

수산화칼슘의 L929 세포독성 및 연쇄구균에 대한 항균효과에 관한 연구

원광대학교 치과대학 치과보존학교실
유영대 · 임미경

Abstract

THE CYTOTOXICITY ON L929 CELLS AND ANTIMICROBIAL EFFECT ON SEVERAL STREPTOCOCCI OF CALCIUM HYDROXIDE

Young-Dae, Yu, Mi-Kyung, Im

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University

Calcium hydroxide has been used not only as pulp capping and pulpotomy agents in the operative dentistry, but dressing and temporary filling materials in root canal treatment. Calcium hydroxide was known to stimulate odontoblast to produce new reparative dentin and to eliminate microorganisms effectively in the infected root canals. The purpose of this study was to evaluate the effect of calcium hydroxide solution on cultured L929 cells and its antibacterial effect on several streptococci.

Calcium hydroxide solution (0.121g/100ml) was added to L929 cells and cell viability was measured using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-dimethyltetrazolium bromide (MTT) and neutral red (NR) dye. Calcium hydroxide solution (20, 40, 60, 80, 100 and 150 μ l) was added to L929 cells in 96-well microplates for 1, 4 and 24 hours respectively. Cell viability was gradually decreased when the volume and exposure time of calcium hydroxide solution were increased. When 150 μ l of calcium hydroxide was applied to L929 cells for 24 hours, there was more than fifty percent reduction of cell viability.

Calcium hydroxide solution (20g/100ml) showed antibacterial effect against *S. uberis*, *S. intermedius* and *S. mitis* after thirty-second exposure. But 0.121g/100ml concentration of calcium hydroxide solution exhibited no antibacterial effect on six streptococci after one-hour exposure.

I. 서 론

수산화칼슘은 주로 임상적 경험에 의하여 깊은 우식 와동이나 치수의 치료 약제로서 많이

사용되어 왔다¹⁾. 수산화칼슘이 치주조직과 직접 접촉되면 치유과정을 촉진하며, 외상으로 인하여 치수가 괴사된 미발육 치아의 치료 및 치근 흡수의 치료와 치근천공을 비외과적으로 치료

시에도 광범위하게 사용되어 왔다²⁻³⁾. 수산화칼슘이 조직에 대하여 나타내는 치유 촉진 효과는 대부분 동물 실험을 통하여 보고되었으며 실험실에서 조직 배양을 통한 효과에 대한 연구는 적은데 Torneck등⁶⁾의 연구에서 수산화칼슘 용액이 특정 농도에서 세포의 DNA합성을 촉진시켰다고 하였다. Martin등은⁵⁾ 수산화칼슘은 근관에서 세균을 제거할 수 있고 치근단부 조직의 치유를 도와주므로 삼출액이 계속 나오는 근관의 치료 및 근관의 임시 충전제로서 사용할 수 있다고 하였다.

수산화칼슘을 근관내에 임시로 충전하여 사용하는 경우에 치근단 병소에서 골의 재생을 촉진하는⁷⁾ 기전으로 수산화칼슘에서 유리되는 수산기가 주변 조직을 알칼리성 환경으로 만들기 때문으로 보고되었다⁸⁾. 또한 수산화칼슘은 용해성이 낮음에도 불구하고 살균효과를 발휘하기 충분할 만큼 pH를 상승시키므로 근관내 소독 약제로 사용하는 경우 근관내의 세균을 효과적으로 제거할 수 있다⁴⁾. 수산기는 장시간에 걸쳐 유리되며 이로 인하여 통상적으로 사용되는 근관소독제와는 달리 수산화칼슘의 효과는 오래 유지될 수 있다⁹⁾. 그러나 근관치료에서 수산화칼슘을 근관에서 사용하면 항균력을 나타내지만 이러한 항균력의 정도에 관하여는 연구자들간에 아직 이견이 있다¹⁰⁻¹⁵⁾. 근관치료시 약제로 사용하는 경우에서 근관형성과 세척 과정을 완결한 후 수산화칼슘을 충전하면 처음 내원시 감염이 있던 근관이 두번째 내원시에는 세균이 제거됨을 보고하였다¹⁶⁾. 그러나 수산화칼슘이 항균력을 나타내기 위한 최소 시간에 대하여는 보고가 미흡하다. 이와 같이 수복이나 근관치료시 사용되는 수산화칼슘이 배양된 세포에 나타내는 위해성이 적으며 항균력을 나타내는 농도를 알아보고 또한 그 농도에서 항균력을 발휘하기 위하여 필요한 최소 경과 시간을 찾는 것은 의의가 있을 것이다.

이에 본 연구는 수산화칼슘의 실험실에서 배양된 세포에 나타내는 효과에 관한 연구는 비교적 미흡하므로 수산화칼슘이 배양된 세포에 대하여 나타내는 효과를 조사하기 위하여 L929

세포에 수산화칼슘을 적용한 후 세포의 생존능의 변화를 관찰하였다. 또한 감염근관으로부터 분리하고 동정한 연쇄구균에 대하여 수산화칼슘이 항균력을 나타내기 위하여 필요한 최소의 접촉시간을 측정하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. L929 세포에 대한 수산화칼슘 용액의 효과

1) L929 세포의 준비

L929 세포(ATCC CCL1, NCTC Clone 929)를 Earle's salt가 포함된 Eagle's minimal essential medium(MEM)에 10% (vol/vol) fetal calf serum, sodium bicarbonate 2.2 mg/ml, streptomycin 50µg/ml, penicillin 100 U/ml이 든 배지에서 배양하였다. 성장 상태의 안정성을 평가하기 위하여 세포의 수와 형태를 전 실험 기간에 걸쳐 관찰하였다.

