리고 Sealapex적용의 경우 SP군으로 나누어 다음과 같이 세포독성 실험을 실시하였다.

1) Millipore filter를 이용한 SDH효소 활성도 검사

Wennberg²⁸⁾의 방법에 따라 직경 60mm의 세포 배양용 dish에 직경 47mm, pore size 0.47μm의 millipore filter를 넣고 그 위에 직경 46mm wire ring을 올려놓아 millipore filter가 부유하는 것을 방지하였다. 5×10⁵ cells/ml 농도로 부유된 배양액을 dish당 5ml씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시

간 배양한 후 세포가 배양된 millipore filter를 배양용 dish로부터 꺼내어 1.5% agar-10% FCS DMEM의 agar표면에 millipore filter의 세포면이 접촉되도록 하였다. 4종의 근관 충전용 시멘트(TS, N2, AH 및 SP)를 혼합 즉시 millipore filter 1개당 직경 7mm, 높이 2mm의 PVC tube 2개에 주입하여 시편을형성하고, 2시간 및 20시간동안 배양한 다음, 시편을 제거하고 agar로부터 millipore filter를 분리하여 tetrazolium salt를 이용한 SDH효소 염색을 시행하고 시편하방과 시편주위의 염색정도를 측정하여 Wennberg²⁸⁾의 판정기준(Table 2. 참조)에 따라 세포독성을 평가하였다.

2) ⁵¹Cr 방출량 검사

Spånberg와 Al-Nazhan²⁹⁾의 방법을 수정하여 시행하였다. 75cm² 세포배양관(Costar, Cambridge, MA. USA)에 4×10⁶개의 치주인대 섬유아세포를 넣고 overnight 배양한 뒤 배양액을 제거하고 새로운 배양액 10ml를 분주한 다음, 10μCi의 ⁵¹Cr(NEN, Du pont Co., Wilmington, DE. USA)을 가하고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간동안 배양하여 ⁵¹Cr을 세포에 표지(labeling) 시킨 다음 0.05% Trypsin-0.01% EDTA용액으로 처리하여 세포를 분리하고 2×10⁶cells/ml의 농도로 배양액에 부유하였다. 4종의 근관 충전용 시멘트(TS, N2, AH 및 SP)는 혼합 즉시 96well flat bottom microplate(Costar, Cambridge, MA. USA)에 well의 바닥이 덮힐 정도로 넣고, 그 위에 ⁵¹Cr으로 표지된 세포가 부유된 배양액 100μl씩을 분주하였다. 세포의 최대 ⁵¹Cr 방출량(total release)은 시편대신 1% Triton X-100 100μl와 세포 부유액 100μl를 혼합하였으며 자연방출량(spontaneous release)을 측정하기 위해서 배양액 100μl와 세포부유액 100μl를 혼합하였다. 이후 plate를 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 30분, 60분, 120분, 240분간 배양한 후 각 well내의 ⁵¹Cr의 방사활성을 gamma counter(Beckman, USA)에서 분당 계산수(count per minute : cpm)로 측정하였다. 세포에 대한 근관 충전용 시멘트의 독성은 세포

막의 파괴 정도를 % lysis(세포의 용해도)로 계산하여 평가하였다.

$$\% \text{ Lysis} = \frac{\text{ER} - \text{SR}}{\text{TR} - \text{SR}} \times 100$$

TR : Total release

SR : Spontaneous release

ER : Experiment release

3) 세포수 산정 및 생존율 검사

3차 배양중인 치주인대 섬유아세포를 6 well plate(Costar, Cambridge, MA. USA)에 1×10^5 cells/well씩 넣고 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 48시간 배양한 후 배양액을 제거하고 새롭게 제조한 배지(10% FCS DMEM)를 well당 2ml씩 분주하였다. 각 well에 Millicell-CM(직경 30mm, Millipore Co., Bedford, MA. 01730, USA)을 놓고 4종의 근관 충전용 시멘트(TS, N2, AH 및 SP)를 혼합하여 직경 7mm, 높이 2mm의 PVC tube에 주입하여 시편을 형성하고 1일, 3일 및 6일간 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양하였으며, 배양 후 시편을 제거하고 PBS용액으로 세포를 세척한 다음 0.05% Trypsin-0.01% EDTA 용액으로 처리하여 개개의 세포로 유리시켜 0.4% Trypan-blue로 염색하여 총 세포수, 생존 세포수 및 죽은 세포수를 산정하였다. 세포 생존율은 총 세포수와 생존 세포수(총 세포수에서 Trypan-blue에 의해 염색된 죽은 세포수를 뺀 수)의 비율로 계산하였다.

4) ¹⁴C-leucine 결합율 검사

Briseño와 Willershausen³⁰⁾의 방법을 수정하여 6 well plate에 4.0×10^5 cells/well을 넣고 24시간 배양한 후 배양액을 교체하고 그 위에 Millicell-CM(Millipore Co., 직경 30mm)을 놓고 4종의 근관 충전용 시멘트(TS, N2, AH 및 SP)를 혼합 즉시 직경 7mm, 높이 2mm의 PVC tube에 주입하여 시편을 형성하고 1일, 3일 및 6일간 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 배양한 후 시편을 제거하고 세포를 PBS용액으로 세척한 다음 1ml의 10% FCS-DMEM을 가한

후 0.2μCi의 ¹⁴C-leucine(Amersham life Sci., Buckinghamshir, England, CFB 67, 50μCi, 1.85 MBq)을 첨가하여 2시간동안 37°C, 5% CO₂ 배양기에서 첨가한 후 배양액은 제거하고 PBS용액으로 세포를 세척한 다음 0.05% Trypsin-0.01% EDTA용액으로 치주인대 섬유아세포를 분리하였다. 분리된 세포는 7.5% Trichloroacetic acid로 2회 세척한 다음 0.2ml의 PBS에 재부유한 뒤 5ml의 cocktail solution(Lumagel safe, Lumae LSC B.V., Belgium)이 들어있는 counting vial에 넣고 혼합한 후 4°C에서 24시간 보관한 다음 β-Scintillation counter(Beckman, LS 9000, USA)에서 그 방사 활성을 측정하여 세포의 단백질 함성량은 단백질 1mg당 cpm단위(cpm per mg protein)로 산정하여 세포에 대한 근관 충전용 시멘트의 독성효과를 평가하였다.

