

광중합형 glass ionomer cement를 포함한 수증 역충전재의 세포주와 검사법에 따른 독성 효과

원광대학교 치과대학 치과보존학교실

임미경 · 구대회

Abstract

CYTOTOXIC EFFECT OF RETROGRADE FILLING MATERIALS INCLUDING GLASS IONOMER CEMENT ACCORDING TO CELL LINES AND ASSAY METHODS

Mi-Kyung Im, D. D. S., M. S. D., Ph. D., Dae-Hoi Koo, D. D. S.

Department of Conservative Dentistry, College of Dentistry, Wonkwang University

Cell culture methods have been used to assess the cytotoxicity of dental materials. Different parameters are used to monitor cytotoxic effects. But it is difficult to compare each investigator's results with different methods. The objective of this study was to investigate cytotoxic effect of several retrograde filling materials according to cell lines and assay methods. Cytotoxicity of Bestalloy (Dogmyung, Korea), Prisma APH (Densply International Inc., U.S.A.), Clearfil FII (Kuraray Co., Japan), Fuji II (GC Co., Japan), Fuji II LC (GC Co., Japan) and IRM (Densply Co., U.S.A.) on L929, 3T3 and KB permanent cell lines was measured. Radiochromium, Lactate dehydrogenase (LDH) release method and colorimetric assays, namely neutral red (NR) and MTT were used. Each material was mixed according to the manufacturer's instruction. They were tested as solid and extracted state. Cell culture media were added to each mixed or solid materials then the solution was collected and used as extract solutions.

Solid Fuji II showed mild cytotoxicity on three cell lines using radiochromium release method. There was no difference in cytotoxicity of extract solution group using radiochromium release method. In colorimetric assay immediate Fuji II group and all the IRM groups showed severe cytotoxic effect. Difference in cytotoxicity was due to rather kinds of cell lines than assay methods. Solid Fuji II and IRM showed mild cytotoxicity on three cell lines. But extract solutions had different cytotoxic effect according to cell lines using LDH release assay. Light-cured glass ionomer had mild to moderate degree of cytotoxicity on

* 이 논문은 1994년도 학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구 되었음

three cell lines.

Cytotoxicity was affected by specimen preparation. Susceptibility of each cell lines were also affected by assay methods. It was suggested that cytotoxicity study using only one cell line and/or assay method might not accurately reflect the real toxic nature of dental biomaterials.

I. 서 론

역충전재가 구비하여야 할 이상적인 요구조건은 여러가지를 생각할 수 있으나, 역충전재는 치근단의 생활조직과 장기간 직접 접촉하므로 생체적합성은 중요한 의미를 가진다. 생체적합성의 연구시 세포 배양을 통한 실험실 조건에서 세포 독성을 검사하는 방법은 재현성이 우수하고 비교적 간단하며, 검사 과정을 표준화하기 쉽기 실험에 소요되는 기간이 적으며 결과를 정량적으로 분석하기 쉬운 장점이 있다^{1,2)}. 이러한 세포 독성 검사의 종류로는 세포수를 산정하여 세포의 성장을 측정하는 방법³⁾, DNA 합성능을 측정하는 방법⁴⁾, 육안과 현미경으로 관찰하는 방법⁵⁾, 발색 반응을 이용하여 흡광도를 측정하여 생존능을 평가하는 방법^{6,7)}, ⁵¹Cr방출과 같은 세포막의 투과도 변화를 관찰하는 방법⁸⁾과 세포외로 유리된 효소의 수치를 측정하는 방법^{9,10)}이 사용되어왔다. 재료의 세포 독성은 표지된 세포로부터 배지로 방출되는 ⁵¹Cr의 양과 상관관계가 있으며 세포가 완전히 죽게 되면 65% 이상의 ⁵¹Cr이 방출된다^{10,11)}. 세포에 독성 변화가 일어났을 때 가장 초기에 나타나는 반응 중의 하나는 lysosome이나 미토콘드리아와 같은 세포 소기관의 투과도의 변화이다^{12,13)}. 제어된 실험 조건하에서 투과도의 변화는 가역적이며 세포의 형태학적 변화보다 먼저 나타나기 때문에 재료의 독성을 평가할 때 예민한 방법으로 사용될 수 있다¹⁴⁾.

독성 실험의 결과에는 여러 인자가 영향을 미치며 재료를 추출하여 사용하는 경우 추출하는 시간, 온도, 방법, 시편의 표면적에 대한 추출 용매에 부피 및 세포와 재료가 접촉하는 방법에 따라서도 다르게 나타나므로¹⁵⁾ 여러 연

구자들의 연구 결과를 상호 비교하기 어렵다. 또한 2가지 이상의 세포주를 대상으로 하였을 때 치과재료가 나타내는 세포 독성에 관한 실험에서는 사용한 세포에 따라 예민도가 다양하게 나타난다¹⁶⁻²¹⁾. 일반적으로 이러한 예민도의 차이는 적지만 사용한 세포주에 따라서는 검사한 재료의 세포 독성의 순위가 다르게 보고되기도 하지만 독성이 현저히 강한 재료는 모든 세포에 대하여 강한 독성을 보인다.

최근 역충전재로 여러가지 재료의 사용 가능성이 모색되고 있으나²²⁾, 이들 재료의 생체적합성에 관한 연구는 매우 적고 최근에 개발된 광중합형 충전용 글라스아이오노머 시멘트와 복합레진을 포함한 역충전재에 관한 포괄적인 연구가 필요하다고 사료되어 본 연구를 고안하였다. 생체재료의 독성 평가시 현재 가장 많이 사용되고 있는 방법은 1982년 ANSI/ADA에 의한 L929 세포와 HeLa 세포를 이용한 ⁵¹Cr방출량의 측정방법이다. 본 연구에서는 표준화된 이 방법과 다른 영구 세포주인 3T3와 KB 등 2종을 사용하여 각 세포주간에 독성 발현의 차이가 어느 정도 나타나는지를 조사하여, 추후 역충전재의 독성 평가시 세포의 선택이 독성 평가시 변수로 작용하는지를 규명하려고 시도하였다. 또한 검사기법을 표준방법인 ⁵¹Cr방출량 측정방법 이외에 발색법인 MTT, Neutral red (NR) 측정법과 생체효소인 Lactate dehydrogenase (LDH) 측정법을 사용하여 각 검사 방법의 차이에 의한 독성효과의 차이를 조사하여, 방사능오염과 폐기등의 문제가 있는 ⁵¹Cr방출량 측정방법 대신 비교적 안전하고 간단한 발색법 혹은 효소측정법으로 실험방법을 대체할 수 있는지를 모색하고자 하였다.

III. 실험재료 및 방법

1. 역충전재의 준비

역충전재의 종류로는 Bestalloy(동명합금, 한국), Prisma APH(Densply International Inc., U.S.A.), Clearfil FII(Kuraray Co., Japan), Fuji II(GC Co., Japan), Fuji II LC(GC Co., Japan)와 IRM(Densply Co., U.S.A.)등 6종을 사용하였다.

고형재료의 평가를 위하여 직경이 16mm인 24 multiwell 세포배양용 plate(Corning, U.S.A.) well의 바닥으로부터 1.5mm가 되도록 혼합하였다. 재료를 혼합한 즉시, 37°C, 5% CO₂ 배양기(비전과학, Model No. BS-9108 MS, 한국)에서 초기경화 동안, 24시간 동안, 일주일 동안 경화시킨 후 평가하였다. 재현성을 평가하기 위하여 각 역충전재 당 5개의 well을 사용하였다.

역충전재를 추출한 용액(이하 실험용액)의 평가를 위하여 24 well plate에 높이가 1.5mm가 되도록 혼합한 후 혼합직후 배양배지 2ml를 첨가하여 37°C, 5% CO₂배양기에서 24시간 동안 방치하여 추출하였다. 또한 각 재료를 혼합하여 초기 경화 후, 24시간, 1주일간 각각 37도, 5% CO₂ 배양기에 방치후 배양배지를 첨가하여 24시간 동안 추출하였다. 실험용액은 0.2µm(Nalgene, U.S.A.)의 syringe filter로 여과시킨 후 실험용액으로 사용하였다.

2. 독성평가

1) 세포의 준비

L929, KB, 3T3 3종의 세포주를 각각 Earle's salt가 포함된 Eagle's minimal essential medium에 배양하였다. 배지에 10% (vol/vol) fetal calf serum, 2mM L-glutamine, sodium bicarbonate 2.2mg/L, streptomycin 50ug, 100 IU penicillin/mL을 첨가하였다. 5-7회 계대하여 실험에 사용하였으며, 배양배지는 실험하기 3일과 하루전에 각각 교환하였다.

2) Radiochromium 방출 측정 방법

⁵¹Cr은 멸균된 식염수에 든 sodium chromate (specific activity, 428.12mC/mg, New England Nuclear/Dupont, DE)를 사용하였다. 실험시작 24시간 전에 세포의 monolayer에 약 100mC/8 × 10⁵으로 배양하여 ⁵¹Cr을 표지하였다. 표지된 세포를 0.25% trypsin (Ca²⁺와 Mg²⁺가 없는 인산완충용액)으로 바닥에서 떼 다음 사용하기 전에 Eagle's MEM으로 3회 세척하여 3-4 × 10⁵/ml 세포수가 되도록 희석하였다.

고형 역충전재의 독성 평가를 위하여 표지된 세포액 2ml을 고형 역충전재가 든 실험군 well에 첨가하였고 5개의 빈 well에 첨가하여 대조군으로 사용하였다. 또한 고형역충전재와 접촉하지 않은 표지된 세포액이 든 well을 reference sample 사용하였다. 실험군과 대조군 well이 있는 plate를 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양한 후, well에서 1ml씩 취하여 8분간 500g에서 원심분리하여 각 세포액의 0.5ml를 새로운 시험관에 옮기고 1분간 gamma particle counter(Gamma 5500, Beckman Instruments, Wakefield, MA)에 옮겨서 CPM (count per minute)을 측정하였다.

실험 용액의 독성평가를 위하여 ⁵¹Cr으로 표지된 세포액 1ml에 실험 용액 1ml을 첨가한 후 1ml씩 취하여 8분간 500g에서 원심분리하여 각 suspension의 0.5ml을 새로운 시험관에 옮기고 1분간 gamma particle counter에 옮겨서 counting하였다. Reference sample로는 ⁵¹Cr으로 표지된 세포액 1ml에 배양 배지 1ml을 첨가한 것을 사용하였다. 실험문에서 방출된 ⁵¹Cr의 백분율은 다음과 같이 계산하였다.

$$^{51}\text{Cr release}(\%) =$$

$$\frac{^{51}\text{Cr release in the test sample}}{^{51}\text{Cr release in the reference sample}} \times 100$$

각 역충전재의 대조군에 대한 독성의 비교는 ANOVA를 사용하여 통계검정하였다.

3) MTT법

성장배지가 든 75cm² 플라스크의 배양액을 제거하고 인산완충용액으로 2회 세척하였다. 1회 세척시에는 20ml, 2회 세척시에는 10ml를 사용하고 잔여액은 파이펫으로 제거하였다. 1% trypsin 50ml을 넣고 30초간 실온에 둔 후 trypsin 용액을 버리고 바닥에 잔여액 약 1ml이 든 플라스크를 CO₂배양기에 5분간 두었다. 성장배지 10ml로 분리된 세포를 회수하여 1000 rpm에서 10분간 원심분리하여 trypsin을 제거한 후 성장배지로 세포수를 2×10⁶ cell/ml로 조정하였다.

