

근관치료전과 후의 치근단 병소에서 임파구의 분포에 관한 면역조직화학적 연구

서울대학교 치과대학 보존학교실

오 태 석 · 임 성 삼

— 목 차 —

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

I. 서 론

일반적으로 치근단 병소의 발생은 감염된 근관으로부터 세균이나, 변형된 치수조직이 근첨공을 통하여 치근단 조직에 잠재성 항원(potential antigen)으로 작용하여 야기된 면역반응이 관여하는 것으로 알려져있다.¹⁻⁴⁾

임파구가 관여하는 면역반응은 두가지 형태로 구분되는데, 하나는 항체형성세포(antibody forming cell)의 전구물질인 B임파구가 관여하는 체액성 면역반응(humoral immune response)이고, 또 다른 하나는 T임파구와 그 분비물질인 lymphokine이 작용하는 세포성 면역반응(cell-mediated immune response)이다. 그러나 T임파구가 B임파구의 작용을 돕는 T helper세포와 B임파구의 작용을 억제하는 T suppressor세포로 구분되는 것으로 보아 두가지

형태의 면역반응이 확연히 나누어져 작용하는 것은 아니며, 두가지 형태의 면역반응이 함께 치근단 병소의 병원론에 관여하는 것으로 사료된다.

근래에 많은 학자들이 치근단 병소에서 면역반응을 규명하기 위하여 치근단 병소내의 Immunoglobulin의 존재를 확인하였고, 또한 치근단 병소에서 Immunoglobulin의 생합성 여부를 활발히 연구하였다.⁵⁻¹¹⁾ Naidorf¹²⁾는 Immunoelectrophoresis 및 single radioimmunodiffusion을 사용하여 치근단 병소에서 IgG, IgA 및 IgM을 정량분석하였고, Pulver 등¹³⁾은 면역형광법(immunofluorescence)을 이용하여 정상치수와 염증치수에서 Immunoglobulin 함유세포의 존재를 연구한 결과 염증치수에서만 Immunoglobulin 함유세포를 발견하였고, 또한 치근단 육아종에서도 같은 연구를 한 결과 Immunoglobulin 함유세포가 존재한다고 보고하였으며, Jones 및 Lally 등¹⁴⁾은 치근단 병소내에서 Immunoglobulin의 생합성을 방사선자기법(autoradiography)을 사용하여 조사한 결과 IgG 및 IgA가 합성된다고 밝혔다. 또 Torabinejad 등¹⁵⁾은 Immunoperoxidase 방법을 통하여 치근단 병소에서 IgG, IgE, Kappa chain 및 Rhamda chain이 존재함을 규명하였고, 조¹⁶⁾는 PAP(Peroxidase-Antiperoxidase) 방법을 이용하여 치근단 낭종 및 치근단 육아종에서 IgG, IgA 및 IgM의 분포에 관하여 관찰하였다. 이와같이 Immunoglobulin에 관한 연구는 활발하였으나, 치근단 병소에서 T 임파구에 관한 연구는 T 임파구의 surface receptor의 특이성때문에 확인하기가 어려워 많이 이루어

지지 않았다. 그러나 Köhler 및 Milstein¹⁷⁾(1975)이 양의 적혈구를 항원으로 사용하여 면역시킨 쥐의 췌장으로부터 T임파구를 얻어 이를 쥐의 골수종세포(myeloma cell)와 결합시켜 Monoclonal antibody를 만들어 T임파구의 확인 및 T임파구 subpopulation의 구별을 가능하게 만든 이후, 치근단 병소에서 Monoclonal antibody를 사용하여 세포성 면역반응에 관한 연구가 활발히 진행되었다. Wamke 및 Levy¹⁸⁾은 Avidin-Biotin-horseradish peroxidase¹⁹⁾방법을 이용하여 입파결절, 췌장, B세포성 입파종 및 T세포성 입파종의 동결조직표본을 연구하여 Monoclonal antibody가 효과적으로 T세포와 B세포를 확인할 수 있음을 보고하였고, Cymerman²⁰⁾은 Avidin-Biotin-horseradish peroxidase 방법과 Monoclonal antibody를 이용하여 치근단 병소에서 T임파구의 존재를 확인하였으며, Skaug²¹⁾은 치근단 육아종에서 2-Aminoethylisothiuronium bromide hydrobromide로 처리한 양의 적혈구를 사용하여 T임파구를 관찰하였고, 또한 토끼의 anti-Tlymphocyte항혈청을 이용하여 면역형광염색법으로 T임파구를 관찰하여 치근단 육아종의 병원론에 T임파구가 관여함을 밝혔으며, Torabinejad²²⁾은 Immunoperoxidase방법과 Monoclonal antibody를 사용하여 만성적 치근단 병소에서 B임파구와 T임파구의 분포를 정량적으로 관찰하여 보고하였다.

이상의 치근단 병소의 면역반응에 관한 대부분의 논문들은 감염된 근관을 치료하지 않은 상태에서 Immunoglobulin의 존재와 합성여부 및 T임파구의 존재를 밝히고 있으며, 근관치료를 시행한 치근단 병소의 면역반응에 관한 연구는 없었다.

이에 저자는 치근단 병소의 발생, 확대 및 지속에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있는 면역학적 기전을 이해하는데 도움이 되고서 의과적 적출에 앞서 근관치료를 시행한 치근단 병소와 감염된 근관을 치료하지 않고 적출한 치근단 병소에서 Monoclonal antibody와 three-stage indirect immunoperoxidase방법을 이용하여 입파구의 분포와 상대적 양(relative concentration)을 관찰한 후 그 결과를 비교, 조사하였고 또한 통계적으로 유의성을 관찰한 바 있기에 보고하는 바이다.

II. 연구재료 및 방법

1. 연구재료

실험군으로는 1985년 1월부터, 1985년 8월까지 서울대학교병원 치과진료부 보존과에 내원한 환자로 부터, 먼저 감염된 근관을 치료한 후 일정한 기간을 두고 적출한 16예의 치근단 병소를 선택하였고, 질병대조군으로는 같은 기간동안 구강외과에 내원한 환자로 부터 감염된 근관을 치료하지 않고 적출한 5예의 치근단 병소를 선택하였는데, 이 과정에서 전신질환이 있는 환자들은 연구대상에서 제외하였다. 환자의 연령분포는 11세부터 58세까지로 평균연령은 32.7세였고, 남녀분포는 남자가 12명, 여자가 9명이었다. 연구대상의 임상적 증상과 방사선학적 진단, 성별, 연령 및 발생부위는 표 1과 같다.

2. 연구방법

1) 병리조직학적 관찰

실험군과 질병대조군으로 사용한 21예 치근단 병소조직중 일부는 병리조직학적 진단을 위하여 적출 후 즉시 10% 중성 Formalin에 고정시킨 후 통법의 탈수과정을 거쳐 paraffin포매하여 4~6 μ 의 박절표본을 만든후에 Hematoxylin-Eosin중복염색을 시행하여 광학현미경으로 관찰하였다.