III. 실험성적

1. Millipore filter를 이용한 SDH효소 활성도 검사

SDH효소의 활성도를 tetrazolium salt의 염색 정도로 관찰한 결과 2시간동안 시편을 적용시킨 경우 Tubliseal은 시편의 직경보다 약간 큰 8.5mm, N2는 10.5mm 및 AH26은 10mm의 염색 안된 부위를 나타내었으며, Sealapex는 대조군과 염색성의 차이가 없었고(Fig. 4 참조), 20시간동안 적용시킨 경우 Tubliseal은 18mm, N2는 47mm 직경의 millipore filter전체가 염색이 안되었고, AH26은 31.5mm까지 염색이 안되었으며, Sealapex는 시편하방에 염색이 미약한 부위가 관찰되었다(Fig. 5 참조). 이상의 결과는 Wennberg²⁸⁾의 판정기준(Table 2. 참조)에 따르면 20시간 시편을 적용했을 때 Tubliseal, N2 및 AH26은 심한 세포독성을 나타내었고 Sealapex는 미약한 세포독성을 나타내었다(Table 3. 참조).

Table 2. Scoring system for evaluation of cytotoxicity in SDH activity test

Score	Appearance of cell-material contact area	Cytotoxicity
0	No difference in staining intensity compared with control area	None
1	A zone of reduced staining intensity, or an unstained zone < 7 mm wide	Mild
2	An unstained zone 7 to 11 mm wide	Moderate
3	An unstained zone > 11 mm wide	Severe

(specimen diameter : 7 mm)

Table 3. Score of SDH activity test

Group	Time	2 hours	20 hours
	Control		0
TS		2	3
N2		2	3
AH		2	3
SP		0	1

과 재료간의 통계학적 유의성을 평가하기 위하여 ANOVA(분산분석)를 시행하고 사후검정으로 Duncan's multiple range test를 하였다. 30, 60 및 120분 사이에는 방출량에 통계학적으로 유의성 있는 차이가 있었으나(p<0.05), 120분과 240분의 방출량간에는 통계학적 유의성은 없었고, Tubliseal과 나머지 3재료와는 유의성 있는 차이를 보였으나(p<0.05) 나머지 3재료간에는 유의성 있는 차이가 없었다.

2. ⁵¹Cr 방출량 검사

⁵¹Cr으로 표지한 치주인대 섬유아세포에 30, 60, 120 및 240분동안 근관 충전용 시멘트를 적용시켜 ⁵¹Cr의 방출량을 측정하여 세포막의 파괴 정도에 따른 세포의 용해도를 %로 나타낸 결과 Table 4와 같다. AH26의 경우 30분 노출시 37.64%로 가장 낮은 세포의 용해도를 보였으나 240분간 노출시 79.64%로 가장 높은 Tubliseal(81.98%)과 유사한 세포의 용해도를 나타내었다(Table 4, Fig. 1 참조). 노출시간

3. 세포수 산정 및 생존율 검사

대조군의 경우 1일에 25.2×10^4 cells/well, 3일에 84.67×10^4 cells/well 및 6일에 101.5×10^4 cells/well로 시간이 경과함에 따라 생존 세포수가 증가하였으며, Tubliseal의 경우 1일에 18.07×10^4 cells/well로 대조군과 유사하였으나, 3일에는 12×10^4 cells/well, 6일에는 4.3×10^4 cells/well로 시간이 경과함에 따라 생존 세포수가 감소하였다(Table 5, Fig. 2, 7, 12 참조).

Table 4. Results of ⁵¹Cr release from fibroblasts exposed to four root canal sealers following exposure time (% lysis)

Group	Time	30 min	60 min	120 min	240 min
	TS		58.60 ± 5.22	64.63 ± 3.76	81.94 ± 1.33
N2		47.32 ± 10.06	49.91 ± 2.38	60.85 ± 2.27	68.25 ± 1.23
AH		37.64 ± 4.13	51.77 ± 4.03	71.67 ± 3.04	79.64 ± 5.20
SP		46.97 ± 0.85	55.88 ± 1.12	56.53 ± 1.28	61.71 ± 5.87

(Mean ± S.D.)

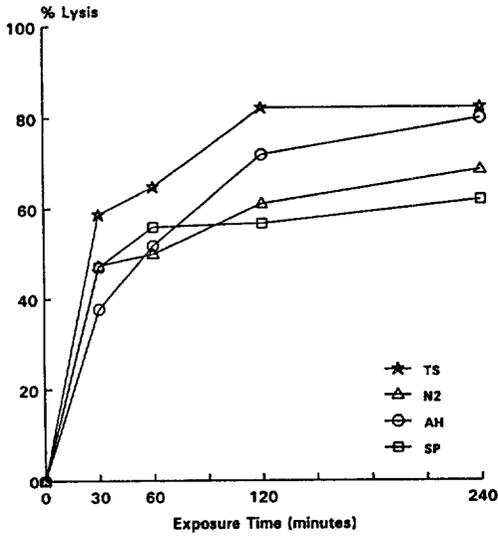


Fig. 1. ^{51}Cr release from fibroblasts exposed to four root canal sealers following exposure time.

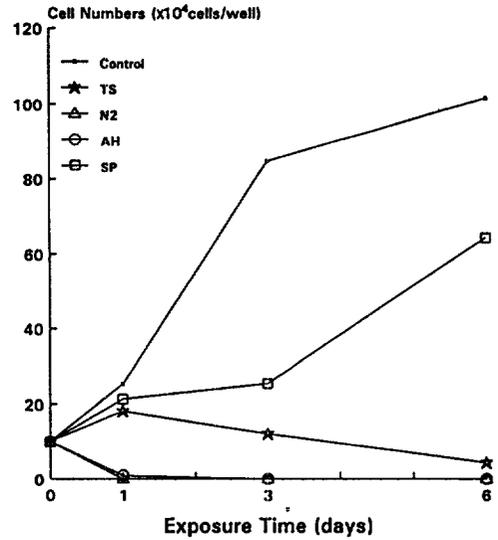


Fig. 2. Effects on growth of fibroblasts exposed to four root canal sealers for 1, 3, and 6 days.

Table 5. Results of viable cell count following exposure time ($\times 10^4$ cells/well)

Group	Time	1 day	3 days	6 days
Control		25.20 \pm 0.70	84.67 \pm 11.23	101.50 \pm 7.56
TS		18.07 \pm 1.89	12.00 \pm 0.00	4.30 \pm 0.51
N2		—	—	—
AH		0.92 \pm 0.31	—	—
SP		21.23 \pm 1.38	25.30 \pm 0.41	64.30 \pm 4.09

(Mean \pm S.D.)

N2의 경우 1일, 3일 및 6일 경과후에 현미경으로 관찰한 세포는 어느정도 형태를 갖고 있었으나 생존 세포가 관찰되지 않았다(Table 5, Fig. 8, 13 참조).

AH26의 경우 1일에 생존 세포수가 0.92×10^4 cells/well로 대조군에 비해 현저히 감소하였으며 3일과 6일에는 생존 세포를 관찰할 수 없었다(Table 5, Fig. 9, 14 참조).