CO₂배양기에 24시간 배양한 후 배양액을 버리고 인산완충용액으로 1회 세척한 후, 각 well에 성장배지를 50μl씩 첨가하였다. 실험용액의 독성평가를 위하여 준비된 실험용액을 96 well plate(Corning, U.S.A.)에 well당 100μl씩을 분주한 후 CO₂배양기에서 24시간 배양하였다. 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-dimethyltetrazolium bromide(MTT, 98%, MW 414, C₁₈H₁₆BrN₅S, Jensen Chemical, Belgium)을 인산 완충용액에 2mg/ml가 되도록 녹인 후에 각 well에 5μl씩 첨가하여 4가지 동안 CO₂배양기에 배양한 후 MTT용액을 버리고, Tray mixer(Fujizoki Pharmaceutical co., FM 5-1, Japan)로 용액을 균일하게 혼합하였다. ELISA Reader II(Behring, Serial No. 350160, Germany)에서 측정 파장 570nm, 참고파장 650nm로 흡광도를 측정하였다. 성장배지만을 100μl 첨가한 well을 대조군으로 설정하였다.

Cell viability(%) =

$$\frac{\text{Absorbance of experimental wells}}{\text{Absorbance of control wells}} \times 100$$

각 역충전제의 대조군에 대한 결과 비교는 ANOVA로 통계검정하였다.

4) Neutral red (NR) 측정법

세포의 충밀도가 60-70% 정도일 때 역충전제에 노출시켰다. CO₂배양기에 24시간 배양한

후 배양액을 버리고 인산완충용액으로 1회 세척한 후, 각 well에 성장배지를 50μl씩 첨가하였다. 실험 용액의 독성 평가를 위하여, 실험 용액을 각 well에 50μl씩 첨가한 후에 CO₂배양기에서 24시간 배양하였다. 성장배지만을 100μl 첨가한 well을 대조군으로 설정하였다. NR염색액을 40μg/ml가 되도록 배지에 녹인 후 37°C 배양기에서 24시간 동안 배양한 후 1,500 g에서 10분 동안 원심분리하여 상청액을 well당 200μl씩 첨가하였다.

각 plate의 처음 2개의 well은 NR이 포함되어 있지 않은 배지를 첨가하여 대조군으로 사용하였다. 96-well plate를 3시간 동안 배양하여 염색액이 생존된 세포에 첨가되도록 하였다. Plate의 배지를 버리고 1% calcium chloride와 0.5% formaldehyde의 혼합액으로 신속하게 씻어내어 잔여의 염색 결정을 제거하고 세포가 흡착되도록 하였다. 1% acetic acid/50% ethanol용액 0.2ml로 염색액을 추출하였다. 10분간 실온에 방치한 후 microtiter plate shaker를 이용하여 수초간 균일하게 혼합한 후 ELISA Reader II (Behring, Serial No.350160, Germany)에서 측정파장 540nm, 참고파장 650 nm에서 흡광도를 측정한 후 다음과 같은 공식에 의하여 세포의 생존도를 계산하였다.

% viability =

$$\frac{\text{Mean absorbance of experimental cells}}{\text{Mean absorbance of control cells}}$$

각 역충전제의 대조군에 대한 독성의 비교는 ANOVA를 사용하여 통계검정하였다.

5) Lactate dehydrogenase (LDH) 측정법
고형재료의 독성평가를 위하여 역충전제가 든 24 well plate에 세포액 2ml을 첨가하고 CO₂ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 대조군으로는 동량의 세포배양액(IMDM with 10% FCS)을 사용하였다. 500μl를 취하여 생리식염수로 2배 희석한 후 sample cup에 넣고 생화학 자동분석기(Hitachi, 747 Automatic analyzer,

Japan)로 lactate dehydrogenase (LDH, Daiichi Purechemical Co., Japan) 효소의 활성도를 측정하였다. 실험용액의 독성평가를 위하여 24 well plate에 세포를 분주한 후 24시간 동안 CO₂ 배양기에서 배양하였다. 각 역충전재의 실험용액 1ml을 24well plate에 첨가하여 위와 같은 방법으로 LDH값을 측정하였다.

고형재료 및 실험용액에서 대조군에 대한 실험군의 LDH값의 백분율을 계산하여 ANOVA로 통계적검정하였다.

III. 실험성적

고형 상태의 역충전재의 세포 독성을 각 세포에 대하여 ⁵¹Cr의 방출을 측정한 경우는 Table 1-3과 같다. Table 1에 나타난 바와 같이 L929

세포에 대해서는 Fuji II는 4가지 시간 경과군 모두에서 radiochromium의 방출이 기타 5종의 재료에 비하여 낮게 나타나 세포 독성이 미약함을 보였다(p<0.05). 기타 5종의 재료는 Bestalloy 즉시균을 제외하면 radiochromium 방출량에서 차이가 나타나지 않아서 세포 독성의 차이를 보이지 않았다. 3T3세포에 대해서는 Table 2에 나타난 바와 같이 Fuji II의 4가지 시간 경과군 모두에서 radiochromium의 방출이 기타 재료에 비하여 유의하게 낮았다 (p<0.05). 또한 L929세포와 비교하면 모든 재료에서 대조군에 대한 radiochromium의 방출 비율이 전반적으로 낮게 나타나 동일 재료에 대하여 3T3의 세포 손상의 정도가 L929세포에 비하여 미약하였다. KB세포에 대하여는 Table 3에 나타난 바와 같이 Fuji II의 모든 군이 기타 5

Table 1. Radiochromium release from L929 cells exposed to retrograde filling materials expressed as cpm

Time	Elapsed time after mixing									
	control		0		30 minutes		24 hours		7 days	
Materials	mean±SE	mean±SE	ratio**	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	mea±SE	ratio	
Bestalloy	374.3±14.6	1009.6±120.8*	2.7	1547.8±17.5*	4.1	1491.4±44.6*	4.0	779.6±50.3*	2.1	
Prisma APH	399.3±5.1	1618.8±11.9 *	4.1	1721.2±61.8*	4.3	1699.8±26.3*	4.3	1674.6±25.0*	4.2	
Clearfil FII	421.8±29.0	1681.6±51.0 *	4.0	1638.8±35.7*	3.9	1643.0±42.7*	3.9	1661.8±38.2*	3.9	
Fuji II	432.8±17.2	816.2±36.5 *	1.9	355.4±13.5*	0.8	394.4±14.8*	0.9	410.2±16.2*	0.9	
Fuji II LC	370.0±17.1	1469.4±19.8 *	4.0	1482.0±18.7*	4.0	1470.6±25.4*	4.0	1225.8±82.9*	3.3	
IRM	383.0±36.3	1296.0±24.5*	3.4	1386.2±31.5*	3.6	1385.4±38.9*	3.6	1425.4±26.6*	3.7	

*; p<0.05, **; compared to control

Table 2. Radiochromium release from 3T3 cells exposed to retrograde filling materials expressed as cpm

Time	Elapsed time after mixing									
	control		0		30 minutes		24 hours		7 days	
Materials	mean±SE	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	mea±SE	ratio	
Bestalloy	594.8±21.5	1401.6±82.6*	2.4	1558.4±29.9*	2.6	1563.0±31.0*	2.6	1583.8±13.5*	2.7	
Prisma APH	571.3±3.5	1693.6±23.7*	3.0	1643.2±14.2*	2.9	1632.8±25.3*	2.9	1661.8±19.8*	2.9	
Clearfil FII	578.5±22.6	1751.4±30.1*	3.0	1666.4±17.3*	2.9	1634.4±37.1*	2.8	1646.8±73.6*	2.8	
Fuji II	547.0±12.4	888.4±72.0*	1.6	577.4±24.1*	1.1	659.8±62.7*	1.2	661.0±14.0*	1.2	
Fuji II LC	538.5±5.1	1512.8±42.2*	2.8	1455.0±27.5*	2.7	1337.6±32.6*	2.5	923.4±53.1*	1.7	
IRM	569.5±12.6	1272.0±21.3*	2.2	1340.4±33.2*	2.4	1426.8±22.0*	2.5	1429.2±8.1*	2.5	

Table 3. Radiochromium release from KB cells exposed to retrograde filling materials expressed as cpm

Time	Elapsed time after mixing									
	control		0		30 minutes		24 hours		7 days	
Materials	mean±SE	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	
Bestalloy	669.3±15.2	1653.4±123.7*	2.5	2115.0±159.4*	3.2	1537.0±127.2*	2.3	1119.0±30.3*	1.7	
Prisma APH	786.3±16.7	2218.2±109.6*	2.8	2066.8±176.7*	2.6	1772.8±62.6*	2.3	1447.3±134.0*	1.8	
Clearfil FII	721.5±15.0	8297.6±34.3*	4.6	2838.0±131.3*	3.9	2889.8±176.3*	4.0	3093.2±28.9*	4.3	
Fuji II	1103.8±324.0	2047.8±62.0*	1.9	820.6±14.7*	0.7	889.6±50.3*	0.8	888.4±37.2*	0.8	
Fuji II LC	838.8±14.6	2779.4±142.6*	3.3	2822.8±284.6*	3.4	2319.8±337.7*	2.8	1188.0±29.8*	1.4	
IRM	709.3±54.9	2647.0±145.2*	3.7	2672.4±329.3*	3.8	2634.6±227.9*	3.7	2531.2±161.6*	3.6	

Table 4. Radiochromium release from L929 cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials expressed as ratio compared to control

Time	Elapsed time after mixing			
	0	30 minutes	24 hours	7 days
Bestalloy	1.1	1.0	1.0	1.0
Prisma APH	1.0	1.0	1.0	1.1
Clearfil FII	1.0	1.0	1.0	1.0
Fuji II	1.0	1.0	1.0	1.0
Fuji II LC	1.0	1.0	1.0	1.0
IRM	1.1	1.1	1.1	1.1

종의 재료에 비하여 세포 독성이 유의하게 낮았다($p < 0.05$). 또한 Clearfill FII는 기타 5종의 재료에 비하여 radiochromium의 방출이 4가지 군 모두 전반적으로 높게 나타났으나 모든 경우에서 유의차가 인정되지는 않았다. 모든 재료가 전 실험군에서 L929, 3T3 및 KB세포에 대하여 대조군에 비하여 유의한 세포독성이 나타났($p < 0.05$). 또한 이들 3종의 세포주에 대하여 모두 시간 경과에 따른 세포 독성 효과의 감소도 나타나지 않았다. 이 중 Fuji II는 3가지 세포주 모두에 대하여 세포독성이 가장 약하게 나타났다. 3T3세포에 대하여 Fuji II LC의 7일군의 세포 독성이 기타 다른 재료와 기타 군에 비하여 약하였다. KB세포에 대하여는 Bestalloy의 7일군이 세포독성이 비교적 약하게 나타났다. 이상과 같이 고행 상태의 재료에 대하여 radiochromium의 방출 방법을 이용하여 측정할 경우, L929세포와 3T3세포는 비슷한 양상을

보였으나, KB세포는 각 재료간의 유의차가 나타난 경우도 있어서 두 세포와는 다른 결과를 보였다.

각 역층전재를 추출한 후 용액을 배양한 L929, 3T3와 KB세포에 노출시킨 후 ^{51}Cr 의 방출을 측정할 경우 Table 4-6에 나타난 바와 같이 전 실험군 모두 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않아 세포독성을 보이지 않았다.