2) 면역조직화학적 관찰

적출한 조직은 즉시 mounting medium을 사용하여 snap-frozen시켜 -70°C에 저장하였고, 면역조직화학적 염색에 사용한 재료는 표 2 및 표 3과 같으며, 염색방법으로는 Falini와 Taylor²³⁾의 방법을 응용한 three-stage indirect immunoperoxidase방법을 사용하였다.

먼저 실험에 사용할 Monoclonal antibody의 단일 특이성을 확인하고, 적절한 희석농도를 결정하기 위하여 정상입파결절의 박절표본을 염색하여 T임파구와 B임파구의 분포를 관찰하였고, 또한 염색강도를 조사하였으며, 조직의 비특이성 염색의 존재유무를 확인하기 위하여 정상입파결절과 치근단 병소 1예의 박절표본을 Monoclonal antibody로 처리하지 않고 염색하였다. 위와 같은 방법으로 시약의 특이성을 확인한 후에 치근단 병소의 동결조직표본을 다음과 같이 염색하였다.

snap-frozen시켜 -70°C에 저장해 놓은 동결조직표본을 cryostat를 사용하여 5 μ 두께로 연속박절하여 Gelatin-coated slide에 올려놓은 후 실온에서 2

Table 1. Number of experimented periapical lesions, their location, clinical symptoms and Tentative diagnosis of involved teeth.

Sample	No.	Age/Sex	Location	Symptoms					Tentative clinical Dx.
				P.	D.	S.	F.	Pus.	
untreated group	1	52/F	<u>3-1</u>	-	-	+	+	-	Peria. cyst
	2	39/M	<u>2</u>	-	+	+	-	-	Peria. granuloma
	3	51/F	<u>3,4</u>	-	+	+	-	-	Peria. cyst
	4	30/F	<u>1</u>	-	+	+	+	+	Peria. cyst
	5	42/F	<u>1,1,2</u>	-	+	+	-	-	Peria. cyst
treated group	6	26/M	<u>1,1,2</u>	+	-	+	-	-	Peria. cyst
	7	53/M	<u>1,1</u>	+	-	+	-	-	Peria. cyst
	8	23/F	<u>2</u>	-	+	+	-	-	Peria. abscess
	9	52/M	<u>2</u>	-	-	-	+	+	Peria. cyst
	10	17/M	<u>2,1</u>	-	-	+	+	+	Peria. abscess
	11	22/F	<u>1</u>	-	+	+	-	-	Peria. granuloma
	12	26/M	<u>1</u>	+	-	-	+	+	Peria. abscess
	13	22/F	<u>1</u>	-	+	+	+	+	Peria. abscess
	14	22/M	<u>1</u>	-	+	-	+	+	Peria. abscess
	16	58/M	<u>2,1</u>	-	+	+	+	+	Peria. abscess
	16	38/F	<u>2</u>	+	-	+	-	-	Peria. cyst
	17	11/M	<u>1</u>	+	-	+	-	-	Peria. abscess
	18	27/M	<u>1</u>	-	+	-	+	+	Peria. abscess
	19	24/F	<u>5</u>	-	+	+	+	+	Peria. cyst
	20	25/M	<u>2,1</u>	-	+	+	+	+	Peria. cyst
	21	30/M	<u>2</u>	-	+	-	-	-	Peria. abscess

P: pain D: discomfort S: swelling F: fistula Pus: pus discharge Peria: Periapical

Table 2. Monoclonal antibodies and their reactivity (DAKO corp. USA)

Monoclonal antibody	Reactive cell population
1. mouse anti-human B cell (pan-B)	all B cells
2. mouse anti-human T cell (T ₁)	95% normal T cells identical to specificity of anti-Leu1, OKT1
3. mouse anti-human T cell, Suppressor/cytotoxic (T ₈)	human suppressor/cytotoxic T cells identical to specificity of anti-Leu2a, OKT8

~24hrs동안 건조시켰다. 이 박절표본을 4°C Acetone에 10분간 침적시킨 후 잠시 공기중에서 건조시켜 methanol-H₂O₂용액(100% methanol 200ml+30% H₂O₂ 5ml)에 20분간 배양하여 세포내 내인성 peroxidase의 활성을 억제시킨 다음 Tris완충액(pH 7.6)에 5분간 침적시켰다. 다음 단계로 정상돼지 혈청을 첨가하여 20분간 배양함으로써 비특이성 반응을 억제시키고, 이 후에 Tris완충액을 사용하여 1:10으로 희석한 3종류의 Monoclonal antibody를 각각의 표본에 첨가하고 30분간 배양하였으며, 다음 단계로 peroxidase가 결합된 토끼의 쥐에 대한 항체(peroxidase conjugated rabbit anti-mouse Ig.)를 첨가하고 20분간 배양한 후에 peroxidase가 결

Table 3. Composition and role of Universal Immunoperoxidase Kit for stain (K.660 DAKO corp. USA)

1. 3% hydrogen peroxide	inhibition of endogenous peroxidase activity
2. normal swine serum, pH7.6 (prediluted in 0.05M Tris)	inhibition of non-specific stain
3. rabbit Ab. against mouse Ig. pH7.6 (prediluted in 0.05M Tris)	peroxidase labelled link antibody
4. swine Ab. against rabbit Ig. pH7.6 (prediluted in 0.05M Tris)	
5. aminoethylcarbazole	chromogen substrate
6. 0.1M acetate buffer, pH5.2	
7. 0.3% hydrogen peroxide in water	
8. graduated test tube	
9. plastic Pasteur pipettes	
10. filter column	

합된 패지의 토끼에 대한 항체(peroxidase conjugated swine anti-rabbit Ig.)를 첨가하고 20분간 배양하였다. 마지막 단계로 기질인 H₂O₂-aminoethyl carbazole(AEC)을 첨가하여 15분간 배양하였다. 이 과정에서 peroxidase의 촉매작용에 의하여 기질이 산화되어 비수용성인 적갈색의 복합물을 형성하게 된다. 각 단계사이에 조직표본을 Tris완충액에 20분간씩 배양하여 단계 사이에서 유발될 수 있는 비특이성 결합을 제거하였다. 이러한 면역조직화학염색은 실온에서 시행하였고, 특수염색과정이 끝난 후 Mayer's Hematoxylin시약을 사용하여 3분간 대조염색을 시행하였고, Glycerol gelatin을 사용하여 cover glass를 견고히 부착시킨 후 광학현미경으로 관찰하였다.