Sealapex의 경우 1일에 21.23×10^4 cells/well로 대조군과 별 차이가 없었으나 3일에는 25.3×10^4 cells/well로 1일에 비해 생존 세포수가 약간 증가하였고, 6일에는 64×10^4 cells/well로 현저히 증가하였으나 대조군보다는 낮

게 나타났다(Table 5, Fig. 2, 10, 15 참조).

총 세포수와 생존 세포수(총 세포수에서 Trypan-blue에 의해 염색된 죽은 세포수를 뺀 수)의 비율인 세포 생존율은 대조군에서 1일 99.33%, 3일 87.2%, 6일 98.83%로 3일에 세포 생존율이 낮게 나타났으며 Sealapex, Tubliseal의 경우도 3일에 낮은 세포 생존율을 보였다(Table 6. 참조)

4. ^{14}C -leucine결합물 검사

^{14}C -leucine의 incorporation rate로 단백질 합성정도를 평가하는 실험으로 대조군의

Table 6. Results of cell viability test (%)

Group \ Time	1 day	3 days	6 days
Control	94.33 ± 1.25	87.20 ± 1.95	98.83 ± 0.25
TS	90.00 ± 0.96	76.10 ± 2.16	79.93 ± 2.36
N2	—	—	—
AH	7.57 ± 2.04	—	—
SP	89.67 ± 6.55	67.84 ± 1.90	91.90 ± 0.81

(Mean ± S.D.)

Table 7. ¹⁴C-leucine incorporation rate of fibroblasts exposed to four root canal sealers following exposure time (%)

Group \ Time	1 day	3 days	6 days
TS	24.65 ± 3.92	0.84 ± 0.02	0.27 ± 0.06
N2	20.82 ± 2.96	0.72 ± 0.08	0.29 ± 0.05
AH	20.37 ± 2.76	0.79 ± 0.01	0.34 ± 0.02
SP	48.98 ± 4.97	43.39 ± 2.82	34.39 ± 2.44

(Mean ± S.D.)

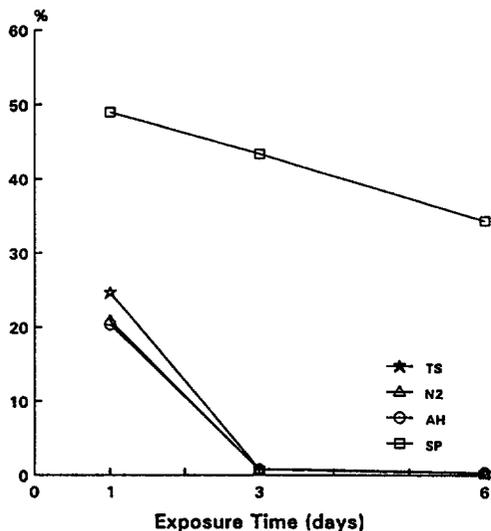


Fig. 3. ¹⁴C-leucine incorporation rate of cultured fibroblasts exposed to four root canal sealers for 1,3, and 6 days.

incorporation rate인 1일 20605.5±4661.5 cpm, 3일 5020.5±130.5 cpm, 6일 14751.0±1241 cpm을 100%로 하였을 때 근관 충전용 시멘트를 적용한 세포의 단백질 합성량은 1일에 Tubliseal, AH26 및 N2는 24.65%, 20.82%, 20.37%의 순으로 비슷한 단백질 합성 정도를 나타내었고, Sealapex는 48.98%로 가장 높은 단백질 합성을 나타내었다. 3일에는 Tubliseal, N2 및 AH26은 단백질합성이 거의 없었으며, Sealapex는 43.39%의 단백질 합성을 보였으며, 6일에는 Sealapex만이 34.39%의 단백질 합성을 나타내었다(Table 7. 참조).

IV. 총괄 및 고안

근관을 외부환경과 차단하고 치근단 조직내로의 세균의 침입을 방지하기 위하여 gutta-percha와 같은 고품 충전재와 근관 충전용 시멘트로 충전한다. 그러나 근관 충전용 시멘트는 유동성이 있어 근단공과 측방관을 통하여 치근단 조직과 접촉 하게 되므로 생체 조직에

자극이 없어야 한다³⁾. 따라서 근관 충전용 시멘트의 조직에 대한 적합성을 평가하여 임상에 사용하여야 한다. 근관 충전 재료의 독성을 평가하는 방법으로는 세포독성 평가방법과 피하 또는 골내 매식후 주위조직의 반응을 관찰하는 방법 및 생체의 치근단 반응을 관찰하는 방법이 있다. 가장 이상적인 방법은 치근단 반응에 의한 평가이나 생체내 실험은 기구조작이나 감염 및 개체의 염증에 대한 반응의 차이등으로 인해 재료자체의 독성이 정확하게 평가되지 않기 때문에 생체의 실험을 주로 이용하고 있다²⁷⁾.

생체의 실험에서 세포 배양법을 많이 사용하는 이유는 사용된 세포의 종류와 기원을 정확히 알 수 있고 배양액이 화학적으로 규정되어 있어 재현성이 있으며, 복잡한 생체계에서 나타날 수 있는 염증, 면역, 신경 혹은 호르몬의 작용등에 의해 영향을 받지 않고, 환경변화에 대한 세포의 반응과 변화에 대한 신속한 실험을 할 수 있으며, 세포반응에 대한 다양한 양상을 양적으로 측정이 용이하기 때문이다³¹⁾.

세포배양법을 사용하여 세포독성을 평가하는 방법으로는 세포수산정^{7,32,33)}과 세포의 형태학적 변화의 현미경적 관찰³³⁾, 방사선동위원소 (⁵¹Cr)의 방출량 검사^{29,32)}나 염색에 의한 세포막의 투과도 변화 측정³⁴⁻³⁶⁾, DNA분석^{37,38)} 및 방사선 동위원소 (¹⁴C-leucine)를 이용한 단백질 합성량 산출에 의한 세포성장률 측정³⁰⁾, 세포의 산소섭취량과 이산화탄소 방출량에 의한 세포호흡량 측정⁵⁾, 효소활성도 측정^{9,28,36)}, 사립체효소의 조직화학적 기계분석^{9,32,39)} 및 당원 대사의 변화조사^{32,40)}등이 있다. 그러나 이들 방법으로 평가된 결과는 실험방법에 따라 독성 정도에 차이가 다양하게 나타나기 때문에 한가지 실험결과에 의하여 세포독성을 단정하기는 어렵다³²⁾. 따라서 본 연구에서는 SDH효소 활성도의 측정과 세포막의 투과도 변화에 의한 방사선 동위원소 ⁵¹Cr의 방출량을 측정하여 단기간의 세포독성을 평가하고, 시간경과에 따른 세포독성을 관찰하기 위하여 1일, 3일 및 6일 동안 근관 충전용 시멘트를 적용시켜 배양한 후 세포수 산정과 세포의 형태학적 변화를 현

미경적으로 관찰하고, 세포의 단백질 합성정도를 ¹⁴C-leucine의 결합율로 평가하여 시간 경과에 따른 세포독성을 관찰하고, 실험 방법간에 차이성 여부를 분석하였다.