세포의 총밀도(confluency)가 약 80~90% 일 때 계대 배양하여 실험에 사용하였으며, 배양 배지는 실험하기 3일과 하루전에 각각 새로운 배지로 교환하였다. 실험 당일에 배양액이 든 75cm² 플라스크의 배양액을 버리고 인산원충용액으로 2회 세척하였는데 1회 세척시에는 20 ml, 2회 세척시에는 10ml를 사용하고 잔여액은 파이펫으로 제거하였다. 플라스크 바닥에서 세포를 떼어내기 위하여 0.25% trypsin-EDTA 5ml을 넣고 30초간 실온에 방치한 후 trypsin 용액을 파이펫으로 제거하고 플라스크를 37°C CO₂배양기에 5분간 두었다. 배양액 10ml을 플라스크에 넣고 세포를 회수하여 1500rpm에서 10분간 원심분리하여 trypsin-EDTA를 세척한 후 세포를 계대배양하였다.

2) 수산화칼슘 용액의 준비

수산화칼슘은 물에 용해성이 낮으므로 실온에서 증류수 100ml에 0.0121g의 수산화칼슘을 녹였다. 수산화칼슘 용액을 30분간 저은 후 5분 동안 원심분리한 후 상청액을 Nalgen여과기(Nalgen Co., Rochester, USA)를 이용하여 0.22 µm 여과지로 여과하고 실험용액으로 사용하였다.

3) MTT를 이용한 L929세포의 생존능 검사
 성장배지 10ml로 분리된 세포를 회수하여 1000rpm(VS-5500, Vision Co., Korea)에서 10분간 원심분리하여 성장배지로 세포수를 2×10^6 cell/ml로 조정하였다. 96-well microplate (NUNC, Denmark)에 well당 100 μ l씩 분주한 후, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 24시간 배양 후 배양액을 버리고 인산완충용액으로 1회 세척한 후, 각 well에 성장배지를 50 μ l씩 첨가하였다. 실험용액은 well당 20, 40, 60, 80, 100과 150 μ l씩을 각각 첨가하고 실험용액을 넣지 않은 배양액을 대조군 용액을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간, 4시간과 24시간 동안 배양하였다. 실험군과 대조군은 각각 8개의 well을 사용하였다. 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-dimethyltetrazolium bromide(MTT, 98%, MW 414, C₁₈H₁₆BrN₅S, Jensen Chemical, Belgium)를 인산완충용액에 2mg/ml이 되도록 녹인 후, 각 well에 50 μ l씩 넣고, tray mixer (Fujizoki Pharmaceutical Co. FM5-1, Japan)로 용액을 균일하게 혼합하였다. ELISA READER II(Behring, Serial No. 350610, Germany)에서 측정파장 570nm로 흡광도를 측정하였다. 흡광도의 비교는 SPSS를 이용하여 one-way ANOVA로 통계처리 하였다(p value=0.05).

4) Neutral red(NR)를 이용한 세포의 생존능 검사

MTT를 이용한 측정 방법과 같은 방법으로 플라스크에서 세포를 회수하여 96-well microplate에 세포를 분주하였다. 실험용액은 well당 20, 40, 60, 80, 100과 150 μ l씩을 각각 첨가하고 실험용액을 넣지 않은 배양액을 대조군 용액을 첨가하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 배양기에서 1시간, 4시간과 24시간 동안 각각 배양하였다.

0.4% neutral red 용액(Difco, USA)을 배양 배지로 1 : 80으로 희석하여 최종 농도가 50 μ l/ml이 되도록 한 후 실험 전날 37 $^{\circ}$ C 배양기에서 배양한 후 실험 당일에 10분간 1500g에서 원심분리하였다. 96-well plate에서 배지를 제거하고 인산완충용액을 well당 200 μ l로 세척한 후 NR용액을 첨가하여 4시간동안 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂

배양기에서 반응시켰다. NR을 제거하고 well당 50 μ l의 인산완충용액으로 세척한 후 acetic acid/ethanol 혼합물을 well당 200 μ l씩 첨가하여 용액을 균일하게 혼합하였다. ELISA READER II(Behring, Serial No. 350610, Germany)에서 측정파장 570nm로 흡광도를 측정하였다. 흡광도의 비교는 one-way ANOVA로 통계처리 하였다(p value=0.05).

2. 수산화칼슘 용액의 연쇄구균에 대한 항균효과

본 실험에 사용한 균주는 감염근관에서 분리 동정된 균주인 *Streptococcus sanguis*, *S. intermedius*, *E. faecalis*, *S. uberis*, *S. mitis*, *S. mutans* 등 6종의 연쇄구균을 사용하였다. 면양혈액한천배지에 순수배양한 각 연쇄구균을 thioglycollate 액체배지에 푼 후 약 10시간 증균시켰다. 이때 균의 혼탁도는 McFarland No.1이었다.

수산화칼슘 분말을 멸균 소독한 증류수에 10 ml에 0.0121g을 녹인 용액과 100ml에 20g을 녹인 용액을 만들었다. 소독된 Kahn 튜브에 수산화칼슘 용액 2ml을 분주한 후 피펫을 사용하여 0.1ml의 균액을 첨가하였다. 세균을 수산화칼슘 용액에 노출시킨 후 30초, 1분, 2분, 5분, 10분, 10분과 1시간이 지난 후에 standard loop로 0.001ml을 면양 혈액한천배지에 접종했다. 37 $^{\circ}$ C CO₂배양기에 약 16시간 배양한 후 세균집락의 생성 유무를 관찰하였다.