염색에 양성반응을 보인 B림파구와 T림파구는 전형적 형태의 림파구 주위에 적갈색 고리를 보이는 것으로 확인될 수 있었다. 이러한 양성반응을 보이는 세포의 표본당 평균수는 각각의 표본에서 임의로 정한 6~10개의 High power microfield(×400)에서 관찰된 수를 총계하여 다시 microfield 수로 나누어 결정했다. 양성반응세포의 수를 세는 과정에서 정확성을 높이기 위하여 Stern등⁴⁾이 사용한 방법과 유사하게 Eyepiece square(Olympus, OC-M 20.4m/m Square 10/10×10)를 이용하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 병리조직학적 소견

Hematoxylin-Eosin 중복염색을 시행한 병리조직학적 관찰에서 질병대조군으로 사용한 5예의 치근단 병소는 모두 치근단 낭종으로 진단되었고, 실험군인 16예의 치근단 병소는 10예가 치근단 낭종, 3예가 치근단 육아종, 2예는 치근단 농양으로 진단되었고 나머지 1예는 괴사조직으로 밝혀졌다.

치근단 낭종의 조직학적 소견은 대부분의 예에서 낭종의 내강을 둘러싸고 있는 상피세포층과 상피층 직하부의 결체조직층이 관찰되었으나 각각의 예에서 임파구와 형질세포 등의 만성염증세포의 침윤 정도와 분포에 차이가 컸고, 신생혈관과 육아조직도 다르게 관찰되었다.

치근단 육아종의 예에서는 교원질이 분해된 조직 잔사가 관찰되었고, 임파구의 침윤 정도는 조직에 따라 달랐지만 이들은 주로 판상으로 밀집되어 있는 형질세포들 사이에서 관찰되었다.

치근단 농양의 조직학적 관찰에서는 농양발생부위는 주로 파괴된 중성구로 구성되고, 그 주위를 생활력이 있는 중성구와 임파구가 둘러싸고 있음을 볼 수 있었고, 또한 혈관확장과 장애성 삼출액의 흔적을 관찰할 수 있었다.

2. 면역조직화학적 소견

정상임파결절에 Monoclonal antibody를 사용하여

Table 4. Concentrations of B, T and T suppressor cells in Endodontically untreated and treated periapical lesions.

Sample	Histopath. Dx.	Pan T($T_1 \times \frac{100}{95}$)	T8	Pan B
untreated group	1. P. cyst	47.4±1.3*	26.7±1.0	25.4±1.0
	2. P. cyst	28.6±1.2	13.3±0.9	11.7±0.7
	3. P. cyst	91.5±0.8	62.2±1.0	78.3±1.0
	4. P. cyst	32.5±1.4	19.2±0.7	29.3±1.7
	5. P. cyst	148.7±3.6	78.1±1.7	115.4±3.8
treated group	6. P. cyst	29.3±1.4	22.8±0.6	15.7±1.4
	7. P. cyst	49.6±1.8	45.7±1.8	48.3±2.7
	8. P. granuloma	44.2±0.9	29.1±0.7	30.7±0.7
	9. P. granuloma	23.7±1.3	16.8±1.8	12.9±0.8
	10. P. cyst	76.5±3.3	49.1±1.4	60.4±2.7
	11. P. cyst	139.7±2.5	84.1±1.0	57.4±1.6
	12. P. abscess	19.6±1.4	13.0±1.0	38.6±2.4
	13. P. cyst	40.2±1.6	31.7±1.0	34.8±1.2
	14. P. cyst	80.0±2.5	59.1±2.0	40.1±1.8
	15. P. granuloma	52.0±1.6	42.1±2.4	30.0±1.6
	16. P. cyst	58.9±3.6	42.5±3.5	51.6±2.2
	17. P. abscess	32.4±1.7	27.8±1.3	33.9±1.6
	18. P. cyst	34.6±2.0	19.8±0.7	18.6±0.9
	19. P. cyst	20.9±1.4	14.0±0.6	14.7±0.9
	20. P. cyst	15.9±0.7	13.0±0.9	12.2±0.7

* Count=average number of stained cells observed in 6-10 microscopic fields (x400) ±SE.

Table 5. Lymphocyte distribution in 5 untreated and 15 treated periapical lesions.

Lymphocyte positive cell	untreated Mean±SD*	treated Mean±SD	t ^c	p
Pan T	69.7±45.3	47.8±30.9	1.146	>0.05
Pan B	56.0±36.9	33.8±15.3	1.798	>0.05
T8	45.9±35.5	33.6±18.5	0.946	>0.05
PanT/PanB	1.41±0.52	1.42±0.46	-0.039	>0.05
T8/PanT	0.61±0.09	0.72±0.11	-1.936	>0.05

*SD=standard deviation

^ct=actual difference between mean/standard error of difference

p = level of significance

Table 6. Lymphocytes distribution according to the duration after Endodontic treatment

Lymphocyte positive cell	1 day (3)	1 week (5)	1 mon (5)	3 mons. (2)	F ^c	p
	Mean±SD*	Mean±SD	Mean±SD	Mean±SD		
PanT	41.0±8.6	60.0±44.6	51.6±17.4	18.4±2.5	0.913	> 0.05
PanB	31.6±13.3	40.8±17.1	34.8±10.9	13.5±1.3	1.672	> 0.05
T8	32.5±9.7	38.9±25.9	38.3±13.5	13.5±0.5	1.396	> 0.05
PanT/PanB	1.25±0.17	1.44±0.64	1.54±0.41	1.36±0.06	0.212	> 0.05
T8/PanT	0.79±0.11	0.67±0.08	0.74±0.10	0.68±0.15	0.803	> 0.05

*SD=standard deviation

^cF=rate of variance

p = level of significance

Table 7. Relative concentrations of lymphocytes in cysts(10), granulomas (3) and abscesses (2) of treated lesions

Lymphocyte positive cell	cyst	granuloma	abscess	F ^c	p
	Mean±SD*	Mean±SD	Mean±SD		
PanT	54.5±35.0	40.0±11.9	26.0±6.4	0.746	> 0.05
PanB	35.4±17.9	24.5±8.2	36.3±2.4	0.554	> 0.05
T8	38.2±21.4	29.3±10.3	20.4±7.4	0.602	> 0.05
PanT/PanB	1.49±0.42	1.67±0.17	0.74±0.23	3.526	> 0.05
T8/PanT	0.73±0.10	0.73±0.06	0.76±0.10	0.167	> 0.05

*SD=standard deviation

^cF=rate of variance

p = level of significance

염색을 한 표본에서 양성반응을 보이는 많은 B림파구가 germinal center에서 관찰되었고, 양성반응의 T림파구는 paracortical region에 밀집되어 보였으나, Monoclonal antibody를 사용하지 않고 단지 aminoethyl carbazole로만 처리한 치근단 병소와 정상임파결절의 조직표본 모두에서 양성반응의 림파구를 관찰할 수 없었는데 이는 본 실험에 사용된 시약이 단일특이성이 있음을 보여주었다.