고형 상태의 역층전재의 세포 독성을 각 세포에 대하여 LDH의 값을 측정할 경우는 Table 7-9와 같다. L929세포를 대상으로 한 Table 7에서 나타난 바와 같이 Fuji II와 IRM의 LDH의 수치가 낮았으며 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않아서 세포 독성을 보이지 않았다. 이들 2 재료를 제외하면 기타의 재료들은 다른 모든 군에서 모두 대조군에 비하여 유의한 세포 독성을 나타냈다 ($p < 0.05$). 4가지 시간 경과군에서 각 시간대가 경과해도 LDH의 수

Table 5. Radiochromium release from 3T3 cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials expressed as ratio compared to control

Materials	Time	Elapsed time after mixing			
	0	30 minutes	24 hours	7 days	
Bestalloy	1.0	1.0	1.0	1.0	
Prisma APH	1.1	1.1	1.1	1.1	
Clearfil FII	1.0	1.0	1.0	1.0	
Fuji II	1.1	1.0	1.0	1.0	
Fuji II LC	1.1	1.0	1.0	1.1	
IRM	1.1	1.0	1.0	1.1	

Table 6. Radiochromium release from L929 cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials expressed as ratio compared to control

Materials	Time	Elapsed time after mixing			
	0	30 minutes	24 hours	7 days	
Bestalloy	1.0	1.0	1.0	1.1	
Prisma APH	1.0	1.0	1.0	1.1	
Clearfil FII	1.0	1.0	1.0	1.1	
Fuji II	1.1	1.0	1.0	1.0	
Fuji II LC	1.0	1.0	1.0	1.0	
IRM	1.1	1.0	1.0	1.0	

Table 7. Release of LDH from L929 cells exposed to retrograde filling materials expressed as concentration in machine units

Materials	Time	Elapsed time after mixing									
		control		0		30 minutes		24 hours		7 days	
		mean±SE	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	
Bestalloy		17.0±0	24.2±1.4*	1.4	26.8±0.6*	1.6	26.4±0.2*	1.6	23.4±1.4*	1.4	
Prisma APH		17.5±0.2	24.5±0.7*	1.4	31.5±0.2*	1.8	38.5±0.7*	2.2	29.8±0.4*	1.7	
Clearfil FII		17.5±0.3	33.2±0.4*	1.9	33.6±0.5*	1.9	33.0±0*	1.9	33.4±0.4*	1.9	
Fuji II		17.0±0.3	15.8±0.6	0.9	15.6±0.5	0.9	15.8±0.2	0.9	16.4±0.4	1.0	
Fuji II LC		17.0±0	28.2±0.8*	1.7	28.4±0.9*	1.7	25.8±0.7*	1.5	29.2±1.4*	1.7	
IRM		17.0±0.2	18.7±0.4	1.1	20.4±0.1	1.2	18.7±0.1	1.1	18.7±0.6	1.1	

치의 증가는 전반적으로 나타나지 않아 시간 경과에 따른 독성 효과의 차이는 나타나지 않았다. Bestalloy, Prisma APH, Clearfil FII 및 Fuji II LC에서 가장 높은 대조군과의 LDH 비율은 2.2였고 가장 낮은 상대비율은 1.4였다. 이들 4종류의 재료에서는 재료간의 상대적인

순위가 각 시간대에서 나타난 경우도 있었으나 인정되지 않은 경우도 있어서 재료간의 상대적인 독성의 순위를 결정할 수 없었다. Table 8에 나타난 바와 같이 3T3세포를 대상으로 한 경우에는 Fuji II와 IRM의 독성이 가장 약하였다. Prisma APH와 Clearfil F II는 다른

Table 8. Release of LDH from 3T3 cells exposed to retrograde filling materials expressed as concentration in machine units

Time	Elapsed time after mixing								
	control		0		30 minutes		24 hours		7 days
Materials	mean±SE	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	mea±SE	ratio
Bestalloy	20.8±0.3	36.8±3.7*	1.8	33.2±2.8*	1.6	31.0±2.5*	1.5	42.2±2.2*	2.0
Prisma APH	21.0±0	49.8±0.4*	2.4	48.0±0.5*	2.3	49.4±0.7*	2.4	47.2±0.4*	2.2
Clearfil FII	21.0±0.4	50.4±0.4*	2.4	50.0±0.3*	2.4	49.2±0.6*	2.3	49.2±1.2*	2.3
Fuji II	20.0±0	19.8±0.4	1.0	20.2±0.4	1.0	20.6±0.2	1.0	21.5±0.5	1.1
Fuji II LC	20.3±0.3	28.4±0.5*	1.4	32.8±1.3*	1.6	28.2±1.3*	1.4	29.4±0.5*	1.4
IRM	21.8±0.3	21.6±0.5	1.0	23.0±0.5	1.1	22.2±0.5	1.0	16.4±1.0	0.8

Table 9. Release of LDH from KB cells exposed to retrograde filling materials expressed as the concentration in machine units

Time	Elapsed time after mixing								
	control		0		30 minutes		24 hours		7 days
Materials	mean±SE	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	mean±SE	ratio	mea±SE	ratio
Bestalloy	18.3±0.3	31.0±1.9*	1.7	32.4±0.8*	1.8	28.8±0.7*	1.6	22.6±0.4*	1.2
Prisma APH	20.6±2.6	36.4±0.7*	1.8	33.0±0.9*	1.7	35.0±1.9*	1.8	32.2±1.5*	1.6
Clearfil FII	22.3±0.3	55.0±2.0*	2.5	46.4±0.4*	2.1	61.6±2.2*	2.8	70.4±1.6*	3.2
Fuji II	23.1±0.5	20.8±1.3	0.9	18.5±1.0	0.8	23.1±1.7	1.0	23.1±0.7	1.0
Fuji II LC	21.7±1.5	39.1±1.4*	1.8	34.7±0.1*	1.6	41.2±1.0*	1.9	36.9±1.2*	1.7
IRM	18.0±0	17.6±0.5	1.0	17.8±1.5	1.0	15.4±1.0	0.9	14.4±1.5	0.8

재료에 비하여 대조군에 대한 비가 높아서 3T3 세포에 대한 독성이 강함을 보였다. 또한 각 시간 경과군에 따른 LDH 수치의 변화는 없었다. Fuji II와 IRM은 가장 독성이 약할 뿐만 아니라 대조군과도 차이가 나타나지 않았다. Prisma APH와 Clearfil FII는 대조군에 대한 상대 LDH의 비율이 2.2-2.4로서 Bestalloy 및 Fuji II LC에 비하여 세포 독성이 강하였다. Table 9에 나타난 바와 같이 KB세포를 대상으로 한 경우에는 Fuji II와 IRM만이 대조군에 비하여 LDH값이 대조군에 비하여 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$). 7일군에서 Bestalloy, Prisma APH와 Fuji II LC는 대조군과의 비율이 유의하게 감소되었다. Clearfil FII는 4가지 시간 경과군 모두에서 항상 LDH의 값이 높게 나타나서 독성이 강하게 지속됨을 나타냈다.

Bestalloy, Prisma APH 및 Fuji II LC는 상대 LDH의 비율이 비슷하여 이들의 세포독성의 정도는 유사하였다. 따라서 Clearfil FII, Bestalloy 등 3종의 재료, Fuji II와 IRM의 순으로 세포 독성이 감소하였다. 이와 같이 고형상태의 재료의 세포 독성을 LDH의 수치로 측정할 경우에는 3종의 세포중 모두에 대하여 Fuji II와 IRM만이 세포독성을 보이지 않는 일치된 결과를 관찰하였다.

각 역충전제의 추출용액의 세포 독성을 각 세포에 대하여 LDH의 값을 측정할 경우는 Table 10-12와 같다. Table 10에 나타난 바와 같이 L929세포에 대하여는 Bestalloy의 즉시군과 24시간군 및 prisma APH의 7일군 및 IRM의 4가지군 모두에서 세포독성이 유의하게 인정되었다($P < 0.05$). 이들을 제외한 기타군에서는

Table 10. Release of LDH (Iu/L) from L929 cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials

Time	Elapsed time after mixing								
	control	0	30 minutes	24 hours	7 days				
Materials	mean± SE	mean± SE	ratio	mean± SE	ratio	mean± SE	ratio	mea± SE	ratio
Bestalloy	13.7± 0.3	17.4± 1.4*	1.3	14.4± 0.2	1.1	16.6± 1.1*	1.2	13.0± 0	0.9
Prisma APH	22.3± 0.3	23.4± 0.5	1.0	24.2± 0.2	1.1	22.4± 1.9	1.0	31.0± 0.8*	1.4
Clearfil FII	18.0± 1.4	16.6± 0.2	1.0	14.6± 0.2	0.8	14.0± 0	0.8	13.4± 0.4	0.8
Fuji II	22.1± 0.4	15.5± 0.4	0.7	15.5± 0.2	0.7	17.7± 0.6	0.8	17.7± 1.0	0.8
Fuji II LC	21.0± 0.4	15.6± 0.2	0.7	17.0± 0	0.8	15.8± 0.4	0.8	15.0± 0.3	0.7
IRM	21.6± 0.4	34.2± 0.2*	1.6	34.6± 0.4*	1.6	35.0± 0	1.6	35.6± 0.4*	1.6

Table 11. Release of LDH (Iu/L) from 3T3 cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials

Time	Elapsed time after mixing								
	control	0	30 minutes	24 hours	7 days				
Materials	mean± SE	mean± SE	ratio	mean± SE	ratio	mean± SE	ratio	mea± SE	ratio
Bestalloy	23.3± 0.5	17.8± 0.2	0.8	17.0± 0.3	0.7	16.0± 0	0.7	17.5± 0.3	0.8
Prisma APH	23.8± 0.3	40.4± 0.5*	1.7	39.6± 0.4*	1.7	41.3± 1.0*	1.7	41.0± 0.4*	1.7
Clearfil FII	25.3± 0.5	18.8± 0.2	0.7	18.6± 0.2	0.7	17.6± 0.2	0.7	18.8± 0.4	0.7
Fuji II	24.3± 0.3	40.8± 1.6*	1.7	20.0± 0.3	0.8	18.4± 0.2	0.8	18.5± 0.3	0.8
Fuji II LC	24.0± 0.4	26.2± 0.4*	1.1	27.6± 0.2*	1.2	23.4± 0.2	1.0	30.6± 0.4*	0.9
IRM	23.8± 0.4	35.4± 0.4*	1.5	37.2± 0.6*	1.6	38.6± 0.7*	1.6	43.6± 0.7*	1.8

대조군에 비하여 유의한 차이가 나타나지 않았다. 즉 IR.은 대조군에 대한 상대 LDH의 비율이 1.6으로서 4가지 시간 경과군에서 항상 일정하여 7일이 경과해도 여전히 강력한 세포 독성을 나타냈으며, Bestalloy는 중등도의 독성을 보였고 Clearfil FII와 Fuji II 및 Fuji II LC는 세포 독성을 보이지 않았다. Table 11에 나타난 바와 같이 3T3세포에 대하여는 Bestalloy, Clearfil FII는 실험 전 군에서 세포독성이 유의하지 않았다. Fuj II는 즉시군에서만 세포 독성이 유의하였고 기타군에서는 나타나지 않았다. Prisma APH와 IRM은 다른 군에 비하여 유의하게 독성이 높았다. 따라서 3T3세포에 대해서는 Prisma APH와 IRM이 가장 강한 세포 독성을 나타냈고 그 다음이 Fuji II LC의 순이었으며 Bestalloy, Clearfil FII는 세포 독성을 보이지 않았다. Table 12에 나타난 바와 같이

KB세포에 대하여는 모든 역충전제의 실험군 전부에서 유의한 차이가 나타나지 않았다($p < 0.05$). 즉 모든 실험군에서 이들은 KB세포에 대하여 독성을 나타내지 않았다. 3종의 세포주에 대한 세포 독성의 결과를 비교하면 L929 세포와 3T3세포에 대해서는 IRM만이 세포 독성을 보였으며 이 결과만이 일치하였다. 또한 L929세포에 대해서는 세포 독성을 보인 군이 전체군 중 7개군이었음에 비하여 3T3세포에 대해서는 11개군이었으며 이들은 다른 재료에 대하여 각기 다른 양상을 보였다. KB세포는 단 1개의 군에서도 유의한 세포 독성을 보이지 않아서 세포 독성의 결과가 세포의 종류에 따라 상당한 차이를 보였다.