III. 실험 성적

1. L929세포에 대한 수산화칼슘의 효과

수산화칼슘 용액이 배양된 L929세포에 미치는 효과를 MTT를 이용하여 측정된 결과는 Table 1 및 Fig. 1과 같다. 수산화칼슘 용액에 1시간 동안 노출된 L929세포가 MTT를 이용하여 formazan결정을 생성하는 능력은 수산화칼슘 용액 150 μ l를 첨가한 경우에서만 대조군에 비하여 유의하게 억제되었다(p<0.05). 또한 4시간과 24시간 동안 수산화칼슘 용액에 노출시킨 경우에는 40 μ l를 첨가한 경우부터 그 이상

부피의 수산화칼슘 용액을 첨가한 모든 경우에 대조군에 비하여 L929세포의 생존능은 유의하게 억제되었다($p < 0.05$). 1시간, 4시간, 그리고 24시간동안 수산화칼슘 용액에 노출시킨 경우 모두에서 각각 노출시킨 수산화칼슘의 부피가 증가할수록 대조군에 대한 각 실험군의 상대적인 흡광도 수치는 전반적으로 감소되어 나타났다(Fig. 1).

NR염색 시약을 이용하여 수산화칼슘 용액에 노출된 L929세포의 생존능의 변화는 Table 2 및 Fig. 2와 같다. 수산화칼슘 용액에 1시간과 4시간 동안 노출시킨 경우는 20 μ l 첨가시부터 150 μ l 부피까지 첨가해도 전 실험군에서 대조군에 비하여 유의한 차이는 나타나지 않았다. 수산화칼슘 용액에 1시간 동안 노출시킨 경우에는 각 실험군에서 대조군보다 오히려 흡광

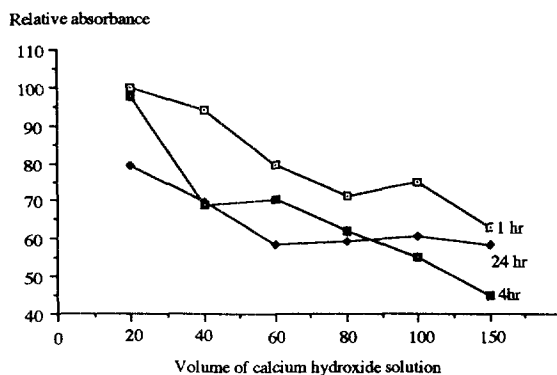


Fig. 1. Relative absorbance of L929 cells by MTT method.

도의 수치가 증가하였으며 4시간 동안 첨가한 경우는 대조군과 비슷한 정도의 흡광도 수치를

Table 1. Absorbance of L929 cells by MTT test exposed to calcium hydroxide solution (0.0121g/10ml) (mean \pm SD)

Vol(ul)	Exposure time		
	1 hr	4 hrs	24 hrs
Control	0.83 \pm 0.02	0.96 \pm 0.15	0.87 \pm 0.12
20	0.83 \pm 0.17	0.76 \pm 0.12	0.85 \pm 0.10
40	0.78 \pm 0.13	0.67 \pm 0.11*	0.60 \pm 0.12*
60	0.66 \pm 0.10	0.56 \pm 0.12*	0.61 \pm 0.10*
80	0.59 \pm 0.12	0.57 \pm 0.12*	0.54 \pm 0.09*
100	0.62 \pm 0.08	0.58 \pm 0.08*	0.48 \pm 0.06*
150	0.52 \pm 0.13*	0.56 \pm 0.07*	0.39 \pm 0.06*

* ; $p < 0.05$

Table 2. Absorbance of L929 cells by NR test exposed to calcium hydroxide solution (0.0121g/10ml) (mean \pm SD)

Vol(ul)	Exposure time		
	1 hr	4 hrs	24 hrs
Control	0.82 \pm 0.07	0.80 \pm 0.11	0.85 \pm 0.06
20	0.76 \pm 0.08	0.60 \pm 0.13	0.77 \pm 0.45
40	0.79 \pm 0.09	0.59 \pm 0.18	0.67 \pm 0.06
60	0.79 \pm 0.09	0.58 \pm 0.17	0.58 \pm 0.09*
80	0.81 \pm 0.04	0.65 \pm 0.26	0.54 \pm 0.12*
100	0.80 \pm 0.09	0.60 \pm 0.12	0.59 \pm 0.10*
150	0.80 \pm 0.06	0.60 \pm 0.58	0.41 \pm 0.11*

* ; $p < 0.05$

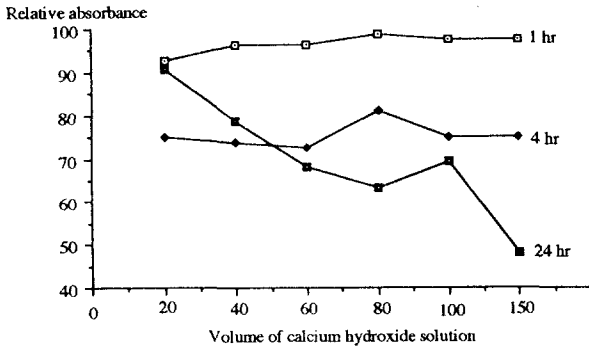


Fig. 2. Relative absorbance of L929 cells by NR method.