SDH효소의 활성도를 측정하는 방법에 대하여 Tronstad등⁴¹⁾과 Wennberg⁴²⁾는 생체의 실험과 생체내 실험에서 SDH효소 활성도를 평가한 결과, 두 실험 결과에 차이가 없었다고 보고하였으며, Yesilsoy와 Feigal⁹⁾이 zone size(염색 안된 부위의 크기), stain intensity(염색도) 및 cell lysis(세포 용해도)등을 비교 평가하였을 때 평가지수에 따른 근관 충전용 시멘트의 독성 정도에 차이가 없었다고 보고한 것을 토대로 가장 간단한 zone size로 독성을 평가할 수 있는 방법이다. 본 연구의 SDH효소 활성도 검사에서 2시간 동안 시편을 적용시킨 경우 독성이 확산되지 못하여 시편주위에만 염색안된 부위가 나타났으나 20시간 적용시에는 재료의 독성 정도에 따라 뚜렷한 염색성의 차이를 나타내어 SDH효소 활성도의 차이를 보였다. 이와같은 결과는 1일의 세포수 산정과 유사한 결과를 나타내었다. Wennberg²⁸⁾의 세포독성 판정기준(Table 2. 참고)에 의하면 20시간 적용시 Sealapex는 미약한 세포독성을 나타내었고, Tubliseal, N2 및 AH26은 심한 세포 독성을 나타내었다. 염색 안된 부위의 크기를 비교해보면 Tubliseal, AH26, N2의 순으로 독성이 크게 나타났다(Fig. 5 참조).

⁵¹Cr 방출량을 측정하는 방법은 약품이나 재료의 독성평가에 많이 사용되며, ⁵¹Cr을 세포에 표지하고 근관 충전용 시멘트를 접촉시킨 후 재료의 독성으로 인해 세포막이 파괴되면서 방출되는 ⁵¹Cr의 양을 대조군의 ⁵¹Cr방출량과 비교하여 세포의 용해도(% lysis)를 산정하여 세포의 독성을 평가한다. 본 연구에서는 ⁵¹Cr 방출량 검사를 이용하여 근관 충전용 시멘트를 30분, 60분, 120분 및 240분 동안 적용시켜 관찰한 결과, 시간이 경과함에 따라 방출량이 증가하여 세포의 독성이 증가함을 나타내고 있으며, 240분에 Tubliseal, AH26, N2, Sealapex의 순으로 세포의 용해도가 낮게 나타나 Tubliseal이 가장 심한 세포독성을 나타

내었고, Sealapex가 가장 낮은 세포독성을 나타내었다.

본 연구의 세포수 산정과 세포의 현미경적 관찰 및 단백질 합성을 비교한 실험은 1일, 3일 및 6일 동안 근관 충전용 시멘트를 접촉시켜 세포를 배양하여 시간경과에 따른 세포독성을 평가한 실험이다. 즉 세포수 산정으로 생존 세포수와 세포 생존율을 관찰한 결과 1일 경과 Tubliseal군의 경우 대조군에 비하여 약간 생존 세포수가 감소하였으며, N2의 경우 세포가 고정되어 세포형태는 남아 있었으나 세포는 모두 사멸하여 생존세포를 관찰할 수 없었다. AH26은 10%이외의 거의 모든 세포가 사멸하였고, Sealapex의 경우 대조군과 별 차이가 없었다. 3일에 Tubliseal은 생존 세포수가 현저히 감소하였고, N2와 AH26은 살아있는 세포를 관찰할 수 없었으며, Sealapex의 경우 1일 보다는 생존 세포수가 약간 증가하였으나 대조군보다는 훨씬 적었다. 6일에 Tubliseal은 3일에 비해 생존 세포수가 현저히 감소하였고, N2와 AH26은 생존 세포가 관찰되지 않았으며, Sealapex의 경우 생존 세포수가 3일에 비해 현저히 증가하였다. 이상의 결과에서 Tubliseal의 경우 독성이 6일에도 지속되었고, Sealapex는 1일 이후에는 독성이 감소하여 6일에는 독성이 거의 없음을 알 수 있다.

^{14}C -leucine 결합율을 이용한 단백질 합성량 측정은 세포수 산정과 유사한 결과를 나타내었다. 즉 1일에는 모든 재료에서 어느 정도 세포의 단백질합성을 보이나 3일과 6일에는 Sealapex외의 다른 3가지 재료에서는 단백질 합성을 확인할 수 없었다. 3일과 6일에 세포가 어느정도 생존된 Tubliseal의 경우 단백질 합성이 불가능하여 시간이 경과하면서 생존 세포수가 감소하는 결과와 일치한다고 할 수 있다 (Table 5와 7참조).

Tubliseal의 경우, 세포수 산정과 단백질합성량 측정 결과에서 나타난 바와 같이 지속적인 세포독성을 나타내었다. 그 이유는 Hume⁴³⁾이 보고한 바와 같이 산화아연 유지놀 시멘트가 수분과 접촉시 가수분해가 일어나 수산화 아연과 유지놀로 분해되어 유지놀이 유리되면서 이

유지놀에 의해 세포독성이 야기되기 때문이라고 사료된다. 그러나 Hume⁴⁴⁾은 산화아연 유지놀 시멘트를 생체에 사용시에는 과충전으로 인해 조직액에 노출된 부위의 세포에 한하여 영향을 받으며 시간이 경과하면서 회석이 되어 독성이 감소하기 때문에 임상에 사용할 수 있다고 보고 한 바 있다.

N2의 경우 여러 연구^{9,10)}에서 심한 독성을 보고하였으며, 본 연구의 SDH효소 활성도 검사(Table 3), 세포수 산정(Fig.2) 및 ^{14}C -leucine결합을 검사(Fig. 3)에서도 가장 심한 세포독성을 나타내었으나 ^{51}Cr 방출량 검사에서는 Tubliseal, AH26, N2, Sealapex의 순으로 세포독성이 낮게 나타났다. 그 이유는 N2의 경우 Formaldehyde가 함유되어 세포를 고정시키는 성질이 있기 때문에⁹⁾ 세포막의 용해도로 독성을 평가하는 ^{51}Cr 방출량 검사에서는 세포독성이 낮게 나타났으리라 사료된다.