L929세포를 대상으로 6가지 역충전제의 추출 용액을 첨가한 실험군 세포의 흡광도를 대조군세포의 흡광도에 대한 백분율로 나타낸 것은

Table 12. Release of LDH (Iu/L) from KB cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials

Time Materials	Elapsed time after mixing								
	control mean± SE	0 mean± Se	ratio	30 minutes mean± SE	ratio	24 hours mean± SE	ratio	7 days mea± SE	ratio
Bestalloy	21.8± 0.5	12.8± 0.2	0.6	14.6± 0.2	0.7	13.6± 0.2	0.6	15.2± 0.2	0.7
Prisma APH	21.0± 0.4	25.2± 0.5	1.2	25.2± 0.3	1.2	27.3± 0.1	1.3	25.2± 0.2	1.2
Clearfil FII	20.8± 0.5	16.8± 0.2	0.8	16.2± 0.2	0.8	14.8± 0.2	0.7	15.2± 0.2	0.7
Fuji II	21.1± 0.3	19.1± 0.1	0.9	19.1± 0.2	0.9	19.1± 0.1	0.9	19.1± 1.2	0.9
Fuji II LC	23.3± 0.3	23.3± 0.2	1.0	30.3± 0.1	1.3	28.0± 0.2	1.2	30.3± 0.2	1.3
IRM	19.7± 0.3	19.7± 0.1	1.0	17.7± 0.2	0.9	19.7± 0.2	1.0	19.7± 0.3	1.0

Table 13. Relative absorbance of L929 cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials expressed as relative percentage compared to control with MTT assay. (mean± SE)

Time Materials	Elapsed time after mixing			
	0	30 minutes	24 hours	7 days
Bestalloy	100.70± 1.61	89.80± 1.92*	88.50± 1.11*	100.80± 2.53
Prisma APH	37.20± 0.84*	56.90± 2.24*	47.70± 0.79*	57.10± 1.85*
Clearfil FII	92.30± 2.07*	97.20± 4.23	95.10± 2.60	97.50± 5.12
Fuji II	1.65± 0.64*	69.10± 1.74*	79.50± 1.43*	68.40± 1.21*
Fuji II LC	57.20± 1.31*	64.80± 1.69*	61.00± 0.99*	56.80± 1.59*
IRM	5.59± 0.22*	5.32± 0.16*	5.36± 0.12*	2.75± 0.43*

Table 13과 같다. Bestalloy에서는 혼합즉시군과 7일 경과군에서 100.7과 100.8로 상대 흡광도가 나타나 L929세포에 대하여 독성이 없었다. 30분 경과군과 24시간 경과군에서의 상대흡광도는 89.9과 88.5로서 대조군에 비하여 흡광도의 감소가 나타났다 ($p < 0.05$). 광중합형 복합레진인 Prisma APH에서는 4가지 시간 경과군 중 혼합즉시군에서 37.2로 상대흡광도가 가장 낮게 나타나 세포생존능의 강한 억제력을 보였다.

Prisma APH의 4가지 군에서는 모두 대조군에 비하여 세포생존능이 유의하게 억제되었다 ($p < 0.05$). 화학 중합형 복합레진인 Clearfil FII에서는 즉시군을 제외하면 기타군에서는 상대 흡광도는 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않아서 L929세포에 대한 독성이 없었다. 화학 중합형 글라스아이오노머 시멘트인 Fuji II에서는 혼합즉시군에서 상대흡광도가 1.7로서 세

포의 생존능은 거의 나타나지 않았다. 그러나 Fuji II의 경우는 경과후 30분이 경과한 이후에는 세포의 생존능은 증가되어 24시간 경과 후에는 79.5로 7일 경과 후에는 68.4로 상대흡광도가 각각 증가하였으나, 4가지 시간 경과군 모두에서 세포의 생존능이 유의하게 억제되었다 ($p < 0.05$). 광중합형 글라스아이오노머 시멘트인 Fuji II LC는 4가지 시간 경과군 모두 상대흡광도가 대조군에 비하여 유의하게 낮았다 ($p < 0.05$). ZOE제재인 IRM의 상대 흡광도는 4가지 시간대군 모두에서 낮은 수치를 보여 독성 효과가 강하였다. 혼합즉시군에서는 Fuji II와 IRM이 가장 낮은 상대흡광도를 나타내었으며 Prisma APH와 Fuji II LC의 순으로 상대흡광도가 증가하였다. 30분, 24시간과 7일 경과군에서는 Fuji II의 상대 흡광도가 증가되었으나 IRM은 L929세포의 생존능을 강하게 억제하였

Table 14. Relative absorbance of L929 cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials expressed as relative percentage compared to control with NR assay (mean± SE)

Time Materials	Elapsed time after mixing			
	0	30 minutes	24 hours	7 days
Bestalloy	100.70± 1.61	89.90± 4.28*	106.00± 3.74*	104.10± 9.77
Prisma APH	37.20± 0.84*	14.29± 0.54*	24.50± 1.48*	13.60± 0.73*
Clearfil FII	91.30± 2.07*	91.30± 1.05*	37.20± 0.94*	82.40± 4.79*
Fuji II	1.63± 0.60*	99.30± 2.87	43.20± 1.50*	102.40± 6.31
Fuji II LC	57.20± 1.31*	81.60± 1.81*	65.20± 10.87*	59.30± 4.17*
IRM	2.75± 0.43*	8.41± 0.36*	17.80± 4.07 *	7.09± 0.56*

Table 15. Relative absorbance of 3T3 cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials expressed as relative percentage compared to control with MTT assay. (mean ± SE)

Time Materials	Elapsed time after mixing			
	0	30 minutes	24 hours	7 days
Bestalloy	116.21± 5.10*	98.27± 2.58	100.19± 2.70	105.26± 4.55
Prisma APH	18.99± 0.55*	36.72± 0.92*	23.42± 0.35*	33.41± 0.72*
Clearfil FII	152.86± 2.72*	107.23± 4.50*	131.57± 2.56*	150.56± 5.51*
Fuji II	5.04± 0.28*	70.61± 2.08*	81.34± 1.57*	60.01± 0.96*
Fuji II LC	71.45± 1.45*	60.86± 3.11*	48.29± 1.44*	42.82± 0.62*
IRM	8.78± 0.21*	9.05± 0.30*	6.57± 0.42*	10.15± 0.29*

다.
L929세포를 대상으로 NR발색시약을 이용하여 6가지 역충전재의 추출 용액을 첨가한 실험군세포의 흡광도를 대조군 세포의 흡광도에 대한 백분율로 나타낸 것은 Table 14와 같다. 즉시군에서 Fuji II와 IRM이 독성이 가장 강하였으며 Bestalloy는 독성이 없었고 Fuji II LC는 Fuji II에 비하여 현저히 독성이 약했는데 이는 MTT를 이용한 경우와 같은 결과를 보였다. Bestalloy는 즉시군에서는 대조군과 유의한 차이를 보이지 않았으나 30분 경과시에는 대조군에 비하여 세포의 생존능이 억제되었고 24시간과 7일 경과군에서는 생존능이 촉진되어 나타났다(p<0.05). Clearfil FII는 4가지 시간 경과군 모두에서 대조군에 비하여 유의한 억제 효과를 보였으나 24시간군을 제외하면 상대흡광도 수치는 비교적 높게 나타났다. Fuji II는 즉시

군에서는 세포 독성이 강하였으나 7일 경과군에서는 세포 독성을 나타내지 않았다. Fuji II LC는 4가지 시간 경과군 모두에서 대조군에 비하여 세포의 생존능이 유의하게 억제되었다. IRM은 4가지 군 모두에서 강력한 세포 독성을 보였다.

3T3세포를 대상으로 6가지 역충전재의 추출 용액을 첨가한 실험군 세포의 흡광도를 대조군세포의 흡광도에 대한 백분율로 나타낸 것은 Table 15와 같다. Bestalloy는 4가지 시간 경과군 모두에서 세포 독성이 없었으며, 즉시군에서는 세포의 생존능이 촉진되었다. Prisma APH에서는 4가지 시간 경과군 모두에서 상대흡광도가 대조군에 비하여 유의하게 억제되었으며(p<0.05), 혼합즉시군의 경우 상대흡광도는 18.99로서 세포 생존능의 강한 억제를 보였다. Clearfil FII에서는 4가지 시간 경과군 모

두에서 상대흡광도 수치가 100이상으로서 세포의 생존능이 대조군에 비하여 오히려 우수하게 나타났다($p < 0.05$). Fuji II에서는 혼합즉시군에서 상대흡광도의 수치가 5.04로서 세포의 생존능이 현저히 억제되었고 30분 경과 이후에는 상대흡광도가 70.61로서 증가되었으나 4가지 시간 경과군 모두에서 대조군에 비하여 세포의 생존능은 유의하게 억제되었다($p < 0.05$). Fuji II LC에서는 4가지 시간 경과군 모두에서 상대흡광도가 대조군에 비하여 유의하게 낮아서 ($p < 0.05$) 세포의 생존능이 억제됨을 보였다. IRM의 경우에는 4가지 시간 경과군 모두에서 상대흡광도가 낮게 나타나 L929세포가 심한 손상을 받았음을 나타냈고 대조군에 비하여 세포의 생존능이 유의하게 억제되었다($p < 0.05$). 3T3세포를 대상으로 한 24가지 실험군 중에서 IRM의 4시간 시간 경과군과 Fuji II의 혼합즉시군에서 가장 낮은 상대 흡광도 수치가 나타났고 기타 실험군에 비하여 유의하게 낮았다($p < 0.05$).

3T3세포를 대상으로 NR측정 방법을 이용하여 6가지 역충전재의 추출 용액을 첨가한 실험군 세포의 흡광도를 대조군 세포의 흡광도에 대한 백분율로 나타낸 것은 Table 16과 같다. 즉시군에서 Bestalloy만이 상대흡광도가 높게 나타난 세포독성을 보이지 않았다. Clearfil은 MTT측정 방법에서의 경우와 달리 상대 흡광도가 낮게 나타났다. Prisma APH와 Fuji II, IRM의 상대 흡광도는 4가지 시간 경과군 모두에서 일정하게 낮은 상태로 유지되어 시간

경과에 따른 세포 독성 효과의 감소는 나타나지 않았다. IRM과 Prisma APH가 독성이 강하고 Fuji II는 즉시군에서만 독성이 강하게 유지되었으며 이는 L929세포를 이용하여 NR과 MTT방법으로 측정된 경우 및 3T3세포를 대상으로 MTT방법으로 측정된 경우와도 달랐다.