보였는데 수산화칼슘 용액 부피의 증가에 따른 흡광도의 감소 양상은 일정하게 관찰되지 않았다. 그러나 수산화칼슘 용액에 24시간 동안 노출된 L929세포는 60 μ l 이상의 용액을 첨가한 모든 경우에서 대조군에 비하여 유의한 세포

생존능의 억제가 관찰되었다($p < 0.05$). NR을 이용한 세포 생존능의 검사에서는 24시간 동안 노출시킨 경우에서만 수산화칼슘 용액 부피 증가에 따른 생존능의 억제가 관찰되었다.

2. 연쇄구균에 대한 수산화칼슘의 항균효과

Table 3에 나타난 바와 같이 세포 생존능의 측정에 사용한 수산화칼슘 용액(0.121g/100ml)을 *S. uberis*, *S. intermedius*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *S. mitis*와 *S. sanguis* 등 6가지 균주에 대하여 30초, 1분, 2분, 5분, 10분과 60분동안 노출시킨 모든 경우에서 수산화칼슘은 이들 세균의 성장을 억제하지 못하였다. 따라서 수산화칼슘의 포화용액은 60분 이내에는 실험대상으로 한 6가지 균주에 대하여 항균력이 없었다.

Table 4에 나타난 바와 같이 수산화칼슘 용액의 농도를 증가시킨 경우(20g/100ml)에는

Table 3. Growth inhibitory effect of calcium hydroxide solution (0.121g/100ml) on several streptococci

Strains	Exposure time					
	30 sec	1 min	2 min	5 min	10 min	60 min
<i>S. uberis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. intermedius</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. mutans</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. faecalis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. mitis</i>	+	+	+	+	+	+
<i>S. sanguis</i>	+	+	+	+	+	+

+ ; Growth, - ; No growth

Table 4. Growth inhibitory effect of calcium hydroxide solution (20g/100ml) on several streptococci

Strains	Exposure time					
	30 sec	1 min	2 min	5 min	10 min	60 min
<i>S. uberis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. intermedius</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. mutans</i>	+	-	-	-	-	-
<i>S. faecalis</i>	+	+	+	+	-	-
<i>S. mitis</i>	-	-	-	-	-	-
<i>S. sanguis</i>	+	-	-	-	-	-

+ ; Growth, - ; No growth

수산화칼슘 용액은 *S. uberis*, *S. intermedius*와 *S. mitis*에 대하여 30초 이내에 항균력을 나타내었다. 그러나 *S. mutans*에 대하여 수산화칼슘 용액은 30초와 1분 사이의 시점에서 항균력을 나타냈다. 또한 *E. faecalis*는 5분과 10분 사이에서 수산화칼슘에 의하여 살균되어 본 실험에 사용한 6가지 세균 중 수산화칼슘에 대한 내성이 가장 강하게 나타났다.

IV. 총괄 및 고찰

수산화칼슘은 수복 영역에서는 이장재와 치수복탁 및 치수복조제로서 사용되어 왔을 뿐 아니라 근관치료영역에서는 약제와 충전용 sealer 등으로 그 사용영역이 확대되어 왔다. 이러한 수산화칼슘의 광범위한 사용은 주로 임상적인 효능에 근거하여 왔는데 수복 영역에서 사용하는 치수의 치유과정을 촉진시키는 작용을 기대하였고 근관치료시에는 감염을 일으키는 세균에 대한 항균작용 및 치근단 조직의 치유를 돕기 위하여 사용되었다¹⁷⁻²⁴⁾.

수산화칼슘에 의한 치수세포의 치유효과는 조직내의 칼슘과 수산기 이온의 낮은 농도와 연관된 것으로 설명되고 있다. 손상된 치수면에 수산화칼슘을 적용하면 하부의 치수에는 이와 비슷한 낮은 농도의 칼슘과 수산기 이온이 있게 되므로 치유가 나타나는 것으로 알려져 있다²⁵⁾. Torneck 등²⁶⁾은 쥐를 이용한 동물실험에서 치수위에 수산화칼슘으로 이장한 후 아말감으로 수복한 부위의 치수가 수산화칼슘 이장재를 사용하지 않고 아말감만으로 수복한 부위보다 세포의 분열이 많이 나타났다고 하였다. 또한 실험실 연구⁶⁾에서는 수산화칼슘 용액(1.137 mg/ml)을 돼지의 치수 섬유아세포에 첨가한 후 [³H]-thymidine uptake를 측정된 결과 이의 유의한 증가가 있음을 보고하였다. 이러한 치수세포의 [³H]-thymidine uptake의 증가는 수산화칼슘용액으로 인하여 촉진되는데 칼슘이온의 농도가 국소적으로 증가한 결과로 DNA합성이 증가된다고 설명하였다. 이때 칼슘이온의 농도는 주변환경에 따라 DNA합성을 촉진시키는 적절한 농도가 달라진다고 하였다^{27,28)}. 이

러한 연구의 결과로 수산화칼슘은 특정 농도에서는 치수의 섬유모세포의 증식을 촉진한다고 하였다. 수산화칼슘이 치주조직에 나타내는 치유효과는 세포분열 뿐 아니라 다른 인자와도 관련된 것일 수 있다. 칼슘이온이 adenosine triphosphatase 활성을 증진시키고 이는 다시 상아질이나 골과 같은 경조직의 광화를 촉진한다²⁹⁾. 반면 고농도의 수산화칼슘을 사용하는 경우는 고농도의 수산기 이온이 유리되어 생활조직과 접촉하게 되므로 오히려 세포의 활성을 억제하고 정상적인 대사반응을 정지시킨다³⁰⁾.