AH26은 접착성이 우수하여 근관의 밀폐성이 좋으며¹¹⁻¹⁴⁾ 근관내 삼입이 용이하여 많이 사용하고 있으나, Yesilsoy와 Feigal⁹⁾ 및 Rappaport등¹⁰⁾은 미약한 세포독성을, Nakamura등⁷⁾은 심한 세포독성을 보고하여 상반된 결과를 보고하였으며, 본 연구에서도 SDH 효소 활성도 검사(Table 3), 세포수 산정(Fig. 2) 및 ^{14}C -leucine결합을 검사에서 심한 세포독성을 나타내었으나 ^{51}Cr 방출량검사에서는 Tubliseal에 비하여 약한 세포독성을 나타내었다.

Sealapex의 경우 수산화 칼슘제재로서 Gordon등⁴⁵⁾은 수산화 칼슘 제재는 칼슘이온 농도보다는 높은 pH가 수복 상아질의 형성을 자극한다고 설명하고 있으며, Torneck⁴⁶⁾은 칼슘이온이 세포내의 ATP작용을 증진시키고 DNA합성을 촉진하며 OH^- 이온에 의해 주위의 pH가 상승된다고 하였으며, 세포의 DNA합성은 수산화 칼슘의 농도가 0.025 ml일때 증가하고 0.050 ml일때는 변화가 없으므로 적절한 농도의 수산화 칼슘이 사용되어야 한다고 보고하였다. 또한 Pitt Ford와 Rowe²⁶⁾는 동물 실험에서 수산화 칼슘제재의 근관 충전용 시멘트에 의하여 정상적인 치근단형성이 가능함을

관찰하였고, Zmener 등²⁵⁾은 Sealapex가 탐식 작용을 유발하지만 치근단 병소의 치유를 유도시킨다고 보고하고 있으며, Holland와 Souza¹⁹⁾는 Sealapex의 경우 동물실험에서 우수한 치근단 폐쇄(apical closure)효과를 나타낸다고 보고하고 있으며 Ghose¹⁸⁾는 무수치의 apexification에 사용한 결과 3-10개월 이내에 거의 대부분의 치아에서 apical barrier가 형성되었음을 방사선 소견으로 관찰 보고하였다. Soares 등²⁰⁾은 동물실험에서 Sealapex와 CRCS등의 수산화 칼슘제재나 산화아연 유지놀제재는 근관 충전후 시간 경과에 따라 모두 부분적인 치근단 폐쇄를 나타내었다고 보고하였다.

본 연구에서는 4가지 실험 모두에서 Tubliseal, N2 및 AH26에 비하여 Sealapex가 독성이 가장 낮게 나타났다. 이상의 연구보고와 본 연구의 결과로 미루어 보아 Sealapex는 조직에 대한 독성이 적고 치근단 폐쇄를 유도하여 근관을 완전히 밀폐시킬 수 있기 때문에 근관 충전용 시멘트로 사용하기에 적합한 재료라 여겨지며 세포독성도 미약하여 생체 적합성도 우수하다고 사료된다.

실험재료의 독성평가에는 세포와의 접촉면적이 중요한 변수로 작용할 수 있어 본 연구에서는 일정한 크기의 PVC tube를 사용하여 시편을 제작함으로써 접촉면적을 일정하게 하여 조건을 동일하게 하였으며, 혼합즉시 시편을 배양액위에 놓아 미경화된 재료가 배양액이나 하방의 세포에 압력을 가하는 것을 방지하기 위해 중간에 millipore filter를 개재시켰다. 또한 근관 충전용 시멘트는 과중전되지 않는다면 세포에 직접 닿는 것보다 조직액에 의해 확산되어 독성물질이 작용되기 때문에 filter에 의해 확산되게 하는 방법을 이용하였다.

세포독성 검사시 세포배양에 이용되는 세포를 선택하는 것은 중요하다⁴⁷⁾. 가능한 한 임상과 동일한 조건을 부여하는 것이 바람직하여 본 연구에서는 치근단과 주위의 치주인대 조직을 배양하여 얻은 섬유아세포를 사용하였다. 그 결과 실험동물의 세포를 사용한 다른 실험결과와 약간의 차이가 있으리라 여겨진다.

실험에 사용하는 재료의 상태는 임상에서와 동일한 조건으로 실험하는 것이 바람직하여 혼합즉시 사용하는 재료인 근관 충전용 시멘트이므로 본 연구에서는 혼합즉시 시편을 형성하여 실험하였기 때문에 독성이 매우 강하여 세포가 조기에 모두 사멸하는 결과를 나타내어 AH26과 N2는 비교할 수가 없었다. 경화가 완전히 이루어진 후에도 독성이 지속되는지에 관한 연구가 필요하리라 여겨진다.

본 연구에서 시행한 SDH효소 활성도 검사, ⁵¹Cr 방출량 검사, 세포수 산정과 ¹⁴C-leucine 결합율을 이용한 세포의 단백질 합성 평가에서 독성의 순위는 ⁵¹Cr방출량에 있어서만 약간 다른 독성순위를 나타내고 나머지 3개의 실험은 유사한 결과를 나타내나 Tubliseal, N2, AH26 및 Sealapex의 독성평가에 ⁵¹Cr방출량 검사를 이용하는 것은 적절하지 않은 것으로 사료된다.

세포배양 실험에 의한 근관 충전용 시멘트의 독성평가는 간단하고 신속한 반응을 얻을 수 있어 많이 이용되나, 임상에서 보다는 실험에 많은 양의 재료가 사용되고 세포가 환경에 민감하며 배양용기라는 제한된 공간에서 실험이 진행되므로 독성이 강하게 나타났으리라 판단되며, 임상에 적용시에는 생체의 실험보다는 다소 독성이 적게 나타나리라고 사료된다. 그리고 본 연구의 결과는 상대적인 재료간의 독성비교이므로 임상에서 생체 적합성을 고려하여 재료를 선택할 참고자료로 이용할 수 있으리라 여겨진다.

V. 결 론

근관 충전용 시멘트의 세포독성을 평가하기 위하여 배양된 치주인대 섬유아세포상에 Tubliseal, N2, AH26 및 Sealapex를 적용시켜 SDH효소 활성도 검사, ⁵¹Cr 방출량 검사, 세포수 산정 및 ¹⁴C-leucine결합율을 측정하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. SDH효소 활성도 검사에서 20시간 배양 후 Sealapex는 미약한 세포독성을 나타내었

고, Tubliseal, N2 및 AH26은 심한 세포독성을 나타내었다.

2. ⁵¹Cr 방출량 검사에서 Tubliseal이 가장 심한 세포독성을 나타내었고 AH26, N2 Sealapex의 순으로 세포독성이 낮게 나타났다.