실험에 사용된 21예의 치근단 병소중 피사조직으로 진단된 1예는 특수염색도중 실수로 인하여 소실되어 실험대상에서 제외하였다. 나머지 20예의 병리조직학적 소견과 림파구들의 상대적 양은 표 4와 같다. 치근단 낭종과 치근단 육아종으로 진단된 18예에서 T림파구의 수가 B림파구의 수보다 많았

다. 그리고 치근단 농양으로 진단된 2예에서는 B림파구의 수가 T림파구의 수보다 많게 관찰되었다.

15예의 실험군과 5예의 질병대조군에서의 림파구의 분포변화는 표 5와 같으며, 실험군에서 T림파구, B림파구 및 T suppressor세포의 수가 대조군보다 감소된 것으로 나타났고, 또 실험군에서 PanT/PanB와 T8/PanT가 대조군보다 약간 높게 관찰되었으나, t분포를 이용하여 5% 유의수준에서 양측검정(two-tailed test)을 한 결과 통계적으로 유의한 차이는 없었다.

실험군에서 근관치료를 시행한 후 적출할 때까지 일정한 기간-1일, 1주일, 1개월, 3개월-이 경과한 조직별로 림파구의 분포변화를 조사한 결과는 표 6에서 보는 바와 같으며, 이들 결과를 F분

포를 이용하여 5%유의수준에서 분산분석을 하였다. 더니 통계적으로 유의할 만한 차이는 없었다. 또 실험군에서 질환별로 임파구의 분포변화를 조사한 결과는 표 7 과 같았으며 F분포를 사용하여 5%유의수준에서 분산분석을 한 결과 이들 사이에서도 유의할 만한 통계적 차이는 없었다.

IV. 총괄 및 고안

치근단 병소에서는 형질세포, 임파구 및 대식세포 등이 출현하며, 이들 세포는 치아우식증, 치주염을 통한 세균감염뿐 아니라 이종단백이 작용할 때 나타나는 것으로서 치근단 병소의 발생에 면역학적 기전이 관여되는 것으로 사료되었다. Stuart²⁴⁾와 Campbell²⁵⁾ 등은 calcium hydroxide, Z. O. E., RC2B 및 Procosol 등을 사용하여 세포성 및 체액성 면역반응을 연구한 결과 경화상태의 근관치료용 cement 들이 생체에 이종단백으로 작용해 비특이성 자극을 유발한다고 보고하였으며, Block 등²⁶⁻³¹⁾은 근관충전제의 항원성에 관한 일련의 논문을 통하여 N₂-paste, Procosol, Eugenol, Grossman sealer 및 Kerr sealer 등이 치수조직을 변형시켜, 이 변형된 치수조직의 항원성이 치근단 병소를 야기시킬 수 있다고 보고하였다. 과거에는 치근단 병소에 출현하는 세포들이 단순히 염증시의 침윤세포로만 알려졌으나, 많은 학자들의 연구에 의하여 이들 침윤세포가 항체생성과 관련이 있음이 밝혀졌으며, Burnett³²⁾에 의하여 면역학적 적격세포(Immune competent cell-ICC)로 명명되었다.

치근단 병소의 병원론은 완전히 규명되지는 않았지만 근관제로부터 항원의 계속적인 유입이 면역반응을 일으켜 치근단 병소를 형성하는 것으로 알려져 근관치료영역에서 이에 대한 지식과 연구결과가 매우 중요한 관심사의 하나가 되고있다.

Torabinejad 등³³⁾은 항원-항체 복합체와 IgE-mediated reaction이 치근단 조직에 일차적 변화를 야기하고, delayed type hypersensitivity가 치근단 병소의 진행과 지속에 관여하는 것으로 보고하였다. Douglas³⁴⁾에 의하면 이미 감작된(sensitized) 임파구가 항원성 물질과 접촉하면 lymphokine을 생성하고, 이 lymphokine이 염증세포의 행동에 변화를 일으키고, 활성화시키며, 일정부위에 유지시킨다. 또한 lymphotoxin을 생성하여 세포의 파괴를 일으키고

osteoclast activating factor를 분비하여 뼈의 흡수를 야기하는 것으로 보고되었다. 한편 T 임파구는 형질세포가 Immunoglobulin을 생성하는 것을 조절하는데, T helper세포는 B 임파구가 형질세포로 분화하는 것을 자극하고 T 임파구의 전구물질을 자극하여 cytotoxic T 세포가 되도록하며, T suppressor 세포는 형질세포의 항체형성을 억제하고 cytotoxic T 세포의 형성을 방해하여 면역반응을 조절한다. 이렇게 면역반응의 조절에 상호 역작용을 하는 T 임파구의 subpopulation을 분리하는 것은 IgG(Tr)와 IgM(Tμ)에 대한 임파구의 surface receptor의 차이에 의하여 가능하였으며, Moretta³⁴⁾(1977)에 의하여 Tμ세포는 helper 기능을 제공하고 Hayward³⁵⁾(1978)에 의하면 Tr세포는 suppressor 기능을 나타냄이 밝혀졌다. Tμ세포와 Tr세포의 분리는 rosette방법에 의하여 가능하며, Gilhus³⁶⁾의 연구에 따르면 Tμ세포는 hemadsorption방법을 사용하여 확인할 수 있는 것으로 보고되었으나, Beverley 등³⁷⁾에 의하면 rosette를 형성하는 모든 세포가 T 임파구가 아니라는 것이 밝혀져, 이후 많은 학자들의 연구를 통하여 T 임파구의 subpopulation을 분리하는데는 이들에 대하여 단일특이성을 지닌 Monoclonal antibody를 사용하는 것이 좋은 결과를 얻을 수 있음이 밝혀졌다.

Skaug 등²¹⁾은 동결시킨 치근단 육아종 66예에서 T 임파구의 존재를 확인해 본 결과 aminoethyl isothiouonium(AET)로 처리한 양의 적혈구를 지시세포로 사용한 closed chamber hemadsorption 방법에서는 치근단 육아종의 68%에서 AET-E(erythrocyte)의 부착(adherence)을 보였고, 주로 T 임파구의 국소적 침윤을 시사하는 국소적 AET-E 부착양상(focal AET-E adherence pattern)이 대부분이었으며, 가끔 중등도의 산재성 AET-E 부착양상(diffuse, moderate AET-E adherence pattern)이 보였는데 이 경우는 T 임파구가 조직을 횡단하여 재순환하기 때문에 나타난 것이라고 보고하였다. 또한 토끼의 T 임파구에 대한 항혈청을 사용하여 면역형광법도 시행하였는데 그 결과가 hemadsorption 결과와 유사하였다고 보고하였다.