임상에서 수산화칼슘을 이장재로 사용하면 치수에 도달하는 칼슘이온과 수산기는 여러 인자에 의하여 영향을 받게 되므로 이에 따른 효과는 다양하게 나타난다. 이들 인자 중 칼슘이온 확산의 속도와 정도가 이에 속하는데 삼차 상아질의 존재 여부와 상아질 석회화 정도에 따라서도 달라진다³¹⁾. 또한 외동 형성 과정에서 근관벽에 생기는 도말층에 의하여 상아세관이 막히는 정도³²⁾, 상아질액과 수산화칼슘과의 상호작용에 의하여 관간상아질 부위에 형성되는 침전 및 사용한 수산화칼슘의 물리적인 형태³³⁾도 영향을 미친다.

본 실험에서는 Torneck 등⁶⁾이 사용한 농도의 수산화칼슘 용액(0.121g/100ml)을 L929세포에 미치는 영향을 평가하기 위하여 사용하였다. MTT를 이용한 세포의 생존능 검사에서는 L929 세포에 수산화칼슘 용액을 1시간과 4시간, 24시간 동안 각각 노출시킨 경우에서 수산화칼슘 용액의 부피를 20 μ l에서 150 μ l까지 증가시키면 점차 대조군에 대한 실험군의 상대 흡광도가 감소되어 나타났다. 그러나 이 효과는 각 부피마다 24시간에 비하여 4시간과 1시간이 각각 상대 흡광도가 낮게 나타나지는 않았다. 이러한 결과는 Torneck 등⁶⁾이 DNA 합성 증가에 따른 thymidine uptake의 증가를 보고한 연구와는 일치하지 않았다. 본 실험과의 차이에 대해서는 사용한 세포의 종류가 Torneck 등⁶⁾의 실험에서 사용된 치수 섬유아세포가 아닌 본 실험에서는 L929세포를 사용한 것도 한가지 원인으로 생각된다. 또한 thymidine uptake와 같은 DNA

합성능 측정 방법은 세포의 미세한 반응도 감지할 수 있는 반면 세포 생존능의 변화를 관찰하는 MTT법은 세포질내 미토콘드리아가 상당한 손상을 받아야만 나타나는 반응이므로 이러한 측정방법의 차이도 원인으로 사료된다. NR을 이용하여 세포의 생존능을 측정한 방법은 L929세포에 수산화칼슘을 1시간과 4시간 동안 노출시킨 경우는 20 μ l부터 150 μ l까지 부피를 증가시킨 모든 경우에서 대조군에 비하여 유의한 억제나 촉진효과를 보이지 않았다. 특히 1시간 동안 노출시킨 경우에는 상대 흡광도가 약간 증가되어 나타났다. 반면 24시간 동안 노출시킨 경우에는 전반적으로 부피증가에 따른 상대흡광도의 감소가 나타나서 MTT를 사용한 경우와 유사한 양상으로 나타났다. 본 실험에서 사용한 MTT와 NR의 방법은 이와 같이 방법에 따라서도 세포 독성효과의 차이가 나타났다. 1시간 동안 노출시킨 경우에 있어서는 비록 통계적인 유의성은 인정되지 않았으나 약간 흡광도의 수치가 증가하여 Torneck등⁶⁾의 연구와 유사하였다. 따라서 추후 세포에 대한 수산화칼슘의 포화용액의 효과는 여러가지 실험 방법을 사용하여 사람의 치수 섬유아세포와 치근단 조직의 세포에 대하여 연구가 계속되어야 할 것이다. 이때 사용하는 수산화칼슘 포화용액은 실제 임상에서 사용하는 수산화칼슘 제제에 비하면 극히 저농도이므로 이러한 결과를 실제 임상에서 적용시는 이 점을 고려해야 할 것이다. 본 실험의 결과 상대 흡광도의 수치가 가장 낮게 나타난 24시간 동안 150 μ l의 수산화칼슘 용액에 노출시킨 경우는 NR과 MTT결과에서 각각 44.8과 48.2로 나타나 세포의 생존능이 50% 이상 감소되어 나타났다.

한편 수산화칼슘은 근관에서 항균력을 나타내는데 Matsumiya등³⁴⁾은 개를 이용한 실험에서 수산화칼슘을 근관에 도포하면 점차 세균이 제거된다고 하였다. Stevens등¹⁰⁾은 수산화칼슘을 근관치료약제로서 사용시 항균력을 나타내지 않을 연구하였는데 수산화칼슘 용액으로 만들어 상청액을 사용한 경우에는 동물실험이나 실험실 연구에서 모두 camphorated chlorophenol과 비교하면 *Streptococcus faecalis*에 대하여

항균력이 약하며 미약한 항균력을 보인다고 하였다. 또한 Fairbourn등¹¹⁾은 우식 상아질에 Dycal 도포시 세균의 성장을 억제하였지만 세균을 완전히 제거하지는 못함으로써 항균력이 약하다고 하였다. 또한 DiFiore등¹²⁾은 실험실 연구에서 수산화칼슘과 물의 혼합액, 또는 Pulpdent는 연쇄구균에 대하여 항균력을 전혀 보이지 않았다고 한다.