3. 세포수 산정에서 Tubliseal은 시간이 경과함에 따라 생존 세포수가 감소하여 세포독성이 지속됨을 나타내었고, N2와 AH26은 1일에 생존 세포를 거의 관찰할 수 없었으며, Sealapex는 시간이 경과함에 따라 생존 세포수가 현저히 증가하여 세포독성이 감소함을 나타내었다.

4. ¹⁴C-leucine 결합을 검사에서 Tubliseal, N2 및 AH26은 3일에 세포의 단백질합성이 나타나지 않아 심한 세포독성을 나타내었으며, Sealapex는 시간이 경과함에 따라 세포의 단백질합성이 감소하였으나 6일에도 세포의 단백질 합성이 계속되어 세포독성이 미약함을 나타내었다.

REFERENCES

1. Ingle J.I. and Taintor J.F. Endodontics. 3rd ed. Philadelphia. Lea & Febiger, p. 231, 1985.
2. Cohen S. and Burns R.C. Pathways of the pulp. 5th ed. St. Louis: Mosby, pp. 207-208, 1987.
3. Schroeder A. Endodontics - Science and Practice. Chicago: Quintessence Pub., pp. 167-168, 1981.
4. Wilson A.D. and Batchelor R.F.: Zinc oxide-eugenol cements: II. Study of erosion and disintegration. J Dent Res, 49: 593-598, 1970.
5. Hume W.R.: Effect of eugenol on respiration and division in human pulp, mouse fibroblasts and liver cells in vitro. J Dent Res., 63:1262-1265, 1984.
6. Meryon S. and Jakeman K.J.: The effects in vitro of zinc released from dental restorative materials. Int Endod J, 18:191-198, 1985.
7. Nakamura H., Sakakibara F., Matsumoto, Y., Hirano S., Hayakawa H., Sakai K., and Yip M.: Study on the cytotoxicity of root canal filling materials. J Endodon, 12: 156-160, 1986.
8. Seltzer S. Endodontology. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger, p. 293, 1988.
9. Yesilsoy C. and Feigal R.J.: Effects of endodontic materials on cell viability across standard pore size filters. J Endodon, 11:401-406, 1985.
10. Rappaport H.M., Lilly G.E., and Kapsimalis P.: Toxicity of endodontic filling materials. Oral Surg, 18:785-802, 1964.
11. Grossman L.I.: Solubility of root canal cements. J Dent Res, 57:927, 1978.
12. McComb D. and Smith D.C.: Comparison of physical properties of polycarboxylate-based and conventional root canal sealers. J Endodon, 2:228-235, 1976.
13. Fogel B.B.: A comparative study of five materials for use in filling root canal spaces. Oral Surg, 43:284-299, 1977.
14. Gentleman B.H., Messer H.H., and ElDeeb M.E.: Adhesion of sealer cement to dentin with and without the smear layer. J Endodon, 17:15-20, 1991.
15. Block R.M., Lewis R.D., Sheats J.B., and Burke S.H.: Antibody formation to dog pulp tissue altered by AH-26 sealer via the root canal. Oral Surg, 48:169-174, 1979.
16. Tamse A., Kaffe I., Littner M.M., and Kozlovsky A.: Paresthesia following over-extension of AH-26: report of two cases and review of the literature. J Endodon, 8:88-90, 1982.
17. Tagger M. and Tagger E.: Subcutaneous