본 연구에서는 Torabinejad 등²²⁾이 사용한 two-stage indirect immunoperoxidase방법에 third link antibody를 첨가하여 한 stage를 더 늘린 three-stage indirect immunoperoxidase방법을 이용하였는데 20예 치근단병소 모두에서 T 임파구의 존재가 확인되어

Skaug등²¹⁾의 보고와 일치되지 않았다. 아마도 이 점은 본 연구에 사용된 방법이 T임파구에 대하여 특이성이 높은 것에 기인한 것 같았으며, 앞으로 T임파구의 연구에 이방법을 많이 활용할 수 있을 것으로 사료되었다. 한편 T임파구의 분포가 많은 예에서 국소적 침윤을 보였고, 간혹 몇 예에서 산재성 침윤을 보였는데 이점은 Skaug등²¹⁾의 보고와 일치된 견해를 보였다.

Cymerman등²⁰⁾은 6예의 치근단 병소에서 T임파구 subpopulation을 조사한 결과 치근단 반흔(periapral scar)으로 진단된 1예를 제외하고 치근단 육아종으로 진단된 나머지 5예에서 T helper/inducer세포와 T cytotoxic/suppressor세포를 확인하였고, 또 T임파구의 수를 정량적으로 조사하지는 않았지만 T helper세포의 수가 Tsuppressor 세포의 수와 비슷한 것으로 사료된다고 보고하였으며, 모든 T임파구가 병소부위에 일정하게 분포되어있지 않고 개개의 집단으로 발견된다고 보고하여 이점은 본 연구의 소견과 일치하였다. 또한 Torabinejad등²²⁾은 13예의 치근단 병소에서 임파구 및 T임파구 subpopulation의 존재를 확인하였고, 또 정량적으로 세포수를 세어 비교하였는데 13예 모두에서 T임파구와 B임파구를 확인하였으며 같은 조직표본에서 평균적으로 T임파구의 수가 B임파구의 수보다 많음이 통계적으로 유의한 차이를 나타냈다고 보고하였으며, 치근단 육아종과 치근단 낭종에서 Thelper세포와 Tsuppressor세포의 수를 비교하였는데 유의성있는 통계적 차이는 없었다고 보고하였다. 또 치근단 육아종에서의 T임파구, B임파구와 T임파구 subpopulation의 평균수와 치근단 낭종에서의 이들의 평균수를 비교하였는데 유의성있는 통계적 차이는 없었다고 보고하였다.

본 연구에서는 20예 치근단 병소에서 B임파구, T임파구 및 Tsuppressor세포의 존재를 확인하였고, 정량적으로 세포수를 세어 비교하였으며 또한 다른 연구와는 달리 치근단 병소에서 근관치료를 하기 전과 근관치료를 시행한 후에 임파구의 분포에서 변화가 있는가를 관찰하였다. 먼저 실험한 모든 예에서 임파구 및 Tsuppressor세포의 존재를 확인하였고, 치근단 낭종과 치근단 육아종으로 진단된 18예에서 T임파구의 평균수가 B임파구의 평균수보다 큰 것으로 나타나 Torabinejad²²⁾의 보고와 일치하였으나 그 차이정도가 본 연구에서는 크지 않았고, 특이하게도 치근단 농양으로 진단된 2예에서

는 B임파구의 평균수가 T임파구의 평균수보다 크게 관찰되었다. 그러나 치근단 농양의 2예는 환자의 임상적 증상과 병리조직학적 소견을 종합하였을 때 다른 만성적 병소와는 달리 급성적 상태를 보였으므로 체액성 면역반응이 우세하여 B임파구와 T임파구의 수에 반전이 이루어지지 않았나 사료된다. 또한 본 연구에서는 감염된 근관으로부터 항원의 지속적인 유입이 치근단 병소의 진행에 영향을 미치는 점에 착안하여, 근관치료를 시행하여 근관계를 완전히 밀폐시키면 항원의 유입이 없어져 치근단 병소의 면역반응이 변화를 일으켜 이것이 임파구의 분포변화로 관찰될 것이라는 관점에서 감염된 근관을 치료한 후 적출한 15예 치근단 병소와 근관치료를 시행하지 않고 적출한 5예의 치근단 병소에서 PanT, PanB 및 Tsuppressor cell의 수를 비교한 결과 근관치료후의 병소에서 이들 임파구의 수가 감소하였으나 통계학적으로 유의성 있는 차이는 없었고, 또한 근관치료를 시행한 15예에서 근관충전후 일정한 관찰기간을 두고 적출한 표본에서 PanT, PanB 및 Tsuppressor cell의 변화를 관찰한 결과 근관치료후 1일, 1주일 및 1개월된 표본에서는 큰변화가 없고, 3개월된 표본에서는 임파구의 수가 크게 감소되었으나 이들 표본사이로 통계적으로 유의성있는 차이는 없었다. 그러나 연구재료의 수가 적었다는 점과 일반적으로 근관치료 후 치근단 조직의 정상적 회복은 치근단 조직의 손상정도에 따라 6개월에서 1년정도 경과해야 이루어지는 것으로 보고되었으나 본 연구에서는 근관치료후 적출할 때까지 관찰한 경과기간이 3개월로 길지 못했다는 점이 결과에 영향을 미쳤다는 것을 배제할 수 없었으며, 또한 한 병소에서도 부위마다 조직병리학적 상태가 다르므로 이 병소를 전체적으로 관찰하였을 때 부위별 미세한 변화를 정확히 관찰하기가 어려워 다른 결과가 나타날 수도 있다고 사료되었다. 그러므로 면역반응의 변화를 좀더 정확히 관찰하기 위해서는 부위별마다 임파구의 변화를 세밀히 살펴보고, 근관치료후 6개월 이상의 관찰기간을 갖는 것이 타당하리라고 사료되었다. 또 근관치료후 적출한 치근단 병소에서 임파구의 분포를 질환별로 비교하였으나 통계적으로 유의성 있는 차이가 없는 것으로 관찰되어 Torabinejad등²²⁾이 근관치료를 시행하지 않고 적출한 치근단 병소중 치근단 육아종과 낭종에서 임파구의 분포에 차이가 없다고 보고한 것과 일치하였다. 마지막으로 본 연

구에 사용된 21예 치근단 병소중 치근단 낭종으로 진단된 예가 15예인 것은 Torabinejad등²²⁾의 연구에서 13예의 치근단 병소중 9예가 치근단 육아종으로 진단된 것과 차이를 보였는데 이는 질병에 대한 조직학적 판단기준의 차이에서 비롯된 것으로 사료되었다.

이상의 연구로써 면역학적 기전이 치근단 병소의 발생, 확대 및 지속에 영향을 미치는 것을 알 수 있으며, 앞으로 치근단 병소의 치유과정에서 면역학적 기전의 변화에 대한 보다 세밀한 연구가 이루어져야 할 것으로 사료되는 바이다.