Bystrom등¹⁴⁾은 근관에서 자주 발견되는 세균에 대하여 포화된 수산화칼슘 용액이 나타내는 항균력에 관하여 연구하였다. 호기성 세균 및 혐기성 세균 27종의 세균 중 26종에 대하여 수산화칼슘 용액은 강력한 항균력을 나타내어 세균과 접촉한 후 1~6분이면 항균력을 보인다고 하였다. Safavi등⁷⁾은 임상에서 근관 형성이 완료된 후 근관충전을 하기 전에 근관에서 세균을 배양하여 주기적으로 검사하였는데 근관내 치료약제로서 수산화칼슘과 iodoine-potassium iodide의 효과를 비교하고 통계적으로 분석하였다. 수산화칼슘을 사용한 경우에서 iodoine-potassium iodide를 사용한 경우보다 배양반전이 적게 나타나 근관치료시 사용약제로서 통상적으로 사용할 것을 추천하였다. 또한 Sjogren등¹³⁾은 임상연구에서 치근단부 병소가 있는 근관에 수산화칼슘을 10분과 7일 동안 각각 도포한 후에 근관에서 수산화칼슘이 세균을 제거하는 효과를 연구하였다. 10분간 적용한 경우는 근관에서 세균이 생존한 반면 7일간 적용한 경우는 효과적으로 세균이 제거됨을 보였다.

그러나 임상에서는 Sjogren등¹³⁾의 연구에서 나타난 바와 같이 10분간 적용시 항균 효과가 나타나지 않는 것은 근관에 수산화칼슘이 도달하기에는 최소한 10분이상의 시간이 소요되는 것으로 추정할 수 있다. Wang등¹⁵⁾에 의하면 수산기는 hydroxyapatite의 완충능 때문에 상아질로 쉽게 확산하지 못한다고 알려졌다. 따라서 충분한 시간이 경과하여야 수산기는 확산되어 항균력을 나타낼 수 있다. 근관에 수산화칼슘을 1개월간 충전하면 hydroxyl 이온에 대한 확산경사도(diffusion gradient)가 형성되는데 이는 pH값이 치근의 끝 부분에서 보다

중심부에서 높기 때문이다³⁵⁾. 따라서 단기간 동안에는 세균은 상아질의 완충능에 의하여 수산화칼슘의 항균력에 대하여 생존할 수 있다. 예를 들면 수산화칼슘의 빠른 항균작용에 대하여 저항성을 보이는 *E. faecalis*는 Safavi등³⁶⁾의 실험실 연구에서 수산화칼슘 용액에 24시간 접촉시킨 경우는 감염 상아질에서 제거되었다. 수산화칼슘은 다소 불용성이며 항균력을 나타내는 수산기의 방출은 수산화칼슘을 녹이는 액상에 의존한다³⁷⁾. 실험실에서 수산화칼슘을 물에 녹이면 수산기이온은 최적의 상태로 유리된다. 그러나 형성된 근관에서 수산기는 물의 부족으로 인하여 제한을 받을 수 있다. 또한 Bystrom등¹⁶⁾의 실험실 연구에서 세균에 대한 항균력은 수산기 이온이 접촉할 수 있는 면적이 넓기 때문에 더욱 촉진되지만 이러한 상황은 실제 형성된 근관에서는 일어날 수 없다.

세포독성 실험에 사용한 0.121g/100ml의 수산화칼슘 용액이 연쇄구균에 나타내는 항균력을 평가하기 위하여 근관에서 분리하여 동정한 6균주의 연쇄구균을 대상으로 실험하였다. 이 용액에서는 60분간 노출시켜도 6균주의 연쇄구균에 대하여 전혀 항균력이 나타나지 않았다. 수산화칼슘 용액의 농도를 20g/100ml로 하여 사용했을 때에는 *S. ubeirs*, *S. intermedius*와 *S. mitis*는 30초 이내에 살균되어 수산화칼슘이 이들 균주에 대해서는 강한 항균력을 보였다. 이들 균주에 대한 항균력은 Bystrom¹⁴⁾의 연구결과와 일치한다. 반면 20% 수산화칼슘 용액은 *S. mutans*를 30초와 1분 사이에 살균하였는데 *E. faecalis*에 대해서는 5분과 10분 사이에 항균력을 나타내어 *E. faecalis*는 Safavi등³⁶⁾의 연구결과에서와 같이 수산화칼슘의 항균력에 가장 강한 저항력을 보였다. 본 실험에 사용한 수산화칼슘 용액의 농도는 0.121g/100ml과 20g/100ml였다. 수산화칼슘은 난용성 물질로서 Ksp(용해적 평형상수)는 5.5×10^{-6} 으로서 평균 온도 25°C를 기준으로 한 값으로서 이 값은 온도와 압력에 따라 유동적인 값이다. 이 Ksp값에 따라 계산한 수산화칼슘 용액을 포화용액으로 만들기 위해서는 0.083g을 100ml에 녹여야 하므로 본 실험에 사용한 0.121g과는 차이가 있었으나 이