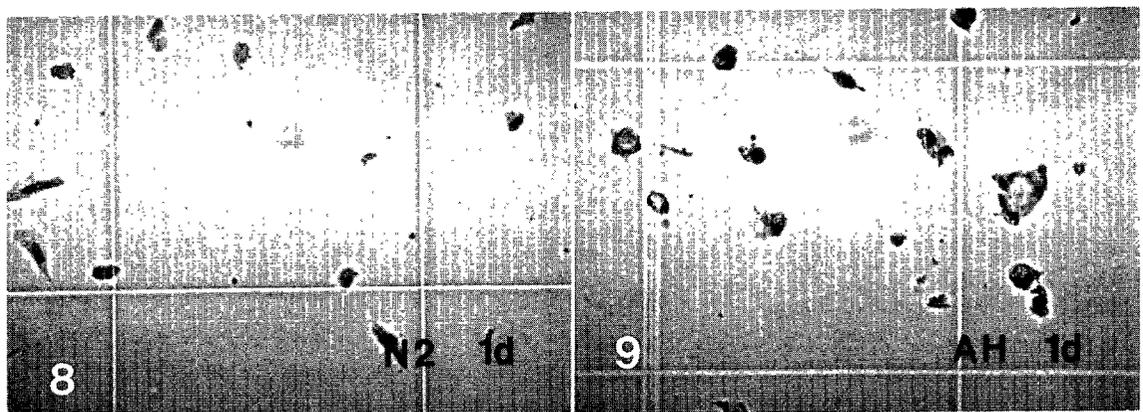
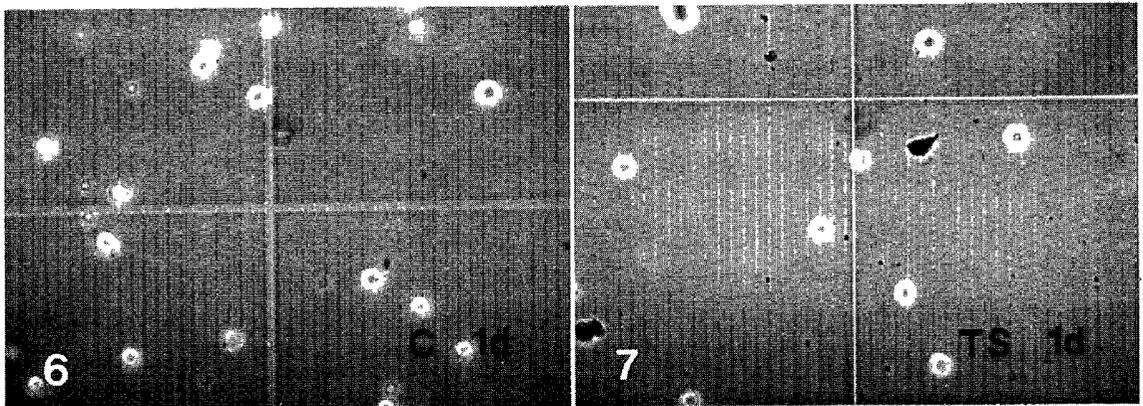
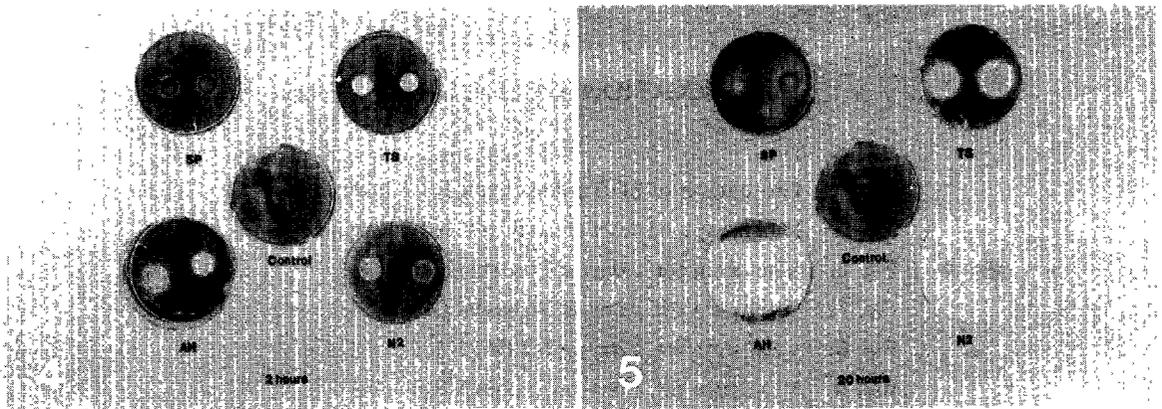
- reactions to implantation of tubes with AH26 and Grossman's sealer. *Oral Surg*, 62: 434-440, 1986.
18. Ghose L.J., Baghdady V.S., and Hikmat Y.M.: Apexification of immature apices of pulpless permanent anterior teeth with calcium hydroxide. *J Endodon*, 13:285-290, 1987.
 19. Holland R. and de Souza V.: Ability of a new calcium hydroxide root canal filling material to induce hard tissue formation. *J Endodon*, 11:535-543, 1985.
 20. Soares I., Goldberg F., Massone E.J., and Soares I.M.: Periapical tissue response to two calcium hydroxide-containing endodontic sealers. *J Endodon*, 16:166-169, 1990.
 21. Alexander J.B. and Gorden T.M.: A comparison of the apical seal produced by two calcium hydroxide sealers and a Grossman-type sealer when used with laterally condensed gutta-percha. *Quintessence Int*, 16: 615-621, 1985.
 22. Hovland E.J. and Dumsha T.C.: Leakage evaluation in vitro of the root canal sealer cement Sealapex. *Int Endod J*, 18:179-182, 1985.
 23. Lim K.C. and Tidmarsh B.G.: The sealing ability of Sealapex compared with AH26. *J Endodon*, 12:564-566, 1986.
 24. Sleder F.S., Ludlow M.O., and Bohacek J.R.: Long-term sealing ability of a calcium hydroxide sealer. *J Endodon*, 17:541-543, 1991.
 25. Zmener O., Guglielmotti M.B., and Cabrini R.L.: Biocompatibility of two calcium hydroxide-based endodontic sealers: A quantitative study in the subcutaneous connective tissue of the root. *J Endodon*, 14: 229-235, 1988.
 26. Pitt Ford T.R. and Rowe A.H.R.: A new root canal sealer based on calcium hydroxide. *J Endodon*, 15:286-289, 1989.
 27. Murphy W.M.: The testing of endodontic materials in vitro. *Int Endod J*, 21:170-177, 1988.
 28. Wennberg A.: In vitro assessment of the biocompatibility of dental materials – the millipore filter method. *Int Endod J*, 21: 67-71, 1988.
 29. Spångberg L.S.W. and Al-Nazhan S.A.: The radiochromium release method for evaluation of cytotoxicity in vitro. *Int Endod J*, 21:72-78, 1988.
 30. Briseño B.M. and Willershausen B.: Root canal sealer cytotoxicity on human gingival fibroblasts. I. Zinc Oxide-Eugenol-based sealers. *J Endodon*, 16:383-386, 1990.
 31. Tyas M.J. and Browne R.M.: Biological testing of dental restorative materials. *J Oral Rehabil*, 4:275-290, 1977.
 32. 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.
 33. Das S.: Effect of certain dental materials on human pulp in tissue culture. *Oral Surg*, 52:76-84, 1981.
 34. Mohammad A.R., Mincer H.H., Younis O., Dillingham E., and Siskin M.: Cytotoxicity evaluation of root canal sealers by the tissue culture-agar overlay technique. *Oral Surg*, 45:768-773, 1978.
 35. Schmalz G.: Agar overlay method. *Int Endod J*, 21:59-66, 1988.
 36. 이상탁, 이정식 : 생체의 실험을 이용한 근관충전용 sealer의 세포독성에 관한 연구. 대한치과보존학회지, 16 : 62-84, 1991.
 37. 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.
38. Matsumoto K., Inoue K., and Matsumoto A.: The effect of newly developed root canal sealers on rat dental pulp cells in primary culture. *J Endodon*, 15:60-67, 1989.
 39. 이승중, 김영해 : 근관충전용 Sealer의 세포독성에 관한 연구. *대한치과보존학회지* 16 : 25-40, 1991.
 40. Majôr 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.
 41. Tronstad L., Wennberg A., and Hasselgren G.: Screening tests for dental materials. *J Endodon*, 4:304-307, 1978.
 42. Wennberg A.: Biological evaluation of root canal sealers using in vitro and in vivo methods. *J Endodon*, 6:784-787, 1980.
 43. Hume W.R.: The pharmacologic and toxicological properties of zinc oxide-eugenol. *J Am Dent Assoc*, 113:789-791, 1986.
 44. Hume W.R.: In vitro studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Int Endod J*, 21:130-134, 1988.
 45. Gordon T.M., Ranly D.M., and Boyan B.D.: The effects of calcium hydroxide on bovine pulp tissue: variations in pH and calcium concentration. *J Endodon*, 11:156-160, 1985.
 46. Torneck C.D., Moe H., and Howley T.P.: The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. *J Endodon*, 9:131-136, 1983.
 47. Hensten-Pettersen A.: Comparison of methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J*, 21:89-97, 1988.