V. 결 론

감염된 근관을 치료하지 않고 적출한 5예의 치근단 병소와 근관치료를 시행한 후 적출한 15예의 치근단 병소에서 Monoclonal antibody와 three-stage indirect immunoperoxidase방법을 이용하여 B림파구, T림파구 및 T suppressor세포의 분포를 정량적으로 관찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 실험한 모든 예에서 T림파구, B림파구 및 T suppressor세포의 존재를 확인할 수 있었다.
2. 근관치료를 시행한 군과 근관치료를 하지않은 군에서 치근단 낭종과 육아종으로 진단된 18예에서는 T림파구의 평균수가 B림파구의 평균수보다 많았고, 그리고 근관치료를 시행한 군에서 치근단 농양으로 진단된 2예에서는 B림파구의 평균수가 T림파구의 평균수보다 오히려 많았다.
3. 근관치료를 시행한 치근단 병소내의 T림파구, B림파구 및 Tsuppressor세포의 수는 근관치료를 하지않은 치근단 병소내의 이들 림파구의 수보다 약간 감소하였으나, 통계적으로 유의할 만한 차이는 없었다.
4. 실험군에서 질환별 및 근관치료한 후의 시간경과별로 T림파구와 B림파구, 그리고 Tsuppressor와 T림파구의 분포비를 비교하였으나 통계적으로 유의성있는 차이는 없었다.
5. 실험군에서 근관치료를 시행한 후 시간경과에 따른 T림파구, B림파구 및 Tsuppressor의 수를 비교관찰한 결과 3개월 경과시에는 림파구의 수가 현저히 감소되는 경향을 보였으나 이들 간에 유의성있는 통계적 차이는 없었다.

REFERENCES

1. Torabinejad, M. & Bakland, L.K.: Immunopathogenesis of chronic periapical lesions. *Oral Surg.* 46: 685-699, 1978.
2. Nishida, O., Okadu, H., Kawagoe, K., et al.: Investigation of homologous antibodies to an extract of rabbit dental pulp. *Arch. Oral Biol.* 16: 739-749, 1971.
3. Longwill, D.G., Marshall, F.J. & Creamer, H.R.: Reactivity of human lymphocytes to pulp antigens. *J. Endod.* 8: 27-32, 1982.
4. Stabholz, A. & McArthur, W.P.: Cellular immune response of patients with periapical pathosis to necrotic dental pulp antigens determined by release of LIF. *J. Endod.* 4: 282-287, 1978.
5. Pulver, W.H., Taubman, M.A. & Smith, D.J.: Immune components in human dental periapical lesions. *Arch. Oral Biol.* 23: 435-443, 1978.
6. Stern, M.H., Driezen, S., Mackler, B.F. & Levy, B.M.: Antibody-producing cells in human periapical granuloma and cysts. *J. Endod.* 7: 447-452, 1981.
7. Kuntz, D.D., Genco, R.J., Guttuso, J. & Natiella, J.R.: Localization of immunoglobulins and third component of complement in dental periapical lesions. *J. Endod.* 3: 68-73, 1977.
8. Yanagisawa, S.: Pathologic study of periapical lesions I. periapical granuloma: Clinical, histopathologic and immunohistopathologic studies. *J. Oral Path.* 9: 283-300, 1980.

9. Stern, M.H., Dreizen, S., Mackler, B.F., Selbst, A.G. & Levy, B.M.: Quantitative analysis of cellular composition of human periapical granuloma. *J. Endod.* 7: 117-122, 1981.
10. Stern, M.H., Dreizen, S., Mackler, B.F. & Levy, B.M.: Isolation and characterization of inflammatory cells from the human periapical granuloma. *J. Dent Res.* 61: 1408-1412, 1982.
11. Stern, M.H., Mackler, B.F. & Dreizen, S.: A quantitative method for the analysis of human periapical inflammation. *J. Endod.* 7: 70-74, 1981.
12. Naidorf, I.J.: Immunoglobulins in the periapical granuloma; a preliminary report. *J. Endod.* 1: 15-18, 1975.
13. Pulver, W., Taubman, M. & Smith, D.: Immune components in normal and inflamed dental pulp. *Arch. Oral Biol.* 22: 103-111, 1977.
14. Jones, O.J. & Larry, E.T.: Biosynthesis of immunoglobulin isotypes in human periapical lesion. *J. Endod.* 6: 672-677, 1980.
15. Torabinejad, M., Kettering, J.D. & Bakland, L.K.: Localization of IgE immunoglobulin in human dental periapical lesions by the peroxidase-antiperoxidase method. *Arch. Oral Biol.* 26: 677-681, 1981.
16. 조효선: 치근단 병소의 면역병리조직학적 연구. *J. KAOD.* 8 : 19-30, 1982.
17. Köhler, G. & Milstein, C.: Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 256: 495-497, 1975.
18. Wamke, R. & Levy, R.: Detection of T and B cell antigens with hybridoma monoclonal antibodies: a avidin-biotin-horseradish peroxidase method. *J. Histochem Cytochem.* 28: 771-776, 1980.
19. Su-Ming Hsu & Raine, L.: Protein A, Avidin and Biotin in immunohistochemistry. *J. Histochem Cytochem.* 29: 1349-1353, 1981
20. Cymerman, J.J., Cymerman, D.H., Walters J. & Nevins, A.J.: Human T lymphocyte subpopulations in chronic periapical lesions. *J. Endod.* 10: 9-11, 1984.
21. Skaug, N., Johannessen, A.C., Nilsen, R & Marte, R.: In situ characterization of cell infiltrates in human dental periapical granulomas 3. Demonstration of T lymphocytes. *J. Oral Path.* 13: 120-127, 1984.
22. Torabinejad, M. & Kettering, J.D.: Identification and relative concentration of B and T lymphocytes in human chronic periapical lesions. *J. Endod.* 11: 122-125, 1985.
23. Falini, B. & Taylor, C.R.: New developments in immunoperoxidase techniques and their application. *Arch. Path Lab. Med.* 107: 105-117, 1983.
24. Stuart, W.W., Crowley, L.V., Turner, D.W., George, B. & Osetek, E.M.: Humoral response to endodontic cements. *J. Endod.* 5: 214-217, 1979.
25. Campbell, A.D., Gear, R.D., Turner, D.W., Cuningham, C.J. & Bell, W.C.: Cell-mediated response to endodontic cements. *J. Endod.* 4: 147-150, 1978.
26. Block, R.M., Lewis, R.D., Sheats, J.B. & Burke, S.H.: Antibody formation to dog pulp tissue altered by N2-type paste within the root canal. *J. Endod.* 3: 309-315, 1977.
27. Block, R.M., Lewis, R.D., Sheats, J.B. & Burke, S.H.: Antibody formation to dog pulp tissue altered by Grossman's formula sealer via root canal. *Oral Surg.* 47: 179-184, 1979.
28. Block, R.M., Lewis, R.D., Sheats, J.B. & Burke, S.H.: Antibody formation to dog