차이는 온도와 압력에 따른 차이에 의한 것으로 사료되었다. 본 실험에서 0.121g/100ml의 농도를 선택한 이유는 Torneck등⁶⁾의 실험에서 이 농도의 수산화칼슘이 세포의 활성을 촉진하는 효과가 있다고 보고하였으므로 이를 검증하기 위하여 이 농도를 선택하였으나 본 실험에서는 유의할 만한 촉진효과는 나타나지 않았다. 이 농도의 용액을 항균 효과의 실험에 사용한 이유는 만약 Torneck등⁶⁾의 보고에서 나타난 바와 같이 이상적인 수산화칼슘의 농도가 될 수 있을 것이나 본 실험에서 나타난 바와 같이 항균효과는 나타나지 않아서 이 포화용액은 생체적 합성과 항균력의 관점에서 유의한 점은 없다고 판단되었다. 한편 20g을 100ml에 녹여서 항균 효과 실험에 사용한 이유는 수산화칼슘의 포화용액으로부터 점차 농도를 증가시켜 실험한 예비실험의 경과에서 항균력도 나타나며 임상에서 사용하는 정도의 점도를 가진 용액으로 사료되었기 때문이다. 현재 임상에서 수산화칼슘을 근관에 약제로서 충전하는 경우에서 정확한 농도에 대한 일치된 견해는 없으며 단지 임상적인 경험에 의한 점조도를 술자들이 사용하고 있을 뿐이다. 이 농도에서는 본 실험에서 나타난 바와 같이 항균력이 나타났으나 두 가지 용액의 농도의 차이가 현격하므로 추후 계속적인 실험을 통하여 농도를 점차 증진시켜서 각 세균에 대하여 수산화칼슘이 항균력을 나타내는 최소의 농도, 혹은 근관에서 분리되는 대다수의 균주에 대하여 항균력을 나타내는 수산화칼슘의 농도를 찾아내는 연구를 해야 할 것으로 사료되었다.

현재 근관치료에서는 약제의 사용빈도가 줄어들고 있고, 사용하는 약제의 종류도 점차 제한되고 있는 반면 수산화칼슘의 사용영역은 점차 확대되고 있다. 본 실험에 의하면 수산화칼슘의 세포독성은 실험조건에 따라 다르게 나타날 수 있지만 다른 충전재나 소독제와 비교시는 세포생존능을 억제하는 정도가 미약한 것으로 사료된다. 또한 수산화칼슘의 항균력에 대하여 저항을 나타낸 *E. faecalis*도 10분 이내에 살균되므로 적어도 연쇄구균에 대해서는 항균력이 우수한 것으로 평가되어 수산화칼슘의

임상적 사용에 대한 실험적인 근거로 사료되었다.

V. 결 론

수산화칼슘의 L929세포에 대한 효과를 판정하기 위하여 0.12%의 수산화칼슘 용액을 20, 40, 60, 80, 100 및 150 μ l씩 첨가하고 1시간과 4시간 24시간 동안 각각 노출시킨 경우는 두 방법 모두에서 수산화칼슘을 첨가한 양이 증가되고 노출시간이 증가함에 따라 L929세포의 생존능은 점차 감소되어 나타났다. 또한 150 μ l의 수산화칼슘 용액에 24시간 노출된 경우 세포의 생존능은 50% 이하로 감소되었다.

수산화칼슘의 연쇄구균에 대한 항균효과를 관찰하기 위하여 0.121g과 20g을 100ml의 증류수에 녹인 용액을 6균주의 연쇄구균과 접촉시켜 항균력을 보이는 시간과 농도를 평가하였다. 0.121g을 100ml에 녹인 용액은 본 실험에 사용한 연쇄구균에 대하여 60분 동안 노출시켜도 항균력을 나타내지 않았다. 20g을 100ml에 녹인 용액에서는 *S. uberis*, *S. intermedius*와 *S. mitis*에 대하여 30초 이내에 항균력을 나타내었으며 *S. mutans*에 대하여는 수산화칼슘 용액은 30초와 1분 사이에서 항균력을 나타냈다. *E. faecalis* 5분 노출시에도 성장을 보여서 수산화칼슘의 항균력에 강한 저항을 보였다.

참고문헌

- Haskall EW, Stanley HR, Chellemi J and Stringfellow H : Direct pulp capping treatment : a long-term follow-up. J Am Dent Assoc 97 : 607-12, 1982.
- Avery JK : Response of the pulp and dentin to contact with filling materials. J Dent Res 60 : 137-9, 1981.
- Tronstad L and Mjor Y : Pulp reactions to calcium hydroxide containing materials. Oral Surg 33 : 961-5, 1972.
- Cvek M, Hollender L and Nord CE : Treatment of non-vital permanent incisors with calcium hydroxide. VI. A clinical, microbiological and radiological evaluation of treatment in one sitting of teeth with mature or immature root. Odontol Revy 27 : 93-108, 1976.
- Martin D and Crabb H : Calcium hydroxide in root canal therapy, a review. Brit Dent J 142 : 277-83, 1977.
- Torneck CD, Moe H and Howley TP : The effect of calcium hydroxide on porcine pulp fibroblasts in vitro. J Endod 9 : 131-6, 1983.
- Safavi KE, Doeden WE, Introcaso JH and Langeland K : A comparison of antimicrobial effects of calcium hydroxide and iodine-potassium iodide. J Endod 11 : 454-6, 1985.
- Hasselgren G, Olsson B and Cvek M : Effects of calcium hydroxide and sodium hypochlorite on the dissolution of necrotic porcine mussle tissue. J Endodon 14 : 125-7, 1988.
- Messer HH and Chen RS : The duration of effectiveness of root canal medicaments J Endod 10 : 240-5, 1984.
- Stevens RT and Grossman LI : Evaluation of the antimicrobial potential of calcium hydroxide as an intracanal medicament. J Endod 9 : 372-4, 1983.
- Fairbourn DR, Charvneau GI and Loesch WJ : Effect of improved Dycal and IRM in deep seated carious lesions (Abstract 739). J Dent Res 59 : 452, 1980.
- DiFiore PM, Peters DD, Setterstrom J and Lorton L : The antibacterial effects of calcium hydroxide apexification pastes on *Streptococcus sanguis*. Oral Surg 55 : 91, 1983.
- Sjogren U, Figdor D, Spangberg L and Sundqvist G : The antimicrobial effect of calcium hydroxide as a short-term intra-