KB세포를 대상으로 6가지 역충전재의 추출 용액을 첨가한 실험군 세포의 흡광도를 대조군 세포의 흡광도에 대한 백분율로 나타낸 것은 Table 17과 같다. Bestalloy는 4가지 시간 경과군 모두에서 상대흡광도의 수치가 높아 세포 독성을 보이지 않거나 미약하였다. Prisma APH에서는 4가지 시간 경과군 모두에서 상대 흡광도가 대조군과 유의한 차이를 나타내었다($p < 0.05$). Clearfil FII에서는 혼합즉시군에서만 상대흡광도의 수치가 대조군에 비하여 유의하게 낮았으며($p < 0.05$), 기타 3가지 군에서는 세포의 생존능이 억제되지 않았다. Fuji II의 혼합즉시군에서는 상대흡광도가 1.63으로 세포의 생존능이 거의 나타나지 않았다. 30분 경과군 이후부터는 상대흡광도의 수치가 증가되었으나, 4가지 실험군 모두에서 대조군에 비하여 세포의 생존능이 유의하게 억제되었으며, 7일 경과군에서도 세포 생존능의 기타 3가지 군에 비하여 유의하게 증가되지 않았다. IRM에서는 혼합즉시군에서 1.44로서 세포의 생존능이 현저히 억제됨을 보였다. 30분 경과 이후부터는 상대흡광도가 증가되었으나 4가지 실험군 모두에서 대조군에 비하여 세포생존능이 유의하게 억제되었다($p < 0.05$). KB세포를 대

Table 16. Relative absorbance of 3T3 cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials expressed as relative percentage compared to control with NR assay. (mean \pm SE)

Time Materials	Elapsed time after mixing			
	0	30 minutes	24 hours	7 days
Bestalloy	147.20 \pm 6.41*	88.06 \pm 5.39*	74.18 \pm 8.24*	102.68 \pm 7.08
Prisma APH	18.75 \pm 0.87*	5.60 \pm 0.41*	11.52 \pm 0.83*	5.27 \pm 0.20*
Clearfil FII	78.35 \pm 5.17*	76.38 \pm 3.61*	38.53 \pm 1.45*	69.38 \pm 3.88*
Fuji II	19.90 \pm 1.08*	113.70 \pm 4.65*	47.97 \pm 1.14*	80.04 \pm 4.10*
Fuji II LC	60.29 \pm 2.50*	87.00 \pm 6.01*	40.90 \pm 2.51*	46.47 \pm 2.02*
IRM	16.47 \pm 1.06*	3.72 \pm 0.19*	8.88 \pm 0.44*	4.61 \pm 0.35*

Table 17. Relative absorbance of KB cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials expressed as relative percentage compared to control with MTT assay. (mean± SE)

Time Materials	Elapsed time after mixing			
	0	30 minutes	24 hours	7 days
Bestalloy	99.48± 0.50*	94.11± 2.54*	96.13± 2.27	98.31± 2.11*
Prisma APH	29.91± 0.57*	47.51± 1.37*	27.67± 1.19*	44.07± 2.11*
Clearfil FII	41.49± 0.50*	109.16± 3.26*	89.57± 2.20*	111.67± 4.66*
Fuji II	1.63± 0.10*	82.26± 3.16*	78.51± 2.54*	78.18± 1.75*
Fuji II LC	45.96± 0.52*	69.43± 1.60*	49.56± 1.06*	56.99± 1.12*
IRM	1.44± 0.08*	42.48± 2.50*	47.97± 1.33*	36.79± 1.20*

Table 18. Relative absorbance of KB cells exposed to extract solutions of retrograde filling materials expressed as relative percentage compared to control with NR assay. (mean± SE)

Time Materials	Elapsed time after mixing			
	0	30 minutes	24 hours	7 days
Bestalloy	80.54± 6.17*	85.70± 10.29*	111.81± 3.13*	108.06± 1.70*
Prisma APH	48.46± 2.07*	28.96± 1.13*	37.63± 1.62*	33.15± 0.42*
Clearfil FII	96.46± 5.59	91.01± 4.29*	98.62± 3.93	102.00± 2.98
Fuji II	19.69± 0.98*	90.50± 5.10*	111.81± 4.64*	108.56± 2.30*
Fuji II LC	86.92± 3.98*	73.94± 2.03*	93.00± 1.66*	83.78± 2.54*
IRM	9.92± 0.59*	12.48± 0.23*	14.11± 0.55*	25.47± 0.46*

상으로 한 24가지 실험군 중에서 Fuji II와 IRM의 혼합즉시군에서 가장 낮은 흡광도가 나타났다($p < 0.05$).

KB세포를 대상으로 NR측정 방법을 이용하여 6가지 역충전제의 추출 용액을 첨가한 실험군 세포의 흡광도를 대조군 세포의 흡광도에 대한 백분율을 나타낸 것은 Table 18과 같다. Fuji II 즉시군과 IRM이 4가지 시간 경과군 모두에서 강한 독성을 보였다. Prisma APH는 시간이 계속 경과되어도 비교적 낮은 상대 흡광도 수치가 나타나 시간 경과에 따른 세포 독성의 감소는 나타나지 않았다.

IV. 총괄 및 고찰

여러가지 재료가 역충전재로서 사용되어 왔으나 그 중 아말감은 가장 오랜 역사를 가지고

있으며 많이 사용되었다²³⁾ 아말감은 방사선 불투과성이고 흡수되지 않으며 조직 적합성이 우수하다는 장점이 있다. 그러나 조직에 변색을 유발하고 galvanism을 유발할 가능성이 있으며 이의 성분을 주위 조직으로 방출하는 단점이 있다^{24, 25)}. 복합레진은 복합레진 단독 혹은 상아질 결합제와 같이 사용하여 역충전재로서 사용될 수 있다²⁶⁾.

Bruce등²⁷⁾은 VERO세포를 대상으로 아말감과 Morita Clearfil 및 7종의 상아질 결합제의 세포 독성을 조사하였다. Agar overlay 방법을 이용하였으며 각 재료를 혼합한 즉시 및 인산 완충용액에 7, 15 및 30일 동안 침지시킨 후 시편을 각각 24시간 동안 노출시켜 측정하였다. 혼합한 즉시에는 아말감과 Tenure만이 미약한 세포 독성을 나타내었다. 아말감은 24시간 군에서는 독성이 없었으나 30일군에서는 독성이

증가하였다. 15일과 30일군의 경우에는 혼합한 즉시군에 비하여 세포독성이 유의하게 증가하였고 이에 대한 설명으로서 생리 식염수 용액에 오랜 기간 동안 침지시킨 결과 아말감의 표면에 부식산물이 축적되는 것을 이유로서 설명하였다²⁸⁾. Clearfil 복합레진은 24시간 군보다 30일군에서 억제대의 크기가 감소하였다. 전반적으로 이들 역충전재는 시간이 경과함에 따라 세포독성이 감소되는 양상을 보였다. 최근 Torabinejad 등은 실험적인 재료로서 mineral trioxide aggregate (MTA)의 역충전재로서 사용 가능성을 연구하였다^{29,30)}. 근첨부 폐쇄성에 관하여 MTA, 아말감과 Super EB시멘트를 비교하여 MTA가 혈액의 존재와 무관하게 염색제의 누출이 적었으며 근첨 와동에 대하여 적합성도 우수하다고 하였다. 또한 agar overlay와 radiochromium 방법을 이용하여 아말감, Super EBA 및 IRM과 MTA의 세포 독성을 비교하였다. Agar overlay 방법 및 radiochromium 방법에서 혼합한 즉시와 경화된 아말감은 기타 재료들에 비하여 유의하게 세포 독성이 낮았다²⁹⁾.

세포독성 검사를 이용한 생체 적합성의 검사는 약제를 검사하는 방법으로 주로 개발되어 왔다. 치과재료는 대부분 불용성이며 두가지 성분으로 공급되어 이 재료들을 혼합하여 사용하거나 적절한 광원을 사용하여 경화시켜서 사용한다. 따라서 이들 재료에서 독성 성분으로 가능한 물질은 이들의 경화반응 뿐 아니라 혼합된 상태의 어떤 단계에서 검사했는지에 대해서도 결정된다³¹⁾. 이러한 경화반응은 반응물질에서 새로운 조합을 형성할 수도 있으므로 재료의 독성이 어떻게 변하는가를 평가하는 것이 중요하다³²⁾. 실험실에서 많은 검사들은 고형재나 재료의 추출액을 사용하게 되는데 검사하고자 하는 재료를 어떤 상태로 검사해야 하는지에 관해서는 일반적으로 일치된 견해가 없다. 즉 검사한 직후 또는 일정 기간 동안 공기 중에 노출시킨 후에 평가해야 하는지에 대한 기준이 없다. 따라서 이들 재료에 대한 독성을 평가할 때에는 실제 임상에서 구강내에 사용되는 재료의 상태를 기준으로 하는 것이 타당할 것이다³¹⁾.

역충전재의 세포독성을 평가할 때 사용해야 하는 세포는 역충전재가 실제로 접촉하는 세포를 대상으로 평가해야 한다. 치아의 근첨에는 여러 세포가 존재하지만 이 중 섬유아세포와 조골세포가 가장 흔하다. 따라서 이들 세포를 독성 검사시에 사용해야 하지만 근관치료시 사용되는 재료에 대한 독성 검사에 관한 연구에서 특정 세포가 다른 세포에 비하여 적절한 증거는 없으며 세포독성 검사에 일반적으로 사용되는 세포를 사용시 이들간에 유의한 차이가 없는 것으로 보고되었다^{4,33,34)}. 독성 검사에 널리 사용되는 세포를 선택하는 경우는 세포의 기원을 알 수 있고 따라서 각 세포의 반응이 균일하게 나타나는 것으로 기대할 수 있어서 다른 연구와 상호 비교가 가능한 장점이 있다. 세포독성 검사와 같은 실험실 연구와 생체의 실험간의 일치에 대하여는 논란이 있어서 두 가지 간의 상관관계가 우수한 것으로 주장하기도 하고^{5,35)} 이들 방법간에 상관성이 없는 것으로 보고하기도 하였다³⁵⁾.

Sandereon³⁶⁾과 Wigzell³⁷⁾은 생체의에서 핵이 있는 세포의 면역학적으로 유발된 연구에서 ⁵¹Cr을 사용하였다. Radiochromium으로 표지된 sodium chromate는 세포의 단백질 및 세포의 성분과 공유결합하지 않으며 결합 과정에서 chromate는 환원되어 재사용되지 않는다³⁸⁾. Radiochromium 방출 방법은 평가하고자 하는 생체 재료가 고형이거나 연성(plastic) 재료이며 세포와 직접적인 접촉이 필요한 경우에 사용되는 방법으로 치과영역에서 소개되었다³⁹⁾. 이 때 세포는 검사하고자 하는 재료위에서 성장하므로 세포의 형태를 광학 현미경하에서 관찰할 수 없다. 또한 세포는 생화학적인 검사가 필요한 경우 쉽게 수거할 수 없다. 이러한 문제점을 극복하기 위하여 여러 연구자들이 검사하고자 하는 재료를 용해시켜 검사하는 방법을 개발하였으며 물이 아닌 다른 용매를 사용하였으나 이 경우에는 결과의 해석이 까다로운 경우도 있었다³⁹⁾. 죽은 세포로부터는 약 70-95%의 radioactivity가 방출되는 것으로 알려져 있다. 이러한 방사선 동위원소의 방출량은 사용한 재료에 따라서도 달라지며 세포가

손상된 경우의 최대 방출이 100%이 세포도 있는 반면 60-70%까지만 방출되는 경우도 있다³⁸⁾. Radiochromium의 방출이 60%이하인 경우는 세포 손상의 정도를 판정하기가 어렵고 35%이하인 경우는 같은 배양 용기내의 세포 안에서도 세포 손상이 세포에 따라서 다르게 나타날 수 있다.