- pulp tissue altered by Eugenol within the root canal. 4: 53-59, 1978.
29. Block, R.M., Lewis, R.D., Sheats, J.B. & Burke, S.H.: Antibody formation to dog pulp tissue altered by Proco-sol via the root canal. *J. Endod.* 4: 178-183, 1978.
 30. Block, R.M., Lewis, R.D., Sheats, J.B. & Fawley, J.: Cell-mediated immune response to dog pulp tissue altered by Kerr (Rickert's) sealer via the root canal. *J. Endod.* 4: 110-116, 1978.
 31. Block, R.M., Lewis, R.D., Sheats, J.B. & Fawley, J.: Cell-mediated immune response to dog pulp tissue altered by Grossman's formula sealer via the root canal. *Oral Surg.* 47: 372-377, 1979.
 32. Burnett, F.M.: The clonal selective theory of acquired immunity. Cambridge England, Cambridge University process. 1959 cited from Balant, J.A.: *Immunology*, 1971, Sounder Co. Phil.
 33. Douglas, S.D. & Stobo, J.D.: Development and structure of cell in the immune system and cellular interaction in the expression and regulation of immunity. In: Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H., Wells, J.V. *Basic and clinical immunology*. 4th ed. Los Altos, CA: Lange Medical publications, 1982: 74-96.
 34. Moretta, L., Webb, S.R., Grossi, C.E., Lydyard, P.M. & Cooper, M.D.: Functional analysis of two human T cell subpopulations; Help and suppression of B cell responses by T cells bearing receptor for IgM or IgG. *J. Exp Med.* 146: 184-200, 1977.
 35. Hayward, A.R., Layward, L., Lydyard, P.M., Moretta, L., Dagg, M. & Lawton, A.R.: Fc-receptor heterogeneity of human suppressor T Cell. *J. Immunol.* 121: 1-5, 1978.
 36. Gihus, N.E., Frostad, S., Matro, R. & Tonder, O.: The ontogeny of immunological receptors in the thymus. *Acta. Pathol Microbiol Immunol. Scand sect C* 90: 307-314, 1982.
 37. Beverley, P.L. & Callard, R.E.: Distinctive functional characteristics of human T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody. *Eur. J. Immunol.* 11: 329-334, 1981.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON LYMPHOCYTE
DISTRIBUTION IN ENDODONTICALLY TREATED
AND UNTREATED PERIAPICAL LESIONS.

Tae Seok Oh, Sung Sam Lim

Department of Operative Dentistry, Seoul National University.

..... » **Abstract** «

This study was designed to identify lymphocytes and to compare the lymphocyte distribution in endodontically treated periapical lesions with that in endodontically untreated periapical lesions by way of immunohistochemical staining. Twenty-one human dental periapical lesions were obtained, frozen, serially sectioned to 4-5 μ , and stained using the three-stage indirect immunoperoxidase technique and monoclonal antibodies for detecting the presence of B, T lymphocyte and T suppressor cell.

Following results were obtained;

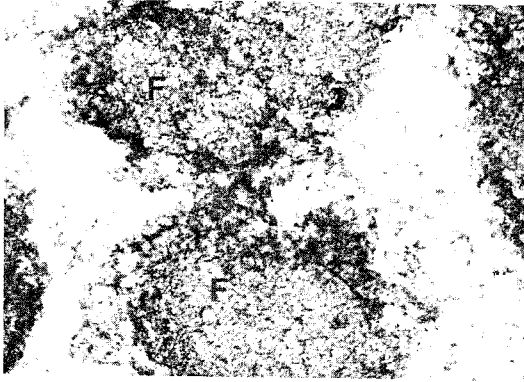
1. All of the examined periapical lesions had positive staining for B, T lymphocyte and T suppressor cell.
2. The concentration of T lymphocytes in 18 lesions diagnosed as periapical cyst and granuloma in both groups was greater than that of B lymphocytes and 2 periapical lesions identified as abscess in treated lesions had more positive B lymphocytes than positive T lymphocytes.
3. The average numbers of T, B lymphocytes and T suppressor cells in Endodontically treated lesions were lower than those of untreated lesions, but no statistically significant difference was noted.
4. When the distribution ratios of T lymphocytes to B lymphocytes and T suppressor cells to T lymphocytes were compared in Endodontically treated lesions by the histological aspects of the lesions and at the intervals of the duration after Endodontic treatment, a statistically significant change was not found.
5. The mean values of T lymphocytes, B lymphocytes and T suppressor cells in Endodontically treated lesions were markedly decreased in the specimens obtained at 3 month after Endodontic treatment, but no statistically significant difference was found.

.....

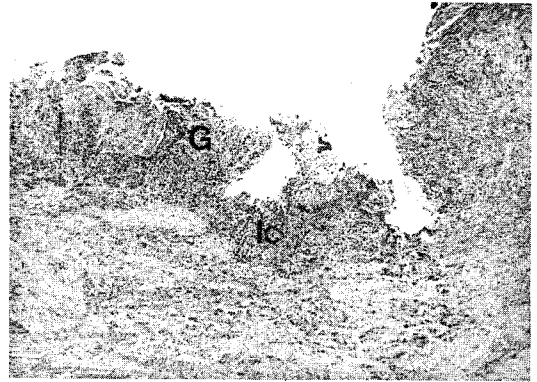
EXPLANATION OF FIGURES

- Fig. 1.** Immunoperoxidase staining of normal lymph node showing, positive staining B lymphocytes in lymphoid follicle (F). (X100)
- Fig. 2.** Immunoperoxidase staining of normal lymph node showing, positive staining T lymphocytes in interfollicular area (I). (X100)
- Fig. 3.** Immunoperoxidase staining of normal lymph node showing, Negative control section in incubated with 5% AEC. (X100)
- Fig. 4.** Periapical cyst being composed of granulation tissue (G) and numerous inflammatory cells (Ic). (H&E, X40)
- Fig. 5.** Immunoperoxidase staining of untreated periapical cyst showing, positive staining of B lymphocytes (arrow). (X100)
- Fig. 6.** Immunoperoxidase staining of untreated periapical cyst showing, positive staining of T lymphocytes (arrow). (X100)
- Fig. 7.** Endodontically treated periapical cyst being composed of stratified squamous epithelium (E) and diffuse infiltration of inflammatory cells (Ic). (H&E, X40)
- Fig. 8.** Immunoperoxidase staining of treated periapical cyst showing, positive staining of B lymphocytes (arrow). (X400)
- Fig. 9.** Immunoperoxidase staining of treated periapical cyst showing, positive staining of T lymphocytes (arrow). (X400)
- Fig. 10.** Endodontically treated periapical granuloma being composed of fibrous connective tissue (C) and multi-focal inflammatory cells infiltration (Ic) around blood vessels (B). (H&E, X40)
- Fig. 11.** Immunoperoxidase staining of treated periapical granuloma showing, positive staining of T lymphocytes (arrow). (X400)
- Fig. 12.** Immunoperoxidase staining of treated periapical granuloma showing, positive staining of T suppressor cells (arrow). (X400)