- canal dressing. *Int Endod* 24 : 119–25, 1991.
14. Bystrom A, Classon R and Sundqvist G : The antibacterial effect of camphorated paramonochlorophenol, camphorated phenol and calcium hydroxide in the treatment of infected root canals. *Endod Dent Traumatol* 1 : 170–5, 1985.
 15. Wang JD and Hume WR : Diffusion of hydrogen ion and hydroxyl ion from various sources through dentin. *Int Endod J* 21 : 17–26, 1988.
 16. Bystrom A and Sundqvist G : The antibacterial action of sodium hypochlorite and EDTA in 60 cases of endodontic therapy. *Int Endod J* 18 : 35–40, 1985.
 17. Law DB and Lewis TM : Effect of calcium hydroxide on deep carious lesions. *Oral Surg* 14 : 1130–7, 1961.
 18. Haskell EW, Stanley HR, Chellemi J and Stringfellow H : Direct pulp capping treatment : a long-term follow-up. *J Am Dent Assoc* 97 : 607–12, 1982.
 19. Bergenholtz G and Reit C : Reactions of the dental pulp to microbial provocation of calcium hydroxide treated dentin. *Scand J Dent Res* 88 : 187–92, 1980.
 20. King JB, Crawford JJ and Lindhal RL : Indirect pulp capping ; a bacteriological study of deep carious dentin in human test. *Oral Surg* 206 : 663–71, 1965.
 21. Brannstrom M, Nyborg H and Stromberg T : Experiments with pulp capping. *Oral Surg* 48 : 347–52, 1979.
 22. Avery JK : Response of the pulp and dentin to contact with filling materials. *J Dent Res* 543 : 188–97, 1975.
 23. Heys DR, Cox CF, Herp RJ and Avery JK : Histological consideration of direct pulp capping agents. *J Dent Res* 60 : 1371–9, 1981.
 24. Holland R, Mello W, Sonza Y, Nery MJ, Bernabe PF and Otoboni FCD : The influence of the sealing material in the healing of process of inflamed pulps capped with calcium hydroxide or zinc oxide-eugenol cement. *Acta Odontol Pediatr* 2 : 5–9, 1981.
 25. Pashley DA and Livingston MJ : Effect of molecular size on permeability coefficient in human dentin. *Arch Oral Biol* 23 : 391–5, 1978.
 26. Torneck CD and Wagner C : The effect of a calcium hydroxide cavity liner on early cell division in the pulp subjacent to cavity preparation and restoration. *J Endod* 6 : 719–23, 1980.
 27. Swierenga SH, Macmanus JP and Whitfield JF : Regulation by calcium of the proliferation of heart cells from young adult rats. *In Vitro* 12 : 31–6, 1976.
 28. Whitfield JF, Macmanus JP, Rixon RH, Boynton AL, Yondale T and Swierenga S : The positive control of cell proliferation by the interplay of calcium ions and cyclic nucleotides. *In Vitro*. 12 : 1–8, 1976.
 29. Abiko Y : Studies on calcium-stimulated adenosine triphosphatase in the albino rabbit dental pulp : its subcellular distribution and properties. *J Dent Res* 56 : 1558–68, 1977.
 30. Schroder U and Granath L : Early reaction of intact human teeth to calcium hydroxide following experimental pulpotomy and its significance to the development of a hard tissue barrier. *Odont Rev* 22 : 379–96, 1971.
 31. Greenhill JD and Pashley DH : The effect of desensitizing agents on the hydraulic conductance of human dentin in vitro. *J Dent Res* 60 : 686–98, 1981.
 32. Brannstrom M, Nordenwall KJ and Glantz PO : The effect of EDTA-containing sur-

- face active solutions on the morphology of prepared dentin. An in vivo study. *J Dent Res* 59 : 1127–31, 1980.
33. Brannstrom M, Isacson G and Johnson G : The effect of calcium hydroxide and fluorides on human dentin. *Acta Odont Scand* 34 : 59–67, 1976.
34. Matsumiya S and Kitamura M : Histo-pathological and histo-bacterial studies of the relation between the condition of sterilization of the interior of the root canal and the healing process of periapical tissues in experimentally infected root canal treatment. *Bull Tokyo Dent Coll* 1 : 1–19, 1960.
35. Tronstad L, Andreasen JO, Hasselgren G, Kristerson L and Riis I : pH changes in dental tissues after root canal filling with calcium hydroxide. *J Endod* 7 : 17–21, 1981.
36. Safavi KE, Spangberg LSW and Langeland K : Root canal dentinal tubule disinfection. *J Endod* 16 : 207–10, 1990.
37. Weast RC, Astle MJ and Beyer WH : *Handbook of chemistry and physics* 65th edn, p. B222. CRC Press Inc., Boca Raton, Florida, 1984.