발색법(colorimetric assay)을 이용한 검사방법은 96-well plate를 이용하여 신속하고 경제적으로 세포의 생존도를 측정할 수 있다. 이러한 검사방법을 이용할 때에는 대조군 및 실험군의 세포가 모두 지수적 성장곡선(exponential growth curve)에 있어야 하며 이를 위하여 검사방법의 예민도가 적절해야 하며 사용한 세포와 독성 물질의 적용시간과 검사방법의 조건등을 고려해야 한다^{39,40)}. 발색법을 이용한 검사방법은 APNaOH, SRB, CVDE, Neutral red(3-amino-7-dimethyl-2-methylphenazine hydrochloride, NR), MTT를 이용한 방법등이 있다. 예민도의 면에서 NR과 MTT를 이용한 방법을 비교하면 NR방법이 예민한 것으로 알려져 있다^{1,42)}.

NR은 수용성이 약한 염기성이며 생존세포의 lysosome에 추적되는 염색제이다⁴³⁾. NR을 이용한 검사법은 실험실에서 세포독성 검사를 위하여 개발되고 광범위하게 연구되었다^{44,45)}. 이 검사법은 생존세포의 lysosome으로 NR염색제가 원형질막(plasma membrane)을 통하여 수동적으로 운반되어 lysosome의 기질내에 다당류에 결합하거나 수소가 결합된 형태로 존재한다⁴⁶⁾. 손상되거나 죽은 세포에서는 원형질막이 장벽의 역할을 상실하여 염색제가 lysosome내에서 존재할 수 없게 된다. 추출된 염색제를 분광광도계(spectrophotometer)로 정량적으로 측정하면 생존세포수와 일치하며 이 방법은 여러 세포를 대상으로 연구되었는데 사람과 동물에서 일차배양한 세포 뿐 아니라 영구 세포주도 사용되었다⁴⁷⁾.

MTT를 이용한 검사 방법은 세포의 생존능, 증식 및 활성을 정량적으로 측정하는 예민하고 신뢰성 있는 방법이다⁴⁸⁾. 이 검사 방법은 생존 세포의 미토콘드리아의 탈수소 효소(dehydro-

genase)가 노란색의 MTT를 물에 녹지 않는 진한 녹색의 formazan결정으로 전환시키는 능력을 측정하며 이때 생성된 formazan의 양은 세포의 수에 비례하며 이러한 결과는 세포의 DNA합성능을 측정하는 [³H]-thymidine uptake의 결과와 일치하는 것으로 알려져 있다^{49,50)}.

Lactate dehydrogenase는 lysosome의 효소중의 하나로서 LDH의 수준은 NAD⁺의 감소에서 기인하는 흡광도의 증가로 측정하게 된다⁵¹⁾. LDH의 방출이 세포막의 파괴를 나타내는 것으로 인정되고 있으나 lysosome 효소의 방출은 좀 더 복잡하여 직접적인 세포독성 반응이 나타나 lysosome과 세포질내 효소가 모두 방출되거나 일부 입자형 물질은 lysosome의 세포막을 파괴할 수도 있고 또는 LDH의 방출이 없는 상태에서 일부 화합물에 의한 선택적인 자극에서 기인할 수도 있어서 복잡한 반응 기전을 갖는 것으로 알려져 있다⁵²⁾.

Aluminum과 zirconium화합물이 육아종을 유발하는 능력에 관한 연구에서 대식세포와 섬유아세포를 이용하여 연구하여 LDH의 방출은 대식세포에서보다 섬유아세포에서 훨씬 느리고 방출량도 적었으며 섬유아세포를 이용하여 얻은 결과는 일정하지 않게 나타났다⁵³⁾. Meryon은 zin oxide eugenol, 복합레진과 글라스 아이오노머 시멘트에 대한 3가지의 독립된 연구 결과를 종합하여 LDH를 이용한 검사에서는 ZOE를 제외하면 LDH의 방출은 나머지 재료에서 유의하게 증가하지 않음을 보였다. 이의 이유에 대하여는 검사에 사용한 세포에서 방출된 효소를 흡수하는 것으로 설명하였으며 따라서 이러한 검사방법을 세포 손상의 척도를 이용하는 경우에서 대식세포가 섬유아세포보다 적합함을 암시하였다⁵⁴⁻⁵⁶⁾. 또한 Meryon에 의하면 lysosome효소를 이용한 독성 검사 방법은 여러 결점을 갖고 있다고 하였다⁵⁷⁾. 이러한 결점으로서 효소 변화의 해석이 어려워 독성을 전반적으로 평가하는 방법으로는 복잡하며 효소의 수치가 배양마다 다를 수도 있으며 lysosome의 여러 효소 중 어떤 것을 선택해야 하는지에 대해서도 어려움이 있다고 하였다. 효

소를 이용한 측정법은 여러가지 인자에 의하여 영향을 받는데 특히 검사방법에서 사용하여야 하는 최적 pH에서 벗어나면 검사 결과는 영향을 받는다. Lactate dehydrogenase를 이용한 독성 검사에서 추출물 중 eugenol에 의하여 이 효소는 영향을 받을 수 있다⁵⁸⁾.

Leirskar등에 의하면 여러 치과용 시멘트의 세포독성은 불소, zinc와 pH의 변화로 알려져 있다⁵⁹⁾. Eugenol은 ZOE에서 가수분해에 의하여 방출되며 tritium으로 표지된 eugenol을 이용하여 eugenol의 방출에 관하여 연구된 바 있다^{60, 61)}. ZOE시편을 식염수에 넣으면 ZOE로부터 즉시 eugenol의 방출이 일어나며^{62, 63)} 이러한 eugenol의 방출은 처음 수초 동안에 급속히 일어나며 이후에는 감소되는 것으로 나타났다. 표면적이 동일한 경우에는 ZOE의 두께는 eugenol의 초기 방출에 영향을 미치지 않아서 이러한 eugenol의 방출은 시편 전체에서 일어난다기 보다는 표면에서 일어나는 것으로 생각되고 있다. ZOE를 혼합하는 비율은 물에 eugenol이 방출되는 양에 영향을 미치지 않는데 이것은 ZOE의 표면 중 제한된 작은 부위만을 eugenolate가 차지하고 있기 때문이다. 따라서 임상적으로 물에 혼합하여도 eugenol을 아주 소량 넣은 혼합에 비하여 약간 eugenol의 방출이 증가할 뿐이다⁶⁴⁾. 세포독성 실험에서와 같이 ZOE를 수분이 많은 환경에 두게되면 실제 치아내에서보다 eugenol의 방출은 과다하게 되므로 세포에 대한 독성은 강하게 나타난다⁶⁵⁾.

Radiochromium 방출 방법을 이용하여 고휘역충전제에 대한 L929세포의 독성을 관찰한 결과 Fuji II가 4가지 시간대 군에서 가장 독성이 적은 것으로 나타났다. Bestalloy 즉시군과 7일군이 다음 순위로 약한 독성을 보였고 기타 재료의 모든 군에서는 독성의 우선 순위가 나타나지 않았다. 3T3세포에 대하여는 L929세포와 같은 결과를 얻었는데 Fuji II가 가장 낮은 세포 독성을 보였고 기타 5가지 재료에서는 독성의 순위가 나타나지 않았다. KB세포에 대해서도 역시 Fuji II가 가장 낮은 세포 독성을 보였으며 Clearfil FII는 가장 강한 독성을 보였고 IRM도 4가지군 모두 독성이 높게 유지

되었다. 즉 L929, 3T3 및 KB세포에 대하여 Fuji II는 항상 가장 낮은 세포 독성을 보였으며 L929세포와 3T3세포는 유사한 반응을 보였으나 KB세포의 독성 반응은 달라서 KB세포는 L929 및 3T3와는 세포의 감수성이 다르다고 사료되었다.

Radiochromium 방출 방법을 이용하여 역충전제의 추출 용액에 대하여 3가지 세포의 독성을 관찰한 경우에는 모두 대조군에 비하여 유의한 차이가 나타나지 않았다. 이는 역충전제를 추출한 용액의 독성 성분이 아주 미약하여 radiochromium을 이용하여 측정하는 경우 감지될 수 없는 정도의 낮은 독성임을 시사하였다. 발색법 중 MTT를 이용한 경우 아말감과 Clearfil FII는 사용한 3가지 세포에 대하여 모두 독성을 나타내지 않았다. IRM은 L929세포와 3T3세포에서는 각각 강한 세포 독성을 나타내었으나 KB세포에 대하여는 중등도의 독성을 보였다. 또한 NR측정법을 이용한 경우 L929세포와 KB세포에서는 아말감과 Clearfil이 모두 독성을 보이지 않았다. L929세포를 대상으로 MTT와 NR측정법의 결과를 비교하면 NR측정법에서 Prisma APH가 즉시군에서 시간이 경과함에 따라 독성이 감소되지 않는 점을 제외하면 기타 5가지 역충전제에서 일치되는 세포 독성 효과를 관찰할 수 있어서 L929세포는 MTT나 NR등 측정 방법에 따른 차이는 적은 것으로 나타났다. 3T3세포에 대하여 MTT와 NR방법을 비교하면 Clearfil FII가 MTT법에서는 독성을 보이지 않는 반면 3T3세포에서는 흡광도가 대조군에 비하여 유의하게 낮은 군도 있다는 점을 제외하면 기타 5가지 역충전제에서 일치되는 세포 독성 효과를 관찰하였다. 3T3세포 역시 MTT나 NR의 방법에 따른 차이는 적었다. KB세포에 대해서 MTT와 NR의 방법을 비교하면 Fuji II LC가 MTT법에서는 세포 독성이 유의하게 인정된 반면 NR방법에서는 각 군에서 세포 독성이 나타나지 않은 점을 제외하면 기타 5가지 역충전제에서 세포독성 효과가 일치됨을 보였다. 따라서 발색법을 이용한 경우에서 일정한 세포에 대해서는 MTT나 NR측정 방법에 따른 차이는 비교적 적은 반면

NR이나 MTT방법을 이용할 경우 세포에 따른 결과는 차이가 좀 더 많아서 측정방법의 차이 보다는 세포의 감수성 자체에 차이가 있는 것으로 사료되었다. 또한 L929, 3T3 및 KB세포를 비교하면 L929와 3T3의 세포 독성 효과는 유사한 반면 KB세포에 대한 반응은 이들 2가지 세포와는 달랐다.

LDH를 측정하는 방법으로 고형 역충전재가 L929세포에 대하여 나타내는 독성은 Fuji II와 IRM이 가장 낮았으며 기타 재료는 모두 대조군에 비하여 유의하게 세포 독성이 인정되었고 Clearfil FII의 LDH의 수치가 가장 높아 이 재료의 세포 독성이 가장 강하였다. 3T3세포에 대하여는 역시 Fuji II와 IRM은 독성이 나타나지 않았고, Prisma APH와 Clearfil FII는 LDH의 값이 높아서 독성이 강하였다. KB세포에 대해서도 역시 Fuji II와 IRM은 독성이 나타나지 않았고 Clearfil FII의 LDH수치가 가장 높아서 독성이 가장 강함을 보였다. 즉 3가지 세포 모두에서 Fuji II와 IRM은 독성을 보이지 않았으며, Clearfil FII는 독성을 강하게 나타내어 고형 역충전재의 LDH를 측정하는 방법에서는 세포 독성의 결과가 일치하여 세포의 감수성이나 예민도의 차이가 인정되지 않았다.