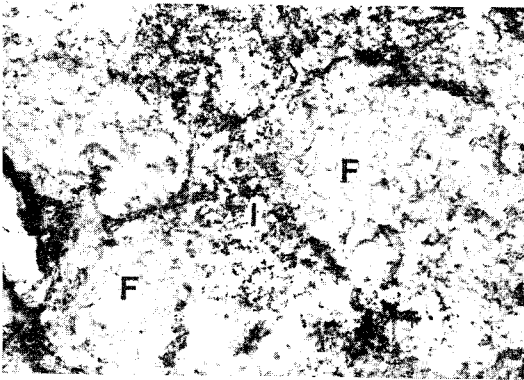
論文 寫真附圖 ①



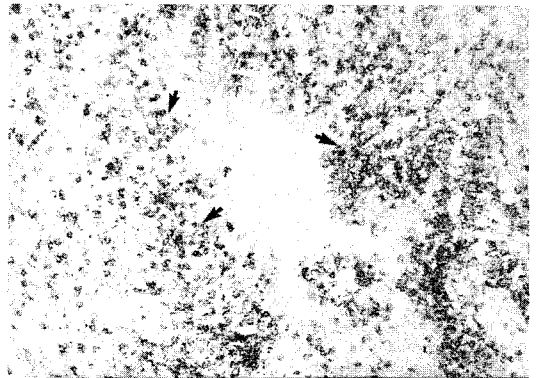
1



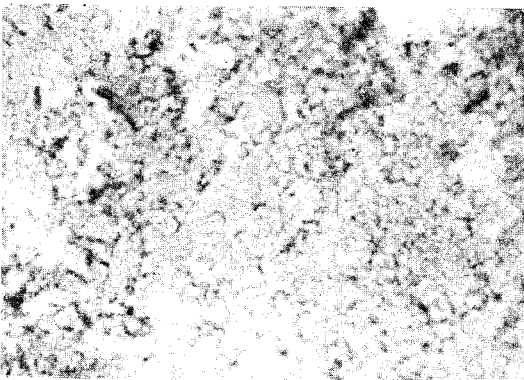
4



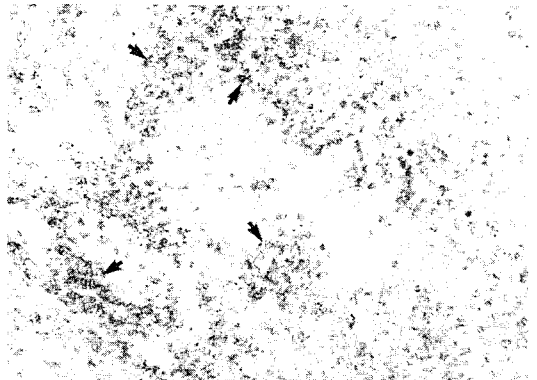
2



5

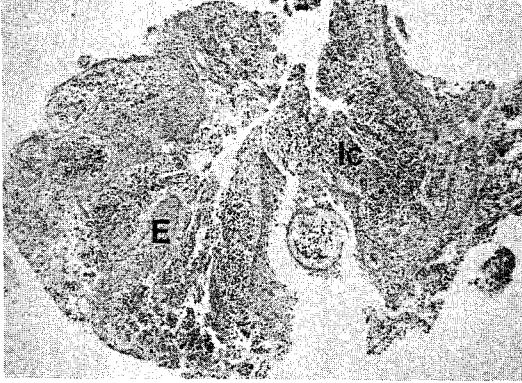


3

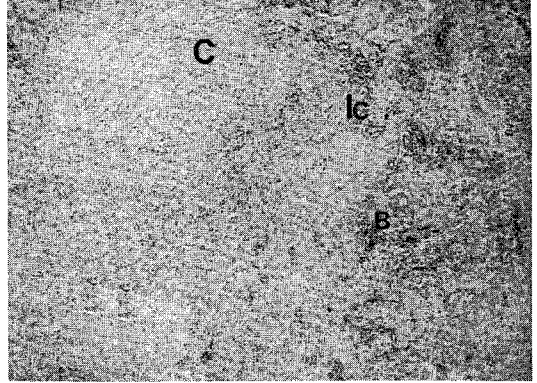


6

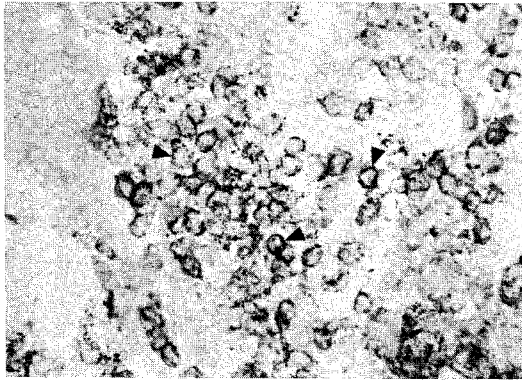
論文 寫真附圖②



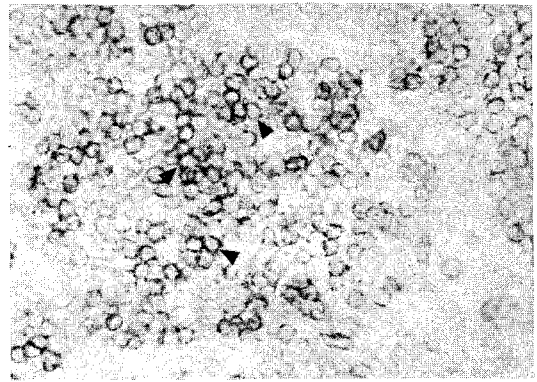
7



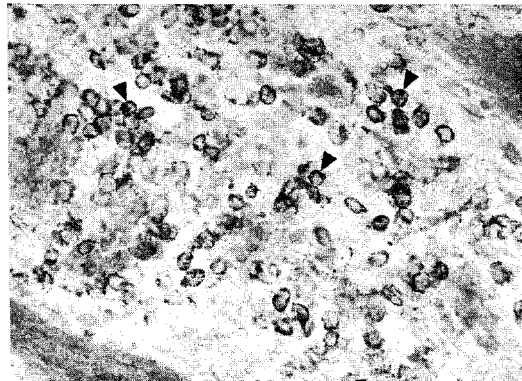
10



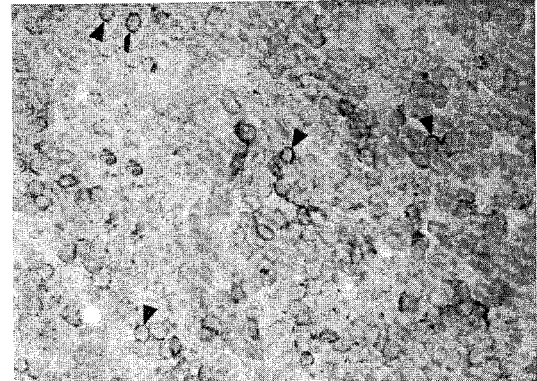
8



11



9



12