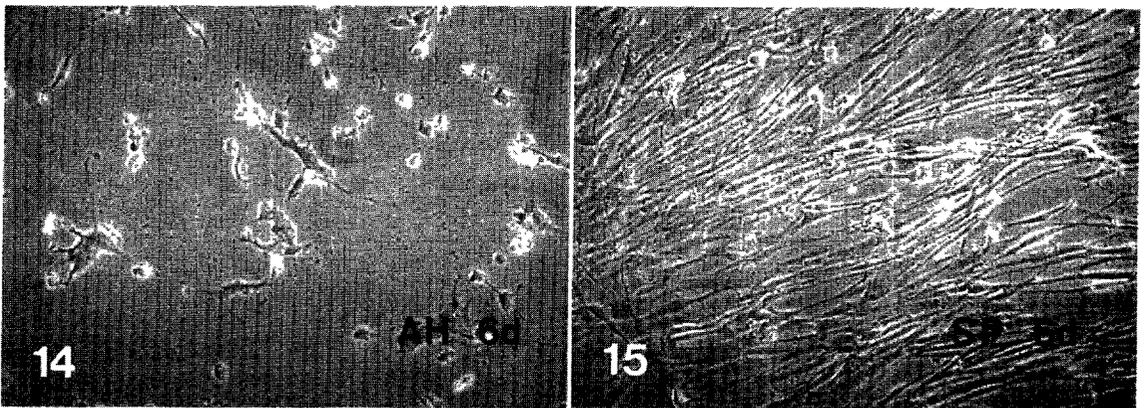
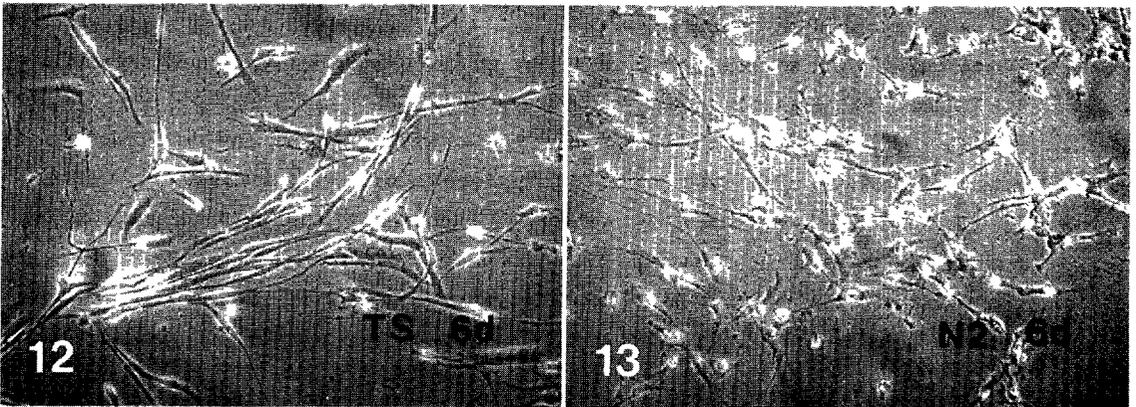
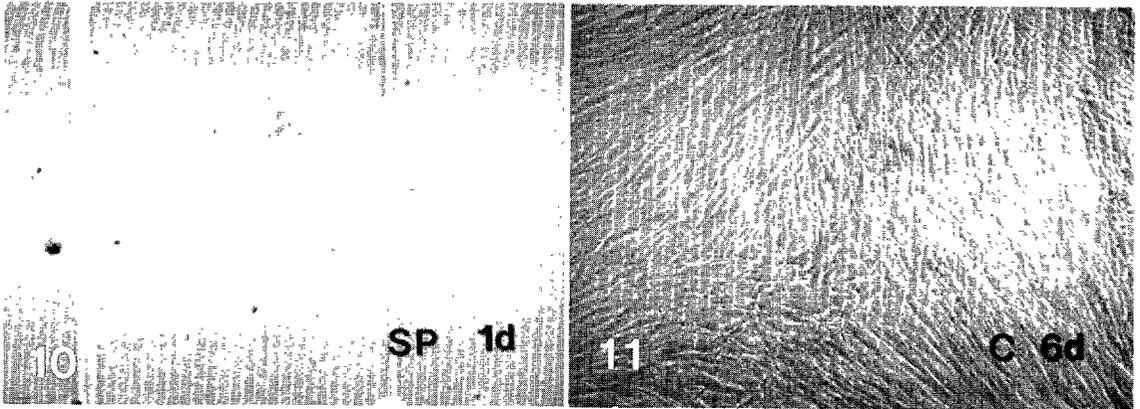
EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 4.** Photograph of SDH activity test for 2 hours
- Fig. 5.** Photograph of SDH activity test for 20 hours
- Fig. 6.** Vital stain for 1 day in Control (X100)
- Fig. 7.** Vital stain for 1 day in Tubliseal (X100)
- Fig. 8.** Vital stain for 1 day in N2 (X100)
- Fig. 9.** Vital stain for 1 day in AH26 (X100)
- Fig. 10.** Vital stain for 1 day in Sealapex (X100)
- Fig. 11.** Fibroblasts cultured for 6 days in Control (X100)
- Fig. 12.** Fibroblasts cultured for 6 days in Tubliseal (X100)
- Fig. 13.** Fibroblasts cultured for 6 days in N2 (X100)
- Fig. 14.** Fibroblasts cultured for 6 days in AH26 (X100)
- Fig. 15.** Fibroblasts cultured for 6 days in Sealapex (X100)

논문 사진부도 ①



논문 사진부도 ②



THE CYTOTOXIC EFFECTS OF ROOT CANAL SEALERS ON FIBROBLASTS IN HUMAN PERIODONTAL LIGAMENT

Gwang - Hee Lee, Ho - Young Choi, Byung - Soon Min,
Sang - Jin Park, Gi - Woon Choi

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Kyung Hee University

The purpose of this study was to evaluate for the cytotoxicity of root canal sealers – Tubliseal, N2, AH26, and Sealapex – on fibroblasts cultivated from human periodontal ligament. Succinate dehydrogenase activity test and ^{51}Cr release test were performed to evaluate the short-term cytotoxicity. According to 1,3 and 6 days vital cell count and ^{14}C -leucine incorporation rate to fibroblasts were evaluated.

The results of this study were as follows:

1. In the test of SDH activity by millipore filter method, Sealapex showed mild cytotoxicity but Tubliseal, N2 and AH26 showed severe cytotoxicity.
2. In ^{51}Cr release test, Tubliseal was the most cytotoxic sealer tested, and rank ordered the relative cytotoxicity of the other sealers tested as follows: AH26, N2, Sealapex.
3. In the test of viable cell count, cytotoxicity in Tubliseal was continued because vital cell number reduced with time. Because vital cell was not showed in N2 and AH26 at 1 day, it was recognized that N2 and AH26 exhibited severe cytotoxicity. In Sealapex, vital cell number increased remarkably with time, so it showed that cytotoxicity decreased with time.
4. In ^{14}C -leucine incorporation rate test, protein sythesis was not produced in Tubliseal, N2 and AH26 after 3 days, it showed that cytotoxicity in Tubliseal, N2 and AH26 was severe. Although protein synthesis in Sealapex decreased with time, it continued after 6 days. Therefore Sealapex has been exhibited mild cytotoxicity.