LDH를 측정하는 방법으로 역충전재의 추출 용액이 L929세포에 대하여 나타내는 효과는 Clearfil FII, Fuji II 및 Fuji II LC는 독성이 없었고 Bestalloy는 미약한 독성을 보인 반면 IRM은 가장 강한 세포 독성을 나타내었다. 3T3 세포를 대상으로 한 경우에는 Bestalloy와 Clearfil FII는 4가지 시간대 군 모두에서 세포 독성이 나타나지 않은 반면 Prisma APH와 IRM은 4가지 시간대군 모두에서 강한 세포독성을 보였다. 또한 KB세포를 대상으로 한 경우에는 실험군 모두가 대조군에 비하여 유의한 세포 독성 효과의 차이가 나타나지 않았다. 즉 L929 세포와 3T3세포에 대해서는 IRM이 공통적으로 강한 세포 독성을 보인 점만이 일치하였고 기타의 역충전재에 대해서는 상이한 소견을 보였으며 KB세포는 LDH 측정방법은 각 재료가 나타내는 독성을 민감하게 변별하지 못하였다. 추출용액에서 LDH의 수치를 측정하는 방법에

대해서는 3가지 세포 모두 감수성의 차이가 있었으며, 특히 KB세포는 독성 물질에 대한 반응성이 다른 2가지 세포와는 상당한 차이가 있음을 시사하였다.

본 실험에서 고형 역충전재를 대상으로 세포 독성을 측정한 것은 radiochromium 방출 방법과 LDH의 측정 방법이었다. Radiochromium의 방출을 측정한 방법에서는 3가지 세포주 모두에서 Fuji II만이 세포 독성이 가장 미약하게 나타난 반면, LDH의 측정 방법에서 Fuji II와 IRM이 가장 미약한 세포 독성을 보였다. 즉 Fuji II는 두 가지 측정 방법 모두에서 세포 독성이 다른 재료에 비하여 미약하게 나타나는 공통된 결과를 보였다. 기타 다른 재료들에 대한 측정 결과는 부분적으로 일치하기도 하고 상반된 결과를 나타내기도 하였으나 현저히 세포 독성을 강하게 보인 재료는 2가지 방법 모두에서 없었다. 또한 역충전재의 추출용액을 대상으로 세포 독성을 측정한 것은 발색법인 MTT와 NR 방법 및 radiochromium 방출 방법과 LDH의 측정 방법이었다. MTT와 NR을 이용한 방법에서는 KB세포를 대상으로 한 MTT측정 방법을 제외하면 Fuji II 즉시군과 IRM의 4가지 시간군 모두가 3종의 세포를 대상으로 한 다른 시간군 모두가 3종의 실험군 전체에서 가장 강한 세포 독성을 보였다. 한편 radiochromium 방출 방법에서는 실험군 모두가 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않았다. LDH를 이용한 방법에서는 IRM은 L929세포와 3T3세포에서는 대조군에 비하여 세포 독성이 유의하게 강하였으나 KB세포에서는 유의한 차이가 나타나지 않았다.

발색법을 사용한 실험에서 글라스아이오노머 시멘트는 화학중합형인 Fuji II의 경우 3가지 세포주 모두에서 혼합 즉시군에서만 독성이 강하게 나타났는데 96-well plate에 실험 용액을 첨가하면 즉시 well의 용액이 노란색으로 변함을 관찰할 수 있어서 독성은 산성 pH가 원인일 것으로 사료되었다. 최근 개발된 광중합형인 Fuji II LC는 혼합하고 광중합하면 종래의 화학중합형에 비하여 경화반응을 촉진할 수 있어서 본 실험에서 나타난 바와 같이 혼합즉시군에

서도 세포독성이 화학중합형에 비하여 개선됨을 관찰하였다. IRM은 L929와 3T3세포에 대해서는 모든 실험군에서 상대흡광도가 낮아서 ZOE제제가 세포독성 실험에서 나타내는 전형적인 소견을 관찰할 수 있었으나 KB세포를 대상으로 한 경우는 30분 경과 이후부터는 세포의 생존능이 회복되어 다른 양상을 나타내었다. 이와 같은 결과를 비교해보면 Fuji II와 IRM을 고형상태로 준비한 경우 세포독성이 미약하였으나 추출 용액을 사용하여 실험한 경우는 세포 독성이 가장 강하게 나타나는 등 재료를 준비하는 방법에 따라서도 상반되는 결과를 얻을 수 있었다.

L929세포와 KB세포는 암세포 기원의 세포로서 이베엽 세포주인 3T3와는 다른 세포 독성의 결과가 나타난 경우도 있었다. 3T3세포의 형태는 구강섬유모세포의 형태와 유사하여 성장속도도 L929나 KB세포와는 달랐다. 또한 KB세포는 세포의 분열과 성장하는 형태가 L929와 3T3와는 달리 각 세포간의 경계가 다소 불명확하고 세포가 응집되어 자라는 듯한 양상으로 분주 후 성장 초기에는 배양 용기에서 세포가 밀집된 부위와 밀도가 낮은 부위의 차이가 뚜렷하게 보였다. 세포독성의 차이는 세포의 성장방식이 다른 KB에서 3T3 및 L929세포와는 상이한 결과가 보였다. 따라서 이러한 차이가 본 실험에서 사용한 각 실험 방법에서 KB세포가 L929 및 3T3세포와 다른 결과를 보이는 이유 중의 하나로 지적될 수 있었다.

Radiochromium 방출을 측정하는 방법은 세포막의 손상과 연관된다. 본 실험에서 고형상태의 역충전재를 준비한 방법은 임상에서 역충전재가 치근단 조직과 직접 접촉한다는 점을 고려한 방법이며, 추출 용액을 사용한 근거는 역충전재가 치근단 조직과 접촉해도 재료가 조직액에 의하여 용출되는 성분이 조직에 영향을 미칠 것으로 기대하기 때문이다. 용액으로 물이 아닌 배양 배지를 사용한 것은 세포의 성장에 영향을 주지 않는 용매를 선택하기 위한 것이나 실제 배양 배지에 대하여 각 독성 성분의 용해성이 유사한지에 관하여는 추후 연구가 필요하다고 사료된다. 이러한 관

점에서 보면 고형 역충전재의 경우는 준비한 재료와 세포의 비율이 실제 임상과 비교시 적절하지 않다고 볼 수 있으며, 추출 용액을 사용한 경우는 용매가 부적절하고 용출하여 실험하는 자체에도 의문이 제기될 수 있다. 또한 동일한 추출 용액을 사용하였어도 radiochromium 방출 방법에는 전 군이 대조군과 유의한 차이를 나타내지 않았거나 LDH나 발색법에서는 재료간 유의차가 나타나는 것으로 보아 3T3나 발색법이 radiochromium법보다는 각 재료의 세포 독성을 지시하는데 더욱 유용한 방법임을 보였다.

MTT방법은 세포의 독성 측정 방법 중 생존능을 관찰하는 방법이므로 세포가 상당히 손상을 받은 이후에 나타나는 반응을 측정하므로 각 세포에 따른 예민도의 차이를 정확히 반영하는 방법으로 적절하지 않을 수도 있다. 또한 본 실험에서는 각 충전재료를 세포배양액에 추출한 것이므로 추출한 용액 속의 성분이 독성을 지닌 성분이 추출되었는지에 의해서도 상대 흡광도의 수치가 영향을 받을 수 있음을 고려해야 할 것이다. 추후 이들 추출용액의 pH측정이나 추출용액 중의 산물분석을 부가적으로 시행해야 할 필요가 있다고 사료된다.

세포 독성을 측정하는 방법 중 최근 국내에서 가장 많이 사용되는 방법 중의 하나인 MTT를 이용하는 방법은 간단하고 신속한 장점을 가지고 있으나, 본 연구에서 나타난 바와 같이 치과재료와 같은 고형 재료를 사용하는 경우에는 용액 상태로 추출하는 방법을 어떻게 선택하느냐에 따라 다른 측정법과 정반대의 결과가 나올 수도 있다는 점을 주목하여야 할 것이다. 이는 발색법 자체가 색 변화에 기반을 두고 있는 만큼 치과용 재료와 같은 대부분의 유색재에서 재료 자체의 색이 실험 결과에 큰 영향을 미치는 변수가 될 수 있을 뿐만 아니라 추출하는 방법이 적절치 않은 실험 방법이 될 수도 있다는 점이다. Radiochromium과 LDH를 이용한 방법은 고형 재료나 액체 상태의 재료를 모두 검사할 수 있는 장점이 있으나 본 실험에서 나타난 바와 같이 이들은 시편을 준비하는 방법에 의하여 영향을 받음을 보였다. 이상을

고려하면 세포 배양을 비유한 독성 검사 방법을 선택하고자 할 때는 사용하는 세포가 가능하면 그 재료가 사용되는 부위의 세포와 동일하거나, 적어도 유사한 것이 유리하다고 사료된다. 또한 세포막의 손상 정도를 척도로 사용하는 방법이나 세포내 활성과 연관된 효소 측정법 및 세포 소기관의 생활능을 측정하는 방법에 따라 상이한 결과를 얻을 수 있으므로 단일 세포에 대한 가지 실험 방법으로 검사하고자 하는 재료의 세포 독성의 정도를 정확히 측정하는 것은 불가능한 것으로 사료된다. 그러나 세포 독성 검사가 새로운 재료를 개발하는 과정에서 이의 인체에 대한 안정성을 평가하는 비교적 초기 단계의 실험으로서 수용되고 있으므로 그 재료의 독성의 윤곽을 파악하는 여전히 중요한 부분이 된다는 점에서 세포와 검사 방법의 선택시 신중을 기하여야 하는 것으로 사료되었다.

V. 결 론

생체재료의 독성 평가시 가장 많이 사용되는 L929 세포에 대한 ^{51}Cr 방출량의 측정방법 이외에 세포내 효소 측정법인 LDH 방법과 발색법인 NR 및 MTT방법을 이용하여 영구 세포주인 L929 및 3T3와 KB등 3종의 세포를 사용하여 역충전제의 세포 독성을 검사하였다. 역충전제로는 Bestalloy, Prisma APH, Clearfil FII, Fuji Fuji II LC와 IRM 등 6종을 사용하여 고형 역충전제 및 고형 역충전제의 추출 용액의 세포 독성을 검사하였다. 사용한 세포주의 종류, 실험 방법 및 시편의 준비 방법등이 독성 효과에 미치는 영향을 연구하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

고형 상태의 Fuji II는 radiochromium 방출 방법을 이용한 경우 3가지 세포주 모두에 대하여 세포 독성이 가장 미약하였다. 재료를 추출한 용액을 대상으로 한 경우에서 radiochromium 방출 방법은 전 실험군에서 대조군과 유의한 차이가 나타나지 않았다. 발색법인 NR과 MTT방법에서 3종의 세포주에 대하여 Fuji II 즉시군과 IRM은 가장 강한 세포 독성을 보였

다. NR과 MTT방법을 비교하면 측정 방법에 따른 차이보다는 대상으로 한 세포에 따른 역충전제의 세포 독성이 관찰되었다. 고형 재료에 대하여 LDH를 측정하는 방법에서 Fuji II와 IRM이 3종의 세포주에 대하여 모두 독성이 가장 미약한 반면 추출 용액에 대하여 LDH를 측정하는 방법에서는 세포주에 따라 독성 효과의 발현에 차이가 있었다. 광중합 glass ionomer cement는 중등도나 미약한 세포 독성을 나타내었다.

세포 독성 효과는 시편을 준비하는 방법에 따라 차이가 있었으며 세포의 감수성이 실험 방법에 따라 일치하는 경우도 있었으며 차이가 나타나기도 하였다. 또한 radiochromium 방법과 발색법 및 효소 측정법인 LDH방법 등 실험 방법에 따른 차이가 현저한 재료도 있으므로 단일 세포주에 대한 한 가지 실험 방법이 세포 독성을 정확히 반영할 수 없음을 시사하였다.

참고문헌

1. Browne RM and Tyas MJ : Biological testing of dental restorative materials in vitro. J Oral Rehab 6 : 36-9, 1979.
2. Tyas MJ : A method for the in vitro toxicity testing of dental restorative materials. J Dent Res 56 : 1285-9, 1977.
3. Keresztesi K and Kellner G : The biologic effect of root filling materials. Int Dent J 16 : 222-231, 1966.
4. Leiskar J and Hegeland 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.
5. Autian J : The use of rabbit implants and tissue culture tests for the evaluation of dental materials. Int Dent J 20 : 481-90, 1970.
6. Borenfreund E and Puerner JA : A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. J Tissue

- Culture Method 9 : 7-9, 1983.
7. Cook JA and Mitchell JB : Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 179-1-7, 1989.
 8. Spangberg L and Langeland K : Biologic effects of dental materials. 1. Toxicity of root canal filling materials on HeLa cells in vitro. *Oral Surg* 5 : 402-14, 1973.
 9. Tyas MJ : The effect of silicate cement on the mitochondria and lysosomes of cultured cells assessed by quantitative enzyme histochemistry. *J Oral Rehab* 6 : 55-60, 1979.
 10. Bunting WL, Kiely JH and Owen CA : Radiochromium-labelled lymphocytes in the rat. *Proceedings of the Society for Experimental Biology*. 113 : 370-, 1963.
 11. Holm G and Perlmann P : Quantitative studies on phyohaemagglutinin-induced cytotoxicity by human lymphocytes against homologous cells in tissue cultures. *Immunology* 12 : 525-36, 1967.
 12. Acosta D and Wenzel DG : A permeability test for the study of mitochondrial injury in vitro cultured heart muscle and endothelioid cells. *Histochem J* 7 : 45-8 1975.
 13. Reed B and Wenzel DG : The lysosomal permeability test modified for toxicity testing with cultured heart endothelioid cells. *Histochem J* 7 : 115-8, 1975.
 14. Carbini RL, Fasch ACC and Itoliz ME : A quantitative microspectrophotometric study of the lead precipitation reaction for the histochemical demonstration of acid phosphatase. *Histochem J* 7 : 419-51, 1975.
 15. Wennber A : Cell culture in the biological evaluation of dental materials : A review. *ATLA* 13 : 19-202, 1986.
 16. Hensten-Pettersen A and Hegeland K : Sensitivity of different human cell lines in the biologic evaluation of dental resin-based restorative materials. *Scand J Dent Res* 89 : 102-7, 1981.
 17. Meryon SD : The importance of surface area in the cytotoxicity of zinc phosphate and silicate cements in vitro. *Biomat* 4 : 39-43, 1983.
 18. Wennberg A, Mjor A and Hensten-Pettersen A : Biological evaluation of dental restorative materials- a comparison of different test methods. *J Biomed Mat Res* 17 : 23-36.
 19. Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA, Garvin PJ and Wallin RF : Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. I. Comparative test system sensitivity. *J Biomed Mat Res* 17 : 571-86, 1983.
 20. Johnson HJ, Northup SJ, Seagraves PA : Biocompatibility test procedures for materials evaluation in vitro. II. Objective methods of toxicity assessment. *J Biomed Mat Res* 19 : 498-508, 1985.
 21. Feigal RJ, Yesilsoy C, Messer HH and Nelson J : Differential sensitivity of normal human pulp and transformed mouse fibroblasts to cytotoxic challenge. *Arch Oral Biol* 30 : 609-13, 1985.
 22. Torabinejad M, Hong CU, Pitt Ford TR and Kettering JD : Cytotoxicity of four root end filling materials. *J Endod* 21 : 489-92, 1995.
 23. Liggett WR, Brady JM, Tasknis PJ and del Rio C : Light microscopy, scanning electron microscopy, and microprobe analysis of bone response to zinc and non-zinc amalgam implants. *Oral Surg* 49 : 254-62, 1980.
 24. Marcotte CR, Dowson J and Rowe NH : Apical healing with retrofilling materials amalgam and gutta-percha. *J Endod* 1 : 63-5, 1975.
 25. Austen BP, Keating KM, Hohenfeldt PR and Gerstein H : Osseous reactions to bi-

- metallic couples composed of amalgams and gold implanted in rat tibias. *Oral Surg* 54 : 79–92, 1982.
26. McDonald NJ and Dumsha TC : An evaluation of the retrograde apical seal using dentine bonding materials. *Int Endod J* 23 : 153–62, 1990.
 27. Bruce GR, McDonald NJ and Sydiskis RJ : Cytotoxicity of retrofill materials. *J Endod* 19 : 288–92, 1993.
 28. Milleding E : Cytotoxicity of corroded and non corroded dental amalgams. *Scand J Dent Res* 93 : 76–83, 1985.
 29. Torabinejad M, Higa RK and Pitt Ford TR : Dye leakage of four root end filling materials : effect of blood contamination. *J Endod* 20 : 159–63, 1994.
 30. Torabinejad M, Wilder Smith P, Kettering JD and Pitt Ford TR : Comparative investigation of marginal adaptation of mineral trioxide aggregate and other commonly used root-end filling materials. *J Endod* 21 : 295–9, 1995.
 31. Hensten-Petersen A : Comparison of the methods available for assessing cytotoxicity. *Int Endod J* 21 : 89–99, 1988.
 32. Ruyter IE : Release of formaldehyde from denture base polymers. *Acta Odontol Scand* 38 : 17–27, 1980.
 33. Spangberg L : Kinetic and quantitative evaluation of material cytotoxicity in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 35 : 389–401, 1973.
 34. Wennberg A, Hasselgren G and Tronstad L : A method for toxicity screening of biomaterials using cells cultured on millipore filters. *J Biomed Mat Res* 13 : 109–20, 1979.
 35. Mjor IA, Hensten-Petersen A and Skogedal O : Biologic evaluation of filling materials. A comparison of results using cell culture techniques, implantation tests and pulpal studies. *Int Dent J* 27 : 124–9, 1977.
 36. Sanderson AR : Applications of isoimmune cytotoxicity using radiolabelled target cells. *Nature* 204 : 250–3, 1964.
 37. Wigzell H : Quantitative titrations of mouse H-2 antibodies using ⁵¹Cr-labelled target cells. *Transplantation* 3 : 423–31, 1965.
 38. Holm G and Perlmann : Quantitative studies on phytohaemagglutinin-induced cytotoxicity by human lymphocytes against homologous cells in tissue culture. *Immunology* 12 : 525–36, 1967.
 39. Borenfreund E and Puerner JA : A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays. *J Tissue Culture Method* 9 : 7–9, 1983.
 40. Cook JA and Mitchell JB : Viability measurements in mammalian cell systems. *Anal Biochem* 179 : 1–7, 1989.
 41. Kueng W, Silber E and Eppenberger U : Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal Biochem* 182 : 16–19, 1989.
 42. Scragg M and Ferreira L : Evaluation of differential staining procedures for quantification of fibroblasts cultured in 96-well plates. *Anal Biochem* 198 : 80–5, 1991.
 43. Finter NB : Dye uptake methods for measuring viral cytopathogenicity and their application to interferon assays. *J Gen Virol* 5 : 419–27, 1969.
 44. Babich H and Borenfreund E : Structure-activity relationship (SAR) models established in vitro with the neutral red cytotoxicity assay. *Toxicology In vitro* 1 : 3–9, 1987.
 45. Babich H and Borenfreund E : Application of the neutral red cytotoxicity assay to in vitro toxicology. *Alter Lab Animal* 18 : 129–44, 1990.

46. Bulychev A, Troyet A and Tulkens P : Uptake and intracellular distribution of neutral red in cultured fibroblasts. *Exp Cell Res* 115 : 343-55, 1978.
47. Borenfreund E and Borrero B : In vitro cytotoxicity assays : Potential alternatives to Draize ocular irritancy test. *Cell Bio Toxi* 1 : 55-65, 1984.
48. Mosmann T : Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays *J Immun Meth* 65 : 55-63, 1983.
49. Gerlier D and Thomasset N : Use of MTT colorimetric assay for measuring both colony size and cytolytic activity of limiting dilution microcultures. *J Immun Meth* 107 : 111-7, 1988.
51. Page RC, Davis P and Allison AC : Effects of dental plaque on the production and release of lysosomal hydrolases by macrophages in culture. *Arch Oral Biol* 18 : 1481-95, 1973.
52. Goldstein IM : Lysosomal hydrolases and inflammation : Mechanisms of enzyme release from polymorphonuclear leukocytes. *J Endod* 3 : 392-33, 1977.
53. Badenoch-Jones P, Turk JL and Parker D : The effects of some aluminum and zirconium compounds on guinea-pig peritoneal macrophages and skin fibroblasts in culture. *J Pathol* 124 : 51-61, 1978.
54. Meryon SD and Riches DWH : A comparison of the in vitro cytotoxicity of four restorative materials assessed by changes in enzyme levels in two cell types. *J Biomed Mat Res* 16 : 519-28, 1982.
55. Meryon SD, Stephnes PG and Browne RM : A comparison of the in vitro cytotoxicity of two glass ionomer cements. *J Dent Res* 62 : 769-73, 1983.
56. Meryon SD and Browne RM : In vitro cytotoxicity of a glass ionomer cement of a new generation. *Cell Biochem Func* 2 : 43-8, 1984.
57. Meryon SD : Quantitative enzyme spectroscopy in the assessment of cell damage in vitro. *Int Endod J* 21 : 113-9, 1988.
58. Hensten-Pettersen A and Hegeland K : Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand J Dent Res* 85 : 291-6, 1977.
59. Leisskar J and Hegeland K : Toxicity of some dental cements in a cell culture system. *Scand J Dent Res* 85 : 471-9, 1977.
60. Becker RM, Hume WR and Wolinsky LE : Release of eugenol from mixtures of ZOE in vitro. *J Pedodon* 8 : 71-7, 1983.
61. Hume WR : An analysis of the release and diffusion through dentin of eugenol from zinc oxide-eugenol mixtures. *J Dent Res* 63 : 881-4, 1984.
62. Wilson AD and Batchelor RF : Zinc oxide-eugenol cements. II. Study of erosion and disintegration. *J Dent Res* 49 : 593-8, 1970.
63. Becker RM, Hume WR and Wolinsky LE : Release of eugenol from mixtures of zinc oxide and eugenol in vitro. *J Pedod* 8 : 71-7, 1983.
64. Hume WR : In vitro studies on the local pharmacodynamics, pharmacology and toxicology of eugenol and zinc oxide-eugenol. *Int Endod J* 21 : 130-4, 1988.
65. Hensten-Pettersen A and Hegeland K : Evaluation of biologic effects of dental materials using four different cell culture techniques. *Scand J Dent Res* 85 : 291-6, 1977.